ISSN 2186-7976

March 5, 2013
平成２５年３月５日発行

Annual Meeting of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 2013

大会講演要旨集

■２０１３年度(平成２５年度)大会[仙台]■







公益社団法人日本農芸化学会

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

© Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

目次

授賞式、受賞者講演、受賞者----------3
一般講演番号の見方----------6
一般講演プログラム----------7
一般講演要旨----------78
大会シンポジウムプログラム----------2, 252
大会シンポジウム要旨----------2, 265
ランチョンシンポジウムプログラム----------2, 440
ランチョンシンポジウム要旨----------2, 441
ランチョンセミナープログラム----------2, 449
ランチョンセミナー広告要旨----------2, 452

日本農芸化学会
（2013 年度）学会賞等授賞式，受賞者講演，受賞者一覧

日　時：2013 年 3 月 24 日（日）13 時～18 時 10 分
場　所：電力ビル　7 階　電力ホール（宮城県仙台市青葉区一番町 3–7–1）
進行予定：

（13:00）　2013 年度学会賞等授賞式
　　1　授賞選考委員長報告
　　2　日本農芸化学会賞等授与
（13:25）　第 10 回農芸化学研究企画賞表彰式
　　1　産学官学術交流委員長報告
　　2　農芸化学研究企画賞表彰
（13:30）　会長祝辞
（13:35）　＊＊＊＊＊＊　休憩 15 分間　＊＊＊＊＊＊
（13:50）　受賞者講演開始
（13:50）　日本農芸化学会賞受賞者講演（2 件，各 30 分）
（14:50）　日本農芸化学会功績賞受賞者講演（2 件，各 30 分）
（15:50）　農芸化学技術賞受賞者講演（2 件，各 15 分）
（16:20）　＊＊＊＊＊＊　休憩 10 分間　＊＊＊＊＊＊
（16:30）　農芸化学奨励賞受賞者講演（10 件，各 10 分）
（18:10）　終了予定
（18:30～21:00）　懇親会　江陽グランドホテル 5 階「鳳凰の間」（宮城県仙台市青葉区本町 2–3–1）

受賞者：

【日本農芸化学会賞】（2 件，50 音順）

重岡　　成　（近畿大学農学部）
　　「光合成生物の環境ストレス応答・耐性の分子機構に関する研究」
伏木　　亨　（京都大学大学院農学研究科）
　　「油脂の嗜好性に関する栄養生理学的研究」

【日本農芸化学会功績賞】（2 件，50 音順）

久原　　哲　（九州大学大学院農学研究院）
　　「バイオインフォマティックスによる生物機能開発」
西田　律夫　（京都大学大学院農学研究科）
　　「昆虫生理活性物質の化学生態学的研究」

【農芸化学技術賞】（2 件，企業名 50 音順）

竹村 浩[1]・加田 茂樹[1]・市瀬 秀之[2]・山中 幸人[3]
　　（[1]株式会社ミツカングループ本社・[2]株式会社ミツカン・[3]株式会社ミツカンフレシア）
　　「納豆菌の系統的育種による商品の差別化と品質向上」
清水（肖）金忠・宮地 一裕・小田巻 俊孝・米澤 寿美子　（森永乳業株式会社）
　　「高菌数，高生残性ビフィズス菌含有ヨーグルト製造方法の技術開発」

【農芸化学奨励賞】（10 件，50 音順）

荒川　賢治　（広島大学大学院先端物質科学研究科）
　　「放線菌線状プラスミドにコードされた抗生物質生合成クラスターの遺伝学的・生物有機化学的解析」

石崎　公庸　（京都大学大学院生命科学研究科）
「光合成生物における生存戦略の分子機構に関する研究」
岡田　晋治　（東京大学大学院農学生命科学研究科）
「小型実験魚類を用いた脊椎動物味覚伝導の普遍性の解明」
小川　哲弘　（東京大学大学院農学生命科学研究科）
「tRNA を標的とする毒素に関する研究」
久世　雅樹　（神戸大学大学院農学研究科）
「海洋生物由来の発光タンパク質に関する生物有機化学的研究」
西本　　完　（(独)農業・食品産業技術総合研究機構　食品総合研究所）
「ビフィズス菌のオリゴ糖代謝機構の解明および代謝酵素群の高度利用に関する研究」
広岡　和丈　（福山大学生命工学部）
「植物の生育促進への利用に資する，枯草菌の転写応答機構の研究」
水谷　公彦　（京都大学大学院農学研究科）
「酵母発現系を用いたハイスループット構造生物学」
村上　一馬　（京都大学大学院農学研究科）
「酸化ストレスに着目したアミロイドβペプチドの神経細胞毒性発現機構」
山本　兼由　（法政大学生命科学部）
「大腸菌環境応答ネットワークに関する包括的研究」

【平成 25 年度日本農学賞受賞者（本会推薦)】

本会より推薦した下記の者が日本農学賞を受賞いたしました.

2013 年 4 月 5 日東京大学弥生講堂で開催される日本農学大会において，日本農学賞授賞式並びに受賞者講演が予定されています.

受賞者：高山誠司（奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科）
受賞題目：植物の自家不和合性における自己非自己識別機構に関する研究

【第 10 回農芸化学研究企画賞】

重点研究領域②　機能性食品素材および食品
久恒　辰博　（東京大学大学院新領域創成科学研究科）
「高機能食品成分を用いた脳老化の予防と改善に関する研究」

重点研究領域③　グリーンバイオテクノロジー
（1）バイオマス資源の生産・供給・利用（有用物質生産プロセス等）に関わるテクノロジー
（2）省資源・省エネルギープロセスに関わるバイオテクノロジー
（3）環境浄化・資源循環に関わるバイオテクノロジー
中島　琢自　（北里大学感染制御研究機構）
「メタン発酵プロセスに用いる高熱性細菌の探索と応用」

重点研究領域④　地場産業の創生と活性化
田丸　靜香　（長崎県立大学看護栄養学部）
「ヘスペリジンの機能性に注目したかんきつ類の高度利用と地域活性化」

【2012 年（Vol.76）B.B.B. 論文賞（掲載順）】

pp.423～428 Do-Hyun IM, Kei-ichi KIMURA, Fumitaka HAYASAKA, Tomonari TANAKA, Masato NOGUCHI, Atsushi KOBAYASHI, Shin-ichiro SHODA, Kentaro MIYAZAKI, Takayoshi WAKAGI, and Shinya FUSHINOBU
Crystal Structures of Glycoside Hydrolase Family 51 α-L-Arabinofuranosidase from *Thermotoga maritima*

pp.679～684 Yosuke HANAI, Ken SHIMONO, Koichi MATSUMURA, Anil VACHANI, Steven ALBELDA, Kunio YAMAZAKI, Gary K. BEAUCHAMP, and Hiroaki OKA
Urinary Volatile Compounds as Biomarkers for Lung Cancer

pp.859～862 Ken SASAKI, Hiroyo MORIKAWA, Takashi KISHIBE, Ayaka MIKAMI, Toshihiko HARADA, and Masahiro OHTA
Practical Removal of Radioactivity from Sediment Mud in a Swimming Pool in Fukushima, Japan by Immobilized Photosynthetic Bacteria

pp.1098～1103 Kazuma MURAKAMI, Nakaba MURATA, Yoshihiro NODA, Kazuhiro IRIE, Takuji SHIRASAWA, and Takahiko SHIMIZU
Stimulation of the Amyloidogenic Pathway by Cytoplasmic Superoxide Radicals in an Alzheimer's Disease Mouse Model

pp.1422～1424 Ken-ichi HASHIMOTO, Jun MURATA, Tomoyuki KONISHI, Isamu YABE, Tsuyoshi NAKAMATSU, and Hisashi KAWASAKI
Glutamate Is Excreted Across the Cytoplasmic Membrane through the NCgl1221 Channel of *Corynebacterium glutamicum* by Passive Diffusion

pp.1484～1491 Hiroaki KATO, Satoru WATANABE, Kaori NIMURA-MATSUNE, Taku CHIBAZAKURA, Yuzuru TOZAWA, and Hirofumi YOSHIKAWA
Exploration of a Possible Partnership among Orphan Two-Component System Proteins in Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942

pp.1596～1599 Keisuke SASAKI, Masayuki HAYASHI, Takumi NARITA, Michiyo MOTOYAMA, Mika OE, Koichi OJIMA, Ikuyo NAKAJIMA, Susumu MUROYA, Koichi CHIKUNI, Katsuhiro AIKAWA, Yasuyuki IDE, Naoto NAKANISHI, Nobuaki SUZUKI, Shigeru SHIOYA, and Akio TAKENAKA
Radiocesium Distribution in the Tissues of Japanese Black Beef Heifers Fed Fallout-Contaminated Roughage Due to the Fukushima Daiichi Nuclear Power Station Accident

pp.2289～2293 Maiko TOMIOKA, Yoshinobu TODA, Junko KURISU, Yasuhisa KIMURA, Mineko KENGAKU, and Kazumitsu UEDA
The Effects of Neurological Disorder-Related Codon Variations of ABCA13 on the Function of the ABC Protein

【Most-Cited Paper Award】 被引用回数 19 回

Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol. 74, pp.152～157
Hiroyuki URANO, Masaru ENOMOTO, and Shigefumi KUWAHARA
Enantioselective Syntheses of Pachastrissamine and Jaspine A *via* Hydroxylactonization of a Chiral Epoxy Ester

※ BBB 論文賞の表彰式は行わないことになりました.

一般講演番号の見方

○ 講演番号の

最初の１桁の数字は講演発表日

２ ⟶ ３月２５日（月）
３ ⟶ ３月２６日（火）
４ ⟶ ３月２７日（水）

次のアルファベットは建物、次の数字は階数、その次の数字は教室番号

Ａ　　Ａ棟
Ｂ　　Ｂ棟
Ｃ　　Ｃ棟
Ｍ　　Ｍ棟

（例：Ａ２３　→　Ａ棟２階３番教室）

次の桁の小文字アルファベットは

ａ　は　午前の部
ｐ　は　午後の部

次の数字は、その会場での講演の順番

たとえば、**２Ａ２３ｐ０５**は、
３月２５日（月）、Ａ棟２階３番教室、午後の部、５番目　の講演です。

○ 講演開始の時間は、次の通りです。

ａ［ａｍ］（午前）

１．　9：00	２．　9：12	３．9：24	４．　9：36
５．　9：48	６．10：00	７．10：12	８．10：24
９．10：36	１０．10：48	１１．11：00	１２．11：12
１３．11：24	１４．11：36	１５．11：48	

ｐ［ｐｍ］（午後）

１．14：00	２．14：12	３．14：24	４．14：36
５．14：48	６．15：00	７．15：12	８．15：24
９．15：36	１０．15：48	１１．16：00	１２．16：12
１３．16：24	１４．16：36	１５．16：48	１６．17：00
１７．17：12	１８．17：24	１９．17：36	２０．17：48

一般講演発表プログラム

1. 講演時間は 1 題につき，12 分（発表 9 分，討論 3 分）.
2. °は講演者（登壇者）を示す.
3. 座長は，25〜27 ページの座長一覧をご覧ください.
4. 講演番号 1 文字目（数字）は講演日（2: 3 月 25 日，3: 3 月 26 日，4: 3 月 27 日），2〜4 文字目は講演会場（C11〜C31），5 文字目（英字小文字 1 字）の a は午前，p は午後，6〜7 文字目（数字 2 桁）は講演順番（01〜20）.（例）「3A20p11」は，3 月 26 日，A20 会場，午後の部，11 番目の講演となります.

第 2 日（3 月 25 日）

講演番号
開始時間　　演　　題　　発表者氏名（所属）

C11 会場　午前の部（9:00〜12:00）

環境—バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオリファイナリー—

2C11a01　固定化柿渋ゲルを用いたクロム(VI)の吸着による除去，還元によるクロム(III)への変換とクロム(III)としての回収
9:00　°鶴田猛彦，畑野智信（八戸工大院工）

2C11a02　テルル酸還元細菌 *Ochrobactrum anthropi* Ti-3 株のテルル酸還元能の解析
9:12　°大塚　治[1]，　長谷川智美[1]，　坂本康太[1]，　生田裕馬[1]，池　道彦[3]，山下光雄[1,2]（[1]芝浦工大　SIT 総合研究所　レアメタルバイオリサーチセンター，[2]芝浦工大　応化，[3]阪大院工学研究）

2C11a03　セレン化カドミウム合成細菌 *Pseudomonas aeruginosa* RB-R 株の特徴づけ
9:24　°綾野裕之[1]，秋山直之[1]，三宅將貴[1]，黒田真史[1,2]，惣田　訓[1]，池　道彦[1]（[1]大阪大院・工，[2]大阪大・CEIDS）

2C11a04　リン酸レギュロン制御因子 PhoU を破壊したフィチン酸代謝菌 *Klebsiella pneumoniae* 9-3B のポリリン酸蓄積
9:36　°杉本敬祐[1]，　大谷　翠[2]，　阿部　歩[2]，　田中みち子[2]，浅野行蔵[2]，曾根輝雄[2]（[1]旭川高専，[2]北大院農）

2C11a05　幌延深部地下環境由来の微生物がフミン酸分子に与える影響
9:48　°上野晃生[1]，清水　了[1]，玉村修司[1]，高田迪彦[1]，遠藤　亮[1]，長沼　毅[2]，大味　泰[1]，金子勝比古[1,3]（[1]幌延地圏環境研究所，[2]広島大院・生物圏科学，[3]北大院・工）

2C11a06　セルロースアセテートの分解に関与する好熱菌由来エステラーゼの性質
10:00　°森芳邦彦，駒　大輔，山中勇人，大本貴士（阪市工研）

2C11a07　オカラ好気高温固体培養を利用した廃食用油処理システムの構築を目指した評価系の確立
10:12　°岩瀬徳康[1]，　松岡真生[1]，　西田茂雄[2]，　若松敏幸[3]，祥雲弘文[1]，若木高善[1]，後藤直宏[4]，伏信進矢[1]（[1]東大院農生科，[2]環清技研エンジニアリング，[3]東京海洋大海科，[4]東京海洋大院海科技）

2C11a08　エタノール生産性 Sphingomonas sp. A1 によるアルギン酸からのエタノール生産に対する溶存酸素濃度の影響
10:24　°吉田志織，藤井麻理，大橋一登，三上真一，河井重幸，村田幸作（京大院・農）

2C11a09　マリンバイオリファイナリー：*Sphingomonas* sp. A1 株によるアルギン酸からのピルビン酸の生産
10:36　°河井重幸[1]，　大橋一登[1]，　吉田志織[1]，　藤井麻理[1]，佐藤信行[2]，村田幸作[1]（[1]京大院・農，[2]マルハニチロ）

2C11a10　*Trametes versicolor* を用いたデンプン系廃棄物からの直接的エタノール生産
10:48　°綱島彩子，内井敦史，岡本賢治（鳥取大院工）

2C11a11　マイクロ波照射とポリオキソメタレート錯体触媒を併用したアオサ属の緑藻の糖化
11:00　°椿俊太郎[1]，平岡雅規[1]，上田忠治[2]，恩田歩武[2]，東　順一[3]（[1]高知大総研セ，[2]高知大理，[3]大阪大工）

2C11a12　イネリグニン生合成の増強
11:12　小柴太一[1]，山村正臣[1]，鈴木史朗[1]，服部武文[3]，坂本正弘[2]，°梅澤俊明[1]（[1]京大生存研，[2]京大院農，[3]徳島大 ISS）

2C11a13　超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* におけるキチン資化能の強化およびその水素生産への応用
11:24　°間宮淳子[1]，折田和泉[1]，中村　聡[1]，今中忠行[2]，福居俊昭[1]（[1]東工大院生命理工，[2]立命館大生命科）

2C11a14　NMR 法によるリグノセルロースの微生物分解の解析
11:36　°西村裕志[1,3]，　田頭英朗[2]，　岡村英保[2,3]，　小澤　佑[2]，片平正人[2,3]，渡辺隆司[1,3]（[1]京大生存圏研，[2]京大エネルギー理工学研，[3]JST CREST）

2C11a15　PCB 分解菌によるビフェニルからのポリヒドロキシアルカン酸（PHA）生産
11:48　°若林愛子[1]，　笹原良介[1]，　田口精一[2]，　前田理久[1]（[1]明治大院農，[2]北大院工）

C11 会場　午後の部（14:00〜17:48）

環境—バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオリファイナリー—

2C11p01　家畜糞を用いたメタン発酵の培養過程に伴うアーキア群の消長
14:00　°中島隆夫[1]，毛塚雄栄[2]，井内優也[2]，松本二郎[3]，井藤俊行[3]，永塚孝幸[4]，滝口泰之[1]（[1]千葉工大院工，[2]千葉工大工，[3]京葉プラントエンジニアリング株式会社，[4]京葉ガス株式会社）

2C11p02　休閑期水田を利用した物質循環型再生可能エネルギー（バイオメタン）の創製－GET システムの構築－
14:12　°浜田千晶，五十嵐理，太田みさき，細田晃文，平野達也，田村廣人（名城大農）

2C11p03　生物的環境浄化型エネルギー生産技術の開発–油汚染環境の浄化を指向したエネルギー生成微生物群集の構築–
14:24　°小坂吉裕，松下俊之，細田晃文，田村廣人（名城大院農）

2C11p04　新規油脂蓄積藻類の探索
14:36　°松延　駿，横山和平，藤井克彦（山口大学農）

2C11p05　海産微細藻類円石藻（*Emiliania huxleyi*）からの原油の生産と解析
14:48　°山根國男[1]，松山　茂[2]，五十嵐健輔[2]，桑原朋彦[2]（[1]筑波大学生物科学系，[2]筑波大学生命環境科学研究科）

2C11p06　微細藻類ユーグレナにおけるバイオ燃料合成増強因子の探索
15:00　°中澤昌美[1,2]，水谷陽子[1]，石川智也[1]，上田光宏[1]，乾　博[1,3]，中野長久[1,4]，宮武和孝[1,5]（[1]阪府大院・生命，[2]科学技術振興機構・さきがけ，[3]阪府大院・総リハ，[4]大阪女短大，[5]帝塚山学院大・人間科）

2C11p07　*Geotrichum candidum* を用いたバイオディーゼル生産
15:12　°田中重光，渡辺　嘉，中野博文，永尾寿浩（阪市工研）

2C11p08　グリセリン酸生産菌 *Gluconobacter frateurii* のメタノール耐性変異株の作製と評価
15:24　°佐藤　俊，羽部　浩，北本　大（産総研環境化学）

2C11p09　サトウキビバガス加水分解物に耐性を有する油脂酵母 *Rhodosporidium toruloides* 変異株の単離
15:36　°北原裕己[1,2]，Du Wei[2]，和地正明[1]，Liu Dehua[2]（[1]東工大・院生命理工，[2]Tsinghua Univ.）

2C11p10　紫外線照射した *Halomonas* 属細菌による PHB 生産
15:48　°世嘉良宏斗，松田英彦，常盤　豊（沖縄県工技セ）

2C11p11　マングローブ域からの(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸資化菌の分離とその特性
16:00　°常盤　豊，世嘉良宏斗（沖縄県工技セ）

2C11p12　微生物燃料電池で発電能力を有する新規 *Geobacter* 属細菌の単離
16:12　°井上謙吾[1]，河野好裕[1]，小椋義俊[2]（[1]宮崎大 IR 推進機構，[2]宮崎大フロンティア）

2C11p13　超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilium* 由来 multicopper oxidase を用いたバイオカソード電極の構築
16:24　°内井俊貴[1]，山口かよ[1]，坂元博昭[1]，里村武範[1]，櫻庭春彦[2]，大島敏久[3]，末信一朗[1]（[1]福井大学院工，[2]香川大学院農，[3]九州大学院農）

2C11p14　深海熱水噴出孔生態系における電流依存型低エネルギー CO_2還元

16:36　◦石居拓己[1]，牧田寛子[2]，山本正浩[2]，高井　研[2]，中村龍平[1]，橋本和仁[1,3]（[1]東大院工，[2]海洋研究開発機構，[3]JST ERATO）

2C11p15　電気化学的集積法による高電流生産 *Shewanella oneidensis* MR-1 変異株の単離と解析

16:48　◦高妻篤史[1]，大場　瞳[1]，但馬　望[2]，橋本和仁[2,3]，渡邊一哉[1]（[1]東薬大生命，[2]東大院工，[3]JST ERATO）

2C11p16　新奇培養法，”電界効果培養”の提案と，その微細藻類の暗所培養への適応

17:00　◦吉田浩爾，中村圭寛，石井正治，五十嵐泰夫（東大院農生科）

2C11p17　グルコース資化能を付加した *Shewanella oneidensis* MR-1 変異株の電流生産能力の解析

17:12　◦中川　元，高妻篤史，渡邉一哉（東薬大生命）

2C11p18　電気培養を用いた水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 の代謝制御と組換え株による乳酸生産

17:24　◦平野伸一[1]，佐々木大介[1]，松本伯夫[1]，石井正治[2]（[1]電中研，[2]東大院農生科・応生工）

2C11p19　BDF 合成過程で発生する実廃液からのエタノール生産

17:36　◦篠藤　伸[1]，松本伯夫[2]，平野伸一[2]，大村直也[2]，安藤昭一[3]（[1]千葉大院・融合，[2]電中研，[3]千葉大・園芸）

C12 会場　午前の部（9:00〜11:48）

環境—バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオリファイナリー—

2C12a01　キシロースからコハク酸生産する細菌の分離とその特性

9:00　◦戸松さやか，木村貴一，進藤　昌（秋田総食研）

2C12a02　大腸菌によるグリセロールからの 3-ヒドロキシプロピオン酸生産

9:12　◦徳山健斗[1]，　田中章太郎[1]，　大野　聡[1]，　吉川勝徳[1]，平沢　敬[1]，古澤　力[1,2]，清水　浩[1]（[1]阪大院・情報・バイオ情報，[2]理研・生命システム）

2C12a03　大腸菌によるバイオマスからのピルビン酸とイソブタノール生産

9:24　◦中島信孝[1,2]，田村具博[1,3]（[1]産総研生物プロセス，[2]産総研バイオマスリファイナリー，[3]北大院農）

2C12a04　担子菌スエヒロタケを用いたコーンミールからの直接 L–リンゴ酸の生産

9:36　◦長根江里[1]，高野真希[2]，星野一宏[2]（[1]富山大工生命，[2]富山大院理工）

2C12a05　洗米排水から分離された高乳酸生成菌の乳酸生成機構

9:48　◦渡辺昌規[1]，服部芽衣[1]，牧野将浩[2]，加来伸夫[1]，佐々野和雄[3]（[1]山形大農，[2]株式会社サタケ，[3]食協株式会社）

2C12a06　*Bacillus coagulans* によるオイルパーム廃棄木からの乳酸生産

10:00　◦荒井隆益[1]，Balakrishnan Kunasundari[1,2]，小杉昭彦[1]，Sudesh Kumar[2]，　村田善則[1]，　PRAWITWONG PANIDA[1]，Deng Lan[1]，森　　隆[1]（[1]国際農林水産業研究センター，[2]マレーシア理科大学）

2C12a07　4–アミノフェニルアラニンおよび 4–アミノフェニル乳酸の生産プロセスの構築

10:12　◦桝尾俊介[1]，川崎志慧[2]，伊藤尚志[1]，藤田智也[1]，高谷直樹[1]（[1]筑波大院・生命環境，[2]ユタ州立大理）

2C12a08　気相染色法を利用したヒノキチオールの塗布とその抗菌活性の検討

10:24　◦菅野　匠[1]，米山雄二[2]，野口正孝[3]，川島徳道[4]，佐野元昭[1]，小林聖人[5]，下村美文[5]，石河睦生[1]（[1]桐蔭横浜大学，[2]文化学園大学，[3]神戸芸術工科大学，[4]IPU･環太平洋大学，[5]東京工科大学）

2C12a09　酵母菌によるハードバイオマス残渣の有効利用

10:36　◦小林聖人[1]，菅野　匠[2]，石河睦生[2]，鈴木義規[3]，斉木　博[3]，下村美文[3]（[1]東京工科大学大学院，[2]桐蔭横浜大学，[3]東京工科大学）

2C12a10　八王子市における木質バイオマスの有効利用に関する研究

10:48　◦坂間雄一郎[1]，　鈴木義規[2]，　斉木　博[2]，　下村美文[2]，軽部征夫[2]（[1]東京工科大院，[2]東京工科大）

2C12a11　新規に分離したバニリン資化性細菌 *Pseudomonas* sp. LLC-1 によるリグニン由来低分子化合物の代謝特性

11:00　◦廣瀬　遵，山中直也，横井春比古（宮崎大工・物質環境化）

2C12a12　ラッカーゼ様高活性を示す微生物の探索・取得

11:12　◦鈴木啓修，青山晃久，加藤裕太，永井和夫，倉根隆一郎（中部大学院応生）

2C12a13　*Penicillium* sp. A592-4B 株の粉砕稲わら分解率向上株迅速育種法

11:24　◦青山晃久，鈴木啓修，倉根隆一郎，永井和夫（中部大院応用生）

2C12a14　G タンパク質 α サブユニット遺伝子点突然変異がヒラタケのラッカーゼ生産に与える効果

11:36　◦阪本鷹行[1]，矢尾祐樹[1]，本田与一[2]，鈴木一実[1]，入江俊一[1]（[1]滋賀県大，[2]京大農）

C12 会場　午後の部（14:00〜18:00）

環境—バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオリファイナリー—

2C12p01　セルロース膜利用糖化プロセスの開発－技術コンセプトおよび酵素回収技術－

14:00　◦栗原宏征，岸本淳平，渡邊志緒美，磯部匡平，澤井健司，南野　淳，山田勝成，米原　徹（東レ株式会社）

2C12p02　セルロース膜利用糖化プロセスの開発－糖液の膜精製・濃縮技術－

14:12　◦岸本淳平，栗原宏征，渡邊志緒美，磯部匡平，澤井健司，南野　淳，山田勝成，米原　徹（東レ株式会社）

2C12p03　膜利用発酵リアクターを用いた高効率エタノール発酵（1）

14:24　◦渡邊志緒美，磯部匡平，澤井健司，岸本淳平，南野　淳，栗原宏征，山田勝成，米原　徹（東レ株式会社）

2C12p04　膜利用発酵リアクターを用いた高効率エタノール発酵（2）

14:36　◦磯部匡平，渡邊志緒美，澤井健司，岸本淳平，南野　淳，栗原宏征，山田勝成，米原　徹（東レ株式会社）

2C12p05　爆砕処理もみ殻からのバイオエタノール生産における糖化後発酵と同時糖化発酵の比較

14:48　◦吉羽悠介[1]，稗田一男[2]，清水範夫[1]（[1]東洋大院生命，[2]フロンティアフーズ(株)）

2C12p06　爆砕処理もみ殻と稲わらからのバイオエタノール生産

15:00　◦田端高光[1]，高品知典[1]，稗田一男[2]，清水範夫[1]（[1]東洋大院生命，[2]フロンティアフーズ(株)）

2C12p07　稲わらからのエタノール発酵副産物のパーフルオロポリマー膜に対する影響

15:12　◦佐々木建吾[1]，松田史生[2]，荻野千秋[3]，近藤昭彦[3]（[1]神戸大院・自然科学，[2]阪大院工・応生工，[3]神戸大院・工・応化）

2C12p08　麹菌由来酵素を表層提示した酵母によるソフトバイオマス糖化発酵の促進

15:24　◦村山浩一[1]，中川拓哉[1]，久田博元[1]，堤　浩子[1]，秦　洋二[1]，近藤昭彦[2]，植田充美[3]（[1]月桂冠・総研，[2]神戸大院・工・応化，[3]京大院・農・応生）

2C12p09　糸状菌を用いたペーパースラッジ類からのバイオエタノールおよび乳酸の生産

15:36　◦瀬戸裕介，高野真希，星野一宏（富山大院理工）

2C12p10　澱粉含量の高い稲ホールクロップから効率的にグルコースを回収するための RT-CaCCO 法の改良

15:48　◦松木順子，城間　力，池　正和，徳安　健（農研機構食総研）

2C12p11　中高圧処理下でのセルラーゼ反応における産生糖量増加メカニズムの解明

16:00　◦栗原　聖[1]，藤田智之[1]，来山哲二[2]，采女信二郎[2]（[1]信州大院農・機能食，[2]ポエック）

2C12p12　セルロース系バイオマスの酵素糖化に関する基盤研究（1）バイオマス糖化に対する *Trichoderma reesei* 由来成分酵素の網羅的機能解析

16:12　◦河合哲志[1]，川口　剛[2]，小笠原渉[3]，岡田宏文[3]，小林良則[1]，森川　康[1,3]（[1]バイオインダストリー協会，[2]大阪府立大学，[3]長岡技術科学大学）

2C12p13　セルロース系バイオマスの糖化酵素に関する基盤研究（2）界面活性剤の糖化促進効果

16:24　◦小林良則，菅　丈司，河合哲志，森川　康（JBA つくば研）

2C12p14　CBH1 と CBH2 の相乗効果メカニズムの解析

16:36　◦沖野祥平，池應真実，種田大介（日揮･技術イノベーション部）

2C12p15　セルラーゼ高生産糸状菌 *Acremonium cellulolyticus* Y-94 株由来の *cre1* 遺伝子破壊株の解析

16:48　◦藤井達也，井上宏之，石川一彦（産総研バイオマスリ研セ）

2C12p16　分裂酵母を用いて生産した *Aspergillus aculeatus* 由来 β-Glucosidase I の機能解析

17:00　木村修一郎，禅院　進，岡田和士，◦東田英毅（旭硝子・ASPEX）

2C12p17　バイオマス完全糖化を目指した β- グルコシダーゼ導入組換え Trichoderma reesei 株構築

17:12　◦平沢大樹[1]，　塩谷幸樹[1]，　中澤　光[1]，　河合哲志[2]，谷　修治[3]，　川口剛司[3]，　岡田宏文[1]，　小林良則[2]，　森川　康[2]，小笠原渉[1]（[1]長岡技科大　生物，[2]JBA つくば研究所，[3]阪府大院生命環）

2C12p18　バイオマス分解に必要な *Trichoderma reesei* 糖化酵素の選抜

17:24　◦小松光子[1]，　三井勇輔[1]，　長野まどか[1]，　吉村聖也[1]，齋藤勇司[1]，　中澤　光[1]，　二階堂満[2]，　戸谷一英[2]，　小笠原渉[1]，森川　康[1]，岡田宏文[1]（[1]長岡技科大・生物，[2]一関高専・物質工）

2C12p19　*Trichoderma reesei* β-キシロシダーゼの酵素化学的性質の解明

17:36　◦山下景子[1]，齋藤勇司[1]，小松光子[1]，二階堂満[2]，戸谷一英[2]，岡田宏文[1]（[1]長岡技科大，[2]一関高専）

2C12p20　理研バイオリソースセンターが提供する超好熱古細菌由来遺伝子をはじめとしたセルラーゼ関連遺伝子

17:48　◦岸川昭太郎[1,2]，小田切正人[2]，雪　真弘[2]，久次米夕佳里[1]，益崎智子[1]，守屋繁春[2]，大熊盛也[2]，村田武英[1]，小幡裕一[1,2]（[1]理研 BRC，[2]理研 BMEP）

C32 会場　午後の部（14:00〜17:00）

環境―環境保全，浄化技術工学，バイオレメディエーション―

2C32p01　化学プロファイリングにより水圏環境の変動情報を捉える試み　－プローブ魚類の組織別傾向－

14:00　◦菊地　淳[1,2,3,4]，葭田征司[3]，伊達康博[1,3]（[1]理研PSC，[2]理研 BMEP，[3]横市院生命，[4]名大院生命農）

2C32p02　プローブ生物と水泥の化学プロファイル相関に基づく水圏環境評価技術の構築

14:12　◦葭田征司[1]，朝倉大河[1]，伊達康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3,4]（[1]横市院生命，[2]理研 PSC，[3]理研 BMEP，[4]名大院生命農）

2C32p03　耐塩性微細藻類フォルミジウムを用いた水田除塩試験

14:24　◦寺本和史[1]，　勝田祐平[1]，　西島純基[2]，　鷲見　亮[2]，森　伸夫[2]，　木村一彦[3]，　吉本博明[4]，　瀬山智子[1]，　江口文陽[1]，飯島倫明[1]（[1]東京農業大学，[2](株)日健総本社，[3]農業，[4]マッシュテック(株)）

2C32p04　フォルミジウム資材によって除塩した水田でのモミロマンの生産

14:36　◦勝田祐平[1]，　寺本和史[1]，　西島純基[2]，　鷲見　亮[2]，森　伸夫[2]，　木村一彦[3]，　吉本博明[4]，　瀬山智子[1]，　江口文陽[1]，飯島倫明[1]（[1]東農大，[2](株)日健総本社，[3]農業，[4]マッシュ･テック(株)）

2C32p05　東日本大震災被災地住民の屎尿処理高効率化のための汚泥複合微生物相の解析

14:48　◦鬼頭昌久[1]，　水野康弘[1]，　倉根隆一郎[1]，　紺野充弘[2]，橘　峰生[3]，植地俊仁[3]，安部　剛[3]（[1]中部大学院応生，[2]釜石大槌地区行政事務組合，[3]クボタ環境サービス(株)）

2C32p06　被災地ヘドロや琵琶湖ヘドロからの難分解性物質分解菌の探索

15:00　◦原　悠大，原田美樹，福田青郎，今中忠行（立命館大生命）

2C32p07　ヤクルト容器を用いた排水処理システムの菌叢解析

15:12　◦渡邊洋平，長井冨美子，山本修太，塚本浩史，吉元健司，白澤幸生（(株)ヤクルト本社）

2C32p08　竹粉を用いた C 重油汚染土壌のバイオスティミュレーション

15:24　◦松井稜太郎[1]，吉田和樹[2]，大島義徳[3]，椎葉　究[1]（[1]東京電機大理工，[2]東京電機大理工，[3](株) 大林組）

2C32p09　塩素化エチレン類汚染環境の好気的生物修復の環境影響評価

15:36　◦俵　陵輔[1]，山副敦司[2]，細山　哲[2]，黄地祥子[2]，山崎秀司[2]，沼田　充[2]，　関口勇地[3]，　野田尚宏[3]，　早津雅仁[4]，　下村有美[4]，高畑　陽[5]，福田雅夫[6]，山根久和[7]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]（[1]東京大院･生セ，[2]NITE，[3]産総研，[4]農環研，[5]大成建設，[6]長岡技術科学大学，[7]帝京大・バイオ）

2C32p10　1,4- ジオキサン汚染地下水の原位置浄化の基礎的検討

15:48　◦大島義徳[1]，松井稜太郎[2]，椎葉　究[2]（[1](株)大林組，[2]東京電機大学）

2C32p11　ダイオキシン汚染サイトの浄化システムの開発へ向けた環境細菌に対する分解プラスミドの接合伝達実験

16:00　◦小林達弥，福田洸平，飯田健義，秋田成美，新谷政己，金原和秀（静岡大院工）

2C32p12　微生物による六価クロム汚染土の浄化技術の開発

16:12　◦隅倉光博[1]，田崎雅晴[1]，山田佳代子[2]，椎葉　究[2]（[1]清水建設株式会社，[2]東京電機大理工）

2C32p13　沈水植物オオカナダモ（*Egeria densa*）のセシウム吸収機構

16:24　◦木幡　光[1]，永川栄泰[2]，櫻井　昇[2]，保倉明子[3]，寺田靖子[4]，長谷川博[1]，原田英美子[1]（[1]滋賀県大環境，[2]都産技研，[3]東京電大工，[4]JASRI/SPring-8）

2C32p14　ジニア根圏土壌から分離した M-2 株の同定と軽油分解特性

16:36　◦山崎周平[1]，　川崎　勇[2]，　高橋　結[2]，　玉置雅彦[3]，村上周一郎[1]（[1]明治大農農化，[2]明治大院農，[3]明治大農農）

2C32p15　リアクター様式の違いが anammox 菌の集積度に及ぼす影響

16:48　◦石川　秀，多田羅昌浩，上野嘉之（鹿島技研）

C20 会場　午前の部（9:00〜12:00）

有機―天然物-単離構造決定，微生物―

2C20a01　Roussellols A および B の構造決定

9:00　◦橋本　勝[1]，竹川大登[1]，田中和明[1]，福士江里[2]，松尾光一[3]，根平達夫[4]（[1]弘前大学農学生命，[2]北海道大学院農，[3]広島大学放射光セ，[4]広島大学院総合科学）

2C20a02　ブナシメジ培養菌糸体由来のナラ枯れ病原菌に対する生育阻害物質について

9:12　◦芳賀真倫，小関卓也，村山哲也，小山浩正，塩野義人（山形大学・農）

2C20a03　コウタケ（*Sarcodon aspratus*）子実体から得られた二次代謝産物について

9:24　◦川畑哲郎[1]，高野文英[2]，只野　武[1]，太田富久[1]（[1]金沢大院，[2]日本薬科大）

2C20a04　シイタケの抗菌物質とその生産を促進するトリコデルマ代謝産物

9:36　◦藤田真智子[1]，石原　亨[2]，時本景亮[3]，中島廣光[2]（[1]鳥取大院・農，[2]鳥取大・農，[3]菌蕈研）

2C20a05　コムラサキシメジ由来の植物成長調節物質とそれらの代謝産物に関する化学的研究

9:48　◦竹田翔伍[1]，崔　宰熏[2]，平井浩文[1]，浅川倫宏[3]，管　敏幸[3]，河岸洋和[1,2]（[1]静大農・応生化，[2]静大院・創造，[3]静県大・薬）

2C20a06　コムラサキシメジが産生するフェアリーリング惹起物質の植物内生に関する化学的研究

10:00　◦崔　宰熏[1]，　山下起三子[1]，　大西利幸[1]，　森田明雄[2]，本橋令子[3]，　切岩祥和[3]，　平井浩文[2]，　浅川倫宏[4]，　菅　敏幸[4]，河岸洋和[1,2]（[1]静大院・創造，[2]静大農・応生化，[3]静大農・共生バイオサイエンス，[4]静県大・薬）

2C20a07　イネにおける植物成長調節物質の生合成経路に関する化学的研究

10:12　◦河村友香子[1]，　関口周兵[1]，　崔　宰熏[2]，　本橋令子[3]，

平井浩文[1]，浅川倫宏[4]，管　敏幸[4]，河岸洋和[1,2]（[1]静大農･応生化，[2]静大院・創造，[3]静大農・生産，[4]静県大・薬）

2C20a08　コムラサキシメジにおける植物成長調節物質の生合成経路に関する化学的研究

10:24　◦圓山和希[1]，崔　宰熏[2]，平井浩文[1]，浅川倫宏[3]，菅　敏幸[3]，河岸洋和[2]（[1]静大農・応生化，[2]静大院・創造，[3]静県大・薬）

2C20a09　中国産ベニタケ属キノコ（*Russula vinosa*）由来の植物成長調節物質の探索

10:36　◦川出美咲[1]，呉　　静[2]，崔　宰熏[2]，平井浩文[1]，河岸洋和[2]（[1]静大院・農，[2]静大院・創造）

2C20a10　フミヅキタケの産生する植物成長調節物質の探索

10:48　◦岩堀倫大[1]，伏見圭司[2]，安西航太[1]，徳山真治[1]，崔　宰熏[2]，平井浩文[1]，河岸洋和[2]（[1]静大農・応生化，[2]静大院・創造）

2C20a11　チャナメツムタケ由来の生理活性物質の探索

11:00　◦的場隆太[1]，平井浩文[1]，河岸洋和[1,2]（[1]静大農・応生化，[2]静大院・創造）

2C20a12　ヤマブシタケ培養ろ液由来の生理活性物質の探索

11:12　◦徳永大輝[1]，　呉　　静[2]，　秋山佑介[1]，　徳山真治[1]，平井浩文[1]，河岸洋和[1,2]（[1]静大農・応生化，[2]静大院・創造）

2C20a13　キシメジ（*Tricholoma flavovirens*）由来の新規機能性化合物の探索

11:24　◦邱　偉涛[1]，小堀　一[1]，平井浩文[1]，河岸洋和[1,2]（[1]静大農･応生化，[2]静大院・創造）

2C20a14　ナラタケ（*Armillaria mellea*）が産生する他感作用物質の化学的解明

11:36　◦小堀　一[1]，呉　　静[2]，関谷　敦[3]，平井浩文[1]，河岸洋和[1,2]（[1]静大農・応生化，[2]静大院・創造，[3]森林総研）

2C20a15　サケツバタケが産生する機能性物質に関する化学的研究

11:48　◦呉　　静[1,2]，平井浩文[3]，河岸洋和[1,3]（[1]静大院・創造，[2]JSPS，[3]静大農・応生化）

C20 会場　午後の部（14:00～17:48）

有機―天然物–単離構造決定，微生物―

2C20p01　ESI-MS 分析で観測される Terpendole イオンの酸化とその抑制

14:00　◦本郷やよい，中村健道，高橋俊哉，本山高幸，林　敏明，廣田　洋，長田裕之，越野広雪（理研基幹研･ケミカルバイオロジー）

2C20p02　*Talaromyces rugulosus* FKI–5329 が生産する NADH–フマル酸還元酵素阻害化合物

14:12　◦森美穂子[1,2]，　増間碌郎[1,2]，　高橋洋子[1,2]，　大村　智[2]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大院・感染制御，[2]北里大・生命研）

2C20p03　In vitro 細胞アッセイによる微生物培養液からの抗インフルエンザウイルス活性物質の探索

14:24　◦渡辺正浩[1]，　石井貴広[1,2]，　野中健一[2]，　松本厚子[2]，増間碌朗[1,2]，　高橋洋子[1,2]，　永井隆之[2]，　山田陽城[1,2]，　大村　智[2]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大感染制御科学，[2]北里大生命研）

2C20p04　インドネシア産糸状菌が生産する赤痢アメーバ特異的含硫アミノ酸代謝酵素阻害化合物

14:36　◦増田祐衣[1]，森美穂子[1,2]，野崎智義[3]，Kristiningrum[4]，Danang Waluyo[4]，Tarwadi[4]，渡辺吉雄[5]，増間碌郎[1,2]，高橋洋子[1,2]，大村　智[2]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大院･感染制御，[2]北里大･生命研，[3]国立感染研，[4]BPPT（インドネシア），[5]日本マイクロバイオファーマ）

2C20p05　微生物代謝産物からの MRSA に対するアルベカシン耐性克服物質の探索

14:48　◦須賀拓弥[1]，　石井貴広[1,2]，　岩月正人[2]，　山本　剛[2]，野中健一[2]，　増間碌郎[1,2]，　花木秀明[2]，　大村　智[2]，　塩見和朗[1,2]（[1]北里大感染制御科学，[2]北里大生命研）

2C20p06　新規抗インフルエンザウイルス活性物質の探索

15:00　◦千葉拓也[1]，　石井貴広[1,2]，　山本　剛[2]，　野中健一[2]，増間碌郎[1,2]，　永井隆之[1,2]，　山田陽城[1,2]，　大村　智[2]，　塩見和朗[1,2]（[1]北里大感染制御科学，[2]北里大生命研）

2C20p07　*Aspergillus* sp. FO-5897 の生産する新規 NADH–フマル酸還元酵素阻害物質

15:12　◦海渕　覚[1]，　森美穂子[1,2]，　酒井一成[2]，　藤澤　圭[2]，岩月正人[2]，　増間碌郎[1,2]，　高橋洋子[1,2]，　大村　智[2]，　塩見和朗[1,2]（[1]北里大院感染制御，[2]北里大生命研）

2C20p08　糸状性硫黄酸化細菌の鞘からのグルコサミノグルカンと 4- アミノ -4,6- ジデオキシ - マンノース（ペロサミン）の同定

15:24　◦成塚理絵[1]，　近藤敬子[1]，　志村庄一[1]，　梅津卓人[1]，武田　穣[1]，真嶋　司[2]，片平正人[2]（[1]横国大院工，[2]京大エネルギー理工学研）

2C20p09　マングローブ林分離糸状菌が塩添加培養により生産する物質について

15:36　◦渋谷史明，小関卓也，村山哲也，塩野義人（山形大農）

2C20p10　RNA 代謝を標的とする新規薬剤の探索

15:48　◦高田綾子[1]，和地正明[2]（[1]東工大，[2]東工大院生命理工）

2C20p11　pre-SMTP を用いた SMTP 同属体の合成と活性評価

16:00　◦清水広大，西村祐一，辻原浩太，鈴木絵里子，蓮見恵司（東京農工大農）

2C20p12　A Novel Cancer Cell Motility Inhibitor from Fusarium sp. FN080326, Fusarisetin A and Its Derivatives

16:12　◦Jae-Hyuk JANG[1,3]，Yukihiro ASAMI[1,2,3]，Jun-Pil JANG[1,3]，Hiroyuki OSADA[2,3]，Jong Seog AHN[1,3]（[1]Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology，[2]RIKEN Advanced Science Institute，[3]KRIBB-RIKEN Collaboration Research Center for Chemical Biology）

2C20p13　Isolation and Structure Determination of New Azaphilone Type Metabolites Isolated from Fungal Strain

16:24　◦Sangkeun SON[1,3,4]，Jong-Won Kim[1,4]，Seung Min Kim[1,4]，Sun-Ok Kim[1,4]，　Masashi Ueki[2,4]，　Jae-Hyuk Jang[1,3,4]，Hiroyuki Osada[2,4]，Jong Seog Ahn[1,3,4]（[1]Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology，[2]RIKEN Advanced Science Institute，[3]University of Science and Technology，[4]KRIBB-RIKEN Collaboration Research Center for Chemical Biology）

2C20p14　Isolation and Structure Determination of New Anthramycin Derivatives from Streptomyces sp. AN091689

16:36　◦MiJin OH[1,3,4]，　Masashi Ueki[2,4]，　Soo-Jin Choo[1,4]，Jae-Hyuk Jang[1,3,4]，Hiroyuki Osada[2,4]，Jong Seog Ahn[1,3,4]（[1]Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology，[2]RIKEN Advanced Science Institute，[3]Uiversity of Science and Technology，[4]KRIBB-RIKEN Collaboration Research Center for Chemical Biology）

2C20p15　*Stenotrophomonas maltophilia* のシデロフォアに関する研究

16:48　◦泉　裕己[1]，伊藤千浩[1]，梶川揚申[1]，田中尚人[2]，佐藤英一[1]，岡田早苗[1]（[1]東農大応生科・化学，[2]東農大・菌株）

2C20p16　多犯性植物病原菌 *Pseudomonas cichorii* の病原性発現に関与するシデロフォア

17:00　◦前中理沙[1]，甲斐建次[1]，Md. Wali Ullah.[2]，大西浩平[3]，木場章範[2]，曳地康史[2]，林　英雄[1]（[1]阪府大院・生命環境，[2]高知大・農，[3]高知大・総研センター）

2C20p17　病原性制御因子 PhcA の欠損により消失する青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* OE1-1 株の二次代謝について

17:12　◦大西秀幸[1]，甲斐建次[1]，木場章範[2]，大西浩平[3]，曳地康史[2]，林　英雄[1]（[1]阪府大院・生命環境，[2]高知大・農，[3]高知大・総研センター）

2C20p18　*Bacillus firmus* GB1 株の生産するカロテノイドに関する研究

17:24　◦大澤絢子[1]，位寄かのこ[1]，Gerhard Sandmann[2]，新藤一敏[1]（[1]日女大家政・食物，[2]フランクフルト大学）

2C20p19　アスタキサンチン産生葉緑体ゲノム改変レタスのカロテノイド詳細分析と抗酸化能

17:36　眞岡孝至[1]，　大澤絢子[2]，　伊藤久美子[2]，　福尾菜美[2]，八反順一郎[3]，金本浩介[3]，新藤一敏[2]，◦三沢典彦[3]（[1]生産開発科学研，[2]日女大家政・食物，[3]石川県大・生資研）

C21 会場　午前の部（9:00～12:00）

有機―天然物，ケミカルバイオロジー，作用機構―

2C21a01　クロイソカイメン中でオカダ酸およびオカダ酸結合タ

ンパク質 OABP2 を生産する生物の探索

9:00 ○小濱真実，岡田華弥，西谷　豪，長由扶子，山下まり，此木敬一（東北大院農）

2C21a02　下痢性貝毒貯蔵生物における自己耐性機構の探索

9:12 ○小野田竜也[1]，渡邊龍一[2]，長由扶子[1]，加賀新之助[3]，鈴木敏之[2]，山下まり[1]，此木敬一[1]（[1]東北大院農，[2]水研センター・中央水研，[3]岩手水技術セ）

2C21a03　ヤエヤマサソリ毒液由来殺虫性ペプチド LaIT2 の活性発現に関わる領域の特定

9:24 ○安藤　亮[1]，石堂嵩典[2]，宮下正弘[2]，中川好秋[2]，宮川　恒[2]（[1]京都大農，[2]京都大院農）

2C21a04　蛍光性デヒドロセレンテラジン類を用いた発光タンパク質の構築

9:36 ○南郷成子（神戸大院農）

2C21a05　動物の化学コミュニケーション＆光コミュニケーションとヒト社会の科学コミュニケーション .

9:48 ○笹川浩美[1,2,3,4]（[1](公財)科学技術館，[2](公財)国際科学振興財団，[3](独)日本科学未来館，[4](学)跡見学園）

2C21a06　細胞内代謝産物の機能（1）～代謝産物による酵素活性化～

10:00 ○甲元一也，勢旗志郎，高木琴味，中川雄市（甲南大学 FIRST）

2C21a07　細胞内代謝産物の機能（2）～代謝産物混合系におけるカクテル効果～

10:12 ○勢旗志郎，甲元一也（甲南大 FIRST）

2C21a08　インドールアルカロイド・オカラミン類の昆虫毒性発現機構

10:24 ○中谷有里[1]，三浦由夏[1]，古谷章悟[2]，松田一彦[2]，林　英雄[3]（[1]近畿大農応生化，[2]近畿大院農応生化，[3]阪府大院生環科）

2C21a09　Unveiling the target of a meroterpenecompound chrodrimanin B that exerts insect control activity

10:36 ○Yan XU[1]，Yuri NAKATANI[1]，Shogo FURUTANI[1]，Kazuhiko MATSUDA[1]，Hideo HAYASHI[2]（[1]Kinki University, [2]Osaka Prefecture University）

2C21a10　*Caenorhabditis elegans* のニコチン性アセチルコリン受容体のサブタイプに対する Paraherquamide A の活性

10:48 ○小鑓亮介[1]，SATTELLE David B.[2]，林　英雄[3]，松田一彦[1]（[1]近畿大院農応生化，[2]マンチェスター大，[3]阪府大院生環科）

2C21a11　放線菌代謝産物から得られた新規プロスタグランジン放出阻害物質 pronqoline に関する研究

11:00 ○中栄功一，倉田育子，細川信夫，波多野和樹，五十嵐雅之，久保田由美子，澤　竜一，西村吉雄，安達勇光，野本明男（微化研）

2C21a12　Aflatoxin Production Inhibitory Activities of Mitochondrial Respiratory Enzyme Inhibitors

11:12 ○DIYAN FEBRI PRABOWO[1]，KEIKO TAKAGI[1]，USUMA JERMNAK[1]，KAZURO SHIOMI[2]，MIHOKO MORI[2]，SATOSHI OMURA[2]，HIROMICHI NAGASAWA[1]，SHOHEI SAKUDA[1]（[1]Department of Applied Biological Chemistry, The University of Tokyo, [2]Kitasato University）

2C21a13　山菜由来の抗がん物質の併用効果と作用メカニズム

11:24 ○高野侑恵[1]，上杉祥太[2]，新藤一敏[3]，土屋英子[4]，木村賢一[1,2]（[1]岩手大・農，[2]岩手大院・農，[3]日女大家政・食物，[4]広島大院・先端物質）

2C21a14　久慈産琥珀に含まれる酵母 Ca^{2+}シグナル伝達の新規阻害物質 neokujigamberol A, B

11:36 ○内田武史[1]，阿部友美[2]，南川裕樹[2]，乾　朋樹[2]，吉田　潤[3]，宮川都吉[4]，新田久男[5]，越野広雪[6]，木村賢一[1,2]（[1]岩手大・農，[2]岩手大院・農，[3]岩手医大・共通教育セ，[4]広島大院・先端物質，[5]久慈琥珀(株)，[6]理研・基幹研）

2C21a15　酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 変異株のストレス感受性を相補する活性物質のスクリーニング

11:48 ○川村悠実[1]，渡部　涼[2]，上杉祥太[1]，喜多島萌[5]，乾　朋樹[1]，大西素子[3]，越野広雪[4]，高木博史[5]，木村賢一[1,2]（[1]岩手大院・農，[2]岩手大・農，[3]中部大・応生，[4]理研・基幹研，[5]奈良先端大・バイオ）

C21 会場　午後の部（14:00～18:00）

有機—天然物，ケミカルバイオロジー，作用機構—

2C21p01　β セクレターゼ BACE1 を標的にしたクルクミン誘導体の構造活性相関研究

14:00 ○今野博行[1]，齋藤悠冴[1]，遠藤　仁[1]，宮崎慶樹[1]，赤路健一[2]（[1]山形大院理工，[2]京都薬大）

2C21p02　クルクミン類似体のアミロイド β 凝集阻害効果

14:12 ○遠藤　仁，齋藤悠冴，宮崎慶樹，今野博行（山形大院理工）

2C21p03　抗真菌活性を持つ BK-1097 類似体の合成及び生物評価

14:24 ○大槻雄介，鐙佳奈子，今野博行（山形大院工）

2C21p04　リンゴ果実上におけるマイコパラサイト機構の全容解明

14:36 ○廣瀬あかね，村上貴宣，橋本　勝（弘前大学）

2C21p05　オカボノアカアブラムシのイネ根への寄生による代謝産物変動

14:48 ○上田真二[1]，佐野千聡[1]，手林慎一[1]，及川　彰[2]，佐々木亮介[3]，斉藤和季[3,4]，上手麻希[5]，間世田英明[5]，石原　亨[6]（[1]高知大農，[2]山形大農，[3]理研 PSC，[4]千葉大院薬，[5]徳島大 STS，[6]鳥取大農）

2C21p06　核酸による食品汚染カビ毒の新規検出系の開発

15:00 ○森田悠治[1]，冨田康之[1]，秋吉妙子[1]，菅　裕明[2]，藤原大介[1]（[1]キリン(株)基盤技術研究所，[2]東京大学理学系研究科）

2C21p07　蛍光プローブ化緑茶カテキン EGCG を用いたがん細胞特異的可視化

15:12 ○熊添基文[1]，末益優美[1]，谷本陽祐[3]，弘津圭祐[1]，田中浩士[3]，高橋孝志[3]，山田耕路[1]，立花宏文[1,2]（[1]九大院農，[2]九大食品機能デザイン，[3]東工大院理工）

2C21p08　新規ヒスチジンキナーゼ阻害剤 signermycinB の作用機構の解明

15:24 ○犬飼洋一[1]，木野弘量[2]，渡邊崇史[2]，五十嵐雅之[3]，岡島俊英[4]，梅北まや[3]，波多野和樹[3]，石井英治[2]，江口陽子[2]，内海龍太郎[2]（[1]近畿大農バイオ，[2]近畿大院農バイオ，[3]微化研，[4]阪大産研）

2C21p09　細菌ヒスチジンキナーゼを標的とする新規抗生物質 waldiomycin の作用機構

15:36 ○木野弘量[1]，犬飼洋一[2]，五十嵐雅之[3]，岡島俊英[4]，石井英治[1]，江口陽子[1]，内海龍太郎[1]（[1]近畿大院農バイオ，[2]近畿大農バイオ，[3]微化研，[4]阪大産研）

2C21p10　細菌情報伝達阻害剤 walkmycin 類のヒスチジンキナーゼ阻害機構

15:48 ○江口陽子[1]，栃尾尚哉[2]，五十嵐雅之[3]，木川隆則[2]，内海龍太郎[3]（[1]近畿大農・バイオ，[2]理研横浜・SSBC，[3]微化研）

2C21p11　TNF-α 放出阻害物質 vialinin A の RBL-2H3 細胞における標的分子の同定

16:00 岡田　潔[1]，叶　躍奇[2,4]，吉岡泰淳[2]，谷口佳代子[3]，○本橋寛子[2]，菅谷紘一[2]，小野瀬淳一[2]，高橋俊哉[4]，越野広雪[4]，矢島　新[3]，矢嶋俊介[1]，阿部尚樹[2]（[1]東農大・応生科・バイオ，[2]東農大・応生科・栄養，[3]東農大・応生科・醸造，[4]理研・基幹研）

2C21p12　Vialinin A 標的分子 USP5 の活性化抑制が TNF-α 放出に与える影響

16:12 ○吉岡泰淳[1]，岡田　潔[2]，叶　躍奇[1,4]，谷口佳代子[3]，菅谷紘一[1]，小野瀬淳一[1]，高橋俊哉[4]，越野広雪[4]，矢島　新[3]，矢嶋俊介[2]，阿部尚樹[1]（[1]東農大・応生科・栄養，[2]東農大・応生科・バイオ，[3]東農大・応生科・醸造，[4]理研・基幹研）

2C21p13　Glaziovianin A は colchicine 結合部位に結合し，細胞内微小管ダイナミクスを抑制する

16:24 ○知念拓実[1]，高木昌俊[2]，早川一郎[3]，木越英夫[3]，今本尚子[2]，臼井健郎[1]（[1]筑波大院・生命環境，[2]理研・基幹研，[3]筑波大院・数理物質）

2C21p14　Capsaicin による可逆的タイトジャンクション開口メカニズムの解析

16:36 ○塩原智子，臼井健郎，韓　駿奎，礒田博子，南雲陽子（筑波大院・生命環境）

2C21p15　遺伝学的操作が容易な多剤超感受性酵母を用いた薬剤標的分子の同定

16:48 ○太田　優[1]，　知念拓実[1]，　志波　優[2]，　吉川博文[2,3]，横島　聡[4]，福山　透[4,5]，小林淳一[6]，臼井健郎[1]（[1]筑波大院・生命環境，[2]東京農大･ゲノム解析セ，[3]東京農大･応生科，[4]名大院･創薬科学，[5]東大院・薬，[6]北大院・薬）

2C21p16　自動酸化によるアポモルフィンのアミロイド β 凝集阻害機構の解析

17:00 ○佐藤瑞穂[1]，　村上一馬[1]，　片山寿美枝[2]，　赤木謙一[2]，入江一浩[1]（[1]京大院農，[2]医薬基盤研究所）

2C21p17　*Cornus Officinalis* のケラチノサイト成熟化に及ぼす影響

17:12 ○那波慶彦[1]，濱中　淳[2]，早瀬　基[3]（[1]一丸ファルコス株式会社，[2]ケーアイケミカル株式会社，[3]株式会社カネボウ化粧品スキンケア研究所）

2C21p18　MCLV3 の立体配座の固定による構造活性相関研究

17:24 ○加藤成人，　御手洗由貴，　土屋玲一郎，　小林　耕，近藤竜彦，坂神洋次（名古屋大院農）

2C21p19　Debromoaplysiatoxin 単純化アナログの 27 位における構造活性相関

17:36 ○花木祐輔[1]，　菊森将之[1]，　植野紗代[1]，　徳田春邦[2]，鈴木信孝[2]，入江一浩[1]（[1]京大院農，[2]金沢大院医）

2C21p20　Debromoaplysiatoxin 単純化アナログの 10 位メチル体の発がん促進活性

17:48 ○菊森将之[1]，　花木祐輔[1]，　柳田　亮[2]，　徳田春邦[3]，鈴木信孝[3]，永井宏史[4]，末永聖武[5]，入江一浩[1]（[1]京大院農，[2]香川大農，[3]金沢大院医，[4]東京海洋大，[5]慶応大理工）

C22 会場　午前の部（9:00〜12:00）

有機―天然物–生合成，代謝―

2C22a01　放線菌 *Streptomyces rochei* の抗生物質生産を誘導するシグナル分子 SRB の生合成機構

9:00 ○津田直人，シャレイ，カワハラヒロユキ，キナシハルヤス，アラカワケンジ（広島大院・先端研）

2C22a02　*Streptomyces rochei* の多重遺伝子破壊株が生産する代謝産物の化学構造および生合成機構の解析

9:12 ○國武博文[1]，平松高広[2]，木梨陽康[2]，荒川賢治[2]（[1]広島大･工，[2]広島大院・先端研）

2C22a03　抗生物質ランカサイジン生合成におけるピロロキノリンキノン要求性デヒドロゲナーゼの機能解析

9:24 ○山内佑介[1]，藪内　優[2]，鈴木敏弘[2]，木梨陽康[2]，荒川賢治[2]（[1]広島大・工，[2]広島大院・先端研）

2C22a04　放線菌 *Streptomyces rochei* の PQQ 破壊株が生産する抗カビ化合物ペンタマイシンの解析

9:36 ○片岡憂祐[1]，曹　志生[1]，吉田竜平[1]，石川　淳[2]，木梨陽康[1]，荒川賢治[1]（[1]広大院・先端研，[2]感染研）

2C22a05　アフラトキシン生合成におけるキサントン骨格形成に係わる遺伝子の解明

9:48 ○矢部希見子[1]，Zeng Hongmei[1,3]，畑林秀美[1]，中川博之[1]，中島廣光[2]（[1]農研機構食総研，[2]鳥取大農，[3]CAAS，中国）

2C22a06　希少放線菌 Actinoplanes missouriensis が生産する芳香族ポリケチドの単離と構造決定

10:00 勝山陽平，○佐藤　啓，大西康夫（東大院　農生科　応生工）

2C22a07　Streptomyces griseus では grixazone 生合成遺伝子群によって viridomycin A も生合成される

10:12 勝山陽平，○胡　　韋，中村一成，大西康夫（東大院農生科応生工）

2C22a08　放線菌 *Streptomyces* sp. JE-08 由来 JBIR-70 の生合成遺伝子クラスターの同定

10:24 ○大野翔登[1]，　勝山陽平[1]，　泉川美穂[2]，　林　貴之[1]，高木基樹[2]，　新家一男[3]，　大西康夫[1]（[1]東大院農生科･応生工，[2]JBIC，[3]産総研）

2C22a09　放線菌由来生合成遺伝子クラスターの大規模かつ広域的なライブラリー構築

10:36 ○小曽根郁子[1]，　酒井紀子[2]，　鈴木真理[2]，　西田みち代[2]，永井　文[2]，白石和子[2]，橋本絢子[1]，高木基樹[1]，新家一男[3]（[1]JBIC，[2]次世代天然物化学技術研究組合，[3]産総研）

2C22a10　病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の第 8 染色体上の二次代謝遺伝子クラスターに含まれる転写活性化因子の役割

10:48 ○加藤直樹，野川俊彦，高橋俊二，長田裕之（理研基幹研･ケミカルバイオロジー）

2C22a11　抗真菌リポペプチド verlamelin 生合成遺伝子の同定

11:00 ○石堂圭一[1]，木下　浩[1]，井原史雄[2]，仁平卓也[1]（[1]阪大・生物工学国際交流セ，[2]農研機構・果樹研）

2C22a12　抗真菌リポペプチド verlamelin 生合成関連遺伝子の機能解析

11:12 ○木下　浩，石堂圭一，仁平卓也（阪大・生物工学国際交流センター）

2C22a13　リベロマイシン生合成におけるサクシニル化機構の解析

11:24 ○高橋俊二，　宮澤　岳，　熊野匠人，　大輪田恵利，高木　海，野川俊彦，清水　猛，浦本昌和，長田裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

2C22a14　[3,3-D2]heptanoic acid を用いたリベロマイシン D 生合成経路の解析

11:36 ○宮澤　岳[1,2]，高橋俊二[1]，本郷やよい[1]，レイローレン[3]，中村健道[1]，チャリスグレゴリー[3]，長田裕之[1,2]（[1]理研基幹研・ケミカルバイオロジー，[2]埼玉大院理工学，[3]ウォーリック大）

2C22a15　Secondary metabolite production in *Streptomyces* can be induced by β-carboline compounds

11:48 ○Suresh PANTHEE，　Shunji TAKAHASHI，Teruo HAYASHI，　Takeshi SHIMIZU，　Makoto MUROI，Hiroyuki OSADA（Chem. Biol., RIKEN ASI）

C22 会場　午後の部（14:00〜18:00）

有機―天然物–生合成，代謝―

2C22p01　*Streptomyces reveromyceticus* 由来の新規 III 型ポリケタイド合成酵素の機能解析

14:00 ○小野寺渓斗[1]，　高橋俊二[2]，　小下雅比古[1]，　寺井悠晃[1]，長田裕之[2]，鮒　信学[1]（[1]静岡県大院・食栄，[2]理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

2C22p02　脂肪酸合成酵素の阻害によるポリケタイドの増産

14:12 ○山梨智也, 大石奈穂美, 山本　聡, 曽根祐輔, 鮒　信学（静岡県大院・食栄）

2C22p03　脂肪酸合成酵素遺伝子の破壊によるポリケタイドの増産

14:24 ○大石奈穂美, 山梨智也, 曽根祐輔, 山本　聡, 鮒　信学（静岡県大院・食栄）

2C22p04　放線菌ホルモン制御系の撹乱による新規 β-カルボリン化合物 kitasetaline の単離とその生合成遺伝子の同定

14:36 ○木谷　茂[1]，　アルンスリーアイヤダ[1]，　新家一男[2]，池田治生[3]，仁平卓也[1]（[1]阪大・生物工学国際交流セ，[2]産総研，[3]北里大・生命研）

2C22p05　放線菌 *Streptomyces lavendulae* FRI-5 における青色素インジゴイジン生合成遺伝子 *lbpA* の機能解析

14:48 ○PAIT IVY GRACE UMADHAY[1]，　木谷　茂[1]，Kurniawan Yohanes Novi[1]，前田亜紗[1]，岩井貴司[1]，池田治生[2]，仁平卓也[1]（[1]阪大・生物工学国際交流セ，[2]北里大・生命研）

2C22p06　Lycopene β-cyclase に高度に保存された酸性アミノ酸の部位特異的変異実験

15:00 ○柏倉　樹[1]，　大塚崇弘[1]，　仲野千秋[1]，　佐藤　努[1]，斎藤　猛[2]，本多泰揮[2]，西山直宏[2]，星野　力[1]（[1]新潟大院，[2]花王，安全評価研究所）

2C22p07　三機能性セスタテルペン / トリテルペン / セスクアテルペン合成酵素の同定及び環状・非環状構造の決定に関与するアミノ酸残基の探索

15:12 ○佐藤　努[1,2]，　小坂明彩香[1]，　山本彩乃[2]，　山鹿宏彰[1]，村田悠輔[3]，品田哲郎[3]，仲野千秋[1]，星野　力[1,2]（[1]新潟大院自然，[2]新潟大農，[3]阪市大院理）

2C22p08　チガヤ由来 Isoarborinol 合成酵素の機能解析

15:24 ○楢木真吾，加藤沙由莉，久城哲夫（明治大・農・農化）

2C22p09　植物トリテルペン合成酵素の生成物制御機構の解析

15:36 ○高瀬翔平，栗原　望，久城哲夫（明治大・農・農化）

2C22p10　ドラフトゲノム情報に基づいたジテルペン抗生物質ソルダリン生合成の解析

15:48 ○松浦靖典，江口　正，工藤史貴（東工大院理工）

2C22p11　麻痺性貝毒生合成初期中間体の合成と毒生産生物からの同定

16:00 ○土屋成輝[1]，長由扶子[1]，此木敬一[1]，長澤和夫[2]，大島泰克[3]，山下まり[1]（[1]東北大院農，[2]東京農工大院工，[3]東北大院生命科学）

2C22p12　5-Fluoro-2'-deoxyuridine の渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* における麻痺性貝毒生合成初期中間体合成に与える影響

16:12 ○長由扶子[1]，土屋成輝[1]，此木敬一[1]，大島泰克[2]，山下まり[1]（[1]東北大院農，[2]東北大院生命）

2C22p13　ファゼイン酸還元酵素の基質特異性と阻害剤設計

16:24 ○宇佐美健太[1]，　藤井佑典[1]，　水谷正治[2]，　近藤　悟[3]，轟　泰司[4]，平井伸博[1]（[1]京大院農，[2]神戸大院農，[3]千葉大院園芸，[4]静大農）

2C22p14　Labdane 型ジテルペン合成酵素遺伝子の swapping による機能解析

16:36 ○山田佑樹，西出崇人，小松　護，池田治生（北里大北里生命研）

2C22p15　バラ香気成分 2-phenylethanol 生合成経路季節変動の環境要因解析

16:48 ○神田桃代[1]，大西利幸[2]，渡辺修治[3]（[1]静岡大院農，[2]静岡大 GRL，[3]静岡大創科技院）

2C22p16　サトウダニ *Carpoglyphus lactis* におけるリノール酸生合成能とその代謝産物

17:00 ○清水伸泰[1]，内藤倫哉[1]，森　直樹[2]，桑原保正[3]（[1]京都学園大バイオ，[2]京大院農・応用生命，[3]富山県大工・生工研セ，JST, ERATO）

2C22p17　コナダニ類における 9,12-octadecadienoic acid の生合成

17:12 ○網干貴子[1]，中嶋祐二[1]，清水伸泰[2]，本田善之[3]，櫻谷英治[1]，小川　順[1]，西田律夫[1]，桑原保正[4]，天野　洋[1]，森　直樹[1]（[1]京大院農，[2]京都学園大バイオ環境，[3]山口農総技，[4]富山県大工生工研セ，JST ERATO）

2C22p18　海洋性粘液細菌のポリケチド抗生物質 haliangicin の生合成単位

17:24 ○孫　雨偉，宮野聖史，鈴木　彰，柘植尚志，小鹿　一（名大院生命農）

2C22p19　マメコガネ由来エリシターの探索とエリシターが誘導する植物揮発性物質の機能解析

17:36 ○三浦宏平，田母神繁，阿部　誠，野下浩二（秋田県立大生資科）

2C22p20　ジャスモン酸メチルで誘導されるアレチマツヨイグサの揮発成分とタンパク質

17:48 ○野下浩二，阿部　誠，田母神繁（秋田県大・生資科）

C25 会場　午前の部（9:24〜12:00）

有機―合成，反応機構―

2C25a03　黄体ホルモン作用物質 Lecanindole D の合成研究

9:24 ○浅沼明子[1]，榎本　賢[2]，桑原重文[1]（[1]東北大院農，[2]産総研生物プロセス）

2C25a04　癌細胞浸潤阻害物質 BU-4664L の合成研究

9:36 ○藤田聡美[1]，　渡邊麻衣[1]，　廣川高史[1]，　榎本　賢[2]，桑原重文[1]（[1]東北大院農・生物産業創成，[2]産総研生物プロセス）

2C25a05　AI-77-B および Sg17-1-4 の合成研究

9:48 ○鈴木智美[1]，永沢友裕[1]，榎本　賢[2]，桑原重文[1]（[1]東北大院農，[2]産総研生物プロセス）

2C25a06　Pestaloquinol A, B および Cytosporin D の全合成研究

10:00 ○廣川高史，陰山真将，桑原重文（東北大院農・生物産業創成）

2C25a07　癌細胞転移阻害物質 Lactimidomycin の全合成研究

10:12 ○永沢友裕，桑原重文（東北大院農）

2C25a08　抗炎症活性物質 Rossinone A の合成研究

10:24 ○滝野ちあき[1]，榎本　賢[2]，桑原重文[1]（[1]東北大院農，[2]産総研生物プロセス）

2C25a09　Glyceollin I の合成研究

10:36 ○河野雄太，久世雅樹，滝川浩郷（神戸大院農）

2C25a10　7-Oxoorobanchol の合成

10:48 ○田中政志，久世雅樹，滝川浩郷（神戸大院農）

2C25a11　4-Hydroxybutanoate 鎖を応用した光延反応アシロキシドナーの開発検討

11:00 ○佐井勇介，重冨顕吾，生方　信（北大院農）

2C25a12　パラジウム触媒を利用したフェナントリドン類のワンポット合成

11:12 ○谷森紳治，中川直道，竹田一貴（大阪府大院生命環境）

2C25a13　三フッ化ホウ素二水和物と *p*-トルエンスルホン酸一水和物の触媒活性

11:24 ○福士幸治[1]，間瀬智志[2]（[1]北大院農，[2]北大院農）

2C25a14　*β*―アミリン生合成：オキシドスクアレンの末端二重結合の E-, Z-Me 基が環化反応に及ぼす影響

11:36 ○宮原悠里[1]，花岡正樹[1]，高橋一成[2]，星野　力[1,2]（[1]新潟大院自然科学，[2]新潟大農応生化）

2C25a15　ラノステロール生合成：2, 3－オキシドスクアレンの Me-29 が正確なフォールデングに最も重要である

11:48 ○星野　力，千葉彬史，阿部奈緒美（新潟大院）

C25 会場　午後の部（14:00〜17:48）

有機―合成，反応機構―

2C25p01　生理活性ステロイド配糖体，アカンサステロサイド B3 の合成研究

14:00 ○合田麗加，中崎敦夫，西川俊夫（名大院生命農）

2C25p02　(-)-5,11-ジデオキシテトロドトキシンの全合成

14:12 ○今津拓也[1]，安立昌篤[1]，磯部　稔[2]，西川俊夫[1]（[1]名大院生命農，[2]台湾国立精華大）

2C25p03　Synthesis of ortho-Terphenyl ortho-Quinone

14:24 ○Wenyu Huang,　Boon-ek Yingyongnarongkul,　Jutatip Boonsombat,　Atsuo Nakazaki,　Toshio Nishikawa（Nagoya Univ.）

2C25p04　植物毒素 Tagetitoxin の合成研究

14:36 ○山田ひと美，安立昌篤，西川俊夫（名大院生命農）

2C25p05　連続環化反応による saxitoxin 骨格の合成研究

14:48 ○上野壮平，中崎敦夫，西川俊夫（名大院生命農）

2C25p06　ペニフルビン A の全合成

15:00 ○深津裕一，小佐野雄太，森川幸則，渡邉秀典（東大院農）

2C25p07　Plumisclerin A の合成研究

15:12 ○服部　弘，石田恭次，渡邉秀典（東大院農生科･応生化）

2C25p08　リアノダン類ジテルペンの合成研究

15:24 ○若森晋之介，渡邉秀典（東大院農生科）

2C25p09　*O*－ビニルヒドロキサム酸構造を有する GAF の全合成研究

15:36 ○堀之内妙子，渡邉秀典（東大院農生科）

2C25p10　Apteniol 類の構造に関する研究

15:48 ○西川　耀[1]，野下俊朗[2]，大内秀一[3]，木立由美[3]，岡本泰輔[4]，齊藤安貴子[4]（[1]県立広島大院生命，[2]県立広島大生命環境，[3]青森大薬，[4]大阪電通大工）

2C25p11　脂質酸化物による DNA 付加体とそのアミダイト体の合成

16:00 ○松島芳隆[1]，記野　順[1]，後藤正憲[2]，新村和也[2]，椙村春彦[2]（[1]浜松医科大学・化学，[2]浜松医科大学・腫瘍病理学）

2C25p12　旧 fengycin 構造の合成研究

16:12 ○六車美沙，本間美保，橋本　勝（弘前大学農学生命）

2C25p13　抗 HIV 活性を有する homophymine A の合成研究：異常アミノ酸部の合成

16:24 ○武田　祥，米田　翔，菊池真理，今野博行（山形大院理工）

2C25p14　異常アミノ酸含有直鎖オクタペプチド callipeltin M の固相全合成

16:36 ○菊池真理，今野博行（山形大院理工）

2C25p15　フルオラス Fmoc 試薬を用いる ACE 阻害活性ペプチド類縁体のミクスチャー合成

16:48 ○廣瀬正樹，松井純子，塩入孝之，濱本博三，松儀真人（名城大農）

2C25p16　アルケンからのアミド化合物の求核付加反応による N-置換アミド化合物の合成

17:00 ○見原果林，岡田　郁，千葉一裕，北野克和（東農工大院農）

2C25p17　N-メチル化アミノ酸誘導体の新規合成法

17:12 ○上村和也，菅井正枝，岡田洋平，千葉一裕（東京農工大院農）

2C25p18　液相ペプチド合成のための疎水性ベンジルアルコールタグの開発

17:24 ○若松弘起，岡田洋平，北野克和，千葉一裕（東農工大院農）

2C25p19　疎水性ベンジルアミンタグを用いたペプチドの head-to-tail 型環化および C 末端アルキルアミド化

17:36 ○藤田裕子[1]，藤田秀司[2]，岡田洋平[1]，千葉一裕[1]（[1]農工大農，[2]JITSUBO 株式会社）

C26 会場　午前の部（9:00〜12:00）

生体高分子・脂質—タンパク質—

2C26a01　赤外自由電子レーザー照射によるアミロイド線維のリフォールディング

9:00 ○川崎平康[1]，藤岡　隼[2]，今井貴之[1]，簗山光一[1,2]（[1]東理大赤外自由電子レーザー研究セ，[2]東理大院総化）

2C26a02　酵母ミトコンドリアキャリア蛋白質の無細胞合成および膜輸送活性の再構成

9:12 岡田有右，○野澤　彰，藤本竜治，戸澤　譲（愛媛大・無細胞セ）

2C26a03　ヒト Na チャネル蛋白質の無細胞合成および電気生理学的機能解析

9:24 ○山下展弘[1]，森田大智[2]，高林泰斗[1]，野澤　彰[3]，戸澤　譲[3]（[1]愛媛大院理工，[2]愛媛大工，[3]愛媛大・無細胞セ）

2C26a04　昆虫病原性糸状菌 *Nomuraea rileyi* の発芽期に誘導されるタンパク質の解析

9:36 ○中島智史[1]，野田孝博[2]，荒木朋洋[1]（[1]東海大・農・バイオ，[2]熊本県農研セ）

2C26a05　ショウガシステインプロテアーゼの精製及び構造解析

9:48 ○西山友貴，荒木朋洋（東海大・農・バイオ）

2C26a06　GPCR の一種，カイコガ PBAN 受容体の高圧処理による細胞膜からの可溶化効率の向上

10:00 ○永田宏次[1]，　片山幸江[1]，　早川　江[1]，　鈴木達也[1]，海老沢樹[1]，　大塚　淳[1]，　岡井公彦[1]，　夏目　亮[2]，　LO Yu-Hua[2]，千田俊哉[2]，　河合岳志[1]，　永峰俊弘[3]，　栗原政明[3]，　李載みん[3]，HULL J. Joe[4]，松本正吾[3]，長澤寛道[1]，田之倉優[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]産総研・BIRC，[3]理研・松本分子昆虫学，[4]米農務省農研局・乾燥地研セ）

2C26a07　シロイヌナズナ由来乾燥・高温ストレス応答転写因子 DREB2A の結晶構造解析

10:12 ○中村　顕[1]，　浅野敦子[1]，　宮川拓也[1]，　澤野頼子[1,2]，佐久間洋[1]，溝井順哉[1]，篠崎和子[1,3]，田之倉優[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東京医歯大・教養，[3]国際農研）

2C26a08　イネの乾燥ストレス応答に関わる転写因子 OsAREB8 の X 線結晶構造解析

10:24 ○宮園健一[1]，　小浦　翼[1]，　薛　友林[1]，　窪田恵子[1]，吉田拓也[2]，藤田泰成[3,4]，篠崎和子[2,3]，田之倉優[1]（[1]東大院農，[2]東大院農・植物分子生理学，[3]国際農林水産研究センター，[4]筑波大生命）

2C26a09　放線菌の転写調節因子 AdpA と DNA の相互作用および立体構造解析

10:36 ○姚　明東[1]，　大塚　淳[1]，　宮園健一[1]，　永田宏次[1]，堀之内末治[2]，大西康夫[2]，田之倉優[1]（[1]東大農生科応生化，[2]東大農生科応生工）

2C26a10　細菌由来アルギン酸 ABC トランスポーターの立体構造と基質輸送

10:48 ○丸山如江，金子あい，三上文三，橋本　渉，村田幸作（京大院農）

2C26a11　タイワンカブトムシ由来セリンプロテアーゼ阻害タンパク質オリクチンの変異体解析

11:00 ○劉　徳生[1]，　鈴木達也[1]，　河合岳志[1]，　堀田彰一朗[1]，石橋　純[2]，山川　稔[2]，永田宏次[1]，田之倉優[1]（[1]東京大学，[2]農生資研）

2C26a12　新奇セリンプロテアーゼ阻害剤 Oryctin と α-chymotrypsin 複合体の X 線結晶構造解析

11:12 ○鈴木達也[1]，　堀田彰一郎[1]，　石橋　純[2]，　山川　稔[2]，永田宏次[1]，田之倉優[1]（[1]東大院農，[2]農生資研）

2C26a13　水酸化アミノ酸の立体選択的合成に有用なアルドラーゼ（asHPAL)–第一基質複合体の結晶構造決定と変異導入による反応機構解析

11:24 ○郭　琳君[1]，岡井公彦[1]，間瀬朋子[1]，Imai Fabiana Lica[1]，永田宏次[1]，日比　慎[2]，宮川拓也[1]，小川　順[2]，田之倉優[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]京大院農・応用生命）

2C26a14　ハロアルカンデハロゲナーゼ DatA の立体構造解析

11:36 ○管　立軍[1]，　矢吹秀弥[1]，　岡井公彦[1]，　大塚　淳[1]，永田裕二[2]，田之倉優[1]（[1]東大院農生科，[2]東北大院生命科）

2C26a15　*Microbacterium sp.58-2* 株由来 hydrazidase の X 線結晶構造解析

11:48 ○秋山友了[1]，　石井美妃[1]，　多久和篤史[2]，　佐々木康幸[1]，老沼研一[2]，高谷直樹[2]，矢嶋俊介[1]（[1]東農大院農学科・バイオ，[2]筑波大院・生命環境）

C26 会場　午後の部（14:00〜16:24）

生体高分子・脂質—タンパク質，多糖質，その他—

2C26p01　酵母 *Kluyveromyces lactis* で異種発現させたサケツバタケ由来レクチンの諸特性

14:00 ○阿部智也[1]，　松葉　悠[1]，　田代　愛[1]，　鈴木智大[2]，小林夕香[3]，道羅英夫[2]，平井浩文[1]，河岸洋和[4]（[1]静大農応生化，[2]静大遺伝子，[3]J-オイルミルズ，[4]静大院創造）

2C26p02　スギヒラタケレクチンの異種発現解析

14:12 ○大前沙央理[1]，鈴木智大[2]，平井浩文[1]，河岸洋和[1,3]（[1]静大農・応生化，[2]静大・遺伝子，[3]静大院・創造）

2C26p03　スギヒラタケレクチン（PPL）の糖鎖構造解析

14:24 ○荒井勇人[1]，　鈴木智大[2]，　道羅英夫[2]，　平井浩文[1]，舘野浩章[3]，平林　淳[3]，小林夕香[4]，河岸洋和[1,5]（[1]静大農・応生化，[2]静大・遺伝子，[3]産総研・糖鎖医工学，[4]J-オイルミルズ，[5]静大院・創造）

2C26p04　棘皮動物グミ由来溶血性レクチン CEL-III の細胞膜貫通オリゴマー構造

14:36 ○畠山智充，郷田秀一郎，海野英昭（長崎大院工）

2C26p05　マガキ由来マンノース特異的レクチンの精製と性質

14:48 ○辻　慶輝，松山一輝，郷田秀一郎，海野英昭，畠山智充（長崎大院工）

2C26p06　C 型レクチンファミリータンパク質マウス RegIV の大腸菌による発現とその性質

15:00 ○加藤裕太，海野英昭，郷田秀一郎，畠山智充（長崎大院工）

2C26p07　溶血性レクチン CEL-III の糖結合サブドメイン 2 β への変異導入による溶血活性の向上

15:12 ○上妻由章，清水良樹，米倉政実（茨城大農）

2C26p08　腸管上皮由来抗菌性レクチン RegIV の機能解析

15:24 ○前迫沙織，磯野麻依，篠原俊哉，渡辺寛人（明治大農）

2C26p09　ミズナ及びミブナ種子由来粘質多糖の特性評価

15:36 ○喜多由香[1]，本田与一[1]，宇山　浩[2]，東　順一[2]（[1]京都大院農，[2]大阪大院工）

2C26p10　菌類残渣からのグルカン類抽出法の改良と高純度化

15:48 ○吉見　啓[1,2]，　阿部敬悦[2,3]，　熊谷俊高[1]，　細山　浩[1]，都築　毅[3]，佐々木宏明[4]，後藤智生[4]（[1](株)ファームラボ，[2]東北大・未来研，[3]東北大院農，[4](株)岐阜セラツク製造所）

2C26p11　トウモロコシ果皮アラビノキシランの水分吸着特性

16:00 ○吉田有希[1]，本田与一[1]，宇山　浩[2]，東　順一[2]（[1]京大院農，[2]阪大院工）

2C26p12　超音波分解による高分岐型 β-1, 3-グルカンに見られる特異な低分子化挙動

16:12 ○重森達也，甲元一也（甲南大 FIRST）

C15 会場　午前の部（9:00〜12:00）

酵素—アミノ酸代謝関連酵素—

2C15a01　*Cupriavidus necator* 由来 L-threonine 3-dehydrogenase によるヒト血漿中 L-threonine 定量法の開発

9:00　◦田部井陽介[1]，　米田英伸[1]，　関口敬文[2]，　滝脇正貴[2]，宇治義則[2]，北島　勲[2]，浅野泰久[1,3]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]富山大学附属病院検査部，[3]JST, ERATO）

2C15a02　変異型の NADP 依存性 D-アミノ酸脱水素酵素を用いる D-アミノ酸の分光学的分析法の開発

9:12　◦今泉吉史[1]，　秋田紘長[1]，　牟田口祐太[1]，　清水泰博[2]，大島敏久[2]（[1]九大院生資環，[2]九大院農）

2C15a03　耐熱性色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素の探索と機能解析

9:24　◦石倉　優[1]，里村武範[1]，櫻庭春彦[2]，大島敏久[3]，末信一朗[1]（[1]福井大院，[2]香川大，[3]九州大院）

2C15a04　好熱性細菌 *Rhodothermus marinas* 由来プロリンラセマーゼホモログの機能解析

9:36　◦小柳峰史[1]，里村武範[1]，櫻庭春彦[2]，大島敏久[3]，末信一朗[1]（[1]福井大院工，[2]香川大農，[3]九大院農）

2C15a05　トリパノソーマ由来 NAD 依存性 L-スレオニン脱水素酵素の機能解析

9:48　◦米田一成[1]，櫻庭春彦[2]，荒木朋洋[1]，大島敏久[3]（[1]東海大・農，[2]香川大・農，[3]九大院・農）

2C15a06　超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM5473 のアスパラギン酸ラセマーゼホモログ遺伝子のクローニングとその遺伝子産物の酵素科学的性質

10:00　◦鷲尾　翼[1]，藤井知実[2]，畑　安雄[2]，老川典夫[1]（[1]関大化学生命工，[2]京都大学化学研究所）

2C15a07　L-グルタミン酸酸化酵素の 1 アミノ酸置換でできた L-ヒスチジン酸化酵素と L-アルギニン酸化酵素の特性解析

10:12　◦稲垣賢二[1]，　中井隆一郎[1]，　田村　隆[1]，　佐野宰久[2]，川口辰也[2]，今田勝巳[2]，日下部均[3]（[1]岡山大院環境生命，[2]大阪大院理，[3]エンザイムセンサ）

2C15a08　Function and evolution of *β*-decarboxylating dehydrogenase family

10:24　◦Lulu YIN[1]，　Ayako Yoshida[1]，　Takeo Tomita[1]，Hiromi Nishida[1]，　Haruyuki Atomi[2]，　Saori Kosono[1]，Tomohisa Kuzuyama[1]，Makoto Nishiyama[1]（[1]Univ. Tokyo, [2]Kyoto Univ.）

2C15a09　*Thermococcus kodakarensis* のリジン・アルギニン生合成酵素の基質認識機構の解明

10:36　◦吉田彩子[1]，　富田武郎[1]，　跡見晴幸[2]，　古園さおり[1]，葛山智久[1]，西山　真[1]（[1]東大生物工学セ，[2]京大院工）

2C15a10　古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* 由来のホモイソクエン酸脱水素酵素ホモログの構造と機能の解析

10:48　◦高橋賢人，富田武郎，葛山智久，西山　真（東大・生物工学セ）

2C15a11　酵母の酸化ストレス耐性に関与する *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 の構造機能解析

11:00　◦那須野亮[1]，平野良憲[1]，伊藤貴文[2]，箱嶋敏雄[1]，日び隆雄[2]，高木博史[1]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]福井県大・生物資源）

2C15a12　微生物由来アスパラギン酸ラセマーゼの X 線結晶構造解析

11:12　◦山内貴恵[1]，藤井知実[1]，郷上佳孝[2]，老川典夫[2]，畑　安雄[1]（[1]京大・化研，[2]関大・化学生命工）

2C15a13　*Corynebacterium glutamicum* 由来グルタミン酸脱水素酵素の結晶構造解析

11:24　◦富田武郎，インルル，葛山智久，西山　真（東大・生物工学セ）

2C15a14　複合体結晶構造に基づくアゼチジン-2-カルボン酸加水分解酵素の反応機構

11:36　◦豊田真悠子[1]，　実森啓二[2]，　WACKETT Lawrence P.[3]，江崎信芳[2]，栗原達夫[2]，三上文三[1]（[1]京大院農，[2]京大化研，[3]ミネソタ大）

2C15a15　D-*threo*-3-ヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼの立体構造解析

11:48　◦松本　悠[1]，　安武義晃[2]，　武田由希[1]，　田村具博[2]，横田　篤[1]，和田　大[1]（[1]北大院農・応生科，[2]産総研・生物プロセス）

C15 会場　午後の部（14:00〜18:00）

酵素—アミノ酸代謝関連酵素，核酸代謝関連酵素—

2C15p01　L-アスパラギン酸オキシダーゼ-キノリン酸シンターゼ複合体の生化学的解析

14:00　◦芦田裕之[1]，秋吉渚月[2]，丸田隆典[2]，石川孝博[2]，澤　嘉弘[2]（[1]島根大総科研センター遺伝子，[2]島根大生資生命工）

2C15p02　超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来のシステイン合成酵素 OPSS の F225 の役割

14:12　◦武田瑛美[1]，中村　卓[1]，石川一彦[2]（[1]長浜バイオ大，[2]産総研）

2C15p03　*Pseudomonas* sp. F2a 株由来セレノリン酸合成酵素の解析

14:24　◦波北　悟，斎藤茂樹，谷　泰史，三原久明（立命館大・生命科学・生物工）

2C15p04　L-トリプトファン要求株を用いた安定型トリプトファン脱水素酵素のスクリーニング

14:36　◦松井大亮[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

2C15p05　新規 D-*erythro*-3-hydroxyaspartate 分解酵素の探索及び一次構造解析

14:48　◦和田　大，長野弘幸，横田　篤（北大院農・応生科）

2C15p06　*Penicillium* sp. AIU 27 が産生するタンパク質酸化能を持つ L-アミノ酸酸化酵素の精製と性質

15:00　◦平良竜大[1]，　星　葉子[1]，　松田　聡[1]，　山田美和[1]，日比　慎[2]，小川　順[2]，礒部公安[1]（[1]岩手大・農，[2]京大院農・応用生命）

2C15p07　卵殻膜由来リシルオキシダーゼによるエラスチンおよび細胞に対する架橋形成

15:12　◦井上侑紀[1]，　伊井野貴史[1]，　山下裕輔[1]，　青笹正義[1]，丸　勇史[1]，赤川　貢[2]，金　武祚[1]（[1]株式会社ファーマフーズ，[2]大阪府立大学）

2C15p08　マウス骨格筋で転写因子 FOXO1 はグルタミン代謝を調節する

15:24　◦亀井康富[1,2]，　狩野理延[1]，　笠原知美[1]，　金井紗綾香[1]，三浦進司[3]，江崎　治[3]，菅波孝祥[1]，北村忠弘[4]，小川佳宏[1]（[1]東京医科歯科大，[2]京都府立大，[3]国立健康栄養研，[4]群馬大学）

2C15p09　*Mycobacterium avium* 由来 MAV_3489 と *M. smegmatis* 由来 MSMEG_2932 の機能解析

15:36　◦森茂太郎，金　　玄，林原絵美子，柴山恵吾（国立感染研・細菌二）

2C15p10　HIV-1 逆転写酵素の cDNA 合成活性についての検討

15:48　◦小西　篤，篠村まゆ，保川　清（京大院・農）

2C15p11　*Pyrococcus furiosus* DNA リガーゼのライゲーション活性向上に向けた立体構造に基づく変異体解析

16:00　◦田邉麻衣子[1]，　石野園子[2]，　養王田正文[3]，　森川耿右[4]，石野良純[2]，西田洋一[1]（[1]日立・中研，[2]九大院・農，[3]東農工大・院工，[4]京大・iCeMS）

2C15p12　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来 RNase P 構成タンパク質 Rpr2 の発現精製と性質

16:12　◦古谷貴志，石原雅人，今井崇喜，西本悦子，山下昭二，角田佳充，木村　誠（九州大院農）

2C15p13　超好熱性古細菌リボヌクレアーゼ P RNA のステムループ構造の触媒活性への関与

16:24　◦上田敏史[1]，　原　唯史[2]，　中島　崇[1,2]，　角田佳充[1,2]，木村　誠[1,2]（[1]九大院システム生命，[2]九大院農）

2C15p14　超好熱古細菌 RNase P 構成タンパク質複合体 *Pho* Pop5-*Pho* Rpp30 と RNA 鎖との相互作用

16:36　◦浜崎真人，中島　崇，角田佳充，木村　誠（九大院・生資環）

2C15p15　シロイヌナズナ由来前駆体 tRNA プロセシング酵素・PRORP1 の酵素化学的性質に関する研究

16:48 ○中山　郁[1]，　今井崇喜[1]，　前田　卓[2]，　中島　崇[1,2]，角田佳充[1,2]，木村　誠[1,2]（[1]九大院　生資環，[2]九大　農）

C16 会場　午前の部（9:00〜12:00）

酵素—糖質代謝関連酵素—

2C16a01　デキストラングルカナーゼの発見

9:00 ○舟根和美[1]，　一ノ瀬仁美[1]，　鈴木龍一郎[1]，　木村啓太郎[1]，齋藤勝一[1]，藤本　瑞[2]，荒木紀美[3]，小林幹彦[3]，木村淳夫[4]（[1]農研機構食総研，[2]農生資研，[3]実践女大，[4]北大・院農）

2C16a02　*Paenibacillus* sp. 598K 由来デキストラングルカナーゼの特性解析

9:12 ○一ノ瀬仁美[1]，　木村啓太郎[1]，　齋藤勝一[1]，　荒木紀美[2]，小林幹彦[2]，藤本　瑞[3]，舟根和美[1]（[1]農研機構　食総研，[2]実践女子大　生活科学，[3]農生資研）

2C16a03　*Paenibacillus* sp. 598K 株由来デキストラングルカナーゼの結晶構造

9:24 ○門間　充[1]，　鈴木喜大[1]，　一ノ瀬仁美[2]，　鈴木龍一郎[2]，藤本　瑞[1]，木村淳夫[3]，舟根和美[2]（[1]農生資研，[2]農研機構　食総研，[3]北大院農）

2C16a04　*Ochromonas danica* 由来 β-1, 3-グルカナーゼの精製と特性解析

9:36 ○磯野直人，松本絵美，久松　眞（三重大院生資）

2C16a05　シイタケ exo-β-1,3-グルカナーゼの発現抑制による子実体収穫後のレンチナン分解抑制

9:48 ○坂本裕一[1]，西谷洋輔[2]，水野雅士[2]，金野尚武[1]（[1]岩手生工研，[2]神戸大農）

2C16a06　高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* 由来 α-アミラーゼファミリー酵素 MalA による分岐グルカン形成

10:00 ○小野寺雅彦[1]，　八波利恵[1]，　月村　亘[1]，　福居俊昭[1]，仲宗根薫[2]，高品知典[3]，中村　聡[1]（[1]東工大院生命理工，[2]近畿大工，[3]東洋大生命科）

2C16a07　*Paenibacillus polymyxa* 由来 β-アミラーゼの X 線小角散乱による構造解析と示差走査熱量測定による各ドメイン間の相互作用解析

10:12 ○西村重徳，高山　葵，深田はるみ，炭谷順一，川口剛司，乾　　隆（阪府大院・生環科）

2C16a08　X 線結晶構造解析によるダイズ β-アミラーゼの反応機構の解明

10:24 ○三上文三[1]，　姜　有那[1]，　安達基泰[2]，　河村和広[1]，水谷公彦[1]，高橋延行[1]（[1]京大院農，[2]日本原子力機構）

2C16a09　アピオス塊茎の β−アミラーゼの分離精製，性質および構造解析

10:36 ○日野ちはる，井下智香子，上妻由章，米倉政実（茨城大院農）

2C16a10　*Streptomyces corchorusii* 由来細胞表層結合型アミラーゼの触媒ドメイン間の相互作用

10:48 ○久保江里果, 西村重徳, 谷　修治, 炭谷順一, 川口剛司（阪府大院・生環科）

2C16a11　*Kitasatospora* sp. MK-1785 株由来 G3 生成アミラーゼの糖転移活性を利用した配糖体の合成

11:00 ○掃部正浩，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大院生命環境）

2C16a12　デキストラン合成酵素 dextran dextrinase の触媒残基およびその機能の決定

11:12 ○貞廣樹里，森　春英，佐分利亘，奥山正幸，木村淳夫（北大院農）

2C16a13　イネ胚乳における澱粉生合成関連酵素の複合体解析

11:24 ○阿部奈津子[1]，クロフツ尚子[1]，中村保典[1]，TETLOW Ian[2]，EMES Michael[2]，藤田直子[1]（[1]秋田県立大，[2]Univ. of Guelph）

2C16a14　GH63 に属する大腸菌由来機能未知酵素 YgjK のコンフォメーション変化

11:36 ○宮崎剛亜[1]，　市川めぐみ[1]，　盛まりな[1]，　北岡本光[2]，森　春英[3]，北野克和[1]，西河　淳[1]，殿塚隆史[1]（[1]東農工大院農，[2]農研機構・食総研，[3]北大院農）

2C16a15　バキュロウイルス - カイコ発現系を用いて産生したヒトチロシナーゼの性質

11:48 ○梅田彩奈[1]，　佐藤正幸[1]，　忠平和子[1]，　日下部宜宏[2]，朴　龍洙[3]，前仲勝実[4]，蜷木　理[5]，殿塚隆史[1]，西河　淳[1]（[1]農工大農・応生科，[2]九大院農・農生資源，[3]静岡大・創科技院，[4]北大院・薬研院，[5]農工大農・生物生産）

C16 会場　午後の部（14:00〜17:48）

酵素—糖質代謝関連酵素—

2C16p01　*Bacillus selenitireducens* 由来 2-*O*-α-D-グルコシルグリセロールホスホリラーゼの発見

14:00 ○仁平高則[1]，　斉藤由華[1]，　東原幸起[2]，　伏信進矢[2]，北岡本光[3]，中井博之[1]，大坪研一[1]（[1]新潟大・農，[2]東大院・農，[3]農研機構・食総研）

2C16p02　2-*O*-α-D-グルコシルグリセロールホスホリラーゼによる β-D-グルコース 1-リン酸加水分解の反応機構

14:12 ○北岡本光[1]，仁平高則[2]，斉藤由華[2]，東原幸起[3]，伏信進矢[3]，中井博之[2]，大坪研一[2]（[1]農研機構・食総研，[2]新潟大・農，[3]東大院・農）

2C16p03　*Bacillus selenitireducens* 由来 2-*O*-α-D-グルコシルグリセロールホスホリラーゼの X 線結晶構造解析

14:24 ○東原幸起[1]，　仁平高則[2]，　斉藤由華[2]，　北岡本光[3]，中井博之[2]，大坪研一[2]，伏信進矢[1]（[1]東大院・農，[2]新潟大・農，[3]農研機構・食総研）

2C16p04　好熱菌 *Caldicellulorsirputor saccharolyticus* 由来コージビオースホスホリラーゼの基質認識機構

14:36 ○岡田理志[1]，　山本拓生[2]，　渡辺　光[2]，　西本友之[2]，茶圓博人[2]，福田恵温[2]，若木高善[1]，伏信進矢[1]（[1]東大院農，[2]林原・研究開発本部）

2C16p05　*Listeria innocua* 由来の新規酵素 1,2-β-D-オリゴグルカンホスホリラーゼの機能解析

14:48 ○豊泉大幸[1]，　阿部紘一[1]，　中島将博[1,3]，　田口速男[1]，平石正男[2]，五十嵐圭日子[2]，鮫島正浩[2]，北岡本光[3]（[1]東理大理工，[2]東大院農生科，[3]農研機構・食総研）

2C16p06　*Clostridium thermocellum* 由来セロビオースホスホリラーゼへの変異導入によるセロオリゴ糖の合成

15:00 ○片山貴之，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（大阪府大院生環）

2C16p07　*Stenotrophomonas maltophilia* No. 43 株由来アルギン酸リアーゼの諸性質の検討及びそのクローニング

15:12 ○石井里沙, 梅村　源, 里村武範, 末信一朗（福井大院工）

2C16p08　ヘパリン分解細菌由来ヘパラン硫酸リアーゼ HepC の結晶構造と活性部位

15:24 ○橋本　渉，丸山如江，中道優介，村田幸作（京大院農）

2C16p09　進化工学的手法による galacto-*N*-biose/lacto-*N*-biose I phosphorylase（GLNBP）の耐熱性化

15:36 ○小山善幸，川上真理子，西本　完，北岡本光（農研機構・食総研）

2C16p10　*Streptomyces lavendulae* 由来 1-デオキシノジリマイシン（DNJ）生合成遺伝子の機能解析

15:48 ○大西　岬，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大院・生命・応生科）

2C16p11　4-ケトアルドペントースの酸化発酵生産には新規 PQQ 酵素が機能する

16:00 ○足立収生[1]，アワーズロケA[2]，阿野嘉孝[3]，赤壁善彦[4]，品川恵美子[5]，薬師寿治[6]，松下一信[7]（[1]山口大学・農，[2]ラプラタ大学・発酵工学研，[3]愛媛大学・農，[4]山口大学・農，[5]宇部高専・物質工学，[6]山口大学・農，[7]山口大学・農）

2C16p12　酵母由来の Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase のクローニングと特性解析

16:12 ○村上智史[1]，高岡友紀[1]，芦田　久[2]，山本憲二[3]，千葉靖典[1]（[1]産総研・生物プロセス，[2]近畿大・生物理工，[3]石川県立大・生物資源工学研）

2C16p13　GH ファミリー 9 に属するエキソ β-D-グルコサミニダーゼの糖鎖合成酵素化

16:24 ○本多裕司[1]，　新井祥子[1]，　鳥本真理恵[1]，　鈴木健太郎[2]，伏信進矢[2]，北岡本光[3]（[1]石川県大　生物資源，[2]東大･院農，[3]（独）農研機構　食総研）

2C16p14　Purification and characterization of nigerose-producing enzyme from *Podospora anserina*

16:36　◦Kyung-Mo SONG, Masayuki OKUYAMA, Haruhide MORI, Atsuo KIMURA（Graduate School of Agriculture, Hokkaido University）

2C16p15　カンゾウ（Glycyrrhiza glabra L.）のフラボノイド系ポリフェノール配糖化酵素遺伝子の単離と解析

16:48　◦桑原侑己[1]，東江直樹[1]，瀧川義浩[2]，早川堯夫[1]，角谷晃司[1]（[1]近畿大薬学総合研究所，[2]近畿大先端技術総合研究所）

2C16p16　高基質特異性型グルコースデヒドロゲナーゼの結晶構造解析

17:00　◦加納義貴[1]，　上原成一朗[1]，　岩田英之[2]，　鹿島康治[2]，大島敏久[3]，櫻庭春彦[1]（[1]香川大農，[2]耐熱性酵素研，[3]九州大農）

2C16p17　ペクチンラムノガラクツロナンの合成に関与するラムノース転移酵素の活性測定法

17:12　牧　祐介[1,2]，　俣木彩恵子[1]，　石井　忠[3]，　今井友也[4]，長谷川友香[5]，大橋貴生[5]，藤山和仁[5]，◦石水　毅[1]（[1]立命館大生命，[2]阪大院理，[3]筑波大院生命環境，[4]京大生存研，[5]阪大生工国際セ）

2C16p18　Cloning, Expression and Characterization of Polygalacturonase from *Arabidopsis thaliana*

17:24　◦Nabilah Sari Mustafa[1], Ohashi Takao[1], Ishimizu Takeshi[2], Fujiyama Kazuhito[1]（[1]International Center for Biotechnology, Osaka Univ, [2]College of Life Sciences, Ritsumeikan Univ）

2C16p19　シロアリ腸内に共生する原生生物由来 GH26 β-マンナナーゼの構造学的解析

17:36　◦塚越　光[1]，　伏信進矢[1]，　小田切正人[2]，　守屋繁春[3,4]，北本勝ひこ[1]，有岡　学[1]（[1]東大院・農生科，[2]理研 BMEP，[3]横浜市立大，[4]理研基幹研）

A11 会場　午前の部（9:00〜12:00）

生物化学工学—酵素工学・生物反応工学，培養工学–微生物，動植物細胞—

2A11a01　糖類による，酵素の安定化

9:00　◦倉知聞多[1]，清水雅史[1]，寺田　聡[1]，小林恭一[2]，大浦　剛[2]，森山展行[3]，安川沙織[3]（[1]福井大工，[2]福井県食品加工研究所，[3]エルローズ）

2A11a02　代謝産物を基体とする酵素凍結変性抑制剤の開発

9:12　◦中川雄市，井上貴裕，甲元一也（甲南大 FIRST）

2A11a03　亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を選択マーカーとした微生物大量培養法の開発

9:24　◦小野敏志[1]，廣田隆一[2]，池田　丈[2]，黒田章夫[2]（[1]広島大工，[2]広島大院先端物質・分子生命）

2A11a04　不溶性セルロース分解に及ぼす Carbohydrate-binding Module family 1 吸着力の影響に関する研究

9:36　◦山崎大樹，野崎功一，水野正浩，荒井　勉，佐藤伸明，天野良彦（信州大・工）

2A11a05　新規なセルロース吸着機構をもつ Carbohydrate-binding Module Family 1 に関する研究

9:48　◦西島拓人，野崎功一，水野正浩，荒井　勉，佐藤伸明，天野良彦（信州大・工）

2A11a06　マルチウェルプレートを用いたカイコ蛹での組換えタンパク質生産

10:00　◦加藤竜也[1]，トンプソンジェームス[2]，朴　龍洙[1,3]（[1]静岡大農・応生化，[2]メイヨ医科大学，[3]静岡大・創科技院）

2A11a07　耐塩性シアノバクテリア *Arthrospira platensis* からの効率の良いグリコーゲン回収法の構築

10:12　◦中西昭仁，藍川晋平，蓮沼誠久，近藤昭彦（神戸大院工）

2A11a08　*Aureobasidium pullulans* M-2 を用いた β-glucan の発酵生産とその生産物の生物評価

10:24　◦浅田祐弘[1,2]，　守屋直幸[1]，　守屋祐生子[1]，　野村秀雄[2]，草野妃里[1]，内山博文[2]，岡部満康[2]，朴　龍洙[3]（[1]アウレオ東京事業部，[2]アウレオカズサ工場，[3]静大創科院）

2A11a09　Display of Neospora caninum Surface Protein Related Sequence 2 (NcSRS2) on Rous sarcoma Virus Derived gag Protein Virus-like Particles (VLPs)

10:36　◦Vipin Kumar Deo, Enoch Y Park, Tatsuya Kato, Jinhua Dong, Katsuhiko Yoshimatsu, Takahiro Otsuki（Shizuoka University）

2A11a10　パルス燃焼式乾燥による生菌乾燥に対する抗酸化剤の保護効果

10:48　◦平康博章，因野要一，西村和彦（大阪府立環農水総研）

2A11a11　超耐熱型好冷性ウリカーゼを用いた尿酸簡易測定法

11:00　◦日ビ隆雄[1]，伊藤貴文[1]，林　祐太[1]，西矢芳昭[2]（[1]福井県大，[2]摂南大）

2A11a12　無細胞タンパク質合成システムを用いたタンパク質合成に対する抗菌ペプチドの阻害効果

11:12　◦石山洋平[1]，　近藤裕志[2]，　落合秋人[2]，　田中孝明[2]，谷口正之[2]（[1]新潟大・人材育成セ，[2]新潟大・自然研）

2A11a13　抗菌活性能を有する D- アミノ酸含有ジペプチドの構造と活性の相関

11:24　◦磯田佳孝[1]，森　信寛[2]，有馬二朗[2]（[1]鳥取大院農，[2]鳥取大農）

2A11a14　D-,L-配列を有するジペプチド類の酵素合成と抗腫瘍活性ジペプチドの探索

11:36　◦田村　丹，岩崎　崇，森　信寛，有馬二朗（鳥取大農）

2A11a15　LPS 刺激細胞を用いた米由来抗菌 CL ペプチドの抗炎症作用の解析

11:48　◦谷口正之[1]，　橋本健司[1]，　田嶋幸司[1]，　杉山圭一[2]，加藤哲男[3]，落合秋人[1]，田中孝明[1]（[1]新潟大自然研，[2]国立衛生研変異，[3]東歯大化学）

A11 会場　午後の部（14:00〜16:48）

生物化学工学—ペプチド・タンパク質工学—

2A11p01　ファージディスプレイ法を用いた新規リグニン親和性ペプチドの探索

14:00　◦山口亜佐子[1,2]，渡辺隆司[1,2]（[1]京大生存研，[2]JST･CREST）

2A11p02　c-myc に作用し構造変化する Pin1-FRET 法の構築

14:12　◦岡部恵美子，日高将文，内田隆史（東北大農）

2A11p03　麹菌 hydrophobin RolA と cutinase CutL1 間の相互作用解析

14:24　◦對馬裕誠[1]，　村垣公英[1]，　上原健二[1]，　高橋　徹[2,3]，山形洋平[4]，阿部敬悦[1,2]（[1]東北大院・生物産業創成，[2]東北大・未来研，[3]酒総研・基盤，[4]東京農工大院農・応生化）

2A11p04　糸状菌由来の免疫回避機能性素材を用いた新規医療用ナノ粒子の開発 - ナノ粒子の性質について -

14:36　◦佐藤大貴[1]，　松村香菜[2]，　高橋慎太郎[3]，　高橋　徹[4]，村垣公英[1]，　石井恵子[2]，　川上和義[2]，　冨樫貴成[5]，　高見誠一[6]，阿尻雅文[6]，福本　学[6]，阿部敬悦[1,7]（[1]東北大院農，[2]東北大院医，[3]東北大・加齢研，[4]酒類研，[5]山形大理，[6]東北大・多元研，[7]東北大・未来研）

2A11p05　カブトムシディフェンシン改変ペプチドとリン脂質膜の表面プラズモン共鳴による相互作用解析

14:48　◦石橋　純[1]，　朝岡　愛[1]，　岩崎　崇[1]，　鈴木秀明[2]，永野富郎[2]，　中村　允[3]，　宮澤光博[1]，　山川　稔[1]（[1]農生資研，[2]JITSUBO 株式会社，[3]和歌山県工技セ）

2A11p06　ハロ酸脱ハロゲン化酵素（L-DEX YL）の基質認識部位の同定

15:00　◦出来弘幸，山根朋也，中村　卓（長浜バイオ大バイオサイエンス）

2A11p07　error prone PCR 法によるフルオロ酢酸分解能を有するハロ酸デハロゲナーゼの創製

15:12　◦中村　卓，阿衣尼沙沙它尔，山口明伸（長浜バイオ大バイオサイエンス）

2A11p08　タンパク質を提示した磁性粒子の簡便な作製法の開発と応用

15:24　◦椎原史裕[1]，　池田　丈[2]，　吾郷友哉[2]，　廣田隆一[2]，黒田章夫[2]（[1]広島大工，[2]広島大院先端物質・分子生命）

2A11p09　部位特異的ランダム変異による一本鎖抗体の可溶性発現能の改変

15:36　◦牧野祥嗣，伊藤伸哉（富山県大院生物工）

2A11p10　large oval aggregates に特異的なモノクローナル抗

体の作製と ELISA による反応性の評価

15:48 ○清水武則[1]，　吉宗一晃[2]，　小森谷友絵[3]，　秋山雄大[4]，神野英毅[3]（[1]日大院生産工・応化，[2]日大生産工・応化，[3]日大生産工・環境安全，[4](株)イムノ・プローブ）

2A11p11　ファージ提示法を用いた抗ネオスポラ抗体の開発及び原虫検出への応用

16:00 ○董　金華[1]，大月隆寛[2]，加藤竜也[2]，朴　龍洙[1,2]（[1]静大創造科学技術院，[2]静大農）

2A11p12　C 型肝炎ウイルスの抗 HCV コア細胞内抗体の発現と精製

16:12 ○山本　英[1]，ビピンクマールデオ[2]，加藤竜也[1]，鈴木哲朗[3]，朴　龍洙[1,2]（[1]静岡大院・農，[2]静岡大・創科技院，[3]浜医大・感染症学）

2A11p13　*Neospora caninum* 抗原タンパク質を提示したバキュロウイルスの作製とマウスの免疫化

16:24 ○大月隆寛[1]，董　金華[2]，加藤竜也[1]，高坂哲也[1]，朴　龍洙[2]（[1]静岡大・院・農，[2]静岡大・創科技院）

2A11p14　アレルゲンチップ開発を目指した組換えダニアレルゲンタンパク質 Der f 10 の *in vivo* 合成

16:36 ○前原大輝[1]，　佐藤正樹[1]，　曽根冬馬[2]，　山田　大[2]，長谷川忠大[2]，山下光雄[1]（[1]芝工大工・応化，[2]芝工大工・電気）

A12 会場　午前の部（9:00〜12:00）

食品―食品工学–製造工学―

2A12a01　ゼラチン/マルトデキストリン共存フィルムにおけるミクロ/マクロ相分離構造と物性の相関

9:00 ○齋藤健太[1]，釜口良誠[2]，水谷勝史[2]，中村　卓[1]（[1]明治大院農・農化，[2]森下仁丹(株)）

2A12a02　架橋程度の異なるタピオカ加工澱粉/卵白共存ゲルの破壊物性と破壊構造の解析

9:12 ○井之上明弘[1]，付　　惟[2]，小林佳祐[2]，中村　卓[1]（[1]明治大農・農化，[2]明治大院農・農化）

2A12a03　プロセスチーズの破壊物性と破壊構造の解析

9:24 ○井上慶太[1]，森口奈津美[2]，中村　卓[1]（[1]明治大農・農化，[2]明治大院農・農化）

2A12a04　グミキャンディにおけるアロマリリースへの相分離構造の影響

9:36 ○廣瀬修吾[1]，長谷部智久[1]，齋藤健太[2]，中村　卓[1]（[1]明治大農，[2]明治大院農）

2A12a05　食感の異なるパスタの破壊過程の可視化

9:48 ○佐藤　純，中村　卓（明治大院農）

2A12a06　酵素添加うどんの食感の差を破壊過程における構造と物性の変化からみえる化する

10:00 ○青山博明[1]，　中村　卓[1]，　渡部幸一郎[2]，　岡本　武[2]，熊澤義之[2]（[1]明治大院農・農化，[2]味の素株式会社・食品研究所）

2A12a07　サトウヤシとサゴ澱粉の物理化学的性質の比較

10:12 アダヴィヤデデ[1,2]，　佐々木朋子[1]，　阿久澤さゆり[3]，○神山かおる[1]（[1]農研機構・食総研，[2]インドネシア・ボゴール農大・食品，[3]東京農大・応用）

2A12a08　口腔および咽頭部での野菜ジュースの嚥下時の挙動

10:24 ○森高初恵[1]，　高松のぞみ[1]，　橘　宏美[1]，　北出昌美[1]，沢村信一[2]，　小林　誠[2]，　矢作裕子[2]，　小野高裕[3]，　田峰謙一[3]，堀　一浩[4]（[1]昭和女大院生，[2]伊藤園・中央研，[3]大阪大院歯，[4]新潟大院歯）

2A12a09　シアン化水素の除去による梅酒中のカルバミン酸エチルの低減

10:36 ○橋口知一，伊豆英恵，松丸克己（酒総研）

2A12a10　埼玉県産小麦の香気成分分析

10:48 ○成澤朋之[1]，小島登貴子[1]，山田昌治[2]（[1]埼玉産技セ北部研，[2]工学院大工）

2A12a11　調理時における塩の溶解性および浸透挙動の計測システムの開発

11:00 ○石川匡子[1]，　築舘亜由美[2]，　鈴木　晶[1]，　菅原弘人[1]，秋山美展[1]（[1]秋田県立大生物資源，[2]秋田県立大院生物資源）

2A12a12　水溶液中のグリシンオリゴマーの粘度 B 係数と部分モル比容の温度変化と水和数の解析

11:12 ○佐藤之紀[1]，岩切恵梨奈[1]，花垣　恵[1]，宮脇長人[2]（[1]県立広島大生命環，[2]石川県大生資環）

2A12a13　食品高分子のゾルゲル転移に及ぼす水分活性の影響

11:24 ○松平景子，宮脇長人（石川県大院生資環）

2A12a14　水溶液中におけるアスコルビン酸の酸化反応の速度論的解析

11:36 ○井上絵里加，宮脇長人（石川県大院生資環）

2A12a15　タンパク質凍結変性の速度論的解析

11:48 ○西野裕貴，宮脇長人（石川県大生資環）

A12 会場　午後の部（14:00〜17:48）

食品―食品工学–加工学―

2A12p01　米粉パンの老化に及ぼすアミロペクチン再結晶化の影響

14:00 ○佐々木朋子，神山かおる，宮下香苗，奥西智哉（(独)農研機構・食総研）

2A12p02　国産超強力小麦から分離したグルテンの添加による製パン性の改良

14:12 ○長澤幸一[1]，　西尾善太[1]，　伊藤美環子[1]，　村山隆二[2]，金藤岳夫[2]，田引　正[1]（[1]農研機構　北農研，[2]長田産業）

2A12p03　アルギン酸類の製パン性への影響について

14:24 ○茂木菜月[1]，　宮島千尋[1]，　笠原文善[1]，　田原　彩[2]，諏訪知世子[2]，瀬口正晴[2]（[1]株式会社キミカ，[2]神女大・家政）

2A12p04　乾熱処理小麦粉による小麦粉／水，およびオイル懸濁液の示すアミログラフ粘度変化（室温）について

14:36 ○田原　彩[1]，　米山瑤子[1]，　松井悠子[2]，　井上琢也[2]，瀬口正晴[1]（[1]神女大家政，[2]森永製菓(株)）

2A12p05　冷凍ドウによる製パン性劣化と多糖類添加によるその回復について

14:48 ○瀬口正晴，森元直美，今岡奈月，田原　彩（神戸女子大）

2A12p06　真空冷却パンの品質に及ぼすパンクラムの冷却速度の影響について

15:00 ○野口智弘[1]，　伊藤康平[2]，　早崎美衣奈[3]，　伊賀大八[4]，井上好文[4]，内野昌孝[3]，高野克己[3]（[1]東京農大応生・食加技セ，[2]東京農大院農・農化，[3]東京農大応生・化学，[4]日本パン技研）

2A12p07　スパゲティの香気成分と製造工程の関係について

15:12 ○山田昌治，岩瀬翔太郎，海老名めぐみ，杉山健二郎（工学院大学工）

2A12p08　高温乾燥によるパスタの食感の変化には澱粉自体の変化も寄与する

15:24 ○小林佳祐，中村　卓（明治大院農・農化）

2A12p09　異なる品種における米内在性デンプン分解酵素の米粒内分布

15:36 ○大倉哲也[1]，露久保美夏[2]，香西みどり[2]（[1]食総研，[2]お茶大院・人間文化）

2A12p10　各種結晶セルロース製剤の小麦粉生地と製品におよぼす影響

15:48 ○前田智子[1]，細見恵莉子[1]，林　祐司[2]（[1]兵庫教育大院，[2]旭化成ケミカルズ(株)）

2A12p11　高圧処理した玄米中の成分組成の変化

16:00 ○藤井華蓮，和田憲明，藤田智之（信州大院農）

2A12p12　落花生アレルゲンの高圧力下での酵素消化に及ぼすシステインの影響

16:12 ○山本和貴[1]，増山啓吾[2]，北河栄一[2]，八巻幸二[1]（[1]農研機構食総研，[2]ソントン食品工業）

2A12p13　トランスグルタミナーゼ含有ゼラチンを活用した徐放性粉末魚油の開発

16:24 ○青木茂太[1]，　仲川清隆[1]，　松本俊介[2]，　阿久津光紹[2]，庄子真樹[3]，　君塚道史[4]，　金内　誠[4]，　下山田真[4]，　西川正純[4]，宮澤陽夫[1]（[1]東北大院農・機能分子解析，[2]青葉化成(株)，[3]宮城県産技セ，[4]宮城大食産業）

2A12p14　麹菌によるアクリルアミドフリーのコーヒー飲料の開発

16:36 ○原　一浩[1]，　岩井和也[1]，　福永泰司[1]，　中桐　理[1]，坪井宏和[2]，坊垣隆之[2]，佐野元昭[3]，尾関健二[3]（[1]UCC R&D センター，[2]大関総研，[3]金工大院・バイオ化学）

2A12p15　血圧上昇の心配ない機能性京漬物の開発

16:48 森　義治[2]，　○今西貴紀[1]，　山根吉人[1]，　上野義栄[3]，

小田耕平[4]（[1](株)本田味噌本店, [2](株)もり, [3]京都府中小企業技術セ, [4]京工繊大）

2A12p16　カンボジア伝統水産発酵食品の成分評価と機能性

17:00　◦塩本望萌[1]，　チュオンモニ[1]，　小柳　喬[1]，　笹木哲也[2]，道畠俊英[2]，チャンサルン[3]，マオソフィアレス[3]，榎本俊樹[1]（[1]石川県大食科，[2]石川県工試化学食品，[3]カンボジア農林水産省）

2A12p17　Microbiological characterization of Cambodian traditional fermented fish products

17:12　◦Mony Roth Chuon[1]，　Koyanagi Takashi[1]，Mimoe Shiomoto[1]，　Tetsuya Sasaki[2]，　Toshihide Michihata[2]，Sarun Chan[3]，　Sophеareth Mao[3]，　Toshiki Enomoto[1]（[1]Dept. Food Sci., Ishikawa Pref. Univ., [2]Indus. Res. Inst. Ishikawa., [3]Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries）

2A12p18　かき玉形成への剪断の影響と卵白の寄与

17:24　◦伊與田哲也[1]，　星野　貴[2]，　滝田裕二[2]，　山口祐輝[2]，五十部誠一郎[3]（[1]明治大院農，[2](株)フロンティアエンジニアリング，[3](独)農研機構・食総研）

2A12p19　プロセスチーズの構造と物性へのプレクックチーズ添加の影響

17:36　◦渡部友里香[1]，　井上慶太[1]，　森口奈津美[2]，　柳沢有哉[3]，武藤高明[3]，芳　一尚[3]，中村　卓[1]（[1]明治大農・農化，[2]明治大院農・農化，[3]雪印メグミルク株式会社・ミルクサイエンス研究所）

A15 会場　午前の部（9:00〜11:24）

食品―食品化学–糖質，脂質―

2A15a01　アラキドン酸等の有用脂質の探索：アメフラシなど数種の海洋軟体動物中の脂質

9:00　◦齋藤洋昭[1]，井岡　久[2]，久保弘文[3]（[1]中央水産研究所，[2]島根県水産技術センター，[3]沖縄県水産海洋研究センター）

2A15a02　北海道産針葉樹に含まれる PPAR α / γ デュアルアゴニストの探索

9:12　◦佐藤真由美[1]，大久保剛[2,3]，本島清人[3]（[1]北林産試，[2]日油株式会社，[3]明治薬大）

2A15a03　パプリカ色素，およびパプリカに含まれるカロテノイドの肥満による疾患の予防・改善作用

9:24　◦中村　望，前多隼人（弘前大学農学生命科学）

2A15a04　クロレラの摂取がヒト血液中のカロテノイド組成に与える影響

9:36　◦宮澤大樹[1]，　仲川清隆[1]，　中嶋裕也[2]，　丸山　功[2]，宮澤陽夫[1]（[1]東北大院農・機能分子解析，[2]クロレラ工業）

2A15a05　高尿酸モデルラットと軽度高尿酸血症患者において β-クリプトキサンチン摂取は尿酸値を低下させる

9:48　◦白倉義之，高柳勝彦，向井克之（ユニチカ(株)　中央研究所）

2A15a06　植物スフィンゴ脂質代謝物がヒト腸管モデル細胞に与える影響

10:00　◦坪谷朗行[1]，　木下幹朗[2]，　荒井克仁[3]，　間　和彦[4]，大西正男[5]（[1]帯広畜産大・食品，[2]帯広畜産大・食品，[3]岩手大院・連農，[4]日本製粉・中研，[5]帯広畜産大・食品）

2A15a07　苦味抑制物質としての脂肪酸の作用機序の解明

10:12　◦本間亮丞[1]，　山下治之[1]，　石丸喜朗[1]，　阿部啓子[1,2]，朝倉富子[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]神奈川科学技術アカデミー）

2A15a08　リパーゼを用いた米油中の γ-オリザノールの濃縮

10:24　◦井上良計[1]，　植向直哉[2]，　川上晃司[2]，　徳井圭裕[2]，畑中唯史[3]，永尾寿浩[4]（[1]リピッドラボ，[2](株)サタケ，[3]岡山生物研，[4]阪市工研）

2A15a09　共役トリエン構造をもつジャカル酸は生体内で共役リノール酸に速やかに代謝される

10:36　◦木島　遼[1]，　都築　毅[1]，　山崎正夫[2]，　池崎　綾[2]，元永千尋[2]，西山和夫[2]，池田郁男[1]（[1]東北大院・農，[2]宮崎大・農）

2A15a10　高アミロース米澱粉の膨潤力・溶解度および溶出糖の構造特性について

10:48　◦中浦嘉子，　齋藤彰浩，　横関みなみ，　山田崇弘，藤田大輔，中尾恵子，井ノ内直良（福山大・生命工）

2A15a11　異なる米から調製した米飯の性状変化

11:00　◦渡邊　香[1]，川原真由美[2]，辻井良政[3]，高野克己[2]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・化学，[3]アルファー食品株式会社）

2A15a12　高スクロース食摂取 KK-A^y マウスの腸内細菌叢と肝臓障害

11:12　◦尾崎桃子[1]，　杉本圭一郎[2]，　中川一弥[2]，　副島友莉恵[3]，熊谷有紗[3]，　高橋芳久[3]，　福里利夫[3]，　山内俊一[3]，　庄條愛子[4]，原田直樹[1]，中野長久[1,5]，乾　博[6]，山地亮一[1]（[1]大阪府大院・生命環境，[2]長岡香料・技開研，[3]帝京大・医，[4]相愛大・人間発達，[5]大阪女子短大，[6]大阪府大・栄養）

A15 会場　午後の部（14:00〜17:48）

食品―食品化学–タンパク質，アミノ酸―

2A15p01　米胚乳タンパク質調製時の加熱処理が収率および保水性にあたえる影響

14:00　◦近藤葉月[1]，平塚貴政[1]，藤井幹夫[1]，門脇基二[2]（[1]亀田製菓，[2]新潟大院・自然研）

2A15p02　ε - ポリリシンとの複合体化による β-コングリシニンの機能改変

14:12　◦濱路育美，橋本健史，好田　正，高橋幸資，服部　誠（東京農工大院農）

2A15p03　コメデンプン表層タンパク質が生デンプン分解性に及ぼす影響

14:24　◦芳原章太[1]，　岡　大貴[2]，　野口治子[3]，　野口智弘[2]，高野克己[3]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・食加技セ，[3]東京農大応生・化学）

2A15p04　アルカリ加熱処理により脱アミド化した米糠タンパク質のアミノ酸組成分析

14:36　◦関ケイトウ[1]，　高井龍之介[1]，　永沼孝子[1]，　小川智久[1]，村本光二[1]，　Chi Hyun[2]，　Cho Seong-Jun[2]（[1]東北大生命，[2]CJ Foods R&D）

2A15p05　Proteomics analysis of rice grain proteins with 2D-DIGE combined with multiplex immunodetection

14:48　◦Gang-hua LANG，Yukari KAGIYA，Kazumi KITTA（NFRI）

2A15p06　ブラックタイガーに含まれるマイナーアレルゲン（ミオシン軽鎖）に関する研究

15:00　◦菰田俊一[1,2]，　アンドレアスロパタ[2,3]（[1]宮城大学食産業，[2]RMIT 大学，[3]ジェームスクック大学）

2A15p07　ソバアルブミンの α-アミラーゼ阻害活性およびその血糖値上昇抑制効果

15:12　◦茂木　崇[1]，　二宮和美[1]，　雨森秀介[1]，　瀬上雅人[1]，赤尾　真[1]，熊谷　仁[2]，熊谷日登美[1]（[1]日大院・生資科，[2]共立女子大・家政）

2A15p08　発酵キョウバクに含まれる有効成分の同定と降圧作用

15:24　◦小山正浩[1]，　石田竜也[2]，　楢本恭子[2]，　猪狩直樹[3]，中村浩蔵[2]（[1]信州大院総合工，[2]信州大院農，[3]大和薬品(株)）

2A15p09　発酵キョウバク由来ペプチドの降圧メカニズム

15:36　◦石田竜也[1]，　小山正浩[2]，　服部成治[1]，　猪狩直樹[3]，中村浩蔵[1]（[1]信州大院農，[2]信州大院総合工，[3]大和薬品(株)）

2A15p10　可食性バイオハイブリッドの創出による β-ラクトグロブリンの機能改変

15:48　◦松尾悠歩，好田　正，高橋幸資，服部　誠（東京農工大学院農）

2A15p11　ローヤルゼリータンパク質アピシン及びその構成成分のヒト組織球性リンパ腫細胞株（U937）の増殖に対する作用

16:00　◦仙波美紗，上妻由章，米倉政実（茨城大院農）

2A15p12　カキ果実に含まれるキチナーゼの同定と精製

16:12　國井沙織[1]，　片桐実菜[2]，　山西妃早子[2]，　尾崎嘉彦[1]，◦森本康一[1]（[1]近畿大生物理工，[2]和歌山県工技センター）

2A15p13　3-deoxyosone 修飾タンパク質の配列解析

16:24　◦石渡まどか[1]，臼井照幸[2]，渡辺寛人[3]，早瀬文孝[1]（[1]明治大農・農化，[2]昭和学院短大・ヘルスケア栄養，[3]明治大農・生命科）

2A15p14　グリセルアルデヒド修飾タンパク質が示す細胞毒性は，「GLAP 構造」によるものである

16:36　◦山岸　理[1]，臼井照幸[2]，渡辺寛人[3]，早瀬文孝[1]（[1]明治大農・農化，[2]昭和学院短大・ヘルスケア栄養，[3]明治大農・生命科）

2A15p15　α-tocopherol によるアマドリ化合物の分解作用の解析
16:48　○木村圭一[1]，臼井照幸[2]，渡辺寛人[3]，早瀬文孝[1]（[1]明治大農・農化，[2]昭和学院短期大・ヘルスケア栄養，[3]明治大農・生命科）

2A15p16　D-キシロース− β-アラニン系メイラード反応で生成する新奇赤色色素の同定
17:00　○伊藤恵介[1]，渡辺寛人[2]，早瀬文孝[1]（[1]明治大農・農化，[2]明治大農・生命科）

2A15p17　D-キシロース-グリシン系メイラード反応により生成する新奇青色色素化合物の同定
17:12　○横関俊昭[1]，渡辺寛人[2]，早瀬文孝[3]（[1]明治大院農・農化，[2]明治大農・生命科，[3]明治大農・農化）

2A15p18　D-Xylose-Glycine 系メイラード反応より生成する青色色素 Blue-M1 の褐変機構の解析
17:24　○高井良輔[1]，渡辺寛人[2]，早瀬文孝[1]（[1]明治大農・農化，[2]明治大農・生命科）

2A15p19　動物行動学に基づいたうま味の相乗効果評価
17:36　○河合崇行，日下部裕子（農研機構　食品総合研究所）

A16 会場　午前の部（9:00〜12:00）

食品—食品機能・栄養–酸化，抗酸化，老化—

2A16a01　亜臨界水抽出による緑茶の苦渋味抑制作用に関する化学的研究
9:00　○宮下知也[1]，衛藤英男[2]，岡村拓哉[3]，木戸康嗣[4]（[1]静大院バイオ，[2]静大農，[3]静大農，[4]静大農）

2A16a02　沖縄県北部　ヤンバル地方の植物“サクラバ”の機能性成分の検討
9:12　○伊波幸紀[1]，當山瑛子[2]，藏屋英介[3]，池松真也[4]（[1]沖縄工業高等専門学校，[2]沖縄工業高等専門学校，[3]沖縄工業高等専門学校，[4]沖縄工業高等専門学校）

2A16a03　竹由来の抗酸化性物質について
9:24　○西澤正平，山下雅大，椎葉　究（東京電機大理工）

2A16a04　竹・松廃材のリグニン成分からの抗酸化物質について
9:36　○倉掛昌裕，廣津紗弥，芝田美幸（福山大生命）

2A16a05　高知県産のイタドリ中のレスベラトロールおよびその配糖体の含量
9:48　○栗田せりか，柏木丈拡，島村智子，受田浩之（高知大･農）

2A16a06　シュタインメッツ粉を用いたパンの抗酸化能について
10:00　○角川幸治[1]，　村上　香[1]，　塩満裕斗[1]，　藤尾勇介[1]，庄林　愛[2]（[1]広島工業大生命・食品生命，[2]アンデルセン・パン生活文化研究所）

2A16a07　ラジカル消去反応におけるチオール化合物と各種抗酸化物の併用効果
10:12　○山元涼子[1]，　藤田　睦[1]，　山内良子[1]，　島村智子[2]，柏木丈拡[2]，受田浩之[2]，穐山　浩[3]，松井利郎[4]，石川洋哉[1]（[1]福岡女子大国際文理，[2]高知大農，[3]国立衛研，[4]九大院農）

2A16a08　チオールによるフラボノイドの抗酸化性増強効果—成分間反応物からの解析—
10:24　○三浦ゆか理，稲井美由紀，増田俊哉（徳島大院総合）

2A16a09　オキシミオグロビン酸化に対するポリフェノールの効果—脂質の共存，非共存条件での検討—
10:36　○稲井美由紀[1]，山内　聡[2]，増田俊哉[1]（[1]徳島大院総合，[2]愛媛大農）

2A16a10　チオレドキシン高含有酵母抽出物によるタバコ煙からの唾液酵素の酸化保護効果
10:48　○伊井野貴史，山下裕輔，丸　勇史，金　武祚（(株)ファーマフーズ）

2A16a11　培養動物細胞に及ぼす白金ナノ粒子の抗酸化効果
11:00　○浜崎武記[1]，　中西秀和[2]，　山川智寛[2]，　金城智也[2]，樺山　繁[3]，照屋輝一郎[1,2]，白畑實隆[1,2]（[1]九大農院，[2]九大シス生，[3]日本トリム）

2A16a12　水素分子及び白金ナノ粒子による HL60 細胞のアポトーシス誘導機構の解析
11:12　○村田みさと[1]，　福永有紗[1]，　中西　恵[1]，　濱崎武記[2]，樺山　繁[3]，照屋輝一郎[1,2]，白畑實隆[1,2]（[1]九大院･シス生･生命工，[2]九大院・農院・生機科，[3](株)日本トリム）

2A16a13　アントシアニジンの生体膜保護作用
11:24　○原口博行，森定敬雅，神林大樹（福山大生命工）

2A16a14　カルノシンによる Caco-2 細胞の機能制御
11:36　○門岡桂史[1]，松本貴之[2]，森松文毅[2]，片倉喜範[1,3]（[1]九大院生資環，[2]日ハム中研，[3]九大院農院）

2A16a15　マガキ由来の新規抗酸化物質における肝保護作用
11:48　○布田博敏[1]，　渡邉　貢[2]，　神　繁樹[1]，　惠　淑萍[1]，武田晴治[1]，櫻井俊宏[1,3]，渡邉孝之[2]，千葉仁志[1]（[1]北海道大学大学院　保健科学研究院，[2]渡辺オイスター研究所，[3]日本学術振興会特別研究員 DC）

A16 会場　午後の部（14:00〜18:00）

食品—食品機能・栄養–酸化，抗酸化，老化—

2A16p01　出芽酵母 LOH 系ならびにヒト培養細胞突然変異検出系を用いた青森県産カシスの DNA 損傷抑制効果の解析
14:00　○山本　歩[1]，　廣内篤久[2]，　中嶋　奏[1]，　川守田早織[1]，上平好弘[3]，加藤陽治[4]（[1]八戸工業高等専門学校物質工学科，[2]環境科学技術研究所生物影響研究部，[3]弘前大学地域共同センター，[4]弘前大学教育学部）

2A16p02　アンチエイジング乳酸菌による結腸ガン細胞抑制効果
14:12　○原田額郎[1]，松本貴之[2]，森松文毅[2]，片倉喜範[3]（[1]九大院シス生，[2]日ハム中研，[3]九大院農院）

2A16p03　抗酸化酵素 SOD1 を欠損する細胞を用いた抗酸化物質の新規評価法
14:24　○井内良仁[1]，柳井　彩[1]，井料由香里[1]，藤井順逸[2]（[1]山口大農，[2]山形大院医）

2A16p04　亜鉛セレン複合栄養機能食品による肝線維化抑制効果についての動物モデルでの検討
14:36　○河野　透[1,3]，　久保田悟[2]，　野崎怜雄[1]，　田村彰吾[3]，森山隆則[3]（[1]旭川医大，[2](株)メディコ・コンスル，[3]北海道大学）

2A16p05　抗糖尿病効果を示す天然還元水の機能評価法の開発
14:48　○山川智寛[1]，　濱崎武記[2]，　成田義篤[3]，　金城智也[1]，中西秀和[1]，石井嘉時[4]，照屋輝一郎[1,2]，白畑實隆[1,2]（[1]九大院シス生･生命工，[2]九大院農院･生機科，[3]九大院･生資環･生機科，[4](株)日田天領水）

2A16p06　アルコール代謝におけるフルボ酸の影響
15:00　○安部直之，山口達明，滝口泰之（千葉工業大院工）

2A16p07　黒大豆ポリフェノールのアルコール摂取時における肝機能保護作用
15:12　○難波文男，伊藤千秋，吉田　正，戸田登志也（フジッコ株式会社）

2A16p08　りんごポリフェノールは心筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスにおいて活性酸素の生成を抑制する
15:24　○佐見　学[1]，　砂川忠広[1]，　田頭素行[1]，　神田智正[1]，中谷晴昭[2]，白澤卓二[3]，清水孝彦[2]（[1]アサヒグループ HD，[2]千葉大院医，[3]順天大院医）

2A16p09　筋萎縮抑制作用を有する食品成分の探索（I）
15:36　○坂田穏行，大塩和孝，中村浩彦，難波和美，武田安弘（森永乳業・栄科研）

2A16p10　筋萎縮抑制作用を有する食品成分の探索（II）
15:48　○大塩和孝，坂田穏行，中村浩彦，難波和美，武田安弘（森永乳業・栄科研）

2A16p11　酸化リン脂質（PCOOH）のヒト肝癌細胞由来 HepG2 における代謝と生理作用
16:00　○鈴木優里，加藤俊治，仲川清隆，宮澤陽夫（東北大院農）

2A16p12　α-tocopherol・α-tocotrienol の膜マイクロドメインへの局在性とコレステロール過酸化反応抑制
16:12　○中村俊之，野間絢子，寺尾純二（徳島大院・HBS）

2A16p13　ヘミン触媒によるホスファチジルコリンヒドロペルオキシドの分解に対する α-トコフェロールの作用
16:24　○渡辺しおり，岩本悟志，山内　亮（岐阜大院応用生物）

2A16p14　ラット小腸上皮細胞におけるレモンフラボノイドの取り込みと酸化ストレスに対する保護作用
16:36　○山本涼平[1]，熊石朱純[2]，栗田彩華[2]，松本俊平[2]，武藤徳男[2]（[1]県広大院生命，[2]県広大生環）

2A16p15　異物抱合酵素発現酵母を用いたフラボノイド抱合体の

調製

16:48 ○生城真一，長谷川崇，黒田将司，西川美宇，鎌倉昌樹，榊　利之（富山県大・工・生物工学）

2A16p16　紫菊花えんめい楽粉末摂取による皮膚の UV 損傷防護

17:00 ○中島加奈子[1]，KHATUN MST Afifa[2]，原　英郎[3]，小西徹也[1]（[1]新潟薬大･産官学連携推進センター，[2]新潟薬大，[3](株)ユニアル）

2A16p17　ヒト皮膚細胞への UVB 誘導ダメージに対するマンギフェリンの防御効果

17:12 ○佐竹大樹[1]，新井浩司[1]，野村義宏[1]，矢ヶ崎一三[2]，西山敏夫[1]（[1]東農工大・農・硬蛋白研，[2]東農工大・院・応用生命）

2A16p18　コラーゲン加水分解ペプチドの UV 損傷マウス皮膚への影響

17:24 ○神保希望[1]，杉原富人[2]，小泉聖子[2]，井上直樹[2]，渡部睦人[1]，野村義宏[1]（[1]東農工大農・硬蛋研，[2]新田ゼラチン株式会社・ペプチド開発部）

2A16p19　光老化マウスの皮膚における *Bifidobacterium breve* B-3 株の保護効果

17:36 ○佐藤拓海，村田麻衣，近藤しずき，小田巻俊孝，若林裕之，山内恒治，清水金忠，阿部文明（森永乳業株･食基研）

2A16p20　生クリームの光酸化に対する新規抗酸化製剤の作用

17:48 ○門脇章夫[1]，檜山真一郎[1]，山本幸弘[2]，原　節子[2]，前田祥貴[1]（[1]太陽化学，[2]成蹊大理工）

A20 会場　午前の部（9:00〜12:00）

食品―食品機能・栄養–脂質代謝―

2A20a01　日本食の長期摂取がマウスの脂質代謝調節機能に与える影響

9:00 ○本間太郎[1]，治部祐里[2]，川上祐生[2]，都築　毅[1]，池田郁男[1]（[1]東北大院・農，[2]岡山県大・保福）

2A20a02　授乳期における母親のコレステロールの過剰摂取は子供の脂肪肝発症リスクを増加させる

9:12 ○伊藤隼哉，都築　毅，池田郁男（東北大院・農）

2A20a03　マウスにおけるレスベラトロール誘導体の摂食抑制および脂肪蓄積抑制作用の検討

9:24 ○茶山和敏[1]，横山晴圭[1]，土井　聡[2]，松川泰治[2]（[1]静岡大農，[2]UHA 味覚糖）

2A20a04　飼料組成の異なる試験食給餌後のラット肝臓での脂肪酸合成酵素 mRNA 量の変化

9:36 ○我妻紀代恵，白川　仁，駒井三千夫（東北大･院農･栄養）

2A20a05　外因性酸化コレステロールの体内動態と有害作用の解明

9:48 ○照沼彰一郎，細野佑紀子，長田恭一（明治大農）

2A20a06　魚油とフコキサンチンの併用による食事性肥満マウスに対する抗肥満作用

10:00 ○菅野翔伍，本間公博，前多隼人（弘前大農）

2A20a07　食事誘導性肥満ラットに対する多穀麹の効果

10:12 ○井口隆文[1]，川田あゆみ[1]，瀬川貴之[1]，渡辺敏郎[1]，山本　明[1]，加藤範久[2]（[1]ヤエガキ醗酵技研，[2]広島大院・生物圏科学）

2A20a08　*Lactobacillus amylovorus* CP1563 株のマウス体脂肪蓄積抑制効果

10:24 石田　優[2]，○菅原智詞[1]，澤田大輔[3]，藤原　茂[1]（[1]カルピス(株)･発酵研，[2]カルピス(株)･品質保証・環境部，[3]カルピス(株)･商開セ）

2A20a09　柿 3 品種の機能性比較

10:36 ○松本健司，武川加奈子（石川県大生資環）

2A20a10　柿果皮抽出物投与が肥満 2 型糖尿病モデル KK-Ay マウスに及ぼす影響

10:48 ○井土良一[1]，高橋　徹[1]，牛尼翔太[2]，石島智子[2]，阿部啓子[2]，中井雄治[2]（[1](公財）東洋食品研究所，[2]東京大院農生命科・応生化）

2A20a11　食後の血中脂質に対するヤムイモおよびその含有成分ジオスゲニンの効果

11:00 ○三好規之，平田　隼，新井英一，大島寛史（静県大院薬食生命科学総合学府）

2A20a12　メープルシロップ抽出物が 2 型糖尿病モデルマウス白色脂肪組織の遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響

11:12 ○原田尚志[1]，石島智子[1]，阿部啓子[1,2]，中井雄治[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]KAST）

2A20a13　Flavan 3-ols 反復投与は骨格筋のミトコンドリア新生を促す

11:24 ○渡辺尚貴，稲川広大，越阪部奈緒美（芝浦工大シス理工）

2A20a14　*Lactobacillus gasseri* SBT2055（ガセリ菌 SP 株）が，高トリアシルグリセロール血症を伴う過体重の日本人の食後脂質代謝に及ぼす影響

11:36 ○小川哲弘[1,2]，門岡幸男[2]，加藤　健[2]，中島　肇[2]，城内文吾[1]，佐藤匡央[1]（[1]九州大学大学院農学研究院，[2]雪印メグミルク(株)ミルクサイエンス研究所）

2A20a15　ターミナリアベリリカ®による食後中性脂肪上昇抑制の検討

11:48 ○長澤早紀[1]，高野　晃[1]，神谷智康[1]，池口主弥[1]，高垣欣也[1]，岩松　葵[2]，安本早穂子[2]，奥島綾夏[3]，宮田　優[2]，田丸靜香[2]，田中一成[3]（[1](株)東洋新薬，[2]長崎県大・栄養健康，[3]長崎県大院・人間健康科学）

A20 会場　午後の部（14:00〜17:12）

食品―食品機能・栄養–脂質代謝―

2A20p01　プロリン異性化酵素 Pin1 阻害剤のハイスループットスクリーニングによる，脂肪細胞分化抑制効果を有する海藻ポリフェノールの同定

14:00 ○生地紘子[1]，森　正[1]，吉澤いぶき[1]，林　宜瑾[1]，豊原治彦[2]，奥田　徹[3]，内田千代子[4]，山下まり[1]，内田隆史[1]（[1]東北大院農，[2]京都大院農，[3]玉川大学術研，[4]福島大）

2A20p02　緑藻由来シフォナキサンチンの脂肪細胞分化抑制作用

14:12 ○李　卓思[1]，藤田絵里子[1]，大久保剛[2]，橋爪　論[2]，菅原達也[1]，平田　孝[1]（[1]京大院農，[2]日油(株)）

2A20p03　ラクトフェリンのヒト脂肪由来幹細胞に対する脂肪細胞分化抑制作用

14:24 ○江島晃佳[1]，岸田綱郎[1]，小野知二[2,3]，村越倫明[1,2]，西野輔翼[1,4]，松田　修[1]（[1]京都府立医科大学，[2]ライオン株式会社，[3]横浜市立大学，[4]立命館大学）

2A20p04　ブルーベリー葉抽出物が脂肪細胞の機能に及ぼす影響

14:36 ○松山勇介[1]，甲斐孝憲[2]，亀長浩蔵[2]，竹下正彦[3]，菊地幸治[3]，松浦　靖[4]，柚木崎千鶴子[4]，西山和夫[1]，山崎正夫[1]（[1]宮崎大農応生，[2](株)なな葉コーポレーション，[3]南日本酪農共同(株)，[4]宮崎県食品開発センター）

2A20p05　α-リポ酸によるアンジオポエチン様タンパク質 2 の産生抑制作用

14:48 ○久米田翔子，山崎正夫，西山和夫（宮崎大院農）

2A20p06　培養骨格筋細胞の脂肪酸酸化を促進する食品成分の探索

15:00 ○阿部大吾，齋藤　武，野方洋一（農研機構･近中四農研）

2A20p07　ニガハッカ（*Marrubium vulgare* L.）からの PPAR γ アゴニスト活性物質の探索

15:12 ○大寺杏奈[1]，宮前友策[1]，仲井奈緒美[1]，荒川武明[2]，平澤　明[2]，河内　敦[3]，川田清和[3]，HAN Junkyu[3]，礒田博子[3]，MOHAMED Neffati[4]，前嶋一宏[5]，秋田　徹[5]，森　直樹[6]，入江一浩[6]，神戸大朋[1]，増田誠司[1]，永尾雅哉[1]（[1]京大院･生命，[2]京大院･薬，[3]筑波大･生命環境，[4]IRA，[5]日本新薬，[6]京大院･農）

2A20p08　クルクミン代謝物がヒト肝癌細胞 HepG2 に与える影響の評価

15:24 ○庄司　求[1]，仲川清隆[1]，渡辺章夫[1,2]，都築　毅[1]，宮澤陽夫[1]（[1]東北大院農，[2]日本食品分析センター）

2A20p09　胆汁酸受容体 TGR5/FXR デュアルモジュレイターとしてのトリテルペノイド化合物の構造活性相関解析

15:36 ○佐藤寛之[1,2]，井口裕介[3]，宇根瑞穂[3]，松田久司[4]（[1]生理研･発達生理，[2]愛媛大･総合科学研究支援センター，[3]広島国際大･薬，[4]京都薬科大・薬）

2A20p10　Oxygenated fatty acids produced by *Lactobacillus plantarum* decrease LXR α-induced SREBP-1c expression resulting in cellular triacylglycerol reduction in HepG2 cells

15:48 ○THARNATH NANTHIRUDJANAR[1]，YOUNG-IL KIM[2]，TSUYOSHI GOTO[2]，NOBUYUKI TAKAHASHI[2]，

TERUO KAWADA[2], SI-BUM PARK[3], SHIGENOBU KISHINO[3], JUN OGAWA[3], TATSUYA SUGAWARA[1], TAKASHI HIRATA[1] ([1]Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [3]Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

2A20p11　3T3-L1 細胞における脂肪蓄積に伴う脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸組成の変化

16:00　○有澤琴子，市　育代，藤原葉子（お茶大院・ライフ）

2A20p12　必須脂肪酸欠乏時に産生される脂肪酸の産生経路とリン脂質における分布

16:12　○市　育代，芳賀静香，有澤琴子，山野美怜，藤原葉子（お茶大院・ライフ）

2A20p13　トランス脂肪酸が遺伝子発現制御に及ぼす影響

16:24　○高畠暁子[1]，　中村豊一[1]，　VO Nguyet Thi Anh[1]，有井康博[2]，井澤真吾[1]（[1]京都工繊大･応生，[2]武庫女大･生活環境）

2A20p14　中枢神経系におけるアポ E 含有 HDL の生成及び代謝メカニズム

16:36　○藤野貴広（愛媛大総科研）

2A20p15　グルコシルセラミドとその構成成分の炭素安定同位体比の測定

16:48　○原口浩幸[1]，　山田桂大[2]，　宮下留美子[1]，　間　和彦[1]，大西正男[3]，吉田尚弘[2]（[1]日本製粉(株)　中央研究所，[2]東工大院総理工　化学環境学，[3]帯広畜大　食品科学研究部門）

2A20p16　ヒト胎盤組織の脂肪酸組成分析－疫学調査試料としての妥当性の検討－

17:00　○山崎潔大[1]，　木村ふみ子[1]，　有馬隆博[2]，　仲井邦彦[2]，仲川清隆[1]，宮澤陽夫[1]（[1]東北大院農･機能分子解析，[2]東北大院医･環境遺伝医学研究センター）

A22 会場　午前の部（9:00～12:00）

食品―食品機能・栄養–免疫，炎症，アレルギー―

2A22a01　*Lactobacillus paracasei* K71 の経口摂取が分泌型 IgA レベルに及ぼす影響

9:00　○熊谷武久[1]，寺平拓也[2]，藤井幹夫[1]，山本哲郎[3]，城斗志夫[4]，原　　崇[4]（[1]亀田製菓，[2]新潟大院・自然科学，[3]TTC，[4]新潟大農）

2A22a02　*Lactobacillus paracasei* K71 投与によるインフルエンザウイルス感染マウスへの効果

9:12　○樋口裕樹[1]，渡辺紀之[1]，熊谷武久[1]，林　京子[2]（[1]亀田製菓(株)，[2]富山大学大学院医学薬学研究部）

2A22a03　*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC により産生された菌体外多糖のパイエル板免疫調節作用と抗アレルギー効果

9:24　○後藤弥生[1]，　吉澤奏子[2]，　鈴木志保[3]，　戸田登志也[1]，山田勝重[1]，北村進一[2]（[1]フジッコ株式会社，[2]大阪府大院・生命環境，[3]有限会社 IPE）

2A22a04　*Lactobacillus salivarius* による腸管バリア保護メカニズムの解析

9:36　○宮内栄治[1,2,3]，　O'Callaghan John[1]，　Butto Ludovica[1]，Hurley Grainne[1]，Melgar Silvia[1]，田辺創一[2]，Shanahan Fergus[1]，Nally Kenneth[1]，O'Toole Paul W.[1]（[1]コーク大，[2]広島大院･生物圏，[3]理研・RCAI）

2A22a05　乳酸菌の抗ウィルス作用についての腸管オルガノイドを用いた検討

9:48　○青木–吉田綾子，園山　慶（北大院農）

2A22a06　乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* OLL2809 のストレス軽減および免疫賦活効果

10:00　○指原紀宏，古市圭介，池上秀二，内田勝幸，伊藤裕之（(株)明治　食機能科学研究所）

2A22a07　乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* OLL2809 および α–ラクトアルブミンの運動選手におけるコンディション改善効果

10:12　○田村　明[1]，　指原紀宏[1]，　長田昌士[1]，　森　　毅[1]，池上秀二[1]，内田勝幸[1]，後藤　穣[2]，大久保公裕[2]，伊藤裕之[1]（[1](株)明治　食機能科学研究所，[2]日本医科大学耳鼻咽喉科）

2A22a08　NOD マウスの 1 型糖尿病の発症原因となる自己免疫応答の誘導を抑制できる乳業用乳酸菌

10:24　○古川和憲[1]，麦　嘉麟[1]，門岡幸男[2]，榎本　淳[1]（[1]群大院工・応化生物，[2]雪印メグミルク(株)ミルクサイエンス研）

2A22a09　*Lactococcus lactis* JCM5805 株（プラズマ乳酸菌）摂取は温度ストレスによる pDC 活性低下を改善する

10:36　○杉村　哲[1]，城内健太[1,2]，大塩木乃実[1]，藤原大介[1]（[1]キリン(株)基盤技術研究所，[2]小岩井乳業(株)技術開発センター）

2A22a10　*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 由来酸性多糖の免疫調節作用の特性

10:48　石田彩佳[1]，　伊藤　智[1]，　芳賀沼亮[1]，　矢野光太郎[1]，○高橋恭子[1]，　細野　朗[1]，　牧野聖也[2]，　池上秀二[2]，　上野川修一[1]（[1]日大生資，[2](株)明治）

2A22a11　*Lactobacillus casei* のゲノム DNA に含まれる抗炎症作用を持つオリゴデオキシヌクレオチドの特定と作用機構の解明

11:00　○平松征洋，佐藤朝光，入江圭一，椎村翔太，中島幸彦，見明史雄，鹿志毛信広（福岡大薬）

2A22a12　*Lactobacillus plantarum* の菌体構成成分が IL-10 産生誘導に及ぼす影響

11:12　○奥津雄太[1]，　長井遼太[1]，　星子浩之[2]，　梶川揚申[1]，田中尚人[1]，佐藤英一[1]，岡田早苗[1]（[1]東農大応生科・化学，[2]サントリービジネスエキスパート(株)）

2A22a13　講演取消

2A22a14　*Lactococcus lactis* C59 株の経口投与による経口免疫寛容誘導の強化

11:36　○西田実紗[1]，　青木ー吉田綾子[1]，　鈴木チセ[2]，　清水　誠[1]，戸塚　護[1]（[1]東大院農生・応生化，[2](独)農研機構・畜草研）

2A22a15　高度不飽和脂肪酸の乳酸菌代謝産物は Caco-2 細胞における腸管上皮バリアの損傷を回復する

11:48　○宮本潤基[1]，　PARK Si-Bum[2]，　岸野重信[2]，　小川　順[2]，鈴木卓弥[1]，田辺創一[1]（[1]広大院生物圏，[2]京大院農・応用生命）

A22 会場　午後の部（14:00～17:24）

食品―食品機能・栄養–免疫，炎症，アレルギー―

2A22p01　Effect of oral intake of whey protein concentrates on colitis in mice.

14:00　○Sharmila JAYATILAKE[1,2]，　Katsuhito ARAI[1,2]，Yoshiko ISHIDA[2]，Nanami KUMADA[2]，Satoru IWATSUKI[3]，Ichiro TANAKA[2]，Yoshihiko TOKUJI[2]，Mikio KINOSHITA[2]，Masao OHNISHI[2]（[1]Iwate Univ.，[2]Obihiro Univ. Agric. Vet. Med.，[3]Asama Kasei）

2A22p02　豆乳の乳酸菌発酵物 PS-B1 摂取によるアレルギー抑制－皮膚炎アレルギーモデルマウスを用いて－

14:12　○三浦良子[1]，　深澤昌史[2]，　照屋雄一[2]，　川久保美穂[2]，藤本京子[2]，野嶽勇一[2]，榊原隆三[2]（[1](株)バイオジェノミクス，[2]長崎国際大・薬）

2A22p03　マウススギ花粉症モデルにおける殺菌および生菌ビフィズス菌の効果

14:24　○渡辺卓巳[1]，坂野綾子[1]，高橋源司[2]，李　貞範[2]，林　京子[2]（[1]コンビ株式会社，[2]富山大院薬）

2A22p04　低酸素環境下における免疫細胞の挙動解析とプロバイオティクスの抗炎症効果

14:36　○荻田　佑[1,2]，宮本潤基[1]，鈴木卓弥[1]，田辺創一[1]（[1]広大院生物圏，[2]日本学術振興会）

2A22p05　腸内共生菌が小腸・大腸の腸管関連リンパ組織の発達や免疫応答に強く関与する

14:48　○鈴木　誠[1]，　細野　朗[1]，　鴨井大樹[1]，　八村敏志[2]，高橋宜聖[3]，　百瀬愛佳[4]，　平山和宏[4]，　伊藤喜久治[4]，　高橋恭子[1]，上野川修一[1]（[1]日大生資科・食品生命，[2]東大院農生科・食の安全研セ，[3]感染研・免疫，[4]東大院農生科・獣医）

2A22p06　難消化性デキストリンは腸内環境の変化を介して腸管免疫を亢進する

15:00　○宮里祥子[1]，　岸本由香[1]，　高橋恭子[2]，　細野　朗[2]，上野川修一[2]（[1]松谷化学工業，[2]日大・生資科）

2A22p07　カルノシン経口投与による小腸粘膜における IgA 産生亢進効果

15:12　○内田順也，清水　誠，戸塚　護（東大院農生・応生化）

2A22p08　複数の TLR 刺激を受けたパイエル板樹状細胞におけ

る応答抑制の解析
15:24 ○上滝隆太郎[1,2]，輪島隼一[1,2]，塩河亜弥[1,2]，八村敏志[1,2]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大院農生科・食の安全研セ）

2A22p09　腸内共生菌がマスト細胞の終末分化に及ぼす影響
15:36 ○伊藤朋子[1]，高橋恭子[1]，笠倉和巳[1,2]，伊藤喜久治[3]，百瀬愛佳[3]，細野　朗[1]，上野川修一[1]（[1]日大生資，[2]順天堂院医，[3]東大農生）

2A22p10　有機酸によるマウス α-ディフェンシン 5 遺伝子の発現調節
15:48 ○栗原健太，高橋恭子，杉　由高，中野　興，細野　朗，上野川修一（日大・生資）

2A22p11　褐藻サガラメ M/C 抽出物の脂溶性画分から単離した抗アレルギー性成分
16:00 ○杉浦義正[1]，勝崎裕隆[2]，今井邦雄[2]，田中竜介[1]，松下映夫[1]（[1]水大校 食品科学，[2]三重大院 生資）

2A22p12　マスト細胞の脱顆粒に及ぼすレスベラトロールの影響
16:12 ○藤原葉子[1]，日野温子[1]，曽根保子[1]，市　育代[1]，福原　潔[2]（[1]お茶大院ライフサイエンス，[2]国立医薬品食品衛生研究所）

2A22p13　*Kaempferia parviflora* 抽出画分の脱顆粒抑制作用の検討
16:24 ○堀籠　悟[1]，吉田　泉[2]，津田愛子[2]，原田哲平[2]，永井　武[2]，山崎久実子[2]，鈴木美そら[2]，川本康晴[2]，穏田友子[2]，吉安友二[2]，勝田真一[2]，里山俊哉[2]，山口昭弘[2]，渡井正俊[2]，広瀬直人[3]，白川　仁[1]，駒井三千夫[1]（[1]東北大院農・栄養学，[2]日本食品分析セ，[3]沖縄県農研セ）

2A22p14　ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の作用解析及びマウス PCA 反応における効果
16:36 ○森下雄太[1]，齋藤亜美[2]，代田　修[3]，黒柳正典[4]，武藤徳男[2]（[1]県広大院生命，[2]県広大生環，[3]徳文大香川薬，[4]静県大薬）

2A22p15　接触皮膚炎モデル動物実験系におけるザクロ果汁ポリフェノール濃縮物のアレルギー抑制効果
16:48 ○長野隆男[1]，伊東秀之[2]，西田典永[3]（[1]川崎医福大臨床栄養，[2]岡山大院医歯薬，[3]森下仁丹）

2A22p16　アレルギー性疾患モデルに対するチシャトウの効果
17:00 ○杉本幸雄[1]，寺崎実希[1]，河野左知[1]，鈴木杏奈[1]，土岐敦美[1]，趙　秋娥[2]，松本幸子[1]，伊東秀之[1]（[1]岡山大薬，[2]大森食品）

2A22p17　発芽ブドウ種子エキスの OVA 感作マウスにおけるアレルギー反応抑制作用
17:12 ○近藤(比江森)美樹[1,2]，藤倉路子[2]，鈴木麻希子[2]，村田健二[3]，落合孝次[4]（[1]徳島文理大食物栄養，[2]岡山県大栄養，[3]カリフォルニア大デービス，[4]シードライフテック(株)）

A25 会場　午前の部（9:00〜12:00）

食品―食品機能・栄養–その他―

2A25a01　食餌性鉄欠乏ラットにおける味嗜好性の変化
9:00 ○幸田理恵，成川真隆，山本　遼，岡田晋治，三坂　巧（東大院農生科・応生化）

2A25a02　甘味受容体に対する甘味増強物質の作用機序の評価
9:12 ○中北智哉，三坂　巧（東大院農生科・応生化）

2A25a03　ヒト甘味受容体における甘味増強物質作用部位の探索
9:24 ○鈴木あゆ，中北智哉，三坂　巧（東大院農生科・応生化）

2A25a04　発光検出法を用いた味覚評価系の開発
9:36 ○戸田安香，三坂　巧（東大院農生科・応生化）

2A25a05　樽酒中の成分が食品の旨味に及ぼす影響
9:48 ○高尾佳史[1]，高橋俊成[1]，藤田晃子[2]，松丸克己[2]，溝口晴彦[1]（[1]菊正宗酒造総研，[2]酒総研）

2A25a06　ノンアルコール飲料摂取による気分状態及び自律神経活動の変化
10:00 ○豊嶋麻里[1]，山崎英恵[1]，松永哲郎[2]，茂田一郎[3]，尾崎一隆[3]，清水二郎[3]，伏木　亨[1]（[1]京大院農，[2]京大院人環，[3]アサヒビール(株)）

2A25a07　*Lactobacillus gasseri* CP2305 株のストレス応答ならびに脳血流に及ぼす影響
10:12 ○藤原　茂[1]，澤田大輔[2]，岡　卓二[3,4]，桑野由紀[5]，六反一仁[5]（[1]カルピス株式会社　発酵応用研究所，[2]カルピス株式会社　商品開発センター，[3]横浜市大医学研究院放射線医学，[4]株式会社ベイバイオイメージング，[5]徳島大学大学院ストレス制御医学）

2A25a08　牛乳 α_s-casein の消化管酵素分解により新しい抗不安トリペプチド Tyr-Leu-Gly が生成する
10:24 ○水重貴文[1,2]，澤眤有里菜[1]，金本龍平[1]，大日向耕作[1]（[1]京大院農・食品生物，[2]京大学際融合・生理化学研究ユニット）

2A25a09　発酵乳ホエーに含まれる細胞内グルタチオン上昇作用分子の探索
10:36 ○畑中唯史[1]，川上賀代子[1]，裏地美杉[1]，守谷智恵[2]，坪井誠二[2]（[1]岡山生物研，[2]就実大薬）

2A25a10　Oligonol の安全摂取量の評価ならびに脂質代謝に与える影響
10:48 ○日野原顯，鈴木ひかる，長田恭一（明治大学農）

2A25a11　りんご未熟果実由来ポリフェノールの安全性と脂質代謝への影響
11:00 ○東　知宏[1]，越　謙太[1]，長田恭一[1]，相倉悦子[2]，林　賢二[2]，半田正之[2]（[1]明治大・農，[2]エバラ食品工業・中央研究所）

2A25a12　ヒトにおける米由来ステロール配糖体画分（PSG）の動脈硬化リスク低減の検証
11:12 ○奥原康英[1]，Bui Thi Nhung[2]，Huy Nguyendo[2]，鴨下澄子[3]，喜瀬光男[1]，Le Thi Hop[2]，山本　茂[3]（[1](株)ファンケル総研，[2]National Institute of Nutrition（Hanoi-Vietnam），[3]十文字学園女子大学アジアの栄養・食文化研究所）

2A25a13　コメ由来ステロール配糖体分画（PSG）とうんしゅうみかん由来 β クリプトキサンチンを含むカプセルが肥満者の脂質代謝に及ぼす影響
11:24 ○伊藤幸彦[1]，野中翔太[1]，喜瀬光男[1]，平山志ほり[2]，國井大輔[2]，仲地　哲[3]，長嶺　勝[4]（[1](株)ファンケル総研，[2]健康科学統合研究センター，[3]おきなわ健康長寿研究開発センター，[4]琉球大学分子生命科学研究施設）

2A25a14　タイ産ブラックジンジャー抽出物の抗肥満作用
11:36 ○吉野　進[1]，キムミンジ[2]，阿波里佳[1]，安　芝英[2]，岩橋弘恭[1]，桑原浩誠[1]，河田照雄[2]（[1]丸善製薬，[2]京大院農・食品生物科学）

2A25a15　グラブリジンは AMPK と CaMKII に依存的に筋肉細胞のグルコース取込みを促進する
11:48 ○澤田圭介[1]，濱田和也[2]，岸田英之[2]，北野光昭[2]，中川　格[2]，芦田　均[1]（[1]神戸大学，[2]株式会社カネカ）

A25 会場　午後の部（14:12〜17:00）

食品―食品機能・栄養–その他―

2A25p01　講演取消

2A25p02　生もと乳酸菌の米ヌカ発酵成分がヒト皮膚の角層水分量に与える影響
14:12 ○近藤紗代[1]，高橋俊成[1]，渡辺敏郎[2]，井口隆文[2]，田辺創一[3]，溝口晴彦[1]（[1]菊正宗酒造総研，[2]ヤヌガキ醗酵技研，[3]広島大院生物圏）

2A25p03　ベニバナ発酵液が皮膚に与える影響
14:24 ○狩野秀道（(株)伊勢半）

2A25p04　葛の花エキス™の摂取が肌症状に及ぼす影響についての探索的研究
14:36 ○城戸弥生，松田朋子，金本優杞，長澤早紀，神谷智康，池口主弥，高垣欣也（(株)東洋新薬）

2A25p05　アロエベラゲル粉末及びアロエベラゲル抽出物は，ヒト繊維芽細胞でのコラーゲンとヒアルロン酸の産生を促進する
14:48 ○田中美順，三澤江里子，齊藤万里江，山内恒治，阿部文明（森永乳業株式会社　食品基盤研究所）

2A25p06　Organotypic coculture of mouse skin cells as a model for studying the effects of collagen peptide prolyl-hydroxyproline on the skin
15:00 ○PHUONG LE VU LAN[1]，RYO TAKATORI[1]，TAKU IWAMOTO[1]，KENJI SATO[2]，MAMORU TOTSUKA[1]，HIDEO SATSU[1]，KAZUHIRO CHIDA[1]，MAKOTO SHIMIZU[1]（[1]The University of Tokyo，[2]Kyoto Prefectural University）

2A25p07　褐藻由来フコキサンチンの線維芽細胞に対する紫外線保護作用

15:12　○菅原達也[1]，　松尾明香[1]，　黒井　梓[2]，　矢野紗枝子[2]，松下奈央[2]，山原　年[2]，平田　孝[1]（[1]京大院農，[2](株)桃谷順天館）

2A25p08　in vitro と in vivo におけるウコン粉末のプレバイオティクス効果

15:24　○韓　圭鎬，橋本千尋，豊田　敏，島田謙一郎，中村有美，福島道広（帯畜大・食品科学）

2A25p09　テアフラビンの腸内細菌叢に対する影響の解析

15:36　○堀江　暁[1]，　市川晋太郎[1]，　平山和宏[2]，　小池　慧[1]，谷口慈将[3]，中山　勉[4]，吉田有人[1]，伊藤喜久治[2]（[1]キリン･基盤研，[2]東大院・農，[3]キリン・健康研，[4]静岡県大・食品栄養）

2A25p10　オカラおよびフスマ可溶化物の腸内菌叢改善効果と胃潰瘍抑制効果

15:48　大串美沙[1]，　今井ももこ[1]，　庄條愛子[1,2]，　飯田聡史[1]，原田直樹[3]，山地亮一[3]，乾　　博[4]，吉澤みな子[5]，和田野晃[1,3]，○中野長久[1,3,6]（[1]大阪府大・地域連携，[2]相愛大・人間発達，[3]大阪府大院・生命環境，[4]大阪府大院・総リハ，[5]大手前栄養学院，[6]大阪女子短大）

2A25p11　ヒト腸内細菌叢定着マウスを用いた *Bifidobacterium longum* BB536 による整理作用の解析

16:00　○菅原宏祐[1,2,3]，小田巻俊孝[1]，清水(肖)金忠[1]，阿部文明[1]，加藤　完[2,3]，菊地　淳[3,4]，福田真嗣[2,5]，大野博司[2,3]（[1]森永乳業食基研，[2]理研 RCAI，[3]横浜市大生命ナノシステム科学，[4]理研 PSC，[5]慶応大先端生命研）

2A25p12　プチヴェールの機能解析

16:12　○小瀬木一真[1]，　糟谷亮介[1]，　山田千佳子[1]，　松田　幹[2]，和泉秀彦[1]（[1]名古屋学芸大院・栄養科学，[2]名大院・生命農）

2A25p13　未成熟柿由来成分の機能性解析

16:24　○折居千賀（公益財団法人　東洋食品研究所）

2A25p14　地域食材を複合した食品開発について

16:36　○寺戸奈保子，梅内志乃，若生　豊（八戸工業大学）

2A25p15　オレンジにんにくの香気成分

16:48　○桑原隆明，高梨豊明，川上美智子（茨城キリスト教大学大学院生活科学研究科食物健康科学専攻）

B11 会場　午前の部（9:00〜11:48）

微生物―細胞–分離，分類，生態―

2B11a01　内生菌根植物セドロと外生菌根菌マツタケで成立した原始的な外生菌根様器官と共生

9:00　○村田　仁[1]，山田明義[2]，丸山　毅[1]，遠藤直樹[2]，山本航平[2]，大平辰朗[1]，下川知子[1]（[1]森総研，[2]信大農）

2B11a02　*Pleurotus* spp. の新規種間について

9:12　○稲冨　聡, 石川真梨子, 奥　竹史, 高野克太, 大内謙二（ホクト(株)きのこ総合研究所）

2B11a03　PCR-DGGE を用いたかつお節かび菌叢の解析

9:24　○小山　大[1]，竹中慎治[2]，土居幹治[1]（[1]マルトモ(株)，[2]神戸大院農）

2B11a04　水圏環境からの発酵性酵母の分離における季節的影響

9:36　○高橋千秋，岸本宗和，乙黒美彩，柳田藤寿（山梨大・ワイン科学研究センター）

2B11a05　植物の根から分離した新規放線菌の分類

9:48　○河口洋子[1], 松本厚子[2], 稲橋佑起[1,2], 大村　智[2], 高橋洋子[1,2]（[1]北里大院・感染制御科学府，[2]北里大・生命研）

2B11a06　循環型浄化槽における脱窒細菌叢と脱窒遺伝子発現の比較解析

10:00　○冨岡顕治[1]，甲木幸絵[1]，岩井正幸[2]，鈴木智順[1]（[1]東理大院理工，[2]東理大理工）

2B11a07　空中浮遊細菌の網羅的な解析に向けた実験方法の検討

10:12　○岸　朋恵[1]，橋本沙季[2]，齊藤　智[3]，鈴木智順[1]（[1]東理大院理工・応生科，[2]東理大理工・応生科，[3](株)竹中工務店・技研）

2B11a08　消化汚泥資化微生物の分離ならびに解析

10:24　○藤井克彦，甲斐隆泰，松延　駿，三上綾香（山口大農）

2B11a09　光感受性菌の分離と同定

10:36　○吉原周佑[1]，関　智章[2]，高橋　結[2]，村上周一郎[1]（[1]明治大農，[2]明治大院農）

2B11a10　中等度酸性環境の微生物層の解析

10:48　○安田貴志，金尾忠芳，上村一雄（岡山大学院）

2B11a11　陸上酸性温泉からの新規好熱性微生物の分離

11:00　○大西真史[1,2]，　高品知典[1]，　伊藤　隆[2]，　加藤慎吾[2]，大熊盛也[2]（[1]東洋大学大学院，[2]独立行政法人理化学研究所）

2B11a12　竹チップにおける微生物群集解析と好熱菌の分離

11:12　○庄山創太，袴田佳宏，大箸信一（金沢工大）

2B11a13　単細胞性シアノバクテリアの細胞凝集を誘導する従属栄養細菌

11:24　○川合瑞希，松浦克美，春田　伸（首都大・生命）

2B11a14　家畜の増体効果をもたらす新規好熱性細菌の有機酸産生能についての研究

11:36　○西田彩夏[1]，　宮本浩邦[1,2,3,5]，　三橋朋美[2]，　宇田川元章[4]，宮本　久[5]，児玉浩明[1]（[1]千葉大院融合科学，[2]千葉大園芸，[3]日環科学株式会社，[4]京葉プラントエンジニアリング(株)，[5]株）三六九）

B11 会場　午後の部（14:00〜17:24）

微生物―細胞–分離，分類，生態―

2B11p01　南極湖由来細菌 *Lysobacter oligotrophicus* 107-E2 株の特性解析

14:00　○福田青郎[1]，木村知見[1]，荒木成朗[1]，三吉祐輝[2]，跡見晴幸[2]，今中忠行[1]（[1]立命館大生命，[2]京大院工）

2B11p02　南極湖由来細菌 *Lysobacter oligotrophicus* 107-E2 株が生産する水溶性色素の解析

14:12　○木村知見，福田青郎，今中忠行（立命館大生命）

2B11p03　Isolation and analysis of actinomycetes from sediments of Pacific Ocean

14:24　○Dana Ulanova，Kian Sim Goo（Kochi Univ.）

2B11p04　ムール貝中に生息していたカニより分離した新規 Bacillus 種の同定

14:36　○小高アラン[1]，山下　隆[2]（[1]東京工科大院･バイオニクス，[2]東京工科大学・応用生物）

2B11p05　海藻多糖分解細菌の分離とその性状

14:48　○森　渓太[1]，山下　隆[2]（[1]東京工科大院・バイオニクス，[2]東京工科大・応用生物）

2B11p06　水稲根圏土壌からの新規 Type I メタン酸化細菌の分離

15:00　○李　哲揆[1]，小木曽拓也[2]，上野千穂子[3]，Dianou Dayeri[4]，木村眞人[5]，浅川　晋[6]（[1]東北大院農，[2]陸上自衛隊，[3]ネスレ日本株式会社，[4]ブルキナファソ国立科学研究センター，[5]中国科学院東北地理与農業生態研究所，[6]名古屋大院生命農）

2B11p07　嫌気環境下での鉄腐食を促進する新規硫酸還元菌・メタン生成菌の探索

15:12　○加藤創一郎[1,2,3]，　吉田裕美[1]，　湯本　勲[1]，　鎌形洋一[1,2]（[1]産総研・生物プロセス，[2]北大院農・応生科，[3]東大先端研）

2B11p08　選択的二段培養により得られた新しい鉄還元細菌群の系統と機能

15:24　○青柳　智[1]，　成廣　隆[2]，　花田　智[2]，　田尾博明[1]，鎌形洋一[2]，堀　知行[1]（[1]産総研・環境管理，[2]産総研・生物プロ）

2B11p09　Comparison of N_2O emitting bacteria isolated from Andisol corn farmland in spring and autumn

15:36　○LI LI, Yasuyuki Hashidoko, Ryusuke Hatano（Hokkaido Univ.）

2B11p10　Isolation of N_2O-quenchers from Tropical Peat Soil in Oil Palm Plantation in Sarawak, Malaysia

15:48　○LAU SHARON YU LING[1,2], YASUYUKI HASHIDOKO[1], LULIE MELLING[2]（[1]Hokkaido Univ., [2]Tropical Peat Research Laboratory Unit）

2B11p11　モザンビークのダイズ根粒菌での *nifD* 遺伝子の多様性

16:00　○安藤康雄[1]，伊藤　治[2]，辻本泰弘[1]，ボイナグイルヘルミノ[3]，コリアールヘンリクエスビクトール[3]，飛田　哲[1]（[1]国際農林水産業研究センター，[2]国連大学，[3]モザンビーク農業研究所）

2B11p12　青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の植物ホルモン走化性と植物感染への影響

16:12　○奥　正太，　中里憲司，　高西寿洋，　緋田安希子，TUNCHAI Mattana，　米田佳那子，　田島誉久，　中島田豊，加藤純一（広島大院先端物質）

2B11p13　青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の有機酸走化性と植物感染への影響
16:24　○加藤純一，奥　正太，中里憲司，高西寿洋，緋田安希子，TUNCHAI Mattana，米田佳那子，田島誉久，中島田豊（広島大院先端物質）

2B11p14　亜熱帯気候に適応した乳酸菌の分離と発酵特性の評価
16:36　武島浩太，平良駿也，○田中　博（沖縄高専・生物資源）

2B11p15　GABA を高生産する新規乳酸菌の単離と工業的な効率生産
16:48　○岩谷和輝[1]，　永井裕次郎[1]，　野村真悟[2]，　塩木康紀[2]，小澤幸央[1]，吉田祥子[2]（[1]東海漬物(株)，[2]豊橋技科大院・工・環境生命）

2B11p16　愛知県におけるヒト糞便からの ESBL 産生大腸菌の分離状況
17:00　○山田和弘[1,2]，鈴木匡弘[2]，松本昌門[2]，倉根隆一郎[1]（[1]中部大院応生，[2]愛知衛研）

2B11p17　便器表面付着性 *Rhizobium* 属細菌のバイオフィルム形成阻害の試み
17:12　○深野　透[1]，　高橋康徳[1]，　五味満裕[2]，　大崎幸彦[2]，三輪京子[1]，森川正章[1]（[1]北大院環・分子生物，[2]小林製薬・中研）

B12 会場　午前の部（9:00〜12:00）

微生物―細胞–情報伝達，細胞応答，ストレス―

2B12a01　出芽酵母 COPII 小胞膜タンパク質遺伝子の多重欠損株におけるゴルジ体膜タンパク質の局在解析
9:00　○藤井聖也，野田陽一，依田幸司（東大院･農生科･応生工）

2B12a02　出芽酵母 Gpx1 が lipid droplet の形成に与える影響
9:12　○大舘　巧[1]，井上善晴[2]，久下周佐[1]（[1]東北薬科大，[2]京大院農）

2B12a03　出芽酵母モノカルボン酸輸送体 Jen1 のグルコース誘導性分解制御因子の探索と解析
9:24　○松本耕助，葛西寛一，大橋優隆，机伸太郎，五味勝也，新谷尚弘（東北大院農）

2B12a04　出芽酵母におけるリン酸飢餓誘導性オートファジーの解析：液胞内リン酸プールとオートファジー誘導の関係
9:36　○横田浩人，五味勝也，新谷尚弘（東北大院農）

2B12a05　Characterization of stress granules upon heat stress in *A. oryzae*
9:48　○HSIANG TING HUANG，　JUN-ICHI MARUYAMA，KATSUHIKO KITAMOTO（Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo）

2B12a06　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の機能未知遺伝子 *POG1* によるリチウム耐性機構の遺伝学的解析
10:00　○喜多島萌，大城　聡，高木博史（奈良先端大・バイオ）

2B12a07　酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 によるストレス下での原形質膜タンパク質の品質管理機構
10:12　○清水優子，鈴木悦子，佐々木俊弥，高木博史（奈良先端大バイオ）

2B12a08　酵母の HECT 型ユビキチンリガーゼ Rsp5 のリン酸化／脱リン酸化に関わる酵素の探索
10:24　○山下由貴，佐々木俊弥，高木博史（奈良先端大･バイオ）

2B12a09　麹菌アレスチン様タンパク質 CreD のマルトースパーミアーゼのエンドサイトーシスへの影響
10:36　○平本哲也，田中瑞己，新谷尚弘，五味勝也（東北大院農･生物産業創成）

2B12a10　糸状菌 *Trichoderma reesei* における菌体外繊維状物質の解析
10:48　○田原伸悟[1]，　新田美貴子[2]，　志田洋介[1]，　堀川祥生[3]，杉山淳司[3]，大隅正子[4]，小笠原渉[1]（[1]長岡技科大　生物，[2]科学技術振興機構，[3]京都大学 生存圏研究所，[4]綜合画像研究支援）

2B12a11　出芽酵母の経時寿命制御における Rpd3/HDAC における機能解析
11:00　○佐藤雅弘，門前宏陽，寺本勘二，今村優子，湯川格史，土屋英子（広島大院先端物質・分子生命）

2B12a12　出芽酵母を用いた新規寿命延長因子の取得と機能解析
11:12　○椿山諒平，水沼正樹，平田　大（広島大院・先端研・分子生命）

2B12a13　出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の生死制御系の構築
11:24　○野口允佐，西田奈央，黒田浩一，植田充美（京大院農）

2B12a14　分裂酵母の非性的凝集に関わる *gsf1* 遺伝子の解析
11:36　○景山瑶子[1]，　伊藤有紀[1]，　大石和義[1]，　松沢智彦[2]，竹川　薫[2]，川向　誠[1]（[1]島根大・生物資源，[2]九大院・生資環・生命機能）

2B12a15　DNA 複製異常時の成長極性変換制御に関与するキナーゼの探索
11:48　○古家野孝行，久米一規，平田　大（広島大院・先端研・分子生命）

B12 会場　午後の部（14:00〜17:36）

微生物―細胞–情報伝達，細胞応答，ストレス―

2B12p01　ビフィズス菌と乳酸菌における酸素感受性の原因酵素に関する研究
14:00　○君島達弥，田中邦房，大形篤史，新村洋一，川崎信治（東農大応生科・バイオ）

2B12p02　ビフィズス菌と乳酸菌の様々な O_2 濃度下における生育と H_2O_2 の影響
14:12　○小島裕貴，熊谷菜生子，伊集院奨，田中邦房，新村洋一，川崎信治（東農大応生科・バイオ）

2B12p03　大腸菌 *tolC* 変異株の酸感受性機構の解析
14:24　○安彦弦太，堀川晃菜，和地正明（東工大院生命理工）

2B12p04　大腸菌の耐圧性に関与する浸透圧・イオンストレス因子の探索
14:36　○長谷川敏美[1]，　中村拓哉[1]，　木戸みゆ紀[2]，　林真由美[1]，井口晃徳[1]，山口利男[3]，重松　亨[1]（[1]新潟薬大・応生科，[2]財団法人にいがた産業創造機構(NICO)，[3]新潟薬大・薬）

2B12p05　大腸菌細胞におけるリボソーム異常が引き起こす塩耐性
14:48　○樽澤武房[1]，長谷要一[1]，武藤あきら[2]，姫野俵太[1,2]（[1]岩手大院連合農，[2]弘前大農）

2B12p06　Effect of plasmid carriage on the osmotic stress response of host cell bacteria
15:00　○GINANJAR KARTASASMITA，
Yurika TAKAHASHI，　Kazunori OKADA，　Hideaki NOJIRI（BRC, Univ. Tokyo）

2B12p07　乳酸菌のペニシリン結合タンパク質と胆汁酸耐性
15:12　○服部正寛[1]，　黒瀬　猛[1]，　新　穂高[1]，　藤村朱喜[1]，田中尚人[2]，岡田早苗[2]，中川純一[1]（[1]東農大食香，[2]東農大菌株）

2B12p08　乳酸菌のサーチュインホモログとコール酸耐性および飢餓応答の関係
15:24　○新　穂高[1]，　吉田裕哉[1]，　田中了慈[1]，　藤村朱喜[1]，田中尚人[2]，岡田早苗[2]，中川純一[1]（[1]東農大院生物産業，[2]東農大菌株）

2B12p09　枯草菌 SigI による定常期における細胞維持機構の解析
15:36　○朝井　計[1]，市島睦生[1]，関口順一[2]（[1]埼玉大院理工，[2]信州大繊維）

2B12p10　*Pseudomonas aeruginosa-Staphylococcus aureus* 共培養により明らかとなった quorum sensing 阻害物質の同定と阻害効果
15:48　○皆川　周[1]，　新野啓介[1]，　山田裕美[1]，　藤井健二[2]，毛利隆太郎[2]，　鹿山鎭男[3]，　加藤文紀[3]，　北山　隆[3]，　菅井基之[3]，後藤直正[1]（[1]京都薬大，[2]近畿大院農，[3]広島大院医歯薬）

2B12p11　TCS と PTS をつなぐコネクター様因子 RcsG の遺伝的解析
16:00　○深見知可，加藤明宣，萩原　慧，内海龍太郎（近畿大院･農）

2B12p12　コネクタータンパク質 SafA によるセンサーキナーゼ PhoQ の活性化に関与する PhoQ ドメインの解析
16:12　○吉谷亘平[1]，石井英治[2]，江口陽子[1]，内海龍太郎[1,2]（[1]近畿大農バイオ，[2]近畿大院農バイオ）

2B12p13　イネ苗立枯細菌病菌 *Burkholderia plantarii* における植物毒素トロポロン産生機構
16:24　○吉岡誠訓[1]，　紀平絵里[1]，　岡本　尚[1]，　仲宗根薫[2]，五十嵐雅之[3]，波多野和樹[3]，江口陽子[1]，内海龍太郎[1]（[1]近畿大院

農，[2]近畿大院生化工，[3]微化研）

2B12p14　白菜軟腐病菌 *Erwnia carotovora* ssp. *carotovora* における signermycin B の病原性抑制効果

16:36　°石井英治[1]，　木野弘量[1]，　渡邊崇史[2]，　五十嵐雅之[3]，波多野和樹[3]，東尾美佳[2]，中北歌織[2]，内海龍太郎[1,2]（[1]近畿大院農バイオ，[2]近畿大農バイオ，[3]微化研）

2B12p15　ラッカセイ種皮ポリフェノールの *Bacillus cereus* に対する抗菌作用の検証

16:48　°小澤恵実[1]，田村倫子[1]，田中尚人[2]，矢口行雄[3]，笠原浩司[4]，村　清司[1]，荒井綜一[5]（[1]東農大応生科・栄養，[2]東農大応生科・菌株，[3]東農大地環科・電顕，[4]東農大応生科・RI，[5]東農大総研）

2B12p16　枯草菌における（p）ppGpp 合成・分解酵素 RelA の新規制御機構の解析

17:00　°大竹俊平[1]，清水　翔[1]，高田　啓[1]，志波　優[2]，吉川博文[1,2]（[1]東京農大・応生科・バイオ，[2]東京農大・ゲノム解析セ）

2B12p17　酸素により制御されるジグアニル酸シクラーゼの多様性

17:12　°吉岡資郎（分子研）

2B12p18　超好熱性アーキアのリボソーム画分に存在する熱ショックタンパク質の機能解析

17:24　°井上貴央[1]，　青木　俊[1,3]，　秀瀬涼太[3]，　細川桂一[2]，跡見晴幸[4]，今中忠行[5]，藤原伸介[1,3]（[1]関西学院大・理工・生命科学，[2]関西学院大・理工・化学，[3]関西学院大・理工・生命環境科学研セ，[4]京大院・工・合成，[5]立命館大・生命科学・生物工学）

B13 会場　午前の部（9:36〜12:00）

微生物—遺伝子–発現制御，トランスクリプトーム—

2B13a04　麹菌における自己切断型選択マーカーカセットを用いた多重遺伝子導入システムの構築

9:36　°張　斯来[1]，江原直樹[1]，水谷　治[2]，田中瑞己[1]，新谷尚弘[1]，五味勝也[1]（[1]東北大院農，[2]酒総研）

2B13a05　麹菌転写因子 HapX によるシデロフォア生産調節機構

9:48　°中村隼人[1]，　林口拓実[1]，　増田裕一郎[1]，　安田庄子[2]，北本則行[2]，志水元亨[1]，加藤雅士[1]（[1]名城大学，[2]あいち産業科学技術総合センター・食品技術総合センター）

2B13a06　*Aspergillus oryzae* の菌体内金属プロテアーゼ saccharolysin ホモログの機能解析

10:00　°石川雄一朗，前田　浩，竹内道雄，山形洋平（東京農工大院・応生化）

2B13a07　麹菌 *Aspergillus oryzae*プロテアーゼ遺伝子の転写解析

10:12　°酒井大介[1]，　竹内道雄[1]，　古崎利紀[2]，　石井一夫[2]，有江　力[2]，山形洋平[1]（[1]東京農工大院・応生化，[2]東京農工大院・農学系ゲノム科学人材育成プログラム）

2B13a08　*Aspergillus nidulans* におけるプロテインキナーゼ C による細胞壁合成酵素遺伝子の転写制御

10:24　°片山琢也[1]，志波　優[2]，吉川博文[3]，太田明徳[3]，堀内裕之[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東農大・ゲノム解析セ，[3]東農大・応生科・バイオ）

2B13a09　黄麹菌 *Aspergillus oryzae*の分生子特異的 NAT の機能解析

10:36　°辻井　雅，森田寛人，前田　浩，山形洋平，竹内道雄（東京農工大院・応生化）

2B13a10　放線菌 *Streptomyces griseus* 由来非特異的 DNA 結合タンパク質 SGR6054 の機能解析

10:48　°手塚武揚[1]，　野本竜平[1]，　木村知宏[1]，　山本祐梨子[1]，宮川拓也[2]，　宮園健一[2]，　田之倉優[2]，　堀之内末治[1]，　大西康夫[1]（[1]東大院農生科・応生工，[2]東大院農生科・応生化）

2B13a11　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の二成分制御系レスポンスレギュレーター TcrA の機能解析

11:00　°毛利佳弘[1]，張文スン[1]，小西健司[1]，手塚武揚[1]，平田愛子[2]，藤田信之[3]，早川正幸[4]，大西康夫[1]（[1]東大院農生科・応生工，[2]東大院新領域・先端生命科学，[3]NITE・NBIC，[4]山梨大・工）

2B13a12　放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) におけるリン酸化模倣変異型 AfsR の機能解析

11:12　°辛　利弥，大西康夫（東大院農生科）

2B13a13　抗寄生虫薬エバーメクチン生産菌における放線菌ホルモン受容体 AvaR1 の機能解析

11:24　°Sultan Suandi Pratama[1]，　木谷　茂[1]，　宮本聖子[1]，池田治夫[2]，仁平卓也[1]（[1]阪大生物工学国際交流セ，[2]北里大･生命研）

2B13a14　放線菌キシロース誘導型発現システムの開発

11:36　°野口祐司[1]，卯津羅敦子[1]，池田治生[2]（[1]長瀬産業，[2]北里大・北里生命研）

2B13a15　AcGFP をレポーター遺伝子に用いた *Streptomyces* 由来シグナルペプチドの探索

11:48　°松本雅子，齋藤結希，橋本義輝，小林達彦（筑波大院・生命環境）

B13 会場　午後の部（14:00〜18:00）

微生物—遺伝子 – 発現制御，トランスクリプトーム—

2B13p01　超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* におけるウイルス様領域の役割

14:00　°田頭健太[1]，福田青郎[1]，金井　保[2]，跡見晴幸[2]，今中忠行[1]（[1]立命館大生命，[2]京大院工）

2B13p02　超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* の低温誘導型 RNA ヘリカーゼの機能解析

14:12　°Sahara Tatit Novi[1,2]，　長岡英里子[1,2]，　秀瀬涼太[2]，今中忠行[3]，藤原伸介[1,2]（[1]関西学院大院・理工，[2]関西学院大・生命環境センター，[3]立命館大・生命科学）

2B13p03　超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis*の二つの Transcription factor B の異なる役割

14:24　°西川　諒[1]，　秀瀬涼太[2]，　今井友裕[2]，　加藤　知[2]，跡見晴幸[3]，金井　保[3]，片野正展[3]，藤原伸介[2]（[1]関学大理工，[2]関学大院理工，[3]京大院工）

2B13p04　超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の水素・硫化水素発生に関わる転写因子 Tk-SurR の転写制御機構

14:36　°川妻孝平[1]，秀瀬涼太[1]，今中忠行[2]，藤原伸介[1]（[1]関学大理工，[2]立命大生命科学）

2B13p05　超好熱・好酸性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* におけるアミノ酸生合成酵素の転写調節機構の解析

14:48　°秋山　渚，富田武郎，葛山智久，西山　真（東大・生物工学セ）

2B13p06　細菌における転写後制御による環境適応機構

15:00　°藤本めぐみ，徳元　舶，前田理久（明治大学大学院）

2B13p07　*Paracoccus* sp. 43P 株の L-gluconate 代謝関連遺伝子の発現制御機構の解析

15:12　°清水　哲，中村　顕（筑波大院生命環境）

2B13p08　*Sphingobium* sp. SYK-6 株におけるバニリン酸およびシリンガ酸代謝系遺伝子の転写制御

15:24　°梅田周佑[1]，笠井大輔[1]，上村直史[1]，原　啓文[2]，福田雅夫[1]，政井英司[1]（[1]長岡技科大・生物，[2]岡山理大工・生体）

2B13p09　コリネ型細菌における転写制御因子 RamA の発現制御機構

15:36　°豊田晃一，寺本陽彦，乾　将行，湯川英明（RITE）

2B13p10　コリネ型細菌におけるアラビノース利用遺伝子の発現制御機構

15:48　°久下貴之[1]，寺本陽彦[2]，乾　将行[2]，湯川英明[2]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE）

2B13p11　コリネ型細菌におけるシグマ因子 SigE を介したイソブタノールストレス応答

16:00　°辻本敏博[1]，豊田晃一[2]，寺本陽彦[2]，乾　将行[2]，湯川英明[1,2]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE）

2B13p12　コリネ型細菌における亜鉛恒常性遺伝子の発現制御機構

16:12　°寺本陽彦，乾　将行，湯川英明（RITE）

2B13p13　*Rhodococcus jostii* RHA1 におけるカテコール分解遺伝子の導入による PCB 分解遺伝子群転写活性の強化

16:24　°伊藤　拓[1]，遠藤銀朗[2]，福田雅夫[3]，宮内啓介[2]（[1]東北学院大院工，[2]東北学院大工，[3]長岡技大生物）

2B13p14　光合成土壌細菌 *Rhodopseudomonas palustris* における安息香酸化合物の嫌気的分解とその制御因子 BadR の機能解析

16:36　°平川秀忠[1,3]，　平川裕子[2,3]，　FIXEN Kathryn R.[3]，GREENBERG E. Peter[3]，HARWOOD Caroline S.[3]（[1]群馬大先端科学ユニット，[2]群馬大薬剤耐性菌実験施設，[3]ワシントン大）

2B13p15　異なる糖で培養したセルロソーム生産菌 *Clostridium*

***cellulovorans* 743B の比較 RNA-seq 解析**

16:48 ○高嶋和也[1], 石川　卓[1], 黒田浩一[2], 植田充美[2], 三宅英雄[1,3,4]（[1]三重大院生資，[2]京大院農・応用生命，[3]三重大・生命支セ，[4]三重大・新産業）

2B13p16　プラスミドを保持した際の宿主細胞応答のプラスミド間比較

17:00 ○高橋裕里香[1]，　新谷政己[2]，　山根久和[3]，　岡田憲典[1]，津田雅孝[4]，野尻秀昭[1]（[1]東大･生物生産セ，[2]静大･工，[3]帝京大･バイオ，[4]東北大院・生命科）

2B13p17　バイオフィルム表現型の変化に関与する新規遺伝因子の探索

17:12 ○李昇ウク[1]，　高橋裕里香[1]，　大浦　啓[2]，　野村暢彦[2]，岡田憲典[1]，山根久和[3]，野尻秀昭[1]（[1]東大生物工学セ，[2]筑波大院生命環境，[3]帝京大・バイオ）

2B13p18　IncP-7 群プラスミド pCAR1 から発現する核様体タンパク質がプラスミド安定性に寄与する機構の解明

17:24 ○廣谷龍輔[1]，　高瀬識之[1]，　武田俊春[1]，　鈴木千穂[1]，尹　忠鉄[2]，新谷政己[3]，岡田憲典[1]，山根久和[4]，野尻秀昭[1,2]（[1]東大･生物工学セ，[2]東大院農生科･アグリバイオ，[3]静大･工，[4]帝京大･バイオ）

2B13p19　プラスミドと宿主染色体にコードされる H-NS 様因子が異なる機能を持つ機構の解析

17:36 ○鈴木千穂[1]，　尹　忠鉄[1,2]，　堀田彰一朗[3]，　寺田　透[2]，田之倉優[3]，岡田憲典[1]，山根久和[4]，野尻秀昭[1,2]（[1]東大・生物工学セ，[2]東大院農生科・アグリバイオ，[3]東大院農生科・応生化，[4]帝京大・バイオ）

2B13p20　プラスミド由来分解系のマスター転写制御因子遺伝子の異なる宿主における発現様式変化

17:48 ○岩田　修[1]，松本貴嗣[2]，新谷政己[3]，高妻篤史[4]，岡田憲典[1]，山根久和[5]，野尻秀昭[1]（[1]東大･生セ，[2]東農大･ゲノム解析セ，[3]静大･工，[4]東薬・生命，[5]帝京・バイオ）

B14 会場　午前の部（9:12〜12:00）

微生物―遺伝子–構造，機能―

2B14a02　*Ralstonia* sp. NT80 におけるリパーゼとその誘導促進因子の発現制御解析

9:12 ○水野佑貴[1]，石橋　隼[1]，関谷麻美[1]，吉澤梨絵[1]，赤沼元気[1]，牛尾一利[2]，石塚盛雄[1]（[1]中央大学理工応化，[2]新居浜高専･生物応化）

2B14a03　*Ralstonia* sp. NT80 におけるリパーゼ発現誘導促進因子 EliA の解析

9:24 ○赤沼元気[1]，石橋　隼[1]，宮川貴裕[1]，吉澤梨絵[1]，渡辺　智[2]，志波　優[3]，吉川博文[2,3]，牛尾一利[4]，石塚盛雄[1]（[1]中大理工応化，[2]東京農大応生科，[3]東京農大 NGRC，[4]新居浜高専生物応化）

2B14a04　*Sphingobium* sp. SYK-6 株のフェニルクマラン型リグニン二量体化合物代謝系遺伝子の単離と解析（第 2 報）

9:36 ○高橋健司[1]，　上村直史[1]，　菱山正二郎[2]，　原　啓文[3]，笠井大輔[1]，片山義博[4]，福田雅夫[1]，梶田真也[5]，政井英司[1]（[1]長岡技科大・生物，[2]森林総研，[3]岡山理大工・生体，[4]日大生資科，[5]東農工大院・BASE）

2B14a05　*Sphingobium* sp. SYK-6 株のリグニン由来ビフェニル脱メチル酵素遺伝子の機能解析と発現制御

9:48 ○吉方太一[1]，鈴木一也[1]，上村直史[1]，笠井大輔[1]，原　啓文[2]，大塚祐一郎[3]，中村雅哉[3]，片山義博[4]，福田雅夫[1]，政井英司[1]（[1]長岡技科大・生物，[2]岡山理大工・生体，[3]森林総研，[4]日大生資科）

2B14a06　環境変化が *Lactobacillus reuteri* DSMZ 20016^{T}の腸管付着因子の発現に与える影響

10:00 ○小林達哉，永倉洋憲，本橋健太，梶川揚申，岡田早苗，佐藤英一（東農大応生科・化学）

2B14a07　トリクロロエチレン分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 のトリクロロエチレン応答性転写制御因子に関する解析

10:12 ○荒木直人，笠井大輔，政井英司，福田雅夫（長岡技科大･生物）

2B14a08　アルファルファ根粒菌のイノシトール合成系はストレスで誘導される

10:24 ○吉田健一[1]，芦田義裕[1]，寺川あやこ[1]，ゾヴィアクローラン[2]，ブルアンクロード[2]（[1]神戸大院農，[2]LIPM-INRA, France）

2B14a09　ソルボース高温発酵・適応育種株の変異点解析

10:36 ○服部浩美[1]，　松谷峰之介[1]，　薬師寿治[1]，　足立収生[1]，外山博英[2]，松下一信[1]（[1]山口大農，[2]琉球大農）

2B14a10　超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis*由来リボキナーゼファミリータンパク質 TK2285 の機能解析

10:48 ○佐藤喬章[1,3]，　藤橋雅宏[2,3]，　宮本幸花[2]，　三木邦夫[2,3]，跡見晴幸[1,3]（[1]京大院工，[2]京大院理，[3]JST CREST）

2B14a11　高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 株の推定 *β*-glycosidase TT_P0042 の機能解析

11:00 ○黒澤智砂，星野貴行，中村　顕（筑波大院生命環境）

2B14a12　*Haloarcula japonica* 由来フィトエンデサチュラーゼ遺伝子ホモログの役割とカロテノイド種の抗酸化活性

11:12 ○八波利恵[1]，安藤　藍[1]，楊　　影[1]，高市真一[2]，河野雅弘[1]，松村有里子[1]，福居俊昭[1]，仲宗根薫[3]，高品知典[4]，中村　聡[1]（[1]東工大院生命理工，[2]日本医大生物，[3]近畿大工，[4]東洋大生命科）

2B14a13　*Serratia marcescens* の Csr システム及び CsrB/C RNA の安定性を制御する CsrD の機能解析

11:24 ○伊藤　学[1]，野村和希[1]，高橋優介[1]，杉本華幸[1,2]，渡邉剛志[1,2]，鈴木一史[1,2]（[1]新潟大院・自然科学，[2]新潟大・農・応生化）

2B14a14　合成生物学による遺伝子大量発現によって双安定システムに多分化能を与える

11:36 ○木賀大介[1]，石松　愛[1,2]，畑　敬士[1]（[1]東工大院総理工，[2]JST）

2B14a15　大腸菌機能未知転写因子 YgeK の機能解析

11:48 ○安藤知菜美[1]，石浜　明[1,2]，山本兼由[1,2]（[1]法政大・生命科学，[2]マイクロナノセンター）

B14 会場　午後の部（14:00〜17:12）

微生物―遺伝子–構造，機能―

2B14p01　出芽酵母に高糖濃度耐性を付与する変異遺伝子の遺伝学的探索

14:00 ○小林達朗，中川洋史，橋爪宏昌，山村英樹，飯村　穣，早川正幸（山梨大学大学院医学工学総合研究部　生体環境医工学系（山梨大院・医工総合・生命））

2B14p02　細胞性粘菌における *α*-MPP の相同遺伝子 *mppA2* の解析

14:12 ○菊地　望[1]，長山耕己[1,2]，大町鉄雄[1]（[1]弘前大･農学生命，[2]マンチェスター大）

2B14p03　ミトコンドリア局在シグナル配列の解析

14:24 ○徳田　茜，星田尚司，赤田倫治（山口大院・医系・応用分子生命）

2B14p04　耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* の交配と接合型

14:36 ○村重　卓，星田尚司，赤田倫治（山口大院・医系・応用分子生命）

2B14p05　フェロモン/受容体間の特異性の変化は生殖隔離を導くか？

14:48 ○清家泰介，中村太郎，下田　親（大阪市立大学院理）

2B14p06　分裂酵母 ADAM メタロプロテアーゼ Mde10 による胞子表層構造の構築

15:00 ○福西加奈，中村太郎（阪市大院理・生物地球）

2B14p07　DNA 損傷部位の核内空間配置変化におけるクロマチンリモデリング複合体および核膜タンパク質の寄与

15:12 ○小西辰紀[1]，　尾間由佳子[1]，　中山景樹[1]，　堀籠智洋[2]，Gasser Susan[2]，原田昌彦[1]（[1]東北大・院農，[2]Friedrich Miescher Institute, Basel）

2B14p08　テロメア維持に欠損を持つ分裂酵母変異株の微小管阻害剤感受性機構

15:24 升田賢太，○上野　勝（広大院先端物質）

2B14p09　イネいもち病のキチンデアセチラーゼ様タンパク Cbp1 の感染特異的器官文化に関わる機能解析

15:36 ○黒木美沙[1]，吉田　翔[2]，成川　恵[1]，鎌倉高志[1]（[1]東理大理工，[2]東理大院理工）

2B14p10　麹菌アミノ酸トランスポーターの機能解析

15:48 ○浜中大夢，松永翔也，金子明裕，佐野元昭，北川治恵，尾関健二，大箸信一（金沢工大・ゲノム研）

2B14p11　*Aspergillus oryzae* のハイドロフォービン群の機能と局在性の解析

16:00　°石田千絵, 山川　結, 早川芙佑華, 水野佑香, 中島春紫（明治大・農・農化）

2B14p12　麹菌 *Aspergillus oryzae* における機能性ハイドロフォービンの生産と吸着

16:12　加瀬明日香, °堂前圭佑, 中島春紫（明治大農・農化）

2B14p13　糸状菌ヒスチジンキナーゼ HysA による ROS 発生への効果

16:24　°林　早紀[1],　金丸京子[1],　吉岡めぐみ[1],　松井哲児[1], 加藤雅士[2], 小林哲夫[1]（[1]名大院農, [2]名城農）

2B14p14　麹菌農薬センサー AoNikA と AoNikB は正反対のスイッチ機能を持つ

16:36　°金丸京子[1],　伊谷優佳里[1],　松井哲児[1],　加藤雅士[2], 小林哲夫[1]（[1]名大院生命農, [2]名城大農）

2B14p15　*Trichoderma* sp. USF-2690 における sorbicillinoid 生合成に関するポリケチド合成酵素遺伝子

16:48　°森岡　陽[1], 志波　優[2], 清水寛之[1], 加藤達也[1], 菅谷紘一[1], 小野瀬淳一[1], 阿部尚樹[1]（[1]東農大・応生科・栄養, [2]東京農大・生物資源ゲノム解析センター）

2B14p16　真菌を用いたクロラムフェニコールの新規作用点の探索

17:00　°井上雅高, 西脇綾香, 後藤麻紀子, 成川　恵, 鎌倉高志（東理大院理工）

B21 会場　午前の部（9:00〜12:00）

微生物—物質生産–発酵（二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質)—

2B21a01　たくあん漬けから分離した乳酸球菌 *Lactococcus lactis* PJR24 株が生産するバクテリオシンの特性

9:00　°木村宏和[1], 松崎弘美[2]（[1]尚絅大・生活科学, [2]熊本県大・環境共生）

2B21a02　ミツバチ腐蛆病菌抑制効果を有するプロバイオティクス乳酸菌の解析

9:12　°杉村祐哉[1], 高松大輔[2], 芳山三喜雄[1]（[1]農研機構　畜草研, [2]農研機構　動衛研）

2B21a03　N/C 末端がリンクした環状バクテリオシン「ガセリシン A」の生合成機構に関する研究

9:24　°鈴木はるか[1],　川井　泰[1],　荒川健佑[2],　中村圭志[1], 安田成美[1],　木ノ内智之[1],　郭　暁艶[1],　水谷　陽[1],　西村順子[1], 北澤春樹[1], 齋藤忠夫[1]（[1]東北大院農, [2]岡山大院自科）

2B21a04　*Lactobacillus gasseri* LA158 が産生する二成分性バクテリオシン「ガゼリシン T」の自己耐性タンパク質に関する検討

9:36　°木ノ内智之[1,2],　安田成美[2],　鈴木はるか[2],　水谷　陽[2], 郭　暁艶[2],　川井　泰[2],　西村順子[2],　藤田康弘[1],　北澤春樹[2], 出内桂二[1], 齋藤忠夫[2]（[1]キリン㈱R&D 本部　飲料技術研究所, [2]東北大院農）

2B21a05　二成分性バクテリオシン「ガセリシン T」の作用機構に関する研究

9:48　°郭　暁艶, 川井　泰, 安田成美, 木ノ内智之, 水谷　陽, 鈴木はるか, 西村順子, 北澤春樹, 齋藤忠夫（東北大院農）

2B21a06　ビセニスタチン生合成における糖転移酵素 VinC の結晶構造解析

10:00　°南後恵理子[1],　南　篤志[2],　沼倉真理緒[3],　熊坂　崇[4], 江口　正[3]（[1]理研播磨, [2]北大院理, [3]東工大院理工, [4]高輝度光科学研究セ）

2B21a07　木質バイオマスを原料とした抗生物質カスガマイシンの発酵生産

10:12　°春日　和[1],　友常久実子[1],　上松　仁[2],　栗本康司[3], 小林正之[1], 小嶋郁夫[1]（[1]秋田県大院生資, [2]秋田高専, [3]秋田県大木高研）

2B21a08　*Streptomyces* 属放線菌の潜在的抗生物質生産能力を引き出すエリスロマイシン耐性変異の特定と機能解析

10:24　°今井　優[1], 綾木啓太[2], 渡邉　健[3], 越智幸三[4], 保坂　毅[2]（[1]信州大院・総合工, [2]信州大・農, [3]信州大院・農, [4]広工大・生命）

2B21a09　UV 照射処理による *Streptomyces griseochromogenes* からの PP1 阻害剤の単離

10:36　°岡田直己, 三橋進也, 生方　信（北大院農）

2B21a10　SMTP-7 による抗炎症作用を介した脳梗塞改善作用機序の解明

10:48　°鈴木絵里子, 松本直欣, 国清雄大, 蓮見惠司（東京農工大農）

2B21a11　複合誘導法の開発：複合系培養法による抗生物質生合成遺伝子の発現誘導

11:00　°尾仲宏康[1,2], 伊澤真澄[2], 森夕希子[2]（[1]東大院農生科・応生工, [2]富山県大・生工研）

2B21a12　異種発現，プロモーター置換，複合培養による Lactazole A 生産量の増加

11:12　°林　昌平[1],　池田治生[2],　大村　智[3],　奥　直也[4], 五十嵐康弘[4], 尾仲宏康[1,4]（[1]東大院農生科・応生工, [2]北里大・生命研, [3]北里大, [4]富山県大・生工研）

2B21a13　放線菌由来ランチビオティック合成酵素によるランチペプチド生産

11:24　°江畑一真[1],　冨宿賢一[1],　浅野泰久[1],　奥　直也[1], 五十嵐康弘[1], 尾仲宏康[1,2]（[1]富山県大工・生工, [2]東大院農生科・応生工）

2B21a14　線状プラスミドを利用した二次代謝産物生合成遺伝子クラスター導入法

11:36　°小松　護[1],　小曽根郁子[2],　橋本詢子[2],　新家一男[3], 片岡正和[4], 池田治生[1]（[1]北里大・北里生命研, [2]JBIC, [3]産総研, [4]信州大）

2B21a15　放線菌におけるマイコスポリン様アミノ酸生合成遺伝子群の解析

11:48　°宮本聖子, 小松　護, 池田治生（北里大・生命研）

B21 会場　午後の部（14:00〜17:36）

微生物—物質生産–発酵（二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質)—

2B21p01　とうふようもろみの生理活性

14:00　°屋良　瞳, 手島寛子, 橘信二郎, 安田正昭（琉大農・亜熱生資）

2B21p02　Comparison of adipogenesis inhibition activity of *Monascus*-fermented cereals

14:12　°Indika WANNINAIKA, Hisashi ASATO, Taisuke WATANABE, Hirohide TOYAMA, Shinjiro TACHIBANA（Dept. Biosci. Biotech., Fac. Agr., Univ. the Ryukyus）

2B21p03　麹菌が産生する鉄キレート環状ペプチド　デフェリフェリクリシンの大量生産技術の開発–菌株育種と培地成分の改良について–

14:24　°戸所健彦, 中川拓哉, 福田克治, 松村憲吾, 入江元子, 堤　浩子, 秦　洋二（月桂冠総研）

2B21p04　トリコテセン産生制御物質の探索・評価および作用機構の解析

14:36　市川雛代[1],　°前田一行[1,3],　中嶋佑一[1],　斉藤臣雄[2], 長田裕之[2], 小林哲夫[1], 木村　真[1,2]（[1]名大院生命農, [2]理研 基幹研, [3]明大院農）

2B21p05　麹菌で異種発現させたアフィディコリン生合成酵素の細胞内局在解析

14:48　°伴　暁彦[1], 田中瑞己[1], 藤居瑠彌[2], 及川英秋[2], 新谷尚弘[1], 五味勝也[1]（[1]東北大院農, [2]北大院理）

2B21p06　出芽酵母の遺伝子多重破壊株によるトリコテセン検出系の構築

15:00　°杉山智樹[1],　山根由美[1],　田中　彰[1],　小宮洋平[1], 越後輝敦[2], 宇佐美論[3], 峯岸宏明[2], 安藤直子[3]（[1]東洋大院工, [2]東洋大・バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター, [3]東洋大・理工）

2B21p07　赤色海洋酵母産生カロテノイドの化学構造および生理活性

15:12　°齋藤　忍[1],　佐藤　光[2],　津端翔二郎[2],　能木裕一[3], 高市真一[4], 浜本牧子[1,2]（[1]明治大院農, [2]明治大農, [3]JAMSTEC, [4]日医大）

2B21p08　酵母による酸化型グルタチオンの生産

15:24　°原　清敬[1], 桐山健太郎[2], 青木直子[1], 近藤昭彦[2]（[1]神戸大・自然, [2]神戸大院・工）

2B21p09　油脂（triacylglycerol）を分泌する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 変異株の解析
15:36　○藤井洋紀，松崎浩明，秦野琢之（福山大・生命工・生物工）

2B21p10　稀少極長鎖不飽和脂肪酸ネルボン酸を生産する微生物の探索
15:48　○梅本宏樹[1]，　東田悠生[2]，　倉田淳志[1]，　浜本一洋[3]，塚原　智[3]，石黒　隆[3]，岸本憲明[1]（[1]近畿大院農，[2]近畿大農，[3]ミヨシ油脂(株)）

2B21p11　ジペプチドによる大腸菌の生育阻害機構の解析
16:00　○板谷佳織，和地正明（東工大院生命理工）

2B21p12　大腸菌における改良型ベンジルイソキノリンアルカロイド生産系を用いたアポルフィンアルカロイド生産
16:12　○松村栄太郎[1]，　中川　明[1]，　南　博道[1]，　片山高嶺[1]，山本憲二[1]，佐藤文彦[2]，熊谷英彦[1]（[1]石川県立大・資源研，[2]京大院・生命）

2B21p13　高いプロバイオティクス効果をもつポリリン酸高蓄積乳酸菌の開発
16:24　○石田康晃[1]，　瀬川修一[2]，　斎木朝子[2]，　廣田隆一[1]，池田　丈[1]，黒田章夫[1]（[1]広島大院，[2]サッポロビール株式会社）

2B21p14　好アルカリ菌 *B. halodurans* C-125 株の各種 pH 条件下での haloduracin の生産
16:36　○片山欣哉，田崎弘之（日獣大）

2B21p15　新規塩基性ポリアミノ酸の探索
16:48　○青柳大介[1]，芝原弘樹[1]，内海尚子[1]，石井義孝[2]，木野邦器[1]（[1]早大理工，[2]大妻女子大）

2B21p16　細胞性粘菌における抗生物質の探索
17:00　○岩崎なつみ[1]，齊藤玉緒[2]（[1]上智大院理工，[2]上智大理工）

2B21p17　シロイヌナズナの側根伸長を促進する *Pseudomonas fluorescens* の解析
17:12　○津田高佑，玉置友樹，田中亜里彩，阿野貴司，岡南政宏（近畿大・生物理工・生物工）

2B21p18　植物葉を利用した新しい微生物農薬候補株の単離
17:24　○大池達矢，岡南政宏，阿野貴司（近畿大学院生物理工）

B22 会場　午前の部（9:00〜12:00）

微生物―物質生産–醸造，発酵（一次代謝産物）―

2B22a01　代謝工学に基づいた大腸菌によるイタコン酸生産
9:00　○岡本脩佑, 田中康智, 麻生祐司, 小原仁実（京都工繊大院・工芸科学）

2B22a02　アクリル酸生産関連遺伝子の発現とアクリル酸発酵生産への応用
9:12　○田中康智, 岡本脩佑, 麻生祐司, 小原仁実（京都工繊大院・工芸科学）

2B22a03　大腸菌における *Bacillus amyloliquefaciens* 由来アミラーゼ遺伝子 *amyA* 発現系の構築
9:24　○麻生祐司，岡本脩佑，田中康智，小原仁実（京都工繊大院工芸科学）

2B22a04　組換え大腸菌による 1-プロパノールの発酵生産に関する研究
9:36　浦野信行，○藤居実咲, 片岡道彦（阪府大院生環科・応生科）

2B22a05　ロイシン生産菌 NB12 株のゲノム配列解析による生産メカニズムの解明
9:48　○外内尚人, 小関智恵, 中西一夫（味の素バイオファイン研）

2B22a06　乳酸菌の不飽和脂肪酸ヒドロキシル化酵素について
10:00　○鈴木由佳, 金内　誠, 畑中咲子, 下山田真, 石田光晴（宮城大食産）

2B22a07　チーズからの好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分離と系統分類学的研究
10:12　○松山未央子，石川森夫，貝沼(岡本)章子，小泉幸道（東農大・応生科・醸造）

2B22a08　*Acetobacter* 属酢酸菌におけるリボソームサブユニット準拠の系統に関する比較考察
10:24　貝沼(岡本)章子[1]，松谷峰之介[2]，○伊佐地麻代[1]，石川森夫[1]，志波　優[3]，吉川博文[3,4]，薬師寿治[2]，松下一信[2]，小泉幸道[1]（[1]東農大・応生科・醸造，[2]山口大・農，[3]東農大・ゲノムセンター，[4]東農大・応生科・バイオ）

2B22a09　こんにゃく飛粉糖化液を利用したプロピオン酸菌による有機酸生産
10:36　○高屋朋彰，椎谷芳樹，廣瀬優作，田中孝国（小山高専物質）

2B22a10　微生物によるグルコースモノアセテートの生産
10:48　○村上　洋，桐生高明，木曽太郎，中野博文（大阪市立工業研究所）

2B22a11　柿乳酸発酵物における腸内菌叢改善効果
11:00　庄條愛子[1,2]，　今井ももこ[1]，　飯田聡史[1]，　大串美沙[1]，原田直樹[3]，　山地亮一[3]，　乾　　博[4]，　細谷圭助[5]，　○和田野晃[1,3]，中野長久[1,3,6]（[1]大阪府大・地域連携，[2]相愛大，[3]大阪府大・生命環境，[4]大阪府大・総リハ，[5]成美大短大，[6]大阪女子短大）

2B22a12　*Lactobacillus plantarum* VL103 株における fumarate reductase 欠損による影響
11:12　○梶野敦史[1]，　辻　　聡[1]，　Pascal Hols[2]，　梶川揚申[1]，佐藤英一[1]，岡田早苗[1]（[1]東農大応生科･化学，[2]ルヴァンカトリック大学・生命科学）

2B22a13　グルコース取込み機構を変換した *Lactobacillus plantarum* VL103 株によるコハク酸生成
11:24　○辻　　聡[1]，　今井祐斗[1]，　Pascal Hols[2]，　梶川揚申[1]，佐藤英一[1]，岡田早苗[1]（[1]東農大応生科･化学，[2]ルヴァンカトリック大学・生命科学）

2B22a14　福山黒酢の醪中の D-アミノ酸の定量と微生物の単離同定による D-アミノ酸の生成機構の解明
11:36　○郷上佳孝[1]，岡田かおり[1]，松井大亮[2]，竹下義隆[3]，老川典夫[1]（[1]関西大化学生命工，[2]現：富山県立大学，[3]福山黒酢株式会社）

2B22a15　黒酢から単離された酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* W-1 の D-アラニン生産とアラニンラセマーゼ
11:48　○坂井麻美，老川典夫（関大化学生命工）

B22 会場　午後の部（14:00〜17:00）

微生物―物質生産–醸造，発酵（一次代謝産物）―

2B22p01　コリネ型細菌を用いた澱粉系バイオマスの利用
14:00　○岡井直子[1]，　足立典子[2]，　高橋千尋[2]，　Emma Niba[1]，松田史生[1]，荻野千秋[2]，近藤昭彦[2]（[1]神戸大自，[2]神戸大院工･応化）

2B22p02　コリネ型アミノ酸生産菌の第三のグルコース輸送バイパス
14:12　○野口土雄[1]，　大下政一[1]，　妹尾彰宏[2]，　三橋　敏[2]，竹野誠記[1]，池田正人[1]（[1]信州大農・応生科，[2]協和発酵バイオ）

2B22p03　コリネ型アミノ酸生産菌の脂質分泌性変異株（第一報）
14:24　○竹野誠記[1]，浦林昭伸[1]，三橋　敏[2]，池田正人[1]（[1]信州大農・応生科，[2]協和発酵バイオ）

2B22p04　コリネ型アミノ酸生産菌の脂質分泌性変異株（第二報）
14:36　高嵜真奈美[1]，　○見村晃紀[1]，　妹尾彰宏[2]，　三橋　敏[2]，竹野誠記[1]，池田正人[1]（[1]信州大農・応生科，[2]協和発酵バイオ）

2B22p05　コリネ型アミノ酸生産菌を用いるビオチンバイオアッセイシステム
14:48　○宮本　綾[1]，　高嵜真奈美[1]，　三橋　敏[2]，　竹野誠記[1]，池田正人[1]（[1]信州大農・応生科，[2]協和発酵バイオ）

2B22p06　酸性条件下におけるグルタミン酸発酵法の開発
15:00　○原　吉彦，伊藤久生，泉井　裕，守屋美加，平野聖子，小野栄治，松井和彦（味の素）

2B22p07　酸性条件下におけるグルタミン酸発酵法の開発(第 3 報)
15:12　○伊藤久生，　泉井　裕，　守屋美加，　平野聖子，　原　吉彦，小野栄治，松井和彦（味の素）

2B22p08　コリネ型細菌における Glu 過剰生産条件での代謝変換の解析
15:24　○高橋新太郎，高木博士，中村一博，橋本賢一，川崎　寿，中松　亘（東電大院工）

2B22p09　Corynebacterium glutamicum のグルタミン酸過剰生成時に発現量が大きく増加する短い機能未知 ORF の解析
15:36　○佐藤美咲, 児山雄太郎, 橋本賢一, 中松　亘, 川崎　寿（東電大院工）

**2B22p10　*Corynebacterium glutamicum* 由来のグルタミン酸排出チャネルである *NCgl1221* 遺伝子産物の C 末端ドメインの電

気生理学的手法を用いた機能解析

15:48 ○橋本賢一[1]，　山下周子[2]，　北嶋俊一[1]，　矢部　勇[1]，夏目　亮[1]，中松　亘[1]，和地正明[2]（[1]東電大院・工・物質工，[2]東工大院・生命理工・生物プロセス）

2B22p11　ワインアロマ醸成に影響する酵母のエピジェネティクス

16:00 ○中川純一，藤村朱熹，戸田恭平，内藤佳代子，磯貝宜美，斎藤優生，　方壁あゆみ，　村中梨紗，　曾　少豊，　藤森　嶺，妙田貴生，戸枝一喜，西澤　信，永島俊夫（東農大院生物産業）

2B22p12　窒素飢餓（NCR）シグナルが下面ビール酵母の Lg-*FLO1* 遺伝子の転写と凝集性を誘導する

16:12 ○尾形智夫, 牧野かおり, 泉川真美（アサヒビール醸造研）

2B22p13　麹菌の生産したスフィンゴ脂質の酵母による取り込みの解析

16:24 ○平田みよ[1]，　泉　和輝[1]，　田島麻理恵[1]，　澤田和敬[2]，柘植圭介[2]，北垣浩志[1]（[1]佐賀大学，[2]佐賀県工業技術センター）

2B22p14　講演取消

2B22p15　レドックス制御による新規バイオエタノール発酵阻害物質・グリコールアルデヒド耐性の増強

16:48 ジャヤコディーラヒル[1,2]，　林　信行[1,2]，　○北垣浩志[1,2]（[1]佐賀大農，[2]鹿児島大学大学院連農）

B23 会場　午前の部（9:00〜12:00）

微生物—物質生産–酵素，タンパク質—

2B23a01　4-HIL 合成に有用な AMKP 還元酵素の X 線結晶構造解析

9:00 ○石　　玄（東大院農生科）

2B23a02　細胞内に近い高分子濃度を持つ無添加細胞抽出液の調製

9:12 ○藤原　慶[1]，柳澤実穂[2]，野村M.慎一郎[1]（[1]東北大・分子ロボ，[2]九州大・理）

2B23a03　麹菌プロテアーゼ遺伝子 TA3 のオルタナティブスプライシング

9:24 ○久保島恵，石田　健，森田寛人，前田　浩，岡本綾子，山形洋平，竹内道雄（東京農工大院・応生化）

2B23a04　海洋性光合成細菌による人工 short hairpin RNA の生産

9:36 ○長尾信義[1]，鈴木宏道[1]，沼野利佳[2]，梅影　創[1]，菊池　洋[1]（[1]豊橋技科大・工，[2]豊橋技科大・EIIRIS）

2B23a05　植物由来オスモチンの麹菌 *A. oryzae* による生産および精製

9:48 ○伊藤大修[1]，丸山潤一[1]，永田宏次[2]，田之倉優[2]，北本勝ひこ[1]（[1]東大院農生科・応生工，[2]東大院農生科・応生化）

2B23a06　*Klebsiella pneumoniae* 9-3B 由来のフィチン酸からイノシトールを生成するフィターゼに関する研究

10:00 ○大谷　翠[1]，Lotis Escobin-Mopera[1]，杉本敬祐[2]，曾根輝雄[1]，阿部　歩[1]，田中みち子[1]，浅野行蔵[1]（[1]北大院農，[2]旭川高専）

2B23a07　亜リン酸デヒドロゲナーゼを用いた NADPH 再生系とシキミ酸デヒドロゲナーゼとの共役反応による高効率シキミ酸合成

10:12 ○児玉洋輔[1]，廣田隆一[2]，池田　丈[2]，黒田章夫[2]（[1]広島大工，[2]広島大院先端物質・分子生命）

2B23a08　新規原理によるアミノ酸定量法－タンパク質翻訳に基づくバイオアッセイ法の提唱

10:24 ○亀谷将史[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

2B23a09　生分解性プラスチック分解能を持つ深海微生物における脂質分解酵素の解析

10:36 ○加藤千明[1]，　座間千夏[1,2]，　関口峻允[1,2]，　濱島裕輝[1,3]，榎　牧子[2]（[1]海洋研究開発機構，[2]東京海洋大院海洋科学，[3]立教大院生命理）

2B23a10　*Streptococcus bovis* 148 由来 AmyA 基質吸着部位の機能解析

10:48 ○上野雅哉，梶川揚申，佐藤英一，岡田早苗（東農大応生科・化学）

2B23a11　*Rhizopus microsporus* のスクロース加水分解酵素遺伝子のクローニング

11:00 ○折笠善丈，小田有二（帯畜大・食品）

2B23a12　*Aureobasidium pullulans* 由来の GH family 51 に属する α-L-アラビノフラノシダーゼの酵母 *Pichia pastoris* における発現と酵素化学的諸性質

11:12 ○東田知洋，太田一良（宮崎大農・応生科）

2B23a13　バイオマス糖化液を原料とした *Trichoderma reesei* セルラーゼの効率的生産系の構築

11:24 ○池　正和，田伏美峰，徳安　健（農研機構・食総研）

2B23a14　プロテアーゼ遺伝子破壊によるセルラーゼ生産菌 *Aspergillus aculeatus* の育種

11:36 ○坂田侑子，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大院生環科）

2B23a15　部位特異的非天然アミノ酸導入系を用いた遺伝子特異的翻訳スイッチ

11:48 ○加藤祐輔，皆葉正臣（農業生物資源研）

B23 会場　午後の部（14:00〜17:48）

微生物—物質生産–酵素，タンパク質—

2B23p01　*Dictyostelium discoideum* のポリケタイド合成酵素遺伝子の発現パターン解析

14:00 ○杉山哲夫[1]，赤羽根一樹[1]，齊藤玉緒[2]（[1]上智大院理工，[2]上智大理工）

2B23p02　細胞性粘菌の予定柄細胞分化誘導に関するポリケタイド合成酵素の働き

14:12 佐藤有紀江[1]，○加賀美太平[2]，齋藤玉緒[2]（[1]上智大院理工，[2]上智大理工）

2B23p03　細胞性粘菌における新規ハイブリッド型ポリケタイド合成酵素の分子進化的解析

14:24 ○李　哲熙[1]，齊藤玉緒[2]（[1]上智大院理工，[2]上智大学理工）

2B23p04　新規ハイブリッド型ポリケタイド合成酵素 SteelyA による形態形成制御機構の解明

14:36 ○成田隆明[1]，加賀美春奈[2]，齊藤玉緒[2]（[1]上智大院理工，[2]上智大理工）

2B23p05　*Gluconobacter melanogenes* 由来の 4－ケトアラボン酸合成酵素の酵素学的解析

14:48 ○大石裕美[1]，田副正明[2]，小林節子[3]，星野達雄[2]（[1]玉川大院農，[2]玉川大学術研究所，[3]株式会社ハイファジェネシス）

2B23p06　親水性イオン液体［BMIM］[Cl] 耐性菌由来の protease の諸性質の検討

15:00 ○妹尾文哉[1]，龍波拓磨[2]，池田泰之[2]，倉田淳志[1,2]，岸本憲明[1,2]（[1]近畿大院農，[2]近畿大）

2B23p07　難分解性タンパク質分解酵素の作用機序の解明

15:12 ○宮末慎弥[1]，満生慎二[2]，境　正志[2]，後藤正利[3]（[1]九産大院工，[2]九産大，[3]九州大）

2B23p08　*Burkholderia* 属最近株 β-フェニルアラニンアミノアシラーゼの組換え発現と精製

15:24 ○若林佳佑[1]，山崎　穣[2]，橋本賢一[1,2]，夏目　亮[1,2]，川崎　寿[1,2]，中松　亘[1,2]（[1]東電大院工・物質工，[2]東電大工・環境化）

2B23p09　*Variovorax* 属細菌由来（*R*）-β フェニルアラニンアミノアシラーゼの組換え発現と精製

15:36 ○井桁啓介[1]，　二階堂圭輔[2]，　夏目　亮[1,2]，　川崎　寿[1,2]，中松　亘[1,2]，橋本賢一[1,2]（[1]東電大院工・物質工，[2]東電大工・環境化）

2B23p10　担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 による西洋ワサビペルオキシダーゼの異種発現最適化

15:48 ○歌島　悠[1,2]，　松本弘嵩[1]，　岸本高英[1]，　柳谷周作[1]，正木和夫[2,3]，家藤治幸[4]（[1]東洋紡，[2]広大院・生物圏，[3]酒総研，[4]愛媛大・農）

2B23p11　*Ralstonia* sp. NT-80 由来ラクトン特異的エステラーゼの機能解析

16:00 ○太田友彦[1]，　岩間佑介[1]，　並木謙太[1]，　月村　亘[1]，赤沼元気[1]，牛尾一利[2]，石塚盛雄[1]（[1]中央大理工応化，[2]新居浜高専生物応化）

2B23p12　酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 が行う酢酸発酵における膜結合型アルデヒド脱水素酵素の役割

16:12 児玉知大[1]，○薬師寿治[1]，松谷峰之介[1]，ティーラグールガンジャナ[2]，松下一信[1]（[1]山口大・農，[2]カセサート大・理）

**2B23p13　*Brevibacillus* sp. 93 株の産生するオリゴ乳酸分解酵

素に関する研究

16:24 ○佐藤友彦[1]，中川甲斐[1]，遠藤睦子[1]，冨田耕右[2]，金子　淳[1]，阿部直樹[1]（[1]東北大院農・生物産業創成，[2]関東学院大・工）

2B23p14　アリシクロバチルス溶菌酵素の探索

16:36 ○湯川清孝[1]，森　梢[2]，金子幸弘[3]，高木瑛実子[1]，秦田勇二[1,2]（[1]横浜市立大学，[2]海洋研究開発機構，[3]国立感染症研究所）

2B23p15　好アルカリ性バシラスの推定 L-ホモ型ポリ-γ-グルタミン酸合成酵素

16:48 ○芦内　誠，山本　孝，清水一希，小松和也（高知大院農）

2B23p16　好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 が生産するケラチン分解性細胞外プロテアーゼ巨大分子複合体に関する研究ー電子顕微鏡による構造解析と観察される小胞についてー

17:00 ○片岡真亜知[1]，山岡昂太[1]，川崎一則[2]，茂里　康[2]，渡部邦彦[1]（[1]京都府大院，[2]産総研・健康工学）

2B23p17　トリ羽毛分解活性を持つ好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株のゲノム解析と ゲノム情報を用いたケラチン分解性プロテアーゼ巨大複合体に含まれる構成成分タンパク質の検索

17:12 稲田秀平[1]，片岡真亜知[1]，松井一真[2]，森坂裕信[2]，植田充美[2]，○渡部邦彦[1]（[1]京都府大院生環，[2]京都大院農）

2B23p18　*α-N*-acetylgalactosaminidase を用いた糖ペプチドの合成

17:24 ○山口竜也[1]，浅野健太郎[1]，橋本賢一[1]，宮崎達雄[2]，川崎　寿[1]，夏目　亮[1]，鰺坂勝美[2]，中松　亘[1]（[1]東電大院・工・物質工，[2]新潟薬大・応生科）

2B23p19　枯草菌細胞壁合成に関与する酵素を用いた新規ペプチド合成法

17:36 ○荘　葉[1]，橋本義輝[1]，安部智子[2]，葛　寅[1]，熊野匠人[1]，小林達彦[1]（[1]筑波大院・生命環境，[2]東電大・理工）

B24 会場　午前の部（9:00〜12:00）

微生物―物質生産-微生物変換，微生物酵素反応―

2B24a01　改良型酵素を用いたゲラニオール関連物質の微生物生産

9:00 ○岩嵜美希，藤井　爽，梶原　順，古林真衣子，斎藤恭一，梅野太輔（千葉大院・工・共生応化）

2B24a02　新規低分子ゲル化剤としての *l*-メントールマルトシドの酵素的合成

9:12 ○井手浩平，小林慶一，本田裕樹，桐村光太郎（早大理工応化）

2B24a03　*dl*-Lysine を原料とした one-pot での L-pipecolic acid 合成方法の開発

9:24 ○三宅良磨[1,2]，出来島康方[1,2]，由上亮一[3]，谷　泰史[3]，三原久明[3]，川端　潤[1,2]（[1]三菱化学科学技術研究センター，[2]エーピーアイコーポレーション，[3]立命館大・生命科学・生物工）

2B24a04　可溶性エポキシドハイドロラーゼ阻害活性をもつ新規 SMTP 同族体の作用解析

9:36 ○大竹新也[1]，長谷川啓子[2]，西村直子[2]，鈴木絵里子[1]，蓮見恵司[1]（[1]東農工大農，[2]株式会社ティムス）

2B24a05　CYP110E1 及び P450BM3（F87V）を用いた希少な芳香環ジオール化合物の生産

9:48 ○北村瑛美[1]，位寄かのこ[1]，寺岡亜佑子[1]，三沢典彦[2]，新藤一敏[1]（[1]日女大家政・食物，[2]石川県大・生資研）

2B24a06　酵素的 Pictet-Spengler 反応によるテトラヒドロイソキノリン類の不斉合成

10:00 ○西八條正克[1]，平井義則[1]，川野　茂[1]，西山　章[1]，南　博道[2]，片山高嶺[2]，八十原良彦[1]，佐藤文彦[3]，熊谷英彦[2]（[1]カネカ・フロンティア研，[2]石川県立大，[3]京大院・生命）

2B24a07　旧黄色酵素の構造情報に基づく機能改変と（4*R*, 6*R*）-Actinol 生産への応用

10:12 浦野信行[1]，○三谷恵一[1]，野村美佳[1]，堀田彰一朗[2]，宮川拓也[2]，田之倉優[2]，清水　昌[3]，片岡道彦[2]（[1]阪府大院生環科・応生科，[2]東大院農生科・応生化，[3]京都学園大・バイオ環境）

2B24a08　テトラヒドロフランを γ-ブチロラクトンに変換する生体触媒の構築

10:24 ○田島誉久，小村彰裕，中島田豊，加藤純一（広島大院先端物質・分子生命）

2B24a09　希少不飽和脂肪酸を用いた脂肪酸の構造と抗菌活性との関係の解明

10:36 ○永尾寿浩[1]，藤原邦夫[2]，田中重光[1]，渡辺　嘉[1]，中野博文[1]，倉田淳志[2]，岸本憲明[2]（[1]阪市工研，[2]近畿大院・農）

2B24a10　*Gluconobacter frateurii* NBRC3285 によるラクトビオン酸生産に関する研究

10:48 ○桐生高明[1]，木曽太郎[1]，中野博文[1]，大江健一[2]，山元英樹[2]，木村　隆[2]，村上　洋[1]（[1]大阪市工研，[2]ユニチカ㈱）

2B24a11　多様な細菌のゲノム上に存在するハロアルカンデハロゲナーゼの機能解析

11:00 ○田中裕興，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大院生命）

2B24a12　酵素複合体を導入したシアノバクテリアによるエチレンガス産生

11:12 ○神藤定生[1]，伊藤ユキ[2]，水戸菜摘[2]，冨田英誠[2]，細田晃文[2]，田村廣人[2]（[1]名城大理工，[2]名城大農）

2B24a13　*Chryseobacterium* sp. 5-3B 由来 *N*-アセチルトランスフェラーゼの遺伝子クローニングと発現

11:24 ○竹中慎治，吉田健二，本間悠太，吉田健一（神戸大院農）

2B24a14　Whole-cell biocatalyst を用いた立体選択的アミノ酸酸素添加反応の検討

11:36 ○日比　慎[1]，笠原拓也[2]，河嶋隆志[2]，高橋里美[1]，小川　順[2]（[1]京大院農・産業微生物，[2]京大院農・応用生命）

2B24a15　分子シャペロン PPIase を利用した蛋白質の可溶性向上〜芳香族アミノ酸脱炭酸酵素との融合化

11:48 ○小柳　喬[1]，原彩由美[1]，南　博道[2]，片山高嶺[2]，熊谷英彦[2]，三沢典彦[2]（[1]石川県大・生資環・食品，[2]石川県大・資源研）

B24 会場　午後の部（14:00〜17:00）

微生物―物質生産-微生物変換，微生物酵素反応―

2B24p01　*Cryptococcus diffluens* のガラクチュロン酸還元酵素の異種発現と組換え酵素による L-ガラクトン酸の生産

14:00 ○松原健生，濱田翔平，岸田正夫（阪府大院生環科・応生化）

2B24p02　食後高血糖改善成分 1-デオキシノジリマイシンの枯草菌等による高生産培養

14:12 ○小野瀬晋司[1]，池田亮一[2]，仲川清隆[1]，木村俊之[3]，山岸賢治[3]，樋口央紀[4]，宮澤陽夫[1]（[1]東北大院農・機能分子解析，[2]旭松食品㈱，[3]東北農研セ，[4]㈱機能性植物研）

2B24p03　組換え大腸菌によるフェニルアセトニトリルの生産

14:24 ○三木佑太[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

2B24p04　*Lactobacillus plantarum* の脂肪酸代謝を活用した *α*-リノレン酸由来希少脂肪酸生産

14:36 ○岸野重信，竹内道樹，平田晶子，朴　時範，小川　順（京大院農・応用生命）

2B24p05　*Lactobacillus plantarum* AKU 1009a 由来リノール酸水和酵素の諸性質解明

14:48 ○竹内道樹[1]，田辺香緒里[1]，平田晶子[1]，朴　時範[2]，岸野重信[1]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大院農・産業微生物）

2B24p06　*Lactobacillus plantarum* の脂肪酸代謝を活用した実用化レベルでの水酸化脂肪酸生産

15:00 竹内道樹，○福永健太，岸野重信，平田晶子，朴　時範，小川　順（京大院農・応用生命）

2B24p07　*Lactobacillus plantarum* AKU 1009a　由来水酸化脂肪酸脱水素酵素の諸性質解明

15:12 ○朴　時範[2]，竹内道樹[1]，岸野重信[1]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大院農・産業微生物）

2B24p08　微生物反応および酵素反応を用いた 5-デオキシ-ヘキソースの生産

15:24 ○吉原明秀[1]，百地　歩[1]，W. J. フリート ジョージ[2]，何森　健[1]（[1]香川大希少糖研セ，[2]オックスフォード大学）

2B24p09　*Aspergillus* 属種間での *α*-グルコシダーゼによるエチル-*α*-グルコシドの生産性の相違について

15:36 ○戸倉慶大[1]，中西載慶[2]，内野昌孝[3]，野口治子[3]，

高野克己[3]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大短大・醸造，[3]東京農大応生・化学）

2B24p10　糸状菌細胞壁溶解に寄与する *Paenibacillus* sp. No. 11 株由来 α-1, 3-グルカナーゼの解析

15:48　◦矢野成和[1]，Suyotha Wasana[2]，藤本寛子[2]，立木　隆[2]，若山　守[2]（[1]山形大院理工，[2]立命館大生命）

2B24p11　カラギーナン分解酵素の探索と精製

16:00　◦高橋　亮，大西浩平（高知大農）

2B24p12　β-グルカン資化性海洋酵母 *Metschnikowia bicuspidata* によるエタノール生産

16:12　◦木島淳子[1]，佐々木愛瀬[1]，金内　誠[2]，笠原　紳[1]（[1]宮城大食産業・環境，[2]宮城大食産業・フード）

2B24p13　海洋性カンファー分解菌の分離と Baeyer-Villiger monooxygenase 遺伝子の取得

16:24　◦安川直希，岩木宏明，長谷川喜衛（関西大･化学生命工）

2B24p14　重イオンビームによる担子菌の変異株作製に関する研究

16:36　◦三橋進也[1]，風間裕介[2]，阿部知子[2,3]，生方　信[1]（[1]北大院農，[2]理研イノベ，[3]理研仁科セ）

2B24p15　糸状菌の生化学的性質に対する界面電荷，界面疎水性の影響

16:48　◦小田　忍[1]，　坂本直樹[1]，　道畠さゆ美[1]，　堀邊英夫[2]，河野昭彦[2]，大箸信一[1]（[1]金沢工大ゲノム研，[2]金沢工大ものづくり研）

A37 会場　午前の部（9:00～12:00）

動物―生理・栄養，生体機能，生体制御―

2A37a01　α－トコフェロールのビタミン E 同族体濃度低下作用の解析

9:00　野村　早，半澤史聡，佐久間衣里，◦池田彩子（名古屋学芸大・管理栄養）

2A37a02　ストレス性睡眠障害モデルマウスの NMR-メタボリック・プロファイリング

9:12　◦根本　直，永井優香，宮崎　歴，大石勝隆（産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門）

2A37a03　ラット小腸における難消化性二糖 Melibiose の水溶性ケルセチン配糖体吸収促進作用

9:24　◦田中誠也[1]，篠木亜季[2]，原　　博[2]（[1]北海道大・農，[2]北海道大・院農）

2A37a04　トランス脂肪酸長期摂取ラットにおける抗動脈硬化リン脂質プラスマローゲンの変動

9:36　◦千葉　俊[1]，西向めぐみ[2]，原　　博[2]（[1]北海道大・農，[2]北海道大院農）

2A37a05　変形性膝関節症における加水分解コラーゲンの効果

9:48　◦上原一貴，松尾俊輝，中島正博，渡部睦人，野村義宏（東農工大農・硬蛋研）

2A37a06　人工甘味料の摂取がマウス肝臓遺伝子発現プロファイルに与える影響の網羅的解析

10:00　◦牛尼翔太[1]，石島智子[1]，阿部啓子[1,2]，中井雄治[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]神奈川科学技術アカデミー）

2A37a07　高脂肪高コレステロール食摂取ラットにおける肝臓脂質代謝に及ぼす乳酸発酵豆乳の影響

10:12　◦小林麻貴[1]，　平畑理映[2]，　榊原里恵[3]，　江草信太郎[3]，福田　滿[1]（[1]武庫川女子大 生環・食栄，[2]武庫川女子大院 生環・食栄，[3]マルサンアイ・開発統括部）

2A37a08　ヒト由来ミトコンドリア局在性 NAD キナーゼ遺伝子のノックダウンの影響

10:24　◦川畑　豊，大橋一登，河井重幸，村田幸作（京大院農）

2A37a09　廃用性骨萎縮における活性酸素産生と抗酸化酵素 SOD1 の役割

10:36　◦清水孝彦[1]，森川大智[1,2]，野尻英俊[2]，斎田良知[2]，小林慶司[1,2]，渡辺憲史[1]，　小澤裕介[1]，　小池正人[1,2]，　麻生義則[3]，　金子和夫[2]（[1]千葉大院医，[2]順天大院医，[3]東京医科歯科院医）

2A37a10　ビタミン C によるアルツハイマー病態の緩和

10:48　◦村上一馬[1,2]，　村田　央[2]，　小澤裕介[2,3]，　木下憲明[4]，入江一浩[1]，白澤卓二[5]，清水孝彦[2,3]（[1]京大院農，[2]都老人研，[3]千葉大院医，[4]免疫生物研，[5]順天大院医）

2A37a11　白金およびパラジウムナノコロイドは *Sod1* 欠損に起因する皮膚萎縮を改善する

11:00　◦澁谷修一，小澤裕介，清水孝彦（千葉大院医　先進加齢医学）

2A37a12　新規タマゴ由来ペプチド摂取が関節損傷に及ぼす効果

11:12　◦内野貴之[1]，　朱　暁琳[1]，　渡部和哉[2]，　安　芝英[2]，青笹正義[2]，　堀江典子[2]，　益田和二行[2]，　丸　勇史[2]，　金　武祚[2]，浅井克仁[1]（[1](株)エバーライフ，[2](株)ファーマフーズ）

2A37a13　新規タマゴ由来ペプチド摂取がヒト膝関節痛に及ぼす効果

11:24　◦青笹正義[1]，　渡部和哉[1]，　安　芝英[1]，　堀江典子[1]，朱　暁琳[2]，　内野貴之[2]，　リムカンヒョン[3]，　益田和二行[1]，丸　勇史[1]，浅井克仁[2]，金　武祚[1]（[1](株)ファーマフーズ，[2](株)エバーライフ，[3]世明大学）

2A37a14　分離大豆タンパク質がマグネシウム欠乏ラット白色脂肪組織遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響

11:36　◦米光翔吾[1]，石島智子[1]，阿部啓子[1,2]，中井雄治[1]（[1]東京大院農，[2]神奈川科学技術アカデミー）

2A37a15　大豆粉摂取がラット肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響

11:48　◦高橋陽子[1]，小西智一[2]，八巻幸二[1]（[1]農研機構・食総研，[2]秋田県立大・生物資源科学）

A37 会場　午後の部（14:00～17:12）

動物―生理・栄養，生体機能，生体制御―

2A37p01　UVB 照射ヘアレスマウスにおける臓器間ネットワークを介した脂肪細胞分化制御因子に及ぼす影響

14:00　◦松居　翔，岸田　黎，辻　　徹，登内彩絵，服部一夫，大石祐一（東農大応生科・栄養）

2A37p02　加齢による皮膚変化の分子レベル解析

14:12　◦井上良希[1]，　伊藤　眸[1]，　中澤京子[2]，　斉藤憲司[2]，加藤久典[2]，服部一夫[1]，大石祐一[1]（[1]東農大応生科･栄養，[2]東大･総括）

2A37p03　プロリン異性化酵素 Pin1 は Presenilin1 に結合し，活性を制御する

14:24　◦佐々木広美，二井勇人，内田隆史（東北大院農）

2A37p04　フェネチルイソチオシアネートの糖尿病への効果

14:36　◦小野弥奈，伊藤芳明，長澤孝志（岩手大院農・応生化）

2A37p05　直鎖イソマルトメガロ糖がラット小腸のケルセチン配糖体吸収と血中濃度に及ぼす影響

14:48　◦篠木亜季，LANG Weeranuch，熊谷祐也，森　春英，木村淳夫，石塚　敏，原　　博（北大院農）

2A37p06　キノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ（QPRT）欠損マウスの真性ナイアシン欠乏

15:00　◦柴田克己[1]，　寺方美紀[1]，　福渡　努[1]，　佐野光枝[1]，福岡伸一[2]（[1]滋賀県大栄養，[2]青山学院大）

2A37p07　Allyl isothiocyanate 投与によるインスリン分泌亢進の作用機序の検討

15:12　◦森　紀之[1]，　倉田真奈美[2]，　松村成暢[2]，　山崎英恵[2]，灘本知憲[1]，伏木　亨[2]（[1]滋賀県大・人間文化，[2]京大院・農）

2A37p08　高コレステロール食給餌マウスへの杜仲葉熱水抽出液投与の効果

15:24　◦荒木真由美[1]，　宮澤真紀[2]，　渡部由貴[3]，　瀬戸山央[1]，廣川隆彦[1]，　青木信義[1]，　安間智慧子[4]，　小林征洋[5]，　亀井飛鳥[3]，阿部啓子[3,6]（[1]神奈川県産技セ，[2]神奈川県衛研，[3]神奈川科学技術アカデミー，[4](有)碧山園，[5]東京海洋大院・海洋科学・食品流通，[6]東大院・農生科・応生化）

2A37p09　紅麹の骨形成促進活性のスクリーニング

15:36　◦池尻真美，比嘉由美子，安里　尚，橘信二郎（琉大農・亜熱生資）

2A37p10　3T3-L1 脂肪細胞に対する短梗五加抽出物の作用

15:48　◦西田美也子，深井一子，永塚貴弘，佐藤眞治，西田浩志，小西徹也（新潟薬大応生科）

2A37p11　飲酒によって変動するマウス糞便中化合物の探索

16:00　◦蛭川頌子，真田峻佑，大島寛史，三好規之（静県大院・薬食生命科学総合学府）

2A37p12　*ob/ob* マウス糞便抽出物の分析によるメタボリック症

候群新規診断バイオマーカーの探索
16:12 ○真田峻佑，蛭川頌子，大島寛史，三好規之（静県大・薬食生命科学総合学府）

2A37p13　PQQ による MC3T3-E1 骨芽細胞の骨形成への影響
16:24 ○比嘉由美子，橘信二郎（琉大農・亜熱生資）

2A37p14　食餌分離大豆タンパク質による脂質吸収阻害がインスリン分泌に及ぼす影響の解析
16:36 ○向後雄一郎，堀内真美，中村　卓，竹中麻子（明治大農）

2A37p15　大豆タンパク質食摂取時の血中アミノ酸濃度の低下が食後インスリン分泌に及ぼす影響
16:48 ○堀内真美，　向後雄一郎，　日野美佳，　佐々木友紀，竹中麻子（明治大農・農化）

2A37p16　ラット α-トコフェロール代謝の性差に関する研究
17:00 ○藤田尚子，竹中麻子（明治大農）

A41 会場　午前の部（9:00〜12:00）

動物—遺伝子・タンパク質–発現制御—

2A41a01　膵 β 細胞における男性ホルモンシグナルの役割について
9:00 ○原田直樹[1]，山地亮一[1]，中野長久[2]，乾　博[3]（[1]大阪府大・生命環境，[2]大阪女子短大，[3]大阪府大・栄養）

2A41a02　癌化シグナルによって発現変動する長鎖ノンコーディング RNA *ANRIL* の機能解析
9:12 ○神武洋二郎[1]，北川雅敏[2]（[1]近畿大産業理工，[2]浜松医大医）

2A41a03　FOXO3a によるテロメラーゼ制御の分子基盤
9:24 ○山下俊太郎[1]，片倉喜範[2]（[1]九州大院シス生，[2]九州大院農）

2A41a04　ヒト Fc ε RI 発現制御における転写因子の直接的な役割
9:36 ○笠倉和巳[1]，稲毛英介[1,2]，鈴木竜洋[1,2]，八代拓也[1]，馬場洋介[1,2]，原むつ子[1]，　大塚宜一[2]，　清水俊明[2]，　大保木啓介[4]，　松本健治[4]，斎藤博久[4]，小川秀興[3]，奥村　康[3]，西山千春[1]（[1]順天堂大・医・アトピー疾患研究センター，[2]順天堂大・医・小児科，[3]順天堂大・医・免疫学，[4]国立成育医療研究センター・免疫アレルギー研究部）

2A41a05　成体海馬神経新生の促進と海馬依存性記憶形成能力との関係性の解析
9:48 ○石川理絵[1]，金　亮[1]，難波隆志[2]，高坂新一[2]，内野茂夫[2]，喜田　聡[1,3]（[1]東農大院・農・バイオ，[2](独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所，[3]CREST, JST）

2A41a06　社会的認知制御記憶固定化および社会性認知記憶に基づいた新規性認知機構の組織学的解析
10:00 ○谷水俊之[1]，　門間和音[1]，　岡野絵美子[1]，　張　悦[1,2]，福島穂高[1,2]，喜田　聡[1,2]（[1]東京農大院・農・バイオ，[2]JST, CREST）

2A41a07　新規物体認知記憶固定化制御機構の脳組織学的解析
10:12 ○河野恭平[1]，　張　悦[1,2]，　谷水俊之[1]，　岡野絵美子[1]，喜田　聡[1,2]（[1]東京農大院・農・バイオ，[2]JST, CREST）

2A41a08　CLOCK/BMAL1 によるサーカディアン転写リズムを制御する細胞内情報伝達経路の同定
10:24 ○森下良一[1]，三浦大樹[1]，喜田　聡[1,2]（[1]東京農大院・農・バイオ，[2]JST, CREST）

2A41a09　クロマグロのトランスクリプトーム解析
10:36 ○森　一樹[1]，　田代康介[1]，　久原　哲[1]，　服部正平[2]，中村洋路[3]，菅谷琢磨[3]，斉藤憲治[3]（[1]九大院農，[2]東大院，[3]中央水研）

2A41a10　ビタミン D 受容体の新規相互作用因子の同定と機能解析
10:48 ○朝妻知子，岡田麻衣子，白髭克彦（東大分生研）

2A41a11　PPAR γ における新規翻訳後修飾の探索
11:00 ○桂　彰吾，横山　敦，白髭克彦（東大分生研）

2A41a12　がんワクチン適格性予測候補遺伝子の探索
11:12 ○高木麻里[1]，　宮田有英[2]，　ボウ暁良[1]，　田代康介[2]，江口りえこ[1]，小松誠和[3]，笹田哲朗[3]，伊東恭悟[3]，久原　哲[2]（[1]九大院システム生命，[2]九大農，[3]久留米大医）

2A41a13　褐色脂肪化における CREG1 の役割の検討
11:24 ○楠堂達也[1]，　片岡直也[2]，　李　勇学[1]，　江川美貴[1]，山下　均[1]（[1]中部大，[2]京都大）

2A41a14　サイトカインによる肝硬変・肝機能制御
11:36 ○井上麻美[1]，　大林賢一[2]，　中村アンナ[2,3]，　上野隆登[3]，鳥村拓司[3]，久原　哲[2]，田代康介[2]（[1]九大院・システム生命，[2]九大院・生資環，[3]久留米大・医）

A41 会場　午後の部（14:00〜17:36）

動物—遺伝子・タンパク質–構造，機能—

2A41p01　リン酸化 Tau の微小管重合促進能を回復させる因子 Pin1 および hGas7
14:00 ○清水泰希，小坂啓太，林　悠太，岡部恵美子，藤田彩子，後藤愛那，日高将文，内田隆史（東北大院農）

2A41p02　プロリン異性化酵素 Pin1 の脳関連キナーゼ CaMKII への影響
14:12 ○金井研太[1]，小坂啓太[1]，堤　貴明[2]，後藤愛那[2]，二井勇人[1,2]，日高將文[1,2]，内田隆史[1,2]（[1]東北大農，[2]東北大院農）

2A41p03　アルツハイマー病関連タンパク質 Gas7b の機能
14:24 ○乗田理恵，藤田彩子，後藤愛那，二井勇人，内田隆史（東北大院農）

2A41p04　酵母 split-ubiquitin システムを用いたヒトドリコールリン酸グルコース合成酵素の解析
14:36 ○高橋哲夫，山田直人（東海大工生命化学）

2A41p05　アクチンのダイナミクスがエピジェネティック制御に及ぼす影響の解析
14:48 ○山崎祥他[1]，　十川久美子[2,3]，　徳永万喜洋[2,3]，　原田昌彦[1]（[1]東北大院農，[2]東工大院生命理工，[3]理研免疫センター）

2A41p06　遺伝子ノックアウト細胞を用いたヒト INO80 複合体のゲノム安定性維持機構の解析
15:00 ○高橋裕一朗[1]，　松田　涼[1]，　北村大志[1]，　西嶋　仁[2]，柴原慶一[2]，原田昌彦[1]（[1].東北大院・農・分子生物，[2]国立遺伝研）

2A41p07　高等動物におけるタンパク質架橋化酵素ファミリーの新規アイソザイムの組織分布に関する解析
15:12 ○清水由隆[1]，鞍本克真[1]，山崎梨沙[2]，辰川英樹[2]，人見清隆[2]（[1]名大院生命農，[2]名大院創薬科学）

2A41p08　モデル生物としてのメダカにおけるタンパク質架橋化酵素ファミリーに関する解析
15:24 ○小河亮太[1]，　斉藤麻衣[2]，　菅沼名津季[2]，　辰川英樹[2]，人見清隆[2]（[1]名大農，[2]名大院創薬科学）

2A41p09　ヒト cDNA リソースと無細胞タンパク質合成系を用いた N-ミリストイル化された膜貫通タンパク質の探索
15:36 ○内海俊彦，守屋康子，乗安義実，福永和貴，飯尾雄介，高光恵美（山口大学院医応用分子生命）

2A41p10　精製標品を用いたヒト ABCB6 の機能解析
15:48 ○大貫　元[1]，木村泰久[1]，松尾道憲[1]，木岡紀幸[1]，植田和光[1,2]（[1]京大院農，[2]京大 iCeMS）

2A41p11　cGMP ホスホジエステラーゼ 6 の発現におけるシャペロンタンパク質の影響
16:00 ○尾谷優磨，嶺岸卓徳，奥田祐介，岡崎修治，赤沼元気，石塚盛雄（中央大理工応化）

2A41p12　リン脂質結合タンパク質 AnnexinA5 の 2 つのアイソフォームの機能の差違に関する検討
16:12 ○横山奈央子，磯脇　恵，八野充子，武本淳史，池上春香，松本和也，田口善智（近畿大生物理工）

2A41p13　骨分化誘導タンパク質 NELL1 が有する細胞接着活性の解析
16:24 ○中村桜子，黒田俊一，新美友章（名大院）

2A41p14　乳腺組織の発達・分化における LGR4 の機能解析
16:36 ○大山一徳[1]，毛利泰彰[1]，曽根瑞季[1]，那波明宏[2]，西森克彦[1]（[1]東北大院農，[2]愛媛大医）

2A41p15　ヒト皮膚 peptidylarginine deiminase の結晶化及び X 線結晶構造解析
16:48 ○金城沙弥[1]，海野昌喜[2]，木澤謙司[3]，小島俊雄[1]，高原英成[1]（[1]茨城大・農，[2]茨城大・フロンティア，[3](株)カネボウ化粧品）

2A41p16　乳腺および乳頭形成過程におけるマウス Mab21l1 遺伝子の機能解析
17:00 ○西谷　健，浅野真也，尾上貴俊，長瀬裕樹，小島拓哉，高橋直樹（東大院農生科・応生化）

2A41p17　脂溶性ビタミン結合タンパク質 α-TTP と脂質を輸送する ABC タンパク質が共同機能する可能性の検討
17:12 ○田口善智，永野雄大，田中真理，小松圭介，名越三千宏，

佐伯和弘（近畿大 生物理工 遺伝子）

2A41p18　トランスクリプトミクスを用いた低酸素条件下におけるマウスメラノーマ細胞悪性化の機構解析

17:24　◦佐藤直也[1]，　矢ヶ崎一三[1]，　古崎利紀[2]，　石井一夫[2]，三浦　豊[1]（[1]東京農工大・院・応用生命化学，[2]東京農工大・農学研究院）

A44 会場　午前の部（9:00〜11:36）

植物—植物ホルモン，成長調節物質—

2A44a01　IAA アゴニスト，アンタゴニストの探索と作用機構の解析

9:00　◦白井郁也，早瀬大貴，浅見忠男（東大院・農生科・応生化）

2A44a02　IAA 生合成阻害剤を用いた IAA 関連変異体の探索

9:12　◦安藤卓也[1,3]，　中村英光[1]，　中野雄司[3]，　長田裕之[3]，嶋田幸久[2]，浅見忠男[1]（[1]東大院・応生化，[2]横浜市大・木原生物学研究所，[3]理研・ASI）

2A44a03　YUCCA を標的とする新型オーキシン生合成阻害剤の開発

9:24　◦山崎千秋[1]，　佐藤明子[1]，　谷川友栄[1]，　三井麻利江[1]，鈴木優志[1]，　國土祐未子[2]，　石井貴広[2]，　添野和雄[2]，　嶋田幸久[1]（[1]横浜市大・木原生研，[2]農研機構・近中四農研）

2A44a04　植物におけるインドール-3-酪酸代謝物の分析

9:36　◦西野雄人[1]，小山彩香[1]，大西敦子[2]，宮下正弘[2]，宮川　恒[2]（[1]京都大農，[2]京都大院農）

2A44a05　植物ホルモン・アブシジン酸の新規アゴニスト・アンタゴニスト探索

9:48　◦伊藤卓也[1]，　近藤恭光[1]，　梅澤泰史[2,3]，　清水　猛[1]，篠崎一雄[2]，長田裕之[1]（[1]理研基幹研　ケミカルバイオロジー，[2]理研植物センター　機能開発，[3]農工大院 BASE）

2A44a06　ABA 受容体アンタゴニスト PAO *n*

10:00　◦竹内　純[1]，岡本昌憲[2]，武藤拓也[3]，CUTLER Sean[2]，平井伸博[4]，轟　泰司[5]（[1]静大院・創造，[2]University of California, Riverside，[3]静大院・農，[4]京大院・農，[5]静大・農）

2A44a07　新奇アブシジン酸受容体アンタゴニスト Panthy の創出

10:12　◦櫻井　栄[1]，　竹内　純[2]，　大西利幸[3]，　平井伸博[4]，轟　泰司[1]（[1]静大農，[2]静大院・創造，[3]静大・若手グローバル研究リーダー育成拠点，[4]京大院農）

2A44a08　Investigation of the factors mediating crosstalk between ABA and GA in plant growth and development by over-expression lines of PYL/PYR/RCAR

10:24　◦Kai JIANG，Eun-Kyung Seo，Hidemitsu Nakamura，Tadao Asami（univ of tokyo）

2A44a09　ジベレリン代謝酵素特異的制御剤の探索

10:36　◦大谷征史，中嶋正敏，福井康祐，中村英光，浅見忠男（東大院・農生科・応生化）

2A44a10　陸上植物 *ent*-kaurene 合成酵素における基質への構造認識に対する差異

10:48　◦嶋根真奈美[1]，　森崎敬子[2]，　植野陽平[3]，　夏目雅裕[1,2,3]，林謙一郎[4]，野崎　浩[4]，川出　洋[1,2,3]（[1]東京農工大院・連農，[2]東京農工大・農，[3]東京農工大院・農，[4]岡山理大・理）

2A44a11　モミラクトン生合成に関与する蘚類ハイゴケのジテルペン環化酵素の機能解析

11:00　貝沼遼介[1]，　嶋根真奈美[2]，　安藤朋子[1]，　宮崎　翔[2]，波多野友希[3]，　夏目雅裕[1,2]，林謙一郎[3]，野崎　浩[3]，◦川出　洋[1,2]（[1]東京農工大院農，[2]東京農工大院連農，[3]岡山理大理）

2A44a12　根寄生植物 *Striga* 種子のストライゴラクトンに対する構造要求性の解明

11:12　◦中嶌　瞳[1,2]，野村早紀[1]，水谷正治[1]，滝川浩郷[1,2]，杉本幸裕[1,2]（[1]神戸大院・農・生命機能科学，[2]JST/JICA, SATREPS）

2A44a13　ミヤコグサ根を用いた ^{13}C 標識 carlactone の 5-deoxystrigol への変換経路の検証

11:24　◦佐渡愛香[1]，秋山康紀[1]，謝　肖男[2]，米山弘一[2]，林　英雄[1]（[1]阪府大院・生命環境，[2]宇都宮大・雑草センター）

A44 会場　午後の部（14:00〜17:36）

植物—遺伝子–機能，発現制御—

2A44p01　イネグルタレドキシンによる発芽と初期生長の抑制

14:00　◦森田重人[1,2]，足立　哲[1]，増村威宏[1,2]，佐藤　茂[1,2]（[1]京都府大院生命環境，[2]京都農技セ生資セ）

2A44p02　*OsJAZ* 遺伝子によって誘導されるイネ病害抵抗性の機構解析

14:12　◦宇野雄太[1]，　平井洋行[1]，　四井翔太[1]，　寺沢勇治[1]，久保健一[2]，蔡　晃植[1]（[1]長浜バイオ大学大学院，[2]奈良先端科学技術大学大学院）

2A44p03　イネのジャスモン酸早期応答性 bHLH 型転写因子 RERJ1 の虫害抵抗性における役割

14:24　◦河村奈央子[1]，　宮本皓司[1]，　小澤理香[2]，　高林純示[2]，宮尾安藝雄[3]，廣近洋彦[3]，野尻秀昭[1]，山根久和[4]，岡田憲典[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]京大・生態研，[3]農生資研，[4]帝京大・バイオ）

2A44p04　イネの病害抵抗性を制御する転写因子 OsWRKY53 の標的遺伝子の同定

14:36　◦小川哲史[1]，　宮本皓司[1]，　清水崇史[1]，　増田優花[1]，中条哲也[1]，　西澤洋子[2]，　南　栄一[2]，　山根久和[3]，　野尻秀昭[1]，岡田憲典[1]（[1]東大生物工学セ，[2]農生資研，[3]帝京大・バイオ）

2A44p05　イネのジテルペン型ファイトアレキシン生産に関与する MEP 経路遺伝子 *OsDXS3* の転写制御機構の解析

14:48　◦宮本皓司[1]，松本貴嗣[2]，岡田　敦[1]，中条哲也[1]，吉川博文[2,3]，渋谷直人[4]，野尻秀昭[1]，山根久和[5]，岡田憲典[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]東京農大･ゲノム解析セ，[3]東京農大･応生科･バイオ，[4]明大･農，[5]帝京大・バイオ）

2A44p06　トマト成熟制御因子 RIN が標的とする GRAS 型転写因子の機能解析

15:00　◦藤澤雅樹，中野年継，嶋　羊子，伊藤康博（農研機構 食総研）

2A44p07　シロイヌナズナ熱ショック転写因子遺伝子 HsfB1 の 5' 上流域に存在する保存配列の役割

15:12　Zhu XuJun[1]，◦田中　俊[1]，Berberich Thomas[2]，草野友延[1]（[1]東北大院生命，[2]BiK-F）

2A44p08　シロイヌナズナ HsfA4c による HsfA2 発現制御機構の解明

15:24　◦野坂亮太[1]，林　秀樹[1]，小林宏太[1]，丸田隆典[2]，高木　優[3,4]，薮田行哲[5]，田茂井政宏[1]，重岡　成[1]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]島根大・生資科・生命工，[3]産総研・生物プロセス，[4]埼玉大・環境科学，[5]鳥取大・農・生資環）

2A44p09　チューリップの花弁特異的 *TgMYB1* プロモーター領域の解析

15:36　◦荘司和明（富山県農総技セ）

2A44p10　ウメ（*Prunus mume*）のアントシアニン合成酵素遺伝子のクローニングと果皮での発現解析

15:48　◦村瀬本弥[1]，米光　裕[2]（[1]和歌山高専専攻科エコ，[2]和歌山高専物質工）

2A44p11　黒ゴマ種子の色素合成に関わる遺伝子の単離

16:00　◦大島佳保里[1]，田代　亨[1]，児玉浩明[2]（[1]千葉大院園，[2]千葉大院融）

2A44p12　シロイヌナズナ VTC2 によるアスコルビン酸生合成の明暗応答制御

16:12　中根友乃[1]，塩見祐貴[1]，丸田隆典[2]，石川孝博[2]，重岡　成[3]，◦吉村和也[1]（[1]中部大応生食栄，[2]島根大生資科生命工，[3]近畿大農バイオ）

2A44p13　アセロラのアスコルビン酸生合成酵素遺伝子の高発現機構の解明

16:24　◦近藤隆之[1]，八川恵梨香[2]，Adebanjo Badejo[1]，藤川愉吉[1]，江坂宗春[1]（[1]広島大院生物圏，[2]広島大生物生産）

2A44p14　ユーグレナにおけるアスコルビン酸生合成光調節機構の解明

16:36　◦山口由貴[1]，西川　仁[1]，丸田隆典[1,3]，澤　嘉弘[1]，重岡　成[2,3]，石川孝博[1,3]（[1]島根大・生資科・生命工，[2]近畿大院・農・バイオ，[3]JST・CREST）

2A44p15　RNA-Seq によるユーグレナ遺伝子の発現解析

16:48 吉田勇太[1]，丸田隆典[1,3]，田茂井政宏[1,3]，重岡 成[2]，○石川孝博[1,3]（[1]島根大・生資科・生命工，[2]近畿大院・農・バイオ，[3]JST・CREST）

2A44p16 ユーグレナペルオキシレドキシンの酵素学的性質と生理機能の解明

17:00 ○玉木 峻[1,3]，丸田隆典[1,3]，澤 嘉弘[1]，重岡 成[2,3]，石川孝博[1,3]（[1]島根大・生資科・生命工，[2]近畿大院・農・バイオ，[3]JST・CREST）

2A44p17 円石藻 *Pleurochrysis carterae* における RNAi 法の確立

17:12 ○遠藤博寿[1,2]，長澤寛道[2]（[1]科学技術振興機構・さきがけ，[2]東大院農・生科・応生化）

2A44p18 植物オーソログ遺伝子配列を有する RNAi コンストラクトによる翻訳抑制の研究

17:24 ○新田啓亮[1]，樋口崇巳[1]，西内 巧[2]，児玉浩明[3]（[1]千葉大院園芸，[2]金沢大学学際科学実験センター，[3]千葉大院融合科学）

A46 会場 午前の部（9:00〜12:00）

植物—環境応答，ストレス応答，生物間相互作用—

2A46a01 傷害応答時における傷害応答シグナルとしてのジャスモン酸イソロイシン

9:00 ○武石翔平，相川健亮，鍋田憲助，松浦英幸（北大院農）

2A46a02 Theobroxide 処理に対する植物応答機構の解明

9:12 ○山下雄大，吉原照彦，鍋田憲助，松浦英幸（北大院農）

2A46a03 イネの根の病害抵抗性発現におけるジャスモン酸類の役割

9:24 ○清水崇史[1]，西野沙希[1]，藤川奈那央[2]，東條元昭[2]，岡田憲典[3]，山根久和[4]，飯野盛利[1]（[1]大阪市大院理，[2]大阪府大生環，[3]東大生物工学セ，[4]帝京大理工）

2A46a04 シバヤナギにゴールを形成するハバチのサイトカイニン合成能の検討

9:36 ○山口大貴，貫井光太，鈴木義人（茨城大・農）

2A46a05 オカボノクロアブラムシがハルニレに形成する虫えい（ハルニレハフクロフシ）組織の性状解析

9:48 ○吉田彩夏[1]，川合隆史[2]，鈴木義人[2]（[1]茨城大学院農，[2]茨城大学農）

2A46a06 ハダニ抵抗性誘導物質の探索

10:00 ○田島直人[1]，洪シウォン[1]，村田未果[2]，河津 圭[2]，石坂眞澄[3]，望月 淳[2]，光原一朗[1]，瀬尾茂美[1]（[1]生物研・植物科学研究領域，[2]農環研・生物多様性研究領域，[3]農環研・有機化学物質研究領域）

2A46a07 サツマイモネコブセンチュウの感染過程におけるエフェクターたんぱく質 MSP7 の機能解析

10:12 ○光増可奈子[1]，相良知実[1]，Bui Thi Ngan[1]，渡邊真紀[1]，土屋晴日[1]，江島千佳[1]，深尾陽一朗[2]，Derek Goto[3]，澤進一郎[1]（[1]熊大・院・自然科学，[2]奈良先端大・バイオ，[3]北大・院・農）

2A46a08 好熱菌発酵産物が植物の生長促進と生体防御の遺伝子発現に与える影響

10:24 ○宮本浩邦[1,2,3]，西内 巧[4]，井藤俊行[5]，宮本 久[6]，児玉浩明[2]（[1]日環科学，[2]千葉大院・融合科学，[3]千葉大院・園芸，[4]金沢大，[5]京葉プラント，[6]三六九）

2A46a09 タバコの過敏感細胞死を誘導する植物病原細菌 *Acidovorax avenae* 由来のエフェクタータンパク質の同定と機能解析

10:36 ○宮田千加[1]，宇野雄太[1]，近藤真千子[2]，青井良介[1]，蔡 晃植[1,2]（[1]長浜バイオ大院，[2]長浜バイオ大）

2A46a10 植物の過敏感細胞死に伴う核 DNA 断片化における新規エンドヌクレアーゼである IREN の役割

10:48 ○大坪由佳，四井翔太，日比野孝紀，青木友里（長浜バイオ大院）

2A46a11 高等植物・エンドファイト共培養液中の生理活性因子に関する研究

11:00 ○西垣舞穂，小川拓水，岡澤敦司，太田大策（阪府大院生命環境）

2A46a12 イネのフィトアレキシン生合成遺伝子ノックダウン変異体の特徴付け

11:12 ○豊増知伸[1]，菅原千都[1]，臼井雅美[1]，清水崇史[2]，岡田憲典[2]，長谷川守文[3]，南 栄一[4]，川名義明[5]，三橋 渉[1]，山根久和[2]（[1]山形大農，[2]東大生物工学セ，[3]茨城大農，[4]農生資研，[5]農研機構東北農研）

2A46a13 FOX ハンティングで単離した広範な病害抵抗性遺伝子 BSR1 の耐病性機構解析と実用化の試み

11:24 前田 哲，菅野正治，後藤新悟，姜 昌杰，高辻博志，○森 昌樹（農業生物資源研究所）

2A46a14 Myc-LCO およびキチンオリゴ糖によるミヤコグサ共生遺伝子発現における NFR 依存性の解析

11:36 ○河原千春[1]，武田直也[2]，川口正代司[2]，秋山康紀[1]，林 英雄[1]（[1]阪府大院・生命環境，[2]基生研・共生システム）

2A46a15 イネのカルシウム依存性プロテインキナーゼ OsCPK8 によって仲介される免疫誘導シグナルの伝達機構解析

11:48 ○韓 宇龍，神村麻友，上坂有矢（長浜バイオ大院バイオ）

A46 会場 午後の部（14:00〜17:48）

植物—環境応答，ストレス応答，生物間相互作用—

2A46p01 ダイズにおけるフラボノイド分泌機構の生化学的解析

14:00 ○山下和晃，杉山暁史，高梨功次郎，矢崎一史（京都大生存研）

2A46p02 トマト植物体におけるレクチン遺伝子の発現部位と発現応答の解析

14:12 ○原 梨紗，坂本 光，小栗 秀（東農大生物産業・生物生産）

2A46p03 “米のとぎ汁発酵液”がトマトかいよう病菌の増殖に与える影響

14:24 ○中田達矢[1]，プリエトラファエル[2]，高瀬尚文[2]，川口 章[3]，關谷次郎[2]（[1]京都学園大院バイオ環境，[2]京都学園大バイオ環境，[3]岡山農林水産総合センター）

2A46p04 培養細胞系を用いた新規植物免疫活性化剤の探索

14:36 ○北畑信隆[1]，八木智華子[1]，来須孝光[2]，浅見忠男[3]，朽津和幸[1]（[1]東京理科大理工，[2]東京工科大応用生物，[3]東大院農生科）

2A46p05 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来カロテノイド酸化開裂酵素の機能解析

14:48 ○松浦秀幸，尾形卓哉，松田悠里，石田洋基，木田和輝，原田和生，平田收正（大阪大学大学院薬学研究科）

2A46p06 窒素固定能を持つ *Nostoc* sp. を着生させる蘚類（ヒョウタンゴケ）のホルモゴニア分化誘導因子の探索

15:00 ○西塚紘明[1]，村井勇太[2]，橋本 誠[2]，橋床泰之[2]（[1]北大農，[2]北大院農）

2A46p07 FDA を用いたマヤプシキ培養細胞活性の簡易的な定量測定

15:12 ○猿山奈緒子[1]，笹本浜子[2]，児玉浩明[3]（[1]千葉大院園芸，[2]横浜国大院環境科学，[3]千葉大院融合科学）

2A46p08 モエジマシダ体内のヒ素挙動に対するリンの蓄積の影響

15:24 ○黄 毅[1]，井上千弘[2]，遠藤銀朗[1]（[1]東北学院大，[2]東北大学）

2A46p09 トマト果実成熟時におけるアスコルビン酸量の増加には D- ガラクツロン酸経路が機能する

15:36 ○志村智美[1]，Badejo A Adebanjo[1]，西川 仁[1]，丸田隆典[1]，澤 嘉弘[1]，重岡 成[2]，石川孝博[1]（[1]島根大・生資科・生命工，[2]近畿大院・農・バイオ）

2A46p10 グルタチオンペルオキシダーゼ相互作用タンパク質の同定および機能解析

15:48 ○尾形知哉[1]，高田梨沙[2]，Gaber Ahmed[2]，田茂井政宏[1,2]，吉村和也[3]，丸田隆典[4]，重岡 成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]中部大・応生・食栄，[4]島根大・生資科・生命工）

2A46p11 AtNUDX6 および 7 による NADH 代謝を介した生物的 / 非生物的ストレス応答関連遺伝子の発現制御

16:00 ○奥田雅宣[1]，野田北斗[2]，田茂井政宏[1,2]，吉村和也[3]，重岡 成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大学・農・バイオ，[3]中部大・応生・食栄）

2A46p12 葉緑体型 NADPH 加水分解素（AtNUDX19）による NADPH ステータス変化を介したストレス/ホルモン応答の制御

16:12 ○辻村昌希[1]，吉田幸史[1]，三島真優[2]，問田英里[1]，丸田隆典[3]，田茂井政宏[1,2]，吉村和也[1,4]，重岡 成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]島根大・生資科・生命工，[4]中部大・応生・

食栄）

2A46p13　葉緑体由来の H_2O_2応答性遺伝子群の包括的な逆遺伝学的解析

16:24　◦丸田隆典[1]，野志昌弘[2]，問田英里[3]，松田　峻[3]，中村茉樹[2]，田茂井政宏[2,3]，高木　優[4,5]，石川孝博[1]，重岡　成[2,3]（[1]島根大・生資科・生命工，[2]近畿大・農・バイオ，[3]近畿大院・農・バイオ，[4]産総研・生物プロセス，[5]埼玉大・環境科学）

2A46p14　ホメオドメインロイシンジッパー転写因子（HAT1）を介した酸化的ストレス応答

16:36　◦問田英里[1]，野志昌弘[2]，松田　峻[1]，野坂亮太[1]，田茂井政宏[1,2]，吉村和也[3]，高木　優[4,5]，丸田隆典[6]，大和　開[6]，澤　嘉弘[6]，石川孝博[6]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]中部大・応生・食栄，[4]産総研・生物プロセス，[5]埼玉大・環境科学，[6]島根大・生資科・生命工）

2A46p15　紫外線で誘導されるオオムギ由来 Nudix 遺伝子の解析

16:48　◦田中小百合（岡山大・植物研）

2A46p16　スペルミンは熱ショック関連遺伝子群の発現を亢進することによって宿主植物を熱ショック傷害から保護する

17:00　Sagor GHM[1]，新津　勝[2]，Berberich Thomas[3]，◦草野友延[1]（[1]東北大院生命，[2]城西大薬，[3]BiK-F）

2A46p17　三量体 G タンパク質の γ サブユニットをコードするイネ OsDEP1 遺伝子は，酵母と植物にカドミウム耐性を与える

17:12　◦國廣俊太[1]，井上雅貴[1]，斎藤達彦[1]，松田大樹[1]，倉俣正人[1]，田口文緒[2]，Youssefian Shohab[3]，Berberich Thomas[4]，草野友延[1]（[1]東北大院生命，[2]農業生物資源研，[3]秋田県立大，[4]BiK-F）

2A46p18　新奇ダイズ塩ストレス応答遺伝子を導入したシロイヌナズナ培養細胞と植物体の耐塩性比較

17:24　◦斎藤祐一，高原英成，小島俊雄（茨城大・農・生化）

2A46p19　ダイズの耐塩性を制御する機能未知アルマジロリピートタンパク質の塩ストレス応答性

17:36　◦佐藤光朗，右田和琴，斎藤祐一，野口和斗，高原英成，小島俊雄（茨城大・農・生化）

B20 会場　午後の部（14:00〜16:48）

糖鎖—合成・生合成—

2B20p01　糸状菌におけるフィトセラミド型中性スフィンゴ糖脂質の生合成経路の解析

14:00　◦山下泰典, 谷　泰史, 沢　良太, 斎藤茂樹, 三原久明（立命館大・生命科学・生物工）

2B20p02　大型褐藻類 *Ascophyllan nodosum* 由来硫酸化多糖体アスコフィランの生物活性に対する脱硫酸化反応の影響

14:12　姜　澤東[1]，冲村　崇[2]，山口健一[1]，◦小田達也[1]（[1]長崎大水，[2]林兼産業株式会社）

2B20p03　グルコマンナン由来オリゴ糖の構造解析と新規性能評価

14:24　◦亀谷奎吾[1]，　岡本真由美[2]，　岩井修一[3]，　竹本克宏[3]，小堀　深[1]，清水功雄[1]（[1]早大理，[2]早大理工研，[3](株)スイスロワール）

2B20p04　NMR による糖鎖の立体構造とダイナミックスの解析

14:36　◦鵜澤　洵[1,2]，花島慎弥[1]，関　宏子[2]，山口芳樹[1]（[1]理研 糖鎖構造，[2]千葉大分析センター）

2B20p05　ハリモグラタスマニア亜種のミルクオリゴ糖の構造解析

14:48　◦浦島　匡[1]，関井伸泰[1]，トーフィックエビ[2]，ダビエスノエル[3]，福田健二[1]，ニコルステワルト[3]，オフテダルオラブ[4]（[1]帯広畜産大，[2]ボゴール農業大，[3]タスマニア大，[4]スミソニアン環境研）

2B20p06　講演取消

2B20p07　Analysis of the *N*-linked Cell Wall Glycans of *Malassezia furfur*, *Pseudozyma antarctica* and *Sympodiomycopsis pahiopedili* (Subphylum Ustilaginomycotina)

15:12　◦Ronilo Jose Flores[1]，Takao Ohashi[1]，Kanae Sakai[2]，Tohru Gonoi[2]，Hiroko Kawasaki[3]，Kazuhito Fujiyama[1]（[1]International Center for Biotechnology, Osaka University, Osaka, Japan, [2]Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan, [3]NITE Biological Resource Center (NBRC), National Institute of Technology and Evaluation (NITE), Chiba, Japan）

2B20p08　担子菌 *Agaricus bisporus* 由来エンド-*β*-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ AB 遺伝子の発現系構築と発現酵素の性質

15:24　◦高橋剛生[1]，谷脇　聡[1]，浜口　祐[1]，Krusong Kuakarun[2]，Kaulpiboon Jarunee[3]，Limpaseni Tipaporn[2]，Pongsawasdi Piamsook[2]，伊藤和央[1]（[1]阪市大院・理，[2]チュラロンコン大・理，[3]タマサート大・医）

2B20p09　魚介類由来グリコサミノグリカンの含有量と繰返し二糖組成

15:36　◦田村純一，藤田裕之，問田椋介，入江有美，木戸口望美，君野大介，後藤尚也，高田博哉，中尾康裕，王　　恵，武田尚子，有馬和也（鳥取大地域環境）

2B20p10　ER *α*-glucosidase II の *β* サブユニットがグルコース切断に与える影響について

15:48　◦武田陽一[1]，瀬古　玲[1]，八須匡和[1]，伊藤幸成[1,2]（[1]JST, ERATO，[2]理研基幹研）

2B20p11　疑似ミスフォールド糖タンパク質を用いた UGGT の機能解明

16:00　◦八須匡和[1]，瀬古　玲[1]，大黒周作[1]，武田陽一[1]，小泉晶彦[1]，藤川紘樹[1]，迫野昌文[1]，伊藤幸成[1,2]（[1]JST･ERATO，[2]理研･基幹研）

2B20p12　糖鎖付加タグの付加による糖タンパク質分泌への影響

16:12　◦高島　晶，天野純子（野口研・糖鎖生物）

2B20p13　合成糖鎖基質を用いたカルネキシンおよびカルメギンのシャペロン活性の比較

16:24　◦迫野昌文[1]，瀬古　玲[1]，武田陽一[1]，八須匡和[1]，小泉晶彦[1]，藤川紘樹[1]，伊藤幸成[1,2]（[1]JST ERATO，[2]理研　基幹研）

2B20p14　出芽酵母におけるシアル酸含有ムチン型糖タンパク質の生産

16:36　杜　東寧[1]，久野　敦[1]，梶　裕之[1]，成松　久[1]，◦千葉靖典[2]（[1]産総研・糖鎖医，[2]産総研・生物プロセス）

C31 会場　午前の部（9:36〜12:00）

新技術—先端バイオ計測，アレイ—

2C31a04　超臨界流体クロマトグラフ-Orbitrap 質量分析計を用いた農薬一斉分析法の開発

9:36　石橋愛実[1]，酒井美穂[2]，安藤　孝[2]，濱坂友子[3]，坂本　茂[3]，福崎英一郎[1]，◦馬場健史[1]（[1]阪大院・工・生命先端，[2]宮崎農試，[3]サーモフィッシャーサイエンティフィック）

2C31a05　^{1}H-NMR による血液透析メタボロミクス-その 1-代謝物ピーク分離定量の新手法

9:48　◦新川隆朗[1]，藤原正子[1]，安藤一郎[1]，今井　潤[1]，佐藤　博[1]，竹内和久[1,2]，高橋征三[1]（[1]東北大院薬，[2](医)宏人会中央クリニック）

2C31a06　^{1}H-NMR による血液透析メタボロミクス-その 2-患者代謝応答の観察

10:00　◦藤原正子[1]，安藤一郎[1]，佐藤　博[1]，竹内和久[1,2]，今井　潤[1]（[1]東北大院薬，[2](医)宏人会中央クリニック）

2C31a07　培養可能な LDI 質量分析プレートの開発研究

10:12　◦常盤野哲生[1]，伊藤一志[2]，吉澤結子[1]（[1]秋田県大生資科，[2]秋田県大システム科技）

2C31a08　質量分析イメージングを用いたトマト果実における代謝物分布の可視化

10:24　◦中村純也[1]，　加来麻衣子[2]，　藤村由紀[2]，　高橋勝利[3]，三浦大典[2]，割石博之[4]（[1]九州大学院生資環，[2]九大レドックスナビ，[3]産総研，[4]九大基教）

2C31a09　IMS を用いた混合香気系の香りを分析する試み

10:36　◦藤森　嶺[1]，曽　少豊[1]，妙田貴生[1]，戸枝一喜[1]，西澤　信[1]，西村敬子[2]（[1]東京農大生物産業・食香，[2]ヤナコ計測）

2C31a10　瞬速 2 μ mODS シリカゲルの HPLC 充填カラムの開発

10:48　◦中塚進一，植地妙子（長良サイエンス株式会社）

2C31a11　モノリスカラムを用いた共存プロテオーム解析

11:00　◦北原奈緒, 森坂裕信, 青木　航, 黒田浩一, 植田充美（京大院・農・応用生命）

2C31a12　NIRS を用いた客観的味覚評価技術の開発(1) 基本味の計測

11:12　◦間宮幹士[1]，星　朱香[1]，青木宗一郎[1]，三浦　裕[2]（[1]キリン(株)基盤技術研究所，[2]キリン(株)健康技術研究所）

2C31a13　NIRS を用いた客観的味覚評価技術の開発(2) 酸味抑制効果の計測

11:24　◦星　朱香[1]，　青木宗一郎[1]，　河野惠美[2]，　小笠原正志[2]，尾中　考[2]，間宮幹士[1]（[1]キリン(株)基盤技術研究所，[2]キリン協和

フーズ(株)食品開発研究所）

2C31a14　ClustalW の派生プログラム，INTMSAlign 法の開発と酵素活性に重要な水素結合ネットワークの予測について

11:36　◦中野祥吾[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

2C31a15　シミュレーションによる植物代謝反応システムの解明

11:48　◦平井優美[1,2]，　シユタサカンスポーン[1,2]，　澤田有司[1,2]，千葉由佳子[3,4]，山下由衣[4]，岩田通夫[5]，尾之内均[2,6]，内藤　哲[4,6]，白石文秀[5]（[1]理研 PSC，[2]JST・CREST，[3]北大創成，[4]北大院生命，[5]九大院農，[6]北大院農）

C31 会場　午後の部（14:00〜16:00）

新技術—分析法，解析法—

2C31p01　微生物細胞の熱膨張率と耐熱性に関する知見

14:00　◦中西弘一[1]，　小暮亮雅[2]，　出内桂二[1]，　桑名利津子[3]，高松宏治[3]（[1]キリン飲料技術研究所, [2]島津総合分析試験センター，[3]摂南大薬）

2C31p02　バイオナノカプセルによるバイオセンサーのナノレベル表面制御及び高機能化

14:12　◦飯嶋益巳，黒田俊一（名大院生命農）

2C31p03　DNA1 分子標準物質の開発

14:24　◦真野潤一[1]，　布藤　聡[2,3]，　吉井淳治[3]，　中江裕樹[3]，高畠令王奈[1], 橘田和美[1]（[1](独)農研機構　食総研, [2](株)ファスマック，[3]バイオチップコンソーシアム）

2C31p04　μL オーダーの検体で多項目同時測定可能な免疫測定法「抗体チップ」

14:36　◦星野文彦[1]，渡辺　修[1]，呉　暁紅[2]，瀧本陽介[2]，大澤俊彦[3]（[1](株)豊田中研，[2](株)ヘルスケアシステムズ，[3]愛知学院大心身科学）

2C31p05　超高分解能光断層計測によるタンパク質結晶の新規観察技術

14:48　◦松村浩由[1]，　石田周太郎[2]，　廣瀬未果[3]，　杉山　成[3]，井上　豪[1]，森　勇介[1]，伊東一良[1]，西澤典彦[2]（[1]阪大院工，[2]名大院工，[3]阪大院理）

2C31p06　タイミング回路の進化工学と変異体解析

15:00　◦池　紘平, 福冨浩樹, 河合繁子, 斎藤恭一, 梅野太輔（千葉大院・工・共生応化）

2C31p07　水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出法による真菌の MIC 及び SMIC 測定

15:12　◦塚谷忠之[1]，末永　光[1]，志賀匡宣[2]，野口克也[2]，松本　清[3]（[1]福工技セ・生物食品研，[2]同仁化学研，[3]崇城大・生物生命）

2C31p08　ELISA の感度向上化を目指したベタイン型代謝産物アナログ添加によるペルオキシダーゼ活性化メカニズムの解明

15:24　◦高木琴味[1]，甲元一也[1]，鹿島康浩[2]（[1]甲南大 FIRST，[2]耐熱性酵素研究所）

2C31p09　放射性セシウムの生体での濃縮・排出の基礎検討

15:36　◦白井　理，北隅優希，加納健司（京都大院農）

2C31p10　直接電子移動型酵素の配向制御を志向した新奇機能化電極の構築

15:48　◦宋　慶盛, 北隅優希, 白井　理, 小川　順, 加納健司（京大院農）

講演番号
開始時間　　演　　題　　発表者氏名（所属）

C11 会場　午前の部（9:00〜12:00）

環境—バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオリファイナリー—

3C11a01　重金属と抗生物質の二重耐性を示す *Bacillus subtilis* によるフェナントレンの分解ポテンシャル

9:00　◦OYETIBO Ganiyu[1,2]，簡　梅芳[2]，イロリマシュオルソジ[1]，オバヨリオルワフェミサンデェー[3]，遠藤銀朗[2]（[1]ラゴス大学，[2]東北学院大・工，[3]ラゴル州立大学）

3C11a02　*Pseudomonas stutzeri* NT-I によるセレン酸還元機構の解析

9:12　◦黒田真史[1,2]，　三輪恵美子[2]，　清　和成[2]，　惣田　訓[2]，山下光雄[3]，池　道彦[2]（[1]阪大・CEIDS，[2]阪大院・工・環エネ，[3]芝浦工大・工・応化）

3C11a03　Methylobacterium fujisawaense FD-1 株による高濃度ホルムアルデヒドの分解

9:24　◦塩崎恵未[1]，米光　裕[2]（[1]和歌山高専専攻科エコ，[2]和歌山高専物質工）

3C11a04　*Stenotrophomonas maltophilia* のクロロホルムに対する走性応答

9:36　◦荷方稔之，荒谷一典，柿井一男（宇都宮大院工）

3C11a05　*Pseudomonas fluorescens* KU-7 株の 2-ニトロ安息香酸に対する走化性

9:48　◦藤岡　諒，岩木宏明，長谷川喜衛（関西大・化学生命工）

3C11a06　4-Chloroaniline degradation by toluene dioxygenase pathway from *Pseudomonas putida* T-57

10:00　◦Tisana Nitisakulkan[1]，Daizou KUDOU[1]，Shota OKU[1]，Alisa S. VANGNAI[2]，Takahisa TAJIMA[1]，Yutaka NAKASHIMADA[1]，Junichi KATO[1]（[1]Hiroshima Univ.，[2]Chulalongkorn Univ.）

3C11a07　酢酸添加条件における好気的ジクロロメタン分解細菌の代謝関連遺伝子の発現解析

10:12　◦細田晃文，竹内一貴，田村廣人（名城大農）

3C11a08　高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株によるビスフェノール A 代謝機構の解明

10:24　◦王　剣橋[1]，　山本涼子[2]，　山本陽太郎[2]，　徳元俊伸[3]，轟　泰司[2]，平井浩文[2]，河岸洋和[1,2]（[1]静大創造院，[2]静大農，[3]静大理）

3C11a09　Sphingomonas bisphenolicum AO1 株のゲノム構造解析

10:36　◦木場　悟，上村真央，奥野将司，小田佳孝，土田昇平，松村吉信（関西大学）

3C11a10　石油中に含まれる芳香族化合物資化性海洋性細菌の探索と解析

10:48　◦千葉翔子[1]，　木村勇太[2]，　橋爪大輔[2]，　山岡正英[2]，若泉博大[2]，岩田健一[1,2]（[1]芝工大院シ，[2]芝工大シ生）

3C11a11　揮発性有機化合物 VOC 分解菌の探索と解析

11:00　◦長瀬　駿，米塚健太，荒木直人，笠井大輔，政井英司，福田雅夫（長岡技科大・生物）

3C11a12　ドリン系農薬分解菌の分解関連遺伝子の探索

11:12　◦Yee Lii Mien[1]，　堀嵜允文[1]，　土金恵子[2]，　細山　哲[2]，藤田信之[2]，　松本貴嗣[3]，　吉川博文[3,4]，　春田　伸[5]，　朝井　計[6]，五十嵐泰夫[7]，岡田憲典[1]，山根久和[8]，野尻秀昭[1]（[1]東大生物工学セ，[2]NITE，[3]東農大・ゲノム解析セ，[4]東農大応生科・バイオ，[5]首都大生命，[6]埼玉大院理工分子生物，[7]東大･応生工，[8]帝京大･バイオ）

3C11a13　3-クロロフェノール脱塩素嫌気性集積培養物における微生物群の増殖のための炭素源の特定

11:24　◦鈴木大典，李智リン，章　春芳，片山新太（名古屋大・エコトピア）

3C11a14　原油試料からの鉄腐食性硝酸塩還元菌の分離

11:36　◦飯野隆夫[1]，若井　暁[2]，鶴丸博人[3]，伊藤公夫[4]，大熊盛也[1]，原山重明[5]（[1]理研 BRC-JCM，[2]広島大院・生物圏，[3]NITE・NBRC，[4]新日鐵住金・先端技研，[5]中大・理工）

C11 会場　午後の部（14:00〜18:00）

環境—バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオリファイナリー—

3C11p01　エタノール生産担子菌 *Flammulina velutipes* Fv-1 株における外来遺伝子発現とエタノール生産能評価

14:00　◦前原智子[1]，　高畠幸司[2]，　小笠原渉[3]，　五十嵐圭日子[4]，鮫島正浩[4]，金子　哲[1]（[1]農研機構　食総研，[2]富山県農技セ・森林研，[3]長岡技大・生物，[4]東大院農生科）

3C11p02　シアノバクテリアを糖質源としたアミラーゼ発現酵母による同時抽出糖化発酵エタノール生産

14:12　◦藍川晋平[1,2]，山田亮祐[3]，中西昭仁[1,2]，松田史生[4]，蓮沼誠久[2,3]，近藤昭彦[1,2]（[1]神大院工，[2]JST CREST，[3]神大自科，[4]阪大院情報）

3C11p03　リグノセルロース系バイオマスからの統合型バイオエタノール生産に資する新規酵母細胞表層提示システムの開発

14:24　◦猪熊健太郎，蓮沼誠久，近藤昭彦（神戸大院工）

3C11p04　発酵阻害物存在下におけるキシロースからのエタノール発酵向上酵母の構築

14:36　◦崎濱由梨[1]，蓮沼誠久[2]，近藤昭彦[1]（[1]神戸大院工，[2]自然科学系先端融合研究環　重点研究部）

3C11p05　ユーカリからの高濃度エタノールの生産

14:48　◦高松朋輝[1]，佐々木千鶴[2]，浅田元子[2]，中村嘉利[2]（[1]徳島大院・先端・生命，[2]徳島大院・ソシオ）

3C11p06　オイルパーム廃棄木搾汁残渣からのバイオエタノール生産

15:00　◦PRAWITWONG PANIDA，　小杉昭彦，　トウラン，荒井隆益，村田善則，齋藤昌義，森　隆（国際農研センター）

3C11p07　エタノール発酵接合菌を用いたペーパースラッジからの直接バイオエタノール生産

15:12　◦高野真希，星野一宏（富山大院理工）

3C11p08　飼料イネロールベールを用いたエタノール固体発酵および簡便なエタノール回収法

15:24　◦堀田光生[1]，　北本宏子[1]，　篠崎由紀子[1]，　川出哲生[2]，橘　保宏[2]（[1](独)農環研，[2](独)生研センター）

3C11p09　*Neolentinus lepideus* による乳製品廃棄物からのエタノールおよび抗酸化物質の生産

15:36　◦中川紗季[1]，　金涌龍一[1]，　竹内沙緒里[1]，　小嶋文博[2]，岡本賢治[1]（[1]鳥取大院工，[2]仙台白百合女子大人間）

3C11p10　キシロース発酵における細胞融合酵母 FSC 株の in vitro 代謝解析

15:48　◦カハルプリハルディ，田中修三（明星大理工）

3C11p11　*PHO13* 破壊がキシロース資化性サッカロマイセス酵母のキシロースからのエタノール生産性に及ぼす効果

16:00　◦小西　仁，福田　明，牟田口梢栄，上村　毅，雨宮正臣（JX 日鉱日石エネルギー(株)中央技術研）

3C11p12　イソプロピルアルコール高生産大腸菌の開発

16:12　◦松本佳子[1]，　藤井亮太[2]，　天野　仰[1]，　白井智量[1,3]，安楽城正[1]，平野淳一郎[1]，高橋　均[1]，竹林のぞみ[1]，森重　敬[1]，舘野俊博[1]，古澤　力[3]，平沢　敬[3]，清水　浩[3]，和田光史[1]（[1]三井化学　触媒研，[2]三井化学シンガポール R&D センター，[3]阪大院情報）

3C11p13　大腸菌によるイソプロピルアルコール連続発酵技術の開発

16:24　◦柴本寛子，上原与志一（三井化学・生産技術センター）

3C11p14　RITE バイオプロセスによる非可食バイオマス由来混合糖からのエタノール生成

16:36　◦乾　将行[1,2]，　城島　透[1]，　信龍亮志[1]，　須田雅子[1]，岡本憲治[3]，　郡司貴浩[3]，　岩田孝弘[3]，　藤澤義和[3]，　Nancy Dowe[4]，Daniel J. Schell[4]，　Ling Tao[4]，　John Ashworth[4]，　湯川英明[1,2]（[1]RITE，[2]GEI，[3]Honda R&D，[4]NREL）

3C11p15　RITE バイオプロセスによる非可食バイオマス由来混合糖からの D- 乳酸生成

16:48　◦加藤直人[1]，　柘植陽太[1]，　須田雅子[1]，　城島　透[1]，Nancy Dowe[2]，Daniel J. Schell[2]，Ling Tao[2]，John Ashworth[2]，

乾　将行[1,3]，湯川英明[1,3]（[1]RITE，[2]NREL，[3]GEI）

3C11p16　RITE バイオプロセスによるバリン生産；収率の改善および非可食バイオマスからの生産の試み

17:00　◦長谷川智[1]，　須田雅子[1]，　平賀和三[1]，　城島　透[1]，Nancy Dowe[2]，Daniel J. Schell[2]，Ling Tao[2]，John Ashworth[2]，乾　将行[1,3]，湯川英明[1,3]（[1]RITE，[2]NREL，[3]GEI）

3C11p17　遺伝子組換えコリネ型細菌によるイソブタノール生産

17:12　◦山本省吾[1,2]，　須田雅子[1,2]，　新美聡子[1]，　乾　将行[1,2,3]，湯川英明[1,2,3]（[1]RITE，[2]BB 組合，[3]GEI）

3C11p18　大腸菌による (*R*)-1,3-ブタンジオール生産の効率化

17:24　◦片岡尚也[1]，　VANGNAI Alisa S.[2]，　田島誉久[1]，中島田豊[1]，加藤純一[1]（[1]広島大院先端物質・分子生命，[2]チュラロンコン大・理）

3C11p19　海洋性新規ブタノール産生クロストリジウム菌の単離

17:36　◦大西浩平[1]，黒澤美樹[2]，高橋　亮[2]，西垣直哉[2]（[1]高知大総研セ，[2]高知大農）

3C11p20　中温菌 *C. cellulovorans* および *C. aceetobutylicum* の共培養によるセルロースからのブタノール発酵

17:48　◦川出雄二郎[1]，山本康介[1]，田丸　浩[1,2,3]（[1]三重大院・生資，[2]三重大・生命支セ，[3]三重大・新産業創生）

C12 会場　午前の部（9:00〜11:48）

環境—バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオリファイナリー—

3C12a01　キシロース資化性の強い組換え *Saccharomyces cerevisiae* の構築

9:00　◦赤松　隆，田口久貴，冨高正隆（崇城大生物生命）

3C12a02　進化工学によるキシロース資化性酵母の阻害物耐性向上

9:12　◦大西　徹[1]，多田宣紀[1]，保谷典子[1]，片平悟史[2]，名倉理紗[2]，石田亘広[2]，今村千絵[2]（[1]トヨタ自動車，[2]豊田中研・バイオ）

3C12a03　リグノセルロース系バイオマス由来発酵阻害物質による酵母 mRNP granule の形成誘導と翻訳抑制

9:24　◦岩城　理，河合孝朗，NGUYEN Trinh Thi My，山本陽佑，井澤真吾（京都工繊大・応生）

3C12a04　葉面酵母 *Pseudozyme antarctica* の生分解性プラスチック分解酵素が植物へ与える効果

9:36　◦植田浩一[1]，　釘宮聡一[1]，　渡部貴志[1]，　篠崎由紀子[1]，光原一朗[2]，吉田重信[1]，田端　純[1]，北本宏子[1]（[1]農環研，[2]生物資源研）

3C12a05　大腸菌を宿主とした生分解性共重合ポリエステルの生合成

9:48　◦外村彩夏[1]，岩崎美佳[1]，坂本日名子[2]，松崎弘美[2]（[1]熊本県大院・環境共生，[2]熊本県大・環境共生）

3C12a06　組換え *Ralstonia eutropha* における脂肪酸合成経路を介した共重合ポリエステルの生合成

10:00　◦岩崎美佳[1]，　外村彩夏[1]，　坂本日名子[2]，　田中賢二[3]，柘植丈治[4]，松崎弘美[2]（[1]熊本県大院・環境共生，[2]熊本県大・環境共生，[3]近大・産理工，[4]東工大院・総理工）

3C12a07　ハロモナス菌によるバイオプラスチック PHB 生産と GC-MS を用いた代謝分析

10:12　ジンユークン，◦河田悦和，川崎一則，茂里　康（産技総研健康工学）

3C12a08　ポリアミド 4 の生分解

10:24　◦山野尚子，川崎典起，中山敦好（産技総研関西セ）

3C12a09　2- ピロリドンを含むコポリエステルアミドの生分解

10:36　◦中山敦好，山野尚子，川崎典起，中村　努，上垣浩一（産技総研関西セ）

3C12a10　各種分光分析法による比較プロファイリングで示唆されたバイオマスの水陸適応戦略

10:48　坂田研二[1]，林　裕志[2]，伊藤研悟[2]，篠阿弥宇[1]，◦伊達康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3,4]（[1]理研 PSC，[2]横市院生命，[3]名大院生命農，[4]理研 BMEP）

3C12a11　糖輸送体蛋白質の無細胞合成および機能再構成系の構築

11:00　◦高林泰斗[1]，寺本真一[1]，泉　厚志[2]，野澤　彰[2]，渡辺誠也[3]，戸澤　譲[2]（[1]愛媛大院理工，[2]愛媛大・無細胞セ，[3]愛媛大農）

3C12a12　ミドリムシ走光性における波長依存性

11:12　◦大岡英史[1]，石居拓己[1]，中村龍平[1]，橋本和仁[1,2]（[1]東大院工，[2]JST ERATO）

3C12a13　炭添加土壌における小松菜の生育と微生物叢の変化に関する研究

11:24　◦澤田直諒[1]，田中理子[2]，吉澤秀二[2]，後藤純雄[3]，吉村武朗[1]，峯木　茂[1]（[1]東理大院応生科，[2]明星大総合理工，[3]麻布大環境科学）

3C12a14　微生物産生界面活性剤サーファクチンナトリウムの物性評価と製剤への応用

11:36　◦早瀬　基(㈱カネボウ化粧品)

C12 会場　午後の部（14:00〜17:36）

酵素—その他—

3C12p01　*Aspergillus oryzae* 由来タンナーゼの特性解析

14:00　◦水野聖之，塩野義人，小関卓也（山形大・農）

3C12p02　緑藻ミル(*Codium fragile*)由来ハロペルオキシダーゼ

14:12　◦大城　隆[1]，中川諒也[2]，西野裕貴[1]（[1]鳥取大院工，[2]鳥取大工）

3C12p03　チロシナーゼとペプチドとを用いた呈色反応

14:24　◦小西康子[1]，　堺澤　静[1]，　平　修[2]，　小原涼太[3]，野田文雄[3]，石田信昭[1]（[1]石川県大食品，[2]北陸先端大院，[3]スギヨ）

3C12p04　*Streptomyces sanglieri* A14 株 glycerophosphoethanolamine ethanolaminephosphodiesterase の精製およびキャラクタリゼーション，遺伝子クローニング

14:36　◦峯田真吾，杉森大助（福島大・理工）

3C12p05　*Streptomyces sanglieri* 由来 glycerophosphocholine cholinephosphodiesterase の諸特性解析と発現の試み

14:48　◦小笠原準季[1]，奥田航輝[2]，杉森大助[1]（[1]福島大院理工，[2]福島大理工）

3C12p06　大腸菌由来の耐熱性無機ピロホスファターゼの精製と特性評価

15:00　◦殷　梓蘭，中村　卓（長浜バイオ大院）

3C12p07　超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の新規アミノプロピル基転移酵素の同定

15:12　◦岡田和真[1]，　秀瀬涼太[1]，　福田青郎[2]，　大島泰郎[3]，今中忠行[2]，藤原伸介[1]（[1]関学大理工，[2]立命大生命科学，[3]共和化工・環境微生物学研究所）

3C12p08　神経剤高分解能を有する変異 Organophosphorus hydrolase の性状と迅速精製法の検討

15:24　◦中山公介[1]，　大森　毅[2]，　瀬戸康雄[2]，　有路沙織[1]，石川暁志[1]，川原一芳[1]（[1]関東学院大・工・物質生命，[2]科警研）

3C12p09　細胞性粘菌における acetoacetyl-CoA thiolase の dual-localization について

15:36　◦関場惇史，板垣祥子，大町鉄雄（弘前大・農学生命）

3C12p10　新規メナキノン生合成経路酵素 MqnD の生成物・類似体複合体の X 線結晶構造解析

15:48　松尾京子[1]，石北　央[2]，大利　徹[3]，◦新井亮一[1]（[1]信州大繊維，[2]京大 CPLS，[3]北大院工）

3C12p11　鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 由来テトラチオン酸ハイドロラーゼの結晶化

16:00　◦中山久之[1]，小坂　恵[2]，上村一雄[1]，金尾忠芳[1]（[1]岡山大院環境生命，[2]岡山大自然生命セ）

3C12p12　ファージ由来ウェルシュ菌特異的溶菌酵素 Psm の触媒ドメインの結晶構造解析

16:12　◦吉田裕美[1]，玉井栄治[2]，関谷洋志[2]，牧　純[2]，神鳥成弘[1]（[1]香川大総合生命研究セ，[2]松山大薬）

3C12p13　ヒト由来スクアレン合成酵素の生産物特異性部位の探索

16:24　◦方波見彰仁，斎藤恭一，梅野太輔（千葉大院・工・共生応化）

3C12p14　*Aspergillus oryzae* フェルラ酸エステラーゼ B のリッドドメインの機能解析

16:36　◦河本かずさ[1]，　鈴木健太郎[2]，　伏信進矢[2]，　塩野義人[1]，小関卓也[1]（[1]山形大・農，[2]東大院農・応生工）

3C12p15　*Enterococcus faecalis* NP-10011 株特異的バクテリオファージのゲノム解析と組換えエンドリシンの特性

16:48　◦粟冠真紀子[1]，　堀内智博[1]，　林　篤[2]，　嶋田貴志[2]，木村哲也[1]，粟冠和郎[1]（[1]三重大院生資，[2]ニチニチ製薬）

3C12p16　Vibrio parahaemolyticus 由来キチンオリゴ糖デアセチラーゼの立体構造に基づいた結合ドメインの機能解析
17:00　°坂木祐太[1]，　杉山佳奈子[3]，　平野貴子[2]，　坂本友樹[2]，前原佑哉[1]，袴田　航[1,2]，朴　三用[3]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科・生命化，[3]横市大院生命ナノ）

3C12p17　モジュラーマンナナーゼ（Man5A）における糖質結合モジュール CBM32 の基質認識における重要性
17:12　°水谷公也，粟冠真紀子，木村哲哉，粟冠和郎（三重大院生物）

3C12p18　*Paenibacillus* sp. IK-5 キトサナーゼに存在する CBM32 糖結合 モジュールの機能解析
17:24　新家粧子[1]，山城玲奈[1]，大沼貴之[1]，木元　久[2]，草桶秀夫[3]，°深溝　慶[1]（[1]近畿大農，[2]福井県大生物資源，[3]福井工大工）

C32 会場　午後の部（14:00〜17:00）

環境—環境保全，浄化技術工学，バイオレメディエーション—

3C32p01　ウキクサ根圏細菌共生系を利用した低炭素型フェノール分解
14:00　°倉科光紀[1]，菅原雅之[1,2]，三輪京子[1,2]，森川正章[1,2]（[1]北大院環境，[2]ALCA）

3C32p02　ウキクサ根圏および活性汚泥からのエストロゲン分解細菌の単離と諸特性解析
14:12　°森本洋輔[1]，菅原雅之[1,2]，三輪京子[1,2]，森川正章[1,2]（[1]北大院環境，[2]ALCA）

3C32p03　モエジマシダによるヒ素高蓄積における微生物の関与
14:24　°簡　梅芳，小畑和貴，宮内啓介，遠藤銀朗（東北学院大・工）

3C32p04　重質油汚染の好気性バイオレメディエーションのための室内試験
14:36　°田中宏幸[1]，吉浪賢史[2]，松久裕之[2]，野村暢彦[1]，中島敏明[1]，内山裕夫[1]（[1]筑波大院生命環境，[2](株)鴻池組）

3C32p05　*Rhodococcus erythropolis* PR4 株における細胞のアルカン相への転移に対する Mg トランスポーターの影響
14:48　°瀧原速仁[1]，荻原　淳[2]，岩淵範之[1]，砂入道夫[1]（[1]日大・生資科・応生科，[2]日大・生資科・生化）

3C32p06　*Methanosarcina thermophila* の鉄還元能と Magnetite 生成
15:00　°山田千早，石井正治，五十嵐泰夫（東大院農生）

3C32p07　チーズホエーからの葉面酵母 *Pseudozyma antarctica* の生分解性プラスチック分解酵素の生産
15:12　°渡部貴志[1,2]，篠崎由紀子[1]，山下結香[1]，小板橋基夫[1]，吉田重信[1]，北本宏子[1]（[1]農環研，[2]JSPS-PD）

3C32p08　各地の畑土壌における生分解性ポリエステル製マルチフィルムの微生物による分解
15:24　°山元季実子，　渡部貴志，　平舘俊太郎，　小板橋基夫，山口紀子，北本宏子（(独)農環研）

3C32p09　葉面酵母由来の酵素による圃場での農業用生分解性マルチフィルムの分解促進
15:36　°山下(鮫島)結香[1]，小板橋基夫[1]，渡部貴志[1,2]，篠崎由紀子[1]，北本宏子[1]（[1]農環研，[2]JSPS-PD）

3C32p10　ダイズ根粒菌の N_2O 還元酵素によるダイズ根圏からの N_2O 発生削減
15:48　°板倉　学[1]，内田義崇[2]，秋山博子[2]，星野(高田)裕子[2]，下村有美[2]，森本　晶[2]，多胡香奈子[2]，王　勇[2]，早川千尋[2]，植竹佑輔[1]，　SANCHEZ Cristina[1]，　江田志磨[1]，　早津雅仁[2]，南澤　究[1]（[1]東北大院生命科学，[2]農業環境技術研究所）

3C32p11　Regulation of N_2O reduction in *Bradyrhizobium japonicum* mutants with increased N_2O reductase activity
16:00　°Cristina SANCHEZ GOMEZ，　Manabu ITAKURA，Yusuke UETAKE，　Shima EDA，　Hisayuki MITSUI，Kiwamu MINAMISAWA（Tohoku University）

3C32p12　耐熱性 Protein Disulfide Isomerase を利用した効率的な BPA の回収
16:12　°ALSHEHRI AMIRA[1,3]，安部　芳[2]，秀瀬涼太[3]，今岡　進[1,3]，藤原伸介[1,3]（[1]関西学院大院・理工，[2]関西学院大学・理工，[3]関西学院大院・生命環境センター）

3C32p13　プロリン誘導体を用いた環境調和型単糖合成
16:24　°酒井　陸[1]，新田拓馬[2]，袴田　航[1,2]，平野貴子[2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科・生命化）

3C32p14　オイルパーム廃棄木中の糖質加水分解酵素の特徴
16:36　°脇坂昂平[1]，　荒井隆益[2]，　小杉昭彦[2]，　韮澤　悟[2]，森　隆[2]，山川　隆[1]（[1]東大院農，[2]国際農林水産業研究センター）

3C32p15　オイルパーム（Elaeis guineensis）古木伐採後貯蔵中にみられるデンプン分解酵素遺伝子の発現解析
16:48　°尾田識史[1]，韮澤　悟[2]，荒井隆益[2]，小杉昭彦[2]，森　隆[1,2]，OTHMAN Sulaiman[3]，ROKIAH Hashim[3]，山川　隆[1]（[1]東大院・農生科・農学国際，[2]国際農研センター，[3]マレーシア理科大学）

C20 会場　午前の部（9:00〜12:00）

有機—天然物–単離構造決定，植物—

3C20a01　オートムギに含まれる新規アベナンスラミド
9:00　°石原　亨，藤田　健，小嶋果奈，中島廣光（鳥取大農）

3C20a02　タルウマゴヤシの生産する didehydro-orobanchol の単離及び構造決定
9:12　°徳永珠美[1]，中谷成史[2]，秋山康紀[2]，林　英雄[2]（[1]阪府大・生命環境，[2]阪府大院・生命環境）

3C20a03　フラバン二量体とその関連化合物によるマウス精子の超活性化様運動の誘導効果
9:24　°荒舘　忠[1]，谷井一郎[1]，小宮　顕[2]（[1]富山大医生物，[2]富山大医腎泌尿器）

3C20a04　褐藻クロメ *Ecklonia kurome* の硫酸化フロロタンニンの単離と構造研究
9:36　°瀬川慎也[1]，伊藤久富[2]，山下まり[1]（[1]東北大院農，[2]長瀬産業）

3C20a05　半寄生帰化雑草ヒサウチソウの成分と生物活性
9:48　°森本正則，東村聡太，松田一彦（近畿大院農）

3C20a06　Oleuropein 糖加水分解産物アミノ酸複合体の構造解析
10:00　°池田修也[1]，松野　聡[1]，大上将司[1]，渡辺修治[2]，大西利幸[3]（[1]静大院・農，[2]静大院・創造，[3]静大・GRL）

3C20a07　ジャバラ果皮ポリメトキシフラボノイドのヒト胃癌細胞に対する作用
10:12　°小島直也，奥野祥治，藤本　晶（和歌山高専）

3C20a08　木本由来生薬のがん細胞増殖抑制活性について
10:24　°小山愛美[1]，常盤野哲生[1]，川井　悟[2]，吉澤結子[1]（[1]秋田県大院生資科，[2]東京電気大理工）

3C20a09　コバノランタナに含まれるポリフェノール類と機能性
10:36　°山崎啓司，奥野祥治（和歌山高専）

3C20a10　梅種子に含まれる脂肪分化促進物質の探索
10:48　°野村紗希[1]，　奥野祥治[1]，　河野良平[2]，　野村幸子[2]，宇都宮洋才[2]（[1]和歌山高専，[2]和歌山医大）

3C20a11　イヌカタヒバが生産するストリゴラクトンの探索
11:00　°謝　肖男[1]，米山香織[1]，来生貴也[1]，高橋明子[1]，内田健一[2]，横田孝雄[2]，野村崇人[1]，米山弘一[1]（[1]宇都宮大・雑草センター，[2]帝京大・バイオ）

3C20a12　気孔形成に関与する新規ペプチド性因子の探索
11:12　°杉田大河，近藤竜彦（名古屋大院生命農）

3C20a13　Search for intestinal maltase inhibitors from *Pluchea indica* leaves
11:24　°ARSININGTYAS INES SEPTI[1]，Maria D. P. T Gunawan Puteri[2]，Eisuke Kato[1]，Jun Kawabata[1]（[1]Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.，[2]Pelita Harapan Univ., Indonesia）

3C20a14　東南アジア産植物中からの膵リパーゼ阻害成分の探索
11:36　°中込　亮，　グナワンプテリマリアデウィピーティー，加藤英介，川端　潤（北大院農）

3C20a15　植物疫病菌 *Phytophthora* 無性生殖の阻害物質の探索
11:48　°岩井里佳，ゴビンダムスダカル，小鹿　一（名大院生命農）

C20 会場　午後の部（14:00〜17:24）

有機—天然物–単離構造決定，動物—

3C20p01　石サンゴ *Montipora digitata* 由来 montiporic acid

D の構造決定

14:00 ○小谷真也[1]，佐藤神奈[2]，カサレトベアトリス[1]，鈴木　款[1]（[1]静岡大院創造，[2]静岡大院農）

3C20p02　新規テトロドトキシン類縁体 6-デオキシテトロドトキシンの単離・構造決定

14:12 ○工藤雄大，此木敬一，長由扶子，山下まり（東北大院農）

3C20p03　サキシマベニコケガ（*Barsine expressa*，ヒトリガ科コケガ亜科）が分泌する新規性フェロモンの同定

14:24 ○藤井　透[1]，　山川　玲[1]，　寺嶋芳江[2]，　井村信弥[2]，石垣圭一[2]，金城政勝[2]，安藤　哲[1]（[1]東農工大院 BASE，[2]琉球大農）

3C20p04　ミッドカイン（MK）を指標とした抗腫瘍活性スクリーニング ～海洋天然物ライブラリを用いて～

14:36 ○祖納元りえ[1]，　山城知佳[2]，　坪田庄真[3]，　藤原健史[4]，石見盛太[4]，金本昭彦[4]，高石花蓮[5]，池松真也[1]（[1]沖縄高専生物資源，[2]京都大院医，[3]名古屋大院医，[4]OP バイオファクトリー株式会社，[5]神戸大理）

3C20p05　アコヤガイ靭帯部に存在する低分子ペプチド（LICP）の構造・機能解析

14:48 ○鈴木道生，長澤寛道（東大院農）

3C20p06　ヒト血漿に存在するリン脂質酸化二次生成物の LC-MS/MS 分析

15:00 ○澤根健人，加藤俊治，仲川清隆，宮澤陽夫（東北大院農・機能分子解析）

3C20p07　LC-MS/MS によるヒト血中 PCOOH の精密定量分析

15:12 ○加藤俊治[1]，仲川清隆[1]，浅井　明[2]，及川眞一[2]，宮澤陽夫[1]（[1]東北大院農・機能分子解析，[2]日医大・内分泌代謝）

3C20p08　ハガタキコケガ性フェロモンとその関連化合物の不斉合成および野外誘引試験

15:24 ○村木優太，田栗知憲，山川　玲，山本雅信，安藤　哲（農工大院・BASE）

3C20p09　ウマノスズクサ花香成分のクロコバエ類に対する誘引活性

15:36 ○大野　慧[1]，酒井圭一[1]，小野　肇[1]，吉永直子[1]，森　直樹[1]，岩佐光啓[2]，西田律夫[1]（[1]京都大院農，[2]帯広畜産大畜産生命科学）

3C20p10　植食性昆虫の食害に対するクチナシの化学的防御機構

15:48 ○内藤裕彬，網干貴子，吉永直子，小野　肇，西田律夫，森　直樹（京大院農）

3C20p11　ヤマトシロアリ（*Reticulitermes speratus*）兵隊アリに新規に見出された抗酸化物質

16:00 ○田崎英祐，仁田尾優，赤壁義彦，松井健二，井内良仁（山口大農）

3C20p12　侵入害虫ナスミバエ誘引化合物の探索と立体化学

16:12 ○吉田幸広[1]，　江口　恭[1]，　宇久田理恵[2]，　原口　大[2]，小濱継雄[2]，小野　肇[1]，西田律夫[1]（[1]京大院農，[2]沖縄県農研センター）

3C20p13　南西諸島に生息するハグルマヤママユが分泌する性フェロモンの構造決定

16:24 ○鐘ヶ江明子[1]，　中　秀司[2]，　閤　祺[1]，　立田晴記[3]，喜友名亮太[3]，　志田岳弥[3]，　加藤三歩[3]，　藤田　新[3]，　山本雅信[1]，安藤　哲[1]（[1]東農工大院　BASE，[2]鳥取大農，[3]琉大農）

3C20p14　イラガ幼虫分泌液由来の痛みならびに炎症の活性測定法

16:36 ○水谷祐輔[1]，小山拓矢[1]，今井邦雄[1]，西尾昌洋[1]，新美友章[2]，勝崎裕隆[1]（[1]三重大院・生資，[2]名大院・生命農）

3C20p15　TypeII 蛾類性フェロモン候補物質の系統的合成と分析データの集積

16:48 ○村上陽子，丸山涼子，坂本有紀，山本雅信，安藤　哲（農工大院 BASE）

3C20p16　トマト近縁野生種 *Solanum habrochaites* の揮発成分に含まれるタバココナジラミ バイオタイプ Q に対する忌避物質の探索

17:00 ○北村登史雄[1]，武田光能[1]，中島修平[2]（[1]農研機構　野菜茶研，[2]岡山大院　自科）

3C20p17　蒼朮抽出物中のヒアルロン酸産生促進物質の単離及び構造解析

17:12 ○成岡美智（神奈川工科大学）

C21 会場　午前の部（9:00～12:00）

有機―天然物，ケミカルバイオロジー，作用機構―

3C21a01　プロシアニジン・オリゴマーの構造－活性相関研究

9:00 ○岡本修平[1]，　石原沙也加[1]，　岡本泰輔[1]，　土井翔馬[1]，泉野麻友[2]，中嶋範行[3]，齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電通大院・工，[2]大阪電通大・工，[3]富山県大・工）

3C21a02　Identification of SQAP-binding proteins from a T7 phage display screen

9:12 ○Jesus Izaguirre Carbonell，Hiroshi Murata，Keisuke Ohta，Tomoe Kusayanagi，Senko Tsukuda，Shinji Kamisuki，Fumio Sugawara（TUS）

3C21a03　タンパク質架橋剤を用いた低分子化合物結合タンパク質の同定法の開発

9:24 ○塚原美宙，松浦英幸，高橋公咲（北大院農）

3C21a04　カルジオリピン - シトクロム *c* 複合体形成の分子機構解明

9:36 ○安部真人，中野正顕，小坂亜弓，三芳秀人（京大院農）

3C21a05　ユビキノンプローブの合成とユビキノン結合性タンパク質 Coq10 の解析

9:48 ○松延広平[1]，　村井正俊[1]，　工藤佐和子[1]，　川向　誠[2]，三芳秀人[1]（[1]京都大院農・応用生命，[2]島根大生物資源科学・生命工学）

3C21a06　ボタンイボタケ由来 *p*-ターフェニル誘導体のがん細胞特異的な細胞毒性における作用メカニズムと構造-活性相関の解明

10:00 ○乗鞍敏夫[1]，　藤原憲秀[2]，　佐野勇介[2]，　佐藤たくと[2]，角田隆幸[3]，櫛部佳祐[3]，森永八江[1]，岩井邦久[1]，松江　一[1]（[1]青森保健大，[2]北大院理，[3]北大理）

3C21a07　Pyrrocidine A によるミトコンドリアを介したアポトーシス誘導機構

10:12 ○上杉祥太[1]，　室井　誠[2]，　近藤恭光[2]，　塩野義人[3]，長田裕之[2]，木村賢一[1]（[1]岩手大院・農，[2]理研基幹研・ケミカルバイオロジー，[3]山形大・農）

3C21a08　シドケ由来抗がん活性物質エンドパーオキシサイドによる酵母の細胞周期制御の解明

10:24 ○今村優子[1]，　汐谷充博[1]，　木村賢一[2]，　湯川格史[1]，土屋英子[1]（[1]広島大院先端物質・分子生命，[2]岩手大院・農）

3C21a09　*Fusarium graminearum* のトリコテセン生産を阻害する precocene II の標的タンパク質に関する研究

10:36 ○古川智宏，坂本直子，露木利枝，長澤寛道，作田庄平（東大院農生科・応生化）

3C21a10　抗喘息作用物質アロサミジン類の標的分子の探索

10:48 ○桑田一平[1]，瀬口武史[2]，村岡聖子[1]，高城景子[1]，遠藤博寿[1]，井上博雅[3]，長澤寛道[1]，作田庄平[1]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]プライムテック株式会社，[3]鹿児島大・医歯）

3C21a11　細胞形態に基づいた創薬ターゲット特定のためのハイコンテントなデータベースの作成

11:00 ○徳光綾子[1]，伊藤昭博[1,2,3]，吉田　稔[1,2,3]（[1]理研・基幹研究所・ケミカルゲノミクス研究グループ，[2]理研・基幹研究所・吉田化学遺伝学研究室，[3]科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業）

3C21a12　がん細胞にアポトーシスを誘導するアセトアミド誘導体の活性評価と作用機序解析

11:12 ○河村達郎，近藤恭光，本田香織，関根朋美，室井　誠，近藤久恵，川谷　誠，長田裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

3C21a13　機能未知ポリ ADP リボシル化酵素 PARP10 のケミカルバイオロジーによる機能解析

11:24 ○竹本　靖[1,2]，　八代田陽子[1]，　岡本怜衣香[3]，　高木美香[3]，斎藤臣雄[4]，長田裕之[4]，吉田　稔[1,3]（[1]理研基幹研・ケミカルゲノミクス，[2]日本学術振興会特別研究員，[3]理研基幹研・創薬シード化合物探索，[4]理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

3C21a14　化合物アレイによるヘッジホッグ伝達経路の阻害剤の探索

11:36 ○近藤恭光，河村達郎，本田香織，関根朋美，長田裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

3C21a15　Proteobase を用いた新規プロテアソーム阻害剤ピロリジラクトンの標的同定
11:48　◦室井　誠，近藤久恵，平田泰子，青野晴美，川谷　誠，野川俊彦，長田裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

C21 会場　午後の部（14:00〜18:00）

有機—天然物，ケミカルバイオロジー，作用機構—
3C21p01　UTKO1 を用いたホヤ脊索管形成機構の解析
14:00　◦溝谷優治[1]，鈴木麻友[1]，渡邉秀典[2]，高取聡美[2]，堀田耕司[1]，岡浩太郎[1]，田代　悦[1]，井本正哉[1]（[1]慶大・理工，[2]東大院農）
3C21p02　オートファジー制御機構の網羅的解析に向けた細胞評価系の構築
14:12　◦加藤直裕，間木重行，田代　悦，井本正哉（慶大理工）
3C21p03　ホップ抽出物キサントフモールの抗がん作用解析
14:24　◦金墉周平，田代　悦，井本正哉（慶大理工）
3C21p04　ヒト大腸がん細胞 LoVo における，EGF 誘導性 E-cadherin 発現抑制機構の解析
14:36　◦大嶽弘之，邊見静香，久田明里，小林大貴，田代　悦，井本正哉（慶大理工）
3C21p05　CysLT1 シグナリングによる Tiam1 の発現制御
14:48　◦笠松誠人，間木重行，田代　悦，井本正哉（慶大･理工）
3C21p06　膜基板型抗体マクロアレイを用いたマルホルミン A_1 の作用機序解析へのアプローチ
15:00　◦小泉幸央[1]，　長井賢一郎[2]，　高　立娜[1]，　蓮見惠司[3]，小代田宗一[1]，杉山俊博[1]（[1]秋田大院医，[2]北里大薬，[3]東農工大院農）
3C21p07　アフリカ伝承薬成分 Voacangine はメントール受容体 TRPM8 の強力なアンタゴニストである
15:12　◦寺田祐子[1]，堀江俊治[2]，高山廣光[3]，渡辺達夫[1]（[1]静県大院薬食，[2]城西国際大薬，[3]千葉大院薬）
3C21p08　Pradimicin A とマンノビオース誘導体の結合解析
15:24　◦中川　優[1]，五十嵐康弘[2]，伊藤幸成[1,3]（[1]理研・基幹研，[2]富山県大・生工，[3]JST・ERATO）
3C21p09　D-アロース中鎖脂肪酸エステルのヒト白血病細胞増殖抑制活性
15:36　◦柳田　亮，小川知紗，小橋克哉，川浪康弘（香川大農）
3C21p10　*Senna occidentalis* 抽出物による創傷回復効果−MMP の発現について−
15:48　◦元矢知志[1]，野村正人[2]，大谷　浩[1]（[1]島根大医，[2]近畿大工）
3C21p11　クリックケミストリー型光親和性プローブを用いた AM 菌のストリゴラクトン結合タンパクの探索
16:00　◦中谷成史，秋山康紀，林　英雄（阪府大院・生命環境）
3C21p12　ベンゾフェノン型 GR24 光親和性分子プローブの合成と AM 菌菌糸分岐誘導活性
16:12　◦秋山康紀，山本克治，林　英雄（阪府大院・生命環境）
3C21p13　ミトコンドリア複合体－ I に作用する光反応性フェンピロキシメートの結合部位の同定
16:24　◦村井正俊，白石悠祐，崎山直人，三芳秀人（京大院農・応用生命）
3C21p14　ミトコンドリア複合体–I に作用するキナゾリン型阻害剤の結合部位の同定
16:36　◦浅野　周，村井正俊，三芳秀人（京都大院農）
3C21p15　ミトコンドリア複合体 - I 阻害剤としてのアミロライド類縁体の合成と作用機構
16:48　◦土生沙綾子，村上園実，村井正俊，三芳秀人（京都大院農）
3C21p16　ネオヘスペリドースの糖取り込み促進作用機構解析
17:00　◦木村太郎[1]，加藤英介[2]，川端　潤[3]（[1]北大院農，[2]北大院農，[3]北大院農）
3C21p17　ゴルジ体マンノシダーゼ特異的蛍光プローブとパスウェイ解析を用いたマンノシダーゼ阻害剤のスクリーニング系開発
17:12　◦鈴木敦子[1]，袴田　航[1,2]，平野貴子[2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用，[2]日大生資科・生命化）
3C21p18　新規パスウェイを経由する小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤の探索
17:24　◦田村沙緒里[1]，　小林拓人[2]，　袴田　航[1,2]，　平野貴子[2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科・生命化）
3C21p19　ヒト赤血球に分布するアミロイド β 量の評価：赤血球膜脂質過酸化とアルツハイマー病への関与の可能性
17:36　◦近藤桃子[1]，　喜古健敬[1]，　宮澤大樹[1]，　仲川清隆[1]，古川勝敏[2]，新井啓行[2]，宮澤陽夫[1]（[1]東北大院農・機能分子解析，[2]東北大学加齢研）
3C21p20　QTRAP MS/MS と QTOF MS/MS によるピロロキノリンキノンの定量分析法
17:48　◦武田光峰[1]，　中野昌彦[2]，　安藤篤正[1]，　木村ふみ子[1]，仲川清隆[1]，宮澤陽夫[1]（[1]東北大院農，[2]三菱ガス化学(株)）

C22 会場　午前の部（9:00〜12:00）

有機—天然物–生合成，代謝—
3C22a01　ラバンドシアニン生合成における新奇プレニルジリン酸合成酵素の同定と機能解析
9:00　◦尾崎太郎，趙　　平，葛山智久，西山　真（東大・生物工学セ）
3C22a02　フェナジノマイシン生合成遺伝子クラスターのクローニング
9:12　◦中尾智世[1]，志波　優[2]，吉川博文[2]，瀬戸治男[2]，大村　智[3]，葛山智久[1]，西山　真[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]東農大，[3]北里大）
3C22a03　バクテリア由来のジテルペン環化酵素の探索と機能解析
9:24　◦本吉祐大[1]，山田佑樹[2]，池田治生[2]，西山　真[1]，葛山智久[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]北里大・北里生命研）
3C22a04　放線菌由来ジテルペン環化酵素 CotB2 の反応機構
9:36　◦目黒亜由子，富田武郎，西山　真，葛山智久（東大・生物工学セ）
3C22a05　BAC を利用した 17 員環マクロサイクリック化合物 versipelostatin の異種生産
9:48　◦橋本拓哉[1]，橋本絢子[2]，新家一男[2]，池田治生[3]，西山　真[1]，葛山智久[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]産総研，[3]北里大・北里生命研）
3C22a06　Isolation and structure elucidation of novel compounds produced by actinomycetes that acquired rifampicin resistance
10:00　◦Wei Li Thong，Makoto Nishiyama，Tomohisa Kuzuyama（Univ. Tokyo）
3C22a07　放線菌の生産するテルペノイド–ポリケタイド融合化合物の生合成に特異的なアミノ基転移反応
10:12　◦磯貝章太，西山　真，葛山智久（東大院農）
3C22a08　新規ヌクレオシド系抗生物質 A-94964 の生合成遺伝子の機能解析
10:24　◦白石太郎，葛山智久，西山　真（東大・生物工学セ）
3C22a09　*Saccharothrix* sp. ST-888 が生産する除草剤 phosphonothrixin の 生合成遺伝子のクローニング
10:36　◦林　健文，西山　真，葛山智久（東大・生物工学セ）
3C22a10　HDAC 阻害剤 trichostatin A 生合成遺伝子のクローニング
10:48　◦工藤　慧，葛山智久，西山　真（東大・生物工学セ）
3C22a11　バクテリアにおける新規葉酸生合成経路の解明
11:00　◦佐藤康治，小林大毅，大利　徹（北大院工）
3C22a12　ペプチド系抗生物質，ボトロマイシン生合成機構の解明
11:12　佐藤康治[1]，　大門美保[1]，　簗島謙太郎[2]，　尾仲宏康[3]，石川　淳[4]，◦大利　徹[1]（[1]北大院工，[2]協和発酵バイオ，[3]東大院･農学生命，[4]国立感染研）
3C22a13　ペプチド系抗生物質，フェガノマイシン生合成機構の解明
11:24　◦野池基義[1]，　雄谷洸一[1]，　佐藤康治[1]，　丸山千登勢[2]，濱野吉十[2]，石川　淳[3]，大利　徹[1]（[1]北大院工，[2]福井県大，[3]国立感染研）
3C22a14　糸状菌 *Phomopsis amygdali* が持つインドールジテルペン生合成遺伝子クラスターの解析
11:36　◦劉　成偉[1]，野池基義[1]，田上紘一[2]，南　篤志[2]，及川英秋[2]，大利　徹[1]（[1]北大院工，[2]北大院理）
3C22a15　ヒト P450 発現菌を用いた karahanaenone の生物変換
11:48　◦宮澤三雄，中橋　浩（近畿大理工）

C22 会場　午後の部（14:00〜18:00）

有機—天然物–生合成，代謝—

3C22p01　糸状菌の二成分情報伝達系攪乱により生産誘導されるポリケタイド化合物の生合成遺伝子クラスターの同定
14:00　○本山高幸，林　敏明，廣田　洋，長田裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

3C22p02　糸状菌 *Magnaporthe oryzae* の二成分情報伝達系攪乱によるテヌアゾン酸の生産誘導
14:12　○尹　忠銖，本山高幸，林　敏明，廣田　洋，長田裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

3C22p03　糸状菌 *Fusarium* sp. RK97-94 のルシラクタエン生合成遺伝子クラスター中のトランスポーターおよびメチル基転移酵素遺伝子の機能解析
14:24　○加藤　翔[1,2]，本山高幸[1]，林　敏明[1]，廣田　洋[1]，田中　彰[3]，安藤直子[3]，鎌倉高志[2]，長田裕之[1]（[1]理研基幹研・ケミカルバイオロジー，[2]東京理科大，[3]東洋大）

3C22p04　放線菌におけるアミノ酸キャリアタンパク質を介した二次代謝産物生合成
14:36　○長谷部文人[1]，富田武郎[1]，高ひかり[2]，藤村　務[2]，西山千春[3]，葛山智久[1]，西山　真[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]順天堂大・医・研究基盤セ，[3]順天堂大・医・アトピー疾患研究セ）

3C22p05　新規アミノ酸キャリアタンパク質を用いて生合成される天然化合物の探索
14:48　○松田研一[1]，長谷部文人[1]，富田武郎[1]，志波　優[2]，吉川博文[2]，新家一男[3]，葛山智久[1]，西山　真[1]（[1]東大·生物工学セ，[2]東農大・生物資源ゲノム解析センター，[3]産総研・バイオメディシナル情報研究センター）

3C22p06　Quinocarcin 生合成における tetrahydroisoquinoline 骨格構築機構の解明：第二報
15:00　○平塚知成，金子峻輔，纐纈健人，南　篤志，大栗博毅，及川英秋（北大院理）

3C22p07　インドールジテルペン・パキシリンの酵素的全合成
15:12　○田上紘一[1]，劉　成偉[2]，南　篤志[1]，野池基義[2]，井坂哲也[3]，笛木周平[1]，七条好宏[1]，戸嶋浩明[3]，五味勝也[4]，大利　徹[2]，及川英秋[1]（[1]北大院理，[2]北大院工，[3]茨大農，[4]東北大院農）

3C22p08　糸状菌 *Chaetomium globosum* 由来 Chaetoglobosin A の生合成研究
15:24　○石内勘一郎，中沢威人，佐藤道大，野口博司，渡辺賢二（静岡県大薬）

3C22p09　天然物生合成遺伝子の異種発現による spirotryprostatin 類の生合成研究
15:36　○石川格靖[1]，恒松雄太[1]，野口博司[1]，守屋央朗[2]，渡辺賢二[1]（[1]静岡県立大学，[2]岡山大学）

3C22p10　糸状菌由来 azaphilone 系天然物 cochliodone A の生合成研究
15:48　○佐藤道大[1]，中沢威人[1]，野口博司[1]，守屋央朗[2]，渡辺賢二[1]（[1]静県大薬，[2]岡山大学・異分野コア）

3C22p11　糸状菌由来休眠型生合成遺伝子の活性化によるポリケタイド系天然物合成システムの構築
16:00　○猿渡隆佳[1]，野口博司[1]，守屋央朗[2]，渡辺賢二[1]（[1]静岡県大薬，[2]岡山大異分野コア）

3C22p12　糸状菌 *Chaetomium globosum* における chaetoviridin 類の生合成経路の解明
16:12　○杉本　覚，佐藤道大，野口博司，渡辺賢二（静岡県大薬）

3C22p13　形態形成変異を指標とした，糸状菌 *Chaetomium globosum* における休眠型生合成遺伝子の活性化変異株のスクリーニング
16:24　○中沢威人，五反田康孝，石内勘一郎，野口博司，渡辺賢二（静岡県大・薬）

3C22p14　Pseurotin 類生合成におけるスピロ環骨格形成機構の解明
16:36　○恒松雄太，福富愛美，野口博司，渡辺賢二（静岡県大薬）

3C22p15　フマギリン生合成遺伝子クラスターの同定
16:48　○福冨愛実，戸塚統子，恒松雄太，猿渡隆佳，佐藤道大，野口博司，渡辺賢二（静岡県大薬）

3C22p16　植物病原菌 *Bipolaris coicis* の生産する植物毒素 radicinin の生合成
17:00　○西田直人，石原　亨，中島廣光（鳥取大農）

3C22p17　サクラ周辺のクマリン分解微生物の単離・同定とクマリン分解代謝の追跡
17:12　○田村　駿，須永祐輔，清水文一（東洋大生命）

3C22p18　海底堆積層に見つかる多様な還元的脱ハロゲン化酵素遺伝子：天然ハロゲン化有機化合物は海底で代謝されている？
17:24　○河合幹彦[1]，豊田　敦[2]，高木善弘[1]，西　真郎[1]，荒井　渉[1]，内山郁夫[3]，伊藤武彦[4]，諸野祐樹[1]，青池　寛[1]，高井　研[1]，藤山秋佐夫[2]，稲垣史生[1]，高見英人[1]（[1]海洋研究開発機構，[2]情報システム研究機構遺伝学研究所，[3]自然科学研究機構基礎生物学研究所，[4]東京工業大学）

3C22p19　*Methylococcus capsulatus*由来のスクアレン合成酵素の DxxE（D）D モチーフの機能解析
17:36　○大竹佳奈，斎藤直樹，仲野千秋，佐藤　努，星野　力（新潟大院自然科学）

3C22p20　黒麹菌が生産する二次代謝産物 pyranonigrin A の生合成機構
17:48　○新藤一敏，中村仁美，理光理沙（日女大家政・食物）

C25 会場　午前の部（9:24〜12:00）

有機—合成，反応機構—

3C25a03　フッ化シアル酸類の合成とシアリダーゼ阻害活性
9:24　○田中皓祐[1]，ノングラックスリウィラジャロエン[2,3]，佐藤宏樹[1]，山田てい子[1]，桑原重文[1]，大類　洋[4]，須原義智[5]，鈴木康夫[2]，清田洋正[1]（[1]東北大院農，[2]中部大，[3]タマサート大，[4]横浜薬科大，[5]芝浦工大）

3C25a04　血管新生阻害物質 cortistatin A 類の合成研究
9:36　○柴田　要，佐藤勇気，山田てい子，桑原重文，清田洋正（東北大院農）

3C25a05　抗腫瘍物質 Maoecrystal V の合成研究
9:48　○小竹正晃，浅尾洋樹，佐々木郁香，島崎泰治，桑原重文，清田洋正（東北大院農）

3C25a06　オートファジー促進化合物 clionamine A-D の合成研究
10:00　○吉田晃之，平松幸之助，佐藤勇気，山田てい子，桑原重文，清田洋正（東北大院農）

3C25a07　生物活性天然物部分構造を付与した金ナノ粒子の合成研究
10:12　○榎本　賢[1]，桑原重文[2]，清水弘樹[1]（[1]産総研北海道センター，[2]東北大農）

3C25a08　新規 *p*-テルフェニル類の合成と TNF-α 放出抑制活性
10:24　○浦尾翔太[1]，矢島　新[1]，吉岡泰淳[2]，勝田　亮[1]，阿部尚樹[2]，額田恭郎[1]（[1]東農大・応生・醸造，[2]東農大・応生・栄養）

3C25a09　Virgineone アグリコンの全合成
10:36　○伊田千絵子，矢島　新，谷口佳代子，村田笙子，勝田　亮，額田恭郎（東農大応生）

3C25a10　Versipelostatin C11-C21 ユニットの合成
10:48　○山本健人，山下あかね，小鷲真衣，勝田　亮，矢島　新，額田恭郎（東農大応生）

3C25a11　電解付加環化反応を利用した新規蛍光性核酸アナログの合成
11:00　○島田恒平，岡田洋平，北野克和，千葉一裕（東京農工大院農）

3C25a12　フラン電解を基軸とした含ピロール共役オリゴマーの合成
11:12　○大神啓介，岡田洋平，北野克和，千葉一裕（東農工大院農）

3C25a13　分子内電子移動プローブとしての [2+2] 付加環化反応
11:24　○山口勇将，岡田洋平，千葉一裕（東農工大院農）

3C25a14　陽極酸化によるペプチドの分子内ジスルフィド結合形成反応
11:36　○高橋優士，北田慎吾，山口勇将，岡田洋平，北野克和，千葉一裕（東農工大院）

3C25a15　陽極酸化を用いたアザヌクレオシドの効率的な合成法

の開発
11:48 ○小路貴生，金　承鶴，千葉一裕（東京農工大学）

C25 会場　午後の部（14:00〜17:24）

有機—合成，反応機構—

3C25p01　配糖化フラボノールから対応するアントシアニンへの変換とその関連体への誘導
14:00 ○近藤忠雄[1]，加藤　亮[1]，尾山公一[2]，吉田久美[1]（[1]名大院情報，[2]名大物国セ）

3C25p02　*β-O-4* 型リグニンオリゴマーの合成研究
14:12 ○板倉圭佑，岸本崇生，濱田昌弘，中島範行（富山県大工）

3C25p03　2' 位に水酸基を有する茶カテキン代謝物の合成
14:24 ○中島範行，成瀬俊一，濱田昌弘，岸本崇生（富山県大工）

3C25p04　環状プレニルフラボノイドの合成および天然物の立体配置の確認
14:36 ○田中寛知[1]，常盤野哲生[1]，川井　悟[2]，吉澤結子[1]（[1]秋県大院生資科，[2]東電大理工）

3C25p05　相間移動型シンコナアルカロイド触媒を用いるシリル保護ジエノラートのエナンチオ選択的遠隔位プロトン化反応の開発
14:48 ○渡邊雄太，稲垣　穣（三重大院生資）

3C25p06　Norleptosohol の合成研究
15:00 ○村井嘉晃，高橋萌子，坂元君年，橋本　勝（弘前大学農学生命）

3C25p07　2 級トシラートの立体反転を利用したハモグリガ性フェロモンのキラル合成
15:12 ○田栗知憲[1,2]，　山川　怜[1]，　藤井　透[1]，　村木優太[1]，安藤　哲[1]（[1]東京農工大学，[2]理化学研究所）

3C25p08　抗 *β*–酸化型 CP–KODA（3–oxo–CP–KODA）の合成研究
15:24 ○大山秀芳，中山ともみ，長谷川守文，戸嶋浩明（茨城大院農）

3C25p09　Tautomycetin の合成研究（6）
15:36 ○重冨顕吾，今村龍太郎，生方　信（北大院農）

3C25p10　Zeylanone 類の合成研究
15:48 丸尾紗也子，西尾和之，○倉持幸司，椿　一典（京府大院生命環境）

3C25p11　エラグ酸配糖体，オキカメリアシドの合成
16:00 小林遼平[1]，花屋賢悟[1]，庄司　満[1]，大場　茂[2]，○須貝　威[1]（[1]慶應大薬，[2]慶應大自然科学研究教育セ）

3C25p12　Glabramycin C の立体化学の決定を目的とした合成研究
16:12 ○山本将起，石神　健，渡邉秀典（東大院農生科）

3C25p13　Okundoperoxide の合成研究
16:24 ○迫田大地，森　直紀，石神　健，渡邉秀典（東大院農）

3C25p14　Clavigerin B の合成研究–Claisen 転位を用いたビシクロ [3.1.1] ヘプテン骨格の構築
16:36 ○柿本　望，渡邉秀典（東大院農生科・応生化）

3C25p15　アザジラクチンの全合成研究–右側ジヒドロフランアセタール部を中心に–
16:48 ○森　直紀，石神　健，渡邉秀典（東大院農生科･応生化）

3C25p16　天然型スフィンゴ糖脂質による免疫細胞の活性化
17:00 ○田代卓哉，汐崎正生，重浦智邦，渡会浩志，谷口　克，森　謙治（理研・RCAI）

3C25p17　ショウジョウバエ雄中の新規トリグリセリドの両鏡像体合成
17:12 ○森　謙治[1,2]（[1]東洋合成(株)，[2]理研）

C26 会場　午前の部（9:00〜11:48）

生体高分子・脂質—脂質—

3C26a01　ヒト心臓由来脂肪酸結合タンパク質の脂肪酸認識機構の解明
9:00 ○杉山　成[1]，廣瀬未果[1]，松岳大輔[1]，原　利明[1]，溝端栄一[2]，井上　豪[2]，松岡　茂[1]，村田道雄[1]（[1]阪大院理，[2]阪大院工）

3C26a02　HDL 形成における ABCA1 の細胞外ドメインの役割の解析
9:12 ○石神正登[1]，長尾耕治郎[2]，植田和光[1,3]（[1]京大院・農，[2]徳島大院・ヘルスバイオサイエンス，[3]京大 iCeMS）

3C26a03　原始腹足類の卵巣から見出された新規な奇数鎖ジエン酸の位置異性体
9:24 ○川島英城（岩手県立大学宮古短大部）

3C26a04　藻類が持つ脂肪酸の二重結合位置の網羅的な決定方法の検討
9:36 ○桜井健太，佐藤直樹（東京大院総）

3C26a05　天然物や食品中の PE プラズマローゲンの HPLC 定量法の比較検討
9:48 ○浅野良緒，山下慎司，串田康子，阿部彰宏，藤田星子，木村ふみ子，仲川清隆，宮澤陽夫（東北大院農・機能分子解析）

3C26a06　リンゴ果実ワックスの分布とクチクラ膜の力学的性質への寄与
10:00 ○松村由貴[1]，椿俊太郎[2]，本田与一[1]，宇山　浩[3]，東　順一[3]（[1]京大院農，[2]高知大総研，[3]阪大院工）

3C26a07　ウメ果実の外果皮の特性評価
10:12 ○東　順一[1]，大江孝明[2]，金山裕亮[3]，宇山　浩[1]（[1]阪大院工，[2]和歌山ウメ研，[3]株サンアクティス）

3C26a08　エイコサペンタエン酸存在下における低温誘導性ポーリンタンパク質の構造と膜透過活性の解析
10:24 ○水谷彩乃[1]，代　先祝[1]，川本　純[1]，佐藤　智[2]，江崎信芳[1]，栗原達夫[1]（[1]京大化研，[2]京大 LTM センター）

3C26a09　エイコサペンタエン酸生合成遺伝子破壊が低温菌外膜タンパク質の生合成におよぼす影響
10:36 ○杉浦美和，朴　貞河，代　先祝，川本　純，江崎信芳，栗原達夫（京大化研）

3C26a10　エイコサペンタエン酸の細胞内挙動解析を目的とした *ω* - エチニル型脂肪酸の合成
10:48 ○森本亮平[1]，　川本　純[2]，　上野源次郎[3]，　佐藤　翔[4]，江崎信芳[5]，栗原達夫[6]（[1]京大化研，[2]京大化研，[3]京大化研，[4]京大化研，[5]京大化研，[6]京大化研）

3C26a11　*ω* - エチニル型脂肪酸を用いたエイコサペンタエン酸修飾タンパク質の探索
11:00 ○河合総一郎, 佐藤　翔, 川本　純, 江崎信芳, 栗原達夫（京都大学化学研究所）

3C26a12　ストレス下における分子シャペロン DnaK2（Hsp70）の機能と脂質・生体膜との相互作用
11:12 ○仲本　準[1]，Huq Saaimatul[1]，末岡啓吾[1]，粟井光一郎[2]，Varvasovszki Viktoria[3]，　Glatz Attila[3]，　Torok Zsolt[3]，Pilbat Ana Maria[3]，Horvath Ibolya[3]，Vigh Laszlo[3]（[1]埼玉大院理工，[2]静岡大若手，[3]Biol. Res. Ctr.）

3C26a13　サルモネラ菌 LPS の糖鎖構造と荷電置換基の解析および *ϕ* X174 スパイクタンパク質との親和性マッピング
11:24 ○篠田佑里恵[1]，内田智子[1,2]，小島久毅[1,2]，稲垣　穣[1]（[1]三重大学生物資源学研究科・生理活性化学研究室，[2]株式会社日本点眼薬研究所）

3C26a14　LPS 糖鎖固定化センサーチップを用いた，表面プラズモン共鳴による，*ϕ* X174 ファージ粒子の相互作用アプローチ
11:36 ○野々垣拓真，南平麻衣，稲垣　穣（三重大学）

C26 会場　午後の部（14:00〜17:00）

有機—天然物–その他—

3C26p01　定量的構造活性相関解析による (+)-dihydroguaiaretic acid の構造と抗かび活性との関係解明
14:00 ○長谷部綾香[1]，　西脇　寿[1]，　秋山浩一[2]，　菅原卓也[1]，岸田太郎[1]，山内　聡[1]（[1]愛媛大農，[2]愛媛大総科支セ）

3C26p02　(+)-verrucosin のベンゼン環上の置換基が植物生長調節活性に与える影響
14:12 ○中山矩美子，西脇　寿，首藤義博，山内　聡（愛媛大農）

3C26p03　Cytotoxic activity of stereoisomers of 1, 7-Seco-2, 7'-cyclolignane
14:24 ○Tuti Wukirsari[1]，Hisashi NISHIWAKI[1]，Kosuke NISHI[1]，Takuya SUGAHARA[1]，　Koichi AKIYAMA[2]，　Taro KISHIDA[1]，Satoshi YAMAUCHI[1]（[1]Ehime Univ. Faculty of Agriculture, [2]Ehime Univ. Integrated center, Tarumi station）

3C26p04　amphotericin B の真菌液胞膜破壊作用を促進する *N*-methyl-*N*″-dodecylguanidine の作用機序

14:36 姜　昌慶[1]，　山田圭一[2]，　◦荻田　亮[1,3]，　臼杵克之助[1]，藤田憲一[1]，田中俊雄[1]（[1]阪市大院・理，[2]群馬大院・工，[3]阪市大・健康研セ）

3C26p05　出芽酵母の偽菌糸形成におけるアクチンパッチ形成不全の関与

14:48 ◦村田和加恵[1,2]，　北原　望[1]，　金原聡子[1]，　荻田　亮[1,3]，藤田憲一[1]，田中俊雄[1]（[1]阪市大院理・生物地球，[2]米子高専・物質工，[3]阪市大・健康研セ）

3C26p06　γ-ポリグルタミン酸に見いだされる理論クラスター構造に関する研究

15:00 島　友紀[1]，　水原尚子[1]，　臼杵克之助[1]，　荻田　亮[1,2]，◦藤田憲一[1]，田中俊雄[1]（[1]阪市大院理，[2]阪市大健康研セ）

3C26p07　セミカルバゾン類の合成とそのプロテアーゼ阻害活性

15:12 ◦長谷川亮太[1]，　川井　悟[1]，　常盤野哲生[2]，　吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資科）

3C26p08　アクリドン類の合成および前骨髄性白血病 HL-60 に対する増殖抑制活性

15:24 ◦岸本真帆[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資科）

3C26p09　フェナントレン関連化合物の合成と前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する影響

15:36 ◦渡邉真穂[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資科）

3C26p10　ピラノフラボノイドの合成および前骨髄性細胞 HL-60 増殖抑制活性

15:48 ◦牧田裕史[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県立大生資科）

3C26p11　フロフラボノイド類の合成および前骨髄性白血病細胞 HL-60 増殖抑制活性

16:00 ◦齋藤裕介[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資科）

3C26p12　アデノシン配糖体 1：皮膚細胞での安定性

16:12 ◦栢野真由美，伊藤理恵，山下　洋，石原達也，太田恒孝，福田恵温（株式会社　林原　研究開発本部）

3C26p13　アデノシン配糖体 2：皮膚細胞のマトリックスメタロプロテアーゼ発現に対する抑制作用

16:24 ◦花岡美穂，八木政裕，大倉隆則，山下　洋，石原達也，太田恒孝，福田恵温（株式会社　林原　研究開発本部）

3C26p14　天然物のヘキサン抽出と酵素反応

16:36 ◦桑原保正[1,2]，市来弥生[1,2]，森田將史[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

3C26p15　畜牛のベッチ中毒とシアナミドとの関連

16:48 ◦加茂綱嗣（(独)農業環境技術研究所）

C15 会場　午前の部（9:00〜12:00）

酵素—酸化還元酵素—

3C15a01　Engineering fructosyl peptide oxidase to improve activity toward the fructosyl hexapeptide standard for HbA1c measurement

9:00 ◦STEFANO FERRI[1]，　YUSUKE MIYAMOTO[1]，AKANE SAKAGUCHI-MIKAMI[2]，　WAKAKO TSUGAWA[1]，KOJI SODE[1]（[1]Tokyo Univ. Agric. & Technol.，[2]Tokyo Univ. Technol.）

3C15a02　コレステロール酸化酵素の脱水素酵素化戦略

9:12 ◦早出広司[1,2]，小嶋勝博[2]，フェリステファノ[1]，櫻井　潤[1]，津川若子[1]（[1]東京農工大院工生命工，[2](有)アルティザイム・インターナショナル）

3C15a03　グルコース酸化酵素の脱水素酵素化戦略

9:24 ◦斉藤匠子[1]，洞口陽平[1]，小嶋勝博[2]，フェリステファノ[1]，津川若子[1]，早出広司[1,2]（[1]東京農工大院工生命工，[2](有)アルティザイム・インターナショナル）

3C15a04　ジスルフィド結合導入による真菌由来 FAD グルコース脱水素酵素の安定性改良

9:36 森　一茂[2]，　小嶋勝博[2]，　◦坂井元気[1]，　大西陽介[1]，フェリステファノ[1]，早出広司[1,2]（[1]東京農工大院工生命工，[2](有)アルティザイム・インターナショナル）

3C15a05　講演取消

3C15a06　糖尿病診断に適した Fructosyl peptide oxidase の開発

10:00 ◦一柳　敦[1]，　鉞　陽介[1]，　渡辺文太[3]，　廣川浩三[2]，五味恵子[1]，中津　亨[4]，加藤博章[4]（[1]キッコーマン研究開発本部，[2]キッコーマンバイオケミファ，[3]京大化研，[4]京大院薬）

3C15a07　*Burkholderia* sp. AIU 129 が産生するグリコールアルデヒドに作用するアルデヒド酸化酵素

10:12 ◦小川なつみ[1]，　三坂裕一[1]，　高橋瑞希[1]，　山田美和[1]，小川　順[2]，片岡道彦[3]，清水　昌[4]，礒部公安[1]（[1]岩手大・農，[2]京大院農・応用生命，[3]阪府大院・生命環境，[4]京都学園大・バイオ環境）

3C15a08　*Ochrobactrum* sp. AIU 240 が産生するグリコール酸酸化酵素

10:24 ◦山田美和，東山貴紀，佐々木みのり，礒部公安（岩手大・農）

3C15a09　4-アミノブチルアミドを酸化する酵素の探索

10:36 ◦菅原麻美[1]，　松井大亮[2,3]，　浅野泰久[2,3]，　米田英伸[2]，礒部公安[1]（[1]岩手大・農，[2]富山県大工・生工研セ，[3]JST, ERATO）

3C15a10　ギ酸オキシダーゼは一酸化窒素還元活性を持つ

10:48 ◦内田博之[1]，　瀬古雄亮[1]，　黒柳美莉[1]，　若泉杏奈[1]，沖　昌也[1]，櫻井明彦[1]，三上文三[2]（[1]福井大工，[2]京大農）

3C15a11　超好熱アーキアに存在する色素依存性 D-乳酸脱水素酵素の機能解析

11:00 ◦里村武範[1]，　金子　祥[1]，　大井愛実[1]，　布浦拓郎[2]，高木善弘[2]，　高見英人[2]，　高井　研[2]，　櫻庭春彦[3]，　大島敏久[4]，末信一朗[1]（[1]福井大院工，[2]海洋研究開発機構，[3]香川大農，[4]九州大院農）

3C15a12　グラム陰性菌由来アロステリック型 D 型乳酸脱水素酵素の酵素学的解析

11:12 ◦古川那由太，戸川美里，中島将博，田口速男（東理大理工）

3C15a13　細菌アロステリック乳酸脱水素酵素の恒常的高活性型酵素への改変

11:24 ◦田口速男[1]，　池原洋子[1]，　宗田亮輔[1]，　室井千尋[1]，荒井一人[1]，宮永顕正[2]，中島将博[1]（[1]東京理大理工，[2]東工大院理工）

3C15a14　フルクトース脱水素酵素の分子内電子移動に関する考察

11:36 ◦河井翔太[1]，　薬師寿治[2]，　松下一信[2]，　北隅優希[1]，白井　理[1]，加納健司[1]（[1]京大院農，[2]山口大院農）

3C15a15　好熱性糸状菌由来 FAD 依存型グルコース脱水素酵素の遺伝子クローニング

11:48 ◦小澤一道，佐々木典子，木下菜央，平塚淳典，横山憲二（産総研・ナノシステム）

C15 会場　午後の部（14:00〜18:00）

酵素—酸化還元酵素—

3C15p01　*Clostridium* 属細菌に由来する新規金属オキシダーゼの異種発現と性質

14:00 ◦原　唯歩，木村祐二，谷村孝将，片岡邦重，櫻井　武（金沢大院・自然科学）

3C15p02　絶対嫌気性菌 *Clostridium* 属細菌の O_2 代謝機構に関する研究

14:12 ◦熊井康人，鈴木一平，工藤貴靖，渡辺大晃，新村洋一，川崎信治（東農大応生科・バイオ）

3C15p03　絶対嫌気性菌 *Clostridium kluyveri* の酸素毒性防御酵素系

14:24 ◦竹内弘貴[1]，　斎藤洋臣[1]，　高橋　徹[1]，　石坂啓泰[2]，新村洋一[3]，川崎信治[4]（[1]東京農業大学　院農，[2]東京農業大学　学生，[3]東京農業大学　教授，[4]東京農業大学　准教授）

3C15p04　ラン藻と大腸菌の鉄還元酵素（第 5 報）

14:36 ◦佐藤純一[1]，　田中英資[1]，　森　鉄也[1]，　武田晃治[2]，安保　充[3]，　吉村悦郎[4]，　中川純一[5]，　阿部　晃[6]，　西田雄三[7]，川崎信治[1]，新村洋一[1]（[1]東農大応生科・バイオ，[2]東農大・教職，[3]明治大・農・農化，[4]東大院農生科・応生科，[5]東農大生物産業・食香，[6]札幌医大医・眼科，[7]金沢医大）

3C15p05　マルチ銅オキシダーゼの分子表面電荷の改変によるケラチン繊維への親和性増大

14:48　○押川直美[1]，原　唯歩[1]，片岡邦重[1]，辻野義雄[2]，櫻井　武[1]（[1]金沢大院・自然科学，[2]千葉科技大・薬）

3C15p06　クラス IIB 型芳香環二水酸化酵素における ferredoxin reductase の X 線結晶構造解析

15:00　○梅田隆志[1]，藤本　瑞[2]，山根久和[3]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]（[1]東大・生セ，[2]生資研，[3]帝京大・バイオ）

3C15p07　芳香環水酸化酵素の ferredoxin-terminal oxygenase の結合解離に関わる酸化還元状態依存的構造変化

15:12　○松澤　淳[1]，梅田隆志[1]，相川大樹[1]，芦川雄二[1]，藤本　瑞[2]，山根久和[3]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]（[1]東大生物工学セ，[2]農生資研，[3]帝京大・バイオ）

3C15p08　*Cellulomonas* 属細菌のカルコゲンオキシアニオン還元特性

15:24　○斎藤茂樹[1]，　岡林拓弥[1]，　加藤元嗣[1]，　谷　泰史[1]，PRAKASH N. Tejo[2]，三原久明[1]（[1]立命館大・生命科学・生物工，[2]Sch. Energy Environ. Sci.・Thapar Univ.）

3C15p09　金属還元細菌 *Geobacter sulfurreducens* のマルチヘムセレンタンパク質の遷移金属酸化物化学変換における役割

15:36　○谷　泰史，新野絵梨奈，斎藤茂樹，三原久明（立命館大・生命科学・生物工）

3C15p10　常圧菌由来イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の耐圧性の獲得

15:48　○濱島裕輝[1,4]，　永江峰幸[2]，　渡邉信久[2,3]，　牧野　龍[1]，山田康之[1]，今井竹夫[1]，加藤千明[4]（[1]立教大院生命理，[2]名古屋大院工，[3]名大 シンクロトロン，[4]海洋研究開発機構・海洋極限）

3C15p11　NADP+依存性ギ酸脱水素酵素の開発

16:00　上田桃子[1]，○林　素子[2]，石原浩二[3]，山本浩明[2]（[1]ダイセル・コーポレート研，[2]ダイセル・グリーンプロダクト開発センター，[3]岡山理大・理）

3C15p12　微生物による第 4 級アンモニウム化合物の分解（第 11 報）：Fusarium 属糸状菌のトリメチルアミノブタノール脱水素酵素の精製と諸性質

16:12　○谷山優子[1]，藤光洋志[2]，有馬二朗[3]，森　信寛[3]（[1]鳥取大院農，[2]鳥取大連農，[3]鳥取大農）

3C15p13　*Flavobacterium* 細菌における耐熱性アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子の分布とその遺伝子産物の特性解明

16:24　○下浦正朝[1]，ドゥシャーエリック[2]，ベルナルドジャン–フランソワ[2]，老川典夫[1]（[1]関大・化学生命工，[2]フランス国立農業研究所）

3C15p14　メチロトローフ細菌が生産するアルデヒドオキシドレダクターゼについて

16:36　○高木一好[1]，矢野成和[2]，若山　守[3]，立木　隆[3]（[1]立命館大応化，[2]山形大院理工，[3]立命館大生工）

3C15p15　嫌気性アンモニア酸化菌のヒドラジン合成

16:48　○平　大輔[1]，久久保寛幹[1]，古川憲治[2]，藤井隆夫[1]（[1]崇城大応生命，[2]古川水環境コンサルタント）

3C15p16　嫌気性アンモニア酸化菌の HAO が触媒するヒドロキシルアミン生成

17:00　○藤井隆夫[1]，入佐達也[1]，平　大輔[1]，古川憲治[2]（[1]崇城大生命，[2]古川コンサル）

3C15p17　植物由来鉄電子移動系を用いた不斉酸化触媒（SanCat. S1ox）の開発

17:12　○永岡宏行（サンヨー食品開発）

3C15p18　超好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来の non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase におけるアロステリック制御の解析

17:24　○伊藤史晃，知識秀祐，中村周吾，清水謙多郎，伏信進矢，若木高善（東大院・応生工）

3C15p19　Ferredoxin:NADP+oxidoreductase from Sulfolobus tokodaii

17:36　○Zhen YAN，　Yoon-Woo Nam，　Shinya Fushinobu，Takayoshi Wakagi（Tokyo Univ. Department of Biotechnology）

3C15p20　トレオニン合成酵素におけるリン酸脱離以降の反応経路についての理論的検証

17:48　○庄司光男[1]，　花岡恭平[1]，　氏家　謙[1]，　田中　弥[1]，栢沼　愛[1]，梅田宏明[1]，町田康博[2]，村川武志[2]，林　秀行[2]（[1]筑波大学，[2]大阪医科大学）

C16 会場　午前の部（9:00〜11:48）

酵素—糖質代謝関連酵素—

3C16a01　*Halomonas* sp. H11 株由来 α-グルコシダーゼ組換え酵素の大腸菌による生産と諸性質

9:00　○城戸悠輔[1]，佐分利亘[1]，小島晃代[2]，森　春英[1]，松井博和[1]（[1]北大院農，[2]日本食品化工）

3C16a02　*Aspergillus aculeatus* 由来 β-glucosidase 1 の基質特異性について

9:12　○馬場祐太朗，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大院・生環科）

3C16a03　*Geobacillus thermoglucosidasius* 由来 Oligo-1, 6-glucosidase のグルコース耐性向上を目指した蛋白質工学的研究

9:24　○小川　俊[1]，塩田一磨[1]，吉田　孝[2]（[1]合同酒精(株)　酵素医薬品研，[2]弘前大　農生）

3C16a04　β-1, 6-グルカナーゼの加水分解機構に関する分子論的解析

9:36　○碓氷泰市[1,2]，尾形　慎[3]，加藤妥奈[2]，宇野修司[2]，服部武史[1]（[1]静岡大院創造，[2]静岡大院農，[3]福島高専物質工）

3C16a05　*Microbulbifer thermotolerans* JAMB-A94 由来耐熱性 β-アガラーゼの構造解析

9:48　○高木瑛実子[1,3]，　横井　岳[2]，　嶋根康弘[3]，　湯川清孝[1,3]，大田ゆかり[3]，　秋田昌岳[3]，　西河　淳[2]，　殿塚隆史[2]，　秦田勇二[1,3]（[1]横浜市大院生命ナノ，[2]東農工大院農，[3]海洋研究開発機構）

3C16a06　*Bifidobacterium longum* 由来のエキソ-β-1, 3-ガラクタナーゼの機能解析

10:00　○藤田清貴，坂口武則，北原兼文，菅沼俊彦（鹿児島大農）

3C16a07　糸状菌イソマルターゼの発現と特性解析

10:12　○山口貴央[1]，山崎信広[1]，栄沢大樹[1]，前川公希[1]，小川　俊[2]，塩田一磨[2]，吉田　孝[1]（[1]弘前大農生，[2]合同酒精　酵医研）

3C16a08　好酸性カビ *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1 株は 3 種類の酸性ラクタ-ゼと 1 種類のアルカリ性ラクタ-ゼを産生する

10:24　○千葉瀬里奈[1]，　高橋直巳[1]，　山下美穂[1]，　小山貴史[2]，礒部公安[1]（[1]岩大農，[2]天野エンザイム）

3C16a09　*Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1 株が産生する pH 1.0 で作用する耐酸性 β-ガラクトシダーゼの精製と性質

10:36　○礒部公安[1]，　山下美穂[1]，　千葉瀬里奈[1]，　高橋直巳[1]，小山貴史[2]（[1]岩手大・農，[2]天野エンザイム）

3C16a10　メタゲノム由来新奇 β-グルコシダーゼの性状解析

10:48　○内山　拓，矢追克郎，宮崎健太郎（産総研生物プロセス）

3C16a11　メタゲノム由来 GH1 β-グルコシダーゼのグルコース阻害耐性と基質特異性における構造基盤

11:00　○城　俊徳[1]，　矢追克郎[2]，　宮崎健太郎[2]，　若木高善[1]，伏信進矢[1]（[1]東大院農，[2]産総研・生物プロセス研究部門）

3C16a12　イネ由来ツベロン酸 β-グルコシドグルコシダーゼアイソザイム 1 の機能解析

11:12　○武田遼介[1]，　姫野奈美[1]，　佐分利亘[1]，　和久田真司[1]，森　春英[1]，松浦英幸[1]，鍋田憲助[1]，今井亮三[2]，松井博和[1]（[1]北海道大院農，[2]農研機構北海道農研）

3C16a13　イネ由来ツベロン酸 β-グルコシドグルコシダーゼのアグリコン認識メカニズムの解析

11:24　姫野奈美[1]，　○佐分利亘[1]，　武田遼介[1]，　和久田真司[1]，松浦英幸[1]，鍋田憲助[1]，森　春英[1]，今井亮三[2]，松井博和[1]（[1]北大院農，[2]農研機構・北農研）

3C16a14　黒穂病菌の生産する分泌型 β-1,3-グルカン分解酵素の単離同定と機能解析

11:36　○中島将博[1]，山下哲郎[2]，竹田　匠[1]（[1]岩手生工研，[2]岩手大農）

C16 会場　午後の部（14:00〜18:00）

酵素—糖質代謝関連酵素—

3C16p01　植物性多糖に作用する *Bifidobacterium longum* 由来の酵素の解析

14:00　○芦田　久[1]，北村有里奈[2]，竹内涼子[2]（[1]近大・生物理工，

[2]京大・院・生命科学）

3C16p02　超好熱菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来キシロース関連代謝酵素の探索

14:12　◦郷田秀一郎，内田拓郎，海野英昭，畠山智充（長崎大学院工）

3C16p03　糸状菌由来の糖化酵素と相乗作用を示す細菌由来酵素の探索

14:24　◦篠田　優[1]，荒井基夫[2]，金政　真[2]（[1]中部大院・応生，[2]中部大・環境生科）

3C16p04　*Paenibacillus* 属細菌由来キチン多糖分解酵素 ChiW の反応産物の解析

14:36　◦伊藤貴文[1]，日ビ隆雄[1]，杉本郁美[1]，鈴木史子[1]，藤井　豊[2]，武藤　明[3]，木元　久[1]（[1]福井県大・生物資源，[2]福井大・医，[3]福井工大・工）

3C16p05　*Streptomyces griseus* 由来の CBM33, SgCBP IV のキチン酵素分解の促進

14:48　◦工藤まどか[1]，　中川裕子[1]，　Vaaje-Kolstad Gustav[2]，Eijsink Vincent[2]，戸谷一英[1]（[1]一関高専・物化工，[2]Norwegian Univ. Life Sci.・Chem. Biotech. Food Sci.）

3C16p06　*Streptomyces griseus* 由来の CBM33, SgCBP V の機能解析

15:00　◦千葉大介，畠山彩乃，戸谷一英，中川裕子（一関高専・物化工）

3C16p07　堆肥から分離された好熱性細菌 *Paenibacillus* sp. TC22-2b 株由来キチナーゼの諸性質

15:12　◦上田純子，黒沢則夫（創価大院工）

3C16p08　転写調節因子 ChiR を介した MicM sRNA による *Serratia marcescens* キチナーゼ遺伝子群発現制御

15:24　鈴木一史[1,2]，　◦小川知佐奈[1]，　佐々木直美[1]，　高野慎也[1]，清水麻里[1]，杉本華幸[1,2]，渡邉剛志[1,2]（[1]新潟大院・自然科学，[2]新潟大・農・応生化）

3C16p09　放線菌由来 GH11 キシラナーゼの基質特異性の解析とキシラン分解における影響

15:36　路川真理[1]，　一ノ瀬仁美[1]，　前原智子[1]，　藤本　瑞[2]，◦金子　哲[1]（[1]農研機構食総研，[2]生物資源研）

3C16p10　コヘシン欠損 CipA を持つ Clostridium thermocellum YM72 のセルロソームの特徴

15:48　◦トウラン，　小杉昭彦，　プラウィッタウォンパニダ，森　　隆（国際農研センター）

3C16p11　*Fusarium* 属菌由来キシログルカナーゼの精製と性質

16:00　◦佐藤将太[1,2]，佐々木良幸[2]，児島　薫[2]，吉田　孝[2]（[1]岩手大院連農，[2]弘前大農学生命）

3C16p12　細胞質局在型 *N*-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ DasD の放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) における機能の解析

16:12　◦齋藤明広[1]，　村上聡史[2]，　海老瀬広規[2]，　杉山裕多[1]，安藤昭一[2]，藤井　毅[3]，宮下清貴[3]（[1]静理工大理工，[2]千葉大院融合，[3]農環研）

3C16p13　アルカリ性嫌気下で生産される *Amphibacillus xylanus* の xylan 分解酵素

16:24　◦西田俊介[1]，　佐藤　梓[1]，　佐藤ひかる[1]，　望月大地[1]，藤田信之[2]，佐藤純一[1]，川崎信治[1]，新村洋一[1]（[1]東農大応生科・バイオ，[2]NITE）

3C16p14　エタノール発酵接合菌 *Mucor circinelloides* 由来キシロースレダクターゼとキシリトールデヒドロゲナーゼの酵素化学的諸性質の検討

16:36　◦濱田龍八[1]，得野克成[1]，山崎思乃[1]，米田英伸[1]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

3C16p15　超耐熱性エンド型セルラーゼの原子分解能による結晶構造解析

16:48　片岡未有，金　翰佑，◦石川一彦（産総研バイオマスリファイナリー研究センター）

3C16p16　NITE 保有菌株のリグノセルロース糖化に関する情報付加の概要

17:00　◦紙野　圭[1]，　島村麻実子[1]，　堀川祥生[2]，　杉山淳司[2]，小笠原渉[3]，森川　康[3]（[1]NITE，[2]京大生圏研，[3]長岡技科大）

3C16p17　*in vitro* complementary assay による天然菌株の成分セルラーゼ評価

17:12　◦島村麻美子[1]，　猪野晋平[1]，　安　善榮[1]，　河合哲志[2]，西嶋桂子[1]，　安宅花子[1]，　佐々木和実[1]，　稲葉重樹[1]，　安藤勝彦[1]，小林良則[2]，小笠原渉[3]，森川　康[2,3]，紙野　圭[1]（[1]NITE，[2]JBA つくば研，[3]長岡技科大）

3C16p18　真菌サブトラクション cDNA ライブラリからのリグノセルロース系バイオマス分解酵素遺伝子の網羅的かつ効率的探索

17:24　◦安　善榮，田中文彦，市川夏子，小口晃央，安藤勝彦，紙野　圭（NITE）

3C16p19　線虫補食で知られるオルビリア目のリグノセルロース分解酵素群の解析

17:36　◦久間木寧子，稲葉重樹，紙野　圭（NITE）

3C16p20　*Clostridium josui* の宿主ベクター系の構築

17:48　◦栗冠和郎，奥川　慶，栗冠真紀子，木村哲也（三重大院生資）

A11 会場　午前の部（9:00〜11:12）

生物化学工学—生物材料工学，生体医用工学，その他—

3A11a01　マベガイ真珠結晶配向性を制御する 2 種の 26kDaADP リボシルトランスフェラーゼ様タンパク質に対するモノクローナル抗体の特性と応用

9:00　◦小野史織[1]，小川智久[1,2]，永沼孝子[1,2]，村本光二[1]（[1]東北大院生命，[2]東北大 , 学際センター）

3A11a02　マベ足糸由来 TIMP 様タンパク質の構造と線維形成機構

9:12　◦青木　大, 佐伯友理, 村本光二, 小川智久（東北大院生命）

3A11a03　人工細胞研究における分子ロボティクスアプローチ

9:24　◦野村慎一郎，藤原　慶（東北大・分子ロボ）

3A11a04　A Noble Fluorescence Probe for Influenza A (H1N1) Virus Detection on Glass surface

9:36　◦SYED Rahin AHMED[1,2]，Jinhua Dong[1]，Takahashi Naoto[1]，Jaebeom Lee[2]，Enoch Y Park[1]（[1]Shizuoka University，[2]Pusan national University）

3A11a05　遺伝子導入ニワトリが生産したエピトープ含有卵白の経口摂取による花粉症治療

9:48　◦上平正道，河邉佳典，林田悠希，沼田健作，原田翔太，井藤　彰（九大院工）

3A11a06　新規ソマトスタチン由来ペプチドの DNA ポリメラーゼ β 特異的阻害活性に基づくヒトがん細胞増殖抑制とアポトーシス誘導

10:00　◦栗山磯子[1]，　宮崎杏奈[2,3]，　津田裕子[2,3]，　吉田弘美[1]，水品善之[1,3]（[1]神戸学院大・栄養，[2]神戸学院大・薬，[3]神戸学院大・ライフサイエンス産学連携セ）

3A11a07　変異型ブタ肝臓由来 D-アミノ酸オキシダーゼを用いた (*RS*)-α-methylbenzylamine のデラセミ化反応

10:12　◦安川和志[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

3A11a08　Direct conversion of glucose to malate by synthetic metabolic engineering

10:24　◦Xiaoting YE[1]，Kohsuke HONDA[1,2]，Yumi MORIMOTO[1]，Kenji OKANO[1]，Hisao OHTAKE[1]（[1]Osaka Univ.，[2]JST PRESTO）

3A11a09　合成代謝工学による人工ピルビン酸酸化経路の構築

10:36　◦本田孝祐[1,2]，　今川貴志[1]，　Ye Xiaoting[1]，　岡野憲司[1]，大竹久夫[1]（[1]阪大院工，[2]JST さきがけ）

3A11a10　Novel non-natural n-butanol synthetic pathway design by synthetic metabolic engineering

10:48　◦Borimas Krutsakorn[1]，　Takashi IMAGAWA[1]，Xiaoyu Bei[1]，Xiaoting YE[1]，Kenji OKANO[1]，Kohsuke HONDA[1,2]，Hisao OHTAKE[1]（[1]Osaka Univ.，[2]JST PRESTO）

3A11a11　炭素間二重結合を還元する耐熱性酵素の探索と同定

11:00　◦辻　直人[1]，本田孝祐[1,2]，岡野憲司[1]，大竹久夫[1]（[1]阪大院・工，[2]JST さきがけ）

A11 会場　午後の部（14:00〜18:00）

食品—食品工学–物性，分析—

3A11p01　Depletion flocculation 現象によりクリーミングする乳化系の流動特性の解析に対する相対流動性指数及び相対粘稠性

係数の適用の試み

14:00 ○合谷祥一[1]，池田新矢[1]，ウドムラチサンサニー[2,3]（[1]香川大農，[2]愛媛大院連農，[3]カセサート大）

3A11p02　W/O/W エマルジョン型凝固剤を用いた豆腐加工

14:12 ○辰巳英三[1]，LI Jinlong[2]，程　永強[2]，齋藤昌義[1]，殷　麗君[2]（[1]国際農研，[2]中国農大・食品科学）

3A11p03　ゼラチンのゲル形成に対するキチンナノファイバー添加の影響

14:24 ○小谷正男[1]，阿部賢太郎[2]，矢野浩之[2]，松宮健太郎[1]，松村康生[1]（[1]京大院農，[2]京大生存圏）

3A11p04　大豆タンパク，多糖の混合ゲルの物性に関する研究

14:36 ○安藤為明[1]，田中克幸[1]，畠中芳郎[2]，室　哲雄[2]，山内朝夫[2]（[1]奥野製薬工業株式会社，[2]地方独立行政法人　大阪市立工業研究所）

3A11p05　ヨーグルトのカード凝固に及ぼす乳タンパク質表面疎水性度の影響

14:48 ○大原慎太郎[1]，岡　大貴[2]，野口智弘[2]，高野克己[3]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・食加技セ，[3]東京農大応生・化学）

3A11p06　小麦粉生地形成における *β*-Lg がグリアジンの表面疎水性度に与える影響

15:00 ○岡　大貴[1]，大原慎太郎[2]，野口智弘[1]，高野克己[3]（[1]東京農大応生・食加技セ，[2]東京農大院農・農化，[3]東京農大応生・化学）

3A11p07　キャッサバおよびわらび澱粉の湿熱処理による物性改変効果

15:12 ○阿久澤さゆり[1]，阿部知美[1]，土田杏里[1]，松森慎悟[2]，松島　良[3]（[1]東京農大・応用，[2]駒沢女子大・人間健康，[3]岡山大・資源）

3A11p08　Physical Properties and Solubility Behavior of Aqueous Solution of Coenzyme Q10 in γ-Cyclodextrin-Surfactant Mixed Systems

15:24 ○Yukiko UEKAJI[1,2]，Mayu ONISHI[2]，Daisuke NAKATA[2]，Keiji TERAO[2]，Arja PAANANEN[3]，Riitta PARTANEN[3]，Hidefumi YOSHII[1]（[1]UGAS Ehime Univ.，[2]CycloChem Bio，[3]VTT）

3A11p09　中華麺の調理工程における放射性セシウムの挙動

15:36 ○濱松潮香[1]，八戸真弓[1]，内藤成弘[1]，佐々木朋子[1]，明石　肇[2]，等々力節子[1]，松倉　潮[1]，川本伸一[1]（[1](独)農研機構食品総合研究所，[2](株)日清製粉グループ本社 QE センター）

3A11p10　低温貯蔵後室温においたニンニクにおけるくぼみ症発生の MRI による追跡

15:48 ○石田信昭[1]，堀金明美[2]，関山恭代[2]，小野祐嗣[2]，庭田英子[3]，山崎博子[4]（[1]石川県大，[2]農研機構食総研，[3]青森野菜研，[4]農研機構東北農研）

3A11p11　苦味受容体 hT2R16 に対する鶏卵抗体の作製およびその特性評価

16:00 ○佐藤創平[1]，藤戸洋聡[1]，水谷公彦[1]，三上文三[1]，伏木　亨[1]，前橋健二[2]，山下裕輔[3]，伊井野貴史[3]，堀江健二[3]，金　武祚[3]，松村康生[1]，林由佳子[1]（[1]京大院農，[2]東農大応生科，[3]ファーマーフーズ）

3A11p12　GC/MS・LC/MS を用いたメタボリックプロファイリングによるしょうゆ旨味成分の探索

16:12 ○志賀一樹[1,2]，山本慎也[1]，中島文子[2]，小玉侑加子[2]，今村美穂[2]，馬場健史[1]，福崎英一郎[1]（[1]阪大院工・生命先端工，[2]キッコーマン・研開本）

3A11p13　クーロアレイ HPLC を用いたカテキン類とテアフラビン類の酸化安定性の評価

16:24 ○松浦加奈子，臼井由美子，石井剛志，中山　勉（静岡県大・食品栄養）

3A11p14　冷凍魚肉の解凍過程における臭気発生に関する研究

16:36 ○小池恭平[1]，吉江由美子[2]，渡辺　学[1]，鈴木　徹[1]（[1]海洋大院海洋科，[2]東洋大生命科）

3A11p15　FAD 依存性グルコース脱水素酵素を用いた自己駆動型バイオクーロメトリーによる日本酒モロミ中のグルコース定量

16:48 ○川嶋浩平，三木功次郎（奈良高専）

3A11p16　正化学イオン化 GC-MS/MS 法(GC-MS/MS(CI))を用いた食品中の脂肪酸分析

17:00 ○坂本雄紀，川名修一，工藤恭彦，中川勝博，宮川治彦（島津製作所）

3A11p17　食品中の微量成分の同定および定量のための Broad Band WET 法

17:12 ○張　晶（東大院農生科）

3A11p18　NMR によるヨーグルトの非破壊分析

17:24 ○盧　翌（東大院農生科）

A12 会場　午前の部（9:00〜12:00）

食品—食品工学–物性，分析—

3A12a01　甲州種ワインに含まれるヒドロキシシンナム酸エチルエステルの生成機構

9:00 ○斉藤史恵，山本祐梨子，久本雅嗣，奥田　徹（梨大・ワイン研）

3A12a02　界面前進凍結濃縮法による日本酒濃縮

9:12 ○新村希世美[1]，ミヒリグナティラカ[1]，松田　章[2]，中村静夫[2]，辻奈緒子[1]，道善倫子[1]，矢野俊博[1]，宮脇長人[1]（[1]石川県大院生資環，[2]石川県工業試）

3A12a03　Progressive freeze-concentration of liquid food by tubular ice system with circulating flow

9:24 ○Mihiri Gunathilake，Kiyomi Shimmura，Michiko Dozen，Osato Miyawaki（Ishikawa Pref. Univ.）

3A12a04　高温高圧水処理による三陸産サンマ魚鱗からのコラーゲンペプチド生成

9:36 ○長田光正，千葉美和，戸谷一英，渡邊　崇（一関高専・物化工）

3A12a05　豆乳を原料とした効率的発酵製造技術の開発

9:48 ○伊藤淑恵[1]，石川潤一[1]，毛利　哲[1]，中村茂雄[1]，池戸重信[1]，齋藤静香[2]，井戸川詩織[2]，岩元　靖[2]，塚田義弘[2]，上野茂昭[3]，藤井智幸[3]([1]宮城県産業技術総合センター，[2]太子食品工業株式会社，[3]東北大院農）

3A12a06　短波帯交流瞬間加熱による豆乳，牛乳中の枯草菌芽胞の失活

10:00 ○植村邦彦，高橋千栄子，小林　功（農研機構食総研）

3A12a07　ホエイタンパク質モデル共存系における熱凝集とステンレス鋼表面に対する付着挙動

10:12 ○金子英基，萩原知明，崎山高明（海洋大海洋科）

3A12a08　エビ・タンパク質のステンレス鋼表面への付着挙動に及ぼす温度の影響

10:24 ○萩原知明，鈴木円香，長谷川友紀，崎山高明（海洋大食品）

3A12a09　両性イオン交換樹脂に対する二価塩化物塩の吸着平衡

10:36 ○武田健一郎，謝　祐基，安達修二（京大農）

3A12a10　デンプンゲルに対する非電解質および電解質の分配平衡

10:48 ○謝　裕基，安達修二（京大院農）

3A12a11　パスタの乾燥条件が吸水特性およびアミロース溶出に及ぼす影響

11:00 ○中島理絵[1]，張　麗芬[2]，西津貴久[3]，後藤清和[3]（[1]岐阜大院・応生，[2]岐阜大院・連農，[3]岐阜大・応生）

3A12a12　グルテン不添加米粉パンの製パン法でグルテリン単量体は発酵及び焼成で気泡を安定化する

11:12 ○川越　靖（農生資研）

3A12a13　超硬質米の麦味噌浸漬による食味及び機能性の改善

11:24 ○中村澄子[1]，仲野洋平[1]，三浦清之[2]，笹原英樹[2]，重宗明子[2]，佐藤　光[3]，大坪研一[1]（[1]新潟大農，[2]農研機構，[3]九州大院農）

3A12a14　高圧酵素処理を用いた超微細米粉の開発

11:36 ○木戸みゆ紀[1,4]，小林兼人[2,4]，知野秀次[3,4]，西脇俊和[3,4]，本間紀之[3,4]，林真由美[1]，山本和貴[5]，重松　亨[1]（[1]新潟薬大・応生科，[2]新潟製粉，[3]新潟農総研・食研セ，[4]にいがた産業創造機構，[5]農研機構・食総研）

3A12a15　高圧下における油脂結晶化の速度論的解析

11:48 山本英二，○中崎千尋，岡田(勝部)泰子，岡林優子，高橋裕子，高橋沙織，遠藤芙美，松井芳佳，三宅沙織，江坂知美（福山大学）

A12 会場　午後の部（14:00〜17:00）

食品―食品工学–その他，食品工学–加工学―

3A12p01　シクロデキストリンによるホップ抽出物からの高純度キサントフモールの製造

14:00　°和田幸樹，石田英誠，高田正保，戸塚篤史（日本食品化工(株)）

3A12p02　力感フィードバックを用いた連続強度評定測定方法の開発

14:12　°小早川達[1]，後藤なおみ[1]，芥川晃士[2]，土門さや香[2]，早川義信[2]，片岡　潔[2]（[1]産総研，[2]花王 ヘルスケア食品研）

3A12p03　連続強度評定による雑味成分を低減したコーヒー飲料の風味特徴の解析

14:24　°土門さや香[1]，芥川晃士[1]，早川義信[1]，片岡　潔[1]，後藤なおみ[2]，小早川達[2]（[1]花王 ヘルスケア食品研，[2]産総研）

3A12p04　少量試料による米粉生地の膨化測定

14:36　°奥西智哉[1]，宮下香苗[1]，大江翔太郎[2]，萬代悠太[2]，増村威宏[2]，黒田昌治[3]（[1]農研機構・食総研，[2]京都府大生命環境，[3]農研機構・中央農研北陸）

3A12p05　茶生葉含有酵素が緑茶の香気成分に及ぼす影響

14:48　°池ヶ谷篤[1,2]，油上　保[1,2]，渡瀬隆也[1,2]，本杉正義[2]（[1]静岡県工業技術研究所，[2]公益財団法人静岡県産業振興財団）

3A12p06　新潟県の新形質米の利用適性

15:00　°渡辺一成[1]，中村澄子[1]，石崎和彦[2]，松井崇晃[2]，田村良浩[2]，大坪研一[1]（[1]新潟大農，[2]新潟農総研作研センター）

3A12p07　沖縄県産シークヮーサー（*Citrus depressa* Hayata）の多変量解析による機能性成分の特性評価

15:12　°當山瑛子[1]，藏屋英介[2]，神谷志織[3]，池松真也[4]（[1]沖縄高専 専攻科，[2]沖縄高専 技術支援室，[3]静岡大院農，[4]沖縄高専 生物資源）

3A12p08　トマト加工・調理条件がオキソ酸生成に与える影響

15:24　°江口　由[1]，松宮健太郎[1]，水谷由記子[1]，高橋春弥[1]，高橋信之[1]，河田照雄[1]，高橋延行[1]，鈴木達哉[2]，荒　武[3]，櫻井　望[3]，鈴木秀幸[3]，柴田大輔[3]，松村康生[1]（[1]京都大院農，[2]千葉農林総研，[3]かずさ DNA 研）

3A12p09　紅麹菌を用いた新規チーズ開発のための基礎的研究

15:36　°小柳遥佳，帯刀実穂，小林　謙，玖村朗人（北大院農）

3A12p10　カマボコ廃棄物を利用した *Rhizopus* 属菌による新規水産発酵食品

15:48　°福田　翼，吉山　慧，原田和樹，古下　学，芝　恒男（水大校院）

3A12p11　担子菌を用いた発酵梅製造法の確立

16:00　°西田菜津美[1]，谷奈津樹[2]，前川　愛[1]，田畑麻里子[2]，松井徳光[2]（[1]武庫川女大院食栄，[2]武庫川女大食栄）

3A12p12　担子菌の発酵能による昆布および鰹節だしがらの有効利用

16:12　°梶野美紀[1]，田畑麻里子[2]，小倉真紀[2]，松井徳光[2]（[1]武庫川女大院食栄，[2]武庫川女大食栄）

3A12p13　担子菌の発酵能を利用した酵母エキスの製造

16:24　°田畑麻里子[1]，玉田萌子[1]，衛藤静乃[2]，八木芙雪[2]，西川健一[2]，矢内徳正[2]，尾畑賢一[3]，松井徳光[1]（[1]武庫川女大食栄，[2]三菱商事フードテック(株)開発部，[3]三菱商事フードテック(株)開発担当役員付）

3A12p14　担子菌の発酵能によるきのこワインの開発および非還元 SDS-PAGE と活性染色を用いた簡便な分子量測定法の確立

16:36　°松井徳光[1]，久保田英博[2]，居村真依[1]，寺前友美子[1]，奥野公美子[1]，藤生弘子[2]，浅川　篤[2]，田畑麻里子[1]（[1]武庫川女大食栄，[2]アトー株式会社技術開発部）

3A12p15　新規セラクルミン配合飲料は既存のクルクミン飲料よりも高い吸収効率を示 した

16:48　°砂川陽一[1,6]，刀坂泰史[1,6]，平野早絵[1]，並木雅俊[1]，渡辺雄一[1]，土井　修[2]，鈴木清美[2]，山内みゆき[2]，横地常弘[2]，大塚喜彦[3]，浜田友子[3]，今泉　厚[3]，野中裕司[4]，不破　喬[4]，寺本貴則[4]，掛谷秀昭[5]，和田啓道[6]，島津　章[6]，長谷川浩二[6]，森本達也[1,2,6]（[1]静県大薬，[2]静県総病院，[3](株)セラバリューズ，[4](株)サントリー食品，[5]京大院薬，[6]京医センター）

A15 会場　午前の部（9:00〜12:00）

食品―食品化学–その他―

3A15a01　ホップ水抽出物中の TRPV1 アゴニストの探索

9:00　°佐藤千鶴，黒田久夫，執行達朗（サッポロビール(株)）

3A15a02　白血球型 12- リポキシゲナーゼに対する中国茶葉抽出物の阻害効果

9:12　°川上祐生[1]，大槻朱美[1]，平野詩織[1]，木下麻衣[1]，山本登志子[1]，辻　英明[1]，木本眞順美[1]，山下広美[1]，伊東秀之[2]，FANG Ding Zhi[3]，高橋吉孝[1]（[1]岡山県大保福，[2]岡山大院医歯薬，[3]Sichuan Univ.）

3A15a03　チロシナーゼ阻害作用を示す米糠タンパク質由来新規ペプチドの同定と機能解析

9:24　°落合秋人，田中聖也，吉田久志，田中孝明，谷口正之（新潟大自然研）

3A15a04　アピオスイソフラボン類における生理活性の評価

9:36　°奈良一寛[1]，堀江祐範[2,3]，高島瑞紀[3]，二木鋭雄[3]，吉田康一[3]，萩原義久[3]（[1]東京家政学院大，[2]産業医大，[3]産総研・健康工学）

3A15a05　バンウコン（*Kaempferia galanga* L.）に含まれる TRPA1 活性化成分

9:48　°竹内俊介[1]，寺田祐子[2]，増田秀樹[3]，後藤洋子[3]，廣岡沙織[3]，西村　修[3]，渡辺達夫[1]（[1]静県大食栄，[2]静県大院薬食，[3]小川香料(株)健康素材研）

3A15a06　国内流通クローブ（*Syzygium aromaticum*）に含有される CYP3A4 阻害活性物質

10:00　°牧内麻緒，平山遥子，柵木美沙，三橋可歩，高佐幸郎，横井　大，飯田恭兵，菅谷紘一，小野瀬淳一，阿部尚樹（東農大・応生科・栄養）

3A15a07　リファンピシン処理 HepG2 における CYP3A4 mRNA 誘導に対するローズマリー（Rosmarinus officinalis L.）の抽出物の効果

10:12　°常岡美紀，尾形ひとみ，佐古いづみ，永松朋子，元田智子，菅谷紘一，小野瀬淳一，阿部尚樹（東農大・応生科・栄養）

3A15a08　タウリンによる TXNIP 発現制御に関する研究

10:24　°権藤祐輔[1]，薩　秀夫[1]，朴　聖俊[2]，若林俊一[2]，中井謙太[2]，清水　誠[1]（[1]東大院・農生科，[2]東大・医科研）

3A15a09　畜産草地研究所保有乳酸菌を用いた発酵乳の官能評価

10:36　°吉村　望[1]，佐々木啓介[2]，萩　達朗[2]，橘内克弘[2]，成田卓美[2]，田川佳男[3]，斉木理彩[4]，田島淳史[1]，野村　将[2]（[1]筑波大院生命環境，[2]農研機構・畜産草地研，[3]鳥取県農林総合研，[4]筑波大学）

3A15a10　アルカリ水の口腔内油脂に及ぼす影響

10:48　°佐藤　愛[1]，金子裕司[2]，形山幹生[2]，小西　豊[1]（[1]キリン(株)飲料技術研究所，[2]キリン(株)健康技術研究所）

3A15a11　シンナムアルデヒドの歯科疾患抑制作用

11:00　°伊藤央貴，湊健一郎，小原章裕（名城大院農）

3A15a12　LC-Orbitrap MS によるトウモロコシ中のかび毒配糖体（マスクドマイコトキシン）の検出（第 2 報）

11:12　°中川博之[1]，坂本　茂[2]，佐合由紀[1]，長嶋　等[1]（[1](独)農研機構・食総研，[2](株)サーモフィッシャーサイエンティフィック）

3A15a13　蛍光色素 FITC 修飾タンパク質に対する抗体の作製とその応用

11:24　°松本　亮[1]，礒見みづき[1]，中村宜督[2]，北元憲利[1]，加藤陽二[1]（[1]兵庫県大院環境人間，[2]岡山大院環境生命）

3A15a14　色素添加によるプルランフィルムの安定性

11:36　°河村沙也加[1]，内野昌孝[2]，廣澤竜太郎[3]，赤地利幸[3]，高野克己[2]（[1]東京農大院・農化，[2]東京農大応生・化学，[3]大和製罐(株)・総研）

3A15a15　ポリフェノール−カフェイン複合体の形成を介した紅茶クリームダウンの分子機構解析

11:48　°石井剛志[1]，太田有香[1]，浅沼俊倫[2,3]，鈴木俊美[4]，望月一男[2]，中山　勉[1]（[1]静岡県大食品栄養，[2]静岡県工技研，[3]静岡県産業振興財団，[4]住友電工(株)）

A15 会場　午後の部（14:00〜17:48）

食品—食品化学–色素，香料—

3A15p01　アラニン点変異体を用いた味覚修飾タンパク質ネオクリンの甘味受容体相互作用部位の探索

14:00　◦小泉太一[1]，寺田　透[2]，金田康平[1]，三坂　巧[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大院農生科・アグリバイオ）

3A15p02　システイン変異体を用いた味覚修飾タンパク質ネオクリンの機能解析

14:12　◦金田康平，小泉太一，三坂　巧（東大院農生科･応生化）

3A15p03　LC-MS/MS を用いた揮発性アルデヒドータンパク質付加体の高感度検出

14:24　平野啓太，◦清水和真，柴田貴広，河合慶親，内田浩二（名大院生命農）

3A15p04　麦茶の焙煎に伴う香気成分の変化

14:36　◦神山紀子[1]，　金子成延[1]，　青木恵美子[1]，　吉岡藤治[2]，平　将人[1]，柳澤貴司[1]，一ノ瀬靖則[1]，小前幸三[1]（[1]農研機構作物研，[2]農研機構近中四農研）

3A15p05　酵母による醤油の重要香気成分 2-furanmethanethiol の生成

14:48　◦孟　き[1]，畑山　誠[2]，菅原悦子[3]（[1]岩手大院農，[2]岩手県工業技術センター，[3]岩手大教）

3A15p06　ジャバラ（*Citrus jabara* Hort. ex Tanaka）の香気成分

15:00　◦富山賢一，矢口善博，櫻井和俊，川上幸宏（高砂香料工業株式会社 研究開発本部）

3A15p07　寒天ゲルの破壊によるフレーバーリリース

15:12　◦山田恭正[1]，垣見奈々美[1]，玉井愛海[1]，西成勝好[2]（[1]同志社女大・食栄，[2]大阪市大院・生活科学）

3A15p08　Full Evaporation Dynamic Headspace GC-MS による煎茶の香気成分分析

15:24　◦岡野谷和則[1]，　冨田佳祐[1]，　荒木義晴[1]，　沢村信一[1]，笹本喜久男[2]，落合伸夫[2]（[1](株)伊藤園，[2]ゲステル株式会社）

3A15p09　GC-C-IRMS および FT-IR によるチャ香気成分，カフェイン，チャ葉の δ 13C の解析

15:36　◦土屋　諒[1]，村田有明[2]，Uli Engelhardt[3]，山田桂大[4]，吉田尚弘[4]，渡辺修治[2]（[1]静岡大・農，[2]静岡大院・創造，[3]ブラウンシュバイク工科大・食品化学，[4]東工大理工・化学環境）

3A15p10　チャ花に蓄積される 1-phenylethanol 配糖体の同定

15:48　◦国政亜衣子[1]，DONG Fang[3]，YANG Ziyin[2]，村田有明[3]，渡辺修治[3]（[1]静岡大院農，[2]South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences，[3]静岡大院創造）

3A15p11　萎凋により生成するチャ葉香気成分の同定とその香気寄与度の解析

16:00　◦友村美穂[1]，勝野　剛[2,3]，楊　子銀[4]，中村順行[3]，渡辺修治[1,2]（[1]静岡大院農，[2]静岡大創造科学技術大学院，[3]静岡県農林技術研究所茶業研究センター，[4]中国科学院）

3A15p12　クロモジ精油の抗炎症作用

16:12　◦堂黒翔太，山崎真央，片方陽太郎，前多隼人（弘前大学農学生命科学）

3A15p13　キサントフィルの酸化的代謝と生物活性

16:24　◦長尾昭彦[1]，　眞岡孝至[2]，　小林みゆき[1]，　小竹-奈良英一[1]，小野裕嗣[1]（[1]農研機構・食総研，[2]生産開発科学研）

3A15p14　イチゴポリフェノールエキス（Fragrasia X ananassa）の抗肥満効果

16:36　◦朴　奎珍[1]，川畑哲郎[2]，高野英文[3]，只野　武[2]，豊田剛史[1]，太田富久[2]（[1]株式会社 テラ･サイエンス，[2]金沢大学，[3]日本薬科大学）

3A15p15　熟成中の赤ワインのアントシアニン誘導体の分析

16:48　◦久本雅嗣，藤原　陽，鈴木淳平，田村彰吾，斉藤史恵，奥田　徹（山梨大・ワイン研）

3A15p16　カムカム色素（アントシアニン）の退色および加工原料の色調安定性について

17:00　◦村山　梢[1]，　野口治子[2]，　飯島　健[2]，　内野昌孝[2]，津久井亜紀夫[2]，高野克己[2]（[1]東京農大院農･農化，[2]東京農大応生･化学）

3A15p17　赤タマネギ外皮に黄色色素は含まれているか？

17:12　◦伊藤裕才[1]，坂本祐実[2]，杉本直樹[1]，穐山　浩[1]（[1]国立医薬品食品衛生研，[2]東理大院薬）

3A15p18　メイラード反応で生じる高分子色素化合物を分解する微生物の探索

17:24　◦松井芳光[1]，岡戸茉凛[2]，高城裕子[2]，小林謙一[1]，山本祐司[1]，中西康博[2]，本間清一[3]（[1]東農大生応化，[2]東農大開発，[3]お茶の水女子大）

3A15p19　フィブロネクチンによる大豆ペクチンの構造認識機構の解明

17:36　◦纐纈洋平[1]，　松下裕昭[2]，　古林万木夫[2]，　金丸義敬[1]，矢部富雄[1]（[1]岐阜大院応生・資源生命，[2]ヒガシマル醤油・研）

A16 会場　午前の部（9:00〜11:12）

食品—食品機能・栄養–酸化，抗酸化，老化，食品機能・栄養–蛋白質・アミノ酸代謝—

3A16a01　ツバキ種子熱水抽出物の AGEs（終末糖化産物）生成抑制作用

9:00　◦史　文磊，野崎　勉，石原健夫（ビーエイチエヌ株式会社）

3A16a02　オオヤマザクラ（*Cerasus sargentii*）実抽出エキスの皮膚酸化ストレスに対する抑制効果

9:12　◦岩間直子[1]，　河合貴弘[2]，　北村裕志[3]，　正木　仁[4]，阿部　馨[5]（[1](地独）青森県産技セ･弘前研，[2]六花酒造株式会社，[3]六花酒造株式会社，[4]東京工科大・応用生物，[5](地独)青森県産技セ・弘前研）

3A16a03　漢薬 蝋梅花（*Chimonanthus praecox*, 花部）のメラニン産生抑制アルカロイド成分

9:24　◦中西勇介[1]，森川敏生[1]，二宮清文[1]，松田久司[2]，中嶋聡一[2]，三木尚子[2]，宮下　優[2]，吉川雅之[2]，早川堯夫[1]，村岡　修[1]（[1]近畿大･薬総研，[2]京都薬大）

3A16a04　アムラ抽出物とコラーゲンペプチドの抗老化作用

9:36　◦藤井　孝[1]，　奥田貴博[1]，　安井菜穂美[2]，　若泉賢功[1]，伊神孝生[1]，池田克巳[2]（[1]三基商事・総研，[2]武庫女・薬）

3A16a05　抗老化効果をもつカロリー制限模倣物質の探索－希少糖 D- アロースの線虫寿命延長効果とその作用メカニズム

9:48　◦佐藤正資[1]，　砂古口博文[1]，　新谷知也[2]，　大隈一裕[2]，何森　健[3]（[1]香川大･農，[2]松谷化学工業，[3]香川大･希少糖研究セ）

3A16a06　セサミン・エピセサミンの代謝および医薬品との相互作用

10:00　◦安田佳織[1]，　上野千来[1]，　西川美宇[1]，　生城真一[1]，鎌倉昌樹[1]，太田美穂[2]，榊　利之[1]（[1]富山県大･工，[2]相愛大･人間）

3A16a07　統合失調症関連エンドフェノタイプ発症に及ぼす妊娠期及び授乳期低タンパク質栄養の影響

10:12　◦市瀬嵩志[1]，小河　匡[2]，安尾しのぶ[3]，古屋茂樹[2,4]（[1]九州大農，[2]九州大院生資環，[3]九州大院資生科，[4]九州大バイオアーキ）

3A16a08　低アルギニン食による脂肪肝モデルラットの確立と脂肪蓄積メカニズムの解析

10:24　◦小山彩香[1]，　大谷りら[1]，　佐藤正幸[1]，　高橋伸一郎[2]，加藤久典[1]（[1]東大院・総括・食と生命，[2]東大院・農生科・応動科）

3A16a09　I 型糖尿病モデルラットにおけるキヌレン酸産生制御を介したドーパミン代謝の調節

10:36　◦福渡　努[1]，　奥野海良人[1,2]，　藤本亜希子[1]，　佐野光枝[1]，柴田克己[1]（[1]滋賀県大人間文化，[2]国立長寿医療研究センター）

3A16a10　C2C12 筋管細胞におけるリジンによる筋肉タンパク質の分解抑制機構

10:48　◦佐藤友紀，伊藤芳明，長澤孝志（岩手大院農）

3A16a11　ローヤルゼリー由来タンパク質中の酸化型トリプトファンの生理機能

11:00　◦大島和也[1]，松岡拓磨[2]，中村　正[2]，金丸義敬[1]，矢部富雄[1]（[1]岐阜大院応生・資源生命，[2](株)秋田屋本店）

A16 会場　午後の部（14:00〜18:00）

食品—食品機能・栄養–消化・吸収，循環—

3A16p01　澱粉から酵素的に生成する多分岐グルカン ™の *In vitro* 消化性

14:00　◦渡辺　光，黒瀬真弓，櫻井岳夫，西本友之，福田恵温

((株)林原　研究開発本部)

3A16p02　多分岐グルカン™のラットにおける消化吸収性の検討

14:12　°井上紳一郎，谷口美文，新井成之，吉實知代，宮田聡美，黒瀬真弓，渡辺　光，西本友之，福田恵温((株)林原　研究開発本部)

3A16p03　多分岐グルカン™のラット・ヒト経口負荷試験

14:24　°吉實知代，新井千加子，宮田聡美，谷口美文，渡辺　光，西本友之，福田恵温((株)林原　研究開発本部)

3A16p04　多分岐グルカン™の生理作用(1)：高脂肪食負荷マウスにおける肝脂肪蓄積の予防効果

14:36　°紙谷隆志，谷口美文，井上紳一郎，池田広司，渡辺　光，西本友之，新井成之，福田恵温((株)林原　研究開発本部)

3A16p05　多分岐グルカン™の生理作用(2)：高脂肪食負荷マウスにおける食後の血中脂質上昇低減効果

14:48　°谷口美文，池田広司，井上紳一郎，紙谷隆志，渡辺　光，西本友之，福田恵温((株)林原　研究開発本部)

3A16p06　魚醤油（しょっつる）の ACE 阻害活性について

15:00　青柳智則[1]，後藤　猛[2]，塚本研一[3]，°高橋砂織[3]（[1]秋田大学工学資源，[2]秋田大学大学院，[3]秋田県総食研）

3A16p07　後発酵茶抽出物の降圧作用

15:12　°中村彰男[1]，　河原田律子[1]，　吉山伸司[1]，　高澤香葉[2]，清水比以呂[2]，増田春菜[1]，井上菜津子[3]，井上孝彦[3]（[1]群馬大院医・病態腫瘍薬理，[2]日本語　高崎健大・健康福祉・栄養学，[3]日本黒茶研究所）

3A16p08　大豆タンパク質発酵抽出物の血圧降下作用

15:24　°中山克大，冨永隆生((株)ラフィーネインターナショナル・研究開発部)

3A16p09　加熱処理したユリネのラット腸内環境と脂質代謝への影響

15:36　°岡崎由佳子[1]，福田絵里[1]，知地英征[1]，加藤範久[2]（[1]藤女子大人間生活，[2]広島大院生物圏科学）

3A16p10　アポリポタンパク C-II の凝集に及ぼす食品因子の影響

15:48　°丹羽利夫[1,2]，大澤俊彦[1,3]（[1]名古屋大生命農，[2]尚絅学院大総合人間科学，[3]愛知学院大心身科学）

3A16p11　腸管上皮細胞におけるリゾホスファチジルイノシトールの生理機能解析

16:00　°宮崎　悠[1]，金　然正[2]，平林義雄[2]，清水　誠[1]，薩　秀夫[1]（[1]東大院・農生科，[2]理研・脳科学）

3A16p12　DSS 誘導性大腸炎モデルマウスにおける食餌性植物および動物スフィンゴ脂質の効果

16:12　°荒井克仁[1]，木下幹朗[2]，三明清隆[3]，間　和彦[4]，大西正男[2]（[1]岩手大院・連農，[2]帯畜大・食品，[3]丸大食品・中研，[4]日本製粉・中研）

3A16p13　にごり酒の胆汁酸吸着能とその有効成分の同定

16:24　°榊原舞子，小高敦史，鈴木佐知子，芦田優子，松村憲吾，石田博樹，秦　洋二（月桂冠総研）

3A16p14　カテキン類が腸管上皮細胞におけるフルクトース吸収活性に及ぼす影響

16:36　°滝　壮平，薩　秀夫，権藤祐輔，清水　誠（東大院農）

3A16p15　ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 によるカロテノイドの取込みに対するグリセロ糖脂質の影響

16:48　°小竹英一，ヨネクラリナ，長尾昭彦（独立行政法人　農業・食品産業技術総合研究機構　食品総合研究所）

3A16p16　小腸および肝臓モデル培養細胞の共培養系を用いたフラボイノイドの吸収代謝評価

17:00　°室田佳恵子[1]，　中村俊之[2]，　熊本　舜[1]，　生城真一[3]，加藤陽二[4]，寺尾純二[2]（[1]近大・理工，[2]徳島大院・HBS 研，[3]富山県大・工，[4]兵庫県大・環境人間）

3A16p17　酵素グルコシダーゼや腸管モデル培養細胞を用いた配糖体 Leptosin の代謝研究

17:12　°荒木裕佳子[1]，　松本大樹[1]，　北元憲利[1]，　室田佳恵子[3]，伊藤美紀子[1]，菊崎泰枝[2]，瀧本陽介[4]，加藤陽二[1]（[1]兵庫県立大環境人間，[2]奈良女子大生活環境，[3]近畿大理工生命科，[4](株)ヘルスケアシステムズ）

3A16p18　γ-グルタミルメチルアミドの輸送分子の同定

17:24　°山本幸子[1]，木村　徹[2]，立木　隆[3]，丑丸　真[1]（[1]杏林大・医・化学，[2]杏林大・医・薬理学，[3]立命館大・生命）

3A16p19　サラシア属植物エキスの吸収動態解析

17:36　°小田由里子，植田文教，石川　静，柿沼千早（富士フイルム株式会社）

3A16p20　ラット小腸におけるクラスリン依存性エンドサイトーシスを介したサケ鼻軟骨由来プロテオグリカン吸収

17:48　°土谷　庸[1]，富田雅弘[1]，坪井　誠[2]，高橋達治[2]，米塚正人[3]，花田玲子[1]，齋藤　望[1]（[1]東北女子大学家政学部，[2]一丸ファルコス株式会社，[3]株式会社角弘プロテオグリカン研究所）

A20 会場　午前の部（9:00〜10:48）

食品―食品機能・栄養-糖質代謝―

3A20a01　ラットにおける離乳期の食事制限が成熟後の糖・脂質代謝に与える影響

9:00　°望月和樹[1]，池田美沙[2]，合田敏尚[2]（[1]山梨大生環，[2]静岡県立大薬食）

3A20a02　田七人参由来ダンマラン系トリテルペンによる骨格筋の糖取込み亢進効果の作用メカニズム解析

9:12　°岩本　拓[1]，　高村裕介[1]，　北村久美子[1]，　生駒桂子[1]，野村　充[1]，　小野知二[1]，　村越倫明[1]，　眞鍋康子[2]，　西野輔翼[3,4]，藤井宣晴[2]（[1]ライオン(株)，[2]首都大学東京院，[3]京都府立医大，[4]立命館大）

3A20a03　サフランは protein tyrosine phosphatase 1B（PT-P1B）の阻害を介してインスリンシグナリングを活性化する

9:24　°前田歩海[1]，甲斐建次[1]，石井剛志[2]，赤川　貢[1]（[1]大阪府大院生命環境，[2]静岡県大食栄）

3A20a04　ヒシ外皮の血糖値上昇抑制作用

9:36　°安田みどり[1]，　安武健一郎[1]，　日野まど香[1]，　宮山　瞳[1]，武富和美[2]（[1]西九大健栄，[2]西九大短大）

3A20a05　落花生渋皮ポリフェノールの精製とその性質

9:48　°辻田隆広，高久武司（愛媛大総合科学研究支援）

3A20a06　*Aspergillus oryzae* FS001 株を用いて発酵させたトウガラシ発酵物の生理活性

10:00　°佐々木文生[1]，　三沢　宏[2,3]，　矢澤一良[3]，　濱田奈保子[3]（[1]海洋大院，[2]日本・バイオ，[3]海洋大）

3A20a07　砂漠人参カンカニクジュヨウ（*Cistanche tubulosa*, 肉質茎）成分の α-グルコシダーゼおよびアルドース還元酵素阻害作用

10:12　°今村美緒[1]，森川敏生[1]，藤倉翔太[1]，二宮清文[1]，赤木淳二[1]，潘　英媛[3]，　居村克弥[1]，　吉川雅之[2]，　袁　丹[3]，　賈　暁光[4]，李　征[5]，村岡　修[1]（[1]近畿大・薬総研，[2]京都薬大，[3]瀋陽薬大，[4]新疆中薬民族薬研，[5](株)栄進商事）

3A20a08　デイジーフラワー（*Bellis perennis*, 花部）成分の脂質代謝改善作用

10:24　°森川敏生[1]，　二宮清文[1]，　李　雪征[2]，　西田枝里子[1]，山下千裕[2]，　山田友視[1]，　松田久司[2]，　中村誠宏[2]，　吉川雅之[2]，早川堯夫[1]，村岡　修[1]（[1]近畿大・薬総研，[2]京都薬大）

3A20a09　デイジーフラワー（*Bellis perennis*, 花部）成分のコラーゲン産生促進作用

10:36　°高森康暢[1]，　森川敏生[1]，　二宮清文[1]，　李　雪征[2]，西田枝里子[1]，　松田久司[2]，　中村誠宏[2]，　吉川雅之[2]，早川堯夫[1]，村岡　修[1]（[1]近畿大・薬総研，[2]京都薬大）

A20 会場　午後の部（14:00〜16:24）

食品―食品機能・栄養，ビタミン・ミネラル―

3A20p01　海藻アカモクの有用ミネラルの季節変動

14:00　°村上　香[1,2]，岡　聡子[1]，貞森康平[2]（[1]広島工業大生命，[2]広島工業大健康情報）

3A20p02　高リン食摂取がラット肝臓及び白色脂肪組織に及ぼす影響：DNA マイクロアレイによる解析

14:12　°千　善宇[1]，石島智子[1]，陶山達也[1]，阿部啓子[1,2]，中井雄治[1]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]KAST）

3A20p03　鉄欠乏食投与がマウス心臓のレドックスホメオスタシスに及ぼす影響

14:24　°井上博文[1]，　小林謙一[2]，　山本祐司[2]，　勝間田真一[1]，鈴木和春[1]，上原万里子[1]（[1]東農大・応生・栄養科学，[2]東農大・応生・化学）

3A20p04　鉄過剰食摂取ラットの血球細胞の遺伝子発現プロファ

イル解析

14:36 ○亀井飛鳥[1], 渡部由貴[1], 篠崎文夏[1], 荒井綜一[1,2], 阿部啓子[1,3]（[1]KAST, [2]東農大・総研, [3]東大院・農生科・応生化）

3A20p05 短期亜鉛欠乏におけるラットの味嗜好性変化の解析

14:48 ○山本 遼, 岡田晋治, 三坂 巧（東大院農生科･応生化）

3A20p06 潰瘍性大腸炎モデルラットにおける生体内亜鉛動態の解析

15:00 ○常木生也[1], 岩谷一史[2], 原 博[2], 石塚 敏[2]（[1]北海道大・農・生機化, [2]北海道大・院農・応生科）

3A20p07 葉酸欠乏ラットを用いたホウレンソウとタンパク質との併用摂取によるホモシステイン低減効果

15:12 ○宮下達也[1], 劉 軼群[2], 劉 穎[2], 稲熊隆博[1], 杉山公男[3]（[1]カゴメ(株)総研, [2]岐阜大院・連農, [3]静岡大・農）

3A20p08 ウェルナー症候群患者由来細胞に対するビタミン C の細胞老化改善作用

15:24 ○小山浩史[1], 澁谷修一[1], 嶋本 顕[2], 横手幸太郎[1], 清水孝彦[1]（[1]千葉大院医, [2]広島大院医歯薬保）

3A20p09 ビタミン D による細胞増殖抑制の作用機構

15:36 ○西川美宇, 河南理恵, 宗綱栄二, 岩崎典子, 生城真一, 榊 利之（富山県立大 生物工）

3A20p10 NIH/3T3 繊維芽細胞中のピロロキノリンキノン（PQQ）結合タンパク質の探索

15:48 ○峰松謙治[1], 幾島知世[1], 太田優香[1], 石井剛志[2], 赤川 貢[3]（[1]大阪府大生命環境, [2]静岡県大食栄, [3]大阪府大院生命環境）

3A20p11 KK-A^y マウスの糖代謝に及ぼすビタミン K 欠乏食の影響

16:00 ○平原啓甫, 白川 仁, 齋藤正頼, Puspo E. Giriwono, 桂井朋子, 後藤知子, 駒井三千夫（東北大院農）

3A20p12 ビオチンのテストステロン産生の促進とその作用機序の解明

16:12 ○前田美里[1], 白川 仁[2], 桂井朋子[2], 駒井三千夫[2]（[1]東北大・農・栄養, [2]東北大院・農・栄養）

A22 会場 午前の部（9:00〜11:36）

食品―食品機能・栄養-免疫，炎症，アレルギー―

3A22a01 ロタウイルスを経口感染させた乳飲みマウスの糞便に含まれるウイルス抗原の定量

9:00 ○稲垣瑞穂[1], 栗本聖羅[1], 山田佳太[2], 内山 昇[3], 矢部富雄[1,4], 中込とよ子[5], 中込 治[5], 金丸義敬[1,4]（[1]岐阜大応生・応用生命, [2]近畿大薬, [3]株式会社レグザム, [4]岐阜大院応生・資源生命, [5]長崎大院医歯薬総合）

3A22a02 牛乳ラクトフォリンは細胞内在化を介して感染細胞のウイルスタンパク質合成を阻害する。

9:12 ○大野翔平[1], 稲垣瑞穂[2], 山田佳太[3], 矢部富雄[1,2,4], 鈴木 徹[4], 松田 幹[5], 高橋 毅[6], 杉山 誠[1,2,4], 中込とよ子[7], 中込 治[7], 金丸義敬[1,2,4]（[1]岐阜大院応生･資源生命, [2]岐阜大応生･応用生命, [3]近畿大薬, [4]岐阜大院連農, [5]名古屋大農, [6](株)明治・研究本部, [7]長崎大院医歯薬総合）

3A22a03 ニンニク抽出物に含まれる TLR 阻害物質の探索

9:24 柴田貴広, ○盧 育章, 本多和也, 河合慶親, 内田浩二（名大院生命農）

3A22a04 たまねぎ抽出物に含まれる TLR 抑制物質の同定と作用機序解析

9:36 柴田貴広[1], ○中島史恵[1], 本多和也[1], 河合慶親[1], 牛田悠介[2], 相澤宏一[2], 稲熊隆博[2], 内田浩二[1]（[1]名大院生命農・応用分子生命科, [2]カゴメ(株)総研）

3A22a05 キャベツ由来イソチオシアネートの TLR 抑制機構

9:48 ○本多和也[1], 柴田貴広[1], 河合慶親[1], 田中浩士[2], 高橋孝志[2], 牛田悠介[3], 相澤宏一[3], 稲熊隆博[3], 内田浩二[1]（[1]名大院生命農・応用分子生命科, [2]東工大院理工・応化, [3]カゴメ(株)総研）

3A22a06 高圧下酵素処理による β-ラクトグロブリンの低アレルゲン化

10:00 ○藤原麻美, 原理恵子, 呉 曦, 友野美怜, 古田早紀, 東 徳洋, 山田 潔（宇都宮大農）

3A22a07 小麦グリアジンの脱アミド化によるアレルゲン性低減化の in vivo における評価

10:12 ○安田果倫[1], 阿部竜典[1], 伊藤みさき[1], 内田裕紀[1], 赤尾 真[1], 熊谷 仁[2], 熊谷日登美[1]（[1]日大院・生資科, [2]共立女子大・家政）

3A22a08 Three different CD103+ dendritic cell subsets in mesenteric lymph node have distinct functions in relation to oral tolerance induction

10:24 ○Aya SHIOKAWA, Satoshi HACHIMURA（Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo）

3A22a09 Effects of tamarixetin on the induction of regulatory B cell population with immune suppressive properties

10:36 ○Chenhao YEH, Makoto SHIMIZU, Mamoru TOTSUKA（Dept. Appl. Biol. Chem.,The Univ. of Tokyo.）

3A22a10 ダイゼインによる 2 型ヘルパー T 細胞（Th2）への機能分化の抑制

10:48 ○石原惟志, ベミンジョン, 清水 誠, 戸塚 護（東京大院農）

3A22a11 T 細胞アナジーにおけるユビキチン化タンパク質の分解の役割

11:00 ○安達 悠, 水口洋平, 中嶋暁子, 山本 愛, 服部 誠, 好田 正（東農工大, 応生化）

3A22a12 大腸と小腸における免疫関連遺伝子の網羅的解析

11:12 ○鴨井大樹, 細野 朗, 鈴木 誠, 今野拓馬, 高橋恭子, 上野川修一（日大生資科・食品生命）

3A22a13 グリケーションタンパク質（AGEs）を認識する自然抗体に関する研究

11:24 ○近澤未歩[1], 宮下宙士[1], 大瀧菜月[1], 柴田貴広[1], 河合慶親[1], 丸山彰一[2], 豊國伸哉[2], 松田 幹[1], 内田浩二[1]（[1]名大院生命農, [2]名大院医）

A22 会場 午後の部（14:00〜16:24）

食品―食品機能・栄養-免疫，炎症，アレルギー―

3A22p01 蒸し発芽大豆の DNA 合成酵素阻害活性と大豆イソフラボンの生理活性

14:00 ○水品善之[1,2], 高橋義洋[3], 栗山磯子[1], 塩見一明[1], 見通真衣[1], 吉田弘美[1]（[1]神戸学院大・栄養, [2]神戸学院大・ライフサイエンス産学連携研究セ, [3](株)小倉屋柳本・開発研）

3A22p02 乳がん細胞を用いたアドレナリン受容体へのノルアドレナリン結合に対するフラボノイド類の抑制効果

14:12 ○山崎隼輔[1], 榊原啓之[2], 下位香代子[1,3]（[1]静岡県立大学大学院 生活健康科学研究科, [2]宮崎大学 農学部, [3]静岡県立大学大学院 薬食生命学科総合学府）

3A22p03 レスベラトロールによる前立腺がんの増殖抑制効果とその分子機構について

14:24 ○三谷塁一[1], 淺野茂三[1], 原田直樹[1], 諫山 篤[1], 谷森紳治[1], 中野長久[2], 乾 博[3], 山地亮一[1]（[1]大阪府大院・生命環境, [2]大阪女子短大, [3]大阪府大院・栄養）

3A22p04 レスベラトロールによるカルボニルレダクターゼ 1 の阻害は低酸素誘導性の薬剤耐性を改善する

14:36 ○伊藤雄太[1], 原田直樹[1], 諫山 篤[1], 谷森紳治[1], 中野長久[2], 乾 博[3], 山地亮一[1]（[1]大阪府大院・生命環境, [2]大阪女子短大, [3]大阪府大院・栄養）

3A22p05 Anti-cancer effect of γ-T3 via proto-oncogene Hras-1 down regulation

14:48 ○Gregor Burdeos[1], Kiyotaka Nakagawa[1], Akio Watanabe[2], Fumiko Kimura[1], Teruo Miyazawa[1]（[1]Tohoku Univ, Grad. Sch. Agr. Sci., [2]Japan Food Research Lab.）

3A22p06 DNA 損傷応答反応に対する米ぬか抽出物の作用

15:00 ○舘脇直人, 鷲尾知佳, 小日山惇, 永塚貴弘, 西田浩志, 小西徹也（新潟薬大応生科）

3A22p07 発酵米糠抽出物のヒト急性 T 細胞性白血病細胞株に対するアポトーシス誘導作用

15:12 ○堀江裕紀子, 根本英幸, 小坂弘明（コーケン･研究開発）

3A22p08 ラット神経膠腫細胞に対する山菜抽出物のアポトーシス誘導効果

15:24 ○櫻林ひかる, 福井 智, 窪島愛華, 野田聖子, 名取貴光（山梨学院大健）

3A22p09 加工時に黄変しない新形質ダイコンとそのスプラウト

の生理機能性について

15:36 ○森光康次郎[1]，大賀智世[1]，深尾友美[1]，久保田紀久枝[1]，石田正彦[2]（[1]お茶大院食物，[2]農研機構野茶研）

3A22p10　アマドリ型糖化リン脂質のテロメラーゼ活性に与える影響

15:48 ○永塚貴弘[1]，仲川清隆[2]，西田浩志[1]，倉田忠男[1]，宮澤陽夫[2]（[1]新潟薬大・応生科，[2]東北大院農・機能分子解析）

3A22p11　*Lactobacillus* 属を用いた飲酒後の口腔内アセトアルデヒド除去技術の開発

16:00 ○長瀬昭広，下山武文，櫻井明徳，細矢美穂，中山　亨（東北大院・工・生工）

3A22p12　β-1, 3-キシロオリゴ糖のヒト白血病細胞株 HL60 に対するアポトーシス誘導作用の重合度依存性

16:12 ○明田川育生[1]，吉田　剛[2]，吉田理佐[2]，吉田滋樹[2]（[1]筑波大・生物資源，[2]筑波大院・生命環境系）

A25 会場　午前の部（9:00〜12:00）

食品—食品機能・栄養–その他—

3A25a01　卵黄由来ペプチドの経口摂取による骨代謝改善効果

9:00 ○渡部和哉[1]，磯野正幸[2]，岡村好孝[2]，川人誠二[3]，丸　勇史[1]，金　武祚[1]，山根哲郎[4]（[1]株式会社ファーマフーズ，[2]ワダカルシウム製薬株式会社，[3]イワキ株式会社，[4]松下記念病院）

3A25a02　骨代謝におよぼすロバスタチン（ラクトン型・アシッド型）投与の影響

9:12 ○藤井駿吾[1]，勝間田真一[1]，井上博文[1]，鈴木和春[1]，長谷川森一[2]，車　炳允[2]，禹　済泰[2]，藤森賢一[3]，西川正洋[3]，上原万里子[1]（[1]東農大・応生・栄養，[2]中部大院応生，[3]グリコ栄養食品(株)開発部）

3A25a03　しょうが抽出物が骨代謝に与える作用効果

9:24 ○伊藤　克[1]，籠谷和弘[1]，大見亮宏[1]，浅沼伸吾[1]，荒木裕子[1]，金岡秀明[2]，矢野竹男[2]，奥村克純[3]，西村訓弘[4]（[1]辻製油(株)，[2]三重大院・地域イノベーション，[3]三重大院・生資，[4]三重大院・医）

3A25a04　破骨細胞の分化と機能に対する米糠タンパク質 Os-CYT1 の影響

9:36 ○大坪貞視，太養寺真弓（新潟農総研食研セ）

3A25a05　ヒト単球 THP-1 を用いた食品の破骨細胞分化への影響

9:48 ○渡辺広大[1]，安藤　恵[1]，湊健一郎[1]，小原章裕[2]（[1]名城大学農，[2]名城大学院農）

3A25a06　ミクログリア MG6 におけるシンナムアルデヒドの抗炎症作用

10:00 ○早坂真依[1]，湊健一郎[2]，小原章裕[3]（[1]名城大学農，[2]名城大学農，[3]名城大学院農学研究科）

3A25a07　食用キノコ「アンニンコウ」由来多糖画分の免疫調節作用

10:12 ○森田　友[1]，湊健一郎[2]，原田栄津子[4]，森園智浩[4]，小原章裕[3]（[1]名城大学農，[2]名城大学農，[3]名城大学院農，[4](株)岩出菌学研究所）

3A25a08　生野菜および漬け物より単離された乳酸菌の諸性状解析

10:24 ○松崎千秋[1]，神島香織[1]，松本健司[2]，片山高嶺[1]，山本憲二[1]，久　景子[3]（[1]石川県大・資源研，[2]石川県大・生資環，[3]日東薬品工業(株)）

3A25a09　イヌのオーラルケアにおける抗歯周病原菌バイオフィルム鶏卵抗体の効果

10:36 ○山下裕輔[1]，弓場安紀子[2]，丸　勇史[1]，森　尚志[2]，金　武祚[1]（[1]株式会社ファーマフーズ，[2]ダクタリ動物病院 京都病院）

3A25a10　フェルラ酸の 2 型糖尿病モデルマウスにおける炎症性遺伝子発現への影響

10:48 ○上野有紀，西川佳那，濱田　愛，山田雄太，大池真央，濱島佑弥，池山将成，大澤俊彦（愛知学院大心身科学）

3A25a11　自然免疫応答を用いた新規食品機能性評価法で判明したアントシアン類の機能性

11:00 ○數村公子[1]，佐藤由紀子[1]，里園　浩[1]，望月美佳[2]，呉　暁紅[3]，土屋広司[1]，小池　隆[4]，岡崎茂俊[5]，大澤俊彦[2]（[1]浜松ホトニクス・中研，[2]愛知学院大・心身，[3]ヘルスケアシステムズ，[4]浜松ホトニクス・電子管，[5]浜松医大・MPRC）

3A25a12　植物由来成分によるヒストン脱アセチル化酵素の活性調節と抗腫瘍及び抗炎症作用の関連について

11:12 ○名取貴光[1,2]，福井　智[1]，桜林ひかる[1]，野田聖子[1]，窪島愛華[1]，長井　薫[2]（[1]山梨学院大健，[2]山梨大院医）

3A25a13　血管新生に及ぼすカロテノイドの影響

11:24 ○梅原平三郎，菅原達也，平田　孝（京大院農）

3A25a14　発酵大麦エキス（FBE）は LPS と TLR4 の結合を阻害することにより抗炎症作用を示す

11:36 ○小口一起[1]，Giriwono E. Puspo[1]，外薗英樹[2]，白川　仁[1]，駒井三千夫[1]（[1]東北大院農，[2](株)三和酒類）

3A25a15　発酵大麦エキスは脳卒中易発性高血圧自然発症ラットの高血圧症を改善する

11:48 ○植田一馬[1]，Ardyansyah Ardy[2,3]，白川　仁[2]，Puspo Giriwono[2]，小口一起[2]，外薗英樹[4]，樋渡一之[5]，高橋沙織[5]，駒井三千夫[2]（[1]東北大・農・栄養学，[2]東北大・院農・栄養学，[3]Food science and Technology Study Program, Universitas Bakrie, Indonesia, [4]三和酒類(株)，[5]秋田県総食研）

A25 会場　午後の部（14:00〜17:36）

食品—食品機能・栄養–その他—

3A25p01　セサミンとエピセサミンの経口投与によるマウス肝臓の遺伝子発現変動の比較解析

14:00 ○姚　瑞卿[1]，安岡顕人[2]，檜木智裕[3]，北川義徳[3]，柴田浩志[3]，阿部啓子[1,4]，三坂　巧[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]前工大・生物工，[3]サントリーウエルネス・健康科学研，[4]神奈川科学技術アカデミー）

3A25p02　総エネルギー量一定条件下で PFC バランスの異なる食餌を摂取させたラットの肝臓における比較遺伝子発現解析

14:12 ○永井俊匡[1]，熊倉　慧[1]，新井　栞[1]，黒田萌珠[1]，赤石結美[1]，石丸喜朗[2]，中井雄治[2]，阿部啓子[2]，朝倉富子[2]（[1]高崎健大・栄養，[2]東大院農生科・応生化）

3A25p03　アミノ酸サプリメントを経口投与したマウス白色脂肪組織の遺伝子発現プロファイリング

14:24 ○篠崎文夏[1]，亀井飛鳥[1]，渡部由貴[1]，荒井綜一[1,2]，熊谷弘太[3]，阿部　岳[4]，阿部啓子[1,5]（[1]KAST，[2]東京農業大学・総研，[3]協和発酵バイオ，[4]Hornet Research Center，[5]東大院農生科・応生化）

3A25p04　シナモン熱水抽出物が骨格筋細胞における糖の取り込みに及ぼす影響

14:36 ○本間夏実[1]，飯塚　望[2]，石林千早[2]，小林克也[2]，佐野佑果[2]，沈　燕[1]，細野　崇[1,2]，有賀豊彦[1,2]，関泰一郎[1,2]（[1]日大院・応生科，[2]日大・生命化）

3A25p05　イソマルチュロースが運動時のグリコーゲン蓄積に及ぼす影響

14:48 ○笹川克己[1]，石川修平[1]，峰尾　茂[1]，西田浩志[2]，佐藤眞治[2]，平山匡男[1]（[1](株)ブルボン健康科学研，[2]新潟薬大応生）

3A25p06　食用菊熱水抽出成分による抗糖尿病作用の検討

15:00 ○山本純平，要　秋蘭，豊田理恵，服部一夫，大石祐一（東農大応生科・栄養）

3A25p07　短時間吸水により機能性を高めた小麦素材の特性

15:12 ○田村倫子[1]，清水寛喜[1]，八田花澄[1]，阿久澤さゆり[1]，村　清司[1]，荒井綜一[2]（[1]東農大応生科・栄養，[2]東農大・総研）

3A25p08　アルギン酸はストロンチウムおよびセシウムの吸収を抑制し，排泄を促進する

15:24 ○原田　瞳[1]，井戸田陽子[1]，森本かおり[1]，矢野健太郎[1]，小林彰子[2]，柿沼千早[1]，宮島千尋[3]，笠原文善[3]，荻原琢男[1]（[1]高崎健康福祉大学薬学部，[2]東京大学大学院農学生命科学研究科，[3]株式会社キミカ）

3A25p09　高血圧自然発症ラットにおけるボイセンベリー果汁および果実酢の抗高血圧作用

15:36 ○松嶋全人[1]，古内　亮[1]，横山忠幸[1]，西田浩志[2]，平山匡男[1,2]（[1]ブルボン・健康科学研，[2]新潟薬大・応生）

3A25p10　大豆サポニン生合成の活性化メカニズムとサポニン生合成を活性化させた大豆種子における機能性

15:48 ○斉藤哲史，白岩雅和（茨城大院農）

3A25p11　大豆イソフラボン腸内細菌代謝物エコールの飼料摂取量低下効果への腸肝循環の関与

16:00 ○岸田太郎，藤谷美菜，水重貴文，山内佳也，村上　聖，

山内　聡，海老原清（愛媛大農）

3A25p12　カルノシン酸及びスルフォラファンの神経細胞保護作用機序

16:12　◦柴田紗知[1]，萱島知子[2]，松原主典[1]（[1]広島大院教育，[2]佐賀大文化教育）

3A25p13　抗発がん性テルペノイド zerumbone による異常タンパク質分解系の活性化

16:24　◦大西康太[1]，　石坂朱里[2,3]，　河合慶親[2,4]，　寺尾純二[2]，入江一浩[1]，村上　明[1]（[1]京大院農・食生科，[2]徳島大院・ヘルスバイオサイエンス，[3]くらしき作陽大･食文化，[4]名大院･生命農学）

3A25p14　質量分析イメージング法による緑茶カテキンおよびその代謝物の生体組織内分布情報の非標識可視化

16:36　◦金　允喜[1]，　藤村由紀[2]，　萩原立春[1]，　佐々木雅子[1]，行平大地[2]，　山口　歩[2]，　永尾達彦[2]，　齋藤和徳[3]，　三浦大典[2]，割石博之[1,2,4]，田中浩士[5]，山田耕路[1]，立花宏文[1,2,4,6]（[1]九大院農，[2]九大レドックスナビ，[3]ブルカーダルトニクス，[4]九大バイオアーク，[5]東工大院理工，[6]九大食品機能デザイン）

3A25p15　動植物体内における機能性食品成分の分布変動解析

16:48　◦財満信宏，吉村征浩，山本彩実，田中照佳，森山達哉，河村幸雄（近大院農）

3A25p16　四重極・飛行時間型質量分析計を用いた Flavanol 類（catechin, epigallocatechin gallte, procyanidin dimer）のラット尿中代謝物のメタボロミクス解析

17:00　◦庄司俊彦[1]，　三浦富智[2]，　石川（高野）裕子[3]，　尾崎嘉彦[4]（[1]農研機構･果樹研，[2]弘前大･保健，[3]農研機構･食総研，[4]近大･生物理工）

3A25p17　ゴマリグナンのアフィニティークロマトグラフィーのための固定化に関する検討

17:12　◦水野裕紀，鈴木健太，今井邦雄，勝崎裕隆（三重大院・生資）

3A25p18　テアフラビン類と蛋白質チオールとの共有結合反応

17:24　◦林　美香[1]，　石井剛志[1]，　浅沼俊倫[2,3]，　望月一男[2]，中山　勉[1]（[1]静岡県大院食品栄養，[2]静岡県工技研，[3]静岡県産業振興財団）

B11 会場　午前の部（9:00〜12:00）

微生物―代謝–代謝調節，発酵生理，メタボローム―

3B11a01　メチロトローフ酵母 *Pichia pastoris* シトクロム *c* の発現制御とメタノール代謝における役割

9:00　◦岡田一真[1]，栗本将太[1]，早川享志[1,2]，中川智行[1,2]（[1]岐阜大院応生，[2]岐阜大応生）

3B11a02　糸状菌 A.nidulans の二次代謝制御に関わるグリコーゲン分解機構の解析

9:12　◦小松崎愛里（筑波大学生命環境）

3B11a03　酵母 *Yarrowia lipolytica* の *n*-アルカン資化に関わる長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の同定と機能解析

9:24　◦岩間　亮[1]，小林　哲[1]，志波　優[2]，吉川博文[2,3]，堀内裕之[1]，福田良一[1]，太田明徳[3]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東京農大・ゲノム解析セ，[3]東京農大・応生科・バイオ）

3B11a04　メチロトローフ酵母 *Pichia pastoris* の高メタノール生育変異株の構築

9:36　◦岩田昇悟[1]，早川享志[1,2]，中川智行[1,2]（[1]岐阜大院応生，[2]岐阜大応生）

3B11a05　糸状菌によるフミン酸の分解と吸着

9:48　◦老沼研一[1]，中澤奈美[1]，岡田　元[2]，大熊盛也[2]，高谷直樹[1]（[1]筑波大院生命環境，[2]理研 BRC-JCM）

3B11a06　糸状菌による芳香族アミノ酸代謝とフェネチルアルコール生産

10:00　◦長田理沙，高谷直樹（筑波大院 生命環境）

3B11a07　糸状菌が産生する有用芳香族化合物の探索

10:12　◦茂本亮輔[1]，老沼研一[1]，岡田　元[2]，大熊盛也[2]，高谷直樹[1]（[1]筑波大学，[2]理研 BRC-JCM）

3B11a08　分裂酵母の酸化ストレス感受性に対するシステインの影響

10:24　◦竹内佳奈[1]，古田奈々[1]，中川　強[2]，戒能智宏[1]，川向　誠[1]（[1]島根大・生物資源・生命工，[2]島根大・総科センター）

3B11a09　分裂酵母の protein kinase A がコエンザイム Q の生合成に及ぼす影響

10:36　◦横見和誠，松尾安浩，戒能智宏，川向　誠（島根大生物資源）

3B11a10　*In-silico* MS/MS ライブラリ（LipidBlast）を用いた *Euglena gracilis* の極性脂質プロファイリング

10:48　◦小川拓水[1]，　中井　来[1]，　岡澤敦司[1]，　Kind Tobias[2]，Fiehn Oliver[2]，太田大策[1]（[1]阪府大院生命環境，[2]UC Davis Genome Center）

3B11a11　超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* 由来システインデスルフラーゼに依存する含硫化合物の探索

11:00　◦秀瀬涼太[1]，井上貴央[2]，藤原伸介[1,2]（[1]関学大院理工生命環境科学研究セ，[2]関学大理工）

3B11a12　物質生産菌の培養液ライブラリーの構築

11:12　◦中島琢自[1]，野中健一[2]，増間碌郎[2]，鈴木賢一[2]，高橋洋子[2]，大村　智[2]（[1]北里大学・感染制御研究機構，[2]北里大学・生命研）

3B11a13　フラボノイド代謝微生物の探索

11:24　◦千野貴裕，橋本義輝，小林達彦（筑波大院・生命環境）

3B11a14　Validation of the applicability of discriminant marker for authenticity assessment of Luwak coffee

11:36　◦Udi JUMHAWAN[1]，　Sastia Prama PUTRI[1]，Yusianto YUSIANTO[2]，Takeshi BAMBA[1]，Eiichiro FUKUSAKI[1]（[1]Grad.Sch.Eng.,Osaka Univ., [2]Indonesian Coffee and Cocoa Research Institute）

3B11a15　ピペロナール代謝酵素の精製

11:48　◦土居志織（筑波大院）

B11 会場　午後の部（14:00〜17:12）

微生物―代謝–代謝調節，発酵生理，メタボローム―

3B11p01　好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 の持つ Heterodisulfide reductase の機能に関する研究

14:00　◦石崎　優, 佐藤由也, 新井博之, 石井正治, 五十嵐泰夫（東大院農生科・応生工）

3B11p02　好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 の酸素耐性型 hydrogenase の機能解析

14:12　◦山口依里香，佐藤由也，新井博之，石井正治，五十嵐泰夫（東大農生科）

3B11p03　好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 の酸化ストレス防御酵素 bacterioferritin comigratory protein に関する研究

14:24　◦佐藤由也，新井博之，石井正治，五十嵐泰夫（東大院・農生科）

3B11p04　*Trichosporonoides megachiliensis* は 3 種の *glucose-6-phosphate dehydrogenase* をストレスの種類によって使い分けている

14:36　◦岩田悠志[1]，荻原　淳[1,2]，加藤　順[2]，春見隆文[1,2]（[1]日大院生資研究科・生資利用，[2]日大生資科・生命化）

3B11p05　枯草菌のコエンザイム A 生合成

14:48　◦緒形雄太，朝山宗彦，長南　茂（茨城大農）

3B11p06　鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* のロダネース様タンパク質の機能解析

15:00　◦上村一雄, 濱崎良太, スルタナシャーミン, 金尾忠芳（岡山大院環境生命）

3B11p07　アーキアが有する phosphoribulokinase ホモログの酵素学的解析

15:12　◦河野卓成，遠藤千夏子，横田明穂，蘆田弘樹（奈良先端大バイオ）

3B11p08　*Streptococcus bovis* のグルタミン酸脱水素酵素（GDH）特性について

15:24　◦安藤太助[1]，　菅原瑶子[2]，　西尾僚平[3]，　磯貝恵美子[4]，米山　裕[5]（[1]東北大院農，[2]東北大院農，[3]東北大院農，[4]東北大院農，[5]東北大院農）

3B11p09　メチトロトーフ酢酸菌 *Acidomonas methanolica* における炭素源に応答した呼吸鎖電子伝達系の変換

15:36　幡田准也，丸山雅史，◦阿野嘉孝（愛媛大・農）

3B11p10　*Acetobacter* 属酢酸菌における AarC の機能の検証
15:48　貝沼(岡本)章子[1]，○山本有紀[1]，石川森夫[1]，志波　優[2]，吉川博文[2,3]，伊藤公一[4]，小泉幸道[1]（[1]東農大応生科・醸造，[2]東農大・ゲノムセンター，[3]東農大応生科・バイオ，[4]ミツカン中研）

3B11p11　酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 株における基幹代謝経路の動作機序
16:00　貝沼(岡本)章子[1]，○吉田将也[1]，石川森夫[1]，小寺義男[2]，大石正道[2]，前田忠計[2]，伊藤公一[3]，小泉幸道[1]（[1]東農大応生科・醸造，[2]北里大・理，[3]ミツカン中研）

3B11p12　酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 株における GntR の機能
16:12　貝沼(岡本)章子[1]，○石川泰平[1]，石川森夫[1]，志波　優[2]，吉川博文[2,3]，伊藤公一[4]，小泉幸道[1]（[1]東農大応生科・醸造，[2]東農大・ゲノムセンター，[3]東農大応生科・バイオ，[4]ミツカン中研）

3B11p13　A Role of Transcriptional Regulator LldR in the Glutamate Metabolism in *Corynebacterium glutamicum*
16:24　○Tanyanut SUPKULSUTRA，Tomoya MAEDA，Kosuke KUMAGAI，Masaaki WACHI（Tokyo Inst. of Tech.）

3B11p14　*Corynebacterium glutamicum* がグルタミン酸を排出する生理的意義の解析
16:36　○高田明香，山下周子，和地正明（東工大院生命理工）

3B11p15　*Corynebacterium glutamicum* のオキサロ酢酸供給強化に向けた代謝改変
16:48　○萩原拓也，下野雄太，澤田和典，和田　大，横田　篤（北大院農・応生科）

3B11p16　放線菌の新規窒素代謝の生理的意義
17:00　○小口　悠[1]，小林卓矢[1]，高谷直樹[2]，矢嶋俊介[1]，祥雲弘文[1]，池田治生[3]，高野英晃[4]，大澤貫寿[1]，佐々木康幸[1]（[1]東農大応生，[2]筑波大・生命研，[3]北里大・北里生命研，[4]日大生資科・生命セ）

B12 会場　午前の部（9:36〜12:00）

微生物—細胞–情報伝達，細胞応答，ストレス—

3B12a04　病原真菌 *Aspergillus fumigatus* の胞子におけるストレス耐性機構の解析
9:36　○萩原大祐，五ノ井透，川本　進（千葉大真菌センター）

3B12a05　糸状菌 *Aspergillus nidulans* リン酸基中間因子 YpdA とレスポンスレギュレーター SskA，SrrA の関係性の解明
9:48　○緑川裕良[1]，萩原大祐[3]，中山真由美[2]，吉見　啓[2]，阿部敬悦[1,2]（[1]東北大院・生物産業創成，[2]東北大・未来研，[3]千葉大・真菌センター）

3B12a06　糸状菌 *Cryphonectria parasitica* の低分子量 GTP 結合タンパク質
10:00　○望月翔子[1]，山内優輝[1]，後藤由貴[1]，高橋拓也[1]，鈴木信弘[2]，笠原　紳[1]（[1]宮城大・食産業・環境，[2]岡山大・資植研）

3B12a07　酵母の鉄硫黄クラスタータンパク質形成に関わる Tah18 タンパク質の NOS 様活性の制御機構
10:12　○川原寛弘，西村　明，高木博史（奈良先端大バイオ）

3B12a08　出芽酵母におけるチオレドキシンの生理学的役割
10:24　○奥　公秀，島並祐子，阪井康能（京都大学大学院　農学研究科　応用生命科学専攻）

3B12a09　遺伝子発現プロファイル解析により示された *Saccharomyces cerevisiae* における圧力感受性と呼吸欠損の関連性
10:36　○野村一樹[1]，岩橋　均[1]，井口晃徳[2]，重松　亨[2]（[1]岐阜大院連農，[2]新潟薬大応生科）

3B12a10　*Saccharomyces cerevisiae* UV 変異株の圧力損傷からの回復機能に関わる変異の解析
10:48　○南波　優[1]，野村一樹[1]，斎木朋恵[1]，木戸みゆ紀[2]，林真由美[1]，井口晃徳[1]，重松　亨[1]（[1]新潟薬大・応生科，[2]新潟産業創造機構）

3B12a11　出芽酵母のアセトアルデヒド耐性機構における NADP 依存型アセトアルデヒド脱水素酵素の役割
11:00　○松山明加[1]，松藤淑美[2]，太田真由美[3]，早川享志[1,3]，中川智行[1,3]（[1]岐阜大院応生，[2]岐阜大，[3]岐阜大応生）

3B12a12　過酷な環境から単離された藻類の環境ストレス耐性機構
11:12　○二ノ宮千夏，甫木隼貴，高橋妙華，尾関　海，加藤ひとみ，新村洋一，川崎信治（東農大応生科）

3B12a13　植物抗菌性蛋白質 AFP1 の標的認識部位の同定
11:24　○小黒芳史，山崎晴丈，高木正道，高久洋暁（新潟薬大応生科）

3B12a14　高温条件下における耐熱酵母の阻害剤に対する検討
11:36　○村田善則[1]，アピワタナピワットワラポーン[2]，廣岡明子[1]，ダンジャレーンハタイラット[2]，ラグサワ—ンプラパソン[2]（[1]国際農研センター，[2]カセサート大・生産改良研究所）

3B12a15　DNA マイクロアレイを用いたタイプ B トリコテセン系マイコトキシンの毒性評価
11:48　○鈴木忠宏，岩橋由美子（農研機構 . 食総研）

B12 会場　午後の部（14:00〜17:36）

微生物—細胞–情報伝達，細胞応答，ストレス—

3B12p01　微生物が分泌するメンブランベシクル(膜小胞体)の解析
14:00　○豊福雅典，内山裕夫，野村暢彦（筑波大院生命環境）

3B12p02　*Rhodococcus* 属細菌の糖脂質合成は二成分制御系によって制御される
14:12　○稲葉知大，菊子拓真，中島敏明，内山裕夫，野村暢彦（筑波大院生命環境）

3B12p03　ロドコッカス属細菌の微生物凝集には細胞外 DNA が関与する
14:24　○長田啓司，菊子拓真，稲葉知大，中島敏明，内山裕夫，野村暢彦（筑波大院生命環境）

3B12p04　細胞間シグナル物質による緑膿菌バイオフィルム脱離の誘導
14:36　○伊藤聡志，柿原健佑，豊福雅典，中島敏明，内山裕夫，野村暢彦（筑波大院生命環境）

3B12p05　嫌気環境下における緑膿菌の Biofilm 形成メカニズムの解析
14:48　○清川達則，豊福雅典，八幡　穣，内山裕夫，野村暢彦（筑波大院生命環境）

3B12p06　毒素産生及び胞子形成に関与するグローバルな転写調節因子はウェルシュ菌バイオフィルム形成を制御する
15:00　○尾花　望，中村幸治，野村暢彦（筑波大生命環境）

3B12p07　*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株バイオフィルムの D-アミノ酸処理に対する挙動
15:12　○大田隼矢[1]，サンチェスゾイ[1]，青木真央[1]，谷　明生[2]，新谷政己[1]，金原和秀[1]（[1]静大・工，[2]岡大・植物研）

3B12p08　Purification and characterization of autoinducer-2-inactivating enzyme from *Eikenella corrodens*
15:24　○Minnatul KARIM[1]，Jasin MANSUR[1]，Ayako NAGAO[1]，Yuichiro NOIRI[2]，Shigeyuki EBISU[2]，Akio KATO[1]，Hiroyuki AZAKAMI[1]（[1]Yamaguchi Univ.，[2]Osaka Univ.）

3B12p09　Indole acts as an intergenus cross-talking signal between *Escherichia coli* and active indole-degrading *Burkholderia unamae* CK43B
15:36　○Dongyeop Kim[1]，Irnayuli R Sitepu[2]，Yasuyuki Hashidoko[1]（[1]Hokkaido Univ.，[2]FNRDC, Indonesia）

3B12p10　*Synechocystis* sp. PCC6803 の細胞外多糖生産を調節する機構解析
15:48　○冨永　昂，三浦のぞみ，佐伯千香，七谷　圭，魚住信之（東北大院工）

3B12p11　K^+トランスポーター Kup の輸送活性に必要な負電荷アミノ酸の同定
16:00　○清水　真[1]，七谷　圭[2]，浜本　晋[2]，黒澤友世[2]，水谷昭文[2]，魚住信之[2]（[1]東北大工，[2]東北大院工）

3B12p12　*Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸透過性機械受容チャネル NCgl1221 の gain-of-function 変異
16:12　○中山義敬，飯田秀利（東京学芸大教育）

3B12p13　大腸菌外膜リポ蛋白質輸送不全による Rcs リン酸リレー系に依存した lolA 転写活性化の機構
16:24　○垰　和之[1]，徳田　元[2]（[1]東京大 RI センター，[2]盛岡大栄養科学）

3B12p14　コリネ型細菌おける *gnd* 遺伝子の発現制御解析
16:36　○田中裕也，寺本陽彦，乾　将行，湯川英明（RITE）

3B12p15　コリネ型細菌 Riboflavin transporter 遺伝子の発現制御

16:48　◦竹本訓彦，田中裕也，乾　将行，湯川英明（RITE）

3B12p16　コリネ型細菌が有する 3 種のシキミ酸デヒドロゲナーゼの機能解析

17:00　◦久保田健，田中裕也，平賀和三，乾　将行，湯川英明（RITE）

3B12p17　コリネ型細菌を利用した，アニリンを生成可能な脱炭酸酵素の探索と解析

17:12　◦藤倉慶太郎[1,2]，平賀和三[1]，乾　将行[1]，湯川英明[1]（[1]RITE，[2]住友ゴム工業(株)）

3B12p18　コリネ型細菌におけるプラスミドの構造不安定性に関わる遺伝子の同定

17:24　◦北出幸広，沖野祥平，郡司　渉，平賀和三，須田雅子，沖部奈緒子，鈴木伸昭，乾　将行，湯川英明（RITE）

B13 会場　午前の部（9:00〜12:00）

微生物—遺伝子–発現制御，トランスクリプトーム—

3B13a01　胞子形成欠損を示す枯草菌 S10 リボソームタンパク質遺伝子，*rpsJ*，変異体の単離と解析

9:00　◦鈴木祥太[1]，　難波恵理[1]，　矢野晃一[1]，　赤沼元気[2]，吉川博文[3]，関根靖彦[1]，河村富士夫[1]（[1]立教大・理・生命理，[2]中央大・理工・応用化学，[3]東農大・応生科・バイオ）

3B13a02　枯草菌の緊縮応答制御時，定常期，胞子形成期の三期におけるダイマーリボソーム形成

9:12　◦田上和美[1]，　渡辺和哉[1]，　尾崎克也[2]，　花井　亮[1]，河村富士夫[1]（[1]立教大学理学部生命理学科，[2]花王生科研）

3B13a03　枯草菌の胞子形成期において EndoA が rRNA の分解に関与する

9:24　◦渡辺和哉，矢野晃一，田上和美，河村富士夫（立教大学理学部生命理学科）

3B13a04　ビフィズス菌のリボゾーム結合部位の解析と翻訳効率の向上

9:36　◦鈴木　徹，賀　建龍，坂口広大（岐阜大学連合農学研究科）

3B13a05　大腸菌 RNA ポリメラーゼ RpoA タグ株のリボソーム形成能の解析

9:48　◦平　優季[1]，片山　映[3]，矢野晃一[4]，河村富士夫[4]，石浜　明[1,2]，山本兼由[1,2]（[1]法政大学・生命科学，[2]マイクロナノセンター，[3]日本医科大学院・医，[4]立教大学・理，生命理学研究センター）

3B13a06　大腸菌の酸性と嫌気環境へ同時に適応する分子機構

10:00　◦山中　幸[1]，石浜　明[2]，山本兼由[1,2]（[1]法政大生命科学，[2]マイクロナノセンター）

3B13a07　口腔内連鎖球菌 *Streptococcus mutans* における RNA ポリメラーゼ結合タンパク質を介した酸素応答機構の解析

10:12　◦安部達也，高橋　徹，市村浩樹，粕谷晴美，山本裕司，向井孝夫（北里大・獣医）

3B13a08　LysR ファミリー転写制御因子 TTC1871 の機能解析

10:24　◦松下　創，富田武郎，葛山智久，西山　真（東大・生物工学セ）

3B13a09　*Pseudomonas putida* のペルオキシレドキシン AhpC 遺伝子（*ahpC*）の調節機構の解析

10:36　伊藤史浩[2]，　田村知佳[1]，　小林絵梨[1]，　◦志川佳奈美[1]，福森文康[1]（[1]東洋大生命，[2]東洋大院生命）

3B13a10　細胞外電子伝達に関与する外膜シトクロム遺伝子の発現制御機構の解析

10:48　◦笠井拓哉，高妻篤史，渡邉一哉（東薬大生命）

3B13a11　鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* におけるテトラチオン酸ハイドロラーゼ遺伝子の転写と制御に関する研究

11:00　◦金尾忠芳[1]，伊藤　恵[2]，村上知佐[3]，上村一雄[1]（[1]岡山大院環境生命，[2]岡山大農，[3]岡山大院自然）

3B13a12　*Bacillus megaterium* の光応答：カロテノイド生産の光誘導と細胞外粘性物質生産の光抑制

11:12　◦見世　光，高野英晃，上田賢志（日大生資科・生命セ）

3B13a13　枯草菌におけるラムノース異化に関わる遺伝子群の発現制御機構の解析

11:24　◦広岡和丈，枝廣貴成，木村晃輔，藤田泰太郎（福山大生命工・生物工）

3B13a14　転写開始機構に内在する熱ショック応答モデルの提唱

11:36　◦佐藤　絢[1]，　岩本裕太[1]，　松本貴嗣[2]，　小林郷菜[1]，小川陸雄[1]，渡辺　智[1]，千葉櫻拓[1]，吉川博文[1]（[1]東京農大・応生科・バイオ，[2]東京農大・ゲノム解析セ）

3B13a15　枯草菌における熱ショック応答と転写開始点の網羅的な解析

11:48　◦松本貴嗣[1]，吉川博文[1,2]（[1]東京農大ゲノム解析セ，[2]東京農大応生科・バイオ）

B13 会場　午後の部（14:00〜18:00）

微生物—遺伝子–発現制御，トランスクリプトーム，細胞–構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子—

3B13p01　メチロトローフ酵母 Zn(II)$_2$Cys$_6$型転写活性化因子 CbMpp1p のメタノール誘導性プロモーター領域への結合

14:00　田畑一巌，◦由里本博也，阪井康能（京大院農･応用生命）

3B13p02　出芽酵母ターミネーター活性の網羅的な評価

14:12　◦松山　崇，　山西　守，　伊藤洋一郎，　今村千絵，片平悟史，池内暁紀（(株)豊田中央研究所）

3B13p03　*Trichoderma reesei* のセルラーゼ誘導物質認識および取り込み系に関する研究

14:24　◦古川隆紀，日下秀行，志田洋介，小笠原渉（長岡技科大生物）

3B13p04　*Trichoderma reesei* のセルラーゼ生産に関与するラクトーストランスポーターの同定と機能解析

14:36　◦谷口大樹[1]，Juliano de Oliveira Porciuncula[2]，古川隆紀[3]，志田洋介[4]，小笠原渉[5]（[1]長岡技科大　生物，[2]長岡技科大　生物，[3]長岡技科大　生物，[4]長岡技科大　生物，[5]長岡技科大　生物）

3B13p05　Regulation of cellulolytic genes by interaction of transcription factors McmA and ManR in *Aspergillus nidulans*

14:48　◦Nuo Li[1]，　Miki AOYAMA[1]，　Masahiro OGAWA[2]，Kyoko KANAMARU[1]，Makoto KIMURA[1]，Yasuji KOYAMA[2]，Tetsuo KOBAYASHI[1]（[1]Nagoya Univ.，[2]Kikkoman Corp.）

3B13p06　*Aspergillus aculeatus* セロビオース応答因子 ClbR とそのパラログ因子 ClbR2 の機能解析

15:00　◦川村彩乃，國武絵美，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大院　生環科）

3B13p07　糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるセルラーゼ生産の pH 依存的制御

15:12　◦宮本健太郎，青山未来，金丸京子，木村　真，小林哲夫（名大院生命農）

3B13p08　糸状菌 *Aspergillus nidulans* における糖飢餓条件に応答したセルラーゼ遺伝子群発現制御メカニズムの解析

15:24　◦浅井雄一郎[1]，　小川真弘[2]，　金丸京子[1]，　木村　真[1]，小山泰二[2]，小林哲夫[1]（[1]名大院生命農，[2]キッコーマン）

3B13p09　*Aspergillus nidulans* 転写因子 ManR ManS 遺伝子によるマンナナーゼ生産制御

15:36　◦渡邉亜也子[1]，　青山未来[1]，　小川真弘[2]，　金丸京子[1]，木村　真[1]，小山泰二[2]，小林哲夫[1]（[1]名大院生命農，[2]キッコーマン株式会社）

3B13p10　麹菌ペントース代謝経路の遺伝子破壊による検証と新規遺伝子による補完

15:48　◦井上泰宏，渥美元規，金丸京子，木村　真，小林哲夫（名大院生命農）

3B13p11　麹菌における炭素源依存的な CreA タンパク質量の制御

16:00　◦田中瑞己，新谷尚弘，五味勝也（東北大院農）

3B13p12　*Aspergillus* の転写因子 AtrR は薬剤排出 ABC トランスポーター遺伝子とエルゴステロール生合成酵素遺伝子の発現を制御する

16:12　◦大場　歩[1]，清水公徳[2]，萩原大祐[2]，新谷尚弘[1]，川本　進[2]，五味勝也[1]（[1]東北大院農・生物産業創成，[2]千葉大・真菌センター）

3B13p13　麹菌 GABA パーミアーゼの解析

16:24　◦佐野元昭，北川治恵，大箸信一（金沢工大）

3B13p14　糸状菌 *Aspergillus nidulans* における α-1, 3-グルカ

ンの生物学的役割

16:36 ○稲葉　梓[1]，吉見　啓[2]，阿部敬悦[1,2]（[1]東北大院農・生物産業創成，[2]東北大・未来研）

3B13p15 ***Aspergillus nidulans*** **における** ***α*****-1,3 グルカン 欠損株の高密度培養性と物質生産性の評価**

16:48 ○一杉昌玄[1]，吉見　啓[2]，稲葉　梓[1]，萩原　開[1]，阿部敬悦[1,2]（[1]東北大院農，[2]東北大未来研）

3B13p16　酵母の脂肪滴動態における Atg8 の機能解析

17:00 ○前田佑一郎，奥　公秀，阪井康能（京大院農）

3B13p17 ***Lactobacillus gasseri*** **SBT2055 由来 aggregation-promoting factor1（APF1）のフィブロネクチン結合特性の評価**

17:12 ○西山啓太[1]，　遠藤沙織[1]，　中里彩季子[1]，　瀬戸康幸[2]，中島　肇[2]，山本裕司[1]，向井孝夫[1]（[1]北里大獣，[2]雪印メグミルク・ミルクサイエンス研）

3B13p18 ***Lactobacillus gasseri*** **JCM1131^{T} に見出された新規なリポテイコ酸の構造**

17:24 ○白石　宗[1]，横田伸一[2]，森田直樹[3]，吹谷　智[1]，冨田　理[4]，田中尚人[5]，岡田早苗[5]，横田　篤[1]（[1]北大院農・応生科，[2]札医大医・微生物，[3]産総研・生物プロセス，[4]NIZO food research，[5]東農大・応生科）

3B13p19 ***Lactococcus lactis*** **ssp.** ***lactis*** **C59 株の細胞表層に存在するルテニウムレッド結合因子**

17:36 ○鈴木チセ，木元広実，小林美穂（農研機構・畜草研）

3B13p20　細胞性粘菌の細胞質分裂に関わるタンパク質 nenkyrin（D411-2p）と相同領域を持つタンパク質の機能解析

17:48 ○稲葉弘哲，依田幸司，足立博之（東京大院農生科・応生工）

B14 会場　午前の部（9:00〜12:00）

微生物—遺伝子–構造，機能—

3B14a01　セルラーゼ分泌性 ***Streptomyces*** **属放線菌からのセルラーゼ遺伝子群の単離・解析および異種放線菌と大腸菌における発現**

9:00 ○友常久実子[1]，　土田美帆[1]，　春日　和[1]，　小林正之[1]，上松　仁[2]，池田治生[3]，石川　淳[4]，小嶋郁夫[1]（[1]秋田県大院，[2]秋田工業高等専門学校，[3]北里大・北里生命研，[4]感染研・生物活性物質）

3B14a02 ***Pseudomonas putida*** **の** ***dnaJ*** **欠損株の作出とその解析**

9:12 ○伊藤史浩[1]，近藤　亮[2]，福森文康[2]（[1]東洋大院・生命，[2]東洋大・生命）

3B14a03 ***Pseudomonas putida*** **の** ***htpG*** **および** ***clpB*** **欠損株の作出とその解析**

9:24 伊藤史浩[2]，○鈴木由人[1]，槇石隆志[1]，稲葉雅人[1]，福森文康[1]（[1]東洋大生命，[2]東洋大院生命）

3B14a04 ***Geobacillus kaustophilus*** **HTA426 において DNA 変異を誘発する遺伝子改変**

9:36 ○鈴木宏和，古川　恵（九大院農）

3B14a05　Analysis of the essential gene for a linear topology of the ***Streptomyces rochei*** **replicons**

9:48 ○Yosi NINDITA[1]，　Zhisheng CAO[1]，　Yuh SHIWA[2]，Hirofumi YOSHIKAWA[2]，Kenji ARAKAWA[1]，Haruyasu KINASHI[1]（[1]Hiroshima Univ.，[2]Tokyo Univ. Agri.）

3B14a06　放線菌線状プラスミド SAP1 上の接合伝達関連遺伝子の機能解析

10:00 ○遠藤翔太[1]，池田治生[2]，片岡正和[1]（[1]信州大工，[2]北里大北里生命研）

3B14a07　人為起源環境汚染物質分解能を有するスフィンゴモナス細菌群のゲノムと可動性遺伝因子に関する研究

10:12 ○永田裕二，田端理朗，大畑智史，大坪嘉行，津田雅孝（東北大院生命）

3B14a08　γ-HCH 分解細菌 ***Sphingomonas*** **sp. MM-1 株が有する多重プラスミドに関する研究**

10:24 ○田端理朗，大畑智史，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大院生命科学研究科）

3B14a09　放線菌伝達性プラスミド pSN22 上にコードされる伝達関連遺伝子 ***traA*** **の機能解析**

10:36 ○神戸麻依，片岡正和（信州大院理工）

3B14a10 ***Streptomyces nigrifaciens*** **由来の伝達性プラスミド pSN22 における TraB の ATP 利用と接合伝達機能の関連性**

10:48 ○伏屋友希弘，宮武　徹，片岡正和（信州大院工）

3B14a11　IncP-9 群 NAH7 接合伝達系の oriT を中心とした解析

11:00 ○岸田康平[1]，井上　慧[1]，宮崎　亮[2]，大坪嘉行[1]，永田裕二[1]，津田雅孝[1]（[1]東北大学，[2]ローザンヌ大学）

3B14a12　IncP-7 群プラスミド pCAR1 の接合伝達に関与する ORF145 および ORF146 の機能解析

11:12 ○新谷政己[1,2]，徳丸裕樹[2]，金原和秀[1]，野尻秀昭[2]（[1]静大・工，[2]東大・生物工学セ）

3B14a13　IncP-1 不和合性群内におけるプラスミド宿主域の多様化

11:24 ○矢野大和[1,2]，　ノックスモーリー[1]，　ロジャーズリンダ[1]，ブラウンセレスト[1]，トップエヴァ[1]（[1]アイダホ大学 IBEST，[2]東大院新領域）

3B14a14　放線菌ファージ TG1 インテグラーゼによる微生物ゲノムへの部位特異的遺伝子導入

11:36 ○石澤崇昭[1]，室井哲朗[1]，平野展孝[1,2]，高橋秀夫[3]，春木　満[1]（[1]日大・工・生命応化，[2]JST・PRESTO，[3]日大・生資・応生科）

3B14a15 ***Lactococcus lactis*** **の新規シトシン特異的 DNA メチル化酵素遺伝子**

11:48 ○小林美穂，　萩　達朗，　野村　将，　木元–新良広実，守谷直子，鈴木チセ（畜草研）

B14 会場　午後の部（14:00〜17:36）

微生物—遺伝子–構造，機能，ゲノム解析，メタゲノム，プロテオーム—

3B14p01　枯草菌ファージ防御遺伝子 ***nonA*** **の転写制御と機能解析**

14:00 ○山本達也[1]，イーリーメン[2]，朝井　計[3]，中村幸治[1]（[1]筑波大院生命環境，[2]東大生物工学セ，[3]埼玉大院理工）

3B14p02　酢酸菌 ***Gluconacetobacter europaeus*** **における遺伝子破壊系の構築**

14:12 ○赤坂直紀[1]，佐古田久雄[1]，秀瀬涼太[3]，藤原伸介[2,3]（[1]マルカン酢株式会社，[2]関西学院大理工生命科学，[3]関西学院大理工生命環境科学研究セ）

3B14p03　線状プラスミド SAP1 を用いた遺伝子クラスター輸送システムの構築

14:24 ○藤森友真[1]，松田卓也[1]，池田治生[2]，片岡正和[1]（[1]信州大院理工，[2]北里大北里生命研）

3B14p04　枯草菌 168 株における挿入配列への適応性の解明

14:36 ○原田翔太[1]，明石基洋[1]，志波　優[2]，吉川博文[1]（[1]東京農大・応生科・バイオ，[2]東京農大・ゲノム解析セ）

3B14p05　3′-5′ exonuclease ドメインを有する枯草菌 dinG の変異解析

14:48 ○明石基洋[1]，志波　優[2]，吉川博文[1]（[1]東京農大･応生科･バイオ，[2]東京農大・ゲノム解析セ）

3B14p06　PBP1B と MreB の同時欠損による大腸菌の溶菌機構の解析

15:00 ○松倉智史，小坂智恵，和地正明（東工大院生命理工）

3B14p07　好アルカリ性細菌の Na^{+}駆動型べん毛モーター固定子 MotPS への変異導入により中性環境での共役イオン透過を高めるアミノ酸残基の同定

15:12 ○高橋優嘉[1,2]，野口有希奈[1]，伊藤政博[1,2]（[1]東洋大院生命，[2]東洋大バイオナノ）

3B14p08　大腸菌の L-アラニン排出輸送体 YgaW の C 末端領域欠失誘導体の機能解析

15:24 ○伊原航平，金　世怜，堀　初弘，佐藤一樹，安藤太助，磯貝恵美子，米山　裕（東北大院農）

3B14p09　大腸菌のアラニン排出輸送体 YgaW のシステインレス変異体の作製と活性評価

15:36 ○金　世怜，堀　初弘，安藤太助，磯貝恵美子，米山　裕（東北大院農）

3B14p10　食用藍藻 ***Arthrospira*** **（*Spirulina*）** ***platensis*** **NIES-39 の制限修飾系** ***Apl*** **I の解析**

15:48 ○白石英秋，田伏洋介（京大院生命）

**3B14p11　緑膿菌おけるナフタレン誘導体に対して応答する遺伝

子群の解析

16:00 ○上田考摂[1]，大浦　啓[1]，李昇ウク[2]，野尻秀昭[2]，豊福雅典[1]，田代陽介[1]，中嶋敏明[1]，内山裕夫[1]，野村暢彦[1]（[1]筑波大・院・生命環境科，[2]東大・院・生物工学セ）

3B14p12　ルーメン細菌 *Selenomonas ruminantium* subsp. lactilytica TAM6421 株のゲノム解析

16:12 ○小野寺智子[1]，　山田(成田)佐知子[1,2]，　阿部直樹[1]，菅英一郎[1]，　児島征司[1]，　宮崎隆雄[1]，　小口晃央[2]，　安海明百[2]，市川夏子[2]，　中澤秀和[2]，　福井重広[2]，　高橋幹男[2]，　山崎秀司[2]，藤田信之[2]，神尾好是[1,3]，金子　淳[1]（[1]東北大院農･生物産業創成，[2]NITE，[3]東北大院生命）

3B14p13　L-乳酸高生産菌 *Enterococcus mundtii* QU25 株のゲノム解析

16:24 ○志波　優[1]，簗瀬弘明[2]，広瀬　侑[3]，児島友子[2]，星野英章[2]，渡辺　智[2]，　善藤威史[4]，　千葉櫻拓[2]，　園元謙二[4]，　門多真理子[2,5]，吉川博文[1,2]（[1]東農大・ゲノムセンター，[2]東農大応用生科・バイオ，[3]豊橋技科大・EIIRIS，[4]九大院・農，[5]武蔵野大・環境）

3B14p14　新規海洋性アクチノバクテリア YM16-304 株の全ゲノム解析

16:36 ○藤浪　俊[1,3]，　笠井宏朗[2]，　堀川博司[1]，　加藤裕美子[1]，原田健史[1]，　細山　哲[1]，　関根光雄[1]，　宝田裕美[1]，　宮澤せいは[1]，中澤秀和[1]，藤田信之[1]（[1]NITE・バイオ，[2]北里大・海洋バイオ，[3]東洋大・バイオ・ナノ）

3B14p15　Phase I study of Asian Microbiome Project: Diversity of intestinal microbiota in Asian youngsters profiled by 16S rRNA gene pyrosequencing

16:48 ○Jiahui JIANG[1]，　Naoshige SAKAMOTO[1]，Koichi WATANABE[2]，　Kazunori MATSUDA[2]，　Takashi KURAKAWA[2]，Hirokazu TSUJI[2]，Fazheng REN[3]，Ying-Chieh TSAI[4]，Yuan-Kun LEE[5]，Sunee NITISINPRASERT[6]，Endang S. RAHAYU[7]，Chii-Cherng LIAO[8]，Kenji SONOMOTO[1]，Jiro NAKAYAMA[1]（[1]Kyushu Univ.，[2]Yakult Central Institute，[3]China Agric. Univ.，[4]National Yang-Ming Univ.，[5]National Univ.of Singapore，[6]Kasetsart Univ.，[7]Gadjah Mada Univ.，[8]Food Industry R&D Institute）

3B14p16　次世代シーケンサーを用いたスギヒラタケのゲノム及びトランスクリプトーム解析

17:00 ○鈴木智大[1]，　五十嵐香理[2]，　道羅英夫[1]，　染谷拓海[2]，高野知之[2]，　大前沙央理[3]，　平井浩文[3]，　矢野健太郎[2]，　河岸洋和[3,4]（[1]静大・遺伝子，[2]明大農・生命科，[3]静大農・応生化，[4]静大院・創造）

3B14p17　*Pleurotus* spp. とその新規種間雑種における遺伝的解析

17:12 ○原田慎嗣，石川真梨子，大内謙二，稲冨　聡（ホクト(株)きのこ総合研究所）

3B14p18　ゲノムシグネチャーを用いた麹菌の遺伝子解析

17:24 ○相良純一（金沢工業大学）

B21 会場　午前の部（9:00〜12:00）

微生物―細胞–複合微生物，共生微生物，難培養性微生物―

3B21a01　Ca^{2+}と Mg^{2+}がプラスミドの接合伝達に与える影響の定量的評価

9:00 ○松井一泰[1]，新谷政己[2]，岡田憲典[1]，山根久和[3]，野尻秀昭[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]静大・工，[3]帝京大・理工）

3B21a02　環境条件がプラスミドの接合伝達頻度に与える影響の解析

9:12 ○李　美英[1]，松井一泰[1]，新谷政己[2]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]静大・工）

3B21a03　環境細菌群集の解析・改良に利用可能なプラスミドの取得

9:24 ○柳田晃輔[1]，松井一泰[1]，新谷政己[2]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]静大・工）

3B21a04　シロアリ腸内共生細菌の 1 細胞解析

9:36 ○雪　真弘[1,2]，新谷政己[2,3]，大熊盛也[1,2]（[1]理研 BMEP，[2]理研 BRC-JCM，[3]静岡大・工）

3B21a05　ジャガイモに優占的な共生細菌群の生化学的特性と組織局在性

9:48 ○大和田琢二[1]，　梨本智也[1]，　八木星伍[1]，　蓮見圭悟[1]，染谷信孝[2]（[1]帯畜大・食品科学，[2]農研機構・北農研）

3B21a06　メタン資化性細菌－ウキクサ共生系によるメタン酸化

10:00 ○井口博之[1]，　梅田涼平[1]，　多賀寛樹[1]，　由里本博也[1]，小山時隆[2]，阪井康能[1]（[1]京大院・農・応用生命，[2]京大院・理・植物）

3B21a07　アカシソ種子由来 *Methylobacterium* sp. OR-01 株のアカシソ上での動態

10:12 ○水野雅之[1]，　井口博之[1]，　谷　明生[2]，　由里本博也[1]，阪井康能[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]岡山大・植物研）

3B21a08　水回りに発生するピンクぬめり構成細菌によるバイオフィルム形成の解析

10:24 ○諸星知広，徐　芳芳，山口友香，王　文昭，池田　宰（宇都宮大院工）

3B21a09　大腸菌のコロニー形成能を失った変異株の性質

10:36 ○三井智玄，納庄一樹，高丸玲子，小川哲弘，日高真誠，正木春彦（東大院農）

3B21a10　アミノ酸資化性酢酸還元菌と還元的酢酸生成菌の共培養系の構築

10:48 ○阿藤　真，石井正治，五十嵐泰夫（東大院農生･応生工）

3B21a11　*Bradyrhizobium japonicum* USDA110 の La^{3+}依存型のメタノール生育と根粒形成に関する研究

11:00 ○三井亮司，松崎亮平，大谷由起，田中三男（岡山理大理）

3B21a12　Oryza longistaminata X O. sativa　交雑後代系統と窒素固定微生物の関係解明

11:12 ○白　啓鈴[1]，磯田玲華[1]，工藤亮太[1]，前川雅彦[2]，橋床泰之[1]（[1]北海道大院農，[2]岡山大資源植物科学所）

3B21a13　ガンコウランリターがスウェーデン高山森林限界付近ツンドラ土壌微生物群集の窒素固定に及ぼす影響とその主要因子の探索

11:24 ○磯田玲華[1]，　原新太郎[1]，　小林　真[2]，　Giesler Reiner[3]，橋床泰之[1]（[1]北大院農，[2]横国院環，[3]Umea Univ.）

3B21a14　水生植物の成長を促進する新規根圏微生物の探索

11:36 ○牧野彩花[1]，　玉木秀幸[1]，　田中靖浩[2]，　遠山　忠[2]，森　一博[2]，池　道彦[3]，森川正章[4]，鎌形洋一[1]（[1]産総研生物プロセス，[2]梨大院医工，[3]阪大院工，[4]北大院環境）

3B21a15　外生菌根菌の菌糸生長を促進する宿主植物由来シグナル分子の探索

11:48 ○足立亜衣，加瀬谷泰介（公益財団法人　東洋食品研究所）

B21 会場　午後の部（14:00〜18:00）

微生物―細胞–複合微生物，共生微生物，難培養性微生物，その他―

3B21p01　*Lactobacillus reuteri* 腸管付着因子と受容体様因子の結合特性

14:00 ○松尾洋輔，梶川揚申，岡田早苗，佐藤英一（東農大応生科・化学）

3B21p02　ラフィノース摂食マウスの腸内フローラ解析とメタボローム解析

14:12 ○中西裕美子[1,2]，榎木満里奈[1,3]，森　雅代[1]，曽我朋義[1,2,4]，五十嵐喜治[5]，冨田　勝[1,2,4]（[1]慶大・先端生命研，[2]慶大・政策・メディア，[3]鶴岡中央高，[4]慶大・環境情報，[5]山形大・農）

3B21p03　マウス消化管内容物のマルチオミクス解析

14:24 ○山本優理[1,2]，中西裕美子[1,2]，村上慎之介[1,2]，野津量子[4]，植野昌未[4]，　日置恭司[4]，　高倉　彰[4]，　中東憲治[1,2]，　平山明由[1]，杉本昌弘[1,2,5]，曽我朋義[1,2,3]，伊藤　守[4]，野村達次[4]，福田真嗣[1,2]，冨田　勝[1,2,3]（[1]慶大・先端生命研，[2]慶大・政策・メディア，[3]慶大・環境情報，[4]実中研，[5]京大・医科研）

3B21p04　食事と加齢が腸内環境に与える影響についてのマルチオミクス解析

14:36 ○石井千晴[1,2]，中西裕美子[1,2]，村上慎之介[1,2]，野津量子[4]，植野昌未[4]，　日置恭司[4]，　高倉　彰[4]，　中東憲治[1,2]，　平山明由[1,2]，曽我朋義[1,2,3]，伊藤　守[4]，野村達次[4]，福田真嗣[1,2]，冨田　勝[1,2,3]（[1]慶大・先端生命研，[2]慶大・政策・メディア，[3]慶大・環境情報，[4]実中研）

3B21p05　豚ふん尿通気処理過程で出現する *Acholeplasma* 属細菌の機能と処理過程におけるその存在の普遍性

14:48 ○花島　大[1]，堀　知行[2]，前田高輝[1]，青柳　智[2]，森岡理紀[1]（[1]農研機構・北農研，[2]産総研つくば）

3B21p06　メタン集積培養におけるメタン酸化菌とメタノール資化性菌の共生関係

15:00 ○下村義典[1]，　山岸卓弥[1]，　久後貴寛[2]，　北川　航[1,3]，片山泰樹[4]，　佐藤朋之[3]，　田中みち子[1]，　浅野行蔵[1]，　鎌形洋一[1,3]（[1]北大院農，[2]北大農，[3]産総研・生物プロセス，[4]産総研・地圏資源）

3B21p07　高濃度セシウムが土壌微生物動態へ及ぼす影響

15:12 ○呉屋恵里[1]，　加藤創一郎[1,2]，　菊池義智[1,2]，　北川　航[1,2]，田中みち子[1]，浅野行蔵[1]，鎌形洋一[1,2]（[1]北大院農・応生科，[2]産総研・生物プロセス）

3B21p08　アルミニウム・重金属耐性菌 *Pullulanibacillus* 属細菌 CA42 株の生産するアルミニウム，金属吸着性多糖の機能・構造

15:24 佐藤准貴，○相澤朋子，浦井　誠，砂入道夫（日大生資科）

3B21p09　ドクゼリの重金属吸着能と *Paenibacillus* 属が生産する EPS との関係性の解析

15:36 ○市橋明大，大嶋俊介，長田賢志，山路恵子，野村暢彦（筑波大・院・生命環境系）

3B21p10　シグナル物質を用いた活性汚泥の硝化活性向上の検討

15:48 ○河嶋伊都子[1]，　豊福雅典[1]，　小林裕子[1]，　橋本英樹[2]，稲葉康平[2]，内山裕夫[1]，野村暢彦[1]（[1]筑波大院・生命環境系，[2]住友重機械工業(株)技術研究所）

3B21p11　放射性セシウムの糞便における濃縮と腸内細菌による放射性セシウムの取り込み

16:00 ○磯貝恵美子[1]，　関根　勉[1]，　鈴木理絵[1]，　黒田健吾[1]，渡邊裕一[1]，　福田智一[1]，　木野康志[1]，　福本　学[1]，　山城秀昭[2]，阿部靖之[3]，小林　仁[4]（[1]東北大，[2]新潟大，[3]山形大，[4]宮城大）

3B21p12　土壌常在菌によるセシウム取り込み機構の解析

16:12 ○根岸真之[1]，　張　鵬堯[1]，　井戸田陽子[1]，　矢野健太郎[1]，森本かおり[1]，辻　　彰[2]，荻原琢男[1]（[1]高崎健康福祉大学薬学部，[2]金沢大学薬学部）

3B21p13　細菌芽胞に対する乳化剤の抗菌効果における脂肪酸鎖長の影響

16:24 ○島谷佳奈果[1]，　野中　愛[2]，　池田圭亮[2]，　倉八正篤[2]，中山素一[1]，人見　潤[1]，宮本敬久[3]（[1]花王(株) 安全性評価研，[2]九大院生資環，[3]九大院農院）

3B21p14　選択的リグニン分解菌のバニリンに対する細胞応答

16:36 ○渡邊崇人，森賢一郎，木戸彩子，長谷川隆大，和泉千尋，津田孝子，西村裕志，渡辺隆司（京大・生存研）

3B21p15　マイタケ由来グルタミン酸デカルボキシラーゼの精製と性質

16:48 ○白坂憲章，岩本和子，福田泰久（近大院農）

3B21p16　新規腋臭菌 *Anaerococcus* sp. 株の発見

17:00 ○篠崎純子，藤井孝吉，梶浦貴之，岩崎敬治，不藤亮介（味の素(株)イノベーション研）

3B21p17　新規腋臭抑制剤ペンタガロイルグルコースの発見と皮膚細菌叢への影響

17:12 ○藤井孝吉[1]，篠崎純子[1]，久永真央[2]，梶浦貴之[1]，岩崎敬治[1]，津田孝雄[2]，不藤亮介[1]（[1]味の素(株)イノベーション研，[2](有)ピコデバイス）

3B21p18　黄色ブドウ球菌の 2 成分性膜孔形成血球崩壊毒素 S 型成分の細胞特異性に関与する領域の解析

17:24 ○竹下珠由[1]，田中良和[2]，神尾好是[3]，金子　淳[1]（[1]東北大院農，[2]北大院先端生命科学，[3]東北大院生命科学）

3B21p19　ノロウイルス様中空粒子の腸上皮細胞株 Caco-2 への結合に関与するタンパク質のプロテオミクス解析

17:36 ○村上耕介[1]，　岡智一郎[1]，　下池貴志[1]，　藤井克樹[1]，朴　英斌[1]，戸高玲子[1]，脇田隆字[1]，松田　幹[2]，片山和彦[1]（[1]感染研ウイルス 2，[2]名大院生命農）

3B21p20　*Bacillus thuringiensis* が産生するがん細胞傷害性タンパク質の担癌マウスに対する抗腫瘍効果

17:48 ○奥村史朗[1]，古賀浩徳[2]，井上國世[3]，水城英一[1]（[1]福岡県工技セ，[2]久留米大医・内科学，[3]京大院農・食品生物）

B22 会場　午前の部（9:00〜12:00）

微生物―物質生産–醸造，発酵（一次代謝産物）―

3B22a01　泡盛の伝統的熟成法「仕次ぎ」による泡盛品質への影響の解析

9:00 ○塚原正俊[1,2]，　冨木崇史[1]，　當間士紋[1]，　伊波朋哉[1]，鼠尾まい子[1]（[1](株)バイオジェット，[2]沖縄県酒造組合仕次ぎ検討委員会）

3B22a02　α-エチル-D-グルコシド高含有焼酎仕込法の開発

9:12 ○宮西史則，関澤今日子，浜中大夢，尾関健二，大箸信一（金沢工大・ゲノム研）

3B22a03　清酒及びみりんのフェルラ酸エチルの生成について

9:24 ○橋爪克己，伊藤俊彦，石塚隆弘，武田尚基（秋田県大・生物資源）

3B22a04　清酒醸造における放射性セシウムとカリウムの挙動

9:36 ○奥田将生[1]，橋口知一[1]，上用みどり[1]，塚本　香[1]，遠藤路子[1]，松丸克己[1]，後藤奈美[1]，山岡　洋[1]，下飯　仁[1]，鈴木賢二[2]（[1]酒総研，[2]福島県ハイテクプラザ）

3B22a05　清酒老香の主成分 Dimethyl trisulfide の生成に影響を与える製造条件の統計解析

9:48 ○佐々木慧[1,2]，　藤井　力[1,2]，　西堀奈穂子[2]，　金井宗良[2]，磯谷敦子[2]，山田　修[2]，後藤奈美[1,2]（[1]広大院・生物圏，[2]酒総研）

3B22a06　清酒の低分子オリゴペプチドの網羅的解析

10:00 ○高橋　圭[1]，徳岡昌文[2]，河野弘美[1]，澤村宣子[1]，妙見夕佳[1]，岩下和裕[1]（[1]酒総研，[2]東農大）

3B22a07　「LC-Q/TOF MS による醸造酒の分析法の開発とメタボローム解析」

10:12 ○森雄太郎[1,2]，豊浦利枝子[2]，徳岡昌文[3]，岩下和裕[1,2]（[1]広島大院・先端研，[2]酒総研，[3]東農大）

3B22a08　清酒粕保存における機能性成分の安定性についての検討

10:24 ○森本朋子[1]，　藤井　力[1]，　金井宗良[1]，　濱田由紀雄[2]，山田　修[1]（[1]酒総研，[2]日本酒造組合中央会）

3B22a09　黒麹菌の菌種が泡盛粕成分に及ぼす影響

10:36 ○渡邉泰祐[1]，　鼠尾まい子[2]，　當間士紋[2]，　冨木崇史[2]，外山博英[1]，塚原正俊[2]（[1]琉球大農・亜熱生資，[2]株式会社バイオジェット）

3B22a10　音響製麹米麹の酵素活性に及ぼす周波数と音量の影響

10:48 ○今山聖加，三枝敬明，寺本祐司（崇城大院）

3B22a11　無通風箱培養における酵素生産と菌体量の相関

11:00 ○伊藤一成[1]，五味勝也[2]，狩山昌弘[3]，三宅剛史[1]（[1]岡山県工技セ，[2]東北大院農・生物産業創成，[3]フジワラテクノアート）

3B22a12　米麹の酵素生産における蛋白質成分添加の影響

11:12 ○兼時健人，前橋健二，柏木　豊（東農大院農）

3B22a13　宮古島産酵母 MY17 株を用いた宮古島産糖蜜における発酵抑制要因の解析

11:24 ○中村　薫[1,2]，　藤井　力[1,2]，　京極理人[1,2]，　吉田聡子[1,2]，川本佑太[1,2]，寺本拓生[1,2]，奥島憲二[3]，山田　修[2]（[1]広大院・生物圏，[2]酒総研，[3]りゅうせき）

3B22a14　幻の湖－富士六湖（赤池）からの発酵性酵母の分離とワイン醸造特性

11:36 ○柳田藤寿，高橋千秋，乙黒美彩，岸本宗和（山梨大・ワイン科学研究センター）

3B22a15　伝統的な壺作り純米黒酢醸造における酢酸菌の多様性の解析

11:48 ○菅原圭悟[1]，　桜井健太[2]，　橋口和典[3]，　長野正信[3]，新井博之[1]，石井正治[1]，五十嵐泰夫[1]（[1]東大院農生科，[2]東大，[3]坂元醸造）

B22 会場　午後の部（14:00〜17:00）

微生物―物質生産–醸造，発酵（一次代謝産物）―

3B22p01　清酒酵母と乳酸菌の複合バイオフィルム形成と共凝集

14:00 土屋典子[1]，○平山　悟[1]，古川壮一[1]，渡辺大輔[2]，下飯　仁[2]，森永　康[1]（[1]日大院，[2]酒総研）

3B22p02　耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* における食塩依存的な産膜形成機構の解析

14:12 ○渡部　潤，上原健二，茂木喜信（ヤマサ醤油）

3B22p03　醤油の機能性香気成分 HEMF の高生産に関わる酵母遺伝子のスクリーニング

14:24 ○上原健二[1]，渡部　潤[1]，赤尾　健[2]，渡辺大輔[2]，茂木喜信[1]，下飯　仁[2]（[1]ヤマサ醤油株式会社，[2]酒総研）

3B22p04　低価値な農産物からの *Lipomyces* 酵母による油脂生産におよぼす培地組成の影響

14:36 ○田邉　聡[1]，柳場まな[1]，黒川博史[2]，浜本友佳[2]，大木　亨[2]，二階堂雅則[2]，前納克裕[2]，長沼孝文[1]（[1]山梨大院生命，[2]ライオン株式会社）

3B22p05　未精製グリセロールを炭素源とした *Lipomyces* 酵母による油脂生産

14:48 ○黒川博史[1]，大木　亨[1]，浜本友佳[1]，田邉　聡[2]，長沼孝文[2]，二階堂雅則[1]，大寺基靖[1]，前納克裕[1]（[1]ライオン株式会社，[2]山梨大院生命）

3B22p06　高温でエタノールを生産する酵母の探索

15:00 ○伴野太平，梶川揚申，佐藤英一，小玉健太郎，岡田早苗（東農大応生科・化学）

3B22p07　*Candida glabrata* 硫酸耐性変異株の分離と特性解析

15:12 ○中村敏英[1]，渡邉　樹[1]，島　　純[2]（[1]農研機構・食総研，[2]京都大・微生物科学）

3B22p08　産業プロセスに有用な酢酸ストレス耐性酵母の同定と耐性メカニズムの解析

15:24 ○田中晃一[1]，灰谷　豊[1]，吉山洋子[1]，山本まみ[2]，中村敏英[2]，安藤　聡[2]，小川　順[3]，島　　純[1]（[1]京大・微生物科学，[2]食総研，[3]京大院農・応用生命）

3B22p09　芳香族アミノ酸の代謝調節による酵母の酢酸ストレス耐性化戦略

15:36 田中晃一[1]，　小松崎典子[2]，　藤原しのぶ[2]，　日比　慎[3]，小川　順[4]，○島　　純[1]（[1]京大・微生物科学，[2]聖徳大・人間栄養，[3]京大院・農・産業微生物，[4]京大院・農・応用生命）

3B22p10　酵母のストレス耐性強化に向けたエルゴステロール蓄積増強に寄与する生合成遺伝子の探索

15:48 ○藤井茂貴[1]，櫻谷英治[1]，田中晃一[2]，小川　順[1]，島　　純[2]（[1]京大院農，[2]京大・微生物科学）

3B22p11　優良清酒酵母菌株の迅速かつ高精度な識別法の確立と保存菌株への適用

16:00 ○赤尾　健，周　　延，水野　恵，渡辺大輔，下飯　仁（酒総研）

3B22p12　清酒酵母特異的な *RIM15* 機能欠失変異による高発酵性メカニズムの解析

16:12 ○渡辺大輔[1]，　周　　延[1]，　平田愛子[2]，　大矢禎一[2]，藤谷典志[1]，赤尾　健[1]，下飯　仁[1]（[1]酒総研，[2]東大院新領域）

3B22p13　清酒酵母におけるリボソーム生合成調節因子 *SFP1* と発酵性に関する研究

16:24 ○周　　延，渡辺大輔，呉　　洪，赤尾　健，下飯　仁（酒総研）

3B22p14　*S.cerevisiae* の持つアルファーグルコシドトランスポーターの諸性質に関する研究

16:36 ○畠中治代[1]，大村文彦[1]，石黒正路[2]（[1]サントリービジネスエキスパート㈱微生物科学研，[2]新潟薬科大学　応用生命科学部）

3B22p15　清酒もろみから分離したリンゴ酸高生産清酒酵母の特性（その 2）

16:48 ○大場孝宏[1]，中山俊一[2]，田代康介[3]，久原　哲[3]（[1]福岡工技セ生物食品研，[2]東農大応生科，[3]九大院農）

B23 会場　午前の部（9:00〜11:48）

微生物—物質生産–酵素，タンパク質，細胞–栄養，生育，増殖—

3B23a01　酢酸菌 *Gluconacetobacter xylinus* NBRC 3288 におけるアルコール脱水素酵素サブユニットの欠損株作製と表現型の解析

9:00 ○向井妃奈[1]，薬師寿治[2]，松谷峰之介[2]，松下一信[2]（[1]山口大院農，[2]山口大農）

3B23a02　乳酸菌由来 Aspartate:Alanine 交換輸送体（AspT）の基質結合によるコンフォメーション間の競合

9:12 ○鈴木聡美[1]，木村拓哉[1]，笹原綾子[1]，七谷　圭[2]，阿部敬悦[3]（[1]東北大学院農，[2]東北大学院工，[3]東北大学未来研）

3B23a03　*Achromobacter obae* 由来アミノ酸アミドラセマーゼの基質特異性に関する研究

9:24 ○松村汐莉[1]，　丸山沙都子[1]，　大塚　稔[1]，　徳南宏祐[1]，鈴木淳巨[2]，岡崎誠司[3]，渡邉信久[2]，山根　隆[2]，米田英伸[1]，浅野泰久[1,3]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]名大院・工，[3]JST, ERATO）

3B23a04　N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）を含む新規オリゴ糖の酵素合成

9:36 ○重網麻依[1]，瀬能宙希[2]，和田　徹[1]，小森　航[2]，平野貴子[2]，袴田　航[1,2]，田代　充[3]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科･生物資源利用，[2]日大生資科・生命化，[3]明星大理工・化学）

3B23a05　腸内細菌 *Prevotella copri* 由来キシロシダーゼ 43A（Xyl43A）の特性解析

9:48 ○佐藤玲央奈，田中芳貴，佐々木謙次，林　秀謙（前橋工科大学）

3B23a06　*Bacteroides plebeius* の *Xyn10A* と *Xyl43A* の特性解析

10:00 ○佐々木謙次, 田中芳貴, 對馬裕誠, 田中裕興, 林　秀謙（前橋工科大院工）

3B23a07　椎茸菌体内の同質倍数核数増大に伴う微結晶セルロース分解力の向上

10:12 ○外山英男（南九州大学）

3B23a08　スーパーフォルダー GFP のジスルフィド架橋導入効果の検討

10:24 ○森　祐磨，須藤慎也，田村　隆，稲垣賢二（岡山大院・環境生命）

3B23a09　*Amphibacilus xylanus* における遊離フラビン関与の酸素代謝（第三報）

10:36 ○木俣真弥[1]，　望月大地[1]，　新井俊晃[1]，　藤田信之[2]，阿部　晃[3]，中川純一[4]，佐藤純一[1]，川崎信治[1]，新村洋一[1]（[1]東農大応生科・バイオ，[2]NITE，[3]札幌医大医・眼科，[4]東農大生物生産・食香）

3B23a10　緑膿菌のカイコへの病原性に対する一酸化窒素解毒酵素の役割

10:48 ○新井博之[1]，飯山和弘[2]，石井正治[1]，五十嵐泰夫[1]（[1]東大院農生科・応生工，[2]九大院・農）

3B23a11　緑膿菌における cbb_3型シトクロム *c* 酸化酵素への電子供与体に関する研究

11:00 ○平井猛博，石井正治，五十嵐泰夫，新井博之（東大院農生科・応生工）

3B23a12　好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* OCh114 の持つ alternative oxidase の機能解析

11:12 ○青山晴菜，木村真人，石井正治，五十嵐泰夫，新井博之（東大院農生科・応生工）

3B23a13　染色体因子によりプラスミドの負荷が軽減した自然変異株の解析

11:24 ○能登　優[1]，　高瀬識之[1]，　高橋裕里香[1]，　松本貴嗣[2]，吉川博文[2]，　土金恵子[3]，　細山　哲[3]，　藤田信之[3]，　岡田憲典[1]，山根久和[4]，野尻秀昭[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]東農大・生物資源ゲノム解析セ，[3]NITE，[4]帝京大・バイオ）

3B23a14　糸状菌由来 adenosine deaminase-related growth factor 類似遺伝子の解析

11:36 ○西川良平[1]，藤田将幸[1]，稲冨　聡[2]，田口悟朗[1]，下坂　誠[1]（[1]信州大・繊維，[2]ホクトきのこ総合研）

B23 会場　午後の部（14:00〜17:12）

微生物—細胞–栄養，生育，増殖—

3B23p01　腸内細菌による鉄還元

14:00 ○櫻井友樹，鈴木義規，斎木　博（工科大）

3B23p02　肺炎連鎖球菌の病原性に寄与する酸素耐性因子の同定

14:12 ○山本裕司，高田美佐子，新里　恵，主藤理奈，岩間然花，向井孝夫（北里大獣）

3B23p03　酸素耐性乳酸菌育種方法の検討

14:24 ○佐々木諒子，喜多隆文，三宅香名芽，山本裕司，向井孝夫（北里大学院獣）

3B23p04　過酸化物還元活性を有する乳酸菌の酸素関連代謝系

14:36 ○梅澤秀幸[1]，　村岡洋輔[1]，　横塚　敢[1]，　田代　光[1]，大山修平[1]，　下薗建志[1]，　深谷太樹[1]，　渡邊昭夫[2]，　佐藤純一[1]，新村洋一[1]（[1]東農大応生科・バイオ，[2]大洋香料）

3B23p05　*Lactobacillus pentosus* KB612 の耐塩性と保有プラスミドとの関連性の検討

14:48 ○杉本　渓[1]，　小林靖尚[1]，　中野綾子[1]，　渕田　琢[1]，吉川悠子[1]，大橋典男[1]，脇　尚子[2]，菅沼大行[2]（[1]静岡県大･食栄，

[2]カゴメ(株))

3B23p06　*Eggerthella* sp. YY7918 の持つダイゼインレダクターゼの諸性質

15:00　○川田結花[1]，　横山慎一郎[2]，　野村　泉[3]，　中塚進一[4]，服部正平[5]，大島健志朗[5]，鈴木　徹[3]（[1]岐阜大・院・応用生物，[2]岐阜県･生物工学研究所，[3]岐阜大･連農，[4]長良サイエンス，[5]東大･院・新領域）

3B23p07　揮発性酢酸イソアミルの *Escherichia coli* に対する生育阻害機構の解析

15:12　○安藤　仁，安井杏奈，倉田淳志，岸本憲明（近畿大農）

3B23p08　大腸菌アラニン要求性変異株由来のアラニン非要求性変異株はアラニン飢餓に応答して出現する

15:24　○渡邉裕一，内ヶ崎啓，関　翔太，佐藤一樹，安藤太助，磯貝恵美子，米山　裕（東北大院農）

3B23p09　大腸菌におけるチオ硫酸の選択的利用によるシステイン合成機構（チオ硫酸リプレッション）

15:36　○仲谷　豪，大津厳生，高木博史（奈良先端大・バイオ）

3B23p10　大腸菌の液固培養シフトによる酸化損傷と酸化ストレス応答関与の解析

15:48　○土戸哲明[2]，佐々木洋行[1]，坂元　仁[2]（[1]関西大院理工，[2]関西大化生工）

3B23p11　抗菌剤処理した大腸菌細胞で発生する活性酸素種と細胞死滅との関連性に関する研究

16:00　中田訓浩[1]，Qiuchen Gu[2]，○松村吉信[1,2]（[1]関西大 ORDIST，[2]関西大化学生命）

3B23p12　切断された tRNA がリボソームに運ばれて翻訳を阻害する

16:12　○小川哲弘，　中西孝太郎，　高橋一敏，　伊藤考太郎，石田　亘，日高真誠，正木春彦（東大院農）

3B23p13　枯草菌の胞子形成に関与するクエン酸回路因子の新規機能解析

16:24　○山下悠美[1]，　横川朋美[1]，　鷲見彰吾[1]，　田中早苗[1]，松本貴嗣[2]，吉川博文[1]（[1]東農大院農，[2]東農大ゲノム解析セ）

3B23p14　枯草菌リボソーム 30S サブユニットタンパク質 RpsK, RpsU の機能解析

16:36　○高田　啓[1]，　盛田雅人[1]，　杉本竜馬[1]，　大竹俊平[1]，鈴木祥太[2]，志波　優[3]，河村富士夫[2]，吉川博文[1,3]（[1]東京農大・応生科・バイオ，[2]立教大・理，[3]東京農大・資源ゲノム解析セ）

3B23p15　好酸性・耐酸性芽胞形成細菌の自己溶菌特性

16:48　○坂元　仁[1]，原　裕人[2]，土戸哲明[1]（[1]関西大化生工，[2]関西大院理工）

3B23p16　鉄呼吸微生物による不溶性鉄酸化物の還元

17:00　○水沼　環[1]，田中崇之[1]，鈴木義規[2]，齋木　博[2]（[1]東京工科大学大学院，[2]東京工科大学）

B24 会場　午前の部（9:00〜11:36）

微生物―物質生産-微生物変換，微生物酵素反応―

3B24a01　立体選択的に α-トリフルオロメチル乳酸アミドを加水分解する微生物酵素の探索

9:00　○渡部俊介[1]，冨宿賢一[1]，西井哲郎[3]，石井章央[3]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO，[3]セントラル硝子）

3B24a02　ホモフェニルアラニン合成遺伝子の同定と物質生産への応用

9:12　○纐纈健人，三橋　敏，田畑和彦（協和発酵バイオ）

3B24a03　放線菌 *Nonomuraea sp.* AHU1850 が持つ IFT 遺伝子のクローニングと発現およびダリア球根からの DFAIII 生産

9:24　○高野七海[1]，スリプジラハティ[2]，大谷　翠[1]，杉本敬祐[3]，曾根輝雄[1]，田中みちこ[1]，浅野行蔵[1]（[1]北大院農，[2]LIPI，[3]旭川高専）

3B24a04　甘草成分グリチルリチン酸の微生物変換によるグリチルレチン酸類縁体の生産

9:36　○大塚百合，三好省三，村上敏之，屋敷圭子，田村幸吉（丸善製薬）

3B24a05　*N*-アセチルスクロサミンの物理化学的及び生化学的な性質について

9:48　和田　徹[1]，小森　航[2]，○中村成寿[1]，篠崎佑子[2]，平野貴子[2]，袴田　航[1,2]，八田珠郎[3]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科・生命化，[3]独・国際農林水産業研究センター）

3B24a06　シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ BM-3 を用いた EPA 変換反応

10:00　○石川千弘[1]，木村隆利[2]，日比　慎[3]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大・微生物科学，[3]京大院農・産業微生物）

3B24a07　カルボン酸還元能を有する嫌気性細菌の探索

10:12　○中谷友樹，岸野重信，笠井　渉，石渡隆之，小川　順（京大院農・応用生命）

3B24a08　α-アミノラクタムを立体選択的に加水分解する微生物酵素の探索

10:24　○冨宿賢一[1]，高田桃子[1]，岩坪宏香[1]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

3B24a09　α-アミノラクタムやアミノ酸アミドに作用する新しいラセミ化酵素の探索

10:36　○永森慎吾[1]，高田桃子[1]，冨宿賢一[1]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

3B24a10　*Rhodococcus* sp. ST-10 由来スチレンモノオキシゲナーゼ（SMO）を利用した光学活性エポキシド生産プロセスの構築

10:48　○戸田　弘，今江龍太，伊藤伸哉（富山県大工・生物工）

3B24a11　白色腐朽菌 *Hericium coralloides* 由来ラッカーゼの異種宿主発現とポリフェノール酸化

11:00　○伊藤伸哉，太田可奈，高木伸也，黒川純司（富山県大・工・生物工）

3B24a12　*Leifsonia* sp. S749 由来アルコール脱水素酵素（LSADH）ホモログ遺伝子のメタゲノムスクリーニングと解析

11:12　○狩谷理美，黒川純司，伊藤伸哉（富山県大･工･生物工）

3B24a13　フェニルアセトアルデヒド還元酵素（PAR）相同遺伝子のメタゲノムスクリーニングとその解析

11:24　○礒谷健太郎，黒川純司，竹内奈美，牧野祥嗣，伊藤伸哉（富山県立大学）

A37 会場　午前の部（9:00〜11:12）

動物―生理・栄養，生体機能，生体制御―

3A37a01　比較定量オミクスを用いた新規ケトン体トランスポーターの生体における機能の解析

9:00　○永森収志[1]，平田　拓[2]，何　　新[2]，Pattama Wiriyasermkul[1]，中込咲綾[1]，石川貴正[3]，曽我朋義[4]，金井好克[1]（[1]大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理，[2]杏林大学　医学部，[3]HMT，[4]慶応大学　先端生命研究所）

3A37a02　卵巣摘出マウスにおいてダイゼイン摂取は長趾伸筋重量を増加させる

9:12　○石川真菜[1]，　小川真弘[1]，　北風智也[1]，　原田直樹[1]，中野長久[2]，乾　　博[3]，山地亮一[1]（[1]大阪府大院・生命環境，[2]大阪女子短大，[3]大阪府大院・栄養）

3A37a03　*Lgr4* ノックアウトマウスにおける雌生殖器の雄化

9:24　○小泉雅江[1,2]（[1]東北大院農，[2]愛媛大医）

3A37a04　老齢マウスにおける摂食量低下のメカニズム

9:36　○宮崎由理[1]，　金子賢太朗[1]，　水重貴文[1,2]，　金本龍平[1]，清水孝彦[3,4]，大日向耕作[1]（[1]京大院・農・食品生物，[2]京大・学際融合・生理化学研究ユニット，[3]千葉大院・医・先進加齢医学，[4]都健康長寿研）

3A37a05　リポ蛋白質受容体ファミリーによる Wnt/ β-catenin シグナル伝達経路の活性化調節

9:48　○鬼丸祐二，細田明美，山岸あづみ，福村智恵，金　東浩，佐伯　茂（大阪市大・生活科学・生体情報）

3A37a06　小胞体ストレスによる FGF21 遺伝子発現誘導機構の解析

10:00　○丸山竜人，　Shimizu Makoto，　李　　娟，　井上　順，佐藤隆一郎（東大院農生科・応生化）

3A37a07　胆汁酸受容体 TGR5 の各種リガンド結合能の解析

10:12　○碇　菜穂[1]，Shimizu Makoto[1]，石黒正路[2]，井上　順[1]，佐藤隆一郎[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]新薬大・応生科）

3A37a08　脂肪細胞分化過程における BCL11B の機能解析

10:24　○井原悠介，　塚本大介，　橋詰　力，　Shimizu Makoto，井上　順，佐藤隆一郎（東大院農生科・応生化）

3A37a09　MIG12 によるトリグリセリド合成促進作用の解析
10:36　◦和泉彬子，　宮田慎吾，　Shimizu Makoto，　井上　順，佐藤隆一郎（東大院農生科・応生化）

3A37a10　脂肪滴局在タンパク質 ADRP の翻訳後修飾
10:48　◦篠田旭弘[1]，鎌田春彦[2]，Shimizu Makoto[1]，井上　順[1]，佐藤隆一郎[1]（[1]東大院農，[2]医薬基盤研究所）

3A37a11　糖新生ならびにホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼのフェノバルビタールに抑制メカニズム
11:00　◦小田裕昭，奥田祐司（名大院生命農学）

A37 会場　午後の部（14:00〜18:00）

動物—細胞–細胞機能，細胞骨格，オルガネラ，輸送—

3A37p01　脂肪肝感受性を規定する候補遺伝子の肝細胞脂質代謝に対する作用の解析
14:00　◦都築佳奈[1]，小林美里[1]，鈴木　京[1]，大野民生[2]，村井篤嗣[1]，堀尾文彦[1]（[1]名大院生命農，[2]名大院医学系）

3A37p02　マスト細胞がインスリン抵抗性に及ぼす影響
14:12　◦関根　瞳[1]，　小林奈保子[2]，　江口　輝[2]，　金子愛果[2]，佐藤明日香[1]，佐藤友宏[1]，有賀豊彦[1,2]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]（[1]日大院　生資科　応生，[2]日大生資科　生命化）

3A37p03　ガーリック由来 diallyl trisulfide によるアセトアミノフェン誘導性肝障害の抑制
14:24　◦木村広慈[1]，　内田真由子[2]，　久保瞳美[2]，　山崎祥一[2]，日吉滉平[2]，今井孝俊[1]，渡辺師成[1]，深尾友美[3]，有賀豊彦[2]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]（[1]日大院・応生科，[2]日大・生命化，[3]お茶大・生環研）

3A37p04　TAFI による肝細胞の生存，細胞死の制御
14:36　◦石井佳澄[1]，　大路拓巳[1]，　小田　誠[2]，　田中伸尚[2]，三浦　徳[2]，奥村暢章[1]，細野　崇[1,2]，有賀豊彦[1,2]，関泰一郎[1,2]（[1]日大院　生資科　応生，[2]日大生資科　生命化）

3A37p05　プリオン感染 N2a 細胞での異常プリオン蛋白蓄積におけるアクチン骨格及び PI3 キナーゼ経路の関与
14:48　◦竹之内敬人[1]，　岩丸祥史[2]，　今村守一[2]，　佐藤　充[1]，横山　隆[2]，毛利資郎[2]，木谷　裕[1]（[1]農生資研・動物生体防御，[2]動衛研・プリオン病研究センター）

3A37p06　3T3-L1 脂肪前駆細胞の分化に伴う phospholipid scramblase 3 の発現および細胞外分泌の解析
15:00　◦猪川　亮, 犬塚達俊, 柴田秀樹, 牧　正敏（名大院生命農）

3A37p07　ALG-2 相互作用因子 CHERP の細胞内局在および選択的スプライシング制御機能
15:12　◦大杉桂奈江，井元千晶，柴田秀樹，牧　正敏（名大院生命農・応用分子生命科）

3A37p08　樹状細胞において PU.1 は CCR7 の発現を制御する
15:24　◦八代拓也, 原むつ子, 小川秀興, 奥村　康, 西山千春（順大医）

3A37p09　p53KO マウス脂肪由来クローナル間葉系幹細胞の樹立と解析
15:36　◦佐伯俊幸（東北大　農）

3A37p10　上皮細胞の抗ウイルス応答に対するメイラード反応後期段階生成物の作用解析
15:48　◦藤野麻美[1]，布野絢子[1]，早瀬文孝[2]，渡辺寛人[1]（[1]明治大農・生命科，[2]明治大農・農化）

3A37p11　抗 CD98 抗体依存性細胞融合阻害物質の新規評価系の構築
16:00　◦桂川美咲[1]，秋山智美[1]，坂野貴志[1]，伊藤守弘[2]，伊藤康彦[2]，中川　大[1]，禹　済泰[1,3]，車　炳允[3]，大西素子[1]（[1]中部大･応生，[2]中部大･生命，[3]中部大・生物機能開発研）

3A37p12　Vinculin と Rab5 が関与するエンドサイトーシス機構の解明
16:12　◦萩原　真[1]，国分栄仁[2]，杉浦進介[1]，小松寿明[1]，多田浩之[1]，磯田竜太朗[1]，　谷川順美[1]，　加藤佳子[1]，　石田直之[1]，　小林かおる[1]，石原和幸[2]，松下健二[1]（[1]国立長寿研，[2]東京歯科大）

3A37p13　ABCG1 発現による脂質ラフトを介した細胞機能の変化
16:24　◦伊藤志帆[1]，渡邊太郎[1]，松尾道憲[1]，植田和光[1,2]（[1]京大院･農・応用生命，[2]京大・物質－細胞統合システム拠点）

3A37p14　ビネキシンは細胞外基質の硬さに依存したアクチン繊維の増強に必要である
16:36　◦市川尚文[1]，　山下　寛[1]，　木村泰久[1]，　植田和光[1,2]，木岡紀幸[1]（[1]京都大院農，[2]京都大 iCeMS）

3A37p15　接着斑タンパク質ビンキュリン，ビネキシンは間葉系幹細胞の脂肪細胞分化を調節している
16:48　◦和田洋樹[1], 山下　寛[3], 植田和光[1,2], 木岡紀幸[1]（[1]京大院･農･応用生命，[2]京大 iCeMS，[3]京大再生医科学研･生体分子設計）

3A37p16　接着斑タンパク質ビンキュリンの脂質ラフト局在化には PIP_2との相互作用が必要である
17:00　◦長里彩花[1], 山下　寛[1], 市川尚文[1], 松尾道憲[1], 植田和光[1,2], 木岡紀幸[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大・iCeMS）

3A37p17　繊維状コラーゲンの小胞体からの搬出におけるカルシウム結合タンパク質 ALG-2 の必要性の検討
17:12　◦京　卓志, 三宅　博, 牧　正敏, 柴田秀樹（名大院生命農）

3A37p18　抗老化素材としてのマルメロ種子エキスの検討
17:24　◦萬治愛子，山田昌良，桜井哲人，粂井貴行（ファンケル総合研究所）

3A37p19　ヒト Rab GTPase の膜テザリング活性の解析
17:36　◦田村直輝，三間穣治（阪大蛋白研）

3A37p20　サイクリン A と複製開始因子 Mcm7 のヒト染色体上での相互作用解析
17:48　◦田辺史行[1]，松本貴嗣[2]，志波　優[2]，渡辺　智[1]，千葉櫻拓[1]，吉川博文[1,2]（[1]東農大・応生科・バイオ，[2]東農大・ゲノム解析セ）

A41 会場　午前の部（9:00〜11:36）

動物—細胞工学–細胞培養，組織培養，物質生産，その他—

3A41a01　米糠抽出物の間葉系幹細胞に対する効果
9:00　◦山内莉奈佳[1]，　福本　健[1]，　森山聖子[1]，　寺田　聡[1]，谷口正之[2]，森山　茂[3]，築野卓夫[3]（[1]福井大工，[2]新潟大，[3]築野食品工業）

3A41a02　3 次元ヒト皮膚モデルを用いた核酸素材オリゴ DNA のコラーゲン代謝活性効果の検討
9:12　◦杉　正人[1]，　鈴木　健[1]，　永井展裕[3]，　高橋環奈[2]，西原雅夫[2]，松永政司[1]（[1]NPO 法人遺伝子栄養学研究所，[2]日生バイオ株式会社，[3]東北大学医学系研究科附属創生応用医学研究センター先進医療開発コアセンター細胞治療分野）

3A41a03　細胞/組織培養における血清代替品としての米糠抽出物とセリシン加水分解物
9:24　◦岡田悠衣[1]，森山聖子[1]，寺田　聡[1]，谷口正之[2]，森山　茂[3]，築野卓夫[3]，國富芳博[4]，佐々木真宏[4]（[1]福井大工，[2]新潟大学，[3]築野食品工業，[4]セーレン(株)）

3A41a04　米糠中の哺乳類細胞活性因子の探索
9:36　◦鈴木陽子[1]，　山内莉奈佳[1]，　森山聖子[1]，　寺田　聡[1]，森山　茂[2]，築野卓夫[2]，谷口正之[3]（[1]福井大学工，[2]築野食品工業，[3]新潟大学）

3A41a05　マウス ES 細胞および iPS 細胞の神経細胞および筋肉細胞への分化解析
9:48　◦中村麻衣, 上芝原佑, 川口英夫, 清水範夫（東洋大院生命）

3A41a06　ROCK 阻害剤による幹細胞の神経細胞への分化誘導
10:00　◦上芝原佑[1]，太田麗央[2]，中村麻衣[1]，清水範夫[1]（[1]東洋大院生命，[2]東洋大生命）

3A41a07　上下動撹拌装置の動物細胞培養における評価
10:12　◦丹生徳行[1,2]，　植木雅志[1]，　佐藤　誠[1,2]，　遠藤　勲[1]，加藤好一[1,2]，金森久幸[1,2]（[1]理研･動物細胞，[2]佐竹化学機械工業(株)）

3A41a08　キメラニワトリによるヒトエリスロポエチンへのガラクトース付加
10:24　◦小島佑介[1]，脇田　潤[1]，小島康裕[2]，山田裕貴[3]，西島謙一[1]（[1]名大院工，[2]生化学工業株式会社，[3]アステラス製薬株式会社）

3A41a09　ニワトリ卵膜形成機構の生化学的研究—ドメイン特異的な抗体を用いた血清 ZP1 の構造・機能解析
10:36　◦福島英晃, 今友里恵, 廣瀬なつみ, 氏田　稔, 奥村裕紀（名城大院農）

3A41a10　オオマリコケムシの産生するゲル状物質化学構造
10:48　◦関根美祈，清水文一（東洋大院生命）

3A41a11　ヒト由来 β-グルコセレブロシダーゼの安定な分泌生産を目指した昆虫細胞発現用ベクターの構築
11:00　白神有基，◦三崎　亮，梶浦裕之，藤山和仁（大阪大・生

物工国セ）

3A41a12　芳香族化合物群の置換基の種類・位置を識別する嗅覚メカニズムの解析

11:12　○安原雅恵，高井佳基，白須未香，東原和成（東大院農生科応生化）

3A41a13　カイコ由来転写制御因子 FMBP-1 の特異的 DNA 認識に関する研究

11:24　○黒澤　大[1]，相沢智康[1]，菊川峰志[1]，神谷昌克[1]，河野敬一[1]，出村　誠[1]，滝谷重治[2]（[1]北大院生命・生命科学，[2]北大院理・生物科学）

A41 会場　午後の部（14:00〜18:00）

動物—細胞–情報伝達，細胞応答—

3A41p01　酸化亜鉛ナノ粒子による急性期肺における酸化ストレスに対するアスコルビン酸の効果

14:00　○福井浩子[1]，堀江祐範[2]，遠藤茂寿[3]，萩原義久[4]，岩橋　均[1]（[1]岐阜大院連農，[2]産医大，[3]単層 CNT 融合開発機構，[4]産総研）

3A41p02　カキドオシエキスによるマウス B16F10 メラノーマ細胞のメラニン生成に対する抑制作用

14:12　○喬　志偉（秋田大院医）

3A41p03　分化阻害剤の細胞内へのダイレクト・インジェクションによる PC12 細胞の神経分化の定量的制御

14:24　○鄭　智恵[1]，三浦夏子[1]，伊藤昭夫[2]，沢田宗孝[2]，西川茂道[3]，黒田浩一[1]，植田充美[1]（[1]京大院・農・応用生命，[2]富士通株式会社，[3]ワケンビーテック株式会社）

3A41p04　PP2C 活性化物質 glabridin の破骨細胞分化抑制機構の解析

14:36　○秋山智美[1]，青山友果[1]，油井信弘[2]，木村賢一[2]，永井和夫[1]，禹　済泰[1]，大西素子[1]（[1]中部大・応生，[2]岩手連大・農）

3A41p05　香気成分の NMDA 型グルタミン酸受容体および不安に対する効果

14:48　○山田康枝[1]，増田修一[1]，伊豆英恵[2]，松丸克己[2]，青島　均[3]（[1]近畿大院工，[2]酒総研，[3]山口大院）

3A41p06　解糖系代謝物メチルグリオキサールによる IRS-1 のリン酸化を介したインスリン抵抗性の可能性

15:00　○野村　亘[1]，後藤　剛[1]，河田照雄[1]，井上善晴[2]（[1]京大院・農・食品生物，[2]京大院・農・応生科）

3A41p07　5-アミノレブリン酸による温熱条件下でのがん細胞死増強作用の検証

15:12　○鳥谷部唯[1]，千葉櫻拓[1]，高橋　究[2]，川上茉利子[1]，芳賀葉月[1]，小倉俊一郎[3]，安部史紀[2]，中島元夫[2]，吉川博文[1]，田中　徹[2]（[1]東京農大･応生科･バイオ，[2](株)SBI ファーマ，[3]東工大･フロンティア研機）

3A41p08　粘膜型マスト細胞の分化・成熟における Notch シグナルの役割

15:24　○中野信浩，西山千春，奥村　康，小川秀興（順天堂大医・アトピー疾患研究センター）

3A41p09　PKG I β と TRPC6 との相互作用に寄与する両蛋白質内のアミノ酸の同定

15:36　○本田　啓，井上隆司（福岡大医）

3A41p10　異なる強度の酸化ストレスに対するマウス海馬由来 HT22 細胞の適応メカニズム

15:48　○石井雅也[1]，石橋和悟[1]，小倉友里奈[2]，三浦和典[2]，根建　拓[1,2]（[1]東洋大生命，[2]東洋大院生命）

3A41p11　プレコンディショニングによる神経細胞保護機構の解明

16:00　○小倉友里奈，根建　拓（東洋大院生命）

3A41p12　栄養条件における神経細胞内 SIRT1 の機能変化

16:12　○藤野耕太郎，橋本祐樹，根建　拓（東洋大院生命）

3A41p13　マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞の cholesterol 25-hydroxylase および Cyp7b1 の発現は上昇する

16:24　○真田洋平[1]，山本岳史[2]，加藤範久[1]，西村英紀[3]，矢中規之[1]（[1]広島大院　生物圏科学，[2]広島大　生物生産，[3]広島大院　医歯薬学）

3A41p14　新規酵素 GDE7 はオートタキシン活性を有し，LPA および alkyl-LPA の産生に関与する

16:36　工藤尊裕[1]，大嶋紀安[2]，Stefania Mariggio[3]，本田絢子[1]，長野友美[1]，加藤範久[1]，Daniela Corda[3]，和泉孝志[2]，○矢中規之[1]（[1]広島大院生物圏科学，[2]群馬大医，[3]National Research Council, Italy）

3A41p15　Siglec-9 によるマクロファージの機能調節

16:48　○庄司　徹，西島謙一，飯島信司（名大院工）

3A41p16　*in vitro* 実験系における腸管上皮細胞とマスト細胞の相互作用の解析

17:00　○西真名美，田中大季，望月鉄之祐，薩　秀夫，戸塚　護，清水　誠（東大院農）

3A41p17　細胞を用いた酵母エキスの辛味増強効果の評価

17:12　○加藤直樹，指原浩一，加藤史佳，佐見　学，北川　泰（アサヒグループ HD(株)）

3A41p18　CDK ファミリー PCTK3 の活性化因子の同定

17:24　○松田真弥，篠倉悠久，辻　明彦，湯浅恵造（徳島大院 STS 研究部）

3A41p19　メラノサイトの機能に影響を及ぼすアーユルヴェーダハーブの探索

17:36　○三木健輔[1]，粕谷裕樹[1]，モハマドナジールホサイン[1]，山下律郎[2]，藤井道彦[1]，鮎沢　大[1]（[1]横浜市大・生命ナノ，[2](株)SLH　BCL カンパニー）

3A41p20　準致死量の界面活性剤によるヒト正常細胞の未成熟老化の誘導機構

17:48　○山上義巳，三木健輔，藤井道彦，鮎沢　大（横浜市大・ゲノムシステム）

A44 会場　午前の部（9:00〜11:24）

植物—植物ホルモン，成長調節物質—

3A44a01　シロイヌナズナにおけるリン酸欠乏とストリゴラクトンの関係

9:00　○伊藤晋作[1]，野副朋子[2]，石毛太一郎[3]，志波　優[3]，今井美咲[3]，中西啓仁[2]，西澤直子[2]，浅見忠男[4]，矢嶋俊介[1]（[1]東農大バイオ，[2]東大院農生科農学国際，[3]東農大生物資源ゲノム研究センター，[4]東大院農生科応生化）

3A44a02　ストリゴラクトン生合成阻害剤を利用したイネの枝分かれ抑制変異体の探索

9:12　○山上大智[1]，福井康祐[1]，伊藤晋作[1]，中村英光[1]，市川裕章[2]，羽方　誠[2,3]，浅見忠男[1]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]農業生物資源研究所，[3]中央農研・北陸）

3A44a03　ストリゴラクトンシグナル因子 D14 による加水分解と植物の分げつ抑制活性の関係

9:24　○戸塚直哉，加藤雄太，候　峰，石　玄，宮川拓也，福井康祐，中村英光，田之倉優，浅見忠男（東大院・農生科）

3A44a04　枝分かれ抑制におけるストリゴラクトンとジベレリンのクロストーク

9:36　○中村英光[1]，伊藤瑛海[2]，Park Seung-Hyun[1]，伊藤晋作[1]，福井康祐[1]，吉澤真人[1]，侯　峰[1]，石　玄[1]，宮川拓也[1]，上田貴志[2]，田之倉優[1]，浅見忠男[1]（[1]東大院農生科，[2]東大院理）

3A44a05　ストリゴラクトンにより誘導される転写因子の光応答シグナルにおける機能の解析

9:48　○永井優子[1]，長江未有[1]，増口　潔[2]，中村英光[1]，浅見忠男[1]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]理研・PSC）

3A44a06　シロイヌナズナの根毛伸長におけるストリゴラクトンミミック debranone の作用解析

10:00　○福井康祐，浅見忠男（東大院農）

3A44a07　植物細胞分裂における C24 エチルステロールの生理機能の解明

10:12　○中本雅俊，太田大策（大阪府大院生命環境）

3A44a08　ブラシノステロイド生合成阻害剤 Brz 耐性突然変異体群 *bil* 原因遺伝子による情報伝達制御の分子機構と応用展開

10:24　○中野雄司[1,5]，山上あゆみ[1]，嶋田勢津子[1]，宮地朋子[1,3]，森　昌樹[4]，長田裕之[1]，Joanne Chory[2]，浅見忠男[3]（[1]理研・基幹研，[2]Salk Inst.，[3]東大院・農生科，[4]農業生物資源研，[5]JST-CREST）

3A44a09　ブラシノステロイド不活性化に関わるシトクロム P450 酵素 CYP72C1 の機能解明

10:36　○佐原瑞穂[1]，水谷正治[2]，渡辺修治[3]，大西利幸[4]（[1]静大・

農，[2]神大院・農，[3]静大院・創造，[4]静大・GRL）

3A44a10　オーキシン・ブラシノステロイド信号伝達同時制御剤の探索と生理機能

10:48　◦ジャルンサンティナイヤネート[1]，中嶋正敏[1]，尹　禎敏[1]，大谷征史[1]，Park Seung-Hyun[1]，林謙一郎[2]，浅見忠男[1]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]岡山理大・生物化学）

3A44a11　ブラシノステロイド拮抗剤の創出

11:00　◦野武　晃[1]，武藤拓也[1]，轟　泰司[2]（[1]静大院・農，[2]静大・農）

3A44a12　12-オキソファイトジエン酸で処理したヒメツリガネゴケのプロテオーム解析

11:12　◦戸島江里香[1]，　阿部達也[2]，　南條洋平[3]，　小松節子[3]，松浦英幸[2]，高橋公咲[2]（[1]北大農，[2]北大院農，[3]作物研）

A44 会場　午後の部（14:00〜17:36）

植物―植物工学–育種，物質生産，形質転換―

3A44p01　基部陸上植物ゼニゴケにおける高効率形質転換系とそれを用いたジーンターゲティング法の開発

14:00　◦石崎公庸，河内孝之（京大院・生命）

3A44p02　植物への遺伝子導入の効率を改善したスーパーアグロの作製

14:12　◦染谷龍彦，野中聡子，平井正良，中村幸治，江面　浩（筑波大生命環境）

3A44p03　アグロバクテリウムを用いたウメ（*Prunus mume*）培養細胞の形質転換

14:24　◦岡本侑也[1]，米光　裕[2]（[1]和歌山高専専攻科エコ，[2]和歌山高専物質工）

3A44p04　多重パルスを用いたエレクトロポレーション法による珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* の高効率形質転換

14:36　◦伊福健太郎[1]，　宮原　窓[1]，　青井政樹[1]，　井上名津子[2]，菓子野康浩[2]（[1]京大院・生命，[2]兵庫県立大院・生命）

3A44p05　ホップ雌株から誘導した雄花を用いた交配

14:48　◦門馬孝之，岡村正愛，百瀬眞幸，梅基直行（キリン(株)基盤技術研究所）

3A44p06　バクテリア由来のピノレジノール変換酵素遺伝子（*pinZ*）を発現させた組換えシロイヌナズナのリグナン組成解析

15:00　◦田村尚之[1]，辻　幸子[1]，楠瀬達也[2]，岡澤敦司[3]，上村直史[4]，菱山正二郎[5]，　福原優樹[4]，　原　啓文[6]，　佐藤かんな[1]，　村中俊哉[2]，片山義博[7]，　福田雅夫[4]，　政井英司[4]，　梶田真也[1]（[1]東農工大院・BASE，[2]阪大院・工，[3]阪府大院・生命環境，[4]長岡技術大・生物，[5]森林総研，[6]岡山理大工・生体，[7]日大生資科）

3A44p07　センブリ培養物に含まれるキサントン配糖体

15:12　◦川上寛子[1]，木下　薫[2]，原光二郎[1]，小峰正史[1]，山本好和[1]（[1]秋田県大院生資，[2]明治薬大）

3A44p08　植物型糖鎖修飾が抑制されたモノクローナル抗体の植物生産

15:24　◦松尾幸毅[1]，　加賀谷羽衣子[2]，　一町田紀子[2]，　松村　健[1]（[1]産総研生物プロセス，[2]ホクサン(株)）

3A44p09　タケ懸濁細胞を用いた合理的代謝フロースイッチングによる外来二次代謝産物生産

15:36　◦野村泰治，塩澤　舞，荻田信二郎，加藤康夫（富山県大・生工研セ）

3A44p10　チューリップバイオマスを原料とした石油非依存的プロセスによる抗菌化合物チューリッパリン B の調製

15:48　野村泰治，林絵美子，川上祥平，荻田信二郎，◦加藤康夫（富山県大・生工研セ）

3A44p11　サツマイモ形質転換法の改良と FBP/SBPase 導入による光合成能および生産性への影響

16:00　◦大鳥久美[1,2]，　窪　康至[1]，　Daniel Padilla-Chacon[1,2]，田茂井政宏[1,2]，横田明穂[2,3]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大・農・バイオ，[2]JST, CREST，[3]奈良先端大・バイオ）

3A44p12　藻類バイオ燃料増産を目指したユーグレナ形質転換技術の確立と光合成機能強化

16:12　◦三根彩佳[1]，　作山治美[2,3]，　杉崎円香[2]，　西川綾香[2]，加藤貴大[2]，吉田絵梨子[3,4]，鈴木健吾[3,4]，丸田隆典[3,5]，石川孝博[3,5]，田茂井政宏[1,2,3]，重岡　成[1,2,3]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]JST, CREST，[4](株)ユーグレナ，[5]島根大・生資科・生命工）

3A44p13　シアノバクテリアを用いたエタノール生産のための代謝改変

16:24　◦蘆田弘樹[1,2]，向川佳子[1]，小林知佑[1]，横田明穂[1]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]JST- さきがけ）

3A44p14　抗体遺伝子組換えタバコ（*N. benthamiana*）の閉鎖型完全人工光植物工場内での高収量養液栽培技術の開発

16:36　◦田坂恭嗣[1]，　福澤徳穂[1]，　一町田紀子[1]，　加賀谷羽衣子[2]，田林紀子[1,2]，松村　健[1]（[1]産総研・生物プロセス，[2]ホクサン・植物バイオセンター）

3A44p15　小規模種子生産を目的としたグロースチャンバーでの作物のミニチュア水耕栽培法

16:48　◦黒田昌治[1]，池永幸子[2]（[1]農研機構中央農研，[2]農研機構東北農研）

3A44p16　ダイズ β-コングリシニンを高集積したイネの特性解析

17:00　Cabanos Cerrone[1]，黒田昌治[2]，加藤直樹[1]，澤田真千子[1]，奥田英子[1]，長岡　利[3]，高岩文雄[4]，内海　成[1]，◦丸山伸之[1]（[1]京大院農，[2]中央農研・北陸セ，[3]岐阜大，[4]農生資研）

3A44p17　イネ植物体におけるトコトリエノール生合成機構の解明

17:12　◦阿部　伎[1]，　松塚健太郎[1]，　木村映一[2]，　木村俊之[2]，村田和優[3]，仲川清隆[1]，宮澤陽夫[1]（[1]東北大院農・機能分子解析，[2]東北農研セ，[3]富山農総技セ）

3A44p18　経口ワクチン用キャリアーを目指したイネ種子 PB-I の特定部位への外来タンパク質局在化と消化酵素耐性に関する研究

17:24　◦佐生　愛[1]，重光隆成[1]，齊藤雄飛[1]，田中愛実[1]，森田重人[1,2]，佐藤　茂[1,2]，増村威宏[1,2]（[1]京府大院，[2]京都農技セ・生資セ）

A46 会場　午前の部（9:00〜11:48）

植物―情報伝達，細胞応答，分化，植物栄養，光合成，オルガネラ，膜輸送植物工学，育種，物質生産，形質転換―

3A46a01　アブシジン酸のシグナル伝達に対するフシコクシンの影響

9:00　◦小松由貴[1]，　松田詩織[1]，　梅津麻美[1]，　深澤壽太郎[2]，山口信次郎[2]，南原英司[3]，神谷勇治[2]，三橋　渉[1]，加藤修雄[4]，豊増知伸[1]（[1]山形大農，[2]理研 PSC，[3]トロント大・細胞システム生物学科，[4]大阪大産研）

3A46a02　bZIP 型転写因子と 14-3-3 相互作用に関する研究

9:12　◦千葉光浩[1]，　深澤壽太郎[2]，　三橋　渉[1]，　加藤修雄[3]，豊増知伸[1]（[1]山形大農，[2]広島大院理，[3]大阪大産研）

3A46a03　Analysis of sugar signaling pathway via plastid invertase in Arabidopsis seedlings

9:24　◦Daniel Padilla-Chacon[1,2]，　Kumi Otori[1,2]，Takanori Maruta[3]，Masahiro Tamoi[1,2]，Shigeru Shigeoka[1,2]（[1]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ.，[2]JST, CREST，[3]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ.）

3A46a04　プラスチドシグナリングを介したインベルターゼの炭素・窒素バランス制御への関与

9:36　◦宮崎　望[1]，　Daniel Padilla-Chacon[2,3]，　野坂亮太[1]，田中裕之[1]，大鳥久美[2,3]，丸田隆典[4]，吉村和也[3,5]，田茂井政宏[1,2,3]，重岡　成[1,2,3]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]JST, CREST，[4]島根大・生資科・生命工，[5]中部大・応生・食栄）

3A46a05　光合成強化植物における C/N バランス制御の初期応答

9:48　◦丸山俊樹[1]，西中大記[2]，大鳥久美[2,3]，Daniel Padilla-Chacon[2,3]，田茂井政宏[1,2,3]，重岡　成[1,2,3]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]JST,CREST）

3A46a06　シロイヌナズナサイトゾル型グルタミン合成酵素 1;2 は根でアンモニウムによって誘導されアンモニウムを同化する

10:00　◦小西範幸，早川俊彦，山谷知行，小島創一（東北大院農）

3A46a07　シロイヌナズナ由来葉緑体局在芳香族アミノ酸トランスポーター候補遺伝子産物の機能解析

10:12　◦秋田　充，　SATTASUK Kwanchanok，　清水綾子，河野真央（愛媛大農）

3A46a08　アジサイのアルミニウム集積と耐性に関わる輸送体遺伝子の取得と機能解明

10:24　根岸孝至[1]，　大島健志郎[2]，　服部正平[2]，　金井雅武[3]，真野昌二[3]，西村幹夫[3]，◦吉田久美[1]（[1]名古屋大情報科学，[2]東京

大新領域，[3]基礎生物学研）

3A46a09　タバコ培養細胞 BY2 株における大豆アレルゲン Gly m Bd 28K の液胞選別輸送シグナルの解析

10:36　◦弓岡仁美[1]，三崎　亮[2]，横路三有紀[3]，近藤（比江森）美樹[4]，木本眞順美[1]，山下広美[1]，辻　英明[1]，藤山和仁[2]（[1]岡山県大保福・栄養，[2]阪大・I.C. Biotech.，[3]久留米大・医，[4]徳島文理大・食物栄養）

3A46a10　トウガン篩管滲出液由来新規耐虫タンパク質 BPLP の遺伝子クローニングと精製タンパクおよび発現タンパク質の生理・生化学活性について

10:48　太田英司，土屋　渉，山崎俊正，中村匡利，平山　力，◦今野浩太郎（農業生物資源研究所）

3A46a11　NMR メタボロミクスによるジャガイモ疫病抵抗性マーカーの探索

11:00　◦関山恭代[1,2]，　池田成志[3]，　津田昌吾[3]，　染谷信孝[3]，近山英輔[2,4]，菊地　淳[2,5,6,7]，小野裕嗣[1]（[1]農研機構・食総研，[2]理研 PSC，[3]農研機構・北農研，[4]新潟国際情報大・情報システム，[5]横市大院・生命ナノ，[6]名大院・生命農学，[7]理研 BMEP）

3A46a12　*Scopolia* 属植物の葉切片からの不定器官形成および不定芽の特性について

11:12　◦小畑瑛理，佐々木和生，下村講一郎（東洋大院・生命）

3A46a13　植物ゲノムの突然変異検出法の開発 II

11:24　◦平津圭一郎[1]，　平野雅士[1]，　塩谷詩織[1]，　牧野耕三[1]，布柴達男[2]（[1]防衛大・応化，[2]国基大・教養）

3A46a14　自家不和合性ペチュニアの花粉側因子 SLF の自他識別機構の解析

11:36　◦久保健一，円谷徹之，梶原貴映，高山誠司（奈良先端大バイオ）

A46 会場　午後の部（14:00〜17:48）

植物—一次代謝，二次代謝—

3A46p01　根寄生雑草ヤセウツボの発芽過程におけるノジリマイシンによる糖代謝阻害と発芽抑制の関連性

14:00　◦若林孝俊[1]，安本周平[1]，明石智義[2]，青木俊夫[2]，米山弘一[3]，杉本幸裕[4]，太田大策[5]，村中俊哉[1]，岡澤敦司[1,5]（[1]阪大院・工，[2]日本大・生物資源，[3]宇都宮大・雑草研セ，[4]神戸大院・農，[5]阪府大院・生命環境・応用生命）

3A46p02　ソヤサポニン生合成に関わる配糖化酵素 Sg-3 及び Sg-4 の機能解析

14:12　◦土永浩輝[1]，　鈴木宗典[1]，　高木恭子[2]，　高田吉丈[3]，塚本知玄[4]，關　　光[1]，石本政男[2]，村中俊哉[1]（[1]阪大院・工・生命先端，[2]農業生物資源研，[3]農研機構・近中四農研，[4]岩手大院・農）

3A46p03　コムギの Bx: UDP-Glc グルコシルトランスフェラーゼの性状解析

14:24　◦中村ちひろ，仲下英雄，須恵雅之（東農大・応生化）

3A46p04　ヤマノイモ属における有用ステロイドサポニン生合成に関わる *β*-グルコシダーゼの同定

14:36　◦水谷正治[1]，　中安　大[1]，　李　榮宰[1]，　山村理恵[1]，川崎　崇[1]，遠城道雄[2]，杉本幸裕[1]（[1]神戸大院農，[2]鹿児島大農）

3A46p05　ハマナス花弁の芳香成分に関する研究

14:48　◦中島広也，熊谷　順，妙田貴生，中澤洋三，相根義昌，戸枝一喜，藤森　嶺，西澤　信（東農大生物産業・食香）

3A46p06　ソバ（*Fagopyrum esculentum*）のルチン生合成に関わるラムノシル化酵素の解析

15:00　◦古謝詠喜（信州大繊維）

3A46p07　ソバのフラボノイド *C* 配糖化酵素の機能解析

15:12　◦伊藤崇充，臼井茉理，古謝詠喜，長友仁寿，下坂　誠，田口悟朗（信州大・繊維）

3A46p08　クマリン生合成に関わるソライロアサガオの桂皮酸オルト位水酸化酵素遺伝子の機能解析とゲノム配列の解析

15:24　◦田辺綾野，清水文一（東洋大生命）

3A46p09　サツマイモ桂皮酸類オルト位水酸化酵素の基質認識部位の探索

15:36　◦岩田友子，柴田行範，槇田雄太，和田瞭典，清水文一（東洋大院生命）

3A46p10　ダイジョ（*Dioscorea alata L.*）の葉における色素変異に関する研究

15:48　◦飯島　健[1]，バビルパチャキル[2]，井土　岳[1]，松原紀嘉[3]，川原玲香[4]，野口治子[1]，内野昌孝[1]，高野克己[1]（[1]東京農大応生・化学，[2]東京農大　（現 JIRCAS），[3]千葉大学，[4]東京農大・生物資源ゲノム解析センター）

3A46p11　ゼニゴケのカロテノイド生合成系遺伝子の解析

16:00　◦竹村美保，三沢典彦（石川県大資源研）

3A46p12　シロイヌナズナにおけるセリン生合成制御の分子基盤

16:12　◦岡村英治[1,2]，平井優美[1,2]（[1]理研 PSC，[2]JST CREST）

3A46p13　登熟期イネ種子の遺伝子発現に及ぼす追肥の影響

16:24　◦緑川景子[1]，　黒田昌治[2]，　寺内かえで[1]，　田村倫子[3]，石丸喜朗[1]，阿部啓子[1,4]，朝倉富子[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]中央農研北陸，[3]東大院農生科・応生化（現東農大応生科・栄養），[4]神奈川科学技術アカデミー）

3A46p14　分子育種によるスクアレンを高蓄積するクラミドモナス形質転換体の作出

16:36　◦梶川昌孝[1,3]，　木平成子[1,3]，　下山未希[2,3]，　加藤美砂子[2,3]，福澤秀哉[1,3]（[1]京大院・生命，[2]お茶の水大院・ライフサイエンス，[3]JST・ALCA）

3A46p15　ミカン科ミカン属由来カフェインシンターゼ相同遺伝子群の機能解析

16:48　藤田ゆり[1]，加藤美砂子[2]，吉澤結子[1]，◦水野幸一[1]（[1]秋田県立大生物資源，[2]お茶の水大院ライフサイエンス）

3A46p16　除虫菊 GDSL リパーゼの加水分解活性に関わるアミノ酸のピレスリン合成活性に対する役割

17:00　◦光森智紀[1]，山田　現[1]，竹内孝幸[1]，菊田幸雄[2]，中山幸治[2]，勝田純郎[2]，畑中顯和[3]，松田一彦[1]（[1]近畿大院農，[2]大日本除虫菊，[3]山口大）

3A46p17　傷害葉での短鎖アルデヒド還元活性の生理学的意義の解明

17:12　志岐和美，長井直子，◦松井健二（山口大院医）

3A46p18　ダイズ Ero1 によるプロテインジスルフィドイソメラーゼファミリーの活性化に関する研究

17:24　◦松崎元紀，　小石原克典，　三田竜太，　成尾由理香，増田太郎，裏出令子（京大院農・農学）

3A46p19　ダイズ QSOX によるタンパク質のジスルフィド結合形成

17:36　◦奥田　綾，松崎元紀，三田竜太，増田太郎，裏出令子（京大院農）

B20 会場　午前の部（9:00〜12:00）

糖鎖—構造，機能—

3B20a01　硫酸化スフィンゴ糖脂質 SM1a，SB1a の合成研究

9:00　◦廣瀬　遥[1]，玉井秀樹[1,2]，安藤弘宗[1,2]，石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS）

3B20a02　ラフト分子の一分子追跡に向けた蛍光ガングリオシドプローブの合成と機能評価 5

9:12　◦河村奈緒子[1,2]，安藤弘宗[1,2]，鈴木健一[2]，CHADDA Rahul[2]，池田泰祐[2]，石田秀治[1]，楠見明弘[2]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS）

3B20a03　*N*-Troc シアル酸誘導体を鍵化合物とする修飾シアル酸含有ガングリオシド GAA-7 の全合成

9:24　◦玉井秀樹[1,2]，安藤弘宗[1,2]，石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS）

3B20a04　糖鎖受容ペプチドの簡便な合成法の開発

9:36　◦朝比奈雄也[1,2]，神田美華[1]，北條裕信[1,2]（[1]東海大工生命，[2]東海大糖鎖研）

3B20a05　クルマエビのインスリン様造雄腺因子の化学合成研究

9:48　◦片山秀和[1]，窪田のぞみ[1]，粂圭一郎[1]，大平　剛[2]，北條裕信[1,3]（[1]東海大工・生命化学，[2]神奈川大理・生物科学，[3]東海大・糖鎖科研）

3B20a06　チオサリチル酸誘導体を脱離基にもつ各種糖供与体の反応挙動

10:00　◦櫻井理沙，土肥博史，西田芳弘（千葉大院融合）

3B20a07　植物病害を抑制する新規サリチル酸糖コンジュゲートの分子設計と機能解析

10:12　◦西田芳弘[1]，崔　紫寧[1]，土肥博史[1]，伊藤　潤[2]，雨宮良幹[2]（[1]千葉大院融合，[2]千葉大院園芸）

3B20a08　アンヒドロ糖を経由するジギトキソースの新規合成経路の開発

10:24　◦中島優子，勝田　亮，矢島　新，額田恭郎（東農大応生）

3B20a09　糖オキサゾリンを糖供与体とする Lacto-*N*-tetraose の酵素合成

10:36　◦小林厚志[1]，瀬野　宗[1]，黄　偉峻[1]，野口真人[1]，片山高嶺[2]，正田晋一郎[1]（[1]東北大院工，[2]石川県大生資工研）

3B20a10　アマドリ転位反応を経由する化学-酵素法により生成した人工糖タンパク質の解析

10:48　◦吉田尚生，酒井謙介，小林厚志，正田晋一郎（東北大院工）

3B20a11　LacdiNAc 構造を有する複合型糖鎖 9 糖の全合成研究

11:00　◦宮沢進平，松尾一郎（群馬大院工）

3B20a12　ドリコール結合 7 糖合成

11:12　◦宇津井隆志[1]，宮沢進平[2]，岩本将吾[2]，松尾一郎[1,2]（[1]群馬大工，[2]群馬大院工）

3B20a13　ヘキソピラノース供与体の反応性に 4 位水酸基保護基がもたらす効果の検証

11:24　◦松本佳央梨[1]，　中島慎也[1,2]，　安藤弘宗[1,2]，　石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS）

3B20a14　神経突起伸展活性をもつガングリオシド LLG-3 の構造活性相関研究

11:36　◦山岸愛実[1]，矢部(細田)律子[1,2]，玉井秀樹[1,2]，小西美紅[1,2]，今村彰宏[1,2]，　矢部富雄[1]，　安藤弘宗[1,2]，　石田秀治[1]，　木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS）

3B20a15　分子内アグリコン転移反応を利用した，*β*-L-アラビノフラノシド誘導体の合成研究

11:48　◦石渡明弘[1]，Kaeothip Sophon[2]，伊藤幸成[1,2]（[1]理研・基幹研，[2]ERATO・JST）

B20 会場　午後の部（14:00〜17:12）

糖鎖—構造，機能—

3B20p01　ジシアリルガラクトースユニットの実用的合成法の開発研究

14:00　◦廣瀬裕哉[1]，　安藤弘宗[1,2]，　石田秀治[1]，　木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS）

3B20p02　II 型 H 抗原糖鎖の効率的合成

14:12　◦原　　温[1]，　今村彰宏[1,2]，　安藤弘宗[1,2]，　石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大院応生，[2]京都大・iCeMS）

3B20p03　マンノース結合タンパク質の認識機構解明に向けたルイス A タンデムリピートの効率的合成研究

14:24　◦山路智也[1]，　植木章晴[1,2]，　安藤弘宗[1,2]，　石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS）

3B20p04　LPS/LOS の酸性内部コア糖鎖の合成研究

14:36　◦一柳　剛，庄野結大，蟻　瑞欽，島田麻衣，大柿敦嗣，門脇拓也（鳥取大農）

3B20p05　位置選択的に硫酸化されたグリコサミノグリカンオリゴ糖の合成

14:48　◦武田尚子[1]，田村純一[2]（[1]鳥取大院工，[2]鳥取大地域）

3B20p06　カルバグルコースを構成糖とする 5a,5a′-ジカルバ-*β*-D-グルコビオースの合成研究

15:00　◦館田尚家，宮崎達雄，鰺坂勝美（新潟薬大院応用生命科学）

3B20p07　多糖ナノ粒子を構造基盤としたインフルエンザウイルス結合性糖鎖クラスター材料の機能設計

15:12　◦尾形　慎[1]，　杉山尚弘[2]，　朴　龍洙[3]，　渡邊浩史[4]，柳瀬美千代[4]，　鷹羽武史[4]，　門川淳一[5]，　鈴木哲朗[6]，　碓氷泰市[2,3]（[1]福島高専物質工，[2]静岡大院農，[3]静岡大院創造，[4]江崎グリコ(株)健康科学研，[5]鹿児島大院理工，[6]浜松医大医）

3B20p08　志賀毒素に対する機能性多価糖鎖の合成

15:24　◦大泉貴宏[1]，村川明子[2]，碓氷泰一[2]，朴　龍洙[1,2]（[1]静岡大・農，[2]静岡大・創科院）

3B20p09　エンド-*α*-マンノシダーゼ解析のための阻害剤の合成

15:36　◦笠原佑太[1]，　岩本将吾[1]，　亀井健一[1]，　飯野健太[1]，瀬古　玲[2,3]，伊藤幸成[2,3]，松尾一郎[1]（[1]群馬大院工，[2]理研基幹研，[3]ERATO-JST）

3B20p10　Siglec-2 阻害剤としてのシスリガンドミミックの合成とその生物学的評価

15:48　◦菅沼勇輝[1]，　松原直子[3]，　岩山祐己[1,2]，　植木章晴[1,2]，今村彰宏[1,2]，　安藤弘宗[1,2]，　鍔田武志[3]，　石田秀治[1]，　木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS，[3]東京医科歯科大・疾患生命）

3B20p11　効率的な小胞体関連糖鎖ライブラリー構築を志向した高マンノース型糖鎖の合成

16:00　◦藤川紘樹[1]，小泉晶彦[1]，八須匡和[1]，迫野昌文[1]，高谷万紀[1]，松尾一郎[2]，　武田陽一[1]，　瀬古　玲[1]，　伊藤幸成[1,3]（[1]JST, ERATO，[2]群馬大院工，[3]理研基幹研）

3B20p12　ヒト ER *α*-1,2 mannosidase I の酵素 活性を加速する因子の探求

16:12　◦相川順一[1]，武田陽一[2]，松尾一郎[3]，伊藤幸成[1,2]（[1]理研基幹研，[2]ERATO・JST，[3]群馬大院工）

3B20p13　ヘパラン硫酸 6 位硫酸基転移酵素の発現を誘導するシグナル伝達経路の解明

16:24　◦西田光貴[1]，　永見圭太郎[2]，　金丸義敬[1,2,3]，　矢部富雄[1,2,3]（[1]岐阜大院・連農・生物資源，[2]岐阜大院・応生科・資源生命，[3]岐阜大・応生科・応用生命）

3B20p14　ブタ精子 CD52 の同定と細胞内カルシウム調節機能の解明

16:36　◦北島　健[1,2,3]，　金澤　尊[1,2,3]，　ガレノエステル[2]，カセカーンワラポン[2]，　堀　和紀[1,2]，　安江　博[4]，　佐藤ちひろ[1,2,3]（[1]名大院生命農学，[2]名大生物機能セ，[3]名大リーディング院 IGER，[4]農業生物資源研家畜ゲノム）

3B20p15　統合失調症患者に見出された ST8SiaII/STX が生合成するポリシアル酸の構造解析

16:48　◦羽根正弥[1,2,3]，北島　健[1,2,3]，佐藤ちひろ[1,2,3]（[1]名大・生物機能セ，[2]名大院・生命農学，[3]リーディング大学院プログラム）

3B20p16　Characterization and intracellular localization of the insect CMP-sialic acid syntheses

17:00　◦di wu[1,2,3]，　Akiko Fujita[1]，　Kayo Hamaguchi[1,3]，Anne Harduin-Lepers[4]，Philippe Delannoy[4]，Vladislav M. Panin[5]，Chihiro Sato[1,2,3]，Ken Kitajima[1,2,3]（[1]Biosci. Biotech. Center，[2]Program for Leading Graduate Schools IGER，[3]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.，[4]Univ of Lille, Villeneuve d'Ascq，[5]Texas A&M Univ.）

C31 会場　午前の部（9:00〜12:00）

新技術—分析法，解析法—

3C31a01　Cell-free Synthesis of Horseradish Peroxidase C for Bead Display-based High-throughput Screening

9:00　◦Bo ZHU，　Takaaki KOJIMA，　Yugo IWASAKI，Hideo NAKANO（Dept. Bioeng., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.）

3C31a02　卵白アルブミン，*β*-ラクトグロブリン，およびグリアジンのアレルゲン高感度測定

9:12　◦大岡尚貴，鈴木義規，斎木　博（東京工科大学）

3C31a03　水溶液中での DNA 核酸の結合定数

9:24　◦鈴木孝浩[1]，渡部　翔[2]，鈴木義規[1]，斎木　博[1]（[1]東京工科大学，[2]東京工科大学大学院）

3C31a04　海底下堆積物からの細胞分離手法，およびフローサイトメトリーによる細胞計数手法の確立

9:36　◦寺田武志[1]，諸野祐樹[2]，稲垣史生[2]（[1](株)マリン・ワーク・ジャパン，[2](独）海洋研究開発機構 高知コア研究所）

3C31a05　飲料中の微量アルコールの簡易測定法の開発

9:48　◦高柳純司, 渡辺敬之, 大嶋利幸（サッポロビール株式会社）

3C31a06　Multiplex（4-plex）TaqMan real-time PCR を用いた食品中に含まれる肉の種識別の検討

10:00　◦有賀博文[1,2]，Stevens Junko[2]（[1]Life Technologies Japan，[2]Life Technologies）

3C31a07　リアルタイム PCR による遺伝子解析方法の検討

10:12　◦渋井達郎，坂口大介，須藤達也，佐藤美香子，原　宏佳（日本獣医生命科学大学　応用生命科学部　食品科学科　食品バイテクノロジー教室）

3C31a08　マルチプレックス LAMP 法による深在性カンジダ症起因菌および深在性トリコスポロン症起因菌の迅速・簡便な検出法

10:24　◦笠原浩平, 石川紘司, 佐藤澄江, 渡辺幸一, 島川康久（ヤクルト中研）

3C31a09　乳製品中 *Filobasidiella neoformans* の迅速・簡便な検出法

10:36　◦石川紘司，笠原浩平，佐藤澄江，渡辺幸一，島川康久（ヤクルト中研）

3C31a10　ローリングサークル増幅法のベロ毒素 mRNA 検出への応用

10:48　◦小堀俊郎[1]，高橋宏和[1]，山嵜裕之[2]，千室智之[2]，小林崇良[2]（[1]農研機構食総研，[2]関東化学）

3C31a11　サルモネラ属細菌結合アプタマーの取得

11:00　◦皆川宏貴，秋富　穣，古市真木雄，堀井克紀，和賀　巌（NEC ソフト・VTC）

3C31a12　最確数・制限酵素断片長多型解析法の食品微生物分析への適用

11:12　◦渡辺克二，木塚　遼，平井　駿，梅田葉介（福工大･工･生命環境）

3C31a13　バックグラウンドがゼロの DNA クローニング法

11:24　◦後藤健太[1,2]，永野幸生[2]（[1]佐賀大院農，[2]佐賀大総分セ）

3C31a14　クエン酸の特異的検出を可能とするインジケータ蛍光タンパク質の創製

11:36　◦本田裕樹，桐村光太郎（早大・理工・応化）

3C31a15　“自分の”ヒト皮膚常在菌を活用した新しいスキンケア法の開発

11:48　◦野嶽勇一[1]，　松本菜季[2]，　三浦良子[2]，　藤本京子[1]，林田友紀[2]，深澤昌史[1]，本多英俊[2]，出来尾格[3]，榊原隆三[1]（[1]長崎国際大薬, [2](株)バイオジェノミクス, [3]英国健康保護局微生物部）

講演番号
開始時間　　演　　題　　発表者氏名（所属）

C11 会場　午前の部（9:00〜11:48）

環境—環境汚染物質，その他—

4C11a01　琵琶湖深湖底由来菌類によるセレンオキサニオン還元とナノ微粒子への変換

9:00　◦阪口利文[1]，　田邊伸康[1]，　有馬寿英[1]，　宮下英明[2]，石川可奈子[3]，岡村好子[4]（[1]県立広島大環境科学，[2]京都大人間環境，[3]県立琵琶湖環境科学研，[4]広島大先端物質科学研）

4C11a02　ブロッコリー実生におけるセレン化合物の酸化ストレス感受性に及ぼす影響

9:12　◦武田　徹，藤原知也，関根康平（近畿大・農・バイオ）

4C11a03　コメに蓄積するヒ素の化学形態と土壌中の動態に関する微生物の影響いついて

9:24　◦倉俣正人[1]，片岡良太[1,2]，榊原風太[1]，安倍　匡[1]，高木和広[1]，石川　覚[1]（[1]農環研，[2]山梨大）

4C11a04　セイタカアワダチソウの PCB 同族体の取り込み・移行促進物質の探索

9:36　◦嶋津小百合[1]，内山琢磨[2]，太田雅也[3]，芦田　均[1]（[1]神戸大院・農，[2]神戸大・農，[3]福山大生命工・生物工）

4C11a05　ヒノキ木紛の生分解性向上のための白色腐朽菌処理

9:48　◦小島　豪[1]，　時本景亮[2]，　西野直樹[1]，　仁戸田照彦[1]，神崎　浩[1]（[1]岡山大院環境生命，[2]日本きのこセ菌蕈研）

4C11a06　アルカリ蒸解スギ基質での *Trichoderma reesei* PC3-7 株の培養と基質糖化に関する研究

10:00　◦脇山慎平[1]，石倉喜郎[2]，金子　舞[2]，野尻昌信[3]，新井博之[1]，石井正治[1]，五十嵐泰夫[1]（[1]東京大院農，[2]地域環境資源センター，[3]森林総合研究所）

4C11a07　堆肥熟成過程における稲ワラ有機物中炭素の残存率

10:12　◦永井　勝[1]，坂田　洋[1]，佐藤義人[2]，多胡靖宏[1]，中村裕二[1]（[1]環境研，[2]青森産技セ）

4C11a08　堆肥化プロセスにおける亜酸化窒素発生に硝化・脱窒細菌が与える影響

10:24　◦大坪和香子[1]，　進藤絵里香[1]，　上田英代[2]，　上田裕一[2]，宮内啓介[1]，遠藤銀朗[1]（[1]東北学院大学，[2]有限会社日本ライフセンター）

4C11a09　畑土壌表面に施用した有機質肥料からの糸状菌脱窒による N_2O 発生

10:36　巍　　魏[1]，磯部一夫[1]，白鳥　豊[2]，西澤智康[1]，大塚重人[1]，◦妹尾啓史[1]（[1]東大院農生科，[2]新潟農総研）

4C11a10　人工土壌作出による有機質資源からの無機肥料製造技術と有機質肥料活用型養液栽培

10:48　◦篠原　信[1]，　岩井　喬[2]，　藤原和樹[1,2]，　青山ちひろ[2]，小川　順[3]，安藤晃規[3,4]，加藤康夫[5]，宮本憲二[6]，高野雅夫[2]（[1]農研機構，[2]名大院・環境，[3]京大院農・応用生命，[4]京大・生理化学，[5]富山県大工・生物工，[6]慶大・理工）

4C11a11　有機質肥料活用型養液栽培における *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* の動態解析

11:00　◦藤原和樹[1,2]，　飯田祐一郎[1]，　青山ちひろ[2]，　大西　純[1]，安藤晃規[3,4]，　小川　順[4]，　加藤康夫[5]，　宮本憲二[6]，　高野雅夫[2]，寺見文宏[1]，篠原　信[1]（[1]農研機構，[2]名大院環境，[3]京大・生理化学，[4]京大院農・応用生命，[5]富山県大・生物工，[6]慶大・理工）

4C11a12　有機質肥料活用型養液栽培を応用した有機質肥料の効率的無機化

11:12　◦青山ちひろ[1]，藤原和樹[2]，高野雅夫[1]，篠原　信[2]（[1]名大院環境，[2]農研機構）

4C11a13　有機質肥料活用型養液栽培における有機態窒素の硝化と菌相推移の解析

11:24　◦犬飼龍矢[1]，　安藤晃規[1,2]，　池本成美[3]，　島　　純[3]，青山ちひろ[4]，　吉田昭介[5]，　宮本憲二[5]，　加藤康夫[6]，　藤原和樹[4,7]，篠原　信[7]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大・生理化学，[3]京大・微生物科学，[4]名大院・環境，[5]慶大・理工，[6]富山県大・生物工，[7]農研機構）

4C11a14　次世代シークエンサーによる有機養液栽培における微生物叢の網羅的解析

11:36　◦吉田昭介[1]，　小野瑞季[1]，　篠原　亘[1]，　榊原康文[1]，安藤晃規[2,3]，小川　順[2]，加藤康夫[4]，篠原　信[5]，宮本憲二[1]（[1]慶大・理工，[2]京大院農・応用生命，[3]京大・生理化学，[4]富山県大・生物工，[5]農研機構）

C12 会場　午前の部（9:00〜12:00）

環境—環境汚染物質，その他—

4C12a01　ポリヒドロキシアルカン酸生産菌 *Ralstonia eutropha* におけるグリセロール資化能の強化

9:00　◦福居俊昭[1]，向山正治[2]，折田和泉[1]，中村　聡[1]（[1]東工大院生命理工，[2]日本触媒）

4C12a02　*Methylobacterium extorquens* の代謝改変によるメタノールを原料とした共重合 PHA の生産

9:12　◦折田和泉，中村　聡，福居俊昭（東工大院生命理工）

4C12a03　植物油を単一炭素源としたポリ（3-ヒドロキシブタン酸-*co*-3-ヒドロキシアルカン酸）の微生物合成

9:24　◦明智　聡，清水理恵，折田　泉，中村　聡，福居俊昭（東工大院生命理工）

4C12a04　組換え *Escherichia coli* によるポリ（3-ヒドロキシプロピオン酸）の生合成

9:36　◦渡辺将史[1]，堀川　洋[2]，向山正治[2]，折田和泉[1]，中村　聡[1]，福居俊昭[1]（[1]東工大院生命理工，[2]日本触媒）

4C12a05　*Ralstonia eutropha* 由来 PHA 重合酵素の改変による 2-ヒドロキシブタン酸重合能力の強化

9:48　◦越智杏奈[1]，　大場貴史[1]，　坂井浩平[1]，　松本謙一郎[1,2]，柘植丈治[2,3]，田口精一[1,2]（[1]北大院工，[2]JST-CREST，[3]東工大）

4C12a06　*Delftia acidovorans* DS-17 由来ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）重合酵素の特徴づけ及び組換え大腸菌を用いた PHA 生産への影響

10:00　◦廣江綾香，牛丸和乗，柘植丈治（東工大院総理工）

4C12a07　フェイシンタンパクが PHA 重合酵素の in vitro 重合活性に与える影響

10:12　◦牛丸和乗，柘植丈治（東工大院総理工）

4C12a08　PhaB 高活性体を用いた光学活性（*R*）-3-ヒドロキシブタン酸生産の向上

10:24　◦大井俊彦[1,2]，　本間以祝[1]，　渡辺剛志[1,2]，　松本謙一郎[1,2]，田口精一[1,2]（[1]北大院工，[2]CREST-JST）

4C12a09　動力学的解析および立体構造に基づいた進化型アセトアセチル-CoA レダクターゼの高活性化メカニズムの解明

10:36　◦渡辺剛志[1,3]，　松本謙一郎[1,3]，　本橋　廉[1]，　池田弘二[2]，田中良和[2]，姚　　閔[2]，田中　勲[2]，田口精一[1,3]（[1]北大院工，[2]北大院生命，[3]JST-CREST）

4C12a10　改変型重合酵素による 2-ヒドロキシブタン酸ベースポリマーの生合成と物性解析

10:48　◦青木駿介[1]，　大場貴史[1]，　越智杏奈[1]，　松本謙一郎[1,2]，田口精一[1,2]（[1]北大院工，[2]JST-CREST）

4C12a11　Metabolic engineering of b-oxidation pathway in *Ralstonia eutropha* for production of poly (3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) from biomass

11:00　◦CHAYATIP INSOMPHUN，Jun Mifune，Yui Kawashima，Izumi Orita，Satoshi Nakamura，Toshiaki Fukui（Tokyo Institute of Technology）

4C12a12　*Corynebacterium glutamicum* をプラットフォームとしたポリ乳酸様ポリマー合成系の効率化のための代謝工学および培養工学的アプローチ

11:12　◦飛谷康太[1]，宋　育陽[1]，松本謙一郎[1,2]，田口精一[1,2]（[1]北大院工，[2]JST-CREST）

4C12a13　*Geobacillus* sp. UZO 3 株が持つダイオキシン・2, 3, 7, 8-TCDD 分子内ジアリールエーテル結合還元開裂酵素の生化学的・遺伝学的研究

11:24　◦鈴木悠造[1]，　中村雅哉[2]，　大塚祐一郎[2]，　川上健志[1,3]，佐藤かんな[1]，　梶田真也[1]，　菱山正二郎[2]，　亀山敏治[4]，　高橋　惇[3]，片山義博[5]（[1]東農工大 BASE，[2]森林総研，[3]高砂熱学工業株式会

社，[4]環テックス株式会社，[5]日大生資科）

4C12a14　油兆試料から構築した n-アルカン分解メタン発酵共生系の群集構造解析

11:36　○中村浩平[1]，　早川沙也加[1]，　小栗正大[2]，　新里尚也[3]，高見澤一裕[1]（[1]岐大応生，[2]岐大院応生，[3]琉大熱生研）

4C12a15　セルロース系バイオマスを原料とした微生物燃料電池の開発

11:48　○小嶋章宏[1]，中村浩平[2]，高見澤一裕[2]（[1]岐大院応生，[2]岐大応生）

C20 会場　午前の部（9:00〜10:48）

有機―天然物–単離構造決定，植物―

4C20a01　海洋共生渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp. 由来の新規巨大代謝産物の単離，構造解析

9:00　○小野寺健一（高知大 , 総合研 , IMT）

4C20a02　紫外線エンド吸収と分取セルを利用した脂質，糖質等の新規定量法

9:12　○松本恵実，藤野和孝，牧岡富広，山本諭志，石野暢好，沢田義治，中塚進一（長良サイエンス株式会社）

4C20a03　ピーマン胎座由来のマウス腸管免疫に影響を及ぼす物質の探索

9:24　○長谷川功[1]，加藤　光[1]，高野文英[2]，只野　武[1]，太田富久[1]（[1]金大院薬，[2]日薬大）

4C20a04　Anti-inflammatory constituents from *Tabebuia avellanedae*

9:36　○Li Zhang[1]，　Suo Maorong[1]，　Isao Hasegawa[1]，Tetsuro Kawabata[1]，　Fumihide Takano[2]，　Takeshi Tadano[1]，Tomihisa Ohta[1]（[1]Kanazawa Univ., [2]Nippon Pharm. Univ.）

4C20a05　固定化ウレアーゼを用いた新規ウレアーゼ阻害剤のスクリーニング

9:48　○菅原美花子（神奈川工科大学）

4C20a06　*Bergenia ligulata* に含まれる DPPH ラジカル消去活性成分について

10:00　○武山佳代，貫名　学（山形大農）

4C20a07　ヤマブドウ種子中の DPPH ラジカル消去活性物質について

10:12　○戸塚紘二郎，貫名　学（山形大農）

4C20a08　アムラ果実エキスの成分研究

10:24　○好村守生[1]，　山上沙織[1]，　高田　瞳[1]，　吉田隆志[1]，吉川伸二[2]，天倉吉章[1]（[1]松山大薬，[2]日本新薬食開研）

4C20a09　ザクロの新規エラジタンニンオリゴマーの構造

10:36　○烏日娜[1]，李　鵬[1]，長友暁史[2]，西田典永[2]，伊東秀之[1]（[1]岡山大院医歯薬，[2]森下仁丹株式会社）

C21 会場　午前の部（9:00〜12:00）

有機―天然物–単離構造決定―微生物

4C21a01　放線菌 *Streptomyces* sp. MK-19 株からの新規 bafilomycin 類縁体の単離と構造の決定

9:00　○肥田木道生[1]，吉田　充[2]，小川直人[3]，小谷真也[4]（[1]静岡大院農，[2]農研機構食総研，[3]静岡大農，[4]静岡大院創造）

4C21a02　*Streptomyces* sp. No.6982 株が産生する新規 α アミラーゼ阻害剤 ASP5034

9:12　○笹村智司[1]，笹村裕美[2]，西脇真哉[2]，村松秀行[2]，田原敦生[1]，松山晃子[1]，高瀬茂弘[1]，羽鳥英孝[2]，中島秀典[1]（[1]アステラス製薬株式会社，[2]アステラスリサーチテクノロジー株式会社）

4C21a03　中皮腫細胞に対して細胞毒性活性を示す化合物 MBJ-0020 に関する研究

9:24　○泉川美穂[1]，　伊藤将士[2]，　河原哲平[1]，　坂田紀秋[2]，土田外志夫[2]，新家一男[3]（[1]JBIC，[2]日本マイクロバイオファーマ，[3]産総研）

4C21a04　植物から分離された希少放線菌の生産する新規物質の探索（2）

9:36　○富田智宏[1]，岩月正人[2]，奥山竜輝[1]，中島琢自[3]，松本厚子[2]，高橋洋子[1,2]，森美穂子[1,2]，大村　智[2]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大感染制御，[2]北里大生命研，[3]北里大感染制御研究機構）

4C21a05　細菌 No.27 株の生産するアフラトキシン生産阻害物質の同定と No.27 株を用いたアフラトキシン汚染防除

9:48　ジャムナクウスマ[1]，チナプチアマラ[2]，ポアポラセップアムナート[3]，河合　亮[1]，長澤寛道[1]，○作田庄平[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]タイ農業協同組合省，[3]カセサート大学）

4C21a06　タイ王国由来海洋放線菌からの新規生理活性物質の探索

10:00　○上口達也[1]，木谷　茂[2]，アリンチップタムチャイピネット[3]，五十嵐康弘[4]，仁平卓也[2]（[1]阪大院工，[2]阪大生物工学国際交流セ，[3]カセサート大，[4]富山県立大生工セ）

4C21a07　放線菌の生産する新規物質 mangromicin A および B の培養条件による生産性の向上と立体構造の研究

10:12　○神谷義之（北里大院・感染制御）

4C21a08　糸状菌より単離した新規ピロリジジノン化合物，ピロリジラクトンの構造

10:24　○野川俊彦，川谷　誠，浦本昌和，岡野亜紀子，青野晴美，高橋俊二，長田裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

4C21a09　ミコール酸含有細菌との複合培養により誘導生産される放線菌由来抗菌物質の構造

10:36　○武村思音[1]，　前田智也[1]，　福田隆雄[1]，　奥　直也[1]，五十嵐康弘[1]，尾仲宏康[1,2]（[1]富山県大･生工研セ，[2]東大院農生科･応生工）

4C21a10　rakicidin A の全立体構造および構造活性相関

10:48　○的場翔平[1]，奥　直也[1]，山崎洋子[2]，嶋崎良子[1]，宮永　賢[1]，五十嵐康弘[1]（[1]富山県大・生工セ，[2]微化研・沼津）

4C21a11　食用ラン藻由来リポペプチド nostofungicidine の絶対立体化学の解明

11:00　○米島洸佑，奥　直也，五十嵐康弘（富山県大工･生工研セ）

4C21a12　水圏由来粘液細菌の生産する新規 rhizopodin 類縁体の構造

11:12　○松本綾香[1]，奥　直也[1]，朝野裕貴[1]，松永孝之[2]，笠井宏朗[3]，五十嵐康弘[1]（[1]富山県立大工･生工研セ，[2]富山県　薬事研，[3]北里大･海洋バイオ）

4C21a13　海洋由来 *Firmicutes* 門細菌の生産する新規 acyloin 化合物の構造

11:24　○朝野裕貴[1]，　奥　直也[1]，　宮永　賢[1]，　笠井宏朗[2]，五十嵐康弘[1]（[1]富山県大・生工研セ，[2]北里大・海洋バイオ）

4C21a14　*Arthrobacter* 属放線菌の生産する新規デプシペプチド arthroamide の構造

11:36　○山本和樹[1]，Martha E. Trujillo[2]，五十嵐康弘[1]（[1]富山県大・生工研セ，[2]スペイン Salamanca 大）

4C21a15　*Fusarium* 属糸状菌の生産する新規デプシペプチド Hikiamide 類の構造決定

11:48　○福田隆雄[1]，須藤ユリ[2]，土屋有紀[2]，奥田　徹[2,4]，藤森文啓[3,4]，及川　勉[5]，五十嵐康弘[1]（[1]富山県立大学・生工研セ，[2]玉川大，[3]東京家政大，[4]ハイファジェネシス，[5]神奈川県保健福祉大）

C22 会場　午前の部（9:00〜10:48）

有機―天然物–生合成，代謝―

4C22a01　*Penicillium purpurogenum* IAM15392 株におけるアンモニウムトランスポーターの同定及び，アザフィロン色素生産時における機能解析

9:00　○小嶋　涼[1]，亀山歩美[2]，新居鉄平[1]，荻原　淳[1]，加藤　順[2]，春見隆文[1]（[1]日大院生資研究科・生資利用，[2]日大生資科・生命化）

4C22a02　ハスモンヨトウ腸管内容物で誘導されるダイズ二次代謝物質

9:12　○村上真一郎[1]，　網干貴子[1]，　吉永直子[1]，　石原　亨[2]，寺石政義[1]，小野　肇[1]，西田律夫[1]，奥本　裕[1]，森　直樹[1]（[1]京都大院農，[2]鳥取大）

4C22a03　アワヨトウ幼虫腸管内容物で誘導されるイネの代謝物質の品種間差

9:24　○松本ふう香[1]，　網干貴子[2]，　吉永直子[2]，　石原　亨[3]，寺石政義[2]，小野　肇[2]，西田律夫[2]，奥本　裕[2]，森　直樹[2]（[1]京大農，[2]京大院農，[3]鳥取大農）

4C22a04　フジコナカイガラムシ色素の生合成機構に関する研究

9:36　○山城敬範，菊池直也，長澤寛道，作田庄平（東大院農生科･応生化）

4C22a05　epsilon-ポリ-L-リジンのペプチド鎖長制御に関わる合成酵素アミノ酸残基の同定
9:48 ○鬼頭奈央子，喜多彰洋，芋川祐紀，丸山千登勢，片野　肇，濱野吉十（福井県立大学）
4C22a06　Streptolidine の生合成に関与する aminotransferase の機能解析
10:00 ○丸山千登勢[1]，佐橋周作[1]，泉川美穂[2]，新家一男[3]，濱野吉十[1]（[1]福井県大・生物資源，[2]JBIC，[3]産総研）
4C22a07　再構成天然物生合成系を利用した翻訳後ヘテロ環化酵素の触媒能解明
10:12 ○後藤佑樹[1,2]，伊藤悠美[3]，加藤保治[1]，角田翔太郎[1]，菅　裕明[1]（[1]東大院理，[2]JST さきがけ，[3]東大院工）
4C22a08　テトラプレニル-β-クルクメン環化酵素のさらなる能力の解析
10:24 佐藤　努[1,2]，○上田大次郎[2]，岡本　渉[1]，仲野千秋[1]，星野　力[1,2]（[1]新潟大院自，[2]新潟大農）
4C22a09　植物毒素チコリン生合成遺伝子の全塩基配列の決定
10:36 佐藤　努[1,2]，○山之内健太[1]，若林広恵[1]，橋本昌征[3]，兼目裕充[4]，浅川義範[4]，白川　隆[5]，仲野千秋[1]，星野　力[1,2]（[1]新潟大院自，[2]新潟大農，[3]成功大・分医研，[4]徳島文理大薬，[5]農研機構）

C25 会場　午前の部（9:00〜12:00）

有機―医薬，農薬―
4C25a01　モノクロロジメドン測定法の根底
9:00 ○知名秀泰，岡田　豊（立命館大生命科学）
4C25a02　ヤエヤマサソリ毒液中に含まれる機能未知のペプチド La1 の化学合成
9:12 ○長尾淳也，宮下正弘，中川好秋，宮川　恒（京大院農）
4C25a03　茶カテキン B 環部の酸化生成物に関する研究
9:24 ○廣瀬紗弓，柳瀬笑子（岐阜大院応生）
4C25a04　アントシアニン類のラジカル酸化反応
9:36 ○長谷川和俊，柳瀬笑子（岐阜大院応生）
4C25a05　アセチル化求電子体を用いたプロアントシアニジンの合成研究
9:48 ○土井翔馬[1]，春井宏太[2]，岡本泰輔[1]，石原沙也加[1]，岡本修平[1]，中島範行[3]，齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電通大院・工，[2]大阪電通大・工，[3]富山県大・工）
4C25a06　プロシアニジン・オリゴマーのプローブ化研究
10:00 ○岡本泰輔[1]，東野雄祐[2]，濱田義知[2]，石原沙也加[1]，岡本修平[1]，土井翔馬[1]，中島範行[3]，齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電通大院・工，[2]大阪電通大・工，[3]富山県大・工）
4C25a07　フルオラス・タグ化したプロシアニジンの合成と化学生物学研究
10:12 ○森口正太郎[1]，石原沙也加[2]，岡本泰輔[2]，東野雄祐[1]，春井宏太[1]，小芦貴弘[1]，齋藤安貴子[1,2]（[1]大阪電通大・工，[2]大阪電通大院・工）
4C25a08　プロシアニジン 2 量体の 3,3″-ジガレート体は HeLa S3 細胞の増殖を強く阻害する
10:24 ○石原沙也加[1]，岡本修平[1]，土井翔馬[1]，岡本泰輔[1]，綾野義博[2]，奥谷晃平[2]，須藤龍彦[3]，長田裕之[3]，齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電通大院・工，[2]大阪電通大・工，[3]理研基幹研・ケミカルバイオロジー）
4C25a09　白血病細胞分化誘導物質 indoluidin の構造活性相関研究
10:36 ○大倉彰太[1,2]，清水　猛[1]，川谷　誠[1]，青野晴美[1]，篠崎　開[2]，長田裕之[1]（[1]理研基幹研・ケミカルバイオロジー，[2]東電大院工）
4C25a10　インスリン様作用を有する二糖 neohesperidose の構造活性相関研究
10:48 ○新谷卓士[1]，加藤英介[2]，川端　潤[2]（[1]北大農・生機科，[2]北大院農・応生科）
4C25a11　霊長類モデルにおける SMTP-7 の脳梗塞改善作用
11:00 ○蓮見恵司[1]，庄　杰[1]，澤田裕伸[2]，西村直子[2]，長谷川啓子[2]，鈴木絵里子[1]（[1]東京農工大農，[2]株式会社ティムス）
4C25a12　γ-BHC 類縁体の合成とその活性
11:12 ○永崎果鈴[1]，辰己侑加理[1]，田中啓司[2]，松田一彦[1]，森本正則[1]，尾添嘉久[3]，栗原紀夫[4]（[1]近畿大農，[2]近畿大農・名古屋大エコトピア科，[3]島根大生物資源，[4]京都大）
4C25a13　α-BHC ラセミ体の光学分割とその鏡像異性体の活性
11:24 ○田中啓司[1]，永崎果鈴[2]，辰己侑加理[2]，松田一彦[2]，森本正則[2]，栗原紀夫[3]（[1]近畿大農，名古屋大エコトピア科，[2]近畿大農，[3]京都大）
4C25a14　インシリコスクリーニングによるブラシノライド様化合物の探索
11:36 ○瀧本征佑，中川好秋，宮川　恒（京大院農）
4C25a15　植物病原菌に対する gallic acid 誘導体の抗真菌効果
11:48 ○中川泰伯，伊藤晋作，佐々木康幸，矢嶋俊介（東農大院）

C26 会場　午前の部（9:00〜11:00）

有機―天然物–その他―
4C26a01　フェノールカルボン酸類のラジカル消去機構(33)―プロトカテキュ酸の水系での二量化反応機構の解析―
9:00 ○武田直樹，加藤英介，川端　潤（北大院農）
4C26a02　不拮抗阻害剤によるラット小腸 α-グルコシダーゼの選択的な精製法の開発
9:12 ○辻　裕貴，加藤英介，川端　潤（北大院農）
4C26a03　^{33}S 標識によるタンパク質の高感度 ^{33}S-NMR に向けて
9:24 ○増田裕一[1]，松尾真嗣[2]，水野　敬[3]，野田泰斗[2]，竹腰清乃理[2]，土井隆行[1]（[1]東北大院薬，[2]京大院理，[3]JEOL RESONANCE）
4C26a04　ピーマンにおけるフラボノイド蓄積に対する光の影響
9:36 ○手林慎一[1,2]，竹尾洋平[1]，大西信太郎[2]，吉田勝平[3]（[1]高知大農，[2]愛媛連大農，[3]高知大理）
4C26a05　オオツマキヘリカメムシ臭気成分の成長に伴う変化と警報フェロモン活性
9:48 ○角田友美，田母神繁，阿部　誠，野下浩二（秋田県大生資科）
4C26a06　日本在来カンキツ類の果実及び葉に含まれるフラボノイドの定量分析及び多変量解析
10:00 ○浅井智紀[1]，岡谷早矢加[2]，松川哲也[1]，梶山慎一郎[1]（[1]近畿大院生物理工，[2]近畿大生物理工）
4C26a07　大規模分子化学計算による酵素リパーゼの鏡像体選択性の予測
10:12 ○矢城陽一朗[1,2]，木村崇知[3]，亀澤　誠[3]，直島好伸[1,2]（[1]岡山理大自然科学研，[2]岡山理大院総合情報，[3]甲南化工）
4C26a08　ロドデンドロール型チロシナーゼ阻害剤の合成と生理活性評価
10:24 ○岩舘丈央[1]，柏倉　裕[2]，二瓶賢一[1]（[1]宇都宮大農，[2]フジグリーン）
4C26a09　非ステロイド性抗炎症薬のプロドラッグ化修飾による皮膚透過性増大戦略
10:36 ○森　亮貴[1]，守金大蔵[2]，高橋秀久[3]，稲垣　穣[1]（[1]三重大院・生資，[2]ダイヤ製薬株式会社，[3]ATM 株式会社）
4C26a10　Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase の蛍光基質の合成及び機能評価
10:48 ○竹井昭登，北詰千恵，杉山民二（明治大院農）

C15 会場　午前の部（9:00〜12:00）

酵素―酸化還元酵素，タンパク質・ペプチド代謝関連酵素―
4C15a01　深海脱窒細菌における 2 種の異化型硝酸塩還元酵素の生理的役割の解明
9:00 ○及川勇二[1]，加藤千明[2]，掘越弘毅[2]，川本　純[3]，栗原達夫[3]，為我井秀行[1]（[1]日大院相関理化，[2]海洋研究開発機構，[3]京大化学研究所）
4C15a02　*Shewanella* 属のシトクロム c_4 の酸化活性の圧力における影響
9:12 ○迫田彩日[1]，羽賀みなみ[1]，加藤千明[2]，栗原達夫[3]，三本木至宏[4]，為我井秀行[1]（[1]日大院相関理化，[2]海洋研究開発機構，[3]京大化学研究所，[4]広大院生物圏科学研究所）
4C15a03　新規二機能性フラビン酵素 Pseudomonas sp. AIU 813 由来 L-アミノ酸モノオキシゲナーゼ / オキシダーゼの X 線結

晶構造解析

9:24 ○イムドヒョン[1]，松井大亮[2,4]，礒部公安[3]，浅野泰久[2,4]，伏信進矢[1,4]（[1]東大農・応工，[2]富山県大工・生工研セ，[3]岩手大農，[4]JST, ERATO）

4C15a04　基質特異性の高い L- アルギニンオキシダーゼの探索

9:36 ○寺井杏奈[1]，松井大亮[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

4C15a05　*Penicillium* sp. KAIT-M-117 由来新規 γ-アミノ酪酸オキシダーゼ遺伝子のクローニング

9:48 ○糸我美瑞[1]，山村　晃[2]，松本邦夫[2]，谷　修治[1]，炭谷順一[1]，川口剛司[1]（[1]阪府大院生環科，[2]神工大応用バイオ）

4C15a06　*Phialemonium* sp. AIU 274 が産生する中鎖アミン酸化酵素の精製と性質

10:00 ○佐々木朋子[1]，相上雄亮[1]，山田美和[1]，岸野重信[2]，小川　順[2]，礒部公安[1]（[1]岩手大農，[2]京都大院農）

4C15a07　*Aspergillus aculeatus* 由来糖化アミノ酸オキシダーゼホモログの基質特異性について

10:12 ○宮武はる香，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大院生環科）

4C15a08　非リボソーム型ペプチド合成酵素のアデニル化ドメインを利用したアミノ酸アミド合成法の開発

10:24 ○鈴木亮平[1]，原良太郎[2]，木野邦器[1,2]（[1]早大理工・応化，[2]早大・科健機構）

4C15a09　*Pseudomonas* 由来 β-peptidyl aminopeptidase の酵素特性評価

10:36 ○有馬二朗，田中あゆみ，森本正純，森　信寛（鳥取大農）

4C15a10　エリンギ由来セリンアミノペプチダーゼの一次構造解析と酵素化学的性質

10:48 ○東海彰太，千葉真範，森　信寛，有馬二朗（鳥取大農）

4C15a11　ミミズ（Eisenia foetida）由来の抗植物ウイルス性メタロプロテアーゼ遺伝子のクローニングと発現

11:00 ○上田光宏[1]，谷川元子[2]，中澤昌美[3]，宮武和孝[4]，脇本吉清[5]，坂口　実[6]，井上國世[7]（[1]阪府大院生環科，[2]阪府大院生環科，[3]阪府大院生環科，[4]帝塚山学院大，[5]ワキ製薬，[6]大阪薬科大学，[7]京都大学）

4C15a12　カニより分離した *Bacillus megaterium* 由来プロテアーゼの精製と特性評価

11:12 ○小山秋平[1]，山下　隆[2]（[1]東京工科大院・バイオニクス，[2]東京工科大・応用生物）

4C15a13　耐熱性セリン-カルボキシルプロテアーゼ，クマモリシンの活性化機構の解析

11:24 ○塩川史弥[1]，尾山　廣[2]，伊東昌章[3]（[1]沖縄高専　専攻科，[2]摂南大　理工　生命科学，[3]沖縄高専　生資工）

4C15a14　大腸菌発現系を用いたヒツジアンジオテンシノーゲンの大量生産

11:36 ○安部江里香[1]，稲山亜由美[2]，山口貴士[1]，朴　明宣[3]，大野　敏[3]，横川隆志[3]，西川一八[3]，鈴木文昭[2]，中川　寅[2]，海老原章郎[2]（[1]岐阜大院・応生，[2]岐阜大・応生，[3]岐阜大・工）

4C15a15　全 400 種ジペプチドの網羅的解析により解明された真核生物ペプチドトランスポーターの基質多選択性

11:48 ○伊藤圭祐[1]，疋田　礼[1]，本山貴康[2]，加藤竜司[3]，河原崎泰昌[1]（[1]静県大院・生活健，[2]不二製油・フードサイエンス研，[3]名大院・創薬）

C16 会場　午前の部（9:00〜11:36）

酵素—糖質代謝関連酵素，脂質代謝関連酵素—

4C16a01　Family GH19 キチナーゼ−基質複合体の立体構造解析

9:00 ○近藤香織[1]，梅本尚之[1]，大沼貴之[1]，稲永英子[2]，大澤拓生[2]，沼田倫征[2]，深溝　慶[1]（[1]近畿大院農・バイオ，[2]産総研・バイオメディカル）

4C16a02　ナガハハリガネゴケ由来キチナーゼ Loop 挿入変異体の作製と機能解析

9:12 ○竹中祥子，大沼貴之，深溝　慶（近大院農）

4C16a03　高い糖転移活性を示すソテツ由来クラス V キチナーゼ CrChiA の構造と機能

9:24 神田有華[1]，梅本尚之[1]，○大沼貴之[1]，平良東紀[2]，大澤拓生[3]，沼田倫征[3]，深溝　慶[1]（[1]近畿大院農，[2]琉球大農，[3]産総研）

4C16a04　GH18 キチナーゼのアロサミジン結合性：植物酵素と微生物酵素の比較

9:36 ○梅本尚之[1]，大沼貴之[1]，平良東紀[3]，作田庄平[2]，深溝　慶[1]（[1]近大院農，[2]東大院農生科，[3]琉球大農）

4C16a05　Pseudomonas sp. KN501 の生産するキチナーゼに関する研究

9:48 ○横地佐江子[1]，松永　彩[2]，平野貴子[2]，袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資料，[2]日大生資科・生化）

4C16a06　構造一体型キチナーゼ *Serratia marcescens* キチナーゼ B の結晶性キチン分解機構の解明とフレキシブル型キチナーゼとの比較解析

10:00 ○杉本華幸[1,2]，中村啓太[2]，西野裕史[1]，藤沼晶子[2]，橋詰義夫[2]，丸屋良輔[2]，五十嵐圭日子[3]，鮫島正浩[3]，渡辺大輝[4]，内橋貴之[4]，安藤敏夫[4]，鈴木一史[1,2]，渡邉剛志[1,2]（[1]新潟大・農・応生化，[2]新潟大院・自然科学，[3]東大院・農生科，[4]金沢大院・自然科学）

4C16a07　真正細菌および古細菌におけるイノシトールリン脂質の新規生合成経路の普遍性

10:12 ○森井宏幸[1]，小川みどり[2]，福田和正[2]，谷口初美[2]（[1]産業医大・化学，[2]産業医大・微生物）

4C16a08　*Lactobacillus plantarum* AKU 1009a 由来新規エノン還元酵素の結晶構造解析

10:24 ○侯　峰[1]，宮川拓也[1]，岸野重信[2]，小川　順[2]，田之倉優[1]（[1]東大院農生科，[2]京大院農）

4C16a09　ホスホエタノールアミンシチジリル基転移酵素 ECT の基質認識機構の X 線結晶構造解析

10:36 ○王　世鵬[1]，大塚　淳[1]，福田良一[2]，永田宏次[1]，太田明徳[2]，田之倉優[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大院農生科・応生工）

4C16a10　油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 由来 phospholipid: diacylglycerol acyltransferase ホモログの機能解析

10:48 ○落合美佐[1]，櫻谷英治[2]，安藤晃規[2,3]，小川　順[2]（[1]サントリービジネスエキスパート(株)，[2]京大院農・応用生命，[3]京大・生理化学ユニット）

4C16a11　電極表面の電場による酵素の変形

11:00 ○北隅優希[1,3]，白井　理[1]，山本雅博[2,3]，加納健司[1,3]（[1]京大院農，[2]甲南大理工，[3]CREST）

4C16a12　アルブチン・ゲンチジン酸縮合体アグリコンの物理化学的性質

11:12 ○木曽太郎，桐生高明，村上　洋，中野博文（阪市工研）

4C16a13　小麦粉生地タンパク質のジスルフィド結合形成に対する小麦粉内在 PDI-Ero1 の作用について

11:24 ○西堀史也[1]，岡　大貴[2]，野口治子[3]，内野昌孝[3]，野口智弘[2]，高野克己[3]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・食加技セ，[3]東京農大応生・化学）

A11 会場　午前の部（9:12〜12:00）

食品—食品工学–保蔵，安全性—

4A11a02　刺身用冷凍魚肉に最適な解凍方法の検討

9:12 ○小南友里，中野早紀，渡辺　学，鈴木　徹（東京海洋大学大学院）

4A11a03　小麦澱粉の糊化・老化に及ぼすヒドロキシプロピル化タピオカ澱粉添加の影響

9:24 ○鳥井昭良[1]，松宮健太郎[2]，林由佳子[2]，入江謙太朗[3]，松村康生[2]（[1]京大・農，[2]京大院・農，[3](株)日清製粉グループ本社・基礎研究所）

4A11a04　TLC を用いたビタミン E の簡易目視定量法

9:36 ○赤坂和昭，細矢理奈（尚絅学院大）

4A11a05　NMR に基づくコーヒー生豆の品種・産地の鑑別法

9:48 ○魏　菲菲[1,2]，降旗一夫[1]，甲田政則[1]，胡　芳宇[1]，宮川拓也[1]，田之倉優[1]（[1]東大院農生科，[2]学振）

4A11a06　食肉由来家畜飼料添加物の硫酸化によるヒトでの代謝

10:00 ○黒木勝久[1]，榊原陽一[1]，LIU Ming-Cheh[2]，水光正仁[1]（[1]宮崎大農応生科，[2]トレド大薬）

4A11a07　大豆クラス 2 食物アレルゲン Glym4 の精製，特性解析及びモノクローナル抗体作製

10:12 ○末森祐輔，木下恵利，矢野えりか，崎川貴文，財満信宏，森山達哉，河村幸雄（近畿大院農）

4A11a08　抗菌ペプチドを利用した微生物検出法における検出用プローブの菌体結合量解析

10:24 ○阿部千春[1]，越山竜行[1]，坂井ちひろ[1]，中住太一[1]，冨澤　聡[1]，北條江里[2]，大槻隆司[2]，米北太郎[2]，森下直樹[2]，菊川峰志[1]，熊木康裕[1]，神谷昌克[1]，出村　誠[1]，河野敬一[1]，松本貴之[2]，森松文毅[2]，相沢智康[1]（[1]北大･院生命科学，[2]日本ハム･中研）

4A11a09　抗菌ペプチドを用いたラテラルフローによる腸管出血性大腸菌，カンピロバクター及びサルモネラ検出法の開発

10:36 ○北條江里[1]，大槻隆司[1]，米北太郎[1]，森下直樹[1]，松本貴之[1]，相沢智康[2]，森松文毅[1]（[1]日本ハム･中研，[2]北大院生命･生命融合）

4A11a10　抗菌ペプチド「ナイシン」およびエタノールを感作した乳酸菌の菌体内残存物質網羅（メタボローム）解析

10:48 ○川井　泰，郭　暁艶，大島　悟，木ノ内智之，水谷　陽，鈴木はるか，西村順子，北澤春樹，齋藤忠夫（東北大院農）

4A11a11　米飯保存時の黄色ブドウ球菌エンテロトキシン A 産生に対する培養温度の影響

11:00 ○筒浦さとみ，村田容常（お茶大院）

4A11a12　食中毒菌の毒素産生および活性を抑制する植物食品の探索

11:12 ○青木菜摘[1]，島村裕子[1]，田中　隆[2]，村田容常[3]，増田修一[1]（[1]静岡県大・食品栄養，[2]長崎大院・医歯薬，[3]お茶大院・人文創科）

4A11a13　食肉中の食中毒菌の分布とその制御に関する研究

11:24 ○新家桃香[1]，島村裕子[1]，青野博志[2]，青野盈瓠[3]，篠田和代[3]，佐藤勝浩[4]，村田容常[5]，増田修一[1]（[1]静岡県大院・薬食生命科学，[2]アオノフレッシュミート(株)，[3]アオノミート(株)，[4](株)ガイア，[5]お茶大院・人文創科）

4A11a14　白菜浅漬けに混入した大腸菌 O157 の生存性

11:36 ○稲津康弘，大畑由起子，川崎　晋（農研機構　食総研）

4A11a15　イオン半導体由来の抗酸化作用を基盤とする安全・安心な食品加工工程の構築

11:48 ○田村健治[1]，苅野　仁[2]（[1]首都大産技高専品川，[2](有)イオン化学）

A12 会場　午前の部（9:00～11:36）

食品―食品化学–その他―

4A12a01　新ショウガとひねショウガの多面的成分組成の比較

9:00 ○飯島陽子[1]，櫻井　望[2]，鈴木秀幸[2]，柴田大輔[2]（[1]神奈川工科大応用バイオ，[2]かずさ DNA 研産業基盤）

4A12a02　塩味受容体 hENaC 発現細胞系による化合物ライブラリーを用いた塩味増強剤の探索

9:12 ○松田龍星[1]，笠原洋一[1,2]，櫻井敬展[2]，石丸喜朗[1]，三坂　巧[1]，阿部啓子[1,3]，朝倉富子[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]日清食品 HD・食総研，[3]神奈川科学技術アカデミー）

4A12a03　苦味抑制物質あるいはエマルション形成が STC-1 細胞の苦味応答に及ぼす影響

9:24 ○古屋進之介，江草　愛，西村敏英（日獣大　応生）

4A12a04　呈味を有さない酵母エキスが基本五味に与える影響

9:36 ○安松良恵[1]，大野勇司[2]，古屋進之助[2]，江草　愛[2]，阿孫健一[1]，池田咲子[1]，山下裕隆[1]，西村敏英[2]（[1]興人ライフサイエンス株式会社，[2]日獣大・応生）

4A12a05　酵母エキス成分の分画物添加が基本味溶液に及ぼす影響

9:48 ○大野勇司[1]，江草　愛[1]，安松良恵[2]，阿孫健一[2]，池田咲子[2]，山下裕隆[2]，西村敏英[1]（[1]日獣大　応生，[2]興人ライフサイエンス(株)）

4A12a06　米麹による食肉加工

10:00 ○飛塚幸喜，城　祥子，安食雄介，野内義之（山形工技セ）

4A12a07　乳酸菌を用いた発酵浅漬けの製造

10:12 ○寺田　創，西野智彦（東京工科大院バイオ）

4A12a08　冷凍すり身（イトヨリダイ）のゲル形成能低下を引き起こすプロテアーゼについて

10:24 ○若宮英倫子[1]，野口治子[2]，内野昌孝[2]，高野克己[2]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・化学）

4A12a09　豆腐形成における凝固剤濃度が沈殿に与える影響と凝固剤種の違い

10:36 ○有井康博[1]，鳥居絵美[1]，岡村麻衣[1]，竹中康之[2]（[1]武庫川女子大生活環境，[2]神戸松蔭女子大生活）

4A12a10　蚕サナギおよびイナゴ蛋白質の栄養特性

10:48 ○友竹浩之，片桐充昭，柴本むつ美（飯田女子短期大学）

4A12a11　核酸染色試薬によるアルデヒド修飾タンパク質の認識

11:00 ○宮下宙士，近澤未歩，大瀧菜月，柴田貴広，河合慶親，内田浩二（名大院生命農）

4A12a12　グリセルアルデヒド修飾アルブミンのグリケーション部位とアミノ酸配列の解析

11:12 ○臼井照幸[1,2]，山岸　理[2]，渡辺寛人[2]，早瀬文孝[2]（[1]昭和学院短大ヘルスケア栄養，[2]明治大農）

4A12a13　LC-MS/MS による過酸化脂質-DNA 付加体の網羅解析及び検出系の確立

11:24 河合慶親[1]，○額惠理香[2]，柴田貴広[1]，内田浩二[1]（[1]名大院農，[2]名大農）

A15 会場　午前の部（9:00～11:48）

食品―食品機能・栄養–神経，内分泌―

4A15a01　カルノシンによる腸管における CREB の活性化とその機能性

9:00 ○藤井　薫[1]，門岡桂史[2]，松本貴之[3]，森松文毅[3]，片倉喜範[1,2,4]（[1]九大院・シス生，[2]九大院・生資環，[3]日ハム中研，[4]九大院・農院）

4A15a02　消化管内分泌細胞株において不飽和アルデヒドは TRPA1 を介して CCK 分泌を誘導する

9:12 ○中島進吾[1]，比良　徹[1]，西山千草[2]，山下貴俊[2]，今義　潤[2]，原　博[1]（[1]北大院農，[2]株式会社　J-オイルミルズ　油脂開発研究所）

4A15a03　GLP-1 の分泌を促進する食品因子の検討とその機序解明

9:24 ○滝川雅仁，栗本雄太，津田孝範（中部大応生）

4A15a04　米胚乳ペプチドはラットにおいて GLP-1 分泌を促進して血糖上昇を抑制する

9:36 ○石川結貴[1]，比良　徹[2]，藤井幹夫[3]，門脇基二[4]，原　博[2]（[1]北大農生機化，[2]北大院農応生科，[3]亀田製菓，[4]新潟大院自然研）

4A15a05　食用菊「モッテノホカ」成分による PC12 細胞の神経突起伸長作用は P38MAPK のリン酸化を抑制することにより増強する

9:48 ○仁科淳良[1]，纐纈　守[2]，二ノ宮真之[2]，木村博一[3]（[1]米沢女子短期大学，[2]岐阜大学，[3]国立感染研）

4A15a06　血管弛緩性ペプチド Trp-His（WH）は筋管細胞の AMP キナーゼを活性化する

10:00 ○曽我　実[1]，大橋彩加[1]，谷口恵実[1]，滝川雅仁[1]，松井利郎[2]，津田孝範[1]（[1]中部大・応生，[2]九大院・農）

4A15a07　フィタン酸によるヒストン脱アセチル化酵素活性化作用

10:12 ○長井　薫（山梨大院医工総合）

4A15a08　コムギ由来ペプチドの新しい機能性

10:24 ○山本裕佳子[1]，水重貴文[1,2]，金本龍平[1]，新村由記[3]，大日向耕作[1]（[1]京大院・農・食品生物，[2]京大・学際融合・生理化学研究ユニット，[3]日清ファルマ(株)）

4A15a09　食刺激が離乳期のマウス大脳皮質味覚野・体性感覚野へ及ぼす影響の解析

10:36 ○伊藤俊輔，青地俊亮，藍澤広行，三坂　巧（東大院農生化・応生化）

4A15a10　ブラジル産プロポリス抽出物による小胞体ストレスからの Neuro2a 細胞保護効果

10:48 ○石合　忍[1]，田原　渉[2]，山本悦子[2]，山本倫大[2]，長井　薫[1]（[1]山梨大院，[2]日本自然食品(有)）

4A15a11　抗酸化食品成分によるアルツハイマー病の予防に関する動物モデル研究

11:00 ○芝原　恵，田村　南，Bruno Herculano，久恒辰博（東大院・新領域・先端生命）

4A15a12　高機能食品素材の脳老化に対する予防・改善効果の評価に適した人体用 MRI 脳画像計測法の確立

11:12 ○樋口陽太[1]，大庭彩香[1]，阿部欣史[1]，陳　揚[1]，左達秀敏[2]，中村純二[2]，時光一郎[2]，久恒辰博[1]（[1]東大院･新領域･

先端生命，[2]花王株式会社・ヒューマンヘルスケア研究センター）

4A15a13　The main function of food intake is to reduce stress.

11:24　◦Shuichi HASHIZUME[1,2]（[1]Idea-Creating Lab, [2]Toho Univ.）

4A15a14　β-ユーデスモールの飲用による自律神経調節作用

11:36　◦小原一朗[1]，北尾紗代子[1]，岡田紘幸[1]，小山田千秋[1]，高橋千佳[1]，眞鍋簡利[1]，形山幹生[1]，永井克也[2]（[1]キリン株式会社健康技術研究所，[2]株式会社 ANBAS）

A16 会場　午前の部（9:00〜11:36）

食品―食品機能・栄養-消化・吸収，循環―

4A16a01　フラボノイドのコレステロール腸管吸収阻害機構の解析

9:00　◦猫橋茉莉[1]，小川真奈[2]，中澤京子[1]，加藤久典[1]，三坂　巧[1]，荻原琢男[3]，阿部啓子[1]，小林彰子[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大農，[3]高崎健大・薬）

4A16a02　フラボノイドの胆汁酸腸管再吸収阻害機構の解析

9:12　◦小川真奈[1]，猫橋茉莉[2]，中澤京子[2]，加藤久典[2]，荻原琢男[3]，阿部啓子[2]，小林彰子[2]（[1]東大農，[2]東大院農生科・応生化，[3]高崎健大・薬）

4A16a03　ローヤルゼリーに含まれる 10-hydroxy-*trans*-2-decenoic acid の吸収と代謝に関する基礎的研究

9:24　◦成田幸夫，加藤健司，太田象三，市原賢二（アピ(株)長良川リサーチセンター）

4A16a04　多継代 Caco-2 のトランスクリプトミクスによる形質変化解析

9:36　◦鈴木千尋[1]，勝山真多[2]，中井雄治[2]，阿部啓子[2]，小林彰子[2]（[1]東大農，[2]東大院農生科・応生化）

4A16a05　ラットにおける肝臓脂肪蓄積に及ぼす MFGM の抑制効果

9:48　◦小田垣成美[1]，瀧口ひとみ[1]，内田健治[2]，山田　潔[1]，東　徳洋[1]（[1]宇都宮大農，[2]よつ葉乳業株式会社）

4A16a06　AV シャント血栓モデルを用いた麹エキス末の抗血栓効果

10:00　◦菅美奈子[1]，山下裕輔[1]，武島一仁[1]，丸　勇史[1]，脇本真之介[2]，脇本吉清[2]，金　武祚[1]（[1]株式会社ファーマフーズ，[2]ワキ製薬株式会社）

4A16a07　Val-Pro-Pro，Ile-Pro-Pro 摂取が皮膚血流に与える影響

10:12　◦鈴木千尋[1]，野中敦子[1]，中村哲平[1]，大木浩司[1]，池谷敏郎[2]，北風政史[3]（[1]カルピス(株)，発酵応用研究所，[2]池谷医院，[3]国立循環器病センター）

4A16a08　ザクロ抽出物のヒトリコンビナントマルターゼ阻害活性

10:24　◦川上賀代子[1]，李　鵬[2]，裏地美杉[1]，畑中唯史[1]，伊東秀之[2]（[1]岡山生物研，[2]岡山大院医歯薬）

4A16a09　ウニ加工品並びにウニ魚醤のイン・ビトロ系における抗酸化性

10:36　◦原田和樹[1]，福田　翼[1]，和田律子[1]，平岡亮人[1]，横山　駿[1]，島田和子[2]，木梨直子[3]，高村仁知[3]（[1]水大校・食科，[2]山口県大・看護栄養，[3]奈良女大院・人間文化）

4A16a10　ヒト微量アミン関連受容体から見た発酵食品由来芳香族アミンの食品機能性

10:48　◦村上由佳，高濱佑成，森村　茂，太田広人（熊大・院・自然科学）

4A16a11　消化管で機能する亜鉛トランスポーターを標的にした亜鉛吸収促進因子の探索

11:00　◦橋本彩子[1]，木津久美子[2]，宮前友策[1]，増田誠司[1]，永尾雅哉[1]，成田宏史[2]，神戸大朋[1]（[1]京大院・生命，[2]京女大・家政・食物栄養）

4A16a12　亜鉛トランスポーター ZIP4 の発現を促進する大豆由来成分の単離・同定

11:12　◦高橋正和[1]，大倉克摩[1]，橋本彩子[2]，永尾雅哉[2]，神戸大朋[2]，入江一浩[3]，大東　肇[1]（[1]福井県大・生物資源，[2]京大院生命・統合生命，[3]京大院農・食生科）

4A16a13　マウス小腸上皮における味覚関連遺伝子群の発現解析

11:24　◦吉岡美紗子[1]，石丸喜朗[1]，朝倉富子[1]，阿部啓子[1,2]（[1]東大院農生科・応生化，[2]KAST）

A22 会場　午前の部（9:00〜11:24）

食品―食品機能・栄養-癌―

4A22a01　*Lactobacillus paracasei* K71 の経口摂取による腸管 IgA レベル亢進と形質細胞様樹状細胞の APRIL 発現増大

9:00　◦寺平拓也[1]，五十嵐晶[1]，熊谷武久[2]，藤井幹夫[2]，城斗志夫[3]，原　崇[3]（[1]新潟大院自然科学，[2]亀田製菓，[3]新潟大農）

4A22a02　乳児ラット壊死性腸炎モデルにおけるヒトミルクオリゴ糖 Lacto-*N*-biose の影響

9:12　◦清水金忠[1]，佐藤拓海[1]，和泉裕久[2]，岩淵紀介[1]，小田巻俊孝[1]，西本　完[3]，阿部文明[1]，北岡本光[3]（[1]森永乳業・食基研，[2]森永乳業・栄科研，[3](独）食品総合研究所）

4A22a03　パン酵母由来 β-グルカン（BBG）のマクロファージにおける抗炎症作用

9:24　◦保田倫子[1]，許　小娟[2]，水野雅史[2]，芦田　均[2]（[1]神戸大院・自然科学，[2]神戸大院・農）

4A22a04　ヒトマクロファージ様細胞における緑茶の幼葉由来水溶性高分子によるインターフェロン α 産生誘導とその作用機序

9:36　◦物部真奈美，荻野暁子，江間かおり，徳田佳子，山本(前田)万里（農研機構・野茶研）

4A22a05　ケルセチンによるビフィズス菌の抗炎症活性増強効果

9:48　◦坂野太研，川畑球一，大東　肇（福井県大・生物資源）

4A22a06　マクロファージの NO 産生における食由来化合物の相乗的抑制効果の解析

10:00　◦上前知之，川畑球一，高橋正和，大東　肇（福井県大院・生物資源）

4A22a07　コラーゲン誘導関節炎マウスにおける水溶性の非変性 II 型コラーゲンの効果

10:12　◦吉成織恵[1,2]，塩島由晃[1]，森山浩義[1,2]，篠崎淳一[2]，中根孝久[2]，増田和夫[2]（[1]株式会社龍泉堂，[2]昭和薬科大学）

4A22a08　オリーブ油搾り粕を有効利用したロコモシティブシンドローム（関節炎）対応食品素材の開発

10:24　◦福光　聡[1]，安本秀幸[2]，間　和彦[1]，落合　潔[1]（[1]日本製粉・中研，[2]東洋オリーブ）

4A22a09　紫外線惹起による皮膚炎症に対するキノコ由来スフィンゴ脂質の抑制効果

10:36　◦都築　毅[1]，後藤智生[2]，阿部敬悦[1]（[1]東北大院・農，[2]岐阜セラツク）

4A22a10　TCR トランスジェニックマウスを用いた食物アレルギー性皮膚炎モデルの解析

10:48　◦平出恵利華[1,2]，足立(中嶋)はるよ[2]，北村紀子[3]，上滝隆太郎[1,2]，武山　純[1,2]，佐伯真弓[3]，西村友枝[3]，神沼　修[3]，廣井隆親[3]，八村敏志[1,2]（[1]東大院農生科･応生化，[2]東大院農生科･食の安全研セ，[3]東京都医学総合研・花粉症プロ）

4A22a11　フキ葉抽出物（*Petasites japonicus*）のカドミウム腎臓障害緩和作用

11:00　◦吉城由美子，開田環美，今井　楓（石川県大）

4A22a12　米ぬか由来アラビノキシラン加水分解物（HRB）によるマウスの LPS/D-ガラクトサミン肝障害の抑制機序

11:12　◦花木麻里子[1]，平井　静[1]，朱　霞[2]，猪狩直樹[2]，江頭祐嘉合[1]（[1]千葉大院・園芸応生化，[2]大和薬品）

B11 会場　午前の部（10:00〜12:00）

微生物―代謝-代謝調節，発酵生理，メタボローム―

4B11a06　13C 安定同位体希釈に基づく新規代謝ターンオーバー解析システムの提案

10:00　◦傳寶雄大[1]，中山泰宗[1]，原田和生[2]，馬場健史[1]，福崎英一郎[1]（[1]大阪大院工，[2]大阪大院薬）

4B11a07　*In vitro* 代謝経路による酵素エフェクター同定手法

10:12　◦斎藤菜摘，曽我朋義，冨田　勝（慶大・先端生命研）

4B11a08　マイクロ波照射が大腸菌のグルコース代謝に与える効果

10:24　◦佐成　巧，麻生祐司，小原仁実（京都工繊大院・工芸科学）

4B11a09　ターゲットメタボロミクスに基づく *Clostridium cellulovorans* の代謝経路の解明

10:36 ○篠原昌宏[1]，森坂裕信[1]，松井一真[1]，高嶋和也[2]，黒田浩一[1]，三宅英雄[2]，田丸　浩[2]，植田充美[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]三重大院・生資）

4B11a10　枯草菌ゲノム縮小株を用いた組換えタンパク質生産における転写，代謝フラックス解析

10:48 ○戸谷吉博[1]，　河崎優樹[1]，　平沢　敬[1]，　増田健太[2]，森本拓也[2]，　ONUMA Chumsakul[3]，　石川　周[3]，　大島　拓[3]，影山　泰[2]，尾崎克也[2]，小笠原直毅[3]，清水　浩[1]（[1]阪大院・情報・バイオ情報，[2]花王・生科研，[3]奈良先端大院・情報）

4B11a11　Metabolomics-based approach for strain improvement of 1-propanol producing *Escherichia coli*

11:00 ○SASTIAPRAMA PUTRI[1]，　NAOKI KAWASE[1]，SHINGO NOGUCHI[2]，　CLAIRE SHEN[3]，　JAMES LIAO[3]，TAKESHI BAMBA[1]，EIICHIRO FUKUSAKI[1]（[1]Dept. of Adv. Sci. and Biotech, Grad. Sch. of Eng., Osaka Univ., [2]Dept. of Biotech., Sch. of Eng., Osaka Univ., [3]Dept. of Chem. and Biomolecular Eng., UCLA）

4B11a12　質量分析器を用いた代謝プロファイリングによる 1－プロパノール生産延長を目的とした主要因子の探索

11:12 ○野口真悟[1]，　プトリサスティアプラマ[2]，　川瀬直樹[2]，シェンクレア[3]，　リャオジェイムズ[3]，　馬場健史[2]，　福崎英一郎[2]（[1]阪大工・応用自然，[2]阪大院工・生命先端，[3]UCLA）

4B11a13　アルコール脱水素酵素阻害剤による酵母中心炭素代謝制御

11:24 ○松田史生[1,2,3]，白井智量[3]，近藤昭彦[3,4]（[1]神戸大自然科学，[2]大阪大情報科学，[3]理研 BMEP，[4]神戸大院工）

4B11a14　出芽酵母によるコハク酸生産におけるメタボロミクスを活用した代謝評価とその生産性の向上

11:36 ○平沢　敬，伊東佑真，清水　浩（阪大院情報・バイオ情報）

4B11a15　ノンターゲットアプローチによる GC/MS 代謝ターンオーバー解析

11:48 ○中山泰宗[1]，　津川裕司[1,2]，　玉田佳大[1]，　馬場健史[1]，福崎英一郎[1]（[1]阪大院工，[2]理研 PSC.）

B13 会場　午前の部（9:00～12:00）

微生物―細胞–構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子―

4B13a01　麹菌 *A. oryzae* におけるエンドサイトーシス関連タンパク質 AipB, AipC, AipD の解析

9:00 ○松尾賢人，樋口裕次郎，菊間隆志，有岡　学，北本勝ひこ（東大院農生科・応生工）

4B13a02　Identification and functional analysis of ER cargo receptors for secreted proteins in *Aspergillus oryzae*

9:12 ○Huy Dung HOANG，　Jun-ichi MARUYAMA，Katsuhiko KITAMOTO（Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo）

4B13a03　麹菌 *A. oryzae* における特殊分泌タンパク質 Acyl-CoA binding protein（AoAcb1）の機能解析

9:24 ○川口航平，田所隆之，菊間隆志，北本勝ひこ（東大院農生科・応生工）

4B13a04　麹菌 *A. oryzae* の菌核形成抑制因子 EcdR の欠損による有性生殖促進効果の検討

9:36 ○田中勇気[1]，　矢萩大貴[1]，　金　鋒杰[1]，　小山泰二[2]，丸山潤一[1]，北本勝ひこ[1]（[1]東大院農生科・応生工，[2]野田産研）

4B13a05　麹菌 *A. oryzae* における菌糸融合の分子機構の解析

9:48 ○塚崎和佳子，川畑絢平，丸山潤一，北本勝ひこ（東大院農生科・応生工）

4B13a06　麹菌 *A. oryzae* における菌糸損傷に対する細胞修復と再生長の分子機構の解析

10:00 ○川畑絢平，佐伯　圭，丸山潤一，北本勝ひこ（東大院農生科・応生工）

4B13a07　麹菌 *A. oryzae* の AoFus3 MAP キナーゼとその相互作用タンパク質の機能的関係の解析

10:12 ○矢萩大貴[1]，丸山潤一[1]，金　鋒杰[1]，BAYRAM Ozgur[2]，VALERIUS Oliver[2]，　BRAUS Gerhard H.[2]，　北本勝ひこ[1]（[1]東大院農生科・応生工，[2]ゲッティンゲン大学）

4B13a08　Functional analysis of Woronin body-tethering protein leashin in *Aspergillus oryzae*

10:24 ○PEI HAN，　JUN-ICHI MARUYAMA，KATSUHIKO KITAMOTO（Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo）

4B13a09　ホスファチジルエタノールアミンの細胞内輸送に関する因子の出芽酵母を用いた解析

10:36 小林新吾[1]，　○水池　彩[1]，　福田良一[1]，　堀内裕之[1]，太田明徳[2]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東農大・応生科・バイオ）

4B13a10　酵母における異常タンパク質発現によるオートファジーの誘導とその分解について

10:48 ○樋口健吾，興梠祐樹，加藤昭夫，阿座上弘行（山口大農）

4B13a11　出芽酵母のクロマチンリモデリング因子 RSC によるオートファジー制御機構の解明

11:00 ○余　斐斐，今村優子，湯川格史，土屋英子（広島大院先端研・分子生命）

4B13a12　エタノールによる出芽酵母の小胞体ストレス応答

11:12 ○宮川賢一，河野憲二，木俣行雄（奈良先端大・バイオ）

4B13a13　分裂酵母カルモジュリンによる胞子細胞膜形成開始の分子メカニズム

11:24 ○石橋尚実，今田一姫，板谷有希子，中村太郎（阪市大）

4B13a14　分裂酵母シンタキシン 1 の胞子形成特異的なエンドサイトーシスの分子メカニズム

11:36 ○山崎百合子，寺口絵理香，中村太郎（大阪市大院理）

4B13a15　分裂酵母の胞子形成の開始に必要な Rab-GEF カスケードの解析

11:48 ○今田一姫，中村太郎（阪市大院理・生物地球）

B14 会場　午前の部（9:00～12:00）

微生物―ゲノム解析，メタゲノム，プロテオーム―

4B14a01　Genome analyses for hyper glucose tolerance of acetic acid bacteria, *Tanticharoenia sakaeratensis* and *Asaia bogorensis*.

9:00 Hiromi Hadano[1]，Norie Higashiura[1]，Hideki Hirakawa[2]，So Takebe[1]，Kazunobu Matsushita[3]，○Yoshinao AZUMA[1]（[1]BOST, Kinki University, [2]Kazusa DNA Research Institute, [3]Yamaguchi University）

4B14a02　環境メタトランスクリプトーム解析により検出した土壌微生物由来のバイオマス糖化関連酵素のクローニングと機能評価

9:12 ○木村信忠，三浦隆匡，高崎一人，菅野　学，鎌形洋一（産総研生物プロセス）

4B14a03　バイオマス分解のための *Clostridium cellulovorans* の定量的セクレトーム解析

9:24 ○松井一真[1]，江坂康平[1]，森坂裕信[1]，三宅英雄[2]，田丸　浩[2]，植田充美[1]（[1]京大院・農・応用生命，[2]三重大院・生資）

4B14a04　キシラン利用菌 *Amphibacillus xylanus* の網羅的手法を用いた代謝経路の解析

9:36 ○望月大地[1]，新井俊晃[1]，田中尚人[2]，志波　優[3]，藤田信之[4]，佐藤純一[1]，川崎信治[1]，新村洋一[1]（[1]東農大バイオ，[2]東農大菌株，[3]東農大ゲノム解析セ，[4]NITE）

4B14a05　適応育種により獲得した耐熱化エタノール発酵細菌のゲノム変異解析

9:48 ○高坂智之[1]，　山下舞子[2]，　中島康之[2]，　松谷峰之介[1]，村田正之[2]，山田　守[1,2]（[1]山口大・農，[2]山口大院・医）

4B14a06　芳香族化合物複合汚染土壌における新規芳香族化合物分解酵素遺伝子の機能相補に基づく探索

10:00 ○永山浩史，菅原智詞，遠藤　諒，加藤広海，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大院生命）

4B14a07　フィニッシング支援ツール GenoFinisher と AceFileViewer

10:12 ○大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大院生命科）

4B14a08　自然変異株のゲノム解析に基づいた放線菌 *Streptomyces griseus* の二次代謝に影響を与える遺伝子の探索

10:24 ○中村一成[1]，　志波　優[2]，　手塚武揚[1]，　吉川博文[2,3]，大西康夫[1]（[1]東大院農生科・応生工，[2]東農大・ゲノム解析セ，[3]東農大応生科・バイオ）

4B14a09　放線菌ゲノムアノテーションプラットフォームの構築

とリファレンス情報の統合

10:36 ○藤澤貴智[1], 照井敬子[1], 桧原直子[1], 山田佐知子[1], 石井英治[1,2], 加藤香奈[1], 手塚武揚[3], 大西康夫[3], 神沼英里[1], 岡本 忍[4], 黒川 顕[5], 中村保一[1]（[1]遺伝研, [2]近畿大院・農, [3]東大院農生科・応生工, [4]ライフサイエンス統合データベースセンター, [5]東工大院・生命理工）

4B14a10 微生物統合データベース MicrobeDB.jp の開発

10:48 ○山本 希[1], 森 宙史[1], 中村保一[2], 内山郁夫[3], 菅原秀明[2], 黒川 顕[1], MicrobeDB.jp プロジェクトチーム[1,2,3]（[1]東工大院・生命理工, [2]国立遺伝研, [3]基生研・ゲノム情報）

4B14a11 原始生態系の解明を目指した温泉微生物群集のメタゲノム解析

11:00 ○西山依里[1], 吉野弘二[1], 中村仁美[1], 須田 好[1], 間渕貴子[1], 河内賢一[1], 森 宙史[1], 丸山史人[2], 大森聡一[3], 丸山茂徳[1], 本郷裕一[1], 黒川 顕[1]（[1]東工大院, [2]東京医科大院, [3]放送大院）

4B14a12 共通祖先系に最も近いバクテリアの潜在的代謝機能

11:12 ○高見英人[1], 野口英樹[2], 高木善弘[1], 内山郁夫[3], 豊田 敦[2], 西 真郎[1], 池 甲珠[1], 荒井 渉[1], 布浦拓郎[1], 伊藤武彦[4], 服部正平[5], 高井 研[1]（[1]海洋機構, [2]遺伝研, [3]基生研, [4]東工大, [5]東大）

4B14a13 高度好塩性アーキア *Haloarcula japonica* のリボソーム蛋白の精製と RFHR 2D 法による解析

11:24 ○仲宗根薫, 池田周平, 佐藤祐介, 藤谷 創（近畿大･工）

4B14a14 分裂酵母における経時老化マーカーの開発

11:36 ○福島玲奈[1,2], 松山晃久[1,3], 吉田 稔[1,2,3]（[1]理研 化学遺伝, [2]埼玉大院理工, [3]理研 ケミカルゲノミクス）

4B14a15 リバースプロテオミクスを用いた eIF5A におけるハイプシン化の機能解析

11:48 ○近藤直子[1,2], 白井温子[1,5], 夏目 徹[3], 浜本牧子[2], 松山晃久[1,4], 吉田 稔[1,4]（[1]理研 化学遺伝, [2]明治大院農 微生物工学, [3]産総研 細胞システム制御解析, [4]理研 ケミカルゲノミクス, [5]理研 細胞記憶）

B21 会場 午前の部（9:00〜11:36）

微生物―その他―

4B21a01 digital PCR による高精度環境微生物定量

9:00 ○星野辰彦, 稲垣史生（海洋研究開発機構 高知コア研究所）

4B21a02 熱測定法と PCR-DGGE 法を用いた土壌微生物群集の多様性評価

9:12 石川 卓[1], ○小野泰弘[1], 妹尾啓史[2], 田中晶善[1]（[1]三重大院・生資, [2]東大院農生科・応生化）

4B21a03 熱測定法を用いた土壌微生物の資化活性に基づく土壌試料の保存条件検討

9:24 石川 卓[2], ○林 寛人[1], 妹尾啓史[3], 田中晶善[2]（[1]三重大・生資, [2]三重大院・生資, [3]東大院農生科・応生化）

4B21a04 水溶性天然ガス田生産水由来の新規酪酸酸化共生細菌の系統分類学的解析

9:36 ○小栗正大[1], 中村浩平[2], 持丸華子[3], 坂田 将[3], 高見澤一裕[2]（[1]岐阜大院応生, [2]岐阜大応生, [3]産総研）

4B21a05 高塩濃度下で機能する酵素の塩適応機構：活性の塩依存性とカチオンの役割

9:48 ○若井 暁[1,2], 安部晶大[1], 城所俊一[3], 仲宗根薫[4], 正木和夫[5], 三本木至宏[1]（[1]広島大院・生物圏, [2]神戸大・自・研究環, [3]長岡技科大・生物, [4]近畿大・工, [5]酒類総研）

4B21a06 *Thermus* 属細菌及び大腸菌におけるシリカ誘導性遺伝子の発現解析

10:00 ○藤野泰寛[1], 岩瀬 真[2], 大島敏久[3], 土居克実[3]（[1]九州大基幹教育院, [2]九大院生資環, [3]九大院農）

4B21a07 海洋から分離された *Terrabacter* sp. OC11 株が有する carbazole 分解遺伝子の解析

10:12 ○大場進太郎[1], 鈴木敏弘[2,3], 前田臨太郎[4], 大森俊雄[5], 布施博之[5]（[1]芝工大院・シ理工・シ理工, [2]芝工大院・地域環境システム, [3]筑波大学・生命環境系, [4]芝工大・シ理工・応化, [5]芝工大・シ理工・生科）

4B21a08 カルバゾール代謝関連酵素の変異型作製による活性の比較

10:24 ○石部貴映[1], 鈴木敏弘[2,3], 布施博之[4], 大森俊雄[4]（[1]芝工大院シ工, [2]芝工大院地域環境システム, [3]筑波大生命環境系, [4]芝工大シ工生科）

4B21a09 Intracellular degradation of 3-hydroxyvalerate oligomers in a PHA-producing bacterium

10:36 ○jing Lu[1,2], Akira Takahashi[1], Shunsaku Ueda[1]（[1]Faculty of Agriculture, Utsunomiya Univ., [2]United Graduate Sch. of Agricultural Sci., Tokyo Univ. of Agriculture and Technology）

4B21a10 Pellicle of thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* strains: Sugar composition of polysaccharide and effect of carbon sources

10:48 ○Buddhika Perumpuli, Taisuke Watanabe, Hirohide Toyama（Univ. Ryukyus）

4B21a11 キノヘモプロテイン・アルコール脱水素酵素 ADH-IIG 遺伝子プロモーターを利用した *Pseudomonas putida* 用異種タンパク質発現プラスミドの構築

11:00 ○外山博英, 宮城雅一, 新垣萌美, 大場真奈, 渡邉泰祐（琉球大農）

4B21a12 薬剤耐性 *Escherichia coli* が保有する耐性遺伝子及びプラスミド間における遺伝的特性

11:12 ○山本詩織, 中野源紀, 田中みち子, 北川 航, 曾根輝雄, 浅野行蔵（北大院農）

4B21a13 アグロバクテリアの Ti プラスミドを簡便に交換する技術の確立

11:24 ○山本真司, 清川一矢, 鈴木克周（広島大院理）

B22 会場 午前の部（9:00〜12:00）

微生物―物質生産–醸造，発酵（一次代謝産物）―

4B22a01 りんご未熟果でんぷんを糖化できる麹菌のスクリーニング

9:00 ○井澤弘美, 藤田修三（青森県立保健大栄養）

4B22a02 味噌用麹の酸性ホスファターゼ遺伝子発現解析

9:12 ○丸井淳一朗[1,2], 多田功生[2], 福岡真里[1,2], 和久 豊[3], 白石洋平[3], 北本則行[4], 杉本達哉[5], 鈴木 聡[2], 服部領太[2], 楠本憲一[2]（[1]国際農研, [2]農研機構・食総研, [3]ビオック, [4]あいち産科技総セ・食工技セ, [5]ナカモ）

4B22a03 麹菌由来新規 4-methyl-2-oxopentanoic acid（MOA）レダクターゼの機能解析及び MOA レダクターゼ高発現株の作製〜新規吟醸酒用麹菌作製への試み〜

9:24 ○竹浦賢吾[1], 森 千明[2], 大穀未来[2], 余野圭司[2], 志水元亨[1], 加藤雅士[1]（[1]名城大院農, [2]名城大農）

4B22a04 麹菌必須遺伝子の解析のためのプロモーターシャットオフシステムの開発

9:36 ○寺戸志保[1,2], 島原朋子[2], 豊浦利枝子[2], 河内護之[1,2], 岩下和裕[1,2]（[1]広島大院・先端研, [2]酒総研）

4B22a05 麹菌の簡易系統判別法の開発と醸造特性予測への利用

9:48 ○大田 民[1], 伊藤 岳[1,2], 岩下和裕[1,2]（[1]独立行政法人酒類総合研究所, [2]広島大学先端物質科学研究所）

4B22a06 玄大麦を用いた液体麹における白麹菌 *Aspergillus kawachii* の遺伝子発現解析

10:00 ○砂川忠広[1], 舛田 晋[2], 内橋康充[1], 結城敏文[1], 安原貴臣[3], 杉本利和[4], 小路博志[2], 福田和郎[1]（[1]アサヒグループホールディングス・食の応用技研, [2]アサヒビール・醸造研, [3]アサヒグループホールディングス・R&D 推進, [4]ニッカウヰスキー・技術開発）

4B22a07 麦麹の製造過程における白麹菌の DNA マイクロアレイ解析

10:12 ○二神泰基[1], 森 一樹[1], 和田正太郎[2], 梶原康博[2], 高下秀春[2], 大森俊郎[2], 田代康介[1], 久原 哲[1], 後藤正利[1]（[1]九大院農, [2]三和酒類）

4B22a08 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* のペクチンメチルエステラーゼ A, B 遺伝子破壊株の機能解析

10:24 ○水谷 治, 柿薗ダララット, 高橋 徹, 山田 修（酒総研）

4B22a09 Aspergillus oryzae KBN616 株のキシリトール代謝関連遺伝子破壊株によるキシリトール生産と関連酵素活性の比較

10:36 ○矢田ひかる[1], マームドアシフ[1], 中村浩平[1], 北本則行[2],

鈴木　徹[3]，高見澤一裕[1]（[1]岐阜大応生，[2]愛知産技研，[3]岐阜大院連農）

4B22a10　ビール用大麦麦芽のアスコルビン酸オキシダーゼについて

10:48　◦金内　誠[1]，Bamforth Charles[2]（[1]宮城大食産，[2]UC Davis）

4B22a11　微細藻由来 Δ 6 不飽和化酵素遺伝子発現による脂質生産性糸状菌 *Mortierella alpina* の脂肪酸組成改変

11:00　浅岡卓也[1]，◦奥田知生[1]，櫻谷英治[1]，安藤晃規[2]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大・生理化学）

4B22a12　油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 の caleosin 遺伝子の単離と過剰発現による脂質蓄積に及ぼす効果

11:12　櫻谷英治[1]，◦三宅貴士[1]，落合美佐[2]，安藤晃規[1,3]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]サントリービジネスエキスパート，[3]京大・生理化学ユニット）

4B22a13　*Mortierella* 属糸状菌によるエイコセン酸生産

11:24　櫻谷英治[1]，　西馬場由美[1]，　◦菊川寛史[1]，　安藤晃規[2]，小川　順[1]（[1]京大院農･応用生命，[2]京大院農･生理化学ユニット）

4B22a14　油糧微生物 *Mortierella chlamydospora* における脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子の機能解析

11:36　櫻谷英治[1]，　◦村椿達哉[1]，　西馬場由美[1]，　菊川寛史[1]，安藤晃規[1,2]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大・生理化学ユニット）

4B22a15　シャグマアミガサダケの生産するヒドラジド化合物ギロミトリンの生合成に関する研究

11:48　上坊史晃[1]，　◦石黒千絵[1]，　出口　悠[1]，　日比　慎[2]，高橋里美[2]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大院農・産業微生物）

B23 会場　午前の部（9:00〜12:00）

微生物—細胞–栄養，生育，増殖—

4B23a01　出芽酵母の高親和性トリプトファン輸送体 Tat2 の機能における膜貫通領域の重要性

9:00　◦阿部文快[1,2]，完田奈緒子[1]，金子麻緒[1]（[1]青山学院大理工，[2]海洋研究開発機構）

4B23a02　出芽酵母の低親和性トリプトファン輸送体 Tat1 のユビキチン化による制御

9:12　◦望月貴博[1]，鈴木麻葉[1]，上村聡志[1]，阿部文快[1,2]（[1]青山学院大理工，[2]海洋研究開発機構）

4B23a03　出芽酵母のロイシン輸送体 Bap2/Bap3 の機能解析

9:24　◦宇佐美佑紀[1]，上村聡志[1]，阿部文快[1,2]（[1]青山学院大理工，[2]海洋研究開発機構）

4B23a04　出芽酵母における染色体からのセントロメア DNA の切り出しによる細胞死の誘導－生存細胞の生存原因の解析－

9:36　◦宮本昭弘，柳本敏彰，秦野琢之，松崎浩明（福山大・生命工・生物工）

4B23a05　出芽酵母における染色体からのセントロメア DNA の切り出しによる細胞死の誘導－二 倍体細胞における細胞死の検討－

9:48　◦柳本敏彰，宮本明弘，秦野琢之，松崎浩明（福山大・生命工・生物工）

4B23a06　出芽酵母の長寿変異株における遺伝子発現の解析

10:00　◦小川貴史，水沼正樹，椿山諒平，平田　大（広島大院・先端研・分子生命）

4B23a07　出芽酵母の液胞膜に局在する寿命制御に関わる Ssg1 の機能解析

10:12　◦小山哲也，水沼正樹，椿山諒平，平田　大（広島大院・先端研・分子生命）

4B23a08　メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* の葉上での窒素代謝遺伝子群の発現制御

10:24　◦白石晃將, 内田大智, 川口甲介, 由里本博也, 阪井康能（京大院農・応用生命）

4B23a09　酵母のペプチド利用制御における UBR 蛋白質のオリゴペプチド認識能の役割

10:36　◦北村憲司（広島大・自然科学研セ）

4B23a10　分裂酵母のアミノ酸取り込みにおける適応現象の解析

10:48　◦孫　暁穎[1,2]，　八代田陽子[1,3]，　高橋秀和[1,3,4]，　浜本牧子[2]，吉田　稔[1,3,5]（[1]理研・化学遺伝学，[2]明治大院・農，[3]理研・ケミカルゲノミクス，[4]岡山大・公衆衛生，[5]科学技術振興機構・CREST）

4B23a11　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における塩基性アミノ酸の細胞毒性メカニズムの解析

11:00　◦菊島理恵，西村　明，高木博史（奈良先端大・バイオ）

4B23a12　酵母チオレドキシンの細胞外への分泌

11:12　池田佳代，野村　亘，◦井上善晴（京大院・農・応生科）

4B23a13　cAMP/PKA は細胞周期制御因子 Whi3 のリン酸化制御を通して様々な生理機能に関わる

11:24　◦水沼正樹，椿山諒平，平田　大（広島大院先端研）

4B23a14　アコニット酸イソメラーゼ遺伝子を高発現させた大腸菌による *trans*- アコニット酸生産

11:36　◦油原かほり，濱地達也，小林慶一，本田裕樹，桐村光太郎（早稲田大学）

4B23a15　*Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株の低栄養生育における窒素源について

11:48　◦稲葉　慧，吉田信行，高木博史（奈良先端大バイオ）

A37 会場　午前の部（9:00〜11:48）

動物—無脊椎動物–生理，細胞，遺伝子，タンパク質—

4A37a01　ESCRT システム関連因子 calpain-7 のエンドソーム成熟過程における役割

9:00　◦前本佑樹[1]，木曽里美[1]，小野弥子[2]，柴田秀樹[1]，牧　正敏[1]（[1]名大院生命農，[2]都医学研）

4A37a02　ゴルジ体に見られる *β*-アロシダーゼ活性に関する研究

9:12　◦三浦一輝[1]，大塚　紋[1]，袴田　航[1,2]，平野貴子[1]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大生資科・生命化，[2]日大院生資科）

4A37a03　軟体動物のレチノイン酸カスケード遺伝子オーソログ cDNA の単離と組織再生過程における発現変動

9:24　◦高橋勇二，渡邊弘明，伊東　翼，金子浩子，官林夕夏，宇田川麻美，北田翔也，梅村真理子，中野春男，高橋　滋（東京薬科大生命科学部）

4A37a04　超深海性ヨコエビが生産する新規セルラーゼの精製と性質

9:36　◦小林英城，秦田勇二，坪内泰志，高見英人（海洋研究開発機構）

4A37a05　線虫 *C. elegans* のインスリン様ペプチド INS-23 の機能解析

9:48　◦松川隼也[1]，松永洋平[2]，岩崎　崇[1,2]，河野　強[1,2]（[1]鳥取大農，[2]鳥取大院・連合農学）

4A37a06　カイコガ性フェロモン生合成活性化神経ペプチド受容体（PBANR）の点変異体を用いたリガンド認識残基の特定

10:00　◦河合岳志[1]，　郭　琳君[1]，　永田宏次[1]，　松本正吾[2]，長澤寛道[1]，田之倉優[1]（[1]東大院農生化・応生化，[2]理研・松本分子昆虫学）

4A37a07　抑制性グルタミン酸受容体の機能的発現量の決定に寄与するアミノ酸の同定

10:12　◦古谷章悟[1]，山口武則[1]，喜多　知[3]，布施利紀[3]，中谷有里[2]，三浦由夏[2]，尾添嘉久[3]，松田一彦[1]（[1]近畿大院農，[2]近畿大農，[3]鳥取大院農）

4A37a08　D2-like ドーパミン受容体アゴニストのブロモクリプチンはカイコの摂食行動を亢進する

10:24　◦太田広人[1]，朝岡　潔[2]（[1]熊大･院･自然科学，[2]農生資研）

4A37a09　カイコにおける神経ペプチド short neuropeptide F が中腸のプロテアーゼ活性に与える影響

10:36　◦大原彩子，永田晋治，長澤寛道（東大院・農生科・応生化）

4A37a10　フタホシコオロギ（*Gryllus bimaculatus*）における脂質動員ホルモン（AKH, adipokinetic hormone）が制御する体液中の脂質および糖質レベルと摂食行動との関連性の解析

10:48　◦小沼貴裕，永田晋治，長澤寛道（東京大院 農生科）

4A37a11　フタホシコオロギにおける交尾後に惹起される摂食行動に関わる生体内因子の同定の試み

11:00　◦塚本悠介，永田晋治，長澤寛道（東大院・農生科・応生化）

4A37a12　フタホシコオロギにおける餌に含まれる共食いを抑制

する因子の同定の試み
11:12 ○永田晋治，長澤寛道（東大院・農生科・応生化）
4A37a13 線虫 *C.elegans* の RNA 結合タンパク質である CeMBL 遺伝子の機能解析
11:24 ○鈴木俊輔，笹川　昇（東海大工）
4A37a14 ブドウ抽出物 ANOX-R5 による線虫 *C.elegans* の寿命への影響
11:36 ○高橋航大[1]，鈴木俊輔[1]，布藤　健[1]，真野　貴[2]，笹川　昇[1]（[1]東海大工，[2]日本薬品株式会社）

A41 会場　午前の部（9:00〜11:36）

動物—細胞–情報伝達，細胞応答—
4A41a01 G タンパク質 γ サブユニット GNG11 の細胞老化における役割
9:00 ○工藤　生，伊藤陽平，古賀慎太郎，Mohammad N Hossain，三木健輔，藤井道彦，鮎沢　大（横浜市大・生命ナノシステム）
4A41a02 細胞老化に伴う核内及び核膜構造の変化
9:12 ○新井留実，三木健輔，藤井道彦，鮎沢　大（横浜市大院生命ナノシステム）
4A41a03 チェックポイントキナーゼ（chk1,2）の過剰チミジンによる細胞老化誘導における役割
9:24 ○杉本量平，野沢愛実，米倉隆造，三木健輔，藤井道彦，鮎沢　大（横浜市立大学）
4A41a04 細胞老化の不均衡増殖モデルの検証
9:36 ○和田卓巳，三木健輔，藤井道彦，鮎沢　大（横浜市大院ゲノムシステム）
4A41a05 アーユルヴェーダハーブの放射線防護効果
9:48 ○高氏裕貴[1]，尾崎洋子[1]，三木健輔[1]，山内正剛[2]，Mohammad N Hossain[1]，藤井道彦[1]，鮎沢　大[1]（[1]横浜市大生命ナノ，[2]放医研防護センター）
4A41a06 ヒト毛乳頭細胞におけるアーユルヴェーダハーブの生理作用
10:00 ○米倉佑香[1]，山口葉子[2]，Mohammad N Hossain[2]，三木健輔[2]，山下律郎[3]，藤井道彦[2]，鮎沢　大[2]（[1]横浜市大・国際総合，[2]横浜市大･生命ナノシステム，[3](株)SLH BCL カンパニー）
4A41a07 加齢に伴う B 細胞機能変化における MAPKp38 の関与
10:12 ○藤木　司[1]，片倉喜範[2]，岸原健二[1]（[1]長国大薬，[2]九大院農院）
4A41a08 細胞を用いた炭酸刺激の評価
10:24 ○加藤史佳[1]，指原浩一[1]，加藤直樹[1]，野場重都[2]，佐見　学[1]，北川　泰[1]（[1]アサヒグループホールディングス，[2]アサヒビール）
4A41a09 骨肉腫細胞株 MG-63 の力学応答とアクチン結合タンパク質 FLNA の関連について
10:36 ○深田　尚，杉本憲治（大阪府大院生命環境）
4A41a10 TGF-β 1 による表皮角化細胞のセラミド合成制御機構の解析
10:48 ○村松愛美[1]，加藤なつき[1]，福田愛美[1]，藤枝亜里紗[1]，山根拓実[1,2]，服部一夫[1]，大石祐一[1]（[1]東農大応生科・栄養，[2]東大院・医）
4A41a11 Cre 依存性 Tert 遺伝子発現トランスジェニックマウスの解析
11:00 ○日出間志寿，伊達しおり，福田真澄，西森克彦（東北大院農）
4A41a12 可欠アミノ酸代謝酵素の発現に与えるロイシンの特異的影響
11:12 ○吉村亮二[1]，今村　渉[2]，加藤久典[2]，水重貴文[3,4]，大日向耕作[4]，金本龍平[1,4]（[1]京府大院･生環，[2]東大･総括，[3]京大･学際融合・生理化学研究ユニット，[4]京大院・農・食品生物）
4A41a13 AIN-76 と 93G を給餌したマウスにおける体重増加，白色脂肪重量の差異について
11:24 ○渡辺智之[1]，福住真吾[2]，増尾森也[2]，久宮彩乃[2]，香川祐輝[1]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]（[1]日大院・応生科，[2]日大・生命化）

A44 会場　午前の部（9:00〜12:00）

植物—タンパク質，酵素–機能，調節—
4A44a01 植物生育における活性炭吸着作用の役割
9:00 ○老野克紀（神奈川工科大学）
4A44a02 イネディフェンシン由来ペプチドのヒト日和見感染菌 *Candida albicans* に対する抗菌活性評価とアミノ酸置換効果の検証
9:12 ○提箸祥幸[1]，高久洋暁[2]，矢頭　治[3]（[1]農研機構・北農研，[2]新潟薬大・応生科，[3]農研機構・中央農研）
4A44a03 4 クマル酸：CoA リガーゼ阻害剤の合成と阻害活性の評価
9:24 ○平竹　潤，切替宏彰，肥塚崇男，渡辺文太（京大化研）
4A44a04 シロイヌナズナの配糖化酵素 UGT71C1 のリグナン生合成への関与
9:36 ○楠瀬達也[1]，畑　直樹[1,2]，小埜栄一郎[3]，佐竹　炎[4]，關　光[1]，村中俊哉[1]，岡澤敦司[1,2]（[1]阪大院・工・生命先端，[2]阪府大院・生命環境・応用生命，[3]サントリー，[4]サントリー生有研）
4A44a05 N-末端ドメインが関与する植物型フェリチンの鉄放出機構
9:48 ○増田太郎[1]，杉原　格[2]，森本晋一郎[2]，三上文三[3]，豊原治彦[2]（[1]京大院農・農学，[2]京大院農・応用生物，[3]京大院農・応用生命）
4A44a06 ジベレリン生合成酵素の構造解析への試み
10:00 ○竹原清日[1]，森中洋一[1]，加藤博章[2]，松岡　信[1]，上口(田中)美弥子[1]（[1]名大生物機能開発利用研究センター，[2]京大院薬・構造生物）
4A44a07 抗真菌タンパク質 Gnk2 のマンノース結合構造の X 線結晶解析
10:12 ○宮川拓也[1]，澤野頼子[1]，秦野賢一[2]，田之倉優[1]（[1]東大院農生科，[2]群馬大工）
4A44a08 シロイヌナズナにおけるアスコルビン酸再生系の包括的な機能解析
10:24 ○野志昌弘[1]，畑中理佐[1]，田茂井政宏[1,2]，高橋隆樹[3]，丸田隆典[3]，澤　嘉弘[3]，石川孝博[3]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大・農・バイオ，[2]近畿大院・農・バイオ，[3]島根大・生資科・生命工）
4A44a09 シロイヌナズナ GDP-D-Mannose 加水分解酵素（At-NUDX9）の同定と機能解析
10:36 ○田中裕之[1]，塩谷知子[2]，丸田隆典[3]，田茂井政宏[1,2]，吉村和也[4]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]島根大・生資科・生命工，[4]中部大・応生・食栄）
4A44a10 シロイヌナズナにおける CYP94B2 の機能解析
10:48 ○天野就基[1]，北岡直樹[1]，川出　洋[2]，谷口沙希[1]，佐分利亘[1]，松井博和[1]，松浦英幸[1]（[1]北大院農，[2]東農工大応生科）
4A44a11 イソキノリンアルカロイド生合成の発現制御に関わる CjWRKY1 の機能解析
11:00 ○山田泰之，島田友恵，吉本忠司，小倉康平，加藤伸彦，小山知嗣，佐藤文彦（京大院生命科学）
4A44a12 sanguinarine 生合成経路における protopine 6-hydroxylase の反応特性
11:12 ○堀健太郎，竹村知也，佐藤文彦（京大院生命科学）
4A44a13 シロイヌナズナのポリアミン酸化酵素は全て逆変換反応を触媒する
11:24 ○Kim Dong Wook[1]，村山千尋[1]，新津　勝[2]，神尾好是[1]，Berberich Thomas[3]，草野友延[1]（[1]東北大院生命，[2]城西大薬，[3]BiK-F）
4A44a14 ヤセウツボ発芽種子で発現する糖加水分解酵素の機能解析
11:36 ○東久保諒[1]，Gregory Guirimand[1]，若林孝俊[1]，水谷正治[3]，杉本幸裕[3]，關　光[1]，村中俊哉[1]，岡澤敦司[1,2]（[1]阪大院・工・生命先端，[2]阪府大院・生命環境・応用生命，[3]神大院・農・植物機能）
4A44a15 シロイヌナズナシグナルペプチドペプチダーゼ（AtSPP）の発現系の構築及び酵素活性の解析
11:48 ○星　雅子[1]，阿部啓子[1,2]，朝倉富子[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]神奈川科学技術アカデミー）

講演番号：2C11a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ C 校舎 11 会場

固定化柿渋ゲルを用いたクロム(VI)の吸着による除去､還元によるクロム(III)への変換とクロム(III)としての回収

Removal of chromium (VI) by adsorption and transformation for chromium (III) by reduction and recovery as chromium(III) using immobilized persimon tannin.

○鶴田 猛彦、畑野 智信（八戸工大院工）
○Takehiko TSURUTA,Tommonobu Hatano (Hachinohe Inst. Tech)

【緒論】クロム(VI)は酸化剤として有用なほか、種々の産業で利用されている重要な資源である。一方で自然界に放出されると、われわれ人間をはじめ、生物にとって極めて有害な物質でもある。当研究室では長年にわたり微生物や未利用バイオマス資源を用いた金属イオンの除去及び回収について研究を行なってきた。その過程で多くの微生物はクロム(VI)を水系からほとんど除去できないのに対し、固定化発酵柿渋ゲルが極めて効率的に水溶液中のクロム(VI)を吸着除去できることを見出した。本発表では、本ゲルを用いたクロム(VI)の吸着による除去、還元によるクロム(III)への変換、および吸着されたクロムのクロム(III)としての脱着回収について報告する。

【実験方法】

(1)固定化発酵柿渋ゲルの調整：固定化発酵柿渋ゲルの調整は、市販の発酵柿渋液とホルマリンを混合後、室温でゲル化させ、ブレンダー粉砕後、篩過することにより粒度を調節したものを用いた。

(2)クロム(VI)の除去：一定量の二クロム(VI)酸カリウム水溶液（pH はクロム除去の pH 依存性を実験により調べ、pH 2.0 に調整）と固定化発酵柿渋ゲルを室温で一定時間混合した。

(3)クロム(VI)除去量の確認：除去実験終了後、ゲルをメンブランフィルターで除去し、ろ液のクロム(VI)量をジフェニルカルバジド吸光度分析で、全クロム量をフレーム原子吸光法により測定した。

(4)吸着・還元されたクロムのゲルからの脱着：0.1M 塩酸を使用してクロムのゲルからの脱着を温度を変えて検討した、

【実験結果・考察】

クロム(VI)水溶液からの除去は。pH の上昇とともに低下することがわかった。一方､pH２以下では、クロム(VI)が完全に除去されるのに対し、クロム総量としては、pH２で最も除去されることがわかった。pH をさらに下げると還元が進み、還元されたクロムが溶液中に残存することがわかった。クロム(III)の除去に対する pH 依存性も検討した。

吸着されたクロムの脱着は、0,1M の炭酸ナトリウムと塩酸で検討し、室温における脱着が塩酸の方が効率的であることがわかった。しかしながら、室温における塩酸での脱着が十分でなかったことから、加熱による脱着を検討したところ、1 時間沸騰することにより吸着されたクロムが完全に還元された状態で脱着回収されることがわかった。クロム(III)についても吸着脱着試験を行い、脱着の活性化エンタルピー変化から、吸着されたクロム (VI) はほぼクロム(III)に還元されたと考えられる。

Chromium (VI) removal, Chromium (VI) reduction, immobilized persimon tannin

講演番号：2C11a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ C 校舎 11 会場

テルル酸還元細菌 *Ochrobactrum anthropi* Ti-3 株のテルル酸還元能の解析
Analysis of tellurate reduction by *Ochrobactrum anthropi* Ti-3
○大塚 治[1]、長谷川 智美[1]、坂本 康太[1]、生田 裕馬[1]、池 道彦[3]、山下 光雄[1,2] ([1]芝浦工大 SIT 総合研究所 レアメタルバイオリサーチセンター、[2]芝浦工大 応化、[3]阪大院工学研究)
○Osamu OOTSUKA[1], Tomomi Hasegawa[1], Kouta Sakamoto[1], Yuuma Ikuta[1], Mitihiko Ike[3], Mitsuo Yamashita[1,2] ([1]Rare Metal Bioresearch Center, [2]Shibaura Institute of Technology, [3]Osaka univ.)

[目的]レアメタルの一種であるテルルを鋼に添加すると快削性、強靭性、耐蝕性が向上することから、主に自動車部品や精密機器などに利用されている。他にも半導体材料として太陽電池に利用され需要も増えている。テルルは主に銅精錬による副産物として生産されているが、銅の精錬方法が変わりテルルの生産量が減っている。テルルの生産量が減っているため、廃棄物や工場廃水に含まれているテルルを回収し再利用することが検討されている。

工場廃水からテルルを回収する方法として凝集剤や電解還元を用いた物理化学的手法の開発が進められているが、未だ確立した方法はない。しかもこの方法では他の金属との混合物からテルルのみを特異的に回収することはできない。

以前我々は微生物を用いたテルルの回収を目指して、テルル酸還元細菌を単離し、*Ochrobactrum anthropi* Ti-3 と命名した。Ti-3 株をテルル酸含有培地で培養すると、テルル酸は亜テルル酸を経て元素態テルルまで還元されることがわかった。Ti-3 株を使用することで工場排水に含まれているテルルを固体の元素態テルルとして特異的に固化回収できる可能性がある。

そこで我々は微生物を用いた工場排水に含まれるテルルの特異的な回収を目指し、本研究ではまずフラスコレベルで Ti-3 株によるテルル酸還元の最適条件を調べることを目的とした。

[実験方法および結果]0.5mM テルル酸含有 TSB 培地を用いて NaCl 濃度、pH、培養温度を変化させて培養を行い *O. anthropi* Ti-3 株によるテルル酸還元の最適条件を調べた。

まず NaCl 濃度を増殖可能域である 0.5 g/L から 6 g/L までに調製し培養を行った。NaCl 濃度 0.5 g/L が最も還元速度が速く、培養開始から 96 時間で 0.4mM のテルル酸を還元することがわかった。次に初発の pH を pH4～pH10 に調製し培養した。pH7～pH10 では 96 時間で 0.4mM のテルル酸を還元した。特に pH9 での還元速度が速く、5.4μmol/L･h だった。最後に培養温度を 23℃から 42℃まで変化させ培養した。37℃では培養開始から 48 時間で 0.4mM のテルル酸を還元し、96 時間目には 0.48mM 還元した。よって還元速度は 37℃が最も速く 14.2μmol/L･h だった。

以上の実験結果から *O. anthropi* Ti-3 株のテルル酸還元の各最適条件は NaCl 濃度 0.5 g/L、pH9、培養温度 37℃だと示唆された。この最適培養条件はこれまでの条件と比較してテルル酸還元速度が約 2.8 倍大きくなり、テルル回収の可能性が高まった。

tellurium, tellurate, Ochrobactrum anthropi

講演番号：2C11a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ C 校舎 11 会場

セレン化カドミウム合成細菌 *Pseudomonas aeruginosa* RB-R 株の特徴づけ
Characterization of a CdSe-synthesizing bacteria; *Pseudomonas aeruginosa* RB-R
○綾野 裕之[1]、秋山 直之[1]、三宅 將貴[1]、黒田 真史[1,2]、惣田 訓[1]、池 道彦[1] ([1]大阪大院・工、[2]大阪大・CEIDS)
○Hiroyuki AYANO[1], Naoyuki AKIYAMA[1], Masaki MIYAKE[1], Masashi KURODA[1,2], Satoshi SOUDA[1], Michihiko IKE[1] ([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]CEIDS, Osaka Univ.)

【背景と目的】II-VI 族半導体であるセレン化カドミウム (CdSe) は、ナノサイズ (1～10 nm) において粒径に応じた波長の蛍光を示す量子ドット材料であり、様々な用途が開発されている。現在主流の CdSe ナノ粒子の合成法であるホットソープ法は、有害な薬品や 300℃程度の高温が必要である。そこで、微生物を利用した CdSe 合成方法が着目されている。微生物による CdSe 合成では、危険な薬品を用いず、常温における緩やかな反応であり、培養条件を制御することによって、そのナノ粒径の微妙な調節が可能となることが期待できる。我々は、これまでに亜セレン酸およびカドミウムから CdSe を合成する微生物の集積を行い、結果として *Pseudomonas aeruginosa* RB-R 株を単離した。本研究では量子ドットとしての CdSe ナノ粒子の合成に向け、本菌株の培養特性および生成される粒子の特徴づけを目的とした。
【方法と結果】乳酸を単一炭素源とする培地で好気培養をしたところ、RB-R 株は 10℃～45℃、pH 5～9.5、NaCl 濃度 0.005～4%の範囲で増殖でき、37℃、pH 7.0、NaCl 濃度 1%が最適増殖条件となり、このとき比増殖速度 0.84 h^{-1} を示した。また、RB-R 株は亜セレン酸およびカドミウムに対し、亜セレン酸では 10 mM、カドミウムでは 20 mM までの増殖が確認され、亜セレン酸の活発な還元は定常期に達してからであることが分かった。次に亜セレン酸とカドミウムをそれぞれ 1 mM ずつ添加した系で RB-R 株を培養したところ、両者が水相から同時に減少し、培養液が CdSe に特有の赤褐色を呈した。このとき 72 時間以内に亜セレン酸は全量、カドミウムは 6 割が除去された。透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察と元素分析により、菌体細胞の内外にセレンとカドミウムから構成されている数 nm のナノ粒子が蓄積されていることが確認された。また、定常期に達した直後の培養液を採取し、遠心分離によって回収した菌体を 100 mg/L トリポリリン酸ナトリウム水溶液にて 3 回洗浄して紫外光を照射すると、CdSe 由来とみられる蛍光が確認された。さらにプロテアーゼ K と超音波破砕処理による粒子の回収を試みたが、TEM 観察の結果、粒子が 200 nm 程に凝集しており、蛍光がみられなかったため、今後は粒径を維持したまま回収する方法の確立が必要と考えられた。

CdSe nanoparticle, Biosynthesis, Quantum dot

講演番号：2C11a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ C 校舎 11 会場

リン酸レギュロン制御因子 PhoU を破壊したフィチン酸代謝菌 *Klebsiella pneumoniae* 9-3B のポリリン酸蓄積
Polyphosphate accumulation in *Klebsiella pneumoniae* 9-3B by *phoU* gene disruption

○杉本 敬祐[1]、大谷 翠[2]、阿部 歩[2]、田中 みち子[2]、浅野 行蔵[2]、曾根 輝雄[2] ([1]旭川高専、[2]北大院農)
○Keisuke SUGIMOTO[1], Midori OHTANI[2], Ayumi ABE[2], Michiko TANAKA[2], Kozo ASANO[2], Teruo SONE[2] ([1]Asahikawa Nat. Coll. of Tech., [2]Hokkaido Univ.)

フィチン酸とは、イノシトールの水酸基全てにリン酸が結合したもので、植物種子においてリンの貯蔵形態として多量に含まれている。また、稲わら、ふすま、糠などの植物系有機廃棄物にもフィチン酸は多量に含まれており、リン資源回収のバイオマスとしての可能性を秘めている。我々のグループが単離した *Klebsiella pneumoniae* 9-3B は、フィチン酸のリン酸基すべてを解離することができる高いフィターゼ活性を有するため、フィチン酸を唯一のリン酸源かつ炭素源として生育することができる*。本菌の分子育種により、フィチン酸から遊離したリン酸をポリリン酸として菌体内で蓄積することができれば、1 種類の微生物でフィチン酸を含むバイオマスからリン酸を回収することが可能となる。そこで我々は、9-3B 株にポリリン酸蓄積能を付加するために、ポリリン酸合成を抑制している *phoU* 遺伝子を相同組換えによりノックアウトした欠損株の作製を試みた。

類縁菌である *Klebsiella pneumoniae* 342 のゲノムデータから、*phoU* 遺伝子および隣接する上流・下流それぞれ 600bp を含めた領域を増幅するプライマーにより、*Klebsiella pneumoniae* 9-3B のゲノム DNA を鋳型とした PCR を行った。PCR 産物をクローニングベクターに挿入した後、*phoU* 遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子と置換するために、*phoU* 遺伝子のみを削除するインバース PCR を行い、別途 PCR で増幅したカナマイシン耐性遺伝子をライゲーションした。カナマイシン耐性遺伝子領域および *phoU* 遺伝子に隣接した 600bp 領域を含むインサートを pWM97 プラスミドベクター（*sacB* 遺伝子をコードしている）に挿入し、ノックアウト導入プラスミドを完成した。このプラスミドを大腸菌 *S17-1 λ pir* に形質転換し、接合伝達により *Klebsiella pneumoniae* 9-3B に導入した。導入した株は、ショ糖を含む寒天培地によりセレクションし、*phoU* 遺伝子欠損株を単離した。単離した株については、コロニーPCR およびサザン解析から *phoU* 遺伝子が欠損されたことを確認した。得られた欠損株と野生株を培養し、細胞抽出液を電気泳動・トルイジンブルー染色したところ、欠損株のみにおいて、ポリリン酸のバンドが検出され、本欠損株がポリリン酸を蓄積することが確認された。現在、NTG 変異法により処理した *Klebsiella pneumoniae* 9-3 から、高いポリリン酸蓄積能を有する変異株のスクリーニングを進めている。

* Mopera LE, et. al., Purification and Characterization of Phytase from *Klebsiella pneumoniae* 9-3B, *J. Biosci Bioeng.*,(2012), 113(5):562-567

polyphosphate accumulation, phytate

講演番号：2C11a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ C 校舎 11 会場

幌延深部地下環境由来の微生物がフミン酸分子に与える影響

Subsurface bacteria in Horonobe alter the molecular structure of humic acids.

○上野 晃生[1]、清水 了[1]、玉村 修司[1]、高田 迪彦[1]、遠藤 亮[1]、長沼 毅[2]、大味 泰[1]、金子 勝比古[1,3] ([1]幌延地圏環境研究所、[2]広島大院・生物圏科学、[3]北大院・工)
○Akio UENO[1], Satoru SHIMIZU[1], Shuji TAMAMURA[1], Michihiko TAKADA[1], Ryo ENDO[1], Takeshi NAGANUMA[2], Yasushi Ohmi[1], Katsuhiko KANEKO[1,3] ([1]H-RISE, [2]Hiroshima University, [3]Hokkaido University)

【研究背景】
地圏環境有機物の主要分画を成す腐植物質は、環境中では非常に安定した物質であるため、一般的には微生物の炭素源としての利用性はほとんど無いと考えられている。しかしながら、腐植物質分解能を有する微生物の報告があることから [1-3]、腐植物質は微生物作用を通じ、地圏環境中の炭素循環に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。昨年度の本大会において、幌延深部地下環境より、フミン酸(HA)を利用すると考えられる集積培養物を得たこと、HA 分解指標の一つである褪色現象が生じたことを報告した。本研究では、昨年度取得した集積培養物より微生物を単離し、微生物がどのように HA の分子構造に影響を与えているのかを調べた。

【方法】
日本原子力研究開発機構・幌延深地層研究施設換気立坑地下 250m より採取した地下水を接種源とし、Aldrich HA を唯一の炭素源とする好気培養にて集積培養物を得た。本集積培養物より HA を利用する微生物の単離を行った。単離した微生物の同定は 16S rRNA 遺伝子配列をデータベースと照合することにより行った。Aldrich HA もしくは集積培養接種源として用いた地下水と同一地層の珪藻質泥岩(声問層)より調製したフミン酸（声問層 HA）を含む培養液にて、集積培養物および単離株の培養を行い、培養液より HA を抽出した。高速サイズ排除クロマトグラフィー(HPSEC)とフーリエ変換赤外分光スペクトル(FT-IR)解析を行い、対照実験群と、集積培養物および単離株培養群間での HA 分子量分布および分子構造の違いを比較した。

【結果及び考察】
集積培養物より微生物の単離を行ったところ、*Pseudomonas stutzeri* に近縁な単離株を得た(HSI-9 株)。HPSEC 分析を行ったところ、対照実験では見られない、高分子側に新たなピークが確認された。FT-IR 解析では、集積培養物および HSI-9 株培養群において、Aldrich HA では 3420 と 1710 cm^{-1} 付近の、声問層 HA ではさらに 1035 cm^{-1} 付近の吸収が消失していた一方、双方の HA において 3290、1540、1450 cm^{-1} 付近の吸収が新たに観察された。地下環境から単離した *P. stutzeri* に近縁な細菌が、同じ地層より抽出した HA(声問層 HA)の構造に影響を与える知見は本研究が初めてとなる。以上の結果から、本研究で得られた微生物の増殖に伴い、HA 分子の利用と構造変化が生じている可能性が示唆された。

【参考文献】
[1] Dari *et al.*, (1995) FEMS Microbiol. Ecol. 16: 115-122.; [2] Grinhut *et al.*, (2011) Environ. Sci. Technol. 45: 2748-2754. [3] Yanagi *et al.*, (2008) Microbes Environ. 23:44-48.

Humic acids, Subsurface bacteria, FT-IR

講演番号：2C11a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ C 校舎 11 会場

セルロースアセテートの分解に関与する好熱菌由来エステラーゼの性質

Characterization of esterase involved in cellulose acetate degradation from thermophile.

○森芳 邦彦、駒 大輔、山中 勇人、大本 貴士 (阪市工研)
○Kunihiko Moriyoshi,Daisuke Koma,Hayato Yamanaka,Takashi Ohmoto (OMTRI)

【目的】

セルロースアセテート（ＣＡ）は、最も豊富なバイオマスであるセルロースを原料にした半合成ポリマーである。我々はこれまで、ＣＡ分解菌によるＣＡの分解がＣＡエステラーゼとエンドグルカナーゼの協同作用によって進行し、主な生成物はセロビオースと酢酸であることをすでに報告した[1)]。これらの知見を利用し、ＣＡ廃棄物を酵素分解し、その生成物を資源として有効利用する目的で本研究を行っている。本研究では、高活性で熱安定性のある酵素を得るため、好熱菌由来の耐熱性ＣＡエステラーゼについて調べている。今回、培養液あたりの酵素活性が最も高かった TTE0866 エステラーゼの性質について詳しく調べた。

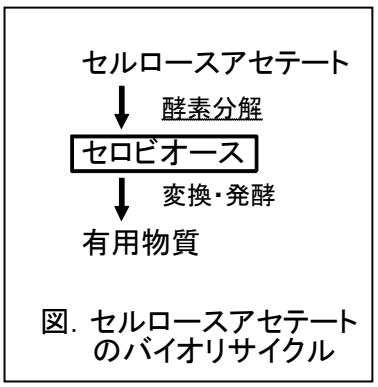


図. セルロースアセテートのバイオリサイクル

【方法・結果】

好熱性の細菌およびアーキア８種類の中から、ＣＡエステラーゼと相同性のある遺伝子をいくつか選別し、ＰＣＲで目的遺伝子を増幅後、大腸菌で発現させた。得られたエステラーゼの酵素活性について可溶性のＣＡ（置換度0.9）を基質にして調べたところ、好熱性の細菌である *Caldanaerobacter subterraneus* 由来のTTE0866 エステラーゼの活性が最も高かった。このエステラーゼについてアフィニティークロマトグラフィーで精製し、その性質について調べた。

この酵素の分子質量はＳＤＳ−ＰＡＧＥで３４kDaであった。反応の最適ｐＨは７から８付近であった。反応の最適温度を調べたところ６０℃であった。これまでのＣＡ分解菌由来のＣＡエステラーゼの最適温度が４５℃であったことから、より高い温度でのＣＡ酵素分解への利用が可能であると考えられた。６０℃における酵素の反応速度定数について求めたところ、K_m値は2. 9 mM、k_{cat}値は72 s^{-1} であった。エステルの鎖長の違いによる反応性への影響を*p*−ニトロフェニルエステルを用いて調べたところ、酢酸、プロピオン酸には反応性が高かったが、長鎖脂肪酸に対しては低かった。不溶性ＣＡ（置換度1.8および2.5）に対して作用させたところ、ＣＡエステラーゼ単独ではわずかにしか脱アセチル化が進行しなかったが、セルラーゼと混合して作用させることで、ＣＡの分解が進行した。このとき置換度2. 5の不溶性ＣＡに対しても速度は遅いが分解が進行した。

[1)] Moriyoshi,K. et al., *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, **74**, 1940-1942 (2010).

biodegradation, cellulose acetate, esterase

講演番号：2C11a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ C 校舎 11 会場

オカラ好気高温固体培養を利用した廃食用油処理システムの構築を目指した評価系の確立

Construction of analytical methods for the high-temperature aerobic solid-state fermentation system with tofu refuse and used cooking oil

○岩瀬 徳康[1]、松岡 真生[1]、西田 茂雄[2]、若松 敏幸[3]、祥雲 弘文[1]、若木 高善[1]、後藤 直宏[4]、伏信 進矢[1] ([1]東大院農生科、[2]環清技研エンジニアリング、[3]東京海洋大海科、[4]東京海洋大院海科技)
○ Noriyasu IWASE[1], Masaki MATSUOKA[1], Shigeo NISHIDA[2], Toshiyuki WAKAMATSU[3], Hirofumi SHOUN[1], Takayoshi WAKAGI[1], Naohiro GOTOH[4], Shinya FUSHINOBU[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Kanseigiken Engineering, [3]Tokyo Univ. of Marine Sci. Tech., [4]Tokyo Univ. of Marine Sci. Tech.)

【背景と目的】日本国内における廃食用油の年間発生量は約 45 万 t と推定され、このうち、事業系から排出されるものはほぼ回収されているものの、数万 t が再生利用困難として廃棄されている。また、一般家庭からの回収率は低く、約 10 万 t が、ゴミとして廃棄され、または排水として下水に流されることにより自然環境の汚染につながっている。一方、豆腐製造における副産物であるオカラは、中・小規模の製造所においては産業廃棄物として処分され、その量は年間 30 万 t 以上と推定されている。しかも、オカラは含水率が 80%を超える代表的な高含水率食品加工残渣であり、保管や運送における腐敗やコストの問題が、リサイクルの大きな妨げとなっている。

そこで我々は、廃食用油とオカラを混合し発酵乾燥させることで飼料や燃料へと再利用するシステムの構築を目指している。本研究では、上記システムにおける廃食用油の分解を評価する分析系の確立を検討した。

【方法と結果】生オカラに発酵乾燥オカラと廃食用油を混合し、ラボスケールでの好気高温培養を行った。培養基質中のアシルグリセロール、遊離脂肪酸といった脂質の含有量、含水率、pH、酵素活性を経時的に測定し、廃食用油の微生物による分解と、それに関わる要素を評価した。また、PCR-DGGE 法による微生物群集解析を行い、優位に存在する微生物の確認を行っている。

lipid, solid-state fermentation, PCR-DGGE

講演番号：2C11a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ C 校舎 11 会場

エタノール生産性 Sphingomonas sp. A1 によるアルギン酸からのエタノール生産に対する溶存酸素濃度の影響

Effect of dissolved oxygen concentration on the productivity of ethanol from alginate by ethanologenic Sphingomonas sp. A1

○吉田 志織、藤井 麻理、大橋 一登、三上 真一、河井 重幸、村田 幸作（京大院・農）
○shiori yoshida,mari fujii,kazuto ohashi,shinnichi mikami,shigeyuki kawai,kousaku murata (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景】世界第６位の広大な排他的経済水域を有する我が国において、海洋バイオマス、特に藻体量が大きく生育速度が速い褐藻類由来バイオマスの有効利活用技術の確立が急務である。当分野では、エタノール生産性 *Sphingomonas* sp. A1 （MK3353 株）によるアルギン酸（褐藻類主成分）からの約 1.3% (w/v) のエタノールの生産に成功している [1)]。MK3353 株は、同 A1 の乳酸脱水素酵素遺伝子欠損株（ldh 株）に、ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子とアルコール脱水素酵素遺伝子を広宿主プラスミド pKS13 を介して導入したエタノール生産株である [1)]。同株はアルギン酸からエタノールを生産する過程で生育阻害物質も生産する [2)]。同株によるエタノール生産には溶存酸素量が大きな影響を及ぼすが [1)]、詳細は不明である。
【方法・結果】エタノール生産性 MK3353 株ならびに対照株（MK3567 株： pKS13 のみを導入した ldh 株） を 5% (w/v) アルギン酸含有培地で 50、95、および 145 spm で培養し、生育性、培地中のエタノール、アルギン酸、各種代謝化合物の濃度、溶存酸素量、生菌数 (cfu)、ならびに生育阻害活性を調べた。溶存酸素量は非破壊酸素濃度計（Fibox 3、PreSens 社）を用いて測定した。その結果、溶存酸素濃度は、全ての系で培養初期に一旦 0%付近まで低下した後、両株ともに 145 spm では高濃度（15%付近）で、50 spm および 95 spm では低濃度（0%付近）で推移したが、エタノール生産性 MK3353 株では培養後期に溶存酸素濃度の上昇が観察された。同 MK3353 株は、145 および 50 spm では低いエタノール生産性およびアルギン酸消費量を示したが、95 spm では旺盛なアルギン酸の消費とエタノールの生産性を示した。以上の結果から、アルギン酸からのエタノール生産反応が酸素要求性であることが分かった。また、145 spm では過剰な溶存酸素による酸素毒性に起因する細胞の死滅が、50 spm では溶存酸素不足による不十分な代謝が両条件における低いエタノール生産性の原因と考えられた。得られた知見に基づく、供給酸素量の至適化によるエタノール生産性の向上が期待された。本研究は、最先端・次世代研究開発支援プログラムの助成により行われた。

1) Takeda *et al. Energy & Environ. Sci.*, **4**:2575-2581 (2011).
2) 藤井ら日本農芸化学会 2012 年度大会　講演要旨集 p. 107.

alginate, ethanol, Sphingomonas sp., oxygen

講演番号：2C11a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ C 校舎 11 会場

マリンバイオリファイナリー: *Sphingomonas* sp. A1 株によるアルギン酸からのピルビン酸の生産
Marine-biorefinery: production of pyruvate from alginate using *Sphingomonas* sp. A1

○河井 重幸[1]、大橋 一登[1]、吉田 志織[1]、藤井 麻理[1]、佐藤 信行[2]、村田 幸作[1] ([1]京大院・農、[2]マルハニチロ)
○Shigeyuki KAWAI[1], Kazuto OHASHI[1], Shiori YOSHIDA[1], Mari FUJII[1], Nobuyuki SATOU[2], Kousaku MURATA[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Maruha Nichiro)

【背景】国土面積は狭隘だが排他的経済水域は広大な我が国において、海洋バイオマス、特に藻体量が大きく生育速度が速い褐藻類由来バイオマスの有効利活用技術の確立が急務である。当分野では、エタノール生産性 *Sphingomonas* sp. A1 株によるアルギン酸（褐藻類主成分；ウロン酸重合体）からの約 1.3% (w/v) のエタノールの生産に成功しているが [1)]、エタノール以外の有用化合物の生産系の確立も望まれる。ピルビン酸は、当該 A1 株によるアルギン酸資化過程の中間代謝化合物であり、様々な用途に用いられる有用化合物である。

【方法・結果】*Sphingomonas* sp. A1 乳酸脱水素酵素遺伝子欠損株 (ldh 株) を 5% (w/v) アルギン酸含有培地で 95 spm (strokes per min)で培養し、培養液のメタボローム解析を行ったところ、著量のピルビン酸が検出された。50、95、および 145 spm で振とう培養してピルビン酸分泌に対する振とう速度の影響を調べたところ、145 spm で培養した場合に最も顕著なピルビン酸の生産（約 54 mM, 約 4.7 g/L）が認められたが、50 spm の場合は全く認められず、ピルビン酸の生産における酸素供給の重要性が明らかとなった。また、野生株のピルビン酸の生産量は ldh 株よりも低く、アルギン酸からのピルビン酸生産に乳酸脱水素酵素遺伝子の破壊が有効であることが示された。A1 ldh 株のさらなる代謝改変による、アルギン酸からのピルビン酸の生産量の向上が期待された。発酵法によるピルビン酸の生産については、大腸菌、コリネ型細菌、および酵母などを用いた、グルコース（陸性バイオマス由来）を基質とする方法が知られているが、本研究により、海性バイオマスからのピルビン酸の発酵生産への途がはじめて拓かれた。アルギン酸からのエタノール生産技術の進展と併せて、陸性から「海性」の再生可能資源に基軸を移した「マリンバイオリファイナリー」技術の更なる展開が期待される。本研究は、最先端・次世代研究開発支援プログラムの助成により行われた。

1) Takeda *et al. Energy & Environ. Sci.*, **4**:2575-2581 (2011).

alginate, pyruvate, metabolome

講演番号：2C11a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ C 校舎 11 会場

Trametes versicolor を用いたデンプン系廃棄物からの直接的エタノール生産

Direct ethanol production from starcheous materials by *Trametes versicolor*

○綱島 彩子、内井 敦史、岡本 賢治（鳥取大院工）
○Ayako TSUNASHIMA,Atsushi UCHII,Kenji OKAMOTO (Tottori Univ.)

【目的】国内の未利用バイオマス中、年間 1900 万トン発生する食品廃棄物において、一部（約 27%）が肥飼料等に再利用されているものの、大部分は焼却処分となっており、現状の処理方法によるコストや環境などへの影響ならびにエネルギーの多様性を考慮した新たな利活用技術の確立が求められている。我々は、多様な発酵特性をもつ担子菌による未利用バイオマスの有効活用（バイオマス・リファイナリー）を目的とした研究を進めており、リグノセルロース原料だけでなく、デンプン質原料に対する分解・発酵能にも注目している[1)]。今回、食品廃棄物のうち、廃棄麺類を対象に発酵担子菌によるエタノール生産について検討した。

【方法】各種デンプン、消費期限切れの麺類、または麺の茹で汁を発酵基質とした培地に菌を接種し、それぞれのエタノール生産について調べた。経時的に採取した試料は、フィルターろ過した後、高速液体クロマトグラフ（示差屈折検出器）で糖およびエタノールの分析を行った。また、残存するデンプンならびに遊離糖は酵素法にても測定した。

【結果】供試した野生担子菌のうち、鳥取県内で採集した白色腐朽菌 *Trametes versicolor*（和名：カワラタケ）に高い可溶性デンプン発酵能を見いだした。本菌の 28S rRNA の塩基配列（AB604944）を BLAST にて相同性検索した結果、既に登録されている *T. versicolor* と一致するものであった。トウモロコシ、ジャガイモ、小麦、米由来の各デンプン培地で発酵させたところ、デンプンの種類や可溶性などの差に関係なく、どれも 7 割以上の収率でエタノールを生産していた。そこで次に、デンプン質原料として廃棄麺（うどんなど）やその茹で汁を対象とした検討を行った。その結果、デンプンの糖化と発酵が同時に進行し、上記と同様の収率で糖質が比較的効率良くエタノールへ変換されていた。このように、当該担子菌は広いデンプン分解ならびに発酵可能な能力を有し、廃棄麺類や茹で汁に対してアミラーゼ添加など特に処理することなく、含有糖質から良好な変換率でエタノールを回収できることが明らかとなった。

1) K. Okamoto *et al.*, Enzyme Microb. Technol. 48: 273-277 (2011).

Trametes versicolor, ethanol, starch

講演番号：2C11a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ C 校舎 11 会場

マイクロ波照射とポリオキソメタレート錯体触媒を併用したアオサ属の緑藻の糖化

Saccharification of green seaweeds by microwave irradiation and polyoxometalate cluster

○椿 俊太郎[1]、平岡 雅規[1]、上田 忠治[2]、恩田 歩武[2]、東 順一[3] ([1]高知大総研セ、[2]高知大理、[3]大阪大工)
○Shuntaro TSUBAKI[1], Masanori HIRAOKA[1], Tadaharu UEDA[2], Ayumu ONDA[2], Jun-ichi AZUMA[3] ([1]Kochi Univ., [2]Kochi Univ., [3]Osaka Univ.)

【緒言】アオサ属の緑藻類の大発生（グリーンタイド）は重大な環境問題となっている。一方、これらの緑藻バイオマスは高い成長速度を有し、デンプンやセルロース、細胞間粘質多糖などの製造原料として有望である。そこで本研究では、バイオマスや触媒を直接かつ集中的に加熱し高い反応効率が達成可能なマイクロ波照射と、硫酸以上の強酸性を有しながら低腐食性かつ回収・再利用可能なポリオキソメタレート錯体触媒を併用してアオサ属の緑藻類を糖化し、未利用の緑藻バイオマスから有用な糖類の回収を行った。
【実験方法】高知県浦ノ内湾において採集したミナミアオサ（*Ulva ohnoi*）、タンク培養したミナミアオノリ（*Ulva meridionalis*）、デンプン（コーンスターチ）、アビセルセルロース（結晶化度 76%、Merck KGaA）の乾燥粉末試料 1 g に対して、ポリオキソメタレート錯体触媒として 1-15 mM のリンタングステン酸を 20 mL 加え、マイクロ波を照射した（Start D, 2.45 GHz, Milestone Inc., 温度条件；120-200℃, 反応時間；7-14 分）。冷却後、可溶部と残渣に分離し、糖組成および糖収量をそれぞれ高速陰イオン交換クロマトグラフィー、フェノール硫酸法、グルコーススタット（和光純薬工業株式会社）により測定した。
【結果】ミナミアオサ（セルロース；19.7%、デンプン；4.2%、中性糖組成；Rha:Gal:Glc:Xyl:Man = 34.2:0.7:52.3:12.7:0.1）およびミナミアオノリ（セルロース；10.7%、デンプン；13.0%、中性糖組成；Rha:Gal:Glc:Xyl:Man = 25.9:11.0:56.2:4.8:2.1）には主要構成多糖としてセルロースおよびデンプンが多く含まれていた。そこで、まずこれらの標品を用いて反応条件を検討したところ、デンプンは 1.46 mM・160℃・14 分において最大糖化率 80.4%に、アビセルセルロースは 14.6 mM・200℃・13 分において最大糖化率 39.0%に達した。ジエチルエーテル抽出によりポリオキソメタレート錯体を回収し 4 サイクル再利用した結果、触媒活性の低下は認められなかった。また、ポリオキソメタレート錯体の添加によりマイクロ波吸収性が上昇し、エネルギー消費量が約 20%低減された。電気伝導性の向上により、温度の上昇に伴い低下する水のマイクロ波吸収性を補っていると考えられた。続いて緑藻試料に応用したところ、ミナミアオサおよびミナミアオノリからそれぞれ最大 171 mg/g (160℃)、257 mg/g (180℃) の中性糖が得られ、主要な糖はグルコースとラムノースで構成されることが分かった。これらの糖はデンプンやセルロース、ウルバンに由来すると考えられた。

microwave, polyoxometalate, green seaweed

講演番号：2C11a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ C 校舎 11 会場

イネリグニン生合成の増強

Up-regulation of lignin biosynthesis in rice

小柴 太一[1]、山村 正臣[1]、鈴木 史朗[1]、服部 武文[3]、坂本 正弘[2]、○梅澤 俊明[1]（[1]京大生存研、[2]京大院農、[3]徳島大ＩＳＳ）
Taichi Koshiba[1], Masaomi Yamamura[1], Shiro Suzuki[1], Takefumi Hattori[3], Masahiro Sakamoto[2], ○Toshiaki Umezawa[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Univ. Tokushima)

木質（リグノセルロース）バイオマスに基づくバイオリファイナリー構築において克服すべき課題は本質的に2つある。第１点は、その超分子構造の強固さ（レカルシトランス）に起因する。第２点は、多糖（セルロース、ヘミセルロース）の炭素含量が化石資源と比べて非常に低いことである。上記の第１点について、リグノセルロースの超分子構造を緩めるための様々な前処理やリグニン量を低下させる分子育種が検討されてきたが、リグノセルロース超分子構造の強固さの解決は非常に手強い課題であり、研究戦略上全く別の発想による研究開発をも並行して推進することが極めて重要と考えられる。すなわち、酵素糖化に依らず激烈な条件でリグノセルロースを一気に分解すれば超分子構造の強固さに起因する問題は回避できる。第２点について、木質多糖は化石資源リファイナリーにおける製品レベルの炭素含量しか有していない。すなわち、既にかなり酸化が進んだ化合物を原材料として使用しなければならないことが、バイオマスリファイナリーを構築する際本質的に不利な点となっている。一方、リグニンは炭素含量が高く、実際パルプ廃液中のリグニンは燃料として利用されており、その原油換算量は我国で年間540万kL（2008年）に上る。加えて、天然芳香族資源としてのリグニンの工業原材料としての利用に関し近年急速に期待が高まっている。

以上に鑑み、本研究ではイネ科エネルギー植物のモデルとしてイネを用い、リグニン量を増強した組換え体を作出した。

すなわち、CaMV35S プロモーターを使用しイネもしくはシロイヌナズナのリグニン合成関連酵素及び転写因子遺伝子をイネにおいて強発現もしくは異種発現させた。得られた一連の形質転換イネを人工気象装置で生育させた。生育させた組換えイネにつき、以下の各項目に関しコントロールと比較解析した：乾物重測定、発現制御を行った遺伝子の発現状況解析（qRT-PCRによる）、茎、葉鞘、葉身部のリグニンの定性・定量解析である。

その結果、茎のリグニン量が最大で53％増加した形質転換体が得られた。本結果は、ガス化・BTL生産および木質ペレットを含む地域バイオマス燃焼システムに適する高発熱型木質バイオマスの作出につながり、リグノセルロースの有効利用システムの構築に至ると考えられる。

lignin, metabolic engineering, rice

講演番号：2C11a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ C 校舎 11 会場

超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* におけるキチン資化能の強化およびその水素生産への応用

Hydrogen Production from Chitin by Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis* and Genetic Modification Aiming Reinforcement of the Chitin Assimilation Ability

○間宮 淳子[1]、折田 和泉[1]、中村 聡[1]、今中 忠行[2]、福居 俊昭[1]([1]東工大院生命理工、[2]立命館大生命科)

○Atsuko MAMIYA[1], Izumi ORITA[1], Satoshi NAKAMURA[1], Tadayuki IMANAKA[2], Toshiaki FUKUI[1] ([1]Tokyo Tech., [2]Ritsumeikan Univ.)

【目的】超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* は至適生育温度 85℃の従属栄養絶対嫌気性菌である。本菌はアミノ酸/ペプチドおよび元素硫黄を含む培地で硫化水素を発生しながら増殖するが、元素硫黄非存在下においてデンプンやピルビン酸などの有機化合物が存在する条件ではプロトンを最終電子受容体として水素を発生しながら増殖する。また、本菌は超好熱菌には珍しいキチン資化性を有しており、キチン分解系酵素遺伝子は約 13 kbp の領域にクラスターを形成している。本菌のキチン代謝では、キチンは細胞外で ChiA(キチナーゼ)によって $GlcNAc_2$ に分解され、細胞内へ輸送された後に Dac,GlmA,GlmD などの作用を経て解糖系に合流する。キチンは自然界に大量に存在するがその有効利用が未だ十分ではないバイオマスであり、今後の利用拡大が期待されている。そこで本研究では *T. kodakarensis* のキチン代謝に着目し、遺伝子改変によってその資化能を強化することで、キチンから次世代エネルギーとして有用な水素を効率的に生産することを目的とした。

【方法および結果】これまでの研究により機能未知遺伝子 *tk1762-tk1763* がキチン代謝遺伝子群の発現抑制に関与していることが明らかにされている。そこで *T. kodakarensis* KUW1 株を親株として、*tk1762-tk1763* を相同性組換えにより欠失させることで発現抑制を解除したΔ6263 株を作製した。また ChiA の高発現のため、KUW1 株およびΔ6263 株の *chiA*(TK1765)上流に強力かつ構成的プロモーター *Pcsg* を挿入した KUW1-Pcsg 株、Δ6263-Pcsg 株をそれぞれ作製した。培養には人工海水栄養豊富培地を用い、生育測定、発生気体の分析、および培養液から調製した画分のウエスタンブロッティング解析を行った。本実験においてキチンの単独添加では菌体の生育は確認されなかったため、キチンとピルビン酸を添加し、ピルビン酸の単独添加と比較した。キチンの添加によっていずれの株においても生育阻害が観察されたが水素発生量は増加し、*T. kodakarensis* がキチンを資化して水素発生を行うことが強く示唆された。Δ6263 株において Dac および GlmA の量は大きく増加したが、ChiA 量は大きな影響を受けなかった。*chiA* 上流に *Pcsg* を挿入した組換え株では、KUW1-Pcsg において菌体外 ChiA が大量に検出されたが、Δ6263-Pcsg 株ではやや増加したに留まった。KUW1 株、Δ6263 株、およびΔ6263-Pcsg 株と比較して KUW1-Pcsg 株ではキチン添加時での菌体あたり水素発生能が大幅に向上したことから、*T. kodakarensis* によるキチンからの水素生産には ChiA が重要な役割を担っていることが推測された。

hydrogen production, chitin, *Thermococcus kodakarensis*

講演番号：2C11a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ C 校舎 11 会場

NMR 法によるリグノセルロースの微生物分解の解析

NMR analyses of microbial degradation of lignocellulose

○西村 裕志[1,3]、田頭 英朗[2]、岡村 英保[2,3]、小澤 佑[2]、片平 正人[2,3]、渡辺 隆司[1,3] ([1]京大生存圏研、[2]京大エネルギー理工学研、[3]JST CREST)
○ Hiroshi NISHIMURA[1,3], Hideaki TAGASHIRA[2], Hideyasu OKAMURA[2,3], Yu KOZAWA[2], Masato KATAHIRA[2,3], Takashi WATANABE[1,3] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]IAE, Kyoto Univ, [3]JST CREST)

陸上生態系における炭素循環において，木材腐朽菌は樹木に固定化された有機物の分解者として重要な役割を担っている．しかしながら，木材腐朽過程における細胞壁構造の変化を天然状態で解析した例は少ない．我々は，木質バイオマスの生分解過程を包括的に理解するために，その構造を精密かつ定量的に捉えるとともに，分解過程の変化を分子レベルでモニタリングすることを目指している．溶液 NMR 法は，木材組織内部の分子構造を原子レベルで把握することができる有力な手段である．
我々は昨年までに，溶液 NMR 法における試料調製法と測定条件の検討を行い，微粉末木粉そのものを可能な限りインタクトな状態で溶解させ，良好な二次元 NMR スペクトル (^{1}H-^{13}C HSQC) を取得することができた．一般にバイオマス試料は高分子で粘性が高いため，緩和時間 T2 が短く，ブロードで弱いシグナルを与える．これに対し我々は，^{1}H-^{13}C TROSY NMR 法を適用することにより高分解能分析が実現できることを見出した．さらに TROSY 法を応用して，^{1}H-^{13}C HSQC スペクトルにおいて各ピークの結合定数 $^{1}J_{CH}$ の相違により生じる積分体積のずれを補正する方法を提案し，定量精度の向上が実現できることを示した．

本研究では，これを発展させ，生分解過程の解析に応用した．その結果，木材腐朽菌の種類による腐朽パターンの違いのほか，選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* においては，培養期間に応じてリグニン分解の選択率が高い期間と低い期間が存在することが NMR 法から確認できた。また，それぞれのスペクトルから示差スペクトルを得ることにより，木質構成成分の構造変化の特徴を効果的に解析できることを見出した．

また木材腐朽時に生じる菌体外二次代謝物の解析も行った．*C. subvermispora* はリグニンを高選択的に分解する一方，セルロースの分解率が低いというユニークな腐朽メカニズムを有し，特徴的な二次代謝物が分解反応に関与すると考えられている. 最近我々は, 本菌特有の二次代謝物である ceriporic acid の過酸化反応がリグニン分解に関与する現象を見出している．本研究では，こうした二次代謝物の生成を実際の腐朽状態を観察しながら NMR 法によりモニタリングするとともに，高分解能質量分析法(LC-IT-TOF-MS, FT-ICR-MS) による解析を行った．

Lignin, NMR, basidiomycete

講演番号：2C11a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ C 校舎 11 会場

PCB 分解菌によるビフェニルからのポリヒドロキシアルカン酸(PHA)生産
Production of polyhydroxyalkanoates from biphenyl in a PCB degrading bacterium
○若林 愛子[1]、笹原 良介[1]、田口 精一[2]、前田 理久[1] ([1]明治大院農、[2]北大院工)
○Aiko Wakabayashi[1], Ryosuke Sasahara[1], Seiichi Taguchi[2], Michihisa Maeda[1] ([1]Meiji Univ., [2]Hokkaido Univ.)

ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA)は、数多くの微生物種によって生合成される脂肪族ポリエステルであり、われわれ人間にとっては生分解性プラスチックとしての利用が可能である。本研究では環境汚染物質であるPCB/ビフェニルの分解・資化能をもつ*Alcaligenes denitrificans* A41株を用いてビフェニルからPHAへ変換することで、環境汚染物質から有用な生分解性プラスチックを生産することを目的としている。
これまでに、ビフェニルを単一炭素源で培養すると、窒素源を制限しなくてもPHAを生産し、そのモノマー組成は3HBよりはむしろ３HVが多い傾向であることが明らかとなっている。今回はより多くのPHAが得られる培養方法(LB−窒素源を含まない最少培地の2段階で行う)で、炭素源によるPHA生産特性を解析した。
A41株をLB培地で12時間培養して菌体量を確保した後、単一炭素源を添加した窒素源制限培地に交換してPHA生産を行った。炭素源はビフェニル(炭素数12)または対照として良好な生育を示すコハク酸(炭素数4)を用いた。PHA生産培養開始から、経時的にサンプリングし、PHA蓄積量およびモノマー組成を解析した。PHA 蓄積量は、コハク酸を単一炭素源にした場合も、ビフェニルを単一炭素源にした場合も、約25%の最大値を示したが、ビフェニルの方がおよそ2倍の時間を要した。PHA顆粒の透過型電子顕微鏡(TEM)解析では、コハク酸では PHA 合成開始から比較的早い時間に顆粒が見られる菌が視野の大半を占めていたが、ビフェニルでは最大値を示す時間帯に向けて徐々に顆粒が確認できる菌が増えていた。PHA 顆粒の大きさや個数は、炭素源で明確な違いは見られなかった。また、炭素代謝が活発でない時期や窒素源非制限時に3HVモノマーモル分率が高くなった。
PHAの蓄積速度は、ビフェニル代謝によるPHAへの炭素フローがコハク酸に比べて時間を要することを反映していると考えられる。そこで、ビフェニルからPHAへの炭素フローの詳細を明らかにするために、ビフェニルでの生育モードが異なるアルカリ条件(pH9)下での PHA 生産特性を解析したところ、生育特性と同様にゆっくりと PHA を蓄積し続け、72 時間後には 30%を超える結果となった。現在、さらに別の観点からビフェニルからPHAへの炭素フローの解析を行っている。

PCB degrading bacteria, Biphenyl, Polyhydroxyalkanoate

講演番号：2C11p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ C 校舎 11 会場

家畜糞を用いたメタン発酵の培養過程に伴うアーキア群の消長

Behavior of Archaeal community accompanying the cultivation process of methane fermentation using livestock manure

○中島 隆夫[1]、毛塚 雄栄[2]、井内 優也[2]、松本 二郎[3]、井藤 俊行[3]、永塚 孝幸[4]、滝口 泰之[1]([1]千葉工大院工、[2]千葉工大工、[3]京葉プラントエンジニアリング株式会社、[4]京葉ガス株式会社)
○Takao NAKAJIMA[1], Yuuei KEDUKA[2], YUUYA IUTI[2], Jirou MATSUMOYO[3], Toshiyuki ITOU[3], Takayuki NAGATSUKA[4], Yasuyuki TAKIGUCHI[1] ([1]Chiba Tech., [2]Chiba Tech., [3]Keiyo Plant Enginneering, [4]Keiyo Gas)

【背景・目的】メタン発酵は多数のアーキアとバクテリアが協調的に働くことで、有機物をメタンに変換しているが、関与する微生物群の種類と役割については不明な点も多い。我々は今回、ＰＣＲ－ＤＧＧＥ法を用いて家畜糞尿のメタン発酵の培養過程に伴うアーキアであるメタン生成菌の消長を解析した。
【方法】５００ｍｌのガラス瓶を用い、そこに家畜糞（牛糞及び鶏糞）と純水を加え密栓し、３７℃で１日１回撹拌し培養した。発生したバイオガスはテドラーバッグで回収し、培養液は細管を通して採取した。バイオガスは水上置換により生成量を測定し、メタン濃度と二酸化炭素濃度はガスクロマトグラフィー（ＧＣ）で測定した。培養液はｐＨを測定後、揮発性有機酸の種類と濃度をＧＣで測定した。さらに培養液からＤＮＡを抽出し、ＰＣＲによって１６ＳｒＲＮＡ遺伝子のＶ３領域を増幅し、ＤＧＧＥ解析装置（ＤＣｏｄｅ、ＢＩＯＲＡＤ製）を用いてアーキア群集解析を行った。
【結果・考察】牛糞のメタン発酵においてＤＧＧＥのバンドは１０本あらわれ、すべてのバンドが培養初期から最終段階まで存在した。メタン生成菌は牛の消化器官にも存在することから、消化器官に存在していたものが体外のメタン発酵においても主導的な役割を果たしていると推察した。また、バンドの濃さはメタン発生量の最大となった直後に最大となる傾向にあり、メタン生成量とアーキアの存在量は相関があることが推測される。揮発性有機酸である酢酸は発酵初期では蓄積し、その後発酵６日目に最大を迎えその後減少した。しかし培養液のｐＨは酢酸の蓄積量とは無関係に７.５～７.８の間で推移した。また、蓄積していた酢酸がなくなるとガスの発生も停止した。このことから牛糞を用いたメタン発酵では酢酸がメタン生成菌の主な基質として用いられることがわかった。現在、ＤＧＧＥのバンドが示す菌種の特定と同時に鶏糞を基質としたメタン発酵を行っており、関与するメタン生成菌を同様に解析し、牛糞のメタン発酵の場合との比較を行う予定である。

DGGE, Methane fermentation, Archaeal community

講演番号：2C11p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ C 校舎 11 会場

休閑期水田を利用した物質循環型再生可能エネルギー（バイオメタン）の創製－GET システムの構築－

GET system-Establishment of renewable energy, biomethane, production system from rice straw in fallow paddy field-

○浜田 千晶、五十嵐 理、太田 みさき、細田 晃文、平野 達也、田村 廣人 (名城大農)
○Chiaki HAMADA,Osamu IGARASHI,Misaki OTA,Akifumi HOSODA,Tatsuya HIRANO,Hiroto TAMURA (Meijo Univ.)

【目的】水田から発生するメタンは二酸化炭素と共に温室効果ガスの一つである。一方でメタンは天然ガスの主成分であり、重要な資源である。近年では食品残渣などをメタン発酵槽に投入してメタンを回収し、エネルギーとして利用しようとする試みが盛んに行われている。しかし、これらのメタン発酵プラントは、プラントの建設、運営維持および基質である食品残渣の選別運搬に多大なコストがかかるという欠点がある。そこで我々は、水稲栽培と競合しないという観点から、冬期湛水田を天然のメタン発酵槽と位置付け、再生可能なバイオマス資源として有望である稲わらを利用して、メタンガス（G）をエネルギー（E）として、水田（T）から回収（GET）する「GET システム」を構築した。「GET システム」は建設コストがかからず、運営維持が容易で、基質である稲わらが毎年供給され、放置水田をエネルギー生産の場にすることが可能である。本研究では「GET システム」の基盤となる、冬期湛水田におけるメタンガスの生成・回収法および微生物群集構造について報告する。
【方法】メタン発酵に適した農業資材を決定するため、農業廃棄物の中でも主要なセルロース系廃棄物の稲わらと家畜排泄物の牛糞堆肥を用いてメタンガス発生効率を検討した。また、稲わらの鋤き込みはメタン発生を促進させると報告されているが、メタン発生効率と施用する稲わらの大きさの関係はこれまで検討されていない。そこで、長径が 0.5 mm、3 mm および 7 mm の稲わらを施与し、メタンガス発生効率を比較した。これらの結果を基に実証試験として、名城大学付属農場の稲収穫後の水田に縦 7.5 m、幅 1.45 m、高さ 0.2 m の畝を作成し、1 mm 以下に粉砕した稲わら 20 kg、生鶏ふん 20 kg、または稲わらと生鶏ふん 20 kg ずつを施用した。また、コントロールとして無施用の畝を作成した。畝をガス回収のための黒色シートで被覆し、水田を湛水した（2012 年 10 月 3 日）。ガス回収量、メタン濃度、温度、酸化還元電位、土壌中の有機酸生成量を測定し、分子生物学的手法を用いて、冬期湛水田でのメタン発生に関わる微生物群集構造を解析した。【結果】冬期湛水田において、メタン発酵の中間産物である酢酸が生成し、処理直後からメタン濃度が直線的に増加し、稲わらおよび鶏ふん処理区では処理 27 日後にはそれぞれ 51%および 61%に達した。また、アーキア群集構造解析の結果、冬期湛水と夏期湛水ではそのプロファイルに変化は無かったが、優占種に差があることが示唆された。低温下の水田土壌においても、稲わら施与直後の湛水は、稲わらの分解過程に関与する発酵性細菌および酸生成細菌とメタン生成過程に関与するメタン生成アーキアが共存・共働し、冬期湛水田において「GET システム」による物質循環型再生可能エネルギーの創製が可能であることが示された。

renewable energy, methane, paddy field

講演番号：2C11p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ C 校舎 11 会場

生物的環境浄化型エネルギー生産技術の開発 -油汚染環境の浄化を指向したエネルギー生成微生物群集の構築-

Development of the renewable energy technology associated with environmental bioremediation -Construction of microbial community for waste oil refinery as renewable energy-

○小坂 吉裕、松下 俊之、細田 晃文、田村 廣人（名城大院農）
○ Yoshihiro KOSAKA,Toshiyuki MATSUSHITA,Akifumi HOSODA,Hiroto TAMURA（Meijo Univ.）

【背景・目的】化石燃料の枯渇または原子力発電に対する不安が叫ばれる現代において、天然ガスの主成分であるメタンは代替エネルギーとして期待され、メタンの部分酸化で得られるメタノールもプラスチックなどの化成品原料として利用可能である。本研究は、製鉄所より廃棄される油含有産業廃棄物を対象とし、1）油分解細菌を用いたバイオレメディエーションによる鉄の回収効率向上（微生物を利用した環境浄化と再資源化）および 2）メタン生成アーキアおよびメタン資化性細菌によるバイオリファイナリー（微生物を利用したエネルギーと資源の創出）による「生物的環境浄化型エネルギー生産技術」の開発を目的とした。そこで演者らは、本目的達成のため、特に油含有産業廃棄物からのメタン生成アーキアによるメタン生成と、メタン資化に関わる微生物の群集構造解析を行ったのでその結果を報告する。【方法】（1）微生物群集構造解析：油含有産業廃棄物の微生物群集構造を解析するために、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）法およびクローンライブラリー法を用いた。DGGE 解析は、DNA をプライマー（Arc787f＋GC および Arc1059r、Bac341f＋GC および Bac534r）で PCR 増幅したものを供した。クローン解析は、DNA をプライマー（Bac530f および Bac1492r）で PCR 増幅し、pGEM-T easy bector および大腸菌 DH5α 株を用いてクローニングした。両方法ともに、シークエンス解析により塩基配列を決定した。（2）メタンおよび有機酸の分析：油含有産業廃棄物 5 g および無機塩培地 30 mL をバイアル瓶に添加し窒素ガスで酸素を除去後、37℃で静置培養した。培養 10 日毎にヘッドスペースガス 500 μL をガスクロマトグラフィー（GC2014-TCD）にて分析し、同時に、培養液 1 mL を高速液体クロマトグラフィー（有機酸分析システム）にて分析した。（3）メタン資化性細菌の集積培養：油含有産業廃棄物 5 g、硝酸無機塩培地 5 mL、メタン 5%（v/v）を嫌気試験管に添加し、20℃および 30℃で振とう培養した。最確数法による集積培養後、GC によりメタン資化能を観測した。また、クローン解析により集積培養物の群集構造解析を行った。【結果・考察】油含有産業廃棄物の分解試験より、酢酸資化性および水素資化性メタン生成アーキア（*Methanosaeta* 属、*Methanosarcina* 属および *Methanospirillum* 属など）、メタン資化性細菌および多数の油分解細菌が存在し、顕著な酢酸生成（約 95.5 ppm）およびメタン生成（約 44.9%（v/v））が観測された。さらに、油含有産業廃棄物より分離されたメタン資化性細菌は、最も近縁な既存種である *Methylosoma difficile* LC2 株との間で 16S rRNA 配列の相同性が 93%と低いことから、新種であることが示唆された。本研究より、油含有産業廃棄物中の微生物群集制御によるバイオリファイナリーの可能性が示唆された。

oil degradation, methane production, methane oxidation

講演番号：2C11p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ C 校舎 11 会場

新規油脂蓄積藻類の探索
Isolation and characterization of oleaginous microalgae from freshwater environments in Yamaguchi
○松延 駿、横山 和平、藤井 克彦（山口大学農）
○SHUN MATSUNOBU,KAZUHIRA YOKOYAMA,KATSUHIKO FUJII (Yamaguchi Univ.)

【目的】最近になって、バイオディーゼル生産の原料のひとつとして油脂を蓄積する微細藻類に関心が寄せられている。最も高濃度に油脂を蓄積する種として*Botryococcus*が知られているが、生育が非常に遅く栄養要求性が高い。従って、培養液体積あたりの生産量の点で考えると本藻類を用いた脂質生産は効率が高くないのが現状であり、変異株の作出や培養条件の改善が試みられている。他方、*Botryococcus*の持つ課題を克服すべく、無機塩培地で良好な生育を示す新たな油脂蓄積株を探索することも興味深い研究テーマであると考えられる。実際に、*Chlorella*や*Scenedesmus*属でも油脂を蓄積する株は見出されている。そこで本研究では、一般水環境にどの程度の割合で油脂蓄積藻類が存在するのか、また、これまで報告例のない属種で油脂蓄積藻類を分離することができるかを検討した。

【方法】湖沼、農業用水等9 ヶ所より水試料を採集し、これを0.45μm孔フィルターでろ過して微生物を捕集した。次に、ろ過した水試料に窒素およびリン等を加えて調製した無機塩培地に微生物を摂取し、25℃で集積培養を行った。集積培養で生育してきた微細藻類株を分離し、各分離株についてNile red染色により脂質蓄積の有無を判定した。脂質蓄積が見られた株について、18S-rDNAを基に系統解析を行った。また、特に高濃度に脂質を蓄積していると思われる株については脂質含量を定量するとともに、脂質をメチルエステル化して脂肪酸組成も分析した。

【結果】集積培養した菌液よりまず微細藻類 388 株を分離した。Nile Red 染色により、分離株のうち 66 株で中性脂質の蓄積を示す黄色蛍光が視認された。特に 6 株は他の株と較べて強い蛍光が確認された。系統解析から蓄積株 66 株の大部分の属種は *Chlorella*、*Scenedesmus*、*Chlamydomonas* 等を含み、脂質含量に差違はあるものの蓄積株が過去に報告されていた。他方、蛍光が特に強かった 6 株の属（*Oogamochlamys* や *Characium* など）では脂質蓄積株はこれまで報告されていないことがわかった。さらにこの 6 株の乾燥菌体重量あたりの脂質含量は約 20%であり、うち 2 株については増殖速度も速く、培養液体積あたりの脂質生産量も今回の分離株だけでなく既報文献の値と比較しても高い値であった。脂肪酸組成の分析を行ったところ、50%以上が不飽和脂肪酸であることもわかった。

microalgae, biofuel, fatty acid

講演番号：2C11p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ C 校舎 11 会場

海産微細藻類円石藻（*Emiliania huxleyi*)からの原油の生産と解析

Production and analysis of petrolium crude oils from a sea microalga, *Emiliania huxleyi*

○山根 國男[1]、松山 茂[2]、五十嵐 健輔[2]、桑原 朋彦[2]([1]筑波大学生物科学系、[2]筑波大学生命環境科学研究科)
○Kunio YAMANE[1], Shigeru Matsuyama[2], Kensuke Igarashi[2], Tomohiko Kuwabara[2] ([1]Tsukuba Univ., [2]Tsukuba Univ.)

石油は我々の生活に必須のエネルギー源であり、従来型石油の埋蔵量はピークを越えようとしている。我国における石油資源は非常に少なく、石油使用量の 0.4%しか供給できない。そのため、国内で持続的な再生可能エネルギーを生産させることが必須である。我国の面積のうち陸地は少なく、海洋の占める割合は陸地の約１２倍である。国土を囲む広大な海洋を利用して海の資源に挑戦することが最重要課題である。さらに食糧生産のための農地との競合もないし、森林破壊もない。

海洋に広く一般的に生息して、成長が速く、時には赤潮のように広大なブルームを形成する微細藻類円石藻（*Emiliania huxleyi*）を用いて原油を生産させることを目的としている。これまでの研究から本円石藻は光合成装置や細胞膜を構成する糖脂質や燐脂質以外にDHAおよび長鎖の炭化水素であるアルケンやアルケノンを多量に含んでおり、加熱処理した際に多量のバイオ燃料を作ることを明らかにしてきた[1]。

原油は多種類の炭化水素で構成され、飽和炭化水素、芳香族炭化水素、レジン、アスファルテンの４種類の成分に大別される。円石藻の乾燥粉末および栄養共生菌で処理した乾燥粉末を 300℃、４日間加熱処理したサンプルには原油と同様に４種類の成分が含まれていることが分った。さらに TLC, GC-MS, DI-MS および赤外分光法による解析により原油が本藻体から生産できることを明らかにした。しかし中東産原油に比べるとレジン含量が高く、質の悪い原油と思われた。[1]山根等、2012 年度日本農芸化学会大会、K. Yamane *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 79:924(2013)

Petrolium crude oil, sea microalgae, *Emiliania huxleyi*

講演番号：2C11p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ C 校舎 11 会場

微細藻類ユーグレナにおけるバイオ燃料合成増強因子の探索

Study for enhancement of Biofuel production in *Euglena*

○中澤 昌美[1,2]、水谷 陽子[1]、石川 智也[1]、上田 光宏[1]、乾 博[1,3]、中野 長久[1,4]、宮武 和孝[1,5]（[1]阪府大院・生命、[2]科学技術振興機構・さきがけ、[3]阪府大院・総リハ、[4]大阪女短大、[5]帝塚山学院大・人間科）

○Masami Nakazawa[1,2], Yoko Mizutani[1], Tomoya Ishikawa[1], Mitsuhiro Ueda[1], Hiroshi Inui[1,3], Yoshihisa Nakano[1,4], Kazutaka Miyatake[1,5] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Osaka Pref. Univ., [2]PRESTO, JST, [3]Dept. Clin. Nutr., Osaka Pref. Univ., [4]Osaka Women's Jun. Col., [5]Tezukayama Gakuin Univ.)

微細藻類ユーグレナは、45%までの高濃度 CO_2 下でも活発に光合成を行い、生育する。光合成や外部炭素源から得た余剰の炭素は、好気状態では貯蔵多糖である β-1,3 グルカン、パラミロンとして蓄積される。さらに、パラミロンを蓄積した細胞を嫌気状態にさらすと、発酵により脂肪酸ー脂肪アルコールエステル（ワックスエステル、主成分 C14:0-C14:0_{Alc}）を産生する。ワックスエステル蓄積量は乾燥重量当たり約 30%にも上るが、カーボンニュートラルな「バイオ燃料生産工場」として実用化するには、さらなる生産向上と均質化が必要である。そこで、従来未開発であったユーグレナの形質転換技術の研究を進め、これにより、CO_2 削減と高バイオ燃料生産を両立した機能強化ユーグレナを開発することを目的としている。本研究では代謝改変ターゲットを効果的に得るために、従来の酵素・代謝学的知見を活かし、RNAi 法によるノックダウンによって、貯蔵多糖およびワックスの量や組成を変動させる因子を探索した。各遺伝子のノックダウンによる表現型は多彩であったが、中でも貯蔵多糖パラミロン量の大幅な低下という表現型を示したクエン酸合成酵素（CS）のノックダウン細胞について、さらに詳しく調べた。

CS ノックダウン細胞では、好気培養 2 日目付近まで細胞内 CS 活性がコントロール細胞と有意な差がなかったが、3 日目以降に CS 活性が急激に低下した。6 日間の培養期間において好気状態における細胞濃度はコントロール細胞とほぼ同等であった。しかし、培養 3 日目以降、細胞内の貯蔵多糖由来の顆粒構造が CS ノックダウン細胞で消失していった。フェノール硫酸法で細胞内パラミロン量を測定したところ、培養 6 日目においてコントロール細胞の 5～10%程度にまで減少していた。さらに、これらの細胞を 12 時間静置することで嫌気状態にさらした後、ワックスエステル量を測定した。その結果、CS ノックダウン細胞では、コントロール細胞の 10%以下にまで減少しており、パラミロン蓄積量とワックスエステル量の相関が非常に高いことが示された。CS ノックダウン細胞におけるパラミロン蓄積低下のメカニズムを明らかにするために、今後さらに代謝物の動態等を検討する予定である。

Euglena gracilis, wax ester fermentation, biofuel

講演番号：2C11p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ C 校舎 11 会場

Geotrichum candidum を用いたバイオディーゼル生産
Biodiesel production by *Geotrichum candidum*
○田中 重光、渡辺 嘉、中野 博文、永尾 寿浩（阪市工研）
○Shigemitsu TANAKA,Yomi WATANABE,Hirofumi NAKANO,Toshihiro NAGAO (OMTRI)

【背景・目的】

飲食店や食品加工場などから生じる油脂含有量の高い廃水は、スカム(浄化槽などの水面に浮上した油脂や固形物など)による下水管の閉塞や悪臭、水質汚濁による環境汚染、生態系への悪影響といった社会的な問題を引き起こしている。日本における年間の食用油脂廃棄量は約 40 万 t であり、そのうち半量が回収・再利用されることなく排出されている。エネルギー自給率の低い日本では、これら廃棄物のエネルギー資源としての有効活用は重要な課題の一つであると同時に、環境保全・公共下水道などの維持管理負担の軽減効果も期待できる。そこで本研究では、微生物変換による油脂含有廃水からのバイオディーゼル(BDF)生産法の確立を目指す。ここでは、オリーブ油をモデル基質として、リパーゼ生産菌による脂肪酸エチルエステル(FAEE)への変換について検討したので報告する。

【方法・結果】

本研究ではこれまでに、油脂でリパーゼが誘導生産される菌が、培養液中にエタノールを添加することにより、基質である油脂（オリーブ油）からオレイン酸(C18:1)エチル(OAEE)を生産することを確認している。そこでまずは、当研究所で保有するリパーゼ生産菌 14 株について、24 時間培養後にエタノールを濃度 10%で添加し、添加後 24 時間で最も OAEE を生産する株を選抜した。その結果、*Geotrichum candidum* が最も効率よく OAEE を生産したため、以降の実験に用いることにした。次に、最適エタノール添加濃度を決定するため、濃度 0, 10, 20, 30%で添加 24 時間後の OAEE 生産量を比較した。その結果、エタノール濃度 20%で最大 OAEE 生産量が得られた。そこで、最適エタノール添加濃度 20%における *G. candidum* の詳細な OAEE 生産挙動をモニタリングした。その結果、*G. candidum* により OAEE は、培養 72 時間で生産量 85.1 g/L、収率 42.6 wt%で生産されることが明らかとなった。さらに、他の脂肪酸(C16:0, C16:1, C18:0, C18:2)由来のエチルエステルを含めた FAEE に関しては、培養 72 時間で生産量 105 g/L、収率 52.5 wt%で生産された。また、培養 72 時間でのエステル化率(100×FAEE/(FAEE+遊離脂肪酸))は、83.3 wt%であった。ただし、C18:0 のエステル化率は 33.8 wt%であり、他の脂肪酸(74.8-86.4 wt%)に対して著しく低い傾向を示した。この特徴は、生産される BDF の融点が下がることを意味する。一方、酵素法やアルカリ法による BDF 生産において問題となるグリセロールに関しては、*G. candidum* がグリセロールを資化するため、その蓄積量は、消費されたオリーブ油から予測される生成量の 13.0%に低減された。

Biodiesel, Lipase, *Geotrichum candidum*

講演番号：2C11p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ C 校舎 11 会場

グリセリン酸生産菌 *Gluconobacter frateurii* のメタノール耐性変異株の作製と評価

Construction and evaluation of methanol-resistant mutant strains of glyceric acid producer *Gluconobacter frateurii*

○佐藤 俊、羽部 浩、北本 大 (産総研環境化学)
○Shun Sato,Hiroshi Habe,Dai Kitamoto (AIST)

【目的】近年、化石燃料の代替としてバイオマスから生産可能なバイオディーゼル（BDF）の生産量が増加している。BDFは、油脂のアルカリ条件における加メタノール分解により生産されており、副産物としてグリセリンが生成する。しかし、この反応では過剰量のメタノールが用いられることから副生するグリセリンはメタノールを含むアルカリ溶液となり、副生グリセリンの有効利用法の開発が望まれている。我々はこれまでに、酢酸菌*Gluconobacter frateurii*が、グリセリンの片末端水酸基を効率よく酸化し、100 g/L以上のグリセリン酸（GA）を生産することを見出した。しかし、酢酸菌によるGA生産において副生グリセリンを原料に用いた場合、メタノール等の不純物により生産性が低下することが分かった。そこで本研究では、*G. frateurii*のGA生産におけるメタノール濃度の影響を調べ、メタノール耐性株の取得および得られた変異株の評価を行ったので報告する。

【方法】GA生産菌として、*G. frateurii* NBRC103465株を用いた。グリセリン酸生産におけるメタノール濃度の影響を、グリセリン培地（グリセリン, 170 g/L; ポリペプトン, 10 g/L; 酵母エキス, 1 g/L; KH_2PO_4, 0.9 g/L; K_2HPO_4, 0.1 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/L）にメタノールを0-5 vol%添加して評価した。30℃、200 rpmで96時間培養後、発酵産物の分析を高速液体クロマトグラフィーで、細胞の増殖を600 nmのOD測定により評価した。メタノール耐性変異株の取得は、*N*-メチル-*N*'-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン（NTG）処理をした菌体をメタノール含有グリセリン培地上で選抜後、生育したコロニーを液体培養に供し、メタノール存在下での菌体増殖および発酵産物の評価を行った。

【結果】メタノールを培養開始時に添加して *G. frateurii* を培養すると、メタノール濃度の増加にともない菌体の増殖が低下し、5 vol%添加条件では増殖が見られなかった。また、GA はメタノール無添加で 28 g/L、1 vol%添加で 14 g/L 生産されたが、3 vol%以上添加した場合はほとんど生産されなかった。そこで、メタノール存在下でも増殖可能な変異株を取得するため、5 vol%メタノール含有グリセリン固体培地上に NTG 処理した *G. frateurii* を生育させ、得られたコロニーを同じ組成の液体培地で培養した。培養液の pH 低下を指標に酸生産株を選抜し、得られた株をフラスコ培養に供し、GA 生産性の高かった 10 株を得た。これらの変異株は、野生株が増殖しない 5 vol%メタノール添加条件においてもメタノール無添加条件と同程度の菌体増殖を示し、メタノール 3 vol%添加条件で約 10 g/L、5 vol%添加条件で約 5g/L の GA を生産した。これらの結果から、NTG 処理で得られた変異株は、5 vol%メタノール添加条件においても GA 生産可能な株であることがわかった。

glyceric acid, acetic acid bacteria, glycerol

講演番号：2C11p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ C 校舎 11 会場

サトウキビバガス加水分解物に耐性を有する油脂酵母 *Rhodosporidium toruloides* 変異株の単離
Isolation of oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* mutants tolerant to sugarcane bagasse hydrolysates

○北原 裕己[1,2]、Du Wei[2]、和地 正明[1]、Liu Dehua[2] ([1]東工大・院生命理工、[2]Tsinghua Univ.)
○Yuki Kitahara[1,2], Wei Du[2], Masaaki Wachi[1], Dehua Liu[2] ([1]Tokyo Inst. of Tech., [2]Tsinghua Univ.)

【目的】酵母 *Rhodosporidium toruloides* はグルコースなどを炭素源として細胞内に大量の油脂（トリアシルグリセロール）を蓄積することが知られている。油脂はバイオディーゼルの原料として利用できる。そこでサトウキビ搾汁後の残渣（バガス）の酸加水分解物を炭素源として *R. toruloides* による油脂生産が試みられているが、バガス加水分解物中の成分により酵母の生育が著しく抑制される。そこで本研究では、*R. toruloides* よりバガス加水分解物に耐性を有する変異株の単離を目的とした。

【方法】サトウキビバガスに 0.5% (v/v) 硫酸を加え 120℃で 60 分間反応させた後、ろ過で加水分解液を回収し、水酸化カルシウムで pH 6.0 に調整した。総炭素濃度が 60 g/L になるように調製したバガス加水分解液に酵母エキス、無機塩類を加え、バガス培地とした。ARTP（Atmospheric Room Temperature Plasma）法により変異処理後、バガス寒天培地上で生育が可能な変異株のスクリーニングを行った。単離された変異株をバガス液体培地で 9 日間培養し、その増殖と油脂生産性を評価した。また得られた油脂をメタノールとリパーゼでトランスエステル化し、脂肪酸組成を比較した。

【結果と考察】スクリーニングにより変異株 S4P11、S4P13、S4P18 を単離した。通常の栄養培地での生育は、野生株と変異株で差がなかった。一方、バガス液体培地では野生株は全く生育できないのに対し、全ての変異株が良好に生育可能であった。バガス加水分解液中の増殖阻害物質として推測されている酢酸、バニリン、フルフラールに対する耐性度を調べたところ、各変異株ともこれらの物質に対する耐性度が向上していた。特に、バニリンに対する耐性度がバガス液体培地での増殖とよく相関していた。このことから、バガス加水分解液中の主たる阻害因子はバニリンであると思われた。変異株 S4P11、S4P13、S4P18 の細胞内油脂蓄積率（乾燥菌体重量比）はそれぞれ 64 %、43%、44% であった。また脂肪酸組成に関しては変異株間で大きな違いはなく、18:1 がほぼ半分を占めており、次に 16:0、18:2、18:0 が多かった。本変異株を用いることによりバガス加水分解液からの油脂生産が可能になった。今後、変異遺伝子の同定を行なっていく予定である。

Sugarcane bagasse hydrolysate, Lignocellulose, *Rhodosporidium toruloides*

講演番号：2C11p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ C 校舎 11 会場

紫外線照射した *Halomonas* 属細菌による PHB 生産

PHB production by a UV mutant of *Halomonas* sp.

○世嘉良 宏斗、松田 英彦、常盤 豊（沖縄県工技セ）
○Hiroto YOKARYO,Hidehiko MATSUDA,Yutaka TOKIWA (OITC)

ポリ(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸（PHB）は微生物によって生産される生分解性プラスチックとして注目されており、生合成経路の解明や生産性向上、共重合体生産等を目指して多くの研究が行われている。安価な原料となる未利用バイオマスを利用した発酵生産についても検討されており、我々も *Halomonas* 属細菌による沖縄産廃糖蜜からの PHB 生産について報告した[1)]。また、PHB 生産菌として知られる *Cuprividus necator* の紫外線変異株は PHB の構成単位である(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸を菌体外に生産することが報告されており、紫外線の照射によって PHB 代謝に関連する生合成経路の一部に変異が生じると考えられる。紫外線照射による PHB 代謝経路の変化を利用すれば、PHB の生産性を向上させた菌株の育種も期待できる。そこで我々は *Halomonas* 属細菌に紫外線照射を行い、得られた変異株の PHB 生産性等を野生株と比較した。

PHB 生産菌は沖縄のマングローブ周辺や藍染料などから分離した *Halomonas* 属細菌を用いた。生理食塩水に分散させた分離菌株に紫外線を照射した後、寒天培地に塗布し、40℃で培養して出現したコロニーのうち表現型が異なるものを変異株として分離した。野生株と変異株の増殖能や PHB 生産性を比較するため、pH10 に調整した合成培地（酵母抽出物、スクロース、緩衝液）を用い、三角フラスコで振とう培養した。生菌数は、野生株、変異株ともに培養開始から 24 時間で 10^3 倍に増殖した後、変異株は 6 日後までこれを維持したのに対し、野生株は 1/10 に低下した。変異株の PHB 生産量は野生株の 3 倍以上（2.3g/L）に達し、乾燥菌体重量あたりの PHB 含量も 2 倍以上（62%）であった。窒素源濃度による PHB 生産量の違いやジャーファーメンターを用いた発酵生産についても検討した。

Poly (*R*)-3-hydroxybutyric acid, *Halomonas*, UV mutant

講演番号：2C11p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ C 校舎 11 会場

マングローブ域からの(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸資化菌の分離とその特性

Isolation of (*R*)-3-hydroxybutyric acid assimilating microorganisms from mangrove

○常盤 豊、世嘉良 宏斗（沖縄県工技セ）
○Yutaka TOKIWA,Hiroto YOKARYO (Okinawa Indus.Tech. Cen.)

目的

琉球地域の伝統染織に広く使われている藍染め液には、好アルカリ性の乳酸菌と *Halomonas* 属の細菌が共存しており、マングローブ域とも類似していることが明らかになってきた。また最近、好気性である *Halomonas* 属の細菌は、嫌気あるいは微好気の環境において、菌体内に蓄積したポリ(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸（PHB）を(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸（R3-HB）に分解して菌体外に放出することも報告されている 1)。R3-HB はヒトの血液中にも常に存在する重要なエネルー源の一つである。今回、通気状態が周期的に変動する生態系における R3-HB の役割を解明するため、マングローブ域から R3-HB 資化菌を分離し、その特性について検討した。

方法

R3-HB は、*Cupriavidus necator* 由来 PHB からブタノリシスにより得た R-3-ヒドロキシ酪酸ブチルエステルをイオン交換樹脂（DIAION PK228）で加水分解して調製した。

R3-HB を主な炭素源とする pH７および pH10 の液体培地に、マングローブ域の泥が混じった海水を添加して好気的および嫌気的に集積培養を行った。R3-HB 資化菌は、生育が認められた培養液を２次培養した後、培養液を希釈し R3-HB を含む寒天平板により分離を行った。分離した微生物については、16SrRNA 遺伝子解析による簡易同定を行った。

結果と考察

マングローブ域 3 ヶ所の試料を好気的に集積培養した場合、R3-HB 資化菌として、pH7 および pH10 においてそれぞれ７株、３株を分離することができた。分離菌 10 株のうち 4 株は、30℃２日間で 0.2% R3-HB を完全に資化した。また、分離菌 10 株のうち４株は、RS-1,3-ブタンジオールをも資化することができた。さらに、分離した R3-HB 資化菌の生態系における役割について、*Halomonas* 属の細菌や好アルカリ性乳酸菌との関連において考察を行った。

1) Kawata Y, Kawasaki K, Shigeri Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 96, 913-920(2012)

3-hydroxybutyric acid, mangrove, Halomonas

講演番号：2C11p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ C 校舎 11 会場

微生物燃料電池で発電能力を有する新規 *Geobacter* 属細菌の単離

High-power generation in microbial fuel cells by novel isolated *Geobacter* species

○井上 謙吾[1]、河野 好裕[1]、小椋 義俊[2]([1]宮崎大 IR 推進機構、[2]宮崎大フロンティア)
○Kengo INOUE[1], Yoshihiro KAWANO[1], Yoshitoshi OGURA[2] ([1]Univ. Miyazaki, [2]Univ. Miyazaki)

【目的】微生物燃料電池（MFC）は微生物が有機物を代謝する過程で生じる還元力を電気エネルギーとして取り出す装置である。*Geobacter sulfurreducens* PCA 株は特に高い電力密度での発電能力を有することで知られている。さらに，本株をアノード電極を-400 mV に印加した MFC で長期間培養することで得られた *G. sulfurreducens* KN400 株はさらに高い電流密度での発電が可能であった。最近報告された PCA 株と KN400 株のゲノム比較の結果，両株のゲノムの相違点は多く，高い発電に必要な遺伝的要因を明確化することは困難であった。このような背景をもとに，本研究では，自然界からさらに高い発電能力を有する株を取得し，それらと PCA 株，KN400 株とのゲノム比較を行うことで，MFC で高い発電能力を発揮するために必要な要因を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】Pt を担持したエアカソードとグラファイト棒をアノードとした単槽エアカソード MFC を用い，酢酸が唯一の電子供与体，電極が唯一の電位受容体となる MFC を構築した。植種源として宮崎県八重川の底泥を添加し，アノードを-400 mV に印加して 30℃で培養を続けた。約一週間程度の培養の後，ある程度の電流の生産が確認されたので，培地を連続供給する系に切り替え，その後出力が安定してからも 20 日程度培養を継続した。アノード表面にバイオフィルムの形成が確認できたので，嫌気条件下でバイオフィルムを掻き採り，一部を新しい MFC に植え継いだ。この操作を８回繰り返した後のバイオフィルムから嫌気条件下で酢酸が電子供与体，フマル酸が電子受容体となる寒天プレートで 120 株の微生物を単離した。単離した株の大まかなゲノムの違いを調べるために repetitive-sequence-based PCR（rep-PCR)を行い，バンドパターンを比較したところ，少なくとも 10 のグループに分類することができた（そのうち一つは PCA 株と同様のバンドパターンを示した)。分類したグループのうち，優占的だった分類群でかつ PCA 株とは異なるゲノムをもつものから代表株３株（YM018，YM075，YM082 株）を選び，それらの純粋培養系での MFC での電流生産能力を調べた。その結果，3 株全て PCA 株よりも早く発電を開始し，また，最大電流密度も 2 倍程度高かった。現在，これら 3 株のゲノム解析を行っており，PCA 株や KN400 株を含めたゲノム比較の結果の一部についても報告する予定である。

Microbial Fuel Cells, *Geobacter*, Extracellular Electron Transfer

講演番号：2C11p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ C 校舎 11 会場

超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilium* 由来 multicopper oxidase を用いたバイオカソード電極の構築

Biocathode electrode employing multicopper oxidase from the archaeon *Pyrobaculum aerophilium*

○内井 俊貴[1]、山口 かよ[1]、坂元 博昭[1]、里村 武範[1]、櫻庭 春彦[2]、大島 敏久[3]、末 信一朗[1]([1]福井大学院工、[2]香川大学院農、[3]九州大学院農)

○ Toshiki Uchii[1], Kayo Yamaguchi[1], Hiroaki Sakamoto[1], Takenori Satomura[1], haruhiko Sakuraba[2], Toshihisa Ohshima[3], Shin-ichiro Suye[1] ([1]Univ. Fukui, [2]Kagawa Univ., [3]Kyushu Univ.)

【目的】バイオ電池は燃料電池と比較して温和な条件で作動し、小型化が容易、環境負荷が小さいといった利点があるが酵素を電極に固定化した際の長期安定性と電極との電子授受の効率化の問題がある。そこで、まず高い安定性を有する超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilium* 由来 multicopper oxidase (McoP) をバイオ燃料電池用素子として用いて研究を進めた。McoP は酸素を基質として電極から直接 4 電子還元反応を触媒することができるため、バイオ電池用カソード素子として期待できる。本酵素を大腸菌に発現させ精製した McoP の長期安定性や電気化学的特性について検討し、本酵素のバイオ電池のカソード触媒としての可能性について検討を行った。

【方法】30℃で保存した McoP 活性の経時変化を測定することで McoP の常温での長期安定性の評価を行った。McoP の活性測定は 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)の酸化による吸光度の変化を測定した。次に McoP の電気化学的性質の検討を行った。McoP をカーボン電極表面に滴下し、電極上に McoP を物理吸着した電極を作製した。この電極を酸素で飽和した 20 mM MES 緩衝溶液 (pH 5.5)中において、-0.7V～+0.7 V、20 mV/s で電位掃引し、サイクリックボルタモグラムを測定した。また、McoP と polyethyleneimine(PEI)を交互積層法により物理吸着と同様の条件下でサイクリックボルタモグラムを測定した。

【結果】Mcop を精製し、酵素活性の経時変化を測定したところ、1 ヶ月経過しても 80 %以上の残存活性を示した。この結果から本酵素は常温で長期間安定であることが分かった。また、物理吸着法で作製した McoP 修飾電極を酸素飽和条件下で酸素の還元波を測定した結果、-0.7 V で 16 μA の酸素の還元波が見られた。このことから本酵素はカソード用電極素子として利用可能であることが分かった。さらに交互積層法で McoP-PEI 積層電極を作製し酸素の還元波を測定した結果、作製 7 日間で約 70%、80 μA/cm^2 の電流密度を維持することができた。このことから、McoP は電極に固定化した際にも高い安定性を維持していることが明らかになりカソード用素子として有用性が高いことが分かった。しかしながら酵素修飾電極によって得られた電流密度はバイオ電池として利用するには低いため今後は電極表面への酵素固定化方法について検討を行い、Mcop 修飾電極の電流密度の向上を目指す必要がある。

biofuel cell, multicopper oxidase, hyperthermophilic

講演番号：2C11p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ C 校舎 11 会場

深海熱水噴出孔生態系における電流依存型低エネルギーCO_2還元

Current dependent low energy CO_2 reduction in ecosystem of deepsea hydrothermal vent

○石居 拓己[1]、牧田 寛子[2]、山本 正浩[2]、高井 研[2]、中村 龍平[1]、橋本 和仁[1,3]([1]東大院工、[2]海洋研究開発機構、[3]JST ERATO)
○ Takumi Ishii[1], Hiroko Makita[2], Masahiro Yamamoto[2], Ken Takai[2], Ryuhei Nakamura[1], Kazuhito Hashimoto[1,3] ([1]The univ. of Tokyo, [2]JAMSTEC, [3]JST ERATO)

自然界における有機物生産は一次生産者と呼ばれる生物によって担われている。細かくは光独立生物と化学独立生物に分類され、前者は光合成としてよく研究されているが、後者については不明点も多い。太陽光が届かない海底で成立している生態系においては、化学独立生物によるCO_2固定プロセスが有機物生産を支えている。そのメカニズムとしては、海底熱水噴出孔から噴出する硫化水素などの還元性物質が化学独立生物のエネルギー源となり、有機物生産がなされていると考えられてきた(図 1(1))。

一方で我々は、熱水噴出孔環境に存在する鉱物が電気伝導性を持つことを明らかにし、熱水噴出孔壁を介して電流が常時生成している可能性を報告している。ここで電流生成は、熱水噴出孔の内壁と外壁における酸化還元電位差に由来し、地球内部に蓄えられた還元エネルギーが電流として鉱物内を直接伝搬していくことを意味している。本研究では、この様な電流によって生態系が維持されているという「電流生態説（図 1(2)）」を立て、その実証に向け、微生物が電流を電子源として利用しCO_2固定を行う能力を持つか否かについて検討を行った。具体的には、代表的な化学独立細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* によるモデル系、ならびに深海より採取された鉄マットサンプルを用いた。実験には FTO 電極を作用極とした電気化学セルを組み、電位制御下で電流応答及を調べた。電位を+0.4V vs SHE に固定し、*A. ferrooxidans* を電気化学セルに添加することで還元電流の生成が観測された。同条件下でサイクリックボルタンメトリーの測定を行うことで、+0.7 V 付近にピークをもつ還元波が観測された。ここで、観測されたピーク電流は掃引速度に対して一次の関係で増加したことから、電極上に吸着した酸化還元種を介して微生物へ電子注入が進行していることを示している。また、環境中の微生物群衆を同様の電気化学セルに添加し、電位を+0 V に設定し還元電流の追跡を行なった。すると、微生物代謝に由来する電流が観測され、電流生成開始後 10 時間後にはCO_2固定に由来する多糖生成が確認された。これらの結果は、電流をエネルギー源とした生物学的CO_2固定化反応が可能であることを示唆している。

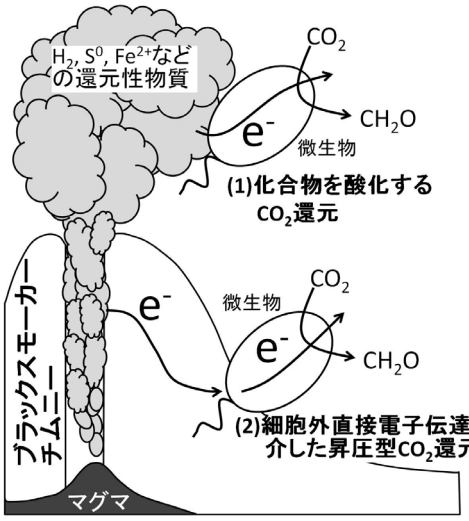


図 1 :熱水噴出孔環境における CO_2 固定

Ecosystem, Hydrothermal vent, Chemoautotroph

講演番号：2C11p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ C 校舎 11 会場

電気化学的集積法による高電流生産 *Shewanella oneidensis* MR-1 変異株の単離と解析

Characterization of high-current producing *Shewanella oneidensis* mutants isolated by electrochemical enrichment method

○高妻 篤史[1]、大場 瞳[1]、但馬 望[2]、橋本 和仁[2,3]、渡邊 一哉[1]（[1]東薬大生命、[2]東大院工、[3]JST ERATO）
○Atsushi KOUZUMA[1], Hitomi OBA[1], Nozomi TAJIMA[2], Kazuhito HASHIMOTO[2,3], Kazuya WATANABE[1]（[1]Tokyo Univ. of Pharmacy and Life Sciences, [2]The Univ. of Tokyo, [3]JST ERATO）

【背景と目的】*Shewanella oneidensis* MR-1 株は主に細胞外膜に局在する導電性シトクロムタンパク質から構成される細胞外電子伝達経路を有しており，金属還元菌及び微生物燃料電池 (Micorbial fuel cells, 以下 MFC) におけるモデル発電微生物として世界的に非常によく研究されている．MR-1 株は外膜シトクロムを介した直接的な接触，またはフラビン等の電子伝達シャトルを介した間接的な経路によって，細胞内の異化代謝に伴って放出された電子を細胞外の電子受容体（金属酸化物，電極等）に伝達することが明らかとなっている．しかし細胞外電子伝達に関与する遺伝子については MR-1 株においても未解明の部分が多く，外膜シトクロム等の主要構成タンパク質をコードする遺伝子（*mtr* 遺伝子）については同定されているが，それら以外の構成遺伝子および発現制御機構についてはほとんど明らかにされていないのが現状である．本研究では MR-1 株の細胞外電子伝達に関与する遺伝子を広範囲にわたって探索するため，MR-1 株のトランスポゾン (Tn) 挿入ライブラリーを電気化学リアクターに添加し，電流を生産させながら培養した．その後集積された変異株を単離，解析することによって電流生産及び細胞外電子伝達に関与する遺伝子の単離を試みた．

【結果】MR-1 株の Tn 挿入ライブラリーを電気化学リアクターに加え，+0.2 V (vs. Ag/AgCl) に印加した電極を用いて電流生産をさせながら 1~2 か月程度集積培養を行った．その後変異株を単離し，Tn 挿入位置を同定した結果，細胞表面の多糖合成，線毛合成への関与が推測された遺伝子への Tn 挿入株に加え，二成分制御系のレスポンスレギュレーターをコードすると推定された遺伝子 (SO_1860) に Tn が挿入された変異株 (EC-2 株) が単離された（図）．EC-2 株は平板培地上で野生株よりも非常に大きなコロニーを形成するという点で特徴的であり，野生株と比較して有意に高い電流生産能力および酸化鉄(III) の還元能力を有していた．SO_1860 の大腸菌におけるホモログ (UvrY) は炭素代謝や鞭毛合成に関与する遺伝子の発現を制御することが報告されているが，MR-1 における機能は不明であり，現在 EC-2 株の高電流生産能力の要因を解明するために DNA マイクロアレイ等を用いて詳細な解析を行っている．

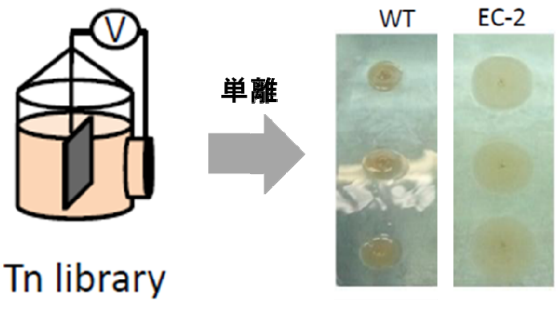


図 電気化学リアクターによるTn挿入株の集積と単離

microbial fuel cell, *Shewanella oneidensis*, extracellular electron transfer

講演番号：2C11p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ C 校舎 11 会場

新奇培養法、”電界効果培養”の提案と、その微細藻類の暗所培養への適応
Proposal of Novel Cultivation Technique “Field Effect Cultivation”And Application for the Dark Cultivation of Microalgae
○吉田 浩爾、中村 圭寛、石井 正治、五十嵐 泰夫（東大院農生科）
○Kouji YOSHIDA,Yoshihiro NAKAMURA,Masaharu ISHII,Yasuo IGARASHI (Univ. Tokyo)

電気培養法は、様々な微生物に対し、培養困難な条件下での培養や、その微生物の限界を超えた増殖を可能とし、有望な次世代培養技術として注目を集めている。従来、電気培養法は作用極表面においてメディエータとなる物質、あるいは細胞表層を酸化・還元し、この酸化力ないしは還元力が、細胞内代謝の酸化還元活性をもつ経路に至り、電子の授受を行う。すなわち、電気化学的作用により電極からのエネルギーの伝達を行っている。この手法を実行するうえで重要であるのは、水の電気分解といった不必要かつ有害な副次的電気化学反応を避ける事であり、このため、作用電位の精密なコントロールが必要とされる。また、ターゲットとなる部位の酸化還元電位によっては、これらの副次的電気化学反応を避ける事が出来ない。
本研究は、電気化学反応を起こすことなく、電界効果を用いることで細胞内の酸化還元部位を直接励起することで、微生物へのエネルギー伝達を行う事を目的とした。
電界効果とは、外部より与えた電界によって対象の電気伝導性を制御する作用であり、半導体分野では電界効果トランジスタとして広く利用されている。
電界効果培養では、培養液中に挿入された内極と、ガラス(試験管)で完全に絶縁された外極にパルス電位を掛け、電界を生じさせる。この時、培養器は電解コンデンサーとして見做すことができ、細胞内の酸化還元部位は誘電体として励起される。こうして、メディエータを介さずに直接、エネルギーの授受を行う事を目的としたのが本手法である。
本研究では、光独立栄養生物であり、従属栄養的に生育する事が出来ない２種の珪藻、*Chaetoceros gracilis* LB2658 と、*Isochrysis aff. galbana* LB2307 に対して、電界効果培養による暗所での増殖を試み、本培養法の有効性を示した。
本研究で対象とする経路は Z-scheme と呼ばれる、光合成の電子伝達系であり、その特性より、パルス間隔を３０ms とした。また、パルス幅は１０ms、パルス電圧は約１３０V とした。培養は２３℃の暗所で２週間行った。また、増殖は、培養後直接計数によって確認した。
その結果、電位を掛けなかった場合に比して３倍程度の増殖が確認され、本培養法が有用である可能性が示唆された。

Field Effect Cultivation, electrolytic cultivation, microalgae

講演番号：2C11p17
講演日時、会場：3 月 25 日 17:12～ C 校舎 11 会場

グルコース資化能を付加した *Shewanella oneidensis* MR-1 変異株の電流生産能力の解析

Investigation of current-generating activity by *Shewanella oneidensis* MR-1 mutant with the ability to utilize glucose

○中川 元、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Gen NAKAGAWA,Atsushi KOUZUMA,Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. of Pharmacy and Life Sciences)

【背景と目的】微生物燃料電池 (Microbial Fuel Cell, 以下 MFC) は有機物の嫌気的酸化分解に伴って生じた還元力を利用して電力を生産する装置である. MFC は有機物処理とエネルギー回収を同時に行えるという利点を持つことから, 次世代型の再生可能エネルギー生産システムとして着目され世界的に研究開発が行われている. MFC には大規模な装置を用いた廃水処理システムや, 小型・高出力リアクターを非常用・家庭用電源として利用するなどの幅広い用途が考えられる.

Shewanella oneidensis MR-1 株は MFC におけるモデル発電細菌として非常によく研究されており，導電性外膜シトクロムから構成される細胞外電子伝達経路を介して細胞内の基質代謝によって放出された電子を細胞外の電子受容体（電極）に伝達することが知られている．MR-1 株は生育基質として乳酸を好んで使用するため，本株を MFC の電流生産菌として利用する際の電子供与体としては通常乳酸が用いられる．しかし小型電源等への MFC の利用を考慮すると，グルコースなどのより安価で扱いやすい基質から電流の生産を行うことが望まれる．しかし MR-1 株は解糖系の遺伝子を一部欠損しているためグルコースの資化能を有しておらず，グルコースを基質とした電流生産が可能であるかは不明確であった．そこで本研究では MR-1 株に糖代謝に必要な遺伝子を導入することにより，グルコースを電子供与体として利用可能な MFC を構築することを目的とした.

【方法と結果】ゲノム配列情報から MR-1 株はグルコースの取り込み及びリン酸化能力を欠損していることが予想された．そこで大腸菌 K-12 株由来のグルコーストランスポーターおよびキナーゼ遺伝子 (*galP* 及び *glk*) を発現するプラスミドを MR-1 株に導入した結果, グルコース資化能を獲得させることに成功した. 本遺伝子導入株を電気化学リアクターに添加し, +0.4 V (vs. Ag/AgCl) の電位を印加した電極を用いてグルコースを基質とした電流生成量を測定した結果，野生株と比較して有意に高い電流生成能力を示すことが明らかとなった．リアクター中の培養上清を HPLC 等により分析した結果，グルコースの分解に伴い乳酸及び酢酸の生成が確認された．現在本遺伝子導入株の電流生産能力，およびその代謝産物についてさらに詳細な解析を行っている.

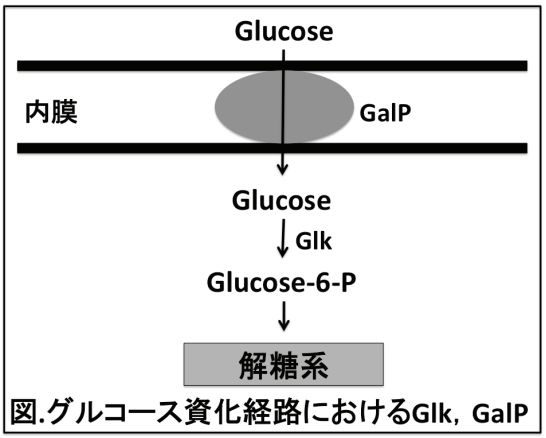


図.グルコース資化経路におけるGlk, GalP

Shewanella oneidensis, Microbial Fuel cell, Extracellular electron transfer

講演番号：2C11p18
講演日時、会場：3 月 25 日 17:24～ C 校舎 11 会場

電気培養を用いた水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 の代謝制御と組換え株による乳酸生産

Metabolic control of *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 by electrochemical cultivation to increase the productivity of lactate

○平野 伸一[1]、佐々木 大介[1]、松本 伯夫[1]、石井 正治[2] ([1]電中研、[2]東大院農生科・応生工)
○Shin-ichi Hirano[1], Daisuke Sasaki[1], Norio Matsumoto[1], Masaharu Ishii[2] ([1]CRIEPI, [2]Tokyo Univ.)

【背景および目的】微生物の代謝は多くの電子授受反応に基づく電子の流れと密接に関与している。我々のグループでは細胞外の電極反応によって代謝を制御する「電気培養法」の開発を進めている。水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株は二酸化炭素固定生物の中で最高レベルの速度を有することから TK-6 株の代謝を高度に利用することで CO_2 からの効率的な有用物質生産が期待される。これまでに、TK-6 株に異種乳酸脱水素酵素遺伝子を導入した乳酸生産株(201 株)が得られている。そこで、本研究では TK-6 株を用いた有用物質生産のための電気化学的代謝制御技術の基盤構築を目指し、電気培養による電極-微生物間の電子の授受が代謝に及ぼす効果について解析を行うとともに、本手法を 201 株に適用することによる乳酸生産性への影響を評価することを目的とした。
【方法および結果】水素/二酸化炭素/窒素混合ガス (75:15:10) 雰囲気下、硝酸呼吸条件において TK-6 株細胞-電極間で電子授受を可能とするシステムを構築することを試みた。TK-6 株細胞内代謝の電子の流れと電極上での電気化学的反応を橋渡しする電子メディエーターを探索した結果、anthraquinone 2,6-disulfonate (AQDS) が増殖を維持しつつ細胞と電子授受が可能であることが明らかとなった。AQDS を介することで、酸化電位(+0.3V vs Ag/AgCl)を印加した際には細胞から電子を引き抜きながら、還元電位(-0.6V)を印加した際には細胞に電極から電子を供給しながら TK-6 株の培養が可能となった。酸化電位を印加しながら培養を行ったところ、細胞内の酸化還元バランス(NAD^+/NADH)は酸化にシフトしており、電子の流れの変化およびそれに伴った代謝変動が推定された。そこで、対数増殖期中期の細胞についてメタボローム解析を行った結果、酸化電位を印加し細胞から電子を引き抜いたことに起因して 30 種の化合物(特定のアミノ酸および直鎖状飽和脂肪酸)の蓄積量が増加していることが明らかとなった。さらに、還元電位を印加し、電極から細胞に電子を供給した場合の代謝変動についても現在詳細な解析を進めている。次に、201 株に対して電気化学的な代謝制御技術を適用し、乳酸生産量への影響を調べた。乳酸脱水素酵素は乳酸生産に還元力を必要とするため、電気化学的に還元力（電子）を供給することによる生産量の向上が期待される。そこで、還元電位を印加しながら培養を行い、細胞内および細胞外（培養液）の乳酸濃度を測定したところ非通電時と比べて培養液中の乳酸濃度の向上が確認された。以上、有用物質生産に向けた電気培養による TK-6 株代謝制御技術の可能性が示された。本研究はＪＳＴ受託研究「先端的低炭素化技術開発（ALCA)」の一部として実施された。

Electrochemical cultivation, Hydrogenobacter thermophilus, Lactate

講演番号：2C11p19
講演日時、会場：3 月 25 日 17:36～ C 校舎 11 会場

BDF 合成過程で発生する実廃液からのエタノール生産
Ethanol production from glycerol in waste of BDF synthetic process
○篠藤 伸[1]、松本 伯夫[2]、平野 伸一[2]、大村 直也[2]、安藤 昭一[3] ([1]千葉大院・融合、[2]電中研、[3]千葉大・園芸)
○Noboru SHINOTOU[1], Norio Matsumoto[2], Shin-ichi Hirano[2], Naoya Ohmura[2], Akikazu Ando[3] ([1]Grad.S.Adv.Integ.Sci.,Chiba Univ., [2]CRIEPI, [3]Fac.Horticul.,Chiba Univ.)

【背景および目的】近年、油糧作物などから合成されるバイオディーゼル燃料（ＢＤＦ）が軽油代替燃料として注目されている。ＢＤＦ合成プロセスではアルカリ触媒法による油脂の変換反応に伴ってグリセロールを含有する高アルカリ性廃液が発生する。この廃液の炭素資源としての有効利用が重要視されているが、高アルカリ環境での処理が大きなハードルとなっている。我々のグループでは微生物の代謝を活性化する電気培養法を用いて環境試料からグリセロールをエタノールへ変換する活性をもつ微生物集積体を獲得し、この集積体からこれまでにグリセロールをエタノールに変換する能力を有する *Paenibacillus macerans* を２種の単離に成功している（NS-1 株,NS-3 株）。これら単離株の特性解析の結果、NS-1 株は高アルカリ条件下でも中性条件下と同程度のグリセロール変換能を有していることが明らかとなっている。本研究では NS-1 株を用い、BDF 合成過程で発生した実際のアルカリ性廃液を対象とし、かつ pH 調整を行わず、廃液中のグリセロールのエタノールへの変換を目的とした。
【方法および結果】BDF 変換の過程で発生する実際の廃液２種に対して変換を試みた。２種の廃液の特性として、ともに pH9.9、主要構成成分はグリセロール、脂肪酸メチルエステル、メタノール、石鹸であり、グリセロール含有率は 45%程度であった。この BDF 廃液を基質(グリセロール終濃度として 30mM 程度)として添加し、バイアル瓶を用いた小スケール(30mL)での培養試験(37℃, 静置)で NS-1 株によるエタノールへの変換を試みたところ、pH を 7.0 に調整した場合では廃液の種類によらず 3 日程度で含有グリセロールがエタノールへと変換された。さらに、pH を調整しない場合においても、変換速度にわずかな遅延は見られたが pH 調整時と同程度の高い効率でのグリセロールのエタノールへの変換が見られた。なお、この実廃液での NS-1 株によるグリセロール変換速度は、微生物集積体を用いた場合よりも 3 倍程度高いものであった。小スケールにおいて実廃液中のグリセロールのエタノールへの変換が pH 調整を行わず可能であることが明らかとなったため、2Ｌ規模（ジャーファーメンター）にスケールアップを行い、実廃液を基質としてグリセロール濃度 30mM となるように添加し、半回分式による NS-1 株の培養を行った。スケールアップした培養試験ではグリセロール変換活性の立ち上がりに遅延が見られ、顕著な活性が見られるまで２週間必要であった。しかし、一度活性が得られてからは処理速度が大きく向上し、基質添加後、数日でグリセロールのエタノールへの変換が可能となった。現在、連続培養による効率的なエタノール変換を試みている。

Glycerol, Ethanol, Electrochemical cultivation

講演番号：2C12a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ C 校舎 12 会場

キシロースからコハク酸生産する細菌の分離とその特性

Isolation and characterization of bacteria producing succinic acid from xylose

○戸松 さやか、木村 貴一、進藤 昌（秋田総食研）
○Sayaka TOMATSU,Kiichi KIMURA,Sho SHINDO（Akita Research Institute of Food and Brewing）

【目的】地球温暖化問題や限られた化石資源への対策としてバイオエタノールが注目されており、食糧と競合しない稲わら等の草本系や、間伐材などの木質系バイオマスを中心としたバイオエタノール製造の開発が行われている。しかし、製造コストが高いため、普及の為の低コスト化技術の開発が急がれている。我々はセルロース系バイオマスから変換される製品をバイオエタノールだけではなく付加価値の高いコハク酸などを生産するバイオリファイナリー技術の開発を行うことを目的に研究を行っている。今回、自然界からキシロースを利用してコハク酸を生産する菌の取得を行い、その性質を検討した。
【方法】自然界から採取したサンプルを滅菌水に懸濁し、キシロースを炭素源とする寒天培地に 0.8%炭酸マグネシウムを添加し、25℃で培養した。寒天培地でクリアゾーンを形成した株を酸生産菌として選抜し、さらにキシロース５％を含む培地に炭酸マグネシウムを 5%添加し、25℃で培養した上清をペーパークロマトグラフィーで有機酸の分離を行い、コハク酸を生産した株を選抜した。コハク酸は、F-キットコハク酸（JKI）を用いた酵素法により測定した。
【結果】キシロースを炭素源とする培地で酸生成が見られた菌株についてコハク酸生産能を検討したところ、101 株でコハク酸の生成が確認され、コハク酸生産能が 15g/l 以上の 35 株を得た。さらに、コハク酸生産能が高い 4 株の同定を行い、16SrDNA の相同性および API20E（シスメックス・ビオメリュー株）同定キットにより、3 株は *Serratia fonticola*、1 株は *Serratia plymuthica* と同定された。また、稲わら糖化液を用いてコハク酸生産能を検討したところ、コハク酸生産が認められたことから、実バイオマスでの利用も可能であった。これらの株はキシロースからのコハク酸生産に優れており、グルコースからは D-乳酸を生成する。グルコース・キシロース混合培地では D-乳酸とコハク酸を同時に作り、特に *S. fonticola* の 3 株は D-乳酸の生産量が高く、*S. plymuthica* はコハク酸の生産量が高い特徴があった。バイオリファイナリーの観点からこれらの菌株は様々な用途に利用できると考えられる。

succinic acid, biorefinery, xylose

講演番号：2C12a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ C 校舎 12 会場

大腸菌によるグリセロールからの 3-ヒドロキシプロピオン酸生産

3-Hydroxypropionic acid　production from glycerol by Escherichia coli

○徳山 健斗[1]、田中 章太郎[1]、大野 聡[1]、吉川 勝徳[1]、平沢 敬[1]、古澤 力[1,2]、清水 浩[1] ([1]阪大院・情報・バイオ情報、[2]理研・生命システム)
○ Kento TOKUYAMA[1], Shoutarou TANAKA[1], Satoshi OONO[1], Katsunori YOSHIKAWA[1], Takashi HIRASAWA[1], Tikara FURUSAWA[1,2], Hiroshi SHIMIZU[1] ([1]Osaka Univ., [2]QBiC RIKEN)

近年、石油などの化石資源の枯渇に備え、化石資源を利用せずに微生物の代謝反応を用いた有用物質生産が注目されている。このような有用物質の一つとして、生分解性ポリエステルの原料やアクリル酸などの前駆体となる物質で広い汎用性がある 3-ヒドロキシプロピオン酸(3HP)が挙げられる。また、微生物を用いた物質生産の基質として、バイオディーゼル燃料生産の副生成物であるグリセロールの利用が注目されている。そこで、本研究では、大腸菌を用いて、グリセロールを基質とした 3HP 生産および生産性の向上を試みた。

大腸菌はグリセロールから 3HP を生産する代謝経路を持たないため、グリセロールから 3-ヒドロキシプロピオン酸アルデヒド（3HPA）への代謝経路には *Klebsiella pneumoniae* の glycerol dehydratase をコードする *dhaB* 遺伝子と glycerol dehydratase reactivase をコードする *gdrB* 遺伝子を導入した。3HPA から 3HP へは、大腸菌の *aldH* 遺伝子がコードする aldehyde dehydrogenase により変換されるが、3HPA は細胞毒性があるため、さらに *aldH* 遺伝子を高コピープラスミドで発現させた。これらの遺伝子改変により、グリセロールを基質とした 3HP 生産株を構築した。さらに、3HP 生産性の向上を目指し、大腸菌の全ての代謝反応を再構築したゲノムスケール代謝モデルを用い、多重遺伝子破壊シミュレーションにより 3HP 生産収率を向上させる遺伝子の破壊候補を抽出した。その結果、*tpiA* 遺伝子と *zwf* 遺伝子の二重破壊により 3HP 生産収率の増加が予測された。そこで、3HP 生産株において、これらの遺伝子の欠損の効果を確認した結果、3HP 生産収率の増加が確認された。

3-Hydroxypropionic acid, Escherichia coli, Glycerol

講演番号：2C12a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ C 校舎 12 会場

大腸菌によるバイオマスからのピルビン酸とイソブタノール生産

Producing pyruvate and isobutanol from biomass using Escherichia coli

○中島 信孝[1,2]、田村 具博[1,3] ([1]産総研生物プロセス、[2]産総研バイオマスリファイナリー、[3]北大院農)
○ Nobutaka NAKASHIMA[1,2], Tomohiro TAMURA[1,3] ([1]AIST, Bioproduction, [2]AIST, Biomassrefinery, [3]Hokkaido Univ.)

大腸菌は世界で最も研究が進んでいる微生物で、扱いも容易なことから、バイオマスから有用物質を生産するための宿主として頻繁に用いられる。しかし大量生産のためには、遺伝子組換え技術を駆使して、その代謝経路に改変を施す必要がある。

そこで我々は、大腸菌の代謝経路改変に必要な多彩な遺伝子組換え技術を開発した。遺伝子大量発現、ゲノム改変（遺伝子破壊、遺伝子ノックイン)、アンチセンス RNA による遺伝子サイレンシング技術などで、中でも遺伝子サイレンシングは独自のもので、世界で最も効率が高い。これらを組み合わせて、我々のみができる複雑な代謝経路改変もある。

次いでこれらの技術を駆使して、医薬品の原材料や食品添加物などとして工業的価値の高いピルビン酸と、軽油代替燃料として期待されるイソブタノールの、グルコースからの生産実証を行った。ピルビン酸では、*poxB* と *ldhA* を遺伝子破壊し、*aceE* に対するアンチセンス RNA を発現させた株が最も生産効率が良いことがわかり、好気条件下バッチ生産で、18 g/L まで蓄積させることができた(26 時間、 37° C)。イソブタノールでは、*poxB*、*ldhA*、*adhE*、*pflB* を破壊し、2-ケト酸デカルボキシラーゼ（*kivd* gene from *L. lactis*)、アルコールデヒドロゲナーゼ（*adh2* from *S. cerevisiae*)、イソロイシン-バリン生合成に関する遺伝子群(*alsS* from *B. subtilis*、*ilvCD* from *E. coli*)、を過剰発現する株が最も生産効率が良いことがわかり、微好気条件下バッチ生産で 19 g/L まで蓄積させることができた(140 時間, 30° C)。

また、多種類の糖を含むバイオマスからの物質生産を鑑み、紫外線照射により、グルコース抑制の効かない変異株を分離した。この株は、グルコースとキシロースを同時に消費することができ、さらに、グルコースとキシロースの 1:1 混合糖から、効率よくイソブタノールを生産することができた。ショットガンクローニングにより、グルコース抑制機構を破壊する原因が *mlc* のプロモーター変異であることも突き止めた。

我々の技術によって、コハク酸などのカルボン酸、アミノ酸、アルコール、ジオールなど様々な化合物をバイオマスから生産することが可能であり、様々な物質の実生産に結びつけていきたい。

本研究は（公財）加藤記念バイオサイエンス研究振興財団、及び新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)「バイオマスエネルギー先導技術開発」、JSPS 科研費 23780096 の助成を受け、行われた。

biomass, metabolic engineering, bioprocess

講演番号：2C12a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ C 校舎 12 会場

担子菌スエヒロタケを用いたコーンミールからの直接 L-リンゴ酸の生産

Direct production of L-malic acid from corn meal by using basidiomycete *Schizophyllum commune*

○長根 江里[1]、高野 真希[2]、星野 一宏[2]([1]富山大工生命、[2]富山大院理工)
○Eri NAGANE[1], Maki TAKANO[2], Kazuhiro HOSHINO[2] ([1]Univ. Toyama, [2]Univ. Toyama)

【目的】現在、未利用バイオマスから生物変換により有用な化学物質の製造が期待されている。L-リンゴ酸は、清涼飲料の酸味料、減塩醤油あるいは薬剤の原材料として、現在、化学合成と酵素反応を組み合わせにより製造されている。しかし、*Aspergillus flavas* および *Schizophyllum commune* は、古くより好気発酵によりグルコースから L-リンゴ酸を生成することが知られていた。そこで、セルロース系バイオマスからバイオリファイナリーとして利用が期待される L-リンゴ酸を生産するための第一段階として、*S. commune* を用いてデンプン系バイオマスであるコーンミールから L-リンゴ酸を生産することを検討した。具体的には、コーンミールを加水分解させるための酵素剤と *S. commune* を組み合わせた同時糖化発酵(SSF)を行った。さらに、*S. commune* のみを用いた糖化発酵同時進行(CBP)により、直接 L-リンゴ酸を生産させることも検討した。
【方法・結果】本研究で使用した担子菌は *S. commune* NBRC 4928 である。本研究で使用したコーンミールは 84%のデンプンを含んでいる。まず、本菌株を使用し、50 g/L のグルコースを炭素源として好気条件下で回分培養を行ったとき、培養 18 日目に 6.2 g/L の L-リンゴ酸が生産できた。またキシロースを炭素源として同様の培養を行った結果、培養 18 日目に 9.1 g/L の L-リンゴ酸が生産できた。さらに、フルクトース、ガラクトース、マルトース、スターチ、CMC などを炭素源としても L-リンゴ酸を生産できることから多様な糖質が利用できること、さらにアミラーゼおよびセルラーゼを分泌することが示唆された。そこで、100 g/L のコーンミールを炭素源とし、加水分解酵素剤(セルラーゼ T：ダビアーゼ：メイセラーゼ＝1：0.2：0.3)と *S. commune* を組み合わせた SSF を行った結果、グルコースで培養した際と比較して増殖が良好であり、培養 6 日目に 30 g/L の L-リンゴ酸が生産できた。また、*S. commune* 単独で CBP を行ったところ、培養 12 日目で 23 g/L の L-リンゴ酸を生産できた。さらに未利用バイオマスのモデルとして、微細セルロース(Sigmacell)を用いてセルラーゼ剤と *S. commune* を用いた SSF を行ったところ、培養 12 日目に L-リンゴ酸を 32 g/L 生産することができた。現在この CBP について検討中である。

L-malic acid, *Schizophyllum commune*, CBP

講演番号：2C12a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ C 校舎 12 会場

洗米排水から分離された高乳酸生成菌の乳酸生成機構

Mechanism of hyper lactic acid producing ability of lactic acid bacteria isolated from rice washing drainage

○渡辺 昌規[1]、服部 芽衣[1]、牧野 将浩[2]、加来 伸夫[1]、佐々野 和雄[3]（[1]山形大農、[2]株式会社サタケ、[3]食協株式会社）
○ Masanori Watanabe[1], Mei Hattori[1], Masahiro Makino[2], Nobuo Kaku[1], Kazuo Sasano[3]（[1]yamagata Univ., [2]Satake co.ltd., [3]Shokkyo co. ltd.）

【目的】現在、無洗米は米を研ぐ労力や洗米に必要な使用水量を削減できるという炊飯プロセス省力化等の経済的メリットが得られるため、その需要が増大しつつある。しかし、無洗米の需要拡大に伴う無洗米製造排水（洗米排水）の増加から、その処理方法やその再資源化に関する研究が行われている。洗米排水には、精白かすを主成分（主要炭素源）とする著量のデンプンやアミノ酸等が含まれていることが知られており、非可食部バイオマスとしての利用が期待されている。

これらを背景に、我々は洗米排水貯蔵タンク内より、高乳酸生成能を有する*L.rhamnosus* M-23株を分離し、本菌株による非加熱・無殺菌状態の洗米排水・米糠混合物からの高濃度乳酸生成について検討を行ってきた。そこで本研究では、新規分離菌株であるM-23株の高濃度乳酸生成機構を明らかにすべく、本菌株の産生する菌体外プロテアーゼの乳酸生成能への関与および動力学的解析に基づいた分離菌株の生理学的特徴と乳酸生成能の関連について検討を行った。

【実験方法】洗米排水に10(%w/v)の米糠を糖化酵素・栄養供給源として混合したものを培養液として用い、任意の乳酸生成菌を接種後、37℃にて培養を行った。嫌気条件は、窒素ガス通気により維持された。発酵液中の生成乳酸濃度はHPLC，プロテアーゼ活性はアゾカゼイン、アゾコラーゲンを基質とした比色定量法により測定した。各種阻害定数(*Ki*)は、Lineweaver-Burkプロットおよび Monod式を用いた非線形最小二乗法により推定を行った。

【結果・考察】供試菌体として、高乳酸生成能を有するM-23株、同じく洗米排水タンク内より分離された乳酸生成菌S-27、K-25、M-32、S-4株について、菌体外プロテアーゼの分析を行った結果、高乳酸生成菌株であるM-23株が、アゾカゼイン、アゾコラーゲンの両基質において、高いプロテーゼ活性を示し、生成乳酸濃度と相関性を示した。また、グルコースを基質とした基質阻害定数の値も生成乳酸濃度と相関性を示した。それに対し、生成物である乳酸の生成物阻害定数の値は、各分離菌株間において有意な差異は認められなかった。以上の結果より、高乳酸生成菌株の分離指標として、プロテーゼ活性、グルコース基質阻害定数の両パラメーターが有効であることが示された。

rice washing drainage, rice bran, protease

講演番号：2C12a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ C 校舎 12 会場

Bacillus coagulans によるオイルパーム廃棄木からの乳酸生産
Production of lactic acid using old oil palm trunk by *Bacillus coagulans*.
○荒井 隆益 [1]、Balakrishnan Kunasundari[1,2]、小杉 昭彦 [1]、Sudesh Kumar[2]、村田 善則 [1]、PRAWITWONG PANIDA[1]、Deng Lan[1]、森 隆 [1] ([1]国際農林水産業研究センター、[2]マレーシア理科大学)
○Takamitsu Arai[1], Kunasundari Balakrishnan[1,2], Akihiko Kosugi[1], Kumar Sudesh[2], Yoshinori Murata[1], PANIDA PRAWITWONG[1], Lan Deng[1], Yutaka Mori[1] ([1]JIRCAS, [2]USM)

パーム油は、大豆をしのぐ最大の植物油資源で単位面積当たりの油脂生産量が 3.4-4.9t/ha と大豆よりも一桁高く油脂生産性がすぐれているが、樹齢に伴い生産性が低下するために 20～25 年ごとに一斉に伐採し、更新される。我々は伐採トランク樹液中に発酵可能な遊離糖が大量に含まれていることを見出しバイオエタノールの原料として有望であることを示した 1)。パーム樹液はグルコースなどの発酵可能糖の他、各種アミノ酸、ビタミン、ミネラルを含む天然優良培地である。一方、乳酸はポリ乳酸の原料であり、需要拡大が予想される。そこで廃棄物である樹液から高効率な発酵法の確立を目指すために、高温下（55～60℃）で乳酸生産能を有する微生物のスクリーニングを試みた。
樹液 1ml を 100ml の一般乳酸菌培地に加えて 55℃で 4 時間インキュベートした後、希釈した培養液を炭酸カルシウム含有の寒天培地に植菌し一晩培養した。クリアーゾーンを形成した菌株を単離し、グルコース含有の液体培地で培養し乳酸生成量を高速液体クロマトグラフィーで測定した。乳酸生産能の最も高い菌株の染色体 DNA を単離し 16SrDNA 配列により同定した結果、*Bacillus cogulans* であった。*B. cogulans* の至適生産温度は 55℃であった。糖資化性を調べた。分離株はグルコース、マルトース、セロビオース、フラクトース、キシロース、マンノース、アラビノース、スクロースなど幅広い糖の資化性を示し、中でも樹液の主要構成糖であるグルコース、スクロース、フルクトースから効率的に生産した。10%の糖を含む樹液を原料に 55℃で培養を行った結果、約 8 割の乳酸を生産した。

参考文献
1) A. Kosugi *et al. J. Biosci. Bioeng.* 110, 322-325, (2010)

biomass, bioplastic, lactic acid

講演番号：2C12a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ C 校舎 12 会場

4-アミノフェニルアラニンおよび 4-アミノフェニル乳酸の生産プロセスの構築

4-aminophenylalanine and 4-aminophenyllactic acid production by recombinant *Escherichia coli*

○桝尾 俊介[1]、川崎 志慧[2]、伊藤 尚志[1]、藤田 智也[1]、高谷 直樹[1] ([1]筑波大院・生命環境、[2]ユタ州立大理)
○Shunsuke Masuo[1], Yukie Kawasaki[2], Takashi ITO[1], Tomoya Fujita[1], Naoki Takaya[1] ([1]Univ. Tsukuba, [2]Utah State Univ.)

バイオリファイナリー技術の開発はバイオマスを有効に利用する上で重要である。4-アミノフェニルアラニン(4a-Phe)は、抗生物質生合成系の中間代謝産物として *Streptomyces venesuelae* および *Streptomyces pristinaespiralis* により合成されることが知られる芳香族化合物であり、新規な化成品原料としての利用が期待される。我々は、組み換え大腸菌を用いてグルコースから 4a-Phe を生産するプロセスの構築を試みた。各種発現ベクターを用いて、4a-Phe の合成に必要な *S. venesuelae* あるいは *S. pristinaespiralis* の *papA*、*papB* および *papC* 遺伝子を発現させた大腸菌株を作製した。グルコースを炭素源とした培地を用いて本菌株を培養したところ、培地中に微量の 4a-Phe が検出された。宿主大腸菌およびその培養条件について種々の検討を行った結果、4a-Phe の生産量が 20 倍に増加した。さらに、遺伝子破壊等により宿主大腸菌を改良することで、生産量が顕著に増加した 4a-Phe 高生産株を作製することに成功した。ジャーファメンターを用いて 4a-Phe 高生産株の培養を行い、培養条件を最適化した結果、グルコースから 2.2 g/l の 4a-Phe を生産することが可能となった。また、グルコース濃度を 2.0 g/l に保ったグルコーススタットにより、培地中に蓄積した 4a-Phe を 4-アミノフェニル乳酸(4a-PLA)に変換できることを見出した。4a-PLA は 4a-Phe と同様に新規な化成品原料となりうる。本研究により、グルコースを原料とした 4a-Phe および 4a-PLA の生産プロセスが構築された。

4-aminophenylalanine, 4-aminophenyllactic acid, glucose-stat

講演番号：2C12a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ C 校舎 12 会場

気相染色法を利用したヒノキチオールの塗布とその抗菌活性の検討

Study of antimicrobial activity of Hinokitiol coated materials using staining method by ultrasonic vapor phase

○菅野 匠[1]、米山 雄二[2]、野口 正孝[3]、川島 徳道[4]、佐野 元昭[1]、小林 聖人[5]、下村 美文[5]、石河 睦生[1]([1]桐蔭横浜大学、[2]文化学園大学、[3]神戸芸術工科大学、[4]IPU・環太平洋大学、[5]東京工科大学)
○ Takumi KANNO[1], yuji YONEYAMA[2], Masataka NOGUCHI[3], Norimiti KAWASHIMA[4], Motoaki SANO[1], kiyohito KOBAYASHI[5], Mifumi SHIMOMURA[5], Mutuo ISHIKAWA[1] ([1]Toin University of Yokohama, [2]Bunka Gakuen University, [3]Kobe design University, [4]International Pacific University, [5]Tokyo University of Technology)

（背景）バイオマスを最大限利用することは地球温暖化や資源枯渇のような環境問題の対策に有効であると考えられる。現在日本では、林地残材や建築廃材などの木質バイオマスはほとんどが未利用である。微生物によって木質バイオマスの分解処理する際に、ヒノキやヒバは抗菌成分であるヒノキチオールが存在するため[1)]、分解効率が高くない。そこでヒノキチオールを抽出した後、微生物によるヒノキの分解を行えば、資化効率が促進されると考えられる。超音波を用いて液体を霧化する技術の超音波霧化がある。この塗布法の特徴は従来の浸漬による方法と比較して使用するヒノキチオールなどの薬剤を非常に少なくすることが可能である[2)]。

（目的）本研究の目的は未利用の木質バイオマスから抗菌活性の高いヒノキチオールの抽出を行い、超音波霧化を利用して衛生用品の生地に塗布することである。

（実験内容）本実験では、ヒノキの外皮およびヒバの外皮から、高圧蒸気下でヒノキチオールの抽出を行った。これらの溶液に抗菌活性があるかを確認するために、5 種類のヒノキチオール溶液と希釈に使用した蒸留水を塗布した。溶液を塗布後、栄養寒天培地のふたを 48 時間開放して空中落下菌を付着させ菌の集合体であるコロニーのカウントを行った。

（実験結果）栄養寒天培地に 5 種類の溶液を塗布し、また比較対象として塗布を行っていない寒天培地を使用した。溶液を塗布後、寒天培地のふたを開放して空中落下菌を付着させて抗菌活性の比較をした。比較結果を図に示す。塗布を行っていない栄養寒天培地及び各溶液のコロニー数を比較するとコロニー数が増えていないため、抗菌活性が確認できた。

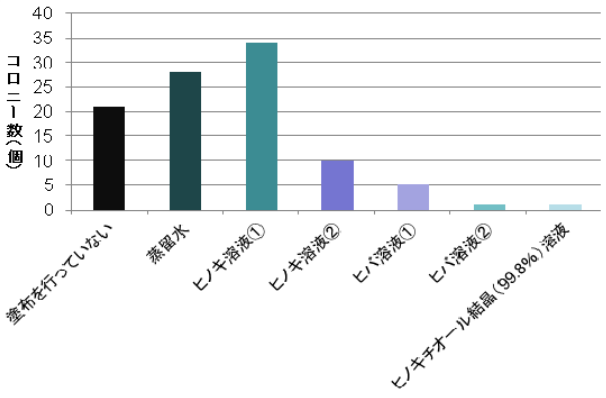


図　48 時間後のコロニーの数

（今後の予定）今後、抗菌試験の再現性を確認するとともに定量的な抗菌試験を行う必要があると考えられる。さらに、ヒノキチオール溶液の塗布回数や、塗布濃度、抗菌活性の持続性を明らかにする必要がある。

（参考文献）

1）岡部敏弘他、におい・かおり環境学会誌 43 巻 2 号 pp.128-137（2012）
2）福永陽子他、2011 年色材研究発表会講演要旨集 pp.212-213（2011）

Hinokitiol, Ultrasonic vapor phase, Woody biomass

講演番号：2C12a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ C 校舎 12 会場

酵母菌によるハードバイオマス残渣の有効利用
Hard biomass residual utilization by the yeast

○小林 聖人[1]、菅野 匠[2]、石河 睦生[2]、鈴木 義規[3]、斉木 博[3]、下村 美文[3]([1]東京工科大学大学院、[2]桐蔭横浜大学、[3]東京工科大学)
○kiyohito kobayasi[1], takumi kanno[2], mutuo isikawa[2], yosinori suzuki[3], hirosi saiki[3], mifumi simomura[3] ([1]Tokyo University of Technology Graduate School, [2]Touin Yokohama University, [3]Tokyo University of Technology)

【背景・目的】ヒノキチオールには強力な殺菌・抗菌作用や炎症を抑える消炎作用を持っているため防腐剤や化粧品として利用されている。このヒノキチオールはヒノキやヒバから抽出することができるが、1t のヒバおがくずから 100g 程度しか抽出できないため、抽出した際には多くのバイオマス残渣が発生する。また、ヒノキやヒバなどはハードバイオマスに分類され、難分解性有機物質のリグニンを多く含んでいることから利用する際には分解処理が求められる。そこで、本研究ではヒノキチオール抽出後のバイオマス残渣の有効利用を目的に酵母菌 C-8 を用いて分解・資化実験を行った。なお、酵母菌 C-8 は排水処理施設の最終好気処理槽の活性汚泥からリグニン、セルロース、タンニン酸などの難分解性有機物質を単一炭素源とした条件下で単離したため、バイオマス残渣の有効利用が期待できる。
【方法・結果】酵母菌 C-8 が難分解性有機物質に対して分解・資化を行うかを確認するために単一炭素源としてリグニン、セルロース、タンニン酸を無機塩液体培地に加え、酵母菌 C-8 を植菌し、長期培養を行った。その結果、図 1 のようにリグニンとセルロースで生育が確認できた。再び同じ組成培地に植菌した結果、図 2 のようにリグニンで生育が確認できた。このことから酵母菌 C-8 はリグニンに対する分解・資化能力を持っていることが分かった。そこで、本研究の目的であるバイオマス残渣を使って分解・資化実験を行った。バイオマス残渣には乾燥ヒノキ、ヒノキチオール抽出後のヒノキ、乾燥ヒバ、ヒノキチオール抽出後のヒバを単一炭素源として使用し、分解・資化実験を行った。

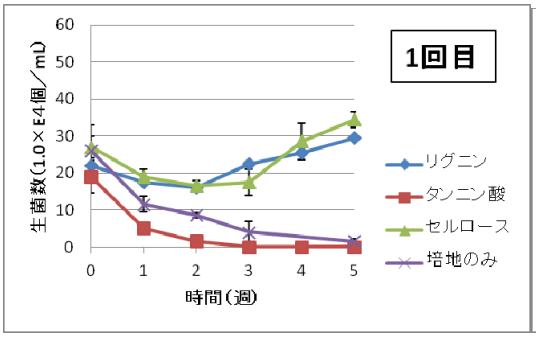


図 1　難分解性有機物質の資化性(1 回目)

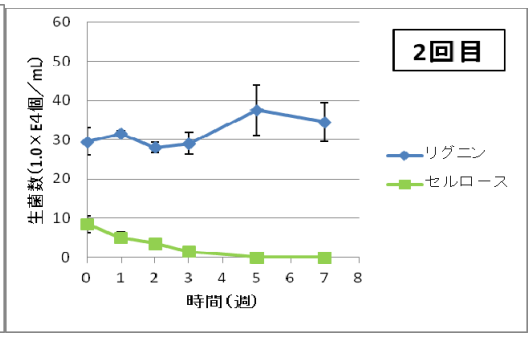


図 2　難分解性有機物質の資化性(2 回目)

yeast, Hard biomass, degradation

講演番号：2C12a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ C 校舎 12 会場

八王子市における木質バイオマスの有効利用に関する研究
Study on utilization of the wooden biomass in Hachioji

○坂間 雄一郎[1]、鈴木 義規[2]、斉木 博[2]、下村 美文[2]、軽部 征夫[2] ([1]東京工科大院、[2]東京工科大)
○ Yuichiro SAKAMA[1], Yoshinori SUZUKI[2], Hiroshi SAIKI[2], Mifumi SHIMOMURA[2], Isao KARUBE[2] ([1]Tokyo University of Technology Graduate School, [2]Tokyo University of Technology)

1. ［背景］

平成 14 年 12 月，文部科学省，農林水産省など 5 省庁によりバイオマス・ニッポン総合戦略が閣議決定された．バイオマスは集荷コストや，より使いやすいエネルギーへの変換などの問題が多く，実用化が進んでいないのが実情である．特に木質バイオマスは，生産地と消費地が遠く離れているケースが多く，集荷コストの問題から，国内ではあまり利用されておらず，バイオマスの輸送用燃料への導入，未利用バイオマスの利用促進，バイオマスタウンの構築が重要な課題となっている．

2. ［研究概要］

東京工科大学と東京都八王子市は，同市内で排出される木質バイオマスを，金属触媒を用いたフィッシャー・トロプシュ合成反応によって液体燃料に変換し有効に利用することを目的とした共同研究を行っている．本研究で想定しているプロセスは，八王子市から排出される木質バイオマスを回収し，ごみ処理施設において木質バイオマスを高温高圧下での不完全燃焼による熱分解によりガス化を行い，一酸化炭素と水素の合成ガスに変換後，得られた合成ガスを金属触媒反応により液化を行うというものである．このプロセスでは廃棄物として収集し処理される木類ごみを原料とするため，集荷コストを最小限に抑えることが可能である．

市内で排出される家庭系可燃ごみの 13.5%が木類ごみでありこの総量は 1 万トンにものぼる，この木類ごみを燃料として利用するためには，廃棄物処理と並行して行える熱化学的変換が有効である．現在，メタン発酵やアルコール発酵により燃料を製造する技術が注目されているが，発酵法では変換時に原料とほぼ同量の残渣が発生するため，廃棄物処理が重要課題となっている都市部には不向きである．一方，熱化学的変換法では残渣を原料の 10%以下に抑えることができ，その組成も通常の焼却と同様な組成となるため，ごみの減容とエネルギー生産が可能という利点がある．

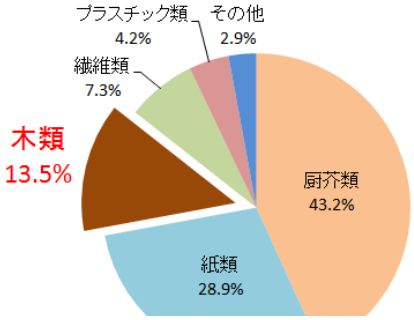


図 八王子市で排出されるごみの内訳
（平成 18 年度，総量 74,000 トン）

本研究により生産した燃料を輸送用燃料として用いることで，バイオマス資源の収集，変換，利用のサイクルが実現し，ごみ処理施設はエネルギー生産型のごみ処理施設となり，バイオマス資源の多岐にわたる利用への道を開くことが可能である．

Wooden biomass, BTL, Waste treatment

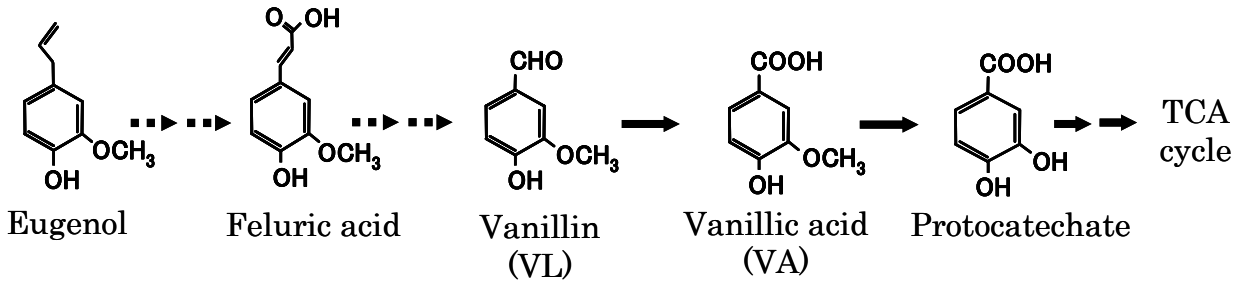
講演番号：2C12a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ C 校舎 12 会場

新規に分離したバニリン資化性細菌 *Pseudomonas* sp. LLC-1 によるリグニン由来低分子化合物の代謝特性

Characterization of lignin-derived low molecular compounds metabolism by a newly isolated bacterial strain *Pseudomonas* sp. LLC-1

○廣瀬 遵、山中 直也、横井 春比古（宮崎大工・物質環境化）
○Jun HIROSE,Naoya YAMANAKA,Haruhiko YOKOI (Univ. Miyazaki)

【目的】バイオマスを紙パルプやバイオエタノールの原料として利用した場合、リグニンが副産物として生成する。その一部は燃料などとして用いられているが、化学組成が比較的均質であることから、石油代替の合成原料としての利用が望まれる。リグニンを高温下、酸化剤やアルカリ等で処理すると芳香族アルデヒドやフェノール類などのリグニン由来低分子化合物（LLC）が得られる。演者らは、これまでに微生物の代謝能を利用して LLC を変換し、有用物質を得ることを最終目的として、土壌試料より LLC を炭素源として資化できる *Pseudomonas* sp. LLC-1 を新たに分離した。本演題では、*Pseudomonas* sp. LLC-1 による LLC の主要な構成成分であるバニリン（VL）の他、関連化合物であるバニリン酸（VA）、フェルラ酸、オイゲノールに対する代謝特性について調べた結果について報告する。
【方法】無機塩類ならびに唯一の炭素源として VL、VA、フェルラ酸、オイゲノールのいずれかを添加した液体培地に LLC-1 株の菌体を接種、培養してそれらの成分に対する資化性を調べた。LLC からの代謝産物は、GC-MS で検出した。LLC に対する代謝能は、代謝によって減少する溶存酸素を指標にして評価した。
【結果】LLC-1 株は VL 及び VA を資化したがオイゲノールとフェルラ酸を資化しなかった。複数の異なる *Pseudomonas* 属菌によるフェルラ酸、VL、VA を経由したオイゲノールの異化経路が報告されており（下図）、LLC-1 株は、オイゲノールから VL までの代謝酵素を欠いていることが示唆された。LLC-1 株は、VL の構造異性体である *o*-バニリンとイソバニリンから dead-end 化合物となる *o*-バニリン酸とイソバニリン酸をそれぞれ蓄積した。また、LLC-1 株は VL ならびにその他の LLC 関連化合物による誘導無しに VL 及び VA を効率良く代謝した。現在、バニリンデヒドロゲナーゼをコードする *vdh* 遺伝子の転写レベルでの調節について調べ、他のフェルラ酸/オイゲノール資化性細菌との比較を行っている。



Pseudomonas, lignin, vanillin

講演番号：2C12a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ C 校舎 12 会場

ラッカーゼ様高活性を示す微生物の探索・取得
Screening of laccase-like producing microorganisms
○鈴木 啓修、青山 晃久、加藤 裕太、永井 和夫、倉根 隆一郎（中部大学院応生）
○Yoshinobu SUZUKI,Akihisa AOYAMA,Yuta KATO,Kazuo NAGAI,Ryuichiro KURANE (Chubu Univ.)

【目的】地球温暖化問題から、二酸化炭素排出量削減のためバイオエタノールが注目されている。第一世代バイオエタノールはトウモロコシなどの食糧デンプンを原料として生産されている。このため食糧との競合が起こり、飢餓に苦しんでいる発展途上国での食糧問題や作物の価格上昇等深刻な問題も引き起こされている。そこで非食部分である稲わらなどの草本系、間伐材などの木質系バイオマスのセルロースバイオマス資源に注目が注がれている。しかしながら、それらのセルロースバイオマス資源をバイオエタノール生産に繋げるには脱リグニンの工程が必要となってくる。当研究では生物（酵素）的脱リグニンを目指して、リグニンを分解する酵素の一つであるラッカーゼに注目し、ラッカーゼを高効率に生産する微生物の取得を目的とした。
【方法】スギを唯一炭素源とする培地にて、各地で採取した土壌に含まれる微生物の集積培養を行った。スギは日本で最もバイオマス資源量が多く、３０％を超えるリグニンによりセルロースを分解するセルラーゼが働くことが困難である。約一週間培養を行い、それより得た上澄み液を酵素液とし、ラッカーゼの指標基質である２，６‐ジメトキシフェノール（２，６‐DMP）の酸化活性を測定した。２，６‐DMP 酸化活性は、リグニンのモデル基質であるフェノール性水酸基を持ち、酸化されると黄色になることより、可視部に吸光最大波長（４６９ｎｍ）にて測定評価した。
【結果】２，６‐DMP 酸化活性測定の結果、２，６‐DMP を酸化する酵素を生産するいくつかの微生物を取得した。過酸化水素（Ｈ２Ｏ２）のような酸化剤を用いないと２，６‐DMP は酸化活性が出ないと、これまでの報告ではなされていた。今回、我々が取得した微生物の生産するラッカーゼ様酵素のほとんどが酸化剤である Ｈ２Ｏ２を用いずに酵素活性を示していた。また Ｈ２Ｏ２を用いずにラッカーゼ様酸化活性を示す酵素の中で一番高酵素活性を示す微生物の単離を行ったところ、その微生物が放線菌であることが明らかになった。

laccase, without H2O2, microorganism

講演番号：2C12a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ C 校舎 12 会場

Penicillium sp. A592-4B 株の粉砕稲わら分解率向上株迅速育種法
Rapid screening method to detect a mutant of *Penicillium* sp. A592-4B that degrades rice straw with higher rate
○青山 晃久、鈴木 啓修、倉根 隆一郎、永井 和夫 (中部大院応用生)
○Akihisa Aoyama,Yoshinobu Suzuki,Ryuichiro Kurane,Kazuo Nagai (Chubu Univ.)

【目的】稲わらなどリグノセルロース原料から生産されるバイオエタノールが食料と競合しない第二世代バイオエタノールとして注目を集めている。しかしながらセルロース等の酵素糖化性に問題があり、実用は限定的である。前回、稲わらに緩和な前処理である粉砕処理のみを施した物を基質とした場合、市販酵素よりも高い分解率を示す酵素を生産する糸状菌の報告を行った。本菌株生産酵素の粉砕稲わら分解率を更に向上させるべく迅速育種法を検討した。
【方法】1)菌株の同定：28S rDNA D1/D2領域および5.8S rDNA ITS領域の塩基配列相同性をGenBankで検索した。2)育種および有用変異株の選別：強アルカリ前処理稲わらを微細粉末(<50um)にした。これを唯一炭素源とした寒天培地を調整し、薄い平板培地を作成した。これに生存率1%となるようUV照射を行った*Penicillium* sp.A592-4B株胞子懸濁液を撒き、数日～数週間培養を行った。生育した菌株のうち、明瞭な透明帯が検出された菌株を優先的に分離し、変異株のライブラリを作成した。これらについて液体培養を行い、培養上清の粉砕稲わら分解活性(30分)を測定した。3)変異株のうち有望な菌株を1Lスケール×3本で培養し、生産酵素を濃縮し、添加量をタンパク量にて統一し、粉砕稲わらと長時間反応させ限界の分解率を測定した。なお、比較として市販最強酵素Cellic CTec2を用いた。
【結果】1)相同性検索の結果、*Penicillium*属糸状菌に属することが分かった。
2)UV処理後の胞子を撒き、合計22,000コロニーが発育した。
そのうち160コロニーに大小の透明帯を検出したため、単菌分離し、変異株ライブラリを作成した。これらの粉砕稲わら分解活性を測定したところ、49株が親株より強い粉砕稲わら分解活性(30分)を示した。そのうち安定して親株より高い粉砕稲わら分解活性を示す菌株2種(SA57-2株およびAS21-6株)を酵素生産に用いた。変異率は全22000コロニー中、透明帯検出したもの160(0.72%)、活性向上49(全体の0.22%、透明帯出現コロニー中の31%)だった。
3)酵素生産に用いたSA57-2株酵素は親株よりタンパク当たりの稲わら分解活性（30分）が親株の1.7倍で、なおかつ粉砕稲わら分解率も向上する非常に有用な変異株であった。
CMC や酸膨潤セルロースを用いた変異育種によって酵素生産量の向上した株を分離したという報告は数多くあるが、実際のバイオマスである稲わらを用いて育種を行い、粉砕稲わらの分解率が向上した変異株を取得した例は少なく、非常に効率的かつ有用な育種法の開発および有用変異株の分離に成功した。

rapid screening, cellulase, *Penicillium*

講演番号：2C12a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ C 校舎 12 会場

G タンパク質αサブユニット遺伝子点突然変異がヒラタケのラッカーゼ生産に与える効果

Effects of point mutations of G protein alpha subunits on Laccase production in *Pleurotus ostreatus*

○阪本 鷹行[1]、矢尾 祐樹[1]、本田 与一[2]、鈴木 一実[1]、入江 俊一[1]([1]滋賀県大、[2]京大農)
○Takaiku SAKAMOTO[1], Yuki YAO[1], Yoichi HONDA[2], Kazumi SUZUKI[1], Toshikazu IRIE[1] ([1]USP, [2]Kyoto Univ.)

【目的】白色腐朽菌が分泌するラッカーゼはリグニン分解酵素としても知られており、高い酸化還元電位と広い基質特異性を持つ。そのため、工場廃液処理、食品添加剤、樹脂生産など、幅広い用途へ利用が期待されている。白色腐朽菌のリグニン分解酵素は cAMP シグナル経路により制御されていると考えられるが、遺伝子機能解析などによる十分な検討は行われていない。我々はアデニル酸シクラーゼ相互作用性三量体 G タンパク質αサブユニット（Gα）アイソフォーム遺伝子候補群を白色腐朽菌ヒラタケからクローン化し、点突然変異を加えることにより GTP アーゼ活性を失った常時活性型の組換え Gα遺伝子群を作成した。これをヒラタケに導入し、ラッカーゼ生産に与える影響を調べ、ラッカーゼ遺伝子発現機構の考察を行い、ラッカーゼ高生産株育種への応用を検討した。
【結果】ヒラタケ PC9 株全ゲノムデータから 14 種類の Gα アミノ酸配列情報を取得し、分子系統解析によりスエヒロタケ由来のアデニル酸シクラーゼ相互作用性 Gα遺伝子（Yamagishi, K. et al. (2002) Microbiology, 148,2797-2809）のオーソログ候補、タンパク質 ID65367 番、115090 番、117454 番、130194 番の遺伝子を選出し、クローン化を行った。次に、GTP アーゼ活性に重要なグルタミン（Q）をアルギニン（R）に置換するような点突然変異を加え、変異遺伝子 65367Q218R、115090Q204R、117454Q208R、130194Q207R をそれぞれ作成した。これらの変異遺伝子をヒラタケ PC9 株にそれぞれ導入し、ラッカーゼ活性の経時変化を測定したところ、65367Q218R については野生型の最大 9 倍、130194Q207R については野生型の 5 倍程度の活性が示された。115090Q204R、および 117454Q208R については、顕著な変化が観察できなかった。
【考察】65367Q218R、130194Q207R は BLOSUM62 スコア表に基づく動的計画法により 78.8%の高い相同性があり（115090Q204R と 117454Q208R は 65367Q218R や 130194Q207R と 59.6%から 69.8%の相同性をもつ)、両者ともにラッカーゼ活性を上昇させる効果を持っていた。これにより、Gα の活性化による効果でラッカーゼ生産が過剰に誘導されることが示された。現在、組換え株の細胞内 cAMP 濃度の変化を測定しているところである。また、65367Q218R と 130194Q207R でラッカーゼ活性の誘導効果に差があったが、これは、下流で機能するアデニル酸シクラーゼへの作用強度の違いが影響している可能性も考えられる。ラッカーゼ高生産株育種を考慮した場合、cAMP シグナル経路の下流因子をターゲットとした方が効果的であることも考えられ、今後は、これらの因子をコードする遺伝子についても遺伝子機能解析を行いたい。

Basidiomycete, Lignin, Laccase

講演番号：2C12p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ C 校舎 12 会場

セルロース膜利用糖化プロセスの開発－技術コンセプトおよび酵素回収技術－

Development of Membrane Separation Technology for Cellulosic Sugar; its concept and description of enzyme recycling

○栗原 宏征、岸本 淳平、渡邊 志緒美、磯部 匡平、澤井 健司、南野 淳、山田 勝成、米原 徹（東レ株式会社）
○Hiroyuki Kurihara,Junpei Kishimoto,Shiomi Watanabe,Kyouhei Isobe,Kenji Sawai,Atsushi Minamino,Kathushige Yamada,Tethu Yonehara (TORAY Industries, Inc)

【目的】現在、国内外において、セルロース系バイオマスを原料としたバイオ燃料製造に関する技術開発が盛んに実施されている。バイオ燃料製造のためには安価な製造プロセスの開発が必要であり、ＳＳＦ（併行複発酵)、ＣＢＰ（糖化発酵同時進行）など分離工程を削減したプロセスが提案されている。しかし、こうした既存技術では、セルロース系バイオマスから「糖」を製造するという観点で見た場合、その糖の品質が、ケーンシュガーなどの可食糖に比べて悪いという課題がある。また、セルロース系バイオマスの加水分解に使用するセルラーゼコストの削減は、種々のプロセスや国内外を問わず共通の課題である。これらの技術課題を解決し、汎用性の高いセルロース由来糖を安価に製造することを本研究・開発の目的とする。
【方法】従来のセルロース加水分解物を当社保有水処理膜（上水、海水淡水化用途）を活用して、分離精製するプロセスおよび装置システムを開発した（膜利用糖化プロセス)。特に糖液の品質向上に関しては、ナノろ過膜による糖の濃縮精製技術、酵素回収に関しては、酵素の脱着技術と限外ろ過膜による回収技術をキー技術として開発を進めた。本演題では、酵素回収技術に関して発表する。

membrane separation, enzyme recycle, enzymatic hydrolysis

講演番号：2C12p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ C 校舎 12 会場

セルロース膜利用糖化プロセスの開発－糖液の膜精製・濃縮技術－

Development of Membrane Separation Technology for Cellulosic Sugar; The description of sugar purification and condensation

○岸本 淳平、栗原 宏征、渡邊 志緒美、磯部 匡平、澤井 健司、南野 淳、山田 勝成、米原 徹（東レ株式会社）
○ Jumpei KISHIMOTO,Hiroyuki KURIHARA,Shiomi WATANABE,Kyohei ISOBE,Kenji SAWAI,Atsushi MINAMINO,Katsushige YAMADA,Tetsu YONEHARA (Toray Industries, Inc.)

【目的】現状のセルロース由来糖液は、糖以外に多くの不純物を含んでいる。不純物は例えば酵素で加水分解できない不溶性のリグニン、あるいは前処理工程で生成する芳香族、フラン系化合物などであり、これらが後段の発酵工程において、微生物の生育あるいは発酵生産に阻害的に作用するという課題があった。本研究では、糖液に含まれる芳香族・フラン系化合物を膜分離により除去することを目的とした。
【方法】セルロース由来糖液に含まれる芳香族・フラン系化合物の除去を目的に有機高分子製のナノろ過膜（NF 膜）を使用した。NF 膜は、１価イオンは透過するが、２価イオンは透過しないというユニークな特性を有することから、硬水の軟水化などの水処理分野で利用されている膜である。このナノろ過膜を用いてセルロース由来糖液のろ過を行ったところ、単糖成分（グルコース、キシロース）は膜の非透過側に濃縮され、一方でこれらの単糖成分と同程度あるいはそれ以下の分子量を有する種々の芳香族やフラン類は膜透過側に分離・除去された。

nanofiltration, sugar, cellulose

講演番号：2C12p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ C 校舎 12 会場

膜利用発酵リアクターを用いた高効率エタノール発酵（１）
High-efficiency Ethanol Fermentation Using a Membrane-integrated Fermentation Reactor（１）
○渡邊 志緒美、磯部 匡平、澤井 健司、岸本 淳平、南野 淳、栗原 宏征、山田 勝成、米原 徹（東レ株式会社）
○Shiomi WATANABE, Kyohei ISOBE, Kenji SAWAI, Jumpei KISHIMOTO, Atsushi MINAMINO, Hiroyuki KURIHARA, Katsushige YAMADA, Tetsu YONEHARA (Toray Industries, Inc)

【目的】化石原料の枯渇や地球温暖化問題の対策として、コーンやさとうきびなどの可食バイオマスを原料としたバイオエタノール製造がブラジルやアメリカなどで進められている。その一方で、食糧との競合が問題視されており、コーンの茎や葉などの非可食バイオマスを原料とすべく、盛んに研究開発が行われている。しかし、非可食バイオマス由来糖は、高効率でエタノール発酵可能な６炭糖に加えて、微生物が利用困難な５炭糖も含まれる混合糖であるため、５炭糖の発酵利用に関する高効率化が課題となっている。
【方法および結果】当社が開発した膜利用連続発酵リアクターは、培養液のろ過に用いる分離膜としてポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜を使用し、培養液を循環することで膜の目詰まりを抑制した高密度培養が可能である。これまでに本リアクターを用いることで、６炭糖を原料とした発酵の高効率化に成功している。そこで、上記課題を解決するために、５炭糖および非可食バイオマス由来糖を想定した混合糖を原料としてエタノールの発酵生産に関する検討を行った。その結果、発酵収率および発酵生産速度を向上させることに成功し、加えて従来のバッチ発酵で課題であったカタボライト抑制の影響を受けない連続発酵を可能とした。

continuous fermentation, xylose, ethanol

講演番号：2C12p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ C 校舎 12 会場

膜利用発酵リアクターを用いた高効率エタノール発酵（２）

High-efficiency Ethanol Fermentation Using a Membrane-integrated Fermentation Reactor（２）

○磯部 匡平、渡邊 志緒美、澤井 健司、岸本 淳平、南野 淳、栗原 宏征、山田 勝成、米原 徹（東レ株式会社）
○Kyohei ISOBE, Shiomi WATANABE, Kenji SAWAI, Junpei KISHIMOTO, Atsushi MINAMINO, Hiroyuki KURIHARA, Katsushige YAMADA, Tetsu YONEHARA (Toray Industries, Inc.)

【目的】化石原料の枯渇や地球温暖化問題の対策として、コーンやさとうきびなどの可食糖を原料としたバイオエタノール製造がブラジルやアメリカなどで進められている。その一方で、食糧との競合が問題視されており、コーンの茎や葉などのセルロース系バイオマスを原料とすべく、盛んに研究開発が行われている。しかしセルロース系バイオマス由来糖は多くの微生物にとって同時資化が困難な５炭糖と６炭糖の混合糖である上、バイオマス糖化の前処理工程では微生物の生育や発酵を阻害する芳香族・フラン系化合物が生成するため、効率的な発酵の妨げとなっていた。
【方法および結果】当社が開発した膜利用連続発酵リアクターは、培養液のろ過に用いる分離膜としてポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜を使用し、培養液を循環することで膜の目詰まりを抑制した高密度培養が可能である。これまでに可食糖を原料とした発酵で本リアクターを用いた高効率化に成功しているが、上記課題を解決するためにセルロース系バイオマス由来糖を原料として膜利用連続発酵リアクターによるエタノール発酵検討を行った結果、発酵阻害物質の影響を低減させることに成功した。

ethanol, fermentation, cellulose

講演番号：2C12p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ C 校舎 12 会場

爆砕処理もみ殻からのバイオエタノール生産における糖化後発酵と同時糖化発酵の比較

Bioethanol production from steam-exploded rice husk by SHF or SSF

○吉羽 悠介[1]、稗田 一男[2]、清水 範夫[1] ([1]東洋大院生命、[2]フロンティアフーズ（株））
○YUSUKE YOSHIBA[1], KAZUO HIEDA[2], NORIO SHIMIZU[1] ([1]Toyo Univ., [2]Frontier Foods Co., Ltd)

【目的】もみ殻は、アジアを中心に世界で年間約 4.5 億 t 生産されている稲の副産物であり、その約 2 割に当たる膨大な量が発生しているといわれている。本研究は、高温・高圧の蒸気で試料を短時間蒸煮することで酸化させ、その後瞬間的に圧力を開放することで物理的に試料を粉砕する爆砕処理をもみ殻に行った後、同時糖化発酵（SSF）や糖化後発酵（SHF）を行い、より効率の良いバイオエタノール生産方法を確立することを目的とする。爆砕処理は、従来の硫酸などによる前処理と比較して環境負荷が少ないと考えられる。
【方法】3.0MPa、236℃、5 分間の条件で爆砕処理を行ったもみ殻を使用した。また、酵素糖化には Cellulase "ONOZUKA" RS（ヤクルト薬品工業）およびスクラーゼ C（三菱化学フーズ）を使用した。エタノール発酵には *Saccharomyces cerevisiae* NBRC0224 または組換え大腸菌 *Escherichia coli* ATCC55124 を使用した。発酵液に添加する培地（糖なし）として、*S. cerevisiae* は YM 培地、*E. coli* は LB 培地または M9 培地を使用した。グルコース濃度を Glucose CⅡ Test Wako (Wako)、還元糖濃度を DNS 法、エタノール濃度をガスクロマトグラフィーによって測定した。
【結果】*S. cerevisiae* を用いて爆砕処理もみ殻の SHF を行ったところ、0.14 mg-EtOH/mg-dry matter のエタノールが得られた。しかし、*E. coli*（LB 培地）を用いて爆砕処理もみ殻の SHF を行ったところ、エタノールは生産されず、発酵阻害が生じたことが分かった。一方、*E. coli*（M9 培地）を用いて SHF を行ったところ、0.07 mg-EtOH/mg-dry matter のエタノールが得られた。

S. cerevisiae または *E. coli* を用いて SSF を行い、SHF の発酵収率と比較した。酵素は Cellulase "ONOZUKA" RS を使用した。*S. cerevisiae* の SSF の場合、0.14 mg-EtOH/mg-dry matter のエタノールが得られ、SHF との差がなかった。一方、*E. coli* と M9 培地を用いた SSF の場合、0.08 mg-EtOH/mg-dry matter のエタノールが得られた。また、M9 培地にカザミノ酸または L-グルタミン酸を添加して SSF を行ったところ、それぞれ 0.10 mg-EtOH/mg-dry matter および 0.11 mg-EtOH/mg-dry matter のエタノールが得られた。さらに、酵素としてスクラーゼ C を使用した場合、*E. coli* で 0.15 mg-EtOH/mg-dry matter のエタノールが得られた。

以上の結果から、ペントースおよびヘキソースの両方を発酵できる組換え大腸菌 *E. coli* を用いることで、爆砕処理もみ殻からエタノールを効率良く生産できることが分かった。

bioethanol, rice husk, steam-explosion

講演番号：2C12p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ C 校舎 12 会場

爆砕処理もみ殻と稲わらからのバイオエタノール生産
Bioethanol production from steam-exploded rice husk and rice straw

○田端 高光[1]、高品 知典[1]、稗田 一男[2]、清水 範夫[1]([1]東洋大院生命、[2]フロンティアフーズ（株））
○Takamitsu TABATA[1], Tomonori TAKASHINA[1], Kazuo HIEDA[2], Norio SHIMIZU[1] ([1]Toyo Univ., [2]Frontier Foods Co., Ltd.)

【目的】もみ殻および稲わらは国内でそれぞれ年間 200 万トンおよび 850 万トン程度発生するリグノセルロース系バイオマスである。本研究では、高温高圧の蒸気でもみ殻を蒸煮し、その後圧力を開放することで分解を行う爆砕処理を行ったもみ殻をセルラーゼ糖化後、発酵させることで効率的にバイオエタノールを生産することと、同様の方法で稲わらでも効率的なエタノール生産ができるかを検討することを目的とする。
【方法】爆砕処理をしたもみ殻を温水抽出し、抽出した溶液をヘミセルロース分画とし、残渣に 0.1% NaOH によるアルカリ処理を行い、抽出した溶液をリグニン分画とした。最終的に残った沈殿物を中和し、セルロース分画とし、このセルロース分画を複合セルラーゼ“ONOZUKA”R－10 を用いて糖化し、糖化率を検討した。エタノール発酵には、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* NBRC 0224 および組換え大腸菌 *Escherichia coli* ATCC 55124 を用いて爆砕処理もみ殻とセルロース分画を糖化後発酵した。また、*E. coli* を用いて爆砕処理もみ殻をエタノール発酵させるために、発酵増殖阻害物質による影響の軽減として、糖化液の希釈、発酵培地の変更、温水による爆砕処理もみ殻の処理、の三種類を行ない、それらを糖化後発酵させ、エタノール収率を比較した。さらに、糖化液にカザミノ酸などのアミノ酸を添加し、収率の向上を検討した。爆砕処理稲わらに対しても同様の方法を適用し、もみ殻とのエタノール収率を比較した。なお、エタノール濃度、グルコース濃度および還元糖濃度の測定には、ガスクロマトグラフィー、Glucose CII test Wako および DNS 法をそれぞれ用いた。
【結果】3.0 MPa、235℃、3 分間の条件で爆砕処理したもみ殻から最も高い酵素糖化率が得られた。この条件の爆砕処理もみ殻とセルロース分画の糖化液を *S. cerevisiae* および *E. coli* でエタノール発酵したところ、セルロース分画糖化液ではそれぞれ 0.16-EtOH/mg-cellulose fraction および 0.27-EtOH/mg-cellulose fraction となったが、爆砕処理もみ殻糖化液では *S. cerevisiae* で 0.13-EtOH/mg-rice husk に対し、*E. coli* ではほとんどエタノールを得ることができなかった。これより、セルロース分画のエタノール発酵には *E. coli* が有効であるが、爆砕処理もみ殻糖化液には発酵と増殖を阻害する物質が含まれており、発酵しないことが分かった。そこで、この爆砕処理もみ殻に含まれる発酵阻害物質の影響の軽減について検討したところ、温水処理後に糖化発酵する方法が良いことが分かった。さらに、爆砕処理もみ殻糖化液にアミノ酸を添加すると、エタノール収率を向上できた。爆砕処理稲わらでも同様の処理を行ったところ、もみ殻と同様の結果が得られた。

bioethanol, rice husk, rice straw

講演番号：2C12p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ C 校舎 12 会場

稲わらからのエタノール発酵副産物のパーフルオロポリマー膜に対する影響

Effect of by-products of ethanol fermentation broth on a perffluoropolymer membrane

○佐々木 建吾[1]、松田 史生[2]、荻野 千秋[3]、近藤 昭彦[3]([1]神戸大院・自然科学、[2]阪大院工・応生工、[3]神戸大院・工・応化)
○Kengo SASAKI[1], Fumio MATSUDA[2], Chiaki OGINO[3], Akihiko KONDO[3] ([1]Kobe Univ., [2]Osaka Univ., [3]Kobe Univ.)

【背景・目的】パーフルオロポリマー膜は炭素原子およびフッ素原子から成る樹脂であり、水－エタノール混合物の蒸気透過法に使用される分離膜である。一方、稲わらを原料としてバイオエタノールを精製する際に、前処理や発酵過程で得られた多種類の副産物（酢酸、ギ酸等）が含まれている事が知られている。しかし、副産物がパーフルオロポリマーの水－エタノール分離に対する影響は不明である。本研究において稲わらを希硫酸処理して得られる個々の副産物についてパーフルオロポリマー膜の性能に対する影響について検討した。
【方法・結果】水－エタノール混合物に 0.1-2g/L の副産物を混合したモデル発酵液を、蒸気透過法によりパーフルオロポリマー膜に供した。蒸気透過開始２時間後と４時間後に透過液を採取し、溶液全体の透過速度および、水のエタノールに対する透過率を求めた。２時間後と４時間後の結果を比較したところ、透過速度（439-507 g/m2/h）および透過率（14.9-23.5）ともに大きな変化は観察されず、パーフルオロポリマー膜は副産物に対して耐性があると考えられた。稲わらを実際に希硫酸処理して得られるエタノール発酵液をパーフルオロポリマー膜に供した結果についても報告するつもりである。本研究の一部は NEDO の助成を受けて行われた。

Ethanol fermentation, Vapor permeation, Rice straw

講演番号：2C12p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ C 校舎 12 会場

麹菌由来酵素を表層提示した酵母によるソフトバイオマス糖化発酵の促進
Improvement of fermentation on soft-biomass with yeast displaying enzyme derived from *Aspergillus oryzae*

○村山 浩一[1]、中川 拓哉[1]、久田 博元[1]、堤 浩子[1]、秦 洋二[1]、近藤 昭彦[2]、植田 充美[3] ([1]月桂冠・総研、[2]神戸大院・工・応化、[3]京大院・農・応生)
○Hirokazu Murayama[1], Takuya Nakagawa[1], Hiromoto Hisada[1], Hiroko Tsutsumi[1], Yoji Hata[1], Akihiko Kondo[2], Mitsuyoshi Ueda[3] ([1]Res. Inst., Gekkeikan Sake Co. Ltd., [2]Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch., Kobe Univ., [3]Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

石油および食糧供給問題などの観点から，非可食セルロース系バイオマスからの代替エネルギー生産が望まれている．原料となるソフトバイオマスには，セルロースに加えてヘミセルロースやリグニンを多く含有し，市販セルラーゼ剤のみではセルロースを効率よく分解ができない事が知られている．そのため，目的バイオマスの分解効率を向上させるには，ヘミセルラーゼなどの酵素を補うことが必要である．

現在，我々はセルラーゼ表層提示酵母を用いて草本系バイオマスから糖化と発酵が同時に行える一貫型のセルロースエタノールの高効率製造プロセス（consolidated bioprocessing，CBP）の開発を目指している．前述の通り，ソフトバイオマスは市販セルラーゼ剤単独ではその糖化効率が悪く，その一因としてセルロース，ヘミセルロース及びリグニンがフェルラ酸とその類縁体を介して互いに結合していることが考えられる．本研究では，フェルラ酸エステラーゼ等の細胞間マトリクス分解酵素などに着目し，麹菌由来酵素を活用したバイオマスの糖化・発酵効率の向上を検討した．

フェルラ酸エステラーゼ等の目的酵素を麹菌 *Aspergillus oryzae* からクローニングし，麹菌 0SI1013 ロイシン要求性株を宿主として高発現株を作製した．これらバイオマス分解酵素を含む培養上清を粗酵素液としてセルラーゼ剤とともにバイオマス分解に供したところ，遊離するグルコースおよびキシロース量の向上が認められた．

加えて，これら麹菌由来酵素遺伝子と酵母の細胞表層タンパク質である α-アグルニチン遺伝子を融合したプラスミドを構築し，各酵素が酵母表面に提示された形質転換体を作製した．この表層提示酵母を用いて市販セルラーゼ剤とともにバイオマスに対して並行複発酵を行ったところ，フェルラ酸エステラーゼ表層提示株はコントロールに対してエタノール生産量が約 20%向上することが確認できた．

本研究は NEDO バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発/セルロースエタノール高効率製造のための環境調和型統プロセス開発の一環として行われたものである．

biomass, bioethanol, arming yeast

講演番号：2C12p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ C 校舎 12 会場

糸状菌を用いたペーパースラッジ類からのバイオエタノールおよび乳酸の生産

Production of bioethanol and lactate from paper sludges by using fungi

○瀬戸 裕介、高野 真希、星野 一宏（富山大院理工）
○yusuke SETO,MAKI TAKANO,KAZUHIRO HOSHINO (Univ. Toyama)

【目的】ペーパースラッジ(PS)は製紙工場の製紙製造工程から排出される廃棄物で国内では年間約500 万 t が排出されている。この PS の処理には主に焼却が用いられ、その時に発生するエネルギーを工場内で再利用など行なっている。しかし、この方法では炭酸ガスが大量に発生してしまうことが問題となっている。一方、木材チップや古紙などからセルロース成分を回収する際および製紙製造工程において未利用な廃棄物として PS が多量に排出されている。さらにパルプ製造工程では未回収部分の繊維残渣(テール)が多量に排出されている。これらの PS やテールは Cellulose や Hemicellulose を多く含んでおり、新規バイオマスとしての有効利用が期待されている。これらバイオマス資源を効率良く有用物質に変換させるためには加水分解反応と発酵を効率良く行う菌株の選択が必要である。接合菌である *Rhizopus* 属は各種 Cellulase の分泌およびエタノールおよび乳酸を生産することが知られている。そこで本研究ではこれら PS 類からエタノールおよび乳酸を生産させるために研究室所有の *Rhizopus* 属から最適な菌株の選択を行った後、最適化したセルラーゼ剤と本株を組み合わせた同時糖化発酵(SSF)を行い Ethanol および乳酸の生産させることを検討した。

【方法・結果】本研究では PS として主にテールを使用した。使用したテールの成分は Cellulose 49 %、Hemicellulose 8%、 Other sugar 9%、 Lignin 31%、および Ash 1 %であった。保有している 76 種類の *Rhizopus* 属から PS から Cellulase の分泌に適した菌株の選択を行った。テールを基質として 96 h の回分培養を行った結果、β-Glucosidase および *endo*-β-Glucanase の活性が高かった *R. oryzae* NBRC 4749 および NBRC 4785 を選択した。次に 14 種類のセルラーゼ剤を用いてテールの加水分解の最適化を行ったところ、Cellulase T ： Onozuka 3S ： Accellerase = 0.31：0.35：0.34 の組み合わせが望ましいことがわかった。そこで 50 g/L のテールを基質としてこの酵素カクテル剤と *R. oryzae* NBRC 4749 を組み合わせた SSF を嫌気条件下で行ったところ培養 72 h でエタノールのみが 20.7 g/L 生成できた。一方、同酵素カクテル剤と *R. oryzae* NBRC 4785 を組み合わせた好気 SSF を行ったところ、培養 36 h で 7.7 g/L の乳酸、7.2 g/L のエタノールが得られた。2 種類の *R. oryzae* を用いて培養条件を変えることによって PS 類からエタノールのみおよびエタノールと乳酸の混合液を生産できることがわかった。

Rhizopus oryzae, paper sludges, bioethanol

講演番号：2C12p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ C 校舎 12 会場

澱粉含量の高い稲ホールクロップから効率的にグルコースを回収するための RT-CaCCO 法の改良
Improvement of the RT-CaCCO process for efficient glucose recovery from starch-rich whole-crop rice

○松木 順子、城間 力、池 正和、徳安 健（農研機構　食総研）
○Junko MATSUKI,Riki Shiroma,Masakazu Ike,Ken Tokuyasu (NFRI, NARO)

【目的】演者らは、稲わらからの効率的なバイオエタノール製造技術を開発する中で、澱粉、ショ糖等の易分解性糖質の流亡を防ぎつつ繊維質の前処理を行う RT-CaCCO 法（Calcium capturing by carbonation at room temperature）やその改良法を開発してきた。これまでに、水酸化カルシウム前処理および二酸化炭素中和が単離澱粉の酵素糖化性に及ぼす影響の評価を行い、報告した。本研究では、稲地上部全体（ホールクロップ）を対象に、セルロースと澱粉の両方を糖化するための条件最適化を行い、RT-CaCCO 法の改良の可能性を検討した。
【方法】基質として、澱粉含量が全乾物重の 26.4%を占める稲ホールクロップ（品種：リーフスター）の微粉砕物を用いた。RT-CaCCO 前処理（常温付近での水酸化カルシウム処理および二酸化炭素中和）後に、酵素糖化によりグルコースに変換し、原料からのグルコース回収率を計算した。
【結果】澱粉をあまり含まない稲わらで最適化された RT-CaCCO 法の基本条件下では、ホールクロップ粉砕物を原料とした際の澱粉の糖化率は 39.6%にとどまり、条件の改良が必要となった。そこで、最適水酸化カルシウム濃度、温度処理条件、および澱粉分解酵素添加の効果を検討した。各反応条件における糊化エンタルピーの差から、原料粉末の乾燥重量に対する水酸化カルシウム濃度 30%（重量比）で、RT-CaCCO 後の穏和な温度処理を施すのが、澱粉の糖化促進に有効であることを見いだした。また、*Bacillus* 属の α-アミラーゼを添加することで、原料からの総グルコース回収量は理論量の 79.8%に達し、澱粉糖化率としては 87.0%となった。使用した *Bacillus* 属 α-アミラーゼは、液化型で未糊化澱粉の分解性が高いことが知られており、これまでに用いてきた糸状菌由来の酵素製剤に含まれるアミラーゼと比べ、ホールクロップへの前処理条件においてより有効に作用する者と考えられた。このように、澱粉含量の高いホールクロップに RT-CaCCO 法を適用する場合、熱糊化の代用となる十分なアルカリ糊化と適切な酵素の組み合わせが重要となることが示された。

saccharification, rice whole-crop, starch alkali gelatinization

講演番号：2C12p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ C 校舎 12 会場

中高圧処理下でのセルラーゼ反応における産生糖量増加メカニズムの解明

Study of the increasing effect of reducing sugars on cellulase reaction under high-hydrostatic pressure

○栗原 聖[1]、藤田 智之[1]、来山 哲二[2]、采女 信二郎[2]（[1]信州大院農・機能食、[2]ポエック）
○Sho Kurihara[1], Tomoyuki Fujita[1], Tetsuji Kitayama[2], Shinjiro Uneme[2] ([1]Shinshu Univ, [2]Puequ)

【目的】 バイオエタノールの原料であるセルロース系バイオマスを用いた、効率的な加水分解による少糖の生産性向上が望まれている。筆者らは 30～90MPa の中高圧条件下でセルラーゼ反応を行い、Celluclast 1.5L が圧力依存性を示すことを見出した。また、常圧下と比較して加圧下で産生糖量が増加することを報告した[1)]。今回、3 種の基質に Celluclast 1.5L を作用させて、90MPa の加圧下でセルラーゼ反応を行い、産生糖量および糖組成への影響を評価した。また、少糖類添加による反応阻害への影響についても調査した。

【方法】 セルラーゼは Celluclast 1.5L (Novozymes 社) を用いた。基質として破砕濾紙、Avicel、Carboxymethylcellulose (CMC) を用いた。チャック付き袋に基質 100mg、0.25M 酢酸緩衝液 5ml (pH 4.5) を入れ、酵素 1.0mg (1% 対基質重量) または 0.25mg を添加し、常圧 (0.1MPa) または中高圧 (90MPa) 下、50℃にて 12, 24 または 48 時間反応した。反応液を煮沸後、遠心し、上清中の還元糖量を Somogyi-Nelson 法 (660nm) で定量した。また、反応開始時にグルコース (Glc) またはセロビオース (Cello) を 10mg (10% 対基質) または 20mg (20%) 添加して同様の反応を行った。

【結果及び考察】 不溶性基質である濾紙および Avicel での反応 24 時間における産生糖量を比較した結果、常圧時の産生糖量に比べて、加圧時の産生糖量はそれぞれ 1.3 倍、1.7 倍に増加した。反応後の糖組成 (Glc/Glc+Cello) を分析したところ、濾紙では 20%から 38%に、Avicel では 37%から 64%へと、いずれも常圧時に比べて加圧時の Glc 生成比率が高くなった。また、反応経過に伴って、Glc の生成比率が増加することを確認した。以上の結果から、加圧時には β-グルコシダーゼの活性が昂進し、産生糖量が増加したことが示唆された。一方、可溶性基質である CMC を用いた場合には、反応時間当たりの産生糖量は増加したものの、中高圧による効果はわずかであった。

反応開始時に Glc または Cello を添加して反応させたところ、基質に CMC を用いた反応で産生糖量の減少が認められた。特に、酵素 0.25%での反応において、Glc 10mg を添加すると 24 時間後の産生糖量は 60%程度に減少した。一方、中高圧条件で反応を行うと、Glc 添加による阻害が緩和され、産生糖量が常圧時の未添加程度にまで回復した。この結果から、90MPa の加圧下で反応を行うことで、生成物による反応阻害が軽減されることが示された。今後は植物素材を基質に用いて、中高圧下での分解の程度の違いを調査する予定である。

1) 日本農芸化学会 2012 年度大会講演要旨集, p.144 (2012)

cellulase, high-hydrostatic pressure, glucosidase

講演番号：2C12p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ C 校舎 12 会場

セルロース系バイオマスの酵素糖化に関する基盤研究（1）バイオマス糖化に対する *Trichoderma reesei* 由来成分酵素の網羅的機能解析

Basic Research on Enzymatic Saccharification of Cellulosic Biomass (1) Comprehensive analysis of the function of component enzymes derived from *Trichoderma reesei* for biomass saccharification

○河合 哲志[1]、川口 剛[2]、小笠原 渉[3]、岡田 宏文[3]、小林 良則[1]、森川 康[1,3]（[1]バイオインダストリー協会、[2]大阪府立大学、[3]長岡技術科学大学）
○ Tetsushi KAWAI[1], Takashi KAWAGUCHI[2], Wataru OGASAWARA[3], Yoshifumi OKADA[3], Yoshinori KOBAYASHI[1], Yasushi MORIKAWA[1,3] ([1]JBA, [2]Osaka Pref Univ, [3]Nagaoka Univ)

【目的】

我々はセルロース系バイオマスからのエタノール生産に用いる高機能糖化酵素の創成を目指し基盤研究を行っている。この技術分野においては、バイオマス糖化に用いる糖化酵素のコストが最大の課題になっている。近年、海外酵素メーカーはバイオマス糖化のための強力なセルラーゼを開発しているが、我々も昨年度の大会において、*T. reesei* PC-3-7をベースにしたBGL組換えセルラーゼJN13に関する評価結果を報告した。本研究ではさらに強力なセルラーゼを開発するためセルラーゼに含まれる各成分酵素のバイオマス糖化における役割を網羅的に解析した。

【方法】

T. reesei PC3-7株由来の単一成分欠損セルラーゼ9種類（ΔCBH I-II、ΔEG I-VII）に一定のBGLを添加してタンパク質量を揃えた条件で糖化反応を行った。前処理バイオマスはNaOH・希硫酸・水熱処理で調製した稲わら・エリアンサス・ユーカリ前処理物、および爆砕処理スギの7種類とAvicelを用いた。

【結果】

各成分酵素のバイオマス糖化に対する機能を各々の成分欠損酵素と野生株酵素（WT）の糖化能力を比較することで解析した。糖化反応の結果、ΔCBH I は WT の糖化率に対して 45～55%であり、CBH I は他の成分酵素では代替できないことがわかった。それに対してΔCBH II は最も糖化能が低いものでも WT の 80%程度であり、バイオマス種によっては CBH II の欠損の効果が全く見られなかった。ただし、Avicel に対してのみ WT の 60%と大きな影響が認められた。エンドグルカナーゼのなかで典型的なエンド作用を示すと言われている EG I・II・III・V のうち、EG III と EG V は糖化に影響を示さないのに対して、EG I と II はそれぞれ効果のある基質が異なるが、比較的 EG II の影響が大きいことが判明した。また GH ファミリー61 に属する EG IV と VII のうち、大きな効果を示すものは EG IV であるが、EG IV も CBH II や EG I・II と同様に基質の種類によりその影響は大きく異なった。最も大きな影響が見られた爆砕処理スギに対しては従来までバイオマス分解に主要な働きをすると考えられていた CBH II や EG I､EG II よりも大きな影響があることが明らかとなった。さらに、この EG IV の影響は前処理バイオマスのリグニン含量に相関することも見出された。

Cellulase, Trichoderma reesei, Biomass saccharification

講演番号：2C12p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ C 校舎 12 会場

セルロース系バイオマスの糖化酵素に関する基盤研究（２）界面活性剤の糖化促進効果
Basic Research on Enzymatic Saccharification of Cellulosic Biomass(2)Effect of Surfactant on Saccharification
○小林 良則、菅 丈司、河合 哲志、森川 康（ＪＢＡつくば研）
○Yoshinori KOBAYASHI,Takeshi SUGA,Tetsushi KAWAI,Yasushi MORIKAWA (JBA Tsukuba Res.Lab.)

【目的】
我々はセルロース系バイオマスからのエタノール生産に用いる高機能糖化酵素の創成、及び高効率糖化法の開発を目指し基盤研究を行っている。これまで、バイオマス糖化における酵素コスト低減の観点から糖化促進効果を有する化合物の探索が行われており、各種界面活性剤等がその効果を示すことが知られている。今回、我々は、各種前処理バイオマスを基質として、各種界面活性剤等の糖化促進効果の評価を行い、次いで、そこから選択された化合物を用いた糖化反応を網羅的に解析し、その効果発現の機構を解明することを試みたのでこれらの結果について報告する。
【方法】
酵素としてAccellerase1500を、基質としてアビセル、エリアンサスの苛性ソーダ処理・水熱処理・希硫酸処理物を用いた。添加効果を試験する化合物として、市販の各種界面活性剤、タンパク質等を用いた。これら酵素、基質、添加物の組み合わせで糖化反応を行い、糖化率を測定すると共に、反応上清、反応残渣中のタンパク量、各種酵素活性（CMCase・PSCase・Cellobiase・*p*NPLase・Xylanase）を測定した。また、これらの糖化反応における各種成分酵素の挙動を電気泳動で解析した。
【結果】
各種の基質と化合物を組み合わせて糖化促進効果を検証した結果、ラウリルアルコール系の界面活性剤 LA-50 が高い促進効果を示した。そこで、酵素量 5mg/g-BM・添加有無の条件下で糖化率を比較したところ、この化合物はアビセルや苛性ソーダ処理物には殆ど促進効果を示さず、水熱・希硫酸処理物には大きな促進効果を示した。このことから、この効果にはこれらの前処理物に存在するリグニンが関与しているものと推測された。苛性ソーダ処理物と水熱処理物を用い、LA-50 添加条件下でタンパク質量の変動、各種酵素活性の変動を比較評価した。添加の場合、苛性ソーダ処理物に比べ、水熱処理物において、反応初期からタンパク質、CMCase、Cellobiase、PSCase、*p*NPLase、Xylanase 活性の上清中での存在量が多く、また反応経過と共にタンパク質や、これらの酵素活性が上清中に戻る傾向が見られ、これらのことが糖化促進の原因であると思われた。また、２次元電気泳動解析からも、界面活性剤によって成分酵素の残渣への吸着挙動に大きな差異が認められた。これらの結果、界面活性剤が各種成分酵素のセルロースやリグニンに対する吸着を緩和し、糖化を促進していると推定された。

biomass, cellulase, saccharification

講演番号：2C12p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ C 校舎 12 会場

CBH1 と CBH2 の相乗効果メカニズムの解析

Analysis of synergy effects between CBH1 and CBH2

○沖野 祥平、池應 真実、種田 大介（日揮・技術イノベーション部）
○Shohei OKINO,MAKOTO IKEO,DAISUKE TANEDA (JGC CORPORATION)

【背景と目的】

セルロース系バイオマスを原料としたバイオエタノール生産において、セルラーゼコストの削減が必須課題となっている。しかしながら、糖化反応の際にセルラーゼ使用量を低減すると、糖化速度だけでなく最終到達グルコース濃度(糖化率)も低下する、いわゆる “頭打ち現象”が引き起こされることが知られている。

我々はこれまでに、セルラーゼ構成成分の一つであるエキソグルカナーゼ CBH2 が、一般的な振盪撹拌によって失活することを見出し、さらに CBH2 活性が維持される静置条件にて糖化反応を行うことで、低セルラーゼ使用量条件における頭打ち現象が解消されることを見出した。この頭打ち現象の解消は、もう一つのエキソグルカナーゼである CBH1 と CBH2 の両者が存在する条件でのみ認められたことから、CBH1 と CBH2 の間に何らかの相乗効果メカニズムが存在することが示唆された。そこで本発表では、相乗効果メカニズムの解明を目的として、糖化反応、及び基質への酵素の吸脱挙動などの解析を進めた結果を報告する。

【実験方法と結果】

セルラーゼは市販酵素（セルラーゼ SS、ナガセケムテックス）を用い、本酵素から CBH1 を主成分とする CBH1 主液と CBH2 を主成分とする CBH2 主液を分画調製した。

ろ紙 10% w/v を基質とし、市販酵素と CBH1 主液の糖化性能を静置条件にて比較した結果、市販酵素ではほぼ 100%の糖化率が得られたが、CBH2 が存在しない CBH1 主液では 60%の糖化率で頭打ちした。CBH1 主液による糖化反応の頭打ち後に、CBH1 主液、もしくは CBH2 主液を追添加したところ、CBH2 主液の添加によって糖化反応が再開し、最終的には市販酵素と同等の濃度まで到達することが認められた。

さらに、糖化反応液上清を SDS-PAGE 解析し、バンド強度を基に CBH1 の反応液中の濃度変化を解析したところ、市販酵素では基質に一旦吸着した CBH1 が糖化反応が進むにつれて反応液中に脱離するが、CBH1 主液では CBH1 が基質に吸着したまま反応液中に脱離しないことが認められた。これらの結果より CBH1 と CBH2 の相乗効果は、CBH2 が CBH1 の基質からの脱離を促進し、CBH1 の糖化反応が再開するメカニズムに起因することが示唆された。

本研究は(独)新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の委託研究として実施した。

Cellulase, Bioethanol, Hydrolysis

講演番号：2C12p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ C 校舎 12 会場

セルラーゼ高生産糸状菌 *Acremonium cellulolyticus* Y-94 株由来の *cre1* 遺伝子破壊株の解析

The analyses of *cre1* gene disruptant strain derived from *Acremonium cellulolyticus* Y-94

○藤井 達也、井上 宏之、石川 一彦（産総研バイオマスリ研セ）
○Tatsuya FUJII,Hiroyuki INOUE,Kazuhiko ISHIKAWA (AIST)

＜目的・方法＞

糸状菌 *Acremonium cellulolyticus* Y-94 株はセルラーゼを菌体外へ大量に分泌する。紫外線や化学変異剤を用いた処理により、Y-94 株由来のセルラーゼ高生産変異株が複数取得されている。近年、宿主ベクター系が構築されたことにより [1)]、本菌の解析の幅が飛躍的に広がった。本研究では、本菌のセルラーゼ生産に関わる転写因子の解析を試みた。他の糸状菌では、*cre1* 遺伝子産物がグルコース抑制を司る転写因子として働くことが知られている。本菌の全ゲノム情報（未公表データ）を解析したところ、*cre1* のホモログ遺伝子を見出した。そこで、*cre1* 遺伝子の遺伝子破壊株を構築し、その表現型を解析した。

＜結果＞

Y-94 株および *cre1* 遺伝子破壊株を、グルコースを添加したセルロース培地で培養したところ、Y-94 株の培養上清中にはセルラーゼ活性が検出されなかったのに対し、*cre1* 遺伝子破壊株ではこれが検出された。また、同様の培養条件で培養した各株を用い、セロビオハイドロラーゼ I 遺伝子の発現を解析したところ、Y-94 株では発現が確認されなかったのに対し、*cre1* 遺伝子破壊株ではこれが確認された。以上の結果から、*cre1* 遺伝子破壊株では、グルコース存在下においてセルラーゼ遺伝子を発現し、セルラーゼを生産すると示唆された。現在、*cre1* 遺伝子が発現を制御する遺伝子について、網羅的に解析を進めている。

1) Fujii et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. Vol. 76, pp245-249, 2012

Acremonium cellulolyticus, cellulase, biomass

講演番号：2C12p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ C 校舎 12 会場

分裂酵母を用いて生産した *Aspergillus aculeatus* 由来 β-Glucosidase I の機能解析

Characterization of ß-glucosidase I from *Aspergillus aculeatus* expressed by fission yeast

木村 修一郎、禅院 進、岡田 和士、○東田 英毅（旭硝子・ＡＳＰＥＸ）
Syuichiro Kimura,Susumu Zen-in,Katsunori Okada,○Hideki Tohda (ASPEX Div., Asahi Glass Co., Ltd.)

セルロース系バイオマスから発酵原料としての単糖、さらにはバイオエタノールや乳酸などのバイオ燃料・化成品を生産するためには、植物細胞壁の主要な構成成分であるセルロースやヘミセルロースを効率よく分解・低分子化する必要がある。その反応過程には複数のセルラーゼが必要とされており、エンドグルカナーゼ・セロビオハイドラーゼとともに、セロビオースをグルコースに分解するβーグルコシダーゼの存在が、効率的な反応には欠かせない。*Aspergillus aculeatus* はバイオマス糖化に優れた酵素を分泌することが知られており、なかでも β-glucosidase I（BGL1）は、セロビオースの分解に優れている。われわれは本酵素を生産する目的で、組換えタンパク質生産用宿主として産業利用が行なわれている、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を宿主とした生産系を構築し、得られた酵素の機能解析を行った。

分裂酵母の高発現遺伝子型コドン使用頻度に合わせた BGL1 遺伝子を全合成し、発現カセットを作製ののち、染色体に組み込んだ。分泌シグナルも、分裂酵母高分泌型のものに置換した。その結果、pNPG 分解活性として 0.85 U/ml の培養上清が得られた。SDS-PAGE によって解析したところ、BGL1 と思われるバンドが分子量 220 000 程度の移動度を示した。N-結合型糖鎖除去によってバンドが低分子側にシフトしたため、天然のものとは異なる過剰の糖鎖付加がなされていると考えられた。精製品を用いた検討から、この糖鎖は比活性には影響しないことが確認された。さらに培養方法を、炭素源であるグルコースを流加するフェドバッチ法に変え、ジャーファーメンターを用いて培養した。その結果、生産レベルが約 300 U/ml に向上した。

このようにして得られた BGL1 を市販のセルラーゼ製剤に添加し、その効果に関して検討を進めている。たとえば Accellerase DUET に BGL1 を 5U, 10U, 25U 添加した反応系を構築し、広葉樹晒クラフトパルプの糖化実験を行った（バイオマス濃度 10%、酵素濃度 5%、50℃、24h、反応系 50ml）。その結果、BGL1 の添加量に依存した糖収量の向上が確認された。われわれは別途、グルコース阻害緩和・耐熱化の観点で、BGL1 の変異体を作製している。これらについても野生型のものと同様の添加効果がみられた。

Schizosaccharomyces pombe, Aspergillus aculeatus, ß-glucosidase

講演番号：2C12p17
講演日時、会場：3 月 25 日 17:12～ C 校舎 12 会場

バイオマス完全糖化を目指したβ-グルコシダーゼ導入組換え Trichoderma reesei 株構築
Construction of recombinant Trichoderma reesei strains expressing β-Glucosidase 1 for efficient biomass conversion

○平沢 大樹[1]、塩谷 幸樹[1]、中澤 光[1]、河合 哲志[2]、谷 修治[3]、川口 剛司[3]、岡田 宏文[1]、小林 良則[2]、森川 康[2]、小笠原 渉[1]([1]長岡技科大 生物、[2]JBA つくば研究所、[3]阪府大院　生命環)
○Hiroki HIRASAWA[1], Koki SHIOYA[1], Hikaru NAKAZAWA[1], Tetsushi KAWAI[2], Shuji TANI[3], Takashi KAWAGUCHI[3], Hirofumi OKADA[1], Yoshinori KOBAYASHI[2], Yasushi MORIKAWA[2], Wataru OGASAWARA[1] ([1]Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech., [2]JBA, [3]Osaka Pref Univ.)

【目的】

セルラーゼ・ヘミセルラーゼ高生産株である *Trichoderma reesei* は、工業用セルラーゼ生産菌として広く使用されている。しかし、*T. reesei* の β-グルコシダーゼ I (TrBGLI) 活性は低いことが報告されている。そこで当研究室では、TrBGLI よりセロビアーゼ比活性が約 10 倍高い *Aspergillus aculeatus* の BGLI (AaBGLI)を発現させることで、*T. reesei* の BGL 活性の改善を試みてきている。本研究では、発現能の異なるセルラーゼ関連遺伝子のプロモーターを用いて AaBGLI を発現させ、得られた形質転換体の酵素活性及びバイオマス糖化を測定し、総合的に糖化酵素を評価した。

【方法・結果】

*aabgl1*を各*xyn3*、*cbh1*、*egl1*プロモーター下にクローニングした形質転換用カセットを作成し、プロトプラスト-PEG法にて*T. reesei* PC-3-7を形質転換した。得られた形質転換体の生産する酵素をそれぞれJN11 (*xyn3*プロモーター利用：2010年度本大会にて報告)、JN12 (*cbh1*プロモーター)、JN13（*egl1*プロモーター：2011年度本大会にて報告）とした。また、培養時にキシランを添加し、セルラーゼとヘミセルラーゼの組成比を変化させた酵素（JN11H、JN12H、JN13H）も作成した。JN11において*aabgl1*は*xyn3*遺伝子と相同に組変わっており、XYNIIIを欠損する酵素となった。一方、JN12、JN13はゲノム上に非相同で組み込まれており、主要なセルラーゼの欠損は確認されなかった。各酵素のセロビアーゼ活性を測定した結果、PC-3-7と比較しJN11とJN12で約100倍、JN13で約250倍増強していた。さらに様々な前処理バイオマスを用いた糖化試験を行った結果、低ヘミセルロース含有バイオマスである水熱処理ユーカリや硫酸処理エリアンサスではJN11が高い糖化能を示した。一方、ヘミセルロースを多く含むNaOH処理エリアンサスを用いた場合は、JN13Hが高い糖化能を示した。JN12は本実験で用いた各前処理バイオマスに対してJN11とJN13より低い糖化能であった。以上のように、AaBGLIを異なる転写活性能をもつプロモーターで発現させることで、異なるBGLI活性とセルラーゼ活性をもつ酵素の作成に成功した。また、各前処理バイオマスに対して、各酵素は異なる糖化能を示したことより、今後はさらにAaBGLIの発現量をコントロールすることで、多様なセルラーゼ活性をもつ酵素ライブラリーの構築を行っていく予定である。

Cellulase, Biomass, Saccharification

講演番号：2C12p18
講演日時、会場：3 月 25 日 17:24～ C 校舎 12 会場

バイオマス分解に必要な *Trichoderma reesei* 糖化酵素の選抜
Selection of saccharifying enzymes from *Trichoderma reesei* for biomass degradation
○小松 光子[1]、三井 勇輔[1]、長野 まどか[1]、吉村 聖也[1]、齋藤 勇司[1]、中澤 光[1]、二階堂 満[2]、戸谷 一英[2]、小笠原 渉[1]、森川 康[1]、岡田 宏文[1] ([1]長岡技科大・生物、[2]一関高専・物質工)
○ Mitsuko KOMATSU[1], Yusuke MITSUI[1], Madoka NAGANO[1], Seiya YOSHIMURA[1], Yuji SAITO[1], Hikaru NAKAZAWA[1], Mitsuru NIKAIDO[2], Kazuhide TOTANI[2], Wataru OGASAWARA[1], Yasushi MORIKAWA[1], Hirofumi OKADA[1] ([1]Nagaoka Univ Technol, [2]Ichinoseki Natl College Technol)

【目的】*Trichoderma reesei* はセルラーゼ・ヘミセルラーゼ高生産菌として知られており、バイオエタノール生産などのセルロース系バイオマスを原料とした産業への利用が期待されている。*T. reesei* はセルロース系基質を炭素源として培養した際に、セルラーゼとしてセロビオハイドロラーゼ(CBH I, II)、エンドグルカナーゼ(EG I , II, III, V)、β-グルコシダーゼ(BGL I)およびポリサッカライドモノオキシゲナーゼ(PMO I, II)を、ヘミセルラーゼとしてキシラナーゼ(XYN I～IV)、キシログルカナーゼ(EG VI)、β-キシロシダーゼ(BXL I)、α-L-アラビノフラノシダーゼ(ABF I～III) およびα-グルクロニダーゼ(GLR I)を分泌生産している。当研究室では *T. reesei* の生産するこれら多種多様なセルラーゼ・ヘミセルラーゼの中からセルロース系バイオマス分解に必要な酵素の選抜を行い、必要な酵素を用いて酵素系を再構築するよりセルロース系バイオマス分解の効率化を目指している。そこで、本研究ではこれら酵素遺伝子の破壊株を構築し、破壊株培養上清を用いてバイオマス糖化への影響を調査した。
【方法】目的遺伝子の ORF に *Aspergillus nidulans* 由来のアセトアミダーゼ遺伝子 *amdS* を挿入することで破壊用の DNA 断片を構築し、*T. reesei* PC-3-7 株をプロトプラスト-PEG 法により形質転換し、アセトアミド資化能による選択をかけ形質転換候補株を得た。得られた候補株は FTA カードを用いた PCR およびサザンブロットにより破壊株であることを確認した。現在までに構築した破壊株は*Δcbh1*、*Δcbh2*、*Δegl1*、*Δegl2*、*Δegl3*、*Δegl5*、*Δbgl1*、*Δpmo1*、*Δpmo2*、*Δxyn1*、*Δxyn2*、*Δxyn3*、*Δxyn4*、*Δegl6*、*Δbxl1*、*Δabf2*、*Δglr1* である。これら破壊株を 1% Avicel と 0.5% Beechwood xylan を炭素源とした培地で生育させ、培養上清を取得した。得られた培養上清をコンバージミル処理したスギ、ナラ、イナワラ、タケの 4 種のバイオマスに対して 50ºC、24 時間反応させて生じた還元糖量や単糖量を測定し、野生株との比較を行った。
【結果】セルラーゼ遺伝子破壊株のうち*Δcbh1*、*Δcbh2* はどのバイオマスに対しても生成糖量の減少が顕著であったが、バイオマスによって減少の傾向が異なった。*Δegl1*、*Δegl2*、*Δpmo1* も影響が見られたが、*Δegl3*、*Δegl5*、*Δpmo2* はどのバイオマスに対してもほとんど影響がなかった。ヘミセルラーゼ遺伝子破壊株では特に*Δbxl1* の影響が顕著であった。*Δxyn1*、*Δxyn3*、*Δxyn4* はバイオマスによって影響の有無が異なり、*Δxyn2*、*Δegl6*、*Δglr1*、*Δabf2* はどのバイオマスに対してもほとんど影響は見られなかった。*Δabf1* と*Δabf3* に関しては現在構築を行なっているところである。

Trichoderma reesei, cellulase, hemicellulase

講演番号：2C12p19
講演日時、会場：3 月 25 日 17:36～ C 校舎 12 会場

Trichoderma reesei β-キシロシダーゼの酵素化学的性質の解明
Characterization of *Trichoderma reesei* be-ta xylosidase
○山下 景子[1]、齋藤 勇司[1]、小松 光子[1]、二階堂 満[2]、戸谷 一英[2]、岡田 宏文[1] ([1]長岡技科大、[2]一関高専)
○Keiko YAMASHITA[1], Yuji SAITOU[1], Mitsuko KOMATSU[1], Mitsuru NIKAIDOU[2], Kazuhide TOTANI[2], Hirohumi OKADA[1] ([1]Nagaoka Univ Technol, [2]Ichinoseki Natil Coll Technol)

【目的】糸状菌 *Trichoderma reesei* はアビセルとキシランで培養した際に、多くのセルラーゼ、ヘミセルラーゼを生産することが知られている。*T. reesei* が生産するヘミセルラーゼの中でキシラン分解酵素は、キシラン主鎖を切断するキシラナーゼ(XYN) 4 種、キシロオリゴ糖をキシロース単位で分解する â-キシロシダーゼ(BXL) 2 種、側鎖のα-グルクロン酸や L-アラビノースをそれぞれ遊離するα-グルクロニダーゼ(GLR) 1 種、α-アラビノフラノシダーゼ(ABF) 3 種が存在する。各キシラン分解酵素の単独遺伝子破壊株を作製し、アビセルとキシランで培養した培養上清を用いて木質バイオマス(スギ、ナラ、タケ、イナワラ)の糖化を行ったところ、野生株と比較して BXL I 遺伝子破壊株(Δbxl1)のみ、生成キシロース量の減少が見られた。さらに、*p*-nitrophenyl â-D-xylopyranoside(*p*NPβXyl)分解活性測定をしたところ、Δbxl1 ではほとんど活性が見られなかった。このことから BXL I が *T. reesei* 培養上清中のキシロシダーゼ活性の大半を担っていることが示された。以上の結果から、BXL I が糖化において重要な役割を担っていることが推察された。BXL I は GH ファミリー3 に属しており、アミノ酸配列から推定される分子量は 85.3 kDa である。本研究では、酵母 *Pichia pastoris* を宿主とした BXL I の発現と、酵素化学的性質の解明を試みた。
【方法・結果】*P. pastoris* 発現ベクターである pPICZC のマルチクローニングサイト内の EcoR I から SnaB I の間に、シグナル配列を含む *bxl1* 遺伝子を挿入し *P. pastoris* X-33 の形質転換を行った。得られた形質転換体を 24 時間ごとにメタノールを添加し、培養したところ、5 日目の培養上清で 1.9U/mL-broth の *p*NPβXyl 分解活性が見られた(発現量 36 mg/L-broth)。この培養上清を用いて 70-80%硫安沈殿を取得し、10mM 酢酸 Buffer(pH5.0)に溶解した。次いで、30%飽和硫安を加えた酢酸 Buffer(pH5.0)で平衡化した butyl Sepharose FF に硫安沈殿溶解液をアプライし、30%～0%飽和硫安溶液で溶出させて精製酵素を得た。各画分の *p*NPβXyl 分解活性を測定し、活性が見られた画分を集め SDS-PAGE を行ったところ、分子量が 102 kDa のほぼ単一のバンドが見られた。精製酵素の酵素化学的性質を調べた結果、至適 pH は 5.0 であり、比活性は *p*NPβXyl を基質とした際に 53 U/mg であった。基質特異性は、*p*NPβXyl 分解活性 100%に対し、*p*NPαAra、*p*NPβGlc 分解活性は、それぞれ 12%と 1%であった。一方、*p*NPβMan と *o*NPβGal 分解活性は検出限界以下であった。現在、pH および温度安定性を調べている。さらに、Δbxl1 培養上清に組換え BXL I を添加し木質バイオマスを糖化することにより BXL I の必要量を明らかにする予定である。

Trichoderma reesei, be-ta xylosidase, biomass

講演番号：2C12p20
講演日時、会場：3 月 25 日 17:48～ C 校舎 12 会場

理研バイオリソースセンターが提供する超好熱古細菌由来遺伝子をはじめとしたセルラーゼ関連遺伝子

Cellulase genes from Pyrococcus and other lelated genes at the RIKEN BioResource Center

○岸川 昭太郎[1,2]、小田切 正人[2]、雪 真弘[2]、久次米 夕佳里[1]、益崎 智子[1]、守屋 繁春[2]、大熊 盛也[2]、村田 武英[1]、小幡 裕一[1,2]([1]理研 BRC、[2]理研 BMEP)
○ Shotaro KISHIKAWA[1,2], Masato OTAGIRI[2], Masahiro YUKI[2], Yukari KUJIME[1], Satoko MASUZAKI[1], Shigeharu MORIYA[2], Moriya OHKUMA[2], Takehide MURATA[1], Yuichi OBATA[1,2] ([1]RIKEN BRC, [2]RIKEN BMEP)

近年の世界的なエネルギー問題よって化石燃料に代わるものとしてバイオマスからの燃料やプラスチックの生産が重要な課題となっている。加えて、食料と競合しないリグノセルロース系バイオマスから燃料やプラスチックの原料となる糖を十分量得る必要がある。セルラーゼはリグノセルロース系バイオマスから糖を得る際に欠かせない因子であるが、現在のセルラーゼに関する理解は進んでおらず、産業利用に十分なリグノセルロース系バイオマスの糖化技術は確立されていない。そのためセルラーゼの詳細な作用機構を解析し、新規遺伝子の発見や遺伝子改変などによる高活性セルラーゼを収集することおよび安価に大量のセルラーゼを得る技術を開発することが急務となっている。

理研バイオリソースセンター（BRC)ではバイオマス工学の発展とエネルギーや環境問題解決貢献するため、バイオマスの糖化に重要なセルラーゼとその関連遺伝子を収集し、提供している。これまでに 20 種類の *Trichoderma reesei*（*Hypocrea jecorina*)由来のセルラーゼやヘミセルラーゼを含むバイオマス糖化に必要な遺伝子ならびに、それら遺伝子の大腸菌発現用プラスミド 34 種類を整備し研究者に提供している。

高温下で酵素反応を行う事ができ、反応温度の調整がしやすく、雑菌等の混入の影響を受けることが少ない耐熱性酵素の特性は、産業化の際大きな利点になる。当センターでは、ゲノムデータを元に超好熱古細菌パイロコッカス属由来のセルラーゼ（エンドグルカナーゼ）遺伝子 5 種類を新たに収集し、それら遺伝子ならびにそれらを大腸菌発現用プラスミド（HAT タグ付加）にサブクローニングした 15 種類の提供を始めている。さらに提供するプラスミドの情報として、遺伝子の全塩基配列、遺伝子領域を増幅する際の PCR 等の条件、個々遺伝子の大腸菌での発現検討の条件などを当センターホームページ上で公開している（http://dna.brc.riken.jp/en/biomass.html)。

本大会では、当センターのバイオマス関連遺伝子群と新たに提供を始めた *Pyrococcus* 属由来セルラーゼ遺伝子を紹介する。また、*Pyrococcus* 属由来セルラーゼ遺伝子を大腸菌で発現させ、酵素活性が認められたエンドグルカナーゼ 2 種（HAT-PF0854 と HAT-PH1171)の至適温度や至適 pH などの酵素特性に関して報告する。

・ 理研バイオリソースセンター（BRC)：http://www.brc.riken.go.jp/
・ 理研 BRC 遺伝子材料開発室：http://dna.brc.riken.jp/ja/

Cellulases, Pyrococcus, Biomass

講演番号：2C32p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ C 校舎 32 会場

化学プロファイリングにより水圏環境の変動情報を捉える試み　ープローブ魚類の組織別傾向ー
Evaluating aquatic environments based on chemical profiling -Tissue specificity in probe fish-

○菊地 淳[1,2,3,4]、葭田 征司[3]、伊達 康博[1,3]([1]理研 PSC、[2]理研 BMEP、[3]横市院生命、[4]名大院生命農)
○Jun KIKUCHI[1,2,3,4], Seiji YOSHIDA[3], Yasuhiro DATE[1,3] ([1]RIKEN PSC, [2]RIKEN BMEP, [3]Yokohama City Univ., [4]Nagoya Univ.)

科学研究の現場では、計測を行い数値化したデータを得ることで、暗黙知から形式知への転換を成し遂げてきた。古くは天文学や地球科学等々、実験室内では到底再現できない、対象がグローバルで暗黙知の世界であればある程、計測データがコペルニクス的転換を創出するケースも多いと言えよう。他にも生命進化、社会生物学等の実験室では再現できない生命科学の暗黙知領域において、やはり計測科学の貢献は大きい。特に前世期後半より勃興した、核酸の配列解析という分子レベルでの増幅技術・高速計測・情報抽出の技術革新は記憶に新しい。我々は、今世紀に残された生命科学の重要課題が、“環境科学”であると考え、上述のような研究哲学を推進している[1,2]。つまり、生命と機械を隔てる大きな特徴が環境への化学的適応であるため、無機物群・有機物群（低分子と高分子）の一斉計測から対象生物の化学プロファイリング技術を高度化することで、外部環境の変化と対象生物の適応戦略とを関連付けようとしている。既に初歩的な試みとして、水圏環境の微生物・藻類複合系[3]や、海藻類[4]の化学プロファイリングについては報告した。しかし生物多様性のある植物界、動物界から膨大な種を計測対象とすることは採集、労力、計測時間、情報解析のあらゆる点で非効率的であろう。そこでプローブ生物を定めつつ、自然環境では時空間を選定した試料採集とを組み合わせ、実験室では適切な試料調製法と計測、および情報解析法を高度化することで、独創的で新規性の高い環境科学アプローチを提案していきたいと考えている。本講演では、水圏に対する環境科学への初歩的な試みとして、懸案の動物界から３魚種のプローブ生物候補を用い、適切な試料調製法を議論する場としたい。特に動物においては、組織毎に高度な機能分化がなされており、応じて化学組成や個体差の変動具合も異なる。我々の初歩的な計測データからは、ICP-OES 法を用いて得た無機物群の個体変動はヒレや骨部位といった代謝ターンオーバーの長い組織ほど大きく、一方で NMR 法を用いて得た有機物群のそれは消化器官を除けば肝臓や筋肉部位といった代謝ターンオーバーの短い組織で顕著であった。これらの結果は、魚類をプローブ生物として化学プロファイリングを行う場合、組織と計測法を適切に選ぶことで対象生物の成長段階までに関わる年・月単位、あるいは週・日単位といったタイムスケールの異なる環境変動の情報を抽出できる可能性が見出されたと考える。

＜参考文献＞: [1]Kikuchi et al. (2011) J. Ecosys. Ecogr. S2, 001; [2] Ogata et al. (2012) PLoS ONE 7, e30263 [3] Everroad et al. (2012) J. Vis. Exp. e3163; [4] Date et al. (2012) Polymer J. 44, 888-894.

environmental metabolomics, environmental ionomics, data minning

講演番号：2C32p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ C 校舎 32 会場

プローブ生物と水泥の化学プロファイル相関に基づく水圏環境評価技術の構築

Methodological investigation for evaluating chemical profiling relationship between probe organism and aquatic environment

○葭田 征司[1]、朝倉 大河[1]、伊達 康博[1,2]、菊地 淳[1,2,3,4]([1]横市院生命、[2]理研 PSC、[3]理研 BMEP、[4]名大院生命農)
○Seiji Yoshida[1], Taiga Asakura[1], Yasuhiro Date[1,2], Jun Kikuchi[1,2,3,4] ([1]Yokohama City Univ., [2]RIKEN PSC, [3]RIKEN BMEP, [4]Nagoya Univ.)

【背景及び目的】

ヒトは水圏環境から人類の生存基盤とでも言えよう様々な物質や機能を享受している。その多大なる恩恵を維持し、持続的に享受し続けるためには水圏環境評価技術が重要である。現存の評価方法では、水質等を指標とした化学的評価と、絶滅危惧種や特定生物などの生物数を指標とした生物学的評価がなされているが、水圏環境中における水棲生物は種々の環境要因に巧みに応答し、恒常性を維持しており、水棲生物を取り囲む種々の環境要因を反映した水棲生物の生体成分変動を調べることが水圏環境の本質を知ることができると著者らは考えている。本研究では、水圏生態系におけるプローブ生物とそれを取り巻く環境との関係性を捉える方法論の確立を目的とし、自然環境中での魚類とその棲息環境（底泥、河川水等）との複雑な関係性を紐解くためのデータマイニング法について検討した。

【方法及び結果】

本研究では、水圏環境評価のためのプローブ生物として、河川の水圏食物連鎖における一次消費者で、水棲環境域が狭いスズキ目ハゼ科であるマハゼに着目した。まず魚類各器官における代謝組成にどの程度多様性があり、あるいは環境応答と連動してどの程度摂動するかを調べるために、各器官の代謝プロファイルを^{1}H-NMRにより、またミネラルプロファイルをＩＣＰ－ＯＥＳにより評価した。その結果、代謝物およびミネラル組成は器官ごとに特徴的なプロファイルを示し、魚類の筋肉部と内臓部に代表される二グループの違いをもつことが観察された。上記の結果を踏まえ、東北地方および関東近郊の河川に生息するハゼ科魚類を対象として同様の解析を行ったところ、各河川の環境情報を反映した代謝プロファイルおよびミネラルプロファイルを取得することが可能であった。同様に、これら魚類の生息環境に関する特徴を調べるため、底泥や河川水を対象としたミネラル組成解析を行ったところ、河川ごとに異なるミネラルプロファイルを示した。本会では、魚類とそれを取り巻く環境データとの関係性を統合的に解析・評価可能なデータマイニング法についても議論したい。

Environmental metabolomics, Evaluation of aquatic environment, Data mining

講演番号：2C32p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ C 校舎 32 会場

耐塩性微細藻類フォルミジウムを用いた水田除塩試験

Clarification of salt removal mechanism at rice paddy using phormidium as halotolerant microalgae

○寺本 和史[1]、勝田 祐平[1]、西島 純基[2]、鷲見 亮[2]、森 伸夫[2]、木村 一彦[3]、吉本 博明[4]、瀬山 智子[1]、江口 文陽[1]、飯島 倫明[1]([1]東京農業大学、[2]（株）日健総本社、[3]農業、[4]マッシュテック（株））
○Kazuhito TERAMOTO[1], Yuhei KATUTA[1], Jyunki NISHIJIMA[2], Ryo SUMI[2], Nobuo MORI[2], Kazuhiko KIMURA[3], Hiroaki YOSHIMOTO[4], Tomoko SEYAMA[1], Fumio EGUCHI[1], Tomoaki IIJIMA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agr., [2]NIKKEN SOHONSHA Co.,Ltd.,, [3]Agr., [4]Mush・Tec Co.,Ltd.,)

2011 年 3 月 11 日に発生した観測史上世界 4 番目の規模となる東日本大震災により東北地方や関東地方は甚大な被害を受けた。地震に伴う大津波は東北地方と関東地方の太平洋沿岸部を襲い 23, 600ha の農地が塩害などに見舞われた。（東北農業研究センター発表）農地の塩害は深刻で、現在も作付ができないところが大半である。作付可能地を早急に増やすために効率的な除塩方法の実現が求められている。

2011 年秋に仙台市の津波被災水田で 4 週間の実証試験を行い塩分吸収能の高い藍藻類であるフォルミジウムとミネラル緩衝作用を有する紙残渣を用いた開発資材が除塩に効果的であることを見出した。すなわち津波堆積物を除去して耕起、湛水した後、10a あたり開発資材 5kg、クロレラ肥料 10kg を施用し、クロレラ肥料は 2 週間後にも追肥した。同条件の農地で農林水産省が推奨する石灰資材を施用する対照区も設け石灰を 200kg 施用後に湛水した。2 週間と 4 週間後の 2 回代かきと排水を行い土壌塩分濃度を測定した。その結果、2 週間後の開発資材施用区の土壌塩分濃度は水稲の作付が可能な 0.10%以下に下がったが、石灰資材施用区は最も低下した場所でも 0.18%に留まった。さらに、土壌の窒素量は石灰資材施用区では除塩前の半分に減少し、微生物数も低下したが開発資材施用区は窒素、リン酸、カリの減少もなく土壌微生物も 3 倍に増加した。これらの結果から微細藻類を用いた塩害土壌改良効果は除塩後新たな施肥を必要としない除塩法であることを確認した。

本研究では開発資材が除塩に効果を発揮するメカニズムを解明するためフォルミジウムが培養液中および水田耕作地で増殖する過程での塩分の取り込み機構と細胞内への蓄積量等を解析した。

さらに、群馬県高崎市内の水田に食塩を散布し人工的に塩害水田(Na 濃度 1.2%程度)を再現し除塩資材が土壌や稲に与える影響を比較した。水田は 1 区画 2a として通常の無塩害水田(コントロール)、塩害モデル水田には除塩資材無施用区、石灰資材 20kg 施用区およびフォルミジウム資材 10kg 施用区として除塩試験を実施した。定植前に代かきと排水を 2 回実施し耐塩性品種でもある飼料用米「モミロマン」を(7 月 18 日)植え、追肥せずに栽培した。フォルミジウム施用区の土壌塩分濃度は仙台での試験と同様に石灰資材散布区よりも早く土壌塩分濃度が作付可能な濃度に下がり、定植直後にはもとの土壌と同様に改善された。フォルミジウム施用区の特徴を石灰施用区と比較すると土壌微生物数は約 10 倍、土壌硬度は前者が中央値で 4.35kg/cm^2 であるのに対して後者は 11.33kg/cm^2 であった。フォルミジウムは培養過程で細胞内に Na を取り込みながら増殖することも確認されていることから水田の水面に浮遊し Na を蓄積しながら増殖して排水経路から Na を排除したことがわかる。現在、土壌構成要素等を詳細に解析しているのでその結果を報告する。

Tohoku earth quake, Salt removal, Microalge

講演番号：2C32p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ C 校舎 32 会場

フォルミジウム資材によって除塩した水田でのモミロマンの生産
Cultivation of the rice plant “momiroman” at rice paddy of salt removed by phormidium materials
○勝田 祐平[1]、寺本 和史[1]、西島 純基[2]、鷲見 亮[2]、森 伸夫[2]、木村 一彦[3]、吉本 博明[4]、瀬山 智子[1]、江口 文陽[1]、飯島 倫明[1] ([1]東農大、[2](株)日健総本社、[3]農業、[4]マッシュ・テック(株))
○Yuhei KATSUTA[1], Kazuhito TERAMOTO[1], Junki NISHIJIMA[2], Ryo SUMI[2], Nobuo MORI[2], Kazuhiko KIMURA[3], Hiroaki YOSHIMOTO[4], Tomoko SEYAMA[1], Fumio EGUCHI[1], Tomoaki IIJIMA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agr., [2]NIKKEN SOHONSHA Co.,Ltd., [3]Agr., [4]Mush・Tec Co.,ltd.)

前報(寺本ら)要旨においても記載したとおり東日本大震災後の津波による海水による浸水農地（水田）の塩害を低減化（除塩）とともに農地の持続性、生産性を向上させる天然物資材による土壌改良方法を開発することを目的として本研究を実施した。

群馬県高崎市内にある水田に食塩を散布し人工的に塩害モデル水田(Na 濃度 1.2%程度)を再現し、除塩資材が土壌や稲に与える影響を検討した。水田は 1 区画 2 a として通常の無塩害水田(コントロール)、塩害モデル水田には除塩資材無施用区(塩コントロール)、石灰資材 20 kg施用区およびフォルミジウム資材 10 kg施用区で除塩試験を実施した。定植前に代かきと排水を 2 回実施し耐塩性品種でもある飼料用米「モミロマン」を(7 月 18 日)植え、追肥せずに栽培した。フォルミジウム資材施用区は定植から 3 週間後、土壌の塩分濃度を著しく低下させた。他の塩害モデル水田も定植時には Na0.5%までには除塩が進んでいた。これらの試験区でのモミロマンの生育状況を詳細に調査しフォルミジウム資材による除塩効果とともに生産性について検討した。定植後各区で著しい成長の違いはなかったが、石灰資材区では草丈がやや短い傾向が観察された。収穫調査として坪刈りを行って草丈、最大稈長、穂数、籾数、1 株あたりの籾数と穂重量、籾乾燥重量、飼料としての生産重量などを調査した。その結果、石灰資材施用区は各調査項目で他の施用区よりも悪い結果が得られた。フォルミジウム施用区は、籾数は無塩害水田コントロール区と同様で、塩+石灰区より著しく高かった。また、籾の乾燥重量は、すべての試験区よりも高かった。すなわち塩害農地で、土壌の塩を利用してフォルミジウムが増殖し、土壌微生物の総数を増やすことにより土壌硬度を低下させ根系組織を十分に成長させて土壌中の栄養素を利用した作物の健全化と増収に寄与したことが推測される。現在、飼料稲としての評価をアミノ酸組成なども検討項目に加えて分析を行っており、それらの詳細な結果を報告する。



写真１ 塩害試験区の根の比較
1:コントロール、2:塩コントロール、
3:石灰資材、4:フォルミジウム資材


写真２ フォルミジウムの水田での増殖

salt removal, the Tohoku earthquake, cultivation of rice

講演番号：2C32p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ C 校舎 32 会場

東日本大震災被災地住民の屎尿処理高効率化のための汚泥複合微生物相の解析
Analysis of bioconsortia sludge for human waste efficient treatment , for the East Japan Earthquake disaster area residents
○鬼頭 昌久[1]、水野 康弘[1]、倉根 隆一郎[1]、紺野 充弘[2]、橘 峰生[3]、植地 俊仁[3]、安部 剛[3]([1]中部大学院応生、[2]釜石大槌地区行政事務組合、[3]クボタ環境サービス(株))
○ Masahisa KITO[1], Yasuhiro MIZUNO[1], Ryuichiro KURANE[1], Mituhiro KONNO[2], Mineo TACHIBANA[3], Toshihito UECHI[3], Tsuyoshi ABE[3] ([1]Chubu Univ., [2]Kamaishi-Ozuti,Iwate, [3]Kubota Environmental Service Co., Ltd.)

【目的】生物学的屎尿処理法である活性汚泥法は、従来型エンジニアリングアプローチでは既に円熟の域に達しており、今後屎尿処理の高効率化を図る上ではバイオからのアプローチを加えることが必要不可欠である。そのような問題がある中で 2011 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災による大津波の被災地である岩手県釜石市では、下水道施設の壊滅的被害を受け、仮設住宅の建設により山間部用の屎尿処理施設である釜石・大槌汚泥再生処理センターに負担が集中し長期化していることから、屎尿処理の更なる高効率化が求められている。現在同施設で ASB 剤添加による活性汚泥中の微生物相の最適化を行っている。本研究では、釜石・大槌汚泥再生処理センターでの ASB 剤添加による誘導効果、活性汚泥中の微生物、活性汚泥中の菌相の変化を調べることを目的とした。
【方法】釜石・大槌汚泥再生処理センターにて ASB 剤による微生物相の誘導を行い PCR－DGGE 法により微生物相の変化を解析した。4 ヶ所の屎尿処理施設と比較検討した。また、同活性汚泥中の酵素活性の変動を調べるためαーアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼの酵素活性を測定し、さらに 19 種の酵素について活性の定性判定を行った。更に活性汚泥中に含まれる微生物の中で、プロテアーゼ等各種酵素活性が高いといわれている *Bacillus* 属に注目し、コロニーカウントを行い *Bacillus* 属生菌数の変動を調べた。同時に活性汚泥を用いた放流水水質の変化を調べ ASB 剤加による屎尿処理への影響を調べた。
【結果】ASB 剤添加による菌相の変動を PCR-DGGE 法を用いて解析した結果、汚泥の高効率化の指標の一つである汚泥沈降性と複合微生物系誘導微生物との正の相関性が示された。酵素活性を測定した結果、誘導によりプロテアーゼ活性に最大で 2 倍の活性値(U/g-ss)が見られた。19 種の酵素の中で唯一活性が低下したシスチンアリルアミダーゼはジスルフィド結合によりたんぱく質の 3 次構造に重要な役割を持つシスチンを分離する酵素であり、この活性の低下が他の酵素に影響を及ぼした可能性が示唆された。放流水 BOD, COD を測定したがいずれも変化はなく環境基準値を下回っていた。

human-waste treatment, activated sludge, bioconsortia

講演番号：2C32p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ C 校舎 32 会場

被災地ヘドロや琵琶湖ヘドロからの難分解性物質分解菌の探索

Characterization of the persistent material degrading bacteria from sludge

○原 悠大、原田 美樹、福田 青郎、今中 忠行（立命館大生命）
○Yudai Hara,Miki Harada,Wakao Fukuda,Tadayuki Imanaka (Ritsumeikan Univ.)

【目的】現在琵琶湖の水は多くの人に利用されているが、近年、生活廃水等の流入により富栄養化が進み、水質の汚濁が進んでいる。この富栄養化によって増殖したプランクトンの死骸や、木質系の枯れ枝や落ち葉等が多く湖底に溜まり、ヘドロ堆積の一因となっている。ヘドロは土砂と様々な有機物等が堆積してできたものであり、分解することは困難である。しかしヘドロ中には有機物の他に有害物質であるアンモニアや硫化水素も含まれており、これらが悪臭の原因にもなっているために放置することはできない。そこで本研究では、琵琶湖のヘドロを始めとした様々なヘドロを微生物の力を用いて分解することを目的とし、ヘドロ中に含まれると考えられる難分解性物質の分解菌の取得及びその機能解析を試みた。

【結果】琵琶湖のヘドロ及び東日本大震災被災地・石巻市から得られたサンプル等の環境サンプルより、ヘドロと水のみの培地で生育できるヘドロ成分分解菌を、好気条件下で計 61 種類単離した。単離できた菌株について、ヘドロのみを含む培地での生育曲線を作成した。その中で生育の良かった菌株について、TC（全炭素量）測定によるヘドロの分解能の検証を行った。菌株をヘドロのみを含む培地にて好気条件下 25℃で 1 週間培養した後、培地を遠心し上清を捨て、沈殿したヘドロ及び菌体を乾燥させ TC を測定したところ、菌体を植菌しなかったブランクと比べ、TC の減少が確認できた。

次に得られた菌株について、それぞれの難分解性物質分解能の検討を行った。まずヘドロ成分の確認のために、ヘドロ中に含まれている多糖類を確認した。ヘドロ中の糖をトリフルオロ酢酸で加水分解を行い、HPLC に供与し分析した所、主としてグルコースの存在が認められ、ヘドロ中にはグルコースを構成糖とする多糖が多く含まれていることが示唆された。この結果を受けてヘドロ中に存在すると予想されるセルロースなどの難分解性多糖の分解能を調べることにした。これまでに単離してきたヘドロ分解菌についてセルロースやキシラン、キチン等の多糖を含有した寒天培地に植菌し、培養後コンゴーレッド染色による培地の分解帯を確認したところ、いくつかの菌株で各多糖に対する分解帯が見られ、難分解性多糖の分解能が示唆された。また、木質系難分解性物質であるリグニンの分解能についても検証を行った。リグニンを唯一の炭素源としたリグニン含有 M9 改変液体培地に複数のヘドロ成分分解菌を植菌した結果、複数の菌株で生育が確認された。さらにリグニン含有 M9 改変液体培地中での生育を測定するために、生菌数測定による生育曲線の作成を行った結果、良好な生育を示した菌株がおり、これらがリグニン分解能を有していることが示唆された。

bioremediation, sludge, Lake Biwa

講演番号：2C32p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ C 校舎 32 会場

ヤクルト容器を用いた排水処理システムの菌叢解析

Phylogenetic analysis of wastewater treatment system using Yakult containers

○渡邊 洋平、長井 冨美子、山本 修太、塚本 浩史、吉元 健司、白澤 幸生（（株）ヤクルト本社)
○YOHEI WATANABE, FUMIKO NAGAI, SYUTA YAMAMOTO, HIROSHI TSUKAMOTO, TAKESHI YOSHIMOTO, YUKIO SHIRASAWA (Yakult Honsya Co, Ltd.)

【目的】ヤクルト容器を担体として用いた排水処理システムは、多段式接触酸化水処理法である。活性汚泥法と比較して汚泥発生量の少ないことが特徴であり、工場や家庭の排水処理を中心に、国内外で 2,000 箇所以上の導入実績がある。一方で、その水浄化メカニズムは不明であった。これを明らかにするためには、本システム中に、どのような機能を持つ微生物が存在するのか明らかにする必要がある。そこで我々は、当社佐賀工場内の本システムより採取した試料を対象に、分子生物学的手法による菌叢解析を行った。
【方法】ヤクルト本社佐賀工場の排水処理施設には、処理槽が直列に 4 槽接続された本システムが導入されている。各槽から、処理槽水およびヤクルト容器を採取した。処理槽水中に浮遊していた汚泥（浮遊汚泥)、ヤクルト容器より容易に剥離した汚泥（剥離汚泥)、ヤクルト容器に強固に付着していた汚泥（固着汚泥）から DNA を抽出後、真正細菌を対象として DGGE 法による菌叢解析を行った。
【結果】菌叢解析の結果、同じ槽内において、浮遊汚泥、剥離汚泥および固着汚泥の菌叢はいずれも異なっていることが判明した。また、すべての槽において、浮遊汚泥には *Bacteroidetes* に属する菌種が、剥離汚泥および固着汚泥には *Proteobacteria* に属する菌種が優占していた。優占菌種の機能に着目すると、全て通性嫌気性菌であり、浮遊汚泥では糖質分解能を持つ菌種、剥離汚泥では硫酸塩または鉄還元能のある菌種、固着汚泥では硝酸塩還元能を持つ菌種であった。更に、浮遊汚泥、剥離汚泥、固着汚泥の菌叢には、それぞれの槽ごとに違いが見られた。以上の結果より、各槽ごとに菌叢は異なり、同一槽内においても浮遊汚泥、剥離汚泥、固着汚泥で菌叢が異なることが明らかとなった。このことから、本システムにおいては、担体に付着する菌種や浮遊する菌種、それぞれの槽の水質に適応した菌種等がシステム全体で共存し、これら多様な菌種が排水を浄化していることが推察された。

Wastewater treatment system, Phylogenetic analysis, DGGE

講演番号：2C32p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ C 校舎 32 会場

竹粉を用いた C 重油汚染土壌のバイオスティミュレーション

Bio-stimulation of C heavy oil contaminated soil using bamboo powder

○松井 稜太郎[1]、吉田 和樹[2]、大島 義徳[3]、椎葉 究[1]([1]東京電機大理工、[2]東京電機大理工、[3](株) 大林組)
○Ryotaro MATSUI[1], KIWAMU SHIBA[2], YOSHINORI OSHIMA[3], Kiwamu SHIIBA[1] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Tokyo Denki Univ., [3]OBAYASHI CORPORATION)

汚染された土壌や海洋を浄化する方法として、低コスト・低環境負荷のバイオレメディエーション方法が注目され、特に油汚染浄化へ適用例は多い。その中で、油汚染土を撹拌する等して好気的条件とし、さらに窒素やリンなどの無機養分を添加することで微生物を活性化させて油分を浄化するバイオスティミュレーション法は、安価で有効な処理方法となっている。ただし、汚染濃度がある程度低い場合しか適用できない点や難分解性油成分の分解が難しい点等の欠点もあり、更に改良が求められている。

筆者らは、油分分解を促進する有機質資材の探索を行う中で竹粉に注目した。竹は、余剰バイオマス資源となっていることから、環境資材としての有効利用が期待されている。また、竹粉は、主に繊維質の炭化水素であり、CN 比は高いが比較的易分解性でしかも土壌中で徐々に生分解されていく性質があること、そのため長期的な土質改善効果も期待できること、難分解性油成分に類似したリグニン成分もあることから分解微生物を誘導しやすい点等のメリットがある。竹粉の分解で増加した微生物が、重油類や作動油などの分解速度の遅い油分を同時に分解することで、結果として分解処理期間が短縮される効果が期待できる。安価で比較的入手が容易な竹粉の添加によって油分処理の工期短縮や、維持管理費等の工費削減も期待できる。以上のことから、C 重油模擬汚染土を用いて竹粉による C 重油分解促進効果について試験を行った。

（方法）

・山砂に C 重油を混合して模擬汚染土を作成した。(TPH で約 720mg/kg)
・竹粉として、孟宗竹を機械的に粗粉砕し 1.5 ㎝角の金属篩でスルーした粉砕物を用いた。
・小型の発泡スチロール箱（L14.5×D14.5×H25cm）に、模擬汚染土壌のみ（対照区）及び±竹粉(重量比 0.5、3%)±窒素肥料(同 0.1%)±リン肥料(同 0.1%)の試験区を作成して、C 重油残存量(TPH)、油膜・油臭測定、一般生菌数、油分解菌数等を測定した。

（結果）

・対照区では、油臭、油膜が 6 週間後も残留したが、竹粉を添加した試験区ではそれらの減少速度は増大した。6 週間目で竹粉添加区での油膜・油臭は、認められなかった。
・油分（TPH）も、対照区と比較して竹添加区では減少が早く、4 週間後で竹 0.5%添加区では 100ppm 以下となった。油分解菌数は開始時や対照区と比較して 2 週間後で 100 倍（10E7 CFU）となった。

Bioremediation, C heavy oil, TPH

講演番号：2C32p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ C 校舎 32 会場

塩素化エチレン類汚染環境の好気的生物修復の環境影響評価
Assessment of Effects to the Environment by Aerobic Bioaugmentation of Chloroethylene-contaminated Environment

○俵 陵輔[1]、山副 敦司[2]、細山 哲[2]、黄地 祥子[2]、山崎 秀司[2]、沼田 充[2]、関口 勇地[3]、野田 尚宏[3]、早津 雅仁[4]、下村 有美[4]、高畑 陽[5]、福田 雅夫[6]、山根 久和[7]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1] ([1]東京大院・生セ、[2]NITE、[3]産総研、[4]農環研、[5]大成建設、[6]長岡技術科学大学、[7]帝京大・バイオ)
○Ryosuke TAWARA[1], Atsushi YAMAZOE[2], Akira HOSOYAMA[2], Shouko OJI[2], Shuji YAMAZAKI[2], Mitsuru NUMATA[2], Yuji SEKIGUCHI[3], Naohiro NODA[3], Masahito HAYATSU[4], Yumi SHIMOMURA[4], Yo TAKAHATA[5], Masao FUKUDA[6], Hisakazu YAMANE[7], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]NITE, [3]AIST, [4]NIAES, [5]Taisei corp., [6]Nagaoka Univ. of Tech., [7]Teikyo Univ.)

【背景と目的】塩素化エチレン類は優れた有機溶剤として広く使用されてきたが、近年発がん性や中枢神経の麻痺などの問題点が指摘されている。これらの不適切な処理による土壌や地下水汚染が問題となっているため、これら汚染を低コストで浄化可能なバイオレメディエーションのニーズが高まっている。中でも外部から分解菌を導入するバイオオーグメンテーションはこれから益々の応用が期待されている。嫌気・好気処理を組み合わせた効率的、かつ実用化可能なバイオレメディエーション技術の確立を目指して、本研究では好気的バイオオーグメンテーションの環境への影響を評価した。
【方法】酸素で飽和させた地下水と地下土壌を混合したスラリー系を作成し、トリクロロエチレン（TCE）、*cis*-1,2-ジクロロエチレン（cDCE）により人工的に汚染させた。地下水と土壌には関西地区の実際の汚染水と汚染土を用いた。好気的塩素化エチレン分解菌として、ジメチルスルフィド（ジメチルスルフォキシド、DMSO）分解菌*Acinetobacter* sp. 20B株、カルバゾール分解菌*Pseudomonas resinovorans* CA10株、ビフェニル/PCB分解菌*Rhodococcus jostii* RHA1株の3株を用い、比較を行った。用いる土壌がシルト質か砂質か、汚染濃度が高いか低いか、用いる分解菌はどの株か、など様々な条件の違いによりどのようにバイオオーグメンテーションの成否や環境への影響が異なるかを調べるため、溶存酸素濃度、ATP濃度、有機酸濃度、TCE/cDCE残存量、pHをそれぞれ測定することで、系内の微生物の活動、酸素や栄養源の消費、塩素化エチレン類の分解などを継時的に追跡した。さらに、DNAを試料から直接抽出し、DGGEや次世代シーケンサーによるメタ16S解析を行うことで、微生物叢変化や既知分解菌／病原性微生物の存在をモニタリングした。
【結果】すべての実験条件において、酸素と有機酸の消費に伴う ATP 濃度の上昇、pH の上昇、TCE/cDCE の減少がみられた。DGGE による解析により時間経過とともに系内の微生物叢が変化することが確認された。さらに、メタ 16S 解析により菌叢内の優占種はβプロテオバクテリアとγプロテオバクテリアであり、その存在比が継時的に変化していくことを見出した。また、20B 株を分解菌として用いた実験においては、最初は添加した *Acinetobacter* 属がほぼ独占的に存在したが、次第にその存在割合が低下し *Pseudomonas* 属に取って代わられていく様を観察することができた。さらに、好気および嫌気的な既知分解菌の存在も確認することができ、病原性微生物の存在割合が最終的に低下することも見出した。CA10 株、RHA1 株を分解菌として用いた実験において得られた知見、またそれら結果と 20B 株を用いた実験結果との比較などを通じて、発表においてはさらに深く議論する。

bioremediation, bioaugmentation, chloroethylenes

講演番号：2C32p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ C 校舎 32 会場

1,4-ジオキサン汚染地下水の原位置浄化の基礎的検討

Fundamental study on in-situ remediation of groundwater contaminated with 1,4-dioxane

○大島 義徳[1]、松井 稜太郎[2]、椎葉 究[2]([1]（株）大林組、[2]東京電機大学)
○Yoshinori Oshima[1], Ryotaro Matsui[2], Kiwamu Shiiba[2] ([1]OBAYASHI CORPORATION, [2]TOKYO DENKI Univ.)

1,4-ジオキサン（以下、ジオキサン）は、環境や人の健康への影響を考慮し、2009 年 11 月に地下水環境基準と、公共用水域の水質汚濁に係る人の健康の保護に関する環境基準の項目に新たに加えられ（基準値 0.05mg/L)、さらに 2012 年 5 月には排水基準（0.5mg/L）も定められた。ジオキサンは、生分解性が低く、他の揮発性有機化合物に比べて揮発性も低い。また、水とは自由な比率で混ざる性質を持つなど、他の特定有害物質に指定されている有機物とは、大きく異なる性質を持っている。

現状で明らかになっている地下水の汚染事例は多くないものの、処分場周辺などでの報告がなされており、環境基準が定められたことにより、今後は、こうした汚染地下水を浄化する必要性が増加するものと予想される。これまでの有害物質とは異なる性状をもつジオキサンで汚染された地下水を浄化する方法については、まだ知見が少ない。そこで、我々はジオキサンで汚染された地下水を、適切に浄化するための方法について、模擬汚染水を用いた基礎的な検討を行った。

ジオキサンは、親水性であり土への吸着性は低いと予測されたことから、原位置洗浄法が有効であると考え、その適用性を評価するためにカラム通水試験を行った。その結果、他の有機物に比べて土から溶脱しやすい性質があり、原位置洗浄が十分に可能であることが分かった。合わせて、薬剤の添加により、浄化速度を速められることが示唆された。

次に、ジオキサンで汚染した水を処理する方法を検討した。ジオキサンは、フェントン反応などの酸化剤処理で処理が可能であることが知られている。フェントン反応と過硫酸塩による酸化分解に適した条件を調べた。現在までの検討で、酸化剤による処理は可能であることが確認し、必要薬剤量などを推定した。

上述のような試験結果をもとに、原位置通水洗浄と組み上げ水の浄化によるジオキサンの浄化が可能であると考えた。通水洗浄試験や各種酸化分解試験の結果とともに、実用化可能と想定した浄化方法を紹介する。

dioxane, groundwater remediation

講演番号：2C32p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ C 校舎 32 会場

ダイオキシン汚染サイトの浄化システムの開発へ向けた環境細菌に対する分解プラスミドの接合伝達実験

Study on conjugal transfer of degradative plasmid between environmental bacteria to develop a system to detoxify dioxin-contaminated site

○小林 達弥、福田 洸平、飯田 健義、秋田 成美、新谷 政己、金原 和秀（静岡大院工）
○Tatsuya Kobayashi,Kohei Fukuda,Takeyoshi Iida,Narumi Akita,masaki Shintani,Kazuhide Kimbara (Shizuoka Univ.)

【背景・目的】ダイオキシン類による広範囲にわたる土壌・水圏の汚染は，世界各地で今なお深刻な環境問題を引き起こしている．このような汚染サイトを浄化する上のコスト面を考えると，人為的に選抜したダイオキシン分解力をもつ微生物を汚染サイトに移植するバイオオーグメンテーションが望ましいが，その確度が低いという問題がある．そこで本研究は，汚染除去の確度を高める手法開発の一環として，ダイオキシン分解菌由来の分解能力を，接合伝達性プラスミドを介して汚染サイトの土着菌に伝播させる浄化システムを構築し，本システムの有効性を評価することを目的とした．
【方法】ダイオキシン類分解プラスミド pCAR1 の 6.9 kb のダイオキシン類分解遺伝子群 *carABC* を，広宿主域で接合伝達頻度の高いプラスミド pBP136 の *Xba*I サイトに挿入し，プラスミド pHKA1 を作製した．さらに pHKA1 の *Bam*HI サイトにカナマイシン(Km)耐性遺伝子を挿入したプラスミド pHKA1::Km を作製して *Pseudomonas putida* KT2440 株を供与菌とし，*P. fluorescens* Pf0-1 株，*P. resinovorans* CA10dm4 株，*P. putida* PpY101 株を受容菌とした．また，静岡県浜松市の佐鳴湖より採取した湖水を孔径 0.22 μm のフィルターでろ過後，終濃度 0.1 mM のカルバゾール（ダイオキシンの構造類似体）を添加して，モデル汚染環境水とした．その後，50 ml の佐鳴湖水に供与菌と受容菌（10^6 と 10^8 CFU/ml ）を接種し，30℃で 15 日間静置した．0, 1, 3, 5, 10, 15 日目に試料を採取し，選択培地に塗布して供与菌，受容菌，接合完了体を計数し，各菌体の動態をモニタリング解析した．
【結果】CA10dm4 株，PpY101 株を受容菌として用いた場合，供与菌 KT2440(pHKA1::Km)株が，$1/10^4$ 程度以下に減少していく傾向が認められた一方，Pf0-1 株を受容菌として用いた場合は，供与菌数がモニタリング期間を通じて 10^5 ~10^6 CFU/ml 程度とほぼ一定で，Pf0-1 株が供与菌の生存に好影響を及ぼしていることが示唆された．プラスミドの接合伝達頻度は，モニタリング開始後 1 日目に測定したところ，いずれの受容菌に対しても受容菌あたり 10^{-6}~10^{-5} であった．接合完了体数は 10^2 CFU/ml から最大 10^6 CFU/ml まで増加し，実験開始後 1 日目では PpY101(pHKA1::Km) ＞ CA10dm4(pHKA1::Km) ＞ Pf0-1(pHKA1::Km)の順に多く、5 日目以降では Pf0-1(pHKA1::Km) ＞ CA10dm4(pHKA1::Km) ＞ PpY101(pHKA1::Km)の順に多くなった．また，各実験における菌体数変化にカルバゾールの有無による違いは認められなかった．現在，Pf0-1 株を受容菌とした場合と，その他の菌株を受容菌とした際に生じた供与菌の生き残りやすさの違いの原因ついて調べている．

dioxin, conjugal transfer, degradative plasmid

講演番号：2C32p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ C 校舎 32 会場

微生物による六価クロム汚染土の浄化技術の開発
Insoluble Treatment of Hexavalent Chromium Using Bioremediation

○隅倉 光博[1]、田崎 雅晴[1]、山田 佳代子[2]、椎葉 究[2]([1]清水建設株式会社、[2]東京電機大理工)
○Mitsuhiro SUMIKURA[1], Masaharu TASAKI[1], Miho YOSHIDA[2], Kiwamu SHIBA[2] ([1]SHIMIZU CORPORATION, [2]TOKYO DENKI UNIVERSITY)

重金属で汚染された土壌の浄化には、物理的および化学的処理が適用されているが現状である。しかしこれらの方法では、コストが高くさらに環境負荷が懸念されることより、我々は新たに生物浄化（バイオレメディエーション）技術を開発し、幾つかの実サイトにて適用している。

六価クロムを対象としたこの生物浄化にはアラビノキシランを含む小麦外皮（Bran、通称フスマ）を用いる。小麦の外皮はアラビノキシラン、セルロースという難消化性多糖類を多く含んでいることが知られている。これら難消化性多糖類を分解できる生物種は限られており、人間を含む動物等は分解できないが、ある特定の微生物は分解し栄養源とすることができる。本技術はこの性質を利用して、アラビノキシランを含む資材を添加し，有用な嫌気性微生物を選択的に増殖させることで、有機酸の生成等による酸化還元電位（EC）の低下（嫌気化）により六価クロムを三価クロムに還元するバイオスティミュレーションである。今回、六価クロムをこの技術により無害化する過程で、クロム及び有機酸等の推移と微生物的解析を行ったので報告する。

【供試汚染土壌】模擬汚染土は脱水ケーキに六価クロム溶液を添加/混合し作成した。この時の溶出六価クロム濃度は 1.57 mg/L、pH は 9.6、含水率は 43.5%であった。

【方法】六価クロムの溶出量は、平成 15 年環境省告示 18 号に準拠し検液を作成し、検液中の六価クロム濃度を JIS K 0102 65.2.1 に準拠して測定した。検液の pH および模擬汚染土の酸化還元電位は、pH 電極（HORIBA 社）および土壌用 OPR 計を用いて測定した。また有機物の指標として，全有機炭素量と有機酸をそれぞれ TOC 計と HPLC を用いて測定した。微生物フローラは、FastDNA-Kit を用いて土壌から全 DNA を抽出後、GC クランプ付ユニバーサルプライマーにより 16SrRNA を PCR にて増幅し、DGGE 電気泳動で分離した。0～30 日間の経時変化をそれぞれ測定した。

【結果】

・六価クロムの溶出量は、Bran 添加区では急速に低下し 3 日目で検出限界以下に達し、特に添加量が多いほど顕著であった。一方対照区（Bran 無添加区）では 1 カ月後でも約 80%の残存率であった。

・六価クロムの減少と同じ傾向で、pH
および酸化還元電位も低下した。有機物については，TOC と有機酸（特に乳酸，ギ酸，酢酸）ともに，約 1 週間は増加するが、その後は減少した。

・DGGE の結果、対照区と比較して添加区では発酵時間が進むほど微生物種の多様性が認められた。

hexavalent chromium, bioremediation, insoluble treatment

講演番号：2C32p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ C 校舎 32 会場

沈水植物オオカナダモ（*Egeria densa*）のセシウム吸収機構

Mechanism of cesium absorption in a submerged plant, *Egeria densa*

○木幡 光[1]、永川 栄泰[2]、櫻井 昇[2]、保倉 明子[3]、寺田 靖子[4]、長谷川 博[1]、原田 英美子[1]（[1]滋賀県大環境、[2]都産技研、[3]東京電大工、[4]JASRI/SPring-8）
○Hikaru KOWATA[1], Yoshiyasu NAGAKAWA[2], Noboru SAKURAI[2], Akiko HOKURA[3], Yasuko TERADA[4], Hiroshi HASEGAWA[1], Emiko HARADA[1] ([1]Univ of Shiga Pref, [2]TIRI, [3]Tokyo Denki Univ, [4]JASRI/SPring-8)

【目的】2011 年 3 月に発生した福島第一原子力発電所の事故により、大量の放射性物質が飛散した。放射性物質は陸地だけでなく、湖沼や貯水池においても汚染を引き起こしている。放射性物質のうち、^{137}Cs は半減期が 30 年と長いことから、1 日も早い放射性物質の除去が望まれる。この問題の解決策の 1 つとして、ファイトレメディエーションが挙げられる。現在までに、陸上植物における Cs の集積性および動態は研究されてきているが、水生植物を用いた研究はほとんど行われていない。このため、水圏における Cs のファイトレメディエーションを実現するためには、水生植物における Cs の集積性について明らかにする必要がある。本研究では、沈水植物オオカナダモ（*Egeria densa*）における、放射性 Cs の蓄積を調査した。さらに、実験室内での栽培系を用いて、Cs の吸収、蓄積機構および植物体内での局在を調査した。
【方法】福島県（桑折町、相馬市、南相馬市）、茨城県（小美玉市）、滋賀県（彦根市）において、2012 年にオオカナダモ、水、底泥のサンプリングを行った。測定前処理として、植物体は破砕し、底泥は 5 日間風乾後、100 ml 容器に敷き詰めた。それらのサンプルについて、Ge 半導体検出器を用いて ^{137}Cs および ^{134}Cs の濃度を測定した。また、実験室内で培養維持されたオオカナダモの節から形成された小植物体（シュート長約 5 cm）を切り離し、20 μM 安定同位体 CsCl を含む Gaudet's medium で 3 日間培養した。その植物体から採取した葉について、SPring-8 の放射光を利用した蛍光 X 線分析を行い、Cs の局在と他の元素との相関を調査した（課題番号 2012B1556）。
【結果】野外でサンプリングした植物体、水、底泥の放射性 Cs 濃度を測定した結果、植物および底泥では南相馬市のサンプルが最も高い値を検出した。水においてはいずれの地点も ^{137}Cs および ^{134}Cs は検出限界以下もしくは不検出であった。さらに、植物体の放射能濃度の値を底泥の値で割ることにより、移行係数を算出したところ、それぞれの地点の底泥の放射能濃度の値と移行係数の大小関係が一致しなかった。このことから、オオカナダモはセシウムを底泥から直接吸収しているのではなく、水から葉面を介して取り込んでいるのではないかと考えられた。また、実験室内で CsCl 処理した植物の高解像度 μ - XRF（micro X-ray fluorescence, マイクロ蛍光 X 線）イメージングを行ったところ、葉の細胞壁もしくはアポプラスト領域に Cs が局在していることが判明した。加えて、K についても Cs と同様の部位での局在が見られ、Cs 特異的な局在部位は確認できなかった。したがって、植物体中において Cs は K とほぼ同じ挙動を示すと考えられた。

Egeria densa, cesium, phytoremediation

講演番号：2C32p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ C 校舎 32 会場

ジニア根圏土壌から分離した M-2 株の同定と軽油分解特性

Identification and characterization of light oil-assimilating M-2 strain from rhizosphere soil of *Zinnia profusion*

○山崎 周平[1]、川崎 勇[2]、高橋 結[2]、玉置 雅彦[3]、村上 周一郎[1] ([1]明治大農農化、[2]明治大院農、[3]明治大農農)
○ SHUHEI YAMAZAKI[1], yu Kawasaki[2], Yui Takahashi[2], Masahiko Tamaki[3], Shuichiro Murakami[1] ([1]Meiji Univ., [2]Meiji Univ., [3]Meiji Univ.)

【目的】鉱物油による汚染は問題が顕在化しないことから、実際は多くの土地で鉱油類による土壌汚染が生じていると考えられている。近年、これらの鉱物油汚染土壌の浄化を化学的、物理的手法ではなく、コストが安価で環境に優しい生物を利用した手法が検討されている。我々は、花卉と根圏微生物を利用したファイトレメディエーションシステムの構築を目的に研究を行い、これまでに観賞用植物であるジニアを軽油汚染土壌で生育させた場合、軽油の除去が促進されること、その根圏土壌から分離した軽油資化性菌M-2 株を、ジニアを定植した軽油汚染土壌に投入することにより除去効果が増強されることを見出した。本研究では、M-2 株の同定、軽油分解特性、および軽油分解に必要な *alkB* 遺伝子について解析を進めた。
【方法】①同定試験：16S rRNA 遺伝子の解析および生理学的試験により同定した。②生育試験：炭素源として 1.2%の軽油を含む液体培地で M-2 株を 30℃で振とう培養し、経時的にサンプリングした培養液をヘキサンで抽出後、残存する軽油成分をガスクロマトグラフにて分析した。また、本菌の資化できる直鎖炭化水素の範囲を調べるために炭素数が 13、24、32 の直鎖炭化水素(C13、C24、C32)をそれぞれ唯一炭素源とする平板培地で生育試験を行った。③*alkB* 遺伝子の分析：炭化水素資化性菌の多くが有しているアルカンヒドロキシラーゼ遺伝子 *alkB*に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、増幅した DNA 断片の塩基配列を決定した。決定した塩基配列から推定されるアミノ酸配列と類似性を示す配列をデーターベースで検索した。
【結果】M-2 株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は、*Acinetobacter junii* の配列と 99.8%の同一性を示した。さらに、生理学的試験の結果も踏まえ、本菌を *Acinetobacter junii* と同定した。1.2%軽油液体培地で本菌株を振とう培養した場合、培養 3 日目においてコントロールと比較して C11、C12 は 83%、C18 は 56%の減少が確認された。本菌は C13、C24、C32 を炭素源とした平板培地上でよく生育し、これらのアルカン資化能を有する事が明らかになった。PCR 法によって M-2 株の有する *alkB* 遺伝子を調べたところ、548 bp の異なる 2 種の DNA 断片（*alkBJ1* および *alkBJ2* ）が得られた。*alkBJ1* および *alkBJ2* から推定されるアミノ酸配列は 70%の同一性を示した。さらに既知のアルカンヒドロキシラーゼのアミノ酸配列と比較したところ、AlkBJ1 は *A. baylyi* ADP1 の AlkMa と 95%、また AlkBJ2 は *A. calcoaceticus* 69-V 株の AlkM と 89%の同一性を有していた。

light oil-assimilating bacteria, alkane hydroxylase, *Acinetobacter junii*

講演番号：2C32p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ C 校舎 32 会場

リアクター様式の違いが anammox 菌の集積度に及ぼす影響

Dominancy of anammox bacteria enriched by various types of bioreactor

○石川 秀、多田羅 昌浩、上野 嘉之（鹿島技研）
○Shu ISHIKAWA,Masahiro Tatara,Yoshiyuki Ueno (Kajima Tech. Res. Inst.)

【目的】嫌気性アンモニア酸化、いわゆる anammox は、自然界の窒素サイクルで重要な役割を担っていることが知られている。この anammox を利用した窒素除去は、省エネ・低環境負荷型の廃水処理技術として注目されているが、従来の硝化・脱窒プロセスに比べ、その普及例は少ない。この理由として、anammox 菌の培養が困難で容易に集積しないことが挙げられている。

昨年度の大会では、複数の環境試料から anammox 菌の集積を試み、優占種が異なる 2 種類の anammox ミクロフローラを取得したことを報告した。本研究では、この 2 種類のミクロフローラをタイプの異なるリアクターで馴養し、anammox 菌の集積状況を観察した。

【方法】ミクロフローラ MFA01、および MFA02 をシードに用い、3 種類のリアクター（固定床型、グラニュール型、プラグフロー型）を用いて、アンモニアと亜硝酸を含む人工培地を連続的に供給し、35℃で馴養を行った。馴養中は水理学的滞留時間を短絡させることにより逐次的に窒素負荷を上昇させた。馴養開始から 200 日経過後、リアクターからミクロフローラを回収し、anammox 菌用のプローブ（amx820）を用いて FISH による顕微鏡観察を行い、DAPI 染色による全菌に対する存在比を算出した。

【結果】回収した全ての馴養後のミクロフローラで anammox 菌を取り囲むように他の細菌が増殖している様子が観察された。また、窒素負荷と anammox 菌の集積度合いに相関は見られず、窒素負荷 2.3-7.5 kg-N/m3/day で運転中のリアクターの anammox 菌の集積度合いは細胞ベースで全菌比 20-75%であった。MFA01 を接種したプラグフローリアクター（7.5 kg-N/m3/day）と、MFA02 を接種したポリエステル不織布固定床リアクター（3.5 kg-N/m3/day）では、全細菌に対する細胞ベースのアナモックス菌の存在比は 70%以上であった。このことから、anammox 菌種によって最適なリアクター様式も異なることが示唆された。現在、ミクロフローラ中の優占菌株に特異的なプライマーをデザインし、定量 PCR を行い、優占菌株の相対的濃度について解析中である。

nitrogen removal, anammox, FISH

講演番号：2C20a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ C 校舎 20 会場

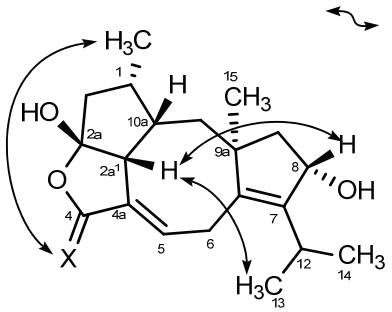
Roussellols A および B の構造決定

Strucures of roussellols A and B

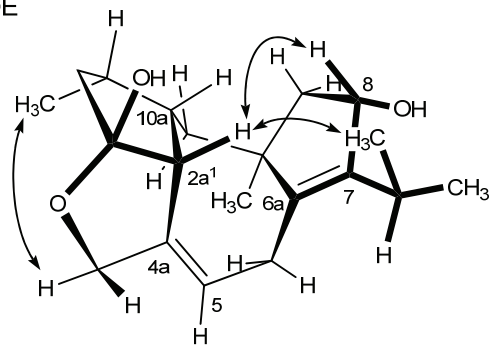
○橋本 勝[1]、竹川 大登[1]、田中 和明[1]、福士 江里[2]、松尾 光一[3]、根平 達夫[4] ([1]弘前大学農学生命、[2]北海道大学院農、[3]広島大学放射光セ、[4]広島大学院総合科学)

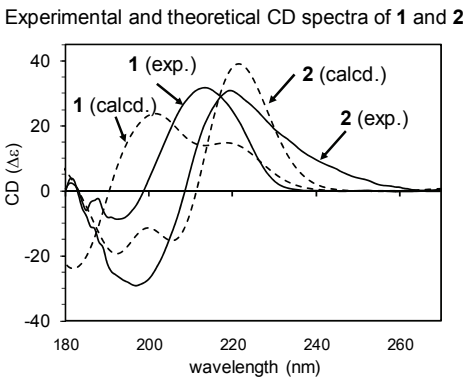
○Masaru HASHIMOTO[1], Hiroto TAKEKAWA[1], Kazuaki TANAKA[1], Eri FUKUSHI[2], Koichi MATSUO[3], Tatsuo NEHIRA[4] ([1]Hirosaki Univ., [2]Hokkaido Univ., [3]Hiroshima Univ., [4]Hiroshima Univ.)

草本タケ *Sasa veitchii*.から単離した子嚢菌 *Roussoella hysterioides* KT1651 の培養抽出液から、Roussellols A (**1**)、B (**2**)を単離した。Roussellols A (**1**)は FDMS により *m/z* = 318.2183 を観測し、分子式を $C_{20}H_{30}O_3$ と決定した。二次元法を含む各 NMR スペクトルを解析して平明構造を推定した。NOE を測定したところ、2a^{1}H と８H, 2a^{1}H と 7 位イソプロピル基、また 1 位メチル基と 4αH 間など平面構造では解釈が難しい相関を観測したが、下に示した折れ曲がった構造とした場合、全てを説明できる。この構造は分子モデリング計算でも安定配座であった。この構造を帰属するに当たり、C2a アセタール炭素を 119.5 ppm のシグナルとする必要があった。この化学シフトは通常のアセタールより若干高周波で共鳴しているが、EDF2/6-31G*レベルでの理論化学シフト計算はこれを支持した。真空紫外領域を含む ECD スペクトルを測定したところ、210 nm 付近で正の分裂型コットン効果を観測した。吸収波長からこの CD は C4a=C5 および C6a=C7 二重結合の相互作用によるもの帰属されるが、モデリングした分子構造では、下の鏡像体とした場合、これらの二面角は約+70°でうまく説明できる。孤立二重結合を励起子キラリティー法に適用させた例はなかったことから、TD－DFT により CD スペクトルを B3LYP/TZVP レベルで理論的に予想したところ、実験データを再現したことから、上記帰属を確認することができた。Roussellols B (**2**)についても、ほぼ同様な手法でその構造を決定した。



1: X = H_2, **2**: X = O





strucural determination, circular dichroism, theoretical calculatio

講演番号：2C20a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ C 校舎 20 会場

ブナシメジ培養菌糸体由来のナラ枯れ病原菌に対する生育阻害物質について
Metabolites from *Hypsizygus marmoreus* against fungus *Raffaelea quercivora*
○芳賀 真倫、小関 卓也、村山 哲也、小山 浩正、塩野 義人（山形大学・農）
○ MASATOMO HAGA, TAKUYA KOSEKI, TETSUYA MURAYAMA, Hiromasa KOYAMA, YOSHIHITO SHIONO (Yamagata Univ.)

【目的】ナラ枯れは、カシノナガキクイムシに寄生しているナラ枯れ病原菌 *Raffaelea quercivora* により、里山のナラ類やカシ類が集団枯死する萎凋病である。枯死による木々の減少は、森林の水源涵養能の低下や生物多様性の低下を引き起こし、多くの府県で被害が確認されている。現在のナラ枯れの防除法としては、カシノナガキクイムシの誘因捕殺や侵入阻止、樹幹への薬剤注入などの方法が行われている。しかし、ナラ枯れの詳細な発病メカニズムは不明なところが多く、完全には予防や除去ができていない。そこで、我々は、新たなナラ枯れ病原菌生育抑制物質を探索する一環として、ナラ枯れ被害木を食用キノコの菌床栽培へ応用した研究をヒントに、食用キノコ培養物より、ナラ枯れ病原菌への抗菌作用を指標に生育抑制物質を単離することを目的とした。
【方法および結果】5 種の食用キノコ（エノキタケ、エリンギ、シイタケ、ブナシメジ、マイタケ）の培養菌糸体を組成の異なる 4 種の培地で培養した。それらの培養物について調べたところ、大豆粉を中心とした液体培地で振とう培養を行ったブナシメジ（*Hypsizygus marmoreus*）の培養抽出物において、ナラ枯れ病原菌に対して顕著な生育阻害活性が観察されたため、活性物質を明らかにすることにした。

6.0 L のブナシメジ培養菌糸体について、ペーパーディスク法による生育阻害活性や TLC 上での挙動を指標に各種カラムクロマトグラフィーにより精製を行った。その結果、活性物質 **1** とその類縁物質 **2**, **3** を単離した。化合物 **1** は、高分解能質量分析により、$C_{10}H_8O$ と決定した。化合物 **1** の ^{13}C-NMR スペクトルデータと UV スペクトルデータ（λ_{max} = 307, 288, 272, 257, 241, 231）より、分子内に 1,3,5-トリイン構造を有していることが判明した。また、^{1}H-NMR スペクトルデータより、シングレットメチル、オキシメチレン、トランスオレフィンプロトンに帰属されるシグナルが、それぞれ観測された。次に **1** の HMBC 実験より、得られた相関をもとに得られた部分構造を結合させ、**1** の構造を 2-(*E*)-decene-4,6,8-triyn-1-ol と決定した。化合物 **2**, **3** についても、同様に構造解析を行ったところ、それぞれ deca-4,6,8–triy-1-ol と 8-(*E*)-decene-4,6-diyne-1,2,10-triol と決定した。さらに、文献検索の結果、**1**、**2** は菌類より単離された既知物質であり、一方、**3** は新物質であった。

Polyacetylenes, *Hypsizygus marmoreus*, Japanese oak wilt

講演番号：2C20a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ C 校舎 20 会場

コウタケ（*Sarcodon aspratus*） 子実体から得られた二次代謝産物について

Search for secondary metabolites from *Sarcodon aspratus*

○川畑 哲郎[1]、高野 文英[2]、只野 武[1]、太田 富久[1] ([1]金沢大院、[2]日本薬科大)
○Tetsuro KAWABATA[1], Fumihide TAKANO[2], Takeshi TADANO[1], Tomihisa OHTA[1] ([1]Kanazawa Univ., [2]Nihon Pharm. Univ.)

【背景・目的】

すべてが菌根性であるイボタケ科キノコからはこれまでに，テルフェニル (クロカワ) やジテルペン (ケロウジ) など新奇な構造を有する化合物が単離・報告されている．そこで今回筆者らは，菌根性キノコの成分探索の一環として，本科のコウタケ (*Sarcodon aspratus*) 子実体を研究素材として用いた．本キノコはコウタケ属であり，秋に広葉樹林やアカマツ混成林に発生する．香気が高く，昔から精進料理の珍菜とされる他，地方では民間薬とし用いられ，煎汁や浸出液が化粧品として利用されている．今回，本子実体の EtOAc:MeOH=1:1 抽出物より，イミダゾリノン骨格を有する化合物を得たので報告する．

【方法】

東北地方で採取し，乾燥させたコウタケ子実体 (470 g) を EtOAc:MeOH=1:1 で抽出し，得られた抽出物を酢酸エチルと水で分配した．次に，酢酸エチル層を SiO_2 および ODS を担体とするクロマトグラフィーで分画し，さらに ODS HPLC で精製することで，化合物 1 を得た．

【結果】

化合物 1 の構造は，1 次元および 2 次元 NMR，MS スペクトルなどの詳細な解析により，イミダゾリノン骨格を有し，N-オキシドおよびヒドロキサム基を有する化合物であると決定した (図 1).
本構造は，非常に特異な香りを持つことから，コウタケの香気成分の 1 つであることが示唆された．

また，同様の基本骨格を有する天然物由来のものは大変珍しく，生理活性評価についてもほとんど行われていない．

さらに本構造は，イソロイシン構造 2 つより成り立っていると考えられ，生合成においてはイソロイシンを原料としていることが考えられる．現在，他の化合物についても精製中であり，これらについてもあわせて報告する予定である．

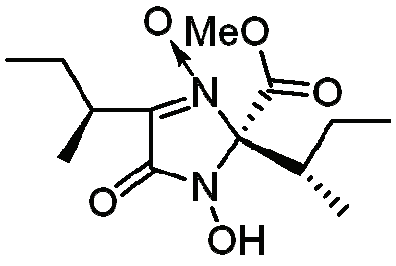


図 1

Sarcodon aspratus, secondary metabolites

講演番号：2C20a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ C 校舎 20 会場

シイタケの抗菌物質とその生産を促進するトリコデルマ代謝産物

The antifungal substance produced by Lentinula edodes and the Trichoderma harzianum metabolites which promote its production

○藤田 真智子[1]、石原 亨[2]、時本 景亮[3]、中島 廣光[2]([1]鳥取大院・農、[2]鳥取大・農、[3]菌蕈研)
○ MACHIKO FUJITA[1], ATSUSHI ISHIHARA[2], KEISUKE TOKIMOTO[3], HIROMITSU NAKAJIMA[2] ([1]Grad. Sch. Agric., Tottori Univ., [2]Fac. Agric., Tottori Univ., [3]Tottori Mycol. Inst.)

【背景・目的】トリコデルマは抗菌物質や溶菌酵素を生産してシイタケ菌糸を侵害するため、シイタケ栽培において大きな問題となっている。私たちは、これまでシイタケとトリコデルマの相互作用について研究を行ってきた。その中で、寒天培地上でシイタケとトリコデルマを対峙培養すると、両菌の接触部においてシイタケの菌糸が褐変し、トリコデルマの侵入が一時的にくい止められることを見出した。この現象にはシイタケの抗菌物質が関与することが考えられ、実際に接触部付近からnona-3,5,7-triyn-1-ol(NTY)が単離された。さらにNTYはシイタケを単独で培養した時と比較し、トリコデルマと対峙培養した時に接触部付近から増加することが確認された。

そこで、このNTY生産量の増加にトリコデルマ代謝産物が関与している可能性を考え、麦芽液体培地で培養したシイタケ菌糸をトリコデルマの培養濾液に移植したところ、移植せずそのまま培養を続けた場合に比べNTY生産量が約30倍増加することを確認した。今回はこのトリコデルマの培養濾液に含まれるNTY生産促進活性を有する化合物について報告する。

【方法】トリコデルマ(*Trichoderma harzianum*)TMIC60622株を麦芽液体培地(4L、ペプトンを加えていない)で25˚C、10日間培養した。培養濾液を各種クロマトグラフィーで精製し、得られた分画物を滅菌水に溶かした後、麦芽液体培地で25˚C、7日間培養したシイタケ(*Lentinula edodes*)TUFC10608株の菌糸に投与した。シイタケをさらに25˚C、10日間培養した後、培養液中のNTY量を LC-MS/MSを用いて定量した。

【結果】トリコデルマの培養濾液をHP20カラムクロマトで分画すると、メタノール50%画分に活性が溶出されることが分かった。この画分を、ODSカラムクロマトで大まかに精製し、活性を示したメタノール20%溶出画分について再度ODSカラムクロマトを行い、細かく分画した。活性が認められたメタノール15%-1画分を、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で精製したところ、保持時間18分付近のピークに活性を認めた。最終的に6.0mgの活性物質が得られ、ESI-MSと^{1}H-NMRからこの活性物質をトリプトファンと同定した。トリプトファンを含んだ麦芽液体培地上でシイタケ菌糸を生育させた場合にはNTYの生産量は増加しなかったが、シイタケ菌糸を生育させている途中でトリプトファンを投与すると、投与しなかった場合に比べ、NTYの生産量が約6倍増加した。現在、NTY生産促進活性を示したトリプトファン以外の画分の精製を行い、活性物質の単離を試みている。

Lentinula edodes, Trichoderma harzianum, antifungal substance

講演番号：2C20a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ C 校舎 20 会場

コムラサキシメジ由来の植物成長調節物質とそれらの代謝産物に関する化学的研究

Chemical studies on metabolites of plant growth-regulating substances from the faily ring-forming fungus *Lepista sordida*

○竹田 翔伍[1]、崔 宰熏[2]、平井 浩文[1]、浅川 倫宏[3]、管 敏幸[3]、河岸 洋和[1,2] ([1]静大農・応生化、[2]静大院・創造、[3]静県大・薬)
○Shogo TAKEDA[1], Jae-Hoon Choi[2], Hirohumi Hirai[1], Tomohiro Asakawa[3], Toshiyuki Kan[3], Hirokazu Kawagishi[1,2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ., [3]University of Shizuoka)

【目的】
我々は以前、フェアリーリングの惹起物質としてコムラサキシメジの培養濾液から植物成長調節活性を有する2-azahypoxanthine (AHX) 及びimidazole-4-carboxamide (ICA) を単離した[1,2)]。また、AHXを植物に処理することにより2-aza-8-oxo-hypoxanthine (AOH) に代謝されることを発見し、このAOHも植物成長調節活性を有していたことを前年度大会にて報告している[3)]。本研究では、これらの化合物の植物体内におけるさらなる代謝およびそれに由来する代謝産物の研究を目的とした。

【方法・結果】
AHX, ICAおよびAOHを処理したイネのエタノールおよびアセトン抽出物を逆相HPLCで分析したところ、無処理のイネの抽出物には見られない化合物の存在がAHXおよびAOH処理したイネにおいて確認できたことから、この化合物を単離し、NMRおよびESI-MSによる構造決定を行った結果、AOHのβ-グルコシドであると判明した。しかし、AOHの糖への結合位置の決定には至らなかったため、現在X線結晶構造解析に供するために結晶化を試みている。
また、化合物の処理期間を4週間から2週間に変更することにより、新たな複数の代謝産物の存在が逆相HPLC解析によって確認された。現在これらの化合物の構造決定を行うために各種クロマトグラフィーによる単離を試みている。

1) J-H Choi *et al.*, *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) J-H Choi *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 58, 9956-9959 (2010)
3) 竹田 翔伍ら、平成 24 年度農芸化学会大会講演要旨集

Lepista sordida, plant growth-regulation, metabolites

講演番号：2C20a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ C 校舎 20 会場

コムラサキシメジが産生するフェアリーリング惹起物質の植物内生に関する化学的研究

Chemical studies on the existence of plant growth regulators produced by *Lepista sordida* in plant

○崔 宰熏[1]、山下 起三子[1]、大西 利幸[1]、森田 明雄[2]、本橋 令子[3]、切岩 祥和[3]、平井 浩文[2]、浅川 倫宏[4]、菅 敏幸[4]、河岸 洋和[1,2] ([1]静大院・創造、[2]静大農・応生化、[3]静大農・共生バイオサイエンス、[4]静県大・薬)

○Jae-Hoon CHOI[1], Kimiko Yamashita[1], Toshiyuki Onishi[1], Akio Morita[2], Reiko Motohashi[3], Yoshikazu Kiriiwa[3], Hirofumi Hirai[2], Tomohiro Asakawa[4], Toshiyuki Kan[4], Hirokazu Kawagishi[1,2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ., [3]Shizuoka Univ., [4]University of Shizuoka)

【目的】ゴルフ場などでシバが環状に繁茂した後枯れ、そのあとにキノコが発生することがある。その現象は“フェアリーリング現象”と言われている。我々はフェアリーリングを形成する菌の一種であるコムラサキシメジの培養ろ液から植物成長調節物質(2-azahypoxanthine, AHX; imidazole-4-carboxamide, ICA)を精製・構造決定し、植物に対する成長調節活性の検討及び作用メカニズムの解明を明らかにした[1, 2)]。前年度大会でAHXの代謝産物である2-aza-8-oxo-hypoxanthine (AOH) を単離成功しまた植物体からのAHX関連化合物の内生を証明した。本研究では様々な植物からAHX関連化合物の内生を確認すること、また植物内でAHXの化学合成の前駆体である5-aminoimidazole-4-carboxamide(AICA)からAHXへの生合成される仮説経路を立て証明することを目的とした。

【方法・結果】トマト3種類を地上部と地下部に切り分け、それぞれエタノール及びアセトン抽出を行い、抽出物を得た。その後、得られた抽出物をC30カラムで部分精製し、PC HILICカラムを用いてLC-MS/MS (LTQ Orbitrap)に供したところ、分析したすべての植物からAHXまたAOHが検出された。また、トマト以外の植物の抽出物についても更に分画を進めている。仮説生合成経路を証明するためイネにAICA取り込み実験を行ったところ、AHXの内生量が無処理イネより増えた。現在、^{13}Cラレル化AICAを合成しこの化合物を用い、イネへの取り込み実験、またイネ由来のタンパク抽出液との反応条件を検討している。

1) J-H Choi et al., ChemBioChem, 11, 1373-1377 (2010)
2) J-H Choi et al., J. Agric. Food Chem., 58, 9956-9959 (2010)

plant growth regulators, Lepista sordida, biosynthetic pathway

講演番号：2C20a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ C 校舎 20 会場

イネにおける植物成長調節物質の生合成経路に関する化学的研究

Chemical studies on biosynthetic pathway of plant growth regulators in *Oryza sativa*

○河村 友香子[1]、関口 周兵[1]、崔 宰熏[2]、本橋 令子[3]、平井 浩文[1]、浅川 倫宏[4]、管 敏幸[4]、河岸 洋和[1,2] ([1]静大農・応生化、[2]静大院・創造、[3]静大農・生産、[4]静県大・薬)

○Yukako Kawamura[1], Shuhei Sekiguchi[1], Jae-Hoon Choi[2], Reiko Motohashi[3], Hirohumi Hirai[1], Tomohiro Asakawa[4], Toshiyuki Kan[4], Hirokazu Kawagishi[1,2] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [3]Department of Biological Science, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [4]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka)

【目的】

我々はフェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジの培養濾液から植物成長調節活性を有する2-azahypoxanthine (AHX) を単離し、報告している[1)]。前年度の大会においてAHXが植物内で内生されていることを報告した[2)]。また、AHXは化学合成法が既に知られており、5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) を前駆体として合成される。AICAは植物が産生していることが知られていることから、我々は植物内でAICAからAHXへの生合成経路が存在しているという仮説をたてた。

そこで本研究ではイネにおけるAHXの生合成経路に関する研究を行いAICAからAHXへの仮説生合成経路を証明することを目的とした。

【方法・結果】

発芽させ、2週間培養したイネを地上部と根に分け緩衝液で抽出を行い、30%, 80%の濃度で順次硫安沈澱を行った。それぞれの画分を粗酵素液として透析後、これらに^{13}CラベルしたAICAを添加することで活性を確認した。その結果、80%硫安沈澱上清画分によって、ラベル化されたAHXの生成がLC-MS/MS分析で確認できた。また、活性がみられた画分から仮説生合成に関わる物質の取得を試みるためにbiotinを導入したAICAをリガンドとしてアフィニティーカラムの作製を行った。アフィニティーカラムに活性画分を供したが、バンドが不鮮明であったため、硫安沈澱以降の精製を進め目的物質の生成をすることにした。現在、硫安沈澱後にイオン交換樹脂を用いた精製方法の検討を行っている。

1) J-H Choi et al., *ChembioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) 崔ら、2012 年度農芸化学会大会講演要旨集

Lepista sordida, growth regulator, biosynthetic pathway

講演番号：2C20a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ C 校舎 20 会場

コムラサキシメジにおける植物成長調節物質の生合成経路に関する化学的研究

Chemical studies on the biosynthetic pathway of plant growth regulators in *Lepista sordida*

○圓山 和希[1]、崔 宰熏[2]、平井 浩文[1]、浅川 倫宏[3]、菅 敏幸[3]、河岸 洋和[2] ([1]静大農・応生化、[2]静大院・創造、[3]静県大・薬)
○Waki MARUYAMA[1], Jae-Hoon Choi[2], Hirofumi Hirai[1], Tomohiro Asakawa[3], Toshiyuki Kan[3], Hirokazu Kawagishi[2] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [3]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka)

【目的】
フェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジ培養ろ液から単離された2-azahypoxanthine (AHX) およびimidazole-4-carboxamide (ICA) は、植物成長調節物質としての活性を有することが示され[1,2]、さまざまな植物に内生することを前大会にて報告した。また、我々は^{15}Nでラベル化された窒素化合物を用い、コムラサキシメジの菌体内における生合成経路について報告した[3]。今回も引き続きこれら化合物の生合成経路の解明を目的とした。

【方法および結果】
20種類のアミノ酸を各1 mM添加した培地でコムラサキシメジを5週間培養したところ、Arg添加培地でAHX量は2.7 倍、ICA量は2.3 倍とcontrolに比べ20種類中最も増加した。そこで^{13}C,^{15}N-Argを添加して同様に培養した。この培養ろ液よりAHX、ICAを分取し、MSに供したところ、^{15}N-AHXおよび^{15}N-ICAが検出された。これよりAHXおよびICAの生合成においてArgが窒素源として関与していることが示唆された。また、コムラサキシメジを培養し得られた菌体を凍結後粉砕し、タンパク質抽出液を得た。現在この抽出液をもちいてAHXおよびICAの生合成経路の解明を行っている。

1) J-H Choi *et al.*, *ChemBioChem*, 11, p 1373-1377 (2010)
2) J-H Choi *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 58, p 9956-9959 (2010)
3) 田中　秀和ら、平成22年度日本農芸化学会大会講演要旨集、p 4

Lepista sordida, plant growth-regulation, biosynthetic pathway

講演番号：2C20a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ C 校舎 20 会場

中国産ベニタケ属キノコ（*Russula vinosa*）由来の植物成長調節物質の探索

Search for plant growth regulationg compounds from fruiting bodies of *Russula vinosa*

○川出 美咲[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[2]、平井 浩文[1]、河岸 洋和[2]（[1]静大院・農、[2]静大院・創造）
○Misaki KAWAIDE[1], Jing WU[2], Jae-Hoon CHOI[2], Hirofumi HIRAI[1], Hirokazu KAWAGISHI[2]
([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka Univ., [2]Graduate School of Science and Chemistry, Shizuoka Univ.)

【目的】

中国産ベニタケ属キノコのうち*Russula vinosa*は中国福建省に自生し、広葉樹と共生する外生菌根菌である。広葉樹の周りにこの菌糸体を植えると*R. vinosa*の子実体が形成し、一方で広葉樹の根が増加したとの報告がある[1)]。しかしながら、そのような植物成長調節活性物質の単離・同定はなされていなかったため、研究対象とした。前大会において、この*R. vinosa*子実体酢酸エチル可溶部に由来する既知化合物1種に弱い植物成長調節活性，新規化合物1種に根毛増加させる作用があることを報告した。[2)] 本研究では、*R. vinosa*に由来する植物成長調節物質のさらなる単離・精製を目的とした。

【方法】

Russula sp. 乾燥子実体をヘキサン、酢酸エチル、エタノール、水で順次抽出し、各可溶部をレタスに対する植物成長調節活性試験に供した。その結果、酢酸エチル可溶部に他の可溶部と比較して顕著なレタスに対する成長促進活性が見られた。そこで、各活性試験の結果を指標にしながら酢酸エチル可溶部をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODSカラムクロマトグラフィー、HPLCにより、順次精製を行った。単離した化合物の構造解析には、NMR、ESI-TOF-MS、IR、旋光度を用いた。

【結果】

*R. vinosa*子実体酢酸エチル可溶部から既知であるが，ある種の活性や機能の報告のない化合物を含む数種類の化合物を単離した。現在、NMRをはじめとした各種機器分析にて構造解析を行い、レタスに対する植物成長調節活性試験を試みている。また、さらなる機能性物質の単離・精製を試みている。

1) Chen Yu-Hang, Chen Zheng-Ming (2007). *CJEA*, **15**(5), 171-173
2) 川出ら，平成 24 年度 日本農芸化学会大会講演要旨集

Russula vinosa, plant regulating compound, structural determination

講演番号：2C20a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ C 校舎 20 会場

フミヅキタケの産生する植物成長調節物質の探索
Search for growth regulating compounds towards plants from *Agrocybe praecox*
○岩堀 倫大[1]、伏見 圭司[2]、安西 航太[1]、徳山 真治[1]、崔 宰熏[2]、平井 浩文[1]、河岸 洋和[2]([1]静大農・応生化、[2]静大院・創造)
○Tomohiro Iwahori[1], Keiji Fushimi[2], Kouta Anzai[1], Shinji Tokuyama[1], Jea-Hoon Choi[2], Hirofumi Hirai[1], Hirokazu Kawagishi[2] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Department of Bioscience, Educational Division, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】
新潟県のあるビニールハウスで、通常よりも肥大したイチゴの実を確認し、その後、根元の土壌からフミヅキタケが発生するという現象が確認された。前大会において、フミヅキタケの培養ろ液に由来する植物成長調節物質を報告した。[1)] 本研究では、フミヅキタケに由来する植物成長調節物質のさらなる単離・精製を目的とした。

【方法】
フミヅキタケの菌糸体の大量培養を行い、得られた培養ろ液を酢酸エチル、1-ブタノール、水で順次抽出し、各画分についてレタスに対する植物成長調節活性試験を行った。酢酸エチル可溶部で伸長抑制活性が確認されたため、節活性試験の結果を指標にしながらフラッシュカラムクロマトグラフィー、HPLC 等により化合物の単離・精製を試みた。

【結果】
フミヅキタケの培養ろ液 - 酢酸エチル可溶部から化合物 **1** および **2** が得られた。NMR を始めとした各種機器分析による構造解析を行い構造決定に至った。また、レタスに対する植物成長調節活性試験を行った。現在、更なる植物成長調節物質の単離・精製を試みている。

1) K.Fushimi *et al., Tetrahedron*, **68**, 1262-1265 (2012)

Agrocybe praecox, structural determination, plant growth regulating compound

講演番号：2C20a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ C 校舎 20 会場

チャナメツムタケ由来の生理活性物質の探索
Search for biologically functional compounds from *Pholiota lubrica*
○的場 隆太[1]、平井 浩文[1]、河岸 洋和[1,2] ([1]静大農・応生化、[2]静大院・創造)
○ Ryuta MATOBA[1], Hirofumi HIRAI[1], Hirokazu KAWAGISHI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Educational Division, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】チャナメツムタケ（*Pholiota lubrica*）はモエギタケ科スギタケ属のキノコであり、北半球温帯に分布する可食性のキノコである。ブナなどの広葉樹林やアカマツ、カラマツなどの針葉樹林に群生する木材腐朽菌の仲間で、秋になるとその子実体が発生する。チャナメツムタケに関する生理活性はいくつか知られているが、生理活性物質の単離・精製および構造解析の研究はなされていない。[1-3] 昨年度大会にて、チャナメツムタケの子実体に由来する生理活性物質を報告した。[4] 本研究では、チャナメツムタケに由来する生理活性物質の探索を試みた。
【方法および結果】チャナメツムタケ子実体をエタノール、アセトンで順次抽出を行った。減圧濃縮後、*n*-ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル、*n*-ブタノールで液 - 液分配を行い、ヘキサンおよびクロロホルム可溶部を各種クロマトグラフィーに供し、化合物の単離・精製を試みた。現在、生理活性物質の単離・精製を進め、NMRを始めとした各種機器分析による化合物の構造解析を目指している。

1) 荒川信彦ら, 日本栄養・食糧学会誌 (1977), **30**(1), 29-33
2) 関谷敦ら, 日本公開特許公報 (2007), JP 2007001961 A 20070111
3) Hiroshi Araya; *Allelopathy* (2007), 341-352
4) 的場隆太ら、平成 24 年度日本農芸化学会大会講演要旨集

Pholiota lubrica, mushroom, biologically functional compound

講演番号：2C20a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ C 校舎 20 会場

ヤマブシタケ培養ろ液由来の生理活性物質の探索

Search for biologically functional compounds from culture broth of *Hericium erinaceus*

○徳永 大輝[1]、呉 静[2]、秋山 佑介[1]、徳山 真治[1]、平井 浩文[1]、河岸 洋和[1,2] ([1]静大農・応生化、[2]静大院・創造)
○Taiki TOKUNAGA[1], Jing WU[2], Yusuke AKIYAMA[1], Shinji TOKUYAMA[1], Hirofumi HIRAI[1], Hirokazu KAWAGISHI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka Univ., [2]Educational Division, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ.)

【目的】

ヤマブシタケ（*Hericium erinaceus*）はサンゴハリタケ科サンゴハリタケ属の可食性のキノコである。広く北半球温帯以北に分布しており、夏の終わりから秋にかけて広葉樹の立木や枯木などに生える。過去に当研究室は、認知症の予防や治療への有効性が指摘されている神経成長因子の合成を促す物質として、ヘリセノン類およびエリナシン類を、それぞれヤマブシタケ子実体および菌糸体から発見したが[1-6]、この培養ろ液に関する研究はあまり行われていない。そこで本研究では、ヤマブシタケ培養ろ液に由来する生理活性物質の探索を試みた。

【方法および結果】

ヤマブシタケ培養ろ液を減圧濃縮後、ヘキサンおよび酢酸エチルで液 - 液分配を行った。得られたヘキサン可溶部および酢酸エチル可溶部をそれぞれフラッシュクロマトグラフィー、HPLC等を用いて分画し、化合物の単離・精製を試みた。その結果、酢酸エチル可溶部から新規化合物を含む数種の化合物の単離に成功した。これらの化合物の構造はMS、IRおよび各種NMRスペクトルにより決定した。これらの化合物を各種活性試験に供し、生理活性について検討する予定である。

1) Kawagishi H, et al : Tetrahedron Lett. 32, 4561-4364, 1991
2) Kawagishi H, et al : Phytochemistry 32, 175-178, 1993
3) Kawagishi H, et al : Tetrahedron Lett. 35, 1569-1572, 1994
4) Kawagishi H, et al : Heterocycl. Commun. 2, 51-54, 1996
5) Kawagishi H, et al : Tetrahedron Lett. 37, 7399-7402, 1997
6) Lee EW, et al : Biosci. Biotechnol. Biochem. 64, 2402-2405, 2000

Hericium erinaceus, biologically functional compound, structural determination

講演番号：2C20a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ C 校舎 20 会場

キシメジ（*Tricholoma flavovirens*）由来の新規機能性化合物の探索

Search for novel functional compounds from *Tricholoma flavovirens*

○邱 偉涛[1]、小堀 一[1]、平井 浩文[1]、河岸 洋和[1,2]([1]静大農・応生化、[2]静大院・創造)
○Weitao QIU[1], Hajime KOBORI[1], Hirofumi HIRAI[1], Hirokazu KAWAGISHI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Educational Division, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】

キシメジ（*Tricholoma flavovirens*）は、ハラタケ目キシメジ科キシメジ属のキノコである。秋季にマツなどの針葉樹林やコナラ、ミズナラなどのナラ類の広葉樹林内地上に発生し、北半球一帯に広く分布している[1)]。古くから可食性のキノコとして利用されてきたが、近年、キシメジと近縁種もしくは同種であると考えられている *T. equestre* による食中毒事故がヨーロッパで報告された[2)]。そこで、本研究ではキシメジ子実体粗抽出液からの様々な生理活性を持つ新規機能性化合物の探索を目的とした。

【方法・結果】

キシメジ子実体をエタノール、アセトンにより順次抽出を行った。減圧濃縮後、分液ロートを用いて順次液–液分配することによってそれぞれヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部、ブタノール可溶部及び水可溶部に分画した。これらのうちヘキサン可溶部を各種クロマトグラフィーに供し、化合物の単離・精製を試みた。現在、NMR や MS などを始めとした各種機器分析により単離・精製したフラクションの構造解析を行い、更に、各種活性試験により化合物の新規な活性の探索を試みている。

1) 今関　六也ら、日本のきのこ、p. 79
2) Petteri N. et al., *Experimental Biology and Medicine* (2006), **231**, 221-228.

Tricholoma flavovirens, spectroscopic interpretation, compounds isolation

講演番号：2C20a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ C 校舎 20 会場

ナラタケ(*Armillaria mellea*)が産生する他感作用物質の化学的解明
Chemical studies on allelopathy compounds from *Armillaria mellea*
○小堀 一[1]、呉 静[2]、関谷 敦[3]、平井 浩文[1]、河岸 洋和[1,2] ([1]静大農・応生化、[2]静大院・創造、[3]森林総研)
○Hajime KOBORI[1], Jing WU[2], Atsushi SEKIYA[3], Hirofumi HIRAI[1], Hirokazu KAWAGISHI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [3]Forestry and Forest Products Research Institute)

【目的】
キシメジ科ナラタケ属のナラタケ(*Armillaria mellea*)は生きている植物に対する寄生性、病原性が非常に強く、ナラタケ寄生による病害は「ナラタケ病」と呼ばれている。また、ナラタケは他の菌類に対する影響も強く、イッポンシメジ科イッポンシメジ属のキノコであるタマウラベニタケ(*Entoloma abortivum*) は近傍にナラタケの菌糸があると球状の奇形を生じることが知られている[1)]。我々は現在までに、ナラタケ属488菌株および543菌株から数種類の化合物を単離し、レタス(*Lactuca sativa*)に対する植物成長調節活性試験において根および胚軸の伸長を著しく抑制したことを報告している[2)]。本研究では、ナラタケが産生する他の菌類に対する活性物質の探索を目的とした。

【方法・結果】
ナラタケ属543菌株を約3週間液体培養することで得られた培養液を濾過し、菌体および培養ろ液に分け、培養ろ液を分液ロートを用いて液-液分配することによって、ヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部、1-ブタノール可溶部および水可溶部に順次分画した。それらのうちヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部から数種類の既知化合物および新規化合物の単離に成功し、新規化合物の絶対立体配置を既知化合物とのCDスペクトルを比較することにより決定した。また、それらの化合物のうち収量の多いものをブナシメジ(*Hypsizigus marmoreus*)の子実体に対する成長調節活性試験に供したところ、各化合物を投与した処理系では子実体重量が大幅に減少し、奇形子実体の発生割合が増加する傾向が見られた。

1) 今関　六也ら、日本のきのこ、p. 282
2) 小堀　一ら、平成 24 年度日本農芸化学会大会講演要旨集

Armillaria mellea, fruiting body, allelopathy compounds

講演番号：2C20a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ C 校舎 20 会場

サケツバタケが産生する機能性物質に関する化学的研究
Chemical studies on biologically functional compounds produced by *Stropharia rugosoannulata*
○呉 静[1,2]、平井 浩文[3]、河岸 洋和[1,3] ([1]静大院・創造、[2]JSPS、[3]静大農・応生化)
○ Jing Wu[1,2], Hirofumi Hirai[3], Hirokazu Kawagishi[1,3] ([1]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., [2]The Japan Society for the Promotion of Science, [3]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka Univ.)

【目的】サケツバタケはモエギタケ科モエギタケ属の食用キノコであり、日本、ヨーロッパ、北アメリカ、ニュージーランド等に自生している。昨年度の本大会において、サケツバタケから極めて新規性が高い骨格をもつstrophasterols A-Dについて発表した[1)]。本研究ではこのキノコからのさらなる活性物質の単離、精製、構造決定、活性発現機構の解明を目的とした。
【方法】サケツバタケ子実体を70%エタノール、アセトンで抽出し減圧濃縮後、ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル、水で順次抽出し、得られた各可溶部を破骨細胞形成阻害、抗小胞体ストレス誘導神経細胞死抑制、抗MRSA、抗真菌の活性試験に供した。活性が確認されたヘキサン可溶部を各種クロマトグラフィーによって分画した。
【結果】ヘキサン可溶部より、新規化合物を含む数種の活性物質を単離した。これらの化合物の構造は MS、IR および各種 NMR スペクトルにより決定した。各化合物を活性試験に供したところ、NPC1L1 阻害活性が確認された。さらに各種活性試験で活性が確認された画分から、活性物質の探索を進めている。
1) Wu, J. *et al*, ***Angew. Chem., Int. Ed. Engl.,*** 51, 10820-10822 (2012)

structure determination, mushroom, *Stropharia rugosoannulata*

講演番号：2C20p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ C 校舎 20 会場

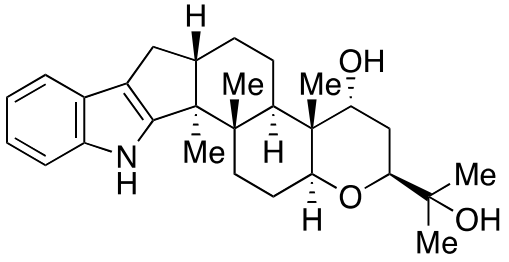
ESI-MS 分析で観測される Terpendole イオンの酸化とその抑制

Detection of oxidized Terpendole ions in ESI-MS and their suppression

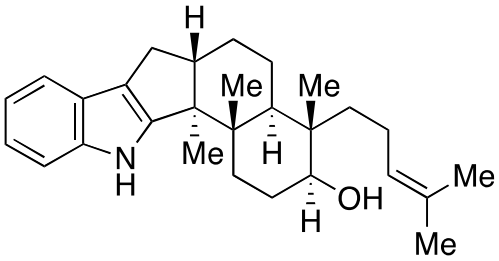
○本郷 やよい、中村 健道、高橋 俊哉、本山 高幸、林 敏明、廣田 洋、長田 裕之、越野 広雪（理研基幹研 ・ケミカルバイオロジー）
○Yayoi HONGO,Takemichi NAKAMURA,Syunya TAKAHASHI,Takayuki MOTOYAMA,Toshiaki HAYASHI,Hiroshi HIROTA,Hiroyuki OSADA,Hiroyuki KOSHINO (Chem. Biol., RIKEN ASI)

[目的] Terpendole 類は ACAT(acyl-CoA: cholesterol acyltransferase)阻害剤として報告された糸状菌由来のインドロジテルペンであり、後に分裂期キネシン KSP(Eg5)の阻害剤として再発見され抗がん剤への応用も期待される terpendole E ほか、多くの類縁化合物が存在する。Terpendole 類の生合成研究や新規同族体の探索において、微量試料中の化合物の高感度・特異的分析には HPLC と組み合わせたエレクトロスプレーイオン化質量分析法(ESI-MS)が有効であり、分子は正イオンモードで高感度に検出されると予想された。しかし、我々は terpendole 類の ESI-MS 分析では一般的な正イオンの $M^{+\cdot}$ と $[M+H]^+$ に加え、$[M+H]^+$の酸化物に相当する$[M+H+16]^+$、$[M+H+32]^+$が強く観測されることを見出した。予期せぬ+16 、+32 イオンの出現は、新規化合物の検出や分子式推定を困難にし、定量分析では低濃度領域でターゲットイオンの感度低下や定量値の再現性低下など分析上の問題となる。そこで、$[M+H+16]^+$、$[M+H+32]^+$生成機構を明らかにするため、ESI による酸化機構およびその抑制法を検討することを目的とした。

[方法と結果] 質量分析の測定試料には単離精製後の terpendole E と同族体の emindole SB を用いた。



terpendole E



emindole SB

精製した分析試料が酸化した不純物を含まないことは HPLC、NMR で確認した。また、$[M+H+16]^+$、$[M+H+32]^+$は高速原子衝撃イオン化質量分析(FAB-MS)では観測されないことから、ESI-MS での電気化学的酸化により生成し、一方 $M^{+\cdot}$、$[M+Na]^+$に対しては強い+16 、+32 は観測されないことが明らかになった。また、分子のどの部位で酸化が起こるのか検討するため、衝突誘起解離(CID)による MS/MS 実験とフラグメンテーション解析を行った。さらに、抗酸化物質であるヒドロキノンを添加すると $[M+H+16]^+$、$[M+H+32]^+$の生成が抑えられることを確認した。その他、ESI-MS の分析条件により酸化を抑制する方法を検討した詳細について報告する。

electrospray ionization mass spectrometry, Terpendoles, electrochemical oxidation

講演番号：2C20p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ C 校舎 20 会場

Talaromyces rugulosus FKI-5329 が生産する NADH-フマル酸還元酵素阻害化合物
NADH-fumarate reductase inhibitors produced by *Talaromyces rugulosus* FKI-5329

○森 美穂子[1,2]、増間 碌郎[1,2]、高橋 洋子[1,2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2] ([1]北里大院・感染制御、[2]北里大・生命研)
○ Mihoko MORI[1,2], Rokuro MASUMA[1,2], Yoko TAKAHASHI[1,2], Satoshi OMURA[2], Kazuro SHIOMI[1,2] ([1]Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato Univ., [2]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato Univ.)

【背景と目的】寄生虫の中でも蠕虫症は、死に至るケースこそ原虫症に比べ少ないものの経過が慢性的で、長期間にわたり人の健康や社会生活に影響を与えるため、特に開発途上国では未だ大きな問題となっている。我々は新たな抗蠕虫薬の開発を目的として、蠕虫特異的な嫌気的エネルギー代謝系に着目し、同代謝系上のミトコンドリア呼吸鎖複合体IとIIから成るNADH-フマル酸還元酵素（NADH-fumarate reductase, NFRD）を阻害する化合物を微生物二次代謝産物から探索した。

前年度、糸状菌*Talaromyces rugulosus* FKI-5329株培養液から単離したNFRD阻害化合物prugosene A1とその新規立体異性体の構造と阻害活性を報告した。今回、さらに同糸状菌培養液から新規prugosene類縁体を見出したので構造と活性について報告する。

【方法と結果】NFRD 阻害活性はブタ回虫（*Ascaris suum*）体壁筋から調製した粗ミトコンドリアを用いて測定した。NFRD は哺乳類の呼吸鎖にも存在する複合体 I を含む。NFRD 阻害活性を示すサンプルから哺乳類の複合体 I を阻害するものを除くため、ウシ心筋から調製した粗ミトコンドリアを用いて、複合体 I を含む NADH-酸化酵素の阻害活性も併せて調べた。8,000 サンプルを超える糸状菌・放線菌培養液サンプルをスクリーニングした結果見出した糸状菌 *Talaromyces rugulosus* FKI-5329 株をコメ培地で培養し、その培養物に NFRD 阻害化合物 prugosene A1 と各種類縁化合物が含まれていることを確認した。培養物を酢酸エチルで抽出後、各種カラムクロマトグラフィーで精製し、prugosene A1 の新規類縁体を単離した。

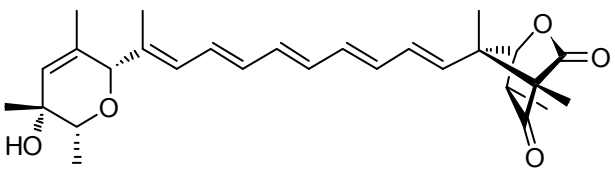


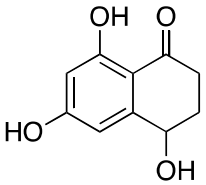
Figure. Prugosene A1 の構造.

Ascaris suum, NADH-fumarate reductase, *Talaromyces*

講演番号：2C20p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ C 校舎 20 会場

In vitro 細胞アッセイによる微生物培養液からの抗インフルエンザウイルス活性物質の探索
Screening for anti-influenza virus compound from secondary microbial metabolites
○渡辺 正浩[1]、石井 貴広[1,2]、野中 健一[2]、松本 厚子[2]、増間 碌朗[1,2]、高橋 洋子[1,2]、永井 隆之[2]、山田 陽城[1,2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2] ([1]北里大感染制御科学、[2]北里大生命研)
○ Masahiro WATANABE[1], Takahiro ISHII[1,2], Kenichi NONAKA[2], Atsuko MATSUMOTO[2], Rokuro MASUMA[1,2], Yoko TAKAHASHI[1,2], Takayuki NAGAI[2], Haruki YAMADA[1,2], Satoshi OMURA[2], Kazuro SHIOMI[1,2] ([1]Grad. Sch. Infect. Control Sci.,Kitasato Univ., [2]Kitasato Inst. Life Sci., Kitasato Univ.)

【背景と目的】現在、インフルエンザウイルス（IFV）への対抗手段として、ワクチンと抗 IFV 薬があるが、ワクチンは抗原性が不一致であると効果が低い。また抗 IFV 薬ではタミフルなどのノイラミニダーゼ阻害薬が用いられているが、それに耐性化したウイルスが報告されている。このような背景から新薬の開発が求められている。本研究室では以前に H1N1 亜型 IFV（A/PR/8/34）を用いたスクリーニングより、糸状菌 *Trichoderma* 属の培養液から抗 IFV 活性物質である wickerol 類および harziandione 類縁体を取得している。本研究では抗原性の異なる H3N2 亜型 IFV (A/Guizhou/54/89) をスクリーニングに用いることで、これまでと異なる活性物質の取得を目指した。
【方法】イヌ腎臓尿細管上皮細胞（MDCK 細胞）に IFV を感染させた後、微生物培養液を添加し、37°C、5% CO_2 の条件で 72 時間培養した。細胞をクリスタルバイオレット溶液にて染色した後、吸光度を測定した。得られた吸光度から生存率を算出し、抗ウイルス薬リバビリンを対照として、活性の評価を行った。その結果、抗 IFV 活性を示した *Chloridium* sp. FKI-6627 株を培養し、得られた培養液について EtOAc 抽出を行った。この抽出物を ODS カラムクロマトグラフィーおよび PTLC を用いて活性物質を単離・精製し、各種機器分析を用いて、構造解析を行った。
【結果】放線菌培養液 3,455 サンプルおよび糸状菌培養液 3,760 サンプル（計 7,215 サンプル）についてスクリーニングを行った結果、放線菌培養液 10 サンプル、糸状菌培養液 11 サンプルに抗 IFV (H3N2) 活性がみられた。このうち、糸状菌 *Chloridium* sp. FKI-6627 株の培養液から、6-hydroxyisosclerone[1)]が得られた（IC_{50}=40 μg/ml)。



6-hydroxyisosclerone

(参考文献)
[1)]Iwasaki S, *et al.*, Tetrahedron Lett. **37**, 3537-3542 (1973).

microbial metabolite, influenza virus, screening

講演番号：2C20p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ C 校舎 20 会場

インドネシア産糸状菌が生産する赤痢アメーバ特異的含硫アミノ酸代謝酵素阻害化合物

An inhibitor against sulfur-containing amino acid metabolic pathway of *Entamoeba histolytica* produced by an Indonesian fungus strain

○増田 祐衣[1]、森 美穂子[1,2]、野崎 智義[3]、Kristiningrum[4]、Danang Waluyo[4]、Tarwadi[4]、渡辺 吉雄[5]、増間 碌郎[1,2]、高橋 洋子[1,2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2]（[1]北里大院・感染制御、[2]北里大・生命研、[3]国立感染研、[4]BPPT（インドネシア）、[5]日本マイクロバイオファーマ）
○Yui Masuda[1], Mihoko Mori[1,2], Tomoyoshi Nozaki[3], Kristiningrum[4], Danang Waluyo[4], Tarwadi[4], Yoshio Watanabe[5], Rokuro Masuma[1,2], Yoko Takahashi[1,2], Satoshi Omura[2], Kazuro Shiomi[1,2]（[1]Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato Univ., [2]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato Univ., [3]Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, [4]BPPT（Indonesia）, [5]MicroBiopharm Japan）

【背景】

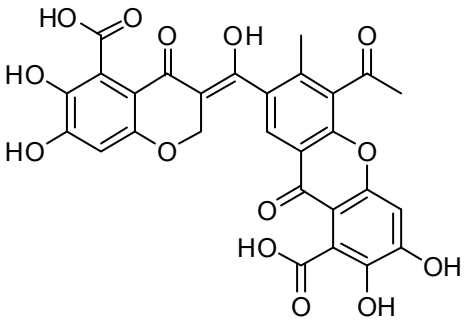
赤痢アメーバ症は赤痢アメーバ（*Entamoeba histolytica*）が水・食物から経口感染し大腸に寄生することにより起こる下痢症であり、熱帯～亜熱帯の開発途上国で多数の感染者がみられる。また我が国においても近年、年間千件を超える発症事例が厚生労働省に報告され、重要な感染症の一つとなっている。治療には抗菌・抗原虫薬であるメトロニダゾールが用いられているが、感染に関与するシスト状態の原虫には効かないことに加え、耐性原虫の出現、催奇形性等の問題があり、異なる作用機構を持つ新薬の開発が望まれている。我々は赤痢アメーバに特異的な含硫アミノ酸代謝を担う酵素群に着目し、これらの酵素を阻害する物質は赤痢アメーバ症の治療薬になると考え、微生物二次代謝産物からの探索を進めている。

【方法】

哺乳類とは異なり、赤痢アメーバの含硫アミノ酸代謝経路ではセリンからセリン-アセチル転移酵素（SAT）とシステイン合成酵素（CS）によりシステインが合成される。我々は大腸菌で発現させた赤痢アメーバのSATとCSを用いて、96穴プレートでの酵素阻害活性測定系を構築し、これを用いて放線菌・糸状菌培養液から両酵素の阻害化合物を探索した。

【結果】

インドネシア産を含む放線菌または糸状菌の培養液計6,700サンプルをスクリーニングし、SAT、CSをそれぞれ阻害する微生物培養液を見出した。その中から強いCS阻害活性を示すインドネシア産糸状菌培養液を選択し、各種カラムクロマトグラフィーにより阻害化合物の精製を行った結果、xanthofulvin（IC_{50}=1.7 μM）を単離した。



Entoamoeba histolytica, cysteine synthase, xanthofulvin

講演番号：2C20p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ C 校舎 20 会場

微生物代謝産物からの MRSA に対するアルベカシン耐性克服物質の探索

Search for circumventors of arbekacin resistance in MRSA

○須賀 拓弥[1]、石井 貴広[1,2]、岩月 正人[2]、山本 剛[2]、野中 健一[2]、増間 碌郎[1,2]、花木 秀明[2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2] ([1]北里大感染制御科学、[2]北里大生命研)
○Takuya Suga[1], Takahiro Ishi[1,2], Masato Iwatsuki[2], Tsuyoshi Yamamoto[2], Kenichi Nonaka[2], Rokuro Masuma[1,2], Hideaki Hanaki[2], Satoshi Omura[2], Kazurou Shiomi[1,2] ([1]Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato Univ., [2]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato Univ.)

【目的】

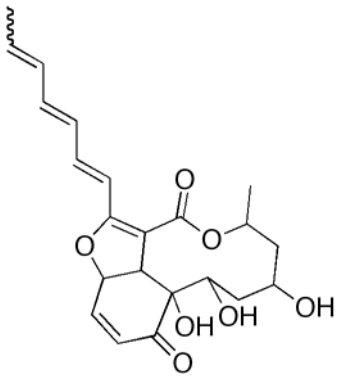
アミノグリコシド系抗生物質アルベカシン（ABK）は、薬剤耐性菌にも有効であるため MRSA に対して用いられてきたが、ABK 耐性 MRSA も出現しており、使用範囲が限定されるようになってきた。MRSA の主な ABK 耐性機構は、修飾酵素である二機能酵素による ABK のアセチル化およびリン酸化と考えられている。この二機能酵素を阻害することができれば、ABK 耐性を克服できることが期待される。そこで、微生物代謝産物からの MRSA に対する ABK 耐性克服活性物質の探索を行った。

【方法】

活性評価はペーパーディスク法により行い、試験菌として ABK 耐性 MRSA を用いた。菌の増殖に影響を与えない濃度の ABK を含有した寒天培地と ABK 非含有寒天培地にそれぞれペーパーディスクを置いて培養し、両寒天培地で阻止円径に有意な差が認められるものを選択した。[a)]

単離した活性物質については二機能酵素阻害活性を評価した。大腸菌により発現させたリコンビナント二機能酵素を用いて酵素反応を行い、反応液を TLC にて展開しニンヒドリンで呈色させ、基質が残存しているか確認した。

【結果】



FKI-6714物質

糸状菌ならびに放線菌の培養液6,699サンプルをスクリーニングした結果、14株の微生物培養液にABK含有培地と非含有培地で有意な差が認められた。これらの微生物培養液について、各種カラムクロマトグラフィーにより精製を行った結果、10個の活性物質を単離した。そのうち、糸状菌である*Penicillium* sp. FKI-6714株から取得した活性物質は、10員環ラクトンを有する新規物質であった。現在詳細な活性について解析中である。

a) T. Suga *et al. J. Antibiot*: **65**, 527-529 (2012).

Arbekacin resistance in MRSA, circumventor of resistance, microbial metabolite

講演番号：2C20p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ C 校舎 20 会場

新規抗インフルエンザウイルス活性物質の探索
Search for a novel anti-influenza virus compound
○千葉 拓也[1]、石井 貴広[1,2]、山本 剛[2]、野中 健一[2]、増間 碌郎[1,2]、永井 隆之[1,2]、山田 陽城[1,2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2] ([1]北里大感染制御科学、[2]北里大生命研)
○Takuya Chiba[1], Takahiro Ishii[1,2], Tsuyoshi Yamamoto[2], Kenichi Nonaka[2], Rokuro Masuma[1,2], Takayuki Nagai[1,2], Haruki Yamada[1,2], Satoshi Omura[2], Kazuro Shiomi[1,2] ([1]Graduate school of infection control sciences, Kitasato Univ., [2]Kitasato institute for life sciences, Kitasato Univ.)

【背景と目的】
インフルエンザウイルスは変異を繰り返しながら毎年のように世界中で流行し、またそれに加えて数十年に一度、数百万～数千万の死者を出す世界規模の大流行が起こっている。現在アジアを中心として家禽類に大規模な流行を起こしている高病原性鳥インフルエンザ H5N1 なども、次の世界的流行を引き起こすウイルスとして危惧されている。現状でヒトへの被害を食い止める手段は、ワクチンの接種もしくは薬剤の投与となるが、新型ウイルスの大流行にあたっては流行予測が必要なワクチンによる対応が困難であり、また発症後の治療には利用できない。
従って治療薬の存在は不可欠であるが、現在利用可能な抗インフルエンザ薬は 2 つの作用点に対する 5 種（日本認可は 4 種）のみである。しかし既に耐性種も出現しており、投与法やウイルス亜型に対するスペクトル、副作用などの問題点もあることから、大流行時の備えとして充分とは言い難い。したがって、新たな抗インフルエンザ薬の開発に対する社会的関心は高い。そして新型や薬剤耐性のウイルス対策としては作用点や構造の異なる薬剤を複数持つことが重要であり、新しい薬剤が求められている。そこで、本研究では微生物代謝産物を探索源として、新しい作用機構、化学構造を持つ新規抗インフルエンザウイルス活性物質の探索を目指している。
【方法】
本アッセイは一般的に抗インフルエンザウイルス活性を評価する手法である *in vitro* アッセイ系を用いている。概略としてはインフルエンザ感受性細胞である MDCK 細胞(イヌ腎臓上皮細胞由来の培養細胞)にインフルエンザウイルス(A/PR/8/34)とサンプルを添加し、ウイルス感染による細胞の生死をクリスタルバイオレット染色法により判定した。
【結果と考察】
微生物培養液からスクリーニングを行った結果、糸状菌培養液サンプルから 3,040 サンプル、放線菌培養液 2,140 サンプルから 14 サンプルに活性がみられた。活性がみられた株を三角フラスコ 3 本で培養を行い、培養再現性を確認した。その結果、7 株が有望株として選定された。今後、選定された株を再培養しその培養液の精製を進めていく。

Influenza virus, screening, antibiotics

講演番号：2C20p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ C 校舎 20 会場

Aspergillus sp. FO-5897 の生産する新規 NADH-フマル酸還元酵素阻害物質

A new NADH-fumarate reductase inhibitor produced by *Aspergillus* sp. FO-5897

○海渕 覚[1]、森 美穂子[1,2]、酒井 一成[2]、藤澤 圭[2]、岩月 正人[2]、増間 碌郎[1,2]、高橋 洋子[1,2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2] ([1]北里大院感染制御、[2]北里大生命研)
○Satoru KAIFUCHI[1], Mihoko MORI[1,2], Kazunari SAKAI[2], kei FUJISAWA[2], Masato IWATSUKI[2], Rokuro MASUMA[1,2], Yoko TAKAHASHI[1,2], Satoshi OMURA[2], Kazuro SHIOMI[1,2] ([1]Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato Univ., [2]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato Univ.)

【背景と目的】

蠕虫症は、線虫、吸虫および条虫などの多細胞の寄生虫によって生じ、経過が慢性的で健康被害が長期間にわたる傾向がある。蠕虫症が蔓延する熱帯および亜熱帯地域では、その持続的な障害が重篤な問題となっている。また、近年日本でもグルメ嗜好、有機野菜の重用などにより蠕虫症の報告例が再び増加傾向にある。

このように蠕虫症は世界規模で問題となっているにもかかわらず，治療に用いられる薬剤は種類が限られ、かつ多くが長期間使用されている。さらに、同じ薬剤が家畜やペットの治療にも使用されており、薬剤耐性寄生虫の出現は広い分野で問題となる。

このような背景のもと、我々は新たな抗蠕虫薬の開発を目指して、微生物代謝産物からの抗蠕虫活性物質の探索研究を進めている。探索ターゲットとして、宿主の体内という嫌気的環境で生育するブタ回虫（*Ascaris suum*）の NADH−フマル酸還元酵素（NFRD）に着目した。この酵素はブタ回虫の嫌気的エネルギー代謝にかかわり、ミトコンドリアの電子伝達系酵素複合体 I および複合体 II の逆反応で構成される。ヒトを含む哺乳類は NFRD を介した嫌気的エネルギー代謝系を用いないため、NFRD を選択的に阻害する物質は宿主である哺乳類に無害な抗蠕虫薬として展開できると予想される。今回、微生物培養液を探索源としてスクリーニングを行った結果、糸状菌培養液から新規 NFRD 阻害物質を見出したので報告する。

【方法および結果】

NFRD 阻害活性はブタ回虫成虫の体壁筋より調製した粗ミトコンドリア画分を粗酵素として用い、基質である NADH の消費による 340 nm の吸光度減少を測定することで評価した。また、ウシ心筋より調製した粗ミトコンドリア画分を用いて NADH 酸化酵素（複合体 I+ III+ IV）の活性を調べ、哺乳類の複合体 I を阻害するサンプルを除外した。土壌糸状菌・土壌および植物由来の放線菌培養液約 8,800 サンプルを新たにスクリーニングし、その中から糸状菌 *Aspergillus* sp. FO-5897 の培養液に NFRD 選択的な阻害活性を見出した。この糸状菌をコメ培地で 3 週間静置培養した後、メタノールで抽出し、各種カラムクロマトグラフィーで NFRD 阻害物質を単離した。各種機器分析の結果、活性物質は α―ピロン環を構造内に持つ新規化合物であることを明らかにした。

NADH-fumarate reductase, antiparasite, *Aspergillus* sp.

講演番号：2C20p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ C 校舎 20 会場

糸状性硫黄酸化細菌の鞘からのグルコサミノグルカンと 4-アミノ-4,6-ジデオキシ-マンノース（ペロサミン）の同定

Identification of glucosaminoglucan and 4-amino-4,6-dideoxy-mannose (perosamine) from the sheath of a filamentous sulfur-oxidizing bacterium

○成塚 理絵[1]、近藤 敬子[1]、志村 庄一[1]、梅津 卓人[1]、武田 穣[1]、真嶋 司[2]、片平 正人[2]([1]横国大院工、[2]京大エネルギー理工学研)
○Rie NARIZUKA[1], Keiko KONDO[1], Shoichi SHIMURA[1], Takuto UMEZU[1], Minoru TAKEDA[1], Tsukasa MASHIMA[2], Masato KATAHIRA[2] ([1]Yokohama National Univ., [2]Kyoto Univ.)

【背景】*Thiothrix* 属は糸状性の硫黄酸化細菌である。活性汚泥に常在し、汚泥の膨化による沈降性低下（糸状性バルキング）との関連性が指摘されている。本属の一部の種は細胞列を包み込むマイクロチューブ状構造体（鞘）を形成する。鞘形成種は分子系統学的に 2 系統（*T. nivea* 群と *T. fructosivorans* 群）に大別される。*T. nivea* の鞘はβ-1,4-グルコサミノグルカン（GG）にデオキシ糖（未同定）の修飾が施された分岐多糖を基本構造単位とすることが分かっている。分岐多糖の細胞近傍での局所的凝集能がマイクロチューブ状構造をもたらすと予想され、この機能性が鞘形成多糖の特徴である。この機能性は化学構造に起因するはずで、*Thiothrix* 属の鞘形成多糖における化学構造上の共通性と多様性を把握することが望まれる。*T. fructosivorans* の鞘の化学的実体は未解明であり、本研究では同種の鞘を精製し、鞘形成多糖の化学構造の解明を試みることとした。
【方法・結果】*T. nivea* で確立した鞘の調製手順に従って *T. fructosivorans* をリゾチーム・NaOH・SDS で処理し、残渣として鞘を得た。得られた鞘がマイクロチューブ構造を保持していることを電子顕微鏡と走査プローブ顕微鏡で確認した。鞘の酸加水分解物由来のアルジトールアセテートおよび(–)-2 ブチル配糖体の TMS 化物を GLC 分析したところ、D-グルコース・D-グルコサミン・L-フコース由来の誘導体がほぼ等モルで検出された。ところが、加水分解物由来の還元アミノ化物（ABEE 化物）を HPLC 分析したところ、これらの糖由来の誘導体の他に既知の糖の誘導体とは異なる保持時間を示す誘導体が検出された。この誘導体を回収して溶液 NMR 分析すると、ペロサミン（Rha4N）とフコースから成る 2 糖の誘導体であることが示唆された。この 2 糖を得るため、鞘に対して弱い加水分解を行った後に *N*-アセチル化を施し、サイズ排除クロマトグラフィーでオリゴ糖画分を回収した。回収した画分の溶液 NMR 分析を行ったところ、α-Rha4NAc-(1→3)-Fuc の化学構造が確認された。なお、ペロサミンは希少糖の 1 つであり、病原性大腸菌やビブリオなどのリポ多糖の成分として報告されているのみで、菌体外多糖成分としての報告はなかった。2 糖を得るために行った弱い加水分解では、塩基性で不溶であり酸性で可溶な多糖（GG と思しき多糖）も主要な部分分解物として得られた。その多糖の固体および溶液 NMR スペクトルは *T. nivea* 由来の GG のスペクトルと一致した。以上の結果より、*T. fructosivorans* の鞘は GG を主鎖とし、α-Rha4N-(1→3)-Fuc を側鎖とする塩基性分岐多糖の会合体であることが判明した。したがって、*Thiothrix* 属の鞘形成多糖は 1 種あるいは 2 種のデオキシ糖で修飾されたβ-1,4-グルコサミノグルカンであることが明らかとなった。

Glucosaminoglucan, Perosamine, *Thiothrix fructosivorans*

講演番号：2C20p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ C 校舎 20 会場

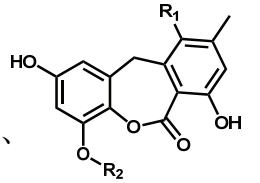
マングローブ林分離糸状菌が塩添加培養により生産する物質について

Salt-dependent compounds produced by the mangrove endphytic fungus

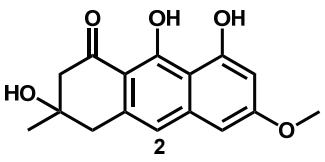
○渋谷 史明、小関 卓也、村山 哲也、塩野 義人（山形大農）
○ FUMIAKI SHIBUYA,TAKUYA KOSEKI,TETSUYA MURAYAMA,YOSHIHITO SHIONO (Yamagata Univ.)

【目的】熱帯から亜熱帯地域の沿岸に見られるマングローブ林は海水から汽水域に生育し、その特殊な環境から、群生する塩性植物には、陸上植物とは異なる多種多様な内生菌が存在している。これまでに、それら内生菌から多くの生理活性物質が単離されており、マングローブ植物内生菌は天然物の探索源としても注目されている。しかし、それら内生菌の環境適応力に着目し、実際にマングローブ林という特殊な環境に対する物質生産性能力を十分に引き出そうとした研究例は少ない。そこで、本研究では、培養条件の変化や環境ストレスを与えることにより、新たに誘導、生産される物質の単離を目的とした。すなわち、マングローブ林より採取した塩性植物由来内生菌から培地に海水と同程度の塩（NaCl）を添加することで、塩ストレスにより二次代謝産物生産パターンが変化する菌株を選別し、誘導される物質の探索を行った。

【方法および結果】採取したマングローブ植物サンプルより分離した糸状菌 40 株を、培養培地に 3% NaCl を添加し、二次代謝産物生産パターンが変化する菌株を探索した。その結果、*Eurotium rubrum* IM-26 株の培養抽出物の TLC 分析において、NaCl 添加により誘導される物質が認められたことから、IM-26 株が生産している物質を明らかにすることにした。IM-26 株を 3 %の NaCl 添加玄米培地で 30 日間培養し、得られた酢酸エチル抽出物を TLC のスポットを指標に各種カラムクロマトグラフィーを用いて精製し、化合物 **1** - **5** を単離した。各種機器分析を用いた構造解析の結果、**1** は高分解能マススペクトルより、分子式を $C_{15}H_{12}O_6$ と決定され、**1** の ^{1}H, ^{13}C-NMR スペクトルデータよりアントラキノン骨格を有する既知の化合物の eurotinone と同定した。また、 **3** - **5** は ^{1}H, ^{13}C-NMR スペクトルデータより、eurotinone の類縁体であることが分かった。**2** は高分解能マススペクトルより、分子式を $C_{16}H_{16}O_5$ と決定され、^{1}H, ^{13}C-NMR スペクトルデータより、**2** は既知の 1 - アントラセノン骨格を有する化合物の torosachrysone と同定された。また、ペーパーディスク法を用いたアッセイ試験より、**1** - **5** の抗菌活性が確認された。さらに、LC/MS 分析より、**1**，**2**，**5** は NaCl 添加培養により生産誘導されることが分かった。



1 : R_1 = OH R_2 = H
3 : R_1 = OH R_2 = CH_3
4 : R_1 = H R_2 = CH_3
5 : R_1 = H R_2 = H



2

Mangrove, Endophytic fungus, *Eurotium rubrum*

講演番号：2C20p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ C 校舎 20 会場

RNA 代謝を標的とする新規薬剤の探索

Search for novel antibiotics targeting RNA metabolism

○高田 綾子[1]、和地 正明[2] ([1]東工大、[2]東工大院生命理工)
○Ayako TAKADA[1], Masaaki WACHI[2] ([1]Tokyo Inst. Tech., [2]Dept. Bioeng., Tokyo Inst. Tech.)

細菌感染症の化学療法において、多剤耐性菌の出現は重大な問題となっている。この問題に対抗する有望な戦略の一つは、新規標的を有する薬剤の開発であろう。近年細菌でも転写後の mRNA レベルで分解、プロセシングによる制御を受けている遺伝子の報告が増加しており、遺伝子発現において RNA 代謝が重要であることが示唆されている。我々はこれまでに RNA シャペロンである Hfq タンパク質が細胞分裂遺伝子 *ftsZ* の発現や（1)、病原性に重要な酸耐性機構 Gad システムの発現に関与していることを見出している（2)。そこで、Hfq の関わる RNA 代謝を標的とした新規スクリーニング系を構築し、細菌の細胞分裂や病原性を抑制する新規薬剤の発見を目的として、探索をおこなった。

Hfq タンパク質の過剰発現は FtsZ タンパク質の合成低下を引き起こし、細胞分裂を阻害する。この分裂阻害を指標にし、Hfq の関わる RNA 代謝を標的とした新規スクリーニング系を構築した。具体的には Hfq の発現が IPTG 誘導可能な菌株を含んだ寒天プレート上に、サンプル溶液を浸み込ませたペーパーディスク(直径 8 mm)を置き、30℃で培養し、ペーパーディスクの周辺にコロニー形成が見られるようなサンプルを探索した。まず、既知の薬剤を用いて探索を行った結果、Rifampicin が濃度依存的に生育を回復することを見出した。Rifampicin は RNA 合成阻害剤であり、RNA 合成を介して Hfq タンパク質の発現を調節している可能性が考えられる。これにより、本スクリーニング系の有効性が示された。続いて、これまでに収集した土壌分離菌のライブラリーを用いて探索を行った。その結果、切り出した寒天の周辺にコロニー形成がみられるサンプルを 3 サンプル見出した。これらは Rifampicin とは異なる挙動を示した。本スクリーニング系により、Hfq タンパク質の発現を抑制する化合物や Hfq の機能を抑える化合物が見出されてくると考えられる。そのような薬剤が見出されることにより、細胞分裂および酸化ストレス防御機構、酸耐性機構に関与する遺伝子発現を抑制できると思われる。

参考文献

(1) Takada A, Nagai K, Wachi M. (2005) A decreased level of FtsZ is responsible for inviability of RNase E-deficient cells. Genes Cells. **10**, 733-741.
(2) Takada A, Umitsuki G, Nagai K, Wachi M. (2007) RNase E is required for induction of the glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*. Biosci Biotechnol Biochem. **71**, 158-164.

RNA metabolism, antibiotics, Hfq

講演番号：2C20p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ C 校舎 20 会場

pre-SMTP を用いた SMTP 同属体の合成と活性評価

Evaluation of novel SMTP congeners synthesized from pre-SMTP

○清水 広大、西村 祐一、辻原 浩太、鈴木 絵里子、蓮見 惠司（東京農工大農）
○ Kodai SHIMIZU,YUUICHI NISHIMURA,KOTA TSUJIHARA,ERIKO SUZUKI,KEIJI HASUMI (Tokyo Noko Univ.)

[背景・目的] SMTPs は糸状菌 *S.microspora* が生産する triprenyl phenol 化合物の一群であり、血栓溶解作用を促進する低分子化合物として単離された。SMTPs はイソプレン側鎖とクロマンラクタムから成る基本骨格と、ラクタム環の窒素原子に結合する側鎖から成る。培地へ特定のアミンを過剰に添加することによって、特定の側鎖を持つ SMTPs が合成でき、これまでに 50 種類以上の同族体が単離されている。SMTPs には、血栓溶解促進作用に加え抗炎症活性を持つ同族体が含まれ、最近、抗炎症作用の標的として soluble epoxide hydrolase (sEH)が同定された。sEH は epoxide hydrolase と phosphatase の二つの酵素活性を持ち、抗炎症活性を有する epoxyeicosatrienoic acid を、不活性な dihydroxyeicosatrienoic acid に変換するため、炎症性疾患の治療のターゲットとして注目されている。従って、SMTPs は血栓塞栓症治療薬と同時に、抗炎症薬としての開発も期待される。SMTPs の生合成経路の研究により、SMTPs の前駆体として pre-SMTP を単離、同定した。pre-SMTP は *o*-ジアルデヒド構造を有し、一級アミンと反応して、フタルイミジンを形成する。したがって、pre-SMTP と一級アミンを反応させることにより、簡便に多様な SMTPs の合成ができる。この方法では、従来の発酵法では生産できないタイプの SMTPs も合成でき、新規同族体の合成に非常に有用である。またこの方法では、発酵法と比べ、極めて小さいスケールで新規同族体の合成と活性測定を行うことができるため、構造活性相関研究には特に有用である。本研究においては、特に sEH 阻害活性に注目して多様な新規 SMTP 同族体を合成し、阻害活性とバイオアベイラビリティーの評価を行った。

[方法] *S.microspora* の培養から、溶媒抽出、シリカゲルクロマトグラフィーにより pre-SMTP を精製した。精製した pre-SMTP と各種アミンを、酢酸を触媒として反応させ、HPLC にて分析した。得られた新規同族体は、酵素アッセイを用いて sEH 阻害活性を測定した。有用と考えられた同族体について培養から大量合成を行い、精製、構造決定を行った。

[結論] 本研究により、sEH 阻害に関して有用と考えられる新規同族体を合成した。また sEH 阻害活性について、構造活性相関情報を得た。今後は同様の方法を用いて、経口吸収性についても有用な同族体を合成することができると考えられる。

pre-SMTP, bioreactive metabolites

講演番号：2C20p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ C 校舎 20 会場

A Novel Cancer Cell Motility Inhibitor from Fusarium sp. FN080326, Fusarisetin A and Its Derivatives

○Jae-Hyuk JANG[1,3], Yukihiro ASAMI[1,2,3], Jun-Pil JANG[1,3], Hiroyuki OSADA[2,3], Jong Seog AHN[1,3] ([1]Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, [2]RIKEN Advanced Science Institute, [3]KRIBB-RIKEN Collaboration Research Center for Chemical Biology)

Secondary metabolites produced by microorganisms are a valuable repository of natural bioactive compounds, many of which have been identified as useful research reagents and potential drug candidates. It is often time consuming and expensive to identify new bioactive molecules using conventional screening strategies. As an alternative approach, we fractionated and screened various fungal extracts using the 3-D epithelial culture system which allows for the visualization of unique phenotypes such as outgrowth potential, motility, differentiation ability, and morphology formation. This screening system uses a gel of reconstituted basement membrane proteins containing growth factors. Since the tissue structure and function of epithelial tumors depend on coordinated cues from the extracellular matrix (ECM), neighboring cells, and growth factors and the acquisition of malignancy is generally accompanied by a tumor cell motility, such as acinar morphogenesis, migration, and invasion, this screening approach would aid in the discovery of antitumor reagents related to tumor cell motility. For the screening sources, we have isolated the fungal strains from soil and marine samples and then prepared the cultured filtrates. In the course of screening our fractionated library, we discovered a fraction derived from the fungus *Fusarium* sp. FN080326, that exhibited inhibitory activity on 3-D matrigel induced acinar morphogenesis of MDA-MB-231 cells. The EtOAc-soluble portion of the fungal extract was purified using ODS column chromatography followed by HPLC to afford novel bioactive fungal metabolite named fusarisetin A. The structure of the fusarisetin A was determined by in detail NMR, CD, X-ray analysis (SPring-8), and chemical reaction experiments to have a pentacyclic ring system comprising a decaline-moiety (6/6) and a tricyclic moiety (5/5/5). We found that fusarisetin A inhibited acinar morphogenesis, cell migration, and cell invasion without showing any significant cell toxicity using a MTT assay and FACS analysis. These results suggest that fusarisetin A is a promising small molecule acinar morphogenesis inhibitor. We report herein the isolation, structural elucidation, and biological activity of fusarisetin A and its derivatives.

fusarisetin, acinar morphogenesis, fungus

講演番号：2C20p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ C 校舎 20 会場

Isolation and Structure Determination of New Azaphilone Type Metabolites Isolated from Fungal Strain

○Sangkeun SON[1,3,4], Jong-Won Kim[1,4], Seung Min Kim[1,4], Sun-Ok Kim[1,4], Masashi Ueki[2,4], Jae-Hyuk Jang[1,3,4], Hiroyuki Osada[2,4], Jong Seog Ahn[1,3,4] ([1]Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, [2]RIKEN Advanced Science Institute, [3]University of Science and Technology, [4]KRIBB-RIKEN Collaboration Research Center for Chemical Biology)

In modern life, the roles of diverse natural products entered a new phase with explosive increase of biological knowledge, especially as the key source for new therapeutic agents. It is therefore required to study diversity of microorganisms such as actinomycetes, fungi and their secondary metabolites. In the course of our investigating structurally diverse secondary metabolites of fungi from ecologically various environments, we discovered several new class azaphilones and known azaphilones such as penicilazaphilone A, sclerotiorin from one fungal culture.

The fungal strain was isolated from a soil sample collected in Daejeon, Korea. As a fermentation condition appropriate for this fungal strain, solid culture media was preferred to liquid culture media after verifying that the solid state fungal culture showed more enriched secondary metabolite profile observed by HPLC than liquid state one. The EtOAc-soluble portion of the fungal extract was purified using reversed-phase(ODS) column chromatography followed by reversed-phase HPLC to afford pure compounds. Chemical structures of diverse azaphilone-type compounds were established on the basis of 1D and 2D NMR.

The azaphilones, interesting set of secondary fungal metabolites, have not only structural diversity but broad biological activities including antimicrobial, antifungal, cytotoxic and anti-inflammatory activities. This shortage of selective bioactivities considered one of the major obstacles to drug development emphasizes the necessity of discovering new azaphilones and their specific biological activities. As a part of efforts to work out this problem, a wide variety of bioactivities of azaphilones from this fungal strain are being evaluated

azaphilone, fungus, bioactive metabolite

講演番号：2C20p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ C 校舎 20 会場

Isolation and Structure Determination of New Anthramycin Derivatives from Streptomyces sp. AN091689

○MiJin OH[1,3,4], Masashi Ueki[2,4], Soo-Jin Choo[1,4], Jae-Hyuk Jang[1,3,4], Hiroyuki Osada[2,4], Jong Seog Ahn[1,3,4] ([1]Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, [2]RIKEN Advanced Science Institute, [3]Uiversity of Science and Technology, [4]KRIBB-RIKEN Collaboration Research Center for Chemical Biology)

Actinobacteria have been proven to be valuable resources for the discovery of novel secondary metabolites. In the course of program to discover the novel bioactive compounds from microorganisms, we found new anthramycin derivatives from the cultured extract of *Streptomyces* sp. AN091689, using various chromatographic methods such as silica gel, reversed-phase column chromatography and HPLC. The chemical structures of new anthramycin derivatives were determined on the basis of extensive spectroscopic analysis using 1D- (1H and 13C), 2D- NMR (COSY, HSQC, HMBC and NOESY) techniques and MS experiment. Anthramycin type analogues are naturally occurring antitumor antibiotics that exert their cytotoxic activity by covalently bonding to the C-2 amino group of guanine residues within the minor groove of DNA. Herein we report the isolation, structural determination of new anthramycin derivatives.

anthramycin, streptomyces, secondary metabolite

講演番号：2C20p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ C 校舎 20 会場

Stenotrophomonas maltophilia のシデロフォアに関する研究
Siderophore produced by *Stenotrophomonas maltophilia*
○泉 裕己[1]、伊藤 千浩[1]、梶川 揚申[1]、田中 尚人[2]、佐藤 英一[1]、岡田 早苗[1] ([1]東農大応生科・化学、[2]東農大・菌株)
○Yuki Izumi[1], Chihiro Ito[1], Akinobu Kjikawa[1], Naoto Tanaka[2], Eiichi Satoh[1], Sanae Okada[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem. Tokyo Univ. Agr, [2]NRIC, Tokyo Univ. Agr)

【背景・目的】*Stenotrophomonas maltophilia* は海中や土壌などの自然環境に広く生息する細菌である。本種は重金属に対し、幅広い耐性を示すことに加え、細胞内に重金属を蓄積する興味深い性質の報告がある。こうした性質を持つ *S. maltophilia* を利用し、金属による汚染環境でのバイオレメディエーションなどが期待できるが、耐性や蓄積がどのような機構に由来するかは未だ不明である。一般に重金属の輸送については、排出または取り込みにおいて極めて低い濃度で調節されることが知られている。よって本種の金属蓄積は従来の経路以外の関与が考えられる。そこで本種が生産する金属キレート物質「シデロフォア」に着目した。

シデロフォアとは、一般に 3 価の鉄に対し高親和性を示すキレート物質であり、植物や微生物が鉄欠乏時に産生する。その構造は、catecholate、phenolate、carboxylate、hydroxamate と 4 つに分類され、構造に対応するトランスポーターを持つ事が特徴である。本研究では *S. maltophilia* の金属耐性および金属蓄積と関連し、シデロフォアが何らかの特徴を持つのではないか考えた。

そこで本研究では未だ明らかとされていない *S. maltophilia* のシデロフォアを単離精製し、その構造を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】臨床、海洋、植物由来の異なる環境から分離された *S. maltophilia* 7 株を用いてシデロフォア産生を確認した。その結果、すべての株でシデロフォアの産生を確認した。次にシデロフォアの構造タイプを決定した。構造タイプの決定には、*S. maltophilia* ゲノム公開株から catecholate type のシデロフォア合成系が確認されたため、その判別に用いられる Arnow assay 法を用いた。その結果、臨床由来の株である *S. maltophilia* IAM 12423^T 以外のすべてにおいて catecholate type であることが明らかとなった。また、*S. maltophilia* IAM 12423^T は実験の結果、上記の carboxylate、hydroxamate type のどちらかに属すると推測された。加えて、他の臨床株が catecholate type に属することから分離源によるシデロフォアタイプに相関性はみられないことが分かった。以上より多くの株が catecholate type のシデロフォアを産生する事から、その中でも安定的に生育する *S. maltophilia* KMM 349 を選抜し、シデロフォアの単離精製を行った。単離精製では、catecholate type シデロフォアが持つ cis-diol 構造に着目し、catecholamine の分離精製に用いられる boronate affinity gel と reverse phase-HPLC により精製した。現在 NMR および MS にてその構造を解析中である。

stenotrophomonas maltophilia, siderophore

講演番号：2C20p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ C 校舎 20 会場

多犯性植物病原菌 *Pseudomonas cichorii* の病原性発現に関与するシデロフォア
Identification and characterization of the siderophores produced by *Pseudomonas cichorii*

○前中 理沙[1]、甲斐 建次[1]、Md. Wali Ullah.[2]、大西 浩平[3]、木場 章範[2]、曳地 康史[2]、林 英雄[1] ([1]阪府大院・生命環境、[2]高知大・農、[3]高知大・総研センター)
○Risa Maenaka[1], Kenji Kai[1], Md. Ullah. Wali[2], Kouhei Ohnishi[3], Akinori Kiba[2], Yasufumi Hikichi[2], Hideo Hayashi[1] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]Kochi Univ., [3]SRC, Kochi Univ.)

【目的】

Pseudomonas cichorii はナスやレタスといった農作物に病原性を示す多犯性グラム陰性細菌である。多くの植物病原菌でタイプⅢ分泌系のタンパク質をコードする *hrp* 遺伝子群がそれらの病原性発現に必須であるように、*P. cichorii* の病原性発現には *hrp* 遺伝子群が重要であることが明らかにされている。さらに、*hrp* 遺伝子群に隣接する *pat* 遺伝子の欠損株はレタスに対する病原性を維持したものの、ナスに対する病原性を失った。したがって、病原性発現における *pat* の機能に興味が持たれた。*pat* 欠損株の形質を調べたところ、鉄を含まない MG 培地で *pat* 欠損株は hyper-swarming motility を示したため、シデロフォア活性を CAS アッセイにより比較した。その結果、低菌密度において *pat* 欠損株は野生株よりもシデロフォア活性が低下したことから、*pat* はシデロフォアを介してナスに対する病原性に関与することが示唆された。そこで本研究では、*P. cichorii* のナスに対する病原性に関与していると考えられるシデロフォアの単離と構造決定、さらに野生株と *pat* 欠損株におけるこれら化合物の動態を調べた。

【方法と結果】

P. cichorii SPC9018 株（野生株）を GASN 培地で 3 日間培養し、菌体を除去した培養上澄に 1 M 塩化鉄（Ⅲ）水溶液を加え、シデロフォアー鉄複合体を含む培養上澄を ODS カラムクロマトグラフィーに供した。CAS アッセイで活性を示した 50% MeOH 画分を HPLC によって精製を行い、405 nm 付近に極大吸収をもつピーク 1～3 を得た。これらを LC/MS に供したところ、ピーク 2 は *m/z* 573.7 に 2 価プロトン化分子を与え、*P. cichorii* LMG 8401 が産生すると報告のあった pyoverdine であると考えられた。また、ピーク 1 と 3 はそれぞれ *m/z* 574.2 と 588.2 に 2 価プロトン化分子を与え、これらは既知の pyoverdine 類の分子量と一致しなかったため、現在構造解析を進めている。

また、*P. cichorii* SPC9018 株とその *pat* 欠損株との GASN 培地での pyoverdine 産生量を比較したところ、*pat* 欠損株ではピーク 3 の産生量が極めて低かったことから、*pat* はピーク 3 の pyoverdine の生合成や分泌に関与していることが示唆された。現在、低菌密度における各 pyoverdine の産生量の詳細な比較を行っている。

Pseudomonas cichorii, siderophore, pyoverdine

講演番号：2C20p17
講演日時、会場：3 月 25 日 17:12～ C 校舎 20 会場

病原性制御因子 PhcA の欠損により消失する青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* OE1-1 株の二次代謝について

The global virulence regulator PhcA controls the production of secondary metabolites in *Ralstonia solanacearum* OE1-1

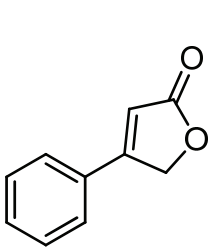
○大西 秀幸[1]、甲斐 建次[1]、木場 章範[2]、大西 浩平[3]、曳地 康史[2]、林 英雄[1] ([1]阪府大院・生命環境、[2]高知大・農、[3]高知大・総研センター)
○Hideyuki Ohnishi[1], Kenji Kai[1], Akinori Kiba[2], Kouhei Ohnishi[3], Yasufumi Hikichi[2], Hideo Hayashi[1] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]Kochi Univ., [3]SRC, Kochi Univ.)

【目的】

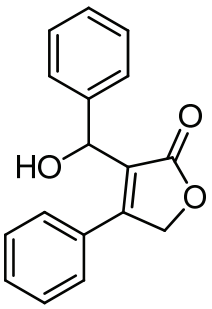
青枯病菌（*Ralstonia solanacearum*）はナス科作物の多くに感染し枯死を引き起す。本菌の病原性はレギュレータータンパク質 PhcA によって制御され、その発現はクオラムセンシング（QS）によって調節されている。QS シグナル物質として methyl 3-hydroxypalmitate が報告されたが、本物質は EI-MS のみによる構造解析に基づいて同定されたものであり、また活性試験の結果からは別の QS シグナル物質の存在が示唆されている。*phcA* 欠損株では二次代謝物のほとんどが産生されなくなるため、二次代謝物やそれらの生合成酵素遺伝子の発現は真の QS シグナル物質を同定するための良い指標となることが期待される。そこで我々は、PhcA 制御下にある *R. solanacearum* の二次代謝の解析を進めた。野生株（OE1-1）とその *phcA* 欠損株を植物水耕栽培用培地（植物スクロース培地、PS 培地）で培養し、それらの二次代謝プロファイルを比較したところ、これまでに報告されている二次代謝物に加えて、いくつかの未同定の化合物が検出された。今回、それらの単離・構造決定を報告する。

【方法と結果】

OE1-1 株と *phcA* 欠損株を PS 培地に植菌し、30℃で 4 日間旋回培養した。得られた培養物を酢酸エチルで抽出して脂溶性画分を得た。酢酸エチル層を脱水・濃縮し、残渣をメタノールに溶解して HPLC 分析に供した。その結果、*phcA* 欠損で消失する二次代謝物は主に 7 つ存在することが明らかになった。そのうち 2 つは既に報告のある ralfuranone と ralfuranone B であった。他の 5 つの二次代謝産物はこれまでに *R. solnacearum* 代謝物中からは見つかっていないものと思われる。最も産生量の多かった化合物を単離して NMR で解析したところ、一置換ベンゼンを 2 つ持つことが示唆されたため、本化合物は ralfuranone B の類縁体であることが予想された。現在、より大量の培養物からこれらの化合物の精製を進めている。加えて、本菌の宿主であるタバコに対するこれらの化合物の植物毒性などについても報告する予定である。



ralfuranone



ralfuranone B

Ralstonia solanacearum, quorum sensing, secondary metabolism

講演番号：2C20p18
講演日時、会場：3 月 25 日 17:24～ C 校舎 20 会場

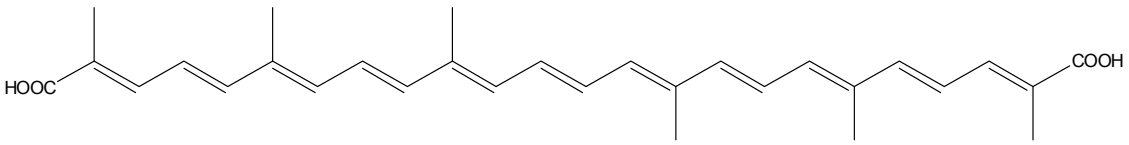
Bacillus firmus GB1 株の生産するカロテノイドに関する研究
Carotenoids Produced by *Bacillus firmus* strain GB1
○大澤 絢子[1]、位寄 かのこ[1]、Gerhard Sandmann[2]、新藤 一敏[1] ([1]日女大家政・食物、[2]フランクフルト大学)
○Ayako OSAWA[1], Kanoko IKI[1], Gerhard SANDMANN[2], Kazutoshi SHINDO[1] ([1]Japan Women's University, [2]Frankfurt University)

【目的】

カロテノイドは自然界に広く分布する黄～赤色の脂溶性色素で、これまでに 750 種以上が報告されている。これらのカロテノイドの中には抗酸化活性等、優れた生理活性を有するものが多く存在している。しかし、活性の検討を行うに充分な量のカロテノイドを確保するのが困難である場合も多く、有用な生理活性を検討するために十分な量の希少カロテノイドを調整する研究は重要だと考える。本研究では、濃ピンク色のコロニーを形成する *Bacillus firmus* GB1 株が生産するカロテノイドの精製・同定、及びその抗酸化活性を明らかにすることを試みた。

【方法と結果】

B. firmus GB1 を 200 mL LB 培地／500 mL 容三角フラスコにて、30℃、150 rpm で 48 h 培養し、収集した菌体から MeOH で濃ピンク色素を抽出した。*B. firmus* GB1 が生産するカロテノイドは、シリカゲル及び逆相系 HPLC での挙動が大変悪く精製が困難であったが、最終的にスチレンポリマー系逆相 HPLC 用カラム（三菱化学社製）を用いることにより完全精製に至ることができた。さらに得られたカロテノイドをジアゾメタンを用いてモノ・ジメチルエステルに誘導し、MS・NMR を用いて構造解析を実施した結果、生産されるカロテノイドを 4,4'-diapolycopenedioic acid と同定した。4,4'-diapolycopenedioic acid はこれまでにいくつかその存在が報告されているが、いずれも誘導体を完全精製することによりその構造を決定しており、天然体の完全精製は今回が初めての報告である。また 4,4'-diapolycopenedioic acid およびモノ・ジメチルエステル誘導体は、$^1O_2$ 消去活性試験において、いずれも優れた活性を示した。



structure of 4,4'-diapolycopenedioic acid

4,4'-diapolycopene dioic acid, antioxidative activity, *Bacillus firmus*

講演番号：2C20p19
講演日時、会場：3 月 25 日 17:36～ C 校舎 20 会場

アスタキサンチン産生葉緑体ゲノム改変レタスのカロテノイド詳細分析と抗酸化能

Detailed analysis of carotenoids and antioxidation activity in astaxanthin-producing chloroplast genome-modified lettuce

眞岡 孝至[1]、大澤 絢子[2]、伊藤 久美子[2]、福尾 菜美[2]、八反 順一郎[3]、金本 浩介[3]、新藤 一敏[2]、○三沢 典彦[3]（[1]生産開発科学研、[2]日女大家政・食物、[3]石川県大・生資研）
Takashi Maoka[1], Ayako Osawa[2], Kumiko Ito[2], Nami Fukuo[2], Jun-ichiro Hattan[3], Kosuke Kanamoto[3], Kazutoshi Shindo[2], ○ Norihiko Misawa[3] ([1]Research Institute for Production Development, [2]Japan Women's Univ., [3]Ishikawa Prefectural Univ.)

【目的】

カロテノイドは、海洋動物、藻類、植物、微生物等、自然界に広く分布する脂溶性色素で、抗酸化活性やビタミン A 様活性等、優れた生理活性を有することが報告されている。特にアスタキサンチン (astaxanthin) は強力な一重項酸素消去活性や脂質過酸化抑制活性を有することが明らかとなっており、様々な有用生理活性が報告されている。演者らは昨年度の本大会で、β-カロテン (β-carotene) から astaxanthin の合成に必要な *crtW* や *crtZ* 遺伝子及び *idi* 遺伝子（いずれも海洋性のα-プロテオバクテリア由来）がレタス葉緑体ゲノムに組み込まれた葉緑体ゲノム改変（Chloroplast Genome-Modified ; CGM）レタス (*Lactuca sativa* var. Berkeley) の作出を行い、効率的な astaxanthin の生産が可能になったことを報告した。今回は、この CGM レタスに含まれる astaxanthin を含むカロテノイドについて詳細に分析すること、また CGM レタスの抗酸化能を調べることを目的とした。

【方法と結果】

非形質転換レタス (WT) および CGM レタスの葉から含有カロテノイドを有機溶媒抽出し、HPLC（Cosmosil 5SL-II 4.6×250 mm, *n*-hexane : acetone=8 : 2）を用いて含有カロテノイドの組成分析を実施した。主な含有カロテノイドは、WT レタスでは、β-carotene (47%), lutein (23%), lactucaxanthin (13%), β-cryptoxanthin (5%) であったのに対し、CGM レタスでは astaxanthin diester (49%), astaxanthin monoester (18%), astaxanthin (遊離体 ; 10%), fritschiellaxanthin (4-ketolutein ; 6%) であった。astaxanthin ester における脂肪酸部分はミリスチン酸 (myristate) またはパルミチン酸 (palmitate) であった。なお、カロテノイド総含有量では、CGM レタスが有意に高値を示した（WT: 0.09 mg/g fresh weight (FW), CGM : 0.23 mg/g FW）。組成分析において CGM レタスに β-carotene が全く存在しないことから、CGM レタスでは β-carotene から astaxanthin への変換が非常に効率よく行われていることが明らかとなった。また、各レタス葉から得たカロテノイド粗抽出液を用いて一重項酸素消去活性評価（*in vitro*, メチレンブルー法）を実施した結果、CGM レタス抽出液は WT レタスと比較して 10 倍程度優れた活性を示した。すなわち、当該試験で一重項酸素を 50%消去するために必要なレタス葉量 (FW) は、WT が 0.11 g であるのに対し、CGM レタスでは 0.01 g であった。

astaxanthin, lettuce, pathway engineering

講演番号：2C21a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ C 校舎 21 会場

クロイソカイメン中でオカダ酸およびオカダ酸結合タンパク質 OABP2 を生産する生物の探索
Screening for producers of okadaic acid and okadaic acid binding protein OABP2

○小濱 真実、岡田 華弥、西谷 豪、長 由扶子、山下 まり、此木 敬一（東北大院農）
○Mami KOHAMA, Kayo OKADA, Goh NISHITANI, Yuko CHO, Mari YOTSU-YAMASHITA, Keiichi KONOKI (Tohoku Univ.)

【目的】クロイソカイメン（*Halichondria okadai*）から単離されたオカダ酸（Okadaic Acid、OA）は、哺乳類のタンパク質脱リン酸化酵素PP1、PP2Aに対する特異的阻害剤であり、強力な発がんプロモーターである。我々は*H. okadai*の自己耐性機構に興味を持ち、OAの毒性を軽減する結合タンパク質の探索を行い、すでにOABP1およびOABP2の単離に成功している。OABP1はアミノ酸配列の相同性からクロイソカイメンにおけるPP2Aであると推定されているが、OABPs 2.1-2.3 の混合物である事が判明したOABP2は、OAに対する自己防御における鍵物質であると推定されたものの、その詳細は明らかにされていない。一方、海綿由来の他の二次代謝産物と同様に、OAは*H. okadai*の共生生物により生産されると考えられてきた。しかし、一般に海綿の共生生物の純化・培養は極めて困難であり、OA生産生物は同定されていない。以上の背景に基づき、本研究では、まずOABP2がクロイソカイメンのタンパク質である事を想定し、*H. okadai*細胞の遺伝子解析を行うことを目的とした。また、*H. okadai*解離液の遺伝子配列を行い、クロイソカイメンに共生する生物種を同定すること、さらに種々条件を設定し培養可能な共生生物を得る事を目的とした。
【方法】新鮮なクロイソカイメンを細断し、50 mMのEDTAを含む人工海水にて解離させた。抗生物質存在下でクロイソカイメン細胞が凝集する経過を観察し、3-4日後、凝集細胞塊を分離した。Extract N-Amp Tissue PCR Kit（Sigma-Aldrich）を用いて細胞塊よりtotal DNAを抽出し、PCRによりrDNA、OABP2.1の一部分に相当する配列を増幅し、その配列解析を行った。先にEDTAで処理して得られたクロイソカイメンの解離液を種々の寒天培地中で培養し、生じたコロニーを純化した。一方、表面を取り除いた*H. okadai*の組織内から取り出した微細藻類をES1培地にて生育を試み、生育が認められた生物については18S rRNA遺伝子の配列を決定して種の同定を試みた。
【結果および考察】抗生物質存在下で維持した *H. okadai* 組織解離液から、約一週間で凝集し、その大きさは 0.2-0.5 μm となる細胞が見出された。この凝集細胞に由来する PCR 産物の塩基配列はクロイソカイメン特異的な rDNA、OABP2.1 の塩基配列とほぼ一致し、クロイソカイメンが OABP2.1 を生産することが明らかとなった。また、*H. okadai* の解離液を種々の寒天培地で培養した結果、合計 9 つの共生微生物が純化された。共生微細藻類については、珪藻 6 種および渦鞭毛藻 2 種を純化することに成功し、前者各種については培養可能である事がわかった。

Halichondria okadai, Okadaic acid, Okadaic acid binding protein

講演番号：2C21a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ C 校舎 21 会場

下痢性貝毒貯蔵生物における自己耐性機構の探索

Screening for Self-Defense Mechanisms in Diarrhetic Shellfish Poisons-Accumulating Species

○小野田 竜也[1]、渡邊 龍一[2]、長 由扶子[1]、加賀 新之助[3]、鈴木 敏之[2]、山下 まり[1]、此木 敬一[1]([1]東北大院農、[2]水研センター・中央水研、[3]岩手水技術セ)
○Tatsuya ONODA[1], Ryuichi WATANABE[2], Yuko CHO[1], Shinnosuke KAGA[3], Toshiyuki SUZUKI[2], Mari YOTSU-YAMASHITA[1], Keiichi KONOKI[1] ([1]Tohoku Univ., [2]NRIFS, [3]Iwate Pref. Fish. Tech. Center)

［背景］養殖業を脅かす動物性食中毒の一種である下痢性貝毒は、渦鞭毛藻の *Dinophysis* spp.や *Prorocentrum* spp.が生産するディノフィシストキシン 1 (DTX1)やオカダ酸 (Okadaic acid, OA)を主要原因毒とする (**Figure 1**)。これら主要原因毒が二枚貝の中腸腺に蓄積されると、その一部は 7 位水酸基が脂肪酸によりアシル化された誘導体 (DTX3) に変換されることが知られているが、この DTX3 は同じく OA を含有することで知られる海綿動物のクロイソカイメン (*Halichondria okadai*) からは検出されていない。一方、*H. okadai* からは OA 結合タンパク質 (OABP2.1-2.3) が単離されており、OA に対する自己耐性に寄与すると考えられているが、OABP2 が *H. okadai* 以外の OA 保有生物に発現するかどうか調べられていない。本研究では有毒および無毒の二枚貝中に OABP2.1 が存在するか否か、二枚貝中の OA アシル化反応の詳細を調べる事を目的とし、以下述べる研究を行ったので報告する。

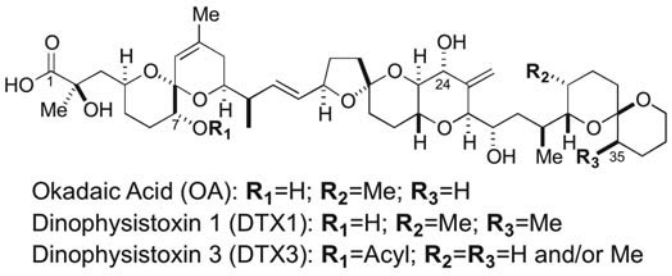


Figure 1. Diarrhetic Shellfish Poisoning Toxins

［方法］下痢性貝毒が発生した岩手県沿岸域で養殖されていた有毒のホタテ貝、ムラサキイガイ、ホヤ、そして、仙台朝市で購入した無毒のホタテ貝を解剖し、中腸腺、外套膜、えら、生殖腺、貝柱を得た。各組織を緩衝液中でホモジェナイズした後、抗 OABP2.1 血清を用いたウェスタンブロッティングにより OABP2.1 の発現を確認した。また、無毒のホタテ貝の各組織を緩衝液中でホモジェナイズし、遠心分離の後、ミクロソーム画分、ミトコンドリア画分を得た。各画分に対し、OA を加えて一定時間インキュベートした。その後、酢酸エチルで抽出し、LC-MS/MS によって OA および DTX3 の定量を行い、その変換収率を求めた。

［結果・考察］OABP2.1 が OA 耐性に関与する鍵タンパク質であると想定したが、有毒および無毒の二枚貝からは検出されなかった。また、種々の条件を検討した結果、中腸腺のミクロソーム画分において OA が DTX3 に変換されること、この変換反応には pH 依存性や温度依存性があることがわかった。さらに、本研究で認められた変換反応は、マガキやシジミ抽出物を用いた実験においても進行することがわかり、二枚貝に共通する変換反応であることが示唆された。OA の 7 位水酸基がアシル化されると、OA の標的分子であるタンパク質脱リン酸化酵素に対する結合性がきわめて低下することが知られており、アシル化反応が二枚貝等の自己耐性機構であることが示唆された。

Diarrhetic Shellfish Poisons, Okadaic Acid, Okadaic Acid Binding Protein

講演番号：2C21a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ C 校舎 21 会場

ヤエヤマサソリ毒液由来殺虫性ペプチド LaIT2 の活性発現に関わる領域の特定
Identification of the domain important for the activity of insecticidal peptide LaIT2 isolated from the *Liocheles australasiae* venom

○安藤 亮[1]、石堂 嵩典[2]、宮下 正弘[2]、中川 好秋[2]、宮川 恒[2] ([1]京都大農、[2]京都大院農)
○Ryo ANDO[1], Takafumi ISHIDO[2], Masahiro MIYASHITA[2], Yoshiaki NAKAGAWA[2], Hisashi MIYAGAWA[2] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】サソリ毒液中には様々な生理活性成分が存在し、その多くは各種イオンチャネルに作用する神経毒ペプチドである。LaIT2はヤエヤマサソリ(*Liocheles australasiae*)の毒液から昆虫麻痺活性を指標にして単離されたペプチド毒素であり、昆虫麻痺活性だけでなく抗菌活性を示すことが明らかになっている。また、LaIT2の構造上の特徴としてジスルフィド結合がC末端領域にのみ存在すること、またN末端領域はα-ヘリックス構造を含むことがある。本研究では、LaIT2のN末端およびC末端領域の活性発現における役割を解明するため、LaIT2およびN末端領域、C末端領域のみからなるペプチドをそれぞれ合成し、麻痺活性ならびに抗菌活性を評価した。
【方法】LaIT2の合成は、Native Chemical Ligation (NCL) 法を用いて行った。まず、C末端側フラグメントとしてLaIT2の31-59残基からなるペプチドを、またN末端側フラグメントとして1-30残基からなるペプチドチオエステル前駆体を、それぞれFmoc固相合成法によって調製した。これらを4-メルカプトフェニル酢酸を含む水溶液中で縮合させ、直鎖状ペプチドを得た。得られたペプチドを、グルタチオンを含む酸化還元バッファーを用いたジスルフィド結合形成に供した後、HPLCによる精製を行った。また、N末端領域ペプチドとして1-30残基からなるペプチドLaIT2(1-30)を、C末端領域ペプチドとして26-59残基からなるペプチドLaIT2(26-59)をそれぞれFmoc固相合成法によって調製した。C末端領域ペプチドについてはLaIT2と同様の手法によりジスルフィド結合を形成させた。合成した各ペプチドのコオロギに対する麻痺活性および大腸菌に対する抗菌活性を調べた。
【結果】昆虫麻痺活性測定の結果、LaIT2はコオロギに対して顕著な活性を示し、LaIT2(1-30)も活性を示した。麻痺からの回復はLaIT2(1-30)を投与した場合のほうが早い傾向が見られた。一方、LaIT2(26-59)は麻痺活性を示さなかった。このことから麻痺活性にはN末端領域が重要であり、C末端領域は補助的な役割を果たしていることが示唆された。また、抗菌試験の結果、昆虫麻痺活性と同様にLaIT2とLaIT2(1-30)が活性を示したのに対してLaIT2(31-59)は活性を示さなかった。これらのことから、LaIT2の昆虫麻痺活性は細胞膜の直接的な破壊によって引き起こされていることが示唆された。

```
LaIT2          AKKPFVQRVKNAASKAYNKLKGLAMQSQYGCPIISNMCEDHCRRKKMEGQCDLLDCVCS
LaIT2(1-30)    AKKPFVQRVKNAASKAYNKLKGLAMQSQYG
LaIT2(26-59)                                QSQYGCPIISNMCEDHCRRKKMEGQCDLLDCVCS
```

scorpion toxin, peptide, native chemical ligation

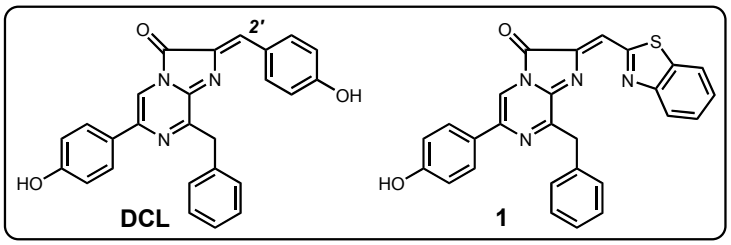
講演番号：2C21a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ C 校舎 21 会場

蛍光性デヒドロセレンテラジン類を用いた発光タンパク質の構築

Construction of a photoprotein by using fluorescent dehydrocoelenterazines

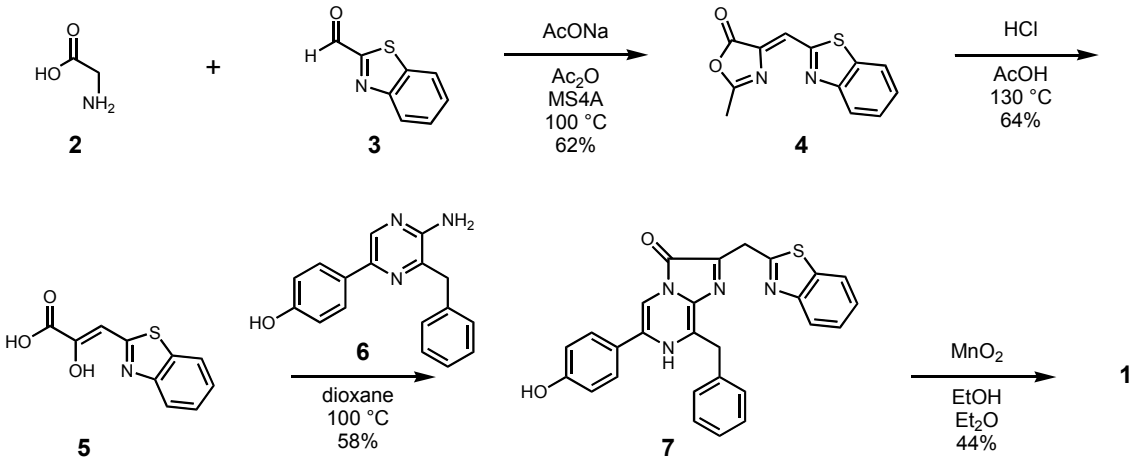
○南郷 成子（神戸大院農）
○Naruko NANGO (Kobe Univ.)

【目的】ヒカリカモメガイの発光タンパク質（Pholasin）はデヒドロセレンテラジン（DCL）を基質として活性酸素により発光する．DCL は Pholasin のシステイン残基に結合し，蛍光性のクロモフォア（発光を司る化学構造）を形成している．DCL は蛍光を示さないが，この DCL を蛍光物質へと修飾できれば，DCL の蛍光，クロモフォア由来の蛍光，Pholasin の発光という 3 種類の光を利用した生体内イメージング手法が確立できる．本研究では，蛍光性 DCL 誘導体の合成を目的とした．



【方法と結果】DCL の 2’位の芳香環をベンゾチアゾール環とした DCL 誘導体（**1**）を合成し，亜鉛(II)イオンと錯体を形成すれば蛍光性 DCL 誘導体が得られると考えた. そこで, Kakoi らの方法[1]に従い，ピルビン酸誘導体（**5**）から **1** を合成することにした．

Glycine（**2**），benzothiazole-2-carboxaldehyde（**3**），そして無水酢酸を縮合することで azlactone（**4**）を合成した．ついで **4** を酸加水分解し，ピルビン酸誘導体（**5**）を合成した．**5** と coelenteramine（**6**）を脱水縮合して得た coelenterazine 誘導体（**7**）を酸化して **1** を合成した．現在，**1** を用いた Pholasin の再構成について検討している．



1. Kakoi, H.; Inoue, S. *Heterocycles* **1998**, *48*, 2747-2748.

bioluminescence, fluorescence, photoprotein

講演番号：2C21a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ C 校舎 21 会場

動物の化学コミュニケーション&光コミュニケーションとヒト社会の科学コミュニケーション.
Animal chemical communication and human science communication.
○笹川 浩美[1,2,3,4] ([1]（公財）科学技術館、[2]（公財）国際科学振興財団、[3]（独）日本科学未来館、[4]（学）跡見学園)
○Hiromi SASAGAWA[1,2,3,4] ([1]JSF, [2]FAIS, [3]JST Miraikan, [4]Atomi gakuen)

地球環境と動物社会の化学コミュニケーションおよび光コミュニケーションに関する研究成果を、ヒト社会の科学コミュニケーション(SC)に応用し、①」ヒトの科学リテラシーの向上と②科学と科学技術を文化にすることを達成した。演者らは、光を操る生き物たちを題材にして、双方向型の科学コミュニケーションプログラム(SCP)を立ち上げた。今回作成した SCP は、2014 年 7～8 月に岩手県立博物館で開催される震災復興記念プログラム:特別展の 1 つとして採用が決定された。
【課題】「生物多様性～光を操る生き物とヒトの科学技術が共存できる地球環境は可能か否か？～」.
【目的】国民の科学リテラシー向上を目指す目的で,一般と研究者を繋ぐ,研究者による双方向型の科学コミュニケーション(SC)プログラム(SCP)を,農芸化学の視点から開発し,科学館で実施した. 【方法・結果】本 SCP の対象は小学校高学年以上～成人，研究成果や科学技術を活用し，実物の提示や発光実験を行い，約 25 分間の直接対話型・体験型に開発した．会場は，3 面大型スクリーン・明暗制御可能な階段教室を使用した．実験・解説の後，参加者は暗闇を体験， 後にヘイケボタルの光コミュニケーションを鑑賞し，終了時はアンケート調査に答えた． 実施は 6 回，参加者は 180 名．ホタル発光時の暗闇とヒトの文字解読可能な照度を比較した．扱った項目は,発光・LED・電球・発光生物・光を操る生物種・宇宙からみた地球の夜・生物多様性・科学技術・ケミカルライト・蛍光・GFP 化学コミュニケーション等. 「生物種の知恵をヒトは科学技術へ活用．ヒトを含め光を操る種と科学技術が共存を考える」SC は成功し、 SCP は完成した。 現在、科学館や学校法人において、本プログラムを実施し、多くの反響と高い評価を得ている。【謝辞】池谷治義氏・菅野治虫氏・大場裕一博士・提髪玲子博士・小林直樹博士・代島慶一氏・豊田倫子女史ら、関係者各位へ御礼申し上げる.
【追記】近年、科学や科学技術 など、研究者や技術者による研究成果は、国民の理解を得ることが要求される。一方、国民は、便利でより良い健やかな生活を手に入れるため、日々進歩する科学や科学技術に対する豊富な知識と理解力・正確な判断など、年齢・性 を問わず各人の「科学リテラシーの向上」が要求されている。資源が限られている日本は、2011年3月11日東日本大震災以降、特にヒトの科学リテラシーを向上させ、科学や科学技術を文化にすることが必須である。「科学コミュニケーション(SC:科学や科学技術に関する課題・科学のおもしろさなどについて、多くの人に伝え共に考えること、人々の意識を高める活動。)」のうち、双方型のSCは、研究者・技術者と国民とをつなぐには有効である。SCは話題提供する研究者側には、脳の創造性が要求され、脳科学としても興味深い。

biodiversity, science communication, chemical communication

講演番号：2C21a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ C 校舎 21 会場

細胞内代謝産物の機能（１）　～代謝産物による酵素活性化～
Function of cellular metabolites (1)　enzyme activation induced by cellular metabolites
○甲元 一也、勢旗 志郎、高木 琴味、中川 雄市（甲南大学 FIRST）
○Kazuya KOUMOTO,Shiro Sehata,Kotomi Takagi,Yuichi Nakagawa (Konan Univ.)

【研究背景】
細胞が、高温、高圧、高塩、乾燥などのストレスを被った際、細胞は外部環境に適応するためにある種の代謝産物を細胞内に高濃度で産生、蓄積することが知られている。これらの代謝産物は、高濃度においても細胞機能を乱さないことから“適合溶質”と呼ばれ、細胞が環境に適応する際に重要な役割を果たすと考えられている。適合溶質と呼ばれる低分子化合物群は、細胞が産生する３０００種類にも及ぶ代謝産物のうちのわずか数十種類に過ぎず、なぜ細胞が数ある代謝産物からそれらを選別して、活用しているかこれまでほとんど明らかとされてこなかった。我々の研究室では、それら適合溶質の化学構造とそれがもたらす細胞機能との間には、何らかの相関や意味があると考え、適合溶質の一つであるグリシンベタインを基体として構造多様性を持たせた合成ライブラリーを構築し、それらやそのアナログが生体反応に如何なる影響を及ぼすか、検討を行ってきた。本講演では、適合溶質がもたらす興味深い酵素活性化機能について、特に適合溶質の化学構造の果たす役割、重要性を中心に報告する。
【実験結果】
適合溶質およびそのアナログの添加効果を、グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、プロテアーゼ、リパーゼ等の加水分解酵素、乳酸脱水素酵素、ペルオキシダーゼのような酸化還元酵素、DNA ポリメラーゼのような合成酵素の酵素反応に対して検討したところ、適合溶質はこれらの酵素反応活性を向上させることが明らかとなった。α−グルコシダーゼを用いて添加効果に関する詳細を検討したところ、活性向上は適合溶質の化学構造に強く依存することが明らかとなった。特に、適合溶質がベタイン構造を有していて、且つ、カチオン性官能基に嵩高い長鎖アルキル基が導入されていると、低濃度で効率よい高い活性化を引き起こした。そのメカニズムを考察するため、速度論パラメータ解析の結果、活性向上は K_m の低下（基質結合性の向上）と、濃度依存的な V_{max} の向上に起因していることが明らかとなった。アレニウスプロットから活性化エネルギーを算出したところ、適合溶質の活性化濃度では、加水分解反応の活性化エネルギーが３分の１にまで低下していることも明らかとなった。講演では、これら適合溶質による酵素活性化の挙動や、そのメカニズムについて紹介する。

cellular metabolite, enzyme activation, compatible solute

講演番号：2C21a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ C 校舎 21 会場

細胞内代謝産物の機能（２）　～代謝産物混合系におけるカクテル効果～
Function of cellular metabolites (2) Cocktail effect of cellular　metabolites under the mixing system
○勢旗 志郎、甲元 一也（甲南大 FIRST）
○Shiro Sehata,Kazuya Koumoto (Konan Univ.)

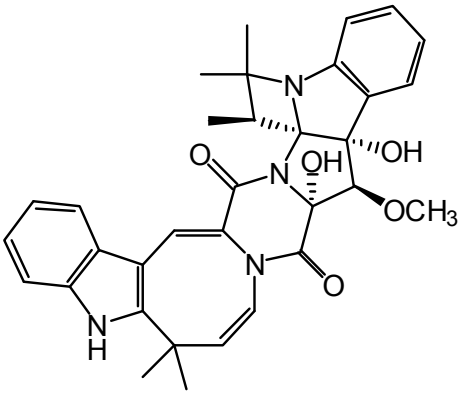
【研究背景】
前講演でも述べているように、極限環境に生息する生物の細胞内には、外部環境の変化に応じて数十種類の機能性代謝産物が産生、蓄積され、生物が極限環境に適用するのに重要な役割を担っていることが報告されている。これまでの研究では、そのような機能を示す個々の代謝産物の機能や性質が深く研究されてきた。しかし、それでは数千にも及ぶ代謝産物の中で、なぜそれらの代謝産物だけが使われてきたのか、その本質を解明するには至らない。我々の研究室では化学的なアプローチとして、構造多様性をもたせた代謝産物アナログライブラリーを合成し、その化学構造と機能の相関について研究してきた。その結果、代謝産物の化学構造に依存して酵素の活性が上昇することが明らかとした。一方で、生物はこれら代謝産物を単一ではなく、混合して活用していることも明らかとなっている。本研究では、我々が合成した代謝産物アナログのライブラリーをベースに、天然に存在するいくつかの機能性代謝産物を混合し、代謝産物の混合効果について *Bacillus Stearothermophillus* 由来のα-グルコシダーゼにおける酵素活性化の点から評価、検討した。
【実験結果】
自然界における機能性代謝産物の混合は、ベタイン型代謝産物同士、ベタイン型代謝産物とポリオール、ベタイン型代謝産物と尿素との組み合わせに大別できる。まず、我々が開発した代謝産物アナログを用い、酵素活性化濃度の異なるベタイン型代謝産物アナログを混合し、混合溶液中での酵素活性化挙動を検討した。その結果、混合によって低濃度領域に酵素活性化の相乗効果が確認された。しかし、代謝産物濃度が高い領域では、活性化効果の強いベタイン型代謝産物の活性化効果のみが現れる結果となった。次に、ポリオールとの混合を検討した。ポリオールは添加によって酵素活性を低下させることがすでに明らかとなっている。それらを混合すると、ポリオールによって代謝産物アナログの活性化効果が弱まった。同様に蛋白質の構造変性を誘起させ、酵素活性を低下させる尿素と混合効果を検討したところ、尿素の添加によってベタイン型代謝産物による酵素活性化効果がさらに向上することが明らかとなった。蛋白質を変性させる尿素がなぜそのような活性化を誘起するか現時点では明らかではないが、自然界において代謝産物が混合されて用いられる意義の一端が現れているものと推察される。本講演では、このような代謝産物混合系において現れる興味深い酵素活性化効果について、混合する代謝産物の種類と組成の点から纏めた結果について報告する。

cellular metabolite, Cocktail effect, betaine

講演番号：2C21a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ C 校舎 21 会場

インドールアルカロイド・オカラミン類の昆虫毒性発現機構
Mode of insect toxicity of indole alkaloids okaramines
○中谷 有里[1]、三浦 由夏[1]、古谷 章悟[2]、松田 一彦[2]、林 英雄[3]([1]近畿大農応生化、[2]近畿大院農応生化、[3]阪府大院生環科)
○ Yuri NAKATANI[1], Yuka MIURA[1], Shogo FURUTANI[2], Kazuhiko MATSUDA[2], Hideo HAYASHI[3] ([1]Fac. of Agric. Kinki Univ., [2]Grad. Sch. of Agric. Kinki Univ., [3]Grad. Sch. of Life Env. Sci. Osaka Pref. Univ.)

［目的］インドールアルカロイドの一種であるオカラミン類は、大豆の搾りかすオカラを培地として使用したとき *Penicillium simplicissimum* が産生する殺虫活性物質である。これまでにオカラミン類として 18 種類の化合物の構造が明らかにされ、一部化合物については全合成も達成されているが、活性発現機構については発見から 20 年以上の月日が経過しているにも関わらず謎であった。オカラミン類を投与された昆虫は比較的短時間で動きを止め、死に至る。この作用が神経活性に基づくと推察し、本研究では神経細胞に存在するオカラミン類のターゲットの解明を試みた。
［方法］カイコ 4 齢幼虫から脳を摘出し、コラゲナーゼを処理して細胞を遊離させたのち、一昼夜培養した。カイコ脳神経細胞のリガンド作動性イオンチャネルに対する活性はホールセルパッチクランプ法を用いて測定した。ターゲット候補のイオンチャネル遺伝子はカイコの脳神経細胞からクローニングし、アフリカツメガエル卵母細胞で発現させた。当該イオンチャネルに対するオカラミン類の活性は二極膜電位固定法により測定した。またカイコ幼虫に対する殺虫活性は注射法により測定した。
［結果と考察］オカラミンはカイコに対する殺虫活性を指標にして単離された。そこで、オカラミン類の中で最強の化合物オカラミン B を選抜し、ホールセルパッチクランプ法を用いてカイコ脳神経細胞に対する本化合物の作用を調べたところ、濃度依存的に内向きイオン電流を誘起することが見出された。この電流の逆転電位は、理論的に計算した塩素イオン平衡電位と近い値を示した。また、オカラミン誘導電流は塩素チャネルブロッカーとして知られている殺虫剤フィプロニルによって抑制された。そこで、カイコ脳から GABA 受容体および抑制性グルタミン酸受容体(GluCl)遺伝子を単離し、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、オカラミン B に対する作用を二極膜電位固定法で測定した結果、オカラミン B は GluCl だけを特異的に活性化した。数種のオカラミン類のカイコ脳神経細胞でのイオン電流誘起活性と GluCl に対する活性との関係を比較したところ、両活性の間には良い相関が見られた。さらに、これらオカラミン類の神経活性は、カイコ幼虫に対する殺虫活性と高い相関を示した。以上の結果から、我々はオカラミン類が昆虫の GluCl を持続的に活性化し、殺虫活性を発揮する可能性が高いことを初めて明らかにした。



Okaramine B

okaramine, silkworm, ion channel

講演番号：2C21a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ C 校舎 21 会場

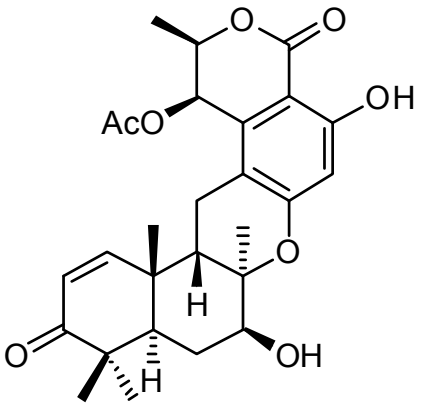
Unveiling the target of a meroterpenecompound chrodrimanin B that exerts insect control activity

○Yan XU[1], Yuri NAKATANI[1], Shogo FURUTANI[1], Kazuhiko MATSUDA[1], Hideo HAYASHI[2]
([1]Kinki University, [2]Osaka Prefecture University)

[Objective] Chrodrimanins are meroterpenoids produced by YO-2 strain of *Talaromyces* sp. grown on the okara media. They were isolated as insecticidal compounds by testing on the silkworm larvae *Bombyx mori*, yet their target is unknown. Since the silkworm larvae were intoxicated by chrodrimanins within a relatively short time after applications, we postulated that the compounds may target the nervous system. Here we have investigated the action of the most potent compound chrodrimanin B on the silkworm larval neurons using patch-clamp electrophysiology. Also we tested it on ligand gated chloride channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes to determine the target.

[Materials and Methods] The brains were dissected from the silkworm larvae and the neurons were dissociated after treating with collagenase. The larval neurons were then incubated for 24 h before electrophysiology. The membrane currents of the silkworm larval neurons were recorded by whole-cell patch-clamp electrophysiology and the agonists were applied with a U-tube. The silkworm GABA- and glutamate-gated chloride channel genes were cloned from the larval neurons by RT-PCR and cRNA were prepared by in vitro transcription from the cDNAs. These two channels were functionally expressed in *Xenopus laevis* by cytoplasmic injection of the cRNAs. The responses to agonists of these channels were recorded by two-electrode voltage-clamp electrophysiology.

[Results and Discussion] Chrodrimanin B was ineffective on the membrane current of the larval neurons when applied alone. However, it markedly attenuated the GABA-induced current, while it hardly affected the acetylcholine and glutamate-induced currents. Hence we tested chrodrimanin B on the GABA and glutamate-gated chloride channels expressed in *Xenopus* oocytes. Chrodrimanin B attenuated the current amplitude of the response to GABA of the GABA-gated chloride channels at low concentrations, whereas it had no significant effect on the current amplitude of the response to glutamate of the glutamate-gated chloride channels. These data suggested that chrodrimanin B primarily targets the GABA-gated chloride channels to intoxicate the silkworm.



Chrodrimanin B

Chrodrimanin, Patch-clamp, Ligand-gated ion channel

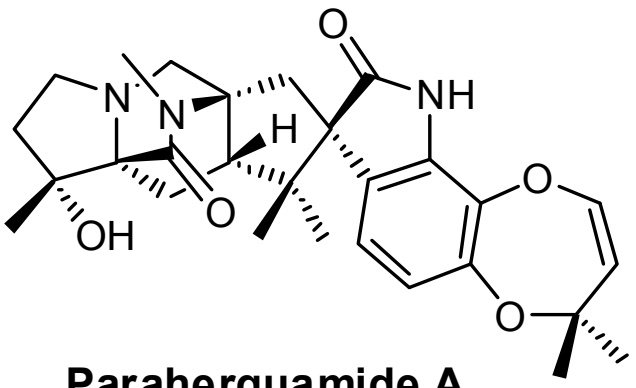
講演番号：2C21a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ C 校舎 21 会場

*Caenorhabditis elegans*のニコチン性アセチルコリン受容体のサブタイプに対する Paraherquamide A の活性

Actions of paraherquamide A on the subtypes of nicotinic acetylcholine receptors in *Caenorhabditis elegans*

○小鑓 亮介[1]、SATTELLE David B.[2]、林 英雄[3]、松田 一彦[1]([1]近畿大院農応生化、[2]マンチェスター大、[3]阪府大院生環科)
○Ryosuke KOYARI[1], David B. SATTELLE[2], Hideo HAYASHI[3], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Kinki Univ., [2]Manchester Univ., [3]Osaka Pref. Univ.)

［目的］世界で約 10 億人の人々が寄生虫症に感染しており、年間死亡者数は 100 万人を超えると言われているが、近年コリン作動性駆虫薬 levamisole に抵抗性を示す線虫が発見され、新規駆虫薬の開発が望まれている。Paraherquamide 類は、*Penicillium paraherquii* が産生する殺線虫活性物質であり、この現状を打破する新型駆虫薬候補として期待されている。これまでに、本化合物が寄生性線虫 *Ascaris suum* の体表筋に存在するニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR)のうち、L-subtype (Levamisole-sensitve)と B-subtype (Bephenium-sensitive)の nAChR に対して阻害活性を示すのに対して、N-subtype (Nicotine-sensitive)の nAChR に対しては顕著な阻害活性を示さないと報告されているものの、本化合物の分子レベルでの作用機構は未解明であった。その原因の一つとして、長年にわたり、線虫の nAChR の異種細胞での発現ができなかったことが挙げられる。しかし近年、自由生活性線虫 *Caenorhabditis elegans* については、数種の補助タンパク質を共発現させることで、L-subtype と N-subtype nAChR のアフリカツメガエル卵母細胞での発現が可能となった。そこで本研究では *C. elegans* の nAChR に対する paraherquamide A の薬理作用を解明することを目的とした。
［方法］Paraherquamide A は、独自に見出した *Penicillium* 属糸状菌を培養したオカラ培地から分離・精製した。*C. elegans* の L-subtype と N-subtype nAChR は、それらを構成するサブユニットの cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクションすることで発現させた。卵母細胞に発現させた nAChR に対する paraherquamide A の活性は二電極膜電位固定法を用いて測定した。
［結果と考察］Paraherquamide A はシリカゲルカラムクロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーを繰り返すことで、糸状菌を培養したオカラ培地から著量取得することができた。このようにして得た paraherquamide A の作用機構を、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた *C. elegans* の L-および N-subtype nAChR のアセチルコリン(ACh)に対する応答の変化を指標に調べたところ、化合物は nAChR に対する ACh の結合を非競合的に阻害することが明らかになった。両受容体の ACh 応答に対する半数阻害活性値を求め、比較したところ、paraherquamide A は N-subtype よりも L-subtype の nAChR に対して強い阻害活性を示すことが明らかとなった。以上の結果から、paraherquamide A は L-subtype の nAChR に対して選択的にアンタゴニストとして作用し、コリン作動性神経伝達システムを阻害することで強力な殺線虫活性を発揮するものと考えられた。



Paraherquamide A

Paraherquamide, Caenorhabditis elegans, Nicotinic Acetylcholine Receptor

講演番号：2C21a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ C 校舎 21 会場

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

Study on prostaglandin release inhibitor, pronqoline from microbial metabolite

○中栄 功一、倉田 育子、細川 信夫、波多野 和樹、五十嵐 雅之、久保田 由美子、澤 竜一、西村 吉雄、安達 勇光、野本 明男（微化研）
○Koichi NAKAE, Ikuko KURATA, Nobuo HOSOKAWA, Masaki HATANO, Masayuki IGARASHI, Yumiko KUBOTA, Ryuichi SAWA, Yoshio NISHIMURA, Hayamitsu ADACHI, Akio NOMOTO (IMC)

【目的】脂質メディエーターであるプロスタグランジンの産生亢進は種々の疾患に深く関与することが報告されている。本研究ではフェノタイプベースの探索系として細胞より放出されるプロスタグランジンを抑制する低分子化合物の探索を微生物代謝産物より行い、単離した化合物の作用機序解析を行うこととした。

【方法】ヒト滑膜肉腫細胞株 SW982 より放出されるプロスタグランジンの放出阻害物質として我々はこれまでに放線菌 MK832-95F2 株の麦固体培養抽出物より benzo[d]isothiazole dione 骨格を有する pronqodine A を単離している。本研究では、MK832-95F2 株の液体培養抽出物及び麦固体培養抽出物より新たな活性成分を見出したことから活性成分の単離精製、構造解析を行い、続いて活性物質の in vitro における生物活性評価、及び作用機序解析を行った。

【結果】 MK832-95F2 株の培養抽出物から各種クロマトグラフィーにより活性物質を単離し、各種スペクトラム解析より構造決定を行った。その結果、液体培養抽出物より単離した pronqoline は isoquinoline dione 骨格を有する新規化合物、また固体培養抽出物から単離した pronqonone は quinone 骨格を有する新規化合物であることが明らかとなった。

Pronqoline は SW982 細胞において各種プロスタグランジンの産生を濃度依存的に阻害したが、サイトカインである IL-6 産生に影響を及ぼすことはなかった。また二電子還元酵素 NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) の阻害剤である dicoumarol が、pronqoline によるプロスタグランジン産生阻害活性をキャンセルすることから、NQO1 の関与について詳細に検討を行った。その結果、pronqoline は NQO1 の基質となり二電子還元を受けた後、活性酸素種であるスーパーオキシドアニオンの生成を伴うレドックスサイクルを惹起することが明らかとなった。また細胞レベルにおいても pronqoline は NQO1 を発現している細胞において活性酸素の生成を誘導することを確認した。更に細胞内における活性酸素種の産生亢進は細胞内の脂質を過酸化することが知られていることから、過酸化脂質検出蛍光プローブを用い、pronqoline の作用について検討した。その結果、pronqoline は細胞内の過酸化脂質の生成を濃度依存的に促進することが明らかとなった。

Pronqoline は NQO1 を発現している細胞において還元的活性化を受け、レドックスサイクルに伴う活性酸素生成により細胞内脂質を過酸化し、プロスタグランジンの産生を抑制することが示唆された。

prostaglandin

講演番号：2C21a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ C 校舎 21 会場

Aflatoxin Production Inhibitory Activities of Mitochondrial Respiratory Enzyme Inhibitors
○DIYAN FEBRI PRABOWO[1], KEIKO TAKAGI[1], USUMA JERMNAK[1], KAZURO SHIOMI[2], MIHOKO MORI[2], SATOSHI OMURA[2], HIROMICHI NAGASAWA[1], SHOHEI SAKUDA[1]
([1]Department of Applied Biological Chemistry, The University of Tokyo, [2]Kitasato University)

Aflatoxins are toxic and carcinogenic secondary metabolites produced primarily by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Aflatoxins frequently contaminate agricultural commodities, and thus pose not only serious health hazards to human and domestic animals but also serious impact on the agricultural economy. To protect agricultural commodities from aflatoxin contamination, specific inhibitors of aflatoxin production may be useful. During our screening with a natural product library (RIKEN Natural Products Depositor), a respiration inhibitor was found to inhibit aflatoxins production of *A. paraciticus*. Since aflatoxin production inhibitory activity of any respiration inhibitors has not been reported, we planned to examine aflatoxin production inhibitory activity of natural respiration inhibitors. In this study, we report the effects of rotenone, siccanin, atpenin A5, and antimycin A (inhibitors of NADH-ubiquinone reductase in complex I, succinate dehydrogenase in complex II, succinate-ubiquinone reductase in complex II, and ubiquinol-cytochrome c reductase in complex III, respectively) on aflatoxin production.
All of the four compunds showed aflatoxin production inhibitory activity. IC_{50} values of rotenone, siccanin, atpenin A5, and antimicyn A for inhibition of aflatoxins B_1 and G_1 of *A. parasiticus* were 5.4 and 6.9, 7.6 and 8.4, 1.2 and 0.6, and 5.6 and 6.4μM, respectively. Those for inhibition of aflatoxin B_1 of *A. flavus* were 14.4, 6, 0.8, and 5.1μM, respectively. All inhibitors inhibited aflatoxin production without significantly inhibiting fungal growth and decreased the mRNA levels of *aflR* encoding a regulatory protein necessary for aflatoxin biosynt0hesis. Since the *aflR* expression is critical for initiation of aflatoxin biosynthesis, the four inhibitors may inhibit aflatoxin production by affecting a pathway present before *aflR* expression. The results obtained in this study suggested that respiration inhibitors are useful to control aflatoxin production.

謝辞
本研究は生物系特定産業技術研究支援センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業「ケミカルバイオロジーを基盤とした革新的な農薬等の探索研究」として行われているものです。
また、化合物ライブラリをご提供いただきました理化学研究所天然物化合物バンク(NPDepo) に感謝申し上げます。

Aflatoxin, Respiration inhibitor, Aspergillus

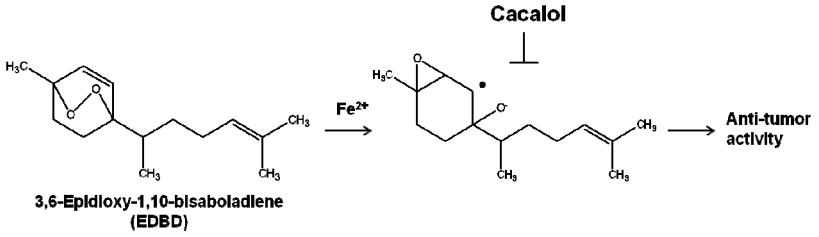
講演番号：2C21a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ C 校舎 21 会場

山菜由来の抗がん物質の併用効果と作用メカニズム

Synergistic effect and the anti-tumor mechanism of compounds derived from edible wild plants

○高野 侑恵[1]、上杉 祥太[2]、新藤 一敏[3]、土屋 英子[4]、木村 賢一[1,2] ([1]岩手大・農、[2]岩手大院・農、[3]日女大家政・食物、[4]広島大院・先端物質)
○ Yukie TAKANO[1], Shota UESUGI[2], Kazutoshi SHINDO[3], Eiko TSUCHIYA[4], Ken-ichi KIMURA[1,2] ([1]Fac. of Agri., Iwate Univ., [2]Grad. Sch. of Agri., Iwate Univ., [3]Fac. of Food and Nutrition, Japan Women's Univ., [4]Grad. Sch. Adv. Sci. Matt., Hiroshima Univ.)

【目的】3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene（EDBD）は、遺伝子変異酵母株（*cdc2-1 rad9*Δ）を用いたスクリーニングによって、北日本に生育する山菜シドケ（モミジガサ）から単離されたビサボラン型セスキテルペンのエンドパーオキサイド化合物である [1)]。EDBD は、Fe^{2+}によって分子内のエンドパーオキサイド構造が開裂して生じるラジカル体が、ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対してアポトーシス様細胞死を誘導し、ヒトメラノーマ細胞 Lox-IMVI の *in vivo* 試験でも腫瘍増殖抑制効果を示す [2)]。一方、シドケには EDBD の他にも抗酸化活性を示し、*in vivo* において乳がん細胞 MDA-MB-231 に効果を示す cacalol が含まれることが報告されている [3,4)]。そこで本研究では、HL60 細胞に対する EDBD と cacalol との併用効果について検討することを目的とした。
【方法・結果】遺伝子変異酵母株に対する活性は、菌を混濁した YPD 培地上に各濃度に調整したサンプルを 5 µl 滴下し、37℃で 6 時間培養後に 28℃で 2 日間以上培養し、生じた酵母の生育円に基づき評価を行った。その結果、EDBD と cacalol は遺伝子変異酵母株に対して表現型が異なる生育円活性を示した。また、HL60 細胞に対する細胞毒性を 48 時間培養後に MTT assay によって調べたところ、EDBD は IC_{50} = 6.0 µM、cacalol は IC_{50} = 39.0 µM を示した。そこで、EDBD と cacalol の併用効果を調べたところ、10 µM EDBD 単独では HL60 細胞の生存率が 18.8%であったのに対し、5 µM cacalol との併用では生存率が 79.3%と、EDBD の細胞毒性が cacalol によって抑制されるという結果を得た。このことは、cacalol の抗酸化作用によって EDBD のラジカル体が有する抗がん効果が抑えられた可能性を示唆し、EDBD 誘導細胞死におけるラジカル中間体を介した作用の重要性が証明された。現在、EDBD の細胞死誘導機構の解析を、ウエスタンブロット法などを用いて進めている。



1) Nishikawa, K., *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 2463-2466 (2008)
2) Kimura, K., *et al*., *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 3887-3897 (2012)
3) Shindo, K., *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1393-1394 (2004)
4) Liu, W., *et al*., *Breast Cancer Res. Treat.*, **128**, 57-68 (2011)

3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene(EDBD), Cacalol, HL60

講演番号：2C21a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ C 校舎 21 会場

久慈産琥珀に含まれる酵母 Ca^{2+}シグナル伝達の新規阻害物質 neokujigamberol A, B

New yeast Ca^{2+}-signal transduction inhibitors, neokujigamberol A and B derived from Kuji amber

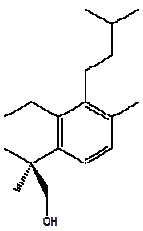
○内田 武史[1]、阿部 友美[2]、南川 裕樹[2]、乾 朋樹[2]、吉田 潤[3]、宮川 都吉[4]、新田 久男[5]、越野 広雪[6]、木村 賢一[1,2]（[1]岩手大・農、[2]岩手大院・農、[3]岩手医大・共通教育セ、[4]広島大院・先端物質、[5]久慈琥珀（株）、[6]理研・基幹研）

○Takeshi UCHIDA[1], Tomomi ABE[2], Yuki MINAMIKAWA[2], Tomoki INUI[2], Jun YOSHIDA[3], Tokichi MIYAKAWA[4], Hisao SHINDEN[5], Hiroyuki KOSHINO[6], Ken-ichi KIMURA[1,2] ([1]Fac. of Agri., Iwate Univ., [2]Grad, Sch. of Agri., Iwate Univ., [3]Center Lib. Arts & Sci., Iwate Med. Univ., [4]Grad. Sch. Adv. Sci. Matt., Hiroshima Univ., [5]Kuji Kohaku Co. Ltd., [6]RIKEN ASI)

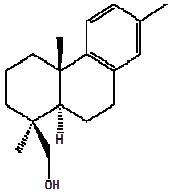
【目的】琥珀は、主に中生代から新生代の植物の樹脂が地中に埋没し、それが化石化したものである。装飾品以外に医療や美容の分野で利用されているが、その生物活性物質に関する報告はこれまで無かった。そこで我々は、琥珀を植物の天然資源と捉え、Ca^{2+}超感受性の遺伝子変異酵母 YNS17（*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ）株を用いたスクリーニングによって、久慈産琥珀（約 8500 万年前）から酵母 Ca^{2+}シグナル伝達を阻害する新規物質 15,20-dinor-5,7,9-labdatrien-18-ol（kujigamberol と命名）（**1**）を見出した[1,2]。今般さらに探索をしたところ、活性を有するマイナー成分の存在が確認できたため、本研究では久慈産琥珀に含まれる新たな活性物質の単離精製を進め、その構造と活性の比較を目的とした。

【方法・結果】遺伝子変異酵母 YNS17 株と 0.3 M $CaCl_2$ を懸濁した YPD 培地にサンプルを 5 µl 滴下し、高濃度の Ca^{2+}存在下で細胞周期が G2/M で停止する性質の回復活性（生育円活性）を用いて、久慈産琥珀中の活性物質の探索を詳細に行ったところ、逆相 HPLC 分析で **1** と近いピークに活性が確認できた。活性物質の単離精製は、久慈産琥珀粉末（1029 g）のメタノール抽出物を酢酸エチル抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝3：1（**1**）、並びに 2：1（**2** と **3**））、逆相 HPLC（85% MeOH）を用いて行い、最終的にオイル状の 1 を 52.1 mg 単離し、また新たに 2 種の活性物質 **2** および **3** をそれぞれ 2.2 mg、1.7 mg 単離した。高分解能 EI-MS の結果より、**2** は分子式 $C_{18}H_{26}O$（分子量 258）であり、**3** は分子式 $C_{18}H_{28}O$（分子量 260）の物質であることが示唆され、各種 NMR を測定して **2** と **3** の構造を決定したところ新規物質であったため、それぞれ 13-methyl-8,11,13-podocarpatrien-19-ol を neokujigamberol A、および 15,20-dinor-5,7,9-labdatrien-13-ol を neokujigamberol B と命名した。**1-3** の化合物は、いずれも遺伝子変異酵母に対し生育円活性を有する。

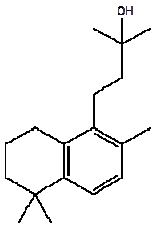
1) Kimura, K., *et al*., *Fitoterapia*, **83**, 907-912 (2012)
2) Ye, Y. Q., *et al*., *Bioorg. Med. Chem. Lett*., **22**, 4259-4262 (2012)



Kujigamberol (**1**)



Neokujigamberol A (**2**)



Neokujigamberol B (**3**)

yeast Ca^{2+}-signal transduction, Kuji amber, Neokujigamberol A and B

講演番号：2C21a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ C 校舎 21 会場

酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 変異株のストレス感受性を相補する活性物質のスクリーニング
Screening of active compounds that complement stress sensitivity of the yeast ubiquitin ligase Rsp5 mutant

○川村 悠実[1]、渡部 涼[2]、上杉 祥太[1]、喜多島 萌[5]、乾 朋樹[1]、大西 素子[3]、越野 広雪[4]、高木 博史[5]、木村 賢一[1,2]（[1]岩手大院・農、[2]岩手大・農、[3]中部大・応生、[4]理研・基幹研、[5]奈良先端大・バイオ）
○Yumi KAWAMURA[1], Ryo WATANABE[2], Shota UESUGI[1], Moe KITAJIMA[5], Tomoki INUI[1], Motoko OHNISHI[3], Hiroyuki KOSHINO[4], Hiroshi TAKAGI[5], Ken-ichi KIMURA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agri., Iwate Univ., [2]Fac. of Agri., Iwate Univ., [3]College of Bioscience and Biotechnology, Chubu Univ., [4]RIKEN ASI, [5]Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の HECT 型ユビキチンリガーゼの一つ Rsp5 は、生育に必須であり、ストレス耐性をはじめ酵母の多様な細胞機能に関与している。基質との結合に関与する WW ドメインにアミノ酸置換（Ala401Glu）が入った Rsp5 変異株（*rsp5*^{A401E}）は、高温（37℃）など各種ストレス下で感受性を示すが、これは Rsp5 の機能低下によりストレスで生じた異常タンパク質が分解されず蓄積するためと考えられる。したがって、Rsp5 変異株のストレス感受性を相補する物質は酵母のストレス応答機構に関わる可能性があり、同じ真核生物であるヒトでも疾病に対する効果が期待される。そこで本研究では、*rsp5*^{A401E} を用いた活性物質のポジティブスクリーニング系を検討し、同時に活性が認められた、ヒマラヤシダー（*Cedrus deodara*）とスギ（*Cryptomeria japonica*）由来の活性物質の単離精製と構造決定を行い、その生物活性と生育円との関連性を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】*rsp5*^{A401E} を用いたスクリーニング系は、酵母（3.5×10^5 cells/ml）を混濁した YPD プレート上に、ペーパーディスクの場合は 40 µl、直接添加の場合は 5 µl のサンプルを添加し、高温（37℃）ストレス下で 30 時間培養後、28℃で 2 日間さらに培養し、生じた生育円の大きさ（強さ）を活性として測定した。ヒマラヤシダーとスギからの活性物質の単離精製は、それぞれ生重量 1.6 kg と 1.3 kg の葉を乾燥後メタノールで抽出し、引き続き酢酸エチル抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン:酢酸エチル=3:1）にて精製を行い、最終的に HPLC 分取（85%または 90% メタノール−0.1% 酢酸）によりヒマラヤシダーから A（7.4 mg）、C（10.1 mg）、D（4.3 mg）の 3 成分、スギから B（22.4 mg）、C（2.3 mg）の 2 成分を単離した。市販品との比較、並びに HR-EI-MS の結果、成分 A は dehydroabietic acid、成分 C は pimaric acid と示唆された。これらの成分は BK チャネルオープナーとして知られているため、市販の BK チャネルオープナー他 7 種を調べたが、いずれも 1.25 µg では *rsp5*^{A401E} に対する活性が認められなかった。一方、両化合物に PP2C 活性化作用を見出したことから PP2C 活性化剤 4 種を調べたところ、同濃度で *rsp5*^{A401E} に対し活性を示した。さらに、両化合物はカルシニューリン阻害活性も示すため、カルシニューリン阻害剤 (FK506 及び cyclosporin A) を評価したところ、本スクリーニング系で生育円が見られた。カルシニューリン経路は Rsp5 によって転写後制御を受けるストレス応答転写因子 Msn2 が不安定化すると考えられている。したがって、*rsp5*^{A401E} では野生株よりも高温ストレス下でカルシニューリン経路が強く活性化されるが、PP2C 活性化剤がカルシニューリンを阻害または発現抑制することで、*rsp5*^{A401E} の高温ストレス感受性を相補する可能性が示唆された。

Saccharomyces cerevisiae, ubiquitin ligase Rsp5, PP2C

講演番号：2C21p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ C 校舎 21 会場

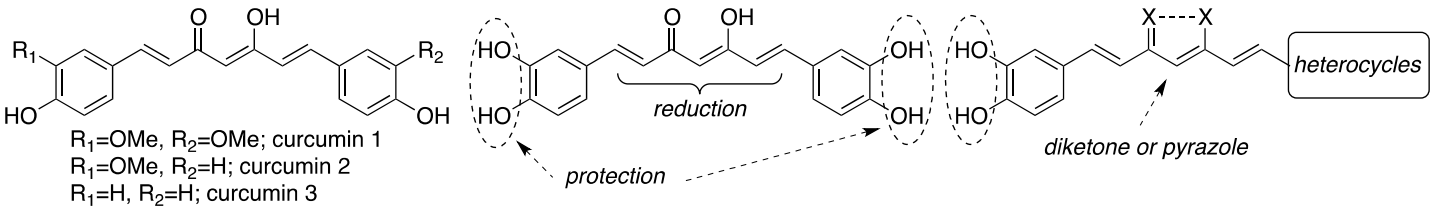
βセクレターゼ BACE1 を標的にしたクルクミン誘導体の構造活性相関研究

Structure activity relationship study of curcumin derivatives for the inhibition of b-secretase BACE1

○今野 博行[1]、齋藤 悠冴[1]、遠藤 仁[1]、宮崎 慶樹[1]、赤路 健一[2] ([1]山形大院理工、[2]京都薬大)
○ Hiroyuki KONNO[1], Yugo SAITO[1], Hitoshi ENDO[1], Keiki MIYAZAKI[1], Kenichi AKAJI[2] ([1]Yamagata Univ., [2]Kyoto Pharm. Univ.)

＜目的＞高齢化社会を迎えアルツハイマー病は増加の一途をたどっている. アルツハイマー病を引き起こす原因の一つは APP (amyloid β protein precursor) からβセクレターゼとγセクレターゼによって切り出されるアミロイドベータ (amyloid β) が高度に凝集したもの（老人班）であり, これが脳の機能低下を招くと考えられている. よって, 根本治療薬としてセクレターゼ阻害剤や amyloid β の凝集阻害剤は有効な薬剤になり得ると考えられる. 遺伝性家族型 APP キャリアー（スウェーデン型; Swe）からは難病である若年性認知症アルツハイマー病を発症するが, その APP を特異的に認識, 切断するβセクレターゼとして BACE1 (beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1)[1] が知られている. 我々は以前に BACE1 阻害剤探索を行う中でウコンの副成分であるクルクミン 2 が阻害活性を有することを見出した. そこで今回, クルクミン誘導体を用いて構造活性相関を行ったので報告する.

＜方法と結果＞クルクミン誘導体の調製はウコン主成分であるクルクミン 1 を構造変換することから始めた. クルクミン類の 4 つのフェノール性水酸基, 2 つのケトン, 2 つの二重結合部位をそれぞれタイプの異なる様々な保護基の導入, 還元反応などを行うことで様々な誘導体に導いた. しかしながら顕著な阻害能の向上は見られなかった.[2] 次にさらなる誘導体を得る目的で, 様々なベンズアルデヒド誘導体とアセチルアセトンのアルドール縮合を検討した. その結果, Pabon らの条件を用いた時に反応がスムーズに進行し, 望むクルクミン誘導体を得ることができた. 得られた誘導体に対して BACE1 阻害能を評価した所, ピラゾールやインドール構造を含んだクルクミン誘導体に阻害能を有することを見出した.



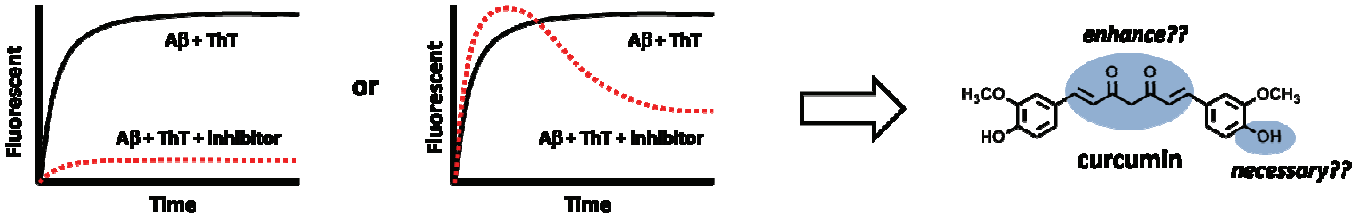
1) Vassar, R. *et al. Science* **1999**, 286.
2) Konno, H.; Aoki, H.; Saito, Y.; Endo, H.; Sanjyo, A.; Akaji, K. *Peptide Science 2011*, **2012**, 305-308.

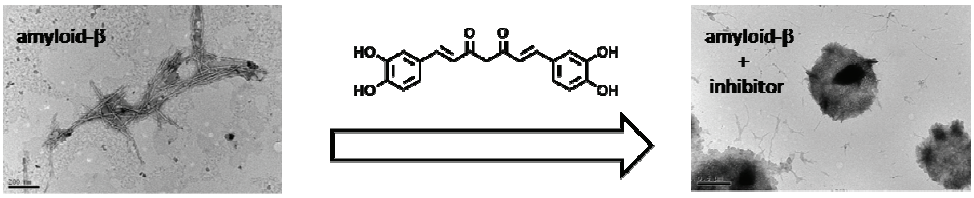
Alzheimer diesese, BACE1 inhibitor, curcumin

講演番号：2C21p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ C 校舎 21 会場

クルクミン類似体のアミロイドβ凝集阻害効果
Effect of Curcumin Analogues for Amyloid-beta Aggregation
○遠藤 仁、齋藤 悠冴、宮崎 慶樹、今野 博行（山形大院理工）
○Hitoshi ENDO,Yugo SAITO,Keiki MIYAZAKI,Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ.)

[背景及び目的] アミロイドβ(Aβ)はアミノ酸残基 40-42 で構成されるペプチドであり，βシートを形成することで凝集体となる。この凝集体は神経毒性を持ち，アルツハイマー病（AD）の原因因子の一つであると考えられている。ポリフェノール類に属されるクルクミンは，アミロイドβ凝集体の形成を強く阻害することが知られ，他のポリフェノールにも同様の作用を示すものが多数報告されているが，それらの詳細な作用機序は不明である。本研究では，クルクミン類似体の Aβ凝集阻害に対する構造活性相関を行うことで，クルクミンの作用部位の検討を行った。
[方法と結果] クルクミン類似体の合成は主に, Pabon らによって報告されている手法を用いることで行った。Aβ凝集阻害活性評価は，チオフラビン T(ThT)法により Aβ凝集体の量を測定することで行った。その結果，クルクミンのフェノール性水酸基が活性に必須であることが明らかとなり，オレフィンとβ-ジケトンからなる平面性は Aβとの親和性に影響を及ぼすことが分かった。また，活性を示した化合物と Aβの TEM 像より，線維化された Aβはあまり見られず球状の塊が観察された。現在、クルクミン類似体を用いた Aβの相互作用部位の特定について検討中である。





amyloid-beta, Curcumin, thioflavine-t

講演番号：2C21p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ C 校舎 21 会場

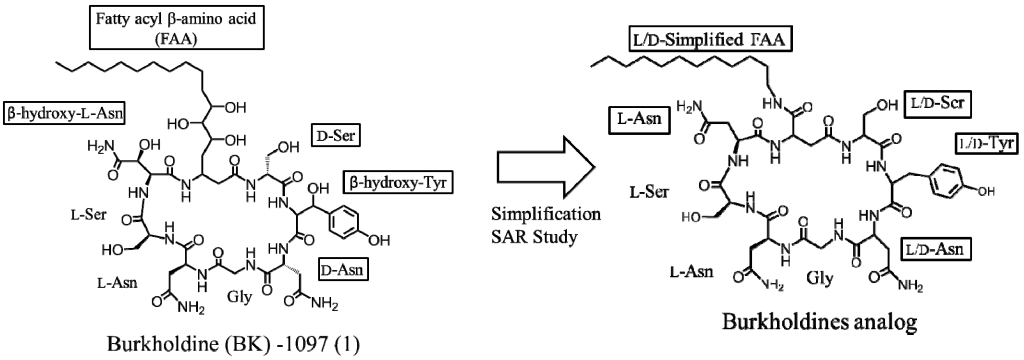
抗真菌活性を持つ BK-1097 類似体の合成及び生物評価

Synthesis and evaluation of BK-1097 analogues with an antifungal activity

○大槻 雄介、鐙 佳奈子、今野 博行（山形大院工）
○Yusuke OTSUKI,Kanako ABUMI,Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ.)

〈目的〉Burkholdine (BK)-1097 は 2010 年に Schmidt らのグループにより *Burkholderia amibifaria 2.2N* から単離、構造決定された環状オクタペプチドである[1]。Bk-1097 (1)の最小発育阻止濃度(MIC)は *S. cerevisiae* と *A. niger* に対し 1.6μg/ml であり、現在真菌治療薬として使用されている Amphotericin B の 25μg/ml より 16 倍抗真菌活性が高い。BK-1097 は環状リポペプチドで、β-hydroxytyrosine とβ-hydroxyasparagine、fatty acyl amino acid (FAA)を含む８つのアミノ酸から構成されている。しかしβ-hydroxytyrosine と FAA の立体化学は未決定であり、活性に必須となる部位もまだ特定されていない。そのため、合成化学的手法により様々な BK-1097 類似体を合成することで立体化学の推定とさらなる生物活性を持つ環状オクタペプチドの探索を行った。

〈方法と結果〉BK-1097 類似体の合成を行うにあたり、単純化した FAA を Fmoc-Asp(*t*Bu)-OH より２段階で合成した。またβ-hydroxytyrosine とβ-hydroxyasparagine は tyrosine および asparagine にそれぞれ変更した。単純化した FAA を含む直鎖ペプチドは 2-chlorotrityl chloride 樹脂を用いた Fmoc 固相合成法により調製した。樹脂上の直鎖ペプチドは 20% HFIP/DMF により樹脂から切り出され、環化させることで保護環状ペプチドが得られた。TFA/TIPS/H_2O による最終脱保護で目的とする環状ペプチドを得ることが出来た。合成したペプチドは *S. cerevisiae* と *A. oryzae* に対する MIC により評価し、立体化学の推定および構造活性相関研究を行った[2]。その結果、FAA の立体化学が L 体のときに高い阻害能を示し、Tyr は L 体と D 体で差がないことがわかった。



[1] Tawfik, K., Jeffs, P., Bray, B., Dubay, G., Falkinham, J. O. Ⅲ, Mesbah, M., Youssef, D., Khalifa, S., Schmidt, E. W. (2010) *Org. Lett.*, **12**, 664-666.
[2] Y. Otsuki, K. Abumi, H. Konno, *Peptide Science 2012*, 印刷中

antifungal activity, unusual amino acid, cyclic lipopeptide

講演番号：2C21p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ C 校舎 21 会場

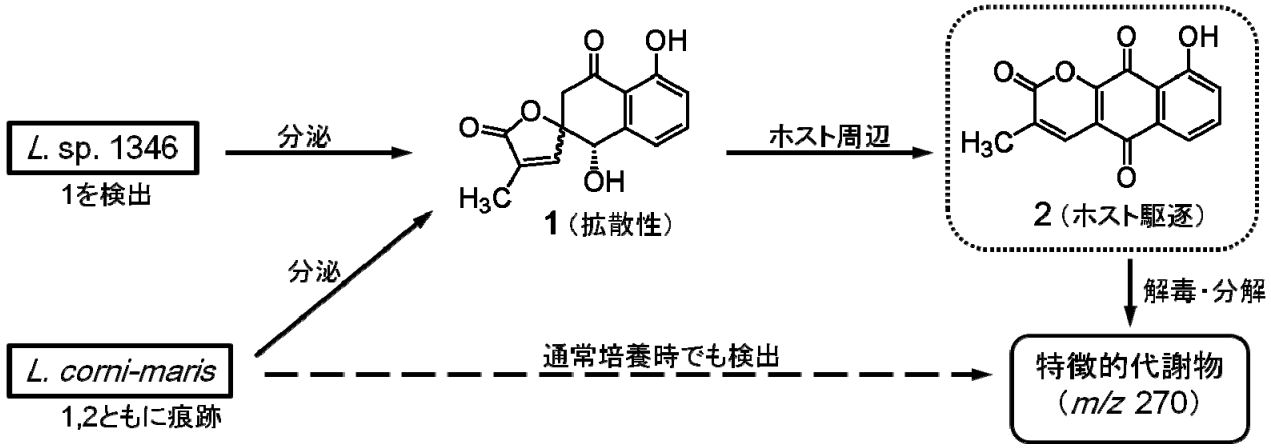
リンゴ果実上におけるマイコパラサイト機構の全容解明

Total mechanism of mycoparasitism on apple fruit

○廣瀬 あかね、村上 貴宣、橋本 勝 (弘前大学)
○Akane HIROSE,Takanori MURAKAMI,Masaru HASHIMOTO (Hirosaki Univ.)

Lambertella sp. 1346 (*L.* sp.1346)、及び *Lambertella corni-maris* (*L. corni-maris*) はリンゴ果実上でリンゴモニリア病菌 *Monilinia fructigena* にマイコパラサイトする。本研究室では、これまでに、*L.* sp.1346 培養液から lambertellol (**1**) を報告した。さらに **1** はマイコパラサイト支配物質前駆体であり、拡散によりホストに接近した後、真の活性物質 lambertellin (**2**)に非酵素的に変化してホストを駆逐すること、また、**1** は弱酸性では安定であるが、中性条件では速やかに **2** へ誘導されること等を明らかにしてきた。しかし通常の培養では、**1** は痕跡量しか検出されず、*L. corni-maris* 培養液の場合、**1**,**2** とも痕跡量であり、本現象を合理的に説明するには十分とは言えなかった。そこで我々は、**2** が本マイコパラサイト支配物質であると同時に、*Lambertella* 属は速やかに **2** を生分解して解毒するシステムを有しており、その動的な関係から **2** が痕跡量であると仮定した。

2 の添加は *L.* sp.1346 の成長を著しく阻害した。また、添加した **2** の濃度は時間ともに減少したことから、**2** は生産者にも毒性を示し、自身で生分解／解毒していることが判明した。また、^{13}C ラベルした **2** を添加して 40 分後に抽出物を分析したところ、GCMS で 13.4 分のシグナル（*m/z* = 270）が同位体ラベル化されることを見出し、**2** の分解物の一つを特定した。このシグナルは、*L. corni-maris* 通常培養時にも検出されたことから、通常の分析では痕跡量しか検出されないものの、一連の① **1** の生産、② **2** への変化、③ ホストの駆逐、④ **2** の解毒、という動的システムの存在を確認、そして本マイコパラサイト現象の全容を分子レベルで明らかにした。



mycoparasitism, mechanism, labeled experiments

講演番号：2C21p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ C 校舎 21 会場

オカボノアカアブラムシのイネ根への寄生による代謝産物変動
Changes of metabolites in roots of rice plant during attacking by Rhopalosiphum rufiabdominalis
○上田 真二[1]、佐野 千聡[1]、手林 慎一[1]、及川 彰[2]、佐々木 亮介[3]、斉藤 和季[3,4]、上手 麻希[5]、間世田 英明[5]、石原 亨[6] ([1]高知大農、[2]山形大農、[3]理研 PSC、[4]千葉大院薬、[5]徳島大 STS、[6]鳥取大農)
○Shinji UEDA[1], Chisato SANO[1], Shinichi Tebayashi[1], Akira OIKAWA[2], Ryousuke SASAKI[3], Kazuki SAITOU[3,4], Maki UWATE[5], Hideaki MASEDA[5], Atsushi ISHIHARA[6] ([1]Kochi Univ., Agri., [2]Yamagata Univ., Agri., [3]RIKEN PSC, [4]Chiba Univ Grad, Pharm, [5]Tokushima Univ., STS., [6]Tottori Univ., Agri.)

【目的】
イネの病害虫に対する抵抗性についての研究は数多く行われているが、その多くは茎葉部を対象とした研究であり、根部を対象とした研究はほとんど行われていない。本研究では陸稲や麦などのイネ科作物の他、ナスやスイカなど果菜類など、広範囲の植物の根に寄生できる農業害虫オアカボノアカアブラムシ（*Rhopalosiphum rufiabdominalis*）がイネ根に寄生した際の代謝産物や遺伝子発現の変動解析を行うことで、害虫の加害に対するイネ根における応答機構について検討した。
【方法】
（供試植物と供試昆虫）*R. rufiabdominalis*は2009年春に高知大学農学部構内のモモの木に発生した個体群を採集し、実験室内でイネ幼苗（日本晴）を用いて飼育した。
（質量分析方法）植物試料のメタノール抽出物は水とヘキサンで液-液分配し、得られた水層15nLをCE-MS(Agilent)で分析した。分析は1 M ギ酸緩衝液（カチオン）もしくは20 mM ギ酸アンモニウム水溶液（アニオン）を泳動液として用い、内部標準として、カチオン分析ではreserpine ($[M+H]^+$, m/z = 609.2806) およびメタノール２量体イオン($[2M+H]^+$, m/z = 65.0597) を用い、アニオン分析ではreserpine ($[M-H]^-$, m/z = 607.2661) およびギ酸２量体イオン($[2M-H]^-$, m/z = 91.0037) を用いて測定した。
（遺伝子発現分析方法）採取されたイネ幼根から、RNeasy Plant Mini Kit(キアゲン)を用いてTotalRNA を抽出し、純度を計測した後にHight capacity RNA-to-cDNA Kit (ABI)を用いてcDNAライブラリを作成した。これをもとにプライマーとqRT-PCRシステムを用いて遺伝子発現量を定量した。プライマーは定法に従い設計・最適化を行い使用した。
【結果】
質量分析の結果からアミノ酸や生体アミン、低分子有機酸の増加が確認され、特にトリプトファンが減少する一方でトリプタミンやセロトニンの増加が確認された。これらの生体アミンと桂皮酸誘導体類の縮合化合物群は、細胞壁の取り込みによりイネの生体防御の一端を担うことが提唱されている。アブラムシが寄生しているイネ根から調製した粗酵素溶液の Peroxidase 活性が増大していることから、イネの根はオアカボノアカアブラムシの寄生に対して、地上部の病害抵抗機構と同様の生体反応が生じていることが推定された。

aphid, rice, metabolomics

講演番号：2C21p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ C 校舎 21 会場

核酸による食品汚染カビ毒の新規検出系の開発

Development of a novel method for the detection of food borne mycotoxin using RNA aptamer

○森田 悠治[1]、冨田 康之[1]、秋吉 妙子[1]、菅 裕明[2]、藤原 大介[1] ([1]キリン（株） 基盤技術研究所、[2]東京大学理学系研究科)
○Yuji Morita[1], Yasuyuki Tomita[1], Taeko Akiyoshi[1], Hiroaki Suga[2], Daisuke Fujiwara[1] ([1]Kirin Company, Ltd., Central Laboratories for Key Technologies, [2]The University of Tokyo)

【目的】

パツリンは*Penicillium expansum*等のカビによって産生され、ヒトへの健康被害を有するカビ毒である。そのため、パツリン汚染の可能性が高い食品として知られているりんご果汁には世界保健機関（WHO）により基準値が推奨され、世界的に規制が強まっている。パツリンの検出方法としてはHPLCやGC-MS等の機器分析が用いられているが、on siteでリアルタイムに検出できる簡易分析系の開発が切望されているのが現状である。しかしながら、パツリンは低分子化合物であるが故に実用化可能な抗体は未だに取得されていない。そこで、我々はパツリンに特異的に結合する核酸リガンド・RNAアプタマーの探索を行うとともに、アプタマーを用いた簡易検出系の構築を試みた。

【方法】

自己切断リボザイムとランダム配列（アプタマー部位）を連結させたRNAライブラリを用いて、試験管内進化法によりパツリンに結合するアプタマーを探索した。この鋳型配列は、ターゲット分子であるパツリンがアプタマー部位に結合することで全体の構造変化が起こり、アロステリックに自己切断活性を働かせることが出来るので、アプタマー取得と同時に検出系への応用も可能にするものである。さらに、本手法は通常のアプタマー取得方法とは異なり、ターゲットであるパツリンの固定化を必要としない。パツリンのような低分子化合物は固定化の際の誘導体化によって構造が大きく変化してしまうことがアプタマー取得を困難にさせる要因となっており、本手法はこの課題を解決出来る点においても優れている。11ラウンドのスクリーニングの後、パツリン結合に伴って自己切断作用が起こるアロステリックリボザイムの解析を行った。

【結果】

配列の解析を行った結果、4種類の配列が濃縮されていた。各塩基配列についてパツリン結合性を確認したところ、1種類のパツリンアプタマーの取得に至った。取得されたアプタマーは構造類似体を認識せず、パツリン特異的に結合することが明らかとなった。

本研究はパツリンに対するアプタマー取得に成功した初めての報告であるとともに、簡易検出系に応用可能な抗体が取得されていない現状において、本アプタマーを用いたパツリン簡易検出系の構築は大いに期待できるものである。また、本法を応用することにより様々な低分子化合物のアプタマー取得・検出系の創出が期待される。

aptamer, ribozyme, patulin

講演番号：2C21p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ C 校舎 21 会場

蛍光プローブ化緑茶カテキン EGCG を用いたがん細胞特異的可視化

Fluorescent imaging of cancer using EGCG-like fluorecent probe

○熊添 基文[1]、末益 優美[1]、谷本 陽祐[3]、弘津 圭祐[1]、田中 浩士[3]、高橋 孝志[3]、山田 耕路[1]、立花 宏文[1,2] ([1]九大院農、[2]九大食品機能デザイン、[3]東工大院理工)
○Motofumi Kumazoe[1], Yumi Suemasu[1], Yousuke Tanimoto[3], Keisuke Hirotsu[1], Hiroshi Tanaka[3], Takahashi Takahashi[3], Koji Yamada[1], Hirofumi Tachibana[1,2] ([1]Kyushu Univ., [2]Kyushu Univ. Food Functional Design Center, [3]Tokyo Institute of Technology Univ.)

【目的】我々はこれまでに、緑茶カテキンの一種である Epigallocatechin-3-O -gallate (EGCG) が腫瘍細胞表面上に高発現するタンパク 67kDa Laminin Receptor (67LR) を介して cGMP 産生を誘導することで腫瘍特異的に細胞致死を誘導することを明らかにした [1)]。そこで本研究では、EGCG が 67LR を標的とすることを利用し、67LR 陽性細胞を特異的に可視化するための蛍光標識化 EGCG の作成を目的とした。

【方法】EGCG の各水酸基をメトキシ基もしくはリンカー構造あるいは蛍光色素 TAMRA を付加した EGCG 誘導体を作成し、これら誘導体のヒト多発性骨髄腫細胞株 U266 に対する増殖抑制活性を ATPlite 法を用いて、また、EGCG の 67LR 依存的な作用である cGMP 産生誘導能を競合イムノアッセイ法により測定した。さらに蛍光色素 TAMRA を付加した EGCG 誘導体の細胞染色能をフローサイトメトリー及び蛍光顕微鏡を用いて評価した。

【結果】各水酸基をメトキシ基に置換した EGCG のがん細胞増殖抑作用ならびに 67LR 依存性のシグナリング誘導能から、数ヶ所の水酸基は EGCG の活性発現に関与していないことが見出した。さらに、EGCG のがん細胞増殖抑制活性に関与していない水酸基にリンカーを介して蛍光色素 TAMRA を付加した EGCG を作成したところ、67LR 陽性細胞である U266 細胞の表面に結合するが 67LR 陰性の正常末梢血リンパ球には結合しないことがフローサイトメトリー解析ならびに蛍光顕微鏡観察から示された。この TAMRA 付加 EGCG の細胞染色能は非標識 EGCG で阻害された。

【結論】EGCG の生理活性発現に関与しない水酸基を明らかにするとともに、その水酸基部位に蛍光色素を導入した EGCG を用いて 67LR 陽性がん細胞を特異的に可視化することに成功した。

1) J. Clin. Invest., in press

EGCG, 67 kDa Laminin Receptor, cancer

講演番号：2C21p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ C 校舎 21 会場

新規ヒスチジンキナーゼ阻害剤 signermycinB の作用機構の解明

The mode of action of signermycinB,a novel inhibitor target ing histidine kinase

○犬飼 洋一[1]、木野 弘量[2]、渡邊 崇史[2]、五十嵐 雅之[3]、岡島 俊英[4]、梅北 まや[3]、波多野 和樹[3]、石井 英治[2]、江口 陽子[2]、内海 龍太郎[2] ([1]近畿大農バイオ、[2]近畿大院農バイオ、[3]微化研、[4]阪大産研)

○Youichi INUKAI[1], Hirokazu KINO[2], Takafumi WATANABE[2], Masayuki IGARASHI[3], Toshihide OKAJIMA[4], Maya UMEKITA[3], Masaki HATANO[3], Eiji ISHII[2], Yoko EGUCHI[2], Ryutaro UTSUMI[2] ([1]Kinki Univ., [2]Kinki Univ., [3]IMC, [4]Osaka Univ.)

近年、既知の抗生物質に対して耐性をもつメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA) 、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)の発生が問題になっている。当研究室では、新規抗生物質の探索を土壌放線菌の天然抽出物(10000 検体)から行った。その結果、MRSA,VRE,枯草菌などのグラム陽性菌の細胞壁合成制御を担う 2 成分情報伝達系（TCS）, WalK(HK, ヒスチジンキナーゼ)/WalR(RR　レスポンスレギュレーター)の WalK 阻害剤として signermycinB を見出した(1)。signermycinB は、WalK を阻害(IC50:60μM)し、多剤耐性菌である、MRSA,VRE に対しても(MIC:3~6μg/ml)抗菌活性を示した。そこで当研究室では、signermycinB の詳細な作用機構の研究を行った。

最初に、WalK,WalR をそれぞれ過剰発現させたときに、signermycinB の感受性の差を比較した。その結果 WalK を過剰発現させた場合にのみ、signermycinB に耐性を示した。さらに、WalK の二量体形成ドメイン、ATP 結合ドメインのどちらかに選択的に結合するのかを、表面プラズモン共鳴法(SPR)を用いて、解析を行った。その結果、signermycinB は、WalK の二量体形成ドメインに特異的に結合することが明らかになった。最後に WalK/WalR の制御下遺伝子の発現に及ぼす signermycinB の影響を定量的リアルタイム PCR 法によって解析した。その結果、WalK 欠損で予想されるプロファイルとよく一致した。このように、signermycinbB は、WalK の二量体形成ドメインに結合し、WalK の自己リン酸化を阻害し、定量的リアルタイム PCR 法によって解析した結果、WalK/WalR 制御下の遺伝子の発現を制御し、枯草菌や MRSA に対して、細胞分裂抑制と致死効果を示す。

さらに詳細な特定部位を明らかにするために, 標的タンパク質である WalK と signermycinB の結合予想モデルから、signermycinB との結合部位である有望アミノ酸を予想し、これら予想部位の 2 か所を変異させた変異体を作成した。これらの変異体を枯草菌内で過剰発現させ、signermycinB との感受性の差を野生型 WalK の過剰生産株と比較することで、signermycinB の結合部位の特定を試みた。

1) Watanabe, T *et al.*, Antimicrob. Agents Chmother.56, 3657-3663 (2012)

antibiotics, histidine kinase, two component system

講演番号：2C21p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ C 校舎 21 会場

細菌ヒスチジンキナーゼを標的とする新規抗生物質 waldiomycin の作用機構

The mode of action of waldiomycin, a novel antibiotic targeting histidine kinases

○木野 弘量[1]、犬飼 洋一[2]、五十嵐 雅之[3]、岡島 俊英[4]、石井 英治[1]、江口 陽子[1]、内海 龍太郎[1] ([1]近畿大院農バイオ、[2]近畿大農バイオ、[3]微化研、[4]阪大産研)
○Hirokazu KINO[1], Youichi INUKAI[2], Masayuki IGARASHI[3], Toshihide OKAJIMA[4], Eiji ISHII[1], Yoko EGUCHI[1], Ryutaro UTSUMI[1] ([1]Kinki Univ., [2]Kinki Univ., [3]IMC, [4]Osaka Univ.)

細菌には、細胞増殖、病原性発現、バイオフィルム形成、クォラムセンシング等の遺伝子発現を調節している情報伝達系である二成分制御系（TCS）が多く存在する。その中でも枯草菌やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）等の低 GC 含量グラム陽性菌に広く保存されている TCS、WalK(ヒスチジンキナーゼ、HK)/WalR(レスポンスレギュレーター、RR)は細胞壁代謝に関与する酵素遺伝子の制御を担っており、増殖に必須である。WalK/WalR を標的とする阻害剤は、細菌致死効果を持つ新規抗生物質と期待され、既存の抗生物質とは異なる作用を示すため、MRSA やバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）等の多剤耐性菌にも有効な、従来とは異なる抗生物質となる。放線菌の培養抽出物を用い、WalK を標的とする新規抗菌剤の探索を行った。その結果、抗菌性を有する新規化合物 waldiomycin を見出した。本研究では、waldiomycin の WalK に対する作用部位も含め、詳細な作用機構の解明を目的とした。
まず、標的タンパク質に対する特異性を評価するために、枯草菌体内で WalK、WalR をそれぞれ過剰発現させた際の、waldiomycin に対する感受性の差を比較した。その結果、WalK 過剰発現時のみ、野生型とは異なる増殖が観察でき、waldiomycin 耐性を示した。次に WalK 阻害様式を調べたところ、WalK 自己リン酸化を阻害することが明らかとなった。また、waldiomycin は ATP 非拮抗阻害を示し、glutaraldehyde を用いた二量体化実験において、WalK の二量体化を阻害した。これらのことより、waldiomycin は WalK 二量体形成ドメインに作用し、その阻害作用を示していることが示唆された。さらに、waldiomycin の WalK 阻害による WalK/WalR 制御下遺伝子の発現への影響を定量的リアルタイム PCR 法により解析を行った。その結果、ハウスキーピング遺伝子等の制御外の遺伝子の発現に影響は見られず、*walR* レギュロンの発現を強く阻害していることが明らかとなった。同時に、枯草菌ではフィラメント細胞、黄色ブドウ球菌では凝集化細胞が観察された。以上の結果より、waldiomycin は WalK に作用し、自己リン酸化を阻害することで、WalK/WalR 制御下遺伝子の発現を選択的に抑制し、細胞壁代謝を阻害し、細胞分裂抑制や細菌致死効果を示していることが明らかとなった。

Two-component system, Antibacterial agent, Multi drug resistance

講演番号：2C21p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ C 校舎 21 会場

細菌情報伝達阻害剤 walkmycin 類のヒスチジンキナーゼ阻害機構
Inhibition mechanism of walkmycins, inhibitors of histidine kinases in bacterial signal transduction
○江口 陽子[1]、栃尾 尚哉[2]、五十嵐 雅之[3]、木川 隆則[2]、内海 龍太郎[3]([1]近畿大農・バイオ、[2]理研横浜・SSBC、[3]微化研)
○ Yoko EGUCHI[1], Naoya TOCHIO[2], Masayuki IGARASHI[3], Takanori KIGAWA[2], Ryutaro UTSUMI[3] ([1]Kinki Univ., [2]Riken Yokohama, [3]IMC)

細菌に広く保存される情報伝達系である二成分制御系（TCS）は、環境の変化をシグナルとして感知するセンサーキナーゼ（ヒスチジンキナーゼ，HK）と HK と対になるレスポンスレギュレーター（RR）から構成される。TCS は病原菌の増殖や病原性などに深く関与することから、抗生物質の新規ターゲットとして注目される。我々は、TCS の HK を阻害する walkmycin 類を放線菌の代謝物より見出している。Walkmycin 類は MRSA や VRE に強い抗菌性を示す(1) とともに、う蝕菌（*Streptococcus mutans*）のバイオフィルム形成も抑制する(2)。本研究では walkmycin 類の HK 阻害機構について検討した。一般に、HK は (i) 自己リン酸化、(ii) RR へのリン酸基転移、(iii) リン酸化 RR の脱リン酸化、の 3 種の酵素活性を有するが、walkmycin 類はこれら 3 種の活性をすべて阻害した。また、ATP 競合試験およびケミカルクロスリンキング試験より、walkmycin 類は HK の二量体化ドメインに作用することが示唆された。そこで、すでに立体構造が NMR により解かれている EnvZ (HK) の二量体化ドメイン(3) を用いて、walkmycin 類の作用を検討した。その結果、表面プラズモン共鳴法および NMR による測定から walkmycin 類が二量体化ドメインへ結合することを確認した。さらに、NMR 解析により、walkmycin 類の添加によって、二量体化ドメインに保存されたヒスチジン付近の領域にシグナル変化が生じることが判明し、HK の活性にはこの領域が非常に重要であることが示唆された。**本研究は，生研センター異分野融合研究事業による。**

(1) Okada et al., *J. Antibiot*. **63**, 89-94 (2010)
(2) Eguchi et al., *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 1475-1484 (2011)
(3) Tomomori et al., *Nature Struct. Biol.*, **6**, 729-734 (1999)

histidine kinase inhibitor, walkmycin, signal transduction

講演番号：2C21p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ C 校舎 21 会場

TNF-α放出阻害物質 vialinin A の RBL-2H3 細胞における標的分子の同定
Identification of a target biomolecule of vialinin A, a potent TNF-alpha release inhibitor, in RBL-2H3 cells

岡田 潔[1]、叶 躍奇[2,4]、吉岡 泰淳[2]、谷口 佳代子[3]、○本橋 寛子[2]、菅谷 紘一[2]、小野瀬 淳一[2]、高橋 俊哉[4]、越野 広雪[4]、矢島 新[3]、矢嶋 俊介[1]、阿部 尚樹[2]([1]東農大・応生科・バイオ、[2]東農大・応生科・栄養、[3]東農大・応生科・醸造、[4]理研・基幹研)
Kiyoshi Okada[1], Yue-Qi Ye[2,4], Yasukiyo Yoshioka[2], Kayoko Taniguchi[3], ○Hiroko Motohashi[2], Kouichi Sugaya[2], Jun-ichi Onose[2], Shunya Takahashi[4], Hiroyuki Koshino[4], Arata Yajima[3], Shunsuke Yajima[1], Naoki Abe[2] ([1]Dept. of Biosci., Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo Univ. of Agri., [2]Dept. of Nutr. Sci, Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo Univ. of Agri., [3]Dept. of Ferment. Sci., Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo Univ. of Agri., [4]RIKEN ASI)

【目的】
ツブイボタケ(*Thelephora vialis*)は中華人民共和国において最も好まれる食用茸の一種であることに加え、腰腿の疼痛などの治療に用いられている薬用キノコでもある。我々は、ツブイボタケ乾燥子実体より新規物質 vialinin A を単離し、好塩基球系 RBL-2H3 細胞において強力な TNF-α放出阻害活性を有することを見出した。そこで、vialinin A のファーマフォコアを明らかにするとともに、細胞内の標的分子を同定し、TNF-α放出抑制機構を解明することを目的とした。
【方法・目的】
Vialinin A の TNF-α放出抑制活性における構造活性相関研究より、テトラハイドロキシ-*p*-テルフェニルの構造がファーマフォコアであることが明らかとなったことから、このファーマフォコアを保持し、vialinin A の側鎖部をより安定なメチル基に変更したアナログ DMT を合成したところ、vialinin A よりもさらに強い抑制活性を示すことが明らかとなった。Vialinin A 及び DMT 処理をした RBL-2H3 細胞における TNF-α の細胞外放出量及び細胞内産生量の検討を行ったところ、放出量は濃度依存的に抑制するのに対し、産生量は低濃度で強力に抑制するものの、濃度が上昇しても活性に変化がないという特徴的な阻害パターンを示すことが明らかとなった。タクロリムスなどの対照として用いた既知の免疫抑制剤等では放出量と産生量の両方で濃度依存的な抑制を示すことから、vialinin A は未知の TNF-α放出抑制機構を持つ可能性が示唆された。そこで、RBL-2H3 細胞中の標的分子を明らかにするため DMT をリード化合物としてビオチン標識化分子プローブを調製し、処理した細胞抽出物を、アフィニティークロマトに供して標的分子の単離を試みた。その結果、約 100kDa 付近に特異的なバンドが検出されたことから、これを MALDI-TOFMS に供し、ペプチドマスフィンガープリント法により解析することで、この分子を脱ユビキチン化酵素の一種である ubiquitin-specific peptidase 5/isopeptidase T (USP5/isoT,EC 3.1.2.15)と同定した。
【結論】
Vialinin A は RBL-2H3 細胞において TNF-α の細胞外への放出を濃度依存的に抑制し、産生を低濃度で強力に抑制することを明らかにした。また、脱ユビキチン化酵素の一種である USP5 が vialinin A の標的分子の一つであることが強く示唆された。

Vialinin A, TNF-alpha, chemical probe

講演番号：2C21p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ C 校舎 21 会場

Vialinin A 標的分子 USP5 の活性化抑制が TNF-α放出に与える影響

Inhibitory effect of TNF-alpha release through suppression of activation of USP5, a target molecule of vialinin A

○吉岡 泰淳[1]、岡田 潔[2]、叶 躍奇[1,4]、谷口 佳代子[3]、菅谷 紘一[1]、小野瀬 淳一[1]、高橋 俊哉[4]、越野 広雪[4]、矢島 新[3]、矢嶋 俊介[2]、阿部 尚樹[1]([1]東農大・応生科・栄養、[2]東農大・応生科・バイオ、[3]東農大・応生科・醸造、[4]理研・基幹研)
○Yasukiyo Yoshioka[1], Kiyoshi Okada[2], Yue-Qi Ye[1,4], Kayoko Taniguchi[3], Kouichi Sugaya[1], Jun-ichi Onose[1], Shunya Takahashi[4], Hiroyuki Koshino[4], Arata Yajima[3], Shunsuke Yajima[2], Naoki Abe[1] ([1]Dept. of Nutr. Sci., Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo Univ. of Agri., [2]Dept. of Biosci., Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo Univ. of Agri., [3]Dept. of Ferment. Sci., Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo Univ. of Agri., [4]RIKEN, ASI)

【目的】

生薬として腰腿の疼痛や手足の麻痺の治療にも使用されている中国産食用茸ツブイボタケ(*Thelephora vialis*)より新規物質 vialinin A を見出し、ラット好塩基球系である RBL-2H3 細胞において、強力な TNF-〈放出阻害活性を示すこと、さらに、アフィニティークロマトグラフィー法を用いることにより、RBL-2H3 細胞中の vialinin A 標的分子の１つとして脱ユビキチン化酵素の一種である Ubiquitin-specific peptidase 5/isopeptidase T (USP5/isoT, EC 3.1.2.15)を同定したことを報告してきた。今回、vialinin A 処理と USP5 酵素活性との関係および TNF-〈放出阻害に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法および結果】

USP5 は、細胞内のポリユビキチン鎖、または、モノユビキチンを標的とすることが知られていることから、それぞれの酵素活性に対する vialinin A の影響を検討することとした。大腸菌を用いて hUSP5 を大量発現させる系を構築、ポリユビキチン鎖としてテトラマーのポリユビキチン、モノユビキチンとしてユビキチン-AMC を基質として用い vialinin A をプレインキュベートさせた後に hUSP5 を添加して脱ユビキチン化反応への影響を検討した。Vialinin A はいずれの基質を用いた場合においても酵素阻害活性を示した。さらにユビキチン-AMC 基質を用いて、他の市販脱ユビキチン化酵素 (USP2 core, USP4, USP8, UCH-L1, UCH-L3) に対する vialinin A の阻害活性についても検討した。その結果、vialinin A は、USP4 および UCH-L1 にも阻害活性を示した。脱ユビキチン化酵素の細胞内での発現量と TNF-α放出との関係を明らかにするため、RNA 干渉の技法を用いて USP5 に加え、vialinin A により阻害される USP4、USP5 とドメイン構造が類似している USP13 についても siRNA により発現を抑制させた細胞を用いて、TNF-〈放出試験を行った。その結果、USP5 発現をノックダウンさせた細胞においてのみ、抗原刺激による TNF-〈放出時において vialinin A 処理で認められたのと同様な TNF-〈放出阻害が認められた。

【結論】

Vialinin A は細胞内に取り込まれ、脱ユビキチン化酵素 USP5 に結合し、その酵素活性を阻害することが明らかとなった。また、USP5 の活性化の抑制と TNF-〈放出阻害作用との間に強い関連性があることが示唆された。

vialinin A, TNF-alpha, USP5

講演番号：2C21p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ C 校舎 21 会場

Glaziovianin A は colchicine 結合部位に結合し、細胞内微小管ダイナミクスを抑制する

Glaziovianin A binds colchicine-binding site on tubulin heterodimer, and inhibits microtubule dynamics

○知念 拓実[1]、高木 昌俊[2]、早川 一郎[3]、木越 英夫[3]、今本 尚子[2]、臼井 健郎[1]（[1]筑波大院・生命環境、[2]理研・基幹研、[3]筑波大院・数理物質）
○ Takumi CHINEN[1], Masatoshi TAKAGI[2], Ichiro HAYAKAWA[3], Hideo KIGOSHI[3], Naoko IMAMOTO[2], Takeo USUI[1] ([1]Univ. Tsukuba, [2]Riken ASI, [3]Univ. Tsukuba)

[背景・目的] 微小管は真核生物の主要な細胞骨格の一つであり、チューブリンヘテロダイマーが重合・脱重合を行うことにより、細胞内で常に伸長・短縮を繰り返す極めて動的な構造体である。微小管動態は伸長・短縮のほか、カタストロフ（伸長から短縮への移行）、レスキュー（短縮から伸長への移行）、ポーズ（伸長・短縮が止まった状態）に分けられ、これらは合わせて微小管ダイナミクスと呼ばれている。

Glaziovianin A（AG1）はブラジル原産マメ科植物である *Ateleia Glazioviana* から単離・精製された新規イソフラボンである。我々はこれまでに、AG1 が動物細胞に異常な紡錘体形成を誘導することで細胞分裂期の進行を阻害すること[1]、また *in vitro* において微小管重合までの lag time を延長し、重合を遅らせるが最終重合度には影響しないこと、さらに細胞内において伸長している微小管先端に集積する EB1 の局在を消失させることを報告してきた[2]。これらの結果から、AG1 は tubulin に直接結合して微小管ダイナミクスそのものを阻害すると予想されるが、AG1 の結合部位や、細胞内微小管動態への直接的な作用は不明のままである。そこで本研究では AG1 の tubulin 上の結合部位や細胞内微小管ダイナミクスへの作用を検討することとした。

[結果・考察] AG1 の tubulin 上の結合部位を探るため、AG1 と結合部位がすでに明らかになっている微小管重合阻害剤との競合実験を行った。その結果 AG1 は[^{3}H]-vinblastine の tubulin への結合を阻害せず、[^{3}H]-colchicine の結合を阻害した。このことから AG1 の微小管上の結合部位は、colchicine 部位と同一または一部重なっていると考えられる。続いて GFP-α-tubulin 発現 PtK2 細胞を用いて AG1 の細胞内微小管動態への作用を検討したところ、AG1 処理により微小管の伸長・短縮の速度、並びにカタストロフの頻度が低下するとともに、伸長・短縮せずに静止しているポーズにいる微小管の割合が増加した。以上のことから AG1 は colchicine 結合部位付近に結合し、細胞内微小管ダイナミクスを抑制することが示された。

1) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 3091-3094 (2007)
2) *In* International Symposium on Cell Functions Mediated by Small Molecules, University of Tsukuba, Japan, Nov 2010

glaziovianin A, colchicine, microtubule dynamics

講演番号：2C21p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ C 校舎 21 会場

Capsaicin による可逆的タイトジャンクション開口メカニズムの解析

Mechanistic analysis of reversible tight junction opening by Capsaicin

○塩原 智子、臼井 健郎、韓 駿奎、礒田 博子、南雲 陽子（筑波大院・生命環境）
○Tomoko SHIOBARA, Takeo USUI, Junkyu HAN, Hiroko ISODA, Yoko NAGUMO (Univ. of Tsukuba)

【目的】タイトジャンクション(Tight Junction: TJ)は、隣接した上皮細胞間隙を強く接着する構造であり、体外からの異物の侵入を防ぐバリア機能などに関わる一方で、抗体などのバイオ医薬品の吸収障壁ともなっている。このため、TJ の開閉を制御することができれば上皮細胞間隙からのバイオ医薬品吸収を促進させることが可能になると考えられる。トウガラシの辛み成分 Capsaicin は腸管上皮 TJ を開口し、物質透過性を亢進させることが報告されている [1)]。この TJ 開口は一過的・可逆的であり、Capsaicin を除去しなくとも、TJ が再び閉口しバリア機能が回復するため、バイオ医薬品の吸収促進剤開発のモデル化合物となりうる。我々は Capsaicin による一過的 TJ 開口メカニズムの解明を目指して解析を行い、TJ 開口時に 1）Cofilin の活性化を介した Actin 変動 [2)]、2）Actin の Apical membrane への集合、3）TJ 構成因子である Occludin の分解、などが起こることを見出してきた [3,4)]。しかしながらこれらの現象と可逆的 TJ 開口との関係は不明のままである。そこで本研究では、Actin や Occludin の変動と一過的な TJ 開口との関連を明らかにすることを目的に解析を行った。
【方法及び結果】上皮細胞層のモデルとして MDCKII 細胞を用い、各種関連タンパク質の安定発現株を作成した。Occludin 過剰発現株及び Cofilin 過剰発現株では Capsaicin による経上皮電気抵抗の低下が抑えられたことから、Occludin 分解と Actin 変動の両方が TJ 開口に関与していることが示唆された。このとき Occludin 過剰発現株では Cofilin の脱リン酸化が抑制されず、Cofilin 過剰発現株では Occludin の分解が抑制されなかったことから、Occludin 分解と Actin 変動は独立した経路であると考えられる。次に、TJ 閉口時の Actin や Occludin の変動を解析するため、 ローダミンファロイジン染色により Actin 局在変動を、またウェスタンブロット法により Occludin 発現レベルを解析した。この結果、TJ 閉口時に Cofilin が再び不活性化され、Actin の局在変動が回復する一方、Occludin のタンパク質量の回復は見られなかった。このことより、TJ 閉口には主に Actin の局在回復が関与していると考えられる。

1) H. Isoda, *etc.*, *Cytotechnology,* **36**, 155-161 (2001)
2) Y. Nagumo, *etc.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **377**, 921-925 (2008)
3)日本農芸化学会 2011 年度大会 3A08p22
4)日本農芸化学会 2011 年度関東支部大会 P-11

tight junction, Capsaicin, Occludin

講演番号：2C21p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ C 校舎 21 会場

遺伝学的操作が容易な多剤超感受性酵母を用いた薬剤標的分子の同定

Target protein identification of small molecule by multidrug-sensitive and high sporulation efficiency yeast strain.

○太田 優[1]、知念 拓実[1]、志波 優[2]、吉川 博文[2,3]、横島 聡[4]、福山 透[4,5]、小林 淳一[6]、臼井 健郎[1] ([1]筑波大院・生命環境、[2]東京農大・ゲノム解析セ、[3]東京農大・応生科、[4]名大院・創薬科学、[5]東大院・薬、[6]北大院・薬)
○Yu OTA[1], Takumi CHINEN[1], Yuh SHIWA[2], Hirofumi YOSHIKAWA[2,3], Satoshi YOKOSHIMA[4], Tohru FUKUYAMA[4,5], Jun-ichi KOBAYASHI[6], Takeo USUI[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]Tokyo Univ. Of Agriculture, [3]Tokyo Univ. Of Agriculture, [4]Nagoya Univ., [5]Tokyo Univ., [6]Hokkaido Univ.)

【背景・目的】小分子化合物の標的分子を同定する有効な手法の一つとして、小分子化合物に対して優性耐性を示す変異株を用いた遺伝学的アプローチが挙げられる。我々は出芽酵母を用い、薬剤排出に関与する 12 遺伝子を破壊するとともに、胞子形成効率を上昇させる変異を導入することにより、遺伝学的解析が容易で、かつ多くの薬剤に対して高い薬剤感受性を示す株「12gene Δ 0HSR」を作製し、報告してきた[1, 2)]。今回この株を用いて、抗ウイルス活性や細胞毒性が報告されている Eudistomin C（EudiC）[3, 4)]の標的分子の探索を行い、本株の標的分子同定での有効性を検証することとした。
【方法・結果】YPD 培地上での EudiC に対する感受性を検討したところ、12gene Δ 0HSR は親株である BY4741 と比べ、約 25 倍の感受性を示した。そこで定法に従い、EudiC に対して優性耐性を示す突然変異株の取得を試みたところ、三つの相補群（*YER1-3*）からなる 8 株の優性耐性変異株を得ることができた。それぞれの相補群から一株ずつ選び、次世代シークエンサーを用いて変異点の同定を行ったところ、それぞれの株から複数の耐性遺伝子候補を見出した。特に強い優性耐性を示した YER1 株に注目して解析を進めた結果、耐性変異遺伝子としてリボソーム小サブユニットの構成タンパク質をコードする RPS14A を同定した。そこでタンパク質合成に対する影響を検討したところ、EudiC は動物細胞のタンパク質合成を強く阻害したことから、EudiC の阻害点の少なくとも一つはタンパク質合成であることが強く示唆された。以上の結果から、我々が作成した 12gene Δ 0HSR 株は、遺伝学的アプローチによる小分子化合物の標的分子同定に有効であると考えられる。

1) 日本農芸化学会 2011 年度大会要旨 p194
2) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1588-1593 (2011)
3) *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 1524-1526 (1984)
4) *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3378-3387 (1987)

Target identification, Multidrug-sensitive yeast strain

講演番号：2C21p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ C 校舎 21 会場

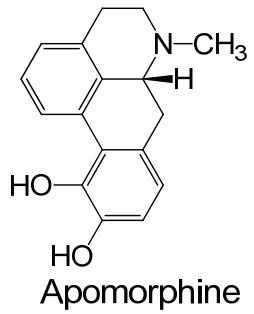
自動酸化によるアポモルフィンのアミロイド β 凝集阻害機構の解析

Inhibitory mechanism of amyloid ß aggregation by apomorphine through its auto-oxidation

○佐藤 瑞穂[1]、村上 一馬[1]、片山 寿美枝[2]、赤木 謙一[2]、入江 一浩[1] ([1]京大院農、[2]医薬基盤研究所)
○Mizuho SATO[1], Kazuma MURAKAMI[1], Sumie KATAYAMA[2], Ken-ichi AKAGI[2], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]NIBIO)

【背景と目的】アルツハイマー病 (AD) の原因物質であるアミロイド β ペプチド (Aβ42) は, 凝集することにより神経細胞毒性を示すことから, Aβ42 の凝集を阻害する化合物は AD 治療薬として期待される. 近年, パーキンソン病の治療薬であるアポモルフィン (下図) は, Aβ40 の凝集を阻害し,[1] AD モデル動物を用いた実験において治療効果を示すことが報告されたが,[2] その詳細な作用機序は明らかにされていない. 本研究グループはこれまでに, カテコール構造を有するフラボノイドは, 自動酸化されて *o*-キノン体を形成し, Aβ42 の Lys16 と付加体を形成することにより凝集を抑制することを明らかにした. 一方, カテコール構造を持たず, 平面性が高いフラボノイドは, Aβ42 凝集体の β シート領域に π/π スタッキング等により相互作用して凝集を抑える可能性が示唆された.[3] 本研究では, アポモルフィンのカテコール構造に着目し, Aβ42 凝集抑制における *o*-キノン体形成の関与を検討した.

【方法と結果】アポモルフィンの Aβ42 の凝集能への影響を, チオフラビン T 蛍光法ならびに電子顕微鏡を用いて評価したところ, アポモルフィンは濃度依存的に Aβ42 の凝集を阻害した. また, CD スペクトルにより Aβ42 の二次構造の変化を調べた結果, アポモルフィンによって Aβ42 の β シート構造への変化が抑制された. 次にアポモルフィンの UV スペクトルを経時的に測定したところ, *o*-キノン形成が確認されたが, 酸化により構造が変化している可能性も考えられた. 一方, 還元剤 [tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride, TCEP-HCl] を加えると, アポモルフィンの凝集阻害能は著しく低下した. これらの結果より, アポモルフィンの自動酸化が Aβ42 凝集阻害に重要であることが示唆された. さらに, Lys16 との付加体形成が凝集阻害に関与するかどうかを調べるため, Lys16 をノルロイシンで置換した Aβ42 変異体を用いて凝集試験を行った. その結果, アポモルフィンは Aβ42 変異体の凝集を野生型と同程度に阻害した. 以上より, アポモルフィンによる Aβ42 の凝集阻害には, Lys16 との付加体形成以外の相互作用 (π/π スタッキング等) が寄与している可能性が考えられる.



Apomorphine

【参考文献】 1) Lashuel, H. A. *et al.*, *J. Biol. Chem*. **2002**, *277*, 42881-42890.
2) Himeno, E. *et al*., *Ann. Neurol.* **2011**, *69*, 248-256.
3) 村上ら, 第 54 回天然有機化合物討論会要旨集 **2012**, *54*, 97-102.

amyloid ß, aggregation, apomorphine

講演番号：2C21p17
講演日時、会場：3 月 25 日 17:12～ C 校舎 21 会場

Cornus Officinalis のケラチノサイト成熟化に及ぼす影響

Pharmacologically effect for keratinocyte maturation in *Cornus Officinalis*

○那波 慶彦[1]、濱中 淳[2]、早瀬 基[3] ([1]一丸ファルコス株式会社、[2]ケーアイケミカル株式会社、[3]株式会社カネボウ化粧品スキンケア研究所)
○Yasuhiko NAWA[1], Atsushi HAMANAKA[2], Motoi HAYASE[3] ([1]ICHIMARU PHARCOS Co., Ltd., [2]KEAI CHEMICAL CO., LTD., [3]Kanebo Cosmetics Inc. Skincare Reserch Laboratory)

紫外線を過剰に浴びないことを推奨されるようになってから、10 年以上が経過し、化粧品を利用する消費者の意識も向上し、光老化に関しては、十分対策をした上で日々生活している。こうした消費者意識の変遷に合わせ、最近では、肌の老化対策と言っても、抗糖化阻害等の生理的老化等をターゲットとした化粧品も多く販売されるようになってきている。

こうした「アンチエイジングケア」に対する消費者の期待もさることながら、Q:肌に関するトラブルで気になることは何ですか？の質問に対し、夏以外の季節においては、「肌の乾燥」と答えた方が 70％を超えた。「乾燥肌ケア」に対する期待も、年代を問わず非常に関心が高いことがアンケート調査を通してわかってきた。

そこで我々は、角層細胞成熟化に関与することが知られてきた Peroxisome Proliferator-Activated Receptor（PPAR; ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体）を指標に乾燥肌ケア素材を探索したところ、中国や朝鮮半島が原産のミズキ科落葉木である Cornus Officinalis にその可能性をみいだしたので報告する。

keratinocyte maturation, *Cornus Officinalis*, PPAR

講演番号：2C21p18
講演日時、会場：3 月 25 日 17:24～ C 校舎 21 会場

MCLV3 の立体配座の固定による構造活性相関研究
Structure Activity Relationship of strained MCLV3 analogues
○加藤 成人、御手洗 由貴、土屋 玲一郎、小林 耕、近藤 竜彦、坂神 洋次 (名古屋大院農)
○Shigeto KATO,Yuki MITARAI,Reiichiro TSUCHIYA,Ko KOBAYASHI,Tatsuhiko KONDO,Youji SAKAGAMI (Nagoya Univ.)

【背景・目的】
植物の地上部のほとんどの組織は、茎頂分裂組織(shoot apical meristem, SAM)に存在する少数の幹細胞に由来する。シロイヌナズナから単離された*clavata*変異株はSAMが肥大化するという表現型を示す。この変異の原因遺伝子の一つである*CLV3*は、翻訳後修飾により、配列中のPro残基が水酸化、糖鎖修飾された13残基の分泌型ペプチドホルモンとしてSAMの幹細胞数を負に調節している。我々は*CLV3*過剰発現体より調製したカルスから、配列中に2残基のヒドロキシPro残基を含む12残基のペプチド(MCLV3)を検出、同定した。MCLV3は成熟型のCLV3ペプチドと比較し、C末端側が1残基短く、糖鎖修飾されていないが、受容体であるCLV1に結合し、非常に低濃度(10 nM)で生理活性を示すことから合成の容易なCLV3誘導体と考えることができる。本研究では、このMCLV3の構造活性相関を明らかにし、有用なアンタゴニストやアゴニストとなる類縁体を合成することを目的としている。
【方法・結果】
我々はこれまでに MCLV3 のアラニン置換体をはじめとする多くの類縁体を合成し、その生理活性を評価することで、両末端のアミノ酸残基が受容体認識に必須であること、分子内に３カ所存在する Pro 残基が生理活性の発現に重要な役割を果たすことなどを明らかにしてきた。Pro 残基は天然では唯一のイミノ酸であるため、Pro 残基の立体配座がペプチドの立体構造に対して重要な役割を果たしているのではないかと予想される。そこで、本大会では MCLV3 の pre-prolyl アミド結合を *cis*-型ないし *trans*-型に固定した MCLV3 類縁体を合成し、その生理活性を評価することで、Pro 残基の配座が MCLV3 の活性発現に対して与える影響について調べた。生物検定には、シロイヌナズナを用いた主根伸長阻害活性（根端分裂組織に対する活性)、*clv3* 変異体の茎頂分裂組織肥大化抑制活性、カリフラワーより調製した膜画分を利用した受容体結合アッセイを用いた。その結果、6,7 残基間のアミド結合を *cis* 型に固定した類縁体は活性を完全に失ってしまった一方で、*trans* 型に固定した類縁体は３種類の生物検定で全て強い活性を示した。一方、8,9 残基間のアミド結合を固定した類縁体は、*cis* 型、*trans* 型共に茎頂と根端の両方で生理活性をほとんど失ってしまったが、*cis* 型に固定した類縁体のみが受容体と結合するという結果を得た。これらの結果より、MCLV3 の７残基目と９残基目の Pro 残基の pre-prolyl アミド結合の立体配座がペプチドの生理活性や結合活性に大きな影響を与えることを明らかにした。

Arabidopsis thaliana, CLV3, peptide

講演番号：2C21p19
講演日時、会場：3 月 25 日 17:36～ C 校舎 21 会場

Debromoaplysiatoxin 単純化アナログの２７位における構造活性相関

Structure-activity studies at position 27 of a simplified analog of debromoaplysiatoxin

○花木 祐輔[1]、菊森 将之[1]、植野 紗代[1]、徳田 春邦[2]、鈴木 信孝[2]、入江 一浩[1] ([1]京大院農、[2]金沢大院医)
○Yusuke Hanaki[1], Masayuki Kikumori[1], Sayo Ueno[1], Harukuni Tokuda[2], Nobutaka Suzuki[2], Kazuhiro Irie[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kanazawa Univ.)

【背景•目的】

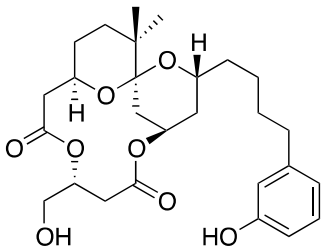
Debromoaplysiatoxin (DAT) は，強力な発がん促進作用を示すプロテインキナーゼ C（PKC）の活性化剤である．本研究グループはこれまでに，DAT の単純化アナログである Aplog-1 が発がん促進作用を示さず，がん細胞増殖抑制活性を示すことを明らかにしている [1)]．また，DAT は PKC のすべてのアイソザイムに強く結合するのに対して，Aplog-1 は腫瘍抑制，アポトーシスなどに関与している PKCδ に選択的に結合することが明らかになっている [2)]．本研究では，Aplog-1 のがん細胞増殖抑制活性に対する PKCδ の関与を調べることを目的として新規誘導体（**1** ～ **3**）を合成し，それらの PKCδ 活性化能とがん細胞増殖抑制活性を評価した．

【方法•結果】

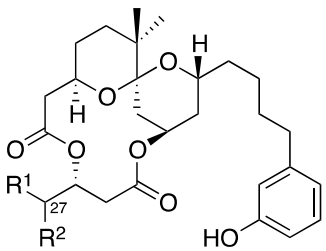
Aplog-1 の PKCδ 活性化に必要とされる 27 位の 1 級水酸基を，2 級水酸基またはメチルエーテルに変換した新規誘導体（**1** ～ **3**）を合成した．化合物 **1** は Aplog-1 と同程度に PKCδ を活性化し，数種のがん細胞（HBC-4，NCI-H460 など）の増殖を顕著に抑制した．一方，**2** および **3** は PKCδ を活性化せず，これらのがん細胞に対する増殖抑制活性も弱かった．以上の結果より，Aplog-1 に特徴的ながん細胞増殖抑制活性は，PKCδ の活性化に起因するものであることが示唆された．

【文献】

1) Nakagawa, Y. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7573.
2) Irie, K. *et al*., *Pure Appl. Chem.* **2012**, *84*, 1341.



Aplog-1



1 : R^1 = Me, R^2 = ⋯OH (*R*)
2 : R^1 = Me, R^2 = ▬OH (*S*)
3 : R^1 = H, R^2 = OMe

Debromoaplysiatoxin, Protein kinase C, Aplog

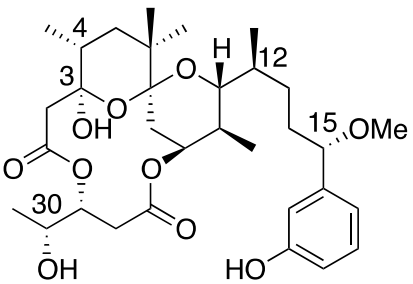
講演番号：2C21p20
講演日時、会場：3 月 25 日 17:48～ C 校舎 21 会場

Debromoaplysiatoxin 単純化アナログの 10 位メチル体の発がん促進活性
Tumor-promoting activity of 10-methyl-aplog-1, a simplified analog of debromoaplysiatoxin

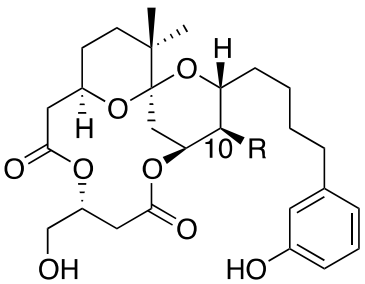
○菊森 将之[1]、花木 祐輔[1]、柳田 亮[2]、徳田 春邦[3]、鈴木 信孝[3]、永井 宏史[4]、末永 聖武[5]、入江 一浩[1] ([1]京大院農、[2]香川大農、[3]金沢大院医、[4]東京海洋大、[5]慶応大理工)
○Masayuki KIKUMORI[1], Yuusuke HANAKI[1], Ryo YANAGITA[2], Harukuni TOKUDA[3], Nobutaka SUZUKI[3], Hiroshi NAGAI[4], Kiyotake SUENAGA[5], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Kanazawa Univ., [4]Tokyo Univ. of Marine Science and Technology, [5]Keio Univ.)

Protein kinase C (PKC) アイソザイムは，細胞の分化や増殖，アポトーシスなどのシグナル伝達において中心的役割を果たしているため，がんやエイズ，アルツハイマー病などの難治性疾患の治療における標的酵素として注目されている．ホルボールエステルに代表される天然発がん促進物質は，PKC を強力に活性化することから，これらの疾患の治療薬としての可能性を有している．しかしながら，その強力な発がん促進活性のために，薬剤としての利用は懸念されている．当研究室では，天然の発がん促進物質の骨格を利用して，その発がん促進活性のみを選択的に取り除いた新しい薬剤を創製する試みがなされてきた．近年，アメフラシ由来の発がん促進物質・debromoaplysiatoxin (DAT) の単純化アナログである **1** が，種々のがん細胞株の増殖を抑制する一方で，発がん促進活性をほとんど示さないことが明らかになった [1)]．当研究室のこれまでの構造活性相関研究により，DAT の 4 位，12 位，30 位のメチル基が発がん促進活性に関与しないことが示されている．一方で，DAT のスピロケタール部分の疎水性置換基が, がん細胞のアポトーシスにかかわる PKCδ への結合能に重要と考えられた．本研究では，DAT のスピロケタール部分の 10 位メチル基の役割を調べることを目的として，**1** の 10 位に DAT と同じ立体配置を持つメチル基を導入した誘導体 (**2**) を，*m*-hydroxycinnamic acid から 8 段階で誘導した既知のアルデヒドを出発原料として，20 段階，0.85%の総収率で合成した [2)]．PKCδ に対する結合能ならびに 39 種のがん細胞株に対する増殖抑制能を評価した結果，**2** は **1** と比べて 10 倍以上高い活性を示し，その活性は DAT と同等であった．一方，*in vivo* の発がん促進活性と高い相関性のある EB ウイルス早期抗原誘導試験の結果，**2** の発がん促進活性は **1** と同程度に低い可能性が示唆された．この傾向は，分化 HL-60 細胞に対する $O_2^{\cdot-}$産生誘導能とも良く対応していた．さらに，マウス皮膚発がん 2 段階試験を行なったところ，**2** は DAT とは異なり，DAT の 5 倍量の塗布によっても発がん促進活性をまったく示さなかった．以上の結果より，DAT の 15 位メトキシ基と 3 位ヘミアセタール水酸基が発がん促進活性に関与する可能性が示唆された．

1) *J. Am. Chem. Soc.* **2009,** *131,* 7573; 2) *J. Med. Chem.* **2012,** *55,* 5614.



Debromoaplysiatoxin (DAT)



1 : R = H
2 : R = Me

protein kinase c, tumor promoter, debromoaplysiatoxin

講演番号：2C22a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ C 校舎 22 会場

放線菌 *Streptomyces rochei* の抗生物質生産を誘導するシグナル分子 SRB の生合成機構

Biosynthetic pathway of the signaling molecules SRBs that induce antibiotic production in *Streptomyces rochei*

○津田 直人、シャ レイ、カワハラ ヒロユキ、キナシ ハルヤス、アラカワ ケンジ (広島大院・先端研)
○ Naoto TSUDA, Li XIE, Hiroyuki KAWAHARA, Haruyasu KINASHI, Kenji ARAKAWA (Hiroshima Univ.)

【目的】*Streptomyces rochei* 7434AN4 株は 2 つの抗生物質 lankacidin C (LC), lankamycin (LM) を生産する。シグナル分子 SRB 合成遺伝子 *srrX* およびその特異的リセプター遺伝子 *srrA* を中心とした遺伝子破壊および転写解析により、*S. rochei* の二次代謝カスケードは以下の経路をとると考えられる ；1) *srrX* より生合成された SRB がその特異的リセプターSrrA に結合する, 2) SRB-SrrA 複合体を形成し、SrrA が SARP 遺伝子 srrY の上流から解離する, 3) アクティベーター遺伝子 *srrY* の mRNA の転写が開始される, 4) 二次代謝に関わる遺伝子の転写が活性化し、最終的に LC,LM が生産される。

最近当研究室では 160 L の培養液から 2 つのシグナル分子 SRB1($C_{15}H_{24}O_5$), SRB2($C_{16}H_{26}O_5$)を単離し構造決定した。本研究では、SRB の生合成経路の解明を目的とした。

【方法及び結果】SRB 生合成遺伝子 *srrX*(*orf85*)の近傍には還元酵素 *srrG*(*orf81*),ホスファターゼ遺伝子 *srrP*(*orf83*), P450 遺伝子 *srrO*(*orf84*), チオエステラーゼ遺伝子 *srrH*(*orf86*)などがコードされており、SRB 生合成への関与が考えられた。そこでまず *srrO* 破壊株を作製して代謝産物解析したところ、LC, LM の生産が確認できた。本株を 80 L 大量培養し、その抽出物をゲル濾過クロマトグラフィーおよびシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて精製し、シグナル分子の構造解析を行った。まず高分解能質量分析により、本株で得られた活性物質の分子式は $C_{15}H_{26}O_4$ と $C_{16}H_{28}O_4$ であることが分かった。さらに NMR 解析を行ったところ、これらは SRB1, SRB2 の C-6'位カルボニル基がメチレン基に置換された化合物であると示唆された。本化合物の構造は、化学合成により確認した。また、*srrG* 破壊株の代謝産物解析を行ったところ、LC, LM 生産が失われていた。このことは C-1' 位の還元が SRB 活性において重要であることを示唆している。本発表ではこれらの経緯について報告する。

signaling molecule, *Streptomyces*, biosynthesis

講演番号：2C22a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ C 校舎 22 会場

Streptomyces rochei の多重遺伝子破壊株が生産する代謝産物の化学構造および生合成機構の解析
Structural elucidation and biosynthesis of secondary metabolites produced by a multiple gene disruptant of *Streptomyces rochei*

○國武 博文[1]、平松 高広[2]、木梨 陽康[2]、荒川 賢治[2] ([1]広島大・工、[2]広島大院・先端研)
○Hirofumi KUNITAKE[1], Takahiro HIRAMATSU[2], Haruyasu KINASHI[2], Kenji ARAKAWA[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Univ.)

【目的】 放線菌は既知の 12,000 種の抗生物質のうち、約 7 割を生産する有用な土壌微生物である。放線菌ゲノムには一株あたり 20 個以上の二次代謝生合成遺伝子クラスターが存在しているにもかかわらず、生産物としてはわずか数種類しか単離・同定できていない。このことより、放線菌ゲノムは天然資源物の宝庫といえる。

2 つの異なるポリケチド化合物ランカサイジン(LC)、ランカマイシン(LM)を生産する *Streptomyces rochei* 7434AN4 株の線状プラスミド pSLA2-L 上には、LC,LM 生合成クラスターの他に構造・機能未知の type-Ⅱ PKS およびカロテノイドがコードされており、さらに染色体上にも 20 種類以上の二次代謝生合成クラスターの存在が示唆された。通常培養条件では LC,LM の生産しか認められず、これらの二次代謝生合成クラスターの発現は silent である可能性が考えられる。本研究では、制御遺伝子の多面発現制御による潜在的二次代謝クラスターのゲノムマイニングを目指した。

【方法及び結果】 三重破壊株 KA57 株(*ΔsrrBΔlkmEΔlkcF-KR1*) からの二次代謝産物の取得を行った。本株はリプレッサー*srrB* の変異により抗生物質生産性を向上させ、*lkcF-KR1* 変異により LC 生合成を遮断し、さらに *lkmE* 変異により LM 生産を低下させた変異株であり、ポリケチドの共通前駆体を Type-Ⅱポリケチドを含めた他の二次代謝生産に利用させることが期待できる。本株を YM 液体培地で培養し、酢酸エチルにより代謝産物を抽出したところ、235 nm に強い UV 吸収をもつ化合物が取得できた。Rf = 0.5 ($CHCl_3$-MeOH=15:1)の化合物(KA57-A)を Sephadex LH20 およびシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、さらに ESI-MS、NMR などを用いて構造解析を行ったところ、本化合物は分子式 $C_{10}H_{20}N_2O_3$ の azoxyalkene 化合物であることが分かった。現在、遺伝子破壊などにより KA57-A の生合成解析を進めており、本発表ではその経緯について報告する。

azoxyalkene, *Streptomyces*, secondary metabolite

講演番号：2C22a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ C 校舎 22 会場

抗生物質ランカサイジン生合成におけるピロロキノリンキノン要求性デヒドロゲナーゼの機能解析
Functional analysis of pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenase in lankacidin biosynthesis

○山内 佑介[1]、藪内 優[2]、鈴木 敏弘[2]、木梨 陽康[2]、荒川 賢治[2]([1]広島大・工、[2]広島大院・先端研)
○Yusuke YAMAUCHI[1], Yu YABUUCHI[2], Toshihiro SUZUKI[2], Haruyasu KINASHI[2], Kenji ARAKAWA[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Univ.)

【目的】放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は線状プラスミド pSLA2-L,-M,-S をもち、ポリケチド抗生物質ランカサイジン(LC)を生産する。pSLA2-L 上には LC 生合成遺伝子(*lkc*)クラスターが存在しており、そのクラスター内に補酵素ピロロキノリンキノン(PQQ)生合成遺伝子(*lkcK-lkcO*)が含まれている。遺伝子破壊実験により、ランカサイジン生合成には PQQ が必須であることが明らかになっている。また、PQQ 要求性酵素にはトリプトファン残基を含む繰り返し配列(Trp-motif；AxDxxxGKxxW)が存在しており、pSLA2-L 上の ORF を調べたところ、*orf23* 遺伝子産物に Trp-motif が見つかった。*orf23* は LC クラスター近傍に位置しており、PQQ 要求性デヒドロゲナーゼ遺伝子と高い相同性を有していた。そこで本研究では、LC 生合成における *orf23* の機能解析を目指した。
【方法及び結果】*orf23* 破壊株の代謝産物解析を行ったところ、lankacidin C を生産しておらず、lankacidinol A および lankacidinol の蓄積が認められた。Lankacidin C の C-23~25 位側鎖はピルビン酸であるのに対し、これらの側鎖は乳酸であった。このことより、Orf23 は C-24 位の酸化反応に関与していることが強く示唆された。

そこで *orf23* の生化学的諸性質を明らかにするため、タンパク大量発現系の構築を行った。放線菌構成型発現ベクターpHSA81 に対して *orf23* および$(His)_6$-Tag 配列を組み込み、発現プラスミド pYY03 を構築した。本プラスミドを含む *S.lividans* 形質転換体のタンパク発現を調べたところ、約 59 kDa の His-Tag 付タンパクが確認できた。形質転換体に基質 lankacidinol を添加したところ、PQQ 存在下で lankacidin C への変換が認められた。本発表ではその経緯について報告する。

pyrroloquinoline quinone, *Streptomyces*, antibiotics

講演番号：2C22a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ C 校舎 22 会場

放線菌 *Streptomyces rochei* の PQQ 破壊株が生産する抗カビ化合物ペンタマイシンの解析
Analysis of the antifungal compound pentamycin produced by the PQQ mutant of *Streptomyces rochei*

○片岡 憂祐[1]、曹 志生[1]、吉田 竜平[1]、石川 淳[2]、木梨 陽康[1]、荒川 賢治[1] ([1]広大院・先端研、[2]感染研)
○ Yuusuke KATAOKA[1], Zhisheng CAO[1], Ryuhei YOSHIDA[1], Jun ISHIKAWA[2], Haruyasu KINASHI[1], Kenji ARAKAWA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]NIID)

【目的】 放線菌 *S. rochei* の保持するプラスミド pSLA2-L 上にはランカサイジン (LC) 生合成遺伝子クラスター (*lkcA-lkcO*) が存在しており、そのクラスター左端には補酵素ピノリキノリンキノン (PQQ) 生合成遺伝子クラスター (*lkcK-lkcO*)が コードされている。*lkcL* 破壊株 (FS7 株) は LC 非生産になり、PQQ 添加により生産が回復した。そこで LC 生合成における PQQ の機能を調べるために親株 51252 株および FS7 株の代謝産物解析を行った。
【方法・結果】 FS7 株抽出物を TLC 解析したところ、UV 吸収をもつ化合物の蓄積が確認された。この化合物を Sephadex Lh-20 によるゲル濾過およびシリカゲル・クロマトグラフィーを用いて精製し、精密構造解析を行った。化合物の UV スペクトルでは 322,338,256nm に特徴的なピークが検出され、ペンタエン構造の存在が示唆された。本化合物の分子量 620、組成式 $C_{35}H_{58}O_{12}$ であり、NMR スペクトルはポリエン化合物 pentamycin 文献値と一致した。以上より 28 員環ポリエンマクロライド pentamycin と同定できた。抗カビ活性により生産量を調べたところ、親株と比較して 250 倍以上生産していることが分かった。pentamycin 生合成クラスターは本プラスミドに存在しておらず、染色体上にコードされていることが示唆された。染色体の塩基配列を決定していくために cosmid DNA ライブラリーから染色体末端側 DNA を検出し、内側へと解析配列を伸長していった。この配列解析と次世代シークエンサーの結果により、pentamycin 生合成クラスターが染色体右末端 510 kb 付近に位置し、全長が約 80 kb だと分かった。本クラスターは 4 つの contig でカバーされており、これらの contig 間のギャップを PCR により埋めてクラスター配列の決定を目指した。構造類似体の fillipin の生合成遺伝子クラスターと比較したところ、P450 水酸化酵素遺伝子 *pemI* が pentamycin の 14 位水酸化に関与していると考えられた。そこで *pemI* (2.5 kb) を pRES18 に形質転換し、FS7 株に導入して相補的遺伝子組み換えを行った。本発表ではその経緯について報告する。

Streptomyces, polyene, biosynthesis

講演番号：2C22a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ C 校舎 22 会場

アフラトキシン生合成におけるキサントン骨格形成に係わる遺伝子の解明
The gene involved in xanthone structure formation in aflatoxin biosynthesis

○矢部 希見子[1]、Zeng Hongmei[1,3]、畑林 秀美[1]、中川 博之[1]、中島 廣光[2] ([1]農研機構食総研、[2]鳥取大農、[3]CAAS、中国)
○ Kimiko Yabe[1], Hongmei Zeng[1,3], Hidemi Hatabayashi[1], Hiroyuki Nakagawa[1], Hiromitsu Nakajima[2] ([1]NFRI, [2]Tottori Univ., [3]CAAS)

【背景・目的】カビ毒 aflatoxin(AF)は主として *Aspergillus parasiticus* 及び *Aspergillus flavus* が生産する強力な発がん性及び急性毒性を有する二次代謝産物であり、AF による穀物汚染は社会的に深刻な問題となっている。AF 汚染の効果的防御法を開発するためには AF 生合成機構の解明が重要であることから、我々は長年 AF 生産にかかわる様々な酵素反応の解明を行って来ている。AF 生合成に係わる遺伝子のほとんどはゲノム上 70kb に及ぶ AF 遺伝子クラスター上に存在し、それら遺伝子の多くの機能が明らかになっているものの、中間体の骨格転移に係わる遺伝子機能については不明な点が多い。*verA* 遺伝子は、AF 生合成経路中、versicolorin A (VA)から demethylsterigmatocystin (DMST)までの骨格転移が生じる反応に関与することが示唆されてきたが、その詳細は明らかではない。そこで、本研究では、*verA* 遺伝子破壊株の性状を調べることにより、*verA* 遺伝子の機能を解析した。
【方法】*A. parasiticus* の *verA* 遺伝子破壊株を作出し、その蓄積産物を調べる。また反応経路上 *verA* 遺伝子の次に位置する *dmtA* 遺伝子の破壊株について蓄積産物を調べる目的で、すでに得られている *A. nidulans* の *dmtA* 遺伝子ホモログである *stcP* 遺伝子の破壊株[1)]の蓄積産物を調べる。
【結果】*verA* 破壊株は分子量 374 の新規の黄色中間体（VERA と呼称）を蓄積し、*A. parasiticus* を用いた VERA のフィーディング実験では、新たにアフラトキシン B_1(AFB_1)及び AFG_1 が生じた。VERA は極めて不安定な物質で、容易に 2 種の物質に、１：１の量比で変換された。これらの物質は、HPLC 及び LCMS 解析により、DMST 及び DMST の構造異性体である sterigmatin であることが明らかとなった。一方、*A. nidulans* は AF の前駆体である sterigmatocystin(ST)を最終産物として生産するが、その生合成経路は AF 生合成経路と同一である。*A. nidulans stcP* 遺伝子は *A. parasiticus* の *dmtA* 遺伝子のホモログであり、両遺伝子とも DMST から ST が生じるメチル化反応に関与している。本研究において *A. nidulans stcP* 遺伝子破壊株の蓄積産物を解析したところ、DMST とともに極微量の sterigmatin が蓄積されることが確認された。以上のことから、VERA は VerA 酵素によって立体特異的に分子内で閉環して DMST に変換されるのに対して、酵素非存在下では非特異的に分子内閉環して DMST 及び sterigmatin に変換されると推定された。以上のことから、VerA 酵素は AF のキサントン骨格形成におけるキー酵素であることが示唆された。
[1)]Kelkar, H.S. et al. Appl. Environ. Microbiol. 62:4296-4298 (1996)

aflatoxin biosynthesis, xanthone structure, verA gene

講演番号：2C22a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ C 校舎 22 会場

希少放線菌 Actinoplanes missouriensis が生産する芳香族ポリケチドの単離と構造決定

Isolation and structural elucidation of an aromatic polyketide produced by Actinoplanes missouriensis

勝山 陽平、○佐藤 啓、大西 康夫 (東大院　農生科　応生工)
Yohei Katuyama,○Kei Sato,Yasuo Onishi (The University of Tokyo)

[背景] 放線菌は生理活性物質のスクリーニング源として重要な微生物群である。土壌から分離される放線菌の大部分は *Streptomyces* 属であり、比較的分離頻度の低いその他の属の放線菌は希少放線菌と呼ばれる。*Streptomyces* 属とは異なった新規二次代謝産物を生産する可能性が高いことから希少放線菌は注目され、種々の分離法も開発されてきた。*Actinoplanes missouriensis* は運動性胞子を形成する希少放線菌であり、近年、431 株(NBRC 102363 株)の全ゲノム配列が決定された[1)]。我々の研究室では *A. missouriensis* を希少放線菌研究のモデル微生物と位置づけ、さまざまな研究を展開してきた。本研究では、*A. missouriensis* が生産する芳香族ポリケチド化合物に着目し、その単離・構造決定を行った。[方法、結果] *A. missouriensis* を 6 種の培地で 4 日間培養し、菌が生産した低分子化合物を XAD に吸着させた。XAD と菌体のメタノール抽出物を LC-MS で分析し、UV スペクトルを指標に芳香族化合物を探索した。その結果、Q 培地を用いて培養した際に 260, 340 nm に極大吸収をもつ芳香族化合物と思われる化合物が検出された。1 L の培養より得られたメタノール抽出物から、ゲル濾過と逆層 HPLC を用いてこの化合物を精製した。^{1}H, ^{13}C NMR、COSY, HMOC 及び HMBC 解析により、この化合物を rhamnosyl-fogacin と同定した(図)。fogacin は *Streptomyces* 属放線菌の二次代謝産物として発見され、*Streptomyces coelicolor* A3(2)の actinorhodin と同様の経路で生合成されることが示唆されていたが[2)]、ラムノース配糖体の報告はなかった。*A. missouriensis* ゲノムには、actinorhodin 生合成に関わる cyclase とアミノ酸配列で 52%の相同性を有する cyclase 遺伝子を含む II 型ポリケチド合成酵素 (PKS) 遺伝子クラスターが見出された。また、このクラスターにはラムノース合成に関係していると考えられる遺伝子も複数存在しており、これが rhamnosyl-fogacin の生合成遺伝子クラスターであると考えられた。現在、この遺伝子クラスター中のポリケタイド合成酵素遺伝子を破壊することによって、rhamnosyl-fogacin が生産されなくなることを確認しようとしている。

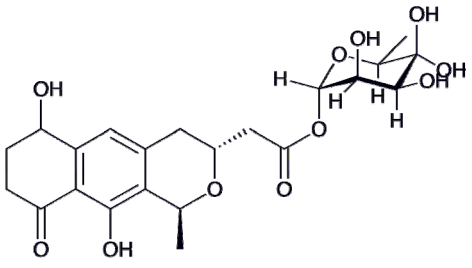


図 rhamnosyl-fogacin

1) Yamamura H. et al., Standard. Genomic Sci. (in press)
2) Radzom M. et al., J. Antibiot. 59, 315 (2006)

Actinoplanes, polyketide, typeII polyketide synthase

講演番号：2C22a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ C 校舎 22 会場

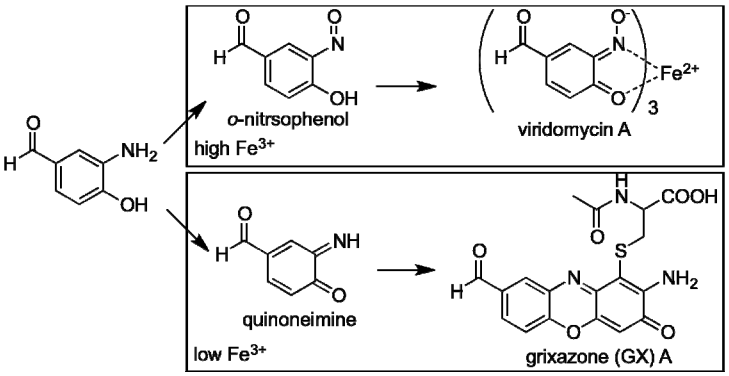
Streptomyces griseus では grixazone 生合成遺伝子群によって viridomycin A も生合成される

The grixazone biosynthesis gene cluster directs the production of a different class of natural compound, viridomycin A, in Streptomyces griseus

勝山 陽平、○胡 韋、中村 一成、大西 康夫（東大院農生科応生工）
Yohei Katsuyama, ○ Wei Hu,Kazunari Nakamura,Yasuo Ohnishi (Department of applied biological chemistry/Department of biotechnology)

【背景・目的】 *Streptomyces griseus* は黄色色素である grixazone（GX）を低リン酸濃度条件で生産する。我々の研究室では、これまでに GX 生合成経路を明らかにしてきたが、近年、3-アミノ-4-ヒドロキシベンズアルデヒド（3,4-AHBAm）の *o*-キノンイミンへの酸化を触媒する二核銅酵素 GriF が 3,4-AHBAm のアミノ基のニトロソ基への酸化も高効率で触媒できることを明らかにした[1)]。もし、この反応が生体内で起これば、3,4-AHBAm は *o*-キノンイミンを経てフェノキサジノンに変換されるのではなく、*o*-ニトロソフェノールに変換されるはずである。実際、*S. griseus* が GX 生産条件において、*o*-ニトロソフェノールと類似の UV 吸収を示す化合物を培地中に生産することが過去に示されていたが、この化合物は培養初期にのみ観察されるものであったため、それ以上の解析は行われてこなかった。今回、GX 生合成遺伝子クラスターにより、GX 以外の化合物が生産される可能性を検討した。

【方法・結果】 3 分子の *o*-ニトロソフェノールは安定な Fe^{2+}キレートを形成するため、200 μM の Fe^{3+}を加えた GX 生産培地で *S. griseus* を培養したところ、培地が緑色を呈した。生産された緑色色素を精製し、NMR を測定した結果、この化合物は予想通り viridomycin A であることが明らかとなった。通常の GX 生産培地での Fe^{3+}濃度は約 8 μM であるが、この低 Fe^{3+}濃度条件における viridomycin A の生産量は高 Fe^{3+}濃度条件（200 μM）での生産量の約 6 分の 1 であった。逆に、低 Fe^{3+}濃度条件における GX の生産量は高 Fe^{3+}濃度条件での生産量の約 8 倍であった。また、GX 生合成の経路特異的転写活性化因子をコードする *griR* の破壊株では、GX だけでなく viridomycin A の生産も完全に消失していた。以上の結果から、viridomycin A は GX 生合成酵素群によって生合成されることが明らかになった。また、培地中の Fe^{3+}濃度は GX を生産するのか viridomycin A を生産するのかに大きく影響していることが示された。本研究は 1 つの生合成遺伝子クラスターがフェノキサジノンとニトロソフェノール鉄キレートという異なるクラスの二次代謝産物の生合成に関与していることを示した点で大きな意義があると考えている。



1） Noguchi A. et al, Nat. Chem. Biol. 6, 641-643 (2010)

Streptomyces griseus, grixazone, viridomycin

講演番号：2C22a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ C 校舎 22 会場

放線菌 *Streptomyces* sp. JE-08 由来 JBIR-70 の生合成遺伝子クラスターの同定

Identification of the JBIR-70 biosynthesis gene cluster in *Streptomyces* sp. JE-08

○大野 翔登[1]、勝山 陽平[1]、泉川 美穂[2]、林 貴之[1]、高木 基樹[2]、新家 一男[3]、大西 康夫[1]([1]東大院農生科・応生工、[2]JBIC、[3]産総研)
○Shoto Ohno[1], Yohei Katsuyama[1], Miho Izumikawa[2], Takayuki Hayashi[1], Motoki Takagi[2], Kazuo Shin-ya[3], Yasuo Ohnishi[1] ([1]Tokyo Univ., [2]JBIC, [3]AIST)

【背景】JBIR-70 は放線菌 *Streptomyces* sp. JE-08（以下、JE-08）が生産する特徴的なシクロペンタ[*b*]ピリジン骨格を有する新規二次代謝産物であり、産総研で行われた一連の化合物スクリーニングにおいて見出された。シクロペンタ[*b*]ピリジン骨格を有する化合物は *Streptomyces* 属放線菌から複数単離されているが、それらの生合成経路は未知であるため、JBIR-70 の生合成経路に興味がもたれた。本研究の最終的な目標は、JBIR-70 の生合成経路・酵素を明らかにすることである。
【方法・結果】JBIR-70 は、同じくシクロペンタ[*b*]ピリジン骨格を有する化合物 Streptazolin の安定同位体取り込み実験の結果[1)]により、I 型ポリケタイド合成酵素（PKS）により生合成されることが予想された。JE-08 のドラフトゲノム配列を次世代シーケンサーにより決定し、異なるコンティグ上に複数の I 型 PKS 遺伝子断片を見出した。これらの I 型 PKS 遺伝子断片を PCR によりつなぎ合わせることで、JBIR-70 生合成遺伝子クラスター候補の全長配列を明らかにした（図 1）。このクラスターには JBIR-70 の生合成に必要な cyclase や aminotransferase をコードする遺伝子が存在した。また、ドメイン構造の情報から I 型 PKS が合成する化合物を予測した結果、JBIR-70 の中間体と思われる構造であった（図 2）。生合成遺伝子クラスター内に存在する I 型 PKS、2 つの cyclase、class Ⅲ aminotransferase、FAD-dependent amineoxidase の遺伝子破壊株を作製したところ、破壊株では JBIR-70 が生産されなかったことから、このクラスターが JBIR-70 生合成遺伝子クラスターであると結論した。修飾酵素遺伝子の破壊株では、生合成中間体（あるいはその変換産物）と思われる化合物が蓄積しており、現在、これらの化合物の構造決定を行っている。

1） M. Mayer and R. J. Thiericke (1993) *Org. Chem.*, **58**, 3486-3489.

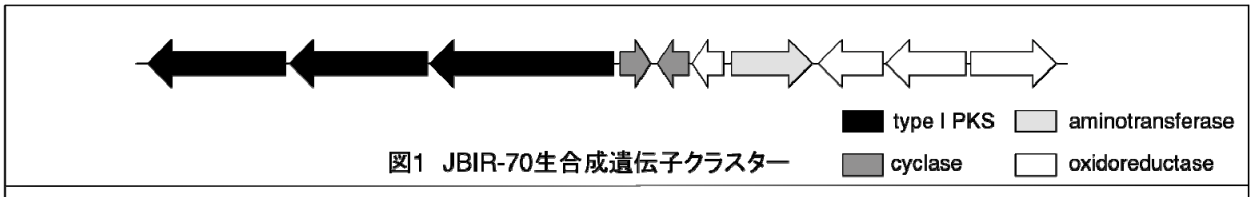


図1 JBIR-70生合成遺伝子クラスター

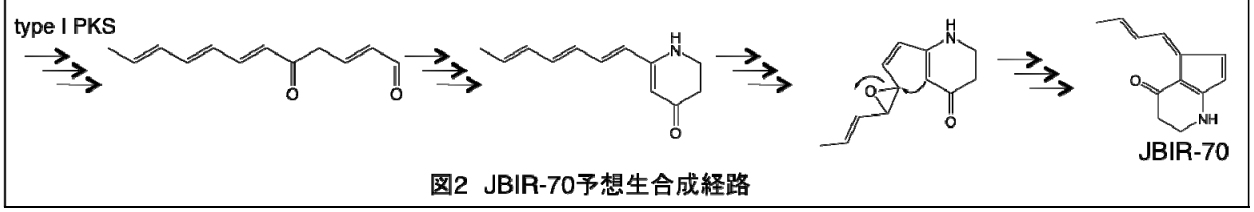


図2 JBIR-70予想生合成経路

Streptomyces, biosynthesis, polyketide

講演番号：2C22a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ C 校舎 22 会場

放線菌由来生合成遺伝子クラスターの大規模かつ広域的なライブラリー構築

Large-scale and wide-range library construction of biosynthesis gene cluster from actinomycetes

○小曽根 郁子[1]、酒井 紀子[2]、鈴木 真理[2]、西田 みち代[2]、永井 文[2]、白石 和子[2]、橋本 絢子[1]、高木 基樹[1]、新家 一男[3] ([1]JBIC、[2]次世代天然物化学技術研究組合、[3]産総研)
○Ikuko KOZONE[1], Noriko SAKAI[2], Mari SUZUKI[2], Michiyo NISHIDA[2], Aya NAGAI[2], Kazuko SHIRAISHI[2], Junko HASHIMOTO[1], Motoki TAKAGI[1], Kazuo SHIN-YA[3] ([1]JBIC, [2]Technology Research Association for Next-Generation Natural Products Chemistry, [3]AIST)

【目的】

天然物は医薬品のリード化合物として有用な資源の一つである。我々は、天然化合物の高い生物活性を有効に利用することを目的に、単離天然化合物ライブラリーの構築を進めてきたが、生産菌の重複分離や代謝物の網羅的なプロファイリングを行っても、化合物のバラエティーさを高めるのは困難であった。そこで我々は、より効率的な次世代型の天然化合物生産を行う技術の開発が必須であると考えるに至った。一方で、この二十年の間に放線菌の生合成遺伝子を応用した化合物生産技術に著しい進歩が見られ、二次代謝産物の分子生物学的生産が現実的になってきた。そこで、次世代型の天然化合物生産技術を用いて単離天然化合物ライブラリーの構築を進めること、およびどのような化合物が生産可能かを検討することを目的に、放線菌生合成遺伝子クラスターの同定・取得、および異種発現生産の大規模な検証実験を行った。

【方法】

ライブラリーの多様性のため、PKS、NRPS、核酸系化合物等の異なる構造からなる化合物を対象に、生合成遺伝子クラスター取得候補化合物の選択を行った。生合成遺伝子クラスター情報が報告されている化合物に関しては、それらのゲノム配列情報を利用し、新規生合成遺伝子クラスターに関しては、次世代シークエンサーを用いたドラフトゲノム配列を取得した後、それらをもとに目的とする化合物の生合成遺伝子クラスターの同定および取得を進めた。実際の生合成遺伝子クラスターの取得に関しては、ゲノムサイズにしたがってコスミドあるいは Bacterial Artificial Chromosome (BAC) を用いた。また、異種発現生産は、3 種類の *Streptomyces* (*S. avermitilis* SUKA17、*S. albus* J1074、*S. lividans* KASU1) を用いて行った。

【結果および考察】

現在までに、53 化合物の生合成遺伝子クラスターについて、BAC で 36 クローン、コスミドで 22 クローン取得した。なかでも rapamycin は 107 kb におよぶ巨大な生合成遺伝子クラスターからなるが、全クラスターを含む BAC クローンの取得に成功した。また、現在これらの化合物のうち、22 種類の化合物に関して、異種発現生産を確認した。本発表では、大規模な生合成遺伝子同定、取得、および異種発現生産を行った結果を報告する。

actinomycetes, biosynthesis gene cluster, microbial secondary metabolite

講演番号：2C22a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ C 校舎 22 会場

病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の第 8 染色体上の二次代謝遺伝子クラスターに含まれる転写活性化因子の役割

A transcriptional activator regulates secondary metabolite gene clusters located on chromosome 8 of human pathogen *Aspergillus fumigatus*

○加藤 直樹、野川 俊彦、高橋 俊二、長田 裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）
○Naoki KATO,Toshihiko NOGAWA,Shunji TAKAHASHI,Hiroyuki OSADA (Chem. Biol., RIKEN ASI)

【目的】糸状菌において多くの二次代謝産物生合成遺伝子は、クラスターに含まれる経路特異的転写因子によってその発現が一括制御されていることが知られている。よって転写因子の強制発現は、未知の二次代謝遺伝子クラスターが担う代謝産物同定に有効な手法となっている。ヒト病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の第 8 染色体短腕のサブテロメア領域には、フミトレモルジン生合成（*ftm*）遺伝子、シューロチン生合成（*pso*）遺伝子など、二次代謝に関わる遺伝子が多く集積している。この複数の二次代謝産物生合成に関わる約 120 kb の領域には、転写因子をコードしていると予測される遺伝子はただひとつ存在するのみである。本遺伝子（AFUA_8G00420）は、糸状菌遺伝子クラスターによく見られる C6 型の zinc-finger モチーフを有する転写因子をコードしている。しかしながら，*ftm* クラスター、*pso* クラスターのどちらからも少し離れた位置に存在しており，領域内のどの遺伝子発現を制御しているのかは不明である。そこで本研究では、この経路得的転写活性化因子をコードしている遺伝子 AFUA_8G00420 の *A. fumigatus* における二次代謝産物生産への関与について検討を行った。

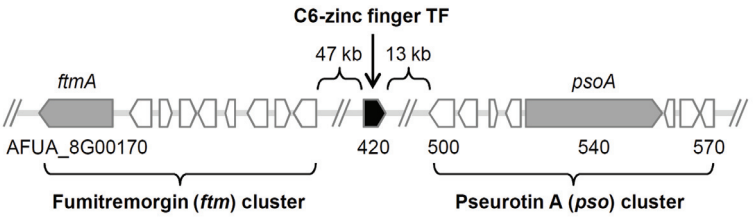


図　*A. fumigatus* の第 8 染色体サブテロメア領域に集積している二次代謝遺伝子とその中に唯一存在する制御遺伝子

【方法と結果】AFUA_8G00420 遺伝子全長をハイグロマイシン耐性遺伝子カセットと置換することで破壊株を作製した。得られた破壊株の培養抽出物を LC/MS により分析し、その代謝産物プロファイルを *A. fumigatus* の各種遺伝子破壊株と比較した。その結果、AFUA_8G00420 遺伝子破壊により、*pso* クラスターに起因する代謝産物の生産の消失が認められた。一方、フミトレモルジン生産への影響は特に見られなかった。現在、遺伝子破壊の代謝産物生産への影響が生合成遺伝子の発現抑制によるものであることを確認するとともに、他の代謝産物生産への影響の有無を検討している。

transcriptional activator, *Aspergillus fumigatus*, secondary metabolite

講演番号：2C22a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ C 校舎 22 会場

抗真菌リポペプチド verlamelin 生合成遺伝子の同定

Identification of the biosynthetic gene of antifungal lipopeptide verlamelin

○石堂 圭一[1]、木下 浩[1]、井原 史雄[2]、仁平 卓也[1] ([1]阪大・生物工学国際交流セ、[2]農研機構・果樹研)
○Keiichi ISHIDO[1], Hiroshi KINOSHITA[1], Fumio IHARA[2], Takuya NIHIRA[1] ([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]Nat. Inst. Fruit Tree Sci.)

【目的】当研究室において昆虫病原性糸状菌*Lecanicillium* sp. HF627より単離された抗真菌化合物verlamelinは５-ヒドロキシテトラデカン酸及び各種アミノ酸より構成される環状リポペプチド化合物である。糸状菌においてリポペプチドを含むアシル化ペプチドの生合成に関する報告は数少なく、その生合成メカニズムに興味が持たれたことから、我々はこの化合物の生合成遺伝子を同定し、生合成メカニズムの解明を目指した。
【方法及び結果】非リボソームペプチド合成酵素（ NRPS ）の保存領域に基づいて設計した縮重プライマーを用いて RT-PCR を行い、verlamelin 生産条件において転写されている NRPS 遺伝子断片を 13 個取得した。得られた断片を用いて各 NRPS 遺伝子を破壊し、得られた各組換え体の物質生産を HPLC により解析したところ、そのうちの一つにおいて verlamelin 生産能が完全に消失していることが確認された。さらにドラフトゲノム解析により当該 NRPS 遺伝子全長の塩基配列（ 26,762bp ）を取得し、推定アミノ酸配列解析を行ったところ、化合物の構造と触媒ドメインの相関が得られたことから、我々は verlamelin 生産に関連した NRPS 遺伝子（ *vlmS* ）を同定することができたと結論づけた。

lipopeptide, NRPS, filamentous fungi

講演番号：2C22a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ C 校舎 22 会場

抗真菌リポペプチド verlamelin 生合成関連遺伝子の機能解析

Functional analysis of genes related to the biosynthesis of antifungal lipopeptide verlamelin

○木下 浩、石堂 圭一、仁平 卓也（阪大・生物工学国際交流センター）
○Hiroshi KINOSHITA,Keiichi ISHIDO,Takuya NIHIRA (Osaka Univ. ICBiotech)

【目的】*Lecanicillium* sp. HF627 が生産する抗真菌リポペプチド化合物verlamelinの生合成遺伝子を探索した結果、*Lecanicillium* sp. HF627 ゲノム上に生合成に必須な非リボソームペプチド合成酵素遺伝子（*vlmS*）を見出した。二次代謝物質生合成に必要な遺伝子群は染色体上に隣接して存在し、クラスターを形成することから、*vlmS* 周辺領域の解析を行ったところ、複数の関連候補遺伝子が存在していることが明らかとなった。本研究ではこれら遺伝子について機能解析を行い、verlamelin 生合成との関係を明らかにすることを目的とした。
【方法および結果】*vlmS* 周辺に見いだされた関連候補遺伝子について、verlamelin 生産条件における発現解析を行った。RT-PCR により発現が確認された遺伝子について、続いて遺伝子破壊を試みた。得られた形質転換株を培養し、培養抽出液を HPLC により解析した結果、脂肪酸水酸化酵素、チオエステラーゼをコードしている各遺伝子破壊株については verlamelin の生産が完全に消失していた。現在、*vlmS* 周辺に存在している他の関連候補遺伝子についても確認を行っている

Lecanicillium, verlamelin, lipopeptide

講演番号：2C22a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ C 校舎 22 会場

リベロマイシン生合成におけるサクシニル化機構の解析
Elucidation of succinylation involved in reveromycin A biosynthesis
○高橋 俊二、宮澤 岳、熊野 匠人、大輪田 恵利、高木 海、野川 俊彦、清水 猛、浦本 昌和、長田 裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）
○Shunji Takahashi,Takeshi Miyazawa,Takuto Kumano,Eri Oowada,Hiroshi Takagi,Toshihiko Nogawa,Takeshi Shimizu,Masakazu Uramoto,Hiroyuki Osada (Chem. Biol., RIKEN ASI)

【目的】リベロマイシン A (RM-A)は放線菌 *Streptomyces reveromyceticus* が生産するポリケチド化合物である。これまでに、遺伝子破壊・相補解析に加えて、生化学解析を行うことにより post-PKS 代謝中間体（RM-A1a)は、バイヤー・ビリガー酸化酵素（RevH)、エステラーゼ（RevN)によるポリケチド鎖切断、スピロアセタール立体特異的環化（RevG, RevJ)、水酸基のカルボン酸への変換（RevE, RevF)を経て RM-T を生成し、水酸化酵素（RevI)により RM-T の C18 位が水酸化された RM-T1 を生成することを明らかにしている。RM-T1 から RM-A 生合成に関しては、遺伝子破壊・相補解析により *revK*, *revL*, *revM* 遺伝子を同定しているが、酵素反応の検証は十分に行われていない。RM-T1 からの反応は、スピロアセタール環の 3 級水酸基エステル化であり、合成化学的アプローチでは 1.5 GPa (15,000 気圧)という超高圧条件が必要な反応である。本研究では、遺伝子破壊解析で確認された RM-T1 から RM-H の生成反応を生化学的に解析する事を目的とする。
【方法・結果】酵素反応を解析するために、大腸菌 BL21(DE3)を用いてN末端にHisタグを付加したRevK及びRevLを異種発現し、Ni-NTAカラムを用いて酵素を精製した。精製酵素（RevK, RevL)、RM-T1、フマル酸、ATP、Mg^{2+}の存在下で酵素反応を検討したが生成物は微量であった。N末端Hisタグ、C末端Hisタグ及びHisタグ除去した酵素を調製し、反応産物をLC-MS解析を行ったところ、Hisタグを除去したRevLを用いた場合には、RM-T1からフマル化体（RM-H）への効率的な変換に成功した。また、RevLの基質特異性の検討結果についても報告する。

reveromycin, succinylation, spiroacetal

講演番号：2C22a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ C 校舎 22 会場

[3,3-D2]heptanoic acid を用いたリベロマイシン D 生合成経路の解析
Analysis of Reveromycin D biosynthesis by feeding of [3,3-D2]heptanoic acid
○宮澤 岳[1,2]、高橋 俊二[1]、本郷 やよい[1]、レイ ローレン[3]、中村 健道[1]、チャリス グレゴリー[3]、長田 裕之[1,2] ([1]理研基幹研・ケミカルバイオロジー、[2]埼玉大院理工学、[3]ウォーリック大)
○Takeshi Miyazawa[1,2], Syunji Takahashi[1], Yayoi Hongou[1], Lauren Ray[3], Takemichi Nakamura[1], Gregory Challis[3], Hiroyuki Osada[1,2] ([1]Chem. Biol., RIKEN ASI, [2]Saitama Univ., [3]Warwick Univ.)

【目的】*S. reveromyceticus*は、C18位のアルキル側鎖長の異なるリベロマイシン類縁体(RM-A, RM-C, RM-D, RM-E) を生産する。RM 構造多様性は、AT4 ドメインが butylmalonyl-CoA、pentylmalonyl-CoA、isobutylmalonyl-CoA、hexylmalonyl-CoA をポリケチド鎖へ選択的に取り込むためと考えられる。これまでの研究で、RevT が 2-enoyl-CoA を基質として上記の 2-alkylmalonyl-CoA が生成することを生化学的に明らかにしている。また、^{13}C 標識した中鎖脂肪酸(hexanoate)は RM-A に取り込まれることも示している。このことは、菌体内に取り込まれ CoA ligase により活性化された中鎖脂肪酸は、β酸化サイクルの初発酵素である Acyl-CoA dehydrogenase により 2-enoyl-CoA に変換され、さらに RevT により還元・カルボキシル化される経路を示唆している。本研究においては、中鎖脂肪酸[3,3-D] heptanoic acid を用いて取り込み実験を行い、D 標識された RM-D を解析することにより上記の生合成経路を検証することを目的とした。
【方法及び結果】野生株及び KASIII ホモログである *revR* 遺伝子破壊株(Δ*revR*)を用いて heptanoic acid の取り込み実験を行ったところ、Δ*revR* を用いた方が効率的に RM-D 増加を確認できた。そこで、Δ*revR* を用いて[3,3-D_2]heptanoic acid の取り込み実験を行った。RM 生産培地で本培養 2 日目に [3,3-D_2]heptanoic acid を添加してさらに 3 日間培養した。その後、アセトン処理、酢酸エチル抽出を行い、逆相 HPLC により RM-A、RM-C、RM-D の分取を行った。それぞれ ESI-TOF/MS 解析をおこなった結果、RM-D のみ 1 Da の増加が確認された。このことから、[3,3-D_2]heptanoic acid は Acyl-CoA dehydrogenase により D 標識が一つ失われた 2-enoyl-CoA に変換された後に RevT の基質となり、pentylmalonyl-CoA を経由して RM-D に取り込まれることが示唆された。

carboxylase/reductase, fatty acid biosynthesis, polyketide

講演番号：2C22a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ C 校舎 22 会場

Secondary metabolite production in *Streptomyces* can be induced by ß-carboline compounds
○Suresh PANTHEE, Shunji TAKAHASHI, Teruo HAYASHI, Takeshi SHIMIZU, Makoto MUROI, Hiroyuki OSADA (Chem. Biol., RIKEN ASI)

Objective: Reveromycin (RM) production from *Streptomyces reveromyceticus* was induced by the addition of tomato juice to the culture medium. This led us to hypothesize that some small molecule, biomediator from tomato was responsible for the activity. Attempts to purify biomediator from tomato juice did not succeed and we screened RIKEN NPDepo chemical library for compounds with similar activity. From the screening, NPD2639, a β-carboline compound was identified as a lead biomediator. Further, extensive structure activity relationships study was conducted to design **B**iomediator that effectively induces **R**everomycin (BR-1). In this research, we focused on the identification of molecular mechanism of BR-1 to induce RM production.

Methods and Results: Using the genome sequence data of *S. reveromyceticus,* DNA array after BR-1 treatment was performed. It was found that BR-1 selectively induced the expression of RM biosynthetic gene cluster. Quantitative RT-PCR of RM gene cluster revealed BR-1 induced the expression of multiple genes involved in polyketide biosynthesis and post polyketide modification. Interestingly, among the three regulatory genes: *revP*, *revQ*, and *revU*, BR-1 selectively induced the mRNA expression of *revU*. RevU belongs to Large ATP binding regulator of the LuxR (LAL) family of regulator and expression of RevU in the wild strain enhanced RM production. Therefore, considering RevU as a positive regulator of RM biosynthesis, we knocked out this gene. The *ΔrevU* strain abolished RM production even in the presence of BR-1 suggesting the crucial role of RevU in BR-1 mediated induction of RM production. To provide more insight into the interaction between BR-1 and RevU, we prepared BR-1 beads and detected binding of the beads to RevU from lysate. Moreover, a competition assay with purified RevU showed that BR-1 bound to RevU in a competitive manner.

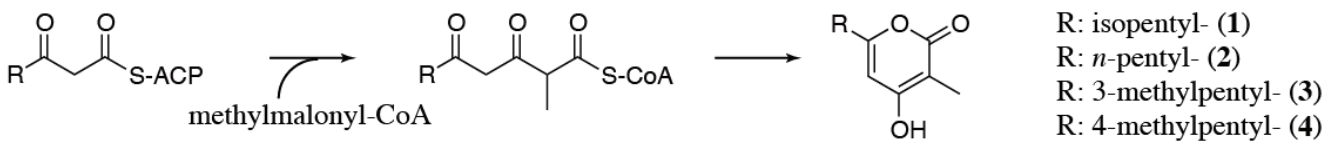
This work was supported in part by the Program for Promotion of Basic and Applied Researches for Innovations in Bio-oriented Industry.

Biomediator, Secondary metabolites, ß-carboline

講演番号：2C22p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ C 校舎 22 会場

Streptomyces reveromyceticus 由来の新規 III 型ポリケタイド合成酵素の機能解析
A novel type III polyketide synthase from *Streptomyces reveromyceticus*
○小野寺 渓斗[1]、高橋 俊二[2]、小下 雅比古[1]、寺井 悠晃[1]、長田 裕之[2]、鮒 信学[1] ([1]静岡県大院・食栄、[2]理研基幹研・ケミカルバイオロジー)
○Keito Onodera[1], Shunji Takahashi[2], Koshita Masahiko[1], Hiroaki Terai[1], Hiroyuki Osada[2], Nobutaka Funa[1] ([1]Univ. of Shizuoka, GDNES, [2]Chem. Biol., RIKEN ASI)

【目的】
放線菌は、ポリケタイドなどの多種多様な二次代謝産物を生産するため、医薬品資源の供給源として重要な地位を占めている。近年、種々の放線菌のゲノム配列が明らかになっており、二次代謝物質の生合成遺伝子が次々と同定されている。III 型ポリケタイド合成酵素（PKS）は、植物と微生物に幅広く分布し、主に芳香族ポリケタイドの合成を触媒する。本研究では、放線菌 *Streptomyces reveromyceticus* のゲノム情報から III 型 PKS 配列を抽出し、その機能を決定することを目的とした。
【方法および結果】
放線菌 *S. reveromyceticus* のゲノムに、III 型 PKS 様配列が 5 種見出された。この内 SRE9488 と名付けたクローンは既知 III 型 PKS とアミノ酸配列の相同性が低いため、新規反応を触媒する可能性が高いと判断した。実際、放線菌 *S. avermitilis* SUKA17 株をホストとして SRE9488 を発現させたところ、形質転換体は **1**～**4** の化合物を生産することが HPLC 分析により判明した。各種 NMR 解析、MS 解析の結果、これらは新規な 4-hydroxy-3-methyl-2-pyrone 誘導体（**1**～**4**）であることが判明した。
SRE9488 を大腸菌用の発現ベクターpColdI にクローニングし、pColdI-9488 を構築した。*E. coli* BL21/pColdI-9488 を 0.1 mM IPTG 誘導下、常法に従って振とう培養したところ、可溶性画分および不溶性画分に組換え SRE9488 が SDS-PAGE により検出された。そこで、*E. coli* BL21/pColdI-9488 の可溶性画分から Nickel-NTA column を用いて組換え SRE9488 を精製し、酵素標品とした。生体内において、SRE9488 はβケト酸と acyl carrier protein とのエステル体をスターター基質として生合成されると考えられる。そこで、7-methyl-3-oxooctanoic acid の *N*-acetylcysteamine（acyl carrier protein のアナログ）とのエステル化合物をスターター基質、methylmalonyl-CoA を伸長鎖基質として組換え SRE9488 の *in vitro* 反応を行ったところ、**4** を生産することが判明した。以上より、SRE9488 は、新規な 4-hydroxy-3-methyl-2-pyrone 誘導体の合成を触媒する III 型 PKS であることが判明した。



polyketide, polyketide synthase, *Streptomyces*

講演番号：2C22p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ C 校舎 22 会場

脂肪酸合成酵素の阻害によるポリケタイドの増産

Increased production of polyketides by inhibition of fatty acid synthase

○山梨 智也、大石 奈穂美、山本 聡、曽根 祐輔、鮒 信学（静岡県大院・食栄）
○Tomoya Yamanashi,Naomi Ohishi,Satoshi Yamamoto,Yusuke Sone,Nobutaka Funa (Univ. of Shizuoka, GDNES)

【目的】

ポリケタイドは、酢酸を構成単位とする二次代謝産物の総称である。ポリケタイド合成酵素は、malonyl-CoA などを基質として多様な構造のポリケタイドを合成する。しかしながら、ポリケタイド合成酵素だけではなく、脂肪酸合成酵素も malonyl-CoA を基質とする。そのため、大腸菌にポリケタイド合成酵素を発現させただけでは高い生産量が得られない。本研究では、脂肪酸合成酵素を阻害することにより、malonyl-CoA の代謝プールを増強し、大腸菌による二次代謝産物の大量生産の基盤を構築する。

【方法および結果】

Ⅲ型ポリケタイド合成酵素 RppA は、5 分子の malonyl-CoA から 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene の合成を触媒する。モノオキシゲナーゼ MomA は、1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene を flaviolin、flaviolin を mompain に酸化する反応を触媒する。mompain は中性水溶液中で紫色を呈し、mompain を定量することにより容易に malonyl-CoA の量を評価できる。大腸菌用発現ベクターpQE2 に *rppA* および *momA* を転写オペロンとなるようクローニングし、pQE2-*rppA*rbs*momA* を作製した。大腸菌 *E. coli* BL21 株および BW25113 株に pQE2-*rppA*rbs*momA* を形質転換した。*E. coli* BL21/ pQE2-*rppA*rbs*momA* と *E. coli* BW25113/ pQE2-*rppA*rbs*momA* は、LB 培地において 8 mg/l と 23 mg/l の flaviolin を生産することが判明した。以上より、間接的に生体内の malonyl-CoA 量を評価できる系が構築できた。cerulenin は、脂肪酸合成酵素 FabB、FabF の阻害剤である。我々は、*E. coli* BL21/ pQE2-*rppA*rbs*momA* に cerulenin を種々の濃度で投与し、flaviolin/mompain 生産能を評価した。その結果、1.6 μg/ml の cerulenin を投与すると *E. coli* BL21/ pQE2-*rppA*rbs*momA* は LB 培地で 46 mg/l の flaviolin を生産した。同様に、*E. coli* BW25113/ pQE2-*rppA*rbs*momA* に 12.5 μg/ml の cerulenin を投与すると 46 mg/l の flaviolin を生産した。次に我々は、大腸菌 *E. coli* BL21 において、アンチセンス RNA による脂肪酸合成酵素遺伝子、*fabH*、*fabF*、*fabB* の knock down を行った。アンチセンス発現ベクターpHN1257[1)]を用いて、*fabF* のアンチセンス RNA を発現させた結果、*E. coli* BW25113/ pQE2-*rppA* は、コントロールと比較して約 2 倍の flaviolin 生産量が得られた。以上より、脂肪酸合成の阻害はポリケタイドの増産に有効であることが強く示唆された。

【引用文献】

1) N. Nakashima and T. Tamura *Nucleic Acids Res.*, **37**, e103 (2009)

fatty acid synthase, polyketide, *E. coli*

講演番号：2C22p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ C 校舎 22 会場

脂肪酸合成酵素遺伝子の破壊によるポリケタイドの増産

Increased production of polyketides by disruption of fatty acid synthase

○大石 奈穂美、山梨 智也、曽根 祐輔、山本 聡、鮒 信学（静岡県大院・食栄）
○Naomi Ohishi,Tomoya Yamanashi,Yusuke Sone,Satoshi Yamamoto,Nobutaka Funa (Univ. of Shizuoka, GDNES)

【目的】

我々は以前、イネゲノムのポリケタイド合成酵素を解析し、新規酵素、クルクミノイド合成酵素を発見した[1)]。また、コンビナトリアルバイオシンセシスにより非天然型の curcumin 誘導体の大腸菌による生産に成功している[2)]。このように未利用「遺伝子資源」を活用することで、新規な天然有機化合物が創生できる。しかしながら、それらの生産量はいずれも～100 mg/l と低かった。この原因として malonyl-CoA の供給量が制限されている点が挙げられる。本研究では、生命にとって必須である脂肪酸合成酵素の遺伝子を破壊することにより、二次代謝産物の生産に適した微生物宿主を開発する。

【方法および結果】

大腸菌 *E. coli* BW25113 株の脂肪酸合成酵素の遺伝子破壊株において RppA を発現し、flaviolin の生産量を比較した。RppA は、5 分子の malonyl-CoA から THN の合成を触媒する。THN は空気中で直ちに赤色色素 flaviolin に酸化されるため、flaviolin を定量することで malonyl-CoA 生産能を評価できる。LB 培地に前培養液を 1%植菌後、1.5 時間後に IPTG 誘導、計 12 時間後の flaviolin を定量した。その結果、*E. coli* Δ*fabF*/ pQE2-*rppA* 株は親株に比べ生産能が 4 倍増え、0.20 g/l の flaviolin を生産した。*E. coli* Δ*fabH*/ pQE2-*rppA* は生育が悪いため、12 時間の培養では親株よりも生産量が低かった。以上の実験は、LB 培地における対数増殖期における生産能を評価している。III 型ポリケタイド合成酵素の多くは、スターター基質を反応に必要とする。そのため、LB 培地の前培養液から菌体を回収し、最小培地や緩衝液に菌体を再懸濁し、スターター基質の前駆体と共に振とうすることによりポリケタイドの生産を行う。このとき、菌体は静止期にあると考えられる。実際、*E. coli* Δ*fabF*/pQE2-*rppA*rbs*momA* の湿潤菌体 0.46 g を 20 mL の最小培地中に再懸濁し、4% glucose と共に 24 時間振とうしたところ、85 m g/l の flaviolin を生産した。親株で同様の実験を行ったところ、7.3 mg/l の flaviolin を生産した。この結果は、Δ*fabF* 株の利用が静止菌体においても有効であることを示している。

【引用文献】

1) Katsuyama, Y., Matsuzawa, M., Funa, N., and Horinouchi, S. *J. Biol. Chem.* **282**, 37702-37709 (2007)
2) Katsuyama, Y., Hirose, Y., Funa, N., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. *Biosci. Biotech. Biochem.* **74**, 641-645 (2010)

polyketide, fatty acid synthase, *E. coli*

講演番号：2C22p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ C 校舎 22 会場

放線菌ホルモン制御系の撹乱による新規β-カルボリン化合物 kitasetaline の単離とその生合成遺伝子の同定

Kitasetaline, a novel ß-carboline alkaloid produced with the genetically modified *Kitasatospora setae*

○木谷 茂[1]、アルンスリー アイヤダ[1]、新家 一男[2]、池田 治生[3]、仁平 卓也[1]（[1]阪大・生物工学国際交流セ、[2]産総研、[3]北里大・生命研）
○Shigeru KITANI[1], Aiyada Aroonsri[1], Kazuo Shin-ya[2], Haruo Ikeda[3], Takuya Nihira[1] ([1]Osaka Univ., [2]AIST, [3]Kitasato Univ.)

【目的】

放線菌ゲノムには、30 前後の二次代謝生合成遺伝子群が存在するが、そのほとんどが休眠状態にあり、多数の二次代謝産物を利用することができない。これらの遺伝子群が休眠する理由として、特定の環境条件でしか作動しない制御系の調節を受けている可能性がある。したがって、二次代謝制御系を撹乱できれば、休眠する二次代謝産物生産が覚醒し、新規化合物の発見に至るのではないかと考えた。

本研究では、放線菌の代表的な二次代謝制御系である放線菌ホルモン制御系に注目し、抗生物質バフィロマイシン生産菌 *Kitasatospora setae* の放線菌ホルモン受容体遺伝子 *ksbC* 破壊株の生産物を解析することで、放線菌ホルモン制御系の攪乱が新規化合物の探索に有効であるかを検討した。

【方法・結果】

ksbC 遺伝子破壊株では、野生型株と比較してバフィロマイシンの生産が減少する一方、UV スペクトルがβ-カルボリン化合物と類似する未知化合物が早期に生産され、また、その生産量は顕著に増加していた。この未知化合物を同定するため、*ksbC* 遺伝子破壊株の固体培養物 1.25 L をメタノール抽出し、その濃縮物を逆相クロマトグラフィーにより精製、目的成分 15 mg を得た。HRFABMS および各種二次元 NMR スペクトルに基づく構造解析により、未知化合物が分子式 $C_{19}H_{19}N_3O_5S$ の新規β-カルボリン化合物（kitasetaline）であることを明らかにした。

次に、kitasetaline 生合成遺伝子を探索するため、*K. setae* ゲノムの BAC ライブラリーを構築し、*Streptomyces avermitilis* の大規模染色体欠失変異体（SUKA 株）に導入した。網羅的 HPLC/DAD 解析により、β-カルボリン化合物生産を付与する BAC クローンを同定し、その生産化合物を分析した結果、kitasetaline と共に kitasetaline 類縁体新規化合物 JBIR-133 と JBIR-134 の生産を検出した。また、最小 kitasetaline 生合成遺伝子を決定したところ、β-カルボリン骨格形成に関わる新規酵素を発見した。

以上より、放線菌ホルモン制御系の攪乱が化合物探索に有効であり、新規生合成経路の発見に繋がることを明らかにした。

【文献】*Appl. Environ. Microbiol.* (2012) 78:8015-24. *J. Biosci. Bioeng.* (2012) 114:56-8.
Nat. Prod. Rep. (2009) 26:1362-84. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2010) 107:2646-51.

streptomyces, ß-carboline, kitasatospora

講演番号：2C22p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ C 校舎 22 会場

放線菌 *Streptomyces lavendulae* FRI-5 における青色素インジゴイジン生合成遺伝子 *lbpA* の機能解析

Cloning and characterization of *lbpA*, an indigoidine biosynthetic gene in *Streptomyces lavendulae* FRI-5

○PAIT IVY GRACE UMADHAY[1]、木谷 茂[1]、Kurniawan Yohanes Novi[1]、前田 亜紗[1]、岩井 貴司[1]、池田 治生[2]、仁平 卓也[1] ([1]阪大・生物工学国際交流セ、[2]北里大・生命研)
○IVY GRACE UMADHAY PAIT[1], Shigeru Kitani[1], Yohanes Novi Kurniawan[1], Asa Maeda[1], Takashi Iwai[1], Haruo Ikeda[2], Takuya Nihira[1] ([1]Osaka Univ., [2]Kitasato Univ.)

Streptomyces lavendulae FRI-5 produces a blue pigment in response to IM-2, a *Streptomyces* hormone, which also controls the production of other secondary metabolites. Biosynthetic gene clusters for secondary metabolites under the control of this *Streptomyces* hormone are frequently accompanied with multiple regulatory genes including a *Streptomyces*-hormone receptor gene. We have previously found *lbpA*, whose product showed the highest homology with a non-ribosomal peptide synthase for indigoidine (blue pigment) biosynthesis, in the flanking region of *farA*, an IM-2 receptor gene. In addition, the adjacent region of *lbpA* has *orfR*, a *Streptomyces* antibiotic regulatory protein (SARP) family gene that often positively controls transcription of the proximal biosynthetic genes. In this study, we characterized the function of *lbpA* and *orfR* in the production of secondary metabolites.

Several purification steps of the culture from the wild-type strain resulted in the isolation of a blue pigment characterized as indigoidine, which requires L-glutamine as a sole precursor. Transcriptional analysis demonstrated that both *lbpA* and *orfR* are under the transcriptional regulation of IM-2, suggesting that these two genes might be involved in indigoidine biosynthesis. Disruption of *orfR* had no effect on the production of indigoidine and other secondary metabolites, as well as on the transcriptional profile of *lbpA*, suggesting that *orfR* has no function in secondary metabolism under the conditions tested. To investigate the metabolite produced by the enzymatic function of LbpA, we performed heterologous expression in a large deletion mutant of *S. avermitilis*, SUKA22. SUKA22 harboring an *lbpA* gene and its upstream region produced small amounts of indigoidine, whereas no indigoidine production was observed in SUKA22 carrying pSET152 (empty vector) as negative control, indicating that LbpA is an indigoidine biosynthetic enzyme belonging to the IM-2 regulatory cascade. Moreover, L-glutamine supplementation enhanced the production of indigoidine in a concentration-dependent manner.

<Reference> *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (2010) 107:2646-51.

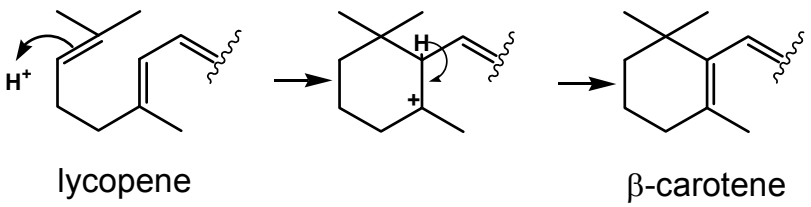
indigoidine, streptomyces, heterologous expression

講演番号：2C22p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ C 校舎 22 会場

Lycopene β-cyclase に高度に保存された酸性アミノ酸の部位特異的変異実験
Site-directed mutagenesis experiments of highly conserved acidic amino acids among lycopene β-cyclases

○柏倉 樹[1]、大塚 崇弘[1]、仲野 千秋[1]、佐藤 努[1]、斎藤 猛[2]、本多 泰揮[2]、西山 直宏[2]、星野 力[1]
([1]新潟大院、[2]花王、安全評価研究所)
○Itsuki Kashiwakura[1], Takahiro Ootsuka[1], Chiaki Nakano[1], Tsutomu Sato[1], Takeshi Saitou[2], Yasuki Honda[2], Nohiro Nishiyama[2], Tsutomu Hoshino[1] ([1]Niigata Univ., [2]Kao Corporation)

【目的】lycopene をβ-carotene へと変換する環化酵素 lycopene β-cyclase は膜タンパク質であるため精製が困難であり、現在この酵素の立体構造は解明されていない。変異導入実験から lycopene β-cyclase に存在する $F^{341}LE^{343}E^{344}T$ モチーフ内の E343 と E344 の重要性が示唆され、lycopene 環化開始時のプロトン付加に関与すると提唱された。[1,2] 芳香族アミノ酸 F329、Y331、F418 も活性部位であると推定されている。[1]我々は、様々な lycopene β-cyclase で高く保存されている酸性アミノ酸 11 ヵ所及び芳香族アミノ酸 4 ヵ所への部位特異的変異導入実験を行い、これらの報告を検証することとした。【方法】緑藻類ムレミカヅキモ(*Selenastrum capricornutum*)由来 lycopene β-cyclase(ScLCY-B)を材料とした。ScLCY-B-pMAL-c4X とリコペン生合成遺伝子群を持つプラスミド(pACCRT-EIB)との共発現系を大腸菌 BL21(DE3)株で構築した。ScLCY-B は Maltose Binding Protein (MBP)と結合して発現する。MBP と His-tag を利用したタンデム精製では、wild-type の酵素を精製することができなかった。またグアニジン塩酸塩で refolding を試み、活性タンパクを得ることができた場合もあったが、再現性に乏しかった。そこで、wild-type や変異 ScLCY-B の発現量は western blot 法で行うこととした。抗体は MBP に特異的な Anti-MBP Monoclonal Antibody を用いた。β-carotene 生成量は、菌体をけん化・ヘキサン抽出後 HPLC で定量した。Quick change で部位特異的変異株を作成し、*in vivo* での ScLCY-B 発現量とβ-carotene 生成量を求め、活性部位を特定することとした。【結果】11 種類の酸性アミノ酸変異株 D154N、D170N、E171Q、D264N、D307N、E343Q、E344Q、E377Q、E378Q、E379Q および E380Q の ScLCY-B 発現量を野生株と比較したが、大きな有意差は見られなかった。D154N、D264N、D307N および E380Q のβ-carotene 生成量が野生株の 0～6%程度まで低下した。特に D154 及び D264 については報告されてなく、活性部位として今回新たに見出した。活性部位として報告されていた $F^{341}LE^{343}E^{344}T$ モチーフ [1,2] 中の E343Q、E344Q の活性は、野生株と同程度であった。活性部位と推定されている芳香族アミノ酸、F329、Y331、F341 及び F418 については、Leu 変異株を作成し、現在発現量やβ-carotene の生成量を検討している。



【文献】1) Arch Biochem Biophys, **1997**, 346, 53-64. 2) Plant Physiol. **2010**, 153, 970-9.

β-carotene, lycopene β-cyclase, site-directed mutagenesis

講演番号：2C22p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ C 校舎 22 会場

三機能性セスタテルペン/トリテルペン/セスクアテルペン合成酵素の同定及び環状・非環状構造の決定に関与するアミノ酸残基の探索

Identification of trifunctional terpene synthase and search for amino acid residues responsible for determination of cyclic and acyclic structure

○佐藤 努[1,2]、小坂 明彩香[1]、山本 彩乃[2]、山鹿 宏彰[1]、村田 悠輔[3]、品田 哲郎[3]、仲野 千秋[1]、星野 力[1,2] ([1]新潟大院自然、[2]新潟大農、[3]阪市大院理)
○ Tsutomu SATO[1,2], Ayaka KOSAKA[1], Ayano YAMAMOTO[2], Hiroaki YAMAGA[1], Yusuke MURATA[3], Tetsuro SHINADA[3], Chiaki NAKANO[1], Tsutomu HOSHINO[1,2] ([1]Niigata Univ., [2]Niigata Univ., [3]Osaka City Univ.)

【背景】

最近、我々は、*Bacillus*属細菌に存在するセスクアテルペン（C_{35}テルペン）の生合成研究から、単環を形成するテトラプレニル-β-クルクメン合成酵素（TS）が既知酵素の一次構造と類似性を持たない新型であることを明らかにした[1)]。TSホモログは、様々な細菌に分布しているが、その機能は全て未知である。昨年度の本大会で、好アルカリ性の*B. clausii* から、新規非環状セスタテルペン・トリテルペンを単離・構造決定し、TSホモログ（Bcl-TS）が、セスタテルペン/トリテルペン合成酵素であることを報告した[2)]。

今回、*B. clausii*から極微量の非環状セスクアテルペン1と考えられるピークをGC-MSによって検出でき、その同定を行った。さらに、TSとBcl-TSのアミノ酸配列の比較から、環状・非環状構造の決定に関与するアミノ酸残基の同定を行ったので報告する。

【結果と考察】

*B. clausii*菌体の1を単離するのは、微量すぎて極めて困難であった。そこで、化学合成したヘプタプレニルニリン酸と精製組換えBcl-TSと反応させたところ、生成物1を確認することができた。現在、生成物1を単離・構造決定している。したがって、Bcl-TSは、三機能性セスタテルペン/トリテルペン/セスクアテルペン合成酵素である可能性が高い。

また、環状・非環状構造を決定するアミノ酸残基の同定を行った。TSとBcl-TSとで完全に違うアミノ酸が保存されている4箇所をターゲットにして、TSをBcl-TSタイプのアミノ酸残基に部位特異的変異によって置換した。各々の変異酵素を精製し、基質と反応させて生成物を解析したところ、D262Eは、環状生成物に加えて、非環状と考えられる生成物を生産した。したがって、D262は、環状・非環状構造の決定に関与するアミノ酸残基であることが示唆された。現在、Bcl-TSをTSタイプのアミノ酸残基に置換し、環状化合物が生産されるか実験を行っている。

【文献】

1) T. Sato et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 9734-9737 (2011).
2) 佐藤ら：2012 年度日本農芸化学会大会（3A06a12）

isoprenoid, terpenoid, terpene synthase

講演番号：2C22p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ C 校舎 22 会場

チガヤ由来 Isoarborinol 合成酵素の機能解析

The functional analysis of Isoarborinol synthase from *Imperata cylindrica*

○楢木 真吾、加藤 沙由莉、久城 哲夫（明治大・農・農化）
○SHINGO NARAKI,SAYURI KATO,TETSUO KUSHIRO (Meiji Univ.)

【目的】多様な構造と生理活性を有するトリテルペンの生合成において、oxidosqualene 環化酵素（OSC）はその基本炭素骨格を構築する鍵酵素である。イネ科のチガヤ（*Imperata cylindrica*）は根茎が生薬ボウコンとして利用され、利尿、止血、浮腫治療、解熱、血尿治療の目的で民間療法的に用いられている。その主要成分は、トリテルペンの一種である cylindrin 及び arundoin である。これらは isoarborane ならびに fernane 型トリテルペンであり、いずれも 2,3-oxidosqualene の環化反応によって生合成されるが、その環化様式が異なる。特に cylindrin の生合成においては、2,3-oxidosqualene が B 環 *boat* コンフォメーションで環化する。B 環が *boat* コンフォメーションで環化する反応はステロールの前駆体である lanosterol や cycloartenol の生合成などごく一部においてしか見られず、ホパン様の 5 環性トリテルペンにおいては大変珍しい例である。そこで、これらトリテルペンを生成する OSC に注目し、両酵素のどのような違いにより異なった環化機構が生じるのかを明らかにするため、本研究ではチガヤ由来の OSC 遺伝子のクローニングと機能解析を行った。
【方法】チガヤ根茎より RNA を抽出・逆転写し、相同性を利用した PCR ならびに RACE 法により、OSC 全長 cDNA 得た。Lanosterol 合成酵素欠損酵母変異株での発現により生成したトリテルペンをヘキサンにて抽出後、GC-MS で解析し、さらに NMR を測定した。
【結果】PCR により 4 種類のチガヤ由来の OSC と思われる配列断片が得られた（OSC1～4）。これらは互いに約 60%のアミノ酸配列同一性を示し、またこれまで既知の OSC と配列を比較したところ、同じイネ科のイネ由来の OSC と高い相同性を有していた。このうち OSC1 に関して酵母での発現を行ったところ、トリテルペンの生成が確認された。GC-MS 解析を行ったところ、*m/z* 259 の特徴的なフラグメントイオンピークを与え、本ピークは fern-9(11)-en 骨格に特徴的なピークであり、生成物が fernenol もしくは isoarborinol であると推測された。本化合物の ^{1}H-NMR を測定し、メチル基ならびにオレフィンプロトンの化学シフト値を文献値と比較したところ、isoarborinol と一致したことより、本生成物を isoarborinol であると同定した。これにより、OSC1 はチガヤの isoarborinol 合成酵素をコードする新規トリテルペン合成酵素遺伝子であることが明らかとなった。

isoarborinol, triterpene, oxidosqualene cyclase

講演番号：2C22p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ C 校舎 22 会場

植物トリテルペン合成酵素の生成物制御機構の解析
Identification of Amino Acid Residue Responsible for Product Specificity in Plant Triterpene Synthases
○高瀬 翔平、栗原 望、久城 哲夫 (明治大・農・農化)
○Syohei TAKASE,Nozomi KURIHARA,Tetsuo KUSHIRO (Meiji Univ.)

テルペノイドは、多様な構造と生物活性を有する天然物の中でも最大の化合物群である。中でもトリテルペンは、高等動植物から微生物まで生物界に広く存在し、ステロイドの前駆体となるなど生体にとって重要な化合物である。トリテルペンはすべて鎖状の基質である 2,3-oxidosqualene の環化反応により生合成され、この共通の基質から環化反応の違いにより多種多様な環状構造へと変換される。この反応は oxidosqualene 環化酵素(OSC)によって触媒されるため、酵素の活性部位のどのような違いにより異なった環化反応を経るのか大変興味が持たれている。本研究では cycloartenol と cucurbitadienol に注目し、両化合物の作り分けに関与するアミノ酸残基を特定することを目的とした。cycloartenol は植物に普遍な植物ステロールの前駆体であり、一方 cucurbitadienol はウリ科特異的な苦味物質の前駆体である。両化合物は oxidosqualene が環化した protosteryl cation を経由した後、ヒドリドとメチル基の 1,2-転位による C9 カルボカチオン中間体までは共通で、ここから脱プロトン化により cycloartenol が、さらなる 1,2-転位により cucurbitadienol が生成する。カボチャ(*Cucurbita pepo*)由来の cycloartenol 合成酵素と cucurbitadienol 合成酵素は 70%のアミノ酸配列同一性を有しており、配列のわずかな違いが 9 位カルボカチオン中間体からの反応制御に関わると考えられた。OSC において唯一タンパク質の結晶構造が解明されているヒト由来 lanosterol 合成酵素の構造を参考に、活性部位に存在すると考えられるアミノ酸残基のうち、cycloartenol と cucurbitadienol 合成酵素の間で異なる 5 つの残基に注目し、各々の残基を置換した点変異体を作成し、酵母の変異株 GIL77 にて発現させた。本酵母株は lanosterol 合成酵素が欠損した ergosterol 要求性株であり、生成物であるトリテルペン化合物が菌体内に蓄積する。生成物をヘキサンで抽出、精製し、GC-MS 解析および ^{1}H-NMR を測定した。その結果 cycloartenol 合成酵素の Tyr118 を Leu に置換した変異体において、cucurbitadienol が主生成物として生成し、一方、cucurbitadienol 合成酵素の対応する Leu125 を Tyr に置換した変異体においては parkeol が主生成物として生成していることが明らかとなった。これにより、アミノ酸 1 残基の違いで C9 カルボカチオン中間体からの生成物の特異性が制御されていることが明らかとなった。

cycloartenol, cucurbitadienol, parkeol

講演番号：2C22p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ C 校舎 22 会場

ドラフトゲノム情報に基づいたジテルペン抗生物質ソルダリン生合成の解析

Biosynthetic analysis of diterpene antibiotic sordarin biosynthesis based on the draft genome sequence information

○松浦 靖典、江口 正、工藤 史貴（東工大院理工）
○yasunori matsuura,tadashi eguchi,fumitaka kudou (Tokyo Institute of Technology)

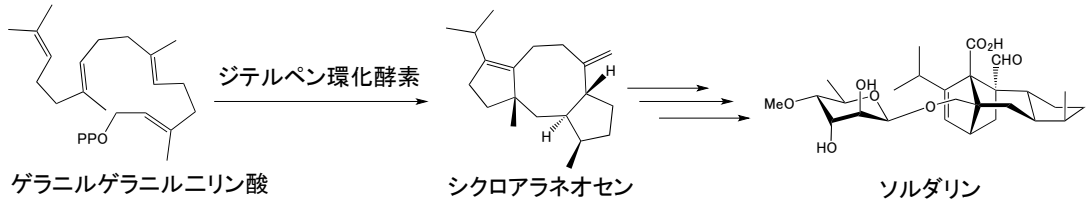
【目的】

ソルダリンは糸状菌 *Sordaria araneosa* Cain ATCC36386 が生産する抗真菌性ジテルペングリコシドである。*Candida albicans* など深部真菌症病原菌を含む真菌のタンパク合成伸長因子 2（EF2）を特異的に阻害し抗真菌性を有することが明らかにされている。その特徴的な四環性アグリコンは、ジテルペン環化酵素による炭素環（シクロアラネオセン）形成後、複数の酸化反応と Diels-Alder 反応により構築されると推定され、その生合成機構に興味が持たれた。そこで本研究では、ソルダリン生合成に関与すると考えられる遺伝子クラスターを特定し、その生合成機構の解明を目指した。

【方法・結果】

まず、ソルダリン生産菌のドラフトゲノム解析を行い、約 45 Mb からなるゲノム DNA 配列情報を得た。次に、ソルダリン生合成に関わると予想されるジテルペン環化酵素遺伝子をフシコッカジエンシンターゼをプローブとして *in silico* にてスクリーニングした。その結果、ジテルペン環化酵素遺伝子、糖転移酵素遺伝子、4 つのシトクロム P450 遺伝子等からなる遺伝子群を見出すことができた。この遺伝子クラスターには、NDP-ソルダロース生合成に関与すると考えられる酵素遺伝子も存在することから、目的としているソルダリン生合成遺伝子クラスターと予想された。

次に、この遺伝子クラスター中にコードされるジテルペン環化酵素を大腸菌で発現させて *in vitro* にて酵素反応解析を行った。まず、cDNA を鋳型とした PCR により得られた増幅断片をタンパク発現用プラスミドに組込み、大腸菌宿主を形質転換して目的の組換え酵素を調製した。ゲラニルゲラニル二リン酸を基質として酵素反応を行い、生成物をヘキサン抽出して GC-MC 分析した結果、シクロアラネオセンに対応する分子イオンピークが検出された。さらに、大スケールで反応を行い、生成物を単離精製して NMR にて構造解析を行った結果、シクロアラネオセンが生成していることが分かった。すなわち、本酵素がシクロアラネオセン合成酵素であることが明らかとなり、本研究で特定した遺伝子群がソルダリン生合成に関与することが強く示唆された。



ゲラニルゲラニル二リン酸　　シクロアラネオセン　　ソルダリン

diterpene, diterpene cyclase, fungus

講演番号：2C22p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ C 校舎 22 会場

麻痺性貝毒生合成初期中間体の合成と毒生産生物からの同定

Synthesis of putative biosynthetic intermediates in early stage for paralytic shellfish toxins, and their identification in toxin producing microorganisms

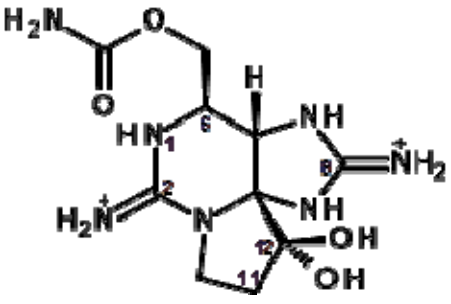
○土屋 成輝[1]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]、長澤 和夫[2]、大島 泰克[3]、山下 まり[1] ([1]東北大院農、[2]東京農工大院工、[3]東北大院生命科学)

○Shigeki Tsuchiya[1], Yuko Cho[1], Keiichi Konoki[1], Kazuo Nagasawa[2], Yasukatsu Oshima[3], Mari Yotsu-Yamashita[1] ([1]Tohoku University Graduate School of Agricultural Science, [2]Tokyo University of Agriculture and Technology Department of Technology, [3]Tohoku University Graduate School of Life Sciences)

[背景、目的] サキシトキシン(STX, 1)とその類縁体は、麻痺性貝中毒の原因物質で、主に海産渦鞭毛藻や淡水産藍藻が生産し、食物連鎖により二枚貝に蓄積され、死亡率の高い食中毒を引き起こす。これまで、淡水産藍藻(*Anabaena circinalis*, *Lyngbya wollei*)および海産渦鞭毛藻(*Alexandrium fundyense*, *A. minutum*)のゲノム中に STX 生合成遺伝子クラスターや相同遺伝子が発見され、生合成経路が推定された[1-4]。本研究では、Neilan ら[2-4]により推定された生合成初期中間体である、アルギニンのカルボキシル基がエチルケトンに変換された A'、A'の α 位のアミノ基をグアニジノ化した B'、B'の脱水体でイミンを形成した C'、及び Neilan らの生合成経路で C'からの誘導体として我々が想定した中間体 D"の合成を試みた。また、合成した化合物を標品として用いて、HILIC-UPLC-Q-TOF-MS による分析条件を確立し、STX 類縁体を生産する藍藻および渦鞭毛藻（有毒及び無毒株）の培養藻体中にそれら生合成中間体が存在するのかどうかを調べた。

[方法、結果] 渦鞭毛藻有毒株 *Alexandrium tamarense* (Axat-2)、及び藍藻有毒株 *Anabaena circinalis* (ACTA04)からは、共通してアルギニン、中間体 A'、および C'の互変異性体と思われる C'-2 が検出され、渦鞭毛藻無毒株(UAT-014-009)[5]と藍藻無毒株(NIES-1645)ではアルギニンのみ検出された。すべての株で、中間体 B'は検出されなかった。D"の互変異性体と思われる D"-2 の場合も、保持時間の一致するピークはどの株からも検出されなかったが、ACTA04 および Axat-2 では D"-2 と同じ分子式の保持時間の違うピークが示され、D"とは別の異性体として存在している可能性がある。

1) Llewellyn. L, *et al*., *Nat. Prod. Rep*. 23, 200-222 (2006).
2) Kellmann R. *et al*., *Appl. Environ. Microbiol*. 74, 4044-4053 (2008).
3) Mihali T. K. *et al*., *PLoS One* 6, e14657 (2011).
4) Stuken A. *et al*., *PLoS One* 6, e20096 (2011).
5) Omura T. *et al.*, *La mer* 41, 86-93 (2003).



Saxitoxin (1)

paralytic shellfish toxins, saxitoxin, biosynthetic intermediate

講演番号：2C22p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ C 校舎 22 会場

5-Fluoro-2'-deoxyuridine の渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* における麻痺性貝毒生合成初期中間体合成に与える影響

Effect of 5-fluoro-2'-deoxyuridine on the biosynthesis of intermediates for paralytic shellfish toxins in the dinoflagellate, *Alexandrium tamarense*

○長 由扶子[1]、土屋 成輝[1]、此木 敬一[1]、大島 泰克[2]、山下 まり[1]([1]東北大院農、[2]東北大院生命)
○ Yuko CHO[1], Shigeki Tsuchiya[1], Keiichi Konoki[1], Yasukatsu Oshima[2], Mari Yamashita[1]
([1]Tohoku Univ.Agr., [2]Tohoku Univ.Life Sci.)

[背景・目的] サキシトキシン及びその類縁体は麻痺性貝中毒の原因として知られる強力な神経毒である。我々は麻痺性貝毒生産渦鞭毛藻（*Alexandrium tamarense*）の細胞周期と毒生産への代謝阻害剤（DNA 合成阻害剤：マイトマイシン C、5-fluoro-2'-deoxyuridine（FUdR）及び分裂阻害剤：コルヒチン）の影響を調べ、細胞周期が停止してもマイトマイシン C では毒生産は継続するのに対し、FUdR 及びコルヒチンでは毒生産が阻害されることをすでに報告した[1), 2)]。シアノバクテリアでは Neilan らが発見した遺伝子クラスターから麻痺性貝毒生合成経路が推定されている[3)]。我々はその推定初期中間体を化学合成し、分析条件を確立した。本研究では FUdR について麻痺性貝毒生合成初期中間体の生産への影響を調べた。

[方法] *A. tamarense* 有毒株(Axat-2)を 203 μM の FUdR を含む T_1 改変培地で 7 日間培養し、細胞密度測定用、毒量分析用及び細胞周期解析用（1 日毎)、中間体分析用（0, 2, 7 日後）に収穫した。遠心分離後、細胞及び培地中の毒量をポストカラム蛍光化 HPLC で測定した。中間体（A', C'-2）及びアルギニンは細胞抽出物を ZIC-HILIC-SPE 処理した後、HILIC-UPLC-ESI-Q-Tof-MS により定量した。また、FUdR 添加の毒生産への影響を thymidine が防止するかどうか調べるため、1mM の thymidine を同時に添加して毒量分析に供した。コントロールとして無添加の細胞を同様に培養し、分析した。

[結果・考察] FUdR 単独と同様に FUdR と thymidine の同時添加でも毒生産は阻害された。FUdR は thymidylate synthase の阻害作用が主に知られているが、thymidylate synthase は麻痺性貝毒生合成には関与しないと推定された。FUdR 添加系で毒生産が停止した後も出発物質であるアルギニンは減少し、アルギニンのカルボキシル基がエチルケトンに変換された中間体 A'は増加した。一方 A'の α 位のアミノ基がグアニジノ化、ついで脱水でイミンを形成した中間体 C'-2 は 2 日後以降増加しなかった。したがって、中間体 A'から C'-2 への経路が FUdR によって阻害されたものと考えられた。

[Reference] 1. Y. Cho *et al.* , Harmful Algae, 10 (2011), p. 235-244.

2. 2007(平成 19)年度日本水産学会要旨集 p.245

3. R. Kellmann *et al*., Appl. Environ. Microbiol. 74, 4044-4053 (2008).

5-Fluoro-2'-deoxyuridine, Alexandrium tamarense, paralytic shellfish toxins

講演番号：2C22p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ C 校舎 22 会場

ファゼイン酸還元酵素の基質特異性と阻害剤設計
Substrate specificity and design of inhibitor of phaseic acid reductase

○宇佐美 健太[1]、藤井 佑典[1]、水谷 正治[2]、近藤 悟[3]、轟 泰司[4]、平井 伸博[1] ([1]京大院農、[2]神戸大院農、[3]千葉大院園芸、[4]静大農)
○ Kenta USAMI[1], Yusuke FUJII[1], Masaharu MIZUTANI[2], Satoru KONDO[3], Yasushi TODOROKI[4], Nobuhiro HIRAI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kobe Univ., [3]Chiba Univ., [4]Shizuoka Univ.)

【目的】
アブシジン酸（ABA）は植物を乾燥から保護する重要なホルモンであり、その代謝による不活性化を抑制することは植物の乾燥耐性の増加につながる。ABAの代謝不活性化は8'-hydroxy-ABAを経て、ファゼイン酸（PA）からジヒドロファゼイン酸（DPA）への還元によって完了する。したがってこの還元反応を触媒する PA 4'-reductase (PAR) を阻害することは ABA 8'-hydroxylase の阻害と同様 ABA 作用の持続に有効であると考えられる。そこで本研究では、PAR の基質特異性を明らかにするとともに PAR 阻害剤のデザイン・合成を行うことを目的とした。

【結果と考察】
PAR 粗酵素液として、ウスイエンドウ子葉抽出液の遠心後上清を用いた。同上清の PA の DPA 変換率は 18 hr で 75%であり、*epi*-DPA は生成しなかった。ABA を基質とした場合、生成物と仮定される 1',4'-*trans*-diol-ABA は検出されなかった。また、1',4'-*cis*-diol-ABA も生成しなかった。この結果は ABA と PA の六員環構造の違い、すなわち 2'位二重結合の有無に由来する立体構造の違いによるものと考えられた。そこで、ABA の 2'位二重結合を還元して、そのシクロヘキセノン環を PA と同じシクロヘキサノン環にした 2',3'-dihydro-ABAs を合成し、その基質としての反応性を調べた（下図）。その結果、(2'*S*)体と(2'*R*)体のいずれもが 4'位還元生成物である 1',4'-diol 体に変換された。この結果は、2'位二重結合を飽和することで基質として ABA より受容されやすくなることを示している。その変換率は PA に類似した側鎖アキシアルの安定配座を有する(2'*S*)体の方が(2'*R*)体よりも大きかった。ただし(2'*S*)体と(2'*R*)体のいずれも DPA と同じ 1',4'-*trans*-diol 体よりも 1',4'-*cis*-diol 体への変換率の方が大きかった。この原因として dihydro 体は PA とは異なり、六員環が五員環エーテルによって固定されていないために配座の自由度が高く、PA とは異なる配座で酵素に結合している可能性が考えられる。得られた知見をもとに現在、2',3'-dihydro-ABA の 4'位カルボニル基をジフルオロメチレン基に改変した誘導体を合成中である。この誘導体はジフルオロメチレン基がカルボニル基のミミックとなることにより PAR による代謝に抵抗し、酵素阻害剤となる可能性がある。

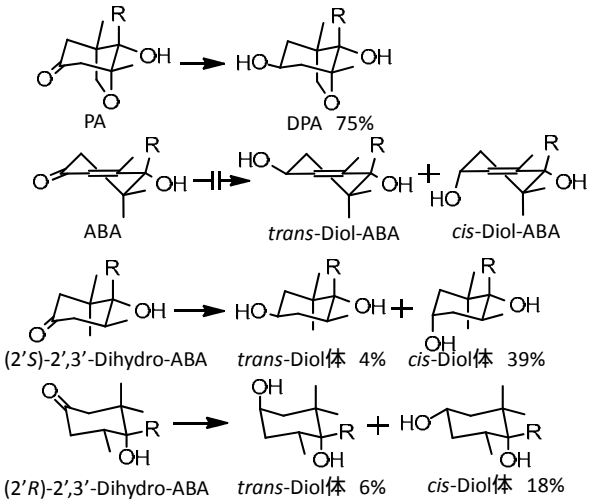


図. 各基質のPARとの反応性
%は基質量を100%とした時の変換率　R=ABAの側鎖

abscisic acid, phaseic acid, reductase

講演番号：2C22p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ C 校舎 22 会場

Labdane 型ジテルペン合成酵素遺伝子の swapping による機能解析

Functional characterization by swapping labdane-type diterpene synthase genes

○山田 佑樹、西出 崇人、小松 護、池田 治生 (北里大北里生命研)
○Yuki Yamada,Takahito Nishide,Mamoru Komatsu,Haruo Ikeda (Kitasato Univ.)

【目的】

放線菌 *Streptomyces* sp. K04-0144 が生産する cyslabdan は MRSA に対するイミペネムの抗菌作用を増強する物質であり、供田らにより細菌から初めて単離された labdane 骨格を有するジテルペン化合物である。当研究室では cyslabdan の全生合成遺伝子群を単離し、4 つの遺伝子(*cldA*：geranylgeranyl diphosphate synthase, *cldB*：type-B terpene synthase, *cldC*：cytochrome P450, *cldD*：type-A terpene synthase)から構成されている事を明らかにした。Labdane 骨格の形成は、CldB による GGPP の末端二重結合のプロトン化を引き金としたカルボカチオン形成によって環化反応が進行し、デカリン骨格を形成し、CldD による脱リン酸化反応によって生成すると推定した。一方、*S. clavuligerus* ATCC27064 のゲノム情報より SCLAV_p0490 および SCLAV_p0491 がそれぞれ CldB および CldD のアミノ酸配列と高い相同性を示し、labdane 骨格形成に関与する事が推定された。そこで、*Streptomyces* sp. K04-0144 と *S. clavuligerus* 由来のそれぞれの環化および脱二リン酸酵素の組み合わせ、さらに *S. avermitilis* SUKA 株による異種発現によって生成する化合物の解析を行なった。

【方法及び結果】

上記 4 つのテルペン合成酵素の組換えタンパク質を *E. coli* で調製し、Mg^{2+}存在下 CldA, IPP と DMAPP によって GGPP を供給する系で反応を行なった。酵素反応は CldB/CldD, CldB/SCLAV_p0491, SCLAV_p0490/CldD および SCLAV_p0490/SCLAV_p0491 の 4 つの組み合わせで行ない、反応生成物をヘキサンで抽出した。GC-MS 解析の結果、それぞれの組み合わせによる反応生成物は同一の分子量を有する炭化水素ではあったが、異なる溶出時間で検出されるとともに EI-MS フラグメンテーションパターンも異なっていた。さらに *S. avermitilis* SUKA 株を用いた異種強制発現系に供し、生産される化合物を解析した。構成的強発現プロモーター(*rpsJp*)の下流に *cldA* を配置し、さらにその下流に各テルペン合成酵素遺伝子を上記 4 つの組み合わせになるように連結した人工オペロンを構築した。各形質転換体のヘキサン抽出物の GC-MS 解析の結果、酵素反応と同一の化合物の生成が確認された。各目的化合物を単離精製し、各種スペクトル解析によって解析した結果、*cldB/sclav_p0491* 形質転換体からは labda-8(17),13(16),14-triene(**1**), *sclav_p0490/cldD* 形質転換体からは labda-7,12,14-triene (**2**)、さらに *sclav_p0490/sclav_p0491* 形質転換体からは新規化合物 labda-7,13(16),14-triene(**3**)を生成する事が明らかになった。

terpene, labdane, streptomyces

講演番号：2C22p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ C 校舎 22 会場

バラ香気成分 2-phenylethanol 生合成経路季節変動の環境要因解析

Analyses of environmental conditions related to the seasonal changes of 2-phenylethanol biosynthetic pathway in rose flowers

○神田 桃代[1]、大西 利幸[2]、渡辺 修治[3]（[1]静岡大院農、[2]静岡大 GRL、[3]静岡大創科技院）
○ Momoyo KANDA[1], Toshiyuki OHNISHI[2], Naoharu WATANABE[3] ([1]Grad. School Agric., Shizuoka Univ., [2]Division of Young Research Leaders, Shizuoka Univ., [3]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ.)

【背景・目的】2-Phenylethanol (2PE) はバラの主要香気成分である。我々はこれまでに、L-phenylalanine (L-Phe) を前駆体とした 2PE 生合成経路として、i) aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) および phenylacetaldehyde reductase (PAR) により 2PE を生合成する経路 (DC route)、ii) aromatic amino acid aminotransferase (AAAT)、α-keto-acid decarboxylase (KDC)、PAR により 2PE を生合成する経路 (AT route) の 2 つの経路が存在することを明らかにしてきた。最近、DC route を経て生合成される 2PE は通年恒常的に生成しているのに対して、AT route を経て生合成される 2PE は 5 月から 10 月にのみ特異的に多量生成していることを見出した。このことから、バラは季節に伴い 2PE 生合成経路を変化させていることを明らかにした。植物の香気成分生合成において、季節によって生合成経路が変化するとの報告は皆無である。本研究ではバラの 2PE 生合成経路の変化をもたらす環境因子を明らかにすることを目的とした。昨年の本大会では、L-Phe の重水素標識体 (L-[$^2H_8$]Phe) をバラに投与することで生成する DC route 由来の [$^2H_8$]-2PE および AT route 由来の [$^2H_7$]-2PE を毎月定量し、さらに [$^2H_8$]-2PE と [$^2H_7$]-2PE の生成量の変化を、平均気温、大気圧、日照時間、湿度の変化と照合した結果、気温の上昇および大気圧の低下が AT route を亢進させる環境要因の一つであることを報告した。そこで本研究では温度の違いによって AT route が亢進あるいは抑制されるかを検証した。
【方法・結果】バラ *Rosa* 'Yves Piaget' の切り花を 4、20、30ºC で 0、2、6、12、24 時間暗黒条件下にてインキュベートした。次にバラ花弁を採取し、L-[$^2H_8$]Phe 溶液にバラ花弁の付け根を 24 時間浸漬することで L-[$^2H_8$]Phe を投与した。投与した L-[$^2H_8$]Phe から生成した 2PE を溶媒抽出し GC-MS を用いて分析した。[$^2H_8$]-2PE 由来の *m/z* 130 (t_R=8.48 min) および [$^2H_7$]-2PE 由来の *m/z* 129 のピーク (t_R=8.49 min) を、それぞれ DC route、AT route を経て生合成された 2PE として定量した。その結果、インキュベート温度の上昇に伴い 2PE の生成量が増加し、特に AT route 由来の 2PE が顕著に増加した。以上より、気温の上昇が AT route を亢進させる環境要因の一つであることが強く示唆された。また、気温上昇によって AT route が亢進される原因は、以下のとおりである。すなわち、AT route 上に存在する AAAT と KDC の至適温度がそれぞれ 45ºC と 40ºC であり、DC route 上の酵素 AADC の至適温度 35ºC に比べ比較的高温であることに関係している可能性が考えられる。

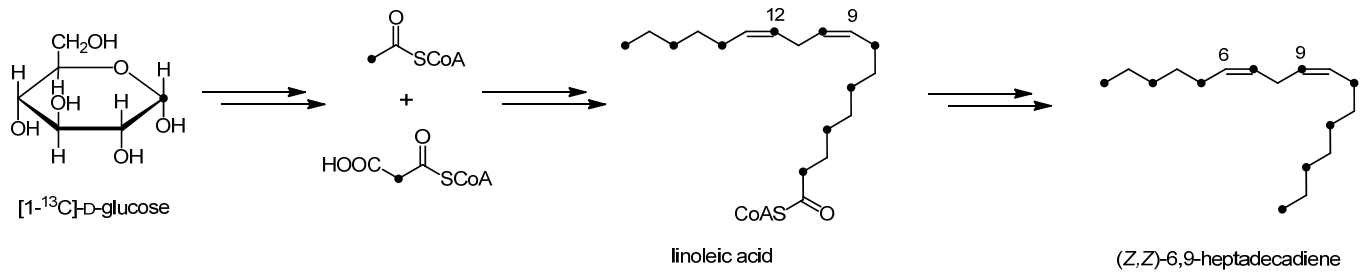
2-phenylethanol, biosynthesis, rose flowers

講演番号：2C22p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ C 校舎 22 会場

サトウダニ *Carpoglyphus lactis* におけるリノール酸生合成能とその代謝産物
Linoleic acid biosynthesis and the metabolite in the astigmatid mite *Carpoglyphus lactis*
○清水 伸泰[1]、内藤 倫哉[1]、森 直樹[2]、桑原 保正[3]（[1]京都学園大バイオ、[2]京大院農・応用生命、[3]富山県大工・生工研セ、JST, ERATO）
○ Nobuhiro SHIMIZU[1], Michiya NAITO[1], Naoki MORI[2], Yasumasa KUWAHARA[3] ([1]Kyoto Gakuen Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Toyama Pref. Univ., JST, ERATO)

【目的】コナダニ類は脂肪族化合物に限り，炭化水素を分泌する種群と脂肪酸エステルを分泌する種群に大別できる．炭化水素を分泌する種群の中で，Z,Z-6,9-ヘプタデカジエン（6,9-C17:2）を主成分とするダニが非常に多く，生合成的に相当する前駆物質はリノール酸である．サトウダニ *Carpoglyphus lactis* に同位体標識したグルコース-1-^{13}C を継続的に給餌したところ，6,9-C17:2 が同位体でラベル化されることを GC/MS で確認した．よってサトウダニは前駆物質であるリノール酸を生合成し，6,9-C17:2 に誘導していると推測した．一部の昆虫（ゴキブリ，アブラムシ，コオロギ，シロアリなどの特定種）を除いて，一般的に動物には ω-6 位に二重結合を作る Δ^{12}-デサチュラーゼがないためリノール酸を生合成できない．そこでまず，コナダニ類がリノール酸を生合成する事実を同位体標識化合物の取り込み実験で証明した．

【方法と結果】同位体標識化合物を給餌したダニの脂質を溶媒抽出し，加水分解とエステル化反応を行って脂肪酸エステルに誘導した．カラムクロマトグラフィーによりリノール酸エステルを単離精製し，^{13}C NMR スペクトルを測定した．標品のスペクトルデータと比較し，同位体標識された炭素原子を帰属することで，サトウダニによるリノール酸の生合成を証明した．さらに，6,9-C17:2 がリノール酸から変換されることを実証するため，^{13}C NMR スペクトルにより，6,9-C17:2 の同位体 ^{13}C 標識位置を特定し，リノール酸のものと比較した．その結果，6,9-C17:2 はリノール酸から直接変換されるか，あるいはリノレイルアルデヒドを経て生成していることが示唆された．



de novo biosynthesis, linoleic acid, *Carpoglyphus lactis*

講演番号：2C22p17
講演日時、会場：3 月 25 日 17:12～ C 校舎 22 会場

コナダニ類における 9,12-octadecadienoic acid の生合成

Biosynthesis of 9,12-octadecadienoic acid in Tyrophagus mites

○網干 貴子[1]、中嶋 祐二[1]、清水 伸泰[2]、本田 善之[3]、櫻谷 英治[1]、小川 順[1]、西田 律夫[1]、桑原 保正[4]、天野 洋[1]、森 直樹[1]（[1]京大院農、[2]京都学園大バイオ環境、[3]山口農総技、[4]富山県大工生工研セ、JST ERATO）

○takako aboshi[1], yuji nakajima[1], nobuhiro shimizu[2], yoshiyuki honda[3], eiji sakuradani[1], jun ogawa[1], ritsuo nishida[1], yasumasa kuwahara[4], hiroshi amano[1], naoki mori[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Gakuen Univ., [3]Yamaguchi Tec. Cent. Agri. Fore., [4]Toyama Pref. Univ., JST ERATO)

【目的】

近年，有機質資材を多用した畑においてコナダニ類が爆発的に増えており，ホウレンソウなどに甚大な被害が出ている．コナダニ類の発生をコントロールするために繁殖に関与する化学的因子の研究が行われているが，栄養代謝の研究はほとんど行われていない．昨年はホウレンソウケナガコナダニ *Tyrophagus similis* において多価不飽和脂肪酸が積極的にリン脂質に取り込まれていることを報告した．今回はホウレンソウケナガコナダニおよびその近縁種のケナガコナダニ *T. putrescentiae* を用い，飽和脂肪酸の不飽和化について追究した．

【方法・結果】

コナダニ虫体とその餌である乾燥酵母の脂質を Bligh-Dyer 法で抽出し，メタノールに転溶後，LCMS-IT-TOF で分析した．両コナダニからは，主要なリン脂質として phosphatidylcholine (PC) (18:1-18:2, 18:2-18:2)，phosphatidylethanolamine (PE) (18:0-18:2) が検出された．一方，乾燥酵母からは PC (16:0-16:1) や PE (16:0-16:1) など飽和脂肪酸や二重結合が一つのアシル基を持つリン脂質が主要成分であった．なお，各リン脂質の同定には，精密質量と MS/MS により生じるプロダクトイオンを用いた．

コナダニから検出されたリン脂質の多価不飽和脂肪酸部分がどのように生合成されるのかを明らかにするために，d_{31}-palmitic acid (16:0) を添加した乾燥酵母 (5%) でコナダニを 3 日間飼育したところ，コナダニから両方のアシル基が同位体標識された d_{58}-PC (16:0-18:2) が検出された．d_{27} 標識の octadecadienoyl 部分の二重結合位置を決定するために，ケナガコナダニの脂質抽出液を dimethyldisulfide と反応させ GC/MS に供試した結果, マススペクトルから 9 位と 12 位に二重結合があることが判明した．ケナガコナダニ体内で 9,12-octadecadienoic acid が生合成されることが明らかとなった．一般に多くの動物は Δ12-desaturase を持っていないが，近年コオロギの一種とコクヌストモドキから Δ12-desaturase 遺伝子が同定されている．コナダニ類も Δ12-desaturase 遺伝子を持つ可能性が示唆された．

Tyrophagus, delta 12-desaturase, phospholipid

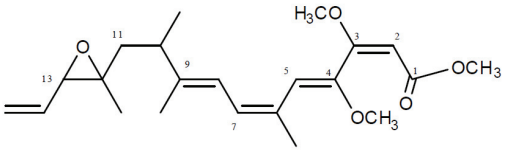
講演番号：2C22p18
講演日時、会場：3 月 25 日 17:24～ C 校舎 22 会場

海洋性粘液細菌のポリケチド抗生物質 haliangicin の生合成単位

Biosynthetic units of marine myxobacterial polyketide antibiotic haliangicin

○孫 雨偉、宮野 聖史、鈴木 彰、柘植 尚志、小鹿 一 (名大院生命農)
○Yuwei SUN,Seishi MIYANO,Akira SUZUKI,Takashi TSUGE,Makoto OJIKA (Nagoya Univ., Grad. Sch. Bioagric. Sci.)

【目的】粘液細菌は希少な難培養性微生物であり従来、注目されていなかったが、近年、培養条件が徐々に確立されるに伴って、数多くの新規性の高い抗生物質を生産できることが分かり、注目を集めつつある。Haliangicin は、より希少で難培養性の海洋性粘液細菌株 *Haliangium ochraceum* から発見された抗真菌性物質である。本菌は最初の海洋性粘液細菌であること、haliangicin は強力な抗真菌性を有するが生産効率が低いことから、haliangicin の生合成遺伝子の異種発現による効率的な生産を目的として研究を行い、培養が比較的容易な粘液細菌 *Myxococcus xanthus* での異種発現に成功している（宮野ら、2009 年度大会）。今回は、異種発現株を用いて安定同位体取り込み実験を行うことで haliangicin の生合成単位を明らかにし、生合成経路に関わる知見を得ることができたので報告する。



haliangicin

【方法・結果】Haliangicin の生産能を有する異種発現株 *M. xanthus* c10-11C-c7-6E 株を培養し、培養開始 48、72 時間の時点で培地に安定同位体標識化合物四種類（[2-^{13}C]acetate、[1,2-$^{13}C_2$]acetate、[1-^{13}C]propionate、L-[*methyl*-^{13}C]methionine）をそれぞれ添加することで haliangicin の安定同位体標識を行った。培養物から haliangicin を精製し、^{13}C NMR スペクトルから構造上どの位置に取り込みがされたかを評価した。結果として、haliangicin は酢酸ユニット三つ（C-1～C-2、C-7~C-8、9-Me）、プロピオン酸ユニット四つ（C-5～C-6、C-9~C-10、C-11~C-12、C-13~C-15）を用いて炭素骨格を生合成することがわかった。また、haliangicin の構造上に存在するすべてのメトキシ基はメチオニン由来であることも判明した。

一方、C-3~C-4 の由来は最初の取り込み実験で明らかにならなかった。他の天然物を参考にし、C-3~C-4 の生合成単位はグリコール酸またはグリセロールである可能性が高いと考えられた。そこで、[1-^{13}C] glycolic acid を培地に投与して安定同位体標識を試みたが、安定同位体の取り込みが観察されなかった。次に[U-$^{13}C_3$]glycerol を用いて安定同位体取り込み実験を行ったところ、C-3 と C-4 に取り込みがみられ、C-3~C-4 の生合成単位はグリセロールであることを確認した。現在、各生合成単位と生合成遺伝子クラスターの対応を解析中である。

haliangicin, myxobacteria, Haliangium ochraceum

講演番号：2C22p19
講演日時、会場：3 月 25 日 17:36～ C 校舎 22 会場

マメコガネ由来エリシターの探索とエリシターが誘導する植物揮発性物質の機能解析
Elicitors of the Japanese beetle and beetle attractant activity of the plant volatiles induced by the elicitors
○三浦 宏平、田母神 繁、阿部 誠、野下 浩二（秋田県立大生資科）
○Kouhei MIURA,Shigeru TAMOGAMI,Mkoto ABE,Koji NOGE (Akita Pref. Univ.)

【目的】植物は昆虫に食害されると，テルペンなど特徴的な揮発性物質を放出する．我々は，雑草のオオイタドリがマメコガネに食害された際，テルペンのオシメン，ファーネセンに加え，食害特異的な揮発性物質としては珍しいフェニルアセトニトリルの放出を報告している．野外でマメコガネは，食害を受けたオオイタドリ葉上によく集合していることから，これら揮発性物質にマメコガネが誘引されると予想し，その誘引活性を調べた．一方，食害特異的な植物揮発性物質の生成は，エリシターと呼ばれる昆虫由来の特異成分により誘導される．現在，昆虫由来のエリシターは 3 種類報告されるが，甲虫目昆虫由来エリシターの報告がないため，マメコガネ由来のエリシター探索を試みた．
【方法】まず，マメコガネ食害が植物ホルモンのジャスモン酸メチル（MeJA）で再現されることを利用し，MeJA 処理したオオイタドリ葉と蒸留水で処理した葉から放出される揮発性物質に対するマメコガネの選好性を調べた．次に，マメコガネ由来エリシターの存在を確認するために，頭部・胸部・腹部の破砕物をオオイタドリ葉に塗布し，24 時間後の揮発性物質の生成の有無を調べた．また，マメコガネ腹部を水で抽出し，その抽出液をオオイタドリ葉の葉柄から吸収させ，揮発性物質の生成量からエリシター活性を評価した．さらに，マメコガネ腹部の水抽出液をゲルろ過によりタンパク質と低分子化合物に分画し，それぞれのエリシター活性を同様に評価した．また，マメコガネ腹部の水抽出液を煮沸する前後のエリシター活性を比較し，マメコガネ由来エリシターの化学的性状を調べた．
【結果と考察】マメコガネの雄成虫は MeJA 処理葉を選好しなかったが，雌成虫は MeJA 処理葉に有意に誘引された．雌成虫は食害葉の揮発性物質を餌探索の手掛かりにすると示唆され，そのため，野外で食害葉上にマメコガネの集合が生成されると考えられる．一方，雄成虫を食害葉上に誘引する要因は，食害葉の揮発性物質より雌成虫が放出する性フェロモンが重要と考えられる．
　オオイタドリ葉に腹部破砕物ならびに腹部水抽出液を処理した場合に，フェニルアセトニトリルはじめ 3 種の揮発性物質の生成が誘導され，マメコガネ腹部に水溶性のエリシターが存在すると判断した．腹部水抽出液を分画したところ，タンパク質を含む画分には，オシメンとフェニルアセトニトリルの生成を誘導するエリシター活性が見られたが，低分子化合物を含む画分には，オシメン生成を誘導する活性しか見られず，少なくとも 2 種類の異なる活性を持つエリシターの存在が示唆された．また，腹部水抽出液を煮沸した場合，オシメンとフェニルアセトニトリルともに生成量が減少したが，完全には消失しなかったため，熱に弱いエリシターとそうでないエリシターの存在が示唆された．

Popillia japonica, *Fallopia sachalinensis*, elicitor

講演番号：2C22p20
講演日時、会場：3 月 25 日 17:48～ C 校舎 22 会場

ジャスモン酸メチルで誘導されるアレチマツヨイグサの揮発成分とタンパク質
Methyl jasmonate induced volatiles and proteins of the evening primrose, *Oenothera* sp.
○野下 浩二、阿部 誠、田母神 繁（秋田県大・生資科）
○Koji NOGE,Makoto ABE,Shigeru TAMOGAMI (Akita Pref. Univ.)

【目的】昆虫食害に対する植物の防御反応のひとつとして，食害を受けた葉から天敵を誘引するテルペン類など特有の揮発成分が誘導的に生産・放出されることが知られている．我々は，ハムシに食害されたアレチマツヨイグサが，ピネンやオシメンなどのテルペン類に加え，植物成分として比較的珍しいイソバレロニトリルを放出すること，このニトリルがアミノ酸のロイシンから生合成されることを見出している．また，昆虫食害による揮発成分の放出が植物ホルモンであるジャスモン酸メチル(MeJA) で再現されることを見出し，MeJA を利用して，アレチマツヨイグサの揮発成分の機能と生合成の解明を進めている．ハムシ食害を受けたアレチマツヨイグサには，ハムシを捕食するルリクチブトカメムシ（天敵カメムシ）が頻繁に見られることから，MeJA 処理で誘導される揮発成分およびイソバレロニトリルの天敵カメムシに対する誘引活性を調べた．また，MeJA 処理による植物葉中のタンパク質レベルの変化の解析とイソバレロニトリル生合成酵素の探索を目的に，まず MeJA 処理で特異的に誘導されるタンパク質の解析を行った．
【方法】ハムシ食害を受けたアレチマツヨイグサ葉と未加害葉，また MeJA 処理した葉と未加害葉の組み合わせで天敵カメムシの選好性を調べた．また，イソバレロニトリル 1–100 µg に対するカメムシの誘引活性を調べた．一方，MeJA 処理したアレチマツヨイグサ葉および蒸留水で処理した葉からタンパク質を抽出し，Triton X-114 を用いた膜タンパク質の可溶化を行った後，親水性タンパク質ならびに膜結合性タンパク質を二次元電気泳動により分離し，MeJA 処理で特異的に誘導されるタンパク質の検出を行った．
【結果と考察】ハムシ食害葉と未加害葉の選好実験では，89% の天敵カメムシがハムシ食害葉を有意に選び，MeJA 処理葉と未加害葉の組み合わせでは，63% の天敵カメムシが MeJA 処理葉を有意に選好した．また，65–70% の天敵カメムシがイソバレロニトリルに対して有意に選好性を示したことから，天敵カメムシはハムシ食害もしくは MeJA 処理で放出される揮発成分を選好し，その主要な誘引活性因子をイソバレロニトリルと結論した．一方，MeJA 処理で誘導されるタンパク質の解析結果，15–20 kDa と比較的低分子量の親水性タンパク質を少なくとも 3 つ，また，pI 3.7–5.5 の酸性領域に分子量約 48 kDa と 38 kDa の膜結合性タンパク質を少なくとも 7 つ検出した．

isovaleronitrile, methyl jasmonate, insect-plant interactions

講演番号：2C25a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ C 校舎 25 会場

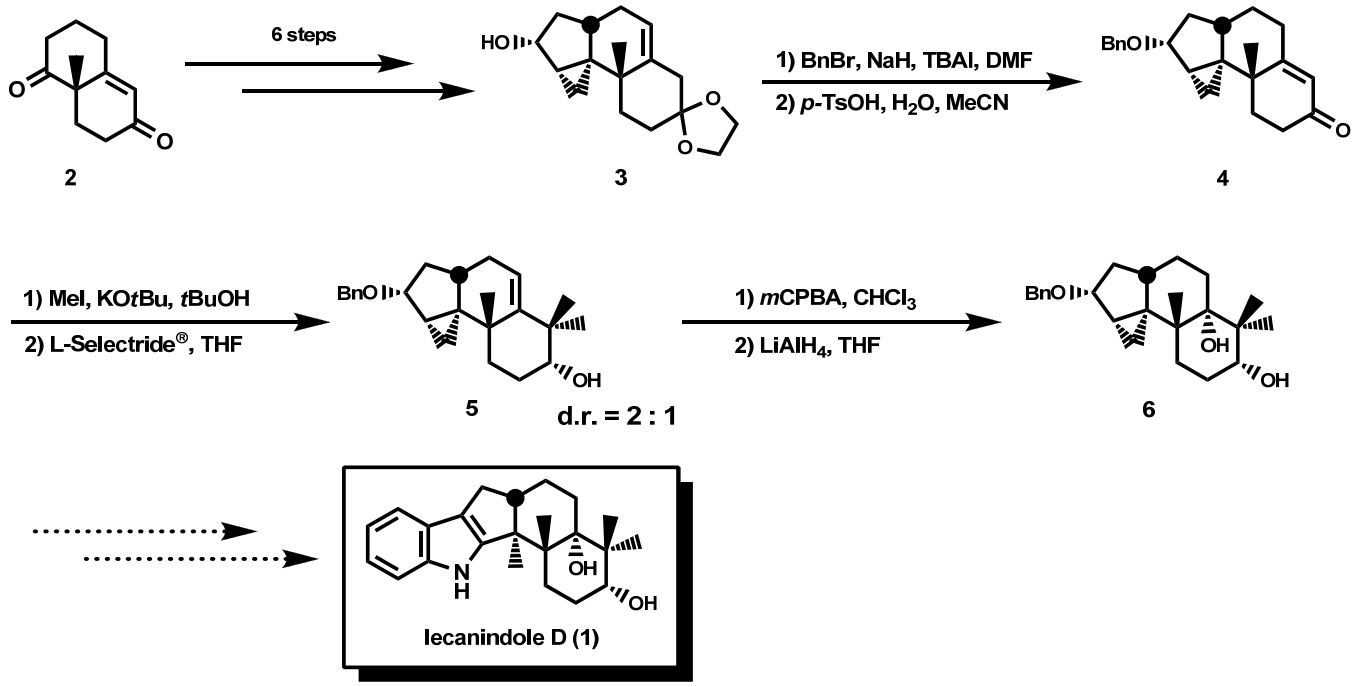
黄体ホルモン作用物質 Lecanindole D の合成研究

Synthetic study on Lecanindole D

○浅沼 明子[1]、榎本 賢[2]、桑原 重文[1] ([1]東北大院農、[2]産総研生物プロセス)
○Akiko ASANUMA[1], Masaru ENOMOTO[2], Shigefumi KUWAHARA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]AIST)

【目的】Lecanindole D (**1**)は昆虫病原菌の一種である *Verticilium lecanii* 6144 より単離・構造決定された特異な環構造を有するインドールセスキテルペンである。**1** は強力かつ選択的なプロゲステロンレセプターのアゴニストとして働くため（EC_{50} 1.1±0.4 nM）、女性の避妊薬や閉経後のホルモン療法の分野における応用の可能性を秘めている。本研究では **1** の初の全合成および応用研究のための安定的な試料供給を目的とした[1)]。

【方法・結果】Wieland-Mischer ketone (**2**)より、6 工程の変換で調製したアルコール **3** をベンジル基で保護した後、アセタールの除去を行うことでα, β−不飽和ケトン **4** を得た。**4** のケトンα位にメチル基を２つ導入し､続く立体選択的なケトンの還元によってアルコール 5 を d.r.=2:1 の選択性で得た。**5** より、オレフィン部分のエポキシド化と $LiAlH_4$ によるエポキシドの位置選択的な開裂によってジオール **6** を得た。今後、左側インドール環部分を構築することで **1** の全合成を達成する予定である。



1) Matthew R. Yudt *et al. J. Nat. Prod.* **2009**, 72, 1944-1948

indole sesquiterpene, lecanindole, progesterone receptor agonist

講演番号：2C25a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ C 校舎 25 会場

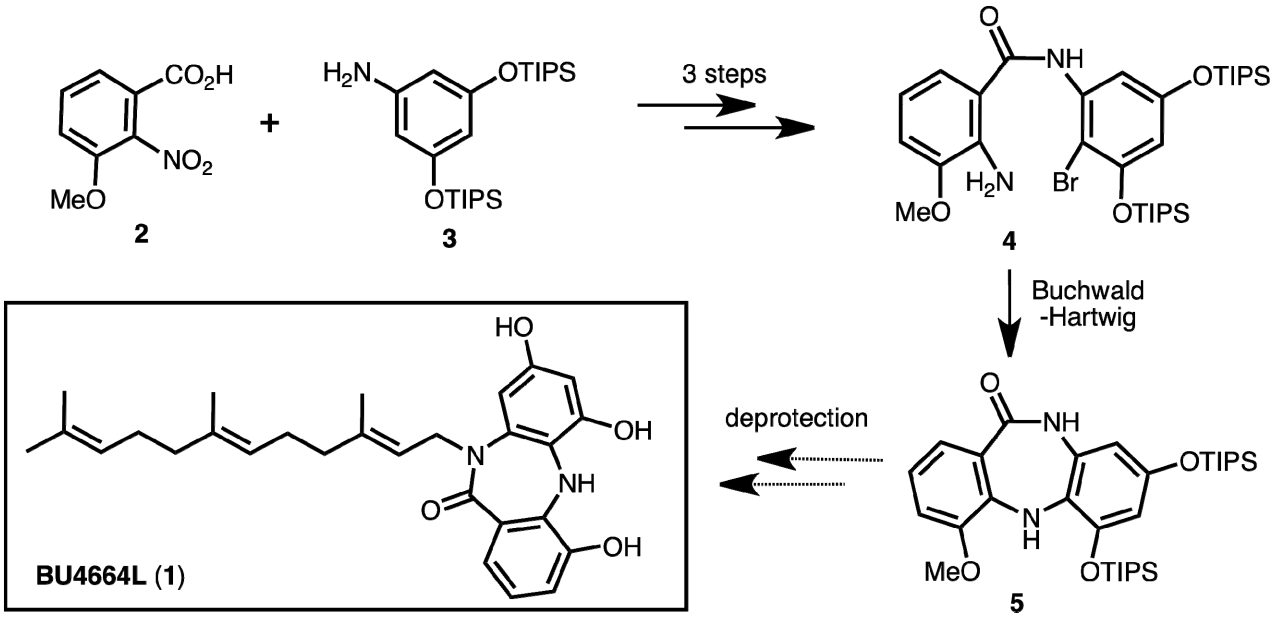
癌細胞浸潤阻害物質 BU-4664L の合成研究

Synthetic studies on the tumor cell invasion inhibitor BU-4664L

○藤田 聡美[1]、渡邊 麻衣[1]、廣川 高史[1]、榎本 賢[2]、桑原 重文[1] ([1]東北大院農・生物産業創成、[2]産総研生物プロセス)
○Satomi FUJITA[1], Mai WATANABE[1], Takafumi HIROKAWA[1], Masaru ENOMOTO[2], Shigefumi KUWAHARA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]AIST)

【目的】放線菌 *Micoromonopora* sp. より単離・構造決定された BU-4664L (**1**)は、天然ではまれなジベンゾジアゼピノン骨格にファルネシル側鎖がついた構造を有する化合物である[1)]。また **1** はマウス結腸癌細胞 26-L5 株に対して浸潤抑制作用を示すことが報告されている (IC_{50} = 1.0 μg/ml)[2)]。本研究では BU-4664L の初の全合成を達成するとともに、構造活性相関研究のためのサンプル供給を目的とした。

【方法・結果】既知のカルボン酸 **2** と別途調製したアニリン誘導体 **3** を出発原料としてアミド化を行い、数工程の変換を経て **4** を合成した。**4** に対して分子内 Buchwald-Hartwig 反応を行うことでジベンゾジアゼピノン骨格を構築し、**5** とした。現在は全合成に向けて脱保護の条件を検討中である。



1）Igarashi, Y. *et al.*, *J. Antibiot.* **2005**, *58*, 350.
2）Miyanaga, S. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 963.

BU-4664L, invasion inhibitor, total synthesis

講演番号：2C25a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ C 校舎 25 会場

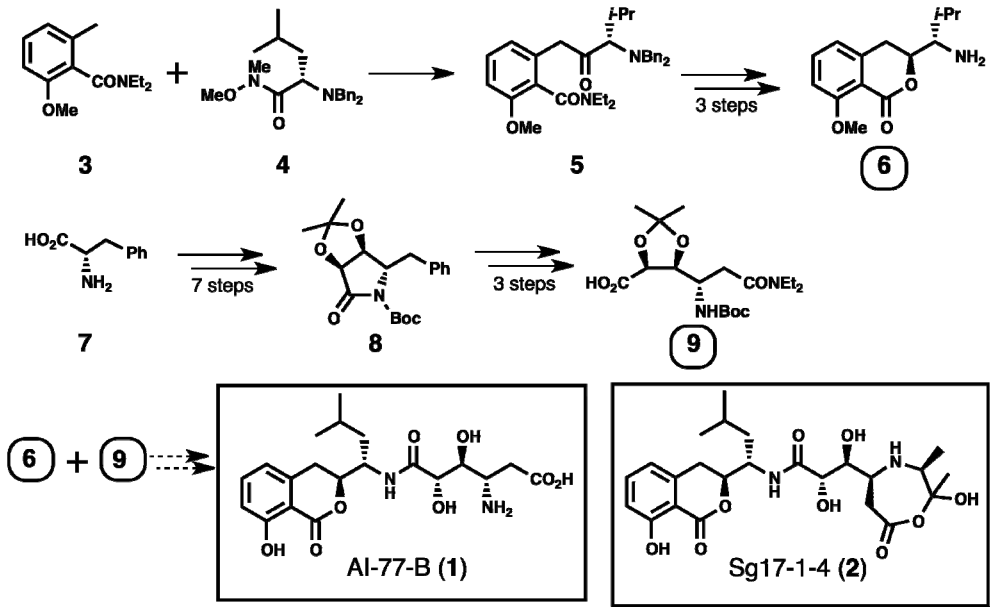
AI-77-B および Sg17-1-4 の合成研究

Synthetic studies on AI-77-B and Sg17-1-4

○鈴木 智美[1]、永沢 友裕[1]、榎本 賢[2]、桑原 重文[1] ([1]東北大院農、[2]産総研生物プロセス)
○Tomomi SUZUKI[1], Tomohiro NAGASAWA[1], Masaru ENOMOTO[2], Shigefumi KUWAHARA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]AIST)

【目的】AI-77-B (**1**) は *Bacillus pumilus* AI-77 より単離・構造決定されたイソクマリン–異常アミノ酸複合型化合物であり、ストレス性潰瘍のラットに対して強力な胃粘膜保護作用を有する[1)]。また、Sg17-1-4 (**2**) は *Alternaria tenuis* Sg17-1 の培養液より単離された特異な 7 員環骨格を有する細胞毒性物質である[2)]。これまでに当研究室において **1** および **2** の全合成が達成されているが、立体選択性や収率に課題を残している[3)]。本研究では両化合物の効率的合成法の確立を目的とした。

【方法・結果】L–ロイシンから 3 工程で得た **4** により、別途調製した **3** をアシル化することでケトアミド **5** とした後、ケトンの立体選択的還元と環化によって左側アミンフラグメント **6** を調製した。一方、L–フェニルアラニン（**7**）を出発原料とし、7 工程の変換を経てラクタム **8** を得た。**8** に対し、芳香環の酸化開裂と生じたカルボン酸のアミド化、続くラクタムの加水分解により右側カルボン酸フラグメント **9** を調製した。今後、得られた **6** と **9** との縮合を含む数工程の変換によって **1** および **2** へ導けるものと考えている。



1) Shimojima, Y. *et al.*, *Agric. Biol. Chem.* **1982**, *46,* 1823.
2) Pei, Y.-H. *et al.*, *J. Antibiot.* **2006**, *59*, 355.
3) 榎本賢, 桑原重文, 有機合成化学協会誌, **2010**, *68*, 387.

total synthesis, AI-77-B, Sg17-1-4

講演番号：2C25a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ C 校舎 25 会場

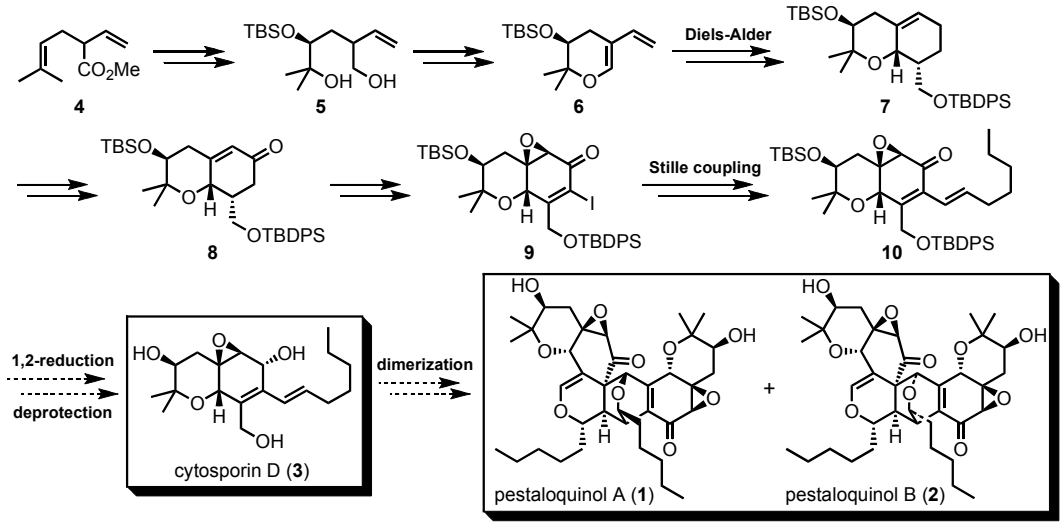
Pestaloquinol A、B および Cytosporin D の全合成研究

Synthetic Studies on Pestaloquinols A and B and Cytosporin D

○廣川 高史、陰山 真将、桑原 重文（東北大院農・生物産業創成）
○Takafumi HIROKAWA,Masayuki KAGEYAMA,Shigefumi KUWAHARA (Tohoku University)

【目的】Pestaloquinol A (**1**)、B (**2**)は Ding らによって植物内生菌 *Pestalotiopsis* sp. より単離・構造決定された 9 環性イソプレニル化エポキシキノール類であり、同時に単離された cytosporin D (**3**)の酸化的二量化によって生成すると提唱されている[1)]。**1** および **2** は HeLa 細胞に対する細胞毒性のみが報告されているが（IC_{50} 8.8 μM)[1)]、類似するエポキシキノール類には血管新生阻害活性が、また単量体構造 **3** の類縁体にはアンジオテンシンⅡに対する拮抗作用が知られていることから、詳細な生理活性の評価が待たれている。本研究では推定生合成経路に立脚した全合成ルートを設計してこれらの初の全合成を達成するとともに、詳細な活性評価や作用機構の解明に向けて標品供給を行うことを目的とした。

【方法・結果】既知化合物 **4** より Sharpless 不斉ジヒドロキシ化を含む変換で **5** とした後、1 級ヒドロキシ基の酸化と生じたヘミアセタールの脱水によって **6** を得た。**6** とアクロレインの Diels-Alder 反応と官能基変換で **7** へと導き、エポキシドを経由したアリル位酸化によって **8** を合成した。続いてエポキシドの導入とエノンへの酸化、およびヨウ素化によって **9** とした後に、Stille カップリングにより C_7 単位の側鎖を導入し、cytosporin D (**3**)の全骨格炭素を有する **10** を合成した。現在 **10** の立体選択的な 1, 2-還元と脱保護によって cytosporin D (**3**)の全合成を目指している。



1) Ding, G.; Zhang, F.; Chen, H.; Guo, L.; Zou, Z.; Che, Y. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 286.

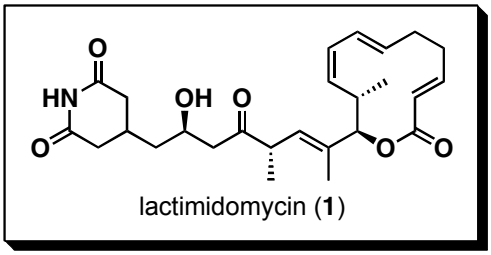
pestaloquinol, cytosporin, total synthesis

講演番号：2C25a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ C 校舎 25 会場

癌細胞転移阻害物質 Lactimidomycin の全合成研究

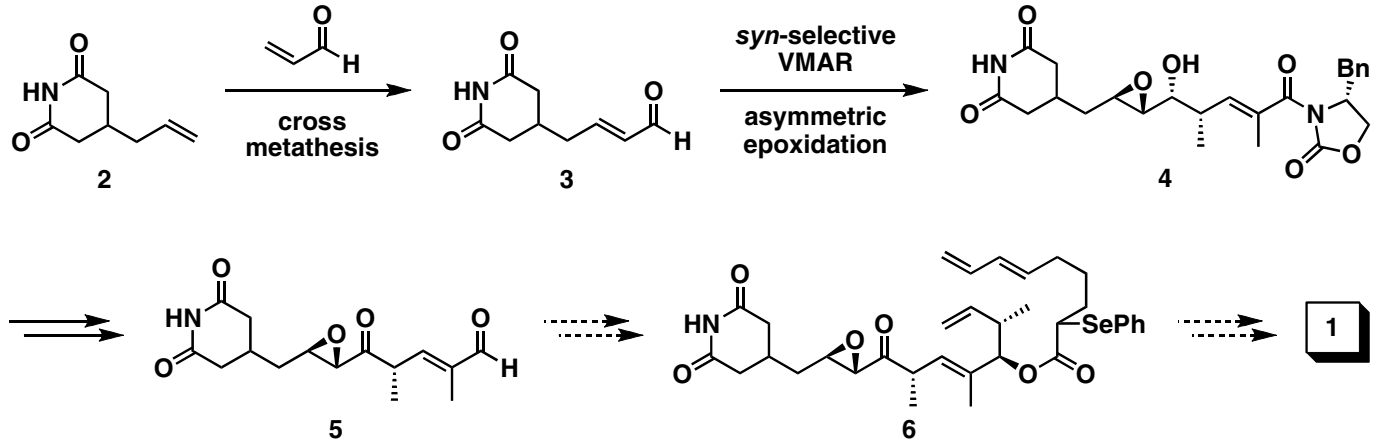
Synthetic Study on Lactimidomycin, a Tumor Cell Migration Inhibitor

○永沢 友裕、桑原 重文（東北大院農）
○Tomohiro NAGASAWA,Shigefumi KUWAHARA (Tohoku Univ.)



【目的】Lactimidomycin (**1**) は 1992 年 Sugawara らによって放線菌 *Streptomyces amphibiosporus* R310-104 より単離・構造決定されたグルタルイミド含有型マクロライドであり、各種癌細胞に対して強力な細胞毒性を示す [1]。また、ヒト由来癌細胞 MDA-MB-231 に対して IC_{50} 0.6 nM という極めて低濃度でその転移を阻害することから新規抗癌剤リード化合物として期待される [2]。本研究では保護基の使用を極力抑えた **1** の効率的合成法の開発を目的とした。

【方法・結果】文献既知のグルタルイミド **2** を出発原料とし、acrolein とのクロスメタセシス反応によって不飽和アルデヒド **3** を良好な収率で得た。このアルデヒド **3** を *syn* 選択的なビニロガス向山アルドール反応 (VMAR) および不斉エポキシ化反応に付すことで **4** を高立体選択的に合成した。**4** より不斉補助基の還元的除去と生じたヒドロキシ基の酸化を経てアルデヒド **5** を得ることができた。現在 **5** から環化前駆体 **6** への変換を検討している。



1) Sugawara, K.; Nishiyama, Y.; Toda, S.; Komiyama, N.; Hatori, M.; Moriyama, T.; Sawada, Y.; Kamei, H.; Konishi, M.; Oki, T. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 1433.
2) Ju, J.; Rajski, S. R.; Lim, S.-K.; Seo, J.-W.; Peters, N. R.; Hoffmann, F. M.; Shen, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1370.

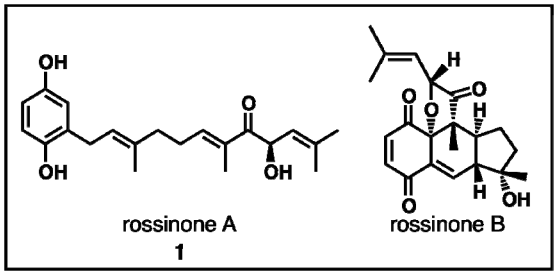
macrolide, cytotoxicity, cell migration inhibitor

講演番号：2C25a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ C 校舎 25 会場

抗炎症活性物質 Rossinone A の合成研究

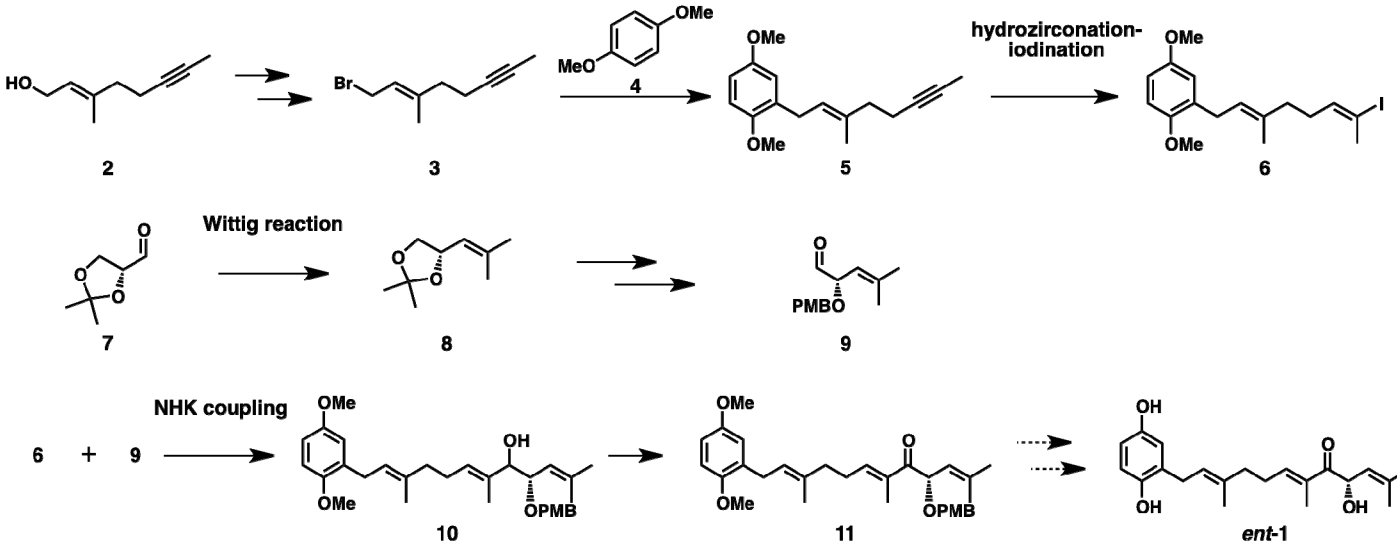
Synthetic Study on Rossinone A, an Anti-inflammatory Natural Product

○滝野 ちあき[1]、榎本 賢[2]、桑原 重文[1] ([1]東北大院農、[2]産総研生物プロセス)
○Chiaki TAKINO[1], Masaru ENOMOTO[2], Shigefumi KUWAHARA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]AIST)



【目的】Rossinone A (**1**)は Copp らによって単離・構造決定された化合物であり、抗炎症活性や P388 に対する細胞増殖抑制活性など様々な生理活性を持つことが知られている [1)]。また **1** は、より複雑な環状構造を持つ rossinone B とその類縁物質の生合成前駆体と考えられている [2)]。本研究では、rossinone 類の生合成経路の解明に向けた化学的知見を得ることおよび、構造活性相関研究に向けた標品供給を目的として **1** の合成研究を行なった。

【方法・結果】既知化合物 **2** を臭化物 **3** へと変換し、パラジメトキシベンゼン **4** をアルキル化することにより **5** を得た。**5** に対しヒドロジルコノ化-ヨウ素化を行い、左側セグメント **6** を合成した。また、既知化合物 **7** より Wittig 反応を含む数工程で右側セグメント **9** を合成した(**9** の鏡像体は L-アスコルビン酸から調製可能)。次に、左側セグメント **6** と右側セグメント **9** との NHK カップリング反応で **10** へと導き、続く酸化により **11** を得た。現在 **11** の脱保護による ***ent*-1** への変換を検討中である。



1) Copp, B. R. *et al.*, *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 9195–9198.
2) Trauner, D. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 6199–6202.

total synthesis, rossinone A, natural products

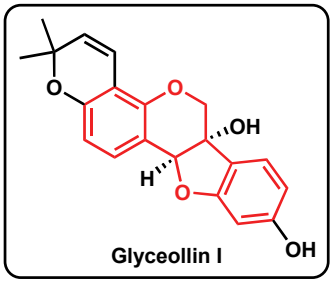
講演番号：2C25a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ C 校舎 25 会場

Glyceollin I の合成研究

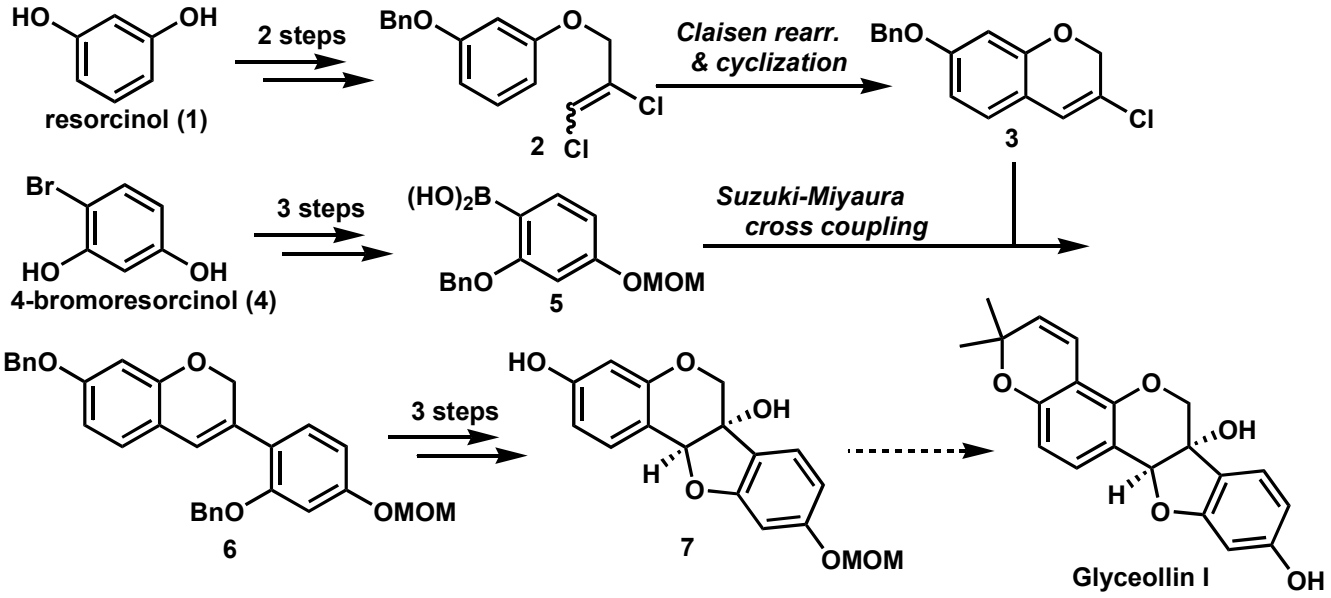
Synthetic Studies on Glyceollin I

○河野 雄太、久世 雅樹、滝川 浩郷（神戸大院農）
○Yuta KOHNO,Masaki KUSE,Hirosato TAKIKAWA (Kobe Univ.)

【目的】Glyceollin I は、大豆より単離・構造決定されたフィトアレキシン[(a)]であり、プテロカルパン骨格に対しイソプレン単位が導入された五環性化合物である。2008 年に Erhardt らにより合成が報告[(b)]されているが、我々はより簡便な合成経路で Glyceollin I を合成することを目的として、その合成研究に着手した。



【方法・結果】市販の resorcinol (**1**)から誘導できる環化前駆体 **2** の Claisen 転位と続く分子内環化によりクロメン **3** を得た。**3** と、4-bromoresorcinol (**4**)より調製できるボロン酸 **5** との Suzuki-Miyaura クロスカップリングにより **6** を合成した。**6** は、既報[(b)]における合成中間体であり、我々は 2 段階の短工程化及び、より収束的な合成法の確立に成功した。この **6** よりプテロカルパン骨格を有する **7** を合成した。現在、目的化合物である Glyceollin I への変換を検討している。



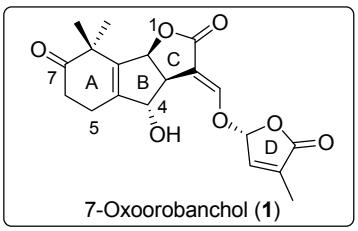
(a) R. S. Burden, J. A. Bailey, *Phytochem.*, **1975**, *14*, 1389-1390
(b) R. S. Khupse, P. W. Erhardt, *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 5007-5010

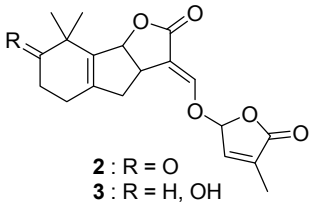
Glyceollin I, Claisen rearrangement, cross coupling

講演番号：2C25a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ C 校舎 25 会場

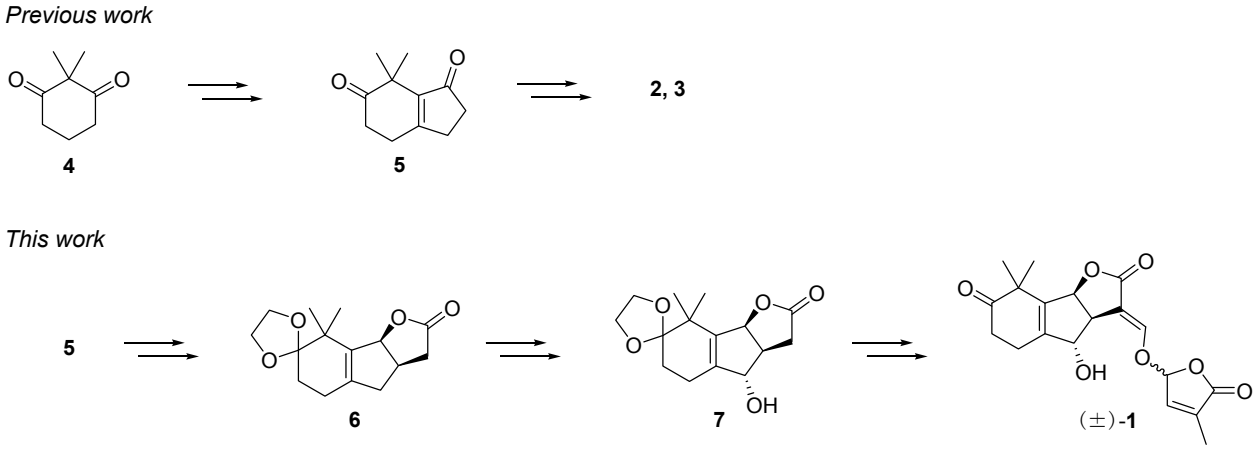
7-Oxoorobanchol の合成
Synthesis of 7-oxoorobanchol
○田中 政志、久世 雅樹、滝川 浩郷 (神戸大院農)
○Masashi TANAKA,Masaki KUSE,Hirosato TAKIKAWA (Kobe Univ.)

【目的】7-oxoorobanchol (**1**) は、アマの根滲出液から単離された根寄生植物に対し種子発芽を促すストリゴラクトン類の一種である。既に我々は、**1** の合成に向け、モデル合成として 7 位に酸素官能基を有するストリゴラクトン (**2, 3**) の合成に成功している。今回、天然物である **1** の合成を目的とする。





【方法と結果】モデル化合物 (**2, 3**) の合成と同様の方法により、2, 2-dimethyl-1, 3-cyclohexanedione (**4**) を出発物質として、二環性化合物 (**5**) を得たのち、**5** への酢酸単位の導入、環化などを行い三環性化合物 (**6**) を得た。得られた **6** の 4 位に水酸基を導入し、化合物 (**7**) を得た。続いて、定法に従い D 環の導入、脱保護を行い **1** のラセミ・ジアステレオマー混合物の合成を達成した。現在は各段階の効率化を検討している。



strigolactone, plant hormone, synthesis

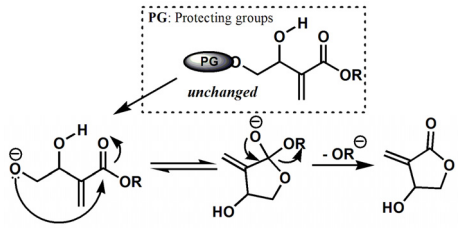
講演番号：2C25a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ C 校舎 25 会場

4-Hydroxybutanoate 鎖を応用した光延反応アシロキシドナーの開発検討

Development of New Acyloxy Donor for Mitsunobu Reaction

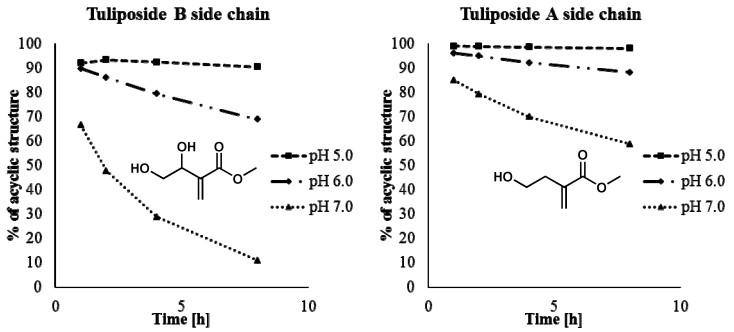
○佐井 勇介、重冨 顕吾、生方 信（北大院農）
○Yusuke SAI,Kengo SHIGETOMI,Makoto UBUKATA (Hokkaido Univ.)

【目的】 Tuliposide は D-glucose に 4-hydroxy-2-methylenebutanoate 鎖が接続した化合物として，チューリップの葯から抽出される主要な二次代謝産物である．当研究室に於いて tuliposide B の側鎖が，中性条件で速やかにラクトン化する現象を確認した．また，環化反応は末端の水酸基を保護することで抑制できることも確認された．この 2 つの結果から，構造の脆弱性を応用することで今までにない新しい有機合成ツールを開発できることが示唆された．その一つとして，光延反応の酸成分が挙げられる．光延反応は 2 級特性基の立体反転反応として有用な反応である．しかし光延反転は，通常エステル化に続く脱アシル化の行程で塩基を使用しなければならないため，脱アシル化条件に弱い基質に対して反応を利用できない．ここで，脱アシル化の段階に中性条件で自己解離が可能であれば，反応制限の緩和を実現し得る．本研究では，中性条件で脱離する新しいアシロキシドナー開発のために，構造の最適化を目的として研究を行った．



Mechanism of lactonization.

【方法と結果】初めに tuliposide A 側鎖の 4-hydroxy-2-methylenebutanoate と tuliposide B 側鎖の 3,4-dihydroxy-2-methylenebutanoate を合成した．合成した化合物を pH 5.0，6.0，7.0 バッファー中 30°C，600 rpm で恒温振盪しながら，経過時間毎に溶液を一部採取した．採取した溶液を，HPLC により鎖状化合物と生成した環状化合物のピーク面積を比較分析することでラクトン化速度を評価した．その結果，B 側鎖では中性条件下で速やかな環化が観測される一方，A 側鎖に顕著な環化は認められなかった．そこで，環化に影響する官能部位の関係をさらに詳しく調べるため，複数の 4-hydroxybutanoate 類縁体を合成し，同様に合成した類縁体を評価した．結果として 3,4-dihydroxy-4-methyl-2-methylenebutanoate は pH 7.0 バッファー溶液中，8 時間以内にほぼすべての直鎖構造がラクトン化した．これらの基礎的探索を踏まえ，現在光延反応への応用を検討中である．



Lactonization rate of Tuliposide B and A side chain.

Tuliposide, 4-Hydroxybutanoate, Mitsunobu reaction

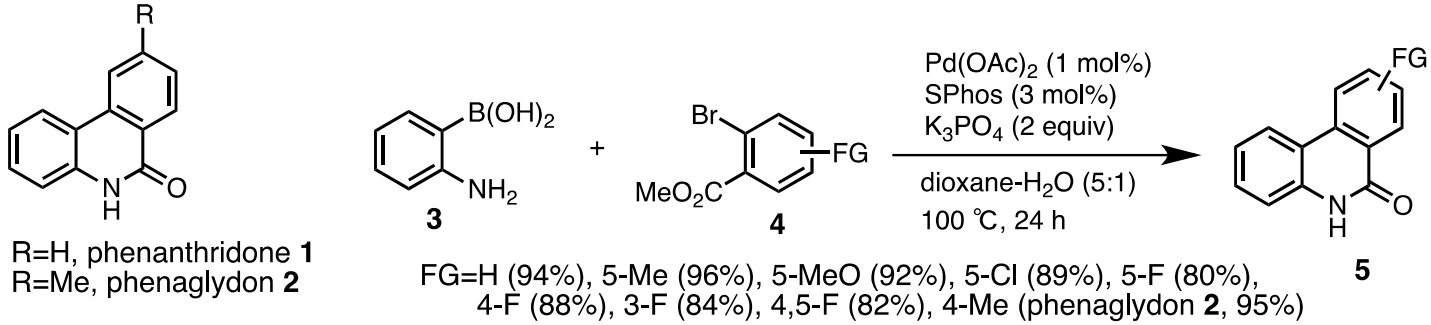
講演番号：2C25a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ C 校舎 25 会場

パラジウム触媒を利用したフェナントリドン類のワンポット合成
Palladium-catalyzed one-pot synthesis of phenanthridones

○谷森 紳治、中川 直道、竹田 一貴（大阪府大院生命環境）
○Shinji Tanimori,Naomichi Nakagawa,Kazutaka Takeda (Osaka Prefec. Univ.)

【目的】フェナントリドン **1** は、三環性の含窒素複素環化合物であり、その誘導体には顕著な生理活性を有するものが多く、医薬品開発のための重要なスカフォールドの一つである．また、天然物としては、ミカン科の植物から単離されたアルカロイドである phenaglydon (**2**)が知られている．このため、誘導体合成の容易なフェナントリドン類の有効な合成法の開発が求められている。本研究では、2-アミノボラン酸 **3** と 2-ハロ安息香酸エステル **4** を出発物質としたパラジウム触媒下、フェナントリドン類 **5** の簡便で効率的な合成法を開発し、ライブラリー構築を行うと共に、phenaglydon (**2**)のワンポット合成を行った。

【方法と結果】まず、市販の 2-アミノボラン酸 **3** と 2-ヨード安息香酸を基質に用い、パラジウム触媒の存在下様々な条件で反応を試みたが、目的としたフェナントリドン **1** の生成は 45%収率にとどまった。そこでメチルエステルを用い、1 モル%の酢酸パラジウム、3 モル%の 2-dicyclohexylphosphino-2',6'-dimethoxybiphenyl(SPhos)、2 当量のリン酸カリウムの存在下、ジオキサン-水 (5:1) 混合溶媒中 100℃で 3 時間反応させたところ、86%の収率で目的の **1** が得られた。また臭化物でも反応は進行し、時間の延長は必要となるが（24 時間）、94%と高収率で生成物を与えた。この条件により、5-メチル、5-メトキシ、5-クロロ、5-フルオロ、4-フルオロ、3-フルオロ、ならびに 4, 5-ジフルオロ安息香酸メチルにおいて、それぞれ 80 から 96%の収率で目的とした縮合環化体 **5** を得ることが出来た。また、4-メチル体も同様に進行し、95%の収率で天然アルカロイド phenaglydon (**2**)を、市販の出発物質からワンポットで合成することが出来た。以上のことから本反応には一般性があることが分かった。今後はボロン酸側の置換基バリエーションについても検討する予定である。



palladium catalyst, one-pot syntesis, phenanthridone

講演番号：2C25a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ C 校舎 25 会場

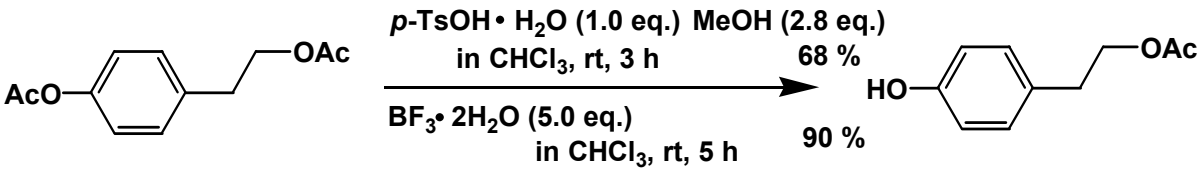
三フッ化ホウ素二水和物と *p*-トルエンスルホン酸一水和物の触媒活性

Catalytic activities of boron trifluoride dihydrate and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate

○福士 幸治[1]、間瀬 智志[2] ([1]北大院農、[2]北大院農)
○Yukiharu Fukushi[1], Satoshi Mase[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Univ.)

【目的】 *p*-トルエンスルホン酸は一水和物（*p*-TsOH·H_2O）が市販され、酸触媒として広く反応に利用されている。2001年、糖誘導体にCH_2Cl_2/MeOH(9:1)中*p*-TsOH·H_2Oが触媒として作用し、benzoyl esterの存在下acetyl esterが選択的にmethanolysisすることが報告された[1)]。三フッ化ホウ素（BF_3）の水和物では、一水和物が強酸であり(Ho≈-12)、Friedel-Crafts反応やFries転位反応などに触媒として利用されている[2)]。一方、二水和物を利用した反応例は少なくPechmann縮合反応での触媒例が知られる程度である[3)]。我々は、$CHCl_3$中室温でBF_3·$2H_2O$がalkyl acetateに影響を与えず、phenyl acetateのみ選択的に加水分解することを報告した[4)]。また、BF_3の配位能を利用することで2,4-diacetoxy-acetophenoneの2位が選択的に脱アセチル化できた。2008年に同じ基質を用い1,4-dioxane中BF_3·Et_2Oと反応（50℃, 3h）し、同様にオルト位選択的な脱アセチル反応が報告された[5)]。これまで多くの保護・脱保護反応に関する研究報告がなされてきたが、実施例に共通性がない場合が多く、有効性の比較や適応範囲を予想できないことが問題であった。我々は、以下に示した基質を用いこれまでの報告例を含め反応条件と生成物の関係から個々の反応の特性を比較することが可能かどうかを検討することとした。

【方法と結果】 4-(2-Hydroxyethyl)phenol、methyl 4-hydroxybenzoate、2,4-dihydroxybenzaldehyde他のacyl esterやbenzyl etherを基質に、上記の触媒を用い脱保護反応を進めている。その結果について報告する。



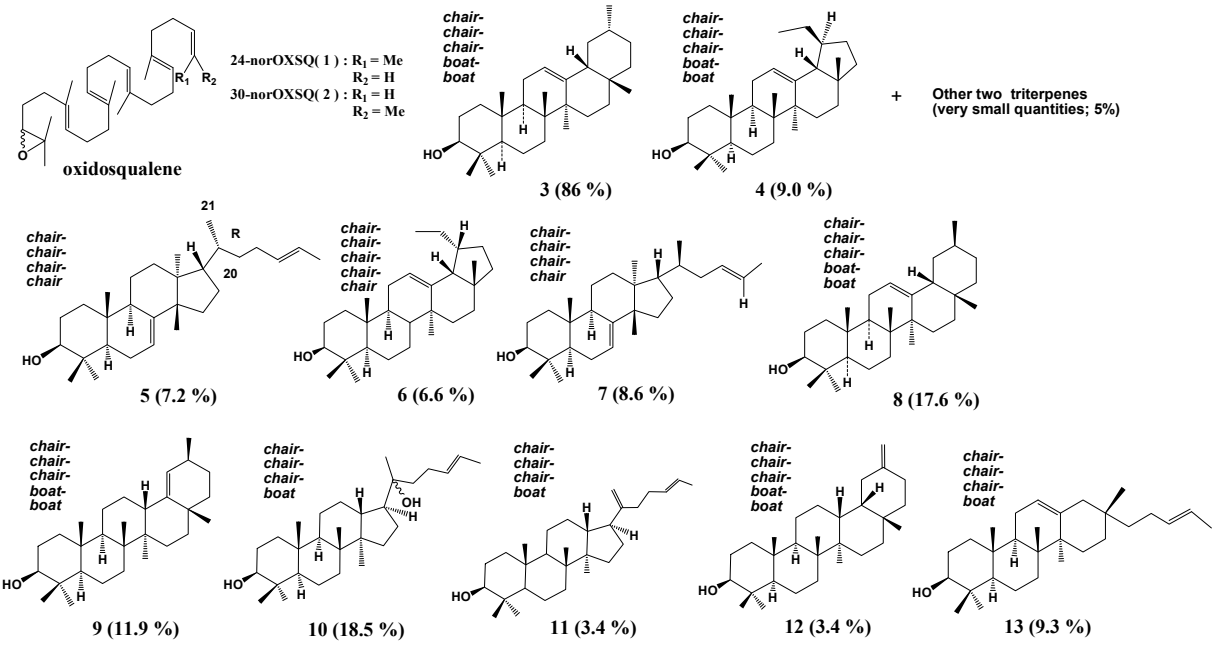
1) *Tetrahedron Lett.*, **42**, 3187-3188 (2001)
2) *Organic Lett.*, **13**, 4128-4131 (2011)とその引用文献
3) *Molecules*, **10**, 762-766 (2005)
4) 間瀬智志他 (2005) 農化北海道支部会、H17.8.6（札幌）要旨集、p.7
http://www.agr.hokudai.ac.jp/jsbba/history/pdf/H10/H1708ab.pdf
5) *Tetrahedron Lett.*, **49**, 4409-4415 (2008)

boron trifluoride dihydrate, *p*-toluenesulfonic acid monohydrate, deprotection reaction

講演番号：2C25a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ C 校舎 25 会場

β―アミリン生合成：オキシドスクアレンの末端二重結合の E-, Z-Me 基が環化反応に及ぼす影響
Effect of E-, Z-Me on the terminal double bond on the polycyclization reaction of oxidosqualene in β-amyrin biosynthesis
○宮原 悠里[1]、花岡 正樹[1]、高橋 一成[2]、星野 力[1,2]([1]新潟大院自然科学、[2]新潟大農応生化)
○Yuri Miyahara[1], Masaki Hanaoka[1], Kazunari Takahashi[2], Tsutomu Hoshino[1,2] ([1]Niigata Univ., [2]Niigata Univ.)

【目的】オキシドスクアレン環化酵素は、2,3–オキシドスクアレン（OXSQ）を基質として様々な環状トリテルペンへと環化する酵素群であり、生物界に広く分布している。*β*-アミリン合成酵素（*β*-AS）に関しては、基質アナログを用いた研究例は少ない。今回、末端二重結合の*E*-Me、*Z*-Meが環化様式にどの様な役割を担っているか検討した。【方法・結果】24-ノル **1**（*E*-Me欠如）及び、30-ノルOXSQ **2**（*Z*-Me欠如）をC27-アルデヒドをWittig反応等に付して合成した。これらを*β*-ASと反応させた。**1**から、GC-MSで主産物1つと微量産物3つを確認した。GC分析により、Product 1（**3**）（86 %）とProduct 2（**4**）（9.0 %）が全体の95 %を占めていた。この2つの酵素産物を単離同定し、NMRで構造解析した。これらは、*β*-アミリンと同様に*chair-chair-chair-boat-boat*でのコンフォメーションで反応を開始した産物であった。即ち、Me-24が欠損しても正常に環化が進行することが分かった。一方、Me-30の欠損の**2**の場合、酵素産物を計9個（**5**～**13**）確認した。4環性のプロダクト**5**、**7**、**10**、**11**、**13**も得られた。この事実は、酵素が正確に2つの*E*-、*Z*-Meを区別していることを示している。以上、酵素が*Z*-Me基を強く捕捉することで基質を正確なフォールディングに導いていることが分かった。



amyrin, triterpene, oxidosqualene

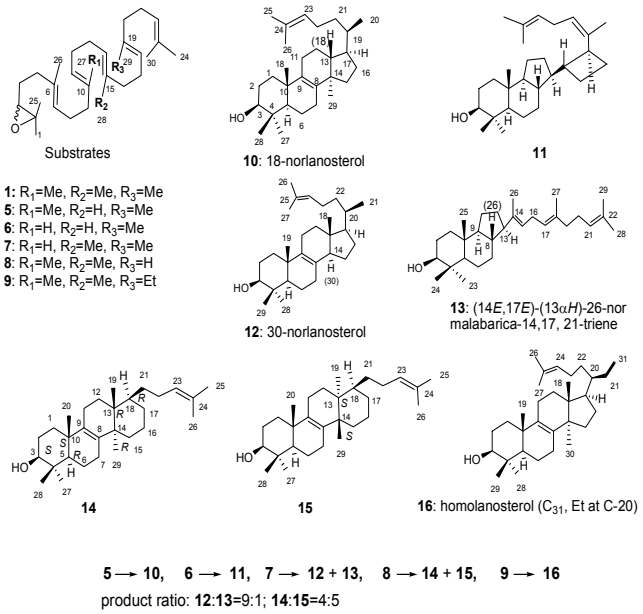
講演番号：2C25a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ C 校舎 25 会場

ラノステロール生合成：２，３－オキシドスクアレンの Me-29 が正確なフォールデングに最も重要である

Lanosterol Biosynthesis: The Critical Role of Me-29 of 2,3-Oxidosqualene in Lanosterol Biosynhtesis

○星野 力、千葉 彬史、阿部 奈緒美（新潟大院）
○Tsutomu Hoshino,Akifumi Chiba,Naomi Abe (Niigata Univ.)

【背景・目的】ラノステロール合成酵素による基質認識機構に関しては、1960 年後半から 1990 年代前半にかけて van Tamelen や Corey らの精力的な研究が報告されてきた。1955 年スイスの ETH school(Arigoni ら)は、基質スクアレンが chair-boat-chair-**boat** 型で折り畳まれ、17α-side chain を持つ protosteryl cation が生成され、その後 backbone 転位が起きラノステロール骨格が構築されると提唱した。[1]1991 年 Corey は 20-oxa アナログを酵素反応に付したところ、中間体 protosteryl cation は、17 位の side chain は、β配向であると報告した。[2]この実験結果は、chair-boat-chair-**chair** で進行することを示している。しかし、Corey らはこの conformation を指摘しなかったためか、教科書や総説等で未だ D 環形成は boat 型であると間違って記載されている。2005 年 Arigoni らは、chair-boat-chair-**chair** と事実上修正した。[3] 1968 年 van Tamelen は 15 位の Me（Me-28）が欠損 **5** しても、正常な conformation が進行し、18-norlanosterol **10** が生成すると報告した。[4]1992 年 Corey らは、27,28-bisnoroxidosqualene **6** の環化物として chair-chair-boat 型で進行した 6/6/5+4 **11** の４環性化合物を報告し、van Tamelen の Me-28 の nor 体の結果と合わせて Me-27 が正常な環化反応に必須であると報告した。[5]しかし、Me-27 のみが欠損した OXSQ **7** や Me-29 が欠損したアナログ **8** の酵素反応は未だ報告されてない。我々は、**7** 及び **8** の環化産物を同定し、Me 基の重要性について更に検討した。[6]【方法・結果】各基質アナログは、SQ から化学合成し，豚肝臓ミクロソーム画分を酵素源とした。**新規骨格の酵素産物 (nortriterpene)**の構造を上図に示した。Folding conformation についても議論する。[6]



1) *Helv. Chim. Acta*. **1955**, *38*, 1890-1940.2）*J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 4025-4026. 3）*Helv. Chim. Acta*. **2005**, *88*, 3011-3050. 4）*J. Am. Chem. Soc*., **1968**, *90*, 3284–3286.5）*J. Am. Chem. Soc*. **1992**, *114*, 1524-1525. 6）Hoshino et al. *Chem. Eur. J* **2012**, *18*, 13108-13116.

Lanosterol, triterpene, oxidosqualene

講演番号：2C25p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ C 校舎 25 会場

生理活性ステロイド配糖体，アカンサステロサイド B3 の合成研究

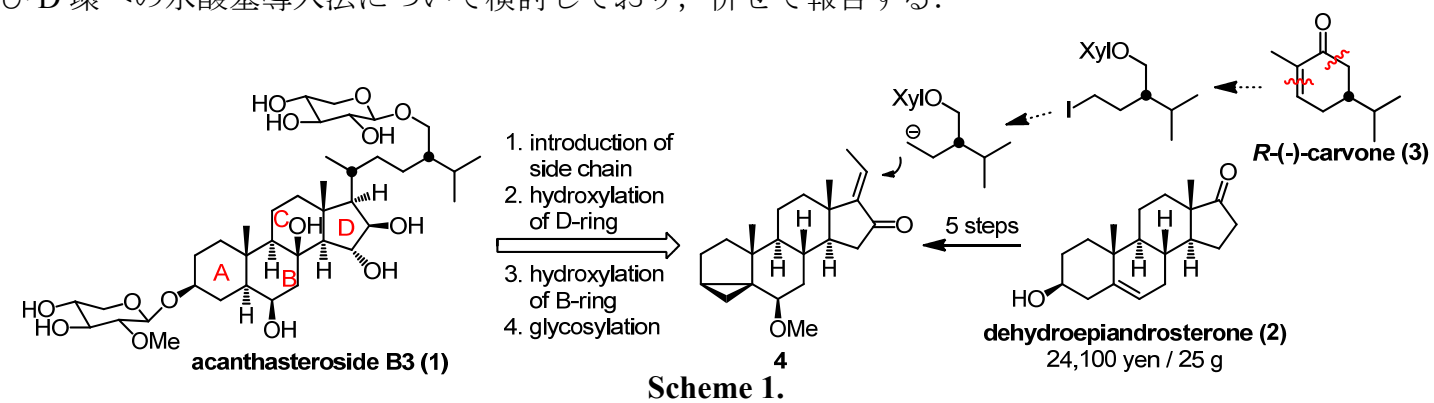
Synthetic Studies on Acanthasteroside B3, a Physiologically Active Steroid

○合田 麗加、中崎 敦夫、西川 俊夫（名大院生命農）
○Reika GODA,Atuo NAKAZAKI,Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

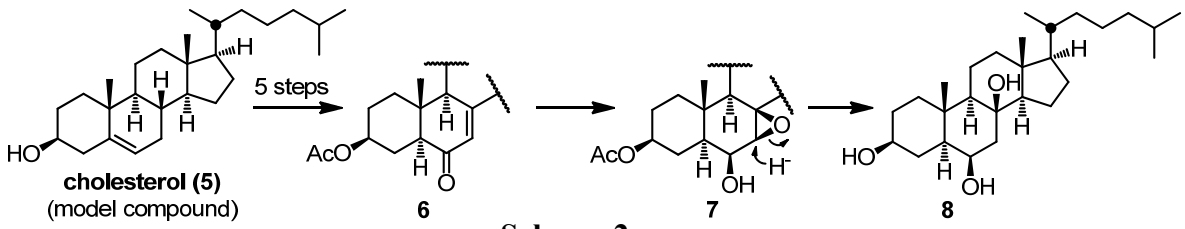
【目的】アカンサステロサイド B3(**1**)は，小鹿らにより沖縄のサンゴ礁に生息するオニヒトデから単離されたステロイド配糖体である [1]．この化合物はマウスの記憶改善効果を示すため，神経変性疾患の医薬品リード化合物として期待されているが，天然からの大量供給は困難である．本研究では，この化合物の安定供給をめざし，市販ステロイドから **1** の化学合成法の開発を目的としている．
【方法・結果】本研究では，安価なデヒドロエピアンドロステロン(**2**)を原料とし，(i) 側鎖の合成および導入，(ii) D 環への水酸基導入，(iii) B 環への水酸基導入および (iv) グリコシル化を行い，**1** を合成する計画である（Scheme 1）．

まず，コレステロール(**5**)を用いたモデル実験において，(iii) の B 環への水酸基の導入法を検討した（Scheme 2）．文献に従い， **5** から 5 工程でエノン **6** を調整した [2]．続いて，**6** の立体選択的なアリルアルコールへの還元およびエポキシ化を行い，β-エポキシアルコール **7** を合成した．最後に **7** のエポキシドをヒドリドで開環することで，B 環へ 2 つの水酸基の導入(**8**)を達成した．

現在，R-(-)-カルボン(**3**)からの側鎖合成法および **2** から合成したエノン **4** [3] への共役付加導入，および D 環への水酸基導入法について検討しており，併せて報告する．



Scheme 1.



Scheme 2.

1) WO 2006/090910.　2) N. V. Kovganko et al., *Chemistry of Natural Compounds*, **2000**, *36*, 377.
3) B. M. Trost et al., *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 1404.

organic synthesis, steroid, neuritogenic activity

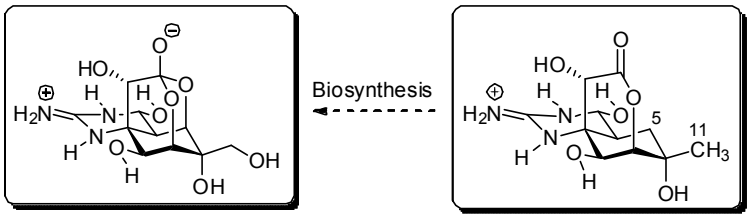
講演番号：2C25p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ C 校舎 25 会場

(-)-5,11-ジデオキシテトロドトキシンの全合成

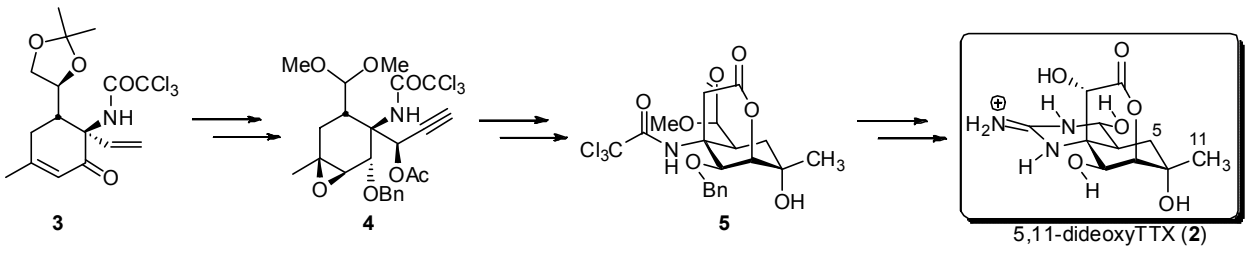
Total synthesis of (-)-5,11-dideoxytetrodotoxin

○今津 拓也[1]、安立 昌篤[1]、磯部 稔[2]、西川 俊夫[1] ([1]名大院生命農、[2]台湾国立精華大)
○Takuya IMAZU[1], Masaatu ADACHI[1], Minoru ISOBE[2], Toshio NISHIKAWA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]National Tsing Hua Univ.)

【目的】フグ中毒の原因物質であるテトロドトキシン (TTX, **1**)は、電位依存性ナトリウムチャネルの強力な阻害活性を持つ天然有機化合物である。我々は、TTX 類の強力な生理活性と特異な化学構造に興味を持ち、これまでに TTX と 5 つの類縁体の合成を報告してきた。また、当研究室で合成を達成した 5,11-dideoxyTTX (**2**)が、近年天然型の類縁体であることが報告された。本研究では、TTX の生合成中間体として有力な 5,11-dideoxyTTX(**2**)の同位標識体が、生合成経路を解明するためのプローブとなり得ると考え、5,11-dideoxyTTX(**2**)の改良合成法およびその標識体の合成を検討した。



【方法および結果】エノン **3** に対して、あらかじめアセトニドの脱保護と 1,2−ジオールの切断を行いアセタールへと変換し、過去の合成法に従ってエポキシ化とアセチレンの導入を行うことで環化前駆体 **4** を合成した。続いて、アセチレンを酸化的に切断し分子内のエポキシドを開環した後、分子内アセタール化によってラクトン **5** を得た。最後に、2 段階でグアニジンを導入した後、すべての保護基を除去し 5,11-dideoxyTTX (**2**)の全合成を達成した。また、生合成研究のための ^{15}N 標識体の合成にも成功した。



［参考文献］
(1)Nishikawa, T.; Asai, M.; Ohyabu, N.; Yamamoto, N.; Isobe, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38,* 3081.
(2)Nishikawa, T.; Asai, M.; Ohyabu, N.; Yamamoto, N.; Fukuda, Y.; Isobe, M. *Tetrahedron* **2001,** *57,* 3875.

tetrodotoxin, total synthesis, guanidine

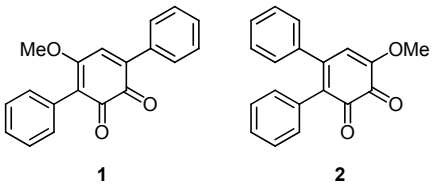
講演番号：2C25p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ C 校舎 25 会場

Synthesis of ortho-Terphenyl ortho-Quinone

○Wenyu Huang,Boon-ek Yingyongnarongkul,Jutatip Boonsombat,Atsuo Nakazaki,Toshio Nishikawa (Nagoya Univ.)

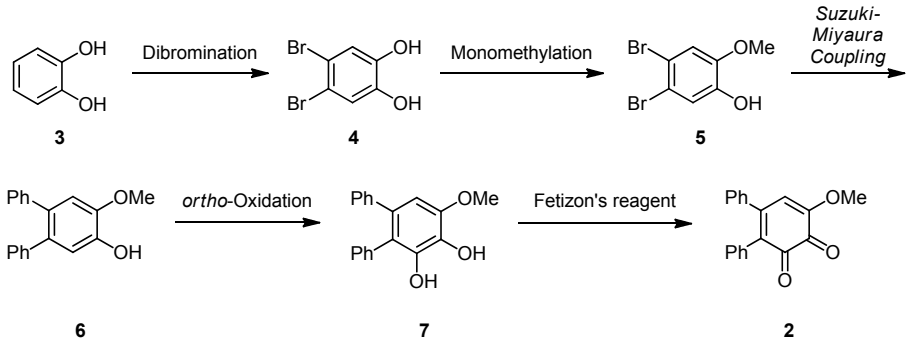
In 2006, three new terphenyl products were isolated by Merck research group from microbial extract of a *Phoma* sp. as inhibitors of parasite cGMP-dependent Protein Kinase (PKG) with IC_{50} values in the range 0.9-5.8 μM.[1] One of these products was identified as *para*-terphenyl *ortho*-quinone **1** and its structure was determined by analysis of the spectroscopic data.

Recently we have reported the synthesis of **1** and its NMR data were not identical to those of the natural compound.[2,3] After re-estimation of the spectroscopic data in the literature, we started the synthesis of *ortho*-terphenyl *ortho*-quinone **2** as a possible structure (Scheme 1). Dibromination of pyrocatechol **3** followed by monomethylation afforded dibromophenol **5**. Suzuki-Miyaura coupling of **5** provided *ortho*-terphenyl **6** under conventional conditions. Fetizon oxidation of catechol **7** synthesized by *ortho*-oxidation of **6** gave the desired corresponding *ortho*-quinone **2** whose structure was confirmed by NMR, IR and HRMS spectral data. However, the spectral data of the synthetic and natural compounds were not identical.



1 **2**

Figure 1



3 **4** **5** **6** **7** **2**

Scheme 1

References

1. Singh, S. B. *et al. J. Nat. Prod*. **2006**, *69*, 710.
2. 澤山　裕介、辻本　恭、杉野　公美、西川　俊夫、磯部　稔、河岸　洋和、日本農芸化学会 2007 年度大会, 3A26a08.
3. Sawayama, Y. *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2006**, *70*, 2998.

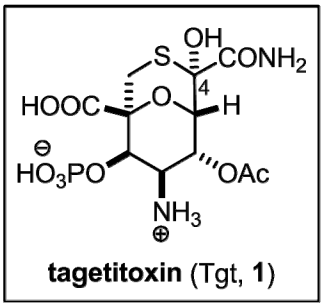
Natural Product Synthesis, para-Terphenyl ortho-Quinone, ortho-Terphenyl ortho-Quinone

講演番号：2C25p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ C 校舎 25 会場

植物毒素 Tagetitoxin の合成研究

Synthetic studies on tagetitoxin, a phytotoxin

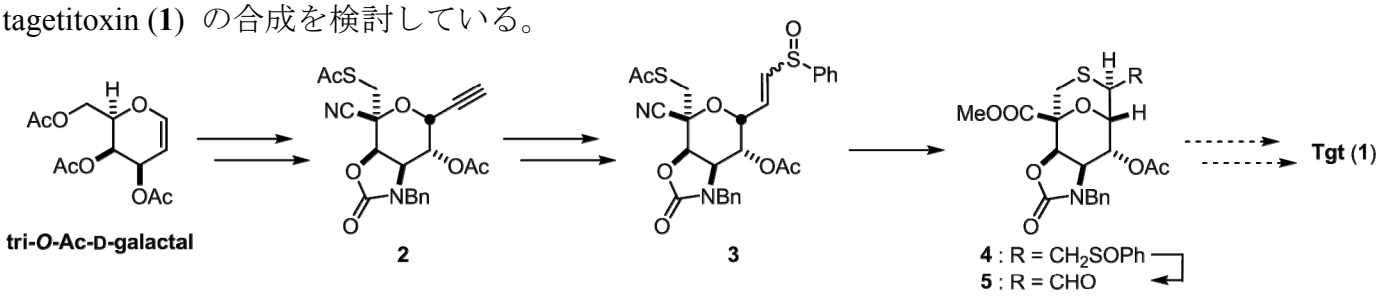
○山田 ひと美、安立 昌篤、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Hitomi Yamada,Masaatsu Adachi,Toshio Nishikawa (Nagoya Univ.)



tagetitoxin (Tgt, **1**)

【目的】Tagetitoxin (Tgt) は、1981年にMitchellらによって頂端萎黄病の原因物質として植物病原性細菌*Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*の培養液から単離された植物毒素である[1)]。Tgtは葉緑体内のRNAポリメラーゼ (RNAP) に対して阻害活性を示し、真核生物のもつRNAP I、IIおよびIIIのうちRNAP IIIのみを選択的に阻害する[2)]。このため生化学の分野ではRNAP阻害剤として利用され、また近年RNAP－Tgt複合体の結晶構造解析が報告されるなど注目されている[3)]。しかしながら、Mitchellらの構造解析研究では、絶対立体化学およびカルボン酸とアミドの位置が未だ決定されていない。本研究では、構造決定を目的としてTgt (**1**) の合成研究を行った。

【方法および結果】2012年度本大会において、D-Galactalから１７工程で望む五連続不斉中心をもつニトリル**2**の合成を発表した[4)]。ニトリル**2**をビニルスルホキシド**3**へと変換し、チオールの分子内共役付加によってオキサチアビシクロ化合物**4**を合成した。続いて、Pummerer反応を利用することでアルデヒド**5**の合成まで完了している。現在は、アルデヒド**5**からアミドの構築と4位の酸化を経て、tagetitoxin (**1**) の合成を検討している。



【参考文献】

1) (a) Mitchell, R. E. et al. *Physiol*. *Plant Pathol*. **1981**, *18*, 157. (b) Mitchell, R. E. et al. *Tetrahedron Lett*. **1989**, *30*, 501.

2) (a) Mathews, D. E. et al. *J*. *Biol*. *Chem*. **1990**, *265*, 493. (b) Steinberg, T. H. and Mathews, D. E. et al. *J*. *Biol*. *Chem*. **1990**, *265*, 499.

3) Artsimovitch, I. et al. *Nat*. *Struct*. *Mol*. *Biol*. **2005**, *12*, 1086.

4) 山田ひと美、安立昌篤、西川俊夫　日本農芸化学会 2012 年度大会　2A07p16.

tagetitoxin, RNA polymerase, oxathiabicyclo[3.3.1]nonane

講演番号：2C25p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ C 校舎 25 会場

連続環化反応による saxitoxin 骨格の合成研究

Synthetic studies toward saxitoxin skeleton through tandem cyclization reaction

○上野 壮平、中崎 敦夫、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Sohei UENO,Atsuo NAKAZAKI,Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

【目的】

貝毒 saxitoxin (STX, **1**)は、電位依存性 Na^+チャネルの強力な阻害活性を有する環状グアニジンアルカロイドである (Figure 1)。近年、**1** は 10 種類ある Na^+チャネルのサブタイプのうち 5 種類を阻害することが報告された。我々は、**1** やそのアナログ **2**,**3** の特異な 3 環性骨格を基盤とした非天然型のアナログを化学合成することで、Na^+チャネルのサブタイプ選択的阻害剤を創製することができるのではないかと考えた。そこで、**1** とそのアナログ **2**,**3** の効率的な骨格構築法の確立を目的として研究を開始した。

【方法・結果】

STX の 3 環性骨格を構築するにあたり、その鍵中間体として環状グアニジンを有するスピロアミナール **4** を設定した (Figure 1)。グリセルアルデヒドアセトニド **5** に対するアセチリド **6** の付加によって得られる **7** から短段階で合成したプロパルギルグアニジン **8** に対し、臭素カチオン源を作用させることで連続環化反応が進行し、鍵中間体であるジブロモスピロアミナール **9** を得ることに成功した (Scheme 1)。現在、**9** から **10** への変換について検討中である。

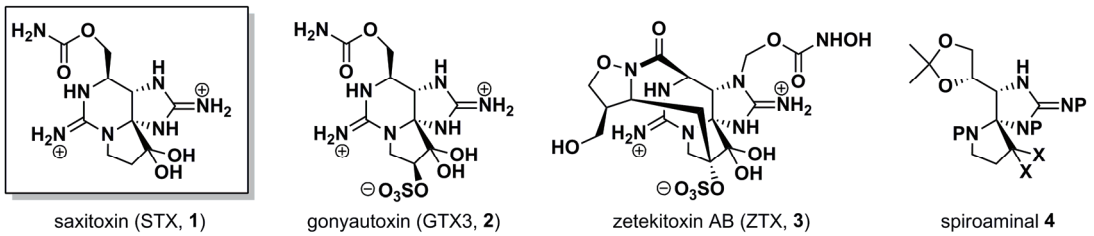
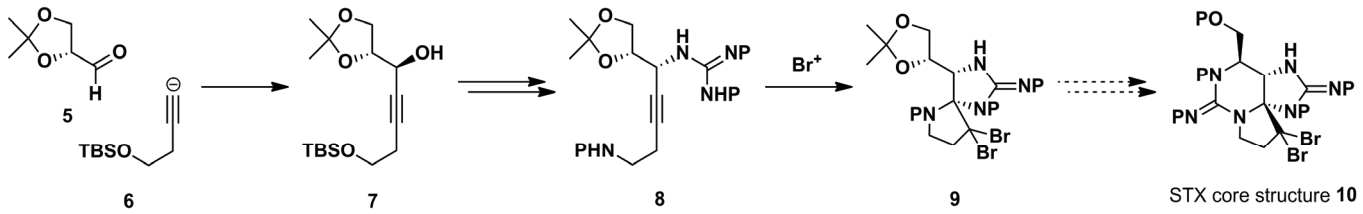


Figure 1



Scheme 1

Saxitoxin, natural product synthesis, Na+ channel

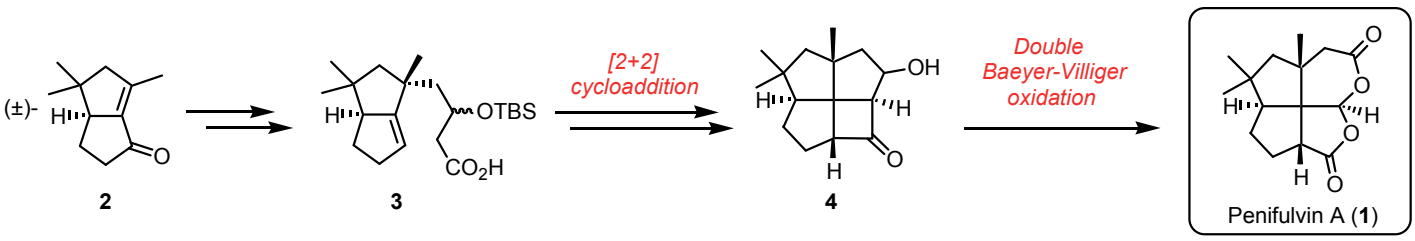
講演番号：2C25p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ C 校舎 25 会場

ペニフルビン A の全合成
Total synthesis of Penifulvin A

○深津 裕一、小佐野 雄太、森川 幸則、渡邉 秀典（東大院農）
○Yuichi Fukatsu,Yuta Osano,Yukinori Morikawa,Hidenori Watanabe (Tokyo Univ.)

［目的］Penifulvin A (**1**)[1]は、2006 年に Glore らによって *Penicillium griseofulvum* (NRRL 35584) の培養菌体から単離・構造決定されたセスキテルペンである。**1** はダイズなど数多くの農作物を食害するヨトウガの一種であるツマジロクサヨトウ(*Spodoptera frugiperda*)の幼虫に対して摂食阻害活性を有しているが、詳細な生理活性発現機構は未だに分かっていない。また **1** は一つの炭素原子が 4 つの環に共有されたジオキサ[5.5.5.6]フェネストラン骨格という、ユニークな構造を有しており合成化学的に非常に興味深い化合物である。**1** の全合成は、2009 年に Mulzer らによって報告され[2]、合成により天然物が図に示したような絶対立体配置を有していることが明らかになったが、構造活性相関研究など、生理活性に関する報告はない。我々は新規な骨格構築法の確立と生理活性発現機構の解明を目指して合成研究に着手し、**1** のラセミ体全合成を達成したので報告する。

［方法・結果］ まず出発原料とするエノン **2** を合成した[3]。この **2** から Claisen 転位反応を経て 6 工程にてカルボン酸 **3** を合成した。このカルボン酸 **3** を用いて分子内[2+2]環化付加反応を行い、良好な収率にて環化体を得た後、シリル基の脱保護を行い **4** を得た。最後に鍵反応である Double Bayer-Villiger 反応を検討した。**4** の水酸基を酸化して得られるジケトンは、不安定で単離が困難であったので、水酸基の酸化と Baeyer-Villiger 酸化反応をワンポットで行い、Penifulvin A (1)のラセミ体全合成を達成した。現在は不斉全合成に向けて検討を行っているので併せて報告する。



2 **3** **4**

参考文献
1) Glore, J. B. *et al. Org. Lett.* **2006**, *8*, 1225-1228.
2) Mulzer, J. *et al., J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 452-453.
3) Paquette, L. A. *et al., J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, *105*, 7352-7358.

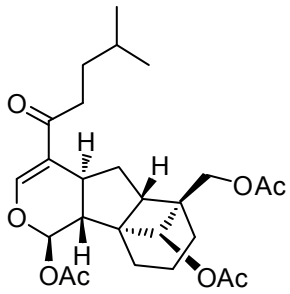
Penifulvin A, total synthesis

講演番号：2C25p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ C 校舎 25 会場

Plumisclerin A の合成研究

Synthetic Study of Plumisclerin A

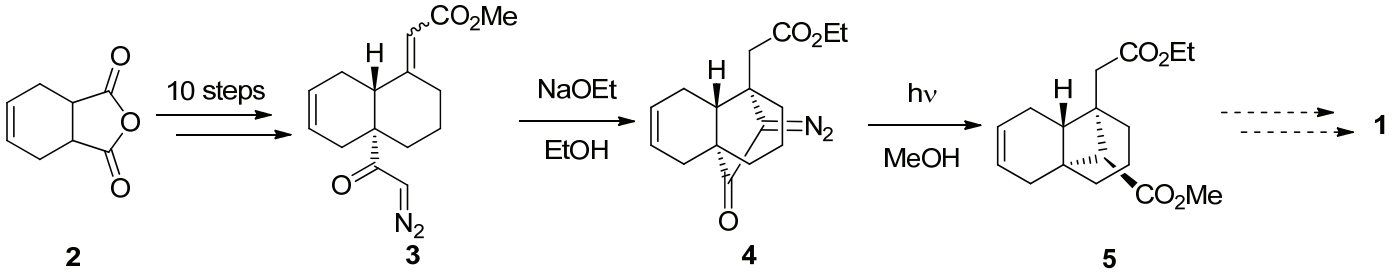
○服部 弘、石田 恭次、渡邉 秀典（東大院農生科・応生化）
○Hiromu HATTORI,Kyoji ISHIDA,Hidenori WATANABE (Tokyo Univ.)



Plumisclerin A (**1**)

【目的】Plumisclerin A (**1**)は2010年Cuevasらによって軟質サンゴ*Plumigorgia terminosclera*より単離されたジテルペンであり[1)]、新規トリシクロ[4.3.1.$0^{1,5}$]デカン骨格を有する。本化合物は抗癌活性を有するものの、詳しい活性やその作用機序など分かっていない。そのため合成研究により天然物及び構造活性相関研究に用いることのできるその誘導体を供給することは、生物学的研究に役立てることができるほか、医薬品としての開発につなげることもできる。我々は合成化学的に興味深い構造を有する本化合物の合成及び、さらなる生物活性の評価を目的とし合成研究に着手した。

【方法と結果】本化合物一番の特徴であり、合成の鍵となる大きなひずみをもった四員環の構築を行うために、五員環を構築した後に Wolff 転位により四員環を得る合成計画を立案した。まず、無水フタル酸誘導体 **2** を原料とし、10 工程の官能基変換等を経てデカリン骨格を有する α-ジアゾケトン誘導体 **3** に導いた。**3** は塩基性条件下で反応させることにより Michael 付加体 **4** を与えた。さらに **4** にメタノール中光照射を行うことで、本化合物に特徴的な四員環をもつ **5** を得ることができた。現在、全合成を目指し左側ジヒドロピラン環部位の合成と、二カ所のエステルをそれぞれ減炭する反応の検討を行っている。



2 **3** **4** **5**

1) M. Martin, *et al*, *Org. Lett*, **2010**, *28*, 1035-1053

total synthesis, Plumisclerin A, anticancer agent

講演番号：2C25p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ C 校舎 25 会場

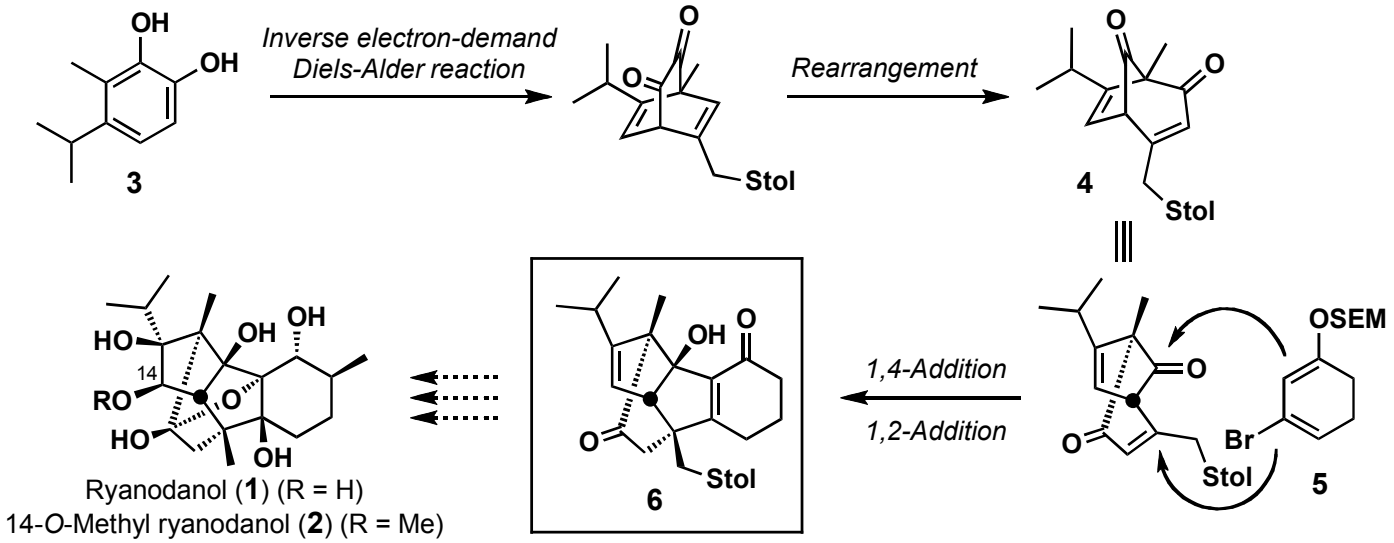
リアノダン類ジテルペンの合成研究

Synthetic study toward ryanodane diterpenes

○若森 晋之介、渡邉 秀典（東大院農生科）
○Shinnosuke WAKAMORI,Hidenori WATANABE (Univ. of Tokyo)

【目的】Ryanodanol (**1**) 及び 14-*O*-methyl ryanodanol (**2**) はコカノキの一種である *Erythroxylum passerinun* の熟果から単離された新規 ryanodane 類ジテルペンである。デング熱を媒介するネッタイシマカの幼生に対し，殺虫活性を有することが明らかとなっている。また ryanodane 類ジテルペンは昆虫摂食阻害活性を有するという報告があることから，本化合物も同様の生物活性を有することが期待できる。しかしながら ryanodane 類ジテルペンの合成研究においては，複雑な炭素骨格と多くの酸素官能基が存在するため，全合成を困難にしている。そこで我々は ryanodane 類ジテルペンが有する特徴的な骨格の効率的構築法の開発及び生物活性機構の解明を目的として，本化合物の合成研究に着手した。

【方法と結果】カテコール誘導体 **3** より逆電子要請型 Diels-Alder 反応， Lewis 酸を用いた転位反応を経て bicyclo[3.2.1]octane 骨格を有するジケトン **4** へと導いた。続いて 6 員環フラグメント **5** を用い, 本化合物と 1,4-付加反応, 1,2-付加反応をそれぞれ行うことで ryanodane 類ジテルペンと同様の骨格を有する鍵中間体 **6** の合成に成功した。現在，最終目的物の全合成に向け種々検討を行なっている。



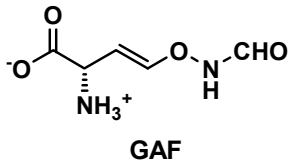
diterpene, organic synthesis, insecticidal activity

講演番号：2C25p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ C 校舎 25 会場

O－ビニルヒドロキサム酸構造を有するＧＡＦの全合成研究

Synthesic study of GAF with a novel *O*-vinyl hydroxamate substructure.

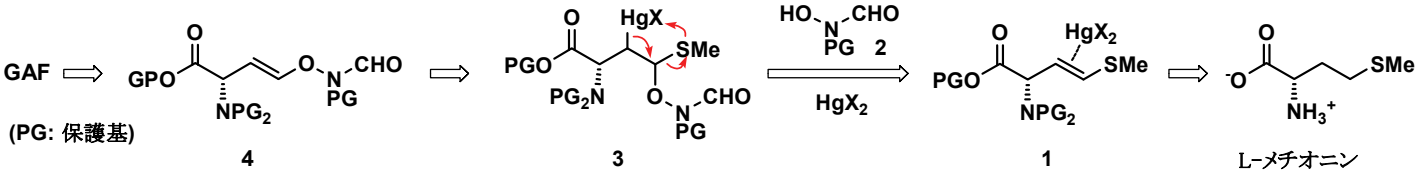
○堀之内 妙子、渡邉 秀典（東大院農生科）
○Taeko HORINOUCHI,Hidenori WATANABE (Tokyo Univ.)



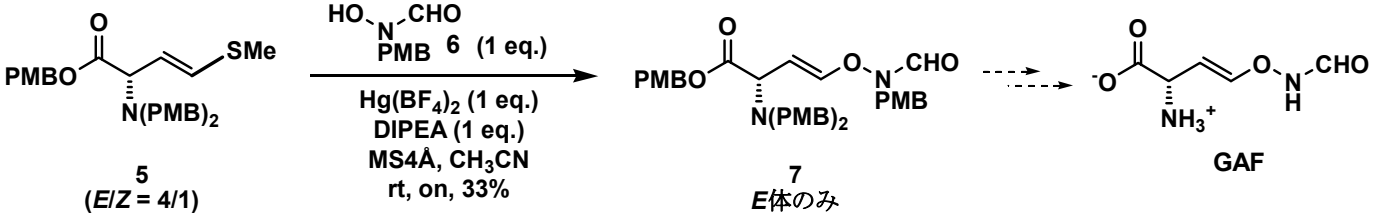
GAF

【背景・目的】右に構造を示すアミノ酸 **GAF** は、2010 年に根圏バクテリアの一種である *Pseudomonas fluorescens* WH6 から単離、構造決定された [1]。**GAF** とは Gerination Arrest Factor（発芽停止因子）の略称であり、**GAF** は雀の帷子などの一年生単子葉植物の発芽を不可逆的に停止するため新規の除草剤としての可能性が期待されている。我々はこれまでに報告のない新規骨格である *O*-ビニルヒドロキサム酸構造の骨格構築法の確立、現段階では明らかになっていない発芽停止メカニズムの解明に必要な試料の恒常的な供給、さらに **GAF** の各種類縁体の合成による更に優れた除草剤候補化合物の創製という三つの事項を目的とし研究を行った。

【結果】本ルートは下図に示すように、安価なＬ－メチオニンから調製したデヒドロメチオニン保護体 **1** のビニルスルフィド部位に対して、ヒドロキサム酸 **2** を用いたオキシマーキュレーションを行うことで **3** を生成し、更に水銀と硫黄の親和性により SMe 基を脱離させることで、一気に **GAF** の保護体 **4** を得るものである。



検討の結果、下図に示すように PMB 基を保護基としたデヒドロメチオニン保護体 **5** のアセトニトリル溶媒に対し、PMB 基を保護基としたヒドロキサム酸 **6**、$Hg(BF_4)_2$、DIPEA を一当量ずつ用い室温で一晩反応させる条件が良いことがわかった。現段階では本反応の収率は３割程度であるものの、新規反応を開発しＬ－メチオニンから３工程で **GAF** の PMB 保護体 **7** を得ることに成功した。今後は、保護基の除去を行い **GAF** の全合成と達成し、さらに **GAF** の各種類縁体の合成による更に優れた除草剤候補化合物の創製を行う予定である。



1. Gary M. Banowetz *et al*, *J. Nat. Prod.*, **2010**, *73*, 1853-1857.

total synthesis, herbicide, germination arrest

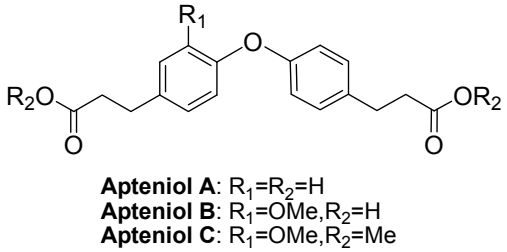
講演番号：2C25p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ C 校舎 25 会場

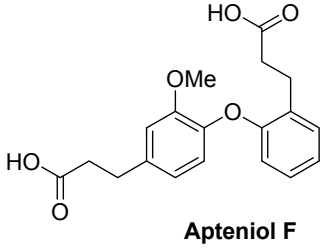
Apteniol 類の構造に関する研究

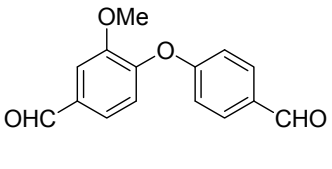
Synthetic studies of apteniols

○西川 耀[1]、野下 俊朗[2]、大内 秀一[3]、木立 由美[3]、岡本 泰輔[4]、齊藤 安貴子[4] ([1]県立広島大院生命、[2]県立広島大生命環境、[3]青森大薬、[4]大阪電通大工)
○Hikaru NISHIKAWA[1], Toshiro NOSHITA[2], Hidekazu OUCHI[3], Yumi KIDACHI[3], Taisuke OKAMOTO[4], Akiko SAITO[4] ([1]Pref. Univ. of Hiroshima, [2]Pref. Univ. of Hiroshima, [3]Aomori Univ., [4]Osaka Electro-Communication Univ.)

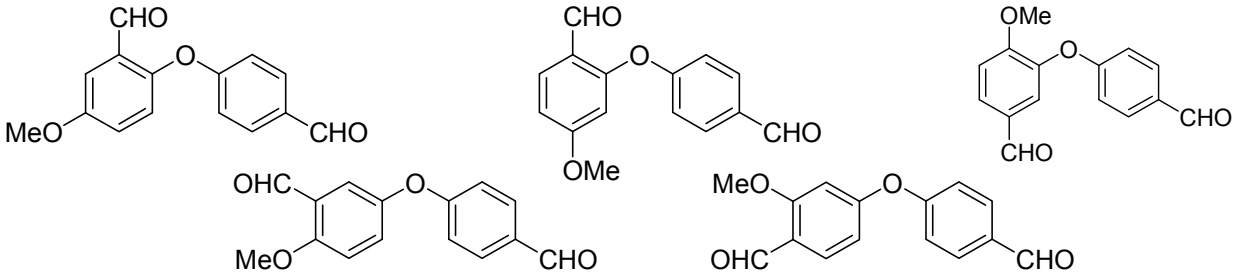
【目的】*Aptenia cordifolia* は南アフリカ原産の多肉植物であり、本植物から単離された apteniol 類はジアリールエーテル型オキシネオリグナンである。Apteniol 類はこれまでに A-G までの 7 種類が単離構造決定されており、いずれも植物種子発芽抑制活性を持っていることが報告されている。[1) 2)] 2012 年、我々は下に示す apteniol A, B, C, F, G として報告されている構造の化合物を合成したが、それらはいずれも天然物の NMR データとは一致しなかった。そこで、apteniol 類の真の構造を明らかにすることを目的として、報告されている apteniol 類の異性体の合成を行った。







【方法・結果】まず、最も構造の簡単な apteniol G の構造の訂正を試みた。Apteniol G は天然物の NMR データより、1,2,4-三置換ベンゼンと 1,4-二置換ベンゼンからなるジアリールエーテルであることが推定される。そこで、Ullmann エーテル合成により、下に示す置換様式の異なる 5 種の異性体を合成した。得られた 5 種の化合物の機器分析のデータと天然物のデータの比較について現在検討中である。また、他の apteniol 類についても下記ジアルデヒドを原料に Horner-Wadworth-Emmons 反応で増炭して合成し、その構造について検討を行っていく。



1) M. DellaGreca *et al*, *Tetrahedron* **2005**, 61,11924-11929
2) M. DellaGreca *et al*, *Chem. Biodiv.* **2007**, 4,118-128

Apteniol, oxyneolignan, Ullmann ether synthesis

講演番号：2C25p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ C 校舎 25 会場

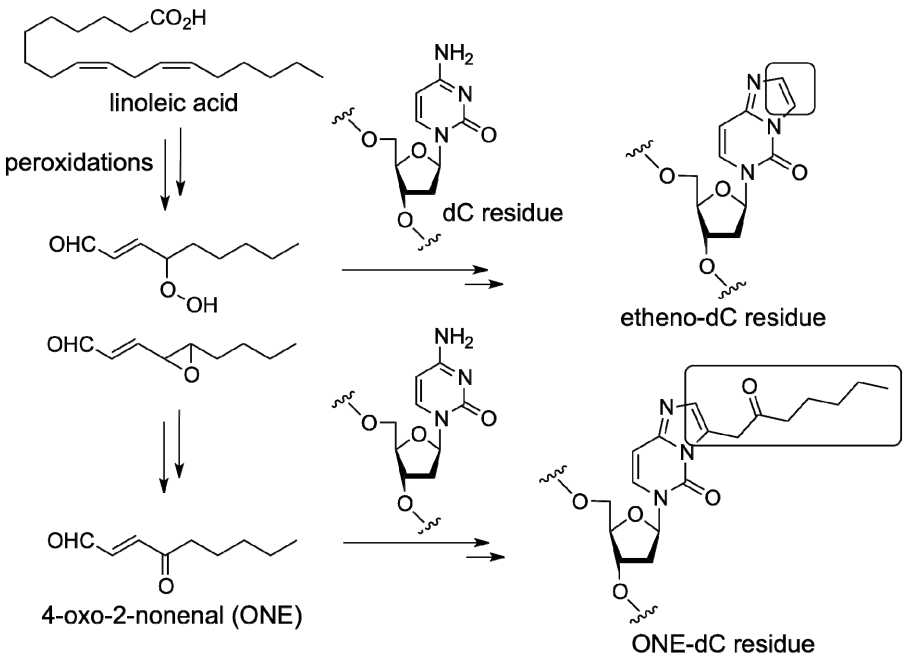
脂質酸化物による DNA 付加体とそのアミダイト体の合成

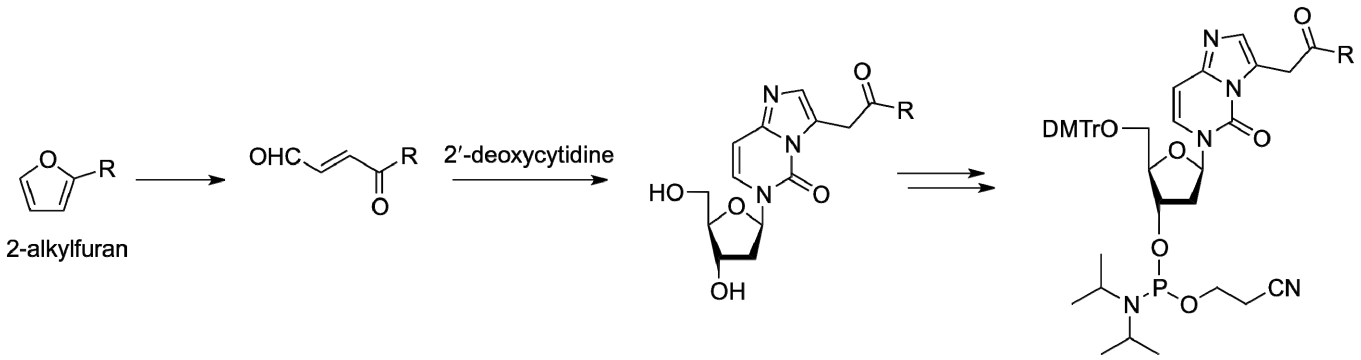
Syntheses of lipid peroxidation-derived DNA adducts and their phosphoramidites for the estimation of the activities of mammalian base excision repair enzymes

○松島 芳隆[1]、記野 順[1]、後藤 正憲[2]、新村 和也[2]、椙村 春彦[2] ([1]浜松医科大学・化学、[2]浜松医科大学・腫瘍病理学)

○Yoshitaka Matsushima[1], Jun Kino[1], Masanori Goto[2], Kazuya Shinmura[2], Haruhiko Sugimura[2] ([1]Hamamatsu Univ. Sch. of Med., Chemistry, [2]Hamamatsu Univ. Sch. of Med., Tumor Pathology)

DNA は活性酸素により酸化的損傷を受けることが広く知られているが、脂質酸化で生じる過酸化脂質との反応によっても損傷を受ける。その際生じた DNA 付加体(adducts)は突然変異を誘発することが多く、さまざまな臓器において発がんを引き起こすと考えられている。最近、ヒト発がん予測指標の確立を目指して、DNA 付加体の網羅的解析たる「DNA アダクトーム解析」が提唱されている。しかし、それらと塩基除去修復酵素との関係など多くは未解明である。我々はこれら DNA 付加体に対するヒト塩基除去修復酵素（MYH、OGG1、NTH1、NEIL1、SMUG1、UNG、TDG など）の活性を調べ、その修復経路を明らかにすることを目的として、特に脂質酸化物に由来すると考えられている付加体を含む DNA オリゴマーを基質として手に入れるため、各種 DNA を合成し、そのアミダイト体への変換反応を行った。その結果について詳細に報告する。





DNA adductome, DNA adduct, synthesis

講演番号：2C25p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ C 校舎 25 会場

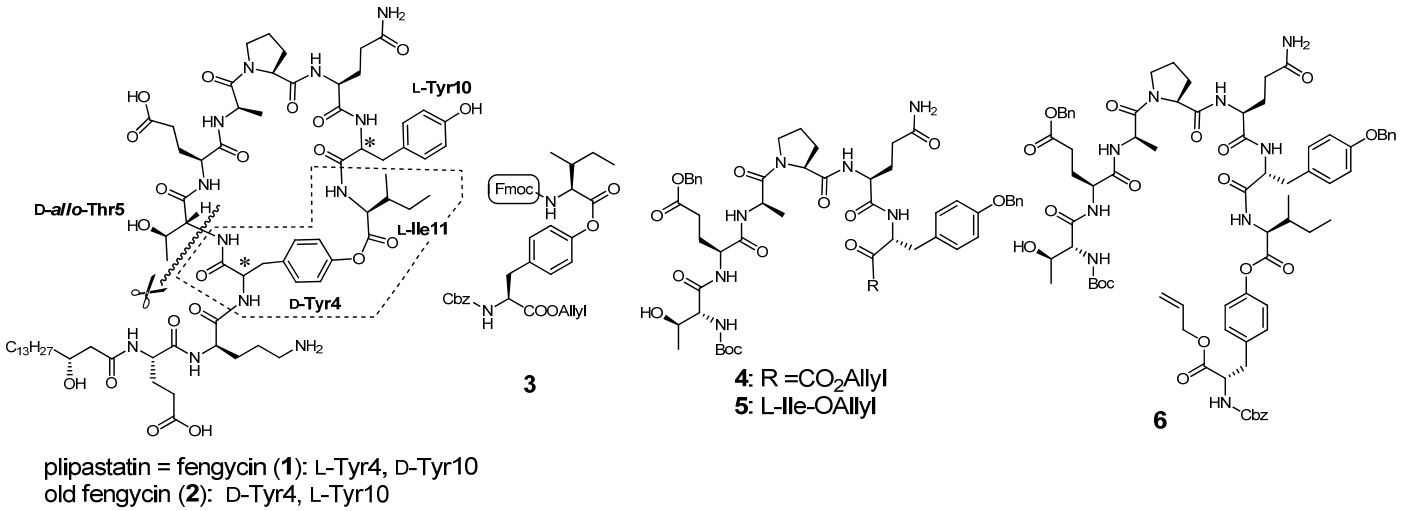
旧 fengycin 構造の合成研究

Synthetic studies on old-fengycin

○六車 美沙、本間 美保、橋本 勝（弘前大学農学生命）
○Misa ROKUSYA,Miho HOMMA,Masaru HASHIMOTO (Hirosaki Univ.)

B. cereus、*B. subtilis* それぞれ生産する fengycin IV 及び plipastatin A1 は同じ構成アミノ酸を有した環状デプシペプチドである。そのスペクトルは明らかに異なっており、これまでそれぞれジアステレオマーと考えられてきた。我々は最近、plipastatin A1 は fengycin IV のカリウム塩で同じ構造を有しており、plipastatin A1 として提唱されている L-Tyr4-D-Tyr10 異性体 **1** に収斂されることを報告した [1]。旧来の fengycin の構造（D-Tyr4-L-Tyr10 異性体 **2**）を合成し、そのスペクトルを比較すれば、これを最終的に確認することができると期待し、**2** の合成を計画した。

2 は不安定なフェノール水酸基によるラクトン環を有しており、これの導入時期・方法が合成の鍵となる。一般にペプチド化は、エステル化に比べ反応が早いことから、当初、先に Tyr 残基とのエステルを導入したユニット **3** をペプチド **4** に組み込むルートを計画した。しかし、**3** の Fmoc 基の除去と同時にエステル結合が切断される、即ち、フェニルエステル近傍に求核基が生じないルートの必要性が判明した。以上の結果をもとに Tyr4/*allo*-Thr5 間で環構造を構築することとし、**5** を合成し、これに Tyr4 部フェノール性水酸基と結合させ **6** を得た。現在、**6** の合成条件の最適化、環化、及び脂肪鎖-Glu-Orn 部の結合を検討している。



1. M. Honma, K. Tanaka, K. Konno, K. Tsuge, T. Okuno, M. Hashimoto, *Bioorg. Med. Chem.,* 20, 3793 (2012).

fengycin/plipastatin, depsipeptide, synthesis

講演番号：2C25p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ C 校舎 25 会場

抗 HIV 活性を有する homophymine A の合成研究：異常アミノ酸部の合成

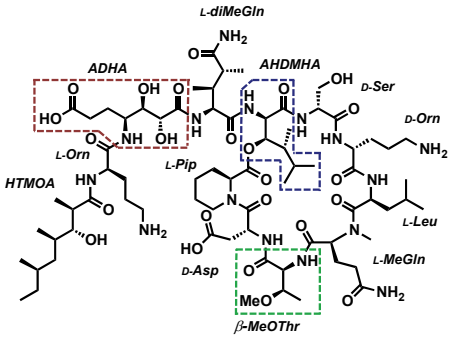
Synthetic study of homophymine A with an anti-HIV activity：synthesis of unusual amino acids

○武田 祥、米田 翔、菊池 真理、今野 博行（山形大院理工）
○Sho TAKEDA,Kakeru MAITA,Mari KIKUCHI,Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ.)

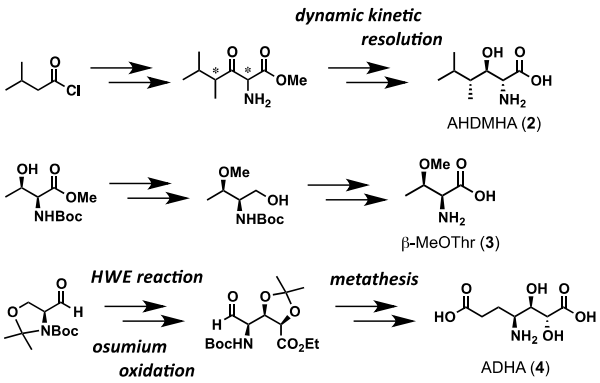
【目的】抗 HIV 活性を有する異常アミノ酸含有環状デプシペプチドとして 2008 年に海綿 *Homophymia* sp. から単離，構造決定された homophymine A (**1**)が知られている [1]. **1** は，抗 HIV 活性（IC_{50}=75 nM）ならびに細胞毒性（TC_{50}=1.19 μM）を示し，他の抗 HIV 活性を有する類似ペプチドと比較して β-MeOTyr を唯一有していないという特徴がある.

我々は，ヒト T 細胞上に存在するケモカインレセプターCCR5 に対して阻害能を有する **1** をリード化合物として挙げ，その全合成ならびに構造活性相関研究によって新規 CCR5 阻害剤の創製を目的としている. そこで，**1** の全合成に向け，今回は環状部分の構成成分である 2-amino-3-hydroxy-4,5-dimethylhexanoic acid (AHDMHA, **2**)および β-methoxythreonine (β-MeOThr, **3**)，そして鎖状部分のアミノジオール誘導体である 4-amino-2,3-dihydroxy-1,7-heptandioic acid (ADHA, **4**)の合成を検討した.

【方法と結果】**2** は出発原料にイソバレリルクロリドおよびグリシンメチルエステル塩酸塩を用い，転位反応や Ru-BINAP 触媒を用いた不斉還元を鍵反応として用いて合成を検討した [2]. また，**3** は保護 L-Thr に対し水酸基をメチルエステル化し，数工程で導いた. 一方で **4** は L-Ser から導かれる Garner's アルデヒドを出発原料として Horner-Wadsworth-Emmons(HWE)反応，ジアステレオ選択的なオスミウム酸化，さらにオレフィンメタセシス反応などを用いて合成を行った.



homophymine A (**1**)



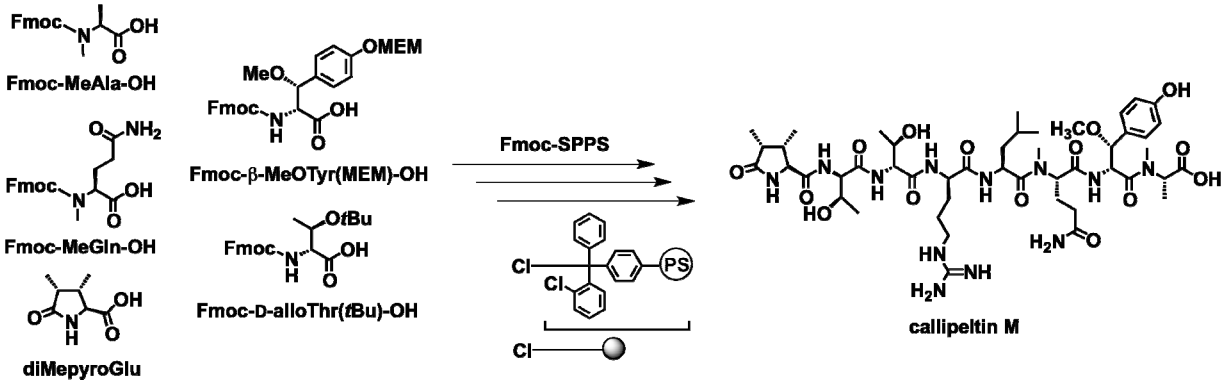
1) Zampela, A., *et al. J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5319-5327.
2) Makino, K., *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 882-884.

homophymine, unusual amino acid, stereocontrolled synthesis

講演番号：2C25p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ C 校舎 25 会場

異常アミノ酸含有直鎖オクタペプチド callipeltin M の固相全合成
Solid phase total synthesis of callipeltin M
○菊池 真理、今野 博行（山形大院理工）
○Mari KIKUCHI,Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ.)

【目的】 Callipeltin B は海綿 *Callipelta* sp. から単離された異常アミノ酸含有環状デプシペプチドであり, 抗 HIV 活性並びに抗腫瘍活性を有することから阻害剤創製のリード化合物としての可能性を持つ. Callipeltin B の環化前駆体 callipeltin M は 2007 年に Zampella らによって海綿 *Latrunculia* sp. から単離・構造決定され, その構成アミノ酸は callipeltin B のものと一致することが明らかになっている [1]. しかし, callipeltin M の全合成例ならびに詳細な生物活性は未だ報告されていないことから, 今回, 固相全合成を検討した.
【方法と結果】2-クロロトリチル樹脂上で, Fmoc 固相合成法を用いて *C* 末端より組み立てることにした. はじめに, 構成する 8 つのアミノ酸のうち異常アミノ酸 Fmoc-L-MeAla-OH, Fmoc-L-MeGln-OH, Fmoc-D-β-MeOTyr(MEM)-OH, Fmoc-D-alloThr(*t*Bu)-OH, L-diMepyroGlu-OH をそれぞれ合成した. これらを用い, 樹脂上で PyBOP/HOBt または COMU/HOAt をカップリング剤に用いて縮合し, 保護 callipeltin M を得た. 樹脂から切り出した後 TFA:CH_2Cl_2=1:3 の条件 [2] で側鎖保護基を脱保護することで callipeltin M の最初の固相全合成を達成することができた. 一方, 樹脂から切り出した粗ペプチドの分析から, 副産物が生成がすることがわかった (目的物:副産物=6:1). そこで構造解析を行った結果, β-MeOTyr 部位が β-Ala で置換されたペプチドであった. これらの詳細について報告したい.



[1] D'Auria, M. V., Sepe, V., D'Orsi, R., Bellotta, F., Debitus, C., Zampella, A. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 131-140.
[2] Kikuchi, M., Nosaka, K., Akaji, K., Konno, H. *Tetrahedron Lett*., **2011**, *52*, 3872-3875.

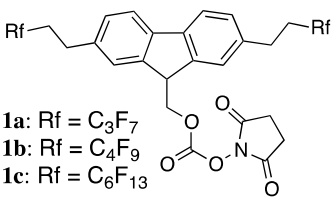
callipeltin, solid phase peptide synthesis, unusual amino acid

講演番号：2C25p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ C 校舎 25 会場

フルオラス Fmoc 試薬を用いる ACE 阻害活性ペプチド類縁体のミクスチャー合成

Mixture Synthesis of ACE Inhibitor Peptides Using Fluorous Fmoc Reagents

○廣瀬 正樹、松井 純子、塩入 孝之、濱本 博三、松儀 真人 (名城大農)
○Masaki HIROSE,Junko MATSUI,Takayuki SHIOIRI,Hiromi HAMAMOTO,Masato MATSUGI (Meijo Univ.)

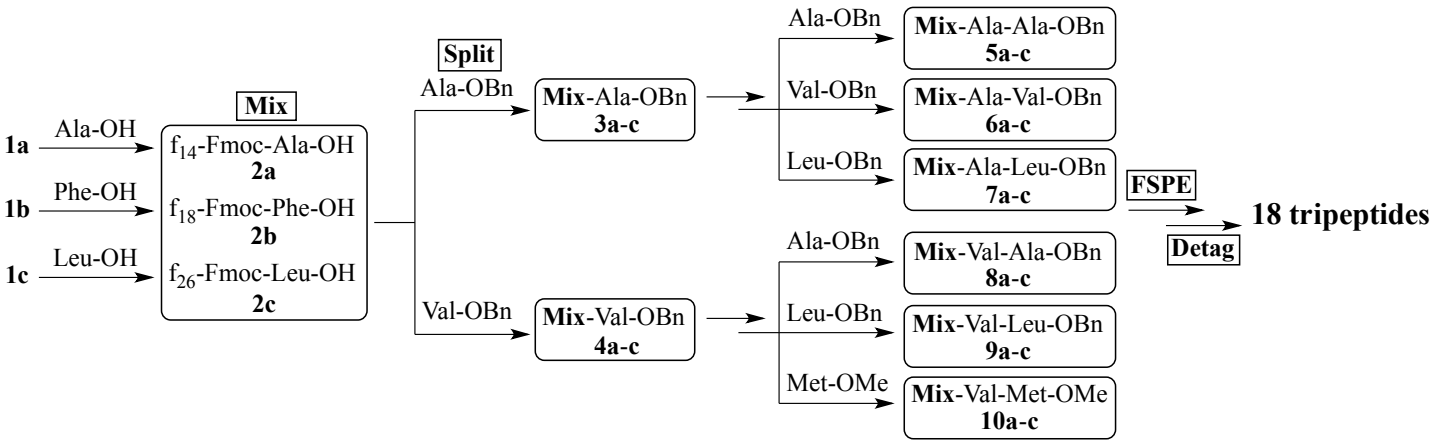


fluorous Fmoc reagents

【目的】 含フッ素化合物はフッ素含有量の違いに基づき、 Fluorous Solid Phase Extraction: FSPE [1] により簡便に分離できる。したがって、フッ素含有量の異なる Fmoc 試薬 (f-Fmoc 試薬) [2] **1a-c** を用いて異なるアミノ酸を保護した後、スプリット型ミクスチャー合成を行えば、構造決定を伴ったペプチドの液相コンビナトリアル合成 (Fluorous Mixture Synthesis) [3] が可能になると考えられる。今回我々はモデル実験として、構造の異なる単純なトリペプチド 18 種類をターゲットとした f-Fmoc 試薬を用いるミクスチャー合成を試みた。

【方法・結果】 まず f-Fmoc 試薬 **1a-c** を用いてそれぞれ異なるアミノ酸の保護を行い、保護体 **2a-c** とした後、これらを混合して 2 等分し、各種アミノ酸 (Ala-OBn, Val-OBn) と縮合することでジペプチド体の混合物 **3**, **4** を得た。続くベンジル基の脱保護を経て、得られた化合物群をそれぞれ 3 等分して異なるアミノ酸との縮合を行い、トリペプチド体 18 種類のライブラリー **5-10** を合成した。**5-10** をそれぞれフルオラス HPLC [3] にて分取したところ、フッ素含有量の少ない化合物から順に分離でき、各種トリペプチド体を単一で得た。最後に各化合物の f-Fmoc 基の脱保護を行い、目的とする 18 種類のトリペプチド体を一挙に合成することができた (**Scheme 1**) 。

Scheme 1



1) Matsugi, M. et al. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1636. 2) Matsugi, M. et al. *QSAR Comb. Sci.* **2006**, *25*, 713.
3) Curran, D. P. et al. *Science* **2001**, *291*, 1766.

peptides, Fluorous Mixture Synthesis, fluorous Fmoc reagents

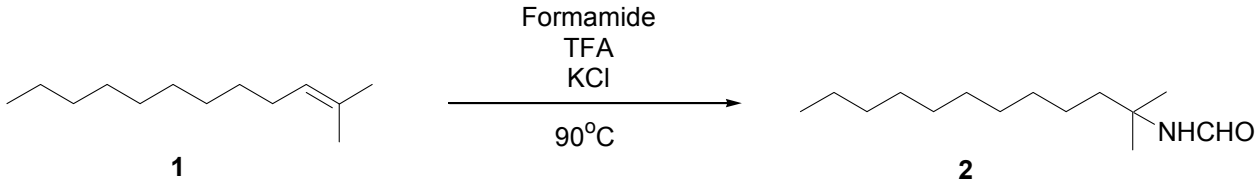
講演番号：2C25p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ C 校舎 25 会場

アルケンからのアミド化合物の求核付加反応による N-置換アミド化合物の合成

Synthesis of N-substituted amides from alkenes with amides by nucleophilic addition reaction

○見原 果林、岡田 郁、千葉 一裕、北野 克和（東農工大院農）
○Karin MIHARA,Iku OKADA,Kazuhiro CHIBA,Yoshikazu KITANO（Tokyo univ. of Agric. and Technol.）

【目的】アミド化合物は、医薬品や機能性材料の原料として利用されることなどから、重要な化合物の一つである。アミド化合物の合成法の一つとして Ritter 反応があるが、N-置換ホルムアミドを得る場合には、毒性の高いシアン化合物を用いる必要がある。アミド化合物の中でも、N-置換ホルムアミドは、その脱水生成物であるイソニトリルが、Ugi 反応や Passerini 反応などの多成分反応の基質として用いられること、また、付着阻害活性、抗マラリア活性等の生理活性を示すことから、特に有用な化合物である。そのため、有毒なシアン化合物を用いずに、ホルムアミドを直接求核剤として、N-置換ホルムアミドを合成する方法の開発が望まれている。これまでに当研究室では、三級アルコールやアルケンを基質として、ブレンステッド酸とホルムアミドを用いた、N-置換ホルムアミドの合成法を構築してきた。しかしながら、アルケンからの合成については、まだ詳細な検討はなされていなかった。そこで本研究では、アルケンへの求核付加反応による、N-置換ホルムアミドを含めたアミド化合物の合成法をさらに詳しく検討することとした。
【方法と結果】ホルムアミドとブレンステッド酸を用いて、アルケンを対応するホルムアミドへと変換する方法を検討した。これまでの検討において、ホルムアミドとブレンステッド酸の比率、種類、および反応温度についてはすでに検討されていた。そこで本研究では、ホルムアミドとブレンステッド酸の当量数、また、アルカリ金属塩の添加による収率の変化を検討した。その結果、2-メチル-2-ドデセン（**1**）にホルムアミド（25当量）、トリフルオロ酢酸（50当量）、塩化カリウム（2当量）を加え加熱することで、目的とする*N*- (2-メチル-2-ドデシル)ホルムアミド（**2**）が高収率で得られた。さらに、種々の官能基を有するアルケンを基質として本反応を行うことによって、様々なアルケンに対して本反応が適応可能であるかを検討した。



1 **2**

alkene, amide, nucleophilic addition reaction

講演番号：2C25p17
講演日時、会場：3 月 25 日 17:12～ C 校舎 25 会場

N-メチル化アミノ酸誘導体の新規合成法

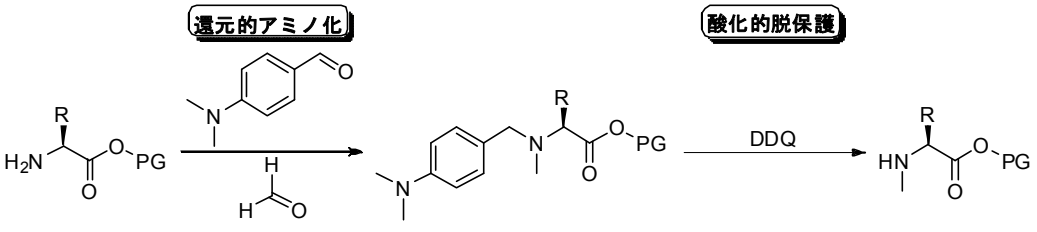
An efficient synthesis of N-methyl amino acid derivatives through redox approach

○上村 和也、菅井 正枝、岡田 洋平、千葉 一裕（東京農工大院農）
○Kazuya KAMIMURA,Masae SUGAI,Yohei OKADA,Kazuhiro CHIBA (Tokyo Univ. of Agric. & Technol.)

【目的】天然の生理活性ペプチドの中にはＮ－メチル化アミノ酸を含むペプチドが数多く存在している. Ｎ－メチル化アミノ酸を含むペプチドでは, 脂溶性が向上することによる膜透過性の改善や, 分子内水素結合ネットワークの変化による酵素耐性の向上など, 物理的及び生化学的特性の変化が見られ, 医薬品としての利用が期待されている. そのため, 効率的なＮ－メチル化アミノ酸の合成法を開発することは医薬品探索という観点からも重要である. これまでに数多くのＮ－メチル化法が開発されてきたが, それぞれの方法に適用できるアミノ酸の範囲や保護基の種類には制限があるため, 構造に応じた多様な手法を確立していくことが重要である. 本研究では、穏和な酸化還元条件でアミノ酸のＮ－メチル化を達成する新規合成法を開発し, 本手法による幅広いアミノ酸のＮ－メチル化, 及びペプチド合成への応用を試みた.

【方法】対応するアルデヒドを用いた還元的アミノ化により, ジメチルアミノベンジル基, メチル基をアミノ酸のアミノ基に導入し, ＤＤＱ酸化によりジメチルアミノベンジル基を切断することによって各種Ｎ－メチル化アミノ酸を得た. メチオニンに関しては, ＤＤＱによる反応後に還元剤であるトリフェニルホスフィンを加えることにより収率の向上が見られた. ペプチドの合成は, 当研究室で開発された疎水性担体を用いる液相合成法によって行った.

【結果】本手法によって, 脂肪族・酸性・塩基性・含スルフィドアミノ酸などの幅広いアミノ酸について, 高い収率でのＮ－メチル化が達成された. 本手法はＦｍｏｃペプチド合成法において頻用されるＢｏｃ, ｔＢｕ, Ｂｎなどの保護基との両立が可能であることが示された. また、メチオニンに関してはＤＤＱ酸化による反応後の収率は低かったものの, 反応後にワンポットでトリフェニルホスフィンによる還元を行うことによって収率の向上が見られた. これはＤＤＱ酸化によって生じたスルホキシド体の還元が起こったことに起因すると考えられる. 発表では, 反応条件やペプチド合成への応用に関して詳細に説明する.



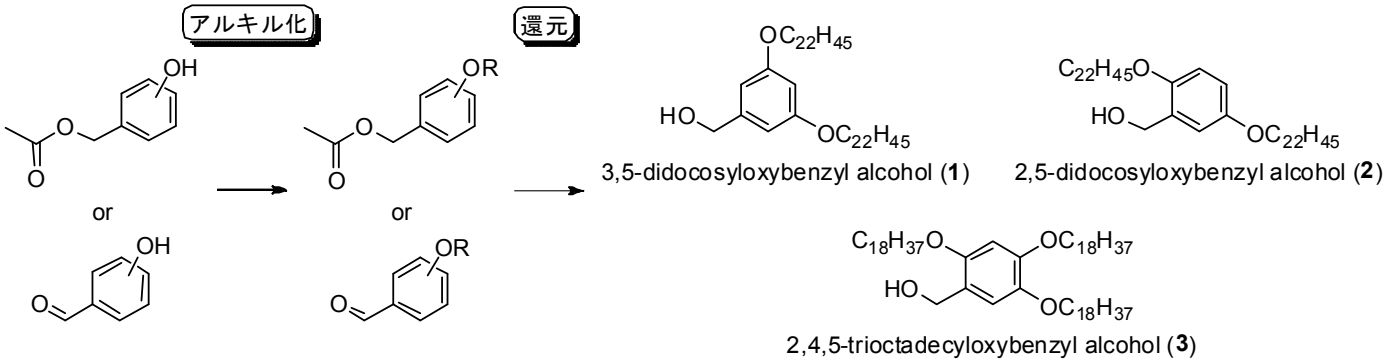
N-methyl amino acid, redox reactions, peptide

講演番号：2C25p18
講演日時、会場：3 月 25 日 17:24～ C 校舎 25 会場

液相ペプチド合成のための疎水性ベンジルアルコールタグの開発
Development of hydrophobic benzylalcohol tag toward liquid-phase peptide synthesis
○若松 弘起、岡田 洋平、北野 克和、千葉 一裕（東農工大院農）
○ Hiroki WAKAMATSU,Yohei OKADA,Yoshikazu KITANO,Kazuhiro CHIBA（Tokyo Univ.of Agric.&Technol.）

ペプチドはタンパク質への高い親和性や化学合成が容易であることなどから，医薬品候補化合物として広く注目を集めている．ペプチド合成の主流となっている固相法は分離精製操作が簡便であり，自動合成やコンビナトリアル合成を可能にしている．一方で，液相法によるアプローチでは高い反応性が獲得されるとともに,TLCやMSといった従来の分析技術による反応のモニタリングが可能となる．我々の研究室では，疎水性ベンジルアルコールを可溶性タグとして用いた液相ペプチド合成法の開発に取り組んできた．本手法では，タグを導入したペプチドが各反応終了後に沈殿として高純度かつ定量的に回収できるため，カラムクロマトグラフィー等の分離精製操作を挟むことなく数十段階に上る化学反応が実現できる．本研究ではこれらの可溶性タグに新たな機能を付加することを目的とし，置換様式の異なる各種疎水性ベンジルアルコールを調製し，ペプチド合成への応用を試みた．

望みの置換様式を有するフェノール性水酸基を対応するアルキルブロマイドによってアルキル化後，エステルに対して水素化アルミニウムリチウムを，アルデヒドに対して水素化ホウ素ナトリウムを用いて還元することで，各種疎水性ベンジルアルコール 3,5-didocosyloxybenzyl alcohol（**1**），2,5-didocosyloxybenzyl alcohol(**2**)，2,4,5-trioctadecosyloxybenzyl alcohol（**3**）をいずれも 2 段階で効率的に調製することに成功した．アルコキシ基の置換様式によって対応するベンジルカチオンの安定性に大きな影響を与えることから，ここで調製した疎水性タグ **1**-**3** は目的に応じた使い分けが可能であることが示された．発表では，これらの疎水性タグの合成の詳細や，それぞれの物性や沈殿特性などについて報告する．



hydrophobic tag, fluorescence tag, liquid-phase synthesis

講演番号：2C25p19
講演日時、会場：3 月 25 日 17:36～ C 校舎 25 会場

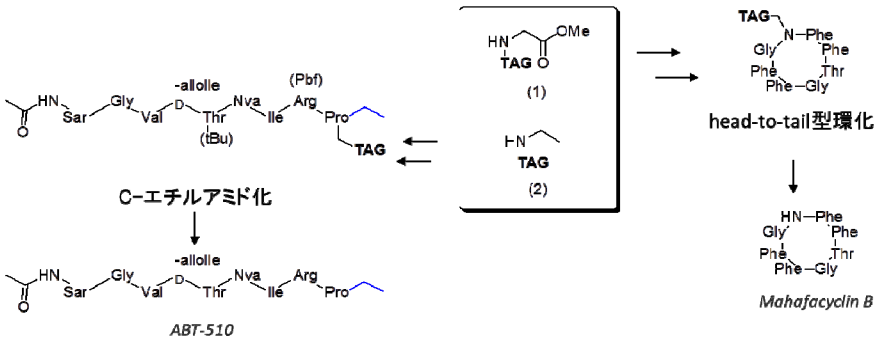
疎水性ベンジルアミンタグを用いたペプチドの head-to-tail 型環化および C 末端アルキルアミド化
Hydrophobic benzylamine tag-assisted head-to-tail cyclization and C-terminal amidation of peptides

○藤田 裕子[1]、藤田 秀司[2]、岡田 洋平[1]、千葉 一裕[1]（[1]農工大農、[2]JITSUBO 株式会社）
○Yuko FUJITA[1], Shuji FUJITA[2], Yohei OKADA[1], Kazuhiro CHIBA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric. and Technol., [2]JITSUBO Co, Ltd)

新たな医薬品候補化合物として，天然型のみならず非天然型ペプチドの合成法ならびに修飾法の開発が大きな注目を集めている．既存のペプチドに更なる機能性を付与する標的部位として N，C 両末端は活性部位への影響が少ないことが期待されるが，現在広く用いられている固相合成法によるアプローチでは，C 末端を支持体へと担持することでペプチドの伸長を行うため，ここへの修飾基の導入は支持体からの切り出し後となり，その効率はペプチドの配列や順序に大きく左右される．このため，支持体とペプチドを繋ぐリンカー部位の構造が広く研究されており，C 末端をアミド体として支持体から切り出すような工夫がなされている．

これまで我々は，長鎖アルコキシ基を 2～3 個持つ疎水性ベンジルアルコール誘導体をタグとして用いたペプチド合成法の開発を進めてきた．この方法では，THF や CH_2Cl_2 などの非極性溶媒を反応溶媒に用いる．TLC や ESI-MS 等で反応終了を確認後 MeOH や CH_3CN 等の極性溶媒を加え沈殿させることで，ろ過によりタグの付いた目的生成物のみを回収する．本法によって，これまで様々な生理活性ペプチドの効率的な液相多段階連続合成に成功している．[1][2]一方で，この方法でペプチド C 末端を修飾するには，従来の固相法と同様に予めタグを除去する必要があり，修飾基の導入が配列に大きく依存してしまう問題を抱えていた．

本研究では，C 末端修飾として主鎖間の環化（head-to-tail 型環化）と C 末端アルキルアミド化を選択し，疎水性タグを除去することなくペプチドの C 末端修飾を行うため，疎水性タグアルデヒドを出発物質としグリシンメチルエステルあるいはエチルアミンを導入したユニット(1)，(2)を基軸とした液相多段階合成を行い，C 末端修飾ペプチドのモデルとして Mahafacyclin B および ABT-510 の合成を達成したので報告する．



[1] G. Tana *et al.*, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 8219-8221
[2] S. Kitada *et al.*, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 4476-4479

hydrophobic benzylamine tag, head-to-tail cyclization, C-terminal amidation

講演番号：2C26a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ C 校舎 26 会場

赤外自由電子レーザー照射によるアミロイド線維のリフォールディング

Refolding of amyloid fibrils through a mid-IR free-electron laser irradiation

○川崎 平康[1]、藤岡 隼[2]、今井 貴之[1]、簗山 光一[1,2] ([1]東理大赤外自由電子レーザー研究セ、[2]東理大院総化)
○Takayasu Kawasaki[1], Jun Fujioka[2], Takayuki Imai[1], Koichi Tsukiyama[1,2] ([1]Tokyo Univ. Science, [2]Tokyo Univ. Science)

[目的] 赤外自由電子レーザー(IR FEL)は、中赤外領域において波長可変かつ直線偏光性を有するパルス性の発振レーザーである。分子に対する IR FEL の照射により、多段階的に光子が吸収され、結合の分解や異性化反応等が引き起こされる（多光子吸収解離現象）。生体物質への IR FEL の応用例では、皮膚や角膜組織からの腫瘍細胞の外科的除去方法として用いられ、FEL 照射に伴うコラーゲンのコンフォメーション変化が報告されている。一方、アミロイド線維は、ベータシートのクラスターからなる強固な立体構造を形成する凝集体であり、アミド I バンドの領域において特徴的な赤外吸収を有する。そこで、IR FEL をアミロイド線維に照射すれば、シート間の水素結合や疎水結合等が影響を受け、リフォールディングが誘起されるのではないかと予想し、酸性条件下で容易にアミロイド線維化するリゾチーム及びインスリンを用いて、IR FEL 照射実験を試みた。
[方法] 20%酢酸中 37°C において NaCl(0.5 M)共存下、chicken egg white lysozyme 及び human insulin(各 2.5 mg/mL)の凝集体を形成させた。遠心回収後沈殿物を水に懸濁し、様々な波数(1000-2000 cm^{-1})で IR FEL を照射した後、KBr-FTIR、IR-SSE を用いる二次構造解析、電子顕微鏡観察、Congo Red(CR)アッセイ、ゲルろ過カラム(SEC)、細菌細胞壁抽出物を用いる酵素活性測定等による解析を行った。FEL 照射方法：2856MHz の熱カソード高周波電子銃を電子源として用い、発振波長 5-10 ミクロンの中赤外領域において、350 ピコ秒間隔のミクロパルスから成るマクロパルス発振(2 マイクロ秒間隔、繰り返し速度:5Hz)により、8-10 mJ/macro-pulse のビームを沈殿試料に直接照射する方法にて実施した。
[結果及び考察] lysozyme 及び insulin の凝集体の FTIR スペクトルでは、アミロイド線維に特徴的なショルダーピークが 1610-1630 cm^{-1} に観測され、シート構造の含有率はどちらも 40-50%であった。一方、1620 cm^{-1} の波数に調整した IR FEL を照射すると、照射時間の経過と共にシート構造の含有率は減少し、約２時間後には両タンパク質共に native とほぼ同様の 10-30%程度まで低下した。CR アッセイ、SEC、電顕画像においても、アミロイド線維の減少結果が支持された。リゾチーム線維の酵素活性は、native 酵素の 30%程度であったが、IR FEL 照射後には 80-90%まで回復した。一方、赤外吸収があまり無い 1100 cm^{-1} または 2000 cm^{-1} での照射では、50-70°C に加熱した場合と同様回復率は 60%程度に留まった。以上の結果を説明するメカニズムとして、IR FEL の照射によりタンパク質自体の熱運動と水分子の拡散が活発化し、シート構造の解離に続いて refolding が促進されるものと考えられる。
[参考文献]T. Kawasaki, J. Fujioka, T. Imai, and K. Tsukiyama, *Protein J.*, 31, 710-716 (2012).

Amyloid fibrils, Free electron laser, refolding

講演番号：2C26a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ C 校舎 26 会場

酵母ミトコンドリアキャリア蛋白質の無細胞合成および膜輸送活性の再構成

Cell-free synthesis and reconstitution of yeast mitochondrial carrier proteins

岡田 有右、○野澤 彰、藤本 竜治、戸澤 譲（愛媛大・無細胞セ）
Yusuke OKADA,○Akira NOZAWA,Ryoji FJIMOTO,Yuzuru TOZAWA (CSTRC, Ehime Univ.)

【目的】我々はこれまでにコムギ胚芽抽出液を利用する無細胞蛋白質合成系を基盤にして、機能型膜輸送体タンパク質の試験管内合成および再構成による輸送活性解析系の開発を進めてきた。今回、この膜輸送体機能解析系を用いて、真核生物の膜輸送体としては最大のファミリーを形成するミトコンドリアキャリアー(MC)を対象として、網羅的な蛋白質合成、ならびにリポソーム再構成系によるMC蛋白質の機能解析を行った。
【方法】研究室の酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）ゲノムに存在する34種全てのMC遺伝子を単離し、コムギ無細胞翻訳用プラスミドにクローニングした。次に、大豆アゾレクチンを構成成分とするリポソームを添加したコムギ無細翻訳系を用いて、34種のMC蛋白質を合成した。続いて、個々の合成MC蛋白質を交換基質が内封されたリポソームと混合し、凍結融解および超音波処理によりMCプロテオリポソームを調製した。RI標識した輸送基質のプロテオリポソーム内への輸送量を液体シンチレーションカウンターにより測定することにより再構成MCの基質輸送活性の解析を行った。
【結果】34種全ての酵母MCについて、リポソーム添加型コムギ無細胞翻訳系による蛋白質合成を確認した。これらの合成MC蛋白質に対し、アゾレクチンリポソーム−MC再構成系を用いてATP/ATP交換輸送活性を測定した結果、4種のMC、AAC1、AAC2、AAC3およびANT1のATP/ATP交換輸送活性を確認できた。ATP/ATP交換輸送の比活性はAAC2が最も高く、続いてAAC3、ANT1、AAC1の順であった。これら4種のMCの基質特異性を解析した結果、AAC1、AAC2、AAC3はATP/ATPもしくはADP/ATPの交換輸送活性を示し、ANT1はATP/ATP、ADP/ATPに加えてAMP/ATPの交換輸送活性を示すことを確認した。これらMCの輸送基質の特異性は、AAC1、AAC2およびANT1に関しては既報の結果と一致しており、報告されていなかったAAC3についてもAAC1およびAAC2と同様の基質特異性を有することを確認した。以上の結果より、無細胞合成・再構成した酵母MC蛋白質は、細胞内と同等な基質選択性を有していることが確認され、この手法に基づく網羅的な生化学的解析により、未解明の基質輸送能を担うMC機能の探索が可能であることが示された。

cell-free protein synthesis, transporter proteins, proteoliposomes

講演番号：2C26a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ C 校舎 26 会場

ヒト Na チャネル蛋白質の無細胞合成および電気生理学的機能解析

Cell-free synthesis and electrophysiological characterization of human Na channel

○山下 展弘[1]、森田 大智[2]、高林 泰斗[1]、野澤 彰[3]、戸澤 譲[3] ([1]愛媛大院理工、[2]愛媛大工、[3]愛媛大・無細胞セ)
○Nobuhiro YAMASHITA[1], Daichi MORITA[2], Taito TAKABAYASHI[1], Akira NOZAWA[3], Yuzuru TOZAWA[3] ([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Ehime Univ., [2]Facul. Eng., Ehime Univ., [3]CSTRC, Ehime Univ.)

【目的】イオンチャネルはあらゆる生物に共通して存在する膜タンパク質であり、その多くが重要な生理的機能を担うことが広く知られている。しかしながら水溶性酵素と異なり膜上で機能し、分子輸送速度が極めて大きいため、機能解析には電気生理学的な手法を要する。中でも平面膜法は 1 分子チャネルのイオン電流測定を可能とし、厳密なイオンチャネルの機能を解析する有効な手段である。我々は、イオンチャネルタンパク質をコムギ胚芽無細胞翻訳系により合成し、さらに精製したタンパク質を平面膜に再構成するシステムを構築し、昨年度の大会で報告した。今回は、約 240kDa の巨大分子量を有するヒト Na チャネルの合成、精製、ならびに再構成系の構築を進め、電圧依存的な Na イオン電流の測定を行った。
【方法】ヒスチジンタグを付加したヒト Na チャネルをベクターにクローニングし、界面活性剤を添加したコムギ無細胞翻訳系にて可溶化合成および TALON カラムによるアフィニティー精製を行った。精製したヒト Na チャネルは大豆由来アゾレクチンからなるリポソームと混合後、界面活性剤除去カラムを用いることでプロテオリポソームとして再構成した。このヒト Na チャネルが組み込まれたリポソームにナイスタチンおよびエルゴステロールを含むリポソームを凍結融解法により融合させ機能解析用のプロテオリポソームを調製した。続いて調製したプロテオリポソームを平板膜と融合させ、観測されたチャネル電流を測定することにより Na チャネル機能の解析を進めた。
【結果】コムギ無細胞系でのヒト Na チャネルの合成条件の検討の結果、mRNA の添加時期および添加量や還元剤の最適化を行うことによりタンパク質の合成量を至適化した。また、精製条件の至適化によりヒト Na チャネルタンパク質の回収率についても改善した。これらのタンパク質合成量および精製効率の至適化条件により、機能解析を行う上で十分量のタンパク質試料を無細胞系にて調製することができるようになった。さらに精製タンパク質とリポソームの質量比を至適化することにより効率的なプロテオリポソーム再構成系を構築した。リポソームに再構成されたヒト Na チャネルの Na イオン輸送活性は、平面膜法により Na イオン電流として検出することができ、複数の電圧条件における電流測定より、電圧依存的な Na チャネル輸送活性を確認した。現在、さらなる電気生理学的な解析を進めるとともに、他のチャネルタンパク質でも本実験で我々が構築したリポソーム再構成系が応用できる否かの確認を進めており、それらの結果を含めて報告する。

cell-free protein synthesis, ion channel, planar lipid bilayer

講演番号：2C26a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ C 校舎 26 会場

昆虫病原性糸状菌 *Nomuraea rileyi* の発芽期に誘導されるタンパク質の解析
Analysis of proteins inducing in germination of emtomopathogenic fungi *Nomuraea rileyi*
○中島 智史[1]、野田 孝博[2]、荒木 朋洋[1] ([1]東海大・農・バイオ、[2]熊本県農研セ)
○ Tomofumi NAKAJIMA[1], Takahiro NODA[2], Tomohiro ARAKI[1] ([1]Dep.of Biosci., Sch. of Agric.,Tokai univ., [2]kumamoto Pref.Agric.Res.Center)

【目的】
昆虫病原性糸状菌の *Nomuraea rileyi* は鱗翅目昆虫の害虫管理法の一つとして期待されている．本菌胞子は寄主昆虫表皮抽出物を添加すると発芽促進することから，発芽促進因子の単離および同定を行った結果，*D-erythro-C14-Sphingosine*(スフィンゴシン)により発芽が促進されることが明らかになった．そこで，本菌の発芽メカニズムを明らかにする目的で,二次元電気泳動を用いたディファレンシャルディスプレイを行い,観察された特異的スポットに対し解析を行った.
【方法・結果】
胞子，発芽菌糸，およびスフィンゴシン誘導発芽菌糸は SMAY 培地を用い培養後 Tween80 水溶液で培地表面を洗うことで懸濁液を調製した．タンパク質の抽出はフェノール法を用い，得られたタンパク質を 2 次元電気泳動に供した．その結果，それぞれ約 600 個のタンパク質スポットが得られ，高回収率でタンパク質を分離することができた．胞子と発芽菌糸の泳動像を比較した結果，発芽菌糸の泳動像に 8 個の特異的スポットが観察された．続いて発芽菌糸とスフィンゴシン誘導発芽菌糸の泳動像を比較した結果，スフィンゴシン誘導発芽菌糸の泳動像に 21 個の特異的スポットが観察された．すなわち，これらのタンパク質が，発芽及びスフィンゴシン誘導発芽に特異的に関与していると推定された．そこで，まずスフィンゴシン誘導で特異的に発現するタンパク質について解析を行った．すなわち,これらのスポットについてトリプシンを用いてインゲル消化を行った.得られた消化物は Zip-Tip 処理後，ナノスプレーで Q-TOF(Quadrupole-Time Of Flight)型質量分析機を用い解析を行った．得られた二価または三価イオンに対し PMF(Peptide Mass fingerprint)解析を行った．その結果，主に微生物由来のタンパク質が同定され，これらのタンパク質がスフィンゴシン誘導発芽菌糸に特異的に発現していることが明らかとなった．また，MS/MS 解析を行い，得られた配列に対し BLAST 解析を行った．その結果，微生物由来の Permease などが同定された．しかし，ほとんどのタンパク質が機能未知であったため，今後さらに詳しく構造解析を行う予定である.

Nomuraea rileyi, entomopathogenic fungi, proteome

講演番号：2C26a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ C 校舎 26 会場

ショウガシステインプロテアーゼの精製及び構造解析

Purification and structural analysis of cysteine proteases from ginger rhizome

○西山 友貴、荒木 朋洋（東海大・農・バイオ）
○Yuki NISHIYAMA,Tomohiro ARAKI (Dep. of Biosci., Sch. of Agric., Tokai univ.)

【目的】近年ショウガから，老化防止や免疫力の向上，殺菌作用，抗がん作用，鎮痛作用など多くの効能があるということが報告されている．また，日本産ショウガから種々の方法によってプロテアーゼが精製され，コラゲナーゼ活性を有することが報告されている．一方海外産ショウガからもシステインプロテアーゼが分離され，プロテアーゼ活性に加え，コラゲナーゼ活性および一次構造が報告されている．さらに，このコラゲナーゼ活性は，切断部位から一つ N 末端側に存在する Pro 残基を認識する特異性を持つことが報告されている．日本産ショウガのシステインプロテアーゼは，一次構造および，切断特異性などの諸性質は明らかになっていない．そこで本研究では，Pro 特異的な制限酵素を得る目的として，試料に日本産ショウガを用いて，システインプロテアーゼの分離および精製を行い，一次構造解析を試みた．

【方法･結果】ショウガシステインプロテアーゼは，まず硫安分画を試みた．すなわちショウガ粗抽出液を調製後，各濃度で硫安分画を行った結果， 40%飽和上清にショウガシステインプロテアーゼの存在を確認した．この画分は，硫安逆透析を行い，DEAE トヨパール陰イオン交換クロマトグラフィーに供した．20mM リン酸緩衝液 pH7.0 と 0.25M NaCl を含む同緩衝液のグラジエント溶出で分離を行った結果， 3 つのピークがプロテアーゼ活性を有することを確認した．これらのピークは， SDS-PAGE を行った結果，29KDa 付近にバンドが存在した． SDS-PAGE で得られたバンドはショウガシステインプロテアーゼであるかを確認するために，ブロッティング後アミノ酸配列分析を行った．その結果，3 つのピークのうち 2 つピークがすでに報告されているシステインプロテアーゼの 2 種と同じ N 末端配列を示した．他の 1 つのピークはこれらとアミノ酸の置換が見出され，新たなプロテアーゼではないかと考えられた．最も高収量で得られたシステインプロテアーゼ P2 画分は，ピリジルエチル化を行い，トリプシン消化を行った．消化物は逆相 HPLC によってペプチドを分離後，アミノ酸組成分析を行い，ショウガシステインプロテアーゼの一次構造を解析した．得られたペプチドについて報告されているシステインプロテアーゼの配列とシステインプロテアーゼ P2 のアミノ酸組成を比較した結果，配列の 47%のペプチドの組成が一致し，組成から推定されたペプチド領域は全体の 97%であった．

ginger, cysteine protease, amino-acid sequence

講演番号：2C26a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ C 校舎 26 会場

GPCR の一種、カイコガ PBAN 受容体の高圧処理による細胞膜からの可溶化効率の向上

High-yield solubilization of Bombyx mori PBAN receptor, a G-protein-coupled receptor, using high hydrostatic pressure

○永田 宏次[1]、片山 幸江[1]、早川 江[1]、鈴木 達也[1]、海老沢 樹[1]、大塚 淳[1]、岡井 公彦[1]、夏目 亮[2]、LO Yu-Hua[2]、千田 俊哉[2]、河合 岳志[1]、永峰 俊弘[3]、栗原 政明[3]、李 載みん[3]、HULL J. Joe[4]、松本 正吾[3]、長澤 寛道[1]、田之倉 優[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]産総研・BIRC、[3]理研・松本分子昆虫学、[4]米農務省農研局・乾燥地研セ)

○Koji NAGATA[1], Yukie KATAYAMA[1], Koh HAYAKAWA[1], Tatsuya SUZUKI[1], Tatsuki EBISAWA[1], Jun OHTSUKA[1], Masahiko OKAI[1], Ryo NATSUME[2], Yu-Hua LO[2], Toshiya SENDA[2], Takeshi KAWAI[1], Toshihiro NAGAMINE[3], Masaaki KURIHARA[3], Jae Min LEE[3], J. Joe HULL[4], Shogo MATSUMOTO[3], Hiromichi NAGASAWA[1], Masaru TANOKURA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]BIRC, AIST, [3]RIKEN, [4]USDA-ARS)

【背景・目的】

膜タンパク質の構造や機能を解析するために、目的膜タンパク質を細胞膜から可溶化（抽出）する操作が必要な場合が多い。膜タンパク質の膜からの可溶化は、通常、膜画分を界面活性剤を含む緩衝液中で分散させることにより行われる。

我々は、カイコガの性フェロモン生合成を司る神経ペプチド PBAN とその受容体（G タンパク質共役受容体（GPCR）クラス A の一種。以下、PBANR と呼ぶ）との複合体結晶構造解析のため、組換え PBANR を昆虫細胞を発現宿主として用いて高発現させ、可溶化、精製、結晶化、結晶構造解析を進めている。

近年、高圧処理による可溶性タンパク質の封入体からの可溶化や巻戻しが報告されており、高圧条件がタンパク質の立体構造形成に有利に働く場合が知られている。本研究では、膜タンパク質 PBANR を界面活性剤を用いて脂質二重膜から可溶化する際に、高圧処理が有効であるかどうかを検討した。

【方法・結果】

昆虫細胞 expresSF+を発現宿主とし、組換えバキュロウイルスを用いて、『 [N 末端] 結晶化用改変 PBANR－TEV プロテアーゼ切断サイト－EGFP－His タグ [C 末端] 』からなる融合タンパク質を発現させた。得られた膜画分を、非イオン性界面活性剤 DDM（n-dodecyl β-D-maltoside）を 1%または 2% (w/v) 含む緩衝液中に分散させ、常圧（0.1 MPa）と高圧（50, 100, 150, 200 MPa）条件下で、室温、1 時間置いた後、遠心上清の SDS-PAGE を行い、EGFP 由来の蛍光強度を計測することにより、可溶化された上記融合タンパク質の定量を行った。また、常圧と高圧条件下で可溶化された融合タンパク質について、TEV プロテアーゼによる切断後、CPM アッセイにより結晶化用改変 PBANR の安定性評価を行った。

200 MPa において可溶化された融合タンパク質の量は常圧下で可溶化されたタンパク質の量の 2.2 倍にも及び、高圧処理により膜タンパク質の可溶化効率が向上することが示された。他の膜タンパク質の可溶化への高圧処理の応用例についても発表する予定である。

high hydrostatic pressure, membrane protein solubilization, PBAN receptor

講演番号：2C26a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ C 校舎 26 会場

シロイヌナズナ由来乾燥・高温ストレス応答転写因子 DREB2A の結晶構造解析
Crystal structure of a plant abiotic stress-responsive transcription factor, DREB2A

○中村 顕[1]、浅野 敦子[1]、宮川 拓也[1]、澤野 頼子[1,2]、佐久間 洋[1]、溝井 順哉[1]、篠崎 和子[1,3]、田之倉 優[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]東京医歯大・教養、[3]国際農研)
○ Akira NAKAMURA[1], Atsuko ASANO[1], Takuya MIYAKAWA[1], Yoriko SAWANO[1,2], Yoh SAKUMA[1], Junya MIZOI[1], Kazuko YAMAGUCHI-SHINOZAKI[1,3], Masaru TANOKURA[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Tokyo Med. Dent. Univ., [3]JIRCAS)

【目的】シロイヌナズナの転写因子である DREB2A は乾燥・高温ストレス条件下で機能発現し、ストレス応答遺伝子群の転写を活性化することで環境ストレス耐性の獲得に寄与している。DREB2A は AP2/ERF ファミリーに属し、類縁タンパク質間で高度に保存された AP2/ERF と呼ばれる DNA 結合ドメインを介して標的遺伝子群のシス配列 DRE/CRT（dehydration-responsive element/C-repeat; A/GCCGAC）へと結合する。DREB2A はまた、同じ AP2/ERF ファミリーの ERF1 タンパク質の認識配列である GCC-box（GCCGCC）にも結合可能であることが知られている。本研究では、DREB2A による DRE および GCC-box の認識機構を解明することを目的として、DREB2A の結晶構造解析を行った。
【方法】構造解析の対象として DREB2A の AP2/ERF ドメインを選択した。このドメインのみを大腸菌で大量発現させ、各種カラムクロマトグラフィーによって精製した。DREB2A AP2/ERF ドメインの結晶は PEG-3350 を主な沈殿剤とする条件で得られ、SPring-8 BL26B2 において最高分解能 2.15 Å の X 線回折強度データを収集した。ERF1 の AP2/ERF ドメイン（GCC-box 結合ドメイン（GBD））の溶液 NMR 構造をモデルとした分子置換法により初期位相を決定し、R_{work}=23.8%、R_{free}=27.4%まで構造精密化した。
【結果・考察】DREB2A AP2/ERF ドメインの結晶構造は、ERF1 GBD の溶液構造と非常に類似しており、主鎖構造（58Cα）の rmsd は 1.1 Å であった。そこで DREB2A AP2/ERF ドメインの立体構造を ERF1 GBD の DNA 結合型構造と重ね合わせることで、DREB2A の DNA 結合モデルを構築した。DREB2A の Val91、Glu96 残基は DNA との結合に重要なアミノ酸残基であり、V91A 変異によって GCC-box 結合能はある程度保持されたまま DRE 結合能が非常に低下し、E96D 変異によって DRE および GCC-box との DNA 結合能が低下することが報告されている。DREB2A の V91 に対応する ERF1 上のアミノ酸残基は Ala であり、近傍に Trp 残基が存在している。一方、DREB2A では V91 の側鎖によって隣接した Trp 残基が押しやられており、この領域に生じた構造的差異により DREB2A は DRE と GCC-box の両方の配列を認識し結合できることが示唆される。DREB2A の E96 およびこのアミノ酸残基に対応する ERF1 上の Asp 残基は、これらのアミノ酸残基が含まれるβ-turn 領域内で主鎖アミド基との水素結合形成に貢献していた。さらに、DREB2A ではこのβ-turn が ERF1 のものよりも一残基短く、β-turn と近傍の Tyr 残基との相互作用があり、このような構造的特徴と併せて E96 残基によりβ-turn の安定化がなされていると考えられる。したがって、E96D 変異を施すとβ-turn の安定性が低下し、DNA 結合に関わる周辺残基、DNA との相互作用界面の安定性へと波及することで、DNA 結合能の低下が引き起こされると考えられる。

crystal structure, stress response, transcription factor

講演番号：2C26a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ C 校舎 26 会場

イネの乾燥ストレス応答に関わる転写因子 OsAREB8 の X 線結晶構造解析

Structural Basis of the DNA Recognition Mechanism by the AREB/ABF Family of bZIP Transcription Factors from Rice (*Oryza sativa*)

○宮園 健一[1]、小浦 翼[1]、薛 友林[1]、窪田 恵子[1]、吉田 拓也[2]、藤田 泰成[3,4]、篠崎 和子[2,3]、田之倉 優[1] ([1]東大院農、[2]東大院農・植物分子生理学、[3]国際農林水産研究センター、[4]筑波大生命)
○Kenichi MIYAZONO[1], Tsubasa KOURA[1], You-Lin XUE[1], Keiko KUBOTA[1], Takuya YOSHIDA[2], Yasunari FUJITA[3,4], Kazuko YAMAGUCHI-SHINOZAKI[2,3], Masaru TANOKURA[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Laboratory of Plant Molecular Physiology, Tokyo Univ., [3]JIRCAS, [4]Tsukuba Univ.)

【背景・目的】植物の有する AREB/ABF ファミリータンパク質は、bZIP ドメインを DNA 結合ドメインとして持つ転写調節因子であり、アブシシン酸シグナル依存的な乾燥ストレス耐性機構において中心的な役割を果たしている。AREB/ABF ファミリータンパク質は、アブシシン酸によって誘導される遺伝子群のプロモータ領域に存在するシスエレメント（ABRE：PyACGTGG/TC）を認識し、下流の遺伝子の発現制御を行う。AREB/ABF ファミリーの有する bZIP ドメイン（AREB/ABF 型 bZIP ドメイン）の DNA 結合領域には、他の bZIP ドメインには見られない特徴的な Ser 残基が保存されているが、その残基が AREB/ABF 型 bZIP ドメインの塩基認識機構にどのように寄与しているかは明らかにされていない。そこで、AREB/ABF 型 bZIP ドメインと ABRE 配列を含む二本鎖 DNA の複合体構造を X 線結晶構造解析法により決定し、その構造基盤の解明を行った。
【方法・結果】イネ由来 AREB/ABF ファミリータンパク質 OsAREB8 の bZIP ドメインを大腸菌の発現系を用いて大量調製し、ABRE 配列を含む 14bp の二本鎖 DNA と共結晶化実験を行ったところ、MPD を沈殿剤とする条件で OsAREB8-DNA 複合体の結晶が得られた。放射光施設 Photon Factory の AR-NW12A ビームラインにて X 線回折実験を行ったところ、3.65Å分解能の X 線回折データを取得でき、分子置換法によりその構造を決定することに成功した。
構造解析の結果、OsAREB8 の bZIP ドメインは、三つのロイシンジッパーリピートと、二つの水素結合、二つの塩橋によって二量体を形成しており、他の bZIP ドメインと同様に二つのプロトマーの間で DNA と結合していた。二本鎖 DNA 中の ABRE 配列は、5 つの残基（Arg248、Asn252、Ser255、Ala256、Arg260）によって認識されており、その中でも Arg248 と Asn252 が塩基認識機構において重要な役割を果たしていた。一方、AREB/ABF 型 bZIP ドメインに特徴的な Ser 残基（Ser255）は、塩基との間の水素結合形成などは見られず、ABRE 配列認識に対する寄与は少ないと予想された。Ser255 の重要性を調べるために Ser255Ala 変異体を作製し、その DNA 結合力をゲルシフトアッセイによって確認したところ、Ser255Ala 変異体は ABRE 配列に対する結合力は変化しないものの、他の塩基配列に対し結合活性を示すようになった。AREB/ABF 型 bZIP ドメインに保存されている Ser 残基は、配列特異性の向上に用いられているわけではなく、他の配列への非特異的な結合を抑制するために利用されていることが示唆された。

crystal structure, transcription factor, stress response

講演番号：2C26a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ C 校舎 26 会場

放線菌の転写調節因子 AdpA と DNA の相互作用および立体構造解析

Crystal structure of AdpA, the central transcriptional factor in the filamentous bacterium, in complex with duplex DNA

○姚 明東[1]、大塚 淳[1]、宮園 健一[1]、永田 宏次[1]、堀之内 末治[2]、大西 康夫[2]、田之倉 優[1]（[1]東大農生科応生化、[2]東大農生科応生工）
○Mingdong YAO[1], Jun Ohtsuka[1], Ken-ichi Miyazono[1], Koji Nagata[1], Sueharu Horinouchi[2], Yasuo Ohnishi[2], Masaru Tanokura[1] ([1]Dept. of Appl. Biol. Chem.,Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

[背景と目的]
放線菌は二次代謝によって医薬品などの有用物質を生産することが広く知られている。放線菌の一種である *Streptomyces griseus* 由来の転写因子 AdpA はその形態分化と二次代謝を司るグローバルな転写因子であり、500 以上の遺伝子の転写を直接制御することが示されている。AdpA は 10 bp 長のコンセンサス配列を認識し、DNA に結合することが明らかにされているが、保存傾向の強い塩基はそのうちの 2 塩基のみであり、同じファミリーに属する転写因子と比較して配列特異性が低いという興味深い性質を有している。我々は、AdpA の DNA 結合ドメインと DNA の複合体の結晶構造を決定し、AdpA による転写調節機構を原子レベルで解明することを目的とした。
[方法と結果]
AdpA の DNA 結合ドメインの大腸菌による発現、カラムクロマトグラフィーによる精製、標的 DNA 断片との混合、及び結晶化実験を行った結果、AdpA－DNA 複合体の結晶を得ることができた。2.9 Å 分解能の回折データを取得し、複合体の結晶構造を分子置換法によって決定することができた。結晶構造から AdpA の特徴である認識配列特異性の低さを説明することが可能であった。すなわち、10 bp のコンセンサス配列のうち、保存傾向の強い 2 つの塩基のみが AdpA の DNA 結合ドメインのアミノ酸残基によって認識されていることが結晶構造から示された。また、AdpA の塩基配列特異性を確認するため、AdpA と DNA の相互作用解析を行った。その結果、保存傾向の強い 2 つの塩基との相互作用の両方が、AdpA と DNA の間の強固な結合に必須であるということが明らかとなった。AdpA が有する 2 つの DNA 結合モチーフ（HTH ドメイン）のうち、一方のみ（N 末端側）が塩基の認識に関わり、もう一方（C 末端側）は塩基を認識せずリン酸基だけを認識し、塩基配列に依存せず DNA との結合力を高めていることが示唆された。AdpA に結合する DNA 分子が湾曲していたことから、過去に提唱されていた AdpA が DNA に結合することで DNA の高次構造が変化するというモデルを支持する結果であった。

transcriptional factor, DNA-binding domain, consensus sequence

講演番号：2C26a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ C 校舎 26 会場

細菌由来アルギン酸 ABC トランスポーターの立体構造と基質輸送

Crystal structure and substrate import of bacterial alginate ABC transporter

○丸山 如江、金子 あい、三上 文三、橋本 渉、村田 幸作 (京大院農)
○Yukie Maruyama,Ai Kaneko,Bunzo Mikami,Wataru Hashimoto,Kousaku Murata (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景と目的】細菌から動植物に至るまで普遍的に存在する ABC トランスポーターは、ATP の加水分解エネルギーを用いて物質を膜の内外に輸送する膜タンパク質複合体である。グラム陰性 *Sphingomonas* 属細菌 A1 株に見出された ABC トランスポーターは、膜タンパク質（AlgM1-AlgM2 ヘテロ二量体)、細胞質 ATP 加水分解酵素（AlgS-AlgS ホモ二量体）で構成され、ペリプラズムの結合タンパク質（AlgQ1, AlgQ2）依存的に酸性多糖であるアルギン酸を取り込む。これまでに、アルギン酸輸送 ABC トランスポーターの構造・機能相関を明らかにすることを目的として、組換えタンパク質の発現・精製系を確立し、X線結晶構造解析とプロテオリポソーム再構成系を用いた機能解析を進めてきた。昨年度は複合体（AlgQ2/AlgM1-AlgM2/AlgS-AlgS）の全体構造を決定し、各サブユニット間の接触様式と基質との相互作用に関して報告した。本発表では、結晶構造中の個々のアミノ酸残基を同定し、構造的特徴を明らかにしたので、立体構造と基質輸送との関係について考察を行う。
【方法と結果】メチオニンをセレノメチオニンに置換した AlgM1-AlgM2/AlgS-AlgS を、AlgQ2 およびアルギン酸オリゴ糖存在下で結晶化し、X線回折データを収集した。異常分散法により決定したセレンの位置を目印として、これまでに構築したモデルを改良した。本結晶構造において、AlgM1-AlgM2 は AlgS-AlgS との接触面側（細胞質側）が開いた Inward-facing 構造をとっており、AlgM1-AlgM2 の閉じたペリプラズム領域にはアルギン酸オリゴ糖を捕捉した AlgQ2 が結合していた。つまり本構造は、基質がトランスポーターへと受け渡される前の状態を表していると考えられる。AlgM1-AlgM2 の内部には、膜貫通領域のペリプラズム側に広い空洞が存在した。この内腔の出口は狭く、多数の疎水性アミノ酸残基が配置されていた。大腸菌マルトーストランスポーターの構造（PDB ID, 2R6G）に基づいて、AlgM1-AlgM2 がペリプラズム側で開いた Outward-facing モデル（基質がトランスポーター内部に捕捉された状態）を構築した。このモデルでは、Inward-facing 構造において内腔の出口を形成していた疎水性残基が互いに接触することによって、AlgM1-AlgM2 の細胞質側は完全に閉じていた。一方、アルギン酸が結合すると考えられる AlgM1-AlgM2 の内腔には、荷電性アミノ酸残基が多数存在していた。これは、内腔に荷電性残基をほとんど持たないマルトーストランスポーターと対照的であり、酸性基質であるアルギン酸の選択性に関わっていると考えられる。

Sphingomonas, alginate, ABC transporter

講演番号：2C26a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ C 校舎 26 会場

タイワンカブトムシ由来セリンプロテアーゼ阻害タンパク質オリクチンの変異体解析
Mutational analysis of oryctin, a serine proteinase inhibitor from the coconut rhinoceros beetle, Oryctes rhinoceros

○劉 徳生[1]、鈴木 達也[1]、河合 岳志[1]、堀田 彰一朗[1]、石橋 純[2]、山川 稔[2]、永田 宏次[1]、田之倉 優[1] ([1]東京大学、[2]農生資研)
○DESHENG LIU[1], Tatsuya Suzuki[1], Takeshi Kawai[1], Shoichiro Horita[1], Jun Ishibashi[2], Minoru Yamakawa[2], Koji Nagata[1], Masaru Tanokura[1] ([1]The University of Tokyo, [2]National Institute of Agrobiological Sciences)

【背景・目的】オリクチンはタイワンカブトムシ（*Oryctes rhinoceros*）の幼虫体液から単離された 66 アミノ酸残基のタンパク質で、そのアミノ酸配列は他のタンパク質・ペプチドに対し類似性がない。オリクチンと七面鳥のセリンプロテアーゼ阻害剤の一種オボムコイドインヒビター（OMTKY3）との立体構造類似性に基づき、オリクチンは真核生物由来のキモトリプシン様セリンプロテアーゼと細菌由来のサチライシン様セリンプロテアーゼに対し強い阻害活性を示す Kazal 型セリンプロテアーゼ阻害剤であることが明らかとなった。Kazal 型セリンプロテアーゼ阻害剤の活性部位は Cys^{II} と Cys^{III} の間の 7 アミノ酸残基である。本研究では、オリクチンと他の Kazal 型セリンプロテアーゼ阻害剤の活性部位との配列比較から、Thr13 と Met14 に着目し、オリクチンが阻害活性を示さないトリプシンやトロンビンなどのセリンプロテアーゼを阻害可能な変異体を得ることを目的とした。
【方法】発現プラスミドとして改変 pET-32a(+)プラスミドを、宿主大腸菌として Shuffle T7 を使用し、オリクチン活性部位（-Thr-Met-Asp-Leu-Val-Pro-His-）中の Thr13 と Met14 における点変異体を作製した。各オリクチン変異体のサチライシンおよびトリプシンに対する阻害活性を蛍光基質を用いて評価した。
【結果】オリクチン変異体の阻害活性試験の結果、Met14Arg、Met14Lys 変異体は野生型オリクチンに比べサチライシン阻害活性が低下したが、トリプシンに対し強い阻害活性を示した。Thr13Pro/Met14Arg、Thr13Pro/Met14Lys 変異体もトリプシンに対し強い阻害活性を示したが、サチライシンに対する阻害活性は消失していた。これらの結果から、オリクチンのセリンプロテアーゼに対する特異性が 13 位、14 位のアミノ酸残基より大きく影響を受け、この 2 つのアミノ酸残基の変異により異なる特異性を持ったセリンプロテアーゼ阻害剤を創生できることが明らかとなった。現在、トロンビン阻害活性を示す変異体の作製を進めている。

mutational analysis, oryctin, serine proteinase inhibitor

講演番号：2C26a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ C 校舎 26 会場

新奇セリンプロテアーゼ阻害剤 Oryctin と α-chymotrypsin 複合体の X 線結晶構造解析
Crystal structure of the complex of oryctin, a new protease inhibitor, and α-chymotrypsin.
○鈴木 達也[1]、堀田 彰一郎[1]、石橋 純[2]、山川 稔[2]、永田 宏次[1]、田之倉 優[1] ([1]東大院農、[2]農生資研)
○ Tatsuya SUZUKI[1], Shoichiro HORITA[1], Jun ISHIBASHI[2], Minoru YAMAKAWA[2], Koji NAGATA[1], Masaru TANOKURA[1] ([1]Tokyo Univ., [2]NIAS)

【背景と目的】タイワンカブトムシ（*Oryctes rhinoceros*）は東南アジアを中心とする温暖な地域にのみ生息するカブトムシの一種で、ヤシの害虫として知られており、国内では沖縄、奄美地方などに侵入し生息している。オリクチンはタイワンカブトムシの幼虫体液からの抗菌ペプチドの精製過程で単離された 66 アミノ酸残基のペプチドである。しかし、オリクチン自体には抗菌作用がなく、他のタンパク質やペプチドとアミノ酸配列も類似していないため、機能不明であった。

我々は配列からではなく立体構造から機能に迫ろうと、溶液 NMR 法によりオリクチンの立体構造を決定し、シチメンチョウのセリンプロテアーゼ阻害剤、オボムコイドインヒビター（OMTKY3）と分子の立体構造が似ていることを明らかにし、さらにオリクチンも OMTKY3 同様セリンプロテアーゼ阻害活性を有することを明らかにした。また、オリクチンには C 末端部に OMTYY3 には見られない特徴的な α-ヘリックスが存在し、α-キモトリプシンとの結合モデルにおいて分子衝突を起こすことが示された。

本研究では、オリクチンのセリンプロテアーゼ阻害作用についてより精密に解析するために、オリクチンと α-キモトリプシンとの複合体について X 線結晶構造解析を行った。

【方法と結果】大腸菌を宿主として発現、精製を行ったオリクチンと、市販の α-キモトリプシンを混合し、ゲルろ過により複合体を精製し、蒸気拡散法によりその結晶化を行い、1.8 Å 分解能で複合体の結晶構造を決定した。

この結果から、オリクチンは α-キモトリプシンと結合すると C 末端部のヘリックスの配向が変化し、分子衝突を回避できる構造に変化していることが明らかとなった。また、Met14 が α-キモトリプシンの活性部位に深く入り込んでおり、オリクチンの基質認識機構に深く関わっている可能性が示唆された。本発表では、オリクチンと α-キモトリプシンとの結合モデルと今回得られた複合体構造とを比較し、オリクチンによる α-キモトリプシンの認識および阻害機構の詳細について報告する。

serine protease inhibitor, structural analysis of protein complex, *Oryctes rhinoceros*

講演番号：2C26a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ C 校舎 26 会場

水酸化アミノ酸の立体選択的合成に有用なアルドラーゼ（asHPAL）-第一基質複合体の結晶構造決定と変異導入による反応機構解析

Crystal structure determination and mutational analysis of asHPAL, a useful aldorase for the stereoselective synthesis of hydroxyl amino acids, to reveal its reaction mechanism

○郭 琳君[1]、岡井 公彦[1]、間瀬 朋子[1]、Imai Fabiana Lica[1]、永田 宏次[1]、日比 慎[2]、宮川 拓也[1]、小川 順[2]、田之倉 優[1]（[1]東大院農生科・応生化、[2]京大院農・応用生命）
○Linjun Guo[1], Masahiko Okai[1], Tomoko Mase[1], Fabiana Lica Imai[1], Koji Nagata[1], Makoto Hibi[2], Takuya Miyakawa[1], Jun Ogawa[2], Masaru Tanokura[1] ([1]Grad. Sch. of Agric. Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ.)

【目的】
医薬品のうち半数以上は特定の光学異性体のみが有効な活性を示すため、キラル化合物は医薬品原料として極めて重要である。微生物由来酵素を用いたキラル化合物の合成は、有機合成よりも立体選択性が高い場合が多く廃棄物も少ないため、効率的かつ環境に優しい生産手段である。水酸化アミノ酸の一種である(2*S*, 3*R*, 4*S*)-4-hydroxyisoleucine（4-HIL）は、高血糖時のみインスリン分泌を促進する化合物で糖尿病治療薬として期待されている。天然型である(2*S*, 3*R*, 4*S*)-4-HILはフェメグリーク種子から抽出可能であるが、収量が低いため、酵素を用いた4-HILの立体選択的合成法の確立が期待されている。本研究で扱う酵素*Arthrobacter simplex* strain AKU 626由来のアルドラーゼ（asHPAL）は、L-アミノ酸アミノ基転移酵素とのカップリング反応により天然型4-HILを優先的に合成することができる。本研究ではasHPALと基質との複合体の結晶構造解析および点変異体解析から、asHPALの詳細な反応機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】
大腸菌Rosetta(DE3)を宿主とした発現系を構築し、可溶性発現したasHPALを陰イオン交換樹脂を用いて精製後、蒸気拡散法により第一基質存在下で結晶を取得した。得られた結晶について大型放射光施設 Photon FactoryでX線回折データを取得し、分子置換法によりasHPAL-第一基質複合体の立体構造を決定した。その後、反応機構解析のために、複数か所に点変異を導入し活性測定を行った。

【結果】
asHPALは結晶中で6量体として存在しており、各プロトマーは12本のαヘリックスと8本のβストランドから成り、各活性部位には１つのMg^{2+}イオンが結合していた。反応には2種類の基質が必要であるが、第一基質となるピルビン酸または2-オキソ酪酸との複合体について1.6 Å分解能で結晶構造を決定した。この複合体構造を基に第二基質アセトアルデヒドとの相互作用エネルギー解析を行い、立体選択性を決定するアミノ酸残基についての知見を得た。この結果について、点変異導入による検証を進めている。

aldolase, crystal structure, stereoselective synthesis

講演番号：2C26a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ C 校舎 26 会場

ハロアルカンデハロゲナーゼ DatA の立体構造解析
Crystal Structure of the Novel Haloalkane Dehalogenase DatA from Agrobacterium tumefacines C58
○管 立軍[1]、矢吹 秀弥[1]、岡井 公彦[1]、大塚 淳[1]、永田 裕二[2]、田之倉 優[1] ([1]東大院農生科、[2]東北大院生命科)
○LIJUN GUAN[1], Hideya Yabuki[1], Masahiko Okai[1], Jun Ohtsuka[1], Yuji Nagata[2], Masaru Tanokura[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Tohoku Univ.)

[背景および目的]

ハロアルカンデハロゲナーゼ(HLD)は炭素とハロゲンの結合を加水分解的に切断する、ハロゲン化合物分解酵素であり、環境汚染物質のひとつである難分解性のハロゲン化合物の分解に役立つことが期待されている。系統学的に 3 つのサブファミリー(HLD-I~III)に分類される。活性部位は 2 つのドメインの間に存在しており、加水分解反応に必須な catalytic triad と呼ばれる 3 つのアミノ酸残基と遊離ハロゲンの安定化に必須な 2 つのアミノ酸残基から構成される。本研究のターゲットである DatA は *Agrobacterium tumefaciens* C58 由来のハロアルカンデハロゲナーゼで、HLD-II に分類されている。HLD-II では反応産物の遊離ハロゲンイオンの安定化に関わるアミノ酸は Asn と Trp であるが、DatA において Trp に対応する 109 番目のアミノ酸残基は Tyr となっている。現在までに HLA-I、III を含めても Tyr が遊離ハロゲンの安定化に関わるという報告はされていないことから、今後、新たなサブファミリーを構成する可能性もある。

[方法および結果]

DatA の反応機構、特に Tyr109 の意義を明らかにするために、DatA-WT および DatA-Y109W の立体構造を決定し、基質結合モデルの作成および活性測定を行った。その結果、基質特異性を決定する構造基盤が、ハロゲン化炭素と活性残基 Asp108 との間の距離にあることが推測された。また、WT と Y109W の k_{cat} 値に差はなく、Y109W という変異によって K_m 値の減少が見られた。これらの結果より、Y109W において Trp109 は dibromopropane を反応に適した位置で結合させることに寄与していることと、DatA の脱ハロゲン反応において遊離のハロゲンイオンの安定化に関わるアミノ酸残基 Asn43 のみであることが示唆された。

Haloalkane Dehalogenase, Crystal Structure, Enantioselectivity

講演番号：2C26a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ C 校舎 26 会場

Microbacterium sp.58-2 株由来 hydrazidase の X 線結晶構造解析
X-ray crystal structure of hydrazidase from *Microbacterium* sp.58-2
○秋山 友了[1]、石井 美妃[1]、多久和 篤史[2]、佐々木 康幸[1]、老沼 研一[2]、高谷 直樹[2]、矢嶋 俊介[1]([1]東農大院農学科・バイオ、[2]筑波大院・生命環境)
○Tomonori AKIYAMA[1], Misaki ISHI[1], Atsushi TAKUWA[2], Yasuyuki sa[1], Kenichi OINUMA[2], Naoki TAKAYA[2], Shunsuke YAJIMA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Tsukuba Univ.)

【目的】ヒドラジン(H_2NNH_2) は有機合成化学の分野において、還元剤、または反応中間体として重要な化合物である。ヒドラジン誘導体のうち、ヒドラジンとカルボン酸が脱水縮合した構造をもつものをヒドラジド($R_1C(=O)NR_2NR_3R_4$)と呼ぶ。天然のヒドラジド誘導体としてはマッシュルーム *Agaricus bisporus* の有する agaritine が知られている。また isonicotine acid hydrazide は結核の治療薬として有名であるが、ウサギ体内のアミダーゼ酵素活性によって isonicotinic acid と hydrazine に分解されることが示唆されている。しかし、これらの物質の生体における代謝や生合成については未解明な部分が多い。
近年、我々はヒドラジン誘導体のうち、4-hydroxy benzoic acid 1-phenyl ethylidene hydrazide (HBPH)を資化可能な *Microbacterium* sp.58-2 株を単離した。更に、本菌が有するヒドラジド分解活性をもとに、hydrazidase を単離、同定した[1)]。本酵素はアミノ酸配列において既知の amidase と約 30%の相同性を有し、ヒドラジドのアミド結合を加水分解する活性を有していた。
そこで新規 hydrazidase の触媒反応、基質認識機構の解明を目指し X 線結晶構造解析を行った
【方法】大腸菌に発現させた組換体 hydrazidase を Ni アフィニティーカラムとゲルろ過カラムにより精製した。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法で行った。X 線回析実験は高エネルギー加速器研究機構の Photon Factory で行い、分子置換法を用いて初期構造を決定した。
【結果】スクリーニングの結果、複数の条件で結晶が得られた。それらを回析実験に供したところ、*C*2、$C222_1$、*I*4 の三種類の空間群に属する結晶であった。また、$C222_1$ の空間群に属する結晶について 1.6Åの分解能で回析データを収集し、構造解析を行った。全体構造はホモ二量体であり、各サブユニットの基質結合ポケットには Amidase Signature Family で保存されている Ser-Ser-Lys の三残基が活性部位と予想される位置に互いに近接して配置されていた。現在、基質複合体の取得を試みている。
1) 多久和ら、日本生化学会 2011 年度要旨集

X-ray crystal structure, hydrazide, hydrazidase

講演番号：2C26p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ C 校舎 26 会場

酵母 *Kluyveromyces lactis* で異種発現させたサケツバタケ由来レクチンの諸特性
Characterization of a heterologous expressed lectin from *Stropharia rugosoannulata* using yeast *Kluyveromyces lactis*

○阿部 智也[1]、松葉 悠[1]、田代 愛[1]、鈴木 智大[2]、小林 夕香[3]、道羅 英夫[2]、平井 浩文[1]、河岸 洋和[4] ([1]静大農応生化、[2]静大遺伝子、[3]J-オイルミルズ、[4]静大院創造)
○Tomoya ABE[1], Haruka MATUBA[1], Ai TASHIRO[1], Tomohiro SUZUKI[2], Yuka KOBAYASHI[3], Hideo DOURA[2], Hirofumi HIRAI[1], Hirokazu KAWAGISHI[4] ([1]Department of Applied Biological Chemistry,Faculty of Agriculture,Shizuoka University, [2]Genetic Research and Biotechnology,Shizuoka University, [3]J-Oil mills INC., [4]Graduate School of Science and Technology,Shizuoka University)

【目的】
我々は現在までにサケツバタケ（*Stropharia rugosoannulata*）からレクチン（SRL）の単離・精製に成功し[1)]、そのアミノ酸配列および cDNA 塩基配列情報の取得に成功した[2)]。SRL は精製時に約 4 kDa のイソレクチンであると考えられた。しかし、遺伝子情報からおよそ 19 kDa のタンパク質として発現すると示唆された。そこで本研究では、4 kDa の成熟タンパク質の生成メカニズムの解明および更なる機能解析のため酵母 *Kluyveromyces lactis* を用いた異種発現系の構築を目的とした。

【方法・結果】
K. lactis protein Expression kit (NEB) を用い、シグナルペプチドを除いた SRL の cDNA の *C* 末端にエンテロキナーゼ切断部位とヒスチジンタグを付加した配列を *pKLAC2* ベクターに挿入し、発現プラスミドの構築を行った。このベクターを *Sac* II により切断・直線化し、相同組換えにより酵母 *Kluyveromyces lactis* GG799 のゲノムに導入した。窒素源にアセトアミドしか含まない YCB プレートで選抜し、YPGal 液体培地で 30°C 、4 日間培養した。培養上清を HisTrap HP カラムを用いて精製し、トリシン SDS-PAGE および MALDI-TOF-MS で rSRL の精製を確認した。次いで、得られた rSRL を赤血球凝集活性試験に供したところ、レクチン活性を有することが明らかになった。また、*C* 末端に付加したヒスチジンタグをエンテロキナーゼで切断し、トリシン SDS-PAGE に供したところ、目的産物以下の分子量にバンドが複数みられたため、タグを除去したことにより自己消化が起こる可能性が示唆された。現在、得られた自己消化産物の *N* 末端アミノ酸配列の取得や反応条件の検討等、更なる解析を行っている。

1) 田代ら、日本農芸化学会 2009 年度大会講演要旨集, p. 27(2009)
2) 田代ら、日本農芸化学会 2010 年度大会講演要旨集, p. 157 (2010)

lectin, mushroom, *Stropharia rugosoannulata*

講演番号：2C26p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ C 校舎 26 会場

スギヒラタケレクチンの異種発現解析
Heterologous expression of a lectin from *Pleurocybella porrigens*
○大前 沙央理[1]、鈴木 智大[2]、平井 浩文[1]、河岸 洋和[1,3] ([1]静大農・応生化、[2]静大・遺伝子、[3]静大院・創造)
○Saori OMAE[1], Tomohiro SUZUKI[2], Hirofumi HIRAI[1], Hirokazu KAWAGISHI[1,3] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Institute for Genetic Research and Biotechnology, Shizuoka University, [3]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】
スギヒラタケ(*Pleurocybella porrigens*)はキシメジ科スギヒラタケ属のキノコで、北陸、中部、東北地方を中心に食用とされてきたが、2004年9月以降、原因不明の急性脳症が相次いだ。この患者の59名中55名がスギヒラタケを摂取していたことから、スギヒラタケが急性脳症の原因物質であると推定された。我々はこれまでの研究において、スギヒラタケからレクチン(PPL)の単離・精製に成功し、そのアミノ酸配列およびcDNA塩基配列情報の取得に成功している[1)]。また、PPLとスギヒラタケ致死性高分子(B3)を混合するとプロテアーゼ活性を示し、血液脳関門を破壊することを報告している[2)]。さらに、大腸菌にて発現させたrPPLはレクチン活性を示すが、B3と混合してもプロテアーゼ活性を示さないのに対し、担子菌にて発現させたrPPLはレクチン活性を示さないが、B3と混合してプロテアーゼ活性を示さすことがわかっている。そこで本研究では両活性を有するrPPLを取得するため、PPLの様々な異種発現を検討することとした。
【方法及び結果】
これまでに我々は、担子菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株を宿主として、GST 融合タンパク質として rPPL の異種発現に成功している。しかしながら得られた rPPL にはレクチン活性がなかったため、今回は PPL を単独で発現する方法を試みた。*P. sordida* YK-624 株由来 GPD プロモーター･ターミネーター間に細胞外分泌シグナルペプチドおよび His Tag を付加した PPL cDNA を挿入し、発現プラスミドを構築した。本プラスミドおよびマーカープラスミドを *P. sordida* YK-624 株由来ウラシル要求性変異株 UV-64 株に PEG 法を用いて導入し、形質転換体を取得した。
また、酵母 *Kluyveromyces lactis* による異種発現も試みた。*K. lactis* α因子、His Tag を融合した PPL cDNA を p*KLAC2* ベクターに挿入し、発現プラスミドの構築を行った。*Sac* II により直鎖状にしたベクターを相同組み換えにより、*K. lactis* GG799 株のゲノムに導入し、形質転換体を取得した。
現在、それぞれ得られた rPPL の諸特性について解析中である。
1) Suzuki, T., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 13, 100-709 (2009)
2) 鈴木ら、第 52 回天然有機化合物討論会講演要旨集、p. 655

mushroom, *Pleurocybella porrigens*, lectin

講演番号：2C26p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ C 校舎 26 会場

スギヒラタケレクチン（PPL）の糖鎖構造解析
Sugar-chain analysis of *Pleurocybella porrigens* lectin

○荒井 勇人[1]、鈴木 智大[2]、道羅 英夫[2]、平井 浩文[1]、舘野 浩章[3]、平林 淳[3]、小林 夕香[4]、河岸 洋和[1,5] ([1]静大農・応生化、[2]静大・遺伝子、[3]産総研・糖鎖医工学、[4]J-オイルミルズ、[5]静大院・創造)
○Yuto ARAI[1], Tomohiro SUZUKI[2], Hideo DOHRA[2], Hirofumi HIRAI[1], Hiroaki TATENO[3], Jun HIRABAYASHI[3], Yuka KOBAYASHI[4], Hirokazu KAWAGISHI[1,5] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Institute for Genetic Research and Biotechnology, Shizuoka University, [3]Research Center for Medical Glycoscience, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, [4]J-Oil Mills, Inc., [5]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】2004年、東北・北陸地方を中心に原因不明の急性脳症が発生し、患者数は59名に達し、17名の患者が亡くなった。そのうち59例中55名はスギヒラタケ（*Pleurocybella porrigens*）を摂取しており、51名が腎機能障害を持っていた。このことから、スギヒラタケが急性脳症の原因であることが予想されたが、未だその発症機構は不明である。我々は現在までに、スギヒラタケからレクチン(PPL)の単離・精製に成功し、そのアミノ酸配列およびcDNA塩基配列情報の取得に成功しており[1)]、PPLとスギヒラタケ致死性高分子を混合するとプロテアーゼ活性を示し、血液脳関門を破壊することを報告している[2)]。さらに、スギヒラタケエタノール可溶部よりミエリン鞘を構成するオリゴデンドロサイトに毒性を示すpleurocybellaziridineの単離にも成功している[3)]。本研究ではプロテアーゼ活性に糖鎖が関与しているかを明らかにするため、大腸菌、担子菌で発現させたrecombinant PPLとnativeのPPLを用いて詳細な解析を行った。
【方法および結果】大腸菌で発現させたrPPLはレクチン活性を示したが、スギヒラタケ致死性高分子を混合してもプロテアーゼ活性を示さなかったのに対し、担子菌で発現させたrPPLはレクチン活性を示さなかったが、スギヒラタケ高分子を混合するとプロテアーゼ活性を示した。この結果から糖鎖がレクチン活性、プロテアーゼ活性に関与していることが示唆された。次いで、natitveのPPLと担子菌で発現させたrPPLの構成糖分析を行った。Nativeの PPLの構成糖はモル比でGlc:Gal:Man:Xyl:GlcN:GalN=1.2:1.0:10.0:1.8:1.8:3.5であり、担子菌で発現させたrPPLの構成糖はGlc:Gal:Man:Xyl:GlcN:GalN=1.1:2.4:7.8:1.0:2.3:1.1であった。また現在、LC-MS/MS、MALDI-TOF-MSを用いて糖鎖構造の詳細な解析を行っている。

1) Suzuki, T., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 702-709 (2009)
2) 鈴木ら、第 52 回天然有機化合物討論会講演要旨集、p. 655
3) Wakimoto, T., et al., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 50, 1168-1170 (2011)

mushroom, *Pleurocybella porrigens*, lectin

講演番号：2C26p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ C 校舎 26 会場

棘皮動物グミ由来溶血性レクチン CEL-III の細胞膜貫通オリゴマー構造

Transmembrane oligomer structure of the hemolytic lectin CEL-III from the sea cucumber *Cucumaria echinata*

○畠山 智充、郷田 秀一郎、海野 英昭（長崎大院工）
○Tomomitsu HATAKEYAMA,Shuichiro GODA,Hideaki UNNO (Nagasaki Univ.)

【目的】溶血性レクチン CEL-III は，棘皮動物グミ（*Cucumaria echinata*）由来の Ca^{2+}依存性 Gal/GalNAc 特異的レクチンであり，2 つの糖結合ドメイン（ドメイン 1，2）とオリゴマー化ドメイン（ドメイン 3）から成る。CEL-III は，標的細胞表面上の Gal/GalNAc 含有糖鎖と結合後，細胞膜中で自己会合し，6～7 量体のオリゴマーからなる膜貫通ポアを形成し，赤血球に対する溶血活性や培養細胞への細胞毒性を発現する。一方，CEL-III は高 pH，高塩濃度の条件下で特異的糖と結合することにより，細胞膜内で形成されるオリゴマーと類似したオリゴマーを，水溶液中でも形成することがこれまでに明らかになっている。そこで今回，CEL-III の膜貫通ポア形成機構を明らかにすることを目的として，この水溶性オリゴマーの結晶構造解析を行った。
【方法】CEL-III を，pH 10, 1 M NaCl 存在下で，特異的糖である lactulose と結合させることにより水溶性オリゴマーの調製を行った。オリゴマーの結晶は，0.1 M lactulose, 10mM $CaCl_2$, 0.5% n-dodecyl-β-D-maltoside 存在下，30% PEG400, 0.1 M $CdCl_2$, 0.1 M CH_3COOH, pH 4.2 の条件で得られた。放射光を用いてこの結晶の回折実験を行った結果，分解能 2.9Å で回折データが得られ，さらに白金誘導体結晶を用いた重原子同形置換法によって立体構造を決定することができた。
【結果】CEL-III オリゴマーは，ドメイン 1 と 2 が会合することによって形成されたリングの内側にドメイン 3 が会合してできたβバレルから成る 7 量体を形成していた。特にモノマーにおいてドメイン 3 中で 2 つのαヘリックスを形成していた領域が大きくコンフォメーション変化することによって約 75Åのβバレルを形成しており，これが膜貫通ポアとなっているものと考えられた。このような膜内でのβバレル形成は，いくつかの細菌由来膜孔形成毒素とも共通した特徴であることから，CEL-III のオリゴマー構造は細菌毒素の作用機構解明に有用な知見を与えるものと考えられる。また，αヘリックスからβシートへの大きな構造変化は，プリオン病を始めとするコンフォメーション病のメカニズムとも類似しており，それらの解明にも有用な情報を与えるものと期待される。

lectin, hemolysin, carbohydrate

講演番号：2C26p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ C 校舎 26 会場

マガキ由来マンノース特異的レクチンの精製と性質
Purification and characterization of a mannose-specific lectin from the oyster *Crassostrea gigas*
○辻 慶輝、松山 一輝、郷田 秀一郎、海野 英昭、畠山 智充（長崎大院工）
○ Yoshiteru TSUJI, Kazuki MATSUYAMA, Shuichiro GODA, Hideaki UNNO, Tomomitsu HATAKEYAMA (Nagasaki Univ.)

【目的】レクチンは，細胞表面糖鎖と結合することにより血球凝集活性や菌体凝集活性を示し，生体防御因子として働いているものが多いと考えられている。特に，海産無脊椎動物におけるレクチンは，生物種によって多様なものが存在しており，それらの構造と生理的機能については非常に興味が持たれる。今回，マガキ（*Crassostrea gigas*）由来のマンノース結合レクチン（CGL-1）を単離し，その構造と性質について検討した。
【方法】マガキを等重量の緩衝液（pH 7.5, 10 mM $CaCl_2$）で破砕した後に，抽出液から mannose-Cellulofine を用いたアフィニティークロマトグラフィー及びゲルろ過によってレクチンを精製した。その結果，SDS-PAGE で約 90 kDa のバンドを示すレクチン CGL- 1 が精製された。CGL-1 を還元ピリジルエチル化後，リジルエンドペプチダーゼ消化ならびに臭化シアン分解によりペプチドへ断片化し，それらを HPLC によって分離した。得られたペプチドはプロテインシークエンサーによってアミノ酸配列分析を行った。一方，CGL-1 の遺伝子は，マガキから抽出した全 RNA を用いて cDNA を作製した後に，データベースから検索したタンパク質遺伝子配列から設計したプライマーを用いた PCR により増幅をおこなった。一方，CGL-1 の結晶化についても，種々の条件下で行い，得られた結晶について X 線回折実験を行った。
【結果】CGL-1 から得られたペプチドの部分配列をもとにデータベースの検索を行った結果，フチガマアンコウ（*Thalassophryne nattereri*）の魚毒に含まれるタンパク質である natterin-3（35.2 kDa）のレクチン様ドメインとの相同性を有するタンパク質（15.5 kDa）であることが明らかとなった。このタンパク質の遺伝子をもとにプライマーを設計し，マガキ cDNA をテンプレートとして PCR を行ったところ CGL-1 遺伝子を増幅することができた。一方，CGL-1 の結晶化条件をハンギング・ドロップ蒸気拡散法を用いてスクリーニングしたところ，2 種類の中性条件下で 1.7Å の分解能を示す結晶が得られた。

lectin, mannose, *Crassostrea gigas*

講演番号：2C26p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ C 校舎 26 会場

C 型レクチンファミリータンパク質マウス RegIV の大腸菌による発現とその性質

Expression of a C-type lectin family protein mouse RegIV in *Escherichia coli* cells and its characterization

○加藤 裕太、海野 英昭、郷田 秀一郎、畠山 智充（長崎大院工）
○Yuta KATO,Hideaki UNNO,Shuichiro GODA,Tomomitsu HATAKEYAMA (Nagasaki Univ.)

【目的】Regenerating gene タンパク質（Reg）は，C 型レクチンファミリーに属するタンパク質であり，膵臓の再生・増殖を制御する因子として見出された。RegIV タンパク質は消化管で主に発現しており，特に胃がんや大腸がんなどでその発現量が上昇することが知られている。その詳細な生理的役割については不明であるが，RegIV はレクチンとしてマンナン対する親和性を有することが示されている。今回，RegIV の構造と機能を明らかにすることを目的として，マウス RegIV を大腸菌で発現し，得られたタンパク質の性質について検討を行った。

【方法】マウス大腸細胞の全 RNA をもとに cDNA を合成し，マウス RegIV 遺伝子配列から設計したプライマーを用いて PCR により RegIV 遺伝子を増幅した。得られた遺伝子断片を pGEX-6P-3 に挿入後，大腸菌 BL21(DE3)pLysS を用いてグルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）融合タンパク質として発現させた。発現したタンパク質を Glutathione Sepharose 4B カラムを用いて精製した後に，GST 部分をプロテアーゼで切断することによって RegIV タンパク質を得た。得られたタンパク質の粒子直径及び二次構造は，動的光散乱（DLS）及び円二色性（CD）スペクトルより調べた。糖結合活性については，酵母マンナンをポリアミドアミンデンドリマー（PD）表面に結合させた mannan-PD を用いて，結合に伴う光散乱強度の変化及び動的光散乱により測定した。

【結果】大腸菌で GST-Reg-IV 融合タンパク質を発現させた結果，大部分が封入体として沈殿画分から得られたことから，これを塩酸グアニジンで可溶化後，アルギニンを含む緩衝液中でリフォールディングを行った。アフィニティークロマトグラフィーによって精製した融合タンパク質の GST 部分をプロテアーゼで切断・精製後，DLS により粒子直径を測定したところ，約 5nm 付近にピークが認められたことから，単量体であるものと考えられた。一方，CD スペクトルの測定からは，二次構造としてβシート含量が多いことが推定されたが，これはマンナンを加えることにより変化したことから，何らかの構造変化が生じたものと考えられた。mannan-PD との相互作用については，溶液の光散乱強度の変化から測定したところ，結合に伴う散乱強度の上昇が認められた。

lectin, Reg, mannan

講演番号：2C26p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ C 校舎 26 会場

溶血性レクチン CEL-III の糖結合サブドメイン 2β への変異導入による溶血活性の向上

Improvement of hemolytic activity of hemolytic lectin CEL-III by mutagenesis of subdomain 2ß in carbohydrate recognition domain

○上妻 由章、清水 良樹、米倉 政実 (茨城大農)
○Yoshiaki KOUZUMA,Yoshiki SHIMIZU,Masami YONEKURA (Ibaraki Univ. Col. of Agr.)

【目的】Ca 依存性溶血性レクチン CEL-III は、赤血球膜上の糖鎖に結合後、オリゴマー化し、小孔を形成して溶血させる。CEL-III は 2 つの糖認識ドメイン (CRD1 と CRD2)と 1 つの会合体-小孔形成ドメインから構成されているが、CRD1 と CRD2 は、それぞれ 3 回の繰り返し構造からなるサブドメイン 1α、1β、1γと 2α、2β、2γからなる。CEL-III はマラリア伝播阻止のために構築されたトランスジェニックハマダラ蚊(TGM) の機能分子に利用され、この CEL-III 発現 TGM は高いマラリア伝播阻止能を示す。マラリア伝播を 100%阻止する TGM を作製するために、この溶血活性／高マラリア活性をさらに高めた CEL-III を構築することを目的として、CEL-III 変異体の作製を行うこととした。以前の研究では、サブドメイン 1α のアミノ酸残基を変異することで溶血活性を向上させることができたため、今回はサブドメイン 2β において変異体解析を行った。
【方法】CEL-III の糖認識ドメイン中のサブドメイン 2β で糖とのスタッキング効果に寄与している Tyr222 を Phe、His、Trp に置換した変異体 CEL-III (Y222F、Y222H、Y222W) 遺伝子を作製し、pET-32a に連結した。構築したプラスミドを大腸菌 BL21(DE3) Codonplus RIL に導入し、IPTG による誘導によって、変異体 CEL-III タンパク質をチオレドキシン融合タンパク質として発現させた。封入体として発現された変異体 CEL-III を 6M グアニジン塩酸塩で可溶化後、希釈法によりリフォールディングして、Lactosyl-cellulofine カラムによるアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製した。次に、精製した変異体 CEL-III のウサギ赤血球に対する溶血活性と溶血速度を調べた。
【結果】変異体 CEL-III をチオレドキシン融合タンパク質として発現し、リフォールディングして、精製したところ、培養液 1L 当たり Y222F が 6.4 mg、Y222H は 4.3 mg、Y222W は 2.9 mg 得ることができた。次に、ウサギ赤血球に対する溶血活性を調べたところ、Y222H および Y222W に関しては溶血活性が大きく低下していたものの、 Y222F については Wild type CEL-III(WT)と比較して、約 2.7 倍に溶血活性が上昇していた。更に変異体 CEL-III の溶血速度を調べたところ、50%溶血に要する時間が Y222F では、WT より約 2.2 倍速くなっていることが明らかになった。以上のように、サブドメイン 1α と同様に、サブドメイン 2β においても、そのスタッキングに関与するアミノ酸に変異を導入することにより、溶血活性が向上した CEL-III を構築できることが示された。

lectin, hemolysis, malaria

講演番号：2C26p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ C 校舎 26 会場

腸管上皮由来抗菌性レクチン RegIV の機能解析

Functional analysis of RegIV , an antibacterial lectin secreted from intestinal epithelia.

○前迫 沙織、磯野 麻依、篠原 俊哉、渡辺 寛人 (明治大農)
○Saori MAESAKO,Mai ISONO,Toshiya SHINOHARA,Hirohito Watanabe (Meiji Univ.)

【目的】腸管上皮は、抗菌ペプチドなどの自然免疫因子を産生することにより、感染防御機能において重要な役割を果たしている。われわれは、腸管上皮細胞より分泌される抗菌性レクチン「RegⅣ」について解析を行い、これまでに RegⅣがマンナンなどの糖を認識して結合することを見出している。さらに、われわれは RegⅣがグラム陽性菌(*Bacillus subtillis*)、グラム陰性菌(*Escherichia coli*)および真菌(*Candida tropicalis*)に対して抗菌性をもつことを見出しているが、その抗菌メカニズムは明らかになっていない。

一方、腸内フローラのバランス維持は、われわれの健康にとってきわめて重要であるが、有益な作用をもたらす常在菌に対する腸管上皮由来抗菌因子の機能については不明の点が多い。そこで本研究では、RegⅣの抗菌メカニズムや生理機能の一端を明らかにすることを目的とし、糖結合性や常在菌に対する作用を解析した。

【方法および結果】大腸菌により His6 タグの付加した RegⅣ組換えタンパク質を発現させ、これを精製して解析に用いた。はじめに Epoxy-activated Sepharose にマンナンをカップリングさせた樹脂を用いて、さまざまな条件下における糖との結合性を解析した。その結果 5.0 から 6.5 の pH において RegⅣのマンナン結合能が確認された。

次に常在菌である乳酸菌(*Lactobacillus acidophilus*)に対する RegⅣの抗菌性について解析を行った。その結果、*B. subtillis* や *E. coli* の増殖を完全に抑制する濃度の RegⅣを作用させても *L. acidophilus* の増殖に大きな影響は観察されなかった。さらに RegⅣを作用させた菌の形態変化を走査型電子顕微鏡(SEM)により観察した。その結果、*B. subtillis* や *E. coli* においては RegⅣの作用により膜構造に大きな形態変化が観察されたが、*L. acidophilus* においては軽微な変化しか認められなかった。

これらのことから常在菌である *L. acidophilus* に対しては、RegⅣは強い抗菌性を示さないことが示唆された。本研究で得られた結果は、腸管上皮細胞から分泌されるレクチンである RegⅣが、感染防御のみならず、腸内フローラ制御においても重要な機能をもつことを示唆するものであると考えられる。

Lectin, Intestine, Antibacterial peptide

講演番号：2C26p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ C 校舎 26 会場

ミズナ及びミブナ種子由来粘質多糖の特性評価
Comparative properties of mucilages of Mizuna and Mibuna seeds
○喜多 由香[1]、本田 与一[1]、宇山 浩[2]、東 順一[2] ([1]京都大院農、[2]大阪大院工)
○Yuka KITA[1], Yoichi HONDA[1], Hiroshi UYAMA[2], Jun-ichi AZUMA[2] ([1]Kyoto Univ., [2]Osaka Univ.)

【目的】
アブラナ科アブラナ属の植物の種子には、水に浸すと種皮表面から粘性物質を生成するものがあり、京都の伝統野菜であるミズナ(水菜) や、その自然交配種であるミブナ(壬生菜)の種子もその一つである。このような種子由来の粘性物質は多糖類からなることがわかっている。植物由来の粘質多糖類は保水性や増粘性を示すことから、食品の増粘安定剤や化粧品、薬剤など様々な分野で利用されている。粘質多糖の性質についての理解は、その新規素材としての利用のために重要であり、多糖産業の発展につながると考えられる。本研究は、ミズナおよびミブナ種子由来の粘質多糖について化学的、物理化学的性質の分析を行い比較検討することで、両者の性質を理解することを目的とする。
【方法】
両種子を水中で膨潤させて粘質多糖を分取した。この粘質多糖をアルカリ処理によりアルカリ可溶成分とアルカリ不溶成分に分離後、アルカリ可溶成分を陰イオン交換クロマトグラフィーにより中性多糖と酸性多糖に分離した。各分画について、酸加水分解後HPAECによる中性糖組成分析を行うとともに、アルカリ不溶成分についてはX線回折も行った。さらに、粘質多糖を濃縮して濃度を調整し、動的粘弾性、せん断速度依存性、粘度のpH依存性、塩添加による粘度変化などを調べた。
【結果】
化学的分析の結果、両粘性物質は多糖を主成分とし、デンプン、灰分、タンパクを含んでいた。X 線回折および中性糖組成分析の結果、多糖はセルロースを含み、アラビノガラクタンやグルコマンナンに富んでいることが示唆された。ミブナの方がセルロース含量がミズナより高い傾向が認められた。アルカリ可溶成分については、わずかな組成の違いは見られるものの、両粘質多糖は非常によく似た成分から成ることが明らかとなった。また、物理化学的分析の結果、ミブナのほうがミズナよりも粘度が高く、動的粘弾性測定において貯蔵弾性率（G'）が損失弾性率（G''）よりも高いことが明らかとなった。両者共に、塩添加による大きな影響は受けなかったが、pH にはわずかに影響を受け、pH8-9 で高く、pH11 を超えると低下した。以上の結果から、両粘質多糖は化学的組成が似通っていると結論された。粘度に相違が認められたことは、セルロースを中心とした多糖間の相互作用のわずかな差に起因すると考えられる。

Seed mucilage, Polysaccharide, Mizuna and Mibuna

講演番号：2C26p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ C 校舎 26 会場

菌類残渣からのグルカン類抽出法の改良と高純度化

An improved method for the extraction of glucans from fungal cell wall

○吉見 啓[1,2]、阿部 敬悦[2,3]、熊谷 俊高[1]、細山 浩[1]、都築 毅[3]、佐々木 宏明[4]、後藤 智生[4]([1]（株）ファームラボ、[2]東北大・未来研、[3]東北大院農、[4]（株）岐阜セラツク製造所)
○Akira YOSHIMI[1,2], Keietsu ABE[2,3], Toshitaka KUMAGAI[1], Hiroshi HOSOYAMA[1], Tsuyoshi TSUDUKI[3], Hiroaki SASAKI[4], Tomoo GOTO[4] ([1]Fermlab, Inc., [2]NICHe, Tohoku Univ., [3]Grd. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [4]GIFU SHELLAC MFG)

【背景・目的】 きのこや麹菌、酵母などの菌類を用いた食品加工過程や発酵醸造過程において、菌体（石付きなどの非可食部）は、整腸剤や栄養剤、食品添加物などへの一部の利用（例：エビオス、ワカモト、酵母エキスなど）を除いて廃棄されており、有効利用・高度利用はほとんど進んでいないのが現状である。本研究では、これまでは廃棄されてきた菌体残渣から高付加価値な有用成分を抽出生産することを目指し、まず菌類細胞壁の主要構成多糖（グルカン、キチン、マンナンなど）のうちグルカン類を高度に分離精製する技術の開発を行った。

【方法･結果】 我々はこれまでに、糸状菌の菌体成分から細胞壁構成多糖であるα-1,3-グルカン（AG）およびβ-1,3-グルカン（BG）を多段階のアルカリ抽出法を用いて精製する方法を開発している[1)]。そこでまず、麹菌（*Aspergillus oryzae*）および近縁の *A. nidulans* の培養菌体を用いて、これらグルカン類の抽出法の簡素化と高効率化を検討した。従来の抽出法では、菌体成分に対して 0.5 M～2 M の NaOH を段階的に処理していたが、アルカリ抽出段階の減数とアルカリ濃度・処理時間を検討したところ、１回の強アルカリ処理（2 M NaOH）においても、AG および BG を効率よく分離できることが確認できた。また、BG が含まれるアルカリ不溶画分について、混入するキチンを除去するためキチナーゼの処理条件を検討したところ、市販のキチナーゼ（*Trichoderma viride*由来）を用いて効率よくキチンを除去できることが確認された。次に、改良したグルカン抽出法を用いて、なめこ等の担子菌および麹菌から細胞壁成分を抽出し、グルカン類の分析を行った。その結果、担子菌からは高純度な BG が得られることが明らかになり、本法による担子菌からのグルカン類抽出は、免疫賦活作用のある BG の生産に適していることが示唆された。また、麹菌類の培養菌体から抽出した AG について構造解析したところ、ほぼ直鎖状の純粋な AG であることが明らかになった。このことから、麹菌類からのグルカン類抽出は、高純度な AG の生産に適していることが示唆された。現在、不溶性グルカン類の効率的利用と高付加価値化を目指し、亜臨界水抽出によるオリゴ糖化と水溶性化、高純度化および機能性評価に取組んでいる。

（本研究は、東北大学工学研究科・阿尻雅文教授および東北大学医学研究科・川上和義教授の協力、JST・企業研究者活用型基礎研究推進事業および東北経済産業局・戦略的基盤技術高度化支援事業の支援を受けた。）

１）新規グルカン及びその製造方法、特許 4595074 号

α-1,3-glucan, ß-1,3-glucan, fungal cell wall

講演番号：2C26p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ C 校舎 26 会場

トウモロコシ果皮アラビノキシランの水分吸着特性

Moisture adsorption characteristic of arabinoxylan from corn pericarp

○吉田 有希[1]、本田 与一[1]、宇山 浩[2]、東 順一[2] ([1]京大院農、[2]阪大院工)
○Tomoki Yoshida[1], Yoichi Honda[1], Hiroshi Uyama[2], Jun-ichi Azuma[2] ([1]Kyoto Univ., [2]Osaka Univ.)

【目的】
トウモロコシは、世界三大食物のひとつであり、大量に生産されている。このトウモロコシの乾燥速度や貯蔵時の保存性に関係する品質を決定する因子として、水分吸着特性が挙げられる。トウモロコシの種子と外的環境とを隔てているのは果皮である。従って、トウモロコシの水分吸着特性の解明には果皮の水分吸着特性を研究することが必要不可欠である。トウモロコシ果皮の主成分はアラビノキシランであることが知られている。そこで、本研究では、トウモロコシ果皮アラビノキシランの水分吸着特性を分析することにより果皮の水分吸着特性の評価を試みた。
【試料と方法】
トウモロコシ果皮試料として、コーンスターチ残渣物を使用した。トウモロコシ果皮由来アラビノキシランを以下のように抽出した。トウモロコシ果皮を、熱水、90% DMSO、4% KOH で段階的に処理した。得られた KOH 抽出物を、濃度勾配を用いたエタノール沈殿法を使用し、エタノール濃度 30-50%間において沈澱したものをアラビノキシランとして得た。アラビノキシランは酸性条件（pH 1）下における加熱加水分解処理により、アラビノースの脱離処理を施した。得られた分岐度の異なるアラビノキシランを用いて、それぞれの水分吸着特性を重量法により評価した。
【結果】
トウモロコシ果皮由来アラビノキシランは、アラビノース 23.3%、キシロース 66.3%、ガラクトース 8.7 %、グルコース 1.7 %から構成されていた。アラビノキシランは酸性条件下において効果的に加水分解され、特にアラビノース側鎖の脱離が優先的に生じた。そこで、酸加水分解条件を 37-57℃、1-3 時間の範囲で変化させることにより、アラビノース/キシロース比（A/X）が 0.35-0.02 のアラビノキシランを調製した。得られたアラビノキシランは、分岐度の低下に伴って低分子化がみられ、アラビノース側鎖だけでなく、主鎖の加水分解も見受けられた。また、全てのアラビノキシランは非晶性を呈した。これらのアラビノース分岐度の異なるアラビノキシランの水分吸着特性を吸着等温線により評価した。その結果、アラビノースの側鎖が多ければ多いほど水を吸着しやすいことが明らかとなった。また、高湿度条件においてはアラビノースの側鎖が多いほどより多くの水分を吸着・維持することも明らかとなった。これらの結果より、アラビノキシランの分岐構造は、トウモロコシ果皮の水分に対する挙動を評価する際の一つの指標として利用できることが推察された。

Corn Pericarp, Arabinoxylan, Moisture Adsorption Characteristic

講演番号：2C26p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ C 校舎 26 会場

超音波分解による高分岐型β-1,3-グルカンに見られる特異な低分子化挙動
Anomalous fast-degradation behavior of hyperbranched ß-1,3-glucan induced by ultrasound irradiation
○重森 達也、甲元 一也（甲南大ＦＩＲＳＴ）
○tatsuya shigemori,kazuya koumoto (Konan Univ.)

【背景と目的】
近年、酵母やキノコが産生する β－１，３－グルカンが抗腫瘍活性を有することが明らかとなり、医療用材料や機能性食品として注目を集めている。β－１，３－グルカンは、グルコースが β－１，３－グリコシド結合で連結された主鎖を持ち、種で異なる割合の β－１，６－グルコシド側鎖を有する。天然では 3 本の主鎖が水素結合と疎水性相互作用によって自己集合した三重鎖構造を形成しているが、β－１，３－グルカンの示す抗腫瘍活性は、この高次構造や分子量、側鎖の分岐度等にあることが示唆されている。また最近、黒酵母菌（*Aureobasidium pullulans*）が産生し、主鎖の８０％以上にβ－１，６－グルコシド側鎖が存在する β－１，３－グルカン（アクアβ）が、既存のβ－１，３－グルカンよりも多様な生理活性を発現することから高い注目を集めている。その作用メカニズムはこれまでの研究と同様に、その高次構造や分子量、側鎖の分岐度等にあると考えられるが、これまでの研究では菌体培養液から抽出された成分をそのまま評価するだけで、その構造と機能の相関に言及した報告はない。そこで本研究では、アクアβの分子量や高次構造が抗腫瘍活性に与える影響を解明するために、超音波分解法により、アクアβを低分子量化する手法の確立と、それによって生成した低分子画分の高次構造解析を行ったので、その結果について報告する。
【結果】
菌体培養液から抽出したアクアβサンプルを１ｍｇ/ｍＬの濃度で蒸留水に溶解させ、バス式超音波照射装置で超音波照射し、時間と共に変化する分子量をサイズ排除クロマトグラフィーで評価した。その結果、一本鎖あたりの重量平均分子量３１８万であったアクアβの分子量は、超音波照射１時間で重量平均分子量１２．９万（初期分子量の４％）に低下した。一方、側鎖グルコシド残基が主鎖の３３％に導入されたスクレログルカンは、１０３万の分子量が重量平均分子量８６．２万（初期分子量の８４％）にしか低下しなかった。このことからアクアβは、他のβ－１，３－グルカンと比較して極めて短時間で低分子化反応が進行することが確認された。また、コンゴレッドを利用した三重鎖構造の確認において、低分子量化されたアクアβも三重鎖・コンゴレッド複合体形成に伴うＵＶスペクトルにおける極大吸収波長のレッドシフトが確認され、三重鎖構造を形成していることが明らかとなった。講演では、なぜこのような急激な反応が進行するのか、アクアβの高次構造や側鎖グルコシド残基の影響等の面から評価した結果についてもあわせて報告する。

hyperbranched ß-1,3-glucan, ultrasound irradiation, higher-order structure

講演番号：2C15a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ C 校舎 15 会場

Cupriavidus necator 由来 L-threonine 3-dehydrogenase によるヒト血漿中 L-threonine 定量法の開発

Enzymatic determination of L-threonine in human plasma using L-threonine 3-dehydrogenase from *Cupriavidus necator*

○田部井 陽介[1]、米田 英伸[1]、関口 敬文[2]、滝脇 正貴[2]、宇治 義則[2]、北島 勲[2]、浅野 泰久[1,3] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]富山大学附属病院検査部、[3]JST, ERATO)

○ Yosuke TABEI[1], Hidenobu KOMEDA[1], Takafumi SEKIGUCHI[2], Masaki TAKIWAKI[2], Yoshinori UJI[2], Isao KITAJIMA[2], Yasuhisa ASANO[1,3] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Clin. Labo. Toyama Univ. Hosp., [3]JST, ERATO)

【背景と目的】血漿中遊離アミノ酸は生体のアミノ酸の僅か数%にすぎないが、摂取タンパク質の分解や合成などと動的平衡状態にあり、その測定は臨床指標として重要である。近年、複数のアミノ酸の血漿中濃度の変動から算出される数値と疾病との関連性が報告され、血漿中アミノ酸の濃度を追跡することにより、健康状態や病態を解析できる可能性が示されている。従来、アミノ酸の分析はニンヒドリン法、ラベル化法を併用した高速液体クロマトグラフィー法や質量分析法による分析が主に行われているが、除タンパク質などの前処理を必要とし、操作が煩雑で分析に時間を要する。一方、酵素を用いる定量法は安価で、簡便な方法として期待されている。我が国での酵素法による生体試料中のアミノ酸定量に関しては、先天性代謝異常の新生児マススクリーニングを中心に実用化がなされており、酵素法によるアミノ酸定量の有用性が示されている。今回、必須アミノ酸の一つである L-threonine の酵素法による測定法を開発したので報告する。

【方法と結果】高い酵素活性を示す NAD^+依存性の L-threonine 3-dehydrogenase (ThrDH)をスクリーニングし、 *Cupriavidus necator* NBRC 102504 に見出した。*C. necator* より精製した ThrDH について、様々な基質に対する活性を調べたところ、L-threonine 及び DL-α-amino-β-hydroxyvalerate に対してのみ活性を示し、本酵素が極めて高い基質特異性を有していることが明らかとなった[1)]。このことから、*C. necator* 由来の ThrDH が生体試料中に含まれる L-threonine を定量するのに有用な酵素であることが考えられた。そこで、ゲノム DNA よりクローニングした ThrDH 遺伝子について pET15b を用いて大腸菌BL21(DE3)内でHis-tag融合タンパク質として発現させた後、Ni-カラムにより精製し、ThrDH-His を得た。本酵素を用いて L-threonine の検量線を作成したところ、終濃度 5 μM までは直線性の高い結果を得ることが可能であった。さらに、ヒト血漿中の L-threonine 濃度を測定し、プレカラム誘導体化法による超高速アミノ酸分析システムの結果と比較したところ、本酵素を用いた場合、限外濾過や酸処理などの除タンパク質の操作を行わずとも高い定量性を有していることが明らかとなった。また、共存物質の影響を検討したところ、ヘモグロビン200 mg/dL以上、アスコルビン酸5 mg/dL以上で正誤差を認めたものの、遊離型ビリルビン(19.0 mg/dL)、抱合型ビリルビン(20.3 mg/dL)、ホルマジン濁度(1410 FTU)、リウマチ因子(500 IU/mL)による影響は認められなかった。このことから、本酵素は血漿中 L-threonine の分析法として充分な性能を有していることが明らかとなった。

1) T Ueatrongchit and Y Asano, *Anal. Biochem.*, 2011, **410**, 44-56.

L-threonine 3-dehydrogenase, human plasma, amino acid

講演番号：2C15a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ C 校舎 15 会場

変異型の NADP 依存性 D-アミノ酸脱水素酵素を用いる D-アミノ酸の分光学的分析法の開発

Development of the spectrophotometric analysis of D-amino acids using the mutant enzyme, NADP-dependent D-amino acid dehydrogenase

○今泉 吉史[1]、秋田 紘長[1]、牟田口 祐太[1]、清水 泰博[2]、大島 敏久[2]([1]九大院生資環、[2]九大院農)
○ YOSHIFUMI IMAIZUMI[1], HIRONAGA AKITA[1], YUTA MUTAGUCHI[1], YASUHIRO SHIMIZU[2], TOSHIHISA OHSHIMA[2] ([1]Kyushu Univ., [2]Kyushu Univ.)

[目的] 天然のタンパク質を構成するアミノ酸は、グリシンを除いて全て光学活性な L-α-アミノ酸である。そのために、アミノ酸に関しては L-アミノ酸が主に注目され、光学異性体である D-アミノ酸は、非天然アミノ酸として、近年まであまり重要視されてこなかった。しかし、近年の分析技術の発展により、高速液体クロマトグラフィーなどにより、D-と L-アミノ酸の正確な分離分析が可能になったことから、微生物だけでなく、魚介類、植物、ヒトを含む哺乳動物にも様々な D-アミノ酸が存在し、特異的な機能を持つことが明らかになってきた。我々は食品における D-アミノ酸の存在とその機能に関する研究を進める中で、食品中の D-と L-アミノ酸を、OPA(o-Phthaldialdehyde)と N-Acetyl-L-Cys などによるジアステレオマー蛍光誘導体化後、それらの異性体を C18-ODS カラムによって、超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) で同時に迅速に分析する方法を確立した [1)]。この UPLC 法は、多数の D-と L-アミノ酸の同時分析には、非常に有効であるが、高価な装置が必要であり、分析時間が長いという短所がある。一方、酵素法は特定の D-アミノ酸を特異的、迅速、安価に測定できる。我々の研究室では、これまで、超好熱菌由来のラセマーゼと NAD 依存性脱水素酵素を利用する D-Asp の分光学的分析法 [1)]や色素依存性 D-プロリン脱水素酵素を利用する D-Pro の電気化学的分析法を既に開発している [2)]。本研究では、新たな D-アミノ酸の分光学的分析法として、我々が堆肥から分離した好熱菌から見出した *meso*-ジアミノピメリン酸脱水素酵素を部位特異的変異法により創製した NADP 依存性の D-アミノ酸脱水素酵素(DAADH)[3)]を用いる D-Ile や D-Lys などの分光学的酵素分析法の開発を行った。
[方法・結果] 変異型 DAADH は組換え大腸菌から既報 [3)]のように精製、調製した。D-アミノ酸の分光学的酵素法としては、DAADH 反応により測定目的の D-Ile や D-Lys などを NADPH に変換後、m-PMS と酸化型 WST-1 (Water soluble tetrazolium) を共役させ、生成する WST-1 のテトラゾリウムをそれぞれ吸光度の増加速度と増加濃度を波長 438 nm の吸光度から測定し、定量 (ε ＝37 $mM^{-1}\cdot cm^{-1}$) した。レートアッセイでは、0.5～12 mM の D-Ile で吸光度との間で直線の検量線が得られた。この方法では、測定感度が十分でないので、エンドポイントアッセイを行った。15 分間の酵素反応時間を用いた分析で、0.5～10 μM の D-Lys で直線の検量線が得られ、μM オーダーの D-Lys の新規酵素分析法が確立できた。
[文献] 1) Y. Mutaguchi et al.(2011) Anal. Biochem. **416**, 61-66. 2) Y. Tani et al. (2009) Anal. Sci. **25**, 919-924. 3) H. Akita et al.(2012) Biotechnol. Lett. **34**,1693-1699.

D-amino acid dehydrogenase, enzymatic analysis, D-amino acid

講演番号：2C15a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ C 校舎 15 会場

耐熱性色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素の探索と機能解析

Screening of thermophilic dye-linked D-amino acid dehydrogenase

○石倉 優[1]、里村 武範[1]、櫻庭 春彦[2]、大島 敏久[3]、末 信一朗[1] ([1]福井大院、[2]香川大、[3]九州大院)
○Masaru ISHIKURA[1], Takenori SATOMURA[1], Haruhiko SAKURABA[2], Toshihisa OHSHIMA[3], Shin-ichiro SUYE[1] ([1]Fukui Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Kyusyu Univ.)

[目的]
色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素 (Dye-DADH) は 2,6-ジクロロインドフェノールなどの人工酸化還元色素を電子受容体として D-アミノ酸の酸化反応を触媒する酵素である。Dye-DADH は人工酸化還元色素を介して電子を電極へ導入することが可能であるため、食品や生体中の D-アミノ酸濃度を電気化学的に測定するバイオセンサ用素子としての利用が期待されている。しかし、従来から研究されてきた大腸菌や緑膿菌のような常温性生物由来の Dye-DADH は不安定であるため、詳細な酵素の機能解析は行われておらず、酵素を素子としたバイオセンサへの応用は困難であった。我々の研究グループでは、安定性の高い Dye-DADH を超好熱性アーキア *Pyrobaculum islandicum* より初めて発見し、詳細な酵素化学的性質の解析を行い、本酵素がセンサ用素子として非常に有用性が高いことを明らかにした[1)]。しかしながら、現在までに D-アミノ酸定量用バイオセンサ素子として利用できる酵素は本酵素以外見出されていない。そこで本研究ではバイオセンサ用素子として有用性の高い新規 Dye-DADH を検索することを目的とした。
[方法・結果]
好熱性細菌 *Rhodothermus marinus*、超好熱性アーキア *Thermoproteus tenax* のゲノム情報から Dye-DADH 候補遺伝子を検索した。その結果、*R. marinus* からは 1 種類、*T. tenax* からは 2 種類の Dye-DADH 候補遺伝子を見出すことに成功した。これら 3 遺伝子について大腸菌によるタンパク質発現系を構築し、発現タンパク質の機能解析を行った。その結果、*R. marinus* 由来の Dye-DADH ホモログについて D-フェニルアラニンを良好な基質とする色素依存性脱水素酵素活性を検出することに成功した。さらに本酵素は 60℃、10 分間の熱処理においても全く失活せず、高い安定性を有することも明らかとなった。

1) Satomura, T. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **277**, 12861-12867 (2002)

Dye-linked dehydrogenase, Thermophile

講演番号：2C15a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ C 校舎 15 会場

好熱性細菌 *Rhodothermus marinas* 由来プロリンラセマーゼホモログの機能解析
Characterization of proline racemase homologue from *Rhodothermus marinas*
○小柳 峰史[1]、里村 武範[1]、櫻庭 春彦[2]、大島 敏久[3]、末 信一朗[1] ([1]福井大院工、[2]香川大農、[3]九大院農)
○Takashi KOYANAGI[1], Takenori SATOMURA[1], Haruhiko SAKURABA[2], Toshihisa OHSHIMA[3], Shin-ichiro SUYE[1] ([1]Fukui Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Kyushu Univ.)

［目的］
我々の研究室では、好熱菌より高い安定性を有する D-アミノ酸代謝に関連する酵素のスクリーニングを行っている。既にゲノム解析が終了している好熱菌ゲノムより D-アミノ酸代謝に関与する酵素のスクリーニングを行った結果、*Rhodothermus marinas* にプロリンラセマーゼをコードしていると予測される遺伝子を見出した。ラセマーゼは D、L 体の基質を高度に認識し、ラセミ化反応を触媒することが可能なため基質の異性体を高度に識別できるバイオセンサ用素子としての応用が期待できる。本研究では、新たに見出したプロリンラセマーゼをコードしていると考えられる遺伝子のクローニング、大腸菌によるタンパク質の発現系の構築を行い、発現タンパク質の詳細な機能解析を行うことを目的として研究を行った。
［方法］
プロリンラセマーゼをコードしていると考えられる遺伝子を PCR 法により増幅し、大腸菌にタンパク質を発現させた際に N 末端アミノ酸にヒスチジンのタグを付加させることが可能なタンパク質発現用ベクターである pET 15b ベクターに組み込んだ。構築した発現プラスミドを *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL に導入し、タンパク質発現を行い、精製を行った。精製タンパク質について、温度依存性、pH 依存性、熱安定性などの酵素化学的性質の解析を行った。
［結果］
大腸菌におけるタンパク質発現系の構築を行った結果、発現タンパク質は可溶性画分として回収することができた。発現したタンパク質を Ni^{2+} chelating アフィニティークロマトグラフィ及び、ゲルろ過クロマトグラフィにより精製したところ、電気泳動的に単一に精製することに成功した。精製酵素の活性測定を行った結果、プロリン及びヒドロキシプロリンの異性化反応の検出に成功した。現在、本酵素のさらなる詳細な酵素化学的性質の解析を行なっている。

isomerase, thermophile, characterization

講演番号：2C15a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ C 校舎 15 会場

トリパノソーマ由来 NAD 依存性 L-スレオニン脱水素酵素の機能解析
Functional analysis of NAD-depandent L-threonine dehydrogenase from Trypanosoma
○米田 一成[1]、櫻庭 春彦[2]、荒木 朋洋[1]、大島 敏久[3]([1]東海大・農、[2]香川大・農、[3]九大院・農)
○ Kazunari YONEDA[1], Haruhiko SAKURABA[2], Tomohiro ARAKI[1], Toshihisa OHSHIMA[3]
([1]Tokai Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Kyushu Univ.)

【目的】NAD 依存性 L-スレオニン脱水素酵素(ThrDH)は NAD を補酵素として L-スレオニンから L-2-アミノ-3-オキソ酪酸への脱水素反応を触媒する酵素である。既知の ThrDH は Medium chain NAD dependent, and zinc containing alcohol/polyol dehydrogenase family に属し、これまでに常温菌や真核生物由来の酵素で機能解析が、超好熱菌由来の酵素では立体構造解析が行われている。一方、南極から単離された低温菌 *Flavobacterium frigidimaris* KUC-1 及び、好熱性アーキアである *Thermoplasma volcanium* 由来の ThrDH は、既知の ThrDH と 1 次構造上非常に低い相同性しか持たないだけでなく、既知の本酵素の活性発現に必須とされる Zinc 結合モチーフもなく、代わりに UDP-galactose 4-epimerase (GalE)に特有のモチーフを有する、特異な酵素であることを既に報告している。ゲノム情報を使用し、この特異な GalE タイプ ThrDH ホモログ遺伝子の生物分布を調べた結果、バクテリアやアーキアだけでなく、ヒトやトリパノソーマなどの真核生物にも存在していることを明らかにした。さらにヒトでは、ThrDH 遺伝子は偽遺伝子となっていることから、ヒトの L-スレオニンの代謝は病原性寄生原虫であるトリパノソーマとは全く異なっていると考えられる。本研究ではトリパノソーマ由来 ThrDH の機能と立体構造の解析を通じて、新規な抗トリパノソーマ薬開発の基礎を築くことを目的としている。
【方法・結果】トリパノソーマのゲノム情報からThrDH遺伝子(Tb927.6.2790)のcDNAをオーバーラップオリゴヌクレオチドを使用し、遺伝子を合成した後、pCold TFベクターに挿入し、大腸菌BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL株を用いてIPTGによる遺伝子の発現を行った。その結果、SDS-PAGEで予測される分子量にバンドが検出され、His-tagカラムによる精製にも成功した。また、活性染色法による酵素活性の確認を行った結果、NAD依存性ThrDH活性の検出に成功した。今後、本酵素の機能解析及び、立体構造解析を目的とした結晶化、X線回折実験を行う予定である。

L-threonine dehydrogenase, NAD, Trypanosoma

講演番号：2C15a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ C 校舎 15 会場

超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM5473 のアスパラギン酸ラセマーゼホモログ遺伝子のクローニングとその遺伝子産物の酵素科学的性質

Expression of aspartate racemase homolog gene of hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis* DSM5473 and enzymatic characterization of its gene product

○鷲尾 翼[1]、藤井 知実[2]、畑 安雄[2]、老川 典夫[1] ([1]関大化学生命工、[2]京都大学化学研究所)
○Tsubasa WASHIO[1], Tomomi FUJII[2], Yasuo HATA[2], Tadao OIKAWA[1] ([1]Kansai Univ., [2]Institute for chemical research, Kyoto Univ.)

【目的】超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM 5473 は 80℃以上の高温環境下で生育が可能な偏性嫌気性菌である。これまでにいくつかの超好熱アーキアに D-Asp およびアスパラギン酸ラセマーゼ(AspR: EC 5.1.1.13)が存在することが報告されているが、その生体内での機能や詳細な酵素科学的な性質については未解明のままである。本研究では *T. litoralis* DSM 5473 のアスパラギン酸ラセマーゼホモログ遺伝子(*Tl-aspr*)を大腸菌で発現し、得られた遺伝子産物の精製方法を確立するとともにその酵素科学的性質を解明することを目的とする。
【方法】*T. litoralis* DSM 5473 のゲノムに対して本菌と近縁の超好熱アーキアの AspR の保存領域に基づき設計したプライマーでポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行った。得られた DNA 断片からゲノムウォーキング PCR で *Tl-aspr* を取得した。*Tl-aspr* を pET11b に挿入後得られた pET11b-*Tl-aspr* を *Escherichia coli* Rosetta(DE3)に形質転換した。得られた形質転換体をアンピシリンとクロラムフェニコールを含む LB 培地で 37℃、16 時間振とう培養した。得られた菌体を超音波破砕後その無細胞抽出液から Tl-AspR を熱処理、DEAE-TOYOPEARL カラムなど各種カラムクロマトグラフィーで精製した。酵素活性は D-Asp を基質として用い 90℃で反応を行い、生成した L-Asp を高速液体クロマトグラフィーで定量し測定した。酵素活性 1 U は 1 分間に 1 μmol の L-Asp を生成する酵素量とした。
【結果及び考察】Tl-AspR は 687 bp の DNA でコードされており総アミノ酸残基数は 228 であった。Tl-AspR は可溶性画分に発現し電気泳動的に単一に精製された。精製酵素標品を用いて酵素科学的性質の検討したところ、本酵素の最適反応温度、最適 pH はそれぞれ 95℃、7.0 であった。また本酵素の 90℃での活性の半減期は 1 h であり、pH 6.0～8.0 で安定であった。本酵素は D-Asp および L-Asp に対して高い特異性を示し、他のアミノ酸に作用しなかった。本酵素活性は *N*-エチルマレイミドやヨード酢酸などの SH 試薬や Zn^{2+}、Cu^{2+}などの金属イオンで阻害され Na^{+}で活性化された。また本酵素は活性発現にピリドキサール 5’-リン酸(PLP)を必要としなかった。本酵素の分子質量はゲルろ過で 56 kDa、サブユニットの分子質量は SDS-PAGE で 24 kDa であったことから本酵素はホモダイマーであることが明らかとなった。Tl-AspR の一次構造は *Pyrococcus horikoshii* OT3、*Streptococcus thermophilus*、*Bifidobacterium bifidum* の AspR とそれぞれ約 68.0 、39.2 、32.9%の相同性を示した。また活性中心に存在する 2 つの Cys 残基は保存されていた。

なお本研究は京都大学化学研究所共同利用・共同研究により実施したものである。

Thermococcus litoralis, aspartate racemase, D-aspartate

講演番号：2C15a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ C 校舎 15 会場

L-グルタミン酸酸化酵素の１アミノ酸置換でできた L-ヒスチジン酸化酵素と L-アルギニン酸化酵素の特性解析

Characterization of L-histidine oxidase and L-arginine oxidase made from L-glutamate oxidase

○稲垣 賢二[1]、中井 隆一郎[1]、田村 隆[1]、佐野 宰久[2]、川口 辰也[2]、今田 勝巳[2]、日下部 均[3]([1]岡山大院環境生命、[2]大阪大院理、[3]エンザイムセンサ)
○ Kenji INAGAKI[1], Ryuichiro NAKAI[1], Takashi TAMURA[1], Tadahida SANO[2], Tatsuya KAWAGUCHI[2], Katsumi IMADA[2], Hitoshi KUSAKABE[3] ([1]Okayama Univ., [2]Osaka Univ., [3]Enzyme Sensor Co. Ltd.)

【目的】L-グルタミン酸酸化酵素(LGOX)は，L-グルタミン酸の酸化的脱アミノ化反応を触媒する L-アミノ酸酸化酵素の一種である。本酵素は，基質特異性が極めて厳格なため，L-グルタミン酸の微量定量に有効であり，種々のバイオセンサーに活用されている。我々は，本酵素の X 線結晶構造解析[1)]及びドッキングスタディーの結果から，基質認識に重要な３つのアミノ酸残基（Arg305，His312，Trp564）を見出し，これらの中で Arg305 が基質の認識に最も重要な残基であることを明らかにした[2)]。また本酵素 Arg305 の１アミノ酸置換により，基質特異性が変化した新規な L-アミノ酸酸化酵素を創出できることを見出した[2)]。今回は，こうして作成した基質特異性改変酵素 L-ヒスチジン酸化酵素(R305L 変異酵素)の X 線結晶構造解析を行い，野生型酵素と比較することにより基質特異性が変化した原因を探った。また L-ヒスチジン酸化酵素と L-アルギニン酸化酵素(R305D 変異酵素)の固定化酵素を用いて，酵素センサーとしての実用性を評価した。

【方法及び結果】R305L 変異酵素は，大腸菌を用いて発現させ，精製，結晶化した。野生型 LGOX とは全く異なる沈殿剤，pH 条件から同じ空間群およびほぼ同様の格子定数を持つ結晶が得られた。Spring-8 のビームライン BL41XU にてこの結晶の回折強度データを分解能 2.9Åまで収集した。構造解析は，野生型 LGOX(PDB ID: 2E1M)をモデルとした分子置換法により行った。野生型酵素と R305L の構造を比較すると，γ鎖中のヘリックス H19 の位置が大きく変わっていた。H19 の N 末端側は 305 に隣接し基質結合部位に近い。この大きな構造変化が，活性ポケットの空間を押し広げ，基質特異性が変化したと考えられる。R305D 変異酵素は L-グルタミン酸にほぼ活性を示さない一方で，L-アルギニンに対し最も高い活性を示した。L-アルギニンを基質とした場合に酸素電極により酸素の吸収が確認され，R305D 変異酵素が酸化的に脱アミノ化反応を触媒していることが確認できた。以上の結果から，L-グルタミン酸酸化酵素から作成した R305D 変異酵素は，新規な L-アルギニン酸化酵素であることが確認された。L-ヒスチジン酸化酵素と L-アルギニン酸化酵素をシリカゲル系担体に固定化し，過酸化水素電極を用いて，酵素センサーとしての実用性を評価した。両酵素の固定化カラムはともに安定で，酵素センサーとしての使用が可能であった。また L-アルギニン酸化酵素(R305D 変異酵素)は，使用する緩衝液により比活性や基質特異性が大きく変動するユニークな性質を持つことが明らかとなった。

1) Arima, J., *et al., FEBS Journal*. **276**, 3894-3903 (2009)
2) Utsumi, T., *et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **417**, 951-955(2012)

L-glutamate oxidase, L-amino acid oxidase, substrate specificity

講演番号：2C15a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ C 校舎 15 会場

Function and evolution of β-decarboxylating dehydrogenase family

○Lulu YIN[1], Ayako Yoshida[1], Takeo Tomita[1], Hiromi Nishida[1], Haruyuki Atomi[2], Saori Kosono[1], Tomohisa Kuzuyama[1], Makoto Nishiyama[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Kyoto Univ.)

[Purpose] In *Thermus thermophilus*, lysine is synthesized through α-aminoadipate (AAA). The reactions in lysine AAA biosynthetic pathway are similar to those in the whole or a part of the leucine biosynthesis, tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) and arginine biosynthesis. The genome survey of the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis* shows that only a single lysine biosynthetic gene cluster is present, which indicates that the lysine biosynthetic gene cluster is responsible for the reactions in those different metabolic pathways. Homoisocitrate dehydrogenase (HICDH) catalyzes the fourth step reaction in lysine AAA biosynthetic pathway. HICDH and the paralogous enzymes, 3-isopropylmalate dehydrogenase (IPMDH) and isocitrate dehydrogenase (ICDH), are called three brothers belonging to divergent β-decarboxylating dehydrogenase family. Our previous report on substrate analysis of HICDH homolog TK0280 from *T. kodakarensis* has shown that TK0280 possesses broad substrate specificity, and substrate recognition is determined by a limited number of amino acid residues. In this research, an evolutionary relationship was analyzed for β-decarboxylating dehydrogenase family, which could provide valuable insights on how a new enzymatic function was evolved and a clue to the origins and evolution of lysine biosynthesis and other related metabolic pathways.
[Result] Phylogenetic analyses from various sources have shown that β-decarboxylating dehydrogenase can be separated into three groups: IPMDH/HICDH group; ICDH/HICDH group; and ICDH/IPMDH/HICDH-mixed group. TK0280 is in the ICDH/IPMDH/HICDH-mixed group, located close to the root of the tree. ICDH and IPMDH seem to be evolved from the common ancestor by specification maintaining the HICDH function during the evolution of in β-decarboxylating dehydrogenase. Characterization of ICDH and IPMDH from *Escherichia coli* and *T. thermophilus* has shown that ICDH and IPMDH strictly discriminate their substrates from each other; however, HICDH activity is detectable for most enzymes. The discoveries of HICDH activity in ICDH or IPMDH from various sources offer implications of evolution in β-decarboxylating dehydrogenase.

β-decarboxylating dehydrogenase, evolution, Thermococcus kodakarensis

講演番号：2C15a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ C 校舎 15 会場

Thermococcus kodakarensis のリジン・アルギニン生合成酵素の基質認識機構の解明
Mechanism for substrate recognition of TK0278 involved in both lysine and arginine biosynthesis in *Thermococcus kodakarensis*

○吉田 彩子[1]、富田 武郎[1]、跡見 晴幸[2]、古園 さおり[1]、葛山 智久[1]、西山 真[1]([1]東大生物工学セ、[2]京大院工)
○ Ayako YOSHIDA[1], Takeo TOMITA[1], Haruyuki ATOMI[2], Saori KOSONO[1], Tomohisa KUZUYAMA[1], Makoto NISHIYAMA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Kyoto Univ.)

【目的】高度好熱菌 *Thermus thermophilus* は、ジアミノピメリン酸ではなくα-アミノアジピン酸(AAA)を経由し、54 アミノ酸からなるキャリアタンパク質 LysW を用いた新規なシステムでリジンを生合成する。この AAA リジン生合成経路では、AAA までの前半の酵素がロイシン生合成経路や TCA サイクルの一部（グルタミン酸生合成）と、AAA 以降の後半の酵素がアルギニン生合成経路と類似した反応を担う。この新規 AAA 経路のリジン生合成遺伝子は好熱性古細菌のゲノム上にも存在し、我々はこれまでに *Sulfolobus* 属や *Thermococcus kodakarensis* がこの LysW を用いた新規なシステムでリジンを生合成することを明らかにしている。また、*T. kodakarensis* ではこのリジン生合成遺伝子群を 1 組しか持っておらず、この酵素群がリジン生合成だけでなくロイシン生合成やグルタミン酸生合成、アルギニン生合成をも担っている可能性が考えられた。我々は前回大会までに、*T. kodakarensis* が LysW を用いたシステムをリジンだけでなくアルギニン生合成にも利用していることを報告し、AAA 以降の反応を担う酵素群がすべて bifunctional に働くことを明らかにした。今回、経路後半の初発酵素であり、AAA とグルタミン酸を基質とすることができる LysX ホモログ TK0278 の基質認識機構を明らかにするため、結晶構造解析と変異体解析を行った。
【方法・結果】*T. kodakarensis* の LysX ホモログである TK0278 の組換えタンパク質を調製し、基質存在下での結晶化スクリーニングを行ったところ、TK0278 に AMP-PNP が結合した結晶構造を 2.7 Å 分解能で決定することに成功した。これまでに我々が決定している AAA のみを基質とする *T. thermophilus* の LysX（TtLysX）やグルタミン酸のみを基質とする *Sulfolobus tokodaii* の ArgX（StArgX）の結晶構造や配列を用いて基質結合部位を比較すると、monofunctional な LysX や ArgX と bifunctional な TK0278 において、3 つの領域に存在するアミノ酸残基がそれぞれの基質認識に重要である可能性が考えられた。そこで、TK0278 でのこれらの残基を TtLysX や StArgX において対応する残基に置換した変異体を作製しその基質特異性を調べた。その結果、TtLysX 型に変異を導入した TK0278 の変異体ではグルタミン酸に対する活性が低下し、StArgX 型にした変異体では AAA に対する活性が低下していた。また、AAA を基質とする LysX やグルタミン酸を基質とする ArgX の間で特徴的な配列を持つ部位のみを置換した変異体では、どちらかの基質に特異的になる現象は見られなかった。これらの結果から明らかとなった、AAA とグルタミン酸を基質とする bifunctional な TK0278 の基質認識機構について報告する。

lysine biosynthesis, arginine biosynthesis, *Thermococcus kodakarensis*

講演番号：2C15a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ C 校舎 15 会場

古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* 由来のホモイソクエン酸脱水素酵素ホモログの構造と機能の解析
Analysis of structure-function relationships of homoisocitrate dehydrogenase homologs from *Sulfolobus acidocaldarius*
○高橋 賢人、富田 武郎、葛山 智久、西山 真（東大・生物工学セ）
○ Kento TAKAHASHI,Takeo TOMITA,Tomohisa KUZUYAMA,Makoto NISHIYAMA（Univ. Tokyo）

(目的) リジンは一般に、細菌や植物ではジアミノピメリン酸 (DAP) を経由する DAP 経路で、カビや酵母ではα-アミノアジピン酸(AAA) を経由する AAA 経路で生合成されることが知られているが、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* は、細菌では初めての例として、AAA を経由してリジンを生合成することが本研究室で明らかにされている。

AAA 経路前半の反応は、ロイシン生合成経路や TCA 回路の一部と酵素反応が類似している。この経路 4 番目の、ホモイソクエン酸(HIC)から 2-オキソアジピン酸(2-OA)に変換する酸化的脱炭酸脱水素反応は、ホモイソクエン酸脱水素酵素(HICDH)によって触媒されるが、HICDH はロイシン生合成経路の 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(IPMDH)、TCA 回路のイソクエン酸脱水素酵素(ICDH)と同じ酵素ファミリーに属している。

好酸性・好熱性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* も、AAA 経路によってリジンを生合成することが示唆されており、AAA 経路前半を構成する酵素や、ロイシン生合成経路、TCA 回路の一部に関わると推定される酵素遺伝子はクラスターを形成せず、ゲノム上にそれぞれ単独で存在している。ゲノム上に 2 つの HICDH ホモログ、*Saci_0600* と *Saci_2375* が見いだされ、それぞれ IPMDH、ICDH とアノテーションされているが、HICDH とアノテーションされる酵素遺伝子は存在しなかった。このことから、これら 2 つの酵素が複数の生合成経路において機能する multifunctional な酵素なのではないかと考え、機能解析を行った。

(方法と結果) 3 つの基質候補、3-イソプロピルリンゴ酸(3-IPM)、HIC、イソクエン酸(IC)に対する活性試験とそれぞれの基質に対する酵素動力学的解析から、Saci_0600 が IPMDH として、Saci_2375 が ICDH と HICDH の二つの機能を持つ bifunctional な酵素として働くことが示唆された。

次に、Saci_0600 と Saci_2375 について、それぞれの基質認識機構を明らかにする為、結晶構造解析を試みた。その結果、両タンパク質の結晶が得られ、Saci_0600 について、3-IPM 結合型の結晶構造を 2.2 Å の分解能で決定することに成功した。*Thiobacillus ferooxidans* 由来の IPMDH をはじめ、これまで基質結合型の構造が決定されている IPMDH はすべてダイマー構造をとるが、Saci_0600 は新規なテトラマー構造を有していた。また、3-IPM のγ-moiety の認識に関わる疎水性アミノ酸残基が、これまでに報告されている IPMDH で観察されるものとは異なっており、Saci_0600 が新規な基質認識機構を有する IPMDH であることが明らかになった。

Sulfolobus acidocaldarius, homoisocitrate dehydrogenase, crystal structure

講演番号：2C15a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ C 校舎 15 会場

酵母の酸化ストレス耐性に関与する *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 の構造機能解析

Structural and functional analyses of the yeast *N*-acetyltransferase Mpr1 involved in oxidative stress tolerance

○那須野 亮[1]、平野 良憲[1]、伊藤 貴文[2]、箱嶋 敏雄[1]、日び 隆雄[2]、高木 博史[1]（[1]奈良先端大・バイオ、[2]福井県大・生物資源）
○Ryo NASUNO[1], Yoshinori HIRANO[1], Takafumi Itoh[2], Toshio HAKOSHIMA[1], Takao HIBI[2], Hiroshi TAKAGI[1] ([1]Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech., [2]Dept. of Bioscience, Fac. of Biotech., Fukui Pref. Univ.)

【目的】

Mpr1 は当研究室の高木らが見出した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の *N*-アセチルトランスフェラーゼであり、当初はプロリンの毒性アナログである L-アゼチジン-2-カルボン酸（AZC）を *N*-アセチル化により解毒する酵素として同定された。しかしその後の研究により、Mpr1 が細胞内に活性酸素種を発生する酸化ストレスに対する耐性を酵母に付与することが明らかとなった。現在我々は、Mpr1 が酸化ストレス下においてプロリン代謝中間体の L-Δ^1-ピロリン-5-カルボン酸（P5C）/L-グルタミン酸-γ-セミアルデヒド（GSA）を *N*-アセチル化することでアルギニン合成を促進し、最終的にはアルギニンから生成した一酸化窒素が細胞に酸化ストレス耐性を付与するメカニズムを考えている。

一方、Mpr1 はその一次構造から Gcn5-related *N*-acetyltransferase （GNAT）スーパーファミリーに属すると考えられるが、Mpr1 と一次構造上の相同性が高い機能既知タンパク質は報告されていない。また最近、*cis*-4-ヒドロキシ-L-プロリン（CHOP）も Mpr1 の特異的な基質になることが判明したが、AZC や CHOP などの環状二級アミンを *N*-アセチル化する酵素は Mpr1 以外に報告されていない。これらのことから、Mpr1 は新規の立体構造や触媒反応機構、基質認識機構を有している可能性が高いと考えられ、それらの解明を目指している。

【方法・結果】

今回我々は、セレノメチオニン多波長異常分散を用いた X 線結晶構造解析により Mpr1 の立体構造を 2.1Å分解能で決定した。立体構造上、類似性の高いタンパク質との構造比較から、Mpr1 において Phe138 の主鎖アミドの NH 基、Asn178 の側鎖、Trp185 の側鎖がアセチル CoA や水分子との結合を介して触媒反応に関与していることが示唆された。また、立体構造および変異体酵素を用いた解析から、Asn135 の側鎖が AZC をはじめとする基質との結合に関わることが示唆された。一方、速度論的解析から Mpr1 による反応が二基質と酵素の三者複合体を形成しながら進行することが明らかになった。本発表では、これらの結果を総合的に考察し、Mpr1 の新規な触媒反応機構について議論する。

yeast, *N*-acetyltransferase Mpr1, catalytic reaction mechanism

講演番号：2C15a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ C 校舎 15 会場

微生物由来アスパラギン酸ラセマーゼの X 線結晶構造解析

Structural Analyses of Bacterial Aspartate Racemase

○山内 貴恵[1]、藤井 知実[1]、郷上 佳孝[2]、老川 典夫[2]、畑 安雄[1]([1]京大・化研、[2]関大・化学生命工)
○Takae YAMAUCHI[1], Tomomi FUJII[1], Yoshitaka GOUGAMI[2], Tadao OIKAWA[2], Yasuo HATA[1]
([1]ICR, Kyoto Univ., [2]Dept. Life Sci. & Biotech., Kansai Univ.)

【目的】D-アミノ酸は生体内で重要な機能を担っており、アミノ酸ラセマーゼにより生合成される。アミノ酸ラセマーゼはピリドキサールリン酸（PLP）依存型と非依存型に分類されるが、PLP 非依存型ラセマーゼの反応機構に関しては未だ明らかになっていないことが多い。本研究では、PLP 非依存型ラセマーゼである微生物由来アスパラギン酸ラセマーゼの反応機構と温度環境に対する適応戦略の解明を目的として、90℃以上の極限環境下で生育する超好熱性古細菌 *Thermococcus litoralis* DSM 5473 由来の耐熱性アスパラギン酸ラセマーゼ（TlAspR）と、低温環境下で生育する乳酸菌 *Lactobacillus sakei* NBRC 15893 由来の低温～常温性アスパラギン酸ラセマーゼ（LsAspR）の二種類のアスパラギン酸ラセマーゼについて X 線結晶構造解析を行った。

【方法】蒸気拡散法により TlAspR と LsAspR の結晶を作成し、高エネルギー加速器研究機構・放射光科学研究施設において X 線回折実験を行った。初期モデルとして *Pyrococcus horikoshii* OT3 由来アスパラギン酸ラセマーゼの PDB 登録座標を使用し、分子置換法による位相決定を行い、それぞれ分解能 1.6 Å（TlAspR）、2.6 Å（LsAspR）で結晶構造を決定した。

【結果】TlAspR と LsAspR は共に分子内に二回回転対称軸を持つホモダイマーであり、N 末端側ヘリックスどうしを接近させて二量体を形成している。二量体形成面でのαヘリックス間において、TlAspR では疎水性残基側鎖間での疎水性相互作用が見られるが、LsAspR ではこのような相互作用が無く、サブユニット間の相互作用様式に大きな違いがあった。また、TlAspR では LsAspR に比較してサブユニット内のイオン対の数が多く、分子表面での相互作用がより強固であると考えられる。さらに、TlAspR の分子体積は LsAspR よりも小さく、よりコンパクトな構造をとっており、これらの構造的要因が TlAspR の熱安定性の獲得に関与していると考えられる。また、推定活性部位付近には微生物由来アスパラギン酸ラセマーゼ間で保存されている二つのシステイン残基と塩基性アミノ酸残基が存在しており、TlAspR では Cys83 と Cys184 が、LsAspR では Cys84 と Cys196 がそれぞれ触媒残基として働き、TlAspR では Arg49 と Lys165 が、LsAspR では Arg48 と Lys165 がそれぞれ基質の認識に関与していることが示唆された。

X-ray crystallography, racemase, thermostability

講演番号：2C15a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ C 校舎 15 会場

Corynebacterium glutamicum 由来グルタミン酸脱水素酵素の結晶構造解析
Crystallographic analysis of glutamate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*
○富田 武郎、イン ルル、葛山 智久、西山 真（東大・生物工学セ）
○Takeo Tomita,Lulu Yin,Tomohisa Kuzuyama,Makoto Nishiyama (Univ. Tokyo)

（目的）*C. glutamicum* はグルタミン酸やリジンなどの発酵生産に利用されている。*C. glutamicum* 由来のグルタミン酸脱水素酵素(CgGDH)は高いグルタミン酸合成活性を持つため、グルタミン生産の鍵酵素の一つであると考えられている。酵素の補酵素特異性や、基質特異性、反応の指向性に関する構造基盤を明らかにすることはグルタミン生産に関する知見やその他のアミノ酸の生合成経路の設計するための基盤となるものと期待される。そこで、CgGDH の基質、補酵素複合体の結晶構造を決定することを目指した。
（方法と結果）N 末端に his-tag を融合した CgGDH を大腸菌に発現させ、Ni^{2+}カラム、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。2-OG、 $(NH_4)_2SO_4$、 $NADP^+$または NADPH 存在下の条件で結晶を得た。条件を最適化した結果、良質な結晶を得ることができ、2-OG/$NADP^+$/硫酸アンモニウム入りの条件での結晶について 1.68 Å 分解能の回折データを得て、分子置換法により構造を決定した。CgGDH は他のバクテリア由来の GDH と同様に、ドメイン I とドメイン II からなるサブユニットが会合したホモヘキサマー構造を有していた。6 つのサブユニットそれぞれに $NADP^+$または NADPH を結合していた。A,B,C,F-chain は 2-OG を結合しており、ドメイン I とドメイン II の間に存在する活性中心が閉じた構造を有しているのに対し、D, E-chain では 2-OG の電子密度が観察されず、また活性中心が開いた構造を有していた。CgGDH の閉じた構造は boGDH/2-OG/NAD^+の構造によく似ていた。2-OG は活性中心内で多くの特異的な結合により認識されていた。2-OG の認識様式は boGDH/2-OG/NAD^+複合体のものと似ていたが、CgGDH の 2-OG の 2-oxo 基が $NADP^+$のニコチンアミドとよくスタッキングしていることや、アンモニア分子が存在すると考えられる側に位置する Q113 が boGDH では Met 残基に置換されているという特徴が見られた。$NADP^+$も多数の特異的な結合により認識されており、2'-リン酸基は R290 や K136 との静電相互作用、S265 との水素結合により認識されていた。また、水分子を介した K284 との静電相互作用や H98 との水素結合が観察された。D264 は近傍に存在するが R290 により隔離され、2'-リン酸基とは別の方向を向いている。R290A, S265A, K136A 変異体を作製し、動力学的解析を行った結果、野生型酵素と比べて、NADPH に対する K_m が上昇していたことから、これらのアミノ酸残基が NADPH の認識に直接関わっていることが明らかになった。

glutamate dehydrogenase, Corynebacterium glutamicum, crystal structure

講演番号：2C15a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ C 校舎 15 会場

複合体結晶構造に基づくアゼチジン-2-カルボン酸加水分解酵素の反応機構

Reaction mechanism of azetidine-2-carboxylate hydrolase based on complex crystal structure

○豊田 真悠子[1]、実森 啓二[2]、WACKETT Lawrence P.[3]、江崎 信芳[2]、栗原 達夫[2]、三上 文三[1]([1]京大院農、[2]京大化研、[3]ミネソタ大)
○Mayuko TOYODA[1], Keiji JITSUMORI[2], Lawrence P. WACKETT[3], Nobuyoshi ESAKI[2], Tatsuo KURIHARA[2], Bunzo MIKAMI[1] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Inst. for Chem. Res., Kyoto Univ., [3]Univ. of Minnesota)

アゼチジン-2-カルボン酸加水分解酵素（以下、A2CH と表記）は、アミノ酸のアナログである(S)-アゼチヂン-2-カルボン酸（AZC）の四員環を開環する酵素である。結晶構造解析により判明した A2CH の三次構造は 2 つのドメインからなり、その構造は一次配列上相同性のある L-2-ハロ酸デハロゲナーゼと類似している。触媒残基である Asp12 はドメイン間のクレフトに位置している。このことから、A2CH の反応機構は L-2-ハロ酸デハロゲナーゼと同様に、触媒残基の Asp が基質の C2 炭素を求核攻撃し、生じたエステル型中間体が水分子の求核攻撃により加水分解されるというものであると考えられている。野生型酵素・D12N 変異体・野生型酵素-基質複合体の結晶構造解析より、A2CH は反応の過程でドメイン間クレフトが閉じる構造変化を起こすと考えられている。今回、さまざまな条件で野生型酵素と基質との共結晶化実験を行った結果、活性部位に生成物の(R)-2-ヒドロキシ-4-アミノ酪酸が入った構造が得られたので報告する。

今までに得られた野生型酵素の結晶、および酵素-基質複合体結晶は空間群が $P2_1$ で、その構造は酵素のドメイン間が開いていた。一方、D12N 変異体の結晶は空間群が $P2_12_12_1$ で、ドメイン間クレフトが閉じ、その中にギ酸イオンが結合していた。今回得られた生成物との複合体結晶は、D12N 変異体と同じ $P2_12_12_1$ の結晶であり、ドメイン間クレフトが生成物のヒドロキシアミノ酸を包むようにして閉じていた。また、酵素-基質複合体の構造と酵素-生成物複合体の構造を重ねて比較したところ、酵素-基質複合体では基質の結合部位が触媒残基の Asp12 からやや離れていたのに対し、酵素-生成物複合体では、生成物のヒドロキシアミノ酸が Asp12 に近接していることがわかった。さらに、生成物のヒドロキシアミノ酸のカルボキシル基の結合部位は、D12N の結晶構造中のギ酸イオンの結合部位と同じであることもわかった。この部位は、L-2-ハロ酸デハロゲナーゼの反応中間体の構造において、カルボキシル基が水素結合している部位と同じであった。これらの結果を一連の流れとして解釈することにより、A2CH の触媒反応は L-2-ハロ酸デハロゲナーゼの場合と同様に、C2 炭素の立体配置が反転する求核置換反応であることが分かった。また、反応においてドメイン間が閉じる構造変化が必要であることが示唆された。

crystal structure, enzyme, complex

講演番号：2C15a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ C 校舎 15 会場

D-*threo*-3-ヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼの立体構造解析
Structural analysis of D-*threo*-3-hydroxyaspartate dehydratase

○松本 悠[1]、安武 義晃[2]、武田 由希[1]、田村 具博[2]、横田 篤[1]、和田 大[1] ([1]北大院農・応生科、[2]産総研・生物プロセス)
○YU MATSUMOTO[1], YOSHIAKI YASUTAKE[2], YUKI TAKEDA[1], TOMOHIRO TAMURA[2], ATSUSHI YOKOTA[1], MASARU WADA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]AIST)

【背景・目的】D-*threo*-3-ヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼ（D-THA DH）は土壌細菌である *Delftia* sp. HT23 株から発見されたピリドキサール 5'-リン酸（PLP）依存性の新規酵素である [1]. D-THA DH は 3-ヒドロキシアスパラギン酸（HA）の 4 種類の光学異性体の内, D-*threo* 体と L-*erythro* 体に対して高いデヒドラターゼ活性を示すが，L-*threo* 体と D-*erythro* 体に対してはほとんど活性を示さない．これまでに HA デヒドラターゼはいくつか報告されているが，その立体構造及び HA 異性体認識機構に関する報告はなく，HA の 2 つの不斉中心をどのように見分けているのかに興味が持たれる．そこで我々はまず D-THA DH を結晶化し，酵素単体と基質アナログ複合体の X 線結晶構造解析を行い，D-THA DH の立体構造情報の取得を試みた.

【方法・結果】D-THA DH 遺伝子配列は GC 含量が高く，大腸菌内での発現量は低かった．そこで，高 GC 含量のゲノムを持つ放線菌である *Rhodococcus erythropolis* L-88 株を宿主としたタンパク質発現系 [2]を用いたところ，D-THA DH の大量発現に成功した．次に酵素単体の結晶化及び X 線結晶構造解析を行い，分解能 1.5 Å で立体構造を決定した．D-THA DH は結晶中でホモダイマーを形成しており，活性部位はサブユニット会合面に存在しダイマー表面に露出していなかった．モノマー構造は 1 次構造から予想された通り, TIM-barrel 及び β-sandwich 構造の 2 つのドメインで構成されていた．活性部位では Lys43 と PLP が結合してシッフ塩基を形成し，His351 と Cys353 が Mg^{2+}を捕捉していた．D-THA DH に本来配位している金属は Zn^{2+}であることが ICP 発光分光分析（ICP-OES）から強く示唆されているので, この Mg^{2+}は結晶化バッファーに多量に含まれる $MgCl_2$ 由来と考えられた．また，基質アナログである D-*erythro*-HA と D-*allo*-threonine をソーキングした複合体結晶の構造をそれぞれ 1.5 Å と 1.6 Å 分解能で決定した．基質アナログ複合体の活性部位では Lys43 と PLP の結合が切れ, 基質アナログの α-アミノ基と PLP のアルデヒド基が結合してシッフ塩基を形成していた．基質アナログの β-OH 基は Mg^{2+}と遠い距離にあるため，OH 基の脱離が起こらず，デヒドラターゼ反応が進まないと考えられる．以上より，菌体内で D-THA DH は活性部位の Zn^{2+}で基質の β-OH 基の脱離を直接行う可能性が示唆された．現在，活性消失変異酵素 H351A 及び C353A を作成し，基質複合体の結晶構造情報の取得を試みている.

1) Maeda *et al.* (2010) *J. Biochem.* **148**(6): 705-712
2) Nakashima and Tamura (2004) *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(9): 5557-5568

hydroxyaspartate, pyridoxal 5'-phosphate, X-ray crystallography

講演番号：2C15p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ C 校舎 15 会場

L-アスパラギン酸オキシダーゼ-キノリン酸シンターゼ複合体の生化学的解析

Biochemical analysis of L-aspartate oxidase - quinolinate synthase complex

○芦田 裕之[1]、秋吉 渚月[2]、丸田 隆典[2]、石川 孝博[2]、澤 嘉弘[2] ([1]島根大総科研センター遺伝子、[2]島根大生資生命工)
○Hiroyuki Ashida[1], Natsuki Akiyoshi[2], Takanori Maruta[2], Takahiro Ishikawa[2], Yoshihiro Sawa[2] ([1]Shimane Univ., [2]Shimane Univ.)

【目的】 L-アスパラギン酸を出発物質とする NAD 生合成経路の初発酵素(NadB)として, L-アスパラギン酸オキシダーゼ(LAO)や L-アスパラギン酸デヒドロゲナーゼ(AspDH)が働くことが知られている. これらの酵素反応の生成物は, 共にイミノアスパラギン酸(ImAsp)であるが, 非常に不安定で水分子と接触とすると半減期 144 秒でオキサロ酢酸とアンモニアに加水分解される. このため, NadB と2番目に働くキノリン酸シンターゼ(QS)は, 複合体を形成し NadB で生成した ImAsp を分子間トンネル経由で QS 活性中心まで輸送し, ジヒドロキシアセトンリン酸(DHAP)との縮合反応でキノリン酸を生成すると予想されている. これまで, LAO, AspDH, QS の X 線結晶構造解析や生化学的解析は報告されているが, 複合体の解析はほとんど行われていない.

今回, *Ralstonia eutropha* 由来の LAO:QS 複合体の発現に成功したので, その生化学的解析について報告する.

【方法・結果】ゲノム構成に合わせ *nadA*, *nadB* の順に発現できるよう, 2 つの遺伝子の間に SD 配列と 7 塩基のスペーサーを挿入した pCold II *Reu_nadA*：*Reu_nadB* を作製した. 大腸菌で発現後, 超音波破砕, Co-カラムで精製を行った. SDS-PAGE で, 溶出画分に等量の 40 kDa (QS)と 60 kDa (LAO)の 2 つのバンドが確認された. ゲル濾過分析で 100 kDa 付近にシングルピークが観察された. この画分を L-Asp, DHAP, フマル酸共存下, pH 8.2, 37℃でインキュベートしたところ, 強いキノリン酸生成活性が確認された（比活性: 9.18 μmoles･min^{-1}･mg protein^{-1}）. すなわち, *R. eutropha* LAO:QS 活性複合体は, 1:1 のヘテロダイマーであった.

嫌気条件下での DHAP, L-Asp, フマル酸に対する K_m 値, Vmax 値は, それぞれ, 4.08 mM, 3.09 mM, 5.78 mM, 11.1 units･mg^{-1}, 10.8 units･mg^{-1}, 10.9 units･mg^{-1} であった. 一方, 複合体 LAO 単独での L-Asp に対する K_m 値, Vmax 値は, 3.74 mM, 11.3 units･mg^{-1} であった. また, 好気条件下での複合体反応のカイネティクス･パラメーターも測定したが, 嫌気条件の値と大差なかった. これらの結果は, LAO:QS 複合体が効率よく共役触媒していることを示唆している. また LAO 反応で生成した還元型 FADH2 は, コハク酸デヒドロゲナーゼの逆反応のように LAO 活性中心でフマル酸をコハク酸に還元し, 酸化型 FAD に戻ることが示唆される.

現在, *P. horikoshi* QS の三次元構造情報を基に, LAO：QS 複合体を形成している QS 側インタフェースを 8 残基予想し, これらの変異酵素を解析中である.

L-aspartate oxidase, quinolinate synthase, Complex

講演番号：2C15p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ C 校舎 15 会場

超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来のシステイン合成酵素 OPSS の F225 の役割
The role of F225 of *O*-phosphoserine sulfhydrylase (OPSS) from hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1
○武田 瑛美[1]、中村 卓[1]、石川 一彦[2] ([1]長浜バイオ大、[2]産総研)
○Emi Takeda[1], Takashi Nakamura[1], Kazuhiko Ishikawa[2] ([1]nagahama bio Univ, [2]AIST)

O-phosphoserine sulfhydrylase (OPSS)は、ピリドキサール 5’リン酸 (PLP) 依存性の酵素で、1 次基質(ホスホセリン(OPS))と 2 次基質(スルフィド)によるシステイン合成反応を触媒し、80～90℃を至適温度とする耐熱性酵素である。OPSS は広い基質特異性をもち、さまざまな 2 次基質を用いることで医薬品やそのビルディングブロックとなり得るさまざまな非天然アミノ酸を合成できる。OPSS による効率の良い非天然アミノ酸合成を行うことが本研究の最終目的である。そのためにまず、OPSS の酵素反応機構の解明が必要である。現在、活性部位の中で役割が明確に分かっている残基は、PLP とシッフ塩基を形成する K127 のみである。最近の論文で、T152、Q224 が基質のカルボキシル基を補足していることが分かった。本研究では、F225 の役割の推定を目的とした。

X 線結晶構造解析による OPSS、OPSS_中間体、OPSS_Cys の構造比較で、側鎖の Root Mean Square Deviation (RMSD)が 0.4 Å以上動きのある活性部位残基が 8 つあることがわかった。これらの残基は、基質が入ることでポケットを閉じ、生成物ができると開く。このうち一番顕著に変化の見られるのが F225 であった。そこで、F225A 変異体を作製し、F225 だけで活性がどう変わるか研究をする。

現在、Inverse PCR 法による部位特異的変異導入で F225A のプラスミド作製まで終了し、今後精製と酸ニンヒドリンによる Cys での活性測定を行う。

F225A によって活性低下がみられる場合、基質の取り込みと生成物の放出に関わる残基と判断できる。推測をより確定的なものにするため、その後、吸光度測定で経時変化を 2 つの方法で見る。1 つは F225A と OPS での中間体測定、もう 1 つは F225A と OPS と求核剤の生成物測定である。中間体測定の方法は、OPSS と OPS の反応中間体が、分光光度計を用いれば 470 nm に中間体特異のピークが見られるので、その吸光度変化を観測する。生成物測定では、アミノ酸分析計や液体クロマトグラフィーで Cys やそれ以外の生成物である非天然アミノ酸の活性を測定する。これら 2 つの実験結果を野生型の場合と比較して検討をしたい。

F225A によって活性に変化がない場合、ポケットの開閉に関わるほか 7 残基との共同作業で取り込みと放出が行われ、F225 のみでは変化が見られなかったと推測できる。

O-phosphoserine sulfhydrylase (OPSS), phenylalanine 225, PLP dependent enzyme

講演番号：2C15p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ C 校舎 15 会場

Pseudomonas sp. F2a 株由来セレノリン酸合成酵素の解析
Characterization of selenophosphate synthetase from *Pseudomonas* sp. F2a
○波北 悟、斎藤 茂樹、谷 泰史、三原 久明（立命館大・生命科学・生物工）
○Satoru HAGITA,Shigeki SAITO,Yasushi TANI,Hisaaki MIHARA (Dept. Biotechnol., Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

【目的】微生物の中には、毒性の高いセレンオキシアニオン (セレン酸・亜セレン酸) を還元し、菌体外にセレン粒子もしくはジメチルセレニドとして排出するものが存在する。*Pseudomonas* 属細菌はこれらセレン排出機構を持つ一方で、必要量のセレンをセレンタンパク質中に取り込む機構も有する。高濃度セレン地帯の土壌から単離された *Pseudomonas* sp. F2a 株は、高い亜セレン酸耐性能を有し、また、水環境中で安定に存在するセレン酸を好気条件下で元素状セレンに還元することが出来る。そのため、本株にはセレン排出ならびに取り込みに関わる一連の遺伝子が存在すると推定される。

セレノリン酸合成酵素 (SPS) はセレニドと ATP を基質としてセレノリン酸を生成する。セレノリン酸はその後、セレノシステイン合成酵素に受け渡され、セレノシステイル-tRNA に変換されることがわかっている。一方、菌体内におけるセレニドの供給源については未だ不明な点が多い。本研究では、 *Pseudomonas* sp. F2a 株の SPS 遺伝子 (*selD*) の *E. coli* 発現系を構築し、精製酵素の性質について解析した。

【方法・結果】*Pseudomonas* sp. F2a の類縁株である *Pseudomonas stutzeri* ATCC17588 株の *selD* 遺伝子の配列を基にしてプライマーを作製し、F2a 株のゲノム DNA を鋳型にして PCR を行った。 PCR 増幅産物を pColdI に組み込み、pColdI-F2a_selD を作製した。これを *E. coli* BL21(DE3) に導入し、発現した His-tag 融合タンパク質を Ni-NTA カラムを用いて精製した。セレノリン酸合成活性は、精製タンパク質にセレニド、ATP を基質として加え、嫌気条件下 37ºC で反応させ、生成した AMP を COSMOSIL $5C_{18}$-MS-II カラムを用いた HPLC で定量することにより測定した。本酵素の ATP に対する K_m、V_{max} 値はそれぞれ 1.2 mM、140 μmol·min^{-1}·mg^{-1} であった。また、*E. coli selD* 欠損株に pColdI-F2a_selD を導入し、*E. coli* のセレンタンパク質であるギ酸脱水素酵素がベンジルビオロゲンを還元する活性を指標として調べた結果、本酵素が *E. coli selD* を相補することが示された。現在、本酵素を用いてセレノシステイン合成酵素やその他のタンパク質との相互作用の解析を進めている。

Selenophosphate synthetase, Selenocysteine, *selD*

講演番号：2C15p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ C 校舎 15 会場

L-トリプトファン要求株を用いた安定型トリプトファン脱水素酵素のスクリーニング

Screening of stable L-tryptophan dehydrogenase mutant by use of *E. coli* tryptophan auxotroph

○松井 大亮[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Daisuke MATSUI[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO)

【目的】我々は、血中アミノ酸による疾病検出を安価且つ簡易的に行うため、酵素を用いた定量法の開発を進めている。*Nostoc punctiforme* ATCC29133由来L-トリプトファン脱水素酵素（TrpDH）は、L-トリプトファンに基質特異性が高く、定量用酵素としての利用が可能である[1)]。しかし、本酵素は不安定なため、グリセロールなどの安定化剤の添加が必要となるが、添加したグリセロールにより定量時のベースラインに影響が生じる問題点がある。本研究では、安定なTrpDH変異型酵素を作成することを目的として、変異型酵素ライブラリーからのスクリーニングを行い、得られた変異型酵素の諸性質解明、L-トリプトファン定量への応用を検討した。
【方法】本酵素遺伝子を挿入した発現ベクターを鋳型とし、エラープローンPCRにより、本酵素変異型酵素ライブラリーを作成した。大腸菌の*trp*Bを破壊したトリプトファン要求株に、変異型酵素ライブラリーを形質転換し、インドール-3-ピルビン酸（IPA）を添加したM9最少培地で培養した。継代培養を行った後に、植菌したプレート上に出現した株のTrpDH活性を測定した。得られた変異型酵素の各種特性を解明すると共に、血漿サンプル中のL-トリプトファンを定量した。
【結果】変異型酵素ライブラリーからのスクリーニング：スクリーニングの宿主として、トリプトファン要求株を用いて、トリプトファンの前駆体であるIPAからのトリプトファン生成能力（TrpDH活性）が高い、つまり生育速度の速い菌株を選別することで、容易にスクリーニングすることが可能となった。継代培養後にプレートに出現したコロニーから、TrpDH活性・安定性の高い変異型酵素の取得に成功した。変異型酵素のアミノ酸配列において、L59F/D168G/A234D/I296Nに置換されていた。
野生型と変異型酵素の特性比較：グリセロールを添加していない条件では、野生型酵素は24時間後の残存活性が19.3％と著しく減少するのに対し、変異型酵素は、90％以上の活性を維持していた。また、変異型酵素の比活性は、野生型酵素と比較して、約10倍の活性を示した。
L-トリプトファン定量への応用：野生型酵素と同様に、変異型酵素もまたL-トリプトファンに対して、高い基質特異性を示した。変異型酵素は、安定化剤の無い条件でも長期間活性を維持し、血漿サンプル中のL-トリプトファン定量用酵素として用いることが可能となった。

1）浅野、松田、特開2012-183018号公報

L-Tryptophan dehydrogenase, Amino acid determination, Random mutagenesis

講演番号：2C15p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ C 校舎 15 会場

新規 D-*erythro*-3-hydroxyaspartate 分解酵素の探索及び一次構造解析

Screening of a novel D-*erythro*-3-hydroxyaspartate degrading enzyme and determination of the primary structure

○和田 大、長野 弘幸、横田 篤（北大院農・応生科）
○Masaru WADA,Hiroyuki NAGANO,Atsushi YOKOTA (Hokkaido Univ.)

【背景・目的】アスパラギン酸のアナログである 3-ヒドロキシアスパラギン酸（HA）は分子内に 2 つの不斉炭素を持ち、4 種類の立体異性体が存在する。4 種類の HA 異性体のうち、L-*threo*-HA に特異的に作用する L-*threo*-HA デヒドラターゼ [1]と、L-*erythro*-HA 及び D-*threo*-HA に作用する D-*threo*-HA デヒドラターゼ [2]がすでに報告されている。一方で、D-*erythro*-HA に作用する酵素の報告例はほとんどない。また、既知の 2 つの HA 分解酵素のアミノ酸配列は、互いに相同性を示さない。本研究では、新規な D-*erythro*-HA 分解酵素を探索し、その諸性質を既知の HA 分解酵素と比較した。
【方法・結果】DL-*erythro*-HA を単一窒素源とした土壌スクリーニングにより D-*erythro*-HA 分解酵素を持つ微生物を探索した。その結果、*Pseudomonas* sp. N99 株から D-*erythro*-HA デヒドラターゼ（D-EHA DH）を見出した。N99 株は HA の 4 種類の異性体すべてに対してデヒドラターゼ活性を持っていた。D-*erythro*-HA 分解酵素の性質を調べるために、N99 株より D-EHA DH の精製を行った。各種クロマトグラフィー及び硫安分画により、目的の酵素をほぼ均一に精製することができた。精製酵素は L-*threo*-HA、D-*erythro*-HA、D-*threo*-HA の順に高いデヒドラターゼ活性を示し、L-*erythro*-HA には活性を示さなかった。このことより、D-EHA DH は HA の 3 番目の炭素の立体配置を厳しく認識していることが示唆された。精製酵素の部分アミノ酸配列を解析したところ、本酵素は様々な微生物由来のセリン/スレオニンデヒドラターゼと高い相同性を示した。さらにインバース PCR 法により全長の推定アミノ酸配列を取得した。既知の HA 分解酵素と比較すると、L-*threo*-HA デヒドラターゼとは約 68%の高い相同性を示したが、D-*threo*-HA デヒドラターゼとは有意な相同性を示さなかった。これらの相同性の結果から、D-EHA DH はセリン/スレオニンデヒドラターゼに属する酵素であり、また L-*threo*-HA デヒドラターゼのホモログであることが明らかになった。現在は D-EHA DH の発現系構築を行っている。

1) Murakami *et al.* (2009) *J. Biochem.* **145**(5): 661-668
2) Maeda *et al.* (2010) *J. Biochem.* **148**(6): 705-712

hydroxyaspartate, serine/threonine dehydratase, PLP-dependent enzyme

講演番号：2C15p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ C 校舎 15 会場

Penicillium sp. AIU 27 が産生するタンパク質酸化能を持つ L-アミノ酸酸化酵素の精製と性質
Purification and characterization of an L-amino acid oxidase with protein-oxidixing activity from *Penicillium* sp. AIU 27

○平良 竜大[1]、星 葉子[1]、松田 聡[1]、山田 美和[1]、日比 慎[2]、小川 順[2]、礒部 公安[1]([1]岩手大・農、[2]京大院農・応用生命)
○ Ryota TAIRA[1], Youko HOSHI[1], Sou MATSUDA[1], Miwa YAMADA[1], Makoto HIBI[2], Jun OGAWA[2], Kimiyasu ISOBE[1] ([1]Iwate Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】現在までに多数の微生物由来 L-アミノ酸オキシダーゼが報告されている。これらの中には低分子ペプチドを酸化する酵素も存在するが、タンパク質を酸化する L-アミノ酸オキシダーゼの報告はない。本研究では、β-ラクトグロブリンやゼラチン等のタンパク質を酸化するオキシダーゼを産生する微生物を探索し、*Penicillium* 属糸状菌が目的とする酵素を産生することを見出したので、酵素生成の最適培養条件、酵素の精製および諸性質について検討した。
【方法】目的酵素を産生する微生物は、N^{α}-Z-L-リジンを単一窒素源とする培地を用いた集積培養法で探索した。酵素活性は、N^{α}-Z-L-リジン、β-ラクトグロブリン、サケ由来ゼラチンを基質にして、基質の酸化で生成される H_2O_2 を比色法（555 nm)で測定して求めた。酵素は、L-リジン培地で培養した菌体から粗酵素液を調製し、硫安塩析後、Pheny-Toyopearl、DEAE-Toyopearl、Aminooctyl-Toyopearl、Hydroxylapatite、Toyoprarl HW-55 の各カラムクロマトグラフィーで精製した。
【結果・考察】分離菌は *Penicillium* 属糸状菌と同定された。本菌は、N^{α}-Z-L-リジン培地および L-リジン培地で酵素を誘導し、酵素生成量は 3 日培養で最大に達した。3 日培養菌体を用いて上記の方法で精製した結果、約 1,200 倍精製され（活性回収率は約 20%)、Native-および SDS-PAGE で単一のタンパク質バンドが得られた。本酵素は、補欠分子族としてフラビンを共有結合しており、分子質量は約 290 kDa（サブユニット= 75 kDa）と推定された。本酵素は、β-ラクトグロブリン（K_m=0.17 mM)、サケ由来ゼラチン、ミオグロビンを酸化し、リジン含有ペプチド、塩基性 L-アミノ酸、芳香族 L-アミノ酸も酸化したが、D-アミノ酸および酸性 L-アミノ酸、L-バリン、L-セリン、L-スレオニンなどを酸化せず、アミン類にも作用しなかった。本酵素とタンパク質との反応から、過酸化水素とアンモニアの生成が確認されたので、タンパク質中のリジンのε-アミノ基が酸化されると推定した。しかし、L-リジンおよびその誘導体に対する K_m 値からε-アミノ基よりもα-アミノ基に対する親和性の方が高いと推定された。本酵素は、pH 5.0～9.0 の広い範囲で作用し、最適反応 pH は 6.5～8.0 であった。また、最適反応温度は 55℃で、pH 5.0～6.0 で 40℃, 30 分間加温しても活性は安定で、pH 6.5 でも約 50%の活性が残存していた。現在までに、牛血清アミンオキシダーゼがタンパク質を酸化するとの報告があるが、本研究で見出した酵素はアミン類には作用せず、補欠分子属もアミンオキシダーゼとは異なっていた。よって、本酵素は、微生物由来のタンパク質を酸化する新規な L-アミノ酸オキシダーゼと考えられた。

Penicillium sp., L-amino acid oxidase, Protein oxidase

講演番号：2C15p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ C 校舎 15 会場

卵殻膜由来リシルオキシダーゼによるエラスチンおよび細胞に対する架橋形成

Cross-link formation by egg shell membrane-derived lysyl oxidase on elastin and cultured cell

○井上 侑紀[1]、伊井野 貴史[1]、山下 裕輔[1]、青笹 正義[1]、丸 勇史[1]、赤川 貢[2]、金 武祚[1]([1]株式会社ファーマフーズ、[2]大阪府立大学)
○Yuki INOUE[1], Takashi Iino[1], Yusuke Yamashita[1], Masayoshi Aosasa[1], Isafumi Maru[1], Mitsugu Akagawa[2], Mujo Kim[1] ([1]Pharma Foods International Co.,Ltd., [2]Osaka Prefecture Univ.)

【目的】
リシルオキシダーゼ（Lysyl oxidase, LOX）はエラスチンやコラーゲンのリジン残基を介して架橋反応を引き起こす酵素である。我々は、鶏卵の未利用素材である卵殻薄膜に LOX が存在することを見出し、その高度利用を行ってきた。卵殻膜由来リシルオキシダーゼのエラスチンおよびヒト真皮由来線維芽細胞（Human dermal fibroblast, HDF）に対する架橋効果を検討したので報告する。
【方法】
LOXのエラスチンに対する効果　LOXは卵殻膜から粗精製し、１％になるようにリン酸カリウムバッファー（100 mM、pH 7.4）に調製した。エラスチン（エラスチンB、細胞外基質研究所）は１％になるように同バッファーで調製した。エラスチン溶液とLOX溶液を 20:1 になるように混合して 96 穴プレートに添加し、37℃に加温、その後４℃に冷却し、濁度を測定した。また、エラスチン-LOX混合溶液をカバーグラス上に載せ、37℃で 16 時間反応後、不溶物の構造を壊さないように余分な溶液を吸入除去し、乾燥後、走査型電子顕微鏡で観察した。対照はBSAまたは熱不活化したLOXを用いた。
LOX のヒト真皮由来線維芽細胞（HDF）に対する効果　HDF は、Cell Applications, Inc.から購入し、添付の無血清培地を用いて培養した。HDF を 24 穴プレート“セルデスク（住友ベークライト）”に 2 x 10^4 cells/well で播種し、２～６日間培養後 LOX 溶液を 0.1%になるように添加し、さらに 1～2 日間培養し、MetOH 固定後、位相差顕微鏡下で観察した。また、細胞膜および核を蛍光試薬で染色し、暗視野で観察した。
【結果】
LOX のエラスチンに対する効果　エラスチン溶液に LOX を添加した場合は不溶物の形成（濁度の上昇）が観察され、４℃に冷却した場合でも濁度の低下は小さかった。また、電子顕微鏡観察では、エラスチン凝集物が結合した“数珠珠様構造物”が多数認められたが、対照として不活化 LOX または BSA を添加した場合は“数珠珠様構造物”は見られなかった。
LOX のヒト真皮由来線維芽細胞（HDF）に対する効果　LOX を添加した場合は位相差顕微鏡観察においても細胞膜および核の蛍光染色後の暗視野観察においても細胞が結合・凝集する像が観察されたが、対照として BSA を添加した場合は細胞が結合・凝集する像は見られなかった。
以上の結果より、LOX はエラスチンを架橋し、エラスチン発現ヒト線維芽細胞を結合・凝集させるので、肌の保湿や弾力を訴求する化粧品への応用が期待される。

Egg shell membrane, Lysyl oxidase, Elastin

講演番号：2C15p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ C 校舎 15 会場

マウス骨格筋で転写因子 FOXO1 はグルタミン代謝を調節する

FOXO1 transcription factor regulates glutamine metabolism in the skeletal muscle

○亀井 康富[1,2]、狩野 理延[1]、笠原 知美[1]、金井 紗綾香[1]、三浦 進司[3]、江崎 治[3]、菅波 孝祥[1]、北村 忠弘[4]、小川 佳宏[1] ([1]東京医科歯科大、[2]京都府立大、[3]国立健康栄養研、[4]群馬大学)
○Yasutomi KAMEI[1,2], Masanobu KANOU[1], Tomomi KASAHARA[1], Sayaka KANAI[1], Shinji MIURA[3], Osamu EZAKI[3], Takayoshi SUGANAMI[1], Tadahiro KITAMURA[4], Yoshihiro OGAWA[1] ([1]Tokyo Medical & Dental Univ, [2]Kyoto Prefectural Univ, [3]Natl Inst of Health & Nutri, [4]Gumma Univ)

【背景と目的】骨格筋はヒトの体重の約 40%を占め、人体で最も大きい組織でありタンパク質（アミノ酸）の形で主要なエネルギー貯蔵を行なっている。飢餓時には血糖維持のため、骨格筋はアクチンやミオシンといった構成タンパク質を分解し、生成したアミノ酸は肝臓にて糖新生の材料として利用される。一方、Forkhead protein-01（FOXO1）はフォークヘッド型の転写因子であり、生体代謝の同化ホルモンであるインスリンと拮抗することが知られている。我々はこれまでに、飢餓や激しい運動等のエネルギー欠乏状態において転写因子 FOXO1 遺伝子の発現が骨格筋で著しく増加することを見出した。また、骨格筋特異的 FOXO1 過剰発現マウス（FOXO1 マウス）では、骨格筋の萎縮が生じることを示した。本研究では、エネルギー欠乏時の骨格筋における FOXO1 の作用機序解明を目的とした。
【方法と結果】FOXO1 マウスおよび FOXO1 を骨格筋特異的に欠損させたマウスを使用し、それぞれの野生型同腹仔の骨格筋と比較して、タンパク質・アミノ酸代謝に関する遺伝子発現および代謝産物を測定した。その結果、FOXO1 はグルタミン合成酵素遺伝子を発現制御し、骨格筋内のグルタミン量が変動することが判明した。さらに、C2C12 筋芽細胞を用いた in vitro の解析により、FOXO1 はグルタミン合成酵素遺伝子プロモーターを転写活性化する事が明らかになった。
【考察】FOXO1 が骨格筋で顕著に増加している飢餓状態においては、骨格筋は萎縮が生じ、構成タンパク質を分解し糖新生に利用される。グルタミンは、糖新生の基質として利用されると共に、アミノ酸分解時に生成されるアンモニアの消去にも役割を果たすことが知られる。すなわち FOXO1 によるグルタミン合成は生体の飢餓適応の一助である可能性がある。一方、FOXO1 は、骨格筋アミノ酸代謝に重要な分岐鎖アミノ酸代謝酵素（BCAT , BCKDH)、アラニンアミノ基転移酵素などの遺伝子発現は活性化せず、骨格筋アミノ酸代謝においての他の転写因子との役割分担があることが示唆される。

skeletal muscle, glutamine, gene expression

講演番号：2C15p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ C 校舎 15 会場

Mycobacterium avium 由来 MAV_3489 と *M. smegmatis* 由来 MSMEG_2932 の機能解析
Molecular characterizations of MAV_3489 from *Mycobacterium avium* and MSMEG_2932 from *M. smegmatis*
○森 茂太郎、金 玄、林原 絵美子、柴山 恵吾（国立感染研・細菌二）
○Shigetarou MORI,Hyun KIM,Emiko RIMBARA,Keigo SHIBAYAMA (Dept. Bacteriology II, NIID)

【目的】酵母や大腸菌の研究から、1 次構造上に Histidine Triad モチーフ（HIT モチーフ）を有するタンパク質はヌクレオチドを基質として加水分解活性を示すことが知られていた。結核菌由来 Rv2613c も 1 次構造上に HIT モチーフが存在していることから、ヌクレオチド加水分解酵素であると予想されていた。しかしながら、Rv2613c の詳細な機能解析を行った結果、我々は本酵素が基質である diadenosine polyphosphate に対して加水分解活性ではなく、加リン酸分解活性を示すことを明らかにした。また、Rv2613c の立体構造を決定し、本酵素が特徴的な 4 量体構造を形成していること、並びにその 4 量体構造が基質結合部位の形成に関与していることを示した。一方、結核菌と同様にマイコバクテリウム属に属する細菌である *Mycobacterium avium* と *M. smegmatis* には、1 次構造上で Rv2613c と高い相同性を示す *M. avium* 由来 MAV_3489 と *M. smegmatis* 由来 MSMEG_2932 がそれぞれ存在しており、両者ともに HIT モチーフを有していることが分かっている。しかしながら、その機能や多量体形成については未知のままであった。そこで本研究では、MAV_3489、並びに MSMEG_2932 の発現、精製、及び機能解析を行い、それぞれの活性様式と多量体形成について明らかにするとともに、Rv2613 との比較を行うことを目的とした。
【方法・結果】MAV_3489、並びに MSMEG_2932 をコードする遺伝子をクローニングし、発現用ベクター pColdI にそれぞれ組み込み、大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株を宿主とした大量発現株を構築した。低温条件下で培養液中に 0.5 mM の Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid を加えることによって、発現の誘導を行った。発現を誘導した菌体をそれぞれ集菌した後、超音波破砕と超遠心操作により、細胞抽出画分を得た。それぞれの細胞抽出画分から 2 種類のカラムクロマトグラフィーにより SAD-PAGE 上で単一バンドになるまで精製を行った。精製した MAV_3489、並びに MSMEG_2932 の酵素活性は HPLC を用いて測定した。その結果、両酵素ともにリン酸存在下で diadenosine tetraphosphate を基質として利用し、反応生成物として ADP と ATP が検出された。従って MAV_3489 と MSMEG_2932 は、ともに Rv2613c と同様に加リン酸分解活性を示すことが明らかにされた。また、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの結果から、MAV_3489 と MSMEG_2932 はともに溶液中で Rv2613c と同様の 4 量体を形成して活性を保持していることが示された。従って、MAV_3489 と MSMEG_2932 においても 4 量体構造が基質結合部位の形成に関与していることが示唆された。今後は MAV_3489、並びに MSMEG_2932 の詳細な酵素学的諸性質を決定し、Rv2613c との比較を行う予定である。

Mycobacteria, phosphorylase, nucleotide

講演番号：2C15p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ C 校舎 15 会場

HIV-1 逆転写酵素の cDNA 合成活性についての検討

Enzymatic characterization of human HIV-1 reverse transcriptase for use in cDNA synthesis

○小西 篤、篠村 まゆ、保川 清（京大院・農）
○Atsushi Konishi,Mayu Shinomura,Kiyoshi Yasukawa (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】ヒト免疫不全ウイルス 1 型（HIV-1）逆転写酵素（RT）は分子量 51,000 の p51 と 66,000 の p66 から成るヘテロダイマー（p66/p51）である。HIV-1 RT はエイズ治療薬である HIV-1 RT 阻害剤の開発のツールとして実用化されているが、cDNA 合成には使用されていない。一方、モロニーマウス白血病ウイルス（MMLV）RT は cDNA 合成に実用化されている。本研究では、HIV-1 RT と MMLVRT の cDNA 合成活性を比較した。
【方法】①組換えHIV-1 RTの調製：HIV-1タイプM RT（HIV-1 M RT）とHIV-1タイプO RT（HIV-1 O RT）に対して、p51（Pro1-Trp426）を発現させた大腸菌BL21(DE3)の菌体とp66（Pro1-Leu561）を発現させた菌体を混合し、超音波破砕の後、可溶性画分からp66/p51を精製した。②poly(rA)-p(dT)$_{15}$（T/P）へのdTTPの取込み：25 μM T/P（濃度はp(dT)$_{15}$のモル換算）、0.2 mM [^{3}H]dTTP存在下、37℃または42℃で反応を行い、経時的に反応液を採取し、酸不溶性画分への放射能の取込みから初速度を求めた。③cDNA合成：0.8 pg/μLのモデルRNA（1,014塩基）存在下、46℃でcDNA合成反応を行った後、PCRを行った。PCRの反応物をアガロース電気泳動にかけ増幅産物を解析した。④熱安定性の評価：RTを42、44、46、48、50℃で10分間熱処理した後に、37℃でT/PへのdTTP取込み活性を測定した。
【結果】①T/PへのdTTP取込み活性 (37℃での速度論的解析)：HIV-1 M RTとHIV-1 O RTの$K_{m,dTTP}$はそれぞれ20 μM、30μMでMMLV RT（250 μM）の8%、12%であった。$K_{m,T/P}$はそれぞれ1.4 μM、1.3 μMでMMLV RT（5.6 μM）の25%、23%であった。k_{cat}はそれぞれ0.35 s^{-1}、1.1 s^{-1}でMMLV RT（29 s^{-1}）の1.2%、3.8%であった。②T/PへのdTTP取込み活性 (42℃での有機溶媒の効果)：ホルムアミドが活性を50%に低下させる濃度（IC_{50}）はHIV-1 M RTとHIV-1 O RTでは22%(w/v)、MMLV RTでは8%であった。ジメチルスルホキシドのIC_{50}はHIV-1 M RTとHIV-1 O RTでは16%、MMLV RTでは21%であった。③cDNA合成：いずれのRTもcDNA合成反応時の酵素濃度が0.1－10 nMではPCRで増幅産物が得られたが、50 nM 以上では得られなかった。④熱安定性：HIV-1 M RT、HIV-1 O RT、MMLV RTのT_{50}（10分間の熱処理により活性が50%に低下する温度）はそれぞれ42℃、46℃、44℃であった。
【考察】HIV-1 RTはMMLV RTよりも、T/Pに対する高い親和性とホルムアミドに対する高い耐性を有した。ホルムアミドは核酸増幅において核酸の二次構造を減少させるために使用されている。これらのことから、HIV-1 RTが標的RNAの高感度検出に有用である可能性が示唆された。
【文献】Konishi, A., Shinomura, M., and Yasukawa, K. (2012) *Appl. Biochem. Biotechnol.* in press

reverse transcriptase, HIV-1, cDNA synthesis

講演番号：2C15p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ C 校舎 15 会場

Pyrococcus furiosus DNA リガーゼのライゲーション活性向上に向けた立体構造に基づく変異体解析
Structure-based mutational study of an *Pyrococcus furiosus* DNA ligase towards improvement of ligation activity

○田邉 麻衣子[1]、石野 園子[2]、養王田 正文[3]、森川 耿右[4]、石野 良純[2]、西田 洋一[1]([1]日立・中研、[2]九大院・農、[3]東農工大・院工、[4]京大・iCeMS)
○Maiko TANABE[1], Sonoko ISHINO[2], Masafumi YOHDA[3], Kosuke MORIKAWA[4], Yoshizumi ISHINO[2], Hirokazu NISHIDA[1] ([1]Central Research Laboratory., Hitachi, Ltd., [2]Dept. of Biosci. and Biotech., Kyushu Univ., [3]Dept. of Biotechnol., Tokyo Univ. of Agric. and Technol., [4]iCeMS, Kyoto Univ.)

ATP を補因子として用いる ATP 依存性 DNA リガーゼは 3 段階の反応により DNA 鎖を結合している。1段階目の反応では，DNA リガーゼに ATP が作用することによって AMP/DNA リガーゼ複合体が形成（アデニリル化）される。2 段階目の反応では、AMP/DNA リガーゼ複合体が基質 DNA に結合し，基質 DNA の 5’部位をアデニリル化する。3 段階目に AMP/基質 DNA 複合体 から AMP が遊離すると同時にホスホジエステル結合が形成され、反応が完了する。これまで、いくつかの ATP 依存性 DNA リガーゼの立体構造が得られているが、構造相同性の高い C 末端側の活性ドメインを比較してみると、古細菌と真核生物由来の DNA リガーゼには，ファージやウィルス由来のものと異なりC 末端に30～50 残基のαヘリックスが付加されていることがわかった。超好熱古細菌 *Pyrococcus furiosus*（*Pfu*）由来DNAリガーゼの結晶構造から，基質DNAが無い状態では，この C 末端ヘリックスは 2 つの活性ドメイン(adenylylation and OB-fold domains)の間に位置し，イオン相互作用によって 2 つの活性ドメインの Closed 構造を維持していることがわかった（Nishida et al. (2006)）。一方，human DNA ligase Ⅰ の基質 DNA との複合体の結晶構造解析では，2 つの活性ドメインが開いて DNA を挟むように結合しているが，C 末ヘリックスは closed 構造とは異なった位置にあることが報告されている(Pascal et al. (2004))。

本研究では，この C 末端ヘリックスの構造変化に着目し，*Pfu* DNA リガーゼにおいて，adenylylation domain と OB-fold domains 間の構造変化が容易になることによりライゲーション活性が改善するかどうかについて，C 末端ヘリックス近傍の残基を改変した変異体を作製して確認した。Closed 構造で adenylylation domain とC 末端ヘリックス間のイオン相互作用に関わり，且つ活性中心に近い荷電残基を置換した変異体の DNA 結合活性を測定した結果，540 番目のアスパラギン酸を逆電荷のアルギニンに置換した変異体が，野生型に比べて幅広い温度領域でライゲーション効率が向上することを確認した。更に，540 番目のアスパラギン酸の変異によるライゲーション効率の向上が，どの反応段階に寄与して起こっているかを評価した結果，1段階目のリガーゼがアデニリル化されるステップと，DNA 結合効率が向上することにより，全体のライゲーション効率が改善していることが確認できた。

DNA ligase, Archaea

講演番号：2C15p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ C 校舎 15 会場

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来 RNase P 構成タンパク質 Rpr2 の発現精製と性質

Overproduction and characterization of the protein Rpr2 in *Saccharomyces cerevisiae* RNase P

○古谷 貴志、石原 雅人、今井 崇喜、西本 悦子、山下 昭二、角田 佳充、木村 誠（九州大院農）
○ takashi FURUTANI, masato ISHIHARA, takayoshi IMAI, etsuko NISHIMOTO, syoji YAMASHITA, yoshimitsu KAKUTA, makoto KIMURA (Kyushu Univ.)

【背景・目的】リボヌクレアーゼＰ（RNase P）は前駆体 tRNA の 5’末端余剰配列を切断するエンドヌクレアーゼである。酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）RNase P は１分子の RNA と９種のタンパク質から構成されている。本研究では、構成タンパク質の一つである Rpr2 を、大腸菌を用いて調製するとともに、その RNA との作用様式を蛍光共鳴エネルギー移動法により検討した。
【方法・結果】Rpr2 の調製は、発現ベクターpET-15b と大腸菌 BL21(DE3)を用いて行った。組換えタンパク質の精製は、ニッケルアフィニティーカラムおよび陽イオン交換カラム（Resourse S）により行った。酵母 RNase P RNA および pre-tRNA^{Tyr} は試験管内転写により調製し、陰イオン交換カラム DEAE Sepharose により精製した。Rpr2 の RNA 作用様式は、蛍光標識した相補的塩基配列を持つ RNA 鎖（Cy3-オリゴと Cy5-オリゴ）と室温で混合後、励起波長 λ=535nm で照射し、λ=590nm の蛍光強度の消光を測定することにより RNA アニーリング促進活性を評価した。続いて、上記の系に Cy5-オリゴと同一の塩基配列をもつ未標識 RNA を加え、蛍光強度の回復を測定することにより RNA 解離促進活性を評価した。Rpr2 を大腸菌内で発現し精製したところ、その収量は 1.96 mg/ml であった。まず、Rpr2 の RNA との作用様式を蛍光共鳴エネルギー移動法により測定したところ、Cy3-オリゴと Cy5-オリゴのアニーリングを 3.5 倍促進するとともに、その解離も促進した。この結果より、Rpr2 はアニーリング促進活性および解離促進活性をともに持つことが分かった。さらに、Rpr2 の Cys90 と Cys93、および Cys115 と Cys117 をそれぞれ Ser に置換した変異体（C90S/C93S と C115S/C117S）を作成し、同様に RNA アニーリング促進活性と RNA 解離促進活性を測定したところ、C90S/C93S 変異体は野生型と同程度の両促進活性を示したが、C115S/C117S 変異体の両促進活性はともに低下していた。この結果から、Rpr2 の RNA アニーリングおよび解離促進活性には、Cys115 と Cys117 が関与していることが分かった。現在、Rpr2 の RNase P RNA および pre-tRNA^{Tyr} への結合能をゲルシフトアッセイにより検討中である。

ribonuclease P

講演番号：2C15p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ C 校舎 15 会場

超好熱性古細菌リボヌクレアーゼ P RNA のステムループ構造の触媒活性への関与

The stem loop structures of the hyperthermophilic archaeal ribonuclease P RNA contribute to catalytic activity

○上田 敏史[1]、原 唯史[2]、中島 崇[1,2]、角田 佳充[1,2]、木村 誠[1,2] ([1]九大院システム生命、[2]九大院農)
○Toshifumi UEDA[1], Tadashi HARA[2], Takashi NAKASHIMA[1,2], Yoshimitsu KAKUTA[1,2], Makoto KIMURA[1,2] ([1]Grad. sch sys life sci, Kyushu Univ., [2]Grad. sch agr, Kyushu Univ.)

【背景･目的】
リボヌクレアーゼ P (RNase P)は、前駆体 tRNA（pre-tRNA）の 5'リーダー配列のプロセシングに関与するエンドヌクレアーゼであり、触媒活性を持つ RNA と補助因子であるタンパク質から構成されている。超好熱性古細菌（*Pyrococcus horikoshii* OT3）の RNase P は、1 分子の RNA（*Pho*pRNA）と 5 種のタンパク質（*Pho*Pop5、*Pho*Rpp21、*Pho*Rpp29、*Pho*Rpp30、*Pho*Rpp38）から構成されている。我々は *Pho*pRNA のヘリックス P3 と P8 を含む 2 つのステムループ構造が触媒活性に関与していることを報告した。本研究では、両ステムループ構造の変異体を作成し、触媒活性への関与についてさらに検討した。
【材料･方法】
両ステムループ構造の欠損体およびループを残しステム領域の長さを変えた変異体を作成し、5 種のタンパク質存在下において pre-tRNA 切断活性の経時変化と最適温度を測定した。また、*Pho*pRNA と両ステムループ構造の欠損体である ΔP3 および ΔP8 の速度論的パラメーターの算出を行なった。最後に、P3 および P8 ステムループ構造がタンパク質との結合に関与しているかどうかについて検討するために、ΔP3 あるいは ΔP8 を 5 種のタンパク質と混合後、再構成酵素をグリセロール密度勾配超遠心分離により精製し、SDS-PAGE によりタンパク質を同定した。
【結果･考察】
再構成系における各種変異体の活性測定したところ、両ステムループ構造ともステム領域（二本鎖領域）を欠損してもある程度活性を維持しその最適温度も変化しなかった。一方、ループ構造を欠損すると両構造とも著しく活性が低下し、その温度依存性も僅かに低下した。この結果より、両ステム構造のループ領域が触媒完成に重要であることが分かった。次に、pre-tRNA 切断活性における速度論的パラメーターを測定したところ、野生型 *Pho*pRNA の触媒定数（k_{cat}）は 7.38 min^{-1}、ミカエリス定数（K_M）は 16.9 μM であった。一方、変異体 ΔP8 では、k_{cat} は変化しなかったが K_M は 49.2 μM に増加し、ΔP3 では K_M は変化しなかったが k_{cat} が 0.89 min^{-1} に減少した。この結果より、P3 は触媒活性に関与しているのに対して、P8 は pre-tRNA との相互作用に関与していることが明らかになった。最後に、ΔP3 あるいは ΔP8 を含む再構成酵素のグリセロール密度勾配遠心法を行ったところ、ΔP8 を含む再構成酵素には 5 種のタンパク質が検出されたが、ΔP3 を含む再構成酵素には *Pho*Pop5 と *Pho*Rpp30 が検出されなかったことから、P3 ステムループ構造が *Pho*Pop5-*Pho*Rpp30 複合体の結合部位として機能していることが示唆された。

Archaea, Pyrococcus horikoshii, Ribonuclease P

講演番号：2C15p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ C 校舎 15 会場

超好熱古細菌 RNase P 構成タンパク質複合体 *Pho*Pop5-*Pho*Rpp30 と RNA 鎖との相互作用
Interaction of the protein complex, *Pho*Pop5-*Pho*Rpp30, in the hyperthermophilic archaeal RNase P with the RNA chain
○浜崎 真人、中島 崇、角田 佳充、木村 誠（九大院・生資環）
○Masato HAMASAKI,Takashi NAKASHIMA,Yoshimitsu KAKUTA,Makoto KIMURA (Kyushu Univ.)

【諸言】リボヌクレアーゼ P（RNase P）は前駆体 tRNA の 5’末端余剰配列を切断するエンドヌクレアーゼで、触媒活性を持つ RNA と補助因子であるタンパク質から構成されている。最近、蛍光標識した相補的塩基配列を持つ２本の RNA 鎖（21 nt）（Cy3-オリゴ-1 と Cy5-オリゴ-2）を用いた実験より、超好熱古細菌（*Pyrococcus horikosii*）RNase P 構成タンパク質複合体 *Pho*Pop5-*Pho*Rpp30 が、RNA の会合と解離をともに促進することを報告した。[1] 本研究では、*Pho*Pop5-*Pho*Rpp30 の RNA 解離会合促進活性の構造基盤を明らかにするために、*Pho*Pop5-*Pho*Rpp30-オリゴ-1 の結晶構造解析を試みるとともに、*Pho*Rpp30 の変異体を作製し RNA 解離会合促進活性への影響について検討した。
【方法】まず、*Pho*Pop5 と *Pho*Pop30 に関して大腸菌を用いて調製し混合後、*Pho*Pop5-*Pho*Rpp30 複合体を陽イオン交換カラムクロマトグラフィーによって精製し濃縮(20 mg/ml)した。このサンプルを 50 mM Tris-HCl,pH7.5, 200 mM Mg(OAc)2, 5mM n-octyl glucopyranoside, 22.5 %(w/v) PEG3350 の条件下、ハンギングドロップ蒸気拡散法によって結晶化した。さらに、形成した結晶にオリゴ-1（5’-ACUGCUAAUGUGGAAAUCUCUAGCACU-3’）を終濃度 9 mg/ml で一週間および終濃度 27 mg/ml で 5 日間ソーキングを行った。このソーキングした結晶を大型放射光施設 Spring-8 にて X 線回折データを収集した。*Pho*Rpp30 の Arg179 と Lys196 をそれぞれ Ala に置換した変異体を作成し、Cy3-オリゴ-1 と Cy5-オリゴ-2 を用いて蛍光共鳴エネルギー移動法により RNA 解離会合促進活性を測定した。
【結果・考察】ソーキングを行った結晶の回折データが得られ、結晶構造を *Pho*Pop5-*Pho*Rpp30 の構造をサーチモデルとした分子置換法によって決定した。その結果、オリゴ-1 の明確な電子密度は検出されなかったが、タンパク質分子でない電子密度が観察され、オリゴ-1 の一部のリン酸骨格部分と *Pho*Rpp30 の Lys179 および Arg196 が相互作用していることが推定された。そこで、この結果を踏まえて、オリゴ-1 と *Pho*Pop5-*Pho*Rpp30 タンパク複合体との相互作用モデルを構築した。続いて、このモデル構造に基づき、*Pho*Rpp30 の Lys179 と Arg196 をそれぞれ Ala に置換した変異体を調製し、Cy3-オリゴ-1 と Cy5-オリゴ-2 を用いて RNA 解離会合促進活性を測定した。その結果、両変異体とも解離促進活性は野生型のそれと同程度であったが、会合促進活性が減少していた。この結果から、*Pho*Rpp30 の Lys179 と Arg196 が RNA の会合促進活性に重要であることが推定された。

1) Ishihara *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, online available (2012)

Ribonuclease P

講演番号：2C15p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ C 校舎 15 会場

シロイヌナズナ由来前駆体 tRNA プロセシング酵素・PRORP1 の酵素化学的性質に関する研究
Enzymatic properties of the pre-tRNA processing enzyme PRORP1 in Arabidopsis thaliana organelle

○中山 郁[1]、今井 崇喜[1]、前田 卓[2]、中島 崇[1,2]、角田 佳充[1,2]、木村 誠[1,2] ([1]九大院　生資環、[2]九大　農)
○Kaoru NAKAYAMA[1], Takayoshi IMAI[1], Taku MAEDA[2], Takashi NAKASHIMA[1,2], Yoshimitsu KAKUTA[1,2], Makoto KIMURA[1,2] ([1]Kyushu Univ., [2]Kyushu Univ.)

【目的】リボヌクレアーゼ P (RNase P) は前駆体 tRNA（pre-tRNA）の 5'末端を成熟化するリボ核タンパク質酵素で、全ての進化系統ドメインで保存されているが、植物や真核細胞の細胞内小器官では RNase P の存在は不明であった。最近、シロイヌナズナの葉緑体とミトコンドリアにおいて、タンパク質・PRORP1 が pre-tRNA の 5'末端を成熟化することが報告された[1)]。本研究では、PRORP1 を大腸菌を用いて調製し、その酵素化学的性質を検討した。

【方法】PRORP1 は 570 アミノ酸残基からなり、N 末端側の細胞内小器官移行シグナル配列と 5 つの RNA 結合モチーフ（PPR モチーフ）、C 末端側の金属ヌクレアーゼドメインから構成されている。 N 末端の移行シグナル配列を除去したΔ38、および 1 番目、2 番目、3 番目の PPR ドメインをそれぞれ欠失した変異体ΔPPR1、ΔPPR2、ΔPPR3 を大腸菌発現系で大量発現し、各種液体クロマトグラフィーにより精製した。pre-tRNA の切断活性は、シロイヌナズナ葉緑体の pre-tRNA^{Phe} とミトコンドリア由来 Nad6 を基質として、反応物を 10%変性ポリアクリルアミドにより電気泳動後、トルイジンブルーにより染色することにより測定した。

【結果】まず、Δ38 を用いて金属イオン依存性を検討したところ、Mg^{2+}と Mn^{2+}イオンの存在下で活性を示し、Mg^{2+}の最大活性濃度は 4.5 mM であった。一方、Ca^{2+}と Zn^{2+}では活性を示さなかった。また、最適反応温度は 35℃付近であった。次に、pre-tRNA^{Phe} と Nad6 に対するミカエリス定数を測定したところ、pre-tRNA に対しては K_M: 8.25 (μ M) で Nad6 に対しては K_M: 49.79 (μ M)であった。最後に、各変異体の酵素活性を検討したところ、何れの変異体も酵素活性を著しく消失していた。以上の結果より、PRORP1 は Mg^{2+}と Mn^{2+}依存性のリボヌクレアーゼで、活性には各 PPR モチーフが重要であることが分かった。

1)Gobert et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 740-744 (2010)

PRORP1, PPR motif, RNase P

講演番号：2C16a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ C 校舎 16 会場

デキストラングルカナーゼの発見
The discovery of dextran glucanase
○舟根 和美[1]、一ノ瀬 仁美[1]、鈴木 龍一郎[1]、木村 啓太郎[1]、齋藤 勝一[1]、藤本 瑞[2]、荒木 紀美[3]、小林 幹彦[3]、木村 淳夫[4]([1]農研機構食総研、[2]農生資研、[3]実践女大、[4]北大・院農)
○Kazumi FUNANE[1], Hitomi Ichinose[1], Ryuichiro Suzuki[1], Keitarou Kimura[1], Katsuichi Saito[1], Zui Fujimoto[2], Araki Motomi[3], Mikihiko Kobayashi[3], Atsuo Kimura[4] ([1]National Food Research Institute, NARO, [2]National Institute of Agrobiological Sciences, [3]Jissen Women's Univ., [4]Hokkaido Univ.)

【目的】環状イソマルトオリゴ糖(CI)は、グルコースがα-1,6 結合で環状に連結した構造で、ある種の微生物がデキストランを炭素源として培養した際に菌体外に生産、蓄積される。CI はう蝕菌のグルカンスクラーゼを強く阻害することによる歯垢形成阻害作用、包接による物質の可溶化、安定化作用などの機能性が報告されている。これまでに知られている CI 生産菌は、*Bacillus circulans* T-3040、同 U-155、*Paenibacillus* sp. 598K 株の 3 菌株である。これらの菌株をデキストラン存在下で培養した際に環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ(CITase) が生産誘導され、CITase によるデキストランを基質とした分子内転移反応で CI が生産される。最近 T-3040 株および 598K 株が澱粉で培養した場合にも CI を生産することが見いだされ、澱粉から CI を生産する酵素系の存在が示唆された。このたび CITase と協同して澱粉から CI を生産する作用のある新規酵素デキストラングルカナーゼ(DGase)を 598K 株培養液中に発見したので報告する。

【方法】*Paenibacillus* sp. 598K 株の培養は炭素源としてデキストラン 40 を加えた LB 培地を用いた。培養上清を Resource Q および Superose12 カラムに供して DGase を分離精製した。DGase 遺伝子は 598K 株ゲノムライブラリーより単離し pET15b にクローニング、*E. coli* BL21(DE3)中で発現した。CI 生産酵素活性は、デキストラン 40 または可溶性澱粉を CI に転換する活性を高速液体クロマトグラフィーにより CI を検出、定量することによって測定した。DGase 活性は、マルトオリゴ糖を基質とした反応生産物を薄層クロマトグラフィーで検出した。

【結果】*Paenibacillus* sp. 598K 株をデキストラン 40 で培養すると、培養液中にデキストランを CI に転換する活性と、澱粉を CI に転換する活性が見いだされた。培養液を Resource Q カラムで分離すると、CITase を添加することにより澱粉から CI を生産する作用を持つ分子量 130 kDa の酵素画分が得られた。本酵素はマルトオリゴ糖を分解・転移し、低分子と高分子産物を同時に生産する不均化反応を触媒することが見いだされ、デキストラングルカナーゼと名付けた。DGase 遺伝子は CITase 遺伝子と連続してコードされており、組換え DGase も同様の不均化反応を触媒し、CITase と協同して澱粉から CI を生産する活性を有することが確認された。
本研究は，生研センターイノベーション創出事業の支援のもとで行われた。

dextran glucanase, cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase, cycloisomaltooligosaccharide

講演番号：2C16a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ C 校舎 16 会場

Paenibacillus sp. 598K 由来デキストラングルカナーゼの特性解析
Characterization of dextran glucanase from *Paenibacillus* sp. 598K
○一ノ瀬 仁美[1]、木村 啓太郎[1]、齋藤 勝一[1]、荒木 紀美[2]、小林 幹彦[2]、藤本 瑞[3]、舟根 和美[1] ([1]農研機構　食総研、[2]実践女子大　生活科学、[3]農生資研)
○Hitomi ICHINOSE[1], Keitarou Kimura[1], Katsuichi Saito[1], Motomi Araki[2], Mikihiko Kobayashi[2], Zui Fujimoto[3], Kazumi Funane[1] ([1]NFRI NARO, [2]Jissen Women's Univ., [3]NIAS)

【目的】*Paenibacillus* sp. 598K 株は、環状イソマルトオリゴ糖生産菌で、デキストランだけでなく澱粉からも環状イソマルトオリゴ糖を生産することができる。環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ（CITase）は、デキストランを基質として分子内糖転移反応により環状イソマルトオリゴ糖を生産する酵素である。一方、デキストラングルカナーゼ（DGase）は、澱粉またはデキストランを加水分解し、グルコースを生成する。DGase は、マルトオリゴ糖およびイソマルトオリゴ糖を不均化し、低分子オリゴ糖だけでなく高分子オリゴ糖を生成する。598K 株は、DGase と CITase の２種類の酵素により、環状イソマルトオリゴ糖を生産することが示唆されていた。598K 株の環状イソマルトオリゴ糖生産機構を明らかにするため、DGase の機能解明を試みた。

【方法・結果】DGase 遺伝子を大腸菌内で発現させ、組換え酵素を精製し、これを用いて特性解析を行った。DGase は、糖質加水分解酵素ファミリー31 に属するα-グルコシダーゼであった。結合の異なるグルコ二糖を基質に用い反応を行うと、α-1,4 結合、α-1,2 結合、α-1,3 結合、α-1,6 結合の順によく分解した。また、パノースを基質に用い反応を行うと、非還元末端グルコースに作用し、グルコースとマルトースが生成された。重合度３から７のマルトオリゴ糖およびイソマルトオリゴ糖を基質に用いて酵素反応速度定数を求めたところ、５糖以上のオリゴ糖をよく分解することが明らかになった。マルトオリゴ糖を基質として不均化反応を行い、生成物を HPLC で分離し、NMR 分析および質量分析を行った。DGase は、供与体のオリゴ糖に作用し、遊離したグルコースを受容体へα-1,6 結合で付加し、高分子化していた。以上の結果から、DGase と CITase の２種類の酵素により、澱粉から環状イソマルトオリゴ糖が生産される機構が示された。

本研究は、生研センターイノベーション創出事業の支援のもとで行われた。

dextran glucanase, glycoside hydrolase, *Paenibacillus* sp.

講演番号：2C16a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ C 校舎 16 会場

Paenibacillus sp. 598K 株由来デキストラングルカナーゼの結晶構造
Crystal structure of *Paenibacillus* sp. 598K dextran glucanase
○門間 充[1]、鈴木 喜大[1]、一ノ瀬 仁美[2]、鈴木 龍一郎[2]、藤本 瑞[1]、木村 淳夫[3]、舟根 和美[2]([1]農生資研、[2]農研機構　食総研、[3]北大院農)
○Mitsuru Monma[1], Nobuhiro Suzuki[1], Hitomi Ichinose[2], Ryuichiro Suzuki[2], Zui Fujimoto[1], Atsuo Kimura[3], Kazumi Funane[2] ([1]NIAS, [2]NFRI NARO, [3]Hokkaido Univ.)

【目的】
デキストラングルカナーゼ(DGase)は、デンプンなどのα結合グルカンのグルコースを転移し、α1,6 結合したデキストランを合成する酵素であり、*Paenibacillus* sp. 598K 株より単離、精製、クローニングされている。DGase は、デキストランを基質として分子内糖転移反応により環状イソマルトオリゴ糖を生産する環状イソマルトオリゴ糖転移酵素と連続してコードされており、２つの酵素により本菌株はデンプンから環状イソマルトオリゴ糖を生産することができる。直鎖／環状イソマルトオリゴ糖を効率的に生産する手法を開発し、産業応用するためには本酵素の立体構造情報が不可欠である。本酵素は DNA 配列解析結果より 1244 アミノ酸と比較的長い配列を有しており、多ドメイン構造を形成していると予想されていた。そこで我々は本酵素の立体構造情報を得て、酵素反応機構および内包するドメインの構造と機能を明らかにすることを目的に本酵素の結晶構造解析に着手した。

【方法】DGase はタンパク質発現ベクターに組み込み大腸菌により大量発現精製し、蒸気拡散法により結晶を作製した。X 線回折データは高エネルギー加速器研究機構放射光施設において測定した。重原子置換体結晶を作製し、単波長異常分散法により位相決定を行った。

【結果】DGase の結晶構造を現段階で 1.95 Å分解能で決定することに成功した。触媒ドメインは$(\beta/\alpha)_8$バレルであり、その N 末端側に１つ、C 末端側には５つのβ構造ドメインが存在し、本酵素は計７つの構造ドメインにより構成されていた。そのうち C 末端側３つのドメインは、他の糖質関連酵素の糖結合モジュールと構造および配列相同性が見られたため、基質結合ドメインとして酵素反応にかかわっている可能性が示唆された。また、触媒ドメインについても構造既知のα-グルコシダーゼとの構造比較を行い、２つのアスパラギン酸が触媒アミノ酸であることが示された。

本研究の一部は、生研センターイノベーション創出事業の支援のもとで行われた。

dextran glucanase, crystal structure, cycloisomaltooligosaccharide

講演番号：2C16a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ C 校舎 16 会場

Ochromonas danica 由来β-1,3-グルカナーゼの精製と特性解析
Purification and characterization of beta-1,3-glucanase from *Ochromonas danica*
○磯野 直人、松本 絵美、久松 眞（三重大院生資）
○Naoto ISONO,Emi MATSUMOTO,Makoto HISAMATSU (Mie Univ.)

【目的】ユーグレナ植物門，黄色植物門，ハプト植物門等に属する藻類は貯蔵多糖として細胞内にβ-1,3-グルカン（パラミロン，ラミナリン，クリソラミナリンなど）を蓄積することが知られている．しかしながら，これらの貯蔵多糖の代謝に関与するβ-1,3-グルカン分解酵素についての知見は乏しい．我々は，これまでに黄金色藻綱オクロモナス目に属する *Ochromonas danica* が生産するβ-1,3-グルカン加リン酸分解酵素（β-1,3-グルカンホスホリラーゼ）の性質，構造，利用などについて報告してきた．本研究では，*O. danica* からβ-1,3-グルカン加水分解酵素 OdBGL1 を精製し，その性質と構造について調べた．
【方法】光非照射下で 3 日間培養した微細藻類 *O. danica* NIES-2142 の細胞を超音波破砕し，粗抽出液を調製した．硫安分画した後，Q Sepharose FF，HiTrap Phenyl HP，Q Sepharose HP により OdBGL1 を精製し，SDS-PAGE により分析した．また，ラミナリンを基質として反応を行い，生じた還元糖量から酵素活性を決定した．各種多糖やラミナリオリゴ糖，セロオリゴ糖に対する酵素活性についても調べた．直鎖β-1,3-グルカンを基質とした酵素反応を行い，反応産物の経時変化を TLC で観察した．また，ラミナリオリゴ糖を基質とした反応産物について，TLC で解析した．さらに，精製酵素をトリプシンで消化した後，MALDI TOF/TOF MS で分析した．得られた MS/MS スペクトルを PepNovo による *de novo* ペプチド配列解析に供し，部分アミノ酸配列を決定した．BLASTP で類似タンパク質の検索を行った．
【結果】HiTrap Phenyl HP で二種類（OdBGL1 と OdBGL2）のβ-1,3-グルカン加水分解酵素が分離され，そのうちの一種類の酵素（OdBGL1）を電気泳動的に均一に精製した．5 L の培養液から，最終的に 0.15 mg の精製 OdBGL1 を得た．精製倍率は 43 倍，収率は 0.7%であった．OdBGL1 の分子量は SDS-PAGE から 36 kDa と見積もられた．*De novo* ペプチド配列解析から得られた OdBGL1 の部分アミノ酸配列の一部は，子嚢菌由来エンド-1,3(4)-β-グルカナーゼ（EC 3.2.1.6）と相同性を示した．OdBGL1 は 45℃以下，pH 3.8-7.8 で活性を維持した．また，至適温度は 55℃，至適 pH は 4.5 であった．本酵素はカードラン，CM カードラン，パキマン，オオムギβ-グルカン，リケナン，ラミナリン，ラミナリオリゴ糖を加水分解した．この基質特異性は，エンド-1,3(4)-β-グルカナーゼと類似していた．一方，OdBGL1 はエンド-1,3(4)-β-グルカナーゼと異なり，セロオリゴ糖も加水分解した．しかし，OdBGL1 はセルロース，CM セルロース，キチンに対しては作用しなかった．直鎖β-1,3-グルカンを基質とした反応産物の解析から，OdBGL1 はエンド型加水分解酵素であることが確認された．また，ラミナリオリゴ糖を基質とした反応産物を解析した結果，OdBGL1 は糖転移反応も触媒することが明らかとなった．

β-1,3-glucanase, *Ochromonas danica*, microalgae

講演番号：2C16a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ C 校舎 16 会場

シイタケ exo-β-1,3-グルカナーゼの発現抑制による子実体収穫後のレンチナン分解抑制

Reduction of lentinan degradation after harvesting by suppression of β-1,3-glucanase in *Lentinula edodes*

○坂本 裕一[1]、西谷 洋輔[2]、水野 雅士[2]、金野 尚武[1]([1]岩手生工研、[2]神戸大農)
○Yuichi SAKAMOTO[1], Yosuke Nishitani[2], Masashi Mizuno[2], Naotake Konno[1] ([1]IBRC, [2]Kobe Univ.)

シイタケより抽出精製されるレンチナンは、免疫賦活活性が知られており、抗がん治療に使用されている。レンチナンは、シイタケ子実体の細胞壁の構成成分である、β1-3-1,6-グルカンである。シイタケ子実体はは収穫後急激に老化し、顕著な現象として、ひだの褐変化と子実体の軟化が起こる。子実体の軟化は細胞壁の分解によって起こると考えられ、その際に細胞壁構成成分のβ1-3-1,6-グルカンであるレンチナンが分解されることで、子実体中のレンチナン含量が低下する。収穫後のレンチナン分解は、β-1,3-グルカナーゼが関わっていることから、β-1,3-グルカナーゼを抑制することで、レンチナン分解を抑制することを試みた。

レンチナン分解に関わるβ1,3-グルカナーゼには、少なくとも 3 種類（exg2[1)]，tlg1[2)]，glu1[3)]）があることを明らかにしている。exg2 は exo 型、tlg1 と glu1 は endo 型のグルカナーゼであり、それぞれ収穫後の発現量が上昇するが、その中でもっとも分解活性が強い exg2 の発現抑制を試みた。exg2 の抑制には、RNAi 法を用いた。gpd をプロモータに用いた pChG’ベクター[4)]を Gateway 化し（pChG-Gateway)、発現抑制用のベクターとして用いた。exg2 の翻訳開始点から下流 250bp に、シイタケ lcc1 の第一イントロンをスペーサーとして挿入し、インバーテッドリピート構造になるように遺伝子合成した後、Gateway 用の pDONR221 に組み込んだ。pDONR221 に組み込んだ遺伝子断片を LR 反応により pChG-Gateway に挿入し、exg2 RNAi 用ベクター（pChG-ivr-exg2）を構築した。形質転換には、プロトプラストを用いた PEG 法により行った。

得られた組換え体の子実体収穫後、EXG2 のウェスタン解析を行い、EXG2 が特異的に抑制された菌株 ivr-exg2#51 を選抜した。ivr-exg2#51 は正常な子実体を形成したが、収穫後保存 4 日目に、野生株と比較して、レンチナン分解活性が 1/2 以下に抑制されていた。そこで、レンチナン含量を測定したところ、SR-1 では収穫後 4 日目のレンチナン残存率が 58%なのに対し、ivr-exg2#51 株では、75%のレンチナンが残存していた。ivr-exg2#51 では、TLG1 等は野生株と同様に発現していることから、exg2 を抑制するだけで、十分にレンチナン抑制効果があると考えられた。

1)Sakamoto et al. (2005) Curr. Genet. 48:195-203 2)Sakamoto et al. (2006) Plant Physiol. 141: 793-801. 3)Sakamoto et al. Appl. Environ. Microbiol. 77:8350-8354 (2011) 4)Nakade et al. (2011) Microbiol. Res. 166:484-493

cell wall, glucanase, *Lentinula edodes*

講演番号：2C16a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ C 校舎 16 会場

高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* 由来 α-アミラーゼファミリー酵素 MalA による分岐グルカン形成

Branched Glucan Formation by an α-Amylase Family Enzyme MalA from Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula japonica*

○小野寺 雅彦[1]、八波 利恵[1]、月村 亘[1]、福居 俊昭[1]、仲宗根 薫[2]、高品 知典[3]、中村 聡[1] ([1]東工大院生命理工、[2]近畿大工、[3]東洋大生命科)
○Masahiko ONODERA[1], Rie YATSUNAMI[1], Wataru TSUKIMURA[1], Toshiaki FUKUI[1], Kaoru NAKASONE[2], Tomonori TAKASHINA[3], Satoshi NAKAMURA[1] ([1]Tokyo Tech, [2]Kinki Univ., [3]Toyo Univ.)

【目的】*Haloarcula japonica* TR-1 株は石川県能登半島の塩田土壌より分離された高度好塩性古細菌である。本菌は菌体内に α-アミラーゼファミリーに属する酵素 (MalA と命名) を生産する。親株 *H. japonica* を用いて生産した組換え MalA の性質検討から、本酵素は高塩濃度下でデンプン加水分解活性を有する好塩性酵素であり、また、α-1,6 グルコシド結合には作用しにくく、主に α-1,4 グルコシド結合を切断するエンド型酵素であると考えられた。一方、組換え MalA を可溶性デンプンに作用させた場合、薄層クロマトグラフィー (TLC) 解析において糖転移産物と思われる生成物が検出されたことから、本酵素は糖転移活性を有することが示唆された。本研究では、*H. japonica* 由来組換え MalA の糖転移活性について解析した。

【結果と考察】組換え MalA をマルトオリゴ糖に作用させ、生成物を TLC により解析した。その結果、基質として 3~7 量体のマルトオリゴ糖を用いた場合において、加水分解産物の他にもとの大きさ以上の糖が検出され、MalA はマルトオリゴ糖に対しても糖転移活性を示すことが明らかとなった。さらに、TLC では分画できないより高重合度の糖の生成も確認された。この高重合度生成物をイソアミラーゼで処理し、TLC により解析した結果、広範囲の重合度のオリゴ糖が検出された。この結果から、MalA は糖転移活性により α-1,4 および α-1,6 グルコシド結合の両方を形成し、グルコース鎖の伸長と分岐形成を同時に触媒することで、低分子直鎖オリゴ糖を基質として様々な長さの分枝構造を有する分岐グルカンを合成したと考えられた。また、直鎖グルカンの多糖であるアミロースからも分岐グルカンの生成が確認された。さらに、分岐グルカンであるアミロペクチンおよびグリコーゲンに組換え MalA を作用させると、分枝の鎖長分布の短鎖側へのシフトが確認され、MalA は短鎖の分枝形成能が強いことが示唆された。次に、アミロースおよび七糖からの糖転移産物に対して市販の α-アミラーゼおよびグルコアミラーゼを作用させ、TLC による解析を行うことで、糖転移産物の消化性を調べた。対照実験から、可溶性デンプンはグルコアミラーゼよりも α-アミラーゼによる分解を受けやすく、逆にグリコーゲンはグルコアミラーゼによる分解を受けやすいことがわかっている。そして、アミロースおよび七糖からの糖転移産物は、α-アミラーゼよりもグルコアミラーゼによる分解を受けやすいことが確認された。これより、MalA の糖転移活性により得られた糖転移産物は、短鎖の割合が多いグリコーゲン様高分岐グルカンである可能性が示唆された。現在、組換え MalA をマルトオリゴ糖に作用させて得られた分岐グルカンのより詳細な解析を行っている。

extremely halophilic archaeon, α-amylase family, branched glucan

講演番号：2C16a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ C 校舎 16 会場

Paenibacillus polymyxa 由来β-アミラーゼの X 線小角散乱による構造解析と示差走査熱量測定による各ドメイン間の相互作用解析

Structural analysis by small-angle X-ray scattering and calorimetric analysis of the multi-domain beta-amylase from *Paenibacillus polymyxa*

○西村 重徳、高山 葵、深田 はるみ、炭谷 順一、川口 剛司、乾 隆 (阪府大院・生環科)
○Shigenori Nishimura, Aoi Takayama, Harumi Fukada, Junichi Sumitani, Takashi Kawaguchi, Takashi Inui (Osaka Pref. Univ.)

*P. polymyxa*由来 β-アミラーゼ（PPB）は，N末端側から触媒ドメイン（PPB-CD）と，２つのデンプン結合ドメイン（SBD1，SBD2）がリンカー配列で連結されたマルチドメイン構造を持つ。また生デンプン分解活性を有することから，生デンプンへの酵素作用の研究に適していると考えられる。我々はこれまでに，PPB-CDの立体構造をX線結晶構造解析によって，またSBD1，SBD2の立体構造をNMR法によって明らかにしている。しかし，PPB全体の構造はいまだ明らかにはされていない。本発表では，X線小角散乱（SAXS）実験によるPPB-CD，１つのSBDをもつPPB-CD-SBD1，およびPPB全体の溶液構造解析について報告する。また，各ドメイン間の相互作用を示差走査熱量分析（DSC）により測定した結果についても報告する。

実験には，大腸菌発現系において発現，精製したPPB-CD，PPB-CD-SBD1およびPPBを用いた。SAXS測定はSPring-8 BL40B2において，4 ～ 10 mg/mLの試料溶液を用いてpH 7.5（20 mM Tris緩衝液），25℃で行った。DSC測定にはnanoDSC IIを用い 1 mg/mLの試料溶液についてpH 7.5（20 mM リン酸緩衝液），昇温速度 1 K min^{-1}で行った。

SAXS散乱曲線の Guinier 解析，および距離分布関数の解析の結果，PPB-CDの慣性半径 R_g，および分子最大長 D_{max} はそれぞれ 23 Å，および 68 Å，PPB-CD-SBD1では 29 Å，および 90 Å，PPBでは 34 Å，および 103 Åであった。また，PPB-CDが球状構造を示したのに対し，SBDの増加に伴って球状からのずれが大きくなり，２つのSBDがPPB-CDから突出した構造であることが分かった。

次に，PPBの散乱曲線を基に，すでに決定しているPPB-CDのX線結晶構造と２つのSBDのNMR構造を用いて，PPB全体の溶液構造モデルを構築した。その結果，PPBの平均構造は３つのドメインが直線上に並んでいるのではなく，CD-SBD1連結部で折れ曲がったL字型をしていることが明らかになった。PPBは２つのSBDで生デンプン表面に吸着し，表面から離れたPPB-CDで触媒反応を行っていると考えられる。

さらに，DSC測定の結果，SBDはPPB-CDよりも高温で変性し，PPB-CD-SBD1やPPBのようにPPB-CDとリンカーで結ばれると，その変性温度が低下することが分かった。このことからPPBにおいてPPB-CDとそれぞれのSBDが相互作用をしていることが示唆された。

β-amylase, starch binding domain, small angle X-ray scattering

講演番号：2C16a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ C 校舎 16 会場

X線結晶構造解析によるダイズβ-アミラーゼの反応機構の解明

Elucidation of reaction mechanism of ß-amylase by X-ray crystallography

○三上 文三[1]、姜 有那[1]、安達 基泰[2]、河村 和広[1]、水谷 公彦[1]、高橋 延行[1] ([1]京大院農、[2]日本原子力機構)
○Bunzou Mikami[1], Youna Kang[1], Motoyasu Adachi[2], Kazuhiro Kawamura[1], Kimihiko Mizutani[1], Nobuyuki Takahashi[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Jap. Atomic Energy Agency)

【目的】β－アミラーゼの活性中心付近には触媒残基である二つの Glu 残基の他に、最大 11Å移動する 9 残基のフレキシブルループと構造が切り換わる 5 残基のインナーループの二つの可動ループが存在する。また、触媒残基の近くに存在する Lys 残基は基質の結合状態によってその側鎖の構造が変化する。野生型の酵素では、インナーループの構造がアポ型からプロダクト型に変化することが触媒反応に重要であると推定されている。今回はダイズβ-アミラーゼのインナーループ上の Thr の変異体の結晶を用いて、基質アナログ複合体の X 線結晶構造解析を行い、インナーループの役割について検討した。
【方法】インナーループの変異体として T342V, T342S, T342A を作製し、それらの結晶化とマルトース複合体の構造解析を行った。回折データの収集には SPring-8 での BL38B1 および BL26B1 の IP デテクターを用い、構造の精密化は分解能 1.2～1.4Åまでのデータを用い、SHELXL によって行った。サブサイト-2 と-1 および+1 と+2 に結合しているマルトースの占有率とループ開閉のマルトース濃度依存性を各変異体の結晶に異なる濃度のマルトースをソーキングした後に構造解析を行うことによって調べた。各結晶は 50%飽和の硫安と 30%グリセロールを含む pH6.1 の酢酸バッファー中でマルトースをソーキングした後に 100K の窒素気流中で凍結した。
【結果】硫酸アンモニウムを沈殿化剤として pH5.4 でハンギングドロップによって得られたダイズβ-アミラーゼの変異体の結晶の空間群はすべて $P3_121$ であり、非対称単位に一分子の酵素分子を含む。T342V, T342S, T342A の変異体では酵素活性が野生酵素に比べて、それぞれ 7.7%、0.3%、0.06%に減少した。T342V, T342S の結晶を用いて、インナーループの構造変化のマルトース濃度依存性を調べた結果、T342V ではプロダクト型の構造を取りやすくなっているのに対し、T342S ではアポ型の構造からプロダクト型への構造変化が認められず、サブサイト-1 のグルコース残基の環の歪みも認められなかった。以上の結果から、インナーループ上の Thr342 の側鎖は、基質の結合とインナーループの構造の切換えに重要であり、基質の取り込みと生成物の遊離に重要な役割を果たすと考えられた。

β-amylase, X-ray crystal analysis, enzyme mechanism

講演番号：2C16a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ C 校舎 16 会場

アピオス塊茎のβ－アミラーゼの分離精製、性質および構造解析

Purification,characterization and cDNA cloning of ß-amylase from tubers of *Apios americana*.

○日野 ちはる、井下 智香子、上妻 由章、米倉 政実（茨城大院農）
○ Chiharu HINO,Chikako INOSHITA,Yoshiaki KOUDUMA,Masami YONEKURA（Ibaraki Univ.）

【目的】アピオス（*Apios americana* Medikus）は北アメリカ原産の多年性のマメ科植物であり、その塊茎は食用とされている。アピオス塊茎には、２種のトリプシンインヒビターやレクチンなどの生理活性タンパク質が含まれており、我々はこれらのタンパク質の単離および構造解析を行い、本学会で報告した。さらに、アピオス塊茎にアミラーゼの存在が明らかになったので、本研究では、アピオス塊茎からアミラーゼを分離精製し、その性質および一次構造を解析することを目的とした。
【方法・結果】アピオス塊茎抽出液を用いて、Butyl-Cellulofine カラムによる疎水性クロマトグラフィーと POROS HQ/M カラムによる陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、本アミラーゼを分離精製した。本酵素の活性は可溶性デンプンを基質として使用し、生成した還元糖の量をジニトロサリチル酸法により求めることで測定した。SDS-PAGE およびゲルろ過により求めた本酵素の分子量は約 48,000 であった。本酵素の至適温度および至適 pH はそれぞれ 50℃、pH4 であった。また、60℃以下、pH3～5 ではほぼ安定であった。アミロースを基質とした場合、マルトースの生成が確認されたので、本酵素はβ－アミラーゼである可能性が高まった。

次に、本酵素の一次構造解析を cDNA クローニングにより行った。本アミラーゼを YMC-Pack PROTEIN-RP カラムを用いた逆相 HPLC によりさらに精製した後、リジルエンドペプチダーゼあるいは臭化シアンによって分解し、YMC-Pack pro C18 カラムを用いた逆相 HPLC によってペプチド断片を分取して、そのアミノ酸配列をプロテインシークエンサーで調べた。これらの部分アミノ酸配列と N 末端アミノ酸配列、さらに本アミラーゼの N 末端アミノ酸配列と相同性が高いダイズのβ－アミラーゼのアミノ酸配列を基に縮重プライマーを設計し、縮重 PCR 法によって、本酵素の部分塩基配列を決定した。次に、RACE 法によって、5’末端領域および 3’末端領域の塩基配列を調べ、全長 cDNA の全塩基配列を決定した。その結果、本酵素は 96bp の 5’UTR、232bp の 3’UTR および 496 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしている 1488bp の ORF を持つことが分かった。また、成熟型の本アミラーゼは 492 アミノ酸残基からなり、その分子量は 55,910 であった。Prot Parama を用いて、本酵素の等電点の推定を行った結果、pI=5.37 と計算された。また、そのアミノ配列の相同性を比較したところ、ダイズやササゲ、サツマイモのβ－アミラーゼとそれぞれ 91%、87%、66%の相同性があった。これらのβ－アミラーゼと同様に本酵素の活性中心のアミノ酸残基は E187、E381 であると推定された。

β-amylase, *Apios americana*, cDNA cloning

講演番号：2C16a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ C 校舎 16 会場

Streptomyces corchorusii 由来細胞表層結合型アミラーゼの触媒ドメイン間の相互作用
Interaction between two catalytic domains of cell-surface-associated amylase from *Streptomyces corchorusii*

○久保 江里果、西村 重徳、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院・生環科）
○Erika KUBO,Shigenori NISHIMURA,Shuji TANI,Junichi SUMITANI,Takashi KAWAGUCHI (Osaka Pref Univ.)

［目的］蛋白性アミラーゼ阻害剤生産菌 *S. corchorusii* は、阻害剤によって他の放線菌が生産するアミラーゼを阻害しつつ、自身はその阻害剤に非感受性の細胞表層結合型アミラーゼ（Cell-Surface-Associated Amylase, CSAA）によって菌体周辺のデンプンを分解し、その分解産物を拡散させる前に素早く吸収することにより環境中で優位にデンプンを資化していると考えられている。CSAA は、アミノ酸配列の相同性から N 末端側に α-amylase、C 末端側に pullulanase の触媒ドメインが存在し、その間には基質結合ドメインである CBM41 および CBM48 が存在するといった非常にユニークなドメイン構造をもつと推定されている。α-amylase と pullulanase が別々の酵素としてではなく一つのポリペプチドとして存在するのは、おそらく各ドメイン間の協調的な相互作用によって、より効率よくデンプンを分解するためであると考えられるが、その詳細は不明である。そこで、本研究では各触媒ドメイン間における協調的な相互作用の解明を目的とした。
［方法と結果］各ドメインの相互作用を解明するにあたり、各ドメインを欠失させた 6 種類のドメイン欠失変異酵素の取得を試みたが、α-amylase と CBM41 のドメインのみ存在する変異酵素しか生産が認められず、欠失変異酵素の生産は困難であると考えられた。そこで、まずは CSAA の α-amylase ドメインに存在する 4 つの保存領域（region Ⅰ～Ⅳ）のうち、region Ⅲ に存在する Glu の変異酵素（CSAA E350Q）の作製を試みた。変異を導入した CSAA 遺伝子を放線菌用発現プラスミドである pSEV1 由来のプラスミドに挿入し、*S. lividans* TK21 での異種発現を試みた結果、α-amylase 活性が著しく低下した変異酵素の生産が確認された。現在、同様にして pullulanase の触媒残基を置換した変異酵素（CSAA E1443Q）の取得を試みており、2 種類の変異酵素におけるそれぞれの触媒ドメイン単独の活性を評価するとともに、2 種類の変異酵素を混合したものと野生型酵素のデンプン分解活性を比較することで 2 つの触媒ドメイン間に協調的な相互作用が存在するかどうか確認する予定である。

Streptomyces corchorusii, alpha-amylase, pullulanase

講演番号：2C16a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ C 校舎 16 会場

Kitasatospora sp. MK-1785 株由来 G3 生成アミラーゼの糖転移活性を利用した配糖体の合成

Synthesis of glycosides by transglycosylation of maltotriose-forming amylase from *Kitasatospora* sp. MK-1785

○掃部 正浩、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院生命環境）
○ Masahiro Kamon,Shuji Tani,Jun-ichi Sumitani,Takashi Kawaguthi (Osaka Prefecture University)

［背景と目的］ *Kitasatospora* sp. MK-1785 株 が生産するマルトトリオース生成アミラーゼ（G3Amy）はデンプンから特異的にマルトトリオース（G3）を生成するため、G3 製造に有用な酵素である。G3Amy をマルトオリゴ糖に作用させたところ、基質よりも高い重合度のオリゴ糖が確認され、本酵素が糖転移活性を有することがわかった。そこで、本研究ではマルトオリゴ糖またはデンプンを G3 供与体とし、ヒドロキシ基を有する化合物に対して G3 転移活性の有無を調べた。

［方法と結果］ まず、マルトテトラオース（G4）またはマルトペンタオース（G5）を G3 供与体として、ハイドロキノン、コウジ酸、バニリン、フェルラ酸、カフェ酸、プロトカテク酸、*p*-ニトロフェノール、シリンガ酸、(+)-カテキン、グリセロールを G3 受容体としてそれぞれ反応を行い、配糖体生成の有無の確認を薄層クロマトグラフィーによって行った。その結果、G3Amy はシリンガ酸以外の化合物を配糖化できることがわかった。また、ヒドロキシ基を 1 つしか持たないバニリン、ニトロフェノールといった化合物はヒドロキシ基を 2 つ以上もつ化合物に比べ転移産物が少なかった。次に可溶性デンプンを G3 供与体、コウジ酸、プロトカテク酸、グリセロールを G3 受容体として反応させたところ、可溶性デンプンを用いても G3 配糖体を合成できることがわかった。以上の結果より、G3Amy は G3 製造だけでなく、G3 配糖体合成酵素としても応用が期待される。

G3 配糖体とすることで有用な化合物となる例として、アミラーゼ阻害活性を有するマルトトリオシルグリセロール（G3-Gly）が挙げられる。現在、G3-Gly 合成のための反応条件について検討を行っている。

maltotriose-forming amylase, transglycosylation, synthesis of glycosides

講演番号：2C16a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ C 校舎 16 会場

デキストラン合成酵素 dextran dextrinase の触媒残基およびその機能の決定

Determination of the catalytic residues and their functions in dextran-synthesizing enzyme dextran dextrinase

○貞廣 樹里、森 春英、佐分利 亘、奥山 正幸、木村 淳夫 (北大院農)
○Juri Sadahiro,Haruhide Mori,Wataru Saburi,Masayuki Okuyama,Atsuo Kimura (Hokkaido Univ.)

【研究背景】Dextran dextrinase (DDase)は，マルトオリゴ糖に作用し非還元末端グルコシル基をα-1,6 転移する反応を触媒し，多糖デキストランを合成する．糸引きビール原因酵素であり，古くから知られているが，未だ *Gluconobacter oxydans* 以外では見出されていない．立体構造は得られていないが，配列情報に基づき 5 ドメイン（N1，N2，A，B および C ドメイン）から成ると推測される．このうち N1-A が活性に必須であり，これらを部分的にでも欠失させると活性が消失する．A ドメインは，GH15 酵素群の glucoamylase(GA)や glucodextranase(GD)の触媒ドメインと，低いながらアミノ酸配列類似性を示すことから，$(\alpha/\alpha)_6$バレル構造であると推定される．更に，A ドメインには，GA および GD の基質結合や触媒に関与するアミノ酸残基が配列上保存されており，A ドメインが DDase の触媒ドメインであり，GA や GD に似た触媒部位を有すると予想される．しかしながら，DDase が専ら転移反応を触媒するのに対し，GA や GD はアノマー反転型加水分解を触媒し，反応機構も全く異なると予想され，この点でも興味が持たれる．本発表では，配列類似性に基づき触媒残基と予想される２つの酸性アミノ酸残基（Glu671 および Glu858）の機能を解析した．

【方法・結果】Glu671 および Glu858 は，配列上 GA・GD の一般酸触媒残基(プロトン供与)ならびに一般塩基触媒残基（水からのプロトン受容）に各々相当する．従って，アノマー保持型酵素 DDase において Glu671 は一般酸塩基触媒，Glu858 は求核触媒残基であると予想され，変異酵素 E671Q および E858A/C/S を作製した．活性必須最小領域からなる欠失酵素を親酵素とした．酵素生産には大腸菌を宿主として用い，Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより精製した．変異酵素は全て，15 mM マルトテトラオース(Glc4)に対して著しく低い活性を示した．推定酸塩基触媒残基の変異酵素 E671Q では，Glc4 に対する k_{cat} が 1.0×10^{-5} 倍（比親酵素）となったが，α-フッ化グルコース（α-GF）に対してはわずか 1.7×10^{-3} 倍であり，Glu671 は酸塩基触媒残基であると考えられた．求核触媒残基については，イソマルトトリオースに対する反応への逆アノマー基質β-フッ化グルコース（β-GF）添加による効果を解析した．すなわち，glycosynthase 反応によるイソマルトテトラオース（IG4）の生成を測定した．E858S/A ではβ-GF 添加時に IG4 の生成速度が著しく上昇したが，親酵素では変化しなかった．従って，Glu858 が求核触媒残基であると生化学的に示された．以上より，DDase は A ドメインを触媒ドメインとし，反応機構の異なる GA および GD と類似した触媒部位を持つと考えられる．

dextran synthesis, catalytic residue, glucoamylase

講演番号：2C16a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ C 校舎 16 会場

イネ胚乳における澱粉生合成関連酵素の複合体解析

Analysis of protein complexes involved in starch biosynthesis in rice endosperm

○阿部 奈津子[1]、クロフツ 尚子[1]、中村 保典[1]、TETLOW Ian[2]、EMES Michael[2]、藤田 直子[1]（[1]秋田県立大、[2]Univ. of Guelph）
○Natsuko ABE[1], Naoko CROFTS[1], Yasunori NAKAMURA[1], Ian TETLOW[2], Michael EMES[2], Naoko FUJITA[1]（[1]Akita Pre. Univ., [2]Univ. of Guelph）

澱粉は植物の光合成産物として主に貯蔵器官に蓄積されるグルコースポリマーであり、その主成分であるアミロペクチンは DNA に次ぐ分子量（$10^{8\sim9}$）を有する。アミロペクチンは秩序だったクラスター構造の繰り返しから構成され、澱粉生合成に関与する多数のアイソザイムが役割分担をして増幅合成される。澱粉が巨大分子として構築されるためには、グルコースを限られた空間に充填するための時空間的に制御された生合成メカニズムが必要となる。例えば、DNA も機能の異なる複数の酵素が複合体を形成し、連続反応することで速やかに合成されるように、澱粉も酵素複合体による合成機構が存在している可能性が高い。近年、トウモロコシやコムギでは澱粉生合成に関与するアイソザイムが複合体を形成している証拠が報告がされており、それがリン酸化によって制御されていることが明らかとなった（Tetlow et al., 2004; 2008）。一方、現時点では複合体の構成要素やその機能については不明な点が多い。我々はイネを用いて澱粉生合成に関与するアイソザイムが複合体を形成しているか調べた。

まず、多くのアイソザイムの酵素活性を含むイネ登熟種子の可溶性画分のゲル濾過クロマトグラフィー（Superdex 200）を行い、分子量 43～670kDa のフラクションをウエスタンブロッティング法で各アイソザイムを検出した。その結果、スターチシンターゼ（SS）I、SSIIa、SSIIIa、枝作り酵素（BE）I、BEIIb、イソアミラーゼ（ISA）1、プルラナーゼ（PUL）、ホスホリラーゼ（PHO）1 がモノマー（約 70～100kDa）よりもさらに高分子量（232～670kDa）のタンパク質が含まれるフラクションから検出された。特徴として、（１）SSIIa、SSIIIa、PHO1 はモノマーより大きい分子量のタンパク質が多かった。（２）BEI、BEIIb、PUL はすべてのフラクションでタンパク質が検出され、モノマーが多かった。（３）SSI はモノマーが多かったが、BEI、BEIIb、PUL に比べ検出されるタンパク質のサイズが限られていた。（４）ISA1 は 232～440kDa 付近のタンパク質が検出された。高分子量で検出されるアイソザイムの種類はトウモロコシと類似していた（Hennen-Bierwagen et al., 2009; Liu et al., 2009）が、各アイソザイムが検出される分子量の範囲やモノマーと高分子量のタンパク質の量的関係が異なるアイソザイムも複数存在した。

以上の結果から、イネでも澱粉生合成関連アイソザイム間で複合体が形成されている可能性が示唆されたが、複合体を構成するアイソザイムの組み合わせはトウモロコシとは異なることが予想された。今後は複合体の活性の有無や、複合体の構成成分について解析していきたい。

Protein complex, Starch biosynthesis, Rice

講演番号：2C16a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ C 校舎 16 会場

GH63 に属する大腸菌由来機能未知酵素 YgjK のコンフォメーション変化

Conformational change of YgjK, a function-unknown enzyme belonging to GH63, from *Escherichia coli*

○宮崎 剛亜[1]、市川 めぐみ[1]、盛 まりな[1]、北岡 本光[2]、森 春英[3]、北野 克和[1]、西河 淳[1]、殿塚 隆史[1]([1]東農工大院農、[2]農研機構・食総研、[3]北大院農)
○ Takatsugu MIYAZAKI[1], Megumi ICHIKAWA[1], Marina MORI[1], Motomitsu KITAOKA[2], Haruhide MORI[3], Yoshikazu KITANO[1], Atsushi NISHIKAWA[1], Takashi TONOZUKA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, [2]NARO, [3]Hokkaido Univ.)

【目的】

大腸菌由来 YgjK は糖質加水分解酵素ファミリー63 に分類される機能未知酵素である。本酵素はグルコオリゴ糖の中でもニゲロース（Glcα-1,3-Glc）を最もよく加水分解するグルコシダーゼであるが、その活性は低く、天然の基質は明らかになっていない。各種単糖との複合体構造解析により、YgjK の活性部位にはグルコースだけでなく、マンノースやガラクトースが結合することが明らかとなっており、YgjK はこれらの単糖から構成される糖質に作用する酵素と考えられる。糖質加水分解酵素は活性中心への変異導入とフッ化糖を組み合わせることにより、縮合反応を触媒することが知られており、その変異体はグライコシンターゼと称されている。そこで、YgjK をグライコシンターゼ化することで、オリゴ糖を合成し、X 線結晶構造解析と組み合わせることで YgjK の天然の基質を予想した。

【方法】

YgjK の一般塩基触媒残基である Glu727 をアラニンに置換した変異体 E727A を遺伝子工学的手法により構築した。変異酵素をβ-グルコピラノシルフルオリド（β-GlcF）および各種糖の混合溶液に作用させ、反応産物を薄層クロマトグラフィーで解析した。ハンギングドロップ蒸気拡散法により作製した E727A の結晶と単離した反応産物との複合体結晶をソーキングにより作製し、X 線結晶構造解析によって E727A と反応産物との複合体構造を決定した。

【結果】

E727A はβ-GlcF をドナー基質、ガラクトースをアクセプター基質としてオリゴ糖を生成した。X 線結晶構造解析により E727A と反応産物である二糖グルコシルガラクトース（GlcGal）の複合体構造（E727A-GlcGal）を 2.0Å 分解能で決定した。電子密度より活性部位のサブサイト-1 には非還元末端のグルコース残基が、サブサイト+1 には還元末端のガラクトース残基が結合しており、その結合様式はα-1,2-結合であることがわかった。E727A-GlcGal の構造および野生型-単糖との複合体構造を比較すると触媒ドメインの（α/α）$_6$バレル構造が変化しており、open 型と close 型の 2 つの構造をとることがわかった。以上のことから YgjK は GlcGal 単位を認識し、induced-fit する加水分解酵素であることが示唆された。

glycoside hydrolase family 63, 2-*O*-α-glucosyl-galactose, conformational change

講演番号：2C16a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ C 校舎 16 会場

バキュロウイルス - カイコ発現系を用いて産生したヒトチロシナーゼの性質
Characterization of human tyrosinase from Baculovirus - silkworm expression system

○梅田 彩奈[1]、佐藤 正幸[1]、忠平 和子[1]、日下部 宜宏[2]、朴 龍洙[3]、前仲 勝実[4]、蜷木 理[5]、殿塚 隆史[1]、西河 淳[1] ([1]農工大農・応生科、[2]九大院農・農生資源、[3]静岡大・創科技院、[4]北大院・薬研院、[5]農工大農・生物生産)

○Ayana UMEDA[1], Masayuki SATO[1], Kazuko TADAHIRA[1], Nobuhiro KUSAKABE[2], Enock Y. PARK[3], Katsumi MAENAKA[4], Osamu NINAGI[5], Takashi TONOZUKA[1], Atsushi NISHIKAWA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, [2]Kyushu Univ., [3]Shizuoka Univ., [4]Hokkaido Univ., [5]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】

チロシナーゼは微生物，植物，動物など様々な生物が有する銅含有モノオキシゲナーゼで，メラニン合成において L-チロシンを L-ドーパに変換する反応と L-ドーパをドーパキノンに変換する反応を触媒している．ヒトチロシナーゼは，皮膚，眼，毛球などにあるメラノサイトでメラニン合成に関わっているが，そのメラニンはシミ，ソバカス，老人斑などの原因物質であるためヒトチロシナーゼの活性阻害機構が注目されている．そこで，本研究ではヒトチロシナーゼの結晶化，阻害剤の探索等を視野に入れ，ヒトチロシナーゼのカイコにおける発現，精製を試み，それらの性質とヒトメラノサイト由来培養細胞発現チロシナーゼとの比較を行った．

【方法・結果】

まず，膜貫通糖タンパク質であるヒトチロシナーゼ cDNA から膜貫通領域を除去し，3'側に FLAG タグ配列を導入した融合遺伝子を作製した．次に，この融合遺伝子を pFastBac にサブクローニングし，大腸菌 BmDH 10bac に導入して融合遺伝子が挿入された 組換え BmNPV バクミドを作製した．これを BmN4 細胞にトランスフェクションして 組換え BmNPV ウイルスを作製した後，さらに二回増幅したウイルス液をカイコ 系統 N43，e21 およびカイコとクワコの BF_1 の 5 齢幼虫に接種した．接種後約 4 日でそれぞれのカイコの体液を回収し， 抗 FLAG タグ抗体を用いた免疫沈降反応によってタンパク質を精製した．ドーパオキシダーゼ法によりチロシナーゼ活性を測定したところ， e21 および BF_1 から得られたチロシナーゼについては活性が確認できたが， N43 からのものには活性がなかった．そこで，N43 の体液に硫酸銅溶液を添加して 30℃で 30 分間インキュベートして活性測定を行うと，活性の発現が見られるようになった．

本発表では，三種類のカイコで発現させたヒトチロシナーゼの種々の酵素学的性質を比較した結果を報告すると共に，ヒトメラノサイト由来培養細胞で発現させた酵素との比較検討結果も発表する．

tyrosinase, silkworm, baculovirus

講演番号：2C16p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ C 校舎 16 会場

Bacillus selenitireducens 由来 2-*O*-α-D-グルコシルグリセロールホスホリラーゼの発見
Discovery of a novel 2-*O*-α-D-glucosylglycerol phosphorylase from *Bacillus selenitireducens*
○仁平 高則[1]、斉藤 由華[1]、東原 幸起[2]、伏信 進矢[2]、北岡 本光[3]、中井 博之[1]、大坪 研一[1]([1]新潟大・農、[2]東大院・農、[3]農研機構・食総研)
○Takanori NIHIRA[1], Yuka SAITO[1], Kouki TOUHARA[2], Shinya FUSHINOBU[2], Motomitsu KITAOKA[3], Hiroyuki NAKAI[1], Ken'ichi OHTSUBO[1] ([1]Niigata Univ., [2]Univ. Tokyo, [3]NFRI-NARO)

【目的】糖加リン酸分解酵素（ホスホリラーゼ）は，その厳密な基質特異性と反応の可逆性から，オリゴ糖合成に有効な酵素の一つである。しかし既知ホスホリラーゼは20種程度と少なく，新たな基質特異性を有する新規酵素の発見が強く望まれている。本報では，α-グルコシドを特異的に加リン酸分解するホスホリラーゼが属するGlycoside hydrolase family 65（GH65）に注目し，好塩菌*Bacillus selenitireducens*由来のGH65ホモログBsel2816の酵素化学的諸性質の検討を行なった。
【方法】*bsel2816* 遺伝子をPCR法にて増幅後，pET-24aベクターに連結することでHis-Tag融合組換え酵素タンパク質Bsel2816発現用ベクターを構築し，大腸菌BL21(DE3)を宿主として当該組換え酵素タンパク質Bsel2816を大量調製した。次に組み換えBsel2816の基質特異性を，既知GH65ホスホリラーゼの基質である各種α-グルコ2糖を用いて調査した。加えて，逆反応時の糖受容体特異性をβ-グルコース1-リン酸存在下で精査した。
【結果】まず Bsel2816 をコージビオースに作用させた際，リン酸存在下でのみ微弱なグルコースの遊離，すなわち加水分解活性を観測した。逆反応において各種単糖を糖受容体とした場合には二糖以上のオリゴ糖は生成せず、β-グルコース 1-リン酸の加水分解が確認された。糖受容体を糖以外にも拡張して調べたところ、グリセロールのみ合成活性を示し，2-*O*-α-D-グルコシルグリセロールを生成することが明らかになった。さらに当該酵素がリン酸存在下で 2-*O*-α-D-グルコシルグリセロールからβ-グルコース 1-リン酸を遊離することも確認した。これらの結果は，Bsel2816 が新規酵素 2-*O*-α-D-グルコシルグリセロールホスホリラーゼであることを示す。

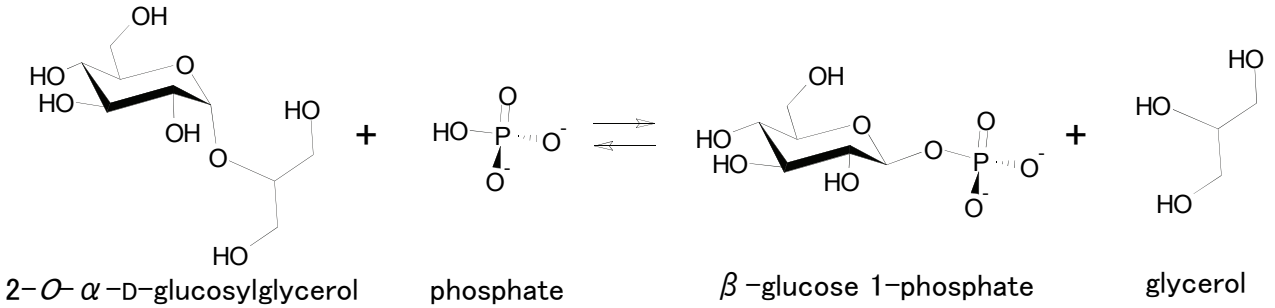


図 2-*O*-α-D-グルコシルグリセロールホスホリラーゼの反応機構

2-*O*-α-D-glucosylglycerol phosphorylase, *Bacillus selenitireducens*, glycoside hydrolase family 65

講演番号：2C16p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ C 校舎 16 会場

2-*O*-α-D-グルコシルグリセロールホスホリラーゼによるβ- D-グルコース 1-リン酸加水分解の反応機構

Reaction mechanism on the hydrolysis of ß-D-glucose 1-phosphate by 2-*O*-α-D-glucosylglycerol phosphorylase

○北岡 本光[1]、仁平 高則[2]、斉藤 由華[2]、東原 幸起[3]、伏信 進矢[3]、中井 博之[2]、大坪 研一[2]([1]農研機構・食総研、[2]新潟大・農、[3]東大院・農)

○Motomitsu Kitaoka[1], Takanori Nihira[2], Yuka Saito[2], Kouki Touhara[3], Shinya Fushinobu[3], Hiroyuki Nakai[2], Ken'ichi Ohtsubo[2] ([1]NFRI-NARO, [2]Niigata Univ., [3]Univ. Tokyo)

【目的】好塩菌*Bacillus selenitireducens*由来2-*O*-α-D-グルコシルグリセロールホスホリラーゼ(GlcGlycerolP) は、2-*O*-α-D-グルコシルグリセロールの加リン酸分解だけでなく、中程度の速度でβ-D-グルコース1-リン酸の加水分解も触媒する。通常反転型ホスホリラーゼでは糖1リン酸の加水分解活性は観測されないことから、この加水分解活性がどのような触媒機構で行われるのか検討した。
【方法】GlcGlycerolPの酸塩基触媒残基に変異を導入し両活性に及ぼす影響を調べた。またβ-グルコース1-リン酸加水分解時における生成グルコースのアノマー型をHPLC法により決定した。さらに$H_2{}^{18}O$存在下でβ-D-グルコース1-リン酸の加水分解を行い、MS分析により^{18}Oの取り込みを調べた。
【結果】E475Q 変異酵素は、2-*O*-α-D-グルコシルグリセロール加リン酸分解活性及びβ-D-グルコース1-リン酸加水分解両方とも示さなかった。この結果は両反応が同じサイトにより触媒されていることを示唆している。β-グルコース 1-リン酸加水分解により生じるグルコースのアノマー型はα型であり、アノマー反転型反応であった。β-D-グルコース 1-リン酸加水分解時に ^{18}O はグルコースのみに取り込まれリン酸には取り込まれなかった。この結果はβ-グルコース 1-リン酸加水分解は C-O 結合を切断することにより行われていることを示しており、その反応機構はホスファターゼ型ではなくグルコシダーゼ型であることを示唆している。以上の結果より GlcGlycerolP は水分子を糖受容体とする活性のある反転型ホスホリラーゼであると結論した。

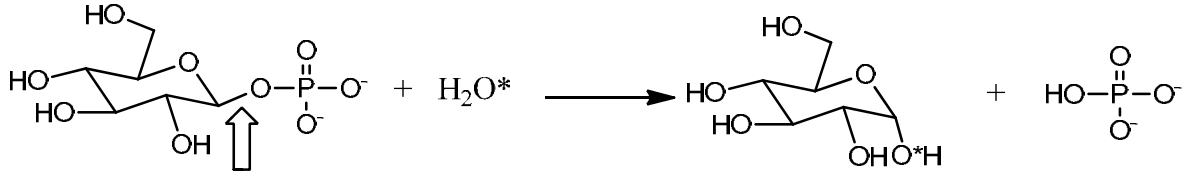


図 GlcGlycerolP によるβ-グルコース 1-リン酸加水分解の反応機構

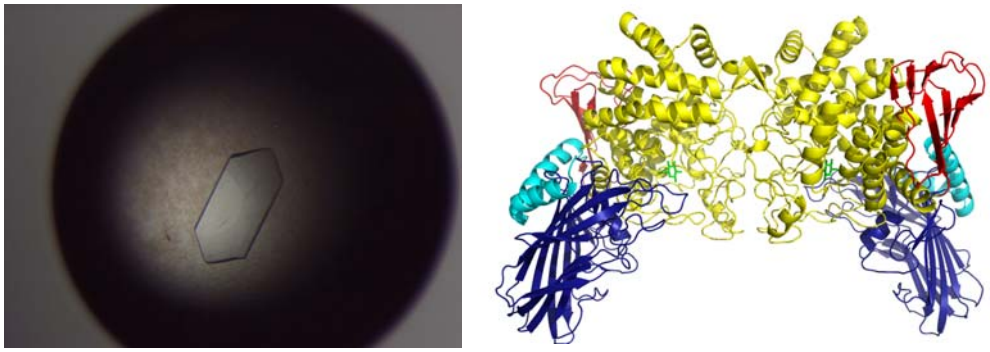
2-*O*-α-D-glucosylglycerol phosphorylase, hydrolysis of ß-D-glucose 1-phosphate, phosphatase

講演番号：2C16p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ C 校舎 16 会場

Bacillus selenitireducens 由来 2-*O*-α-D-グルコシルグリセロールホスホリラーゼの X 線結晶構造解析
Crystallographic analysis of 2-*O*-α-D-glucosylglycerol phosphorylase from *Bacillus selenitireducens*

○東原 幸起[1]、仁平 高則[2]、斉藤 由華[2]、北岡 本光[3]、中井 博之[2]、大坪 研一[2]、伏信 進矢[1]([1]東大院・農、[2]新潟大・農、[3]農研機構・食総研)
○Kouki Touhara[1], Takanori Nihira[2], Yuka Saitou[2], Motomitsu Kitaoka[3], Hiroyuki Nakai[2], Ken'ichi Ohtsubo[2], Shinya Fushinobu[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Niigata Univ., [3]NFRI-NARO)

【目的】好塩菌*Bacillus selenitireducens*由来2-*O*-α-D-グルコシルグリセロールホスホリラーゼ(GlcGlycerolP) は、2-*O*-α-D-グルコシルグリセロールの加リン酸分解だけでなく、その合成とβ-グルコース1-リン酸の加水分解も触媒する。X線結晶構造解析によりそれらの反応の分子機構の決定を試みた。
【方法】pET-28aベクターに組み込まれた*bse12816*遺伝子を大腸菌で大量発現し、Ni affinity chromatography、anion exchange chromatography、size exclusion chromatographyで精製後、様々な条件で結晶化を試みた。また、活性中心残基であるグルタミン酸475番をグルタミンに置換した変異体を用いて、様々な基質との複合体構造の決定を試みた。
【結果】タンパク質の精製後、結晶化スクリーニングを行い、そのうち一条件でタンパク質の結晶を得ることができた。その条件を精密化することにより、より良質な結晶を得、高エネルギー加速器研究機構のフォトンファクトリーにてデータ収集を行った。結果、分解能 2.1 Å のデータセットを得た。本酵素と同じく Glycoside Hydrolase family 65 に属する maltose phosphorylase の構造（PDB:1H54）を用いて、分子置換法により位相決定を行った。更に構造の精密化を行い、β-グルコースとの複合体構造を決定した。



GlcGlycerolP の結晶（左）および全体構造（右）

X-ray crystallography, glycoside hydrolase family 65, 2-*O*-α-D-glucosylglycerol phosphorylase

講演番号：2C16p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ C 校舎 16 会場

好熱菌 *Caldicellulorsirputor saccharolyticus* 由来コージビオースホスホリラーゼの基質認識機構
Substrate recognition mechanism of kojibiose phosphorylase from *Caldicellulorsirputor saccharolyticus*

○岡田 理志[1]、山本 拓生[2]、渡辺 光[2]、西本 友之[2]、茶圓 博人[2]、福田 恵温[2]、若木 高善[1]、伏信 進矢[1] ([1]東大院農、[2]林原・研究開発本部)
○Satoshi Okada[1], Takuo Yamamoto[2], Hikaru Watanabe[2], Tomoyuki Nishimoto[2], Hiroto Chaen[2], Shigeharu Fukuda[2], Takayoshi Wakagi[1], Shinya Fushinobu[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]HAYASHIBARA CO.LTD. R&D Center)

〈背景・目的〉
コージビオースは麹から発見されたグルコースがα-1,2 結合した二糖であり、みりんや酒、蜂蜜中などに微量に存在し、難う蝕性やビフィズス菌生育活性化作用などの三次機能を有することがわかっている。一方でコージビオースは精製が非常に困難で希少な糖質である。
コージビオースホスホリラーゼはコージビオースを加リン酸分解してβ-グルコース-1-リン酸とグルコースを生じる反応、およびその逆反応によりコージビオースを合成する反応を触媒する。本研究ではコージビオースホスホリラーゼの X 線結晶構造解析を行うことにより、コージビオースの合成反応に重要な残基を特定することを目的としている。また本酵素は糖質関連酵素データベース CAZy 上で糖質加水分解酵素ファミリー65(GH65)に属するが、このファミリーでは基質との複合体の構造はまだ得られておらず、GH65 の基質認識様式を調べることも目的の一つである。
〈方法・結果〉
好熱菌 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* よりコージビオースホスホリラーゼの遺伝子をクローニングし、大腸菌を宿主として組み換え酵素を大量発現し、種々の方法により酵素を精製した。精製酵素を用いた結晶化、および基質との共結晶化を行い、得られた結晶を用いて Spring-8, KEK-PF において X 線回折実験を行った。
リン酸、グルコース＋リン酸、コージビオース＋硫酸との複合体についてそれぞれ分解能 2.6、2.1、2.8Å の回折データを得ることに成功し、既知構造である *Lactobacillus brevis* 由来のマルトースホスホリラーゼをテンプレートとした分子置換法により立体構造を決定した。得られた構造とアミノ酸配列の比較および変異体を用いた動力学的解析によって GH65 のファミリーにおいて基質の認識に重大な影響を及ぼすと推定される残基を特定した。



コージビオースホスホリラーゼの結晶(左)、および全体構造(右)

Kojibiose phosphorylase, Glycoside Hydrolase family 65, Structure-based mutagenesis

講演番号：2C16p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ C 校舎 16 会場

Listeria innocua 由来の新規酵素 1,2-β-D-オリゴグルカンホスホリラーゼの機能解析
Characterization of 1,2-ß-D-oligoglucan phosphorylase, a novel enzyme from *Listeria innocua*.
○豊泉 大幸[1]、阿部 紘一[1]、中島 将博[1,3]、田口 速男[1]、平石 正男[2]、五十嵐 圭日子[2]、鮫島 正浩[2]、北岡 本光[3] ([1]東理大理工、[2]東大院農生科、[3]農研機構・食総研)
○Hiroyuki TOYOIZUMI[1], Koichi ABE[1], Masahiro NAKAJIMA[1,3], Hayao TAGUCHI[1], Masao HIRAISHI[2], Kiyohiko IGARASHI[2], Masahiro SAMEJIMA[2], Motomitsu KITAOKA[3] ([1]Tokyo Univ. Science, [2]Tokyo Univ., [3]NFRI－NARO)

【目的】ホスホリラーゼは、糖鎖を加リン酸分解して糖リン酸を生成する酵素である。この反応は可逆的であるため、逆反応を用いたオリゴ糖合成が容易である。また、ホスホリラーゼの高い反応位置選択性もオリゴ糖合成に有用な性質である。しかし、既知のホスホリラーゼの反応の種類は少ないため、その種類の増加が望まれる。Glycoside hydrolase family 94 (GH94) は、ホスホリラーゼを含むファミリーであり、系統樹上で基質特異性ごとのグループに分かれる。そこで、本研究では GH94 の機能未知のグループに注目し、*Listeria innocua* 由来 Lin1839 タンパク質の機能解析を行った。
【方法、結果】大腸菌を用いて組換え Lin1839 タンパク質(rLin1839)を生産した。精製した rLin1839 の分子量を SDS-PAGE、ゲルろ過クロマトグラフィーにより調べたところ、どちらの場合も分子量が約 110kDa であった。この結果は rLin1839 が単量体であることを示している。逆反応を用いて rLin1839 の基質特異性を調べた。まず、ドナーをα-グルコース-1-リン酸(G1P)としてアクセプターを調べたところ、rLin1839 はソホロース(Glc-β1,2-Glc)に対して最も高い活性を示した。次に、ソホロースをアクセプターとしてドナーを調べたところ、rLin1839 は G1P に特異的であった。そこで、ソホロースと G1P を基質としたときの逆反応における反応生成物を薄層クロマトグラフィー(TLC)により調べたところ、複数の重合度のオリゴ糖が検出された。3 糖、4 糖と推測される反応生成物をゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、NMR を用いて構造決定を行ったところ、それぞれソホロトリオース(Glc-β1,2-Glc-β1,2-Glc)、ソホロテトラオース(Glc-β1,2-Glc-β1,2-Glc-β1,2-Glc)であった。これは、rLin1839 がβ1,2-グルコシド結合に作用することを示している。機能解析に十分な量の基質を得るため、グルコースと G1P を出発原料として rLin1839 によるソホロオリゴ糖(β1,2-グルコオリゴ糖)の合成を行った。グルコース 250 mM と G1P 500 mM を含む溶液 20 ml に rLin1839 を 2 mg/ml (終濃度)加えて反応を行ったところ、反応初期にはポリマーが合成されたが、長時間反応ではオリゴ糖が蓄積した。14 日反応を行ったサンプルを熱処理、電気透析、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。その結果、2 糖から 5 糖のソホロオリゴ糖をそれぞれ 98 mg、120 mg、100 mg、36 mg 得た。精製した基質を用いて逆反応のカイネティクス解析を行った。その結果、2 糖、3 糖、4 糖に対する K_m はそれぞれ 8.5 mM、6.0 mM、6.5 mM、k_{cat} はそれぞれ 97 s^{-1}、110 s^{-1}、90 s^{-1} であった。この結果から、本酵素を 1,2-β-D-オリゴグルカンホスホリラーゼと命名した。順反応のカイネティクパラメーターについては現在解析中である。

Sophorose, Phosphorylase, ß-1,2-glucan

講演番号：2C16p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ C 校舎 16 会場

Clostridium thermocellum 由来セロビオースホスホリラーゼへの変異導入によるセロオリゴ糖の合成

Mutagenesis of cellobiose phosphorylase from *Clostridium thermocellum* for synthesis of cellooligosaccharide.

○片山 貴之、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（大阪府大院生環）
○Takayuki KATAYAMA,Shuji TANI,Jun-ichi SUMITANI,Takashi KAWAGUCHI (Osaka Pref. Univ.)

[背景・目的] セロビオースホスホリラーゼ（CBP）及びセロデキストリンホスホリラーゼ（CDP）は, GH94 に属する酵素であり, それぞれ, セロビオース及びセロオリゴ糖の加リン酸分解を可逆的に触媒する。CBP では, *Cellvibrio gilvus* 由来のもの（CgCBP）について詳細な立体構造解析が行われており, サブサイトについても詳細に研究されているが, CDP については立体構造が解析されておらず, プラス側サブサイトについても明らかになっていない。そこで, 本研究では CgCBP の立体構造を基に, *Clostridium thermocellum* 由来 CBP（CtCBP）と CDP（CtCDP）の一次配列を比較し, プラス側サブサイトに位置すると思われるアミノ酸に変異を導入することで, 合成反応がセロビオースで停止する CBP に対してセロオリゴ糖合成能を付与し, プラス側サブサイトに関する知見を得ることを目的とした。また, GH94 の一次配列を比較すると, CBP において保存されている, 活性中心の入口に位置するループが CtCDP では 12 アミノ酸長くなっていることが明らかとなったので, その影響についても検討した。

[方法・結果] CgCBP の立体構造より, プラス側サブサイトに相当すると思われる位置に, 基質が入り込めるスペースを与える目的で, 障害となることが予想される各アミノ酸をアラニンに置換した変異酵素を作製した。得られた変異酵素をグルコースとセロビオース, セロトリオースに作用させ, TLC によって反応産物を解析したところ, E636A において, セロビオースにグルコースを付加した, セロトリオースと思われるスポットが確認された。また, R166A / E636A は, グルコースからもセロトリオースを合成する活性を有しており, R166A / E185A / E636A では, その活性が有意に上昇していた。さらに, R166A / E185A / R190A / E636A は, グルコースからセロトリオースを合成する活性を保持しながら, わずかにセロトリオースにグルコースを付加する活性を有するようになった。R166A / E185A / R190A / E636A に, CDPase で見られるループ中の 12 アミノ酸を挿入すると, セロトリオースにグルコースを付加する活性が上昇した。現在, 各アミノ酸に部位飽和変異を導入し, 最適化を行っている。

Cellobiose phosphorylase, Cellodextrin phosphorylase, Cellooligosaccharide

講演番号：2C16p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ C 校舎 16 会場

Stenotrophomonas maltophilia No. 43 株由来アルギン酸リアーゼの諸性質の検討及びそのクローニング
Characterization and cloning of alginate lyase from *Stenotrophomonas maltophilia* No. 43
○石井 里沙、梅村 源、里村 武範、末 信一朗（福井大院工）
○Risa ISHII,Hajime UMEMURA,Takenori SATOMURA,Shin-ichiro SUYE (Univ. Fukui)

[目的]
第三世代バイオマスである海藻の効率的な糖化を行うために、海藻の主成分であるアルギン酸の糖化法の開発が行われている。アルギン酸分解酵素であるアルギン酸リアーゼは現在までに多数発見されており、研究が進められてきている。本研究室では越前海岸で取得した海藻類からアルギン酸分解能を持つ微生物の単離に成功し *Stenotrophomonas maltophilia* No. 43 株と同定した。本菌株は高いアルギン酸リアーゼ活性を有していることが明らかとなり、アルギン酸の糖化用酵素資源として期待される。本研究では本菌株が有するアルギン酸リアーゼの詳細な酵素化学的性質の解析とタンパク質の立体構造解析を目的として研究を行った。
[方法]
S. maltophilia No. 43 株由来のアルギン酸リアーゼの精製を行なった。本酵素を DEAE-TOYOPEARL 弱陰イオン交換クロマトグラフィーと Q-Sepharose 強陰イオン交換クロマトグラフィー、BUTYL-TOYOPEARL 疎水クロマトグラフィーの 3 段階の精製方法によって単一に精製することに成功した。精製したアルギン酸リアーゼを用いて、本酵素の酵素化学的性質の検討を行った。また、精製酵素の N 末端のアミノ酸配列を同定し、特定した N 末端アミノ酸配列を元にアルギン酸リアーゼをコードする遺伝子のクローニング、大腸菌によるタンパク質発現系の構築を行なった。
[結果・考察]
S. maltophilia No. 43 株が生産するアルギン酸リアーゼの酵素化学的性質の解析を行なった結果、本酵素は 50°C で 1 時間熱処理を行っても失活せず、今までに見出されているアルギン酸リアーゼの中でも高い安定性を有する酵素であることが明らかとなった。また、基質特異性について本酵素はアルギン酸ポリマー中の α-L-マンヌロン酸(M)と β-D-グルロン酸(G)からなるヘテロポリメリック部位およびポリ M 部位を特異的に認識し切断することが明らかとなった。本酵素は一次構造から Polysaccharide lyase Family(PLs)6 に属していることが明らかとなっている。PLs-6 に属するアルギン酸リアーゼについては、最近、同じ *S. maltophilia* KJ-2 株でアルギン酸リアーゼ活性が報告されているが [1)]、この酵素はヘテロポリメリック部位のみに反応することから本酵素と基質特異性が大きく異なっていた。現在、本酵素の立体構造解析を行うために結晶化条件の検討を進めている。
1) S. I. Lee *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 95, 1643-1653, (2012)

Stenotrophomonas maltophilia, alginate lyase, cloning

講演番号：2C16p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ C 校舎 16 会場

ヘパリン分解細菌由来ヘパラン硫酸リアーゼ HepC の結晶構造と活性部位

Crystal structure and active site of heparan sulfate lyase HepC from heparin-degrading bacterium

○橋本 渉、丸山 如江、中道 優介、村田 幸作（京大院農）
○Wataru Hashimoto,Yukie Maruyama,Yusuke Nakamichi,Kousaku Murata (Kyoto Univ.)

【背景と目的】グリコサミノグリカン（GAG）は、哺乳類において細胞外マトリックスとして存在し、細胞間相互作用に重要な役割を担っている。構成糖、グリコシド結合様式、及び硫酸化の相違により、GAG はヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸などに分類される。連鎖球菌などの病原性細菌はヒアルロン酸リアーゼを細胞外に分泌し、細胞外マトリックスを分解することにより宿主細胞に侵入することが示されている。そのため、GAG に作用する酵素の構造と機能を解析することは細菌による感染症発症の理解に繋がる。これまでに、GAG の分解に作用する細菌由来酵素として、ヒアルロン酸リアーゼ、コンドロイチン硫酸リアーゼ、ヘパリンリアーゼ、不飽和グルクロニルヒドロラーゼなどの構造機能相関が明らかにされている。本研究では、ヘパラン硫酸リアーゼに焦点を当て、その構造機能解析を進めた。
【方法と結果】ヘパリン分解細菌 *Pedobacter heparinus* は、ヘパリン関連多糖に作用する三種類の酵素（HepA, HepB, HepC）を生産する。その内、ヘパラン硫酸に作用するリアーゼ（HepC）をコードするホモログ遺伝子が、連鎖球菌を始めとする各種病原性細菌のゲノムに存在していた。そこで、HepC の立体構造を明らかにするため、本酵素の大量発現系を大腸菌内に構築し、組換え酵素を X 線結晶構造解析に供した。セレノメチオニン置換体を用いた異常分散法により、HepC の立体構造を分解能 2.2Å で決定した。HepC は、N 末端側と C 末端側の二つのドメインから構成されている。N 末端側 α ドメインは α/α バレル構造を、C 末端側 β ドメインは逆並行 β シート構造を形成する。各種 GAG リアーゼと比較したところ、HepC は一次構造上有意な相同性を示さないのに対し、立体構造の点ではコンドロイチン硫酸リアーゼ、ヒアルロン酸リアーゼ並びにヘパリンリアーゼ HepB と類似していることが分かった。また、最近構造決定された *Bacteroides* 属細菌由来ヘパリナーゼ III とも似ている。HepB との構造比較から予測される HepC の活性部位について、その構成残基（N 末端ドメイン残基 His241 と Tyr294、及び C 末端ドメイン残基 His424）に部位特異的変異を導入したところ、変異体酵素は顕著に活性を低下した。そのため、これらのアミノ酸残基が酵素反応に重要であり、HepC は N 末端側 α ドメインと C 末端側 β ドメインの界面に活性部位をもつことが示唆された。また、HepC と酵素反応産物であるヘパラン四糖との親和性を differential scanning fluorimetry で解析した。その結果、本酵素の融解温度（T_m）はヘパラン四糖存在下で顕著に低下することが示されたため、酵素反応産物は HepC の構造不安定化を引き起こすことが考えられた。

heparan sulfate lyase, *Pedobacter heparinus*, X-ray crystallography

講演番号：2C16p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ C 校舎 16 会場

進化工学的手法による galacto-*N*-biose/lacto-*N*-biose I phosphorylase (GLNBP)の耐熱性化
Thermostabilization of galacto-*N*-biose/lacto-*N*-biose I phosphorylase (GLNBP) by evolutionary engineering

○小山 善幸、川上 真理子、西本 完、北岡 本光（農研機構・食総研）
○ Yoshiyuki KOYAMA,Mariko KAWAKAMI,Mamoru NISHIMOTO,Motomitsu KITAOKA (NFRI-NARO)

【目的】

Galacto-*N*-biose/lacto-*N*-biose I phophorylase (GLNBP)はラクト-*N*-ビオース I (LNB)を α-ガラクトース 1-リン酸と *N*-アセチルヘキソサミンに加リン酸分解する酵素であり、本酵素を用いて LNB の大量調製を行うことが可能である。実用的な LNB の生産では、雑菌の混在リスクの低減や高糖濃度条件下で反応させるために高温で反応させることが望ましい。しかしながら、GLNBP はビフィズス菌と一部の病原菌以外に存在せず、好熱菌由来の耐熱性酵素のアミノ酸配列に基づく酵素の改良が困難である。そこで本研究では、変異型 GLNBP ライブラリーを作出し、耐熱性 GLNBP を選抜することを目的とした。

【方法・結果】

まず、変異型 GLNBP ライブラリーからの耐熱性 GLNBP 選抜条件を確立した。多検体の選抜を可能にするために GLNBP 発現大腸菌 [BL21(DE3), ベクターp28a]の 96 穴マイクロプレート上における培養条件の検討を行った。その結果、30℃, 18 時間静置培養することで安定的に GLNBP が発現することが明らかになった。酵素の抽出は Bugbuster master mix を用いることで多検体の同時処理を可能とした。抽出した酵素を、40-65℃の条件で 30 分間処理したところ、55℃で処理した時の酵素活性が非加熱条件に比べて約 1.5%に低下したが、明確に測定可能な活性が残存していた。野生型が 1.5%の残存活性を示す時、半減期が 2 倍に向上した耐熱性変異型酵素では理論上約 12 倍高い残存活性を示すことから、有意に耐熱性変異株が選抜出来る条件であると想定した。

次に、変異型 GLNBP 発現ライブラリーを作製し、耐熱性変異型 GLNBP 発現株の探索を行った。エラープローン PCR 法により作製した変異型 GLNBP ライブラリーから無作為に約 5000 クローンを選択し、耐熱性変異株の選抜を行ったところ、172 株より抽出した酵素が野生型酵素に比べて 10 倍以上高い残存活性を示した。これまでに 172 株のうち 166 株の塩基配列を決定し、野生型 GLNBP とアミノ酸配列レベルで異なる 12 種の変異点を得た。12 種の点変異酵素の熱安定性を精製酵素で評価し、耐熱性が明らかに向上する 7 種の変異点を同定した。

現在、更なる塩基配列の解析を進め、新たな耐熱性変異部位を探索するとともに、耐熱性変異点を組み合わせた耐熱性 GLNBP の作出を行っている。

thermostabilization, phosphorylase, evolutionary engineering

講演番号：2C16p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ C 校舎 16 会場

Streptomyces lavendulae 由来 1-デオキシノジリマイシン（DNJ）生合成遺伝子の機能解析
Functional analysis of the genes responsible for 1-deoxynojirimycin biosynthesis from *Streptomyces lavendulae*

○大西 岬、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院・生命・応生科）
○Misaki OHNISHI,Shuji TANI,Jun-ichi SUMITANI,Takashi KAWAGUCHI (Grad Sch Life & Env Sci, Osaka Pref Univ.)

【目的】1-デオキシノジリマイシン(DNJ)はグルコースのアナログであり、強力なグルコシダーゼ阻害剤として機能する。DNJ は桑などの植物や、ある種の *Streptomyces* 属、*Bacillus* 属の微生物により生産される。DNJ の生合成については同位体標識を用いた研究により、グルコースが初発物質であると推定されているものの、合成中間体や関与する酵素など、詳細な生合成経路は明らかにされていない。一方、最近 *Bacillus* 属 DNJ 生産菌からショットガンクローニングによって大腸菌に DNJ 合成能を付与する遺伝子 *gabT1*、*yktc1*、*gutB1* が報告された。我々はこの結果を踏まえ、以前に当研究室で土壌から単離した DNJ 生産放線菌 *S. lavendulae* subsp. *trehalostaticus* No.2882 株から、これら 3 つの遺伝子を含む約 11 kb の DNA 断片取得に成功した。そこで本研究では、取得した DNJ 生合成に関与する遺伝子群をもとに、放線菌における DNJ 生合成系を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】3 つの遺伝子をポリシストロニックに発現するよう発現プラスミドを構築し、プロトプラスト PEG 法により *S. lividans* TK21 株を形質転換した。その結果、DNJ 生産を確認した。よって、これら 3 つの遺伝子が DNJ 生合成に必要であると考え、個々の遺伝子の機能を解析するために、大腸菌にて 3 つの遺伝子の発現を試みた。まず大腸菌用発現プラスミド pET-16b の T7 プロモーター下流に、His･Tag 融合タンパク質として発現するよう各遺伝子を挿入したコンストラクトを構築した。その後、大腸菌宿主・培養温度・IPTG 添加の有無による発現条件検討を行った。その結果、Yktc1 のみ、可溶性タンパク質として発現させることに成功した。しかし GabT1、GutB1 は不溶性画分に発現産物が見られた。現在、GabT1、GutB1 を可溶性タンパク質として得るため、リフォールディング及び放線菌での発現を検討中である。3 つの遺伝子全てを可溶化させることができれば、*in vitro* で DNJ の酵素合成を再現し、各遺伝子産物の基質と反応産物を同定することで DNJ 生合成経路を明らかにしていく予定である。また、取得済みの約 11 kb の DNA 断片中には *Bacillus* 属 DNJ 生産菌で報告された DNJ 生合成遺伝子群とは異なる遺伝子が見出された。よってこれらの遺伝子の DNJ 代謝への関与についても追及する予定である。

1-deoxynojirimycin, *Streptomyces*

講演番号：2C16p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ C 校舎 16 会場

4-ケトアルドペントースの酸化発酵生産には新規 PQQ 酵素が機能する

Oxidative fermentation of 4-keto-D-aldopentose is catalyzed by a new quinoprotein

○足立 収生[1]、アワーズ ロケ　A.[2]、阿野 嘉孝[3]、赤壁 善彦[4]、品川 恵美子[5]、薬師 寿治[6]、松下 一信[7]([1]山口大学・農、[2]ラプラタ大学・発酵工学研、[3]愛媛大学・農、[4]山口大学・農、[5]宇部高専・物質工学、[6]山口大学・農、[7]山口大学・農)

○Osao ADACHI[1], Roque　A. Hours[2], Yoshitaka Ano[3], Yoshihiko Akakabe[4], Emiko Shinagawa[5], Toshiharu Yakushi[6], Kazunobu Matsushita[7] ([1]Yamaguchi Univ., [2]La Plata Univ., [3]Ehime Univ., [4]Yamaguchi Univ., [5]Natl. Coll. Ube. Technol., [6]Yamaguchi Univ., [7]Yamaguchi Univ.)

【目的】４位にケトンをもつ種々の新規五炭糖を、高速・高収率に発酵生産できる酸化発酵系が見つかった(1)。これまでに、この酸化発酵に関係する酢酸菌の単離・同定(2)、それを触媒している未同定な膜酵素の特定(3)、酸化発酵産物の単離と化学構造解析(4)を実施し、未知の反応系であることを確認した。本報では、4−ケトアルドペントース生成に機能する膜酵素であるアルドペントース４−脱水素酵素(APDH)の特徴づけを目指した。

【方法】*Gluconobacter oxydans* NBRC 3244 と NBRC 12528 を本研究に用いた。グルコース、グルコン酸、グリセロール、酵母エキス、及びペプトンからなる培地を基本培地として用いた。酵素活性は PMS-DCIP やフェリシアニドを電子受容体とする測定法を用いたほか、TLC−TTC 発色法やゲル濾過によって反応生成物の確認と単離を行った。

【結果】以下に示す種々な検討から、APDH はこれまで報告されていない PQQ 酵素であると結論した。容易にアポ化されるソルビトール脱水素酵素やグリセロール脱水素酵素と違って、細胞膜を高濃度 EDTA で処理することで、APDH は大部分アポ化された。アポ酵素は PQQ と唯一 Ca^{2+}添加によってホロ酵素となり酵素活性を回復した。しかしながら細胞膜から可溶化した後では、他の PQQ 酵素と同様にアポ酵素のホロ化は難しかった。APDH を界面活性剤によって細胞膜から可溶化して、イオン交換クロマトによって精製酵素が得られた。しかし、可溶化後の APDH は不安定で、アパタイトカラムに強く吸着して、1 M リン酸緩衝液でようやく溶出された。精製した APDH は、PQQ-アルコール脱水素酵素のような特徴的なヘム *c* サブユニット由来の吸収スペクトルを示さず、400 nm 近辺に低い吸収を示した。グルコースをグルコン酸へ酸化できない PQQ-グルコース脱水素酵素(QGDH)欠損株も、野生株と同程度にアルドペントースを酸化して 4−ケトペントースを生成したことから、APDH は QGDH とは異なる PQQ 酵素と結論する根拠のひとつとなった。

【文献】(1) 足立収生, 新規酸化発酵系の開発、*酢の機能と科学*、酢酸菌研究会編、朝倉書店、175-179 (2012). (2) O. Adachi *et al*., *B. B. B*,, **74**, 2555-2558 (2010). (3) O. Adachi *et al*., *B. B. B*., **75**, 1801-1806 (2011). (4) O. Adachi *et al*., *B. B. B*,, **75**, 2418-2420 (2011).

4-keto-D-aldopentose, oxidative fermentation, quinoprotein

講演番号：2C16p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ C 校舎 16 会場

酵母由来の Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase のクローニングと特性解析

Molecular cloning and characterization of the endo-beta-*N*-acetylglucosaminidases from yeasts

○村上 智史[1]、高岡 友紀[1]、芦田 久[2]、山本 憲二[3]、千葉 靖典[1] ([1]産総研・生物プロセス、[2]近畿大・生物理工、[3]石川県立大・生物資源工学研)
○Satoshi MURAKAMI[1], Yuki TAKAOKA[1], Hisashi ASHIDA[2], Kenji YAMAMOTO[3], Yasunori CHIBA[1] ([1]Bioproduction Res. Inst., AIST, [2]Fac. of Biol.-Oriented Sci. and Tech., Kinki Univ., [3]Res. Inst. for Bioresources and Biotech., Ishikawa Prefectural Univ.)

【目的】 Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase (ENGase)は *N*-グリカンの *N,N'*-ジアセチルキトビオース部分を加水分解する酵素である。ENGase は副反応として切断した糖鎖をアクセプター分子に転移する活性(トランスグリコシレーション活性)を持つことから、近年、糖ペプチドや糖タンパク質の化学-酵素合成の分野で注目を集めている。我々はメタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* を用いた糖鎖研究の過程で本酵母が複合型糖鎖を加水分解する ENGase を持つことを見出した。そして有用な新規酵素の取得を目的として *O. minuta* およびその他の酵母の ENGase の探索を行い、遺伝子のクローニングと特性解析を行った。
【方法と結果】 Fmoc ラベルしたアガラクト 2 分岐複合型糖鎖(NGA2-Asn-Fmoc)を基質として *O. minuta* の細胞抽出液の ENGase 活性を測定した結果、分解活性が確認された。*Mucor hiemalis* 由来の Endo-M のアミノ酸配列を元にデータベース検索を行った結果、*O. minuta* のゲノム配列中に Endo-M とアミノ酸配列で 33.9%の相同性を持つ遺伝子(*Endo-Om*)が検出された。さらにこの配列を元に他の酵母由来の ENGase を検索したところ、*Candida parapolymorpha* (Endo-Cp), *Pichia anomala* (Endo-Pa), *Zygosaccharomyces rouxii* (Endo-Zr)で相同性の高い遺伝子が検出された(括弧内は酵素名)。各酵素と Endo-Om のアミノ酸配列の相同性は、53.9%、42.5%、30.6%で、それぞれの細胞抽出液から ENGase 活性が確認された。また培養上清中に ENGase 活性は検出されなかった。一方、*Saccharomyces cerevisiae* や *Pichia pastoris* などの他の酵母では該当する ENGase の遺伝子は検出されなかった。

各酵母から遺伝子をクローニングし、大腸菌と酵母で過剰発現系を構築して Ni アフィニティーカラムで精製を行った。4 つの酵素はいずれも N 末側に GH ファミリー85 ENGase に共通する保存領域と推定の活性中心アミノ酸残基を持ち、アミノ酸配列から推定される分子量は 73-87 kDa、推定等電点は 5.6-6.7 であった。至適反応 pH はいずれも pH 5.0-5.5 付近で、至適反応温度は 40-60℃であった。4 つの酵素は 2 価の金属イオンのうち Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}によって阻害されたが、EDTA や EGTA には影響を受けなかった。各種 PA 化糖鎖を用いて基質特異性を調べた結果、いずれも高マンノース型、ハイブリッド型、2 分岐の複合型糖鎖を加水分解したが、コアフコース付きの糖鎖や 3 分岐・4 分岐の複合型糖鎖は分解することができなかった。また NGA2-Asn-Fmoc をドナー、*p*NP-Glucose をアクセプターとしてトランスグリコシレーション活性の有無を調べた結果、Endo-Zr 以外の酵素でトランスグリコシレーション活性が確認された。

Endo-beta-*N*-acetylglucosaminidase, Yeast, *N*-glycan

講演番号：2C16p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ C 校舎 16 会場

GH ファミリー9 に属するエキソβ-D-グルコサミニダーゼの糖鎖合成酵素化

Glycosynthase from an inverting glycoside hydrolase belonging to GH9 family

○本多 裕司[1]、新井 祥子[1]、鳥本 真理恵[1]、鈴木 健太郎[2]、伏信 進矢[2]、北岡 本光[3]([1]石川県大　生物資源、[2]東大・院農、[3]（独）農研機構　食総研)
○Yuji HONDA[1], Sachiko ARAI[1], Marie TORIMOTO[1], Kentaro SUZUKI[2], Shinya FUSHINOBU[2], Motomitsu KITAOKA[3] ([1]Ishikawa prefectural Univ., [2]Univ. of Tokyo, [3]National Food Resarch Institute)

【緒言】糖質加水分解酵素(GH)はアミノ酸配列の類似性を基にして、130 以上のファミリーに分類されている。GH9 ファミリーにはエンドグルカナーゼ(EC 3.2.1.4)、セロビオヒドロラーゼ(EC 3.2.1.91)、β-グルコシダーゼ (EC 3.2.1.21)およびエキソβ-D-グルコサミニダーゼ(EC.3.2.1.165)が分類されている。

我々は 2011 年に、*Photobacterium profundum* SS9 から得られた GH9 に属する PBPRA0520 蛋白質が、アノマー反転型のエキソβ-D-グルコサミニダーゼである事を報告した(1)。

GH はその触媒機構の違いによって、アノマー保持型酵素とアノマー反転型酵素に大別されている。一般的に、アノマー保持型酵素は加水分解反応だけではなく、糖転移反応も触媒する事ができる。しかし、アノマー反転型 GH は加水分解反応しか触媒する事ができない。

ところが、我々は 2006 年に、触媒基近傍のアミノ酸残基を置換した変異型酵素とフッ化糖を作用させると、アノマー反転型酵素でも糖鎖を合成できる事を報告した(2)。

本研究では、アノマー反転型エキソβ-D-グルコサミニダーゼの糖鎖合成酵素化を目的とし、触媒に関与しているアミノ酸残基を置換した様々な変異型酵素を作成した。さらに、これらの酵素の加水分解能とフッ化糖(α-GlcN-F)に対する反応性を検討した。

【方法と結果】野生型酵素の基質フリー構造と GlcN 複合体の X 線結晶構造解析から、本酵素の触媒に関与しているアミノ酸残基が D139、D143、および E555 であると考えられた。これらのアミノ酸残基をアラニンに置換した変異型酵素(D139A、D143A、E555A)を作成した。これらの変異型酵素の加水分解活性を測定した結果、全ての変異型酵素の加水分解活性は大幅に低下していた。また、これらの変異型酵素にα-GlcN-F を作用させると、D139A だけが $GlcN_2$ とα-$GlcN_2$-F を生成した。

次に、本酵素の糖鎖合成酵素化に最適なアミノ酸残基を探索するために、D139 に対して saturation mutagenesis 法と部位特異的変異導入法を導入し、19 種の変異型酵素(D139X)を得た。これらの変異体の糖鎖合成能について調べてみると、D139E, D139A,および D139S が良好な糖鎖合成能を示す事が判明した。

【参考文献】

(1) Honda et al. *Glycobiology* **21**, pp. 503-511 (2011)
(2) Honda and Kitaoka *J. Biol. Chem.* **281**, pp. 1426-1431 (2006)

Glycoside hydrolase, Glucosaminidase, Glycosynthase

講演番号：2C16p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ C 校舎 16 会場

Purification and characterization of nigerose-producing enzyme from *Podospora anserina*

○Kyung-Mo SONG,Masayuki OKUYAMA,Haruhide MORI,Atsuo KIMURA (Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

A filamentous fungus *Podospora anserina* has been used as a model organism for investigation of biological studies because of rapid life cycle and ease of culture. The genome project of *P. anserina* revealed that this fungus contains a number of putative carbohydrate-related enzymes. However, the carbohydrate metabolism of *P. anserina* is still unclear.

In this study, we discovered that *P. anserina* produces glucose, maltose and nigerose (3-*O*-α-D-glucopyranosyl-D-glucopyranose) in the culture medium when it was cultivated in a liquid medium containing soluble starch as carbon source. In particular, the 9-days culture supernatant contained 6.5 g/L of nigerose when 15% (w/v) soluble starch was used. The enzyme, which catalyzed conversion of starch to nigerose, was purified from the culture supernatant. The enzyme was an α-glucosidase with strong transglycosylation activity, catalyzing hydrolysis of starch along with formation of nigerose and maltose. The α-glucosidase was consisted of two polypeptides, 57 and 45 kDa subunits. N-terminal and the peptide mass finger printing analyses of two polypeptides indicated that the enzyme was B2B450 in UniProtKB and was synthesized as a single polypeptide precursor. Interestingly, the recombinant enzyme produced in *Pichia pastoris* was also comprised of two polypeptides and their N-terminal sequences were identical to N-terminal sequences of the enzyme purified from *P. anserina*. The kinetic studies of the recombinant enzyme revealed that the enzyme showed surprisingly strong transglycosylation activity. The transglycosylation ratio was 83% at 1 mM maltose used as substrate and reached to 99% at 20 mM maltose.

nigerose production, α-glucosidase, transglycosylation

講演番号：2C16p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ C 校舎 16 会場

カンゾウ(Glycyrrhiza glabra L.)のフラボノイド系ポリフェノール配糖化酵素遺伝子の単離と解析
Isolation and analysis of flavonoids-specific glycosyltransferase genes from licorice (Glycyrrhiza glabra L.)

○桑原 侑己[1]、東江 直樹[1]、瀧川 義浩[2]、早川 堯夫[1]、角谷 晃司[1] ([1]近畿大薬学総合研究所、[2]近畿大先端技術総合研究所)
○Yuki Kuwahara[1], Naoki Toue[1], Yoshihiro Takikawa[2], Takao Hayakawa[1], Koji Kakutani[1] ([1]Kinki Univ., [2]Kinki Univ.)

【背景および目的】マメ科の薬用植物カンゾウの根は様々な薬理活性を有することから、医薬品および化粧品の他、甘味料原料として多用されている。その含有成分には glycyrrhizin を代表とする他に、isoliquiritin、isoliquiritigenin、shinflavanone、licoricone のように多様なフラボノイド系ポリフェノールがある。これらは特異的な二次代謝の働きにより生合成され、その最終産物は配糖化により液胞内に蓄積させるものと考えられるが、カンゾウのフラボノイド化合物への配糖化に関与する糖転移酵素に関する知見はほとんどない。そこで、本研究では、遺伝子工学的手法を用いることによりカンゾウの根に存在するフラボノイド系ポリフェノール配糖化酵素遺伝子の単離および解析を試みた。
【材料および方法】まず、スペイン甘草（*Glycyrrhiza glabra* L.）から Total RNA を抽出し、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応法によって RNA から cDNA を合成した後、cDNA ライブラリーを作成した。一方、既知のグルコース転移酵素遺伝子配列の相同性検索によって RT-PCR で共通する部分の cDNA 断片を得、その断片をプローブとして、cDNA ライブラリーからプラークハイブリダイゼーションにより、スクリーニングを行った。そして得られた断片の塩基配列を決定した後、大腸菌発現ベクターpET32 に挿入した。大腸菌 AD494(DE3)pLysS 株に形質転換後、目的タンパク質を発現誘導させ、基質（6,7,4’-OH isoflavone、7,3’,4’-OH isoflavone、daidzein、genistein、biochanin A、quercetin、fisetin）と UDP-グルコースを用いた糖転移反応を HPLC により分析した。
【結果および考察】今回、グルコース転移酵素遺伝子断片をプローブとして、cDNA ライブラリーによりスクリーニングを行ったところ、計 35 個の陽性クローンがスクリーニングされた。それらの塩基配列を解析したところ、2 つのグループに分類された。一方は *Pueraria montana* var. *lobata* のグルコース転移酵素遺伝子と 99%の相同性が、他方は *Medicago truncatula* のグルクロン酸転移酵素遺伝子と 96%の相同性があった。次に発現ベクターpET32 に挿入後、発現タンパク質を誘導させ、それらの酵素活性を測定した。今回、多種のフラボノイド系ポリフェノール基質および糖質を用いて、発現酵素の酵素活性の解析を検討した結果、いくつかの基質において糖転移酵素活性があることを確認した。したがって、カンゾウの根に存在するフラボノイド系ポリフェノール配糖化遺伝子の単離が示唆された。

Licorice (Glycyrrhiza glabra L.), Glycosyltransferase genes, Flavonoid series polyphenol

講演番号：2C16p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ C 校舎 16 会場

高基質特異性型グルコースデヒドロゲナーゼの結晶構造解析

Crystal structure analysis of high substrate specificity type glucose dehydrogenase

○加納 義貴[1]、上原 成一朗[1]、岩田 英之[2]、鹿島 康治[2]、大島 敏久[3]、櫻庭 春彦[1] ([1]香川大農、[2]耐熱性酵素研、[3]九州大農)
○Yoshitaka Kanoh[1], Seiitirou Uehara[1], Hideyuki Iwata[2], Kouzi Kashima[2], Toshihisa Ohshima[3], Haruhiko Sakuraba[1] ([1]Kagawa Univ., [2]Thermostable Enzyme Lab., [3]Kyusyu Univ.)

Archaea に広く分布する Entner-Doudoroff 経路の始発酵素である Glucose dehydrogenase(GDH) は、NADP(NAD)依存的に D-グルコースの C1 から水素を引き抜き NADPH(NADH)とグルコノラクトンを生成する。
好熱性 Archaea *Sulfolobus solfataricus* 由来の GDH(SsGDH)は、D-グルコースや D-ガラクトースのみならず、アルドペントースである D-キシロースに対しても高い反応性を示すことが知られている。また他の Archaea 由来の GDH においても複数種の糖基質に対して反応性を示すことが報告されている。SsGDH については、酵素-NADP-基質の 3 者複合体の結晶構造が解析されているが、複数種の糖基質に対応した基質認識機構の詳細は不明である。今回、我々は、好熱性 Archaea *Thermoplasma volcanium* に、グルコースとガラクトースのみに反応性を示す高基質特異性型の GDH(TvGDH)を見出した。GDH における基質認識機構の違いを明らかにするために本酵素の結晶構造解析を行い、2.6Åでアポ型立体構造の決定に成功した。SsGDH の 3 者複合体と比較した結果、双方のモノマー及びテトラマー構造は非常に似通っているものの、活性中心において基質特異性への関与が推測されるアミノ酸残基の幾つかに違いが確認された。また、NADP 結合部位にもわずかに違いが認められた。一方、TvGDH と NADP の 2 者複合体の結晶を作製し、解析した結果、NADP のニコチンアミド部分の電子密度が得られず、この部分が酵素に強固に保持されていないことが推定された。そこで、TvGDH の NADP 結合部位近傍の Thr277 を SsGDH 型の Phe に改変した T277F 変異体酵素を用いて NADP との共結晶を作製した結果、ニコチンアミド部位を含む NADP と TvGDH の複合体構造の取得に成功した。現在、本変異体酵素を用いて TvGDH-NADP-基質の 3 者複合体構造の取得を検討しており、TvGDH における基質認識メカニズムの解明を目指している。

archaea, glucose dehydrogenase, Thermoplasma volcanium

講演番号：2C16p17
講演日時、会場：3 月 25 日 17:12～ C 校舎 16 会場

ペクチンラムノガラクツロナンの合成に関与するラムノース転移酵素の活性測定法

Assay method for rhamnosyltransferase involved in biosynthesis of pectic rhamnogalacturonan

牧 祐介[1,2]、俣木 彩恵子[1]、石井 忠[3]、今井 友也[4]、長谷川 友香[5]、大橋 貴生[5]、藤山 和仁[5]、○石水 毅[1]([1]立命館大生命、[2]阪大院理、[3]筑波大院生命環境、[4]京大生存研、[5]阪大生工国際セ)
YUSUKE MAKI[1,2], SAEKO MATAKI[1], TADASHI ISHII[3], TOMOYA IMAI[4], YUKA HASEGAWA[5], TAKAO OHASHI[5], KAZUHITO FUJIYAMA[5], ○ Takeshi ISHIMIZU[1] ([1]Col. of Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Grad. Sch. of Sci., Osaka Univ., [3]Grad. Sch. of Life Environ. Univ. of Tsukuba, [4]RISH, Kyoto Univ., [5]ICBiotech., Osaka Univ.)

【序論】植物細胞壁成分のペクチンは構造が非常に複雑で、60 種類以上の糖結合様式を含む。各糖結合を形成する糖転移酵素の同定は進んでおらず、ペクチン生合成の分子機構は不明な部分が多い。これらの酵素は植物特有なものが多く、情報生物学的な手法による遺伝子同定には限界があり、各酵素の活性測定法を構築し、生化学的に酵素を同定する必要がある。しかし、これらの酵素のドナー基質・アクセプター基質の調製が難しく、酵素の活性測定法は一部しか確立されていない。本発表では、ペクチンの主骨格の一つで、ガラクツロン酸とラムノースの繰り返し構造 $(\text{-2GalUA}\alpha\text{1-4Rha}\alpha\text{1-})_n$ をとっているラムノガラクツロナンの合成に関わるラムノース転移酵素の活性測定法を構築した。
【方法・結果】ドナー基質については、既報の合成法に従い、UDP-ラムノースを調製した。アクセプター基質のラムノガラクツロナンオリゴ糖については、市販のラムノガラクツロナン多糖にドリセラーゼを作用（酵素分解）、あるいは酢酸を作用（酸加水分解）させ、調製した。その後、各オリゴ糖を 2-アミノピリジンにより蛍光標識し、陰イオン交換クロマトグラフィーにより分離した。このようにして 3~7 糖程度の長さの蛍光標識ラムノガラクツロナンオリゴ糖を得た。調製した UDP-ラムノースとオリゴ糖を基質として、アズキ上胚軸のミクロソーム膜画分を酵素源に用いて、ラムノガラクツロナンオリゴ糖を伸長させるラムノース転移酵素の活性を初めて検出した。この方法を用いてアズキ上胚軸由来の酵素のキャラクタリゼーションを行った。

glycosyltransferase, pectin, plant cell wall

講演番号：2C16p18
講演日時、会場：3 月 25 日 17:24～ C 校舎 16 会場

Cloning, Expression and Characterization of Polygalacturonase from *Arabidopsis thaliana*

○Nabilah Sari Mustafa[1], Ohashi Takao[1], Ishimizu Takeshi[2], Fujiyama Kazuhito[1] ([1]International Center for Biotechnology, Osaka Univ, [2]College of Life Sciences, Ritsumeikan Univ)

Polygalacturonase (PG) is an enzymatic protein that hydrolyze α-1,4 glycosidic linkages in polygalacturonic acid producing D-galacturonic acid. PGs form the most abundant glycohydrolase family in *Arabidopsis thaliana* and they are considered to be involved in fruit ripening, organ abscission and pollen grain development. Previously, we found that PG activity from pea seedling localized in the Golgi apparatus, where cell wall pectin biosynthesis occurs, indicating that some of PGs might be involved in pectin biosynthesis. However, the corresponding genes for Golgi-localized PG proteins have never been identified. The genome database of *Arabidopsis thaliana* predicts 64 putative PG genes, which are then phylogenetically divided into 6 clades (clade A, B, C, D, E and F). Some of the genes from clade A, B, C and D have been partially studied but none of these genes was reported to be involved in pectin biosynthesis. Clades E and F are the candidates from which putative genes of PG involved in pectin biosynthesis can be chosen. Clade F consists of 16 genes, 7 of which are predicted to have trans-membrane regions. In this study, we try to identify and characterize putative genes of Arabidopsis polygalacturonase in clade F (AtPGF). To investigate PG activities, AtPGF proteins were heterologously expressed in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and their activities were examined. AtPGF activity was successfully detected using fluorophore-labeled oligogalacturonic acids as the substrate.

polygalacturonase, *Arabidopsis thaliana*, *Schizosaccharomyces pombe*

講演番号：2C16p19
講演日時、会場：3 月 25 日 17:36～ C 校舎 16 会場

シロアリ腸内に共生する原生生物由来 GH26 β-マンナナーゼの構造学的解析

Characterization and structural analysis of GH26 ß-mannanases from symbiotic protists in the hindgut of termite

○塚越 光[1]、伏信 進矢[1]、小田切 正人[2]、守屋 繁春[3,4]、北本 勝ひこ[1]、有岡 学[1]（[1]東大院・農生科、[2]理研 BMEP、[3]横浜市立大、[4]理研基幹研）
○ Hikaru TSUKAGOSHI[1], SHINYA FUSHINOBU[1], MASATO OTAGIRI[2], SHIGEHARU MORIYA[3,4], KATSUHIKO KITAMOTO[1], MANABU ARIOKA[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]RIKEN BMEP, [3]Yokohama City Univ., [4]RIKEN ASI)

【目的】現在、再生可能なエネルギー資源として非可食性の木質系バイオマスが注目を集めている。その利用に際しては、セルロース・ヘミセルロース・リグニンから成る強固な細胞壁構造を酵素によって分解するバイオ変換プロセスが重要となる。シロアリはリグニン以外の全ての木質系バイオマス成分を資化する能力を持つ生物であり、その高度な木材資化システムの応用が期待される。シロアリの木材分解系においては、シロアリ内在性セルラーゼに加え、腸内に共生する原生生物が木材分解に大きく寄与している。なかでも木材成分中の約 2 割を占めるマンナン・キシラン等のヘミセルロースの分解については、シロアリ自身は内在性ヘミセルラーゼを持たず、腸内の原生生物のみがヘミセルラーゼを有することがわかっている。シロアリ木材資化システムの解明にあたり、原生生物によるヘミセルロース分解機構の解明が重要である。

ヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus* 腸内に共生する原生生物由来の endo-1,4-β-マンナナーゼ RsManC、RsManH はいずれも GH26 に属し約 20%のアミノ酸配列相同性を持つ。演者らは昨年度大会において RsManC、RsManH が異なる基質特異性を示すことを報告した[1)]。RsManC はガラクトマンナン、直鎖マンナンをランダムに分解する一方、RsManH はガラクトマンナンへの基質特異性が低いが、直鎖マンナンを分解して主にマンノビオースを生成する特徴を有する。今回 RsManC、RsManH の機能について構造学的観点からより詳細に解析することを目的とした。

【方法・結果】RsManC および RsMaH のホモロジーモデリングの結果、いずれも過去に *Cellvibrio japonicus* で報告されたマンノビオースを特異的に切り出す exo 型マンナナーゼ CjMan26C と類似した構造を有することが示唆された。CjMan26C のサブサイト-2 近傍のループ構造によって活性クレフトが立体阻害されることが exo 型活性の理由と考えられており、モデリングの結果、マンノビオースを主な分解産物とする RsManH も同様のループ構造を持つことが予想された。現在、RsManH のループ構造へのアミノ酸置換による変異導入を行い、RsManH の分解活性への影響を検討している。また endo 型活性を示す RsManC に対して RsManH のループ構造を置換導入することにより、RsManC の基質分解特性への影響を検討している。

さらに RsManC と RsManH の構造解析を目指し、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* で異種生産を行い、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、疎水性相互作用カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いて酵素を精製し、RsManC の結晶取得に成功した。現在 RsManC の X 線結晶構造解析を行うとともに RsManH の結晶化条件を検討中である。

1)塚越、松井、北本、守屋、有岡、2012 年度日本農芸化学会講演要旨集 3C10p16

hemicellulase, mannanase, termite

講演番号：2A11a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ A 校舎 11 会場

糖類による、酵素の安定化

Using Saccharides for Enzyme Stabilization

○倉知 聞多[1]、清水 雅史[1]、寺田 聡[1]、小林 恭一[2]、大浦 剛[2]、森山 展行[3]、安川 沙織[3]([1]福井大工、[2]福井県食品加工研究所、[3]エルローズ)
○Monta Kurachi[1], Masafumi Shimizu[1], Satoshi Terada[1], Kyoichi Kobayashi[2], Takeshi Ohura[2], Nobuyuki Moriyama[3], Saori Yasukawa[3] ([1]Fukui Univ., [2]Fukui Perfectural Food Processing Research Institute, [3]Elle Rose)

【緒言】酵素は診断の目的で医療機関で広く利用されている。独自の立体構造を持ち、加熱や pH などさまざまな要因により構造が破壊され、活性が損なわれる。これを防ぐために牛血清から得られる BSA を酵素安定化剤として添加することが多いのであるが、BSA には人獣共通感染症のリスクがあり、医療機関では利用が制限される。そこで、BSA に代わる酵素安定化剤として、ラッキョウから得られる多糖フルクタンの利用を考えた。フルクタンは水に易溶で、取り扱いが容易である。すでに二糖のトレハロースに酵素保護効果が知られており、同じ糖類であることから有効性に期待した。

本研究では酵素を酸性やアルカリといった、pH の大きく異なる環境にさらした場合に生じる失活をフルクタンが抑制できるかを検討し、実際に有効な酵素保護剤として構築することを目指す。

【実験操作】

１．酸処理による酵素の失活とフルクタンによる保護効果　酸性の緩衝液(pH 2.0) 4℃で 10 分間処理し、酵素を失活させる。この処理の際にフルクタンを共存させた。中性に戻した後、その残存活性を測定することで評価した。酵素としては西洋ワサビ由来のペロキシダーゼを用い、オルトフェニレンジアミンと過酸化水素を含む基質溶液で反応させ、490 nmの吸光度を測定して評価した。

２．アルカリ処理による酵素の失活とフルクタンによる保護効果　アルカリ性の緩衝液(pH 13.5)を用いて上と同様の方法で評価した。

３．さまざまな糖類との比較　トレハロース、スクロースなど他の糖の保護効果を上と同様に測定し、フルクタンと比較した。

４．フルクタンの分子量と酵素保護効果の関連　調製法により、フルクタンの分子量は大きく異なる。これら分子量の異なるフルクタンを用いて、その保護効果を上と同様に測定し、評価した。

【結果】

１．酸で処理されたペロキシダーゼは無処理に対して 44 %の残存活性であった。フルクタンを共存させた場合、95 %の残存活性が認められた。

２．アルカリ処理では、7 %となり大きく失活したが、フルクタンの共存で 32 %であった。

３．酸処理の際、トレハロース共存では 38 %、フルクトースでは 31 %、イヌリンでは 38 %であり、フルクタンに大きく劣っていた。

４．フルクタンの分子量を変化させると、酵素保護効果が大きく変動した。

enzyme, fructan, devitalization

講演番号：2A11a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ A 校舎 11 会場

代謝産物を基体とする酵素凍結変性抑制剤の開発

Exploration of freeze denaturation inhibitor of enzyme derived from cellular metabolites

○中川 雄市、井上 貴裕、甲元 一也（甲南大 FIRST）
○Yuichi Nakagawa,Takahiro Inoue,Kazuya Koumoto (Konan Univ.)

【研究背景と目的】

酵素は、生物学や医療診断薬、医薬品や化成品の開発、食品製造分野など様々な分野で用いられている。しかし、酵素は弱い分子間相互作用で活性構造を保持しているため、加熱や凍結、pH 変化、塩や有機溶媒の添加などによって容易に変性失活してしまう。凍結乾燥可能な限られた酵素を除けば、その保存は溶液での保存となるが、長期にわたって保存する場合には、経時的な変性も無視できない。そこで、酵素の凍結保存法の開発が望まれているが、酵素は凍結・解凍の過程で凍結変性してしまう。そのため、ジメチルスルホキシドや（ＤＭＳＯ）グリセロール、グリシンベタイン、L−エクトインといった凍害防止剤の添加によって凍結変性を軽減する試みが研究されてきた。凍害防止剤に使用される物質の多くは天然の代謝産物に由来し、そのような分子種が凍害防止剤として有用と考えられるが、どのような構造が最適構造であるのかわかっていない。我々の研究室では、凍害防止剤としても用いられているグリシンベタイン（*N,N,N*-トリメチルグリシネート）を基体とし、化学構造に多様性を持たせた代謝産物アナログライブラリーを合成し、代謝産物の化学構造と酵素活性との相関について調べてきた。本研究では、そのライブラリーを利用して、凍害防御効果が高い代謝産物の化学構造を系統的に検討したので報告する。

【実験結果】

当研究室でこれまで酵素活性実験で詳細な検討がされてきたα-グルコシダーゼを用い、凍結・解凍に伴う残存活性を反応速度比（Activity）から算出した。α−グルコシダーゼ単独では、凍結・解凍を繰り返すと、その活性は急激に低下していき、１２回の凍結・解凍後ではその残存活性は１３％にまで低下した。そこに既存の凍害防止剤として知られるＤＭＳＯ、グリセロール、グリシンベタイン、L-エクトイン、L-ヒドロキシエクトインを 1 mol/L の濃度で添加すると、残存活性は 61%、45%、49%、77%、76%に上昇した。一方で、我々が開発したライブラリーを用いると、凍結変性を抑制する効果の高いアナログ（グリシンベタインのアミノ基に３つの *n*-ブチル基が導入された化合物）が選出され、その化合物を 300 mM の濃度で含む酵素溶液では 100 回凍結融解を繰り返しても 97%以上の活性を保持することが明らかとなった。この化合物の凍害防御効果は既存のものと比較しても遙かに高く、その応用が期待される。講演ではアナログを用いた構造相関に加え、他の酵素系への添加効果についても合わせて報告する。

Freeze denaturation inhibitor, Cellular metabolites, Enzyme

講演番号：2A11a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ A 校舎 11 会場

亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を選択マーカーとした微生物大量培養法の開発

Application of the phosphite dehydrogenase gene as a selectable marker for mass cultivation of microorganisms

○小野 敏志[1]、廣田 隆一[2]、池田 丈[2]、黒田 章夫[2]（[1]広島大工、[2]広島大院先端物質・分子生命）
○Satoshi ONO[1], Ryuichi HIROTA[2], Takeshi IKEDA[2], Akio KURODA[2]（[1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Univ.）

【目的】バイオ燃料や物質生産のための微生物培養は、一般に目的とする微生物の純粋培養を前提としており、コンタミネーションを防ぐために培地や機器の滅菌処理、抗生物質の利用が必要である。しかしながら、培養のスケールが大きくなるほど、投入エネルギーや薬品調達のコストが高くなり、さらに抗生物質を含む廃液は耐性菌などの出現を助長する可能性があるため、その処理は厳重に管理されなければならない。そこで、安価で安全に目的株のみを増殖させることができる選択マーカーを確立することができれば、微生物大量培養における物質生産のコスト削減に貢献できると考えられる。本研究では亜リン酸デヒドロゲナーゼ（PtxD）の選択マーカーとしての有効性を検討した。
【方法・結果】PtxD は亜リン酸（H_3PO_3）を酸化してリン酸（H_3PO_4）に変換する酵素である。リンは生育に必須の元素であるため、亜リン酸を利用できないバクテリアに *ptxD* を導入することで、亜リン酸をリン源とした最少培地において選択的に増殖させることができると考えられる。*Ralstonia* sp. 4506 株および *Klebsiella* sp. 4507 株から取得した亜リン酸トランスポーター遺伝子（*ptxABC*）および *ptxD* をpUC プラスミドにクローニングし、亜リン酸を利用できない大腸菌において異種発現させ、亜リン酸をリン源とした MOPS 合成培地で増殖を調べた。その結果、0.5 mM 亜リン酸存在下で *ptxABCD* 発現大腸菌のみが増殖を示した。さらに、*ptxABCD*/pUC プラスミドは選択物質として亜リン酸を使用した方が、アンピシリンを使用した時よりも安定に大腸菌菌体内に保持されることが明らかになった。以上のことから、*ptxD* が選択マーカーとして機能し、目的遺伝子の高発現に効果的であることが示唆された。

phosphite, phosphite dehydrogenase, mass cultivation

講演番号：2A11a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ A 校舎 11 会場

不溶性セルロース分解に及ぼす Carbohydrate-binding Module family 1 吸着力の影響に関する研究
Research on the influence of adsorption on Carbohydrate-binding Module family 1 to insolubility cellulose degradation

○山崎 大樹、野崎 功一、水野 正浩、荒井 勉、佐藤 伸明、天野 良彦 (信州大・工)
○Taiki YAMAZAKI, Kouichi NOZAKI, Masahiro MIZUNO, Thutomu ARAI, Nobuaki SATO, Yoshihiko AMANO (Shinshu Univ)

【目的】糸状菌由来のセルラーゼに存在する Carbohydrate-binding Module Family 1 (CBM1) は、結晶性セルロースと疎水的相互作用を行う 3 つの芳香族アミノ酸残基を有する。これらのアミノ酸残基は CBM1 の平滑面に存在し、セルロースのグルコースリングと重なり合うように結合する。この結合によって不溶性セルロースとセルラーゼの触媒領域が接触する機会が増加し、その触媒能を向上させることがわかっている。また、CBM1 の 3 つの芳香族アミノ酸残基の組合せによって吸着力が変化するという報告例もある(1)。本研究では、*Trametes hirsuta* 由来 Endo-glucanase 1 (EG1)の CBM1 に変異を導入し、CBM1 の吸着力と不溶性セルロースの分解率の相関性を調査した。
【方法】EG1 の CBM1 が有する芳香族アミノ酸残基の組み合せ (W-YY) を、より疎水性度が高い W-WW と疎水性度が低い Y-YY へ変異させるための PCR プライマーを設計した。これらを用いて、PCR により目的の変異部位を持つDNA断片をそれぞれ増幅した。プラスミドベクターpNAN8142 に目的DNA を挿入し、*Aspergillus oryzae* niaD の形質転換を行い、組換えセルラーゼを発現させた。組換え酵素は澱粉を炭素源とする培地で、形質転換体を 30℃、3 日間培養し、上清を粗酵素液として調製した。酵素の精製は、硫安沈殿、アビセルアフィニティーカラムとゲル濾過カラム(TOYOPEARL HW-50S)によって行い、SDS-PAGE で単一バンドとなるまで精製した。精製した各変異体 EG1 を用いて、可溶性基質として CMC の加水分解活性をそれぞれ測定した。
【結果】EG1(W-YY)および変異体 CBM1 (W-WW、Y-YY) をもつ EG1 の CMC 活性(U/mg)はほとんど違いが見られなかった。この結果から可溶性基質に対して CBM1 吸着力の影響が無いことが示唆された。現在、不溶性基質であるリン酸膨潤アビセル(PASC)及びアビセルに対する加水分解活性の調査を行う。また、アビセルに対する吸着能も調査し、変異体酵素の吸着力と加水分解活性の関連性について明らかにする予定でいる。
(1) S. Takashima *et al.*, *FEBS Lett.*, **581**, 5891-5896, 2007.

carbohydrate-binding Module family 1, Hydrolytic activity of cellulase, adsorption

講演番号：2A11a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ A 校舎 11 会場

新規なセルロース吸着機構をもつ Carbohydrate-binding Module Family 1 に関する研究

Analysis of New Carbohydrate-binding Module Family 1 strongly adsorbed on cellulose

○西島 拓人、野崎 功一、水野 正浩、荒井 勉、佐藤 伸明、天野 良彦（信州大・工）
○Hiroto NISHIJIMA, Kouichi NOZAKI, Masahiro MIZUNO, Thutomu ARAI, Nobuaki SATO, Yoshihiko AMANO (Shinshu Univ.)

【目的】白色腐朽菌 *Irpex lacteus* 由来の Xylanase（*Ipx*Xyn10B）は、結晶性セルロースに対して強力に吸着し、脱離しにくいという特殊な性質をもっている。本酵素は、N 末端に Carbohydrate-binding Module Family 1（CBM1）を有し、その吸着力が酵素の高吸着を引き起こしていることが示唆されている。本研究では、*Ipx*Xyn10B CBM1 と一般的な CBM1 を GFP 融合タンパク質（CBM1-GFP）として調製した。また、それらの一次構造を比較し、特徴的なアミノ酸残基を置換した変異体を作製した。これらのセルロース吸着能力を評価し、セルロース高吸着能に関与する要因を解析した。
【方法】*Irpex lacteus* MC-2 株の cDNA を鋳型として、*Ipx*Xyn10B の CBM1 領域を PCR により増幅した。一方、コントロールとして *Trametes hirsuta* Endo-glucanase 1（EG1）由来の CBM1 領域を PCR により増幅した。これら増幅断片を pRSET/EmGFP に連結後、大腸菌において各 CBM1-GFP の発現系を構築した。EG1 に存在する CBM1 のように、一般的な CBM1 にはセルロース吸着に関与する３つの芳香族アミノ酸残基（W-YY）が存在する。*Ipx*Xyn10B CBM1 には、それらに隣接する部位にさらに付加的な芳香族アミノ酸残基（Tyrosine）が存在し、W-YYY 型の構造を有することが明らかとなった。この Tyrosine 残基を EG1 CBM1 と同じく Serine に変異させた CBM1-GFP（Y52S）を作製し、吸着能力を評価した。セルロースへの吸着能力は、結晶性セルロースに吸着した蛍光強度を測定することで行い、Langmuir 吸着等温式よりその最大吸着量と吸着平衡定数を算出した。
【結果】*Ipx*Xyn10B 由来 CBM1 の最大吸着量と吸着平衡定数は、同じ Family に属する EG1 CBM1 の約 2 倍高い値となった。一方、Y52S 変異体のセルロース吸着能は、EG1 CBM1 と同程度にまで低下した。これら結果により、*Ipx*Xyn10B CBM1 は W-YYY 型の芳香族アミノ酸が関与する新規なセルロース吸着機構をもつことが明らかとなり、付加的な Tyrosine 残基は CBM1 に高吸着能をもたらす原因であることが証明された。本 CBM1 を利用することで、セルロースへの吸着能力を強化したセルラーゼの作出が可能であり、酵素のセルロース分解能力をさらに向上できる可能性があると考えられる。

Carbohydrate-binding Module, Xylanase, Irpex lacteus

講演番号：2A11a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ A 校舎 11 会場

マルチウェルプレートを用いたカイコ蛹での組換えタンパク質生産

Recombinant protein production in silkworm pupae using a multi-well plate

○加藤 竜也[1]、トンプソン ジェームス[2]、朴 龍洙[1,3]([1]静岡大農・応生化、[2]メイヨ医科大学、[3]静岡大・創科技院)
○Tatsuya Kato[1], James Thompson[2], Enoch Y. Park[1,3] ([1]Shizuoka Univ., [2]Mayo clinic college of medicine, [3]Shizuoka Unv.)

【目的】カイコを用いた組換えタンパク質生産法は、カイコが非常に高いタンパク質生産能を有するため、注目されている。本研究室では現在までに、カイコ-*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus（BmNPV）バクミド系を用いて様々なタンパク質を活性を有する状態で発現し、精製を行ってきている。本研究では、カイコさなぎ（蛹）を用いたメディウムスループットな組換えタンパク質発現・精製系を確立するために、様々な外来遺伝子を持つ組換え BmNPV バクミドを用いて、カイコさなぎから組換えタンパク質生産を行った。
【方法】本研究室で保存している蛍光タンパク質遺伝子と融合させたヒト由来遺伝子を持つ組換え BmNPV バクミドを有している大腸菌 16 株を 96 ディープウェルで培養し、96 ウェル BAC プレップユニフィルター（Whatman）を用いて組換え BmNPV バクミド DNA を回収した。回収した組換え BmNPV バクミド DNA の濃度を測定し、アガロースゲル電気泳動で回収した組換え BmNPV バクミド DNA を確認した。また、外来遺伝子の BmNPV バクミドへの挿入は PCR により確認した。16 種類の組換え BmNPV バクミド DNA のうち 10 種類を用いて、カイコさなぎに組換え BmNPV バクミド DNA を注射した。組換えタンパク質の発現は、蛍光タンパク質の蛍光で確認した。
【結果】 96 ディープウェルプレートの 48 ウェルを用いて 16 種類の組換え BmNPV バクミドを有する大腸菌を 1.5 ml の LB 培地で培養後 20 時間培養後、96 ウェル BAC プレップユニフィルターを用いて組換え BmNPV バクミド DNA を回収した。1 ウェルあたり回収できた組換え BmNPV バクミドは平均 50-60 ng/μl であり、これは従来のアルカリ SDS 法の約 10-20 分の 1 の回収率であった。アガロース電気泳動により抽出した BmNPV バクミドを確認したところ、従来のアルカリ SDS 法で抽出した組換え BmNPV バクミド DNA に比べ、ゲノム DNA の混入が抑えられており、その代わりに回収できる DNA 全体量も減少していることが一因であると示唆された。10 種類の組換え BmNPV バクミドをカイコさなぎ 1 頭あたり 3～6 μg(DNA 溶液 40 μl)に注射して、6-7 日間 27℃で飼育した。飼育後、カイコさなぎ内で、またはカイコさなぎの破砕液で GFP 蛍光が観察され、組換えタンパク質を発現していることが確認された。同時に抽出した組換え AcMNPV バクミドを注射したカイコさなぎには、GFP 蛍光が観察されなかった。

silkworm pupae, recombinant protein production, Multi-well plate

講演番号：2A11a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ A 校舎 11 会場

耐塩性シアノバクテリア *Arthrospira platensis* からの効率の良いグリコーゲン回収法の構築
Method construction of an efficient collection of glycogen from *Arthrospira platensis* (halotolerant cyanobacterium)
○中西 昭仁、藍川 晋平、蓮沼 誠久、近藤 昭彦（神戸大院工）
○ AKIHITO NAKANISHI,SHIMPEI AIKAWA,TOMOHISA HASUNUMA,AKIHIKO KONDO (Kobe Univ.)

持続可能な社会を実現する上で、安定的に資源を確保できるシステムの構築は重要である。その一端を担うバイオリファイナリーでは燃料をはじめとして様々な生物からのバイオマス生産が試みられているが、食糧と競合せず耕作地や水資源の限界を克服できるような次世代型バイオマス資源が強く求められている。微細藻は独立栄養的に光、水、二酸化炭素とわずかなミネラル分だけで生育が可能であり、通年で回収ができることや植物に比べ細胞の倍化速度が速いこと、また有用性の高い資源を生産できることなどから注目を集めており、特に近年、微細藻が生産する脂質や糖質をエネルギー資源として有効利用しようと開発が進められている。そこで本研究では、前述条件に加え塩水環境下で生育することができ、また窒素枯渇条件下で有用性の高い糖質であるグリコーゲンを体内に高含蓄できる *Arthrospira platensis* を用い、効率の良いバイオマス生産系の構築を目指した。

効率の良いバイオマスの生産系とは総収量だけではなく回収のしやすさも考慮する必要がある。そこで *A. platensis* のグリコーゲン生産の効率化を目指すために菌体回収量（重量）とグリコーゲン回収量（重量）だけではなく、培地容量当たりのグリコーゲン回収率（重量／容積）を評価する必要があった。従って今回、培地を交換せずに窒素枯渇になるまで培養を続ける場合と、労力を用いてでも低窒素培地に置換する場合とどちらが効率がいいのか評価するため実験を行った。

各々の条件において菌体回収量・グリコーゲン回収量・グリコーゲン回収率の経時変化を比較して、各々に有意な差を確認できた。また、菌体回収量とグリコーゲン回収量で二変量解析を行った結果、低窒素培地に置換した場合とそのまま培地交換をせず窒素枯渇にした場合とで傾向に違いが出ることが明らかになったので今回合わせて報告する。

Glycogen production, Biomass conversion, Halotolerant cyanobacterium

講演番号：2A11a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ A 校舎 11 会場

Aureobasidium pullulans M-2 を用いたβ-glucan の発酵生産とその生産物の生物評価
The Production of ß-glucan using *Aureobasidium pullulans* M-1 and It's Biological Evaluation
○浅田 祐弘[1,2]、守屋 直幸[1]、守屋 祐生子[1]、野村 秀雄[2]、草野 妃里[1]、内山 博文[2]、岡部 満康[2]、朴 龍洙[3] ([1]アウレオ東京事業部、[2]アウレオカズサ工場、[3]静大創科院)
○YUKOH ASADA[1,2], NAOYUKI MORIYA[1], YUKIKO MORIYA[1], HIDEO NOMURA[2], KISATO KUSANO[1], HIROHUMI UCHIYAMA[2], MITSUYASU OKABE[2], Enoch Y Park[3] ([1]Aureo Co. Ltd., [2]Aureo Co. Ltd., [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

【目的】β-(1-3)(1-6) グルカン(以下βグルカンと略称) はキノコや酵母によって生産される多糖で、生体内の自然免疫機構に作用することにより、抗腫瘍効果、アレルギー軽減作用などの生物活性能をもつことで知られている。そのため、その安価な大量生産方法が期待されている。演者らは、βグルカンの生産菌 *Aureobasidium pullulans* M-1（以下 M-1 株と略称） を親株として、紫外線照射による突然変異を行い、βグルカン高生産株 *Aureobasidium pullulans* M-2 株（以下 M-2 株と略称）を獲得し、更には M-2 株の生産性の改善、パイロット発酵槽へのスケールアップ、該発酵生産物の化学構造の推定および生物活性評価を行った。
【方法】M-1 株を、PDA (Difco)スラントで 7 日間培養し、得られた菌体を PBS 10 ml に懸濁した（1000 CFU/ml）。懸濁液を PDA プレートに塗布し、それぞれ 0, 5, 10 分間の UV 照射を行った。25 ℃、4 日間培養後形成したコロニーを 4℃で 3 日間培養を行い、厚膜胞子化させた。この中からコロニーを複数個ピックアップし、フラスコ培養を行い、βグルカン濃度を定量し、産生量の最も高いコロニーを M-2 株と命名。更に Box- Behnken 法による実験計画法を用いてβグルカン生産培地組成の改善を行った。また単位液量当たりの撹拌動力を一定とする方法で 200 L 発酵槽へのスケールアップを行った。得られた培養液中のβグルカンは、培養液をα-アミラーゼ、プロテアーゼ、アミログルコシダーゼで処理をし、さらにエタノール沈殿により精製した。精製したβグルカンの糖の結合位置をメチル化分析法により解析、構成糖の主成分であるグルコースについては、13C NMR および 1HNMR スペクトルを測定した。醗酵生産物であるβグルカンの生物活性評価は RAW264.7 細胞を用いて検討を行った。RAW264.7 細胞をβグルカン量として 100μg/ml のβグルカンで刺激し、細胞より単離した総 RNA を用いて Il-1β mRNA の発現量をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。
【結果】フラスコ培養で、親株に対して 2 倍以上のβグルカン産生量を持つ M-2 株を獲得。3L ジャーを用いた培養でもβグルカンの生産性は 2 倍に向上した。さらに、200 L バイオリアクターへのスケールアップを行ったところ、3L ジャー培養での結果を再現することが出来た。この結果から 10kL 容量の大型発酵槽での大量培養生産も可能であることを明らかにした。培養液中のβグルカンの構成糖分析の結果、本発酵生産物中に含まれるβグルカンは、β-(1-3)(1-6)結合グルカンであった。さらに、得られたβグルカンは、細胞試験で IL-1βの産生能が上昇することを見出した。従って、本菌株が産生するβグルカンは機能性素材として非常に有効な成分であることが判明した。

Aureobasidium pullulans M-2, ß-1,3-1,6-glucan, Scaling up

講演番号：2A11a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ A 校舎 11 会場

Display of Neospora caninum Surface Protein Related Sequence 2 (NcSRS2) on Rous sarcoma Virus Derived gag Protein Virus-like Particles (VLPs)

○Vipin Kumar Deo,Enoch Y Park,Tatsuya Kato,Jinhua Dong,Katsuhiko Yoshimatsu,Takahiro Otsuki (Shizuoka University)

Neosporosis is an infectious disease primarily of cattle and dogs, caused by *Neospora caninum*. Neosporosis is a major cause of abortion in dairy cattle worldwide leading to huge economic loss in dairy industry. One of the ways to assist the cattle industry is to detect the early stages of Neosporosis and take preventive measures such as vaccination or other medicines. Proteins displayed on the surfaces of intracellular pathogens are believed to play critical roles in infection process. The *N. caninum* surface associate antigen 1 (NcSAG1) and NcSAG1 related sequence 2 (NcSRS2) have been identified as major surface antigen proteins of *N. caninum* tachyzoites, and were demonstrated to be immune-dominant and involved in interactions between the tachyzoite and the host cell. Here we report two types of proteins, *Rous sarcoma* virus group-antigen protein (gag) and NcSRS2 were co-expressed in silkworm larvae. gag protein has self folding property to form VLPs of 80-100 nm diameter carrying no genetic material hence cannot pathologically transmit any kind of infection, as a result they are biologically safe to handle. The gag protein formed virus-like particles (VLPs) displaying rNcSRS2 were secreted into hemolymph and purified. The antigenicity of the purified protein was confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using neosporosis positive bovine serum. Amount of purified antigenic VLP-NcSRS2 protein was 0.85 mg and display of rNcSRS2 on the VLPs was confirmed by transmission electron microscope. Approximately 0.16 µg of rNcSRS2 was displayed per 1 µg of VLPs-NcSRS2 was confirmed by ELISA. Twenty microgram of purified VLP-NcSRS2 was used to immunize BALB/C mice in a three-dose regimen without adjuvant. Serum collected showed presence of antibodies specific for VLP-NcSRS2. Further analysis of the serum revealed the subclass of antibodies present in the decreasing order IgG3> IgG1>IgG2a>IgG2b respectively. Here we have shown the display, expression and immunization studies of neosporosis targeting membrane proteins with ease, which are vaccine candidates for neosporosis.

Keywords: display technology; macromolecular nano-structures; neosporosis; virus-like particle; silkworm expression system

Display technology; macromolecular nano-structures, silkworm expression system, virus-like particle

講演番号：2A11a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ A 校舎 11 会場

パルス燃焼式乾燥による生菌乾燥に対する抗酸化剤の保護効果

Efect of antioxydants to preservation of living bacteria by by using pulse combustion spray dryer

○平康 博章、因野 要一、西村 和彦（大阪府立環農水総研）
○Hirofumi HIRAYASU,Youichi INNO,Kazuhiko NISHIMURA (REAF, Osaka Pref.)

【目的】

パルス燃焼式乾燥（以下、パルス乾燥と記す）法は、ガス燃料によるパルスジェットエンジンから発生する衝撃波および熱風で原料液を微細な霧として一瞬で脱水及び乾燥を行う乾燥方式である。原料の熱による変質が少ないことから、微生物を生存させたまま乾燥粉末化する用途への応用が可能である。本研究では、乳酸菌のパルス乾燥についてこれまでの乾燥後生存率 60%という値をさらに向上させるため、乾燥時に菌に添加する保護剤の検討を行い、特に抗酸化剤の効果について検証した。

【方法と結果・考察】

試験には乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* を使用した。MRS 培地で 24 時間培養後、遠心分離で回収した菌体を乾燥保護剤水溶液に懸濁した。乾燥保護剤は 5%スキムミルク、5%トレハロースを基本とし、これに抗酸化剤として 0.01%アスコルビン酸もしくは 0.5%グルタチオンを添加した。菌は懸濁後直ちにハイパルコン社製 HPL-0.5 型パルス乾燥機に導入し、乾燥室温度 65℃、処理速度 500ml/h で乾燥した。乾燥前後での生菌数をコロニーカウント法で測定し、乾燥による生存率の変化を求めた。

結果、抗酸化剤を添加しない場合の乾燥後生存率 27%に比べアスコルビン酸もしくはグルタチオンの添加によりそれぞれ 91%, 90%の乾燥後生存率が得られた。また、これらの抗酸化剤に代えて、0.1%デヒドロアスコルビン酸もしくは 1.0%グリシンを添加した場合、乾燥後生存率はそれぞれ 30%, 55%に留まった。これらの結果から乳酸菌生菌のパルス乾燥にあたっては抗酸化剤の添加が重要であることが示唆された。さらに、乳酸菌以外の細菌として糖化菌 *Bacillus mesenterics* を用いて同様に培養とパルス乾燥試験を行ったところ、抗酸化剤無添加での乾燥後生存率 36%に対し 0.1%アスコルビン酸添加での乾燥後生存率は 85%となり、生存性向上の効果が認められた。

今回の試験では菌の再懸濁から乾燥までの時間が短いため、細胞中への抗酸化剤の取り込みは少なく、よって抗酸化剤による生存性向上効果は乾燥時の熱および酸素による細胞膜の酸化損傷を抑制したことが主な要因であったと推察される。

dry preservation, pulse combustion drying, antioxydant

講演番号：2A11a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ A 校舎 11 会場

超耐熱型好冷性ウリカーゼを用いた尿酸簡易測定法

Simple method of urate determination using hyperthermostable psychrophilic enzyme

○日ビ 隆雄[1]、伊藤 貴文[1]、林 祐太[1]、西矢 芳昭[2]([1]福井県大、[2]摂南大)
○Takao HIBI[1], Takafumi Itoh[1], Yuta Hayashi[1], Yoshiaki Nishiya[2] ([1]Fukui Prefectural Univ., [2]Setsunan Univ.)

尿酸のより簡便な定量法は、高尿酸血症の診断のみでなく、生活習慣病の予防にも役立つことが期待される。また尿酸のその場定量は腫瘍崩壊症候群（TLS）のモニタリングにも役立つことが期待される。昨年度大会において、我々は、尿酸酸化酵素ウリカーゼ（UOD）を分子構造に基づいて改変し室温付近での活性を高めた好冷性変異体、さらに室温付近での活性を維持したまま 80℃近傍まで熱安定性を高めた超耐熱型好冷性変異体酵素が得られたことを報告した。Peroxidase を固定化した ferrocene 練り混みカーボンペースト電極(PO-CPE)は、オキシダーゼの固定化電極として血清中の成分の定量に優れた特性を示すことが報告されている（H. Kinoshita (1991) *Anal. Sci.* **7**(supplement) 879-882)。そこで、今回は PO-CPE 上に UOD を固定化した電極を作製し、尿酸簡易定量に関わるその特性について検討した。

【方法】

UOD 固定化 PO-CPE は、グラファイト粉末、液体パラフィン、ferrocene（重量比 10:5:1)を練り合わせた後、horseradish peroxidase 及び UOD を電極表面に重層し乾燥させた酵素固定層の上から、厚さ 20 μm の透析膜で被覆し作製した。尿酸の定量は、0.2 M ホウ酸緩衝液(pH 8)、0.1 M NaCl 中（セル容量 5 ml）で行い、一定加電圧(E = 0.02 V vs Ag/AgCl)での還元電流を測定して行った。

【結果及び考察】

標準試料として用いた尿酸の濃度を変えた時の還元電流の応答に基づいて検量線を作製した。予備検討において、野性型の酵素を用いた場合、応答が直線性を示す濃度範囲が 0.01-0.1 mg/dL であったのに対して、超耐熱型好冷性変異体 UOD を固定化した電極を用いた場合 0.7-7 mg/dL の範囲で直線性を示した。さらに、野性型 UOD 固定型に比べて、温度変化に対する感度変化は抑えられ、室温環境下の測定におけるバラツキを小さくするのに有利な性質を示すことが判明した。250 μL 容量の微量電解セルを構築し、0～18 mg/dL 尿酸を含む 5 μL の標準試料溶液について尿酸測定を行ったところ、測定範囲において直線的応答を示し、本変異体を用いた酵素電極は実用的な感度を有することが示された。

Psychrophilic enzyme, clinical diagnosis, hyperthermostability

講演番号：2A11a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ A 校舎 11 会場

無細胞タンパク質合成システムを用いたタンパク質合成に対する抗菌ペプチドの阻害効果

Inhibitory effects of antimicrobial peptide on protein synthesis in cell-free protein synthesis system.

○石山 洋平[1]、近藤 裕志[2]、落合 秋人[2]、田中 孝明[2]、谷口 正之[2]([1]新潟大・人材育成セ、[2]新潟大・自然研)
○ Yohei ISHIYAMA[1], Hiroshi KONDO[2], Akihito OCHIAI[2], Takaaki TANAKA[2], Masayuki TANIGUCHI[2] ([1]CFIL, Niigata Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. Technol., Niigata Univ.)

【目的】

天然物由来の抗菌ペプチドは、従来の抗生物質に代わる医薬品や機能性食品素材として注目されており、国内外で活発に研究されている。抗菌ペプチドの代表的な作用機構としては、微生物の細胞膜を標的としている場合（Melittin や Magainin など）および細胞内分子を標的としている場合（Pyrrhocoricin や Buforin-II など）が報告されている。しかし、細胞内分子を標的としている抗菌ペプチドにおいて、その抗菌作用メカニズムの全容は明らかになっていない。そこで本研究では、既存の抗菌ペプチドの細胞内標的分子を明らかにするために、大腸菌の無細胞タンパク質合成を用いたアッセイシステムを開発することを目的とした。

【実験方法】

本研究では、大腸菌の無細胞タンパク質合成システム（Rapid Translation System (RTS)）を用いて、His-tagged Green Fluorescent Protein (GFP)の合成に対するカエル由来ペプチド Buforin-II の添加効果を検討した。すなわち、GFP ベクターまたは mRNA から GFP を合成する系に Buforin-II を添加し、GFP 合成量を測定した。GFP の合成量は、ポリペプチド量として SDS-PAGE におけるバンド強度を、成熟 GFP 量として 509 nm における蛍光強度を測定することによって評価した。また、グアニジン塩酸塩で変性させた Luciferase を DnaK によってフォールディングするプロセスに Buforin-II を添加し、Buforin-II のリフォールディングプロセスに対する影響を評価した。

【結果および考察】

GFP ベクターから GFP を合成する系において、Buforin-II は、濃度依存的に GFP の合成を阻害した。この結果から、本実験系においても Buforin-II がタンパク質合成を阻害することを確認できた。また、mRNA から GFP を合成する系においても、ポリペプチドレベルで GFP の合成を阻害したことから、Buforin-II は翻訳プロセスを阻害したことがわかった。さらに、変性 Luciferase を用いて Buforin-II のリフォールディングプロセスに対する影響を評価した結果、DnaK シャペロンによる変性 Luciferase のリフォールディングを濃度依存的に阻害することを確認した。以上の結果より、Buforin-II はタンパク質合成の複数のプロセスを阻害することが示唆された。現在、発現する mRNA 量を定量的 RT-PCR を用いて測定することによって、転写プロセスに対する Buforin-II の作用について検討している。

antimicrobial peptide, protein synthesis, Buforin II

講演番号：2A11a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ A 校舎 11 会場

抗菌活性能を有する D-アミノ酸含有ジペプチドの構造と活性の相関

Relationship between antimicrobiol activity and structure in D-Trp-L-Phe ester derivatives

○磯田 佳孝[1]、森 信寛[2]、有馬 二朗[2] ([1]鳥取大院農、[2]鳥取大農)
○Yoshitaka ISODA[1], Nobuhiro MORI[2], Jiro ARIMA[2] ([1]Tottori Univ., [2]Tottori Univ.)

【目的】近年、D-アミノ酸に関する研究の進展と共に、優れた機能を有するD-アミノ酸含有ペプチド類が発見されつつある。しかしD-アミノ酸含有ペプチド類に関する研究は歴史が浅く、L-アミノ酸からなるペプチド類と比較すると機能が未同定のペプチドが多数存在していると考えられる。従って、今後は様々な当該ペプチド類を対象とした生理機能に関する研究が進められることが予測される。MEROPSデータベース上のファミリーS12に属するアミノペプチダーゼ（D-アミノペプチダーゼ）は、D-アミノ酸誘導体に対し加水分解及びアミノリシスを触媒し、様々なD-アミノ酸含有ペプチド類の合成が可能であった。また当酵素はD-アミノ酸誘導体をアシル供与体、L-アミノ酸誘導体をアシル受容体として優先的に利用し、D-,L-配列を有するペプチドを高収率に合成する。我々はこれまでに、D-アミノペプチダーゼで合成されるD-Trp-L-Phe 及びD-Phe-L-Trpのベンジルエステル誘導体が、グラム陽性細菌に対し中程度の抗菌活性を示すことを見出した。本発表では、D-Trp-L-Phe誘導体を対象に構造と抗菌活性能の相関関係について報告する。
【方法】L-Phe のエステル誘導体は、L-Phe とアルコールを混合し酸触媒、加熱によって合成した。D-Trp-L-Phe を核とするジペプチド誘導体は、D-Trp-OMe と合成した L-Phe 誘導体を基質とし、D-アミノペプチダーゼと 2 時間反応することで合成した。生成ペプチドは酢酸エチルで抽出後、LC/MS で確認した。抗菌活性試験には、緑濃菌、枯草菌および黄色ブドウ球菌を用い、96 穴培養プレートを用いて各化合物の存在下で各菌を一晩培養し、培養後の濁度測定により生育阻害活性を評価した。
【結果】今回新たに、C 末側の構造が直鎖で炭素鎖が 6 および 8 のものやベンジルエステルから炭素鎖が 1～2 個長くなった D-Trp-L-Phe 誘導体を合成した。それぞれのペプチドに対して抗菌活性試験を行ったところ、各々のペプチドで抗菌活性強度や、抗菌活性を示す細菌に違いが見られた。特に、D-Trp-L-Phe-OBzl から、アルコールの炭素鎖が 1 及び 2 個伸長したものは、D-Trp-L-Phe-OBzl では抗菌活性を示さなかった緑膿菌および枯草菌に対して抗菌活性を示す結果となった。それぞれの細菌に対する MIC の概算値は、D-Trp-L-Phe-2phenylethylester は緑膿菌に対して＜50μg/ml、枯草菌に対して＜100μg/ml、は黄色ブドウ球菌に対して＜100μg/ml であった。これらの MIC 値は概算値であるため、現在は、正確な MIC 値の算出及び各化合物の抗菌活性強度を比較するため、生成ペプチドの単離を行っている。

D-amino acid, antimicrobiol activity, dipeptide

講演番号：2A11a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ A 校舎 11 会場

D-,L-配列を有するジペプチド類の酵素合成と抗腫瘍活性ジペプチドの探索
One-pot enzymatic synthesis of Diverse DL-configuration peptides for screening of anti-tumor agents
○田村 丹、岩崎 崇、森 信寛、有馬 二朗（鳥取大農）
○Akira TAMURA,Takashi IWASAKI,Nobuhiro MORI,Jiro ARIMA (Tottori Univ.)

【目的】D-アミノ酸を含有するペプチドには、特異な生理活性を示す例があり、多様な機能や生理活性が期待できる素材であると考えられている。しかしそのようなペプチドは、自然界に殆ど存在していないため、その構造と活性との相関は未だ網羅されていない。我々は加水分解と拮抗してアミノリシス反応を触媒する酵素、*Streptomyces sp.*82F2 由来のファミリーS12 ペプチターゼ(D-アミノペプチターゼ)を取得した。当酵素は D-アミノ酸誘導体をアシル供与体として、L-アミノ酸誘導体をアシル受容体として優先的に利用する。従って、本酵素反応により D-,L-配列のペプチドが立体選択的に合成されることから、多くの機能性ペプチドの探索のツールとして用いることが可能である。本演題では、多様な基質の組み合わせでの D-アミノペプチダーゼ反応液から見出された、抗腫瘍活性を有するペプチドについて報告する。
【方法】96-well プレートを用い、D-アミノ酸エステル(アシル供与体)と L-アミノ酸エステル(アシル受容体) の様々な組み合わせで、D-アミノペプチダーゼと反応させた酵素反応区と、未反応区を調整した。抗腫瘍活性の評価には、T-リンパ性白血病細胞(Jurkat)をはじめとするヒト由来腫瘍細胞 5 種と、正常細胞であるマウス繊維芽細胞(NIH/3T3)を用い、評価法として WST 法を採用した。それぞれの基質の組み合わせによる酵素反応区と未反応区の間で細胞毒性を比較し、酵素反応区のみ活性がみられた組み合わせを選抜した。また、抗腫瘍活性が見られた酵素反応液については、酵素反応生成物を質量分析(LC/MS)で確認した。
【結果】様々な基質の組み合わせで D-アミノペプチダーゼと反応し、440 種類の酵素反応液を作成した。これらの中から、Jurkat に対し細胞毒性を示し NIH/3T3 に対しては細胞毒性を示さない反応液を選抜した結果、D-Phe-OMe と Gly-OBzl との組み合わせが選抜された。なお、この組み合わせの未反応区からは、Jurkat に対する細胞毒性は確認されなかった。酵素反応液を LC/MS で分析した結果、D-Phe-Gly-OBzl の合成が確認された。D-アミノペプチダーゼ反応後に Gly の誘導体を特異的に加水分解する酵素である枯草菌由来の Dpp を添加して未反応の基質を加水分解し、SepPak(ODS)に供することで D-Phe-Gly-OBz の純品が得られた。様々な腫瘍細胞を用いて細胞毒性評価を行った結果、D-Phe-Gly-ベンジルエステルは、Jurkat に対し特異的に高い活性(MIC:4.9μg/mL)を示し、その他の細胞については、殆ど毒性を示さなかった（MIC:＞156.1μg/mL)。

anti-tumor activity, dipeptide, aminopeptidase

講演番号：2A11a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ A 校舎 11 会場

LPS 刺激細胞を用いた米由来抗菌 CL ペプチドの抗炎症作用の解析
Modulation of inflammation in LPS-stimulated mouse macrophage and human cells by antimicrobial CL peptide from rice protein

○谷口 正之[1]、橋本 健司[1]、田嶋 幸司[1]、杉山 圭一[2]、加藤 哲男[3]、落合 秋人[1]、田中 孝明[1]([1]新潟大自然研、[2]国立衛生研変異、[3]東歯大化学)
○Masayuki Taniguchi[1], Kenji Hashimoto[1], Koji Tajima[1], kei-ichi Sugiyama[2], Tetsuo Kato[3], Akihito Ochiai[1], Takaaki Tanaka[1] ([1]Niigata Univ., [2]Nat. Inst. Health Sci., [3]TDC)

【目的】

これまでに米タンパク質由来の抗菌ペプチドである CL(14-25)が，歯周病菌に対する抗菌作用だけでなく,プロテアーゼ阻害作用，エンドトキシン結合活性などを有していることを報告してきた。本研究では，CL(14-25)の生体防御に関する多機能性を明らかにすることを目的として，グラム陰性菌が有するリポ多糖（LPS）またはその構成成分である Lipid A によって誘導される一酸化窒素(NO)産生および炎症性サイトカイン（IL-6）産生に対する CL(14-25)の抑制作用について検討した。また，LPS と CL(14-25)の結合と親和性に関して検討した。

【実験方法】

本研究では，*Escherichia coli* の LPS と Lipid A を主に使用した。抗菌ペプチドとして，米の Cyanate lyase の部分配列である 12 残基のアミノ酸からなる CL(14-25)を用いた。マウスマクロファージ RAW264 を培養した後，CL(14-25)を LPS あるいは Lipid A と同時に添加し,一定時間培養した後に産生する NO を Griess reagent を用いて測定した。また，コンフルエントな状態まで培養したヒト大動脈内皮細胞(HAEC)に，CL(14-25)を LPS または Lipid A と同時に添加し,一定時間培養した後に産生する IL-6 を，ELISA キットを用いて定量した。LPS と CL(14-25)の結合は，Limulus test を用いて検討した。さらに，LPS と CL(14-25)の親和性は，CL(14-25)をセンサーチップに固定化し，Biacore を用いて測定した。

【結果と考察】

CL(14-25)は,RAW264 細胞と HAEC に対して 1 mM の濃度においても細胞毒性を示さなかった。RAW264 細胞を 100 ng/mL の LPS または Lipid A で刺激した場合に NO の産生は著しく増加したが,CL(14-25)を添加することによって，NO の産生を抑制できた。また，HAEC を 100 ng/mL の LPS または Lipid A で刺激した場合に IL-6 産生量は大幅に増加したが，100 μM 以上の CL(14-25)を添加することによって，IL-6 の産生を抑制できた。Limulus test を用いて LPS と CL(14-25)の結合を検討した結果，LPS の活性を 50%阻害する有効濃度は約 200 μM であった。したがって，CL(14-25)は LPS に直接結合することによって，抗炎症作用を発揮していると考えられる。現在，Biacore を用いて LPS と CL(14-25)の親和性について検討している。

antimicrobial peptide, anti-inflammation, lipopolysaccharide

講演番号：2A11p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ A 校舎 11 会場

ファージディスプレイ法を用いた新規リグニン親和性ペプチドの探索

Screening of molecular targeting peptides for lignin in phage displayed peptide library

○山口 亜佐子[1,2]、渡辺 隆司[1,2] ([1]京大生存研、[2]JST・CREST)
○Asako YAMAGUCHI[1,2], Takashi WATANABE[1,2] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]CREST, JST)

【目的】植物細胞壁は、セルロース・ヘミセルロースという多糖類と、リグニンという芳香族系高分子から構成されている。リグニンは、セルロースに次いで地球上で最も豊富に存在する天然高分子である。石油からバイオマスに資源を置き変えるためには、リグニンから芳香族化学品を生産するなどの高付加価値利用も必須となり、それによってバイオマスを基盤とした化学産業が大きく前進すると期待される。バイオマスの総合的な利用のために、リグニンを多糖から高選択的かつ高効率的に分離・分解するプロセスが重要となるが、糖の発酵生産でこれを達成することは容易ではない。現在、リグニン転換技術の開発を目指して、新たなリグニン高親和性触媒の研究が行われている。リグニン親和性分子が創出されれば、リグニンへの結合を制御した触媒の開発につながると考えられる。

そこで、本研究では、ファージペプチドライブラリーを用いた分子進化工学的手法により、リグニンに対して親和性を持つ新規分子の探索を試みた。リグニンのような不溶性物質に対するバイオパンニングの例はこれまでに少なく、実験方法も確立されていない。そのため、まずスクリーニング方法の検討を行った。

【方法および結果】７～１２個アミノ酸残基のランダムペプチドをファージ表層に提示させたライブラリーを用いて、ユーカリまたはスギのリグニンに対してバイオパンニングを行った。結合バッファー、pH の条件、未結合ファージの洗浄の条件等について、検討した。バイオパンニングを数ラウンド行った結果、ファージの input 量に対する output 量の割合によりファージが濃縮されたことを確認した。各ラウンドの溶出液についてファージ ELISA を行った結果、リグニンに対する親和性がラウンドごとに上昇していた。さらに、各ラウンドよりランダムに選択したファージクローンを単離し、ファージ ELISA によって親和性を調べた。その結果、いくつかのクローンがリグニン親和性を示した。またシングルクローンのアミノ酸配列を解析した結果、いくつかのコンセンサスな配列が見出された。これらのことから、ユーカリまたはスギのリグニンに親和性を持つペプチドが有意に選択されたものと考えられる。現在、選択した配列のペプチド合成を試み、親和性解析などの検討を行っている。

lignin, peptide, phage display

講演番号：2A11p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ A 校舎 11 会場

c-myc に作用し構造変化する Pin1-FRET 法の構築

Visualization of Pin1 binding with c-myc peptide by fluorescence resonance energy transfer-based indicators

○岡部 恵美子、日高 將文、内田 隆史（東北大農）
○Emiko OKABE,Masafumi HIDAKA,Takafumi UCHIDA (Tohoku Univ.)

＜背景・目的＞

タンパク質のリン酸化は、多くの酵素・受容体に構造変化をもたらし、それらを活性化・非活性化させることで細胞機能を調節している。Pin1（ペプチジルプロリルイソメラーゼ）は、タンパク質のリン酸化セリン-プロリン部位を認識し、そのペプチド結合の異性化を触媒することでリン酸化タンパク質の速やかな構造変化を促している。Pin1 は転写因子（p53, c-Myc など）、微小管重合因子（タウ）、酵素（キナーゼ）など様々なタンパク質に結合し、リン酸化タンパク質の機能や安定性を制御することで癌やアルツハイマー病などの疾患に深く関連している。

Pin1 の構造は WW ドメインと触媒ドメインから成り、水溶液中ではこれら二つのドメインは弱い相互作用しか示さないが、Pin1 の基質となり得るペプチドの存在下では強い相互作用を形成する。すなわち、Pin1 は標的分子との結合によって構造が大きく変化することが示唆されている。Pin1 の構造変化をリアルタイムで解析できれば、Pin1 が関係する疾患のメカニズムの解明に役立つ。我々はこの Pin1 の構造変化を FRET で解析するシステムの構築を目指し、Pin1 とリン酸化タンパク質の複合体形成、構造変化の解明を試みた。

＜方法・結果＞

Pin1 の N 末端および C 末端部位に、それぞれ CFP、YFP を付加したセンサータンパク質を作成し、Fluorescence resonance energy transfer (FRET)法による Pin1 の構造変化の可視化を試みた。このセンサータンパク質に対し 435nm の光を照射すると、WW ドメインと触媒ドメインが離れている場合は CFP の励起光である 475nm、ドメイン同士が近接する場合は FRET により 527nm の光が検出される。リン酸化および非リン酸化 c-myc ペプチド存在下で FRET シグナルの変化を測定した結果、リン酸化ペプチド特異的に FRET 比が変化した。さらに、Pin1 と CFP・YFP の間に様々な配列、長さのリンカーを挿入すると FRET 効率も変化した。この結果は、本 FRET 法を利用することで Pin1 の構造変化を可視化できることを示している。現在、Pin1 を標的とした薬剤候補化合物スクリーニングへの応用などを視野に入れたセンサータンパク質の開発を進めている。

Pin1, FRET, phosphorylation

講演番号：2A11p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ A 校舎 11 会場

麹菌 hydrophobin RolA と cutinase CutL1 間の相互作用解析
Analysis of the interaction between *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA and cutinase CutL1
○對馬 裕誠[1]、村垣 公英[1]、上原 健二[1]、高橋 徹[2,3]、山形 洋平[4]、阿部 敬悦[1,2]([1]東北大院・生物産業創成、[2]東北大・未来研、[3]酒総研・基盤、[4]東京農工大院農・応生化)
○Yusei TSUSHIMA[1], Kimihide MURAGAKI[1], Kenji UEHARA[1], Toru TAKAHASHI[2,3], Youhei YAMAGATA[4], Keietsu ABE[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]NICHe., Tohoku Univ., [3]NRIB., [4]Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)

【背景・目的】hydrophobin はすべての糸状菌が保有する両親媒性蛋白質であり、菌糸や分生子表面に局在している。 *Aspergillus oryzae* を生分解性ポリエステルである PBSA を唯一の炭素源として培養すると，hydrophobin RolA と PBSA 分解酵素である cutinase CutL1 を共発現する。PBSA 表面に吸着した RolA は PBSA 表面上に CutL1 を濃縮し、PBSA 分解を促進する。このような RolA の固液界面への酵素濃縮機能は hydrophobin の新たな機能である(1)。現在まで、RolA と CutL1 は抗原抗体反応並みの強さで相互作用し、静電的相互作用が関与していることが明らかとなった。RolA 側では His32、Lys34 が、CutL1 側では Glu31、Asp142、Asp171 が相互作用に関与するアミノ酸残基として同定された(2)。これら同定されたアミノ酸残基がどれほど静電的相互作用に関与しているか、また静電的相互作用に関与するほかのアミノ酸残基が存在するかを、変異体を用いて解析した。
【方法と結果】RolA および CutL1 の部位特異的変異導入体を作製し、プルダウンアッセイ及び分子間相互作用解析装置 QCM を用いて相互作用解析を行った。プルダウンアッセイの結果、 250mM NaCl 存在下で RolA に対する CutL1 の結合量が顕著に減少した。さらに QCM 解析の結果 250mM NaCl 存在下で RolA に対する CutL1 の結合能が減少し Kd 値が 200nM 程度となった。また、RolA-H32S/K34S 変異体を用いた解析では、RolA WT と比較して CutL1 WT に対する Kd 値が 46nM に増加したが (RolA WT は 6.2nM)、200nM (NaCl 添加時) までは増加していない。一方 CutL1-E31S/D142S/D171S 変異体を用いた解析では、CutL1 WT と比較して RolA WT に対する Kd 値は 80nM に増加していたが、こちらも 200nM までは増加していなかった。さらに、RolA-H32S/K34S と CutL1-E31S/D142S/D171S の相互作用解析では 200nM 程度の Kd 値が得られた。これらの事から RolA の正電荷アミノ酸残基である His32, Lys34 と CutL1 の負電荷アミノ酸残基である Glu31, Asp142, Asp171 が RolA-CutL1 間の静電的相互作用を形成している主要なアミノ酸残基であることが明らかとなった。また、これらアミノ酸残基以外にも、RolA には CutL1 と相互作用する正電荷アミノ酸残基、 CutL1 には RolA と相互作用する負電荷アミノ酸残基が残存していると考えられる。現在、正または負電荷アミノ酸残基修飾剤を用いて、化学修飾 RolA-H32S/K34S および化学修飾 CutL1-E31S/D142S/D171S と、RolA 正電荷アミノ酸三重変異体を作製し、相互作用解析を行っている。
(1)Takahashi *et al*., *Mol Microbiol*. 57: 1780-1798 (2005)
(2)村垣ら，日本農芸化学会 2011 年度大会要旨集 p164

biodegradable plastic, *Aspergillus oryzae*, quartz crystal microbalance (QCM)

講演番号：2A11p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ A 校舎 11 会場

糸状菌由来の免疫回避機能性素材を用いた新規医療用ナノ粒子の開発 - ナノ粒子の性質について -
Development of imaging nano-particles coated with immune-response free fungal materials - about the properties of nano-particles-

○佐藤 大貴[1]、松村 香菜[2]、高橋 慎太郎[3]、高橋 徹[4]、村垣 公英[1]、石井 恵子[2]、川上 和義[2]、冨樫 貴成[5]、高見 誠一[6]、阿尻 雅文[6]、福本 学[6]、阿部 敬悦[1,7] ([1]東北大院農、[2]東北大院医、[3]東北大・加齢研、[4]酒類研、[5]山形大理、[6]東北大・多元研、[7]東北大・未来研)
○Daiki SATOU[1], Kana MATUMURA[2], Shintarou TKAHASHI[3], Toru TAKAHASHI[4], Kimihide MURAGAKI[1], Keiko ISHII[2], Kazuyoshi KAWAKAMI[2], Takanari TOGASHI[5], Seiichi TAKAMI[6], Masahumi AJIRI[6], Manabu FUKUMOTO[6], Keietu ABE[1,7] ([1]Grad Sch Agric Sci Tohoku Univ., [2]Grad Sch Med Tohoku Univ., [3]IDAC Tohoku Univ., [4]NRIB., [5]Yamagata Univ., [6]IMRAM Tohoku Univ., [7]NICHe Tohoku Univ)

【目的】医療用ナノ粒子は、蛍光イメージング、MRI、CT、中性子捕捉療法、磁気温熱療法分野、薬物送達系 (DDS) としての利用が期待されている。MRI や CT では固体ナノ粒子がイメージング試薬として利用できるが、静脈内に投与したナノ粒子の殆どが肝臓や脾臓などの細網内皮系に捕捉され標的組織へ送達できないことが課題である。一方、我々は産業糸状菌である麹菌の界面活性蛋白質 hydrophobin(-RolA) がポリエステル表面に結合してポリエステラーゼをリクルートして分解を促進する研究、および RolA の材料表面への吸着に関する研究を行ってきた(1)。その後、ヒト感染性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* において胞子表層に存在する hydrophobin がヒトの免疫応答回避 (ステルス) 能を有することが示された(2)。そこで我々は、生体内で安定な金属酸化物ナノ粒子に、糸状菌の新規ステルス因子である界面活性蛋白質 RolA を被覆し、ステルス機能と水溶性を賦与した新規のステルスナノ粒子の開発を行った。本研究では、RolA 被覆酸化鉄粒子の分散性指標となるゼータ電位を測定した。また、ステルス機能を樹状細胞およびマクロファージで評価したので報告する。
【方法】RolA は組み換え体として発現し、従来法に従って硫安沈殿、カラムクロマトグラフィーにより精製した(1)。更に RolA をポリミキシン B 固定化カラムで処理し精製過程で混入する LPS を除去した。酸化鉄 (Fe_3O_4) ナノ粒子 (平均粒径 200 nm) は高温熱水反応により合成し(3)、次いで緩衝液中でLPS-free RolA にて被覆した。LPS-free RolA 被覆酸化鉄ナノ粒子について、C57BL/6 マウスより調製した骨髄樹状細胞でサイトカイン産生能を、またマクロファージ RAW264.7 細胞に LPS-free RolA 被覆酸化鉄ナノ粒子を与えて貪食能を観察した。
【結果】飽和被覆試験の結果、酸化鉄ナノ粒子 5.8×10^3 mm^2/ 1 mg は、13 μg の LPS-free RoA で完全に被覆された。ステルス性試験の結果、 LPS-free RolA 担体および LPS-free RolA 被覆酸化鉄ナノ粒子は、樹状細胞でサイトカイン産生を誘起せず、さらにマクロファージの貪食回避が可能であった。以上の結果、LPS-free RolA 被覆酸化鉄ナノ粒子は、医療用ナノ粒子に必要なステルス能を有すると考えられる。現在、マウスを用いた *in vivo* 試験に向けて、生体内における分散性を調べるため、各 pH における RolA 被覆酸化鉄ナノ粒子のゼータ電位を測定中である。

(1) Takahashi T. et al. *Mol Microbiol* 57:1780,2005
(2) Aimanianda C. et al. *Nature* 460:1117,2009
(3) Togashi T. et al. *Dalton Trans* 40:1073,2011

hydrophobin, immuno evasion, nano-particles

講演番号：2A11p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ A 校舎 11 会場

カブトムシディフェンシン改変ペプチドとリン脂質膜の表面プラズモン共鳴による相互作用解析
Surface plasmon resonance analysis of interaction between beetle defensin-derived paptide and phospholipid membrane

○石橋 純[1]、朝岡 愛[1]、岩崎 崇[1]、鈴木 秀明[2]、永野 富郎[2]、中村 允[3]、宮澤 光博[1]、山川 稔[1]（[1]農生資研、[2]JITSUBO 株式会社、[3]和歌山県工技セ）
○Jun ISHIBASHI[1], Ai Asaoka[1], Takashi Iwasaki[1], Hideaki Suzuki[2], Tomio Nagano[2], Makoto Nakamura[3], Mitsuhiro Miyazawa[1], Minoru Yamakawa[1] ([1]National Institute of Agrobiological Sciences, [2]JITSUBO Co. Ltd., [3]Industrial Technology Center of Wakayama)

抗微生物タンパク質の多くは正電荷に富んでおり、負電荷を帯びた細胞膜を特異的に攻撃し、膜傷害を与えることにより機能すると考えられている。カブトムシの抗微生物タンパク質であるディフェンシンを改変して得られたペプチドは、負電荷を帯びた細胞膜を攻撃することが明らかになっているが、リン脂質膜とどのような相互作用を示し、どのように膜傷害活性を示すかは不明であった。このため、リン脂質二重膜との相互作用を表面プラズモン共鳴スペクトルにより解析した。

酸性リン脂質であるフォスファチジルグリセロール（PG）および両性リン脂質であるフォスファチジルコリン（PC）の脂質二重膜を Biacore1000 の L1 センサーチップ上に形成させた。PBS（10 mM リン酸ナトリウム、130mM NaCl, pH 7.0）を移動相としてこのチップ上にカブトムシディフェンシン改変ペプチドを添加したところ、PG については結合が見られたものの、PC についてはほとんど見られなかった。また、移動相の塩濃度の上昇および pH の変化により、PG に対する結合が減少した。これらの結果より、カブトムシディフェンシン改変ペプチドは静電的相互作用により酸性リン脂質に結合していることが確認された。

カブトムシディフェンシン改変ペプチドを PG 固定化チップ上に注入し、解離を長時間行った後においては、センサーグラムのレスポンスは注入開始時を下回った。この結果から、このペプチドがセンサーチップ上からリン脂質を剥がし取っていることが示唆された。膜孔を形成することにより抗菌作用を示すと考えられているディフェンシン、モリシン、セクロピン B などの抗菌タンパク質では、注入時より下へのレスポンス低下は見られなかった。この結果から、カブトムシディフェンシン改変ペプチドはカーペットモデルで説明される機構によりリン脂質膜を剥がしさることにより作用を示すことが示唆された。

本研究は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」により行われた。

antimicrobial peptide, surface plasmon resonance, phospholipid

講演番号：2A11p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ A 校舎 11 会場

ハロ酸脱ハロゲン化酵素(L-DEX YL)の基質認識部位の同定

Indentification of the substrate recognition site of haloacid dehalogenase from *Pseudomonas* sp. YL.

○出来 弘幸、山根 朋也、中村 卓（長浜バイオ大バイオサイエンス）
○Hiroyuki DEKI,Tomoya YAMANE,Takashi NAKAMURA (Nagahama Institute of Bio-science and Technology.)

[目的]

環境中において有害な有機ハロゲン化合物の分解を触媒する代表的な酵素としてハロ酸デハロゲナーゼが研究されている。特に *Pseudomonas* sp. YL 株由来 L-2-ハロ酸デハロゲナーゼ（L-DEX YL）は、結晶構造や代表的な基質である L-2-クロロプロピオン酸（L-CPA）に対する反応過程の研究が進められている。本研究では、L-DEX YL が D-2-クロロプロピオン酸（D-CPA）に対して活性を持たないことに注目し、L-DEX YL の基質認識部位に部位特異的変異を加え D-CPA を分解することが可能か確認を行い L 体の基質認識に重要なアミノ酸残基を同定することを目的とした。

[方法]

はじめに、ドッキングシミュレーション（MOE, 2011.10. ASE Dock）を用いて L-DEX YL - L-CPA 複合体を作成し、L-CPA の部分を D-CPA に置換した。その結果、L-DEX YL の Y12 と N119 で D-CPA が接触していることが確認された。そこで東洋紡の KOD-Plus-Mutagenesis Kit を用いた部位特異的変異導入法により Y12A、N119A、Y12A と N119A の Double Mutant（DM）の三種類の L-DEX YL 変異体遺伝子を作製し、大腸菌 JM109 で IPTG 発現誘導法により大量発現させ、疎水性クロマトグラフィを用いて Y12A、N119A、DM の変異体酵素を精製した。精製後、HPLC、チオシアン酸水銀を用いた塩化物イオンの比色定量法あるいは pH 指示薬[ブロモチモールブルー(BTB)]を用いて L-CPA、D-CPA に対する活性を確認した。

[結果]

超音波破砕後の菌体抽出液を用いた酵素活性測定では、Y12A と N119A の L-DEX YL 変異体による D-CPA の L-乳酸への変換率が野生型 L-DEX よりもわずかに上昇することが確認されたが、DM ではほとんど活性が見られなかった。同様にして L-CPA の D-乳酸への変換率を確認したところ 3 種類の変異体酵素では野生型よりも活性が低下することが確認された。

次に、精製した Y12A、N119A の変異体酵素の BTB を用いた酵素活性測定では D-CPA の L-乳酸への変換率がやはり野生型 L-DEX よりもわずかに上昇することが確認された。今後、HPLC を用いて酵素反応によって L-乳酸または D-乳酸が生成されているかを確認し本学会で発表する予定である。

Haloacid Dehalogenase, Site-Directed Mutagenesis, Substrate recognition site

講演番号：2A11p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ A 校舎 11 会場

error prone PCR 法によるフルオロ酢酸分解能を有するハロ酸デハロゲナーゼの創製
Construction of haloacid dehalogenase degrading fluoroacetate by error prone PCR
○中村 卓、阿衣尼沙 沙它尔、山口 明伸（長浜バイオ大バイオサイエンス）
○ Takashi NAKAMURA,Satter AINISHA,Akinobu YAMAGUCHI (Nagahama Institute of Bio-science and Technology)

[目的]
L-2-ハロ酸デハロゲナーゼ（L-DEX）は、L-体の 2-ハロ酸を加水分解反応により脱ハロゲン化し、D-体の 2-ヒドロキシ酸を生成する酵素である。ただし、炭素－フッ素（C-F）結合は炭素に対する最も強い共有結合であり、L-DEX はこの C-F 結合を切断できないと考えられている。一方、C-F 結合切断酵素としては、モノフルオロ酢酸（MFA）を加水分解する MFA デハロゲナーゼ（MFADEX）が知られており、MFADEX は C-F 結合をもつ MFA を効率よく分解して対応するヒドロキシ酸（グリコール酸）を生成するが、フッ素以外のハロゲン原子をもつ酢酸（クロロ酢酸やブロモ酢酸）に対する活性は低い。本研究の目的は、進化工学的手法により C-F 結合切断能をもつ L-DEX を創製し、その構造と機能を解析することにより、C-F 結合切断の分子メカニズムを明らかにすることである。機能獲得型変異酵素の反応機構を解明するアプローチはこれまでになく、C-F 結合切断に本質的に関与するアミノ酸を明確に示すことが期待できる。
[方法]
L-DEX としては、*Pseudomonas* sp. YL 株由来の L-DEX YL を使用した。まず、C-F 結合を切断する L-DEX YL 変異酵素を効率よくスクリーニングするために MFA の毒性を利用した。様々な MFA 濃度を含む LB 培地上で、野生型 L-DEX YL を発現するプラスミドで形質転換した大腸菌が生育できない濃度を探索した。次に、L-DEX YL 変異遺伝子ライブラリーを error-prone PCR 法によって作製し、得られた DNA ライブラリーで大腸菌を形質転換し、先に設定した MFA 濃度の寒天培地でコロニーが形成されるか調べた。
[結果]
まず、野生型 L-DEX YL を発現するプラスミドで形質転換した大腸菌が生育できない MFA 濃度を探索したところ、コロニーの形成を完全に阻害はできなかったものの、50 mM の MFA を含む寒天培地で、MFA を含まない寒天培地に比べてコロニー形成速度が大きく減少した。次に、L-DEX YL 変異体遺伝子の DNA ライブラリー（4.1×10^5）で大腸菌を形質転換し、それを 50 mM MFA 寒天培地にプレーティングしたところ、生育速度の速いと思われるコロニーを 9 種類見出した。現在、そのコロニーが本当に L-DEX YL 変異酵素の作用で MFA を分解できるようになった影響で生育が早くなったのか、プラスミドを抽出して再度形質転換実験を行っているところである。

haloacid dehalogenase from *Pseudomonas* sp. YL, error prone PCR, fluoroacetate dehalogenase

講演番号：2A11p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ A 校舎 11 会場

タンパク質を提示した磁性粒子の簡便な作製法の開発と応用

Novel method for the production of protein-displaying magnetic beads

○椎原 史裕[1]、池田 丈[2]、吾郷 友哉[2]、廣田 隆一[2]、黒田 章夫[2] ([1]広島大工、[2]広島大院先端物質・分子生命)
○Fumihiro SHIIHARA[1], Takeshi IKEDA[2], Yuuya AGOU[2], Ryuichi HIROTA[2], Akio KURODA[2] ([1]HIroshima Univ., [2]Hiroshima Univ.)

[目的]

磁性粒子は、DNA やタンパク質など特定の生体分子の単離や、磁場勾配の利用により薬物を輸送するドラッグデリバリーシステム、ガンの温熱治療など幅広い用途に利用できる。磁性粒子にタンパク質を固定化することで、目的タンパク質の精製が簡便となり、またそのタンパク質をアンカーとして利用し、酵素・抗体・受容体を掲示することが可能である。

当研究室で開発された Si-tag はシリカ(SiO_2)に強力に結合するタンパク質である。Si-tag と目的タンパク質との融合タンパク質を作製することで、任意のタンパク質をシリカ・ガラス・半導体基板上に固定化できる。最近の研究において、Si-tag はシリカの他にもマグネタイト(Fe_3O_4)に結合することが分かった。本研究では、Si-tag を用いたマグネタイト粒子上へのタンパク質固定化法の開発を行い、その有用性を検証した。

[方法・結果]

Si-tag を介して固定化されたタンパク質が機能的に働くかどうかを調べるために以下の実験を行った。まず、抗体結合タンパク質である protein G と Si-tag の融合タンパク質(Si-tag 融合 protein G)を作製した。得られたタンパク質溶液をマグネタイト粒子と混合することで、Si-tag 融合 protein G をマグネタイト粒子上に固定化した後、磁石を用いて粒子を回収した。続いて抗 H-FABP 抗体溶液と粒子を混合し、磁石を用いて粒子を回収した。得られた粒子を洗浄後、異なる濃度の H-FABP 溶液と反応させた。磁石を用いて粒子を回収した後、検出用抗体(HRP 標識抗 H-FABP 抗体)と反応させた。発色基質を添加したところ、H-FABP 濃度に比例した発色が見られた。この結果より、Si-tag を介して目的のタンパク質がマグネタイト粒子上に機能的に固定化されていることが示された。また、本手法により簡便に抗体を提示したマグネタイト粒子を作製できることが判明した。

続いて、細菌に対する抗体を掲示したマグネタイト粒子によって目的の菌を回収できるか検討した。抗大腸菌抗体を提示した粒子を大腸菌培養液と混合後、磁石を用いて粒子を回収した。粒子を PBS で懸濁し、LB 寒天培地にプレーティングしたところ、抗体を固定化しなかった場合に比べて、抗体を固定化した場合は多くのコロニー形成が見られたことから目的の菌を回収できたことが示された。

これらの結果より、Si-tag を利用することで簡便にタンパク質を提示したマグネタイト粒子が作製でき、免疫測定法などに利用できることが分かった。

Si-tag, magnetic beads, immobilization

講演番号：2A11p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ A 校舎 11 会場

部位特異的ランダム変異による一本鎖抗体の可溶性発現能の改変

Modulation of scFv solubility by site-directed random mutagenesis

○牧野 祥嗣、伊藤 伸哉（富山県大院生物工）
○Yoshihide MAKINO,Nobuya ITOH (Toyama Pref. Univ.)

一本鎖抗体（scFv）は、抗体の可変領域（Fv）の重鎖と軽鎖をペプチドリンカーで連結した低分子化抗体である。分子量が完全抗体と比較して小さく、微生物を用いた組換え体の生産もできるため、抗原への親和性を付与する等の蛋白質工学が可能である。しかし大腸菌内では、scFv は多くの場合不溶性画分に発現し、その後の可溶化処理が必要となる。

大腸菌細胞質で効率よく折れたたむことが可能な scFv のバリアントを多種類取得すれば、組換え生産や蛋白質工学による改変が容易となる。しかし、scFv は２本のジスルフィド結合を持っており、大腸菌細胞質の還元的条件ではしばしば折れたたみが阻害される。そこで本研究では、scFv 内のシステイン残基およびその周辺のアミノ酸残基を置換し、細胞質でより効率的に生産可能な scFv への改変を試みた。

大腸菌で発現生産した場合に可溶性処理を経て取得される、M3C65 scFv（Brown, M., et al. (2000) *J. Exp. Med.*, **191**, 2101-2111）をモデルとして、この改変を試みた。分子内でジスルフィド結合を生じる２つの Cys のペアを、Ala またはランダムなアミノ酸に置換した。このとき、ジスルフィド結合する Cys の１つのペアに対して、側鎖の原子のいずれかが 3～5 Å の距離で接触するようなアミノ酸残基１つを選び、このアミノ酸残基も同時にランダムな残基に置換した。ライブラリの選択には、twin-arginine translocation (TAT) machinery を利用した。TAT machinery は、凝集またはミスフォールドしたものではなく、可溶性 scFv のみを細胞質からペリプラズム空間に移送する（Fisher, A.C. and DeLisa, M.P., (2009) *J. Mol. Biol.*, **385**, 299-311）。TAT machinery を利用したベクターを構築し、合計１４種類のランダム置換ライブラリを構築した。

scFv に融合させたβ-ラクタマーゼ活性による抗生物質耐性を指標として選択を行った結果、L 鎖の Cys は Ala に、H 鎖の Cys と Trp36 はランダムなアミノ酸に置換したようなライブラリからのみ、クローンが取得された。ペリプラズムの可溶性画分を取得して ELISA 法で scFv の発現量を比較したところ、未変異または全 Cys を Ala に置換した変異体に対し、取得されたクローンでは発現量が増加していた。遺伝子配列を解析したところ、変異導入部位は元のアミノ酸ではないが、限られた組み合わせのアミノ酸に置換されていた。

同様の変異導入を行うことで、大腸菌細胞質においても可溶性画分により発現しやすいような変異体の創出が可能だと考えられる。

single-chain antibody, protein engineering, disulfide bond

講演番号：2A11p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ A 校舎 11 会場

large oval aggregates に特異的なモノクローナル抗体の作製と ELISA による反応性の評価

Monoclonal antibody against large oval aggregates and reactivity of the monoclomal antibody by ELISA

○清水 武則[1]、吉宗 一晃[2]、小森谷 友絵[3]、秋山 雄大[4]、神野 英毅[3] ([1]日大院生産工・応化、[2]日大生産工・応化、[3]日大生産工・環境安全、[4]（株）イムノ・プローブ)
○Takenori SHIMIZU[1], Kazuaki YOSHIMUNE[2], Tomoe KOMORIYA[3], Takahiro AKIYAMA[4], Hideki KOHNO[3] ([1]Dep. of Appl. Mol. Chem. Grad. Sch. of Ind. Tech. Nihon Unv., [2]Dep. of Appl. Mol. Chem. Coll. of Ind. Tech. Nihon Unv., [3]Dep. of Sust. Eng. Coll. of Ind. Tech. Nihon Univ., [4]Immuno Probe Co., Ltd.)

Amyloid beta protein ($A\beta_{1-42}$)はアルツハイマー病の原因と考えられているタンパクであり、凝集体、線維状、単量体など様々な構造体を形成することが知られている。我々は、凝集 $A\beta_{1-42}$ を作製し、その凝集 $A\beta_{1-42}$ に対するモノクローナル抗体の作製を行った。また、対象実験として、線維状 $A\beta_{1-42}$ および単量体を作製し、比較を行った。まず、凝集 $A\beta_{1-42}$ の作製として 0.44 mM の $A\beta_{1-42}$ 溶液 500 μl を調製し、4 ℃で 30 分間インキュベートした。その後、溶液をダルベッコ PBS により 0.22 mM に調製し、線維状形成を阻害する $A\beta_{16-20}$ を 2.2 mM 添加し、37 ℃で 16 時間攪拌した。線維状 $A\beta_{1-42}$、単量体 $A\beta_{1-42}$ も同時に作製し、それらの $A\beta_{1-42}$ の構造を Thioflavin T 法、atomic force microscopy(AFM)により解析した。凝集 $A\beta_{1-42}$ を AFM で確認後、この凝集 $A\beta_{1-42}$ をマウスに免疫することによりモノクローナル抗体の作製を行い、その評価を ELISA により行った。その結果、凝集 $A\beta_{1-42}$ に反応性のあるモノクローナル抗体が 4 クローン得られた。また、それらの抗体は、線維状 $A\beta_{1-42}$、単量体に対して反応性は低く、その交差反応性は約 10%であった。さらに得られた抗体がどの大きさの凝集 $A\beta_{1-42}$ に特異的な反応を持つかということを調べるためにフィルターを用いて限外濾過を行い、それぞれの分画の凝集 $A\beta_{1-42}$ に対する反応性を ELISA により評価した。その結果、220 nm 以上の非常に大きい凝集 $A\beta_{1-42}$ large oval aggregates (LOA)に特異的なモノクローナル抗体であることがわかった。本研究で得られたモノクローナル抗体を用いることにより凝集 $A\beta_{1-42}$ の構造解明につながることが期待される。現在、大きさの異なる凝集 $A\beta_{1-42}$ に対するモノクローナル抗体を作製中であり、これらの抗体についても報告する。

amyloid beta protein$_{1-42}$, monoclonal antibody, ELISA

講演番号：2A11p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ A 校舎 11 会場

ファージ提示法を用いた抗ネオスポラ抗体の開発及び原虫検出への応用

Development of murine anti-Neospora antibodies and their application on detection of neosporosis

○董 金華[1]、大月 隆寛[2]、加藤 竜也[2]、朴 龍洙[1,2]([1]静大創造科学技術院、[2]静大農)
○Jinhua DONG[1], Takahiro OTSUKI[2], Tatsuya KATO[2], Enoch Y. PARK[1,2] ([1]School of Science and Technology, Shizuoka University, [2]Faculty of Agriculture, Shizuoka University)

【目的】ネオスポラ症はネオスポラ原虫(Neospora caninum)の感染により流産死産を起こす疾患である。N. caninum は、1984 年ノルウェーで犬の神経病として初めて報告され、その後新種の原虫として確認され、多くの哺乳動物への感染が確認された。牛の場合、汚染された水、餌を摂取することで感染されるが、牛と牛との間の水平感染は観察されていない。しかし母牛から経胎盤感染する垂直感染が高い確率で発生する。特に妊娠牛が感染すると、季節を問わずに流産、死産、ミイラ胎児の娩出がおこり、新生子牛の神経症状などが認められる。近年日本ではネオスポラ症は、発生する件数が増加傾向である。しかし、牛ネオスポラ症に対した有効な治療法はなく、感染した場合、今のところ処分する以外手段はない。よって、ネオスポラ症の予防法の開発が急務である。本研究では組換体ネオスポラタンパク質を用いてマウスに免疫し、抗ネオスポラ抗体を開発し、その抗ネオスポラ抗体を利用した新規原虫検出方法の開発を研究目的とした。
【方法】ネオスポラ原虫タンパク質 NcSAG1 の遺伝子を原虫ゲノム DNA から増幅した後、pENTR/D にクローニングし、さらに Gateway Technology 及び Bac-to-Bac システムを用いて組換え BmNPV Bacmid を作製し、カイコ幼虫に注射して組換え体 NcSAG1(rNcSAG1)を発現させた。rNcSAG1 は Anti-FLAG M2 Affinity Gel を用いて精製した。さらに精製 rNcSAG1 を BALB/C マウスに免疫した。免疫されたマウスの脾臓から全 RNA を抽出し、抗体可変領域遺伝子の増幅に成功した。制限酵素で処理した後、ファージミド pDong1/Fab に組込み、抗体 Fab 断片を提示したファージライブラリを作製した。得られた陽性クローンの遺伝子を解析、また抗体の抗原特異性を確認し、それらを用いた新規原虫検出方法を開発した。
【結果】ネオスポラタンパク質 rNcSAG1 はカイコで発現させ、精製を行った結果、分子量 37kDa のシングルバンドが観察された。rNcSAG1 を用いてマウスを免疫し、血清中に抗 NcSAG1 抗体を有することが確認された。免疫したマウスの脾臓 全 RNA から抗体可変領域遺伝子を増幅し、ファージミドに組込み、ファージ提示抗体ライブラリを作製した。抗体ライブラリから２株の陽性クリーン A10 と H3 を得た。両クローン共に特異的に rNcSAG1 に結合し、免疫染色によってネオスポラ原虫に結合した。A10 抗体を固定化してファージ提示 H3 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法では、溶液中に存在する原虫を定量することができた。本法は農場で原虫をモニターリングすることで、ネオスポラ症の予防に有用であることが示唆された。

Neospora caninum, antibody, detection

講演番号：2A11p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ A 校舎 11 会場

C 型肝炎ウイルスの抗 HCV コア細胞内抗体の発現と精製
Expression and purification of Anti-HCV core intracellular antibody
○山本 英[1]、ビピン　クマール デオ[2]、加藤 竜也[1]、鈴木 哲朗[3]、朴 龍洙[1,2] ([1]静岡大院・農、[2]静岡大・創科技院、[3]浜医大・感染症学)
○Takeshi Yamamoto[1], Vipin Kumar Deo[2], Tatsuya Kato[1], Tetsuro Suzuki[3], Enoch Y. Park[1,2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., [3]Hamamatsu University School of Medicine)

【目的】C型肝炎は世界中で約 1 億 7 千万人の患者が確認されている一方で、その有効なワクチンは知られていない。C型肝炎はC型肝炎ウイルス（Hepatitis C virus ： HCV）に感染することで発症する病であるが、C型肝炎ウイルスは未だ明らかになっていない部分が多い。一方で、抗 HCV コア細胞内抗体はC型肝炎ウイルスの感染と増殖に重要な役割を果たすC型肝炎ウイルスのコアタンパク質の機能を阻害することが明らかになった。本研究は、HCV 産生を阻害する抗 HCV コア細胞内抗体について、精製抗体及びコア - 抗体複合体の立体構造を解析し、その知見を基にして新たな抗 HCV 剤の開発へ展開を目指すものである。そこで、抗 HCV コア細胞内抗体をカイコで発現し、精製を行い、精製した抗 HCV コア細胞内抗体を用いてC型肝炎コアタンパク質との相互作用を検討したので、ここで報告する。
【方法と結果】抗原相補性決定領域（CDR）から成る抗 HCV コア細胞内抗体(1Y4L）の遺伝子を含んだプラスミド（pCAG/1Y4L）から、PCR により抗 HCV コア細胞内抗体の配列を増幅した。更に 1Y4L 遺伝子にウェスタンブロットでの検出や精製のためのタグ配列、及びカイコでの分泌シグナルの配列を連結した遺伝子を TOPO Cloning、Gate way technology、Bac-to-Bac を用いて *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus （BmNPV） -Bacmid へ組込み、Bacmid/1Y4L を得、これをカイコに注射した。また、タンパク質のフォールディングを補助するシャペロンタンパク質の HSP70 遺伝子を組込んだ Bacmid/HSP70 も同時に注射し、1Y4L と HSP70 を共発現させた。組換えバクミドによる十分な感染を確認した後、カイコの体液と脂肪体を回収して、anti-FLAG M2 antibody agarose クロマトグラフィーで目的タンパク質を精製した。HEK293T 細胞に、コアタンパク質と HA タグ配列を組込んだ発現ベクター（pCAG/38HA）を導入することにより発現させたコアタンパク質と得られた精製 1Y4L との相互作用を ELISA で確認したところ、組換え抗 HCV コア細胞内抗体とコアタンパク質との相互作用が確認された。更に HSP70 との共発現により、抗 HCV コア細胞内抗体のコアタンパク質への結合能は向上した。これらの結果より、組換え抗 HCV コア細胞内抗体はコアタンパク質に結合でき、今後コアタンパク質の解析ツールとして利用可能であることが示唆された。

Hepatitis C virus, intrabody, silkworm

講演番号：2A11p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ A 校舎 11 会場

Neospora caninum 抗原タンパク質を提示したバキュロウイルスの作製とマウスの免疫化
Preparation of baculovirus displaying *Neospora caninum* antigenic protein and its immunization of mouse

○大月 隆寛[1]、董 金華[2]、加藤 竜也[1]、高坂 哲也[1]、朴 龍洙[2]([1]静岡大・院・農、[2]静岡大・創科技院)
○Takahiro Otsuki[1], Jinhua Dong[2], Tatsuya Kato[1], Tetsuya Kohsaka[1], Enoch Y Park[2] ([1]Shisuoka Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technolo., Shizuoka Univ.)

【目的】*Neospora caninum*はアピコンプレックス門の寄生性原虫の一つである。終宿主としてイヌに、また中間宿主として様々な哺乳動物に感染することが知られている。通常は不顕性感染となり、大きな問題となることはないが、感染が顕性となると死産や流産が頻発する。特にウシをはじめとする家畜で問題となっている。我々は既に、ネオスポラ症に深く関わる3種類の抗原タンパク質（NcSRS2, NcSAG1, NcMIC3）をカイコ-バクミド発現系で発現し、免疫原性を確認した[1)]。本研究は、カイコ幼虫を用いて原虫タンパク質を提示したバキュロウイルスを作製し、*Neospora caninum*感染に対するワクチンとしての応用を目的とする。今回は現在までに得られた成果を報告する。
【方法】バキュロウイルス表面に抗原タンパク質を提示するために、3種類の抗原タンパク質（NcSRS2, NcSAG1, NcMIC3）をバキュロウイルスの主要エンベロープタンパク質Gp64と融合タンパク質としてカイコ幼虫体内で発現させた。スクロース密度勾配超遠心法により抗原提示バキュロウイルスを含む幼虫体液から抗原提示バキュロウイルスを精製、回収した。回収した精製ウイルスはPBSに対して透析、定量PCRによるウイルスタイター測定をした後、１回あたり1×10^8（pfu/匹）相当の抗原提示バキュロウイルスをBALB/cマウスに接種し、マウスへの免疫化を試みた。計３回の接種を行い、免疫化後のマウスから血清を採取した。抗原を固相化したELISAにより血清中の抗NcSRS2, NcSAG1, NcMIC3抗体産生の確認を行った。
【結果】ウエスタンブロット法により、精製バキュロウイルスからGp64融合抗原タンパク質が確認された。また、精製ウイルスを固相化したELISAにより、完全長のGp64を融合させた抗原より膜貫通・細胞内領域のみを融合させた抗原タンパク質の抗原タンパク質の提示量が約10倍多いことが示された。免疫化実験では各抗原に対する抗体産生が確認され、抗原を提示していないウイルスで免疫化したコントロールと比較し、有意な結果が得られた。また、抗原提示ウイルスにより免疫化したマウスは抗原タンパク質のみで免疫化したマウスより高い抗体力価を得ることが出来た。

[1)] Otsuki et al., Vet. Parasitol. 2012 Oct 8.

Neospora caninum, Baculovirus display, Immunization

講演番号：2A11p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ A 校舎 11 会場

アレルゲンチップ開発を目指した組換えダニアレルゲンタンパク質 Der f 10 の *in vivo* 合成

The synthesis of recombinant allergen protein,Der f 10 in *E.coli* to construct allergen chip

○前原 大輝[1]、佐藤 正樹[1]、曽根 冬馬[2]、山田 大[2]、長谷川 忠大[2]、山下 光雄[1]([1]芝工大工・応化、[2]芝工大工・電気)
○daiki maehara[1], masaki satou[1], touma sone[2], hiroshi yamada[2], tadahiro hasegawa[2], mitsuo yamashita[1] ([1]S.I.T, [2]S.I.T)

[目的]現在わが国においては全人口の約 2 人に 1 人がアレルギー疾患に罹患していると推定されており、アレルギーに対する根本的治療法は減感作療法だけとされている。この治療は患者にアレルゲンエキスを投与することで、免疫寛容を誘導することで効果が表れる。しかしながらアレルゲンエキスには複数種類のアレルゲンタンパク質が含まれている。例えばコナヒョウヒダニの場合アレルゲンは 13 種存在するのに対し、ふつう患者はその内のいくつかにしか感作を起こさない。従って減感作療法を適正に行うためには患者に対してどのアレルゲンタンパク質が感作しているかを検査し、適正なものを投与する必要がある。そこで既存の検査機器よりも簡易かつ迅速にアレルゲンを特定するため、PDMS(ポリジメチルシロキサン)を基盤としアレルゲンタンパク質を固着させた検査チップの開発を目指している。PDMS は生体適合性素材であること、微細流路が形成可能であること、チップ化が容易であること、可視光の吸収がほぼ無いことなどの特長がある。そこで本研究ではチップに固着させるアレルゲンタンパク質としてダニ虫体由来で甲殻類のトロポミオシンと高い相同性がある Der f 10 を *in vivo* にて組換え合成し、精製後 PDMS 上で検出することを目的とした。
[方法]本実験で使用する組換え *E. coli* SG13009 株は His-tag 融合型の組換え Der f 10(以下 rDer f 10)を合成するための遺伝子をプラスミド上に持つ。IPTG を加え誘導培養を行い、集菌後の菌体をガラスビーズ破砕によってタンパク質を溶出させた。その試料を Ni-NTA agarose を用いて rDer f 10 を精製した。精製した rDer f 10 を CBB 染色と Western blotting により合成と純度の確認を行った。抗体は以前作製したポリクローナル抗体を 10000 倍希釈したものを使用した。次に市販の Der f 1・Der f 2 モノクローナル抗体が r Der f 10 と交差するかどうかを調べるために、ニトロセルロース膜上で抗原抗体反応を行った。タンパク質の定量は Bradford 法で行った。
[結果]精製後の組換えタンパク質は CBB 染色で検出した結果 Der f 10 に相当する分子量 36.7k 付近の単一なタンパク質バンドが確認された。Western blotting の結果でも、このバンドが染色されたことから rDer f 10 が精製できたと思われる。rDer f 10 は純度 95%、収量 2.3μg/m l culture であった。200ng の r Der f 10 を用いても膜上で市販の Der f 1・Der f 2 モノクローナル抗体と特異的に反応することはなかった。これらの結果から組換え合成した rDer f 10 を検査チップに利用できると思われる。

Der f 10, allergy, allergen chip

講演番号：2A12a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ A 校舎 12 会場

ゼラチン/マルトデキストリン共存フィルムにおけるミクロ/マクロ相分離構造と物性の相関

Correlation of micro/macro phase-separated structure and physical properties of gelatin/maltodextrin mixed films

○齋藤 健太[1]、釜口 良誠[2]、水谷 勝史[2]、中村 卓[1]([1]明治大院農・農化、[2]森下仁丹（株））
○KENTA SAITO[1], RYOSEI KAMAGUCHI[2], MASAFUMI MIZUTANI[2], TAKASHI NAKAMURA[1]
([1]MEIJI UNIV GRAD SCHOOL, [2]MORISHITA JINTAN CO.,LTD.)

【目的】食用カプセルに求められる機能性としては、品質保持、栄養強化、風味（フレーバー)、食感がある。これらの機能性にはシェル（フィルム、膜）の構造が大きく関係していると考えられる。シェルの構造形成成分にはタンパク質と多糖類がある。これらを混合すると一般的に相分離構造を形成することが知られている。本研究ではタンパク質として冷却によりゲル化するゼラチンを、多糖類として澱粉の分解物でゲル化能のないマルトデキストリンを用いた。前回大会においてマルトデキストリンのデキストロース当量（DE）が異なるものを用いることで分散相サイズの異なる4種類のゲル構造（均質・ミクロ相分離・セミマクロ相分離・マクロ相分離）を形成することを明らかにした[(1)]。そこで本研究では、分散相サイズの異なるゲル構造を形成する溶液を用いたゼラチン/マルトデキストリン共存フィルムを作製し、それらの微細構造と物性の相関を明らかにすることを目的とした。
【方法】ゼラチン濃度を20%、マルトデキストリン濃度を10%、グリセリン濃度を4%に固定した。マルトデキストリンのDEは4・11・16・18を用いた。それぞれ調製し、60℃で10分間加熱した溶液を塩化ビニールの鋳型に分注し、氷水で10分間冷却後、5℃で一晩冷蔵してゲル-シートを作製した。さらに、ゲル-シートを乾燥させてフィルムを作製した。これらのフィルムについてクリープメータで突き刺し試験を、溶出試験器で溶解性を測定した。さらに共焦点レーザー走査顕微鏡（CLSM)、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて微細構造を観察した。
【結果】CLSM・SEM観察の結果より、フィルム構造においてもゲルと同様にDEが異なるものを用いることで、分散相サイズの異なる4種類の構造（均質・ミクロ相分離・セミマクロ相分離・マクロ相分離）を形成した。DEが低い程、マルトデキストリン-リッチ分散相の直径が大きい傾向を示した。ゲル-シートを乾燥してフィルムにすることで、分散相の形状が球体から楕円体に変化した。フィルムの突き刺し試験の結果、分散相を形成しない均質構造、1μm未満の小さな分散相をもつミクロ相分離構造、1～10μmの分散相をもつセミマクロ相分離構造、10μm以上の大きな分散相をもつマクロ相分離構造の順で、短い変形距離で破断した。また、溶解性は大きな分散相をもつ構造の方が、溶けにくい傾向がみられた。以上の結果から分散相サイズが異なるフィルムの構造と物性の関係について考察する。

（1）日本農芸化学会 2012 年度大会講演要旨集 p.575

Gelatin, Film, Phase-separated structure

講演番号：2A12a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ A 校舎 12 会場

架橋程度の異なるタピオカ加工澱粉/卵白共存ゲルの破壊物性と破壊構造の解析

Analysis for fracture properties and structure of co-gels with cross-linked tapioca starch/egg white protein

○井之上 明弘[1]、付 惟[2]、小林 佳祐[2]、中村 卓[1] ([1]明治大農・農化、[2]明治大院農・農化)
○Akihiro INOUE[1], Wei FU[2], Keisuke KOBAYASHI[2], Takashi NAKAMURA[1] ([1]Meiji Univ., [2]Meiji Univ.)

【目的】

食品のおいしさを決定する重要な要因として食感がある。食感は咀嚼による食品構造の破壊過程において、力学特性と構造状態の変化が認知されることにより表現される。食品構造を形成する主要な成分として澱粉が挙げられる。中でもタピオカ澱粉は食品の食感改良の目的で用いられており、例えばドーナツやうどんなどの食品に特徴的な「もちもち」とした食感を付加させることが知られている。しかし、なぜ「もちもち」とした食感が発現するのかは明らかになっていない。そこでタピオカ澱粉を卵白に混合したゲルを食品モデルとして破壊過程における力学特性と構造状態の変化を検討した。これまでの研究では、馬鈴薯澱粉を比較対象とし、タピオカ澱粉の伸びる性質とタンパク質界面での相互作用が重要であることを明らかにした[1)]。架橋は澱粉の膨潤を抑制し、伸びる性質に影響することが知られている。そこで、本研究では、架橋程度の異なるタピオカ加工澱粉を用いて、破壊物性と破壊構造を比較し、破壊過程でのタピオカ澱粉の伸びる性質を解析することを目的とした。

【方法】

卵白と澱粉を混合した溶液を、95℃で 10 分間加熱、氷水中で 10 分間冷却した後に 6℃で一晩冷蔵しゲルを作製した。ゲル作製には未加工のタピオカ澱粉と架橋の程度が異なる架橋タピオカ澱粉を用いた。ゲルについて、クリープメータにて破断強度試験を行った。歪率を段階的に変えて圧縮したゲルを化学固定した。これら固定ゲルについて目視による巨視的観察、また走査型電子顕微鏡(SEM)を用いてゲルの微細構造を観察した。

【結果】

破断強度試験の結果、応力−歪曲線において未加工のタピオカ澱粉では低歪領域で低応力、高歪領域で高応力、また降伏点を生じない物性を示した。それに対し、架橋タピオカ澱粉では低歪領域で高応力、高歪領域で低応力、さらに降伏点を生じた。また、架橋の程度が高いほど低歪領域の応力が高くなり、降伏点が低歪・低応力側へシフトした。段階的に圧縮したゲルの巨視的観察ではゲルの潰れ方に違いが見られた。未加工のタピオカ澱粉では表面に亀裂が形成されなかった。しかし、架橋タピオカ澱粉では亀裂が生じた。また、架橋の程度が高いゲルでは亀裂の入り始める歪率が低かった。さらに圧縮したゲルの微細構造観察の結果についても報告する。

1) 日本食品科学工学会 59 回大会要旨集 p. 160 (2012)

tapioca starch, gel, fracture property

講演番号：2A12a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ A 校舎 12 会場

プロセスチーズの破壊物性と破壊構造の解析

Analysis for physical properties and structure of process cheese during fracture process

○井上 慶太[1]、森口 奈津美[2]、中村 卓[1] ([1]明治大農・農化、[2]明治大院農・農化)
○Keita INOUE[1], Natsumi MORIGUCHI[2], Takashi NAKAMURA[1] ([1]Meiji Univ., [2]Meiji Univ.)

【目的】

プロセスチーズは一般的に複数のナチュラルチーズと乳化促進のための溶融塩などの原料を混合・加熱溶融・乳化・冷却して製造される。原料配合・製造条件を変えることにより、いろいろな食感・風味・二次加工特性（熱溶融性や糸曳き性など）を持つ製品が作られている。これらの様々な特性のうち、食感は食品のおいしさを決定する重要な要因である。食感は口腔内での咀嚼による食品構造の破壊過程において、力学特性と構造状態の変化が認知されることにより表現される。そのため、この力学特性と構造状態がどのように変化しているのかを明らかにすることは重要である。そこで、本研究では、市販プロセスチーズを用いて、咀嚼による破壊をイメージした破壊物性測定・破壊構造観察を行い、プロセスチーズの破壊過程を解析することを目的とした。

【方法】

量販店で購入した 15 種類の市販プロセスチーズについて、クリープメータを用いて楔形治具による破断強度試験を行い、得られた荷重-歪曲線のパターンを分類した。そこから、さらに 4 種類を選び、デジタルカメラを用いて破断強度試験時のプロセスチーズを側面から動画撮影し、巨視的観察を行った。また、破断強度試験前後のプロセスチーズの微細構造を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察した。

【結果】

破断強度試験で得られた荷重-歪曲線の結果から、市販プロセスチーズは以下の 4 つのグループに分類された。(A)低歪率での荷重増加後、歪率が増加しても荷重がほぼ一定に推移するもの(B)立ち上がり荷重が低く、また高歪率において荷重低下を生じないもの(C)低歪率での 2 段階の荷重増加後、破断後に荷重低下するもの(D)立ち上がり荷重が高く、破断後に 2 段階の荷重低下を生じるもの。各グループから 1 種類ずつ選び、さらに構造観察を行った。動画撮影での巨視的観察より、低歪率において、種類間の形状変化の違いは見られなかった。しかし、歪率 70%において、(A)と(B)は亀裂を生じないが、(C)と(D)では側面に亀裂が発生、伝播した。この亀裂が入ったプロセスチーズでは、亀裂の発生と荷重-歪曲線での荷重低下に相関が見られた。未変形構造の SEM 観察より、脂肪球サイズ・脂肪球分布・カゼインサブミセルの凝集構造に 4 種類のプロセスチーズの間で違いがみられた。破壊過程でのこれら構造の変化についても報告し、プロセスチーズの破壊物性と破壊構造の関係について考察する。

process cheese, microstructure, food texture

講演番号：2A12a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ A 校舎 12 会場

グミキャンディにおけるアロマリリースへの相分離構造の影響

Effect of the phase-separated structure of gummy candies on aroma release

○廣瀬 修吾[1]、長谷部 智久[1]、齋藤 健太[2]、中村 卓[1] ([1]明治大農、[2]明治大院農)
○Shugo Hirose[1], Tomohisa Hasebe[1], Kenta Saito[2], Takashi Nakamura[1] ([1]Meiji Univ., [2]Meiji Univ.)

【目的】食感と風味はおいしさにとって重要な要因である。食品構造は食感に大きく影響するだけでなく、構造内の香気化合物(低分子量化合物)を保持することにより、食品の香り(アロマリリース)にも影響する。また、グミキャンディは食感と香りを楽しむ菓子である。グミキャンディの構造はゼラチンがネットワークを形成している。これまでの研究により、多糖類であるペクチン・アラビアガムを添加することで、ゼラチンと相分離構造を形成し食感が変化することを明らかとした(1)。しかし、相分離構造の形成により、アロマリリースに与える影響は明らかではない。そこで本研究では、グミキャンディにペクチン・アラビアガムを添加した異なる相分離構造がアロマリリースに与える影響について検討した。
【方法】グミキャンディは、固形分濃度でゼラチン５％と一定にし、ゼラチン単独グミ、ペクチン 2.5%添加グミ、アラビアガム 15%添加グミの計 3 種類を用いた。さらに、4 種類の香気化合物(Ethyl propanoate, cis-3-Hexenol, Damascenone, Methyl anthranilate)を含むグレープ合成香料を全体量に対し 0.5%添加した。これらについて、物性測定として破断強度試験を行い、構造は走査型電子顕微鏡にて観察した。また、香気分析において、ヘッドスペースに放出された香気化合物を、SPME(PDMS/DVD)により捕集した。未破壊のグミ(円柱型：直径 14 mm, 高さ 5 mm)では、平衡状態にて捕集し、破壊(咀嚼)をイメージした条件では円柱型のグミを 5 mm 立方体に切断し、非平衡状態にて 37℃の超純水を加え撹拌してから捕集し、GC によりリリース量を測定した。
【結果】破断強度試験と構造観察の結果から、多糖類(ペクチン、アラビアガム)を添加する事でゼラチンと相分離構造を形成する事が確認された。また、未破壊グミでのアロマリリース分析で、Damascenoone が 3 種類のどのグミにおいても検出されなかった。ペクチン添加グミで、ゼラチン単独グミと比較すると、構造内に保持されずに放出される傾向を示した。このことは、ゼラチン/ペクチン共連続構造による間隙構造が原因であると考えられる。一方、アラビアガム添加グミで、ゼラチン単独グミと比較すると、Ethyl propanoate, cis-3-Hexenol においてグミ構造内に有意に保持された。このことは、ゼラチン-アラビアガム共存グミによるコアセルベート構造の分散相内(アラビアガムリッチ相)に香気化合物が保持されたためであると考えられる。また、破壊(咀嚼)をイメージしたフレーバーリリースの分析についても報告する。
(1)第 56 回日本食品科学工学会 p125 3Bp10

aroma release, phase-separated structure, gummy candy

講演番号：2A12a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ A 校舎 12 会場

食感の異なるパスタの破壊過程の可視化

Visualization for pasta with different texure during fracture process

○佐藤 純、中村 卓 (明治大院農)
○Jun SATO,TAKASHI NAKAMURA (Meiji Univ.)

【目的】

パスタにおいて食感は、おいしさを決める重要な要因である。パスタはデュラムセモリナ粉に水を加えて混合・混練し、押出成形、乾燥工程を経て加工される。特に、乾燥工程の条件（温度、湿度）はパスタの食感に大きな影響を与える。これまでの研究で、高温乾燥パスタにおいて低温乾燥パスタよりもタンパク質重合率が高くなり、破断強度試験において、破断荷重、もろさ荷重が大きくなることを報告した[1)]。また、官能評価の結果より、高温乾燥パスタのほうが低温乾燥パスタよりも歯切れがよく、硬い食感であることが明らかとなった。そこで本研究では、食感の異なる高温乾燥、低温乾燥パスタについて、機械的特性とその破壊過程の観察から、食感の違いを可視化することを目的とした。

【方法】

デュラムセモリナ粉を原料とし、小型電動パスタマシン（マジカ）を用いてテフロンダイ（直径 1.75 cm）で押し出し成型後、乾燥温度 85℃／55℃、湿度 80%（高温乾燥パスタ／低温乾燥パスタ）で乾燥パスタを作製した。【茹で後／茹で前】=2.5 倍になるように茹でたパスタについて、クリープメーターにて破断強度試験をくさび型の冶具を用いて行い、破壊過程を麺の下方向から動画撮影し、観察した。また走査型電子顕微鏡（SEM）を用いてくさび型冶具でパスタを 60%圧縮したときのパスタ横断面を観察した。

【結果】

二点識別法官能評価を行った結果、低温乾燥よりも高温乾燥パスタの方が歯切れが良く、硬い食感であった。破断強度試験の結果、高温乾燥パスタの方が、低温乾燥パスタよりも破断荷重、もろさ荷重が大きかった。歪率 60%時の内部構造について SEM を用いて観察したところ、パスタ中心部において、高温乾燥パスタでは澱粉粒が変形していないのに対し、低温乾燥パスタでは澱粉粒が横に伸び、変形している様子が観察された。さらに、麺の下方向から破壊動画を観察した結果、低温乾燥パスタでは破断直前まで直径方向に伸展し、破断点から徐々に破壊された。一方、高温乾燥パスタでは破断直前まで直径方向に伸展した後、破断点から急激に破壊が起こり、長さ方向に伸展した。以上のことから、パスタの食感の違いを機械的特性、破壊構造観察により考察する。

1）日本食品科学工学会第 58 回大会講演集 p. 99

pasta, texture, structure

講演番号：2A12a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ A 校舎 12 会場

酵素添加うどんの食感の差を破壊過程における構造と物性の変化からみえる化する
Visualization of texture difference on wheat noodle treated with enzymes by means of variation of structure and physical properties on fracture process
○青山 博明[1]、中村 卓[1]、渡部 幸一郎[2]、岡本 武[2]、熊澤 義之[2]([1]明治大院農・農化、[2]味の素株式会社・食品研究所)
○ Hiroaki AOYAMA[1], Takashi NAKAMURA[1], Koichiro WATABE[2], Takeshi OKAMOTO[2], Yoshiyuki KUMAZAWA[2] ([1]Meiji Univ., [2]Institute of food sciences & technologies, Ajinomoto Co., Inc)

【目的】食品において、食感はおいしさを決める重要な要因である。その食品の構造形成成分としてタンパク質や澱粉などの高分子化合物が挙げられる。それらの成分を混合や加熱・冷却といった物理的加工することにより、食品構造を形成する。その食品構造が破壊される過程、つまり人間が口腔内で食品を咀嚼することで生じる状態構造、力学物性の変化を知覚する過程で食感を発現する。さらに、食感改良の加工法として、トランスグルタミナーゼ(TG)、グルコースオキシダーゼ(GO)が用いられている。TG はタンパク質分子間のε(γ-グルタミル)-リジンイソペプチド架橋反応を触媒する酵素である。また、GO はタンパク質の-SH 基の酸化による、S-S 架橋の形成に寄与し、タンパク質ネットワークを強固にすると考えられている。以上の様なメカニズムにより、TG や GO を小麦粉製品に添加すると食感が変化し、それぞれの食感が異なることが知られている。しかし、TG や GO の添加による食感の違いが、咀嚼過程でどのような構造変化、力学物性によって生じているのか明らかではない。そこで本研究では、TG、GO を添加して調製したうどんの食感の違いを破壊過程における構造と物性の変化の差からみえる化することを目的とした。
【方法】酵素無添加と TG、GO をそれぞれ添加して調製した 3 種類のうどんについてクリープメータを用いて破断強度試験を行なった。この破壊過程をデジタルカメラにて動画観察した。さらにこの破断強度試験で破壊したうどんについて、共焦点レーザー走査顕微鏡(CLSM)及び走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて破壊構造を観察した。
【結果及び考察】破断強度試験で得られた荷重-歪曲線の結果より、TG 添加うどんは最も高荷重で破断した。また、破断後の荷重が大きく低下した。GO 添加うどんは酵素無添加よりも高荷重で破断した。また、破断後の荷重の低下が小さかった。以上より、TG 添加うどんは破断後、壊れやすく、一方 GO 添加うどんは壊れにくい力学物性を示すことが明らかとなった。破壊構造の観察結果より、TG 添加うどんは、グルテンネットワークが麺線方向に伸び、ちぎれたように破壊されていることが明らかとなった。一方、GO 添加うどんは、破壊方向に巻き込まれるようにグルテンネットワークが伸びた構造変化を起こすことが明らかとなった。以上より、TG 添加うどんはグルテンネットワークがちぎれるように破壊が起きたため荷重が大きく低下したと考えられる。一方 GO 添加うどんはグルテンネットワークが伸びた構造変化を起こすため荷重低下が小さかったと考えられる。さらに、食感とこれら破壊過程における構造・物性の変化との関係についても報告する。

food texture, transglutaminase, glucose oxidase

講演番号：2A12a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ A 校舎 12 会場

サトウヤシとサゴ澱粉の物理化学的性質の比較

Physicochemical Properties of Arenga and Sago Starches

アダヴィヤ デデ[1,2]、佐々木 朋子[1]、阿久澤 さゆり[3]、○神山 かおる[1]（[1]農研機構・食総研、[2]インドネシア・ボゴール農大・食品、[3]東京農大・応用）
Dede Adawiyah[1,2], Tomoko Sasaki[1], Sayuri Akuzawa[3], ○Kaoru Kohyama[1] ([1]NARO National Food Research Institute, [2]Bogor Agric. Univ., Indonesia, [3]Tokyo Univ. Agric.)

【目的】インドネシア等の熱帯地方では、ヤシ科植物が澱粉の主要な原料である。サゴ澱粉として市販されている中には、サゴヤシ（*Metroxylon sago*）由来の澱粉とサトウヤシ（*Arenga pinnata*）由来のものがある。サゴヤシ澱粉はサゴパールとしても知られ、粥や菓子等の食用澱粉として広く用いられており、研究報告も多い。一方、サトウヤシはシロップ原料となる樹液が採れなくなった後の幹から澱粉を取り、西ジャワ地方では家内工業的に伝統食品である麺類に利用しているが、サトウヤシ澱粉についての研究は少ない。昨年の本大会において、両澱粉を比較し、アミロース含量や糊化ピーク温度は同等だったが、サトウヤシ澱粉はサゴヤシ澱粉よりも糊化温度範囲が狭いこと、低濃度では粘性が低いが、高濃度では動的弾性率が高いゲルを形成することを報告した。本研究では、さらに両澱粉の物理化学的性質を比較し、サトウヤシ澱粉の特性を生かした利用法に資する。
【方法】西ジャワ産のサゴヤシ澱粉とサトウヤシ澱粉を試料に用いた。澱粉粒の形状を光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡（日立ハイテクノロジーズ製 SU-1510）で観察した。アミロペクチンの鎖長分布は HPAEC－PAD 法（Dionex 製 DX-500 使用）で分析し、X線結晶回折（島津製作所製 Maxima XRD 7000 使用）及び膨潤度の測定を行った。また、水分量 70%（w/w）の条件で示差走査熱量計（セイコー製 SSC5200H システムと DSC120 モジュール）を用いて糊化させた後 5℃に保ち、老化した澱粉の再糊化に伴う熱測定を行った。10%（w/w）濃度の澱粉ゲルを調製し、1mm/s で初期高さの 90%までの圧縮測定、及び 50%まで 2 回圧縮するテクスチャー測定（SMS 製 TA-XT*plus* 使用）を行った。
【結果と考察】サゴヤシ澱粉の形状は卵形の楕円形と球形が混在していたが、サトウヤシ澱粉は大粒子から小粒子まで観察され、その形状も流線形や不定形などであり、既報の澱粉粒とは著しく異なる形状であった。成分分析やアミロース量に差がなかったのに加えて、アミロペクチンの鎖長分布や、X線回折パターンに、両澱粉に有意な差異は認められなかった。糊化ピーク温度は 67℃付近で両澱粉間に差がなかったが、膨潤度は 70℃以上においてサトウヤシ澱粉の方が低く、糊化澱粉の保水力が低いことが示唆された。また糊化した澱粉のアミロペクチンの再結晶化の示差走査熱量分析結果より、サトウヤシ澱粉はサゴヤシ澱粉よりも老化が速く、最終的な再糊化エンタルピーが低値となることが示された。サトウヤシ澱粉ゲルは、サゴヤシ澱粉ゲルよりも圧縮歪 50%までは 2 倍程圧縮荷重値が高く、圧縮歪 60%付近で明確な荷重値の減少が観察され、破断したことを示した。サトウヤシ澱粉ゲルの力学特性は、硬くて脆いという特徴があった。

gelatinization, retrogradation, gel

講演番号：2A12a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ A 校舎 12 会場

口腔および咽頭部での野菜ジュースの嚥下時の挙動

Behavior of vegetable juice in the oral cavity and the pharynx at swallowing

○森高 初恵[1]、高松 のぞみ[1]、橘 宏美[1]、北出 昌美[1]、沢村 信一[2]、小林 誠[2]、矢作 裕子[2]、小野 高裕[3]、田峰 謙一[3]、堀 一浩[4]（[1]昭和女大院生、[2]伊藤園・中央研、[3]大阪大院歯、[4]新潟大院歯）
○ Moritaka Hatsue[1], Nozomi Takamatsu[1], Hiromi Tachibana[1], Masami Kitade[1], Shin-ichi Sawamura[2], Makoto Kobayashi[2], Yuuko Yasaku[2], Takahiro Ono[3], Kenichi Tamine[3], Kazuhiro Hori[4] ([1]Showa Women's Univ., [2]ITO EN LTD, [3]Osaka Univ., [4]Niigata Univ.)

【目的】食塊を安全に嚥下するためには、舌、喉頭蓋や咽頭部の連動した運動機能が重要となる。老化などにより円滑な嚥下機能が低下すると誤嚥が生じ、死亡率の極めて高い誤嚥性肺炎を発症する。現在、日本は超高齢社会となっており、誤嚥性肺炎のリスクを低減した食品が求められている。ヒトの嚥下過程において、口腔内では舌運動が最大の動力源となり、食塊は口腔から咽頭へと移動する。咽頭部では、気管口は喉頭蓋によって塞がれ、喉頭が前上方に挙上して生じる陰圧によって食塊は引き込まれる。誤嚥性肺炎のリスクを低減した食品開発のためには、このようなメカニズムによって生じる口腔内や咽頭部での食塊の状態あるいは食塊の刺激によって生じる生体反応を定量的に評価することが不可欠となるが、測定は極めて困難である。

本報告では、口腔内から咽頭部での一連の嚥下過程における食塊の全体像を把握するために、口腔内では舌と硬口蓋との接触様相を定量的に評価し、咽頭部においては超音波パルスドップラー法により食塊の移動状態を明らかにし、野菜ジュースの連続した嚥下過程について検討した。

【方法】250μm に粉砕したにんじんピューレ(以後、CP と表す)を 0、10、20、30%添加した CP 添加野菜ジュースを試料とした。舌圧は T 字型に 5 個の感圧点を配列した極薄型の舌圧センサシートをヒトの硬口蓋正中前部・正中中部・正中後部・後方周辺部に貼り付け、嚥下時に発生する舌圧をスワロースキャンにより解析した。咽頭部における食塊通過時の速度はパルスドップラー法により超音波画像診断測定装置を用いて測定し、あわせて 9 点尺度法による官能評価を実施した。

【結果】舌が硬口蓋に接触する時間は、どの CP 濃度においても硬口蓋正中前部は後部よりも長く、CP 濃度別では 30%CP 添加野菜ジュースが 0%よりも有意に長かった。舌が硬口蓋を最も強く押す最大舌圧は、30%CP 添加野菜ジュースが 0%よりも有意に強かった。官能評価においては、20% CP 添加野菜ジュースでは 0%、10%よりも、30%CP 添加野菜ジュースでは他のすべての CP 濃度ジュースよりも舌を硬口蓋に強く押しつけ、力を入れて飲み込むと評価された。咽頭部における最大速度は CP 添加濃度が増加すると有意に遅くなり、最大速度平均および速度平均も 30%CP 添加野菜ジュースでは 0%、10%よりも有意に遅い速度であった。以上の結果より、30%CP 添加野菜ジュースでは口腔内で舌運動によって長時間強い力が加わり咽頭部へ送り込まれ、その嚥下動作は有意に認識されるほど強く、また咽頭部では 0%、10%CP 添加野菜ジュースよりも食塊全体が遅い速度で通過することから、CP の野菜ジュースへの添加は誤嚥リスクの低減へプラスに作用することが示唆された。

vegetable juice, tongue pressure, maximum velocity in pharynx

講演番号：2A12a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ A 校舎 12 会場

シアン化水素の除去による梅酒中のカルバミン酸エチルの低減

Reduction of ethyl carbamate in *ume* liqueur by the removal of hydrogen cyanide

○橋口 知一、伊豆 英恵、松丸 克己 (酒総研)
○Tomokazu HASHIGUCHI,Hanae IZU,Katsumi MATSUMARU (NRIB)

【背景】カルバミン酸エチルは、発がん性及び遺伝毒性のある物質として知られており、各種の発酵食品や酒類に含まれている。国際がん研究機関(IARC)は、2007 年にカルバミン酸エチルの分類を Group 2A(probably carcinogenic to humans)に格上げしている。演者らは梅酒中のカルバミン酸エチルの低減を目的として、梅酒仕込時に脱酸素剤を使用して脱酸素状態として梅酒を製造したところ、最大でカルバミン酸エチルが 47%減少したことを報告している[1)]。カルバミン酸エチルが減少した理由は、主にシアン化水素の減少によるものと考えられている。この方法を梅酒メーカーの実仕込に適用するためには、密閉タンクが必要となり、開放タンクを用いる梅酒仕込には適用することができない。そこで、脱酸素剤の代わりにソーダ石灰を仕込容器の空間部に配置し、シアン化水素を除去しながら梅酒を製造したところ、カルバミン酸エチルを低減させることができたので報告する。
【方法と結果】解凍した冷凍梅 (2009 年和歌山県産南高梅)、氷砂糖、35%アルコールを 1 L のビーカーに仕込後、ビーカーの口にプラスチック製の網を乗せ、その網の上にソーダ石灰 20 g を入れたシャーレを置いた。さらに全体をプラスチック製のパウチ袋に入れ、30℃で 3 ヶ月間暗所に保存した。ソーダ石灰を配置した梅酒は対照と比較して、シアン化水素が 49%減少、カルバミン酸エチルが 16%減少した。次に、シアン化水素のさらなる除去を目的として、前述と同じ仕込条件で梅酒の浸漬中にマグネチックスターラーで攪拌 (300 rpm, 100 rpm) を 3 ヶ月行い、ソーダ石灰を取り除き、さらに 30℃で 5 ヶ月間暗所に保存した。攪拌した梅酒は対照と比較して、シアン化水素が 79%、カルバミン酸エチルが 70%減少した。OD_{430} は攪拌した梅酒で 0.334 (300 rpm)、0.355 (100 rpm) と対照の 0.389 より低くなった。pH は攪拌した梅酒で 3.1、対照は 3.0 であった。総酸は、攪拌した梅酒で 21.8(300 rpm)、21.9 (100 rpm)、対照で 22.3 であった。ベンズアルデヒドは攪拌した梅酒で 35.2 mg/L (300 rpm)、34.0 mg/L (100 rpm) と対照の 43.1 mg/L より低くなった。安息香酸エチルは、攪拌した梅酒で 0.57 mg/L (300 rpm)、0.55 mg/L (100 rpm)、対照で 0.57 mg/L であった。当所職員等 18 名による官能評価を行ったところ、攪拌した梅酒と対照では大差は見られなかった。

1) Hashiguchi T *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2060-2066 (2010)

ethyl carbamate, *ume* liqueur, hydrogen cyanide

講演番号：2A12a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ A 校舎 12 会場

埼玉県産小麦の香気成分分析

Flavor analysis of wheat in SAITAMA

○成澤 朋之[1]、小島 登貴子[1]、山田 昌治[2] ([1]埼玉産技セ北部研、[2]工学院大工)
○Tomoyuki Narisawa[1], Tokiko Kojima[1], Masaharu Yamada[2] ([1]SAITEC, [2]Kogakuin Univ.)

【目的】これまで埼玉県では麺用小麦として「農林 61 号」が主として栽培されてきた。この「農林 61 号」はオーストラリア産小麦「ASW」と比較して、独特な風味があるとして、長年にわたり一定の評価を受けてきた。しかし、「農林 61 号」はその誕生から 60 年以上経過しており、近年、反収が低下している。そこで、埼玉県では平成 26 年を目処に、新品種である「さとのそら」へ転換することが決定している。しかし、この「さとのそら」は製粉業者を始めとする実需者からは、風味が弱い・麺が作りにくいなどの問題が指摘されている。そこで、本研究ではガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）を用い、各種小麦粉およびその小麦粉から作られる生地の香気成分を分析することにより、それぞれの小麦粉の特徴を明らかにした。

【方法】小麦粉は採り口の異なる三種類の粉（一等粉、二等粉、および末粉）を用いた。各種小麦粉は処理を加えずに、そのまま測定に用いた。生地は、小麦粉：水：食塩＝50：25：2 の割合になるよう、小麦粉へ食塩水を加え、ビーカー中でかくはんすることにより調製した。粉や生地はそれぞれ 5g ずつバイアルビンにとり、100℃で熱平衡化したヘッドスペースの蒸気を GC/MS により分析した。

【結果】一等粉において検出された共通の主要な化合物は 1-ヘキサノール、2-エチル-1-ヘキサノールであった。他にノナナール、ベンズアルデヒド、3,5-ジ-t-ブチル-4-ヒドロキシトルエンなどがみられた。ノナナールやベンズアルデヒドは「ASW」や「さとのそら」ではあまりみられず、「あやひかり」や「農林 61 号」に比較的多くみられた。また、「農林 61 号」は生地にした際、粉と比べて 1-ヘキサノールの減少およびベンズアルデヒドの増加が顕著にみられた。この傾向は一等粉、二等粉、および末粉でも共通してみられた。ベンズアルデヒドは、単体ではアーモンド様の香気特性を示すことが知られている。以上の結果から、農林 61 号での風味があるという特徴はベンズアルデヒドに起因しており、生地にすることでベンズアルデヒドが増加していることから、他の品種とは異なる酵素活性が発現している可能性が示唆された。また、風味が弱いといわれている「さとのそら」はベンズアルデヒドや 1-ヘキサノール、2-エチル-1-ヘキサノールの組成が「ASW」と類似しているため、風味において大きな特徴がなく風味が弱いという評価につながったものと考えられる。

Flavor, GC/MS, wheat

講演番号：2A12a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ A 校舎 12 会場

調理時における塩の溶解性および浸透挙動の計測システムの開発

A novel measurement system for solubility and penetration behavior of the salt in cooking

○石川 匡子[1]、築舘 亜由美[2]、鈴木 晶[1]、菅原 弘人[1]、秋山 美展[1]（[1]秋田県立大生物資源、[2]秋田県立大院生物資源）
○Kyoko ISHIKAWA[1], Ayumi TSUKIDATE[2], Mihoshi SUZUKI[1], Hiroto SUGAWARA[1], Yoshinobu AKIYAMA[1] ([1]Biore., Akita Pref. Univ., [2]Dept. Grad. Sch. Biore., Akita Pref. Univ.)

【目的】塩は、調理において必要不可欠なものであり、味付けはもちろん、食感など物性にも影響を与える。現在、にがり成分含量が異なる塩、粒径が大きい塩など様々な塩が販売されており、これらを用いて焼き魚や漬物などの調理を行った際、塩味がまろやかになりおいしいといわれている。これは、塩の粒径並びに無機成分の違いにより、付着性や溶解速度が異なり、その結果食品内部への浸透性や食品内部との相互作用に影響を与え、味の違いになっていると考えられる。しかし、従来食品中の塩分濃度測定は、食品の水抽出液を用いた成分分析のみで、食品表面上の塩溶解挙動のような微量測定ならびに非破壊測定は不可能であった。そこで、本研究では、食品表面上での塩の溶解性および浸透度合を電気インピーダンスにより非破壊かつリアルタイムでモニタリングできる新規評価法について検討した。
【方法】インピーダンス測定には、LCR メーターを用いた（3532-50、日置電気（株））。試料には、寒天ゲルを用い、プラスチックセル（25 mm × 25 mm × 12 mm）およびガラスセル（25 mm × 25 mm × 50 mm）に流し固めテストピースを作製した。電極はステンレス電極を用い、塩の浸透挙動を調べる際は、電極を絶縁スプレーにて被膜し、一部分のみが寒天ゲルに直接接触できるようにしたものを用いた。塩を寒天ゲル上に一様に振り掛け、表面上および内部のインピーダンス値を測定した。同時に、食塩を振り掛けた後の寒天ゲルの塩化物イオン濃度を定量し、食塩の浸透挙動について確認した。
【結果】プラスチックセルを用い、食品表面上における食塩の溶解性をインピーダンス測定した結果、塩が溶解するのに伴いインピーダンス値が徐々に低下した。既知濃度の食塩水を寒天ゲル上に塗布した際のインピーダンス値と比較したところ、各々のインピーダンス値の相関は高く、本法にて食品表面上における食塩の溶解性を計測できることが明らかとなった。続いて、寒天ゲルの上部、中部、下部のみでそれぞれ直接寒天に接触できるように一部を被膜で覆ったステンレス電極を用い、寒天ゲル内への浸透挙動について検討した。その結果、電極の接触部位が上部から下部に移行するのに伴い、インピーダンス値が低下するまでの時間が長くなった。これは、塩がゲル下部に浸透するまでに時間がかかることを示唆している。実際に、寒天ゲルを上部、中部、下部に裁断し、各ゲルの塩化物イオン濃度を定量したところ、インピーダンス値が一定になるまでの時間と寒天ゲル中の塩化物イオン濃度は相関が高かった。以上の結果から、インピーダンス測定は、食品における塩の溶解性ならびに浸透挙動を非破壊かつリアルタイムでモニタリングできることが示唆された。

solubility, penetration, salt

講演番号：2A12a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ A 校舎 12 会場

水溶液中のグリシンオリゴマーの粘度 B 係数と部分モル比容の温度変化と水和数の解析
Effect of temperature on hydration number calculated from viscosity B-coefficient and partial molar volume for glycine oligomer in water

○佐藤 之紀[1]、岩切 恵梨奈[1]、花垣 恵[1]、宮脇 長人[2]([1]県立広島大生命環、[2]石川県大生資環)
○Yukinori Sato[1], Erina Iwakiri[1], Megumi Hanagaki[1], Osato Miyawaki[2] ([1]Pref.Univ. of Hiroshima, [2]Ishikawa Pref. Univ.)

【目的】25℃でのグリシン(Gly)の水和量は，L-アラニンや L-バリンなど比較すると小さい。しかし，Gly がペプチド結合してオリゴマーとなった際の水和量は多くなり，25℃では Gly-Gly-Gly＞Gly-Gly＞Gly の順であるが，温度による水和量への影響は知られていない。そこで，Gly オリゴマー水溶液中の溶質の水和層の大きさ（パラメータ h）を，5～40℃の温度範囲内で Gly などの h と比較した。
【方法】Gly，Gly-Gly，Gly-Gly-Gly のアミノ酸およびそのオリゴマー水溶液をそれぞれ 0-0.5 mol/L の濃度になるように調製し，キャノンフェンスケ粘度計と精密密度計（DMA 4500，Anton Paar）を用い，5～40℃の一定温度でそれらの水溶液の粘度（η_L）と密度（ρ）から粘度 B 係数(-)と部分モル体積 V_2 (ml/mol)を求めた。常法にしたがい，粘度 B 係数はアミノ酸水溶液の η_L と蒸留水の粘度 η_0 の比と質量モル濃度 m の関係式から求め，見かけのモル体積（ϕv）の算出式を c→0 に外挿して V_2 とした。B と V_2 値から，アミノ酸の水和パラメータ h を h (mol/mol) = (1000B/2.5－V_2) /18 の式から求めた。
【結果】水和数を示す水和パラメータ h は，粘度 B 係数と部分モル体積 V_2 の関数である。そこで，まず，温度別の粘度 B 係数を調べたところ，Gly 水溶液では温度上昇とともに粘度 B 係数は上昇したが，Gly オリゴマー水溶液の粘度 B 係数には温度の影響はほとんどみられなかった。同一温度での Gly 水溶液の粘度 B 係数は Gly-Gly や Gly-Gly-Gly に比べると小さく，Gly-Gly-Gly の粘度 B 係数は Gly-Gly のそれよりも大きな値を示した。これらは，ペプチド結合の形成による水和量の上昇とそれらの温度による影響を意味している。一方，V_2 の温度変化を調べたところ，どの分子種でも温度が上昇すると V_2 値は高くなったものの，数 ml/mol ほどであった。同一温度で比較した場合，Gly-Gly-Gly＞Gly-Gly＞Gly となり，オリゴマーの重合度と V_2 は対応していた。これらの粘度 B 係数と V_2 値から水和パラメータ h を算出したところ， Gly の水和パラメータ h は， 温度上昇に伴って上昇したことから，低温で h が高くなるスクロースなど糖の h の水中での温度依存性とは逆の温度依存性を示した。一方， Gly オリゴマーの水和パラメータ h は，明らかな温度変化を示さなかった。これらは，水和パラメータ h は粘度 B 係数と V_2 の関数であるが，h は水溶液の粘度 B 係数の影響を大きく受け，温度上昇に伴う粘度 B 係数の増加傾向がみられる Gly では温度上昇とともに h は高くなったものの，Gly オリゴマーでは粘度 B 係数の温度変化が明確でなかったため h にも温度による影響はほとんどみられなかったと考えられた。

viscosity, partial molar volume, hydration

講演番号：2A12a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ A 校舎 12 会場

食品高分子のゾルゲル転移に及ぼす水分活性の影響
Effect of water activity on sol-gel transition of food macromolecules
○松平 景子、宮脇 長人（石川県大院生資環）
○Keiko MATSUHIRA,Osato MIYAWAKI (Ishikawa Pref. Univ.)

【目的】寒天、ゼラチン、ペクチン、カラギーナンなどゾル・ゲル転移の性質を示す食品は多く存在する。ゼラチンはコラーゲンの部分分解物であり、ゾル・ゲル転移はランダムコイル⇆三重らせん構造の状態変化である。カラギーナンは直鎖含硫黄多糖類の一種で、紅藻類から得られる。カラギーナン水溶液において、その物理的性質は、カラギーナンの硫酸基による静電的相互作用および、分子間水素結合などにより強く影響される。本研究では、κ-カラギーナン、ゼラチンのゾル･ゲル転移に及ぼす水分活性の影響について検討した。
【方法】種々濃度のスクロース、グルコース、リボースなどの糖類、および尿素などの低分子溶液中における0.5%κ-カラギーナンまたは5%ゼラチンのゾル・ゲル転移挙動を高感度示差走査熱量計(Micro DSCⅢ, Setarum)により解析した。また、0.5%κ-カラギーナンにおいてはB型粘度計(BLアダプタ,東京計器)により低分子溶液濃度や温度を変化させκ-カラギーナン溶液の粘度変化を測定し、κ-カラギーナンのゾル・ゲル転移挙動を解析した。溶液の水分活性は精密氷点降下測定により求めた。
【結果】熱分析結果より、κ-カラギーナンのゾル・ゲル転移温度はKCl濃度に依存し、KCl濃度が上昇すると転移温度が上昇した。κ-カラギーナン、ゼラチン共に、スクロース、グルコースなどの糖を加えるとゾル・ゲル転移温度が上昇、ゲルが安定化し、リボースを加えた場合、ゾル・ゲル転移温度はほとんど変化せず、尿素を加えた場合は、ゾル・ゲル転移温度は下降し、ゲル状態が不安定化した。この低分子共存溶質によるゾル・ゲル転移挙動に及ぼす影響は、水分活性による高分子水和状態に及ぼす影響と、共存低分子の高分子への直接結合による影響のバランスによることが示唆された。
熱分析の結果に基づき、van’t Hoff 式を適用してゾル・ゲル転移曲線を推定した結果 κ-カラギーナン、ゼラチンのゾル･ゲル転移は、狭い温度範囲での急激な変化であることがわかった。また、B 型粘度計による κ-カラギーナンの粘度変化は、ゲル化点近傍では直角双曲線で表すことができ、熱分析の場合と同様に狭い温度範囲で急激な変化を示すことがわかった。
以上のゾル・ゲル転移挙動を RNase のアンフォールディングに伴う熱変性曲線[1)]と比較すると、共存低分子溶質の存在による水分活性の影響はほぼ同様である一方、高分子のゾル・ゲル転移は RNase の熱変性と比較して温度範囲の狭い急激な変化であり、このことは分子量の違いによるモル当り状態変化エンタルピーの違いを反映しているものと思われた。
【文献】1)O.Miyawaki, Biochim. Biophys. Acta, **1774**, 928(2007)

food macromolecule, sol-gel transition, water activity

講演番号：2A12a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ A 校舎 12 会場

水溶液中におけるアスコルビン酸の酸化反応の速度論的解析

Kinetic analysis of oxidation of ascorbic acid in aqueous solution.

○井上 絵里加、宮脇 長人（石川県大院生資環）
○Erika INOUE,Osato Miyawaki (Ishikawa Pref. Univ.)

【緒言】アスコルビン酸(AsA)は食品中において、栄養素としてのみならず抗酸化剤としても機能しており、その加工や貯蔵の際における安定性は実用上重要な意義を有している。本研究では AsA の熱安定性に及ぼす環境要因として温度、pH、酸素濃度などを選択し、それぞれが AsA に及ぼす影響について解析した。

【実験方法】pH6.0 又は pH8.0 の 15/M リン酸緩衝液を用いて，アスコルビン酸ナトリウム 0.15g/L の試料を 100ml 作製した。試料を温度 40℃、50℃、60℃、または 70℃に設定した恒温槽に浸漬したリフラックス付き三口フラスコ内で酸素濃度を 0%(N_2)、5%、20%(Air)、50%、または 100%に変化させたガスを通気しながら AsA 酸化反応を行い、一定時間ごとに試料をサンプリングした。また、温度条件は同様で、最初にそれぞれのガスを短時間通気後、密閉条件での反応も行い、この場合、必要に応じて酸素電極を用い、O_2 濃度変化のモニタリングも行った。分析は HPLC (PU-980 HPLC Pump, UV/VIS Detector, JASCO; Inertsil-NH_2 HPLC column, 4.6x250mm, GL Sciences)を用い、移動相（acetonitrile:H_2O:acetic acid=87:11:2）、流速 2ml/min、検出波長 UV243nm、温度 40℃の条件で、還元型 AsA 濃度を測定した。

【結果】AsA 酸化反応は酸素濃度 0%ではほとんど進行せず、反応速度は酸素濃度に強く依存した。通気条件による酸素濃度一定条件において反応速度は零次反応で記述でき、反応速度定数は酸素濃度に比例して変化した。零次反応速度定数の温度依存性はアレニウス型であり、これより求めた活性化エネルギーは 40～60kJ/mol であった。

一方、通気をしない密閉条件下での AsA 酸化反応は一次反応的な挙動を示し、反応の進行に伴う AsA 濃度の低下に伴い、酸素濃度も低下することがわかった。

AsA 酸化速度は pH にも強く依存し、pH が高いほど反応速度は大きくなった。

以上の AsA 酸化反応の速度論的解析結果は、これまで報告されている AsA は OH イオンによってモノアニオンとなり、その後さらに分子状酸素で酸化されてラジカルを経てデヒドロアスコルビン酸へと分解されていくメカニズム[1)]により良好に説明することができた。

【文献】1) S. R. Tannenbaum et al, Food Chemistry, ed. by O. R. Fennema, p.490, Marcel Dekker, NY (1985).

ascorbic acid, oxidation, kinetics

講演番号：2A12a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ A 校舎 12 会場

タンパク質凍結変性の速度論的解析
Kinetic analysis of protein freeze-denaturation
○西野 裕貴、宮脇 長人 (石川県大生資環)
○Hiroki Nishino,Osato Miyawaki (Ishikawa Prefectural Univ.)

【はじめに】　水溶液の凍結は、水の凍結と同時に塩や酸の濃縮による pH 変化、分子内疎水性相互作用変化、SS-SH 交換反応等の諸変化を伴う。本研究では凍結の際に起こるミクロな凍結濃縮に着目し、凍結濃縮が引き起こすタンパク質の凍結変性機構の解明を試みた。タンパク質の凍結変性は、凍結の際の氷結晶生成による凍結濃縮による濃縮部分が反応場となり、タンパク質変性が開始・進行する。本研究では、分離大豆タンパク質(SPI)の凝集と乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の活性に及ぼす凍結の影響ならびにそれに対する各種共存物質による凍結濃縮への影響について検討した。
【方法】分離大豆タンパク質(SPI)の凝集　試料は分離大豆タンパク質(ニューフジプロ,不二製油)0.032,0.064,0.128w%水溶液にスクロースを 0w%, 0.01w%, 0.03w%,0.1w%となるように添加したものを使用した。分離大豆タンパク質溶液を-5℃, -18℃,-40℃の各温度で、凍結・保存し、一定間隔ごとに取り出して、室温で解凍し、SPI変性タンパク質濃度を分光光度計 600nmにおいて測定した。さらに、遠心分離をし、変性タンパク質を沈殿除去した後、吸光度 280nmで上清中の未変性タンパク質濃度を測定した。
乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の活性に及ぼす凍結の影響　試料はLDH水溶液(0.0043 mg protein/ml酵素希釈溶液)にTris-HClが 0M,0.025M、ならびに$CaCl_2$を 0M,0.05M,0.15Mとなるように添加したものを使用した。上記試料を-5℃, -18℃,-40℃の各温度で凍結・保存し、一定間隔ごとに取り出して、室温で解凍後、酵素活性を測定した。
【実験結果および考察】　凍結大豆タンパク質溶液の変性タンパク質濃度は時間依存的に上昇し、上清中の未変性タンパク質濃度は、時間依存的に減少したことから、大豆タンパク質凍結変性は速度過程であることがわかった。未変性 SPI 終濃度は SPI 濃度に依存せず、温度に強く依存した。変性 SPI 終濃度は、SPI 濃度および温度の両方に強く依存した。凍結 SPI 溶液にスクロースを入れると、変性が抑制された。このことから、スクロースは反応に必要な水を奪うことで、ミクロ凍結濃縮における濃縮率を低下させ、結果的にタンパク質変性を抑制させたと推定される。
　一方、凍結 LDH 溶液の活性変化は凍結開始とともに進行し、時間依存性が小さいことがわかった。このことから、凍結変性は凍結濃縮が引き金となることで起こることがわかった。凍結 LDH 溶液に$CaCl_2$と添加すると、活性が低下した。このことは、Ca^{2+}の濃縮によるタンパク質架橋反応の影響を受けたと推定される。

freeze-denaturation, soyprotein, Lactate Dehydrogenase

講演番号：2A12p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ A 校舎 12 会場

米粉パンの老化に及ぼすアミロペクチン再結晶化の影響

Effect of amylopectin retrogradation on rice flour bread staling

○佐々木 朋子、神山 かおる、宮下 香苗、奥西 智哉（(独）農研機構・食総研)
○Tomoko Sasaki,Kaoru Kohyama,Kanae Miyashita,Tomoya Okunishi (NARO, NFRI)

【目的】パンの老化は品質劣化の主たる要因であるため、老化の程度を適切に評価し、その制御要因を明らかにすることが、パンの品質向上のためには不可欠である。本研究では、アミロース含量の異なる米粉を使用した米粉パンについて、老化にともなうかたさの変化とアミロペクチンの再結晶化の関連性を解析した。さらに米粉パンの調製に用いた米粉と小麦粉をブレンドしたゲルを調製し、アミロペクチンの再結晶化に及ぼすブレンドの影響、およびゲルとパンにおけるアミロペクチンの老化の関連性を明らかにすることを目的とした。
【方法】3 品種（ひとめぼれ、ミルキークイーン、マンゲツモチ）の米粉を小麦粉に 30%配合した米粉パン、および対照試料として小麦粉 100%のパンを焼成後、0-4 日間室温で保存した試料を解析に用いた。テクスチャーアナライザー(TA-XT Plus, SMS)を用いて圧縮試験を行い、パンのかたさを測定した。さらにパンのクラムを直接容器に入れ、糊化時の吸熱ピークを DSC（示差走査熱量測定装置、セイコーインスツル（株））によって解析した。また、同じ米粉を用いて、米粉と小麦粉をブレンド(30:70)した試料について 40%(w/w)ゲルを調製し、ゲルに含まれている澱粉の老化にともなう吸熱エンタルピーの変化を DSC によって解析した。
【結果】クラムの糊化時の吸熱エンタルピーは、パンの老化と共に増加する傾向が認められた。保存期間3日までは小麦粉100%のパンのエンタルピーが最も高かったが、4日目は逆転し、すべての米粉パンよりも低い値を示した。米粉パンの中ではマンゲツモチ（糯米）が保存期間を通して低い値を示した。かたさの指標となる変形率25%下での圧縮応力値の経時変化とクラムの糊化時の吸熱エンタルピーの変化を比較すると、試料間の違いは異なる傾向を示した。マンゲツモチの米粉パンはかたさおよびエンタルピー共に、増加の速度が遅く、他のパンに比べてアミロペクチンの再結晶化および硬化が遅いことが明らかになった。次に、米粉、小麦粉、および両者をブレンドしたゲルの吸熱エンタルピーの経時変化を比較した。ひとめぼれとミルキークイーンの米粉から調製したゲルの吸熱エンタルピーは、小麦粉ゲルよりも急速に増加したが、マンゲツモチのゲルはエンタルピーの増加が遅く、クラムと同様の傾向を示した。一方、米粉と小麦粉をブレンドしたゲルについてはいずれも小麦粉単独より低い値を示し、エンタルピーの増加速度も遅かった。その試料間の違いはクラムの吸熱エンタルピーの経時変化と同様の傾向を示した。米粉あるいは小麦粉100%の試料と比べて米粉と小麦粉をブレンドした試料はアミロペクチンの再結晶化が抑えられ、澱粉の老化が遅くなることが示唆された。

rice flour bread, staling, amylopectin

講演番号：2A12p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ A 校舎 12 会場

国産超強力小麦から分離したグルテンの添加による製パン性の改良

Improving of breadmaking property by addition of gluten isolated from domestic extra strong wheat

○長澤 幸一[1]、西尾 善太[1]、伊藤 美環子[1]、村山 隆二[2]、金藤 岳夫[2]、田引 正[1]([1]農研機構　北農研、[2]長田産業)
○Koichi NAGASAWA[1], ZENTA NISHIO[1], MIWAKO ITO[1], RYUICHI MURAYAMA[2], TAKEO KANAFUJI[2], TADASHI TABIKI[1] ([1]NARO Hokkaido Agricultural Reseach Center, [2]Nagata Industry)

【目的】グルテンは、品質改良剤として小麦製品、水産ねり製品等に幅広く使用されている。製パンにおいては、製パン性の向上等を目的として添加されている。演者らは、国産の規格外小麦の有効利用を最終目標として、国産原料から優れた製パン改良効果を有するグルテンの創出を試みてきた。その原料として、製パン性への寄与が大きいグルテニンサブユニット組成を持つ超強力小麦が望ましいと考えた。超強力小麦「ゆめちから」は、生地の強さや製パン性への寄与が大きい[1)]とされる *Glu-D1d* と *Glu-B3b* 遺伝子にコードされるグルテニンサブユニット組成を持つ。タンパク質含量が高く、高収率でグルテンが回収できる利点もある。「北海 262 号」は、その組成が異なる（*Glu-D1d* と *Glu-B3g* 遺伝子の組合せ）が、同様に生地の強さや製パン性への寄与が大きいとされる組合せを持つ[1)]。本研究では、これらグルテンの添加による製パン改良効果を検討し、さらに、グルテニンサブユニット組成との関係について検討することを目的とした。
【方法】グルテンはマーチン法で調製した。小麦粉 500ｇに蒸留水 280～300 ml を加えて生地を形成し、蒸留水で生地の澱粉を洗い流して生グルテンを得た。それを凍結乾燥、粉砕し、乾燥グルテンを得た。原料の小麦粉には超強力小麦「ゆめちから」、「北海 262 号」のものを用い、比較には市販の強力粉(カメリヤ・日清製粉)から分離したグルテン（「カメリヤ」グルテンとする)、市販乾燥グルテン（SIGMA 社製）を用いた。得られたグルテンの化学的特徴について、溶解性、起泡性の測定により検討した。製パン試験は、食パンの基本配合に対し、グルテンを対粉 2.0%、3.5%置換添加して行った。パンの評価は、外観、比容積、クラムの物性測定、老化試験により行った。
【結果】グルテンの弱酸性溶媒に対する溶解性は、「カメリヤ」、「ゆめちから」、「市販乾燥グルテン」、「北海 262 号」のグルテンの順に高かった。起泡性は、いずれも同程度であった。製パン試験の結果、グルテン 3.5%添加のパンの比容積は、無添加のものに対し、市販乾燥グルテン添加で 1.10 倍、「カメリヤ」グルテン添加で 1.14 倍、「ゆめちから」グルテン添加で 1.22 倍、「北海 262 号」グルテン添加で 1.19 倍であった。これより、「ゆめちから」のグルテニンサブユニット組成を持つグルテンの添加が製パン性の向上に効果的と考えられた。このことは、小麦粉での製パン試験の結果[1)]と一致した。パンの老化は、いずれのグルテンの添加によっても老化抑制効果が認められた。特に「北海 262 号」グルテンの添加が効果的であり、グルテニンサブユニット組成の違いが影響していると考えられた。

１）Ito et.al. *Breeding Science* 61, 281-287 (2011)

gluten, wheat, bread

講演番号：2A12p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ A 校舎 12 会場

アルギン酸類の製パン性への影響について

Effects of Alginates on Breadmaking Properties

○茂木 菜月[1]、宮島 千尋[1]、笠原 文善[1]、田原 彩[2]、諏訪 知世子[2]、瀬口 正晴[2] ([1]株式会社キミカ、[2]神女大・家政)

○Natsuki MOKI[1], Chihiro MIYAJIMA[1], Fumiyoshi KASAHARA[1], Aya TABARA[2], Chiyoko SUWA[2], Masaharu SEGUCHI[2] ([1]KIMICA Corporation, [2]Kobe Women’s University)

【目的】昆布、わかめ等の褐藻類中、乾燥藻体の 30-60％を占めるアルギン酸類を小麦粉にブレンドして製パン試験を行ない、各アルギン酸類の製パン性（パン高、比容積）に与える影響を検討した。

【方法】アルギン酸（2種）、アルギン酸プロピレングリコールエステル（3種）、アルギン酸ナトリウム（4種）、アルギン酸カルシウム、アルギン酸アンモニウム、アルギン酸カリウムの 12 種類の粉体を小麦粉に最大 5%までブレンドする。ファリノグラフから小麦粉吸水率を測定後、これまでの方法（1）で製パン試験を行なう。

【結果】 12 種類のアルギン酸類の内、アルギン酸エステル（4種）はいずれも 1.5%付近のブレンドで製パン性の最大の改良効果が認められた。4 種のアルギン酸ナトリウムのうち粘性の高い順に、3 種のブレンドで多少の改良効果が認められた。アルギン酸カリウム、アルギン酸アンモニウムのブレンドでは添加効果は認められなかった。アルギン酸カルシウム、アルギン酸のブレンドでは製パン性が低下した。

(1) Cereal Chem. 87:231-236, 2010.

Alginates, Breadmaking, Propylene glycol alginates

講演番号：2A12p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ A 校舎 12 会場

乾熱処理小麦粉による小麦粉／水、およびオイル懸濁液の示すアミログラフ粘度変化（室温）について

Change of viscosities (at room temperature) of dry-heated wheat flour/water, or oil in amylograph profiles

○田原 彩[1]、米山 瑤子[1]、松井 悠子[2]、井上 琢也[2]、瀬口 正晴[1]（[1]神女大家政、[2]森永製菓（株））
○Aya TABARA[1], Yoko YONEYAMA[1], Yuko MATSUI[2], Takuya INOUE[2], Masaharu SEGUCHI[1]
([1]Kobe Women’s University, [2]MORINAGA & Co., LTD)

【目的】乾熱処理（120℃）は薄力小麦粉に様々な変化を与えること（乾熱処理小麦粉中のデンプン粒の親油化（疎水化）[1)]、プライムスターチ区分とテーリングス区分の相互作用 [2)]、パンケーキの弾力性 [3)]やカステラ容積の増加 [4)]）が知られている。本研究では、乾熱処理が小麦粉にもたらす変化の原因について、小麦粉の親水化、疎水化の面から検討した。
【方法】小麦粉をアルミホイルで作ったトレー（30×24×3 cm^3）上に 5mm 厚さになるよう均等に入れ、オーブン中で 40、50、60、70、80、90、100、110、120℃、各 120 分間乾熱処理する。各小麦粉（165g）と一定量（135mL）の水をアミログラフカップ（直径 9cm、深さ 11cm）に入れ、粘度がプラトーになるまで室温でアミログラフ試験を行い、その最終粘度を測定する。さらに小麦粉（170ｇ）とオイル（サラダ油）との懸濁液の粘性変化も検討するため、水の代わりにオイル（130mL）を加えて同様の実験を行う。
【結果】小麦粉／水、小麦粉／オイル懸濁液は、小麦粉の乾熱処理温度の上昇に伴って、何れも室温で粘度上昇が認められた。なお、小麦粉／水懸濁液の乾熱処理温度と粘度の関係から、90℃付近で変曲点の存在が確認された。小麦粉の親水化の原因は不明だが、親油化の原因はデンプン粒表面の親油化が推察された。

1) Cereal Chem. 61:248-250, 1984. 2) Cereal Chem. 85:626-628, 2008. 3) Food Sci. Technol. Res. 12:167-172, 2006. 4) Food Sci. Technol. Res. 14:431-436, 2008.

Dry-heated wheat flour, Viscosity, Amylograph

講演番号：2A12p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ A 校舎 12 会場

冷凍ドウによる製パン性劣化と多糖類添加によるその回復について

Recovery of defeated breadmaking properties by frozen dough to them by the addition of polysaccharides

○瀬口 正晴、森元 直美、今岡 奈月、田原 彩（神戸女子大）
○Masaharu Seguchi,Naomi Morimoto,Natsuki Imaoka,Aya Tabara (Kobe Women's Univ.)

【目的】冷凍ドウを用いて製パンを行なうと製パン性（パン高、比容積）は極めて劣化する事が報告された。解凍したドウ表面からしみ出る水量と製パン性との間に大きな負の相関性があった(1)。解凍ドウに砂糖、イーストを加え、撹拌、醗酵を取り入れた製パンを行なうと、製パン性の回復がわかった(2)。今回各種多糖類をこのドウに 5%添加し、冷凍ドウによる製パン性劣化を改良することを研究目的とした。

【方法】多糖類として 14 種類（ローカストビーンガム、グアーガム、キサンタンガム、タマリンドシードガム　ネイティブ型ジェランガム、特殊デキストリン、LM ペクチン、発酵セルロース、CMC、κ-カラギーナン、こんにゃく加工品、HM ペクチン、ι-カラギーナン、λ-カラギーナン）を用いた。冷凍、解凍、製パン法はこれまでの方法で行なった。

【結果】冷凍解凍ドウによる製パン試験の結果、14 種類の多糖類のうち、製パン性劣化改良効果があったのはグアーガム、キサンタンガム、タマリンドシードガムであり、特殊デキストリン、こんにゃく加工品もわずかに劣化改良効果があった。そのなかでもキサンタンガムはその効果が顕著に認められた。冷凍時間を 1 日、3 日、6 日としても製パン性の劣化改良効果は変わらなかった。解凍ドウからしみ出る水量も認められず、キサンタンガムの保水性の大きいことが認められた。

(1) Cereal Chem. 80:264-268,2003. (2) Cereal Chem. 88:409-413, 2011.

frozen dough, breadmaking properties, polysaccharides

講演番号：2A12p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ A 校舎 12 会場

真空冷却パンの品質に及ぼすパンクラムの冷却速度の影響について

Influence of a cooling rate on the quality of vacuum-cooling bread

○野口 智弘[1]、伊藤 康平[2]、早崎 美衣奈[3]、伊賀 大八[4]、井上 好文[4]、内野 昌孝[3]、高野 克己[3] ([1]東京農大応生・食加技セ、[2]東京農大院農・農化、[3]東京農大応生・化学、[4]日本パン技研)
○Tomohiro Noguchi[1], Kouhei Itou[2], Miina Hayasaki[3], Daihachi Iga[4], Yoshifumi Inoue[4], Masataka Uchino[3], Katsumi Takano[3] ([1]Dept. Appl. Biosci. FPC Tokyo Univ. Agr., [2]Agrichem., Agr., Grad. Sch. Tokyo Univ. Agr., [3]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Biosci., Tokyo Univ. Agr., [4]Japan Institute of Baking)

【目的】

焼成したパンを真空下で冷却すると、水分が急速に蒸発すると共に蒸発潜熱によりパン内部の冷却が促進される。このことにより、製パン工程において冷却時間の劇的な短縮が可能となる。また、真空冷却を施した食パンは、クラムが柔らかく、通常の製品よりもその柔らかさが維持されるとされ、近年ヨーロッパにおいて真空冷却技術を利用したパンがシェアを伸ばしている。しかし、真空冷却によるクラムのソフト化のメカニズムの詳細は解明されていない。我々はこれまでに、常圧冷却パンと真空冷却パンとの間に水分量や水分活性に大きな差異がないものの、真空冷却パンはクラムの気泡率が高く膜厚が薄いこと、さらにはタンパク質の水溶化度が高いこと等を報告している[1)]。そこで、本研究では冷却方法の差異によるこれらの事象とパン品質との関係性を解明するため、パン焼成後の保持熱の影響によるクラム物性と成分変化について検討を行った。

【方法】

角型食パン（70%加水）をノータイム法にて調製し、焼成直後に真空冷却（35hPa、120 秒間）を行ったものと、焼成直後のパンをオートクレーブバックに包み 125℃で 0～60 分間保温後、常圧冷却（1013hPa、90 分間）したものを試料とした。パンの水溶性成分分析は、パンを 2cm 厚にスライスし中央部を採取後、純水を加え超音波ホモゲナイザーにて破砕後、遠心分離にて得られた上澄液中のタンパク質量を Lowry 法にて測定した。また、パンの吸水特性試験は、パンを 3cm の立方体にカット後、水に浸漬し圧縮試験による物性測定を行った。

【結果】

パン焼成後の熱がタンパク質の溶解性に与える影響を検討したところ、焼成後直ちに真空冷却を行った試料（真空）では、タンパク質の溶出量は 64.7（mg/パン乾物 1g）であったのに対し、焼成後保温せずに常圧冷却（常圧）を行った試料では、53.3（mg/パン乾物 1g)、保温 30 分、60 分ではそれぞれ 39.4、37.5（mg/パン乾物 1g）となり、保温時間が長くなるにつれて減少した。次に、パンクラムの吸水特性を解析するため、パンの吸水後の物性を測定したところ、真空および常圧共に吸水によって圧縮試験による 50%応力は低下し、その低下率は常圧に比べ真空が大きく、吸水後の物性がよりソフトになることが示唆された。

1）日本食品科学工学会第 59 回大会講演要旨集 P173

vacuum-cooling, bread

講演番号：2A12p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ A 校舎 12 会場

スパゲティの香気成分と製造工程の関係について
Relationship between flavor compounds and processing of spaghetti
○山田 昌治、岩瀬 翔太郎、海老名 めぐみ、杉山 健二郎（工学院大学工）
○Masaharu YAMADA,Shotaro IWASE,Megumi EBINA,Kenjiro SUGIYAMA (Kogakuin Univ.)

【目的】スパゲティはデュラム小麦由来の粗挽き粉（セモリナ）を水とともに混練し、押し出し成形して乾燥させたものであり、生スパゲティと異なりアルデンテの食感を楽しむ食品である。スパゲティは茹であげると独特なグリーンな香気が生じ、ソースを絡めたときにスパゲティ料理の総合的な香りを形成している。イタリアには多くのスパゲティメーカーがあり、各々独自の工程で製造しており、その工程がスパゲティの香気に影響を与えている。スパゲティの製造工程で、スパゲティの香気に大きな影響を与えるのは乾燥工程である。本研究では、スパゲティの乾燥工程と最終的な乾燥スパゲティの香気との関係を把握するため、GC/MS を用いて様々な温度で乾燥させたスパゲティのゆで上げ時の香気を測定し、香気の特徴を調べるとともに乾燥条件との関係について考察した。
【方法】カナダ産のデュラムセモリナ粉と水を 2:1 の割合でミキサーを用いて 5 分間混ねつし、パスタマシンによって製麺した。その後、通風型乾燥機を用いて 40、60、80、および 100℃でそれぞれ 5 時間乾燥させた。でき上がった乾燥スパゲティについて、ゆで上げ条件を一定にしてゆで上げた麺線を一定時間放冷し、バイアルビンに充てんしてヘッドスペース型 GC/MS で香気成分の分析を行った。
【結果および考察】
測定したスパゲティすべてに共通した 15 種類の香気成分がみられた。そのうちアルデヒド類 9 種類、アルコール類 3 種類、ケトン類 1 種類の計 13 種類は主にデュラム小麦に含まれる香気成分であり、各成分量を数値化したところ、乾燥温度との相関性はなかった。
一方、上記以外の 2 種類（2-pentylfuran, benzaldehyde）は乾燥温度の上昇による成分量の増加がみられたため、乾燥工程由来の香気成分であると思われる。2-pentylfuran はメイラード反応によって発生する香気成分であり、官能的には甘い香りと位置づけられている。benzaldehyde は主にメイラード反応の副反応であるストレッカー分解により発生した生成物であり、官能的にはアーモンド様の香りと位置づけられている。乾燥温度が上昇することでメイラード反応がより進行し、これらの加熱香気成分の成分量が増加したと考えられる。
以上の結果から、スパゲティの乾燥工程で、乾燥温度が高くかつ長いほどメイラード反応由来の香気成分が強くなり、逆に低くかつ短いほど穀物由来の香気成分が際立ってくると考えられた。
本研究では、イタリアの代表的なメーカーの乾麺についても香気分析を行いその特徴を調べた。

flavor, processing, spaghetti

講演番号：2A12p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ A 校舎 12 会場

高温乾燥によるパスタの食感の変化には澱粉自体の変化も寄与する

Durum starch properties contribute to change of pasta texture during high-temperature drying

○小林 佳祐、中村 卓（明治大院農・農化）
○Keisuke Kobayashi,Takashi Nakamura (Meiji Univ.)

【目的】パスタにおいて食感は美味しさを決める重要な要因である。パスタはデュラムセモリナに水を加え、混合・混練、押出し成型、乾燥過程を経て製造される。なかでも乾燥過程ではパスタのひび割れを防ぐために加熱温度・相対湿度をコントロールした乾燥が行われており、その乾燥条件の違いでパスタの食感は大きく異なると言われている。この乾燥過程ではタンパク質が高分子量化することが明らかとされている。しかし、乾燥過程は主成分である澱粉についても物理的な加工をしている場だと考えられるが、その変化についていまだ明らかとなっていない。今までの実験から高湿加熱処理(パスタ乾燥条件)することにより澱粉の糊化特性が変化すること[1)]また、そのメカニズムについて明らかにしてきた[2)]。しかしながら、高湿加熱処理によって生じた糊化特性の変化がどのように食感に影響を与えるかはいまだ明らかとなっていない。そこで本実験では茹でパスタをモデルとした澱粉ゲルを作成し、澱粉ゲルの破断物性と食感への高湿加熱処理の影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】デュラムセモリナからマーチン法を用いて澱粉を単離した。単離したデュラム澱粉(DS)の水分含量を 30%に調整し、加熱温度（80～90℃）と相対湿度（70～90%）の条件を組み合わせて恒温恒湿で加熱処理した。この処理澱粉を 0.15%キサンタンガム溶液に固形分濃度 30%となるように混合し、澱粉懸濁液を作製した。作製した懸濁液を 100℃で 10 分間加熱、0℃で 10 分間冷却し、澱粉ゲルを作製した。このゲルをクリープメータにて破断強度試験、テクスチャー試験をおこなった。さらに、順位法を用いた官能評価をおこなった。
【結果】茹でパスタをモデルとした澱粉ゲルについて破断強度試験の立ち上がり荷重、もろさ荷重は未処理に比べて、高湿加熱処理することで増加した。また、加熱温度・相対湿度が高いほど立ち上がり荷重、もろさ荷重が増加する傾向が見られた。テクスチャー試験の付着性において未処理よりも高湿加熱処理することで付着性が減少した。また、加熱温度・相対湿度が高いほど付着性が減少した。官能評価では、かたさ、歯切れ、付着性について評価した。未処理に比べ高湿加熱処理したゲルのかたさ、歯切れのスコアが高く、付着性のスコアが低くなった。また、加熱温度・相対湿度が高いサンプルほどかたさ、歯切れのスコアが高く、付着性のスコアが低くなった。官能評価でのかたさは破断強度試験の立ち上がり荷重、歯切れはもろさ荷重、付着性はテクスチャー試験の付着性と相関がみられた。これらの結果よりパスタの高温高湿乾燥過程でも同様に澱粉粒の膨潤が抑制され、その変化はパスタの食感をサックリとしたものにしている可能性が示唆された。

1) 第 58 回食品科学工学会大会要旨集 p. 64(2011)
2) 日本農芸化学会 2012 年度大会

starch, pasta, sensory evaluation

講演番号：2A12p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ A 校舎 12 会場

異なる品種における米内在性デンプン分解酵素の米粒内分布

Distribution of starch degrading enzymes in rice grains of different cultivars

○大倉 哲也[1]、露久保 美夏[2]、香西 みどり[2]([1]食総研、[2]お茶大院・人間文化)
○Tetsuya OOKURA[1], Mika TSUYUKUBO[2], Midori KASAI[2] ([1]NFRI, [2]Ochanomizu Univ.)

【目的】炊飯中の還元糖の増加は飯の食味に影響を与えるが、デンプン分解酵素の米粒内の局在については不明な点が多い。本研究では異なる品種の生米粒において、炊飯時の還元糖生成に寄与するα–グルコシダーゼ、プルラナーゼ、イソアミラーゼ、α–アミラーゼ、β–アミラーゼの分布を比較することを目的とした。
【方法】南魚沼産コシヒカリ・滋賀県産日本晴・滋賀県産羽二重糯より，5画分（玄米を100%とし、搗精部位層 100-90%、90-80%、80-70%、70-0%）の米粉を調製し、リン酸バッファーで懸濁後、TCAを用いてタンパク質を回収した。
得られたタンパク質はSDS-PAGEで分離、ニトロセルロース膜に転写後、デンプン分解酵素に対する抗体を用いて解析した。
【結果】コシヒカリ・日本晴においては、α–グルコシダーゼとプルラナーゼは内層部（70-0%画分）に多く存在し、外層部に近づくほど少なく、糠層（100-90%画分）では明瞭な特異的バンドが検出されなかった。一方、羽二重糯では、内層部に多く存在するものの、糠層でもバンドが検出された。α–アミラーゼ I はコシヒカリと羽二重糯で 90-70%画分に分布していたのに対し、日本晴では糠層にもバンドが検出された。また、コシヒカリ・日本晴において外層部に分布していたアミラーゼ II-4 は、羽二重糯では内層部（70-0%画分）でも強く発現していた。これらの結果から、デンプン分解酵素の中には、異なる品種間で米粒内分布に差が認められる酵素が存在することが明らかとなった。

rice cooking, starch degrading enzymes, immunoblot

講演番号：2A12p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ A 校舎 12 会場

各種結晶セルロース製剤の小麦粉生地と製品におよぼす影響

Effects of various crystalline-cellulose powders on the properties of wheat-dough and final products

○前田 智子[1]、細見 恵莉子[1]、林 祐司[2]([1]兵庫教育大院、[2]旭化成ケミカルズ（株））
○Tomoko Maeda[1], Eriko Hosomi[1], Yuji Hayashi[2] ([1]Hyogo Univ. of Teacher Education, [2]Asahi Kasei Chemicals Corporation)

[目的]我が国は小麦粉の殆んどは外国からの輸入であり、年間の小麦消費量のうち約 10%が国産小麦であり、残りはすべて外国産である。我々日本人は古来から米を主食としてきたが、食生活の欧風化、生活スタイルの多様化と共に米の消費量は確実に減少し、パン、うどん、パスタ、ラーメン等の小麦粉製品の摂取が着実に増えつつある。また、小麦粉はこのような米に替わる主食的な製品だけではなく、カレー、揚げ物等のレトルトや冷凍食品およびケーキ、菓子等の嗜好食品への加工にも幅広く用いられており、我々の食生活を支える最も重要な食品素材といえる。本研究では、粒子形状の異なる結晶セルロースを含む「セオラス」を取り上げ、小麦粉生地や製品の品質におよぼす影響を調べた。即ち、各種セオラスの小麦粉用途における機能性や品質改善効果を調べることで、新たな小麦粉加工食品への実際的応用について検討を行った。
[方法]市販薄力小麦粉用いて、一般の調理書に基づきスポンジケーキを調製した。セオラスは粒子形状の異なる結晶セルロースを含む FD-101、FD-301、RC-N30、DX-2 の 4 種類とし、粉重量に対して 1-3%まで添加した。各種セオラスの糊化特性への影響は、ビスコアミログラフによる加熱・冷却時のゲル特性を測定し、ケーキの品質はケーキの膨らみとクリープメーターによる破断、テクスチャー試験により測定した。更に味、外観、テクスチャー等 15 項目について評点法により官能評価を行った。
[結果]ビスコアミログラフのピーク粘度とブレイクダウンは、いずれのセオラス添加においても増加し、最終粘度はセオラスの種類により増減が見られたが、特に FD-301 で低い値を示した。加熱による糊化促進と冷却によるゲル化抑制の見られた FD-301 について、ケーキの品質への影響を確認した。FD-301 の添加はケーキの膨らみと軟らかさを向上させ、官能評価でもセオラス無添加のコントロールよりも良好な評価を得た。一方、FD-101 の添加はケーキの膨らみと軟らかさを抑制し、RC-N30 でもケーキ内相密度の増加が見られ、DX-2 添加は、硬く膨らみの悪いケーキをもたらした。また、セオラスは焼成前の生地の物性にも影響を与え、特に FD-301 を添加することで、生地はまとまりやすく、かつ流動性の高いものとなった。その他のセオラスも卵（水分）とバター（油脂）の添加時に、生地物性に大きな変化が観察され、コントロールとは全く異なる挙動を示した。即ち、FD-101 では、水分添加による多量の気泡発生と同時に生地体積の低下、また油脂添加による更なる体積の低下と生地の流動性の向上（液状化）が見られた。一方、RC-N30 と DX-2 では水分添加による気泡発生は観察されたが逆に生地粘度は増加する傾向を示し、各種製剤により生地とケーキへ影響は顕著に異なった。

wheat, cellulose, dough

講演番号：2A12p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ A 校舎 12 会場

高圧処理した玄米中の成分組成の変化

Variation of ingredient composition in brown rice by high-hydrostatic pressure treatment

○藤井 華蓮、和田 憲明、藤田 智之（信州大院農）
○Karen FUJII,Noriaki WADA,Tomoyuki FUJITA (Shinshu Univ.)

【目的】 玄米にはフェルラ酸などの機能性成分が豊富に含まれているものの、その多くは果皮や胚芽などの糠層に存在しており、精白時に除去されている。和田らは、精白米への機能性富化を目的として、玄米に水を添加して加温・加圧（55℃, 100MPa）処理を 24 時間行うことで、精白後の精白米中のポリフェノール成分量が顕著に増加することを明らかにした [1)]。今回は、玄米への加工処理時間の検討と加工処理した玄米を精白、炊飯して得た炊飯米中のポリフェノール成分の定量および可溶性成分の成分量変化について調査した。

【方法】 原料の玄米は 2010 年度産のコシヒカリを用いた。玄米に水を添加して、常温（20℃）または加温（55℃）、常圧（0.1MPa）または加圧（100MPa）の各条件下で 6 時間または 24 時間加工処理した。加工後の玄米を送風乾燥し、家庭用精米機で精米したのち、ミルで粉砕して、加工精白米粉を得た。加工精白米 150g に水 225g を加えて炊飯し、加工炊飯米を得た。凍結乾燥後、ミルで粉砕して、加工炊飯米粉とした。各米粉から粗抽出物を調製し、総ポリフェノール量およびフェノール酸類を定量した。また、調製した粗抽出物を用いて遊離成分の HPLC 分析を行った。

【結果及び考察】 処理時間の異なる精白米粉中の成分量を比較したところ、常温・常圧 6 時間の処理では、未処理の米粉に比べて総ポリフェノール量が 1.3 倍、フェルラ酸は 2.0 倍に増加したのに対し、加温・加圧 6 時間の加工精白米では総ポリフェノール量が 2.0 倍、フェルラ酸は 4.6 倍に増加していた。加温・加圧 24 時間処理区の増加率（総ポリフェノール量 2.3 倍、フェルラ酸 5.2 倍）には及ばないものの 6 時間処理でも成分が増加することがわかった。以上の結果から、玄米の加工処理においては、6 時間の加工処理でもポリフェノール成分が胚乳部に浸透移行することが示された。

炊飯後の各米粉中の総ポリフェノール量を比較したところ、加温・加圧 6 時間および 24 時間の炊飯米粉において、未処理の米粉に対してそれぞれ 4.3 倍、5.2 倍の値を示した。炊飯米においても 6 時間の処理で総ポリフェノール量は高い値を示しており、炊飯後もポリフェノール成分が保持されていることが示唆された。なお、炊飯米粉中のフェノール酸類については現在定量中である。

各米粉から調製した粗抽出物中の遊離成分の HPLC 分析結果から、加温または加圧処理によって精白米中で増加する複数のピークが確認できた。これらの遊離成分についても今後分析を行う予定である。

1）日本食品科学工学会第 58 回大会講演集，p. 106（2011）

brown rice, high-hydrostatic pressure, polyphenolic compounds

講演番号：2A12p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ A 校舎 12 会場

落花生アレルゲンの高圧力下での酵素消化に及ぼすシステインの影響
Effect of cysteine on enzymatic digestion of a peanut allergen under high hydrostatic pressure
○山本 和貴[1]、増山 啓吾[2]、北河 栄一[2]、八巻 幸二[1]([1]農研機構食総研、[2]ソントン食品工業)
○Kazutaka YAMAMOTO[1], Keigo MASUYAMA[2], Eiichi KITAGAWA[2], Kohji YAMAKI[1] ([1]National Food Research Institute, NARO, [2]Sonton Food Industry Co., Ltd.)

【目的】落花生は、食物アレルギーの主要な原因食品の 1 つであり、重篤なアナフィラキシーショックを引き起こしやすいため問題視されており、低アレルゲン化手法の確立が望まれている。落花生においては 11 種類のアレルゲン蛋白質の存在が報告され、Ara h 1、Ara h 2、Ara h 3 が主要アレルゲンとされている。これらのアレルゲン蛋白質は加熱や酵素処理に対する安定性が高く、アレルゲン性の低減が困難な問題があった。本研究では、高圧力下での酵素(プロテアーゼ)処理による落花生の低アレルゲン化を検討する過程で、Ara h1、Ara h3 のプロテアーゼ分解が高圧力下で促進されること、Ara h2 が酵素分解において高い耐性を示すことを見出している。本報では、アミノ酸であり還元力が高いシステインに着目し、Ara h2 の酵素分解に及ぼすシステイン添加の影響について検討した。
【方法】硫安分画と限外濾過とによる簡易精製法により得た Ara h 1、Ara h 2、または Ara h 3 (0.25 mg/ml)に、0～140mM のシステイン存在下で、トリプシン(250 U/ml)、キモトリプシン(2.5 U/ml)、または必要に応じてペプシン(25 U/ml)を添加し、常圧下もしくは 200~600 MPa の高圧力下で 37℃、36 分間処理(定圧 30 分間)した。その後、SDS-PAGE により消化産物の泳動パターンを比較した。
【結果】ペプシンによる高圧酵素処理において、Ara h 1 及び Ara h 3 の消化に促進効果はなく、Ara h 2 に至ってはペプシン消化自体が確認されなかった。トリプシン、キモトリプシンによる消化においては、常圧下ではいずれのアレルゲン蛋白質も分解が不完全であり、分子量約 10~20 kDa の消化抵抗性断片が残った。しかし、トリプシン、キモトリプシンによる各高圧酵素処理では、Ara h 1 は 200 MPa 以上及び 400 MPa、Ara h 3 は 200 MPa 以上及び 200~500 MPa でそれぞれ消化が促進されて断片が消失した。一方、Ara h 2 は、高圧力下での酵素消化促進効果は見られなかった。そこで、Ara h 2 をシステイン存在下でトリプシンまたはキモトリプシン高圧酵素処理したところ、消化性断片がほぼ消失するシステイン濃度条件、圧力条件の組み合わせがあることが明らかとなった。以上、Ara h 1 及び Ara h 3 の酵素消化が、高圧力下で促進されること、システインを添加することで Ara h2 の酵素消化が促進されることが明らかになり、落花生の低アレルゲン化への可能性が示された。

peanut, allergen, pressure

講演番号：2A12p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ A 校舎 12 会場

トランスグルタミナーゼ含有ゼラチンを活用した徐放性粉末魚油の開発
Development of production technology for powdered fish oil as a slow-release formulation
○青木 茂太[1]、仲川 清隆[1]、松本 俊介[2]、阿久津 光紹[2]、庄子 真樹[3]、君塚 道史[4]、金内 誠[4]、下山田 真[4]、西川 正純[4]、宮澤 陽夫[1]([1]東北大院農・機能分子解析、[2]青葉化成（株）、[3]宮城県産技セ、[4]宮城大食産業)
○Shigeta Aoki[1], Kiyotaka Nakagawa[1], Shunsuke Matsumoto[2], Mitsuaki Akutsu[2], Naoki Shoji[3], Norihito Kimizuka[4], Makoto Kanauchi[4], Makoto Shimoyamada[4], Masazumi Nishikawa[4], Teruo Miyazawa[1] ([1]Grad. Sch. Agr. Sci. Tohoku Univ., [2]AOBAKASEI Co., Ltd., [3]Indust. Technol. Inst. Miyagi Pref. Gov., [4]Sch. Food, Agri. and Envi. Sci. Miyagi Univ.)

【目的】近年、食品産業界では加工食品の流通が増し、粉末油脂の需要が増加している。通常、粉末化される油脂は植物性油脂であり、魚油が粉末化された例はほとんどない。粉末魚油が調製され、その新たな機能的側面として、粉末魚油をヒトが摂取した場合、消化管からのトリグリセリドの吸収が緩やかになり、DHA 等の不飽和脂肪酸の健康機能を持続的に享受できる可能性が予想される。先に我々は、このような徐放効果が実際に起きることを、トランスグルタミナーゼ含有ゼラチンで水溶性低分子 DNJ（桑に特徴的に含まれる食後高血糖改善成分）を包接させた実験で証明している(1)。そこで本研究では、種々の条件で魚油の乳化液を作り、これをトランスグルタミナーゼ含有ゼラチン製剤（青葉化成（株）「マーズゲル S」）で包接することで、魚油を粉末化できる条件を検討するとともに(2)、その実用性（酸化安定性と徐放性）を明らかにしようとした。
【方法】魚油に、HLB(Hydrophile-Lipophile Balance)の異なる種々の乳化剤、水を加え、加温しながら混合し、乳化液を調製した。次いで、乳化液にマーズゲル S を加え、ゲル化させた後、4℃で 6 時間保存することで、トランスグルタミナーゼによるゼラチン内部の架橋構造形成を十分に促進させた。ゲルを凍結乾燥後、低温下で粉末化を試みた。粉末魚油の実用性という観点から示差走査熱量計(DSC)及びヘッドスペース GC 分析による酸化安定性試験、そして、架橋構造にトラップされた油脂の徐放性を確認するため溶出試験を行なった。
【結果】魚油に HLB 値が高い乳化剤を加えると、魚油を粉末化できた。さらに、HLB 値が高い乳化剤と低い乳化剤を併用し、かつ融点の高いパーム油を少量加えることで、油脂の結晶化を制御しやすくなり、質の高い魚油粉末油脂を調製できることがわかった。粉末魚油（パーム油を少量加えたもの）では、脂質含有量を最大で 73%まで高めることができ、この時の DHA 量は、粉末 1 g あたり 140 mg に達した。酸化劣化による魚油特有の酸敗臭はあまり感じられず、実際に酸化安定性の向上を DSC やヘッドスペース GC 分析で確認した。溶出試験では、粉末化による魚油の徐放性が確認できたことから、ヒトの体内でも徐放効果が期待された。そこで現在、健常者に粉末魚油あるいは液体魚油を摂取してもらい、摂取前から摂取 6 時間後まで 1 時間ごと経時的に採血し、血漿中の脂質成分の挙動を調べている。
(1) Vichasilp, C. et al., Food Chemistry, 134, 1823-1830 (2012)
(2) 青木茂太ら, 日本食品科学工学会第 59 回大会講演集, P134 (2012)

fish oil, powder, slow-release

講演番号：2A12p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ A 校舎 12 会場

麹菌によるアクリルアミドフリーのコーヒー飲料の開発
Development of acrylamide-free ready-to-drink coffee by *Aspergillus oryzae*
○原 一浩[1]、岩井 和也[1]、福永 泰司[1]、中桐 理[1]、坪井 宏和[2]、坊垣 隆之[2]、佐野 元昭[3]、尾関 健二[3] ([1]UCC R&D センター、[2]大関総研、[3]金工大院・バイオ化学)
○Kazuhiro HARA[1], Kazuya IWAI[1], Taiji FUKUNAGA[1], Osamu NAKAGIRI[1], Hirokazu TSUBOI[2], Takayuki BOGAKI[2], Motoaki SANO[3], Kenji OZEKI[3] ([1]R&D center, UCC, [2]Gen. Res. Lab., Ozeki, [3]Biosci. and Chem., K.I.T.)

【目的】
アクリルアミド（AA）は、食品の原材料中に含まれるアミノ酸（アスパラギン）と還元糖が、揚げる・焼く・焙るなどの加熱調理中のメイラード反応の過程で生成するとされ、焙煎コーヒー豆にも AA が微量含まれている。国際がん研究機関による発がん性分類において、AA は「ヒトに対しておそらく発がん性がある」と考えられる「グループ 2A」に分類されており、WHO では食品中の AA の低減方法を探ることを勧告している。
一方で、麹菌 *Aspergillus oryzae* が AA をアミダーゼにより分解・代謝することが報告されており、麹菌は FDA の GRAS リストにも記載され安全性が高いことから、我々は麹菌を使った生物学的手法によるコーヒー飲料のアクリルアミド低減方法について検討した。既に、誘導酵素であるアミダーゼを誘導培養なしに高生産する株をセルフクローニング法により得ており、本研究では、アミダーゼ高生産セルフクローニング株によるコーヒー抽出液の AA 低減効果の確認およびコーヒー抽出液の評価を行った。
【方法・結果】
YPD 培地でセルフクローニング株をセルロース繊維とともに培養し、ペレット状の菌体を洗浄後、10ppm AA 水溶液 40ml に添加したとき、乾燥重量 150 mgのセルフクローニング株による処理で 6 時間後にはほぼ 0 になった。コーヒー抽出液（可用性固形分 2.0%）で同様に実施した場合、処理 16 時間後の AA は 54%まで減少したが、AA 水溶液の場合と同様の結果は得られなかった。コーヒー抽出液の場合は麹菌の添加量、反応温度等を改良する必要がある。
処理後のコーヒー抽出液に含まれるカフェイン、モノ-カフェオイルキナ酸類、有機酸類は、処理 16 時間後でもコントロールと比較してそれぞれ 15%、6%の減少に留まった。GC/MS による香気成分分析では、処理コーヒーは日本酒やワインなどの香気の構成成分である 1-プロパノール、酢酸エチル、2-メチル-1-ブタノール、イソブチルアルコール、イソアミルアルコールの濃度がコントロールと比較して著しく増加した。また、パネラーによる官能検査の結果、処理コーヒーは花様の香り、日本酒を連想させる香りを持つと評価された。これらの結果から、AA を低減しつつ、特徴のある香気が付与されたコーヒー飲料への応用が示唆された。

coffee, acrylamide, amidase

講演番号：2A12p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ A 校舎 12 会場

血圧上昇の心配ない機能性京漬物の開発

Biofunctional Kyoto-pickles that reduce blood pressure

森 義治[2]、○今西 貴紀[1]、山根 吉人[1]、上野 義栄[3]、小田 耕平[4]([1]（株）本田味噌本店、[2]（株）もり、[3]京都府中小企業技術セ、[4]京工繊大)
Yoshiharu Mori[2], ○Takanori IMANISHI[1], Yoshito YAMANE[1], Yoshie UENO[3], Kohei ODA[4]
([1]Honda Miso Honten, [2]Mori, [3]Kyotofuchusyokigyogijyutuse, [4]Kyoto Institute of Technol.)

緒言：米糠は GABA やビタミン類などの生理活性物質を多く含み、一方白味噌は ACE 阻害ペプチドや蛋白質分解酵素を含む。この両素材で作製した新規糠床に京野菜を漬け込むと、２つの血圧降下物質（GABA, ACE 阻害ペプチド）を含む機能性の強化された新規京漬物の製造が可能となる。このような機能性を高めた新規京漬物の開発を目指し、１）糠漬け中の ACE 阻害ペプチドの増強、２）新規糠漬けに適した京野菜の選抜、３）動物実験による血圧抑制効果の検証を目的に、以下検討を加えた。

実験方法：プロテアーゼ活性の測定；全国味噌技術会、基準味噌分析法に準拠した。GABA量の測定；HPLC法で行った。ACE阻害活性の測定；分析キット(同人化学研究所)プロトコールに準拠し測定し、ACE阻害活値を薬剤カプトプリル量に換算して表記した。動物実験：①高血圧自然発症ラット(SHR/Izm系)に対する単回投与： 2g/kgの用量で投与する試験群 1（GABAとACE阻害ペプチドを含む試料）及び試験群 2（GABAとACE阻害ペプチドを含まない試料）と対照群の 3 群を設定した。試験動物数は 1 群 6 匹とした。②高血圧自然発症ラット(SHR/Izm系)と③食塩感受性モデルラット(DIS/Eis系)に対する長期投与：飼料中に 10 %試料を含む，試験群 1 及び 2、並びに対照群の 3 群を設定した。試験動物数 6 匹。

結果：１）新規糠床は、血圧上昇抑制に十分な 0.1%以上の GABA を含む。漬物中の ACE 阻害ペプチド量増大を図る為、プロテアーゼ活性の強い麹菌 6 種を対象に、ACE 阻害ペプチド量のみならず、漬物の味、色など総合的に検討した。目的に叶うものとして焼酎用麹菌が選択された。２）官能テスト、血圧抑制物質含量(GABA, ACE 阻害ペプチド)などに基づき、商品化に適した京野菜として青味大根などが選定された。３）大根漬け（乾燥重量１ｇ当たり GABA:1%、ACE 阻害ペプチド；2.8 mg,食塩；15 %）を対照に，実験方法に示した試料をそれぞれ作製し血圧抑制実験を行った。①高血圧自然発症ラットに対する単回投与で、投与後４時間で有意な血圧上昇抑制効果を認めた。②高血圧自然発症ラットに対する長期投与で、試験群１及び試験群２に於いて有意な血圧上昇抑制効果を認めた。その効果は、試験群１で強く認められた。③食塩感受性モデルラットに対する長期投与で、試験群１及び２に於いて有意な血圧上昇抑制効果が認められた。その効果は、試験群１で強く認められた。これらの結果より新規糠床で作製した漬物は、ラットの血圧上昇抑制効果があると結論した。

結論：目的に叶う新規京漬物開発の道を拓くことが出来た。

本研究は、京都府中小企業技術開発促進事業＜企業連携型>補助金により実施した。

Kyoto-pickles, GABA, ACE inhibitory peptides

講演番号：2A12p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ A 校舎 12 会場

カンボジア伝統水産発酵食品の成分評価と機能性

Composition and functionality of Cambodian traditional fermented fish products

○塩本 望萌[1]、チュオン モニ[1]、小柳 喬[1]、笹木 哲也[2]、道畠 俊英[2]、チャン サルン[3]、マオ ソフィアレス[3]、榎本 俊樹[1]([1]石川県大食科、[2]石川県工試化学食品、[3]カンボジア農林水産省)
○Mimoe SHIOMOTO[1], Mony CHUON[1], Takashi KOYANAGI[1], Tetsuya SASAKI[2], Toshihide MICHIHATA[2], Sarun CHAN[3], Sopheareth MAO[3], Toshiki ENOMOTO[1] ([1]Ishikawa Prefectural Univ., [2]IRII chemical food, [3]Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Cambodia)

【目的】東南アジア、東アジアでは、様々な発酵食品が食されており、また、これらの発酵食品の成分特性や関与する微生物については、多くの研究がなされている。カンボジアには、タク・トレイ（魚醤油)、プラホック（魚類ペースト)、カピ（小エビペースト）といった伝統水産発酵食品があるが、これらの成分特性や機能性については、ほとんど明らかにされていない。本研究ではカンボジアの伝統水産発酵食品であるタク・トレイ、プラホック、カピの成分特性と機能性について検討した。
【方法】試料に用いたタク・トレイ（10 種類)、プラホック（3 種類)、カピ（3 種類）は、カンボジアの製造工場より直接入手した。水分は常圧加熱乾燥法、窒素はケルダール法、脂質はソックスレー抽出法、灰分は 550℃灰化法により測定した。塩分の測定は塩分計（アタゴ PAL-ES1）により行った。遊離アミノ酸、有機酸の分析は、それぞれアミノ酸自動分析計（日立 L8900)、有機酸分析計（Dionex ICS1500）を用いた。香気成分については、テナックス吸着法（GC/MS：AGILENT 7890A/5975C）により分析を行った。抗酸化活性は ORAC 法、ACE 阻害活性は OPA を用いた蛍光法により行った。
【結果】カンボジアの伝統水産発酵食品の一般成分を測定した結果、タク・トレイの灰分値は高いことが明らかとなった。タク・トレイには塩分が 20%以上含まれており、このことが高い灰分値の要因と思われる。プラホックは脂質や窒素が多いことが分かった。カピの結果はプラホックと似ていたが、pH がアルカリ性であった。遊離アミノ酸分析では、様々なアミノ酸が検出された。タク・トレイではアスパラギン酸、グルタミン酸、アラニンが主なアミノ酸であった。カピは全体的に遊離アミノ酸含量が多く、中でも特にアスパラギン、リジン、シトルリンが多く見られた。プラホックでは、グルタミン酸、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、リジンが主なアミノ酸であった。有機酸の分析を行った結果、タク・トレイには乳酸と酢酸が多く含まれていた。カピにはタク・トレイと同様に酢酸と乳酸が多かった。また、コハク酸などの有機酸も多く存在した。プラホックには酢酸が多く含まれていた。さらに、香気成分の分析から、タク・トレイの臭いはブタン酸や 2 - ブタノンなどの様々な香気成分が合わさって、独特なにおいを醸し出していることが示唆された。プラホックには様々な酸、アルコール、アルデヒド類が含まれていた。カピの主な香気成分はトリメチルアミンとアルコール類であった。ORAC 法を用いた抗酸化活性分析では、タク・トレイにおいて試料間で大きな差が認められたが、いずれも高い抗酸化活性を示した。ACE 阻害活性については、すべてのサンプルで強い阻害活性が認められた。

Cambodian traditional fermented fish products, composition, functionality

講演番号：2A12p17
講演日時、会場：3 月 25 日 17:12～ A 校舎 12 会場

Microbiological characterization of Cambodian traditional fermented fish products

○ Mony Roth Chuon[1], Koyanagi Takashi[1], Mimoe Shiomoto[1], Tetsuya Sasaki[2], Toshihide Michihata[2], Sarun Chan[3], Sopheareth Mao[3], Toshiki Enomoto[1] ([1]Dept. Food Sci., Ishikawa Pref. Univ., [2]Indus. Res. Inst. Ishikawa., [3]Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries)

[BACKGROUND]

Cambodia has an extensive network of waterways, marine and freshwater fishes comprise a major portion of the diet of most Cambodians, particularly in many products that are preserved such as, *Prahok* (fish paste), *kapi* (shrimp paste) and *toeuk trey* (fish sauce). However, microbiological characteristics of these Cambodian fermented products have not been elucidated. Therefore, present study aims to determinate microbiological compositions in Cambodian traditional fermented fish products.

[METHOD]

Cambodian traditional fermented fish products, *prahok*, *kapi*, and *toeuk trey*, were obtained from factories in Cambodia. To determine these products' microbiota, Isolation of microorganisms from the samples was done by standard method using MRS, GAM, TSA and PDA broth. Physiological and morphological characteristics were conducted following the standard determinative bacteriological procedure. Isolated microorganisms were phylogenetically identified by the sequence of ribosomal RNA (rRNA) gene using the primers (7F, 5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') and (1510R, 5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') for amplification.

[RESULT]

A total of 181 strains were isolated from 13 Cambodian traditional fermented fish products. The bacteria were mainly gram-positive cocci or rods, and *Bacillus*, *Clostridium*, and *Staphylococcus* were frequently identified at up to 10^8cfu/g. Halotolerant and halophilic lactic acid bacteria *Tetragenococcus* (*T. halophilus* and *T. muriaticus*) and other bacterial genera such as *Psychrobacter*, *Virgibacillus, Lysinibacillus, Kocuria, Micrococcus, Lentibacillus,* and *Jeotgalicoccus* were occasionally found at 10^2–10^5 cfu/g. Low numbers of fungi *Rhodotorula* and *Candida* were also seen.

fermented fish products, microflora, Cambodia

講演番号：2A12p18
講演日時、会場：3 月 25 日 17:24～ A 校舎 12 会場

かき玉形成への剪断の影響と卵白の寄与
Effect of shearing on “kakitama” formation and contribution of egg white
○伊與田 哲也[1]、星野 貴[2]、滝田 裕二[2]、山口 祐輝[2]、五十部 誠一郎[3] ([1]明治大院農、[2](株)フロンティアエンジニアリング、[3]（独）農研機構・食総研)
○tetsuya iyoda[1], takashi hoshino[2], yuji takita[2], yuki yamaguchi[2], seiichirou isobe[3] ([1]Meiji Univ., [2]FRONTIER ENGINEERING CO., [3]National Food Research Institute)

【目的】
液全卵は生卵に近い機能性を持ち、割卵の手間が省け、殻などの廃棄物もなく簡便に扱える。そのため、工業的に広く利用されている。しかし、サルモネラ菌による食中毒が危惧されるため、加熱殺菌処理を行う必要がある。この加熱殺菌処理では、間接加熱殺菌処理とジュール加熱殺菌処理が用いられている。この内、ジュール加熱処理後の液全卵ではかき玉が形成されるのに対して、間接加熱処理では形成されない。その原因として、加熱方法の違いや細い間隙を通る事による剪断の影響が考えられる。これまでの研究にて、加熱の均一性と昇温速度の違いによる過加熱が影響する事がわかった。
また、強い剪断を掛けた液全卵ではかき玉が形成されない事を明らかにした。しかし、その際の要因については分かっていない。そこで本研究ではかき玉形成への卵白、卵黄の寄与を明らかにする事を目的とした。
【方法】
市販卵を割卵し、卵白と卵黄を分けて目開き850μmの篩に通し、未処理液卵白・卵黄サンプルとした。これを250ｇ測り取り、ホモジナイザーを用いて-0.08MPaの減圧状態でそれぞれ4500、9000rpmと回転数を変えて1分間攪拌した。これら液卵白・卵黄の各３種類を90℃の熱湯の中に流し入れてかき玉を作製した。この卵白かき玉について、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて微細構造観察した。さらに、卵白かき玉と上清を目開き250μmの篩で分けて、それぞれ凍結乾燥した。これをSDS-PAGEで分析した。また、３種類の液卵白について粘度測定、加熱ゲルの破断強度試験を行った。
【結果】
液卵黄ではかき玉は形成されなかった。しかし、液卵白サンプルでは、未処理で衣状、4500rpm で針状のかき玉が形成され、9000rpm では分散した様子が観察された。SEM による微細構造観察では、剪断力を強めるにつれて粗い構造が見られた。液卵白の粘度測定については、剪断が強くなるにつれて粘度は低下し、攪拌抵抗性も低下する傾向にあった。加熱ゲルの破断強度試験では、剪断の影響は見られなかった。これらは液全卵時とほぼ同様の結果であった。卵白かき玉の SDS-PAGE では、未処理と 4500rpm においてオボトランスフェリン、オボムチンと思われるバンドが上清よりもかき玉により濃く現れた。以上の事から、かき玉形成には卵白の寄与が大きく、中でもオボトランスフェリン、オボムチンが関与している事が示唆された。

liquid whole egg, shearing, pasteurization

講演番号：2A12p19
講演日時、会場：3 月 25 日 17:36～ A 校舎 12 会場

プロセスチーズの構造と物性へのプレクックチーズ添加の影響

Effect of precooked cheese addition on microstructures and physical properties of process cheese

○渡部 友里香[1]、井上 慶太[1]、森口 奈津美[2]、柳沢 有哉[3]、武藤 高明[3]、芳 一尚[3]、中村 卓[1]([1]明治大農・農化、[2]明治大院農・農化、[3]雪印メグミルク株式会社・ミルクサイエンス研究所)
○Yurika WATANABE[1], Keita INOUE[1], Natsumi MORIGUCHI[2], Yuya YANAGISAWA[3], Takaaki MUTOH[3], Kazunao FUSA[3], Takashi NAKAMURA[1] ([1]Meiji Univ., [2]Meiji Univ., [3]MEGMILK SNOW BRAND Co.,Ltd.,Milk Science Research Institute)

【目的】プロセスチーズはナチュラルチーズと溶融塩を混合・加熱溶融・乳化して製造される。乳化はプロセスチーズにおいて製品の品質を決定づける最も重要な工程である。乳化の際に粘度が次第に上昇する現象をクリ―ミングと言い、この反応は最終製品の物性調整のために重要である。さらに、物性調整のためにプレクックチーズが利用されている。プレクックチーズを数%添加すると、乳化したチーズでクリーミングが起こり、不溶性のカゼインミセルが増加し、チーズが硬くなることが明らかにされている。一方、我々はクリーミングではカゼインサブミセルの凝集構造がランダムからストランド状へ変化し、チーズの物性が変化し降伏点を示すことを報告した。そこで本研究では、プロセスチーズの構造と物性へのプレクックチーズの添加の影響を明らかにすることを目的とした。クリーミングを示したプロセスチーズと示さなかったプロセスチーズをプレクックチーズとして使用し、カゼインサブミセルの凝集構造とチーズの物性との相関を検討した。
【方法】プロセスチーズは最終重量が 30 g、水分含量が 45.0－46.0%、pH が 5.8－5.9 となるように調整した。溶融塩はポリリン酸塩とジリン酸塩（4：1）を、原料チーズはチェダーとゴーダを用いた。乳化は加熱温度 90℃で、加熱撹拌中の粘度を測定できる機器 Rapid Visco Analyzer（RVA）によって行った。撹拌速度と撹拌時間は各 2 水準の計 4 条件でプロセスチーズを試作し、これをプレクックチーズとして用いて、無添加でクリーミングを起こさない撹拌条件でプロセスチーズを作製した。これらについて走査型電子顕微鏡(SEM)、共焦点レーザー走査顕微鏡により構造観察を、クリープメータにより破断強度試験を行った。
【結果および考察】RVA による乳化中、短時間撹拌で試作したクリーミングを示さないプレクックを添加したチーズでは粘度は変化せず、クリ―ミングが見られなかった。しかし長時間撹拌でクリーミングを示したプレクックを添加したチーズではクリーミングが見られた。破断強度試験では、クリーミングを示さないプレクックを添加したチーズは降伏点のない物性を示し、クリーミングを示すプレクックを添加したチーズは降伏点を持つ物性を示した。SEM 微細構造観察の結果から、クリーミングを示さないプレクックを添加したチーズではカゼインサブミセルの構造がランダム状に、クリーミングを示したプレクックを添加したチーズではストランド状に凝集した。すなわち、プレクック添加によるクリーミングでのチーズの構造と物性の変化は無添加でクリーミングを示したチーズと同様の変化であった。以上よりプレクック添加によりクリーミング反応が促進される事が明らかとなった。

process cheese, microstructure, rva

講演番号：2A15a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ A 校舎 15 会場

アラキドン酸等の有用脂質の探索：アメフラシなど数種の海洋軟体動物中の脂質

Lipid and fatty acid of several marine herbivorous mollusks

○齋藤 洋昭[1]、井岡 久[2]、久保 弘文[3] ([1]中央水産研究所、[2]島根県水産技術センター、[3]沖縄県水産海洋研究センター)
○Hiroaki SAITO[1], Hisashi Ioka[2], Hirofumi Kubo[3] ([1]National Research Institute of Fisheries Science, [2]Shimane Prefectural Fisheries Technology Center, [3]Okinawa Prefectural Fisheries and Ocean Reserch Center)

【目的】乳幼児ではアラキドン酸合成能が弱く、調製粉乳への添加が推奨されているが、自然界には適確な供給源がない。そこで、食経験のある海洋生物を対象にアラキドン酸などの有用脂肪酸供給源を探索する目的で、アメフラシ（*Aplysia kurodai*）など低未利用海洋動物数種について脂質を調べる。これらの動物は限定された地域で食用とされ消費されているが、含まれる脂質についてはほとんど分かっていない。脂質クラスや脂肪酸を調べ，それらの脂質特性を解明する。

【方法】アメフラシ（*Aplysia kurodai*）やマガキガイ（*Conomurex luchuanus*）などの軟体動物の脂質クラスと脂肪酸組成を調べた。すべての脂肪酸は、ジメチルオキサゾリン（DMOX）誘導体に変換後、ガスクロマトグラフィーマススペクトル法で化学構造を決定した。

【結果】試みたすべての動物で各臓器のトリアシルグリセロール（TAG）、リン脂質など主要クラスで、主要高度不飽和脂肪酸（PUFA）は，アラキドン酸（ARA、20:4n-6），22:4n-6，18:3n-3，イコサペンタエン酸（EPA、20:5n-3）および 22:5n-3 で，ドコサヘキサエン酸（DHA、22:6n-3）はほとんど含まれなかった。これらの軟体動物は植食性で、ARA や 22:5n-3 含量が高く DHA が痕跡量しか含まれないことから、餌料生物脂質の影響を直接受けると同時に、DHA 生合成能が低いこと、DHA の非必須性が示唆された。

fatty acid, marine lipid, mollusk

講演番号：2A15a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ A 校舎 15 会場

北海道産針葉樹に含まれる PPARα/γデュアルアゴニストの探索

Identification and characterization of PPARα/γ dual agonists in conifer grown in Hokkaido

○佐藤 真由美[1]、大久保 剛[2,3]、本島 清人[3]([1]北林産試、[2]日油株式会社、[3]明治薬大)
○Mayumi SATO[1], Takeshi OHKUBO[2,3], Kiyoto MOTOJIMA[3] ([1]Forest Products Research Institute, Hokkaido Research Organization, [2]NOF Corporation, [3]Meiji Pharmaceutical Univ.)

【目的】PPARα のリガンドは、脂質代謝や糖代謝を亢進させることによりインスリン抵抗性を改善し、血中脂質及び血糖値を低下作用させる。また、PPARγ のリガンドもインスリン抵抗性を改善し、血糖値低下作用などを有している。しかしながら、PPARγ アゴニストには浮腫、体重増加などの副作用が認められる。一方、PPARα および PPARγ 両者に対して相互作用を有する PPARα/γ デュアルアゴニストは、糖尿病治療剤として、糖代謝改善作用に加えて脂質代謝改善作用を併せ持ちながら、体重増加等の副作用を持たない、インスリン抵抗性改善剤となることが期待されている。本研究では、北海道産未利用森林バイオマスの有効利用を目的として、針葉樹に含まれる PPARα/γ デュアルアゴニストを探索し、その同定を行った。

【方法】針葉樹樹葉をエタノールで抽出後、ヘキサン、ジエチルエーテル、酢酸エチル、ブタノールにより逐次、溶媒分画を行った。各画分を PPARs レポーターアッセイに供し、PPARα 及び γ に対するアゴニスト活性を測定した。活性画分を、さらに 5%塩酸水溶液と 5%水酸化ナトリウム水溶液により溶媒分画し、得られた画分の PPARγ 活性を測定した。活性画分を GC-MS により分析し、活性成分の同定を行った。

【結果】各画分の PPARγ に対するアゴニスト活性を測定した結果、ジエチルエーテル画分に強い活性が認められた。この活性化画分を GC-MS 分析に供した結果、4 種のジテルペンを同定した。これらジテルペンの標品を用いて、PPARs アゴニスト活性を測定したところ、このうち 2 種のジテルペンが高い PPARα/γ デュアルアゴニスト活性を有していることが明らかとなった。

PPAR, diabetes, diterpene

講演番号：2A15a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ A 校舎 15 会場

パプリカ色素、およびパプリカに含まれるカロテノイドの肥満による疾患の予防・改善作用

Paprika carotenoids regulates adipocytokine expression in obesity-induced inflammatory cells

○中村 望、前多 隼人 (弘前大学農学生命科学)
○Nozomi NAKAMURA,Hayato MAEDA (Hirosaki Univ.)

【目的】パプリカ(*Capsicum annuum* L.)色素中に含まれるカロテノイドであるカプサンチン、カプソルビンは、分子中に酸素を持つキサントフィルに分類される。これらのカロテノイドは強力な一重項酸素消去能を持ち、抗がん作用、及び血中の HDL-コレステロール上昇作用など生活習慣病の予防効果が報告されている。本研究では、培養細胞を用い、パプリカに含まれるカロテノイドの脂肪細胞での代謝調節、肥満による炎症状態の改善作用について検討した。

【方法】3T3-L1 脂肪細胞を前培養後、パプリカ色素(15、30、60 μg/ml)、カプサンチン(5、10 μM)、カプソルビン(5、10 μM)を添加し、24 時間後に培地上清および細胞を回収した。脂肪細胞の分化に与える効果を glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)活性にて評価し、脂肪細胞分化に関わる遺伝子 peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPARγ)の発現量、アディポネクチン、レジスチン、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)発現量の変化を real time RT-PCR 法にて評価した。また、培地上清中のアディポネクチン、レジスチンのタンパク質発現量を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法にて評価した。3T3-L1 脂肪細胞培養上清で刺激したマウス由来マクロファージ様細胞(RAW264.7)にカプソルビン(2.5、5、10 μM)を添加し、12 時間後に培地上清および細胞を回収した。cyclooxygenase-2 (COX2)、inducible nitric oxide synthase (iNOS)、tumor necrosis factor-α (TNF-α)、interleukin-6 (IL-6)、MCP-1 の発現量の変化を real time RT-PCR 法にて、培地上清中の IL-6、TNF-αのタンパク質発現量を ELISA 法にて評価した。

【結果】パプリカ色素は脂肪細胞の分化を促進し、インスリン抵抗性を改善するアディポネクチンの発現を上昇させ、インスリン抵抗性を亢進するレジスチンの発現を抑制した。さらに、カプソルビン添加群ではカプサンチン添加群よりも強い傾向を示した。また、炎症状態の RAW264.7 細胞にカプソルビンを添加することによって、炎症に関わる遺伝子、炎症性サイトカインの発現が抑制された。これらの結果から、パプリカ色素、およびパプリカに含まれるカロテノイドの肥満による疾患の予防・改善作用が示唆された。

carotenoid, adipocyte, capsorubin

講演番号：2A15a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ A 校舎 15 会場

クロレラの摂取がヒト血液中のカロテノイド組成に与える影響

Blood carotenoids after chlorella supplementation in Japanese subjects.

○宮澤 大樹 [1]、仲川 清隆 [1]、中嶋 裕也 [2]、丸山 功 [2]、宮澤 陽夫 [1] ([1] 東北大院農・機能分子解析、[2] クロレラ工業)
○Taiki Miyazawa[1], Kiyotaka Nakagawa[1], Yuya Nakashima[2], Isao Maruyama[2], Teruo Miyazawa[1] ([1]Grad. Sch. Agr. Sci. Tohoku Univ., [2]Chlorella Industry Co., Ltd.)

【目的】健常者と比較して、アルツハイマー病（AD）者の赤血球の過酸化脂質濃度は高く [1)]、抗酸化成分である極性カロテノイド（キサントフィル）の濃度が低い [2)]。キサントフィルをヒトが摂取すると、赤血球のキサントフィル濃度は増え、過酸化脂質濃度は低くなる [3)]。赤血球のキサントフィル濃度を高く保てる食品素材を見いだせば、AD の老化赤血球の蓄積を予防できると考えた。緑藻の一種であるクロレラは、タンパク質やミネラルに含み、健康に役立つ食材として、古くから食されている。クロレラはキサントフィルも多く含む（約 450 mg ルテイン/100g）ので、本研究では、赤血球へのキサントフィル補給を目的に、クロレラ摂取がヒトの血液中のキサントフィル濃度に与える影響を明らかにしようとした。

【方法・結果】クロレラは、乾燥クロレラ粉末を 200 mg/粒に成形した「バイオリンク」（クロレラ工業社製）を用いた。被験者（血中脂質が高めの健常者）は朝食、昼食、夕食時にクロレラ錠剤を各 15 粒、すなわち 1 日に 45 粒（クロレラとして 9 g、ルテインとして 30 mg）を毎日摂取した。摂取前、摂取 1 および 2 ヶ月後の血液を採取し、赤血球と血漿のカロテノイド濃度を HPLC 法で分析した。その後、クロレラの摂取を止め、後期観察として 1 ヶ月後の血液を分析した。その結果、クロレラ摂取により、赤血球と血漿のルテイン濃度が有意に増加し、赤血球では摂取前の約 4 倍の濃度に達した。クロレラの摂取をやめると直ちに赤血球のルテイン濃度は減少した。赤血球と血漿のルテイン濃度に、強い正相関を認めた（Figure 1）。β-カロテンなどルテイン以外のカロテノイドにも、赤血球と血漿の濃度に正相関が認められた。クロレラに含まれるルテインの一部は、消化管から吸収され、血漿リポタンパク、更には赤血球膜に移行し蓄積することが示唆された。今回の試験では、被験者（健常者）の血中の過酸化脂質濃度がさほど高くなかったためか、過酸化脂質濃度へのクロレラ摂取の影響は認められなかった。赤血球にキサントフィルが多く移行したことを考えると、更に長期摂取した場合や、AD 者にクロレラを与えた場合に、赤血球膜の脂質過酸化の抑制が期待された。

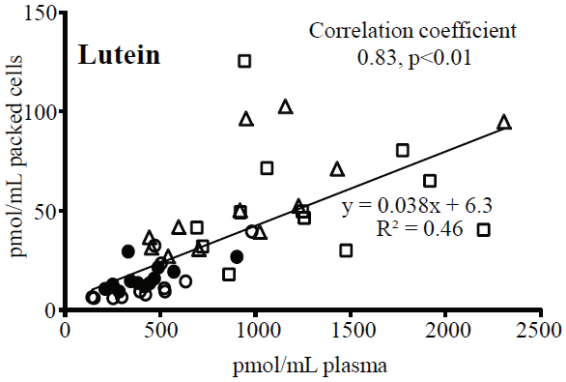


Figure 1. Correlation of erythrocyte and plasma lutein; white circle: before administration, triangle: 1 month administration, square: 2 month administration, black circle: 1 month observation period.

1) T. Miyazawa et. al., *Oxygen Radicals.* Elsevier Amsterdam 327-330 (1992)
2) T. Kiko et. al., *J Alzheimers Dis* 28 593-600 (2012)
3) T. Miyazawa et. al., *J. Oleo Sci*., 60 495-499 (2011)

chlorella, blood, carotenoid

講演番号：2A15a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ A 校舎 15 会場

高尿酸モデルラットと軽度高尿酸血症患者においてβ-クリプトキサンチン摂取は尿酸値を低下させる

Intake of ß-cryptoxanthin reduces serum urate level in hyperuricemic model rats and mildly-hyperuricemic human subjects

○白倉 義之、高柳 勝彦、向井 克之（ユニチカ（株）　中央研究所）
○Yoshiyuki Shirakura,Katsuhiko Takayanagi,Katsuyuki Mukai (UNITIKA Ltd., R&D Center)

【目的】高尿酸血症は痛風の原因として知られているが、近年では心血管イベントとの相関性などから、メタボリックシンドロームの危険因子として認知されつつある。β-クリプトキサンチン（β-CX）は温州みかんに特異的に多量に含まれるカロテノイドである。栄養疫学調査の結果、温州みかんの摂取量と血清中の β-CX 濃度には正の相関が認められ（J. Health Sci., 48(4), 350-353，2002）、また温州みかんの摂取が痛風の罹病リスクを下げる（治療 84(4), 142-144，2002）ことから、β-CX の摂取による尿酸値の上昇抑制が示唆された。そこでラットを用いて β-CX の尿酸値の上昇抑制作用を検証すると共に、ヒトへの作用についても検証した。
【方法】（ラット試験）7 週齢雄性ウイスターラットを 1 週間予備飼育した後に 3 群（各 6 匹）に分割した。各群には通常飼料（CRF1：対照群）、1%イノシン酸添加飼料（イノシン酸群）、 1%イノシン酸＋0.02%β-CX 添加飼料（CX 群）を供与して飼育し、20 日目に血清と腎臓を採取・分析した。（ヒト試験）事前検査により尿酸値が 7.0 以上の男性 9 名を被験者とした。試験食には β-CX 含有するドリンク（0.2mg /100ml /本）を用い、これを毎日 1 本、6 ヶ月間摂取した。試験食摂取のタイミングや試験期間中の生活には一切の制限を設けず、2 ヶ月ごとに採血とアンケート調査を行った。
【結果】（ラット試験）イノシン酸群の血清尿酸値は対照群に比べ有意に高く、食餌性の高尿酸血症を発症していた。一方 CX 群の尿酸値はイノシン酸群に比べ有意に低く、対照群と同等にまで抑制されていた。CX 群の腎臓では尿酸を再吸収する URAT-1 の発現亢進が抑制されるなど、遺伝子レベルでの変動が見られたのに加え、乳酸値も有意に低値であった。（ヒト試験）被験者（年齢 42.9±6.7 歳、BMI23.9±1.8）は β-CX の摂取によって血清尿酸値が徐々に低下し、4 ヶ月目と 6 ヶ月目には初期値に比べ有意な低値を示した。また尿酸値以外の生化学マーカーに異常は認められず、β-CX の摂取による健康への悪影響は認められなかった。
【結論】ラットはイノシン酸摂取により食餌性の高尿酸血症状態を呈し、β-CX の摂取は尿酸値上昇を抑制した。CX 群では URAT-1 の発現亢進抑制や乳酸値の上昇抑制が認められ、尿酸の排出促進による尿酸値抑制が示唆された。またヒトにおいても β-CX の摂取による尿酸値低下が認められた。β-CX には尿酸値の上昇抑制効果に加え、内臓脂肪蓄積抑制作用もある（J. Agric. Food Chem., 59, 12342-12351, 2011）ことから、β-CX は総合的な抗メタボリックシンドローム作用を有することが示唆された。

β-cryptoxanthin, hyperuricemia, urate excretion

講演番号：2A15a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ A 校舎 15 会場

植物スフィンゴ脂質代謝物がヒト腸管モデル細胞に与える影響
Effect of sphingolipid metabolite on cell proliferation and cytokine formation in Caco-2 cells
○坪谷 朗行[1]、木下 幹朗[2]、荒井 克仁[3]、間 和彦[4]、大西 正男[5]([1]帯広畜産大・食品、[2]帯広畜産大・食品、[3]岩手大院・連農、[4]日本製粉・中研、[5]帯広畜産大・食品)
○Akiyuki Tsuboya[1], Mikio Kinoshita[2], Katsuhito Arai[3], Kazuhiko Aida[4], Masao Ohnishi[5] ([1]Obihiro Univ., [2]Obihiro Univ., [3]Iwate Univ., [4]Nippon Flour Mills., [5]Obihiro Univ.)

目的：スフィンゴ脂質は生体膜の構成成分として重要な脂質であるだけでなく，近年ヒトに対する機能性についての報告が増えつつある。当研究室ではスフィンゴ脂質の生体機能について研究しており，これまでに大腸癌細胞に対する細胞死誘導並びに DMH 処置マウスにおける大腸腺腫抑制効果等を報告してきた(1,2,3)。しかしながらその詳細な作用機序並びに代謝的運命については不明な点が多い。そこで今回はスフィンゴ脂質代謝物が腸管細胞の細胞分化並びにサイトカイン分泌に与える影響について腸管モデル細胞を用いて検討し，スフィンゴ脂質の消化管への機能との連関について検討した。
方法：(スフィンゴ脂質等の調製）哺乳類由来のスフィンゴイド塩基(スフィンゴシン(d18:1^{4t})，フィトスフィンゴシン(t18:0)は市販品を，植物由来にスフィンゴイド塩基(8 不飽和型スフィンゴイド塩基，d18:2$^{4t,\ 8t\ or\ c}$）については，トウモロコシグルコシルセラミドよりアルカリ分解・分取 TLC 並びに逆相 HPLC を用いて調製し，一部は GC-MS を用いて純度の検定を行った。またセラミドはトウモロコシグルコシルセラミドよりスミス分解法を用いて調製した。（細胞実験）ヒト結腸癌由来細胞(Caco-2 細胞)を約 3 週間の前培養の後使用した。培地は 10%FBS 添加 DMEM を用い，無血清培地にセラミド画分，フィトスフィンゴシン，並びにトウモロコシセレブロシド由来スフィンゴイド塩基を加えた試験培地に切替え，24 時間培養した。尚，サイトカインの定量には，ヒトサイトカイン抗体アレイ(Proteome Profiler™，コスモバイオ）を用いた。
結果：通常の未分化 Caco-2 細胞ではスフィンゴイド塩基で細胞死が誘導されたが，分化させた Caco-2 細胞の場合，細胞死の誘導は抑制された。また，サイトカインの誘導を抗体アレイを用いて検討したところ，未添加群と比較して，セラミド，スフィンゴイド塩基投与により，サイトカインの誘導が生じ，セラミドとスフィンゴイド塩基では誘導パターンは異なっていた。また，植物由来のスフィンゴイド塩基（8 不飽和型）の結果についても報告する予定である。

１．J. Oleo Sci. 53, 503 (2004). ２．J. Food Lipids, 16, 200 (2009). ３．Eur.J. Lipid Sci. Technol, 112, 708 (2010).

sphingolipid, Caco-2, cytokine

講演番号：2A15a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ A 校舎 15 会場

苦味抑制物質としての脂肪酸の作用機序の解明
Elucidating the mechanism of how fatty acids act as bitterness inhibitors
○本間 亮丞[1]、山下 治之[1]、石丸 喜朗[1]、阿部 啓子[1,2]、朝倉 富子[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]神奈川科学技術アカデミー)
○Ryousuke Homma[1], Haruyuki Yamashita[1], Yoshiro Ishimaru[1], Keiko Abe[1,2], Tomiko Asakura[1] ([1]University of Tokyo, [2]Kanagawa Academy of Science and Technology)

（目的）苦味は一部の例外を除いて忌避される味であり、食品加工においては、苦味を抑制する様々な試みが行われている。私達は、チーズから苦味を抑制する物質として遊離脂肪酸を同定し、昨年度の本大会で報告した。今回、脂肪酸による苦味抑制の作用機序を解明するために、苦味物質と脂肪酸の相互作用について解析した。
（方法）等温滴定カロリメトリー(ITC)を用いて、炭素鎖長および不飽和度の異なる 8 種類の脂肪酸と塩酸キニーネの相互作用を測定した。また、脂肪酸グリセリンエステルであるモノグリセリド及び各種リン脂質についても、塩酸キニーネとの相互作用を測定した。さらに、24 種類の苦味物質とオレイン酸(18:1)との相互作用の測定も行い、結合定数、結合比および熱力学的パラメーターを算出し、ITC による相互作用の結果と官能評価による苦味抑制活性を比較検討した。ラウリン酸(12:0)と塩酸キニーネの混合溶液で析出した結晶の苦味抑制活性と構造について、二分子間の結合様式を解析した。
（結果および考察）脂肪酸の鎖長は、12 以上では塩酸キニーネとの相互作用が見られたが、デカン酸(10:0)では相互作用は検出されなかった。結合定数は鎖長 18 のオレイン酸で最も大きく、不飽和度による結合定数の違いは小さかった。オレイン酸モノグリセリドでは、相互作用は検出できなかった。リン脂質ではホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロールで相互作用が認められたが、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンには認められなかった。
苦味物質のうち、オレイン酸に対する相互作用を検出できたのは塩酸キニーネ、塩酸プロメタジン、塩酸ベルベリンなど 6 種類で、これらの化合物には、窒素を含む環構造が共通に存在した。脂肪酸による苦味抑制作用機序をさらに詳細に検討するため、ラウリン酸と塩酸キニーネの複合体の解析を行った。混合溶液から生成した結晶は、塩酸キニーネ単独と比べて苦味の抑制が認められた。また、結晶の組成はラウリン酸：塩酸キニーネが約 1：1.2 であり、共結晶を構成していると推定された。
以上の結果から、脂肪酸の苦味抑制作用は、苦味物質と直接相互作用し苦味の発現を抑えている可能性が示された。また、相互作用には脂肪酸の鎖長、官能基、苦味物質の部分構造が関与していることが示唆された。

bitter, fatty acid, isothermal titration calorimetry

講演番号：2A15a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ A 校舎 15 会場

リパーゼを用いた米油中のγ-オリザノールの濃縮

Concentration of gamma-Oryzanol in rice bran oil using Lipase

○井上 良計[1]、植向 直哉[2]、川上 晃司[2]、徳井 圭裕[2]、畑中 唯史[3]、永尾 寿浩[4] ([1]リピッドラボ、[2](株)サタケ、[3]岡山生物研、[4]阪市工研)
○ Yoshikazu INOUE[1], Naoya UEMUKI[2], Kouji KAWAKAMI[2], Yoshihiro TOKUI[2], Tadashi HATANAKA[3], Toshihiro NAGAO[4] ([1]Lipid Lab., [2]Satake Coop., [3]RIBS Okayama, [4]OMTRI)

【目的】我々は米糠からヘキサンを用いない搾油、抽出により得られた米粗油の水ーエタノールによる脱酸法、分子蒸留による機能性成分の濃縮方法について検討してきた。昨年度の報告では、水-エタノール 90%を用いることによって、抗酸化剤、紫外線吸収剤、更年期障害などの医薬品として有用で、フェルラ酸とステロールのエステルであるγ-オリザノールが約 10%に濃縮されることを報告した。しかし、この濃度ではまだ十分ではない。そこで本報告においては、機能性成分であるγ-オリザノールをさらに濃縮する方法として、①リパーゼを用いて、γ-オリザノールを加水分解せず、トリグリセリドをグリセリンと遊離脂肪酸に加水分解することが出来るリパーゼの探索とその作用条件の検討、②加水分解によって得られるグリセリンを水層に分離し、低沸成分である遊離脂肪酸を分子蒸留（短工程蒸留）で除去し、γ-オリザノールを 30%まで濃縮する方法の検討、をそれぞれ目的とした。

【方法】米糠を圧搾して得られた圧搾油（γ-オリザノール含量：約 5%）に、*Candida rugosa* 由来または *Rhizopus oryzae* 由来のリパーゼと水を添加し、30℃で攪拌しながらトリグリセリドを加水分解した。反応後、油層のガスクロマトグラフィー(GC)により、遊離脂肪酸、γ-オリザノール、トリグリセリドを一括分析した。同時に、遊離脂肪酸含量の指標である酸価の測定も実施した。得られた反応液を加熱処理して油水分離した後、油層中の水分量をさらに下げるために 80℃, 2.7kPa で脱水し、珪藻土による濾過で不溶性物資を除去した。これを高真空下（190-200℃, 27Pa）で分子蒸留し、遊離脂肪酸を除去した。得られた蒸留残渣のγ-オリザノール、遊離脂肪酸含量を GC で測定した。

【結果】リパーゼの検索を行ったところ、*C. rugosa* リパーゼがトリグリセリドの 98%以上を遊離脂肪酸まで加水分解するのに対して、*R. oryzae* リパーゼはトリグリセリドの約 1/3 を残し、遊離脂肪酸とジグリセリドとトリグリセリドが一定の比率になるところで平衡状態になることが分かった。いずれのリパーゼを用いたときでも、γ-オリザノールはほとんど加水分解されなかった。

次に、600g スケールでの酵素反応とγ-オリザノールの濃縮を行った。米粗油：水を 1:1(wt/wt)にして所定の酵素量の *C. rugosa* リパーゼを添加し、30℃で 17 時間反応した。反応後の油層を分子蒸留し、遊離脂肪酸を主とする留分と、γ-オリザノールを 30%以上含む蒸留残渣を得ることが出来た。

rice bran, lipase, γ-Oryzanol

講演番号：2A15a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ A 校舎 15 会場

共役トリエン構造をもつジャカル酸は生体内で共役リノール酸に速やかに代謝される

Jacaric acid with a conjugated triene structure is quickly metabolized to conjugated linoleic acid in rats

○木島 遼[1]、都築 毅[1]、山崎 正夫[2]、池崎 綾[2]、元永 千尋[2]、西山 和夫[2]、池田 郁男[1]([1]東北大院・農、[2]宮崎大・農)
○Ryo Kijima[1], Tsuyoshi Tsuduki[1], Masao Yamasaki[2], Aya Ikezaki[2], Chihiro Motonaga[2], Kazuo Nishiyama[2], Ikuo Ikeda[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Miyazaki Univ.)

【背景・目的】共役脂肪酸の研究において、共役ジエン構造を持つ共役リノール酸（CLA）の研究は盛んであるが、共役トリエン構造をもつ共役リノレン酸の研究は、それほど進んでいない。我々は、植物種子油中に多く含まれる共役リノレン酸に興味を持ち、様々な試験を行ってきた。そして、共役リノレン酸に CLA よりも強い癌抑制効果があることを見出した。さらに最近、天然に存在する共役リノレン酸の中で、どの脂肪酸に強い癌抑制効果があるか検討したところ、8c,10t,12c-18：3 の構造をもつジャカル酸（JA）に最も強い癌抑制効果があることを見出した。JA は観葉植物として利用される青紫色の花を持つ植物であるジャカランダの種子に多く含まれる脂肪酸である。現在のところ、この JA に関する情報は少なくその吸収代謝については知られていない。今後 JA を有効に応用していくためにも、吸収代謝に関する情報は必要不可欠である。そこで本研究では、ラットを用いて未だ明らかになっていない JA の吸収代謝について検討することとした。また我々は、キリやニガウリ種子に多く含まれている共役リノレン酸であるα-エレオステアリン酸（ESA、9c,11t13t-18:3）が、生体内で共役トリエン構造のメチル基側の二重結合が速やかに飽和化され、CLA になる興味深い代謝機構を明らかにしている。同じ共役トリエン構造を持つ JA でも同様の代謝反応を受けることが考えられ、その点においても注目して研究を行った。

【方法・結果】SD 系ラット（9 週齢、雄性）に胸管リンパカニュレーション手術を行い、JA もしくは ESA を含むエマルジョンを投与した。投与後 24 時間、リンパ液を経時時間毎に採取した。採取したリンパ液は Bligh&Dyer 法にて脂質抽出後、メチル化を行い GC 分析に供した。その結果、投与後すぐの GC クロマトグラムより JA のピークが検出されたことから、JA がラット体内に吸収されることが明らかとなった。また CLA とリテンションタイムが一致する未知の脂肪酸ピークが検出されたため、この脂肪酸の構造を決定するため GC/MS 分析を行った。その結果、未知の脂肪酸は 8 位と 10 位に二重結合を持つ CLA であることが分かった。以上により、JA は生体内で CLA に代謝されることが明らかとなった。この JA の飽和反応は、共役トリエン構造のメチル基側の二重結合が代謝を受けることが分かった。そして、JA の吸収速度は ESA よりも速いこと、CLA への代謝転換率は ESA の方が JA よりも高いことが分かった。以上より、JA はラット体内に吸収され、8,10-CLA に代謝されることが分かった。そして吸収速度は ESA よりも早く、CLA への代謝転換率は ESA の方が高いことが明らかとなった。

conjugated linlenic acid, Jacaric acid, conjugated linoleic acid

講演番号：2A15a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ A 校舎 15 会場

高アミロース米澱粉の膨潤力・溶解度および溶出糖の構造特性について
Properties of high amylose rice starch：swelling power, solubility, leached saccharides, and their structural properties.
○中浦 嘉子、齋藤 彰浩、横関 みなみ、山田 崇弘、藤田 大輔、中尾 恵子、井ノ内 直良（福山大・生命工）
○ Yoshiko Nakaura,Akihiro Saito,Minami Yokozeki,Takahiro Yamada,Daisuke Fujita,Keiko Nakao,Naoyoshi Inouchi (Fukuyama Univ.)

【目的】高アミロース米は、硬く粘りの弱い米飯物性を示すことから日本人の嗜好に合わず、日本における栽培量は極めて少ない。しかしながら、高アミロース米は良食味米に比べて食後の血糖上昇が緩やかなことから糖尿病の食事療法への利用が期待されるなどその需要は年々拡大している。これまで日本で育成された高アミロース米の性質については多数報告されているが、米飯物性に大きく関与すると考えられる胚乳澱粉の膨潤力・溶解度および溶出した糖の構造解析についての報告は少ない。そこで、本研究では日本で栽培されている代表的な高アミロース米の胚乳澱粉の膨潤力・溶解度および溶出糖の構造解析を行い、その品種間差と要因について明らかにする。
【方法】精白米 5 品種（コシヒカリ、ベニロマン、ホシユタカ、夢十色、雪の穂）から冷アルカリ浸漬法にて胚乳澱粉を調製した。各試料米澱粉を用いてヨウ素・澱粉複合体吸収曲線の測定、イソアミラーゼにより枝切り処理した澱粉の単位鎖長分布の測定、アミロペクチンの短鎖領域における側鎖長分布の測定、示査走査熱量計（DSC）による澱粉の糊化温度および糊化熱量の測定、RVA による澱粉の粘度測定を行った。また、各試料米澱粉の糊化温度付近の水における膨潤力・溶解度の測定、溶出した澱粉由来成分のヨウ素親和性の最大吸収波長の測定、溶出糖の平均鎖長の測定等を行った。
【結果】対照試料として用いたコシヒカリのアミロース含量は 17.6%と中程度のアミロース含量の米であったが、その他の 4 品種は 26.5%以上となり高アミロース米であることが確認できた。アミロペクチンの短鎖領域における側鎖長分布は、雪の穂で短鎖が多く、ベニロマンで少ない結果となった。アミロペクチンの側鎖長分布と正の相関関係がある糊化開始温度は、雪の穂で 48.4℃と最も低く、次いでホシユタカの 56.6℃、夢十色の 56.9℃、コシヒカリの 61.4℃となり、最も高い値を示したのはベニロマンの 65.0℃であった。澱粉の老化の指標として用いられる RVA のセットバック値は、340RVU を示した夢十色が最も高い値となった。澱粉の膨潤力は、雪の穂で低い値を示したが、これは雪の穂のアミロペクチン側鎖が他の試料に比べて短いことが原因であると考えられた。溶解度は、コシヒカリとホシユタカで高い値を示した。各試料米澱粉の糊化開始温度付近の水に溶出した澱粉由来成分のヨウ素親和性の最大吸収波長は、雪の穂を除く高アミロース米で 600nm 以上の値を示したが、雪の穂とコシヒカリはそれらの値より 10nm 以上低い値となった。溶出糖の平均鎖長はコシヒカリで高く、夢十色で低い値となった。これら、高アミロース米澱粉の溶解度および溶出した澱粉由来成分のヨウ素親和性、溶出糖の平均鎖長の品種間差の要因については、現在検討中である。

starch, high amylose rice

講演番号：2A15a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ A 校舎 15 会場

異なる米から調製した米飯の性状変化

Microscopes-compared of the leached starch of cooked rice prepared from different freshness of rice

○渡邊 香[1]、川原 真由美[2]、辻井 良政[3]、高野 克己[2]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・化学、[3]アルファー食品株式会社)
○ Kaori WATANABE[1], Mayumi KAWAHARA[2], Yoshimasa TSUJII[3], Katsumi TAKANO[2] ([1]Agrichem., Agr., Grad. Sch., [2]Dept. Appl. Biol. chem., Fac. Biosci., Tokyo Univ. Agr., [3]Alpha Foods. Co. Ltd.)

【背景・目的】

米飯食味の中でも重視される「粘り」は、炊飯過程において米澱粉が米胚乳酵素の作用を受け、米飯表層に濃縮され形成される米澱粉の部分分解物で、その評価について澱粉の物理的および構造的な分析が行われている。今回、食味の異なる米飯から作製した凍結切片の光学顕微鏡により観察を行い、米飯表面の粘り形成状態や厚みなど視覚的な差異から粘りと米飯食味との関係性を解明することを目的とした。

【方法】

試料には 4℃保存した精白米(4℃保存)、および 35℃の恒温庫にて 25 日間劣化処理した精白米(35℃保存)を用いた。これらについて、米胚乳アミラーゼ酵素活性量の測定および米飯物性の測定による差異を確認をし、それぞれから作製した切片の顕微鏡観察を行なった。

【結果】

4℃保存した米飯の物性値を 100%とした場合、35℃保存した米飯は米粒表面において、硬さがコシヒカリでは 6.1%、つや姫では 9.3%増加し、一方付着性はコシヒカリは 21.3%、つや姫は 25.9%低下していた。炊飯中に澱粉に作用し米飯の食味に影響するαおよびβ-amylase 活性量は、コシヒカリで 26.2%および 17.3%、つや姫で 19.0%および 13.7%低下していた。以上より、35℃保存処理によって米飯の粘りおよびその形成にかかわる酵素活性量の低下が確認できたので、それぞれの米飯切片について観察した。4℃保存では、米飯表面におねばと思われる米粒を覆う澱粉層が観察できたが、35℃保存では同層はわずかに確認された。また、米飯内部の細胞壁の輪郭は 4℃保存は細胞の崩壊が進んでいたが、37℃保存は輪郭が明瞭であった。ヨウ素染色した場合、染色度合いと外観で違いがみられた。4℃保存で染色が薄く、35℃保存では濃くなった。また 4℃保存、35℃保存ともに内層は青紫色、外層は赤紫色に染色されることから外層はアミロペクチンの割合が多いと考えられた。また、各外層は 4℃保存では境界が不明瞭で輪郭が厚く、35℃保存でははっきりと薄い輪郭をしていた。つや姫においても同様の結果が得られた。以上より、米飯切片の観察で表面の溶出澱粉の状態を確認することが出来た。その表面の形状については、粘りの大きい米飯では厚いおねばと思われる澱粉層が米粒を覆っていた。また、アミラーゼ活性量の低下による澱粉分解量の減少による影響も推察された。

Cooked rice, freshness, the leached starch

講演番号：2A15a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ A 校舎 15 会場

高スクロース食摂取 KK-A^{y} マウスの腸内細菌叢と肝臓障害

Cecal microflora and hepatopathy in KK-A^{y} mice fed a high-sucrose diet

○尾崎 桃子[1]、杉本 圭一郎[2]、中川 一弥[2]、副島 友莉恵[3]、熊谷 有紗[3]、高橋 芳久[3]、福里 利夫[3]、山内 俊一[3]、庄條 愛子[4]、原田 直樹[1]、中野 長久[1,5]、乾 博[6]、山地 亮一[1] ([1]大阪府大院・生命環境、[2]長岡香料・技開研、[3]帝京大・医、[4]相愛大・人間発達、[5]大阪女子短大、[6]大阪府大・栄養)
○Momoko OZAKI[1], Keiichiro SUGIMOTO[2], Kazuya NAKAGAWA[2], Yurie FUKUSHIMA[3], Arisa KUMAGAI[3], Yoshihisa TAKAHASHI[3], Toshio FUKUSATO[3], Toshikazu YAMANOUCHI[3], Aiko SHOJO[4], Naoki HARADA[1], Yoshihisa NAKANO[1,5], Hiroshi INUI[6], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]Nagaoka Perfume Ltd., [3]Teikyo Univ., [4]Soai Univ., [5]Osaka Women's Univ., [6]Osaka Prefecture Univ.)

【目的】スクロースやフルクトースは優れた甘味料であり、先進国では多量に摂取されている。フルクトースは生体内に取り込まれると肝臓で急激に代謝され、脂質合成が亢進することから、スクロースやフルクトースの過剰摂取は、肥満や脂肪肝さらには肝臓障害（非アルコール性脂肪性肝炎：NASH）を引き起こし、またインスリン抵抗性の原因ともなり、糖尿病合併症への関与も指摘されている。一方で、高脂肪食摂取に起因した肝臓障害の原因として、腸内細菌叢の乱れが指摘されている。すなわち、高脂肪食摂取による腸内細菌叢の乱れが、腸管粘膜バリアー機能を低下させ、腸内細菌が産生したエンドトキシンが取り込まれることによって肝臓障害さらには肥満が誘引されると言われている。スクロースやフルクトースの過剰摂取に起因した肝臓障害にも腸内細菌叢が関係していると考えられるが、詳細は不明である。本研究では、肥満・二型糖尿病モデルである KK-A^{y} マウスにスクロースを過剰摂取させ、盲腸内細菌叢の変化について検討した。
【方法】KK-A^{y} オスマウス（5 週齢）を 4 群に分け、それぞれにスターチ食、スクロース食、高脂肪食、高脂肪スクロース食を与え、8 週間飼育した。飼育終了後、血液、肝臓、盲腸を採取し、盲腸内細菌叢は属特異的プライマーを用いたリアルタイム PCR 法で、また盲腸内の有機酸組成は HPLC 法にて測定した。
【結果・考察】飼料摂取量は群間で差はなかったが、体重は高脂肪食群と同様にスクロース食群で増加する傾向が見られた。内臓脂肪量は群間に差はなかったが、肝臓重量はスクロース食を摂取した 2 群で有意に増加した。肝臓トリアシルグリセロール量は、スクロース食群で著しい上昇が見られ、高脂肪スクロース食群でさらなる有意な上昇が見られた。肝臓障害のマーカーである血漿アラニンアミノトランスフェラーゼ活性は、スクロース食を摂取した 2 群で有意に上昇したが、高脂肪食群では大きな変化は見られなかった。一方、血糖値の上昇は高脂肪食を摂取した 2 群でのみ観察された。盲腸内容物重量は高脂肪食を摂取した 2 群で有意に減少したが、スクロース食群ではほとんど変化しなかった。ところが、盲腸内 pH は高脂肪食を摂取した 2 群と同様にスクロース食群で上昇した。さらに、盲腸内細菌叢について検討したところ、スクロース食群で高脂肪食を摂取した 2 群と同様に *Bifidobacterium* の減少が観察された。また、有機酸分析を行った結果、スクロース食群でプロピオン酸、*n*−酪酸が減少した。以上の結果から、高スクロース食を摂取すると、高脂肪食と同様に、腸内細菌叢が乱れ、その結果として肝臓障害が引き起こされていることが示唆された。

Sucrose, NASH, Microflora

講演番号：2A15p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ A 校舎 15 会場

米胚乳タンパク質調製時の加熱処理が収率および保水性にあたえる影響

Effect of Heat Treatment on Yield and Water Holding Capacity of Rice Endosperm Protein Isolate

○近藤 葉月[1]、平塚 貴政[1]、藤井 幹夫[1]、門脇 基二[2]([1]亀田製菓、[2]新潟大院・自然研)
○Hazuki KONDO[1], Takamasa HIRATSUKA[1], Mikio FUJII[1], Motoni KADOWAKI[2] ([1]Kameda Seika Co., Ltd., [2]Niigata Univ.)

【目的】米（胚乳）タンパク質は血清コレステロール低下作用や脂質代謝改善作用を有し[1]，機能性食品素材としての有用性が期待できる．米タンパク質は主として水不溶であるグルテリンとプロラミンで構成されるが，強アルカリ溶液で抽出可能であるため，この抽出液の pH を中性～弱酸性にしてタンパク質を凝集させることで分離物が調製される．しかし従来の調製法[2]では，米タンパク質は硬い凝集体として回収されるため舌触りや保水性の低さが問題であった．これらの問題点を解決するため，本研究ではタンパク質調製プロセスを検討することにより調製米タンパク質の物性改良を試みた．
【方法】コシヒカリの米粉を 0.2%水酸化ナトリウム水溶液に 16 時間浸漬し米タンパク質アルカリ抽出液を得た．これを常温下で pH5.5 に調整し凝集させた米タンパク質を遠心分離により回収した（従来法）．実験①：pH5.5 への調整時に加熱処理した米タンパク質と従来法で調製されたものの保水性を比較した．実験②：pH4～9 に調整して得られた米タンパク質について，pH 調整時に非加熱と加熱処理の収率・保水性を比較した．実験③：SDS-PAGE 試料として調製米タンパク質を還元処理前または後に monobromobimane 蛍光標識したものを用い，分析を行った．還元前標識の monobromobimane 蛍光強度から遊離システイン残基量，還元後標識の蛍光強度からシステイン＋シスチン残基量を推定し，非加熱と加熱処理で比較した．
【結果】①：従来法では米タンパク質はペレット状に凝集するのに対し，加熱処理をした米タンパク質は巨大なゲル状凝集物として回収され，従来法よりも高い保水性を示した．②：非加熱で pH4～5 および 6～9 に調整した場合，得られた米タンパク質の保水性は向上したが収率は低下した．加熱処理した場合，pH4～5 および 6～9 で保水性がより高まり，いずれの pH においても収率は高かった．③：加熱処理した米タンパク質のシステイン＋シスチン残基量と遊離システイン残基量の差分が増加したことより，加熱処理によるシスチン残基の増加が示された．以上の結果から，米タンパク質の調製プロセスにおける加熱処理によりジスルフィド結合が形成されたと推察され，この分子ネットワーク形成が調製米タンパク質の収率・保水性を向上させると考えられた．
本研究は農林水産省委託事業「農林水産物・食品の機能性等を解析・評価するための基盤技術の開発」の支援を得た．
1：L. Yang et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 694-703 (2007)
2：T. Kumagai et al. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 52, 467-472 (2006)

rice endosperm proteins, disulfide bond, monobromobimane

講演番号：2A15p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ A 校舎 15 会場

ε-ポリリシンとの複合体化によるβ-コングリシニンの機能改変

Functional improvement of β-conglycinin by conjugating with ε-polylysine.

○濱路 育美、橋本 健史、好田 正、高橋 幸資、服部 誠（東京農工大院農）
○Ikumi HAMAJI,Takeshi HASHIMOTO,Tadashi YOSHIDA,Koji TAKAHASHI,Makoto HATTORI (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】大豆タンパク質の主成分であるβ-コングリシニンは必須アミノ酸を豊富に含む良質のタンパク質であり、乳化性・気泡性・ゲル化性などの機能特性や、血中コレステロール低下作用、血圧上昇抑制、抗酸化作用、肥満防止効果などの生理機能を持つ有用な食品素材である。一方で、このタンパク質は酸性条件下で機能特性が低下するため、食品の調理・加工・保存における大豆タンパク質の利用の障害となっている。また、大豆アレルギーの原因物質であることが問題となっている。

本研究では、食品への応用を考慮して、食品加工に用いられる微生物由来トランスグルタミナーゼ（MTGase）により、β-コングリシニンとε-ポリリシン（PL）を複合体化することで、β-コングリシニンの機能特性の向上と低アレルゲン化を達成することを目的としている。

【方法】βコングリシニンは、等電点沈殿と Q-Sepharose Fast Frow (2.5 ID×50 cm, GE Healthcare Bio-Science AB)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより、脱脂大豆粉末から抽出・精製した。精製β-コングリシニンの Gln 残基と PL のε-アミノ基のモル比が 1 : 1 となるように混合し、タンパク質溶液とした。1 g のタンパク質に対して 200 unit の酵素力値となるように、タンパク質溶液と酵素溶液を混合した。pH 7.6、40℃で 1 時間 MTGase 反応させ、β-コングリシニン-PL 複合体を得た。アミノ酸分析により複合体の化学組成を調べた。機能特性の評価として、複合体の pH 依存的溶解性測定と乳化性測定を行った。複合体の乳化性は濁度法により評価した。

【結果】MTGase 反応により、高分子のβコングリシニン-PL 複合体が得られた。アミノ酸分析により、β-コングリシニン 1 分子あたり約 18 分子の PL が結合していることが明らかとなった。溶解性測定により、複合体の酸性条件下での溶解性の改善が認められた。これは塩基性ポリペプチドである PL の結合により、複合体の等電点が塩基性側にシフトしたためであると考えられた。また、乳化性測定により、酸性条件下での乳化性の改善が認められた。これは PL の結合により親水基が付与されたためであると考えられた。

以上より、本研究の手法がβ-コングリシニンの溶解性、乳化性といった機能性の改善に有効であることが明らかとなった。

β-conglycinin, solubility, emulsifying property

講演番号：2A15p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ A 校舎 15 会場

コメデンプン表層タンパク質が生デンプン分解性に及ぼす影響

Effects of rice starch surface protein gives to raw starch degradability

○芳原 章太[1]、岡 大貴[2]、野口 治子[3]、野口 智弘[2]、高野 克己[3]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・食加技セ、[3]東京農大応生・化学)
○ SHOTA YOSHIHARA[1], DAIKI OKA[2], HARUKO NOGUCHI[3], TOMOHIRO NOGUCHI[2], KATSUMI TAKANO[3] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch., [2]Dept.Appl.Biol.Chem.,FPC., [3]Dept.Appl.Biol.Chem.,Fac.Biosci.,Tokyo Univ.Agr.)

【目的】

生デンプンはその起源の違いによって、アミラーゼによる分解性に差異がみられ、その要因については結晶構造や粒子径に起因するなど様々な要因が考えられている。本研究では、デンプン粒表面に存在するタンパク質がアミラーゼによるデンプンの分解性に差を生む一要因であると考え、デンプンのアミラーゼによる分解性に及ぼすデンプン粒表層タンパク質(SSP)の影響について検討を行った。これまでに、トウモロコシデンプンの SSP がアミラーゼによる生デンプンの分解性に関与していることを報告している。そこで本報ではコメデンプン SSP がコメ生デンプン分解性に与える影響の解析を目的とし検討を行った。

【方法】

試料は、SIGMA 社製のコメデンプンを用いた。SSP はデンプンに 1% SDS を加えて振盪処理し、抽出した。SSP を除去したものを SSP 除去デンプンとした。アミラーゼによる生デンプン分解試験は、各デンプン試料にα-アミラーゼ（SIGMA 社製；*Bacillus* 起源）を添加し、酵素反応（37℃、1 時間）させ、酵素反応によって生成した遊離糖をフェノール・硫酸法にて測定し、分解率を算出した。

【結果】

コメデンプン SSP 量は、デンプン 1g あたり 1.2±0.2mg であった。また、得られた SSP を SS 結合還元処理後 SDS-PAGE に供したところ、13, 20, 28, 33 および 60kDa にタンパク質バンドを確認した。特に 13kDa のバンドが最も濃く検出され、N 末端アミノ酸配列解析の結果、コメプロラミン前駆体と 90%の相同性を示した。

次に、未処理デンプンおよび SSP 除去デンプンについて、アミラーゼによる分解試験を行ったところ、未処理に比べ SSP 除去デンプンでは分解率が向上した。そこで、SSP 除去デンプンに SSP を加え同様に分解性試験を行ったところ、SSP 除去デンプンに比べ分解性が低下し、未処理デンプンと同等の分解率を示した。

Starch Surface Protein, amylase, raw starch degradability

講演番号：2A15p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ A 校舎 15 会場

アルカリ加熱処理により脱アミド化した米糠タンパク質のアミノ酸組成分析

Analysis of the amino acid composition of rice bran protein deamidated by alkaline heat treatment

○関 ケイトウ[1]、高井 龍之介[1]、永沼 孝子[1]、小川 智久[1]、村本 光二[1]、Chi Hyun[2]、Cho Seong-Jun[2]
([1]東北大生命、[2]CJ Foods R&D)
○keitou kan[1], Ryunosuke Takai[1], Takako Naganuma[1], Tomohisa Ogawa[1], Kouji Muramoto[1], Hyun Chi[2], Seong-Jun Cho[2] ([1]Tohoku Univ., [2]CJ Foods R&D)

【目的】玄米の精米により副生する米糠には約 15～20%タンパク質が含まれている。しかしその溶解性は、大豆タンパク質や乳清タンパク質などに比べて低いため、タンパク質素材として十分に利用されていない。演者らはこれまで、脱アミド化による米糠タンパク質の溶解性の向上と構造変化の関係を明らかにした。本研究では，アルカリ加熱処理により脱アミド化した米糠タンパク質のアミノ酸組成の変化を調べるために、4 M メタンスルホン酸、及び 3%フェノールを含む 6M 塩酸を用いて酸加水分解を行い、トリプトファンを含む全アミノ酸の組成分析法を検討した。

【方法】トリプトファンを含む標準アミノ酸混合液を加水分解用ガラス小試験管（8 x 90mm）に分注、減圧乾燥後、6M 塩酸、4 Mメタンスルホン酸、または3%フェノールを含む6 M 塩酸を加えて、減圧封管した。110℃で22時間加水分解後、減圧乾燥で塩酸を除いた試料を緩衝液に溶解してアミノ酸分析に供した。メタンスルホン酸加水分解物は3.5 M NaOHで中和後、緩衝液で希釈してアミノ酸分析を行った。アミノ酸は、イオン交換樹脂カラム（Shim-pack Amino-Na）を装着したHPLC装置で分離後、オルトフタルアルデヒドでポストカラム誘導体化し、蛍光検出器（Ex: 350 nm、Em: 450 nm）を用いて分析した。米糠タンパク質を同様に、3%フェノールを含む6 M塩酸と4 Mメタンスルホン酸で加水分解し、上記アミノ酸分析計でアミノ酸組成を測定した。さらに、アミノ酸の回収係数を用いて米糠タンパク質のアミノ酸組成を計算した。アルカリ処理によりアミノ酸の組成の変化も調べた。

【結果】6 M塩酸加水分解するトリプトファンは、標準アミノ酸混合物を用いた場合には、3%フェノールを6 M塩酸に添加することにより、70%が回収された。一方、4 Mメタンスルホン酸での回収率はほぼ100%であった。このとき加える酸の量を100 μlから50 μlに減らすと、回収率はそれぞれ、60%と68%に減少した。これらの方法で米糠タンパク質を加水分解し、アミノ酸組成分析を行ったところ、アルカリ加熱処理による脱アミド化により分析値が変化したアミノ酸は検出されなかった。また、4 Mメタンスルホン酸と3%フェノールを含む6 M塩酸を用いた加水分解で得た結果に顕著な差異はみられず、トリプトファンの回収率では前者が優れているものの、中和処理が不要な後者では、微量試料の分析や、プレカラム誘導体化法による分析では有利であると考えられる。

Ricebran, Protein, Amino acid

講演番号：2A15p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ A 校舎 15 会場

Proteomics analysis of rice grain proteins with 2D-DIGE combined with multiplex immunodetection

○Gang-hua LANG,Yukari KAGIYA,Kazumi KITTA (NFRI)

Safety assessment on genetically modified (GM) crops has been legally imposed in many countries. Comparisons between a GM crop and its appropriate comparator focusing on the determination of similarities and differences could give an acceptable judging standard of safety assessment. Rice is a staple food in many countries of the world. GM rice has been developed in several countries. Analyses of the rice profile and allergen content have drawn recent attentions. Several rice proteins including nonspecific lipid transfer protein-1 (nsLTP1), alpha-amylase/trypsin inhibitor family proteins, alpha-globulin, glyoxalase 1 (Gly1) and granule-bound starch synthase 1 (GBSS1) have been suggested to be major rice allergens, which have been wildly used in the evaluation of GM rice. In order to evaluate the methods applied to assess the unintended effects of genetic modification on rice storage proteins, rice grain proteins were analyzed by 2D-DIGE combined with multiplex immunodetection.

Antisera raised against respective recombinant rice allergens were applied for the simultaneous immunodetection of 5 kinds of rice allergens from rice soluble proteins resolved by both 1D- and 2D-PAGE. Moreover, extraction efficiency of various extraction solutions for rice salt-soluble and total proteins was analyzed. Compositional differences of the solutions for extracting salt-soluble and total proteins resulted in differing extraction efficiency of rice grain proteins. By matching the images of multiplex immunodetection and the fluorescent image of 2D-DIGE, the corresponding spots of three kinds of rice allergen were located in the images of 2D-DIGE while the other two sports were found to be not suitable for analysis with 2D-DIGE. The result suggested that immunoblotting analysis with antiserum against allergenic proteins is still an unreplaceable tool for the safety assessment of GM rice, and the combination of multiplex immunodetection with 2D-DIGE analysis allowed the comprehensive proteomic analysis of rice storage proteins.

Rice protein, Proteomics, Immunodetection

講演番号：2A15p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ A 校舎 15 会場

ブラックタイガーに含まれるマイナーアレルゲン(ミオシン軽鎖)に関する研究
Myosin light chain as a minor allergen from Black tiger Prawn (*Penaeus monodon*)
○菰田 俊一[1,2]、アンドレアス ロパタ[2,3] ([1]宮城大学食産業、[2]RMIT 大学、[3]ジェームスクック大学)
○Toshikazu Komoda[1,2], Lopata Andreas[2,3] ([1]Miyagi Univ., [2]RMIT University, [3]James Cook University)

[目的]
エビ・カニを含む甲殻類は、食物アレルギーの原因食品となることが多く、成人の約 5～10%がエビ・カニ対してアレルギーを持つことが報告されている。主要なアレルゲンとしては、トロポミオシンタンパクが挙げられ、多くの研究がなされているが、この他にもアレルゲンとなり得るタンパク質がエビ・カニに含まれている可能性がある。本研究では、一般的に食されているエビの中からブラックタイガーを研究対象とし、これに含まれるマイナーアレルゲンを調査することとした。

[方法および結果]
ミオシン軽鎖(Myosin Light Chain: MLC)は、バナメイ種(*Litopenaeus vannamei*)のエビから見出されたマイナーアレルゲンであり、これがブラックタイガーに含まれるか検討した。はじめに、対象のブラックタイガーから m-RNA を抽出し、これを基に cDNA を合成した。次に、バナメイ種由来 MLC のアミノ酸配列を参考にしてプライマーを作成し、ブラックタイガー由来の cDNA を鋳型とした PCR 反応を行った。この結果、MLC 遺伝子と同等のサイズの遺伝子断片が増幅していることがわかった。そこで、TA クローニングにより増幅断片をベクター(pCR2.1)に挿入し、形質転換の後、プラスミドを抽出して、挿入部分の遺伝子配列を解析した。この結果、増幅された断片の配列はバナメイ種由来 MLC とほぼ一致することがわかった。さらに、発現用のプラスミド(pRSET A)を用いて、この断片由来のタンパク質を発現させることを試みた。CBB 染色により目的の 20KD 付近にバンドが見られ、目的のタンパク質が発現していることがわかった。次にこのバンドの特性を確認するため、ウェスタンブロッティングを行った。一次抗体には、エビ・カニ等の甲殻類５種を免疫したウサギの血清を用い、二次抗体には抗ウサギ IgG 抗体を用いた。この結果、20KD 付近に明確なバンドが得られた。このことは、甲殻類により免疫を施されたウサギが、遺伝子組み換え MLC に対する抗体を持っていることを示している。
以上、本研究では、ブラックタイガーから、バナメイ種に見出されているマイナーアレルゲンのミオシン軽鎖に相当する m-RNA を見出した。また、これを発現させることに成功し、ブラックタイガーにもバナメイ種を同様のマイナーアレルゲンがある可能性を示した。

Allergen, Myosin light chain, Black tiger prawn

講演番号：2A15p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ A 校舎 15 会場

ソバアルブミンのα-アミラーゼ阻害活性およびその血糖値上昇抑制効果
Inhibitory activity of buckwheat albumin against α-amylase and its suppressive effect on hyperglycemia
○茂木 崇[1]、二宮 和美[1]、雨森 秀介[1]、瀬上 雅人[1]、赤尾 真[1]、熊谷 仁[2]、熊谷 日登美[1]([1]日大院・生資科、[2]共立女子大・家政)
○Takashi MOGI[1], Kazumi Ninomiya[1], Shusuke Aamori[1], Masato Senoue[1], Makoto Akao[1], Hitoshi Kumagai[2], Hitomi Kumagai[1] ([1]Dept. Chem. Life Sci., Nihon Univ., [2]Dept. Food Sci. Nutr., Kyoritsu Women's Univ.)

【目的】生活習慣に起因する2 型糖尿病の予防と治療には、食後の血糖値の上昇抑制が重要と言われている。小麦のアルブミン画分に含まれるα-アミラーゼインヒビター（α-AI）は、デンプン性食品を摂取した場合に血糖値の上昇を抑制することから、特定保健用食品の有効成分として使用されている。一方、我々は、米アルブミン画分中のα-AIが、昆虫のα-アミラーゼは阻害するが、哺乳類のα-アミラーゼをほとんど阻害しないにも関わらず、食後血糖値の上昇抑制作用を有することを既に明らかにしている。米α-AIは、小麦α-AIと異なり、消化耐性が高く、グルコース負荷時にも、血糖値上昇抑制効果を示した。このように、小麦と米のα-アミラーゼインヒビターは、配列の相同性が高いが、その特性は異なっている。しかしながら、小麦や米以外の穀物のα-AI の機能に関する詳細な研究はほとんど見られない。そこで、本研究では、ソバアルブミン画分に含まれるα-AI を精製し、そのα-アミラーゼ阻害活性および血糖値上昇抑制効果について検討した。
【方法】ソバ粉からアルブミン画分を抽出し、種々のα-アミラーゼに対する阻害活性および消化耐性を *in vitro* で測定した。α-アミラーゼ阻害活性は、α-AI 共存下における種々のα-アミラーゼの 2-クロロ-4-ニトロフェニル-α-D マルトトリオシド分解活性から求めた。消化耐性は、ペプシンおよびトリプシンを作用させた際の SDS-PAGE のバンドパターンの変化から評価した。次に、ソバα-AI をデンプンあるいはグルコースとともにラットに経口投与し、血糖値上昇抑制作用について検討した。さらに、ストレプトゾトシンの投与により糖尿病を誘発させたラットに対し、ソバα-AI をデンプンとともにラットに経口投与し、糖尿病患者に対する食後血糖値上昇抑制効果について検討した。
【結果】ソバα-AI は、小麦および米α-AI とも異なり、昆虫、ヒトおよびブタ膵臓由来アミラーゼに対しては阻害活性を示したが、ヒト唾液由来アミラーゼに対しては阻害活性を示さなかった。また、ソバα-AI はペプシンやトリプシンにより分解され、消化耐性は認められなかった。しかし、その消化物は高いα-アミラーゼ阻害活性を保持していた。さらに、ソバα-AI をデンプンと同時投与した場合には食後の血糖値上昇を抑制したが、グルコースとの同時投与では、血糖値上昇抑制は認められなかった。一方、ソバα-AI と、デンプンあるいはグルコースとの同時投与において、血中インスリンの上昇は抑制された。また、糖尿病誘発モデルラットに対しても、ソバα-AI は、デンプン負荷による食後の血糖値上昇を有意に抑制した。

buckwheat, α-amylase inhibitor, hyperglycemia

講演番号：2A15p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ A 校舎 15 会場

発酵キョウバクに含まれる有効成分の同定と降圧作用

Identification of antihypertensive compounds from fermented buckwheat sprouts

○小山 正浩[1]、石田 竜也[2]、楢本 恭子[2]、猪狩 直樹[3]、中村 浩蔵[2]([1]信州大院総合工、[2]信州大院農、[3]大和薬品(株))
○ Masahiro KOYAMA[1], Ryuya ISHIDA[2], Kyoko NARAMOTO[2], Naoki IGARI[3], Kozo NAKAMURA[2] ([1]Interdiscip. Grad. Sch. Sci. Tech, Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Shinshu Univ., [3]Daiwa Pharm.)

【目的】発芽ソバを原料とした乳酸発酵食品・発酵キョウバクは，高血圧自然発症ラット(SHR)において 10 μg/kg という低用量で，1.0 mg/kg 投与の降圧剤・カプトプリルに匹敵する降圧作用を示す。この強力な降圧作用は乳酸発酵で生成する物質により引き起こされると考えられた。そこで本研究では，まず両者の降圧作用および含有成分を単回経口投与試験と HPLC 分析で比較した。その後，強い降圧作用が確認された HPLC ピークに対して LC-MS/MS，アミノ酸配列解析を行い発酵キョウバクに含まれる降圧成分を同定し，その効果を単回経口投与試験により検証した。
【方法】まず，両凍結乾燥物(各 1.0 mg/kg)をサンプルとして SHR への単回経口投与試験を行い両者の降圧作用を確認した。その後 ODS カラムを用いて両者の HPLC 分析を行い，乳酸発酵により生成したピークを分取，凍結乾燥物(0.01 mg/kg)の SHR への単回経口投与試験で降圧作用を確認した。降圧ピークに含まれる物質は，アミドカラムにより細分離し，分離ピークについて構造解析を行った。構造解析には，LC-ESI-MS/MS 分析とエドマン分解法によるアミノ酸配列分析を用いた。構造決定したペプチド類は液相法または固相法により合成し，各ペプチド(0.1 mg/kg)の SHR への単回経口投与試験で降圧作用を確認した。各単回経口投与試験では，試料投与前および投与後 3,6,9,24 時間後の収縮期血圧および拡張期血圧をテイルカフ法で測定した。
【結果】単回経口投与試験の結果，発酵キョウバクは有意な降圧作用を示したが発芽ソバは降圧作用を示さなかった。そこで両者の含有成分を HPLC 分析したところ，乳酸発酵後に生成するピーク(ODS ピーク)が確認され，ODS ピークは発酵キョウバクに匹敵する降圧作用を示した。ODS ピーク中の降圧物質を精製するため，分離モードが異なるカラムを複数用いて HPLC 分析条件を検討した結果，アミドカラムを用いた分析で最適な分離が得られた。LC-MS/MS 分析で得たフラグメントイオンから，分離ピークに含まれている化合物はペプチドおよびアミノ酸であると推定されたため，エドマン分解でアミノ酸配列を確認し 6 種のペプチド(DVWY，FDART，FQ，VAE，VVG，WTFR)とチロシンを同定した。ペプチドデータベース検索により，DVWY，VAE，WTFR は新規ペプチドであると推定され，FQ，VAE，VVG，WTFR の配列はソバ由来タンパク質に存在していた。SHR への単回経口投与試験の結果，全てのペプチド投与群で有意に血圧が低下，これらのペプチドの降圧作用を初めて確認することが出来た。以上の結果から，乳酸発酵により生成する発芽ソバ由来の新規降圧ペプチドが発酵キョウバクの降圧作用の一旦を担っていることが明らかとなった。

peptide, lactic fermentation of buckwheat sprouts, Blood pressure lowering effect

講演番号：2A15p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ A 校舎 15 会場

発酵キョウバク由来ペプチドの降圧メカニズム

Antihypertensive mechanism of peptides from fermented buckwheat sprouts

○石田 竜也[1]、小山 正浩[2]、服部 成治[1]、猪狩 直樹[3]、中村 浩蔵[1]([1]信州大院農、[2]信州大院総合工、[3]大和薬品(株))
○Ryuya ISHIDA[1], Masahiro KOYAMA[2], Seiji HATTORI[1], Naoki IGARI[3], Kozo NAKAMURA[1] ([1]Grad. Sch. Agric. Shinshu Univ., [2]Interdiscip. Grad. Sch. Sci. Tech. Shinshu Univ., [3]Daiwa Pharm.)

【背景・目的】ソバ植物体乳酸発酵食品である発酵キョウバクは，高血圧自然発症ラット(SHR)において低用量で優れた降圧作用を示し，その降圧メカニズムにはアンジオテンシン I 変換酵素(ACE)阻害作用と血管拡張作用が関与している。発酵キョウバクの *in vitro* ACE 阻害活性(IC_{50}値)は 240 μg/mL であり，*in vivo* では 10 mg/kg 投与で SHR の胸部大動脈，肺，心臓，腎臓，肝臓の ACE 活性を有意に低下させた。また，SHR 由来胸部大動脈を用いた血管等尺性張力試験では，0.5 μg/mL から血管拡張を開始し，50%拡張濃度は 8.3 μg/mL であった。本研究では，発酵キョウバクから同定された降圧ペプチド(DVWY，FQ，VAE，VVG，WTFR）の ACE 阻害活性，血管拡張作用を測定することで発酵キョウバク由来ペプチドの降圧メカニズムの検討を行った。
【実験方法】*in vitro* ACE 阻害活性測定は堀内らの方法に従った。ペプチド溶液または純水（陰性対照群）と基質 Hip-His-Leu を混合し，37℃で 7 分間インキュベート後，ウサギ肺由来 ACE を添加し，さらに 30 分間インキュベートした。その後 1 N 塩酸により反応を停止させ，酢酸エチルによって遊離馬尿酸を抽出，HPLC により定量し，50%阻害濃度（IC_{50}値）を算出した。*in vivo* ACE 阻害活性は，ラット組織中の ACE 活性を測定することで算出した。雄性 13～15 週齢 SHR(各群 5 匹)に各ペプチドを 10 mg/kg，陰性対照として純水を単回経口投与した。投与から 6 時間後，すべての投与群をエーテル麻酔下で開腹し，胸部大動脈，肺，心臓，腎臓，肝臓を摘出。臓器は Tris-HCl buffer でホモジナイズし，抽出物の ACE 活性を堀内らの方法で測定，組織 ACE 活性を算出した。血管等尺性張力試験は，SHR 由来胸部大動脈より作製したリング標本を用いて行った。リング標本は，Krebs-Henseleit 溶液を満たしたマグヌス実験装置にセットし，静止張力 1.5 g を負荷した状態で収縮剤（フェニレフリン）により血管を収縮させ，降圧ペプチド 1.0～200 μg/mL の累積添加による張力変化を測定した。
【結果】各ペプチドの ACE 阻害活性測定の結果，いずれも *in vitro* および *in vivo* で ACE 阻害能を有することが明らかとなった。特に，発酵キョウバクで優れた ACE 阻害活性が確認された心臓と胸部大動脈においてFQおよびDVWYが強い効果を発揮し,心臓で FQが90.5%,胸部大動脈でFQが20.6%,DVWY が 28.3%の ACE 活性を抑制した。また，DVWY および VVG が血管拡張作用を示し，それぞれ 1.0，100 μg/mL から血管を拡張させ，最大拡張率は 36.2，55.9%であった。このように発酵キョウバクの優れた降圧作用には，組織 ACE 阻害作用および血管拡張作用を有するペプチドが関与しており，降圧メカニズムを裏付ける物質が明らかとなった。

antihypertensive peptide, ACE inhibition, vasodilation

講演番号：2A15p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ A 校舎 15 会場

可食性バイオハイブリッドの創出によるβ-ラクトグロブリンの機能改変

Functional improvements in β-lactoglobulin(BLG) by preparing edible bioconjugate

○松尾 悠歩、好田 正、高橋 幸資、服部 誠（東京農工大学院農）
○Yuho Matsuo,Tadashi Yoshida,Koji Takahashi,Makoto Hattori (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】β-ラクトグロブリン（BLG）は、必須アミノ酸を豊富に含み、乳化性、気泡性、ゲル化性などの機能特性を有する有用なタンパク質である。しかし、BLG は牛乳アレルギーの最も強力なアレルゲンであり、酸性条件および塩存在下で乳化性が低下するという問題点があるため、その機能を改変することには重要な意義がある。本研究では食品への応用を考慮して、食品加工に用いられる微生物由来トランスグルタミナーゼ（MTGase）により、BLG とε-ポリリシン（PL）を複合体化し、さらにメイラード反応によってデキストラン（Dex）を複合体化することにより、BLG の機能改変を試みた。
【方法】BLG と PL のモル比が 1:3 となるように混合しタンパク質溶液とした。1ｇの BLG に対して 2,000 unit の酵素力価となるように、タンパク質溶液と酵素溶液を混合した。pH 7.0、37 ℃で 48 時間 MTGase 反応させ、BLG-PL 複合体を得た。アミノ酸分析により BLG-PL 複合体の化学組成を調べた。さらに、BLG-PL 複合体と Dex（分子量 9,000-11,000、Sigma Aldrich）を相対湿度 79%、50℃で 24 時間メイラード反応させ、BLG-PL-Dex 複合体を得た。280 nm の吸光度測定およびフェノール硫酸法により、BLG-PL-Dex 複合体の化学組成を調べた。また、複合体をマウス（BALB/c）に腹腔内投与により免疫し、得られた血清を非競合法 ELISA に供して特異的抗体量を測定することで、複合体の免疫原性を評価した。
【結果】MTGase 反応により、BLG:PL=1:1.1（モル比）の BLG-PL 複合体が得られた。さらにメイラード反応により、BLG-PL:Dex=1:2.0（モル比）の BLG-PL-Dex 複合体が得られた。複合体の免疫原性については、BLG-PL 複合体投与時には BLG 投与持と比較して抗 BLG 抗体産生性が低下していたが有意な差ではなかった。一方で BLG-PL-Dex 複合体投与時には BLG 投与時と比較して抗 BLG 抗体産生性が有意に低下しており、より効果的に免疫原性の低減化を達成できた。また、抗 BLG-PL 抗体産生性および抗 BLG-PL-Dex 抗体産生性を調べた結果、いずれの場合も新たな免疫原性は生じていなかった。
　我々は、既に、BLG-PL 複合体がレチノール結合能を維持した状態で、BLG より優れた乳化性を有することを明らかにしており、本研究の手法が BLG の乳化性の改善、免疫原性の低減化といった多面的な機能改変に有効であることが明らかとなった。

β-lactoglobulin, immunogenicity, Maillard reaction

講演番号：2A15p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ A 校舎 15 会場

ローヤルゼリータンパク質アピシン及びその構成成分のヒト組織球性リンパ腫細胞株（ U937 ）の増殖に対する作用

Effect of apisin and its subunits in royal jelly on proliferation of human histiocytic lymphoma cell line (U937)

○仙波 美紗、上妻 由章、米倉 政実（茨城大院農）
○Misa SENBA,Yoshiaki KOUZUMA,Masami YONEKURA (Ibaraki Univ.)

【目的】我々の研究から、ローヤルゼリータンパク質の 1 つであるアピシン（ 分子量 350,000 ）は、MRJP1 (分子量 58,000 ）という糖タンパク質とアピシミン（ 分子量 5,500 ）というペプチドから成るオリゴマーであると考えられている。また、アピシンはヒト組織球性リンパ腫細胞株（ U937 ）等の各種培養動物細胞に対して、増殖促進作用を示すことを既に報告した。しかし、その作用メカニズムや、活性本体が MRJP1 あるいはアピシミンのいずれであるか等は未解明である。そこで本研究では、まずアピシンからアピシミン及び MRJP1 をそれぞれ分離精製し、これらの U937 細胞に対する作用を調べた。

【方法】アピシンの分離は既報に従い、ローヤルゼリー粗抽出液を DEAE-Cellulofine A-500 カラムに供し、分離されたアピシン画分を脱塩後、凍結乾燥したものをアピシン画分とした。アピシミンの分離は、まずアピシン画分を DTT、EDTA を含む脱イオン水で溶解し pH8 に調整後、2 倍容量のアセトン・メタノール混液（ 3:1, v/v ）を加えて混合し、沈殿生成後、遠心分離により得た上清を脱塩したものをアピシミン画分とした。細胞培養は、CO_2 インキュベーターで 37℃、5% CO_2 の条件下で行い、1% ペニシリン・ストレプトマイシンを含む RPMI-1640 培地で 1.0×10^5cells/ml に希釈した U937 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、各試料を終濃度 0.25～1.0mg/ml となるように添加後、24～72 時間培養し、トリパンブルー染色した後に Countess 自動セルカウンターを用いて細胞数を測定した。

【結果及び考察】アピシンは、既報と同様に精製され、MRJP1 とアピシミンから構成されていることをトリシン SDS-PAGE 及び N 末端アミノ酸配列解析によって確認した。アピシミン画分は、アピシン 250mg から 21.4mg 得られ、トリシン SDS-PAGE の結果、アピシミンが主要成分であったが、少量の MRJP1 が混在していることが分かった。これらの試料をそれぞれ U937 細胞に添加し、無血清培養条件下で細胞増殖に対する作用を調べた結果、培養 24～72 時間後、試料無添加のコントロールに対してアピシン画分では生細胞数が有意に増加し、一方アピシミン画分では生細胞数が有意に減少した。この結果から、アピシンの U937 に対する細胞増殖促進作用の活性本体は MRJP1 であることが示唆された。現在、アピシミンの純度を上げる方法並びに MRJP1 の分離法を更に検討中であり、次にアピシン及びその構成成分の細胞増殖に対する詳細な作用及びメカニズムを調べる予定である。

royal jelly, apisin, apisimin

講演番号：2A15p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ A 校舎 15 会場

カキ果実に含まれるキチナーゼの同定と精製

Purification and characterization of endochitinase from Diospyros kaki fruit

國井 沙織[1]、片桐 実菜[2]、山西 妃早子[2]、尾崎 嘉彦[1]、○森本 康一[1] ([1]近畿大生物理工、[2]和歌山県工技センター)
Saori Kunii[1], Mina Katagiri[2], Hisako Yamanishi[2], Yoshihiko Ozaki[1], ○Koichi Morimoto[1] ([1]Kinki Univ., [2]NIFTS, NARO)

【背景と目的】 カキ（*Diospyros kaki*）が食用として珍重された歴史は古いが，カキ果実に含まれるタンパク質の研究はほとんどない．カキに含まれるタンパク質含量は 0.5 g／100 g（湿重量）で，果実としては少ない部類である．しかし貴重な果実資源の一つであるカキ果実の有用性を明らかにするためには，タンパク質の研究が不可欠である．そこで，平核無柿の全タンパク質を抽出し，二次元電気泳動に展開して主なタンパク質スポットを質量分析計にて同定した．大量に含まれるタンパク質スポットは，意外にもキチナーゼと相同性の高いペプチド断片を有していた．本報告では，カキ・キチナーゼの精製と性質を明らかにすることを目的とした．

【方法と結果】 平核無柿をタンパク質抽出液（8 M 尿素，2% Triton X-100，2% CHAPS，30 mM DTT，1 mM PMSF，10 mM EDTA）にて抽出して超音波処理した．遠心後，上清を回収して TCA/アセトン処理して沈澱を集め，1 次元目に pH 3-11 の等電点電気泳動，2 次元目 12.5% SDS-PAGE にて全タンパク質を分離した．一番含量の多いスポットをトリプシンによりゲル内消化して，MALDI-TOF（ABI 4700）を用いて PMF 法によりタンパク質を同定した．その結果，このタンパク質は，ヨーロッパブドウ（*Vitis vinifera*）や竹（*Bambusa oldhamii*）のキチナーゼ前駆体のペプチド断片と Protein Score で 112 の高い相同性を示した．

次に，カキ・キチナーゼの性質を調べるために精製を試みた．まず，平核無柿の果肉を小片に分け，ワーリングブレンダーを用いて酢酸緩衝液中で磨砕して上清を回収した．その後，キチナーゼ画分を硫酸アンモニウムによる塩析（20-60%）と，透析，濃縮の工程を経て粗精製した．さらに疎水相互作用 HPLC（TSKgel BioAssist Phenyl），次に陰イオン交換 HPLC（TSKgel BioAssist Q）にてキチナーゼを精製した．SDS-PAGE の結果，カキ・キチナーゼの分子量は 2.8 万で，純度 90%以上であった．カキ・キチナーゼの二次構造を調べるために円二色性スペクトル（J-820，JASCO）を測定した結果，α-helix とβ-sheet の混合型であることが示された．

植物のキチナーゼには，病原性の真菌に対する防御機構の一つである Pathogenesis-related (PR)-protein として機能するファミリーが知られる．本研究で，カキ果実に大量のキチナーゼが見つかったことは，キチナーゼとカキ果実の生理的現象との関連が推察される．

chitinase, Kaki

講演番号：2A15p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ A 校舎 15 会場

3-deoxyosone 修飾タンパク質の配列解析
Sequence analyses of 3-deoxyosone-modified proteins
○石渡 まどか[1]、臼井 照幸[2]、渡辺 寛人[3]、早瀬 文孝[1]([1]明治大農・農化、[2]昭和学院短大・ヘルスケア栄養、[3]明治大農・生命科)
○Madoka Ishiwata[1], Teruyuki Usui[2], Hirohito Watanabe[3], Fumitaka Hayase[1] ([1]Meiji Univ., [2]Showagakuin Junior College, [3]Meiji Univ.)

【目的】メイラード反応は還元糖などのカルボニル化合物とアミノ酸などのアミノ化合物の非酵素的反応であり、食品中や生体内で起こることが知られている。α-ジカルボニル化合物である 3-deoxyglucosone (3-DG) や 3-deoxyxylosone (3-DX) などの 3-deoxyosone 類は、メイラード反応における重要な中間体である。これらの化合物は、タンパク質のリジン残基、アルギニン残基等を修飾して advanced glycation end-products (AGEs) 生成や、タンパク質の重合、架橋を引き起こす。メイラード反応によるタンパク質の構造の変化は、タンパク質の機能を著しく低下させる。しかしながら、3-deoxyosone 類によるタンパク質のグリケーション機構についての知見は乏しい。

そこで本研究では、タンパク質として cytochrome c、ribonuclease A を用い、3-deoxyosone 類修飾タンパク質におけるグリケーション生成物の解析と、配列解析によるアミノ酸残基の修飾部位について検討した。

【方法】3-DG (10 mM) または 3-DX (10 mM) とタンパク質 (cytochrome c と ribonuclease A、5 mg/ml) を 0.2 M リン酸緩衝液 (pH7.4) に溶解し、37℃で所定時間 (0 時間から 240 時間) インキュベートし、継続的に採取した。反応溶液は脱塩および未反応 3-DG または未反応 3-DX を除くために超純粋中で透析した。各サンプルを SDS-PAGE により分画後、切り出した各バンドをトリプシンまたはキモトリプシンで消化した。これらの操作により得られたペプチドを LC-MS/MS (LTQ-Orbitrap) 分析に供し、タンパク質データベース検索エンジン SEQUEST により解析を行った。

【結果】SDS-PAGE による分析の結果、3-DX や 3-DG は反応時間が進むにつれてバンドが高分子側にシフトしてダイマーバンドやトリマーバンド等が検出された。LC-MS/MS 分析のデータを SEQUEST によって解析を行った結果、cytochrome c においては 3-DG 系と 3-DX 系の両方で、リジン残基の多くが主にピロールアルデヒド化合物や N^{ε}-カルボキシメチルリジンによって修飾されているとこが明らかとなった。またアルギニン残基では、イミダゾリノン化合物が主要な生成物であることが明らかとなった。加えて、アルギニン残基にはスピロ化合物であるイミダゾロンも生成していることが明らかとなった。ribonuclease A においても 3-DG 系と 3-DX 系の両方で、cytochrome c と同様の傾向が見られた。これらの結果から、ジカルボニル化合物の種類によりタンパク質中で生成する化合物に大きな差異はないことが明らかとなった。

Glycation, 3-deoxyosone, Protein

講演番号：2A15p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ A 校舎 15 会場

グリセルアルデヒド修飾タンパク質が示す細胞毒性は、「GLAP 構造」によるものである
Cytotoxicity of glyceraldehyde-modified protein depends on GLAP structure

○山岸 理[1]、臼井 照幸[2]、渡辺 寛人[3]、早瀬 文孝[1]([1]明治大農・農化、[2]昭和学院短大・ヘルスケア栄養、[3]明治大農・生命科)
○Tadashi Yamagishi[1], Teruyuki Usui[2], Hirohito Watanabe[3], Fumitaka Hayase[1] ([1]MeijiUniv, [2]Showagakuin Junior College, [3]MeijiUniv)

【目的】メイラード反応とは、タンパク質などのアミノ化合物と、還元糖などのカルボニル化合物との間で起こる、非酵素的褐変反応であり、Advance glycation end prodacts（AGEs）を生成する。特に、グリセルアルデヒド（GLA）由来の AGEs は、細胞毒性を有し、ストレプトゾトシン誘発性糖尿病ラットにおいて増加するなど、様々な生理活性を有することが報告されている。また、GLA２分子が Lysine に修飾することにより生成するピリジニウム型 AGE である GLAP は、単独で細胞毒性を有することが報告されている。そこで本研究では、GLAP の特異的ポリクローナル抗体を作製した。さらに、GLA 修飾ウシ血清アルブミン（BSA）の細胞毒性試験に抗 GLAP 特異的抗体を用い、細胞毒性の抑制効果を検討した。これにより、GLA 修飾タンパク質の生理作用を示すエピトープである化学構造の解明を目的とした。
【方法】抗 GLAP 特異的抗体作製の為に GLAP アナログを作製した。GLA (200mM)と 6-アミノヘキサン酸（100mM)を 0.2M リン酸緩衝液(pH7.4)中で、37℃で 1 週間インキュベートし、反応溶液をクロマトグラフィーにより単離・精製した。抗体作製は、GLAP アナログをハプテンとして、キャリアタンパク質の Keyhole Limpet Hemocyanin（KLH）に結合し、GLAP 抗原を調製した。この抗原を BALB/c 系雌マウスに免疫し、血清を採取して抗 GLAP 特異的抗体を得た。細胞毒性は、HL-60 細胞、PC12 細胞および NGF で神経細胞様に分化した PC12 細胞について検討した。HL-60 細胞では、１%FBS 含有 DMEM 培地を用いて、2×10^6 cell/ml の濃度で細胞浮遊液を調製した。細胞浮遊液および試料を 24 well plate に播種した。96 時間後に一定量の浮遊細胞液を 0.4%トリパンブルー生理食塩液と等量混合した後、顕微鏡観察し生細胞数を血球計算板で測定した。PC12 細胞および分化 PC12 細胞においても同様の方法を用いて行った。
【結果】ELISA 法によりマウス抗血清の抗体価の上昇を確認した。また、競合 ELISA 法により GLAP 特異的抗体であることを確認した。HL-60 細胞、PC12 細胞および分化 PC12 細胞において、GLA-BSA 濃度依存的に control と比較して細胞増殖率が減少した。また、GLA-BSA 群では抗 GLAP 特異的抗体の添加により、細胞増殖率の減少が回復した。よって、抗 GLAP 特異的抗体が GLA-BSA において GLAP を捕捉することにより細胞毒性を抑制することが示唆された。この結果は、GLA 修飾タンパク質の生理作用を示すエピトープの化学構造が、GLA 由来の主要 AGE の GLAP であることを支持した。

Maillard, glycation, glyceraldehyde

講演番号：2A15p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ A 校舎 15 会場

α-tocopherol によるアマドリ化合物の分解作用の解析

Degradation of Amadori Compound by α-tocopherol

○木村 圭一[1]、臼井 照幸[2]、渡辺 寛人[3]、早瀬 文孝[1]([1]明治大農・農化、[2]昭和学院短期大・ヘルスケア栄養、[3]明治大農・生命科)
○Keiichi Kimura[1], Teruyuki Usui[2], Hirohito Watanabe[3], Fumitaka Hayase[1] ([1]Meiji Univ., [2]Showagakuin Junior College, [3]Meiji Univ.)

【目的】生体内のメイラード反応により生じた糖化タンパク質（Advanced glycation end products；AGE）は細胞機能障害を引き起こし、糖尿病合併症の発症に関与する。したがってメイラード反応の抑制剤は、合併症の発症を抑制しうると考えられる。我々は、食品成分のメイラード反応抑制作用について解析を行い、ある種の因子が反応の重要な中間体であるアマドリ化合物を分解して AGE の生成を抑制することを見出している。

一方、生体内ではメイラード反応によりリン脂質 phosphatidylethanolamine（PE）のアマドリ化した産物（Amadori-PE）が蓄積することが報告されている。Amadori-PE は脂質過酸化を引き起こすとともに血管新生などの生理作用を有しており、糖尿病合併症の病態との関連が示唆されている。

以上の背景から本研究では脂質のメイラード反応に対する抑制因子を探索した結果、α-tocopherol および関連化合物がアマドリ化合物分解活性を有することを見出し、その作用機構を解析した。

【方法】（1）グルコースと PE をメタノール-リン酸緩衝液（pH 7.4）に溶解し、37℃で 24 h インキュベートした。反応溶液より脂溶性画分を抽出し、固相抽出（Sep-Pak C18）に供した後、LC-Qtof-MS にて Amadori-PE の存在を確認した。逆相 HPLC により単離した Amadori-PE と α-tocopherol をメタノールに溶解し、37℃で 24 h 反応させた後、LC-Qtof-MS により生成物を分析した。（2）α-tocopherol による分解作用を検証するために、可溶性のビタミン E 関連化合物である Trolox を水溶性アマドリ化合物である fructose-*p*-toluidine と反応させ、逆相 HPLC で生成物を分析した。

【結果】α-tocopherol と反応させることにより、Amadori-PE が減少し、PE が生成する、すなわちアミノ基が再生することが明らかとなった。脂質由来アマドリ化合物に対する分解活性を有する化合物はこれまで報告されておらず、α-tocopherol は脂質の過酸化だけでなく、糖化をも抑制しうることが初めて示された。一方、α-tocopherol による新たな作用を検証するため、Trolox が水溶性アマドリ化合物分解活性を有するか評価した。その結果、Trolox が濃度依存的にアマドリ化合物を分解したことから、クロマノール類がアマドリ化合物分解作用をもつことが明らかとなった。

これらの結果は、α-tocopherol をはじめとするクロマノール類がアマドリ化合物分解という新たな作用により、タンパク質や脂質のメイラード反応を抑制し、関連疾患の予防に寄与しうることを示唆するものである。

maillard rection, Amadori compound, α-tocopherol

講演番号：2A15p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ A 校舎 15 会場

D-キシロースーβ-アラニン系メイラード反応で生成する新奇赤色色素の同定

Identification of Novel Pyrrolopyrrole Compounds Formed in a D-Xylose － β-Alanine Reaction System

○伊藤 惠介[1]、渡辺 寛人[2]、早瀬 文孝[1] ([1]明治大農・農化、[2]明治大農・生命科)
○Keisuke Ito[1], Hirohito Watanabe[2], Fumitaka Hayase[1] ([1]Meiji Univ., [2]Meiji Univ.)

【目的】　食品の加工、貯蔵、調理の際には、タンパク質や糖質をはじめとする食品成分間の反応が起こる。その一つとして知られるメイラード反応は、カルボニル化合物とアミノ化合物間の非酵素的褐変反応であり、食品の品質形成や劣化に関与する重要な反応である。その最終生成物である褐色色素のメラノイジンは、難分解性の高分子化合物であるため、その構造や生成経路には不明な点が多い。D-キシロースーグリシンモデル系において Blue-M1 [1]、Red-M1、M2 [2]をはじめとする色素化合物が同定されており、それらはピロロピロール骨格を有し、単独で褐変することなどからメラノイジンの重要な中間体であると推測されている。本研究では、D-キシロースーβ-アラニンモデル系において、新奇赤色色素の生成を確認し、構造解析を行った。また、インキュベーションによる褐変への寄与について考察した。

【方法】　D-キシロースとβ-アラニンを 60%エタノールに溶解し(pH 8.1)、26.5℃にて 48 時間インキュベートした。反応溶液を各種クロマトグラフィーにて精製し、主要化合物を LC-ESI-Qtof-MS、NMR により構造解析を行った。また、各種赤色色素を単独、もしくは、モデル反応系内でインキュベートした。

【結果】　反応溶液を陰イオン交換クロマトグラフィーにより分画した。吸光度測定より、560 nm に吸収を持つ画分を濃縮後、主要生成物を逆相 HPLC により精製し、2 種類の赤色色素を得、それぞれ Red-B1、Red-B2 と命名した。LC-ESI-Qtof-MS による質量解析、組成演算の結果、Red-B1 は分子量 723、組成式 $C_{32}H_{43}N_4O_{15}$ であり、Red-B2 は分子量 705、組成式 $C_{32}H_{41}N_4O_{14}$ であると決定した。NMR による構造解析の結果、Red-B1 は Red-M1 同様、アゼピン構造、ピロロピロール構造を有する化合物であり、Red-B2 は、ピロロピロール構造とピロール構造を有する化合物であった。これらの化合物も Blue-M1 同様ピロロピロール骨格を有していた。さらに、インキュベーションにより、赤色色素の減少に伴い褐変が進むことから、本研究で同定した赤色色素はメラノイジンとなる中間体である事が示唆された。

[1] F. Hayase, et al, Biosci. Biotechnol. Biochem., 63 (8), 1512-1514 (1999)
[2] F. Hayase, et al, Biosci. Biotechnol. Biochem., 73 (10), 2287-2292 (2009)

Maillard reaction, red pigment, Pyrrolopyrrole

講演番号：2A15p17
講演日時、会場：3 月 25 日 17:12～ A 校舎 15 会場

D-キシロース-グリシン系メイラード反応により生成する新奇青色色素化合物の同定
Identification of Novel Blue Pigment Formed in a D-Xylose-Glycine Maillard reaction

○横関 俊昭[1]、渡辺 寛人[2]、早瀬 文孝[3]（[1]明治大院農・農化、[2]明治大農・生命科、[3]明治大農・農化）
○Toshiaki Yokozeki[1], Hirohito Watanabe[2], Fumitaka Hayase[3] ([1]Meiji Univ., [2]Meiji Univ., [3]Meiji Univ.)

【目的】メイラード反応とは、アミノ化合物とカルボニル化合物の間で起こる非酵素的褐変反応である。この反応は食品の加工、貯蔵、調理の際に起こり、食品の品質形成や劣化に関与する重要な反応である。反応最終生成物であるメラノイジンは難分解性褐色高分子化合物であり、その複雑な構造のために構造や生成経路について未だ不明な点が多い。我々はこれらの解明を目的として、D-キシロース-グリシンモデル系反応において、主要生成物である Blue-M1[1]を始めとする Blue-M1~M7 までの 7 種の青色色素化合物を同定してきた。これらの青色色素化合物は単独で褐変する性質を有することから、メラノイジン生成の重要な中間体であると推測されている。本研究では、D-キシロース-グリシンモデル系において、上記の 7 種の青色色素化合物以外に、新奇の青色色素化合物を単離し、構造解析を行った。また、この青色色素化合物の単独インキュベートによる化学的変化について研究を行った。
【方法】D-キシロース(1M)とグリシン（0.1M）を炭酸水素ナトリウム(0.1M)含有 60%エタノール溶液(pH8.1)中で 26.5℃にて 48 時間インキュベートした。この反応溶液を各種クロマトグラフィーにて精製し、青色色素化合物ついて LC-ESI-Qtof-MS、NMR による構造解析を行った。
【結果】陰イオン交換クロマトグラフィーにて反応溶液から青色色素画分を分画した。青色色素画分を固相抽出にて精製後、逆相 HPLC により新規青色色素化合物を単離・精製し、この化合物を Blue-M8 と命名した。
LC-ESI-Q-TOF-MS による質量解析、組成演算の結果、Blue-M8 は分子量 676、組成式 C29H34N5O14 と決定した。NMR による構造解析の結果、Blue-M8 は主要な青色色素である Blue-M1 にグリシンが 1 分子付加した構造であった。また Blue-M8 の化学的性質を調べるために、反応溶液と同一条件下で単独インキュベートを行った。その結果、Blue-M8 からグリシンが脱離し、Blue-M1、M3、M5、M6、M7 などの数種の青色色素化合物が生成することを HPLC による重ね打ち試験および LC-ESI-Q-TOF-MS により確認した。Blue-M8 は単独で他の青色色素化合物に変化する唯一の青色色素化合物であり、さらに褐変する性質を有することから、メラノイジン生成の重要な中間体であると強く示唆される。

[1] F. Hayase, et al, Biosci.Biotechnol.Biochem, 63, 1512-1514(1999)

maillard, pigments, melanoidin

講演番号：2A15p18
講演日時、会場：3 月 25 日 17:24～ A 校舎 15 会場

D-Xylose-Glycine 系メイラード反応より生成する青色色素 Blue-M1 の褐変機構の解析
Browning Mechanism of Blue-M1 from D-Xylose-Glycine Maillard Reaction System
○高井 良輔[1]、渡辺 寛人[2]、早瀬 文孝[1] ([1]明治大農・農化、[2]明治大農・生命科)
○RYOUSUKE TAKAI[1], HIROHITO WATANABE[2], HUMITAKA HAYASE[1] ([1]Meiji Univ., [2]Meiji Univ.)

【緒言】 メイラード反応は還元糖などのカルボニル化合物とアミノ酸などのアミノ化合物間で生じる非酵素的褐変反応である。メイラード反応の最終生成物であるメラノイジンは難分解性高分子であるため、その構造や生成機構については明らかとなっていない。
当研究室ではD-xylose-glycine系メイラード反応においてBlue-M1 [1] をはじめとする数種類の青色色素化合物を同定している。これらの青色色素は単独で褐変し、一部メラノイジンと類似する化学的性質を持つことから、メラノイジンの重要な中間体であると考えられている。本研究ではD-xylose-glycine 系の主要青色色素である Blue-M1 の単独インキュベーションによる分解生成物の構造解析を行い、褐変機構の知見を得た。
【実験方法】200 μM Blue-M1、100 μM 炭酸水素ナトリウムを pH8.1 の 60 %エタノール溶液に溶解し、26.5 ℃で一週間インキュベーションした。反応溶液を RP-HPLC に供し、Blue-M1 及び分解生成物の経時的変化を調べた。また、分解生成物を各種クロマトグラフィーにて単離・精製し、質量分析及び NMR にて構造解析を行なった。
【結果】Blue-M1 はインキュベーション時間に伴い減少し、Peak-Ⅰ、Peak-Ⅱが増加した。RP-HPLC のリテンションタイム、質量分析の結果より Peak-Ⅱは当研究室で報告されている PPA-1 (Pyrrolopyrrole aldehyde-1) と同定した。
Peak-Ⅰを単離・精製後、質量分析に供した結果、$[M+H]^+$= 341 の分子イオンピークを検出した。高分解能 MS により、組成式 $C_{14}H_{16}O_8N_2$ と決定した。次に NMR による構造解析を行い,
Peak-Ⅰは、PPA-1 同様にピロロピロール構造を有し、糖由来の側鎖に 1,2,3-トリヒドロキシプロピル基を持つ、 1,4-(dicarboxymethyl)-5-(trihydroxypropyl)-pyrrolo[3,2-b]-2-carbaldehyde (PPA-2) と同定した。
また Blue-M1 の減少量と、PPA-1 及び PPA-2 の生成量を定量した。一週間のインキュベーションにより、200 μM Blue-M1 に対し、PPAs は合計 70 μM 程度生成した。また PPA-1 と PPA-2 の生成量を比較すると、PPA-2 の方が PPA-1 より約 5 倍多く生成した。
本研究の結果より Blue-M1 は一度分解を経た後、さらなる反応を経てメラノイジンを形成することが示唆された。
[1] F. Hayase, et al, Biosci. Biotechnol. Biochem., 63 (8), 1512-1514 (1999)

maillard, pigment, pyrrolopyrrole

講演番号：2A15p19
講演日時、会場：3 月 25 日 17:36～ A 校舎 15 会場

動物行動学に基づいたうま味の相乗効果評価

Estimation of synergetic effects with umami taste based on ethological analysis

○河合 崇行、日下部 裕子（農研機構　食品総合研究所）
○Takayuki KAWAI,YUKO KUSAKABE (National Food Research Institute)

うま味識別能に優れた C57BL/6 系マウスを用いて、うま味・甘味・核酸の混和によるおいしさ（＝嗜好）の相乗効果を調べた。濃度の異なる数種類の試料溶液をマウスに提示した際に示す 10 秒間のリック数に基づいて嗜好相乗効果の大きさを評価した。
その結果、単独では高い嗜好性を示さない 100 mM グルタミン酸ナトリウム溶液と単独では高い嗜好性を示さない 8 mM イノシン酸ナトリウム溶液の混和により強い嗜好相乗効果が認められた。リック特性を示す曲線のシフト量から推算すると、グルタミン酸ナトリウム溶液に 8 mM イノシン酸ナトリウムをを混和した場合の嗜好相乗効果は、グルタミン酸ナトリウム単独時の 16 倍相当以上であった。イノシン酸ナトリウム溶液に 100 mM グルタミン酸ナトリウムを混和した場合の嗜好相乗効果は、イノシン酸単独時の約 4 倍相当であった。
また、サッカリン溶液に 10 mM グルタミン酸ナトリウムを混和した場合にも、サッカリン単独時の約 2 倍相当の嗜好相乗効果が認められた。このことは甘味受容体とうま味受容体が同一細胞に共存している可能性を支持する結果であると考えられる。

umami, synergetic effects, lick

講演番号：2A16a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ A 校舎 16 会場

亜臨界水抽出による緑茶の苦渋味抑制作用に関する化学的研究

A chemical study about the bitterness restraint action of the green tea by sub-critical water extraction

○宮下 知也[1]、衛藤 英男[2]、岡村 拓哉[3]、木戸 康嗣[4]([1]静大院バイオ、[2]静大農、[3]静大農、[4]静大農)
○TOMOYA MIYASHITA[1], HIDEO ETOH[2], TAKUYA OKAMURA[3], KOUJI KIDO[4] ([1]Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ., [3]Shizuoka Univ., [4]Shizuoka Univ.)

【目的】現在、緑茶は健康維持および健康増進を目的に飲用の需要が増加し、消費者に受け入れられている。特に緑茶に含まれるカテキンの機能性についてはこれまでに数多くの研究がされ、様々な生理機能が報告されている。しかし、カテキンには独特の強い苦渋味があるため、飲みにくく、高濃度に摂取するのは容易ではないという点がある。そのため、美味しく飲みやすい製品が望まれている。そこで、我々は食品加工としての実例が少ない亜臨界水抽出技術を利用して緑茶の味や香りの改善を行った。その結果、緑茶本来の香りを残しつつ、強い苦渋味を抑えた緑茶抽出液を得ることに成功した。人による官能評価や味覚センサー分析による化学的評価によっても同様の評価が得られた。そこで、本研究ではカテキンの苦渋味抑制メカニズムを解明することを目的に味に関与する成分を分析し、苦渋味抑制効果について検証を行った。
【方法】緑茶（茶葉）に蒸留水を混合させ、熱水（90℃）、加圧（120℃）、亜臨界水（3MPa、120～150℃）の条件で抽出を行った。その後、得られた緑茶抽出液を濾過させ、分析用の緑茶サンプルとした。亜臨界水抽出の特性を明らかにさせるため、従来の抽出方法である熱水抽出・加圧抽出を対照として用いた。それぞれ得られた緑茶サンプルをタンパク質、アミノ酸、糖類（多糖類、遊離糖類）、カテキン類、カフェインなどの成分を分析し、検証を行った。
【結果】亜臨界水抽出では従来の熱水抽出・加圧抽出に比べ、全糖量が多いことが確認された。また、その中でも水溶性ペクチンおよび水溶性食物繊維の含有量が増加することが分かった。さらに遊離糖類を分析した結果、スクロース、マルトースが増加していることが確認された。これらの結果から糖の成分が何らかの形で苦渋味をマスキングしているのではと示唆された。アミノ酸分析の結果ではセリン、グルタミン酸、アルギニンの増加が確認され、アミノ酸による苦渋味抑制効果も考えられた。カテキン類およびカフェインの分析結果では機能性が高いEGCGの含有量に変化は見られなかったが、EGCGの次に苦渋味が強いとされているECG含有量に有意な減少が確認された。また、カテキンのガレート基が遊離していく傾向が見られ、亜臨界水による加水分解作用によるものと示唆された。カフェインの含有量には変化は見られなかった。亜臨界水抽出で得られる緑茶抽出液は高濃度のカテキンを含有しながらも苦渋味は抑制され、非常に飲みやすくなると化学的にも評価された。今後、糖類やアミノ酸によるカテキンの苦渋味マスキング効果について細胞レベルでの検証や新たな機能性について検討を行っていく予定である。

Sub-critical water, Green tea, Bitterness

講演番号：2A16a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ A 校舎 16 会場

沖縄県北部　ヤンバル地方の植物”サクラバ”の機能性成分の検討

Examination of the functional ingredient of the plant called "Sakuraba" in Yanbaru area of the northern Okinawa district

○伊波 幸紀[1]、當山 瑛子[2]、藏屋 英介[3]、池松 真也[4] ([1]沖縄工業高等専門学校、[2]沖縄工業高等専門学校、[3]沖縄工業高等専門学校、[4]沖縄工業高等専門学校)
○Yukitoshi IHA[1], Akiko TOUYAMA[2], Eisuke KURAYA[3], Shinya IKEMATSU[4] ([1]ONCT, [2]ONCT, [3]ONCT, [4]ONCT)

【目的】近年では、ポリフェノールなどの有効成分の動脈硬化や脳梗塞を防ぐ抗酸化作用が注目され、多くの研究が報告されている。沖縄県は、亜熱帯気候に属し、独特な植物の生態系を持つため全国でも有数な亜熱帯野菜・果物の産地となっている。しかし、県産の亜熱帯野菜・果物に関しては、含まれている成分の科学的調査が行われていない品種もある。そこで我々は、沖縄県でも独特な野菜・果物の栽培が盛んである県北部のヤンバル地方に着目し、栽培している野菜・果物の機能性成分の検討を行なっている。今回は、33 種の野菜・果物を調査・検討していく中で“サクラバ”という植物に含まれている特徴的な機能性成分を見つけたので、その機能性成分を詳しく調査してくことにした。
【方法】はじめに、ヤンバル地方で栽培している野菜・果物を凍結乾燥機にて一晩乾燥させ、乾燥試料を作製した。次にマルチビーズショッカーを用いて 2000rpm、1min で破砕した。乾燥試料 0.5g に対して、100%エタノールを 10ml、熱水を 10 ml それぞれ加え、10min 程度混和し、15ml チューブに移し、一晩回転撹拌した。それぞれをエタノール抽出、熱水抽出試料溶液とした。
　一晩撹拌させた試料溶液を用いて、Folin・Ciocalteu 法で総ポリフェノール量を、DPPH 法にて抗酸化活性能、チロシナーゼ阻害活性能、抗腫瘍活性能を測定した。
　また、ビタミン C 定量、UPLC などの解析機器を用いての詳細な機能性成分分析を進めた。
【結果】現在、サクラバの 100%エタノール抽出、熱水抽出試料溶液の総ポリフェノール量、抗酸化活性能双方とも、ポリフェノールが多く含まれていると報告され、沖縄県北部で栽培されているブラジル南部原産のフトモモ科の果実である“ジャボチカバ”と同等であることがわかった。また、チロシナーゼ阻害活性能では、高い阻害率があり、より詳細な細胞を用いた試験での検討を進めている。今後、“サクラバ”という植物の機能性を詳細に明らかにし、沖縄県北部地域の農業の活性化に繋げていきたい。

functional ingredient, polyphenol

講演番号：2A16a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ A 校舎 16 会場

竹由来の抗酸化性物質について

antioxidant compounds from bamboo (*Phyllostachys pubescens*)

○西澤 正平、山下 雅大、椎葉 究（東京電機大理工）
○shohei NISHIZAWA,masahiro YAMASHITA,kiwamu SHIIBA (Tokyo Denki Univ.)

孟宗竹（*Phyllostachys pubescens*）はイネ科に属していて、国内では大量の繁茂が環境問題を引き起こすほどバイオマスとして多く存在しており、成長が２～３年と早く、リグニンが木質と比較して少ない点から、バイオ資源としても注目されている。実際、竹をバイオエタノール原料として研究が行われパイロットプラントも動き始めている。しかしながら、硫酸や高アルカリを用いるようなエタノール発酵前の前処理と糖化処理については、生産コストの高騰化や廃液処理、残渣処理などの問題がある。そのため低コストなバイオリファイナリー生産技術が求められている。当研究室では、強酸や強塩基を用いることなく抽出・糖化し付加価値の高い成分をバイオリファイナリーとして調製する研究を行っている。今回、孟宗竹から、抗酸化性の高い物質を精製し、その構造と性状分析について研究を行ったので、報告する。

（方法）

・孟宗竹を機械的に粗粉砕し 1.5 ㎝角の金属篩でスルーした粉砕物を水洗し、オートクレーブにより圧力(121℃、10 分)処理後、植物細胞壁破壊酵素（ヤクルト社製セルラーゼ「オノズカ」）により酵素処理（50℃、2 時間）した。その後、遠心分離した上清を凍結乾燥して粗竹オリゴ糖（BOS）とした。

・BOS1％水溶液を ShephadexLH-20 に供し、水→水：Met(50:50) →Met100％で溶出させた。

・BOS およびカラム溶出液の抗酸化性を DPPH 法によりアスコルビン酸に換算した抗酸化成分濃度（ASA）を求めた。また、フェルラ酸濃度を HPLC により求めた。更に、2N TFA により加水分解後、構成糖を LiChroCART250 カラムを用いた HPLC により測定した。

・最も抗酸化性の強かったカラム溶出液中の成分は更に HPLC（LiChroCART150 カラム）に供し、ピークを２成分検出した。その２成分の抗酸化能を測定した。

（結果）

・BOS を孟宗竹 100ｇから約 700mg 調製した。BOS の構成糖比は xyl:Ara:Glu（46:13:41）で、BOS の FD 中フェルラ酸量は 552mg/100g であった。

・カラム溶出により No.1～14 まで分画した。抗酸化性が最大の分画（Met100%画分）は NO.12 で、その抗酸化能は全 ASA 換算濃度で 0.537μmol／ｍｌであった。全糖量 45μｇ／ml、還元糖量 9.9μｇ／ml

・NO.12 を更に HPLC で分離した 2 成分のうち、peak2 は抗酸化能がより強く、構成糖として、キシロースとアラビノースを含有していた。

arabinoxylan, ferulic acid, antioxidant

講演番号：2A16a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ A 校舎 16 会場

竹・松廃材のリグニン成分からの抗酸化物質について

Antioxidant from lignin of bamboo and akamatsu

○倉掛 昌裕、廣津 紗弥、芝田 美幸（福山大生命）
○Masahiro Kurakake,Saya Hirotsu,Miyuki Shibata (Fukuyama Univ.)

【目的】竹や木材などの廃棄物は木質バイオマスとして注目されており、主成分のセルロースの糖化によりエタノール発酵用のグルコースが得られる。しかし、その他成分のリグニンの分解物やヘミセルロースに結合するフェルラ酸などを抗酸化剤として利用することも可能と考えられる。ここでは竹廃材等草本類に対して、リグニンの変性・分解効果のあるアンモニア高温処理を行い、その処理物抽出液の抗酸化性について調べた。また、リグニン含量の高い針葉樹の赤松（枝部）を試料として用い、リグニンからの抗酸化物の生産性について調べた。

【方法】(1)アンモニア高温処理法：25ml容メジューム瓶に粉砕した試料2gを量り入れ、25%アンモニア水4mlを加え均一になるように混ぜた。120℃で20分間置いた後、アンモニアを除去するため減圧乾燥させた。この乾燥物をアンモニア高温処理試料として実験に供した。

(2)DPPHラジカル消去活性測定法：試験管に試料抽出液 0.2ml、0.1M Tris-HCl (pH7.4) 0.8 ml、0.5M DPPH (1.1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラシル) 1mlを順次加えて 10 秒間攪拌後、暗所で 20 分間置いた。その後、波長 517nmでの吸光度を測定した。試料溶液の代わりにエタノールを添加したものの吸光度をブランクとして、試料のDPPHラジカル消去活性を計算した。50％消去率を与える試料溶液の濃度IC50 を求めた。

(3)SOD様活性測定法:試験管に試料抽出液 0.1ml、50mMリン酸(pH8.0)2.5ml、2mMキサンチン 0.1ml、3mMEDTA・2Na 0.1ml、1.5mM WST-1 0.1ml、60 mU/ml XO（キサンチンオキシダーゼ）0.1mlを順次加えて 10 秒間攪拌後、37℃で 20 分間置き、波長 438nmの吸光度を測定した。試料抽出液の代わりにエタノール 0.1mlを添加したもの、XOの代わりにエタノール 0.1mlを添加したもの、試料抽出液とXOの代わりにエタノール 0.2mlを添加したものをそれぞれブランクとして、活性酸素消去力（SOD様活性）を求めた。DPPHラジカル消去活性測定と同様にIC50 を求めた。

【結果】アンモニア高温処理および未処理の孟宗竹および赤松の抽出液の DPPH ラジカル消去活性について比較したところ、孟宗竹では処理により IC50 は 40％まで減少し、抗酸化物質の生成が認められた。一方、赤松では処理より IC50 は 4 倍程度になり、抗酸化性は大きく減少した。この結果について詳細に調べるため、孟宗竹および赤松をアンモニア高温処理後、リグニンを抽出・分離し、その抗酸化性について分析を行なった。

antioxidant, lignin, akamatsu

講演番号：2A16a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ A 校舎 16 会場

高知県産のイタドリ中のレスベラトロールおよびその配糖体の含量

The contents of resveratrol and its glycosidic form in *Polygonum cuspidatum* harvested in Kochi

○栗田 せりか、柏木 丈拡、島村 智子、受田 浩之（高知大・農）
○Serika KURITA,Takehiro KASHIWAGI,Tomoko SHIMAMURA,Hiroyuki UKEDA (Kochi Univ.)

[目的]イタドリ（*Polygonum cuspidatum*）は東アジアに主に生息するタデ科の多年生植物で、日本の一部の地域において新芽の部分は食用とされ、また中国では根部が漢方薬として用いられている。イタドリの薬効成分であるレスベラトロール（Resv）はポリフェノールの一種であり、抗酸化、抗癌、血糖降下、利尿作用などが報告されている。漢方薬として主に用いられる乾燥されたイタドリ根部の Resv 含量の報告はあるものの、可食部を含む他の部位の含量についての研究はほとんどない。本研究では、高知県内で採取されたイタドリの新芽をはじめとする各部位の遊離および配糖体で存在する Resv 含量を測定し、生育地域間での違いを比較した。
[方法]高知県西部(四万十町)・中部(鏡村)・東部(室戸市)にて、2012 年 5 月に採取したイタドリを用いた。新鮮なイタドリを、可食部である茎上部・中部・下部および茎部の表皮、葉、塊茎、根茎に分け、それぞれの部位を 80%メタノールで 2 回抽出したものを MeOH 抽出液とした。濃縮乾固した MeOH 抽出液を水と酢酸エチルで液液分配し、酢酸エチル層を濃縮した後 30%アセトニトリルに転溶し、ODS-Sep-Pak®カートリッジにアプライした。アセトニトリルで溶出し、得られた溶出液を濃縮乾固し、30%アセトニトリルで定容したものを遊離 Resv 試料とした。また MeOH 抽出液を濃縮乾固させ、β-グルコシダーゼを用いて加水分解(37℃、一晩)した後、同様に処理したものを総 Resv 試料とした。Resv 含量は逆相系 HPLC を用いて分析し、新鮮重（f.w.）1 g あたりの含量で示した。総 Resv 含量から遊離 Resv 含量を差し引いた値を配糖体 Resv 含量とした。
[結果]鏡村のイタドリでは、可食部である若い茎部あるいは茎部の表皮の総 Resv 含量は 0.1-0.5 μg/f.w.g であり、上部・中部・下部での差は認められなかった。他の部位の総 Resv 含量において、葉部は茎部の 5-10 倍であったのに対し、根部の含量は非常に高く根茎は 5,263 μg /f.w.g であった。他の地域においても、部位ごとの総 Resv 含量には同様の傾向が認められたが、遊離 Resv 含量と配糖体 Resv 含量の比率は異なっていた。鏡村のイタドリの葉部では総 Resv 含量に占める配糖体 Resv の割合は 93%であったのに対し、室戸市のイタドリの葉部では配糖体 Resv の比率が 18%と非常に低かった。以上から Resv はイタドリ組織全体に分布しており、現在破棄されている茎部の表皮や葉部なども Resv 供給源として利用できる可能性が見いだされた。また地域間で配糖体 Resv の比率に差が見られたことから、生育環境の違いがイタドリの各部位における遊離および配糖体 Resv の分布に影響することが考えられた。今後はイタドリ中の Resv 含量と抗酸化能の関係について検討する予定である。

resveratrol, Polygonum cuspidatum, antioxidant

講演番号：2A16a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ A 校舎 16 会場

シュタインメッツ粉を用いたパンの抗酸化能について
Antioxidant activity of the bread containing Steinmetz flour

○角川 幸治[1]、村上 香[1]、塩満 裕斗[1]、藤尾 勇介[1]、庄林 愛[2] ([1]広島工業大生命・食品生命、[2]アンデルセン・パン生活文化研究所)
○Koji Kakugawa[1], Kaori Murakami[1], Yuto Shiomitsu[1], Yusuke Fujio[1], Megumi Shobayashi[2] ([1]Hiroshima Institute of Technology, [2]ANDERSEN Institute of Bread & Life Co., Ltd.)

【目的】老化や疾病の原因のひとつとして、フリーラジカルや活性酸素による生体高分子の過酸化が挙げられる。その予防を目的に様々な食品の抗酸化能が研究されており、全粒穀物の抗酸化能については知られているが、パンの抗酸化能についての知見は少ない。これまでに我々は、全粒粉系のパンがイギリスパンに比べ高い抗酸化能を有している事を明らかにした[1)]。また、トレコンブロートと呼ばれるシュタインメッツ粉、ライ麦粉、ごま等を配合したパンには、大腸ガン抑制活性がある事を明らかにした[2)]。本研究では、一般的に抗酸化能の評価に用いられている DPPH 法及び ORAC 法を用い、株式会社アンデルセンで市販されている様々なパンについて抗酸化能の評価を行った。
【方法】原料となる精白小麦粉、シュタインメッツ粉、全粒粉、ライ麦粉、ごま及びこれらとその他種実類、ドライフルーツを原材料として用いたパンについて、DPPH 法及び ORAC 法を用いて抗酸化能の測定を行った。穀粉類以外の測定用試料は、凍結乾燥後、フードプロセッサー及びミルを用いて粉砕・混合したものを用いた。DPPH 法については、測定用試料を 80%エタノールで抽出した後、DPPH ラジカル消去能の評価を行った。ORAC 法については、測定用試料を n-ヘキサン:ジクロロメタン(1:1)で脂溶性成分の抽出後、食品機能性評価マニュアルの方法[3)]に従って親水性 ORAC の測定を行った。また、脂溶性成分については、親油性抗酸化物質の緩衝液への溶解に RMCD を含有する 50%アセトン溶液を用いる親油性 ORAC 標準法[4)]に従って測定を行った。
【結果】本研究では、抗酸化能を比較する対照として精白米飯及び精白小麦粉を使用したイギリスパンを用いた。DPPH 法及び ORAC 法のいずれを用いた場合でも、シュタインメッツ粉を用いた 8 種類のパンについては全て白米やイギリスパンよりも有意に抗酸化能が高かった。また、両法とも、大腸ガン抑制効果を示したトレコンブロートよりも、ミューズリーブロート、シュタインメッツレーズン、シュタインメッツウォルナッツ、フルーツ&ナッツブレッドの抗酸化能が有意に高かった。これらのパンについては、パンの製造に用いた小麦粉以外の原料の抗酸化能が高いことから、パンの抗酸化能は製造原料に由来するものと考えられた。

1)2009 年日本農芸化学会大会講演要旨集 p.214
2)第 71 回日本癌学会学術総会 PROCEEDINGS p. 354
3)食品機能性評価マニュアル集第 II 集, p. 79
4)Jimenez-Alvarez et al, *J Agric. Food Chem.*, **56**, 6470 (2008)

orac, dpph, Steinmetz flour

講演番号：2A16a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ A 校舎 16 会場

ラジカル消去反応におけるチオール化合物と各種抗酸化物の併用効果

Combination effects between a thiol compound and other antioxidants in a radical scavenging reaction.

○山元 涼子[1]、藤田 睦[1]、山内 良子[1]、島村 智子[2]、柏木 丈拡[2]、受田 浩之[2]、穐山 浩[3]、松井 利郎[4]、石川 洋哉[1]([1]福岡女子大国際文理、[2]高知大農、[3]国立衛研、[4]九大院農)
○ Ryoko YAMAMOTO[1], Mutsumi FUJITA[1], Ryoko YAMAUCHI[1], Tomoko SHIMAMURA[2], Takehiro KASHIWAGI[2], Hiroyuki UKEDA[2], Hiroshi AKIYAMA[3], Toshiro MATSUI[4], Hiroya ISHIKAWA[1] ([1]Fukuoka Women's Univ., [2]Kochi Univ., [3]NIHS, [4]Kyusyu Univ.)

【目的】

酸化防止剤として食品への用途が認められている抗酸化成分を併用する場合，成分間での相互作用を考慮する必要がある。すなわち，抗酸化成分の混合系では互いが相乗あるいは相殺的に作用する可能性があるため，その相互作用解析・評価が重要となる。本研究では，薬剤の併用効果解析法である Median effect analysis を用いて，抗酸化能を有する代表的なチオール化合物であるグルタチオンと各種抗酸化物の併用効果解析を試みた。

【方法】

グルタチオンと抗酸化成分 20 種（ポリフェノール類中心）を試験物質として用いた。活性測定には DPPH ラジカル消去活性測定法を用いた。まず，2 種類の抗酸化成分を単独で測定した後，各々を IC_{50} の濃度比で混合し，再度活性を測定した。得られた結果を基に Median effect plot を行い，各直線の傾き m 値より各濃度レベルにおける Combination index （CI 値）を算出し併用効果の判定を行った（CI<1：相乗効果，CI=1：相加効果，CI>1：相殺効果）。

【結果】

Median effect analysis による解析の結果，カテキン類・ケルセチンなど多くの抗酸化物との間でグルタチオンとの併用における相乗効果が確認された（17 通りの組合せ）。また，供試した濃度範囲によって効果が異なり，より高濃度域において CI 値が小さくなる傾向，すなわち高濃度域で大きな相乗効果を発現することが確認された。相乗効果を示した化合物群は，いずれも分子内にカテコールあるいはピロガロール構造を有していることが明らかになった。相乗効果の程度は，カテコール群＞ピロガロール群であり，カテコール類の CI 値は 0.3-0.5 であったのに対し，ピロガロール類では CI 値 0.7-0.8 程度であった。フラボノール類では，ケルセチン（相乗）＞ミリセチン（相乗）＞ケンフェロール（相加）となった。カテキン類でも同様に，カテコール構造を有するエピカテキン・エピカテキンガレートがエピガロカテキン・エピガロカテキンガレートよりも大きな相乗効果を示した。フェノール酸類では，カフェ酸・プロトカテク酸＞没食子酸＞フェルラ酸となった。グルタチオンなどのチオール化合物は，ラジカル消去反応において酸化した抗酸化物を再生する能力を有することが知られている。本実験での相乗効果は，グルタチオンの各抗酸化物に対する再生効果を反映したものと考えられた。

antioxidant, combination effects, median effect analysis

講演番号：2A16a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ A 校舎 16 会場

チオールによるフラボノイドの抗酸化性増強効果―成分間反応物からの解析―

Enhancement of antioxidant activity of flavonoids by thiols, anlaysis of cross coupling products

○三浦 ゆか理、稲井 美由紀、増田 俊哉（徳島大院総合）
○Yukari MIURA,MIYUKI INAI,TOSHIYA MASUDA (Univ. Tokushima)

【目的】ポリフェノールは食用植物由来の機能性物質として，食品のみならず，他の多くの分野からも期待されている。ポリフェノールの化学的性質としては，容易に酸化されることがあげられ，これがポリフェノールの有する高い抗酸化機能に繋がっている。一方，脂質などの食品成分に対する抗酸化条件において，ラジカル種となるポリフェノールは，続くラジカル消去反応により安定化し，結果として酸化物を生成する。その過程は，基本的にキノンやセミキノンラジカルなどの求電子性物質を経る。一方，生体や食品中には，求核性を有する物質が多々あり，従って，それらの物質と酸化過程のポリフェノールは容易に成分間反応を引き起こす。[1] 我々の研究グループでは，ポリフェノールの抗酸化反応機構研究の一環として，最近これらの成分間反応を研究してきた。その過程で，システイン誘導体のチオール基が，抗酸化反応中のポリフェノール酸化物と反応し，その抗酸化性を増強する事実を見いだし，報告している。[2] 本研究では，抗酸化ポリフェノールとして，フラボノイドを取り上げ，それらの抗酸化性が，システイン誘導体の共存において増強するのかを検討することにした。

【方法及び結果】フラボノイドとして，入手可能であったケンフェロール，ケルセチン，モリン，ミリセチン，ルテオリン，タキシフォリン，カテキンの脂質リノール酸メチルの抗酸化性を，システチンから３段階で合成した N-ベンゾイルシステインメチルエステルを共存させて測定し，共存させないものと比較した。なお，システイン等のチオール系物質には，強い抗酸化性があると言われているが，今回用いた条件において，用いたシステイン誘導体自体は，脂質酸化に対してほとんど抗酸化性を示さず，従ってフラボノイドに対する抗酸化性増強効果解析の単純化が容易である。[2] 測定の結果として，カテキン，タキシフォリン，ミリセチンに，抗酸化性増強効果が認められた。今回はさらに，ミリセチンを取り上げ，抗酸化性過程における成分変化を解析したところ，B 環部分にチオールが 1 個ないし 2 個付加した物質が抗酸化増強に寄与するものと判明した。なお，C 環部分にチオールが付加した不安定な生成物も得られたが，その抗酸化性への影響については現在解析中である。

1) Fujimoto, A., Masuda, T., *J. Agric. Food Chem.* **60**, 5142-5151 (2012).
2) Fujimoto, A., Inai, M., Masuda, T, *Food Chemistry*, in press.

flavonoids, thiols, antioxidant synergism

講演番号：2A16a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ A 校舎 16 会場

オキシミオグロビン酸化に対するポリフェノールの効果―脂質の共存，非共存条件での検討―
Effect of polyphenols on oxymyoglobin oxidation, an investigation in the presence of lipids

○稲井 美由紀[1]、山内 聡[2]、増田 俊哉[1] ([1]徳島大院総合、[2]愛媛大農)
○Miyuki INAI[1], SATOSHI YAMAUCHI[2], TOSHIYA MASUDA[1] ([1]Univ. Tokushima, [2]Ehime Univ.)

【目的】ポリフェノールは，現在，植物由来の食品成分として様々な機能が期待され，広く研究されている。我々の研究グループでも，これまでポリフェノールが有する抗酸化関連機能について，ポリフェノールの抗酸化反応生成物を解析することにより研究してきた。[1)] ところで，食肉の色は，色素タンパク質ミオグロビンによることがよく知られている。このミオグロビンのヘム部の［Fe（Ⅱ）］に分子状酸素が配位することで，ミオグロビンはオキシミオグロビンとなり，食肉の鮮やかな赤色を呈する。なお，このオキシミオグロビンはそれほど安定ではなく，分子内で酸化されることにより，褐色のメトミオグロビン［Fe（Ⅲ）］になるともに，活性酸素を発生する。従って，食肉の鮮やかな色の保持や活性酸素の発生による品質劣化の防止の観点から，オキシミオグロビンの酸化制御は重要とされる。本研究では，このミオグロビンの酸化に対して，一般に強い抗酸化作用のあるポリフェノールがどのような効果を示すかを検討することを目的とした。

【方法及び結果】市販のメトミオグロビンを還元することにより調製したオキシミオグロビンの溶液に，27 種のポリフェノールおよび関連抗酸化フェノールを加えて，570 nm の吸光度の減少度からオキシミオグロビンの変化を測定した。その結果，多くのフェノール物質は，メト化促進作用，すなわちオキシミオグロビンの酸化促進作用を示すことがわかった。[2)] ところで，食肉中には不飽和脂質が存在し，それら由来の酸化生成物がオキシミオグロビンの酸化を促進することも知られている。そこで，不飽和脂質存在下におけるポリフェノールの効果も検証した。不飽和脂質として，リノール酸を用い，これを Tween20 でミセル化した系に，オキシミオグロビンとポリフェノールを加え，先と同様に吸光度にてオキシミオグロビンの酸化を経時的に測定したところ，直接的にはオキシミオグロビンの酸化作用を促進していたポリフェノールの中に，オキシミオグロビン酸化の抑制作用を有するもの（ジヒドロカフェ酸，ロスマリン酸，エラグ酸，カルノシックアシド）を認めた。このような，共存脂質のあるなしで，異なる結果が得られる結果の詳細と理由の検討結果について報告する。

1) Fujimoto, A., Masuda, T. *Food Chemistry*, **132**, 901-906 (2012).
2) Masuda, T., Inai, M., Miura, Y., Masuda, A, Yamauchi, S. submitted.

oxymyoglobin oxidation, polyphenols, unsaturated lipids

講演番号：2A16a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ A 校舎 16 会場

チオレドキシン高含有酵母抽出物によるタバコ煙からの唾液酵素の酸化保護効果

Oxidation-protective effect of salivary enzyme from cigarette smoke by thioredoxin-enriched yeast extract

○伊井野 貴史、山下 裕輔、丸 勇史、金 武祚（（株）ファーマフーズ）
○Takashi IINO,Yusuke Yamashita,Isafumi Maru,Mujo Kim (Pharma Foods International Co., Ltd.)

【目的】
チオレドキシンは生体が酸化ストレスや炎症に曝されたときに誘導される、抗酸化・抗炎症活性を有するタンパクである。我々は、2011 年度日本農芸化学会大会において、チオレドキシン高含有酵母抽出物によるタバコ煙中のペルオキシラジカル消去効果について報告した。今回、我々は、チオレドキシン高含有酵母抽出物によるタバコ煙からの唾液酵素の酸化保護効果について、インビトロ試験およびヒトボランティア試験を行ったので報告する。
【方法】
インビトロ試験　最初に、ヒト唾液をタバコ煙に暴露させた場合のダメージを評価するのに適する酵素を調べたところ、乳酸脱水素酵素（LDH）の酵素活性がタバコ煙への暴露時間に応じて減少することが示され、LDHが評価に適していることが示された。次に、ヒト健常ボランティアより提供された唾液に、チオレドキシン高含有酵母抽出物、他各種被験物質（市販のチオレドキシン活性のない酵母抽出物、BSA、蒸留水等）を 0.5～8%添加し、タバコ煙に 60～90 秒間暴露させ、その後にLDH活性を測定し、未暴露時と比較した。
ヒトボランティア試験　喫煙者を被験者とし、チオレドキシン高含有酵母抽出物を 10 mg/錠含有するタブレット 5 錠、およびプラセボタブレット 5 錠を 1 時間おきに 4 回摂取（噛まずに口中で溶解）してもらい、タブレットの摂取前後で唾液中のパーオキシダーゼ活性を測定した。
【結果】
インビトロ試験　チオレドキシン高含有酵母抽出物は濃度依存的にタバコ煙による LDH 活性の障害を減少させる効果が示された。チオレドキシン活性のない酵母抽出物や BSA や蒸留水は障害を減少させる効果をほとんど示さなかった。これらの結果より、酵母抽出物中のチオレドキシンがタバコ煙中のペルオキシラジカルを消去することにより唾液中の LDH 活性を保護している可能性が示された。
ヒトボランティア試験　チオレドキシン高含有酵母抽出物を含有するタブレットを摂取した場合、プラセボタブレットを摂取した場合と比較して唾液中のパーオキシダーゼ活性が約 25%改善される傾向が示された。
以上の結果より、チオレドキシン高含有酵母抽出物は、タバコ煙からの口腔内保護ひいては慢性閉塞性肺疾患（COPD）予防のための機能性食品素材として有用であることが示された。

thioredoxin, cigarette smoke, salivary enzyme

講演番号：2A16a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ A 校舎 16 会場

培養動物細胞に及ぼす白金ナノ粒子の抗酸化効果

Antioxidative effect of platinum nanoparticles on cultured animal cells

○浜崎 武記[1]、中西 秀和[2]、山川 智寛[2]、金城 智也[2]、樺山 繁[3]、照屋 輝一郎[1,2]、白畑 實隆[1,2]([1]九大農院、[2]九大シス生、[3]日本トリム)
○ Takeki HAMASAKI[1], HIDEKAZU NAKANISHI[2], TOMOHIRO YAMAKAWA[2], TOMOYA KINJYO[2], SHIGERU KABAYAMA[3], KIICHIRO TERUYA[1,2], SANETAKA SHIRAHATA[1,2] ([1]Kyushu Univ., [2]Kyushu Univ., [3]Nihon Trim)

【目的】ナノ粒子の生理作用に関する報告は最近では数多く、金属酸化物ナノ粒子においてもその還元活性が注目されている。また、天然水や水道水にも多数のナノ粒子の存在が知られており、さらに、電気分解によって金属ナノ粒子が合成されることも知られている。我々はこれまでに、電解還元水中に白金ナノ粒子が存在していることを明らかにしており、さらに粒子径 2-3 nm の合成白金ナノ粒子が in vitro においてスーパーオキシド、過酸化水素やヒドロキシルラジカルなどの活性酸素種(ROS)を消去することを確認している。電解還元水は酸化ストレス関連疾患である糖尿病、ガンといった疾病に対する改善効果が報告されており、我々は電解還元中に含有する白金ナノ粒子がこれら効果に関与していると推測した。そこで本研究では合成白金ナノ粒子について動物培養細胞に及ぼす毒性、抗酸化能及び作用機構について検討したので報告する。
【方法】白金ナノ粒子は H_2PtCl_6 のクエン酸還元により合成した。また、粒子径は透過型電子顕微鏡を、溶液濃度は ICP-MS を用いて測定した。ラット骨格筋芽細胞 L6 を用いた細胞毒性試験は WST-1 Assay 及び LDH Assay により行った。さらに白金ナノ粒子を含む無血清培地中で 2 h 処理した際の細胞内還元型グルタチオン(GSH)濃度を蛍光法で、細胞内 ROS 量を Imaging cytometer で測定した。また、real-time PCR 法を用いて抗酸化酵素関連遺伝子発現に及ぼす白金ナノ粒子の影響を調べた。
【結果】2-3 nm の白金ナノ粒子による細胞毒性は 10 ppm 以下の濃度では認められなかった。また、ppb から ppm レベルの白金ナノ粒子添加によって濃度依存的に細胞内 GSH 濃度の増加および細胞内 ROS 濃度の減少が認められた。さらに、白金ナノ粒子処理により細胞内グルタチオンレダクターゼ, グルタチオンペルオキシダーゼ, ヘムオキシゲナーゼ-1 及びマンガンスーパーオキシドジスムターゼ遺伝子発現の増強が認められた。
【考察】以上の結果から 2-3 nm サイズの白金ナノ粒子は多機能抗酸化剤として、様々な酸化ストレス関連疾患を抑制する効果が期待される。

nanoparticles, antioxidant

講演番号：2A16a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ A 校舎 16 会場

水素分子及び白金ナノ粒子による HL60 細胞のアポトーシス誘導機構の解析

Analysis of mechanism of apoptosis induction by hydrogen molecules and Pt nanoparticles in HL 60cells

○村田 みさと[1]、福永 有紗[1]、中西 恵[1]、濱崎 武記[2]、樺山 繁[3]、照屋 輝一郎[1,2]、白畑 實隆[1,2] ([1]九大院・シス生・生命工、[2]九大院・農院・生機科、[3]（株）日本トリム)
○MISATO MURATA[1], ARISA FUKUNAGA[1], MEGUMI NAKANISHI[1], TAKEKI HAMASAKI[2], SHIGERU KABAYAMA[3], KIITIROU TERUYA[1,2], SANETAKA SHIRAHATA[1,2] ([1]Division of Life Engineering, Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu Univ, [2]Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu Univ, [3]Nihon Trim Co. Ltd)

【背景及び目的】

水の電気分解により得られる電解還元水が多量の水素分子及び白金電極由来の微量の白金ナノ粒子を含み、ガンや糖尿病などの酸化ストレス関連疾患に対して、改善効果を示すことが報告されている。そこで、当研究室では電解還元水の作用機構を解明するために、合成白金ナノ粒子添加水素分子含有水を電解還元水のモデル水と考え、白金ナノ粒子と水素分子によるガン細胞のアポトーシス誘導機構について検討を行っている。

本研究では、アポトーシスを誘導する主要経路の一つであるミトコンドリア経路に着目し、白金ナノ粒子と水素分子による HL60 細胞のアポトーシス誘導機構の検討、及び粒子径の異なる白金ナノ粒子の効果の検討を行った。

【材料及び方法】

ヒト骨髄性白血病株である HL60 細胞に白金ナノ粒子と水素分子を添加してアポトーシス誘導するための条件検討を、フローサイトメトリーを用いた AnnexinV-FITC 解析法及び Sub-G1 解析法により行った。次に、ミトコンドリア経路を介したアポトーシス誘導経路に着目し、白金ナノ粒子及び水素分子によるアポトーシス誘導に及ぼすカスパーゼ 3/8/9 阻害剤の影響を Sub-G1 解析法を用いて調べた。また、アポトーシス関連タンパク質発現について、Western blotting 法を用いて解析を行った。

【結果及び考察】

条件検討の結果、2-3nm の白金ナノ粒子によって HL60 細胞にアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。白金ナノ粒子と水素分子併用処理下では白金ナノ粒子及び水素分子濃度依存的に HL60 細胞のアポトーシスが誘導された。

アポトーシス誘導機構を検討した結果、ミトコンドリア経路を阻害するカスパーゼ 3/8/9 阻害剤によっては顕著なアポトーシス抑制が確認されなかったが、Western blotting 解析の結果から、カスパーゼ 3/8/9 の活性化が確認された。したがって、白金ナノ粒子と水素処理による HL60 細胞のアポトーシス誘導にカスパーゼ依存性の経路が関与していることが推測された。

hydrogen, Apoptosis, Metal nanoparticles

講演番号：2A16a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ A 校舎 16 会場

アントシアニジンの生体膜保護作用

Protection of cell membrane function by anthocyanidins

○原口 博行、森定 敬雅、神林 大樹（福山大生命工）
○Hiroyuki Haraguchi,Takanori Morisada,Daiki Kanbayashi (Fukuyama Univ.)

［目的］　アントシアニジンは多くの有色野菜に含まれるアントシアニンの発色団である。これらには様々な生理機能が期待され、前回その抗酸化作用を報告した。今回は特に、ラット肝臓より調製したミトコンドリア及びミクロソームにおける膜脂質過酸化系に対する保護作用を報告する。

［方法］　アントシアニジンの B 環置換基の異なるペラルゴニジン、シアニジン、デルフィニジン、ペオニジン及びマルビジンについて、ミトコンドリア及びミクロソームでの膜脂質過酸化抑制効果を検討した。ミトコンドリアにおいては、電子伝達依存性(NADH 及びコハク酸誘導) 及びアスコルビン酸-Fe 系による膜脂質過酸化を誘導した。ミクロソームにおいては、電子伝達依存性(NADPH 及び NADH 誘導)、P-450 依存性(CCl_4 及び *t*-BuOOH 誘導)及びアスコルビン酸-Fe 系による膜脂質過酸化を誘導した。ミトコンドリアにおける酸化障害は dihydroxyfumarate(DHF)-Fe 系により誘導した。

［結果］　これらアントシアニジンはミトコンドリアにおける電子伝達依存性及びアスコルビン酸-Fe 系による膜脂質過酸化、ミクロソームにおける電子伝達依存性、P-450 依存性及びアスコルビン酸-Fe 系による膜脂質過酸化を抑制した。また、ミトコンドリアにおいては、DHF により誘導される呼吸鎖酵素活性(NADH-cytochrome *c* reductase 及び succinate-cytochrome *c* reductase)の低下を抑制した。現在、置換基を同じくする骨格の異なるフラボノイド類との作用の違いを検討中である。

anthocyanidin, antioxidant, mitochondria

講演番号：2A16a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ A 校舎 16 会場

カルノシンによる Caco-2 細胞の機能制御

Functional regulation of Caco-2 cells by carnosine

○門岡 桂史[1]、松本 貴之[2]、森松 文毅[2]、片倉 喜範[1,3] ([1]九大院生資環、[2]日ハム中研、[3]九大院農院)
○Keishi KADOOKA[1], Takashi MATSUMOTO[2], Fumiki MORIMATSU[2], Yoshinori KATAKURA[1,3]
([1]Kyushu Univ., [2]R&D Center, Nippon Meat Packers, Inc., [3]Kyushu Univ.)

【背景・目的】

カルノシンは食肉に多く含まれているジペプチドであり、多くの機能性を有することが既に知られている。本研究において我々は、食品と生体との接点としての腸管に着目し、ヒトの腸管におけるカルノシンの新たな機能性を明らかにすることを目的に研究を行った。

【方法】

ヒト腸管上皮細胞及びヒト神経細胞のモデルとして、ヒト結腸ガン由来 Caco-2 細胞及びヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いた。カルノシン処理による、Caco-2 細胞における BDNF 及びその他の神経栄養因子の発現の変化は定量 RT-PCR 法により評価した。また、Caco-2 細胞における網羅的な遺伝子発現の変化は、DNA マイクロアレイ法により解析した。さらに、Caco-2 細胞において産生された神経栄養因子の機能性を、SH-SY5Y 細胞の樹状突起伸長能を指標にし、イメージングサイトメーター IN Cell Analyzer 1000 を用いて定量的に評価した。

【結果】

Caco-2 細胞に 1 mM カルノシンを添加し培養することで、Caco-2 細胞における BDNF 及びその他の神経栄養因子の発現が増強されることが定量 RT-PCR 法により確認された。さらに、カルノシンで処理をした Caco-2 細胞の培養上清を SH-SY5Y 細胞に添加し培養したところ、樹状突起が伸長する様子が観察された。その際、カルノシン処理をした Caco-2 細胞の培養上清中にはわずかではあるが BDNF が含まれていることが明らかとなった。以上の結果からカルノシンは、Caco-2 細胞において神経栄養因子の分泌を促し、神経細胞の活性化を引き起こしうるものと考えることができた。

次に DNA マイクロアレイ解析の結果から、カルノシンは Caco-2 細胞において、神経栄養因子以外にも様々な液性因子（APLN、CCK、EDN、ADM など）の発現を増強することが明らかとなった。以上の結果から、カルノシンは腸管上皮を活性化し、多様な液性因子の発現増強を通じて全身性に影響を及ぼしうるものと考えることができた。

Caco-2, carnosine, DNA microarray

講演番号：2A16a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ A 校舎 16 会場

マガキ由来の新規抗酸化物質における肝保護作用
Hepatoprotective Effects of a Novel Phenolic Antioxidant from the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) on Cultured Human Hepatocytes
○布田 博敏[1]、渡邉 貢[2]、神 繁樹[1]、惠 淑萍[1]、武田 晴治[1]、櫻井 俊宏[1,3]、渡邉 孝之[2]、千葉 仁志[1] ([1]北海道大学大学院　保健科学研究院、[2]渡辺オイスター研究所、[3]日本学術振興会特別研究員 DC)
○Hirotoshi Fuda[1], Mitsugu Watanabe[2], Shigeki Jin[1], Shu-Ping Hui[1], Seiji Takeda[1], Toshihiro Sakurai[1,3], Takayuki Watanabe[2], Hitoshi Chiba[1] ([1]Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, [2]Watanabe Oyster Laboratory Co. Ltd., [3]Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science)

【背景と目的】酸化ストレスが関与する疾患の治療にビタミンＣやビタミンＥ等の抗酸化物質、あるいは多価不飽和脂肪酸(PUFA)が使われているが、より効果的な肝臓の保護・治療薬が求められている。我々は、新規の抗酸化物質(3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol、DHMBA)を マガキ抽出物より発見し、これがヒト LDL の金属酸化を抑制し、培養ヒト肝細胞の APPH 酸化を抑制することを報告した (J. Agric. Food Chem., 60, 830-835, 2012, Food Chem., 134, 2086-2089, 2012)。今回、DHMBA の肝臓保護作用を検討するために、ヒト肝臓由来の株化細胞(C3A)を用いた viability test、及び肝細胞障害時に血中に見られるトランスアミナーゼ(AST、ALT)活性の測定を実施した。既存の抗酸化物質のジブチルヒドロキシトルエン(BHT)、ビタミン C(VC)、ビタミン E(VE)、及び PUFA であるドコサヘキサエン酸(DHA)、エイコサペンタエン酸(EPA)についても同様の検討を行い、DHMBA と比較した。また C3A 細胞に DHMBA を添加後、肝臓の線維化に関与する遺伝子の定量を行った。
【方法と結果】96 穴プレートに播種した C3A 細胞に各抗酸化物質及び PUFA を添加し、24 時間後に位相差顕微鏡による観察、及び viability test を行った。その結果、DHMBA 添加群において細胞毒性は見られず、むしろ低濃度(62.5μM)から細胞数の有意な増加が見られた。VC、VE 添加群では細胞毒性は示されなかったが、BHT 添加群では最終濃度 250μM で 75%、500μM で 90%の細胞死が観察された。また EPA 及び DHA 添加群では高濃度(500μM)において約 30%の細胞毒性が見られた。各抗酸化物質及び PUFA 添加後の細胞培養液中のトランスアミナーゼ活性の定量を行った結果、DHMBA 添加群では用量依存的にトランスアミナーゼ活性が低下したが、BHT 及び PUFA 添加群では低下を認めなかった。また、C3A 細胞に DHMBA を添加し、real-time PCR 法により肝臓の線維化に関与する遺伝子の定量を行った結果、線維化時に増加する遺伝子(αSMA、TGFβ、TNFα)の有意な低下、及び線維化を抑制する遺伝子(MMP-1)の有意な増加が見られた。
【考察】DHMBA を添加した C3A 細胞において、いずれも統計学的に有意な、細胞数の増加、細胞培養液中のトランスアミナーゼ活性の低下、線維化時に増加する遺伝子の発現低下、線維化を抑制する遺伝子の発現上昇を認めた。これらの結果から、DHMBA はヒト肝細胞の酸化抑制作用に加え、ヒト肝細胞保護作用も有すると考えられた。

fibrosis, PUFA, 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol

講演番号：2A16p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ A 校舎 16 会場

出芽酵母ＬＯＨ系ならびにヒト培養細胞突然変異検出系を用いた青森県産カシスのＤＮＡ損傷抑制効果の解析

Protective effects of blackcurrant extract on DNA damage: Evaluation by using the Saccharomyces cerevisiae LOH system and human lymphoblastoid cell gene mutation assay.

○山本 歩[1]、廣内 篤久[2]、中嶋 奏[1]、川守田 早織[1]、上平 好弘[3]、加藤 陽治[4]([1]八戸工業高等専門学校物質工学科、[2]環境科学技術研究所生物影響研究部、[3]弘前大学地域共同センター、[4]弘前大学教育学部)

○Ayumi YAMAMOTO[1], Hirouchi Tokuhisa[2], Kana Nakashima[1], Saori Kawamorita[1], Yoshihiro Kamitai[3], Yoji Kato[4] ([1]Faculty of Chemical and Biological Engineering, Hachinohe National College of Technology, [2]Department of Radiobiology, Institute for Environmental Sciences, [3]Center for Joint Research, Hirosaki University, [4]Faculty of Education, Hirosaki University)

死因第一位であるがんに対する意識の向上、メタボリックシンドロームや糖尿病などの生活習慣病への注目度の高まりといった社会背景から、近年、日常的に摂取する食品によるがんや生活習慣病の予防が大きな注目を集めており、そのような効果を有する食品の探索・機構解析・利用が重要な研究課題となっている。がんや生活習慣病は活性酸素などの化学物質や紫外線・放射線のような物理的因子により生じる DNA 修飾・損傷や染色体異常、突然変異により遺伝子が正常に機能しないことで引き起こされると考えられている。そのため、いかにして様々なストレスからゲノム DNA を防御するかが、がんや生活習慣病の予防にとって重要な鍵となる。私はこの様なゲノム DNA を防御する食品のことをゲノムディフェンダーと呼ぶことを提案し、ゲノムディフェンダーを用いたゲノム DNA の防御という観点からのヘルスケア（ゲノムディフェンスヘルスケア）の構築・展開を検討している（従来、DNA 損傷や突然変異を抑制する物質として抗変異原性物質という用語が用いられているが、一般消費者でも比較的理解しやすい言葉として本用語を提案する)。

本会ではゲノムディフェンダーとして注目しているカシスに関して近年得られた研究データを報告する。カシスは古くからジャムやリキュールとしてヨーロッパを中心に利用されてきた。近年、カシスアントシアニンの解析が進むとともに、抗酸化作用やがん予防効果などの健康作用が明らかになってきた。しかしながら、カシスによるがん予防効果やその他の機能性については未解明な点が多い。私達は出芽酵母やヒト培養細胞を用いて生産量全国一位の青森県産カシスのゲノムディフェンダー活性を解析した。その結果、活性酸素誘発物質（過酸化水素）やアルキル化損傷誘発物質（メチルメタンスルホン酸)、更には紫外線や放射線によって生じる DNA 損傷や染色体異常を抑制することが明らかになってきており、青森県産カシスがゲノムディフェンダー食品として高いポテンシャルを有している可能性が示唆されている。機能性食品としての将来的な展開に大きな期待をよせている。

Blackcurrant, DNA damage and mutation, antioxidant activity

講演番号：2A16p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ A 校舎 16 会場

アンチエイジング乳酸菌による結腸ガン細胞抑制効果

Anti-aging lactic acid bacteria inhibits the growth of colon cancer

○原田 額郎[1]、松本 貴之[2]、森松 文毅[2]、片倉 喜範[3] ([1]九大院シス生、[2]日ハム中研、[3]九大院農院)
○Gakuro HARADA[1], Takayuki Matsumoto[2], Fumiki Morimatsu[2], Yoshinori Katakura[3] ([1]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ., [2]R&D Center, Nippon Meat Packers Inc., [3]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

【目的】カロリー制限シグナルの下流シグナル分子として知られ、長寿・抗老化因子として機能するサーチュインファミリータンパク質のほ乳類ホモログの一つ SIRT1 は、これまでに様々な組織において抗老化機能を発揮していることが明らかになっている。本研究では、この SIRT1 発現を、食品と生体との接点としての腸管において増強する食品を探索するためのシステムを構築すると共に、その食品の機能性や機能性発現の分子基盤を明らかにすることを目的として研究を行なった。

【方法】ヒト結腸ガン由来の細胞株 Caco-2 細胞をモデル細胞株として用い、SIRT1 プロモーター制御下で EGFP を発現するベクターを安定導入した組換え Caco-2 細胞を樹立した。食品としては、乳酸菌の加熱死菌体を用いた。樹立細胞株に乳酸菌を 30 μg/mL の濃度で添加させた後 3 日間培養し、フローサイトメーターを用いて EGFP の蛍光の変化を追跡した。また、ヒト結腸癌に対する SIRT1 活性化乳酸菌の効果を、ヒト結腸腺癌細胞株 DLD-1 細胞、HCT116 細胞を用いて検証した。β-カテニン活性は、M50 Super 8x TOPFlash レポーターベクターを用いたルシフェラーゼアッセイ及びβ-カテニン抗体を用いたウエスタンブロッティングにより評価した。

【結果･考察】フローサイトメーターを用いた解析を行い、数種の SIRT1 増強乳酸菌株候補を同定した。このうち T2102 株は、Caco-2 細胞内の内在性 SIRT1 発現を増強することが定量 RT-PCR 解析により明らかとなった。この T2102 株による SIRT1 増強効果は、Caco-2 細胞上の TLR 依存的であると共に、炎症反応惹起の結果によるものではないことが明らかとなった。さらに、T2102 株は細胞内β-カテニン量を減少させると共に、β-カテニンの転写活性を抑制し、結果としてβ-カテニン依存的な増殖を示す DLD-1 細胞、HCT116 細胞の増殖を強く抑制することが明らかとなった。以上の結果から、T2102 株は SIRT1 を発現増強・活性化させることによって、β-カテニンを不活化し、β-カテニン依存的な結腸癌細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。

SIRT1, β-catenin, colon cancer

講演番号：2A16p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ A 校舎 16 会場

抗酸化酵素 SOD1 を欠損する細胞を用いた抗酸化物質の新規評価法

Novel antioxidant assay system using SOD1-deficient cells

○井内 良仁[1]、柳井 彩[1]、井料 由香里[1]、藤井 順逸[2]([1]山口大農、[2]山形大院医)

○YOSHIHITO IUCHI[1], AYA YANAI[1], YUKARI IRYO[1], JUNICHI FUJII[2] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Yamagata Univ.)

抗酸化化合物の評価系には通常、動物実験の前段階として培養細胞を用いるアッセイ系が使われる。しかし体内の酸素濃度約 2%に比して、空気中の 20% 酸素濃度で行なわれる通常培養で生育可能な細胞は酸化ストレスに強い抵抗性を有する事を意味している。このような細胞に人為的に酸化ストレスを与えた後に投与する事で選別されてきた抗酸化物質は、必要以上に強い抗酸化活性を有し生体に副作用を及ぼす可能性も考えられる。また、抗酸化物質の評価に際して、外部から人為的に酸化ストレスを与える方法は、細胞内部で発生する活性酸素による酸化ストレスとは生理的にかけ離れる条件であると考えられる。そこで、より生体内に近い条件でかつ微量な活性酸素種を鋭敏に検出するアッセイ系を開発する必要がある。近年、抗酸化酵素 SOD1 の欠損マウスから単離した線維芽細胞が、この目的に理想的である事を見いだした。本細胞は生体内の酸素濃度に近い約 1%では生育できるが、通常酸素濃度（20%）を酸化ストレスとして認知し、全く増殖できない。本研究では、SOD１KO 線維芽細胞を用いた通常酸素培養により、有効な抗酸化活性をもたらす化学物質の検出系を確立することを目的とする。まず SOD1 KO 細胞が死滅する 20%酸素濃度下で細胞増殖させられるかどうかを指標にすることによって、有効な抗酸化物質のスクリーニングに適用できるか、既知のモデル化合物を用いて検討した。その結果いくつかの既知の抗酸化物質のうち、アスコルビン酸を添加した SOD1 KO 細胞において細胞増殖が観察された。グルタチオン、カテキン、コエンザイム Q10 を添加した SOD1 KO 細胞において細胞死の抑制が観察された。一方でいずれの化合物も高濃度では細胞死を促進した。
以上のことから、酸化ストレスに脆弱で不安定な SOD1 KO 線維芽細胞を維持増殖させることの可能な抗酸化物質が存在することがわかり、今後、未知な抗酸化物質の評価のためのスクリーニングに応用可能なことが示された。

antioxidant enzyme, superoxide dismutase, knockout mouse

講演番号：2A16p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ A 校舎 16 会場

亜鉛セレン複合栄養機能食品による肝線維化抑制効果についての動物モデルでの検討

Zinc selenium compound nutritional performance food prevents ongoing thioacetamide-induced liver fibrosis in rats

○河野 透[1,3]、久保田 悟[2]、野崎 怜雄[1]、田村 彰吾[3]、森山 隆則[3] ([1]旭川医大、[2]（株）メディコ・コンスル、[3]北海道大学)
○TORU KONO[1,3], SATORU KUBOTA[2], REO NOZAKI[1], SHOUGO TAMURA[3], TAKANORI MORIYAMA[3] ([1]Asahikawa Medical Univ., [2]Medico Consl, [3]Hokkaido Univ.)

【背景】亜鉛、セレンは体内における重要な金属酵素（抗酸化酵素、コラゲナーゼなど）の必須元素であり、活性酸素処理にも重要であることから、慢性肝炎において低亜鉛血症だけでなく低セレン血症も出現することが指摘されている(Nutrition Research 2011.31.829)。われわれは胃炎胃潰瘍の治療薬で亜鉛錯体 Polaprezinc が亜鉛欠乏を改善し、肝線維化を促進する最も重要な因子 TIMP-1 を阻害し、肝臓の線維化を抑制することを報告してきた(Life Sciences 2012.90.122)。一方、低セレン血症に関する知見は少ない。そこで亜鉛とセレンを配合した亜鉛／セレン配合サプリメント(アルフラット)の、肝線維化抑制効果を硫酸亜鉛、亜鉛市販サプリメント(亜鉛錯体)、と比較検討した。【方法】動物は Wistar 5 週齢雄ラットを用いた。硫酸亜鉛は和光純薬、亜鉛錯体は KAL 社、アルフラットはメディコ・コンスル社の製品を使用。肝硬変ラットモデルは、チオアセタマイド（TAA）300mg/L 含水を摂水 20 週間与えて犠牲死。肉眼的にも肝線維化が始まる投与開始 10 週後から最後の 10 週間、硫酸亜鉛、亜鉛錯体、アルフラットのいずれかを混合餌として与え、線維化の程度を各種線維化関連マーカー（組織、血液）で比較検討した。【結果】アルフラット併用投与群は、肝臓内ハイドロキシプロリン量を TAA 単独群、硫酸亜鉛併用群、亜鉛錯体併用群に比較して有意に減少させた。TIMP-1 については、TAA 単独群、硫酸亜鉛併用群に比較して有意に抑制したが、亜鉛錯体とは有意差がなかった。線溶系蛋白 proMMP-9 について、アルフラット併用群は TAA 併用群、硫酸亜鉛併用群、亜鉛錯体併用群いずれに対しても有意に産生を亢進した。proMMP-2 について、アルフラット併用群はいずれの群と比較しても有意に産生を抑制した。血清セレン値は TAA 単独群では正常値以下に低下していたが、アルフラット併用群では有意に増加し、正常値に回復した。【考察】肝硬変ラットモデルにおいて肝線維化がアルフラット投与によって抑制されることが各種線維化マーカーによって明らかとなった。アルフラットによって血清セレン値も維持され、セレンによる強力な抗酸化作用が期待される。さらに発癌に関与する proMMP-2 の抑制は今後の研究課題である。亜鉛とセレンを主成分とした栄養機能食品が亜鉛製剤単独より優れた肝機能改善効果を示したことは今後の臨床応用が期待される。

selenium, zinc, liver fibrosis

講演番号：2A16p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ A 校舎 16 会場

抗糖尿病効果を示す天然還元水の機能評価法の開発

Development of evaluation method for natural reduced water exhibiting anti-diabetes effect

○山川 智寛[1]、濱崎 武記[2]、成田 義篤[3]、金城 智也[1]、中西 秀和[1]、石井 嘉時[4]、照屋 輝一郎[1,2]、白畑 實隆[1,2]([1]九大院シス生・生命工、[2]九大院農院・生機科、[3]九大院・生資環・生機科、[4]（株）日田天領水)

○ Tomohiro Yamakawa[1], Takeki Hamasaki[2], Yoshiatsu Narita[3], Tomoya Kinjo[1], Hidekazu Nakanishi[1], Yoshitoki Ishii[4], Kiichirou Teruya[1,2], Sanetaka Shirahata[1,2] ([1]Kyushu Univ., [2]Kyushu Univ., [3]Kyushu Univ., [4]Hita Tenryosui Co. Ltd.)

【背景及び目的】

我々の体では過剰なストレス、紫外線、化学物質、エネルギー代謝過程などにより活性酸素種が発生する。この活性酸素種は不安定であり、非常に反応性が高いため様々な疾病の原因となることが知られている。大分県日田市の深井戸水である日田天領水®をはじめとした天然還元水は、長期間飲用することで糖尿病、動脈硬化症、ガンといった生活習慣病の改善に効果が期待されている。実際、我々はハムスター膵臓β細胞株である HIT-T15 細胞を用いて、日田天領水®が細胞内活性酸素種の量を低下させ、インスリンの分泌を促進するとともに、1 型糖尿病誘導剤であるアロキサンによる細胞傷害を抑制することを報告した。

HIT-T15 細胞ではグルコース刺激により細胞内 ATP 量が増加し、次いで、細胞内カルシウム量が増加した後に、インスリン分泌が促進される。そこで、細胞内 ATP 量の増加を指標にした天然還元水の機能評価法を検討した。

【材料及び方法】

超純水、日田天領水®、ドイツ・ノルデナウ水、及び種々の市販のナチュラルミネラルウォーターを用いて作成した 10% FBS/RPMI1640 培地中で HIT-T15 を培養し、ATP アッセイキットによりグルコース刺激時の細胞内 ATP 量を測定した。

【結果及び考察】

多くの市販ナチュラルミネラルウォーターが細胞内 ATP 量を増加させなかったのに比べ、日田天領水®やドイツ・ノルデナウ水は顕著に細胞内 ATP 量を増加させた。細胞内 ATP 量の増加とインスリン分泌との間には良い相関が認められた。

このことから、膵臓β細胞内の ATP 量の増加を指標にした天然還元水の機能評価法は低コストのアッセイ法として有用であることが示唆された。

diabetes, functional water, pancreatic beta cell

講演番号：2A16p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ A 校舎 16 会場

アルコール代謝におけるフルボ酸の影響

Effects of fulvic acid on alcohol metabolism

○安部 直之、山口 達明、滝口 泰之（千葉工業大院工）
○naoyuki ABE,tatsuaki YAMAGUCHI,yasuyuki TAKIGUCHI (Chiba Tec)

【背景及び目的】アルコールは体内に吸収されると、酵素によって、エタノールからアセトアルデヒド、アセトアルデヒドから酢酸に分解される．アルコールを吸収したときに生じる頭痛や吐き気などの原因は、主にアセトアルデヒドの蓄積によって起こるといわれている．また、エタノール分解時に産生される活性酸素が肝細胞を傷つけて、アセトアルデヒドの分解の阻害となることがわかっている．これまでにウコンに含まれるクルクミンには抗酸化作用、抗炎症作用があることが報告されており、アセトアルデヒドの蓄積を解消する物質として有効であることが報告されている．[1)] そして、土壌に含まれる腐植物質の１つである水溶性のフルボ酸にはクルクミンと同じように抗酸化作用[2)]、抗炎症作用が確認されており、アセトアルデヒドの蓄積を解消する物質して機能することが推測される．よって、本研究では、フルボ酸のアルコール代謝に及ぼす影響について検討した．

【方法】８週齢雌のＢＡＬＢ／ｃ マウス７匹を１群とし実験を行なった．実験には 1 週間予備飼育した２０～２３g のマウスを１晩絶食させた後、２時間おきに３回エタノール４０％ １００μL／匹経口ゾンデを用いて経口投与を行なった． ３回目のエタノール投与直後に評価物質（PBS／フルボ酸／クルクミン）を経口投与し、エタノール投与後、血液に含まれているエタノール濃度、アセトアルデヒド濃度、酢酸濃度及び肝臓に含まれているアセトアルデヒド濃度を測定し比較した．エタノール濃度、酢酸濃度はＦ―キット（Ｊ．Ｋ．Ｉ）を用いて測定し、アセトアルデヒド濃度はアセトアルデヒドを２，４－ジニトロフェニルヒドラジンを用いて誘導体化し、ＨＰＬＣ（高速液体クロマトグラフィー）を用いて測定した．

【結果】フルボ酸投与群とクルクミン投与群は非投与群に比べ、アルコール代謝が促進され、血中のエタノール濃度、アセトアルデヒド濃度、酢酸濃度及び肝臓のアセトアルデヒド濃度が有意に低下し、アルコール代謝の促進が確認された．このことからフルボ酸は二日酔い防止に効果があることが期待される．

１）浜野　拓也ら、応用薬理　７２，３１（２００７）．
２）Ｕｅｄａ　Ｊ，Ｉｋａｔａ　Ｎ，Ｓｈｉｎｏｚｕｋａ　Ｔ，ａｎｄ　Ｙａｍａｇｕｃｈｉ　Ｔ，*Ｓｐｅｃｔｒｏｃｈｉｎ．Ａｃｔａ　Ａ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｍｏｌ．Ｓｐｅｃｔｒｏｓｃ.*，６０，２４８７―２４９２（２００４）．

alcohol metabolism, fulvic acid

講演番号：2A16p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ A 校舎 16 会場

黒大豆ポリフェノールのアルコール摂取時における肝機能保護作用

Black soybean polyphenol protects liver function from the stress of alcohol consumption.

○難波 文男、伊藤 千秋、吉田 正、戸田 登志也（フジッコ株式会社）
○Fumio NANBA,Chiaki Ito,Tadashi Yoshida,Toshiya Toda (Fujicco Co. Ltd.)

【目的】黒大豆は古くから生薬として利用され、様々な効能が知られているが、それらのほとんどは科学的なデータに裏付けられたものではない。また、黒大豆には低重合プロアントシアニジンなどのポリフェノールが多く含まれ、これらの成分が様々な生理活性の本体であることがわかってきつつある。そこで本研究では、黒大豆ポリフェノール（BP）の解毒をはじめとする肝機能改善作用（養血平肝)、とくにアルコールの継続的な摂取による肝機能障害と、それに伴う脳神経系の機能低下に対する影響を調べることを目的とした。【方法】Wistar ラット（雄性、7 週齢）を 3 群に分け、それぞれ Control 食、EtOH 含有食、EtOH+黒大豆ポリフェノール（BP）含有食を 4 週間与えた。12 時間の絶食後、採血、組織の摘出を行ない、以下の分析に供した。血液は血清を調製後、総コレステロール（TC)、トリグリセリド（TG)、遊離脂肪酸（FFA)、ALT 活性の測定に用いた。さらに摘出した肝臓より総脂質を測定（Folch 法）し、また、炎症性サイトカイン（TNF-α、IL-1β、IL-6）および肝臓の繊維化（Col1a、αSMA)、酸化ストレス（p47phox）に関連する遺伝子の発現量を評価するため、RNA の抽出を行なった。加えて同時に摘出した大脳についても RNA の抽出を行ない、神経成長因子（NGF)、アセチルコリン合成酵素（ChAT）などの発現量を評価した。抽出した RNA は逆転写反応を経て、リアルタイム PCR による定量を行なった。【結果】血清中の TC および FFA については EtOH 摂取により有意に高値を示したが、BP の同時摂取によりそれらの値は Control レベルまで低下した。一方 TG については BP 摂取による変化は認められなかった。さらに肝臓中総脂質に関しても同様に、EtOH 摂取により増加したものの、BP 摂取による抑制が認められた。このことから、BP を摂取することで、脂質の代謝が促進され、アルコール継続摂取による脂肪肝傾向を改善することが示された。さらに ALT 活性についても、EtOH 摂取により上昇した値が BP 群では有意に低値を示した。また、肝臓の遺伝子発現の分析では、EtOH 摂取により上昇した TNF-α や Il-6、Col1a、及び p47phox が、BP を摂取することで有意に低下した。このことから BP はアルコール摂取による肝臓の酸化ストレス、および炎症を抑制し、繊維化を軽減する可能性が示唆された。大脳の遺伝子発現については、EtOH 摂取によって NGF および ChAT の発現量が低下したが、BP 投与群ではそれらが有意に上昇した。このことから、BP 摂取により、EtOH による神経細胞の成長阻害、および神経伝達物質であるアセチルコリンの合成の低下を抑制することが示唆された。以上のことから、BP を摂取することによって、継続的なアルコール摂取による肝機能障害そして脳機能低下が抑制されることが示唆された。

black soybean, alcohol, antioxidant

講演番号：2A16p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ A 校舎 16 会場

りんごポリフェノールは心筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスにおいて活性酸素の生成を抑制する

Apple Polyphenols Regulate Mitochondrial Superoxide Generation in Heart/Muscle-Specific Manganese-Superoxide Dismutase-Deficient Mice

○佐見 学[1]、砂川 忠広[1]、田頭 素行[1]、神田 智正[1]、中谷 晴昭[2]、白澤 卓二[3]、清水 孝彦[2]（[1]アサヒグループ HD、[2]千葉大院医、[3]順天大院医）

○ Manabu SAMI[1], Tadahiro SUNAGAWA[1], Motoyuki TAGASHIRA[1], Tomomasa KANDA[1], Haruaki NAKAYA[2], Takuji SHIRASAWA[3], Takahiko SHIMIZU[2] ([1]Asahi Group HD, [2]Chiba Univ. Grad. Sch. Med., [3]Juntendo Univ. Grad. Sch. Med.)

【目的】りんごは抗酸化作用を有するプロシアニジンを主成分としたポリフェノールを多く含んでいる（Sunagawa *et al.*, Planta Med. 2010）。りんごポリフェノール（AP）の個体レベルでの抗酸化作用を検証するために、ミトコンドリア活性酸素に起因した心筋特異的 Mn-SOD 欠損マウス（拡張型心筋症モデルマウス）に対する病態改善作用、および生体内抗酸化作用について検討を行った。

【方法と結果】AP0.1%水溶液を心筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスへ飲水投与したところ、心臓重量増加と心臓組織の繊維化が有意に抑制され、個体寿命も有意に延伸した。一方、*in vitro* での培養細胞を用いた過酸化水素による活性酸素種（ROS）産生系において、AP による前処理は ROS の産生量を抑制した。また、タモキシフェン誘導性 Mn-SOD 欠損マウスより調製した胎児繊維芽細胞において、AP による前処理は ROS の産生量を抑制した。さらに、心筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスから単離調製した心室筋細胞において、AP の摂取は ROS の生成量を抑制した。これらの結果から、AP は生体内で心臓ミトコンドリアの活性酸素生成を抑制し、拡張型心筋症の症状を軽減することで個体寿命を延伸することが示唆された（Sunagawa *et al.*, Int. J. Life Sci. Med. Res. 2012）。

apple polyphenol, oxidative stress, Manganese-superoxide dismutase

講演番号：2A16p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ A 校舎 16 会場

筋萎縮抑制作用を有する食品成分の探索 (I)
Research of foods alleviating skeletal muscle atrophy (I)
○坂田 穏行、大塩 和孝、中村 浩彦、難波 和美、武田 安弘 (森永乳業・栄科研)
○Yasuyuki Sakata,Kazutaka Oshio,Hirohiko Nakamura,Kazuyoshi Namba,Yasuhiro Takeda (Morinaga Milk Industry Co., Ltd)

【目的】サルコペニアは、狭義には加齢による筋量の減少として定義され、その成因として、不活動、低栄養、慢性炎症、インスリン抵抗性などが挙げられている。高齢者の日常生活機能低下の抑制、健康長寿の実現には、サルコペニアを予防することが重要であり、運動や、日常的に摂取する食品に期待が寄せられている。筋萎縮は、mTOR シグナルを介する筋たんぱく質合成の低下と、FoxO、NF-κB を介した筋たんぱく質分解の亢進により引き起こされる。筋萎縮は糖尿病などの慢性疾患でも見られ、このメカニズムの一つとしてグルココルチコイドレセプターの関与が示唆されている。
本研究では、合成グルココルチコイドの 1 種であるデキサメタゾン（dex）により筋萎縮を誘導したラットを用い、筋萎縮抑制作用を有する食品成分について探索、検討した。食品成分として、シイクワシャー抽出物、ブドウ抽出物、BCAA について検討した。
【方法】雄性 SD ラット（15 ヵ月齢）を平均体重が等しくなるように 5 群に群分けし、それぞれ対照群（CTL 群）、dex 投与群（DEX 群）、dex 投与＋シイクワシャー抽出物摂取群（SE 群）、dex 投与＋ブドウ抽出物摂取群（GE 群）、dex 投与＋BCAA 摂取群（BCAA 群）とした。食品成分は、被験試料を飼料に混合して摂取させた。2 週間給餌の後、デキサメタゾンを腹腔内に 1 日 1 回、5 日間投与した。最終投与の翌日に解剖し、後肢筋（腓腹筋、ヒラメ筋、前頸骨筋、長指伸筋）を摘出し、各重量を測定した。また、筋組織より RNA を抽出後調製したサンプル、またはホモジナイズ後遠心分離し調製したサンプルを用い、筋萎縮に対する影響を評価した。
【結果・考察】CTL群と比較し、デキサメタゾンを投与したDEX群で腓腹筋、前頸骨筋、長指伸筋の各重量が有意に低下していた。DEX群とその他の群の筋重量を比較したところ、前頸骨筋においてシイクワシャー抽出物を摂取したSE群のみ、筋重量の低下が有意に抑制されていた。また、腓腹筋、長指伸筋においても、SE群で筋重量の低下を抑制する傾向が見られた。長指伸筋中のたんぱく質濃度を測定したところ、SE群においてのみ、組織1gあたりのたんぱく質含有量が有意に増加していた。筋萎縮に関与することが示唆されている筋特異的ユビキチンリガーゼであるAtrogin-1、MuRF1のmRNA発現量においても、前頸骨筋でデキサメタゾンの投与により有意な増加が見られたが、SE群のみ有意に増加が抑制されていた。
以上の結果より、シイクワシャー抽出物はデキサメタゾンによる筋萎縮を抑制することが示された。

muscle atrophy, Sarcopenia, antioxidant

講演番号：2A16p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ A 校舎 16 会場

筋萎縮抑制作用を有する食品成分の探索 (II)

Research of foods alleviating skeletal muscle atrophy in rat (II)

○大塩 和孝、坂田 穏行、中村 浩彦、難波 和美、武田 安弘 (森永乳業・栄科研)
○KAZUTAKA OSHIO, YASUYUKI SAKATA, HIROHIKO NAKAMURA, KAZUYOSHI NAMBA, YASUHIRO TAKEDA (Morinaga Milk Industry Co.,Ltd)

【目的】サルコペニアは、狭義には加齢による筋量の減少として定義され、その成因として、不活動、低栄養、慢性炎症、インスリン抵抗性などが挙げられている。高齢者の日常生活機能低下の抑制、健康寿命の実現には、サルコペニアを予防することが重要であり、運動や日常的に摂取する食品に期待が寄せられている。筋萎縮は、mTORシグナルを介する筋たんぱく質合成の低下と、FoxO、NF-κBを介した筋たんぱく質分解の亢進により引き起こされる。

本研究では、不活動のモデルとして広く用いられている廃用性筋萎縮モデルラット（後肢ギプス固定モデル）を用い、筋萎縮抑制作用を有する食品成分について探索、検討した。食品成分として、シイクワシャー抽出物(SE)、ブドウ抽出物(GE) 、BCAAについて検討を行った。

【方法】雄性SDラット（18ヵ月齢）を用い、ギプス固定による筋萎縮の誘導を行い検討を行った。１週間の馴化期間後、体重が等しくなるように５群に群分けし、それぞれ、対照群：Cont群、後肢固定群：Fix群、後肢固定＋SE摂取群：Fix＋SE群、後肢固定＋GE摂取群：Fix＋GE群、後肢固定＋BCAA摂取群：Fix＋BCAA群とした。食品成分は、被験試料を飼料に混合して摂取させた。

２週間の給餌後、Cont群以外の全ての群に対し、麻酔下にて腓腹筋・ヒラメ筋が収縮位となるように後肢ギプス固定を施した。固定開始後８日目に解剖し、後肢筋（腓腹筋、ヒラメ筋、前頸骨筋、長指伸筋）を摘出し、各重量を測定した。ヒラメ筋組織中からmRNAの抽出を行い、筋萎縮関連因子のmRNA（Atrogin-1、MuRF1、Myostatin）の発現量測定を行った。また、ヒラメ筋組織中のたんぱく質量についても測定を行った。

【結果・考察】Cont群と比較し、Fix群において、腓腹筋・ヒラメ筋の重量及び体重当たりの筋重量が有意に低下しており、ギプス固定による筋萎縮の誘導が観察された。Fix群とその他の群の比較を行ったところ、ヒラメ筋において、Fix＋SE群のみ、体重当たりの筋重量減少が有意に抑制されていた。ヒラメ筋組織中の組織1g当たりのたんぱく質濃度を測定したところ、Fix＋BCAA群のみ、有意な低下抑制が見られ、Fix＋GE群、Fix＋SE群に低下抑制傾向が見られた。筋萎縮関連因子のmRNA発現量は、ギプス固定により有意な増加が観察されたが、各被験試料の摂取により有意な改善は見られなかった。

以上の結果より、廃用性筋萎縮に対して、BCAAやブドウ抽出物が萎縮抑制作用を有すること、更に、シイクワシャー抽出物がより強い抑制作用を持つ可能性が示された。

sarcopenia, muscle atrophy, Citrus depressa

講演番号：2A16p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ A 校舎 16 会場

酸化リン脂質（PCOOH）のヒト肝癌細胞由来 HepG2 における代謝と生理作用

Metabolism and physiological effect of PCOOH in HepG2 cells.

○鈴木 優里、加藤 俊治、仲川 清隆、宮澤 陽夫（東北大院農）
○ YUURI SUZUKI,SHUNJI KATO,KIYOTAKA NAKAGAWA,TERUO MIYAZAWA（Tohoku Univ.）

【目的】動脈硬化性疾患の最大の危険因子は高 LDL-コレステロール血症であり、その要因は、血管内皮下における LDL の酸化変性にあると考えられる。酸化 LDL 形成では、LDL 表面膜のホスファチジルコリン（PC）から、酸化一次生成物として PC ヒドロペルオキシド（PCOOH）が生じ、その病態生理学的作用が注目されている[1)]。PCOOH は動脈硬化巣形成の第一段階である単球の血管内皮細胞への接着を誘導することから、PCOOH が動脈硬化巣の形成と進展に関与することを報告した[2)]。ヒト肝癌細胞（HepG2）の実験では、細胞内で PCOOH が PCOH へ還元される可能性が指摘され[3)]、PCOOH の作用がそれ自体によるか、PCOH など代謝物に起因するのか、未だ不明である。本研究では、合成した高純度 PCOOH[4)] を HepG2 に処理し、細胞内への取り込みと代謝を LC-MS/MS で評価し、生理作用との関係を明らかにしようとした。
【方法と結果】2-メトキシプロペンで、ヒドロペルオキシド基を保護する方法により、高純度の PCOOH 標準品を調製した。これを培地に加え、HepG2 を培養したところ、PCOOH が細胞から検出され、既報[3)] ように PCOH も認められることを LC-MS/MS で確認した。定量的に検討するには、①細胞や培地から通常の方法で抽出を行うと PCOOH の多くが分解すること、②PCOOH を単に培地（細胞を含まない培地）に添加しても培地中で PCOOH が減少することがわかったので、これらを抑えることが重要であった。①では、細胞や培地抽出物の濃縮過程で PCOOH の分解が起きることが判明し、抽出時に脂質分子（スフィンゴミエリン）を細胞や培地サンプルに加えると分解を防げることがわかった。②では、種々の培地を用いて、PCOOH が分解しにくい培地・培養条件を検討し、RPMI-1640 培地（FBS 0.3%を含む）が有用であった。これらの方法で培養試験を行い、培地に加えた PCOOH の一部は HepG2 へ取り込まれ、そのほとんどが細胞内で速やかに PCOH へと還元され、その後細胞内に蓄積する（一部は培地へ放出される）ことを定量的に明らかにした。こうした現象は、RPMI-1640 培地で培養可能なヒト大腸癌細胞（DLD-1）とヒト単球細胞（THP-1）でも観察された。したがって、PCOOH の病態生理学的作用は、細胞内で還元されずに残存する PCOOH と還元物 PCOH によって引き起こされる可能性があり、今後さらなる検証が必要と考えられた。

1) Kinoshita M, et al., J Lipid Res, 46, 822-828 (2000); 2) Asai A, et al., J Lipid Res, 50, 957-965 (2009); 3) Bao Y, Williamson G, J Lipid Res, 11, 2351-2360 (1996); 4) Ibusuki D, et al, J Lipid Res, 49, 2668-2677 (2008)

HepG2, PCOOH, metabolism

講演番号：2A16p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ A 校舎 16 会場

α-tocopherol・α-tocotrienol の膜マイクロドメインへの局在性とコレステロール過酸化反応抑制

Localization of of α-tocopherol and α-tocotrienol in membrane microdomain and their inhibitory effect on cholesterol hydroperoxide production

○中村 俊之、野間 絢子、寺尾 純二（徳島大院・HBS）
○Toshiyuki NAKAMURA,Ayako NOMA,Junji TERAO (The Univ. of Tokushima)

ラフト・カベオラは生体膜上に存在するコレステロールやスフィンゴ脂質に富んだマイクロドメインであり、細胞膜を介する情報伝達の中継点として機能すると考えられている。一方、ビタミン E である α-tocopherol（α-T）および α-tocotrienol（α-T3）は、食事由来の脂溶性抗酸化物質であり、α-T あるいは α-T3 摂取マウスの皮膚にこれら化合物が蓄積することが報告されている。すでに我々は、UVA 照射したヘアレスマウス皮膚にコレステロール過酸化物が蓄積すること、コレステロール過酸化物がコラーゲン分解酵素である matrix metalloproteinase-9 の発現を誘導することを報告した [1]。そこで本研究では、コレステロールに富む膜マイクロドメインへの α-T・α-T3 の局在性を検討するとともに、UVA 照射によるコレステロール過酸化物生成に対するこれら化合物の抑制効果を比較した。

マウス皮膚線維芽細胞 NIH-3T3 に α-T あるいは α-T3 を単独処理し、iodixanol 密度勾配超遠心により分画後、α-T・α-T3 の分布を HPLC–蛍光検出器を用いて確認した。膜マイクロドメイン画分は Flotillin-1、Caveolin-1 およびコレステロールの分布を指標に用いて決定した。次に、α-T・α-T3 処理細胞にコレステロール除去剤である methyl-β-cyclodextrin（MβCD）を処理することで膜マイクロドメインを破壊し α-T・α-T3 の取り込み量の変化を調べた。さらに、α-T・α-T3 処理細胞にヘマトポルフィリン存在下で UVA 照射し、コレステロール過酸化物の生成量の変化を TLC-Blot/GC-MS 法 [2] を用いて確認した。

α-T あるいは α-T3 処理細胞の密度勾配超遠心分離により、両化合物とも一部は膜マイクロドメイン画分に分布することが示唆された。MβCD 処理後の細胞分画では、α-T の分布量パターンに変化はないものの、α-T3 処理細胞では膜マイクロドメイン画分の α-T3 量に減少傾向がみとめられた。したがって、α-T に比べて α-T3 は膜マイクロドメインにある程度局在して分布すると考えられる。さらに、α-T・α-T3 処理細胞を UVA 照射した結果、両者の処理により過酸化コレステロールの生成が抑制された。現在、α-T・α-T3 の膜マイクロドメインへの局在性と UVA 照射によるコレステロール過酸化物生成抑制との関係を検討中である。

[1] Minami et al. *J. Nutr. Biochem.* 20:389-398 (2009)
[2] Minami et al. *Lipids* 42:1055-1063 (2007)

vitamin E, cholesterol hydroperoxide, microdomain

講演番号：2A16p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ A 校舎 16 会場

ヘミン触媒によるホスファチジルコリンヒドロペルオキシドの分解に対するα-トコフェロールの作用

Effect of α-tocopherol on the hemin-catalyzed decomposition of phosphatidylcholine hydroperoxide in micelles

○渡辺 しおり、岩本 悟志、山内 亮（岐阜大院応用生物）
○Shiori WATANABE,Satoshi IWAMOTO,Ryo YAMAUCHI (Gifu Univ.)

【目的】α-トコフェロール（TH）はフリーラジカル捕捉剤として、脂質ペルオキシルラジカル（LOO•）に水素原子を供与してヒドロペルオキシド（LOOH）とし、連鎖反応を停止させる。その結果生じた TH ラジカル（T•）は、さらに LOO• を捕捉して付加体（T-OOL）を形成する。一方、脂質過酸化一次反応で生じた LOOH は、遷移金属イオンなどによってレドックス分解を受けると、生体に有害なアルデヒドなどの二次生成物を生じる。本研究では、ヘミン触媒によるリン脂質ヒドロペルオキシドの分解に対する TH の作用をミセル溶液で検討し、脂質過酸化二次反応における TH の役割を明らかにすることを目的とした。
【方法】1-パルミトイル-2-リノレオイルホスファチジルコリン（PLPC）に大豆リポキシゲナーゼを作用させて PLPC 13-ヒドロペルオキシド（PLPC-OOH）を調製した。PLPC-OOH（最終濃度 0.5 mM）あるいはこれに TH（最終濃度 0.1 mM）を添加して、5 mM デオキシコール酸ナトリウムを含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）でミセル溶液とした。調製したミセル溶液はヘミン（最終濃度 10 μM）を添加して、37℃で反応させた。PLPC-OOH の分解で生ずるアルデヒドは、ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体として逆相 HPLC で分析した。また、PLPC-OOH と TH との反応生成物は、逆相 HPLC で分取して構造解析した。
【結果】PLPC-OOH ミセルにヘミンを作用させると、PLPC-OOH は急激に分解して、二次生成物であるヘキサナールが増加した。このミセル溶液に TH を添加しても、PLPC-OOH の分解は抑制されなかったが、ヘキサナールの生成はほぼ完全に抑制された。このことから、TH は PLPC-OOH から生じたフリーラジカル種を捕捉することによってアルデヒド生成を抑制したものと推定した。そこで、TH 存在下で PLPC-OOH ミセルにヘミンを作用させ、反応生成物を HPLC で分取して構造解析した。その結果、主要反応生成物として、PLPC-OOH のレドックス分解で生じたアルコキシルラジカルに由来する epoxyPLPC ラジカルが TH に付加した T-epoxyPLPC を得た。さらに本反応を経時的に検討すると、T-epoxyPLPC 以外にペルオキシルラジカルとの付加体である TOO-epoxyPLPC と TOO-PLPC の生成も認められた。以上の結果より、脂質過酸化二次反応において、TH は脂質ヒドロペルオキシドのレドックス分解で生じたフリーラジカル種と付加体を形成することによって、アルデヒドの生成を抑制できることが明らかとなった。

lipid peroxidation, phosphatidylcholine hydroperoxide, alpha-tocopherol

講演番号：2A16p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ A 校舎 16 会場

ラット小腸上皮細胞におけるレモンフラボノイドの取り込みと酸化ストレスに対する保護作用

Uptake and antioxidative effect of lemon flavonoids in rat small intestine epithelial cells (IEC-6)

○山本 涼平[1]、熊石 朱純[2]、栗田 彩華[2]、松本 俊平[2]、武藤 徳男[2] ([1]県広大院生命、[2]県広大生環)
○Ryohei YAMAMOTO[1], Kasumi KUMAISHI[2], Ayaka KURITA[2], Shunpei MATSUMOTO[2], Norio MUTO[2] ([1]Pref. Univ. Hiroshima, [2]Pref. Univ. Hiroshima)

【目的】
レモンなどの柑橘の果皮にはフラボノイドなど様々な生理活性物質が含まれており、抗酸化活性や代謝調節活性などの機能性が注目されている。我々もこれまでに、レモンに含まれる主たるフラボノイドのエリオシトリンやその加水分解物であるエリオジクチオール7-グルコシドおよびエリオジクチオールが、強い抗酸化活性やα-グルコシダーゼ阻害活性を示す事を報告した。本報では、これらのレモンフラボノイドについてラット小腸上皮細胞（IEC-6細胞）を用い、過酸化水素による酸化障害に対する細胞保護効果および体内動態の予備評価として細胞への取り込みについても解析を行った。
【方法】
レモン果皮メタノール抽出液からエリオシトリンを既報に従って精製した。そのエリオシトリンをヘスペリジナーゼなどで酵素処理し、エリオジクチオール7-グルコシドとエリオジクチオールを得た。これらの物質の細胞保護効果は、IEC-6細胞を10% FBSを含むDMEM培地で培養し、過酸化水素による酸化障害に対する抑制をWST-1法で評価した。つまり96ウェルマイクロプレートで24時間前培養を行い、各濃度のサンプルを添加して6時間培養した。培養後に培地を交換し、過酸化水素を添加し20時間培養した。その後WST-1試薬を添加し2時間後の吸光度を415 nmで測定した。また細胞内への取り込み量は60 mmディッシュで細胞をコンフルエントまで培養した後、サンプルを添加して6時間培養した。細胞を回収し超音波で細胞を破砕後、メタノールで溶解した遠心上清をHPLCで分析した。
【結果】
エリオシトリンをヘスペリジナーゼやナリンギナーゼで酵素処理することで、エリオジクチオール及びエリオジクチオール 7-グルコシドを精製した。純度はいずれも HPLC で 95%以上であった。過酸化水素を IEC-6 細胞に対して各濃度で処理したところ、200 μM から強い障害性が認められた。この酸化ストレス障害に対して、レモンフラボノイドを 6 時間前処理することで有意にその細胞障害性が軽減された。その中でも特にエリオジクチオールに強い細胞保護効果が見られた。これに対して、レモンフラボノイド処理後 6 時間の細胞内の取り込み量を測定したところ、エリオジクチオールが多く取り込まれ、エリオシトリンやエリオジクチオール 7-グルコシドなど配糖体の取り込み量は少なかった。以上のようにレモンフラボノイドの酸化ストレス障害に対する細胞保護効果は、細胞内吸収量に相関して強く認められた。

lemon flavonoid, IEC-6 cell, antioxidative effect

講演番号：2A16p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ A 校舎 16 会場

異物抱合酵素発現酵母を用いたフラボノイド抱合体の調製
Whole cell dependent-production of flavonoid conjugates using genetically engineered yeast cells expressing UGT or SULT isoforms
○生城 真一、長谷川 崇、黒田 将司、西川 美宇、鎌倉 昌樹、榊 利之（富山県大・工・生物工学）
○ Shinichi IKUSHIRO,Takashi HASEGAWA,Masashi KURODA,Miyu NISHIKAWA,Masaki KAMAKURA,Toshiyuki SAKAKI (Dep. of Biotech., Fac. of Engineer., Toyama Pref. Univ.)

【目的】食品中機能性成分であるﾌﾗﾎﾞﾉｲﾄﾞ化合物は、体内に吸収された後に異物代謝過程において種々の抱合化反応（ｸﾞﾙｸﾛﾝ酸抱合、硫酸抱合、ﾒﾁﾙ抱合など）を受けることにより、その体内動態や機能性が大きく影響を受けることが知られている。これら代謝物の分析及び機能性評価をおこなうためには標準化合物が必要とされるが，有機化学的手法による抱合体の合成は多段階のｽﾃｯﾌﾟが必要であり困難な場合が多い。我々はこれまでに異物代謝酵素発現酵母株を開発することにより、種々の医薬品及び食品中機能性成分の抱合体の酵素合成を可能にしてきた。本研究では異物代謝酵素発現酵母を用いて種々のﾌﾗﾎﾞﾉｲﾄﾞ化合物の抱合代謝物調製技術の開発をおこなった。
【方法・結果】染色体組込み型発現ﾍﾞｸﾀｰ(pAUR)を用いて、酵母内において補基質である UDP-ｸﾞﾙｸﾛﾝ酸を供給するﾗｯﾄ由来 UDP-ｸﾞﾙｺｰｽ脱水素酵素(UGDH)及び 36 種の哺乳動物由来 UGT 分子種 cDNA（ﾋﾄ 15 種、ﾗｯﾄ 10 種、ﾏｳｽ 8 種、ﾌﾞﾀ 2 種、ｳｻｷﾞ 1 種）と共に出芽酵母 AH22 株において同時発現させた. UGT-UGDH 遺伝子形質転換酵母の静止菌体に 8%ｸﾞﾙｺｰｽを添加したところ、細胞内への UDP-ｸﾞﾙｸﾛﾝ酸の蓄積が確認された。さらにﾌﾗﾎﾞﾉｲﾄﾞ基質の添加により対応する抱合体の産生がみられ、ｹﾙｾﾁﾝをはじめﾙﾃｵﾘﾝ、ｱﾋﾟｹﾞﾆﾝ、ｹﾝﾌｪﾛｰﾙなど複数の水酸基をもつ化合物に対して部位特異的な抱合代謝物を得ることが可能であることが示された。また、ﾋﾄ由来 UGT のみならずﾗｯﾄなど哺乳動物種由来 UGT においても効率的な抱合体産生がみられ、発現分子種を選択することにより多様な構造を有するﾌﾗﾎﾞﾉｲﾄﾞ抱合体を調製することが可能である。さらに硫酸抱合体産生系については、自律複製型発現ﾍﾞｸﾀｰ(pGYR)を用いて 5 種のﾋﾄ SULT 分子種（1A1,1A3,1B,1E1,2A1）を発現させた酵母株を構築した。SULT1A1 発現静止菌体に 1%硫酸ｱﾝﾓﾆｳﾑ、8%ｸﾞﾙｺｰｽ及び 0.5mM ｹﾙｾﾁﾝを添加したところ、6 時間後にはほぼ 100%近い変換効率で 3`位硫酸抱合体が得られた。また、ｸﾞﾙｸﾛﾝ酸抱合体と同様に、発現分子種を選択することにより部位特異的な硫酸抱合体を調製することが可能である。
【結論】ﾋﾄを含めた複数の哺乳動物由来 UGT 及び SULT 分子種から構成される出芽酵母抱合体調製系を用いることにより，種々のﾌﾗﾎﾞﾉｲﾄﾞに対する部位特異的なグルクロン酸及び硫酸抱合体を調製することが可能である。生体内においてﾊﾞｲｵﾌｧｸﾀｰとして機能するﾌﾗﾎﾞﾉｲﾄﾞ抱合体の体内動態及びその機能性を解析することができるものと考えている。

Flavonoid, Glucuronide, Sulfate

講演番号：2A16p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ A 校舎 16 会場

紫菊花えんめい楽粉末摂取による皮膚の UV 損傷防護

Protective effect of ingested purple chrysanthemum on UV induced skin damage

○中島 加奈子[1]、KHATUN MST Afifa[2]、原 英郎[3]、小西 徹也[1]（[1]新潟薬大・産官学連携推進センター、[2]新潟薬大、[3](株)ユニアル）
○Kanako NAKAJIMA[1], Afifa KHATUN MST[2], hideo HARA[3], Tetsuya KONISHI[1]（[1]NUPALS LCRDP, [2]NUPALS, [3]UNIAL Co,. Ltd.）

【目的】

菊花は古来不老長寿の食材として知られ、中国やタイでは菊花茶などの形で日常的に健康飲料として飲用されている。新潟や東北地方の一部では紫色の食用菊が“延命楽”や“かきのもと”、“もってのほか”などの愛称で食されており、アントシアニンを含む機能食材としてその生理機能に興味が持たれている。紫菊の生理活性については血糖値上昇抑制作用や抗糖化作用などが報告されているが、本研究では紫菊乾燥花弁試料（商品名えんめい楽粉末）を用いて、その in vitro 抗酸化活性を測定すると同時に、ヘアレスマウスにえんめい楽を経口投与し、紫外線による皮膚損傷の防御作用について照射後の皮膚の肥厚変化、組織酸化ストレス、炎症マーカーの変化を指標に検討を加えた。

【方法・結果】

In vitro 抗酸化測定についてはえんめい楽粉末の水抽出液について ORAC 値の測定、ESR による DPPH ラジカル消去活性の測定、および DMPO スピン捕捉法による OH ラジカル消去活性、SOD 様活性の測定を行った。ラジカル消去活性測定の結果は、OH ラジカル消去活性において特に強い活性を示した。

皮膚の UVB 損傷防御作用の検討は、えんめい楽粉末を水懸濁液としたものを 10 週齢のヘアレスマウスに 400 mg/Kg/day、800 mg/Kg/day で 14 日間経口投与し、投与開始 7 日目からマウス背部に UV-B を 200mJ/day 連続照射し、4 日目および 7 日目にと殺し、採取した皮膚についてチオバルビツール酸反応性物質(TBARS)および還元型グルタチオン(GSH)濃度の測定を行い、ウエスタンブロットにより Cox-2、Nf-κB の発現を調べた。その結果、7 日目において過酸化脂質のレベルを示す TBARS 値が UV 照射コントロール群に比べえんめい楽投与群では有意に低い値と示し、その作用はえんめい楽摂取濃度依存的であった。GSH 濃度はえんめい楽の濃度依存的に増加が見られた。ウェスタンブロットの結果からは、UV 照射 4 日目では Cox-2 の発現レベルにえんめい楽摂取の影響は見られなかったが、Nf-κB ではえんめい楽の摂取濃度依存的な発現量の増加が見られた。しかし、照射 7 日目では Cox-2、Nf-κB 共にえんめい楽の摂取濃度依存的な発現量の低下が見られた。

以上の結果から、えんめい楽の摂取により抗酸化レベルが増強され、皮膚の UV-B に対する損傷防御機能が向上したことが示唆された。

chrysanthemum, Antioxidant effect, skin damage

講演番号：2A16p17
講演日時、会場：3 月 25 日 17:12～ A 校舎 16 会場

ヒト皮膚細胞への UVB 誘導ダメージに対するマンギフェリンの防御効果

Protective effects of mangiferin on UVB-induced damage in human skin cells.

○佐竹 大樹[1]、新井 浩司[1]、野村 義宏[1]、矢ヶ崎 一三[2]、西山 敏夫[1]([1]東農工大・農・硬蛋白研、[2]東農工大・院・応用生命)
○ Hiroki SATAKE[1], Koji ARAI[1], Yoshihiro NOMURA[1], Kazumi YAGASAKI[2], Toshio NISHIYAMA[1] ([1]Scleroprotein Res.Inst.,Fac.of Agric.,Tokyo Univ.of Agric.and Technol., [2]Div.of Applied Biol.Chem.,Tokyo Univ.of Agric.and Technol.)

【緒言】皮膚へ紫外線が照射されると活性酸素種（reactive oxygen species；ROS）が発生し酸化ストレスシグナル伝達経路が活性化し、炎症反応関連物質の発現を亢進する。慢性的にこの系が活性化するとシワ、シミなどの皮膚老化を引き起こす。そのため ROS を除去する抗酸化物質の抗老化作用が注目されている。本研究では抗酸化物質であるマンギフェリンに着目した。マンギフェリンは南アフリカに生息するハニーブッシュ（*Cyclopia genistoides*）に多く含まれるポリフェノールで、抗酸化作用や抗炎症作用、抗腫瘍、抗糖尿病活性を有していることが報告されている。本研究では、紫外線 B 波(UVB)の表皮角化細胞ならびに真皮線維芽細胞への影響を解析し、皮膚細胞レベルでのマンギフェリンの抗酸化効果を明らかにすることを目的とした。
【方法】ヒト表皮角化細胞（HaCaT 細胞）およびヒト真皮線維芽細胞（HDF）を用いてマンギフェリンの効果を検討した。マンギフェリン 10～400μM を細胞に処理し UVB を照射後、細胞生存率の測定や酸化ストレスシグナル経路に関連する遺伝子（*FOS, JUN,* およびマトリックスメタロプロテアーゼ *MMP-1, 2, 9* など）の発現量測定を行った。また、western blot 法により MMP-1 の発現量を比較した。
【結果】40％細胞生存率の UVB 照射条件下(UVB 75mJ/cm^2)においてマンギフェリン 400μM により HaCaT 細胞の生存率は有意に上昇した。さらに HaCaT 細胞において UVB 10mJ/cm^2 照射による MMP-1 遺伝子発現上昇がマンギフェリン 400μM 処理により有意に抑制された。一方、線維芽細胞の HDF は本実験条件下では UVB への感受性が低く、100～500mJ/cm^2 の UVB 照射条件でも 80％程度の細胞生存率を示し、マンギフェリンの効果は明らかではなかった。
【考察】皮膚に紫外線が照射されると、酸化ストレスシグナル伝達経路の亢進により MMP-1 を主とするいくつかの MMP 群の発現上昇、活性化が促進され、その結果、細胞外マトリックスが過剰に分解され、シワのような皮膚の組織構造変化を引き起こすと考えられている。本研究から、マンギフェリンはヒト表皮角化細胞（HaCaT 細胞）の UVB 照射による細胞死を抑制し、皮膚構造変化の原因と考えられる MMP-1 の遺伝子発現を抑制することが示唆された。この結果から、マンギフェリンは MMP-1 発現抑制効果によりシワ形成を抑制する可能性が考えられた。

Mangiferin, antioxidant, keratinocyte

講演番号：2A16p18
講演日時、会場：3 月 25 日 17:24～ A 校舎 16 会場

コラーゲン加水分解ペプチドの UV 損傷マウス皮膚への影響

Effect of collagen hydrolysates on UV damage in mouse skin

○神保 希望[1]、杉原 富人[2]、小泉 聖子[2]、井上 直樹[2]、渡部 睦人[1]、野村 義宏[1] ([1]東農工大農・硬蛋研、[2]新田ゼラチン株式会社・ペプチド開発部)
○Nozomi JIMBO[1], Fumihito Sugihara[2], Seiko Koizumi[2], Naoki Inoue[2], Mutsuto Watanabe[1], Yoshihiro Nomura[1] ([1]Tokyou Univ. Agri. & Technol., [2]Nitta Gelatin Inc.,Peptide Division)

【目的】これまでの研究で、我々は加水分解コラーゲン摂取により光老化モデルの皮膚状態改善効果を認め報告している(BBB, 2009)。そこで、本研究では、加水分解コラーゲン摂取により血中で検出されるジペプチドを含有する加水分解コラーゲンの皮膚状態改善効果に関する検証を行った。摂取したジペプチドの血中および皮膚移行の確認を行い、紫外線単回照射による皮膚障害モデルおよび紫外線長期照射の光老化モデルを用いての効果について検証を行った。
【実験方法】ヘアレスマウス（Hos:HR-1）に、豚皮由来の Hyp-Gly を含有する加水分解コラーゲン（Cpt-A）、魚鱗由来の Pro-Hyp を含有する加水分解コラーゲン（Cpt-B）、および魚鱗由来の Hyp-Gly:Pro-Hyp を 1:2 で含む加水分解コラーゲン（Cpt-C）を経口投与（2g/Kg B. W.）し、投与 30、60、120、240 分後に採血、ならびに背部皮膚を採取した。血中及び皮膚中のペプチドは LC-MS／MS にて定量した。また、UVB 照射したヘアレスマウスへの投与の効果も検討した。まず、UVB の単回照射を行い、照射後 3 日間の背部皮膚の水分量を経時的に測定し、照射後 4 日目に解剖し背部皮膚組織の SOD 活性を測定した。次に光老化モデルへの加水分解コラーゲン投与の影響を検証する為、ヘアレスマウスに 7 週間 UVB を週 3 回照射し、並行して加水分解コラーゲンを毎日経口投与した。
【結果および考察】加水分解コラーゲン摂取により、血中・皮膚移行が経時的に確認された。
UVB の単回照射により皮膚水分量は低下するが、Cpt－A 投与により照射後 1 および 2 日目で、CPT－C 投与により照射後 2 日目で皮膚水分量の低下を有意に抑制した（$p<0.05$）。また、加水分解コラーゲン投与における皮膚の SOD 活性の上昇が確認できた。次に光老化モデルでは UVB 照射により皮膚水分量の低下が認められたが、7 週目の時点で Cpt-A 投与により水分量低下改善傾向を認めた（$p<0.10$）。また、皮膚中のコラーゲンの線維形成に関与するプロテオグリカンであるデコリン量の増加、および高分子化が認められた。一方、得られた皮膚よりリアルタイム PCR により Ⅰ型コラーゲンα1 鎖およびヒアルロン酸合成酵素（HAS-2）の遺伝子発現量の変化を調べた。個体差が大きく統計的な有意差は見られなかったものの、Cpt-B 投与により Ⅰ型コラーゲンおよび HAS-2 の発現亢進が認められた。Cpt-B>>Cpt-C>Cpt-A の順でこれら遺伝子の発現が亢進している傾向が認められた。
以上の結果より、加水分解コラーゲンが皮膚状態改善効果を示すのは、加水分解コラーゲン摂取後に血中で認められる Pro-Hyp などのジペプチドが大きく影響しているものと思われる。また、含有するペプチドが異なる加水分解コラーゲンでは、皮膚への効果が異なる事が示唆された。

collagen hydrolysate, photo aging, moisture content

講演番号：2A16p19
講演日時、会場：3 月 25 日 17:36～ A 校舎 16 会場

光老化マウスの皮膚における *Bifidobacterium breve* B-3 株の保護効果
Protection effect of *Bifidobacterium breve* B-3 on skin of photoaging mice.
○佐藤 拓海、村田 麻衣、近藤 しずき、小田巻 俊孝、若林 裕之、山内 恒治、清水 金忠、阿部 文明（森永乳業株・食基研）
○ Takumi SATOU,Mai MURATA,Shizuki KONDOU,Toshitaka ODAMAKI,Hiroyuki WAKABAYASHI,Kouji YAMAUCHI,Kanetada SHIMIZU,Fumiaki ABE (Morinaga milk industry co., LTD)

【目的】
我々はこれまでに高脂肪食による肥満誘導モデルに対し *B. breve* B-3 株(B-3)の抗メタボリックシンドローム効果を報告してきた(kondo et al. 2010)。肥満同様、加齢に伴う皮膚老化は QOL を大きく低下させる因子とされている。紫外線曝露による光老化は皮膚のバリア機能に大きなダメージを与え皮膚老化を大きく加速する事から近年、光老化に効果を示す食事成分が注目されている。本大会では B-3 投与による皮膚の抗光老化効果について、紫外線照射モデルマウスを用いた検討を行ったので報告する。
【方法】
7 週齢の Hos:HR-1 系♂マウスを用い、UV 非照射群（UV(-)）、UV 照射群（UV(+)）、UV 照射+B-3 投与群（B-3）の 3 群（各群 n=8）に分け、光老化誘導として紫外線（UVB）を 3 回/週、7 週間行い、B-3 の投与は 2×10^9/日でゾンデによる経口投与にて行った。光老化に対する皮膚状態の評価は経皮水分蒸散量（TEWL）および皮膚水分含量を 1 回/週で測定した。試験終了時には背部より皮膚を、腹部後大静脈より血清を採取し、病理組織染色による組織の観察、表皮肥厚の測定、炎症性サイトカインの定量、各種酸化関連因子の評価を行った。
【結果・考察】
UV(+)群と比較して、B-3 投与群では UV 照射による TEWL 値の上昇が有意に抑制され、さらに UV 照射による皮膚水分含量の低下も有意に抑制した。皮膚組織観察の結果、UV(+)群と比較して B-3 投与群では UV 照射による表皮肥厚が有意な抑制が認められた。また皮膚及び血清中の炎症性サイトカイン量は B-3 投与群において IL-1β 量が低い傾向を示した。酸化関連因子として皮膚中の SOD 様活性を測定したところ、UV 照射による活性の低下傾向が観察されたが、B-3 投与による変化は観察されなかった。TEWL 値や皮膚中水分含量値は皮膚バリア機能を反映するため、B-3 の投与は UV 照射によって生じる皮膚の炎症に作用するとともに皮膚のバリア機能を維持及び改善すると考えられる。

Bifidobacterium, aging, skin

講演番号：2A16p20
講演日時、会場：3 月 25 日 17:48～ A 校舎 16 会場

生クリームの光酸化に対する新規抗酸化製剤の作用

Effect of Antioxidative Formulation against Photooxidation of Fresh Cream

○門脇 章夫[1]、檜山 真一郎[1]、山本 幸弘[2]、原 節子[2]、前田 祥貴[1]([1]太陽化学、[2]成蹊大理工)
○Akio KADOWAKI[1], Shinichiro HIYAMA[1], Yukihiro YAMAMOTO[2], Setsuko HARA[2], Yoshitaka MAEDA[1] ([1]TAIYO KAGAKU Co. Ltd., [2]Seikei Univ.)

【目的】食品が販売される場面においては、より美味しく見えるよう強い光が照射されていることが多い。光は食品にダメージを与える要因の一つであり、特に繊細な風味が特徴の食品では展示中に風味が劣化することが問題となっている。このような食品の嗜好的品質や栄養価値の低下は、食品中に含まれる脂質分子の酸化が大きな原因となっている。本研究では生クリームをターゲットとして乳脂劣化物の分析を行い、独自の乳化技術で脂溶性抗酸化剤と水溶性抗酸化剤を一剤化した抗酸化製剤の酸化抑制効果を検討した。
【方法】脂溶性抗酸化素材としてトコフェロール（Toc)、水溶性抗酸化素材としてカテキンが主要成分となる茶抽出物を用い、これらを一剤化した抗酸化製剤(TSM)を調製した。TSM は Toc 濃度で 40 ppm となるように生クリームに添加し、冷蔵下で光照射試験を行った。また、乳化製剤化を行わず抗酸化素材を直接添加した生クリーム試料についても同様の試験を行った。光源には蛍光灯、あるいは LED を使用した。生クリームの劣化を評価する指標として、過酸化物価（PV）の測定、およびガスクロマトグラフィー(GC)を用いて生クリーム劣化臭を分析した。また、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により Toc 量の経時変化を測定した。
【結果】蛍光灯および LED のいずれを照射した場合にも、TSM 添加生クリームでは PV の上昇が有意に抑制された。一方で非製剤化試料では、無添加と比較して PV はやや低い値を示したが、TSM ほどの抑制効果は得られなかった。また HPLC により Toc 量を測定したところ、TSM 添加試料では照射時間に伴い Toc 量が減少したのに対し、非製剤化試料では変化が認められなかった。GC による劣化臭の分析では、劣化生クリームの異臭成分として、ペンタナール、ヘキサナール、ヘプタナールなどのアルデヒドや、ケトン類を確認した。TSM 添加生クリームではこれら異臭成分も有意に減少しており、官能試験においても差が認められた。以上の結果より、乳化製剤化することで抗酸化素材がより効果的に作用することが明らかとなり、脂溶性抗酸化剤と水溶性抗酸化剤を一剤化した TSM の有効性が示された。

antioxidant, photooxidation, off-flavor

講演番号：2A20a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ A 校舎 20 会場

日本食の長期摂取がマウスの脂質代謝調節機能に与える影響

The effect of long-term intake of Japanese food on regulatory function in lipid metabolism in mice

○本間 太郎[1]、治部 祐里[2]、川上 祐生[2]、都築 毅[1]、池田 郁男[1]([1]東北大院・農、[2]岡山県大・保福)
○Taro HONMA[1], Yuri JIBU[2], Yuki KAWAKAMI[2], Tsuyoshi TSUDUKI[1], Ikuo IKEDA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Okayama Pref. Univ.)

【目的】日本人の平均寿命は着実に増加し、長寿国として知られている。平均寿命が延びた理由の一つとして食生活が注目され、日本人の食事は「日本食」として世界中で盛んに研究されている。現在、健康維持に効果のある日本食に特徴的な食品成分が広く研究されている。しかしこれらの研究は、単一もしくは数種の食品成分の短期的な摂取による影響を見ているものが主体であり、これらの成分が集まった「日本食」の「長期的摂取」がどう影響するかは明らかになっていない。一方、日本食の内容はここ 40～50 年間で大きく様変わりし、また、食の欧米化とともに生活習慣病の発症率が増加している。そのため、現在日本食の健康有益性が本当に高いのか疑わしい。時代とともに徐々に変化している日本食において、どの年代の日本食が最も高い健康有益性を持つかについて、科学的根拠を持って示した研究は過去にほとんどない。このことについて明らかとできれば、現代の食生活を見直し健康に加齢し、個人の QOL（quality of life）を向上させるための重要な手掛かりを得ることができる。そこで本研究では、日本食の長期的摂取が生活習慣病の発症に大きく関わる脂質代謝系にどう影響するのかを検討するとともに、最も健康有益性の高い日本食を明らかにすることを試みた。

【方法】管理栄養士の指導の下、日本国民・栄養調査に基づき 2005 年、1990 年、1975 年、1960 年それぞれ 1 週間 21 食分の日本食の献立を再現し、調理したものを凍結乾燥・粉末化した。作製した各年代の日本食をそれぞれ通常飼育食（CE-2；日本クレア）に混合して 30%日本食混合物とし、老化促進モデルである SAMP8 マウス（4 週齢、雄性）に自由摂食させ、8 ヶ月間飼育した。試験期間終了後、血漿、肝臓の生化学的検査に加え、肝臓において生活習慣病関連遺伝子の DNA マイクロアレイ解析を行った。

【結果】1975 年の日本食を摂取したマウスは、白色脂肪組織重量や肝臓脂質蓄積量が減少した。そのメカニズムとして、肝臓において脂肪分解に関与する patatin-like phospholipase domain containing 2 (Pnpla2)、脂肪酸の β 酸化に関与する peroxisome proliferator-activated receptor α (Pparα) や acyl-CoA oxidase (Acox) の発現量が 1975 年の日本食を摂取したマウスで増加し、これにより、脂肪の分解が促進され、脂質蓄積が減少したことが示唆された。以上より、1975 年付近の日本食に高い健康有益性を持つことが示唆された。

Japanese food, lipid metabolism, DNA microarray

講演番号：2A20a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ A 校舎 20 会場

授乳期における母親のコレステロールの過剰摂取は子供の脂肪肝発症リスクを増加させる

High dietary cholesterol intake during lactation promotes development of fatty liver in offspring

○伊藤 隼哉、都築 毅、池田 郁男（東北大院・農）
○Junya ITO,Tsuyoshi Tsuduki,Ikuo Ikeda (Tohoku Univ.)

【背景・目的】近年、妊娠・授乳期における母親の栄養状態が、子供のメタボリックシンドローム発症リスクに大きく関与することが報告されている。そのため、このメカニズムを明らかにするための様々な研究が進んでいる。その一方で、妊娠・授乳期における母親へ単一成分を強化した場合に、子供へ与える影響に着目した試験はほとんどない。我々は以前に、授乳期における母親の高脂肪食摂取が、子供のメタボリックシンドローム発症リスクを増加させることを明らかにした。その中で、母親の高脂肪食摂取により、子供のエネルギー摂取が増加するだけでなく、メタボリックシンドロームに密接に関連するコレステロールの摂取が増加することに着目した。コレステロールの過剰摂取は血中コレステロール濃度を上昇させ、動脈硬化症の発症リスクを増大する。動脈硬化症は発症すると完治することが非常に困難であることから、発症メカニズムを解明し、予防することが重要である。また、血中コレステロール濃度は脂肪肝の発症にも関連しており、脂肪肝を介したメタボリックシンドロームの発症予防においても重要な役割を担っている。そこで本研究では、マウスを用いて、授乳期における母獣のコレステロール摂取が、仔マウスの脂質・糖質代謝系、ひいてはメタボリックシンドロームの発症リスクに与える影響を詳細に検討した。
【方法】妊娠した C57BL/6J マウスを出産までコレステロールを添加しない普通食で飼育した。出産から離乳までの授乳期（３週間）を普通食または 0.2%コレステロール添加食で飼育した。離乳後の８週間は仔マウスを全て普通食で飼育した。離乳時と 11 週齢にて屠殺し、血清や各種臓器を採取し、種々の分析に供した。
【結果】授乳期における母獣のコレステロール摂取によって、離乳時における仔の肝臓コレステロール濃度は有意に増加した。11 週齢では肝臓のコレステロールのみならず、トリアシルグリセロール濃度が有意に増加し、脂肪肝の発症リスクが高まることが明らかとなった。このメカニズムを検証するために、肝臓の脂質・糖質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量を測定した。その結果、肝臓へのリポタンパク質流入に関与する分子の発現が増加していた。また、コレステロール濃度に応答し、それら分子の発現を制御する因子も有意に増加していた。以上より、授乳期における母獣のコレステロール摂取は、乳児の肝臓にコレステロールを蓄積させることが明らかになった。さらに、肝臓のコレステロールが肝臓への中性脂肪蓄積を誘導することで、将来における脂肪肝発症リスクを増加させることが示唆された。

lactation, cholesterol, fatty liver

講演番号：2A20a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ A 校舎 20 会場

マウスにおけるレスベラトロール誘導体の摂食抑制および脂肪蓄積抑制作用の検討

Effect of resveratrol derivative on food intake and fat accumulation in mice

○茶山 和敏[1]、横山 晴圭[1]、土井 聡[2]、松川 泰治[2]([1]静岡大農、[2]UHA 味覚糖)
○Kazutoshi SAYAMA[1], Haruka YOKOYAMA[1], Satoshi DOI[2], Taiji MATSUKAWA[2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Mikakuto Co.)

＜緒論＞ これまでの研究で、レスベラトロールは脂肪蓄積抑制作用を有することが報告されている。そこで、我々は、数種のレスベラトロール誘導体を作成し、3T3L1 脂肪前駆細胞を用いて、作成したレスベラトロール誘導体の脂肪蓄積抑制作用をスクリーニングした。その結果、そのうちの１つのレスベラトロール誘導体（RD）が強い脂肪蓄積抑制活性を有することを見出した。そこで、この RD をマウスに投与して脂肪蓄積抑制作用を検討した。その結果、マウスに対しても RD が強い脂肪蓄積抑制作用を有し、また摂食抑制作用を有する可能性が示唆され、農芸化学会 2011 年度大会でこれらの結果を発表した。

そこで、本研究では、RD の脂肪蓄積抑制及び摂食抑制作用をより詳細に検討した。

＜材料及び方法＞ 実験には４週齢の C57BL/6J マウスを使用した。また、投与実験には、コントロール飼料として AIN-76 を用い、さらに AIN-76 に脂質を添加した高脂肪食飼料を作成した。また、実験群には、高脂肪食飼料に RD を 0.4%、0.2%。0.1%、0.05%の割合で混合した飼料を使用した。各飼料をマウスに６週間投与した後、解剖して各種臓器重量を測定するとともに、血中の脂質量を測定した。また、摂食抑制作用のメカニズムを解明するために、摂食抑制が顕著だった 0.4%RD 投与群と高脂肪食群の血中のグレリン、レプチン、アディポネクチンおよびアグーチ関連ペプチド（AGRP）濃度を測定した。

＜結果及び考察＞ ６週間の RD 投与の結果、すべての RD 投与群の体重増加量が高脂肪食群と比較して有意に低下していた。また、RD 投与によって、いずれの実験群も摂食量の顕著な抑制がみられた。また、腹腔内脂肪および肝臓重量もすべての RD 投与群で有意に低下していた。血中脂質量は、総コレステロール量が 0.05%RD 含有飼料の投与によって低下し、0.4%RD 飼料投与群では増加していた。血中アディポネクチンおよびレプチン量は RD 投与によって有意に低下し、血中グレリン量は有意に増加していた。また、血中 AGRP 量には低下傾向がみられた。

以上の結果から、RD は、低濃度の投与でも、摂食抑制を伴う脂肪蓄積抑制作用を発揮することが明らかとなった。また、摂食抑制のメカニズムとして、RD によるアディポネクチンと AGRP の抑制が関与している可能性が示唆された。摂食抑制に関わるそのほかのホルモン等の分析も行っており、それらの結果については発表の際に報告する予定である。

resveratrol derivative, anti-obesity, food intake

講演番号：2A20a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ A 校舎 20 会場

飼料組成の異なる試験食給餌後のラット肝臓での脂肪酸合成酵素 mRNA 量の変化

Diet composition affects postprandial expression of fatty acid synthase mRNA in rat liver

○我妻 紀代恵、白川 仁、駒井 三千夫（東北大・院農・栄養）
○Kiyoe WAGATSUMA,HITOSHI SHIRAKAWA,MICHIO KOMAI (Tohoku Univ.)

【背景】脂肪酸合成酵素遺伝子（以下、FASN）は、NADPH 依存的にパルミチン酸を合成する酵素である。肝臓での FASN mRNA 量は、摂食後急激に増加し、その後短時間で減少する。mRNA 量は、転写と分解の量で決定するが、FASN mRNA の急激な低下の機構は十分に明らかではない。これまでに我々は、ラット肝臓において摂食後に起こる FASN mRNA 量の減少は、摂食後に発現量が変化する miRNA による RNA 分解を介する可能性を見出した。本研究では、飼料組成の異なる同熱量の異なる餌を一定量給餌後のラット肝臓での FASN mRNA、および FASN mRNA を標的とする miRNA 量の変化について解析を行った。
【方法】SD 系雄性ラット（7 週齢）を 24 時間絶食後に、同熱量の 3 種の実験食 4 g を 2 時間摂食させ、解剖した［実験食：1 高スクロース無脂肪食（HS/NF）、2 高スクロース大豆油食（HS/S）、3 コーンスターチ大豆油食（C/S）］。得られた血清を用いて、グルコース、インスリン、グルココルチコイド濃度を測定した。また、肝臓からトータル RNA を採取し、cDNA を合成後、FASN, SREBP1c, SCD-1, ChREBP mRNA 量を定量 RT-PCR 法で測定した。さらに、肝臓の全抽出液、または肝臓核画分の抽出液を調製し、ウェスタンブロット法で FASN の発現制御に関わる転写因子のタンパク質量を測定した。
【結果】血清グルコース濃度は、絶食時比べ、HS/NF 群で 1.3 倍、HS/S 群で 1.7 倍、C/S 群で 1.9 倍であった。また、血清インスリン濃度は、それぞれ、1.5 倍、2.0 倍、2.0 倍であった。肝臓 FASN mRNA 量は摂食により顕著に増加し、それぞれ絶食群の比べ 35 倍、11 倍、4 倍であった。一方、SREBP1c mRNA 量は、18 倍、7 倍、7 倍、SCD-1 mRNA は 8 倍、7 倍、0.5 倍であった。また、FASN の転写制御に関わる転写調節因子の発現量をウェスタンブロットで測定したところ、成熟型 SREBP1c 量は 2.6 倍、2.7 倍、2.3 倍、核内 ChREBPβ量は、3.2 倍、1.2 倍、0.8 倍であり、さらに、有意な差ではないが LXRα量が HS/NF 群で上昇傾向を示し、LXRαの標的遺伝子 CYP7A1 mRNA が 4.5 倍、1.6 倍、1.2 倍と HS/NF 群で顕著に増加していた。以上のことから、FASN mRNA の誘導は食餌組成により異なり、従来の報告の通り、HS/NF 食が最も誘導させていた。また、HS/NF 食での FASN mRNA 量の上昇には、ChREPBβや LXRαの活性化によることが示唆された。つぎに、プライマー伸長法と定量 PCR を組み合わせた方法で、FASN mRNA 分解について検索したところ、先に見出していた領域で RNA 分解が起こると推定された。また、HS/NF 群で本領域での mRNA 量の低下が最も顕著であることから、本領域を介した RNA 分解は mRNA の誘導後直ちに起こることが示唆された。

fatty acid synthase, post-transcriptional regulation, MicroRNA

講演番号：2A20a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ A 校舎 20 会場

外因性酸化コレステロールの体内動態と有害作用の解明

Elucidation of the pharmacokinetics and adverse effect of exogenous oxidized cholesterol in rats

○照沼 彰一郎、細野 佑紀子、長田 恭一（明治大農）
○Shoichiro TERUNUMA,Yukiko HOSONO,Kyoichi OSADA (Meiji Univ.)

【目的】食事由来酸化コレステロール（OXC）は、脂質代謝を撹乱し、動脈硬化を誘発する可能性がある。我々は、以前の研究で OXC が生体内で胆汁酸に異化されないことを明らかにした。本研究では、OXC の生体内動態ならびに脂質代謝撹乱作用のメカニズムを検討した。
【方法】Exp .1　ステロイド 3 位を重水素標識したコレステロールを加熱酸化させた後に、コレステロールと OXC に分画した。8 週齢の雄 Wistar 系ラットを 12 時間の絶食後、重水素標識されたコレステロールまたは OXC をそれぞれ経口投与し、12 時間後に解剖を行い、血液、肝臓、心臓、腎臓、胃、小腸、大腸内容物ならびに糞便を採取した。血漿は超遠心分離により、HDL、VLDL および LDL 画分に分画した。得られた各組織とリポタンパク質から脂質を抽出してケン化後、ケン化画分を TMS 誘導体化して GC-MS に供して、ステロール成分を測定した。
Exp. 2　8 週齢の雄 Wistar 系ラットを 12 時間の絶食後、コレステロールおよび OXC を 50mg（対照は非投与）経口投与した。0、4、8、16、24 時間後に解剖を行い、血漿および肝臓の OXC レベルならびに肝臓の脂質代謝を調節する遺伝子の発現レベルを測定した。
【結果・考察】Exp. 1　投与したコレステロールは、各リポタンパク質画分および各組織から検出された。よって、投与 12 時間後には、肝臓に取りこまれた後に、末梢組織に運搬されていることが確認された。同様に種々の OXC も各リポタンパク質画分より検出され、かつ心臓や腎臓からも検出された。投与した OXC もコレステロールと同様にリポタンパク質に組み込まれて、末梢組織で利用されることが明らかとなった。
Exp. 2　肝臓のコレステロール合成律速酵素（HMG-CoA reductase）の遺伝子発現レベルは、対照群と比べて、コレステロール投与 8 時間後に低くなった。一方、OXC 投与群は、コレステロール投与群と比べて 8 時間後で有意に高くなった後、24 時間後には対照群と比較して有意に低くなった。また、肝臓のコレステロール異化律速酵素（CYP7A1）の遺伝子発現レベルは、コレステロール投与 16 時間後、対照群と比べて高くなる傾向となった。それに対して OXC 投与群は、コレステロール投与群と比べて有意に低下し、3 群間で最も低いレベルとなった。よって、OXC は、摂取して短期間でコレステロール合成と異化律速酵素の両者の遺伝子発現レベルを変動させることが確認できた。OXC 摂取の度に上記のような変動が繰り返し生じることで、脂質代謝の恒常性が失われる可能性があると思われる。

oxidized cholesterol, lipid metabolism, rat

講演番号：2A20a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ A 校舎 20 会場

魚油とフコキサンチンの併用による食事性肥満マウス に対する抗肥満作用

Anti-obesity effects of fish oil and fucoxanthin on diet-induced obesity model mice

○菅野 翔伍、本間 公博、前多 隼人 (弘前大農)
○shogo KANNO,kimihiro HONMA,hayato MAEDA (Hirosaki Univ.)

【目的】フコキサンチン(Fx)はワカメなどの褐藻類に含まれるカロテノイドの一種である。Fx は白色脂肪組織に UCP1(uncoupling protein 1)を発現させ、脂質代謝を亢進する作用を示すことが報告されている。また糖尿病肥満モデルマウスを用いた実験で、魚油とともに投与することでその効果が高まることも報告されている。本研究では正常マウス(C57BL/6J)に対し、高脂肪食とともに Fx と魚油を併用投与した場合の作用について検討した。
【方法】4 週齢の C57BL/6J 雄マウスを 30%の脂質を含む高脂肪食で 4 週間、実験飼育をおこなった。実験群はコントロール群（ラード 23%、大豆油 7%）、魚油群（ラード 23%、大豆油 3.5%、魚油 3.5%）、魚油＋Fx 群（ラード 23%、大豆油 3.4%、魚油 3.5%、Fx 0.1%）の 3 群でおこなった。解剖の後、脂肪組織重量、血漿脂質成分の測定をおこなった。また熱産生に関る UCP1 の白色脂肪組織(WAT)、褐色脂肪組織(BAT)での mRNA とタンパク質の発現量について Real-time RT-PCR 法、Western blot 法にて測定した。
【結果】実験飼育期間中に 3 群間の体重の変化、及び摂食量に有意な差は認められなかった。一方、魚油＋Fx 群においてコントロール群と比較し、WAT 重量が有意に減少した。また、WAT、BAT における UCP1 の mRNA とタンパク質の発現の上昇傾向が認められた。更に血漿中のトリアシルグリセロール、遊離脂肪酸、LDL コレステロールの低下も認められた。これらのことから Fx と魚油の併用投与は食事性肥満誘導マウスに対して、脂質代謝亢進による脂肪組織重量減少効果にあわせて、血漿脂質成分の改善効果を示すことが明らかとなった。

Fucoxanthin, UCP-1, Fish oil

講演番号：2A20a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ A 校舎 20 会場

食事誘導性肥満ラットに対する多穀麹の効果

Effects of multi grain koji in diet-induced obesity rats

○井口 隆文[1]、川田 あゆみ[1]、瀬川 貴之[1]、渡辺 敏郎[1]、山本 明[1]、加藤 範久[2] ([1]ヤエガキ醗酵技研、[2]広島大院・生物圏科学)
○Takafumi Iguchi[1], Ayumi Kawata[1], Takayuki Segawa[1], Toshiro Watanabe[1], Akira Yamamoto[1], Norihisa Kato[2] ([1]YAEGAKI Bio-industry, Inc., [2]Hiroshima Univ.)

【目的】麹は、穀類などの表層に麹菌を生育させ、麹菌が産生するプロテアーゼ、アミラーゼなどによって原料を分解させることを目的とし、主として醸造産業において使用されるが、昨今塩麹などとして食品素材としても注目されている。そこで我々は、*Aspergillus oryzae* を種菌とし、数種類の穀物から多穀麹を製麹し、食品としての新たな機能性を検討した。
【方法および結果】雄性 SD ラットに多穀麹、または熱処理した多穀麹を 3%添加した高脂肪・高ショ糖食を 3 週間与え、血清脂質、臓器重量、脂肪組織重量を測定した。その結果、多穀麹を与えた群では、対照群と比較して脂肪組織重量が有意に低値を示し、また盲腸重量の増加及び盲腸内有機酸、特に乳酸の増加が認められた。一方で、殺菌した多穀麹を与えた群では、脂肪組織重量や盲腸重量の変化が全く認められなかった。この結果より、多穀麹は脂肪蓄積抑制作用と腸内環境改善作用を有していることが示され、さらにそれらの効果には、熱処理によって構造変化または失活する成分が関与している事が示唆された。そこで、次に麹菌がこれらの効果に関与しているか評価するため、麹菌（生菌）を、高脂肪・高ショ糖食に混ぜてラットに与えた。その結果、麹菌を与えた群と対照群の脂肪組織重量に差は認められず、麹菌は脂肪蓄積抑制効果を有していないことが明らかとなった。しかしながら盲腸重量および盲腸内有機酸については、重量の増加、乳酸の増加が認められ、腸内環境改善作用を有することが考えられた。以上の結果より、多穀麹には脂肪蓄積抑制作用と腸内環境改善作用を有することが確認され、腸内環境改善作用には生きた麹菌が関与している事が示唆された。現在、多穀麹よりエキスを調製し、エキス画分の効果について検討している.

Koji, obesity, *Aspergillus oryzae*

講演番号：2A20a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ A 校舎 20 会場

Lactobacillus amylovorus CP1563 株のマウス体脂肪蓄積抑制効果
Anti-obesity effect of *Lactobacillus amylovorus* strain CP1563 in mice fed with a high-fat diet
石田 優[2]、○菅原 智詞[1]、澤田 大輔[3]、藤原 茂[1] ([1]カルピス(株)・発酵研、[2]カルピス(株)・品質保証・環境部、[3]カルピス(株)・商開セ)
Yu ISHIDA[2], ○Tomonori SUGAWARA[1], Daisuke SAWADA[3], Shigeru FUJIWARA[1] ([1]Microbiology & Fermentaion Laboratory, Calpis Co., Ltd., [2]Quality Assurance & Enviroment Department, Calpis Co., Ltd., [3]Products Development Center, Calpis Co., Ltd.)

我々はこれまで、β酸化を促進する PPARα に着目し、ヒト PPAR リガンド結合ドメインを用いたリガンドアッセイ系において各種乳酸菌の有機溶媒抽出物の PPARα 活性化能を比較し、抗メタボ活性が期待される *Lactobacillus amylovorus* CP1563 株を選抜した。HDL-C が 40mg/dL 以下且つ BMI28 以上の成人男女 40 名（平均年齢 47.4±11.5 歳）を対象に、12 週間の摂取試験を実施した結果、CP1563 株破砕菌体摂取群では、摂取前と比較して体重、BMI および CT 検査の皮下脂肪面積が有意な低下を示し、プラセボ摂取群と比較して体脂肪率、BMI の低下が認められ、さらに、層別解析では特に体脂肪面積高値者において体脂肪面積の有意な低下が認められることを報告した。

今回我々は、マウス肥満モデル系を用いて体脂肪蓄積抑制効果とそのメカニズムについて検証した。C57BL/6 マウスに 2 週間高脂肪食（対照）を自由摂取させて馴化した後、2 群に割付け、高脂肪食（対照）もしくは CP1563 株破砕菌体 10%混餌高脂肪食を自由摂取により投与した(カロリーは同一に調整)。12 週間投与後、18 時間以上絶食後に下大静脈から採血を行い、腹部 CT スキャンによる体脂肪測定、および血漿中の脂質関連マーカー、肝臓中の脂質等を測定した。その結果、CP1563 群破砕菌体投与群において体重が有意に減少し、その低下は体脂肪の低下によって説明が可能であった。体脂肪の低下は約半分が皮下脂肪、約半分が内臓脂肪の低下でありおのおの有意な低下を示した。内臓脂肪については副睾丸周囲脂肪の減少が明確であった。さらに、肝臓中の脂質濃度については、CP1563 株破砕菌体投与群の遊離型および総コレステロール濃度が有意に低下し、TG は低下する傾向が示された。

以上の結果から、CP1563 株破砕菌体投与により内臓脂肪および皮下脂肪の蓄積が抑制されること、また肝臓中の脂質量が低下していることが示唆された。

PPARα, Lactic Acid Bacteria, Anti-obesity effect

講演番号：2A20a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ A 校舎 20 会場

柿 3 品種の機能性比較

Comparison of functionalities among three persimmon cultivars

○松本 健司、武川 加奈子（石川県大生資環）
○Kenji MATSUMOTO,Kanako TAKEKAWA (Ishikawa Prefectural Univ.)

【目的】柿の未成熟果実から調製したタンニン含量の高い食物繊維（柿繊維）は胆汁酸吸着能を有しており、平核無柿の柿繊維はヒト介入試験で血中コレステロール低減効果を示した[1)]。しかしながら、柿の品種は非常に多いため、すべての品種から調製した柿繊維が有効性を示すとは限らない。そこで、本研究では日本を代表する 3 品種の柿から柿繊維を調製し、動物実験において柿の品種間での効果の違いを明らかにすることを研究の目的とした。

【方法】完全甘柿である富有柿、不完全渋柿である平核無柿、完全渋柿である蜂屋柿の未成熟果実から柿繊維を調製し、各品種の柿繊維の in vitro での胆汁酸吸着活性とフラボノイド含量を測定した。動物実験では、AIN-76 を改変した高脂肪高カロリー餌中のセルロース 4%のうち 2%を各柿繊維に置き換え、C57BL/6J マウス（オス、 7 週齢）に 10 週間摂取させ品種間の効果を比較した（コントロール群 n=7、各柿繊維群 n=6）。

【結果】In vitro における胆汁酸吸着能は富有柿が最も低く、平核無柿と蜂屋柿は同程度であった。また、フラボノイド含量は富有柿が最も低く、蜂屋柿が最も高かった。動物実験では、摂取熱量、体重増加量について群間差がなく、すべての品種において in vitro 胆汁吸着能に対応した糞への胆汁酸排泄促進効果が確認できた（コントロール群に対し、富有群：1.55 倍、平核無群：2.57 倍、蜂屋群：2.61 倍）。飼育期間中の空腹時血糖値は平核無群と蜂屋群でコントロール群よりも有意に低値を示し、血中脂質濃度に関しては、蜂屋群で non-HDL コレステロールの有意な低下が見られ、平核無群と蜂屋群で遊離脂肪酸の有意な低下が見られた。また、肝臓コレステロール含量は富有群と平核無群で有意な低下が見られたものの、蜂屋群ではコントロール群と差が見られなかった。

胆汁酸の排泄促進は脂質代謝および糖代謝の改善に有効であることから、今回使用した富有柿、平核無柿、蜂屋柿から調製した柿繊維はいずれも脂質代謝および糖代謝の改善に有効な食品素材と考えられる。しかしながら、空腹時血糖値の低下は平核無柿と蜂屋柿で、脂質代謝の改善効果は蜂屋柿のみで見られたため、胆汁酸吸着活性とフラボノイド含量が高い品種ほど、糖代謝と脂質代謝の改善に有効であると考えられる。現在、品種間の作用メカニズムの違いを明らかにするために肝臓および脂肪組織での遺伝子発現解析を検討中である。

1) Gato *et al.*, Persimmon fruit tannin-rich fiber reduces cholesterol levels in humans. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **62**, 1-6, 2013.

persimmon, hypocholesterolemic effect, C57BL/6J mice

講演番号：2A20a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ A 校舎 20 会場

柿果皮抽出物投与が肥満 2 型糖尿病モデル KK-Ay マウスに及ぼす影響

Effects of ingested persimmon peel extract on obese type 2 diabetic KK-Ay mice

○井土 良一[1]、高橋 徹[1]、牛尼 翔太[2]、石島 智子[2]、阿部 啓子[2]、中井 雄治[2] ([1]（公財）東洋食品研究所、[2]東京大院農生命科・応生化)
○Ryoichi IZUCHI[1], Toru TAKAHASHI[1], Shota USHIAMA[2], Tomoko ISHIJIMA[2], Keiko ABE[2], Yuji NAKAI[2] ([1]Toyo Institute of Food Technology, [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo)

【背景・目的】干し柿製造時に残渣として排出される柿果皮は、カロテノイド等の機能性成分を多く含むが、そのほとんどは廃棄されている。これまでに、柿果皮抽出物（PPE）[1)] を投与した非肥満 2 型糖尿病モデル Goto-Kakizaki ラットでは、インスリンシグナル伝達経路関連の発現変動遺伝子数の割合が有意に高く、インスリン受容体 β サブユニット（IRβ）のチロシンリン酸化が亢進すること [2)]、遺伝子発現解析からは、脂質代謝関連の発現変動遺伝子数の割合も有意に高いことが分かっている。これらの変化が普遍的なものであるか、他のモデル動物である肥満 2 型糖尿病 KK-Ay マウスで検討した。
【実験方法】オス 5 週齢 KK-Ay マウスを 2 群（6 匹/群）に分け、通常飼料（CD）と 0.1%PPE 添加飼料（PD）を自由摂取にて 8 週間与えた。投与終了後、麻酔下で血液と肝臓を採取して、血漿中の生化学指標と肝臓中脂質を測定した。さらに、肝臓から total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ法により遺伝子発現を解析した。
【結果と考察】投与終了時の体重・摂餌量、精巣上体の脂肪細胞の大きさや肝臓への脂肪・コレステロールの蓄積量、血漿中グルコース濃度、インスリン濃度、中性脂肪・コレステロール濃度では影響がみられなかった。PD 群は CD 群と比較して血漿中の総ケトン体濃度が低く、肝臓中の遊離パルミチン酸量が有意に増加した。遺伝子発現解析より、これらの変化はケトン体由来の脂肪酸合成に関与する acetoacetyl-CoA synthetase（AACS）や脂肪酸合成に関与する fatty acid synthetase（FASN）、ATP citrate lyase（ACLY）遺伝子の発現増加が関係していると考えられた。さらに、これらの遺伝子の発現変化はインスリンシグナル伝達経路を介した可能性があったが、IRβ のチロシンリン酸化に影響は無かった。以上の結果から、KK-Ay マウスへの PPE 投与は、インスリン受容体を介さない経路により脂肪酸の生合成を促進する可能性が示唆された。

参考文献

1) Izuchi R. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, *73*, 2793-5.
2) Izuchi R. *et al.*, *J Agric Food Chem.* **2011**, *59*, 3320-9

persimmon peel, KK-Ay mouse, microarray

講演番号：2A20a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ A 校舎 20 会場

食後の血中脂質に対するヤムイモおよびその含有成分ジオスゲニンの効果

Effects of yam and its constituent diosgenin on blood levels of postprandial triacylglycerol

○三好 規之、平田 隼、新井 英一、大島 寛史（静県大院薬食生命科学総合学府）
○Noriyuki MIYOSHI,Jun HIRATA,Hidekazu ARAI,Hiroshi OHSHIMA (Univ. of Shizuoka)

メタボリック症候群はインスリン抵抗性や内臓脂肪蓄積を基盤とし、耐糖能異常、高トリグリセリド血症、低 HDL 血症、高血圧などを呈する代謝異常症である。インスリンは血管内皮細胞表面に存在する lipoprotein lipase（LPL）を活性化することが知られており、インスリン抵抗性が存在すると LPL 活性が低下し、レムナントの異化障害が生じる。この場合、血中トリグリセリド値は空腹時には正常値を示すが、食後に異常な増加を示し、この増加が遷延する食後高脂血症は、動脈硬化症など血栓症進行の重要な危険因子として近年認められつつある。我々はこれまでに azoxymethane/dextran sulfate sodium 誘発大腸発がんモデルの ICR マウスや、肥満モデル KK-A^yマウスにおいて、生薬である山薬（ヤムイモの乾燥品）および山薬中の有効成分であるジオスゲニンの経口投与が、肝臓・筋肉・白色脂肪組織における *lpl* 遺伝子発現を強く誘導することや、血中トリグリセリド値を低下させるなど脂質代謝改善効果を示すことを明らかにしてきた。そこで本研究では正常ラットを用いた脂質負荷試験を行い、ジオスゲニンおよび山薬による食後の血中トリグリセリドレベルに対する影響を検討した。

通常食で飼育し一晩絶食した 9 週齢の雄性 Wistar ラット（各群 n=7）に、純水あるいは山薬、ジオスゲニン（終濃度 500 ppm）を混合し調製した soybean oil、egg lecithin、glycerol のエマルジョン 10 ml/kg bw を経口投与し、経時的に採取した血漿中のトリグリセリド値を測定した。コントロール群の血中トリグリセリド C_{max}、T_{max}、$AUC_{0\text{-}8h}$ 値はそれぞれ 99.9 ±20.9 mg/dL、1.71±0.76 h、569±101 mg/dL*h であった。山薬群の血中トリグリセリド T_{max} 値（3.29±0.95 h、p<0.05）が対照群に比べて有意な増加を示したが、山薬群の C_{max}、$AUC_{0\text{-}8h}$ 値およびジオスゲニン群の各パラメーターに有意な変動は認められなかった。さらに、これらのラットを高脂肪食あるいは 500 ppm の山薬、ジオスゲニンを含む高脂肪食で 6 週間飼育し、山薬、ジオスゲニンを含まない上述のエマルジョンで再度脂質負荷試験を行った。その結果、空腹時の血中トリグリセリド値や、脂質負荷後の血中トリグリセリド値から求めた各パラメーター（C_{max}、T_{max}、$AUC_{0\text{-}8h}$）に対照群と山薬およびジオスゲニン群で有意な差は認められなかった。

以上の結果より、山薬は食餌と同時に摂取することによって脂質の吸収を遅らせ、食後の急激な血中トリグリセリドの上昇を抑制することが示唆された。現在、脂質の吸収に関わる膵リパーゼ阻害活性の検討と、各臓器における *lpl* など脂質代謝に関わる遺伝子の発現変動解析を行っている。

yam, diosgenin, triacylglycerol

講演番号：2A20a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ A 校舎 20 会場

メープルシロップ抽出物が 2 型糖尿病モデルマウス白色脂肪組織の遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響
Effects of maple syrup extract administration on gene expression profiles in white adipose tissue of type 2 diabetic model mice
○原田 尚志[1]、石島 智子[1]、阿部 啓子[1,2]、中井 雄治[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]KAST)
○Takashi Harada[1], Tomoko Ishijima[1], Keiko Abe[1,2], Yuji Nakai[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agri. Life Sci.,Univ. Tokyo, [2]KAST)

サトウカエデの樹液を煮詰めて作られた天然甘味料であるメープルシロップは、ミネラルやビタミンが豊富に含まれている事に加え、クマリンやリグナン等多くのポリフェノールを含有しているといった特徴をもつ。ポリフェノール含有飼料の摂取により骨格筋におけるインスリンシグナルの活性化や、脂肪組織からのアディポネクチン分泌の亢進が引き起こされるといった報告がある事から、ポリフェノールによるインスリン抵抗性改善効果が示唆されており、ポリフェノールを多く含むメープルシロップにおいても同様の効果が期待される。

しかし、メープルシロップ摂取が生体に及ぼす影響についてはほとんど明らかになっていない。当研究室ではこれまでに、メープルシロップのブタノール抽出物(maple syrup extract;MSE)含有飼料を投与した2型糖尿病モデルマウス(KK-A^yマウス)肝臓のDNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、β酸化亢進・脂質合成抑制・インスリンシグナル活性化作用に加え、アディポネクチンレセプターの発現上昇が起こる事を明らかにし、MSE摂取によるインスリン抵抗性改善効果の可能性について報告した(飯田ら、日本農芸化学会2012年度大会)。とくに脂肪組織から分泌されるアディポネクチンは肝臓でのAMPKの活性化を引き起こしインスリン抵抗性改善に寄与する事が知られており、MSE摂取が脂肪組織でのアディポネクチン分泌を亢進させる可能性が示唆された。これらの事から、MSE摂取が脂肪組織に対しても影響を及ぼすことが考えられる。

そこで本研究では、MSE含有飼料を摂取したKK-A^yマウスの精巣上体白色脂肪組織のDNAマイクロアレイ解析により、MSEのインスリン抵抗性改善機構を解明する事を目的とした。5週齢のKK-A^yマウスを各群の体重及び非空腹時血糖値の平均が等しくなるように2群(n=8)に分け、AIN-93G組成のコントロール食及びコントロール食にMSEを0.1%で添加したMSE食をそれぞれ自由摂食・飲水にて42日間の飼育を行っている。飼育期間中の体重変化量・摂餌量を計測し、飼育期間終了後、精巣上体白色脂肪組織を摘出し、DNAマイクロアレイ解析に供する予定である。

本講演では、精巣上体白色脂肪組織における遺伝子発現変動解析の結果を中心とした報告を予定している。

なお本研究は、カナダ農務・農産食品省のカナダ農務・農産食品推進プログラムから財政的援助を受けた、ケベック農業開発評議会の援助により実施した。

DNA microarray, maple syrup, white adipose tissue

講演番号：2A20a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ A 校舎 20 会場

Flavan 3-ols 反復投与は骨格筋のミトコンドリア新生を促す

Repeated administration of flavan 3-ols induced mitochondria biogenesis in skeletal muscle

○渡辺 尚貴、稲川 広大、越阪部 奈緒美（芝浦工大シス理工）
○Naoki WATANABE,Kodai INAGAWA,Naomi OSAKABE (Shibaura Institute of Technology)

目的）高ポリフェノール含有チョコレートの摂取がメタボリックシンドロームのリスクファクターを改善することが、ランダム化比較試験およびその後のメタアナリシスの結果から明らかとなっているが、そのメカニズムについては未だ解明されていない。一方昨年度の本大会で、我々はチョコレートに含まれる flavan 3-ols がエネルギー代謝を修飾する可能性について報告した。そこで今回、そのメカニズムを明らかにするため、flavan 3-ols 反復投与後のエネルギー代謝に及ぼす作用について間接カロリメトリー法を用いて検証すると共に、各臓器のミトコンドリア新生に与える影響を観察した。
方法）８週令雄性 C57BL6/J マウスを 2 群に分け、Control 群には精製水を、flavan 3-ols 群にはカカオ由来の flavan 3-ols 画分を 50mg/kg 14 日間経口投与した。飼育終了時に Tail caff 法にて血圧を測定した。その後、絶食条件下で小動物呼気分析装置 MK-5000-RQ(室町機械社製)を用いて、24 時間の呼気分析を実施し、採血および解剖に供した。各臓器のミトコンドリアコピー数はリアルタイム RT-PCR 法で、脱共役タンパク質（UCPs）およびβ酸化関連酵素群のタンパク質発現を Western blot 法にて解析した。血漿生化学分析は市販のキットを用いて実施した。
結果）飼育終了時の血圧は control 群に比べて、flavan 3-ols 群で有意に低下した。空腹時血漿グルコース濃度も flavan 3-ols 群で有意な低下を認めた。呼気分析から算出した呼吸交換比（RER）は Control 群に比べて、flavan 3-ols 群で断続的に低値を示し、24 時間の平均値では control 群に比べて有意に低下した。一方、エネルギー代謝量および行動量には両群間で差異は認められなかった。各臓器のミトコンドリアコピー数は、flavan 3-ols 投与により腓腹筋で有意な著しい増加が認められ、またひらめ筋および・褐色脂肪組織においても有意な増加が認められたが、肝臓・白色脂肪組織では差は認められなかった。褐色脂肪組織中の UCP-1 発現量は control 群に比べて、flavan 3-ols 群で有意に上昇したが、腓腹筋・ひらめ筋中の UCP-3 の発現量には差異は認められなかった。腓腹筋・ひらめ筋中のβ酸化関連酵素のタンパク質発現量は flavan 3-ols 群で有意に増大していたが、肝臓では差が見られなかった。
結論）以上の結果から、flavan 3-ols の反復投与により、骨格筋のミトコンドリア新生が促され、β酸化系が亢進し、脂質消費が高まることが明らかとなった。これらの作用は、高ポリフェノールチョコレートの摂取によるメタボリックシンドローム予防・改善作用の発現に深く関与することが示唆された。

Flavan 3-ols, mitochondria, lipid metabolism

講演番号：2A20a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ A 校舎 20 会場

Lactobacillus gasseri SBT2055（ガセリ菌 SP 株）が、高トリアシルグリセロール血症を伴う過体重の日本人の食後脂質代謝に及ぼす影響

Effects of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on postprandial lipid metabolism in Japanese overweight subjects with hypertriacylglycerolemia

○小川 哲弘[1,2]、門岡 幸男[2]、加藤 健[2]、中島 肇[2]、城内 文吾[1]、佐藤 匡央[1]（[1]九州大学大学院農学研究院、[2]雪印メグミルク（株）ミルクサイエンス研究所）

○ Akihiro OGAWA[1,2], Yukio KADOOKA[2], Ken KATO[2], Hajime NAKAJIMA[2], Bungo SHIROUCHI[1], Masao SATO[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Milk Science Research Institute, MEGMILK SNOW BRAND Co. Ltd.)

【背景と目的】

Lactobacillus gasseri SBT2055（ガセリ菌 SP 株）はヒト小腸由来のプロバイオティクス菌である。我々はこれまでにガセリ菌 SP 株がラット[1)]およびヒト[2)]において内臓脂肪の蓄積を抑制することを明らかにしてきた。また、ガセリ菌 SP 株はラットにおいて食事脂質吸収を抑制することを確認した[3)]。そこで、ヒトにおけるガセリ菌 SP 株の食後脂質代謝に及ぼす影響について検討した。

【対象と方法】

高トリアシルグリセロール(TAG)血症を伴う過体重の被験者 20 名に 4 週間プラセボ食 200g/日を摂取させ、4 週間の wash out 期間の後、ガセリ菌 SP 株を含む被験食 200g/日を摂取させた。それぞれの試験食摂取後に脂質負荷試験を実施して、負荷食摂取から 1 時間おきに 8 時間血液を採取し、食後の血清 TAG と血清遊離脂肪酸（NEFA）濃度、絶食時におけるその他代謝に関係するパラメータを測定した。

【結果】

負荷食摂取 2 時間後の血清 TAG 濃度が、被験食ではプラセボ食に比べ有意に低い値を示した。また、負荷食摂取 2～8 時間後の血清 NEFA 濃度とその上昇曲線下面積は被験食摂取により有意に低い値を示した。さらに、絶食時の血清 NEFA 濃度も被験食摂取により低値を示した。

【結論】

ガセリ菌 SP 株は食後の血清 TAG や血清 NEFA の濃度を低下させ、食後脂質代謝を改善することが示唆された。

（参考文献）

1) Sato M et al., *Br J Nutr.* **99**, 1013-7 (2008)
2) Kadooka Y et al., *Eur J Clin Nutr.* **64**, 636-43 (2010)
3) Hamad EM., *Br J Nutr.* **101**, 716-24 (2009)

probiotics, postprandial lipid metabolism, obesity

講演番号：2A20a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ A 校舎 20 会場

ターミナリアベリリカ?による食後中性脂肪上昇抑制の検討
Effects of the extract from *Terminalia bellirica* on postprandial triglyceride levels
○長澤 早紀[1]、高野 晃[1]、神谷 智康[1]、池口 主弥[1]、高垣 欣也[1]、岩松 葵[2]、安本 早穂子[2]、奥島 綾夏[3]、宮田 優[2]、田丸 靜香[2]、田中 一成[3] ([1]（株）東洋新薬、[2]長崎県大・栄養健康、[3]長崎県大院・人間健康科学)
○ Saki NAGASAWA[1], Akira TAKANO[1], Tomoyasu KAMIYA[1], Motoya IKEGUCHI[1], Kinya TAKAGAKI[1], Aoi IWAMATSU[2], Sahoko YASUMOTO[2], Ayaka OKUSHIMA[3], Yu MIYATA[2], Shizuka TAMARU[2], Kazunari TANAKA[3] ([1]Toyo Shinyaku, [2]Univ. of Nagasaki, [3]Graduate School of Univ. of Nagasaki)

【目的】
ターミナリアベリリカ（*Terminalia bellirica*）は、インドやスリランカなどの東南アジアに広く生育する広葉樹である。インドの伝承医学「アーユルヴェーダ」では、伝統的に、果実を肝臓保護や下痢止めとして活用されている。また、トリテルペンやポリフェノールを含み、脂質代謝異常改善作用や抗肥満作用などの報告がなされている。
我々は、ターミナリアベリリカ（*Terminalia bellirica*）の抽出物（ターミナリアベリリカ®）を開発し、ヒトにおいて、300 mg/回の有効量で脂肪負荷後の中性脂肪上昇抑制作用を有することを確認している。
本試験は、より低用量での有効性を確認することを目的とした。

【方法】
34 名の健常成人男女（年齢 22.1±2.0 歳）を対象に、二重盲検クロスオーバー法で試験を実施した。被験者には、試験内容を十分に説明した後に文書による試験参加の同意を得た上で、試験に参加させた。
試験前日は統一食を 21 時までに摂取させ、その後試験終了まで、水のみ摂取可とした。試験当日、被験者にターミナリアベリリカ®200 mg（被験食群）、またはプラセボ食品（コントロール群）を、負荷食品摂取直前に 100 ml の水とともに摂取させ、負荷食品摂取前、摂取 2,3,4,6 時間後に血中中性脂肪濃度の測定を行った。なお、負荷食品として、コーンクリームポタージュに脂質を負荷したもの、およびプレーンベーグル（脂質として 41.6 g）を用いた。

【結果】
コントロール群と比較して、被験食群は、摂取 2,4,6 時間後の血中中性脂肪濃度において、有意な低値が認められた(摂取 2 時間後:$p<0.01$, 摂取 4,6 時間後：$p<0.05$)。また、AUC においても、有意な低値が認められた($p<0.05$)。
以上の結果より、ターミナリアベリリカ®は、200 mg/回においても、食後の中性脂肪上昇抑制作用を有することが示唆された。

Postprandial triglyceride levels, Terminalia bellirica

講演番号：2A20p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ A 校舎 20 会場

プロリン異性化酵素 Pin1 阻害剤のハイスループットスクリーニングによる、脂肪細胞分化抑制効果を有する海藻ポリフェノールの同定

A High-Throughput Screen for Inhibitors of the Prolyl Isomerase, Pin1, Identifies a Seaweed Polyphenol that Reduces Adipose Cell Differentiation

○生地 紘子[1]、森 正[1]、吉澤 いぶき[1]、林 宜瑾[1]、豊原 治彦[2]、奥田 徹[3]、内田 千代子[4]、山下 まり[1]、内田 隆史[1]([1]東北大院農、[2]京都大院農、[3]玉川大学術研、[4]福島大)
○Hiroko IKUJI[1], Tadashi Mori[1], Ibuki Yoshizawa[1], Yi-Chin Lin[1], Haruhiko Toyohara[2], Toru Okuda[3], Chiyoko Uchida[4], Mari Yotsu-Yamashita[1], Takafumi Uchida[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Tamagawa Univ., [4]Fukushima Univ.)

Pin1 は様々なタンパク質のリン酸化 Ser/Thr-Pro モチーフに結合してプロリンのペプチド結合の cis/trans 異性化を触媒する peptidyl prolyl cis/trans isomerase (PPIase)である。我々は最近の研究において、Pin1 がマウス繊維芽細胞(MEF)の中性脂肪の摂取量とインスリン刺激による MEF の脂肪細胞への分化を促進することを発見した。この結果は Pin1 のダウンレギュレーションが高血圧や肥満、非アルコール性脂肪性肝炎などの肥満関連疾患の治療への有効なアプローチとなることを示唆した。

我々はまず、Pin1 の阻害剤を発見するためのハイスループットスクリーニング(HTS)系を構築し、天然物ライブラリーを探索した。天然化合物は特徴的な構造を有し、薬剤としては合成化合物よりも大きな可能性を持っている。例えば、今日までに発展してきたガン治療薬の 73%は天然物またはその誘導体である。そのような成功例がある一方で、天然物からの化合物の単離や合成には多くの困難が存在し、近年ではあまり探索源として用いられていなかった。
しかし、現在臨床的に使用されている免疫抑制剤である CyclospolinA や FK506 は天然物を由来とする薬剤である。それらの標的分子はそれぞれ PPIase サブファミリー、cyclophilin と FK506 結合タンパク質(FKBPs)である。この事実は、天然物ライブラリーが新たな PPIase 阻害剤の探索においても優れた供給源となることを示唆している。

しかし、PPIase 阻害剤の HTS 法はいまだ確立されておらず、過去の研究もわずかな阻害剤候補を発見したのみである。この研究では我々は効率的に Pin1 阻害剤を分析する HTS 法を確立することから開始し、直接的で信頼性のある、リアルタイム蛍光モニタリングシステムを用いたアッセイ系を構築した。そして、HTS 法を天然物ライブラリーのスクリーニングに応用し、海藻である *E.Kurome* より Pin1 の酵素活性を阻害する化合物 974-B を発見した。さらに、インスリン等を含む培地を使用した脂肪細胞分化誘導実験とオイルレッド O 染色による解析で、974-B は脂肪前駆体細胞 NIH3T3-L1 の脂肪細胞への分化を抑制することを明らかにした。974-B は哺乳類細胞への毒性も少なく、肥満関連疾患の治療に有効な薬剤リード化合物となることが期待される。
【2007 年　農芸化学研究企画賞】

Pin1, adipocyte, drug

講演番号：2A20p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ A 校舎 20 会場

緑藻由来シフォナキサンチンの脂肪細胞分化抑制作用
Inhibition effect of siphonaxanthin from green algae on adipocyte differentiation
○李 卓思[1]、藤田 絵里子[1]、大久保 剛[2]、橋爪 論[2]、菅原 達也[1]、平田 孝[1]([1]京大院農、[2]日油(株))
○Zhuosi Li[1], eiriko fujita[1], takeshi ookubo[2], ronn hashizume[2], tatsuya sugawara[1], takashi hirata[1]
([1]kyouto Univ, [2]NOF CORPORATION.)

【目的】海洋生物には特有のカロテノイドが存在し、様々な生理活性作用が注目されている。例えばワカメなどの褐藻に含まれているフコキサンチンはアポトーシス誘導作用、血管新生抑制作用、抗肥満作用などを有することが報告されており、機能性食品素材として期待されている。一方、我々はクビレズタやミルなどの深所性緑藻に特有のシフォナキサンチンがフコキサンチンと同等以上の強い生理活性を有することを見い出した。本研究では、シフォナキサンチンの新規機能性として抗肥満作用に着目し、前駆脂肪細胞である 3T3-L1 細胞を用いてシフォナキサンチンが脂肪細胞の分化や成熟に与える影響を評価した。
【方法】乾燥したミル（*Codium fragile*）を粉砕し、アセトンを加え、4℃で一晩静置した。得られた抽出物をシリカゲルクロマドグラフィー およびHPLCに供し、シフォナキサンチンを精製した。マウス由来 3T3-L1 細胞を脂肪細胞に分化誘導した時のシフォナキサンチンの影響を調べた。脂肪細胞分化に関連する遺伝子発現の経時的な変化は、リアルタイムRT-PCR法によって評価した。細胞内脂肪滴はOil-red O染色を用いて定量した。また、分化した脂肪細胞の脂質代謝に与えるシフォナキサンチンの影響についても検討した。脂肪細胞に分化させた 3T3-L1 細胞にシフォナキサンチンを添加し、細胞内脂肪滴に与える影響を調べた。また、リアルタイムRT-PCR法を用いて脂質合成と分解に関連する遺伝子発現レベルを評価した。
【結論】3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化過程では、5μM シフォナキサンチン添加により、細胞内脂肪蓄積量が有意に低下した。脂肪細胞分化マーカーである C/EBPα、PPARγ-2、SCD-1 及び aP2 の mRNA 発現レベルは脂肪細胞分化の進展とともに増加し、シフォナキサンチン添加により有意に低下した。以上の結果から、シフォナキサンチンは前駆脂肪細胞の分化を抑制することが示された。さらに、分化した脂肪細胞でもシフォナキサンチンの添加により細胞内脂質蓄積量が減少した。また、脂質代謝に関する遺伝子 LPL、FAS、ACC の mRNA 発現も有意に低下したことから、シフォナキサンチンは成熟脂肪細胞の脂質代謝を促進する可能性も示された。

siphonaxanthin, adipocyte, inhibition

講演番号：2A20p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ A 校舎 20 会場

ラクトフェリンのヒト脂肪由来幹細胞に対する脂肪細胞分化抑制作用

The anti-adipogenic action of lactoferrin against human adipose-derived stem cell

○江島 晃佳[1]、岸田 綱郎[1]、小野 知二[2,3]、村越 倫明[1,2]、西野 輔翼[1,4]、松田 修[1] ([1]京都府立医科大学、[2]ライオン株式会社、[3]横浜市立大学、[4]立命館大学)
○Akika Ejima[1], Tsunao Kishida[1], Tomoji Ono[2,3], Michiaki Murakoshi[1,2], Hoyoku Nishino[1,4], Osam Mazda[1] ([1]Kyoto Prefectural Univ., [2]Lion Corporation, [3]Yokohama City Univ., [4]Ritsumeikan Univ.)

ラクトフェリンは、トランスフェリンファミリーに属する分子量約 80 kDa の鉄結合性糖タンパクであり、哺乳動物の乳汁、涙液、唾液、好中球に含まれる。その多彩な機能の一つとして、脂質代謝改善作用が示されている。我々は、ラクトフェリン腸溶錠を BMI が 25 以上のヒトに服用させる（ラクトフェリンとして 1 日 300 mg、8 週間投与）と、体重と内臓脂肪量が有意に減少することを示した（Ono T, et al., Br J Nutr.104:1688, 2010）。我々はまた、ラクトフェリンがラットの脂肪前駆細胞に作用して脂肪の蓄積を抑制すること、その作用がペプシンによるラクトフェリンの分解で消失すること、さらに脂肪蓄積抑制作用は C/EBPα、C/EBPδ と PPARγの発現を抑制することに起因することを報告した（Ono T, et al., Br J Nutr. 105: 200, 2011）。

本研究では、ヒト脂肪由来幹細胞（ADSC）を用いて、ラクトフェリンの脂肪分化に対する作用とそのメカニズムを検討した。脂肪分化誘導培地にラクトフェリンを 300、500、1,000 μg/mL の濃度で添加し、この培地中で ADSC を 14 日間培養した。Oil Red O 染色により脂肪滴の蓄積を評価したところ、ラクトフェリンの濃度依存的に脂肪滴の蓄積抑制作用が認められた。また、成熟脂肪細胞のマーカータンパク質である FABP4 の mRNA レベルをリアルタイム RT-PCR で評価したところ、500 および 1,000 μg/mL のラクトフェリンを添加した細胞において有意な減少が認められた。次に、ADSC を 1,000 μg/mL のラクトフェリンを含む DMEM/10% FBS で 5 日間培養した後、総 RNA を抽出し、Affymetrix 社製のマイクロアレイを用いて遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、脂肪分化の主要な制御因子である PPARγの発現がラクトフェリンによって抑制されることが明らかとなった。また、C/EBPα、KLF15 など PPARγのプロモーター制御に関与している転写因子の減弱が認められた。これらの結果より、ラクトフェリンが PPARγのプロモーター制御因子の発現に影響を与え、ヒト脂肪由来幹細胞の脂肪細胞への分化を抑制していることが示唆された。また、ラクトフェリンが脂肪酸の β 酸化をつかさどる acyl-CoA synthetase long-chain（ACSL）群の遺伝子発現を調節していることが示唆された。

本研究の結果、ラクトフェリンがヒト脂肪由来幹細胞に作用して脂肪細胞への分化を抑制することが明らかとなった。さらに、ラクトフェリンが脂肪前駆細胞のみならず、肝細胞や筋細胞などにおいても脂肪の取り込みやエネルギー代謝を調節している可能性が考えられ、このことはラクトフェリンの全身的な代謝の制御メカニズムとして興味深い。

Lactoferrin, Adipocyte, Metabolic syndrome

講演番号：2A20p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ A 校舎 20 会場

ブルーベリー葉抽出物が脂肪細胞の機能に及ぼす影響

Effect of blueberry leaf extract on the adipocyte function.

○松山 勇介[1]、甲斐 孝憲[2]、亀長 浩蔵[2]、竹下 正彦[3]、菊地 幸治[3]、松浦 靖[4]、柚木崎 千鶴子[4]、西山 和夫[1]、山崎 正夫[1]([1]宮崎大農応生、[2]（株）なな葉コーポレーション、[3]南日本酪農共同（株）、[4]宮崎県食品開発センター)
○Yusuke Matsuyama[1], Takanori Kai[2], Kouzou Kamenaga[2], Masahiko Takeshita[3], Kouji Kikuchi[3], Yasushi Matsuura[4], Chizuko Yukizaki[4], Kazuo Nishiyama[1], Masao Yamasaki[1] ([1]Miyazaki Univ., [2]Nanaha Corporation., [3]Minami Nippon Dairy Co-op Co., [4]Miyazaki Prefecture Foods Development Center.)

【目的】エネルギーの過剰摂取、運動不足によるエネルギー消費の減少を原因とした肥満を伴う高血圧、高脂血症、糖尿病といった生活習慣病の増加が問題となっており、食品成分によるその予防、改善作用が期待されている。ブルーベリー葉は宮崎県における JST 地域結集型共同研究事業の成果として脂肪肝抑制、血圧降下作用が報告され、抗生活習慣病作用を有する新規な機能性食材として期待されている。脂肪細胞は生理状況に応じて種々のアディポサイトカインを産生・分泌し、糖・脂質代謝や血管機能の恒常性維持に重要な役割を果たしている。肥大化した脂肪細胞においてはアディポサイトカイン産生のインバランスを惹起することで生活習慣病を誘発することが明らかとなりつつある。本研究ではマウス由来前駆脂肪細胞株 3T3-L1 を用いて、ブルーベリー葉抽出物が脂肪蓄積、アディポサイトカインの産生・分泌へ与える影響について検討した。
【方法】マウス由来前駆脂肪細胞株 3T3-L1 をコンフルエントの状態にし、イソブチルメチルキサンチン、デキサメタゾン、インスリンを含む分化培地にて 48 時間培養後、インスリンを含む成熟培地にて 48 時間ごとに培地交換し、脂肪細胞を分化・成熟させた。成熟 6 日目に宮崎県産ラビットアイブルーベリー葉抽出物を 0-100 μg/ml で 24 時間処理し、トリパンブルー色素排除法にて細胞毒性を確認した。さらに Western Blotting にて単量体アディポネクチンおよび多量体アディポネクチンの産生・分泌への影響、ELISA にて Monocyte Chemoattractant Protein-1(MCP-1)の分泌への影響を検討した。
【結果】ブルーベリー葉抽出物 0-100 μg/ml 処理において細胞毒性は認められなかった。また、MCP-1 の分泌には影響しなかった。しかし、SDS-PAGE による Western blotting の結果、ブルーベリー葉抽出物 6.25 μg/ml 処理において単量体アディポネクチンの産生・分泌を有意に増加させたが 100 μg/ml 処理においては影響しなかった。さらに Native PAGE の結果、6.25 μg/ml の濃度において多量体アディポネクチンを増加させた。以上よりブルーベリー葉抽出物はアディポネクチンの産生・分泌を増加させることで生活習慣病予防・改善作用を持つことが示唆された。

Blueberry leaf extract, Adipocyte, Adiponectin

講演番号：2A20p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ A 校舎 20 会場

α-リポ酸によるアンジオポエチン様タンパク質 2 の産生抑制作用
Inhibition of angiopoietin-like protein 2 production by α-lipoic acid.
○久米田 翔子、山崎 正夫、西山 和夫（宮崎大院農）
○SHOKO KUMEDA,MASAO YAMASAKI,KAZUO NISHIYAMA (Miyazaki Univ.)

【目的】糖尿病、動脈硬化性疾患、がんの発症・浸潤・転移など様々な病態に共通して起きている「慢性炎症」と呼ばれる状態が近年注目を集めている。特に糖尿病や動脈硬化性疾患の発症には肥満を背景とした脂肪組織の慢性炎症が関与している。肥満によるアディポカインの産生バランスの破綻により脂肪組織内に活性型マクロファージが浸潤し、活性型マクロファージは脂肪細胞由来のインスリン抵抗性を誘発するアディポカインの産生を亢進させる。アンジオポエチン様タンパク質 2(Angptl2)は近年発見されたアディポカインの一種であり、肥満マウスでは脂肪組織における発現量と血中濃度が上昇していること、Angptl2 を高発現させたマウスでは脂肪組織で炎症が誘導されること、さらに培養細胞株 3T3-L1 細胞においては分化・成熟に伴い発現が上昇することが報告されており、脂肪組織に慢性炎症を誘導する重要な分子として注目されている。本研究では脂肪組織での Angptl2 の産生・放出抑制を介した慢性炎症の改善を目的とし、抗炎症作用を有するα-リポ酸(LA)が脂肪細胞の Angptl2 産生・放出に及ぼす影響について検討した。
【方法】マウス由来前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞をコンフルエントの状態にし、イソブチルメチルキサンチン、デキサメタゾン、インスリンを含む分化培地にて 48 時間培養後、インスリンを含む成熟培地にて 48 時間ごとに培地交換し、脂肪細胞を分化・成熟させた。成熟過程で LA を 0～0.1 mM の各濃度で処理し、成熟 8 日目に細胞内トリグリセリド蓄積量を Oil Red O 染色により測定した。また、Angptl2 のタンパク質発現レベルを Western Blot により測定した。
【結果】細胞毒性のない LA 濃度において、細胞内のトリグリセリド蓄積量に有意な差はなかった。一方で細胞内に蓄積した油滴は LA 処理によって小型化する傾向が認められた。細胞培養上清中の Angptl2 のタンパク質発現レベルは LA 処理により有意な差はなかったが、細胞中の Angptl2 のタンパク質レベルでの発現は 0.1 mM の LA 処理により減少した。これらのことから、LA は脂肪細胞の肥大化を抑制することで Angptl2 産生を減少させる可能性が示唆された。

α-lipoic acid, angiopoietin-like protein 2, chronic inflammation

講演番号：2A20p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ A 校舎 20 会場

培養骨格筋細胞の脂肪酸酸化を促進する食品成分の探索

A search for effective food components that stimulate fatty acid oxidation in skeletal muscle cells

○阿部 大吾、齋藤 武、野方 洋一（農研機構・近中四農研）
○Daigo ABE,Takeshi Saito,Yoichi Nogata (NARO WARC)

【目的】

近年、食生活の欧米化に伴い、生活習慣病やメタボリックシンドロームが社会問題となっている。これらの病態には肥満が深く関わっており、摂取エネルギー過多が主要因として挙げられる。骨格筋は人体最大の組織であり、エネルギー(脂質)代謝において重要な役割を果たしている。骨格筋は運動などにより脂質代謝を促進することが知られているが、食品成分により同様の作用を亢進できれば、生活習慣病やメタボリックシンドロームの予防・改善に役立つと考えられる。そこで本研究では、骨格筋において脂質代謝を促進する食品成分を見出すことを目的とする。

【方法及び結果】

マウス筋芽細胞 C2C12 を 2%ウマ血清で培養することにより筋管細胞へと分化させ、脂肪酸酸化試験に用いることとした。分化した筋管細胞は、無血清培地で数時間培養した後、試験化合物、[^{3}H]-パルミチン酸を加え、24 時間培養した。培養上清にトリクロロ酢酸を加え遠心することで、タンパク及び脂肪酸を除去するとともに、活性炭・ガラス繊維フィルターで濾過した。得られた $^{3}H_2O$ を含む水を中和し、液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定することで脂肪酸酸化活性とした。ポジティブコントロールには PPARδのアゴニストである GW501516 を用い、対照区を 100%として評価を行った。

食品成分 250 種類を 50μM で試験したところ、数種類の化合物に C2C12 筋管細胞の脂肪酸β酸化を促進する作用を見出した。これら化合物はデルフィニジンやロスマリン酸などのポリフェノールであった。デルフィニジン、ロスマリン酸ともに濃度依存的な脂肪酸酸化の促進が確認された。現在、作用機構に関する検討を実施している。

fatty acid oxidation, muscle, polyphenol

講演番号：2A20p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ A 校舎 20 会場

ニガハッカ（*Marrubium vulgare* L.）からの PPARγアゴニスト活性物質の探索
Search for PPARγagonist from *Marrubium vulgare* L.

○大寺 杏奈[1]、宮前 友策[1]、仲井 奈緒美[1]、荒川 武明[2]、平澤 明[2]、河内 敦[3]、川田 清和[3]、HAN Junkyu[3]、礒田 博子[3]、MOHAMED Neffati[4]、前嶋 一宏[5]、秋田 徹[5]、森 直樹[6]、入江 一浩[6]、神戸 大朋[1]、増田 誠司[1]、永尾 雅哉[1]（[1]京大院・生命、[2]京大院・薬、[3]筑波大・生命環境、[4]IRA、[5]日本新薬、[6]京大院・農）
○ Anna OHTERA[1], Yusaku MIYAMAE[1], Naomi NAKAI[1], Takeaki ARAKAWA[2], Akira HIRASAWA[2], Atsushi KAWACHI[3], Kiyokazu KAWADA[3], Junkyu HAN[3], Hiroko ISODA[3], Neffati MOHAMED[4], Kazuhiro MAESHIMA[5], Toru AKITA[5], Naoki MORI[6], Kazuhiro IRIE[6], Taiho KAMBE[1], Seiji MASUDA[1], Masaya NAGAO[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ., [3]University of Tsukuba, [4]IRA, [5]Nippon shinyaku, [6]Kyoto Univ.)

【目的】植物抽出物から肝線維化抑制物質を同定する目的で、肝星細胞株における脂肪蓄積促進活性を指標に様々な植物抽出物を探索したところ、地中海沿岸に生育する植物ニガハッカ（*Marrubium vulgare* L.）の抽出物が脂肪蓄積促進活性を示すことがわかった。肝線維化抑制には PPARγ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ）が関わることが知られている。そこで本研究では、ニガハッカに PPARγアゴニスト活性物質が含まれることを確認し、その単離精製を目的とした。
【方法】PPARγアゴニスト活性について、GAL4 の DNA 結合ドメインと PPARγリガンド結合ドメインのキメラ分子、およびその標的配列を上流に持つルシフェラーゼレポーターを発現するプラスミドを肝癌細胞 HepG2 に導入して、一過的に発現させるレポーターアッセイ系を用いて検討した。本アッセイ系を指標に、ニガハッカのメタノール抽出物より、各種クロマトグラフィーを用いて PPARγアゴニスト活性物質の単離精製を行った。
【結果・考察】レポーターアッセイ系により、ニガハッカのメタノール抽出物に PPARγアゴニスト活性を確認した。次に抽出物を酢酸エチル、ブタノール、および水を用いて分配した結果、酢酸エチル層に活性が確認された。酢酸エチル層をシリカゲルクロマトグラフィーにより分画したところ、複数の画分で PPARγアゴニスト活性が観察されたが、そのうちの 1 つの画分について各種クロマトグラフィーを用いて精製を進め、^{1}H および ^{13}C NMR 解析を行った結果、脂肪酸を主成分として含む画分に活性が見られた。そこで、この画分をメチルエステル化した後、GC-MS により分析した結果、4 種の脂肪酸 (**1-4**)を同定できた。既に脂肪酸 **1-3** は PPARγアゴニスト活性が知られていたが、三重結合を有する珍しい脂肪酸である脂肪酸 **4** (6-octadecynoic acid, 6-ODA) については報告がなかった。そこで、6-ODA を合成し、単体での活性試験を行ったところ、脂肪酸 **1-3** と同程度の PPARγアゴニスト活性が確認出来た。また 6-ODA と三重結合の位置が異なる 9-octadecynoic acid (9-ODA) についても同様の PPARγアゴニスト活性が認められた。一方、6-ODA と 9-ODA について、中・長鎖脂肪酸の受容体で、糖尿病、脂質代謝で注目される GPR40 に対するアゴニスト活性を調べたところ、6-ODA のみで活性が認められた。

本研究は、JST/JICA の地球規模課題対応国際科学研究協力事業の支援を受けて行われた。

PPARγ, GPR40, 6-octadecynoic acid

講演番号：2A20p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ A 校舎 20 会場

クルクミン代謝物がヒト肝癌細胞 HepG2 に与える影響の評価

Effects of curcumin metabolite on HepG2 cells

○庄司 求[1]、仲川 清隆[1]、渡辺 章夫[1,2]、都築 毅[1]、宮澤 陽夫[1] ([1]東北大院農、[2]日本食品分析センター)
○MOTOMU SHOJI[1], KIYOTAKA NAKAGAWA[1], AKIO WATANABE[1,2], TSUYOSHI TSUDUKI[1], TERUO MIYAZAWA[1] ([1]Tohoku Univ. Grad. Sch. Agr. Sci., [2]Japan Food Res. Lab.)

【目的】カレー粉の黄色色素であるターメリック(*Curcuma longa* L)に含まれるクルクミンは、細胞や動物実験により抗酸化、抗炎症、抗腫瘍などの生理作用を有することが知られている。また本研究室では以前、クルクミンを摂取したラットの肝臓でアシル CoA オキシダーゼの発現が有意に増加し、ペルオキシソームにおける脂肪酸のβ酸化を促進することで抗脂肪肝作用を示すことを報告している[1)]。一方、ヒトや実験動物に摂取されたクルクミンは大部分が消化管において抱合体へと変換されるので、血漿や臓器に遊離型クルクミンはほとんど存在しないことが知られる[2)]。そのため上記の生理作用はクルクミン自体ではなく抱合体に由来しているのではないかとも言われているが、結論は得られていない。本研究では、クルクミンの最も主要な抱合体として知られるクルクミングルクロン酸抱合体を、ラット肝臓を酵素源としてクルクミンから調製・単離し、この生理作用をヒト肝癌細胞 HepG2 を用いた培養細胞実験で明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】ラット肝臓を酵素源としてクルクミンと UDP-グルクロン酸からクルクミングルクロン酸抱合体の高純度品を調製した。生理作用の評価では、はじめにクルクミン（10-50 μM）を HepG2 細胞に処理したところ、過去に報告されているように HepG2 の増殖抑制が確認された。次いで、クルクミングルクロン酸抱合体（10-25 μM）を HepG2 に処理したところ、本実験条件下では細胞増殖に影響しなかった。DNA マイクロアレイ（酸化ストレス・アンチエイジングチップ ジェノパール(R)：三菱レイヨン社製）解析においては、クルクミン処理細胞、クルクミングルクロン酸抱合体処理細胞において、脂肪酸合成酵素である FASN の有意な発現低下が認められた。また、クルクミングルクロン酸抱合体処理細胞でのみ､炎症を促進する NFKB1 と IL-1B の有意な発現低下が認められた｡したがって、クルクミングルクロン酸抱合体は、クルクミン自体が示す HepG2 増殖抑制活性を失いつつも、抗脂肪肝作用や抗炎症作用を有しており、クルクミンは生体内ではクルクミングルクロン酸抱合体として生理活性を発揮していると考えられた。

1) Asai A, Miyazawa T, Dietary curcuminoids prevent high-fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and epididymal adipose tissue, *J. Nutr.*, **131**, 2932-2935 (2001)
2) Asai A, Miyazawa T, Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma, *Life Sci.*, **67**, 2785-2793 (2000)

curcumin, conjugation, HepG2

講演番号：2A20p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ A 校舎 20 会場

胆汁酸受容体 TGR5/FXR デュアルモジュレイターとしてのトリテルペノイド化合物の構造活性相関解析

Structure-activity relationships of triterpenoids as TGR5/FXR dual modulator

○佐藤 寛之[1,2]、井口 裕介[3]、宇根 瑞穂[3]、松田 久司[4] ([1]生理研・発達生理、[2]愛媛大・総合科学研究支援センター、[3]広島国際大・薬、[4]京都薬科大・薬)
○Hiroyuki SATO[1,2], Yusuke Iguchi[3], Mizuho Une[3], Hisashi Matsuda[4] ([1]National Institute for Physiological Sciences, [2]Ehime Univ., [3]Hiroshima International Univ., [4]Kyoto Pharmaceutical Univ.)

胆汁酸をリガンドとする G タンパク共役型の受容体(GPCR)である TGR5 はヒト筋肉・げっ歯類褐色脂肪組織(BAT)、小腸内分泌細胞、免疫細胞などに発現し、それぞれエネルギー消費亢進作用、インスリン分泌促進ホルモンである GLP-1 の分泌促進作用、抗炎症作用などを示し、生理的には食後のエネルギー代謝調節のシグナル分子となっているものと考えられている。また生体における TGR5 の活性化は動物モデルで、肥満や糖尿病、あるいはそれらが重複した状態であるメタボリックシンドロームなどの生活習慣病に対して予防的な作用を示すことが示されていることから、それらの治療薬開発のターゲットとしても注目されている。

FXR は核内受容体型転写因子の 1 種であり、同じく胆汁酸をリガンドとし、腸肝循環系での胆汁酸合成、胆汁酸輸送などを調節しており、そのアンタゴニストは肝臓でのコレステロールから胆汁酸の合成を促進することから脂質代謝異常を改善する可能性が考えられている。

われわれはこれまで、新規高親和性 TGR5 アゴニストとしてオリーブ葉抽出物から分離同定された天然トリテルペノイド化合物、オレアノール酸について、その修飾体などを中心に類似構造化合物 34 種の in vitro における TGR5 活性化能を解析し、構造活性相関解析を行うとともに高親和性化合物のさらなる探索を行った。その結果、ベツリン酸、ウルソール酸などのいくつかの化合物が、オレアノール酸と同等以上の活性化能をもつことを見出した。TGR5 活性化能を示した化合物について、FXR の活性化能、活性阻害能を調べたところ、いずれの化合物でも活性化能は見られなかったが、いくつかの化合物はリガンド依存的 FXR 活性化の阻害作用を示すことを見出した。

これらの結果より、TGR5 の活性化並びに FXR の活性抑制作用を同時に示すある種のトリテルペノイドが、メタボリックシンドロームなどの代謝性疾患発症に対して、多角的な作用を発揮し、予防的な効果を発揮しうることが期待され、現在、TGR5/FXR デュアルモジュレイターコンセプトの下、いくつかの化合物に関して in vivo での作用解析を行っている。

Triterpenoid, Bile acid receptor, Metabolic syndrome

講演番号：2A20p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ A 校舎 20 会場

Oxygenated fatty acids produced by *Lactobacillus plantarum* decrease LXRα-induced SREBP-1c expression resulting in cellular triacylglycerol reduction in HepG2 cells

○THARNATH NANTHIRUDJANAR[1], YOUNG-IL KIM[2], TSUYOSHI GOTO[2], NOBUYUKI TAKAHASHI[2], TERUO KAWADA[2], SI-BUM PARK[3], SHIGENOBU KISHINO[3], JUN OGAWA[3], TATSUYA SUGAWARA[1], TAKASHI HIRATA[1] ([1]Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [3]Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

Background: Hyperlipidemia is a main risk factor of atherosclerosis. Since liver cells function in either lipid synthesis or β-oxidation, dysfunction of liver leads to cardiovascular disease (CVD) including atherosclerosis. Liver X receptor α (LXRα) and sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) have been known in their crucial roles in lipid metabolism, therefore they have lately attracted considerable attention as therapeutic targets of CVD. Recently, new oxo- and hydroxy-octadecenoic and octadecadienoic acids (ODAs and ODDAs) were discovered by fermentation of *Lactobacillus plantarum* from unsaturated fatty acids like linoleic acid (LA). However, the effect of these oxygenated fatty acids on lipid metabolism is still obscure. Hence, we aimed to clarify the ameliorating effect of these fatty acids on lipogenesis in liver cells comparing with LA and eicosapentaenoic acid (EPA)

Methods: We first screened the effect of the oxygenated fatty acids on triacylglycerol (TG) accumulation and SREBP-1c expression in synthetic LXRα agonist (T0901317)-treated HepG2 cells. To further elucidate the mechanism, the activation of LXRα and the expression of lipogenic-related genes were studied by using luciferase reporter assay and RT-PCR, respectively.

Results: The results showed that 10-hydroxy-12*Z*-18:1 (HYA), 6*Z*-10-hydroxy-12*Z*-18:2 (γHYA), 10-keto-12*Z*-18:1 (KetoA), and 6*Z*-10-keto-12*Z*-18:2 (γKetoA) can significantly decrease mRNA expression of SREBP-1c induced by T0901317. We found that all of them down-regulated the luciferase activity of LXRα and the mRNA expression of lipogenic genes. Interestingly, HYA, γHYA, KetoA, and γKetoA inhibited SREBP-1c maturation more than LA and EPA. Additionally, HYA and KetoA also significantly suppressed the expression of ACC2, which is a major player in β-oxidation and lipid accumulation, more than LA and EPA. Corresponding with aforementioned results, HYA, KetoA, and γKetoA significantly reduced TG synthesis of HepG2 cells more than LA and EPA.

Conclusion: Our findings suggest that these four sorts of oxo- and hydroxy-ODAs and ODDAs might be applied to utilize in CVD or atherosclerosis therapy due to their effective hypolipidemic effect, which can be attributed to a decrease of not only SREBP-1c maturation, but also ACC2 expression.

oxygenated fatty acids, *Lactobacillus plantarum*, SREBP-1c

講演番号：2A20p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ A 校舎 20 会場

3T3-L1 細胞における脂肪蓄積に伴う脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸組成の変化

The changes in fatty acid composition of phospholipids monolayer during LD formation in 3T3-L1 adipocytes

○有澤 琴子、市 育代、藤原 葉子（お茶大院・ライフ）
○KOTOKO ARISAWA,IKUYO ICHI,YOKO FUJIWARA (Ochanomizu Univ.)

【目的】

生体膜を構成するリン脂質には、飽和脂肪酸から不飽和脂肪酸まで様々な脂肪酸が結合している。この脂肪酸の多様性は膜の流動性や膜タンパク質の機能などに関与することが示唆されており、これらは細胞の機能維持に重要であると考えられている。

白色脂肪細胞は分化に伴い脂肪滴が肥大化し、細胞の形態・性質共に大きく変わることから、細胞を構成する膜リン脂質も変化する可能性がある。また、脂肪滴膜は他の生体膜とは異なりリン脂質の一重膜で構成され、二重膜とは異なる脂肪酸組成を持つことが考えられる。そこで、本研究では分化に伴う脂肪細胞のリン脂質の脂肪酸の変化と、脂肪滴における膜リン脂質の脂肪酸組成について検討した。

【方法】

マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 を insulin, dexamethasone, 3-isobutyl-1-methyl xanthine を用いて分化誘導して脂肪を蓄積させ、2 日ごとに 10 日目まで回収した。これらを脂質抽出した後、薄層クロマトグラフィーを用いて各リン脂質に分画し、結合している脂肪酸を GC−MS で測定した。測定したリン脂質は、脂肪滴膜の主なグリセロリン脂質であるホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)である。

脂肪滴は細胞回収後、ショ糖濃度勾配による超遠心で他のオルガネラ(細胞膜, 小胞体, ゴルジ体)と分画した。この脂肪滴画分を脂質抽出し、上述の方法で各リン脂質の脂肪酸を測定した。

【結果】

１．脂肪細胞の分化に伴う細胞全体のリン脂質脂肪酸組成の変化

PC、PE で分化に伴い、飽和脂肪酸である C18:0 の減少と、一価不飽和脂肪酸の顕著な増加が確認された。また、n-3 系多価不飽和脂肪酸(PUFA)は増加し、n-6 系 PUFA は減少していた。

２．脂肪滴の肥大に伴う一重膜リン脂質の脂肪酸の変化

脂肪滴膜の PC, PE では分化に伴い飽和脂肪酸の割合は減少し、一価不飽和脂肪酸は増加した。n-3 系、n-6 系 PUFA については脂肪滴膜の PC は分化に伴う変化が見られなかったが、PE では共に増加していた。

以上の結果より、脂肪の蓄積に伴う脂肪細胞の二重膜と脂肪滴一重膜のリン脂質を比較すると、飽和脂肪酸と一価不飽和脂肪酸の変化に違いはみられなかった。しかし、PUFA については一重膜と二重膜で異なる傾向がみられることが分かった。

Phospholipid, Lipid droplet, Adypocite

講演番号：2A20p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ A 校舎 20 会場

必須脂肪酸欠乏時に産生される脂肪酸の産生経路とリン脂質における分布

Pathway for the synthesis and distribution in phospholipid species of the fatty acid produced by essential fatty acid deficiency

○市 育代、芳賀 静香、有澤 琴子、山野 美怜、藤原 葉子（お茶大院・ライフ）
○ Ikuyo ICHI, Shizuka HAGA, Kotoko ARISAWA, Misato YAMANO, Yoko FUJIWARA (Ochanomizu Univ.)

【目的】必須脂肪酸欠乏時には、n-6 系と n-3 系多価不飽和脂肪酸（PUFA）の減少と n-9 系 PUFA であるミード酸(C20:3n-9)の増加がみられる。必須脂肪酸欠乏時のミード酸はオレイン酸（C18:1n-9）から産生され、それらの産生酵素は n-6 系 PUFA のリノール酸(C18:2)からアラキドン酸(C20:4)、n-3PUFA のα-リノレン酸（C18:3）から EPA（C20:5）が産生されるのと同様であると考えられている。しかし、その産生遺伝子や経路の詳細は明らかになっていない。そこで、必須脂肪酸欠乏状態にある培養細胞に siRNA による遺伝子発現抑制を行い、必須脂肪酸欠乏時のミード酸の産生遺伝子の同定とその経路について検討した。また、PUFA が生体膜のリン脂質に存在していることから、必須脂肪酸欠乏時の各リン脂質におけるミード酸の分布について調べた。
【方法】ミード酸の産生遺伝子の同定には NIH3T3 細胞を用いて、脂肪酸伸長酵素（Elovl1-7）および不飽和化酵素（Fads1-3）のリポフェクタミンによる RNAi を行い、ミード酸の減少がみられる遺伝子を調べた。さらに、これらの遺伝子の発現抑制下において、オレイン酸からミード酸にいたる中間物質（18:2n-9, 20:1n-9, 20:2n-9）を測定し、産生経路の同定を行った。各リン脂質中の脂肪酸は、脂質抽出後、TLC にて各リン脂質を分画し、メチルエステル化を行い、GC-MS を用いて分析を行った。
【結果】ミード酸の産生遺伝子は、Elovl5、Fads1、Fads2 であることが分かった。そこで、これらの siRNA による遺伝子発現抑制を行い、オレイン酸からミード酸の産生経路を検討した結果、以下の 2 つの経路でミード酸が産生されることが分かった。

経路 1：18:1n-9→(Fads2)→18:2n-9→(Elovl5)→20:2n-9→(Fads1)→20:3n-9
経路 2：18:1n-9 →(Elovl5)→20:1n-9→(Fads2)→20:2n-9→(Fads1)→20:3n-9

次に必須脂肪酸欠乏時のミード酸がどのリン脂質に多く存在しているか調べた。その結果、ミード酸はホスファチジルイノシトール（PI）に非常に多く分布していることが分かった。PI は脂肪酸部分に特徴的な構造を持つことが知られており、その多くが *sn*-1 位にステアリン酸、*sn*-2 位にアラキドン酸を有している。今回、通常ではアラキドン酸を多く有する PI が、必須脂肪酸欠乏時にはミード酸を多く有するということが明らかとなった。この 2 つの脂肪酸は共にカルボキシル基側から 5 番目に二重結合をもつΔ5 系列の脂肪酸であることから、PI は sn-2 にΔ5 の脂肪酸を好み、必須脂肪酸欠乏時のミード酸は、PI においてアラキドン酸の代用をしていることが示唆された。

fatty acid, phospholipid, polyunsaturated fatty acid

講演番号：2A20p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ A 校舎 20 会場

トランス脂肪酸が遺伝子発現制御に及ぼす影響
Effects of *trans*-fatty acid on the gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*
○高畠 暁子[1]、中村 豊一[1]、VO Nguyet Thi Anh[1]、有井 康博[2]、井澤 真吾[1] ([1]京都工繊大・応生、[2]武庫女大・生活環境)
○Akiko TAKABATAKE[1], Toyokazu NAKAMURA[1], Nguyet Thi Anh VO[1], Yasuhiro ARII[2], Shingo IZAWA[1] ([1]Div. Appl. Biol., Kyoto Inst. Technol., [2]School of Human Env. Sci., Mukogawa Women's Univ.)

不飽和脂肪酸は置換基の配置によりシス型とトランス型に分類される。天然の植物油に含まれているのはシス脂肪酸だが、高温下での精製・脱臭処理や硬化処理などによってトランス脂肪酸が生成する。トランス脂肪酸の過剰摂取は、LDLコレステロールレベルの上昇とHDLコレステロールレベルの低下を引き起こし、冠状動脈性心臓病などのリスクを増大させる危険性が報告されている。そのため、各国でその使用を規制する動きが見られるが、分子レベルや細胞レベルでのトランス脂肪酸の作用機構はいまだによくわかっていない。

出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*は、脂肪酸を単一の炭素源として生育することが可能なため、トランス脂肪酸が真核細胞に与える影響を分子・細胞レベルで解析する上で優れたモデル生物である。本研究では、オレイン酸 (18:1 *cis*-9)とエライジン酸 (18:1 *trans*-9)をそれぞれ炭素源とする培地で酵母細胞を培養し、両者の違いを検討した。DNAマイクロアレイ解析により、エライジン酸での培養によって複数の遺伝子の転写レベルが有意に上昇することを見出した。さらに、GFP fusionを使った蛍光顕微鏡解析やWestern blot解析により、これらの遺伝子がコードするタンパク質の発現レベルもエライジン酸培地中では高いことを確認した。これらの遺伝子の転写制御機構について検討したところ、転写調節因子Mga2とSpt23はオレイン酸培地中では活性が抑制されていたのに対し、エライジン酸培地中では活性化されていた。これらの結果は、オレイン酸とそのトランス異性体であるエライジン酸が、遺伝子発現制御に関しては全く異なる影響を与えることを強く示唆している。

trans-fatty acid, Mga2, Spt23

講演番号：2A20p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ A 校舎 20 会場

中枢神経系におけるアポ E 含有 HDL の生成及び代謝メカニズム

Production and metabolism of apoE-containing HDL in central nervous system

○藤野 貴広（愛媛大総科研）
○Takahiro FUJINO (Ehime Univ.)

アポリポプロテイン E（アポ E）はほとんどのリポタンパクに含まれる糖タンパク質で、リポタンパク代謝においてリポタンパク受容体のリガンドとして機能している。特に、アポ B48 を含むリポタンパク・レムナントはアポ E が主要なリガンドとなり、肝臓におけるクリアランスに重要である。実際、アポ E の 3 つのアイソフォーム（アポ E2、E3 及び E4）の内、LDL 受容体に結合しないアポ E2 をホモで有すると、リポタンパク・レムナントのクリアランスは著しく遅延する。またアポ E は、ABCA1 によるコレステロール排出のアクセプターとして末梢組織に於ける過剰なコレステロールの引き抜きにも重要である。アポ E のアイソフォーム間におけるコレステロール排出能は見かけ上、アポ E2 > アポ E3 ≧ アポ E4 の順であることが知られており、その分子メカニズムは不明であった。我々は、精製アポ E を用いた解析から、ABCA1 によって生成されたアポ E 含有 nascent HDL が LDL 受容体に直接結合し、細胞に取り込まれることを見いだした。すなわち、アポ E アイソフォーム間にコレステロール排出能の違いはなく、その違いは LDL 受容体に対する結合親和性によって生じることを明らかにした。中枢神経系でアポ E は唯一のアポタンパクであり、アポ E を発現するアストロサイトによって nascent HDL が ABCA1 を介して生成され、神経細胞にコレステロールを供給していると考えられている。中枢神経系では LDL 受容体以外にアポ E をリガンドとするが高く発現しているが、その中でも VLDL 受容体や apoER2 受容体（恐らく LRP1 も）はアポ E 含有 nascent HDL とは結合しないことを見出した。この結果は、LDL 受容体を欠損した神経細胞ではアポ E 含有 nascent HDL がほとんど取り込まれなくなる結果と一致した。すなわち、中枢神経系におけるアポ E 含有 HDL の主要な受容体は LDL 受容体であることが明らかとなった。さらに、神経細胞及びアストロサイトにおける LDL 受容体のコレステロールによる発現調節は、アストロサイトによるアポ E 含有 nascent HDL の供給と神経細胞による取込みを非常によく説明するものであった。

HDL, lipoprotein, cholesterol

講演番号：2A20p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ A 校舎 20 会場

グルコシルセラミドとその構成成分の炭素安定同位体比の測定

Molecular and Intramolecular Carbon Isotopic Measurement of Glucosylceramide

○原口 浩幸[1]、山田 桂大[2]、宮下 留美子[1]、間 和彦[1]、大西 正男[3]、吉田 尚弘[2] ([1]日本製粉（株）中央研究所、[2]東工大院総理工　化学環境学、[3]帯広畜大　食品科学研究部門)
○Hiroyuki HARAGUCHI[1], Keita YAMADA[2], Rumiko MIYASHITA[1], Kazuhiko AIDA[1], Masao OHNISHI[3], Naohiro YOSHIDA[2] ([1]Central Laboratory, Nippon Flour Mills Co., Ltd., [2]Department of Environmental Chemistry and Engineering, Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, [3]Department of Food Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

【目的】スフィンゴ脂質の一種であるグルコシルセラミド (GlcCer)は食品として摂取することにより皮膚の保湿性を向上させる効果があることが報告されている。食品として摂取された GlcCer はその分子内構成分子である脂肪酸とスフィンゴイド塩基に分解された後、腸管で吸収され、その一部はセラミド(Cer)に再合成されるとの報告もあるが、摂取された GlcCer が皮膚に存在する Cer にどのような機序で寄与しているかは不明な点も多い。一方、ある物質の炭素安定同位体比（$\delta^{13}C$ 値）を測定することで、その由来や生成過程を推測することができ、原料判別などに応用されている。そこで、GlcCer 分子内構成成分、つまり脂肪酸とスフィンゴイド塩基の $\delta^{13}C$ 値は GlcCer 摂取後の体内動態に関して有用な手がかりになると考えられる。本発表では食品として摂取する様々な由来の GlcCer と GlcCer 分子内構成成分の $\delta^{13}C$ 値を測定した。
【方法】試験に使用した GlcCer は食品として摂取される様々な由来の高度精製品を用い、WS-CDRS 法で $\delta^{13}C$ 値を測定した。一方、それらをメタノリシスし、GlcCer 分子内構成成分である脂肪酸画分とスフィンゴイド塩基画分を得た後、体内動態を測定する場合の微量分析を想定して、それぞれの画分をガスクロマトグラフー燃焼ー安定同位体質量分析計(GC-C-IRMS)を用いて $\delta^{13}C$ 値を測定した。また、脂肪酸画分はメタノリシスによるメチル基、スフィンゴイド塩基画分はトリメチルシリル(TMS)化による TMS 基が $\delta^{13}C$ 値に影響を及ぼすため、それぞれをリノール酸メチルと TMS 化スフィンゴシンを用いて補正を行った。
【結果と考察】WS-CRDS で GlcCer の $\delta^{13}C$ 値を測定した結果、由来植物を反映した値となり（コメやダイズなど：約-30‰、トウモロコシ：約-15‰）、摂取試験を行う際の由来の選択基準になることが示唆された。また、GC-C-IRMS を用いた GlcCer 分子内構成成分である脂肪酸画分とスフィンゴイド塩基画分の $\delta^{13}C$ 値の測定の結果、それぞれの画分は数種の成分を含んでおり、由来植物を反映した値となったが、同じ由来でも成分間で差があることが分かった。これらの結果はそれぞれの成分の生成過程を反映している事が示唆される。食品として摂取した GlcCer と皮膚に存在する微量な Cer を構成している分子内構成成分である脂肪酸とスフィンゴイド塩基の $\delta^{13}C$ 値を測定する事で、GlcCer 摂取後の皮膚への Cer への関与をトレースできることが期待される。

Glucosylceramide, Carbon stable isotope ratio

講演番号：2A20p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ A 校舎 20 会場

ヒト胎盤組織の脂肪酸組成分析－疫学調査試料としての妥当性の検討－

Analysis of fatty acid composition in lipid from human placental tissue; validation of placenta for epidemiological study sample

○山崎 潔大[1]、木村 ふみ子[1]、有馬 隆博[2]、仲井 邦彦[2]、仲川 清隆[1]、宮澤 陽夫[1] ([1]東北大院農・機能分子解析、[2]東北大院医・環境遺伝医学研究センター)

○Isao Yamazaki[1], Humiko Kimura[1], Takahiro Arima[2], Kunihiko Nakai[2], Kiyotaka Nakagawa[1], Teruo Miyazawa[1] ([1]Grad. Sch. Agr. Sci. Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Med. Tohoku Univ.)

【目的】多価不飽和脂肪酸、とくにドコサヘキサエン酸（DHA）とアラキドン酸は、胎児と乳幼児の発育に重要な生体膜脂質の構成脂肪酸である。胎児と乳幼児の発育と生体内の脂肪酸組成あるいは脂肪酸摂取との関係についての疫学調査は、ドイツや米国など諸外国で実施されているが、日本人を対象とした調査例はほとんどない。このため我々は、日本人を対象として胎児と乳幼児の発育と脂肪酸の関係について疫学的な検証を行うための出生コホート調査を進めている。その際に、我々は脂肪酸摂取量の推定のため、母体血（妊娠 26 週頃）および臍帯血、母乳を収集しているが、母体血採血は採血時に侵襲性があり回数を増やすことは難しい。母乳はあくまで乳児の脂肪酸摂取および出産後の母体の脂肪酸組成の指標であり、臍帯血は 30%程度の確率で欠損または採取量不足が生じる。一方で、胎盤は分娩後に廃棄されるため、容易に入手可能な生体試料の一つである。先行研究では胎盤の利用例は少ないが、胎盤は胎児へ栄養を運ぶ臓器で、出生直後の新生児の脂肪酸組成を推定する上での有用性が期待される。さらに、胎盤はグリセロリン脂質が総脂質の約 90%と、分析試料としての取り扱いも容易である。このため、生体内の脂肪酸分布を評価する生体試料として胎盤の有用性を明らかにする目的で研究を進めている。今回、保存方法と保存期間が試料の脂肪酸組成に及ぼす影響を検討したので報告する。

【方法と結果】胎盤試料を、4℃で 0、3 および 7 日間、さらに－15℃で 27 日間保存し、脂肪酸分析を GC-FID で行った。その結果、上記の保存条件間では脂肪酸組成に有意な差異は認められなかった。次いで、胎盤（n=5）の母体側と胎児側からそれぞれ 6 か所（計 12 か所）を採取し、GC-FID で脂肪酸組成を分析したところ、DHA 濃度は母体側が高いことが分かった。また、母体側の中心部と外側部からそれぞれ 6 か所（計 12 か所）を採取し、脂肪酸組成を分析したところ、外側部の 6 か所の間では脂肪酸組成の変動が大きいことが分かった。以上の結果から、胎盤試料のサンプリング箇所は厳密に決めておく必要があると考えられ、母体側の中心部を採取場所とする方法が適切と考えられた。また、その上で、202 名の母親から提供された胎盤試料について、予備的な検討を行い、脂肪酸組成分析および各脂肪酸の RSD 値（相対標準偏差）を算出した。その結果、胎盤試料に含まれる多くの脂肪酸において母親個体間での変動が大きいことが示された。今後、母乳や赤血球中の脂肪酸分析の結果と比較し、胎盤試料の有用性について検討を行う計画である。

fatty acid, placenta, epidemiological study

講演番号：2A22a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ A 校舎 22 会場

Lactobacillus paracasei K71 の経口摂取が分泌型 IgA レベルに及ぼす影響
Effect of oral *Lactobacillus paracasei* K71 administration on secretory IgA levels
○熊谷 武久[1]、寺平 拓也[2]、藤井 幹夫[1]、山本 哲郎[3]、城 斗志夫[4]、原 崇[4] ([1]亀田製菓、[2]新潟大院・自然科学、[3]ＴＴＣ、[4]新潟大農)
○Takehisa KUMAGAI[1], Takuya TERADAIRA[2], Mikio FUJII[1], Tetsuro YAMAMOTO[3], Toshio JOH[4], Takashi HARA[4] ([1]Kameda Seika, [2]Grad. Sch. Sci. & Technol., Niigata Univ., [3]TTC, [4]Fac. Agric.,Niigata Univ.)

【目的】*Lactobacillus paracasei* K71 (K71株) は酒粕由来の乳酸菌であり、OVA感作したBALB/cマウスの血中IgEレベル亢進を抑制する[1)]。プラセボ対照比較試験により、K71株はアトピー性皮膚炎[2)]及び花粉症[3)]の症状緩和効果が確認されている。更に、K71株の免疫賦活効果を示唆する結果も得られている。本研究では、K71株の分泌型IgAレベル亢進効果について検討するために、①BALB/cマウスの糞中IgAと腸管免疫組織におけるIgA産生細胞、②健常人の唾液中分泌型IgAに及ぼすK71株摂取の影響を調べた。
【方法】K71株を加熱殺菌処理した粉末菌体 (2×10^{11}cfu/g相当) を調製し、摂取試料とした。①BALB/cマウス(♀、6週齢)をK71株投与群と対照群に分け(n=6)、コンベンショナルな環境で飼育した。蒸留水で懸濁したK71株を毎日単回(1 mg/day/mouse)経口投与した。飼育開始から1週間毎に糞中のIgAをELISA法により測定した。また、飼育6週目にパイエル板と腸管膜リンパ節におけるIgA^+CD19^+細胞をFACS解析により検出した。有意差検定はStudent t-検定を用いた。②ヒト試験はオープン試験で行った。まず30歳以上60歳未満の健康な男女20人から試験前に唾液中分泌型IgAを測定し、IgA分泌速度が遅い被験者11人を選抜した。K71株を12週間、毎日100 mg経口摂取してもらった。摂取開始から4週間毎に唾液量と分泌型IgAを測定した。ヒトIgAは市販のEIAキットを用いて測定した。安全性確認のために一般臨床検査(血液、尿)、生活習慣アンケート等を実施した。有意差検定は対応のあるt-検定を用いた。
【結果】①K71株投与群マウスは対照群マウスと比較し、6週間の飼育期間中の糞中IgAレベルが高く、飼育2～6週目に有意差が認められた。また、K71株投与群マウスの腸管膜リンパ節においてIgA^+CD19^+細胞が有意に増加していた。②試験開始後2人が脱落し、9人で統計解析を行った。K71株摂取により、唾液中IgAの分泌速度が経時的に上昇し続け、摂取前と比較して4～12週間で有意差が認められた。一般臨床検査値に軽微な変動が見られたが、試験責任医師より臨床上問題ないと判断された。以上のことから、K71株摂取によりヒト唾液中分泌型IgAレベルの亢進が確認され、この効果は腸管膜リンパ節におけるIgA産生B細胞の増加と関連するものと推察される。

1) T.Kumagai *et al.* : *Food Sci Technol Res*,(in printing)
2) M.Moroi *et al.* : *J Dermatol*, 38, 131 (2011)
3) 斎藤 真理子　他：日農化会講要, 204 (2009)

lactic acid bacteria, immunoglobulin A, administration

講演番号：2A22a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ A 校舎 22 会場

Lactobacillus paracasei K71 投与によるインフルエンザウイルス感染マウスへの効果
Effect of *Lactobacillus paracasei* K71 administration on influenza virus infection in mice
○樋口 裕樹[1]、渡辺 紀之[1]、熊谷 武久[1]、林 京子[2] ([1]亀田製菓(株)、[2]富山大学大学院医学薬学研究部)
○ Yuki HIGUCHI[1], Toshiyuki WATANABE[1], Takehisa KUMAGAI[1], Kyoko HAYASHI[2] ([1]KAMEDA SEIKA CO., LTD., [2]Toyama Univ.)

【目的】*Lactobacillus paracasei* K71 (K71 株)は抗アレルギー作用を有する乳酸菌として選抜された。前演者より K71 株摂取による未処理 BALB/c マウスの糞中分泌型 IgA 量の上昇及び健常人の唾液中分泌型 IgA の分泌速度が上昇したことから、K71 株摂取による抗体産生を亢進する効果を確認している。本研究ではヒトインフルエンザウイルスに感染させたマウスに K71 株を経口投与して、その効果を検討した。
【方法】試料として K71 株(低用量群；5mg/日と高用量群；10mg/日)、陽性対照としてリン酸オセルタミビル(タミフル群)、陰性対照として蒸留水(対照群)を用いた。6 週齢の雌 BALB/c マウスを 4 群に分け(n=10)、1 週間試料を経口投与した後、A 型インフルエンザウイルス (A/NWS/33、H1N1 亜型) を麻酔下でマウスに経鼻接種した。引き続き 1 週間試料を投与した。各群をそれぞれ 2 グループに分け(n=5)、1 つのグループは感染 3 日後に、気道洗浄液 (BALF) 及び肺を採取し、ウイルス量をプラークアッセイによって測定した。もう一方のグループは感染から 2 週間後までの体重測定及び死亡例を記録し、感染 2 週間後の血清、BALF を採取し、中和抗体価をプラークアッセイにより測定した。タミフル耐性ウイルス (2009 年流行のブタ型パンデミックウイルス、患者分離株、H1N1 亜型) を用い上記と同様に試験を行い、タミフル耐性ウイルスに対する効果を確認した (K71 株投与は低用量群のみ)。有意差検定は対照群に対して t-検定を行った。
【結果】ウイルス (NWS 株) 感染時では、K71 株低用量群及び高用量群は、対照群と比較して体重減少を抑制し、両群の体重変化はほぼ等しかった。低高用量群とも BALF 及び肺のウイルス量は対照群に比べて有意に抑制され、血清及び BALF の抗体産生量は用量依存的に増加する傾向が認められた。タミフル群では、体重減少が見られず、ウイルス量及び抗体産生量が低下した。タミフル耐性ウイルス感染時では、K71 株群は体重減少及び体内ウイルス量の抑制、血清及び BALF の抗体産生量の増加が見られた。一方、タミフル群では、体重の減少、ウイルス量及び抗体産生量は対照群と同程度であった。以上のことから、K71 株投与によりインフルエンザ症状の緩和が見られ、体重変化、ウイルス量の観点から、5mg/日の投与量で十分な抑制効果が得られると考えられる。タミフル投与ではウイルス量の抑制と同時に抗体産生量の低下が認められたが、K71 株投与では抗体産生量の上昇が見られ、作用の違いを示した。抗体産生を刺激したことから、次回の感染時に高い防御機能を発揮する可能性が考えられる。またタミフル耐性ウイルスにも効果を示したことから、有効性の広さが示唆される。

lactic acid bacteria, influenza virus, neutralizing antibody titer

講演番号：2A22a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ A 校舎 22 会場

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* FC により産生された菌体外多糖のパイエル板免疫調節作用と抗アレルギー効果

Effects of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC on intestinal immunological activities through Peyer's patch cells, and its oral administration against allergic dermatitis in mice

○後藤 弥生[1]、吉澤 奏子[2]、鈴木 志保[3]、戸田 登志也[1]、山田 勝重[1]、北村 進一[2] ([1]フジッコ株式会社、[2]大阪府大院・生命環境、[3]有限会社 IPE)

○ Yayoi GOTOH[1], Kanako YOSHIZAWA[2], Shiho SUZUKI[3], Toshiya TODA[1], Katsushige YAMADA[1], Shinichi KITAMURA[2] ([1]Fujicco Co., Ltd., [2]Osaka Prefecture Univ., [3]IPE Inc.)

【目的】*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC（FC 株）はカスピ海ヨーグルトの製造に用いられる菌であり、その発酵物中に菌体外多糖（EPS）を産生することが知られている。本研究では、EPS の腸管免疫に対する作用をパイエル板細胞を用いて調べること、および FC 株牛乳発酵物と EPS の経口投与がアレルギーモデルマウスに与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】C3H/HeJ マウス（8 週齢、♀）よりパイエル板細胞を摘出し、EPS を添加して 5 日間培養し培養上清を得た。同マウスより摘出した骨髄細胞に本培養上清を添加して 6 日間培養後の細胞増殖数を測定しパイエル板免疫調節作用の指標として検証した。次に FC 株牛乳発酵物がアレルギーモデルマウスに与える影響を調べた。BALB/c マウス（6 週齢、♂）を馴化飼育後、耳介に 2,4,6-トリニトロクロロベンゼン（TNCB）を塗布することで感作し、4 日目以降 1 日おきに TNCB を塗布してアレルギー様の皮膚炎を誘発した。感作 4 日前より感作日までは 1 日 1 回、感作日以降は 1 日おきに、FC 株牛乳発酵物を $2x10^8$cfu/匹/日となるように経口投与した。対照群には PBS を、陽性対照群にはプレドニゾロンを 3mg/kg/日となるように投与した。感作日および感作 4 日後からは 1 日おきに 24 日後まで TNCB 塗布前の耳介厚測定を行い、25 日後に耳介切片の HE 染色による組織学的解析と、血漿中 IgE 量および糞便中 IgA 量の測定を ELISA 法にて実施した。また、同様の実験系にて EPS を 0.05mg または 0.5mg/kg/日となるように経口投与し、EPS のアレルギー抑制効果を検証した。

【結果】パイエル板培養上清の添加により骨髄細胞の増殖促進効果が認められた。腸管におけるパイエル板免疫調節に賦活効果を及ぼしていることが示唆された。さらに、FC 株牛乳発酵物投与の投与により、対照群に比べて耳介肥厚化が有意に抑制された。血漿 IgE 量および糞便中 IgA 量は対照群に比べて低い傾向にあった。また、EPS 0.05mg、0.5mg/kg の投与によっても PBS 群に比べて耳介肥厚化が有意に抑制された。これらの結果から FC 株 EPS は腸管免疫を介した免疫調節作用により抗アレルギー効果を発揮すると考えられた。

lactic acid bacteria, exopolysaccharide, allergy

講演番号：2A22a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ A 校舎 22 会場

Lactobacillus salivarius による腸管バリア保護メカニズムの解析
Mechanism of protection of intestinal barrier function by *Lactobacillus salivarius*

○宮内 栄治[1,2,3]、O’Callaghan John[1]、Butto Ludovica[1]、Hurley Grainne[1]、Melgar Silvia[1]、田辺 創一[2]、Shanahan Fergus[1]、Nally Kenneth[1]、O’Toole Paul W.[1] ([1]コーク大、[2]広島大院・生物圏、[3]理研・RCAI)
○Eiji Miyauchi[1,2,3], John O’Callaghan[1], Ludovica Butto[1], Grainne Hurley[1], Silvia Melgar[1], Soichi Tanabe[2], Fergus Shanahan[1], Kenneth Nally[1], Paul W. O’Toole[1] ([1]Univ. Coll. Cork, [2]Hiroshima Univ., [3]RIKEN RCAI)

【目的】ある種の乳酸菌は腸管上皮の Tight junction（TJ）機能を調節することが確認されている。本研究では *Lactobacillus salivarius* 33 菌株を用い、菌株レベルでの TJ 調節機能の違いを検討するとともに、本機能に関与する菌成分の同定を試みた。
【方法】Caco-2 細胞を Transwell 上で分化させることにより、腸管上皮様単層を作製した。本単層に *L. salivarius* 33 菌株をそれぞれ添加後、酸化ストレスにより TJ 透過性亢進を誘導した。TJ 機能は、経上皮電気抵抗値、FITC-dextran 透過性、および TJ 関連タンパク質の局在変化により評価した。また、本スクリーニングにより TJ 透過性亢進抑制効果の高い菌株および低い菌株を選抜し、比較トランスクリプトーム解析に供した。得られたデータから TJ 調節機能に関与する候補遺伝子を特定し、同遺伝子破壊株の作製および TJ 調節効果の変化を評価した。
【結果】*L. salivarius* 33 菌株の TJ 透過性亢進抑制効果を比較した結果、同効果は菌株レベルで大きく異なることが明らかになった。効果の高い菌株として UCC118 および CCUG38008 株、効果の低い菌株として AH43324 株を選抜し、上皮単層への作用を比較した。その結果、UCC118 および CCUG38008 株は酸化ストレスによる TJ 関連タンパク質局在変化を抑制したが、AH43324 株は抑制効果を示さなかった。また、UCC118 および CCUG38008 株は上皮単層の ERK リン酸化を誘導する一方、AH43324 株は Akt および p38 リン酸化を誘導した。MEK（ERK の上流）阻害剤 U0126 により UCC118 および CCUG38008 株の TJ 透過性亢進抑制効果が減弱したことから、これらの有効菌株は上皮の ERK 経路を活性化することにより TJ 透過性亢進を抑制することが示唆された。UCC118 株と AH43324 株の比較トランスクリプトーム解析を行った結果、AH43324 株はバクテリオシン関連遺伝子群を高発現することが明らかになった。バクテリオシンを欠損した UCC118 bac−株を作製し、TJ への影響を親株と比較した結果、UCC118 bac−株は親株より高い TJ 透過性亢進抑制効果を有することが明らかとなった。細胞内シグナルへの影響を比較した結果、UCC118 株は酸化ストレスによる Akt および p38 リン酸化を増強させたが、UCC118 bac−株ではリン酸化増強作用は見られなかった。
【結論】*L. salivarius* の TJ 調節機能は菌株レベルで異なり、上皮細胞内シグナル経路の活性化パターンに依存することが示された。また、TJ 調節機能に関わる菌成分の一つとしてバクテリオシンを同定した。バクテリオシンは上皮の Akt および p38 MAPK 経路を活性化することにより、*L. salivarius* の TJ 透過性抑制効果を減弱させることが示唆された。

lactobacilli, intestinal epithelial cells, tight junction

講演番号：2A22a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ A 校舎 22 会場

乳酸菌の抗ウィルス作用についての腸管オルガノイドを用いた検討

Mechanistic study on anti-virus effect of lactobacilli by using intestinal crypt organoids

○青木－吉田 綾子、園山 慶 (北大院農)
○Ayako AOKI－YOSHIDA,Kei SONOYAMA (Hokkaido Univ.)

【背景・目的】近年、ウィルス感染に対する乳酸菌の防御効果が明らかになり、乳酸菌の抗ウィルス効果に対する関心が高まってきている。しかしながら、そのメカニズムについては未解明な部分が多い。そこで本研究では、乳酸菌による抗ウィルス作用のメカニズムを明らかにすることを目的として、*Lactobacillus plantarum* No.14株（LP14株）生菌体を乳酸菌モデル株として用い、腸管オルガノイド培養における、ウィルス認識に関与するToll-like receptor（TLR）3の発現と抗ウィルス作用を有するサイトカインであるIFN-αの発現に対するLP14株生菌体の投与効果を検討した。

【方法】C57BL/6マウス（7週齢・♀）の小腸から陰窩を採取し、マトリゲル中で培養することにより腸管オルガノイドを誘導した。培養6日目に、LP14株生菌体とTLR3リガンドであるpolyI:Cを添加した。培養後、腸管オルガノドからRNAを回収し、cDNAを調製後、IFN-α、およびTLR3の発現をReal-time PCRにより解析した。また、C57BL/6マウス（7週齢・♀）に、1週間、LP14株生菌体を含有する飼料を自由摂取させ、小腸におけるTLR3のmRNA発現量に与える影響についても解析した。

【結果・考察】腸管オルガノイドにおけるTLR3とIFN-αのmRNA発現量は、LP14株生菌体単独およびpolyI:Cの同時添加により増加した。また、LP14株生菌体の投与は、C57BL/6マウス小腸におけるTLR3 mRNA発現量を増加させた。以上の結果より、LP14株生菌体は、小腸上皮におけるTLR3の発現と、IFN-α産生誘導を増強させることで、抗ウィルス活性を誘導する可能性が考えられた。現在、他の乳酸菌株についても同様の検討を進めている。

lactobacilli, IFN-α, TLR3

講演番号：2A22a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ A 校舎 22 会場

乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* OLL2809 のストレス軽減および免疫賦活効果
Effects of *Lactobacillus gasseri* OLL2809 on stress and immune activation
○指原 紀宏、古市 圭介、池上 秀二、内田 勝幸、伊藤 裕之（（株）明治　食機能科学研究所）
○ Toshihiro SASHIHARA,Keisuke FURUICHI,Shuji IKEGAMI,Masayuki UCHIDA,Hiroyuki ITOU (Food Science Research Labs, Meiji Co., Ltd.)

【目的】慢性的なストレスは神経系や内分泌系に影響し、NK 細胞傷害活性など免疫力を低下させることが知られている。*Lactobacillus gasseri* OLL2809 は樹状細胞などからの IL-12 産生を誘導する効果の高いプロバイオティクス乳酸菌で、免疫賦活効果を有している。また、ある種の乳酸菌にはストレスを軽減する効果もあることが報告されている。そこで、OLL2809 株について、浸水ストレス負荷モデルを用いて、免疫への影響やストレス軽減効果を評価した。

【方法】6 週齢の雄性 Sprague Dawlye ラット(日本 SLC)を通常群、ストレス群、OLL2809 群の 3 群に分けた(Day 1)。全群とも通常飼育した後、Day 9 からストレス群および OLL2809 群において、底面から 1.5cm の高さまで水を張ったケージ中で 5 日間飼育した。Day 1 から day 14 まで、OLL2809 群に 40mg/kg-body weight/day の OLL2809 株を強制経口投与した。通常群およびストレス群には溶媒の水のみを同様に投与した。

【結果】通常群と比較してストレス群では、暗期の行動量と体重が顕著に低下し、副腎および腎臓の肥大、肝臓、胸腺及び脾臓の萎縮が認められた。ストレスマーカーである血中コルチコステロン、ノルアドレナリン、酸化ストレスマーカーの血中 8-OHdG が有意に増加し、脾臓 NK 活性が有意に低下した。また、糞便中の *Enterobacteriaceae* および *Enterococcus* 数が有意に増加し、回腸組織中の熱ショックタンパク質、HSP70 の発現量が有意に増加した。OLL2809 を投与したところストレス群と比較して、行動量、体重、臓器重量に影響は認められなかったが、血中コルチコステロン、8-OHdG の増加は緩やかで、脾臓の NK 活性は有意に亢進した。また、回腸内容物中 *Enterobactericeae*、便中 *Enterococcus* の増加もストレス群に比べて緩やかで、回腸 HSP70 発現量は有意に減少した。

【考察】浸水ストレス負荷ラットへの OLL2809 株の経口投与は、本ストレスモデルにおいては行動量や体重、臓器重量といった指標にまでは影響を及ぼさないが、ストレスを軽減することが示唆された。また、ストレス負荷による NK 活性の低下を抑制する効果が確認された。さらに、ストレス負荷は小腸粘膜バリア所見にまで影響を及ぼさないが、軽微な炎症反応は生じており、OLL2809 株の投与によりこの炎症が抑制されていることが HSP70 の解析から示唆された。

Lactobacillus gasseri, Stress, NK activity

講演番号：2A22a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ A 校舎 22 会場

乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* OLL2809 およびα - ラクトアルブミンの運動選手におけるコンディション改善効果

Conditioning effects of *Lactobacillus gasseri* OLL2809 and α-lactalbumin on athletes

○田村 明[1]、指原 紀宏[1]、長田 昌士[1]、森 毅[1]、池上 秀二[1]、内田 勝幸[1]、後藤 穣[2]、大久保 公裕[2]、伊藤 裕之[1]([1]（株）明治　食機能科学研究所、[2]日本医科大学耳鼻咽喉科)
○Akira Tamura[1], Toshihiro Sashihara[1], Masashi Nagata[1], Takeshi Mori[1], Syuji Ikegami[1], Masayuki Uchida[1], Minoru Gotoh[2], Kimihiro Okubo[2], Hiroyuki Itoh[1] ([1]Food Science Research Laboratories, R&D Division, Meiji Co.,Ltd, [2]Department of Otorhinolaryngology, Nippon Medical School Hospital)

【背景】高強度の運動は生体の炎症や運動後の免疫低下を引き起こす。これまでに、乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* OLL2809 に免疫賦活効果が、α - ラクトアルブミン（αLA）には抗炎症効果などが認められている。本研究では OLL2809 株のみ、および OLL2809 株と αLA の相乗摂取による運動選手のコンディション改善効果を臨床評価した。

【方法】日常的に運動を行っている 44 名の大学生を対象に、無作為化プラセボ対照二重盲検法（3 群間の並行比較試験）を行った。1 週間の前観察期間終了後、無作為にプラセボ群と OLL2809 株のみを摂取する群（以下、OLL2809 群）、および OLL2809 株に加えて αLA を摂取する群（以下、OLL2809+αLA 群）の 3 群に割り付けた。各被験者にはプラセボまたは 100mg の OLL2809 株（OLL2809 群）、または 100mg の OLL2809 株に加えて 900mg の αLA（2809+αLA 群）を含有する錠剤を 4 週間摂取させた。4 週間の被験物の摂取前後で、それぞれ 1 時間のエルゴメーターによる運動を負荷した。また、POMS アンケート調査を摂取前後の計 2 回、VAS 法による疲労感の調査および血液検査を摂取前後の運動負荷前後で計 4 回行った。運動は 70%$HR_{reserve}$ を保つよう負荷した。

【結果】被験物の摂取前後で一過性の運動パフォーマンスへの影響は認められなかった。一方、OLL2809 群では POMS の「緊張・不安」スコアの有意な低下が認められた。また、摂取前検査では全群、摂取後検査ではプラセボ群で運動後に運動前と比較して NK 活性の有意な低下が認められたのに対して、摂取後では OLL2809 群および OLL2809+αLA 群では運動後の NK 活性の低下は認められなかった。また、OLL2809+αLA 群では POMS の「疲労」スコアの低下、および摂取前後における運動前の VAS スコアで疲労感の低下が認められた。これらの効果を示す客観的指標として TGF-β1 および ROMs（reactive oxygen metabolites）の低下が認められた。

【考察】OLL2809 株の摂取により精神的ストレスの軽減効果が認められ、また運動負荷後の NK 活性の低下が抑制された。一方、OLL2809 株に加えて αLA を摂取することは、日々の疲労感の軽減に有効であった。これら被験物は直接的に運動パフォーマンスを向上させる作用はないが、運動選手のコンディションを改善するのに有用であることが明らかになった。

Lactic acid bacteria, α-lactalbumin, NK activity

講演番号：2A22a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ A 校舎 22 会場

NOD マウスの 1 型糖尿病の発症原因となる自己免疫応答の誘導を抑制できる乳業用乳酸菌

Lactic acid bacteria in dairy products capable of suppressing the induction of autoimmune responses leading to the onset of Type 1 diabetes in NOD mice

○古川 和憲[1]、麦 嘉麟[1]、門岡 幸男[2]、榎本 淳[1]([1]群大院工・応化生物、[2]雪印メグミルク(株)ミルクサイエンス研)
○Kazunori FURUKAWA[1], Khar Loon MAK[1], Yukio KADOOKA[2], Atsushi ENOMOTO[1] ([1]Gunma Univ., [2]Megmilk Snow Brand Co.)

【目的】最も代表的な自己免疫疾患の一つである 1 型糖尿病は、インスリンやグルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）などの自己抗原に特異的な T 細胞が体内で自発的に活性化され、それらが膵臓ランゲルハンス島に侵入し、そのβ細胞を選択的に破壊するために発症すると考えられている。本研究では 1 型糖尿病の予防・治療法を確立するために、チーズなどの製造に実際に使用されている乳酸菌が、この疾病の動物モデルである NOD マウスの GAD に特異的な自己免疫応答の誘導を抑制できるかどうか *in vitro* で検討することを目的とした。
【方法】糖尿病未発症の 10～12 週齢のメスの NOD マウスの脾臓細胞を GAD の主要なエピトープである GAD 524-543（GAD の 524～543 残基）を添加して 3 日間培養後、IL-2 を添加してさらに 3 日間培養した（一次抗原刺激)。これらの細胞を回収・洗浄後、自己抗原存在下、24 時間培養し（二次抗原刺激)、それらの培養上清中に含まれる IFN-γ産生量を ELISA にて測定・比較した。
【結果および考察】あらかじめ加熱殺菌処理をした 2 種類の乳酸菌株（*L. helveticus* SBT 2171 および *L. gasseri* SBT 1265）を一次抗原刺激時に 0.1～100μg/ml の濃度範囲で添加したところ、NOD マウス T 細胞の GAD 524-543 に特異的な IFN-γ応答は完全に抑制された。この乳酸菌の抑制効果は、1）*L. helveticus* で特に顕著であり、2）その最適濃度は 1～10μg/ml であり、3）さらに 2 種類の乳酸菌株を単独ではなく、混合して添加した場合においても観察された。しかし、これらの乳酸菌を二次抗原刺激時に添加した場合は、その添加濃度に関わらず、GAD に特異的な自己免疫応答は全く抑制されなかった。すなわち、乳酸菌の抑制効果は naïve な T 細胞が自己抗原刺激により活性化・分化する過程で発揮されるが、活性化された後では効果がないものと考えられた。次に naïve な NOD マウスの脾臓細胞に GAD 524-543 および *L. helveticus*（10μg/ml）を加えて 3 日間培養後、IL-2 を添加してさらに 3 日間培養した。このようにして得られた乳酸菌刺激細胞を新たな NOD マウスの脾臓細胞と 1:2 あるいは 1:10 の割合で混合して培養し、その GAD に特異的な IFN-γ産生応答を上述した方法により測定したところ、Transwell で分離して共培養した際には認められなかったものの、直接混合して培養した場合においては、それが 1/3～1/4 まで大きく低下することが見出された。これらの結果より、乳酸菌刺激により GAD に特異的な自己免疫応答を抑制できる能力を有する制御性細胞が誘導された可能性が示唆された。

Type 1 diabetes, Lactic acid bacteria, Autoimmune response

講演番号：2A22a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ A 校舎 22 会場

Lactococcus lactis JCM5805 株（プラズマ乳酸菌）摂取は温度ストレスによる pDC 活性低下を改善する
Lactococcus lactis JCM5805 feeding improve the negative regulation in pDC activity induced thermal stress

○杉村 哲[1]、城内 健太[1,2]、大塩 木乃実[1]、藤原 大介[1] ([1]キリン（株）基盤技術研究所、[2]小岩井乳業（株）技術開発センター)
○Tetsu SUGIMURA[1], Kenta JOUNAI[1,2], Konomi OHSHIO[1], Daisuke FUJIWARA[1] ([1]Kirin Co., Ltd. Central Laboratories for Key Technologies, [2]Koiwai Dairy Products Co., Ltd. Technical Deveropment Center)

【目的】
季節の変わり目や気候の異なる地域への旅行では風邪に罹患しやすい。その要因の一つとして外気温の変化が第一に考えられる。プラズマサイトイド樹状細胞（pDC）はウイルス感染防御機構を司る免疫細胞であるが、外気温変化の影響に関する知見は報告されていない。そこで、外気温変化がpDC活性にもたらす影響を明らかにすることを目的とし、マウスに高温及び低温ストレスを負荷した際のpDC活性を調べた。さらに、高いpDC活性化能を有する乳酸菌*L. lactis* JCM5805株の摂取が、温度ストレスによるpDC活性低下を改善する効果を持つかどうかについて検証した。
【方法】
①高温及び低温ストレス負荷がpDC活性に与える影響
8週齢・C57BL/6J（♀）を個別飼育制御装置の高温（37℃）・常温（23℃）・低温（10℃）条件下に移し、24時間及び7日間飼育後に解剖を行った。採血、及び脾臓（SPN）・腸管膜リンパ節（MLN）の摘出を行い、血中IFN-α濃度測定及びフローサイトメーターを用いたpDC活性（MHC class II, CD86, CD40）の測定・各種遺伝子転写量の解析を行った。
②高温ストレス負荷によるpDC活性低下に対する*L. lactis* JCM5805株摂取の効果
常温（23℃）において6週齢・C57BL/6J（♀）に*L. lactis* JCM5805株を1mg/dayで2週間混餌投与した後、高温（37℃）・24時間飼育した。解剖を行い、①同様の評価の他、SPN細胞を用いてCpG刺激に対するIFN-α産生量の解析を行った。
【結果】
①高温24時間飼育群では、SPN及びMLNのpDC活性が常温24時間飼育群と比較して有意に低下していた。一方で、高温7日間飼育群では常温飼育群との有意な差は見られなかった。以上の結果から、高温ストレスの短時間負荷により、生体内pDCの活性が低下することが示唆された。また、低温ストレス負荷群ではpDC活性の低下は見られなかった。
②*L. lactis* JCM5805株を摂取した高温飼育群は、SPNのpDC活性が非摂取高温飼育群と比較して有意に高かった。さらに、CpG刺激に対するIFN-α産生量も非摂取高温飼育群に対して有意に高いという結果が得られた。このことより、*L. lactis* JCM5805株摂取が高温ストレス負荷によるpDC活性の低下を改善する可能性が示唆された。

lactic acid bacteria, plasmacytoid dendritic cell, thermal stress

講演番号：2A22a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ A 校舎 22 会場

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 由来酸性多糖の免疫調節作用の特性
Characterization of immunomodulatory effect of acidic extracellular polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1

石田 彩佳[1]、伊藤 智[1]、芳賀沼 亮[1]、矢野 光太郎[1]、○高橋 恭子[1]、細野 朗[1]、牧野 聖也[2]、池上 秀二[2]、上野川 修一[1]([1]日大生資、[2]（株）明治)
Ayaka ISHIDA[1], Tomo ITO[1], Ryo HAGANUMA[1], Kotaro YANO[1], ○Kyoko TAKAHASHI[1], Akira HOSONO[1], Seiya MAKINO[2], Syuji IKEGAMI[2], Shuichi KAMINOGAWA[1] ([1]NUBS, [2]Meiji Co., Ltd.)

【目的】乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1(以下 1073R-1 株)で調製した発酵乳には免疫調節作用があることが報告されている。我々は以前に、1073R-1 株が産生する酸性多糖(acidic extracellular polysaccharides, APS)がマウス脾臓細胞およびマクロファージ細胞株から IL-10 や IL-12 等のサイトカイン産生を誘導することを報告している。本研究では、標的細胞の 1 つであると考えられる単球/マクロファージに対する APS の作用の特性と機構を明らかにすることを目的とした。
【方法】APS は(株)明治より供与された。マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 に APS あるいはリポ多糖(lipopolysaccharides, LPS)を添加し、10 分あるいは 30 分後に細胞を回収した。細胞抽出液を抗リン酸化 Erk 抗体、抗リン酸化 JNK 抗体、抗リン酸化 p38 抗体を用いたウェスタンブロットに供し、MAP キナーゼの活性化を解析した。一方、RAW264.7 に APS、LPS を添加して培養し、2 時間後に細胞を回収して核抽出物を調製した。得られた核抽出物について NF-kB 結合配列を含むオリゴ DNA プローブを用いたゲルシフトアッセイを行った。また、ヒト単球株 THP-1 に NF-kB 結合配列を有するルシフェラーゼレポータープラスミドを導入した。その後、APS、LPS を添加して 24 時間培養し、ルシフェラーゼアッセイにより NF-kB の活性化を測定した。
【結果・考察】ウェスタンブロッティングの結果、APS 刺激により RAW264.7 細胞において Erk のリン酸化が認められた。また、p38 や JNK の顕著なリン酸化は見られなかった。これに対して、LPS 刺激では、p38 と JNK のリン酸化が観察され、Erk の強いリン酸化は認められなかった。また、ゲルシフトアッセイにおいて、RAW264.7 細胞を APS で刺激した際には顕著な NF-kB の核移行は観察されなかった。これに対して、LPS で刺激した際には NF-kB の核移行が誘導された。さらに、THP-1 細胞を用いたレポーターアッセイの結果、LPS が NF-kB の活性化を誘導するのに対して、APS はむしろ濃度依存的に NF-kB の活性化を抑制した。
以上の結果から、単球/マクロファージからのサイトカイン産生を誘導する際の細胞内シグナル伝達は、APS と LPS では異なる特性を有することが明らかになった。APS によるシグナル伝達は主に Erk の活性化を介する可能性が示され、NF-kB の活性化による強い炎症反応の誘導を伴わずに免疫調節作用を発揮することが期待される。

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus*, acidic extracellular polysaccharides, immunomodulation

講演番号：2A22a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ A 校舎 22 会場

Lactobacillus casei のゲノム DNA に含まれる抗炎症作用を持つオリゴデオキシヌクレオチドの特定と作用機構の解明

Identification of oligodeoxynucleotide with anti-inflammatory effect from *Lactobacillus casei* genomic DNA and analysis of their mechanism

○平松 征洋、佐藤 朝光、入江 圭一、椎村 翔太、中島 幸彦、見明 史雄、鹿志毛 信広（福岡大薬）
○Yukihiro Hiramatsu, Tomomitsu Satho, Keiichi Irie, Shota Shiimura, Yukihiko Nakashima, Fumio Miake, Nobuhiro Kashige (Fukuoka Univ.)

【目的】これまでに、我々は、乳酸菌 *Lactobacillus casei* のゲノム DNA が抗炎症作用を持つことを明らかにしている（Microbes and Infection, In press）。本研究では、*L. casei* ゲノム DNA のどの部位が抗炎症作用を有しているか確認するために、ヒト結腸上皮細胞株 Caco-2 を用いて、抗炎症作用を持つ配列（オリゴデオキシヌクレオチド：ODN）の特定を試みた。さらに、ヒトマクロファージ様細胞株 THP-1 を用いて、この ODN が免疫細胞においても抗炎症作用を示すか検討した。また、「特定の ODN は Hsp90 へ結合すること」、「Hsp90 へ結合し、その ATPase 活性を阻害する物質は、抗炎症作用を有する Hsp70 の発現を誘導すること」が報告されている。よって、*L. casei* 由来 ODN の抗炎症作用機構を解明するために、Hsp90 の ATPase 活性および Hsp70 発現について検討した。

【方法】*L. casei* ゲノム DNA を *Sau*3AIで切断し、pUC19 に挿入することで、ゲノム DNA ライブラリーを作製した。この中から、100 個のプラスミドを選択し、H_2O_2 により炎症を誘発させた Caco-2 細胞を用いて、IL-8 の遊離抑制作用を測定した。そして、抗炎症作用を持つプラスミドに含まれる *L. casei* ゲノム DNA 由来の塩基配列を決定し、共通配列を特定した。これらの共通配列による抗炎症作用の確認は、各 ODN を合成し、IL-8 の遊離抑制作用を測定することで行った。さらに、LPS により炎症を誘発した THP-1 細胞の COX-2・iNOS 発現量および NO 分泌量に *L. casei* 由来 ODN が与える影響を検討した。加えて、*L. casei* 由来 ODN による recombinant Hsp90 の ATPase 阻害作用、*L. casei* 由来 ODN を曝露した Caco-2 および THP-1 細胞の細胞内 Hsp70 発現量を解析した。

【結果】ゲノム DNA ライブラリーから選択した 100 個のプラスミドのうち、24 個が IL-8 の遊離を抑制した。そして、この 24 個のプラスミドに含まれる *L. casei* 由来配列を決定し、8 塩基から成る 18 種類の共通配列を特定した。このうち、14 種類の合成 ODN は、H_2O_2 による Caco-2 細胞からの IL-8 の遊離を抑制した。また、最も高い IL-8 遊離抑制作用を示した ODN-7F（5'-TTTTGCCG-3'）は、THP-1 細胞において、LPS により誘発した COX-2・iNOS 発現および NO 分泌を抑制した。この結果は、ODN-7F が *L. casei* ゲノム DNA の抗炎症作用の因子として機能することを示唆している。また、ODN-7F は、recombinant Hsp90 の ATPase 活性を阻害し、Caco-2 および THP-1 細胞において、Hsp70 の発現を誘導した。よって、ODN-7F の抗炎症作用機構の一つとして、Hsp70 誘導作用が考えられる。

oligodeoxynucleotide, lactic acid bacteria, heat shock protein

講演番号：2A22a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ A 校舎 22 会場

Lactobacillus plantarum の菌体構成成分が IL-10 産生誘導に及ぼす影響
The impact of cellular components of *Lactobacillus plantarum* on interleukin-10 production
○奥津 雄太[1]、長井 遼太[1]、星子 浩之[2]、梶川 揚申[1]、田中 尚人[1]、佐藤 英一[1]、岡田 早苗[1]([1]東農大応生科・化学、[2]サントリービジネスエキスパート（株））
○Yuta Okutsu[1], Ryouta Nagai[1], Hiroyuki Hoshiko[2], Akinobu Kajikawa[1], Naoto Tanaka[1], Eiichi Satoh[1], Sanae Okada[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem. Tokyo Univ. Agr., [2]Suntory Business Expert LTD.)

【背景・目的】近年、乳酸菌によるアレルギー疾患や自己免疫疾患などを軽減させる免疫調節作用に強い関心と期待が集まっている。しかし、免疫調節作用のリガンドとしての菌体構成成分は特定されているが、菌株間において活性が異なる要因については明らかになっていない。また、菌体構成成分の一つである細胞壁テイコ酸(WTA)の免疫学的関与についての報告は少ない。そこで本研究では、炎症反応の抑制に重要な抑制性サイトカインである IL-10 を指標とし、*Lactobacillus plantarum* の株間において WTA を含む菌体構成成分に着目し活性が異なる要因について調べることを目的とする。
【方法・結果】長野県の伝統発酵食品「すんき漬け」から分離された *L. plantarum* 13 株とヒト由来単球性白血病細胞である THP1 細胞を用いて ELISA 法にて IL-10 産生誘導の評価を行った。その結果、菌株間で IL-10 産生誘導に差がみられた。その中から IL-10 産生誘導の高い株として *L. plantarum* SNK24、低い株として *L. plantarum* SNK1 を選抜した。選抜株の総菌体(Cell)から、細胞構造を維持した細胞壁(ICW)、ペプチドグリカン(PG)、WTA、細胞内容物(PP)の各菌体画分を調製し IL-10 を測定した。その結果、各菌体画分の中で ICW が最も活性が高く、活性が異なる要因として細胞壁が重要であることを示唆された。次に細胞壁成分の一つである WTA の関与を明らかにするため、WTA を除去した ICW 画分(脱 WTA・ICW)を調製し ICW と比較した。その結果、脱 WTA・ICW で IL-10 産生誘導が大きく低下した。また、WTA 単体では活性が少ないことから、IL-10 産生誘導において WTA は細胞壁に必要な因子であることが考えられる。さらに、細胞壁がなぜ活性が異なる要因になるのかを明らかにするため、N-Acetylmulamidase(M1 酵素)を用いて菌体の消化耐性について検討した。*L. plantarum* 13 株の Cell と ICW を用いて M1 酵素による溶菌酵素耐性試験と IL-10 測定を行った。その結果、Cell と ICW において M1 酵素の消化率と IL-10 産生誘導との間で負の相関を示した。そのため IL-10 産生誘導において溶菌酵素耐性の強い細胞壁を持つ菌株程、高い活性を示すことが示唆された。その事から菌体の細胞壁の量及び厚さの違いによって、活性差が生まれているのではないかと考えられる。以上の結果から活性が異なる要因として、細胞壁構造の違いが関与している可能性が示唆された。

Lactobacillus plantarum, IL-10, cell wall teichoic acid

講演番号：2A22a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ A 校舎 22 会場

Lactococcus lactis C59 株の経口投与による経口免疫寛容誘導の強化
Enhancement of oral tolerance induction by feeding *Lactococcus* lactis C59

○西田 実紗[1]、青木一吉田 綾子[1]、鈴木 チセ[2]、清水 誠[1]、戸塚 護[1] ([1]東大院農生・応生化、[2](独)農研機構・畜草研)
○MISA NISHIDA[1], AYAKO YOSHIDA[1], CHISE SUZUKI[2], MAKOTO SHIMIZU[1], MAMORU TOTSUKA[1] ([1]Dept.Appl.Biol.Chem., The Univ. Tokyo, [2]NILGS)

【目的】*Lactococcus lactis* C59(C59)と *Lactobacillus gasseri* OLL2809(LG2809) は共に抗アレルギー効果を持つことが知られているプロバイオティック乳酸菌である。これまでに LG2809 経口投与が脾臓において、IL-10 産生、T 細胞抑制活性を示す T 細胞の割合を増加させるとともに 、その抑制活性を増強することで経口免疫寛容を強化することを報告している。本研究では、OVA 特異的 T 細胞レセプター遺伝子を導入したトランスジェニックマウスである DO11.10 マウスへの卵白アルブミン(OVA)含有水の投与で誘導される経口免疫寛容に、C59 の経口投与が与える効果を解析した。

【方法】DO11.10 マウスに C59 生菌を毎日 1 mg、12 日間胃内強制投与した。その最初の 7 日間は水を、最後の 5 日間には 20%OVA 含有水を自由摂取させて、経口免疫寛容を誘導した。DO11.10 マウスの脾臓 $CD4^+$T 細胞を、抗原提示細胞、OVA ペプチドとともに培養し、48 時間後に ELISA により脾臓 CD4+ T 細胞のサイトカイン産生(IL-2, IL-4, IL-10, TGF-β)を測定した。また、96 時間後に脾臓 $CD4^+$ T 細胞の増殖応答を調べた。

【結果】C59 経口投与で、経口免疫寛容誘導の指標となる $CD4^+$ T 細胞の増殖応答、IL-2 産生量が共に低下したことから、C59 経口投与は経口免疫寛容を強化することが示唆された。これまでの報告において LG2809 の経口投与が TGF-β 産生の低下、IL-10, IL-4 産生の増加を示したのに対し、C59 経口投与では、TGF-β 産生量の低下は見られず、IL-10, IL-4 の低下が見られた。C59 は LG2809 とは異なったメカニズムで経口免疫寛容を強化することが示唆された。

lactic acid bacteria, oral tolerance, interleukin

講演番号：2A22a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ A 校舎 22 会場

高度不飽和脂肪酸の乳酸菌代謝産物は Caco-2 細胞における腸管上皮バリアの損傷を回復する
Polyunsaturated Fatty Acid Metabolites by Lactic Acid Bacteria Recovers the Intestinal Epithelial Barrier Impairment in Caco-2 Cells

○宮本 潤基[1]、PARK Si-Bum[2]、岸野 重信[2]、小川 順[2]、鈴木 卓弥[1]、田辺 創一[1]([1]広大院生物圏、[2]京大院農・応用生命)
○Junki MIYAMOTO[1], Si-Bum PARK[2], Shigenobu KISHINO[2], Jun OGAWA[2], Takuya SUZUKI[1], Soichi TANABE[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】
リノール酸の乳酸菌代謝産物である共役リノール酸について、モデル動物評価系における自己免疫疾患・腸炎軽減効果が報告され、不飽和脂肪酸の乳酸菌代謝産物がヒトに与える効果に注目が集まっている。本研究では、乳酸菌によるリノール酸代謝の中間体と考えられる水酸化脂肪酸などの希少脂肪酸が、ヒト腸管上皮細胞培養株 Caco-2 細胞のタイトジャンクション(TJ)バリアに与える効果を検討した。
【方法】
２層式の培養装置 Transwell で Caco-2 細胞を培養した。乳酸菌がリノール酸から生成する希少脂肪酸(各 50 μM)をそれぞれ Caco-2 細胞に添加し、24 時間培養を続けた。その後、基底膜側に IFN-γ (50 ng/mL) を添加し 24 時間刺激した。次に、基底膜側のみ培地交換を行い、TNF-α (50 ng/mL) を加えて TJ バリアを刺激した。TNF-α添加後、経時的に経上皮電気抵抗(TER)を測定し、炎症性サイトカイン IL-8 の発現変化を評価した。また、発現変動が観察された脂肪酸にて前処理した Caco-2 細胞については、TJ 関連因子(claudin-1, occludin, zonula occludens-1; ZO-1, myosin light chain kinase; MLCK)の発現変化も評価した。
【結果および考察】
IFN-γ＋TNF-α処理によって TER は有意に低下し、IL-8 産生が亢進したことから、TJ バリアの損傷が示唆された。本評価系にて乳酸菌がリノール酸から生成する希少脂肪酸の機能を検討したところ、水酸化脂肪酸 (10-hydroxy-12-octadecenoic acid; HYA) において TER の有意な回復が観察された。また、HYA は、IL-8 の mRNA およびタンパク質発現を有意に抑制した。さらに、HYA は claudin-1, occludin, MLCK の mRNA 発現、および occludin と ZO-1 のタンパク質発現を制御し、IFN-γ+TNF-α未処理の状態に近づけた。一方、興味深いことに、HYA の飽和化産物(10-hydroxyoctadecanoic acid; HYB)は IFN-γ+TNF-αによるタンパク質発現変化をさらに増長させた。このように、HYA は TJ 損傷を回復するが、HYB では効果が見られないことから、HYA による TJ 回復機構の少なくとも一部に、不飽和構造が重要であると結論された。
HYA は、炎症性腸疾患などの TJ バリア損傷と関連する疾病の予防・軽減に寄与する可能性が考えられる。今後、作用機序の解明や in vivo における HYA の効果を検討する予定である。

polyunsaturated fatty acid, tight junction, lactic acid bacteria

講演番号：2A22p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ A 校舎 22 会場

Effect of oral intake of whey protein concentrates on colitis in mice.

○Sharmila JAYATILAKE[1,2], Katsuhito ARAI[1,2], Yoshiko ISHIDA[2], Nanami KUMADA[2], Satoru IWATSUKI[3], Ichiro TANAKA[2], Yoshihiko TOKUJI[2], Mikio KINOSHITA[2], Masao OHNISHI[2]
([1]Iwate Univ., [2]Obihiro Univ. Agric. Vet. Med., [3]Asama Kasei)

Inflammatory bowel disease (IBD) is an autoimmune disease of unknown etiology that can lead to inflammation and cancers. The incidence if IBD has increased over the past decades with arising need of suppressing this disease. Whey proteins contain many bioactive peptides with potential health benefits for such diseases. We investigated the effect of oral intake of whey protein concentrates (WPC) on colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS) in mice. In this study, we supplemented the two kinds of WPCs, high temperature treated-WPC (HWPC), and low temperature treated-WPC (LWPC) to the laboratory chows respectively. All mice showed a decline of body weight during the induction of IBD, while the weight loss was less in LWPC -fed mice compared to HWPC and control groups. Histopathological study showed that oral intake of LWPC can partially avoid both the distraction of epithelial cells and the infiltration of immune cells in colon of IBD-induced mice. The weight gain after stop administration of DSS was higher in LWPC-fed mice than in control and HWPC-fed group. The effect of enzyme-digested LWPC (DLWPC) and LWPC on IBD in mice was almost same. These suggest that the suppression and the recovery from DSS induced IBD by oral intake of LWPC are possibly due to heat-unstable peptide fragments. To elucidate the mechanism of LWPC's function, we compared the transcriptome in colons by DNA microarray. The results of microarray analysis revealed oral intake of LWPC results in the enhanced expression of genes related to immunogloblin mediated immune responses in colon.

whey, colitis, microarray

講演番号：2A22p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ A 校舎 22 会場

豆乳の乳酸菌発酵物 PS-B1 摂取によるアレルギー抑制 －皮膚炎アレルギーモデルマウスを用いて－
Evaluation of anti-allerginic effects of oral supplemention with fermented soybean milk using lactic acid bacteria

○三浦 良子[1]、深澤 昌史[2]、照屋 雄一[2]、川久保 美穂[2]、藤本 京子[2]、野嶽 勇一[2]、榊原 隆三[2] ([1]（株）バイオジェノミクス、[2]長崎国際大・薬)
○ Ryoko MIURA[1], Masashi FUKASAWA[2], Yuichi TERUYA[2], Miho KAWAKUBO[2], Kyoko FUJIMOTO[2], Yuichi NODAKE[2], Ryuzo SAKAKIBARA[2] ([1]BIOGENOMICS CO.,LTD, [2]Nagasaki intl.Univ. Department of Pharmacy)

アレルギー罹患者数は年々増加の傾向を辿り、現在では 3 人に 1 人が何らかのアレルギー疾患に悩まされているとさえ言われていることから、アレルギーの予防・改善を目的とした食品の応用研究が脚光を浴びている。我々はヒト常在乳酸菌の複合培養より調製した豆乳の乳酸菌発酵物 PS-B1 が示す有用作用の解析に取り組んでおり、これまでに PS-B1 がガン細胞増殖抑制作用、肝保全作用等、多岐にわたる生理作用を有することを明らかにしてきた。今回、PS-B1 がアレルギー性皮膚炎に対して抑制作用を示すことが示唆される実験結果を得たので、これを報告する。

まず、4 週齢の BALB/c 雄性マウスの両耳介にアセトン溶解ジニトロフルオロベンゼン（DNFB）を週 2 回塗布し、典型的な接触性皮膚炎の症状を呈するアレルギー性皮膚炎を誘導した。マウスの耳介の肥厚化をアレルギー症状の指標とし、DNFB 感作の 24 時間後に耳介の厚みを測定し、その変化を追跡した。飼育期間中は通常飼料あるいは PS-B1 を含有する飼料を摂取させ、感作開始から 52 日目に血液、耳介、脾臓、腸管を回収した。次いで、①ELISA による血中 IgE の定量、②定量的 RT-PCR による各種サイトカインおよび炎症性メディエータータンパク質の耳介、脾臓における発現変動の検出、③腸管内のパイエル板数の計測、の 3 つの実験を実施した。

その結果、通常飼料摂取群と比較して、PS-B1 含有飼料摂取群では皮膚炎モデルマウスの耳介の肥厚化に 10%程度の抑制が見られ、PS-B1 の摂取がアレルギー症状の抑制に有効であることが示唆された。また、PS-B1 含有飼料摂取群では、慢性皮膚炎部位において局所的に高発現となる IL-13、ペリオスチン、および TSLP mRNA の発現量が抑制されていた。さらに、血中 IgE 量や脾臓における Th2 型サイトカイン（IL-4）量も同様に減少していたことから、PS-B1 摂取が全身レベルにおいてもアレルギーの抑制に機能することが示唆された。

一方、PS-B1 含有飼料摂取群において、パイエル板数が有意に増加していることが見出された。本実験では PS-B1 をマウスに経口摂取させていることから、PS-B1 が示したアレルギー抑制作用の機序の一つとして腸管免疫の関与が挙げられる。今後、PS-B1 が腸内細菌叢およびパイエル板組織に対して及ぼす影響について検討する。

Lactic acid bacteria, Allergy, Peyer's Patch

講演番号：2A22p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ A 校舎 22 会場

マウススギ花粉症モデルにおける殺菌および生菌ビフィズス菌の効果

Effects of the oral administration of heat-killed and viable bifidobacteria on the pathophysiology of Cryj1 induced pollinosis in mice.

○渡辺 卓巳[1]、坂野 綾子[1]、高橋 源司[2]、李 貞範[2]、林 京子[2] ([1]コンビ株式会社、[2]富山大院薬)
○ Takumi WATANABE[1], Ayako SAKANO[1], Genji TAKAHASHI[2], Jung-bum LEE[2], Kyoko HAYASHI[2] ([1]Combi Corp., [2]Toyama Univ.)

【目的】スギ花粉症は、多くの人達を悩ますアレルギー疾患であり、その予防・治療対策には大きな関心が寄せられている。ビフィズス菌は、整腸効果や抗肥満作用だけでなく、抗アレルギー作用など様々な生理効果が期待でき花粉症に対しても有効な報告がなされている。そこで、我々は健康な母乳栄養児の糞便から *Bifidobaterium longum* BR-108 株（以下 BR-108）を単離し殺菌菌体化した。この BR-108 殺菌菌体が、生菌と同様に抗アレルギー作用を保持しているのかを、マウススギ花粉症モデルを用いた花粉症治療効果の評価によって検証した。
【方法】BALB/c マウス（雌、6-8 週齢）に、花粉由来アレルゲン（Cryj1, 10μg/mouse）＋ adjuvant（0.2ml/mouse）を 0d, 7d, 14d に皮下注射し、その後 21d - 27d の間、毎日、1 日 1 回、アレルゲン（2μg/20μl/mouse）を経鼻投与した。試料は殺菌ビフィズス菌（BR-108 殺菌菌体）および生菌ビフィズス菌（生菌剤）を用い、初回のアレルゲン投与の 7 日前より 27 日後（合計 35 日間）まで、1 日 2 回（am9,pm6）、投与量が 2.0×10^9 bacteria/day になるように調製し、強制経口投与した。最終日（アレルゲンの初回注射 27d 後）に、アレルゲン経鼻投与直後のアレルギー症状（鼻掻き行為）を記録し、その後に採血して、血清中の総 IgE 量および Cryj1 特異的 IgE 量、組織のサイトカイン遺伝子発現量を測定した。
【結果】鼻掻き行為は、アレルゲンの局所投与後の 5 分間以内に頻発し、その後は急速に減少した。そこで、投与後 5 分間の鼻掻き行為の回数を測定したところ、Control 群（蒸留水のみ投与した群）と比較して BR-108 殺菌菌体投与群と生菌剤投与群はいずれも、有意に低かった。また、血清中の総 IgE 量も、Control 群に比べて BR-108 殺菌菌体投与群および生菌剤投与群では有意に回数が低かった。Cryj1 特異的 IgE 量も、ビフィズス菌投与によって低下した。現在、組織中のサイトカイン遺伝子発現量の解析を進めている。
【考察】マウススギ花粉症モデルに対する BR-108 殺菌菌体の経口投与の効果を検証した結果、Control 群と比較して鼻症状が有意に抑制されたが、これは、血清中の IgE 産生量減少を反映していると考えられる。特に血清中の総 IgE 量は、BR-108 殺菌菌体投与群が、生菌剤投与群より有意に低値を示していた。以上のことから、BR-108 殺菌菌体の経口摂取はスギ花粉症の症状緩和に有用であることが示唆された。また、殺菌菌体も生菌同様の作用が確認できたことから、生菌ビフィズス菌の抗アレルギー作用は殺菌菌体においても保持されていると推察される。

bifidobacteria, pollinosis, heat-killed

講演番号：2A22p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ A 校舎 22 会場

低酸素環境下における免疫細胞の挙動解析とプロバイオティクスの抗炎症効果

Analysis of immune cells and anti-inflammatory evaluation of probiotics in a hypoxia environment

○荻田 佑[1,2]、宮本 潤基[1]、鈴木 卓弥[1]、田辺 創一[1]([1]広大院生物圏、[2]日本学術振興会)
○Tasuku Ogita[1,2], Junki Miyamoto[1], Takuya Suzuki[1], Soichi Tanabe[1] ([1]Hiroshima Univ, [2]JSPS)

【目的】Th17 は、炎症性腸疾患などの自己免疫疾患の発症と増悪に関与するヘルパーT 細胞（Th 細胞）である。炎症組織では、血管形成異常や炎症性細胞の活性酸素産生による酸素の大量消費により、酸素の供給が不安定となることから、健常時の 5～7%酸素から、炎症組織局所は 1%以下の低酸素状態に陥る。我々は、1%酸素濃度下で腸間膜リンパ節細胞（MLN）を培養すると、低酸素下で誘導され Th17 分化や炎症応答に関与する低酸素誘導因子-1α（hypoxia inducible factor-1α：HIF－1α）の発現が著しく増加することを見出している。そこで、1%酸素濃度下での免疫細胞割合変化を調べ、低酸素下における炎症応答メカニズムを検討するとともに、プロバイオティクスの抗炎症効果を評価した。
【方法】(実験 1)BALB/c マウス(♀, 6 週齢)から MLN を調製した。MLN を 1%酸素濃度下、anti-CD3/CD28 存在下で 24 時間培養し、炎症性免疫細胞割合、生存率および抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2 の発現をフローサイトメトリーで解析した。
（実験 2）1%酸素濃度下で MLN を 24 時間培養後、21%酸素濃度に変えて（酸素の再曝露）、TGF-βと IL-6 存在下で 48 時間培養し、Th17 割合をフローサイトメトリーで解析し、培地中の IL-17 濃度を ELISA で測定した。さらに、本評価系にプロバイオティクスを添加し、抗炎症性を評価した。
【結果】（実験１）1%酸素濃度下では $ROR\gamma t^+$ $CD4^+$（Th17）割合が有意に増加し、一方、$Foxp3^+$ $CD4^+$（制御性 T 細胞: Treg）割合は有意に減少した。さらに、$CD86^+$ $CD11c^+$ 細胞（炎症性樹状細胞）と $CD11b^+$ $CD11c^+$ 細胞（Th17 型樹状細胞）割合は有意に増加したが、$CD103^+$ $CD11c^+$ 細胞（抗炎症樹状細胞）割合は減少した。これは、炎症性腸疾患患者の腸管炎症組織における免疫細胞の挙動と類似していた。また、1%酸素濃度下での培養は 21%酸素濃度下での培養と比較し、免疫細胞の生存率を有意に増加させ、炎症性樹状細胞における Bcl-2 の発現も有意に増加させた。（実験２）MLN を酸素に再曝露すると、Th17 からの IL-17 産生が上昇した。酸素を再曝露する実験系（1%→21%酸素）に *Bifidobacterium longum* を供したところ、21%酸素下で見られた Th17 抑制効果が減弱した。
【考察】低酸素下における生存率上昇および Bcl-2 の発現亢進から、低酸素下では樹状細胞の TLR 発現割合やサイトカイン産生応答が変化することにより、炎症性樹状細胞の生存が長期に維持され、慢性的な炎症応答を起こすことが示唆された。炎症組織局所を模した 1%酸素濃度下での MLN の培養は、Th17 抑制効果に着目した、より生体炎症組織環境に近い、抗炎症効果評価系であると考えられる。また、本研究で構築した評価系を用いることは、複雑な生体における炎症メカニズムの解明に繋がるとともに、抗炎症効果のあるプロバイオティクスをより正確に選抜できると期待される。

hypoxia, Th17, probiotics

講演番号：2A22p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ A 校舎 22 会場

腸内共生菌が小腸・大腸の腸管関連リンパ組織の発達や免疫応答に強く関与する
Intestinal commensal bacteria induce immunomodulatory responses and the development of the gut-associated lymphoid tissue in the small or large intestine

○鈴木 誠[1]、細野 朗[1]、鴨井 大樹[1]、八村 敏志[2]、高橋 宜聖[3]、百瀬 愛佳[4]、平山 和宏[4]、伊藤 喜久治[4]、高橋 恭子[1]、上野川 修一[1]([1]日大生資科・食品生命、[2]東大院農生科・食の安全研セ、[3]感染研・免疫、[4]東大院農生科・獣医)
○Makoto Suzuki[1], Akira Hosono[1], Daiki Kamoi[1], Satoshi Hachimura[2], Yoshimasa Takahashi[3], Yoshika Momose[4], Kazuhiro Hirayama[4], Kikuji Itoh[4], Kyoko Takahashi[1], Shuichi Kaminogawa[1] ([1]Department of Food Bioscience and Biotechnology, Nihon University, [2]Research Center for Food Safety, Graduate School of Agricultural and Life Science, The University of Tokyo, [3]Department of Immunology, NIID, [4]Department of Veterinary Public Health, Graduate School of Agricultural and Life Science, The University of Tokyo)

【目的】腸内共生菌の多くは大腸部位に存在し、腸管関連リンパ組織の形成や IgA 産生に影響を与えている。生体にとって本来は異物である腸内共生菌が、免疫系によって完全に排除されることなく大腸内に共生できることから、大腸における免疫系と腸内共生菌との相互作用を解明することは非常に重要であると考えられる。大腸部位には、小腸パイエル板と類似した構造を持つ盲腸リンパ節、結腸リンパ節が存在するが、その組織の発達や機能についてはパイエル板ほど詳細な研究は行われておらず、不明な点も多い。そこで本研究では、腸内共生菌が腸管部位ごとに異なる環境において、免疫系は腸内共生菌とどのように相互作用しているのかを解明することを目指した。つまり、大腸および小腸の腸管関連リンパ組織に注目し、部位の違いによるリンパ組織形成や免疫応答に与える影響を調べるため、腸内共生菌のいない無菌マウスや特定の菌のみを定着させたノトバイオートマウスを用いて、腸内共生菌による免疫系への修飾作用を解析した。
【方法】BALB/c マウスについて、通常マウス及び無菌マウスより小腸パイエル板、盲腸リンパ節、結腸リンパ節を採取してそれぞれ細胞を調製し、マウス腸内細菌から分離されたグラム陰性菌の *Bacteroides acidifaciens* type A43 (BA)、グラム陽性菌の *Lactobacillus johnsonii* 129 (LJ)の加熱死菌体との共培養を行った（7 日間)。そして、培養上清中の総 IgA 量を ELISA で測定した。また、通常マウス及び無菌マウス、及び無菌マウスに BA を経口投与して 6 週間飼育した BA マウスを 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で還流固定し、結腸リンパ節凍結切片を作製し、免疫組織学的な検討を行った。
【結果・考察】腸内共生菌の存在しない無菌マウスにおいては、小腸パイエル板や盲腸リンパ節の組織のサイズは小さく、細胞数も著しく少ないのに対し、結腸リンパ節は通常マウスと比較してあまり大きな差は見られなかった。通常マウス、無菌マウス共に *Lactobacillus* よりも *Bacteroides* による菌体刺激の方が高い IgA 産生を誘導する傾向がみられた。また、無菌マウスでは腸管関連リンパ組織の胚中心形成が観察されないのに対して、*Bacteroides* を単独定着させた BA マウスでは小腸パイエル板、盲腸リンパ節、結腸リンパ節においていずれも胚中心の形成が観察された。以上より、大腸リンパ組織の細胞については菌体に対する IgA 産生応答が *Lactobacillus* よりも *Bacteroides* の菌体刺激の方が反応性が高く、さらに *Bacteroides* が腸管免疫系の組織形成や免疫応答に強く影響を与えていることが示唆された。

IgA, *Bacteroides*, *Lactobacillus*

講演番号：2A22p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ A 校舎 22 会場

難消化性デキストリンは腸内環境の変化を介して腸管免疫を亢進する

Resistant maltodextrin up-regulate intestinal immunological response through the change of enteric environment

○宮里 祥子[1]、岸本 由香[1]、高橋 恭子[2]、細野 朗[2]、上野川 修一[2]([1]松谷化学工業、[2]日大・生資科)
○Shoko MIYAZATO[1], YUuka KISHIMOTO[1], Kyoko TAKAHASHI[2], Akira HOSONO[2], Shuichi KAMINOGAWA[2] ([1]Matsutani Chemical industry Co., Ltd., [2]Nihon Univ.)

【目的】 難消化性デキストリンはトウモロコシでん粉に由来する水溶性の食物繊維であり、整腸作用を有するプレバイオティクス素材としてよく知られており、食後血糖上昇抑制作用や中性脂肪低下作用などの生体調節機能を有している。一方、他の発酵性糖質で報告されているような腸管免疫に及ぼす影響については未解明であった。本試験では、難消化性デキストリンの摂取が腸管免疫に及ぼす影響および腸管の部位による免疫応答の差異と腸内環境の変化を、マウスを用いて検討した。
【方法】 実験１： 7 週齢の BALB/c 雌性マウスを 3 群に分け、難消化性デキストリンを 0%、5%もしくは 7.5%含有する飼料でそれぞれ 4 週間飼育した。飼育 1、2 および 4 週目に解剖により腸管を採取し、腸内容物中の総 IgA を測定した。同時に採取した小腸パイエル板細胞は LPS またはコンカナバリン A を添加して共培養し、得られた上清中の総 IgA 量およびサイトカイン量を測定した。また、解剖前 24 時間の糞便を採集し糞便中総 IgA を測定した。
実験２： 実験 1 と同様の飼料で 2 週間飼育した BALB/c マウスから、飼育 1 週目および 2 週目に腸管を摘出し、小腸、盲腸、結腸の各粘膜組織の総 IgA 産生量を測定した。また、盲腸内容物中の pH および有機酸を測定した。
【結果および考察】 実験１： 難消化性デキストリンの摂取により、腸内容物中および糞便中の総 IgA 量が用量依存的に増加した。腸管内容物中の総 IgA 量は対照群に比べ 7.5%摂取群が有意に高かった。パイエル板細胞の IgA および IL-12p40 産生量は、難消化性デキストリンの摂取用量に依存して高くなる傾向があり、給餌開始から 2 週目までに顕著な免疫応答の変化がみられた。以上より、難消化性デキストリンの摂取は腸管免疫系応答を活性化し IgA 分泌を増加させることが示唆された。
実験２： 小腸および結腸粘膜中の総 IgA 量は各群間で有意な差は認められなかったが、盲腸粘膜中の総 IgA 量は 7.5%難消化性デキストリン摂取群の 2 週目において、対照群と比べ有意に高かった。盲腸内容物中の有機酸量は難消化性デキストリン摂取により有意に増加し、pH は有意に低下した。摂取 1 週目ではコハク酸および n-酪酸が、摂取 2 週目ではコハク酸が有意に増加した。また、乳酸およびプロピオン酸も、難消化性デキストリン摂取により増加する傾向が見られた。これらの結果から、難消化性デキストリン摂取による腸管免疫系応答の亢進は、難消化性デキストリンが盲腸内の腸内細菌によって資化されておこる腸内環境の変化が強く関与していることが示唆された。

Resistant maltodextrin, intestinal immunity, cecal fermentation

講演番号：2A22p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ A 校舎 22 会場

カルノシン経口投与による小腸粘膜における IgA 産生亢進効果

Promotive effect of oral carnosine administration on IgA production in small intestinal mucosa

○内田 順也、清水 誠、戸塚 護（東大院農生・応生化）
○Junya UCHIDA,Makoto SHIMIZU,Mamoru TOTSUKA (Department of Applied Biological Chemistry, The University of Tokyo)

【目的】腸管は栄養素の消化吸収の場であると同時に、生体異物に対する防御機構として腸管免疫系を発達させている。腸管免疫系では粘膜固有層でB細胞が産生する免疫グロブリンA（IgA）が重要な役割を果たしている。これまでの研究により、食品由来ジペプチドであるカルノシンがマウス腸管上皮細胞のToll様受容体（TLR）リガンド刺激によって誘導されるインターロイキン-6分泌を増強することを明らかにしており、粘膜固有層のIgA産生量を増強する効果が示唆された。そこで、本研究では、カルノシンをマウスに経口投与した時の、小腸粘膜におけるIgA産生に対する効果を検討した。

【方法】BALB/cマウスに0.5%カルノシンを含む飲用水を2週間自由摂取させた後、小腸を取り出した。小腸を切り開き、小腸粘膜をカバーガラスによりそぎ取って回収した。それをホモジナイズして遠心した後、上清に含まれるIgA量をELISA法により測定した。また、粘膜固有層リンパ球（LPL）におけるナイーブB細胞（$IgA^{-}B220^{+}$細胞）およびIgA産生形質細胞（$IgA^{+}B220^{-}$細胞）の割合の変化を、フローサイトメトリーにより解析した。

【結果】カルノシンの経口投与は、マウス小腸粘膜でのIgA量を有意に増加させた。また、粘膜固有層リンパ球におけるナイーブB細胞とIgA産生形質細胞の割合をともに有意に増加させた。以上の結果から、カルノシンが粘膜固有層中のB細胞を増加させることにより小腸粘膜中のIgA量を増加させていることが考えられ、カルノシンが腸管粘膜免疫を増強する効果を有することが示唆された。

Carnosine, Iga

講演番号：2A22p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ A 校舎 22 会場

複数の TLR 刺激を受けたパイエル板樹状細胞における応答抑制の解析

Suppression of responses via multiple TLR stimulation in Peyer's patch dendritic cells

○上滝 隆太郎[1,2]、輪島 隼一[1,2]、塩河 亜弥[1,2]、八村 敏志[1,2] ([1]東大院農生科・応生化、[2]東大院農生科・食の安全研セ)
○Kotaki Ryutaro[1,2], Shun-ichi Wajima[1,2], Aya Shiokawa[1,2], Satoshi Hachimura[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [2]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo)

【目的】 樹状細胞 (dendritic cells; DCs) は Toll 様受容体 (Toll-like receptors; TLRs) を介して微生物によって刺激を受け、様々なサイトカインを産生することで免疫応答を制御している。TLRs は多くの微生物が共通して持っている微生物関連分子パターン (microbes-associated molecular patterns; MAMPs) を認識する。現在までそれぞれの TLR 刺激に対する応答性についてはかなり研究が進んでいる。しかし生体内において微生物は複数の MAMPs によって異なる TLRs を同時に刺激すると考えられる。このような複数の TLRs の同時刺激による相互作用についてはまだ不明な部分が多い。当研究グループは常に多くの共生細菌が存在している腸管免疫系に着目し、小腸パイエル板 (PP) DCs において TLR9 リガンド (CpG oligo DNA; CpG) 単独刺激によって惹起される *Il12b* および *Il27* 発現が TLR2 リガンド (Pam_3CSK_4; P3C および lipoteichoic acid; LTA) との同時刺激で抑制されることを見出した。これら遺伝子は免疫系において主に T 細胞分化誘導などに働く IL-12 ファミリーサイトカインの遺伝子である。このような抑制は IL-12, IL-23 といったタンパク質レベルにおいても観察された。これらのことから複数の TLRs 刺激には単なる相加・相乗的な相互作用のみではなく、抑制的に働く相互作用も存在することが示された。このような抑制的相互作用は生体内において過剰な免疫応答を防ぐ役割を果たしていると考えられる。そこで本研究では、このような他の TLRs 刺激による応答に対して抑制的に働く TLR について調べた。

【方法】 BALB/c マウス PP から MACS 法により $CD11c^+$ 細胞を DCs として精製した。TLR1-9 の各リガンド全てもしくはそれらから 1~数種類ずつ除いたものによる同時刺激を加えて 12 h 培養した後、定量 RT-PCR により *Il12b* の mRNA 発現量を解析し、刺激から除外されることによって *Il12b* 発現が上昇するような TLR リガンドが抑制的なものであると考えこれを探索した。また、これまで見られてきた TLR2 リガンドによる抑制作用が他の TLR 刺激からどのような影響を受けるのか調べた。

【結果】 PP DCs の *Il12b* 発現は複数のリガンドのうち TLR5 リガンド (flagellin) を除外することで上昇した。このことから、TLR5 が他の TLR 応答によって誘導される *Il12b* 発現を抑制する働きをもつことが示唆される。また、これまでの研究で見られていた P3C と CpG の同時刺激による CpG 刺激依存的 *Il12b* 発現の抑制は、さらに TLR4 リガンド (lipopolysaccharide; LPS) 刺激を加えることにより解除され *Il12b* 発現が上昇していた。これらの結果から、複数の TLRs を介した応答が複雑に相互作用することによって共生細菌や病原性微生物に対する免疫応答が制御されていることが示唆される。

dendritic cells, Toll-like receptors, Peyer's patch

講演番号：2A22p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ A 校舎 22 会場

腸内共生菌がマスト細胞の終末分化に及ぼす影響
Effect of intestinal commensal bacteria on terminal differentiation of mast cells.
○伊藤 朋子[1]、高橋 恭子[1]、笠倉 和巳[1,2]、伊藤 喜久治[3]、百瀬 愛佳[3]、細野 朗[1]、上野川 修一[1]([1]日大生資、[2]順天堂院医、[3]東大農生)
○Tomoko ITO[1], Kyoko TAKAHASHI[1], Kazumi KASAKURA[1,2], Kikuji ITOH[3], Yoshika MOMOSE[3], Akira HOSONO[1], Shuichi KAMINOGAWA[1] ([1]NUBS, [2]Juntendo Univ., [3]U.Tokyo)

【目的】マスト細胞は、アレルギー炎症を誘導する細胞として知られる一方で、感染防御においても重要な役割を果たしていることが報告されている。マスト細胞は骨髄中で幹細胞から分化し、未成熟な細胞として血中に放出され、定着した末梢組織で終末分化を遂げて成熟する。したがって、マスト細胞の機能は、終末分化・成熟を遂げる組織の環境の影響を受けて決定される。腸管には多くの腸内細菌が存在しており、これらの腸内細菌がマスト細胞の終末分化に影響を及ぼしている可能性が示唆される。本研究では、腸内細菌がマスト細胞の終末分化および機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】野生型及び MyD88$^{-/-}$マウスの骨髄細胞を IL-3 含有培地で 3 週間培養し、未成熟な骨髄由来マスト細胞（BMMC）を得た。その後 2 週間の BMMC の成熟期間中、*Lactobacillus casei* JCM1134(LA)及び *Bacteroides acidifaciens* type A43(BA)で 2 日おきに刺激し、マスト細胞の機能に及ぼす影響を評価した。アレルギー炎症のエフェクター機能として顆粒形成及び IgE/抗原刺激による脱顆粒反応を、感染防御機能として微生物刺激に対する MIP-2 産生を評価した。さらに、LA 及び BA での刺激が転写因子のmRNA 発現に及ぼす影響を評価した。脱顆粒の測定は、β-hexosaminidase の放出量を指標に、顆粒形成はトルイジンブルー染色で評価した。MIP-2 産生は、BMMC を微生物加熱死菌体の存在下で培養して得た上清中の濃度を ELISA により測定した。mRNA 発現は、定量 RT-PCR により測定した。また、ウィルスベクターを用いた C/EBPα の誘導発現系を構築し、BMMC における過剰発現試験を行った。
【結果・考察】BMMC の成熟過程における LA・BA での刺激により、ともに脱顆粒反応が MyD88 非依存的に抑制された。一方、LA での刺激は MyD88 依存的に顆粒形成の減少および転写因子 C/EBPα の発現上昇を引き起こしたが、BA での刺激はこれらに影響を及ぼさなかった。また、LA での刺激により微生物刺激に対する MIP-2 の産生が低下したが、BA での刺激では顕著な作用は認められなかった。さらに、C/EBPα を過剰発現させた BMMC において顆粒形成の減少が観察された。一方、この BMMC において微生物刺激に対する MIP-2 産生は増加していた。よって、成熟過程における腸内細菌の刺激によりマスト細胞のアレルギー炎症のエフェクター機能と感染防御機能がともに変化すること、また、腸内細菌の種類によってその影響が異なることが示された。さらに、これらの作用のうち顆粒形成の減少は転写因子 C/EBPα の増大によるものであり、その他の作用は別の経路を介するものであると考えられた。

mast cell, C/EBPα, commensal bacteria

講演番号：2A22p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ A 校舎 22 会場

有機酸によるマウスα-ディフェンシン 5 遺伝子の発現調節
Regulation of Mouse α-Defensin 5 Gene Expression by Organic Acids
○栗原 健太、高橋 恭子、杉 由高、中野 興、細野 朗、上野川 修一（日大・生資）
○Kenta Kurihara, Kyoko Takahashi, Yutaka Sugi, Kou Nakano, Akira Hosono, Shuichi Kaminogawa (Nichidai)

【目的】ヒトの腸内には数百種類以上100兆個以上の腸内細菌が共生し腸内細菌叢を構成している。この腸内共生菌は宿主細胞と相互作用し健康や疾患と密接に関係していると言われているが詳細なメカニズムは十分明らかにされていない。腸管の管腔と体内を隔てる上皮細胞はα-ディフェンシンをはじめとする抗菌ペプチドを産生し、これらの抗菌ペプチドは病原菌の侵入を防ぐのみでなく腸内細菌叢の維持にも関わっている。我々は、α-ディフェンシン5の発現が小腸上皮細胞では共生菌によりMyD88依存的に増大するのに対し、大腸上皮細胞では共生菌によりMyD88非依存的に抑制されること、α-ディフェンシン5遺伝子の5’領域がヒト腸管上皮細胞株Caco-2で転写活性化能示すことを報告している。本研究では、腸管上皮細胞株を用いたモデル系を用いα-ディフェンシン-5遺伝子の発現に対する腸内共生菌の作用とその機構を明らかにすることを目的とした。
【方法】マウスα-ディフェンシン5遺伝子の開始コドン上流1033bp、827bp、621bp、415bp、209bpをそれぞれ挿入したルシフェラーゼレポータープラスミドを構築した。構築したプラスミドをCaco-2細胞に導入し、一過性の発現試験を行った。また、腸内細菌の代謝産物であるプロピオン酸、酪酸、乳酸を添加しα-ディフェンシン5遺伝子5’領域の転写活性化能に及ぼす影響を評価した。さらに、モノカルボン酸トランスポーター(MCT)の阻害剤であるα-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸(α-CHCA)を添加して同様のレポーターアッセイを行った。
【結果】様々な長さの5’領域をそれぞれレポーターアッセイに供した結果、(-827/-621)bpと(-415/-209)bpに転写活性化エレメントが、(-621/-415)bpに転写抑制エレメントが存在することが示唆された。また、腸内細菌代謝産物として用いたプロピオン酸、酪酸、乳酸すべて9mMの濃度でα-ディフェンシン5遺伝子5’領域の転写活性化を抑制した。なかでも、乳酸に最も強い抑制作用が認められた。開始コドン上流209bp の5’領域に対しても乳酸は抑制作用を示したことから、乳酸に対する応答配列が開始コドン上流209bp内に存在する可能性が示された。また、阻害剤α-CHCA添加ではα-ディフェンシン5遺伝子5’領域の乳酸による発現抑制は阻害されなかったことから、乳酸による抑制機構はMCT以外の経路を介する事が示された。これらの結果から、大腸上皮細胞で観察される、共生菌によるMyD88非依存的なα-ディフェンシン5遺伝子の発現抑制に、共生菌が産生する有機酸による開始コドン近傍のエレメントを介した転写抑制が関わっていることが示唆された。また、さらに上流の転写活性化あるいは抑制エレメントを介して共生菌が作用する可能性も考えられる。

Intestinal epithelial cell, Commensal bacteria, α-defensin

講演番号：2A22p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ A 校舎 22 会場

褐藻サガラメ M/C 抽出物の脂溶性画分から単離した抗アレルギー性成分
Anti-allergic component of lipophilic fraction from M/C extract of *Eisenia arborea* (brown alga)

○杉浦 義正[1]、勝崎 裕隆[2]、今井 邦雄[2]、田中 竜介[1]、松下 映夫[1] ([1]水大校 食品科学、[2]三重大院 生資)
○Yoshimasa SUGIURA[1], Hirotaka KATSUZAKI[2], Kunio IMAI[2], Ryusuke TANAKA[1], Teruo MATSUSHITA[1] ([1]National Fisheries Univ., [2]Mie Univ.)

【目的】演者らはこれまで、水産物由来の抗アレルギー食材として褐藻サガラメに着目して研究を進めてきた。その中で、メタノール／クロロフォルム（M/C）抽出物の水溶性画分より抗アレルギー性成分として海藻ポリフェノール（フロロタンニン）類を単離・同定している[1)]。一方、M/C 抽出物の脂溶性画分をシリカゲルクロマト分画して得たアセトン溶出物にも抗アレルギー性を認めた[2)]が、その有効成分については未解明であった。

今回は、サガラメ M/C 抽出物の脂溶性画分アセトン溶出物に含まれる有効成分を単離・同定したので、その抗アレルギー効果も含めて報告する。

【方法】①有効成分の分離分画：サガラメの M/C 抽出物を蒸留水との間で溶媒分配して得た脂溶性画分を試料とした。その画分をシリカゲル（Wako gel C-300）カラム精製に付し、ヘキサンおよびクロロフォルムで洗浄後、アセトンで溶出した。得られたアセトン溶出物を逆相 ODS（Fuji Silysia, Chromatorex）精製に供し、水－アセトニトリル系溶媒で段階溶出した。得られた各画分のリポキシゲナーゼ（LOX）阻害活性を測定し、活性物質精製の指標とした。②構造解析：有効性が確認できた画分より単離した物質については、LC-MS、^{1}H-および ^{13}C-NMR によるスペクトル解析により、構造解析した。③単離物質の抗アレルギー性評価：LOX 阻害活性に加え、炎症反応に関わる生体内酵素（ホスホリパーゼ A_2（PLA_2）、シクロオキシゲナーゼ-2（COX-2））に対する阻害効果も調べた。

【結果】上記アセトン溶出物を逆相 ODS 簡易クロマトで分画し、得られた各画分を逆相 HPLC 分析した。その結果、40 %アセトニトリル溶出画分に大きなピークを認たため、これを分取して LOX 阻害活性測定したところ、濃度依存的に有効性を認めた。そこでこのピークをスペクトル分析したところ、フロロタンニンの 1 種 dieckol と同定できた。ここで単離した dieckol の抗アレルギー性を評価するために、PLA_2 および COX-2 阻害活性も測定した。その結果、濃度依存的阻害活性を認めることができた。その活性強度は、LOX 活性阻害も含め、陽性対照の茶カテキン（エピガロカテキンガレート, EGCg）と同等かそれ以上であった。

現在、単離された dieckol について、炎症性酵素ヒアルロニダーゼに対する活性阻害試験や RBL-2H3 細胞を用いた脱顆粒抑制評価を用いた *in vitro* の系およびマウス耳介浮腫試験を用いた *in vivo* の系で、それぞれ抗アレルギー・抗炎症性を調べている。

1)*FFI ジャーナル*, **216**, p46, 2011. 2)*平成 24 年度日本水産学会秋季大会 講演要旨集*, p79, 2012.

Eisenia arborea, anti-allergy, phlorotannin

講演番号：2A22p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ A 校舎 22 会場

マスト細胞の脱顆粒に及ぼすレスベラトロールの影響
Effect of resveratrol on the degranulation in mast cells
○藤原 葉子[1]、日野 温子[1]、曽根 保子[1]、市 育代[1]、福原 潔[2]([1]お茶大院ライフサイエンス、[2]国立医薬品食品衛生研究所)
○Yoko Fujiwara[1], Atsuko Hino[1], Yasuko Sone[1], Ikuyo Ichi[1], Kiyoshi Fukuhara[2] ([1]Ochanomizu Univ., [2]NIHS)

【背景・目的】
近年、日本をはじめとする先進諸国で花粉症等のアレルギー疾患が増加している。即時性アレルギー反応は､抗原がマスト細胞の表面に発現しているIgE受容体に結合することでマスト細胞が脱顆粒し、顆粒からヒスタミン等の生理活性物質が放出されることによって引き起こされるため、脱顆粒を抑えることで、アレルギー反応の抑制が期待できる。Resveratrol （RSV）は葡萄果皮中に多く含まれるポリフェノールで、マスト細胞において抗原抗体刺激による脱顆粒を抑制することが報告されているが、その詳細な作用機序は解明されていない。本研究では、RSV とその水酸基の数や位置を変化させた数種の stilbene 誘導体を用いて、マスト細胞における脱顆粒抑制効果の比較と、その作用機序を検討した。
【方法】
ラット好塩基球性白血病細胞（RBL-2H3）を抗ジニトロフェニル（DNP）IgE 抗体で感作後、抗原として牛血清アルブミン（DNP-BSA）で刺激し脱顆粒反応を誘導した。その後、脱顆粒の指標として脱顆粒と共に放出されるβ-hexosaminidase の遊離率や、細胞内 Ca^{2+}濃度を測定した。同様に、カルシウムイオノフォア A23187 により細胞内にCa^{2+}を流入させ脱顆粒を誘発した際のβ-hexosaminidase 遊離率を測定した｡抗酸化活性による寄与を検討するため､DPPH assayにより化合物が持つ抗酸化活性を、細胞への影響として抗原刺激時の細胞内ROS産生量をそれぞれ測定した。
【結果・考察】
RSV および 3 位に水酸基を有する stilbene 誘導体は有意な脱顆粒抑制作用を示した一方で､抗酸化活性や細胞内 ROS 産生抑制効果を持つ 4 位の水酸基のみを持つ stilbene 誘導体は脱顆粒率に影響を及ぼさなかった。このことから、RBL-2H3 における RSV の脱顆粒抑制作用にはその 3 位の水酸基が寄与しており、4 位の水酸基が持つ抗酸化活性による ROS 産生抑制は関与しないことが明らかとなった。また RSV および 3 位の水酸基を持つ誘導体は、抗原刺激に誘導される細胞内 Ca^{2+}濃度上昇や、カルシウム流入刺激による脱顆粒率も抑制した。以上のことから、RSV はマスト細胞の抗原刺激に応じた一連の反応において、複数の作用点によって脱顆粒抑制効果を示す可能性が示唆された。

mast cell, degranulation, resveratrol

講演番号：2A22p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ A 校舎 22 会場

Kaempferia parviflora 抽出画分の脱顆粒抑制作用の検討
Inhibitory effects on degranulation of fractions from *Kaempferia parviflora* extract in RBL-2H3 cells

○堀籠 悟[1]、吉田 泉[2]、津田 愛子[2]、原田 哲平[2]、永井 武[2]、山崎 久実子[2]、鈴木 美そら[2]、川本 康晴[2]、穏田 友子[2]、吉安 友二[2]、勝田 真一[2]、里山 俊哉[2]、山口 昭弘[2]、渡井 正俊[2]、広瀬 直人[3]、白川 仁[1]、駒井 三千夫[1]([1]東北大院農・栄養学、[2]日本食品分析セ、[3]沖縄県農研セ)
○Satoru HORIGOME[1], Izumi YOSHIDA[2], Aiko TSUDA[2], Teppei HARADA[2], Takeshi NAGAI[2], Kumiko YAMAZAKI[2], Misora SUZUKI[2], Yasuharu KAWAMOTO[2], Tomoko ONDA[2], Tomoji YOSHIYASU[2], Shin-ichi KATSUDA[2], Toshiya SATOYAMA[2], Akihiro YAMAGUCHI[2], Masatoshi WATAI[2], Naoto HIROSE[3], Hitoshi SHIRAKAWA[1], Michio KOMAI[1] ([1]Grad.Sch.Agri.Sci.,Tohoku Univ, [2]Japan Food Research Laboratories, [3]Okinawa Prefectural Agricultural Research Center)

【目的】*Kaempferia parviflora*は，黒ショウガとして知られるショウガ科の植物であり，日本ではサプリメントとして利用され，タイにおいては胃腸薬やスパイスとして伝統的に用いられている。我々はこれまで，黒ショウガに含まれている複数のメトキシフラボノイドのうち，5,7-dimethoxyflavone(DME)，5-hydroxy-3,7,3',4'-tetramethoxyflavone(TME)が，シークヮーサーの抗炎症成分であるノビレチン(Nob)を上回る強い脱顆粒抑制作用，炎症性サイトカイン類のmRNA発現抑制及びタンパク質分泌抑制作用を有し，作用機序の一つにIgE受容体シグナル伝達経路にあるERK1/2あるいはその上流のリン酸化シグナル伝達を抑制する可能性を確認した[1)]。今回，黒ショウガに含まれる脱顆粒抑制物質をさらに検索するために黒ショウガ抽出物を分画して得られた各フラクションについて脱顆粒抑制作用を調べた。
【方法】黒ショウガ粉末に 50%エタノールを加え，抽出した。抽出液を減圧濃縮後，水及びヘキサンで分配し，ヘキサン層を回収した。ヘキサン層を減圧濃縮後，シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した。得られた各フラクションを乾固し，DMSO に溶解し，ラット好塩基球性白血病細胞株 RBL-2H3 に分注後，抗原で刺激した。37℃で 3 時間反応後，反応後，培養上清を分取し，細胞を Lysis buffer で溶解した。細胞及び上清のβ-ヘキソサミニダーゼの放出量を吸光法にて測定した。放出率は細胞に対する上清の吸光度より求め，コントロールに対する放出率の割合を算出し，脱顆粒抑制作用を調べた。
【結果】今回得られた 7 フラクションのうち，6 フラクションにおいて 10～0.005μg/mL の範囲で濃度依存的な脱顆粒の抑制が認められた。また，脱顆粒抑制作用の強さとしては，カラム溶出順に作用が減弱する傾向がみられた。これらのフラクションに含まれる成分は現在解析中である。
1)日本食品科学工学会第 56 回大会(2009)ほか

degranulation

講演番号：2A22p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ A 校舎 22 会場

ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の作用解析及びマウス PCA 反応における効果

Studies on action mechanism of degranulation and effect in mouse PCA reaction

○森下 雄太[1]、齋藤 亜美[2]、代田 修[3]、黒柳 正典[4]、武藤 徳男[2] ([1]県広大院生命、[2]県広大生環、[3]徳文大香川薬、[4]静県大薬)
○Yuta MORISHITA[1], Ami SAITO[2], Osamu SIROTA[3], Masanori KUROYANAGI[4], Norio MUTO[2] ([1]Pref. Univ. Hiroshima, [2]Pref. Univ. Hiroshima, [3]Tokushima bunri Univ. Kagawa, [4]Pref. Univ. Shizuoka)

【目的】近年、アレルギー患者は増加の一途を辿っている。特に花粉症に代表される I 型アレルギーは、くしゃみや鼻水などの症状を呈し日常生活に支障をきたす。これまでに我々は脱顆粒抑制活性を指標として野菜等をスクリーニングした結果、ホウレンソウ（*Spinacia oleracea*）に強い脱顆粒抑制活性を見出し、その作用成分としてフラボノイドのグルクロン酸配糖体（SO-1）を単離・精製した。本研究では、ホウレンソウ由来 SO-1 とそのアグリコンの *in vitro* 及び *in vivo* における活性評価と、脱顆粒シグナル伝達を含めた作用解析を行った。
【方法】*In vitro* 試験では、ラット好塩基球性白血病細胞株（RBL-2H3 細胞）を使用し、細胞から放出されるβ-hexosaminidase 量を指標に脱顆粒抑制活性を評価した。SO-1 はホウレンソウの熱水抽出物から精製し、そのアグリコンは SO-1 をβ-glucuronidase により加水分解し、HPLC を用いて精製した。細胞内シグナル伝達については Western blotting によるシグナル分子の発現解析を行い、細胞内 Ca^{2+} 濃度については抗原抗体刺激下での変化を Fura 2-AM を用いて測定した。*In vivo* 試験では SO-1 とそのアグリコンを用い、雄性 ICR マウスの受動皮膚アナフィラキシー反応（PCR 反応）に対する影響を評価した。
【結果】RBL-2H3 細胞評価系において、SO-1 及びそのアグリコンは強い脱顆粒抑制活性を示し、IC_{50} はそれぞれ 0.97 μg/ml、0.51 μg/ml であった。脱顆粒シグナル伝達について Western blotting により解析を行ったところ、SO-1 では Lyn 及び Syk のリン酸化の抑制が認められた。また SO-1 のアグリコンについては、Syk のリン酸化の抑制が強く認められた。また抗原抗体刺激した際の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化に対して、SO-1 は 10、1 μg/ml で顕著な抑制を示し、さらにアグリコンはより低濃度の 0.1 μg/ml でも強い抑制を示した。これらのことから SO-1 及びそのアグリコンの作用経路は、Lyn や Syk の上流部、FcεRI への影響を介した細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇抑制による脱顆粒抑制であると示唆された。PCR 反応において、SO-1 は強い抑制効果を示し、またアグリコンに関しては 8.6 mg/kg で 100%抑制した。SO-1 のアグリコンは抗アレルギー剤であるオキサトミド（43 mg/kg（100 nmol/g）64%抑制）よりも強い抑制活性を示した。以上の結果からホウレンソウに含まれる SO-1 とそのアグリコンは脱顆粒に関わるシグナル伝達の上流部で作用していると示唆された。また *in vivo* での抑制が認められることから、SO-1 及びアグリコン摂取による抗アレルギー作用の有用性が示唆された。

Spinacia oleracea, degranulation, RBL-2H3

講演番号：2A22p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ A 校舎 22 会場

接触皮膚炎モデル動物実験系におけるザクロ果汁ポリフェノール濃縮物のアレルギー抑制効果

Polyphenol-rich concentrate of pomegranate juice reduces dinitorofluorobenzene-induced contact hypersensitivity

○長野 隆男[1]、伊東 秀之[2]、西田 典永[3]([1]川崎医福大臨床栄養、[2]岡山大院医歯薬、[3]森下仁丹)
○Takao Nagano[1], Hideyuki Ito[2], Norihisa Nishida[3] ([1]Kawasaki Univ. Med. Welfare, [2]Okayama Univ., [3]Morishita Jintan Co.)

【目的】エラジタンニン(ET)は，ザクロ，ラズベリー，くるみなどに含まれるポリフェノールの一種である。ET はそのままの形では吸収されず，腸内細菌によりエラグ酸を経て各種代謝物に変換されて生体内に吸収される。我々は，ラット由来の好塩基球（RBL-2H3）細胞株を用いて脱顆粒抑制試験をおこない，ET 代謝物は強い脱顆粒抑制効果を有することを見出した。この結果から，ET 代謝物は優れたアレルギー抑制効果を有する可能性が考えられる。そこで，ザクロ果汁から ET が主要な成分であるポリフェノール濃縮物(PJC)を調製し,接触皮膚炎のモデル動物実験系を用いて PJC のアレルギー抑制効果を検討した。
【方法】6 週齢雌 BALB/c マウスを用い，水の代わりに 0.2%PJC 水溶液を摂取させた PJC 摂取群（n=6）と水のみを摂取させたコントロール群（n=7）で実験をおこなった。まず，実験 0 日目に，マウスの背中の毛を剃り，毛を剃った部分に 0.5% dinitrofluorobenzene (DNFB)で感作をおこなった。実験 7 日目，14 日目に 0.15%DNFB を耳介部分にチャレンジし，その後の 1 日毎にマイクロメータを用いて耳介部分の厚みを測定して,アレルギー症状の程度を評価した。細胞内サイトカインの解析は,まず,マウスの脾臓からリンパ球細胞を取り出して，PMA とイオノマイシンで活性化をおこない，サイトカインの細胞内移動を阻害するモネオシン存在下で 5 時間培養した。培養した細胞をパラホルムアルデヒドで固定し，抗 CD4 抗体での標識，IL-4，IFN-γ に対する抗体でサポニンを利用した細胞内サイトカイン染色をおこない，フローサイトーメーターを使用して解析をおこなった。
【結果】実験 7 日目と 14 日目に DNFB をチャレンジした後の耳介部分の厚みを測定したところ，どちらもアレルギー反応によると考えられる厚みの増加が観察され，チャレンジした 1～2 日後に最も増加する結果となった。また，14 日目にチャレンジした方が耳介部分の厚みの増加は大きくなる結果であった。コントロール群と比較して PJC 摂取群は,14 日目に DNFB をチャレンジした 2 日後において，耳介部分の厚みの増加を有意に抑制した。次に，脾臓リンパ球細胞の細胞内サイトカイン解析をおこない,CD4 ポジティブ細胞で IFN-γ を産生する細胞と IL-4 を産生する細胞について調べた。その結果，コントロール群と比較して PJC 摂取群では，IFN-γ を産生する細胞数の増加がみられ，IFN-γ を産生する細胞と IL-4 を産生する細胞の比（Th1/Th2）が高くなる結果であった。以上の結果から，PJC には接触皮膚炎においてアレルギー抑制効果があり，その効果は動物体内に吸収された ET 代謝物が Th1 の方向に Th1/Th2 バランスを調節することが考えられた。

pomegranate, contact hypersensitivity, allergy

講演番号：2A22p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ A 校舎 22 会場

アレルギー性疾患モデルに対するチシャトウの効果
Effect of Lactuca sativa var.asparagina on allergic disease model in mice
○杉本 幸雄[1]、寺崎 実希[1]、河野 左知[1]、鈴木 杏奈[1]、土岐 敦美[1]、趙 秋娥[2]、松本 幸子[1]、伊東 秀之[1]([1]岡山大薬、[2]大森食品)
○Yukio SUGIMOTO[1], Miki TERASAKI[1], Sachi KOHNO[1], Anna SUZUKI[1], Atsumi TOGI[1], QUI E Zhao[2], Sachiko MATSUMOTO[1], Hideyuki ITO[1] ([1]Okayama Univ., [2]Ohmori Foods)

【目的】チシャトウは中国を中心に栽培され、日本でも一部の地方で自家栽培されてきたチシャ類（レタス、サラダナ）の一種である。チシャ類は、ケルセチンおよびルテオリン類の配糖体を含むことが知られており、これらのポリフェノールは抗アレルギー作用を有することが報告されている。しかし、チシャ類の抗アレルギー作用に関する検討はほとんど行われていない。そこで、本研究ではマウスのアレルギー性疾患モデルを用いて、チシャトウが抗アレルギー作用を有するか否かを検討し、アレルギー性疾患緩和食材としての有用性について検討した。
【方法】雌性 BALB/c 系マウスに卵白アルブミン（OVA)および水酸化アルミニウムゲルを感作 0 日目および 5 日目に腹腔内投与して全身感作を行った。その後、感作 14 日目から 21 日目まで OVA を反復して点鼻投与することによりアレルギー性鼻炎モデルを作製した。チシャトウ凍結乾燥品（茎部および葉部）はいずれも 0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁し、感作 0 日目から 1 日 1 回、抗原点鼻 1 時間前に経口投与した。抗原点鼻により惹起されるくしゃみ反応および鼻掻き行動の回数を指標として薬効評価を行った。また、マウスの背部皮膚にヒスタミン溶液もしくはサブスタンズＰ溶液を皮内注射することにより誘発される掻痒行動および血管透過性亢進反応に対するチシャトウ、レタス、キャベツおよびブロッコリー凍結乾燥品投与の効果についても検討した。
【結果】アレルギー性鼻炎マウスにおける感作 21 日目のくしゃみ反応および鼻掻き行動に対して、チシャトウ茎部投与群およびチシャトウ葉部投与群のいずれにおいても対照群と比較して有意な抑制作用が認められた。また、ヒスタミン誘発掻痒行動に対してレタス、キャベツおよびブロッコリーの凍結乾燥品を投与した群と比較して、チシャトウ茎部投与群およびチシャトウ葉部投与群ではより強い抑制作用が観察された。さらに、ヒスタミン誘発血管透過性亢進反応に対してチシャトウ茎部投与群は有意な抑制作用を示した。一方、サブスタンズＰ誘発掻痒行動に対してはチシャトウ投与による影響は認められなかった。
【考察】チシャトウの茎部および葉部にはアレルギー性鼻炎症状およびアレルギー性皮膚炎症状を抑制する成分が含有されていると考えられ、チシャトウはアレルギー性疾患の症状を軽減する食材となりうる可能性が示唆された。

Lactuca sativa var.asparagina, allergy, inflammation

講演番号：2A22p17
講演日時、会場：3 月 25 日 17:12～ A 校舎 22 会場

発芽ブドウ種子エキスの OVA 感作マウスにおけるアレルギー反応抑制作用

Anti-allergic effect of GGSE on OVA-sensitized mice

○近藤（比江森） 美樹[1,2]、藤倉 路子[2]、鈴木 麻希子[2]、村田 健二[3]、落合 孝次[4]([1]徳島文理大食物栄養、[2]岡山県大栄養、[3]カリフォルニア大デービス、[4]シードライフテック（株））
○Miki Hiemori-Kondo[1,2], Michiko Fujikura[2], Makiko Suzuki[2], Kenji Murata[3], Koji Ochiai[4] ([1]Tokushima Bunri Univ., [2]Okayama Pref. Univ., [3]California Univ. Davis, [4]Seed-Life Tech. Inc.)

【目的】食品由来のポリフェノールによる様々な機能性が注目されているが、なかでもブドウ種子は当該成分を豊富に含む食品素材の一つである。発芽ブドウ種子エキス(GGSE)は未発芽ブドウ種子エキスと比較して水溶性ポリフェノールを多く含有し、高い機能が期待される食品素材である。我々はこれまで、*in vitro* ならびに *in vivo* において GGSE の抗アレルギー作用を明らかにしてきた。昨年度の本大会では、食物アレルギーモデル動物であるオボアルブミン(OVA)感作マウスに対して、抗原刺激期間に GGSE を経口投与した際の免疫グロブンリン濃度に与える影響について報告した。本研究では、GGSE の投与時期を変更し、感作期間に GGSE を投与した際のアレルギー反応抑制効果について検討した。

【方法】OVA 感作マウスは、BALB/c マウス（6 週令、雌）に Day 1 と Day 15 に OVA 2 μg を水酸化アルミニウムとともに腹腔内に免疫して作製した。次いで、OVA 1 mg を Day 20 から Day 24 まで 5 日間連続してゾンデにて経口投与し、アレルギーを誘発した。この間、GGSE(125, 250, 500 mg/kg)を Day 1 から Day 19 まで 1 日おきに計 10 回経口投与した。Day 20 の抗原刺激開始前および Day 24 の最終抗原刺激後に尾静脈より採血し、最終的に Day 26 に解剖して全血液を採取した。Day 20, 24, 26 の血漿免疫グロブリン濃度（総 IgE、OVA 特異的 IgE、IgG 抗体のサブクラス）を ELISA 法により測定し、さらに、Day 24 の血漿ヒスタミン濃度を競合 ELISA 法により測定した。

【結果及び考察】GGSE(500 mg/kg)投与群は感作対照群に対して、Day 20, 24, 26 の血漿 OVA 特異的 IgE 抗体および IgG_1 抗体が有意に低値を示し、一方で IgG_{2a} 抗体濃度は高値を示した。さらに、Day 24 の血漿ヒスタミン濃度が有意に低値を示した。従って、GGSE は Th1 細胞を活性化して Th2 への免疫偏向を是正し、OVA 特異的 IgE 抗体の産生低下に伴う肥満細胞の脱顆粒反応の抑制を通してヒスタミンの放出量を低下させ、最終的にアレルギー反応を抑制することが示唆された。以上の結果は、GGSE を抗原刺激期間に投与した場合と比較して、明確なアレルギー反応抑制効果を示すものであり、GGSE の利用には感作期間からの摂取がより効果的であることが明らかになった。

germinated grape seed extract, anti-allergic effect, OVA-sensitized mice

講演番号：2A25a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ A 校舎 25 会場

食餌性鉄欠乏ラットにおける味嗜好性の変化

Analysis of taste preference on dietary iron deficient rats

○幸田 理恵、成川 真隆、山本 遼、岡田 晋治、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Rie KOHTA,Masataka NARUKAWA,Ryo YAMAMOTO,Shinji OKADA,Takumi MISAKA (Dept. Appl. Biol. Chem. , The Univ. Tokyo)

【目的】必須微量元素である鉄は、生体内においてヘモグロビンやミオグロビンの構成成分として存在し、酸素の運搬、保持に関与する。そのため、体内の貯蔵鉄が枯渇するとヘモグロビン濃度が低下し、貧血を呈する。一方、味を正しく知覚できなくなる味覚障害において、亜鉛の欠乏がその原因として重要視されているが、鉄欠乏に起因する味覚障害患者も多数報告されている。しかし、亜鉛欠乏性味覚障害と同様にその発症メカニズムはよくわかっていない。

そこで本研究では味覚障害における鉄の役割の解明を目指し、鉄欠乏ラットにおける味覚表現型を解析した。亜鉛欠乏ラットでは塩味に対する嗜好性が上昇することが知られているため、まず鉄欠乏ラットにおいても塩味に対する嗜好性が変化するかどうかを行動学的手法により測定した。さらに、塩味以外の基本味に対する嗜好性変化の有無も同様に検討した。

【方法】3 週齢 SD 系雄性ラットをコントロール食（Cnt）群、ペアフィーディング（PF）群、鉄欠乏食（FeD）群に分けた。1 週間の予備飼育の後、通常粉末食もしくは鉄欠乏粉末食で 3 週間飼育した。飼育期間中、体重および摂食量、摂水量を記録した。飼育終了時に全血を採取し、血清鉄濃度を測定した。このとき、塩味（300 mM NaCl）に対する嗜好性の変化を 48 時間二瓶選択試験により週に一度測定した。基本味に対する嗜好性の変化は PF 群と FeD 群ラットにおいて brief access 試験により評価した。塩味に対する嗜好性の上昇が観察された飼育 8 日目以降のラットで、酸味（クエン酸）、苦味（安息香酸デナトニウム）と甘味（ショ糖）溶液に対するリッキング回数を測定した。

【結果】FeD 群において飼育開始後すぐに体重増加の鈍化が見られ、飼育 13 日目以降に Cnt 群の体重との間に有意差が見られた。3 週目における血清鉄濃度は FeD 群において有意に低下していた。塩味に対する嗜好性は FeD 群において継時的な上昇が見られ、2 週目以降で Cnt 群、PF 群の嗜好性との間に有意な差が見られた。鉄欠乏によって塩味に対する嗜好性の上昇が観察されたことから、酸味、苦味、甘味に対する嗜好性を現在測定している。

mineral, iron deficient, taste preference

講演番号：2A25a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ A 校舎 25 会場

甘味受容体に対する甘味増強物質の作用機序の評価
Evaluation of the mechanism of sweet taste enhancers act to the sweet taste receptor
○中北 智哉、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Tomoya Nakagita,Takumi Misaka (Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

[目的]ヒト甘味受容体 hT1R2 / hT1R3 は Class C GPCR に属するヘテロダイマーであり、スクロースをはじめ、甘味を呈する多様なリガンドを受容することが知られている。我々はこれまでに、hT1R3 の膜貫通領域に作用するネオヘスペリジンジヒドロカルコン(NHDC)・シクラメートといった甘味料をごく少量他の甘味料に添加することで、甘味受容体の応答を相乗的に増強することを明らかにしている。しかしながらこれら二分子の大きさ及び構造は大きく異なっていることから、それぞれが同一の機構で応答増強を引き起こしているのかどうかについては明らかになっていない。そこでこれら二分子の応答増強の機構を甘味受容体の変異体を用いて解析を行うこととした。
[方法]甘味受容体及びキメラ G タンパク質を安定的に発現させた甘味受容体安定発現細胞（野生型）に対して蛍光カルシウム指示薬を取り込ませることで、甘味受容体の応答を蛍光指示薬の蛍光強度変化として検出した。甘味の基準物質として 1 mM アスパルテームを用い、これに対して NHDC・シクラメートの濃度を変えて添加することにより応答増強能の測定を行った。また、野生型を基に hT1R3 の膜貫通領域に点変異を導入したコンストラクトを多種作製し、同様に変異体の安定発現細胞を作出した。これらを野生型と同様に測定することによって二種の甘味料の甘味増強能にどのような違いが得られるのか検証を行った。
[結果]NHDC・シクラメートの両分子について、多くの変異体における甘味増強能の低下が認められたものの、その低下の度合いに差が認められた。NHDC については増強能が決定的に減弱する残基は認められなかった一方、シクラメートについては多数の変異により増強能の減弱・消失が認められた。さらにシクラメートは一部の変異体において応答増強能を示さないだけでなく、逆に応答抑制能を獲得していることが明らかになった。このことから、大きな分子である NHDC はその作用点の多さから、一ヶ所の変異導入により大きく応答増強能が失われることはないが、小さな分子であるシクラメートは受容体のわずかな構造の違いにより応答増強能を示したり、あるいは応答抑制能を示すのだろうと考えられる。今後この結果について詳しく考察し、甘味受容体の活性化機構を明らかにしていく予定である。

sweet, receptor, enhancer

講演番号：2A25a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ A 校舎 25 会場

ヒト甘味受容体における甘味増強物質作用部位の探索

Investigation of the interaction sites for sweet taste enhancers on human sweet taste receptor

○鈴木 あゆ、中北 智哉、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Ayu Suzuki,Tomoya Nakagita,Takumi Misaka (Dept. Appl. Biol. Chem. , The Univ. Tokyo)

(目的・背景)

甘味受容体はT1R2とT1R3の2つのサブユニットから構成されるGタンパク質共役型受容体である。甘味受容体には複数のリガンド結合部位が存在し、構造の異なる多種類の甘味物質を受容するという特徴がある。一方、甘味増強物質とは、それ自身が甘味活性を発揮しないような低濃度において、他の甘味物質と同時に甘味受容体に作用することで甘味を増強する物質である。ヒト甘味受容体に作用する甘味増強物質はいくつか知られおり、NHDCはT1R3の膜貫通領域、SE-3はT1R2の膜外領域に作用していることが報告されている。

本研究では、新たな甘味増強物質として低級アルコールに注目した。マウスの行動試験を用いた過去の知見により、低級アルコールであるエタノールは甘味受容体に作用することが予想されていた。実際に甘味受容体発現細胞を用いたアッセイ系において、マウス甘味受容体で低級アルコールが受容され、それだけでなく、低濃度で作用させることによって甘味増強効果を持つことが確認されている。今回はヒト甘味受容体について低級アルコールの作用効果を検証し、その相互作用部位を探索した。作用部位が明らかになることにより、新たな甘味増強物質の開発が期待される。

(方法・結果)

甘味受容体およびキメラG蛋白質を発現させた培養細胞に、カルシウム蛍光指示薬を負荷した後リガンドを添加した。リガンド添加時に甘味受容体が活性化されることによって生じる細胞内カルシウムイオン濃度変化を、カルシウム指示薬の蛍光強度変化として記録した。低級アルコールとしてエタノールを用いて検証を行った。

マウスと同様にヒト甘味受容体においてもエタノールが受容され、甘味増強効果もあることが明らかとなった。また、NHDC と SE-3 の甘味増強効果については、その作用部位に点変異を導入したヒト甘味受容体変異体を用いることで増強効果が消失することが知られている。これらのヒト甘味受容体変異体について、エタノールによる甘味増強効果を検証したところ、甘味増強効果は野生型と同程度に認められることが判明した。以上の結果より、低級アルコールの甘味受容体への作用機構は、既知の甘味増強物質とは異なる新規の場所であることが強く示唆される。

sweet, taste receptor, sweet enhancers

講演番号：2A25a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ A 校舎 25 会場

発光検出法を用いた味覚評価系の開発

Establishment of a Luminescence-Based Functional Assay for Taste Receptors

○戸田 安香、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Yasuka Toda,Takumi Misaka (Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo)

【目的】近年、甘味、旨味、苦味といった基本味の受容に関わる味覚受容体や、辛味や冷感などの味感覚に関わる受容体など、様々な味物質の受容に関わる分子が同定されてきた。それに伴い、これらの受容体を培養細胞へ発現させ、味物質に対する応答の強さを定量的に検出するという、客観的味覚評価系の開発がなされてきた。この評価系は、新規呈味調節物質の探索や呈味調節作用のメカニズム解明などに役立てられている。しかし、一般的な細胞応答の検出方法は、味物質添加後に生じる細胞内Ｃａ$^{2+}$濃度の上昇値をＣａ$^{2+}$感受性蛍光指示薬を用いて検出する蛍光検出法であるため、リガンド溶液中に蛍光物質が存在する場合、細胞応答の検出が適切に行えないなどの問題点があった。

当研究室では昨年度、発光検出法を用いた新規味覚評価系の開発に着手し、甘味評価系の構築に成功した。この甘味評価系は、従来の蛍光検出系と同様に甘味物質添加により生じる細胞応答の強さを感度良く検出可能であり、更に、蛍光物質を含有するサンプルを測定可能であるという点で蛍光検出系に比べ優れた味覚評価系であることが証明された。今回は、発光検出系の使用用途を広げることを目的に、甘味以外の味質に対応する発光検出系の構築を行なった。

【方法】ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に味覚受容体、Ｇタンパク質、アポ発光タンパク質を一過的に発現させた。発光基質を添加し、細胞内に発光タンパク質を形成させた。味物質を添加し、得られる発光強度の変化をマイクロプレートリーダにて検出した。

【結果】受容体として甘味受容体以外の様々な受容体を遺伝子導入に用いた場合についても、良好な応答を検出可能であると確認できた。特筆すべき点として、これらの評価系は従来の蛍光検出系よりも感度が高く、蛍光検出系では検出が難しかった味強度の弱い物質に対しても細胞応答を検出可能であるという特徴が認められた。本発光検出系は基礎研究ならびに食品産業の場において、有用なツールとなることが期待される。

cell-base assay, luminescence, taste receptor

講演番号：2A25a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ A 校舎 25 会場

樽酒中の成分が食品の旨味に及ぼす影響

Taste-enhancing effects of *taru-sake* ingredients on umami

○高尾 佳史[1]、高橋 俊成[1]、藤田 晃子[2]、松丸 克己[2]、溝口 晴彦[1] ([1]菊正宗酒造総研、[2]酒総研)
○ Yoshifumi TAKAO[1], Toshinari TAKAHASHI[1], Akiko FUJITA[2], Katsumi MATSUMARU[2], Haruhiko MIZOGUCHI[1] ([1]Kiku-masamune, [2]NRIB)

【目的】

清酒を杉樽に数日間貯蔵することで杉特有の爽やかな香りを付与した樽酒には、通常の清酒成分に加え、杉樽由来成分が含まれていることから、うなぎのかば焼きなどの脂っこい料理に合うとされてきた。そこで、樽酒と料理の相性（油との親和性、旨味増強効果）について官能評価、界面張力測定および味覚認識装置による分析を行い、樽酒は通常の清酒に比べ、口中の油を洗い流す効果が高いだけでなく、食材の旨味を増強させる効果も高いことを明らかにした[1)]。今回は樽酒の旨味増強効果に着目し、樽酒及び杉樽抽出物が各種旨味物質の旨味強度に及ぼす影響を味覚認識装置を用いて調べた。

【方法】

食材に含まれる旨味成分として、グルタミン酸ナトリウム（MSG)、イノシン酸 2 ナトリウム、グアニル酸 2 ナトリウム、コハク酸 2 ナトリウムを対象とした。旨味強度の測定には、味覚認識装置（インテリジェントセンサーテクノロジー、SA402B）を用いて、各種旨味成分を旨味センサーに浸し、本醸造酒（対照酒）もしくは杉樽貯蔵した同清酒（樽酒)、エタノール、杉樽抽出物で同センサーを洗浄後に、後味としての旨味（旨味後味）強度を測定した。洗浄液として用いた清酒やエタノールはエタノール濃度を 15%に調整したものを使用した。また、杉樽エタノール抽出物は杉樽断片を 20%エタノールに 20℃、24 時間浸漬し、エタノール濃度を 15%に調整したものを使用した。

【結果】

まず、各種旨味成分を用いて旨味後味に及ぼす樽酒の影響を調べたところ、MSG とコハク酸 2 ナトリウムにおいて、対照酒に比べ樽酒では旨味後味が強くなる傾向が見られた。次に杉樽由来成分の旨味増強効果について調べるため、杉樽抽出物と各種旨味成分を用いて同様の試験を行ったところ、試験に供したすべての旨味成分において、エタノールに比べ杉樽抽出物では有意に旨味後味が強くなっていた。このことから、樽酒が旨味成分の旨味を増強する要因は杉樽由来の成分にあると考えられる。

1)：平成 24 年度日本醸造学会大会講演要旨集 p5

taru-sake, umami

講演番号：2A25a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ A 校舎 25 会場

ノンアルコール飲料摂取による気分状態及び自律神経活動の変化

Changes in mood states and autonomic nervous activity induced by non-alcoholic beverages

○豊嶋 麻里[1]、山崎 英恵[1]、松永 哲郎[2]、茂田 一郎[3]、尾崎 一隆[3]、清水 二郎[3]、伏木 亨[1]([1]京大院農、[2]京大院人環、[3]アサヒビール（株））
○Mari TOSHIMA[1], Hanae YAMAZAKI[1], Tetsuro MATSUNAGA[2], Ichiro MODA[3], Kazutaka OZAKI[3], Jiro SHIMIZU[3], Tohru FUSHIKI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ., [3]ASAHI Breweries, LTD.)

【目的】気分転換を目的として摂取される飲料や食品には、リラックス効果や高揚感などの心理学的効果があることが経験的に知られている。我々はこれまで、気分の切り替え効果をもつ飲料・食品の評価方法を確立した。本研究では、近年飛躍的に市場を拡大しているノンアルコール飲料に着目し、ノンアルコール飲料が気分の切り替えにどのように寄与しているのかについて、主観的及び客観的な両側面から検討した。

【方法】21-34 歳の健康な日本人女性 19 名が実験に参加した。気分を表す 30 ワードで構成された評価尺度「気分シート」を主観的指標として、各ワードに対する評価を気分の変化量としてスコア化した。気分状態の個人差を小さくする目的で、ストレス負荷として 15 分間のクレペリンテストを課した。自律神経活動変化は、心拍変動パワースペクトル解析法により評価した。心拍変動測定と気分シート記入を 1 セットとし、クレペリンテスト前に 1 セット、テスト後に 1 セットを測定し、その後サンプル飲料（150 mL）摂取を組み込み、3 回測定を行った。飲料サンプルには炭酸水（コントロール）、ワイン風味ノンアルコールカクテル（NA ワイン）、及びノンアルコールビール（NA ビール）を用い、各飲料摂取後には、摂取したサンプルに対する嗜好強度を Visual Analogue Scale (VAS) を用いて測定した。

【結果と考察】各飲料摂取前後の気分スコア変化量は、コントロール群に比して NA ワイン群では有意に高かった。NA ビール群についてもコントロール群との間に有意な差は認められなかったものの、気分スコアの変化は NA ワインと類似した挙動を示した。NA ワイン群では特に喜び項目のスコアがコントロール群に比して有意に高い値を示し、嫌悪項目のスコアでは有意な差は認められなかった。このことから、NA ワイン摂取によりポジティブな気分状態へと誘導された理由として、嫌悪感の和らぎではなく喜びの増幅が推察された。また、各飲料摂取前後の自律神経活動の変化に関して、NA ワイン群及び NA ビール群では自律神経バランス指標（LF/HF 値）はコントロール群に比して有意に低くなり、自律神経活動のバランスが副交感優位となったことが認められた。以上の結果から、飲料間に違いはあるものの、ノンアルコール飲料の摂取により気分状態はポジティブに、自律神経活動は副交感優位に、それぞれ誘導されることが示唆された。

mood, autonomic nervous activity, non-alcoholic beverages

講演番号：2A25a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ A 校舎 25 会場

Lactobacillus gasseri CP2305 株のストレス応答ならびに脳血流に及ぼす影響
Effect of *Lactobacillus gasseris* strain CP2305 on stress response and cerebral blood flow in humans

○藤原 茂[1]、澤田 大輔[2]、岡 卓二[3,4]、桑野 由紀[5]、六反 一仁[5] ([1]カルピス株式会社　発酵応用研究所、[2]カルピス株式会社　商品開発センター、[3]横浜市大医学研究院放射線医学、[4]株式会社ベイバイオイメージング、[5]徳島大学大学院ストレス制御医学)
○shigeru Fujiwara[1], Daisuke Sawada[2], Takashi Oka[3,4], Yuki Kuwano[5], Kazuhito Rokutan[5] ([1]Microbiology & Fermentation Laboratory, Calpis Co.,Ltd, [2]Products Development Center, Calpis Co.,Ltd, [3]Dept. Radiobiology, School of Medicine, Yokohama Sity University, [4]BayBioImaging Co.,Ltd, [5]Dept. Stress Sci., Inst. Health Biosci., The Univ. of Tokushima Graduate School)

（背景）近年、日常生活でのストレスを抱える人口やうつ病の発症率は著しく増加し、平成 19 年の国民健康・栄養調査ではストレス人口は 61.1%にも達した。現在、「ストレス緩和」は「糖尿病」とともに重点調査項目に指定されている。

我々は消化管内の微生物と宿主の生理機能に軸足を置いた研究を進めてきた。この中で、乳酸菌が脳腸相関を介し、精神状態に影響を及ぼす可能性について検討を加えてきた。今回、消化管定着性の高い CP2305 株を用いた検討について報告する。

（方法）CP2305 株の生菌および死菌体を用いて、ストレス負荷状態の健常人によるヒト試験を実施し、ストレス低減作用を評価した。アンケートによる主観評価に加え、ストレスホルモンやストレス関連遺伝子の変化を含む客観評価を実施した。さらに、高次脳機能への影響についての解析の端緒として、ストレスを自覚する健常成人のムード変化と関連する可能性のある脳血流変化を、SPECT を用いて評価した。

ストレス低減評価は、解剖実習前後の健常成人男女合計 56 名（医学部 2 年生）を対象に実施した。生菌体の摂取試験は 3 週間のウォッシュアウト期間を挟む 4 週間摂取の二重盲検クロスオーバー試験とした（1 群 12 名）。加熱殺菌体の摂取試験は、5 週間の摂取期間を設けた 1 群 16 名の二重盲検群間並行比較試験とした。摂取量はいずれも $1x10^{10}$ 個/日とした。

^{99}Tc-ECD を用いた SPECT による脳血流試験は、予備検討として、8 名のストレスを自覚する健常成人男女 8 名（30 歳－55 歳）の 1 群オープン試験とし、1 日あたり $2x10^{10}$ 個の生菌を 4 週間摂取させ、摂取前後の 3 次元立体画像を比較した。

（結果）CP2305 株生菌体摂取では有意なうつ傾向と睡眠の改善が得られ、不安抑制傾向も認められた。判別分析により両群の判別が可能であった。腹部症状では、腹痛の有意な改善が示され、客観マーカーとして、唾液コルチゾールの有意な低下、消化管内 *Lactobacillus* の増加と相関したストレス関連遺伝子の有意な発現変化が認められた。加熱殺菌体でもほぼ同様な成績が得られ、本株の、ストレス軽減効果が示された。

脳血流試験では、大脳血流の増加に加え、感情・ストレス制御に関連する基底核血流の有意な低下が認められた。大脳皮質血流を部位別に見ると、視覚野近傍の領域の有意な血流低下が認められた。全データの判別分析により、摂取前後の判別が可能であった。

Lactobacillus gasseri, Stress-relief, Aesthetic sentiments

講演番号：2A25a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ A 校舎 25 会場

牛乳 α_s-casein の消化管酵素分解により新しい抗不安トリペプチド Tyr-Leu-Gly が生成する
Novel anxiolytic tripeptide, Tyr-Leu-Gly released from milk α_s-casein
○水重 貴文[1,2]、澤岻 有里菜[1]、金本 龍平[1]、大日向 耕作[1]（[1]京大院農・食品生物、[2]京大学際融合・生理化学研究ユニット）
○Takafumi MIZUSHIGE[1,2], Yurina SAWASHI[1], Ryuhei KANAMOTO[1], Kousaku OHINATA[1]
([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】これまで我々は、ジペプチド Tyr-Leu (YL; 0.1－1 mg/kg, i.p.)が医薬品に匹敵する抗不安活性を示すことを見出した[1]。しかしながら、YL およびその類縁体が食品タンパク質の消化管酵素処理により実際に生成するのか否か明らかではなかった。本研究では、主要な牛乳タンパク質α_{s1}-casein の一次構造中に YL 配列が存在することに注目し、これを消化管プロテアーゼで消化した際に YL 関連ペプチドが生成するか検討するとともに、それらの抗不安作用およびその作用機構を解析した。
【方法】α_s-casein をペプシン(pH 2.0, 37℃×5 hrs)で消化した後、続いてパンクレアチン(P+P)、トリプシン(P+T)、あるいはキモトリプシン(P+C)でそれぞれ消化した(pH 7.5, 37℃×5 hrs)。生成したペプチドを LC/MS (Q-TOF, Xevo, Waters)で定量した。抗不安作用は高架式十字迷路試験で評価した。雄性 ddY マウス(24－27 g)に試料を腹腔内投与し 30 分後に迷路中央にマウスを置き 5 分間の行動を観察した。オープンアームでの滞在時間の割合が増加した際に抗不安活性が有りと判定した。
【結果】消化管内の酵素消化を想定した P+P 消化物中には YL (2.7 mol%)よりも Tyr-Leu-Gly (YLG; 19.2 mol%）が多く存在することがわかった。なお、P+T あるいは P+C 消化物中の YL および YLG 生成率はいずれも高くなかった(＜3.2 mol%)。そこで、YLG を化学合成し、その生理作用を検討した。YLG (1－3 mg/kg)の腹腔内投与により用量依存的にオープンアームでの滞在時間の割合が増加し、抗不安作用を示すことがわかった。YLG と YL を等モル(3.5 μmol/kg)投与し抗不安活性を比較したところ、同程度に強力な活性を示すことが判明し、YL の C 末端側への鎖長延長が許容されることが明らかとなった。さらに、YLG の抗不安作用はセロトニン 5-HT_{1A}、ドーパミン D_1、および $GABA_A$ 受容体アンタゴニストで阻害されたが、YLG はこれらの受容体に直接結合しなかった。したがって、YLG はセトロニン、ドーパミン、GABA の分泌促進を介して抗不安作用を示すと考えられる。この YLG の抗不安機構は YL と共通である。なお、P+P 消化物も同様に抗不安作用を示した。
【結論】牛乳α_s-caseinのペプシンーパンクレアチン消化によりYLGが生成することを見出した。YLGの抗不安作用は5-HT_{1A}およびD_1、$GABA_A$受容体の活性化を介することが判明した。以上、牛乳α_s-casein摂取により消化管で強力な抗不安ペプチドYLGが生成する可能性が示された。

[1] Kanegawa N, Suzuki C, Ohinata K. (2010) FEBS Lett 584:599-604.

anxiety behavior, gastrointestinal protease, neurotransmitter

講演番号：2A25a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ A 校舎 25 会場

発酵乳ホエーに含まれる細胞内グルタチオン上昇作用分子の探索

Investigaion of active molecules on increasing of cytosolic glutathione from fermented whey

○畑中 唯史[1]、川上 賀代子[1]、裏地 美杉[1]、守谷 智恵[2]、坪井 誠二[2]（[1]岡山生物研、[2]就実大薬）
○Tadashi Hatanaka[1], Kayoko Kawakami[1], Misugi Uraji[1], Chie Moritani[2], Seiji Tsuboi[2] ([1]RIBS, Okayama, [2]Shujitsu Univ.)

【背景】以前、我々は、*Lactobacillus helveticus* 発酵乳ホエーの投与により、暗期において、脳内松果体中セロトニン量が減少し、脳内睡眠物質メラトニン量が上昇すること、一方、明期においては、セロトニン量が増加し、メラトニン量が減少すること、更にこのことは、暗期において、松果体中のメラトニン合成の律速酵素である Serotonin N-acetyltransferase (NAT) の活性上昇によるものであることを明らかにしている。また、我々は、NAT の生化学的解析により、グルタチオンを介したレドックス制御を受けることについても、既に明らかにしている[*]。

【目的】発酵乳ホエーは、細胞内における還元型グルタチオン濃度を上昇させることにより、NAT 分子内の SS 結合を開裂し、NAT 活性を上昇させると考えている。そこで、今回、NAT を強制発現させた COS 細胞（COS/NAT 細胞）を用い、発酵乳ホエーに含まれる、細胞内グルタチオン濃度を上昇させる活性成分の同定を目的として、実験を行った。

【方法】発酵乳ホエーを、限外濾過膜（分画分子量 1 万カット）により、分子量 1 万以下の画分を得、一部を、ゲル濾過カラム（Superdex Peptide）による分析を行った。ついで、分子量 1 万以下の画分を凍結乾燥し、逆相カラム（Inertsil ODS-3, 4.6mm×250mm）を用いた HPLC による分離を行い、得られたフラクションを蒸発乾固させた。COS/NAT 細胞を 1.5×10^5 / 2ml / 35mm dish で 48 時間培養した後、各フラクションを培地に加え、24 時間後に細胞を回収し、細胞内グルタチオン量等を測定した。

【結果】ゲル濾過カラムによる分析により、分子量 1 万以下に含まれる成分は、推定分子量（109）が、ピークトップであり、アミノ酸を豊富に含むと思われた。逆相カラムのフラクションの内、3 フラクションに、細胞内グルタチオン濃度を上昇させる活性を見出した。現在、この活性フラクションに含まれるペプチドの同定を行っているところである。

【参考文献】[*]S. Tsuboi, Y. Kotani, K. Ogawa, T. Hatanaka, S. Yatsushiro, M. Otsuka, Y. Moriyama
J. Biol. Chem. **277** (46), 44229-44235 (2002)

fermented whey, glutathione, melatonin

講演番号：2A25a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ A 校舎 25 会場

Oligonol の安全摂取量の評価ならびに脂質代謝に与える影響
Evaluation of safety of dietary Oligonol and its effects on lipid metabolism in rats
○日野原 顯、鈴木 ひかる、長田 恭一 (明治大学農)
○Ken HINOHARA,Hikaru SUZUKI,Kyoichi OSADA (Meiji Univ.)

【目的】緑茶カテキンは、抗酸化作用や抗肥満作用などを示すことが報告されているが、その一方で過剰摂取により肝障害を発症することも報告されている。Oligonol はカテキンオリゴマーリッチなライチ由来のポリフェノールを化学的に茶カテキンを利用して低分子化したものである。Oligonol は茶カテキンと比べて毒性が低いことがわかっており、マウスについての LD_{50} 値は 2000mg/kg であるが、それ以上の濃度での影響はよくわかっていない。そこで本研究は Oligonol の安全摂取量の評価ならびに脂質代謝に与える影響を検討した。

【方法】5 週齢の Wistar 系雄ラットを 1 週間予備飼育した後、Oligonol を非投与群、500、1000、2500、5000mg/kg B.W 投与群の 5 群に分け、各濃度を胃内に強制投与した。投与 24 時間後にエーテル麻酔を施し、腹部動脈より採血死させた。肝臓重量、肝障害諸パラメータ、抗酸化諸パラメータ、および脂質代謝諸パラメータをそれぞれ測定した。また、肝臓の病理組織学的検査も行った。

【結果】肝臓重量は非投与群と比較して 5000mg 投与群で有意に高くなった。肝障害パラメータである AST、ALT、LDH 活性値は、いずれも非投与群と比較して 2500mg および 5000mg 投与群で有意に高くなった。しかし、これらの結果は、正常時の基準値の範囲内であり、総ビリルビンや ALP などの他の肝障害パラメータに大きな変化はないこと、さらに、肝臓病理学的検査の結果から、肝細胞壊死、うっ血、グリソン鞘浸潤などの障害が見られなかったことから、Oligonol は、比較的高いレベルで、投与しても毒性は強くはないということが考えられた。脂質代謝パラメータについて調べたところ、肝臓、血漿のトリグリセリド濃度に変化はなかった。また脂肪酸合成系酵素にも変化は見られなかった。しかし、血漿の総コレステロール濃度は非投与群と比較して 5000mg 投与群で有意に低くなった。また、動脈硬化指数 AI 値は 2500mg および 5000mg 投与群で有意に低くなった。Oligonol はミセル崩壊能を有し、脂質の吸収阻害作用を発揮することが分かっているが、本研究では吸収された後に、コレステロール代謝関連酵素の mRNA 発現レベルや、酵素活性を調節する可能性があると思われた。現在、コレステロール代謝諸酵素の mRNA レベルの変化について検討中である。

Oligonol, safety, rats

講演番号：2A25a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ A 校舎 25 会場

りんご未熟果実由来ポリフェノールの安全性と脂質代謝への影響

Verification of safety of unripe apple polyphenol and it's effect on lipid metabolism

○東 知宏[1]、越 謙太[1]、長田 恭一[1]、相倉 悦子[2]、林 賢二[2]、半田 正之[2] ([1]明治大・農、[2]エバラ食品工業・中央研究所)
○Tomohiro AZUMA[1], Kenta KOSHI[1], Kyoichi OSADA[1], Etsuko AIKURA[2], Kenji HAYASHI[2], Masayuki HANDA[2] ([1]Meiji Univ., [2]Ebara Foods Co. Ltd.)

【目的】りんごは未成熟時に養分の分散を防ぐため間引きが行われており、完熟果実 1 個につき 5 個のりんご未熟果実が廃棄されている。我々はこの廃棄されるりんご未熟果実の利活用を探索するために、りんご未熟果実に含まれているポリフェノール成分（UP）の機能性に注目し、UP による生体内の脂肪蓄積の抑制あるいはコレステロール低下作用を検証してきた。しかし、高濃度のポリフェノール成分を含むサプリメントの過剰服用による健康被害が近年になって報告されているため、ポリフェノール成分を用いた健康食品の製造には、安全摂取量を考慮する必要がある。本研究では、UP の安全摂取量を求めるために、UP の単回投与による毒性試験を行い、肝機能に与える影響を検証した。同時に生体内脂質代謝パラメータの変化を調べ、UP の単回投与による脂質代謝に対する影響を検証した。
【実験方法】5 週齢雄の Wistar 系ラットを 24 時間絶食させた後、UP を 0、500、1000、2500 および 5000mg/kg B.W. の濃度で経口投与し、24 時間後にエーテル麻酔を施し、腹部大動脈より採血死させた。採取した肝臓と血漿を用いて、病理組織学的検査、肝機能および脂質代謝パラメータを測定した。
【実験結果】体重に変化はなかったが、肝臓重量は非投与の場合と比較して 5000mg 投与で高くなった。血漿 AST 活性値は、非投与と比較して 2500 あるいは 5000mg 投与で若干高くなった。ALT、LDH および ALP の各活性値は、非投与と比べて 5000mg 投与で有意に高くなった。肝臓の病理組織学的検査では、5000mg 投与で軽度の肝細胞の単細胞壊死が確認された。以上の結果より、最大無毒性量（NOAEL）は 1000mg/kg/day であり、UP の人一日摂取許容量は 600mg/kg B.W.と予想される。肝臓のコレステロール濃度は、UP を投与した場合には、非投与と比較していずれの濃度でも有意に低くなった。以上の結果から、UP の単回投与により 24 時間以内に生体内のコレステロール代謝に大きな影響が現れることが明らかとなった。これらの効果の作用メカニズムを調べるため、コレステロール代謝に関わる肝臓の種々の遺伝子発現レベルを検討している。

procyanidin, hepatic function, rat

講演番号：2A25a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ A 校舎 25 会場

ヒトにおける米由来ステロール配糖体画分（PSG）の動脈硬化リスク低減の検証

Hypocholesterolemic effect of rice sterol glycosides in menopausal women with hypercholesterolemia

○奥原 康英[1]、Bui Thi Nhung[2]、Huy Nguyendo[2]、鴨下 澄子[3]、喜瀬 光男[1]、Le Thi Hop[2]、山本 茂[3] ([1](株)ファンケル総研、[2]National Institute of Nutrition（Hanoi-Vietnam）、[3]十文字学園女子大学アジアの栄養・食文化研究所)
○Yasuhide OKUHARA[1], Nhung Bui Thi[2], Nguyendo Huy[2], Sumiko KAMOSHITA[3], Mitsuo KISE[1], Hop Le Thi[2], Shigeru YAMAMOTO[3] ([1]FANCL Research Institute, [2]National Institute of Nutrition（Hanoi-Vietnam）, [3]Asian Nutrition and Food Culture Reseach Center, Jumonji University)

【目的】米由来のステロール配糖体画分（以下 PSG）は細胞や動物の実験において糖・脂質代謝異常の改善や動脈硬化のリスク低減などの効果が知られているが、ヒトにおける検証はまだ行われていない。本研究ではこれらの効果の中で主として動脈硬化のリスク低減の指標となるコレステロールの改善がヒトにおいても認められるか否かについて検証を行った。
【方法】BMI　25 以上で重篤な合併症がないベトナム人女性（年齢 50～65 歳）44 名にベトナム人医師が口頭で試験内容等を説明し、文章による同意確認を行った。同意者に対して検査を行い LDL コレステロールが 140 mg/dL 以上の該当者を被験者とした。試験は二重盲検としプラセボ群（PSG 0.0 mg/man/day)、低 PSG 摂取群（PSG 12.5 mg/man/day)、中 PSG 摂取群（PSG 25.0 mg/man/day）及び高 PSG 摂取群（PSG 50.0 mg/man/day）の 4 群の並行摂取で行い、被験者の各群への割付は無作為抽出により行った。試験期間中はベトナム人医師から被験者へ生活習慣を変えないよう指導を行った。PSG を含有するソフトカプセルを 1 日 12 個、3 回に分けて 12 週間毎日摂取した。身体・血圧の測定、血液・尿検査、食事調査及びベトナム人医師による問診等は摂取開始前、摂取 6 及び 12 週目に行った。なお、試験はヘルシンキ宣言に準拠するとともに(株)ファンケル総合研究所とベトナムの National Institute of　Nutrition の倫理委員会の承認を受け実施した。
【結果】解析人数はプラセボ群が 9 名、低 PSG 群が 10 名、中 PSG 群が 9 名及び高 PSG 群が 8 名であった。摂取開始前と比較して高 PSG 摂取群で摂取 12 週目の中性脂肪と LDL コレステロールに有意な低下（$p<0.05$）が、HDL コレステロールには有意な上昇（$p<0.05$）が認められた。一方、低 PSG 摂取群、中 PSG 摂取群でも LDL コレステロールに有意な変動が認められたがいずれも PSG 摂取との相関は低いものであった。その他、全群ともに試験期間を通じて、被験食品の摂取に関連する副作用と見られる症状及び所見は認められなかった。
【まとめ】PSG の摂取により中性脂肪、コレステロールの値の改善が認められ、PSG はヒトにおいても動脈硬化のリスクを低減させると考えられた。その有効量は被験者や試験系などさまざまな条件によって変動すると考えられるがおおむね 50.0 mg/man/day と推定された。また、PSG はヒトにおける安全性も極めて高いと考えられた。

human, atherosclerosis, rice

講演番号：2A25a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ A 校舎 25 会場

コメ由来ステロール配糖体分画(PSG)とうんしゅうみかん由来βクリプトキサンチンを含むカプセルが肥満者の脂質代謝に及ぼす影響

Effect of rice-derived steryl glucoside and β-cryptoxanthin on obesity.

○伊藤 幸彦[1]、野中 翔太[1]、喜瀬 光男[1]、平山 志ほり[2]、國井 大輔[2]、仲地 哲[3]、長嶺 勝[4] ([1](株)ファンケル総研、[2] 健康科学統合研究センター、[3] おきなわ健康長寿研究開発センター、[4] 琉球大学分子生命科学研究施設)
○Yukihiko ITO[1], Shouta NONAKA[1], Mitsuo KISE[1], Shihori HIRAYAMA[2], DAISUKE KUNII[2], Satoru NAKACHI[3], MASARU NAGAMINE[4] ([1]FANCL Research Institute, [2]Human Health & Behavioral Science Research Center, [3]Okinawa Health and Longevity Research and Development Center, [4]University of the ryukyus TBRC)

【目的】これまでに、我々はコメ由来のステロール配糖体分画(PSG)が高脂肪食摂取肥満モデルマウスの内臓脂肪蓄積、血清 LDL コレステロール上昇、血清 HDL コレステロール低下を抑制することを明らかにした。また、うんしゅうみかんに多く含まれるカロテノイドの一種であるβクリプトキサンチンについては、その抗肥満作用が多く報告されている。本研究では PSG とうんしゅうみかん由来βクリプトキサンチンを含むカプセル(PSG＆βCRY カプセル)の摂取による肥満者の脂質代謝パラメーター、体組成、メンタルヘルスに及ぼす影響を検討するため、肥満者(BMI が 25 以上)でかつ脂質代謝異常に該当する日本人男性を対象として、プラセボを対照とした二重盲検並行群間比較試験を実施した。
【方法と結果】試験はおきなわ健康長寿研究開発センターと（株)ファンケル総合研究所の倫理委員会の承認のもと、ヘルシンキ宣言に則り実施した。被験者 30 名をプラセボカプセル摂取群、PSG＆βCRY カプセル摂取群(PSG として 30 mg/day, βCRY として 0.25 mg/day)に分け、プラセボカプセルもしくは PSG＆βCRY カプセルを 1 日 2 回、12 週間毎日摂取させた。PSG＆βCRY カプセル摂取群において摂取前に比べて、LDL-コレステロールが低下傾向を示し、動脈硬化指数は有意に低値を示した。さらに、気分プロフィール検査(POMS)を実施した結果、PSG＆βCRY カプセル摂取群では摂取前に比べて、抑うつ-落込みのスコアが有意に改善した。一方、プラセボカプセル摂取群ではすべての項目において摂取前後で有意な変動は認めなかった。また、プラセボカプセル摂取群、PSG＆βCRY カプセル摂取群とも試験期間を通じて、摂取に関連する副作用と見られる症状及び所見は認められなかった。
【結論】PSG＆βCRY カプセルが肥満者の脂質代謝とメンタルヘルスの改善に有用であることが示唆された。

rice, human, obesity

講演番号：2A25a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ A 校舎 25 会場

タイ産ブラックジンジャー抽出物の抗肥満作用
Anti-obesity effects of black ginger extract from Thailand
○吉野 進[1]、キム ミンジ[2]、阿波 里佳[1]、安 芝英[2]、岩橋 弘恭[1]、桑原 浩誠[1]、河田 照雄[2]([1]丸善製薬、[2]京大院農・食品生物科学)
○Susumu Yoshino[1], Minji Kim[2], Riyo Awa[1], Ji-Yeong An[2], Hiroyasu Iwahashi[1], Hiroshige Kuwahara[1], Teruo Kawada[2] ([1]MARUZEN PHARMACEUTICALS CO., LTD., [2]Kyoto Univ.)

【目的】近年、過食や運動不足などに代表される生活習慣の悪化が原因となり、肥満が増加の一途をたどっている。肥満は心疾患、脂質代謝異常、高血圧、高脂血症、高尿酸血症など様々な合併症を引き起こし、その対策が必要とされている。肥満の予防および治療法としては食事制限や運動があるが、近年では蓄積された体脂肪の分解・消費を促進する抗肥満作用を持つ物質の有用性が注目されている。*Kaempferia parviflora*(KP)はタイ王国やラオスなどの東南アジアを原産とするショウガ科の植物で、血流の改善や滋養強壮、消化器の改善、関節痛の改善などに経験的に用いられている。今回、KP 抽出物による、食餌性肥満モデルマウスにおける抗肥満作用について検証したので報告する。
【方法】雄性 C57BL/6J マウスを用いて、高脂肪食（脂肪 60kcal%）群、KP 抽出物をそれぞれ 0.5%および 1.0%含有した高脂肪食群の 3 群で試験を行った。7 週間、各飼料と水を摂取させ、その間の体重および摂餌量（摂取エネルギー量）を測定し、飼育期間終了後に腹腔内脂肪重量（腸間膜、精巣周囲、腎周囲）、肝臓重量、および血液パラメーターを測定した。更に、褐色脂肪組織（BAT）よりミトコンドリアを単離し、BAT における脱共役タンパク質（Uncoupling protein 1：UCP1）の発現量をウエスタンブロッティングにより測定した。
【結果】各群間の摂取エネルギー量に差は認められなかったにも関わらず、KP 抽出物を摂取したマウスでは、体重推移が有意に低下した。また、腸間膜、精巣周囲、腎臓周囲それぞれの脂肪蓄積が有意に抑制された。血中パラメーターに関しては、トリグリセリド、レプチンが有意に低下した。さらに、BAT において熱産生・エネルギー代謝に重要な役割りを果たす UCP1 の発現量が有意に増加した。
【考察】以上の結果より、高脂肪食で誘発された肥満の抑制に、KP 抽出物の摂取が有効であることが示唆された。また、この抗肥満作用の作用メカニズムの１つとして、KP 抽出物摂取によるエネルギー消費量の増大が考えられた。

Black ginger, Anti-obesity, UCP-1

講演番号：2A25a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ A 校舎 25 会場

グラブリジンは AMPK と CaMKII に依存的に筋肉細胞のグルコース取込みを促進する

Glabridin stimulates glucose uptake via AMPK and CaMKII in skeletal muscle cells

○澤田 圭介[1]、濱田 和也[2]、岸田 英之[2]、北野 光昭[2]、中川 格[2]、芦田 均[1]（[1]神戸大学、[2]株式会社カネカ）
○Keisuke SAWADA[1], Kazuya HAMADA[2], Hideyuki KISHIDA[2], Mitsuaki KITANO[2], Kaku NAKAGAWA[2], Hitoshi ASHIDA[1]（[1]Kobe Univ., [2]Kaneka Corp.）

【目的】これまでに我々は、筋肉細胞のグルコース取込み活性を指標として血糖調節に役立つ食品因子を探索し、甘草成分であるグラブリジンに有効性を見出した。そこで本研究では、グラブリジンの筋肉細胞における糖代謝調節効果、特に、グルコース取込みを誘導するメカニズムを検討した。
【方法】実験にはラット骨格筋由来 L6 細胞を用いた。グルコース取込み量は、細胞内への 2-deoxyglucose（2DG）取込み量を酵素的に定量することにより評価した。乳酸分泌量、細胞内グリコーゲン量ならびに ATP 量はそれぞれ酵素反応を利用して定量した。シグナル伝達タンパク質のリン酸化はウエスタンブロット法により検出した。
【結果と考察】グラブリジンを 3, 10, 30 μM で 4 時間処理した L6 細胞では、グルコース取込み量が作用濃度依存的に増加した。促進的に取込まれたグルコースの利用形態を検討するために糖代謝物を測定すると、細胞内グリコーゲン量の減少および乳酸分泌量の増加が見られ、一方で、ATP は 30 μM で処理した場合には減少傾向であった。これらの結果は、グラブリジンが細胞内のエネルギー消費を誘導することを示唆している。次に、エネルギー消費やインスリン刺激によって細胞膜上へと移行してグルコースを取込む glucose transporter type 4 (GLUT4)の局在を検討すると、グラブリジンの作用濃度に依存的に細胞膜上の存在量が増加することがわかった。そこで、グラブリジンの作用機構を解明するため、GLUT4 の膜移行に寄与するシグナル伝達タンパク質の活性を抑制した時のグルコース取込み量を測定した。その結果、グラブリジンによって誘導されるグルコースの取込みは、AMP 依存性キナーゼ（AMPK）の阻害剤である compound C によって抑制され、一方でインスリン伝達経路の阻害はこれを抑制しないことがわかった。AMPK は AMP/ATP 比の急激な上昇のほか、細胞質中の Ca^{2+}濃度の上昇にも応答する。このことから、グラブリジンが Ca^{2+}とその下流のカルモジュリン依存性キナーゼ（CaMKII）を介してグルコースの取込みを増加させた可能性を考え、細胞膜透過性の Ca^{2+}キレート剤である BAPTA/AM と CaMKII 阻害剤である KN-93 をそれぞれ作用させてグルコースの取込み量を測定したところ、いずれの化合物によってもグラブリジン依存的なグルコースの取込みは抑制された。さらに、グラブリジンを処理した細胞では AMPK とその下流の AS160、ならびに CaMKII のリン酸化が促進されることが確認できた。以上の結果から、グラブリジンは筋肉細胞内においてエネルギー消費を促進するとともに、細胞質中の Ca^{2+}濃度の上昇によって活性化される AMPK や CaMKII を介してグルコースの取込みを促進することが明らかとなった。

glabridin, glucose uptake, skeletal muscle cells

講演番号：2A25p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ A 校舎 25 会場

生もと乳酸菌の米ヌカ発酵成分がヒト皮膚の角層水分量に与える影響

Effect of *Leuconostoc mesenteroides*-fermented rice bran extracts on stratum corneum hydration

○近藤 紗代[1]、高橋 俊成[1]、渡辺 敏郎[2]、井口 隆文[2]、田辺 創一[3]、溝口 晴彦[1]([1]菊正宗酒造総研、[2]ヤエガキ醗酵技研、[3]広島大院生物圏)
○Sayo KONDO[1], Toshinari TAKAHASHI[1], Toshiro WATANABE[2], Takafumi IGUCHI[2], Soichi TANABE[3], Haruhiko MIZOGUCHI[1] ([1]Kiku-masamune, [2]Yaegaki, [3]Hiroshima Univ.)

【目的】生もとは清酒醸造における伝統的酒母である。既報において、生もとより単離された乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* LK-16 株で米ヌカを発酵させることにより、正常ヒト皮膚線維芽細胞に対する細胞賦活効果およびヒアルロン酸産生促進効果が認められることを報告した[1)]。この *in vitro* 試験の結果から、米ヌカ発酵液にはヒト皮膚に対する保湿効果が期待されたので、本報では、皮膚塗布された米ヌカ発酵液の皮表角層水分量への影響を検証した。また、活性成分の探索を目的として米ヌカ発酵液の分画を行い、各画分の正常ヒト皮膚線維芽細胞に対するヒアルロン酸産生促進効果について検討した。
【方法と結果】ヒト皮膚に対する影響：米ヌカ発酵液を被験者の前腕内側部に 1 日 2 回、2 週間にわたって塗布し、SKICON-200EX（IBS社製）を用いて角層水分量を測定した。測定は、温度および湿度を一定に保った部屋で 30 分間安静にして被験部位を順化させたのちに実施した。その結果、米ヌカ発酵液を塗布した部位では、コントロール塗布部位と比較して有意に角層水分量が増加しており、保湿効果があることが示唆された。活性成分の探索：米ヌカ発酵液をBio-Gel P-2 のカラムクロマトグラフィーで分画したところ、分子量 1000 前後の画分にヒアルロン酸産生促進効果を認めた。フェノール硫酸法による糖の定量およびアミノ酸分析の結果、この画分は糖とペプチドを含んでいた。さらに分画を行った結果についても合わせて報告する。

[1)]近藤ら、日本農芸化学会 2012 年度大会講演要旨集 p. 401（講演番号 2J12a07）

Leuconostoc mesenteroides, hyarulonic acid, stratum corneum hydration

講演番号：2A25p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ A 校舎 25 会場

ベニバナ発酵液が皮膚に与える影響

Effect of Pichia-fermented safflower extracts on skin condition

○狩野 秀道（（株）伊勢半)
○Hidemichi KANO (Isehan Co.)

【目的】ベニバナは古くから漢方薬（紅花：コウカ）として使われ、その薬理作用に対する研究は数多く報告されている。一方で、江戸時代より山形の農家ではベニバナ花弁から赤色色素を効率よく抽出するための工程としてベニバナを自然発酵させた紅餅を製造しており、ベニバナと発酵処理は昔から深い関わりがあるといえる。本研究では、ベニバナを発酵処理し、ベニバナ本来の機能性を向上させることを目的に、特に肌に塗布することで新たな機能を見出すための検討をおこなった。
【方法】山形県産ベニバナ（*Carthamas tinctorius* Linne(Compositae)）の花弁を熱水抽出し、花弁残渣を除去してベニバナ抽出液を得た。このベニバナ抽出液にベニバナから単離した酵母（*Pichia kudriavzevii* SAF-UN-1）を植菌し、液体培養した。培養後、殺菌処理および遠心分離して固形分を除去したものをベニバナ発酵液とした。このベニバナ発酵液に防腐剤としてフェノキシエタノールおよび 1,2-ペンタンジオールを添加した後、遠心分離およびメンブランフィルター濾過により精製し、調製液を得た。皮膚細胞への活性を評価するため、皮膚に対する安全性を確認した上で、ベニバナ発酵液を用いてコラーゲン産生促進試験、繊維芽細胞増殖試験、角化細胞増殖試験、抗酸化試験（DPPH ラジカル消去活性試験)、チロシナーゼ活性阻害試験を実施し、調製液を用いて被験者への肌塗布による表皮角層水分量測定装置および水分計を用いた保湿性試験を実施した。
【結果】ベニバナ発酵液について皮膚への安全性を確認したところ、皮膚刺激性、経口毒性、感作性、変異原性等が認められないことが確認され、皮膚に対して安全であることが確認された。正常ヒト真皮線維芽細胞を用いたコラーゲン産生促進試験では、ベニバナ発酵液は、対照と比べて濃度依存的にプロコラーゲン産生量を増加させた。繊維芽細胞増殖試験および角化細胞増殖試験では、いずれも細胞増殖を示した。抗酸化試験およびチロシナーゼ活性阻害試験では、微弱ながらも活性を示した。また被験者への肌塗布による表皮角層の保湿試験では有効性を示した。このことから、ベニバナを発酵させたベニバナ発酵液は皮膚に対して有用な効果があると思われた。

Safflower, Pichia, Skin

講演番号：2A25p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ A 校舎 25 会場

葛の花エキス ™ の摂取が肌症状に及ぼす影響についての探索的研究

Effect of *Pueraria* flower extract on skin symptoms: a preliminary clinical study

○城戸 弥生、松田 朋子、金本 優杞、長澤 早紀、神谷 智康、池口 主弥、高垣 欣也（（株）東洋新薬）
○Yayoi KIDO, Tomoko MATSUDA, Yuki KANAMOTO, Saki NAGASAWA, Tomoyasu KAMIYA, Motoya IKEGUCHI, Kinya TAKAGAKI (Toyo Shinyaku)

【目的】

葛の花エキス ™ はマメ科クズ(*Pueraria thomsonii*)の花部の抽出物である。我々は、複数の *in vivo* 及びヒト試験において、葛の花エキス ™ の内臓脂肪低減作用や抗脂肪肝作用などを既に報告しているが、特に、葛の花エキス ™ を 12 週間にわたり連続摂取させた二重盲検並行群間試験において、血中高分子アディポネクチンが摂取前と比較して有意に上昇したことを確認している。

アディポネクチンは、AMP キナーゼ経路や PPARα経路を活性化することでインスリン感受性を亢進させるため、脂質および糖代謝のキー因子として注目されている。近年になり、アディポネクチンの新たな機能として、真皮中のコラーゲンやヒアルロン酸合成を促進することが報告され出しており、アディポネクチンの増加は肌の水分量や弾力などにも影響を及ぼす可能性が示唆されている。

以上の背景から、葛の花エキス ™ の連続摂取がヒト肌症状に及ぼす影響を確認することを目的として、健常女性を用いた探索的研究を行った。

【方法】

試験はオープン法で実施した。試験の実施にあたっては、ヘルシンキ宣言の精神に則り、被験者に試験内容を十分に説明した後に書面による試験参加の同意を得た上で、実施した。健常成人女性 2 名を対象とし、葛の花エキス ™ 300 mg を含む試験食品を 12 週間摂取させ、摂取前、4 週目、8 週目、12 週目に、体重、BMI、体脂肪率、ウエスト周囲長、ヒップ周囲長、上腕周囲長、皮下脂肪厚の測定および肌測定（水分量、水分蒸散量、弾力）を行った。なお、皮下脂肪厚は、BFI メジャー(㈱誠鋼社製)を用いて、上腕背部・腹部・腰部・大腿前部・大腿後部を測定した。

【結果】

摂取前と比較して、体重、BMI、体脂肪率、ウエスト周囲長、ヒップ周囲長、上腕周囲長および皮下脂肪厚が減少した。肌測定においては、水分量および弾力は摂取前と比較して高値を示し、水分蒸散量は摂取前と比較して低値を示した。

以上のことから、葛の花エキス ™ の継続摂取は抗肥満作用を示すことが確認され、さらには肌症状の改善にも有効である可能性が示唆された。

Pueraria flower extract, skin symptoms

講演番号：2A25p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ A 校舎 25 会場

アロエベラゲル粉末及びアロエベラゲル抽出物は、ヒト繊維芽細胞でのコラーゲンとヒアルロン酸の産生を促進する

Aloe vera powder and aloe vera gel extract promote production of collagen and hyaluronic acid on human fibroblast.

○田中 美順、三澤 江里子、齊藤 万里江、山内 恒冶、阿部 文明（森永乳業株式会社　食品基盤研究所）
○Miyuki TANAKA,Eriko MISAWA,Marie SAITOU,KOUJI YAMAUTI,Fumiaki ABE (Morinaga Milk Co.)

〔目的〕

アロエベラゲルは、アロエベラの食用の葉肉部分で、ヨーグルトなどの食品素材として広く利用されている。我々は、これまでにアロエベラゲルの体脂肪低減効果及び抗糖尿病効果を確認し、有効成分として5つの植物ステロール（アロエベラステロール®）を同定した。

古くからアロエベラゲルの経口投与及び塗布による創傷治癒作用など肌に関する効果についての有効性について報告されているが、我々はこれまでに、マウス光老化モデルにおいて、アロエベラゲル粉末（AVGP）および、アロエベラゲル抽出物（AVGE）摂取によって、紫外線照射による背部水分蒸散量やしわ個数の増加における予防効果を確認してきた。そこで今回、さらに、ヒト繊維芽細胞を用いて、AVGP 中の水溶成分及び AVGE 添加による効果について検討を行なった。

〔方法〕

ヒト正常繊維芽細胞を、90％コンフルエントまで培養した段階で、各濃度の AVGP 水溶性成分及び AVGE を添加して 24 時間培養した後、MTT アッセイ及び培養上清中の type Ⅰ コラーゲン、ケラチノサイトグロースファクター量を ELISA にて、また細胞を回収して、定量的 RT-PCR 法に各遺伝子の発現を検討した。

〔結果〕

AVGP 水溶性成分を添加により、ヒト繊維芽細胞で増殖促進が認められると共に、培養上清中の type Ⅰ コラーゲン、ケラチノサイトグロースファクター量の増加が確認された。さらに、定量的 RT-PCR 法にて解析した結果、AVGP 水溶性成分を添加により、皮膚基底膜の構成成分である、Ⅳ型コラーゲンのサブユニット COL4A1 及び COL4A2 の mRNA 発現量が増加することを確認した。また、AVGE 添加により COL4A1、COL4A2 及び、ヒアルロン酸合成酵素 HAS3 の mRNA 発現量が増加することを確認した。

〔結語〕

AVGP 水溶性成分には、コラーゲンの産生を促進する効果があることが示唆された。さらに、アロエベラステロール®を濃縮した AVGE については、これまでに PPAR s を介した抗肥満及び抗糖尿病効果を有することを確認していたが、今回、ヒト繊維芽細胞からのコラーゲン及びヒアルロン酸の産生を促進する効果があることが示唆された。

Aloe vera gel, collagen, hyaluronic acid

講演番号：2A25p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ A 校舎 25 会場

Organotypic coculture of mouse skin cells as a model for studying the effects of collagen peptide prolyl-hydroxyproline on the skin

○PHUONG LE VU LAN[1], RYO TAKATORI[1], TAKU IWAMOTO[1], KENJI SATO[2], MAMORU TOTSUKA[1], HIDEO SATSU[1], KAZUHIRO CHIDA[1], MAKOTO SHIMIZU[1] ([1]The University of Tokyo, [2]Kyoto Prefectural University)

Collagen and its peptides have been suggested to be functional food substances for skin care in recent years. However, the molecular mechanisms by which these food components benefit the skin are not well understood. In order to examine the effects of collagen peptides on gene expression of skin fibroblasts and keratinocytes and especially on the interactions between them, we have used a coculture system of primary mouse skin cells.

Basically, mouse skin fibroblasts were cultured in collagen gel in culture inserts, and keratinocytes were freshly isolated from new born mice and overlaid on top of the gel. The culture surface was then exposed to air to allow the formation and differentiation of a skin-like layer. On day five of medium change process, prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp) which is a collagen-derived dipeptide, was added to the basal side of the gel. Alternatively, the peptide was added to keratinocyte monoculture and fibroblast monoculture for comparisons. Analysis by real time RT-PCR revealed that Pro-Hyp enhanced the expression levels of keratin-associated proteins 14, 15, and 8-2 in the keratinocytes and prolyl-4-hydroxylase in the fibroblasts of coculture whereas those of monocultures remained unchanged. The effects of proline, hydroxyproline, and a mixture of these amino acids on skin coculture were also studied.

On the other hand, we found that mRNA of the proton-coupled oligopeptide transporter 1 (Pept1) is expressed in keratinocytes but not in fibroblasts. This can be the key for understanding the effects of Pro-Hyp and other collagen peptides on skin cells. We are now trying to examine the transport activity of Pept1 in keratinocytes using [^{3}H]Glycylsarcosine as a reference substrate.

In short, we suggest that the coculture system of mouse skin fibroblasts and keratinocytes can be used for studying the mechanisms of skin care effects of collagen peptides.

organotypic coculture, skin, collagen peptide

講演番号：2A25p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ A 校舎 25 会場

褐藻由来フコキサンチンの線維芽細胞に対する紫外線保護作用
Brown algal fucoxanthin can protect fibroblasts against UV
○菅原 達也[1]、松尾 明香[1]、黒井 梓[2]、矢野 紗枝子[2]、松下 奈央[2]、山原 年[2]、平田 孝[1]([1]京大院農、[2]（株）桃谷順天館)
○Tatsuya SUGAWARA[1], Asuka MATSUO[1], Azusa KUROI[2], Saeko YANO[2], Nao MATSUSHITA[2], Toshi Yamahara[2], Takashi HIRATA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]MOMOTANI JUNTENKAN LTD.)

【目的】フコキサンチンは、コンブ、ワカメ、ヒジキなどの食用褐藻類に含まれる主要なカロテノイドである。これまでに抗肥満作用、抗糖尿病作用、抗炎症作用、血管新生抑制作用などの様々な機能性が報告されており、健康に寄与する新規素材としての有効活用が期待されている。近年、紫外線暴露によって引き起こされる皮膚の光老化現象が、真皮層の細胞外マトリックスの破綻を引き起こし、シワ形成と密接に関わることが示されてきている。さらに皮膚の光老化現象には血管新生が関わることも報告されている。そこで本研究では、フコキサンチンの皮膚光老化に対する作用を調べるために、表皮のモデルとしてケラチノサイトを、真皮のモデルとして繊維芽細胞を用いて、紫外線照射によって引き起こされる反応に対するフコキサンチンの影響を評価した。

【方法】UVA（10 J/cm^2）を照射した正常ヒト由来繊維芽細胞（NHDF）におけるマトリックスメタロプロテアーゼ 1（MMP-1）の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法で、細胞外への分泌量を ELISA 法を用いて測定し、フコキサンチン添加による影響を調べた。さらに表皮層と真皮層のクロストークを想定し、フコキサンチン処理または未処理の正常ヒト由来ケラチノサイト(NHEK)に UVB 照射後(20 mJ/cm^2)、得られた培地を用いて NHDF を培養し、MMP-1 の mRNA 発現量と分泌量を比較した。

【結果と考察】フコキサンチンは、繊維芽細胞において、UVA によって誘導される MMP-1 の mRNA 発現と細胞外への分泌の促進を有意に抑制した。一方、UVB 照射したケラチノサイトから得られた培地によって、繊維芽細胞の MMP-1 発現量及び分泌量は有意に促進されたが、ケラチノサイトを予めフコキサンチンで処理することにより、それらの促進は有意に抑制された。以上の結果から、フコキサンチンは紫外線によって引き起こされる皮膚光老化反応とシワ形成を抑制する可能性が示唆された。

carotenoid, photoaging, skin

講演番号：2A25p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ A 校舎 25 会場

in vitro と in vivo におけるウコン粉末のプレバイオティクス効果

Prebiotic effects of turmeric powder in vitro and in vivo

○韓 圭鎬、橋本 千尋、豊田 敏、島田 謙一郎、中村 有美、福島 道広（帯畜大・食品科学）
○Kyu-Ho HAN, Chihiro HASHIMOTO, Bin TOYODA, Ken-ichiro SHIMADA, Yumi NAKAMURA, Michihiro FUKUSHIMA (Obihiro Univ.)

【目的】食物繊維は腸内発酵により腸内環境を改善することなど、生体コントロールに重要な役割を果たしているのが注目されている。以前の研究でウコン粉末には盲腸の重量や糞便の排泄増加などの効果が見られ、ウコン粉末はプレバイオティクスとしての可能性が示唆された。今回は in vitro と in vivo におけるウコン粉末の脂質代謝または腸内環境に及ぼす影響について検討した。
【方法】in vitro ではジャーファーメンターを用いて窒素源にはニュートリエントブロスを、炭素源にはセルロースまたはウコン粉末を用いた。これに希釈した豚の糞便液を混合させ、それぞれ４８時間培養を行った。各培養時間より採取した培養液から細菌叢、短鎖脂肪酸、アンモニア態窒素、またスカトール・インドールを分析した。さらに、in vivo では低脂肪食群、高脂肪食群、また高脂肪食にウコン粉末を１０％添加した食群を用意し、８週齢のＳＤ系雄ラットに４週間自由摂取させた。飼育期間中には摂取量、体重増加及び糞便排泄量を測定し、飼育後には内臓脂肪量、肝臓重量及び盲腸重量を測定した。血清からは脂質、盲腸内容物からはｐＨ、細菌叢及び短鎖脂肪酸を測定した。また、糞便中へ排泄された脂質も分析した。
【結果】培養開始以降、ｐＨと大腸菌はウコン粉末添加によってセルロースより低下した。乳酸菌、*Lactobacillus*、また *Bifidobacterium* は培養開始以降、ウコン粉末添加でその菌の増殖が見られた。短鎖脂肪酸ではウコン粉末添加で生成量の増加が見られ、特に酢酸とプロピオン酸がセルロース添加より高くなった。アンモニア態窒素とインドール産生はウコン粉末添加で抑制された。一方、ウコン粉末をＳＤ系ラットに４週間投与した結果、高脂肪食群に比べ、摂取量、体重量、また内臓脂肪量の低下、盲腸重量と糞便量の増加が見られた。特に、糞便量は高脂肪食群に約２倍排泄された。血清の中性脂肪濃度は、ウコン粉末の投与により投与期間を通して高脂肪食群に比べ減少した。ウコン粉末群の肝臓の中性脂肪は高脂肪食群に比べ低下し、糞便の遊離脂肪酸の排泄量は増加した。さらに、盲腸内容物のｐＨはウコン粉末の投与により低下し、乳酸菌は増加した。盲腸内容物の短鎖脂肪酸はウコン粉末の投与により増加し、特に酢酸と酪酸が低脂肪食群と高脂肪食群に比べより高くなった。
【考察】以上の結果より、ウコン粉末は in vitro と in vivo においてプレバイオティクス効果が見られた。さらに、高脂肪食において食欲を抑制し、脂質代謝改善効果が確認された。しかし、ウコンにはクルクミンが多く含まれているので、現在クルクミンを除去した残渣物から食欲、脂質代謝および腸内環境改善効果についても検討中である。

Turmeric, Prebiotics, Short-chain fatty acid

講演番号：2A25p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ A 校舎 25 会場

テアフラビンの腸内細菌叢に対する影響の解析
Influence of theaflavins on commensal bacterial growth and cecum microbial proportion of human-flora-associated mice

○堀江 暁[1]、市川 晋太郎[1]、平山 和宏[2]、小池 慧[1]、谷口 慈将[3]、中山 勉[4]、吉田 有人[1]、伊藤 喜久治[2] ([1]キリン・基盤研、[2]東大院・農、[3]キリン・健康研、[4]静岡県大・食品栄養)
○Akira Horie[1], Shintaro Ichikawa[1], Kazuhiro Hirayama[2], Kei Koike[1], Yoshimasa Taniguchi[3], Tsutomu Nakayama[4], Aruto Yoshida[1], Kikuji Itoh[2] ([1]Kirin Co., Ltd., [2]The Univ. of Tokyo, [3]Kirin Co., Ltd., [4]Univ. of Shizuoka)

【背景】紅茶は世界で最も普及した飲料の 1 つであり、様々な生理作用を示すことが知られている。中でも、茶葉の発酵過程でカテキン 2 分子が重合することによって生じるテアフラビン類（TF）は、紅茶に特徴的な赤橙色を呈するポリフェノールであり、高い抗酸化活性を有することが報告されている。TF にはガレート結合の数とその位置の違いによって TF1、TF2a、TF2b、TF3 の 4 種が知られており、多くのポリフェノール類と同様、その吸収性は低いものと考えられている。近年、食品成分の腸内細菌叢に対する作用に注目が集まっているが、TF が腸内細菌叢に与える影響はこれまで全く知られていなかった。今回我々は、TF が腸内細菌叢に与える影響を *in vitro*/*in vivo* の両面から解析した。
【方法】TF による静菌活性を *in vitro* で評価するため、0 - 2,000 ppm の TF 混合物を含有する寒天培地上で、ヒト腸内常在菌および病原性細菌 36 株（aerobe 15 株 / anaerobe 21 株）の MIC（最小生育阻止濃度）を評価した。次に、感受性の高かった常在菌株に対する TF の各分子種の活性を比較した。さらに、ヒト腸内細菌叢に対する効果を *in vivo* で解析した。具体的には、TF 混合物を 0.5%添加した飼料をヒトフローラ定着（HFA）マウスに対して 3 週間投与した。糞便由来の DNA を qPCR で解析することによって、腸内細菌叢の構成を経時的に調べた。
【結果･考察】*in vitro* で MIC を評価した結果、TF 混合物は 400 - 800 ppm という濃度でサルモネラ菌や MRSA のような病原体を始め、ヒト腸内常在菌を含む幅広い細菌の発育を抑制した。その反面、プロバイオティクスとして知られる *Lactobacillus* や *Bifidobacterium* といった乳酸菌の生育には全く影響しなかった。また、TF の代表的な 4 分子種の静菌活性を比較したところ、2 分子のガレートが配位した TF3 が最も強い活性を示した。このことから、TF の静菌活性にはガレートの配位が重要であると考えられる。さらに、HFA マウスを用いた *in vivo* 試験の結果、TF 摂取群において *Bacteroides* や *Clostridium* cluster XIVa が有意に減少した。その一方で、ヒト腸内において主要な乳酸菌である *Bifidobacterium* の菌数に変化は認められず、*in vitro* の MIC アッセイと共通した傾向が見られた。以上の結果から、TF はヒト腸内細菌叢の構成を変化させる可能性があることが示唆された。

commensal bacteria, theaflavin, black tea polyphenol

講演番号：2A25p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ A 校舎 25 会場

オカラおよびフスマ可溶化物の腸内菌叢改善効果と胃潰瘍抑制効果

Protective effects of solublized wheat bran and tofu refuse on intestine microflora and gastric stress ulcer in mices

大串 美沙[1]、今井 ももこ[1]、庄條 愛子[1,2]、飯田 聡史[1]、原田 直樹[3]、山地 亮一[3]、乾 博[4]、吉澤 みな子[5]、和田野 晃[1,3]、○中野 長久[1,3,6] ([1]大阪府大・地域連携、[2]相愛大・人間発達、[3]大阪府大院・生命環境、[4]大阪府大院・総リハ、[5]大手前栄養学院、[6]大阪女子短大)
Misa Ogushi[1], Momoko Imai[1], Aiko Syojyo[1,2], Satoshi Handa[1], Naoki Harada[3], Ryuichi Yamaji[3], Hiroshi Inui[4], Minako Yoshizawa[5], Akira Wadano[1,3], ○Yoshihisa Nakano[1,3,6] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]Soai Univ., [3]Osaka Prefecture Univ., [4]Osaka Prefecture Univ., [5]Otemae College., [6]Osaka Women's Junior College.)

【目的】オカラおよびフスマは食素材加工の際に副生される物質であり、食物繊維を豊富に含み、生活習慣病の予防として機能性を発揮している。しかし、これらの食素材加工副産物の大部分が不溶性食物繊維であり、機能性食品への加工が困難である。そこで我々は、これまでに加工処理を施し、水溶性の素材に仕上げることに成功してきた。そこで今回は、この可溶化オカラおよびフスマを用いて、食品としての機能性について、新規に開発することを目指し、種々の生理機能についてマウスを用いて検討を行った。まずは腸内菌叢改善作用および脂質吸収抑制作用について、さらに浸水拘束ストレスモデルでの胃潰瘍抑制効果について検討した。
【方法】加水下でオカラおよびフスマ乾燥物をオートクレーブ処理し、セルラーゼとペクチナーゼおける酵素処理を行い、可溶化物を精製した。実験動物には 8 週齢の雄性 Balb/c マウスを用い、これらの可溶化物を凍結乾燥し、マウスの飼料に添加した。[実験１] 各々の可溶化処理前乾燥物（以下、乾燥物）および可溶化物を標準食(AIN-93)および高脂肪食に 3%添加し実験飼料とし、2 週間飼育した。飼育終了後、血液および盲腸を採取した。盲腸は RT-PCR 法を用い、盲腸内菌叢解析を行った。[実験 2] 各々の可溶化物を標準食に 3%添加し、2 週間の飼育後、16 時間絶食させた。Yoneda らの方法に従い、水浸拘束負荷試験を行い、終了時に血液および胃組織を採取した。
【結果と考察】[実験 1]高脂肪食オカラ可溶化物添加飼育マウスでは、盲腸内容物中の乳酸菌数が、普通食対照区の約 10 倍、高脂肪食対照区の約 60 倍にまで増加していた。ビフィズス菌数は、高脂肪食摂取により、著しい減少がみられたが、フスマ可溶化物添加飼育マウスでは、高脂肪食対照区の約 4 倍に増加していた。また、各々の可溶化物添加飼育マウスでは、対照区に比べて血中中性脂肪濃度は低値を示した。乾燥物添加飼育マウスでも、対照区に比べて血中中性脂肪の低下傾向がみられた。[実験 2] 胃潰瘍面積は対照区で 139.6㎜^{2} であり、オカラ可溶化物添加マウスでは、100.6㎜^{2} であった。一方、フスマ可溶化物添加飼育マウスは、28.2㎜^{2} であり、対照区と比較して、顕著に低値を示し、胃潰瘍抑制効果がみられた。
これら 2 つの実験結果より、オカラおよびフスマ可溶化物には腸内菌叢改善効果かつ脂質吸収抑制効果および胃潰瘍抑制効果が期待される知見が得られた。

bran, tofu-refuse, GI-tract

講演番号：2A25p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ A 校舎 25 会場

ヒト腸内細菌叢定着マウスを用いた *Bifidobacterium longum* BB536 による整理作用の解析

Analysis of the physiological action by *Bifidobacterium longum* BB536 using mice model with human microflora

○菅原 宏祐[1,2,3]、小田巻 俊孝[1]、清水(肖) 金忠[1]、阿部 文明[1]、加藤 完[2,3]、菊地 淳[3,4]、福田 真嗣[2,5]、大野 博司[2,3] ([1]森永乳業食基研、[2]理研 RCAI、[3]横浜市大生命ナノシステム科学、[4]理研 PSC、[5]慶応大先端生命研)

○Hirosuke SUGAHARA[1,2,3], Toshitaka ODAMAKI[1], Jin-zhong XIAO[1], Fumiaki ABE[1], Tamotsu KATO[2,3], Jun KIKUCHI[3,4], Shinji FUKUDA[2,5], Hiroshi OHNO[2,3] ([1]MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD, [2]RIKEN RCAI, [3]Yokohama city Univ., [4]RIKEN PSC, [5]Keio Univ.)

＜目的＞

Bifidobacterium longum BB536 の経口摂取は、便中のビフィズス菌数を増加させ、有害細菌や腐敗産物を減少させることが報告されている。しかしヒトの腸内細菌叢は複雑であるため、*B. longum* BB536 による生理作用は十分に解明されていない。そこで本研究では、無菌マウスにヒト腸内細菌叢を定着させたマウスモデルを用いて、*B. longum* BB536 による腸内細菌叢および腸内代謝産物への影響を解析した。

＜方法＞

B. longum BB536 を無菌環境下で飼育した BALB/c マウスに胃内投与し、単独定着マウスを作製した。この単独定着マウスと無菌マウスの両群に対し、健常成人の糞便を胃内投与し、ヒト腸内細菌叢定着マウスを作製した。ヒト糞便投与後 1、7、14、21 日後の便を回収し、リアルタイム PCR 及び次世代シーケンサーを用いて腸内細菌叢を解析した。また、7、14、21 日後の便から水溶性代謝物を抽出し、NMR メタボロミクスにより腸内代謝産物を網羅的に解析した。

＜結果＞

ヒト糞便定着 7 日後における両群の腸内細菌叢を網羅的に解析した結果、*B. longum* BB536 を予め単独定着させたマウス群では無菌マウスにヒト糞便を胃内投与した群と比べて、ヒト腸内優勢細菌群の一つである *Lachnospiraceae* が有意に高い割合を占め、*Lactobacillaceae* が有意に低い割合を示した。腸内代謝産物のメタボロミクスから、*B. longum* BB536 の定着により糖および乳酸が有意に減少し、ピメリン酸が有意に増加した。さらに酢酸も増加傾向にあった。また、ピメリン酸量と *Lachnospiraceae* の割合には正の相関関係が認められ、ピメリン酸量と *Lactobacillaceae* の割合の間には負の相関関係が認められた。ピメリン酸は生体内におけるビオチンの前駆体であるため、便中のビオチン濃度を測定したところ *B. longum* BB536 群ではビオチン濃度が増加傾向にあることが明らかとなった。ビオチンは生体にとって必須の因子であり、腸内細菌叢により産生されることが報告されている。本実験の結果から、*B. longum* BB536 の腸内環境への影響の一つとして、腸内細菌叢の変動を介したビオチン生産能の増強が示唆された。

Bifidobacterium, Microflora, Metabolomics

講演番号：2A25p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ A 校舎 25 会場

プチヴェールの機能解析
Performance analysis of a Petit Vert
○小瀬木 一真[1]、糟谷 亮介[1]、山田 千佳子[1]、松田 幹[2]、和泉 秀彦[1]([1]名古屋学芸大院・栄養科学、[2]名大院・生命農)
○Kazumasa OZEKI[1], Ryousuke KASUYA[1], Chikako YAMADA[1], Tsukasa MATSUDA[2], Hidehiko IZUMI[1] ([1]Nagoya University of Art and Sciences, [2]Nagoya University)

【目的】
プチヴェールはケールと芽キャベツの交配によって作り出された新奇のアブラナ科植物である。両者の長所を受け継いだ非結球性の芽キャベツで、一般の野菜に比べて栄養価が高く、糖度も 11～13 度と高いため食べやすい。アブラナ科植物にはケルセチン、ケンフェロールなどの機能性を有するポリフェノールが含まれており、生活習慣病の予防やアレルギーに効果的であることが知られている。しかし、プチヴェールの機能性や、それに関与している成分については明らかにされていない。そこで、プチヴェールの成分を分離して、親野菜であるケールや芽キャベツと比較し、抗アレルギー作用を解析することを目的とした。また、プチヴェール乾燥粉末や調理後のプチヴェールの成分変化についても解析を行った。
【方法】
各野菜 200g を 70%メタノール 500ml でホモジナイズし、ろ過後、50ml に濃縮した。次に、80%メタノール 350ml、ヘキサン 400ml を加えて液液分配抽出を行った。下層のメタノール層に同量のヘキサンを加え、再度液液分配抽出を行い、脂質を除いた。このメタノール層を 20ml に濃縮したものをダイヤイオン HP20 カラムに通し、水溶出画分、70%エタノール溶出画分をそれぞれ集め 20ml に濃縮した。それぞれの画分について、DPPH 法、Folin-Ciocalteu 法を用いて抗酸化物質量、ポリフェノール量をそれぞれ測定した。また、HPLC 法による成分の分離も行い、各野菜間で比較した。プチヴェール乾燥粉末については、ダイヤイオン HP20 カラムに通す前の濃縮液を生と比較した。調理操作については、ゆで調理、レンジ調理を行い、それぞれ生と比較した。抗アレルギー作用については、RBL-2H3 細胞にプチヴェール抽出液を添加し、脱顆粒の抑制率を測定した。
【結果】
抗酸化物質量、ポリフェノール量ともに、プチヴェールはケールよりメキャベツに近い値を示した。また、HPLC 法による成分の分離パターンもプチヴェールとメキャベツは類似していた。加えて、プチヴェール乾燥粉末 10g には、生のプチヴェール 100g に相当するポリフェノールが含まれていることが分かった。調理操作に関しては、ゆで調理よりレンジ調理の方が、ポリフェノールが残存していることが分かった。抗アレルギー作用に関しては、現在解析中である。

Petit Vert, polyphenol, RBL-2H3

講演番号：2A25p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ A 校舎 25 会場

未成熟柿由来成分の機能性解析

Study on functional components from seed, skin and flesh of young persimmon

○折居 千賀（公益財団法人　東洋食品研究所）
○Chika Orii (TOYO INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGY)

【目的】柿（Diospyros kaki）は古来より食用だけではなく薬（漢方薬）や染料として用いられるなじみ深い果物である。近年健康に対する意識の高まりにより、柿渋タンニンや柿果皮由来成分の抗酸化活性および抗菌活性をはじめとした機能性に関する研究が進められ、有効活用する試みがなされている。本研究では摘果、産業廃棄物として処理されることが多い富有柿および次郎柿の未成熟果実における皮、種、果実部位を対象とし、新たな機能性食品を確立するためそれらが含有する成分および各部位由来の成分が有する機能性について調べた。
【方法】７月に摘果した富有柿および次郎柿の未成熟果実における種、皮および果実部位を用い、エタノール抽出を行った。また、減圧乾固の過程でエタノール不溶の成分が各抽出物にて生じたため、同画分を分離、水に再溶して水画分とした。なお、各抽出液はエタノールもしくは水で 10%(w/v)となるように調製した。抽出液を TLC 分析（展開溶媒：クロロホルム-酢酸エチル-ギ酸＝5:4:1、検出試薬：p-アニスアルデヒド、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン、DPPH）に供した。さらにポリフェノールおよび抗酸化活性の定量を行い、糖の吸収に関与するα-グルコシダーゼおよび脂肪吸収に関与するβ-リパーゼ阻害活性について IC50 値を調べ、比較を行った。
【結果】TLC の結果、各抽出物において抗酸化活性を有する化合物がいくつか見られた（Rf 値=0～0.33 付近）。ポリフェノール成分および抗酸化活性の定量では富有柿種（ポリフェノール量：20.47 mg-没食子酸相当量/1.0 g、抗酸化活性：12.42 μmol-trolox 相当量/1.0 g）、次郎柿種（ポリフェノール量：13.91 mg、抗酸化活性：6.17μmol）において高い値を示した。また、富有柿では各抽出物の水画分にてα-グルコシダーゼおよびβ-リパーゼ阻害活性が見られた。α-グルコシダーゼ阻害活性では果実（水画分：IC50=5.49 mg/ml）が最も高く、β-リパーゼ阻害活性では皮（水画分：IC50=23.9 μg/ml）において高い活性が見られた。また、種においては水画分だけではなくエタノール抽出画分にもα-グルコシダーゼ阻害活性が見られた（IC50=9.91 mg/ml）。次郎柿ではα-グルコシダーゼおよびβ-リパーゼの両方に対して顕著な阻害活性を示したのは果実（水画分）のみであり、種や皮においては顕著なα-グルコシダーゼ阻害活性と弱いβ-リパーゼ阻害活性を示した。また、次郎柿皮部位ではエタノール抽出画分においても顕著なα-グルコシダーゼ阻害活性が見られた（IC50=17.07 mg/ml）。これらのことより柿未成熟果実由来の成分は糖質脂質吸収抑制効果を有する可能性を明らかにした。

young persimmon, α-glucosidase inhibition, β-lipase inhibition

講演番号：2A25p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ A 校舎 25 会場

地域食材を複合した食品開発について

Health food development utilizing the food materials in local area

○寺戸 奈保子、梅内 志乃、若生 豊（八戸工業大学）
○naoko terado,yukino umenai,yutaka wako (Hachinohe institute tech)

【目的】青森県内近海の全域でサメが捕獲され、年間約1，615トン程度の水揚げがある。多くはアブラツノザメで、刺し身や煮付け、ちくわなどに加工され食に供されている。サメからはスクワレンなどの機能性成分が健康食品の素材として広く利用されている。しかし、青森県ではサメ肝臓の多くは廃棄されているのが現状であり、有効利用が課題となっている。また、当地方では養蚕に使われた桑畑が各地に残されており桑の葉をお茶として飲む習慣がある。桑の葉は血糖値コントロールなど健康に役立つとされ、利用の広まることが望まれる。本研究では、健康に役立つ成分を含む、地域の未利用資源などを活用し食品開発を行うための基礎的データを得ることを目的とする。
【方法】サメ肝油は水揚げされた新鮮な肝臓から低温下で自重によりろ紙ろ過分離し調製した。桑葉抽出エキスは試料重量30倍量の水-エタノールの混液により、混合比率を変え加熱抽出した。食用菊抽出エキスはエタノールによる加熱抽出物を逆相のパックカラムで分画し調製した。サメ肝油の組成はシリカゲルTLCにより分離し硫酸噴霧・加熱により生じるスポットより推定した。桑抽出エキス中のポリフェノール類はHPLCにより検討した。また、エキスの活性酸素（･OH）消去活性の評価はデオキシリボース法により行った。また、がん細胞死誘導能はHL60細胞を用いMTT法により細胞活性を測定し評価した。さらに、各抽出画分の糖吸収阻害活性の評価は、腸アセトンパウダーを利用しα-グルコシダーゼ阻害活性測定によるin- vitro の方法で検討した。食用菊エキス画分のルテオリン等のフラボノイド含有量はHPLCにより推定した。
【結果】地域の食材を組み合わせ健康に資する食品を作る観点より、食品素材となるそれらのエキスの調製方法と有効成分の含有量、生理活性を検討した。調製したサメ肝油の組成は概ねスクワレン45%、アルコキシグリセロール 35～40%、脂肪酸 5%程度であった。桑茶のポリフェノールの多くはクロロゲン酸類であり、一方食用菊はアピゲニンに UV スペクトの類似するフラボノイドが多く含まれていた。現在、ルテオリンを多く含有する画分の調製方法は検討中である。桑葉抽出エキスの活性酸素消去能は約 3μg/ml で 50%の活性が認められた。また 10μg/ml 以上のエキス濃度により HL60 細胞の細胞死が誘導された。血糖値コントロールに有効な量の桑葉の成分を作製する食品に含有させるため、現在この成分の調製方法の検討を進めている。地域の食材より調製した、活性酸素消去やα-グルコシダーゼ阻害活性などの生理作用を示す食品素材を組み合わせることにより、有用な成分を無理なく摂取できる食品の開発が可能であることが示された。

food development, shark liver oil, mulberry tea

講演番号：2A25p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ A 校舎 25 会場

オレンジにんにくの香気成分

The aroma components in processed orange garlic

○桑原 隆明、高梨 豊明、川上 美智子 (茨城キリスト教大学大学院生活科学研究科食物健康科学専攻)
○Takaaki KUWAHARA,Toyoaki TAKANASHI,Michiko KAWAKAMI (Ibaraki Christian Univ.)

ニンニク(*Allium sativum*)は日本には 8 世紀頃に伝わり、香気成分のスルフィド類が、活性酸素消去作用、解毒酵素 GST の活性化作用等の機能をもつことから、重要な農産物として位置づけられてきた。宮坂らは、生ニンニクを冷凍加工することで保存性と機能性を強化したオレンジニンニクを開発した[宮坂他により製法特許出願中]。本研究ではその試作品の香気特性の解明を行った。

１．試料　①生ニンニク、②オレンジニンニク、③加工後 10 か月保存(茶色)、④加工後 1 年保存(黒色)の 4 試料を用いた。試作品の匂いの比較にはニンニクから揮発するヘッドガスを SPME 法（マイクロ固相抽出法）で捕集し、GC-MS 分析する方法を用いた。

２．結果　官能検査では、オレンジニンニクは、生ニンニクが有する強烈なニンニク臭が弱まり、熟成したマイルドな香りに感じられた。分析の結果、オレンジニンニクの香気総量は生ニンニクの 1.06 倍で香気総量には余り変化がなく、香りがよく保持されていた。保存時間の長い試料③は 0.44 倍、試料④は 0.11 倍で香気が減少していた。オレンジニンニクでは、低分子アルデヒド類の増加が認められ、ニンニク特有のスルフィド類では allyl methyl disulfide, allyl propyl disulfide, diallyl disulfide, allyl (*Z*)-1-propenyl sisulfide などの disulfide 類が減少し、allyl (*E*)-1-propenyl disulfide の他、allyl methyl trisulfide, diallyl trisulfide などの trisulfide 類が大きく増加した。また、3-vinyl-[4H]-1,2-dithiin, 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin の環状含硫化合物も増加した。保存期間の長い試料③では、diallyl trisulfide が香気の 62.45%も占めるようになり、試料④では ethanol が 10.95%、allyl alcohol が 7.43%、acetic acid が 16.03%に増加し、発酵や酸化が進行したと考えられた。

processed orange garlic, aroma components, GC-MS

講演番号：2B11a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ B 校舎 11 会場

内生菌根植物セドロと外生菌根菌マツタケで成立した原始的な外生菌根様器官と共生

Root endophytic association between *Cedrela odorata* and *Tricholoma matsutake*

○村田 仁[1]、山田 明義[2]、丸山 毅[1]、遠藤 直樹[2]、山本 航平[2]、大平 辰朗[1]、下川 知子[1]([1]森総研、[2]信大農)
○Hitoshi MURATA[1], Akiyoshi Yamada[2], Tsuyoshi Maruyama[1], Naoki Endo[2], Kohei Yamamoto[2], Tatsuro Ohira[1], Tomoko Shimokawa[1] ([1]FFPRI, [2]Shinshu U.)

【目的】マツタケはマツ科の根の細胞間隙に宿り、「外生菌根」と呼ばれる共生器官を作って生きる。この周りに「シロ」と呼ばれる塊状の菌糸集落を形成し、シロの成長の過程で子実体が発生する。我々は、「シロはアカマツとしかできないのか？」という疑問を持ち、アカマツとは全く異なる植物セドロ（センダン科）を宿主に用いてシロ作製に取り組んだ。セドロは、自然界ではマツタケ（担子菌）とは別の生物門に属する菌類（接合菌）を植物細胞内部に取り込み、「内生菌根」と呼ばれる全く異なる共生器官を形成する。
【方法】培養細胞から再生したセドロ無菌苗をマツタケの宿主に用いた。マツタケ山と類似する条件、つまり、花崗岩土壌に最低限の栄養源を調整した培地で、他の微生物がいない状態で140日、セドロとマツタケ菌糸を２員培養した。アカマツとの２員培養を標準区に用いた。
【結果】セドロ−マツタケで出来たシロは、アカマツ−マツタケのシロと同じような立派な菌糸塊をつくり、かつシロ独特の芳香を発する。なお、アカマツ−マツタケで出来る共生器官は典型的な外生菌根であったが、セドロ−マツタケでは、不完全な菌根形態をとる。前者では菌糸が根の細胞間隙にくまなく編め目状に張り巡らされているのに対し、後者では根の細胞間隙に維管束と平行するように縦方向のみ菌糸伸長が起こる。また、一部の植物細胞内には菌糸が宿っていた。つまり、この「不完全」な外生菌根は「原始的」な外生菌根様器官の様相を呈していた。というのも、草本や熱帯林の多くでみられる「内生」は起源が古く、温帯から亜寒帯の特定の樹種のみに見られる「外生」は進化的に新しいというのが定説である。今回、セドロ−マツタケで見られた菌根様器官は「内生」から「外生」に共生形態が移った時のものに相当すると考えられる。マツは表皮細胞の下に内皮細胞があり、菌糸は比較的植物組織に深く入り込むことができる。しかし、セドロでは、表皮細胞と内皮細胞の間に硬い外皮細胞があり菌糸が組織深く入ることはできない。表皮細胞は通常根毛になる部分だが、マツタケ菌糸が宿ることにより根毛が発達せずマツタケ菌糸の居場所となった。マツタケがセドロの成長に影響を与えているかを、植物の地上部、地下部の長さ、及び乾燥重量で調べた。その結果、マツタケが宿ることで、植物体大きさ及び重量が明確に増大していた。つまり、共生が成立していたのである。本成果は、多様な樹種がマツタケと共生できることを示し、様々な樹種を使ったマツタケ栽培化技術開発の先駆けとなる。また、熱帯の内生菌根植物で「原始的」な共生器官が形成されたことは、植物と菌根菌との共進化の解明の手がかりになり、菌根を利用した森林再生にも役立つ。

evolution, fungi, mycorrhiza

講演番号：2B11a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ B 校舎 11 会場

Pleurotus spp. の新規種間について

Novel interspecific hybrids about *Pleurotus* spp.

○稲冨 聡、石川 真梨子、奥 竹史、高野 克太、大内 謙二（ホクト（株）きのこ総合研究所）
○Satoshi Inatomi,Mariko ISHIKAWA,Takeshi OKU,Katsuhiro TAKANO,Kenji OUCHI (Hokuto Co.,ltd Mushroom Research Laboratory)

Pleurotus spp.は、*Pleurotus eryngii*（Dcex Fr.）Quel.、*Pleurotus ostreatus*（Fr.）Quel.および*Pleurotus nebrodensis*（Dcex Fr.）Quel.をはじめ様々な種が知られ、とりわけ*P. eryngii*では数種の変種も存在し、分類学的な位置づけも検討されている。近年ではバイリングが、その遺伝学的解析から、*P. erynii* var. *touliensis* C.J.Mou とすることが適切であるとされ、分類学的位置が解明された例がある。さらに*P. eryngii* と*P. erynii* var. *touliensis* C.J.Mou との交配により、*P. eryngii* の亜種とも考えられる品種も育成されている。

当研究所では*Pleurotus* spp.の種間での交配の可能性をさらに広げて検討することで、新しい品種を生み出すことができるのではないかと考え、保有している *Pleurotus* spp.を網羅的に交配させた。その結果、以下に示す知見が得られた。

①*P. eryngii* と *P. ostreatus* は交配しなかった。②*P. eryngii* と *P. nebrodensis* は交配した。③*P. ostreatus* と *P. nebrodensis* は交配した。④*P. ostreatus* と *P. nebrodensis* との交配株は、*P. eryngii* と交配した。

④で得られた交配株は、さらに*P. ostreatus* および*P. eryngii* との交配が可能であった。

本発表ではこれらに関する詳細な知見を報告する。

Pleurotus, interspecific hybrids, mushroom

講演番号：2B11a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ B 校舎 11 会場

PCR-DGGE を用いたかつお節かび菌叢の解析

PCR-DGGE analysis of fungal communities in molded dried-bonito

○小山 大[1]、竹中 慎治[2]、土居 幹治[1]([1]マルトモ（株)、[2]神戸大院農)
○Dai KOYAMA[1], Shinji TAKENAKA[2], Mikiharu DOI[1] ([1]Marutomo co. ltd., [2]Grad. Sch. Agr., Kobe Univ.)

【目的】
かつお節の枯節（以下、枯節）は日本の伝統的な発酵食品であり、その製造にはかび付けと呼ばれる工程が存在する。かび付けは発酵段階と乾燥段階からなり、それらを数回繰り返したかつお節のみが枯節と呼ばれる。かび付けがもたらす効果としては匂いの変化などがあり、*Aspergillus* 属や *Eurotium* 属を中心としたかびの関与が報告されている。[1)] しかしこれらは培養工程を経て同定された菌種であり、これまでに枯節から直接かつお節かびを同定した報告は少ない。そのため実際のかび付け工程において、どのような種類のかびが関与しているのか詳細は不明である。そこで、かつお節表面から回収した糸状菌からの DNA 抽出や ITS 領域を増幅するための条件を確立した。[2)]
本報告では複数のかつお節かび菌叢を分子学的手法により培養を経ずに検出、比較することを目的としている。枯節からかつお節かびが直接的に同定できれば、効率のよいかび付け条件の探索や枯節の品質向上に大きく貢献できる。

【方法】
様々な条件でかびつけ加工が行われた枯節を準備し、それぞれのサンプルからかびを回収し、ゲノム DNA を抽出した。それらのゲノム DNA を鋳型とし、既報の PCR プライマー[2)]と新規 PCR プライマーを用いてかび rRNA 遺伝子や ITS 領域を増幅した。PCR 増幅物を PCR-DGGE に供し、泳動後ゲルのバンドパターンを比較した。

【結果】
PCR-DGGE 解析の結果より、培養工程を経ない枯節からの直接的なかび種の検出に成功した。また PCR-DGGE 泳動パターンの比較より、1: 同一の加工場においてかび付けが常にほぼ一定のかび菌叢によって行われていること、2: かつお節枯節の表面と内部のかび菌叢が類似していること、3: 全国の異なる加工場で生産される枯節が独特な菌叢を有していることを見出した。

1)M. Doi *et al.*, Agric. Biol. Chem., 53:1051-1055 (1989).
2)2012 年日本農芸化学会大会講演要旨集 (3C2503a).

PCR-DGGE, Dried-bonito, *Katsuobusi*

講演番号：2B11a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ B 校舎 11 会場

水圏環境からの発酵性酵母の分離における季節的影響

Seasonal influence in the isolation of fermentative yeast from the aquatic enviroments

○高橋 千秋、岸本 宗和、乙黒 美彩、柳田 藤寿（山梨大・ワイン科学研究センター）
○Chiaki TAKAHASHI,Munekazu KISHIMOTO,Misa OTOGURO,Fujitoshi YANAGIDA (Univ. of Yamanashi)

［目的］ 近年、自然界から多くの *Saccharomyces* 属酵母が分離されて発酵食品に応用されているが、陸圏に比べ水圏環境からの分離に関する研究は少ない。*Saccharomyces* 属酵母の存在は水圏においても確認されているが、数が極端に少ない為に分離困難であることが多い。酵母の特徴は種の多様性にあり、水圏における酵母の探索と生理学的特性の解析を行うことにより、新たな特徴をもった酵母を選抜し、食品へ応用することができる。今回、我々は水圏から *Saccharomyces* 属酵母を効率よく分離することを目的に、富士五湖の各湖における発酵性酵母の消長に及ぼす季節的な影響を明らかにした。また分離した *Saccharomyces* 属酵母のワイン醸造に関する 2、3 の性質を調べることを目的とした。

［方法］ 富士五湖（西湖・本栖湖・精進湖・山中湖・河口湖）より 2011 年（8 月･11 月）・2012 年（2 月･5 月）に採水した水を 350mL ずつメンブレンフィルターでろ過し、YPS(スクロース 20%、ポリペプトン 0.3%、酵母エキス 0.3%、プロピオン酸 Na 0.64%, クロラムフェニコール 0.01%)寒天平板培地で 25℃、3 週間嫌気培養した後メンブレンフィルター上のコロニーを釣菌し、純化した。分離株は、栄養細胞や子嚢胞子の形態観察及び YPS 液体培地での発酵性試験を行い、産膜の有無やアルコール濃度を測定した。また 5.8S rDNA を含む ITS 領域の PCR-RFLP 解析を行い、さらに 26S rDNAD1/D2 領域の塩基配列解析から種の同定を行った。また *Saccharomyces* 属酵母と同定された菌株について、ブドウ果汁における発酵速度やアルコール生成量、亜硫酸耐性を調査した。

［結果］ 富士五湖より四季を通して全 26 個所、208L の湖水から発酵性酵母 458 株を分離した。その中で産膜性酵母は全酵母の 50%であった。季節毎の発酵性酵母数は、秋が最も多く、次いで、夏、春、冬の順であった。秋は産膜性の酵母より、非産膜性の酵母が多く分離された。湖水 10L あたりの発酵性酵母数は河口湖が最も多く、精進湖が最も少なかった。各湖における分離酵母数の季節的な消長は、西湖･本栖湖･精進湖･河口湖で酷似しており、山中湖のみ違ったパターンを示した。全分離酵母のうち 41 株が *Saccharomyces* 属酵母と同定されたが、この中の 40 株は秋に分離され、残り 1 株は冬に精進湖から分離された。富士五湖から分離された *Saccharomyces* 属酵母の中に、ブドウ果汁における発酵が極めて旺盛で、アルコールを 12.2～12.8%(v/v)生成する株や 100ppm の亜硫酸に耐性を示す株が認められ、今後、これらのワイン醸造特性の解析を進めて行く予定である。

isolation, fermentative yeast, *Saccharomyces*

講演番号：2B11a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ B 校舎 11 会場

植物の根から分離した新規放線菌の分類
Taxonomic study of a novel actinomycete strain isolated from plant roots
○河口 洋子[1]、松本 厚子[2]、稲橋 佑起[1,2]、大村 智[2]、高橋 洋子[1,2] ([1]北里大院・感染制御科学府、[2]北里大・生命研)
○Yoko Kawaguchi[1], Atsuko Matsumoto[2], Yuki Inahashi[1,2], Satoshi Omura[2], Yoko Takahashi[1,2] ([1]Grad. Sch. Infection Control Sci., Kitasato Univ., [2]Kitasato Inst. Life Sci., Kitasato Univ.)

【目的】植物の根より分離した放線菌から、新属 *Phytohabitans suffuscus* K07-0523^T や、新種 *Actinoallomurus radicium* K08-0182^T 等 1 属 8 種の新属新種を提唱し、植物から多様な放線菌が分離されることを明らかにしてきた。さらに、新種 *Streptosporangium oxazolinicum* K07-0460^{T}から、抗トリパノソーマ活性を有する新物質 spoxazomicin を見い出すなど、植物分離放線菌が二次代謝産物の探索源としても有用であることを報告してきた。今回、新たに植物の根から放線菌を分離し、分類を行ったので報告する。
【方法】北里大学薬用植物園より採取したクリスマスローズ（*Helleborus orientalis*)の根を滅菌水で良く洗い、乾燥前および乾燥後の試料をそれぞれすりつぶして分離サンプルとした。 Nalidixic acid 25 mg /L 、Benlate 20 ・g /L を含む、Water proline agar （proline 1.0%, agar 1.2%, tap water）および CMC agar（carboxymethyl cellulose 1%, L-asparagine monohydrate 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, trace metals, agar 1.5%）と混釈し、27℃, 3～8 週間培養し、放線菌を釣菌、純粋培養後、分離株を得た。分離株は、16S rRNA 遺伝子部分塩基配列（約 500 bp）に基づき BLAST 検索により帰属する属および種を推定した。近縁種との相同性が低い株については、16S rRNA 遺伝子全塩基配列を解読し、近隣結合法による系統解析を行った。また常法に従い形態観察や菌体の化学分析を行った。
【結果】乾燥前サンプルから 12 属に属する 166 株、乾燥後サンプルから 12 属に属する 61 株の放線菌が分離された。そのうち既知種と 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の相同性が低い株（98% 以下）は、乾燥前サンプルからは 2 株、乾燥後サンプルからは 3 株分離されており、いずれの方法においても互いに異なる新規性の高い株が分離されることが明らかとなった。
乾燥後サンプルより得られた K12-0602 株は、 16S rRNA 遺伝子の塩基配列（約 1400 bp）の BLAST 検索により *Catelliglobosispora koreensis* LM042^T と最も高い相同性を示したが、その値は 96.9% と低かった。さらに本株の主要メナキノンが MK-10(H_4) であり、*C. koreensis* とは異なったことから新規性が高いことが示唆された。

plant roots, actinomycetes, endophyte

講演番号：2B11a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ B 校舎 11 会場

循環型浄化槽における脱窒細菌叢と脱窒遺伝子発現の比較解析

Comparative analysis of microbiota and genes expression on denitrifying bacteria in the lab-scale wastewater treatment system

○冨岡 顕治[1]、甲木 幸絵[1]、岩井 正幸[2]、鈴木 智順[1] ([1]東理大院理工、[2]東理大理工)
○Kenji TOMIOKA[1], Sachie Katsuki[1], Masayuki Iwai[2], Tomonori Suzuki[1] ([1]TUS, [2]TUS)

【目的】本研究は循環型浄化槽浄化メカニズムを解明する研究の一環として、浄化槽内における脱窒過程にかかわる細菌群を明らかにし、それらの脱窒関連遺伝子の発現を解析することを目的としておこなった。

【方法】生物学的な有機物分解過程を細菌叢、水質の両面でモニタリングすることが可能な循環型モデル浄化槽を構築した。この循環型汚水装置における脱窒細菌の多様性と脱窒能を議論するために、脱窒に関連する遺伝子（*nirS*, *nirK*, *nosZ*）をターゲットとした PCR-DGGE 法と、これらの遺伝子が発現した mRNA をターゲットとした RT-PCR-DGGE 法を用いて比較解析した。さらに、環境因子として、COD、BOD、各種無機態窒素（アンモニア態窒素、硝酸態窒素、亜硝酸態窒素）、溶存酸素濃度を測定した。

【結果】PCR-DGGE の解析結果より、*nirS* では *Pseudomonas* 属や *Thauera* 属に近縁な細菌が多く検出され、*nirK* では *Alcaligenes* 属や *Mesorhizobium* 属に近縁な細菌が多く検出された。また、RT-PCR-DGGE の解析結果より、*Thauera* 属に近縁な細菌が汚水投入後の早い時期 0~18 h に *nirS* の高い発現を示し、*Pseudomonas* 属に近縁な種が 18~120 h に *nirS* の高い発現をしていたことが示された。*Alcaligenes* 属や *Mesorhizobium* 属に近縁な脱窒細菌は共に 18~120 h に *nirK* の高い発現を示す傾向にあった。また、0~18 h において、亜硝酸態窒素濃度が大きく減少していることが確認された。このことから、0~18 h に亜硝酸還元反応を主要に行っている細菌群は *Thauera* 属であることが示唆された。*nosZ* については、0~18 h に最も高い発現量を示す傾向がある細菌と 18~120 h に最も高い発現量を示す傾向がある細菌が存在する可能性が示唆され、それらは現在解析中である。

Denitrification, RT-PCR-DGGE, nirS

講演番号：2B11a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ B 校舎 11 会場

空中浮遊細菌の網羅的な解析に向けた実験方法の検討

Investigation of methodology for an exhaustive analysis of airborne bacteria

○岸 朋恵[1]、橋本 沙季[2]、齊藤 智[3]、鈴木 智順[1]（[1]東理大院理工・応生科、[2]東理大理工・応生科、[3]（株）竹中工務店・技研）
○Tomoe KISHI[1], Saki HASHIMOTO[2], Satoshi SAITO[3], Tomonori SUZUKI[1] ([1]TUS, [2]TUS, [3]Takenaka Co.)

【目的】大気中には様々な細菌、真菌などの空中浮遊微生物が存在する。現在、空中浮遊微生物に関する研究の多くは、これら微生物がどのような細胞形態や生菌死菌の割合で空気中に浮遊しているかについて、あまりなされていない。また、これらの研究の多くは、PCR 時に DNA 溶液の代わりに精製水を使用することで、ネガティブコントロール（NC）としている。これではサンプリング以降の各操作や試薬類に微生物の混入が起こっても見逃されてしまう恐れがある。さらに環境中には、生きているが培養できない VNC 状態にある細菌が多く存在していることが分かっているため、培養法だけでなく非培養法も行い、網羅的な解析を目指す。また、空中浮遊微生物は存在量が少なく、様々な微生物が混在しているうえ、個々の検出感度が異なるという問題もある。そこで本研究では、上記問題点を解決することを目的とし、今回は細菌についてのみ解析を行った。
【方法・結果】エアサンプラーで室内の空気を 1 枚のグリセリン塗布シャーレに 3,000 L 捕集し、二分した一方は培養法として純粋分離、他方は非培養法として 16S rDNA をターゲットにした PCR-DGGE 法を行った。非培養法では、滅菌生理食塩水で捕集したシャーレからこすり取り、Saline EDTA で洗浄後、そのまま遠心、あるいは凝集剤であるポリ塩化アルミニウム（PAC）を加え遠心、と複数の集菌方法の検討を行った。NC は捕集操作をしていないグリセリン塗布シャーレから DNA 抽出および PCR-DGGE 法と同じ操作をしたものを用いた。その結果、培養法および非培養法にそれぞれ特異的に検出される細菌が存在し、現状では PCR-DGGE 法のみで網羅的な空中浮遊微生物の解析ができないことが示された。また、集菌方法の違いからも検出される細菌が異なり、それらは現在解析中である。今回の NC には複数の DGGE バンドが確認され、これまでの他の研究における NC の問題点を示唆した。大気中には生菌、死菌も浮遊していることが示唆され、それぞれどのような細菌がどのような生死の割合で大気中に存在しているのかについても解析中である。

airborne bacteria, PCR-DGGE, microbiota

講演番号：2B11a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ B 校舎 11 会場

消化汚泥資化微生物の分離ならびに解析

Isolation and characterization of "digested sludge"-assimilating microbes

○藤井 克彦、甲斐 隆泰、松延 駿、三上 綾香（山口大農）
○Katsuhiko FUJII,Takayasu KAI,Shun MATSUNOBU,Ayaka MIKAMI (Yamaguchi Univ.)

【目的、背景】

活性汚泥法では、下水中の有機物等を好気微生物に栄養として摂取させることで下水浄化を達成することから、処理にともない微生物バイオマス（余剰汚泥）が発生する。下水処理場では毎日大量の下水が処理されることから余剰汚泥の発生量は莫大なものとなる。そこで余剰汚泥を有効利用する手段として、バイオガス生産（嫌気消化）を行う施設が増えてきた。しかしバイオガス生産ではメタン生産菌によって生分解しやすい成分は分解されるものの、反応後には生分解性の低い汚泥残渣（消化汚泥）が発生し、これが我国で最も大量に排出される産業廃棄物となっている。余剰汚泥を部分分解する微生物はメタン生産菌以外にも幾つか分離例があるが、前述のとおり生分解しやすい成分のみを分解することから、反応後はやはり生分解性の低い残渣が残る。そこで本研究では消化汚泥を分解できる微生物を探索し、分離株の性状解析を行った。

【実験方法】

近隣下水処理場から採集した脱水消化汚泥の乾燥・破砕粉末を基質とし、これを水または無機塩培地に懸濁させたものを培養液とした。森林や農地を中心として土壌を採集し、集積培養を行った。集積培養で微生物の増殖が見られたフラスコの菌液を寒天培地に接種してコロニー分離を行い、得られた分離株の資化性、酵素活性、ならびに系統分類を行った。

【実験結果】

消化汚泥を基質とした培養液で分解微生物の探索を試みたところ、当初は微生物増殖を示す試料を見出すことができなかった。汚泥中の重金属の毒性が微生物の生育に悪影響を及ぼしている可能性があると考え、2 N 硫酸存在下で重金属を抽出除去した汚泥を調製し、この乾燥・破砕粉末を用いて再度微生物探索を試みた結果、複数の環境試料の集積培養で微生物増殖が見られ、最終的に 8 株の分離株が得られた。分離株は純粋培養において消化汚泥を唯一の栄養源として生育できることが確認された。また、汚泥のどのような成分を分解して生育するのかを検討するため、消化汚泥の成分に対する分解酵素の活性を検討したところ、分離株はいずれもキシラナーゼ、ケラチナーゼおよびキチナーゼ活性を持つことがわかった。

microbial degradation, digested sludge, fungi

講演番号：2B11a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ B 校舎 11 会場

光感受性菌の分離と同定
Isolation and identification of light-sensitive microorganisms
○吉原 周佑[1]、関 智章[2]、高橋 結[2]、村上 周一郎[1] ([1]明治大農、[2]明治大院農)
○Shusuke Yoshihara[1], Tomoaki Seki[2], Yui Takahashi[2], Shuichiro Murakami[1] ([1]Meiji Univ., [2]Meiji Univ.)

【目的】土壌中には様々な微生物が棲息し、その多くは培養が困難な難培養微生物であることが知られている。土壌団粒内部は光が届きにくい環境であるため、光照射により増殖等に影響が見られる微生物（光感受性菌）が存在する可能性が考えられる。そこで本研究では、土壌試料の超音波破砕処理と遮光培養を組み合わせることで、光感受性菌の分離を試みた。
【方法】①土壌試料の調製と微生物の分離：土壌試料を洗浄した後、超音波破砕により得られた上清を微生物の分離源とした。これを遮光条件下で 1/10 肉汁平板培地に接種し、30℃で培養した。増殖した微生物を分離した後、光照射条件および遮光条件下で培養し、増殖に差が見られる微生物を光感受性菌として分離した。②同定試験：分離した光感受性菌に対し、16S rRNA 遺伝子解析による同定試験を行った。③生育試験：分離した光感受性菌について、光照射条件および遮光条件下での増殖速度の差異を調べた。また培地条件の影響を調べた。
【結果】土壌の洗浄を繰り返すことにより、土壌表面から遊離したと思われる微生物数は減少した。その後、土壌団粒を超音波破砕して得られた上清から回収できる微生物数が増加したことから、この試料中には土壌に強く付着している、あるいは土壌団粒内部に棲息する微生物が多く含まれていると結論した。次にこの試料から遮光条件下で分離した微生物 649 株において、最終的に光照射条件下でコロニーの広がりが抑制される性質(光感受性)を示す 14 の候補株を分離し、その中で最も光感受性の強かった No.14 株を以後の実験に用いた。No.14 株は 16S rRNA 遺伝子解析の結果、*Paenibacillus alvei* と同定された。No.14 株を 1/10 肉汁平板培地を用いて培養し、増殖速度を観察したところ、光照射条件下と比較して遮光条件下で速く周囲に広がった。また、光照射条件および遮光条件下で培養し、増殖に差が生じた時点で培養条件を入れ替えて培養しても、コロニーの広がり方に大きな変化は見られなかった。このことから、No.14 株は増殖初期に光照射を受けた影響が、以後の増殖にも反映されることが示唆された。No.14 株の固体培地上で広がる性質が、栄養分の枯渇によって起こるか否かを調べるために、炭素源としてグルコースを種々の濃度で含む培地で培養した。その結果、グルコース濃度に関係なく、本菌のコロニーが広がる性質は光にのみ影響を受けることが明らかになった。

light-sensitive microorganisms, *Paenibacillus alvei*, light suppression

講演番号：2B11a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ B 校舎 11 会場

中等度酸性環境の微生物層の解析

The analysis of bacterial community in the moderately acidic environment

○安田 貴志、金尾 忠芳、上村 一雄（岡山大学院）
○Takashi Yasuda,Tadayoshi Kanao,Kazuo Kamimura (Okayama Univ.)

【目的】硫化鉱石を産出していた鉱山の多くは廃鉱となっているが、残存する硫化鉱石に起因する酸性鉱山廃水が生じている。この廃水は、Fe^{2+}や重金属を含有する pH 2～4 の酸性水であり、河川や湖に流入すると酸性化や重金属汚染を引き起こすため、含まれる金属の除去と中和処理が施されている。Fe^{2+}は Fe^{3+}に変換すると比較的容易に沈殿させることができるが、酸性条件下で化学的に鉄を酸化するためには、多量の中和剤が必要であるため、廃水処理には酸性環境下で鉄を酸化する鉄酸化細菌が用いられている。岡山県の柵原鉱山でも酸性鉱山廃水の処理に鉄酸化細菌である *Acidithiobacillus ferrooxidans* が用いられている。この細菌は、増殖の最適 pH が 2～3 であるため、鉄を酸化したのちに廃水の中和に比較的多量の $CaCO_3$ を必要とする。pH 4 付近で鉄を酸化できれば、中和剤を低減させることが可能であるため、低コスト化が期待できる。酸性鉱山廃水は、廃鉱に残存する硫化鉱石がなくなるまで発生し続けるため、処理コストの低減かは極めて重要な課題である。そこで、本研究では、pH 4 付近で鉄を酸化できる細菌の探索を試みた。
【方法】岡山県美咲町の柵原鉱山の山麓から流出している地下水を試料に用いた。採取した試料から、Ultra Clean Soil DNA Isolation kit（MO BIO）を用いて DNA を抽出し、16S rDNA を PCR 増幅して DGGE 解析に供した。検出された DNA バンドの塩基配列を決定することによって、酸性鉱山廃水中の微生物群集の解析を行った。また、Fe^{2+}を含む無機塩培地（pH 3～4）を用いて、化学合成独立栄養的に増殖する中等度好酸性の鉄酸化細菌の集積・単離を試みた。
【結果】採取した鉱山廃水は、水温 12.7℃、pH 4.2 で鉄の含有量は 55 mg/L であった。
DGGE 解析によって、鉄酸化能を持ち、化学合成独立栄養的に生育できる *Ferrovum* 属の細菌や *Gallionella* 属の細菌が検出された。この他にも、従属栄養細菌である *Nitrosospira* や *Actinobacterium* に属する細菌が検出された。これらの細菌の中で *Ferrovum* 属細菌が鉱山廃水の主要な細菌であることが明らかとなった。酸性鉱山廃水からは、鉄酸化細菌である *A. ferrooxidans* や硫黄酸化細菌である *Acidithiobacillus thiooxidans*、 *Acidithiobacillus caldus* などの好酸性の化学合成独立栄養細菌が検出されているが、これらの細菌は DGGE 解析では検出されなかった。*Ferrovum* 属の細菌は、弱い酸性環境下で生育することが報告されており、この菌の性質の解析によって中等度酸性条件下で廃水処理を行うシステムが構築できる可能性があるため、その単離を試みている。

acid mine drainage, Ferrovum, Acidithiobacillus

講演番号：2B11a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ B 校舎 11 会場

陸上酸性温泉からの新規好熱性微生物の分離
Isolation of novel thermophilic microorganisms from an acidic hot spring
○大西 真史[1,2]、高品 知典[1]、伊藤 隆[2]、加藤 慎吾[2]、大熊 盛也[2] ([1]東洋大学大学院、[2]独立行政法人理化学研究所)
○ Masafumi ONSHI[1,2], Tomonori TAKASHINA[1], Takashi ITOH[2], Shingo KATO[2], Moriya OHKUMA[2] ([1]Toyo Univ., [2]RIKEN)

【背景・目的】
陸上の温泉環境からは、これまで数多くの好熱性微生物が分離されている。近年、培養に依存しない分子生態学的手法の発展に伴い、温泉環境には多種多様な未培養微生物が存在することが明らかにされている。生命の初期進化の解明や耐熱性酵素の産業利用といった、多くの基礎・応用研究の基盤を好熱性微生物の研究が支えている。本研究では、温泉環境から新規の好熱性微生物を分離し、その生理学的特徴を明らかにすることを目的とした。

【実験方法】
栃木県・塩原温泉(74.3℃ pH2.2)から温泉水を採取し、この温泉水を試料として集積培養を行った。集積培養は、気相、培養温度、pH、栄養条件を変えて 30 通りの培養条件を設定した。生育が確認できた培養液中の菌叢を確認するため、アーキア及びバクテリアの 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR クローン解析を行った。新規性の高い微生物が確認できた集積培養溶液から、限界希釈法により純化を試みた。分離した微生物株の 16S rRNA 遺伝子配列を決定し系統解析を行った。

【結果・考察】
集積培養では、30 通り中 14 の培養条件で微生物の生育が確認できた。クローン解析によって、培養された微生物の大部分は既知種に近縁（16S rRNA 遺伝子相同性 99%以上）であることが判明した。一例として *Desulfurella kamchatkensis* 様バクテリアは硫黄嫌気、55℃、pH5.0 にて、*Thermoplasma acidophilum* 様アーキアは、鉄還元嫌気、55℃、pH2.0 等の培地条件で確認できた。両種とも他の培地条件でも生育しており、多様な生育能力を示した。一方、これらの集積培養液中には、既知種とは相同性の低い新規バクテリア及びアーキアがそれぞれ混在していた(16S rRNA 遺伝子相同性 82%以下)。系統解析の結果から、新規バクテリア種は *Thermotogae* 門に含まれ、少なくとも属レベルで新規であることが示唆された。集積培養液中では *Desulfurella kamchatkensis* 様バクテリアが混在していたが、限界希釈法を 3 度繰り返すことで、この新規バクテリア種を純粋分離することに成功した。現在、本菌株の系統分類学的研究を継続している。

isolation, Thermotoga, Shiobara hot spring

講演番号：2B11a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ B 校舎 11 会場

竹チップにおける微生物群集解析と好熱菌の分離

Investigation of microbial community structure with PCR-DGGE methods in bamboo chips and the isolation of thermophilic bacteria.

○庄山 創太、袴田 佳宏、大箸 信一（金沢工大）
○Sota Shouyama,Yoshihiro Hakamada,Shinichi Ohashi (KIT)

[目的]近年、竹による里山の荒廃が問題視されている。その竹の伐採処理のために細分化された竹チップを野外に放置すると、50～70℃の熱を発生し 3～4 年後には分解が進み肥料になる。本研究では竹チップの微生物群集解析を行い、実際に微生物の分離を行うと同時に、セルラーゼを生産する好熱菌の分離を試みた。
[方法]竹チップをもとに DGGE 法による微生物群集解析を行い、さらに竹チップから菌の分離を行った。竹チップを生理食塩水に懸濁した後、硫酸アンモニウム培地、硝酸培地、好気性菌選択培地、パールコア培地に塗布し、好気条件下で 30 ℃で 2 日間静置培養を行った。分離菌を SCI した後、15 項目の生化学試験による簡易同定および 16S rDNA の塩基配列解析を行った。得られた分離菌の中から好熱菌を選択し、その培養液を用いてリン酸膨潤セルロースに対する分解能を調べた。
[結果]DGGE 法による解析の結果、*Bacillus smithii*、*Ureibacillus themosphaericus*、*Geoabcillus pallidus* の存在が推定された。これら 3 株は好熱菌であった。その他には、*Sphingobacteriumu* 属、*Sphingobacteria* 綱、*Alphaproteobacteria* 綱、*Hizobiales* 目、*Bacillales* 目 *Bacteroidetes* 門、*Chloroflexi* 門が存在していることが推定されたが上記 3 株以外、属・種は推定できなかった。
一方、竹チップから 21 株を分離し生化学試験によって分類した結果、*Bacillus* 属、*Micrococus* 属、*Streptococus* 属、*Branhamella* 属、*Moraxella* 属、*Brucella* 属、*Bordetella* 属、*Alcaligenes* 属細菌の存在が推定された。
分離した 4 株の好熱菌は 3 株が *Bacillus* 属、1 株が *Branhamella* 属であると推定された。リン酸膨潤セルロースに対する分解活性を測定した結果、最も分解活性が高かった S4 株は、80 ℃でも生育可能な高度好熱菌に分類されることが判った。また、反応液の TLC の分析により、リン酸膨潤セルロースからセロビオースが生成していることが判った。S4 株は *B. subtilis subsp. subtilis* の 16S rDNA に対し、99.9%の相同性を示し、*B.subtilis* の基準亜種である *B. subtilis subsp. subtilis* とクラスターを形成したことから、種レベルで *B. subtilis* に帰属すると推定された。
[考察]分離した *Bacillus* 属細菌は、DGGE 法によって推定された好熱菌 3 株と異なっていた。このことから、採取箇所を変えることで、種々の微生物が分離できると考えられた。生育温度が 30～80 ℃まで幅広い範囲の微生物が分離可能であることがわかった。
セルロースの分解試験の結果から分離された好熱菌 S4 株は、CBH を有していると考えられた。

bamboo chips, thermophilic bacteria, microbial community structure

講演番号：2B11a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ B 校舎 11 会場

単細胞性シアノバクテリアの細胞凝集を誘導する従属栄養細菌

A thermophilic unicellular cyanobacterium formed cell aggregate under co-culture conditions with a heterotrophic bacterium.

○川合 瑞希、松浦 克美、春田 伸（首都大・生命）
○Mizuki KAWAI,Katsumi MATSUURA,SHIN HARUTA (Tokyo Metropolitan Univ.)

シアノバクテリアは酸素発生型の光合成で独立栄養的に生育する細菌で、地球上の一次生産者として重要である。我々は、シアノバクテリアを含む微生物複合系での挙動に着目し、シアノバクテリアと共存する従属栄養細菌との二者関係を解析している。55℃付近の温泉流水中に発達する微生物マットは、シアノバクテリアを主たる一次生産者とした微生物複合系が形成されており、高温のため真核生物の関与はなく、細菌種数も限定されることから、光エネルギーによって駆動される生態システムを解析するうえで有効なモデル系である。これまで温泉地の微生物マットから単細胞性のシアノバクテリアを単離する過程で、未純化の状態では顕著な細胞凝集性を示すが、純化すると細胞凝集性や固体表面への付着性が失われることを見い出した。そこで、本研究では単細胞性シアノバクテリアの細胞挙動に影響を与える従属栄養細菌を探索し、その共培養効果を明らかにすることを目的とした。

長野県中房温泉において 55℃の温泉流水に発達する微生物マットを採取した。好気従属栄養条件で、10 株の細菌を単離し、16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析した。これらの細菌を好気従属栄養条件で前培養したのち、遠心集菌して菌体を滅菌生理食塩水で洗浄した。同一箇所の微生物マットからこれまでに単離している単細胞性のシアノバクテリアである”*Thermosynechococcus*” sp. strain NK55a は、綿栓をした 50 mL 容量三角フラスコに液体培地を 20 mL 入れ、50℃、静置・光独立栄養条件で培養した。このシアノバクテリア NK55a の培養液に従属栄養細菌の細胞を添加し、培養時間の経過に伴う細胞凝集の形成を評価した。*Bacillus* 属細菌および *Meiothermus* 属細菌との組み合わせでは顕著な細胞凝集の形成は観察されなかった。しかし、*Schleferia* 属様細菌 LA 株との共培養では、培養培養液中にシアノバクテリア細胞の凝集が観察されるようになり、培養を続けると培養フラスコの内壁に細胞の付着性が観察された。対数増殖期まで培養したシアノバクテリア培養液に LA 株の培養液を添加して培養を開始し、さらに詳細に解析した。培養 6 時間後に、それぞれの菌数は、1.5 倍、1.4 倍になっていた。顕微鏡観察したところ、凝集体は数百のシアノバクテリア細胞から構成され、そこには LA 株も共凝集しており、LA 株の割合は約 10 分の 1 であった。LA 株が主体となる細胞凝集は観察されない。シアノバクテリアは LA 株の共存によって、細胞の付着性が上昇したと考えられた。その共存効果について現在解析を進めている。

cyanobacteria, aggregation, co-culture

講演番号：2B11a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ B 校舎 11 会場

家畜の増体効果をもたらす新規好熱性細菌の有機酸産生能についての研究
Production of organic acids by novel probiotic thermophiles that have been isolated from compost
○西田 彩夏[1]、宮本 浩邦[1,2,3,5]、三橋 朋美[2]、宇田川 元章[4]、宮本 久[5]、児玉 浩明[1] ([1]千葉大院融合科学、[2]千葉大園芸、[3]日環科学株式会社、[4]京葉プラントエンジニアリング(株)、[5]株)三六九)
○Ayaka NISHIDA[1], Hirokuni Miyamoto[1,2,3,5], Tomomi Mitsuhashi[2], Motoaki Utagawa[4], Hisashi Miyamoto[5], Hiroaki Kodama[1] ([1]Chiba Univ., [2]Chiba Univ., [3]Japan Eco-science (Nikkan Kagaku) Co. Ltd., [4]Keiyo Plant Engineering, Co. Ltd., [5]Miroku Co. Ltd)

当研究室では好熱菌発酵産物の生理作用についての研究を行なっている。当該発酵産物は、エビやカニ、小魚などの未利用海産資源とコーヒー粕を原料として、高温・好気的な repeated fed-batch 方式によりコンポスト化した資材である。これまでの研究から発酵産物は、農業現場では作物中の硝酸塩の低減、畜産現場では、家畜の成長促進や肉質向上などの効果をもたらすことが明らかとなっている。特に、マウスへの投与実験により、増体効果、内臓脂肪量の低下、腸管免疫の賦活化などの効果があることが分かった。この発酵産物を与えたマウスの盲腸便に含まれる好熱菌の単離が行われ、そのうち、16S rRNA 配列が *Bacillus thermoamylovorans* LMG18084^T に近縁なバクテリアの一つが、BP-863 株として国際寄託された。標準菌株 *B. thermoamylovorans* は好熱性でグラム陽性、通性嫌気性の 桿菌で、糖をよく分解することで知られている菌であるが、BP-863 株は異なる性質を有していることが明らかになった。BP-863 株は *B. thermoamylovorans* と比較して、有機酸生産能や芽胞形成能が高かった。有機酸の生産能が高い菌は整腸作用が高いと考えられており、新たなプロバイオティクスとしての利用が期待された。そこで、BP-863 株のマウスへの投与実験を実施した結果、増体効果や、腸管免疫の賦活化がみられ、内臓脂肪量も低下する傾向が確認された。このことから、好熱菌発酵産物による動物への効果の一部には BP-863 株が深く関与していることが示唆された。本研究では *B. thermoamylovorans* LMG18084^T、BP-863 株、さらに同様に発酵産物より単離された、*B. thermoamylovorans* LMG18084^T に近縁な N21 株の３株における、有機酸産生能の違いを比較した。

Bacillus, compost, probiotics

講演番号：2B11p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ B 校舎 11 会場

南極湖由来細菌 *Lysobacter oligotrophicus* 107-E2 株の特性解析
Lysobacter oligotrophicus, a bacterium isolated from a freshwater lake in Skarvsnes, Antarctica.
○福田 青郎[1]、木村 知見[1]、荒木 成朗[1]、三吉 祐輝[2]、跡見 晴幸[2]、今中 忠行[1] ([1]立命館大生命、[2]京大院工)
○Wakao FUKUDA[1], Tomomi KIMURA[1], Shigeo ARAKI[1], Yuki MIYOSHI[2], Haruyuki ATOMI[2], Tadayuki Imanaka[1] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】
南極地域は極めて低温で乾燥しているだけでなく、オゾンホールが存在するために強度の紫外線に晒さている等、多くの生物にとって生育が困難な環境である。このため南極地域は植生も乏しく、南極地域の淡水湖は有機物濃度も低い。しかしながらその湖底には、藻類を含む生物群による構造体（コケ坊主）が存在し、実際にはたくさんの生物が生きていることが知られている。これら淡水湖の藻類を含む湖水サンプルより、新属新種細菌 *Rhodoligotrophos appendicifer* 等の、栄養源の豊富な培地では生育できない貧栄養微生物がいくつか単離された。本研究ではこのような貧栄養細菌のうち、*Lysobacter* 属細菌 107-E2 株に着目し、南極微生物の新奇な性質を明らかにすること、及び新分類群の提案を目的として種々の解析を行った。
【結果】
南極昭和基地の南・スカルブスネス地域にある淡水湖（たなご池）由来サンプルより単離された 107-E2 株の諸性質について解析を行った。まず 16S rRNA 遺伝子配列解析より、本菌はプロテアーゼやリゾチーム等様々な分解酵素を生産する *Lysobacter* に属することが予想された。実際に本菌は至適生育温度こそ 23℃（生育上限温度 25℃）であるが、4℃という低温環境でも活性なエステラーゼやアミラーゼ、プロテアーゼ、リゾチーム等の様々な分解酵素を生産した。さらに本菌は-5℃という氷点下の環境でも固体培地上にコロニーを形成することから、低温環境に適応した微生物である事が分かった。また通常の微生物培養用に用いられる LB 培地（トリプトン 10g、乾燥酵母エキス 5g を含む培地）の様な栄養源の豊富な培地では生育できず、この有機物濃度を 4 分の 1 以下に下げることで良好な生育を示した。さらに有機物濃度を 100 分の 1 まで下げた培地中でも生育が確認されるなど、貧栄養性を示した。以上の様な特性に加えて本菌は培養後期において溶菌しながら水溶性メラニンと予想される暗褐色の水溶性色素を生産も確認された。また細胞形態を電子顕微鏡により確認したところ、連鎖状の桿菌である事が分かった。
桿菌であることや種々の分解酵素の生産、暗褐色の色素生産等 *Lysobacter* 属細菌に特徴的な性質を持つ一方、低温環境での生育や貧栄養性などのユニークな特徴を持つことから本菌は *Lysobacter* 属細菌の新種であると予想された。そこで本菌を *Lysobacter oligotrophicus*（貧栄養性の *Lysobacter* 属細菌）と命名した。

Antarctica, isolation, oligotroph

講演番号：2B11p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ B 校舎 11 会場

南極湖由来細菌 *Lysobacter oligotrophicus* 107-E2 株が生産する水溶性色素の解析
Characterization of Water-soluble Dark-brown Pigment from Antarctic Bacteria, *Lysobacter oligotrophicus* 107-E2
○木村 知見、福田 青郎、今中 忠行（立命館大生命）
○Tomomi Kimura,Wakao Fukuda,Tadayuki Imanaka (Ritsumeikan Univ.)

【目的】南極地域の湖より分離された貧栄養性細菌 *Lysobacter oligotrophicus* 107-E2 株は低温環境でも様々な分解酵素を生産し、また培養後期に溶菌とともに菌体外に暗褐色の水溶性色素を分泌することがわかっている。この色素生産は *Lysobacter* 属細菌に共通の特徴として知られているが、色素の同定に関して報告はされていない。本研究では *L. oligotrophicus* 107-E2 株の生産する水溶性色素の正体・機能を明らかにすることを目的とし、色素の同定及びその機能解析を行った。一般に細菌が生産する暗褐色の色素として、メラニンが知られている。そこで本研究ではまずこの水溶性色素がメラニンであると推定して解析を進めた。
【結果】メラニン合成の初発物質であるチロシンを添加した培地で *L. oligotrophicus* 107-E2 株を培養した所、チロシンを添加しない培地よりも水溶性色素の生産が誘導された。逆にメラニン合成を担うチロシナーゼの阻害剤（コウジ酸）を培地に添加すると、水溶性色素の生産が抑制された。これらの結果からこの水溶性色素の正体が水溶性メラニンである事が強く示唆された。

水溶性本色素がメラニンである事を裏付ける結果を得るために、ゲルろ過クロマトグラフィー等で分離精製した色素を光学分析によって解析した。その結果、UV-Vis や IR 分析ではメラニンに特徴的な波形が見られた。特に IR 分析ではメラニン標品と類似した波形を示し、加えて糖鎖に帰属されると考えられるピークが見られた。本菌は菌体外にムコ多糖様の粘性物質を生産するため、本色素の水溶性に糖鎖付加が関与している事が予測された。そこで色素に付加していると推測される糖鎖を、酸加水分解により切り出し、フェノール硫酸法による糖検出反応を行ったところ、実際に糖が検出された。更にこの糖鎖の加水分解により、本色素は水に不溶性となった。以上より、本菌の生産する色素は糖鎖をもち、この糖鎖の付加によって水溶性を獲得したメラニンである事が分かった。また HPLC により糖鎖の構成成分を分析したところ、平均的なメラニン 1 分子（推定分子サイズ約 75kDa）に対し、マンノース 24 分子、グルコース 16 分子、N-アセチルグルコサミン 74 分子が付加している事が分かった。

本菌は UV 照射の刺激によってメラニンを細胞内に蓄積する傾向にある。また大腸菌に対して UV 照射を行った場合、本メラニン色素を添加することで大腸菌の生存率が上昇した。南極地域はオゾンホールが存在するため、季節によっては高レベルの UV が降り注ぐ。暗褐色の本色素はこの UV に対する防御システムとして生産されている可能性が高いと考えられる。

Lysobacter, melanin, Antarctica

講演番号：2B11p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ B 校舎 11 会場

Isolation and analysis of actinomycetes from sediments of Pacific Ocean

○Dana Ulanova,Kian Sim Goo (Kochi Univ.)

[Aim]

Recently the great attention has been attracted to marine microorganisms as a source of biotechnologically important compounds. The aims of this study are isolation of actinomycetes from marine sediments and analysis of their potential to produce bioactive secondary metabolites.

[Methods]

Sediment samples were collected from Tosa Bay, Kochi Prefecture at different depths on January 2012. Samples were pretreated and plated on several types of agar media, such as ISP1, AMM, Bennets and other media generally used for actinomycetes isolation. Plates were incubated at 28^{o}C for up to four months. In total, more than 100 actinomycete-like colonies were picked up from isolation plates and used for further analysis. The bacterial diversity and bioactive compound production potential of the collection have been characterized by 16S rRNA sequencing and biological activity assays.

[Results]

Based on 16S rRNA analysis, 50% of analyzed strains belong to the genus *Streptomyces* and another half to non-*Streptomyces* genera, such as *Rhodococcus*, *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Nocardiopsis*, *Nocardia*, *Saccharomonospora* and others. Bioassay analysis showed 60% of tested strains to produce compound(s) inhibiting growth of bacteria and 1.4% to have antifungal activity. The preliminary results of this study have revealed a good production potential of isolated marine actinomycetes. Marine actinomycete collection could be used as a material for further biological activity assays, secondary metabolite profiling, as well as for analysis of genes related to secondary metabolite biosynthesis.

marine, actinomycetes, bioactive compounds

講演番号：2B11p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ B 校舎 11 会場

ムール貝中に生息していたカニより分離した新規 Bacillus 種の同定

Identification of Bacillus sp. nov., isolated from pea crabs in mussels.

○小高 アラン[1]、山下 隆[2] ([1]東京工科大院・バイオニクス、[2]東京工科大学・応用生物)
○Allant KODAKA[1], Takashi YAMASHITA[2] ([1]Tokyokouka Univ., [2]Tokyokouka Univ.)

【目的】
当研究室では、ムール貝中に生息していたカニから、新規微生物と思われる *Bacillus* 属の菌株を分離した。本研究では、この *Bacillus* 属の菌株の同定を目的とした。

【方法・結果】
16S rRNA 系統解析と各種性状試験を用いて分離株の同定を行った。16S rRNA 系統解析の結果、分離株は *Bacillus thermoamylovorans* に近い菌であるという事が分かった。現在、各種性状試験を行い分離株の性状を調べている。

16S rRNA sequence analysis, Bacillus thermoamylovorans

講演番号：2B11p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ B 校舎 11 会場

海藻多糖分解細菌の分離とその性状

Isolation and characterization of bacteria degrading seaweed-polysaccharide

○森 渓太[1]、山下 隆[2] ([1] 東京工科大院・バイオニクス、[2] 東京工科大・応用生物)
○Keita MORI[1], Takashi YAMASHITA[2] ([1]Toukyoukouka Univ., [2]Toukyoukouka Univ.)

【目的】

海洋バイオマスである褐藻類は、アルギン酸粘膜によって利用しやすい多糖類が保護されているため、活用が難しい。一方で粘度が高く、難分解性のアルギン酸を資源として利用するには、分解し、均一な分子量にする簡便な方法が必要である。そこで本研究では、アルギン酸分解酵素を産生するアルギン酸資化細菌の探索を行った。

【方法及び結果】

海洋環境から褐藻を採取し、炭素源にアルギン酸を使用して分離を行ったところ、海水塩濃度、pH7.5、好気条件で培養することで、複数の株を分離することができた。分離株のアルギン酸分解能を調べたところ、いくつかの陽性株を取得できた。現在、これらの分離株を 16S rRNA 系統解析等により詳しい性状の調査している。

alginic acid, biomass

講演番号：2B11p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ B 校舎 11 会場

水稲根圏土壌からの新規 Type I メタン酸化細菌の分離

Isolation of a novel type I methane oxidizing bacterium from rice rhizosphere soil

○李 哲揆[1]、小木曽 拓也[2]、上野 千穂子[3]、Dianou Dayeri[4]、木村 眞人[5]、浅川 晋[6]([1]東北大院農、[2]陸上自衛隊、[3]ネスレ日本株式会社、[4]ブルキナファソ国立科学研究センター、[5]中国科学院東北地理与農業生態研究所、[6]名古屋大院生命農)

○Chol Gyu LEE[1], Takuya Ogiso[2], Chihoko Ueno[3], Dayeri Dianou[4], Makoto Kimura[5], Susumu Asakawa[6] ([1]Tohoku Univ., [2]Japan Ground Self-Defense Force, [3]Nestle Japan Ltd., [4]National Center of Scientific and Technological Research, [5]Chinese Academy of Sciences, [6]Nagoya Univ.)

【背景・目的】

メタンは主要な温室効果ガスであり、水田は全メタン放出量の 20%を占める重要なメタン放出源の一つである。メタン酸化細菌は生成したメタンを酸化し二酸化炭素に変換するため、水田の炭素循環や温室効果ガス発生において重要な役割を担っており、その生態を解明することは非常に重要である。

メタン酸化細菌はメタンを唯一の炭素源およびエネルギー源として生育する好気性微生物であり、主にαおよびγサブクラスのプロテオバクテリア門に属する。メタン酸化細菌は各種性質の違いにより、主に type I, type II の 2 つのグループに分類され、水田生態系においては type I, type II 両グループのメタン酸化菌が存在することが確認されている。しかしこれまで type I に属するメタン酸化細菌の分離例は 2 例しかなく、また水田土壌からの分離例は未だ報告されていない。そこで本研究では、水稲根圏土壌から type I メタン酸化細菌を分離し、形態や培養性状の調査、系統遺伝的性質の解明により、分離菌株の特性を明らかにすることを目的とした。

【方法】

愛知県農業総合試験場安城農業技術センター内の水田圃場より採取した水稲根圏土壌を、硝酸無機塩培地を用い、メタン雰囲気下、30℃でメタン酸化細菌の集積培養を行った。得られた培養液について、平板培地によるコロニー分離および液体培地への植え継ぎを継続することにより純化を行った。得られた菌株は各種従属栄養培地を用い、メタン非存在下での生育や形態の観察により、純粋性の確認を行った。また菌株から DNA を抽出後、16S rRNA および *pmoA* 遺伝子の塩基配列解析を行い、近縁種の探索を行った。

【結果】

分離株を様々な従属栄養培地で 1 ヶ月間培養したが濁度の上昇は認められず、細胞形態やコロニー性状の観察結果と合わせ、菌株の純粋性が確認された。得られた分離株は運動性のある桿菌であり、20%メタン雰囲気下の 7 日間の培養により約 80%のメタンを消費し、660nm における濁度は 0.6 に達した。16S rRNA 遺伝子の塩基配列による系統解析より type I に属すことが示され、最近縁種である *Methylocaldum szegediense* との相同性は 93%であった。また、*pmoA* 遺伝子配列に基づくアミノ酸配列の相同性解析の結果、*Methylococcus capsulatus* と最も近縁であり、相同性は 88%であった。以上より、水稲根圏土壌から分離された本菌株は type I メタン酸化細菌であり、*Methylococcaceae* 科の新属である可能性が考えられた。

Methanotroph, Isolation, Characterization

講演番号：2B11p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ B 校舎 11 会場

嫌気環境下での鉄腐食を促進する新規硫酸還元菌・メタン生成菌の探索

Novel sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea accelerating iron corrosion under anoxic conditions

○加藤 創一郎[1,2,3]、吉田 裕美[1]、湯本 勲[1]、鎌形 洋一[1,2]（[1]産総研・生物プロセス、[2]北大院農・応生科、[3]東大先端研）
○ Souichiro KATO[1,2,3], Hiromi YOSHIDA[1], Isao YUMOTO[1], Yoichi KAMAGATA[1,2] ([1]AIST, [2]Hokkaido Univ., [3]Tokyo Univ.)

鉄構造物の腐食（さび）において、全体の 1～2 割、無酸素環境下においてはそのほとんどに微生物が関与していると見積もられている。鉄腐食は鉄表面に電位差が生じ、負電位箇所（アノード）での鉄酸化反応（$Fe^0 \rightarrow Fe^{2+} + 2e^-$）と正電位箇所（カソード）での還元反応が共役することで進行する。純粋に電気化学的なカソード反応としては、有酸素条件では酸素還元反応、無酸素条件ではプロトン還元（水素発生）反応が起こる。プロトン還元は非常に遅い反応であり、無酸素条件での腐食は理論上ほとんど進行しない。しかし、ある種の微生物が無酸素環境下での金属腐食を大きく促進することが以前から報告されていた。近年の研究により、金属鉄中の自由電子、もしくは金属鉄表面の水素原子を積極的に電子・エネルギー源として利用可能な微生物（硫酸還元菌・メタン生成菌の一部）がカソード反応を促進し腐食を引き起こす、との見方が強まってきた。しかし、鉄腐食を有意に促進する微生物の純粋分離例はわずか 2 例（いずれも海洋性微生物）しかなく、またその金属鉄 - 微生物間電子移動反応の分子メカニズムは不明である。本研究では、淡水環境で鉄腐食を促進する硫酸還元菌・メタン生成菌の集積培養、および純粋分離を試みた。

水田土壌を微生物源とし、金属鉄粒子（直径約 1㎜）を唯一の電子供与体、SO_4^{2-}（硫酸還元菌用）もしくは CO_2（メタン生成菌用）を唯一の電子受容体とした淡水無機培地、すなわち鉄腐食が生育の絶対条件である環境で微生物の集積培養をおこなった。滅菌土壌を添加したコントロール培養では鉄の自然酸化に伴う水素発生が見られたが、硫酸還元・メタン生成は見られなかった。一方で未滅菌土壌を添加した系では、鉄の酸化に伴う硫酸還元・メタン生成が観察された。またその硫酸還元・メタン生成速度は、鉄の自然酸化に伴う水素発生から計算される速度の少なくとも 5 倍以上であり、鉄腐食促進微生物が集積されていることが示唆された。現在、集積培養物の 16S rRNA 遺伝子配列にもとづく群集構造解析、および硫酸還元菌・メタン生成菌の純粋分離を試みている。

iron corrosion, sulfate-reducing bacteria, methanogenic archaea

講演番号：2B11p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ B 校舎 11 会場

選択的二段培養により得られた新しい鉄還元細菌群の系統と機能

Phylogeny and physiological function of novel iron(III)-reducing bacteria isolated by selective two-step culture

○青柳 智[1]、成廣 隆[2]、花田 智[2]、田尾 博明[1]、鎌形 洋一[2]、堀 知行[1] ([1]産総研・環境管理、[2]産総研・生物プロ)
○Tomo AOYAGI[1], Takashi NARIHIRO[2], Satoshi HANADA[2], Hiroaki TAO[1], Yoichi KAMAGATA[2], Tomoyuki HORI[1] ([1]AIST EMTech, [2]AIST BPRI)

【背景】鉄は第 4 位の地殻構成元素であり、地下深部まで酸化鉄鉱物として広く分布している。地圏の大部分を占める嫌気環境において鉄還元反応は、酢酸をめぐりメタン生成と基質競合するため、地球の炭素・エネルギー循環を理解する上で重要である。しかし酸化鉄鉱物を還元する微生物の存在は長い間知られていなかった。我々は、嫌気土壌環境で結晶性酸化鉄の存在依存的に酢酸を取り込む新規な鉄還元細菌群を分子系統学的に同定するとともに、酸化鉄鉱物を基質とした長期間の培養によりその微生物集積系を構築してきた。本研究では、次世代シークエンスと独自に着想した選択的二段培養を組み合わせることで、新しい鉄還元細菌群の網羅的な分離培養を試みた。
【方法・結果】4 種の結晶性酸化鉄（Hematite、Goethite、Lepidocrocite、Magnetite）を電子受容体、酢酸を電子供与体として用い、鉄還元細菌以外の微生物の増殖を極度に制限した培養条件下において、自然環境試料（水田、森林、用水路堆積物等）を接種源とする一段目培養を 2 年間以上継続した。鉄還元反応が観察された 58 の集積系から DNA を抽出し、細菌の 16S rRNA 遺伝子 V4 領域を標的として PCR 増幅を行った。得られた遺伝子増幅断片を次世代シークエンサー（MiSeq、illumina）による大規模塩基配列解読に供し、各集積系で 2～10 万の遺伝子断片を系統学的に特徴づけた。その結果、鉄還元細菌として知られる *Geobacter* 属や *Anaeromyxobacter* 属を含む *Deltaproteobacteria* 綱の新規細菌群が最優占種として同定され、つづいて *Firmicutes* 門や *Chloroflexi* 門の新規細菌群が主要となった。さらに、新規細菌群の高度な集積が見られた 38 の培養系を対象として、電子受容体基質を酸化鉄鉱物から溶解性の鉄（ニトリロ三酢酸鉄、クエン酸鉄）に置き換える二段目培養に供することで、優占微生物の増殖を促し純粋菌株としての取得を試みた。限界希釈法による 4～8 回の継代培養やロールチューブ法によるコロニーピックアップを経て、分子系統樹上で新しい分類群を形成する *Geobacter* 属細菌 4 種、*Pelobacter* 属細菌 1 種（それぞれが最近縁株の 16S rRNA 遺伝子に対して 95.2～96.9%の配列相同性をもつ）の分離培養に成功した。なお分離株の純度確認は、Terminal restriction fragment length polymorphism（T-RFLP）解析、顕微鏡による細胞形態観察、フマル酸培養試験により行った。本研究で取得された菌株のいくつかは、土壌環境で実際に代謝活性を有する新規な鉄還元細菌群と近縁であった。以上から、選択的二段培養により地球物質循環に中心的に関与する新しい鉄還元細菌を複数取得し、特に *Deltaproteobacteira* 綱に属する鉄還元微生物の系統学的な広がりを見出すことができた。

Iron(III)-reducing bacteria, Isolation, 16S rRNA gene deep sequencing

講演番号：2B11p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ B 校舎 11 会場

Comparison of N_2O emitting bacteria isolated from Andisol corn farmland in spring and autumn

○LI LI,Yasuyuki Hashidoko,Ryusuke Hatano (Hokkaido Univ.)

Background: Nitrous oxide (N_2O) is an active greenhouse gas contributing more than 7% of global warming. The objectives of our study are to search for major N_2O emitters from Andisol corn farmland in Hokkaido University Shizunai Experimental Livestock Farmland (Shinhidaka, Hokkaido, Japan; 42° 25′ N, 139° 29′ E) and compare N_2O-emitting microorganisms isolated from different seasons, spring in 2012 and autumn in 2011. Using N_2O emission assay system with a soilless, gellan gum soft gel medium, many N_2O emitting eubacteria were successfully isolated from Andisol of corn farmland. We investigate the seasonal differences of microfloral community structures and also physiological traits of active N_2O emitting bacteria.

Methods: An excess amount of KNO_3 was added to the simple Winogridisk's mineral solution (10 ml volume; 0.5 mg ml^{-1} KNO_3 as the substrate, pH 5.0) without adding any additional carbon sources to focus on N_2O emission assay by incomplete denitrification. An aliquot (100 μl) of supernatant from soil suspensions (10 mg wet soil) were inoculated into 10.0 ml medium and incubated at 20℃ for 7 days. The isolated N_2O emitters pre-cultured on modified MW plates for 2-4 days were inoculated to the medium for N_2O emission assay. After 7 days of incubation at 20℃, headspace gases (22.5 ml in a vial) of the vials were sampled (50-1000 μl) and subjected to an ECD-gas-chromatographic analysis. Using sequence of 16S rRNA gene for homology search on NBCI data base, isolated N_2O emitting bacteria were identified.

Results and discussion: From the sample of the corn field collected in November 2011, less capabilities of N_2O emission (up to 51 ng ml^{-1} headspace d^{-1}) than the samples collected in spring 2007 and 2011 were detected. The dominant species of N_2O emitting bacteria isolated from Andisol in November were *Pesudomonas* sp. and *Burkhoderia* sp., and it was clearly different from N_2O emitting bacteria in the spring soil. This seasonal difference of soil bacterial community structure is probably influenced by VWC (volumetric water content) and corn roots actively providing carbon sources. For future work, using these N_2O emitting bacteria isolated from Andisol as model bacteria, we aimed to find an environmental-friendly way to reduce N_2O emission.

nitrous oxide emission, nitrous oxide emitter, seasonal differences

講演番号：2B11p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ B 校舎 11 会場

Isolation of N_2O-quenchers from Tropical Peat Soil in Oil Palm Plantation in Sarawak, Malaysia

○LAU SHARON YU LING[1,2], YASUYUKI HASHIDOKO[1], LULIE MELLING[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Tropical Peat Research Laboratory Unit)

Background

Various groups of microorganisms contribute to the production and consumption of the greenhouse gas nitrous oxide (N_2O). During our attempt to isolate potent N_2O-emitting bacteria from soils collected at various depths from an oil palm plantation on peat in Sarawak, Malaysia, N_2O-quenchers were also successfully isolated and identified as *Burkholderia* sp. and *Flexibacter* sp. We therefore evaluated their capability as N2O quenchers and investigate further their physiological traits.

Methods

Subsequently, by adapting the method of N_2O emission assay involving peat soil-mimicking soft gel medium adjusted to pH 5.0, these isolates were measured for its N_2O-quenching ability by supplementing N_2O into the headspace prior to incubation at 25°C for five days. The N2O level in headspace was monitored everyday by ECD-GC analysis. Acetylene inhibition assay was conducted with 10% acetylene injected into the headspace and incubated in the same manner.

Results

Initial supplementation of approximately 6 ppmv of N_2O standard gas showed that these isolates are able to quench exogenous N_2O although there are denitrifiers producing all the denitrifying enzyme reported to not reduce exogenous N_2O. In fact 5 days later, N2O level was less than zero, which was less than the atmospheric level (300 ppb). These potential isolates were also subjected to the 10% acetylene inhibition assay and one of the Burkholderia sp. was found to be a complete denitrifier. This isolate may reduce the atmospheric N_2O into dinitrogen gas (N_2) by a catalyst nitrous oxide reductase (N_2OR). Conversely, *Flexibacter* sp. and another *Burkholderia* sp. were not positive on the acetylene inhibition assay, suggesting this bacterium possesses a different mechanism to quench N_2O from complete denitrifiers.

This preliminary study will serve as a platform in our quest to find mitigation options to reduce N_2O emissions from the tropical peatlands.

Nitrous oxide emission, Tropical peat soil, Nitrous oxide quenchers

講演番号：2B11p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ B 校舎 11 会場

モザンビークのダイズ根粒菌での *nifD* 遺伝子の多様性
Diversity of *nifD* gene in soybean bradyrhizobia in Mozambique

○安藤 康雄[1]、伊藤 治[2]、辻本 泰弘[1]、ボイナ グイルヘルミノ[3]、コリアール ヘンリクエス ビクトール[3]、飛田 哲[1] ([1]国際農林水産業研究センター、[2]国連大学、[3]モザンビーク農業研究所)
○Yasuo ANDO[1], Osamu ITO[2], Yasuhiro TSUJIMOTO[1], Guilhermino BOINA[3], Henriques Victor COLIAL[3], Satoshi TOBITA[1] ([1]JIRCAS, [2]United Nations Univ., [3]IIAM)

日本・ブラジル・モザンビークの三国間協力である「ナカラ回廊農業開発研究・技術移転能力向上プロジェクト」は，(1)モザンビーク国北部を対象とした農業開発研究，(2)本活動を通したモザンビーク国農業研究所(IIAM)の研究能力向上，を2本の柱としている。この中で筆者らは，地域の主要自給作物であるトウモロコシに新規換金作物のダイズを組み合わせた間作技術の開発を目的として研究を行っている。これまでに，ダイズの導入がトウモロコシの生産量を増大させることはわかってきた。しかし，モザンビークで栽培されているダイズに共生する根粒菌についての情報はほとんどない。そこで,まずどのようなダイズ根粒菌が分布しているのかを知るために，窒素固定遺伝子の一つである *nifD* 遺伝子の塩基配列を決定し，解析を行った。

モザンビーク北部のナカラ回廊周辺の Lichinga（標高約 1,400m），Mutegueless と Ruace（同 約 700m），Nampula（同 400m）の4地域6ほ場で栽培のダイズの根から根粒を採取し，それを1個ずつ FTA プラントセーバーカード上でつぶしてサンプルを染みこませたのち風乾して，乾燥状態のまま持ち帰った。カードから直径 2mm のディスク片を打ち抜き，洗浄ののち，*nifD* 遺伝子の PCR に供した。用いたプライマーは nifD-70F と nifD-904R（Risal ら，2010）である。PCR 産物のシークエンスを行い *nifD* の部分塩基配列を決定し，得られた配列について BLAST 解析を行った。

Lichinga の2ヶ所のほ場から採取した根粒菌の *nifD* は，すべて類似の配列であり，*Bradyrhizobium* sp. の1系統とほとんど 100%の相同性を示した。Mutegueless の 2 つのほ場のうち，一つでは *Bradyrhizobium* sp. の系統に類似の配列がみられ，また *B. yuanmigense* と *B. japonicum* に類似の配列がわずかに見つかった。もう一つのほ場からは，Lichinga でみられた配列がほとんどを占めていた。その他に *Bradyrhizobium* sp.，あるいは *B. elkani* の配列に近いものがわずかにあった。Ruace からは，*Bradyrhizobium* sp.に近い配列が多く，また *B. japonicum* に相同性が高いものも多かった。Nampula のほ場では，ほとんどが *Bradyrhizobium* sp.であった。

以上のように，モザンビークでは熱帯・亜熱帯地域に分布する *Bradyrhizobium* sp.の系統が広く分布していることがわかった。

soybean, Bradyrhizobium, nifD

講演番号：2B11p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ B 校舎 11 会場

青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の植物ホルモン走化性と植物感染への影響

Chemotaxis toward phytohormone in *Ralstonia solanacearum* and its involvement in plant infection

○奥 正太、中里 憲司、高西 寿洋、緋田 安希子、TUNCHAI Mattana、米田 佳那子、田島 誉久、中島田 豊、加藤 純一（広島大院先端物質）
○Shota OKU, Kenji NAKAZATO, Toshihiro TAKANISHI, Akiko HIDA, Mattana TUNCHAI, Kanako YONEDA, Takahisa TAJIMA, Yutaka NAKASHIMADA, Junichi KATO (Hiroshima Univ.)

【目的】*Ralstonia solanacearum* はトマトなど経済的に重要な植物に感染し萎凋 (青枯病) を引き起こす土壌伝染性の植物病原菌であり、世界中で深刻な作物被害を引き起こしている。また、*R. solanacearum* は高い運動性を有し、様々な化合物に対して走化性を示す。走化性とは運動性細菌が特定の化合物の濃度勾配を感知し、誘引もしくは忌避応答を示す行動である。近年、*R. solanacearum* の植物感染において走化性が重要な役割を担うことが報告されたが、その詳細な機構はほとんど解明されていない。一般的な感染機構として、*R. solanacearum* は根の傷口から根内部へと侵入し、内部で増殖することにより通水を阻害、萎凋を引き起こす感染モデルが知られる。その感染モデルから、*R. solanacearum* の植物感染に関わる走化性は、感染プロセス初期「青枯病菌の宿主への接近、及び根内部への侵入」に寄与しているものと予想される。本研究では、*R. solanacearum* Ps29 を用い、植物感染に関わる具体的な走化性機構の特定及び解析を試みた。
【方法・結果】植物感染に関わる走化性には植物特有の化合物の関与が予想される。そこで本研究では植物ホルモンに着目し、解析を試みた。まず、Computer-assisted capillary assay 法により Ps29 の植物ホルモンに対する走化性を検出した。その結果、Ps29 は傷害ストレス応答性植物ホルモンであるジャスモン酸にのみ強い誘引応答を示すことが明らかとなった。このことから *R. solanacearum* は傷口から分泌されるジャスモン酸に誘引されて傷口へと接近、根内部へと侵入し、植物萎凋を引き起こす感染機構が予想された。走化性は、走化性センサータンパク質 (MCPs) が化合物を認識することで生じる。*R. solanacearum* はゲノム情報から 22 MCPs を保持することが予想されるが、ジャスモン酸走化性に関与する MCPs は不明である。そこで、Ps29 の MCP 遺伝子をそれぞれ破壊した Ps29-MCPs single mutant library を構築し、ジャスモン酸走化性に関わる MCPs の特定を試みた。網羅解析の結果、ジャスモン酸走化性に関わる主要な MCP (CtjA) の特定に成功した。現在は、Ps29 Δ*ctjA* を用いた植物感染実験や CtjA の特性化により、*R. solanacearum* の植物感染に関わる走化性機構の解析を試みている。

本研究は、生物系特定産業技術研究支援センターからイノベーション創出基礎的研究推進事業の助成を受け実施したものです。

Ralstonia solanacearum, Chemotaxis, Jasmonic acid

講演番号：2B11p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ B 校舎 11 会場

青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の有機酸走化性と植物感染への影響
Chemotaxis toward organic acids in *Ralstonia solanacearum* and its involvement in plant-infection
○加藤 純一、奥 正太、中里 憲司、高西 寿洋、緋田 安希子、TUNCHAI Mattana、米田 佳那子、田島 誉久、中島田 豊（広島大院先端物質）
○Junichi KATO,Shota OKU,Kenji NAKAZATO,Toshihiro TAKANISHI,Akiko HIDA,Mattana TUNCHAI,Kanako YONEDA,Takahisa TAJIMA,Yutaka NAKASHIMADA (Hiroshima Univ.)

【目的】*Ralstonia solanacearum* はトマトやタバコなどの商業的価値の高い作物に感染し萎凋を引き起こす病原細菌であり、世界中で被害をもたらしている。環境中の運動性細菌が特定の化学物質の濃度勾配に反応し、誘引あるいは忌避応答を示す行動を走化性という。近年、*R. solanacearum* の植物感染において走化性が重要な役割を果たすことが報告された。また、これまでの研究から *R. solanacearum* が植物の根から分泌される根滲出液に強く誘引されることが明らかとなっている。根から植物内部へと侵入し萎凋を引き起こす *R. solanacearum* の感染モデルから、根滲出液への走化性が感染において重要であることが予想される。しかしながら、根滲出液は「アミノ酸」、「有機酸」、「糖」などの主要画分により構成される混合物であるため、根滲出液成分のいずれの化合物に対する走化性が感染に関与するか不明である。本研究では、根滲出液に含まれる化合物について *R. solanacearum* の走化性を検出し、植物感染に重要となる走化性物質の特定およびそれらを感知する走化性センサータンパク質(MCP)の解析を試みた。*R. solanacearum* 植物感染走化性機構の解明により、新規防除技術の確立等への応用が期待される。
【方法・結果】*R. solanacearum* Ps29 を供試株とし、Computer-assisted capillary assay 法により走化性評価を行った。植物根滲出液に含まれると考えられている植物関連物質から 65 種類の化合物を選抜し、Ps29 の走化性を解析した。その結果、リンゴ酸およびクエン酸に対して極めて強く誘引されることが明らかとなった。また、これまでの報告からリンゴ酸、クエン酸は根滲出液において量的にも主要な成分であると考えられており、これらの走化性が植物感染において重要となることが予想される。そこで、次に、Ps29 走化性分子機構の解析を試みた。*R. solanacearum* GMI1000 のゲノム情報をもとにした Protein BLAST 解析により、*R. solanacearum* は 22 個の MCP を有することが予想された。そこで Ps29-MCP 遺伝子の単独破壊株ライブラリを構築し、有機酸走化性に関与する MCP の網羅的解析を行った。その結果、リンゴ酸走化性に関与する MCP (CtoA, CtoB) およびクエン酸走化性に関与する MCP (CtoA, CtoC) が特定された。現在は、リンゴ酸走化性欠失株 Ps29 Δ*ctoA* Δ*ctoB*、クエン酸走化性欠失株 Ps29 Δ*ctoA* Δ*ctoC*、及び Ps29 Δ*ctoA* Δ*ctoB* Δ*ctoC* を作製し、MCP 遺伝子の相補により走化性分子機構の詳細な解析を行っている。また、これらの変異株を用いた植物感染実験により有機酸走化性と植物感染の関連についても解析している。本研究は、生物系特定産業技術研究支援センターからイノベーション創出基礎的研究推進事業の助成を受け実施したものです。

Ralstonia solanacearum, Chemotaxis, root exudate

講演番号：2B11p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ B 校舎 11 会場

亜熱帯気候に適応した乳酸菌の分離と発酵特性の評価

Lactic Acid Bacteria in the Subtropics: Isolation and their Fermentation Characteristics

武島 浩太、平良 駿也、○田中 博（沖縄高専・生物資源）
Kouta TAKESHIMA,Shunya TAIRA, ○ Hiroshi TANAKA (Okinawa National College of Technology, Department of Bioresources Bioengineering)

【目的】

沖縄の亜熱帯気候に生育する天然資源から亜熱帯気候に適応した乳酸菌を分離し、食品加工への応用を目的として発酵特性を比較評価する。沖縄本島に生育する植物、干潟にみられる海藻類の他、沖縄の長寿食習慣の要因とされる天然資源（島野菜や亜熱帯性の果物）から乳酸菌の分離を試みる。

【方法】

１．乳酸菌の分離源

沖縄本島の北部地域に生育する植物の花、葉、茎、果実を乳酸菌の分離源とした。海藻類は名護市の辺野古干潟で採集し、島野菜と亜熱帯性の果物は沖縄本島の市場などから入手して分離源とした。

２．乳酸菌の分離方法

一定の大きさに加工した分離源を滅菌生理食塩水（9 ml）に加えてよく混合し、混合液（0.5 ml）を１%(w/v)炭酸カルシウムを含むMRS寒天培地に塗布した。MRS寒天培地を嫌気条件下(AnaeroPack)、37℃で 24～96 時間培養し、出現したコロニーの性状を次の観点から評価した。評価項目：①クリアゾーン（halo）の有無、②コロニーの形状、③コロニーの色、④グラム染色。本発表では、クリアゾーンを形成し、かつ、グラム染色陽性のコロニーを暫定的に乳酸菌として取り扱った。

３．発酵特性の評価

分離した乳酸菌を脱脂乳培地およびMRS培地で培養することで発酵特性を比較評価した。評価項目は、発酵速度、酸生成量、生菌数の変化とした。

【結果】

これまでに 42 種類の植物資源、10 種類の果物、3 種類の海藻類からクリアゾーンを形成するコロニーを、それぞれ 10 株（分離率 24 %）、10 株（分離率 100 %）、1 株（分離率 33 %）分離した。グラム染色の結果、植物分離源から 5 株（分離率 12 %）、果物分離源からは 10 株（分離率 100 %）のグラム陽性菌を分離した。

本発表では、亜熱帯気候に生育する天然資源から分離された乳酸菌の発酵特性を比較検討するとともに、天然資源の種類や生育環境と乳酸菌分離頻度との関係についても考察する。

Lactic Acid Bacteria, Isolation, Fermentation

講演番号：2B11p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ B 校舎 11 会場

GABA を高生産する新規乳酸菌の単離と工業的な効率生産
Isolation of a lactic acid bacterium producing high level of GABA, and development of industrial technology

○岩谷 和輝[1]、永井 裕次郎[1]、野村 真悟[2]、塩木 康紀[2]、小澤 幸央[1]、吉田 祥子[2]([1]東海漬物(株)、[2]豊橋技科大院・工・環境生命)
○Kazuki Iwaya[1], Yujiro Nagai[1], Masato Nomura[2], Yasunori Shioki[2], Yukio Ozawa[1], Sachiko Yoshida[2] ([1]R&D lab.,Tokai Pickeling Co.,Ltd., [2]Dep.Envirn.Life Sci.Toyohashi Univ.Technol.,)

【背景及び目的】
γ-アミノ酪酸(GABA)は哺乳動物の抑制性の神経伝達物質であり、近年ではリラックス作用、血圧上昇抑制作用を有することから機能性物質として食品に利用されている。一方、日本の伝統的な発酵食品である漬物において、乳酸菌の働きでグルタミン酸から GABA が生産されることも知られており、漬物由来の乳酸菌の有用性が注目されている。漬物由来の乳酸菌を上手く使うことで GABA を豊富に含んだ高付加価値商品の開発につながると考えられる。
本研究では、漬物に存在する乳酸菌の中から GABA を高生産する乳酸菌を単離し、工業的利用を見据え、高濃度の GABA を短時間で生産できる培養方法を構築することを目的とした。
【方法及び結果】
漬物から 314 株の乳酸菌を分離し、最も GABA 生産能が高い菌を選抜した。選抜された GABA 生産乳酸菌をグルタミン酸ナトリウム(MSG)1%(W/V)含む GYP 培地に植菌し、30℃、初発 pH5.0 で培養を行った。GABA 生産能を比較するための対照区には GABA を高生産することが報告されている *Lactobacillus brevis* NBRC12005 を用いた。試験の結果、*L. brevis* は 24 時間後の定常期から GABA を生産開始したのに対し、単離された乳酸菌は対数増殖期中期の 12 時間後から GABA の生産を開始し、30 時間で全ての MSG を GABA へと変換することができた(*L. brevis* は 72 時間を要した)。
次に、単離された乳酸菌に対し、遺伝子解析ならびに糖資化試験を実施した。16SrDNA 解析の結果、単離された乳酸菌は *Lactobacillus parabrevis* に最も近縁であることが明らかとなった。さらに、*L. parabrevis* との DNA-DNA ハイブリッド形成試験を実施し、新規性を確認した。その結果、相同性が 16%と低い値を示し、新種の乳酸菌であることが示唆された。また、糖資化試験においても近縁種である *L. parabrevis* と明確な差が確認されたため、単離された乳酸菌は、*Lactobacillus* 属に帰属される新種であることが明らかとなった（新規乳酸菌 TK63404 寄託番号：NITE P-930)。
次に、GABA 生産の工業利用を目指し、培地組成、菌の増殖至適温度、pH、及びグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)の至適温度、pH の検討を行い、最適培養条件を確立した。その結果、一般的な培養条件に比べ、乳酸菌量は約 3 倍、GAD 活性は約 2 倍まで向上させることができ、高い変換効率を維持したまま 30%(W/V)MSG を 72 時間で変換することが可能となった。

GABA, lactic acid bacteria, fermentation

講演番号：2B11p16
講演日時、会場：3月25日 17:00～ B校舎11会場

愛知県におけるヒト糞便からのESBL産生大腸菌の分離状況
Prevalence of Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing *Escherichia coli* isolated from human stool samples in Aichi Prefecture.
○山田 和弘[1,2]、鈴木 匡弘[2]、松本 昌門[2]、倉根 隆一郎[1] ([1]中部大院応生、[2]愛知衛研)
○Kazuhiro YAMADA[1,2], Masahiro SUZUKI[2], Masakado MATSUMOTO[2], Ryuichiro KURANE[1] ([1]Chubu Univ., [2]Aichi Prefectural institute of Public Health)

【目的】基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)はセフォタキシムやセフタジジムなどの第三世代セフェム系抗生物質を含む種々のβ-ラクタム系抗生物質を分解することができるβ-ラクタマーゼである。薬剤耐性菌の蔓延は院内感染だけでなく市中感染としても問題となっており、ESBLを産生する腸内細菌もその一つとなっている。日本で分離されるESBL産生菌の主流はCTX-M型β-ラクタマーゼ(CTX-M)であり、TEM型やSHV型といった他の型に比べ市中からもよく分離され、環境をはじめ家畜やヒトに広く分布しており、CTX-M型ESBL産生菌の動向を把握することは重要になってくる。そこで愛知県におけるヒト糞便中のESBL産生大腸菌の遺伝的・血清学的特徴を調べるために、分離された大腸菌について血清型、ESBL遺伝子の保有状況、PFGEパターンを調査した。またESBL産生大腸菌の多様性を比較するため、他の大腸菌とクラスター解析を行った。
【方法】2010年から2012年に食中毒関連事例(118/192)及び健常者(74/192)から検出された大腸菌192株に対し、市販抗血清による血清型別試験、*Xba* Ⅰを用いたパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)によるクラスター解析を行った。クラスター解析はBio Numericsを用い、相関性が80%以上の部分を1つのクラスターとした。ESBL遺伝子はPCR法により$bla_{\text{CTX-M}}$のCTX-M-1・CTX-M-2・CTX-M-9の各グループの保有状況を調査した。さらにCTX-Mグループのいずれかが陽性となった場合は、ダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定し、BLAST検索を用いた相同性検索により、CTX-M型を決定した。
【結果と考察】供試した192株中、ESBL遺伝子が陽性となったのは10株(5.2%)であった。その内訳はCTX-M-1 group 3株(CTX-M-1：1株、CTX-M-15：1株CTX-M-55：1株)、CTX-M-9 group 7株(CTX-M-14：4株、CTX-M-27：3株)で、今回CTX-M-2 group遺伝子は検出されなかった。血清型試験ではO血清型が決定されたのは192株中52株であり、そのうちO1が20株と最も多く、次いでO18が12株、O25が7株、O74が4株となっていた。ESBL遺伝子陽性株10株では、血清型が決定されたのは3株であり、O1：HUTが1株(CTX-M-55)、O25：H4が1株(CTX-M-14)、O153：H6が1株（CTX-M-14）であった。O・H血清型共に型別不能の株が最も多く、今回分離された大腸菌いついて血清型とESBL遺伝子との明確な関連性は認められなかった。全193株のPFGE法によるクラスター解析では2株から17株よりなるクラスターが37個形成された。ESBL産生株のうちO25:H4(CTX-M-14)を含む3株は同一クラスターを形成したが、それ以外の9株は異なるクラスターに分類された。これらの結果から愛知県においてESBL遺伝子陽性大腸菌は多様性に富んでいることが示唆された。

Escherichia coli, ESBL, CTX-M

講演番号：2B11p17
講演日時、会場：3 月 25 日 17:12～ B 校舎 11 会場

便器表面付着性 *Rhizobium* 属細菌のバイオフィルム形成阻害の試み
Trial for inhibition of biofilm formation by toilet bowl attached *Rhizobium*.
○深野 透[1]、高橋 康徳[1]、五味 満裕[2]、大崎 幸彦[2]、三輪 京子[1]、森川 正章[1] ([1]北大院環・分子生物、[2]小林製薬・中研)
○Toru FUKANO[1], Yasunori TAKAHASHI[1], Mitsuhiro GOMI[2], Yukihiko OSAKI[2], Kyoko MIWA[1], Masaaki MORIKAWA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd.)

【目的】トイレ便器表面の汚れの一要因である、細菌によるバイオフィルムの形成メカニズムの解明およびその防除を目的として、当研究室ではこれまでに便器表面に初期付着する細菌群を 11 株（R1～R11 株）単離しており、昨年度大会においてそのうち顕著なバイオフィルムを形成する *Rhizobium* 属細菌 R8 株の諸性質について報告している。本研究では、R8 株のバイオフィルム形成を阻害する細菌を探索することでバイオフィルムの防除における新しい知見を得る事を目的とした。
【方法と結果】R1～11 株を網羅的に 2 種類混合培養した際のバイオフィルム形成を調べた結果、R1 株と R2 株が R8 株のバイオフィルム形成を顕著に阻害することが判明した。16S rRNA 遺伝子配列解析の結果、R1 株は *Chryseobacterium* 属、R2 株は *Microbacterium* 属細菌である事がわかった。
R1 株、R2 株のバイオフィルム形成阻害活性を有する因子の特定を目指して、それぞれの細菌について細胞外、細胞膜、細胞質画分を調製し R8 株のバイオフィルム形成に及ぼす添加効果を調べた結果、R1 株の細胞外、細胞内（細胞膜、細胞質）いずれの画分にもバイオフィルム形成阻害活性が認められなかったことから、阻害因子の特定は困難であった。そこで、R1 株が生細胞である（代謝活性を有する状態）ことが必要であるのか検討した。対象実験として R1 株を紫外線殺菌処理したものを準備し、生細胞と比較したところ、紫外線殺菌処理した R1 株細胞には R8 株のバイオフィルム形成阻害活性が認められなかった。すなわち、R1 株のバイオフィルム形成阻害活性は単なる細胞表面での物理的化学的相互作用によるものではないと推定される。
一方、R2 株については、細胞質画分を 3 mg/ml 添加すると明瞭な R8 株の生育およびバイオフィルム形成阻害活性が見られた。R1 株の細胞質画分を同濃度添加しても R8 株の生育およびバイオフィルム形成はまったく影響を受けないことから、本活性物質は R2 株に固有であると思われる。最後に、細菌のバイオフィルム形成を阻害する物質の一つにペプチドグリカン合成に関係する D-アミノ酸が知られている。そこで、*Rhizobium* 属細菌 R8 株における D-アミノ酸の添加効果を検証した。その結果、R8 株のバイオフィルム形成阻害には高濃度（500μM）の D-アミノ酸が必要であることが分った。

biofilm, toilet bowl, *Rhizobium*

講演番号：2B12a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ B 校舎 12 会場

出芽酵母 COPII 小胞膜タンパク質遺伝子の多重欠損株におけるゴルジ体膜タンパク質の局在解析

Comprehensive disruption of *Saccharomyces cerevisiae* COPII membrane proteins and analysis of multiple-gene-disruptant golgi protein localization.

○藤井 聖也、野田 陽一、依田 幸司（東大院・農生科・応生工）
○Shoya Fujii,Yoichi Noda,Koji Yoda (Tokyo Univ.)

【目的】COPII 小胞に存在する膜タンパク質（以下 COPII 膜タンパク質と呼ぶ）はタンパク質を小胞膜につなぎとめるアダプターとして働き、タンパク質の選択的輸送を行う。しかしながらどの COPII 膜タンパク質がその役割を担っているのかについてはまだ不明な点が多い。その理由の一つとして複数の COPII 膜タンパク質によって輸送されるタンパク質が存在する場合、単独の遺伝子破壊では輸送に影響が出ない可能性があるためである。そのため本研究では COPII 膜タンパク質をコードする遺伝子の多重破壊株を作成し、この株を解析することで、より深く個々の COPII 膜タンパク質の機能に迫ることを目的とした。
【方法】*Saccharomyces cerevisiae* の COPII 膜タンパク質がコードする遺伝子を相同的組み換えにより順番に破壊した。破壊の後に、使用した選択マーカー（*URA3*）の抜き出しを行い、同じマーカーを次の破壊に使い回した。これにより作成した多重遺伝子欠損株の表現型を解析し、同時に共焦点顕微鏡とショ糖密度勾配遠心により細胞内の膜タンパク質の局在を追跡した。
【結果】現在 *svp26*、*erv41*、*erv46*、*erv14*、*erv29*、*emp46*、*emp47*、*got1* の 8 重破壊株の作成まで成功した。破壊株は 4 重破壊（*erv14* まで）の時点で野生株と比べ生育速度の低下を示し、8 重破壊（*got1* まで）の時点でさらなる低下を示した。また 8 重破壊株は 16℃、37℃におけるコロニー形成能力を失っており、前者は他研究者の論文からおそらく *erv14* の破壊が原因であることが推測されたが、後者の原因がどの遺伝子にあるかは不明だった。破壊した COPII 膜タンパク質の遺伝子をプラスミドで戻したところ、37℃での生育阻害は *ERV14* あるいは *GOT1* 遺伝子の導入によって回復した。したがってこれらの遺伝子の二重破壊が 37℃での生育阻害の原因であることが強く示唆された。
本研究室で解析が進んでいたマンノース転移酵素群（Mnn1、Mnn2、Mnn5、Mnn6(Ktr6)、Ktr1、Ktr2、Ktr3、Ktr4、Ktr5、Ktr7、Kre2、Och1、Yur1）の局在解析を実施し、8 重破壊株において Mnn1、Mnn2、Mnn5、Ktr3、Ktr4、Kre2 がゴルジ体から小胞体に誤局在する様子が観察された。このうち Mnn2、Mnn5、Ktr3、Kre2 は *svp26* 遺伝子の単独破壊、また Ktr4 は *erv41* もしくは *erv46* 遺伝子の単独破壊によってゴルジ体から小胞体への局在変化が起こることを我々は以前に報告していたが、これまでに Mnn1 の局在が変化するという報告はなされていない。本研究により、複数の COPII 膜タンパク質が Mnn1 のゴルジ体局在に関与する可能性が初めて示された。

protein transport, COPII membrane protein, multiple gene disruption

講演番号：2B12a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ B 校舎 12 会場

出芽酵母 Gpx1 が lipid droplet の形成に与える影響
Effect of Gpx1 on lipid droplet formation in *Saccharomyces cerevisiae*
○大舘 巧[1]、井上 善晴[2]、久下 周佐[1] ([1]東北薬科大、[2]京大院農)
○Takumi OHDATE[1], Yoshiharu INOUE[2], Shusuke KUGE[1] ([1]Tohoku Pharm. Univ., [2]Kyoto Univ.)

我々は、出芽酵母のグルタチオンペルオキシダーゼホモログ遺伝子（*GPX1*、*GPX2*、*GPX3*）の 1 つの Gpx1 の機能解析を行ってきた。その結果、Gpx1 がオレイン酸培地において発現誘導され、ペルオキシソームマトリックスに分布すること、ならびに *gpx1*Δ株がオレイン酸培地において生育低下を示すことを明らかにしてきた。また、*gpx1*Δ株ではペルオキシソーム形成が低下することを見いだし報告した。今回、脂肪酸の貯蔵、あるいは毒性軽減に関わる lipid droplet（LD）と Gpx1 の関係について検討を行った。LD はグルコース培地で培養した場合、定常期において合成が誘導されるが、オレイン酸培地では培養開始から強く誘導される。野生株、および *gpx1*Δ株の LD を BODIPY493/503 により染色し、フローサイトメーターを用いて 1 細胞あたりの蛍光強度を測定した結果、*gpx1*Δ株の LD は野生株より低下することが判明した。一方、Gpx1 と同様にペルオキシソームに分布しペルオキシソームの機能発現に重要な役割を持つペルオキシソーム型カタラーゼ（Cta1）を欠損させると、予想に反して LD は野生株より増加した。これらの結果は、Cta1 はペルオキシソーム内の酸化ストレスを軽減することでペルオキシソームにおける脂質の代謝に寄与しているが、Gpx1 の場合は異なった役割を持つ可能性を示唆している。そこで、LD の合成段階に着目した。オレイン酸培地ではトリアシルグリセロールが LD の構成成分の大部分を占める。オレイン酸培地において、ジアシルグリセロールに脂肪酸を結合させトリアシルグリセロールへと変換するトリアシルグリセロール合成酵素として、*DGA1* と *LRO1* が知られている。そこで、*gpx1*Δ株に *DGA1*、あるいは *LRO1* を過剰発現させたが、*gpx1*Δ株のオレイン酸培地での生育低下は回復しなかった。このことから、LD の減少が *gpx1*Δ株のオレイン酸培地での生育低下の直接的な要因ではないと考えられた。ペルオキシソームと LD の膜成分は小胞体（ER）膜に由来することが知られており、ER ストレスと脂質代謝の関連も指摘されている。*gpx1*Δ株において、ペルオキシソームと LD の形成が低下することから、現在、ER ストレスと Gpx1 の関係について検討を行っている。

glutathione peroxidase, lipid droplet, endoplasmic reticulum

講演番号：2B12a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ B 校舎 12 会場

出芽酵母モノカルボン酸輸送体 Jen1 のグルコース誘導性分解制御因子の探索と解析
Analysis of proteins involved in glucose-induced degradation of monocarboxylic acid transporter Jen1 in the yeast.
○松本 耕助、葛西 寛一、大橋 優隆、机 伸太郎、五味 勝也、新谷 尚弘（東北大院農）
○Kosuke Matsumoto,Hirokazu Kasai,Masataka Ohashi,Shintaro Tukue,Katsuya Gomi,Takahiro Shintani (Tohoku Univ.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のモノカルボン酸輸送体 Jen1 は 12 回膜貫通型タンパク質であり、細胞膜上に局在して乳酸やピルビン酸の取り込みを担っている。培地中のグルコースによって Jen1 の発現は抑制されているが、グルコースの枯渇によってその発現は脱抑制される。グルコースの再添加により *JEN1* 遺伝子の転写抑制が起こるとともに、細胞膜上に局在する Jen1 は速やかに分解される。この分解はエンドサイトーシスと多胞体経路を介して、液胞で行われる。本研究では、グルコース誘導性の Jen1 分解機構を解明することを目的として、Jen1 分解を制御する遺伝子の同定を試みた。
まず、出芽酵母遺伝子破壊株ライブラリーの各破壊株において HA タグを付加した Jen1 を発現させグルコース添加後の Jen1 の分解を経時的に解析する事によって、グルコース誘導的な Jen1 分解に欠損を示す株のスクリーニングを行った。
これまでに、エンドサイトーシスや多胞体経路に関わる遺伝子群、液胞機能に関わる遺伝子群、クロマチンに作用して遺伝子の発現制御に関わる遺伝子など約 50 の遺伝子破壊株を取得した。また、炭素カタボライト抑制に関わるとされる転写複合体である Ccr4-Not 複合体のコアを構成するタンパク質の遺伝子欠損株を複数取得した事から、この複合体がグルコース誘導的な Jen1 の分解の制御に寄与している事が考えられた。
少なくとも 9 つのタンパク質から構成される Ccr4-Not 複合体は酵母からヒトに至る真核生物に広く保存されており、Ccr4 及び Caf1 のヌクレアーゼ活性による mRNA 分解を通じた転写制御や、Not4 のユビキチンリガーゼ活性によるユビキチン-プロテアソームシステムでのタンパク質の分解など様々な生理的機能への関与が報告されている。今回、Not4 タンパク質のユビキチンリガーゼ活性に関与されるとされる 35 番目のロイシンに変異を導入した Not4 L35A タンパク発現株においても *not4* 破壊株と同様に Jen1 の分解に欠損が見られた事から、この複合体の持つユビキチンリガーゼ活性がグルコース誘導性の Jen1 分解に関与している事が示唆された。

transporter, glucose repression, ubiquitination

講演番号：2B12a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ B 校舎 12 会場

出芽酵母におけるリン酸飢餓誘導性オートファジーの解析：液胞内リン酸プールとオートファジー誘導の関係
Analysis of a phosphate starvation-induced autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*: Relationship between the vacuolar phosphate pool and an induction of autophagy
○横田 浩人、五味 勝也、新谷 尚弘（東北大院農）
○hiroto yokota,katsuya gomi,takahiro shintani (Tohoku Univ.)

オートファジーとは、真核生物において細胞質成分をオートファゴソームと呼ばれる二重膜構造体が取り込み、リソソーム・液胞へ輸送し分解を行う機構であり、栄養飢餓などのストレス条件に応答して誘導されることが知られている。出芽酵母において、オートファジーは窒素飢餓条件で顕著に誘導され、環境中から供給できないアミノ酸を自らの構成成分の分解産物で補うことで必要最低限のタンパク質合成を促している。それに対して、リン酸飢餓条件でオートファジーが誘導されることは知られているものの、その知見は少ない。出芽酵母の液胞内には多量のリン酸がポリリン酸として貯蔵されており、リン酸飢餓時にリン酸源として機能することが考えられた。そこで、出芽酵母のリン酸代謝とリン酸飢餓誘導性オートファジーの関連性について解析を行っている。

オートファジーの活性を二種類のレポータータンパク質を用いて測定した。一つはオートファゴソーム形成に関与し、自身もオートファゴソームに取り込まれる Atg8 の N 末端に GFP タグを融合した GFP-Atg8、もう一つはプラスミドのマルチクローニングサイト由来のペプチド(MCS ペプチド)が融合した CFP(CFP*)である。両者ともオートファジー依存的に液胞へ輸送され、液胞内プロテアーゼによる分解を受けるが、Atg8 や MCS ペプチド部分が分解されるのに対してプロテアーゼ耐性な GFP や CFP 部分は液胞内に蓄積する。この蓄積をウェスタンブロット法によって検出してオートファジー活性の指標とし、リン酸飢餓誘導性オートファジーの解析を行った。

まず、リン酸飢餓誘導培地として最小培地からリン酸を抜いたものを用いた。この培地では、最小培地と比較して生育阻害は見られなかったものの、各レポータータンパク質の液胞への蓄積は促進されていることが観察された。しかし、窒素飢餓条件によるレポータータンパク質の蓄積と比較すると、リン酸飢餓条件による蓄積は遅く、リン酸飢餓誘導性オートファジーは窒素飢餓誘導性オートファジーと比較してその誘導が遅延することが分かった。次に、出芽酵母におけるリン酸代謝に関連した遺伝子を破壊した株においても同様の解析を行った結果、液胞内のポリリン酸の蓄積や液胞からのリン酸の排出に関与する遺伝子の破壊株では野生株よりもリン酸飢餓誘導性オートファジーの誘導が促進され、さらにリン酸飢餓条件による生育阻害がわずかに起こることが観察された。これらのことから、リン酸飢餓誘導性オートファジーとポリリン酸の代謝の間に関連性があることが示唆された。

autophagy, phosphate metabolism

講演番号：2B12a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ B 校舎 12 会場

Characterization of stress granules upon heat stress in *A. oryzae*

○ HSIANG TING HUANG,JUN-ICHI MARUYAMA,KATSUHIKO KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

The ability of adaptation to stresses or environmental stimuli is crucial for cell survival, and eventually this adaptive process is achieved by the regulation of gene expression. Traditionally, the regulation of transcription has been regarded as the major cellular determinant. However, more and more evidences have accumulated and indicated that the posttranscriptional modulation of mRNA in translation and stability plays a vital role in this process. The common feature of environmental stress response is the global translation inhibition, in which cells shut down protein synthesis to conserve anabolic energy and initiate a reconfiguration of gene expression. The stalled preinitiation complexes, together with their associated mRNAs are routed into discrete cytoplasmic foci known as stress granules. Stress granules are cytoplasmic non-translating mRNP granules that have been functionally implicated in the posttranscriptional regulation of mRNAs and in cellular signal transduction. Stress granules are conserved in eukaryotes, and have been studied extensively in yeast and mammalian cells. However, stress granules in filamentous fungi including *Aspergillus oryzae* have not yet been defined so far.

In the present study, EGFP fusion protein of AoPab1, the homolog of *S. cerevisiae* Pab1p, was used as a marker of stress granules. Localization analysis showed that AoPab1 was evenly distributed through the cell, and was accumulated as the cytoplasmic foci in response to heat stress. We have shown previously that AoSO protein, the homolog of *Neurospora crassa* SO of unknown molecular function necessary for hyphal fusion, accumulates at the septal pore when cells are subjected to various stresses. The stress-induced accumulative behavior raises a possible link between AoSO and stress granules. We found that AoSO accumulated not only at the septal pore but also at the hyphal tip in cells exposed to heat stress. Cytoplasmic AoSO foci were colocalized with the AoPab1-mDsRed marked stress granules, and were sensitive to cycloheximide treatment, suggesting that cytoplasmic AoSO foci are mRNP granules, and AoSO may participate in the posttranscriptional regulation of mRNA in response to heat stress. Further investigation of the effect of *Aoso* deletion on the function of stress granules revealed that AoSO was not indispensable for stress granule formation; however, the distribution of stress granules was affected in the *Aoso*-deleted strain. Since we have observed that AoPab1-EGFP marked stress granules were usually docked with vacuoles, the possibility of the involvement of autophagy in stress granules is being investigated.

stress granule, *Aspergillus oryzae*, autophagy

講演番号：2B12a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ B 校舎 12 会場

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の機能未知遺伝子 *POG1* によるリチウム耐性機構の遺伝学的解析

Genetic analysis of lithium stress tolerance by the uncharacterized *POG1* in *Saccharomyces cerevisiae*

○喜多島 萌、大城 聡、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Moe Kitajima,Satoshi Oshiro,Hiroshi Takagi (Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】

当研究室では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のユビキチンリガーゼ Rsp5 変異株（*rsp5*^{A401E}）が種々のストレスに感受性を示すことから、Rsp5 がストレス耐性に関与すると考えている。これまでに *rsp5*^{A401E} 株の高温、塩化リチウムに対する感受性を相補するマルチコピーサプレッサーとして、転写因子をコードすると推定されている *POG1*（Promoter of Growth）を単離した。興味深いことに、野生株で *POG1* を過剰発現させると塩化リチウム耐性が著しく向上することを見出した。*POG1* は G1/S 期移行に関与する転写因子として以前に報告されたが、一次構造上のオルソログが他の生物に存在せず、既知の機能ドメインも見出されていないため、その分子機能はほとんど不明である。また、リチウムは躁うつ病の治療薬に用いられているが、その作用機序、細胞毒性については不明な点が多い。したがって、*POG1* の機能解析によってリチウムの細胞毒性や躁うつ病における作用機序などに対して新たな知見が得られる可能性がある。そこで、本研究では、機能未知遺伝子 *POG1* によるリチウム耐性機構の解明を目的として、*POG1* と遺伝学的相互作用を示す遺伝子を単離し、その解析を行った。

【方法・結果】

S. cerevisiae の非必須遺伝子破壊株コレクションの中から、リチウム感受性を示すと報告されている 43 種の遺伝子破壊株で *POG1* を過剰発現させ、塩化リチウム（200 mM、400 mM）に対する感受性をスポット試験で評価した。その結果、*POG1* の過剰発現によってリチウム感受性が相補される遺伝子は 23 種、相補されない遺伝子は 20 種であった。*POG1* と各遺伝子の機能的相関を調べるために、Gene Ontology により、各遺伝子の細胞内における機能分類を行った。ゲノム全体の出現頻度と比較して各クラスターの出現頻度が特に高かったものに注目すると、リチウム感受性が相補されない遺伝子には液胞形成に関与する遺伝子の出現頻度が高いことが示された。そこで、液胞の染色試薬 FM4-64 を用いて液胞形態の観察を行ったところ、①*POG1* の過剰発現、②リチウムストレスにおいて、1 細胞当たりの液胞数の増加、及び各液胞のサイズ縮小（液胞の fragment 化）が見られた。高浸透圧やイオンストレス条件下では、細胞のストレス応答として液胞が fragment 化することは既に報告されている。現在、*POG1* 過剰発現株は液胞の fragment 化誘導など、液胞の形態形成に関与することでリチウム耐性を示すという仮説を立て、*POG1* 過剰発現株における液胞の形態形成とリチウム耐性の関連性について解析を進めている。

POG1, lithium stress, vacuole fragmentation

講演番号：2B12a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ B 校舎 12 会場

酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 によるストレス下での原形質膜タンパク質の品質管理機構

Rsp5-mediated quality control of plasma membrane proteins under stress conditions in *Saccharomyces cerevisiae*

○清水 優子、鈴木 悦子、佐々木 俊弥、高木 博史（奈良先端大バイオ）
○Yuko Shimizu,Etsuko Suzuki,Toshiya Sasaki,Hiroshi Takagi (Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は発酵生産過程で高温、高濃度エタノール、高浸透圧、冷凍、乾燥など様々なストレスに曝されながら、有用機能を発揮している。しかし、長期間のまたは複合的なストレスによって、多くの細胞内タンパク質は変性し、異常タンパク質として蓄積するため、生育阻害や細胞死が引き起こされる。したがって、酵母の有用機能を維持するためにはストレス耐性の向上が課題である。我々は酵母のストレス防御機構の解明と産業酵母の育種への応用を目的に研究を進めており、これまでに Rsp5 が酵母のストレス耐性に関与していることを報告してきた。Rsp5 は酵母の HECT 型ユビキチンリガーゼの内、唯一生育に必須のタンパク質であり、多様な生命現象に関与している。Rsp5 が担う重要な機能の一つにエンドサイトーシスがある。例えば、原形質膜上のアミノ酸パーミアーゼ Gap1 は、アンモニウムイオンのような利用しやすい窒素源が存在すると、Rsp5 によるユビキチン化を受けた後、エンドサイトーシスを経て液胞で分解される。我々は、ストレス下で生じる異常タンパク質のうち、原形質膜上のものに関しては Rsp5 を介した経路で除去され、そのことがストレス耐性に重要であるという仮説を立てている。そこで本研究では、Gap1 をモデル基質としてストレス下における Rsp5 の機能を解析し、原形質膜タンパク質の品質管理機構を検証することを目的とした。
【方法と結果】ストレスに伴う Gap1 のエンドサイトーシスを解析するため、タンパク質の変性を誘導する様々なストレス（エタノール、高温、過酸化水素、塩化リチウム）で酵母を処理後、GFP を融合した Gap1 の細胞内局在を経時的に観察した。その結果、野生株ではこれらのストレスに曝した直後から Gap1 が積極的に液胞へ輸送されていたが、*rsp5* 変異株、エンドサイトーシス経路欠損株、非ユビキチン化型変異 *gap1* 発現株では原形質膜から液胞への輸送が遅延していた。さらに、ウェスタン解析の結果から、エタノールストレス下では非ストレス条件下に比べ Gap1 の存在量が減少することが確認された。一方でユビキチン化される Gap1 の量は増加しており、エタノールによって Gap1 のユビキチン化が誘導され、分解されることが明らかとなった。また、放射性同位元素でラベルしたシトルリンの細胞内への取り込み量から Gap1 活性を算出した結果、エタノール存在下で Gap1 の活性は顕著に低下しており、Gap1 が変性している可能性が考えられた。以上の結果から、ストレスに伴い変性した原形質膜タンパク質が Rsp5 依存的に液胞へ輸送され、分解される品質管理機構の存在が示唆された。

ubiquitin ligase Rsp5, ethanol stress, general amino acid permease Gap1

講演番号：2B12a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ B 校舎 12 会場

酵母の HECT 型ユビキチンリガーゼ Rsp5 のリン酸化／脱リン酸化に関わる酵素の探索

Search for the enzymes involved in the phosphorylation/dephosphorylation of the HECT-type ubiquitin ligase Rsp5 in *Saccharomyces cerevisiae*

○山下 由貴、佐々木 俊弥、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Yuki Yamashita,Toshiya Sasaki,Hiroshi Takagi (Grad. Sch. Biol . Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は種々の発酵生産過程で様々なストレスに曝されており、産業利用上、ストレス耐性の向上が課題である。酵母におけるエンドサイトーシスの多くは HECT 型ユビキチンリガーゼ Rsp5 によるユビキチン化が引き金となる。原形質膜上のアミノ酸パーミアーゼ Gap1 は、利用しやすい窒素源の添加やエタノールストレス下において、Rsp5 によりユビキチン化されエンドサイトーシスを経て、速やかに液胞で分解される。この経路が欠損すると酵母の生存率が低下するため、ストレス耐性においても重要な機構であると考えられる。我々は最近、Rsp5 の基質認識に関与する WW ドメイン内の Thr357 がリン酸化されること、およびこの残基のリン酸化/脱リン酸化が Rsp5 の活性を制御している可能性を見出した。そこで、本研究では、Rsp5 の活性制御機構を解明することを目的に、Thr357 のリン酸化/脱リン酸化に関わる酵素の同定を試みた。
【方法・結果】我々が取得した *rsp5*^{T357A} 変異株では、プロリンを取り込む Gap1 が恒常的にユビキチン化され、液胞で分解されるため、プロリンアナログのアゼチジン-2-カルボン酸（AZC）に対して耐性を示す。この置換（T357A）は脱リン酸化状態をミミックしているため、Rsp5 を基質とする kinase の遺伝子破壊株は *rsp5*^{T357A} 変異株と同様の表現型に、phosphatase の遺伝子破壊株は AZC 感受性になると考えられる。そこで、酵母の非必須遺伝子破壊株（約 4,800 株）コレクションから、AZC に対する表現型を指標に、一次スクリーニングを行い、kinase 遺伝子破壊株（141 株）、 phosphatase 遺伝子破壊株（70 株）を選抜した。次に、得られた候補株を再度 AZC 含有最少寒天培地にスポットし、二次スクリーニングを行った。その結果、kinase 遺伝子破壊株から AZC 耐性を示すΔ*mkk1*、Δ*npr1* の２株、phosphatase 遺伝子破壊株から AZC 感受性を示すΔ*sit4*、Δ*reg1* の２株を取得した。最近、Npr1 及び Sit4 が Rsp5 のアダプターである Bul1/2 をそれぞれリン酸化、脱リン酸化することが報告された。このリン酸化／脱リン酸化は窒素源の変化に伴って起こり、リン酸化された Bul1/2 に 14-3-3 タンパク質が結合するため、Rsp5 が Gap1 をユビキチン化できないことが示唆されている。現在、スクリーニングで取得した 4 個の遺伝子について、アダプターのリン酸化に関与する可能性も含め、ストレス条件下での Rsp5 のリン酸化状態との関連性を解析している。

yeast, ubiquitin ligase Rsp5, phosphorylation

講演番号：2B12a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ B 校舎 12 会場

麹菌アレスチン様タンパク質 CreD のマルトースパーミアーゼのエンドサイトーシスへの影響
Effect of an arrestin-like protein ,CreD, on endocytosis of maltose permease in *Aspergillus oryzae*
○平本 哲也、田中 瑞己、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大院農・生物産業創成）
○Tetsuya Hiramoto,Mizuki Tanaka,Takahiro Shintani,Katsuya Gomi (Grad Sch Agric Sci, Tohoku Univ)

【目的】我々は、麹菌のデンプン分解酵素生産において、誘導基質であるマルトースの細胞内取込み系が重要であり、その取込みを担うマルトースパーミアーゼ(MalP)遺伝子はグルコースにより転写抑制を受けることをすでに明らかにしている [1]。一方、出芽酵母で報告されているように、タンパク質レベルでエンドサイトーシス依存的に液胞へ輸送され分解を受ける機構が存在するか調べるため、GFP-MalP 融合タンパク質を MalP プロモーター制御下で発現させたところ、マルトース誘導条件下では主として GFP-MalP は細胞膜上に局在が観察された。これにグルコースを添加すると速やかに細胞膜からの GFP 蛍光の消失と液胞と推定されるオルガネラへの移行が認められた [2]。本研究では、グルコース存在下における MalP のエンドサイトーシス依存的な液胞への移行の確認と、グルコース抑制に関わる遺伝子変異による MalP のエンドサイトーシスに対する影響について解析を行った。
【結果】MalP の細胞内局在変化を観察するために GFP-MalP 融合タンパク質を *malP* プロモーター制御下で発現させ、共焦点顕微鏡を用いて蛍光観察を行った。マルトース誘導条件下で細胞膜上への GFP-MalP の局在化を確認した後に、アクチン重合阻害剤である Latrunculin B で処理し、グルコース添加後の GFP-MalP の局在変化を観察した。その結果、Latrunculin B 処理を行った株ではグルコース添加後も細胞膜上の GFP 蛍光が消失しないことが明らかとなった。このことから、細胞膜上から液胞への GFP-MalP の輸送はエンドサイトーシス依存的な機構によるものであることが示された。
次にグルコース存在下における MalP のエンドサイトーシスによる液胞への輸送・分解機構を詳細に解析するために、カーボンカタボライト抑制転写因子（CreA）のユビキチン化に関わる CreD の遺伝子破壊株を作製し、GFP-MalP のエンドサイトーシスに及ぼす影響を調べた。その結果、*creD* 破壊株においてはマルトース誘導後、グルコースを添加しても細胞膜上から液胞への GFP-MalP の移行が認められなかった。さらに、HECT ユビキチンリガーゼ（HulA）の WW ドメインと相互作用すると予測される CreD の PPXY モチーフに変異を導入することにより、GFP-MalP の取込み遅延が起きることが明らかとなった。以上から、麹菌において CreD は MalP とユビキチンリガーゼ HulA 間を仲介するアダプターとして機能している可能性が示唆された。

1）Hasegawa et al. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 1-9 (2010).
2）平本哲也ほか：第 63 回日本生物工学会大会講演要旨、p. 230 (2011).

Aspergillus oryzae, maltose permease, endocytosis

講演番号：2B12a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ B 校舎 12 会場

糸状菌 *Trichoderma reesei* における菌体外繊維状物質の解析

Analysis of extracellular fibrous material of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*

○田原 伸悟[1]、新田 美貴子[2]、志田 洋介[1]、堀川 祥生[3]、杉山 淳司[3]、大隅 正子[4]、小笠原 渉[1]([1]長岡技科大 生物、[2]科学技術振興機構、[3]京都大学 生存圏研究所、[4]綜合画像研究支援)
○Shingo TAHARA[1], Mikiko NITTA[2], Yosuke SHIDA[1], Yoshiki HORIKAWA[3], Junji SUGIYAMA[3], Masako OSUMI[4], Wataru OGASAWARA[1] ([1]Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech., [2]JST, [3]RISH, Kyoto Univ., [4]IIRS)

【目的】

Trichoderma reesei はセルラーゼ高生産糸状菌であり、これまでに各種セルラーゼの酵素学的諸性質およびセルラーゼ遺伝子群の転写調節機構を中心とした様々な解析が行われてきた。*T. reesei* はセルロースを唯一の炭素源として培養したときに大量のセルラーゼを誘導生産する。セルラーゼ生産条件下における菌糸について走査型電子顕微鏡を用いて観察したところ、細胞壁上に繊維状物質が生産されるということが明らかとなった。また、セルラーゼ生産条件下でなくとも物理的な刺激を受けたときにも生産が促進されることが示唆されている。そこで本研究では、繊維状物質の生理学的役割およびセルラーゼ生産性との関係を明らかにすることを目的として、繊維状物質の成分分析および網羅的遺伝子発現解析を行った。

【方法と結果】

走査型電子顕微鏡を用いてノンコーティングおよび低電圧条件下にて *T. reesei* の細胞表層を観察したところ、繊維状物質は細胞壁上で生産されている様子が観察された。セルラーゼを生産する条件（セルロース培養）、セルラーゼを生産せず物理的刺激を与える条件（グルコース振とう培養）、セルラーゼを生産せず物理的刺激を与えない条件（グルコース静置培養）で培養した菌糸から細胞壁画分を調製し FT-IR 分光法にて成分分析を行った。その結果、細胞壁の主成分は主にキチンであるという結果が得られたが、培養条件間で大きな差異は見られなかった。上記の培養条件に加え、可溶性のセルラーゼ誘導物質あるソホロースを用いて培養した菌糸から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。*T. reesei* が有する 9129 遺伝子のうち、多糖合成に関与すると思われる 15 遺伝子の発現挙動はこれらの培養条件によって大きな差異は見いだせなかった。これらの 15 遺伝子については定量的リアルタイム PCR でその発現挙動の精査を行っている。また、マイクロアレイ解析からその他の遺伝子についても解析を行っている。

filamentous fungi, cellulase, cell wall

講演番号：2B12a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ B 校舎 12 会場

出芽酵母の経時寿命制御における Rpd3/HDAC における機能解析

Role of Rpd3 histone deacetylase complex for chronological lifespan in budding yeast

○佐藤 雅弘、門前 宏陽、寺本 勘二、今村 優子、湯川 格史、土屋 英子（広島大院先端物質・分子生命）
○Masahiro SATOU, Hironobu MONZEN, Kanji TERAMOTO, Yuko IMAMURA, Masashi YUKAWA, Eiko TUCHIYA (Hiroshima Univ.)

ヒストン蛋白質のアセチル化/脱アセチル化修飾はクロマチンリモデリングの原動力の一つであり、ヒストンアセチル化酵素(HAT)とヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)によって触媒されるこの可逆的反応は転写や修復といった DNA 代謝反応の制御において極めて重要な役割を果たしている。また最近では、これらの修飾酵素がヒストン以外の蛋白質を基質として作用し、様々な生命現象に関与していることも明らかになってきている。

これまでに、当研究室ではヒト HDAC1 ホモログである Rpd3 複合体の欠損株が野生株に比べて経時寿命(細胞が分裂停止状態で時間的にどのくらい長く生きられるか)が短くなることを見出している。*rpd3* 欠損株の複製寿命(細胞が何回分裂できるか)が野生株に比べて延びることは既に報告されているが(Kim *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2011)、経時寿命への Rpd3 複合体の関与については全く不明である。そこで本研究室では、Rpd3 複合体がどのように経時寿命の維持に働いているかを明らかにすることを目的とした。

経時寿命の維持に必要な Rim15 経路の欠損株では、定常期において誘導されるストレス耐性の異常やグリコーゲン蓄積能の低下、活性酸素(ROS)の蓄積が観察されることが知られている。これらの表現型について調べたところ、*rpd3* 欠損株でも同様の異常が観察された。また、*rim15* 欠損株に *rpd3* の欠損を加えても付加的な寿命の短縮が観察されなかったことから、Rpd3 の経時寿命維持に必要な働きは Rim15 経路と関係している可能性が示唆された。さらに、Rim15 経路の下流で働く転写因子のうち *Gis1* の欠損株に *rpd3* の欠損を加えても付加的な寿命の短縮が観察されなかったこと、野生株に Gis1 を過剰発現させた際に起こる生育遅延が *rpd3* 欠損株では観察されなかったことからから、Rpd3 複合体と Gis1 との機能的関係が示唆された。

現在、*rpd3* 欠損株における Gis1 標的遺伝子の転写解析、および Rim15 経路の下流で働く別の転写因子 Msn2、Msn4 と Rpd3 の機能関係について詳細に調べている。

Aging, Chronological lifespan, Histone Deacetylase

講演番号：2B12a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ B 校舎 12 会場

出芽酵母を用いた新規寿命延長因子の取得と機能解析
Identification of novel regulators of longevity and analysis of its functions in budding yeast
○椿山 諒平、水沼 正樹、平田 大（広島大院・先端研・分子生命）
○Ryohei Tsubakiyama,Masaki Mizunuma,Dai Hirata (Dep. of Mol. Biotech., Grad. Sch. of AdSM, Hiroshima Univ.)

【目的】
我々は、Ca^{2+}シグナルの生理機能を明らかにする過程で、Ca^{2+}シグナルへの正常な応答が寿命の延長に重要であることを見いだした。*S*-アデノシルホモシステイン (AdoHcy)水解酵素の変異株 *sah1-1/scz7* は、*zds1* 破壊株が示す Ca^{2+}感受性を抑圧する変異株として取得された。*sah1-1* 株は寿命が著しく短く、興味深いことに顕著なテロメアの短縮も観察された。この変異株では、その基質である AdoHcy だけでなく、*S*-アデノシルメチオニン (AdoMet)も細胞内に高蓄積していることが明らかとなっている。AdoMet は、メチル基供与体として、DNA、リン脂質、およびタンパク質など各種生体分子のメチル化反応において必須な役割をもった生理活性物質である。一方、AdoHcy はこのメチル化反応を阻害し、細胞毒性をもつため Sah1 によって速やかに加水分解される。これまで、AdoMet/AdoHcy、またそれらが関わるメチル化制御が寿命に与える影響については不明な点が多い。そこで、本研究ではメチル化制御の異常が予想される *sah1-1* 株を用いた解析を通して、メチル化が関わる新規寿命制御機構を解明することを目的とした。
【方法・結果】
sah1-1 株は許容温度においても増殖遅延を示す。そこで、この変異株の増殖遅延を抑圧する変異株を取得することにより、寿命が延長した変異株が取得できると予想し、新規寿命制御因子の取得を試みた。スクリーニングの結果、多数の変異株の取得に成功し、遺伝的解析より、変異は 1 つの遺伝視座に集約されることが明らかとなった。そこで、この抑圧変異を *ssg1* (Spontaneous Suppressor of Growth-delay of the *sah1-1*)変異と命名した。また、*ssg1* 変異のクローニングの結果、その原因遺伝子は *ERC1* と同一遺伝子であった。*ERC1* は、過剰発現によりエチオニン (メチオニンの構造アナログ)耐性を付与する遺伝子として取得されたものであるが、その機能はほとんど明らかになっていない。
ssg1 変異によって *sah1-1* 株の増殖遅延が抑圧されたことから、*sah1-1 ssg1* 株では *sah1-1* 株の寿命およびテロメア長の短縮といった表現型も抑圧できることが予想された。解析の結果、*sah1-1 ssg1* 株では期待通り、寿命が野生株よりも延長し、テロメアの短縮も抑圧された。また、同様に *ssg1* 株においても寿命の延長が観察された。これらの結果より、*SSG1* 遺伝子が新規寿命制御因子である可能性が示唆された。現在、*ssg1* 変異による寿命延長の詳細なメカニズムを明らかにするために、その延長に必要な因子を同定するとともに、既知の寿命制御機構との関係を解析中である。

Yeast, Life span, SAM

講演番号：2B12a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ B 校舎 12 会場

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の生死制御系の構築
Construction of the system to control cell death of *Saccharomyces cerevisiae*
○野口 允佐、西田 奈央、黒田 浩一、植田 充美（京大院農）
○Misa NOGUCHI,Nao NISHIDA,Kouichi KURODA,Mitsuyoshi UEDA (Kyoto Univ.)

【背景・目的】
近年、遺伝子工学による研究が盛んになってきており、遺伝子工学の研究結果を実用化することは社会にとって大変有益と考えられる。しかし、遺伝子組み換え体が環境中に放出されると、既存の生態系を破壊してしまうという懸念がある。そのため、遺伝子組み換え体は開放系で用いることが制限されており、研究で用いる場合であっても遺伝子組換え体の使用には封じ込めの制限が設けられている。本研究では遺伝子組み換え体が役目を果たしたときに細胞死が引き起こされる系の構築を目的とした。特に、産業利用を目指し、物質を加えることや熱などのエネルギーを必要とする細胞死誘導系ではなく、栄養枯渇条件で細胞死が誘導される系をデザインした。

【方法・結果】
細胞死の中でも、プログラムされた細胞死であるアポトーシスに着目した。アポトーシスは、哺乳類において機構がよく研究されており、また、プログラムされた機構であるため機構を理解すれば狙ったときに細胞死を引き起こすことができる。アポトーシスを促進する代表的な因子として BAX が挙げられ、これまでに、哺乳類の *BAX* を酵母で発現させると酵母のアポトーシスが引き起こされることが報告されている。そこで今回、*BAX* を酵母内で誘導発現することでアポトーシスを誘導することにした。まず、ガラクトース応答性プロモーターを用いてヒト由来の *BAX* を出芽酵母に導入し、*BAX* 発現系を確立した。*BAX* を導入した出芽酵母をガラクトース培地で培養させたのち、寒天培地にまき、生えてきたコロニーの数から生存率を求めた。結果として、ガラクトース誘導によって出芽酵母の生存率が低下したことを確認し、アポトーシス誘導系を構築することができた。さらに、プロモーターの活性を広げるため、各種プロモーターを使った *BAX* 発現系の構築を検討した(1)。

Reference
(1) Noguchi *et al.*, submitted

apoptosis, cell death, Genetically-modified organism (GMO)

講演番号：2B12a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ B 校舎 12 会場

分裂酵母の非性的凝集に関わる *gsf1* 遺伝子の解析
Analysis of *gsf1* gene which involves non-sexual flocculation in fission yeast
○景山 瑶子[1]、伊藤 有紀[1]、大石 和義[1]、松沢 智彦[2]、竹川 薫[2]、川向 誠[1] ([1]島根大・生物資源、[2]九大院・生資環・生命機能)
○ Yoko KAGEYAMA[1], Yuki ITO[1], Kazuyoshi OISHI[1], Tomohiko MATSUZAWA[2], Kaoru TAKEGAWA[2], Makoto KAWAMUKAI[1] ([1]Shimane Univ., [2]Kyushu Univ.)

背景･目的　分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*の有性生殖移行メカニズムを調べる中で単離した *sam*(skip starvation for mating)*2* 変異株は、$CaCl_2$ 感受性を示す(1, 2)。この$CaCl_2$ 感受性を抑圧する遺伝子のスクリーニングを行った結果、典型的なZn2-C6 型ジンクフィンガーモチーフタンパク質をコードする遺伝子を単離した。単離した遺伝子は、その後の研究結果により *gsf1*(galactose-specific flocculation)と命名した。そして、次世代シークエンスにより *sam2* 変異株の全ゲノム解析を行ったが、*gsf1* の上流、下流領域には変異は入っておらず、*sam2* 変異株には *pka1* と他の変異が存在していた。*gsf1* は *sam2* 変異株の$CaCl_2$ 感受性を抑圧するサプレッサー遺伝子であった。本研究では *gsf1* 遺伝子の解析を進めることとした。

方法･結果　まず、二段階 PCR 法により作製した破壊用 DNA 断片を野生株に形質転換することで *Δgsf1* 株を取得した。得られた *Δgsf1* 株を液体培養させたところ、接合型に依存せず、細胞同士が非常に強く凝集した。この凝集はガラクトース、EDTA の添加によって抑圧された。この結果より、*Δgsf1* 株の凝集はガラクトース糖鎖を含む凝集素を介する Ca^{2+}に依存した非性的凝集であると考えられた。この *Δgsf1* 株では凝集素である Gsf2 の発現が上昇していた。そして、以前単離された株で変異遺伝子が不明であった *gsf1* 変異株(3)には *gsf1* のナンセンス変異が認められた。

次に *Δgsf1* 株の表現型を確認するため、様々な薬剤に対する感受性をスポットアッセイにより調べた。その結果、$CaCl_2$, KCl, HU（DNA 合成阻害剤）に感受性を示した。

また、*gsf1* は *sam4*(*rad24*)変異株の $CaCl_2$ 感受性を抑圧したことから、*gsf1* は *sam2*、*sam4* 変異株のサプレッサーとして働くことが判明した。また、Gsf1 の細胞内における局在を確認するため、Gsf1-GFP タギング株を作製し、蛍光観察を行った。Gsf1 は核に局在しており、転写因子として様々な遺伝子の発現を制御していると考えられた。

(1) Oowatari, *et al. Biosci Biotechnol Biochem.* **73**, 1591-1598 (2009)
(2) Gupta, *et al. Biosci Biotechnol Biochem.* **75**, 1456-1465 (2011)
(3) Tanaka, *et al. J Bacteriol.* **181**, 1356-1359 (1999)

non-sexual flocculation, $CaCl_2$ sensitivity, transcription factor

講演番号：2B12a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ B 校舎 12 会場

DNA 複製異常時の成長極性変換制御に関与するキナーゼの探索
Search for kinases related to the transition of growth polarity on perturbed DNA replication
○古家野 孝行、久米 一規、平田 大（広島大院・先端研・分子生命）
○Takayuki KOYANO,Kazunori KUME,Dai HIRATA (Dep. of Mol. Biotech., Grad. Sch. of ADSM, Hiroshima Univ.)

【目的】
細胞形態は細胞の機能と密接に関係する。細胞形態を決定する重要な因子が細胞極性である。細胞極性は細胞周期と連動して制御されることから、染色体サイクルと細胞極性との連携制御が示唆されるが、その実体は不明である。我々は、分裂酵母を用いて、細胞周期と細胞極性の連携制御の解明を目指している。分裂酵母は、直径が一定で細胞端でのみ極性成長する。特に、G2 期初期において、単極成長から両極成長へと成長極性をダイナミックに変化させる（New End Take Off; NETO）。NETOが起こるためには、一定の細胞サイズへの到達、DNA複製の完了という２つの条件を満たす必要がある。

我々は NETO の制御機構を明らかにするため、高温で NETO の起こらない単極成長変異体の原因遺伝子として、DNA 複製に必須な Pol1 (DNA polymerase α)を同定し、*pol1* 変異体での NETO 遅延機構を解析した。その結果、DNA チェックポイント経路の Cds1 キナーゼが、カルシニューリン（CN）をリン酸化することにより活性化し、さらに活性化した CN が微小管プラス端結合分子（+TIPs）の一つ Tip1/CLIP170 を脱リン酸化することにより、微小管の安定化を伴う NETO 遅延を誘導する、新規経路を発見した。NETO 制御機構をさらに理解するため、NETO に関与する因子、特にキナーゼに注目し、スクリーニングを行った。

【方法・結果】
NETO 制御機構をさらに解析するため、キナーゼ破壊体ライブラリー（90 株）を用い、関連するキナーゼの探索を行った。具体的には、１）*pol1* 変異体（S 期遅延）の NETO 遅延に重要なキナーゼ。２）*cdc10* 変異体（G1 期停止）の単極成長様式の維持に重要なキナーゼ。上記のスクリーニングより、G1 期および S 期の成長極性変換制御に重要なキナーゼを同定した。現在スクリーニングにより得られたキナーゼについて、既知の NETO 制御経路との機能的関係について詳細に解析中である。

kinase, cell polarity, fission yeast

講演番号：2B12p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ B 校舎 12 会場

ビフィズス菌と乳酸菌における酸素感受性の原因酵素に関する研究

Characterization of enzymes involve in O_2-sensitivity of *Bifidobacterium* and lactic acid bacteria.

○君島 達弥、田中 邦房、大形 篤史、新村 洋一、川崎 信治（東農大応生科・バイオ）
○Tatsuya KIMISHIMA,Kunifusa TANAKA,Atsushi OGATA,Yoichi NIMURA,Shinji KAWASAKI (Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】我々はビフィズス菌の酸素感受性機構の解明を目的として研究を行っている。これまでにビフィズス菌と腸内で乳酸生成においてニッチを共有する乳酸菌を供試菌として用い、0~20 %の様々な O_2 濃度下で生育を観察したところ、微好気性株、酸素耐性株、酸素感受性株、及び酸素高感受性株の 4 つのグループに分類された。中でも酸素感受性、酸素高感受性に分類された株から O_2 存在下での生育において培地中に過酸化水素（ H_2O_2 ）の蓄積が検出された。このことから O_2 存在下における生育阻害の要因が、菌自身の生成する H_2O_2 ではないかと推察した。そこで、酸素感受性、酸素高感受性として分類されたビフィズス菌や乳酸菌を供試菌として H_2O_2 生成に関与する原因酵素の同定を行っている[1)]。本学会では、高濃度の H_2O_2 の蓄積が検出された *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*（ *L. del. delbrueckii* ）における H_2O_2 生成酵素について解析を行ったので報告する。

【方法】酸素を付与した *L. del. delbrueckii* DSM20074^T の無細胞抽出液を用いて酸素代謝酵素の探索を行ったところ、電子供与体として NAD(P)H とピルビン酸を基質としたときに酸素代謝活性が検出された。NAD(P)H oxidase 活性では H_2O_2 の生成が検出された。そこで、各種カラムを用い NAD(P)H oxidase 活性を指標に H_2O_2 生成に関与する原因酵素の精製を行っている。

1）Kawasaki. *et al*, AEM. 75:629-636 (2009)

Bifidobacterium, *Lactobacillus*, H_2O_2

講演番号：2B12p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ B 校舎 12 会場

ビフィズス菌と乳酸菌の様々な O_2 濃度下における生育と H_2O_2 の影響
Effect of H_2O_2 on the growth of *Bifidobacterium* strains and lactic acid bacteria under the various O_2 concentrations
○小島 裕貴、熊谷 菜生子、伊集院 奨、田中 邦房、新村 洋一、川崎 信治（東農大応生科・バイオ）
○ Hiroki Kojima,Naoko Kumagai,Susumu Ijyuuin,Kunihusa Tanaka,Youichi Nimura,Shinji Kawasaki (Dept. of bioscience Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】ビフィズス菌のO_2存在下における生育阻害要因の解明と、各種環境要素による生育促進機構の解明を目的として研究を行っている。現在までにビフィズス菌のO_2存在下での生育阻害要因が、ビフィズス菌自身が生成するH_2O_2に起因することを推定している[1)]。また平板培養法においてCO_2と低濃度O_2による生育促進効果が観察されている[2)]。なお、これらの研究は栄養源の豊富なMRS培地を用い行った。

本学会では、半合成培地を用いビフィズス菌と乳酸菌の様々なO_2 濃度下における生育とH_2O_2の影響を解析したので報告する。

【結果】昨年度までに、目的以外の環境要素の影響を軽減するために半合成培地を用いた培養法の確立と各種環境要素の影響を解析した。半合成培地で良好に生育した数種のビフィズス菌を培養し、O_2とCO_2の生育に及ぼす影響を観察したところ、CO_2と低濃度O_2による生育促進効果に関して再現性が得られた。更に、H_2O_2分解速度の遅い半合成培地を開発し、嫌気条件下でH_2O_2の生育への影響を観察したところ、H_2O_2濃度に応じた生育の阻害が観察された。本年度はさらに供試菌を増やし、H_2O_2を途中添加し生育の観察を行ったところ、生育の阻害と停止が観察された。現在、H_2O_2による生育停止についての生理解析を行っている。

1)2) Kawasaki.*et al*, AEM. 73: 7796-7798 (2007) 、AEM. 75:629-636 (2009)

Bifidobacterium, Oxidative stress

講演番号：2B12p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ B 校舎 12 会場

大腸菌 *tolC* 変異株の酸感受性機構の解析

Why does *E.coli tolC* mutants show increased acid sensitivity ?

○安彦 弦太、堀川 晃菜、和地 正明（東工大院生命理工）
○Genta ABIKO,Akina HORIKAWA,Masaaki WACHI (Tokyo Inst. of Tech.)

［はじめに］

これまでの研究により *Escherichia coli* の外膜を貫通するチャネルタンパク質をコードする *tolC* 遺伝子の欠損株が、酸感受性を示すことが見出された(1)。TolC タンパク質は内膜のポンプタンパク質と複合体を形成し、抗生物質や界面活性剤などの外来物質や、インドールやポルフィリンなどの代謝物を、能動的に排出する。TolC 依存的な排出システムは特に薬剤耐性の面で重要視され、研究が盛んに行われてきた。しかし、これまで酸耐性と TolC の関連を示す報告はなく、TolC タンパク質の酸耐性機構への寄与を解明することは、TolC 依存的な排出システムの新たな存在意義を示すことにつながる。また、酸耐性は病原性大腸菌の経口感染に必須のメカニズムであり、細菌感染の防御の観点から、TolC がターゲットとなり得ることを示している。*tolC* 変異株では、大腸菌の酸耐性システムの一つである Gad システムの酸性条件での発現誘導が阻害されている。Gad システムは、グルタミン酸脱炭酸酵素 GadA/B とグルタミン酸:GABA アンチポーターGadC より構成される。Gad システムは細胞外のグルタミン酸をとりこんで脱炭酸し GABA に変換して細胞外に GABA を排出し、H^+を消費することで細胞内 pH を上昇させる。

［結果と考察］

トリプトファンの代謝物であるインドールは、TolC 依存的排出システムの基質であり、また、酸耐性システムの発現を誘導することが知られている。そこで、インドール合成を触媒するトリプトファナーゼをコードする *tnaA* 遺伝子と *tolC* の二重欠損株を構築したところ、酸耐性と Gad システムの発現誘導が回復した。このことから、*tolC* 変異株では、インドールが排出できずに細胞内に蓄積し、これが酸耐性システムの発現を阻害していると考えられた。Gad システムの発現調節は複雑であり、制御因子として 20 種以上のタンパク質と 4 種の sRNA が見出されているが、制御機構の全体像は未解明である。今後、インドールのターゲットとなる制御因子の特定を行う予定である。

［参考文献］

(1) Deininger KN, Horikawa A, Kitko RD, Tatsumi R, Rosner JL, Wachi M, Slonczewski JL.(2011) A requirement of TolC and MDR efflux pumps for acid adaptation and GadAB induction in *Escherichia coli*.

tolC, acid resistance, *Escherichia coli*

講演番号：2B12p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ B 校舎 12 会場

大腸菌の耐圧性に関与する浸透圧・イオンストレス因子の探索

Research of stress-responsive factors was involved in the high pressure resistance of *E.coli*.

○長谷川 敏美[1]、中村 拓哉[1]、木戸 みゆ紀[2]、林 真由美[1]、井口 晃徳[1]、山口 利男[3]、重松 亨[1] ([1]新潟薬大・応生科、[2]財団法人にいがた産業創造機構(NICO)、[3]新潟薬大・薬)
○Toshimi HASEGAWA[1], Takuya NAKAMURA[1], Miyuki KIDO[2], Mayumi HAYASHI[1], Akinori IGUCHI[1], Toshio YAMAGUCHI[3], Toru SHIGEMATSU[1] ([1]Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Niigata Industrial Creation Organization (NICO), [3]Fac. Pharm., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

【緒言】我々は、高圧処理を殺菌技術として応用することを目的に、微生物の圧力死滅機構の解明を目指している。これまでに大腸菌K12株で共存塩の種類および濃度により死滅挙動が変化する事が示された。このことから、浸透圧およびイオンストレス応答に関与する膜タンパク質の機能障害により圧力死滅挙動が変化する可能性が示された。最近、Keio collection [1]などの遺伝子欠損株ライブラリが開発され、遺伝子の機能を網羅的に解析することが可能となった。そこで、我々が開発した圧力死滅挙動をハイスループットに解析できる方法(HT-PIKAS法 [2])を利用し、浸透圧およびイオンストレス応答に関わる遺伝子欠損株と親株BW25113株の圧力死滅挙動を比較解析することで、既知のイオンおよびイオンストレス応答機構と耐圧性の関連性を解析した。
【方法】Keio collectionから浸透圧およびイオンストレス応答に関わる遺伝子欠損株(9株)を選択した。変異株と親株を24時間、37℃で振とう培養した。培養液をNaCl水溶液 (0～0.35 M)を用いて10倍希釈した。60分間氷上で保存後、圧力処理(20℃, 400 MPa)を施し、生菌数を算出した。算出後、生菌数と圧力処理時間の関係から死滅挙動を解析した。
【結果・考察】圧力死滅反応を一次反応として近似し、死滅速度定数 k [s^{-1}]を算出し、得られた k 値と NaCl 濃度の相関性を解析した。その結果、親株の k 値は、0.05～0.20 M で濃度依存的に増加し、0.20～0.35 M で減少した。これは、NaCl 共存下の K12 株の圧力死滅挙動と類似し、浸透圧およびイオンストレスとそれらに対する応答反応の影響により死滅挙動が大きく変動する事が示唆された。
次に、浸透圧およびイオンストレス応答変異株を用い、NaCl 共存下、400 MPa での圧力死滅挙動を解析し、親株と変異株の k 値を比較した。その結果、変異株の圧力死滅挙動には次の 4 パターン (1)親株と同等の k 値 (*ΔompC*:この遺伝子は圧力耐性の変化には関与しない) (2)高濃度で親株よりも k 値が高い (*ΔompR*:この遺伝子は高塩濃度における圧力耐性に関与) (3)低濃度で親株よりも k 値が高くなる（*ΔenvZ*, *ΔompF*, *ΔmscL*, *ΔchaA*:これらの遺伝子は低塩濃度における圧力耐性に関与）(4)低濃度(0～0.145 M)と等張濃度付近(0.145～0.2 M)で親株よりも k 値が高い (*ΔmzrA*, *ΔmscS, ΔnhaA* : これらの遺伝子は低濃度および等張濃度における耐圧性に関与)が示された。 以上の結果から、圧力死滅挙動には浸透圧およびイオンストレス応答に関与する遺伝子の有無が影響し、塩濃度に応じて耐圧性に作用する遺伝子が異なる事が示唆された。本研究の一部は、JST-CREATE により実施した。
[1] Baba *et al., Mol. Syst. Biol.* (2006), [2] Hasegawa *et al.*, *J. Biosci. Bioeng*., (2012).

High pressure inactivation, *Escherichia coli*, Osmotic and cationic stress

講演番号：2B12p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ B 校舎 12 会場

大腸菌細胞におけるリボソーム異常が引き起こす塩耐性

Loss of integrity of the ribosome provides Escherichia coli cells with salt resistance

○樽澤 武房[1]、長谷 要一[1]、武藤 あきら[2]、姫野 俵太[1,2]([1]岩手大院連合農、[2]弘前大農)
○Takefusa TARUSAWA[1], Yoichi HASE[1], Akira MUTO[2], Hyouta HIMENO[1,2] ([1]Iwate Univ., [2]Hirosaki Univ.)

【背景】外界の浸透圧が高くなると細胞から水分子が流失する。この脱水作用に対して、細胞は K^+ イオンや浸透圧調整物質(osmolyte)を取り込むことで水和状態に回復し、浸透圧変化に適応する。このような応答は発現しているタンパク質レベルの早期的な応答と、シグナル伝達を受けて活性化される転写レベルの応答に分けて理解されてきた。高浸透圧環境では，細胞の転写開始を司る σ 因子は通常主要な σ^{70} から，種々のストレス応答遺伝子の転写に関わる σ^{S} に切り替わることが知られている。この σ 因子の切り替えにはグローバル遺伝子発現制御を行なっているシグナル物質である ppGpp の増減が関連しているとされている。我々はバクテリアリボソームの小サブユニットの生合成因子のひとつである RsgA タンパク質について研究してきたが、この過程で *rsgA* 遺伝子欠損株(Δ*rsgA*)が高浸透圧条件に耐性を示すことを発見した。Δ*rsgA* 株は通常の培養条件下では生育速度は野生型よりも著しく遅く、未成熟なリボソームを細胞内に蓄積する。これまで浸透圧応答は転写制御を中心にそのメカニズムが説明されてきたが、高浸透圧に対する耐性増強にリボソームが関与するというのは新たな知見であった。本研究ではリボソームと浸透圧応答の関連性を調査し、Δ*rsgA* 株の浸透圧耐性のメカニズム解明を目指した。

【結果と考察】*rsgA* 欠損株で見出されていた高浸透圧耐性の表現型が、リボソーム 30S サブユニットの生合成因子に加え、50S サブユニットの生合成因子や非必須リボソームタンパク質など、リボソームに関与するさまざまな因子の遺伝子の欠損によってもたらされることが確認された。また、翻訳阻害剤の中に、野生型大腸菌の高浸透圧耐性を増強するものが見つかった。これらの翻訳阻害剤はリボソームの生合成というよりは 70S リボソームの翻訳活性に影響していると考えられた。以上から、翻訳機構に何らかの障害を受けることが高浸透圧ストレスに対する耐性増強を導いていることが示唆された。

ribosome, salt stress, translation

講演番号：2B12p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ B 校舎 12 会場

Effect of plasmid carriage on the osmotic stress response of host cell bacteria
○GINANJAR KARTASASMITA,Yurika TAKAHASHI,Kazunori OKADA,Hideaki NOJIRI (BRC, Univ. Tokyo)

[Backgrounds & Objectives] Carbazole degradative plasmid pCAR1 was originally isolated from *Pseudomonas resinovorans*, and was proven to be IncP-7 plasmid transferable to other *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas* bacteria. Previously, the physiological effect of pCAR1 carriage on osmotic stress responses of three *Pseudomonas* strains (*P. putida* KT2440, *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* Pf0-1) were measured by employing the cell respiration as a reporter with BIOLOG Phenotype Microarray (PM) (Fig. 1). Among 12 conditions in PM analysis, pCAR1-containing strain showed reduction of cell respiration compared to pCAR1-free strain, with 5 compounds ($NaNO_2$, KCl, NaCl, Na_2SO_4, HCOONa) for KT2440, urea for PAO1, and $NaNO_2$ for Pf0-1. In the present study, effects of pCAR1 carriage on three hosts under the osmotic stress caused by KCl, NaCl, and HCOONa were evaluated by cell growth.

[Methods & Results] Three *Pseudomonas* host strains with/without pCAR1 were cultured in 1/5 LB medium supplemented with 4% KCl, 4% NaCl or 4% of HCOONa (Fig. 2). During incubation (30˚C, 300 strokes/min), cell growth was monitored by measuring its turbidity at 600 nm. As results, the growth of pCAR1-containing KT2440 were relatively slower than pCAR1-free KT2440, whereas the growth rate for PAO1 and Pf0-1 were almost the same irrespective of pCAR1 carriage, which is in agreement with the previous result from PM (Fig. 1).

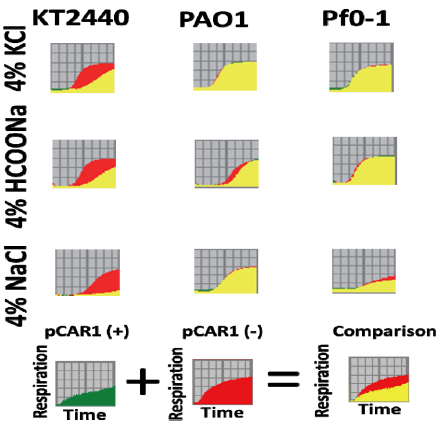


Fig. 1 The effect of plasmid carriage on host response to osmotic stress measured by PM

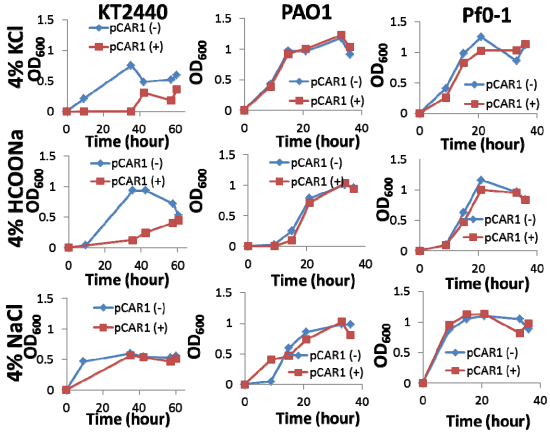


Fig. 2 The effect of plasmid carriage on host response to osmotic stress measured by spectrophotometry

osmotic stress, *Pseudomonas*, pCAR1

講演番号：2B12p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ B 校舎 12 会場

乳酸菌のペニシリン結合タンパク質と胆汁酸耐性

Penicillin-binding proteins of lactic acid bacteria and bile acid resistance

○服部 正寛[1]、黒瀬 猛[1]、新 穂高[1]、藤村 朱喜[1]、田中 尚人[2]、岡田 早苗[2]、中川 純一[1]([1]東農大食香、[2]東農大菌株)
○Masahiro Hattori[1], Takeshi Kurose[1], Hotaka Atarashi[1], Shuki Fujimura[1], Naoto Tanaka[2], Sanae Okada[2], Junichi Nakagawa[1] ([1]Tokyo Univ of Agriculture, [2]Tokyo Univ of Agriculture)

【目的】
ペニシリン結合タンパク質 (以下 PBPs) は細菌細胞壁ペプチドグリカン合成酵素の一つであり、ペニシリンのターゲットとして知られているが、その研究は病原性細菌に集中しており、乳酸菌ではほとんど検討されていない。乳酸菌は胆汁酸に晒されると死滅し、この際細胞壁も損傷を受けていると考えられるが、そこに関与する酵素反応機構は未まだ不明である。そこで本研究では、乳酸菌の PBPs の解析と胆汁酸の主成分であるコール酸に対するストレス応答機構との関係について試験することを目的とした。
【方法】
Lactobacillus casei 菌の標準株で発酵乳由来の NRIC 0644 株、及び植物由来で胆汁酸耐性のより強い NRIC 1917、1981 株について、培地にコール酸を添加し、経時的な PBPs バンドパターンを比較した。ペニシリン結合タンパク質の検出にはビオチン標識したアンピシリンを作成し、細菌細胞膜タンパク質と反応させストレプトアビジンを用いたウエスタンブロッティングによって検出した。PBPs バンドパターンの比較から、PBP の分子種にストレス対応の違いがあるかを試験した。
【結果】
Lactobacillus casei 菌 3 株の PBPs バンドパターンは、高分子 PBP である 105 kDa、93 kDa、83kDa、74 kDa、69 kDa、58 kDa については同じであった。一方、低分子 PBP を比較すると 24 kDa は 3 株とも同じであったが、加えて 0644 株では更に 21.5 kDa のバンドが確認され、1981 株、及び 1917 株においては 19.5 kDa のバンドが確認された。また、コール酸含有培地で生育させると、58 kDa、24 kDa、21.5 kDa 及び 19.5 kDa の PBP が経時的に変動する事を見出した。これらの結果は動物由来の株と植物由来の株で細胞壁合成に差があるという可能性、また、PBPs の発現が胆汁酸ストレスに誘導されて変動する可能性を示した。実際に胆汁酸耐性に PBPs がどのように関与するかを更に検討する予定である。

penicillin binding protein, lactic acid bacteria, bile acid resistance

講演番号：2B12p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ B 校舎 12 会場

乳酸菌のサーチュインホモログとコール酸耐性および飢餓応答の関係

Relationship between sirtuin homolog and stress responses to cholate and/or starvation in the lactic acid bacteria

○新 穂高[1]、吉田 裕哉[1]、田中 了慈[1]、藤村 朱喜[1]、田中 尚人[2]、岡田 早苗[2]、中川 純一[1]([1]東農大院生物産業、[2]東農大菌株)
○Hotaka Atarashi[1], Yuya Yoshida[1], Ryoji Tanaka[1], Shuki Fujimura[1], Naoto Tanaka[2], Sanae Okada[2], Junichi Nakagawa[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】我々は乳酸菌の胆汁酸ストレス耐性に関わる遺伝子制御機構を解析するアプローチとして、ヒトなど真核生物で「長寿遺伝子」とされているサーチュインに着目した。サーチュインは環境ストレスやカロリー制限などに対して応答反応を引き起こすヒストン脱アセチル化酵素である。乳酸菌にはその祖先と考えられるホモログがあるが、ヒストンを持たない原核生物における役割は不明である。そこで、サーチュインと乳酸菌の胆汁酸ストレス応答との関連について遺伝生化学的な解析を行い、その役割を解明する事を目的とした。

【方法】3 株の *Lactobacillus casei* 株、即ち、チーズ由来 NRIC 0644 株、サトウキビワイン由来 NRIC 1917 株、コンポスト由来 NRIC 1981 株 (以下 NRIC 省略) を用い、MRS 培地に胆汁酸の主成分であるコール酸を添加し、生育を観察した。次にサーチュインの賦活剤であるレスベラトロールまたは、阻害剤であるスラミンを乳酸菌に作用させ、コール酸添加 MRS 培地中での生育を観察した。更に、これらのサーチュインホモログ遺伝子をクローニングし、大腸菌発現系を用いて組換えタンパク質を生産、アフィニティー精製し、酵素活性を測定した。次に、組換えタンパク質に対する抗体を作製し、コール酸及び飢餓ストレス存在下における発現量の変動をウエスタンブロットにて解析した。

【結果と考察】コール酸存在下の生育では、1917 株、1981 株、0644 株の順にコール酸耐性が高い事が明らかになった。更にレスベラトロール処理した菌株はコール酸耐性能が上昇し、スラミン処理した菌株はコール酸耐性能が減少することが示された。全ゲノム解析から、3 株全てがサーチュインを保有しており、1981 株においては *Lactobacillus rhamnosus* 型のサーチュイン配列も見出され、2 つのサーチュインを保有していることが示された。精製された組換え *L. casei* 型サーチュインタンパク質は脱アセチル化活性を有し、レスベラトロールで賦活化され スラミンで阻害された。この酵素反応の至適温度はヒトの SIRT1 が 37℃ であるのに対し、45～50℃ であった。また、コール酸ストレスを受けた乳酸菌のサーチュインホモログの発現量は直後に一旦低下するが、3 時間後には急増した。さらに、培地の炭素源濃度を減少させた飢餓ストレス下においても発現量が増加した。これらの事は, コール酸及び飢餓ストレスに対し、サーチュインが何らかのストレス応答に関与していることを示唆した。

sirtuin, lactic acid bacteria, cholate-tolerance

講演番号：2B12p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ B 校舎 12 会場

枯草菌 SigI による定常期における細胞維持機構の解析

Study of the maintenance of *Bacillus subtilis* cells at stationary phase by SigI regulatory system

○朝井 計[1]、市島 睦生[1]、関口 順一[2] ([1]埼玉大院理工、[2]信州大繊維)
○Kei ASAI[1], Mutsuki Ichishima[1], Junichi Sekiguchi[2] ([1]Saitama Univ., [2]Shinshu Univ.)

【目的】

枯草菌の代替シグマ因子の一つ SigI は熱ストレス応答シグマとして見出された。SigI のレギュロンとしてこれまで、MreBH（細胞骨格アクチン蛋白質の一つ)、BcrC（細胞壁合成阻害剤バシトラシン耐性)、LytE（細胞壁溶解酵素の 1 種、DL-endopeptidase）をコードする遺伝子が知られている。この LytE とは別の DL-endopeptidase である CwlO の同時欠失は、細胞の伸長阻害をまねき合成致死になる。また *lytE* と *cwlO* 遺伝子の転写は、低 G+C グラム陽性細菌に広く保存されている増殖に必須な 2 成分制御系 WalK/WalR で正に制御されている。昨年度の本大会で、SigI が CwlO をコードする遺伝子の転写にも関わり、SigI と CwlO も合成致死となることを発表した。このような背景から、SigI は WalK/WalR とともに、細胞表層の変化を感知し、表層の構造に関わる因子の発現を制御し、細胞の恒常性維持に関わる重要な機構と考え解析を進めている。

【方法と結果】

WalK/WalR は対数増殖期に活発に働き、定常期に弱まっていく。これに対し、*sigI* 遺伝子の発現は対数増殖期に弱く、定常期になり誘発された。*sigI* の転写活性は WalK/WalR の活性化によって抑制されるので、*sigI* は WalK/WalR によって対数増殖期に転写レベルで抑制されることが示唆された。一方、LB 培地液体培養で、定常期の後期に入ると *sigI* 破壊株は野生株に比べて、顕著な濁度の減少がみられた。熱ストレス応答以外にも、SigI は定常期における細胞恒常性維持に関わると考えられる。

そこで LytE や CwlO の定常期における遺伝子発現を *lacZ* 転写フュージョンを用いて解析した。LytE は定常期に入り転写が減少していった。CwlO も定常期に入り転写が減少するが、低いレベルで維持されていた。どちらの転写レベルも *sigI* 破壊株では顕著に減少した。

sigI 遺伝子の発現を人為的に変化させた時のマイクロアレイ解析等による転写解析から、SigI で転写を正に制御される遺伝子として細胞壁や細胞分裂に関わる遺伝子や、DNA 合成・DNA 修復に関わる遺伝子が確認された。CwlO 遺伝子とあわせいくつかの遺伝子について転写開始点を決定した。得られたコンセンサツ配列は同じファミリーの他のシグマ因子の既知の配列とは大きく異なっていた。

現在 *sigI* 破壊株の定常期における濁度減少と SigI レギュロンとの関連を解析中である。

Bacillus subtilis, sigma factor, cell wall

講演番号：2B12p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ B 校舎 12 会場

Pseudomonas aeruginosa-*Staphylococcus aureus* 共培養により明らかとなった quorum sensing 阻害物質の同定と阻害効果
Identification and inhibition activity of quorum sensing inhibitors revealed by co-culture with *Pseudomonas aeruginosa*-*Staphylococcus aureus*

○皆川 周[1]、新野 啓介[1]、山田 裕美[1]、藤井 健二[2]、毛利 隆太郎[2]、鹿山 鎭男[3]、加藤 文紀[3]、北山 隆[3]、菅井 基之[3]、後藤 直正[1]([1]京都薬大、[2]近畿大院農、[3]広島大院医歯薬)
○Shu Minagawa[1], Keisuke Shinno[1], Hiromi Yamada[1], Kenji Fujii[2], Ryutaro Mouri[2], Shizuo Kayama[3], Fuminori Kato[3], Takashi Kitayama[3], Motoyuki Sugai[3], Naomasa Gotoh[1] ([1]Kyoto Pharmaceutical Univ., [2]Kinki Univ., [3]Hiroshima Univ.)

【目的】日和見感染菌の *Pseudomonas aeruginosa* と *Staphylococcus aureus* は、両菌種の混合感染や菌交代症などの臨床報告もあり、宿主内相互関係が示唆されている。これまでに、*P. aeruginosa* は *S. aureus* の増殖抑制を示すことを示した。一方で、*S. aureus* は、*P. aeruginosa* の quorum sensing（QS）を介した増殖抑制作用に抵抗するために、QS 阻害物質を産生していることが示唆された。本研究では、*S. aureus* が産生する QS 阻害物質を同定し、QS 抑制能の解析を行った。
【方法】*P. aeruginosa*-*S aureus* 共培養系により *P. aeruginosa* による *S. aureus* 増殖抑制能を調べた。*P. aeruginosa* の QS を *lasB* エラスターゼとピアシアニンの産生量を示標に調べた。*S. aureus* 培養上清を酢酸エチル抽出後、TLC により分画後、*Chromobacterium violaceum* VIR07 を用いたレポーターアッセイにより QS 阻害物質を探索した。その後、*S. aureus* 培養上清の酢酸エチル抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび HPLC(溶離液: water / MeOH = 7 / 3、カラム: COSMOSIL 5C18-MS-II water、内径×長さ: 20×250 mm）により分離し、1H-NMR、13C-NMR、HRMS、旋光度測定、融点測定によって構造決定した。
【結果・考察】*P. aeruginosa* と *S. aureus* を液体培地中で共培養を行ったところ、培養開始時の菌数がほぼ同数の条件下では、共培養により *S. aureus* の生菌数は減少した。しかしながら、*P. aeruginosa* に対し *S. aureus* が 100 倍以上存在する条件下では、*S. aureus* の生菌数減少量は低下した。さらに、この共培養条件における *P. aeruginosa* のピオシアニン産生が減少していた。これにより、*S. aureus* は *P. aeruginosa* による QS を介した増殖抑制に抵抗していることが示唆された。*S. aureus* 培養上清からの酸性化酢酸エチル抽出物をシリカゲル薄層板を用いて分画し、その上に *C. violaceum* VIR07 を含む寒天培地を重層し、培養を行った。その結果、*C. violaceum* の QS 制御下にある violacein の産生が抑制されるスポットが 2 カ所見られた。これらのスポットには、*S. aureus* 培養上清に含まれる cyclic-dipeptides（CDPs）が 7 種類含まれていることが明らかとなった。これらの CDPs は *P. aeruginosa* の増殖には影響を与えずに、QS 制御下にあるピオシアニンやエラスターゼの産生を抑制した。また、その阻害効果は構造によりことなっていた。これらのことから、*S. aureus* は CDPs を産生することにより *P. aeruginosa* の QS を介した増殖抑制に抵抗していることが明らかとなった。このような細菌間の相互作用による生存戦略の解析は、新たな治療法や予防法の提案に繋がることが期待される。

quorum sensing, inhibitor, bacterial interaction

講演番号：2B12p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ B 校舎 12 会場

TCS と PTS をつなぐコネクター様因子 RcsG の遺伝的解析

Genetic characterization of RcsG, a connector of PTS to TCS

○深見 知可、加藤 明宣、萩原 慧、内海 龍太郎（近畿大院・農）
○Tomoka FUKAMI,Akinori KATOU,Kei HAGIHARA,Ryuutarou UTSUMI (kinki Univ.)

サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) はマウスに対し致死的な病原性を示す。サルモネラ菌において、RcsC/RcsD/RcsB 系など二成分制御系（TCS）の一部は、病原性調節に重要な役割を担う。これまでに、TCS を中心とした病原性調節ネットワークの解析から、複数の TCS 間を繋ぐ情報伝達機構の存在が明らかとなって来た。その一つとして、コネクターと呼ばれるユニークなスモールタンパクを介した機構の報告例が相次いでいる。我々は、コネクター因子を介する機構の更なる解明のため、新たなコネクター候補の探索を行っている。RcsC/RcsD/RcsB 系を活性化する因子として、最近得られた RcsG について報告する。

RcsC/RcsD/RcsB 系は、ヒスチジンホスホトランスフェラーゼ (HPt) ドメインを単独のリン酸基転移部位として保持する RcsD が、ヒスチジンキナーゼ RcsC とレスポンスレギュレーターRcsB の間でリン酸リレーを中継する変則的な TCS を形成している。RcsG の過剰発現によって、莢膜多糖合成関連遺伝子 *wzc* が活性化されたが、*rcsB*、*rcsC*、*rcsD* をそれぞれ欠損させた株では *wzc* は活性化されなかった。このことから、RcsG は RcsC/RcsD/RcsB 依存的に *wzc* を活性化することが示され、リン酸リレーの関与が示唆された。RcsG の直接的な標的を調べるために bacterial two-hybrid system (BACTH) による解析を行ったところ RcsD と RcsG 間で相互作用が検出された。しかし、RcsD のリン酸化部位を変異させると相互作用が失われた。そこで、BACTH に使用される大腸菌株において、披検体サルモネラ RcsD のリン酸供与体となりうる、大腸菌 *rcs* 系遺伝子の欠損を試みた。また、*rcsG* は糖取込みに関わるホスホトランスフェラーゼシステム (PTS) の転写調節因子 *rcsH* や PTS レギュレタリードメイン (PRD) *rcsI* といった、他のスモールタンパク質をコードする遺伝子等とクラスターを形成しており、それらの遺伝子欠損による *wzc* 発現への影響が調べられた。その結果、*rcsG* 欠損株と *rcsH* 欠損株では、アンピシリンを含む LB 培地において *wzc* の顕著な発現低下が認められた。さらに、*rcsG* オペロンが構成的に発現される *rcsJ** 変異株において、アンピシリン非存在下においても *rcsG* 依存的に *wzc* 発現が活性化されるかが検証された。

two-component system, connector, network

講演番号：2B12p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ B 校舎 12 会場

コネクタータンパク質 SafA によるセンサーキナーゼ PhoQ の活性化に関与する PhoQ ドメインの解析

Analysis of the PhoQ sensor domain involved in activation of sensor kinase, PhoQ by the connector, SafA in *Escherichia coli*

○吉谷 亘平[1]、石井 英治[2]、江口 陽子[1]、内海 龍太郎[1,2] ([1]近畿大農バイオ、[2]近畿大院農バイオ)
○Kohei YOSHITANI[1], Eiji ISHII[2], Yoko EGUCHI[1], Ryutaro UTSUMI[1,2] ([1]Kinki Univ., [2]Kinki Univ.)

大腸菌の二成分制御系 PhoQ/PhoP と Evgs/EvgA をつなぐコネクター因子 SafA は、65aa からなる一回膜貫通型タンパク質で、その C 末端側であるペリプラズム領域で PhoQ のセンサードメイン(PhoQ-SD)(41-193aa)に作用し、PhoQ/PhoP を活性化する。PhoQ-SD は二価の陽イオン(Ca^{2+}, Mg^{2+})、酸性 pH、CAMPs(カチオン性抗菌ペプチド)などの多くの刺激を感知する部位であり、特に Mg^{2+}は SD のもつ酸性クラスター(EDDDDAE)に結合し PhoQ を抑制している。PhoQ-SD 領域内の D179 と SafA のペリプラズム領域の R53 が相互作用することが示唆されている(1)。本研究では PhoQ の SD ドメイン内の各種変異体を用いて、SafA による PhoQ の活性化の効果を調べ、SafA と強く相互作用する PhoQ-SD 領域を明らかにした。

最初に PhoQ-SD を 6 つの領域(⊿50-180aa, ⊿51-76aa, ⊿77-101aa, ⊿102-126aa, ⊿127-154aa, ⊿155-181aa)を欠失し SafA による PhoQ の活性化がどのように変化するかレポーターアッセイ法(mgtA-lacZ)を用いて調べた。⊿51-76aa, ⊿77-101aa, ⊿102-126aa, ⊿155-181aa 領域に関しては SafA による活性化が見られなっかったため、これらの PhoQ-SD 欠損領域は、SafA の作用に重要な領域であることが考えられる。それに対して、⊿127-154aa でのみ SafA による活性化が PhoQ の野生型と同程度見られ、SafA による活性化に必須でないことが示された。これらの結果より SafA の活性化に関与する PhoQ の領域として D179 を含む PhoQ 155-181aa の領域が重要であることが示唆された。また、PhoQ 127-154aa には酸性クラスター(Mg^{2+})が存在していることからこれまで得られている、Mg^{2+}と SafA が競合的に作用していないという結果と一致した。

(1) Eguchi, Y and Ishii, E. *et al.*, (2012) *Mol. Microbiol.* ***85***. (2), 299-313

two-compornent system, signal sensing, membraine protein

講演番号：2B12p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ B 校舎 12 会場

イネ苗立枯細菌病菌 *Burkholderia plantarii* における植物毒素トロポロン産生機構

Mechanism of plant toxigenesis tropolone-production in rice seedling damping-off bacteria *Burkholderia plantarii*

○吉岡 誠訓[1]、紀平 絵里[1]、岡本 尚[1]、仲宗根 薫[2]、五十嵐 雅之[3]、波多野 和樹[3]、江口 陽子[1]、内海 龍太郎[1] ([1]近畿大院農、[2]近畿大院生化工、[3]微化研)

○ akinori YOSHIOKA[1], eri KIHIRA[1], syo OKAMOTO[1], kaoru NAKASONE[2], masayuki IGARASHI[3], masaki HATANO[3], yoko EGUCHI[1], ryutaro UTSUMI[1] ([1]Kinki Univ, [2]Kinki Univ, [3]IMC)

イネ苗立枯細菌病菌 *Burkholderia plantarii* が感染したイネ苗は、根の伸長阻害や、葉のクロロシスが引き起こされ、また苗全体が萎凋し枯死する。病害の原因は、*B. plantarii* が産生する植物毒素トロポロンであると考えられている。トロポロンは、鉄とキレート化して第二鉄錯塩を形成する性質を持つ。このように、*B. plantarii* はイネ苗に対して甚大な影響を与えるにも関わらず、トロポロン産生に関与する遺伝子やメカニズムは解明されていない。これらの解明によって、病原性因子をターゲットにした新規薬剤の開発が期待される。そこで、本研究では *B. plantarii* のトロポロン産生に関与する遺伝子の探索を目的とした。

B. plantarii を 6 日間培養すると、1 日目ではトロポロンの産生は認められなかったが 2 日目以降、培養時間とともにトロポロンの増大が確認された。また、寒天重層法によって、*B. plantarii* にトロポロンを滴下することで濃度依存的にトロポロンの産生量が増加したため、トロポロンによってトロポロン産生の誘導が認められた。そこで、菌の増殖段階やトロポロンを感知するセンサーとして Two-Component signal transduction System (TCS)の関与を考えた。TCS とは外界からのシグナルに対してセンサーであるヒスチジンキナーゼ (HK)が自己リン酸化し、レスポンスレギュレーター (RR)にリン酸基を転移することで、その制御下遺伝子の発現制御を行うシステムである。そこで、*B. plantarii* のゲノム情報をもとに推定した TCS 遺伝子の破壊株を作製し、トロポロン産生能を調べた。その結果、*ΔHK3* においてトロポロン産生能が低下した。また、*HK3* 遺伝子に隣接する遺伝子 *RR1, RR2* においても同様に破壊株を作製し、トロポロン産生能の評価を行った。その結果、*HK3* と同様、トロポロン産生能が低下した。破壊株に対してこれら 3 つの遺伝子を導入することにより、トロポロンの産生能が回復した。これらの結果は、*B. plantarii* におけるトロポロン生産が TCS によって制御されていることを示唆した。

Burkholderia plantarii , Two Component System, tropolone

講演番号：2B12p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ B 校舎 12 会場

白菜軟腐病菌 *Erwnia carotovora* ssp. *carotovora* における signermycin B の病原性抑制効果
Inhibitory effect of signermycin B against the plant pathogenicity of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*

○石井 英治[1]、木野 弘量[1]、渡邊 崇史[2]、五十嵐 雅之[3]、波多野 和樹[3]、東尾 美佳[2]、中北 歌織[2]、内海 龍太郎[1,2] ([1]近畿大院農バイオ、[2]近畿大農バイオ、[3]微化研)
○ Eiji ISHII[1], Hirokazu KINO[1], Takafumi WATANABE[2], Masayuki IGARASHI[3], Masaki HATANO[3], Mika HIGASHIO[2], Kaori NAKAKITA[2], Ryutaro UTSUMI[1,2] ([1]Kinki Univ., [2]Kinki Univ., [3]IMC)

農業分野における植物病のうち、細菌によって引き起こされるものはその感染力や細菌による土地の汚染が多大な被害をもたらしている。特に、様々な作物への感染が知られている白菜軟腐病菌は、農作物に感染すると、傷口や水孔から侵入し、植物体を軟化腐敗させ、悪臭を放つ原因となっている。その原因は、軟腐病菌が分泌する植物細胞壁分解酵素群(ペクチナーゼ)による植物細胞壁の主な構成成分(ポリガラクツロン酸など)の分解により起こる。本病は、発病後の防除はきわめて困難であり、発病前の予防が重要となる。我々は、ヒスチジンキナーゼ阻害剤である signermycin B が軟腐病菌による軟化腐敗を抑えることを見出した。そこで、signermycin B が病原性抑制にどのように関わっているか、遺伝子発現解析や酵素レベルでの病原性に与える効果について解析を行った。

我々はまず、白菜軟腐病菌が分泌する植物細胞壁分解酵素が signermycin B を作用させることでその分泌量がどのように変化するか、ルテニウムレッドを用いたペクチナーゼアッセイにより調べた。その結果、signermycin B を添加するとその濃度依存的にペクチナーゼ活性が減少していた。また、その時の CFU は signermycin B を添加しても変化はなく、signermycin B が軟腐病菌に対して抗菌活性を示さないことが明らかとなった。さらに、signermycin B 添加時の菌の形態変化を光学顕微鏡で観察したところその形態に変化はなく、これらのことから病原性を特異的に抑えていることが示唆された。次に主要なペクチナーゼのひとつであるポリガラクツロナーゼをコードする *peh1*、ペクテートリアーゼをコードする *pel3* のプロモーター領域と GFP を融合したプラスミドを構築し、signermycin B による変化を遺伝子発現レベルで調べた。その結果、signermycin B 添加時における遺伝子発現の差は、24 時間培養した菌においても変化は見られなかった。このことは、signermycin B がこれらの遺伝子発現レベルでの影響を与えておらず、分泌されるペクチナーゼの量が変化していることが推測された。現在、抗体を作成しており、それを用い菌体内のタンパク質発現を比較することで signermycin B の作用を明らかにしていく。

plant pathogen, *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*

講演番号：2B12p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ B 校舎 12 会場

ラッカセイ種皮ポリフェノールの *Bacillus cereus* に対する抗菌作用の検証

Verification of the antibacterial action of peanut skin polyphenol against *Bacillus cereus*

○小澤 恵実[1]、田村 倫子[1]、田中 尚人[2]、矢口 行雄[3]、笠原 浩司[4]、村 清司[1]、荒井 綜一[5]([1]東農大応生科・栄養、[2]東農大応生科・菌株、[3]東農大地環科・電顕、[4]東農大応生科・RI、[5]東農大総研)
○Megumi Ozawa[1], Tomoko Tamura[1], Naoto Tanaka[2], Yukio Yaguchi[3], Koji Kasahara[4], Kiyoshi Mura[1], Soichi Arai[5] ([1]Nutri. Sci., Tounodai, [2]NRIC, Tounodai, [3]Electron Microsc. Cent., Tounodai, [4]RI, Tounoudai, [5]NRI, Tounodai)

【目的】 非食部として大量廃棄されるラッカセイ種皮は、ポリフェノールを多量に含有する。ラッカセイ種皮より単離した三量体プロシアニジンのエピカテキン・エピカテキン・カテキン(EEC)は食中毒菌である *Bacillus cereus* に対して強い抗菌作用を示したことから、EEC による *B.cereus* の代謝変動を DNA マイクロアレイで解析し、昨年度の本大会で発表した。今回は、特に変動の大きかった細胞壁の生合成や細胞膜の物質輸送に関連する遺伝子に着目し、EEC の抗菌メカニズムについて検討した。

【方法】ラッカセイ種皮のポリフェノールは熱水で抽出し、EEC の分離は限外濾過、ゲル濾過、MPLC および HPLC で行った。DNA マイクロアレイ解析は、*B.cereus* ATCC 14579 を LB 培地で OD_{600} が 0.5 になるまで培養し、それに EEC 溶液または水を添加して、30 分培養したものを供試した。菌体からの RNA 抽出は QIAGEN の RNeasy Mini Kit を使用し、Agilent のキットを用いて Cy3 ラベル化 cDNA を作製した。DNA チップは、NCBI の *B.cereus* ATCC 14579,complete genome データを用いて Agilent のカスタムアレイで作製した。遺伝子発現の解析には GeneSpring GX を使用した。リアルタイム RT-PCR による解析には EEC 溶液または水を添加後 10 分と 30 分の菌体を使用し、定量は検量線法で行った。

【結果および考察】DNA マイクロアレイ解析の結果、EEC が細胞壁の生合成や細胞膜の物質輸送に影響を与えている可能性が示唆された。そこで、細胞壁生合成に関与するペニシリン結合蛋白質(PBP)の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR で解析したところ、EEC 添加においてその遺伝子発現が上昇し、10 分後よりも 30 分後の方がより発現量が増加した。さらに *B.subtilis* で知られている細胞表層ストレスに応答する LiaRS 二成分制御系に依存する LiaIH に相同な遺伝子の発現についても、PBP 遺伝子と同様に EEC 添加により発現の上昇が認められた。以上の結果から、EEC は細胞膜に存在するタンパク質と結合し、細胞壁の生合成を阻害することで *B.cereus* の生育を抑制することが推察される。また、EEC は細胞膜に存在するトランスポーターと結合し、物質の取込を阻害している可能性が考えられることから、[^{14}C]-グルコースを用いた取込阻害についても検討である。

peanut skin polyphenol, antibacterial, *Bacillus cereus*

講演番号：2B12p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ B 校舎 12 会場

枯草菌における(p)ppGpp 合成・分解酵素 RelA の新規制御機構の解析

Analysis of a novel regulatory mechanism of RelA ; (p)ppGpp synthesis and degradation enzyme in Bacillus subtilis.

○大竹 俊平[1]、清水 翔[1]、高田 啓[1]、志波 優[2]、吉川 博文[1,2] ([1]東京農大・応生科・バイオ、[2]東京農大・ゲノム解析セ)

○Shunpei Otake[1], Sho Shimizu[1], Hiraku Takada[1], Yuh Shiwa[2], Hirofumi Yoshikawa[1,2] ([1]Tokyo Univ. Agric., [2]NGRC)

【背景・目的】微生物は様々な環境で生息し、環境の変化に応じて増殖速度を制御する。その制御の一つとしてトリガー分子であるアラーモン(p)ppGppによる緊縮応答が挙げられる。枯草菌において、(p)ppGppの細胞内濃度の調節は合成のみを行うYwaC、YjbMと、合成・分解の両方の活性を持つRelAによって行われる。そのため、*relA*破壊株では(p)ppGppの蓄積による顕著な生育遅延を示す。しかし、RelAによる(p)ppGpp細胞内濃度の制御に関してはまだ不明な点が多い。そこで、本研究ではRelAによる栄養条件に応じた(p)ppGpp分解活性制御機構の解明を目的とする。

【方法・結果】我々は、生育遅延を示す*relA*の変異株(*relA 691*)を取得しているが、その変異個所であるACTドメインは、アミノ酸などの低分子と結合して酵素活性を制御するドメインであることから、(p)ppGppの分解活性が低下していると考えられる。また、*relA691*株に(p)ppGpp合成のみを行う*ywaC*、*yjbM*破壊カセットを導入しても生育遅延が抑圧されないことから、(p)ppGpp合成活性は保持していると考えられた。これらのことから、なんらかの低分子がACTドメインに結合し(p)ppGpp分解活性を促進していることが示唆された。そこで*relA 691*株より生育遅延を抑圧する抑圧変異株を取得し、次世代シークエンサーによるマッピング解析により、(p)ppGppの分解活性制御に関与する因子の同定を試みた。その結果、アミノ酸飢餓時に誘導されるメチオニン代謝関連酵素遺伝子*mtnA*のORF内にフレームシフト変異を同定した。*mtnA*破壊カセットの導入により*relA691*株の生育遅延が抑圧される一方で、メチオニン代謝においてMtnAの上流に位置するMtnKの破壊カセットを導入しても抑圧されなかった。このことから、MtnAが触媒する反応の基質となるMTR-1PがRelAのACTドメインに結合し、(p)ppGpp分解活性を正に制御していることが考えられた。現在はRelAのACTドメインとMTR1-Pとの関連性について、さらに詳細な解析を行っている。本大会では以上二者の関係性を中心に、栄養状態に応じたRelAによる(p)ppGpp分解活性制御機構について議論したい。

bacillus subtilis, RelA, ppGpp

講演番号：2B12p17
講演日時、会場：3 月 25 日 17:12～ B 校舎 12 会場

酸素により制御されるジグアニル酸シクラーゼの多様性
Diversity of diguanylate cyclases regulated by molecular oxygen

○吉岡 資郎 (分子研)
○Shiro YOSHIOKA (Institute for Molecular Science)

酸素(O_2)はバクテリアの生態に影響を及ぼす因子の一つである。大腸菌や枯草菌を始めとする多くのバクテリアは O_2 を求める（あるいは忌避する）性質を持ち、これは走気性(aerotaxis)と呼ばれている。走気性には、O_2 を検知しべん毛モーターの回転方向を制御するための走気性制御タンパク質(MCP)の存在が必須である。例えば、枯草菌由来 HemAT はグロビン型 O_2 センサードメインを持ち、O_2 結合部位としてヘム（鉄-ポルフィリン錯体）を有している。一方、硫酸還元菌にはヘムエリスリン（ノンヘム鉄２核錯体）様ドメインを O_2 センサードメインとして持つ DcrH、およびペリプラズムに c 型ヘム（ヘムのビニル基がシステインと共有結合を形成）を持つ DcrA が存在している。この他にもヘム含有型の PAS ドメインを有する MCP（緑膿菌由来 Aer2）が知られており、走気性制御 MCP における O_2 センサードメインの構造や活性中心の種類には多様性が存在する事がわかる。

様々なバクテリアのゲノムデーターベースを検索したところ、上述の走気性制御 MCP に類似の O_2 センサードメインと GGDEF ドメインが融合した新規な O_2 センサータンパク質の存在が示唆された。GGDEF ドメインはバイオフィルム形成のセカンドメッセンジャーとして機能する c-di-GMP の合成を触媒する。つまり、このようなタンパク質は O_2 センサードメインへの O_2 結合に応答して c-di-GMP 合成を制御するジグアニル酸シクラーゼ(DGC)であると考えられる。さらに、このような O_2 センサータンパク質の存在は、O_2 によってバイオフィルム形成が制御される事を示唆している。本発表では、このような DGC について紹介するとともに、グロビン型 O_2 センサードメインを有する HemDGC に関する報告を行う。

HemDGC は好冷性硫酸還元菌 *Desulfotalea psychrophila* LSv54 のゲノム中より見出された遺伝子 DP0201 を pET ベクターにクローニングし、大腸菌中に発現させた。単離・精製した HemDGC は O_2 結合型と還元(Fe^{2+})型の混合物であったが、GTP を加えると c-di-GMP 合成活性を示した。一方、ヘム鉄が酸化(Fe^{3+})または還元(Fe^{2+})されると c-di-GMP 合成活性はほとんど見られず、一酸化炭素(CO)や一酸化窒素(NO)が結合した場合にも活性はほとんど見られなかった。次に、ヘムの遠位空間に存在すると考えられるチロシン(Y55)をフェニルアラニンに置換したところ、Y55F 変異体は安定な O_2 結合型を形成する事ができず、c-di-GMP 合成活性も示さなかった。以上から、HemDGC はヘム鉄への O_2 結合によって c-di-GMP 合成活性を発現する DGC であり、その活性には Y55 が必須であると結論付けられた。

diguanylate cyclase, c-di-GMP, biofilm

講演番号：2B12p18
講演日時、会場：3 月 25 日 17:24～ B 校舎 12 会場

超好熱性アーキアのリボソーム画分に存在する熱ショックタンパク質の機能解析
Functional analysis of heat-inducible proteins found in ribosomal fraction of hyperthermophilic archaea

○井上 貴央[1]、青木 俊[1,3]、秀瀬 涼太[3]、細川 桂一[2]、跡見 晴幸[4]、今中 忠行[5]、藤原 伸介[1,3] ([1]関西学院大・理工・生命科学、[2] 関西学院大・理工・化学、[3] 関西学院大・理工・生命環境科学研セ、[4]京大院・工・合成、[5]立命館大・生命科学・生物工学)
○Takahiro Inoue[1], Syun Aoki[1,3], Ryota Hidese[3], Keiichi Hosokawa[2], Haruyuki Atomi[4], Tadayuki Imanaka[5], Shinsuke Fujiwara[1,3] ([1]Dept. of Biosci., Sch. of Sci. and Tech., Kwansei Gakuin Univ., [2]Dept. of Chem., Sch. of Sci. and Tech., Kwansei Gakuin Univ, [3]Res. Cent. for Environ. BioSci., Grad. Sch. of Sci. and Tech., Kwansei Gakuin Univ., [4]Dept. of Syn . Chem. and Biol. Chem., Grad. Sch. of Eng., Kyoto Univ., [5]Dept. of Biotech., Col. of Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

【研究目的】超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* は 60℃から 100℃の幅広い生育温度を示し、生育至適温度は 85℃である。高温ストレス環境下（93℃）で特異的に誘導される遺伝子をマイクロアレイを用いて解析したところ、遺伝子クラスター*TK0482-TK0489* が見出された。この遺伝子クラスターのオルソログはバクテリアやユーカリアには存在せず、*Thermococcales* 目に属する一部の超好熱性アーキア（*Thermococcus gammatolerans* 及び *Pyrococcus furiosus*)にのみ存在する。*TK0482-TK0489* に存在する８つの遺伝子は系統的に２つのグループに分かれ、各々の保存性は高い。グループ１から TK0482 をグループ２から TK0483 を組換えタンパク質として精製し、それぞれの抗体を作出し、細胞内における局在性を検討したところ、TK0482 はリボソーム画分に、TK0483 は細胞質画分に存在した。本研究ではこれら高温特異的遺伝子群の機能を明らかにすることを目的とする。

【実験方法】*TK0482* 遺伝子クラスターの生理的役割について知見を得るために 6 種の遺伝子破壊株（Δ *TK0482*, Δ *TK0482-TK0485*, Δ *TK0486-TK0488*, Δ *TK0482-0487*, Δ *TK0482-TK0488*, Δ *TK0482-0489*)を作製した。各遺伝子破壊株及び野生株を 93℃で培養し、生育特性を調べた。また TK0482 遺伝子クラスター全破壊株から S30 画分を抽出し、無細胞翻訳系により翻訳活性を測定した。さらに、その S30 画分を熱処理することでリボソームの熱安定性を評価した。そこに、グループ１、グループ２の精製タンパクを添加することで翻訳活性に与える影響を調べた。

【実験結果と考察】遺伝子破壊株を作製して生育特性解析を行った結果、いずれの破壊株においても野生株と比較して生育に差は見られなかった。この領域の生育における必須性はないと考えられる。*TK0482-TK0489*の全遺伝子クラスターを破壊した株から S30 画分は 60℃においては野生株と同等の翻訳活性を示したが、70℃以上で顕著に低下した。この結果より、*TK0482* 遺伝子クラスターが高温での翻訳に重要であることが示唆された。また、破壊株の S30 画分は野生株のそれと比べて 70℃以上での安定性が低下していた。このことから *TK0482-TK0489* の全遺伝子クラスターは 70℃以上でリボソームの安定化に関与していることが考えられた。

Thermococcus kodakarensis, ribosome, heat-inducible proteins

講演番号：2B13a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ B 校舎 13 会場

麹菌における自己切断型選択マーカーカセットを用いた多重遺伝子導入システムの構築
Development of multiple gene integration system by a self-excising marker cassette in *Aspergillus oryzae*

○張 斯来[1]、江原 直樹[1]、水谷 治[2]、田中 瑞己[1]、新谷 尚弘[1]、五味 勝也[1] ([1]東北大院農、[2]酒総研)
○Silai ZHANG[1], Naoki EBARA[1], Osamu MIZUTANI[2], Mizuki TANAKA[1], Takahiro SINTANI[1], Katsuya GOMI[1] ([1]Tohoku Univ, [2]NRIB)

麹菌は多数の二次代謝関連遺伝子を有しているものの、その多くは極めて僅かにしか発現していないため、二次代謝化合物生産のクリーンホストとしての利用が期待されている。しかし、麹菌は利用出来る選択マーカーが限られているため、二次代謝化合物の生合成マシナリー構成遺伝子を全て導入することが困難である。我々はこれまでに、変異型 *loxP* を用いた Cre/*loxP* システムによる多重遺伝子導入法の開発を行ってきた(1)。現在までに、*thiA* プロモーターによって Cre を細胞内で条件的に発現させ、ウラシル要求性マーカーを効率的にリサイクリングするシステムを構築している。しかし、ウラシル要求性株の選択に用いる 5-フルオロオロチン酸が高価である点や、*thiA* プロモーターによる Cre の発現抑制が完全ではない点が問題となっている。そこで、本研究ではこれらの問題点を解決可能な Cre/*loxP* システムの開発を目指すこととした。

リサイクリングに用いる選択マーカーとしてアデニン要求性マーカーを用いることとし、はじめに *adeA* 破壊株を作成した。取得した *adeA* 破壊株はアデニン要求性を示し、YPD 寒天培地上でコロニーが赤色を呈したことから、コロニーの色のみで *adeA* 脱落株が選択可能であると考えられた。Cre 発現のための条件的発現プロモーターには、グルコースを単一炭素源とした条件で発現が抑制され、キシロースを単一炭素源条件で誘導されるキシラナーゼ遺伝子 *xynG2* のプロモーターを使用することとした。マーカーリサイクリングが可能かを検証するため、変異型 *loxP* 配列で挟んだ *adeA* マーカーを *adeA* 破壊株に導入した後、*xynG2* プロモーターに Cre を連結したプラスミドを導入した。得られた形質転換体をグルコースを炭素源とした最小寒天培地で生育させた後、YPD 寒天培地およびキシロースを炭素源とした YPX 寒天培地にそれぞれ植え継いだ。その結果、YPX 寒天培地においてのみコロニーが赤色を呈した。また、YPX 培地に植え継いだ株の栄養要求性を調べた結果、アデニン要求性を示した。さらに、ゲノム DNA を抽出して PCR を行った結果、*adeA* マーカーが脱落していることが確認された。以上の結果から、*adeA* をマーカーとして用いることにより、安価かつ簡便にマーカーリサイクリングが可能であることが示された。現在、*adeA* と Cre 発現カセットの両者を変異型 *loxP* 配列で挟んだ断片を搭載したプラスミドの構築を行い、*adeA* と Cre 発現カセットの同時脱落を試みているところである。

(1)江原直樹、水谷治、五味勝也 (2012) 生物工学会誌、90(6): 298-301

Aspergillus oryzae, marker recycling, *adeA*, Cre/*loxp*

講演番号：2B13a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ B 校舎 13 会場

麹菌転写因子 HapX によるシデロフォア生産調節機構

Regulation of siderophore production by transcription factor HapX

○中村 隼人[1]、林口 拓実[1]、増田 裕一郎[1]、安田 庄子[2]、北本 則行[2]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1] ([1]名城大学、[2]あいち産業科学技術総合センター・食品技術総合センター)
○Hayato Nakamura[1], Takumi Hayashiguchi[1], Yuichirou Masuda[1], Shouko Yasuda[2], Noriyuki Kitamoto[2], Motoyuki Shimizu[1], Masashi Kato[1] ([1]Meijo Univ., [2]Food Res. Center, ACIST)

【概要】

デフェリフェリクリシン（DFF）は *Aspergillus oryzae* が生産するシデロフォアで、鉄欠乏時に DFF 生合成系の初発酵素遺伝子 *dffA* の産物が誘導され、生産が開始される。DFF は鉄と結合し変色することから、清酒醸造において品質劣化の原因となっている。一方、麹菌シデロフォアは安全性の面から鉄の補給剤としての利用が期待されている。[1)] 微生物の鉄恒常性には HapX と呼ばれる転写因子がかかわっている。*hapX* 遺伝子は当研究グループが見つけた新規転写因子で、鉄を補酵素として含む酵素の生産を調節する。HapX の機能解析の研究から、HapX がシデロフォア生産制御遺伝子 *sreA* を抑制することが明らかとなっている。[2)] すでに SreA が *dffA* 遺伝子を抑制することがわかっているため、HapX が SreA を介して *dffA* 遺伝子を間接的に制御することが予想される。そこで本研究では、HapX 高発現株と HapX 破壊株を用いて DFF への影響を調べることで、シデロフォア生産に関する HapX の機能解析を目的とした。

【方法と結果】

taaG2 プロモーターの制御下に *hapX* 遺伝子を連結し、*pyrG* 遺伝子をマーカーとして導入したプラスミドを作製し、*pyrG* 遺伝子を破壊した *A. oryzae* KBN616 に導入し高発現株とした。破壊株は相同組換え効率を上げるため、*ligD* 遺伝子を破壊して、*ligD* 遺伝子破壊株を製作した後、*hapX* 遺伝子破壊用プラスミドを用いて形質転換し作製した。野生株、高発現株および破壊株をデンプンを炭素源としたツァペックドックス液体培地に植菌し、鉄を添加・非添加条件で培養を行った。それぞれの菌体から mRNA を抽出した後、RT-PCR によって遺伝子発現強度を測定した。高発現株では野生株に比べ *dffA* 遺伝子発現強度が大きくなり、破壊株では小さくなることが確認された。*sreA* 遺伝子の発現強度を確認したところ、高発現株では小さくなり、破壊株では大きくなることが確認された。以上の結果から HapX は *sreA* 遺伝子発現制御を介して、*dffA* 遺伝子の発現制御に関与し、シデロフォア生産に影響を与えることが示された。

1) Suzuki S. et al. Int J Vitam Nutr Res, 77, 13 (2007)
2) Hortschansky P. et al. EMBO J, 26, 3157 (2007)

siderophore, HapX, dffA

講演番号：2B13a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ B 校舎 13 会場

Aspergillus oryzae の菌体内金属プロテアーゼ saccharolysin ホモログの機能解析
Functional analysis of intracellular metalloproteases saccharolysin homolog in *Aspergillus oryzae*
○石川 雄一朗、前田 浩、竹内 道雄、山形 洋平（東京農工大院・応生化）
○Yuichiro ISHIKAWA,Hiroshi MAEDA,Michio TAKEUCHI,Youhei YAMAGATA (Division of Applied Biological Chemistry, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

[目的] *A. oryzae* のゲノムには他の *Aspergillus* 属よりも多くのプロテアーゼ遺伝子が存在している。アミノ酸配列の相同性から、これらの内 3 つのプロテアーゼ遺伝子が *S. cerevisiae* の saccharolysin（EC 3 . 4 . 24 . 37）のホモログ遺伝子であると推定され、 oryzalysin（ols）A , B , C とした。Ols A , B , C はそれぞれ saccharolysin と 43% , 36% , 31% の相同性を示した。Saccharolysin は酵母において、ミトコンドリア膜間腔に局在する金属ペプチダーゼで、ミトコンドリア膜間腔やマトリックス間でミスフォールドされたタンパク質や酸化ダメージを受けたタンパク質が分解されて産生されるペプチドや、特異的なペプチダーゼによって切断されたシグナルペプチドを分解する機能が知られている。酵母ゲノム中には、saccharolysin 遺伝子は 1 つしか存在しない。これに対して、 *A. oryzae* ゲノム中には、 *ols A* , *ols B* , *ols C* の 3 つの遺伝子が存在している。このことから *A. oryzae* ではこれらの酵素の機能分担の可能性が示唆された。本研究では、 *A. oryzae* における oryzalysin の機能解析を目的とした。
[方法・結果] *ols A* , *ols B* , *ols C* の各遺伝子の単独破壊株を作製し、コントロール株と比較した。最少培地や富栄養培地において表現型に有意な差は見られなかった。様々な環境条件下、阻害剤存在下における表現型を観察した。熱・酸化・浸透圧などの環境ストレス下や細胞壁阻害剤である calcofluor white , congo red , micafungin 、ミスフォールドタンパク質生産を誘導する dithiothreitol（DTT）を添加した場合、コントロール株と比較して表現型に有意な差は見られなかった。このことから、*ols A* , *ols B* , *ols C* は細胞壁合成、ミスフォールドタンパク質の分解には関与していないことが示唆された。ミトコンドリア電子伝達鎖の脱共役剤である 2 , 4 – dinitrophenol（2 , 4 - DNP）を添加した場合、 *ols* A , *ols B* , *ols C* の各遺伝子の単独破壊株でコントロール株よりコロニー中心部における気中菌糸の伸長促進、密度増加が見られ、中でも *ols* A 破壊株では、これらの表現型が顕著であり、さらにコロニーサイズの増大も見られた。*ols* A , *ols B* , *ols C* の各遺伝子の単独破壊株の転写解析について報告する。

なお、本研究の一部は、生研センター基盤研究推進事業の一環として行われたものである。

Aspergillus oryzae, metalloprotease, transcriptome

講演番号：2B13a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ B 校舎 13 会場

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

Gene transcriptional analysis of proteases in *Aspergillus oryzae*

○酒井 大介[1]、竹内 道雄[1]、古崎 利紀[2]、石井 一夫[2]、有江 力[2]、山形 洋平[1] ([1]東京農工大院・応生化、[2]東京農工大院・農学系ゲノム科学人材育成プログラム)
○Daisuke SAKAI[1], Michio TAKEUCHI[1], Toshinori KOZAKI[2], Kazuo ISHII[2], Tsutomu ARIE[2], Youhei YAMAGATA[1] ([1]Division of Applied Biological Chemistry, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, [2]Human Resource Development Program in Agricultural Genome Sciences, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】

2005 年に日本のグループにより麹菌 *Aspergillus oryzae* の全ゲノム配列の解析が終了した。その結果、*A. oryzae* は *A. fumigatus* や *A. nidulans* などの他の *Aspergillus* 属と比べてゲノムサイズが大きく、遺伝子数が多いことが明らかとなった。また、菌体内外で多くの重要な役割を担っているプロテアーゼをコードする遺伝子についてもこれらの *Aspergillus* 属と比べて約 3 割多く、*A. oryzae* のゲノム中にのみ認められるプロテアーゼ遺伝子が存在することが明らかとなった。しかし、これらのプロテアーゼの役割についてはほとんど解明されておらず、多くのプロテアーゼについてはどのような条件で発現するのか、まだ分かっていない。本研究では、*A. oryaze* プロテアーゼ遺伝子の転写解析を行い、同一のグループに属するプロテアーゼ間での培養条件に応じた使い分けを明らかにすること、また、窒素代謝に関連する遺伝子の制御機構を調べることを目的としている 。

【方法】

Czapeck-Dox 液体培地 (グルコース: 2.0%, 窒素源: 0.3%) で 窒素源として、硝酸ナトリウム、ゼラチンを用い、各培養条件で 48、72 時間振とう培養した。培養後の菌体から RNA を抽出し、RNA-Seq 用にサンプル調整を行い、クオリティチェックをした後、Illumina 社の次世代シーケンサー (GAIIx) を用いて RNA-Seq を行った。得られたデータから、各種解析ソフトを用いてトランスクリプトーム解析を行った。

【結果】

プロテアーゼ遺伝子の転写解析の結果、時間変化よりも窒素源変化に対して、変動する遺伝子が多く見られた。また、転写変化のパターンが類似したプロテアーゼ遺伝子や無機窒素代謝関連の遺伝子が見られ、これらの遺伝子では同様の制御を受けている可能性が示唆された。さらに、プロテアーゼ遺伝子の転写変化パターンは、既知の転写因子の転写変化パターンと異なるものが見られ、これらの遺伝子には未知の転写因子が関与している可能性が考えられる。

なお、本研究の一部は生研センター基礎推進事業の一環として行われたものである。

Aspergillus oryzae, transcriptome analysis, protease

講演番号：2B13a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ B 校舎 13 会場

Aspergillus nidulans におけるプロテインキナーゼ C による細胞壁合成酵素遺伝子の転写制御
Transcriptional regulation of cell wall related genes by protein kinase C in *Aspergillus nidulans*
○片山 琢也[1]、志波 優[2]、吉川 博文[3]、太田 明徳[3]、堀内 裕之[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東農大・ゲノム解析セ、[3]東農大・応生科・バイオ)
○ Takuya KATAYAMA[1], Yuh SHIWA[2], Hirofumi YOSHIKAWA[3], Akinori OHTA[3], Hiroyuki HORIUCHI[1] ([1]Dept. of Biothechnol., Univ. of Tokyo, [2]Genome Res. Center, Tokyo Univ. of Agric., [3]Dept. of Biosci., Tokyo Univ. of Agric.)

プロテインキナーゼ C (PKC) は真核生物に高度に保存されたセリン／スレオニンキナーゼである。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の唯一の PKC である Pkc1p は細胞壁の完全性維持に関わるシグナル伝達経路（cell wall integrity（CWI）経路）において中心的な役割を担うだけでなく、その他多くの現象に関わることが示唆されている。*S. cerevisiae* と同様に糸状菌 *Aspergillus nidulans* も単一の PKC である PkcA を持つ。*A. nidulans* にも CWI 経路の構成因子のオルソログが保存されていることから、PkcA も CWI 経路において機能すると考えられている。本研究では PkcA の転写制御に関わる機能を解明することを目的とした。

まず、*S. cerevisiae* の知見を基に活性化型 PkcA（PkcA（R429A））を発現制御が可能なプロモーター下で高生産することが可能な株（R429A 株）を作製し、PkcA（R429A）の誘導条件における網羅的な転写解析を行った。その結果、R429A 株では 1158 遺伝子の mRNA 量が野生型株の 1.5 倍以上に増加していた。この中には細胞壁の合成に関わるグルカン合成酵素遺伝やキチン合成酵素遺伝子が含まれていた。これまでに *A. nidulans* では α-1,3-グルカン合成酵素遺伝子は CWI 経路によって制御されることが示唆されているが、β-1,3-グルカン合成酵素遺伝子、キチン合成酵素遺伝子の転写制御機構は未解明である。そこで、PkcA の細胞壁合成酵素遺伝子の転写制御への関与について更なる解析を行った。

リアルタイム定量 PCR 法を用い、PkcA（R429A）の誘導条件における細胞壁合成酵素遺伝子の転写解析を行ったところ、R429A 株では α-1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *agsB*、β-1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *fksA*、キチン合成酵素遺伝子 *chsB*、*chsC*、*chsD*、*chsF*、*csmA*、*csmB* の mRNA が野生型株と比較して増加していた。PkcA（R429A）の誘導条件で長時間培養した二次的な影響を排除するため、次に PkcA（R429A）の抑制条件で培養後、PkcA（R429A）の誘導条件に移して 1 時間培養した場合の細胞壁合成酵素遺伝子の転写解析を行った。その結果、R429A 株では *agsB*、*chsB*、*chsC*、*chsD*、*csmA*、*csmB* の mRNA が野生型株と比較して増加していた。

これらのことから、PkcA が α-1,3-グルカン合成酵素遺伝子の転写制御だけでなくキチン合成酵素遺伝子の転写制御にも関与することが示唆された。

Aspergillus, protein kinase C, cell wall

講演番号：2B13a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ B 校舎 13 会場

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の分生子特異的 NAT の機能解析

Functional analysis of conidia specific natural antisense transcript in *Aspergillus oryzae*

○辻井 雅、森田 寛人、前田 浩、山形 洋平、竹内 道雄（東京農工大院・応生化）
○Masaru Tsujii,Hiroto Morita,Hiroshi Maeda,Youhei Yamagata,Michio Takeuchi (Division of Applied Biological Chemistry, Tokyo univ. of agriculture and technology)

【目的】黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、我が国の醸造産業において酵素の供給源として広く用いられ、食品利用で安全な微生物として認められている。黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の分生子及び発芽分生子における EST 解析の結果、 331-25 遺伝子から転写された NAT(natural antisense transcript）は分生子にのみ見出され、 528 の EST のうち 43 という高頻度で読まれた。また、331-25遺伝子 から転写される sense 鎖は *Rhodococcus erythropolis* においてコレステロールの資化に関与している 3-ketosteroid Δ 1 dehydrogenase と塩基配列で 23% の相同性を持つ。本研究は 331-25 遺伝子から転写され、分生子特異的に存在する NAT の機能を明らかにすることを目的として解析を行なった。

【方法】分生子、発芽分生子及び菌糸における 331-25 遺伝子 RNA の存在量の違いを確認するために、Cz 平板培地にて *A. oryzae* RIB40 を培養した後、分生子を回収し、この分生子を Cz 培地にて液体培養し、膨潤した分生子（液体培養 2 時間)、発芽分生子(液体培養 6 時間)、菌糸(液体培養 24 時間、液体培養 48 時間)として回収した。さらに、分生子を着生しないΔ *brlA* 株の作製を行った。得られた菌体から total RNA を抽出して,それをテンプレートに cDNA 合成を行い、 RT-PCR によって sense 鎖と antisense 鎖それぞれの 331-25 遺伝子 RNA の各条件における存在量の比較を行なった。さらに、 5’- RACE 法を用いて antisense RNA の転写開始点の決定を行なった。また、331-25 遺伝子の破壊株を作製して、各条件で培養を行いその表現型を観察することによって、331-25 遺伝子の機能解析を行なった。

【結果】分生子、発芽分生子、菌糸及び分生子着生直前における 331-25 遺伝子から転写される RNA の存在量について比較したところ、 331-25 遺伝子 の antisense RNA は分生子に特異的に存在していて、 初期発芽分生子では僅かにしか検出されず、発芽分生子と菌糸においては存在していないことが確認された。さらに、sense RNA は分生子、発芽分生子には存在しており、24 時間液体培養した菌糸では僅かにしか検出されず、48 時間液体培養した菌糸では検出されなかった。シークエンス解析により、分生子特異的に存在している antisense RNA はたんぱく質をコードしないことが確認された。さらに、 331-25 遺伝子の破壊株のコレステロールを唯一の炭素源とした寒天培地における表現形の観察では、ホスト株と破壊株において表現形に差は見られなかった。また、Δ *brlA* 株における 331-25 遺伝子 RNA の発現については、現在検討中である。

natural antisense transcript, *Aspergillus oryzae*, conidia

講演番号：2B13a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ B 校舎 13 会場

放線菌 *Streptomyces griseus* 由来非特異的 DNA 結合タンパク質 SGR6054 の機能解析

Analysis of the non-specific DNA-binding protein SGR6054 in *Streptomyces griseus*

○手塚 武揚[1]、野本 竜平[1]、木村 知宏[1]、山本 祐梨子[1]、宮川 拓也[2]、宮園 健一[2]、田之倉 優[2]、堀之内 末治[1]、大西 康夫[1] ([1]東大院農生科・応生工、[2]東大院農生科・応生化)
○Takeaki TEZUKA[1], Ryohei NOMOTO[1], Tomohiro KIMURA[1], Yuriko YAMAMOTO[1], Takuya MIYAKAWA[2], Ken-ichi MIYAZONO[2], Masaru TANOKURA[2], Sueharu HORINOUCHI[1], Yasuo OHNISHI[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Univ. of Tokyo)

【背景・目的】*S. griseus* のゲノム中に見出された遺伝子 *SGR6054* は放線菌において広く保存されており、非特異的 DNA 結合活性を有するタンパク質をコードしている。我々はこれまでに X 線結晶構造解析により SGR6054 の立体構造を明らかにしており、SGR6054 は二量体で機能すると考えられた[1)]。SGR6054 は RNase 活性を持つタンパク質であることを既に発表しているが[2)]、DNA 結合活性に比べて RNase 活性は微弱であることが判明したため、DNA 結合活性に焦点を絞って解析を行った。本研究では、SGR6054 の立体構造および NMR による DNA 滴定実験をもとに DNA 結合能に重要な残基を予想し、変異型タンパク質を作製して *in vitro* 解析を行った。また、遺伝子破壊株を作製して表現型を野生株と比較することで *in vivo* での機能解析を行った。【方法・結果】^{15}N および ^{13}C ラベル体の組換え SGR6054 タンパク質を調製し、NMR を用いて DNA 滴定実験を行い ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルを測定したところ、タンパク質の主鎖 NH 由来シグナルに DNA 濃度依存的な変化が観測された。この変化は SGR6054 二量体と二本鎖 DNA のモル比 1:1 で収束していたことから、二本鎖 DNA1 分子に対して SGR6054 二量体 1 分子が特異的に結合していることが示された。NMR におけるシグナル変化が大きな残基が DNA との相互作用に関わると予想し、化学シフトの変化強度が 0.14 以上の 13 残基に対してアラニン置換型変異タンパク質を作製して *in vitro* での DNA 結合能を野生型タンパク質と比較したところ、L90A 変異タンパク質では DNA 結合能が顕著に低下していた。また、X 線結晶構造解析で明らかになった SGR6054 の立体構造をもとに DNA 結合活性に重要と予想した 17 残基に対して同様にアラニン置換型変異タンパク質を作製して *in vitro* 解析を行ったところ、K69A および R86A 変異タンパク質では DNA 結合能が野生型と比較して顕著に低下していた。一方、in-frame deletion により *SGR6054* 遺伝子破壊株を作製して表現型を解析したところ、遺伝子破壊株は野生株と比較して生育の遅延が見られた。また、野生株が十分な形態分化を行うことができない最少培地においても気中菌糸形成を行っていたことから、*SGR6054* が生育と形態分化に重要な機能を持つ遺伝子であることが示唆された。1) 野本ら、日本農芸化学会 2010 年度大会要旨集 p.84 (講演番号 2ASp02)、2) 手塚ら、日本農芸化学会 2010 年度大会要旨集 p.84 (講演番号 2ASp03)

DNA-binding protein, *Streptomyces griseus*

講演番号：2B13a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ B 校舎 13 会場

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の二成分制御系レスポンスレギュレーターTcrA の機能解析
Analysis of the two-component system response regulator TcrA in *Actinoplanes missouriensis*

○毛利 佳弘[1]、張 文スン[1]、小西 健司[1]、手塚 武揚[1]、平田 愛子[2]、藤田 信之[3]、早川 正幸[4]、大西 康夫[1]（[1]東大院農生科・応生工、[2]東大院新領域・先端生命科学、[3]NITE・NBIC、[4]山梨大・工）
○Yoshihiro MOURI[1], Moon-Sun JANG[1], Kenji KONISHI[1], Takeaki TEZUKA[1], Aiko HIRATA[2], Nobuyuki FUJITA[3], Masayuki HAYAKAWA[4], Yasuo OHNISHI[1]（[1]Tokyo Univ., [2]Tokyo Univ., [3]NITE・NBIC, [4]Yamanashi Univ.）

【目的】*Actinoplanes missouriensis* は、栄養豊富な条件下では基底菌糸を伸長する一方で、栄養飢餓状態に陥ると短い胞子嚢柄を介して基底菌糸上に、運動性胞子を内包する胞子嚢を形成する。この胞子は多数のべん毛を持ち、胞子嚢から放出されるとべん毛運動による走化性を示す。我々はこれまでに *A. missouriensis* の全ゲノム配列を決定し、べん毛合成遺伝子クラスターを同定してきた。べん毛合成遺伝子クラスターの上流には走化性遺伝子クラスターおよび二成分制御系のレスポンスレギュレーターTcrA（two-component system response regulator）をコードする遺伝子が存在している。我々は TcrA がべん毛形成および走化性の制御に関与するのではないかと考え、TcrA について詳細な解析を進めている。
【方法・結果】*tcrA* 遺伝子欠失変異株を作製したところ、胞子が胞子嚢から泳ぎださなくなり、欠失させた遺伝子の導入で再び胞子が泳ぎだす様子が観察された。詳細に表現型を調べた結果、変異株はつぶれた胞子嚢を形成し（SEM 観察）、成熟した胞子嚢内で一部の胞子が発芽していることが明らかになった（TEM 観察）。一方、*tcrA* 遺伝子、べん毛合成遺伝子クラスターおよび走化性遺伝子クラスターの転写単位を RT-PCR、S1 mapping により決定し、野生株と変異株でそれぞれの転写単位の転写量を qRT-PCR にて比較した。その結果、べん毛合成遺伝子クラスター内の 9 個の転写単位のうち 5 つにおいて、*tcrA* 破壊株での転写量の減少が観察された。それぞれの転写単位の転写開始点を 5'-RACE 法により決定し、プロモーター領域およびその上流領域に対して、大腸菌で発現・精製した His-tag 付加 TcrA タンパク質の結合能を EMSA（Electrophoresis Mobility Shift Assay）で調べた。その結果、転写量が減少していた 5 つの転写単位のうち 3 つの転写単位の上流領域に TcrA が *in vitro* で結合することが明らかになった。また、TcrA においてリン酸化部位と予測される Asp52 を Asn に置換した TcrA タンパク質を発現するベクターを *tcrA* 欠失変異株に導入しても、SEM 観察での表現型は野生株のものに戻らなかった。以上のことから、リン酸化した TcrA によりべん毛合成遺伝子クラスターが直接的、間接的に活性化され、べん毛の形成が促進されることが示唆された。

Actinoplanes missouriensis, response regulator, flagella

講演番号：2B13a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ B 校舎 13 会場

放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)におけるリン酸化模倣変異型 AfsR の機能解析

Functional analysis of phosphorylation mimic AfsR proteins in *Streptomyces coelicolor* A3(2)

○辛 利弥、大西 康夫（東大院農生科）
○Toshiya SHIN,Yasuo OHNISHI (Tokyo Univ.)

【背景・目的】

放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)は二次代謝産物として、色素性抗生物質アクチノロージン（Act）を生産する。*Streptomyces* の二次代謝制御の研究は、*S. coelicolor* A3(2)をモデルとして行われてきた。Act の生産は AfsK-AfsR-AfsS シグナル伝達経路による制御を受けている。外界からのシグナルを受けた AfsK をはじめとする Ser/Thr キナーゼにより、転写活性化因子 AfsR はリン酸化され、活性化されることが示唆されている。活性化された AfsR は RNA ポリメラーゼをリクルートし、機構未知な Act 生産活性化因子をコードする *afsS* の転写を活性化する。AfsR ホモログは *Streptomyces* に広く保存されており、他菌種においても二次代謝制御に関与する例が報告されている。

現在のところ、リン酸化による AfsR 活性化の分子機構は全く不明である。AfsR ホモログ間で保存性の高い 21 の Thr 残基にアミノ酸置換を導入した実験により、T297 および T536 が被リン酸化部位であると示唆されていた。[1)]今回、これらの Thr 残基が被リン酸化部位であることを証明するとともに、リン酸化による AfsR 活性化機構の解明を目指した。

【結果】

Ser/Thr キナーゼ阻害剤スタウロスポリンを添加した培地においては、野生型 *afsR* を導入した *afsR* 破壊株は Act 生産を行わなかった。一方、リン酸化 Thr の電荷を模倣する酸性アミノ酸置換の導入により、恒常的に活性化されていると考えられるリン酸化模倣変異型 AfsR を *afsR* 破壊株で発現させたところ、T297D、T536D、および T536E の 3 種では Act 生産が引き起こされた。T297 と T536 のどちらかがリン酸化を模倣した状態になっていれば、Ser/Thr キナーゼ阻害剤の存在下であっても、AfsR は活性型として機能したことから、T297 と T536 のリン酸化による AfsR 活性化が強く示唆された。

ウェスタンブロット解析により変異型 AfsR の発現を確認したところ、T297D、T536D、および T536E は野生型 AfsR が安定に存在する生育の早い段階から分解を受けていることが示唆された。また、大腸菌において過剰生産させたところ、野生型 AfsR は可溶性画分に検出されたが、T536D および T536E では不溶性画分に検出された。これらの結果はリン酸化によって AfsR の細胞内での性状が大きく変化することを示唆している。現在、リン酸化された T297 および T536 を含むペプチドに対する抗体を用いて *in vivo* におけるリン酸化 AfsR の検出を試みており、その結果についても報告する予定である。

1）田中ら(2010) 日本農芸化学会 2010 年度大会要旨集 p. 85

Streptomyces, transcriptional activator, antibiotic biosynthesis

講演番号：2B13a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ B 校舎 13 会場

抗寄生虫薬エバーメクチン生産菌における放線菌ホルモン受容体 AvaR1 の機能解析
Characterization of AvaR1, a Streptomyces hormone receptor with avermectin production in Streptomyces avermitilis
○Sultan Suandi Pratama[1]、木谷 茂[1]、宮本 聖子[1]、池田 治夫[2]、仁平 卓也[1]([1]阪大生物工学国際交流セ、[2]北里大・生命研)
○Suandi Pratama Sultan[1], Shigeru KITANI[1], Kiyoko MIYAMOTO[1], Haruo IKEDA[2], Takuya NIHIRA[1] ([1]Osaka Univ., [2]Kitasato Univ.)

Streptomyces species has the ability to produce a plethora of antibiotics with important medical and agricultural applications. One of the well-known regulatory systems for antibiotic production is the signaling system with the *Streptomyces* hormone as a small diffusible signaling molecule and its cognate receptor. We have previously identified avenolide, a new class of *Streptomyces* hormone, which elicits production of the important anthelmintic agent avermectin in *S. avermitilis*. Here, we describe the characterization of AvaR1, an avenolide receptor, in the regulatory mechanism for avermectin production. Gel-shift assay revealed that AvaR1 has DNA binding activity toward the upstream region of *aco* (*sav3706*), presumable avenolide biosynthetic gene, suggesting that AvaR1 might control the *aco* transcription directly. In the *avaR1* disruptant, which produced avermectin in a manner similar to that of the wild-type strain, transcriptional level of *aco* increased compared with that in the wild-type strain.

To examine the possibility that AvaR1 controls avenolide production via the function of *aco*, we evaluated avenolide activity in the culture of the *avaR1* disruptant, showing that avenolide activity of the *avaR1* disruptant increased to a level 8.1-fold greater that of the wild-type strain. These phenotypic changes attributable to the *avaR1* disruption were restored by *cis*-complementation of the *avaR1* disruptant, not by *trans*-complementation. These findings demonstrated that AvaR1 forms a negative autoregulatory circuit for avenolide production by the direct control of AvaR1 for transcription of the avenolide biosynthetic gene.

Streptomyces, Avermectin, Avenolide

講演番号：2B13a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ B 校舎 13 会場

放線菌キシロース誘導型発現システムの開発

Development of xylose inducible expression system for Streptomyces.

○野口 祐司[1]、卯津羅 敦子[1]、池田 治生[2] ([1]長瀬産業、[2]北里大・北里生命研)
○Yuji NOGUCHI[1], Atsuko UZURA[1], Haruo IKEDA[2] ([1]Nagase & Co., LTD., [2]Kitazato Univ.)

【目的】

我々は放線菌 *Streptomyces* 属が有する豊富な酵素や二次代謝生合成に関わる遺伝子群に着目し、放線菌を発現宿主とする発現系：N-STePP(Nagase’s *Streptomyces* Technology for Protein Production)を開発してきた。これまでに、*S. cinnamoneus* 由来のホスホリパーゼ D 遺伝子のプロモーター(以下 PLD プロモーター)や *S. septatus* 由来のメタロエンドペプチダーゼ遺伝子のプロモーターを利用した発現系を構築した。様々な遺伝子の発現に対応する為には、それぞれの機能に適した発現系を選択する必要があり、宿主の生育に悪影響を及ぼす機能を有する遺伝子の発現には、誘導型発現系が有効である。今回、目的遺伝子の発現を誘導、非誘導条件において厳密に制御可能な発現系を構築することを目的として、キシロースイソメラーゼ遺伝子(以下 *xylA*)のプロモーターを利用した放線菌誘導型発現系の開発を行った。

【方法】

Streptomyces 属において、*xylA* はキシルロースキナーゼ遺伝子(以下 *xylB*)、そしてこれら遺伝子の発現を負に制御する転写抑制因子 *xylR* とともにオペロンを形成している。XylR はキシロース非存在下、すなわち非誘導条件において *xylA* プロモーターに結合し、*xylA* および *xylB* の転写は抑制される。そしてキシロースが存在する誘導条件において、XylR はプロモーター領域から離れ、両遺伝子の転写は活性化される。今回、*S. avermitillis* のゲノム DNA を鋳型に *xylA* プロモーターおよび xylR を PCR により取得し、多コピーベクターに組込んだ。レポーター遺伝子としてキチナーゼ遺伝子を選択し、*xylA* プロモーターの下流に連結し、*xylR* は PLD プロモーターの下流に連結した。構築したプラスミドを *S. lividans* 1326 に導入し、得られた形質転換体のキチナーゼ活性を指標に誘導型発現系の評価を行った。

【結果】

xylA プロモーター単独で多コピーベクター上にてキチナーゼ遺伝子を発現させると、非誘導条件においても著量のキチナーゼ活性が検出された。転写抑制因子である XylR を共発現させることで、キシロースの添加に応じてキチナーゼ遺伝子の発現を厳密に制御可能な誘導型発現系を構築することに成功した。本発現系は、培養初期に発現させると宿主の生育に悪影響を及ぼすような遺伝子の発現や、様々な遺伝子の機能解析に有用である。

streptomyces, inducible expression system, xylose

講演番号：2B13a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ B 校舎 13 会場

AcGFP をレポーター遺伝子に用いた *Streptomyces* 由来シグナルペプチドの探索

Screening of signal peptides from *Streptomyces* using AcGFP as a reporter

○松本 雅子、齋藤 結希、橋本 義輝、小林 達彦（筑波大院・生命環境）
○Masako MATSUMOTO,Yuki SAITO,Yoshiteru HASHIMOTO,Michihiko KOBAYASHI (Grad. School of Life and Environm. Sci., Univ. of Tsukuba)

放線菌、特に *Streptomyces* 属はさまざまな抗生物質を生産することで知られ、これら抗生物質は医薬品としてだけではなく農薬や動物薬等としても使用されている。本属は工業的に非常に有用な生物資源であることから、放線菌における大量発現系の構築が期待されている。我々は、これまでに *Streptomyces* 属放線菌で機能する誘導型発現ベクターおよび構成型発現ベクターの開発に成功している。しかし、これらはターゲットタンパク質の菌体内での大量発現を目的としたものである。本研究では、ターゲットタンパク質を菌体外に分泌・発現させるのに効率の高いシグナルペプチドの探索を目的とした。

全ゲノム配列が決定されている *Streptomyces* 属放線菌から 20 個のシグナルペプチドを選択した。それぞれのシグナルペプチドと（レポーターとした）AcGFP を in frame で連結し、構成型発現ベクター pHSA81 のニトリルヒドラターゼ遺伝子プロモーター下に配置したプラスミドを構築した。本プラスミドで、*S. lividans* TK24 を形質転換し、菌体外に分泌される AcGFP を指標にスクリーニングを行った。その結果、1 つのシグナルペプチドを組込んだ形質転換体の培養上清に高い AcGFP の蛍光が確認された。さらに、本培養上清を SDS-PAGE に供したところ、AcGFP の分泌・発現が確認された。

Streptomyces, signal peptide, plasmid

講演番号：2B13p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ B 校舎 13 会場

超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* におけるウイルス様領域の役割
The role of virus-like regions in the cell of hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*
○田頭 健太[1]、福田 青郎[1]、金井 保[2]、跡見 晴幸[2]、今中 忠行[1] ([1]立命館大生命、[2]京大院工)
○Kenta Tagashira[1], Wakao Fukuda[1], Tamotsu Kanai[2], Haruyuki Atomi[2], Tadayuki Imanaka[1] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Kyoto Univ.)

【背景・目的】様々なアーキアのゲノム解析より、いくつかの超好熱菌のゲノム上に、溶原化ウイルスに由来すると考えられるプロウイルス領域が見つかっている。これらプロウイルス領域はウイルス由来の遺伝子を有してはいるが、そのほとんどは既にウイルス粒子形成能を失っている。例えば、鹿児島県小宝島より単離された超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* において、そのゲノム上にウイルスの溶原化により形成されたと予想される 4 つのウイルス様領域（TKV1~TKV4）が存在することが明らかになっている。これらウイルス様領域内に含まれている遺伝子群の機能はほとんど未知であるが、その一部は転写・DNA 複製関連の遺伝子として機能推定されている。しかしながらウイルス様領域外のゲノム上にこれら転写・DNA 複製関連の遺伝子のホモログが別途存在していることから、ウイルス様領域がむしろ *T. kodakarensis* に対し何の役割も持っていない可能性も予想され、ウイルス様領域が *T. kodakarensis* の菌の生育に関してどのような影響を与えているのかは不明である。このような背景のもと本研究では、*T. kodakarensis* ゲノム上に存在するウイルス様領域の役割を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】各ウイルス様領域を単独で破壊した株（ΔTKV1~ΔTKV4 株）を取得し、栄養を多く含む培養条件において野生株と生育を比較した所、すべての領域単独破壊株は野生株と比べて生育が悪くなった。またマイクロアレイ解析を行った所、DNA 複製・転写関連遺伝子よりもむしろ、様々な異化・同化代謝経路の遺伝子の変動が目立った。特に ΔTKV1~ΔTKV4 株全てでグルタミンーグルタミン酸間の変換を触媒する酵素 glutamine synthetase をコードする遺伝子（*Tk-glnA*）の転写量が減少した。次に *Tk-glnA* の転写量の減少に注目して、グルタミンまたはグルタミン酸を培地に追加し、領域単独破壊株の生育に与える影響を解析した。その結果、ΔTKV2・ΔTKV3 株ではグルタミンまたはグルタミン酸を添加しても野生株より生育が悪いままであったが、ΔTKV1・ΔTKV4 株では各アミノ酸添加培地では野生株と同等の生育を示した。さらに ΔTKV4 株は先のマイクロアレイ解析でトリプトファン合成遺伝子群の転写量減少が見られたが、ΔTKV4 株はトリプトファンの添加により野生株と同等の生育を示した。以上のことから、TKV1・TKV4 は細胞内の複数のアミノ酸供給に関与していると予想された。また複数のウイルス様領域破壊株も取得し生育特性解析、およびマイクロアレイ解析を行った。その結果、ウイルス様領域単独破壊株とは異なったアミノ酸代謝関連遺伝子の顕著な転写量変動が観察されており、ウイルス様領域のアミノ酸代謝との関連が強く示唆された。

Archaea, virus-like region, hyperthermophiles

講演番号：2B13p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ B 校舎 13 会場

超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* の低温誘導型 RNA ヘリカーゼの機能解析
Induction mechanisms of cold-inducible RNA helicase in hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis*

○Sahara Tatit Novi[1,2]、長岡 英里子[1,2]、秀瀬 涼太[2]、今中 忠行[3]、藤原 伸介[1,2] ([1]関西学院大院・理工、[2]関西学院大・生命環境センター、[3]立命館大・生命科学)
○ Tatit Novi Sahara[1,2], Eriko Nagaoka[1,2], Ryouta Hidese[2], Tadayuki Imanaka[3], Shinsuke Fujiwara[1,2] ([1]Dept. of Biosci., Grad. Sch. of Sci. and Tech., Kwansei-Gakuin Univ., [2]Res. Cent. for Environ. Biosci., Grand. Sch. of Sci. and Tech., Kwansei-Gakuin Univ., [3]College of Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

【研究目的】
Thermococcus kodakarensis は *Pyrococcus* 属超好熱菌にはない低温誘導型 RNA ヘリカーゼ(TK0306)を有する。TK0306 オルソログを持つ好熱菌は TK0306 オルソログを持たない好熱菌に比べ生育下限温度が低い傾向がみられる。つまり *T. kodakarensis* 等の好熱菌においては、生育至適温度より低温環境での生育に TK0306 オルソログが関与していると考えられた。本研究では TK0306 の生理学的役割を明らかにするため破壊株を作製し生育に及ぼす影響を調べると共に、TK0306 遺伝子の誘導機構を調べることを目的とした。

【実験方法】
まず TK0306 破壊株を作製し、得られた破壊株及び野生株を硫黄添加培地および非添加培地で 60℃、85℃で培養し生育の違いを調べた。また TK0306 の誘導機構を解明するために、超好熱始原菌である *Pyrobaculum calidifontis* 由来のカタラーゼを用いたレポーターアッセイを構築した。プロモーターの上流及び下流から欠失を行い、低温ストレス下での特異的誘導に必要な制御領域の特定を試みた。

【実験結果】
硫黄添加培地および非添加培地で野生株と TK0306 破壊株を培養し 60℃と 85℃で生育解析を行った。硫黄添加培地では生育差が見られなかったが、非添加培地では 60℃において TK0306 破壊株は野生株に比べて溶菌するという特徴を示した。このことから TK0306 は低温環境下において水素発生系の遺伝子調節に関与している可能性が考えられる。またプロモーター検索用プラスミドに TK0306 プロモーター領域及びその上流領域（約 500bp）を挿入したプラスミドを作製し、転写量の検討を行ったところ、60℃特異的にカタラーゼ遺伝子の転写が見られた。これによりクローン化した領域は温度依存性を支配する領域が含まれると判断した。更に領域を限定すると、SD 周辺領域が低温誘導に関与していることが考えられた。そこで *T. kodakarensis* 内で恒常的に発現している GDH 遺伝子の SD 周辺領域と比較してみると TK0306 は SD から開始コドンまでにアデニンの連続配列が見られた。この配列を GDH の SD から開始コドンの間に挿入すると GDH に低温誘導性が付加された。このことからアデニンの連続配列は低温誘導性に必要な領域であることが示唆された。

Thermococcus kodakarensis, RNA helicase, cold-inducibe

講演番号：2B13p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ B 校舎 13 会場

超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* の二つの Transcription factor B の異なる役割
Different roles of two orthologous transcription factor B proteins in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*

○西川 諒[1]、秀瀬 涼太[2]、今井 友裕[2]、加藤 知[2]、跡見 晴幸[3]、金井 保[3]、片野 正展[3]、藤原 伸介[2]（[1]関学大理工、[2]関学大院理工、[3]京大院工）
○Ryo Nishikawa[1], Ryota Hidese[2], Tomohiro Imai[2], Satoru Kato[2], Haruyuki Atomi[3], Tamotsu Kanai[3], Masahiro Katano[3], Shinsuke Fujiwara[2] ([1]Kwansei-Gakuin Univ., [2]Kwansei-Gakuin Univ., [3]Kyoto Univ.)

【研究目的】アーキアの転写は、RNA ポリメラーゼ(RNAP)と主に二つの基本転写因子 TATA-binding protein (TBP)、Transcription factor B (TFB)によって行われる。アーキアの転写装置はユーカリアのそれと類似している一方、その制御機構はバクテリアのそれと類似している。すべてのアーキアはユーカリアの Pol II と類似した一種類のみの RNAP を有し、かつ異なる複数の TFB と TBP を有している。これら TFB と TBP の組み合わせにより多様な遺伝子の転写が調節されていると考えられる。超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* は二つの TFB（*TFB1*: TK1280、*TFB2*: TK2287）と一つの TBP（TK0132）を有している。アミノ酸配列の相同性解析から、TFB1 のホモログは *Thermococcus* 属や *Pyrococcus* 属のみに保存されていた。一方で、TFB2 のホモログは *Thermococcus* 属のほか、好熱菌や常温性メタン菌、好塩菌にわたるまで保存されていた。*in vitro* の転写実験では二つの TFB に転写活性化における違いは認められなかったが、それぞれの TFB の生理的役割に違いがあるかは明らかではない。本研究では、TFB1 と TFB2 の生理機能の解明を目的とした。

【結果】*TFB1* 破壊株と *TFB2* 破壊株を作製し、これらの *TFB* 破壊株を用いて 60℃、85℃、93℃での生育特性解析を行った。その結果、いずれの破壊株でも 93℃での生育が衰え、両者は高温における転写活性化に必要なことが推察された。各 *TFB* 遺伝子の転写量を調べたところ、*TFB1* は高温になるにつれて発現量が増えたが、*TFB2* 遺伝子では温度依存的な発現量の変化は認められなかった。*TFB1* 発現の高温依存性は *TFB2* 破壊株でもその傾向がみられた。これらの結果は、TFB1 が特に高温において重要な機能を有している事を示唆している。また、TFB1 あるいは TFB2 破壊株を 60℃、85℃、93℃で培養し、野生株に対し発現量が変動する遺伝子をマイクロアレイ解析により網羅的に調べた。*TFB1* 破壊株および *TFB2* 破壊株で発現変動する遺伝子群には明らかな違いが認められ、これら TFB が発現を支配する遺伝子は異なっていると考えられた。特に *TFB1* 破壊株は鞭毛形成に関わる遺伝子の転写量が著しく減少しており、本株のおける鞭毛形成が抑えられていることが予想された。そこで 85℃で培養した *TFB1* 破壊株と野生株 KU216 を電子顕微鏡で観察・比較し、鞭毛形成の変化を調べた。観察の結果、*TFB1* 破壊株では鞭毛の消失がみられた。このことから、TFB1 は鞭毛形成に関わる遺伝子の発現を特異的に制御していると考えられる。

Transcription factor B, flagellin, hyperthermophilic archaeon

講演番号：2B13p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ B 校舎 13 会場

超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の水素・硫化水素発生に関わる転写因子 Tk-SurR の転写制御機構

Transcriptional regulatory mechanism by the transcriptional regulator, Tk-SurR, involved in the generation of H_2/H_2S from a hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*

○川妻 孝平[1]、秀瀬 涼太[1]、今中 忠行[2]、藤原 伸介[1] ([1]関学大理工、[2]立命大生命科学)
○Kohei Kawazuma[1], Ryota Hidese[1], Tadayuki Imanaka[2], Shinsuke Fujiwara[1] ([1]Kwansei-Gakuin Univ., [2]Ritsumeikan Univ.)

【目的】超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* には、硫黄の有無で代謝•呼吸関連遺伝子の発現調節に関わる転写因子 *Tk*-SurR が存在する。硫黄含有培地では *Tk*-SurR の CXXC モチーフが酸化型となりその構造が変化する事で、DNA 結合能が失われることが知られている[Yang et al., Mol Microbiol., 77(5):1111-22 (2010)]。これまでに、マイクロアレイ解析で、*Tk*-SurR 破壊株で、野生株 KU216 と比べて顕著に転写量が増加した遺伝子として、TK1325-26 遺伝子クラスターを同定した。本遺伝子群は NADPH の生成に必須な Ferredoxin:NADP oxidoreductase(FNO)をコードしていると考えられ、本遺伝子のプロモーター領域の TATA-box の上流と下流に *Tk*-SurR の認識配列(GTTnnnAAC)が存在する。一方 *T. kodakarensis* には TK1325-26 のオルソログである TK1684-1685 が存在する。本遺伝子群のプロモーター領域も同様に TATA-box の上流と下流に *Tk*-SurR の認識配列が存在する。興味深い事に、マイクロアレイ解析から、*Tk*-SurR 破壊株で、TK1684-85 遺伝子は野生株 KU216 と比べて転写量が減少した。本研究では、２つの FNO 遺伝子の異なる発現動態に着目し、*Tk*-SurR によるそれら遺伝子の転写調節機構の解明を試みた。
【結果および考察】超好熱菌 *Pyrobaculum calidifontis* 由来カタラーゼ（*Pc*-Kat）をレポーターとし、*Pc*-Kat 遺伝子上流に TK1325-26 遺伝子あるいは TK1684-85 遺伝子のプロモーター領域を組み込んだレポータープラスミドを作成した。TK1325-26 遺伝子プロモーターの二つの *Tk*-SurR 結合配列(TATA-box の上流配列: aSBS1、TATA-box の下流配列 aSBS2)に機能欠損変異を導入した。また、TK1684-85 遺伝子プロモーターも同様に、TATA-box の上流配列（bSBS1）、TATA-box の下流配列(bSBS2)に機能欠損変異を導入した。各々の変異型プロモーターを有する形質転換体を培養し、生育した菌体の *Pc*-Kat の発現量を調べた。その結果、TK1325-26 遺伝子プロモーター領域の aSBS1 あるいは aSBS2 の破壊は *Pc*-Kat の発現を上昇させた。このことから両 aSBS はオペレーターとして働くことが示された。一方、TK1684-85 遺伝子プロモーターでは bSBS1 の破壊は発現を低下させ、bSBS2 の破壊は発現を上昇させた。bSBS1 はエンハンサーとして機能し、bSBS2 はオペレーターとして機能していると考えられる。TK1684-85 遺伝子プロモーターの TATA-box と bSBS1 の距離が、TK1325-26 遺伝子プロモーターの TATA-box と aSBS1 の距離と比較して 16 塩基長いため、その距離の違いが発現動態の違いを生み出していると予想された。

Transcriptional regulator, Hyperthermophilic archaeon, H_2/H_2S generation

講演番号：2B13p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ B 校舎 13 会場

超好熱･好酸性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* におけるアミノ酸生合成酵素の転写調節機構の解析
Analysis of transcriptional regulation of amino acid biosynthetic genes in thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*

○秋山 渚、富田 武郎、葛山 智久、西山 真（東大・生物工学セ）
○Nagisa AKIYAMA,Takeo TOMITA,Tomohisa KUZUYAMA,Makoto NISHIYAMA (Univ.Tokyo)

【目的】バクテリアは一般にジアミノピメリン酸を経由してリジンを生合成することが知られているが、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* はα-アミノアジピン酸（AAA)を経由する新規のリジン生合成経路によりリジンを生合成することが明らかとなっている。AAA 経路の前半を構成する酵素はロイシン生合成や TCA 回路の一部と相同性を有し、後半部分の酵素はアルギニン生合成経路の一部と相同性を有することから、アミノ酸生合成の進化を明らかにする上での格好の対象であると考えられている。超好熱・好酸性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* は *T. thermophilus* と同様に AAA 経路によってリジンを生合成し、AAA 経路の後半を構成する遺伝子群の一部（*lysZYJK*）がアルギニン生合成経路の一部（LysW-Glu から Orn への変換）も担う bi-functional な機能を有することが本研究室により明らかになっている。また、同遺伝子群は *Sulfolobus* 属の同クラスター内に見られる転写調節因子 LysM を介してリジンによって転写調節を受けることがこれまでに明らかにされている。一方で、AAA 経路の前半を構成すると予想される遺伝子群はそのホモログであるロイシン生合成遺伝子や TCA 回路の一部の遺伝子も含め、すべてゲノム上で個別に存在しており、それらの機能とともに調節機構に関しても不明な状況である。本研究ではリジン生合成を中心に、各アミノ酸生合成経路酵素遺伝子の転写調節機構を明らかにし、それらの細胞内機能を解明することを試みた。
【方法と結果】対数増殖中期に 1 mM のリジンまたはアルギニンを添加してから 24 時間培養を行った *S. acidocaldarius* の菌体から total RNA を抽出し、HCS ホモログである *Saci_1304* について qRT-PCR を行った。*Saci_1304* の転写量は、リジン添加時に添加していないサンプルと比べて 10 分の 1 程度に抑えられた一方、アルギニンによる転写量の変動は見られなかった。*Saci_1304* の転写ユニットを同定する目的で上流、下流領域について RT-PCR を行った。その結果、*Saci_1305* から *Saci_1302* までで形成される転写ユニットが存在することが示唆された。そこで、転写因子 LysM が *Saci_1304* をはじめリジン生合成前半部を後半部同様に制御している可能性を考え、*Saci_1304* 上流や、転写開始点と思われる領域付近をプローブとしたゲルシフトアッセイを行った。その結果、*Saci_1304* 上流への LysM の弱い結合が見られたが、結合には高濃度の LysM を必要とし LysM は *Saci_1304* を制御する主な因子ではないことが示唆された。本発表では *Saci_1304* の転写調節様式や、ロイシン生合成遺伝子群など他のアミノ酸生合成酵素遺伝子の転写調節解析に関しても発表する予定である。

transcriptional regulation, lysine biosynthesis, Sulfolobus acidocaldarius

講演番号：2B13p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ B 校舎 13 会場

細菌における転写後制御による環境適応機構

Adaptation to environmental changes via posttranscriptional regulation in bacteria

○藤本 めぐみ、徳元 舶、前田 理久（明治大学大学院）
○MEGUMI FUJIMOTO,WATARU TOKUMOTO,MICHIHISA MAEDA (Meiji Univ.)

環境汚染物質 PCB を分解する *Alcaligenes denitrificans* A41 株は、PCB/ビフェニル分解を担う *bph* 遺伝子群を上流から *bphE*, *bphG*, *bphF*, *orf4*, *bphA1*, *bphA2*, *bphA3*, *bphB*, *bphC*, *bphD*, *orf1*, *bphA4* という順でクロモソーム上に保持している。これまでに、*bph* 遺伝子群は *bphE* 上流に存在する P_E プロモーターから一つの転写単位(*bph* mRNA)として転写され、転写後に *bphF-bphA1* 間および *bphB* 遺伝子内領域の少なくとも 2 か所で RNase E による切断を受けて別々の RNA セグメントへと分断されること、切断された各 RNA セグメント間で安定性が異なっており、*bph* 遺伝子群の各遺伝子産物の量的制御が転写後調節によって行われていることが示唆されている。

当研究室では、転写後調節の詳細な分子機構を解明し、この機構を保持するバクテリアにとっての意義を明らかにすることを目的として研究を行っている。この目的に対して RNase E による切断を受けない株を構築するために *bphF-bphA1* 間領域に存在する *orf4* を完全に欠損させた *orf4* null 株の構築を行った。

orf4 null 株の構築には *bphF* 領域内に組込まれたターミネーターによってビフェニル単一炭素源での生育ができない A41-*F(TER)*株を用いた。*orf4* を完全に取り除いた領域(*bphG-bphF-bphA1*)をもつ DNA 断片を用いて、A41-*F(TER)*株クロモソームの相同組換えを行った。ダブルクロスオーバーの起きた株は *orf4* 領域と同時にターミネーター領域も欠損することからビフェニル単一炭素源での生育が可能となることが予想される。この組換え体の特徴を利用したビフェニル単一炭素源での集積培養および選択によって、*orf4* null 株を獲得した。A41 野生株と *orf4* null 株をビフェニル単一炭素源で培養したところ、*orf4* null 株は野生株よりも良好な生育が見られ、最終的な培養液の濁度でも *orf4* null 株の方が野生株より高くなった。現在、この株を用いてビフェニル分解能に対する影響、*bph* mRNA の切断パターンおよび安定性、Bph タンパク質発現量の解析を行なっている。

posttranscriptional regulation, RNase E, PCB/bphenyl

講演番号：2B13p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ B 校舎 13 会場

Paracoccus sp. 43P 株の L-gluconate 代謝関連遺伝子の発現制御機構の解析
Transcriptional regulation of L-gluconate catabolic genes in *Paracoccus* sp. 43P
○清水 哲、中村 顕（筑波大院生命環境）
○Tetsu Shimizu,Akira Nakamura (Tsukuba Univ.)

【序論】我々は、筑波大学周辺土壌より単離した L-グルコース資化菌 *Paracoccus* sp. 43P 株の L-グルコース代謝経路の解析を行い、同代謝経路の全貌を明らかにした [1)]。同代謝経路は L-グルコースの 1 位の酸化による L-gluconate への変換と、*lgn* 遺伝子群(*lgn* cluster)による L-gluconate 以降の代謝により構成されていた。*lgn* cluster の上流には、cluster とは逆向きに IclR family の転写調節因子をコードする *lgnR* が存在しており、*lgn* cluster の転写調節に関与していることが推察された。今回は *lgn* cluster の転写制御機構について解析を行ったので報告する。
【方法】接合伝達を用いた相同組換えにより *lgnR* 破壊株を作製し、*lgn* cluster の発現に及ぼす影響を解析した。また RT-PCR により *lgn* cluster の転写ユニット解析を行い、転写開始点を 5'-RACE 法により決定した。さらに *lgnR* を大腸菌を宿主として発現させ、ゲルシフトアッセイ、DNase I footprint 法により LgnR とプロモーター領域の結合を解析した。
【結果・考察】*lgn* cluster 内の *lgnH* にコードされる L-gluconate dehydrogenase 活性は、野生株では L-gluconate 存在下で誘導され、D-glucose により抑制されていたが、*lgnR* 破壊株では炭素源によらず恒常的に誘導されていた。また *lgnR* 破壊株では、*lgn* cluster 内の *lgnA*、*lgnH* のみならず *lgnR* 自身の転写量が大きく上昇していた。これらの結果から *lgnR* が *lgn* cluster 及び *lgnR* 自身の発現を抑制するリプレッサーをコードしていることが予想された。RT-PCR 解析により、*lgn* cluster が実際にオペロンとして転写されていることを明らかにし、5'-RACE 法により *lgnR*、*lgnA* 上流の転写開始点を同定した。
次にゲルシフトアッセイにより、LgnR が *lgnA*、*lgnR* のプロモーター領域にそれぞれ結合することを明らかにした。さらに LgnR と両プロモーター領域との結合が中間代謝物である D-idonate の存在下で阻害されたことから、D-idonate が *lgn* cluster の LgnR による発現抑制の解除に必要なインデューサーであることが明らかとなった。また DNase I footprint 法により、LgnR がプロモーター領域のどの部分に結合しているのか検討したところ、LgnR は特定の配列ではなく二つのプロモーター領域全体に結合していることが示された。以上の結果から、LgnR は *lgnA*、*lgnR* のプロモーター領域に結合して RNA ポリメラーゼの結合を阻害することにより、それらの転写を抑制しており、D-idonate の存在下ではその抑制が解除されることが示された。

[1)] T. Shimizu, N. Takaya and A. Nakamura. An L-glucose catabolic pathway in *Paracoccus* species 43P. *J. Biol. Chem*., 287, 40448-40456, 2012.

transcriptional regulation, L-gluconate, iclR

講演番号：2B13p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ B 校舎 13 会場

Sphingobium sp. SYK-6 株におけるバニリン酸およびシリンガ酸代謝系遺伝子の転写制御
Transcriptional Regulation of Vanillate and Syringate Catabolism in *Sphingobium* sp. Strain SYK-6

○梅田 周佑[1]、笠井 大輔[1]、上村 直史[1]、原 啓文[2]、福田 雅夫[1]、政井 英司[1]（[1]長岡技科大・生物、[2]岡山理大工・生体）
○ Shusuke UMEDA[1], Daisuke KASAI[1], Naofumi KAMIMURA[1], Hirofumi HARA[2], Masao FUKUDA[1], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]Okayama Univ. Sci.)

【目的】*Sphingobium* sp. SYK-6 株は、様々なリグニン由来の二量体化合物をバニリン酸(VA)又はシリンガ酸(SA)を経由して代謝する。VA は LigM により脱メチルされプロトカテク酸(PCA)へと変換され、PCA 4,5-開裂経路によって代謝される。SA は DesA による脱メチルを受けて 3-*O*-メチルガリック酸(3MGA)に変換された後、3MGA 3,4-dioxygenase (DesZ)と PCA 4,5-dioxygenase (LigAB)により芳香環開裂を受ける経路と、LigM による脱メチルを受けてガリック酸(GA)へと変換された後、GA dioxygenase (DesB)と LigAB により環開裂を受ける経路で代謝される。これらの内、*ligM* と *desB* が関与する経路が重要な役割を担うことが示されている。一方、SA 代謝系遺伝子の転写制御については、*desB* において若干の解析がなされ、*desB* の転写が SA 存在下で誘導されること、そして転写制御に関わるプロモーター領域が示されている。本研究では、VA 及び SA 代謝系遺伝子の転写制御機構を明らかにすることを目的として、*desA* と *ligM* の転写誘導性の評価と *desB* の転写制御因子の同定を行った。
【方法】VA 及び SA 存在下又は非存在下で培養した SYK-6 株から単離した全 RNA を鋳型に用いて、定量的 reverse transcription (qRT)-PCR 解析を行った。ビオチン標識した *desB* プロモーター領域を含む DNA 断片と SYK-6 株の細胞抽出液を混合後、ストレプトアビジンビーズを用いて *desB* プロモーター結合タンパク質を単離した。SDS-PAGE によって分離した結合タンパク質をトリプシン消化し、MALDI-TOF- MS 分析によりタンパク質を同定した。ゲルシフト解析は、精製した His-tag 融合タンパク質とジゴキシゲニン標識した *desB* プロモーター断片を用いて行った。SYK-6 株の *desB* 転写制御因子の候補遺伝子を相同組換えにより破壊し、破壊株の VA 及び SA での生育能を調べた。
【結果】qRT-PCR 解析により *desA*、*ligM*、*desB* の転写量を測定した結果、VA 及び SA での培養時に各遺伝子の顕著な転写誘導が観察され、これら遺伝子が同一の転写制御を受ける可能性が考えられた。SYK-6 株の細胞抽出液から単離した *desB* プロモーター結合タンパク質の MALDI-TOF-MS 解析の結果、MarR 型転写制御因子及び LysR 型転写制御因子とそれぞれ相同性を示す *SLG_12870* と *SLG_14170* が同定された。ゲルシフト解析の結果、*SLG_12870* 遺伝子産物が *desB* プロモーター領域と特異的に結合することが示され、本遺伝子を *desR* と命名した。SYK-6 株の *desR* 破壊株は、VA 及び SA 培地上で野生株よりも早く生育したことから、本遺伝子が VA と SA 代謝系遺伝子の転写を負に制御することが示唆された。現在、*desR* 破壊株における *desA*、*ligM*、*desB* の転写解析を行うと共に、*SLG_14170* の *desB* の転写制御への関与について解析を進めている。

lignin, transcriptional regulation, *Sphingobium*

講演番号：2B13p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ B 校舎 13 会場

コリネ型細菌における転写制御因子 RamA の発現制御機構

Transcriptional regulation of the global regulator RamA in *Corynebacterium glutamicum*

○豊田 晃一、寺本 陽彦、乾 将行、湯川 英明 (RITE)
○Koichi TOYODA,Haruhiko TERAMOTO,Masayuki INUI,Hideaki YUKAWA (RITE)

【目的】我々は有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* における中央代謝系の調節機構の解明を目的として、関連酵素遺伝子の発現制御機構の解析を進めており、様々な転写因子の関与を明らかにしてきた。解糖系酵素 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase をコードする *gapA* は 3 つのグローバルレギュレーターGlxR、SugR、RamA によって、複数の生体内外のシグナルに応じて発現が制御されている。これら転写因子自身の発現制御機構の解析から、何れも負の自己制御を受けることが示されている。また、RamA は *sugR* の転写活性化因子として機能する。*ramA* 遺伝子のプロモーター領域には RamA 自身に加え SugR、GlxR が結合するが、その制御機構は明らかとなっていない [1, 2]。本研究では SugR、GlxR による *ramA* の発現制御機構を明らかにすることにより *C. glutamicum* における転写制御ネットワークを解明することを目的とした。

【方法と結果】*in vitro* DNA 結合解析により各転写因子が *ramA* 遺伝子上流へ結合することを確認した。レポーターアッセイを用いて野生株、 *sugR*、 *ramA*、*sugR-ramA* 破壊株における *ramA* プロモーター活性を測定した。どの破壊株も野生株より高い活性を示したことから RamA および SugR は抑制因子として機能していることが示された。*ramA* 破壊株と *sugR-ramA* 破壊株はほぼ同程度のプロモーター活性を示したことから、*ramA* 破壊株において RamA、SugR 両方による抑制が外れていることが示唆された。これは RamA が *sugR* の活性化因子であることと一致する。*glxR* 遺伝子破壊株は顕著な生育低下を示すため、GlxR 結合サイトへ変異を導入した *ramA* プロモーターの活性を測定することで GlxR の機能を推定した。この変異により野生株ではプロモーター活性が消失し、*sugR*、*ramA*、*sugR-ramA* 破壊株ではその活性が半減した。これらの結果から、GlxR は活性化因子として機能することが示された。これまでの知見と合わせることにより、GlxR を頂点とした転写制御ネットワーク構造が見出された。本研究の一部は NEDO の委託研究の一環として行われたものである。

1) J Bacteriol (2008) 190, 8033.
2) J Bacteriol (2011) 193, 4123.

Corynebacterium glutamicum, global regulator, transcriptional regulation

講演番号：2B13p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ B 校舎 13 会場

コリネ型細菌におけるアラビノース利用遺伝子の発現制御機構
Transcriptional regulation of arabinose utilization genes in *Corynebacterium glutamicum*
○久下 貴之[1]、寺本 陽彦[2]、乾 将行[2]、湯川 英明[2]([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Takayuki KUGE[1], Haruhiko TERAMOTO[2], Masayuki INUI[2], Hideaki YUKAWA[2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】当研究室では、有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* の糖利用能の向上を目指し、関連遺伝子の機能および発現制御機構の解析を進めてきた。その中で ATCC 31831 株がアラビノース資化能を有することを見い出し、その代謝酵素遺伝子 *araBDA* を同定した[1]。また C5 糖トランスポーター遺伝子 *araE* が、リグノセルロース系バイオマスを原料とした高効率バイオプロセスのキーとなる C6･C5 混合糖同時利用に有効に活用できることを示した[2]。本研究では、これらアラビノース利用系遺伝子の発現制御機構の解析を行った。
【方法と結果】*C. glutamicum* ATCC 31831 株のゲノム上では、*araBDA* と *araE* は、LacI ファミリーの転写因子をコードする *araR* とクラスターを形成している。RT-PCR 解析により、これらの遺伝子はアラビノース添加後 5 分で顕著に発現が誘導されることが示された。これに対して、*araR* 破壊株をアラビノース非存在下で培養した場合、*araBDA* と *araE* の mRNA レベルは高く保たれている。また、*in vitro* DNA 結合解析により AraR タンパク質が *araA*･*araE* 遺伝子の上流域に特異的に結合し、アラビノース添加によりその結合が阻害されることが確認された。これらの結果から、AraR がアラビノース代謝に関わる遺伝子の転写抑制因子として働き、アラビノースによる発現誘導を直接的に制御することが明らかになった。
1) Appl Environ Microbiol (2009) 75, 3419.
2) Appl Microbiol Biotecnol (2009) 85, 105.

Corynebacterium glutamicum, sugar metabolism, transcriptional regulation

講演番号：2B13p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ B 校舎 13 会場

コリネ型細菌におけるシグマ因子 SigE を介したイソブタノールストレス応答

Isobutanol stress response mediated through SigE in *Corynebacterium glutamicum*

○辻本 敏博[1]、豊田 晃一[2]、寺本 陽彦[2]、乾 将行[2]、湯川 英明[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Toshihiro TSUJIMOTO[1], Koichi TOYODA[2], Haruhiko TERAMOTO[2], Masayuki INUI[2], Hideaki YUKAWA[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】イソブタノールは高エネルギー密度、低吸湿性、低腐食性であることから、エタノールに代わる次世代のバイオ燃料として期待されている。しかし低濃度でも微生物細胞の増殖や機能に悪影響を及ぼすことが知られており、この細胞毒性の強さが微生物を用いた生産技術の開発において大きな障壁となっている。高効率生産株の構築には、イソブタノールストレスに対する応答機構を解明することが重要である。我々は、有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* におけるイソブタノールストレス応答の解析を進めている。トランスクリプトーム解析の結果から、イソブタノールストレスにより ECF シグマ因子 SigE の発現が誘導されることが分かった。*sigE* 破壊株は、SDS などの細胞表層ストレスに対する耐性が低下することが知られている。しかし SigE の発現制御機構およびターゲット遺伝子については大部分が不明である。本研究では、イソブタノールストレス応答における SigE の役割について解析を行った。
【方法と結果】SigE およびそのアンチシグマ因子である CseE の遺伝子欠損株を作製し、イソブタノール存在下(0%~2%)における生育を調べた。*sigE* 欠損株の生育はいずれの濃度においても野生株と同等であったが、*cseE* 欠損株では 1.5%イソブタノール存在下における生育速度が低下した。アンチシグマ因子はシグマ因子の活性抑制因子であることから、SigE の活性化はイソブタノール耐性を低下させることが示唆された。野生株におけるトランスクリプトーム解析により見出したイソブタノール応答性遺伝子の発現制御と SigE との関連を調べるため、イソブタノール暴露後の *sigE* および *cseE* 欠損株についてマイクロアレイを用いてトランスクリプトーム解析を行った。2%イソブタノール添加前および添加 10 分後の細胞から全 RNA を抽出してマイクロアレイに供した。その結果、野生株においてイソブタノールに応答して発現が上昇した 483 遺伝子のうち 18 遺伝子は、*sigE* 欠損株においてイソブタノールに応答した発現の上昇が消失した。一方 *cseE* 欠損株では、イソブタノール添加前におけるこれら 18 遺伝子の発現量は野生株よりも高く、イソブタノール添加後においても発現量は野生株と同程度以上であった。このことから、イソブタノールストレス応答において、SigE はこれら 18 遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。18 遺伝子には、膜タンパク質や加水分解酵素などをコードする遺伝子が含まれていた。

Corynebacterium glutamicum, Isobutanol stress response, Sigma factor

講演番号：2B13p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ B 校舎 13 会場

コリネ型細菌における亜鉛恒常性遺伝子の発現制御機構
Transcriptional regulation of zinc homeostasis genes in *Corynebacterium glutamicum*
○寺本 陽彦、乾 将行、湯川 英明（RITE）
○Haruhiko TERAMOTO,Masayuki INUI,Hideaki YUKAWA (RITE)

【目的】必須微量元素である亜鉛は過剰に存在すると細胞毒性を示すため、厳密な恒常性制御が必要とされる。多くの細菌では、亜鉛欠乏条件における亜鉛取り込み系遺伝子の発現誘導が、転写因子 Zur によって制御されることが知られている。Zur は亜鉛依存的にプロモーター領域に結合することにより転写を抑制する。我々は、有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* の代謝調節機構を解明するため、様々な物質代謝遺伝子の発現制御機構の解析を進めてきた。本研究では、多くの代謝酵素に必要とされる亜鉛の本菌における恒常性制御についての知見を得るため、亜鉛耐性に関わる輸送体遺伝子を同定し、その亜鉛応答発現制御における Zur の役割を解析した。
【方法と結果】細菌において、cation diffusion facilitator （CDF）ファミリーと P-type ATPase ファミリーに属する様々な金属排出体が報告されている。*C. glutamicum* R ゲノム上には、3 個の CDF 遺伝子と 9 個の P-type ATPase 遺伝子が存在する。これらの遺伝子の RT-PCR 解析の結果、1 個の CDF 遺伝子と 3 個の P-type ATPase 遺伝子の発現が亜鉛により促進されることが示された[1,2]。このうち、*zrf*（CDF 遺伝子）と *zra*（P-type ATPase 遺伝子）の欠損により亜鉛耐性が低下することを確認した。*zur* 遺伝子の欠損により、*zrf* と *zra* の mRNA レベルが上昇し、亜鉛に対する応答が消失した。また、*in vitro* DNA 結合解析により、Zur が *zrf* および *zra* のプロモーター領域に結合し、この結合は亜鉛添加によって阻害されることが示された。これとは対照的に、*znuB2*（亜鉛取り込み系 ABC 輸送体遺伝子）のプロモーター領域に対する Zur の結合は亜鉛添加により促進されることを確認した。これらの結果から、*C. glutamicum* において、Zur が亜鉛取り込み系遺伝子と排出系遺伝子の転写抑制因子として働き、それらのプロモーター領域に対する結合様式の違いにより亜鉛による誘導と抑制の双方を制御することが示唆された。
本研究の一部は NEDO の委託研究の一環として行われたものである。
1) Biosci Biotechnol Biochem (2012) 76, 1952.
2) FEBS J (2012) 279, 4385.

Corynebacterium glutamicum, zinc homeostasis, transcriptional regulation

講演番号：2B13p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ B 校舎 13 会場

Rhodococcus jostii RHA1 におけるカテコール分解遺伝子の導入による PCB 分解遺伝子群転写活性の強化

Enhancement of the transcriptional activity of the PCB degradation genes in *Rhodococcus jostii* RHA1 by the introducing of catechol degradation gene

○伊藤 拓[1]、遠藤 銀朗[2]、福田 雅夫[3]、宮内 啓介[2]（[1]東北学院大院工、[2]東北学院大工、[3]長岡技大生物）

○taku itou[1], Ginro Endo[2], Masao Fukuda[3], Keisuke Miyauchi[2]（[1]Graduate School of Tohoku Gakuin Univ., [2]Tohoku Gakuin Univ., [3]Nagaoka Univ. Tech.）

【目的】ポリ塩化ビフェニル(以下 PCB)は、発癌性、ホルモン異常、内臓障害、胎児への催奇性など生物に対する有害性を示す難分解性の環境汚染物質として知られている。これまでに、PCB 汚染の微生物を用いた浄化を目的として、PCB 分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 が単離され、その PCB 分解経路、および分解に関与する遺伝子群(*bph* 遺伝子群)が明らかにされている。RHA1 株はビフェニルとの共代謝によって PCB を分解し、高塩素置換の PCB も分解可能という特徴を持つ。これまでの研究で、ビフェニルの分解産物である安息香酸を添加するとビフェニル存在下でのビフェニル分解遺伝子群の転写活性化が抑制されること、転写活性化抑制の原因物質が安息香酸の代謝産物であるカテコールであることを明らかにした。これらの知見をもとに、本研究では *bph* 遺伝子群の転写活性化抑制の原因物質であるカテコールの分解遺伝子 *catA* を RHA1 株で高発現させ、*bphAa* の転写活性、およびビフェニルを単一炭素源にしたときの生育を観察した。

【方法】*catA* 高発現用プラスミドとして、*catA* 遺伝子の上流に構成的に発現するカナマイシン耐性遺伝子のプロモーター領域を組み込んだプラスミドを用いた。レポータープラスミドとして、ルシフェラーゼ遺伝子の上流に *bphAa* プロモーター領域を組み込んだプラスミドを用いた。これらのプラスミドを RHA1 株に導入し、ルシフェラーゼ活性を指標として、ビフェニル存在下、およびビフェニルと安息香酸存在下での *bphAa* 転写活性を *catA* 高発現の有無で比較した。また、ビフェニルを単一炭素源として加えた M9 培地における野生株と *catA* 高発現株の生育を、濁度(A_{660})を 15 分ごとに測定することで比較した。

【結果】安息香酸を単一炭素源として利用できない RHA1 の *catA* 破壊株に、*catA* 高発現プラスミドを導入して *catA* を相補したところ、安息香酸を単一炭素源とした生育が観察されたことから、*catA* 高発現プラスミドの *catA* が RHA1 株において発現していることが確認された。さらに *bphAa* 転写活性の観察により、野生株において安息香酸存在下で見られる活性化抑制が *catA* 高発現株では解除されることが明らかになった。また、ビフェニルを単一炭素源とした場合の生育能は、*catA* 高発現株が野生株を上回っていることが観察された。これらの結果により、RHA1 株において *catA* を高発現することで *bphAa* プロモーター活性のカテコールによる抑制が解除され、ビフェニルの代謝能が向上することが示唆された。

PCB, Rhodococcus, catabolite repression

講演番号：2B13p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ B 校舎 13 会場

光合成土壌細菌 Rhodopseudomonas palustris における安息香酸化合物の嫌気的分解とその制御因子 BadR の機能解析

Anaerobic benzoate degradation in the photosynthetic soil bacterium, Rhodopseudomonas palustris and its regulatory element, BadR

○平川 秀忠[1,3]、平川 裕子[2,3]、FIXEN Kathryn R.[3]、GREENBERG E. Peter[3]、HARWOOD Caroline S.[3] ([1]群馬大先端科学ユニット、[2]群馬大薬剤耐性菌実験施設、[3]ワシントン大)
○Hidetada HIRAKAWA[1,3], Yuko HIRAKAWA[2,3], Kathryn R. FIXEN[3], E. Peter GREENBERG[3], Caroline S. HARWOOD[3] ([1]Gunma Univ., [2]Gunma Univ., [3]Univ. Washington)

光合成土壌細菌である *Rhodopseudomonas palustris* は、様々な芳香族化合物を嫌気的に分解できる。芳香族化合物は生体エネルギーもしくは炭素源として、中間代謝物である Benzoyl-CoA を介して、２段階のプロセスで Pimelyl-CoA へと還元・分解される。これまでに我々は Benzoyl-CoA から Pimelyl-CoA までの変換に関わる酵素群とその中間体を同定した。Benzoyl-CoA は Benzoyl-CoA レダクターゼ BadDEFG によって Cyclohexene-carboxyl-CoA へと脱芳香化される（１段階目）。さらに、BadK, BadH, BadI の一連の反応によってシクロヘキセン環が還元・開裂され、Pimelyl-CoA に変換される（２段階目）。しかしながら、これらの嫌気的分解がどのように制御されているのかは明らかになっていなかった。今回、BadK, BadH, BadI の発現制御に関わる因子 BadR を発見したので報告する。

badR 遺伝子は *badH-badI-badK* オペロンの上流に存在している。その遺伝子産物 BadR は MarR family の転写制御因子と相同性の高いアミノ酸配列を有していた。*badH-badI-badK* オペロンの転写量は分解基質となる芳香族化合物存在下で誘導されるが、*badR* 遺伝子欠損株では芳香族化合物非存在下においても高い転写活性を示した。*badR* 遺伝子をサブクローニングし、大腸菌内で BadR を過剰発現させ、精製を行った。ゲルシフトアッセイおよび、DNaseI フットプリンティング解析によって、BadR 精製蛋白質は *badH* プロモーター上にある RNA ポリメラーゼ結合領域に直接結合することが分かった。さらに、Cyclohexene-carboxyl-CoA から Pimelyl-CoA へと代謝される際に生じる中間体である 2-oxo-cyclohexane carboxyl-CoA を加えると BadR の結合能が消失した。

以上の結果から、芳香族化合物（分解基質）非存在下においては少なくとも BadH-BadI-BadK の発現は BadR によってタイトに抑制されている。しかしながら、芳香族化合物が存在し、分解が進み代謝中間体 2-oxo-cyclohexane carboxyl-CoA が細胞に蓄積するに伴い、脱抑制されると推測される。従って、*R. palustris* にとって、BadR 制御系は必要に応じて、芳香族基質から効率的に生体エネルギーと炭素源を取り出すための代謝制御戦略の一つであると考えられる。

Anaerobic, biodegradation, MarR repressor

講演番号：2B13p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ B 校舎 13 会場

異なる糖で培養したセルロソーム生産菌 *Clostridium cellulovorans* 743B の比較 RNA-seq 解析
Comparative RNA-seq analysis of the cellulosome producing *Clostridium cellulovorans* 743B cultivated in different sugar media

○高嶋 和也[1]、石川 卓[1]、黒田 浩一[2]、植田 充美[2]、三宅 英雄[1,3,4] ([1]三重大院生資、[2]京大院農・応用生命、[3]三重大・生命支セ、[4]三重大・新産業)
○Kazuya Takashima[1], Takashi Ishikawa[1], Kouichi Kuroda[2], Mitsuyoshi Ueda[2], Hideo Miyake[1,3,4] ([1]Dept. Life Sci., Grad. Sch. Biores., Mie Univ., [2]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Dept. Bioinfo. Life Sci. Center, Mie Univ., [4]Indust. Technol. Innova. Inst., Mie Univ.)

【背景・目的】嫌気性菌である *Clostridium cellulovorans* はセルロソームと呼ばれる超タンパク質複合体を生産し、ソフトバイオマスを効率よく分解することができる。セルロソームは足場タンパク質と数種類のセルロソーム形成可能な酵素やタンパク質から構成されており、*C. cellulovorans* は炭素源に応じてこれらの酵素やタンパク質の種類を変化させる。当研究グループにおいて *C. cellulovorans* のゲノム解析は完了しており [1)]、セルロソーム関連遺伝子や分泌型の酵素であるノンセルロソームに関連した遺伝子の同定を行った [2)]。そこで、炭素源にグルコース、セロビオース、カルボキシメチルセルロース、キシラン、マンナン、ローカストビーンガム、ペクチンを用いた時の RNA-seq 解析を行い、セルロソームやノンセルロソーム関連遺伝子の発現パターンを明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】炭素源としてグルコース、セロビオース、カルボキシメチルセルロース、キシラン、マンナン、ローカストビーンガム、ペクチンの 7 種類の糖を用いて培養を行った。これらの糖のいくつかは不溶性であり、また、*C. cellulovorans* の菌体は凝集する性質があるため、各培養液の ATP 量の経時変化を測定することで菌体の増殖量の経時変化を見積もった。それぞれの菌体は対数増殖期で回収し、total RNA の抽出を行った。その後、得られた total RNA から RNA-seq ライブラリーを作製し、次世代シークエンサーに供した。シークエンスから得られたリード配列をゲノム配列にマッピングし、遺伝子ごとにリードとその数を集計した。また、遺伝子ごとに配列長が異なるため、マッピングされたリード数の正規化を行った。

C. cellulovorans は、足場タンパク質である *CbpA* 遺伝子と 8 種類の糖質関連酵素遺伝子を含む巨大なクラスターを形成することが先行研究およびゲノム解析から明らかになっている。グルコース、セロビオース、カルボキシメチルセルロースのようなグルコース、セルロース系の糖を用いた時、*cbpA* 遺伝子とその下流に位置する遺伝子が高い発現量を示した。また、キシラン、マンナン、ローカストビーンガム、ペクチンのようなヘミセルロース系の糖を用いた時、キシラナーゼなどのヘミセルラーゼ遺伝子が高い発現量を示した。これらの結果から、セルロソーム、ノンセルロソーム関連遺伝子の発現量や発現パターンは、培養に用いた糖の種類によって異なることが明らかになった。

1) Y. Tamaru *et al*., *Journal of Bacteriology*, 192, 901-902 (2010)
2) Y. Tamaru *et al*., *Microbial Biotechnology*, 4, 64-73 (2011)

cellulosome, RNA-seq, *Clostiridium*

講演番号：2B13p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ B 校舎 13 会場

プラスミドを保持した際の宿主細胞応答のプラスミド間比較

Comparison of impacts of plasmid carriage on *Pseudomonas putida* KT2440 between IncP-7 plasmid pCAR1, IncP-1 plasmid RP4 and IncP-9 plasmid NAH7

○高橋 裕里香[1]、新谷 政己[2]、山根 久和[3]、岡田 憲典[1]、津田 雅孝[4]、野尻 秀昭[1] ([1]東大・生物生産セ、[2]静大・工、[3]帝京大・バイオ、[4]東北大院・生命科)
○ Yurika TAKAHASHI[1], Masaki SHINTANI[2], Hisakazu YAMANE[3], Kazunori OKADA[1], Masataka TSUDA[4], Hideaki NOJIRI[1] ([1]BRC, Univ. Tokyo, [2]Fac. Eng. Shizuoka Univ., [3]Teikyo Univ., [4]Tohoku Univ.)

【背景・目的】プラスミドは宿主に新規形質を与えるが、同時に宿主の生育にとって大きな“負荷”となる場合があることは古くから経験的に知られている。これまで発表者らは、カルバゾール分解プラスミド pCAR1[不和合性（Inc）P-7 群、200 kb]を保持する 3 種の *Pseudomonas* 属細菌を用い、プラスミド保持株と非保持株の表現型・転写レベルの比較によって、プラスミドを保持した宿主の変化の実体を明らかにしてきた。プラスミド上の遺伝子の転写が加わるだけでなく、染色体上遺伝子の転写も変動して宿主細菌にさらなる影響を及ぼすこと、その負荷の大きさは宿主によって異なることを報告している（高橋ら、昨年度本大会）。しかしこの現象が他のプラスミドを用いた場合にどの程度共通するのかは不明であった。そこで本研究では、プラスミドによる宿主染色体の転写変動を異なるプラスミド間で比較することを目的とした。
【方法・結果】異なるシングルコロニーに由来する *P. putida* KT2440 株（#2, #4、以下別の系統として扱う）に、pCAR1、多剤耐性プラスミド RP4（IncP-1、60 kb）、ナフタレン分解プラスミド NAH7（IncP-9、82 kb）をそれぞれ保持させた。3 種のプラスミド保持株及び親株を、コハク酸を唯一の炭素源としてそれぞれ液体培養し、対数期と定常期においてトランスクリプトーム解析を行った。各プラスミドを保持した際に 2 倍以上転写変動した遺伝子の数を系統ごとに集計し、系統間で共通する遺伝子の個数を調べたところ(Table 1)、予想に反し系統間で大きな差異が見られた。RP4 保持株では転写変動した遺伝子のうち約半数が 2 つの系統で共通であった。pCAR1 保持株では転写変動した遺伝子の数は RP4 保持株よりも少ないものの、その種類は系統間で大きく異なった。NAH7 保持株では、1 系統(#4)では転写変動した遺伝子の数が 3 株中最も少なかった一方で、もう 1 系統(#2)では 3 株中最も多くの遺伝子が転写変動しており、系統間で共通に転写変動した遺伝子は少なかった。ここから、RP4 は宿主に比較的大きな負荷を与えるもののその内容は系統間でよく似ている一方で、pCAR1 は宿主に与える転写変動が小さいものの系統間でその内容が変化しやすく、NAH7 では宿主に与える転写変動の大きさ自体が系統間で大きく異なる、というプラスミドによる違いが見出された。

Table 1. 各プラスミドを保持した際に転写変動した遺伝子の数 (fold change ≥ 2)

	RP4				pCAR1				NAH7			
	対数期		定常期		対数期		定常期		対数期		定常期	
	誘導	抑制	誘導	抑制	誘導	抑制	誘導	抑制	誘導	抑制	誘導	抑制
系統#2	97	159	251	136	61	134	90	51	419	193	1185	96
系統#4	64	114	251	108	104	45	22	44	58	39	1	30
#2と#4で共通	**26**	**61**	**133**	**57**	**20**	**1**	**2**	**4**	**27**	**14**	**1**	**0**

plasmid, *Pseudomonas*, transcriptome

講演番号：2B13p17
講演日時、会場：3 月 25 日 17:12～ B 校舎 13 会場

バイオフィルム表現型の変化に関与する新規遺伝因子の探索
Searching of novel genetic elements involved in biofilm phenotypic change
○李 昇ウク[1]、高橋 裕里香[1]、大浦 啓[2]、野村 暢彦[2]、岡田 憲典[1]、山根 久和[3]、野尻 秀昭[1] ([1]東大生物工学セ、[2]筑波大院生命環境、[3]帝京大・バイオ)
○ Seunguk LEE[1], Yurika TAKAHASHI[1], Hiromu OURA[2], Nobuhiko NOMURA[2], Kazunori OKADA[1], Hisakazu YAMANE[3], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Univ. of Tsukuba, [3]Teikyo Univ)

【背景と目的】バイオフィルム中での宿主細菌の振る舞いにプラスミドが与える影響を解析することは、実環境中でのプラスミドの挙動を知る基盤情報となるが、報告例は非常に少ない。そこで、カルバゾール分解プラスミド pCAR1 と 3 種の *Pseudomonas* 属細菌 (*P. putida* KT2440 株、*P. aeruginosa* PAO1 株、*P. fluorescens* Pf0-1 株) を用いて、宿主細菌が pCAR1 を保持することで、形成するバイオフィルムの構造に差異が見られるかどうかを解析した。pCAR1 保持株と非保持株の形成するバイオフィルムを共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、KT2440 株特異的に保持株が形成するバイオフィルムはフラットになり、繊維状化した菌体が多く認められた。また、この現象は pCAR1（IncP-7）特異的で、異なる種類のプラスミド[NAH7 (IncP-1)、RP4 (IncP-9)]では繊維状化は観察されなかった。pCAR1 上には 3 種の核様体タンパク質（Pmr, Phu, Pnd）がコードされているため、繊維状化へのそれらの関与を各単独・二重破壊株を用いて評価した。その結果、ΔPmr/ΔPhu と ΔPmr/ΔPnd の 2 組の二重破壊株で繊維状化が亢進した（2012 年度講演番号：3C21p20）。本年度は、上記の繊維状化の原因を探るため、pCAR1 保持や NAPs 遺伝子の破壊がバイオフィルム形成時のトランスクリプトームに及ぼす影響を高密度タイリングアレイで解析した。
【結果】pCAR1 保持時に 2 倍以上転写変動した遺伝子は、KT2440 株で 81 個（増加 52、減少 29）、*pmr* と *pnd* の二重破壊株で 1137 個（増加 1115、減少 22）、*pmr* と *phu* の二重破壊で 1454 個（増加 1452、減少 2）であり、その中で 32 遺伝子の転写が共通に増加した（共通に減少した遺伝子は抽出されず）。また、pCAR1 保持株において *pmr* と *pnd*、および *pmr* と *phu* の二重破壊により共通に転写変動した遺伝子は 186 個であった。これら 2 条件での抽出作業で共通に抽出された遺伝子は、繊維状化の原因遺伝子、あるいは繊維状化を亢進する遺伝子と考えられた。このような遺伝子は 2 個存在し、ECF σ 因子をコードすると考えられる PP_0704 と TonB 依存型シデロフォア受容体をコードすると考えられる PP_2193 であった。これらの 2 個の遺伝子を含め抽出された 32 個の遺伝子について、pBBad18k ベクター（アラビノース添加により挿入遺伝子が高発現）を用いて過剰発現株を作製した。現在までに、23 個の過剰発現株の作製が完了しており、これらが形成するバイオフィルムの構造を共焦点レーザー顕微鏡で評価した。その結果、ほとんどの株ではバイオフィルムの形状に差が見られなかったが、いくつかの株で 6 時間培養したバイオフィルムで菌体が伸びる現象が観察された。発表では、解析対象とした遺伝子のバイオフィルム形成への影響について論ずる。

biofilm, plasmid, nucleoid-associated proteins

講演番号：2B13p18
講演日時、会場：3 月 25 日 17:24～ B 校舎 13 会場

IncP-7 群プラスミド pCAR1 から発現する核様体タンパク質がプラスミド安定性に寄与する機構の解明

Functional mechanism of nucleoid-associated proteins in stable maintenance of IncP-7 carbazole degradative plasmid pCAR1

○廣谷 龍輔[1]、高瀬 識之[1]、武田 俊春[1]、鈴木 千穂[1]、尹 忠鉄[2]、新谷 政己[3]、岡田 憲典[1]、山根 久和[4]、野尻 秀昭[1,2] ([1]東大・生物工学セ、[2]東大院農生科・アグリバイオ、[3]静大・工、[4]帝京大・バイオ)
○Ryusuke HIROTANI[1], Noriyuki TAKASE[1], Toshiharu TAKEDA[1], Chiho SUZUKI[1], Choong-Soo YUN[2], Masaki SHINTANI[3], Kazunori OKADA[1], Hisakazu YAMANE[4], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]Tokyo Univ., [2]Tokyo Univ., [3]Shizuoka Univ., [4]Teikyo Univ.)

【背景と目的】大腸菌における H-NS に代表される核様体タンパク質（NAPs）は、DNA に結合して核様体という高次構造を作ることから、多数の遺伝子の転写を制御する global regulator として働くことが知られている。我々が研究対象とする IncP-7 群カルバゾール分解プラスミド pCAR1 上には 3 つの NAPs (H-NS 様因子[Pmr]、HU ホモログ[Phu]、NdpA ホモログ[Pnd]) がコードされており、プラスミド機能の発現に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。例えば、上記 3 つの NAPs 遺伝子のうち *pmr* と *phu*、あるいは *pmr* と *pnd* の組み合わせで二重破壊を施した pCAR1 を保持した *Pseudomonas putida* KT2440 株では、コハク酸を唯一の炭素源とする液体培地での継代培養で、pCAR1 の全体、またはカルバゾール資化能に関与する *car* 遺伝子群を含む領域が脱落しやすいことが明らかとなっている(廣谷ら、2012 年度本大会)。また、二重破壊株のトランスクリプトーム解析の結果から、染色体上では 33 遺伝子、pCAR1 上においては 6 遺伝子が fold-change が 2 以上で転写変動する遺伝子として選抜されており、これらには鉄代謝関連遺伝子（染色体上）や相同組換えに関わる *recT*（pCAR1 上）が含まれていた(廣谷ら、2012 年度本大会)。本年度は、これら遺伝子のプラスミドの安定性への関与について評価した。

【方法と結果】多くの鉄関連遺伝子が誘導されることで菌体内の細胞内鉄イオンが不足し、それが負荷となってプラスミドが不安定化したと仮定した。そこで、キレートされ菌体内に取り込まれやすいクエン酸鉄を等量あるいは 10 倍量添加した培地で継代培養を行い、プラスミドの安定性を評価した。その結果、いずれの培地においても NAPs 遺伝子二重破壊株での安定性の向上は認められず（右図）、菌体内の鉄欠乏がプラスミド不安定化の主因ではないことが示唆された。現在、RecT を過剰発現させた *P. putida* KT2440(pCAR1)株における pCAR1 の安定性と相同組換え頻度の測定を行っており、これらの結果についても報告する。

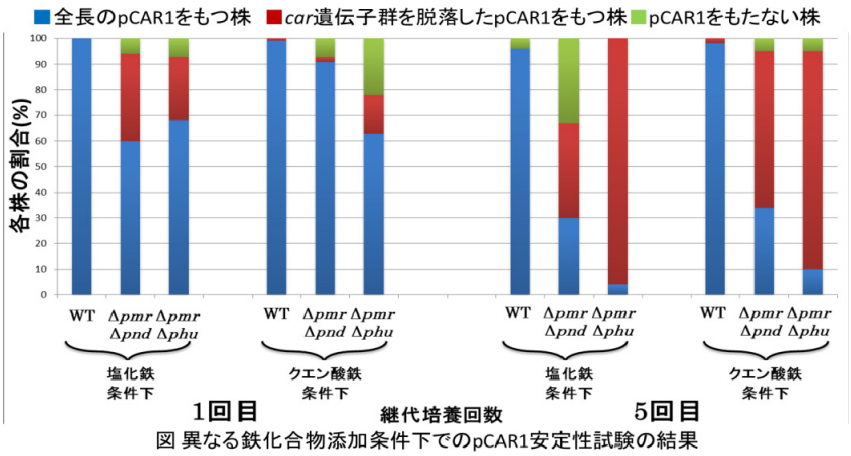


図 異なる鉄化合物添加条件下でのpCAR1安定性試験の結果

Pseudomonas, nucleoid-associated proteins, plasmid

講演番号：2B13p19
講演日時、会場：3 月 25 日 17:36～ B 校舎 13 会場

プラスミドと宿主染色体にコードされる H-NS 様因子が異なる機能を持つ機構の解析
Homo- and hetero-oligomerization mechanisms for explaining functional differences between plasmid- and chromosomally encoded H-NS family proteins

○鈴木 千穂[1]、尹 忠鉄[1,2]、堀田 彰一朗[3]、寺田 透[2]、田之倉 優[3]、岡田 憲典[1]、山根 久和[4]、野尻 秀昭[1,2] ([1]東大・生物工学セ、[2]東大院農生科・アグリバイオ、[3]東大院農生科・応生化、[4]帝京大・バイオ)
○ Chiho SUZUKI[1], Choong-Soo YUN[1,2], Shoichiro HORITA[3], Tohru TERADA[2], Masaru TANOKURA[3], Kazunori OKADA[1], Hisakazu YAMANE[4], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]The Univ. of Tokyo, [3]The Univ. of Tokyo, [4]Teikyo Univ.)

【目的】宿主がプラスミドを保持すると、染色体・プラスミド両ゲノム由来の因子が両者の遺伝子を制御する。プラスミド pCAR1 由来の Pmr と *Pseudomonas putida* KT2440 株染色体由来の TurA, TurB の 3 つの H-NS 様因子（核様体タンパク質の一種）は、C 末端側で標的遺伝子配列に結合した後、その分子を「足場」にして N 末端側のタンパク質間相互作用ドメインにより DNA 上で多量体化することで遺伝子の転写制御を行う。以前行われた *pmr*, *turA*, *turB* 破壊株のトランスクリプトーム比較では各々異なる遺伝子の転写が変動したため、3 つの因子はゲノム上の異なる箇所に結合し異なる遺伝子の転写を制御すると予想された。しかし改変クロマチン免疫沈降法で同定されたゲノム上の結合箇所は全因子でほぼ一致しており、3 つの因子で機能が異なる原因は解明できなかった。Pmr, TurA, TurB はホモ・ヘテロ多量体を形成するため、同定された結合箇所は最終的なヘテロ多量体の結合箇所を示しているに過ぎず、「足場」となる分子の結合位置や各ヘテロ多量体の組成の違いが 3 つの因子の機能の違いを生む可能性がある。そこで本研究では Pmr のホモ・ヘテロ多量体形成機構の解明を試みた。
【方法と結果】Pmr, TurA, TurB をリガンドに、Pmr をアナライトにして、表面プラズモン共鳴法により解離定数 (K_D) と最大結合量 (R_{max}) の算出を試みた。各因子とも多様な会合状態をとるため、同一センサーチップ上で 3 つのリガンドの固定化量をほぼ一致させ、相対的な K_D, R_{max} を算出した。高濃度のアナライトではアナライトのホモ多量体化に起因する測定値の上昇が見られたため、低濃度のアナライトを用いて平衡値解析を行った。その結果、K_D の値に差は見られなかったものの、Pmr-Pmr, TurA-Pmr 間における各 R_{max} の値は TurB-Pmr 間の R_{max} の値に比べて約 2 倍大きく、Pmr-Pmr, TurA-Pmr 間の結合比は TurB-Pmr 間の約 2 倍であることが示唆された。以上から、Pmr, TurA と TurB では Pmr に対する結合比が異なるため（右図）、*turB* 破壊株では Pmr, TurA が TurB の機能を相補できず異なる遺伝子の転写変動が見られたと考えられる。本研究は、一般に機能が重複すると考えられている同一細胞内の複数の H-NS 様因子が、タンパク質分子の性質の違いにより異なる機能を持つことを明確に示した初めての例である。

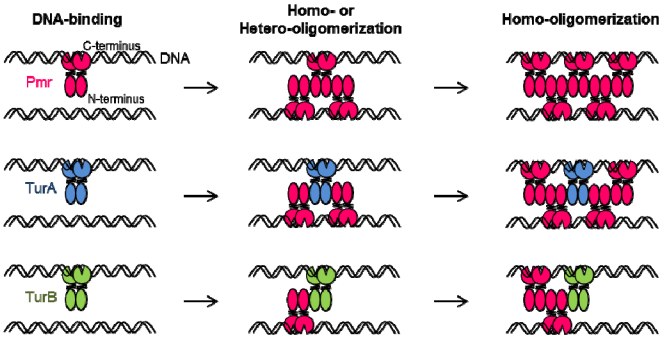


図. Pmr, TurAとTurBではPmrに対する結合比が異なる.

nucleoid-associated proteins, plasmid, *Pseudomonas*

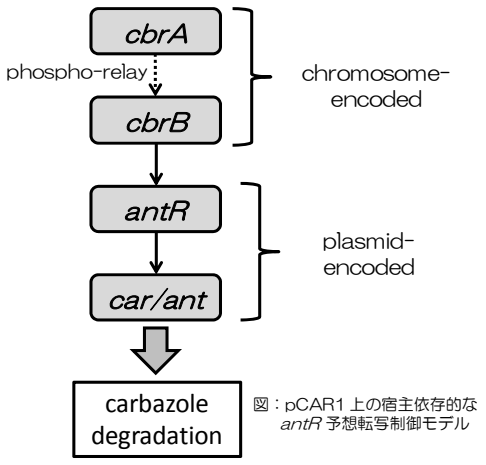
講演番号：2B13p20
講演日時、会場：3 月 25 日 17:48～ B 校舎 13 会場

プラスミド由来分解系のマスター転写制御因子遺伝子の異なる宿主における発現様式変化
Host-dependent transcriptional control of master regulator gene for plasmid-encoded carbazole degradative operons.

○岩田 修[1]、松本 貴嗣[2]、新谷 政己[3]、高妻 篤史[4]、岡田 憲典[1]、山根 久和[5]、野尻 秀昭[1]([1]東大・生セ、[2]東農大・ゲノム解析セ、[3]静大・工、[4]東薬・生命、[5]帝京・バイオ)
○Osamu IWATA[1], Takashi MATSUMOTO[2], Masaki SHINTANI[3], Atsushi KOUZUMA[4], Kazunori OKADA[1], Hisakazu YAMANE[5], Hideaki NOJIRI[1] ([1]University of Tokyo, [2]Tonodai Univ., [3]Shizuoka Univ., [4]Toyaku Univ., [5]Teikyo Univ.)

【背景】接合伝達性プラスミド pCAR1 は主に *Pseudomonas* 属を宿主とし，カルバゾール分解能を宿主に付与する．強力な分解能の発現は，pCAR1 上にコードされる転写因子 AntR が分解オペロン（*car/ant* オペロン）の発現を誘導することで起きる．これまでに，*P. putida* KT2440 株をはじめとする複数のモデル宿主を用いた解析を通して，*antR* の転写制御は σ^{54} 依存的であり宿主由来の CbrA-CbrB 二成分制御系の CbrB が宿主共通で必要であることが明らかになっており，基本的な *antR* の制御モデルが明らかになりつつある．ここで，pCAR1 が接合伝達性であることを考えると，*Pseudomonas* 属をはじめとして様々な細菌が pCAR1 を保持した際に分解系の遺伝子が等しく発現して，“同等の分解能力”を宿主に与えるのか，ということに興味が持たれる．そこで，本研究ではモデル宿主以外の異なる宿主に着目し，分解遺伝子群の発現がどのように変化するかを比較検討することとした．種々の宿主における pCAR1 上の遺伝子発現を個々に調節する因子の解明を行うことで，プラスミドを介した各宿主の環境適応能力やそれに伴うプラスミドの進化を理解する上で重要な知見が得られると予想される．

【結果】まず，KT2440 株以外の *Pseudomonas* 属宿主に着目したところ，*P. aeruginosa* PAO1 株においては，染色体上に存在する *antR* ホモログが pCAR1 上の分解系遺伝子群の転写に関与することが明らかとなった．そこで，染色体上の *antR* について新たに RACE 解析を行い，転写制御様式が σ^{70} 依存的であることを明らかにした．このことは，PAO1 株において *car/ant* オペロンの制御は σ^{54} かつ σ^{70} でデュアルに制御され，モデル宿主 KT2440 株とは発現条件や発現量に差がある可能性を示すものである．現在、この制御ネットワークの違いがどのように分解遺伝子群の発現に差を与えるのかについて解析を行っている．また CbrB の系統樹解析の結果から，*Pseudomonas* 属の他，窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* や好塩細菌 *Halomonas elongata* においてもオルソログが存在していた．そこで，*antR* の発現制御機構がそれら細菌含めて各種細菌において機能的に保存されているかを確認するためにレポーターアッセイによる解析を行っており，本大会ではその結果を報告する予定である．



図：pCAR1 上の宿主依存的な *antR* 予想転写制御モデル

plasmid, Pseudomonas, two-component system

講演番号：2B14a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ B 校舎 14 会場

Ralstonia sp. NT80 におけるリパーゼとその誘導促進因子の発現制御解析
Analysis of gene regulation of lipA and eliA in *Ralstonia* sp. NT80
○水野 佑貴[1]、石橋 隼[1]、関谷 麻美[1]、吉澤 梨絵[1]、赤沼 元気[1]、牛尾 一利[2]、石塚 盛雄[1] ([1]中央大学理工応化、[2]新居浜高専・生物応化)
○yuuki mizuno[1], Hayato Ishibashi[1], Mami Sekiya[1], Rie Yoshizawa[1], Genki Akanuma[1], Kazutoshi Ushio[2], Morio Ishizuka[1] ([1]Chuo Univ, [2]Niihama Natl.col.tech)

【背景と目的】
Ralstonia sp. NT80 のリパーゼ（LipA）はステアリルアルコール等の高級アルコールによって顕著に発現誘導される。その誘導効率は一般的にリパーゼの誘導剤として用いられるダイズ油と比較するとおよそ 17 倍にも及ぶ。しかしながら、この特殊な誘導機構に関する詳細な分子メカニズムは解明されていない。そのなかで我々は、ステアリルアルコールによるリパーゼ発現時に分子量約 14 kDa の分泌タンパク質（EliA; effector protein of lipase induction）が多量に発現していること、このタンパク質が高級アルコールによるリパーゼ発現誘導を促進することを見出している。そこで本研究では、高級アルコールによるリパーゼ発現誘導機構全様解明を目指し、*lipA*と*eliA*の発現制御機構を明らかにすることを目的とした。
【結果と考察】
高級アルコールによる誘導では、培養上清におけるリパーゼ活性は培養開始から 36－48 時間後から上昇するが、*lipA* 転写活性も酵素活性の向上と相関性を持って増加することが確認された。その一方で、*eliA* の転写活性は *lipA* の誘導よりやや早い段階で上昇することが分かった。*eliA* 破壊株では、培養上清に見られるステアリルアルコール由来の白濁が残存することから、我々は EliA がステアリルアルコールの認識、取り込みに関与するのではないかと考えている。今回の結果は、EliA の発現後に *lipA* が誘導されることを示しており、我々の予想を支持するものであると考えている。
一方、*lipA* 直下流にはリパーゼのシャペロン遺伝子(*lipB*)がコードされており、*lipA* は *lipB* とその下流にコードされている glutaminyl-tRNA synthetase 遺伝子とオペロンを形成していることが確認された。また、*eliA* は上流にコードされている OmpW family protein をコードする遺伝子とオペロンを構成するが、自身のプロモーターからの転写も確認されている。現在、これらの転写調節領域を用いたゲルシフトアッセイ（EMSA）、ならびにアフィニティ精製により転写因子の探索を行っている。
以上の解析に加え、プロテオーム解析による LipA 発現誘導制御タンパク質の探索も試みている。ステアリルアルコールによる誘導時には非誘導時には観察されないタンパク質が培養上清に多数観察されるため、これらのタンパク質と LipA の発現との関連について検証している。

Regulation, Lipase, *Ralstonia*

講演番号：2B14a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ B 校舎 14 会場

Ralstonia sp. NT80 におけるリパーゼ発現誘導促進因子 EliA の解析
EliA facilitates the induction of lipase expression by stearyl alcohol in *Ralstonia* sp. NT80
○赤沼 元気[1]、石橋 隼[1]、宮川 貴裕[1]、吉澤 梨絵[1]、渡辺 智[2]、志波 優[3]、吉川 博文[2,3]、牛尾 一利[4]、石塚 盛雄[1] ([1]中大理工応化、[2]東京農大応生科、[3]東京農大 NGRC、[4]新居浜高専生物応化)
○Genki AKANUMA[1], Hayato ISHIBASHI[1], Takahiro MIYAGAWA[1], Rie YOSHIZAWA[1], Satoru WATANABE[2], Yu SHIWA[3], Hirofumi YOSHIKAWA[2,3], Kazutoshi USHIO[4], Morio ISHIZUKA[1] ([1]Chuo Univ., [2]Tokyo Univ. Agric., [3]Tokyo Univ. Agric. NGRC, [4]Niihama Natl. Col. Tech.)

【目的】
脂質加水分解酵素であるリパーゼ（EC 3.1.1.3）は、食品における油脂加工、洗剤への添加、臨床分野での診断薬や消化薬など、多方面で活躍する有用酵素である。一般的に、微生物が生産するリパーゼは油や脂肪酸、界面活性剤などによって発現誘導されるが、我々はこれまでに *Ralstonia* sp. NT80 が分泌するリパーゼ（LipA）がステアリルアルコール等の高級アルコールによって顕著に生産誘導されることを見出している。その誘導効率は一般的な誘導剤として知られるダイズ油の 7 倍にも及ぶ。その高い生産性（1L 培養液から最大で 1 g）と耐熱性から産業利用も期待されるが、その誘導機構は不明だった。そこでこの誘導機構の全様解明を目指し、制御因子の探索と機能解析を試みた。
【結果と考察】
ステアリルアルコールによるリパーゼ発現時には分子量約 14 kDa の分泌タンパク質（EliA; effector protein of lipase induction）も多量に発現していた。このタンパク質をコードする遺伝子のクローニングから、EliA はヘキサデカンの乳化と酸化、資化に関与する *Pseudomonas aeruginosa* の PA タンパク質と 30%の相同性を示すことが分かった。リパーゼの高発現時に多量に分泌されること、ステアリルアルコールと同様に長鎖炭化水素を有するヘキサデカンの資化に関わるタンパク質と一部相同性を有することから、EliA がリパーゼの発現誘導に関与する可能性が考えられた。このことを検証するため、*eliA* 遺伝子破壊が及ぼすリパーゼ生産への影響を観察した。その結果、ステアリルアルコールによる誘導時において、培養上清におけるリパーゼ活性、LipA タンパク質量ともに破壊株で著しく低下していた。このときの *lipA* 転写量は野生株と比較しておよそ 1/16 まで低下していたことから、EliA がステアリルアルコールによる LipA 発現誘導を促進していると考えた。一方、野生株では難溶性ステアリルアルコールの乳化に伴う培地の白濁が培養時間とともに解消されるのに対し、*eliA* 破壊株では 72 時間の培養後も白濁が残存していた。*eliA* 遺伝子破壊株に見られるこれらの異常は、遺伝子相補によって完全に回復した。これらの観察結果に加え、精製 EliA が高い界面活性作用を有していること、水溶性のリパーゼ誘導剤である polyoxyethylene (20) oleyl ether を用いた場合には *eliA* 破壊の影響は観察されなかったことから、EliA は細胞によるステアリルアルコールの認識、分解に関与し、結果としてリパーゼ発現誘導を促進していると考えられる。

lipase, secreted protein, *Ralstonia*

講演番号：2B14a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ B 校舎 14 会場

Sphingobium sp. SYK-6 株のフェニルクマラン型リグニン二量体化合物代謝系遺伝子の単離と解析（第 2 報）

Characterization of the Dehydrodiconiferyl Alcohol Catabolic Genes in *Sphingobium* sp. Strain SYK-6 (Part II)

○高橋 健司[1]、上村 直史[1]、菱山 正二郎[2]、原 啓文[3]、笠井 大輔[1]、片山 義博[4]、福田 雅夫[1]、梶田 真也[5]、政井 英司[1]（[1]長岡技科大・生物、[2]森林総研、[3]岡山理大工・生体、[4]日大生資科、[5]東農工大院・BASE）

○Kenji TAKAHASHI[1], Naofumi KAMIMURA[1], Shojiro HISHIYAMA[2], Hirofumi HARA[3], Daisuke KASAI[1], Yoshihiro KATAYAMA[4], Masao FUKUDA[1], Shinya KAJITA[5], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]FFPRI, [3]Okayama Univ. Sci., [4]Nihon Univ., [5]Tokyo Univ. Agric. Tech.)

【緒言】*Sphingobium* sp. SYK-6 株の多様なリグニン分解酵素遺伝子を植物のリグニン構造の改変に利用することで、バイオ燃料生産に適した脱リグニンが容易な植物を作出できる可能性がある。リグニン生合成の初期に主要な二量体の一つとして phenylcoumaran が生成することから、本研究では phenylcoumaran 分解系遺伝子に着目した。SYK-6 株において phenylcoumaran 型化合物の dehydrodiconiferyl alcohol (DCA) は、B 環側鎖γ位がカルボン酸に酸化された DCA-C に変換された後、A 環側鎖γ位がカルボン酸に酸化された DCA-CC に変換される。その後、A 環側鎖のγ位が脱離した DCA-S に変換され、α-β開裂を受けて代謝される。前年度の本大会で、DCA から DCA-C への変換に複数の alcohol dehydrogenase と aldehyde dehydrogenase が関与することを報告した。本研究では DCA-C および DCA-CC の変換に関与する酵素遺伝子を単離し、機能を明らかにすることを目的とした。

【方法】DCA の存在下または非存在下で培養した SYK-6 株から RNA を単離し、得られた cDNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。DCA-C 変換候補遺伝子を大腸菌で発現させ、組換え体の細胞抽出液を用いて DCA-C 変換実験を行った。DCA-CC 変換遺伝子は、*Pseudomonas putida* に構築した SYK-6 株のコスミドライブラリーから単離した。大腸菌を宿主にサブクローニングを行い DCA-CC 変換遺伝子の同定を行った。また相同組換えによって SYK-6 株の DCA-CC 変換遺伝子を破壊し、休止細胞を用いて DCA-CC 変換活性を調べた。各基質の変換と反応産物の同定は HPLC および LC-MS 分析により行った。

【結果】SYK-6 株において DCA-C の変換が誘導的であったことから、DCA 培養時に特異的に転写が誘導され、かつ DCA-C の酸化に働く可能性のある遺伝子を探索した。その結果、choline dehydrogenase と相同性を示す *SLG_09480* と *SLG_09500* が見出された。両遺伝子を含むプラスミドを導入した大腸菌の DCA-C 変換能を調べた結果、DCA-C の A 環側鎖γ位がアルデヒドに変換されたことが示された。SYK-6 株のコスミドライブラリーから DCA-CC 変換クローンを単離し、サブクローニングを行った。その結果、*SLG_09370* が DCA-CC の DCA-S への変換に関与することが示唆された。興味深いことに *SLG_09370* と相同性を示す遺伝子はデータベース上に存在しなかった。*SLG_09370* 破壊株の DCA-CC 変換活性が SYK-6 株と比較して有意に低下したことから、本遺伝子が SYK-6 株において DCA-CC 変換に関与することが示唆された。本研究は NEDO バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発（先導技術開発）の助成を受けて行われたものである。

lignin, phenylcoumaran, *Sphingobium*

講演番号：2B14a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ B 校舎 14 会場

Sphingobium sp. SYK-6 株のリグニン由来ビフェニル脱メチル酵素遺伝子の機能解析と発現制御
Characterization of the *Sphingobium* Genes Involved in the O Demethylation of 5,5'-Dehydrodivanillate and Their Transcriptional Regulation

○吉方 太一[1]、鈴木 一也[1]、上村 直史[1]、笠井 大輔[1]、原 啓文[2]、大塚 祐一郎[3]、中村 雅哉[3]、片山 義博[4]、福田 雅夫[1]、政井 英司[1] ([1]長岡技科大・生物、[2]岡山理大工・生体、[3]森林総研、[4]日大生資科)
○Taichi YOSHIKATA[1], Kazuya SUZUKI[1], Naofumi KAMIMURA[1], Daisuke KASAI[1], Hirofumi HARA[2], Yuichiro OTSUKA[3], Masaya NAKAMURA[3], Yoshihiro KATAYAMA[4], Masao FUKUDA[1], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]Okayama Univ. Sci., [3]FFPRI, [4]Nihon Univ.)

【目的】様々なリグニン由来の二量体化合物を分解する *Sphingobium* sp. SYK-6 株は、ビフェニル化合物の 5,5′-デヒドロジバニリン酸(DDVA)を脱メチルし、芳香環開裂、側鎖開裂および脱炭酸の後、バニリン酸を経由して代謝する。SYK-6 株の DDVA *O*-デメチラーゼは、オキシゲナーゼ(LigXa)、フェレドキシン(LigXc1)、フェレドキシンレダクターゼ(LigXd1)の 3 成分から構成されることが示唆されている。前年度の本大会において、*ligXc1* の大腸菌組換え体での発現量が極めて低かったため、LigXc1 と同等の機能を有する LigXc2 を用いて DDVA *O*-デメチラーゼの再構成実験を行った。本研究では、*ligXc1* の発現系を再検討の後、LigXa、LigXc1、LigXd1 を用いて DDVA *O*-デメチラーゼを再構成し、酵素学的な諸性質を明らかにすることを目的とした。また、*ligXa* の直上流に MarR 型転写制御因子と相同性を示す *SLG_07780* が存在することから、本遺伝子が関与すると推定される DDVA 代謝系遺伝子の転写制御について解析を行った。
【方法】His-tag 融合 *ligXa*、*ligXc1*、*ligXd1* を大腸菌にて発現させ、各成分を精製した。DDVA *O*-デメチラーゼ活性は、NADH の存在下、精製した各成分を混合し DDVA と反応させ、HPLC を用いて DDVA の減少量を測定することで調べた。至適温度と至適 pH はそれぞれ 10～50°C、pH 5.0～9.0 の範囲で調べた。基質特異性の解析には、バニリン酸やシリンガ酸等のリグニン由来の単量体化合物を用いた。DDVA 存在下または非存在下で培養した SYK-6 株から全 RNA を単離し、逆転写反応により合成した cDNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。SYK-6 株の *SLG_07780* を相同組換えによって破壊し、破壊株の DDVA での生育能を調べた。
【結果】精製した LigXa、LigXc1、LigXd1 を用いて DDVA *O*-デメチラーゼ活性の再構成実験を行った結果、DDVA の分解と脱メチル産物の蓄積が観察された。DDVA *O*-デメチラーゼ活性は、オキシゲナーゼ、フェレドキシン、フェレドキシンレダクターゼのモル比が、1 : 30 : 2 の時に最大値を示した。また至適温度と至適 pH は、それぞれ 30°C および pH 6.0 であった。本酵素は DDVA に対して特異的であり、リグニン由来の単量体化合物を基質としないことが示された。現在、本酵素の動力学的性質について解析を進めている。DNA マイクロアレイ解析の結果、DDVA 分解に関与する *ligXa*、*ligZ* (芳香環開裂ジオキシゲナーゼ)、*ligY* (側鎖開裂ヒドロラーゼ)の転写が DDVA 存在下での培養時に誘導されることが示された。また、*SLG_07780* 破壊株の DDVA での生育が野生株よりも早かったことから、本遺伝子がこれら DDVA 代謝系遺伝子の少なくとも一部を負に制御することが示唆された。

lignin, *O*-demethylase, non-heme iron oxygenase

講演番号：2B14a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ B 校舎 14 会場

環境変化が *Lactobacillus reuteri* DSMZ 20016^T の腸管付着因子の発現に与える影響

Transcriptional analysis on adhesion factors affected by environmental change in *Lactobacillus reuteri* DSMZ 20016^T

○小林 達哉、永倉 洋憲、本橋 健太、梶川 揚申、岡田 早苗、佐藤 英一（東農大応生科・化学）
○Tatsuya KOBAYASHI,Hironori NAGAKURA,Kenta MOTOHASHI,Akinobu KAJIKAWA,Sanae OKADA,Eiichi SATOH (Dept. Appl. Biol. Chem. Tokyo Univ. Agr.)

［背景・目的］腸内常在細菌の中でも乳酸菌の腸管付着様式は、複数のタンパク質が菌体表層に維持されることで、フレキシブルな付着性を有すると考えられつつある。さらに近年では housekeeping protein であるタンパク質が本来の機能に加えて、腸管への付着性を有するなど、乳酸菌の腸管定着様式に関する新しい知見が報告がされている。その中でも我々は、*Lactobacillus reuteri* DSM20016^T の Mucus adhesion promoting protein（MapA）が、腸管付着に深く関わっていることを明らかとした [1)]。また、他菌種で腸管付着因子としての報告例がある Elongation factor Tu（EF-Tu）に着目し、*L. reuteri* の保持する EF-Tu も腸管上皮細胞 Caco-2 への付着を示唆した [2)]。さらに、MapA や EF-Tu のみならず、他のタンパク質が *L. reuteri* の腸管付着に関与している可能性を考慮する必要がある。また、これらのタンパク質は消化管内で遺伝子発現を変動させ、腸管付着に関与していると考えられる。以上のことから、本研究では消化管内での環境変化が *L. reuteri* の腸管付着因子の遺伝子発現に与える影響を検討した。

［方法］他菌種での報告例がある腸管付着タンパク質の相同性検索を行った結果、*L. reuteri* に対し、GroEL、Fibronectin binding protein（FbpA）と高い相同性を有するタンパク質を保持していることが判明した。それぞれの遺伝子をクローニングし、大腸菌発現系を用いたヒスチジンタグ法により、これらのタンパク質を調製した。この精製したタンパク質を用い、多重免疫標識法および競合阻害試験を行った。また、消化管内における環境因子を考慮し、RT-qPCR により遺伝子発現の変化を解析した。

［結果・考察］FbpA、GroEL が、多重免疫標識法および競合阻害試験において Caco-2 細胞に付着することが認められた。この結果から、これらのタンパク質は *L. reuteri* の腸管付着に関わるタンパク質である可能性が考えられる。GroEL に関しては腸管付着因子として興味深い傾向が見られた。RT-qPCR の結果から、腸管付着因子の遺伝子発現が環境の変化に応じて変動することが明らかとなった。現在、さらなる環境因子の影響について解析中である。

1）Miyoshi *et al.,* BBB 70(7), 1622-1628. (2006)
2）加藤ら 日本農芸化学会 2008 年度大会講演要旨 p79

Lactobacillus reuteri, adhesion, environmental change

講演番号：2B14a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ B 校舎 14 会場

トリクロロエチレン分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 のトリクロロエチレン応答性転写制御因子に関する解析

Trichloroethylene-responsive transcriptional regulators in *Rhodococcus jostii* RHA1

○荒木 直人、笠井 大輔、政井 英司、福田 雅夫 (長岡技科大・生物)
○Naoto ARAKI,Daisuke KASAI,Eiji MASAI,Masao FUKUDA (Nagaoka Univ. Tech.)

【目的】トリクロロエチレン(TCE)により引き起こされる土壌・地下水汚染が問題となっており、微生物を利用したバイオレメディエーションが有効な汚染浄化法として期待されている。我々は、ビフェニル(BPH)分解菌である *Rhodococcus jostii* RHA1 に TCE 分解能を見いだし、TCE 分解に対する BPH 分解酵素の関与を明らかにした。また、RHA1 による TCE 分解は BPH がない TCE 存在下で促進された。一方、RHA1 の BPH 分解酵素遺伝子の発現は、二組の BphS-BphT 二成分制御システム(BphS1-BphT1 および BphS2-BphT2)により正に調節されることが明らかにされている。本研究では、これら制御系が TCE 分解能の活性化に関与するのかについて調べた。

【方法】BphS-BphT が TCE に応答して転写を活性化させるのかを調べるために、BPH 分解能を持たない *Rhodococcus erythropolis* IAM1399 に、BphS-BphT 発現プラスミド(BphS1-BphT1 および BphS2-BphT2 いずれか) と BphS-BphT 調節性転写プロモーターとルシフェラーゼ遺伝子を連結したリポータープラスミドを導入した。この株の懸濁液を 1mM 相当の TCE を含む塩素化エチレン類に 12 時間曝してから、ルシフェラーゼ活性を測定した。また塩素化エチレン類の分解能を調べるため、コハク酸で培養した菌懸濁液 1 ml を 500 nmol の塩素化エチレンと共に 20 ml のガラスバイアル中に密封し、3 日後の TCE 残存量をガスクロマトグラフィーで定量した。

【結果と考察】リポータープラスミドを用いた解析において、オリジナルのインデューサーである BPH やエチルベンゼンと同様に、TCE による顕著な転写活性化が BphS1-BphT1 および BphS2-BphT2 それぞれの発現株で観察された。また、この転写活性化はテトラクロロエチレン、シス-ジクロロエチレン(CDC)およびトランス-ジクロロエチレンでも見られた。RHA1 のこれらインデューサーに対する分解能を調べたところ、CDC の分解が観察された。また、センサーキナーゼの BphS1 と BphS2 をコードする *bphS1* および *bphS2* の二重破壊株、レスポンスレギュレーターの BphT1 と BphT2 をコードする *bphT1* および *bphT2* の二重破壊株では、TCE の分解能がほとんど観察されなかった。以上の結果より、RHA1 の BPH 分解酵素系は二組の BphS-BphT 制御系を介して TCE をはじめとする塩素化エチレンにより誘導されることが示唆された。

Chloroethylene, *Rhodococcus*, Two-component regulator

講演番号：2B14a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ B 校舎 14 会場

アルファルファ根粒菌のイノシトール合成系はストレスで誘導される
Possible inositol biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*
○吉田 健一[1]、芦田 義裕[1]、寺川 あやこ[1]、ゾヴィアク ローラン[2]、ブルアン クロード[2] ([1]神戸大院農、[2]LIPM-INRA, France)
○Ken-ichi YOSHIDA[1], Yoshihiro ASHIDA[1], Ayako TERAKAWA[1], Laurent SAUVIAC[2], Claude BRUAND[2] ([1]Kobe Univ., [2]LIPM-INRA, France)

一般にイノシトールは、グルコース-6-リン酸からミオ-イノシトール-1-リン酸、そしてその脱リン酸を経て生合成される。しかし真正細菌には、結核菌や高度好熱菌など一部例外を除き、イノシトール生合成は存在しないとされてきた。一方、結核菌では特殊なリン脂質に含まれるイノシトールが必須なため、従ってミオ-イノシトール-1-リン酸合成酵素をコードする *rv0046c* も必須遺伝子であり、本酵素が薬剤開発のターゲットとして取り上げられたこともあってグルコース-6-リン酸をミオ-イノシトール-1-リン酸へと異性変換する反応の詳細が詳らかとなっている。

我々は、アルファルファ根粒菌 *Sinorhizobium meliloti* 1021 のゲノム情報より、*rv0046c* に有意な相同性を示す *smb20249* を見出した。同遺伝子を大腸菌にて発現・精製し、その酵素活性測定を行ったところ、SMb20249 は RV0046c とほぼ同等のミオ-イノシトール-1-リン酸合成酵素活性を示し、明らかに *S. meliloti* 1021 が同酵素活性を持ち得ることが判明した。加えて、ミオ-イノシトール-1-リン酸を脱リン酸してミオ-イノシトールへと導くイノシトール-1-リン酸脱リン酸化酵素とされる大腸菌の SuhB と高い相同性を示す SMb20150 と SMc03994 に関して大腸菌にて発現・精製し、それぞれ SMb20249 との共役反応によるグルコース-6-リン酸からのミオ-イノシトール生成を確認した。この結果は、*S. meliloti* 1021 が明らかにイノシトール生合成系を備え得ることを強く示唆した。

smb20249 の転写発現を検討したところ、RopE2 制御下にあるプロモーターから転写されることが明らかとなり、特に高塩濃度や高温などのストレスにより誘導されることも確かめられた。従って、*S. meliloti* 1021 のイノシトール合成系はストレスで誘導されることも示された。

smb20249 の破壊を試みたところ、首尾よく破壊株を得ることができ結核菌におけるような必須性は否定された。しかし、まずイノシトール合成系の生理機能解明の糸口として、同遺伝子が塩ストレス耐性に関与する可能性を想定し、塩ストレス耐性因子として既に同定されているトレハロース合成系、グリシン・ベタイン合成系と組み合わせた多重遺伝子破壊を実施して、その影響調査に着手した。加えて、宿主アルファルファ植物への感染や根粒形成、窒素固定などの高次機能への影響の有無に関しても現在解析を進めている。

inositol, *Sinorhizobium meliloti*, stress response

講演番号：2B14a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ B 校舎 14 会場

ソルボース高温発酵・適応育種株の変異点解析

Mutational analysis of the strain adapted to high-temperature sorbose fermentation

○服部 浩美[1]、松谷 峰之介[1]、薬師 寿治[1]、足立 収生[1]、外山 博英[2]、松下 一信[1] ([1]山口大農、[2]琉球大農)
○ Hiromi HATTORI[1], Minenosuke MATSUTANI[1], Toshiharu YAKUSHI[1], Osao ADACHI[1], Hirohide TOYAMA[2], Kazunobu MATSUSHITA[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Ryukyu Univ.)

酢酸菌は様々な糖や糖アルコールなどに対して、強い酸化能力を持つ。これらの酸化は細胞膜表層に結合した膜酵素によって行われるため、その生産物は培地中に効率良く蓄積され、酸化発酵と呼ばれている。しかし、これらの発酵は通常 32 ℃以下で行われ、冷却コストがかかるため、耐熱性を持った酢酸菌の開発が期待されている。

本研究ではより高温での L-ソルボース発酵が可能な株を作り出すこと、耐熱性機構についての知見を得ることを目的とした。タイで単離された 37 ℃で生育できる酢酸菌 *Gluconobacter frateurii* CHM43 株[1] を生育限界温度である 38.5 ℃で繰り返し培養することによって、38.5 ℃での生育が向上した適応株(CHM43 AD 株)を得た。CHM43 AD 株を野性株と比較したところ、高温(38.5～40 ℃)での L-ソルボース生産性が向上していた[2]。

CHM43 AD 株と野性株の比較ゲノム解析を行ったところ、CHM43 AD 株では 12 回膜貫通型の multidrug transporter にフレームシフト変異が入り、6 回膜貫通した辺りで終始コドンが現れることがわかった。野生株を用いてこの transporter の破壊株（CHM43⊿*trp*::Km）を作成し、生育比較を行ったところ、CHM43 ⊿*trp*::Km 株は lag phase が長くなるものの、高温下（38.5 ℃）での生育が野生株に比べて著しく向上した。また、CHM43 AD 株を用いて同様の破壊株（CHM43 AD ⊿*trp*::Km）を作成し、生育比較を行ったところ、やはり lag phase が長くなり、CHM43 ⊿*trp*::Km 株と同様の生育を示した。これらの結果からこの multidrug transporter が生育の立ち上がり、さらには耐熱性と何らかの関わりを持っていることが分かった。また、CHM43 AD 株では変異型 transporter が発現し、機能を持っている可能性が高いことも明らかになった。

現在、この変異と耐熱性との関連についてさらに解析を進めているところである。

本研究は ALCA 事業の一環である。

[1] Moonmangmee D, et al: Isolation and characterization of thermotolerant Gluconobacter strains catalyzing oxidative fermentation at higher temperatures. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,**64**: 2306 (2000)

[2] Hattori H, et al: High-temperature sorbose fermentation with thermotolerant Gluconobacter frateurii CHM43 and its mutant strain adapted to higher temperature. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **95**: 1531 (2012)

Gluconobacter, thermotolerant, multidrug transporter

講演番号：2B14a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ B 校舎 14 会場

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* 由来リボキナーゼファミリータンパク質 TK2285 の機能解析
Characterization of the ribokinase family protein TK2285 from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*
○佐藤 喬章[1,3]、藤橋 雅宏[2,3]、宮本 幸花[2]、三木 邦夫[2,3]、跡見 晴幸[1,3] ([1]京大院工、[2]京大院理、[3]JST CREST)
○Takaaki SATO[1,3], Masahiro FUJIHASHI[2,3], Yukika MIYAMOTO[2], Kunio MIKI[2,3], Haruyuki ATOMI[1,3] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ., [3]JST CREST)

［背景･目的］アーキアはバクテリアや真核生物とは異なる第 3 の生物界を構成するドメインであり、高温・高塩濃度・高圧・酸性などといった極限環境下で生育する微生物を多く含んでいる。また、アーキアはこれまでによく調べられているバクテリアや真核生物が用いている代謝経路とは異なる新規代謝経路を数多く有していることが分かってきている。一方、近年ゲノム解析により膨大な数の微生物のゲノム塩基配列が決定されているが、解読された遺伝子の約半数は全くの機能未知遺伝子や大まかな機能は予測されているものの真の機能は不明な遺伝子である。本研究では超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* において ribokinase family に属する sugar kinase とアノテートされているがその基質や機能は不明である TK2285 タンパク質の機能解析を目的とした。
［方法・結果］TK2285 の組換え型タンパク質を大腸菌で発現し、熱処理および陰イオン交換・疎水・ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。精製タンパク質の結晶構造解析を行ったところ、ribokinase family に分類される典型的な kinase の結晶構造と良く類似していた。そこで典型的な ribokinase family kinase の基質である単糖、リン酸化糖、ヌクレオシドに加えアミノ糖や二糖などの様々な糖、計 44 種類に対する kinase 活性を測定した。その結果、単糖である D-allose, D-lyxose, D-tagatose, D-talose, D-xylose および D-xylulose に対して 0.8~1.4 μmol min^{-1} mg^{-1} 程度の有意な活性を示した。しかしながら、これらの基質に対する速度論的解析を行った結果、最も親和性の高い tagatose ですら K_m 値が 53 mM であり、生体内における真の基質であるかは疑わしかった。そこで、一般的な ribokinase family kinase の基質ではないものの 18 種類の糖アルコールに対しても活性を調べた。その結果、意外なことに *myo*-inositol に対して 44 μmol min^{-1} mg^{-1} と顕著な活性を示した。さらに速度論的解析を行った結果、k_{cat} と K_m はそれぞれ 27.4 s^{-1} と 0.25 mM であり、その K_m 値から *myo*-inositol が TK2285 の真の基質である可能性が示された。ゲノム情報を改めて見返すと TK2285 遺伝子の近傍に *myo*-inositol monophosphate synthase 遺伝子(TK2278)が存在しており、この事実も TK2285 が *myo*-inositol 代謝に関連していることを示唆している。アーキアにおいて *myo*-inositol から構成される生体成分としては膜脂質である archaetidylinositol や浸透圧調整物質である di-*myo*-inositol-1,1'-phosphate などが知られているが、現在提唱されているそれらの生合成経路上において *myo*-inositol のリン酸化のステップは見当たらない。よって TK2285 はアーキアにおける *myo*-inositol の新しい代謝経路に関与する可能性がある。

Archaea, ribokinase, inositol

講演番号：2B14a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ B 校舎 14 会場

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 株の推定 β-glycosidase TT_P0042 の機能解析

Functional analysis of a putative ß-glycosidase TT_P0042 from *Thermus thermophilus* HB27

○黒澤 智砂、星野 貴行、中村 顕（筑波大院生命環境）
○Chisa Kurosawa,Takayuki Hoshino,Akira Nakamura (Tsukuba Univ.)

【目的】*Thermus thermophilus* HB27 株は至適生育温度を 70～75 °C に有する高度好熱菌で、全ゲノム配列が明らかにされ、また簡便な操作で遺伝子組換えが可能なため、高度好熱菌のモデル生物として様々な研究がなされている。同株の推定β−glycosidase 遺伝子 *TTP0042* は、レポーター遺伝子として広く利用されているが、その生理機能については未解明のままである。同遺伝子の上流には、3 つの糖取り込みに関与する遺伝子(*TTP0039-TTP0041*)及び LacI family の転写調節遺伝子 *TTP0038* が存在している。

我々は、同株で利用可能な誘導発現系の開発を最終目標として研究を行っているが、今回は *TTP0042* に着目して解析を行い、同遺伝子がセロビオース代謝に関わることを明らかにしたので報告する。

【方法及び結果】大腸菌を宿主に TTP0042 を生産し、その酵素活性について検討したところ、ONPG 及び *p*-nitrophenyl-β-D-glycopyranoside といったβ–結合を有する化合物に対して活性を示し、特に後者に対して強い活性を示した。そのため同酵素は、グルコースのβ-1,4-結合に対して特異性を示す酵素であることが示された。

次に、耐熱化ハイグロマイシン耐性遺伝子の挿入により *TTP0042* 破壊株（*ΔTTP0042* 株）を作製し、糖の資化性について検討したところ、*ΔTTP0042* 株がセロビオース資化性を失っていることを見出した。さらに、野生株の培養液にセロビオースを添加すると、無添加時には見られなかったβ−glycosidase 活性が確認された。一方 *ΔTTP0042* 株では、セロビオースの有無に関わらず活性は認められなかった。野生株におけるβ−glycosidase の誘導はラクトース添加では認められなかったので、この誘導現象はセロビオース特異的であると考えられる。

以上の結果から、*TTP0042* はセロビオースの代謝に関わる遺伝子であることが示唆された。現在同酵素の詳細な酵素学的解析を行うと共に、推定転写因子 TTP0038 による遺伝子発現調節についても解析を行っている。これらの結果についても併せて報告する予定である。

Thermus thermophilus, ß-glycosidase, cellooligomer

講演番号：2B14a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ B 校舎 14 会場

Haloarcula japonica 由来フィトエンデサチュラーゼ遺伝子ホモログの役割とカロテノイド種の抗酸化活性

Function of *Haloarcula japonica crtI* gene homologs and antioxidant capacity of carotenoids from *H. japonica*

○八波 利恵[1]、安藤 藍[1]、楊 影[1]、高市 真一[2]、河野 雅弘[1]、松村 有里子[1]、福居 俊昭[1]、仲宗根 薫[3]、高品 知典[4]、中村 聡[1] ([1]東工大院生命理工、[2]日本医大生物、[3]近畿大工、[4]東洋大生命科)

○Rie YATSUNAMI[1], Ai ANDO[1], Ying YANG[1], Schinichi TAKAICHI[2], Masahiro KOHNO[1], Yuriko MATSUMURA[1], Toshiaki FUKUI[1], Kaoru NAKASONE[3], Tomonori TAKASHINA[4], Satoshi NAKAMURA[1] ([1]Tokyo Tech., [2]Nippon Med. Sch., [3]Kinki Univ., [4]Toyo Univ.)

【目的】植物や細菌が生産するカロテノイドは、8 つのイソプレン (C_5) 単位が結合した C_{40} の構造をもつ。一方で、ある種の高度好塩性古細菌は C_{50} のカロテノイドを生産することが知られている。細菌における C_{40} カロテノイド生合成系に倣い、高度好塩性古細菌における C_{50} カロテノイド生合成系が推測されている。しかしながら、高度好塩性古細菌の生産するカロテノイド生合成の全貌は未だ明らかになっていない。最近になり、高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* の全ゲノム配列が明らかにされ、また *H. japonica* が生産するカロテノイド種も同定されつつある。本研究では、*H. japonica* におけるカロテノイド生合成系とその役割の解明を目的とした。すなわち、細菌のカロテノイド生合成系においてフィトエンからリコペンに至る 4 段階の不飽和化反応への関与が知られているフィトエンデサチュラーゼ (CrtI) に注目し、*H. japonica crtI* 遺伝子ホモログの解析を行った。さらに、*H. japonica* におけるカロテノイド種の役割を調べるため、その抗酸化活性を測定した。

【方法と結果】*H. japonica* の全ゲノム配列のアノテーションの結果、*crtI* 遺伝子と相同な 4 つの遺伝子ホモログが見出された。このうち、相同性のより高い 2 つの遺伝子ホモログ (*c0507* および *d1086*) の破壊株を構築した。その結果、*d1086* 遺伝子破壊株の生産するカロテノイド類は野生株と同様であった。一方で、野生株のコロニーがバクテリオルベリン由来の赤色を呈するのに対し、*c0507* 遺伝子破壊株のコロニーは黄色となった。カロテノイド分析の結果、*c0507* 遺伝子破壊株においては、野生株で見られた C_{50} カロテノイドは検出されず、推定生合成系の上流に位置するフィトエン、フィトフルエン、ζ-カロテン、ニューロスポレンおよびリコペンが検出された。次に、*c0507* 遺伝子断片を高度好塩性古細菌-大腸菌シャトルベクター pWL102 に連結し、上で構築した *c0507* 遺伝子破壊株に形質転換した。その際、プロモーターは *H. japonica* 細胞表層糖タンパク質遺伝子由来のものを用いた。この *c0507* 遺伝子再導入株の生産するカロテノイド類を分析した結果、野生株同様、C_{50} カロテノイドを再び蓄積するようになることがわかった。これより、c*0507* 遺伝子産物はリコペンからの IDR の生成反応に関与していることが強く示唆された。また、*H. japonica* の野生株からカロテノイド種を抽出し、ESR を用いた DPPH 法により、全カロテノイドとバクテリオルベリンの抗酸化活性を測定した。その結果、全カロテノイドおよびバクテリオルベリンは、抗酸化活性を有することがわかった。

carotenoid biosynthesis, extremely halophilic archaeon, genome

講演番号：2B14a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ B 校舎 14 会場

Serratia marcescens の Csr システム及び CsrB/C RNA の安定性を制御する CsrD の機能解析
Functional analysis of Csr system and CsrD controlling the stability of CsrB/C RNA in *Serratia marcescens*

○伊藤 学[1]、野村 和希[1]、高橋 優介[1]、杉本 華幸[1,2]、渡邉 剛志[1,2]、鈴木 一史[1,2] ([1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大・農・応生化)
○Manabu Ito[1], Kazuki Nomura[1], Yusuke Takahashi[1], Hayuki Sugimoto[1,2], Takeshi Watanabe[1,2], Kazushi Suzuki[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. & Tech., Niigata Univ., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Facul. Agric., Niigata Univ.)

【目的】Csr グローバル制御システムは、細菌のバイオフィルム形成、病原性、運動性、解糖系等、幅広く遺伝子発現を調節している重要なシステムであり、大腸菌などのグラム陰性菌を中心に広く分布している。Csr システムは CsrA から CsrD までの４種の因子によって構成されている。mRNA 結合タンパク質 CsrA、small RNA CsrB 及び CsrC、CsrB/C RNA の安定性を制御する CsrD タンパク質である。CsrB/C RNA は CsrA に結合してその機能を抑制し、CsrB/C RNA 自身は CsrD によってその安定性が制御されている。CsrD は GGDEF-EAL ドメインからなるタンパク質であるが c-di-GMP 代謝活性を示さず、作用メカニズムは明らかになっていない。CsrD のホモログは多くの細菌に存在するが、機能が明らかになっているのは大腸菌由来の CsrD のみである。今回、腸内細菌科グラム陰性細菌 *Serratia marcescens* 由来の各 *csr* 遺伝子をクローン化し、大腸菌内で発現させてその影響を大腸菌の各 *csr* 遺伝子と比較するとともに、*Serratia* CsrD が大腸菌 CsrB/C RNA 安定性に与える影響について調べた。
【方法】*S. marcescens* Db11 のゲノム情報をもとに、大腸菌 Csr システムに相当する各遺伝子を *S. marcescens* 2170 から PCR により増幅し、pBR322 に挿入した。得られたプラスミドで大腸菌を形質転換し、Csr システムによって制御されるバイオフィルム形成量、グリコーゲン合成量、*csrB* 発現量を測定した。また、クローン化した *S. marcescens* 2170 *csrD* を大腸菌で発現させ、大腸菌 CsrB/C RNA の安定性に与える影響をノーザンブロッティングによって調べた。
【結果】*S. marcescens* 2170 には大腸菌の *csrA*、*csrB*、*csrC*、*csrD* に相当する遺伝子が存在していた。これらの *csr* 遺伝子は、大腸菌の *csr* 遺伝子と同様に大腸菌のバイオフィルム形成量、グリコーゲン合成量、*csrB* 発現量に影響を与え、機能は同一であると考えられた。大腸菌 *csrD* 欠損株では CsrB/C RNA は安定化し、それらの半減期は 30 分以上であった。*Serratia csrD* をクローン化したプラスミドで大腸菌 *csrD* 欠損株を形質転換したところ、*csrD* 欠損によって安定化した大腸菌 CsrB/C が不安定化し、半減期が短くなった。大腸菌 CsrD では、活性に重要なアミノ酸残基が部位特異的変異による解析によって明らかになっている。これらのアミノ酸残基は *Serratia* CsrD においてもよく保存されていた。よって、*Serratia* CsrD は大腸菌 CsrD と同様に CsrB/C RNA の安定性制御を行っていると考えられた。しかし、*Serratia* CsrD が大腸菌 CsrB/C の安定性に及ぼす影響は、大腸菌 CsrD より小さかった。大腸菌内での *Serratia* CsrD 発現量は大腸菌 CsrD の 77.0%であり、発現量の差による影響は小さいと考えられた。

Csr system, small RNA, GGDEF-EAL domain protein

講演番号：2B14a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ B 校舎 14 会場

合成生物学による遺伝子大量発現によって双安定システムに多分化能を与える

Multipotency obtained by gene overexpression in a bistable system by synthetic approach

○木賀 大介[1]、石松 愛[1,2]、畑 敬士[1] ([1]東工大院総理工、[2]JST)
○Daisuke KIGA[1], Kana Ishimatsu[1,2], Hata Takashi[1] ([1]Tokyo Tech, [2]JST)

遺伝子の発現制御は、個々の遺伝子の制御として理解するだけでなく、遺伝子が相互作用するネットワークである「遺伝子回路」の動態として理解することが重要である。そして、遺伝子回路の動態を理解するために、生物から得られる実際のデータと数理モデルとを相補的に活用することが重要になっている。しかしながら、天然の遺伝子回路は多要素が複雑に相互作用するシステムであるため、適切な数理モデル化の手法は未だ確立していない。そのため、比較的少数の遺伝子によって構成されるモデル人工遺伝子回路を生きた細胞内に構築し、その動態を数理モデルによって記述する、合成生物学アプローチが注目されている。

細胞の分化を概念的に理解するためのモデル回路に、二つの遺伝子が互いの発現を抑制しあう相互抑制回路がある。この回路を持つ細胞は、二つの安定状態(遺伝子発現プロファイルにより記述される状態)のうちのどちらかをとる、双安定を示す。一つの細胞が、二つの安定状態のうち実際にどちらをとるかは、初期状態が二つの安定状態を分ける分水嶺のどちら側にいるかによって決まる。一方、細胞集団が多様化するか否かも、集団の初期状態の分布が分水嶺をまたぐか否かによって決定される。このシンプルな回路は、分化のモデル系としてよく研究されているが、一旦分化した後の多分化能獲得など、天然システムで見られる高次な現象について、すべてを説明するには至っていない。

本研究では、相互抑制関係にある遺伝子の大量発現によって、細胞に多分化能を与え、さらに分化後の細胞の比率を自由にコントロールするメカニズムを提案する。双安定状態にある細胞内で遺伝子の大量発現を行うと、双安定状態から単安定に変化させることができる。このとき、大量発現のレベルを調整するとことで、これまでよりはるかに簡単に、細胞集団と分水嶺の位置関係をコントロールできるようになり、その結果、細胞の比率を簡単にコントロールすることができるようになった。我々はこのモデルを、相互抑制回路と大量発現回路の二つを組み合わせた人工遺伝子回路を大腸菌に実装することで、生きた細胞において実証することに成功した。

大量発現による初期状態制御メカニズムは、分子や細胞の種類や詳細によらないことから、幹細胞などの分化制御に広く応用できることが期待される。

synthetic biology, genetic circuit

講演番号：2B14a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ B 校舎 14 会場

大腸菌機能未知転写因子 YgeK の機能解析
Characterization of the transcription factor YgeK of *Escherichia coli*
○安藤 知菜美[1]、石浜 明[1,2]、山本 兼由[1,2] ([1]法政大・生命科学、[2]マイクロナノセンター)
○Chinami ANDO[1], Akira ISHIHAMA[1,2], Kaneyoshi YAMAMOTO[1,2] ([1]Dept. Frontier Biosci., Hosei Univ., [2]Research Center for Micro-Nano Tech., Hosei Univ.)

大腸菌 YgeK は helix-turn-helix（HTH）モチーフをもつ転写因子と推定され、HTH モチーフの類似性から NarL ファミリーとして分類される。NarL ファミリーの多くの転写因子は細菌情報伝達機構の二成分制御系のレスポンスレギュレーターであり、N 末端にリン酸化アスパラギン酸を含むレシーバードメインをもつが、YgeK はレシーバードメインがない。しかし、レシーバードメインをリン酸化する二成分制御系のヒスチジンキナーゼである UhpB と BarA は YgeK をリン酸化することが試験管内反応で確認され、従来のレスポンスレギュレーターのリン酸化とは異なる反応機序をもつと考えられる。本研究では YgeK の機能解析を行った。

まず、大腸菌内 *ygeK* 遺伝子の発現を確認するために、*ygeK* のプロモーター領域と *lacZ* の融合遺伝子を作製し、L ファージを媒介に *ygeK-lacZ* 融合遺伝子を大腸菌ゲノム上に導入した。b-ガラクトシダーゼ活性を指標にフェノタイプマイクロアレイを用い様々な培養条件で *ygeK* 遺伝子の発現を測定したが、有意な発現を確認できなかった。つぎに、*araBAD* プロモーターで誘導する *ygeK* 発現プラスミドを構築した。*ygeK* 発現プラスミドを様々な大腸菌株に導入した形質転換体から全タンパク質画分を調製し、ウェスタンブロッティングにより YgeK 発現を確認した。その結果、YgeK は特定の大腸菌株でのみでしか検出できなかった。YgeK が発現する大腸菌形質転換体の表現型についてフェノタイプマイクロアレイを用いて網羅的に解析を行った。その結果、YgeK 発現によりジペプチド資化能が消失し、いくつかのリン源の資化能が向上した。また、いくつかの抗生物質に対する感受性が変化することも確認された。さらに、YgeK 発現よるゲノム発現をトランスクリプトームによって網羅的に解析を行っている。これらの結果を踏まえ、大腸菌 YgeK の機能について考察する。

Escherichia coli, transcription regulation, *ygeK*

講演番号：2B14p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ B 校舎 14 会場

出芽酵母に高糖濃度耐性を付与する変異遺伝子の遺伝学的探索
Genetic search for the mutated gene which confers high-concentration sugar tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*
○小林 達朗、中川 洋史、橋爪 宏昌、山村 英樹、飯村 穣、早川 正幸（山梨大学大学院医学工学総合研究部　生体環境医工学系（山梨大院・医工総合・生命））
○Tatsuro KOBAYASHI,Youji NAKAGAWA,Hiroaki HASHIZUME,Hideki YAMAMURA,Yuzuru IIMURA,Masayuki HAYAKAWA (Division of Biotechnology, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi (Dept. Biotech. Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi))

【目的】バイオエタノール生産においては、高糖濃度環境下における酵母の発酵力や生育の低下が問題となる。一方、ワイン醸造やパン製造においても、高糖濃度のブドウ果汁やパン生地を用いた場合、発酵不良がしばしば問題になる。それゆえ、酵母の高糖濃度耐性能を強化する技術が強く求められているが、高糖濃度環境への適応機構には不明な点が多く、その技術は未だ確立されていない。本研究室では、実験室酵母に変異処理を行うことで、50%(w/v)グルコース存在下でも良好な生育を示す高糖濃度耐性突然変異株である HCEBG2 株が取得されている。そこで、本研究においては HCEBG2 株から高糖濃度耐性を付与する変異遺伝子の探索を行った。
【方法及び結果】遺伝学的解析の結果、HCEBG2 株が有する高糖濃度耐性変異は一遺伝子変異でかつ半優性変異であった。そこで、遺伝学的マッピング法により変異遺伝子の探索を行った。まず、HCEBG2 株と野生型株の二倍体を作製し、胞子を形成させた後四分子分離を行い、複数の遺伝子座と高糖濃度耐性変異遺伝子座について連鎖分析を行った。その結果、*ADE2* 遺伝子座との連鎖分析において四分子分布は両親二型 : 非両親二型 : テトラ型の比が 19 : 1 : 6 となり、L 分布を示した。従って、変異遺伝子座は *ADE2* 遺伝子座と連鎖しており、第 XV 番染色体上に存在することが明らかになった。また、遺伝学的距離は約 23 cM であることが判明した。そこで変異遺伝子座のより詳細なマッピングを行うため、変異遺伝子座付近と推測された *ECM3* 遺伝子座へ *SpHIS5* 遺伝子を、*PNS1* 遺伝子座へ *kanMX* 遺伝子をそれぞれ挿入した野生型株を構築し、HCEBG2 株と接合させ四分子解析を行った。53 子嚢を解析し、Perkins の近似式により遺伝学的距離を算出した結果、*ECM3* 遺伝子座との距離が 4.7 cM、*PNS1* 遺伝子座との距離が 27.4 cM となった。従って高糖濃度耐性変異遺伝子は *ECM3* 遺伝子座から 4.7 cM 右腕側に存在することが示唆された。現在、この付近の遺伝子群のクローニングを行い、変異遺伝子の特定を進めている。

high-concentration sugar tolerance, mutated gene, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：2B14p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ B 校舎 14 会場

細胞性粘菌における α-MPP の相同遺伝子 *mppA2* の解析
Analysis of *Dictyostelium* α-MPP homolog *mppA2* gene
○菊地 望[1]、長山 耕己[1,2]、大町 鉄雄[1] ([1]弘前大・農学生命、[2]マンチェスター大)
○Nozomi KIKUCHI[1], Koki NAGAYAMA[1,2], Tetsuo OHMACHI[1] ([1]Fac. of Agr. & Life Sci., Hirosaki Univ., [2]Fac. of Life Sci., Univ. of Manchester, UK)

【背景・目的】ミトコンドリアタンパク質の多くは核ゲノムにコードされており、N 末端にミトコンドリア移行シグナル（MTS）配列を持つ前駆体タンパク質として細胞質で合成される。その後、ミトコンドリアへ移行し、MTS 配列が MPP（Mitochondrial processing peptidase）によって切断・除去されて成熟体タンパク質となる。当研究室では細胞性粘菌におけるミトコンドリア生合成研究の一環として、MPP の構造解析と機能についての研究が行われてきた。MPP は α-及び β-サブユニットからなるヘテロ二量体酵素である。前駆体として合成された α-MPP はミトコンドリアへ移行し、既存の MPP によって MTS が切断された後、さらに新規プロテアーゼ MAPP（MPP α-processing peptidase）によりプロセシングされて成熟体になることが分かった。また粘菌ゲノムプロジェクトにおいて、α-MPP と相同な遺伝子 *mppA2* の存在が示された。そこで、α-MPP との関連から未だ解明されていない MPPA2 の構造と機能解析について研究を行った。
【方法及び結果】cDNA クローン（VFF577）のインサート DNA を pET-15b にサブクローニングして pETmppA2 を構築した。大腸菌形質転換体（pETmppA2）を LB 培地で培養し、IPTG 添加して MPPA2 を発現させ、SDS-PAGE で解析した結果、約 59 KDa のタンパク質が検出された。また、MPPA2 の細胞内局在性を検討するため、MPPA2-GFP 融合タンパク質を粘菌細胞で発現させて蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、MPPA2 はミトコンドリアに局在することが分かった。さらに、粘菌の発生分化における MPPA2 の発現を調べるため、発生各時期の細胞から粗酵素を調製し、抗 MPPA2 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、MPPA2 は発生の開始から集合体期の細胞において高く発現し、その後減少した。現在、MPPA2 過剰発現株及びその遺伝子の破壊株を作製し、MPPA2 の機能解析と発生分化に対する影響について検討中である。

Mitochondrial processing peptidase (MPP), *Dictyostelium discoideum*

講演番号：2B14p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ B 校舎 14 会場

ミトコンドリア局在シグナル配列の解析

Analysis of mitochondrial localization signal sequence

○徳田 茜、星田 尚司、赤田 倫治（山口大院・医系・応用分子生命）
○Akane TOKUDA,Hisashi HOSHIDA,Rinji AKADA (Yamaguchi Univ.)

タンパク質は細胞内でそれぞれに決められた細胞小器官で働き、その場所への移動は配列中にコードされている局在配列によって決まる。しかし、様々なミトコンドリア局在タンパク質の配列を見ても明確な保存配列はない。

本研究では *Neurospora crassa* のミトコンドリア局在型 ATPase である NcSu9 のシグナル配列を用いて、ミトコンドリア局在に重要な配列を解析した。

これまでに NcSu9 の 1-33 アミノ酸がミトコンドリアに局在を示すのに必要な配列であることを明らかにしていた。ミトコンドリア局在に必要な最小限の局在配列を同定するため 2-33 アミノ酸残基を様々に削除した NcSu9 シグナル配列を GFP に付加し、GFP の局在を観察した。

本研究では、効率的に DNA 配列の削除を行うために、DNA 断片を非相同末端結合により高頻度で結合できる酵母 *Kluyveromyces marxianus* を宿主として用いた。*K. marxianus* で NcSu9_1-33 GFP を発現させるように作成したプラスミドをテンプレートにして、NcSu9_1-33 の一部だけを削除するように PCR で合成した。この線状 DNA を *K. marxianus* へ導入すると DNA の両末端間で非相同末端結合することで NcSu9_1-33 を部分的に削除したプラスミドを構築した。

計 35 個の削除配列の局在から、個々の削除ではミトコンドリアに局在した領域でもこれらを組み合わせて同時に削除するとミトコンドリアに局在しなくなる場合があった。そこで、アミノ酸側鎖の性質に着目したところミトコンドリア局在を示すものは“塩基性-疎水性-疎水性”配列を三つ以上含むことが分かった。そこで、人工的に設計した配列を用いて局在を観察すると、二回ではミトコンドリアに局在せず、三回では一部ミトコンドリアに局在し、四回ではほとんどの GFP がミトコンドリアに局在することが分かった。繰返し単位をさらに解析すると塩基性残基の位置はアルギニン残基でもリシン残基でもミトコンドリアに局在した。一方、疎水性アミノ酸を変化させた場合にはミトコンドリアに局在するとしないものが存在し、さらに中性アミノ酸を含んでいてもミトコンドリアに局在する配列が見つかった。したがって、疎水性の部分はより厳格な規則があることが示唆された。

mitochondrial localization signal, deletion analysis, *Kluyveromyces marxianus*

講演番号：2B14p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ B 校舎 14 会場

耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* の交配と接合型

Mating and mating types of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*

○村重 卓、星田 尚司、赤田 倫治（山口大院・医系・応用分子生命）
○Suguru MURASHIGE,Hisashi HOSHIDA,Rinji AKADA (Yamaguchi Univ.)

耐熱性酵母*Kluyveromyces marxianus*はバイオエタノール生産に有用であり、モデル生物としての利用も期待できる酵母であるが、交配条件や接合型の決定機構については知られていない。そこで、本研究では交配条件と接合型遺伝子の解析を行った。

K. marxianus DMKU3-1042 野性株から得た異なる栄養要求性を持つ 2 株の変異体を用いて栄養要求性相補によって交配を調べた。2% グルコース固体培地に 2 つの株を交差させるように塗り、部分的に混合した。1 日後これを最少培地へレプリカし培養すると、混合した場所でのみ酵母が増殖したことから、*K. marxianus* は交配でき、ホモタリック酵母であることがわかった。最適な交配条件を調べるために、様々な条件で交配させ最少培地に広げ、生えたコロニーを計数した。Yeast Nitrogen Base (YNB)、グルコース、$(NH_4)_2SO_4$ からなる最少培地の成分を変化させた結果、$(NH_4)_2SO_4$ は交配を抑制しており、交配培地として 0.17% YNB 及び 2%グルコース液が適していることがわかった。また、交配時の細胞濃度を変化させたところ、交配率は細胞濃度に大きく依存しており、低い細胞濃度のときに高い交配率を示し、高い細胞濃度のときはほとんど交配しないことがわかった。

K. marxianu がホモタリックであることは、接合型を変換できることを示している。そこで、接合因子 **a**-ファクターとα-ファクターのプロモーター下流にそれぞれ GFP と RFP の蛍光タンパク質遺伝子を配置させて単一の株に導入した。交配条件で培養したところ、各細胞でどちらか一方の蛍光が観察された細胞だけでなく、両蛍光タンパク質が発現している細胞も存在したことから、*S. cerevisiae* で考えられている **a** 型とα型の接合型決定の概念では説明できない事がわかった。

K. marxianus のゲノム配列上には 3 つの *MAT* 候補遺伝子が存在していた。これら候補遺伝子の発現や破壊時の接合型を調べることで、*K. marxianus* における接合型の解析を進めている。

Kluyveromyces marxianus, mating, mating type

講演番号：2B14p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ B 校舎 14 会場

フェロモン/受容体間の特異性の変化は生殖隔離を導くか?
Does a change in molecular specificity between the mating pheromone and its cognate receptor trigger reproductive isolation?
○清家 泰介、中村 太郎、下田 親（大阪市立大学院理）
○Taisuke Seike,Taro Nakamura,Chikashi Shimoda (Osaka City Univ.)

私たちは分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いて試験管内で生殖隔離を実現することに成功した。接合には接合フェロモンとその受容体間の分子認識が一義的に重要であるが、私たちはそれら 2 つのタンパク質を両方とも変えることにより、変異体間では接合できるが、野生型とはまったく接合できない変異体のペアを 3 種作製することができた。これらの変異体間での接合によって生じた胞子は正常に発芽し、稔性を持っていることを確認した。そこで次に、野生型ペアと変異体ペアを混合培養した際の、相互遺伝子フローを検証した。染色体上に薬剤耐性マーカー（G418 とナウセオスライシンのどちらか一つ）を組み込み、接合により二重耐性株が出現するかを詳細に調べた。その結果、変異体ペアでも予想通り二重耐性株が出現したことから、これらも独立した生殖群として進化していく可能性が示唆された。さらに *S. pombe* に最も近縁な *S. octosporus* とのキメラ受容体実験により、フェロモン/受容体間の認識には接合フェロモンの 7 番目のチロシン残基が効いていることを明らかにした。このことは両種間でもフェロモンと受容体の突然変異により接合前隔離が生じたことが種分化のトリガーとなった可能性を示唆している。本大会では、このようにして接合フェロモンと受容体の共進化が生殖隔離を誘導し、種分化へとつながる可能性を議論したい。

fission yeast, mating, reproductive isolation

講演番号：2B14p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ B 校舎 14 会場

分裂酵母 ADAM メタロプロテアーゼ Mde10 による胞子表層構造の構築

Role of the fission yeast ADAM metalloprotease Mde10 in construction of spore surface

○福西 加奈、中村 太郎（阪市大院理・生物地球）
○Kana FUKUNISHI,Taro NAKAMURA (Osaka City Univ.)

ADAM(a disintegrin and metalloprotease)は高等真核生物に広く保存されているメタロプロテアーゼである。ADAM はメタロプロテアーゼ、ディスインテグリン、システインリッチ、膜貫通ドメインなど特徴的なドメインを有する。高等生物のＡＤＡＭは、細胞表層で様々なタンパク質と相互作用し、細胞内シグナルの調節、細胞の増殖、分化などに関わっていることが知られている。分裂酵母の Mde10 は、ADAM の分裂酵母オルソログである。Mde10 は胞子の表層に局在し、その表層構造の構築に関わっていることから、高等生物の ADAM と似た機能を有していると思われるが、その詳細な分子メカニズムは不明である。本研究は、i)各ドメインの機能　ii)Mde10 と相互作用する因子の取得と解析により、分子メカニズム解明を目指す。

i)については、Mde10 に存在するドメインを欠失したさまざまな変異遺伝子を作製し、胞子表層構造への影響を調べた。ii)については、酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングを行い、その候補遺伝子をこれまでに 2 つ取得した。また、野生型株と mde10 破壊株の胞子壁を構成するタンパク質の比較から、候補因子を 1 つ取得した。

yeast, protease, cell wall

講演番号：2B14p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ B 校舎 14 会場

DNA 損傷部位の核内空間配置変化におけるクロマチンリモデリング複合体および核膜タンパク質の寄与
Contribution of chromatin remodeling complexes and nuclear membrane proteins to the spatial arrangement of DNA double-strand break site

○小西 辰紀[1]、尾間 由佳子[1]、中山 景樹[1]、堀籠 智洋[2]、Gasser Susan[2]、原田 昌彦[1]（[1]東北大・院農、[2]Friedrich Miescher Institute, Basel）
○TATSUNORI KONISHI[1], YUKAKO OMA[1], KEYAKI NAKAYAMA[1], CHIHIRO HORIGOME[2], SUSAN GASSER[2], MASAHIKO HARATA[1] ([1]Lab. Mol. Biol., Grad. Sch. Agri.Sci., Tohoku Univ., [2]Friedrich Miescher Institute, Basel)

【目的】DNA 二重鎖切断(DSB)は、細胞死やがん化を誘発する重篤な DNA 損傷であり、その修復にはクロマチンリモデリング複合体による DSB 部位周辺のクロマチンの構造変換が必要である。最近の出芽酵母を用いた解析により、DSB を核膜近傍にまで移行させる機構が存在しており、この核内のクロマチン空間配置の変化も修復に関与することが明らかにされた。その際に DSB は、核膜タンパク質である Mps3 または核膜孔複合体(NPC)と結合することが示されており、これによって損傷部位を核膜に繋留し、不必要な DNA 鎖の組み換えが抑制されていると考えられている。しかし、DSB の核膜近傍への移行について、その制御機構および Mps3 と NPC の関係性は明らかにされていない。我々は、DSB 部位周辺に結合する SWR1 および INO80 クロマチンリモデリング複合体による DSB 部位周辺のクロマチン構造変換が、その核膜近傍への移行の制御に関与していると予想し、両複合体の機能欠損によって、DSB の核膜近傍への移行がどのように変化するかを解析した。また、この修復経路における Mps3 と NPC の機能の関連性を調べるために、Mps3 または NPC の DNA 結合能の欠損が、DSB の核膜への繋留に与える影響を解析した。
【方法】解析には、ガラクトース添加により MAT 遺伝子座特異的に単一の DSB を導入することができる出芽酵母を用いた。*SWR1* を欠損させた SWR1 複合体変異株および *ARP8* を欠損させた INO80 複合体変異株を用いて、DSB を導入後、経時的に DSB の Mps3 への結合、および DSB の NPC への結合をクロマチン免疫沈降法により検出した。また、同様の方法により NPC 変異株(*nup133⊿N*)における DSB の Mps3 への結合、Mps3 変異株(*mps3⊿N*)における DSB の NPC への結合を検出した。
【結果】野生株と比較して、SWR1 複合体変異株では DSB の Mps3 への結合、および DSB の NPC への結合が共に著しく低下していた。この結果は、SWR1 複合体が DSB の核膜近傍への移行に必要であることを示している。一方、INO80 複合体変異株では、DSB の Mps3 への結合は著しく低下していたが、DSB の NPC への結合は野生株と同程度の結合が観察された。これらの結果は、SWR1 複合体と INO80 複合体が異なる機構で、DSB の核膜近傍への移行に寄与していることを示唆している。また、NPC 変異株では DSB の Mps3 への結合が低下し、Mps3 変異株では DSB の NPC への結合が低下した。これらの結果は、Mps3 と NPC が協調的に DSB に結合することにより、DSB を安定に核膜に繋留させていることを示唆している。

DNA double-strand break repair, chromatin remodeling complex, nuclear membrane protein

講演番号：2B14p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ B 校舎 14 会場

テロメア維持に欠損を持つ分裂酵母変異株の微小管阻害剤感受性機構
Mechanism of sensitivity to microtubule inhibitor in fission yeast mutant that has defect in telomere maintenance
升田 賢太、○上野 勝（広大院先端物質）
Kenta Masuda,○Masaru UENO (Hiroshima Univ.)

DNA が損傷すると細胞周期が停止し、DNA 損傷が修復される仕組みをチェックポイントと言う。特に細胞周期の G２期で働くものを G２チェックポイントと言う。抗がん剤の多くは DNA に損傷を与えることでがん細胞を死滅させる。正常細胞は、G1 チェックポイントが強く働いているのに対して、がん細胞の多くは、G1 チェックポイントが機能せず、G2 チェックポイントで DNA 損傷が修復される。抗がん剤によって DNA 損傷を与えたときに、 G2 チェックポイントを阻害すると、G１チェックポントが強く働いている正常細胞の生育には影響を与えず、G2 チェックポイントが強く働いているがん細胞は、DNA 損傷を修復することが出来ず、結果としてがん細胞を特異的に攻撃するため、G2 チェックポイント阻害剤は、副作用の少ない抗がん剤となることが期待されている。

当研究室は、分裂酵母を用いてテロメア維持や DNA 修復に関係する蛋白質の機能解析を行い、その知見をがんの治療に応用することを目指している。Pot1 は一本鎖のテロメア突出に結合し、染色体末端を保護している。分裂酵母 *pot1* 欠損株は染色体が環状化した株が生き残る。RecQ ヘリケースは DNA 組換えの複数の段階に関与している。我々は、分裂酵母 Pot1 と RecQ ヘリケース Rqh1 との二重変異株は、テロメアが DNA 組換えで維持されることや、微小管阻害剤に感受性になることを報告している（高橋ら、Mol. Cell. Biol. 2011）。しかしその機構は完全には解明できていない。そこで *pot1 rqh1* 二重変異株が微小管阻害剤感受性になる原因の解明を本研究の目的とした。

pot1 rqh1 二重変異株の微小管阻害剤感受性を抑圧する変異株を探索した結果、G2 チェックポイントで機能する因子である *chk1* を破壊すると *pot1 rqh1* 二重変異株の微小管阻害剤感受性が抑圧されることを発見した。*pot1 rqh1* 二重変異株は、テロメア間での組み換え中間体が染色体分配時にも蓄積している。一方 *pot1 rqh1 chk1* 三重変異株は、テロメア間での組み換え中間体が染色体分配時に蓄積しないことがわかった。これらのことから、Chk1 は *pot1 rqh1* 二重変異株のテロメア間の組換え中間体を蓄積させることで、微小管阻害感受性を高めていることが示唆された。

ヒト G2 チェックポイント因子である Chk1 の阻害剤は、正常細胞に影響を与えず、がん細胞のみを攻撃する副作用の少ない抗がん剤となることが期待されている。本研究で発見した現象を利用すると、微小管阻害剤存在下での分裂酵母の生育回復を指標にした新しい Chk1 阻害剤のスクリーニング法の開発に応用できることが期待できる。

Temolere, DNA repair, anti-cancer drugs

講演番号：2B14p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ B 校舎 14 会場

イネいもち病のキチンデアセチラーゼ様タンパク Cbp1 の感染特異的器官文化に関わる機能解析
Functional analysis of Cbp1 like chitindeacetylase involved in infection-specific organ differentiation of Magnaporthe oryzae
○黒木 美沙[1]、吉田 翔[2]、成川 恵[1]、鎌倉 高志[1] ([1]東理大理工、[2]東理大院理工)
○Misa KUROKI[1], Syou YOSHIDA[2], Megumi NARUKAWA[1], Takashi KAMAKURA[1] ([1]Tokyo Univ. of Science, [2]Tokyo Univ. of Science)

イネに感染し深刻な被害を引き起こす植物病原菌の一種であるイネいもち病菌 Magnaporthe oryzae は、感染初期段階に分生子の先端から粘着物質を分泌し植物表皮上に接着する。その後発芽管を伸ばして植物表皮の環境を認識し、発芽管の先端に感染に特化した器官である付着器を形成してイネに侵入する。この付着器形成は様々な環境要因により誘導されると考えられている。現在、付着器形成促進シグナルとして、接着表面の疎水性や硬度、植物由来成分などが挙げられているが、分化の条件や誘導に関する遺伝子についてはまだ完全には解明されていない。
付着器形成に影響を与えると考えられる遺伝子として、chitin-binding protein 1(*CBP1*)が単離された。*CBP1* は発芽管伸長時に特異的に発現が見られ、キチンデアセチラーゼ相同タンパク質 Cbp1 をコードすることがわかっている。*CBP1* 遺伝子破壊株を作製したところ、疎水性の人工固体基質上において野生株と比較して付着器形成率が低下した。しかし、植物表皮成分である 1,16-hexadecandiol や cAMP 分解阻害剤である 3-isobutyl-1-methylxanthine 、PKC 活性化因子である 1,2-dioctanoyl-rac-glycerol の添加によって付着器形成率の回復が見られた。このことから、*CBP1* は付着器形成そのものではなく付着器形成の誘導に関わると考えられる。そこで、*CBP1* の機能についてさらに解析を進めた。
まず *CBP1* のキチンデアセチラーゼ活性について調べた。既に結晶構造解析や活性測定がなされている他の菌のキチンデアセチラーゼの配列を参考に *CBP1* の活性中心を推測し、その部位に変異を導入したところ、付着器形成率の低下が見られた。これにより、*CBP1* がキチンデアセチラーゼとして働く可能性が示された。
また、*CBP1* のアミノ酸配列には、GPI アンカー型タンパク質において特徴的な配列との相同性が見られる。そのため、*CBP1* がシグナル経路に関わるモデルとして GPI アンカー修飾を受けている可能性を考えた。*CBP1* の C 末端欠損株を作製したところ、付着器形成率の低下が見られた。GPI アンカー修飾には C 末端の配列が重要である事が知られており、*CBP1* が GPI アンカー化している可能性が示唆された。現在、*CBP1* の GPI アンカー化についてさらに検証を進めている。

GPIanchor, pathogenesis, Appressorium

講演番号：2B14p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ B 校舎 14 会場

麹菌アミノ酸トランスポーターの機能解析
Functional analysis of amino acid transporter in *Aspergillus oryzae*
○浜中 大夢、松永 翔也、金子 明裕、佐野 元昭、北川 治恵、尾関 健二、大箸 信一（金沢工大・ゲノム研）
○Hiromu HAMANAKA, Shoya MATSUNAGA, Akihiro KANEKO, Motoaki SANO, Harue KITAGAWA, Kenji OZEKI, Shinichi OHASHI (KIT)

【目的】
外界の栄養源の取り込みには細胞膜上に存在するトランスポーターが重要な働きをしている。トランスポーターの働きは、外界の栄養源の濃度や種類により、遺伝子で複雑な制御を受けることが近年の研究により明らかにされてきている。
麹菌(*Aspergillus oryzae*)の遺伝子は約 12,000 個とされており、そのうちトランスポーターに関係していると考えられるものが約 600 個あるとされている。また、その中でアミノ酸に関わるトランスポーターは約 80 個あると考えられている。麹菌のトランスポーターに関係している遺伝子についてはあまり解析が進んでいない。そこで昨年度の本大会で、酵母で解析が進んでいる様々なアミノ酸の取り込みに関係しているとされる General amino acid permease (Gap 1)と高い相同性をもつ麹菌の遺伝子(Gap A)について報告を行った[1)]。今回 Gap A について、アミノ酸の取り込みについて解析を行ったので報告する。
【方法および結果】
酵母の Gap 1 と高い相同性をもつ Gap A について、*A.oryzae ligD* 破壊株を宿主として遺伝子破壊株の作製を行った。宿主株と破壊株でヒスチジンやプロリンなどを単一窒素源とした培地での生育を観察したところ、破壊株では宿主株と比べ、明らかな生育不良が観察された。この結果から、破壊した遺伝子はアミノ酸などの取り込みに関わる重要な遺伝子であると考えられる。また、酵母の Gap 1 の発現を抑制するとされるアルギニンを単一窒素源とした培地での生育を観察したところ、宿主株と破壊株の差はあまりみられなかった。このように、Gap A と酵母の Gap 1 で機能が同じ点がみられた。
また現在、Gap A と相同性の高い別の遺伝子についても解析を行っている。

1)佐野ら：日本農芸化学会 2012 年度大会

Aspergillus oryzae, transporter, amino acid

講演番号：2B14p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ B 校舎 14 会場

Aspergillus oryzae のハイドロフォービン群の機能と局在性の解析

Characterization and localization of hydrophobins in *Aspergillus oryzae*

○石田 千絵、山川 結、早川 芙佑華、水野 佑香、中島 春紫（明治大・農・農化）
○ Chie ISHIDA,Yui YAMAKAWA,Fuyuka HAYAKAWA,Yuka MIZUNO,Harushi NAKAJIMA (Dept. of Agricultural Chemistry, Univ. of Meiji)

【目的】

ハイドロフォービン（hydrophobin）は、空気中に菌糸を伸長させる糸状菌・担子菌類にみられる細胞表層タンパク質である。低分子量（70～150a.a.）の両親媒性タンパク質であり、菌体外に分泌された後、菌糸や分生子の表層に自己集合して単層を形成し、撥水性の付与や疎水性物質表面への吸着に関与することが知られている。一般に、１つの菌株には互いに相同性の低いハイドロフォービン遺伝子が複数存在しているが、その使い分けについてはほとんど解明されていない。

著者らは麹菌 *Aspergillus oryzae* から、ハイドロフォービンをコードすると推定される遺伝子を 4 つ単離し（*hypA, B, C, D*）、発現特性や局在性について解析を進めている。これまで、HypA は主として分生子に、HypB は菌糸に局在し、HypC は通常の条件下では発現量が少ないことを観察している。さらに、*hypA* 遺伝子は分生子形成期に転写量が増加し、一方、*hypB* 遺伝子は菌糸の伸長期に転写され、分生子形成期には転写量が減少することを見出している。この転写パターンからプロモーターがハイドロフォービンの局在性を制御していると考えられる。本研究では、*hypA, hypB*遺伝子のプロモーターの機能について解析を行った。

【方法】

hypA, hypB 遺伝子のプロモーター制御下で蛍光タンパク質を発現する融合遺伝子 P*hypA*-DsRed2, P*hypB*-eGFP および HypA と HypB のプロモーター領域を交換した P*hypA*-*hypB*-DsRed2, PhypB-*hypA*-eGFP を構築し、co-transformation により麹菌に導入して同時発現株を作製した。蛍光顕微鏡観察を行い、*hyp* 遺伝子のプロモーターとハイドロフォービンの局在性との関連を解析した。

【結果】

PhypA-DsRed2・PhypB-eGFP 同時発現株では、P*hypB* 制御下にある eGFP は主として菌糸に、P*hypA* 制御下にある DsRed2 は分生子頭に局在化することを観察した。また、eGFP は菌糸伸長時期に、DsRed2 は分生子形成時期に蛍光が増大したことから、麹菌のハイドロフォービンの局在性はアミノ酸配列ではなく、*hyp* 遺伝子群のプロモーターにより発現時期と局在性が制御されていることが示唆された。

Aspergillus oryzae, hydrophobin

講演番号：2B14p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ B 校舎 14 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* における機能性ハイドロフォービンの生産と吸着
Production and adsorption of functional hydrophobin in *Aspergillus oryzae*
加瀬 明日香、○堂前 圭佑、中島 春紫（明治大農・農化）
Asuka Kase,○Keisuke Domae,Harushi Nakajima (Dept. of Agricultural Chemistry , Meiji Univ.)

【目的】
ハイドロフォービンは糸状菌・担子菌の空気中に露出した細胞の表層に普遍的に存在する両親媒性の低分子量タンパク質である。単量体として細胞外に分泌された後、細胞表層で疎水性領域を外側に向けて自己集合して強固な単層を形成することにより、気中菌糸や胞子・分生子に撥水性を与える。一方、単量体のハイドロフォービンは各種の基材の表面に強く吸着する性質を有し、基材表面をハイドロフォービンでコーティングすることにより、基材の疎水性度が大きく変化することが報告されている。著者らは、麹菌（*Aspergillus oryzae* ）からハイドロフォービンをコードすると考えられる遺伝子（*hypA* ～*hypD* ）を単離し、固体培養時には *hypA* 遺伝子が最も多く発現すること、およびコードされる HypA タンパク質が主として分生子に局在することを観察している。本研究では、麹菌を宿主として単量体の HypA および重金属吸着ペプチドを結合した機能性 HypA の大量生産と精製システムを構築し、親水性および疎水性の各種基材に吸着させて吸着状況および安定性を検討することにより、HypA を用いた機能性素材開発のための基礎的知見を得ることを目的としている。
【方法】
吸着性・自己集合性の強いハイドロフォービンを単量体の状態で調製するため、麹菌を宿主として *enoA* プロモーター制御下で液体培養により HypA および機能性 HypA を生産し、疎水性クロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製した。精製 HypA の水溶液を各種基材上に滴下して乾燥することにより吸着させ、免疫染色および走査型電子顕微鏡により吸着状況と安定性について検討を行なった。
【結果】
免疫染色を応用した検出法により、HypA および機能性 HypA がテフロン板などの疎水性基材表面に吸着していることが観察され、機能性ペプチドを融合した機能性ハイドロフォービンも固体基材表面への吸着能を保持していることが示された。一方、走査型電子顕微鏡により、ガラス板などの親水性基材表面への特徴的な吸着パターンが観察されたが、吸着の安定性は高くないことも判明した。

Aspergillus oryzae, Hydrophobin, adsorption

講演番号：2B14p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ B 校舎 14 会場

糸状菌ヒスチジンキナーゼ HysA による ROS 発生への効果
Generation of Reactive Oxygen Species through the function of HysA, a Sensor Histidine kinase in *Aspergillus nidulans*

○林 早紀[1]、金丸 京子[1]、吉岡 めぐみ[1]、松井 哲児[1]、加藤 雅士[2]、小林 哲夫[1] ([1]名大院農、[2]名城農)
○Saki HAYASHI[1], Kyoko KANAMARU[1], Megumi YOSHIOKA[1], Tetsuji MATSUI[1], Masashi KATO[2], Tetsuo KOBAYASHI[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Meijo Univ.)

生物は、速やかに環境変化を認識し適応するための遺伝子発現制御システムをもっている。その中でも、環境センサーであるヒスチジンキナーゼと下流制御因子レスポンスレギュレーター間のリン酸基転移を介した情報伝達機構は、バクテリアから酵母カビなどの真核微生物、さらには植物まで広く保存された環境応答システムである。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* には 15 種類のヒスチジンキナーゼと 4 種類のレスポンスレギュレーター、その間に機能するリン酸基転移中間因子 YpdA が存在し、糸状菌の環境応答、生育分化に重要な働きをしていることが明らかになってきた。分生子形成に重要な TcsA、浸透圧応答センサーである TcsB、糸状菌特異的な農薬感受性に関与する NikA、赤色光に応答して有性性殖を抑制する FphA など各センサーの機能および下流情報伝達機構、制御に関わる他の複数の因子などが報告されている。われわれは、Real Time PCR を用いた発現解析から、*A. nidulans* において発現量が最も多かったヒスチジンキナーゼ HysA に着目した。有性性殖を誘導するために寒天培地上で酸素レベルを制御すると、HysA の発現レベルが唯一高く維持されていたため、酸素制限条件で機能するヒスチジンキナーゼとして Hypoxia Sensor と推定し命名した。これまでに、*hysA* の破壊株、誘導発現株、リン酸基転移変異株を作成し生育の変化を観察したが、野生株との顕著な差を見いだすことができなかった。そこで本研究では、大腸菌で HysA タンパク質を精製し、*in vitro* において解析することで HysA 機能解明の手がかりを得ることにした。まず、糸状菌ヒスチジンキナーゼを用いたリン酸基転移反応が報告されていなかったため、精製 HysA の His 残基の自己リン酸化と His 残基から HysA 自身の C 末端側リン酸基受容部位(Asp 残基)へのリン酸基転移、さらに YpdA (His 残基) への転移を観察した。この HysA の自己リン酸化には還元剤 (DTT, GSH) を必要とし、酸化剤 (H_2O_2, DTNB) が存在すると HysA のリン酸化は認められなかった。しかしながら、*in vivo* においては、酸化剤 H_2O_2、還元剤 GSH 存在下、*hysA* 破壊株と野生株の生育に何ら違いが認められなかった。生物において、生育過程における酸化還元状態と ROS の発生に密接な関係があると考えられるため、次に NBT 染色による ROS の発生レベルを液体培養、寒天培地で観察した。その結果、*hysA* 破壊株は菌糸、分生子全体において ROS の発生レベルが高いことが観察された。破壊株に *hysA* 遺伝子を導入した誘導発現株では野生株と同様、菌糸先端のみに ROS が発生していた。リン酸基転移欠損の変異をもつ *hysA* 遺伝子の導入株は破壊株同様、高い ROS の発生を示した。以上の結果から、HysA は ROS 発生レベルをコントロールするセンサーヒスチジンキナーゼであると考えられた。

Aspergillus nidulans, Histidine Kinase, His-Asp phosphorelay

講演番号：2B14p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ B 校舎 14 会場

麹菌農薬センサーAoNikA と AoNikB は正反対のスイッチ機能を持つ
AoNikA and AoNikB are different histidine kinases about the sensing to fungicides, controlling the signal transduction in the opposite ways.
○金丸 京子[1]、伊谷 優佳里[1]、松井 哲児[1]、加藤 雅士[2]、小林 哲夫[1]([1]名大院生命農、[2]名城大農)
○Kyoko KANAMARU[1], Yukari Itani[1], Tetsuji Matsui[1], Masashi Kato[2], Tetsuo Kobayashi[1]([1]Meidai Univ., [2]Meijo Univ.)

His-Asp リン酸リレー情報伝達機構は原核生物から真核生物まで広く保存され、環境変化に応答してセンサーであるヒスチジンキナーゼから下流因子へのリン酸基転移によって情報が細胞内に伝達されるシステムである。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* には 15 種類のヒスチジンキナーゼが存在し、光や酸素、浸透圧などの変化に応答した遺伝子発現調節に機能することで糸状菌の生育分化をコントロールする。その中でもヒスチジンキナーゼ NikA は重要で、その遺伝子を破壊すると菌糸伸長が異常になり、糸状菌特異的な農薬（イプロジオン、フルジオキソニル）に耐性を示す。この破壊株に *nikA* 遺伝子を導入すると野生株と同様の正常な生育と農薬感受性を回復するが、情報伝達に重要なリン酸化部位に変異をもつ遺伝子を導入すると破壊株と同様の生育不良と農薬耐性を示した。すなわち、NikA を介したリン酸基転移が正常な生育と農薬感受性に重要であるといえる。また、NikA は N 末端側に 6 つの HAMP ドメインと呼ばれるシグナル応答領域を保持しており、1 番目の HAMP ドメインを欠失した変異株は良好な生育を示すものの農薬に対する感受性を示さなかった。正常な生育には 2 番目から 6 番目までの 5 つの HAMP ドメインで十分であり、1 番目の HAMP ドメインに農薬が作用すると 5 つの HAMP ドメインによる NikA の活性化が抑制されると考えられる。NikA 活性の抑制は結果的には下流因子（YpdA, SskA）へのリン酸基転移の抑制であり、すると、下流の情報伝達機構である HOG 経路が活性化され、異常な遺伝子発現による生育抑制が引き起こされると考えられている。本研究では、麹菌 *Aspergillus oryzae* に存在する 3 つの NikA タイプのヒスチジンキナーゼ AoNikA, AoNikB, AoNikC に注目した。AoNikA は *A. nidulans* NikA のオルソログであり、AoNikB は AoNikA と高いアミノ酸配列の相同性を示すが HAMP ドメインを 1 つ欠いており、AoNikC は HAMP ドメインを全くもたない。これら 3 つのヒスチジンキナーゼの農薬応答性を解析することで、HAMP ドメインの構造と機能において新たな知見が得られると考えた。まず、*AonikA*, *AonikB*, *AonikC* 遺伝子をそれぞれ *A. nidulans nikA* の破壊株に導入し、生育と農薬応答性を観察した。AoNikA は予想通り *nikA* 破壊株の生育欠損を相補した。それに対して、AoNikB, AoNikC はどちらも通常培地の生育において *nikA* 破壊株の生育不良を回復しなかった。しかしながら AoNikB はフルジオキソニルが培地中に存在すると、*nikA* 破壊株の生育欠損を相補し正常な菌糸伸長を促した。このことは AoNikA と AoNikB が正反対の農薬応答性を示すことを示唆した。*A. oryzae* の農薬感受性や AoNikA, B, C の発現レベルの解析と併せて、正反対のスイッチ機能をもつヒスチジンキナーゼを介した情報伝達機構について考察する。

Aspergillus oryzae, His-Asp phosphorelay, Histidine kinase

講演番号：2B14p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ B 校舎 14 会場

Trichoderma sp. USF-2690 における sorbicillinoid 生合成に関するポリケチド合成酵素遺伝子
Polyketide Synthase Gene for Sorbicillinoid Biosynthesis in *Trichoderma* sp. USF-2690

○森岡 陽[1]、志波 優[2]、清水 寛之[1]、加藤 達也[1]、菅谷 紘一[1]、小野瀬 淳一[1]、阿部 尚樹[1] ([1]東農大・応生科・栄養、[2]東京農大・生物資源ゲノム解析センター)
○Yoh Morioka[1], Yuh Shiwa[2], Hiroyuki Shimizu[1], Tatsuya Kato[1], Kouichi Sugaya[1], Jun-ichi Onose[1], Naoki Abe[1] ([1]Dept. of Nutr. Sci., Faculty of Applied Bio., Tokyo Univ. of Agri., [2]NGRC, Tokyo Univ. Agri.)

【目的】
土壌より分離したかび *Trichoderma* sp. USF-2690 株が複数の強い新たな DPPH ラジカル捕捉物質を生産していることを見出した [1)]。これらの化合物を sorbicillinoid 類と命名し、これまで安定同位体 ^{13}C の分子中への取り込み実験による生物有機化学的解析を行い、sorbicillinol を起点とした sorbicillinoid 類推定生合成経路について検討し報告してきた [2-4)]。今回我々は、次世代シークエンサーを用いて sorbicillinoid 類生合成に関するポリケチド合成酵素（PKS）遺伝子の探索を行うことを目的とした。
【方法】
液体培地にて 3 日間培養した *Trichoderma* sp. USF-2690 株より mRNA を抽出し cDNA としたのち、次世代 DNA シークエンサーの RNA-seq 法を用いてシークエンスを行った。シークエンスの結果得られた配列データから BLAST や 2ndFind、InterProScan などを用いてドメイン構造の解析を行った。
【結果】
シークエンスの結果 24891 個のコンティグが得られた。そのうち、PKS の必須構成ドメインである β-ketoacyl synthase (KS)、acyl transferase (AT)、acyl carrier protein (ACP) を含むものは 6 コンティグであり、還元型 PKS と非還元型 PKS が半数ずつ見出された。なかでも非還元型 PKS 3 コンティグのうちの 1 コンティグは、ACP ドメインの下流に monooxigenase のドメイン構造が含まれていた。生物有機化学的解析から sorbicillinol は環化前に酸化反応を受ける可能性が高いと推定され、sorbicillinol を産生する PKS は酸化酵素をコードするドメインを持つことが予想されることより、このコンティグが sorbicillinoid 類生合成の鍵となる sorbicillinol 産生 PKS 遺伝子である可能性が高いと予想し、現在詳細な機能解析を行っている。

1）N.Abe et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 661-666 (1998)
2）N. Abe et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 2090-2099 (2002)
3）阿部, 廣田, *有機合成化学協会誌* **62**, 584-597, (2004)
4）K. Sugays et al. *Tetrahedron Lett.* **49**, 654-657, (2008)

polyketide synthase, sorbicillinoid, RNA-seq

講演番号：2B14p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ B 校舎 14 会場

真菌を用いたクロラムフェニコールの新規作用点の探索

A Possible Alternative Target of Chloramphenicol in Fungi

○井上 雅高、西脇 綾香、後藤 麻紀子、成川 恵、鎌倉 高志（東理大院理工）
○Masataka INOUE, Ayaka NISHIWAKI, Makiko GOTO, Megumi NARUKAWA, Takashi KAMAKURA (Tokyo Univ. of Science)

イネいもち病菌（*Magnaporthe oryzae*）はイネに感染し、イネいもち病を引き起こす植物病原糸状菌である。本菌は宿主へ感染する過程で発芽管の先端に付着器という特異的器官を形成する。この付着器形成という現象は、真核生物における最も単純な細胞分化の一つであると考えられている。一般的に細胞分化には多くの遺伝子が関わっているため、この付着器形成を利用して細胞内因子の働きを阻害する薬剤の作用点を同定する実験系を構築した。

本菌に既存の薬剤を作用させた時に、一部の薬剤は発芽管伸長を阻害しない濃度で付着器形成を阻害した。その中の一つである Chloramphenicol(Cm)に今回着目した。Cm は原核生物の 70S リボソームの 50S サブユニットに作用し、タンパク質合成を阻害する効果が知られている。原核型リボソームがミトコンドリアに存在する事から、Cm を作用させる事で本菌のミトコンドリアに変化があるかどうかを調べる為に、本菌の胞子をミトコンドリアプローブである MitoTrackerRed で染色して観察した。その結果ミトコンドリアに形態上大きな違いは見られなかったため、本菌における Cm の作用点が既知以外の分子である可能性が考えられた。

新規作用点の探索を目的として、ペプチドレベルで探索することができる T7 ファージディスプレイ法と、タンパク質レベルで探索することができるアフィニティークロマトグラフィー法の双方を用いて取得を試みた。その結果、T7 ファージディスプレイ法でフォスファターゼ様タンパク質の一部と部分的相同性の高い候補ペプチド配列を得た。アフィニティークロマトグラフィー法を用いた結果でも、このタンパク質と同様の分子量であるバンドが確認できたため、これを Cm の標的候補タンパク質とした。

二回相同組換えを用いて本菌の標的候補タンパク質をコードしている遺伝子の破壊株を得た。破壊株では、発芽管伸長速度と胞子形成能が野生株より低下した。また、野生株の付着器形成を阻害する濃度の Cm を破壊株に作用させたところ付着器形成は野生株ほど阻害されなかった。その為、候補タンパク質は本菌の生育に関与しており、Cm と結合することにより付着器形成を阻害する可能性が示唆された。現在、この遺伝子に注目し更なる破壊株の取得、相補株の取得、生育検定を行い遺伝子の機能解析を進めている。また、アフィニティークロマトグラフィー法による候補タンパク質の精製と構造解析を同時に進めている。これら遺伝子、タンパク質の双方向から候補タンパク質の解析を行い、本菌における Cm の新規作用点の同定を目指している。

Magnaporthe oryzae, Appressorium, T7 phage display

講演番号：2B21a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ B 校舎 21 会場

たくあん漬けから分離した乳酸球菌 *Lactococcus lactis* PJR24 株が生産するバクテリオシンの特性

Characterization of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* PJR24 isolated from *Takuan-zuke*

○木村 宏和[1]、松崎 弘美[2] ([1]尚絅大・生活科学、[2]熊本県大・環境共生)
○Hirokazu KIMURA[1], Hiromi MATSUSAKI[2] ([1]Shokei Univ., [2]Pref. Univ. Kumamoto)

【目的】ある種の乳酸菌が生産する抗菌物質、バクテリオシンは安全な食品保存料としての利用が期待されているが、選択性・特異性が高く標的細菌のみに抗菌作用を示すことが重要となる。そこで、様々な抗菌スペクトルを示すバクテリオシンの探索は必要不可欠である。本研究では、発酵食品のたくあん漬けからバクテリオシン生産乳酸菌を分離し、生産するバクテリオシンについて検討を行った。
【方法と結果】たくあん漬けから、バクテリオシン生産乳酸菌 4 株（PJR12, PJR24, PJR27, PJR28 株と命名）を分離した。それら分離したバクテリオシン生産乳酸菌の培養液上清の抗菌スペクトルを検討したところ、PJR12, PJR27, PJR28 株は多くのグラム陽性細菌に対して抗菌作用を示し,それぞれの生産菌とナイシン Z 生産菌の間で cross-immunity を示した。そこで、ナイシン遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行いその塩基配列の解析を行ったところ、これら 3 株はナイシン Z 生産菌であることが明らかとなった。一方、PJR24 株は、ナイシン Z 生産菌に対して抗菌作用を示すため、ナイシンとは異なるバクテリオシンであることが考えられた。PJR24 株を 16S rRNA 解析および生理学的手法を用いた解析により *Lactococcus lactis* と同定した。PJR24 株の培養液上清より、70%飽和硫酸アンモニウム分画、透析により粗精製したバクテリオシンの pH、熱安定性について検討したところ、比較的広い pH 領域で安定であったが、110℃、10 分のオートクレーブ処理により検討したすべての pH 領域において失活したため、熱感受性であることが明らかとなった。粗精製したバクテリオシンを Accell QMA Sep-Pak を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、Tricine-SDS-PAGE およびゲルバイオアッセイ（重層法）を行ったところ、生育阻止円が観察され、本バクテリオシンの分子量は約 8.0 kDa であることが分かった。現在、逆相 HPLC を用いて、本バクテリオシンのさらなる精製を行っている。

bacteriocin, lactic acid bacteria

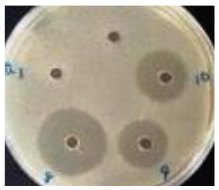
講演番号：2B21a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ B 校舎 21 会場

ミツバチ腐蛆病菌抑制効果を有するプロバイオティクス乳酸菌の解析

Analysis of probiotic lactic acid bacteria with antagonistic effects on foulbrood diseases in honeybees

○杉村 祐哉[1]、高松 大輔[2]、芳山 三喜雄[1]（[1]農研機構　畜草研、[2]農研機構　動衛研）
○Yuya SUGIMURA[1], Daisuke TAKAMATSU[2], Mikio YOSHIYAMA[1]（[1]NARO NILGS, [2]NARO NIAH）

【背景・目的】腐蛆病は、ミツバチ感染病であり法定伝染病に指定されている。原因菌であるアメリカ腐蛆病菌（*Paenibacillus larvae*）もしくはヨーロッパ腐蛆病菌（*Melissococcus plutonius*）がミツバチ幼虫に経口感染することで発症し、蜂群に深刻な被害を引き起こす。我が国における腐蛆病の防除は、抗生物質ミロサマイシンを用いた方法が唯一認められている。しかし、抗生物質の使用には、耐性菌の出現やミツバチ産物への残留が懸念されている。近年、これらの諸問題を解決する為、ヒトや家畜・魚類において抗生物質の代替として、プロバイオティクスを用いた感染病防除の試みが盛んに行われ、実際に効果を示す研究結果が多数報告されている。一方、ミツバチにおいては消化管内から乳酸菌をはじめとした多くのプロバイオティクス候補菌が単離されている。そこで、本研究ではミツバチにおいてプロバイオティクスを利用した腐蛆病防除法の開発を目指し、腐蛆病菌に対して抗菌効果を有するプロバイオティクス乳酸菌株の取得とその解析を試みた。


図　抗菌活性の測定

【方法・結果】ミツバチから消化管内容物を解剖・回収し、ミツバチ用飼料と混合し 35℃ で 3 日間培養した。培養後、炭酸カルシウムを含んだ MRS 寒天培地に塗布し嫌気条件下にて 3 日から 5 日間培養を行った。寒天培地上で生育した細菌をコロニー形状や酸の産生量、16S rRNA 遺伝子配列などを指標として計 11 株の菌株（LA1~11 株）を単離・分類した。その内訳は *Lactobacillus* 属細菌 10 株および *Bifidobacterium* 属細菌 1 株であった。次に、それらの菌株のアメリカ腐蛆病菌に対する抗菌活性を well diffusion assay を用いて検討した（図）。得られた菌株の中でアメリカ腐蛆病菌に対して最も強い抗菌活性を示した菌株は乳酸菌 LA2 株で、平均 20 mm の阻止円を形成した。さらに、各菌株の 48 時間培養液をろ過滅菌し、アメリカ腐蛆病菌およびヨーロッパ腐蛆病菌の培養液に 1/20 量添加し、生育抑制効果を調べた。その結果、最も強い生育抑制効果が示されたのは、阻止円の形成と同様に LA2 株であり、どちらの病原細菌もコントロールと比較して 50%程度の生育に抑制された。

本研究により得られた乳酸菌 LA2 株は *in vitro* で優れた抑制効果を示したことから、プロバイオティクス菌株として有用であると考えられた。現在、腐蛆病菌に対する抑制効果の原因を解明すべく、乳酸菌 LA2 株の分泌成分中における有機酸生成量の定量等を行っており、それらの結果も合わせて報告する予定である。本研究は生研センターイノベーション創出事業によるものである。

Honeybee pathogen, Probiotics, Foulbrood disease

講演番号：2B21a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ B 校舎 21 会場

N/C 末端がリンクした環状バクテリオシン「ガセリシン A」の生合成機構に関する研究

Genetic study on biosynthesis of gassericin A, a circular bacteriocin having peptide-bonded N- and C- terminal ends

○鈴木 はるか[1]、川井 泰[1]、荒川 健佑[2]、中村 圭志[1]、安田 成美[1]、木ノ内 智之[1]、郭 暁艶[1]、水谷 陽[1]、西村 順子[1]、北澤 春樹[1]、齋藤 忠夫[1]([1]東北大院農、[2]岡山大院自科)
○Haruka SUZUKI[1], Yasushi KAWAI[1], Kensuke ARAKAWA[2], Kiyoshi NAKAMURA[1], Narimi YASUTA[1], Tomoyuki KINOUCHI[1], Xiao yan GUO[1], Akira MIZUTANI[1], Junko NISHIMURA[1], Haruki KITAZAWA[1], Tadao SAITO[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Okayama Univ.)

【目的】ヒト乳児便由来の *Lactobacillus gasseri* LA39 は、環状構造を有するバクテリオシン「ガセリシン A (GA)」を生産する。これまで N-末端と C-末端でペプチド結合した環状ペプチドは、微生物、植物、ヒトを除く哺乳類より 100 種類以上が見出され、環状化は加熱安定性に寄与するとされている。しかしその環状化機構については研究が進んでいるサイクロチドファミリーで酵素の関与が示唆されているものの、原核生物においてはほとんど解明されていない。ガセリシン A の生合成には 7 つの遺伝子（*gaaBCADITE*）が関与しており、*gaaA* は構造遺伝子、*gaaI* は自己耐性遺伝子と同定され、*gaaTE* が ABC-トランスポーター、*gaaBCD* は機能未知とそれぞれ推定されている。本研究では、GA の環状化が酵素によるものと仮定し、GA の生合成遺伝子（*gaaBCADITE*）上の環化に関与する遺伝子（群）を特定することにより、GA の環状化機構について解明することを目的とした。
【方法】①GA の生合成遺伝子（*gaaBCADITE*）の各 ORF 欠損株について、培養上清中の抗菌活性を *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM1002^{T}（pSYE2）を指標菌に用いて測定した。抗菌活性が得られた株については質量分析（FAB-MS）により環化形成の有無を検証した。②全生合成遺伝子を組み込んだ発現ベクター（pGAA2）を鋳型とした部位特異的変異により、プロティナーゼと推定される *gaaB* のアミノ酸置換を行い、変異導入プラスミドを作製した。本変異プラスミドを中間宿主体 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 に形質転換し、プラスミドを抽出した後、最終宿主である *Lb. gasseri* JCM1131^{T}または GA 自然耐性獲得株 1131^{GAr}に形質転換し、上清中の活性を測定した。
【結果】①各生合成遺伝子欠損株のうち、GA 耐性株 1131^{GAr}（pGAA2⊿*gaaTE*）の培養上清に抗菌活性が認められた。本株の培養上清から最終的に C8 逆相クロマトグラフィーを用いて活性成分を精製し、質量分析に供して得た m/z 値 5,671 は環化 GA の m/z 値 5,651 と比較して約 20（水 1 分子）高値であった。本結果から、1131^{GAr}（pGAA2⊿*gaaTE*）の GA は *gaaBCADI* から生産された非環状化構造であり、GaaTE が環化形成に関与する因子である可能性を原核生物で初めて見出すことが出来た。②GA のリーダー切断酵素と推定される GaaB（全 174 アミノ酸残基）の分子内に各 1 残基のみ存在する Cys97 および His83 のアミノ酸置換を行った改変株で、両培養上清に通常に抗菌活性が認められたことから、GaaB が少なくともシステインプロティナーゼおよび His 残基を触媒残基とするセリンプロティナーゼではないことが推定された。現在、残るセリンプロティナーゼの触媒残基（Ser, Asp, Glu）のアミノ酸置換を行っており、GaaB における前駆体 GA のリーダー切断ポケットの特定を試みている。

biosynthesis, bacteriocin, gassericin A

講演番号：2B21a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ B 校舎 21 会場

Lactobacillus gasseri LA158 が産生する二成分性バクテリオシン「ガゼリシン T」の自己耐性タンパク質に関する検討

Study for an immunity protein (GatI) of a Class IIb bacteriocin, gassericin T, produced by *Lactobacillus gasseri* LA158

○木ノ内 智之[1,2]、安田 成美[2]、鈴木 はるか[2]、水谷 陽[2]、郭 暁艶[2]、川井 泰[2]、西村 順子[2]、藤田 康弘[1]、北澤 春樹[2]、出内 桂二[1]、齋藤 忠夫[2] ([1]キリン（株）R&D 本部　飲料技術研究所、[2]東北大院農)

○Tomoyuki KINOUCHI[1,2], Narimi YASUTA[2], Haruka SUZUKI[2], Akira MIZUTANI[2], Xiao yan GUO[2], Yasushi KAWAI[2], Junko NISHIMURA[2], Yasuhiro FUJITA[1], Haruki KITAZAWA[2], Keiji DEUCHI[1], Tadao SAITO[2] ([1]Kirin, [2]Tohoku Univ.)

【目的】ヒト腸管由来乳酸菌である *Lactobacillus gasseri* LA158が産生する「ガゼリシンT」は、二成分性のバクテリオシン（class IIb）である。ガセリシンTは広い抗菌スペクトルと温度・pH に対する高い安定性を有しており、天然の食品保存剤としての応用が期待される。しかし、ガセリシンTの作用機構および自己耐性機構については未だ不明な点が多い。ガゼリシンTの自己耐性遺伝子(*gatI*)は、ガゼリシンT構造遺伝子(*gatAX*)の直ぐ下流に位置しており、112アミノ酸残基からなる4回膜貫通型の疎水性タンパク質(GatI)と推定されている。そこで本研究では、ガゼリシンT感受性株に*gatI*を導入し、自己耐性タンパク質であることを確認すると同時に、耐性に関与する部位を特定するため欠損株を作製し、検証することを目的とした。

【方法】乳酸球菌由来の発現ベクター pIL253-P_{32}のP_{32}プロモーター下流に*gatI*を挿入したpGTIをバクテリオシン非生産株*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363および*Lb. gasseri* JCM1131^{T}に導入し、ガセリシンT（LA158培養上清）に対する抗菌活性（感受性）を測定した。同様に、4番目の膜貫通領域を欠損させた株（2種)、および4つ目の膜貫通領域の下流となる細胞内に突出したC-末端アミノ酸6残基を欠損させた株を作製し、*Lb. gasseri* JCM1131^{T}に導入し抗菌活性を測定した。さらに、クラスの異なるバクテリオシンであるナイシンA（class I、lantibiotics　：食品添加物）やガゼリシンA（class IV：*Lb. gasseri* LA39由来の環状バクテリオシン）との交差耐性能も評価した。

【結果】*gatI*を*Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG1363に導入した場合、LA158培養上清に対し耐性能は認められなかったが、JCM1131^{T}に導入した場合、*gatI*非導入株（pIL253-P_{32}）に比べ16倍の耐性を獲得した。これによりGatIはガゼリシンTの自己耐性タンパクであることを確認できた。また、GatIを発現するためにはヘテロでなくホモの宿主に導入することが必須であることが明らかとなった。

次いで、C-末端6残基を欠損させた変異株は、*gatI*導入株と同様に16倍の耐性を示したため、非膜貫通領域であるC-末端6残基は耐性に関わらないことが判明した。また、4番目の膜貫通領域を欠損させた株に関しては、*gatI*導入株と比較して8倍も耐性が低下し、大部分の耐性機能が失われていた。本結果より、GatIが耐性タンパク質として正常に機能するためには、4番目の膜貫通領域の存在が不可欠であることが明らかになった。さらに、GatIは、ガゼリシンAに対しては耐性を示さなかったが、ナイシンAには2倍の耐性を有していた。二成分性バクテリオシンの耐性機構に関する今後のさらなる解明が期待される。

immunity, bacteriocin, peptide

講演番号：2B21a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ B 校舎 21 会場

二成分性バクテリオシン「ガセリシン T」の作用機構に関する研究

Study on mode of antibacterial action of gassericin T, a class IIb bacteriocin

○郭 暁艶、川井 泰、安田 成美、木ノ内 智之、水谷 陽、鈴木 はるか、西村 順子、北澤 春樹、齋藤 忠夫 (東北大院農)
○ Xiaoyan Guo,Yasushi Kawai,Narimi Yasuta,Tomoyuki Kinouchi,Akira Mizutani,Haruka Suzuki,Junko Nishimura,Haruki Kitazawa,Tadao Saito (Tohoku Univ.)

【目的】ヒト腸管から高頻度で検出される乳酸菌 *Lactobacillus gasseri*（ガセリ菌）は、相補的な二成分ペプチド GatA・GatX から構成される class IIb バクテリオシン「ガセリシン T」を生産する株が多い。本バクテリオシンは広い抗菌スペクトルと温度・pH に対する高い安定性を有しており、天然の食品保存剤として有望と考えられる。ガセリシン T は膜を貫通して孔を形成して、菌体内から物質の流出を引き起こすことで標的細菌を死に至らしめることが推定されている。しかしながら、GatA と GatX はどちらが先に膜に付着して作用するか、GatA と GatX は単独でも孔を形成（作用）できるか、また GatA と GatX はどの段階（膜に付着する前か、膜に挿入した後か）で複合体になるかなど、これら作用機構については不明な点が数多く残されている。そこで本研究では、*L. gasseri* LA158 が生産するガセリシン T の作用機構について基礎的な検討を試みた。
【方法】ガセリシン T 構造遺伝子 *gatAX* を欠損させた *L. gasseri* LA158 Δ*gatAX*（ガセリシン T を生産しない）、*gatX* を欠損させた LA158 Δ*gatX*(GatA のみ生産)および *gatA* を欠損させた LA158 Δ*gatA*（GatX のみ生産）の計 3 株と、ガセリシン T の指標菌に *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM1002^{T} を使用した。GatA あるいは GatX を含む培養上清の抗菌活性は寒天拡散法(agar-well diffusion method)により確認し、活性単位を AU/mL で表した。GatA あるいは GatX を含む培養上清を用いて GatAX、GatA、GatX など 5 つの異なる感作（作用）モデルを構築し、指標菌 JCM1002^{T} に供試した。また、感作後の生菌数および反応液の残存活性による GatA と GatX の指標菌への付着率について測定した。
【結果】GatA を含む培養上清は弱い抗菌活性 (31AU/mL) が検出されたが、GatX を含む培養上清には、16 倍濃縮液でも抗菌活性が認められなかった。しかしながら、GatA と GatX の上清等量混合液では約 64 倍の活性上昇（985AU/mL）が認められ、ガセリシン T は抗菌活性の発現に相補的なペプチドを必須とする二成分性バクテリオシン（class IIb）であることが確認できた。作用機構実験では、GatA と GatX の等量混合液は、指標菌に感作 4 時間から高い生育阻害を示した。また、GatA と GatX は単独でも抗菌的に作用したが、GatA と GatX の感作順序は抗菌作用に無関係であった。感作段階における GatA および GatX の指標菌への付着率はそれぞれ約 60%で、GatA･GatX が共同に感作した際の付着率は約 75%であった。以上の結果から、GatA は単独でも細胞膜に孔を形成し、GatX は菌体表層に付着して菌の生育を阻害する（静菌）と推定され、GatA と GatX は別々に膜に作用し、膜への挿入後に複合体になる可能性が高いと考えられた。

mode of action, bacteriocin, gassericin T

講演番号：2B21a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ B 校舎 21 会場

ビセニスタチン生合成における糖転移酵素 VinC の結晶構造解析
Crystal structure of glycosyltransferase VinC involved in the biosynthesis of Vicenistatin
○南後 恵理子[1]、南 篤志[2]、沼倉 真理緒[3]、熊坂 崇[4]、江口 正[3] ([1]理研播磨、[2]北大院理、[3]東工大院理工、[4]高輝度光科学研究セ)
○Eriko Nango[1], Atsushi Minami[2], Mario Numakura[3], Takashi Kumasaka[4], Tadashi Eguchi[3] ([1]RIKEN SPring-8 Center, [2]Hokkaido University, [3]Tokyo Institute of Technology, [4]Japan Synchrotron Radiation Research Institute)

【目的】ビセニスタチンは、*Streptomyces halstedii* HC34 より単離され、アミノ糖ビセニサミンが 20 員環マクロラクタム（ビセニラクタム）に結合した構造を有する抗腫瘍抗生物質である。VinC はビセニスタチン生合成における糖転移酵素であり、親水性基をほとんど持たないビセニラクタムを基質とし、様々な化合物を基質として認識することが可能であることから、その基質認識機構に興味が持たれている。また、本酵素は、糖転移反応の逆反応も触媒するなどのユニークな特徴を示しており、新規生理活性配糖体を創製する手段として、その応用化が期待されている。本研究では、VinC の立体構造を明らかとし、その情報を基に触媒や認識に関与するアミノ酸残基の解明を行うことを目的に X 線結晶構造解析及び変異体実験を行った。
【方法と結果】VinC は、大腸菌で大量発現させ調製した。陰イオン交換樹脂など各種クロマトグラフィーによる精製ののち、蒸気拡散法による結晶化を行った。回折データの収集は SPring-8 で行い、Se-MAD 法を用いて、分解能 2.0 Å で構造決定した。また、様々な基質を用いて共結晶化を検討したところ、チミジン二リン酸（dTDP）と VinC の複合体結晶化に成功し、分解能 2.1 Å で構造決定した。本酵素の構造は、N末端ドメインとC末端ドメインから成る二つのドメイン構造を有し、両ドメインとも糖転移酵素の三次構造に良く見られる Rossmann fold を示していた。dTDP はC末端ドメインに存在しており、類似構造との比較より、活性部位は二つのドメインの間に存在すると予想された。糖受容体（ビセニラクタム）の認識部位は、N末端ドメインに位置し、非常に広い活性部位であることが予想された。更に、ビセニスタチンを基質として、docking simulation を行った結果、ビセニラクタム部分が多くの疎水性残基に囲まれており、マクロラクタムのアミド基が Tyr99 と水素結合することで、基質認識されていることが示唆された。また、グリコシル結合付近には、His13 と Asp130 が存在すると予想され、これらの残基が触媒残基である可能性が考えられた。そこで、His13 を Ala に、Asp130 を Asn に変えた変異体を作成し、糖転移反応の比活性を求めたところ、活性が非常に低下することがわかり、これらの残基が酵素反応に関与することが明らかとなった。



glycosyltransferase, crystal structure, antibiotics

講演番号：2B21a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ B 校舎 21 会場

木質バイオマスを原料とした抗生物質カスガマイシンの発酵生産

Production of an antibiotic kasugamycin from cellulosic biomass

○春日 和[1]、友常 久実子[1]、上松 仁[2]、栗本 康司[3]、小林 正之[1]、小嶋 郁夫[1] ([1]秋田県大院生資、[2]秋田高専、[3]秋田県大木高研)

○ Kano Kasuga[1], Kumiko Tomotsune[1], Hitoshi Agematsu[2], Yasuji Kurimoto[3], Masayuki Kabayashi[1], Ikuo Kojima[1] ([1]Akita Pref. Univ., [2]Akita Natl. College Technol., [3]Inst. Wood Technol., Akita Pref. Univ.)

【目的】稲わら、林地残材などのセルロース系バイオマス(CB)は、セルロースなどの多糖類を多く含むにもかかわらず、ほとんど有効利用されていない。*Streptomyces* 属放線菌は主に土壌に生息し、その一部はセルロースや CB の資化能を有し、セルラーゼやその遺伝子群が報告されている。一般に *Streptomyces* 属放線菌からはこれまでに数多くの抗生物質が見出され実用化されているが、抗生物質生産放線菌の多くはセルロース資化性が低く、イネいもち病用農薬として使用されている抗生物質カスガマイシン(KSM)を生産する *Streptomyces kasugaensis* もまたセルロース資化能をもたない。我々は、CB を発酵原料として KSM を生産できる菌株の育種をめざして、KSM 生合成遺伝子群を CB 資化性放線菌に導入し、CB を主要原料とした KSM の発酵生産について検討した。

【方法・結果】

(1) C42/pKSM109 の構築と KSM 生産： 本研究室で単離した CB 資化性放線菌 *Streptomyces thermocarboxydus* C42 に KSM 生合成プラスミド pKSM109 を導入した。pKSM109 は染色体組込み型ベクターに KSM 生合成遺伝子群を連結したもので、宿主の染色体に安定に組込まれる。この遺伝子導入株 C42/pKSM109 を、カルボキシメチルセルロース(CMC)を主要炭素源として添加した低栄養液体培地(MY 培地)で培養したところ、培養上清から KSM が検出された。これより C42/pKSM109 は CMC を資化して生育し、KSM を生産したことが示された。

(2) 種々の CB を発酵原料とした KSM 生産： C42/pKSM109 が様々な CB を主要発酵原料として KSM を発酵生産できるか検討した。まず、微結晶セルロース、廃綿粉、稲わら粉、スギ辺材粉などを 1, 2, 4%の各濃度で MY 培地に添加し C42/pKSM109 を培養したところ、いずれの CB を用いた場合でも KSM が生産された。特にスギ辺材粉からは、微結晶セルロースと同様に高濃度の KSM が生産された。また、各種木材粉を主要発酵原料として同様の KSM 発酵試験を行ったところ、スギ辺材粉以外にもマカンバやミズナラ、ヤナギなど広葉樹の木材粉で KSM 生産が認められたが、スギやヒバなど針葉樹の心材粉からは KSM がほとんど生産されなかった。このため、CB の中でも C42/pKSM109 による KSM 生産の発酵原料として適するもの、適さないものがあると示唆された。現在、比較的良好な KSM 生産を導いたスギ辺材やヤナギ材の木粉を用い、KSM 発酵生産の条件検討を行っている。

Streptomyces, kasugamycin, cellulosic biomass

講演番号：2B21a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ B 校舎 21 会場

Streptomyces 属放線菌の潜在的抗生物質生産能力を引き出すエリスロマイシン耐性変異の特定と機能解析
Identification and functional characterization of erythromycin resistance mutations that activate potential of *Streptomyces* species to produce antibiotics

○今井 優[1]、綾木 啓太[2]、渡邉 健[3]、越智 幸三[4]、保坂 毅[2]（[1]信州大院・総合工、[2]信州大・農、[3]信州大院・農、[4]広工大・生命）
○Yu IMAI[1], Keita AYAKI[2], Ken WATANABE[3], Kozo OCHI[4], Takeshi HOSAKA[2] ([1]Interdisc. Grad. Sch. Sci. and Technol. Shinshu Univ., [2]Fac. Agri. Shinshu Univ., [3]Grad. Sch. Agri. Shinshu Univ., [4]Fac. Life Sci. Hiroshima Inst. Technol.)

【背景と目的】 放線菌がリボソームを標的とする薬剤に対する耐性を獲得すると、潜在能力を発揮して二次代謝産物を過剰生産することがある。この知見をもとに、最近我々は *Streptomyces* 属放線菌へのエリスロマイシン（EM）耐性付与が、その潜在的な抗生物質生産能力を強力に活性化し得ることを新たに見出した[1)]。しかし、これまで EM 耐性付与による抗生物質生産活性化効果のメカニズムはもとより、原因となる変異遺伝子さえ明らかになっていなかった。本研究の目的は、放線菌における EM 耐性変異を特定し、抗生物質生産活性化における同変異の重要性を検証することにある。
【方法】 本研究では、*Streptomyces coelicolor* A3（2）および *Streptomyces lividans* 1326 から取得した抗生物質高生産 EM 耐性変異株を研究材料として、以下の検討を行った。
【結果と考察】 *S. coelicolor* A3（2）の抗生物質高生産 EM 耐性変異株（SCE234 株）は、親株の 15 倍の EM 耐性を獲得しており、アクチノロージン（ACT）およびウンデシルプロジギオシン（RED）を過剰生産する。この EM 耐性変異株の全ゲノム配列を解析したところ、*nsdA* 遺伝子に点変異（T680G 変異）があることを見出した。一方、*S. lividans* 1326 から取得した抗生物質高生産 EM 耐性変異株（SLE259 株）は、高い EM 耐性を示し（親株の 17 倍以上）、ACT や RED のみならず、親株が生産できない抗菌物質をも高生産する菌株である。*S. coelicolor* A3（2）の検討で得られた知見から、先ずこの変異株の *nsdA* 遺伝子の塩基配列を調べたが、予想に反して同遺伝子内に変異が存在しなかった。そこで、いくつかの細菌で EM 耐性が確認されているリボソームタンパク質 L4 遺伝子（*rplD* 遺伝子）や rRNA 遺伝子（*rrn* 遺伝子）などを解析した。その結果、染色体上に 6 コピーある *rrn* 遺伝子のうち、*rrnC* 遺伝子（23S rRNA 遺伝子）に点変異（A2281G 変異）が存在することを突き止めた。
以上のように、放線菌の EM 耐性と抗生物質生産活性化に関わる可能性がある 2 種類の異なる変異の特定に成功した。SCE234 株で変異が認められた *nsdA* 遺伝子は、*Streptomyces* 属に広く分布し、抗生物質生産と胞子形成に関わることが知られている[2)]。しかし、同遺伝子と EM 耐性との関連は明らかになっていない。一方、SLE259 株で認められた *rrnC* 変異と抗生物質生産との因果関係を示す実験的証拠は全く報告されていない。現在、本研究で特定した *nsdA* 変異と *rrnC* 変異の生理・生化学的特性を明らかにし、これら変異の抗生物質生産活性化効果を様々な放線菌を用いて証明することに取り組んでいる。
【参考文献】[1)]Imai, Y. *et al*., *J. Antibiot*., 65（2012）. [2)]Li, W. *et al*., *J. Bacteriol*., 188（2006）.

antibiotic production, erythromycin resistance mutation, *Streptomyces*

講演番号：2B21a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ B 校舎 21 会場

UV 照射処理による *Streptomyces griseochromogenes* からの PP1 阻害剤の単離
Isolation of PP1 inhibitor from UV-treated *Streptomyces griseochromogenes*
○岡田 直己、三橋 進也、生方 信（北大院農）
○Naoki OKADA,Shinya MITSUHASHI,Makoto UBUKATA (Hokkaido Univ.)

【目的】セリン/スレオニンホスファターゼである PP1 は生体内におけるタンパク質合成、細胞周期、RNA スプライシング、グリコーゲンや脂質の代謝など、生体内の機構に深く関わっているとされているが、いまだ多くの機能が明らかにされていない。それゆえ、PP1 特異的阻害剤は生体内における、PP1 のさらなる生理作用の解明において有用であると考えられる Tautomycetin(TC)は *Streptomyces griseochromogenes* の培養液から単離・構造決定されたポリケチド化合物であり、PP1 の特異的阻害剤である。野生株(理化学研究所より供与)における TC 生産性は極めて低く、多量の TC を得ることは難しいため、当研究室では野生株への UV 照射を行い、TC 高生産株の取得を目指した。その結果、得られた菌株の内、No.53 株培養粗抽出物が最も高い PP1 活性阻害性を示した。No.53 粗抽出物の、HPLC－Photodiode array を用いて得られたスペクトルデータは､TC が示す保持時間やUV スペクトルパターンをもつピークを示さなかった。本研究では、この TC とは異なる PP1 阻害物質の単離と構造決定を目的とした。

【方法】PP1 阻害活性試験における基質として *p*-nitrophenylphosphate を、ポジティブコントロールとして、セリン/スレオニンホスファターゼ阻害剤 microcystin-LR(MLR)用い、pH 7.0 の条件下において、阻害物質の探索を行った。培地に、0.05%マロン酸二ナトリウムを前駆体物質として加えた。No.53 株を 20 ml 三角フラスコを用いて前培養したのち、6 L の ジャーファーメンターにより本培養を行った。抽出は、得られた培養液を遠心分離後、菌糸体をアセトンにより抽出し、さらに培養上清と合わせ水層-クロロホルム層(pH 4.0)による液液抽出法を用いた。次いで、分離操作はシリカゲルカラムクロマトグラフィー、HPLC (Mightysil RP18-GP column)により行った。

【結果】シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、得られた各フラクションにおいて、PP1 阻害活性試験を行ったところ、複数のフラクションが PP1 阻害活性を示した。これに加えて、それぞれのフラクションを HPLC 分析・分取、及び PP1 阻害活性試験を行った結果、No.53 株は複数の PP1 阻害物質を生産していることが示唆された。大量培養による PP1 阻害物質の単離・構造決定は、現在検討中である。

Streptomyces, PP1, Inhibitor

講演番号：2B21a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ B 校舎 21 会場

SMTP-7 による抗炎症作用を介した脳梗塞改善作用機序の解明
Identification of biological mechanisms of SMTP-7, a novel therapeutic compound against stroke with an anti-inflammatory potential
○鈴木 絵里子、松本 直欣、国清 雄大、蓮見 惠司（東京農工大農）
○ERIKO SUZUKI,NAOKI MATSUMOTO,YUDAI KUNIKIYO,KEIJI HASUMI（Tokyo Noko Univ.）

[目的・背景] 脳梗塞は、世界的に死因の上位を占める疾患である。しかしながら、急性期脳梗塞治療薬の開発は未だ発展途上であるといってよく、既存薬よりも安全性が高く、より有効な治療薬の開発は急務である。 SMTP は、真菌 *S. microspora* の培養液中から発見された生理活性物質群であり、脳梗塞を対象に、現在医薬開発が進められている。保有する 60 種余りの SMTP 同属体のうち、SMTP-7 にはマウスおよび霊長類を用いた脳梗塞モデルにおいて、優れた脳梗塞改善作用が見出されている。これには血栓溶解活性に加えて、抗炎症作用に起因する脳組織保護作用が相乗的に寄与しているものと考え、我々は、SMTP の新たな作用標的分子の探索を行った。その結果、既に明らかにされていた血液線溶系の plasminogen 以外に、抗炎症作用を有する脂肪酸エポキシドである epoxyeicosatrienoic acid (EET) を不活性な dihydroxyeicosatrienoic acid (DHET) へと変換する酵素である、soluble epoxide hydrolase (sEH)を同定した。本研究においては、SMTP-7 の抗炎症作用が sEH 阻害を介したものであることを明らかにし、脳梗塞動物モデルにおける優れた薬効の作用機序を解明することを目的とした。

[結果・考察]SMTP-7 は、*in vitro* 酵素アッセイ系において sEH の epoxide hydrolase 活性、phosphatase 活性を共に強く阻害した。また、ヒト肝癌細胞 HepG2 細胞を用いた培養細胞系においても、LC-MS を用いた解析により、SMTP-7 に非常に強い sEH 阻害活性が認められた。このことから、SMTP-7 は細胞内に局在する sEH と相互作用し、その活性を発現するものと考えられた。そこで次に *in vivo* における活性を評価するべく、マウスに SMTP-7 および sEH の基質である EET を尾静脈より投与し、一定時間後に血液および肝臓、脳を採取し、それぞれにおいて変換された DHET 量を LC-MS を用いて定量することで、内在性の sEH に対する SMTP-7 の阻害活性を評価した。結果、上記 3 種いずれにおいても、SMTP-7 による sEH 阻害活性が認められた。本研究より、SMTP-7 の優れた脳梗塞改善作用の機序として、plasminogen を介した血栓溶解作用と、sEH 阻害を介した抗炎症作用が相乗的に寄与していることが示された。

SMTP-7, inflammation, stroke

講演番号：2B21a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ B 校舎 21 会場

複合誘導法の開発：複合系培養法による抗生物質生合成遺伝子の発現誘導

The combined induction, increasing of secondary metabolites in heterologous expression strains by the combined culture

○尾仲 宏康[1,2]、伊澤 真澄[2]、森 夕希子[2] ([1]東大院農生科・応生工、[2]富山県大・生工研)
○Hiroyasu ONAKA[1,2], Masumi IZAWA[2], Yukiko MORI[2] ([1]Dept. Biotechnology, Univ. of Tokyo, [2]Dept. Biotechnology, Toyama Pref. Univ.)

【目的】近年の放線菌ゲノム解析の進歩により 1 種類の放線菌が生産する二次代謝産物数は少なく見積もっても約 30 種類であることが明らかとなったが、二次代謝は生育環境や生育条件によって大きく変化し、実際の実験室レベルでの純粋培養によって同定される二次代謝産物は 1 株あたり数種類にとどまっている。複合培養は放線菌とミコール酸含有細菌を共培養するだけの簡便な培養法であるが、純粋培養では生産しなかった二次代謝が複合培養時にのみ観察される事から二次代謝生産に適した共培養法であるといえる [1)]。複合培養法を用いて *Streptomyces endus* S-522 が生産する新規抗生物質・アルキベマイシンをこれまでに発見しているが、アルキベマイシンも純粋培養では生産しない抗生物質であった [2)]。本講演では複合培養法の概念を拡張し、生合成遺伝子クラスターを異種発現させた遺伝子組換え株においても複合培養を行った結果、異種発現二次代謝産物の増大が認められたことについて報告する。

【方法】*Streptomyces lividans* ゲノム内に存在する cryptic 生合成遺伝子群であるアクチノロージン、ウンデシルプロディギオシン両生合成遺伝子群は複合培養によって発現し、これら二種類の色素生産をするようになる。複合培養に最適な *S. lividans* の染色体上に *Streptomyces* sp. TP-A0584 由来ゴードスポリン生合成遺伝子群、*Streptomyces* sp. TP-A0274 由来スタウロスポリン生合成遺伝子群、*Lechevarieria aerocolonigenes* 由来レベッカマイシン生合成遺伝子群をそれぞれクローニングした異種発現株を作製した。これらの異種発現株をミコール酸含有細菌である *Tsukamurella pulmonis* もしくは *Corynebacterium glutamicum*、 *Rhodococcus erythropolis* と複合培養し、その生産量を HPLC にて定量した。

【結果及び考察】それぞれの生産量を純粋培養時の生産量と比較したところ、ゴードスポリン異種発現株と *C. glutamicum* との複合培養を除く全ての組み合わせにおいて複合培養時に生産量の増大がみられた。ゴードスポリンにおいては *T. pulmonis* との組み合わせで最大 5.1 倍、スタウロスポリンにおいては *R. erythropolis* との組み合わせで最大 8.1 倍、レベッカマイシンにおいては *R. erythropolis* との組み合わせで最大 25.7 倍の生産量の増大が見られた。以上の事から、*S. lividans* を宿主にした二次代謝生合成異種発現株は複合培養によって生産量の増大が高頻度でみられることが明らかとなった。以上の結果を踏まえ、二次代謝生産に有効な手段である本手法を複合誘導法と命名した。

1) H. Onaka *et al*., ***Appl Environ Microbiol.*** 77(2): 400-406 (2011)
2) Y. Igarashi *et al.*, ***Org Lett.*** 12(15): 3402-3405 (2010)

Streptomyces, antibiotics production, combined culture

講演番号：2B21a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ B 校舎 21 会場

異種発現、プロモーター置換、複合培養による Lactazole A 生産量の増加

Increase of lactazole A production by heterologous expression, promoter substitution and combined culture

○林 昌平[1]、池田 治生[2]、大村 智[3]、奥 直也[4]、五十嵐 康弘[4]、尾仲 宏康[1,4]（[1]東大院農生科・応生工、[2]北里大・生命研、[3]北里大、[4]富山県大・生工研）
○Shohei HAYASHI[1], Haruo IKEDA[2], Satoshi OMURA[3], Naoya OKU[4], Yasuhiro IGARASHI[4], Hiroyasu ONAKA[1,4] ([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Kitasato Inst. For Life Sci., Kitasato Univ., [3]Kitasato Univ., [4]Dept. Biotechnol., Toyama Pref. Univ.)

【目的】これまでに様々な細菌からチオストレプトンなどの抗菌性チオペプチドが発見され、生合成遺伝子が同定されている。チオペプチドはリボソームで翻訳された前駆体ペプチドが、様々な翻訳後修飾を受けて生成されるリボソーマルペプチドであり、複素環や脱水アミノ酸と、大員環を形成するための窒素含有 6 員環を含む。これまでに、ゲノムマイニングによって発見した *Streptomyces lactacystinaeus* OM-6519 の未同定のチオペプチド生合成遺伝子クラスターをクローニングし、*Streptomyces lividans* TK23 で異種発現させて得られた新規化合物 lactazole A の構造を決定した。*S. lactacystinaeus* OM-6519 の培養液からは lactazole A は検出されず、異種発現での生産量は約 5 mg/l だった。また、lactazole A の生合成には 6 つの遺伝子 *lazABCDEF* が必要であることを明らかにした。lactazole A はリボソームで翻訳された前駆ペプチド LazA が LazBCDEF の修飾を受けて生成されると推定した。lactazole A はリボソーマルペプチドであることから、*lazA* の転写量を上昇させることで生産量が増加すると予想される。そこで、プロモーター置換と複合培養[1)]を用いてさらに生産量を増加させた。

【方法】*lazA* 上流の lactazole プロモーターから *lazF* までを含む領域が形質転換された異種発現株を用いて *lazA* の in-frame 欠損株を作製し、lactazole A 生産能を失ったことを確認した。次に、*Streptomyces* sp. TP-0584 由来の複合培養によって生産量が増加することがわかっているゴードスポリンの前駆ペプチドをコードする遺伝子 *godA* のプロモーター[2)]の下流に *lazA* をクローニングしたプラスミドを作製した。このプラスミドを *lazA* 欠損株に形質転換し、*lazA* の *godA* プロモーター置換株を作製した。本株を *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 との複合培養および純粋培養し、培養液中の lactazole A をブタノールで抽出後、HPLC を用いて定量した。

【結果と考察】プロモーター置換株の lactazole A 生産量は最大で 16 mg/l に達した。本菌を *T. pulmonis* TP-B0596 と複合培養すると、さらに生産量が増大し、lactazole A 生産量は 46 mg/l に達した。興味深いことに *lazA* 本来のプロモーターを持つ異種発現株を複合培養すると生産量が低下したことから、*godA* プロモーターでのみ複合誘導がおこることが明らかとなった。元株では生産しない lactazole A を異種発現で生産させ、プロモーター置換、複合培養を組み合わせることで生産量を大幅に増加させることができたことから、本手法は二次代謝産物の生産に有効な手法であると考えられる。

1) Onaka, H. *et al. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011** 77(2): 400-406
2) Onaka, H. *et al. Microbiol.* **2005** 151(12): 3923–3933.

combined culture, Streptomyces, antibiotic production

講演番号：2B21a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ B 校舎 21 会場

放線菌由来ランチビオティック合成酵素によるランチペプチド生産

Production of lanthipeptide by lantibiotic synthetase derived from actinomyces

○江畑 一真[1]、冨宿 賢一[1]、浅野 泰久[1]、奥 直也[1]、五十嵐 康弘[1]、尾仲 宏康[1,2] ([1]富山県大工・生工、[2]東大院農生科・応生工)
○ KAZUMA EBATA[1], KEN-ICHI FUHSHUKU[1], YASUHISA ASANO[1], NAOYA OKU[1], YASUHIRO IGARASHI[1], HIROYASU ONAKA[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., Toyama Pref. Univ., [2]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

【目的】ランチペプチドは脱水した Ser もしくは Thr と Cys の環化に由来する分子内チオエーテル環(ランチオニン)を有するリボソーム合成型ペプチドの総称である[1)]。ランチオニンはペプチドの構造安定性と生理活性に寄与しており、これまで抗菌活性のほか、放線菌における気菌糸形成や抗アロディニア作用などの報告がある。またランチオニン形成を触媒するランチビオティック合成酵素は一般的に基質特異性が低く、1～2 段階で反応が完結する。そのため本酵素を用いたランチペプチドアナログの生産や、既知ペプチドとのハイブリッド化合物の生産に利用できると考えられる。そこで本研究では、ゲノムマイニングによって *Streptomyces* sp.TP-A0584[2)]から見出されたランチビオティック合成酵素遺伝子 *orf231* を大腸菌で異種発現、酵素精製し、*orf231* の下流に存在する 2 つの構造遺伝子 *orf232*, *orf233* に由来するペプチドを基質として *in vitro* でのランチペプチドの生産を行うこととした。

【方法】*Streptomyces* sp. TP-A0584 より見出された 2673 bp からなるランチビオティック合成酵素をコードすると推定される *orf231* を大腸菌組換えタンパク質発現用ベクターpET-26b(+)に挿入し *orf231* 発現ベクターを構築した。*E. coli* BL21(DE3)を宿主にシャペロンベクターとの共発現によって可溶性酵素の生産が確認できたので IMAC を用いて均一に精製した。また、2 つの構造遺伝子のうちの *orf232* より、基質となる前駆ペプチドのアミノ酸配列を予測し 29 残基からなる合成基質を調製した。本酵素と合成ペプチド基質を用いて *in vitro* での酵素反応を行い、反応物を LC/MS によって解析した。

【結果および考察】解析の結果、前駆ペプチドとは異なる検出時間と分子量の新たなピークを 3 つ確認した。前駆ペプチドとの分子量の差から、3 つの新たなピークは全て前駆ペプチドが 3 残基脱水したということが示された。しかし、3 つのピークは検出時間が異なることから、それらは脱水部位や Cys との環化部位が異なると考えられる。MS/MS 解析の結果からメインピークにおいて、脱水した 2 残基の Ser と 1 残基の Thr を特定した。それら脱水アミノ酸は、前駆ペプチドの C 末側に集中していることがわかった。これは酵素によって前駆ペプチドに存在する Ser と Thr が脱水されたことを示し、それら 3 残基の脱水アミノ酸のどれかと Cys が環化している可能性を示唆している。

【文献】

1) W A van der Donk, *et al.*, **Nat. Prod. Rep.**, 2012, *in press*
2) H. Onaka, *et al*., **Microbiology**., **2005**, *151*, 3923-3933

Streptomyces, anticiotic production, lanthipeptide

講演番号：2B21a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ B 校舎 21 会場

線状プラスミドを利用した二次代謝産物生合成遺伝子クラスター導入法

Introduction of biosynthetic gene cluster for secondary metabolite using liner plasmid

○小松 護[1]、小曽根 郁子[2]、橋本 詢子[2]、新家 一男[3]、片岡 正和[4]、池田 治生[1]([1]北里大・北里生命研、[2]JBIC、[3]産総研、[4]信州大)
○Mamoru KOMATSU[1], Ikuko KOZONE[2], Junko HASHIMOTO[2], Kazuo SHINYA[3], Masakazu KATAOKA[4], Haruo IKEDA[1] ([1]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato Univ., [2]JBIC, [3]AIST, [4]Shinsyu Univ.)

微生物二次代謝産物の中でラクトン型ポリケチドやペプチド化合物は type-I 型ポリケチド合成酵素や非リボソーム型ペプチド合成酵素によって骨格を生成するため、それらの生合成遺伝子群は 100 kb を超えるものも少なくない。我々はこれまで、avermectin の工業生産菌である *Streptomyces avermitilis* の大規模欠失体（SUKA）を宿主とした異種微生物由来の二次代謝産物生産について検討してきたが[1)]、このような巨大な DNA 断片を利用した物質生産を達成するためには宿主に対する効率的な遺伝子導入方法が必須であり、また、それが安定的に保持されることが重要である。放線菌は一般的に大腸菌で調製した DNA(Dam Dcm による修飾された)を制限する。したがって、*S. avermitilis* や *S. coelicolor* A3(2)に導入する場合、大腸菌 *dam dcm* 変異株で DNA を調製しなければならない。さらに本変異株は *recA* 変異を付与できないことや、*dam* が mutator 遺伝子であることなどから相同配列を有する組換えプラスミドの安定性が極めて悪い。一方、*S. lividans* 1326 株は一般の *Streptomyces* の菌株と比べ、Dam Dcm で修飾された DNA の制限は低い。*Streptomyces* 属からは数種の線状プラスミドが報告されているが、複製・伝達に必要な遺伝子を全て含むものは *S. coelicolor* A3(2)の SCP1(350 kb)と *S. avermitilis* の SAP1(94 kb)である。両者は *S. lividans* や他の *Streptomyces* に伝達し安定に保持される。また、*S. lividans* は上記で述べたように大腸菌で調製した DNA を直接導入可能である。そこで *S. lividans* にファージ *attB* 配列を挿入した SAP1 を導入しておき、大腸菌から調製した巨大 DNA 断片を形質転換後、SAP1 上に組込む。得られた形質転換体は *S. avermitilis* や他の *Streptomyces* 属に接合によって伝達させることが可能である。そこで、SAP1 上にアクチノファージ φC31 あるいは TG1 の *attB* 配列を導入するとともに、*S. lividans* の染色体上の φC31 および TG1 の *attB* 配列を欠失させた。数種の二次代謝産物生合成遺伝子群を含む BAC クローンを、SAP1 ベクターを保持する *S. lividans* に形質転換した。次いで、*S. lividans* 形質転換体と *S. avermitilis* SUKA22 とを寒天培地上で混合培養後、胞子を集め、接合体のみが生育する条件で選択した。得られた接合体からは二次代謝産物生合成遺伝子群を含んだ SAP1 を検出することができた。

Ref.
1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**:2646-2651 (2010).

Streptomyces avermitilis, Liner plasmid, Conjugation

講演番号：2B21a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ B 校舎 21 会場

放線菌におけるマイコスポリン様アミノ酸生合成遺伝子群の解析

Discovery of genes involving biosynthesis of mycosporine-like amino acids by genome mining in *Actinomycetales* strains

○宮本 聖子、小松 護、池田 治生（北里大・生命研）
○Kiyoko MIYAMOTO,Mamoru KOMATSU,Haruo IKEDA (Kitasato Univ.)

【目的】マイコスポリン様アミノ酸（MAAs）は、310～362 nm の紫外線を吸収する低分子化合物である。シアノバクテリア・糸状菌・海藻類・微細藻類により生産され、紫外線防御の役割を果たすことが知られている。MAAs の紫外線吸収能は極めて高く、今日では天然由来のサンスクリーン物質として化粧品やスキンケア製品に利用されている。近年、Walsh らによって MAAs の一種である shinorine の生合成遺伝子群が *Anabaena variabilis* ATCC 29413 からクローン化され（*Science,* **329**:1653-6, 2010）、demethyl 4-deoxygadusol 合成酵素遺伝子、*O*-methyltransferase 遺伝子、ATP-grasp ファミリー遺伝子、NRPS 様遺伝子より構成されることが明らかとなった。一方、これまでグラム陽性菌ならびに放線菌からの MAAs の生産は報告されていない。細菌のゲノムデータベースより上記 4 遺伝子のオルソログを検索した結果、放線菌 *Actinosynnema mirum* DSM 43827 および *Pseudonocardia* sp. P1 の 2 菌株が類似の遺伝子群を保持することを見出した。ところが、これら 2 菌株では NRPS 様遺伝子の代わりに D-Ala D-Ala ligase ホモログ遺伝子を有していたことから、生産される化合物の構造推定には至らなかった。そこで本研究では、放線菌由来の推定 MAAs 生合成遺伝子群を異種発現に供し、機能解析を行った。　【方法および結果】上記 2 つの推定 MAAs 生合成遺伝子群は、同遺伝子群の上流および下流領域の相補的な配列（それぞれ 50-bp）とλ-Red 組換え系を利用して、直接染色体 DNA からクローン化した（*in vivo* cloning）。得られた各生合成遺伝子群は、染色体組込み型プラスミドに移し替えた。さらに効果的な発現を期待するため、同生合成遺伝子群の初発の遺伝子の上流に構成的発現プロモーターをλ-Red 組換え系を利用して導入した（*PNAS,* **107**:2646-51, 2010）。得られた組換えプラスミドは、我々が開発した汎用宿主 *Streptomyces avermitilis* SUKA22 に導入した。*A. mirum* DSM 43827 由来の MAAs 生合成遺伝子群を導入した SUKA22 形質転換体の生産物を解析したところ、MAAs は検出されなかった。一方、同生合成遺伝子群を構成的発現プロモーターによって強制発現させた形質転換体からは MAAs と推定される物質が複数生成され、LC/MS-MS 解析によって主生産物は shinorine であることがわかった。同様に *Pseudonocardia* sp. P1 由来の MAAs 生合成遺伝子群を導入した形質転換体においても、shinorine の生産が確認された。この結果から、放線菌 2 菌株由来の MAAs 生合成遺伝子群の D-Ala D-Ala ligase ホモログ遺伝子産物は、*A. variabilis* ATCC 29413 の NRPS 様遺伝子産物と同一の反応（mycosporine glycine に L-serine を付加）を触媒すると推定された。これはグラム陽性菌由来の初めての MAAs 生合成遺伝子群の報告である。

mycosporine-like amino acids, *Streptomyces avermitilis*, heterologous expression

講演番号：2B21p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ B 校舎 21 会場

とうふようもろみの生理活性

Bioactive properties of moromi for making tofuyo

○屋良 瞳、手島 寛子、橘 信二郎、安田 正昭（琉大農・亜熱生資）
○Hitomi Yara,Hiroko Teshima,Shinjiro Tachibana,Masaaki Yasuda（Dept. Biosci. Biotechnol., Univ. Ryukyus）

【背景・目的】「とうふよう」は、乾燥させた豆腐を麹（紅麹、黄麹）、泡盛および少量の塩で調製した「もろみ」に漬け込んで発酵・熟成させた沖縄の伝統的大豆発酵食品である。とうふよう熟成期間に、もろみ中の麹菌が産生する各種プロテアーゼの作用によって豆腐の主要大豆タンパク質はペプチドおよびアミノ酸に分解される。当研究室では、これまでにとうふよう由来の生理活性物質として複数のアンジオテンシン I 変換酵素（ACE）阻害ペプチドを単離し、構造および諸性質を明らかにしている。しかしながら、豆腐由来のペプチドやその他の生理活性物質は、熟成期間にもろみ中にも移行していると考えられているにもかかわらず、多量に調製されたもろみのほとんどがとうふようの漬け込みに再利用されるか廃棄されている。そこで、我々はもろみの機能性に着目し、もろみの有効活用を目的としてもろみの ACE 阻害活性および抗酸化活性について調べた。
【方法】とうふよう漬け込み前と漬け込み後 3 ヵ月のもろみを凍結乾燥し、蒸留水を加えて 25℃、1 時間振とう抽出して遠心分離で得られた上清をもろみ水抽出液とした。ACE 阻害活性は、合成ペプチド *N*-[3-(2-furyl)acryloyl]-L-Phe-L-Gly-L-Gly（FAPGG）を基質として用い Murray らの方法（Murray *et al.* 2004）に従って測定した。ウサギ肺アセトン粉末より抽出した粗 ACE を用いて UV 透過プレートにより 340 nm の吸光度を測定し、ACE 阻害率を算出した。さらにペプチドの人工消化耐性を調べるため、市販の消化酵素（ペプシン、キモトリプシン、トリプシン）を用いて、Kuba らの方法（Kuba *et al.* 2003）に従いもろみ抽出物の連続人工消化を行った。また、同抽出液の抗酸化活性を調べるため、抽出液をメタノールで段階希釈し、Brand-Williams らの方法（Brand-Williams、Cuvelier and Berset、 1995）に従って DPPH ラジカル捕捉活性を測定した。ポジティブコントロールとして Trolox 検量線を作成し、SC_{50} 値を求めてラジカル捕捉活性を算出した。
【結果】とうふよう漬け込み後の試料は、漬け込み前の試料に比べて有意に高い ACE 阻害活性を示したことから、熟成期間中に豆腐由来 ACE 阻害ペプチドのもろみへの移行が示唆された。人工消化耐性試験では、漬け込み後の ACE 阻害活性は未処理の阻害活性に比べて約 40%減少したが、漬け込み前の抽出液の連続消化後の ACE 阻害活性とほぼ同等の活性を維持していた。したがって、もろみ由来の ACE 阻害ペプチドは生体内の消化、吸収という関門を通過して血圧上昇抑制効果を示す可能性が示唆された。同様に、DPPH ラジカル捕捉活性においても漬け込み後の試料は高い抗酸化活性を示した。

angiotensin converting enzyme, antioxidative activity, tofuyo

講演番号：2B21p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ B 校舎 21 会場

Comparison of adipogenesis inhibition activity of *Monascus*-fermented cereals

○ Indika WANNINAIKA,Hisashi ASATO,Taisuke WATANABE,Hirohide TOYAMA,Shinjiro TACHIBANA (Dept. Biosci. Biotech., Fac. Agr., Univ. the Ryukyus)

[Objectives] *Monascus* fungi have been used in fermentation industry in East Asia. And also *Monascus*-fermented rice, beni-koji, is used as Chinese herbal medicine for therapy of hyperlipidemia. Excessive adipogenesis cause obesity which is a significant risk factor for many diseases such as diabetes, cancer, heart disease, hypertension, and osteoporosis. Lovastatin and citrinin, water-insoluble secondary metabolites of *Monascus* spp., have adipogenesis inhibitory activity. Recently, it has been reported that two types of yellow pigment, monascin and ankaflavin, produced by genus *Monascus* show antiobesity effects by inhibiting differentiation of pre-adipocytes. The aim of this study is to seek water-soluble adipogenesis inhibitors from different types of beni-koji samples and uncover those properties to use in food industry.
[Methods] A total of 25 strains of *Monascus* fungi were used in screening of adipogenesis inhibitory activity. *Monascus* strains used in this study were maintained on PDA medium at 30^{o}C for 7 to 10 days. Spores of these strains were collected (5×10^4 spores/mL) and stored at 4^{o}C for further studies. Each strain was cultivated on steamed rice or barley with 5×10^4 spores/mL/50 g dry weight at 30^{o}C and 35^{o}C for 14 days. Extracts of water, methanol, and hexane were prepared from each beni-koji sample. Lovastatin and citrinin in each extract were detected by TLC methods. Mouse 3T3-L1 pre-adipocytes were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum (FCS) as the basal medium. To induce differentiation of pre-adipocytes to adipocytes for accumulation of triglycerides (TG), 3T3-L1 cells were stimulated in DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS), dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine, and insulin for 2 days. And then, differentiated adipocytes were further cultured for 8 days in DMEM containing 10% FBS and insulin and/or an appropriate amount of each koji extract. Accumulation of TG in adipocytes was evaluated by oil red O staining and measured absorbance at 510 nm for calculation of adipogenesis inhibition.
[Results] The results of TLC for positive controls showed that lovastatin is water-insoluble but citrinin is partially water-soluble. However, both chemicals were not detected on TLC in any water extract of the koji samples prepared in this study. For barley-koji samples, only the methanol extracts of *M. purpureus* NBRC32316 and *M. pilosus* IFO4507 showed significantly higher adipogenesis inhibitory activities compared with those of other koji samples tested. To confirm whether lovastatin, citrinin, monascin, and ankaflavin are contained in the methanol extracts, analysis of the composition of koji samples is also in progress.

Monascus, Adipogenesis inhibition, 3T3-L1 cells

講演番号：2B21p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ B 校舎 21 会場

麹菌が産生する鉄キレート環状ペプチド　デフェリフェリクリシンの大量生産技術の開発 - 菌株育種と培地成分の改良について -

Development of mass production technology of Deferriferrichrysin, an iron-chelating cyclic peptide produced by *Aspergillus oryzae* - improvement of strain and liquid culture media -

○戸所 健彦、中川 拓哉、福田 克治、松村 憲吾、入江 元子、堤 浩子、秦 洋二 (月桂冠総研)
○Takehiko TODOKORO, Takuya NAKAGAWA, Katsuharu FUKUDA, Kengo MATSUMURA, Motoko IRIE, Hiroko TSUTSUMI, Yoji HATA (Res. Inst., Gekkeikan Sake Co. Ltd.)

【背景および目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* は鉄制限条件下において、 N^{δ}-アセチル-N^{δ}-ヒドロキシオルニチン、セリン、グリシンからなる六員環ペプチドシデロフォアであるデフェリフェリクリシン（Dfcy）を産生する。Dfcy は無色の化合物であるが、環境中の鉄を特異的にキレートし、赤色のフェリクリシン（Fcy）となる。清酒醸造では、米麹由来の Dfcy が鉄をキレートし Fcy となると清酒が着色するため、Dfcy・Fcy は品質劣化の原因物質と位置付けられてきた。

一方で Dfcy および Fcy は、高い水溶性、pH や熱に対する高い安定性、無味無臭であることといった特徴を持ち、長い食経験のある麹産生であることから、他の食品・医薬品への応用が期待できる。Fcy は鉄をキレートしていることから貧血予防食品や貧血症の医薬品への利用が、Dfcy は抗酸化活性を有することから、食品の酸化防止用途や化粧品等への応用が考えられる。

しかしながら、一般的な培養条件下では麹菌の Dfcy 産生量は非常に少なく、さらに鉄存在条件下では産生抑制されてしまうことから、商業規模での生産は難しいとされていた。種々の検討の末 Dfcy の大量生産系構築に初めて成功したことを 2012 年度大会にて報告したが[1)]、本研究では菌株育種や培養条件の改良によって生産効率をさらに向上させるべく検討を行った。

【方法および結果】①生産株の育種　醸造用麹菌株から Dfcy を最も高生産する菌株を親株とし、NTG 処理により変異株取得を行った。約 300 株から Dfcy 高生産株を選抜する育種手法を 14 世代経た結果、Dfcy 生産性が向上した F14 ： 90-3 株を取得した。前回大会にて報告した F11：74-5 株[1)]と比較し、F14:90-3 株を用いた培養試験では約 20% Dfcy 生産量が増加した。

②培地の検討　培養条件面から Dfcy 生産量を向上させるため、窒素源について再検討した。これまでに、無機窒素と有機窒素を両方添加した培地で菌体の生育が良好となること、清酒粕やそのプロテアーゼ分解物は鉄の混入が少ないために Dfcy 生産には最も適した有機窒素源であることを報告した。さらにその後の研究で酒粕プロテアーゼ分解物は他の有機窒素源での培養に比べて菌体重当たりの Dfcy 生産効率が高い可能性が示唆されたため、本研究では酒粕プロテアーゼ分解物を分画し、Dfcy 産生に寄与する成分について調査したので報告する。加えて、無機塩について検討を行うため、硫酸鉄を除いたツァペックドックス（CD）培地を基本に CD 培地に含まれる各成分濃度を変化させて、個々の成分が培養に与える影響について検討したので併せて報告する。

1) 戸所ら　2012 年日本農芸化学会大会講演要旨集　2B18a11

Deferriferrichrysin, *Aspergillus oryzae*, fermentation

講演番号：2B21p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ B 校舎 21 会場

トリコテセン産生制御物質の探索・評価および作用機構の解析
Screening and evaluation of trichothecene regulatory compounds and analysis of the functional mechanism

市川 雛代[1]、○前田 一行[1,3]、中嶋 佑一[1]、斉藤 臣雄[2]、長田 裕之[2]、小林 哲夫[1]、木村 真[1,2]([1]名大院生命農、[2]理研 基幹研、[3]明大院農)
Hinayo Ichikawa[1], ○Kazuyuki Maeda[1,3], Yuichi Nakajima[1], Tamio Saito[2], Hiroyuki Osada[2], Tetsuo Kobayashi[1], Makoto Kimura[1,2] ([1]Nagoya Univ., [2]RIKEN ASI, [3]Meiji Univ.)

【目的】ムギ類赤かび病菌 *Fusarium graminearum* は、トリコテセン系かび毒を産生し、穀類を汚染する植物病原糸状菌である。トリコテセン系かび毒は人体に有害であるため、赤かび病菌による穀物汚染は農作物に甚大な経済的被害をもたらしている。本研究では赤かび病菌によるトリコテセン系かび毒の産生に影響を与える化合物を探索し、トリコテセン生合成を抑制する薬剤の開発や二次代謝制御メカニズムの解明へと発展させることを目的とする。
【結果と考察】まず、理化学研究所化合物バンク NPDepo の化合物を用いてトリコテセン産生制御物質の探索を行った。低分子化合物を添加したトリコテセン産生液体培地を用いて 15-アセチルデオキシニバレノール（15-ADON）を産生する JCM 9873 株を培養した後、毒素産生量を化合物無添加区と比較した。NPDepo の authentic library および pilot library の合計 456 化合物のスクリーニングを行ったところ、生育にほとんど影響を与えずに毒素産生を抑制する化合物と増加させる化合物を見出した。そこでこれらの類縁体についても活性評価を行い、毒素産生量を比較した。その結果、より毒素産生抑制作用が強い化合物として DHA(In-house chemical code)、増加作用が強い化合物として THF-poodle(In-house chemical code)を同定した。RT-PCR によってトリコテセン生合成遺伝子（*Tri* 遺伝子）の発現を解析したところ、DHA は *Tri* 遺伝子発現を抑制、THF-poodle は *Tri* 遺伝子発現を活性化することが示唆された。また、いずれの化合物もトリコテセン生合成に必要な farnesyl pyrophosphate （FPP）供給系遺伝子にも作用していることが示唆された。
本発表では、薬剤添加時における *Tri* 遺伝子発現量の経時変化や二次代謝制御に関わる候補遺伝子破壊株に対する作用に関して、報告する予定である。

謝辞
本研究は生物系特定産業技術研究支援センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業「ケミカルバイオロジーを基盤とした革新的な農薬等の探索研究」として行われているものである。

Fusarium graminearum, trichothecene, regulatory compound

講演番号：2B21p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ B 校舎 21 会場

麹菌で異種発現させたアフィディコリン生合成酵素の細胞内局在解析
Subcellular localization of aphidicolin biosynthetic enzymes expressed in the heterologous host, Aspergillus oryzae
○伴 曉彦[1]、田中 瑞己[1]、藤居 瑠彌[2]、及川 英秋[2]、新谷 尚弘[1]、五味 勝也[1] ([1]東北大院農、[2]北大院理)
○Akihiko Ban[1], Mizuki Tanaka[1], Ryuya Fujii[2], Hideaki Oikawa[2], Takahiro Shintani[1], Katsuya Gomi[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Hokkaido Univ.)

近年，糸状菌や放線菌が生産する多種の二次代謝産物生合成に関与する生合成遺伝子クラスターが次々に同定され，その中でも特に有用なものを高生産させようという動きが活発になっている。その際に麹菌 *Aspergillus oryzae* が自身の二次代謝産物低生産性から糸状菌宿主のクリーンホストとしての利用が期待されており，実際に *A. oryzae* に異種の二次代謝産物遺伝子クラスターを導入することで目的の最終産物を生産できることも報告されている[1)]。一方，効率的な二次代謝産物の生合成反応を考えると，糸状菌のような真核生物では生合成が細胞質ではなく何らかのオルガネラ内で行われている可能性を考慮する必要がある。しかしながら糸状菌における二次代謝産物の生合成反応がどのオルガネラで行われているかについての報告はあまりなされていない。今後，麹菌に異種の二次代謝系を導入し，高生産させるためにはオルガネラ局在化の制御が重要であると考えられる。そこで本研究では，モデルとして植物病原菌 *Phoma betae* の生産する DNA polymerase 阻害剤であるアフィディコリンの生合成遺伝子クラスターの局在を解析することを目的とした。

P. betae によるアフィディコリン生合成においては，GGS と ACS という 2 種類の可溶性酵素が基本的な炭素骨格合成反応を触媒し，その後，微生物から動植物に至る生物界に広く分布する Cytochrome P450 ファミリーに属する 2 種類の P450-1 と P450-2 が 3 ヶ所の炭素を水酸化する。これら各生合成酵素に GFP を融合させたタンパク質を麹菌で発現させて蛍光顕微鏡観察を行い，融合タンパク質の局在を観察した。続いて，各オルガネラ特異的に存在するオルガネラマーカータンパク質等に RFP を融合させたタンパク質を麹菌内で共発現させ，オルガネラへの局在が示唆された生合成酵素の局在部位を同定した。その結果，2 種類の可溶性酵素は細胞質に，2 種類の P450 は小胞体への局在が認められた。

また，植物の二次代謝産物生合成では，P450 が膜貫通ドメインを介して小胞体膜に結合し，P450 の細胞質側ドメインに可溶性酵素が動的に解離・会合するメタボロンを形成するようなモデルが提唱されている[2)]。そこで現在は，各酵素をそれぞれ単独で導入した際の局在と，同時に複数導入した際の生合成酵素間の相互作用による局在の変化の可能性ついての解析を行っている。

1) Fujii *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1813-1817 (2011)
2) Ralston *et al.*, *Phytochem. Rev.*, **5**, 459-472 (2006)

Aspergillus oryzae, Secondary metabolite, Cytochrome P450

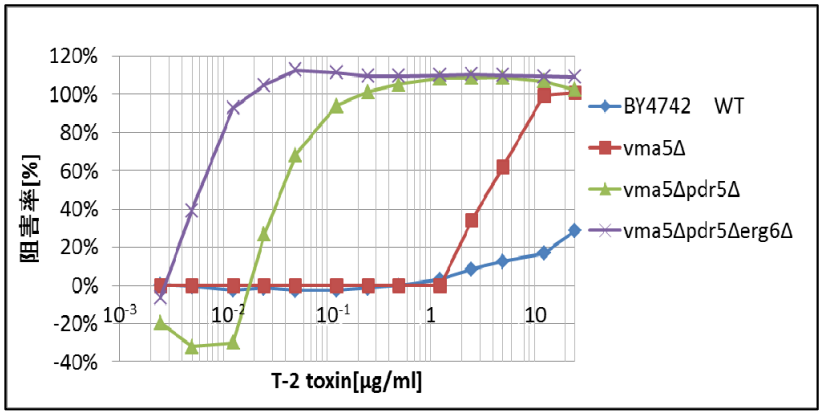
講演番号：2B21p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ B 校舎 21 会場

出芽酵母の遺伝子多重破壊株によるトリコテセン検出系の構築

Construction and evaluation of highly sensitive yeasts which can be utilize for trichothecene bioassay.

○杉山 智樹[1]、山根 由美[1]、田中 彰[1]、小宮 洋平[1]、越後 輝敦[2]、宇佐美 論[3]、峯岸 宏明[2]、安藤 直子[3] ([1]東洋大院工、[2]東洋大・バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター、[3]東洋大・理工)
○Tomoki Sugiyama[1], Yumi Yamane[1], Akira Tanaka[1], Yohei Komiya[1], Akinobu Echigo[2], Ron Usami[3], Hiroaki Minegishi[2], Naoko Takahashi-Ando[3] ([1]Toyo Univ., [2]Toyo Univ., [3]Toyo Univ.)

【目的】*Fusarium* 属のかびが生成するトリコテセン類は小麦や大麦、トウモロコシなどの重要穀類に感染し、下痢や嘔吐、ATA 症等の症状を引き起こす。その中で deoxynivalenol (DON) と nivalenol (NIV) は日本が作成した規制の対象になっているが、DON や NIV よりも強毒性の T-2 toxin や他のトリコテセン類は、規制対象外である。これらトリコテセンの検出には、HPLC や GC-MS、ELISA が多用されているが、高価な上、毒性とは相関しない。そこで本研究では簡易的で安価な上、毒性に相関する検出系を構築するために、トリコテセン高感受性酵母の作出を目指した。
【実験方法】本研究ではまず、A 型トリコテセン(T-2 toxin)と D 型トリコテセン(verrucarin A)によって共通に生育阻害のかかる遺伝子破壊体を、BY4742 を親株とする遺伝子破壊ライブラリーから選抜した。そして、それらの株の破壊された遺伝子をトリコテセン耐性遺伝子候補とした。さらに、これらの毒素耐性遺伝子を相同組換えにより、多重に破壊し、よりトリコテセンに対し感受性の高い株の作製を試みた。その際、改良型酢酸リチウム法を用い、LEU2、URA3 の置換による遺伝子破壊を行った。これらの高感受性株について、96 well plate を用いて、IC_{50} を求めたが、さらに培養条件を検討することで、トリコテセンをより高感度に検出する系の構築を試みた。
【結果】トリコテセン耐性遺伝子としては、ABC トランスポーター遺伝子、エルゴステロール生合成関連、V-ATPase 関連、エンドサイトーシス関連、RNApolymerase 関連の遺伝子が選抜された。それぞれの遺伝子破壊株の T-2 toxin に対する IC_{50} を求めたところ、SDS 添加条件下で BY4742 の親株の IC_{50} は 10 μg/ml 以上、選抜された単一破壊株での IC_{50} が 0.1～5 μg/ml、二重破壊体は 0.01～0.1 μg/ml、三重破壊体は 0.001～0.01 μg/ml となった。図に一例を示す。このように、トリコテセン耐性遺伝子を複数破壊することで、T-2 toxin への感受性は大きく高まった。またこの酵母を用いて、ディスク阻害法によって T-2 toxin、DON や NIV の検出を試みている。今後はより毒性の弱い B 型トリコテセンの DON や NIV を検出対象として、さらなる遺伝子破壊や培養条件の改良によって、十分な検出のできる系を構築していく予定である。



trichothecene, mycotoxin, drug resistant gene

講演番号：2B21p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ B 校舎 21 会場

赤色海洋酵母産生カロテノイドの化学構造および生理活性
Chemical structure and physiological function of carotenoid producing by a red marine yeast
○齋藤 忍[1]、佐藤 光[2]、津端 翔二郎[2]、能木 裕一[3]、高市 真一[4]、浜本 牧子[1,2] ([1]明治大院農、[2]明治大農、[3]JAMSTEC、[4]日医大)
○Shinobu SAITO[1], Hikaru SATO[2], Shojiro TUBATA[2], Yuiti NOGI[3], Shiniti TAKAITI[4], Makiko HAMAMOTO[1,2] ([1]Meiji Univ., [2]Meiji Univ., [3]JAMSTEC, [4]Nippon Med. Sch.)

【目的】

我々は健康維持・増進に資する新規機能性物質を産生する海洋酵母の探索を行う中で、赤色コロニーを形成する海洋酵母1株の産生する赤色色素の推定構造が、今までに報告のないカロテノイドであることを発見した。本研究では、その赤色色素の化学構造の決定および生理活性を調べた。

【方法と結果】

本赤色海洋酵母は以前の研究より、新規化学構造であると推定されたカロテノイドの他にβ-カロテン、γ-カロテンおよびトルレンを同時に産生することが明らかになっている。そこで、細胞を破砕後、アセトン抽出、ケン化、TLC 処理後、HPLC により新規化学構造と推定されたカロテノイドのみ分画したものを MS、NMR および CD に供した。その結果、赤色海洋酵母が産生するカロテノイドは 2-ヒドロキシトルレンであり、これは今までに報告のない新規カロテノイドであると考えられた。

生理活性については、分画精製した新規化学構造と推定されたカロテノイドに加えて、本赤色海洋酵母が産生するすべてのカロテノイドの混合物を用いた。一重項酸素消去能は、次亜塩素酸ナトリウムと過酸化酸素の反応により生成する一重項酸素の消去量をルミノメーターにより検出した。その結果、本新規カロテノイドの一重項酸素消去能は、既存のカロテノイドに比べ、著しく高いとは言い難い結果であった。一方、HeLa 細胞の生育に及ぼす影響を調べた結果、その生育を抑制も促進もしなかった。MCF-7 等他の腫瘍細胞、正常細胞の生育に及ぼす影響についても報告する予定である。

carotenoid, marine yeast

講演番号：2B21p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ B 校舎 21 会場

酵母による酸化型グルタチオンの生産

Oxidized Glutathione Production by Engineered Yeast

○原 清敬[1]、桐山 健太郎[2]、青木 直子[1]、近藤 昭彦[2] ([1]神戸大・自然、[2]神戸大院・工)
○Kiyotaka HARA[1], Kentaro Kiriyama[2], Naoko Aoki[1], Akihiko Kondo[2] ([1]Kobe Univ., [2]Kobe Univ.)

【目的】　グルタチオンは、抗酸化作用、解毒作用などの機能を持つトリペプチドである。細胞内で酸化型グルタチオンは、Glutathione Reductase (Glr)によって還元型グルタチオンに還元され、通常は、ほとんどが還元型として存在している。本研究では、現在還元型として生産されているグルタチオンを、より安定性の高い酸化型として高効率に生産する酵母の創製を目的としている。
【方法】　*Saccharomyces cerevisiae* YPH499 株の *GLR* に *his3* 遺伝子を挿入することで *GLR* 破壊株を作製した。また、グルタチオン合成酵素遺伝子 *GSH1*、*GSH2* および Glutathione peroxidae (Gpx) 遺伝子の過剰発現は、*PGK1* のプロモーターおよびターミネーターを用いてゲノム組み込みを行った。なお、グルタチオン濃度は HPLC を用いて測定した。
【結果】　*GLR* 破壊株の還元型グルタチオン濃度は親株よりも低下したのに対し、酸化型グルタチオン濃度は増加した。また、*GSH1* 及び *GSH2* を過剰発現させたところ、酸化型グルタチオン、還元型グルタチオン濃度はともに増加した。また、Gpx 遺伝子を過剰発現させることでも酸化型グルタチオン濃度が増加した。

Glutathione, Yeast, Metabolic Engineering

講演番号：2B21p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ B 校舎 21 会場

油脂（triacylglycerol）を分泌する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 変異株の解析

Characterization of triacylglycerol-secreting mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*

○藤井 洋紀、松崎 浩明、秦野 琢之（福山大・生命工・生物工）
○Hiroki FUJII,Hiroaki MATSUZAKI,Takushi HATANO (Fukuyama Univ.)

【目的】油脂生産微生物のほとんどは、産物油脂を細胞内に蓄積する。我々は、油脂を細胞外へ分泌生産する微生物の育種実験を行ってきた。産物油脂を細胞外に排出させることにより、生産能の強化と抽出コストの削減を目指している。これまで 2 種の酵母（*Trichosporon* sp.および *Saccharomyces cerevisiae*）の triacylglcerol（TG）分泌変異株を材料として、TG の細胞外排出機構の解析を行ってきた。今回は *S. cerevisiae* で得られた知見について報告する。

【方法･結果】*S. cerevisiae* の STG1 変異株は、TG を菌体外に漏出する。STG1 株の TG 分泌（$Halo^{+}$）形質は 1 遺伝子変異に由来し、野生型遺伝子により相補される。また細胞凝集性が強く、遺伝子クローニングの障壁ともなってきた。変異遺伝子を特定するため、Yeast-Knock-Out collection（YKO、約 4800 株）より TG 分泌の表現型を示す株をスクリーニングした。得られた候補株について、STG1 株との交配試験並びに菌体外 TG の検出を行った。その結果、*SPC72* 遺伝子が TG 分泌抑制に関与していることが強く示唆された。親株（YP1）の *SPC72* を破壊した（YP1/*SPC72*⊿）ところ、菌体外に TG が検出されるようになった。一方 *spc72* 株は、細胞内油滴（Lipid droplet）の形態・配位に異常を生じ、また油滴タンパクの分子種にも変動が起こっていることが明らかとなった。Spc72p は 622 アミノ酸で構成され coiled-coil 構造を有し、SPB の outer-plaque に局在する。その機能として、細胞質微小管や星状体微小管の形成・安定に関わることが示されている。変異遺伝子 *spc72* の塩基配列を親株のそれと比較した結果、ORF の上流 124 塩基から下流 58 塩基までに変異点は存在しなかった。今後発現の有無や強弱の解析を進め、*SPC72* の変異が TG 分泌にどのように関与するかについて明らかにしていきたい。

triacylglycerol, secretion, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：2B21p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ B 校舎 21 会場

稀少極長鎖不飽和脂肪酸ネルボン酸を生産する微生物の探索

Screening of microorganisms producing rare very long chain fatty acid, nervonic acid

○梅本 宏樹[1]、東田 悠生[2]、倉田 淳志[1]、浜本 一洋[3]、塚原 智[3]、石黒 隆[3]、岸本 憲明[1]（[1]近畿大院農、[2]近畿大農、[3]ミヨシ油脂（株））
○ Hiroki Umemoto[1], Yuki Higashida[2], Atsushi Kurata[1], Kazuhiro Hamamoto[3], Satoshi Tsukahara[3], Takashi Ishiguro[3], Noriaki Kishimoto[1] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kinki Univ., [2]Fac. of Agric., Kinki Univ., [3]Miyoshi oil and fat Co., Ltd.)

【目的】　ネルボン酸（*cis*-15-Tetracosenoic acid、$C_{24:1}$）は、ヒト脳内の白質に存在するスフィンゴ脂質を構成する主要な脂肪酸である。X 連鎖性副腎白質ジストロフィーや多発性硬化症など髄鞘が脱落して発症する疾患の治療や予防のために、ネルボン酸が投与されている。現在、植物種子由来のネルボン酸が市販されているが、生産量が少なく高価で安定供給に課題がある。そこで我々は、微生物発酵による安価なネルボン酸の生産方法を開発することを目的に研究をおこなった。本研究では、まず、ネルボン酸を高生産する微生物をスクリーニングした。

【方法・結果】　関西地方の土壌および海洋から単離した真菌約 200 株と細菌および酵母約 100 株、（独）製品評価技術基盤機構（NITE）からのスクリーニング株 66 株からネルボン酸生産菌を探索した。供試株は PYM グルコース培地とポテトデキストロース培地に 28℃で 3～7 日培養し、菌体は凍結乾燥した。乾燥菌体は塩酸メタノールで処理して脂肪酸メチルエステルを調製し、GC/MS で脂肪酸組成を分析した。その結果、土壌由来の真菌 RD000969 株と RD003333 株が、$C_{24:1}$ 脂肪酸を全脂肪酸の 6.7%と 5.3%生産していた。両菌体から調製した塩酸メタノール処理物から、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで脂肪酸メチルエステル画分を得た。これを逆相分取 HPLC に供して $C_{24:1}$ 脂肪酸メチルエステルを精製した。精製標品は、ジメチルジスルフィド誘導体に変換し GC/MS 分析で分子イオンピーク *m/z* 474 とフラグメントイオンピーク *m/z* 173 と 301 を検出したので、$C_{24:1}$ (*Δ*15) 脂肪酸と同定した。また、精製標品の FT-IR 及び ^{1}H、^{13}C-NMR 分析結果から、*cis*-15-Tetracosenoic acid であることを明らかにした。両株は 28S rDNA D1/D2 塩基配列と形態学的特徴から、いずれも *Mortierella* 属の新種と同定された。アラキドン酸生産菌として報告されている *Mortierella elongata* NBRC8570 と *Mortierella alpina* NBRC32281 のネルボン酸生産量は、全脂肪酸の 1.3%と 0.3%であったことから、スクリーニングで得られた *Mortierella* sp. RD000969 と RD003333 は、*Mortierella* 属の中でもネルボン酸生産能力が高い株であることを明らかにした。

nervonic acid, *Mortierella*, single cell oil

講演番号：2B21p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ B 校舎 21 会場

ジペプチドによる大腸菌の生育阻害機構の解析
The analysis of growth inhibition mechanism by dipeptide in *E.coli*.
○板谷 佳織、和地 正明（東工大院生命理工）
○Kaori ITAYA,Masaaki WACHI (Tokyo tech.)

【目的】ジペプチドはモノマーのアミノ酸にはない物理・化学的性質や生理機能を有するため、食品や医薬への応用が期待されている。例えば、L-グルタミン（Gln）は代謝系において重要な役割を果たすアミノ酸として知られているが、水溶液中での安定性や熱安定性の低さからその利用が限定されていた。一方、L-アラニル-L-グルタミン（Ala-Gln）は、水溶液中で安定であり熱安定性が高いため、Gln の代替品として用いられている。しかしながらペプチドの化学合成は工程が複雑なためアミノ酸に比べ著しく価格が高い。近年、枯草菌から無保護のアミノ酸 2 つを ATP 依存的に結合させる L-アミノ酸リガーゼが発見され、ジペプチドの発酵による生産法が開発された。この酵素を大腸菌で発現させ、ジペプチドの分解を担うペプチダーゼの遺伝子を欠失させることにより、Ala-Gln 生産菌が作出された。しかし、ペプチダーゼを欠損させた株（Δpeps 株）は Ala-Gln を含むグルコース最少培地（Ala-Gln 培地）で生育が著しく抑制された。本研究では Ala-Gln により Δpeps 株の生育阻害が引き起こされるメカニズムを明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】Ala-Gln 培地での Δpeps 株の生育阻害は以下の 2 つの方法によって回復した。1 つは Ala-Gln 培地にカザミノ酸を加えること、もう 1 つは Δpeps 株でジペプチドトランスポーターをコードする遺伝子群である *dpp* オペロンを欠損させることである。これらの事実から生育阻害の原因を次のように予測した。Δpeps 株はジペプチドトランスポーターにより培地中の Ala-Gln を取り込むが、ペプチダーゼの欠損により Ala-Gln を菌体内で分解できず、菌体内に蓄積した Ala-Gln がアミノ酸生合成系に影響を及ぼし、その結果生育阻害が引き起こされる。そこで、Ala-Gln 存在下でアミノ酸生合成系が影響を受けているかを調べるため、Ala-Gln 培地に 20 種のアミノ酸を様々な組み合わせで添加した培地を作成し、Δpeps 株の生育が回復するかどうかを調べた。その結果、グリシン、スレオニン、セリン、アルギニンの 4 つのアミノ酸を同時に加えたときに生育が回復することが確認された。また遺伝学的な解析から、Δpeps 株における Ala-Gln による生育阻害は *hfq* 遺伝子の欠損によって回復されることが明らかとなった。Hfq は RNA 結合タンパク質として知られ、sRNA を介した mRNA の転写後調節に関わっているとされている。これらの結果より、Ala-Gln による Δpeps 株の生育阻害は、グリシン、スレオニン、セリン、アルギニンの 4 種類のアミノ酸の生合成系が阻害されることによって引き起こされ、阻害メカニズムには Hfq・sRNA を介した転写後調節が関わっていることが示唆された。

dipeptide, metabolic control, *Escherichia coli*

講演番号：2B21p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ B 校舎 21 会場

大腸菌における改良型ベンジルイソキノリンアルカロイド生産系を用いたアポルフィンアルカロイド生産

Production of aporphine alkaloids in *Escherichia coli* using a modified biosynthesis system for benzylisoquinoline alkaloids

○松村 栄太郎[1]、中川 明[1]、南 博道[1]、片山 高嶺[1]、山本 憲二[1]、佐藤 文彦[2]、熊谷 英彦[1]([1]石川県立大・資源研、[2]京大院・生命)
○Eitaro MATSUMURA[1], Akira NAKAGAWA[1], Hiromichi MINAMI[1], Takane KATAYAMA[1], Kenji YAMAMOTO[1], Fumihiko SATO[2], Hidehiko KUMAGAI[1] ([1]Ishikawa Prefectural University, [2]Kyoto University)

【目的】アルカロイドは、テルペノイドやフラボノイドとならぶ主要な植物二次代謝産物であり、さまざまな生理活性を有する化合物が見いだされている。その中でも benzylisoquinoline alkaloid (BIA)は、モルヒネやコデインなどの少量で顕著な生理活性を示す化合物が含まれることから、新たな生理活性を有する医薬品への応用が期待されている。しかし、BIA は光学活性を有する複雑な構造であるため、化学合成が困難である。そのため、BIA の取得は、現状では植物体からの抽出に頼っており、迅速かつ安定に供給できる生産系の開発が望まれている。我々は、これまでに、ほとんどの BIA の中間体である(*S*)-reticuline を組換え大腸菌により発酵生産できる系を確立した[1)]。この生産系に新たな遺伝子を導入して生合成経路を伸長することにより、さまざまな BIA が低コストで短期間に生産できることが期待される。本研究では、組換え大腸菌による(*S*)-reticuline 生産系の有用性を実証するために、同生産系に単一の酵素遺伝子を新たに導入することによる aporphine alkaloid の生産を検証した。
【方法】(*S*)-Reticuline を corytuberine に変換する P450 酵素である CYP80G2 を大腸菌で発現させるため、*ompA* のシグナル配列および *Bacillus megaterium* 由来 $P450_{BM3}$ の reductase ドメインと融合した酵素遺伝子を構築した。この改変型酵素遺伝子を、各種代謝中間体からの(*S*)-reticuline 生産株に導入した組換え大腸菌を取得した。得られた菌株は、pH 制御下で培養し、生成した BIA を LC-MS を用いて定量することにより評価した。
【結果】改変型 CYP80G2 を導入した(*S*)-reticuline 生産株は、培地中の pH をアルカリ性に維持することにより、評価したすべての中間体から corytuberine を生成し、dopamine を基質とした場合に最大濃度 12.3 mg/L の corytuberine を生成した。また、magnoflorine は、(*S*)-reticuline 生産系に含まれる *Coptis japonica*（オウレン）由来の coclaurine *N*-metyltransferase (CNMT)により、corytuberine から生成される。改変型 CYP80G2 を導入した(*S*)-reticuline 生産株の培養において、corytuberine が生成された後に pH を中性付近に変更することにより magnoflorine が生成し、その収量は dopamine を基質とした場合には 3.6 mg/L、glucose を基質とした場合には 0.2 mg/L であった。本研究において、大腸菌による(*S*)-reticuline 生産系を発展させることにより、単一菌株による aporphine alkaloid 生産系を構築することができた。

1) Nakagawa *et. al.* Nat. Commun. 2:326 (2011)

alkaloid, cytochrome P450, microbial production

講演番号：2B21p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ B 校舎 21 会場

高いプロバイオティクス効果をもつポリリン酸高蓄積乳酸菌の開発

Engineering of polyphosphate-accumulating lactobacilli which have high effects of probiotics

○石田 康晃[1]、瀬川 修一[2]、斎木 朝子[2]、廣田 隆一[1]、池田 丈[1]、黒田 章夫[1] ([1]広島大院、[2]サッポロビール株式会社)
○Yasuaki Ishida[1], Shuichi Segawa[2], Asako Saiki[2], Ryuichi Hirota[1], Takeshi Ikeda[1], Akio Kuroda[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Sapporo Breweries Ltd.)

【背景・目的】プロバイオティクスである乳酸菌には、便秘改善、感染防御、免疫調節、腸管バリア機能改善など多岐に渡る効果があると複数報告されているが、その活性物質や作用機構は不明な点が多かった。最近の研究により、乳酸菌が産生する腸管バリア機能を高める活性物質が探索され、ポリリン酸が同定された[1)]。このことから、乳酸菌に多量のポリリン酸を蓄積させることによって、乳酸菌に本来備わっているプロバイオティクス効果に加え、より高い腸管バリア機能改善効果をもった高機能性乳酸菌が開発できると考えられる。本研究では、ポリリン酸を多量に蓄積する乳酸菌を得るために高蓄積菌株のスクリーニング、培養条件の検討、ポリリン酸蓄積関連遺伝子の変異による高蓄積化を試みると共に、*Lactobacillus* 属乳酸菌のポリリン酸蓄積メカニズムを調べた。
【方法・結果】公的微生物保存機関及び、サッポロビール菌株ライブラリから得られた 85 株の乳酸菌を MRS 培地で静置培養し、24 時間後のポリリン酸量を計測した結果、ポリリン酸高蓄積菌株として *Lactobacillus paracasei* SBC8207 株（以下、8207 株）を取得した。この 8207 株のポリリン酸蓄積量と増殖の関係を経時的に調べた結果、対数増殖期初期にポリリン酸を最も蓄積し、やがて増殖に伴い減少することが分かった。また、さらに 8207 株のポリリン酸蓄積能力を向上させるために、低リン酸培地である大豆ペプチド培地を用いたリン酸制限培養後のリン酸添加や、ポリリン酸蓄積の負の制御因子である *phoU* に変異を誘発するため NTG 処理を行った。その結果、それぞれ通常培養時の 14 倍、37 倍ものポリリン酸を蓄積させることに成功した。現在、ポリリン酸蓄積に関与する遺伝子として知られるポリリン酸キナーゼ遺伝子（*ppk*）、*phoU* の破壊により、これらの酵素がポリリン酸合成にどのように関与しているのか解析中である。

1）Segawa, S. *et. al.*, PLoS one, 6:e23278 (2011)

polyphosphate, probiotics, *Lactobacillus*

講演番号：2B21p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ B 校舎 21 会場

好アルカリ菌 *B. halodurans* C-125 株の各種 pH 条件下での haloduracin の生産
Haloduracin production at various pH conditions by alkaliphile *B. halodurans* C-125
○片山 欣哉、田崎 弘之（日獣大）
○Kinya KATAYAMA,Hiroyuki TAZAKI (NVLU)

ランチビオティック haloduracin は幅広い抗菌スペクトルを有しており、その抗菌活性は食品保存料として使用されているランチビオティック nisin と同等あるいはそれ以上である。ランチビオティックは、非リボソームペプチド合成酵素によって生合成されるペプチド系抗生物質とは異なり、通常のタンパク合成と同様にリボソームで生合成が行われる。その前駆体ペプチドの構造遺伝子はゲノム上にコードされているため、遺伝子解析により生成物の一次構造の予測が可能である。実際、haloduracin は好アルカリ性細菌 *Bacillus halodurans* C-125 のゲノム解析によってその存在が予想され、発見された 2 つのペプチドが相乗的に作用するタイプのランチビオティックである。

我々は以前、haloduracin βペプチドの構造遺伝子 BH0453 の転写と haloduracin αおよびβペプチドの生産が、中性の培養条件(pH 7.0)に比べアルカリ性の条件(pH 9.5)でより活発に行われていることを報告した。今回各 pH での培養を経時的に観察し、haloduracin の生産を調べたので報告する。

【方法】Horikoshi II 培地(1% 可溶性でんぷん, 0.5% ポリペプトン, 0.5% イーストエキス, 0.1% K_2HPO_4, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 7.5)を 1 M NaOH により pH 7.5, 8.3, 9.0, 9.8, 10.5 に調整、Na^+濃度が 0.1 M となるように 1 M NaCl を加えた培地を調製し、37° C にて震盪培養を行った。培養液は経時的（6 時間毎）に回収し、OD_{600}、pH、抗菌活性を調べた。抗菌活性試験の試料は菌体の 70% 2-プロパノール溶液抽出液を乾固した後、滅菌水に溶解して調製した。活性測定は *Lactobacillus gaseri* を指標菌とした寒天拡散法によって行った。【結果】OD_{600} は pH 8.3, 9.0 の条件が高値を示した。培養液の pH はいずれの条件においても変化がみられた。pH は対数増殖期(0-12 h)が最も低く（12 h, pH 7.3-8.6)、その後に増加する傾向が見られ、29 h の培養後には pH7.8～8.7 となっていた。抗菌活性は培養時間 12 h の菌体では見られなかった。比活性（阻止円直径／OD_{600}）は回収時の培地の pH が 8.5 以上のものが高値を示した。

【考察】以前に報告した中性(pH7.0)の培養条件では、アルカリ条件に比べ生育が非常に悪かったが、今回予備実験として行った pH 7.0 の培養条件では、対数増殖期に pH が酸性(pH 6.7)になることが確認され、これが原因であると考えられた。各条件での OD_{600} の値にはばらつきが見られたが、アルカリ性の培養条件の比活性が高いのは、培養液の pH が 8.5 以上に保たれるためであると考えられる。
現在、各培養条件での haloduracin 生合成遺伝子の発現量のリアルタイム PCR による定量を行っており、それについてもあわせて報告する。

haloduracin, Bacillus halodurans, lantibiotic

講演番号：2B21p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ B 校舎 21 会場

新規塩基性ポリアミノ酸の探索

Screening for Novel poly(amino acid)-producing Microorganisms

○青柳 大介[1]、芝原 弘樹[1]、内海 尚子[1]、石井 義孝[2]、木野 邦器[1] ([1]早大理工、[2]大妻女子大)
○Daisuke AOYAGI[1], Hiroki SHIBAHARA[1], Naoko UCHIUMI[1], Yoshotaka ISHII[2], Kino KUNIKI[1] ([1]Waseda Univ., [2]Otsuma Women's Univ.)

【背景】ポリアミノ酸は、ペプチド結合に由来する生分解性と構成アミノ酸の官能基に由来する多様な機能や生理活性を有することから、資源循環型の機能性ポリマーとして注目されている。なかでも、塩基性のポリアミノ酸は正電荷を帯びているので細胞との親和性が高く、細胞培養基材やドラッグデリバリーシステムなどへの応用が期待される。微生物由来の塩基性ポリアミノ酸は、放線菌の生産するポリリジンや子嚢菌の生産するポリアルギニルヒスチジン（PRH）などが知られているが、わずか数例しか報告されていない。そこで本研究では、工業的有用性が期待される塩基性ポリアミノ酸を生産する微生物の取得を試みた。
【方法・結果】ポリアミノ酸生産菌の探索にはポリリジン生産菌で知られているスクリーニング法を用いた。本手法は、塩基性色素を添加した平板培地上で微生物の分泌する化合物と色素の静電的相互作用によりハロを形成することを利用したものである。ハロが確認できた 38 株の培養上清から、弱陽イオン交換カラムを用いた固相抽出によって塩基性成分を抽出した。MALDI-TOF MS を用いて質量分析を行い、最終的に 4 菌株から規則的な分子量のピークを示す計 4 種類の候補化合物を取得した。候補化合物を酸加水分解し、HPLC を用いて構成成分の分析を行ったところ、うち 3 種類はポリリジンあるいはポリリジンを主鎖とする誘導体であったが、1 種類は新規な PRH 類似ポリアミノ酸であることが示唆された。当該 PRH 様物質は、アルギニンとヒスチジンが連続的かつ交互に付加されているオリゴペプチドであり、その構造からジペプチド単位で合成されている既知 PRH とは異なる機構で合成されていることも示唆された。また、本生産菌では、既報の PRH 生産菌とは異なりポリリジンの併産は観察されなかった。

amino acid, poly(arginyl-histidine), poly(lysine)

講演番号：2B21p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ B 校舎 21 会場

細胞性粘菌における抗生物質の探索

The antibiotics hunting in the cellular slime mould

○岩崎 なつみ[1]、齊藤 玉緒[2] ([1]上智大院理工、[2]上智大理工)
○Natsumi IWASAKI[1], Tamao SAITO[2] ([1]Grad. sch. of Sci. and Tech., Sophia Univ, [2]Fac. of Sci. and Tech., Sophia Univ.)

＜目的＞土壌微生物の細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は、単細胞期と多細胞期の二つの時期を併せ持つ特殊な生活環を持つことから、発生・分化のモデル生物として実験に広く用いられている。ゲノム解読終了により、細胞性粘菌は 45 個のポリケタイド合成酵素(PKS)を持つことが明らかとなった。一般に放線菌等の土壌微生物は天然物を産出する貴重な資源として考えられており、これまで多くの有用物質が発見されている。土壌微生物の細胞性粘菌はその生活環や PKS 遺伝子を多く有していることから、未知の二次代謝産物を産生していることが示唆される。今回、天然物資源と考えられる細胞性粘菌から、抗生物質の探索を試みた。

＜方法＞細胞性粘菌をろ紙上に発生させ、細胞外に分泌する疎水性物質を beads を用いて吸着・回収する方法と子実体そのものを集めて疎水性物質を回収する方法の二つの方法でサンプルの回収・抽出を行った。このように抽出した溶液を細胞抽出液として、抽出液について *Bacillus subtilis* および *Escherichia coli* に対する抗菌活性の有無の検証を行った。コントロールには Ampicillin と 40%メタノールを、抽出液の抗菌活性はペーパーディスクを用いたディスクディフュージョン法を用いた。

＜結果＞二つの方法で抽出した細胞抽出液について *Bacillus subtilis* および *Escherichia coli* に対する抗菌活性の有無の検証を行った結果、*Bacillus subtilis* にのみ阻止円がみられた。このことから、細胞性粘菌はグラム陽性桿菌に対する抗生物質を持つことが示唆された。また、子実体から直接サンプルを回収する方法で抽出した細胞抽出液が、より阻止円が大きくなり、抗菌活性物質をより有効に抽出することが可能だと考えられる。今回は *Dictyostelium discoideum* のみで実験を行ったが、今後は異なる種からも抽出を行い、抗生物質の探索を行っていきたいと考えている。

Dictyostelium, antibiotic, polyketide

講演番号：2B21p17
講演日時、会場：3 月 25 日 17:12～ B 校舎 21 会場

シロイヌナズナの側根伸長を促進する *Pseudomonas fluorescens* の解析

Analysis of a plant growth-promoting rhizobacterium, *Pseudomonas fluorescens*

○津田 高佑、玉置 友樹、田中 亜里彩、阿野 貴司、岡南 政宏（近畿大・生物理工・生物工）
○Kosuke TSUDA,Yuki TAMAKI,Arisa TANAKA,Takashi ANO,Masahiro OKANAMI (Kinki Univ.)

【緒言】

Plant Growth-Promoting Rhizobacteria（PGPR）とは、直接的または間接的に植物生長を促進する土壌中に常在する根圏微生物である。それらが生長促進するメカニズムはよく解っていないが、大気中の窒素の固定、植物ホルモンまたは植物ホルモン様物質の産生、シデロフォアの産生、リン酸、カリウム、亜鉛の可溶化などを行っていることが考えられる。一方、根圏微生物のおよそ 2～5%が PGPR と考えられるが、芽胞を形成しない微生物の方が、芽胞からの復帰に時間を要する芽胞形成微生物よりも利用時には有利であると考えられる。また、PGPR のほとんどが、植物生長促進効果（PGP 効果）とともに植物病原菌に対する増殖抑制効果をもつことが知られている。

【方法・結果】

シデロフォア形成能、リン可溶化能、フィチン可溶化能を指標として、環境微生物をスクリーニングした結果、複数の微生物株が単離された。中でも A-2 株は、これらについて最も強い能力を示した。さらに、A-2 株は、シロイヌナズナ芽生えの側根数の増加や根毛の増加、地上部の生長促進などを引き起こし、PGPR としての特徴を示した。A-2 株は、紫外線照射下において蛍光を発すること、および、16S rRNA 遺伝子の塩基配列から、*Pseudomonas fluorescens* であることが強く示唆された。一方、A-2 株は、植物病原菌 *Fusarium oxysporum* と *Rhizoctonia solani* の増殖を抑制することができた。現在、A-2 株による PGP 効果のメカニズムを解明するため、PGP 効果を発現できない A-2 株の突然変異体の単離を試みている。

Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*, Phytopathogenic Fungi

講演番号：2B21p18
講演日時、会場：3 月 25 日 17:24～ B 校舎 21 会場

植物葉を利用した新しい微生物農薬候補株の単離
Isolation of antifungal bacteria from plant leaves
○大池 達矢、岡南 政宏、阿野 貴司（近畿大学院生物理工）
○ Tatsuya OHIKE,Masahiro OKANAMI,Takashi ANO（Div. Biotechnol. Sci., Grad. Sch. Biol.-oriented Sci. and Technol., Kinki Univ.）

【目的】
自然界に生息する微生物の抗菌活性を活用することで、作物を植物病原菌などから守る微生物農薬が生物的防除の１つとして注目されている。我々は、微生物農薬の新しい単離源としてエンドファイト（endophyte）に注目した。エンドファイトとは生きた植物体内で病気を起こさずに共生している真菌や細菌のことで内生菌とも呼ばれており、植物との親和性が高いことが知られている。
本研究では、植物との親和性の高さを活かし、*Rhizoctonia solani* や *Fusarium oxysporum* などの植物病原菌に対し、より効率の高い増殖抑制を示す新しい微生物農薬の単離源として細菌性エンドファイトの探索を行うことを目的とした。
【材料および方法】
細菌の単離源として 35 種類の植物葉を採取し、エンドファイトの単離を試みた。植物葉は、次亜塩素酸とエタノールによる表面殺菌後、葉の表面を寒天培地上に密着させ、コロニーの出現の有無により、葉表面の殺菌効果を確認した。その後、植物葉を 5 mm 角に切断し、寒天培地に移し、培養を行った。培養後、生育したコロニーを釣菌し、画線培養により単離を行った。
得られた細菌エンドファイトは、植物病原菌に対する抗菌活性を確認し、培養上清の抗菌活性試験および、HPLC による抗菌活性物質の分析を行った。
【結果および考察】
全 35 種類中、6 種類の植物葉から細菌エンドファイトを単離することができた。このうち、植物病原菌に対して強い抗菌活性をもつものはクリ葉から単離された KL１のみであった。この細菌エンドファイトの 16S rRNA 系統解析を行った結果、*Bacillus* 属の細菌であることが判明した。また、生産する抗菌活性物質が耐熱性を持つこと、*Bacillus* 属細菌であることから、KL1 が生産する抗真菌活性物質は、リポペプチド系抗菌物質であることが示唆された。以上のことから今回単離された細菌エンドファイトは、植物との親和性が高いことが期待され、微生物農薬としての利用が可能であることが示唆された。

biocontrol agent, endophyte, lipopeptide antibiotic

講演番号：2B22a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ B 校舎 22 会場

代謝工学に基づいた大腸菌によるイタコン酸生産

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for itaconic acid production

○岡本 脩佑、田中 康智、麻生 祐司、小原 仁実（京都工繊大院・工芸科学）
○Shusuke OKAMOTO,Yasutomo TANAKA,Yuji ASO,Hitomi OHARA（Kyoto Inst. Tech.）

[緒言] 糸状菌 *Aspergillus terreus* によって発酵生産されるイタコン酸は、ラジカル重合反応性を有する環境調和型モノマーとして注目されている。しかし、本菌のイタコン酸生産性は 4 日間の発酵で対糖収率 50%程度と低く、従来法に替わる新しいバイオプロセス生産法の開発が望まれている。そこで本研究では、イタコン酸を効率的に生産するための手法の確立を目的とし、代謝工学的手法により代謝経路を改変した大腸菌を用いて、グルコースからのイタコン酸生産を試みた。

[方法] *Aspergillus terreus* 由来の *cis*-アコニット酸脱炭酸酵素遺伝子(*cad*) を pET system 用発現ベクターにクローニングし、pETHis-cad を作製した。pETHis-cad と pLysS を用いて、大腸菌 *Escherichia coli* BW25113 (DE3)を形質転換した。得られた形質転換体 *E. coli* BW25113 (DE3) (pETHis-cad, pLysS) を LB 培地に接種し 37˚C で培養後、培養液濁度が OD_{600}=0.4~0.6 の時に IPTG を終濃度 0.1 mM となるように添加し、*cad* の発現を誘導した。その後、20˚C もしくは 37˚C で培養した。菌体破砕液を SDS-PAGE に、培養液上清を HPLC に供することで Cad タンパク質の発現とイタコン酸の生産量の確認を行った。また、*E. coli* BW25113 (DE3) (pETHis-cad, pLysS)のイソクエン酸脱水素酵素遺伝子(*icd*) とイソクエン酸リアーゼ遺伝子(*aceA*) を破壊した株を作製し、Cad タンパク質の発現とイタコン酸生産量の確認を行った。さらに、*cis*-アコニット酸と菌体破砕液を反応させ生成するイタコン酸量を定量することで Cad 活性を測定した。

[結果と考察] *E. coli* BW25113 (DE3) (pETHis-cad, pLysS) において培養温度 20˚C で *cad* を発現させたところイタコン酸の生産が確認できた。このとき、培養液中のイタコン酸濃度は 54 時間の培養で 0.17 g/L であった。また、発現させた Cad タンパク質の大部分は可溶性タンパク質として確認できた。一方、培養温度 37˚C の条件で *cad* を発現させたところ、明確なイタコン酸生産は確認できなかった。このとき、発現させた Cad タンパク質の大部分はインクルージョンボディを形成していた。よって、大腸菌において緩やかに *cad* の発現誘導を行うことで、グルコースからイタコン酸が生産できることがわかった。さらに、*icd* 破壊株において *cad* を発現させたところ、54 時間の培養で 0.69 g/L のイタコン酸を生産した。また、*E. coli* BW25113 (DE3) (pETHis-cad, pLysS) の Cad 活性値は 45.87±1.46 U/mg であったのに対し *icd* 破壊株では 28.48±0.415 U/mg であった。以上の結果から、代謝工学的手法によりイタコン酸生産性を高めることができることを明らかにした。

itaconic acid, *Escherichia coli*, metabolic engineering

講演番号：2B22a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ B 校舎 22 会場

アクリル酸生産関連遺伝子の発現とアクリル酸発酵生産への応用

Expression of acrylic acid synthetic genes and application of these genes to acrylic acid fermentative production

○田中 康智、岡本 脩佑、麻生 祐司、小原 仁実（京都工繊大院・工芸科学）
○yasutomo TANAKA,shusuke OKAMOTO,yuji ASO,hitomi OHARA（Kyoto Inst. Tech）

[目的]近年、バイオマスからの微生物によるモノマー発酵生産法の開発が盛んである。一方、有用なビニルモノマーであるアクリル酸を乳酸から生物変換できる *Megasphaera elsdenii* の存在が明らかとなっている。しかし、その生産性は培地中濃度で 0.1 g/L 程度と極めて低く、アクリル酸を生産するための技術基盤は今のところ存在しない。そこで本研究では、既にゲノムシーケンスの明らかな *M. elsdenii* JCM1772 のコードするアクリル酸生産関連遺伝子 *pct*（プロピオニル-CoA 転移酵素遺伝子）および *lcdCAB*（ラクチル-CoA 脱水酵素遺伝子）を乳酸生産大腸菌 *Escherichia coli* JW0885 に導入し発現させることで、グルコースからのアクリル酸の直接発酵生産法の開発を試みた。
[方法・結果]*M. elsdenii* JCM1772 のゲノムを鋳型として PCR により *pct* および *lcdCAB* を 1 つのオペロンとして増幅後、発現ベクターpTV118N にクローニングし pTV-pct-lcdCAB を得た。これを用いて *E. coli* JW0885 を形質転換した。得られた形質転換体 *E. coli* JW0885(pTV-pct-lcdCAB) を 0.1 mM IPTG を添加した LB 培地にて微好気条件下で 20 ºC で 24 h 培養した。また、*pct* および *lcdCAB* をそれぞれ pET system 用発現ベクターpETHis にクローニングし pETHis-pct と pET-lcdCAB を得た。これらを用いて *E. coli* JW0885(DE3)(pLysS)を形質転換した。得られた形質転換体 *E. coli* JW0885(DE3)(pETHis-pct, pLysS)および *E. coli* JW0885(DE3)(pET-lcdCAB, pLysS)を 1.0 mM IPTG を添加した LB 培地にて 37 ºC で 3h 培養した。培養後、菌体を破砕し SDS-PAGE により Pct および LcdCAB の発現の確認を行った。また、培養液上清を HPLC に供しアクリル酸生産性を解析した。その結果、*E. coli* JW0885(pTV-pct-lcdCAB)を用いた場合、Pct および LcdCAB の明確な発現の確認はできなかったが、グルコースからのアクリル酸の生産を確認できた。このとき、培養液中のアクリル酸濃度は 0.01 g/L、対糖収率は 0.9%であった。一方、*E. coli* JW0885(DE3)(pETHis-pct, pLysS)および *E. coli* JW0885(DE3)(pET-lcdCAB, pLysS)を用いた場合、Pct と LcdCAB が高発現することを確認した。現在、pET system を用いて *pct* および *lcdCAB* を 1 つのオペロンとして共発現させるためのプラスミドの構築を行っている。

fermentation, acrylic acid, *Megasphaera elsdenii*

講演番号：2B22a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ B 校舎 22 会場

大腸菌における *Bacillus amyloliquefaciens* 由来アミラーゼ遺伝子 *amyA* 発現系の構築

Establishment of expression system of *Bacillus amyloliquefaciens* amylase *amyA* in *Escherichia coli*

○麻生 祐司、岡本 脩佑、田中 康智、小原 仁実（京都工繊大院工芸科学）
○Yuji ASO,Syusuke OKAMOTO,Yasutomo TANAKA,Hitomi OHARA（Kyoto Inst. Tech.）

［目的］アミラーゼ遺伝子と種々のマテリアル生産遺伝子を大腸菌において共発現させることで、デンプン系バイオマスを資化しマテリアルを生産可能な大腸菌が創製できる。しかし、アミラーゼ遺伝子と他の遺伝子をそれぞれ別の発現ベクターを用いて共発現させるには、各々のベクターが互いに和合性を示す必要がある。そこで本研究では、pMB1 レプリコンを有する一般的な大腸菌用ベクターと和合性を示す発現ベクターを新たに開発し、これを用いて大腸菌において *Bacillus amyloliquefaciens* 由来アミラーゼ遺伝子 *amyA* の発現系を構築した。

［方法・結果］OprI 融合タンパク質発現ベクターpVUB3（4.3 kb、pMB1 レプリコン）の *lacIQ'*-Ptrc-*oprI-rrfB-rrnBT1T2* の領域（2.8 kb）を、pACYC184 および pGBM1 にそれぞれクローニングすることで pACYC-VUB3（7.0 kb、p15A レプリコン）および pGBM-VUB3（6.8 kb、pSC101 レプリコン）を開発した。開発した両発現ベクターは pMB1 レプリコンを有するベクターと和合性を示すとともに、目的タンパク質の細胞表層発現に利用可能である。pVUB3、pACYC-VUB3、pGBM-VUB3 の *oprI* の下流に in-frame で *amyA* をクローニングすることでそれぞれ pVUB3-amyA、pAV-amyA、pGV-amyA を得た。各プラスミドを用いて大腸菌 *Escherichia coli* JM109 を形質転換後、1%可溶性デンプン含有 LB 培地を用いて 37℃で培養し 1 mM IPTG 添加により *amyA* の発現を誘導したところ、培地中のデンプンの完全分解を確認した。また、得られた菌体を SDS-PAGE に供したところ、AmyA（63.2 kDa）の発現を確認した。このときの AmyA 発現量は導入したプラスミドのコピー数に依存していた。

amylase, compatible plasmid, *Bacillus amyloliquefaciens*

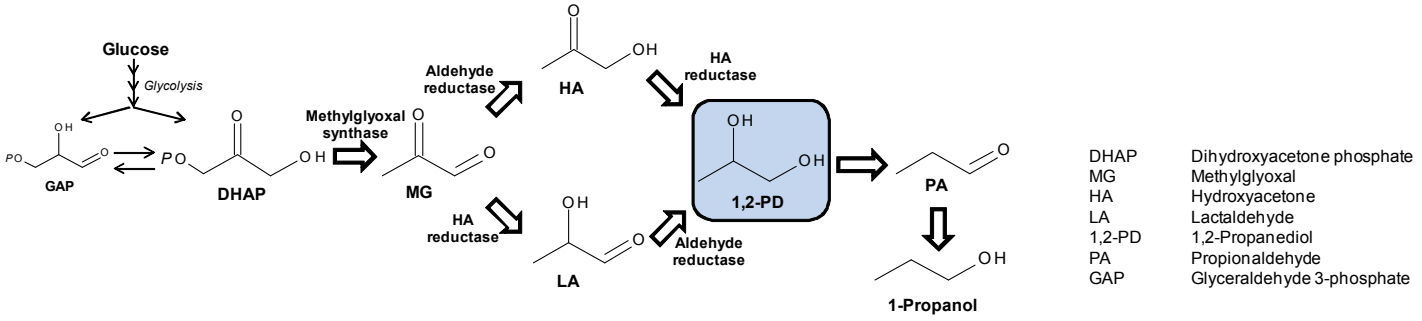
講演番号：2B22a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ B 校舎 22 会場

組換え大腸菌による 1-プロパノールの発酵生産に関する研究

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for fermentative production of 1-propanol

浦野 信行、○藤居 実咲、片岡 道彦（阪府大院生環科・応生科）
Nobuyuki URANO,○Misaki FUJII,Michihiko KATAOKA (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【目的】1-プロパノールは多目的な溶媒として様々な分野で使用されている化合物であり、さらに代表的汎用ポリマーであるポリプロピレンの単量体であるプロピレンに容易に変換できる化合物でもあるため、バイオポリマー原料としても注目を集めている。これまでのバイオエタノールを中心とした燃料生産のためのバイオマス利用だけでなく、汎用ポリマー原料としてのバイオマス利用が可能になれば、より長期間の CO_2 固定という面においても大きな期待ができる。これまでの研究において、人工生合成経路（下図）を導入した組換え *Escherichia coli* を用いることで、グルコースからの 1-プロパノール発酵生産の可能性を示してきた。そこで本研究では、生合成経路中、特に 1,2-プロパンジオール（1,2-PD）へ至る各反応を触媒する酵素の検討を行い、1-プロパノール生産量を増加させることを目的とした。
【方法と結果】ジヒドロキシアセトンリン酸（DHAP）から 1,2-PD への各変換反応を触媒する酵素をいくつか選抜し、各反応を触媒する酵素の最適な組み合わせを選ぶため、様々な組み合わせで大腸菌に導入した。各組換え体を用いて、グルコースから 1,2-PD の生成が可能かどうかを調査するとともに、1,2-PD の生成量の比較を行ったところ、全ての組換え体において 1,2-PD の生成が確認できた。そしてメチルグリオキサール合成酵素として *E. coli* 由来の Methylglyoxal synthase を、アルデヒド還元酵素として *E. coli* 由来 2,5-diketo-D-gluconate reductase B を、HA 還元酵素として *E. coli* 由来 glycerol dehydrogenase を用いた際に最も高い 1,2-PD 生成量を示した。それぞれの菌株における各反応の酵素活性を測定したところ、選抜した菌株は他の株と比較して、最も高いアルデヒド還元酵素活性を有している一方で、HA 還元酵素活性は最も低いものであった。



metabolic engineering, 1-propanol, *Escherichia coli*

講演番号：2B22a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ B 校舎 22 会場

ロイシン生産菌 NB12 株のゲノム配列解析による生産メカニズムの解明
Investigation of production mechanism in a leucine producer NB12 by determination of the genome sequence
○外内 尚人、小関 智恵、中西 一夫 (味の素バイオファイン研)
○Naoto Tonouchi,Chie koseki,Kazuo Nakanisshi (Bio-Fine Research Institute, Ajinomoto Co. Inc.)

【目的】
NB12 菌は変異処理により育種されたコリネバクテリウムのロイシン生産菌株である。この株では生合成の鍵酵素である IPMS（α - isopromyl malate synthase）と AHAS（acetohydroxylate synthase）について、フィードバック阻害および抑制が解除されているが、遺伝子解析はこれまで行われていなかった。そこで、この株の変異点を見出・解析し、ロイシン生産メカニズムを考察した。

【方法と結果】
NB12 株のゲノム配列を SOLiD 法により決定し、野生株と比較した。IPMS をコードする *leuA* 遺伝子と AHAS をコードする *ilvBN*遺伝子に変異（*leuA*（G564D）および *ilvB*（G235D））が見られ、これらの変異により酵素のフィードバック阻害が解除されたと考えられた。また、変異型の *leuA* および *ilvBN*遺伝子を導入することにより、ロイシンの蓄積が見られた。一方、フィードバック抑制に関しては、*leuA*、*ilvBN* 両遺伝子ともプロモーター等の変異は見られなかったが、TD（threonione dehydratase: *ilvA*）に変異（A95T）が見られたことから、この変異により TD が欠損して Ile 要求性となり抑制解除されたと推定された。

leucine producer, genome sequence, mutation point

講演番号：2B22a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ B 校舎 22 会場

乳酸菌の不飽和脂肪酸ヒドロキシル化酵素について

Characteristics of unsaturated fatty acid hydroxylase in lactic acid bacteria

○鈴木 由佳、金内 誠、畑中 咲子、下山田 真、石田 光晴（宮城大食産）
○ yuka suzuki,makoto kanauchi,sakiko hatanaka,makoto shimoyamada,mitsuharu ishida (Miyagi Univ)

【目的】消費者の食品への安全・安心の意識の高まりから、天然香料の需要が高まっている。そのため天然香料を効率よく抽出する技術の開発が行われてきた。しかし、原料の供給が不安定であることや、抽出量が微量であることから、天然香料は未だ高価である。そこで、微生物の発酵作用を利用したバイオコンバージョンによる「天然香料」に準じた香料の生産技術の開発が検討されている。

これまで、*Penicillium* 属や *Empedobacter* 属などの微生物を利用したγ-lactone の生成方法が検討されてきた。しかし、近年、桃の香りを呈するγ-lactone を、乳酸菌と酵母の共存発酵により、不飽和脂肪酸から生産することが報告されている。これは、乳酸菌により不飽和脂肪酸をヒドロキシル化した後、その脂肪酸を酵母がβ酸化することで得られるものである。しかし、この微生物の働きの中で、乳酸菌の不飽和脂肪酸のヒドロキシル化能は、菌種間での差異が認められ、γ-lactone の生成は、工業的に難しいと考えられる。そこで、安定したγ-lactone の生産には、乳酸菌の働きが重要になる。さらに、乳酸菌が不飽和脂肪酸をヒドロキシル化するメカニズムに関しては、未だ不明確な点が多く、それらヒドロキシル化酵素についての報告はない。そこで本研究では、乳酸菌のヒドロキシル化酵素に関して酵素活性やその特性について検討を行った。

【方法】ヒドロキシ脂肪酸高生産乳酸菌 No.20 株とγ-lactone 生成能が高い酵母の混合培養（0.1%オレイン酸添加培地）を行い、γ-lactone を高生産する条件について検討を行った。γ-lactone の測定は GS/MS にて行った。さらに、YP 培地で乳酸菌の培養試験を行い、No.20 株の粗酵素液を抽出した。その後、No.20 株の無細胞溶液と酵母を用いてγ-lactone 生成試験を行った。ヒドロキシル化酵素の活性測定は、Nitro Blue と PMS システムの電子伝達系による発色にて行った。オレイン酸を基質、NADH を補因子として反応液に添加し、反応後、A540 を測定した。

【結果】オレイン酸添加培地にて乳酸菌 No.20 と酵母を混合培養することにより、γ-dodecalactone が高生成することを確認した。さらに、この乳酸菌 No.20 の無細胞溶液と酵母によるγ-lactone 生成試験を行った結果、γ-dodecalactone の生成が確認され、その変換率はこれまで報告されたものと同程度であった。また、この乳酸菌の菌体を回収し、菌体内酵素の活性測定を行った結果、至適 pH は 5.0 であった。

hydroxy fatty acid, lactic acid bacteria, γ lactone

講演番号：2B22a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ B 校舎 22 会場

チーズからの好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分離と系統分類学的研究
Presence of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria in various cheeses
○松山 未央子、石川 森夫、貝沼（岡本） 章子、小泉 幸道（東農大・応生科・醸造）
○ Mioko Matsuyma,Morio Ishikawa,Akiko Okamoto-Kainuma,Yukimichi Koizumi (Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】 チーズはその製造や熟成に乳酸菌が関与する代表的な発酵食品であるが、チーズ熟成中の乳酸菌相とそれらの熟成への関与については未解明の部分が残されている。そこで、本研究ではこれまでチーズ製造に利用されてきたスターター菌種とは異なる好塩性・好アルカリ性の乳酸菌の分離を種々のチーズから試み、その系統、生理・生化学的性状から、チーズ熟成における乳酸菌相の多様性、およびその役割について考察することを目的とした。
【方法】ヨーロッパ産の各種熟成チーズ 11 点より、食塩濃度 7%もしくは 9%、pH 9 の GYPF（glucose-yeast extract-peptone-fish extract）培地を用い直接平板分離を行い、生菌数を測定した。そのうち、2 種のチーズについては食塩濃度 0、3.5、7%及び pH 6、7、8、9 の条件を相互に組み合わせた 12 条件の培地を用い、直接平板分離を行った。得られたコロニーは純化後、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく分子系統解析をはじめとする各種分類学的性状の解析に供した。さらに、分離株を加熱殺菌された白カビ熟成チーズに添加し、10℃の低温条件で保存し、生菌数、チーズ中の各種成分の消長について検討を行った。
【結果及び考察】各種熟成チーズから食塩含有、アルカリ性条件で生育可能な乳酸菌の分離を試みた結果、11 点中 8 点のチーズから生菌数 10^{3}-10^{10} CFU/g でコロニーが得られ、系統解析を行った全ての株は、好塩性・好アルカリ性乳酸菌、*Marinilactibacillus psychrotolerans* と相同値が 98-100%であった。食塩・pH を組み合わせた分離では、一方のチーズからは低食塩濃度、中性～酸性条件下で *Lactococcus* 属が 10^{7}-10^{10} CFU/g の生菌数で分離され、その他の条件では *M. psychrotolerans* と近縁な株のみ 10^{9}-10^{10} CFU/g の生菌数で分離された。また、他方のチーズからは全ての条件で *Enterococcus faecalis* と近縁な株のみが 10^{7}-10^{10} CFU/g の生菌数で分離された。さらに、加熱殺菌された白カビ熟成チーズに *M. psychrotolerans* 分離株を添加し、低温条件下にて保存した結果、生菌数は 10^{8} CFU/g を 28 日目まで維持した。また、チーズの有機酸含有量については、乳酸の減少に伴う酢酸の増加を観察し、分離株が乳酸を酸化し、酢酸を生成している可能性が示唆された。以上より、好塩性・好アルカリ性の乳酸菌群は主要な乳酸菌相として熟成チーズに広く存在し、その分離には食塩含有、アルカリ性の条件を与えることが必要と考えられた。また、好塩性・好アルカリ性乳酸菌分離株は、低温保存下のチーズ中で生育可能であることから、チーズの熟成に関与している可能性が示唆された。本研究は、公益財団法人発酵研究所研究助成を受け実施したものである。

lactic acid bacteria, acetic acid, cheese

講演番号：2B22a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ B 校舎 22 会場

Acetobacter 属酢酸菌におけるリボソームサブユニット準拠の系統に関する比較考察
Varification of the phylogenic relationship proposed on the basis of ribosomal subunit proteins in genus *Acetobacter*

貝沼（岡本） 章子[1]、松谷 峰之介[2]、○伊佐地 麻代[1]、石川 森夫[1]、志波 優[3]、吉川 博文[3,4]、薬師寺 治[2]、松下 一信[2]、小泉 幸道[1]（[1]東農大・応生科・醸造、[2]山口大・農、[3]東農大・ゲノムセンター、[4]東農大・応生科・バイオ）
Akiko Okamoto-Kainuma[1], Minenosuke Matsutani[2], ○Asayo Isaji[1], Morio Ishikawa[1], Yuh Shiwa[3], Hirofumi Yoshikawa[3,4], Toshiharu Yakushi[2], Kazunobu Matsushita[2], Yukimichi Koizumi[1]
([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Biol. Chem., Yamaguchi Univ., [3]Genome Research Center, Tokyo Univ. Agric., [4]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】 近年、MALDI-TOF MS によるバクテリアの迅速同定が行われるようになってきているが、これに付随して本法による系統解析も試みられている。中でも Teramoto らの報告[1)]に始まる一連の解析は、リボソームサブユニットタンパク質を対象としていて論拠が明解である。本研究では、酢酸菌を用い、16S rRNA 配列準拠の従来法からゲノムスケールに至る各種系統解析を行って、リボソームサブユニット準拠の系統の意味や有効性を検証するとともに、MALDI-TOF MS によるバクテリアの系統解析の精度について検証を行う。また、酢酸菌における系統についても併せて考察する。
【方法】 *Acetobacter* 属酢酸菌 18 種、*Acetobacter pasteurianus* 10 株について、種レベル・株レベルの解析をそれぞれ行った。ゲノム未解析株については、Illumina Genome Analyzer IIx によりドラフトゲノム配列を得た。全種／全株共通のオルソログ遺伝子のセット及びリボソームサブユニット配列は、ドラフトゲノム配列および公開されているコンプリートゲノム配列より抽出した。系統解析は、各種コンカテマー配列について MEGA version 5.0 を用いて、NJ 法により行った。16S rRNA 配列を含むハウスキーピング遺伝子については、定法により系統樹を作成した。MALDI-TOF MS は島津製作所製 AXIMA Performance を使用し、ポジティブリニアモードで測定を行った。マトリクスは 1%トリフルオロ酢酸を含む 50%アセトニトリル溶液にシナピン酸（1%）を溶解したものを用いた。
【結果】 種レベル・株レベルともに、リボソームサブユニットタンパク質のコンカテマー配列による系統樹は、全オルソログコンカテマー配列による系統樹に近似した。これは、S10-spc-α オペロンにコードされるリボソームサブユニットに限定しても同様であった。このことから、リボソームサブユニット準拠の系統は、酢酸菌においてはゲノムの系統を反映した系統として使用できる可能性が示唆された。MALDI-TOF MS を用いたリボソームサブユニットピークのマッチングによる系統解析法は、リボソームサブユニット配列準拠の場合と類似の系統を示し、株レベルでは適用可能性が示されたが、系統の精度には検討の必要性が示唆された。16S rRNA 配列準拠の場合は、種レベル・株レベルとも上記と異なる特徴的な系統を示し、酢酸菌科細菌内における系統を考える場合、検討の必要性が示された。

1) K. Teramoto *et al.*, *Anal. Chem.*, 79, 8712 (2007).

acetic acid bacteria, MALDI-TOF MS, phylogenetic analysis

講演番号：2B22a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ B 校舎 22 会場

こんにゃく飛粉糖化液を利用したプロピオン酸菌による有機酸生産

Production of a mixture of organic acids (propionic acid and acetic acid) from enzymatically saccharified Tokibo (fly powder of Konjac) by propionibacteria.

○高屋 朋彰、椎谷 芳樹、廣瀬 優作、田中 孝国（小山高専物質）
○Tomoaki KOUYA,Yoshiki SHIIYA,Yusaku HIROSE,Takakuni TANAKA (Oyama NCT.)

【背景・目的】こんにゃく精粉製造時に副産物として得られるこんにゃく飛粉は、多糖（デンプン・グルコマンナン）やタンパク質など、多くの栄養成分が含まれていることが報告されている。しかし、1. 微細な粒子のために扱いにくい、2. えぐみがある、3. 特有の刺激臭を有しているなどの問題点から、一部が肥料などに用いられている以外には有効な利用手段が見つかっておらず、主に農産廃棄物として処理されている。本研究ではこんにゃく飛粉に含まれる多糖に着目し、複数の酵素製剤を組み合わせたこんにゃく飛粉の液化・糖化条件の最適化を検討した。また、こんにゃく飛粉溶液およびこんにゃく飛粉の酵素糖化液中に含まれる多糖（デンプン・グルコマンナン）や単糖（グルコース・マンノース）を効率的に資化するプロピオン酸菌の検索を行った。酵素処理によって得られたこんにゃく飛粉糖化液および見出したプロピオン酸菌を用いて、効率的な有機酸生産条件の検討を行った。
【方法】こんにゃく飛粉、McIℓvaine 緩衝液、および各種酵素（α - アミラーゼ、グルコアミラーゼ、セルラーゼ等）を混合し、pH4.5 もしくは pH6.5 の条件下で 60℃、24 時間反応させて液化・糖化反応を行った。プロピオン酸菌の糖資化性試験は、多糖または単糖の初期基質濃度が 5g/L となるように調整した YE 培地（pH6.5）にプロピオン酸菌を初期濁度（$O.D._{660}$）≒0.1 となるように接種し、培養 48 時間後の濁度および各有機酸濃度を測定した。グルコース濃度および可溶性全糖濃度は、それぞれグルコース-CII テストワコー（和光純薬工業）およびフェノール硫酸法を用いて評価した。有機酸濃度は、Shim-Pack SCR-102H カラム（島津製作所）と電気伝導度検出器（島津製作所）を備えた HPLC により測定した。
【結果】市販の酵素製剤（α-アミラーゼ、グルコアミラーゼ、セルラーゼ）を組み合わせて用いることにより、こんにゃく飛粉溶液中の不溶性・可溶性多糖の 75%以上を単糖へ変換することが可能となった。また、グルコースおよびマンノースを効率的に有機酸（プロピオン酸・酢酸）に変換するプロピオン酸菌として、*Propionibacterium arabinosum* JCM 6428 および *Propionibacterium acidipropionici* JCM 20264 を見出した。現在、これらの酵素処理法と見出したプロピオン酸菌を組み合わせたこんにゃく飛粉からの有機酸生産について、二段階発酵法や同時糖化発酵法による検討を行っている。

Tobiko, enzymatic saccharification, propionibacteria

講演番号：2B22a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ B 校舎 22 会場

微生物によるグルコースモノアセテートの生産
Production of D-glucose mono acetate by *Bacillus megaterium*
○村上 洋、桐生 高明、木曽 太郎、中野 博文（大阪市立工業研究所）
○ Hiromi MURAKAMI,Takaaki KIRYU,Taro KISO,Hirofumi NAKANO（Osaka Municipal Technical Research Institute）

【目的】D-グルコースやショ糖は安価で大量に供給しうる糖質原料であり、分子内に多数の水酸基を有するため、甘味料としてだけではなく保湿、ゲル化、デンプンの老化防止などの食品加工特性により利用されている。これらの糖質に新たな物性を付与し有効利用することを目的に、ショ糖から発酵生産される糖質について検索を行った。
【方法および結果】唯一の炭素源としてショ糖 0.2 %、無機塩として NaCl 0.05 %、KH_2PO_4 0.1 %、K_2HPO_4 0.1%、NH_4NO_3 0.3 %、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 %を含む寒天平板培地上に土壌懸濁液を塗布し、この上で生育するコロニーを単離した。得られた菌株を上記無機塩溶液にショ糖 1 %、酵母エキス 0.1 %、ポリペプトン 1%を添加した液体培地で培養した後、培養液を薄層クロマトグラフィーにより分析した。薄層クロマトグラム上で、Rf 値を指標にショ糖から未知の生成物を生じる菌株を選択した。
検索により得られた菌株の内 12 株は、ショ糖あるいは D-グルコースを含む培養液中に、薄層クロマトグラム上で D-グルコースより Rf 値の大きい類似のスポットを検出した。またこの生成物は、炭素源を D-グルコースに代えた時にも同様に検出されたが、マルトース、トレハロースからは生成しなかった。得られた菌株の同定を依頼し、*Bacillus* 属に属することが示唆された。
D-グルコースあるいはショ糖を含む培養液中に蓄積した生成物を調製した。上記液体培地 100 ml に菌株を接種し、30℃で 3 日間振とう培養した。遠心分離により菌体を除いた上清に 4 倍量のエタノールを加え、高分子化合物を溶媒沈殿させた後、上清を減圧濃縮し、活性炭クロマトグラフィーに供した。カラムを水にて洗浄後、0～30 %のエタノール濃度勾配により溶出し、目的の生成物のみを含む画分を凍結乾燥した。JOEL JMS-AX505HA を用い、マトリックスに m-ニトロベンジルアルコール、検体に NaCl を添加して Positive FAB 法にてイオン化し質量分析を行った。m/z=223, 245 にそれぞれ M+H, M+Na に基づく分子イオンピークを検出し、生成物の分子量は 222 と推定された。生成物 2mg を KBr 200mg と混合粉砕した後加圧して円盤とし、透過法により FT-IR を測定した。1700 cm^{-1}, 1240 cm^{-1} 付近に強い吸収が認められた。生成物 50mg を重水 1.0 mL に溶解し、内部標準として DSS を加え NMR 測定を行った。^{13}C-NMR より、カルボニル炭素、メチレン炭素、メチル炭素および D-グルコースの C1 位アノマー炭素が認められた。これらの結果から、生成物の構造は D-グルコースの C6 位に酢酸がエステル結合した D-グルコースモノアセテートであると推定した。

glucose, acetate, sugar ester

講演番号：2B22a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ B 校舎 22 会場

柿乳酸発酵物における腸内菌叢改善効果

Improvement of intestine microflora by the lactic fermentation product of a Japanese persimmon

庄條 愛子[1,2]、今井 ももこ[1]、飯田 聡史[1]、大串 美沙[1]、原田 直樹[3]、山地 亮一[3]、乾 博[4]、細谷 圭助[5]、○和田野 晃[1,3]、中野 長久[1,3,6]（[1]大阪府大・地域連携、[2]相愛大、[3]大阪府大・生命環境、[4]大阪府大・総リハ、[5]成美大短大、[6]大阪女子短大）

Aiko Shoujyo[1,2], Momoko Imai[1], Satoshi Handa[1], Misa Ogushi[1], Naoki Harada[3], Ryuichi Yamaji[3], Hiroshi Inui[4], Keisuke Hosotani[5], ○Akira Wadano[1,3], Yoshihisa Nakano[1,3,6] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]Souai Univ., [3]Osaka Prefecture Univ., [4]Osaka Prefecture Univ., [5]Seibi University Junior College., [6]Osaka Woman Junior College.)

【目的】和歌山県紀北地域は全国有数の果物の産地として知られている。その中で柿は、全国 1 位の生産量である。しかしながら、生産量の 10%にあたる 5,000t は規格外品として廃棄物処理されている。そのため有用な再資源化が望まれている。そこで本研究では、サイレージに着目し、規格外柿の家畜飼料化を目指した。乳酸菌を用い、規格外柿における乳酸発酵法の確立を行った。さらに、乳酸発酵物をマウスに経口摂取させて、腸内菌叢改善効果について検討を行った。

【方法】冷凍保存した刀根早生柿と大豆エキスを 1:1 で混合し、発酵基礎培地とした。培地に種菌として *L.* perolens、*L.* brevis、*L.* paracasei および *L.* casei の 4 種の *Lactobacillus* 属の乳酸菌を添加し、柿発酵物の作製を行い、生菌数を測定した。機能性成分として、タンニン、ビタミン C、β-カロテンおよびβ-クリプトキサンチンを測定した。実験動物は 8 週齢の雄性 Balb/c マウスを用い、柿醗酵物を凍結乾燥させて基礎飼料（AIN-93）および高脂肪飼料に各々2%添加し、2 週間飼育した。飼育終了後、血液および盲腸を採取した。盲腸は RT-PCR 法を用い、盲腸内菌叢解析を行った。

【結果と考察】柿成果と比較して、柿醗酵物のビタミン C は、約 1/2 量に減少していた。しかし、β-カロテンおよびβ-クリプトキサンチンは増加していた。このことから、乳酸発酵することにより機能成分が分解されにくいことが示唆された。動物実験において、マウスの体重増加量および総摂食量は、高脂肪食群および普通食群のいずれの区においても大きな差は認められなかった。血中中性脂肪濃度は高脂肪食群および普通食群のいずれの区においても、柿乳酸発酵物添加区で有意に低い値を示した。盲腸内菌叢解析の結果から、高脂肪食群では対照区に比べて柿乳酸発酵試料添加区で Total eubacteria の増加が認められ、高脂肪摂取による腸内菌数の低下(Total Eubacteria)は、柿発酵試料摂取により改善されることが示唆された。特に柿乳酸発酵物添加により *Lactobacillus* の著しい増加が明らかとなった。

persimmon, fermentation, intestine

講演番号：2B22a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ B 校舎 22 会場

Lactobacillus plantarum VL103 株における fumarate reductase 欠損による影響
Analysis of a fumarate reductase gene-deficient *Lactobacillus plantarum* VL103
○梶野 敦史[1]、辻 聡[1]、Pascal Hols[2]、梶川 揚申[1]、佐藤 英一[1]、岡田 早苗[1] ([1]東農大応生科・化学、[2]ルヴァンカトリック大学・生命科学)
○Atsushi Kajino[1], Akira Tsuji[1], Pascal Hols[2], Akinobu Kajikawa[1], Eiighi Satoh[1], Sanae Okada[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem. Tokyo Univ. Agr., [2]Universite Catholique de Louvain)

【背景・目的】
Lactobacillus plantarum NCIMB 8826 株（WT 株）の乳酸脱水素酵素 lactate dehydrogenase 欠損株 (VL103 株)を宿主とした物質生成モデルケースの構築を目指し、コハク酸の生成量向上を試みている。そこで、コハク酸生成に関与する 4 種の炭酸固定酵素である phosphoenolpyruvate carboxylase(PEPCK)や malic enzyme(ME)、pyruvate carboxylase(PC)、*Bacillus subtilis* 由来 PC(BSU)を高発現あるいは共発現させることでコハク酸生成量の向上に成功した。また、副産物の生産に関与する遺伝子欠損によるコハク酸生成量向上にも成功した[1)]。しかし、現在の条件に対する酵素の高発現および共発現、代謝改変はコハク酸生成量の向上には至ったものの、理論最大値の 25%程度で頭打ちとなった。

この現象の要因として、コハク酸を生成する際に、フマル酸からコハク酸への反応において補酵素の $FADH_2$ の酸化反応が原因で、酸化還元バランスが偏ることが考えられた。そこで、フマル酸からコハク酸の生成を触媒する酵素である fumarate reductase（frd）に着目した。frd 遺伝子を欠損することで、$FADH_2$ の酸化反応を経ずに物質生成し、コハク酸よりも高効率でフマル酸の生成を行うことができると考えた。また、生成物であるフマル酸は、ポリエステル樹脂の原料や食品添加物に用いられる有機酸であるため、物質生成モデルケースに適している。

【方法・結果・考察】
相同組換えにより、*L. plantarum* VL103 株の fumarate reductase 欠損株（Δfrd 株）を取得した。また、フマル酸生産に関わる上記 4 種類の炭酸固定酵素である PEPCK や ME、PC、BSU の高発現株を作成した。それらΔfrd 株および高発現株において生育測定を行ったところ、*L. plantarum* VL103 株よりΔfrd 株および高発現株の生育が低下した。また、HPLC による有機酸測定などによる生成物を測定した。その結果、Δfrd 株および高発現株において少量のフマル酸生成とリンゴ酸の生成が見られた。フマル酸は、溶解度が低いために菌体内に蓄積することができないため、リンゴ酸で代謝が停止してしまっているのではないかと考えている。以上のことから、フマル酸の生成量の向上のため、菌体外への排出系の改善が望まれる。

[1)]辻ら　日本農芸化学会 2012 年度大会

Lactobacillus plantarum , fumarate reductase, metabolic analysis

講演番号：2B22a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ B 校舎 22 会場

グルコース取込み機構を変換した *Lactobacillus plantarum* VL103 株によるコハク酸生成
Knock-out of the *ptsI* gene results in increased production of succinic acid in fermentation of glucose by *Lactobacillus plantarum*

○辻 聡[1]、今井 祐斗[1]、Pascal Hols[2]、梶川 揚申[1]、佐藤 英一[1]、岡田 早苗[1] ([1]東農大応生科・化学、[2]ルヴァンカトリック大学・生命科学)
○Akira Tsuji[1], Yuto Imai[1], Pascal Hols[2], Akinobu Kajikawa[1], Eiichi Satoh[1], Sanae Okada[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem. Tokyo Univ. Agr., [2]Universite Catholique de Louvain)

【背景・目的】
我々は代謝改変を用いた乳酸菌によるコハク酸生成モデルについて検討している。これまでに、*Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826株の乳酸生成経路(LDH)を欠損した*L. plantarum* VL103株に対し、種々の代謝改変によるコハク酸生成量の変動について報告している[1)]。

さらなる効率的な物資生産モデルを構築するために、*L. plantarum* VL103株の主要な糖取込み機構であるphosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system(PTS)に着目した。他菌種においてPTSを破壊し、グルコース取込み機構を変換することで効率の良い物質生成を行う報告が存在する。そこで、*L. plantarum* VL103株のPTS Enzyme I (EI)欠損によりPTS破壊株を作出し、グルコース取込み機構の変換がコハク酸生成に与える影響について測定することを目的とした。

【方法・結果・考察】
相同組換えにより*L. plantarum* VL103株のEI欠損株を取得した。この*L. plantarum* VL103 ΔEI株と*L. plantarum* VL103株の糖類資化能を比較した。その結果、*L. plantarum* VL103 ΔEI株はフルクトース、ソルビトール、マンノースなど13種の糖類が培養24時間の段階で資化不能であり、PTSの破壊を確認した。また、*L. plantarum* VL103 ΔEI株はグルコースやマルトースなど5種の糖類の資化能が認められ、非PTS輸送体による糖の取込みが行われていることが示された。

グルコース取込み機構を変換した*L. plantarum* VL103 ΔEI株は*L. plantarum* VL103株と比べ、比増殖速度やグルコース消費速度が向上していた。これは、*L. plantarum* VL103株がLDHの欠損に伴い菌体内に蓄積したピルビン酸による負荷が、EIの欠損によりピルビン酸生成量が減少したことで解消されたためだと考えられる。

この *L. plantarum* VL103 ΔEI 株に対し、これまでにコハク酸生成量の向上に成功した酸固定酵素である phosphoenolpyruvate carboxylase や malic enzyme、pyruvate carboxylase を高発現した。これらの代謝改変株の代謝解析により、*L. plantarum* VL103 株の PTS の破壊がコハク酸生産量を向上させることが判明した。しかし、今回作出した全ての代謝改変株はアセトインやギ酸などの副産物を生成しておりコハク酸の対糖収率が低く、菌体内のエネルギー獲得経路とコハク酸生産のバランスを考慮することが依然として検討課題として挙げられる。

1) 辻ら 日本農芸化学会 2012 年度大会

succinic acid, metabolism engineering, phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system

講演番号：2B22a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ B 校舎 22 会場

福山黒酢の醪中の D-アミノ酸の定量と微生物の単離同定による D-アミノ酸の生成機構の解明
Elucidation of production mechanism of D-amino acids in Fukuyama black vinegar: quantitative D-amino acids analysis and isolation and identification of microorganisms in Moromi
○郷上 佳孝[1]、岡田 かおり[1]、松井 大亮[2]、竹下 義隆[3]、老川 典夫[1]([1]関西大化学生命工、[2]現：富山県立大学、[3]福山黒酢株式会社)
○Yoshitaka GOUGAMI[1], Kaori OKADA[1], Daisuke MATSUI[2], Yoshitaka TAKESHITA[3], Tadao OIKAWA[1] ([1]Kansai Univ., [2]Toyama Pref. Univ., [3]Fukuyamakurozu Corp.)

【目的】先にわれわれは福山黒酢中にさまざまな D-アミノ酸が存在することを明らかにした。本研究では、D-アミノ酸含有量の高い福山黒酢の醸造工程から採取された試料（醪）中の D-アミノ酸の定量と微生物の単離、同定を行い、製品中の D-アミノ酸の生成機構を解明することを目的としている。
【方法】仕込み完了時を 0 か月とし、仕込み後 1、2、3、4、（商品Ｉ：原料に玄米）または 3、4、5 か月後（商品 K：原料に玄米と大豆）の 2 製品の各醸造工程で採取された試料中の D-及び L-アミノ酸含有量を高速液体クロマトグラフィーで定量した。また各試料を MRS 寒天培地、酢酸菌寒天培地に塗布後 25℃で静置培養し微生物を単離した。得られた微生物をそれぞれ同液体培地で 25℃、24 時間振とう培養後、各菌体からゲノムを抽出し、決定した 16SrDNA の配列に基づき単離微生物の同定を行った。さらに単離微生物の D-アミノ酸生産能を検討した。
【結果および考察】アミノ酸分析の結果、商品Ｉ及び K の醸造工程で採取された試料中には、D-Asp、D-Glu、D-Ala、D-Ser、D-Val、D-Leu、D-Ile、D-Met、D-His、D-Lys、D-Pro が含まれていることが明らかとなった。試料中の各 D-アミノ酸濃度は、D-Asp は商品 K（441.7 μM、醸造期間 3 か月）、D-Glu は商品 K（505.7 μM、醸造期間 4 か月）、D-Ala は商品 K（4479.9 μM、醸造期間 5 か月）、D-Ser は商品 K(49.5 μM、醸造期間 5 か月)、D-Val は商品 K(184.2 μM、醸造期間 3 か月)、D-Leu は商品Ｉ(252.6 μM、醸造期間 3 か月)、D-Ile は商品Ｉ（44.2 μM、醸造期間 4 か月）、D-Met は商品Ｉ（290.0 μM、醸造期間 1 か月)、D-His は商品Ｉ（193.6μM、醸造期間 1 か月)、D-Lys は商品Ｉ（90.2 μM、醸造期間 3 か月)、D-Pro は商品Ｉ（110.5 μM、醸造期間 1 か月）中でそれぞれ最大となった。また商品Ｉおよび K の醸造工程中には乳酸菌（*Pediococcus pentosaceus*)、細菌（*Pantoea* sp.、*Bacillus subtilis* subsp.、*Staphylococcus* sp.)、酢酸菌(*Gluconacterobacter europaens*、*Acetobacter pasturianus*、*Gluconoacetobacter xylinans*)が存在することが明らかとなった。*P. pentosaceus*、*A. pasturianus*、*G. xylinus* はいずれも振とう及び静置培養条件下で D-Ala、D-Asp または D-Glu を菌体外に生産することが明らかとなった。酢酸菌 *A. pasturianus* と *G. xylinus* はいずれも D-Ala を菌体外に生産し、特に *A. pasturianus* は著量の D-アラニンを菌体外に生産することが明らかとなった。これまで酢酸菌が D-アミノ酸を菌体外に生産するという報告はなく本 2 菌株が最初の例である。以上の結果から黒酢製品中の D-アミノ酸は醸造に関与するさまざまな微生物によって生産されることが明らかとなった。本研究はイノベーション創出基礎的研究推進事業により実施したものである。

D-amino acid, black vinegar, acetic acid bacteria

講演番号：2B22a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ B 校舎 22 会場

黒酢から単離された酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* W-1 の D-アラニン生産とアラニンラセマーゼ
D-Alanine production and alanine racemase of acetic acid bacterium, *Acetobacter pasteurianus* W-1 isolated from black vinegar

○坂井 麻美、老川 典夫 (関大化学生命工)
○Asami SAKAI, Tadao OIKAWA (Kansai Univ.)

【目的】先にわれわれは、黒酢から単離された酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* W-1 が著量の D-アラニンを菌体外に生産することを見出した。本研究では、本菌の D-アラニン生産の最適条件を検討するとともに、本菌の D-アラニン代謝に関与するアラニンラセマーゼ遺伝子(*Ap-alr*)のクローニングと酵素科学的性質を解明することを目的としている。
【方法】*A. pasteurianus* W-1 を NBRC 804 (pH 6.6) 液体培地で振とう及び静置培養し、経時的に培養液をサンプリングしその遠心上清中に含まれる D-及び L-アラニンを高速液体クロマトグラフィーで測定し定量した。また NBRC 804 培地中の各成分の濃度を変化させ D-アラニン生産が最大になる濃度をそれぞれ決定した。一方 *A. pasteurianus* W-1 のゲノムを調製しこれを鋳型として用い、ゲノム情報に基づきプライマーを設計しポリメラーゼ連鎖反応により *Ap-alr* を増幅した。*Ap-alr* を pET21b に挿入後 pET21b- *Ap-alr* を *Escherichia coli* BL21(DE3)に形質転換した。得られた形質転換体を LB-アンピシリン培地で振とう培養し、得られた菌体の無細胞抽出液から Ap-Alr を Ni-NTA 及びゲル濾過クロマトグラフィーで精製し、酵素科学的性質を検討した。
【結果】アミノ酸分析の結果、*A. pasteurianus* W-1 は、NBRC 804 培地では D-アラニンを静置培養では約 0.0784 g/l、振とう培養では約 0.0355 g/l (共に培養時間：168 時間) 最大生産した。D-アラニン生産量の多かった静置培養について、NBRC 804 培地中のグルコース (0.5%)、ポリペプトン (0.5%)、酵母エキス (0.5%)、硫酸マグネシウム (0.1%)、L-アラニン (0%) の濃度を 0.1-1%、0.1-1%、0.1-1%、0.1-1%、0-7%の範囲で変化させ D-アラニン生産量を検討したところ、それぞれ 0.5、0.7、1.0、0.3、7%の時に最大となり、NBRC 804 培地での D-アラニンの生産量の約 680 倍となった。また、NBRC 804 培地に L-アラニンを終濃度 7%添加した培地では、D-アラニン生産量は約 53.3 g/l となり、D-アラニン生産量には培地中の L-アラニンの濃度が大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。そこで本菌体の *Ap-alr* のクローニングを行い、酵素科学的性質を検討したところ、本酵素は 1,143 bp の DNA でコードされ総アミノ酸残基数は 381 であった。本酵素の一次構造は *E. coli*、*Corynebacterium glutamicum*、*Geobacillus stearothermophilus* 由来のアラニンラセマーゼとそれぞれ 28.4、29.7、30.0.%の相同性を示した。本酵素の精製酵素標品の吸収スペクトルには波長 420 nm 付近にピリドキサール 5'-リン酸(PLP)に由来すると考えられる吸収極大が存在した。

なお、本研究はイノベーション創出基礎的研究推進事業により実施したものである。

D-amino acid, black vinegar, Acetobacter pasteurianus

講演番号：2B22p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ B 校舎 22 会場

コリネ型細菌を用いた澱粉系バイオマスの利用

Utilization of starch biomass by *Corynebacterium glutamicum*

○岡井 直子[1]、足立 典子[2]、高橋 千尋[2]、Emma Niba[1]、松田 史生[1]、荻野 千秋[2]、近藤 昭彦[2] ([1]神戸大自、[2]神戸大院工・応化)
○Naoko OKAI[1], Noriko ADACHI[2], Chihiro TAKAHASHI[2], Emma Niba[1], Fumio MATSUDA[1], Chiaki OGINO[2], Akihiko KONDO[2] ([1]Org.Adv.Sci.Tech., Kobe Univ., [2]Dept.Chem.Sci.Eng., Kobe Univ.)

目的

Corynebacterium glutamicum はアミノ酸、化成品原料の生産に用いられる有用細菌であり、産業利用においては単糖類が主な発酵原料として用いられてきた。植物バイオマス資源のなかでもアジアの芋澱粉類は未利用のものが多く、化成品の原料としてその有効利用が望まれる。本研究ではコリネ型細菌による澱粉系バイオマスの利活用を目指し、*C. glutamicum* に *Bacillus* 属細菌由来の分泌アミラーゼを付与し細胞表層に提示したアミラーゼと共発現することにより、不溶性成分の多い芋澱粉からのアミノ酸発酵を行った。バイオプラスチック原料であるカダベリンの前駆体としてリジンの発酵を検討した。

方法

B. subtilis、*B. amyloliquefaciens*、*B. licheniformis* のα-アミラーゼ遺伝子を、コリネバクテリウム-大腸菌シャトルベクターpCH に組み込み、*C. glutamicum* ATCC13032 株を形質転換した。分泌シグナルは、アミラーゼ遺伝子のインタクトの配列および *E.coli* 由来 *torA* シグナル配列の二種を検討した。アミラーゼを分泌する *C. glutamicum* 形質転換株は、澱粉プレートのヨウ素反応および液体培養上清の可溶性澱粉分解活性によりスクリーニングした。次に選択した *Bacillus* 由来の分泌型アミラーゼ遺伝子を、*Streptococcus bovis* 由来α-アミラーゼ(*amyA*)を細胞表層に提示させホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子(*hom*)を欠損した *C. glutamicum* HPA 株に導入し、二種のα-アミラーゼを共発現させた。構築株を、馬鈴薯澱粉またはトウモロコシ澱粉を主炭素源とした MMYE 培地を用いて好気的に 30℃で培養し、経時的に培養上清のα-アミラーゼ活性およびリジン濃度を測定した。尚、用いた二種の宿主株については単糖で培養した時の代謝産物を測定した。

結果

導入したアミラーゼ遺伝子のうち、*B. subtilis* 由来の *amyE* は *C. glutamicum* の培養上清において澱粉分解活性を示し、*C. glutamicum* (pCH-amyE) 株は澱粉（馬鈴薯、トウモロコシ、キャッサバ澱粉）を 30℃で分解した。このとき分泌シグナルは *amyE* のインタクトの配列が有効であった。さらに *C. glutamicum* HPA(pCH-amyE) 株を馬鈴薯澱粉を主炭素源として培養したところ、培養上清および細胞表層ともにアミラーゼ活性を発現し、リジンを上清中に生成した。

Corynebacterium glutamicum, amylase, Lysine

講演番号：2B22p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ B 校舎 22 会場

コリネ型アミノ酸生産菌の第三のグルコース輸送バイパス

A third glucose-uptake bypass in *Corynebacterium glutamicum*

○野口 土雄[1]、大下 政一[1]、妹尾 彰宏[2]、三橋 敏[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1]([1]信州大農・応生科、[2]協和発酵バイオ)
○Norio NOGUCHI[1], Masakazu OHSHITA[1], Akihiro SENOO[2], Satoshi MITSUHASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu University, [2]Kyowa Hakko Bio)

これまでに、コリネ型アミノ酸生産菌においてイノシトール輸送体 IolT1 および IolT2 が共にグルコース輸送バイパスとして機能すること、調節遺伝子 *iolR* の破壊で IolT1 が高発現して PTS 非依存的なグルコース輸送が可能になること、さらに、細胞内グルコースのリン酸化には公知の 2 種キナーゼに加えて第三のキナーゼが関わることを報告してきた。今回、*ptsH* 破壊株からグルコース生育が回復したサプレッサー株の中に IolT1 と IolT2 を同時破壊してもグルコースでなお生育する株が存在することを見出した。同株で発現している第三のグルコース輸送バイパスを明らかにしたので報告する。

Corynebacterium glutamicum, glucose-uptake bypass, suppressor mutation

講演番号：2B22p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ B 校舎 22 会場

コリネ型アミノ酸生産菌の脂質分泌性変異株　（第一報）
Corynebacterium glutamicum mutants that secrete fatty acids from glucose (1st)
○竹野 誠記[1]、浦林 昭伸[1]、三橋 敏[2]、池田 正人[1] ([1]信州大農・応生科、[2]協和発酵バイオ)
○Seiki TEKENO[1], Akinobu URABAYASHI[1], Satoshi MITSUHASHI[2], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu University, [2]Kyowa Hakko Bio)

コリネ型アミノ酸生産菌はアミノ酸のみならず、種々のコモディティケミカルや異種タンパク質の生産宿主としても有用である。しかし、同菌種が脂質を生産するという報告はこれまでにない。今回、同菌による脂質生産の可能性を検証するため、まず同菌の細胞膜の主要構成脂肪酸であるオレイン酸を脂質生産のメルクマールとして、同脂肪酸の分泌株を簡便にスクリーングできるバイオアッセイ系を構築した。次いで、このアッセイ系を用い、野生株から変異剤処理によって同脂肪酸を分泌する変異株の取得を試みた。その結果、オレイン酸を微量ながら分泌生産する変異株を取得したので報告する。

Corynebacterium glutamicum, fatty acid secretion, NTG-derived mutant

講演番号：2B22p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ B 校舎 22 会場

コリネ型アミノ酸生産菌の脂質分泌性変異株　（第二報）
Corynebacterium glutamicum mutants that secrete fatty acids from glucose (2nd)
高嵜 真奈美[1]、○見村 晃紀[1]、妹尾 彰宏[2]、三橋 敏[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1] ([1]信州大農・応生科、[2]協和発酵バイオ)
Manami TAKASAKI[1], ○Akinori MIMURA[1], Akihiro SENOO[2], Satoshi MITSUHASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu University, [2]Kyowa Hakko Bio)

我々はコリネ型アミノ酸生産菌の野生株から、変異剤を使用しない自然変異によってもオレイン酸分泌株が得られることを見出した。これは、同菌種では 1 変異により脂質の過剰合成と分泌が起こることを意味している。この自然変異育種を 3 段階繰り返すことによってオレイン酸の分泌量がステップワイズに向上した変異株を取得した。次いで、全ゲノム解析によって同株がもつ変異点を特定した。さらに、発酵上清のメタボローム解析によって、発酵培地中に分泌された脂質を同定した。以上の結果を併せて報告する。

Corynebacterium glutamicum, fatty acid secretion, spontaneous mutation

講演番号：2B22p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ B 校舎 22 会場

コリネ型アミノ酸生産菌を用いるビオチンバイオアッセイシステム

A biotin-bioassay system using a biotin high-requiring mutant of *Corynebacterium glutamicum*

○宮本 綾[1]、高嵜 真奈美[1]、三橋 敏[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1]([1]信州大農・応生科、[2]協和発酵バイオ)
○Aya MIYAMOTO[1], Manami TAKASAKI[1], Satoshi MITSUHASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu University, [2]Kyowa Hakko Bio)

細菌のビオチン要求株はビオチンに対する感度が高い。このため、バイオアッセイの指示菌として用いる場合、寒天に含まれるビオチンを除去する必要がある上、直接定量できるビオチン濃度も極めて低濃度に限られるという問題があった。今回、ビオチン要求性のコリネ型アミノ酸生産菌でビオチンの取り込み系遺伝子 *bioY* を破壊した結果、ビオチンの要求量が大幅に高まることを見出した。野生株を指示菌とするとビオチンの定量範囲が 1 μg/L～1 mg/L であるのに対し、*bioY* 破壊株では 1 mg/L～1000 mg/L であり、測定域を 3 桁高められることがわかった。両株を使い分けることで、1 μg/L から 1 g/L に及ぶ 6 桁の範囲で定量が可能なバイオアッセイ系を構築することができた。

Corynebacterium glutamicum, biotin-bioassay system, biotin uptake system

講演番号：2B22p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ B 校舎 22 会場

酸性条件下におけるグルタミン酸発酵法の開発

Glutamic acid fermentation under acidic condition

○原 吉彦、伊藤 久生、泉井 裕、守屋 美加、平野 聖子、小野 栄治、松井 和彦 (味の素)
○Yoshihiko Hara,Hisao Ito,Hiroshi Izui,Mika Moriya,Seiko Hirano,Eiji Ono,Kazuhiko Matsui (Ajinomoto Co., Inc.)

現在グルタミン酸はコリネ型細菌を用いて広く世界中で発酵生産されているが、コリネ型細菌がグルタミン酸を過剰生産できるのは中性付近においてのみである。従ってグルタミン酸発酵においては窒素源としてだけでなく、発酵液の pH を維持するためにも大量のアンモニアを添加している。本研究ではグルタミン酸の溶解度が低い酸性条件下（pH3～5）でグルタミン酸結晶を析出させながら発酵を行うことにより、発酵工程の中和に必要となるアンモニア、更に単離精製工程で使用する酸類を削減する「グルタミン酸晶析発酵法」の実現を目指している。

我々はこれまでに、酸性条件下で生育でき、かつ安全な菌株 *Pantoea ananatis* AJ13355 株を単離し、生合成経路の改変により pH4.5 の酸性条件下で 14g/L のグルタミン酸を蓄積する菌株の育種に成功している。本報告では更なる蓄積量の増加を狙い、特にクエン酸シンターゼ（CS）の性質に着目し検討を行った。グラム陽性菌由来の CS は「Small Type」と呼ばれ、ATP により活性阻害を受ける一方、グラム陰性菌は「Large Type」と呼ばれる酵素を有し、NADH、α-ケトグルタル酸により活性阻害を受けることが既に知られている。グルタミン酸の前駆体であるα-ケトグルタル酸による阻害に着目し、さらに解析を行った結果、*E.coli* に代表される「Large Type」の CS は高濃度のグルタミン酸により阻害を受ける一方で、「Small Type」の CS は阻害を受けないことを見出した。

グルタミン酸の耐酸性菌 *Pantoea ananatis* AJ13355 株中で「Small Type」であるコリネ型細菌由来の CS 遺伝子を発現させた結果、大幅にグルタミン酸生産能が向上し、スクロースを原料として pH4.6 にて蓄積が 22g/L に到達した。

Glutamic acid, fermentation, acidic pH

講演番号：2B22p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ B 校舎 22 会場

酸性条件下におけるグルタミン酸発酵法の開発 （第３報）

Glutamic acid fermentation under acidic condition

○伊藤 久生[1]、泉井 裕[2]、守屋 美加[3]、平野 聖子[4]、原 吉彦[5]、小野 栄治[6]、松井 和彦[7]([1]味の素、[2]味の素、[3]味の素、[4]味の素、[5]味の素、[6]味の素、[7]味の素)

○Hisao ITO[1], Hiroshi IZUI[2], Mika MORIYA[3], Seiko HIRANO[4], Yoshihiko HARA[5], Eiji ONO[6], Kazuhiko MATSUI[7] ([1]AJINOMOTO, [2]AJINOMOTO, [3]AJINOMOTO, [4]AJINOMOTO, [5]AJINOMOTO, [6]AJINOMOTO, [7]AJINOMOTO)

我々は酸性 pH にてグルタミン酸発酵を行い、培養液中にグルタミン酸の結晶を析出させる「グルタミン酸晶析発酵法」の実現に向け、種々の検討を行っている。これまでに、耐酸性菌 *Pantoea ananatis* AJ13355 株に対して生合成経路の改変、特にコリネ型細菌由来の CS 遺伝子を発現させることにより、スクロースを原料として pH4.6 にて 22g/L のグルタミン酸蓄積を得ている。

本報告では、グルタミン酸結晶を析出させるべく生産条件の検討を行った。種々の検討を行ったが、いずれの条件においてもグルタミン酸蓄積が 50g/L 程度となったところでグルタミン酸生産は頭打ちとなり、過飽和が解消する濃度まで蓄積を向上させることができなかった。本現象の原因を解析した結果、AJ13355 株より誘導したグルタミン酸生産菌においては、生育・糖消費活性が菌体外のグルタミン酸濃度依存的に低下していることが明らかとなった。

そこで、グルタミン酸によって本生産菌の生育が阻害される条件を探索し、突然変異によりグルタミン酸耐性を獲得した AJ13601 株を取得した。本菌株はグルコースを原料とした pH4.5 の培養条件下で 82g/L のグルタミン酸を蓄積するに至った。飽和濃度（41g/L）を越えて蓄積した分は培養液中に結晶として析出することが確認でき、世界で初めてグルタミン酸の晶析発酵に成功した。

glutamic acid, fermentation, acidic pH

講演番号：2B22p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ B 校舎 22 会場

コリネ型細菌における Glu 過剰生産条件での代謝変換の解析

Analysis of the metabolic conversion of Glu overproduction conditions in Corynebacterium glutamicum.

○高橋 新太郎、高木 博士、中村 一博、橋本 賢一、川崎 寿、中松 亘（東電大院工）
○Shintaro TAKAHASHI, Hiroshi TAKAKI, Kazuhiro NAKAMURA, Ken-ichi HASHIMOTO, Hisashi KAWASAKI, Tsuyoshi NAKAMATSU (Tokyo Denki Univ.)

【背景・目的】*Corynebacterium glutamicum* は Glu 過剰生成時に 2-oxoglutarate dehydrogenase（ODH）活性の低下とともに、TCA 回路周辺の酵素活性が変化することが確認されている。Glu を生産するために代謝の流れが変化し、オキサロ酢酸とアセチル CoA の供給バランスが保たれていることが考えられる。*C. glutamicum* による Glu 過剰生成時に TCA 回路周辺の代謝変換に関与していると考えられる pyruvate quinine oxidoreductase（PQO）、isocitrate lyase（ICL）をコードする遺伝子の破壊株を作成し、Glu 過剰生産時の代謝にどのような変化が生じるか解析した。

【方法】*C. glutamicum* の野生株及び PQO 遺伝子破壊株（Δ*pqo* 株）、ICL 遺伝子破壊株（Δ*icl* 株）を Glu 過剰生成及び非生成条件で培養し比較検討した。遺伝子の破壊は目的遺伝子の両端の数塩基だけ残し、インフレームで破壊した。Glu 過剰生成条件（biotin 制限、Tween 40 添加、penicillin 添加）及び非生産条件（control）で培養を行い、Glu 非生成条件における対数増殖期後期にあたる培養 18 時間目で比較した。

【結果】Δ*pqo* 株の生育は Glu 過剰生産及び非生産条件ともに野生株に比べ上昇がみられ、Glu 生産量及び糖消費量が上昇していた。Δ*icl* 株の生育は Glu 過剰生産及び非生産条件ともに野生株に比べ変化は見られず、biotin 制限と Tween 40 添加で Glu 生産量及び糖消費の上昇がみられた。遺伝子破壊株の ODH 等の酵素活性測定を行った結果についても併せて報告する。

Corynebacterium glutamicum, L-glutamate

講演番号：2B22p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ B 校舎 22 会場

Corynebacterium glutamicum のグルタミン酸過剰生成時に発現量が大きく増加する短い機能未知 ORF の解析

Analysis of unknown fanction short ORFs which are significantly up regulated during glutamate over production in Corynebacterium glutamicum

○佐藤 美咲、児山 雄太郎、橋本 賢一、中松 亘、川崎 寿（東電大院工）
○ Misaki SATO,Yutaro KOYAMA,Kenichi HASHIMOTO,Tsuyoshi NAKAMATSU,Hisashi KAWASAKI (Tokyo Denki Univ.)

[目的]

うま味成分として知られているグルタミン酸は *Corynebacterium glutamicum* を用いて工業生産されている。*C. glutamicum* は育成必須因子である biotin の制限、Tween 40 などの界面活性剤の添加、ペニシリンの添加などの条件により菌体外にグルタミン酸が排出される。このとき TCA 回路の 2-oxoglutalate dehydrogenase（以下 ODH）活性が低下し、グルタミン酸の排出には mechanosensitive channels が利用されていることが解明されているが、グルタミン酸過剰生成機構のすべてが解明されているわけではない。我々は、グルタミン酸過剰生成時の全 ORF の発現量変化について解析した結果、７つの ORF（*NCg10226*、*NCg10917*、*NCg12841*、*NCg12944*、*NCg12945*、*NCg12946*、*NCg12975*）の発現量がグルタミン酸生成時に大きく増加していることを見出している。これら 7 つの ORF はいずれも短く、機能は未知である。本研究では、これらの ORF を破壊し、グルタミン酸過剰生成にどのような影響を及ぼすのかを研究する。

[方法]

破壊はインフレームで破壊する方法を用いた。*NCg12944*、 *NCg12945*、*NCg12946* がコードするタンパク質は相同性が非常に高いため、3 つまとめて破壊した（以下⊿*NCg12944-2946*）。破壊株と野生株のグルタミン酸生産能について比較を行った。

[結果]

作製した破壊株（Δ*NCg10226*、Δ*NCg10917*、Δ*NCg12841*、Δ*NCg12944-2946*）を用いてペニシリン添加によるグルタミン酸生産培養を行った。ペニシリン添加条件では、各破壊株と野生株において生育、グルタミン酸生産量、糖消費いずれにおいてもほとんど差は見られなかった。ビオチン制限および、Tween 40 添加によるグルタミン酸生産培養の結果についても報告する。

Corynebacterium glutamicum, short ORF, glutamic acid

講演番号：2B22p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ B 校舎 22 会場

Corynebacterium glutamicum 由来のグルタミン酸排出チャネルである *NCgl1221* 遺伝子産物の C 末端ドメインの電気生理学的手法を用いた機能解析
The functional analysis of the C-terminal domain of the protein which encoded by *NCgl1221* in *Corynebacterium glutamicum* by using electrophysiological technique
○橋本 賢一[1]、山下 周子[2]、北嶋 俊一[1]、矢部 勇[1]、夏目 亮[1]、中松 亘[1]、和地 正明[2]([1]東電大院・工・物質工、[2]東工大院・生命理工・生物プロセス)
○Kenichi HASHIMOTO[1], Chikako YAMASHITA[2], Syunichi KITAJIMA[1], Isamu YABE[1], Ryo NATSUME[1], Tsuyoshi NAKAMATSU[1], Masaaki WACHI[2] ([1]Materials Science and Engineering, Tokyo Denki Univ., [2]Department of Bioengineering, Tokyo Institute of Technology)

【目的】*Corynebacterium glutamicum* は特定の条件下で著量のグルタミン酸を細胞外に蓄積する微生物である。我々はスモールコンダクタンスメカノセンシティブチャネル(MscS)と相同性のある *NCgl1221* 遺伝子産物が、圧力依存的に開孔し、グルタミン酸を濃度勾配依存的に通過させることを明らかにした(Hashimoto et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2012)。*NCgl1221* は、大腸菌の MscS をコードする遺伝子と比較し、C 末端側に機能未知のドメインを持つタンパク質をコードする。本研究では、電気生理学的手法を用い、このドメインの機能を探ることを目的とした。
【方法】大腸菌の MscS は 286 個のアミノ酸残基により構成されているが、NCgl1221 は 533 個のアミノ酸残基によって構成されている。そこで、NCgl1221 の 286 番目のトレオニン以降の C 末端側ドメインを欠失させた NCgl1221 変異体を構築し、既にパッチクランプ法を用いたメカノセンシティブチャネルの解析実績のある *Bacillus subtilis* にて異種発現させ、パッチクランプ法による電気生理学的な解析を行った。パッチクランプ法は単一細胞に直接ピペットをアクセスさせ、細胞膜に存在するチャネルもしくはトランスポーターを介したイオンの輸送を電流値としてリアルタイムに記録する膜タンパク質の解析手法である。本研究では、ピペット内に任意の圧力をかけることで細胞膜の張力をコントロールし、野生型 NCgl1221 と C 末端ドメインを欠失させた変異型 NCgl1221 の機能の違いを比較した。
【結果】我々は既に野生型 NCgl1221 が圧力依存的に開孔するメカノセンシティブチャネルであることを明らかにしている(Hashimoto et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2010)が、大腸菌の MscS と同じ長さにまでC末端ドメインを欠失させた変異体においても圧力依存的なチャネル活性を示すことが分かった。この時マイナスのチャージを持ったグルタミン酸が、圧力依存的に細胞膜を通過していると考えられる電流が観測されたことから、この C 末端ドメイン欠失型 NCgl1221 変異体も細胞膜内外の濃度勾配依存的にグルタミン酸を通過させることが分かった。また、C 末端ドメイン欠失型 NCgl1221 は、野生型 NCgl1221 と比較し、より低い膜張力でチャネルが開孔することも分かった。これより、NCgl1221 の C 末端ドメインは圧力に応答したチャネル活性の制御に深く関連する機能を有していると考えられる。

Corynebacterium, mechanosensitive channel, L-glutamate

講演番号：2B22p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ B 校舎 22 会場

ワインアロマ醸成に影響する酵母のエピジェネティクス
Yeast epigenetics influencing wine aroma production
○中川 純一、藤村 朱熹、戸田 恭平、内藤 佳代子、磯貝 宜美、斎藤 優生、方壁 あゆみ、村中 梨紗、曾 少豊、藤森 嶺、妙田 貴生、戸枝 一喜、西澤 信、永島 俊夫（東農大院生物産業）
○Junichi NAKAGAWA, Syuki FUJIMURA, Kyouhei TODA, Kayoko NAITO, Yoshimi ISOGAI, Yuuki SAITO, Ayumi HOUKABE, Risa MURANAKA, Syoufon SOU, Takane FUJIMORI, Takao MYODA, Kazuki TOEDA, Makoto NISHIZAWA, Toshio NAGASHIMA (Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】　ワイン醸造中の酵母はエタノールを初めとするストレスに耐えるためにエピジェネティクス制御を発動している。この際直接生存に関わらない遺伝子も影響を受けると推測され、本研究ではワインアロマ醸成に酵母のエピジェネティクス制御が関与している可能性を試験することを目的とした。芳醇な香りを生産する遺伝子の働きを明らかにできれば、その情報はワインの市場価値を向上させることに役立てることが可能であると期待される。

【方法】*Saccharomyces cerevisiae* BY4742 株の野生型と、同株由来のエピジェネティクス関連の単一遺伝子欠損株である、*sir2*, *sir3*, *sir4*, *ada2*, *hos3*,および、協会ワイン酵母である OC2 などを用いてエタノール発酵能を測定し、野生株と同程度以上の発酵能を持つ株を用いて、ブドウ果汁より、ワイン試験醸造を行った。出来あがったワインについて、ワインアロマ官能検査を行い、並行して、GC/MS 測定によって、香気成分分析を行った。さらに、これらの株において、配糖体となっている香気成分を切断して揮発性を高めると想定される５つの酵母グリコシダーゼ遺伝子の発現を RT-PCR によってモニターした。

【結果】各種のエピジェネティクス関連遺伝子欠損株と、野生株やワイン酵母によって醸造されたワインの香気成分パターンは官能試験レベルで異なっており、GC/MS 分析によって、一部は化合物の変動を同定することが出来ることがわかった。また、RT-PCR による発現解析の結果、菌株によってグリコシダーゼ遺伝子発現に差のあることも判明した。

【考察】エピジェネティクス制御に関連する *sir2* などの遺伝子は、環境応答において生き残りや寿命延長の為に働くとされているが、これらがグローバルな遺伝子発現変動を引き起こす結果、2 次代謝である香気成分生成に関わる遺伝子発現にも変化が生じ、結果としてワインアロマ組成にも変化をきたす可能性が示唆された。

epigenetics, wine aroma, budding yeast

講演番号：2B22p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ B 校舎 22 会場

窒素飢餓(NCR)シグナルが下面ビール酵母の Lg-*FLO1* 遺伝子の転写と凝集性を誘導する

Nitrogen starvation (NCR) induces expression of Lg-*FLO1* and flocculation in bottom-fermenting yeast

○尾形 智夫、牧野 かおり、泉川 真美（アサヒビール醸造研）
○Tomoo OGATA,Kaori Makino,Mami Izumikawa (Research & Development Laboratories for Brewing)

【目的】ビール酵母の凝集性は、ビールの香味形成に影響し、また、繰り返し使用する酵母数を維持するためにも重要な特徴である。ビール酵母の凝集性誘導には、従来より、麦汁中の糖の消費や、栄養源の枯渇等が影響することが報告されてきた。下面ビール酵母の凝集性は、Lg-*FLO1* 遺伝子の関与が考えられているので、同遺伝子発現と炭素源、窒素源等の飢餓シグナルが関係するかを検討した。
【結果】対数増殖期の下面ビール酵母を、炭素源、窒素源、アミノ酸飢餓の各飢餓状態においたところ、窒素飢餓状態でのみ、凝集性の誘導が見られた。Lg-*FLO1* 遺伝子の発現も、窒素飢餓状態で、転写が誘導されていることが、リアルタイム PCR によって、わかった。Lg-*FLO1* プロモーターを接続したレポーター遺伝子は、窒素源飢餓条件下で、実験室酵母において、発現の誘導が確認された。
また、資化されにくい窒素源であるプロリンを単一窒素源とした場合にも、下面ビール酵母の凝集性は誘導され、Lg-*FLO1* プロモーターを接続したレポーター遺伝子を有する実験室酵母は、プロリンを単一窒素源とした場合に、発現の誘導がみられた。以上より、下面ビール酵母の凝集性誘導には、資化されやすい窒素源から資化する機構である NCR(Nitrogen Catabolite Repression)が関与していることが考えられた。
NCR に関与する転写因子 GLN3 遺伝子を破壊した実験室酵母では、Lg-*FLO1* プロモーターを接続したレポーター遺伝子の発現は見られず、また、転写因子 Gln3p が結合すると予想される GATA 配列を削除した Lg-*FLO1* プロモーターを接続したレポーター遺伝子を有する実験室酵母でも、レポーター遺伝子の発がみられなかった。
【考察】下面ビール酵母では、NCR の機構に基づき、転写因子 Gln3p が作用し、Lg-*FLO1* プロモーター上の GATA 配列に結合し、Lg-*FLO1* 遺伝子の転写を誘導し、凝集性を誘導すると考察した。
T. Ogata, Yeast Vol.29 p487-494 (2012).

bottom-fermenting yeast, flocculation, nitrogen starvation

講演番号：2B22p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ B 校舎 22 会場

麹菌の生産したスフィンゴ脂質の酵母による取り込みの解析
Analysis of uptake of sphingolipids of fungus *Aspergillus* by yeast
○平田 みよ[1]、泉 和輝[1]、田島 麻理恵[1]、澤田 和敬[2]、柘植 圭介[2]、北垣 浩志[1] ([1]佐賀大学、[2]佐賀県工業技術センター)
○Miyo HIRATA[1], Kazuki IZUMI[1], Marie TASHIMA[1], Kazutaka SAWADA[2], Keisuke TSUGE[2], Hiroshi KITAGAKI[1] ([1]Saga Univ., [2]Industrial Technology Center of Saga.)

【背景・目的】我々は焼酎粕に含まれるスフィンゴ脂質の一種である glucosylceramide の研究を通じて、白麹菌を含む麹菌がスフィンゴイド塩基の 9 位にメチル基を有する特異的な glucosylceramide を生産することを明らかにした[1)]。さらに麹自体に含まれる glucosylceramide と麹と酵母と混ぜてエタノール発酵させた後の gluucosylceramide の組成が違うことに気づき、麹菌が生産した glucosylceramide を酵母が自らの生体膜に取り込んで利用しているのではないかとの仮説を立てた。麹菌の生産する 9 位にメチル基を有する glucosylceramide は高い膜流動性の保持能を持つことが報告されている。一方、エタノール発酵条件下の酵母において生体膜流動性の維持は発酵能維持・エタノール耐性・低温耐性に重要な因子であり、麹を使った酒類での酵母の多くの発酵特性を説明できる可能性がある。そこで本研究ではエタノール発酵条件下における酵母による麹菌の生産した glucosylceramide の取り込みを解析した。【方法・結果】YPD 培地で培養した協会焼酎用酵母、70%精麦大麦、焼酎用麹（*A.kawachii* を使用）を用いて 8 日間の小仕込試験を行った。比較対象として、麹を用いずにグルコースを加えて発酵させたものも同様に解析した。各サンプルの醪から酵母画分を遠心分離で単離し glucosylceramide を抽出した後、TLC で検出した。その結果、麹を含む小仕込試験から単離した酵母画分には麹菌特異的 glucosylceramide に相当するスポットが数日の発酵期間で検出されるようになった。一方、グルコースを用いた小仕込試験から単離した酵母では麹菌特異的 glucosylceramide のスポットは検出されなかった。以上の結果は酵母が麹菌の生産した glucosylceramide を細胞内に取り込んで利用しているという仮説を支持するものである。これらの結果から、麹を使った発酵において麹菌の生産した glucosylceramide を酵母など他の微生物が取り込んで自分の生体膜に利用していることが考えられる。
1) Hirata et al., *J. Agric. Food Chem.*, in press (2012)

Sphingolipid, Aspergillus, yeast

講演番号：2B22p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ B 校舎 22 会場

レドックス制御による新規バイオエタノール発酵阻害物質・グリコールアルデヒド耐性の増強

Redox balancing towards improvement of tolerance of yeast to glycolaldehyde, a novel bioethanol fermentation inhibitor.

ジャヤコディー ラヒル[1,2]、林 信行[1,2]、○北垣 浩志[1,2] ([1]佐賀大農、[2]鹿児島大学大学院連農)
Lahiru Jayakody[1,2], Nobuyuki Hayashi[1,2], ○Hiroshi Kitagaki[1,2] ([1]Saga Univ., [2]Kagoshima Univ.)

バイオエタノール製造時の発酵阻害物質としてはこれまで六炭糖や五炭糖の脱水により生じる 5－ヒドロキシメチルフルフラールやフルフラールが世界中で注目され研究されてきた。これに対し我々は、逆アルドール縮合によりこれらの糖が過分解してグリコールアルデヒドを生じ、これこそが強い発酵阻害効果を持つことを初めて明らかにしてきた。さらにゲノム網羅的なアプローチにより得られた情報から、アルコールデヒドロゲナーゼ Adh1 の遺伝子を高発現することでグリコールアルデヒドの毒性を解除できることを明らかにし、さらに加圧熱水処理セルロースの毒性さえも解除できることを示してきた。

しかし、*ADH1* 高発現株はまだ完全にグリコールアルデヒドや加圧熱水処理セルロースに耐性ではなく、さらなる改善ポイントがあることを示唆していた。そこで、今回は Adh1 が補因子とする NADH ではなく、NADPH を補因子とする Gre2 の遺伝子を高発現することでさらにグリコールアルデヒドへの耐性を高めることができたことを報告する。細胞内レドックスバランス解析により、グリコールアルデヒド濃度が低い時には NADH 依存的経路が優先的に働くが、グリコールアルデヒド濃度が高くなると NADPH 依存的経路が働きグリコールアルデヒド耐性を獲得していることが明らかになった。

1) Jayakody et al., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(1):273-83 (2012)
(Key Scientific Article in *Renewable Energy Global Innovations*)
2) Jayakody et al., *Biotechnology Letters*, 33(2):285-92 (2011)

Bioethanol, Glycolaldehyde, Yeast

講演番号：2B23a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ B 校舎 23 会場

4-HIL 合成に有用な AMKP 還元酵素の X 線結晶構造解析

X-ray crystallography of AMKP reductases useful for 4-HIL synthesis

○石 玄（東大院農生科）
○Xuan SHI (Tokyo Univ.)

4-ヒドロキシイソロイシン（4-HIL）は、タンパク質を構成しない天然アミノ酸の 1 つであり、3 つの不斉炭素をもつため 8 種類のジアステレオマーを取り得る。4-HIL はフェヌグリークの種子から最初に単離され、2*S*,3*R*,4*S* 体であることが明らかになった。この(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL は血糖値依存的なインスリン分泌活性を示してインスリン感受性を向上させることから、医薬品や健康食品素材として有用である。フェヌグリークから抽出した際の 4-HIL の収量は約 3 mg/kg とわずかであり、産業利用においては非経済的であることから、(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL の製造法として化学合成法や微生物による触媒反応を併用した合成法などが検討されてきた。しかし、その合成戦略は特定のキラリティーをもつ基質からの不斉誘導またはラセミ体の酵素速度論的分割に依存しており、複雑な多段階反応を必要とする。最近、2-アミノ-3-メチル-4-ケトペンタン酸 (AMKP) から 2*S*,3*R*,4*S* 体の 4-HIL を生成する酵素として AMKP 還元酵素が同定された。この酵素は 2S,3R,4S 体の 4-HIL 合成のバイオプロセス構築のためのポテンシャルをもつが、その立体選択性は十分に厳密ではない。*Bacillus thuringiensis* 2e2 由来 AMKP 還元酵素 HILDH は AMKP ラセミ体の還元反応において 2*S*,3*R*,4*S* 体に加えて 2*S*,3*S*,4*R* 体を生成する。一方、ARAP（*Aureobasidium pullulans* NBRC 4466 由来）、ARAF（*Acremonium fusidioides* IG 305 由来）、ARFA547（20-14 FA547 由来）は AMKP ラセミ体から 4 種類の 4*S* 体を生成し、2 位及び 3 位の立体配置を区別できない。

本研究では、AMKP 還元酵素の立体選択性を厳密に制御するための酵素改変を目指して、4 種類の AMKP 還元酵素（HILDH、ARAP、ARAF 及び ARFA547）の X 線結晶構造解析を行い、立体選択性を規定する構造基盤を解析した。HILDH の活性ポケットには Arg88 と Trp242 が空間的に離れて位置しており、それぞれの残基が AMKP のカルボキシル基を結合することで 2*S*,3*S*,4*R* 体及び 2*S*,3*R*,4*S* 体が生成されることが推定された。また、ARAP、ARAF 及び ARFA547 においては、HILDH の Arg88 と Trp242 に相当する残基が Thr 残基（または Gly 残基）及び Arg 残基に置換されているため、Arg 残基と AMKP のカルボキシル基との相互作用が優勢となり 4*S* 体のみが生成されることが推定された。この 4*S* 体及び 4*R* 体の制御基盤の理解は、特に HILDH の立体選択性を制御し 2*S*,3*R*,4*S* 体の生成のみを導く酵素改変に貢献するものと期待される。

4-hydroxyisoleucine, enantioselective reduction, short-chain dehydrogenase/reductase

講演番号：2B23a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ B 校舎 23 会場

細胞内に近い高分子濃度を持つ無添加細胞抽出液の調製
Condensation of an additive-free cell extract to mimic the conditions of live cells
○藤原 慶[1]、柳澤 実穂[2]、野村 M. 慎一郎[1] ([1]東北大・分子ロボ、[2]九州大・理)
○Kei FUJIWARA[1], Miho YANAGISAWA[2], Shin-ichiro NOMURA M.[1] ([1]Tohoku Univ. Molbot, [2]Kyushu Univ.)

近年の生命科学の大変な進歩にともない、大腸菌における膨大な知見が蓄積されている。そんな大腸菌とはいえ、細胞抽出液や精製因子から再構成には未だ困難であるという認識が共通である。本研究では、細胞に近い細胞抽出液を調製し脂質二重膜小胞に内包した人工細胞を構築し、細胞と何が違うのかを探ることで細胞を創るために必要な因子と条件を明らかにすることを目的としている。

細胞から細胞抽出液を得るとき、細胞と近い条件にするにはどのようなバッファーや塩が最適であるか。この問いに答えるためにそもそもバッファーや塩の添加が必須なのかを解析した。まず対数増殖期の大腸菌細胞を集菌し、氷冷浸透圧法により超純水で洗浄したのち、超音波で破砕、細胞抽出液の 30,000 x g 上清を得た。典型的には、50 mg/ml 程度のタンパク質を含み、70 mosM 相当の浸透圧を示す化合物、25 mg/ml 相当の核酸を含んでいた。こうして得られた細胞抽出液(無添加細胞抽出液)はエネルギー再生系とマグネシウム酢酸塩、グルタミン酸カリウム、DNA のみの添加で GFP やルシフェラーゼを活性ある形で発現させることができた。次に、上記のようにして得た無添加細胞抽出液をより細胞に近づけるため、真空乾燥機を用いた低圧蒸散法によるゆるやかなタンパク質の濃縮を試みた。この方法では、再構成型無細胞翻訳システムである PURE system も十分なタンパク質合成活性を保ったまま濃縮可能であり、無添加細胞抽出液も、濃縮前の細胞抽出液と比べ同等のタンパク質合成活性を保持した状態で、180 mg/ml まで濃縮に成功した。過去の報告によると大腸菌における対数増殖期のタンパク質濃度は約 210 mg/ml であり、本研究で得た濃縮無添加細胞抽出液は細胞に限りなく近い細胞抽出液といえる。

さらに上記の無添加細胞抽出液を脂質二重膜小胞に内包することを目指した。しかし濃縮後の細胞抽出液は非常に粘性が高く、ハンドリングに難点があったため、脂質二重膜小胞内包後に高分子成分を浸透圧によって濃縮することを試みた。GFP をインジケータとして内部高分子量を見積もった結果、脂質二重膜小胞中で浸透圧によって二倍以上の高分子濃度に到達したことが確認された。

将来的には、今回得られた細胞内並みの高分子濃度を持つ細胞抽出液を高機能化することで、毒性・バイオハザードを考慮不要の無細胞下で、細胞並みの効率で産業上有用な物質生産が可能になることが期待される。

Protein expression, Cell-free science, Reconstitution of cells

講演番号：2B23a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ B 校舎 23 会場

麹菌プロテアーゼ遺伝子 TA3 のオルタナティブスプライシング

Alternative splicing of protease gene TA3 in *Aspergillus oryzae*.

○久保島 恵、石田 健、森田 寛人、前田 浩、岡本 綾子、山形 洋平、竹内 道雄（東京農工大院・応生化）
○Megumi KUBOSHIMA, Ken ISHIDA, Hiroto MORITA, Hiroshi MAEDA, Ayako OKAMOTO, Youhei YAMAGATA, Michio TAKEUCHI (Division of Applied Biological Chemistry, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】

2005 年に終了した麹菌 *Aspergillus oryzae* の全ゲノム解析により，*A.oryzae* の 12 種のセリンタイプカルボキシペプチダーゼ(CPase)遺伝子の存在が明らかとなった。本研究で着目している TA3 遺伝子はその 12 種の CPase 遺伝子の内の 1 つであり、*A. oryzae* 特異的な遺伝子である。TA3 は全長 1,775 bp で 3 つのイントロンを含むと推定されているが、本研究でその mRNA の配列を調べたところ，一部のイントロンが除去されないオルタナティブスプライシングが起こっている可能性が示唆された。そこで、そのオルタナティブスプライシングの詳細について検討した。

【方法】

A.oryzae RIB40 株を窒素源の異なる Czapeck-Dox 液体培地で培養し，そこから経時的に g DNA を含まない mRNA を精製して逆転写反応を行うことで窒素源、培養時間の異なる cDNA を得た。同様に、窒素源と培養時間を揃え、異なった温度で培養することで培養温度の異なる cDNAを得た。それらの cDNA を鋳型として TA3 遺伝子特異的プライマーを用いた PCR を行い，大腸菌を宿主として TA3 の cDNA ライブラリを作製した。得られたライブラリからプラスミドを抽出，イントロン中に特異的に存在する制限酵素サイトを用いた制限酵素処理と PCR により TA3 cDNA の 3 つのイントロンの有無を解析した。

【結果】

TA3 mRNA の中には，3 つのイントロンが全てスプライスされたものも存在していたが，一部のイントロンが除去されないオルタナティブスプライシングによる産物も存在することが明らかになった。さらに，TA3 のオルタナティブスプライシングは，培養時間依存的，培地依存的、温度依存的にそのパターンが変化することが明らかとなった。培養時間が長い程イントロンのスプライシングが抑制される傾向が見られ、その抑制の度合いは N 源がタンパク質か否かで異なっていた。そして、異なった培養温度でのスプライシングパターンの比較により、高温で培養するほど TA3 イントロンのスプライシングが促進される傾向が認められた。

なお、本研究の一部は生研センター基礎推進事業の一環として行われたものである。

Aspergillus oryzae, Alternative splicing, Protease

講演番号：2B23a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ B 校舎 23 会場

海洋性光合成細菌による人工 short hairpin RNA の生産

Artificial short hairpin RNA production by the marine phototrophic bacterium

○長尾 信義[1]、鈴木 宏道[1]、沼野 利佳[2]、梅影 創[1]、菊池 洋[1]（[1]豊橋技科大・工、[2]豊橋技科大・EIIRIS）
○Nobuyoshi NAGAO[1], Hiromichi SUZUKI[1], Rika NUMANO[2], So UMEKAGE[1], Yo KIKUCHI[1]
([1]Toyohashi Univ. Tech., [2]Toyohashi Univ. Tech. EIIRIS)

RNA が持つ機能は多岐にわたる。特定の物質に結合する RNA アプタマーや、配列特異的に遺伝子発現を抑制する siRNA など、様々な機能性 RNA が発見・開発されており、学術研究だけでなく医療や産業に応用されようとしている。しかしながら、一般に合成 RNA は高価であり、産業的応用に向けた大量生産手法が確立しているとはいえない。

我々はこれまでに、任意の組換え RNA を簡便かつ安価に生産することを目的として、海洋性光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* を用いた RNA 生産手法について研究を行ってきた。本細菌は、増殖と同時に自身の核酸を細胞外へ放出するという特徴を持つ。さらに培養液中の RNA 分解酵素活性が非常に低いため、細胞外 RNA は分解されず安定に存在することが明らかとなっている（１）。我々は既に、これらの性質を利用した RNA アプタマーの細胞外生産に成功している（１、２）。この手法は、細胞の破砕を必要としないことや RNA 分解酵素活性の影響が低いことなどから、簡便かつ安価という要求を満たすことが期待される。

現在、本細菌を用いて、もう一つの機能性 RNA である short hairpin RNA（shRNA）の細胞外生産について研究を進めている。まず、本細菌由来の *rrn* プロモーター配列と *puf* ターミネーター配列を持つプラスミド DNA にマルチクローニングサイトを導入することで、組換え RNA 発現ベクターを構築した。このベクターに設計した shRNA 配列をクローニングし、本細菌に導入した。このベクター保持株を好気条件下にて培養し、細胞内および細胞外の全 RNA を調製した。続いてノーザンハイブリダイゼーションおよびプライマー伸長法による解析を行った。

前年度大会においては、shRNA は転写されているものの生成物は部位特異的な切断を受けていたことを報告した。今回は、その断片化を抑える新たな配列をデザインし、生産を試みた。その結果、完全長 shRNA の細胞外生産に成功した。

（１） Suzuki *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 786(2010)
（２） Suzuki *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.* **112**, 458(2011)

recombinant RNA production, extracellular nucleic acids, *Rhodovulum sulfidophilum*

講演番号：2B23a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ B 校舎 23 会場

植物由来オスモチンの麹菌 *A. oryzae* による生産および精製
Production and purification of the osmotin from plants in *Aspergillus oryzae*
○伊藤 大修[1]、丸山 潤一[1]、永田 宏次[2]、田之倉 優[2]、北本 勝ひこ[1] ([1]東大院農生科・応生工、[2]東大院農生科・応生化)
○Hiromasa ITO[1], Jun-ichi MARUYAMA[1], Koji NAGATA[2], Masaru TANOKURA[2], Katsuhiko KITAMOTO[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Appl. Biol. Chem., The Univ. of Tokyo)

【目的】

オスモチンは、植物の防御ペプチドファミリーの PR-5 (Pathogenesis-related proteins of family 5)に属するタンパク質であり、酵母に対してアポトーシスを誘導することが知られている。また、哺乳類細胞において、糖取り込みや脂肪酸代謝を促進するアディポネクチンと類似の機能をもつことが報告されている [1)]。このことから、オスモチンは糖尿病や動脈硬化など生活習慣病を改善する物質として期待されている。以前の研究では、タバコ由来オスモチンについて解析が進められてきたが、食用である野菜や果物に含まれているオスモチンを生産し、その活性を調べることは重要であると考えられる。

麹菌 *Aspergillus oryzae* は異種タンパク質生産宿主として利用されており、その特長の一つは、大量のタンパク質を培地中に分泌する能力である。また、長年食品製造に用いられてきたために安全性が保証されている。本発表では、トマトおよびイチゴ由来のオスモチンについて、*A. oryzae* を用いた生産と精製を行ったので報告する。

【方法と結果】

成熟型オスモチンをコードする cDNA に関して、*A. oryzae* で高発現している *tef1* 遺伝子の塩基配列を参考にコドン最適化を行った。この cDNA の上流に、α-アミラーゼをコードする *amyB* 遺伝子を融合し、高発現プロモーターP-*glaA142* 制御下で発現するプラスミドを作製した。AmyB と各オスモチンとの間には、Kex2 様プロテアーゼ切断配列および His_6 タグを挿入することで、His_6 タグが付加されたオスモチンが AmyB から切り離され培養液に分泌されるように設計した。*A. oryzae* プロテアーゼ 10 重破壊株 NSlD-ΔP10 [2)] を宿主として、各オスモチンの発現プラスミドにより形質転換を行った。取得した形質転換株を 5×DPY 培地で 4 日間振とう培養したところ、培養液中にトマトおよびイチゴ由来それぞれのオスモチンの生産を確認した。さらに、その培養液を Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーに供することによりオスモチンを精製した。現在、酵母を用いて抗菌活性の確認を行なっている。

1) Narasimhan *et al.* (2005) *Mol. Cell* 17, 171-180.
2) Yoon *et al.* (2011) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 747-759.

Aspergillus oryzae, heterologous protein production, osmotin

講演番号：2B23a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ B 校舎 23 会場

Klebsiella pneumoniae 9-3B 由来のフィチン酸からイノシトールを生成するフィターゼに関する研究

Studies on *Klebsiella pneumoniae* 9-3B phytase which liberate *myo*-inositol from phytic acid

○大谷 翠[1]、Lotis Escobin-Mopera[1]、杉本 敬祐[2]、曾根 輝雄[1]、阿部 歩[1]、田中 みち子[1]、浅野 行蔵[1] ([1]北大院農、[2]旭川高専)

○MIDORI OHTANI[1], Lotis Escobin-Mopera[1], KEISUKE SUGIMOTO[2], TERUO SONE[1], AYUMI ABE[1], MICHIKO TANAKA[1], KOZO ASANO[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Asahikawa Nat. Coll. of Tech.)

【目的】土壌から単離されたグラム陰性細菌 *Klebsiella pneumoniae* 9-3B はフィチン酸が唯一の炭素・リン源である改変最少培地で生育することができる。我々はすでに、この株が有するフィチン酸から全てのリン酸基を遊離させ、イノシトールを生成できるフィターゼを単離、精製した。[1)] 本フィターゼをクローニングし、大腸菌を用いて発現することにより、酵素科学的特性を解明することを目的とした。

【方法と結果】精製フィターゼの N 末端アミノ酸配列を解析し、得られた配列をもとに相同性検索を行った。得られた配列からプライマーを設計し、*K. pneumoniae* 9-3B のゲノム DNA を鋳型としてクローニングを行った。その結果、*K. pneumoniae* 342 由来の oligogalacturonide ABC transporter, periplasmic pectic oligomer-binding protein (TogB)と 99%の相同性を持つことがわかった。TogB は約 45 kDa の大きさを持ち、ABC トランスポーターにおいて、ガラクツロン酸誘導体の認識に関与するタンパク質である。*TogB* 遺伝子を pET-28(b)に挿入し、大腸菌 BL21(DE3)を用いて IPTG 誘導により発現を行った。His-tag を用いたアフィニティクロマトグラフィにより TogB を精製し、フィターゼ活性を測定したが、フィターゼ活性を確認することはできなかった。

バクテリアが有しているフィターゼは、そのサイズが約 45 kDa を示す場合が少なくはないため、*K. pneumoniae* 9-3B からの精製の際、TogB とは別のフィターゼが同じ画分に混在していた可能性が推測された。そこで、TogB とフィターゼが相互作用を示した結果として、フィチン酸からイノシトールが生成すると仮定し、*K. pneumoniae* 9-3B が有するフィターゼと混合して反応させることにした。フィターゼを発現させるために、*K. pneumoniae* subsp. pneumoniae 1084 が有する 3-phytase の配列をもとにプライマーを設計し、*K. pneumoniae* 9-3B のゲノムからクローニングを行った結果、*K. pneumoniae* 342 が有するヒスチジン酸ホスファターゼ(HAP)と 100%の相同性を持つことがわかった。この HAP を大腸菌で発現させたところ、約 45 kDa のサイズを持ち、フィターゼ活性を有していた。TogB と HAP とを高濃度で混合してフィチン酸と反応させた結果、反応系中のフィチン酸の約 9 割がイノシトールへと変換された。現在、フィチン酸からイノシトールへの変換の詳細を解析中である。

1) Lotis, E. *et al. J. Biosci. Bioeng.* **113**, 562-567.(2012)

phytase, *myo*-inositol, *Klebsiella pneumoniae*

講演番号：2B23a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ B 校舎 23 会場

亜リン酸デヒドロゲナーゼを用いた NADPH 再生系とシキミ酸デヒドロゲナーゼとの共役反応による高効率シキミ酸合成

Enhanced production of shikimate by the coupling reaction of the NADPH-regeneration system using a phosphite dehydrogenase and the shikimate dehydrogenase

○児玉 洋輔[1]、廣田 隆一[2]、池田 丈[2]、黒田 章夫[2] ([1]広島大工、[2]広島大院先端物質・分子生命)
○Yosuke KODAMA[1], Ryuichi HIROTA[2], Takesi IKEDA[2], Akio KURODA[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Univ.)

【背景と目的】バイオプロセスによる物質生産は環境に調和した生産システムとして期待されている。しかし、一般的な生体触媒は調製に多くの手間を要することや、安定性、副反応による収率低下などの問題がある。我々はこれまでに、高い物質生産能力を持つ生体触媒を簡単に調製する技術を開発した。これは反応に使用する好熱菌の酵素を大腸菌で発現させた後、熱処理を行うだけの非常に簡便なものである。熱処理をすることで大腸菌由来の酵素は失活し、不要な副反応が起こらず目的物質を高収率で獲得することが可能となる。シキミ酸は３つの不斉炭素原子を持つため化学合成が困難であるが、酵素反応では立体選択的な生合成が可能である。しかし、補酵素として高価な NADPH を必要とするため、その供給方法が課題となる。本研究では、好熱菌由来シキミ酸デヒドロゲナーゼを発現させた大腸菌ホールセル生体触媒に、既存の NAD(P)H 再生酵素のなかで最も強い NAD(P)H 生成能力を示す亜リン酸デヒドロゲナーゼ(PtxD)を共役させ、シキミ酸生成におけるその効果を検証した。
【方法と結果】*Thermus thermophius* 由来のシキミ酸デヒドロゲナーゼ TTHA1050 を、pET システムを用いて大腸菌内に発現させ、その加熱処理菌体において NADPH 依存的に 3-デヒドロシキミ酸からシキミ酸が合成される事を HPLC により確認した。部位特異的変異により *Ralstonia* sp. 4506 株由来の耐熱性 PtxD(RsPtxD)の NADP に対する特異性を高めた変異体(RsPtxD-DM)を作製し、TTHA1050 と共役反応を行った。その結果、RsPtxD-DM と共役させることで反応速度の増大、シキミ酸収率の向上が認められた。

biosynthesis, phosphite dehydrogenase, shikimate

講演番号：2B23a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ B 校舎 23 会場

新規原理によるアミノ酸定量法－タンパク質翻訳に基づくバイオアッセイ法の提唱

Proposal of the “translation-dependent” bioassay, a novel concept of amino acid assays

○亀谷 将史[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Masafumi KAMEYA[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO)

【背景】

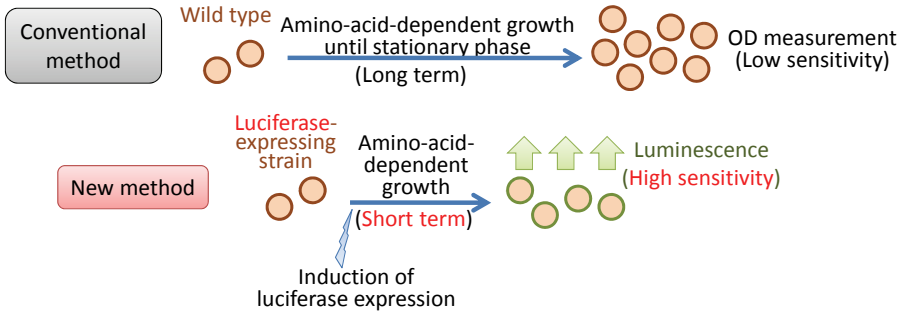
アミノ酸は食品の品質管理や各種疾病検出の重要な指標として用いられ、その迅速・簡便な定量法の開発は工業的・医療的見地から強く望まれている。乳酸菌を用いたバイオアッセイ法は、古くからアミノ酸定量法の一つとして知られ広く用いられてきた。本法はアミノ酸要求性の乳酸菌を用い、そのアミノ酸濃度依存的な生育量によって定量を行う手法である。しかし本法は、生育終了まで長時間（一晩）を測定に要し、また菌濁度測定という感度の低い検出法を用いるなどの問題点を有していた。

これまでに我々は、ルシフェラーゼを発現させた乳酸菌株による新規バイオアッセイ法を構築した[1]（下図）。本手法では、従来法よりはるかに迅速（30 分）かつ高感度なアミノ酸定量が可能である。しかし、本定量法がどのような機構により成り立っているかは未解明だった。

【手法・結果】

新規バイオアッセイは細胞分裂阻害性の抗生物質存在下でも影響を受けず、菌の生育に基づく（growth-dependent）従来法とはまったく異なる原理に基づく定量法であることが示された。さらに、ルシフェラーゼ以外のマーカー遺伝子の使用や、菌体あたりのマーカータンパク質発現量などを検討した。その結果本系は、タンパク質合成速度が外因性アミノ酸の濃度に応じて変化しそれがシグナル強度の差となって現れる、translation-dependent な定量法であることが示された。すなわち、一見すると従来法にも似た本手法が実はこれまでにない新規な原理に基づく定量法であり、また「生育」より迅速に進行する「タンパク質翻訳」に基づくことが上記のような迅速な定量を可能にしたと考えられる。さらに本法は、マーカーの種類を変えることで発光・発色・蛍光など様々な方式で検出可能であり、今後幅広い環境での実用が期待される。

[1] 特願 2011-184005. 浅野泰久、亀谷将史



bioassay, amino acid, lactic acid bacteria

講演番号：2B23a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ B 校舎 23 会場

生分解性プラスチック分解能を持つ深海微生物における脂質分解酵素の解析

Analysis of the lipolytic enzymes from the biodegradable plastics degrading deep-sea bacterium.

○加藤 千明[1]、座間 千夏[1,2]、関口 峻允[1,2]、濱島 裕輝[1,3]、榎 牧子[2]([1]海洋研究開発機構、[2]東京海洋大院海洋科学、[3]立教大院生命理)
○Chiaki KATO[1], Chinatsu ZAMA[1,2], Takayoshi SEKIGUCHI[1,2], Yuki HAMAJIMA[1,3], Makiko ENOKI[2] ([1]JAMSTEC, [2]Tokyo Univ. Mar. Sci. Tech., [3]Rikkyo Univ.)

近年、汎用プラスチックの代用品として生分解性プラスチックが注目されているが、海洋、特に深海における分解機構に関する知見はまだ少ない。日本海溝から分離された好冷好圧性の *Moritella* sp. JT01 株が生産する脂質分解酵素は、深海環境に適応しており、低温・高圧力下で活性を示す。先行研究より、本酵素は熱に対して比較的安定であり、150MPa 圧力下で最大活性を示すことがわかっている。本研究では、JT01 株が生産する、脂質分解酵素の遺伝子ならびに発現解析を行った。

JT01 株の染色体 DNA をランダムに切断し、ベクターpUC119 に挿入した後、*Escherichia coli* JM109 株に導入した。トリブチリンを懸濁させた寒天培地に植菌し、37℃で 1 日培養した後、15℃に移し、数日間でハローを形成するコロニーを探索した。脂質分解酵素の遺伝子をコードする部分が導入された株であれば、酵素の働きによりトリブチリンが分解され、ハローを形成する。ハローの大きさに関わらず、判別できたものは全て選抜した。これらについて、エステラーゼ遺伝子の存在を確認するために網羅的にシークエンスを行った。

ハロー形成形質転換株は全部で約 100 コロニー確認できた。導入断片のシークエンス解析により、5 種類の遺伝子を含むクローンが得られ、うち 3 つは、他の細菌のゲノムから推定したリパーゼ・エステラーゼと、低いながらも有意な相同性を示した。低温下でもハローを形成できること、推定リパーゼ・エステラーゼと低いが有意な相同性を示したこと、*Moritella* sp. JT01 株の培養液に脂質分解酵素の存在が確認されていることなどから、これら 3 つの遺伝子は、新規の脂質分解酵素をコードしている可能性が高い。今後、これらの遺伝子を発現・精製して、加圧下における活性の挙動や基質特異性などについて解析する予定である。

Lipolytic enzyme, deep-sea, piezophilic

講演番号：2B23a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ B 校舎 23 会場

Streptococcus bovis 148 由来 AmyA 基質吸着部位の機能解析
Functional Analysis of Starch Binding Domain(SBD) of AmyA
○上野 雅哉、梶川 揚申、佐藤 英一、岡田 早苗（東農大応生科・化学)
○Masaya Ueno,Akinobu Kajikawa,Eiichi Satoh,Sanae Okada (Dept. Appl. Biol. Chem. Tokyo Univ. Agr.)

【背景・目的】我々は *Streptococcus bovis* 148 株より生澱粉分解酵素であるα-amylase（AmyA）を取得している。AmyA は単一酵素で液化と糖化を同時に行う特性を有しており、基質を最終産物として 80%のグルコースにまで分解可能である。そのため本酵素を用いたバイオエタノール生産等の応用利用が期待されており、長年研究が行われてきた。AmyA は現在までに分解を行う部位である Catalytic Domain(CD)、基質吸着能を有する繰り返し様配列である Starch Binding Domain(SBD)、それらを繋ぐ Linker Domain(LD)の 3 つの領域から構成されることが判明している。さらに、SBD の基質吸着能は Y(Y535・Y630), Y(Y537・Y632), W(W548・W644)の三つのアミノ酸残基による吸着活性部位の形成が重要であると示唆されている。また、吸着活性部位をフェニルアラニンに置換した AmyA の吸着試験結果より、芳香族アミノ酸が基質と相互作用することで基質吸着能が構築されることを報告した[1]。しかし、この結果から上記三つのアミノ酸残基は芳香環による相互作用以外にも、他の相互作用により吸着することが示された。チロシンとフェニルアラニンはそれぞれヒドロキシ基、ピロール環の N 原子を有しており、基質グルコース環と水素結合が可能である。そのため、本研究では上記三つのアミノ酸残基を水素結合可能なアミノ酸に置換することで、SBD の基質吸着能をより詳細に解明することを目的とした。
【方法・結果】吸着活性部位をグルタミン(Q)・セリン(S)に置換したΔY1-Q(Y535Q・Y630Q), ΔY2-Q(Y537Q・Y632Q), ΔW-Q(W548Q・W644Q)、ΔY1-S(Y535S・Y630S), ΔY2-S(Y537S・Y632S), ΔW-S(W548S・W644S)を作成し澱粉吸着試験に供した。その結果、フェニルアラニン置換型 AmyA の吸着率より低い値ではあるものの、吸着能がほぼ消失したプロリン置換型 AmyA と比較し、吸着が確認された。このことから SBD の基質吸着能には上記三つの芳香族アミノ酸残基による水素結合の関与が示唆された。現在、上記三つのアミノ酸残基を複数個所置換した AmyA を用いて更なる解析を進めている。
1）斎藤ら、日本農芸化学会 2012 年度大会講演要旨集

amylase, adsorption, starch

講演番号：2B23a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ B 校舎 23 会場

Rhizopus microsporus のスクロース加水分解酵素遺伝子のクローニング
Cloning and nucleotide sequence of sucrose-hydrolyzing enzyme gene from *Rhizopus microsporus*
○折笠 善丈、小田 有二（帯畜大・食品）
○Yoshitake ORIKASA,Yuji ODA (Dept. Food Sci., Obihiro Univ. Agr. Vet. Med.)

【目的】*Rhizopus*属糸状菌は、一般にスクロースを糖源とする培地において生育不能あるいは生育してもその速度はきわめて遅いとされている。これまでに、演者らはスクロースで速やかに生育可能な*R. oryzae*菌株および*R. delemar*菌株を見出し、分泌するスクロース加水分解酵素が、それぞれグルコアミラーゼ[1)]およびβ-フルクトフラノシダーゼ[2)]であることを明らかにした。本研究では、*R. microsporus*および*R. stolonifer*の中からスクロースを分解可能な菌株を選抜し、その酵素をコードする遺伝子について調べた。
【方法】供試菌株は*R. microsporus* 7株(NBRC 4737, 4768, 31988, 32995, 32996, 32997, 100014)および*R. stolonifer* 5株(NBRC 32998, 4781, 5411, 6188, 30816)である。対照菌株としてスクロースで生育可能な*R. delemar* NBRC 4754および*R. oryzae* NBRC 4785を使用した。各菌株は試験管(直径1.8cm)中のPDA寒天培地で増殖させ、この菌体を液体培地(10%スクロース0.2% $(NH_4)_2SO_4$、0.065% KH_2PO_4、0.025% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、2.5% $CaCO_3$) 100 mlに移植して30℃、振盪培養し、ろ液について分析した。PCRは*R. microsporus* NBRC 4754由来のβ-フルクトフラノシダーゼ(*sucA*)遺伝子をもとに設計したプライマーで行った。
【結果】供試菌株を14日間培養したろ液についてTLC分析したところ、*R. microsporus* NBRC 32995以外はすべてスクロースを分解していなかった。*R. microsporus* NBRC 32995の培養ろ液中の変化を追跡したところ、4日目から単糖が出現し、乳酸の生成によりpHが低下した。10日目でスクロースはすべて分解されたものの、14日目でも生成する単糖は完全には消費されてはいなかった。スクロース分解活性は培養時間とともに急激に上昇した。培地中のスクロースをフルクトオリゴ糖に変えて*R. microsporus* NBRC 32995を培養すると、*R. oryzae* NBRC 4785とは異なり、*R. delemar* NBRC 4754と同様に単糖へと分解したことから、スクロースの分解に関与する酵素はβ-フルクトフラノシダーゼと推定された。そこで、*R. delemar* NBRC 4754の*sucA*類似の配列を縮重プライマーとして用い、*R. microsporus* NBRC 32995のゲノムDNAを鋳型としてPCR増幅したところ、β-フルクトフラノシダーゼと相同性を有するDNA増幅断片が得られた。
1) Watanabe T and Oda Y (2008) Biosci. Biotechnol. Biochem., 72, 3167-3173
2) Orikasa Y and Oda Y (2012) Folia Microbiol. in press.

Rhizopus microsporus, beta-fructofuranosidase

講演番号：2B23a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ B 校舎 23 会場

Aureobasidium pullulans 由来の GH family 51 に属するα-L-アラビノフラノシダーゼの酵母 *Pichia pastoris* における発現と酵素化学的諸性質

Characterization of *Aureobasidium pullulans* GH family 51 α-L-arabinofuranosidase expressed in *Pichia pastoris*.

○東田 知洋、太田 一良（宮崎大農・応生科）
○Chihiro HIGASHIDA,Kazuyoshi OHTA (Univ. of Miyazaki)

【目的】近年、ヘミセルロースを含む木質系バイオマスはバイオエタノール生産の原料として注目されている。ヘミセルロースの構成多糖であるキシランはβ-D-キシロースの主鎖にα-L-アラビノフラノース等の糖が側鎖として結合しており、この側鎖をα-L-アラビノフラノシダーゼ等で加水分解することでキシランの分解効率が上昇することが報告されている。既に、真菌 *A. pullulans* ATCC 20524 株から GH family 51 に属するα-L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子 *abfB* をクローニングした。本報では、同酵素をメタノール資化酵母 *P. pastoris* で発現させ、組換え酵素の酵素化学的諸性質を検討した。
【方法・結果】*A. pullulans* ATCC 20524 株の菌体から全 RNA を抽出し、*abfB* 遺伝子の ORF を含む cDNA を合成した。*abfB* cDNA の ORF は 2,097 bp であり、アミノ酸 17 残基のシグナルペプチドと 682 残基の成熟酵素をコードした。そのアミノ酸配列には、15 ヶ所の *N* 結合型糖鎖付加可能部位が存在した。また、相同性がある *Aspergillus* 属や *Penicillium* 属糸状菌の GH family 51 のα -L-アラビノフラノシダーゼと比較すると、C 末端側が 56 残基長いことが特徴であった。次に、この *abfB* cDNA を 2 種の染色体組込み型ベクターに挿入後 *P. pastoris* を形質転換した。分泌シグナルを含まないベクター pPIC3.5 に全 ORF を挿入して作製した株を pABF115 由来株、酵母α因子の分泌シグナルを含む pPIC9 に *abfB* cDNA の成熟酵素領域を挿入して作製した株を pABF116 由来株とした。30℃で 120 時間、液体振とう培養した結果、*A. pullulans* ATCC 20524 株が細胞外に 0.043 U/ml の酵素活性を示したことに対し、pABF115 由来株が 8.4 U/ml、pABF116 由来株が 4.7 U/ml と高い酵素活性を示した。そこで、細胞外酵素活性のより高い pABF115 由来株の液体培養上清から、ゲル濾過クロマトグラフィーにより本酵素を電気泳動的に単一に精製した。精製酵素の分子量は 116 kDa であり、*N*-glycosidase F 処理で *N* 結合型糖鎖を除去すると分子量が約 70 kDa に減少した。また、比活性は最適 pH 4.5、最適温度 75℃で 23.7 U/mg、K_m と V_{max} はそれぞれ 6.27 mM、78.1 μmol/min/mg であった。本酵素は、合成基質 *p*-nitrophenyl (*p*NP) α-L-arabinofuranoside に対して 11.3 U/mg の酵素活性を示したが、*p*NP α-L-arabinopyranoside に対する活性は検出できなかった。また、多糖においては、ライ麦由来アラビノキシランに対して 1.87 U/mg の酵素活性を示したが、その他のキシランに対して微弱な酵素活性を示した。同様にテンサイ由来アラビナンに対しても低い酵素活性(0.292 U/mg)を示したことから、本酵素はアラビノキシランに特異的な型のα- L -アラビノフラノシダーゼであることが示唆された。
本研究は文部科学省特別教育研究経費研究推進事業の一環として行われた。

Aureobasidium pullulans, arabinofuranosidase, GH family 51

講演番号：2B23a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ B 校舎 23 会場

バイオマス糖化液を原料とした *Trichoderma reesei* セルラーゼの効率的生産系の構築
Efficient production system of *Trichoderma reesei* cellulases from hydrolysate of biomass
○池 正和、田伏 美峰、徳安 健（農研機構・食総研）
○Masakazu IKE,Mine TABUSE,Ken TOKUYASU (NARO, NFRI)

【目的】
繊維質原料からのエタノール製造工程においては、糖化酵素のコストが実用化に向けた大きな障壁となっており、糖化酵素の低コスト生産技術開発が強く求められている。我々は、多様な原料や変換プロセスに対応した糖化酵素を安価で安定的に大量生産するために、微生物の改良や培養技術の高度化など、総合的に研究開発を進めている。これまでに、*Trichoderma reesei* 変異株を用い、グルコース、キシロース、セロビオース等のモデル糖質を原料とした連続フィード培養による酵素生産技術について報告している[1), 2)]。可溶性糖質の組成・添加量等の添加様式を制御することで、高いセルラーゼ生産性を維持しつつ、ヘミセルラーゼ生産量の制御が可能であり、多様な変換プロセスに対応した酵素カクテルの効率的生産への利用が期待できる。本研究では、モデル糖質使用系から一歩踏み込んで、セルロース系バイオマス糖化液を連続フィード培養の供給糖源とした際のセルラーゼ生産特性を評価した。
【方法・結果】
グルコース存在下でもセルラーゼ生産が可能な *T. reesei* M2-1 株を用いて、モデル糖液（供給糖源：グルコース(Glc)＋キシロース(Xyl)＋セロビオース(C2)）を連続フィードし、ヘミセルラーゼ比率の高いセルラーゼ製剤を得た。この製剤を用いて水酸化カルシウム前処理稲わらを酵素糖化し、遠心分離上澄として Glc 4.24%、Xyl 2.01%、C2 0.4% (Glc+Xyl+C2 = 6.66%)のバイオマス糖化液を回収した。この糖化液を用いて、M2-1 株の連続フィード培養（添加速度約 7.5 g-sugar/L/day、酵素生産期間 6 日）を行ったところ、投入糖質あたりのセルラーゼ生産効率は、300FPU(濾紙分解活性)/g-sugar を超え、同菌株のセルロースバッチ培養や Glc+C2 での連続フィード培養と比較してほぼ同等であった。この結果は、連続フィード培養における供給糖源として、バイオマス糖化液が使用可能であることを示しており、酵素生産原料コスト低減に繋がるものと期待される。
なお、本研究は、農林水産省「農山漁村におけるバイオ燃料等生産基地創造のための技術開発」によるものである。
1) Ike et al. Appl. Microbiol. Biotechnol.(2010)87:2059-2066
2) Ike et al. Biosci. Biotechnol. Bioeng. in press

Trichoderma reesei, cellulases, hydrolysate

講演番号：2B23a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ B 校舎 23 会場

プロテアーゼ遺伝子破壊によるセルラーゼ生産菌 *Aspergillus aculeatus* の育種
Breeding of *Aspergillus aculeatus* by the protease-gene-deletion
○坂田 侑子、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院生環科）
○Yuko SAKATA,Syuji TANI,Jun-ichi SUMITANI,Takashi KAWAGUCHI (Grad Sch Life & Env Sci. Osaka Pref Univ)

【背景と目的】*Aspergillus aculeatus* は *Trichoderma reesei* 由来セルラーゼと協調的に基質に作用して効率よく糖化する特徴的なセルラーゼを分泌する。本菌を宿主として内在性タンパク質を高発現させると、*Aspergillus oryzae* を宿主とした場合の 9.4 倍量のタンパク質生産が観察されたことから、我々は本菌をセルラーゼ生産工場として利用することを目指している。しかし、*A. aculeatus* セルラーゼは培養後期に活性が低下するという問題がある。セルラーゼ活性の低下に伴うようにプロテアーゼ活性が上昇していくことから、セルラーゼ活性の低下の一因はプロテアーゼによる分解であると推測された。これまでに本菌の分泌する主要なプロテアーゼの一つがアスパラギン酸プロテアーゼの Aspergillopepsin I (PEPI) であると同定され、PEPI は *in vitro* で本菌の主要なセルラーゼの一つであるβ-Glucosidase 1 (BGL1) を限定分解することが明らかになり、培養後期のセルラーゼ活性の低下はプロテオリシスが原因であることが強く示唆された。しかしながら、本菌の培養上清には未同定のプロテアーゼも確認できさらなる知見を得る必要がある。そこで、本課題ではセルラーゼを安定的に生産する宿主を開発することを目的に、プロテアーゼ遺伝子破壊株を作出しその影響を解析した。
【方法と結果】まず菌体外プロテアーゼ活性を網羅的に低下させるために、菌体外プロテアーゼ転写活性化因子 *prtT* を破壊した。*prtT* 破壊株では菌体外プロテアーゼ活性がホストと比較して最大約 1/6 に低下していた。*prtT* 破壊株は *Aspergillus fumigatus* での報告とは異なり BSA を単一窒素源に用いた場合にも生育障害は起こらず、その詳細を解析したところ、グルタミン酸プロテアーゼ Aspergillopepsin II (PEPII) の発現・タンパク質生産が検出限界以下に低下した一方で、PEPI への影響は発現・タンパク質レベル共に限定的なものであった。そこでさらにプロテアーゼ活性を低下させるために *prtT*・*pepI* 二重破壊株を作出した。*prtT*・*pepI* 破壊株はプロテアーゼ活性がホストと比較して最大約 1/10 に低下しており、培養上清の活性染色ではプロテアーゼは検出されなくなった。また最近 *A. fumigatus* において PrtT が鉄の取り込みやエルゴステロール生合成等、菌体外プロテアーゼ以外の制御にも関わっていることが報告され、*A. aculeatus* においても *prtT* の破壊が菌体外プロテアーゼ以外にも影響していることが推測された。そこで現在 *pepI*、*pepII* 単独、二重破壊株を作製し、各プロテアーゼ遺伝子破壊株を用いてセルラーゼ生産に与える影響を比較している。

protease, Aspergillus, gene disruption

講演番号：2B23a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ B 校舎 23 会場

部位特異的非天然アミノ酸導入系を用いた遺伝子特異的翻訳スイッチ

Gene-specific translational switching by site-specific incorporation of nonnatural amino acids

○加藤 祐輔、皆葉 正臣（農業生物資源研）
○Yusuke KATO,Masaomi MINABA (Natn. Inst. Agrobiol. Sci.)

組換えタンパク質の生産や遺伝学的研究において、厳密な遺伝子発現の制御法（誘導時には高い発現、非誘導時には完全な発現抑制）が求められている。特に、毒性の強い組換えタンパク質の発現の場合、非誘導時のわずかな発現（leaky な発現）により宿主細胞が死ぬため、これを完全に抑えることが重要となる。しかし、酵素性毒素など非常に毒性の強いタンパク質の発現コンストラクトを維持できるほど leaky な発現を抑制することは、未だに難しい。

従来の発現制御法のほとんどは転写レベルの制御による。この研究では、それとは異なる、部位特異的非天然アミノ酸導入系を利用した新しい遺伝子特異的な翻訳レベルの発現調節法を開発した。この発現調節法では、天然には存在しないアミノ酸のひとつ・ヨウ化チロシン（IY）を、アンバー終止コドン（UAG）に導入する系（理研・坂本健作チームリーダーより分譲）を利用した。この系は、次の 3 要素で構成される：(1)IY、(2)IY と結合しアンバー終止コドンを認識する tRNA（IY-tRNA）、(3)IY および tRNA の結合を特異的に触媒するアミノアシル tRNA シンテターゼ（IYRS）。翻訳を制御しようとする遺伝子の開始コドン近傍にアンバー終止コドンを導入する。3 要素が全て揃っていれば、導入された終止コドンには対応する非天然アミノ酸が組み込まれて、タンパク質に翻訳され、遺伝子は発現する。3 要素に欠けるものがあれば、非天然アミノ酸は導入されず、導入された終止コドンで翻訳は止まり、遺伝子は発現しない。EGFP の蛍光を指標とした検定では、IYRS または IY-tRNA の発現抑制により 1%以下、IY 非添加では 6-8%に翻訳効率を抑制することができた。

この翻訳レベルの発現調節は、転写レベルの発現調節と組み合わせて、相乗的に調節の厳密さを上げることができると考えられる。そこで、厳密な転写レベルの発現調節系のひとつ、araBAD プロモーターによる T7 RNA ポリメラーゼの誘導をともなう T7 プロモーターとラクトースオペレーターによる組換えタンパク質発現系と組み合わせて、強毒性タンパク質 ColE3 酵素ドメイン(ColE3e、東大・農・正木春彦教授より分譲)の発現コンストラクトの維持が可能か検定した。ColE3e の翻訳開始コドンの直下に 1～3 個のアンバー終止コドンを挿入した発現コンストラクトは、転写レベルのみの発現抑制では維持できなかった。しかし、翻訳レベルにおける発現抑制を併用すると、維持できるようになった。結論として、翻訳レベルと転写レベルの発現調節を組み合わせることにより、従来より高い厳密性を達成できると考えられる。

recombinant protein, gene expression, translational regulation

講演番号：2B23p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ B 校舎 23 会場

Dictyostelium discoideum のポリケタイド合成酵素遺伝子の発現パターン解析

Expression of *Dictyostelium* polyketide synthases is regulated by development and environmental condition

○杉山 哲夫[1]、赤羽根 一樹[1]、齊藤 玉緒[2] ([1]上智大院理工、[2]上智大理工)
○Tetsuo SUGIYAMA[1], Kazuki AKABANE[1], Tamao SAITO[2] ([1]Grad. sch. of Sci. and Tech., Sophia Univ, [2]Fac. of Sci. and Tech., Sophia Univ.)

【目的】本研究では細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* におけるポリケタイド合成酵素（PKS）遺伝子の機能解析の足掛かりとして、発生段階における PKS 遺伝子の発現パターンの解析を行うことを目的とする。

【背景】*D.discoideum* は、ゲノムデータ解析により 45 個の PKS 遺伝子の配列を持つことがわかった。これまで新規ハイブレット型酵素である Steely A の産物である MPBD(4-methyl-5-pentylbenzene-1,3-diol)や Steely B の産物の DIF-1（Differentiation Inducing Factor-1）は分化を誘導するシグナルとして働く事が示されており、これらを含むいくつかのポリケタイドが *D.discoideum* において発生を調節するシグナルとして作用する事が知られている。しかし、その他多くの PKS の産物や機能は未解明のままである。

D.discoideum は Cd^{2+}が存在する寒天上で発生させると、柄細胞分化誘導能があがることが示されており（Kubohara & Okamoto 1994）、重金属が分化誘導を司るポリケタイド合成を促進する事が示されている(Serafimidis *et al.*, 2005)。しかし一方、同じ条件では胞子細胞の分化は誘導されないことから、重金属による影響は PKS 全体を活性化するものではなく、柄細胞分化誘導分子に特異的なものではないかと考え、重金属による PKS の発現調節を検証することにした。さらに、単細胞期にはポリケタイドがどのような影響を及ぼしているのかを検証する目的で、餌の違いによる PKS 遺伝子の発現の違いについても検証した。

【方法】偽遺伝子などを除く 36 個の PKS 遺伝子の発生時間別の発現パターンを調べた。また環境応答するかどうかを調べるために、単細胞期に捕食する餌（合成液体培地、グラム陰性菌、グラム陽性菌）の違いと Cd^{2+}存在下で発生させた時の PKS 遺伝子の発現パターンや発現量について調べた。

【結果】今回調べた 36 個の PKS 遺伝子は全て各発生段階のいずれかにおいて発現を持つことが分かった。また餌の違いにおける結果は、5 個の PKS 遺伝子に発現量の変化が見られ、特に *steelyA* と脂肪酸合成酵素遺伝子である *pks16* に大きな変化が見られた。Cd^{2+}の存在下で発生させた結果は、発現パターンに大幅な変化は見られなかったが、8 個の PKS 遺伝子に発現量の変化が見られた。しかし、それらの変化は小さく、*D.discoideum* においてポリケタイドは、環境応答分子というよりはむしろ、発生分化の調整に主に関わっているのではないかと考えられる。

Dictyostelium, polyketide, cadmium

講演番号：2B23p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ B 校舎 23 会場

細胞性粘菌の予定柄細胞分化誘導に関するポリケタイド合成酵素の働き

Functional analysis of polyketide syntheses that regulate *Dictyostelium* prestalk differentiation

佐藤 有紀江[1]、○加賀美 太平[2]、齋藤 玉緒[2]([1]上智大院理工、[2]上智大理工)
Yukie Sato[1], ○Taihei Kagami[2], Tamao Saito[2] ([1]Grad. sch. of Sci. and Tech, Sophia Univ., [2]Fac. of Sci. and Tech, Sophia Univ.)

【目的】本研究では細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* における予定柄細胞分化誘導因子の探索を通して、ポリケタイド合成酵素の働きを解明することを目的とする。
【背景】ポリケタイドは植物や微生物などで酢酸・マロン酸経路によって生産され、抗生物質や抗腫瘍物質などの有用な生理活性物質として注目されている化合物である。土壌微生物であり、社会性アメーバとして知られている細胞性粘菌 *D. discoideum* は 45 個ものポリケタイド合成酵素(PKS)遺伝子を持っており、分子生物学的手法が用いやすい対象であることから、ポリケタイド研究において有用な生物といえる。
細胞性粘菌は、通常は土壌中のバクテリアを捕食して単細胞のアメーバとして生活しているが、飢餓をきっかけとした無性生殖サイクルでは細胞集合により多細胞体を形成する。多細胞体は一連の形態形成過程を経て、胞子と柄の二種類の細胞からなる子実体を形成する。
細胞性粘菌 *D. discoideum* におけるポリケタイドの役割は主に細胞間コミュニケーションや分化誘導であると考えられているが多くが未解明である。
【方法】*D. discoideum* で初めて発見された 2 つの新規ハイブリッド型ポリケタイド合成酵素(SteelyA, SteelyB)は、本来独立して働いている I 型 PKS と Ⅲ型 PKS が融合した構造を持ち、共に分化誘導因子の生合成に関わっている。また、これら 2 つの *stl* 遺伝子は細胞性粘菌の多くの種で保存されている。更に、*D. discoideum* との近縁種では *pks2* 遺伝子が保存されているが、他の多くの *pks* 遺伝子は種間で保存されているものがない。一方で細胞性粘菌の柄分化はポリケタイドによって誘導されることが明らかになっている。そこで保存されている 3 つの *pks* が協調して柄の主要な部分を誘導しているのではないかと考え、それぞれの二重遺伝子破壊株を作製し、予定柄細胞マーカー遺伝子の発現を観察した。
【結果】*stlA*/*stlB* 二重遺伝子破壊株と *pks2* 遺伝子破壊株において、マーカー遺伝子の発現異常が見られた。このことから、*stlA* と *stlB* が協調して働いている可能性や既知の化合物以外にも産物がある可能性が考えられる。また、*pks2* は予定柄細胞の位置情報に関与している可能性が示唆された。これらの遺伝子破壊株の作製・解析により、細胞性粘菌における柄細胞分化誘導機構はこれまで考えられていた以上に複雑であることが推察される。

Dictyostelium, polyketide, differentiation

講演番号：2B23p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ B 校舎 23 会場

細胞性粘菌における新規ハイブリッド型ポリケタイド合成酵素の分子進化的解析
Molecular evolutional analysis of novel hybrid type polyketide synthases in the cellular slime mould

○李 哲熙[1]、齊藤 玉緒[2]([1]上智大院理工、[2]上智大学理工)
○Tetsuhiro RI[1], Tamao Saito[2] ([1]Grad. sch. of Sci. and Tech., Sophia Univ, [2]Fac. of Sci. and Tech., Sophia Univ.)

【目的】土壌微生物の細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* において通常 3 種に分類されてきたポリケタイド合成酵素(PKS)のうちⅠ型とⅢ型のハイブリッドした非常に珍しい構造の PKS である SteelyA および SteelyB が発見された。これらの酵素は *D. discoideum* の最終形態である子実体の柄と胞子への分化誘導を行う物質、DIF-1(Differentiation Inducing Factor-1)および MPBD(4-methyl-5-pentylbenzene-1,3-diol)を合成することも明らかにされた。近年他の細胞性粘菌においてもゲノム解析が進み、進化的に離れ子実体の形態が明らかに異なる種や柄細胞を形成しない種においても Steely 酵素遺伝子の存在が明らかになってきたことから、他種においても DIF-1 や MPBD が合成されているのかという疑問が生じた。そこで *D. discoideum* の複数の近縁種を用いて Steely の産物がどのように変化してきたかを、Ⅲ型 PKS を中心とした分子進化的な観点から解析を行った。

【方法】細胞性粘菌は SSU-rRNA 系統解析によって 4 つのグループに大別されることがわかっており、ゲノム解析の結果と合わせて *stlA,B* 遺伝子はグループ 3 以外の全てのグループにおいて発見された。これを踏まえ当実験では *D. discoideum* の近縁種でありゲノム情報が未解析である以下の 5 種を対象とし、*stlA,B* 遺伝子の検索を行った。用いたのは *D. discoideum* と同じグループ 4 に属する *D. dimigraformum*、*D. mucoroides*、*D. firmibasis*、グループ 3 と 4 の中間である *Polysphondylium violaceum* およびグループ 3 の *D. vinaceo-fuscum* である。*stlA,B* 遺伝子が存在したものに関してはそれらのⅢ型 PKS の立体構造解析を行った上で、*D. discoideum* と同様に DIF-1 ないしは MPBD の合成を行っているかの解析を行った。

【結果】5 種すべてにおいてⅠ型とⅢ型のハイブリッドした PKS、すなわち *stl* 遺伝子が発見され、アミノ酸アライメントにおいても既存の遺伝子とほぼ一致する形となり、TypeⅢPKS の活性中心周辺についても同様であった。DIF-1 および MPBD が上記の 5 種に実際に存在するのか、生化学データに基づいて検討したい。

Dictyostelium, Steely, polyketide

講演番号：2B23p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ B 校舎 23 会場

新規ハイブリッド型ポリケタイド合成酵素 SteelyA による形態形成制御機構の解明
SteelyA, a novel hybrid type polyketide synthase, regulates the chemotaxis and spore maturation in *Dictyostelium discoideum*
○成田 隆明[1]、加賀美 春奈[2]、齊藤 玉緒[2] ([1]上智大院理工、[2]上智大理工)
○Takaaki Narita[1], Haruna Kagami[2], Tamao Saito[2] ([1]Grad. sch. of Sci. and Tech., Sophia Univ., [2]Fac. of Sci. and Tech., Sophia Univ.)

【目的】Steely酵素はI型とIII型のポリケタイド合成酵素 (PKS)が融合した新規ハイブリッド型酵素であり、細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum*で初めて発見された。Steely酵素は細菌・植物以外で初めて発見されたIII型PKSであると同時に、天然で唯一発見されたハイブリッド型酵素である。そのため、新規有用物質の開発やコンビナトリアル生合成への応用などが期待されている酵素であり、その基礎的理解は非常に重要である。2種類存在するSteely酵素のうち、本研究の対象であるSteelyAは*in vivo*で4-methyl-5-pentylbenzene-1, 3-diol (MPBD)を合成しており、この物質は胞子成熟を誘導していることがこれまでの我々の研究により明らかとなった。しかしその詳細な機構は未解明である。また、SteelyA遺伝子 (*stlA*)の発現時期から、SteelyAは*D. discoideum*の発生過程において初期にも何らかの働きをしていると考えられた。そこで本研究では、SteelyAの発生初期における機能解析、およびSteelyAの産物であるMPBDによる胞子形成機構の解明を目的とした。
【方法】SteelyA遺伝子破壊株 (*stlA*$^-$株)を用いて、発生初期における表現型の観察を行った。そして表現型の欠損がMPBDを加えることで回復するのか検証した。また、*stlA*$^-$株に分化マーカー遺伝子のプロモーターにより制御された*lacZ*遺伝子を導入することにより、分化マーカー遺伝子の空間的発現解析を行った。
【結果】*stlA*$^-$株の発生初期における表現型の観察を行った結果、*stlA*$^-$株は野生株 (Ax2)に比べて細胞集合の開始が遅れ、さらにAx2に比べ小さな多細胞体を形成する様子が観察された。Ax2の細胞はcyclic adenosine monophosphate (cAMP)に対する走化性を示したが、*stlA*$^-$株はAx2に比べcAMPに対する走化性の比率が減少していた。しかし、このcAMPに対する走化性の欠損はMPBDを加えることで回復した。よって、SteelyAの産物であるMPBDは胞子成熟を誘導する物質であると同時に、*D. discoideum*の発生初期においては細胞の走化性獲得に関与していると考えられる。また、*stlA*$^-$株は発生の最終段階において、予定胞子細胞マーカー遺伝子の空間的発現がAx2とは異なることがわかった。しかしこの欠損はMPBDを加えることで回復したことから、MPBDは発生の最終段階で作用している事が示唆された。そこで、*stlA*$^-$株の発生最終段階のみにMPBDを加えた場合の胞子形成率を調べたところ、発生初期~中期にはMPBDが存在しないにも関わらず、*stlA*$^-$株の胞子の欠損は回復した。
以上より、SteelyAの産物であるMPBDは、発生初期においては細胞の走化性獲得に関与しており、発生の後期においては最終段階で作用して胞子成熟を誘導していると考えられる。

Dictyostelium, polyketide, MPBD

講演番号：2B23p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ B 校舎 23 会場

Gluconobacter melanogenes 由来の４－ケトアラボン酸合成酵素の酵素学的解析
Enzymatic analyses of 4-ketoarabonate synthase derived from *Gluconobacter melanogenes*
○大石 裕美[1]、田副 正明[2]、小林 節子[3]、星野 達雄[2] ([1]玉川大院農、[2]玉川大学術研究所、[3]株式会社ハイファジェネシス)
○HIROMI OISHI[1], Masaaki Tazoe[2], Setsuko Kobayashi[3], Tatsuo Hoshino[2] ([1]Tamagawa Univ., [2]Tamagawa Univ. Lab., [3]HyphaGenesis Inc.)

【目的および背景】４－ケトアラボン酸（４ＫＡ）は、Ｄ－酒石酸の原料となる有用な物質である。Ｄ－酒石酸は光学活性を有する農薬や医薬品製造の際の原料として使用されている。*Gluconobacter melanogenes* は、グルコースからグルコン酸、２－ケトグルコン酸、２，５－ジケトグルコン酸（ＤＫＧＡ）を経て４ＫＡを生産する。しかし、ＤＫＧＡから４ＫＡ変換機構については未だ明確になっていない。そこで *G. melanogenes* のＤＫＧＡから４ＫＡの生成に関与する酵素を精製し、酵素学的諸性質を調べると共に、その変換経路の酵素学的な解明を試みた。
【方法および結果】酵素活性は、ＤＫＧＡを基質として生成した４ＫＡ量をＨＰＬＣで定量することにより測定した。本酵素の局在性を調べたところ、細胞膜に分布していることから、菌体をビーズ破砕し、得られた無細胞抽出液を１００ｋ×ｇで７０分間、遠心を行い、膜画分を取得した。本酵素は、膜画分を２００ ｍＭ ＫＣｌを含む２０ ｍＭ ＭＯＰＳ（ｐＨ ７.０）緩衝液中で２％ Ｔｗｅｅｎ８０により可溶化された。得られた可溶化液を２段階の疎水クロマトグラフィーによって分画を行った結果、本酵素は電気泳動的に均一に精製された。本酵素はゲルろ過により９２.２ ｋＤａの分子サイズを有し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより４６.１ ｋＤａのサブユニットから構成される二量体であると推定された。精製された本酵素は、単独でＤＫＧＡから４ＫＡを生成したことから、脱炭酸反応、脱水素反応を同時に触媒する多機能性膜結合型酵素であると推定された。さらに精製酵素を用いて至適ｐＨ、至適温度、反応への酸素要求性、基質特異性などの酵素学的諸性質を調べた。本酵素はｐＨ４.５～７で高い活性を示し、また２５～３５℃で高い活性を示した。酵素の保存に関しては、４０℃以下、ｐＨ７．５以下で安定であった。ＥＤＴＡ処理による活性の低下は認められなかった。チアミンピロリン酸、$MnCl_2$の添加で活性は促進された。また、本酵素の基質特異性を調べた限りでは、ＤＫＧＡのみを基質とし、反応に酸素を必要としなかった。

4-ketoarabonate synthase, Gluconobacter melanogenes, D-tartaric acid

講演番号：2B23p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ B 校舎 23 会場

親水性イオン液体 [BMIM][Cl] 耐性菌由来の protease の諸性質の検討

Characterization of extracellular protease from hydrophilic ionic liquid [BMIM][Cl]-tolerant bacteria

○妹尾 文哉[1]、龍波 拓磨[2]、池田 泰之[2]、倉田 淳志[1,2]、岸本 憲明[1,2] ([1]近畿大院農、[2]近畿大)
○Humiya SENOO[1], Takuma TATSUNAMI[2], Yasuyuki IKEDA[2], Atsushi KURATA[1,2], Noriaki KISHIMOTO[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kinki Univ., [2]Fac. of Agric., Kinki Univ.)

【目的】イオン液体はアニオンとカチオンから構成され、常温常圧で液体の塩である。不揮発性や難燃性を示すため安全性が高い。アニオンとカチオンの組み合わせを変化させることで、親水性や疎水性を示すイオン液体を調製可能である。親水性イオン液体は、セルロースやケラチンなどの難水溶性バイオマスを溶解できるため、バイオマス利用技術に応用されつつある。イオン液体は溶媒として有用性が高いが、高濃度の親水性イオン液体中では酵素が変性して失活する。さらに 1% 親水性イオン液体や疎水性イオン液体存在下で *Escherichia coli* の生育は阻害された。そのため高濃度の親水性イオン液体中で利用できる酵素や微生物の開発が期待されている。昨年度、我々は親水性及び疎水性イオン液体存在下で生育する *Staphylococcus* sp. FSW1 をくさや漬け汁から単離し、本菌株が、10% 1-Butyl-3-methylimidazolium chloride ([BMIM][Cl]) 耐性菌であることを明らかにした [1)]。本年度は、さらに親水性イオン液体存在下で生育する微生物を探索し、得られた菌株が生産する酵素の諸性質の解明を試みた。
【方法・結果】 60 種類の海水や土壌、塩分を含む食品サンプルを単離源として、[BMIM][Cl] 存在下で生育する微生物を探索した。その結果、京都味噌から CMW1 株を見いだした。16S rRNA 遺伝子解析の結果、CMW1 株は、*Bacillus* 属細菌であると示された。CMW1 株は、10% [BMIM][Cl] 存在下で良好に生育し、培養液上清中においてプロテアーゼ活性を検出できた。硫酸アンモニウム沈殿、Phenyl sepharose と DEAE sephadex を用いたカラムクロマトグラフィーにより、本酵素を電気泳動的に均一になるまで精製した。精製酵素を用いて、諸性質の検討を行った。本酵素反応の最適 pH は 8.0~9.0 であった。最適反応温度は 55℃ であり、$CaCl_2$ の添加により 65℃ となった。本酵素は、pH 4.0~12.5 で安定であった。10% [BMIM][Cl] 存在下では本酵素反応は 45% の活性を示した。[BMIM][Cl] を用いて酵素安定性を検討したところ、80% [BMIM][Cl] 存在下まで安定であった。N 末端アミノ酸配列解析の結果、本酵素はズブチリシン BPN` と 79% の相同性を示した。
1) 妹尾ら、2012 年度日本農芸化学会大会講演要旨集 3C25p15

ionic liquid, protease, Bacillus

講演番号：2B23p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ B 校舎 23 会場

難分解性タンパク質分解酵素の作用機序の解明
Functional analysis of genetic variation in PrPSc degrading enzyme (NAPase)
○宮末 慎弥[1]、満生 慎二[2]、境 正志[2]、後藤 正利[3] ([1]九産大院工、[2]九産大、[3]九州大)
○Shinya MIYASUE[1], Shinji MITSUIKI[2], Masashi SAKAI[2], Masatoshi GTOU[3] ([1]Kyusyusanngyo Univ., [2]Kyusyusanngyo Univ., [3]Kyusyu Univ.)

【目的】NAPAse は好アルカリ性放線菌 TOA-1 から分離した難分解性タンパク質分解酵素であり、その諸性質や構造は解明されている。しかし、作用機序は憶測の域を出ない。遺伝子工学的手法による解析により、ある領域が分解酵素活性の発現に寄与することが推測されたが直接的要因が証明されていない。本研究では、大量かつ短時間でタンパク質を生産する大腸菌 *E.coli* を宿主として行い、活性型 NAPase の取得と、同時に推測領域の変異型 NAPase の製作また、特性解析をおこなった。
【方法・結果】初めに活性型 NAPase の取得として、発現遺伝子である *nap A* を導入した発現ベクターpET32b pronap を大腸菌 *E.coli* BL21 (DE3)に導入し、組換え NAPase を得た。しかし、不溶性凝集体として発現してしまったため、活性は示さなかった。そのため、in vitro リフォールディング操作が必要となり条件の探索を行った。条件探索を行った結果、変性剤は 8 M urea buffer を使用し、リフォールディング最適条件として、100 倍希釈法、希釈液： 50 mM Tris-HCl buffer in 1 M Arg (pH 7.0)、温度：15~20℃であった。また、濃縮・精製法も決定した。リフォールディング液の濃縮法としては、限界ろ過膜クロスフロー法による 5 倍濃縮が行え、精製法としては、CM-Toyopearl イオン交換クロマトグラフィー法において、分画サンプルの一部を SDS-PAGE による分子量推定行った結果、目的タンパク質量と合致した。
現在、酵素活性推定領域の変異型遺伝子の作製を行っており、こちらを使用して発現させた変異型酵素特性解析も併せて報告する予定である。

protease, in vitro refolding, Nocardiopsis sp. TOA-1.

講演番号：2B23p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ B 校舎 23 会場

Burkholderia 属最近株 β-フェニルアラニンアミノアシラーゼの組換え発現と精製

Expression and purification of recombinant β-phenylalanin aminoacylase derived from *Burkholderia* sp

○若林 佳佑[1]、山崎 穣[2]、橋本 賢一[1,2]、夏目 亮[1,2]、川崎 寿[1,2]、中松 亘[1,2]（[1]東電大院工・物質工、[2]東電大工・環境化）
○Keisuke WAKABAYASHI[1], Minoru YAMASAKI[2], Kenichi HASHIMOTO[1,2], Ryo NATSUME[1,2], Hisashi KAWASAKI[1,2], Tsuyoshi NAKAMATSU[1,2] ([1]Mat.Sci.Eng.TDU, [2]Green.Sust.Chem.TDU)

【背景】*R*体のβ-フェニルアラニン(*R*-β-Phe)は、抗がん剤の一種 TAXOL の原料となる有用な物質である。化学合成法でβ-Phe を合成すると *S*体も生成してしまうため、効率的に光学分割できる方法の開発が待ち望まれている。環境に対して低負荷にβ-Phe を光学分割するプロセスの開発を念頭に、我々は、アミノ基をアセチル化したβ-Phe((*R*, *S*)-*N*-Ac-β-Phe)をキラル特異的に加水分解できる酵素β-Phe アミノアシラーゼに着目した研究を行っている。*N*-Ac-β-Phe を基質としてβ-Phe アミノアシラーゼを利用して *R*-β-Phe を光学分割する本法の利点は、(i)反応で生じる副産物が酢酸のみであること、(ii)別の部位を化学修飾したβ-Phe を基質に用いて光学分割するよりも高いキラル特異性が見込めることである。*R*体特異性を示すβ-Phe アミノアシラーゼの生産菌を自然界からスクリーニングした結果、*Burkholderia* 属細菌ならびに *Variovorax* 属細菌が得られた。

【目的】高性能な酵素の開発を念頭に、β-Phe アミノアシラーゼの構造機能相関を明らかにすることを目的としている。本研究では *Burkholderia* 属細菌由来β-Phe アミノアシラーゼについて、遺伝子のクローニング、大腸菌を用いた組換え発現系の構築、酵素精製系の確立、酵素の諸性質の解析を行う。

【方法・結果】*Burkholderia* 属細菌のゲノム中より(*R*)-β-Phe アミノアシラーゼ遺伝子を PCR で増幅してクローニングを行った。Cold ショックプロモーターを利用する発現プラスミドを構築し、(*R*)-β-Phe アミノアシラーゼを大腸菌内で高発現させることもできた。酵素の精製系についてもほぼ確立したため、酵素の諸性質について検討している。本発表では、当該酵素の発現、精製、諸性質の解析結果について報告する。

β-phenylalanine, aminoacylase, optical resolution

講演番号：2B23p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ B 校舎 23 会場

Variovorax 属細菌由来*(R)*-β フェニルアラニンアミノアシラーゼの組換え発現と精製
Expresssion and purification of recombinant ß-phenylalanine aminoacylase derived from *Variovorax. sp*

○井桁 啓介[1]、二階堂 圭輔[2]、夏目 亮[1,2]、川崎 寿[1,2]、中松 亘[1,2]、橋本 賢一[1,2]([1]東電大院工・物質工、[2]東電大工・環境化)
○Keisuke IGETA[1], Keisuke NIKAIDO[2], Ryo NATSUME[1,2], Hisashi KAWASAKI[1,2], Tsuyoshi NAKAMATSU[1,2], Kenichi HASHIMOTO[1,2] ([1]Mat.Sci.Eng.TDU, [2]Green.Sust.Chem.TDU)

【背景】*R* 体の β-フェニルアラニン(*R*-β-Phe)は、抗がん剤の一種 TAXOL の原料となる有用な物質である。化学合成法で β-Phe を合成すると *S* 体も生成してしまうため、効率的に光学分割できる方法の開発が待ち望まれている。環境に対して低負荷に β-Phe を光学分割するプロセスの開発を念頭に、我々は、アミノ基をアセチル化した β-Phe((*R, S*)-*N*-Ac-β-Phe)をキラル特異的に加水分解できる酵素 β-Phe アミノアシラーゼに着目した研究を行っている。*N*-Ac-β-Phe を基質として β-Phe アミノアシラーゼを利用して *R*-β-Phe を光学分割する本法の利点は、(i)反応で生じる副産物が酢酸のみであること、(ii)別の部位を化学修飾した β-Phe を基質に用いて光学分割するよりも高いキラル特異性が見込めることである。*R* 体特異性を示す β-Phe アミノアシラーゼの生産菌を自然界からスクリーニングした結果、*Burkholderia* 属細菌ならびに *Variovorax* 属細菌が得られた。*Variovorax* 属細菌由来 β-Phe アミノアシラーゼについてはショットガンクローニング法を用いて当該酵素遺伝子が得られた。

【目的】高性能な酵素の開発を念頭に、β-Phe アミノアシラーゼの構造機能相関を明らかにすることを目的としている。本研究では *Variovorax* 属細菌由来 β-Phe アミノアシラーゼについて、大腸菌を用いた組換え発現系の構築、酵素精製系の確立、酵素の諸性質の解析を行う。

【方法・結果】を N 末端に His タグを付加した *(R)*- Phe アミノアシラーゼを大腸菌内で発現し、Ni^{+} アフィニティークロマトグラフィーにより His タグ付加 *(R)*- Phe アミノアシラーゼを精製した。His タグをプロテアーゼにより切断後、再度の Ni^{+}アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを行うことで高純度な試料を精製できるようになった。得られた試料を用いて、酵素の諸性質について検討している。本発表では、当該酵素の発現、精製、諸性質の解析結果について報告する。

β-phenylalanine, aminoacylase, optical resolution

講演番号：2B23p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ B 校舎 23 会場

担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 による西洋ワサビペルオキシダーゼの異種発現最適化
Optimization of horseradish peroxidase heterologous expression in a basidiomycete yeast *Cryptococcus* sp. S-2

○歌島 悠[1,2]、松本 弘嵩[1]、岸本 高英[1]、柳谷 周作[1]、正木 和夫[2,3]、家藤 治幸[4] ([1]東洋紡、[2]広大院・生物圏、[3]酒総研、[4]愛媛大・農)
○ YU UTASHIMA[1,2], HIROTAKA MATSUMOTO[1], TAKAHIDE KISHIMOTO[1], SHUSAKU YANAGIDANI[1], KAZUO MASAKI[2,3], HARUYUKI IEFUJI[4] ([1]TOYOBO, [2]Hiroshima Univ., [3]NRIB, [4]Ehime Univ.)

【目的】

西洋ワサビペルオキシダーゼ(以下 HRP)は、過酸化水素とメディエーターの酸化反応を触媒する酵素であり、臨床検査や食品加工、分子生物学試験など様々な分野で利用される酵素である。一方、担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 は生デンプン分解アミラーゼや生分解プラスチック分解クチナーゼなどの多様な酵素を生産すると共に、キシラナーゼプロモーターを用いた異種タンパク質高発現宿主として発現系が構築されてきた。

HRP はタンパク質 1 分子中に 1 分子のヘム鉄と 2 分子のカルシウムを含む、ヘム結合型タンパク質であり、その異種発現に関しては、*Saccharomyces cerevisiae* や *Pichia pastoris*, *Escherichia coli*, タバコ細胞などを用いて行われてきたが、その発現は非常に難しく、生産性は最大でも約 6.2mg/L(*Pichia pastoris*)程度と非常に低いことが報告されている。本研究では、HRP の *Cryptococcus* sp. S-2 による組換え大量発現を試みた。

【方法、結果】

HRP 遺伝子を *Cryptococcus* sp. S-2 の発現ベクターpCsUX2 にクローニングし、*Cryptococcus* sp. S-2 の形質転換体を取得したが、その発現は確認されなかった。そこで、HRP 遺伝子全長を *Cryptococcus* sp. S-2 で高発現する遺伝子のコドンユーセージに合わせて最適化し、同様に形質転換体を取得したところ、活性型で HRP が発現することを確認した。

次に、転写が正常に行われているかどうかを確認するため、3’ RACE によって、転写産物の解析を行ったところ、コドン最適化遺伝子では、遺伝子全長が転写されているのに対して、野生型遺伝子では、遺伝子の途中で poly(A)付加が起こり、転写が停止していることが判明した。また、定量 RT-PCR によって、mRNA の転写量を比較したところ、最適化遺伝子は野生型遺伝子の約 4000 倍量転写されていた。

次に、HRP の生産量を向上させるため、N 末端の分泌シグナル配列の置換と C 末端の液胞滞留シグナル配列の除去を検討したところ、HRP の生産量は最大で約 9.9 倍に向上した。

以上の結果から、コドンユーセージの最適化による転写量の増加と、シグナル配列の置換による、分泌効率化により、HRP の生産量が向上したと考えられる。

heterologous expression, horseradish peroxidase, *Cryptococcus* sp. S-2

講演番号：2B23p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ B 校舎 23 会場

Ralstonia sp. NT-80 由来ラクトン特異的エステラーゼの機能解析
Functional analysis of lactone-specific esterase from *Ralstonia* sp. NT-80
○太田 友彦[1]、岩間 佑介[1]、並木 謙太[1]、月村 亘[1]、赤沼 元気[1]、牛尾 一利[2]、石塚 盛雄[1]([1]中央大理工応化、[2]新居浜高専生物応化)
○ tomohiko OHTA[1], yusuke IWAMA[1], kenta NAMIKI[1], wataru TSUKIMURA[1], genki AKANUMA[1], kazutoshi USHIO[2], morio ISHIDUKA[1] ([1]Chuo Univ., [2]Niihama Nati. col. tech.)

Ralstonia sp. NT-80（旧名 *Pseudomonas* sp. NT-40）由来エステラーゼ（Est80）は細胞内膜にゆるく結合した膜表在性タンパク質で、その遺伝子は当研究室においてトリブチリン寒天プレート選択法でクローニングされたものである。本酵素は大腸菌 BL-21 (DE3)および pET41b(+)を用いた大量発現系により発現され、機能解析によりカルボン酸エステル、特に三種のラクトン化合物に対して高い特異性を有したエステラーゼであることが明らかにされた。ラクトン化合物は医薬品や香料等の合成中間体として利用されていることから、ラクトン特異的に作用する本酵素は有用な研究対象であると言える。一方、我々は本酵素の機能向上を目的として、進化分子工学的手法で様々な変異を本酵素に導入することで、ラクトン特異性を保持したまま、熱安定性を約 12℃向上させた変異体を得ることに成功した。そこで、野生体、変異体タンパク質の双方を精製し、導入した変異がもたらす酵素特性変化について詳細に解析した。その結果、変異体タンパク質では熱耐性以外にも、有機溶媒耐性や尿素による変性に対する耐性も向上していることが分かった。立体構造予測によれば本変異体においてアミノ酸置換はタンパク質表面に存在する残基で起きており、このような観察は進化分子工学法によって熱安定性の向上したタンパク質においてよく見られるものであるとされている。実際にこの変異が本酵素の立体構造にどのような変化を起こし、機能向上をもたらしているのかを明らかにするため、現在本酵素の結晶化を試みている。しかしながら、本酵素は疎水性が非常に高く、機能的な状態で精製するためには界面活性剤による可溶化が必要であった。そこで、結晶化に実績のあるいくつかの界面活性剤を用いて精製を行い、立体構造解析に適した機能的なエステラーゼの獲得を目指した。最も効果的だった界面活性剤は *n*-Dodecyl-β-D-maltoside（DDM）であり、回収率は 86%、最終的なエステラーゼの純度は 77%であった。

一方、*in vivo* において本酵素がどのような働きをしているのかを理解するための一助として、転写単位、および転写開始点の同定を行った。本酵素をコードする遺伝子は、直上流の oxidoreductase をコードする遺伝子とオペロンを組んでおり、oxidoreductase 遺伝子の翻訳開始点から上流 20 bp の位置に転写開始点が存在していた。RT-PCR の結果、本酵素は NT-80 の対数増殖期から発現していることが判明した。

Ralstonia, lactone-specific esterase, *n*-Dodecyl-ß-maltoside

講演番号：2B23p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ B 校舎 23 会場

酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 が行う酢酸発酵における膜結合型アルデヒド脱水素酵素の役割

Roles of a membrane-bound aldehyde dehydrogenase complex in the acetic acid fermentation of thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* SKU1108

児玉 知大[1]、○薬師 寿治[1]、松谷 峰之介[1]、ティーラグール ガンジャナ[2]、松下 一信[1] ([1]山口大・農、[2]カセサート大・理)
Tomohiro KODAMA[1], ○ Toshiharu YAKUSHI[1], Minenosuke MATSUTANI[1], Gunjana THEERAGOOL[2], Kazunobu MATSUSHITA[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Kasetsart Univ.)

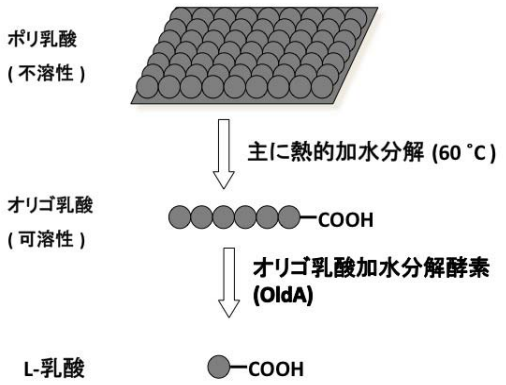
【はじめに】酢酸発酵は酢酸菌に特徴的であり，２つの膜結合酵素によって行われる。アルコール脱水素酵素（ADH）はエタノールを酸化してアセトアルデヒドを生じ，さらにアルデヒド脱水素酵素（ALDH）がアセトアルデヒドを酢酸へ酸化する。精製酵素をもとにクローニングされた遺伝子から推測されたアミノ酸配列から，ALDH は次の３つのサブユニットから構成されると考えられる。補欠分子族にモリブドプテリンを持つ触媒サブユニット（AldH），３つのヘムＣを含むシトクロム *c* サブユニット（AldF），２つの［2Fe-2S］クラスターを含むサブユニット（AldG）である。ALDH が試験管内でアセトアルデヒドの酸化を触媒することが示されているものの，酢酸発酵における役割は十分に示されていない。本研究では逆遺伝子的なアプローチによって，酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 の ALDH 遺伝子の酢酸発酵における重要性を評価した。
【結果と考察】マーカーフリーで，インフレームの *aldH* 遺伝子の破壊株（Δ*aldH* 株）を作製した。この Δ*aldH* 株は，4%エタノールを添加した培地（酢酸発酵条件）で十分な生育が出来ず，酢酸発酵能を失っていた。さらに *aldH* を持つプラスミドにより，生育能と酢酸生成能が回復した。すなわち，酢酸発酵において ALDH が重要な役割をもっているということを証明することができた。膜画分の ALDH 活性を，フェリシアニドを電子受容体として測定したところ，Δ*aldH* 株は野生株よりも低下していたが，野生株の約 30%の活性を示した。Δ*aldH* 株を 4%エタノール培地で培養を試みても生育できないが，このとき，野生株と比べて著量のアセトアルデヒドを培地中から検出した。このことは，ALDH 活性を失った Δ*aldH* 株は，ADH が触媒する反応によって生じたアセトアルデヒドを酢酸に酸化できず，そのまま培地中に残すことを示す。この蓄積したアセトアルデヒドによって，生育が抑制されたと考察した。60°C 処理による ADH の失活を利用した実験から，Δ*aldH* 株に残存する ALDH 活性は，ADH 分子に由来しないことを確認した。ドラフトゲノム解析から，本菌は，*aldSLC* と名付けたもう一つの ALDH のホモログを持つことを見いだした。野生株と Δ*aldH* 株の膜画分のアセトアルデヒドに対する K_M 値を求めたところ，Δ*aldH* 株のそれは野生株に比べ高かった。以上の結果から，本研究で破壊した *aldFGH* 遺伝子の産物は，高親和性の ALDH で酢酸発酵に不可欠である。一方，Δ*aldH* 株で残存している 30%程度の活性はもう一つの *aldSLC* 遺伝子が担っているが，アセトアルデヒドへの親和性は低く，それだけでは酢酸発酵に貢献することはできないと考察できる。

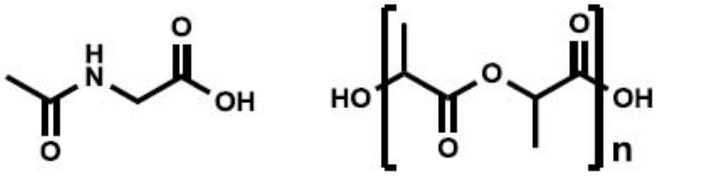
acetic acid bacteria, acetaldehyde, aldehyde dehydrogenase

講演番号：2B23p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ B 校舎 23 会場

Brevibacillus sp. 93 株の産生するオリゴ乳酸分解酵素に関する研究
Characterization of the oligo lactic acid degrading enzyme produced by *Brevibacillus* sp. strain 93
○佐藤 友彦[1]、中川 甲斐[1]、遠藤 睦子[1]、冨田 耕右[2]、金子 淳[1]、阿部 直樹[1]([1]東北大院農・生物産業創成、[2]関東学院大・工)
○Tomohiko SATO[1], Kai Nakagawa[1], Mutuko Endo[1], Kousuke Tomita[2], Jun Kaneko[1], Naoki Abe[1]
([1]Tohoku Univ., [2]Kantogakuin Univ.)

【目的】*Brevibacillus* sp. 93 株は堆肥中の発酵熱に相当する 60˚C の環境でポリ乳酸（PLA）を分解する菌として単離された好熱性 PLA 分解細菌である。今回の発表では、本菌の生産するオリゴ乳酸（低分子可溶性ポリ乳酸）分解酵素（OldA）の諸性質について報告する。
【方法と結果】本菌の培養上清から精製したオリゴ乳酸分解酵素が N-Ac-Gly や N-Bz-Ala のアミド結合を分解する amidohydrolase 様活性を保持していることを見出した。そこでデータベース上から検索した amidohydrolase のコンセンサス配列を基に合成したオリゴヌクレオチドプライマーを用い、本酵素遺伝子（*old*A）のクローニングを行った。その結果、*old*A は *Brevibacillus brevis* NBRC100599 株の amidohydorolase 遺伝子（*ama*A）と高い相同性（同一性/類似性：87%/95%）を示した。*old*A を pET22b ベクターにライゲーション後、*E. coli* BL21 (DE3)にて C 末端 His_6 融合タンパク質として発現させ、Ni^{2+}カラム、陰イオン交換カラムを用いて組換え酵素（rOldA）を精製した。rOldA について諸性質を調べた結果、オリゴ乳酸（乳酸の重合度 6 以下）を基質にした場合の至適温度は 60˚C、至適 pH は 9.0 を示した。また、合成ペプチドに対する基質特異性を調べた結果、活性認識にはアミド結合とそれに隣接するカルボニル基が必要であることが判明し、OldA はオリゴ乳酸のエステル結合を誤認識して分解することが明らかとなった。以上の結果より、本菌による 60˚C におけるポリ乳酸分解メカニズムを下図のように提案した。





N-Ac-Glycine のアミド結合　　ポリ乳酸のエステル結合

poly lactic acid, amidohydrolase, oligo lactic acid

講演番号：2B23p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ B 校舎 23 会場

アリシクロバチルス溶菌酵素の探索
Screening of Alicyclobacillus lytic enzyme
○湯川 清孝[1]、森 梢[2]、金子 幸弘[3]、高木 瑛実子[1]、秦田 勇二[1,2] ([1]横浜市立大学、[2]海洋研究開発機構、[3]国立感染症研究所)
○Kiyotaka Yukawa[1], Kozue Mori[2], Yukihiro Kaneko[3], Emiko Takagi[1], Yuji Hatada[1,2] ([1]Yokohama City Univ., [2]Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, [3]National Institute of Infectious Diseases)

【背景および目的】
現在、清涼飲料水業界および原料業界を軸に食品原料全般への汚染が懸念されている。食品の原料（果汁・液糖等）の変敗原因として、耐熱性好酸性菌（Thermo-Acidophilic Bacilli 以下 TAB）の増殖が挙げられる。中でも、*Alicyclobacillus acidterrestris* は増殖に伴い、グアイアコールという異臭を放つガスも生成するため、果実飲料等を製造する清涼飲料水業界ではこの *A. acidterrestris* の制御や殺菌が製品の品質向上・保持を必要としている。しかし、本菌は芽胞を形成し、非常に強い耐熱性を有するため、通常の熱処理による除去は困難である。そこで、本研究では TAB 菌の一種である *A. acidterrestris* を溶菌対象とした溶菌酵素の探索とその性質解析を主目的とする。

【方法および結果】
深海由来の放線菌 410 株のスクリーニングを行った。スクリーニング方法としては、培養上清液を粗酵素溶液としてペーパーディスクに染み込ませた後 *A. acidterrestris* の培養プレート上に乗せる固体法と、*A. acidterrestris* 培養液に対して、目的酵素を添加し 580nm 下での菌体濁度（吸光度）の変化をみる液体法の 2 種を用いた。スクリーニングによって海洋研究開発機構保有の放線菌 410 株のうち *Streptomyces* sp. No.22 に高い溶菌活性が見られたため、選定菌とした。次に、選定菌のゲノム DNA 回収を行い、PCR と DNA シークンエンス解析により選定菌の 16SrRNA 遺伝子の情報を得た。その結果、選定菌が *Streptomyces somaliensis* の類縁で有る事が推定された。続いて、*A. acidterrestris* に対する溶菌物質の精製を行った。*Streptomyces* sp. No.22 の培養上清液から溶菌酵素を精製するため、3 種類の樹脂（陰イオン交換樹脂、ハイドロキシアパタイト、Cibacron Blue F3G-A）を用いて液体クロマトグラフィーを行った。SDS-PAGE による精製物確認において、ゲル上の 24kDa 付近に単一のタンパク質のバンドが見られたため、これを最終精製物とした。最終精製物を濃縮し、溶菌酵素の PVDF 膜への転写を行い、エドマン分解法により N 末端アミノ酸配列の決定を行った。本アミノ酸配列を用いてプライマーを設計し、PCR にて目的遺伝子を増幅した。その後、DNA シークエンス解析によって、本酵素遺伝子の配列を決定した。本遺伝子から推定されるタンパク質の分子量は 24kDa であり、精製酵素の SDS-PAGE 上での分子量と一致した。また、本酵素の至適活性条件や、リゾチームとの性質比較を検討した。

deep-sea, Alicyclobacillus, lytic enzyme

講演番号：2B23p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ B 校舎 23 会場

好アルカリ性バシラスの推定 L-ホモ型ポリ-γ-グルタミン酸合成酵素
A candidate system for poly-γ-L-glutamate synthetase from alkalophilic *Bacillus*
○芦内 誠、山本 孝、清水 一希、小松 和也（高知大院農）
○Makoto Ashiuchi,Takashi Yamamoto,Kazuki Shimizu,Kazuya Komatsu (Kochi Univ.)

【背景】ポリ−γ−グルタミン酸（ＰＧＡ）は納豆の糸の主成分として有名だが、最新研究によれば、納豆菌に限らず、比較的多くの生物種でＰＧＡ生産が認められることが報告されている。なかでも、極限環境微生物と呼ばれる一群の生物種で立体規則性に優れたＰＧＡが環境適応因子として生産されていることが分かってきた。例えば、好アルカリ性の *Bacillus halodurans* C-125 では L−グルタミン酸のみからなる L−ＰＧＡが合成され、これがアルカリ耐性化に深く関わると予想されている。興味深いことに、*B. halodurans* ゲノムの配列分析はＰＧＡ合成オペロン（*pgs*）が存在しないことを明らかにした。すなわち、立体規則性 L−ＰＧＡは D−グルタミン酸に富む混成ＰＧＡを合成する納豆菌型の既知システムとは全く異なる機構で合成されていることを意味している。
【目的】我々は、*B. halodurans* の全ゲノム配列を再精査し、シアノファイシンと呼ばれるらん藻のポリアミノ酸（主鎖はポリ−(−L−アスパラギン酸）の合成酵素とアミノ酸配列上類似する仮想タンパク質、並びにこれらをコードする遺伝子クラスターに注目した。具体的には三つの相同遺伝子が近接して存在していたことから、これらにコードされるタンパク質を各々暫定的に Plg1、Plg2、Plg3 と名付けた。今回、これらの大腸菌内での発現系を構築するとともに、酵素科学的性質を調べた。
【方法と結果】Plg1、Plg2、Plg3 をコードする各遺伝子を PCR で増幅した。この際、各々の遺伝子産物のカルボキシル基末端にヒスチジンタグが配置するようにデザインしたプライマーを用いた。大腸菌発現ベクターpTrc99A に各種増幅断片を組み込み、pPLG1、pPLG2、pPLG3 の各ベクターを構築した。次いで大腸菌 JM109 に導入し各 Plg 酵素の生産系を構築した。酵素精製は Ni−キレートアフィニティークロマトグラフィーに基づいて実施した。基質依存的な ATPase 活性を指標に各 Plg 酵素の機能を調べたところ、Plg2 酵素に L−グルタミン酸依存 ATPase 活性が認められた。一方、D−グルタミン酸ではこの反応は進行しなかった。他の酵素にこのようなアミノ酸依存的な ATPase 機能は認められなかったが、代わりに Plg1 酵素ではテトラ−γ−L−グルタミン酸存在下で微弱ながら ATPase 活性を示した。そのため、相同酵素に関してはペプチド依存的な ATPase 機能を示す可能性がある。いずれにしても、このような段階的伸長反応（ブロック合成）を経てＰＧＡが生産されることを示す報告はこれ以外になく、新たな基質認識とペプチド連結機構の発見が待たれる。現在、最適酵素システム構築の必要性から各 Plg 酵素の組み合わせによる新機能開発を進めている。また、産業上の有用性が示された L−ＰＧＡの効率的な酵素合成法についても検討している。

poly-γ-L-glutamate, synthetase, alkalophilic *Bacillus*

講演番号：2B23p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ B 校舎 23 会場

好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 が生産するケラチン分解性細胞外プロテアーゼ巨大分子複合体に関する研究ー電子顕微鏡による構造解析と観察される小胞についてー
Study of a macromolecular complex of keratinolytic protease produced by a thermophilic bacterium, *Meiothermus ruber* H328
○片岡 真亜知[1]、山岡 昂太[1]、川崎 一則[2]、茂里 康[2]、渡部 邦彦[1] ([1]京都府大院、[2]産総研・健康工学)
○ Maachi Kataoka[1], Akito Yamaoka[1], Kazunori Kawasaki[2], Yasushi Shigeri[2], Kunihiko Watanabe[1] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]AIST)

【目的】好熱性細菌*Meiothermus ruber* H328株は、本研究室で有馬温泉の土壌から単離され、難分解性タンパク質であるトリ羽毛ケラチンを強力に分解する[*]。この分解に関わるケラチン分解性細胞外プロテアーゼは、動的光散乱により分子量1.5×10^8 Daと推定される巨大分子複合体を形成する。さらに界面活性剤 (例えば30% (w/v)SDS)、有機溶媒 (例えば60% クロロホルム)等の超強力変性剤に対して非常に高い耐性を示す。この驚異的な安定性には、巨大分子複合体の分子構造が関与している可能性がある。そこで本研究では、この巨大分子複合体構造の解明を目的として、巨大分子プロテアーゼ活性画分をショ糖密度勾配遠心により精製・分離し、電子顕微鏡による構造解析を行った。
【方法】3% (w/v)羽毛含有YS培地 (0.5% yeast extract, 0.5% sucrose, 0.5% $CaCO_3$)、60˚C、37 h振盪培養後の培養上清を回収した後、限外濾過 (分画分子量500 kDa)濃縮、ゲル濾過クロマトグラフィー (Sephacryl S-1000, 分画分子量1.0×10^8 Da)により巨大分子プロテアーゼ活性画分を分離し、20-60%ショ糖密度で超遠心を行った。得られた活性画分サンプルに対しネガティブ染色 (1% 酢酸ウラニル)を行い、透過型電子顕微鏡 (FEI, Tecnai G2F20)による観察を行った。加えて、フリーズ・フラクチャー・レプリカ (FFR)法による電子顕微鏡観察も行った。
【結果】限外濾過濃縮サンプルでは、分子直径約30-40 nmの粒子を中心に、より小さな微粒子から約200-300 nmの大きな粒子まで様々なサイズの粒子が観察された。Sephacryl S-1000により、排除容積に溶出される高分子でケラチン分解活性の強い画分 (Peak 1)と、それより低分子でケラチン分解活性の弱い画分 (Peak 2)の2画分が得られた。Peak 1では分子直径30-40 nmの粒子を中心に、より大きいサイズの直径100-400 nmの粒子が多数確認できた。一方で、Peak 2では直径約10 nm以下の小さい粒子のみが確認できた。また、ショ糖密度勾配遠心により分離された活性画分 (35-50%画分)ではFFR法により、直径100-200 nmの脂質二重膜様構造の小胞が確認できた。活性を持たない画分とは異なり、活性画分で観察された膜構造表面上には、直径10 nm以下の粒子が多数存在することが確認でき、これがプロテアーゼタンパク質分子である可能性が示唆された。多くのグラム陰性細菌が小胞を産生することは知られているが、好熱性グラム陰性細菌である*Meiothermus*属において小胞が産生されるというのは初めての知見である。

[*]*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82,941-950 (2009)

thermophile, protease, complex

講演番号：2B23p17
講演日時、会場：3 月 25 日 17:12～ B 校舎 23 会場

トリ羽毛分解活性を持つ好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株のゲノム解析と ゲノム情報を用いたケラチン分解性プロテアーゼ巨大複合体に含まれる構成成分タンパク質の検索
Genome analysis of *Meiothermus ruber* H328 degrading intact chicken feathers and identification of protein components included in a macromolecular complex of keratinolytic protease(s)
稲田 秀平[1]、片岡 真亜知[1]、松井 一真[2]、森坂 裕信[2]、植田 充美[2]、○渡部 邦彦[1] ([1]京都府大院生環、[2]京都大院農)
Shuhei Inada[1], March Kataoka[1], Kazuma Matsui[2], Hironobu Morisaka[2], Mitsuyoshi Ueda[2], ○Kunihiko Watanabe[1] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株は、難分解性のトリ羽毛ケラチンを強力に分解できる。このトリ羽毛分解には複数の酵素群が関与していると考えられるが、中でも特に重要な役割を果たすとされる分泌型のケラチン分解性プロテアーゼは、界面活性剤や有機溶媒といった変性剤に対して著しい耐性を示し、さらに巨大な複合体を形成していることが分かっている。そこでこのプロテアーゼ複合体の構成成分および本酵素以外の他の酵素群を検討し、これらの酵素群によるトリ羽毛分解機構やケラチン分解性プロテアーゼの安定性機構を解明することを目的に、本研究では H328 株ゲノム DNA の全塩基配列を決定し、本菌株が有する遺伝子の全容解明を行っている。
【方法・結果】H328 株ゲノムの全塩基配列を決定するため、まずゲノム DNA を次世代シーケンサーにより配列決定した。種の基準株である DSM 1279 株の既知ゲノム塩基配列 (3,097,457 bp) を対照として、約 3.0 Mbp のドラフトゲノムが構築できた (カバー率 98.66%)。また配列未決定な gap 領域は 55 ヶ所で、PCR によりこの gap 領域を増幅後キャピラリーDNA シーケンサーおよび次世代シーケンサーで個別に配列決定したところ、現在までに 47 ヶ所の配列決定を行うことができた (カバー率 99.81%)。この暫定的な H328 株ゲノムの塩基配列情報に対し、BLAST 検索により基準株の遺伝子群との相同性を調べ、H328 株ゲノムに含まれる遺伝子を同定した。基準株の持つ 3,052 個の遺伝子のうち 2,874 個が H328 株においても相同性を示す遺伝子として存在し、そのうちペプチダーゼ／プロテアーゼ遺伝子を 78 個同定できた。さらにこれらに対しシグナル配列の有無や細胞内局在を調査し、トリ羽毛分解に関与している可能性のある酵素遺伝子を計 26 個特定した。
　他方で H328 株ゲノムの塩基配列情報を用い、本菌株が生産する巨大なケラチン分解性プロテアーゼに対して MALDI-TOF/MS 解析を行ったところ、複数の細胞表層を構成するタンパク質および分泌型の機能未知タンパク質を同定できた。このうち機能未知タンパク質の 1 つは、ゲノム上において分泌型のセリンペプチダーゼ遺伝子とオペロン構造を保持していることが示唆されたため、これらが積極的にトリ羽毛分解に関わることが期待できる。またこのプロテアーゼ複合体は電気泳動的に分離できないタンパク質を多く含むため、未だ全ての構成成分タンパク質、特にペプチダーゼ／プロテアーゼを同定するには至っていない。そこで現在、タンパク質の前処理など MALDI-TOF/MS 解析の条件検討を行うことで、他の酵素群を同定しようと試みている。

protease, thermophile, genome

講演番号：2B23p18
講演日時、会場：3 月 25 日 17:24～ B 校舎 23 会場

α-N-acetylgalactosaminidase を用いた糖ペプチドの合成
Studies on α-N-acetylgalactosaminidase for the synthesis of glycopeptide
○山口 竜也[1]、浅野 健太郎[1]、橋本 賢一[1]、宮崎 達雄[2]、川崎 寿[1]、夏目 亮[1]、鰺坂 勝美[2]、中松 亘[1] ([1]東電大院・工・物質工、[2]新潟薬大・応生科)
○ Tatsuya Yamaguchi[1], Kentaro Asano[1], Kenichi Hashimoto[1], Tatsuo Miyazaki[2], Hisashi Kawasaki[1], Ryo Natsume[1], Katsumi Ajisaka[2], Tsuyoshi Nakamatsu[1] ([1]Dept. Mat. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng., Tokyo Denki Univ., [2]Dept. Appl. Life Sci.,Niigata Univ. Pharm.)

【背景・目的】微生物由来α-*N*-acetylgalactosaminidase を用いた O 型糖ペプチド合成法を確立し、ペプチド糖鎖の機能解析を行うことを目的としている。本研究では、当該酵素活性を示す微生物を自然界からスクリーニングし、その酵素の性質を明らかにするとともに、ペプチドの Ser 側鎖への糖転移反応を解析する。
【方法・結果】mucin 含有固体培地を用いて単離した微生物群から endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase 活性を有する微生物を取得した。それらを mucin 含有液体培地で培養し、培養液上清中の endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase 活性を Galβ1-3GalNAcα-*O*-*p*NP に対する加水分解能を指標として評価した。これまでに、高い活性を示す菌株 No.802.1d と No.703.1a を得ている。No.802.1d は mucin を C 源とする培地で培養したときのみ、酵素活性が認められた。No.703.1a は mucin だけでなくポリペプトンを C 源とする培地で培養した場合でも酵素活性が確認できた。No.703.1a の生産する酵素は、Galβ1-3GalNAcα-*O*-*p*NP に対して No.802.1d よりも高い活性を示した。他の基質に対する加水分解能も調べてみたところ、No.802.1d が生産する酵素は、Galβ1-3GalNAcα-*O*-*p*NP に対して活性を示したが､他の基質に対しては活性を示さなかった。No.703.1a の生産する酵素は、Galβ1-3GalNAcα-*O*-*p*NP だけでなく GalNAcα-*O*-*p*NP、GalNAcβ-*O*-*p*NP、GlcNAcβ-*O*-*p*NP に対しても加水分解活性を示した。No.703.1a の生産する酵素について精製を進め、Galβ1-3GalNAcα-*O*-*p*NP に対して活性を示す endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase と他の基質に活性を示す酵素を分離し、目的の酵素を得ることができた。No.802.1d と No.703.1a 両菌株の当該酵素の精製を行い、これらの精製酵素を用いて合成反応の確認を行っている。なお、No.802.1d については粗酵素ながら合成反応が確認できており、No.703.1a については精製酵素を用いて合成反応を検討している。本発表では No.703.1a の生産する酵素の諸性質と糖ペプチド合成反応について報告する。

endo-alpha-N-acetygalactosaminidase, exo-alpha-N-acetygalactosaminidase

講演番号：2B23p19
講演日時、会場：3 月 25 日 17:36～ B 校舎 23 会場

枯草菌細胞壁合成に関与する酵素を用いた新規ペプチド合成法

Novel peptide synthesis using microbial enzyme

○荘 葉[1]、橋本 義輝[1]、安部 智子[2]、葛 寅[1]、熊野 匠人[1]、小林 達彦[1] ([1]筑波大院・生命環境、[2]東電大・理工)
○ Ye ZHUANG[1], Yoshiteru HASHIMOTO[1], Tomoko ABE[2], Yin GE[1], Takuto KUMANO[1], Michihiko KOBAYASHI[1] ([1]Grad. School of Life and Environm. Sci., the Univ. of Tsukuba, [2]School of Sci. and Eng., Tokyo Denki Univ.)

【目的】

Pseudomonas chlororaphis B23 菌のニトリル遺伝子クラスター下流に存在するアシル CoA 合成酵素 (AcsA) は、脂肪酸と CoA のチオエステル結合形成を触媒してアシル CoA を合成する。本酵素において、 CoA の代わりに、同じくチオール基を持つ化合物である L-Cysteine を基質として反応させた場合、アミド結合を持った産物である N-acyl-L-cysteine が生産され、本来のチオエステル結合 (-CO-S-) 形成だけではなく、アミド結合 (-CO-NH-) 形成をも触媒することを当研究室の先行研究で明らかにした。また、このアミド結合形成反応はアセチル CoA 合成酵素やルシフェラーゼにも見られ、adenylate-forming superfamily に属する酵素が普遍的に持つ活性であると考えられた。

枯草菌などの一部のグラム陽性菌は、ペプチドグリカンとともに細胞壁を構成するテイコ酸に D-Alanine を結合する一連の反応に関わる *dlt* オペロンを持つ。本オペロン中の DltA は、D-Alanine をアシル側基質とし、キャリアタンパク質である DltC のホスホパンテテイン補欠分子族のチオール基に D-Alanine をチオエステル結合で付加する反応を触媒する。DltA も adenylate-forming superfamily に属すことから、本酵素におけるアミド結合形成能を調べることを目的とした。

【方法・結果】

大腸菌を宿主とした DltA の発現系を構築し、DltA を大量に精製した。本酵素を用いて D-Alanine と DltC の代わりに L-Cysteine を基質として反応し、HPLC による反応産物の分離および LC-MS/MS 分析を行った。その結果、反応産物を D-Alanine と L-Cysteine がアミド（ペプチド）結合した N-D-Alanyl-L-cysteine と同定し、 DltA も新規アミド結合形成能を持つことを実証した。D-Alanine の代わりに様々なアミノ酸を L-Cysteine とともに基質として反応した産物も LC-MS/MS によりペプチドであることを同定し、本酵素を利用した新しいペプチド合成法を開発した。

adenylate-forming superfamily, amide bond, thioester bond

講演番号：2B24a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ B 校舎 24 会場

改良型酵素を用いたゲラニオール関連物質の微生物生産

Bacterial production of Geraniol and its related compounds using laboratory-engineered geraniol synthase

○岩嵜 美希、藤井 爽、梶原 順、古林 真衣子、斎藤 恭一、梅野 太輔（千葉大院・工・共生応化）
○Miki IWASAKI,Akira FUJII,Jun KAJIWARA,Maiko FURUBAYASHI,Kyoichi SAITO,Daisuke UMENO (Dept. Appl. Chem. Biotech., Chiba Univ.)

1.目的　ゲラニオールは、商業生産されている重要なモノテルペンのひとつであり、香料として年間 50 tの需要がある。その他に、ビタミンや香料原料である酢酸ゲラニルなどの合成原料としても利用される。本研究室では，カロテノイド色素の合成経路によってテルペン合成酵素の細胞内活性を可視化する手法(特開 2011-125334A)を開発してきた。本研究では、この手法を用いてゲラニオール合成酵素（GES）の宿主細胞内における発現量および活性（細胞内活性）を向上させることによって、ゲラニオール生産の効率を向上することを目指した。

2. 方法と結果　細胞内局在シグナル配列を含むN末端から 52 アミノ酸分を除去した変異体(GES_{M53})の遺伝子全域を変異PCR法によってランダム化しライブラリを作製した。その全遺伝子を含む領域を鋳型にして、ランダムに変異を導入したライブラリを作製した。基質消費スクリーニングを用いて、その中からより細胞内活性の高いGES変異体を複数得た。これらの遺伝型およびWestern解析から、GES細胞活性の向上の殆どが翻訳量の向上による細胞内の有効酵素濃度の向上によるものであることが示唆された。この知見をもとに、RBS Calculator (Salis HM, 2009 *Nat Biotech*) を用いて、翻訳効率を種々（RBS score 800 - 2,000,000）に設定したGESの発現コンストラクトのシリーズを作製し、上流経路を強化した大腸菌株に導入した。そのゲラニオール生産効率はRBS score 40,000 で飽和し、15 mg /L /15hであった。

一方、ゲラニオールの大腸菌生産株に pACYC 系のプラスミドを共存させると、ゲラニオールが未検出となり、かわりに酢酸ゲラニルが検出された。種々の検討の結果、pACYC の発現する選択マーカ（CAT, Chroramphenicol acetyl transferase）がゲラニオールを効率的にアセチル化することが分かった。酢酸ゲラニルは、ゲラニオールと同様に香料として広く利用される化合物である。GES 生産プラスミドと pACYC 系プラスミドを共導入した大腸菌は 15 mg /L /15h の酢酸ゲラニルを蓄積した。

terpene, directed evolution, high throughput screening

講演番号：2B24a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ B 校舎 24 会場

新規低分子ゲル化剤としての *l*-メントールマルトシドの酵素的合成

Enzymatic Synthesis of *l*-Menthyl Maltoside Exhibiting Properties as a Novel Low-Molecular-Weight Gelator

○井手 浩平、小林 慶一、本田 裕樹、桐村 光太郎（早大理工応化）
○Kohei IDE,Keiichi KOBAYASHI,Yuki HONDA,Kohtaro KIRIMURA (Dept. Appl. Chem., Fac. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】*l*-メントールは天然のハッカ油に含まれ、清涼剤や香料として有用な化合物であるが、水溶性が低く(18.9 mg/100 ml, 20°C)揮発性を有するためにその利用範囲には限界があった。本研究では*l*-メントールを出発基質として、*l*-メントールの配糖体である*l*-メンチルα-マルトシド(*l*-α-MenG$_2$)を微生物由来の酵素を用いた三段階の反応により選択的に合成した。さらに*l*-α-MenG$_2$が低分子ゲル化剤として機能することを見出し、その諸性質を検討した。

【方法および結果】*Xanthomonas campestris* WU-9701由来のα-グルコース転移酵素XgtA[1)]を用いて*l*-メントールとマルトースから*l*-メンチルα-グルコシド（*l*-α-MenG）を合成した[2)]。さらに、*l*-α-MenGを可溶性デンプン溶液に加え*Bacillus macerans*由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを作用させたのち、*Aspergillus oryzae*由来のα-アミラーゼによる位置選択的な加水分解処理を行うことにより、供与*l*-α-MenG当たり74.2%の収率で*l*-α-MenG$_2$を合成した[2)]。*l*-α-MenG$_2$は*l*-メントールの約1570倍の高い水溶性(29.6 g/100 ml, 20°C)を示し、さらに水溶液は30 g/l以上の濃度において熱可逆的かつ迅速なゾル-ゲル転移を示した。ゾル-ゲル転移温度は30 g/lで12°C、 250 g/lで24°Cと*l*-α-MenG$_2$濃度の増加に伴い上昇した。一方で、同様の方法により合成した*d*-メントールおよび*d*-iso-メントールのα-マルトシドはゲル化剤としての機能を示さなかった。したがって、*l*-α-MenG$_2$の低分子ゲル化剤としての機能は立体構造に基づく固有の性質と判明した。

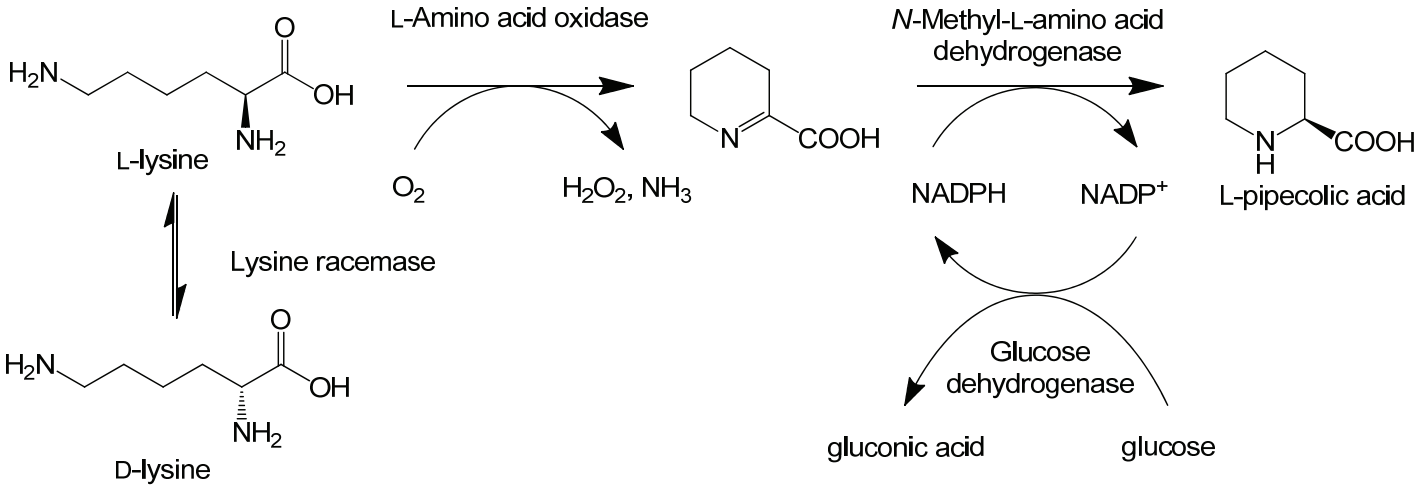
(1) Sato T, et al., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **80**, 20-27 (2012).
(2) K. Kirimura *et al*., J. Biosci. Bioeng., **89**, 138-144 (2000); ibid, **94**, 119-123 (2002).

Enzymatic reaction, Low-molecular-weight gelator, Menthyl maltoside

講演番号：2B24a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ B 校舎 24 会場

dl-Lysine を原料とした one-pot での L-pipecolic acid 合成方法の開発
One-pot synthesis of L-pipecolic acid from *dl*-lysine.
○三宅 良磨[1,2]、出来島 康方[1,2]、由上 亮一[3]、谷 泰史[3]、三原 久明[3]、川端 潤[1,2] ([1]三菱化学科学技術研究センター、[2]エーピーアイコーポレーション、[3]立命館大・生命科学・生物工)
○Ryoma Miyake[1,2], Yasumasa Dekishima[1,2], Ryoichi Yukami[3], Yasushi Tani[3], Hisaaki Mihara[3], Hiroshi Kawabata[1,2] ([1]Mitsubishi Chemical Group Science and Technology Research Center, [2]API Corporation, [3]Dept. Biotechnol., Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

【目的】光学活性非天然環状アミノ酸は医薬品の重要中間体として広く利用されており、効率的な合成法の確立が求められている。既に弊社では*N*-メチルアミノ酸デヒドロゲナーゼ(NMAADH)を用いて、L-lysineを原料としたL-pipecolic acid合成プロセスの構築に成功している [(1)]。本研究では当プロセスの効率化、および適用可能基質の拡充を目的として、NMAADH、グルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)、アミノ酸オキシダーゼおよびアミノ酸ラセマーゼの4遺伝子共発現大腸菌を用いたラセミ体基質からの光学活性環状アミノ酸の生産方法の開発を行った。
【方法・結果】L-Lysine に特異的に作用し、かつ大腸菌で高発現可能なアミノ酸オキシダーゼとしてマサバ *Scomber japonicus* 由来 lysO が知られている [(2)]。これに加えてリジンラセマーゼ、NMAADH、GDH を含む合計 4 遺伝子を発現するプラスミドを構築した。本プラスミドを保持する組換え大腸菌を用い、*dl*-lysine を原料とした休止菌体反応を行うことで、one-pot 反応による高光学純度の L-pipecolic acid を生産することに成功した。(1)特許 JP4590981、(2)由上ら、第 85 回生化学会大会



L-pipecolic acid, lysO, NMAADH

講演番号：2B24a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ B 校舎 24 会場

可溶性エポキシドハイドロラーゼ阻害活性をもつ新規 SMTP 同族体の作用解析

Evaluation of novel SMTP congeners with an inhibitory potency against soluble epoxide hydrolase

○大竹 新也[1]、長谷川 啓子[2]、西村 直子[2]、鈴木 絵里子[1]、蓮見 惠司[1]([1]東農工大農、[2]株式会社ティムス)
○Shinya OTAKE[1], Keiko HASEGAWA[2], Naoko NISHIMURA[2], Eriko SUZUKI[1], Keiji HASUMI[1]
([1]Tokyonoko Univ., [2]TMS Co., Ltd)

【目的】

糸状菌 *S. microspora* が生産するトリプレニルフェノール化合物の一群であるSMTP同族体は血栓溶解促進作用を有する化合物として発見された。SMTP分子は、クロマンラクタムとイソプレン側鎖から成る基本骨格とラクタム窒素に結合した側鎖（N側鎖）から構成されており、培養培地に添加するアミンの種類を変えることによりN側鎖の異なる50数種類のSMTP同族体を生産することができる。SMTPの作用機序としてプラスミノゲン活性化を促進するモジュレーター活性による血栓溶解作用、そしてsoluble epoxide hydrolase (sEH) の阻害による抗炎症作用であることが示唆されており、同族体の種類によりこれらの活性は大きく変化することが分かっている。また、sEHは2つの生理的に重要な酵素活性（エポキシドハイドロラーゼ活性とホスファターゼ活性）を有する酵素であるが、既にN側鎖構造の異なる同属体については構造活性相関情報を得ている。一方で基本骨格の活性への影響に関する情報がなかった。そこで本研究では、SMTPのイソプレン側鎖の構造が異なる新規のSMTP同族体を微生物変換により創製し、sEH阻害の構造活性相関情報を得ることを目的とする。

【方法】

SMTP同族体の内基本骨格に最も近いSMTP-0を使用して、微生物変換による新規同族体の創製を試みた。また、SMTPの生産菌の培養を通常より延長して自己代謝による変換も試みた。変換体の精製は、溶媒抽出、逆相HPLCにより行い、NMR、MS等の機器分析により構造を決定した。さらに、得られた新規同属体７種について、蛍光基質を用いた酵素反応系でsEH阻害活性評価を行った。

【結果】

土壌より分離した真菌をスクリーニングし、変換活性を確認した40株のうち、3株から5種類の新規同族体を単離した。またSMTPの生産菌による自己代謝産物として2種類の新規同族体を単離した。これらの新規同族体は、いずれもイソプレン側鎖の構造が変換された化合物であり、sEHの2つの酵素活性に対して異なる影響の変化を示した。一部の新規同族体はsEH阻害活性の内、ハイドロラーゼ阻害活性を保持したまま、ホスファターゼ阻害活性を失うことが明らかとなった。即ち、イソプレン側鎖の構造変化はsEHのホスファターゼ阻害活性を左右する要素であることが示唆され、新規同族体は現在未解明な、sEHホスファターゼ活性の機能解析に有効な化合物になる。

Bioconversion, Soluble epoxide hydrolase, Inhibition

講演番号：2B24a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ B 校舎 24 会場

CYP110E1 及び P450BM3(F87V)を用いた希少な芳香環ジオール化合物の生産
Production of rare phenolic diol compounds by CYP110E1 and P450BM3(F87V)
○北村 瑛美[1]、位寄 かのこ[1]、寺岡 亜佑子[1]、三沢 典彦[2]、新藤 一敏[1] ([1]日女大家政・食物、[2]石川県大・生資研)
○Emi Kitamura[1], Kanoko Iki[1], Ayuko Teraoka[1], Norihiko Misawa[2], Kazutoshi Shindo[1] ([1]Japan Women's Univ., [2]Ishikawa Prefectural Univ.)

【目的】我々は植物、シアノバクテリアまたは細菌由来の種々のシトクロムP450遺伝子を発現した組換え大腸菌を用いて、様々な化合物への水酸化導入による新規または希少化合物の効率的な創製を目指している。今回は、我々が保有するP450の中で特に種々の芳香環への水酸基導入機能に優れた２種のP450を用いて、フェノールまたはナフトール化合物への水酸基導入研究を実施した。用いたP450は、シアノバクテリア*Nostoc*（*Anabaena*）sp. PCC7120株由来のCYP110E1（プラスミド名：pCYP110E1-Red）[1)]、および細菌*Bacillus megaterium* BM-3株由来のP450BM3において87番目のPheがValに変異したもの(P450BM3(F87V);プラスミド名：pFusionF87V）[2)]である。また、今回用いる基質から得られる変換物は芳香環に２つの水酸基（ジオール）を有する可能性が高く、抗酸化活性を有することが期待される。そこで、本活性についても検討する。
【方法】プラスミドpCYP110E1-RedまたはpFusionF87Vを保持する2種の組換大腸菌の細胞を用いて、市販のphenol類、hydroxybiphenyl類、naphthol類と共培養してバイオコンバージョンを行った。得られた変換物は溶媒分画、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製後、NMR及びMS解析により構造決定を行った。さらにラット脳脂質過酸化抑制評価系により抗酸化活性の検討を実施した。
【結果】
2-phenylphenol, 3-phenylphenol, 4-phenylphenol, 2-chloro-4-phenylphenol, 4-chloro-4'-hydroxybiphenyl, 4-bromo-4'-hydroxybiphenyl, 4-bromophenol, 1-naphthol, 2-naphtholの９つの基質について検討を行い、1-naphthol以外の８基質で変換反応が進行した。全部で11の変換物が得られた。変換反応としては水酸基の導入以外に他にoxidation coupling反応が見られた。CYP110E1およびP450BM3(F87V)では多くの場合、同一の変換物が得られたが、基質に4-chloro-4'-hydroxybiphenyl, 3-phenylphenol, 4-phenylphenolを用いて変換実験を行った場合においては水酸基の導入位置が異なる変換物が得られた。
得られた変換物の多くは*ortho*-diol構造を有していた。これらはラット脳脂質過酸化抑制評価系において、基質に対して100倍程度優れた抗酸化活性を示すことが確認された。
1) T. Makino et al, Microbial Cell Factories 11:95 (2012)
2) N. Misawa et al, Appl. Microbiol. Biotechnol. 90:147-157 (2011)

CYP110E1, P450BM3(F87V), antioxidative activity

講演番号：2B24a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ B 校舎 24 会場

酵素的 Pictet-Spengler 反応によるテトラヒドロイソキノリン類の不斉合成
Asymmetric Synthesis of Tetrahydroisoquinolines by Enzymatic Pictet-Spengler Reaction

○西八條 正克[1]、平井 義則[1]、川野 茂[1]、西山 章[1]、南 博道[2]、片山 高嶺[2]、八十原 良彦[1]、佐藤 文彦[3]、熊谷 英彦[2] ([1]カネカ・フロンティア研、[2]石川県立大、[3]京大院・生命)
○Masakatsu Nishihachijo[1], Yoshinori Hirai[1], Shigeru Kawano[1], Akira Nishiyama[1], Hiromichi Minami[2], Takane Katayama[2], Yoshihiko Yasohara[1], Fumihiko Sato[3], Hidehiko Kumagai[2] ([1]Kaneka Corp., [2]Ishikawa Pref. Univ., [3]Kyoto Univ.)

【背景と目的】イソキノリンアルカロイドは様々な生理活性物質を含む有用な化合物群である。例えば、モルヒネ（鎮痛剤）、パパベリン（鎮痙剤）、ベルベリン（抗菌・抗炎症剤）など実際に医薬品として利用されている化合物も存在する。これまでに様々な植物から多様な構造をもつイソキノリンアルカロイドが多数単離されており、その生合成経路も明らかとなっている。植物体内ではチロシンから誘導されたドーパミンと 4-ヒドロキシフェニルアセトアルデヒドがノルコクラウリンシンターゼ（NCS）の作用により縮合し、(*S*)-ノルコクラウリンが合成する。本化合物はさらに(*S*)-レチクリンへ誘導された後、各種酵素により生理活性のある化合物に変換される。我々はテトラヒドロイソキノリン骨格を形成する NCS に着目し、本酵素を用いた各種光学活性 1-置換テトラヒドロイソキノリンの製造方法の確立を目指した。医薬品中間体として有用な光学活性 1-置換テトラヒドロイソキノリンは、光学分割や不斉還元反応、不斉 Pictet-Spengler 反応により合成できる。しかし、これらの方法はいずれも多段階の反応を必要とし、さらに、分割法は収率が低く、触媒を利用した方法では高価な貴金属や配位子を利用するという課題がある。一方、NCS による酵素的 Pictet-Spengler 反応では、高価な試薬を使わずに一段階の反応で光学活性 1-置換テトラヒドロイソキノリン誘導体を立体選択的に合成することが可能である。
【方法と結果】キンポウゲ科の植物の一種であるオウレン（*Coptis japonica*）由来の NCS を遺伝子組換え大腸菌で生産し、この菌体をそのまま利用して NCS の基質特異性を評価したところ、植物体内で基質として利用されるフェニルアセトアルデヒドよりもアルキル側鎖の長い芳香族アルデヒドや、直鎖状・分岐鎖状のアルキルアルデヒドなどにも作用することが分かった。さらに、本菌体を用いて、いくつかの光学活性 1-置換テトラヒドロイソキノリンの合成を試みたので、その結果を報告する。

Norcoclaurine synthase, Pictet-Spengler reaction, Tetrahydroisoquinoline alkaloids

講演番号：2B24a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ B 校舎 24 会場

旧黄色酵素の構造情報に基づく機能改変と(4*R*,6*R*)-Actinol 生産への応用

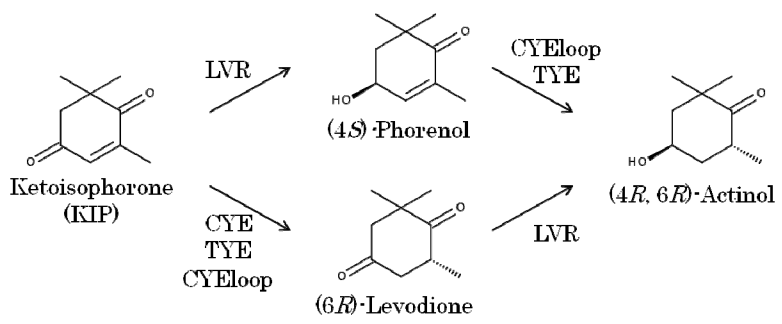
Functional improvement and application to (4*R*,6*R*)-Actinol production based on structural information of an Old Yellow Enzyme

浦野 信行[1]、○三谷 恵一[1]、野村 美佳[1]、堀田 彰一朗[2]、宮川 拓也[2]、田之倉 優[2]、清水 昌[3]、片岡 道彦[2] ([1]阪府大院生環科・応生科、[2]東大院農生科・応生化、[3]京都学園大・バイオ環境)

Nobuyuki URANO[1], ○ Keiichi MITANI[1], Mika NOMURA[1], Shoichiro HORITA[2], Takuya MIYAKAWA[2], Masaru TANOKURA[2], Sakayu SHIMIZU[3], Michihiko KATAOKA[2] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agric. Life Sci., Univ. of Tokyo, [3]Bioenviron. Sci., Kyoto Gakuen Univ.)

【目的】(4*R*,6*R*)-Actinol は 2 つのキラル中心を有し，Zeaxanthin 等の合成中間体として利用される化合物である。本研究では、Ketoisophorone (KIP)から(4*R*,6*R*)-Actinol の効率的な立体選択的生産を目的とする。これまでに本変換反応に適用可能な酵素として、基質特異性の異なる 2 種の旧黄色酵素（*Candida macedoniensis* 由来の CYE 及び *Torulopsis* sp.由来の TYE）と *Corynebacterium aquaticum* 由来の Levodione 還元酵素(LVR)を見出し、それらの遺伝子を発現させた大腸菌を触媒として用いることで KIP の(4*R*,6*R*)-Actinol への変換反応に成功している。しかし、CYE は(4*S*)-Phorenol を不斉水素化できないため、CYE と LVR を用いた系では(4*R*,6*R*)-Actinol だけでなく、多量の(4*S*)-Phorenol が蓄積した。一方で TYE は KIP、(4*S*)-Phorenol の両者に作用するが、CYE に比べ高濃度 KIP において活性が低下するという問題点がある。そこで、更なる生産効率向上のために CYE と TYE の構造解析による基質結合様式を踏まえ、(4*S*)-Phorenol に対する不斉水素化能を付加した数種の改良型 CYE を作成した。本発表では、それら改良型 CYE を用いた KIP の(4*R*,6*R*)-Actinol への変換反応について検討を行ったので、報告する。

【結果】改良型 CYE の中で、特に(4*S*)-Phorenol 不斉水素化能の高い酵素として改良型酵素 CYEloop を選抜した。旧黄色酵素(CYE、TYE、CYEloop)のいずれかを発現させた大腸菌と LVR と補酵素再生に必要な Glucose 脱水素酵素(GDH)を共発現させた大腸菌の２種の菌体を混合して、KIP から(4*R*,6*R*)-Actinol への変換反応を比較したところ、改良型酵素である CYEloop が(4*R*,6*R*)-Actinol を最も高い生成量を示した。また高濃度の KIP 存在下においても活性が維持され、(4*S*)-Phorenol 不斉化能を有していたことから CYEloop は目的とする性質を有する改良型酵素であることが明らかとなった。続いて、CYEloop、LVR と GDH の 3 つの酵素遺伝子を１つの菌体に共発現させた組換え大腸菌を作製し、得られた組換え大腸菌を用いて、高濃度の KIP を用いた(4*R*,6*R*)-Actinol への変換反応を行ったところ、(4*S*)-Phorenol が減少することが確認され、(4*R*,6*R*)-Actinol を高い生成量で得ることに成功した。



Old Yellow Enzyme, Chiral compound, Asymmetric hydrogenation

講演番号：2B24a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ B 校舎 24 会場

テトラヒドロフランをγ-ブチロラクトンに変換する生体触媒の構築
Construction of biocatalyst for bioconversion from tetrahydrofuran to γ-butyrolactone
○田島 誉久、小村 彰裕、中島田 豊、加藤 純一（広島大院先端物質・分子生命）
○Takahisa TAJIMA,Akihiro OMURA,Yutaka NAKASHIMADA,Junichi KATO (Hiroshima Univ.)

【目的】 テトラヒドロフラン（THF）は各種溶媒として幅広く使用されているが、その安定性ゆえに地下水など環境中に長期にわたって残存し、環境汚染を引き起こすことが懸念されている。そこで我々はこれまでに THF を分解する *Rhodococcus aetherivorans* M8 株を分離・同定し、その代謝物解析により γ-ブチロラクトン(GBL)を経由する酸化経路で THF を分解することが推定された。そこで THF 分解機構の一部を利用すれば、THF の代謝産物である GBL に変換することが可能であると考えた。GBL はポリマー原料として有用な C4 化合物の一つである。そこで本研究では、THF から GBL への 2 段階の酸化反応を触媒する酵素遺伝子の同定とこれらを利用した生体触媒の構築を目的としている。
【方法と結果】 次世代シーケンサーによるゲノム解析により 6,534 のコンティグ配列が得られた。Blast 検索により THF の第一段階酸化経路を触媒する THF モノオキシゲナーゼ（TMO）クラスターの存在を確認した。約 8 kbp の配列内に *Pseudonocardia* 属で報告のある THF モノオキシゲナーゼクラスターと同様の遺伝子群が確認された。次に第二段階である γ-ブチロラクトンへの変換を担うアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の選抜を行った。ゲノム配列中に確認された 30 のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子を候補として絞り込みを行った。THF を単一炭素源として培養した菌体より RNA を抽出して RT-PCR を行い、THF で発現誘導される遺伝子の探索を行った。その結果、発現量が顕著であったもののうち、配列全長が得られている遺伝子を用い、TMO と同時に有機溶媒耐性微生物 *Pseudomonas putida* T-57 株に発現させた生体触媒の構築を行っている。

tetrahydrofuran, γ-butyrolactone, bioconversion

講演番号：2B24a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ B 校舎 24 会場

希少不飽和脂肪酸を用いた脂肪酸の構造と抗菌活性との関係の解明

Clarification of relationship between structure of fatty acid and antibacterial activity with rare unsautrated fatty acids

○永尾 寿浩[1]、藤原 邦夫[2]、田中 重光[1]、渡辺 嘉[1]、中野 博文[1]、倉田 淳志[2]、岸本 憲明[2] ([1]阪市工研、[2]近畿大院・農)
○Toshihiro Nagao[1], Kunio Fujiwara[2], Shigemitsu Tanaka[1], Yomi Watanabe[1], Hirofumi Nakano[1], Atsushi Kurata[2], Noriaki Kishimoto[2] ([1]OMTRI, [2]Grad. Sch. of Agric., Univ. of Kinki)

【目的】

Aeromonas hydrophila subsp. *hydrophila* N-6 は、植物油を基質として、原料油脂を構成する脂肪酸の炭素鎖長より 0～4 個短い不飽和脂肪酸と不飽和脂肪族アルコールからなるワックスを菌体内に蓄積する。すなわち、この微生物変換法により、天然油脂中に希少な不飽和脂肪酸（RUFA）を生産することが可能となる。一方、天然油脂中に豊富なリノール酸（9-*cis*,12-*cis*-C18:2）やパルミトオレイン酸（9-*cis*-C16:1）などの不飽和脂肪酸は、*Staphylococcus aureus* などのグラム陽性菌に対する抗菌活性を示すことが既に知られている。そこで本研究では、微生物変換法で調製した RUFA の *Staphylococcus* 属細菌に対する抗菌活性、および様々な既存脂肪酸の同菌株に対する抗菌活性を比較することにより、飽和・不飽和脂肪酸の構造と抗菌活性の関係を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】

オレイン酸（9-*cis*-C18:1）、9-*cis*,12-*cis*-C18:2、α-リノレン酸（9-*cis*,12-*cis*,15-*cis*-C18:3）をそれぞれ含む油脂を添加した培地で、N-6 株を 28℃、5～6 日間振盪培養した。培養液からのワックスの溶媒抽出、ワックスのケン化分解、脂肪酸の溶媒分画、および HPLC 分取により、7-*cis*-C16:1、5-*cis*-C14:1、7-*cis*-C14:1、7-*cis*,10-*cis*-C16:2、5-*cis*,8-*cis*-C14:2、7-*cis*,10-*cis*,13-*cis*-C16:3、5-*cis*,8-*cis*,11-*cis*-C14:3 をそれぞれ精製した。これらの RUFA および市販の各種脂肪酸、合計 29 種類の *S. aureus* NBRC13276 および *S. epidermidis* NBRC100911 に対する抗菌活性を、微量液体希釈法により評価した。その結果、NBRC13276 に対する抗菌活性の場合、9-*cis*-C18:1 の最小発育阻止濃度（MIC）は 630 μg/mL であるのに対して、微生物変換法で調製した 7-*cis*-C16:1 の MIC は、評価した脂肪酸の中で最も低い 8.8 μg/mL であった。この抗菌活性は、マカデミアナッツ油などに含まれ、活性が強いことが公知である 9-*cis*-C16:1 の MIC（19.2 μg/mL）よりも強かった。また、脂肪酸の炭素数と抗菌活性の関係を調べた結果、二重結合数が同じ脂肪酸の間では、抗菌活性が最大となる炭素数があること、その炭素数は二重結合数によって異なること、炭素数と二重結合数が同じ場合、抗菌活性は二重結合の位置に依存することが分かった。

unsaturated fatty acid, antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*

講演番号：2B24a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ B 校舎 24 会場

Gluconobacter frateurii NBRC3285 によるラクトビオン酸生産に関する研究
Oxidation of lacotose by *Gluconobacter frateurii* NBRC3285

○桐生 高明[1]、木曽 太郎[1]、中野 博文[1]、大江 健一[2]、山元 英樹[2]、木村 隆[2]、村上 洋[1]([1]大阪市工研、[2]ユニチカ（株））
○Takaaki Kiryu[1], Taro Kiso[1], Hirofumi Nakano[1], Kenichi Ooe[2], Hideki Yamamoto[2], Takashi Kimura[2], Hiromi Murakami[1] ([1]OMTRI, [2]UNITIKA)

【目的】ラクトビオン酸はラクトースの還元末端がカルボキシル基となったアルドン酸で、腸管内でのカルシウム吸収促進、エコールの産生促進およびビフィズス菌増殖活性等の機能性を示すことが知られている。我々はカスピ海ヨーグルトの発酵菌の一種、*Acetobacter orientalis* がラクトースを酸化しラクトビオン酸を生産することを明らかにし、そのラクトース酸化活性について報告を行っている。しかし、*A. orientalis* のラクトース酸化活性は非常に微弱であり、本酵素の性質解明をさらに進めるためには、より高いラクトース酸化活性を示す酢酸菌の取得が必要となった。

【方法】約 60 種の酢酸菌（*Acetobacter* 属、*Gluconobacter* 属、*Gluconacetobacter* 属）を YPGL 液体培地（0.5%ポリペプトン、0.5%イーストエクストラクト、0.5%グルコース、0.5%ラクトース、0.1%硫酸マグネシウム）を用い、240 振とう/分、27℃で 3 日間培養した。培養後、休止菌体を調製し、1%ラクトースと反応させ生成するラクトビオン酸量を比較し、生成量の多かった *Gluconobacter frateurii* NBRC3285 株を選択した。*G. frateurii* NBRC3285 株のラクトースに対する資化性を調べるとともに、2,6-dichlorophenol-indophenol を用い、休止菌体の酸化活性の至適 pH や基質特異性について調べた。さらに、休止菌体でラクトースを酸化する際に、グルコースを添加して生成するラクトビオン酸を HPAEC-PAD で定量し、ラクトース酸化に対するグルコースの影響を調べた。

【結果】*Gluconobacter* 属及び *Gluconacetobacter* 属は、*Acetobacter* 属よりも高いラクトース酸化活性を示す傾向がみられた。さらに最もラクトースを酸化する活性が高い *G. frateurii* NBRC3285 株を選択した。*G. frateurii* NBRC3285 株の休止菌体の至適 pH は pH 5.0、グルコースに対して高い酸化活性を示す一方、二糖類に対する活性は低く、グルコースに対する活性を 100%としたとき、マルトースに対する活性は 0.25±0.11 %、ラクトースに対する活性は 0.11 %以下であった。上記の結果は、すでに報告している *A. orientalis* の結果と同様の傾向を示したことから、*G. frateurii* NBRC3285 株でも *A. orientalis* と同様の酵素の働きでラクトースが酸化されていると考えられる。さらに、ラクトースを酸化する際にグルコースを添加した場合、グルコース添加量依存的に、ラクトビオン酸の生成が抑えられたことから、阻害形式は不明であるが、ラクトースの酸化は、グルコースにより阻害されることが示唆された。

lactobionic acid, gluconobacter, oxidation

講演番号：2B24a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ B 校舎 24 会場

多様な細菌のゲノム上に存在するハロアルカンデハロゲナーゼの機能解析
Functional analysis of haloalkane dehalogenases from various bacterial genomes

○田中 裕興、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院生命）
○Hiroki Tanaka,Yoshiyuki Ohtsubo,Yuji Nagata,Masataka Tsuda (Tohoku Univ.)

【背景・目的】ハロアルカンデハロゲナーゼ(HLDs)は有機ハロゲン化合物の炭素–ハロゲン原子の結合を加水分解で切断する酵素である。様々な有機ハロゲン化合物が農薬などとして利用されると共に、有用物質の化学合成やゴミ処理の際の副産物として環境中へ放出され、深刻な環境汚染を引き起こしており、多様な基質特異性を示すHLDsは有機ハロゲン化合物分解の鍵酵素として、バイオレメディエーションへの利用が期待されている。一方、ゲノム解析の進展に伴い、多種多様な細菌が推定HLD遺伝子を有していることが明らかになった。本研究では、それらの機能解析を行い、新規反応特性を有するHLDを取得することを目的とした。
【方法】HLDsの加水分解反応にはcatalytic triadと呼ばれる3つのアミノ酸残基が必須である。また、HLDsは配列の系統学的解析から３つのサブファミリー（HLD-I, HLD-II, HLD-III）に分類されるが、HLD-IIIの機能に関する知見は乏しい。そこで、catalytic triadと推定されるアミノ酸残基が保存されたデータベース上の推定HLD遺伝子のうち、HLD-IIIを中心に、多様な環境に棲息する細菌ゲノム由来の９つを選択し、これら遺伝子のコドン使用等を大腸菌での発現に最適化した上で、Hisx6タグを付与して人工合成した。これら推定HLDsを発現させた大腸菌の粗酵素抽出液、および精製酵素の様々な有機ハロゲン化合物に対する活性を、遊離ハロゲンイオンを定量するチオシアン酸第二水銀比色定量法、および検出器にECDを装備したガスクロマトグラフィーで検討した。
【結果】解析した９つ全ての推定HLDsは、一般にHLDsの良い基質である1,3-dibromopropaneに対するHLDs活性を有していたことから、実際にHLDsであると結論した。さらに、このうちのいくつかのHLDsについて18種のハロアルカン類に対する分解活性を検討したところ、既知のものとは異なる基質特異性を示した。すなわち、catalytic triadと推定されるアミノ酸残基を有することなど、ある程度の条件を絞ってデータベースからHLDs遺伝子を探索し、大腸菌での発現に最適化した遺伝子を人工合成する方法は、新規HLDsの取得法として有効であることが示された。また、高温、高塩などの極限環境を含む様々な環境由来の細菌がHLD遺伝子を有していることは、その生理学的意義を考える上で興味深いだけでなく、応用面からも耐熱性や耐塩性などに優れたHLDsの取得も期待できる。

haloalkane dehalogenase, bioremediation, genome

講演番号：2B24a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ B 校舎 24 会場

酵素複合体を導入したシアノバクテリアによるエチレンガス産生

Construction and analysis of recombinant cyanobacterium expressing a chimeric enzyme complex for ethylene production

○神藤 定生[1]、伊藤 ユキ[2]、水戸 菜摘[2]、冨田 英誠[2]、細田 晃文[2]、田村 廣人[2] ([1]名城大理工、[2]名城大農)
○Sadanari JINDOU[1], Yuki Ito[2], Natsumi Mito[2], Hideaki Tomita[2], Akifumi Hosoda[2], Hiroto Tamura[2] ([1]Meijo Univ., [2]Meijo Univ.)

【目的と背景】

エチレンガスは、石油から大量に生産され、様々な石油化学製品を製造する初発物質として極めて重要な工業用原料ガスである。しかし、ナフサを主体とする熱分解によるエチレン生成は、石油を原料としたエネルギー消費型の製造法であるため、脱石油依存、省エネルギーおよび二酸化炭素排出削減を可能にする新規なエチレン製造法の確立は、喫緊の課題である。

セルロース分解性嫌気性菌は、コヘシン・ドックリン結合が高い結合特異性と結合親和性を持つ酵素複合体・セルロソームを形成し、逐次反応活性を上昇させることが報告されている。そこで、演者らは、セルロース分解性嫌気性菌のコヘシン・ドックリン複合体系を利用してエチレンガス生合成に関わる ACC 合成酵素および ACC 酸化酵素を複合体化することで効率的なエチレン生産を期待できると考え、エチレンガス合成型人工酵素複合体の構築を試みた。さらに、省エネルギーおよび二酸化炭素消費型の新規なエチレン製造法を確立するため、合成生物学の手法を用いて構築したエチレン生合成人工酵素複合体を酸素発生型光合成生物であるシアノバクテリアに導入し、二酸化炭素から光合成的にエチレンへ変換させる新規なエチレン生産系の開発を試みたので、その成果を報告する。

【方法および結果】

Synechococcus elongatus PCC7942 (R2-PC)株内で複製可能なプラスミド pUC303 にエチレンガス合成型人工酵素複合体の遺伝子群がコードされた遺伝子を導入し、形質転換した。形質転換によって発現した単一コロニーを釣菌し、BG-11 液体培地を 100 mL 分注したルー氏培養瓶に植菌した。培養は 27℃、エアーポンプによるバブリング(0.5 L/min)、白色蛍光灯の光による連続照明条件下でおよそ $O.D._{730nm}$=1.0 となるように行った。つぎに培養液 10 mL を 20 mL バイアル瓶に分注し密閉した後、27℃、115 rpm で一晩振とう培養した。培養した菌体のヘッドスペースからシリンジで 500 µL 抽出したものを FID 検出による GC で測定した。その結果、組換え *S. elongatus* PCC7942 (R2-PC)株よりエチレンガスの産生を確認した。菌体当たりの最大生産量を示す培養条件をさらに検討したので、これを報告する。

ethylene, cyanobacteria, cellulosome

講演番号：2B24a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ B 校舎 24 会場

Chryseobacterium sp. 5-3B 由来 *N*-アセチルトランスフェラーゼの遺伝子クローニングと発現
Cloning, expression, and characterization of *N*-acetyltransferase from *Chryseobacterium* sp. 5-3B

○竹中 慎治、吉田 健二、本間 悠太、吉田 健一 (神戸大院農)
○shinji Takenaka,Kenji Yoshida,Yuuta Honma,Ken-Ichi Yoshida (Kobe Univ.)

【目的】 我々はこれまでに芳香族および脂肪族アミンのアミノ基を位置または立体選択的に *N*-アセチル化する酵素の特性について報告してきた。単離菌 *Chryseobacterium* sp. 5-3B 株の生産するアセチル CoA 依存的 *N*-アセチルトランスフェラーゼ（NatA）は、キラルな脂肪族アミンである 2-フェニルグリシンの L-体に対してのみ活性を示す特異な酵素であった。[1)] 本研究では、酵素化学的諸性質を調べることを目的とし、同酵素の遺伝子（*natA*）のクローニングおよび発現を試みたので報告する。

【方法】 酵素精製 : 既報の方法[1)] を基にゲル濾過クロマトグラフィーのステップを加え、親株 5-3B の細胞抽出液からの NatA 精製酵素を調製した。酵素活性：アセチル CoA 共存下酵素反応を行い、2-フェニルグリシンの *N*-アセチル化物である 2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸の生成量または遊離 CoASH 量を定量した。遺伝子発現：*natA* 断片を pET28b ベクターに組み込み、大腸菌 BL21 株に導入して得られた形質転換株で発現させた。

【結果】 本酵素の N 末端アミノ酸配列（19 a.a.）および *Chryseobacterium* 属細菌のゲノム情報を基に見出した保存領域を参考に、5-3B 株ゲノム DNA から PCR にて目的とする遺伝子をクローニングした。塩基配列から推定される一次配列は 162 a.a.であり、分子質量は 18.1 kDa であった。形質転換株を 37℃で培養して組み換え酵素（rNatA）を発現させると多くが不溶性タンパク質であったが、IPTG 添加後に 15℃で 24 時間培養すると可用性画分に活性体として回収することができた。His-tag カラムにて精製した rNatA を用いて酵素の性質を調べた。2-フェニルグリシンのクロロやヒドロキシル誘導体などの類縁化合物について基質特異性試験をした。本酵素の基質特異性は高く、2-フェニルグリシンおよび 2-クロロフェニルグリシンに対して高い活性を示した。最適条件下で L-2-フェニルグリシンに対する酵素反応速度論量を求めたところ、*Km* 値および *Vmax* 値はそれぞれ 175±18 μM および 42±4 μmol･min^{-1}･mg protein^{-1} であった。アシル CoA に対する特異性を試験したところ、本酵素はアセチル CoA 以外にプロピオニル CoA やブチリル CoA のアシル基を 2-フェニルグリシンのアミノ基に転移することができた。 1）日本農芸化学会 2012 年度大会（京都、3C23a01）

Chryseobacterium, 2-phenylglycine, N-acetyltransferase

講演番号：2B24a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ B 校舎 24 会場

Whole-cell biocatalyst を用いた立体選択的アミノ酸酸素添加反応の検討
Stereoselective bioconversion of amino acids with Whole-cell biocatalyst
○日比 慎[1]、笠原 拓也[2]、河嶋 隆志[2]、高橋 里美[1]、小川 順[2]（[1]京大院農・産業微生物、[2]京大院農・応用生命）
○Makoto HIBI[1], TAKUYA KASAHARA[2], TAKASHI KAWASHIMA[2], SATOMI TAKAHASHI[1], JUN OGAWA[2] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】
本研究室ではアミノ酸酸素原子添加酵素の一種である Fe(II)/α-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ（Fe/αKG-DO）を対象とした新規酵素触媒の開発を実施してきた。これまでに様々な微生物種より多種多様な Fe/αKG-DO 類を取得しており、数多くのキラル水酸化アミノ酸やキラルアミノ酸スルフォキシドを高変換率かつ高光学純度で生成することが可能となっている。本講演ではこれらの Fe/αKG-DO 類を産業用酵素触媒として有効に利用するため、Whole-cell biocatalyst を用いたアミノ酸変換反応の検討を行った。
【手法】
Bacillus thuringiensis 2e2 株由来の遊離型 L-アミノ酸に作用する Fe/αKG-DO（IDO）、*Burkholderia ambifaria* AMMD 株由来の *N*-スクシニル-L-アミノ酸に作用する Fe/αKG-DO（SadA）、および *B. ambifaria* AMMD 株由来の *N*-スクシニル-L-アミノ酸デアシラーゼである LasA の組み換え大腸菌株を構築した。これらの株を適切に培養・タンパク質発現誘導することで、各組み換え酵素の大量発現菌体を得た。得られた菌体の乾燥菌体を調製し、Whole-cell biocatalyst としてアミノ酸変換反応に用いた。
【結果】
IDO 組み換え大腸菌の Whole-cell biocatalyst を用いたアミノ酸のスルフォキシド化反応を行った結果、L-メチオニン、L-エチオニン、*S*-メチル-L-システイン、*S*-エチル-L-システイン、*S*-アリル-L-システインを *S* 体のアミノ酸スルフォキシドに変換することができた。L-メチオニン（50 mM）を基質に用いた際に最大変換効率 100%、最大光学純度 99%以上での L-メチオニン-*S*-スルフォキシドの生産を達成した。次に SadA 組み換え大腸菌と LasA 組み換え大腸菌の Whole-cell biocatalyst を複合的に組み合わせて使用した反応系においては、*N*-スクシニル-L-ロイシン（10 mM）を基質として用いた際に、L-*threo*-β-ヒドロキシロイシンを変換率 80%、光学純度 99%以上で生産することができた。これらの生産プラットフォームは他の酵素と基質の組み合わせにも適用可能であり、様々な種類のアミノ酸の誘導体を取得するための優れた産業的生産法となり得る。

α-ketoglutarate dependent dioxygenase, hydroxylase, amino acids

講演番号：2B24a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ B 校舎 24 会場

分子シャペロン PPIase を利用した蛋白質の可溶性向上～芳香族アミノ酸脱炭酸酵素との融合化

Use of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase for improvement of the solubility of aromatic L-amino acid decarboxylase

○小柳 喬[1]、原 彩由美[1]、南 博道[2]、片山 高嶺[2]、熊谷 英彦[2]、三沢 典彦[2] ([1]石川県大・生資環・食品、[2]石川県大・資源研)
○Takashi KOYANAGI[1], Ayumi HARA[1], Hiromichi MINAMI[2], Takane KATAYAMA[2], Hidehiko KUMAGAI[2], Norihiko MISAWA[2] ([1]Dept. Food Sci., Ishikawa Pref. Univ., [2]Res. Inst. Biores. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ.)

[研究背景]
ペプチジルプロリルイソメラーゼ（PPIase, EC5.2.1.8）は、タンパク質分子中のプロリン残基のシス・トランス異性化を行う酵素である。本酵素は、プロリン残基のラセミ化を通してタンパク質のフォールディングを助けるシャペロン様の働きを担うことが知られている。これまでの研究により、FKBP（FK506-binding protein）型 PPIase を *Bacillus megaterium* 由来シトクロム P450 BM3 タンパク質の N 末端に付加することにより、大腸菌細胞内における可溶性が向上することが報告されている。本研究グループでは、芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ（AADC, EC4.1.1.28）を大腸菌内で高発現させ、芳香族アミノ酸を原料として様々な生理活性アミン誘導体を発酵生産することを目指している。そこで本発表では、超好熱古細菌 *Thermococcus* sp. KS-1 株由来 PPIase と *Pseudomonas putida* KT2440 株由来 AADC を融合化し、大腸菌内における可溶性・活性の向上を試みたので報告する。

[研究結果]
PPIase 遺伝子を保持する pET-21d 由来プラスミドに PCR により増幅した *P. putida* KT2440 株由来 AADC 遺伝子を連結し、大腸菌 BL21(DE3) 内に導入した。18 ℃にて培養を行い、対数増殖期にて IPTG (0.2 mM) を添加して発現を誘導、超音波破砕ののち可溶性・不溶性画分を回収した。これらの画分について SDS-PAGE により AADC 発現量を確認したところ、pET 系ベクターを用いて同様に発現した PPIase 非融合型（野生型）組換え体および N 末端ヒスチジンタグ融合型組換え体に比し、PPIase 融合体の可溶体比率が顕著に増加していることが確認された。続いて、同菌株群を AADC の基質である L-ドーパおよび L-フェニルアラニンの存在下（各 1 mM）にて培養し、培養上清中へのドーパミン・フェネチルアミン生成量を HPLC により評価したところ、PPIase 融合体発現株において最も生成量が多いことが確認された。本結果から、PPIase 融合化により AADC の可溶性が改善されて総活性が高まり、ドーパミン・フェネチルアミンの生成能向上につながったことが強く示唆された。

PPIase, molecular chaperone, aromatic L-amino acid decarboxylase

講演番号：2B24p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ B 校舎 24 会場

Cryptococcus diffluens のガラクチュロン酸還元酵素の異種発現と組換え酵素による L - ガラクトン酸の生産

Heterologous expression of D - galacturonate reductase of *Cryptococcus diffluens*and L - galactonate production by recombinant enzyme

○松原 健生、濱田 翔平、岸田 正夫（阪府大院生環科・応生化）
○Takeo Matsubara,syohei Hamada,masao kishida (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ)

[目的]D-ガラクチュロン酸 (GalUA)は細胞間接着物質として柑橘類等の植物細胞壁に含まれるペクチンの主な構成糖である。現在ペクチンは主に家畜の飼料や増粘剤等の安価な商品に再生利用されているが、加工コスト等の問題で利用範囲が限定的である。我々はペクチンの新たな利用を促進させるため微生物の働きを利用したペクチンの高付加価値化を目指している。現在までにガラクチュロン酸資化酵母 *Cryptococcus diffluens* OPU-FC 11 株を単離しており、本酵母のガラクチュロン酸 代謝の第一反応がガラクチュロン酸還元反応であることを明らかにしている。この還元反応を触媒するガラクチュロン酸還元酵素 (*GAR1*) のより詳細な機能解析のため、*C. diffluens* OPU-FC11 株から *GAR1* 遺伝子のクローニングを行い、*Saccharomyces cerevisiae* 形質転換体による異種発現を試みた。また本組換え酵素を用いた D – ガラクチュロン酸からの L – ガラクトン酸の生産について検討した。

[方法と結果] OPU-FC11 からクローニングされた GAR1 遺伝子を Gal プロモーター下流に接続し、酵母導入用プラスミドベクターを構築した。これを酵母 *S. cerevisiae* BY4741 株に酢酸リチウム法を用いて導入し、*S. cereviciae* BY4741 GAR1 形質転換体を単離した。この形質転換株をガラクトースの培地で培養し、組換え酵素を誘導発現させたところ、菌体破砕液中に酵素活性の指標となる、NADPH の特異吸収 (OD 340) のガラクチュロン酸依存的減少が認められ、*GAR1* 遺伝子の異種発現を確認できた。また、この組換え酵素反応溶液を HPAEC – PAD にかけ反応産物を検出したところ L- ガラクトン酸に相当するピークを確認することができ、組換え *GAR1* も OPU-FC11 の酵素と同様に D – ガラクチュロン酸から L - ガラクトン酸に変換できることが確認できた。現在、L - ガラクトン酸の高生産条件の検討を行っており、また、*S. cerevisiae* の *GAR1* 形質転換体の静止菌体を用いた、D – ガラクチュロン酸からの L- ガラクトン酸の生産についても検討している。

Cryptococcus diffluens, D - galacturonate, L - galactonate

講演番号：2B24p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ B 校舎 24 会場

食後高血糖改善成分 1-デオキシノジリマイシンの枯草菌等による高生産培養

Production of the α-glucosidase inhibitor 1-deoxynojirimycin from *Bacillus* species

○小野瀬 晋司[1]、池田 亮一[2]、仲川 清隆[1]、木村 俊之[3]、山岸 賢治[3]、樋口 央紀[4]、宮澤 陽夫[1]([1]東北大院農・機能分子解析、[2]旭松食品(株)、[3]東北農研セ、[4](株)機能性植物研)
○ Shinji ONOSE[1], Ryoichi IKEDA[2], Kiyotaka NAKAGAWA[1], Toshiyuki KIMURA[3], Kenji YAMAGISHI[3], Ohki HIGUCHI[4], Teruo MIYAZAWA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Asahimatsu Foods Co., [3]Japan National Agricultural Research Center, [4]Biodynamic Plant Institute)

【目的】アザ糖 1-デオキシノジリマイシン（DNJ）はα-グルコシダーゼ阻害（α-GI）作用を示し、糖尿病の予防と治療への応用が期待されている。DNJ の供給源には、DNJ を含有する桑葉がもっぱら用いられるが、DNJ 濃度が低く供給量は限られる。一方、ある種の放線菌や枯草菌でも DNJ 生産が報告されており、幾つかの菌株培養液にはα-GI 活性が認められ、その主体が DNJ によると推定されている。すなわち、微生物、とくに醗酵食品由来の枯草菌等に DNJ を生産させることができれば、新たな DNJ 供給源になる可能性がある。本研究では、はじめに①DNJ 生産が推定されている *Bacillus subtilis* DSM704[1)]を用い、菌体と培養液の DNJ とその前駆体を HILIC-LC-MS/MS で調べ、DNJ 生産を確証しようとした。次いで、②どのような菌株が DNJ を作るのか、そして食展開できる枯草菌等に高生産できるのか、③培養条件で DNJ 生産性を変えられるのか、これら 3 点を明らかにしようとした。
【方法と結果】①DSM704 の菌体と培養液（合成培地）のアザ糖を HILIC-LC-MS/MS で分析し、これらに含まれるアザ糖類が DNJ であることを確認した。さらに、DNJ の前駆体と考えられる 2-アミノ-2-デオキシ-D-マンニトール（ADM）が DNJ と同程度に存在することを見出した。微生物による DNJ 生産が明確となったので、次に、②DNJ 高生産菌のスクリーニングへと研究を進めた。醗酵食品由来の菌株（約 750 株）を候補株とし、実際の生産を想定して大豆ペプトンを用いて培養した。培地のα-GI 活性を調べ、高活性の菌株を幾つか選抜した。最も活性が高かった 2 種の菌株の 16SrRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、枯草菌とその類縁菌に分類される菌株（*Bacillus subtilis* B4, *Bacillus amyloliquefaciens* AS385）であることがわかった。これらの菌株が確かに DNJ を高生産することを HILIC-LC-MS/MS 分析で確認した。③菌株 B4 と AS385、比較として DSM704 を種々の条件で培養し、培養液の DNJ 量を調べた。DSM704 に比べ、B4 と AS385 の DNJ 生産量ははるかに多く、培地（大豆ペプトン）にソルビトールを加えると、とくに AS385 では DNJ 生産量がさらに増加することがわかった。DNJ の最大生産量は約 0.5 g/L 培地であり、この培養液には同程度の量の前駆体 ADM も含まれていた。ADM から DNJ への変換をさらに促進することで、極めて多量の DNJ を生産でき、有効な DNJ 供給源になると考えられた[2)]。現在は、ADM から DNJ への変換について、全ゲノムが解析されている *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 を用い検討（培養条件、遺伝子発現変化、等）を進めている。

1) Stein DC, et al., *Appl Environ Microbiol.*, 48, 280-284 (1984).
2) Onose S, et al., *Food Chem.*, in press (2012).

1-Deoxynojirimycin, Microbial production, Carbon source

講演番号：2B24p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ B 校舎 24 会場

組換え大腸菌によるフェニルアセトニトリルの生産

Production of phenylacetonitrile by recombinant *Escherichia coli*

○三木 佑太[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Yuta Miki[1,2], Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ, [2]JST, ERATO)

【緒言】フェニルアセトニトリル (PAN) は医薬品や光学分割剤など様々な有用物質の前駆体である。PAN は現在、シアンや金属触媒を用いた化学合成法にて工業生産されているため、これらの薬剤を使用しない安全で環境に配慮した代替生産法の確立は社会的意義が大きい。そこで本研究では、微生物や植物において PAN 生合成を担うアルドキシム - ニトリル経路に着目し、この経路を応用した組換え大腸菌による PAN 生産についての検討を開始した。従来研究にて、シロイヌナズナ由来シトクロム P450 (CYP) 79A2 がフェニルアラニン (Phe) からフェニルアセトアルドキシム (PAOx) への水酸化反応を触媒すること、PAOx 資化バクテリア *Bacillus* sp. strain Oxb-1 由来 PAOx デヒドラターゼ (Oxd) が PAOx から PAN への脱水反応を触媒することが既に明らかにされている[1,2]。今回の発表では、これらの遺伝子を導入した大腸菌変異株による PAN 生産系の構築について報告する。

【方法】シロイヌナズナ由来 CYP79A2 および CYP のレドックスパートナーである P450 レダクターゼ (ATR) の cDNA をそれぞれ T7 プロモーター制御下に配置したプラスミドベクター pET-ATR-CYP79A2 を構築した。また、*Bacillus* sp. strain Oxb-1 由来 Oxd の cDNA を T7 プロモーター制御下に配置した pCDF-Oxd を構築した。これらのプラスミドにて形質転換した大腸菌変異株を種々の培養条件にて培養し、培養物中の生成物を汎用分析機器にて定性・定量分析した。また、シャペロンとの共発現についても検討を行った。

【結果】pET-ATR-CYP79A2 にて形質転換した変異株は、LB 培地中での IPTG 添加による発現誘導によって PAOx を産生することが確認された。また、含ラクトース培地を用いたオートインダクション法では、約 2 倍の PAOx 産生量が得られた。シャペロンとの共発現について検討した結果、GroEL/ES との共発現系においてさらに 6 倍高い PAOx 産生量が得られた。PAOx 産生株培養物中の他生成物について分析した結果、フェニルアセトアルデヒドやフェネチルアルコール等、PAOx の代謝物と思われるいくつかの生成物が確認された。次に、PAOx 産生株に pCDF-Oxd を形質転換した変異株について検討した結果、顕著な PAN 産生が確認された。PAN 産生株培養物中には、PAOx や PAOx 代謝物は検出されなかったことから、PAOx が Oxd によって効率良く PAN に変換されていることが示唆された。PAOx や PAN の産生量増大に向けた他の検討結果についても報告する。

[1] Wittstock U. and Halkier B. A. *J Biol Chem.* **275**, 14659-14666.
[2] Kato Y. et al. *Biochemistry* **39**, 800-809.

aldoxime-nitrile pathway, cytochrome P450, aldoxime dehydratase

講演番号：2B24p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ B 校舎 24 会場

Lactobacillus plantarum の脂肪酸代謝を活用したα-リノレン酸由来希少脂肪酸生産
Production of rare fatty acids from α-linolenic acid using fatty acid metabolism of *L. plantarum*
○岸野 重信、竹内 道樹、平田 晶子、朴 時範、小川 順 (京大院農・応用生命)
○Shigenobu KISHINO,Michiki TAKEUCHI,Akiko HIRATA,Si-Bum PARK,Jun OGAWA (Kyoto Univ.)

【目的】

乳酸菌の脂肪酸代謝は、腸内細菌の生理学的・栄養学的機能に重要な役割を担うと考えられているが、詳細な検討はなされてこなかった。我々は、リノール酸を効率よく共役リノール酸へと変換する *Lactobacillus plantarum* AKU 1009aをモデルに、乳酸菌の不飽和脂肪酸代謝の解明を試みている。本代謝には、水和脱水酵素 (CLA-HY)、酸化還元酵素(CLA-DH)、異性化酵素 (CLA-DC)、エノン還元酵素 (CLA-ER) が関与しており、既にこれらの酵素を発現する形質転換体の作成に成功している。また、リノール酸を基質とし、これらの形質転換体を用いることにより、様々な水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸の生産を可能としている。また、これらの希少脂肪酸に関して、様々な生理機能を見いだしている。そこで本発表では、これらの形質転換体を用い、炭素数18のω３脂肪酸であるα-リノレン酸(*cis*-9,*cis*-12,*cis*-15-octadecatrienoic acid)の変換を行い、より多様な希少脂肪酸の誘導を試みた。

【方法・結果】

L. plantarum AKU 1009a由来水和酵素(CLA-HY)、酸化還元酵素(CLA-DH)、異性化酵素(CLA-DC)、エノン還元酵素(CLA-ER)をそれぞれ発現する形質転換大腸菌を培養し、集菌・洗浄した菌体を触媒として用い、α-リノレン酸を基質とする反応を行った。

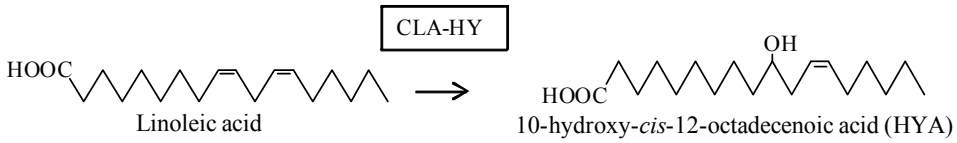
その結果、水酸化脂肪酸として10-hydroxy-*cis*-12,*cis*-15-octadecadienoica acid (αHYA)、オキソ脂肪酸として 10-oxo-*cis*-12,*cis*-15-octadecadienoica acid (αKetoA), 10-oxo-*trans*-11,*cis*-15-octadecadienoica acid (αKetoC), 10-oxo-*cis*-15-octadecenoic acid (αKetoB)、共役脂肪酸として *cis*-9,*trans*-11,*cis*-15-octadecatrienoic acid (CALA1), *trans*-9,*trans*-11,*cis*-15-octadecatrienoic acid (CALA2)、非メチレン型の部分不飽和脂肪酸として*cis*-9,*cis*-15-octadecadienoica acid, *trans*-10,*cis*-15-octadecadienoica acidの生成が確認され、これらの希少脂肪酸の生産が可能であることが示された。

rare fatty acid, omega-3 fatty acid, lactic acid bacteria

講演番号：2B24p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ B 校舎 24 会場

Lactobacillus plantarum AKU 1009a 由来リノール酸水和酵素の諸性質解明
Analysis of linoleic acid hydratase from *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a
○竹内 道樹[1]、田辺 香緒里[1]、平田 晶子[1]、朴 時範[2]、岸野 重信[1]、小川 順[1] ([1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物)
○Michiki TAKEUCHI[1], Kaori TANABE[1], Akiko HIRATA[1], Si-Bum PARK[2], Shigenobu KISHINO[1], Jun OGAWA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】
近年、様々な機能性脂肪酸が、栄養学的・薬理学的見地から注目を集めており、機能性脂肪酸の微生物生産に関する試みも盛んに行なわれている。機能性脂肪酸の一つである共役リノール酸（CLA）は共役した二重結合を有するリノール酸（*cis*-9, *cis*-12-octadecadienoic acid）の異性体であり、その中でも *cis*-9, *trans*-11 および *trans*-10, *cis*-12 異性体において、体脂肪の減少・抗がん作用・動脈硬化予防作用など有益な生理活性が見いだされている。
本研究室では、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a によるリノール酸の飽和化代謝経路を明らかにすることにより CLA 生産に関与する酵素及び不飽和脂肪酸の飽和化に関与する 4 つの酵素（水和酵素（CLA-HY)、酸化還元酵素（CLA-DH)、異性化酵素（CLA-DC)、エノン還元酵素（CLA-ER)）を見いだしている。本研究では、本菌の不飽和脂肪酸飽和化代謝の初発反応を触媒する CLA-HY について諸性質の解明を試みた。



【方法・結果】
L. plantarum AKU 1009a 由来 CLA-HY を His-tag 融合タンパク質として大量発現する形質転換大腸菌を作成した。形質転換大腸菌を、LB 培地を用いて培養し、対数増殖期初期に IPTG（終濃度 1 mM）を添加することにより、導入タンパク質の誘導を行った。得られた菌体を超音波破砕することにより cell-free-extracts を作成し、アフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。精製酵素の吸収スペクトルを測定した結果、450 nm 付近に極大吸収を示したことから、本酵素はフラビン酵素であることが示唆された。また、本酵素の活性が NADH の添加により増加することが判明した。本酵素は、Δ9 位にシス型二重結合を有する炭素数 18 の脂肪酸を基質とした。また、本酵素が触媒する反応は、基質の 9 位の二重結合の水和反応であり、10 位選択的に水酸基を導入することを明らかにした。さらに、反応 pH、温度等の影響を検討するなど、本酵素の諸性質を解明した。

lactic acid bacteria, hydroxy fatty acid, hydratase

講演番号：2B24p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ B 校舎 24 会場

Lactobacillus plantarum の脂肪酸代謝を活用した実用化レベルでの水酸化脂肪酸生産

Practical production of hydroxy fatty acids using fatty acid metabolism of *L. plantarum*

竹内 道樹、○福永 健太、岸野 重信、平田 晶子、朴 時範、小川 順（京大院農・応用生命）
Michiki Takeuchi,○Kenta Fukunaga,Shigenobu Kishino,Akiko Hirata,Si-Bum Park,Jun Ogawa (Kyoto Univ.)

【目的】

近年、共役脂肪酸やオキソ脂肪酸など、希少脂肪酸の生理機能に注目が集まっている。例えば、共役した二重結合を有するリノール酸異性体である共役リノール酸（CLA）に関して、抗ガン作用、抗動脈硬化作用、体脂肪減少作用など様々な生理機能が報告されている。また、水酸化脂肪酸についてはポリマー原料等としての化成品原料用途が検討されている。しかし、希少脂肪酸の多くはその効率的供給法がないため、機能評価や用途開発が充分ではないのが現状である。我々は以前よりリノール酸を効率よく CLA へと変換する乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a を用いた不飽和脂肪酸代謝の解明を試みている。これまでに、本代謝には水和脱水反応、酸化還元反応、異性化反応、エノン還元反応が関与していることを明らかにしている。本研究では、その初発反応（リノール酸の 10 位に水酸基を付加する水和反応）を触媒する水和酵素（CLA-HY）を希少脂肪酸の実用的生産に活用する事を試みた。

【方法・結果】

L. plantarum AKU 1009a 由来の水和酵素（CLA-HY）を His-tag 融合タンパク質として大量発現する形質転換大腸菌を作成した。形質転換大腸菌を培養し、集菌・洗浄した菌体を触媒として用い、リノール酸やα-リノレン酸を基質として反応を行った結果、それぞれ 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid、10-hydroxy-*cis*-12,*cis*-15-octadecadienoic acid を得ることができた。また、反応条件を最適化することにより、基質濃度約 30% (w/v)から 95%以上の収率で生産物を得ることでき、さらに生成物の精製プロセスについても検討を行い、純度 99%以上まで精製する系の確立に成功した。本研究により、微生物を用いて希少脂肪酸である水酸化脂肪酸を高効率、高純度で生産することが可能となった。水酸化脂肪酸は、希少脂肪酸である共役脂肪酸やオキソ脂肪酸の原料や、ナイロン、化粧品等の石油由来製品の原料となりうることから、本酵素および生成物の応用開発に期待が持たれる。

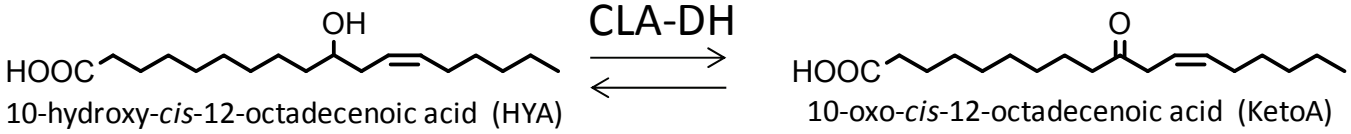
rare fatty acid, hydroxy fatty acid, hydratase

講演番号：2B24p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ B 校舎 24 会場

Lactobacillus plantarum AKU 1009a　由来水酸化脂肪酸脱水素酵素の諸性質解明
Analysis of hydroxy fatty acid dehydrogenase from　*Lactobacillus plantarum* AKU 1009a
○朴 時範[2]、竹内 道樹[1]、岸野 重信[1]、小川 順[1] ([1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物)
○Si-Bum Park[2], Michiki Takeuchi[1], Shigenobu Kishino[1], Jun Ogawa[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】

共役リノール酸（CLA）は抗癌抑制作用、体脂肪蓄積抑制作用など有用な生理機能活性を示すことが報告されている。我々は、リノール酸を効率よく CLA へと変換する *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a を用いた CLA 生産プロセスの構築に成功している。また、本菌による CLA 生成反応が、水和脱水酵素 CLA-HY によるリノール酸の 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA)への水和、酸化還元酵素 CLA-DH による HYA の 10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid (KetoA)への酸化、異性化酵素 CLA-DC による KetoA の 10-oxo-*trans*-11-octadecenoic acid (KetoC)への異性化、ならびに上述の酸化反応、水和反応の逆反応である CLA-DH による KetoC の 10-hydroxy-*trans*-11-octadecenoic acid (HYC)への還元と、CLA-HY による HYC の *cis*-9, *trans*-11-および *trans*-9, *trans*-11-CLA への脱水から成り立つことを明らかにした。本研究では、本代謝における水酸化脂肪酸の酸化ならびにオキソ脂肪酸の還元反応を触媒する CLA-DH の諸性質について検討した。



10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA)　　10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid (KetoA)

【方法・結果】

L. plantarum AKU 1009a 由来 CLA-DH を大量発現する形質転換大腸菌を作製し、LB 培地にて培養、IPTG による導入タンパク質の誘導を行ったのち、遠心により集菌・洗浄した。洗浄菌体を超音波破砕することにより cell-free extracts を調製し、各種クロマトグラフィーにより CLA-DH の精製を行った。得られた精製酵素の native 分子量を調べたところ、32 kDa のモノマーとして存在することを明らかにした。HYA を基質とし、分光光学的な解析を行い、酵素学的な性質を調べた結果、HYA から KetoA への反応において NAD^+を補酵素とすること、最適反応温度ならびに pH が 40℃、pH 8.0 であること、40℃、30 分間の処理に対して安定であることなどが判明した。また、様々な水酸化脂肪酸に対する活性の評価から、HYA が最も適した基質であることが判明した。さらに本酵素は NADH 依存的に KetoA を HYA へと還元すること、ならびに還元反応において立体選択性を示さないことが明らかになった。

lactic acid bacteria, dehydrogenase, oxo fatty acid

講演番号：2B24p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ B 校舎 24 会場

微生物反応および酵素反応を用いた 5-デオキシ-ヘキソースの生産

Production of novel 5-deoxy-hexose from 2-deoxy-D-glucose

○吉原 明秀[1]、百地 歩[1]、W. J. フリート ジョージ[2]、何森 健[1] ([1]香川大希少糖研セ、[2]オックスフォード大学)
○Akihide YOSHIHARA[1], Ayumi MOMOJI[1], George W. J. Fleet[2], Ken IZUMORI[1] ([1]RSRC, Kagawa Univ., [2]Oxford Univ.)

１. 目的

本研究では、希少糖の生産戦略図イズモリングを基盤とし、2-デオキシ-D-グルコースを出発原料として、化学的還元法、微生物的酸化反応、酵素的異性化反応を用いた複合方式で、新規 5-デオキシ-ヘキソースの生産方法の確立を目的とした。

２. 実験方法

2-デオキシ-D-グルコースを出発原料とし、ラネーニッケル触媒を用いた水素添加法を用いて基質の還元を行い、2-デオキシ-D-グルシトールの生産を行なった。次に、得られた 2-デオキシ-D-グルシトールを基質に *Gluconobacter thailandicus* NBRC 3254 を用いて酸化反応を行い、5-デオキシ-D-フルクトースへ変換した。最後に、この 5-デオキシ-D-フルクトースを *Pseudomonas cichorii* ST24 株由来の D-タガトース-3-エピメラーゼ(D-TE)を用いて、エピ化反応を行い 5-デオキシ-D-プシコースとの平衡混合物を得た。その反応液から目的とする 5-デオキシ-D-プシコースを分離した。

３. 結果

2-デオキシ-D-グルコースは、ラネーニッケル触媒を用いた水素添加法により還元した。その結果、約 2%の副産物が確認されたが、効率よく 2-デオキシ-D-グルシトールを得ることができた。次に、2-デオキシ-D-グルシトールを *G. thailandicus* NBRC 3254 を用い酸化反応を試みた。20%までの全ての基質濃度で基質は酸化され、5-デオキシ-D-フルクトースへの変換率はほぼ 100%であった。最後に、5-デオキシ-D-フルクトースを基質に D-TE を用いて反応した結果、24 時間以内で平衡に達し、その平衡比は約 70：30 であった。本研究において、化学的還元法、微生物的酸化反応、酵素的エピ化反応を組み合わせることで、2-デオキシ-D-グルコースから 2-デオキシ-D-グルシトールを経て、5-デオキシ-D-フルクトースおよび、5-デオキシ-D-プシコースの生産法を確立した。

この結果を用いることで、各種 5-デオキシ-ヘキソース生産における基盤ができ、今後各種の 5-デオキシ-アルドースへの反応についても可能性が示唆された。

rare sugar, D-tagatose 3-epimerase

講演番号：2B24p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ B 校舎 24 会場

Aspergillus 属種間でのα-グルコシダーゼによるエチル-α-グルコシドの生産性の相違について
Comparison of Etyl-α-glucoside production by α-glucosidase among various *Aspergillus* species.
○戸倉 慶大[1]、中西 載慶[2]、内野 昌孝[3]、野口 治子[3]、高野 克己[3] ([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大短大・醸造、[3]東京農大応生・化学)
○Keita TOKURA[1], Kotoyosi NAKANISHI[2], Masataka UCHINO[3], Haruko NOGUCHI[3], Katsumi TAKANO[3] ([1]Agrichem., Agr., Grad. Sch., [2]Junior College. Ferment. Sci., [3]Dept. Appl. Biol. chem., Fac. Biosci.,Tokyo Univ. Agr.)

【目的】一部の *Aspergillus* 属由来のα - グルコシダーゼは、エタノール存在下においてマルトースを基質とした転移反応とグルコースを基質とした縮合反応により、希少糖であるエチル-α-グルコシド(以下 EG)を生成する。これまでに、*A. niger* 由来α - グルコシダーゼ(AnAG;以下このように菌種グルコシダーゼの略記を行う)は転移・縮合能を共に持つが、*A. oryzae* 由来α - グルコシダーゼ(AoAG)は縮合能を持たないことが確認されている。さらに分子構造の解析では、AnAG は２つ、AoAG は１つのサブユニットでそれぞれ構成されていた。そこで、*Aspergillus* 属は 18S rDNA 塩基配列による系統解析で 4 グループに分類されるため、各グループから *A. niger*(グループ 1)、*A. fumigatus*(グループ 2)、*A. oryzae*、*A. nidulans*(グループ 3)、*A. terreus*(グループ 4)を選抜し、それぞれα - グルコシダーゼの転移・縮合能と分子構造の関係を検討した。
【方法】MYP 培地で各菌体を培養(30 ℃, 180 rpm, 24 h)後、菌体の破砕、粗酵素の調製を行った。その後、Butyl-TOYOPEARL 650S を担体とした疎水クロマトグラフィー、DEAE-TOYOPEARL 650C を担体とした陰イオン交換クロマトグラフィー、Sephacryl S300 を担体としたゲル濾過クロマトグラフィーに順次供し、主要活性画分を回収、透析し精製酵素とした。精製酵素をタンパク質濃度 10 mg/ml に調製し、Native-PAGE、SDS-PAGE に供しα - グルコシダーゼのタンパク質分子構造の比較を行った。転移・縮合反応による EG 生産性試験は、酵素 0.05 U/ml、基質 0.2 M、受容体 3.0 M、酢酸緩衝溶液（pH 4.0）0.05 M の終濃度となるように調整し酵素反応(30 ℃、24-48 時間)させた後、沸騰水浴 10 分で反応を停止した。その後、常法により EG 生産性の確認を行った。
【結果】AnAG、AfAG、AoAG、AdAG、AtAG による転移反応サンプル全てにおいて、EG の生産が確認された。縮合反応サンプルでは、AnAG、AfAG、AtAG は EG 生産が確認されたが、AoAG、AdAG では生産が確認されなかった。また PAGE による分子構造解析の結果、AfAG は 3 つのサブユニット、AdAG は 2 つのサブユニット、AtAG は 1 つのサブユニットで構成されていることが示唆された。AtAG は、縮合能をもたない AoAG と同様に 1 つのサブユニットで構成されているにも関わらず、AnAG と同様に転移・縮合能をともに有する結果となった。このことから、PAGE による分子構造の解析からでは転移・縮合能との相関性を得ることができなかったため、さらに詳細な立体構造の解析の必要性が示唆された。

α-glucosidase, *Aspergillus*, Ethyl-α-glucoside

講演番号：2B24p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ B 校舎 24 会場

糸状菌細胞壁溶解に寄与する *Paenibacillus* sp. No. 11 株由来α-1,3-グルカナーゼの解析
Charactarization of α-1,3-Glucanase from *Paenibacillus* sp. No. 11: An Enzyme Participates in Fungal Cell-Wall Degradation
○矢野 成和[1]、Suyotha Wasana[2]、藤本 寛子[2]、立木 隆[2]、若山 守[2]([1]山形大院理工、[2]立命館大生命)
○Shigekazu Yano[1], Wasana Suyotha[2], Hiroko Fujimoto[2], Takashi Tachiki[2], Mamoru Wakayama[2]
([1]Yamagata Univ., [2]Ritsumeikan Univ.)

【目的】α-1,3-グルカナーゼは、糸状菌が生成するグリコシダーゼファミリー71 型（GH 71 型）と、細菌が生成する GH 87 型に大別される。GH 71 型 α-1,3-グルカナーゼは、*Streptococcus mutans* が形成するバイオフィルムの分解活性と、糸状菌細胞壁 α-1, 3-グルカン分解活性を持つことが知られている。一方で、GH 87 型 α-1,3-グルカナーゼは、*S. mutans* のバイオフィルム分解に関する研究が積極的に行われているのに対して、細胞壁分解に関する研究はほとんど行われていない。前報では、*Bacillus circulans* KA-304 が、*Schizophyllum commune* 細胞壁標品を誘導炭素源とした時に、GH 87 型 α-1,3-グルカナーゼ（Agl-KA）を生産すること、また、Agl-KA が *B. circulans* KA-304 由来の GH 19 型キチナーゼと共同して *S. commune* 菌糸よりプロトプラストを生成することを報告した（1)。Agl-KA は、既知の GH 87 型酵素、例えば、*Paenibacillus* sp. RM1 の Mutanase RM1 など（2)、と高い相同性を示すことから、GH 87 型酵素の多くが糸状菌細胞壁 α-1, 3-グルカンの分解活性を持つと考えられる。本報では、土壌より分離した *Paenibacillus* sp. No. 11 株の α-1,3-グルカナーゼ遺伝子をクローニングした結果と、大腸菌で発現させた α-1,3-グルカナーゼ（Agl-PG11）の *S. commune* 細胞壁分解活性を調べた結果を報告する。
【方法と結果】Agl-KA や Mutanase RM1 などの配列情報を基に、*Paenibacillus* sp. No. 11 株の Agl-PG11 遺伝子をクローニングした。得られた遺伝子配列より明らかになったアミノ酸配列は、Agl-KA と 76%、Mutanase RM1 と 77%の相同性を示した。さらに、データベース上のアミノ酸配列とも比較したところ、*Paenibacillus* sp. JDR-2 の APHP domain-containing protein と最も高い相同性（96%）を示した。Agl-PG11 遺伝子は、pET ベクター系を用いて、*Escherichia coli* Rosseta-gami（DE3）で発現させ、次いで、本酵素を DEAE-cellulofine A-500 カラムと Butyl-TOYOPEARL 650M カラムを用いて精製した。Agl-PG11 と Agl-KA の性質を比較した結果、両酵素の熱安定性と pH 安定性はほとんど差がなかったが、Agl-PG11 の至適 pH が 5.0 であるのに対して、Agl-KA の至適 pH が 8.0 であるという点で大きく異なっていた。両酵素の *S. commune* プロトプラストの生成反応に与える影響を、酢酸緩衝液（pH 5.5)、リン酸緩衝液（pH 6.5)、リン酸緩衝液（pH 7.5）の 3 種類を用いて比較したが、生成するプロトプラスト数に大きな差は認められなかった。以上の結果から、Agl-KA 以外の GH 87 型 α-1,3-グルカナーゼも、真菌細胞壁 α-1, 3-グルカンの分解活性を持つことが示された。（1）2010 年農芸化学会大会講演番号 3C22p04、（2）Shimotsuura *et al., App.l Environ. Microbiol*., **74**(9), pp.2759–2765 (2008)

Fungal cell-wall, α-1,3-Glucanase, Protoplast

講演番号：2B24p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ B 校舎 24 会場

カラギーナン分解酵素の探索と精製

Purification and characterization of carrageenan-degrading enzyme

○高橋 亮、大西 浩平（高知大農）
○Ryo TAKAHASHI,Kohei ONISHI (Kochi Univ.)

【目的】現在生産されているバイオ燃料の多くは食用作物を原料としており、食料との競合が課題となっている。紅藻類が生産する「カラギーナン」は、D-ガラクトースが連なった主鎖に硫酸がエステル結合した多糖であり、硫酸基の位置と個数によってκやλ等いくつかの種類が知られている。カラギーナンはヒトの消化酵素では分解されないことから、食料と競合しないバイオ燃料生産の糖源として有望であると考えられる。カラギーナンをバイオ燃料の原料として用いるには糖化を行う必要があるが、その方法としては環境負荷の少ない酵素的糖化が望ましい。本研究ではカラギーナンを分解可能な微生物を環境中より単離し、カラギーナン分解酵素の同定と遺伝子の特定および精製と機能解析を行うことを目的とした。
【方法・結果】カラギーナンをゲル化させた固体培地を使用し、コンゴレッドによるハロ形成やゲルの分解を指標として、カラギーナン分解能を有する微生物の探索を行った。結果、固体培地上でハロの形成やゲルの陥没が見られる数種の糸状菌および細菌を単離した。このうち、16SrDNA の解析により *Bacillus* 属に分類された細菌を液体培地で培養し、上清より菌体外酵素液を得た。この酵素液とκ-カラギーナンまたはλ-カラギーナンとを反応させ、生成物をゲルろ過により分析した結果、両者共にカラギーナンの分解産物が確認できた。さらに、SDS-PAGE やλ-カラギーナンゲルを用いた活性染色によって、酵素液中よりλ-カラギーナン分解酵素と思われるタンパク質（H146k）を特定した。H146k の N 末端アミノ酸配列を決定し、当細菌のドラフトゲノム配列に対して BLAST 解析を行うことで、本酵素をコードする遺伝子領域を同定した。塩基配列より予想される H146k の分子量は 146 kDa であり、N 末端側には SOSUI プログラムによってシグナル配列と推定される部分も有していた。また、遺伝子産物には Glycosyl hydrolase 42 family に属するβ-ガラクトシダーゼと相同性を有するドメインも含まれていることが判明したが、既知のカラギーナン分解酵素との顕著な相同性は見いだせなかった。次に、この遺伝子を大腸菌 BL21 株に導入して H146k の大量発現系を構築した。組換え BL21 株の菌体内より回収した H146k を含む粗酵素とκ-カラギーナン、λ-カラギーナンの反応試験を行った結果、κ,λ 両方のカラギーナンの分解産物が確認できた。したがって、H146k は少なくとも二種のカラギーナンに対する分解活性を有していることが示唆された。現在まで海洋性細菌由来の種々のカラギーナン分解酵素が報告されているが、それらはすべて一種類のカラギーナンのみに特異的であり、二種以上のカラギーナン分解活性を持つものは知られておらず、本研究の酵素が最初の例である。

carageenase, carrageenan, Bacillus

講演番号：2B24p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ B 校舎 24 会場

β-グルカン資化性海洋酵母 *Metschnikowia bicuspidata* によるエタノール生産

Ethanol production by ß-glucan-assimilating marine yeast *Metschnikowia bicuspidata* .

○木島 淳子[1]、佐々木 愛瀬[1]、金内 誠[2]、笠原 紳[1] ([1]宮城大食産業・環境、[2]宮城大食産業・フード)
○Junko KISHIMA[1], Manase SASAKI[1], Makoto KANAUCHI[2], Shin KASAHARA[1] ([1]Miyagi Univ., [2]Miyagi Univ.)

海洋酵母 *Metschnikowia bicuspidata* は海藻表面等に多く見られ，海藻の多糖を分解して炭素源としていると考えられている。本酵母の利用法が確立できれば，わが国に豊富に存在する海藻等の海洋系バイオマスの高度利用へと展開できる可能性がある。*M. bicuspidata* が菌体外に生産するβ-グルカン分解酵素については，既報[1)]の通りエキソ型の作用様式を示し，至適温度 35℃付近，至適 pH は 5.0 付近で, 50～60℃で失活した。ラミナリンを基質とした場合の最大反応速度 V_{max} は 2.58 μg/min, ミカエリス定数 K_m は 3.0 mg/ml であった。本酵素の基質特異性について精査したところ，*p*-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシドを加水分解したことから，β-グルコシダーゼとすることが適切であり，当初基質として用いていたβ-1,3-グルカンに加えて，β-1,4-グルカン（セルロース）やβ-1,6-グルカン，セロビオース等も基質となりうると考えられた。

M. bicuspidata は発酵能（エタノール生産能）を有し，25℃，グルコース濃度 5%，静置培養条件下では約 2%（v/v）のエタノール濃度に到達することが確認された。菌体の増殖は培地中の糖濃度より温度に依存する一方，エタノール発酵は温度より糖濃度に依存していた。また，上述のβ-グルコシダーゼは，好気的培養条件下で高生産されることから，効率的なエタノール生産のためには好気的条件下で糖化を行い，発酵時には嫌気的条件下に切り替える必要がある。また，*M. bicuspidata* と他の酵母等を共培養することで，糖化・発酵のさらなる効率化が期待できると考えられ，より高濃度のエタノール生産を目指し，発酵条件の最適化を進めている。

M. bicuspidata は耐塩性を示し，塩分濃度 5%までは成育には影響は見られず，15%の塩分濃度下でも，通常培地中での培養と比較して 16%以上の成育が確認された。また，塩分濃度が発酵に及ぼす影響についても検討した。

M. bicuspidata は寒天培地上では明確な二形性を示すことが認められた。25℃，PDA 培地上で偽菌糸を形成した。本酵母については，海藻に対する感染性・病原性は報告されてはいないが，海藻組織内への侵入と偽菌糸形成が関連している可能性が考えられた。

1) 渡辺浩子ら 農化大会 2008 年度要旨集

marine yeast, ß-glucosidase, biomass utilization

講演番号：2B24p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ B 校舎 24 会場

海洋性カンファ―分解菌の分離と Baeyer-Villiger monooxygenase 遺伝子の取得

Isolation of marine bacteria capable of utilizing camphor and cloning of Baeyer-Villiger monooxygenase genes

○安川 直希、岩木 宏明、長谷川 喜衛（関西大・化学生命工）
○Naoki YASUKAWA,Hiroaki IWAKI,Yoshie HASEGAWA (Kansai University)

【目的】Baeyer-Villiger monooxygenase (BVMO)は、ケトンからラクトン又はエステルへの Baeyer-Villiger 酸化反応を触媒する酵素であり、光学純度の高いラクトンやエステルを生成することから、有用な生体触媒として広く研究されている。本研究では、新たな BVMO 遺伝子を取得するため、複数の BVMO が代謝に関与することが知られているカンファ―分解経路に着目し、海洋性カンファ―分解菌の分離・同定、BVMO 遺伝子の取得・解析を行った。

【実験方法と結果】

宮崎沖、福井沖、小笠原諸島沖から採取した海水サンプルから集積培養法により、カンファ―分解菌 4 株(D-45-7 株、F-45-1 株、F-45-2 株、G-45-1 株)を分離した。16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統解析を行った結果、D-45-7 株は *Rhodococcus pyridinivorans* (類似性：100%)、F-45-1 株は *Sphingobium* 属(<99.2%)、G-45-1 株は *Marinobacter* 属(<98.2%)に帰属された。F-45-2 株は最も近縁な *Teredinibacter turnerae* との類似性は 92.9%であり、新属・新種の細菌であると考えられた。BVMO 遺伝子を取得するため、土壌性細菌由来の Cycloalkanone monooxygenase (CAMO)のアミノ酸保存領域から作成したプライマーで PCR を行った結果、F-45-1 株、D-45-7 株で予測される約 1.0kbp の PCR 産物が得られた。取得した PCR 産物の塩基配列を解析したところ、F-45-1 株の推定アミノ酸配列は *Sphingomonas* 属由来の推定 Cyclohexanone monooxygenase(CHMO)と 99.4%、D-45-7 株は *Rhodococcus* 属由来の推定 CHMO と 99.4%一致した。増幅が見られなかったカンファー分解菌の BVMO は、土壌性細菌由来の CAMO で見られるアミノ酸保存領域を有していないことが示唆された。そこで、海洋性細菌由来の推定 BVMO のアミノ酸保存領域から作成したプライマーを用いて PCR を行った。その結果、F-45-2 株で予測される約 1.0kbp の PCR 産物が得られ、*Sphingomonas* 属由来の推定 BVMO と 63.3%一致した。現在、F-45-1 株、F-45-2 株についてインバース PCR を行い、BVMO 遺伝子全域の取得を試みている。

Baeyer-Villiger monooxygenase, camphor degradation, marine bacteria

講演番号：2B24p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ B 校舎 24 会場

重イオンビームによる担子菌の変異株作製に関する研究

Study on heavy-ion beam mutagenesis of Perenniporia fraxinea

○三橋 進也[1]、風間 裕介[2]、阿部 知子[2,3]、生方 信[1]（[1]北大院農、[2]理研イノベ、[3]理研仁科セ）
○Shinya MITSUHASHI[1], Yusuke KAZAMA[2], Tomoko ABE[2,3], Makoto UBUKATA[1] ([1]Hokkaido Univ. Grad. Agr., [2]RIKEN Innovation Center, [3]RIKEN Nishina Center)

【背景および目的】近年、キノコ類並びにその抽出成分の生理活性が再注目され、抗菌活性や細胞死誘導活性を示す様々なテルペノイド類、ステロイド類が報告されている[1)]。そのため、キノコの培養株に変異を導入することで、生理活性物質の生産性を向上させたり、新規化合物を生産させたりすることは重要と考えられる。しかしながら多くのキノコ類は菌糸体から子実体形成を誘導することが難しいため、容易に胞子を得ることはできない。これは、キノコにおいては細菌類のように変異誘導処理後に単コロニー分離して有用株を選択することが困難であることを意味する。よって、キノコの変異株作製には、培養菌糸体のような細胞の集合体を処理しても明確な表現型を誘導することができる高効率の変異原が必要と考えられる。

重イオンビーム照射による変異の導入法は、ガンマ線やアルキル化剤処理などの従来法に比べ、高い変異導入効率と広い変異スペクトルを示すことが植物の品種改良研究で明らかにされている[2)]。そこで本研究では、キノコの新たな変異株作製法を確立するため、重イオンビームを変異原としてベッコウタケ培養菌糸体を処理し、重イオンビーム照射がキノコの生理活性物質の生産性改変を誘導するか調べた。

【方法および結果】ベッコウタケ(*Perenniporia fraxinea*)菌糸を平板培地で培養した後、寒天ごと面積約 2 x 2 mm の小切片として切り出した。次に小切片を 9 cm シャーレの培地上に並べ、理研リングサイクロトロンを用いて重イオンを照射した。その結果、$^{12}C^{6+}$ビーム(300, 400 Gy)においては生存率 100%とコントロール群と差はなかったが、300 Gy の $^{40}Ar^{17+}$ビームでは生存率 28.1%に低下がみられた。そこで、$^{40}Ar^{17+}$ビーム(300 Gy)被照射群より 9 株を得て、液体培養後にエルゴステロールの生産量の変化および、抽出物の細胞死誘導活性を調べた。するとコントロール群に比べ、エルゴステロール生産量については 8 株に明確な差が見られた。また生物活性についても 6 株に差が見られた。

以上の結果から、重イオンビームを変異原としたキノコの改変は高効率と考えられた。今後、最適な核種並びに照射エネルギーの検討などを行うことで更に成績が向上すると期待される。重イオンビーム法はキノコによる生理活性物質の生産性増強および新規化合物の創製に繋がると考えられる。

1) Lindequist, U. *et al.*, *eCAM*, 285-299, **2005;** 2) Abe T. *et al., JSCRP*, 58-63, **2010**

heavy-ion beam, mushroom, microorganism

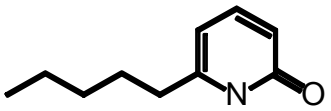
講演番号：2B24p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ B 校舎 24 会場

糸状菌の生化学的性質に対する界面電荷、界面疎水性の影響

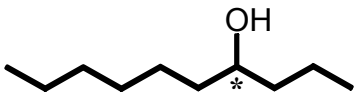
Effects of interfacial charge and hydrophobicity on biochemical properties of fungi

○小田 忍[1]、坂本 直樹[1]、道畠 さゆ美[1]、堀邊 英夫[2]、河野 昭彦[2]、大箸 信一[1] ([1]金沢工大ゲノム研、[2]金沢工大ものづくり研)
○Shinobu ODA[1], Naoki SAKAMOTO[1], Sayumi MICHIHATA[1], Hideo HORIBE[2], Akihiko KONO[2], Shinichi OHASHI[1] ([1]Kanazawa Inst. Technol., [2]Kanazawa Inst. Technol.)

【目的】　抽出液面固定化(Ext-LSI)システムと液-液界面バイオリアクター(L-L IBR)では、液体培地と疎水性有機溶媒との液-液界面に形成されたポリアクリロニトリル(PAN)製中空微粒子層中に糸状菌細胞が固定化されている。Ext-LSI が脂溶性二次代謝物の発酵生産に適したデバイスであるのに対し、後者は脂溶性基質の微生物変換に有効なシステムである。本研究では、Ext-LSI による抗真菌性二次代謝物 6-Pentyl-α-pyrone (6PP)の発酵生産と L-L IBR による *n*-デカンの位置・立体選択的水酸化反応を対象として、PAN 微粒子層中へのイオン交換樹脂微粒子あるいは疎水性樹脂微粒子の配合効果について検討することを目的とした。
【方法】　平均粒径 40 μm、比重 0.02 の PAN 製中空微粒子に粒径 25～100 μm のイオン交換樹脂あるいは 100 μm の各種疎水性樹脂微粒子を対 PAN 重量比 1:2.5～1:7.5 で配合した。イオン交換樹脂としてはオルガノ(株)製の IRA910CT 等のアニオン交換樹脂、IRC76 等のカチオン交換樹脂並びにキレート樹脂 IRC748 を用い、疎水性樹脂としてはポリメチルメタクリレート (PMMA)やポリテトラフルオロエチレン (PTFE)等 14 種類のポリマー微粒子を用いた。これらの配合樹脂系を *Trichoderma atroviride* AG2755-5NM398 による 6PP 生産と *Monilliera* sp. NAP00702 による *n*-デカン水酸化反応に適用した。
【結果】　カチオン交換樹脂とキレート樹脂が両糸状菌の増殖を著しく阻害したのに対して、IRA98 等のアニオン交換樹脂配合系で 6PP 生産能の著しい向上と胞子形成の抑止が認められた。*n*-デカンの水酸化についてもアニオン交換樹脂の配合効果が確認され、IRA910CT 配合系で 4-decanol の生産量は大きく増大した。なお、過剰な界面荷電の付与によって両培養系とも物質生産能の低下を来した。一方、疎水性樹脂微粒子の配合系に関しては、配合した疎水性樹脂の接触角と *n*-デカン水酸化能との間に相関関係が認められ、特にポリプロピレン (PP)と PTFE 配合系で 4-decanol の生産量が有意に増大した。なお、疎水性樹脂微粒子の配合は、菌体増殖に対して有意な影響を与えなかった。アニオン交換樹脂と疎水性樹脂との併用効果についても調べた。



6-Pentyl-α-pyrone (6PP)



(–)-4-Decanol

interface bioreactor, microbial transformation, secondary metabolite fermentation

講演番号：2A37a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ A 校舎 37 会場

αートコフェロールのビタミンE同族体濃度低下作用の解析

Alpha-tocopherol decreases vitamin E isoform concentration in rat tissues

野村 早、半澤 史聡、佐久間 衣里、○池田 彩子（名古屋学芸大・管理栄養）
Saki NOMURA,Fumiaki HANZAWA,Eri SAKUMA,○Saiko IKEDA (NUAS)

［目的］近年、αートコフェロール以外のビタミンE同族体の生理作用が期待されているが、体内のビタミンE同族体濃度は、主要ビタミンEであるαートコフェロールの摂取によって低下することが知られている。本研究では、γートコフェロールやトコトリエノールの体内濃度に対するαートコフェロールの低下作用の詳細を明らかにすることを目的とした。
［方法］実験 1：Wistar ラットにγートコフェロール 10mg と、αートコフェロール 1 または 10mg を含む試験溶液を経口投与し、8 時間後に屠殺した。実験 2：γートコフェロールの代わりにαートコトリエノール 10mg とγートコトリエノール 14mg の混合物を用いて、実験 1 と同様の実験を行った。実験3:γートコフェロール添加(150mg/kg)飼料を6週間摂取させることによって体内にγートコフェロールを蓄積させたラットに、ビタミンEを含まない飼料、またはαートコフェロール添加(100mg/kg)飼料を 1、3、または 7 日間摂取させた。実験 4：αートコトリエノールとγートコトリエノールの添加飼料を 6 週間摂取させた後に、実験 3 と同様の実験を行った。
［結果］実験 1：主要臓器のγートコフェロール濃度は、αートコフェロールの投与量依存的に低下した。実験 2：主要臓器のαーおよびγートコトリエノール濃度は、αートコフェロールの投与量依存的に低下した。実験 3：主要臓器のγートコフェロール濃度と、γートコフェロールの代謝産物であるγCEHC の排泄量の低下は、αートコフェロール摂取の有無によって変動しなかった。実験 4：主要臓器のαーおよびγートコトリエノール濃度の低下は、αートコフェロール摂取の有無によって変動しなかった。また、γートコトリエノールの代謝産物であるγCEHC の排泄量の低下も、αートコフェロール摂取による影響を受けなかった。
以上の結果から、αートコフェロールによる同族体濃度の低下は、経口摂取した同族体の臓器への移行をαートコフェロールが阻害することが主な原因であり、αートコフェロールは同族体の異化には影響しないと推察された。

tocopherol, tocotrienol, vitamin E

講演番号：2A37a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ A 校舎 37 会場

ストレス性睡眠障害モデルマウスの NMR-メタボリック・プロファイリング
NMR-metabolic profiling on stress-induced sleep disordered mice
○根本 直、永井 優香、宮崎 歴、大石 勝隆（産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門）
○Tadashi NEMOTO,Yuka NAGAI,Koyomi MIYAZAKI,Katsutaka OISHI (Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

NMR-メタボリック・プロファイリング（MP）法は、代謝性の混合物溶液、すなわち尿や血液、唾液等をほとんど前処理せずそのまま NMR 計測するケモメトリックス（化学パターン認識）であり、主要な包括的メタボローム解析手法である。実施が極めて簡単であり、「データ分布の構造」から系に与えた摂動を考察してメカニズムの推定、追跡・評価を行う。

睡眠や食事などの毎日の規則正しい生活リズムは健康維持のための基本だが、近年の人工的生活環境への大きな変化に伴い、日々の生活リズムが大きく乱れる人の増加が深刻化している。ストレスが睡眠・覚醒のリズムを乱す事も経験的に知られ、その関連性は指摘されて入るものの、科学的実証のないままであった。

最近になって我々は、ストレスによって日周性の行動リズムを乱す睡眠障害の動物モデル系を構築することに成功した。このストレス誘導性睡眠障害モデルマウスは、正常マウスに対して軽度な慢性的ストレスを負荷することによって作成され、遺伝子の改変や薬物の投与を行わないため、ヒトの睡眠障害への外挿が可能であり、その理解に繋がる可能性のあるモデル系である。このマウスでは、本来、夜行性動物として低活動であるべき明期にも活動が見られ、特に明期前半の過活動が特徴的である。睡眠リズムでも昼夜のリズムが乱れ、睡眠の断片化や睡眠深度の低下を示す。ストレス応答によるとみられる交感神経系の亢進なども観測されるので、軽度な慢性ストレスによる交感神経系のリズム制御の撹乱が睡眠障害を引き起こすものと考えられる。このような生物学的観察や脳波計測によって、睡眠障害を確認できる一方、ストレスの影響度、睡眠障害の度合いを簡便に計測評価する方法が無く、状態の把握が困難であった。

そこで、NMR-MP 法のストレス誘導性睡眠障害マウスへの適用を試みた。時系列に採取した睡眠障害マウスと対照群の血漿あわせて 43 検体を重水にて 5 倍に希釈し、BrukerBiosipin AV-500 にて軽水信号を前飽和した水素核 1 次元スペクトルを計測した。試料温度は 25℃、実数部で 16k、32k までゼロフィリングを行いフーリエ変換後、絶対値微分処理を行なって 1 検体あたり約 230 変数として主成分分析（PCA）を行なった。その結果、散布図上では、ストレス誘導性睡眠障害群と対照群の分離は明確では無かったが、変数選択は行わず、明期後半群のみを抜き出して対照群とともに再度主成分分析を行うとはっきりとした第一主成分軸に沿った左右の分離傾向が現れ、ストレスの影響度または睡眠障害の状態を簡便に可視化することができた。

sleep disorder, nmr metabolomics, mouse

講演番号：2A37a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ A 校舎 37 会場

ラット小腸における難消化性二糖 Melibiose の水溶性ケルセチン配糖体吸収促進作用

Melibiose, a non-digestible saccharide, promotes absorption of quercetin glycosides in rat small intestine

○田中 誠也[1]、篠木 亜季[2]、原 博[2] ([1]北海道大・農、[2]北海道大・院農)
○SEIYA TANAKA[1], AKI SHINOKI[2], HIROSHI HARA[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Univ.)

【目的】ケルセチンは植物中に豊富に存在するフラボノイドの一種であり、大部分が配糖体として存在する。ケルセチンには抗酸化作用の他に、抗がん作用や抗動脈硬化作用などが報告されており、ケルセチンの生物学的利用性を上げることがその生理作用の増強に繋がる。先の研究で難消化性二糖、DFAⅢにケルセチンの吸収促進作用を見いだした。本研究では、ラットの小腸結紮ループを用いて、グルコースとガラクトースがα-1,6 結合した難消化性二糖である Melibiose(Mel)が、ケルセチン配糖体の吸収速度と吸収動態に与える影響を検討した。
【方法】7 週齢 Wistar/ST 雄性ラットに一週間 AIN-93G 食を摂取させ馴化後、一晩絶食させ、ケタミン・キシラジン麻酔下で門脈にカテーテルを留置した。小腸結紮ループは生理食塩水で腸内容物を洗浄後、Treitz 靱帯より 5 cm 肛門側空腸に 15 cm の結紮ループを作製し、試験溶液を注入した。試験溶液はケルセチン 3-O-β-グルコシド（イソクエルシトリン）に 1~7 分子のグルコースを結合させて水溶性を高めた酵素処理イソクエルシトリン(Q3GM, 10 mmol/L、三栄源エフ・エフ・アイ)＋Mel(100 mmol/L)ないし、対照群として Q3GM, 10 mmol/L のみの 2 群で行った。血液は、門脈に留置したカテーテルから経時的(0, 15, 30, 60 分)に採取し、60 分後腹部大動脈からも採取した。さらに空腸ループを摘出し、内容物を粘膜とともに採取した。血漿および内容物はメタノールで抽出後、ケルセチンアグリコン、抱合体、配糖体を LC-MS で測定した。
【結果】試験溶液を空腸結紮ループに注入後、門脈血中に検出されたのは主にケルセチンアグリコンと抱合体であった。アグリコンの血中濃度は 30 分まで上昇し、30 分後に Mel 群では対照群より約 2 倍の有意な高値を示した。一方、抱合体の濃度は両群で差は見られなかった。また、血中にケルセチン配糖体も低値ながら検出され、タイトジャンクション経由の吸収も存在するが、Mel の影響は見られなかった。腹部大動脈血では大半が抱合体として検出され、その濃度は門脈血の 1/5 程度で両群間に有意な差はなかったが、Mel 群では対照群と比べて増加傾向にあった。ループ内に残存したケルセチンは、対照群でアグリコンと配糖体であったが、Mel 群では配糖体は消失していた。またケルセチン残存量は Mel 群で有意な低値を示した。これらの結果から、Mel は細胞内経路を介したケルセチンアグリコンの吸収を促進させることが示された。よって Mel にはケルセチンの生物学的利用性の上昇による、その生理作用の増強が期待できる。

quercetin, melibiose, absorption

講演番号：2A37a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ A 校舎 37 会場

トランス脂肪酸長期摂取ラットにおける抗動脈硬化リン脂質プラスマローゲンの変動

Variation of anti-atherogenic phospholipid plasmalogen in rats fed *trans* fatty acids

○千葉 俊[1]、西向 めぐみ[2]、原 博[2] ([1]北海道大・農、[2]北海道大院農)
○Shun CHIBA[1], Megumi NISHIMUKAI[2], Hiroshi HARA[2] ([1]Hokkaido Univ, [2]Hokkaido Univ)

【目的】プラスマローゲン(Pls)は、グリセロール骨格の *sn*-1 位に、ラジカル感受性が高いビニルエーテル型結合を持つアルケニル型リン脂質である。これまでの研究で、動脈硬化の危険因子であるトランス脂肪酸を高濃度で摂取することにより、血漿 Pls が減少し、また Pls の *sn*-1 位にトランス脂肪酸が組み込まれることが明らかになった。しかし、トランス脂肪酸をより長期間摂取したときの、血漿と組織中 Pls の変動は明らかになっていない。本研究では、4 ヶ月間トランス脂肪食を摂取したラットにおける、体内 Pls 濃度変動および *sn*-1 位へのトランス脂肪酸組み込みを、エタノールアミンクラス(PlsEtn)とコリンクラス (PlsCho) 別に検討した。
【方法】6 週齢の Wistar-ST 雄性ラットを AIN-93G で準拠した試料で 7 日間馴化した後、大豆油 7%添加の標準食群と 7%の大豆油に 23%のナタネ硬化油(*trans* 18:1 を 38%含有)を添加した高脂肪食群(トランス脂肪酸食群)の計 2 群に分けた。4 か月の試験飼育後、麻酔下で腹部大動脈血および肝臓、小腸粘膜、心臓、腓腹筋、上大動脈、海馬、小脳、中脳、大脳皮質を採取した。採取サンプルは脂質抽出後、LC-MS/MS 法により PlsEtn と PlsCho、計 66 分子種を定量した。
【結果】トランス脂肪酸食群の PlsCho は、血漿および脳を除くすべての組織で減少しており、特に動脈壁での減少が大きかった。一方、PlsEtn に有意な減少はなく、心臓では増加した。*sn*-1 位別に解析すると、PlsEtn、PlsCho 共に 16:0 炭素鎖を有する分子種が大きく減少し、一方 18:1 分子種が増加していた。特に PlsEtn の 18:1 分子種の増加が顕著であり、その増加は *sn*-1 位へ *cis* 18:1 炭素鎖にかわり *trans* 18:1 が大量に組み込まれるためであった。代表的 PlsEtn 分子種である DHA およびアラキドン酸を *sn*-2 にもつ分子種で調べると、*sn*-1 が 18:1 の分子種のうち 60～80%が *trans* で占められていた。以上、長期トランス脂肪酸食摂取は体内 PlsCho を大きく減少させ、PlsEtn の *sn*-1 位へ *trans* 鎖が大量に組み込まれることが明らかとなった。今後これら現象の生理的意義、特に血管内皮を中心に動脈硬化症との関連を検討する。

plasmalogen, *trans* fatty acids

講演番号：2A37a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ A 校舎 37 会場

変形性膝関節症における加水分解コラーゲンの効果

Effect of collagen hydrolysates on the progression of knee osteoarthritis

○上原 一貴、松尾 俊輝、中島 正博、渡部 睦人、野村 義宏（東農工大農・硬蛋研）
○Kazuki UEHARA,Toshiki MATSUO,Masahiro NAKASHIMA,Mutsuto WATANABE,Yoshihiro NOMURA (Tokyo Univ. Agri. and Technol.)

【目的】加水分解コラーゲン(Collagen hydrolysates: CH)摂取により、変形性膝関節症（膝 OA）の症状を改善するという報告があり、その作用機序を明らかにすることを目的とした。本研究では、まず in vivo の系として自然発症型 OA モデルである STR/Ort マウスに CH を経口投与することで OA 症状改善効果の検証を行い、次に in vitro の系として CH 由来ペプチド及びその構成アミノ酸が滑膜細胞のヒアルロン酸合成に与える影響について検討を行った。
【方法】31 週齢の STR/Ort 雄マウスに胃ゾンデを用いて、CH(400mg/kg B.W.)を 4 週間連日投与し、35 週齢で解剖を行った。膝関節の組織標本を作製し、Mankin 法を用いてスコア化し、OA 症状を評価した。対照群として、OA を発症しない STR/Ort 雌マウスを用いた。

ウサギ膝関節由来滑膜細胞 HIG-82 は、10%ウシ胎児血清を含む F-12 培地でコンフルエントになるまで培養し、200nmol/ml の濃度の CH 由来ペプチドおよびアミノ酸(Pro-Hyp、Hyp-Gly、Pro、Hyp)を添加した無血清培地に交換し培養した。培養 24 時間後、上清を回収し、定法に従いヒアルロン酸を精製し、アガロースゲル電気泳動でヒアルロン酸の分子量を、セルロースアセテート膜電気泳動で合成量を測定した。
【結果および考察】OA 発症群の Mankin スコアは 9.14 であった。(OA 非発症対照群スコアは 2.29) CH 投与によりスコアは 6.75 を示し、OA 症状の改善が認められた。特に、プロテオグリカンの関節表面部の改善が顕著であった。

滑膜細胞の培養上清中のヒアルロン酸は、アガロースゲル電気泳動による解析の結果、コントロールでは 700k 付近から低分子にかけて広い分子量分布を示していたのに対し、Pro-Hyp および Hyp-Gly 添加によりその分布は 1000k 付近へと変化し、合成されたヒアルロン酸が高分子化していることが示された。また、セルロースアセテート膜電気泳動よる解析の結果では、ヒアルロン酸の合成量に差は認められなかった。Pro および Hyp 添加では、ヒアルロン酸の分子量および産生量に影響を与えなかった。したがって、CH 摂取後に血中で検出されるジペプチド添加は、ヒアルロン酸の量ではなく、高分子化という質の向上に寄与しているものと考えられる。

以上の結果から、加水分解コラーゲン(CH)の OA 改善効果は、吸収されたジペプチドが滑膜細胞のヒアルロン酸代謝に影響を与え、産生するヒアルロン酸を高分子化させることで、変形性膝関節症の進行を抑えている可能性が考えられる。

osteoarthritis, collagen hydrolysates, hyaluronan

講演番号：2A37a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ A 校舎 37 会場

人工甘味料の摂取がマウス肝臓遺伝子発現プロファイルに与える影響の網羅的解析

Effects of artificial sweeteners on the hepatic gene expression profile in mice

○牛尼 翔太[1]、石島 智子[1]、阿部 啓子[1,2]、中井 雄治[1] ([1]東大院農生科・ 応生化、[2]神奈川科学技術アカデミー)
○Shota USHIAMA[1], Tomoko ISHIZIMA[1], Keiko ABE[1,2], Yuji NAKAI[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]KAST)

【背景】

摂食に伴う生体の応答は、栄養面に加えて、視覚・嗅覚・味覚といった感覚面からの効果も複雑に関係している。味覚に関しては、味物質は口腔内の味覚受容体で受容され味情報として脳で知覚されるだけでなく、消化管内にも味覚受容体の存在が最近報告されており、腸脳相関が新たな研究基軸として浮上している。とくに甘味は口腔で嗜好性を付与すると共に、腸管で甘味物質が受容されることによってホルモン放出や糖取り込みの活性化など様々な変化を誘導する可能性がある。

人工甘味料はエネルギー源とならないため、砂糖に代表される糖類の代替として低カロリー食品に添加されている。その一方で、近年、人工甘味料を摂取させたラットは糖類を摂取させたラットに比べて体重増加が著しいという報告(Swithers *et al.*,***Appetite***, 55, 2010, 528-533)から、人工甘味料が生体のエネルギー代謝に影響を与える可能性が示唆されている。しかし、これまでに人工甘味料の摂取が各組織に与える影響について詳細な解析はなされていない。

【目的】

本研究は、マウスに対して人工甘味料（サッカリン）による甘味刺激を与え、末梢組織における遺伝子発現プロファイルの変化について DNA マイクロアレイを用いて網羅的に捉えることを目的とした。

【結果と考察】

解剖前日から絶食・絶水処理を行った後、水またはサッカリン溶液を飲水させた。6 時間後に解剖を行い、各群のマウスより肝臓を摘出した。得られた肝臓から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析に供した。サンプル間クラスタリングの結果、サッカリン溶液を飲水させた群でクラスターを形成し、人工甘味料の摂取によって遺伝子発現プロファイルが大きく変化したことが示唆された。さらに発現変動遺伝子を抽出し、Gene Ontology(GO)に基づいた機能解析を行った結果、エネルギー代謝関連遺伝子の発現変動が確認された。とくに、脂肪酸 β 酸化関連遺伝子の多くが発現上昇していたことから脂質分解の亢進が示唆された。一方、脂肪酸やコレステロール生合成関連遺伝子の多くが発現低下していたことから、脂質合成は抑制されていることが考えられた。水またはサッカリン溶液をゾンデによって胃内投与したマウスではこれらの変化はほとんど見られなかった。以上の結果から、口腔での甘味受容が肝臓の遺伝子発現に影響を与えたことが示唆された。

saccharin, liver, DNA microarray

講演番号：2A37a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ A 校舎 37 会場

高脂肪高コレステロール食摂取ラットにおける肝臓脂質代謝に及ぼす乳酸発酵豆乳の影響

Effects of Lactic Acid-fermented Soymilk on Hepatic Lipid Metabolism in Rats Fed a High Fat and High Cholesterol Diet

○小林 麻貴[1]、平畑 理映[2]、榊原 里恵[3]、江草 信太郎[3]、福田 滿[1]（[1]武庫川女子大 生環・食栄、[2]武庫川女子大院 生環・食栄、[3]マルサンアイ・開発統括部）
○ Maki KOBAYASHI[1], Rie HIRAHATA[2], Rie SAKAKIBARA[3], Shintaro EGUSA[3], Mitsuru FUKUDA[1] ([1]Mukogawa Women's Univ., [2]Mukogawa Women's Univ., [3]Marusan-Ai Co., Ltd.)

【目的】近年、食生活の欧米化や運動不足により脂質異常症が増加している。一方ではその予防に有効な大豆食品の摂取量は不足しがちである。大豆は機能性因子である大豆タンパク質、イソフラボンを豊富に含み脂質代謝改善効果、抗肥満効果が報告されている。本研究室では大豆食品の中でも容易に食生活に取り入れられる豆乳に注目し、植物性食品由来乳酸菌で発酵させた乳酸発酵豆乳を作製した。本研究室ではこれまでに普通食、高コレステロール食、高脂肪食摂取ラットにおける乳酸発酵豆乳の脂質代謝改善効果を報告している。しかし実際の食事では脂肪やコレステロールを単独摂取することはなく、両方を同時に摂取することが多い。そこで本研究では 2 種類の高脂肪高コレステロール食摂取時の乳酸発酵豆乳の脂質代謝への影響を検討した。
【方法】7 週齢 SD 系雄性ラットを AIN-93G 組成飼料で 1 週間予備飼育したのち AIN-93G 組成飼料の 0.5%をコレステロールで 30%を脂肪で置換した脂質高含量食群、脂質高含量食群の飼料を大豆タンパク質濃度 10%相当に乳酸発酵豆乳で置換した脂質高含量食-乳酸発酵豆乳群、AIN-93G 組成飼料の 0.125%をコレステロールで、15%を脂肪で置換した脂質中含量食群、脂質中含量食群の飼料を大豆タンパク質の濃度 10%相当に乳酸発酵豆乳で置換した脂質中含量-乳酸発酵豆乳群の計 4 群に分け 5 週間飼育した。毎週尾動脈採血を行い、血液成分分析を行った。飼育終了後、肝臓脂質を Folch 法で抽出し、肝臓の脂質量、コレステロール濃度、トリグリセライド濃度を測定した。さらに肝臓の脂質代謝関連遺伝子の発現量の変化を Real time RT-PCR 法で調べ比較した。
【結果】脂質中含量食群で乳酸発酵豆乳摂取により血漿コレステロール濃度、トリグリセライド濃度は有意に低下したが、脂質高含量食群では有意な低下はなかった。肝臓脂質量は乳酸発酵豆乳摂取により脂質高含量食群、中含量食群ともに有意に低下し、肝臓コレステロール量も両群で有意に低下し、トリグリセライド量は脂質高含量食群で減少傾向、脂質中含量食群で有意に低下を示した。肝臓の脂質代謝関連遺伝子発現については乳酸発酵豆乳摂取により脂質中含量食群でのみ FAS 遺伝子発現量が有意に減少し、SREBP-2 遺伝子発現量が有意に増加した。以上の結果から、脂質高含量食投与群では肝臓脂質の過剰蓄積により肝機能低下が起こったため、乳酸発酵豆乳摂取による血中脂質分泌低下作用は認められなかったが、脂質中含量食投与群では、乳酸発酵豆乳により肝臓遺伝子発現調節作用をともなった肝臓脂質蓄積抑制効果と血中脂質分泌量低下による血中脂質濃度上昇抑制効果が認められ、肝臓の脂質代謝を改善することが示唆された。

lactic fermented soymilk, lipid metabolism, high fat and high cholesterol diet

講演番号：2A37a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ A 校舎 37 会場

ヒト由来ミトコンドリア局在性 NAD キナーゼ遺伝子のノックダウンの影響

Effect of knockdown of human mitochondrial NAD kinase gene

○川畑 豊、大橋 一登、河井 重幸、村田 幸作（京大院農）
○Yutaka KAWABATA,Kazuto OHASHI,Shigeyuki KAWAI,Kosaku MURATA (Kyoto Univ.)

【背景】NAD キナーゼ (NADK) は、NAD^+のリン酸化による $NADP^+$の合成反応を触媒する生体に必須の酵素である。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のミトコンドリア局在性 NADK (Pos5) は、NADK 活性よりも強い NADH キナーゼ (NADHK: NADH のリン酸化による NADPH 合成反応を触媒する) 活性を有するため、NADHK と呼ばれることもある。一方、ヒトでは、細胞質局在性 NADK は知られていたが、ミトコンドリア局在性 NADK は不明であった。最近、当分野ではヒトの機能未知タンパク質 C5orf33 がミトコンドリア局在性 NADK であることを明らかにした。C5orf33 は、その V_{max} や NAD^+ に対する K_m 値は細胞質局在性 NADK のそれらよりも著しく低い（各々、約 1/200 および約 1/50）、真核生物由来であるにも拘わらず ATP とポリリン酸の両方をリン酸供与体として利用できるといった特徴を有する。C5orf33 とヒト細胞質局在性 NADK との相同性は Blastp で検出できない程度に低く、寧ろ C5orf33 はマラリア原虫のミトコンドリア局在性 NADK ホモログと高い相同性を示す。本研究では、siRNA による C5orf33 のノックダウンの影響を調べた。

【方法・結果】siRNA による C5orf33 のノックダウンを試みたところ、対照 siRNA で処理した対照細胞と比較して、70%程度のノックダウンが qPCR により観察された。さらに、抗 C5orf33 抗体を用いて、トランスフェクションの 3 日後のノックダウンを確認した。siRNA 処理した細胞をミトコンドリア画分と細胞質画分に分画したところ、ミトコンドリア画分の NADK 活性はノックダウンにより約半分程度に減少した。ノックダウンにより、細胞の生存性、細胞質局在性 NADK、細胞質およびミトコンドリア局在性 $NADP^+$依存イソクエン酸脱水素酵素（*IDH1* および *IDH2*）各遺伝子の転写量に変化は観察されなかったが、活性酸素種（ROS）の増大が観察された。対照細胞のミトコンドリア画分の NADK 総活性は細胞質画分の NADK 総活性の 4%程度に過ぎなかったが、ROS 制御における C5orf33 の重要性が示された。

NAD kinase, mitochondria, HEK293A cells

講演番号：2A37a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ A 校舎 37 会場

廃用性骨萎縮における活性酸素産生と抗酸化酵素 SOD1 の役割

Cytoplasmic reactive oxygen speicies and SOD1 regulate bone mass during mechanical unloading

○清水 孝彦[1]、森川 大智[1,2]、野尻 英俊[2]、斎田 良知[2]、小林 慶司[1,2]、渡辺 憲史[1]、小澤 裕介[1]、小池 正人[1,2]、麻生 義則[3]、金子 和夫[2]([1]千葉大院医、[2]順天大院医、[3]東京医科歯科院医)
○Takahiko Shimizu[1], Daichi Morikawa[1,2], Hidetoshi Nojiri[2], Yoshitomo Saita[2], Keiji Kobayashi[1,2], Kenji Watanabe[1], Yusuke Ozawa[1], Masato Koike[1,2], Yoshinori Asou[3], Kazuo Kaneko[2] ([1]Grad. Med., Chiba Univ., [2]Grad. Med., Juntendo Univ., [3]Grad. Med., Tokyo Med. Dent. Univ.)

【目的】運動器（骨・筋肉）の恒常性には機械的刺激が重要であり、長期臥床・麻痺・無重力環境などにより機械的刺激が減弱すると、骨・筋は萎縮を呈する。この萎縮からの回復には、多大な時間と労力を要する為に、予防法の確立に向けた様々な研究がなされている。しかし、臨床的に有効な予防法や治療法はいまだ見つかっていない。一方、我々は細胞質に局在する主要な抗酸化酵素 SOD1 の欠損マウスで骨量が顕著減少することを報告したが [1)]、廃用性骨萎縮への SOD の関与は不明である。本研究では、廃用性骨萎縮における活性酸素と SOD の関与を検討した。

【方法・結果】廃用性骨萎縮のモデルとして 10 週齢の雄マウスの尾部懸垂を行い、7 日後に採取した骨髄細胞での活性酸素産生量を蛍光試薬と FCM にて測定したところ、荷重群に比し有意に蛍光強度が増強していた（$p < 0.05$）。尾部懸垂後 7 日の骨髄細胞では、ALP や Runx2 など骨芽細胞分化関連遺伝子の mRNA 発現レベルの低下と破骨細胞分化マーカー（Cathepsin K）の発現レベル上昇が認められた。同時に、細胞内 SOD のうち SOD1 の有意な特異的な上昇が認められたが、SOD2（ミトコンドリアに局在）の発現レベルに変化は見られなかった。これら結果から、尾部懸垂による骨髄内活性酸素の増加に対する SOD1 の関与が示唆された。次に、SOD1 欠損マウスにて尾部懸垂を行い、3D マイクロ CT 解析を行った、欠損マウスの大腿骨で骨量（BV/TV）の減少が増悪した（野生型：-23.9%、欠損マウス：-47.5%）。骨形態計測においては、欠損マウス尾部懸垂において骨形成率の減少が有意に悪化したが、尾部懸垂による骨吸収活性上昇率には有意差は認められなかった。さらに抗酸化剤ビタミン C を尾部懸垂時に腹腔内に 2 週間投与したところ、有意に骨萎縮が軽減した。

【考察】骨における機械的刺激減弱と酸化ストレスの関連性が明らかとなった。抗酸化酵素 SOD1 は、機械的刺激減弱に伴い発現上昇を認め、その欠損により骨萎縮を増悪させた。これらより SOD1 は機械的刺激減弱による骨萎縮に対する防御的役割があることが示唆され、SOD1 を中心とする抗酸化の観点からの機械的刺激減弱による骨萎縮に対する予防の可能性が示唆された [2)]。

【参考文献】

1) Nojiri, H. *et al., J. Bone Miner. Res.* **2011**, *26*, 2682-2694.
2) Morikawa, D. *et al., submitted*.

mechanical unloading, reactive oxygen species, superoxide dismutase

講演番号：2A37a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ A 校舎 37 会場

ビタミン C によるアルツハイマー病態の緩和

Prevention of Alzheimer-like pathologies by vitamin C *in vivo*

○村上 一馬[1,2]、村田 央[2]、小澤 裕介[2,3]、木下 憲明[4]、入江 一浩[1]、白澤 卓二[5]、清水 孝彦[2,3]（[1]京大院農、[2]都老人研、[3]千葉大院医、[4]免疫生物研、[5]順天大院医）
○ Kazuma MURAKAMI[1,2], Nakaba MURATA[2], Yusuke OZAWA[2,3], Noriaki KINOSHITA[4], Kazuhiro IRIE[1], Takuji SHIRASAWA[5], Takahiko SHIMIZU[2,3] ([1]Kyoto Univ., [2]TMIG, [3]Chiba Univ., [4]IBL, [5]Juntendo Univ.)

【目的】アルツハイマー病（AD）の原因物質と考えられている 42 残基のアミロイドβペプチド（Aβ42）は，可溶性オリゴマーを形成することによって，シナプス毒性ならびに行動異常を誘発する．我々はこれまでに，細胞質ラジカルの消去能低下に伴う酸化ストレスは，Aβのオリゴマー化を促進することで，AD 病態を悪化させることを明らかにした.[1)] 本研究では，ビタミン C（VC）の抗酸化機能に着目し，AD モデルマウス（J20 系統）に VC を飲水投与させて，各種 AD 様症状への効果を調べた．

【方法】Aβオリゴマー形成能，Aβ42 量，シナプトフィジン量，グルタチオン量を ELISA あるいはウェスタンブロットを用いて，酸化ストレス（タンパク質のカルボニル化）はドットブロット法にて，老人斑ならびに神経炎症を免疫組織染色実験で，また空間認知機能を Y 迷路，高架式十字迷路によって、それぞれ評価した．

【結果】実験に用いた AD マウスは，8 ヶ月齢頃から AD 様症状が現れることが知られている．そこで，6 ヶ月齢の AD マウスに 1% VC 水（1.3 g/kg/day）を予防的に半年間与えた後，12 ヶ月齢の時点で行動試験に供し，各種生化学解析を行った．その結果，VC 投与群の AD マウスは，非投与群に比べて Y 迷路及び高架式十字迷路試験において有意な改善効果を示した．また，オリゴマー形成能，ならびに無毒性の Aβ40 に対する可溶性 Aβ42 比が VC 投与によってそれぞれ顕著に減少し，これらの改善効果は酸化ストレス，シナプス毒性の緩和とよく相関していた．さらに，AD のもう一つの病理学的特徴であるタウタンパク質のリン酸化も VC 投与群において軽減されていた．しかしながら，老人斑の蓄積やそれに伴うアストログリアの異常炎症は改善されなかった．以上の結果より，水溶性ビタミンである VC は老人斑より可溶性オリゴマーを標的とすることによって，各種 AD 病態を緩和していることが示唆された．近年，がん患者への高濃度 VC の点滴療法がすでに実施されていることから，VC による副作用の心配はあまりないと考えられ，今後 VC は有望な抗 AD 薬になる可能性がある.[2)]

【参考文献】

1) Murakami, K. *et al., J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 44557-44568.
2) Murakami, K. *et al., J. Alzheimers Dis.* **2011**, *26*, 7-18.

amyloid ß, oxidative stress, vitamin C

講演番号：2A37a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ A 校舎 37 会場

白金およびパラジウムナノコロイドは *Sod1* 欠損に起因する皮膚萎縮を改善する

Platinum and palladium nanoparticles reverse skin atrophy induced by *Sod1* deficiency

○澁谷 修一、小澤 裕介、清水 孝彦（千葉大院医　先進加齢医学）
○Shuichi Shibuya,Yusuke Ozawa,Takahiko Shimizu (Dept. of Adv. Aging Med., Chiba Univ. Grad. Sch. of Med.)

活性酸素制御は生体機能の維持に重要であり、酸化ストレスは加齢性疾患の発症に強く関与する。安全性が高く活性酸素消去活性を持つ物質は加齢性疾患の予防や治療への応用に期待できる。SOD は O_2^- を H_2O_2 へ不均化する酵素で、生体内に存在する酸化ストレスに対抗する抗酸化システムの中で重要な役割を果たしている。これまで我々は SOD1 欠損マウスが皮膚萎縮や低代謝型骨量減少など様々な変化を示すことを明らかにしてきた。また、白金（Pt）ナノコロイドは強い抗酸化活性と安全性が報告されている。本研究では皮膚老化モデルマウスに対する Pt -パラジウム（Pd）ナノコロイド混合液の病態改善効果および抗酸化効果を調べることを目的とした。Pt ナノコロイド溶液（1 μmol）の抗酸化活性を調べたところ、SOD 活性は 2,142 ± 423 U（SOD Assay Kit-WST; Dojindo)、カタラーゼ活性は 69 ± 16 U（Amplex Red Catalase Assay Kit; invitrogen)であり、SOD とカタラーゼ活性を有する SOD/カタラーゼ模倣物質であることが示された。この活性は室温での 4 週間のインキュベーションにより有意に減少したが、Pt ナノコロイドに 3 倍モル量の Pd ナノコロイドを加えた混合液はインキュベーションによる抗酸化活性の減少が有意に抑制され、Pd ナノコロイドによる Pt ナノコロイドの抗酸化活性の保持効果が示された。さらに、SOD1 欠損マウス真皮線維芽細胞に Pt ナノコロイド溶液、Pd ナノコロイド溶液、および Pt-Pd ナノコロイド混合液を添加し、内因性スーパーオキシド（O_2^-）を dihydroethidium で検出した。その結果、無添加の線維芽細胞で見られた 20%O_2 環境下での顕著な細胞内 O_2^- 発生は Pt ナノコロイド溶液添加により有意に抑制されたが、室温でインキュベーションした Pt ナノコロイド溶液は O_2^- 発生の抑制は認められなかった。一方、Pd ナノコロイド溶液単独では O_2^- 発生の抑制は認められなかったが、Pt-Pd ナノコロイド混合液は室温でインキュベーションしても細胞内 O_2^- 発生を有意に抑制した。*In vivo* 実験として皮膚萎縮を示す SOD1 欠損マウス背面皮膚へ 4 週間連日で Pt-Pd ナノコロイド混合液を経皮投与し、病態改善効果を調べた。その結果、マウス皮膚への Pt-Pd ナノコロイド混合液塗布は皮膚厚が有意に増加し、SOD1 欠損マウスの皮膚萎縮を正常化した。更に、皮膚中の過酸化脂質も有意に減少した。以上の結果から、Pd ナノコロイドは Pt ナノコロイドの酸化劣化を抑制することが示され、Pt-Pd ナノコロイド混合液は安定した抗酸化活性により細胞内 O_2^- を消去し、内因性 O_2^- に起因する皮膚病態をマウス個体で改善することが明らかになった。

SOD, antioxidant, skin atrophy

講演番号：2A37a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ A 校舎 37 会場

新規タマゴ由来ペプチド摂取が関節損傷に及ぼす効果

The effect of new egg-derived peptide intake to joint damage

○内野 貴之[1]、朱 暁琳[1]、渡部 和哉[2]、安 芝英[2]、青笹 正義[2]、堀江 典子[2]、益田 和二行[2]、丸 勇史[2]、金 武祚[2]、浅井 克仁[1] ([1]（株）エバーライフ、[2]（株）ファーマフーズ)
○Takayuki UCHINO[1], Xiaolin Zhu[1], Kazuya Watabe[2], Jiyeong An[2], Masayoshi Aosasa[2], Noriko Horie[2], Kazuyuki Masuda[2], Isafumi Maru[2], Mujo Kim[2], Katsuhito Asai[1] ([1]Everlife Co.,Ltd., [2]Pharma Foods International Co.,Ltd.)

【目的】 鶏卵は、生体（ヒヨコ）を形作る全ての成分が含まれているバイオカプセルである。これまでに我々は、卵由来成分に骨の成長促進効果があることを報告してきた。 本研究では、新たに開発したタマゴ由来ペプチド（iHA）の軟骨に対する効果を、軟骨前駆細胞を用いた *in vitro* 試験およびウサギ関節軟骨損傷モデルを用いた *in vivo* 試験により評価した。

【方法】 *in vitro* 試験はマウス軟骨前駆細胞株（ATDC5）を用いて実施した。iHA 添加条件で培養した ATDC5 細胞の細胞増殖率を、経時的に測定した。また iHA を添加した同細胞の培養上清中のヒアルロン酸産生量を測定した。*in vivo* 試験はウサギ軟骨損傷モデルを用いて実施した。ウサギ膝関節の損傷手術（骨孔作製）後、iHA を 3 週間経口投与した。投与期間終了後、損傷部位を摘出し、骨孔の剖検と、アルシアンブルー染色、サフラニン O 染色による病理組織学的解析を行った。

【結果】 iHA の添加により、ATDC5 細胞は顕著に増殖し、ヒアルロン酸産生が促進された。さらに iHA 添加により軟骨細胞への分化が促進されることが分かった。本結果から、iHA が軟骨細胞活性化機能を有することが示唆された。

iHA を経口投与したウサギの膝関節損傷部位の剖検の結果、iHA 投与群で明らかな修復促進が観察された。また、損傷部位の病理組織学的解析の結果、コントロールと比較して iHA 投与群で軟骨基質染色面積の有意な増加が認められた。

本結果から、新規タマゴ由来ペプチドである iHA が、膝関節損傷の修復に効果を有することが示唆された。

Egg-derived peptide, Hyaluronic acid, Joint damage

講演番号：2A37a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ A 校舎 37 会場

新規タマゴ由来ペプチド摂取がヒト膝関節痛に及ぼす効果

The effect of new egg-derived peptide intake on human knee joint pain

○青笹 正義[1]、渡部 和哉[1]、安 芝英[1]、堀江 典子[1]、朱 暁琳[2]、内野 貴之[2]、リム カンヒョン[3]、益田 和二行[1]、丸 勇史[1]、浅井 克仁[2]、金 武祚[1] ([1]（株）ファーマフーズ、[2]（株）エバーライフ、[3]世明大学)

○ Masayoshi AOSASA[1], Kazuya WATABE[1], Jiyeong AN[1], Noriko HORIE[1], Xiaolin ZHU[2], Takayuki UCHINO[2], Kang-Hyun LEEM[3], Kazuyuki MASUDA[1], Isafumi MARU[1], Katsuhito ASAI[2], Mujo KIM[1] ([1]Pharma Foods International Co.,Ltd., [2]Everlife Co.,Ltd., [3]Semyung Univ.)

【目的】 鶏卵は、生体(ヒヨコ)を形作る全ての成分が含まれているバイオカプセルである。

前演者の発表では、新規タマゴ由来ペプチド(iHA)が軟骨前駆細胞の増殖とヒアルロン酸産生を促進することが確認された。更には経口投与によるウサギの膝関節損傷部位に対する修復促進作用が示された。

本試験では、前演者らの試験結果を元に膝関節痛を有する被験者を募集し、実際に膝関節痛に対するヒトボランティア試験を行い効果を検証した。

【方法】 膝関節痛を有する被験者 51 名を募集し、17 名ずつ 3 群に分けた。

試験群は iHA 低用量群(摂取量 50mg/日)、iHA 高用量群(摂取量 200mg/日)、プラセボ群とした。

被験者の膝関節痛の程度について、WOMAC (Western Orntario and McMaster Universities Osteoaarthritis Index、及び JOA スコアを用いた医師による聞き取り調査を行い、症状を数値化し各群間でばらつきが生じないよう群分けした。

効果の検証は、3 種類のアンケートにより評価を行った。実施したアンケートは、被験者自身が記入する主観的な評価結果が得られる WOMAC アンケートと VAS アンケート、および医師の聞き取り調査で記載し客観的な評価が得られる JOA スコアを用いた。

【結果】 VAS アンケートでは、iHA を摂取した被験者自身の体感としてひざ関節の痛み及び階段の昇降が容易になる傾向が認められた。また、WOMAC、JOA スコアでは、歩行、階段の昇降に関する項目で改善される傾向が認められた。

前演者と本研究の結果から iHA は、細胞試験、ウサギ膝関節軟骨損傷モデルを用いた動物試験、および膝関節痛を有する被験者を対象としたヒト試験において、関節軟骨に対する修復促進作用と関節痛の緩和作用が確認できた。

Egg-derived peptide, Joint pain, WOMAC

講演番号：2A37a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ A 校舎 37 会場

分離大豆タンパク質がマグネシウム欠乏ラット白色脂肪組織遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響
Effect of dietary soy protein isolate on gene expression profile in white adipose tissue of magnesium-deficient rats
○米光 翔吾[1]、石島 智子[1]、阿部 啓子[1,2]、中井 雄治[1] ([1]東京大院農、[2]神奈川科学技術アカデミー)
○Shogo YONEMITSU[1], Tomoko ISHIJIMA[1], Keiko ABE[1,2], Yuji NAKAI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]KAST)

【背景・目的】マグネシウム(Mg)は生体内において多くの生理的・生化学的作用に関与しており、その摂取不足により様々な代謝障害が引き起こされることが知られている。これまでに我々は、Mg欠乏食投与によるタンパク質利用の低下を見いだし、食餌中Mgはタンパク質代謝に深く関係することを明らかにした(Nemoto et al., Magnes Res, 2006)。食餌中のMgとタンパク質の関係については、両者の「量的関係」を変化させることによる生体への影響については報告があるものの、食餌中タンパク質の「質」がMg欠乏に与える影響については報告が無い。そこで本研究では、タンパク質給源として必須アミノ酸をバランスよく含む良質なタンパク質である分離大豆タンパク質（soy protein isolate;SPI）を用い、Mg欠乏状態にどのように影響するのかを明らかにすることを目的とした。昨年度は、血液生化学データ及び肝臓のDNAマイクロアレイ解析の結果、タンパク質給源の差がMg欠乏による血清遊離脂肪酸濃度及び肝臓の脂質代謝関連遺伝子の発現変動に表れることを報告した。本年度は、これらに関与する白色脂肪組織（WAT）でのMg欠乏状態への影響について解析を行った。
【方法】被験動物は4週齢Wistar系雄性ラットを用いた。飼料はAIN-93G飼料組成をもとに作製した。タンパク質給源にはカゼイン（コントロール）とSPIを用い、飼料中Mg濃度は正常食（0.05%）とMg欠乏食（0.02%）に設定した。24匹のラットを4群に分け(n=6)、タンパク質給源と飼料中 Mg 濃度の視点から、カゼイン正常食、カゼインMg欠乏食、SPI正常食、SPI Mg欠乏食をそれぞれに4週間自由摂食させた。飼育終了後WATを採取しDNAマイクロアレイに供し、階層的クラスター解析及び各タンパク質給源においてMg欠乏食投与による発現変動遺伝子の抽出を行った。
【結果および考察】階層的クラスター解析の結果、SPI 正常食群と SPI Mg 欠乏食群のクラスターは明確に分離せず、1 つのクラスターを形成した。このクラスターに次いで近いのはカゼイン正常食群であり、それら 3 群と最も離れたのはカゼイン Mg 欠乏食群であった。このことから、WAT においては、SPI 摂取時は Mg 欠乏の影響が弱くコントロールであるカゼイン正常食摂取時に近い状態であること、カゼイン摂取時は Mg 欠乏の影響が強く表れることが示唆された。これはタンパク質給源の影響が食餌中 Mg 濃度の違いよりも大きいことを示す肝臓の結果とは異なった。Mg 欠乏食投与による発現変動遺伝子を解析すると、カゼインと SPI で同様の発現変動した遺伝子には、脂質の取り込みに関する遺伝子、糖新生に関する遺伝子などが含まれ、カゼインと SPI で逆の発現変動した遺伝子には、ミトコンドリアの熱産生に関する遺伝子などが含まれていた。

magnesium deficiency, soy protein isolate, white adipose tissue

講演番号：2A37a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ A 校舎 37 会場

大豆粉摂取がラット肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響

Effect of soybean powder on hepatic gene expressions in rats

○高橋 陽子[1]、小西 智一[2]、八巻 幸二[1] ([1]農研機構・食総研、[2]秋田県立大・生物資源科学)
○Yoko TAKAHASHI[1], Tomokazu KONISHI[2], Kohji YAMAKI[1] ([1]NFRI, NARO, [2]Akita Prefectural Univ.)

【目的】大豆は、タンパク質や不飽和脂肪酸の多い油脂の他、ミネラル、ポリフェノール等の有用な成分を豊富に含んでいる。これらの成分は心血管病やがん、更年期障害、骨粗鬆症等に対して予防効果や症状緩和作用があると考えられている。しかし、大豆に含まれる各成分単独の作用メカニズムについては多くの研究成果が報告されている一方、大豆そのものの健康作用を追究した研究成果はあまり示されていない。本研究では、大豆粉を摂取したラットの肝臓で、代謝系にどのような影響が見られるかを DNA マイクロアレイ解析により評価した。
【方法】大豆粉を 0、12.5、25、または 50 g/100 g 含む食餌を、雄 SD ラットに 21 日間摂取させた。食餌タンパク質、脂質および食物繊維量は、各群とも 20、15、および 5 g/100 g となるように、カゼイン、パーム油およびセルロースで調整した。肝臓 RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いて組織で発現している各遺伝子の発現量を測定した。DNA マイクロアレイデータは、遺伝子発現シグナルに含まれる不要なノイズを除いて 3 パラメータ対数正規分布に従い標準化することにより、異なる実験間でも遺伝子発現変化の比較ができるようにした。大豆粉を含まない食餌群と大豆粉食群間で発現量に差があった遺伝子のデータから、肝臓の機能に対する大豆粉摂取の影響を検討した。
【結果】血清脂質濃度および肝臓中性脂肪濃度は、食餌中の大豆粉量が多い群ほど低い値を示す傾向が見られた。DNA マイクロアレイ解析で得られたデータを用いて主成分分析を行った結果、食餌中の大豆粉の量は、肝臓のトランスクリプトームの変化を説明する大きな要素であることが示された。大豆粉摂取によって発現量が変化した遺伝子について、各々が有する生物学的機能を Gene ontology で同定したところ、肝臓での脂質および脂肪酸合成に関わるトランスクリプトームに対して特異的に影響していた。これらの脂質合成系遺伝子の mRNA 発現量を個別に見ると、食餌大豆粉量の増加に伴い減少していたものが多かった。このような大豆粉摂取による肝臓での脂肪酸合成系の抑制は、酵素活性のレベルでも確認できた。また、本研究と同様に凍り豆腐摂取の影響を調べた DNA マイクロアレイデータを、本研究のデータと比較すると、大豆の総合的な機能性は、凍り豆腐が有する機能性と相関があることが明らかになった。

DNA microarray, gene expression, soy

講演番号：2A37p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ A 校舎 37 会場

UVB 照射ヘアレスマウスにおける臓器間ネットワークを介した脂肪細胞分化制御因子に及ぼす影響
Effect of UVB irradiation on transcription factors involved in adipocyte differentiation through organ networks in hairless mice

○松居 翔、岸田 黎、辻 徹、登内 彩絵、服部 一夫、大石 祐一（東農大応生科・栄養）
○Syo MATHUI,Rei KISHIDA,Toru TSUJI,Ayae TONOUCHI,Kazuo HATTORI,Yuichi OISHI (Tokyo University of Agriculture)

【目的】皮膚は人体最大の臓器で、他の臓器と有機的に関わりながら一個体を形成している。したがって、皮膚への刺激は、皮膚に限られたものだけでなく、他臓器とネットワークを形成し、身体へ様々な影響を及ぼすことが考えられる。そこで本研究では、肝臓および脂肪組織に対する UVB 照射の影響について分子レベルで検討を行った。

【方法】実験には Hos:HR-1、雌、6 週齢のヘアレスマウスを用いた。マウスは 7 日間の馴化飼育後、コントロール (CO) 群と UVB 群に群分けを行った。CO 群は、馴化飼育と同様の条件下で飼育を行い、試験に用いた。UVB 群に関しては UVB 照射試験を行った。UVB のエネルギー量は 1.6J とした。CO 群、UVB 群ともに試験 24 時間後、解剖を行い、表皮、肝臓、脂肪組織を採取した。表皮は nerve growth factor (NGF)、calcitonin gene-related peptide I (CGRP) mRNA、肝臓は CGRP、interleukin 6 (IL6)、serum amiroid A 1/2 (SAA1/2) mRNA、脂肪組織は IL6、peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ)、activating enhancer-binding protein 2 alpha (AP-2)、CCAAT/enhancer-binding protein α (C/EBPα)、C/EBPβ の mRNA 量を Real-time PCR にて測定した。血清中の SAA 濃度は、ELISA キットを用いて測定した。

【結果・考察】神経ペプチドである表皮中の NGF、CGRP の mRNA 量は CO 群に比して UVB 群で有意に増加した。このことから、知覚神経を介し UVB の刺激が他の臓器に影響を与えることが考えられた。肝臓中の CGRP、IL6、SAA1/2 mRNA 量は、CO 群に比して UVB 群で有意に増加した。さらに、血清中の SAA の濃度は、CO 群に比して UVB 群で有意に増加した。また、脂肪組織中の IL6 mRNA 量は、CO 群に比して UVB 群で有意に増加し、脂肪細胞分化に関連する PPARγ、AP-2、C/EBPα、C/EBPβ の mRNA 量は、CO 群に比して UVB 群で有意に減少した。これまでに、脂肪細胞では、SAA による NF-κB pathway を介した炎症性サイトカインの増加が報告されている。これらのことから、UVB による皮膚への刺激が、知覚神経を介して肝臓に伝わり、肝臓での炎症関連因子の遺伝子発現の変化に繋がることが考えられた。また、肝臓で合成された SAA は、血液を介して脂肪組織に働きかけ、*IL6* の発現の増加をもたらし、脂肪組織中の *IL6* は、脂肪細胞の分化に関わる遺伝子発現の減少を引き起こすことが考えられた。以上より、UVB 照射による身体への影響は、肝臓、脂肪組織の炎症を引き起こし、生活習慣病の増悪に繋がる可能性が示唆された。

UVB, organ networks, adipocyte differentiation

講演番号：2A37p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ A 校舎 37 会場

加齢による皮膚変化の分子レベル解析
Age-related changes in skin components of the rats
○井上 良希[1]、伊藤 眸[1]、中澤 京子[2]、斉藤 憲司[2]、加藤 久典[2]、服部 一夫[1]、大石 祐一[1] ([1]東農大応生科・栄養、[2]東大・総括)
○Yoshiki INOUE[1], Hitomi ITO[1], Kyoko NAKAZAWA[2], Kenji SAITO[2], Hisanori KATO[2], Kazuo HATTORI[1], Yuichi OISHI[1] ([1]Tokyo University of Agriculture, [2]The University of Tokyo)

【目的】わが国では高齢化が進み、「健康寿命」をいかに延ばすかが大きな課題となっている。加齢は、皮膚、骨格や筋組織、免疫力、ホルモンなどに影響を与えるが、その中でも、皮膚は特に加齢による影響が顕著に現れる組織の一つである。しかし、皮膚の加齢による変化を分子レベルで検討した研究は少ない。そこで我々は、ラットを用いて、皮膚における重要な構成分子であるコラーゲンやヒアルロナン量の経時的変化を測定し、その変化のメカニズムを検討した。

【方法】Wistar 系雄性ラットに AIN-93G 組成の飼料を与え、2、4、6、12、18、21 ヶ月齢の時点で解剖を行った。その後、皮膚中のⅠ型およびⅢ型トロポコラーゲン量をウエスタンブロッティング法、ヒアルロナン量をカルバゾール硫酸法によって測定した。また、皮膚の total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ（GeneChip, Rat Genome 230 2.0, Affymetrix）に供した。さらに、皮膚の collagen alpha-1(I) chain（COL1A1）、collagen alpha-1(III) chain（COL3A1）、hyaluronan synthase2（HAS2）、tumor necrosis factor-alpha（TNF-α）mRNA 量、肝臓の insulin like growth factor-I（IGF-I）mRNA 量をリアルタイム PCR により確認した。

【結果および考察】加齢に伴い、皮膚中Ⅰ型およびⅢ型トロポコラーゲン量は減少した。また、COL1A1 mRNA 量は 4 ヶ月齢以降、加齢に伴い減少し、COL3A1 mRNA 量も加齢とともに減少した。したがって、加齢によるコラーゲンの mRNA 量の減少が、コラーゲン合成の低下を引き起こすことが示唆された。一方、ヒアルロナン量は 12 ヶ月齢まで維持されたが、18 ヶ月齢で減少が認められた。しかし、ヒアルロナンの主要な合成酵素である HAS2 の mRNA 量には変化が認められなかった。リアルタイム PCR の結果、皮膚中 TNF-αの mRNA 量が加齢とともに上昇していたことから、加齢に伴って皮膚中の NF-κB の活性化が引き起こされていることが予想された。また、加齢とともに肝臓中の IGF-I mRNA 量が減少していた。NF-κB は COL1A1 mRNA の発現を抑制することが知られており、IGF-I は COL1A1 mRNA の発現を促進することが報告されている。したがって、加齢に伴う COL1A1 mRNA 量の低下は、皮膚での NF-κB 活性化と、肝臓からの IGF-I 分泌減少を介していることが考えられた。以上のことから、加齢に伴う皮膚の変化には、皮膚中の炎症性因子の発現増加と肝臓からのサイトカイン分泌減少が関与している可能性が示唆された。

aging, skin, collagen

講演番号：2A37p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ A 校舎 37 会場

プロリン異性化酵素 Pin1 は Presenilin1 に結合し、活性を制御する
Prolyl isomerase Pin1 binds Presenilin1 and regulates its activity.

○佐々木 広美、二井 勇人、内田 隆史（東北大院農）
○Hiromi SASAKI,Eugene FUTAI,Takafumi UCHIDA (Tohoku Univ. agri)

アルツハイマー病患者脳内で見られる老人斑の主要構成成分であるアミロイドβ（Aβ）は、γセクレターゼにより生成される。γ セクレターゼは、活性中心 presenilin（PS）と 3 つのサブユニット（Nicastrin、Aph1、Pen2）からなる膜タンパクプロテアーゼ複合体であり、アミロイド前駆体タンパク（APP）を膜内の複数箇所で切断し、長さの異なる Aβ（Aβ40, Aβ42, Aβ43 など；数字はアミノ酸長）が生成される。このうち、Aβ42 と Aβ43 は、アルツハイマー病発症、重症度に関連することが示唆されている。Aβ 生成に影響を与える因子として、我々は peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase（Pin1）が、APP の phosphoThr668-Pro サイトに結合し、Aβ 生成を増加させることを示した（1）。一方、Pin1 は Aβ 生成を抑制するという報告もあり（2)、その詳細な制御機構は明らかでなかった。本研究では、γセクレターゼのホモログを持たない酵母細胞に４つのサブユニットと、基質（C99,C55）を発現させ、この酵母細胞のミクロソーム膜を用いた試験管内での Aβ 生成系を構築した（3)。基質 C99 では、過去の報告と同様、Pin1 の過剰発現により Aβ 生成が増加することが示された。また、Pin1 との結合サイトを有さない C55 を基質とした場合も、Pin1 を過剰発現することで Aβ 生成量が変動することを見出した。このことから、Pin1 は基質との結合によらない機構でも Aβ 生成を制御していると推測した。γ セクレターゼ活性中心 presenilin1（PS1）には、Pin1 の作用モチーフである Thr354-Pro サイトが存在し、このサイトのリン酸化により γ セクレターゼ活性が増加することが報告されている（4)。そこで、PS1 と Pin1 の相互作用、機能解析のため、Thr354-Pro サイトの Thr 残基を、Ala や Glu に置換した変異体を作成した。この変異体のミクロソーム膜を用いて、免疫沈降を行ったところ、リン酸化に依存した PS1 と Pin1 との結合が示唆された。現在、この変異体の Aβ 生成を解析中である。

1. H. Akiyama, et al. (2005) *BBRC* 336: 521-529
2. L. Pastorino, et al. (2006) *Nature* 440: 528-534
3. S. Yagishita, et al. (2008) *BBRC* 377: 141-145
4. Y. Ryu, et al. (2010) *JNC* 115:574-584

Alzheimer's disease, Presenilin1, Pin1

講演番号：2A37p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ A 校舎 37 会場

フェネチルイソチオシアネートの糖尿病への効果

Dietary phenethyl isothiocyanate alleviates hyperglycemia in type 2 diabetic mice

○小野 弥奈、伊藤 芳明、長澤 孝志（岩手大院農・応生化）
○Mina ONO,Yoshiaki ITO,Takashi NAGASAWA (Iwate Univ.)

【目的】私たちはこれまでに本わさびに含まれる 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate の糖尿病態緩和効果を明らかにし、同じイソチオシアネート類の phenethyl isothiocyanate(PEITC)にも糖尿病モデル動物において血糖上昇を抑制する傾向があることを見出した。しかしながら、飼育期間が短期であったため、はっきりとした血糖上昇抑制効果が認められなかったこと、またその血糖低下メカニズムは不明であったことから、本研究では飼育期間を延長した際の糖尿病態への効果および PEITC の直接的な作用メカニズムについて、病態モデル動物と細胞とを用いて検討を行った。
【方法】動物実験では、KK-A^y マウス(雄、4 週齢)を用い、高脂肪食を与えた HF 群、0.05%PEITC 含有高脂肪食を与えた PEHF 群の 2 群に群分けをし、47 日間飼育した。飼育期間中に空腹時血糖および HbA1c 値を測定し、解剖後には血糖値、血液および肝臓の脂質量、糞中の脂質量および胆汁酸量、肝臓の糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量を測定した。また、Wistar 系ラット(雄、5 週齢)を用い、0.05%PEITC を含有した 20%カゼイン食を摂取させ、尿中 ITC 代謝物から PEITC の吸収率を求めた。細胞実験では、ラット肝臓由来細胞 H4IIE を用いて、PEITC 添加によるインスリンシグナルや AMPK 経路などの動態を調べた。
【結果】KK-A^y マウスの血糖値は、飼育 28 日目以降 PEHF 群で有意に低下し、HbA1c 値も有意に低値を示した。肝臓 G6Pase 発現量は PEHF 群で減少傾向を示したことから、PEITC は肝臓での糖新生を抑制することで血糖上昇を抑制した可能性が考えられた。一方、脂質代謝においては肝臓コレステロール量の低下が認められた。しかし糞中の胆汁酸量は減少しており、糞中コレテロール量の増加も認められなかったことから、脂質代謝に関しては今後詳しい検討が必要と考えられた。また、吸収率の検討から PEITC の吸収効率は高いこともわかった。
H4IIE 細胞を PEITC で刺激したところ、インスリン受容体基質である IRS1/2 に近い分子量の位置にタンパク質のチロシンリン酸化を認めたが、IRS1/2 とは異なる分子であることがわかった。また、これまで糖新生抑制のシグナルとして報告のある Akt や AMPK の弱いリン酸化が認められ、また MAPK の活性化も認めた。
以上より、PEITC の経口的な摂取により血糖上昇の抑制など糖尿病の緩和効果が認められた。細胞でのシグナル解析の結果より、種々のシグナルの活性化がみられたことから、これらの刺激が作用発現に寄与している可能性が考えられた。

isothiocyanate, insulin signal, diabetes

講演番号：2A37p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ A 校舎 37 会場

直鎖イソマルトメガロ糖がラット小腸のケルセチン配糖体吸収と血中濃度に及ぼす影響
Effect of α-1,6-glucosaccharides on small intestinal absorption of quercetin glycoside in rats
○篠木 亜季、LANG Weeranuch、熊谷 祐也、森 春英、木村 淳夫、石塚 敏、原 博（北大院農）
○Aki SHINOKI,Weeranuch LANG,Yuya KUMAGAI,Haruhide MORI,Atsuo KIMURA,Satoshi ISHIZUKA,Hiroshi HARA (Hokkaido Univ.)

【目的】直鎖イソマルトメガロ糖は、α-1,6-グルコシド結合から成り、構成単糖の重合度が 10 から多糖までの糖質である（オリゴ糖は重合度 2～9 の糖質）。本研究では、直鎖のイソマルトメガロ糖とイソマルトオリゴ糖の生理作用を検証する一環として、先に難消化性糖で見いだしたフラボノイド配糖体の吸収促進作用を検討した。フラボノイドの一種であるケルセチン配糖体（quercetin-3-*O*-β-glucoside、Q3G）は植物に豊富に存在し、発がんや動脈硬化抑制効果が報告されている。Q3G のバイオアベイラビリティを高めることができれば、これらの病態予防に寄与すると考えられる。そこで、イソマルト糖が共存する場合の Q3G 吸収を小腸結紮ループ試験および摂食試験により検討した。
【方法】ループ試験：試験動物は 7 週齢の Wistar / ST 雄性ラットを用い、麻酔下にて空腸に結紮ループを作製し、門脈に採血用のカテーテルを留置した。ループ内には、易水溶性の Q3G 混合物（Q3Gn、10 mmol / L）溶液、またはそれに直鎖イソマルトオリゴ糖（平均重合度 3.6）またはメガロ糖（平均重合度 11.0、20 mmol / L）を添加した試験溶液を注入した。門脈血は経時的（7.5、15、30 分後）にカテーテルから採取し、小腸ループは投与 30 分後に取り出した。摂食試験：試験動物は 4 週齢の Wistar 雄性ラットを用い、0.5% Q3G 添加群（対照群）、0.5% Q3G +3%直鎖イソマルトオリゴ糖またはメガロ糖添加群の 3 群で 2 週間飼育し、解剖前に尾静脈より採血した。両試験における血液中および小腸内容物中に残存する Q3G とその代謝産物の濃度は LC / MS で測定した。
【結果】ループ試験において、Q3Gn溶液を腸管に注入後、門脈血中のケルセチンアグリコン濃度は、対照と比較して直鎖メガロ糖で大きく増加し、直鎖オリゴ糖でも増加傾向を示した。ケルセチンのグルクロン酸または硫酸抱合体濃度は、直鎖メガロ糖またはオリゴ糖添加により影響されなかった。小腸管腔内に残存する可溶化Q3G量は、直鎖メガロ糖やオリゴ糖の添加で増加を示した。別途行った試験管内の試料においても直鎖メガロ糖添加により可溶化Q3Gは大きく増加した。摂食試験においては、血中アグリコンはわずかで、大半は抱合体で存在したが、このケルセチン抱合体濃度は、直鎖メガロ糖の摂取によりオリゴ糖群より大きく増加した。以上の結果より、直鎖メガロ糖はQ3Gの吸収を促進し、本来難溶性のQ3Gを小腸管腔内において可溶化することで吸収を促進したものと思われた。直鎖メガロ糖は、Q3Gのバイオアベイラビリティを高め、その生理作用増強に寄与すると推察される。
本研究は、生研センターイノベーション創出事業の支援のもとで行われた。

Linear α-1,6-glucosaccharides, Quercetin, absorption

講演番号：2A37p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ A 校舎 37 会場

キノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ（QPRT）欠損マウスの真性ナイアシン欠乏
Truly niacin deficiency in quinolinate phosphoribosyltransferase (QPRT) Knockout mice

○柴田 克己[1]、寺方 美紀[1]、福渡 努[1]、佐野 光枝[1]、福岡 伸一[2]（[1]滋賀県大栄養、[2]青山学院大）
○Katsumi Shibata[1], Miki Terakata[1], Tutomu Fukuwatari[1], Mitue Sano[1], Shin-ichi Fukuoka[2]
([1]Univ. of Shiga Pref., [2]Aoyama Gakuin Univ.)

【目的】実験動物として使用するラットやマウスはビタミンのナイアシンをアミノ酸のトリプトファンから生合成する能力が高く，今までナイアシン欠乏モデル動物を作成することができなかった．例えていえば，ラットやマウスではビタミン C 欠乏状態を作り出せないことと同じ状態であった．我々はトリプトファン完全分解経路（トリプトファン→キヌレニン→アミノカルボキシムコン酸セミアルデヒド→グルタリル-CoA→アセチル-CoA 経路）と NAD 回路をつなぐ酵素 Quinolinate phosphoribosyltransferase (QPRT, EC 2.4.2.19. キノリン酸 ＋ PRPP → ニコチン酸モノヌクレオチド ＋ CO_2 + PPi）を欠損させた QPRT-KO マウスの作成に成功した．なお，キノリン酸はアミノカルボキシムコン酸セミアルデヒドから非酵素的に生成する．本研究では，この QPRT-KO マウスがナイアシン含有食では健常に生育するが，ナイアシン欠食投与時にはナイアシン欠乏に陥るか否かを検討した．
【方法】8 週齢までは市販の固形食で飼育した QPRT 遺伝子を有する *QPRT* $^{+/+}$マウスと QPRT 遺伝子を欠損させた *QPRT* $^{-/-}$マウスを各々ナイアシン含有精製食（30 mg ナイアシンと 2.3 g のトリプトファン/kg 飼料）あるいはナイアシン欠精製食（0 mg ナイアシンと 2.3 g のトリプトファン/kg 飼料）で 23 日間飼育した．この間，飼料摂取量と体重を測定した．22～23 日の 24 時間尿を採取し，トリプトファン→ナイアシン経路の中間代謝産物量を測定した．採尿終了後，マウスを解剖し，各組織重量（大脳，肺，心臓，肝臓，腎臓，胃，腓腹筋，ひらめ筋）を測定し，各組織重量の NAD 濃度と組織染色を行った．
【結果と考察】ナイアシン含有食を投与した場合，遺伝子型に関わらず飼料摂取量，体重増加量，組織重量，組織中の NAD 濃度には両群間に差異は認められなかった．また，組織像にも差異は認められなかった．したがって，*QPRT* $^{-/-}$マウスにおいてもナイアシンそれ自体が供給されれば，健常に発育することが示された．一方，ナイアシン欠食を投与した *QPRT* $^{-/-}$マウスにおいては，ナイアシン含有食を投与された *QPRT* $^{-/-}$マウスと比較して，飼料摂取量は 60%に（p<0.01），体重は 70%に（p<0.05）低下した．また，各組織重量，NAD 濃度も *QPRT* $^{-/-}$マウスにおいて低下していた．最も顕著な NAD 濃度の低下は小腸において見られた（p<0.01）．組織像でも小腸にのみナイアシン欠乏に起因する異常が認められた．さらに，尿中にはナイアシンおよびその異化代謝産物は検出されなかった．
【結論】QPRT を欠損させた *QPRT* $^{-/-}$マウスは飼料中からナイアシンを抜けば容易にナイアシン欠乏状態となることを明らかにした．したがって，ナイアシン欠乏モデル動物としての活用が期待される．

mice, niacin-deficiency, quinolinate phosphoribosyltransferase

講演番号：2A37p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ A 校舎 37 会場

Allyl isothiocyanate 投与によるインスリン分泌亢進の作用機序の検討

Mechanisms of enhancement of insulin secretion by administration of allyl isothiocyanate

○森 紀之[1]、倉田 真奈美[2]、松村 成暢[2]、山崎 英恵[2]、灘本 知憲[1]、伏木 亨[2] ([1]滋賀県大・人間文化、[2]京大院・農)
○ Noriyuki MORI[1], MANAMI KURATA[2], Shigenobe MATSUMURA[2], Hanae YAMAZAKI[2], Tomonori NADAMOTO[1], Tohru FUSHIKI[2] ([1]Univ. of Shiga Prefecture, [2]Kyoto Univ.)

【背景•目的】 Allyl isothiocyanate (AITC) はわさびやマスタードの主な辛味成分であることが知られている。これまでの検討により、AITC はマウスに胃内投与することで、熱刺激受容体である TRPV1 を介して糖質エネルギー代謝を亢進させることが明らかになった。さらに AITC の胃内投与は血糖値上昇を抑制することや血中インスリン濃度を上昇させることが明らかになっている。AITC 投与によるインスリン分泌亢進には、膵臓への直接作用や神経系を介した作用等が考えられるが、作用機序に関しては不明な点が多い。本研究では TRP 受容体に着目した AITC の胃内投与による血中インスリン濃度上昇の作用機序の解明を目的とし、AITC の直接作用による膵臓からのインスリン分泌亢進に TRP 受容体が関与するか検討を行った。
【方法】 C57BL/6 マウス、♂を実験に用いた。また、それぞれ C57BL/6 をバックグラウンドとする TRPA1KO、TRPV1KO マウスを用いた。血中インスリン濃度の測定では、マウスを 3 時間絶食させた後、AITC (25mg/kg) または vehicle を胃内投与し、投与 15 分後に断頭採血による採血を行った。採取した血漿中のインスリン濃度を市販のイムノアッセイキットを用いて測定し、血中インスリン濃度とした。膵島からのインスリン分泌能測定では、麻酔したマウスの膵臓を HANKS 液で膨張させて摘出し、コラゲナーゼ処理後、顕微鏡下でランゲルハンス島を単離した。単離したランゲルハンス島を AITC 添加グルコース溶液中でインキュベートした。インキュベート後の溶液を回収し、溶液中のインスリン量 (インスリン分泌量) を RIA 法で測定した。
【結果•考察】 AITC 投与により野生型マウスおよび TRPA1KO マウスでは投与後 15 分で血中インスリン濃度の上昇が確認されたが、TRPV1KO マウスでは確認されなかった。よって AITC 投与による血中インスリン濃度の上昇には TRPV1 が関与していることが考えられた。また、マウスより単離した膵島からのインスリン分泌能の評価では、インキュベート溶液への AITC 添加により野生型マウスおよび TRPA1KO マウスの膵島からのインスリン分泌量の増加が観察されたが、TRPV1KO マウスの膵島ではインスリン分泌量の増加は観察されなかった。従って、AITC が膵島の TRPV1 に直接作用しインスリン分泌を促進する可能性が示された。以上の結果から AITC 胃内投与による血中インスリン濃度の増加には AITC の TRPV1 を介した膵臓への直接作用が寄与している可能性が考えられた。

allyl isothiocyanate, TRPV1, carbohydrate oxidation

講演番号：2A37p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ A 校舎 37 会場

高コレステロール食給餌マウスへの杜仲葉熱水抽出液投与の効果

Effect of the administration of hot water extract of *Eucommia ulmoides* (Tochu) leaves in mice fed a high-cholesterol diet

○荒木 真由美[1]、宮澤 真紀[2]、渡部 由貴[3]、瀬戸山 央[1]、廣川 隆彦[1]、青木 信義[1]、安間 智慧子[4]、小林 征洋[5]、亀井 飛鳥[3]、阿部 啓子[3,6] ([1]神奈川県産技セ、[2]神奈川県衛研、[3]神奈川科学技術アカデミー、[4](有)碧山園、[5]東京海洋大院・海洋科学・食品流通、[6]東大院・農生科・応生化)
○Mayumi Araki[1], Maki Miyazawa[2], Yuki Watanabe[3], Ou Setoyama[1], Takahiko Hirokawa[1], Nobuyoshi Aoki[1], Chieko Yasuma[4], Yukihiro Kobayashi[5], Asuka Kamei[3], Keiko Abe[3,6] ([1]Kanagawa Industrial Technology Center, [2]Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, [3]KAST, [4]Hekizanen Co., Ltd., [5]Tokyo Univ. of Marine Science and Technology, [6]Univ. of Tokyo)

【目的】

杜仲（トチュウ、*Eucommia ulmoides*）の樹皮は古くから生薬として利用されてきた。近年、日本ではその葉を用いた健康茶が知られるようになったが、その効能や安全性は完全には解明されていない。これまでに我々は食餌性高コレステロール血症マウスにおいて肝臓中脂質濃度の上昇及び肝機能評価項目の値の上昇が杜仲葉熱水抽出液の摂取によって改善される傾向を確認した。今回、DNA マイクロアレイを用いて肝臓の遺伝子発現の変動を網羅的に解析し、杜仲葉熱水抽出液の作用を遺伝子レベルで解明することを目的とした。

【方法】

杜仲葉を煮出し、水に対する杜仲葉重量が 4g/L 及び 20g/L になるように、2 種類の杜仲葉熱水抽出液を調製した。4 週齢の雄性 C57BL/6NCrSlc マウスを 12 匹ずつコントロール(C)群、4g/L 杜仲葉熱水抽出液投与(T4)群、20g/L 杜仲葉熱水抽出液投与(T20)群の 3 群に分けた。4 週間、全群に 2%コレステロールを含む高コレステロール食を自由摂取させ、C 群には水を、T4 群、T20 群には各杜仲熱水抽出液を自由摂水させた。期間終了時に肝臓を採取した。この肝臓組織片から Total RNA を抽出し、マウス全ゲノムが搭載されたマイクロアレイを用い、全遺伝子発現量を測定した。

【結果】

肝機能評価項目の値は C 群に比べ T4 群では抑制される傾向を示した。この T4 群と C 群の二群間で DNA マイクロアレイ解析を行った。遺伝子発現量測定データを DFW アルゴリズムにより正規化し、Rank Products 法により二群間比較を行った。階層的クラスター解析の結果、二群の遺伝子発現プロファイルが異なっていることが示唆された。Gene Ontology に基づく遺伝子セット濃縮度解析の結果、T4 群では、C 群に比べ細胞分裂に関連するカテゴリーで発現が上昇した遺伝子の割合が有意に高く、炎症応答に関連するカテゴリーで発現が減少した遺伝子の割合が有意に高いことが分かった。現在、詳細な解析を行っている。

Eucommia ulmoides, Tochu, DNA microarray

講演番号：2A37p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ A 校舎 37 会場

紅麹の骨形成促進活性のスクリーニング

Screening for osteogenic promotion activity of beni-koji

○池尻 真美、比嘉 由美子、安里 尚、橘 信二郎（琉大農・亜熱生資）
○Mami Ikejiri, Yumiko Higa, Hisashi Asato, Shinjirou Tachibana (Dept.Biosci.Biotechnol.Univ.Ryukyus)

【研究背景･目的】紅麹菌(*Monascus* 属菌)は子のう菌類に属するカビで、沖縄県では琉球王朝時代より豆腐ようの製造に用いる重要な微生物である。紅麹菌は、コレステロール降下作用をはじめとする様々な生理活性を示す多様な二次代謝産物を産生することが報告されている。近年、紅麹抽出物による骨形成促進効果が報告されているが、その詳細なメカニズムや生理活性物質の構造などについては明らかにされていない。骨代謝は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成によって行われ、正常な骨代謝の維持には両細胞の働きのバランスが重要とされている。このため、骨粗鬆症は一般的に骨吸収の亢進と骨形成の抑制による骨代謝バランスの崩壊が主な病因とされている。すなわち、骨代謝における骨形成促進は、骨破壊に傾いた骨粗鬆症の骨代謝バランス改善に寄与することが期待されている。現在、骨粗鬆症の治療薬として有効とされているのは骨吸収抑制剤であり、骨形成促進物質は骨粗鬆症の新しい治療法や予防法の開発に貢献できると考えられる。そこで本研究では、マウスの骨芽細胞 MC3T3-E1 を用いて紅麹抽出物の骨形成促進活性をスクリーニングすることを目的とした。
【方法・結果】米および麦で調製した紅麹の水抽出物をろ過滅菌して本実験に用いた。マウス前駆骨芽細胞 MC3T3-E1 株を用い、10%牛胎児血清を含むαMEM を基本培地に用いた。紅麹抽出物の MC3T3-E1 細胞に対する細胞毒性を MTT ホルマザン比色法にて評価した。96 穴プレートに 1×10^4 cells/well となるように播種して 37℃、5 % CO_2 下で 24 時間培養し、紅麹抽出物およびその PBS 希釈液を 10 μl/well ずつ添加してさらに 24 時間培養した。培養液に MTT 溶液を加えて生成した不溶性ホルマザン色素を抽出し、吸光度を測定してコントロールに対する生存率で細胞毒性を評価した。紅麹抽出物による骨形成促進（石灰化）を評価するために、石灰化染色（Alizarin red S 染色法）およびアルカリフォスファターゼ(ALP)活性測定を行った。48 穴プレートに細胞を 5×10^3 cells/well で播種し、2 日間培養してコンフルエントにした後、アスコルビン酸およびβ-グリセロリン酸を培地に加えて分化誘導刺激すると共に、同分化誘導刺激培地に対し終濃度 10% (v/v)になるよう試料を添加した。2 日毎に培地交換を行い、14 日間培養した後、石灰化染色を行った。スクリーニングの結果、幾つかの試料においてコントロールに比べて骨形成が 160~200 %に増大したのに対し、コントロールに比べて 80%近く骨形成を抑制する試料も確認された。

Monascus, bone formation, osteoblast

講演番号：2A37p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ A 校舎 37 会場

3T3-L1 脂肪細胞に対する短梗五加抽出物の作用

The effect of Goka extracts on 3T3-L1 adipocytes

○西田 美也子、深井 一子、永塚 貴弘、佐藤 眞治、西田 浩志、小西 徹也（新潟薬大応生科）
○Miyako Nishida,Ichiko Fukai,Takahiro Eitsuka,Shinji Sato,Hiroshi Nishida,Tetsuya Konishi (Niigata Univ. Pharm. Applied Life Sci.)

【目的】五加（短梗五加）は、サポニンやクロロゲン酸等を多く含むウコギ科の低木であり、中国ではその根皮は生薬として用いられている。その葉や実は機能性食品として期待されているが詳細な研究はされていない。我々はマウス繊維芽細胞由来の 3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いたこれまでの研究で五加の葉と実が脂肪細胞への分化を促進すること、また脂肪細胞の善玉アディポサイトカインであるアディポネクチンの分泌を増加させる事を明らかにした。そこで、本研究では脂肪細胞への分化を促進させる物質を同定するため五加の実の分画抽出を行い、抽出画分で 3T3-L1 脂肪細胞への影響を検討することを目的とした。
【方法】五加の実の 80%MeOH 抽出物をヘキサン・酢酸エチル・ブタノール・水で順次抽出し、抽出画分を得た。脂肪細胞への分化促進に対する各抽出画分の影響を、分化誘導をかけた細胞及びかけない細胞各々について Oil Red-O 染色により評価した。さらに脂肪細胞分化の指標である PPARγ発現量とアディポネクチン発現量をウェスタンブロット法により評価した。さらに、五加の実の抽出物がインスリンシグナルに与える影響を検討するため、IRS、Akt のリン酸化をウェスタンブロット法により確認した。
【結果・考察】Oil Red-O 染色の結果から、分化誘導を行った細胞では五加の実のブタノール画分は 80%MeOH 抽出物に比べ脂肪細胞の脂肪蓄積量を増加させることが明らかとなった。またウェスタンブロット法の結果から、PPARγ発現量、細胞内アディポネクチン発現量が 80%MeOH 抽出物に比べブタノール画分において増加する傾向が見られた。さらに、3T3-L1 前駆脂肪細胞を分化誘導せず抽出画分を添加した実験でもブタノール画分は脂肪蓄積量を増加させた。また IRS、Akt のウェスタンブロット法の結果からブタノール画分において IRS、Akt のリン酸化が促進され、インスリンシグナルの活性化が明らかとなった。このように、五加の実の抽出物には脂肪細胞の分化を促進する成分およびインスリン様作用を持つ成分の存在が示唆され、その多くはブタノール画分に存在することが明らかになった。

3t3-l1, Goka, adiponectin

講演番号：2A37p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ A 校舎 37 会場

飲酒によって変動するマウス糞便中化合物の探索

Search for mice fecal contents affected by ethanol feeding

○蛭川 頌子、真田 峻佑、大島 寛史、三好 規之（静県大院・薬食生命科学総合学府）
○ Shoko HIRUKAWA,Shunsuke SANADA,Hiroshi OHSHIMA,Noriyuki MIYOSHI（Univ. of Shizuoka）

飲酒は、口腔、咽頭、食道、結腸直腸、肝臓と女性の乳房のがんの重要なリスク要因の一つである。特に上部消化器系のがんではエタノール代謝で重要な役割を果たすアルコールデヒドロゲナーゼ（ADH）やアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ALDH）の遺伝子型の関与や、エタノールの中間代謝物であるアセトアルデヒドが重要な役割を担っているなどが報告されている。一方、結腸・直腸がんではアルコールの摂取量が多い人ほど発がんのリスクが高まると報告されているが、ADH や ALDH の遺伝子型との関連は明らかにされていない。さらに最近では、腸内細菌叢の変動による低レベルの持続的な炎症応答と、肥満、糖尿病、脂質代謝異常など様々な生活習慣病との関連性が多く報告されている。そこで本研究では、飲酒による大腸発がんに関与する腸管内分子を同定することを目的とし、エタノール投与および対照マウス糞便の網羅的解析を行い、飲酒によって変動する糞便中化合物の探索を行った。

6 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを 1 週間の予備飼育後、20%エタノール投与群（n=10）および水道水を与えた対照群（n=9）の 2 群に分けて通常食にて 24 週間飼育を行った。飼育期間中に体重・摂餌量・摂飲量をそれぞれ測定したところ、摂餌量には群間で顕著な差は認められなかったが、エタノール投与開始後 2 週間目からエタノール投与群で有意な体重減少および 8 週間目からは摂飲量の減少が認められた。また、4 週間毎に代謝ゲージ（24 時間）を用い採取した糞便から Bligh-Dyer 法により有機層および水層画分を抽出した。抽出した各画分をそれぞれ濃縮後、UPLC-Q-TOF-MS にて、逆相および HILIC カラムによる分離、ポジティブおよびネガティブモードでの検出条件で網羅的に分析を行ったところ、異なる各分離・検出条件で、それぞれ約 900 の MS イオンピークが検出された。さらに、得られた MS イオンピークを多変量解析ソフトウェアに供し、エタノール投与によって有意に変動するピークの抽出を行ったところ、エタノール投与によって有意に増加および減少する複数のイオンピークが抽出された。

現在、エタノール投与によって有意に変動したこれらのピークの MS/MS 解析や精密質量・同位体比による化合物の同定と、同定した各化合物の起炎性および変異原性試験など生物活性試験を行い、飲酒による大腸発がんへの関与について検討を行っている。

colon carcinogenesis, alcohol, metabolomics analysis

講演番号：2A37p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ A 校舎 37 会場

ob/ob マウス糞便抽出物の分析によるメタボリック症候群新規診断バイオマーカーの探索

Search for novel diagnostic biomarkers of metabolic syndrome by analyses of fecal extraction from *ob/ob* mice

○真田 峻佑、蛭川 頌子、大島 寛史、三好 規之（静県大・薬食生命科学総合学府）
○shunsuke sanada,syouko hirukawa,hiroshi ohshima,noriyuki miyoshi（Univ of sizuken）

【目的】宿主と腸内細菌叢が相互に影響・作用しあっていることや、腸内細菌叢の変化が宿主の genotype に依存しない生理的・病理的表現型を決定・誘導する最も重要な要素の一つであることが多くの科学的エビデンスにより明確に示されつつある。特に、肥満や糖尿病、高脂血症などのメタボリック症候群様症状において、腸内細菌叢の変化に伴う低レベルの持続的な炎症がそれらの疾患を惹起・進行・重症化させることが強く示唆されている。しかし、腸管内でこれらの表現型に影響する分子群については明らかにされていない部分が多い。そこで本研究では、肥満モデルマウスである *ob/ob* マウスの糞便抽出物の網羅的解析により、腸管内で作用する炎症マーカー分子を探索し、血中サイトカイン等のバイオマーカーよりも早期に且つ正確に評価できる分子の探索・同定することを目的とした。

【方法】C57BL/6J マウス (7 週齢、雄、n=5) および *ob/ob* (7 週齢、雄、n=5) マウスを用い、搬入後から研究終了まで完全配合飼料 AIN76 を不断給与できる環境で 1 匹ずつ個別のゲージで 24 週間飼育した。4 週おきに採血し、血糖・血中脂質を測定した。さらに体重・摂餌量を経時的に測定し病態生理学的な基礎データ得た。また、各マウスの糞を 2 週おきに採取した。これをクロロホルム・水・メタノールで抽出し、有機溶媒可溶画分と水溶性画分にわけた後、乾固させ、水・メタノール混合液によく溶かし、UPLC-ESI-Q-TOF-MS に供した。得られた TOF-MS データを多変量解析ソフトウェアにて統計学的に処理し、疾患群で有意に差が認められた MS イオンピークの探索および化合物の同定を行った。

【結果】C57BL/6J マウスと比較して *ob/ob* マウスは血糖値、血中脂質、体重において顕著に数値が上昇しており、肥満を呈していた事が示唆された。両マウスの糞サンプルを UPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析の後、TOF-MS データを多変量解析ソフトウェアにて統計学的に処理することにより、*ob/ob* マウスにおいて有機溶媒可溶画分と水溶性画分の両方で C57BL/6J マウスと比較して、有意に増加・減少した複数の分子の抽出に成功した。

現在、疾患群で有意な差が認められた MS イオンピークの精密質量や同位体比、MS/MS 分析によりこれらの有意に増加・減少している分子の同定を行っている、さらに同定した化合物を NF-κB レポータージーンプラスミドを導入した大腸がん由来細胞 (HCT116、HT29、SW480) に曝露し、起炎症活性について検討を行っている。

matabolic syndrome, inflammation, biomarker

講演番号：2A37p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ A 校舎 37 会場

PQQ による MC3T3-E1 骨芽細胞の骨形成への影響

Effect of PQQ on bone formation in MC3T3-E1 cells

○比嘉 由美子、橘 信二郎（琉大農・亜熱生資）
○Yumiko Higa,Shinjiro Tachibana (Dept. Biosci. Biotechnol., Univ. Ryukyus)

【目的・背景】ピロロキノリンキノン（PQQ）は、NAD(P)、FAD に次ぐ 3 番目の酸化還元酵素の補酵素として微生物で発見された。近年、抗酸化作用や神経保護作用など PQQ の様々な生理作用が報告されている。我々は、PQQ 欠乏食給餌マウスにおいて骨格異常が現れるという報告から、PQQ が骨代謝に何らかの影響を及ぼしていると仮定した。本研究では、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 株を用いて、骨形成におよぼす PQQ の影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】MC3T3-E1 細胞は 10%牛胎児血清を含むα-MEM（基本培地）で培養した。5×10^3 個の細胞を 96 穴プレートに播種し、細胞の接着を確認した後、PQQ（10^{-12}～10^{-4} M）を含む同培地でさらに 24 時間培養し、細胞生存率を WST-1 比色法により評価した。また、1×10^6 個の細胞を 24 穴プレートに播種し、基本培地で 3 日間培養して単層形成を確認した後、L-アスコルビン酸(LAA)とβ-グリセロリン酸(βGP)および各濃度（10^{-10}～10^{-4} M）の PQQ を含む分化誘導培地にて 14 日間培養し、Alizarin red S 染色および von Kossa 染色により細胞の石灰化を評価した。対照として基本培地に LAA とβGP のみ添加した分化誘導培地で細胞を 14 日間培養した。同条件で 14 日間培養した細胞の抽出液を用いてアルカリホスファターゼ（ALP）活性を調べた。また、経時的な PQQ の影響を調べる目的で、同条件で一カ月間細胞を培養し、石灰化および ALP 活性を調べた。各ステージの細胞から TRIzol を用いて total RNA を抽出し、RT-PCR 法により骨形成関連遺伝子の発現解析を行った。

【結果および考察】未分化の MC3T3-E1 細胞は、10^{-4} M PQQ の存在下において生存率が有意に低下し、細胞増殖速度においても有意な抑制効果が観察された。一方、分化誘導後の細胞では、10^{-4} M PQQ の存在下において有意な生存率の低下が認められたものの未分化の細胞に比べて生存率の改善が認められた。また、14 日間培養した細胞では、PQQ 添加濃度に依存した石灰化の減少が認められた。14 日間培養した同細胞の ALP 活性は、PQQ 添加濃度に依存した減少が確認されたものの 10^{-10} および 10^{-6} M PQQ を添加した細胞において ALP 活性が対照よりも有意に高い値を示した。しかしながら、PQQ の長期曝露実験における経時的骨形成の観察において、培養 14 日目の細胞における ALP 活性の実験群間での変動が小さく、石灰化染色との相関性が低いことが示唆された。また、本研究では PQQ 存在下における骨形成関連遺伝子の発現変動についても検討したので併せて報告する。

PQQ, osteoblast, bone formation

講演番号：2A37p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ A 校舎 37 会場

食餌分離大豆タンパク質による脂質吸収阻害がインスリン分泌に及ぼす影響の解析

Effect of reduced triglyceride absorption on insulin secretion in rats fed soy protein diet.

○向後 雄一郎、堀内 真美、中村 卓、竹中 麻子 (明治大農)
○Yuichiro Kogo,Mami Horiuchi,Takashi Nakamura,Asako Takanaka (Meiji Univ.)

[目的]ラットに分離大豆タンパク質(SPI)をタンパク質源とする食餌を摂取させると、食後インスリン分泌が低下する。SPI による腸管での中性脂肪（TG）吸収阻害と、食餌脂質によるインスリン分泌促進が報告されていることから、本研究では SPI による TG 吸収阻害作用がインスリン分泌低下の主要因となるのかについて検討した。また、SPI が飼料及び消化管内容物のタンパク質・脂質動態に及ぼす影響を、走査型電子顕微鏡（SEM）及び共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）で観察し、脂質吸収低下との関連性を検討した。[方法]①5 週齢の Wistar 系雄ラットに 1 日 8 時間(9:00-17:00)の時間制限給餌訓練を 4 日間行った後、4 群(各群 n=5)に分けた。5 日目の 9:00 から、各実験群に、タンパク質源としてミルクカゼインを用いた 20%カゼイン(CAS)食、CAS 食中の脂質を糖質に置き換えた CASNF 食、CAS 食のタンパク質源を SPI に置き換えた SPI 食､SPI 食中の糖質の 11.4%を脂質に置き換えた SPIHF 食をそれぞれ与え、24 時間後に解剖した。また実験食摂食開始 0、1、2、8 時間後に尾から採血を行い、血中のインスリン、グルコース、TG 濃度を測定した。更に解剖時の肝臓・血中 TG 濃度を測定した。②飼料（CAS 食, SPI 食）およびこれらの飼料を摂取したラットの食後 1、2 時間後の胃内容物に染色試薬を添加し、CLSM による蛍光観察を行った。タンパク質染色には FITC（Ex:Em=488:519)、脂質染色には Nile red（Ex:Em=559:591）を使用した。観察画像の脂肪塊の数と面積を、ImageJ を用いて解析した。また食餌タンパク質、αコーンスターチの SEM による観察も行った。[結果]①食後血中インスリン濃度は､CAS 群と比べて SPI 群で低下し､SPI 群と SPIHF 群の間では差がみられなかった。食後血中 TG 濃度は CAS 群と CASNF 群間で差はなかったが､SPIHF 群では SPI 群と比較して顕著に高かった。また解剖時の肝臓・血中 TG 濃度は、SPI 摂取で有意に低くなったが、飼料中脂質量の影響を受けなかった。以上より、腸管における脂質吸収量の低下は、SPI 食摂取による食後インスリン分泌低下の主原因ではないことが示された。②飼料染色の結果、CAS 食・SPI 食いずれでもタンパク質と脂質は分離して存在していたが､タンパク質塊は CAS 食の方が大きく､SPI と CAS では形も異なっていた。SEM 観察により、CLSM と同様の CAS と SPI の構造の違いを確認した。胃内容物染色の結果、CAS 食で脂肪の周りをタンパク質が覆う乳化状態を観察したが、SPI 食ではこのような構造は観察されなかった。飼料・胃内容物共に､脂肪は球状で存在しており､その数と大きさに CAS 食と SPI 食の差は無かった。CLSM 観察でラットのタンパク質・脂質の動態を観察する新たな方法を確立し、食餌タンパク質の違いにより消化管内容物の動態が異なる可能性を示した。

soy protein, insulin, triglyceride absorption

講演番号：2A37p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ A 校舎 37 会場

大豆タンパク質食摂取時の血中アミノ酸濃度の低下が食後インスリン分泌に及ぼす影響

Effect of reduced plasma amino acid concentrations on postprandial insulin secretion in rats fed soy protein diet

○堀内 真美、向後 雄一郎、日野 美佳、佐々木 友紀、竹中 麻子 (明治大農・農化)
○Mami Horiuchi, Yuichiro Kogo, Mika Hino, Yuki Sasaki, Asako Takenaka
(Dept.Agric.Chem.,Sch.Agric.,Meiji Univ.)

【目的】我々は、ラットに分離大豆タンパク質を窒素源とする飼料を与えると、食後インスリン分泌が低下することを報告してきた。同様の現象が低タンパク質食の給餌でもみられることから、血中に吸収される特定のアミノ酸量の減少が食後インスリン分泌を低下させる可能性が考えられた。そこで本研究ではまず、20%大豆タンパク質（SPI）食、低タンパク質（5%カゼイン，5 CAS）食、通常（20%カゼイン,20CAS）食摂取後の血中アミノ酸濃度の違いを比較した。さらに、SPI 食への特定のアミノ酸の添加と、カゼイン組成のアミノ酸混合（CASAA）食からの特定のアミノ酸の除去が、食後インスリン分泌に及ぼす影響を検討した。
【方法】7～8 週齢の Wistar 系雄ラットを 1 日 8 時間制限給餌に 4 日間順化させた後、次の 3 つの動物実験を行った。①ラットを 3 群に分け、20CAS 食、20SPI 食、5CAS 食を給餌した。摂食開始 30 分後に尾静脈血、門脈血、動脈血を採取して、血漿インスリン、グルコース濃度と血中の遊離アミノ酸濃度を測定した。②ラットを 6 群に分け、20CAS 食、20SPI 食、20SPI 食にバリン(V)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、フェニルアラニン(F)をそれぞれ添加した餌を与えた。③ラットを 6 群に分け、20%CASAA 食、20%大豆アミノ酸混合（SPIAA）食、20%CASAA 食から V、I、L、F をそれぞれ完全に除いた餌を与えた。実験②③とも、実験食給餌 1 日目に、摂食開始 0、1、2、8 時間後にラットの尾静脈から採血を行い、血漿中のインスリン、グルコース濃度を測定した。2 日目に、摂食開始 30 分後の門脈血と動脈血を採取して血中の遊離アミノ酸濃度を測定した。
【結果】実験①では、20CAS 群と比べ 20SPI 群と 5CAS 群で、門脈及び動脈血中の V、I、L、F 濃度が有意に低かった。実験②では、アミノ酸添加群で、他の群と比べて添加した各アミノ酸の血中濃度が有意に増加した。SPI 食摂取時のインスリン分泌低下は、L あるいは F の添加により回復したが、V と I の添加では回復しなかった。実験③では、CASAA 群と SPIAA 群の食後血漿インスリン濃度に差はみられなかった。CASAA 群、SPIAA 群と比べ V、I、L、F をそれぞれ欠乏させた群で食後血漿インスリン濃度は有意に低く、V、I、L、F の欠乏は食後インスリン分泌を抑制することが示された。以上の結果より、SPI 食摂取時の食後インスリン分泌抑制には、ロイシンやフェニルアラニンなどの特定の血中アミノ酸濃度の低下が寄与する可能性が示された。なお本研究の一部は、生研センターイノベーション創出事業の成果である。

Soy protein, Amino acid, Insulin secretion

講演番号：2A37p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ A 校舎 37 会場

ラットα-トコフェロール代謝の性差に関する研究

Sex differences in rat alpha-tocopherol metabolism.

○藤田 尚子、竹中 麻子（明治大農）
○Naoko FUJITA,Asako TAKENAKA (Meiji Univ.)

【目的】ビタミン E の生体活性型である α-トコフェロール（toc）は、ラットの臓器や血漿中の濃度に雌雄差があることが報告されている。しかし、雌雄ラットの toc 代謝に関する詳細な報告はない。本研究では､ラットの toc 代謝の性差および性ホルモンと toc 代謝量の関連性について検討を行った。
【方法】実験 1：9 週齢 Wistar 系ラットの雄と雌に AIN93G 組成飼料を与え、2 日目から 24 時間尿を採取した。5 日目に 12 時間絶食状態で解剖し、血漿・肝臓をサンプルとして得た。肝臓・血漿の toc 濃度および尿中 toc 代謝物（α-CEHC）量を HPLC により測定した。また、肝臓・血漿のトリグリセリド（TG)、リン脂質（PF)、総コレステロール（TC）量を測定した。実験 2：3 週齢 Wistar 系ラットを用いて実験 1 と同様の解析を行った。実験 3：9 週齢 Wistar 系ラットの雄と雌に AIN93G を与えて 3 日目から 24 時間尿を採取した。4 日目に toc エマルジョン（40mg/kgBW）を経口投与し、直後 24 時間尿を採取した。5 日目に 12 時間絶食状態で解剖し、血漿および肝臓をサンプルとして得た。肝臓・血漿の toc 濃度および尿中 toc 代謝物（α-CEHC）量を測定した。実験 4：9 週齢 Wistar 系雌ラットに卵巣除去手術または偽手術を施し、22 日間市販の固形飼料を与え飼育した後、AIN93G 組成飼料を与えて 4 日目から 24 時間尿を採取した。5 日目に 15 時間絶食状態で解剖し、血漿および肝臓をサンプルとして得た。実験 1 と同じ項目を測定した。実験 5：9 週齢 Wistar 系雄ラットに精巣除去手術または偽手術を施し、実験 4 と同様の解析を行った。
【結果】実験 1：尿中 α-CEHC 量は雌で雄の約 6 倍と大幅に多かった。一方で肝臓・血漿 toc 濃度は雌が雄の約 2 倍高く、肝臓 TG 濃度も雌が雄の約 2 倍高かった。実験 2：3 週齢のラットでは尿中 α-CEHC および肝臓・血漿 toc 濃度に雌雄差はなかった。実験 3：toc エマルジョン投与により雄雌共に尿中 α-CEHC 量は増加したが、投与前後いずれにおいても雌の尿からは雄に比べ多量の α-CEHC を検出した。実験 4：卵巣除去は尿中 α-CEHC 量および肝臓・血漿 toc 濃度に影響を与えなかった。実験 5：精巣除去は尿中 α-CEHC 量を増加させた。また、肝臓・血漿 toc 濃度は精巣除去により上昇し、肝臓 TG も上昇した。以上の結果は、α-CEHC の尿中排出量が性成熟したラットの雌で雄に比べ大幅に多いことを明らかにし、この性差の要因として男性ホルモンが関与する可能性を示した。

α-tocopherol, α-CEHC, rat

講演番号：2A41a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ A 校舎 41 会場

膵β細胞における男性ホルモンシグナルの役割について
Role of androgen signaling in pancreatic beta-cells
○原田 直樹[1]、山地 亮一[1]、中野 長久[2]、乾 博[3] ([1]大阪府大・生命環境、[2]大阪女子短大、[3]大阪府大・栄養)
○Naoki HARADA[1], Ryoichi YAMAJI[1], Yoshihisa NAKANO[2], Hiroshi INUI[3] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]Osaka Woman's Junior College, [3]Osaka Pref. Univ.)

【目的】膵臓β細胞は、血糖値の上昇を感知して血糖降下ホルモンであるインスリンを分泌することで血糖値の恒常性維持に寄与する。そのため、β細胞量の減少やグルコース応答不全はインスリン分泌の減少に伴う慢性的な高血糖、つまり糖尿病発症の引き金となる。さらに、高血糖状態が持続すると、β細胞の量と質をさらに低下させる糖毒性を生じさせ、糖尿病はより一層悪化する。近年、男性において血中テストステロン値が低いと2型糖尿病の発症率が上昇するという疫学調査の結果を受けて、糖代謝における男性ホルモンの重要性が注目されている。本研究では、アンドロゲン受容体（AR）を介した男性ホルモンシグナルがβ細胞の増殖に及ぼす影響について検討し、さらに糖毒性との関わりについて検討した。
【方法・結果】ラットより単離した膵島におけるARの発現をウエスタンブロットにより検討した結果、膵島にARの発現が認められた。膵臓組織切片による解析から、ARはβ細胞の核に多く発現することが判明した。β細胞株であるINS-1細胞から単離したAR高発現株（INS-1 #6）では、テストステロン濃度依存的に細胞増殖が亢進し、siRNAによりARをノックダウンするとテストステロンによる細胞増殖促進作用は消失したことから、テストステロンによるβ細胞の増殖亢進はARを介して発揮されることが明らかとなった。また、INS-1細胞を異なるグルコース濃度（5.5－22.2 mM）で培養した結果、高グルコース下においてARタンパク質が減少することを見出した。高グルコース下でのAR mRNAの減少は観察されなかったこと、ARタンパク質の減少はプロテアソーム阻害剤であるMG132によって回復したことから、翻訳後のユビキチンープロテアソーム系による分解の亢進がARタンパク質の減少に繋がることが判明した。ARの分解はグルコーストランスポーター2を介して取り込まれたグルコースが代謝されることが重要であることが判明したが、外因性のインスリンを添加しても観察されなかったことから、分泌されたインスリンによる影響ではなかった。細胞内カルシウムイオンキレート剤であるBAPTA-AMで高グルコースによるARの分解が抑制されたこと、カルシウムイオノフォアであるA23187でもARの減少が観察され、MG132により回復したことから、AR分解にはグルコースの代謝に伴う細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が関与することが示唆された。さらに、高グルコース下のINS-1細胞ではテストステロンによる細胞増殖亢進作用は認められなかった。これらの結果から、テストステロンはARを介してβ細胞の増殖を促進することで抗糖尿病作用を持つこと、また、高血糖下ではARの減少によるβ細胞増殖低下が糖毒性に繋がることが示唆された。

androgen receptor, pancreatic beta-cell, diabetes

講演番号：2A41a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ A 校舎 41 会場

癌化シグナルによって発現変動する長鎖ノンコーディング RNA *ANRIL* の機能解析

The functional analysis of long noncoding RNA *ANRIL* regulated by oncogenic signal

○神武 洋二郎[1]、北川 雅敏[2] ([1]近畿大産業理工、[2]浜松医大医)
○Yojiro Kotake[1], Masatoshi Kitagawa[2] ([1]Kinki Univ., [2]Hamamatsu Univ. School of Medicine)

哺乳類の大規模トランスクリプトーム解析の結果、大量の長鎖非コーディングRNA（long ncRNA: lncRNA）が存在することが明らかとなったが、その機能はほとんど不明であった。しかし近年の研究から、いくつかのlncRNAについては、クロマチン制御、転写制御、核内構造体形成やタンパク質輸送などに関与することが分かり、その機能が明らかとなりつつある。最近我々は、癌化シグナル（$H\text{-}Ras^{G12V}$ 過剰発現）によって複数のlncRNAの発現量が変動することを見出した。今回、我々は癌化シグナルによって発現量が低下する*ANRIL*というlncRNAに注目し、解析を行った。*ANRIL*は*INK4* locus（CDKインヒビターp15/p16 及びp53 安定化因子ARFをコードする領域）とは逆向きに転写される。我々はこの*ANRIL*の機能として、*p15* 及び*p16* の転写を抑制していることを明らかとした。*ANRIL*をノックダウンした細胞は、*p15* 及び*p16* の転写が活性化し、早期細胞老化の表現型を示した。またChromatin immunoprecipitation assayの結果、*ANRIL*をノックダウンすると、*INK4* locus上のポリコームタンパクSUZ12 結合量が減少することが分かった。さらにRNA immunoprecipitation assayの結果、*ANRIL*がSUZ12 と結合していることが分かった。本発表では、*ANRIL*によるポリコームリクルートメントを介した*INK4* locusの転写抑制機構を紹介したい。

Long noncoding RNA, Polycomb, INK4 locus

講演番号：2A41a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ A 校舎 41 会場

FOXO3a によるテロメラーゼ制御の分子基盤

Molecular basis for the FOXO3a-induced transcriptional activation of hTERT

○山下 俊太郎[1]、片倉 喜範[2] ([1]九州大院シス生、[2]九州大院農)
○Shuntaro Yamashita[1], Yoshinori Katakura[2] ([1]Kyushu Univ., [2]Kyushu Univ.)

【目的】これまでに本研究室では、長寿遺伝子として知られる SIRT1 がヒト正常線維芽細胞におけるテロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子（*hTERT*）の転写増強を通じてテロメラーゼの活性化を引き起し、その結果として細胞の分裂寿命を延長しうることを明らかにしてきた。本研究では、*hTERT* 転写活性化における SIRT1 の下流因子として FOXO3a に注目し、その関与について検証した。

【方法】本研究においては、モデル細胞としてヒト臍帯血由来正常線維芽細胞 HUC-F2 細胞を用いた。遺伝子解析はプロモーターアッセイ、定量 RT-PCR 法及び Chromatin immunoprecipitation (ChIP)アッセイにより評価した。

【結果と考察】まず、FOXO3a が SIRT1 により誘導される *hTERT* の転写増強に寄与しうるか検証した。その結果、SIRT1 が FOXO 依存的な転写を活性化すること、FOXO3a ノックダウン細胞において、SIRT1 による *hTERT* 転写増強が抑制されること、さらに dominant active FOXO3a が、SIRT1 と同様に E-box/c-MYC 依存的に *hTERT* の転写活性化を引き起こすとともに、*hTERT* コアプロモーター領域におけるヒストンのアセチル化を誘導することも明らかになった。以上の結果から、SIRT1 は FOXO3a を活性化させることで、c-MYC 依存的に *hTERT* の転写活性化を引き起こしていることが明らかになった。

最後に、FOXO3a が細胞老化に与える影響についても検証した。その結果、dominant active FOXO3a の発現によって、正常線維芽細胞の分裂寿命が延長することが明らかになった。以上の結果から、FOXO3a による *hTERT* 転写の活性化は、細胞分裂寿命の延長につながりうるものと考えられた。

hTERT, FOXO3, anti-aging

講演番号：2A41a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ A 校舎 41 会場

ヒト Fc ε RI 発現制御における転写因子の直接的な役割
Direct role of transcription factor on regulation of human FcεRI expression
○笠倉 和巳[1]、稲毛 英介[1,2]、鈴木 竜洋[1,2]、八代 拓也[1]、馬場 洋介[1,2]、原 むつ子[1]、大塚 宜一[2]、清水 俊明[2]、大保木 啓介[4]、松本 健治[4]、斎藤 博久[4]、小川 秀興[3]、奥村 康[3]、西山 千春[1] ([1]順天堂大・医・アトピー疾患研究センター、[2]順天堂大・医・小児科、[3]順天堂大・医・免疫学、[4]国立成育医療研究センター・免疫アレルギー研究部)
○ Kazumi Kasakura[1], Eisuke Inage[1,2], Ryuyo Suzuki[1,2], Takuya Yashiro[1], Yosuke Baba[1,2], Mutsuko Hara[1], Yoshikazu Ohtsuka[2], Toshiaki Shimizu[2], Keisuke Oboki[4], Kenji Matsumoto[4], Hirohisa Saito[4], Hideoki Ogawa[3], Ko Okumura[3], Chiharu Nishiyama[1] ([1]Atopy (Allergy) Research Center, [2]Department of Pediatrics, [3]Department of Immunology, Juntendo Univ. Sch. Med., [4]Department of Allergy and Immunology, National Research Institute for Child Health and Development)

【背景/目的】アレルギー疾患が急増する現代、アレルギー炎症の予防・治療法の開発は急務である。高親和性 IgE 受容体(FcεRI)はアレルギー炎症誘導の責任細胞であるマスト細胞や好塩基球に発現し、抗アレルギーのターゲット分子である。FcεRI は IgE と結合するα鎖、細胞内にシグナルを伝達するβ、γ鎖の 3 つのサブユニットから構成されている。これまでにヒト FcεRI α、β鎖遺伝子における発現制御解析により両遺伝子の転写調節に重要な転写因子群が同定されている。そこで、これらの遺伝子群の si RNA を用いて FcεRI 各サブユニットの発現制御における直接的な作用を解析した。【方法】ヒトマスト細胞株 (LAD2)に転写因子 PU.1、GATA-1、GATA-2 に対する si RNA をエレクトロポレーション法により導入した。si RNA 導入 48 時間後の LAD2 を用いて、FcεRI 各サブユニットの mRNA 発現を定量 PCR、細胞表面の FcεRI 発現を FACS により解析した。また、各転写因子のノックダウンがマスト細胞の機能に及ぼす解析するために IgE/抗原による脱顆粒応答をβ-hexosaminidase 活性を指標として評価した。また、ChIP アッセイにより FcεRI α、β鎖遺伝子のプロモーター領域への各転写因子の結合能を解析した。さらに、細胞株に加えてヒト末梢血由来のマスト細胞を用いて上記実験を行った。【結果/考察】PU.1、GATA-1、GATA-2 に対する si RNA の導入により細胞表面の FcεRI 発現が抑制された。また、FcεRI α鎖の mRNA 発現もそれぞれの si RNA の導入により抑制された。GATA-2 の si RNA 導入ではα鎖に加えてβ鎖の mRNA 発現も抑制された。さらに、ChIP アッセイにより FcεRI α、β遺伝子のプロモーター領域にそれぞれの転写因子が結合し得るか確認したところ、mRNA 発現の調節作用と相関してα鎖プロモーター領域には 3 つ全ての転写因子が、β鎖プロモーターには GATA-2 が結合することが明らかとなった。これらの結果から、PU.1、GATA-1 はα鎖、GATA-2 はα、β鎖の転写調節を直接担っており、FcεRI の発現制御に関わっていることが示された。FcεRI を介した IgE/抗原刺激による脱顆粒応答も各転写因子の si RNA 導入により抑制された。またその抑制効果は FcεRI 発現の抑制効果と相関していた。さらに、上記の細胞株に加えてヒト末梢血由来 $CD34^+$ 細胞から分化させたマスト細胞を用いた解析においても各転写因子のノックダウンにより FcεRI の発現抑制が確認された。以上のことから、PU.1、GATA-1、GATA-2 各 si は FcεRI 発現を抑制し、引き続いて、その効果は IgE/抗原によるマスト細胞のアレルギー応答を抑制し得るものであることから、転写因子の発現制御を介した FcεRI 発現制御が今後アレルギーの予防・治療に用いられることが期待される。

mast cell, FcεRI, transcription factor

講演番号：2A41a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ A 校舎 41 会場

成体海馬神経新生の促進と海馬依存性記憶形成能力との関係性の解析

Relationship between promoting adult hippocampal neurogenesis by memantine and hippocampus-dependent memory formation

○石川 理絵[1]、金 亮[1]、難波 隆志[2]、高坂 新一[2]、内野 茂夫[2]、喜田 聡[1,3]（[1]東農大院・農・バイオ、[2]（独）国立精神・神経医療研究センター神経研究所、[3]CREST,JST）
○Rie ISHIKAWA[1], Ryang KIM[1], Takashi NAMBA[2], Shinichi KOHSAKA[2], Shigeo UCHINO[2], Satoshi KIDA[1,3] ([1]Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, Japan, [2]National Institute of Neuroscience, NCNP, [3]CREST. JST)

成体神経新生は側脳室下帯と海馬歯状回顆粒細胞下層において認められる。成体海馬神経新生と記憶形成能力との関連性は数多く報告されているが、成体海馬神経新生の促進による影響を解析した例は少ない。NMDA 型グルタミン酸受容体阻害剤メマンチン投与により成体海馬神経新生が著しく促進されることから、本研究ではメマンチン投与による成体海馬神経新生の促進が海馬依存的記憶形成に与える効果を解析した。3 カ月齢の成体雄マウスにメマンチンを 50 mg/kg で腹腔内投与し、その 3 日後、3 週間後、あるいは 4 ヶ月後に、海馬依存性記憶を評価できる社会的認知記憶課題およびモリス水迷路課題に供した。メマンチン投与 3 日後あるいは 4 ヶ月後に記憶課題に供した場合にはコントロール群と同程度の社会的認知記憶及び空間記憶が観察された。しかし、メマンチン投与により増殖が促進された神経幹細胞が成熟した時期にあたる投与 3 週間後に記憶課題に供した場合には、メマンチン投与群では社会的認知記憶及び空間記憶の顕著な向上が観察された。また、細胞増殖マーカー 5-bromo-2-deoxyuridine(BrdU)を投与した解析から、行動解析に用いた全てのメマンチン群において新生細胞数が顕著に増加していること、すなわち、神経新生の亢進が確認された。さらに、興味深いことに、メマンチン投与 3 週間後に記憶課題に供したメマンチン群では、BrdU 陽性細胞数とモリス水迷路課題の TQ 区に滞在した時間、すなわち、神経新生と空間記憶の強さとの間に有意な正の相関関係が観察され、神経新生が記憶向上に貢献することが強く示唆された。最後に、メマンチン投与により新生した神経細胞が記憶回路に取り込まれていることを解析するため、メマンチン投与 3 週間後にモリス水迷路課題において空間記憶を形成させて、プローブテストによる記憶想起後に、記憶想起時に活性化されたニューロンのマーカーとなる転写因子 CREB のリン酸化型 CREB（pCREB）と BrdU の二重免疫染色を行った。その結果、pCREB と BrdU の二重陽性細胞数はメマンチン投与群においてコントロール群よりも有意に多く観察された。さらに、全 BrdU 陽性細胞数中の二重陽性細胞数の割合を算出した結果でも、メマンチン投与群ではコントロール群と比較して有意にこの割合が高いことが示され、新生されたニューロンが優先的に記憶回路に取り込まれていることが強く示唆された。以上の結果から、メマンチン投与による成体海馬神経新生の促進が海馬依存性記憶形成能力の向上を導くことが示唆された。

adult hippocampal neurogenesis, memantine, memory formation

講演番号：2A41a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ A 校舎 41 会場

社会的認知制御記憶固定化および社会性認知記憶に基づいた新規性認知機構の組織学的解析
Understanding mechanisms for formation and regulation of social recognition memory at the anatomical level

○谷水 俊之[1]、門間 和音[1]、岡野 絵美子[1]、張 悦[1,2]、福島 穂高[1,2]、喜田 聡[1,2] ([1]東京農大院・農・バイオ、[2]JST, CREST)
○ Toshiyuki TANIMIZU[1], Kazune KADOMA[1], Emiko OKANO[1], Yue ZHANG[1,2], Hotaka FUKUSHIMA[1,2], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]JST, CREST)

記憶は保持時間の観点から、数時間程度しか保持されない短期記憶と最長一生保持される長期記憶に分けられる。不安定な記憶は新規遺伝子発現依存的な固定化のプロセスを経ることによって、安定な長期記憶として保持される。本研究では、社会的認知記憶課題を用いて、成熟マウスが幼若マウスを記憶する社会的認知記憶固定化、さらに、記憶固定化後に幼若マウスが既知であるか新規であるかを認識するメカニズムを組織学的に解析した。まず、初期応答遺伝子 c-fos 及び Arc の発現誘導を指標とした免疫組織化学染色法を用いて、社会的認知記憶固定化時に遺伝子発現が誘導される脳領域を同定した。その結果、幼若マウスにエクスポージャーした後の固定化誘導時に前頭前野、前帯状皮質、扁桃体基底外側部、海馬において、顕著な c-fos 及び Arc 発現誘導が観察され、これら脳領域が社会的認知記憶固定化に関与することが示唆された。さらに、免疫組織化学染色にて観察された c-fos 陽性細胞数の領域間の相関関係について解析した。その結果、幼若マウスにエクスポージャーした時間が長くなるに連れて領域間の正の相関性が強くなることが観察され、社会的認知記憶固定化誘導時に複数の脳領域にまたがるネットワークが形成されることが示唆された。また、顕著な c-fos 発現が誘導された脳領域にタンパク質合成阻害剤アニソマイシンを局所注入した結果、前頭前野、前帯状皮質あるいは海馬における遺伝子発現阻害により、社会的認知記憶固定化の阻害が観察され、これら脳領域における新規遺伝子発現は社会的認知記憶固定化に必須であることが示された。続いて、既知の幼若マウスを再度エクスポージャーした際に、遺伝子発現が誘導される脳領域を c-fos 発現を指標にして解析した。その結果、前頭前野、前帯状皮質、扁桃体基底外側部では、新規及び既知どちらの幼若マウスにエクスポージャーした場合でも顕著な c-fos 発現誘導が観察されたのに対して、海馬では既知の幼若マウスにエクスポージャーした場合では c-fos 発現誘導は観察されないことが明らかになった。従って、海馬はマウスの新規性を認識する機構に関与しており、新規のマウスと認識した場合のみ活性化されることが示唆された。

memory, social recognition, consolidation

講演番号：2A41a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ A 校舎 41 会場

新規物体認知記憶固定化制御機構の脳組織学的解析
Understanding mechanisms for consolidation of object recognition memory
○河野 恭平[1]、張 悦[1,2]、谷水 俊之[1]、岡野 絵美子[1]、喜田 聡[1,2] ([1]東京農大院・農・バイオ、[2]JST, CREST)
○Kyohei KONO[1], Yue ZHANG[1,2], Toshiyuki TANIMIZU[1], Emiko OKANO[1], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]JST, CREST)

記憶は脳に保持される時間で数時間程度の短期記憶と、数日から最長一生保持される長期記憶に分けられる。不安定な記憶が安定な長期記憶として保持されるためには、新規遺伝子発現依存的な固定化と呼ばれるプロセスを必要とする。この固定化には転写因子 c-AMP responsive element binding protein (CREB)による転写活性化を必要とすることが明らかにされている。一方、げっ歯類を用いた記憶研究では、記憶能力を評価する課題として、新規物体認知記憶課題が広く用いられている。しかしながら、組織学的な観点からの新規物体認知記憶の制御機構は、ほとんど明らかにされていないのが現状である。そこで、本研究では、新規物体認知記憶固定化のメカニズムを組織レベルで解明することを目的として、CREB 標的遺伝子である最初期遺伝子 c-fos の発現誘導を指標に、マウスにおける新規物体認知記憶固定化時に CREB を介する遺伝子発現が誘導される脳領域を同定した。物体を設置していないオープンフィールドにマウスを 1 日 20 分間 3 日間連続で入れて新規環境に馴化させ、4 日目に 2 種類の物体を設置したオープンフィールドにマウスを 15 分間入れた (Exploration 群)。その 90 分後の c-fos 発現を免疫組織化学染色法により様々な脳領域について解析した。コントロール群として、4 日目に物体を設置しなかった Habituation 群、馴化期間を設けずに、物体を設置したオープンフィールドにマウスを直接入れた No habituation 群、また、マウスに処置を施さない Home cage 群を設定した。その結果、前帯状皮質、海馬では Exploration 群において顕著な c-fos 発現が誘導されることが初めて明らかとなった。また、新規物体認知に重要であることが示唆されていた島皮質と嗅周皮質においても c-fos 発現誘導が観察された。以上の結果から、新規物体認知記憶固定化に前帯状皮質、海馬、島皮質、嗅周皮質が関与していることが強く示唆された。

Memory, Consolidation, CREB

講演番号：2A41a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ A 校舎 41 会場

CLOCK/BMAL1 によるサーカディアン転写リズムを制御する細胞内情報伝達経路の同定
Analyses of intracellular signal transduction pathways regulating circadian rhythms of CLOCK/BMAL1-mediated transcription in NIH3T3 cell

○森下 良一[1]、三浦 大樹[1]、喜田 聡[1,2]([1]東京農大院・農・バイオ、[2]JST, CREST)
○Yoshikazu MORISHITA[1], Daiki MIURA[1], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]JST, CREST)

bHLH-PAS 型転写調節因子 BMAL1 と CLOCK はヘテロダイマーを形成して、E-box 配列に結合する。この CLOCK/BMAL1 の標的遺伝子群の転写制御を起点とした転写 - 翻訳フィードバックループによって、高等動物における細胞レベルのサーカディアンリズムが産み出されている。CLOCK/BMAL1 によるサーカディアン転写リズムはサーカディアンリズム産生の中枢である視交叉上核のみならず、末梢組織においても観察され、組織特異的機能の制御に寄与することが明らかにされている。現在までに、細胞内カルシウムイオンや cAMP 情報伝達経路がサーカディアンリズム制御に関与することが示唆されているものの、細胞内情報伝達経路と CLOCK/BMAL 1 による転写制御のクロストークはほとんど解析されていない。以上の背景から、本研究では、CLOCK/BMAL1 による転写リズム制御機構解明を目的として、サーカディアン転写リズムを制御する細胞内情報伝達経路の同定を試みた。50％ウマ血清含有培地による血清ショックを NIH3T3 細胞に与えた結果、過去の報告に一致して、血清ショック後 18 時間をピークとした CLOCK/BMAL1 標的遺伝子 DBP (albumin D-element binding protein) mRNA の発現リズムが観察され、血清ショックによってサーカディアン転写リズムの同調が誘導されることが確認された。そこで、この同調系における Dbp mRNA の発現リズムに対する各種情報伝達経路の選択的阻害剤群 [U0126 (MEK)、SP600125 (JNK)、SB203580 (p38)、H89 (PKA)、LY294002 (PI3K) など] 添加の効果を定量的 RT-PCR 法により解析した。その結果、PKA 阻害剤 H89 添加により、血清ショック後 12 及び 18 時間における Dbp mRNA の発現量の増加が阻害された。以上の結果から、NIH3T3 細胞における Dbp mRNA の発現リズム制御に PKA 情報伝達経路が関与することが示唆された。現在、各種阻害剤の影響、また、Dbp 以外の時計遺伝子群の転写リズムに対する阻害剤の影響を解析している。

circadian rhythm, Dbp, NIH3T3

講演番号：2A41a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ A 校舎 41 会場

クロマグロのトランスクリプトーム解析
Transcriptome analysis of pacific bluefin tuna
○森 一樹[1]、田代 康介[1]、久原 哲[1]、服部 正平[2]、中村 洋路[3]、菅谷 琢磨[3]、斉藤 憲治[3]([1]九大院農、[2]東大院、[3]中央水研)
○ Kazuki MORI[1], Kosuke TASHIRO[1], Satoru KUHARA[1], Masahira HATTORI[2], Yoji NAKAMURA[3], Takuma SUGAYA[3], Kenji SAITOH[3] ([1]Kyushu Univ., [2]Tokyo Univ., [3]National Research Institute of Fisheries Science)

【目的】
マグロは長距離・長時間の持続的な回遊能力と短時間の瞬発的な突進能力を併せ持つ頂点捕食者である。優れた運動能力に関して分子レベルの知見を得るために、全ゲノムドラフトシーケンシングおよび RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。

【方法・結果】
クロマグロの心臓・赤筋（血合い）・白筋（赤身）・肝臓・腎臓の 5 組織について GS FLX による RNA-seq を行い cDNA リードを得た。全ゲノムドラフトシーケンシングによって予測された約 2 万 7 千遺伝子のコード領域に対して cDNA リードをマッピングし、貼り付いたリード数から各遺伝子の発現量を推定した。
瞬発力を担う白筋（赤身）では、解糖系遺伝子群の発現(RPKM)が全発現量の半分以上を占めており、強力な無酸素運動能力と整合している。取り分け glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase は一遺伝子だけで全発現の 1/4 に達していた。一方で赤身が白筋であるにも関わらず赤色を呈しているように、酸素貯蔵タンパク質であるミオグロビンも赤筋比で 1/6 程度とはいえ発現していたことは、有酸素運動能力を併せ持つことも示唆している。
白身魚であるタイセイヨウサケに関する EST 解析の報告(Adzhubei AA, et al., 2007)では、赤筋は白筋に近い発現プロファイルを示していたのに対して、クロマグロの赤筋における発現は白筋よりむしろ心臓に似ており、心臓と同様に持続的な運動に適応していることが示唆された。赤筋の酸化的リン酸化関連の遺伝子発現は心臓よりさらに高く全発現量の 4 割以上を占めていた。
このようにクロマグロの白筋と赤筋はそれぞれの目的に適応して高度に発達していると考えられる。各組織で共通または特異的に使い分けられているアイソザイムについても述べる予定である。

tuna, transcriptome, muscle

講演番号：2A41a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ A 校舎 41 会場

ビタミン D 受容体の新規相互作用因子の同定と機能解析

Identification of novel interactant of Vitamin D Receptor

○朝妻 知子、岡田 麻衣子、白髭 克彦（東大分生研）
○Tomoko ASATSUMA,Maiko OKADA,KATSUHIKO SHIRAHIGE (Univ. Tokyo)

【背景・目的】

ビタミン D 受容体(VDR)はビタミン D(D_3)をリガンドとして活性化する核内受容体であり、生体内においてはカルシウム代謝をはじめとする様々な生理作用に関連した遺伝子の発現を制御する。VDR の転写制御機構においては、リガンド依存的なコリプレッサー、コアクチベーター複合体の変換等が知られており、これまでに多様な VDR 相互作用因子が同定されてきた一方で、D_3 の作用機構の全てが明らかになっている訳ではない。近年、当グループでは VDR を含む、一部の核内受容体複合体が *in vitro* で自己ユビキチン化(E3)活性を持つことを明らかにした。そこで本研究では、VDR の自己 E3 活性を指標とした複合体精製を行うことで、VDR 新規相互作用因子の同定を試みた。

【方法】

新規相互作用因子同定にあたり、VDR 複合体を分画し、同定済みである主要な因子群の除外を計った。ヒト胎児腎臓由来 293 細胞より取得した核抽出液を AF-Heparin カラムを用いて分画し、各画分で VDR 複合体の自己 E3 活性を検討した。この結果、各画分特異的な活性を見出したため、この活性を指標に VDR 複合体構成因子の探索を行った。

【結果】

強い E3 活性を有した画分に含まれた VDR 相互作用因子を質量分析器に供した所、機能未知タンパク質 BEND3 (BEN domain containing 3)を同定した。共免疫沈降を行った結果、BEND3 と VDR との結合は D_3 非依存的であった。そこで、VDR の転写機能における BEND3 の役割を検討した。ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った結果、BEND3 は VDR の D_3 依存的な転写活性化能を正に制御した。また、ヒト大腸ガン由来 HT-29 細胞を用いて D_3 標的遺伝子 Cyp24a1 の活性化について検討した結果、BEND3 のノックダウンにより標的遺伝子の活性化が減弱した。

【展望】

以上、本研究では VDR 新規相互作用因子として BEND3 を同定し、BEND3 が VDR の転写活性化機構に関与する可能性を見出した。今後、D_3 存在下における BEND3 複合体構成因子の同定を試みる等、更なる解析を行い、BEND3 による VDR 転写活性化の分子機構を明らかにしていく予定である。

Vitamin D Receptor, complex purification, transcription

講演番号：2A41a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ A 校舎 41 会場

PPARγにおける新規翻訳後修飾の探索

Searching for novel post-translational modifications of PPARγ

○桂 彰吾、横山 敦、白髭 克彦（東大分生研）
○Shogo KATSURA,Atsushi YOKOYAMA,Katsuhiko SHIRAHIGE (IMCB, University of Tokyo)

【目的】

ポストゲノム時代において、遺伝子の数だけでは生命現象の多様性を説明できないことが明らかとなってきた。この問題を説明し得る概念として、翻訳後修飾（PTMs）が知られており、PTMsを受けることでタンパク質の機能の多様性が生み出されると考えられている。さらに近年の質量分析計の発展により、未知のPTMsが今後同定される可能性が高まっている。本研究では、新規PTMsを受けるタンパク質のモデルとして、脂質代謝や脂肪細胞分化など様々な機能を担うペルオキシソーム増殖因子活性化受容体γ (PPARγ) に注目した。これまでPPARγで同定されたPTMsはリン酸化とSUMO化のみであるが、PPARγの多様な生理作用を考慮すると、様々なPTMsによるPPARγの機能制御が予想される。中でも大腸癌におけるPPARγは、腫瘍抑制作用を示すことが知られているものの、その分子制御機構には、PTMsの関与を含めて不明な点が多い。そこで、大腸癌におけるPPARγの新規PTMsを質量分析にて同定し、PPARγの機能調節への影響を明らかにすることを本研究の目的とした。

【方法】

当グループでは、核内受容体HNF4αの精製系を構築し、網羅的なPTMsの同定に成功している(Yokoyama *et al. BBRC* 2011)。この系を用いて、大腸癌由来のCaco-2細胞における内在性PPARγを精製し、得られたPPARγについてLC-MS/MS解析、続いてMODIRO解析を行うことで、新規PTMs同定を試みた。

【結果】

内在性PPARγの84番目のセリンにおけるリン酸化を大腸癌で初めて見出した。さらにこのリン酸化がPPARγの転写活性化能に影響するか否か、また大腸癌における主要なシグナル伝達因子であるβ-cateninによる発癌遺伝子の活性化に影響を及ぼすか否かをレポーターアッセイにて検討した。その結果、PPARγのリン酸化は、自身の転写活性化能及びβ-cateninの転写活性化には明らかな影響を及ぼさなかった。今後さらなる解析により、大腸癌におけるPPARγのリン酸化の意義を明らかにしていく予定である。

PPARγ, post-translational modification, colon cancer

講演番号：2A41a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ A 校舎 41 会場

がんワクチン適格性予測候補遺伝子の探索

Prognotic biomarker for the individual cancer peptide vaccination.

○高木 麻里[1]、宮田 有英[2]、ボウ 暁良[1]、田代 康介[2]、江口 りえこ[1]、小松 誠和[3]、笹田 哲朗[3]、伊東 恭悟[3]、久原 哲[2] ([1]九大院システム生命、[2]九大農、[3]久留米大医)
○Mari TAKAKI[1], Naoe MIYATA[2], Xiaoliang PANG[1], Kosuke TASHIRO[2], Rieko EGUCHI[1], Nobukazu KOMATSU[3], Tetsurou SASADA[3], Kyogo ITOH[3], Satoru KUHARA[2] ([1]System life sci.,Kyusyu Univ., [2]Aguriculture,Kyushu Univ., [3]Sch.of Med.,Kurume Univ.)

がんの治療法として、外科的切除療法、放射線療法、抗がん剤を用いた科学療法が一般的であるが、近年、第四の治療法として、がんペプチドワクチン療法が注目されている。がんペプチドワクチン療法とは、がんを発症した患者にがんペプチドワクチンを投与し、人間に元来備わっている免疫機能を増強することでがんの進行を抑える方法である。副作用が少なく、延命効果があることが分かっている一方で、がんペプチドワクチンは、患者により効果が異なることが問題視されている。そこで、本研究ではがんペプチドワクチンの適格性を判断するためのがんワクチン適格性予測遺伝子マーカーの探索を試みた。

ワクチン適格性予測遺伝子マーカー探索は、がんペプチドワクチン療法を実際に行った末期の前立腺がん患者 40 人の血液細胞から RNA 抽出を行い、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現の網羅的解析を行った。比較対象は、ワクチン療法後、生存日数が 900 日以上のワクチン有効患者 20 人と治療後生存日数が 300 日以下のワクチン無効患者 20 人である。

DNA マイクロアレイ発現解析の結果、ワクチン無効患者と有効患者において異なる遺伝子発現プロファイルを示す約 50 の遺伝子を確認することが出来た。また、それらにはがん細胞系、免疫系、炎症系遺伝子が含まれていた。これらは、がんペプチドワクチン治療において、ワクチン療法の適格性予測遺伝子として有用である可能性を示唆している。今後、確認された遺伝子の詳細な発現解析等を用いた遺伝子マーカーとしての有用性評価や遺伝子マーカーとして利用した適格性診断手法の構築を進める必要がある。

cancer, biomarker, expression profile

講演番号：2A41a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ A 校舎 41 会場

褐色脂肪化における CREG1 の役割の検討

The role of CREG1 on brown fat differentiation

○楠堂 達也[1]、片岡 直也[2]、李 勇学[1]、江川 美貴[1]、山下 均[1] ([1]中部大、[2]京都大)
○Tatsuya KUSUDO[1], Naoya KATAOKA[2], Yongxue LI[1], Miki EGAWA[1], Hitoshi YAMASHITA[1] ([1]Chubu Univ., [2]Kyoto Univ.)

脂肪を蓄積する白色脂肪組織を、脂肪を燃焼する褐色脂肪組織に変えることは生活習慣病対策の新戦略として注目されている。我々は内臓肥満、高脂血症、及び動脈硬化を呈することを期待してモデルマウスを作製した。しかし、予想に反して、本マウスでは高脂血症の正常化と動脈硬化の改善が認められた。生化学的、組織学的解析の結果、皮下脂肪組織の褐色脂肪化がこの原因と考えられた。転写調節に関与する因子に焦点を当て、マイクロアレイ解析により褐色脂肪化の原因遺伝子を探索したところ、細胞の増殖と分化を調節する分泌タンパク質である Cellular repressor of E1A-stimulated gene(以下 CREG1)が見出された。本研究では CREG1 による褐色脂肪化について検討することを目的とした。

CREG1 遺伝子をアデノウイルス発現ベクターに導入し、CREG1 発現アデノウイルスを作製し超遠心を用いて精製した。精製した CREG1 発現アデノウイルスを褐色脂肪細胞への分化能を有する C3H10 細胞に感染させ CREG1 を発現させた。その後、褐色脂肪細胞への分化を誘導し、分化 8 日目に RNA サンプルを調製した。リアルタイム PCR により各種遺伝子の発現量を検討したところ、褐色脂肪細胞の分化マーカーである UCP1 の発現量が有意に上昇していた。一方、CREG1 に対する siRNA を用いて C3H10 細胞における CREG1 の発現を抑制し、褐色脂肪細胞への分化を誘導した。分化 8 日目に RNA サンプルを調製し、遺伝子発現量を検討したところ、UCP1 の発現は有意に抑制された。これらのことから、CREG1 の発現が C3H10 細胞の褐色脂肪細胞分化に影響することが示唆された。現在、CREG1 による褐色脂肪分化作用を個体レベルで証明するために、マウス皮下脂肪組織に CREG1 発現アデノウイルスを導入し検討を行っている。

CREG1, Brown fat

講演番号：2A41a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ A 校舎 41 会場

サイトカインによる肝硬変・肝機能制御
Effect of cytokines on liver cirrhosis and liver function.
○井上 麻美[1]、大林 賢一[2]、中村 アンナ[2,3]、上野 隆登[3]、鳥村 拓司[3]、久原 哲[2]、田代 康介[2]（[1]九大院・システム生命、[2]九大院・生資環、[3]久留米大・医）
○ASAMI INOUE[1], KENICHI OBAYASHI[2], ANNA NAKAMURA[2,3], TAKATO UENO[3], TAKUJI TORIMURA[3], SATORU KUHARA[2], KOSUKE TASHIRO[2] ([1]System life sci., Kyushu Univ., [2]Agriculture, Kyushu Univ., [3]Sch.of Med., Kurume Univ.)

肝臓は、糖、アミノ酸、脂質など各種生体構成成分の代謝機能、薬物代謝、胆汁生産など多彩な機能を備えた生体の恒常性維持に必須の臓器である。肝臓はその 9 割を占める主要な構成細胞である肝細胞（肝実質）及び非肝実質と呼ばれるクッパ―細胞、血管内皮細胞、肝星細胞などいくつかの細胞から構成されている。肝臓はアルコールやウィルス等の要因により傷害を受けると壊れた肝実質を線維化し、自身を修復するが、過剰な繊維化は肝の大部分が線維化した肝硬変を経て、やがて肝癌へと移行する。肝線維化は重篤な病気であるが未だ有効な治療法は見つかっていない。

いくつかの細胞から構成される肝臓の中でも肝星細胞は健康な肝臓ではビタミン A を貯蔵し、肝臓内のディッセ腔と呼ばれる肝細胞と類洞内皮細胞の間隙に存在する非肝実質構成細胞の 1 つである。この肝星細胞は、肝傷害時に活性化され、貯蔵していたビタミン A を消失、筋線維芽細胞様の形態を呈する。活性化した肝星細胞は、肝細胞の再生に必要な HGF 等のサイトカインを分泌し肝再生を促進する一方、コラーゲンや TGF-β を産生して肝臓の線維化にも関わることが知られている。現在、主に使用されているモデル肝星細胞 LX-2 は primary Hepatic Stellate cell(pHSC)に SV40T 抗原遺伝子を導入し作製された不死化細胞株 LX-1 を、低血清状態で長期間培養しクローン化された不死化細胞株である。一方で、ヒト肝星細胞の機能解明や創薬の観点から依然としてヒト初代肝星細胞の利用が渇望されているが、安定的供給が難しいことやサンプルが貴重なため、汎用には至っていない。

そこで、我々は肝線維化に深く関わっているヒト初代肝星細胞を標的とし、炎症に関与する種々のサイトカイン曝露に対する遺伝子発現応答解析を試みた。

その結果、いくつかのサイトカインを同時に暴露することで、ヒト初代肝星細胞の Matrix metaloprptease1 (MMP1) の高発現を誘導し、alpha-smooth muscle actin (α-SMA)遺伝子の発現を抑制することが明らかとなった。そこで、影響因子の特定を行った結果、ある特定のサイトカインの組み合わせが線維化を改善する可能性があることが明らかとなった。さらに、肝硬変モデルマウスを用いて、サイトカインの同時投与を行った結果、線維化マーカーである α-SMA 遺伝子発現が顕著に減少していることが確認された。以上より、特定サイトカインの組み合わせによる肝線維化改善の可能性が示唆された。

liver cirrhosis, cytokine, liver regeneration

講演番号：2A41p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ A 校舎 41 会場

リン酸化 Tau の微小管重合促進能を回復させる因子 Pin1 および hGas7
A Novel Role For Pin1 And hGas7b In Microtubular Maintenance
○清水 泰希、小坂 啓太、林 悠太、岡部 恵美子、藤田 彩子、後藤 愛那、日高 將文、内田 隆史（東北大院農）
○Taiki SHIMIZU, Keita KOSAKA, Yuta HAYASHI, Emiko OKABE, Ayako FUJITA, Aina GOTOH, Masafumi HIDAKA, Takafumi UCHIDA (Tohoku Univ.)

【目的】
神経軸索を構成している微小管を安定化する機能をもつ Tau はリン酸化・脱リン酸化によって活性を制御されている。過剰なリン酸化を受け神経原線維変化を起こし、タウオパチーがアルツハイマー病の病理学的特徴となっている。リン酸化 Tau の微小管重合促進活性を回復するタンパク質として、プロリン異性化酵素の Pin1 が存在する。Pin1 は PP2A に作用しその活性を高め、リン酸化 Tau の脱リン酸化が進むことは知られている。現在、我々は Pin1 によるリン酸化 Tau の構造変化自体が微小管重合促進活性を回復させているのではないかと考え実験を進めている。また我々は Pin1 の WW ドメインホモログとして Gas7b を発見し、Pin1 と同様に微小管重合を促進する新規機能を示した。Pin1 や Gas7 の発現量の低下がアルツハイマー病と関係があることから、これら分子の作用メカニズムを明らかにすることはアルツハイマー病治療により近づくことになるであろう。
【方法と結果】
タウ蛋白質,Pin1 蛋白質,Gas7b 蛋白質は大腸菌で、また、GSK3b 蛋白質は SF9 細胞で発現・精製した。Tubulin は本研究科、渡邊康一博士より提供された牛脳から精製した。Tau の C 末端側からドメインごとに欠損させた欠損変異体を作製した。各種変異体と野生型 Tau は、哺乳類細胞 HEK293 において発現させることでリン酸化修飾を行い、精製した。
Gas7 に関しては濁度法と蛍光法による微小管重合の経時的な測定および暗視野顕微鏡による観察から Tau との協働的な微小管重合促進が見られた。そこで Pull down assay による Tau と Gas7b の結合解析を行った結果、Tau 中の repeat domain3 に結合することが分かった。今後、この repeat domain3 のうちどの部位に結合しているのかを調べていく必要がある。
Pin1 に関しては、大腸菌から精製したタウタンパク質に GSK3b および Pin1 を作用させ western blotting でタウのリン酸化の違いを見たところ Pin1 の有無で違いは見られなかった。このことから Pin1 は GSK3b によるタウのリン酸化を直接制御していないことが分かった。我々は Pin1 がリン酸化タウの構造変化をもたらすことで微小管重合促進能を回復するのではないかと考えており、現在、Pin1 の有無によるリン酸化タウの微小管重合促進能の違いを調べるため濁度法、蛍光法そして暗視野顕微鏡による解析を行っている。

Pin1, Gas7, Tau

講演番号：2A41p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ A 校舎 41 会場

プロリン異性化酵素 Pin1 の脳関連キナーゼ CaMKII への影響
Effects of Peptydil Prolil Isomerase Pin1 on Brain-Related Kinase CaMKII
○金井 研太[1]、小坂 啓太[1]、堤 貴明[2]、後藤 愛那[2]、二井 勇人[1,2]、日高 將文[1,2]、内田 隆史[1,2] ([1]東北大農、[2]東北大院農)
○kenta kanai[1], keita kosaka[1], takaaki tutumi[2], aina goto[2], eugene futai[1,2], masafumi hidaka[1,2], takafumi uchida[1,2] ([1]Tohoku Univ., [2]Tohoku Univ.)

[目的]

プロリン異性化酵素 Pin1 は、特定のリン酸化 Ser/Thr-Pro 部位の *cis/trans* 異性化を触媒し、タンパク質の分解や活性を制御する酵素である。多様な生物機能を持つが、我々はタウオパチー防御機能に注目した。タウオパチーはリン酸化タウが脳内で凝集し認知症症状を呈する疾患でアルツハイマー病とも重なる疾患である。Pin1 は、リン酸化タウに結合し phosphatase PP2A による脱リン酸化を受けやすくする。またタウキナーゼの一種として、CaMKⅡ（Ca^{2+}/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼⅡ）が知られている。これまでの研究で、Pin1 が CaMKⅡに結合することを見出した。 この結果より、Pin1 が CaMKⅡに作用しその活性化や安定性を制御し、タウのリン酸化を制御することで、タウの安定性を変化させるのではないかと推測した。このように Pin1、CaMKⅡ、タウの関係性に焦点を当てることにより、神経変性疾患のメカニズムを解明することが本研究の目的である。

[方法と結果]

始めに、CaMKⅡの Pin1 結合サイトを詳細に検討した。CaMKⅡ中の Pin1 が結合する可能性のある部位に変異をいれた Pin1 変異体を、マウス神経芽細胞腫 Neuro2a で過剰発現させ、Pull down assay を行った。その結果より、CaMKⅡの T176 部位が Pin1 との結合に重要であることが示唆された。次に Pin1 がその結合部位を介して CaMKⅡの安定性やキナーゼ活性に与える影響を解析した。安定性についての実験では、CaMKⅡと Pin1 を過剰発現させ、Westrn blot によりタンパク質の量を確認した。すると CaMKⅡは著しくタンパク質の量が減少していた。この結果は、Pin1 が CaMKⅡの安定性の制御に関わっていることを示唆した。次にキナーゼ活性について調べた。Neuro2a で Pin1 を阻害剤でノックダウンするか、si RNA により *Pin1* をノックダウンさせ、Kinase Assay により、CaMKⅡのキナーゼ活性を測定した。その結果より、Pin1 は CaMKⅡのキナーゼ活性に関与することが示唆された。

Aizheimer's disease, Pin1, CaMKII

講演番号：2A41p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ A 校舎 41 会場

アルツハイマー病関連タンパク質 Gas7b の機能

Function of alzheimer's disease related molecule Gas7b

○乗田 理恵、藤田 彩子、後藤 愛那、二井 勇人、内田 隆史（東北大院農）
○Rie NORITA,Ayako FUJITA,Aina GOTOH,Eugene FUTAI,Takafumi UCHIDA (Tohoku Univ.)

Gas7 は、プロリン異性化酵素である Pin１の WW ドメインと類似した構造を持ったタンパク質であり、微小管重合を促進する（1)。また、in vitro の実験により活性のある Tau が減少すると Gas7 の発現量が低下することが示されている(2)。マウス Gas7 にはヒト hGas7a と hGas7b のホモログである mGas7cb と mGas7b などが存在している。アルツハイマー病患者脳では Gas7 が有意に減少していた(2)。我々は、Gas7 の脳での機能、特に神経疾患との関連について研究を行っている。

第一に、Gas7b が Tau のどこに結合するのかを解明することを目指し、Tau 配列内の 312 番目と 332 番目のプロリンをそれぞれアラニンに置換した点変異体 Tau(P312A、P332A)を作製して、結合解析を行った。さらに、欠損変異体 Tau を作製し、Gas7b との結合を pull down assay で検討し、N 末からリピートドメイン 3 までの変異体(1-336a.a)が、Gas7b と結合することを見出した。以上の結果から、相同性の高いリピートドメイン間の中でも、特に、リピートドメイン 3 にユニークな配列が Gas7b との結合において重要であると考えられた。(清水等の発表参照)。

第二に、Gas7 の微小管重合の制御機能について検討した。Gas7 は微小管重合を促進するだけでなく、微小管の束化の促進、アクチンとの架橋など、多様な機能を有することを見出した（Goto A et al. in preparation)。

第三に、野生型マウスと Gas7 ノックアウトマウスで脳の各部位での Tau の発現を Tau5、AT180、AT8、PHF1 を用いて、ウエスタンブロットと組織免疫染色による定量を行ったが、有意差は出なかった。次に、抗β-チューブリン抗体 TUJ1 を用い、両マウスの脳の各部位の微小管を染色し、軸索の形成を調べたところ、歯状回でのみ軸索の形成不全が発見された。この欠陥がマウス脳機能にどのような影響を与えているのかについて検討する予定である。

参考論文

(1)Uchida T *et al.*(2009)*J Mol Biol* **391** 849
(2)Akiyama H *et al.*(2009),*J Biol Chem* **284** 32695

gas7, alzheimer's disease, microtubule

講演番号：2A41p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ A 校舎 41 会場

酵母 split-ubiquitin システムを用いたヒトドリコールリン酸グルコース合成酵素の解析

Analyses of the human dolichol-phosphate glucose synthase using the yeast split-ubiquitin system

○高橋 哲夫、山田 直人（東海大工生命化学）
○Tetsuo Takahashi,Naoto Yamada (Tokai Univ.)

【目的】真核細胞の粗面小胞体(rER)膜に局在するドリコールリン酸グルコース(Dol-P-Glc)合成酵素は、N-グリカンの前駆体であるドリコール結合オリゴ糖(DLO)生合成の最終段階で働く3種類のグルコース転移酵素(ALG6,ALG8及びALG10)に対して、それらの糖供与体基質であるDol-P-Glcを供給している。本研究では、Dol-P-Glc合成酵素をコードするヒト*ALG5*遺伝子を酵母split-ubiquitinシステムに適用することにより、ヒトDol-P-Glc合成酵素のrER膜上での配向性及び物理的相互作用について解析を行うことにした。
【方法】最初に、ヒト脾臓由来cDNAプールからh*ALG5*遺伝子全長をPCRにより増幅し、split-ubiquitinシステム用のベイトベクター(pBT3-NまたはpBT3-C)にクローニングすることで、それぞれN末端及びC末端にCub-LexA/VP16を付加した本酵素を発現するための2種類のベイトコンストラクト(pBT3-N-hALG5及びpBT3-C-hALG5)を作成した。これらを陽性または陰性のコントロールプレイ(pAI-Alg5またはpDL2-Alg5)と組み合わせて酵母NMY51株を二重形質転換し、得られたベイト/プレイ共発現株についてレポーター検出用培地上での増殖性試験を行うことで、本酵素のN-末端及びC-末端の膜配向性をそれぞれ検証した。次に、膜配向性予測アルゴリズムTOPCONSを用いて本酵素を解析したところ、3箇所の疎水性領域(hydrophobic region; HR1～3)が想定された。そこで、各HRの直前または直後まで欠失した変異体ベイトコンストラクトを4種類作製した。これらをpAI-Alg5またはpDL2-Alg5と組み合わせて上記と同様の増殖性試験を行うことで、各HRの位置の膜配向性を解析した。さらに、本酵素同士のrER膜上での物理的相互作用の有無を調査するため、N末端及びC末端にそれぞれNubGを付加した本酵素を発現するための2種類のプレイコンストラクト(pPR3-N-hALG51及びpPR3-C-hALG5)を作製し、上記2種類のベイトと組み合わせて同様の解析を行った。
【結果及び考察】膜配向性についての増殖性試験の結果、両ベイトは、pAI-Alg5との共発現の場合のみに両培地上での有意な増殖性が観察された。これらの結果から、本酵素のN末端とC末端はrER膜上で細胞質側に配向していることが判明した。さらに、物理的相互作用についての増殖性試験の結果、pBT3-C-hALG5/pPR3-N-hALG5共発現株で選択培地上での増殖性が観察され、本酵素同士がrER膜上で二量体(または少量体)を形成していることが示唆された。現在、本酵素の各HRの膜配向性や、Dol-P-Glcを基質とする3種類のグルコース転移酵素を含めた他の糖転移酵素との相互作用について、詳細に解析中である。

split-ubiquitin system, dolichol-phosphate glucose synthase, ALG5

講演番号：2A41p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ A 校舎 41 会場

アクチンのダイナミクスがエピジェネティック制御に及ぼす影響の解析
Analysis of the effects of actin dynamics on epigenetic regulation
○山崎 祥他[1]、十川 久美子[2,3]、徳永 万喜洋[2,3]、原田 昌彦[1] ([1]東北大院農、[2]東工大院生命理工、[3]理研免疫センター)
○Shota YAMAZAKI[1], Kumiko SOGAWA[2,3], Makio TOKUNAGA[2,3], Masahiko HARATA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Tokyo Tech., [3]RIKEN)

アクチンは、細胞の運動・接着・極性・形態変化など、細胞の基本活動を支える細胞骨格形成に中心的な役割を果たしている。細胞骨格構成因子としてのアクチンの解析が進む一方で、近年になり核内に集積したアクチンファミリーとしてアクチン関連タンパク質(actin-related protein; Arp)が発見されている。またクロマチンリモデリング複合体の構成タンパク質としてアクチン- Arp 複合体が同定されるなど、アクチンファミリーのエピジェネティック制御への関与も示唆されている。細胞質にはアクチンファミリーである Arp2/3 複合体が存在し、アクチンフィラメントの伸長や架橋構造を形成することで強固なアクチン骨格が形成される。一方、細胞核には Arp4～Arp9 と一部のアクチンが局在し、これらはクロマチンリモデリング複合体やヒストン修飾複合体を構成してエピジェネティック制御に関わるが、通常は核内にアクチンフィラメントは観察されない。しかしジョン・ガードン博士によって、遺伝子のリプログラミングに核内のアクチンフィラメント形成が必要であることが報告されるなど、核内のアクチンとエピジェネティック制御の関連性が示唆されている。そこで我々は、核内のアクチン量やフィラメント形成を人為的に変化させることで、核内のアクチン骨格とエピジェネティック制御との関連を解析することを試みた。まず、HeLa 細胞にアクチンの重合促進剤であるファロイジンを添加したところ、細胞質のアクチンフィラメントの増加に加えて、核内のアクチン量の増加が観察された。この条件を、基底層細胞である HaCaT 細胞に適応したところ、分化による重層化の促進が観察され、核内アクチン量の変化が細胞分化に影響を与えることが示された。次に、核移行シグナルを付加したアクチンを HeLa 細胞で発現したところ、ファロイジンによって染色されるフィラメント構造が核内に形成された。この結果から、核内のアクチンフィラメント形成は通常は何らかの因子によって抑制されているが、そのバランスが崩れることで核内アクチンフィラメントが出現する可能性を考えた。最近、*in vitro* の解析により、核に局在する Arp4 がアクチンに結合して重合を阻害することが報告されている。そこで我々は RNA 干渉による Arp4 のノックダウンを行い、核内アクチンを観察した。その結果、Arp4 ノックダウンが核内アクチン量を増加させることが示された。またアクチン重合を安定化させる変異アクチンを同時に発現させると、核内にアクチンフィラメントが観察された。この結果は、Arp4 が核内アクチン量やフィラメント形成の制御において重要な役割を果たすことを示している。今後、核移行シグナル付加アクチンや Arp4 ノックダウン細胞を用いることにより、核内アクチンのエピジェネティック制御への関与が解析できると考えている。

β-actin, Arp4, actin-remodeling

講演番号：2A41p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ A 校舎 41 会場

遺伝子ノックアウト細胞を用いたヒト INO80 複合体のゲノム安定性維持機構の解析
Analyses of the involvement of human INO80 chromatin remodeling complex with gene knockout cells

○高橋 裕一朗[1]、松田 涼[1]、北村 大志[1]、西嶋 仁[2]、柴原 慶一[2]、原田 昌彦[1]([1].東北大院・農・分子生物、[2]国立遺伝研)
○ Yuichiro TAKAHASHI[1], Ryo Matsuda[1], Hiroshi Kitamura[1], Hitoshi Nishijima[2], Kei-ichi Shibahara[2], Masahiko Harata[1] ([1]Lab. Mol. Biol., Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ., [2]Nat. Inst. Genet.)

【目的】転写・複製・修復などのゲノム機能の制御において、クロマチンの構造変換（クロマチンリモデリング）が重要な役割を果たしている。クロマチンリモデリングには多くのタンパク質が関与しており、その中でも ATP を加水分解する際のエネルギーを利用してクロマチンリモデリングを行う ATP-dependent chromatin remodeling complex（ADCR 複合体）が重要な役割を果たしている。INO80 複合体はこのような ADCR 複合体の 1 つであり、遺伝子発現制御に関与することが報告されている。それに加えて我々は出芽酵母を用いて、INO80 複合体が DNA 二重鎖切断修復や停止した複製フォークの進行際への関与を介してゲノム安定性維持に寄与していることを示している（Curr Biol 18, 566-, 2008, Nucleus 2, 38-, 2011)。INO80 複合体は酵母からヒトまで進化的に保存されていることから、遺伝子発現やゲノム安定性維持におけるヒトの INO80 複合体の機能を明らかとすることを本研究の目的とした。
【方法】ヒト INO80 複合体は、3 種類のヒトアクチン関連タンパク質（hArps）をその機能に必須な構成因子として含んでいる。このうち、hArp5 および hArp8 は hINO80 複合体に特異的な構成因子である。そこで、ヒト B 細胞白血病由来 NALM-6 細胞を用いて hArp5、hArp8 の遺伝子ノックアウト（KO）細胞を樹立し、hINO80 複合体の機能を解明することを試みた。
【結果】これら 2 種類の KO 細胞は、共に DNA の複製阻害剤である aphidicolin に対し強い感受性を示した。また、このような DNA 複製ストレス環境下において、hArp5-KO および hArp8-KO 細胞では分裂期染色体の切断頻度が増加するなど、ゲノムの不安定化が観察された。さらに、細胞に酸化ストレスを与えた際、酸化ストレス応答遺伝子の 1 つである Heme oxygenase-1（HO-1）の発現量が、hArp5-KO および hArp8-KO 細胞では著しく低下していた。酸化ストレスもまた、DNA に損傷を与え、ゲノムの不安定化を引き起こすことから、hINO80 複合体が酸化ストレス存在下でのゲノムの安定性維持に機能している可能性が示唆された。そこで、HO-1 の発現制御領域に対して、抗 hArp5 抗体および抗 hArp8 抗体を用いたクロマチン免疫沈降（ChIP）を行ったところ、この領域に hINO80 複合体が結合していた。さらに、hINO80 複合体機能欠損細胞では、酸化ストレス時に HO-1 の activator である Nrf2 の結合量が WT と比較して減少していることが示された。これらの結果は、酸化ストレス時に hINO80 複合体が HO-1 の発現制御配列に結合し、周辺のクロマチン構造を変換することで、転写因子のリクルートや HO-1 の発現を促進し、ゲノム安定性を維持している可能性を示唆している。

actin-related proteins, chromatin remodeling complex, gene expression

講演番号：2A41p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ A 校舎 41 会場

高等動物におけるタンパク質架橋化酵素ファミリーの新規アイソザイムの組織分布に関する解析

Analyses on tissue distribution of novel members of higher animal transglutaminases family

○清水 由隆[1]、鞍本 克真[1]、山崎 梨沙[2]、辰川 英樹[2]、人見 清隆[2]([1]名大院生命農、[2]名大院創薬科学)
○Yoshitaka SHIMIZU[1], Katsuma KURAMOTO[1], Risa YAMASAKI[2], Hideki TATSUKAWA[2], Kiyotaka HITOMI[2] ([1]Ngoya Univ.,grad.Sch.Fac.Agr., [2]Ngoya Univ.,grad.Sch.Pharm)

【目的】タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼ(TGase)は、カルシウムイオン依存的に、基質タンパク質中のグルタミン残基とリジン残基の間に不可逆なイソペプチド結合を形成させる。また、グルタミン残基に一級アミンを取り込ませたり、脱アミド化反応によりグルタミン酸に変換させたりする反応も触媒する。この酵素反応は多彩な生命現象に関与し、哺乳類では 8 種のアイソザイムが酵素ファミリーを形成している。これらは様々な組織で特異的に発現し、特異的に生理的役割を果たしていると考えられている。例えば、Factor XIII（血漿型）は血液凝固、TGase 1 （皮膚型）は皮膚表皮形成、TGase 2（組織型）は細胞死や細胞接着に関与している。

一方、新規なメンバーである TGase 6 および TGase 7 は、アイソザイム間の塩基配列の相同性を利用した degenerated PCR 法によって、遺伝子の存在が明らかになった。しかし、未だ組織分布や生理学的意義についての情報は少ない。本研究では、これら２つの新規なメンバーの、RNA レベルおよびタンパク質レベルの発現解析を目的とした。

【方法および結果】マウス各組織から RNA を抽出し、各アイソザイムに特異的なプライマーを用いて reverse transcription-PCR を行い、mRNA の発現分布を調べた。TGase6 は皮膚、精巣、脳で、TGase 7 は腎臓、精巣、脳、胎児の肝臓において特異的な発現を見いだした。さらに、TGase 6 についてはリアルタイム PCR を行い、解糖系酵素である GAPDH をコントロールとして組織毎の発現量の比較を行った。その結果、皮膚と小脳において特に高い mRNA 発現が見られた。

また、タンパク質レベルでの発現解析のため組換えタンパク質と抗体取得を試みた。まず、ヒト TGase 6 遺伝子を大腸菌で発現させるベクターを構築し、BL21(DE3)pLysE 株を形質転換した。発現誘導を行ったところ、ほとんどが不溶性画分に回収された。そのため変性剤により可溶化させ、ヒスチジンタグを利用して精製した。これを抗原としてマウスに感作させ、モノクローナル抗体の作製を行った。その結果、TGase 6 に反応性を示すモノクローナル抗体 2 種を取得(2A2, 3B11)した。2A2 はウエスタンブロットにおいて,一方 3B11 は ELISA 解析において特に高い反応性を示した。これらは他のアイソザイムとの交差反応性も確認されず、TGase 6 に対して特異的に反応することが示された。3B11 を用いた ELISA 解析によって、TGase 6 の mRNA 発現が報告されている神経系細胞株 NCI-H69 において、そのタンパク質発現を示唆する結果を得た。

transglutaminase, calcium, RNA

講演番号：2A41p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ A 校舎 41 会場

モデル生物としてのメダカにおけるタンパク質架橋化酵素ファミリーに関する解析

Characterlization of transglutaminases in medaka as a model organizm

○小河 亮太[1]、斉藤 麻衣[2]、菅沼 名津季[2]、辰川 英樹[2]、人見 清隆[2]([1]名大農、[2]名大院創薬科学)
○Ryota OGAWA[1], Mai SAITOH[2], Natsuki SUGANUMA[2], Hideki TATSUKAWA[2], Kiyotaka HITOMI[2] ([1]Nagoya Univ., Fac. Agr., [2]Nagoya Univ., Grad. Sch. Pharm. Sci.)

【目的】生体内でタンパク質を架橋化修飾する酵素・トランスグルタミナーゼは(以下 TGase と略記)は、カルシウムイオン依存的に、タンパク質中のグルタミン残基とリジン残基との間に不可逆なイソペプチド結合を形成させる。この他グルタミン残基に一級アミンを取り込ませたり、脱アミド化反応によりグルタミン酸に変換させたりする反応も触媒する。この酵素は幅広く生物界に存在し、ヒトなど高等動物では 8 種のアイソザイムが存在して、血液凝固や皮膚表皮形成、死細胞の処理などに必須である。しかし、その他のアイソザイムも含めて、未だそれらの生理機能について全容解明には至っていいない。

モデル生物としてのメダカ（ニホンメダカ *Oryzias latepis*） は比較的短期間に変異個体を取得でき、また発生過程や組織での発現解析・観察も容易である。我々は、動物における TGase の生理機能解明を目指して、メダカの TGase 遺伝子オルソログ（類似遺伝子）の生化学的解析を進めている。前回大会では、ヒト皮膚型（TG1）と組織型（TG2）についての解析結果を報告した。今回は、ヒト血液凝固に関わる TGase アイソザイム （FXIII）の類似遺伝子産物の生化学的解析をはじめとして、新規に見出されたどのヒト型 TGase にも属さない、メダカ特有の遺伝子についても解析することを目的とした。

【方法および結果】メダカの TGase に該当する遺伝子の解析は、基礎生物学研究所バイオリソースセンター作成のデータベースを利用して行い、ヒト・マウス遺伝子の相同性配列を基に検索した結果から、メダカには 5 種類のアイソザイムが存在することが判明した。いずれも活性部位近辺や活性発現に必要なアミノ酸残基は保存されていた。

これらについて、ヒト血液凝固型 TGase のオルソログを 01TGB と命名し、それ以外の 2 種を 01TG0, 01TGF と命名して、全配列決定後それぞれの組換えタンパク質の発現を行った。ヒスチジンタグ付きのタンパク質として大腸菌にて発現誘導したところ、可溶性画分として発現される傾向はそれぞれで異なった。01TGB，01TGF はほとんどが不溶性画分に回収されたが、精製を行って酵素活性を解析したところ、いずれも可溶性画分ではカルシウムイオン依存的な活性を示した。また 01TGB の可溶性画分を解析したところ、不活性な前駆体として合成されるヒト酵素 FXIII と異なり、合成された段階で活性を有していた。

medaka, transglutaminase, calcium

講演番号：2A41p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ A 校舎 41 会場

ヒト cDNA リソースと無細胞タンパク質合成系を用いた N-ミリストイル化された膜貫通タンパク質の探索

Identification of novel transmembrane N-myristoylated proteins using human cDNA resource and in vitro translation system

○内海 俊彦、守屋 康子、乗安 義実、福永 和貴、飯尾 雄介、高光 恵美（山口大学院医応用分子生命）
○Toshihiko Utsumi, Koko Moriya, Yoshimi Noriyasu, Kazuki Fukunaga, Yusuke Iio, Emi Takamitsu (Yamaguchi Univ.)

[目的] タンパク質 N-ミリストイル化は、主要なタンパク質脂質修飾の一種であり一般に細胞質タンパク質に生ずることが知られているが、最近我々は、小胞体膜に局在する 2 回膜貫通型タンパク質である lunapark が N-ミリストイル化され、この脂質修飾が小胞体の形態形成に関与していることを見出した。本研究では、膜タンパク質に起きる N-ミリストイル化が多くの膜タンパク質に生じる普遍的な修飾であるのか否かを明らかにすることを目的として、約 6,300 個のヒト cDNA を含む KOP cDNA clones から N-ミリストイル化された膜貫通タンパク質の探索を行った。
[方法・結果] かずさ DNA 研究所ヒトタンパク質発現クローン(Flexi ORF clones) 約 6,300 個のうち、N 末端に Met-Gly 配列を持つ cDNA 約 480 個を対象として、我々の研究室でこれまでに確立した、無細胞タンパク質合成系による代謝標識法とバイオインフォマティクスによる手法とを組み合わせた手法により新規な N-ミリストイル化されたタンパク質の同定を試みた。その結果、37 個の新規な N-ミリストイル化タンパク質が同定され、この中に膜貫通タンパク質と予測されるタンパク質が 9 個存在していた。そこで、これらの中から機能既知の膜タンパク質 3 個(SERINC1, CTL1, P2RX5)についてその全長 cDNA の C 末端に Flag-tag を付加し、昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系における代謝標識により N-ミリストイル化を検討した結果、3 個のタンパク質はいずれも効率良く N-ミリストイル化されることが示された。これらのタンパク質の膜上トポロジーを遺伝子導入細胞を用いてグリコシル化感受性試験により検討を行った結果、それぞれ 11 回、及び 10 回膜貫通型膜タンパク質と推定される SERINC1 及び CTL1 は N-末端をそれぞれ小胞体内腔、細胞質に向けた多重回膜貫通タンパク質として膜局在することが示唆された。また P2RX5 は N-末端を細胞質に向けた 1 回膜貫通型膜タンパク質であり、小胞体膜に特異的に局在することが明らかになった。　以上の結果から、これまで細胞質タンパク質に選択的に生ずると考えられてきたタンパク質 N-ミリストイル化は、種々の膜上トポロジーをとる多くの膜貫通タンパク質に普遍的に見出される翻訳後修飾であることが明らかになった。

N-myristoylation, transmembrane protein, cDNA resource

講演番号：2A41p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ A 校舎 41 会場

精製標品を用いたヒト ABCB6 の機能解析

Functional analysis of human ABCB6 with purified protein

○大貫 元[1]、木村 泰久[1]、松尾 道憲[1]、木岡 紀幸[1]、植田 和光[1,2]（[1]京大院農、[2]京大 iCeMS）
○Hajime Ohnuki[1], Yasuhisa Kimura[1], Michinori Matsuo[1], Noriyuki Kioka[1], Kazumitsu Ueda[1,2]
([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ, [2]iCeMS, Kyoto Univ)

＜目的＞ ABCB6 は ABC(ATP-binding cassette)タンパク質ファミリーに属する膜タンパク質であり、ミトコンドリアにおいてヘム前駆体のポルフィリンである CPgenⅢ（coproporphyrinogenⅢ）を輸送すると考えられてきた。しかし近年、ABCB6 欠損マウスや欠損変異を持ったヒトにおいて、ポルフィリン代謝に異常が見られないことが報告された。また ABCB6 は抗がん剤治療などによって発現量が上昇することから、抗がん剤などの薬剤の排出に関わっている可能性も示唆されており、ABCB6 の生理的役割は未解明のままである。そこで本研究ではヒト由来の細胞株である Freestyle293 細胞を用いて ABCB6 の大量発現と精製を行い、ABCB6 の輸送基質を明らかにすることを目的とした。
＜結果＞ C 末端に Flag-tag を融合させたヒト ABCB6 を Freestyle293 細胞に一過的に発現させ、Flag-M2 抗体を用いて精製を行った。その結果、純度 95%以上の精製標品を 1 リットル培養あたり 150 μg 得た。精製 ABCB6 は ATPase 活性を示し、その活性はリン酸アナログのフッ化ベリリウムによって阻害された。ABC タンパク質の ATPase 活性は輸送基質によって上昇する事が知られているため、本研究では ATPase 活性を指標に ABCB6 の輸送基質を探索した。まずポルフィリン化合物について検討を行った。ABCB6 の ATPase 活性は CPgenⅢの酸化体である CPⅢ（coproporphyrinⅢ）、および pheophorbide A、coproporphyrinⅠ、hematoporphyrin によって濃度依存的に増大したため、これらの化合物が ABCB6 の輸送基質となることが示唆された。また、CPⅢのカルボキシル基をメチル化したテトラメチルエステル体では活性は誘導されなかったことから、CPⅢのカルボキシル基が基質認識に重要であることが明らかとなった。次に ABCB6 が多剤認識能を有するかを明らかにするため、様々な構造を持つ化合物が活性に与える影響を検討した。その結果、抗生物質の antimycin A が活性を増加させる事が明らかとなった。一方、vinblastine や paclitaxel、verapamil などの薬剤は活性に影響を与えなかったことから、ABCB6 は MDR1 や ABCG2 とは異なり、多剤認識能を持たないことが示唆された。次いで ABCB6 によるポルフィリンの輸送を直接的に測定するため、昆虫細胞 HighFive に ABCB6 を発現させ、粗膜ベシクルを用いて輸送活性を評価した。ABCB6 発現細胞より調製した粗膜ベシクルでは ATP 依存的な CPⅢの輸送が検出された。この輸送活性は antimycinA によって阻害されたことから、ABCB6 の特異的な活性である事が確認された。本報告は ABCB6 が実際にポルフィリン化合物を基質として認識し、輸送する事を示した初めての研究である。

ABCB6, porphyrin, purification

講演番号：2A41p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ A 校舎 41 会場

cGMP ホスホジエステラーゼ 6 の発現におけるシャペロンタンパク質の影響
Effect of chaperon proteins on functional expression of cGMP phosphodiesterase 6
○尾谷 優磨、嶺岸 卓徳、奥田 祐介、岡崎 修治、赤沼 元気、石塚 盛雄（中央大理工応化）
○yuma otani,Takunori Minegishi,Yusuke Okuda,shuji Okzaki,Genki Akanuma,Morio Ishizuka (Chuo Univ.)

脊椎動物の眼網膜視細胞に局在する cGMP Phosphodiesterase 6 (PDE6) は、錐体細胞内でα'_2, γ'_2のヘテロ 4 量体サブユニット構造をとっている。その内のα'_2触媒サブユニットがリン酸ジエステル結合を加水分解し、細胞内 cGMP 濃度を下げることで、細胞内外の情報伝達に重要な役割を担っている。脊椎動物において、この PDE6 の遺伝子変異が先天性定常夜盲、網膜色素変性症などの原因の一つであるとの報告があり、これまでに、大腸菌や昆虫細胞などで遺伝子組換え技術を用いた PDE6 の発現が試みられてきたが、機能的な発現は確認されていなかった。近年、翻訳後修飾タンパク質である Aryl-hydrocarbon-interacting protein-like 1 (AIPL1)により PDE6 触媒サブユニットが最適化されること、AIPL1 が分子シャペロンタンパク質の Heat-shock protein 70 (Hsp70)と相互作用することが報告された。これらのことから、複数のシャペロンが PDE6 の機能的発現に寄与することが考えられた。

そこで本研究では、取扱いの容易な大腸菌による発現・解析システムを用いた触媒サブユニット PDE6α'の機能的発現を目的とし、*in vitro* と *in vivo* の両方で PDE6α'発現におけるシャペロンの影響を調べた。ウサギ網状赤血球ライセートを用いた無細胞発現系おいて、シャペロン Hsp40, 70, AIPL1 が PDE6α'の機能的発現に与える影響を観察すると共に、PDE6α'と Hsp40, Hsp70 の大腸菌同一系内、温度制限下での機能的発現を行った。その結果、PDE6α'が Hsp40, Hsp70 と相互作用し、PDE6α'の立体構造構築に影響を及ぼしている可能性が示唆された。そこで、さらなる PDE6α'の機能的発現を目指し、精製 Hsp40, Hsp70 を用いた無細胞発現系による PDE6α'の発現量増加条件の検討を試みると共に、PDE-Glo™ Phosphodiesterase Assay による cGMP 加水分解活性の測定を行い、PDE6α'の加水分解能を測定した。その結果、過剰量の Hsp40 により Hsp70 の機能が補助され、PDE6α'との相互作用効率が高まり、PDE6α'の発現量が増加することがわかった。これに加え、AIPL1 が Heat-shock protein 90 (Hsp90)と相互作用していること、阻害サブユニット PDEγ'が PDE6 の四次構造の安定化に寄与しているという報告があることから、大腸菌による発現・解析システムを用いた Hsp90 と AIPL1 の発現系構築とその精製を行っている。また、無細胞発現系において、精製した Hsp40, 70, 90, AIPL1 を用いた PDE6α'の機能的発現を行うと共に、PDE6α'と PDEγ'の大腸菌同一系内、温度制限下での機能的発現を行うことで、それぞれのシャペロン相互作用、PDEγ'の構造安定化への寄与を利用し、より活性を維持した PDE6α'の発現・精製を試みている。

phosphodiesterase 6, Xenopus laevis, Chaperon proteins

講演番号：2A41p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ A 校舎 41 会場

リン脂質結合タンパク質 AnnexinA5 の 2 つのアイソフォームの機能の差違に関する検討

Functional analysis of two isoforms of phosphatidylserine-binding protein Annexin A5.

○横山 奈央子、磯脇 惠、八野 充子、武本 淳史、池上 春香、松本 和也、田口 善智（近畿大生物理工）

○ Naoko YOKOYAMA,Aya ISOWAKI,Mitsuko HACHINO,Atsushi TAKEMOTO,Haruka IKEGAMI,Kazuya MATSUMOTO,Yoshitomo TAGUCHI (Facl. of Biol. Sci. and Tech., Kinki Univ.)

【序論】

AnnexinA5は、カルシウム依存的に、生体膜を構成する主要なリン脂質の1つであるホスファチジルセリンに特異的に結合する320アミノ酸からなるタンパク質である。222頭の黒毛和種のプロテオーム解析の結果と、それぞれのウシ個体の形質の関連付けから、ウシAnnexinA5には、2残基でアミノ酸配列が異なる2種類のアイソフォーム（33型、37型（見かけ上の分子量がそれぞれ約33kDaと約37kDa））が存在し、ウシ個体がもつAnnexinA5のアイソフォームの種類と個体の枝肉重量には相関があることが示された。以上のプロテオーム解析の結果は、AnnexinA5が肉牛のバイオマーカーとして機能しうること、さらには、黒毛和種の重要な経済形質の1つである枝肉重量が、AnnexinA5のアミノ酸配列に影響されていることを示唆している。

【目的】

私達は、AnnexinA5が骨格筋の形成に関与し、その関与がアイソフォームによって異なるために、ウシ個体がAnnexinA5のどのアイソフォームを保持するかによって枝肉重量に変化が生じるのではないかと考えた。この仮説を検証するために、本研究では、骨格筋様の細胞に分化可能なマウス由来の筋芽細胞株C2C12を用いて、AnnexinA5の各アイソフォームの機能解析を行った。

【方法・結果】

マウス肺よりウシ33型に相当するAnnexinA5の全長cDNAを単離した。このマウスAnnexinA5のcDNAの2つの領域（35番目と124番目のアミノ酸残基をコードしている部分）に部位特異的突然変異を導入し、ウシ37型と相同なアミノ酸配列をもつマウス37型AnnexinA5のcDNAを得た。これらをマウス由来の筋芽細胞株C2C12に導入し、それぞれのタンパク質を安定的に発現する細胞株を単離した。単離したそれぞれの安定発現細胞株をコンフルエントになるまで培養後、無血清培地に交換することで骨格筋様の細胞への分化を誘導し、各細胞株による分化状態の差異を検討した。

その結果、導入したAnnexinA5のアイソフォームによって、骨格筋特異的な遺伝子の発現や、細胞の形態に違いがあることが観察され、AnnexinA5が骨格筋の形成に関与する可能性が示唆された。

AnnexinA5, proteomic analysis, C2C12

講演番号：2A41p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ A 校舎 41 会場

骨分化誘導タンパク質 NELL1 が有する細胞接着活性の解析

Analysis of Cell adhesion activity of bone-inducing protein, NELL1

○中村 桜子、黒田 俊一、新美 友章（名大院）
○Yoko NAKAMURA,Shun'ichi KURODA,Tomoaki NIIMI (Nagoya Univ.)

【目的】頭蓋骨縫合早期癒合症 (Craniosynostosis) 患者の頭部縫合線で過剰発現している遺伝子として発見された *NELL1* は，ラミニン G ドメイン，6 つの epidermal growth factor (EGF) 様ドメイン，4 つの von Willebrand factor type C (vWC) ドメインなどからなる分子量約 140 kDa の分泌タンパク質をコードしている. NELL1 タンパク質は, 骨芽細胞または間葉系幹細胞において, MAP (mitogen-activated protein) キナーゼ経路を介して骨芽細胞分化に必須な転写因子である Runx2 を活性化することから骨再生医療への応用が期待されている．しかし，NELL1 の受容体や細胞内の詳細なシグナル伝達経路は明らかになっていない.

これまでに我々は，NELL1 タンパク質の C 末端側領域がインテグリンを介した細胞接着を担うことを見出し，NELL1 タンパク質がインテグリンと結合して，接着斑キナーゼ (FAK)-MAP キナーゼ経路を介して骨分化を制御する可能性を示唆した．本研究では，NELL1 タンパク質に含まれる細胞接着部位を詳細に解析して, NELL1 の骨誘導活性における接着活性の意義について明らかにすることを目指した.

【方法】NELL1 タンパク質の欠失変異体の発現ベクターを作製し，大腸菌 Rosetta-gami2 株およびヒト胎児腎臓由来 293-F 細胞へ導入した．NELL1 欠失変異体タンパク質を精製し，マウス骨芽前駆細胞株 MC3T3-E1 を用いて細胞接着アッセイを行った.

【結果】これまでの検討から NELL1 の C 末端側 vWC ドメインに最も強い細胞接着活性が観察されたので, 同領域をさらに細分化して細胞接着部位の同定を試みた．大腸菌 Rosetta-gami2 株に発現させた 5 種類の NELL1 欠失変異体タンパク質は, より C 末端に近い部分に強い細胞接着活性が観察された．また，ヒト 293-F 細胞に発現させた NELL1 欠失変異体タンパク質は，大腸菌由来 NELL1 欠失変異体タンパク質と同様に C 末端側 vWC ドメインを含む領域に強い細胞接着活性が観察された．一方，C 末端から 61 aa（アミノ酸残基）を削った変異体は接着活性を失っていた．以上から，NELL1 の細胞接着部位は，C 末端から 61 aa の領域，もしくは同領域に隣接する vWC ドメインとの境界部分に存在すると考えられた．現在，NELL1 の細胞接着活性にとって必要十分な領域の同定を行うとともに，NELL1 における細胞接着活性と骨分化誘導活性の関係を解析している.

NELL1, cell adhesion, osteogenesis

講演番号：2A41p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ A 校舎 41 会場

乳腺組織の発達・分化における LGR4 の機能解析
The function of LGR4 in mammary gland development and differentiation
○大山 一徳[1]、毛利 泰彰[1]、曽根 瑞季[1]、那波 明宏[2]、西森 克彦[1] ([1]東北大院農、[2]愛媛大医)
○ Kazunori OYAMA[1], Yasuaki MOHRI[1], Mizuki SONE[1], Akihiro NAWA[2], Katsuhiko NISHIMORI[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Ehime Univ.)

LGRs(leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptors)は膜外ドメインにロインシンリッチリピートを持つ受容体ファミリーである。これまでに LGRs に含まれる LGR4 が様々な組織の発生・分化に関わることが報告されている。特に発達期腎臓の尿管芽分化や腸管構造の発達・恒常性維持、輸卵管内における卵成熟など上皮管腔組織の発達・機能維持に関わることが近年明らかになっている。また LGR4 はリガンドの不明なオーファンレセプターであったが、近年いくつかのグループが LGR4 および LGR5 の受容体として R-spondins を同定した。LGR4,5 は R-spondin と結合することで Wnt β-catenin シグナルを制御することが明らかとなっている。

乳腺は哺乳類に特徴的なミルクを生産する器官である。マウスにおいては胎児期に発生した乳腺原基から、第二次性徴期のホルモン刺激を受け樹枝状の管腔組織が枝分かれと伸長を繰り返し発達していく。この過程で乳腺細胞は上皮内腔細胞と筋上皮細胞の 2 種類の細胞へと分化し二重の管構造をとる。更に妊娠時にはホルモン分泌の変化を受け、ミルクを生産する alveolar と呼ばれる組織が分化する。このように乳腺は代表的な管腔構造を形成する上皮性組織であり、出生後に内分泌制御を受けて発達・分化する特徴的な器官である。本研究では LGR4 の乳腺発達・分化における LGR4 の機能解析を目的とした。

LGR4 を全身で欠損させた Lgr4(-/-)マウスは腎臓の発生不全などの原因により新生児致死を示すため、出生後に発達する乳腺の解析が不可能であった。そこで Keratin5-CreTg マウスを用いた Lg4 conditional KO マウス(Lgr4 cKO マウス)を作成した。このマウスは表皮系組織で Lgr4 が特異的に欠損しているため、致死を回避し成獣齢マウスにおける解析が可能となった。Lgr4cKO マウスを用いて乳腺組織の発生における LGR4 の機能を解析したところ、第二次成長期にあたる 4 週齢から 8 週齢において乳腺管構造の伸長遅延およびブランチング形成の低下を示した。また妊娠時において alveolar の発達不全を呈し、授乳能が失われていた。これらの結果から Lgr4 は生後の乳腺発達に関わる機能を有することが明らかとなった。また FACS を用いた乳腺細胞の分画解析により、加齢 Lgr4 cKO マウスでは細胞画分の比率に変化が見られた。このことは LGR4 が長期的に乳腺細胞の分化に関わることを示唆する。

LGR4, gene knockout mouse, mammary gland

講演番号：2A41p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ A 校舎 41 会場

ヒト皮膚 peptidylarginine deiminase の結晶化及び X 線結晶構造解析

Crystallization and X-ray crystallographic analysis of human epidermal peptidylarginine deiminase

○金城 沙弥[1]、海野 昌喜[2]、木澤 謙司[3]、小島 俊雄[1]、高原 英成[1]([1]茨城大・農、[2]茨城大・フロンティア、[3](株) カネボウ化粧品)
○Saya Kinjou[1], Masaki Unno[2], Kenji Kizawa[3], Toshio Kojima[1], Hidenari Takahara[1] ([1]Ibaraki Univ., [2]Ibaraki Univ. Frontier, [3]Kanebo Cosmetics Inc.)

【目的】Peptidylarginine deiminase (PAD) は、Ca イオン存在下においてタンパク質中のアルギニン残基をシトルリン残基に変換する翻訳後修飾酵素である。PAD は哺乳動物には 5 種類 (PAD1, 2, 3, 4, 6) が存在し、ヒトの表皮・毛嚢組織では PAD1, 2, 3 が発現し、角質化に関わる種々のタンパク質を標的として細胞分化に関わっていることが判っている。これら 3 種類の PAD は異なる細胞に分布し、かつ基質特異性も異なっている。これまでに我々は、ヒト表皮におけるこれらの PAD 遺伝子の基本的な発現制御機構を明らかにし、加えて、組織発現部位が厳密でかつ基質特異性も高い、PAD3 の高次構造を X 線結晶構造解析により解明することに成功した。そこで本研究では未だ立体構造が明らかとなっていない PAD1,PAD2 について、同様に X 線結晶構造解析によってその立体構造を明らにすることにより各 PAD 間で異なる基質認識の仕組みを原子レベルで解明し、なぜ 3 種類の PAD がヒト表皮で必要なのかを考察することを目的とした。
【方法・結果】ヒト組換え型 PAD1 と PAD2 を大腸菌で発現させるため pET-16b をベクターとして構築した。何れの PAD とも N 末端領域に His タグを導入して大腸菌で発現させたところ、菌体抽出液の可用性画分に活性を有して発現させることに成功した。また、N 末端領域に His タグをつけたままでも各組換え PAD の比活性、基質特異性は独立型のそれと変わりがないことが確認できた。ついで、アフィニティー精製とゲル濾過法により高濃度、高純度の標品を調製後、HANPTON RESEARCH 社製の結晶化バッファーキットを用いたハンギングドロップ蒸気拡散法により、結晶化条件の検索を試み、PAD1, PAD2 ともに結晶化に成功した。現在、さらに良質かつ大型の結晶を得るための最適化を試みており、本発表においては X 線結晶構造解析によって得られた構造モデルを報告する予定である。

peptidylarginine deiminase, human epidermal, molecular structure

講演番号：2A41p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ A 校舎 41 会場

乳腺および乳頭形成過程におけるマウス Mab21l1 遺伝子の機能解析

Functional analyses of mouse Mab21l1 gene during mammary gland and nipple development

○西谷 健、浅野 真也、尾上 貴俊、長瀬 裕樹、小島 拓哉、高橋 直樹（東大院農生科・応生化）
○Ken Nishitani,Shinya Asano,Takatoshi Ogami,Hiroki Nagase,Takuya Kojima,Naoki Takahashi (Grad. Sch. Agr. Life Sci. Univ. of Tokyo)

我々は発生過程で重要な遺伝子だと考えられている *Mab21l1* 遺伝子の機能解析をしている。*Mab21l1* ノックアウトマウスでは、水晶体及び包皮腺の形態形成異常を生じ、雄では不妊性が見られた。*Mab21l1* ノックアウトマウス雌では正常に妊娠・出産するが、その新生仔は遺伝子型によらず生後 24 時間以内に死亡することが分かった。その際、新生仔を引き離し野生型の里親に育てさせると正常に育った。このため、母獣の授乳行動に異常があると考えられた。そこで、授乳行動に関わる組織の１つである乳頭において解析を行うと、胎生期で *Mab21l1* は乳腺上皮細胞の周囲の乳腺間充織細胞で発現していた。特に胎生期 18.5 日目では、*Mab21l1* の発現領域は乳頭形成にとって重要だと報告されている nipple sheath に隣接していた。そこで、*Mab21l1* ノックアウトマウス雌で胎生期 18.5 日目の nipple sheath を観察したところ、欠損していることが分かった。出生後の乳頭でも解析すると、野生型と比べ有意に小さく、それが授乳不全の原因の１つではないかと推測された。これらの結果から、*Mab21l1* は胎生期の nipple sheath 形成に必要であり、乳頭の正常な形態形成を助け、授乳不全になるのを防ぐ働きをしている可能性が考えられた。また、胎生期における乳頭の形成過程には、PTHrP シグナルが重要であることが報告されている。乳腺上皮細胞から分泌された PTHrP シグナルにより、乳腺間充織細胞の *Bmpr1a* の発現量が上昇する。BMPR1A は細胞自律的および他律的に BMP4 に応答し、*Msx2* の発現を誘導して nipple sheath 内の毛包形成を抑制し、これが nipple sheath の形成につながっていく。*Mab21l1* ノックアウトマウス雌と野生型において、この PTHrP シグナル経路の遺伝子の発現を比較したが有意な差は見られなかった。一方、授乳行動に関わる組織の１つである乳腺を解析すると、出産後の *Mab21l1* ノックアウトマウス雌の乳腺葉が早期に退縮していることが確認された。出産後の乳腺における *Mab21l1* の発現を調べたところ、*Mab21l1* は管腔上皮細胞で発現していた。乳腺葉の退縮は、JAK1/STAT3 シグナル経路によるアポトーシスの亢進によって引き起こされることが報告されている。そこで、管腔上皮細胞における *Stat3* の発現を比較すると、*Mab21l1* ノックアウトマウス雌では本来発現が認められない出産後 1 日目において発現が上昇していた。したがって、*Mab21l1* ノックアウトマウス雌の出産後の乳腺では、*Stat3* の異常な発現上昇に起因してアポトーシスが亢進され、早期退縮が引き起こされたことが推測された。この結果より、*Mab21l1* は出産後の乳腺の管腔上皮細胞において *Stat3* の発現を抑制することによって、異常なアポトーシスの亢進による乳腺の早期退縮が起こるのを防ぐ働きをしていることが示唆された。

Mab21l1, mammary gland, nipple

講演番号：2A41p17
講演日時、会場：3 月 25 日 17:12～ A 校舎 41 会場

脂溶性ビタミン結合タンパク質α-TTP と脂質を輸送する ABC タンパク質が共同機能する可能性の検討

Interaction between vitamin E-binding protein α-TTP and lipid transporters belonging to ABC proteins

○田口 善智、永野 雄大、田中 真理、小松 圭介、名越 三千宏、佐伯 和弘 (近畿大 生物理工 遺伝子)
○Yoshitomo TAGUCHI, Yuta NAGANO, Mari TANAKA, Keisuke KOMATSU, Michihiro NAGOSHI, Kazuhiro SAEKI (Kinki Univ.)

【序論・目的】α-tocopherol transfer protein（α-TTP）は、脂溶性の抗酸化物質であるビタミン E の一つであるα-tocopherol に結合する細胞質局在タンパク質である。ヒト、マウス、ラットでは、α-TTP は肝臓に特異的に強く発現しており、食餌中から摂取されたビタミン E からα-tocopherol のみを選抜して、体中に循環させることに機能する。

肝臓に発現するα-TTP は、脂質を輸送する ABC タンパク質である ABCA1 と共同でα-tocopherol の肝細胞からの分泌に機能することが示されているが、両者が直接相互作用するかなど、α-TTP と ABCA1 の共同機能の態様は明らかではない。そこで、本研究では、ヒト由来の培養細胞 HEK293 において、α-TTP と ABCA1 を共発現させ、これら 2 つのタンパク質が直接相互作用するかを検討した。

また、動物におけるビタミン E の供給源である植物を主食とするウシよりα-TTP の cDNA を単離し、ウエスタン解析や免疫組織染色により、ウシにおけるα-TTP の発現部位を検討した。その部位においてα-TTP と ABC タンパク質が共同で機能する可能性について考察した。

【結果・考察】HEK293 細胞において、HA タグを付加したマウスα-TTP と、DsRed を融合させたマウス ABCA1 を共発現させ、両者が相互作用するかを免疫沈降法によって検討した。その結果、これら 2 つのタンパク質が共免疫沈降することが確認され、α-TTP と ABCA1 が直接相互作用していることが示唆された。

また、ウシにおけるα-TTP の組織ごとの発現パターンはマウスやヒトとは異なり、肝臓以外にも、肺においてα-TTP が相当量発現していることが明らかになった。α-TTP は、ウシ肺では特に、肺胞の上皮細胞および細気管支の上皮細胞において発現していた。肺の上皮細胞の表面を覆う肺サーファクタントにはα-tocopherol が含まれること、肺胞Ⅱ型細胞にはサーファクタントに脂質を供給する ABCA3 が特異的に発現することから、肺においてα-TTP は ABCA3 と共同で機能している可能性が示唆された。

ABC protein, α-TTP, vitamin E

講演番号：2A41p18
講演日時、会場：3 月 25 日 17:24～ A 校舎 41 会場

トランスクリプトミクスを用いた低酸素条件下におけるマウスメラノーマ細胞悪性化の機構解析

Transcriptomic analysis of malignancy progression of mice melanoma cells under hypoxia

○佐藤 直也[1]、矢ヶ崎 一三[1]、古崎 利紀[2]、石井 一夫[2]、三浦 豊[1] ([1]東京農工大・院・応用生命化学、[2]東京農工大・農学研究院)
○Naoya SATO[1], Kazumi YAGASAKI[1], Toshinori KOZAKI[2], Kazuo ISHII[2], Yutaka MIURA[1] ([1]Tokyo university of agriculture and technology, department of applied biochemistry, [2]Tokyo university of agriculture and technology, graduate school of agriculture)

[目的]固形癌の内部では、癌細胞の異常増殖により低酸素環境がしばしば生じる。一部の癌細胞は、低酸素環境からの離脱過程を介して悪性化することが知られている。ガングリオシドの一種である GM3 は、細胞の接着や運動に関与するタンパク質と相互作用し、癌細胞の接着や運動を調節すると考えられているが、低酸素環境における GM3 と癌細胞との関連性に関する報告は少ない。我々は昨年度本大会において、低酸素培養処理を施すことでマウスメラノーマ細胞 B16F10 の接着能・運動能が変化し、悪性化することを報告した。また、その際に GM3 syntase の mRNA 発現量が増加し、細胞膜上の GM3 存在量が増加すること、さらに GM3 と相互作用する接着因子の細胞膜マイクロドメインへの局在が変化することも明らかにしている。そこで本研究では、マウスメラノーマ細胞 B16F10 をモデル癌細胞とし、低酸素環境における GM3 及び関連分子の挙動変化のさらなる検討及び次世代シークエンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行い、新たな癌細胞悪性化機構を見出すことを目的とした。
[方法]低酸素条件培養群は、1%酸素条件下で 96 時間培養したものを用いた。低酸素条件下で培養した癌細胞より細胞膜マイクロドメイン画分を調製し、GM3 と各種細胞膜タンパク質との共局在を観察し、通常酸素条件下で培養した対照群と比較した。また運動能の変化に関与すると思われるアクチンの細胞内での存在状態を、蛍光顕微鏡により観察した。さらに、それぞれの条件下で培養した細胞より総 RNA を調製し、次世代シークエンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行った。
[結果]細胞膜マイクロドメインへのインテグリンα5 及びβ1 の局在を確認したところ、低酸素培養処理を施すことによりこれら分子のマイクロドメインへの局在が増加していることが改めて確認された。細胞膜中の GM3 含量が増加していることから、GM3 を介したマイクロドメイン構造の大きな変化が癌細胞悪性化の一つの機構であると予想される。低酸素環境における代表的な悪性化経路として、転写因子である HIF (Hypoxia Inducible Factor,低酸素誘導因子)を介した機構が知られている。しかし、GM3 syntase は HIF のターゲットではない。このことから HIF 非依存的な悪性化機構の存在が示唆されたため、次世代シークエンサーを用いて遺伝子発現変化の網羅的解析を行った。その結果、低酸素環境においてはスプライスバリアントを含む多くの遺伝子の発現変化が確認された（発現が上昇した遺伝子が約 800 個、減少した遺伝子が約 1200 個)。現在、発現変動遺伝子群を用いてパスウェイ解析を用いて HIF の直接または間接のターゲットとなっていない遺伝子の探索を行っており、それらの遺伝子群と GM3 との関連性について解析した結果を報告する。

GM3, hypoxia, transcriptomics

講演番号：2A44a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ A 校舎 44 会場

IAA アゴニスト、アンタゴニストの探索と作用機構の解析

Function analysis of IAA agonist and antagonist

○白井 郁也、早瀬 大貴、浅見 忠男（東大院・農生科・応生化）
○Ikuya Shirai,Hiroki Hayase,Tadao Asami (Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo.)

【背景と目的】オーキシンは植物の発芽や成長・花芽形成といった、植物の生活環に幅広く関わる植物ホルモンであり、その作用については植物ホルモンの中で最も古くから研究されてきた。しかし、その生合成経路やシグナル伝達経路・植物体内における移動に関しては未解明な点が多い。これまでの研究でオーキシン機能の解明には、オーキシン機能制御剤の利用が極めて有効であった。そこで残された問題点を解明するために、既存のオーキシン機能性制御剤とは異なる作用機序を有する化合物の発見とその利用を目指した。まず複数の受容体を介したインドール-3-酢酸（IAA）のシグナル伝達機構の解明に向けて、新規の IAA アゴニスト、アンタゴニストの探索とその機能解析を行った。

【方法と結果】

リード化合物の選抜のため、暗所におけるシロイヌナズナ地上部の重力応答を指標にしたフェノタイプスクリーニングを行った。その結果、オーキシン活性を阻害する化合物として 5-メチル-3-フェニルイソキサゾール-4-カルボン酸（MPCA）を見出した。本化合物は、構造が一部 IAA の構造と類似していた。そこで IAA と MPCA の重ね合わせ及び TIR1 への結合解析を行った結果、MPCA のイソキサゾール部分が IAA 受容体である TIR1 とその標的タンパク質である Aux/IAA の結合を阻害している可能性が考えられた。この結果に基づき、MPCA と似た構造を有する化合物のうち、イソキサゾールに相当する部位にベンゼン環を有するビフェニルカルボン酸（BCA）と、同部位に環構造を有さないフェニルプロピオン酸（PPA）が、それぞれアンタゴニスト、アゴニスト活性を有するのではないかと考え、シロイヌナズナにおける生理活性について検討した。

その結果、PPA は主根の伸長阻害と側根の形成促進活性を有し、オーキシン活性をもつと考えられた。一方、MPCA と BCA はともに、側根の形成阻害・重力屈性異常など種々の IAA アンタゴニスト活性を示した。これらの結果から、MPCA や BCA の有する環部分がアンタゴニスト活性に関与していることが確認された。また複数の生理試験から、MPCA と BCA は IAA 受容体ホモログに対する親和性の差により異なる機能特異性を有する可能性が示唆された。

auxin, inhibitor, signaling

講演番号：2A44a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ A 校舎 44 会場

IAA 生合成阻害剤を用いた IAA 関連変異体の探索
IAA mutants isolated by screening with IAA biosynthesis inhibitor
○安藤 卓也[1,3]、中村 英光[1]、中野 雄司[3]、長田 裕之[3]、嶋田 幸久[2]、浅見 忠男[1]（[1]東大院・応生化、[2]横浜市大・木原生物学研究所、[3]理研・ASI）
○ Takuya Ando[1,3], Hidemitsu Nakamura[1], Takeshi Nakano[3], HIroyuki Osada[3], Yukihisa Shimada[2], Tadao Asami[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem. Univ. of Tokyo, [2]Kihara institute, Yokohama city Univ., [3]ASI, RIKEN)

【背景と目的】

植物ホルモンIndole-3-acetic acid（IAA）は植物において多様な生理機能を示す事が知られているが、その生合成及びシグナル伝達経路は多岐に渡っており全容解明には至っていない。また、他の植物ホルモンとのクロストークに関しても様々な知見が蓄積されてきているが、具体的な因子や詳細な制御機構に関しては未だ不明な点が多い。最近になって初めてのIAA生合成特異的阻害剤であるL-AOPPがマイクロアレイデータの比較解析によって見出された。(Soeno et al. PCP, 2010）。そこで本研究では、この阻害剤を用いて新たなIAA関連変異体のスクリーニングを行い、得られた変異体*rai*（*resistance to auxin inhibitor*）の性状解析と原因遺伝子の解析を通したIAAの生合成及びシグナル伝達機構の解明を目指した。

なお、阻害剤を用いた変異体スクリーニングの利点として、生育に重要な生合成遺伝子の機能を抑えた擬似的な二重変異体のスクリーニングが可能である事、目的に応じて濃度を変える事によって致死にならない範囲での抑制が可能である事、他の阻害剤と組み合わせることも可能である事、等を挙げることができる。

【方法と結果】

前回報告では、取得した変異体 *rai1* における IAA 応答性遺伝子や IAA 内生量の変動などの *rai1* の基本的な性状解析に関して報告した。今回報告では、マップベースドクローニング法と高速シーケンサーの併用による原因遺伝子の絞り込みや、*rai1* の詳細な機能解析を行ったので報告する。

rai1 は植物生活環の各段階で継続的に強い IAA シグナル過剰形態を示す変異体であるが、WT とのバッククロスによる F2 世代の分離比から、二重変異体の可能性が示唆されていた。掛け合わせ実験により *ETO1(ETHYLENE OVERPRODUCER 1)*を原因遺伝子として特定したが、既知の *eto1* 単変異体との形態比較を行ったところ、別の原因遺伝子の変異が共在することによって *rai1* の形質が発現される事が判明した。また、*rai1* 変異体における *ETO1* の変異配列情報を元に、ETO1 遺伝子に変異が入っていない *rai1* 単変異体ラインを作成したところ、単変異体においても L-AOPP に対する抵抗性を観察する事が出来た。

現在のところ *rai1* 原因遺伝子は特定できてないが、高速シークエンサーの利用により候補を 21 個に絞り込んだ。これらの遺伝子破壊株を用いて *rai1* 原因遺伝子の特定を行っている。原因遺伝子の特定と並行して、*rai1* 芽生えの根の細胞壁染色や根毛形態形成観察、及び播種後 45～75 日の形態解析を行い、*rai1* の IAA シグナル過剰を裏付ける形態が観察された。また環境ストレスに対する抵抗性なども追及中であり、合わせて報告する予定である。

plant hormone Auxin, biosynthesis inhibitor, mutant screening

講演番号：2A44a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ A 校舎 44 会場

YUCCA を標的とする新型オーキシン生合成阻害剤の開発

Searching for auxin biosynthesis inhibitors targeting YUCCA enzyme

○山崎 千秋[1]、佐藤 明子[1]、谷川 友栄[1]、三井 麻利江[1]、鈴木 優志[1]、國土 祐未子[2]、石井 貴広[2]、添野 和雄[2]、嶋田 幸久[1]（[1]横浜市大・木原生研、[2]農研機構・近中四農研）
○Chiaki YAMAZAKI[1], Akiko Sato[1], Tomoe Tanikawa[1], Marie Mitsui[1], Masashi Suzuki[1], Yumiko Kokudo[2], Takahiro Ishii[2], Kazuo Soeno[2], Yukihisa Shimada[1] ([1]Kihara Inst. Biol. Res., Yokohama City Univ., [2]NARO/WARC)

植物ホルモンの一種であるオーキシンは、植物の分化や生長、重力や光などに対する環境応答を制御する非常に重要な成長調節物質である。オーキシン Indole-3-acetic acid（IAA）の生合成経路は網目状で複雑であると考えられてきたが、近年 L-Tryptophan（Trp）から Indole-3-pyruvic acid（IPyA）を経て IAA を生合成する経路が、主要経路の１つとして認識されるようになった。我々は、これまでに Trp から IPyA を合成する TAA1 の阻害剤について報告している。今回は、IPyA から IAA への反応を触媒するフラビンモノオキシゲナーゼ（YUCCA）を阻害する化合物群を発見し、構造活性相関を検討して構造最適化を行った。

これらの化合物は、野生型のシロイヌナズナに対して化合物添加培地で生育させると、主根伸長や側根形成、根毛形成、地上部重量等において顕著な生育抑制を示した。このとき、IAA を同時添加すると、化合物による成長阻害が対照区と同程度にまで回復した。また、シロイヌナズナ *YUCCA* 過剰発現体は高オーキシン型の表現型を示すが、これらの化合物添加培地で生育させると、野生型と同程度まで表現型を回復した。これらのことより、化合物はオーキシンの生合成酵素を標的としたオーキシン生合成阻害剤であることが示唆された。加えて、シロイヌナズナ YUCCA2 のリコンビナントタンパク質を用いた酵素阻害活性試験の結果、これらの化合物が *in vitro* において YUCCA2 の活性を阻害することが判明した。これらの結果より、得られた化合物は YUCCA を標的とする新型オーキシン生合成阻害剤であることが強く示唆された。

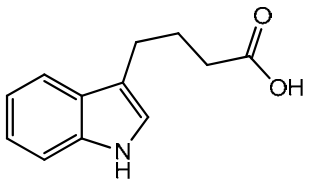
本研究は、生研センターイノベーション創出事業の一環として行われた。

Arabidopsis, auxin biosynthesis inhibitor

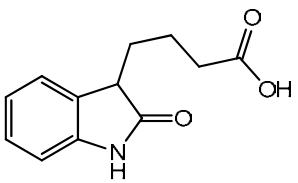
講演番号：2A44a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ A 校舎 44 会場

植物におけるインドール-3-酪酸代謝物の分析
Analysis of indole-3-butyric acid metabolites in plants
○西野 雄人[1]、小山 彩香[1]、大西 敦子[2]、宮下 正弘[2]、宮川 恒[2] ([1]京都大農、[2]京都大院農)
○Yuuto Nishino[1], Ayaka Koyama[1], Atsuko Onishi[2], Masahiro Miyashita[2], Hisashi Miyagawa[2] ([1]Kyoto Univ., [2]Grad.School, Kyoto Univ.)

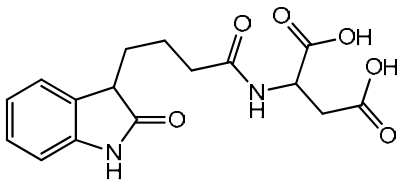
【目的】オーキシンは、植物の成長や発達に不可欠な植物ホルモンであり、インドール-3-酢酸(IAA)が最も重要な役割を果たしている。インドール−3−酪酸(IBA)もオーキシンの一つであるが、IAA の炭素鎖の伸長によって合成されることや、また逆にβ酸化によって IAA へと変換されることから、IBA は IAA の内生量を調節するための貯蔵形態の一つであると考えられている。これまでにさまざまな植物における IAA 代謝が調べられ、酸化とアミノ酸抱合が主な代謝反応であることが明らかにされてきたのに対し、IBA の代謝については、シロイヌナズナにおいてグルコース抱合体の存在が報告されているのみであり、特に主要作物であるイネにおける IBA 代謝物についてはほとんど不明である。そこで本研究では、IBA も IAA と同様の代謝反応を受けていると予想し、シロイヌナズナおよびイネにおける IBA とその酸化体、ならびにそのアスパラギン酸抱合体の探索および定量を行った。
【方法・結果】標品として用いる OxIBA は IBA から DMSO を用いた酸化反応により合成した。また、OxIBA-Asp は OxIBA と Asp(OtBu)-OtBu を縮合させた後、脱保護することにより合成した。これらの標品を外部標準として実験に用いた。シロイヌナズナは発芽後 5 週のものを地上部、ロゼット葉、地下部にわけ、イネは発芽後 2 週のものを地上部、地下部にわけて、液体窒素中で破砕した後、80%アセトン水溶液で抽出した。この抽出液を C18 固相カートリッジで部分精製し、LC-ESI-MS/MS 分析に供し、MRM 検出法による IBA 代謝物の同定ならびに定量を行った。その結果、シロイヌナズナではいずれの代謝物も検出され、特に OxIBA が他の IBA 代謝物と比べより多く存在することが分かった。一方、イネでは OxIBA と OxIBA-Asp が検出されたが、IBA はほとんど検出されなかった。これらのことから IBA は植物体内において IAA と同様の酸化代謝ならびにそのアミノ酸抱合化反応を受けることが示唆された。



IBA



OxIBA



OxIBA-Asp

Indole-3-butyric acid

講演番号：2A44a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ A 校舎 44 会場

植物ホルモン・アブシジン酸の新規アゴニスト・アンタゴニスト探索
Searching for novel agonists and antagonists of phytohormone abscisic acid
○伊藤 卓也[1]、近藤 恭光[1]、梅澤 泰史[2,3]、清水 猛[1]、篠崎 一雄[2]、長田 裕之[1] ([1]理研基幹研　ケミカルバイオロジー、[2]理研植物センター　機能開発、[3]農工大院 BASE)
○Takuya ITO[1], Yasumitsu Kondoh[1], Taishi Umezawa[2,3], Takeshi Shimizu[1], Kazuo Shinozaki[2], Hiroyuki Osada[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN ASI, [2]Gene Discovery, RIKEN PSC, [3]BASE, Tokyo Univ. of A&T)

アブシジン酸(ABA)は、乾燥、塩などの環境変化を受けた時や種子が成熟する時に働く植物ホルモンで、植物は ABA の働きで水ストレス耐性能を獲得する．このため、水ストレスに耐性な作物育種を目指して、ABA の生合成や信号伝達機構を解明する取組みが長年行われてきた．信号伝達の研究では，シロイヌナズナの ABA 受容体が単離されたことで、タンパク質脱リン酸化酵素(PP2C)，タンパク質リン酸化酵素(SnRK2)との 3 因子による信号伝達機構の大枠が確立した．この受容体単離には選択的アゴニストの Pyrabactin が果たした役割が大きく、ケミカルバイオロジーが多大な貢献をしたと言える．これは、シロイヌナズナには受容体のパラログが多数存在するために遺伝学が有効に機能しないことが原因であった．このことは，今後の ABA 信号伝達研究でもケミカルバイオロジーが有効な手段であることを示している．しかし，Pyrabactin 以外のアゴニスト，アンタゴニストは報告されていないのが現状である．したがって、新規アゴニスト、アンタゴニストが単離できれば、ABA 信号伝達解明のためのプローブになることが期待できるのみならず、水ストレスに耐性な作物育種に向けたリード化合物になることも期待できる。

我々は、ABA の新規アゴニスト、アンタゴニストを単離する目的で、理研天然化合物ライブラリーの 24,000 化合物から、化合物アレイを用いてシロイヌナズナの受容体 PYR1 と物理相互作用する化合物をスクリーニングした。それに続く SnRK2 キナーゼアッセイ、PP2C フォスファターゼアッセイを用いてアンタゴニスト活性を示す 2 化合物を同定した．これらはテトラヒドロピラン環と 2-(trimethylsilyl)ethoxymethyl 基を共通にもつ化合物であった. しかしこの化合物は ABA の種子発芽阻害効果に対してアンタゴニスト活性を示さず、これは種子内で化合物が代謝されるためであることが示唆された.

abscisic acid, antagonist, chemical array

講演番号：2A44a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ A 校舎 44 会場

ABA 受容体アンタゴニスト PAO*n*

An antagonist of ABA receptor, PAO*n*

○竹内 純[1]、岡本 昌憲[2]、武藤 拓也[3]、CUTLER Sean[2]、平井 伸博[4]、轟 泰司[5] ([1]静大院・創造、[2]University of California, Riverside、[3]静大院・農、[4]京大院・農、[5]静大・農)
○Jun TAKEUCHI[1], Masanori OKAMOTO[2], Takuya MUTO[3], Sean CUTLER[2], Nobuhiro HIRAI[4], Yasushi TODOROKI[5] ([1]Grad. School Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]University of California, Riverside, [3]Grad. School Agric., Shizuoka Univ., [4]Grad. School Agric., Kyoto Univ., [5]Facul. Agric., Shizuoka Univ.)

【目的】アブシジン酸(ABA)は種子休眠や気孔閉鎖など，環境ストレス耐性誘導において重要な役割を果たす植物ホルモンである。ABA 受容体 PYR/PYL/RCAR (PYLs)は，ABA と結合後，タンパク質脱リン酸化酵素 PP2C と複合体を形成することでその酵素活性を阻害し，以降のリン酸化カスケードを活性化して遺伝子発現・生物活性を誘導する。したがって，PYLs-PP2C 間相互作用を制御する分子，PYLs のアゴニスト/アンタゴニストは ABA シグナル伝達に関する化学生物学的研究において有用な化学ツールとなる。これまでに，PYLs-ABA 結晶構造に基づいて *S*-ABA の 3’位に硫黄を介して直鎖アルキルを導入した AS*n* (*n* はアルキル鎖の炭素数)を合成し，異種発現タンパク質を用いた in vitro PP2C 活性試験，ABA 応答性遺伝子の qRT-PCR および生物活性試験の結果から，*n*<4 はアゴニスト，一方 *n*>4 はアンタゴニストとして機能することを確証した。しかし，PYLs-ABA-PP2C の三元複合体形成により，PYLs と ABA の結合は PYLs-ABA 複合体と比較して約 10 倍強固になるため，PYLs-PP2C 間相互作用を阻害する AS*n* (*n*>4)は ABA ほど強く PYLs に結合出来ないと予想される。そこで本研究では，PYLs に対する結合親和性を本質的に向上させることを目的として，AS*n* を構造改変した新規 PYLs アンタゴニストを設計・合成した。

【方法と結果】アンタゴニストとして機能する AS*n* (*n*>4)はアルキル鎖の配座自由度が高く，ABA と比べると PYLs 結合時のエントロピー損失が大きいと予測される。そこで，これを小さくするために，ABA の環部二重結合にベンゼン環を導入してアルキル鎖の配座自由度を制限した PAO*n* (*n* はアルキル鎖の炭素数)を設計した。6-Hydroxy-2,2-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-1(*2H*)-one のフェノール性水酸基を TBS で保護した後，側鎖ジエンカルボン酸のメチルエステルを 4 段階で導入した。続いて環部 4’位を酸化，TBS 基を脱保護してアルキル鎖を導入した後，側鎖メチルエステルをアルカリ加水分解して PAO*n* (*n*=0-10)をラセミ体として得た。PAO*n* を生物活性試験に供したところ，*n*<3 は単独で発芽阻害作用を示しアゴニスト，一方 *n*>3 は ABA による発芽阻害作用を抑制しアンタゴニストとして機能した。PAO4 と *S*-AS6 の活性を比較したところ，シロイヌナズナ種子発芽に対して，PAO4 は *S*-AS6 と同程度のアンタゴニスト活性を示した。一方，レタス種子発芽に対しては *S*-AS6 の約 3 倍強いアンタゴニスト活性を示した。今回使用した PAO4 はラセミ体であることを考慮すると，*S*-PAO4 は *S*-AS6 よりも強い PYLs アンタゴニストとして機能する可能性がある。現在，PAO*n* を光学分割するとともに，in vitro PP2C 活性試験による *S*-AS*n* との活性比較を検討している。

abscisic acid, PYLs, antagonist

講演番号：2A44a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ A 校舎 44 会場

新奇アブシジン酸受容体アンタゴニスト Panthy の創出

Panthy, novel antagonists of abscisic acid receptors

○櫻井 栄[1]、竹内 純[2]、大西 利幸[3]、平井 伸博[4]、轟 泰司[1] ([1]静大農、[2]静大院・創造、[3]静大・若手グローバル研究リーダー育成拠点、[4]京大院農)
○ Sakae SAKURAI[1], Jun TAKEUCHI[2], Toshiyuki OHNISHI[3], Nobuhiro HIRAI[4], Yasushi TODOROKI[1] ([1]Shizuoka Univ., [2]Sci. Technol. Shizuoka Univ., [3]Division of Young Research Leaders, Shizuoka Univ., [4]Grad. Kyoto Univ.)

【目的】アブシジン酸（ABA）は種子休眠や環境ストレス応答に必須の植物ホルモンである。ABA 受容体 PYR/PYL/RCAR (PYLs)は ABA と結合すると構造変化を起こし，タンパク質脱リン酸化酵素 PP2C と複合体を形成することで ABA シグナル伝達を活性化する。PYLs-PP2C 間相互作用を阻害する化合物つまり PYLs アンタゴニストは, ABA シグナル伝達に関する化学生物学的研究において有用なツールとして機能する。PYLs-ABA 複合体結晶構造において，ABA の C3’→H 方向と C4’→O 方向にはそれぞれ小さなトンネルが存在し，PYLs 表面の PP2C 結合部位へと通じている。これら 2 つのトンネルは何れも ABA 結合時の構造変化によって形成されるため, ABA の 3’位または 4’位に適切な置換基を導入した ABA アナログは，PYLs アンタゴニストとして機能する可能性がある。そこで我々はまず C3’→H 方向のトンネルに着目して，ABA の 3’位に直鎖アルキル基を導入した AS6 を設計・合成した。AS6 は PYLs のリガンドでありながら PP2C 活性阻害を誘導しない PYLs アンタゴニストとして機能することを昨年度本大会で報告した。しかし，PP2C との相互作用を誘導しない AS6 の PYLs に対する親和性は，PP2C との複合体形成で強化される ABA のそれと比べて本質的に弱くならざるを得ず，AS6 は ABA に対して 3 当量以上の処理ではじめて明確なアンタゴニスト活性を示す。そこで本研究では，より低濃度で活性を示す PYLs アンタゴニストの創出を目指し，C4’→O 方向のトンネルに着目した。このトンネルには PP2C の Trp 残基の側鎖インドール環が入り込み, PYLs の芳香族アミノ酸残基側鎖と相互作用するだけでなく，水分子を介して ABA の 4’位カルボニル酸素と水素結合する。従って，PP2C の Trp インドール環構造を取り込んだ ABA アナログは PYLs-PP2C 間相互作用の妨害と PYLs に対する親和性強化を同時に実現できると予想した。そこで，ABA の 4’位に hydrazone を介して芳香環を導入した panthy を新規 PYLs アンタゴニスト候補化合物として設計・合成した。
【方法・結果】芳香環としてベンゼン環もしくはナフタレン環をもつ hydrazide 化合物と ABA を酸性条件下で反応し，数種の panthy を合成した。AS6 と同様に，panthy は ABA によるシロイヌナズナおよびレタス種子発芽阻害作用を抑制した。特に，1-naphthylacetichydrazone を有する panthy1NP1 が最も高い活性を示し，AS6 よりも 3 倍強い PYLs アンタゴニストとして機能することが示唆された。

abscisic acid, PYL, antagonist

講演番号：2A44a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ A 校舎 44 会場

Investigation of the factors mediating crosstalk between ABA and GA in plant growth and development by over-expression lines of PYL/PYR/RCAR

○Kai JIANG,Eun-Kyung Seo,Hidemitsu Nakamura,Tadao Asami (univ of tokyo)

ABA (abscisic acid) and GA (Gibberellin) are two major plant hormones that regulate many aspects of plant growth and development. ABA is known as a negative regulator of plant growth in seed germination, cell elongation, root development, floral transition and stomatal movements. Conversely, GA plays positive roles in promoting seed germination, stem and hypocotyl elongation, flowering. ABA and GA play antagonistic roles with each other in seed germination, flower transition, fruit development and so on. There are many cues of plant physiological observations that show the crosstalk between these two hormones. However the molecular events of crosstalk between ABA and GA largely remain elusive.

As most accepted ABA receptors by now, PYR/PYL/RCAR (abbreviated to PYL in later text) show vital roles in ABA signaling pathway. In the presence of ABA, the complex of PYL and ABA will bind to PP2C and prevent its inhibitory activity of dephosphorylation on SnRK2. After released from inhibition by PP2C, SnRK2 activates downstream factors and induces the ABA responses such as prevention of seed germination and stomatal opening.

To test whether the ABA signaling pathway activated by PYLs functions in the crosstalk between ABA and GA, we have constructed the transgenic *Arabidopsis thaliana* in which each PYL receptor (PYL-OX) is over-expressed. Then we observed the responses of each PYL-OX line to treatments of ABA, GA and biosynthetic inhibitors of these two hormones. Based on these data, we will discuss the roles of individual PYL protein in ABA signaling pathway and in the crosstalk between ABA and GA signaling.

ABA, GA, crosstalk

講演番号：2A44a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ A 校舎 44 会場

ジベレリン代謝酵素特異的制御剤の探索
Random screening of specific chemicals regulating gibberellin metabolism
○大谷 征史、中嶋 正敏、福井 康祐、中村 英光、浅見 忠男（東大院・農生科・応生化）
○Masato Otani,Masatoshi Nakajima,Kosuke Fukui,Hidemitsu Nakamura,Tadao Asami (Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo)

【目的】植物ホルモンの一種･ジベレリンには種子発芽促進、茎の伸長促進、花芽形成促進、花器官や種子の発達など種々の制御機能が知られており、果実の落下防止や着花促進などに対する生長調節剤として利用されている。私たちは、植物におけるジベレリンの内生量の調節に直接関わることによりジベレリンの機能発現に大きく影響を与えている代謝反応に興味を持ち、化学的な精密制御を可能とする代謝反応阻害剤の探索を行っている。本研究では、シロイヌナズナのジベレリン代謝酵素 2-oxidase に焦点を当て、当該酵素に対して活性阻害効果を示す化合物を探索する目的で、RI 標識ジベレリンの代謝反応モニター系を利用して化合物ライブラリーからのスクリーニングを展開した。

【方法および結果】　シロイヌナズナのジベレリン代謝過程において主要に働いていると報告されている GA 2-oxidase の一種、AtGA2ox2 を化学制御の対象として選択し、まず大腸菌発現系による His タグ融合型リコンビナントタンパク質(His-AtGA2ox2)を調製した。His-AtGA2ox2 の酵素活性は、標品の代謝産物を GC/MS を用いて同定することにより確認した。続いて、放射性標識 GA_4 誘導体とイメージングアナライザーを用いて、His-AtGA2ox2 の酵素活性検出系を最適化した。この系に市販の化合物ライブラリー約 1,000 種(終濃度として平均 5×10^{-5}M)を添加し、酵素反応の進行を明らかに阻害するもの 1 種、methyl 6-chloro-3H-1,2,3-benzodithiazole-4-carboxylate 2-oxide (CBTC)を選抜した。シロイヌナズナの種子発芽、および、その後の植物体の生長に対する CBTC の投与効果を調べたところ、双方とも有意に促進傾向を確認した。本研究で見出した CBTC はその特異性の高さゆえ、ジベレリンの生合成反応には影響を与えず代謝反応のみを抑制する効果が期待される。従ってこの特性は、ジベレリンシグナル伝達の持続性向上と、実用化面における本剤の共処理によるジベレリン使用量の軽減につながると期待している。発表では本剤の効果に関する選択性、および、構造活性相関についても併せて報告する予定である。CBTC は Herz 反応を利用することにより 5-クロロアントラニル酸メチルから二段階の反応で合成する事ができるため、基質となる種々のアニリン誘導体から類縁体を合成し、CBTC よりもさらに効果の強い化合物の創製を目指した。さらに、種々の類縁体に関して GA 2-oxidase 酵素代謝阻害活性測定、GA 2-oxidase 酵素への結合活性測定、植物の系における伸長促進作用などについて調べたので、これらの結果について発表する予定である。

gibberellin, GA2ox, CBTC

講演番号：2A44a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ A 校舎 44 会場

陸上植物 *ent*-kaurene 合成酵素における基質への構造認識に対する差異

Substrate specificity of *ent*-kaurene synthases in land plants

○嶋根 真奈美[1]、森崎 敬子[2]、植野 陽平[3]、夏目 雅裕[1,2,3]、林 謙一郎[4]、野崎 浩[4]、川出 洋[1,2,3] ([1]東京農工大院・連農、[2]東京農工大・農、[3]東京農工大院・農、[4]岡山理大・理)
○Manami SHIMANE[1], Keiko MORISAKI[2], Youhei UENO[3], Masahiro NATSUME[1,2,3], Ken-ichiro HAYASHI[4], Hiroshi NOZAKI[4], Hiroshi KAWAIDE[1,2,3] ([1]United Grad. School of Agric. Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Dept. Appl. Biol. Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol., [3]Grad. School of Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol., [4]Dept. Biochem., Okayama Univ. Sci.)

【目的】

ent-kaurene はジテルペン型植物ホルモン・ジベレリンの前駆体であり，geranylgeranyl diphosphate (GGDP) から *ent*-copalyl diphosphate (*ent*-CDP)を経て生合成される。*ent*-CDP から *ent*-kaurene を合成する *ent*-kaurene 合成酵素 (CPS/KS あるいは KS) はコケ・シダ・裸子・被子植物の全ての陸上植物において機能することが知られている。一方，高等植物はジベレリンの他多彩な二次代謝系ジテルペン類を生産し，*ent*-CDP の立体異性体である(+)-CDP，*syn*-CDP もラブダン型ジテルペン類の中間体として生合成される。我々はシダ植物イヌカタヒバ (*Selaginella moellendorffii*) の KS の機能解析を行っている過程で，イヌカタヒバ KS は *ent*-CDP 以外の CDP も基質として認識し，各々全く構造が異なる生成物群を与えることを見出した。そこで本研究ではイヌカタヒバ KS に加え，多彩なジテルペン型ファイトアレキシン類の生産主として知られるイネの KS を初めとする，各種植物の CPS/KS，KS における基質の立体構造の認識の差異について解析を行った。

【結果・考察】

コケ植物ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) の CPS/KS，シダ植物イヌカタヒバ・被子植物レタス (*Lactuca sativa*) 及びイネ (*Oryza sativa*) の KS について大腸菌を宿主とし組換え酵素を調製した。ヒメツリガネゴケ CPS/KS は *ent*-kaurene 合成活性に加え，GGDP から *ent*-CDP を合成する活性も有するため，人工変異導入により *ent*-CDP 合成活性を失わせたもの (cps/KS) を作製し解析に用いた。GGDP を基質とし *ent*-CDP 合成酵素と各種 cps/KS，KS を組み合わせて酵素反応を行った。得られた生成物を GC/MS 分析に供したところ，全ての酵素において *ent*-kaurene の合成が確認された。同様に(+)-CDP，*syn*-CDP の各合成酵素と組み合わせて反応を行ったところ，ヒメツリガネゴケ cps/KS，イヌカタヒバ・レタスの KS は双方の CDP も基質として認識し環化反応生成物が確認されたが，イネの KS は(+)，*syn*-CDP とも認識せず，環化反応生成物は検出されなかった。以上の実験より，イネ KS は基質の立体を高度に認識しており，*ent*-CDP のみを特異的に環化反応基質に用いることが明らかとなった。イネでは KS から遺伝子重複を経て派生した二次代謝系酵素が多数存在し，*ent*-CDP，*syn*-CDP を生合成中間体とする複雑なファイトアレキシン類生合成系が機能することが知られる。複雑な二次代謝系の進化に伴い，イネの KS は厳密な基質認識を行うことでジベレリン生合成系を精密に維持してきたと考えられる。

gibberellin, *ent*-kaurene synthase, diterpene

講演番号：2A44a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ A 校舎 44 会場

モミラクトン生合成に関与する蘚類ハイゴケのジテルペン環化酵素の機能解析

Functional analysis of the diterpene cyclase involved in momilactone biosynthesis in *Hypnum plumaeforme*

貝沼 遼介[1]、嶋根 真奈美[2]、安藤 朋子[1]、宮崎 翔[2]、波多野 友希[3]、夏目 雅裕[1,2]、林 謙一郎[3]、野崎 浩[3]、○川出 洋[1,2] ([1]東京農工大院農、[2]東京農工大院連農、[3]岡山理大理)
Ryosuke KAINUMA[1], Manami SHIMANE[2], Tomoko ANDO[1], Sho MIYAZAKI[2], Yuki HATANO[3], Masahiro NATSUME[1,2], Ken-ichiro HAYASHI[3], Hiroshi NOZAKI[3], ○Hiroshi KAWAIDE[1,2] ([1]Grad. School Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]United Grad. School Agric. Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol., [3]Okayama Univ. Sci.)

【目的】

テルペノイドは天然に広く存在し、多様な生理活性物質を持つ化合物群である。植物の防御応答に関与するテルペノイドとして、例えばイネがストレスに応答して生産を誘導する種々のジテルペン型ファイトアレキシンが知られている。モミラクトンは植物の生長抑制作用を持つイネのファイトアレキシンの一つであり、その生合成経路や生理活性の研究が進められてきた。2007年に野崎らは蘚類ハイゴケがモミラクトン類を生産していることを報告した。進化的に離れたイネとハイゴケがモミラクトン類を生産することは興味深く、本研究ではハイゴケのモミラクトン生合成に関わるジテルペン環化酵素HpDTCの同定とその機能解析に取り組んだ。

【方法・結果】

ヒメツリガネゴケや被子植物のジテルペン環化酵素遺伝子の配列をもとにハイゴケのジテルペン環化酵素 HpDTC1 の遺伝子をクローニング後、組換え酵素を大腸菌で生産した。ゲラニルゲラニル二リン酸(GGDP)を基質にして酵素反応を行い、生成物を GC-MS 分析したところ単一のジテルペン炭化水素化合物を与えた。多機能型 HpDTC1 の反応中間体を同定するために、B 型環化酵素活性を欠失させた HpDTC1DM を作製した。HpDTC1DM の酵素反応の結果から、HpDTC1 は *ent*-copanyl diphosphate(*ent*-CDP)を経由する酵素反応を持つことが分かった。最終生成物の構造は、完全 ^{13}C 標識物の酵素合成と ^{13}C-^{13}C COSY によって *ent*-pimara-9(11),15-diene と決定した。これは、モミラクトン生合成中間体である *syn*-pimara-7,15-diene とは異なるため、モミラクトン生合成に関与する HpDTC を探索するために次世代シークエンサーによる解析を行い、新たにジテルペン環化酵素 HpDTC2 の cDNA 配列を決定した。HpDTC2 の組換え酵素を HpDTC1 と同様に生産し、GGDP を基質として酵素反応後に生成物を GC-MS で分析した。HpDTC2 の反応生成物は単一であり、標品の *syn*-pimara-7,15-diene と保持時間、マススペクトルが一致していた。また、HpDTC1DM と同様に B 活性を欠失させた HpDTC2DM 酵素を作製して生成物を調べたところ、反応中間体は *syn*-CDP であった。以上より、HpDTC2 が *syn*-pimara-7,15-diene 合成酵素であると同定され、これがモミラクトン生合成に関与すると判断した。系統樹解析において HpDTC2 はイネのモミラクトン合成酵素とは進化的に離れており、ハイゴケはイネとは独立にモミラクトン合成能を獲得したと考えられる。また、HpDTC1 と HpDTC2 では酵素反応収率に違いが見られたため、両酵素について動力学的な解析を進めている。

pimaradiene, phytoalexin, terpenoid

講演番号：2A44a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ A 校舎 44 会場

根寄生植物 *Striga* 種子のストライゴラクトンに対する構造要求性の解明

Structural requirements of strigolactones for germination induction and inhibition of *Striga* seeds

○中嶌 瞳[1,2]、野村 早紀[1]、水谷 正治[1]、滝川 浩郷[1,2]、杉本 幸裕[1,2]（[1]神戸大院・農・生命機能科学、[2]JST/JICA, SATREPS）
○Hitomi NAKASHIMA[1,2], Saki NOMURA[1], Masaharu MIZUTANI[1], Hirosato TAKIKAWA[1,2], Yukihiro SUGIMOTO[1,2] ([1]Grad. School of Agric. Sci., Kobe Univ., [2]JST/JICA, SATREPS)

【目的】根寄生雑草であるストライガ（*Striga* spp.）はアフリカで主要な穀物に寄生し農業に大きな被害を及ぼしている。これまでの研究によりストライガ種子は宿主が分泌するストライゴラクトン（SL）に応答し発芽することが知られている。*S. hermonthica* はソルガムやトウモロコシ、イネなどに寄生し天然の SL だけでなく合成ストライゴラクトンである GR24 でも発芽誘導される。一方、*S. gesnerioides* は GR24 では発芽誘導されないが、宿主であるササゲが分泌する *ent*-2'-*epi*-orobanchol 及びそのアセチル体である alectrol に応答し発芽する。我々は alectrol の構造を解明する過程で *S. gesnerioides* 種子がストライゴラクトンに対して高度な構造要求性を有しており、発芽誘導しない化合物の一部が発芽阻害活性を有することを見出した。本研究では様々なストライゴラクトンの立体異性体を合成し、*S. hermonthica* に対する発芽誘導活性と *S. gesnerioides* に対する発芽誘導活性及び発芽阻害活性を評価し SL の構造活性相関研究を行った。
【方法】評価に用いた天然 SLs は既報の方法に従いラセミックジアステレオメリック混合物として合成した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによりジアステレオマーを分離し、さらにキラルカラム HPLC に供することによりラセミ体を分離した。得られた立体異性体の絶対立体配置は CD スペクトルに基づいて決定した。各化合物の *S. hermonthica* 及び *S. gesnerioides* に対する種子発芽刺激活性を評価した。さらに発芽刺激活性が認められなかった化合物については種子発芽阻害活性を評価した。阻害活性は *ent*-2'-*epi*-orobanchol と各試験化合物を同時に投与し、発芽率を比較することで評価した。
【結果及び考察】*S. hermonthica* に対しては試験したすべての異性体で発芽誘導活性が認められ、特に strigol と同様の立体配置を有する異性体が高い発芽刺激活性を有していた。*S. gesnerioides* は alectrol と同様の立体配置を有する異性体で発芽刺激活性が認められた。特に水酸基を有するアナログが高い発芽刺激活性を示した。一方、strigol と同様の立体配置を有する化合物は発芽阻害活性を示した。以上の結果より、発芽刺激活性と発芽阻害活性に関しては C 環及び D 環 2'位の立体配置が重要であり、さらに *S. gesnerioides* に対する発芽刺激活性については構造中の水酸基が活性を向上させることが示された。

Strigolactone, *S. gesnerioides*, Structure-activity relationship

講演番号：2A44a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ A 校舎 44 会場

ミヤコグサ根を用いた ^{13}C 標識 carlactone の 5-deoxystrigol への変換経路の検証
Investigation of the putative biosynthetic pathway from carlactone to 5-deoxystrigol by incorporation of the ^{13}C-labeled precursor in the roots of *Lotus japonicus*

○佐渡 愛香[1]、秋山 康紀[1]、謝 肖男[2]、米山 弘一[2]、林 英雄[1] ([1]阪府大院・生命環境、[2]宇都宮大・雑草センター)
○Aika Sado[1], Kohki Akiyama[1], Xiaonan Xie[2], Koichi Yoneyama[2], Hideo Hayashi[1] ([1]Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Weed. Sci. Center, Utsunomiya Univ.)

【目的】ストリゴラクトン (strigolactone, SL) は植物においてアーバスキュラー菌根菌や根寄生雑草との相互作用における根圏情報物質として作用するのみならず, 地上部の枝分かれを制御する内生ホルモンとしても働くアポカロテノイドである。天然からこれまでに単離されている十数種の SL はすべて 5-deoxystrigol(5DS)を共通の基本骨格としているため, 5DS が水酸化やエポキシ化などの構造修飾を受けて多様な構造の天然 SL が生合成されると考えられている。これまでに 5DS がカロテノイドからカロテノイド酸化開裂酵素である CCD7 と CCD8, シトクロム P450 や D27 などの酵素群により生合成されることが分かっているが, 中間体を含め詳細な生合成経路はほとんど不明であった。ごく最近, all-*trans*-β-carotene から D27 と CCD7, CCD8 により carlactone が生成することが明らかになった (Alder *et al*. 2012)。Carlactone は 5DS と同じ 19 個の炭素から成り, SL の構造的特徴であるエノールエーテルで結合したメチルブテノライド環を持つことから, さらなる酸化および環化反応により 5DS 骨格が形成されうるため, 5DS 生合成の有力な中間体と考えられている。しかしながら, 植物から carlactone の単離はなされておらず, 実際に植物体内で carlactone から 5DS へと変換されるかについては証明されていない。そこで本研究では, ^{13}C 標識した carlactone を合成し, 主要な SL として 5DS を生産するミヤコグサ根への取り込み実験を行うことで, 植物体内で carlactone が 5DS に変換されるかを検討することとした。

【方法および結果】取り込み実験に供する ^{13}C 標識化合物を調製するにあたり, まず carlactone の合成法を検討した。β-ionone からクロロ酢酸エチル, 続くナトリウムメトキシドとの反応によって C_{14}-aldehyde を合成した。この C_{14}-aldehyde と bromobutenolide とのカップリング反応について種々の条件検討を行った結果, 極めて低収率ながら carlactone を有機合成的に得ることができた。本合成により得られた carlactone の MS, UV, ^{1}H-,および ^{13}C-NMR スペクトルデータは文献値と良く一致した。^{13}C 標識 carlactone の合成は, 2,6-dimethylcyclohexanone の iodo[^{13}C]methane と LDA によるメチル化で合成した 2,2,6-[2-$^{13}CH_3$]trimethylcyclohexanone を, さらに 2 段階の反応で[1-$^{13}CH_3$]-β-ionone へと導き, これに上記の反応スキームを適用することにより行った。現在, 水耕栽培したミヤコグサの根を用いた取り込み実験を行っている。

carlactone, strigolactone, *Lotus japonicus*

講演番号：2A44p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ A 校舎 44 会場

イネグルタレドキシンによる発芽と初期生長の抑制

Suppression of germination and shoot establishment by glutaredoxin in rice

○森田 重人[1,2]、足立 哲[1]、増村 威宏[1,2]、佐藤 茂[1,2]（[1]京都府大院生命環境、[2]京都農技セ生資セ）
○Shigeto MORITA[1,2], Satoru ADACHI[1], Takehiro MASUMURA[1,2], Shigeru SATOH[1,2] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]Kyoto Pref. Agr. Forest. Fish. Technol. Center)

【目的】グルタレドキシン（GRX）は、グルタチオンの還元力を用いてタンパク質のジスルフィド結合を還元する酵素であり、原核生物から真核生物まで広く保存されている。GRX の生理的機能として、酸化ストレスに対する防御やタンパク質の活性調節などが知られている。

当研究室ではイネの登熟種子と完熟種子で多量に発現している GRX アイソフォーム OsGRXC2;2 に着目し、その機能解析を行っている。これまでに我々は、免疫組織観察によって OsGRXC2;2 が種子外周部のアリューロン層に高蓄積していることを明らかにした。また過剰発現形質転換イネを用いた解析により、OsGRXC2;2 が登熟種子において活性酸素の一種であるスーパーオキシドに対する防御に関与していることを明らかにした。

一方、発芽種子において OsGRXC2;2 は、その蓄積量が吸水後 1 日目以降急速に減少し、3 日目でほぼ消失することから、発芽過程においても役割を持つと考えられる。本研究では、形質転換イネを用いた解析により、OsGRXC2;2 と発芽との関連について調査した。

【方法および結果】 OsGRXC2;2 を CaMV 35S プロモーター制御下で過剰発現させた形質転換イネおよび発現抑制させた形質転換イネを用いて、発芽過程における表現型を観察した。その結果、OsGRXC2;2 過剰発現系統では野生型やコントロール系統に比べて、発芽とその後の初期生長に遅延が見られた。また過剰発現系統では、発芽後に第 1 葉の伸長が観察されない個体が 17－25%見られた。一方、発現抑制系統においては発芽および初期生長に変化は見られなかった。また吸水時の OsGRXC2;2 蓄積量の変化を調査するため、ウェスタンブロット解析を行った結果、野生型と比べて過剰発現系統では吸水時の OsGRXC2;2 の減少が緩やかであった。

以上の結果から、完熟種子に蓄積している OsGRXC2;2 は発芽および発芽後の初期生長の抑制因子として機能していることが示唆された。

glutaredoxin, seed germination, reactive oxygen species

講演番号：2A44p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ A 校舎 44 会場

OsJAZ 遺伝子によって誘導されるイネ病害抵抗性の機構解析
Molecular mechanism of rice disease resistance induced by *OsJAZ*
○宇野 雄太[1]、平井 洋行[1]、四井 翔太[1]、寺沢 勇治[1]、久保 健一[2]、蔡 晃植[1] ([1]長浜バイオ大学大学院、[2]奈良先端科学技術大学大学院)
○Yuta Uno[1], Hiroyuki Hirai[1], Syota Shii[1], Yuji Terasawa[1], Kenichi Kubo[2], Che Fang-Sik[1] ([1]Nagahama Inst. of Bio-Sci. and Tech., [2]NAIST)

これまでの研究で、我々はイネの植物免疫反応時に発現誘導される転写調節因子として *OsJAZ* 遺伝子を同定した。そこで、イネの植物免疫反応誘導における *OsJAZ* 遺伝子の役割を解明することを目的として研究を行った。まず、*OsJAZ* 遺伝子の過剰発現イネ(JAZ-OX)を作製し、イネ白葉枯病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*（*Xoo*）を接種した。その結果、JAZ-OX ではニホンバレ野生株に比べて病徴の減少と菌体増殖の抑制が認められた。さらに、JAZ-OX イネ培養細胞を作製し、*Xoo* を接種したところ、JAZ-OX イネ培養細胞の培地上清中で *Xoo* 接種 18 時間後から菌体数の減少が認められた。このような菌体の増殖抑制は細胞を含まない JAZ-OX イネ培養細胞の培地上清でも認められたことから、JAZ-OX イネ培養細胞の培地上清中に抗菌性の物質が存在する可能性が示唆された。そこで、JAZ-OX イネ培養細胞の培地上清と WT の培地上清に存在するタンパク質についてプロテオーム法で解析したところ、PR５、PR７、PR８が JAZ-OX イネ培養細胞の培地上清中で顕著に蓄積していることが明らかとなった。また、JAZ-OX イネ培養細胞培地上清の酢酸エチル抽出物についても調べたところ、*Xoo* に対する抗菌活性が存在することが示された。そこで、この抗菌活性物質について HPLC で精製したところ、ひとつのピークに抗菌活性が回収された。このことから、JAZ-OX イネ培養細胞の培地上清中にはファイトアレキシン様の物質が存在することが示唆された。以上のことから *OsJAZ* 遺伝子過剰発現イネ培養細胞では、PR タンパク質やファイトアレキシン様物質を蓄積することで Xoo に対して病害抵抗性を示していることが明らかとなった。

plant, rice, PR potein

講演番号：2A44p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ A 校舎 44 会場

イネのジャスモン酸早期応答性 bHLH 型転写因子 RERJ1 の虫害抵抗性における役割

Involvement of the JA-inducible transcription factor RERJ1 in rice defense response against herbivores

○河村 奈央子[1]、宮本 皓司[1]、小澤 理香[2]、高林 純示[2]、宮尾 安藝雄[3]、廣近 洋彦[3]、野尻 秀昭[1]、山根 久和[4]、岡田 憲典[1]([1]東大・生物工学セ、[2]京大・生態研、[3]農生資研、[4]帝京大・バイオ)
○ Naoko KAWAMURA[1], Koji Miyamoto[1], Rika Ozawa[2], Junji Takabayashi[2], Akio Miyao[3], Hirohiko Hiochika[3], Hideaki Nojiri[1], Hisakazu Yamane[4], Kazunori Okada[1] ([1]the Univ. of Tokyo, [2]Kyoto Univ., [3]NIAS, [4]Teikyo Univ.)

ジャスモン酸（JA）は、植物の形態形成や老化などの生理現象に関わると共に、病虫害抵抗性の発現などのストレス応答において中心的な役割を担う植物ホルモンである。イネのJA応答性遺伝子として単離された*RERJ1* (*Rice Early Responsive to Jasmonate 1*)はbHLH型転写因子をコードしており、その発現はJA処理のほか傷害や乾燥ストレスによっても誘導を受ける。*RERJ1* mRNAの発現はJA処理後 30 分でピークとなる迅速かつ一過的な誘導を示し、また、*RERJ1* プロモーターGUS植物を用いた解析において、RERJ1 の発現は傷害部位のごく近傍で認められる。これらのことから、RERJ1 はJAシグナル伝達経路の早期で機能する転写因子であり、イネのストレス応答において重要な役割を持つと考えているが、RERJ1 の標的遺伝子や生理機能については明らかになっていない。そこで本研究では、特に虫害を含む傷害応答におけるRERJ1 の役割を明らかにする目的で、*RERJ1-Tos17*挿入変異株(*rerj1* 変異株)を用いたアワヨトウ幼虫による摂食実験および傷害処理時のトランスクリプトーム解析を行った。

摂食実験では、野生型株および *rerj1* 変異株の葉をアワヨトウの幼虫に摂食させ、一定期間後に葉の被食面積および幼虫の体重変化を計測した。その結果、*rerj1* 変異株の被食面積は野生型株のそれよりも有意に大きく、また、摂食後の幼虫の体重変化は *rerj1* 変異株を摂食した幼虫の方が顕著な増加を示した。これらのことから、RERJ1 が虫害抵抗性の発現に関与することが強く示唆された。

一方、トランスクリプトーム解析では、野生型株および *rerj1* 変異株の葉身を剣山を用いて傷害処理し、未処理(0 分)、処理後 30 分、120 分の 3 つの経時点で採集した葉から RNA サンプルを調製し、マイクロアレイに供した。両株間において各経時点で発現量に有意な差が認められた 1341 遺伝子を選抜した後、階層的クラスタリング解析によって発現パターンを分類した。その結果、野生型株では傷害応答的に誘導されるが、変異株では誘導が顕著に弱くなる遺伝子が 29 遺伝子同定された。そのうち、野生型株において傷害処理後 30 分で早期に誘導される 13 遺伝子にはタンパク質間相互作用ドメインをコードする遺伝子が、傷害処理後 120 分の後期で誘導される 16 遺伝子には、昆虫の消化を阻害するプロテイナーゼインヒビターや抗菌性タンパク質であるキチナーゼなど、防御応答に関わる遺伝子が多く含まれていた。RERJ1 が傷害応答早期で誘導されることから、これらの中には RERJ1 に直接転写制御を受ける標的遺伝子も存在するが、特に傷害応答後期で発現する防御応答関連遺伝子には RERJ1 の間接的な転写制御により誘導されるものも存在していると考えられる。

jasmonic acid, bHLH transcription factor, herbivore

講演番号：2A44p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ A 校舎 44 会場

イネの病害抵抗性を制御する転写因子 OsWRKY53 の標的遺伝子の同定

Identification of the target genes of OsWRKY53, a transcription factor mediating disease resistance in rice

○小川 哲史[1]、宮本 皓司[1]、清水 崇史[1]、増田 優花[1]、中条 哲也[1]、西澤 洋子[2]、南 栄一[2]、山根 久和[3]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1] ([1]東大生物工学セ、[2]農生資研、[3]帝京大・バイオ)
○Satoshi OGAWA[1], Koji MIYAMOTO[1], Takafumi SHIMIZU[1], Yuka MASUDA[1], Tetsuya CHUJO[1], Yoko NISHIZAWA[2], Eiichi MINAMI[2], Hisakazu YAMANE[3], Hideaki NOJIRI[1], Kazunori OKADA[1] ([1]The University of Tokyo, [2]NIAS, [3]Teikyo University)

【背景と目的】植物が病原菌に感染した際、病原菌細胞表層由来のキチンオリゴマー等がエリシターとなって植物細胞表面の受容体と結合する。それが引き金となってシグナル伝達が起こり、エリシター応答性転写因子の発現が誘導される。発現した転写因子は標的遺伝子の発現を誘導し、最終的に抗菌性タンパク質の生産等様々な病害抵抗性反応が誘導される。OsWRKY53 はイネのキチンエリシター誘導性転写活性化因子であり、イネで過剰発現させるとイネいもち病菌(*Magnaporthe oryzae*)に対する抵抗性が増強される。このことから、OsWRKY53 はイネの病害抵抗性を正に制御する重要な分子スイッチの 1 つと考えている。これまで我々は、OsWRKY53 の N 末端側に存在する予想リン酸化サイトのセリンを全てアスパラギン酸に置換した擬似リン酸化体では、*in vitro* において転写活性化能が増強されることを明らかにした。さらに、この OsWRKY53 擬似リン酸化体(活性型 OsWRKY53)をイネで過剰発現させると、通常の OsWRKY53 過剰発現イネと比較してイネいもち病菌に対する抵抗性が顕著に上昇することを示した。本研究では、昨年度 1 連で行った非形質転換イネ、OsWRKY53 過剰発現体、活性型 OsWRKY53 過剰発現体を用いたトランスクリプトーム比較を本年度は 4 連で行い、活性型 OsWRKY53 過剰発現株がイネいもち病菌に対して強い抵抗性を示す原因の特定を進めた。
【結果】まず、水または親和性イネいもち病菌(Ina86-137 株)接種後 2 日目の葉身から RNA を抽出後、マイクロアレイ解析を行った。その結果、OsWRKY53 過剰発現体と比較して活性型 OsWRKY53 過剰発現体で転写量が上昇する遺伝子が、水接種時において 1291 個、いもち菌接種時において 338 個選抜された。これらの遺伝子は、活性型 OsWRKY53 過剰発現体が OsWRKY53 過剰発現体よりも強い抵抗性を示すことに寄与していると考えられた。次に、その 1291 遺伝子および 338 遺伝子を、過去に行った ChIP-Seq 解析において遺伝子領域近傍に OsWRKY53 の結合が見られた遺伝子群と照合した。その結果、1291 遺伝子中 108 個、および 338 遺伝子中 12 個が、OsWRKY53 が近傍に結合していた。さらに各遺伝子の予測される機能を調べたところ、キチナーゼ等の防御応答関連遺伝子が 108 遺伝子中には 7 個存在したが、12 遺伝子中には存在しなかった。この結果から、活性型 OsWRKY53 過剰発現体では、予め防御応答関連遺伝子を含む標的遺伝子が転写誘導されることでイネいもち病菌感染時に素早く抵抗性反応を誘導できるため、強い病害抵抗性を示すことが考えられた。現在、標的遺伝子候補のプロモーターへの OsWRKY53 の結合能、ならびに OsWRKY53 と活性型 OsWRKY53 における DNA 結合能の差異の有無について、ゲルシフトアッセイにより解析を進めている。

Rice, Disease resistance, Transcriptome analysis

講演番号：2A44p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ A 校舎 44 会場

イネのジテルペン型ファイトアレキシン生産に関与するMEP経路遺伝子 *OsDXS3*の転写制御機構の解析

Analysis of the transcriptional regulatory mechanism of the MEP pathway gene *OsDXS3* that is involved in the diterpenoid phytoalexin production in rice

○宮本 皓司[1]、松本 貴嗣[2]、岡田 敦[1]、中条 哲也[1]、吉川 博文[2,3]、渋谷 直人[4]、野尻 秀昭[1]、山根 久和[5]、岡田 憲典[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]東京農大・ゲノム解析セ、[3]東京農大・応生科・バイオ、[4]明大・農、[5]帝京大・バイオ)
○Koji MIYAMOTO[1], Takashi MATSUMOTO[2], Atsushi OKADA[1], Tetsuya CHUJO[1], Hirofumi YOSHIKAWA[2,3], Naoto SHIBUYA[4], Hideaki NOJIRI[1], Hisakazu YAMANE[5], Kazunori OKADA[1] ([1]The University of Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]Tokyo Univ. of Agric., [4]Meiji Univ., [5]Teikyo Univ.)

植物は病原菌の感染を認識し、ファイトアレキシンの生産を含む様々な抵抗性反応を誘導する。イネにおいては、モミラクトン類およびファイトカサン類が主要なジテルペン型ファイトアレキシンとして知られている。ジテルペン型ファイトアレキシンは、メチルエリスリトールリン酸 (MEP)経路由来のゲラニルゲラニル２リン酸を共通の前駆体として、ジテルペン環化酵素による環化反応およびP450などによる酸化反応を経て生合成される。我々はこれまでにモミラクトン生合成酵素遺伝子およびファイトカサン生合成酵素遺伝子がそれぞれ４番染色体上と２番染色体上で遺伝子クラスターを形成していることを見出した。また、キチンエリシター応答性bZIP型転写因子OsTGAP1が培養細胞において、MEP経路遺伝子・モミラクトン生合成酵素遺伝子・ファイトカサン生合成酵素遺伝子のエリシター応答的な転写誘導に関与することも明らかにした。さらに、ChIP-seq解析により、OsTGAP1の結合位置の網羅的同定を行ったところ、イネゲノム中において約2700箇所の結合位置を見出した。ジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子については、MEP経路の初発段階を触媒するデオキシキシルロースリン酸合成酵素をコードする*OsDXS3*の転写開始点付近に強いOsTGAP1の結合が見出された。そこで、本発表においては、*OsDXS3*に注目し、OsTGAP1による転写制御機構をより詳細に解析することにした。

ChIP-seq により *OsDXS3* の転写開始点付近において見出された OsTGAP1 の結合領域には、OsTGAP1 の予想結合配列である TGACG-motif (TGACGT)が２つ近接して存在していた。ゲルシフトアッセイの結果、両方の TGACG-motif に変異を導入した場合には、OsTGAP1 の結合が見られなくなった。これらのことから、OsTGAP1 はこれら２つの TGACG-motif を認識し、*OsDXS3* 上流域に結合していると考えられる。さらに *OsDXS3* の上流域にホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結したコンストラクトをイネ培養細胞に一過的に導入し、*OsDXS3* のプロモーター活性を検討した。ミューテーション解析の結果、これらの２つの TGACG-motif がエリシター未処理時のプロモーター活性に関与していることが明らかになった。しかしながら、現在までにこれらの TGACG-motif が *OsDXS3* のエリシター応答的な転写誘導および OsTGAP1 依存的な転写誘導に関与する結果は得られていない。現在、よりレポーター活性が高い条件で実験を行うため、*OsDXS3* 転写開始点付近の OsTGAP1 の結合領域を 5 つタンデムにつないだコンストラクトを作製中であり、このコンストラクトを用いたレポータージーンアッセイの結果についても報告する予定である。

rice, phytoalexin, MEP pathway

講演番号：2A44p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ A 校舎 44 会場

トマト成熟制御因子 RIN が標的とする GRAS 型転写因子の機能解析

Functional analyses of a GRAS family transcription factor gene that is a direct target of fruit ripening regulator RIN

○藤澤 雅樹、中野 年継、嶋 羊子、伊藤 康博（農研機構 食総研）
○Masaki FUJISAWA,Toshitsugu NAKANO,Yoko SHIMA,Yasuhiro ITO (Natl. Food Res. Inst., NARO)

【目的】果実の成熟は、その品質を決定する重要なプロセスであるが、成熟を制御する遺伝的メカニズムは非常に複雑であり、その全容は未だ明らかにされていない。トマトの果実成熟期に特異的に発現する MADS-box 型転写因子 RIN は、その変異株の解析等から成熟制御経路の最上位の因子であると考えられている。我々はこれまでに、RIN が直接的に転写を制御している標的遺伝子を多数同定し、RIN がこれらの転写制御を介して広範な成熟現象に関わっていることを明らかにしてきた。今回は、同定した RIN 標的遺伝子のうち、成熟期果実で RIN 依存的に高発現している機能未知の GRAS 型転写因子 Solyc07g052960 について機能解明を目的として研究を行った。
【方法】Solyc07g052960 遺伝子産物配列について、BLAST による既知タンパク質配列との相同性検索、および系統樹解析を行った。また、RIN と複合体を形成する MADS-box 型転写因子 FUL1 および FUL2 についてクロマチン免疫沈降（ChIP）を行い、Solyc07g052960 遺伝子上流 2 kb のプロモーター領域に存在する CArG box 配列への生体内での結合性を調べた。また、GFP と融合させた遺伝子をタマネギ表皮細胞で発現させ、Solyc07g052960 遺伝子産物の細胞内局在性を調べた。さらに、Solyc07g052960 について RNAi による遺伝子発現抑制株を作出し、マイクロアレイ解析等により果実における遺伝子発現への影響を調べた。
【結果】相同性検索の結果、Solyc07g052960 遺伝子産物は植物に特有な GRAS ドメインを有するタンパク質群と高い相同性を示し、系統樹解析の結果、シロイヌナズナ AtSCL32（機能未知）や SHR と近縁であった。ChIP により、RIN 結合部位に FUL1 および FUL2 も結合することが判明し、Solyc07g052960 の発現が MADS box 複合体により制御されていることが示唆された。また、GFP シグナルが核で検出され、遺伝子産物の核局在性を示した。さらに、Solyc07g052960 の果実における発現を 1/10 程度に抑制した組換え株を作出したが、外見上非組換え体の果実との相違は見られなかった。しかし、マイクロアレイ解析等による発現解析の結果、果実の成熟時に高発現することが知られるポリガラクチュロナーゼ（PG2A）やエンド - 1,4 - β - グルカナーゼ（Cel2）をコードする遺伝子の発現レベルが、組換え株果実で低下する傾向が示された。
【考察】Solyc07g052960 は、成熟の際に RIN の下流で *PG2A* や *Cel2* の発現制御に関与していると推測され、発現をより強く抑えることで日持ち性の向上に役立つ可能性がある。なお、本研究は生研センターイノベーション創出事業の助成を受けたものである。

fruit ripening, transcription factor, tomato

講演番号：2A44p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ A 校舎 44 会場

シロイヌナズナ熱ショック転写因子遺伝子 HsfB1 の 5’上流域に存在する保存配列の役割

Role of the sequence-conserved upstream ORF found in 5'-leader region of *HsfB1* encoding heat shock transcription factor B1 in Arabidopsis

Zhu XuJun[1]、○田中 俊[1]、Berberich Thomas[2]、草野 友延[1] ([1]東北大院生命、[2]BiK-F)
XuJun Zhu[1], ○Shun Tanaka[1], Thomas Berberich[2], Tomonobu Kusano[1] ([1]Tohoku Univ., [2]BiK-F)

【背景・目的】
植物に細胞死を引き起こす因子の探索の中で、シロイヌナズナ熱ショック転写因子 HsfB2b をコードする *HsfB2b* 遺伝子を同定した。シロイヌナズナは 21 種の熱ショック転写因子遺伝子をもち、DNA 塩基配列の相同性やドメインの特徴等から A、B、C、3 つのクラスに分けられている。熱ショック反応はこれら *Hsf* の複雑なネットワークによって制御されていることが既往の研究から示されている。クラス B 遺伝子には他に 4 種(*HsfB1, HsfB2a, HsfB3, HsfB4*)が存在したために、クラス B の 5 種の *HsfB*s の細胞死誘導活性の有無を検討した。その過程で、*HsfB1* の主たる翻訳領域(main open-reading frame)の翻訳は転写後制御を受けていることを認めた。本研究では、*HsfB1* での転写後制御の機構を明らかにすることを目的とした。
【方法】
細胞死誘導活性は、ジャガイモウイルス X を基本骨格として持つベクターにシロイヌナズナ由来の cDNA を組み込んだコンストラクトを、アグロバクテリウムを介してベンサミアナタバコの葉に接種し判定した。転写後制御の解析は、*HsfB1* cDNA の 5’-leader 領域にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を持つコンストラクトを構築しパーティクル・ガン法によってシロイヌナズナのロゼット葉に導入することにより、一過的に発現させて行った。また、*HsfB1* cDNA の 5’-leader 領域にレポーター遺伝子として *GUS* 遺伝子をもつコンストラクトをアグロバクテリウム法により導入した形質転換シロイヌナズナを用いた解析法も併用した。
【結果】
1) 5 種のクラス B 熱ショック転写因子遺伝子のうち *HsfB2b* と *HsfB1* の遺伝子産物は細胞死誘導活性を有していた。
2) *HsfB2b* と *HsfB1* が細胞死を誘導するのは、植物細胞の核に因子が局在することと転写抑制活性を持つことが必要であった。
3) 他の *HsfB2a*、*HsfB3* そして *HsfB4* が細胞死誘導活性を持たないのは、それぞれの因子が転写抑制活性を持たないことによると考察した。
4) *HsfB1* 全長 cDNA をベンサミアナタバコに導入したところ、転写物は検出されるものの翻訳産物が検出されなかった。
5) 4)の現象には、*HsfB1* cDNA の 5’-leader 領域に存在する進化的に保存された短い ORF が関与していた。
6) *HsfB1* cDNA の 5’-leader 領域が有する転写抑制活性は、他の遺伝子に対しても有効であった。

Arabidopsis thaliana, heatshock transcription factor, post-transcriptional regulation

講演番号：2A44p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ A 校舎 44 会場

シロイヌナズナ HsfA4c による HsfA2 発現制御機構の解明
Regulation mechanism of HsfA2 expression via HsfA4c
○野坂 亮太[1]、林 秀樹[1]、小林 宏太[1]、丸田 隆典[2]、高木 優[3,4]、薮田 行哲[5]、田茂井 政宏[1]、重岡 成[1] ([1]近畿大院・農・バイオ、[2]島根大・生資科・生命工、[3]産総研・生物プロセス、[4]埼玉大・環境科学、[5]鳥取大・農・生資環)
○ Ryota NOSAKA[1], Hideki HAYASHI[1], Kota KOBAYASHI[1], Takanori MARUTA[2], Masaru OHME-TAKAGI[3,4], Yukinori YABUTA[5], Masahiro TAMOI[1], Shigeru SHIGEOKA[1] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [3]AIST., [4]IEST, Saitama Univ., [5]Fac. Agr., Tottori Univ.)

【目的】

シロイヌナズナに 21 種類存在する熱ショック転写因子 Hsf は、複雑なネットワークを形成し、種々の環境ストレス応答に機能している。その中でも HsfA2 は、種々の環境ストレス条件下において、分子シャペロンである熱ショックタンパク質、抗酸化酵素であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ 2 や、適合溶質としてだけでなく抗酸化剤としても機能するラフィノース属オリゴ糖合成に機能するガラクチノール合成酵素など多くの細胞防御関連遺伝子群の発現を誘導し、酸化的ストレス耐性能の獲得に寄与する重要な転写因子である（Plant J. 2006）。これまでに当研究室では、HsfA2 が植物体における環境ストレス応答のキーレギュレーターの一つであると考え、その発現制御機構の解明を進めてきた。そして現在までに、HsfA1d および HsfA1e が HsfA2 のプロモーター領域に保存された熱ショックエレメント（HSE）を介して、HsfA2 の発現を制御していることを明らかにしている（Plant Cell Physiol. 2011）。しかしながら、HsfA1d/A1e 二重変異株において、HsfA2 の強光および高温ストレス応答は完全に抑制されず、HsfA1d/A1e 以外にも HsfA2 の発現制御に関与している因子の存在が示唆された。そこで本研究では、HsfA2 のストレス応答に関与する新規の制御因子を同定し、その因子を介した HsfA2 の発現制御機および Hsf シグナルネットワークへの関係について解析を試みた。

【方法および結果】

Hsf ホモログの中で転写活性化能を有するクラス A Hsfs に着目し、HsfA2 の転写開始点から上流-334 bp のプロモーター領域にルシフェラーゼを連結したベクターをレポーター、クラス A Hsfs を過剰発現させるベクターをエフェクターとした一過的レポーターアッセイを行ったところ、HsfA4c の過剰発現において HsfA2 プロモーターの活性化が認められた。また、HsfA4c ドミナントネガティブ型過剰発現株（HsfA4c-SRDX）および HsfA4c 遺伝子破壊株（KO-HsfA4c）では HsfA2 とその標的遺伝子である Hsp18.1-CI の熱ストレス（37℃、30 min）応答の抑制が認められた。一方、HsfA4c 過剰発現株（OX-HsfA4c）ではそれらの発現は増加していた。さらに、OX-HsfA4c はコントロール株と比較して高い熱ストレス耐性を示した。しかしながら、KO-HsfA4c と HsfA4c-SRDX で認められた HsfA2 および Hsp18.1-CI の発現抑制は KO-HsfA1d/A1e で認められたものよりも小さいことから、HsfA4c は HsfA2 の発現制御のファインチューニングに機能していることが示唆された。

heat shock transcription factor, signal transduction, Arabidopsis

講演番号：2A44p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ A 校舎 44 会場

チューリップの花弁特異的 *TgMYB1* プロモーター領域の解析

Analysis of tulip petal-specific *TgMYB1* promoter region

○荘司 和明（富山県農総技セ）
○Kazuaki Shoji (Toyama pref. agric. for. and fish. res. ctr.)

【目的】チューリップ（*Tulipa gesneriana*）の花底部で見られる青色発現には、鉄イオンが必須であり、液胞型鉄イオントランスポーター遺伝子（*TgVit1*）の発現が関与していることを明らかにしている（Shoji et al., 2007, 2010）。

昨年度までの本大会において、*TgVit1* を花弁全体で発現させた「青いチューリップ」を実現するため、花弁特異的に発現している *R2R3-MYB* 遺伝子（*TgMYB1*）をクローン化し、そのプロモーター領域（1.2 kbp）の単離と花弁特異的に遺伝子発現を誘導するシスエレメント配列の解析について報告した。その結果から、TATA box の上流約 200 bp にプロモーター活性が認められる最小の領域が存在し、その内部に 20 bp の部位特異的欠失（Δ1～Δ6）を導入した結果、２つの領域（Δ2 および Δ5）がシスエレメントとして機能している可能性が示された。今回、Δ2 の領域においてより詳細な解析を行ったので報告する。

【方法】GFPマーカー遺伝子を持ち、*TgMYB1*プロモーターと*TgVit1*を繋いだ遺伝子導入用ベクターをパーティクルガン法で‘紫水晶’花弁の紫色細胞に遺伝子導入すると、形質転換細胞は青色に変化する。この性質を利用することによりプロモーター活性の有無を生細胞で評価することが可能である。

今回、Δ2領域内にinverse PCR法で4 bpずつの欠失（Δ7～Δ11）を新たに導入しプロモーター活性を評価した。更に活性が消失した領域について1 bpずつの欠失を導入し最終的なシスエレメント配列の特定を試みた。

【結果】Δ2 領域内に 4 bp ずつの欠失を導入した結果、プロモーター活性が消失したと思われる配列が、2 箇所（Δ7 および Δ9）存在することが確認された。そこで、Δ7 の 4 bp を挟む前後の 1 塩基を加えた 6 bp について更に 1 bp ずつ欠失（Δ12～Δ17）を導入し活性を評価したところ、Δ14～Δ17 の配列（TCAT）がプロモーター活性に重要な配列であることが判明した。この配列はもう一方の 4 bp 欠失である Δ9 にも共通する配列であり、さらに Δ5 領域にも存在する配列であることから、TCAT の３つのタンデム配列が *TgMYB1* プロモーターにおいて花弁特異性を決めるシスエレメントである可能性が示唆された。

tulip, promoter, transporter

講演番号：2A44p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ A 校舎 44 会場

ウメ(*Prunus mume*)のアントシアニン合成酵素遺伝子のクローニングと果皮での発現解析

Cloning and expression analysis of anthocyanin biosynthesis genes in fruit skin of *Prunus mume*

○村瀬 本弥[1]、米光 裕[2] ([1]和歌山高専専攻科エコ、[2]和歌山高専物質工)
○Motoya MURASE[1], Hiroshi YONEMITSU[2] ([1]Wakayama NCT, [2]Wakayama NCT)

【目的】ウメ（*Prunus mume* Sieb. et Zucc.）の果実の紅色はアントシアニンであるが、その合成経路や合成酵素遺伝子、またその発現機構などはわかっていない。一般に、アントシアニンはフェニルアラニンからアントシアニン合成酵素群によって生合成される。我々は、ウメ果実のアントシアニンの生合成に関する分子機構を解明するために、今回、ウメ果実のアントシアニン合成酵素と考えられる chalcone synthase (CHS)、chalcone isomerase (CHI)、flavanone-3-hydroxylase (F3H), flavanone-3'-hydroxylase (F3'H)、dihydroflavanol-4-reductase (DFR)、anthocyanidin synthase (ANS), UDP- glucose:flavonoid-3-*O*-glucosyltransferase (UFGT)の各 cDNA をクローニングした。また、紅色度合の異なるウメ果実での各アントシアニン合成酵素遺伝子及び MYB 転写因子様遺伝子の発現量を RT-PCR 法により調べた。

【方法】ウメ‘南高’の果実は和歌山県農林水産総合技術センター果樹試験場うめ研究所より入手した。まず、紅色果皮より全 RNA を抽出した。次に、CHS、F3H、ANS および UFGT 遺伝子については、SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clonetech 社) を用いて、果皮由来全 RNA を鋳型に、‘南高’のゲノム DNA 由来アントシアニン合成酵素遺伝子断片の塩基配列を基に設計したプライマーを用いて、5'-及び 3'-RACE を行い、クローニングした。また、CHI、F3'H および DFR 遺伝子については、果皮由来全 RNA より逆転写酵素により合成した cDNA を鋳型に、モモ（*Prunus persica*）の各アントシアニン合成酵素遺伝子の 5'UTR および 3'UTR を参考に設計したプライマーを用いて PCR を行い、クローニングした。一方、各アントシアニン合成酵素遺伝子および MYB 転写因子様遺伝子の発現量は、紅色度合の異なる３種の果実由来 cDNA を鋳型に RT-PCR により半定量した。ただし、アクチン遺伝子の mRNA 内部標準とした。

【結果】ウメの紅色果実の果皮由来 cDNA より、７種のアントシアニン合成酵素遺伝子をクローニングした。いずれも、バラ科の各アントシアニン合成酵素遺伝子と 79～99％の高い相同性があった。一方、7 種のアントシアニン合成酵素遺伝子および MYB 転写因子様遺伝子の発現量を紅色度合が異なる果皮で調べた結果、発現量が紅色度合と正の相関関係にある遺伝子は MYB および CHS 遺伝子であった。

Prunus mume, anthocyanin, gene

講演番号：2A44p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ A 校舎 44 会場

黒ゴマ種子の色素合成に関わる遺伝子の単離

Isolation of genes involved in the pigment biosynthesis of black sesame seeds

○大島 佳保里[1]、田代 亨[1]、児玉 浩明[2] ([1]千葉大院園、[2]千葉大院融)
○Kaori OSHIMA[1], Toru TASHIRO[1], Hiroaki KODAMA[2] ([1]Chiba Univ., [2]Chiba Univ.)

白ゴマと黒ゴマ、および中間色の茶ゴマと金ゴマなど、ゴマの種皮の色は、ゴマの用途とも密接に関連している。しかし、これらの色素の形成に関わる知見は非常に限られている。黒ゴマと白ゴマを交配させると黒ゴマになることから、黒ゴマの形質を決めている優性遺伝子が存在することが考えられる。黒ゴマの黒色成分の化学的性質は、当初はアントシアニン系色素であるといわれていたが、その後、カテコール系のタンニン色素であると報告されている。我々のこれまでの研究から、アントシアニンの骨格物質であるフラボノイドの合成経路の鍵酵素であるカルコン合成酵素をコードする遺伝子は、黒ゴマ種子形成過程では発現していないということが明らかになっている。植物のタンニン色素合成経路についてはまだほとんどわかっていない。本研究では、cDNA サブトラクション法を用いて黒ゴマ種子で高発現している遺伝子を単離した。その結果、二次代謝産物の合成に関わるラッカーゼおよびシトクロム P450 と相同性の高い cDNA 断片を得た。ラッカーゼは昆虫クチクラの色素形成に関わることが知られている酵素で、フェノール化合物の酸化を行う。アラビドプシスの TT10 遺伝子座は、ラッカーゼをコードしておりプロアントシアニジンの酸化を行い、種皮の色素形成に関わっていることが知られている。シトクロム P450 はさまざまな化合物の水酸化反応を行う酵素である。とくにテルペノイド系化合物などの合成に関わる CYP71 と呼ばれるグループと相同性が高い。この 2 種類の遺伝子について RACE 法により全長遺伝子の単離を試みるとともに、ゴマ種子形成時期、およびゴマの葉、茎、根の各組織での発現について調べたので報告する。

black sesame, cDNA subtraction, pigment biosynthesis

講演番号：2A44p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ A 校舎 44 会場

シロイヌナズナ VTC2 によるアスコルビン酸生合成の明暗応答制御

Regulation of light-dark response of ascorbate biosynthesis by VTC2 in Arabidopsis

中根 友乃[1]、塩見 祐貴[1]、丸田 隆典[2]、石川 孝博[2]、重岡 成[3]、○吉村 和也[1]([1]中部大応生食栄、[2]島根大生資科生命工、[3]近畿大農バイオ)

Tomono NAKANE[1], YUTAKA SHIOMI[1], Takanori MARUTA[2], Takahiro ISHIKAWA[2], Shigeru SHIGEOKA[3], ○Kazuya YOSHIMURA[1] ([1]Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [2]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [3]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ.)

アスコルビン酸(AsA)は水溶性抗酸化物質として酸化ストレスに対する防御系や補酵素として様々な代謝系に関与している。そのため、その細胞内レベルやレドックスバランスの変化は生物の正常な機能発現に必須である。植物には、光合成由来の糖からAsAを合成する、D-マンノース/L-ガラクトース(D-Man/L-Gal)経路が普遍的に存在している。しかし、その生理機能の理解の進展に反して、明/暗条件などの種々の環境要因に応答した細胞内AsA量の制御に関しては不明な部分が数多く残されている。事実、従来の遺伝子組換えによる生合成関連の遺伝子の恒常的な過剰発現では、ある一定濃度に達したAsAにより生合成関連酵素のフィードバック阻害が起こり、細胞内AsA量の変化がほとんど認められない。このことは、D-Man/L-Gal経路の律速段階が未だ明確ではないことを示唆している。そこで本研究では、これまでに知見からD-Man/L-Gal経路の構成酵素の中で、調節酵素として機能している可能性のあるマンノース-6-リン酸イソメラーゼ(PMI1)、GDP-マンノースピロホスホリラーゼ(VTC1)、GDP-マンノース-3,5-エピメラーゼ(GME)、GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼ(VTC2)、およびL-ガラクトース-1-リン酸ホスファターゼ(VTC4)に焦点を絞り、それらのエストロゲン(ES)誘導系による一過的発現が、明/暗条件下でのシロイヌナズナの細胞内AsA量に及ぼす影響を検討した。

通常条件(明/暗: 16 h / 8 h)で播種後 2 週間栽培した一過的発現系導入植物に 100 μM ES をスプレーにより噴霧した。その結果、PMI1、VTC1、GME、および VTC4 導入植物のいずれにおいても、ES 処理による各導入遺伝子の一過的な発現は確認されたが、3 日目までに AsA 量の有意な変化は認められなかった。一方、VTC2 導入植物では ES 処理後 1 日目の VTC2 mRNA レベルが一過的に発現上昇(10.8 倍)し、7 日目には AsA 量が 2.3 倍に増加していた。また、VTC2 導入植物では、恒明条件下における AsA 量の増加が ES 処理により顕著に促進され(約 1.7 倍/3 日後)、恒暗条件下での減少が抑制(約 0.3 倍)されていた。以上より、VTC2 が D-Man/L-Gal 経路の律速段階であり、AsA 生合成の明/暗応答の制御に重要であることが示された。現在、内因性 VTC2 の影響を避けるため、同遺伝子の破壊株(KO-*vtc2*)における一過的な VTC2 の発現誘導の影響を検討している。

ascrorbate, VTC2, Arabidopsis

講演番号：2A44p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ A 校舎 44 会場

アセロラのアスコルビン酸生合成酵素遺伝子の高発現機構の解明

Mechanism of high gene expression of ascorbic acid-biosynthesizing enzyme in Acerola.

○近藤 隆之[1]、八川 恵梨香[2]、Adebanjo Badejo[1]、藤川 愉吉[1]、江坂 宗春[1] ([1]広島大院生物圏、[2]広島大生物生産)
○Takayuki KONDO[1], Erika YATSUKAWA[2], Badejo Adebanjo[1], Yukichi FUJIKAWA[1], Muneharu ESAKA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Univ.)

【目的】ビタミン C として広く知られているアスコルビン酸(AsA)は、強い還元力を有しており、活性酸素種を除去するなど、植物にとって非常に重要な物質である。熱帯植物であるアセロラは、その果実に AsA を豊富に含んでいることが知られているが、その生合成機構や果実への集積機構については不明な点が多い。本研究室では、アセロラの AsA 生合成に関して、植物では主要な AsA 生合成経路であるマンノース経路に関与する生合成酵素遺伝子のクローニングと発現解析を行っている。これまでに、AsA 生合成酵素遺伝子の発現解析より、アセロラの AsA 生合成酵素の mRNA 発現はシロイヌナズナよりも高いことが確認されている。また、アセロラ果実の成熟過程では AsA 含量と生合成酵素の mRNA 発現量に正の相関があることも確認されている。さらに、マンノース経路において D-mannose-1-P から GDP-D-mannose への反応を触媒する GDP-D-mannose pyrophosphorylase (GMP)のプロモーター解析も行っている。本研究では、アセロラの AsA 生合成酵素遺伝子の高発現機構を転写レベルで明らかにすることを目的として、GMP のプロモーター領域についてより詳細な解析を行う。
【方法・結果】最初に、ルシフェラーゼを用いたプロモーター解析法について検討した。まず、発芽後約 3 週間のシロイヌナズナの葉よりプロトプラストを単離した。次いで 35S プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を結合したベクターを、ポリエチレングリコール・カルシウム法により導入した後、プロトプラスト内のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、ベクターを導入したプロトプラストにおいて、一過的に発現したルシフェラーゼによる非常に強い発光シグナルを検出した。次に、これまでの研究で明らかにされている GMP 遺伝子の上流域 1200bp に着目し、ルシフェラーゼを用いてプロモーター解析を行う。GMP 遺伝子の上流域 1200bp および、上流域の 5'側から段階的に短くした複数の DNA 断片の 3'側にルシフェラーゼ遺伝子を挿入して、プロモーター解析ベクターを作製した。今後、作製したベクターを用いてアセロラの AsA 生合成酵素遺伝子の高発現機構を解析すると共に、環境応答性の解析を行う予定である。

ascorbic acid, Acerola, gene expression

講演番号：2A44p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ A 校舎 44 会場

ユーグレナにおけるアスコルビン酸生合成光調節機構の解明

Elucidation of light-regulation mechanism of ascorbate biosynthesis in *Euglena*

○山口 由貴[1]、西川 仁[1]、丸田 隆典[1,3]、澤 嘉弘[1]、重岡 成[2,3]、石川 孝博[1,3]（[1]島根大・生資科・生命工、[2]近畿大院・農・バイオ、[3]JST・CREST）
○ Yuki YAMAGUCHI[1], Hitoshi Nishikawa[1], Takanori Maruta[1,3], Yoshihiro Sawa[1], Shigeru Shigeoka[2,3], Takahiro Ishikawa[1,3] ([1]Shimane Univ., [2]Kinki Univ., [3]JST・CREST)

【目的】緑藻ユーグレナ（*Euglena gracilis*）は、植物同様 mM オーダーの高濃度でアスコルビン酸を含んでいるが、その生合成経路は植物とは異なり D-ガラクツロン酸を代謝中間体として L-ガラクトノ-1,4-ラクトンを最終前駆体とするガラクツロン酸経路により生合成されている。今回、ユーグレナにおけるアスコルビン酸生合成調節機構を明らかにすることを目的に、光のアスコルビン酸生合成におよぼす影響について検討した。

【結果】従属栄養培地で遮光条件下、定常期まで培養したユーグレナ野生株(WT)および葉緑体欠損変異株(SM-ZK)について、42 μmol/m^2/s の光照射を行った。その結果、WT および SM-ZK いずれの細胞も光照射 6 時間までにアスコルビン酸の有意な増加が観察され、また野生株では光強度に応じてアスコルビン酸レベルが増加することから、アスコルビン酸生合成光調節機構の存在が示唆された。アスコルビン酸生合成に関わる作用スペクトルを調べた結果、WT および SM-ZK ともに 440 nm 付近の青色光に対して特異的に応答することから、青色光受容体の関与が強く示唆された。これまでにユーグレナの青色光受容体として作用が唯一報告されている photoactivated adenylyl cyclase のサイレンシング変異体に対し、75 μmol/m^2/s の青色光を照射しアスコルビン酸レベルにおよぼす影響を検討したが、野生株と比較してアスコルビン酸生合成の青色光応答性に有意な違いは認められなかった。そこでユーグレナ EST データベースより、シロイヌナズナの青色光受容体フォトトロピン(Phot)と類似性を示す 4 つの Phot 様遺伝子（*EgPhot1-4*）を見出し、二本鎖 RNA 導入によるサイレンシングの影響について検討した。その結果、*EgPhot3* および *EgPhot4* 発現抑制細胞において、青色光に対する応答性が顕著に抑制されたことから、これら Phot 様タンパク質のアスコルビン酸生合成光調節機構への関与が強く示唆された。

Euglena, Ascorbic acid, light regulation

講演番号：2A44p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ A 校舎 44 会場

RNA-Seq によるユーグレナ遺伝子の発現解析

Gene expression analysis of *Euglena* by RNA-Seq method

吉田 勇太[1]、丸田 隆典[1,3]、田茂井 政宏[1,3]、重岡 成[2]、○石川 孝博[1,3]([1]島根大・生資科・生命工、[2]近畿大院・農・バイオ、[3]JST・CREST)
Yuta YOSHIDA[1], Takanori MARUTA[1,3], Masahiro TAMOI[1,3], Shigeru SHIGEOKA[2], ○Takahiro ISHIKAWA[1,3] ([1]Shimane Univ., [2]Kinki Univ., [3]JST・CREST)

【目的】微細藻類ユーグレナ（*Euglena gracilis*）は動物と植物両方の特徴を有し、光独立栄養/従属栄養などさまざまな培養条件で生育可能な上、アミノ酸やビタミンなどの各種栄養素を豊富に含み、パラミロンやワックスエステルなど高い有用物質生産能を有していることから、今後バイオリソースとしての利用が大いに期待されている。ユーグレナの有用性を理解するためには遺伝子レベルでの解析が不可欠であるが、核ゲノム配列は未解読であることに加え、既存の EST データは完全長ではなくカバレッジが低く、ユーグレナの遺伝子情報は乏しいのが現状である。そこで本研究では、ユーグレナ遺伝情報の活用を目指して次世代シーケンサーによる RNA-Seq 解析を行った。

【方法と結果】光従属栄養条件下で培養 3 日目と定常期(7 日目)、および光独立条件下で定常期まで培養したユーグレナ野生株から mRNA を抽出･精製し、HiSeq2000 を用いてペアエンド法でシーケンスし、各サンプルから 34M～49M リードを得た。得られた配列データは fastq-mcf および condetri でトリミング後、Trinity および TGICL アセンブラによるアセンブルを行い、最終的に 132,284 個の transcripts を得た。得られた transcripts のうち、24.3%に相当する 32,116 の transcripts にユーグレナ mRNA の 5’末端に特有の Splicing-leader 配列が存在していた。また、アセンブルによって得られたコンティグ配列に、サンプル毎のリード配列をアライメントし、発現量値 FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads)による発現遺伝子比較を行ったので、その結果についても併せて報告する。

Euglena, gene expression, comprehensive analysis

講演番号：2A44p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ A 校舎 44 会場

ユーグレナペルオキシレドキシンの酵素学的性質と生理機能の解明
Enzymological and physiological analysis of peroxiredoxin in *Euglena*
○玉木 峻[1,3]、丸田 隆典[1,3]、澤 嘉弘[1]、重岡 成[2,3]、石川 孝博[1,3]（[1]島根大・生資科・生命工、[2]近畿大院・農・バイオ、[3]JST・CREST）
○Shun TAMAKI[1,3], Takanori MARUTA[1,3], Yoshihiro SAWA[1], Shigeru SHIGEOKA[2,3], Takahiro ISHIKAWA[1,3] ([1]Dept. Appl. Biosci. Biotech., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]JST・CREST)

【目的】これまでに我々は緑藻ユーグレナ(*Euglena gracilis* Z)は、カタラーゼを持たず細胞質にのみ局在するアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)が主要な過酸化水素代謝酵素として機能していることを明らかにしている（Biochem. J., 2010)。さらに最近ではユーグレナの EST および RNA-Seq 解析の結果より、APX 以外にもペルオキシレドキシン（Prx）やグルタチオンペルオキシダーゼといったチオールペルオキシダーゼの存在も示唆されているが、それらの生理機能は未解明である。今回、ユーグレナ活性酸素種（ROS）代謝機構の解明を目的として、ユーグレナ Prx に着目し、組換え体 Prx による酵素学的性質とサイレンシングによる生理機能について検討した。

【結果】ユーグレナ EST 情報および RNA-Seq の結果に基づき、PCR により 4 つの完全長 Prx cDNA (Prx1～4)を単離した。得られた各成熟型タンパク質の推定分子量は約 21 kDa で、Prx1～3 は既知 2-CysPrx と約 60%の同一性を、Prx4 は同 PrxII と約 40～70%の同一性を示した。膜貫通ドメイン予測プログラム（TMHMM）および細胞内局在予測プログラム（TargetP）の結果から、Prx1 および Prx4 は細胞質、Prx2 および Prx3 はそれぞれ葉緑体とミトコンドリアに局在することが推測された。これらの結果から、APX とは異なり、Prx は細胞内コンパートメントにアイソフォームが存在し、ROS 代謝に寄与することが示唆された。ユーグレナ Prx の酵素学的性質を検討するために、pColdII ベクターと大腸菌 BL21star の系により組換え体 Prx を発現後、His タグを利用して精製酵素を調整した。Prx の活性測定には、酵母由来チオレドキシン（Trx）/Trx 還元酵素（NTR）を用いて行った。4 つの組換え体 Prx はいずれも過酸化水素およびアルキルヒドロペルオキシドに対し活性を示し、過酸化水素に対する Km 値と触媒効率はそれぞれ約 40 μM および約 0.03 μM^{-1} s^{-1} であり、ユーグレナ APX の触媒効率（16.5 μM^{-1} s^{-1}）と比較して著しく低いことが示された。Prx アイソザイムの生理機能を明らかにするために、電気穿孔法によりユーグレナ細胞へ二本鎖 RNA を導入することでサイレンシングの影響を検討した。Prx1 および Prx2 サイレンシング細胞では、粗酵素液中における Prx 活性がコントロール細胞と比較してそれぞれ約 70%および 20%低下した。現在これら Prx サイレンシングがユーグレナ細胞に及ぼす影響について検討を進めている。

Euglena gracilis, peroxiredoxin, reactive oxygen species

講演番号：2A44p17
講演日時、会場：3 月 25 日 17:12～ A 校舎 44 会場

円石藻 *Pleurochrysis carterae* における RNAi 法の確立

Establishment of RNAi techniques in the coccolithophorid alga *Pleurochrysis carterae*

○遠藤 博寿[1,2]、長澤 寛道[2] ([1]科学技術振興機構・さきがけ、[2]東大院農・生科・応生化)
○Hirotoshi ENDO[1,2], Hiromichi NAGASAWA[2] ([1]JST. PRESTO, [2]Univ. Tokyo)

【背景と目的】骨や貝殻などの石灰化した硬組織には、無機カルシウム塩の他に、結晶形成を制御する微量の有機物、特にタンパク質が含まれている。海洋性単細胞藻類の円石藻*Pleurochrysis carterae*は、炭酸カルシウムでできたココリス(coccolith)と呼ばれる微細構造物を細胞内で合成し、その細胞の表面を覆っている。円石藻は、このココリス形成と光合成を介して海洋の炭素循環に大きな影響を及ぼすが、ココリスが作られるメカニズムについては不明な点が多い。以前、我々はこのココリスから Coccolith Scale Associated Protein (CSAP)-1および-2と名付けた2種類のタンパク質を同定し、cDNAのクローニングを行い、全長を取得した。これらのタンパク質はN末にシグナルペプチドを有する酸性の分泌タンパク質であり、発現解析の結果、遺伝子*CSAP-2*はココリス形成に同調して発現が上昇することが明らかになった。そこで、本研究では、RNAiを用いたノックダウンの手法の確立と、その手法を用いたCSAP-2のココリス形成に関する機能解析を試みた。
【手法と結果】まず、定常期後期にある細胞をProteinaseKで処理し、低張の緩衝液（100 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 8.0)）に浸透させることにより、短時間で大量のプロトプラストを調製する系を確立した。また、このプロトプラストは再び海水に戻すことにより、24時間以内に再びココリス形成を開始することを確認した。次に、FITCでラベルしたdextranをマーカーとして、エレクトロポレーションおよびpolyethylene glycol (PEG)を用いて、外来物質をプロトプラスト内に取り込ませる方法を検討した。その結果、PEG (MW=6,000)で10-15分間細胞を処理することにより、90%以上の細胞にFITC-dextranを導入することに成功した。さらに、この系を用いて、carbonic anhydrase (CA)およびCSAP-2をコードする遺伝子のdsRNAを導入し、発現の抑制を試みた。その結果、これらの遺伝子の発現は、導入後約40時間後に、最大で約50%程度に減少した。現在は、このノックダウンの効率を上げるための実験系の最適化と、遺伝子の発現抑制がココリス形成に及ぼす影響を調べるため、走査型電子顕微鏡を用いたココリスの形態観察を行っている。

biomineralization, coccolith, *Pleurochrysis*

講演番号：2A44p18
講演日時、会場：3 月 25 日 17:24～ A 校舎 44 会場

植物オーソログ遺伝子配列を有する RNAi コンストラクトによる翻訳抑制の研究
Translational repression induced by RNAi constructs with plant ortholog sequences
○新田 啓亮[1]、樋口 崇巳[1]、西内 巧[2]、児玉 浩明[3]([1]千葉大院園芸、[2]金沢大学学際科学実験センター、[3]千葉大院融合科学)
○ Keisuke Nitta[1], Takami Higuchi[1], Takumi Nishiuchi[2], Hiroaki Kodama[3] ([1]Chiba Univ., [2]Kanazawa Univ., [3]Chiba Univ.)

植物の RNAi 法では標的配列のセンス鎖とアンチセンス鎖をスペーサーを介して接続した、逆位反復配列を転写するコンストラクトを導入する。転写産物はヘアピン構造となり、ステム部分が Dicer-like protein(DCL)によって二本鎖 RNA と認識され、21～25nt の siRNA にプロセシングされる。siRNA は argonaute protein を含む RNA-Induced Silencing Complex (RISC) に取り込まれ、相同な配列を持つ mRNA の分解を仲介する。動物では small RNA による翻訳抑制はよく知られているが、植物においては転写因子である AP2 遺伝子の発現が miRNA により翻訳抑制を受けることなど、翻訳抑制の例は少ない。一方で近年、翻訳抑制に関わるいくつかの遺伝子（SUO、Katanin、vcs）が同定されている。

本研究室では、RNAi 法の特異性を調べる実験をおこなってきた。NtFAD7 遺伝子はタバコ葉緑体局在型トリエン脂肪酸合成酵素をコードする。AtFAD7 遺伝子は、アラビドプシスにおける NtFAD7 遺伝子オーソログ遺伝子であり、NtFAD7 遺伝子との配列相同性はおよそ 70%である。AtFAD7 遺伝子を標的配列とした RNAi コンストラクトをタバコに導入し、トリエン脂肪酸が減少した M47 株を作出した。M47 株では野生型と比較して、NtFAD7 mRNA 量の減少が予想された。しかし実際に調べたところ、予想とは逆に NtFAD7 mRNA の量は増加していた。この結果は、AtFAD7 siRNA が NtFAD7 mRNA の分解ではなく、翻訳抑制を誘導していることを示唆している。

NtFAD7 遺伝子は、本来、翻訳段階で調節を受ける。野生株タバコで翻訳抑制剤であるシクロヘキシミドを処理すると、NtFAD7 mRNA 量が増加する。興味深いことに M47 株においてシクロヘキシミド処理すると NtFAD7 mRNA が蓄積することがわかり、AtFAD7 siRNA が NtFAD7 の mRNA の分解ではなく翻訳抑制を誘導していることを強く示唆している。

本研究では、一般的に、逆位反復遺伝子配列と標的遺伝子間の配列相同性があまり高くない場合で、しかも標的遺伝子が翻訳段階で調節を受ける遺伝子であった場合に、siRNA による翻訳抑制が誘導され、mRNA 量が増加するのではないかと仮定した。そこでシクロヘキシミド処理によって mRNA 蓄積量が増加するタバコ遺伝子（群）を同定し、さらに相同性が 70%程度のアラビドプシスオーソログ遺伝子を選抜した。このアラビドプシス遺伝子配列からなる RNAi コンストラクトがタバコにおいてどのような効果をもたらすか調べたので報告する。

RNA interference, translational repression, Nicotiana tabacum

講演番号：2A46a01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:00～ A 校舎 46 会場

傷害応答時における傷害応答シグナルとしてのジャスモン酸イソロイシン

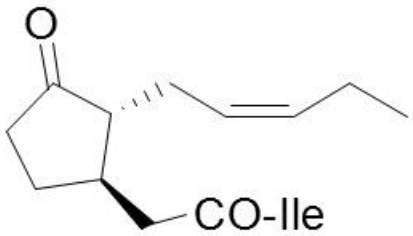
Jasmonoyl isoleucine as a wound-induced mobile signal in response to leaf wounding

○武石 翔平、相川 健亮、鍋田 憲助、松浦 英幸 (北大院農)
○Shohei TAKEISHI,Kensuke AIKAWA,Kensuke NABETA,Hideyuki MATSUURA (Hokkaido Univ.)

研究背景・目的）植物においてジャスモン酸（JA）やその誘導体は、植物の生物的・非生物的ストレスに対する防御応答に密接に関わるシグナル物質である。その中でも JA 類縁体の一つであるジャスモン酸イソロイシン（JA-Ile）は植物ストレス応答機構の活性化因子として広範な研究が行われている。我々は重水素ラベル体を用いた実験から JA-Ile の移動性と非傷害葉での傷害応答遺伝子発現を確認し、また傷害を与えた葉で新たに合成された JA-Ile が傷害応答時に非傷害葉に移動するということ、およびそのシグナル伝達は傷害後 1 時間以内という早期的な応答であることを示した[1][2]。これらを踏まえ、本研究では植物体内で生物学的に許容できる JA-Ile の投与量を決定し、傷害応答時の移動性シグナル分子としての JA-Ile について検証することを目的とした。

方法）ジャスモン酸生合成不全のトマト（*Solanum lycopersicum*, castlemart, *spr2*）を用いて実験を行い、傷害時に生物学的に許容できる投与濃度を検証した。トマト葉をピンセットで挟むことで傷害を与え、同時に外部から様々な濃度の JA-Ile を塗布し傷害後 1 時間以内の茎浸出液中の JA-Ile を分析した。さらに、接ぎ穂を野生株、台木を *spr2* とした接ぎ木トマトを作成してこれを実験に供し、トマト傷害応答遺伝子発現解析を行った。

結果）茎浸出液の定量分析より、生物学的に許容できる外部投与濃度を決定(5 nmol/葉)するとともに、傷害葉に投与した JA-Ile の重水素ラベル体が、一時間以内に健全葉へ輸送されていることを確認した。また、接ぎ木トマトを用いた遺伝子発現解析[*JAZ, PIN2, PIN1, LAP, AOC, AOS*]より、生物学的に許容できる投与濃度(5 nmol/葉)によって十分に JA-Ile による傷害応答遺伝子が誘導されることを確認した。今回の実験より、植物傷害応答時において傷害葉で新たに合成された JA-Ile は健全葉へ輸送され、傷害応答遺伝子の発現を誘導しているということが明らかとなった。現在、接ぎ木トマトを用いて非傷害葉での JA 類の生合成活性化について検討中である。



Jasmonoyl isoleucine
(JA-Ile)

Fig. JA-Ileの化学構造

[1] Chizuru S *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, **52**, 509-517 (2011)
[2] Matsuura H *et al.*, *Phytochemistry*, **83**, 25-33 (2012)

Jasmonoyl isoleucine, mobile signal, wound-induced systemic acquired resistance

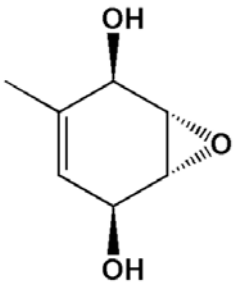
講演番号：2A46a02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:12～ A 校舎 46 会場

Theobroxide 処理に対する植物応答機構の解明
Biological response of the plant toward theobroxide treatment
○山下 雄大、吉原 照彦、鍋田 憲助、松浦 英幸（北大院農）
○ Yudai YAMASHITA,Teruhiko YOSHIHARA,Kensuke NABETA,Hideyuki MATSUURA (Hokkaido Univ.)

【背景・目的】 糸状菌、*Lasiodiplodia theobromae* は様々な興味ある生理活性物質を生合成し、特に植物ホルモンであるジャスモン酸を生合成することが知られている。また、当研究室において本菌培養ろ液中より、バレイショ塊茎形成誘導活性、アサガオ花芽誘導促進活性など様々な興味深い生物活性を示す化合物、theobroxide が単離された。この theobroxide を植物に処理すると、あらゆる植物において矮化する傾向を示した。これは、theobroxide が植物ホルモンの一種であるジベレリン（GA）に対し、何らかの影響を与えていることを示唆するものである。この仮説を裏付けるものとして、theobroxide をホウレンソウに処理することで GA の内生量が減少するという報告も過去になされている。しかし植物ホルモンは、他の植物ホルモンとのクロストークによって複雑なシグナル伝達機構を形成していることが知られている。その一例として GA はアブシシン酸（ABA）と互いに拮抗する植物ホルモンであることが挙げられる。これに関連し、theobroxide 処理を施した植物において根からの吸水が抑制される現象も観察されており、これは theobroxide が ABA に対し影響することを示唆するものである。そこで本研究では特に、theobroxide 処理による植物体内での ABA の動態に着目し、theobroxide の作用機序の解明を目的に研究を進めた。さらに、theobroxide が農業利用価値のある薬剤となりうるかどうかについても検討を行った。

【方法】 短日条件に設定した人工気象器内で 5 週間育成したシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）を用いて実験を行った。育成したシロイヌナズナに対し theobroxide 水溶液による灌水処理を施し、地上部を採取後、UPLC MS/MS に供して解析を行った。また、theobroxide 処理を施したシロイヌナズナの RNA を抽出し、定量リアルタイム PCR により関連遺伝子について遺伝子発現量解析を行った。さらに、theobroxide 処理を施したシロイヌナズナに対し断水処理を行うことで乾燥ストレスを、塩水による灌水処理を行うことで塩ストレスをそれぞれ与え、環境ストレスへの影響を評価した。

【結果】Theobroxide 処理により、シロイヌナズナにおいて ABA の内生量が有意に増加することが、UPLC MS/MS 解析により明らかとなった。遺伝子発現量解析によっても、ABA 増加にともなう ABA と他の植物ホルモンとのクロストークに矛盾しない結果が得られ、その一例として、活性型 GA 生合成遺伝子の一つである *GA3ox1* の発現量減少が観察された。また、theobroxide 処理したシロイヌナズナは乾燥ストレス、および塩ストレスに対する耐性を示し、これは theobroxide の農業利用の可能性を示すものである。この効果は ABA の蓄積がもたらしたものであることが予想される。



Theobroxide

theobroxide, abscisic acid, gibberelline

講演番号：2A46a03
講演日時、会場：3 月 25 日 09:24～ A 校舎 46 会場

イネの根の病害抵抗性発現におけるジャスモン酸類の役割

Roles of jasmonate in disease resistance in rice root

○清水 崇史[1]、西野 沙希[1]、藤川 奈那央[2]、東條 元昭[2]、岡田 憲典[3]、山根 久和[4]、飯野 盛利[1]（[1]大阪市大院理、[2]大阪府大生環、[3]東大生物工学セ、[4]帝京大理工）
○ Takafumi Shimizu[1], Saki Nishino[1], Nanao Fujikawa[2], Motoaki Tojo[2], Kazunori Okada[3], Hisakazu Yamane[4], Moritoshi Iino[1] ([1]Osaka City Univ., [2]Osaka Prefecture Univ., [3]Biotechnology Research Center, The Univ. of Tokyo, [4]Teikyo Univ.)

我々はこれまでに、イネのジャスモン酸（JA）生合成変異株 *cpm2*（*coleoptile photomorphogenesis*）を単離し、それを用いることで、主にイネのいもち病菌に対する病害抵抗性発現における JA の役割について解析を進めてきた。その過程で、*cpm2* を畑地で採取した土壌に移植することで、移植後 20 日以内に顕著な根腐れをおこし、枯死してしまうことを見出した。これは、イネが自然界で生存する上で、JA は根の病害抵抗性発現に必須であることを示唆している。そこで、本研究ではこの *cpm2* の根腐れについて、その原因を追究することとした。

まず、この現象が畑地土壌中の微生物から受ける病害によるものかの検討を行った。実験には大阪市立大学理学部附属植物園内の畑地より採取し、粒径 2.8 mm のふるいにかけた土壌を用いた。滅菌寒天上で育てた発芽後 3 日の野生型イネ及び *cpm2* を採取した土壌に移植し、その生育を観察した。対照区には同じく採取しオートクレーブ滅菌を行った土壌を用いた。その結果移植後 10 日前後で、滅菌土壌ではいずれの植物体も生育していたが、非滅菌土壌では *cpm2* だけが枯死した。また、同様の実験を水田由来の土壌を用いて行ったところ、畑地土壌と同様に *cpm2* だけが枯死した。以上の結果から、*cpm2* の枯死はこれら畑地や水田の土壌に由来する微生物によるものであることが示された。

枯死した *cpm2* の顕微鏡観察を行ったところ、根や葉鞘に *Pythium* 属菌のものと思われる多数の卵胞子が観察された。そこで枯死した *cpm2* と対照区として用いた野生型イネから、NARM 培地（Morita and Tojo, 2007）を用い *Pythium* 属菌の単離を試みた。その結果、*cpm2* からは複数のサンプルから単一種と思われる形態の *Pythium* 属菌が得られたのに対し、野生型イネからは *Pythium* 属菌を含む互いに形態を異にする様々な菌が得られた。このことは *cpm2* が、自然環境中に複数種存在する菌の内、ある特定の *Pythium* 属菌の種に対して特に抵抗性が低下していることを示唆している。

cpm2 から単離された *Pythium* 属菌を、滅菌寒天上で発芽させた *cpm2* 及び野生型イネに接種したところ、*cpm2* だけが接種後 3～4 日で完全に枯死した。また、この *cpm2* の枯死は、外部からの JA の添加により回復した。以上の結果から、今回単離された *Pythium* 属菌が、供試した畑地や水田で *cpm2* が特異的に枯死する主要な原因の一つであり、JA がイネの *Pythium* 属菌抵抗性において重要な機能を有することが考えられた。現在は、今回単離した *Pythium* 属菌の同定を進めるとともに、*Pythium* 属菌感染によってイネで誘導される本菌への抵抗性反応について解析を進めている。

rice, jasmonate, disease resistanse

講演番号：2A46a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ A 校舎 46 会場

シバヤナギにゴールを形成するハバチのサイトカイニン合成能の検討

Study on cytokinin biosynthesis in sawfly inducing insect galls on a willow tree.

○山口 大貴、貫井 光太、鈴木 義人（茨城大・農）
○Hiroki YAMAGUCHI,KOUTA NUKUI,YOSHIHITO SUZUKI (Ibaraki Univ.)

【目的】演者らは従来より，昆虫が形成するゴール（虫えい）の形成における植物ホルモン類の関与について研究を行っている。シバヤナギにゴールを形成するハバチは，体内に高濃度のオーキシン（IAA）およびサイトカイニンを含んでおり，さらにゴール組織ではこれらの植物ホルモンの情報伝達が活性化されているとの結果が得られたことから，それら植物ホルモン類がゴール形成に関与する可能性が高いことを示してきた。また，IAA に関しては，ハバチが Trp からの生合成活性を有することも確認したが，サイトカイニンについては，ハバチ体内で生合成される可能性が高いとの状況証拠があるものの，直接的な証拠を得るには至っていなかった。本研究では，この点を明らかにするために，サイトカイニン類の前駆体と考えられる AMP や ATP の標識体をハバチ幼虫に投与する変換実験を行った。

【方法・結果】IPT 酵素のポジティブコントロールとして，AMP を基質とするアグロバクテリウムの *TZS* 遺伝子，および ATP を基質とするシロイヌナズナの *IPT4* 遺伝子（阪大，柿本しより供与）の各産物を大腸菌で生産させた。一方，ハバチ幼虫の個体を基質水溶液に浸漬，あるいは体内へのインジェクションなどの方法を各種検討し，代謝産物について LC/MS/MS による解析を行った。その結果，ポジティブコントロールに関しては，脱リン酸化をへて，イソペンテニルアデニンおよびイソペンテニルアデノシンが明瞭に検出された。一方，ハバチに関しては，弱いながらも *trans* リボシルゼアチンのピークが認められた。現在，再現性をとるとともに，セルフリー系などを用いたより効率的な変換活性を得るための条件検討を行っている。

gall, cytokinin, sawfly

講演番号：2A46a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ A 校舎 46 会場

オカボノクロアブラムシがハルニレに形成する虫えい(ハルニレハフクロフシ)組織の性状解析

Characterization of *Ulmus* gall tissue induced by an aphid *Tetraneura nigriabdominalis*

○吉田 彩夏[1]、川合 隆史[2]、鈴木 義人[2] ([1]茨城大学院農、[2]茨城大学農)
○Sayaka YOSHIDA[1], Takashi KAWAI[2], Yoshihito SUZUKI[2] ([1]Ibaraki Univ., [2]Ibaraki Univ.)

【目的】ゴールとは，昆虫などの刺激に対して，植物の一部の細胞が異常に増殖，肥大したり，組織分化の過程が狂ったりすることによって引き起こされる，組織や器官の病理学的に異常な形状のことをいう。我々はオカボノクロアブラムシ（*Tetraneura nigriabdominalis*）がハルニレに形成する袋状のゴール（ハルニレハフクロフシ）を材料にゴール形成機構の解明に向けた研究を行っている。このゴールはオカボノクロアブラムシが葉の師管液を吸汁する際に，唾液として分泌される成分により誘導されると考えられるが，その形成機構の詳細は不明である。ゴール組織の横断面を観察したところ，細胞は伸長しておらず，急速なゴールの発達は通常の植物組織に見られる伸長や伸展とは異なり，細胞分裂による新たな組織の形成によることが判明している。また，アブラムシには植物組織に比べて高濃度の IAA やサイトカイニンが含まれ，これら植物ホルモン類のゴール形成への関与が示唆されたが，これらによって発現が誘導される負の制御因子（AUX/IAA，typeA-RR）の発現量は逆に低下しているとの予備的結果が得られていた。本研究では，ゴール組織がアブラムシにとって都合の良い組織に改変されているという観点から，ゴール組織の性状解析を行った。

【方法・結果】まず，ハルニレにおける遺伝子発現解析に先立って，RNA の調製法の検討を行った。その結果，純度の高い RNA が収率良く得られる調整法を確立した。細胞分裂のマーカー遺伝子として CYCD の発現量を測定した結果，発達中のゴール組織では葉に比べて明瞭に細胞分裂が盛んであるという結果が得られると共に，AUX/IAA 類および type A-RR の発現が何れもゴール組織で抑えられるという結果が得られた。また，害虫の食害に対する反応として，揮発性物質の生成を GC/MS を用いて測定した結果，正常葉においてはジャスモン酸やサリチル酸によって perillene および (*Z*)-3-hexenyl butyrate を始めとする数種のエステル化合物が誘導されたのに対して，ゴールではこれらの発生が抑えられていた。これらの結果から，ゴール組織は IAA やサイトカイニンのホルモンシグナルが伝達されやすい状態になっていると共に，植物の抵抗性発現も抑制されている可能性が示唆された。

gall, *Ulmus davidiana*, *Tetraneura nigriabdominalis*

講演番号：2A46a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ A 校舎 46 会場

ハダニ抵抗性誘導物質の探索
Exploration of natural defense substances against *Tetranychus urticae*
○田島 直人[1]、洪 シウォン[1]、村田 未果[2]、河津 圭[2]、石坂 眞澄[3]、望月 淳[2]、光原 一朗[1]、瀬尾 茂美[1]([1]生物研・植物科学研究領域、[2]農環研・生物多様性研究領域、[3]農環研・有機化学物質研究領域)
○Naoto Tajima[1], Si Won Hong[1], Mika Murata[2], Kei Kawadu[2], Masumi Ishizaka[3], Atsushi Mochizuki[2], ichiro Mitsuhara[1], Shigemi Seo[1] ([1]Div. Plant Sci., Natl. Inst. Agrobiol. Sci., [2]Biodiversity Div., Natl. Inst. Agro-Environment. Sci., [3]Organochemicals Div., Natl. Inst. Agro-Environment. Sci.)

近年、環境低負荷型の病害防除を目的として、植物の病害抵抗性を高めるプラントアクティベーターの探索が行われている。植物に感染する病原体はその生存様式により、生きた植物細胞内で栄養を得る biotroph 病原体と宿主細胞を殺して栄養にする necrotroph 病原体の２つに大別できる。これまで見つかったプラントアクティベーターの多くはサリチル酸系を制御することで biotroph 病原体に効果を示すタイプであり、necrotroph 病原体や害虫に効くタイプは少ない。
演者らは、害虫に効くプラントアクティベーターを見つけるべく、その探索源として過敏感反応（HR）に着目した。HR は非親和性の病原体の感染に伴って植物細胞で誘導される形態的・生理的反応の総称であり、その過程では抗菌性物質などが生産される。HR では害虫防御に関わる遺伝子群の発現も誘導されることから、「HR が誘起された植物では害虫抵抗性誘導物質が生産されている」と予想して、タバコモザイクウイルス感染により HR が誘起されたタバコ葉から害虫に対する抵抗性誘導物質の探索を試みた。メタノール抽出画分をトマトに塗布するとハダニ雌成虫の生存率と産卵数を低下させる活性が検出できたことから、種々のクロマトにより精製して、最終的に活性を示す物質（TRI1）を単離した。TRI1 自身には殺ハダニ活性はないことから、得られた耐虫性効果はトマトで誘導された抵抗性反応に因るものであると推察された。

induced resistance, plant activator, *Tetranychus urticae*

講演番号：2A46a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ A 校舎 46 会場

サツマイモネコブセンチュウの感染過程におけるエフェクターたんぱく質 MSP7 の機能解析

Functional analysis of MSP7 during root-knot nematode infection in *Arabidopsis thaliana*

○光増 可奈子[1]、相良 知実[1]、Bui Thi Ngan[1]、渡邊 真紀[1]、土屋 晴日[1]、江島 千佳[1]、深尾 陽一朗[2]、Derek Goto[3]、澤 進一郎[1] ([1]熊大・院・自然科学、[2]奈良先端大・バイオ、[3]北大・院・農)
○Kanako MITSUMASU[1], Tomomi SAGARA[1], Bui Thi Ngan[1], Maki WATANABE[1], Haruhi TSUCHIYA[1], Chika EJIMA[1], Yoichiro FUKAO[2], Derek GOTO[3], Shinichiro SAWA[1] ([1]Grad. Sci. Tech., Kumamoto Univ., [2]NAIST, [3]Hokkaido Univ.)

【目的】　植物寄生性線虫の植物への感染に関する分子機構の解明を行う為に、当研究室では、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）を宿主としたサツマイモネコブセンチュウ（*Meloidogyne incognita*）のモデル感染系を構築している。植物寄生性線虫の宿主細胞への感染過程に関与する因子やシグナル伝達経路を明らかにし、それらを制御することができれば、より特異性の高い線虫防除法の開発が期待できる。本研究では、*M. incognita* が感染する際に宿主細胞に注入するエフェクターたんぱく質の一種である MSP7 に注目し、線虫感染過程における MSP7 の宿主細胞への作用機構を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】　MSP7 のアミノ酸配列には既知の機能ドメイン等は存在せず、宿主細胞に対する活性や相互作用する因子等は直接予測できなかった。しかし、MSP7 のアミノ酸配列の一部は *A. thaliana* の病害抵抗性に関わるキナーゼ型受容体の細胞質内領域の一部のアミノ酸配列と相同性を示した。そこで、このキナーゼ型受容体の機能喪失型変異体について線虫感染性を調査したところ、感染性は有意に増加した。このことから、MSP7 がキナーゼ型受容体との相同領域を介して宿主細胞の感染防御機構を抑制する可能性が考えられた。次に、MSP7 と相互作用する宿主因子を探索する為に、*MSP7* 遺伝子を bait とし、*A. thaliana* の実生の cDNA library を prey として Yeast Two Hybrid スクリーニングを行った。その結果、現在までに候補遺伝子として B3 ドメインを含む転写因子をコードする遺伝子を得ている。この B3 転写因子の機能を喪失させた変異体を用いて線虫感染実験を行ったところ、感染効率が低下する傾向が見られた。現在、MSP7 と相互作用する宿主因子の探索を継続するとともに、線虫感染時における B3 転写因子の発現局在の解析や MSP7 過剰発現による線虫感染性への影響を調査する為の *A. thaliana* 変異体を作製中である。

root-knot nematode, *Arabidopsis thaliana*, effector protein

講演番号：2A46a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ A 校舎 46 会場

好熱菌発酵産物が植物の生長促進と生体防御の遺伝子発現に与える影響
Effects of thermophile-fermented compost on the growth and biological defense in the plant
○宮本 浩邦[1,2,3]、西内 巧[4]、井藤 俊行[5]、宮本 久[6]、児玉 浩明[2] ([1]日環科学、[2]千葉大院・融合科学、[3]千葉大院・園芸、[4]金沢大、[5]京葉プラント、[6]三六九)
○ Hirokuni MIYAMOTO[1,2,3], Takumi NISHIUCHI[4], Toshiyuki ITO[5], Hisashi MIYAMOTO[6], Hiroaki KODAMA[2] ([1]Japan Eco-science, [2]Grad.Adv.Integr. Chiba Univ., [3]Fac.Hort. Chiba Univ., [4]Kanazawa Univ., [5]Keiyo plant eng., [6]MIROKU)

【背景と目的】我々は、*Bacillaceae*を主体とした好熱菌群によって海産資源を75℃前後で発酵した産物を土壌に施用すると植物の生長に影響を与えることを明らかにしている。本研究では、当該発酵産物が植物の遺伝子発現に与える影響を網羅的に解析し、作用機序の一端を明らかにすることができたので報告する。【方法と結果】モデル植物としてアラビドプシスを対象として、発酵産物を土壌に施用、あるいは非施用して一定期間栽培し、植物体の地上部のRNAを抽出した上でDNAマイクロアレイによる解析を実施した。発酵産物施用区では、Auxin Efflux carrier family proteinの発現が増強する傾向が確認された。この結果は、発酵産物の土壌への添加によって、作物の根の伸長や生体重量の増加をもたらすこれまでの知見と矛盾しなかった。次に、害虫に対する忌避物質を生産する酵素群であるhydroperoxyde lyase 1 (HPL1)の発現が高くなることが明らかになった。当該酵素は、土壌中の含水率が減少するとその発現量が減少する傾向が確認されたが、逆に、同じく忌避物質を生産するCYP71B15の発現は増加する傾向が認められた。これらの遺伝子群の発現は、発酵産物を施用した農地において病害虫被害が減少する傾向と関与する可能性が示唆された。さらに興味深いことに、Heat shock protein関連遺伝子群は、総体的に発現量が高い傾向があった。これらの傾向から、発酵産物を土壌に施用することによって、植物体としてはストレス耐性を増強させていることが期待された。以上の結果から、発酵産物の土壌への施用は、生長促進と生体防御に関連する遺伝子群の発現レベルの増強に寄与する可能性が示唆された。

Thermophile, plant growth, biological defense

講演番号：2A46a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ A 校舎 46 会場

タバコの過敏感細胞死を誘導する植物病原細菌 *Acidovorax avenae* 由来のエフェクタータンパク質の同定と機能解析

Identification of effector protein from pathogenic bacteria which induced hypersensitive cell death in *Nicotiana benthamiana*.

○宮田 千加[1]、宇野 雄太[1]、近藤 真千子[2]、青井 良介[1]、蔡 晃植[1,2] ([1]長浜バイオ大院、[2]長浜バイオ大)

○Chika Miyata[1], Yuta Uno[1], Machiko Kondo[2], Ryousuke Aoi[1], Fang-Sik Che[1,2] ([1]Nagahama inst. of Bio-Sci. and Tech, [2]Grad. Sch. of Biosci.)

植物病原細菌 *Acidovorax avenae* N1141 菌株を非宿主であるタバコ（*Nicotiana benthamiana*）に接種すると過敏感細胞死を含む植物免疫反応が誘導される。この様な過敏感細胞死誘導には、植物病原細菌に存在する TypeIII 分泌装置とそれを介して植物細胞内に分泌されるエフェクターと呼ばれるタンパク質が関与することが明らかとなっている。そこで、*A. avenae* N1141 菌株の TypeIII 分泌装置欠損株（*NΔT3SS*）を作製し、*N. benthamiana* の葉に接種したところ、過敏感細胞死は誘導されなかった。このことから、*A. avenae* N1141 菌株によって誘導される *N. benthamiana* の過敏感細胞死にも TypeIII 分泌装置から植物細胞内に分泌されるエフェクターが関与する可能性が示唆された。*N. benthamiana* の過敏感細胞死誘導に関与する *A. avenae* N1141 菌株由来のエフェクタータンパク質を同定するため、*A. avenae* N1141 トランスポゾン挿入変異株を作製し、過敏感細胞死誘導能を失った変異株を選抜した。約 4200 株の変異株をスクリーニングしたところ、過敏感細胞死誘導能を欠失した 28 株のトランスポゾン挿入変異株を得た。選抜された変異株のトランスポゾン挿入遺伝子を解析したところ、そのほとんどが Type III 分泌装置を構成するタンパク質をコードする遺伝子であった。しかし、この Type III 分泌装置に関与する遺伝子の他に、UGE と名付けたタンパク質をコードする遺伝子が含まれていた。このタンパク質はグルコース代謝に関わっていることが知られており、近年他の病原細菌で病徴因子として機能することが報告されている。そこで、この遺伝子の欠損変異株を相同組み換え法で作製し、*N. benthamiana* に接種したところ、過敏感細胞死の誘導が認められなかった。現在、*N. benthamiana* に *UGE* 遺伝子を導入することで、過敏感細胞死が誘導されるかどうかを確認している。

plant, effector, Type III

講演番号：2A46a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ A 校舎 46 会場

植物の過敏感細胞死に伴う核 DNA 断片化における新規エンドヌクレアーゼである IREN の役割
IREN is a key enzyme in nuclear DNA degradation during HR cell death in rice
○大坪 由佳、四井 翔太、日比野 孝紀、青木 友里（長浜バイオ大院）
○Yuka OTSUBO,Syota SHII,Takanori HIBINO,Yuri AOKI（Nagahama Inst. of Bio-Sci. and Tech.）

これまでの研究で、我々は、イネが植物病原細菌 *Acidovorax avenae* を認識すると植物特有の転写因子である OsNAC4 を介して過敏感細胞死を誘導することを報告した。さらに、*OsNAC4* の RNAi 抑制形質転換体を用いたマイクロアレイ解析によって、分子内に EF-hand モチーフを有するエンドヌクレアーゼ様分子をコードする *IREN* が OsNAC4 によって転写制御されていることを明らかにした。そこで、過敏感細胞死における IREN の役割を明らかにすることを目的として研究を行った。まず、IREN をイネ細胞内で過剰発現させたところ、過敏感細胞死誘導時に認められる核 DNA の断片化が認められた。そこで、過敏感細胞死を誘導したイネ培養細胞の細胞質と核抽出物におけるヌクレアーゼ活性を In-gel アッセイによって調べたところ、核抽出物においてヌクレアーゼ活性の上昇が認められた。また、IREN の過敏感細胞死誘導時における細胞内局在について抗 IREN 抗体を用いたウエスタンブロットで解析したところ、IREN は核に蓄積することが明らかになった。そこで、IREN がヌクレアーゼ活性を有するのかを調べるため、リコンビナント IREN タンパク質を作製し、in vitro でのヌクレアーゼ活性を調べた。まず、リコンビナント IREN に基質として環状と直鎖状の pBluescript を加えたところ、IREN はエンドヌクレアーゼ活性を有することが示された。次に、この様な IREN のエンドヌクレアーゼ活性に必要な補因子を調べたところ、Mg^{2+}と Mn^{2+}がエンドヌクレアーゼ活性に必要であり、Zn^{2+}や EDTA によって活性阻害が生じることが示された。一方、Ca^{2+}の添加では、エンドヌクレアーゼ活性は若干上昇するものの顕著な濃度依存性は認められないことも明らかになった。次に、エンドヌクレアーゼ活性の至適 pH について調べたところ、IREN は pH8.0 付近に指摘 pH を有することが示された。以上の結果から、IREN は、エンドヌクレアーゼ様活性を有しており、過敏感細胞死誘導時に認められる核 DNA 断片化の主な実行因子であることが示唆された。

IREN, nuclease, DNA laddering

講演番号：2A46a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ A 校舎 46 会場

高等植物・エンドファイト共培養液中の生理活性因子に関する研究

Studies on plant growth promoting factors produced during co-culture of higher plants and endophytic microorganisms

○西垣 舞穂、小川 拓水、岡澤 敦司、太田 大策（阪府大院生命環境）
○Maiho NISHIGAKI,Takumi OGAWA,Atsushi OKAZAWA,Daisaku OHTA (Osaka Pref. Univ)

【目的】自然環境下，植物と根圏微生物叢の間には多様な相互作用が存在する．植物は，病原体の侵入に対して多様な防御応答反応を示す．一方，植物共生微生物であるエンドファイトとの互恵的相互作用の確立初期過程においても防御応答が惹起されると考えられるが，その後に植物側で発動されるはずの抵抗性レベルの制御に関する分子メカニズムに対する明確な説明はない．本研究では，植物の化学防御機構であるファイトアレキシン生合成誘導とその制御に着目し，エンドファイトとの互恵関係成立過程の解明を目的とした．

【背景】シロイヌナズナは主要な抗菌性の生理活性物質ファイトアレキシンとしてカマレキシンを生合成する．我々は，病原微生物感染や活性酸素などの物理的刺激に応答して誘導され，カマレキシン生合成を正に制御する新規転写調節因子 *ANAC042* を同定した．そこで，エンドファイト接種時にカマレキシン生合成がどのように誘導され，制御されるかを明らかにすることで，互恵的共生関係成立過程に関する新たな知見を得ることができると考えた．

【方法】シロイヌナズナにおけるカマレキシン生合成誘導の指標とするため，*ANAC042* プロモーター制御下で *GUS* レポーター遺伝子を発現するシロイヌナズナ系統（*ANAC042pro::GUS*）を樹立する．次に，多様な植物の生育促進や種子生産の増加をもたらすエンドファイトである *Sebacina* 属菌を *ANAC042pro::GUS* 植物に接種し，その際に誘導される *ANAC042* 発現を手掛かりに，カマレキシン生合成制御と防御応答を明らかにするための実験系を確立する．植物根系の観察を容易にするために，菌と植物は液体培地で共培養する．

【結果】*Sebacina* 属菌と *ANAC042pro::GUS* 植物を液体培地で共培養したところ，根端のカマレキシン生合成部位において GUS 発現誘導とともに発根の誘導が認められた．次に，*Sebacina* 属菌との共培養時に観察されるこれらの応答が，植物根組織への菌糸侵入に依存するものなのかを検証するため，共培養後の液体培地をフィルター滅菌処理し *ANAC042pro::GUS* 植物に添加した．その結果，GUS 発現誘導と発根促進が確認され，シロイヌナズナと *Sebacina* 属菌の共培養液中には *ANAC042* 発現誘導，あるいは発根促進に関わる生理活性物質が含まれていることが明らかとなった．

endophyte, phytoalexin, plant microbe interactions

講演番号：2A46a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ A 校舎 46 会場

イネのフィトアレキシン生合成遺伝子ノックダウン変異体の特徴付け
Characterization of a mutant of phytoalexin biosynthetic gene in rice
○豊増 知伸[1]、菅原 千都[1]、臼井 雅美[1]、清水 崇史[2]、岡田 憲典[2]、長谷川 守文[3]、南 栄一[4]、川名 義明[5]、三橋 渉[1]、山根 久和[2] ([1]山形大農、[2]東大生物工学セ、[3]茨城大農、[4]農生資研、[5]農研機構東北農研)
○Tomonobu Toyomasu[1], Chizu Sugawara[1], Masami Usui[1], Takafumi Shimizu[2], Kazunori Okada[2], Morifumi Hasegawa[3], Eiichi Minami[4], Yoshiaki Kawana[5], Wataru Mitsuhashi[1], Hisakazu Yamane[2] ([1]Yamagata Univ., [2]Univ. of Tokyo, [3]Ibaraki Univ., [4]National Institute of Agribiological Sciences, [5]National Agriculture and Food Research Organization)

【背景・目的】
イネ（*Oryza sativa*）ゲノムには多様な labdane 関連ジテルペン環化酵素遺伝子が存在するが、その中の一つ *OsCPS4* は、*syn*-コパリル 2 リン酸合成酵素をコードし、フィトアレキシンのモミラクトン A、B とオリザレキシン S の生合成に関与する。モミラクトン B はイネの根から侵出するアレロパシー物質として再同定された。演者らはモミラクトンの生理的役割を逆遺伝学的に追究することを目的として、*OsCPS4* での *Tos17* 挿入変異体 *cps4-tos* の取得と特徴付けについて 2009、2010 年度の本大会において報告した。この *cps4-tos* 変異体では、レトロトランスポゾン *Tos17* が *OsCPS4* 遺伝子の第３イントロンに挿入されていたことから、野生型よりは少なかったものの、*OsCPS4* 成熟型 mRNA が検出され、ノックダウン体と考えられた。本発表では、この変異体を用いてイモチ病耐性試験と水田雑草に対するアレロパシー試験を行い、*OsCPS4* の病理的・生態学的役割を検討した。
【方法・結果】
生物試験には *cps4-tos* 変異体と対照野生型イネとして日本晴を用いた。イモチ病耐性試験については、イモチ病菌胞子を点滴法、あるいは噴霧法で接種し、病斑を比較した。その結果、野生型よりも *cps4-tos* 変異体での方が病害度は有意に高かった。LC-MS/MS 分析により、変異体の罹病葉身ではモミラクトン A、B、オリザレキシン S の蓄積量が野生型よりも少なく、これにより *cps4-tos* ではイモチ病抵抗性が野生型よりも低くなったと考えられた。アレロパシー試験では、ポットに入れた水田雑草種子を含む水田土壌において湛水状態でイネを育て、約 2 ヶ月後に各種水田雑草の乾燥重量と数を計測した。その結果、野生型よりも *cps4-tos* の周辺の方でイヌホタルイ、コナギ、キクモ、ミゾハコベなどの成長が良い傾向がみられた。このことは、モミラクトンが水田土壌中でも水田雑草に対してアレロパシー物質としてふるまうことを示唆した。

phytoalexin, allelochemical, rice

講演番号：2A46a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ A 校舎 46 会場

FOX ハンティングで単離した広範な病害抵抗性遺伝子 BSR1 の耐病性機構解析と実用化の試み

Analyses of the Mechanism of Broad-Spectrum Disease Resistance by BSR1 Gene and a Practical Application

前田 哲、菅野 正治、後藤 新悟、姜 昌杰、高辻 博志、○森 昌樹（農業生物資源研究所）
Satoru Maeda,Shoji Sugano,Shingo Goto,Chang-Jie Jiang,Hiroshi Takatsuji,○Masaki Mori (NIAS)

【目的】

我々はイネ完全長 cDNA 過剰発現シロイヌナズナ（イネ FOX ナズナ）系統に対し病原細菌 *P.syringae* 及び病原糸状菌 *C. higginsianum* 感染スクリーニングを行い、両菌に抵抗性を付与するイネの受容体様細胞内リン酸化酵素遺伝子 *BROAD-SPECTRUM RESISTANCE1*（*BSR1*)を同定している。また、*BSR1* 過剰発現（*BSR1*-OX）イネが重要病害の白葉枯病及びいもち病に対して高度の抵抗性を示すこと、*BSR1* 過剰発現トマトが斑葉細菌病に抵抗性を示すことを明らかにしている。さらにマイクロアレイ解析の結果、*BSR1*-OX イネで発現増大する遺伝子のうち 2 割弱が、サリチル酸(SA)アナログの BTH に発現応答することを示している。そこで本年度は、BSR1 による広範囲な病原菌に対する抵抗性に SA が関与しているのかどうかを明らかにすると共に、イネで実用化に向けた試みを行うことを目的とした。

【方法・結果】

BSR1-OX イネにおける抵抗性に、内在性 SA が必要かどうか調べるために、*BSR1*-OX と *NahG*（SA 含量が低い）イネを交雑した植物体を作出した。いもち病抵抗性検定を行ったところ、*NahG* イネは WT に比べ抵抗性が弱くなったのに対し、*BSR1*-OX/*NahG* イネでは *BSR1*-OX イネよりやや弱いものの、WT に比べ有意に強い抵抗性を示した。よって、*BSR1*-OX における抵抗性の増大に内在性 SA 経路はほとんど寄与していないことが示唆された。また RNAi 法により作出した *BSR1* ノックダウンイネでは白葉枯病、いもち病の感染に対し共に抵抗性が弱まったので、BSR1 はイネ本来の両病害に対する抵抗性機構に関与していることがさらに支持された。

これまでの研究に用いた *BSR1*-OX イネはトウモロコシのユビキチンプロモーターで構成的に過剰発現したものであるが、実用化を考えた場合、可食部で構成的に発現するプロモーターよりも病原菌感染応答性プロモーターの方がより好ましいと思われる。そこで、いもち病菌、白葉枯病菌それぞれの感染により発現が誘導されるイネの *GST* 遺伝子のプロモーター（P_{GST}）を用いて BSR1 を発現させることにした。P_{GST}:*BSR1* 形質転換イネを作製し、いもち病抵抗性検定、白葉枯病抵抗性検定を行ったところ、両菌に複合抵抗性を示す系統が得られた。

rice, disease resistance, FOX hunting

講演番号：2A46a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ A 校舎 46 会場

Myc-LCO およびキチンオリゴ糖によるミヤコグサ共生遺伝子発現における NFR 依存性の解析
The analysis of NFR dependency of Myc-LCO and chitooligosaccharide-induced symbiotic gene expression in *Lotus japonicus*

○河原 千春[1]、武田 直也[2]、川口 正代司[2]、秋山 康紀[1]、林 英雄[1] ([1]阪府大院・生命環境、[2]基生研・共生システム)
○Chiharu KAWAHARA[1], Naoya TAKEDA[2], Masayoshi KAWAGUCHI[2], Kohki AKIYAMA[1], Hideo HAYASHI[1] ([1]Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]NIBB)

【目的】アーバスキュラー菌根菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AM 菌）と植物との共生は 80%以上もの陸上植物に見られ,「地球上で最も普遍的な共生」と呼ばれる。AM 菌と植物はそれぞれが生産するシグナル物質により互いの存在を認識する。植物の根から分泌されるストリゴラクトンは AM 菌の宿主認識反応である菌糸分岐を誘導する。一方，AM 菌は Myc ファクター (Myc factor, MF）と呼ばれる共生シグナルを生産すると考えられてきたものの，ながらくその活性本体は解明されなかった。最近，フランスのグループが AM 菌から Nod ファクター (Nod factor, NF）に極めて構造の類似したリポキチンオリゴ糖 (mycorrhizal lipochitooligosaccharide, Myc-LCO）を MF として同定した。また，キチンオリゴ糖が common sym pathway 依存的に共生遺伝子発現を誘導することが報告された。本研究では，Myc-LCO が実際に MF として機能しているのか否かを検証するために，NF，Myc-LCO，キチンオリゴ糖によるミヤコグサ共生遺伝子発現誘導活性を調べた。また，重要な共生初期応答であるカルシウムスパイキングの解析を行い，これら共生応答の誘導における NF 受容体 (NFR) 依存性を調べた。今回，長鎖のキチンオリゴ糖が NFR 非依存的に共生応答を誘導することを見出したので報告する。
【方法・結果】NF, Myc-LCO, キチンオリゴ糖 (2-8 糖) で処理したミヤコグサの根における *SbtS, SbtM1*, *NIN, NSP2* などのミヤコグサ共生関連遺伝子の発現誘導活性を qRT-PCR により調べた。その結果，野生型では NF, Myc-LCO 共に強い誘導活性が見られたものの, NF 受容体変異体 (*nfr1*, *nfr5*, *nfr1/nfr5*) ではこれら応答は野生型に比べて大きく低下した。キチンオリゴ糖では重合度が 4 以上の長鎖の糖で *SbtS*, *SbtM1*, *NIN*, *NSP2* の発現応答が見られ，NF 受容体変異体においても野生型と同様の応答が見られた。次に，カルシウムイオン濃度により蛍光強度を変化させる Yellow Cameleon を導入したミヤコグサを用いて，カルシウムスパイキングの解析を行った。その結果，野生型では NF，Myc-LCO，キチンオリゴ糖による応答が観測されたものの，*nfr1* 変異体ではキチンオリゴ糖でしか応答が観測されなかった。続いて，NF, Myc-LCO, キチンオリゴ糖が菌根形成に及ぼす影響について調べるために，野生型ミヤコグサを用いて AM 菌 *Glomus intraradices* の接種実験を行った。播種時とその後 1 週間毎にこれら試料溶液を培土に潅注することにより処理を施した。3 週間後の感染率を計測したところ，NF および Myc-LCO 処理区ではコントロールと比べて菌根形成が有意に抑制されていた。一方，キチンオリゴ糖処理区ではコントロールとの差は見られなかった。以上の結果より，Myc-LCO は NFR 依存的に，長鎖のキチンオリゴ糖は NFR 非依存的に共生応答を誘導することが示唆された。

arbuscular mycorrhizal fungi, Myc-LCO, chitooligosaccharide

講演番号：2A46a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ A 校舎 46 会場

イネのカルシウム依存性プロテインキナーゼ OsCPK8 によって仲介される免疫誘導シグナルの伝達機構解析

Analysis of signal transduction mechanism mediation by calcium-dependent protein kinase8 (CDPK8) of rice during plant immunity

○韓 宇龍、神村 麻友、上坂 有矢（長浜バイオ大院バイオ）
○Yulong HAN,mayu kamimura,yuya kousaka (Grad. Sch. of Biosci)

イネに褐条病細菌 *Acidovorax avenae* の非病原性菌株を接種すると、活性酸素の発生や過敏感細胞死、免疫関連遺伝子の発現などの植物免疫反応が誘導される。これまでの研究で、このような免疫反応はリン酸化阻害剤と Ca^{2+}阻害剤によって抑制されることが明らかになった。さらに、6 種類の Ca^{2+}依存性プロテインキナーゼ（*OsCPK*）が非病原性菌接種によって発現誘導されることも明らかになっている。そこで、非病原性菌株接種後のイネ細胞におけるリン酸化タンパク質を検出したところ、非病原性菌株接種後 15 分以内にリン酸化タンパク質の蓄積が認められた。さらに、このリン酸化タンパク質の蓄積はカルシウム依存的であることも明らかになった。次に、同定した *OsCPK* のどの分子が免疫反応誘導に関与するかを調べるため、免疫反応誘導時に発現誘導される *OsWRKY70* のプロモーター活性を指標として調べた。その結果、*OsCPK8* を過剰発現させたときに、*OsWRKY70* のプロモーター活性が上昇することが示された。そこで、この OsCPK8 が仲介するシグナル伝達機構を明らかにすることを目的として、OsCPK8 と相互作用するタンパク質の探索を行った。OsCPK8 と相互作用するタンパク質を調べるため、BiFC 法による相互作用解析をベースとした大腸菌スクリーニング法の構築を試みた。相互作用が報告されている OsMAP1 と OsMEK1 の他に、相互作用しないことが明らかになっている OsMAP2 と OsMEK1 にそれぞれ Venus の N 末端半分と C 末端半分を融合させたタンパク質を発現するベクターを大腸菌 BL21 (DE3)に形質転換し、BiFC による蛍光を観察したが、どの組み合わせでも BiFC 由来の特異的な蛍光が観察されなかった。そこで、真核生物に近いフォールディングをする大腸菌 Rosetta-gamiB にそれぞれのベクターを導入したところ、OsMAP1 と OsMEK1 を発現させたときのみに BiFC 由来の特異的な蛍光が観察された。そこで、この確立したスクリーニング系を用いて、OsCPK8 と相互作用するタンパク質の探索を行った。その結果、4 種類のタンパク質が OsCPK8 の基質候補として得られた。次に、これら候補体タンパク質が実際にイネ細胞内において OsCPK8 と相互作用するかどうかを BiFC 法により調べたところ、3 種類のタンパク質と相互作用することが明らかになった。現在、OsCPK8 によるこれら候補タンパク質のリン酸化を確認している。

OsCPK, BiFC, plant immunity

講演番号：2A46p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ A 校舎 46 会場

ダイズにおけるフラボノイド分泌機構の生化学的解析
Biochemical analysis of flavonoid secretion in soybean

○山下 和晃、杉山 暁史、高梨 功次郎、矢崎 一史（京都大生存研）
○Kazuaki YAMASHITA,Akifumi SUGIYAMA,Kojiro TAKANASHI,Kazufumi YAZAKI（Kyoto Univ.）

ダイズ、エンドウ、インゲンなどのマメ科植物は穀物として食糧供給に重要であり、現在世界の耕地面積の 12～15 %で栽培されている。マメ科植物の大きな特徴は、土壌微生物の根粒菌と共生して共生窒素固定を行うことであるが、この根粒菌との共生は、主に根に生じる窒素固定器官である「根粒」で行われる。根粒形成のプロセスは、マメ科植物の根からフラボノイド等のシグナル分子が土壌中に分泌されることにより始まり、シグナル分子は根粒菌内の転写因子 NodD タンパク質を活性化して、根粒菌からのシグナルである Nod ファクターの生合成が誘導される。ダイズにおけるシグナル分子として、これまでにゲニステイン、ダイゼイン、クメステロールが同定されており、またダイズの根からのイソフラボノイドの分泌が ATP 依存的であることが生化学的解析から報告された（Sugiyama et al., 2007）。一方、ダイズの根分泌物中にはフラボノイドのアグリコンのみならず、配糖体も多く含まれていることや、アポプラストにフラボノイド配糖体を基質とするβグルコシダーゼが存在することから、ダイズの根にはフラボノイドの配糖体を分泌する機構も存在することが示唆される。しかしながら、アグリコンや配糖体にかかわらずフラボノイド類を根から分泌するトランスポーターはこれまでに 1 つも同定されていない。本研究ではこうした輸送体の実態に迫るため、ダイズのフラボノイド分泌機構を生化学的に解析した。

まず、ダイズの各生育段階での根分泌物の質的・量的な変化を調べるため、水耕栽培したダイズの水耕培地中のフラボノイド含有量を HPLC により測定した。その結果、窒素欠乏条件においてフラボノイドの分泌量が顕著に増加すること、ダイゼインとマロニルダイジンが主な分泌物であり、6 週齢まではダイゼインが、それ以降はマロニルダイジンが多く分泌されることが明らかになった。

窒素欠乏状態のダイズ根からは、顕著なマロニルダイジンの分泌が検出されたことから、ダイズの膜ベシクルを用いたマロニル配糖体の生化学的輸送活性測定や、アポプラストに存在するβグルコシダーゼの発現解析や活性測定を行った。本発表ではこれらの解析結果をもとにダイズのフラボノイド分泌メカニズムについて議論する。

soybean, flavonoid secretion, nitrogen deficiency

講演番号：2A46p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ A 校舎 46 会場

トマト植物体におけるレクチン遺伝子の発現部位と発現応答の解析

Tissue localization and expression of lectin genes in tomato plant

○原 梨紗、坂本 光、小栗 秀（東農大生物産業・生物生産）
○Risa HARA,Hikaru Sakamoto,Suguru Oguri (Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】レクチンは糖と特異的に結合し、赤血球凝集活性を示すタンパク質である。植物では種子・果実・塊茎などからレクチンが発見されている。トマト植物体においてはキチン結合性を示す 2 種のイソレクチン分子が、果実（果実タイプレクチン：TL-F）と葉（葉タイプレクチン：TL-L）に見出されている。これらのレクチンの植物体における役割は不明である。TL-F は、赤熟した果実の可溶性タンパク質含量の４％を占める糖タンパク質であり、果実におけるレクチン活性の 90%は種子周辺の房室組織に局在している。レクチンの活性は受粉後２０日まで上昇し、以後は一定に達する。トマト健常葉においてレクチンは果実の 5 分の１程度の比活性で存在するが、その活性は傷害処理により増加する。　本研究では、トマト植物体におけるレクチンの役割解明を目的に、*TL-F* 遺伝子の組織特異的発現部位を解析し、両イソレクチン遺伝子の発現応答の違いを比較した。

【方法と結果】１．受粉後 5 日の果実に減圧下で植物ホルモン溶液を吸入し、処理後 12 時間後に *TL-F* 遺伝子の発現を RT-PCR で検出した。*TL-F* 遺伝子の発現は、サリチル酸により誘導されたが、メチルジャスモン酸とキトオリゴ糖は *TL-F* 遺伝子の発現を誘導しなかった。また、トマト葉かび病菌（*Passalora fulva*）胞子懸濁液を注入した緑熟期果実において 24 時間後に *TL-F* 遺伝子の発現量の増加が観察された。２．*TL-F* 遺伝子の発現部位を調べるために、*TL-F* 遺伝子の 5'上流側に位置する約 1.7 kbp のトマトゲノム DNA をクローニングし、このプロモーター配列をβ-グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子と融合したレポーター遺伝子発現ベクターを作製した。本ベクターを用いて形質転換されたトマトの緑熟期果実において、GUS 活性染色による発色は、レクチン活性の分布と一致して胎座と房室組織に検出された。サリチル酸を注入した果実では、対照区に比べて濃い色素の沈着が房室組織周辺と維管束に見られた。興味深いことに GUS 活性は形質転換トマトの葯にも検出された。GUS 活性は、本レポーター遺伝子ベクターで形質転換されたシロイヌナズナの葯や、花粉、伸長した花粉管においても観察された。３．トマト小葉におけるイソレクチン遺伝子（*TL-L*）の発現はサリチル酸の葉面散布では活性化されず、メチルジャスモン酸処理と傷害処理により経時的に *TL-L* 転写産物の増加が示された。以上のトマトレクチンの発現様式から、TL-F は主に果実における糸状菌感染に対して、TL-L は葉における食害に対して生体防御に関連する役割を担うことが予想された。

lectin, tomato, salicylic acid

講演番号：2A46p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ A 校舎 46 会場

“米のとぎ汁発酵液”がトマトかいよう病菌の増殖に与える影響

Effect of fermented rice-rinsing solution on *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* proliferation.

○中田 達矢[1]、プリエト ラファエル[2]、高瀬 尚文[2]、川口 章[3]、關谷 次郎[2] ([1]京都学園大院バイオ環境、[2]京都学園大バイオ環境、[3]岡山農林水産総合センター)

○Tatsuya NAKATA[1], Rafael PRIETO[2], Hisabumi TAKASE[2], Akira KAWAGUCHI[3], Jiro SEKIYA[2] ([1]Kyoto Gakuen Univ., [2]Kyoto Gakuen Univ., [3]Okayama Pref. Technol. Center Agric., Forest., Fish.)

【目的】農家の知恵で開発されたさまざまな民間農業資材が植物病害の防除に用いられているが、それらの科学的根拠は必ずしも明らかでない。米のとぎ汁と牛乳から調製した発酵液（とぎ汁発酵液）も民間農業資材の一つであり、ネギ白絹病などの病害防除に効果をあげていると報告されている。とぎ汁発酵液には乳酸菌が関与しているといわれているが、その実態は不明である。今回はこのとぎ汁発酵液の特性とトマトかいよう病菌（*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*）の増殖抑制活性について報告する。

【方法】米のとぎ汁発酵液は、密閉容器にいれた精白米のとぎ汁と牛乳を 4:1 の割合でよく混合し、25℃暗所で 2 週間以上静置培養して調製した。トマトかいよう病菌は岡山県のトマト圃場から分離された 05-M1 株を使用した。トマトかいよう病菌はポテトショ糖培地（PS 培地）で培養した。増殖に与える影響は、PS 液体培地にトマトかいよう病菌を一定量移植し、これに無菌ろ過したとぎ汁発酵液を加えて 30℃で 24 時間振とう培養した後、660 nm の濁度から評価した。乳酸の定量は市販の D/L-乳酸定量キットを用いた。

【結果】① とぎ汁発酵液は、培養開始後可燃性のガスを生成しながら発酵した。とぎ汁発酵液の pH は発酵開始直後は 6.9 であったが、発酵の進行とともに低下し、10 日目には約 3.6 となり、以後この pH であった。そこでとぎ汁発酵液の乳酸の定量を行うと、L-乳酸は 0 日目から少量存在し、14 日目までほぼ同じ量であった。D-乳酸は当初は全く存在していなかったが、発酵の進行とともに生成が認められ、4 日目で最大に達した。一方牛乳を加えずにとぎ汁のみを発酵させた場合は L-乳酸は存在したが、D-乳酸の生成は認められなかった。これらの結果から乳酸菌の関与が示唆された。② とぎ汁発酵液は、トマトかいよう病菌の in vitro 増殖を抑制することを初めて見出した。沸騰水中で 10 分間熱処理したとぎ汁発酵液を使用してもトマトかいよう病菌を抑制したので熱に安定な化合物が増殖抑制に関与していることが推察された。トマトかいよう病菌の増殖抑制活性は、牛乳を加えないとぎ汁のみの発酵液やとぎ汁を加熱殺菌したとぎ汁発酵液には認められなかった。③ これらの結果から、米のとぎ汁由来の乳酸菌などの微生物が本発酵液に関与しており、牛乳中の成分が増殖抑制物質の生成に必要であることが推察された。今後関与する乳酸菌とかいよう病菌の増殖抑制物質の同定について検討を進める予定である。

fermented rice-rinsing solution, *Clavibacter michiganensis*, lactobcillus

講演番号：2A46p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ A 校舎 46 会場

培養細胞系を用いた新規植物免疫活性化剤の探索

Screening of novel plant defense activator

○北畑 信隆[1]、八木 智華子[1]、来須 孝光[2]、浅見 忠男[3]、朽津 和幸[1] ([1]東京理科大理工、[2]東京工科大応用生物、[3]東大院農生科)
○Nobutaka KITAHATA[1], Chikako YAGI[1], Takmitsu KURUSU[2], Tadao ASAMI[3], Kazuyuki KUCHITSU[1] ([1]Tokyo Univ. of Sci., [2]Tokyo Univ. of Tech., [3]Tokyo Univ.)

病原菌や害虫に直接作用し、殺菌・殺虫活性を持つ既存農薬と異なり、病原菌感染時に植物の免疫応答を亢進することで植物に耐病性を付与する植物免疫活性化剤は、耐性菌の出現の回避や圃場の微生物相の保全のために有効と考えられる。しかし、このような活性を持つ化合物は、サリチル酸(SA)経路に作用する数種しか報告されておらず、適用範囲も限定的なのが現状である。

我々は、タバコ培養細胞 BY-2 に、卵菌由来のタンパク質性エリシターcryptogein を処理するモデル実験系を用いて、植物免疫の情報伝達系や過敏感細胞死(PCD)誘導機構の研究を進めて来た。その結果、NADPH oxidase を介した活性酸素種(ROS)の積極的生成のパターンと、遺伝子発現や PCD との間に相関関係が見られることを見出し、それを指標とした簡便な植物免疫活性化剤の選抜法を考案した(PCT 出願済)。本手法を用いて、約 11,000 化合物からなるケミカルライブラリーを対象としてケミカルスクリーニングを行った。その結果、感染防御応答の指標としての ROS 生成を亢進する化合物を約 500 種見出した。さらにこれらの化合物が病害応答シグナル経路の活性化に関与しているのか調べるため、化合物で前処理したタバコ培養細胞を、PCD が誘導されない低濃度の cryptogein で処理し、PCD 誘導能を調べた。その結果、単独処理では細胞死を誘導しないが、BY-2 細胞の cryptogein に対する感受性を高め PCD を誘導する 58 種の化合物を、植物免疫活性化剤の候補化合物として選抜した。

選抜した化合物がどのように免疫応答を亢進しているのか調べるために、化合物で前処理したシロイヌナズナを、代表的な pathogen/microbe-associated molecular pattern であるペプチド flg22 で処理し、病害応答の主要経路である SA シグナル経路及びジャスモン酸(JA)シグナル経路におけるマーカー遺伝子の発現量の変化を調べた。その結果、選抜した化合物には、既知の植物免疫活性化剤と同様に SA 経路を活性化する化合物だけでなく、これまでほとんど報告のない JA 経路を活性化する化合物や、両方の経路を活性する化合物が含まれていた。これらの化合物は、新しい作用機構を持つ植物免疫活性化剤の候補と考えられ、その作用機構について解析を進めている。

plant defense activator, chemical biology, pathogen

講演番号：2A46p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ A 校舎 46 会場

Chlamydomonas reinhardtii 由来カロテノイド酸化開裂酵素の機能解析

Functional analysis of carotenoid cleavage dioxygenase in Chlamydomonas reinhardtii

○松浦 秀幸、尾形 卓哉、松田 悠里、石田 洋基、木田 和輝、原田 和生、平田 收正（大阪大学大学院薬学研究科）
○Hideyuki MATSUURA,Takuya OGATA,Yuri MATSUDA,Hiroki ISHIDA,Kazuki KIDA,Kazuo HARADA,Kazumasa HIRATA (Osaka Univ.)

植物ホルモンであるアブシジン酸は植物の乾燥ストレス応答や休眠、気孔開閉など、また同じく植物ホルモンであるストリゴラクトンは分枝抑制や菌根菌の共生制御など、植物の高次機能発現の極めて重要な部分を担っている。これら植物ホルモンはいずれもカロテノイドを前駆体とし、カロテノイドが酸化開裂酵素によって開裂されることによって産生されるアポカロテノイドの一種である。アポカロテノイドの中には、β-イオノンなどの C13 アポカロテノイド類のように、果実や花の色素や芳香として機能するものも存在する。こうしたアポカロテノイド産生に関与するカロテノイド酸化開裂酵素遺伝子は、モデル植物であるシロイヌナズナの場合、5 種の 9-*cis*-epoxy-carotenoid dioxygenase (*NCED*)及び、4 種の carotenoid cleavage dioxygenase (*CCD*)遺伝子から構成されている。こうしたカロテノイド酸化開裂酵素遺伝子の中には、陸生植物の進化上の起源であるラン藻や緑藻などにおいてもホモログ遺伝子が存在しているものもある。これまで、ラン藻や緑藻においてカロテノイド酸化開裂酵素遺伝子やその産物であるアポカロテノイドの役割や機能については明らかになっていないが、植物における重要性に鑑みるとそれら遺伝子の機能進化プロセスを解明することの意義は大きい。そこで我々は、緑藻のモデル生物である *Chlamydomonas reinhardtii* を材料に、そのカロテノイド酸化開裂酵素遺伝子の機能解析を通じた、当該遺伝子の機能進化プロセスの解明を目指している。

C. reinhardtii のゲノムデータベースからは、*CCD1*、*CCD7*、*CCD8* の 3 種のカロテノイド酸化開裂酵素ホモログ遺伝子の存在が示唆されている。本研究ではまず *CCD1* 遺伝子ホモログ(*CrCCD1*)をクローニングした。続いて、β-carotene、zeaxanthin 蓄積大腸菌に、クローニングした *CrCCD1* 遺伝子を導入し発現させたところ、カロテノイド含量の顕著な減少が認められた。さらに ß-carotene 蓄積大腸菌からはβ-ionone、zeaxanthin 蓄積大腸菌からは 3-hydroxy-β-ionone が検出されたことから、CrCCD1 は当該カロテノイドの 9'-10'位の炭素二重結合を酸化開裂する活性を有していることが示唆された。さらに、*CrCCD1* を過剰発現した *C. reinhardtii* 株を作製し、表現系解析を行った。*CrCCD1* 遺伝子発現用ベクターをガラスビーズ法により *C. reihardtii* に形質転換した後、*CrCCD1* mRNA が高蓄積している形質転換体を選抜した。*CrCCD1* 過剰発現株の通常培養条件における生育は、空ベクター導入株と同様であった。一方、様々なストレス条件下における増殖を比較したところ、*CrCCD1* 過剰発現株が酸化ストレスに対する耐性能を獲得していることが示された。本会では、当該過剰発現株のその他表現系についても報告する。

Carotenoid cleavage dioxygenase, Chlamydomonas reinhardtii, Oxidative stress

講演番号：2A46p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ A 校舎 46 会場

窒素固定能を持つ *Nostoc* sp.を着生させる蘚類（ヒョウタンゴケ）のホルモゴニア分化誘導因子の探索

The search for hormogonium-inducing factor from a moss (*Funaria hygrometrica*) allowing epiphytic attachment of nitrogen-fixing *Nostoc* sp.

○西塚 紘明[1]、村井 勇太[2]、橋本 誠[2]、橋床 泰之[2] ([1]北大農、[2]北大院農)
○ Hiroaki NISHIZUKA[1], Yuta MURAI[2], Makoto HASHIMOTO[2], Yasuyuki HASHIDOKO[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Univ.)

研究背景）シアノバクテリアの一種である *Nostoc* sp. はツノゴケやオニブキ、ソテツなど複数種の光合成植物と相利的な共生関係を構築することが知られている。これらの共生関係が成立および維持されるためには、シアノバクテリアと宿主植物との間に化学物質を介したシグナル応答が機能する必要があると考えられている。*Nostoc* sp. が宿主植物と共生関係を構築するためには、1）宿主を認識し、2）宿主との共生部位に誘引される過程が必要であると考えられている。*Nostoc* sp. は宿主植物との共生部位へ誘引される際に、ホルモゴニア（hormogonia）と呼ばれる運動性を有する形態へと分化する。この分化は、宿主植物から放出されるホルモゴニア分化誘導因子（hormogonia-inducing factor, HIF）によって引き起こされるが、その化合物についての知見はほとんどない。本研究では、マゴケの一種（種は未同定）から HIF の探索を試みた。

方法） バイオアッセイに用いたシアノバクテリアは、コケの葉表面から分離し、modified Winogradsky’s 寒天平板培地で継代培養した *Nostoc* sp. 株を使用した。抽出に用いたコケ（2.7 kg）は 2012 年 5 月下旬に苫小牧の石炭火力発電所灰捨て場（N 42° 41.361 E 141° 48.704）で許可を得て採取した。これをメタノールで抽出し、抽出液（7 L）を減圧溜去したのち、得られた粗抽出物を水で再懸濁し、等量の n-ヘキサン、酢酸エチル、n-ブタノールの順に液液分配した。ペーパーディスクを用いた予備試験で *Nostoc* sp. に対する HIF 様活性が認められたヘキサン層を、シリカゲルカラムによりさらに分画した。バイオアッセイは、Winogradsky’s 寒天培地（糖なし）で培養した凝集体を Winogradsky’s ゲランガムゲル（0.6% gellan）に乗せ、その上にコケ植物体 1 mg 新鮮重相当の分画物をチャージしたペーパーディスクを乗せるサンドイッチ法によって生理活性試験を行った。25℃明所条件でそれぞれの分画物に対する *Nostoc* sp. の反応を経時観察し、凝集体の分散を HIF 様活性の指標とした。HIF 様活性が見出された画分は各種クロマトグラフィーに供し、活性本体を追跡した。

結果および考察）バイオアッセイ開始 12 時間後から、HIF 様活性が酢酸エチル 30%溶出画分で見いだされ、これをチャージしたディスクで挟んだ *Nostoc* sp. の凝集体が徐々に分散していく様子が観察された。分散の初期にある *Nostoc* sp. 凝集体を蛍光顕微鏡で観察したところ、ホルモゴニアの出現とその運動性が確認された。我々の研究室では、ソテツサンゴ状根から 1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol を HIF として見出しており、本活性物質との関連性について検討している。

hormogonium-inducing factor, *Nostoc* sp., diacylglycerol

講演番号：2A46p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ A 校舎 46 会場

FDA を用いたマヤプシキ培養細胞活性の簡易的な定量測定

Rapid quantitation of viability of cultured *Sonneratia alba* cells by vital staining with fluorescein diacetate

○猿山 奈緒子[1]、笹本 浜子[2]、児玉 浩明[3] ([1]千葉大院園芸、[2]横浜国大院環境科学、[3]千葉大院融合科学)

○Naoko SARUYAMA[1], Hamako SASAMOTO[2], Hiroaki KODAMA[3] ([1]Chiba Univ., [2]Yokohama National Univ., [3]Chiba Univ.)

森林は多種多様な生物の生息・生育の場としてだけでなく、地球温暖化対策としても注目されていることから、森林保全は環境問題を解決する一つの手段として重要である。実際に樹木の研究を行うには広い実験スペースと多くの時間を必要とするため、培養細胞を用いた解析は有効な手段の一つである。しかし、培養細胞の確立は容易ではなく、確立後も細胞の維持に多大な労力を費やす。

本実験で用いたマヤプシキはマングローブ植物の一種であり、日本では沖縄県の西表島や石垣島の一部にしか生育していない貴重な植物である。このマヤプシキの液体培養細胞系が確立された（Kawana , 2007）。マヤプシキはマングローブ植物の中でも、比較的海側域に生育し、その液体培養細胞はNaCl非存在下よりも50mM NaCl存在下で良い増殖を示す（Kawana and Sasamoto, 2008）。このことから、マヤプシキ細胞には耐塩性/好塩性の性質があると考えられる。NaCl の存在によって細胞の活性に違いが出るのかどうかを調べるために、生細胞のみを染色することが知られているフルオレセイン・ジアセテート（FDA）染色をし、顕微鏡観察を行ったところ、NaCl の有無による染色の違いは、ほとんど確認できなかった。細胞増殖の指標として、生重量、乾重量、細胞数、圧縮細胞量（PCV）、静置細胞量（SCV）などが用いられ、培地や生理活性物質が細胞に与える影響をはかる指標とされている。しかし、マングローブのような樹木培養細胞は細胞増殖が遅くかつプロトプラスト化も困難な場合が多い。微生物の分野では、森林土壌中のバクテリアの活性を FDA 加水分解活性法を用いて測定されてきた。本研究では、この FDA を用いる方法を植物培養細胞に応用し、マヤプシキ培養細胞の代謝的活性の指標として使えるかどうかを検討した。

FDA は無蛍光物質であるが生細胞のみに取り込まれたのち、加水分解され蛍光物質であるフルオレセインを生成する。本実験は NaCl 非存在下と 50mM、100mM NaCl を含む MS 培地で 21 日培養したマヤプシキ培養細胞を用いて行った。主な実験方法は FDA を添加し、30℃で振とう培養した後、アセトンで反応を停止させ、波長 490nm の吸光度を測定した。本実験では測定に用いるマヤプシキ培養細胞量、反応時間、FDA 量の 3 点について最適な反応条件を検討し、決定した。その結果、NaCl 非存在下よりも 100mM NaCl 存在下で培養した細胞の方が多くフルオレセインを生成した。この結果は、細胞増殖の観察から推察されていたようにマヤプシキ培養細胞はNaCl非存在下よりも100mM NaCl 存在下の方が代謝活性が高いことを支持するものである。

FDA, cultivation cell, mangrove

講演番号：2A46p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ A 校舎 46 会場

モエジマシダ体内のヒ素挙動に対するリンの蓄積の影響

Effect of phosphorus accumulated in *Pteris vittata* on arsenic uptake, transportation and accumulation

○黄 毅[1]、井上 千弘[2]、遠藤 銀朗[1] ([1]東北学院大、[2]東北大学)
○Yi HUANG[1], CHIHIRO INOUE[2], GINNROU ENNDOU[1] ([1]Tohoku-gakuin Univ., [2]Tohoku Univ)

【目的】土壌中のヒ素汚染浄化法としてヒ素超蓄積植物モエジマシダ（*Pteris vittata*）を用いたファイトレメディエーションが注目されている。一般の土壌は好気状態であり、通常の草本植物が吸収するヒ素の形態は主に五価のヒ酸イオンである。無機ヒ酸はリン酸と構造が非常に類似しているため、植物では根でのリン酸輸送体を通じてヒ酸を体内に取り込まれることが知られている。また取り込まれたヒ酸イオンは亜ヒ酸イオンに還元されて地上部に輸送・蓄積されることも知られている。ヒ素とリンの植物体内における挙動も類似する点が多く、ヒ素超蓄積植物モエジマシダのリン酸とヒ酸の競合取り込みについて多く研究されているが、モエジマシダ体内におけるヒ素とリンの相互作用については不明な点が多い。本研究では、モエジマシダのヒ素取込・輸送・蓄積に対するリン蓄積の影響について詳細な検討を行った。
【方法及び結果】異なるリン蓄積状態のモエジマシダを用い、水耕栽培の系において 24 時間でのヒ酸取込、そして導管液と組織別のヒ素化合物種を ICP-MS により、リン濃度を ICP-AES により調べた。初期段階(0-6h)ではヒ酸取り込み量はリン蓄積の状態に拘らず同様であるため、リンの蓄積によるリン酸輸送体の発現抑制によってヒ酸取り込みが抑制されることではないと示唆された。一方、根のリン蓄積量が高いほど根部のヒ素蓄積量が低くなることが確認され、その減少の割合は培養液からのヒ素取込量の減少の割合とほぼ一致した。さらに植物全体の亜ヒ酸の存在割合も低下したことが確認された。上記の結果はモエジマシダではリンの蓄積に伴ってヒ酸還元酵素活性が阻害され亜ヒ酸の生成量が低下したことによって、ヒ素蓄積量を低下させたと考えられた。この時の導管液中のリン濃度は根部のリン蓄積量に応じて上昇するが、ヒ素濃度は逆に低下することからも確認された。

arsenic, phosphorus, *Pteris vittata*

講演番号：2A46p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ A 校舎 46 会場

トマト果実成熟時におけるアスコルビン酸量の増加には D-ガラクツロン酸経路が機能する

D-Galacturonate pathway contributes to increments of ascorbate in ripening tomato fruits

○志村 智美[1]、Badejo A Adebanjo[1]、西川 仁[1]、丸田 隆典[1]、澤 嘉弘[1]、重岡 成[2]、石川 孝博[1]([1]島根大・生資科・生命工、[2]近畿大院・農・バイオ)
○Tomomi Shimura[1], Adebanjo Badejo A[1], Hitoshi Nishikawa[1], Takanori Maruta[1], Yoshihiro Sawa[1], Shigeru Shigeoka[2], Takahiro Ishikawa[1] ([1]Dept. Appl. Biosci. Biotech., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ.)

【目的】果実は一般に植物組織の中でも高濃度のアスコルビン酸を含有しているが、その生合成調節や蓄積のメカニズムは未解明の問題である。植物のアスコルビン酸生合成の主要経路については、シロイヌナズナを中心とした分子遺伝学的研究から、 D-マンノース/L-ガラクトース経路であることが証明されているが、別経路して D-ガラクツロン酸経路の存在も示唆されている。しかし、同経路については構成酵素遺伝子が未同定であり、そのアスコルビン酸生合成への関与については疑問視されているのが現状である。トマト果実のアスコルビン酸含量は、成熟段階に応じて増加することが知られており、近年のリソース整備の現状と併せて、果実におけるアスコルビン酸研究の良いモデルである。そこで本研究では、*Solamumu lycopersicum* L. cv.’Micro-Tom’を用い、果実成熟段階におけるアスコルビン酸レベルと生合成との関係について解析した。

【結果】Micro-Tom 果実のアスコルビン酸含量は、Immature Green (IMG) から Red (RD) までの成熟過程で約 2 倍に増加し、既報のトマト果実に匹敵することが示された。Q-PCR により果実成熟過程における 7 つの D-マンノース/L-ガラクトース経路構成酵素遺伝子の発現レベルを検討したところ、すべての遺伝子発現量はアスコルビン酸量の増加に反して抑制される傾向が認められた。[6-^{14}C] アスコルビン酸によるトレーサー実験より、RD におけるアスコルビン酸量の増加は葉からの転流の結果ではないことが示された。切取った IMG と RD 果実に対して、アスコルビン酸生合成の前駆体となる L-ガラクトースおよび D-ガラクツロン酸を各 5 mM 濃度で添加したところ、IMG では L-ガラクトースに対してのみアスコルビン酸量の有意な増加が観察されたのに対し、RD では D-ガラクツロン酸に対して最も顕著なアスコルビン酸の増加が認められた。また IMG と RD 果実について、D-ガラクツロン酸経路の構成酵素アルドノラクトナーゼ活性を測定した結果、RD 段階では IMG の約 2 倍に活性の増加が認められた。以上の結果から、成熟後期の RD 果実では D-ガラクツロン酸経路が機能することでアスコルビン酸レベルの増加に貢献していることが示唆された。

Ascorbate, Tomato, Biosynthesis

講演番号：2A46p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ A 校舎 46 会場

グルタチオンペルオキシダーゼ相互作用タンパク質の同定および機能解析

Identification and characterization of glutathione peroxidase-interacting protein

○尾形 知哉[1]、高田 梨沙[2]、Gaber Ahmed[2]、田茂井 政宏[1,2]、吉村 和也[3]、丸田 隆典[4]、重岡 成[1,2] ([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]中部大・応生・食栄、[4]島根大・生資科・生命工)

○tomoya ogata[1], risa takada[2], Ahmed Gaber[2], Masahiro Tamoi[1,2], Kazuya Yoshimura[3], Takanori Maruta[4], Shigeru Shigeoka[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [4]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ.)

活性酸素種（ROS）は酸素毒としてだけでなく、植物のストレス応答を導くシグナリング因子としても機能することから、ROS の量的バランスからなる細胞内レドックス状態は厳密に制御されなければならない。我々はシロイヌナズナに 8 つ存在するグルタチオンペルオキシダーゼ（GPX1～8）の分子特性および生理機能について解析してきており、最近 GPX8 は酸化的ストレス応答性を示すこと、および細胞質だけでなく核にも局在することから、DNA の酸化損傷の防御に不可欠であることを明らかにした（*PCP* **53**, 1596-606, 2012)。一方、植物 GPX はタンパク質間相互作用を介してシグナル伝達系にも関与することが示唆されてきている。したがって、GPX は抗酸化酵素およびシグナリング因子としてのバイファンクショナルな機能を果たすと考えられる。そこで本研究では、GPX8 と相互作用するタンパク質を同定し、その機能解析を試みた。

Yeast two-hybrid system により、GPX8 の相互作用タンパク質（GPX8-interacting protein 1：GIP1）を同定した。GIP1 は抗酸化酵素などのストレス防御タンパク質ではなく、細胞質と核に局在すること、およびアブシジン酸（ABA）応答に関与することが報告されていた。GIP1 は GPX8 とは異なり、正常および酸化的ストレス条件下で構成的な発現を示した。GPX8 および GIP1 欠損株はどちらも酸化的ストレスに対して高感受性を示した。また、両欠損株は ABA 処理に対しても高感受性を示した。よって、GPX8 および GIP1 は共に酸化的ストレスおよび ABA 応答に関与することが示唆された。興味深いことに、GIP1 欠損株では GPX8 のストレス応答性が抑制されたことから、GIP1 は GPX8 の発現制御に関与することが示された。現在、プルダウンや BiFC 法を用いて GPX8-GIP1 相互作用について検証するとともに、両遺伝子欠損株におけるストレス／ホルモン応答性遺伝子群の発現について調べている。

glutathione peroxidase, reactive oxygen species, stress

講演番号：2A46p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ A 校舎 46 会場

AtNUDX6 および 7 による NADH 代謝を介した生物的/非生物的ストレス応答関連遺伝子の発現制御
Regulation of gene expression involved in the biotic and abiotic stress responses via NADH metabolism by AtNUDX6 and 7

○奥田 雅宣[1]、野田 北斗[2]、田茂井 政宏[1,2]、吉村 和也[3]、重岡 成[1,2] ([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大学・農・バイオ、[3]中部大・応生・食栄)
○Masanobu OKUDA[1], Hokuto NODA[2], Masahiro TAMOI[1,2], Kazuya YOSHIMURA[3], Shigeru SHIGEOKA[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ.)

【緒言】NADH は補酵素や主要な還元力として多様な代謝や細胞応答に関わっている。一方、APD-リボースは種々のストレスによる DNA 損傷の修復や細胞死の誘導などに関与するタンパク質翻訳後調節機構であるポリ ADP-リボシル化反応(PAR)の分解過程から生成される細胞毒性分子である。シロイヌナズナ Nudix hydrolase (AtNUDX) ファミリーの中で、AtNUDX6 は NADH を生理的基質とし、NADH 代謝調節による TRX-h5 の発現制御を介した NPR1 依存的サリチル酸シグナリング経路の制御により、病原菌感染に対する全身獲得性免疫機構に関与する (*Plant Physiol.* 2010)。一方、AtNUDX7 は NADH および ADP-リボースの両方を生理的基質とし、酸化ストレス条件下での ADP-リボースからのヌクレオチドリサクル、および NADH レベルの調節を介した PAR 制御による DNA 損傷の修復に機能する(*Plant Physiol.* 2009)。また、病原菌感染時には生物的ストレス応答の制御に関わる植物ホルモン、サリチル酸(SA)の蓄積の抑制にも機能している。本研究では、AtNUDX6 および 7 による NADH 代謝がどのようにして異なる細胞応答を制御しているのかを明らかにするために、両酵素の遺伝子破壊による細胞内 NADH レベルの変化が遺伝子発現制御に及ぼす影響を解析した。

【結果、考察】通常条件下における NADH 量は、野生株と比較して AtNUDX6 破壊株(KO-*nudx6*)では約 1.7 倍、AtNUDX7 破壊株(KO-*nudx7*)では約 2 倍、両遺伝子破壊株(WKO-*nudx6/7*)では約 4 倍にまで増加していた。遊離および総 SA レベルは野生株と比較して KO-*nudx6* 株では変化が認められなかったが、KO-*nudx7* 株(3 倍および 1.6 倍)や WKO-*nudx6/7* 株(3.6 倍および 3 倍)において顕著に増加していた。また、SA 誘導性遺伝子(NIMIN2、PR1 および PR2 など)の発現量は KO-*nudx7* 株および WKO-*nudx6/7* 株においてそれぞれ 2～3 倍および 3～17 倍に増加していた。これらのことから、細胞内 NADH レベルは SA 応答と正の相関関係にあると考えられた。マイクロアレイ解析の結果、KO-*nudx6*、KO-*nudx7* および WKO-*nudx6/7* 株において共通に発現増加した遺伝子が 26 個、減少した遺伝子が 31 個認められた。さらに、パラコート (PQ) による酸化的ストレス下において KO-*nudx6* および KO-*nudx7* 株で共通に増加した遺伝子が 66 個、減少した遺伝子が 32 個認められた。それらには、生物的/非生物的ストレス応答関連遺伝子が約 10%～40%含まれていた。また、発現パターンが NADH レベルと正もしくは負の相関関係にあるものが 32 個存在していた。以上より、AtNUDX6 および 7 による細胞内 NADH 代謝は、種々の遺伝子の発現制御を介して生物的/非生物的ストレス応答の制御に機能していることが示唆された。

Nudix hydrolase, NADH, salicylic acid

講演番号：2A46p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ A 校舎 46 会場

葉緑体型 NADPH 加水分解酵素（AtNUDX19）による NADPH ステータス変化を介したストレス/ホルモン応答の制御

Regulation of stress and hormonal responses through changes in the NADPH status modulated by a chloroplastic NADPH pyrophosphohydrolase, AtNUDX19

○辻村 昌希[1]、吉田 幸史[1]、三島 真優[2]、問田 英里[1]、丸田 隆典[3]、田茂井 政宏[1,2]、吉村 和也[1,4]、重岡 成[1,2] ([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]島根大・生資科・生命工、[4]中部大・応生・食栄)

○Masaki Tsujimura[1], Tomofumi Yoshida[1], mayu mishima[2], Eri Toida[1], Takanori Maruta[3], Masahiro Tamoi[1,2], Kazuya Yoshimura[1,4], Shigeru Shigeoka[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [4]Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ.)

NAD(P)H は補酵素もしくは細胞内レドックス状態の決定因子として主要な役割を果たしているため、そのレベルおよびレドックス状態（NADPH ステータス）の変化は種々の代謝だけではなく、ストレスやホルモン応答にも影響を及ぼすと考えられる。最近我々は、シロイヌナズナの葉緑体型 NADPH 加水分解酵素（AtNUDX19）の欠損が NADPH レベルの増加、光合成および抗酸化系の活性化、光酸化的ストレス耐性能の向上を引き起こすことを明らかにした。これらのことは、AtNUDX19 が NADPH ステータスの制御を介して、ストレス応答に関与することを示唆している。そこで本研究では、マイクロアレイ解析により AtNUDX19 を介したストレス応答機構の解明を試みた。

通常光もしくは強光照射下の野生株および AtNUDX19 欠損株（KO-*nudx19*）を用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、KO-nudx19 株ではストレス応答/耐性関連遺伝子に加え、多くのホルモン応答/生合成関連遺伝子の発現が変化していた。そこで、定量的 RT-PCR により遺伝子発現を詳細に解析した結果、KO-nudx19 株における NADPH ステータス変化と耐病性ホルモンであるサリチル酸（SA）の生合成/応答との関連が示された。事実、KO-*nudx19* 株では SA レベルが有意に増加しており、SA 処理に高感受性を示した。また、SA 処理による病原菌感染応答関連遺伝子の発現上昇が亢進しており、DC3000/avr Rpm1 感染による病変進行の促進および死細胞数の増加が認められた。したがって、AtNUDX19 は SA 応答のネガティブレギュレーターであることが示唆された。

そこで次に、SA と拮抗的に作用し、浸透圧および傷害ストレス応答を制御するアブシジン酸（ABA）およびジャスモン酸（JA）に対する応答への関与について解析した。その結果、KO-*nudx19* 株は JA メチルおよび ABA 処理に対して非感受性を、傷害や浸透圧ストレスに対して高感受性を示した。また、KO-nudx19 株では、JA または ABA 処理下におけるそれぞれのホルモン応答性遺伝子の発現が抑制されていた。

以上より、AtNUDX19 は NADPH ステータス制御による SA 応答の制御を介して、JA および ABA 応答を正に調節していることが示唆された。すなわち、AtNUDX19 は植物ホルモンの制御を介して多様なストレスに対する応答のバランス維持に寄与していると考えられる。現在、KO-*nudx19* 株の耐病性をより詳細に解析するとともに、SA 欠乏株との二重変異株を用いた SA と強光ストレス応答の関連についての解析を行なっている。

Nudix hydrolase, NADPH, Phytohormone

講演番号：2A46p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ A 校舎 46 会場

葉緑体由来の H_2O_2 応答性遺伝子群の包括的な逆遺伝学的解析
Comprehensive reverse genetic analysis of chloroplastic H_2O_2-responsive genes

○丸田 隆典[1]、野志 昌弘[2]、問田 英里[3]、松田 峻[3]、中村 茉樹[2]、田茂井 政宏[2,3]、高木 優[4,5]、石川 孝博[1]、重岡 成[2,3] ([1]島根大・生資科・生命工、[2]近畿大・農・バイオ、[3]近畿大院・農・バイオ、[4]産総研・生物プロセス、[5]埼玉大・環境科学)
○Takanori MARUTA[1], Masahiro NOSHI[2], Eri TOIDA[3], Shun MATSUDA[3], Maki NAKAMURA[2], Masahiro TAMOI[2,3], Masaru TAKAGI[4,5], Takahiro ISHIKAWA[1], Shigeru SHIGEOKA[2,3] ([1]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [4]AIST, [5]IEST, Saitama Univ.)

生物にとって活性酸素種（ROS）がシグナリング因子としてストレス応答に重要であることは周知の事実となってきており、ROSの生成部位や種類に依存した複数のシグナル伝達経路の存在も示唆されてきている。最近、我々はエストロゲン誘導型RNAi法によるチラコイド膜結合型APX（tAPX）の誘導抑制系を構築し、マイクロアレイ解析により葉緑体由来のH_2O_2 に特異的に応答する候補遺伝子群（*Responsive to tAPX Silencing*; *RTS*）を約 800 個同定した（*J. Biol. Chem.* **287**, 11717-29, 2012）。さらに、RTS遺伝子群の機能分類および生理学的解析により、葉緑体由来のH_2O_2 は生物的および非生物的ストレス応答に関与し、その制御にはアブシジン酸（ABA）やサリチル酸（SA）などの植物ホルモンが関与することを明らかにした。そこで、葉緑体由来のH_2O_2 シグナリングの分子機構を明らかにするために、RTS遺伝子群の包括的な逆遺伝学的解析を行ったので報告する。

RTS 遺伝子群から酸化的シグナリングにおいて重要な役割を担う遺伝子を同定するために、各遺伝子の欠損株および転写因子の優性抑制株のパラコート感受性を評価し、11 ラインの光酸化的ストレス感受性（*pss*）および 9 ラインの非感受性（*psi*）変異株が得られた。それらの原因遺伝子のうち、PSS8 はフェニルプロパノイド経路に関与するフェルラ酸 5-ヒドロキシラーゼ（FAH1）をコードしていた。*pss8* では光酸化的ストレス下におけるアントシアニンの蓄積およびその生合成遺伝子の誘導が抑制されており、FAH1 はアントシアニン生合成の発現に必須であることが示された。また、PSI2 はグルタミン酸脱炭酸酵素をコードしており、γ-アミノ酪酸代謝と酸化的ストレス応答の関連が示唆された（*BBB*, in press）。一方、11 の *PSS*/*PSI* 遺伝子が転写因子をコードしており、酸化的シグナリングへの関与が示された。興味深いことに、PSS7 は酸化的ストレス、アブシジン酸およびサリチル酸（SA）応答に、PSS4 は酸化的ストレスおよび SA 非依存的な病原菌応答に関与することが示唆された。現在、各転写因子の下流遺伝子の同定などを試みるとともに、*pss* 変異株ラインにおいて、最も強い酸化的ストレス感受性を示す *pss9* の原因遺伝子の機能解析を進めている。

reactive oxygen species, chloroplast, transcription factor

講演番号：2A46p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ A 校舎 46 会場

ホメオドメインロイシンジッパー転写因子（HAT1）を介した酸化的ストレス応答

Oxidative stress response via homeodomain leucine zipper protein (HAT1)

○問田 英里[1]、野志 昌弘[2]、松田 峻[1]、野坂 亮太[1]、田茂井 政宏[1,2]、吉村 和也[3]、高木 優[4,5]、丸田 隆典[6]、大和 開[6]、澤 嘉弘[6]、石川 孝博[6]、重岡 成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]中部大・応生・食栄、[4]産総研・生物プロセス、[5]埼玉大・環境科学、[6]島根大・生資科・生命工）

○Eri TOIDA[1], Masahiro NOSHI[2], Shun MATSUDA[1], Ryota NOSAKA[1], Masahiro TAMOI[1,2], Kazuya YOSHIMURA[3], Masaru TAKAGI[4,5], Takanori MARUTA[6], Kai YAMATO[6], Yoshihiro SAWA[6], Takahiro ISHIKAWA[6], Shigeru SHIGEOKA[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [4]AIST, [5]IEST, Saitama Univ., [6]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ.)

【目的】活性酸素種（ROS）がシグナルとして作用し、植物の成長・発達およびストレス応答の制御に関与することは周知の事実である。興味深いことに、近年の包括的なトランスクリプトーム解析により、ROSの種類や生成部位特異的なシグナリング経路の存在も示唆されてきた。これまでに我々は、シロイヌナズナにおけるチラコイド膜結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（tAPX）の誘導抑制系を用いたマイクロアレイ解析などにより、葉緑体由来のH_2O_2がシグナリング因子として生物的および非生物的ストレスの両方に重要であることを明らかにしてきた（*J. Biol. Chem.*, 287: 11717-11729, 2012）。さらに、葉緑体由来のH_2O_2応答性遺伝子群の破壊株ラインからの酸化的ストレス感受性変異株の選抜および原因遺伝子の機能解析により、ホメオドメインロイシンジッパー転写因子（HAT1）の葉緑体由来のH_2O_2シグナリングへの関与が示唆された。そこで本研究では、HAT1の機能解析により葉緑体由来のH_2O_2シグナリングの分子機構の解明を試みた。

【結果・考察】酸化的ストレスの指標としてパラコートを用い、葉緑体由来の H_2O_2 応答性遺伝子群の破壊株ラインから酸化的ストレスに対して高感受性あるいは非感受性を示す変異株を複数選抜した。それらの中で、HAT1 欠損株（*hat1*）はサリチル酸およびエリシター処理にも高感受性を示した。対照的に、HAT1 に転写抑制ドメインを連結し、過剰発現させた優性抑制株はパラコート、サリチル酸およびエリシター処理に非感受性を示した。このことから、HAT1 は転写抑制因子であることが示唆された。*HAT1* の発現は tAPX の誘導抑制に加え、光酸化的ストレス、サリチル酸およびエリシター処理によって抑制された。次に、野生株および *hat1* を用いてマイクロアレイ解析を行い、*hat1* において誘導された 95 個の遺伝子を同定した。それらには、ペルオキシダーゼやアブシジン酸応答に関与する遺伝子が含まれており、それらのプロモーター領域には HAT1 ホモログの認識シス配列が含まれており、直接的な標的遺伝子である可能性が示唆された。これらのことから、HAT1 は酸化的シグナリングの下流においてアブシジン酸を介したストレス応答に関与する可能性が示唆された。現在、ルシフェラーゼレポーター法などを試みている。

reactive oxygen species, redox signaling, transcription factor

講演番号：2A46p15
講演日時、会場：3 月 25 日 16:48～ A 校舎 46 会場

紫外線で誘導されるオオムギ由来 Nudix 遺伝子の解析
Expression of Nudix genes in barley under UV irradiation

○田中 小百合 (岡山大・植物研)
○Sayuri TANAKA (IPSR)

【背景・目的】

太陽光は植物の生育と発達を調節する環境シグナルであり、エネルギー源としても極めて重要である。そのうち、紫外線は波長により UV-A(320-400nm)、UV-B(290-320nm)、UV-C(100-290nm)に区分され、UV-A と UV-B はオゾン層を通過する。地表に到達する紫外線の 99%が UV-A であるが、環境悪化によるオゾン層の破壊が今後続けば、地上における UV-B や UV-C の影響が無視できなくなる。これまで、UV-B は生理学的レベルあるいは DNA レベルで、植物の生育過程に傷害を及ぼすことが報告されてきた。しかし、植物における UV-C に対する応答・防御メカニズムは明らかではない。

本研究では、UV-C に対するオオムギの応答・防御メカニズムを明らかにすることを目的として、植物の代謝制御や生物的・非生物的ストレスに応答する Nudix ファミリー遺伝子に着目し、オオムギ由来 Nudix ファミリー遺伝子の探索と紫外線応答について解析した。

【方法・結果】

27 種類のシロイヌナズナ由来 Nudix タンパク質のアミノ酸配列と相同性を示すアミノ酸配列をコードするオオムギ由来遺伝子を BLAST 検索したところ、14 種類の Nudix 遺伝子に集約することができた。これら遺伝子の紫外線応答について、オオムギ幼芽に 340、312、260nm の紫外線を 24 時間照射後に全 RNA を抽出してリアルタイム PCR 法により解析した。その結果、AtNUDX9 相同性遺伝子は UV-A と UV-B でそれぞれ、1.3、1.4 倍、AtNUDX12、13、16 相同性遺伝子は UV-B と UV-C でそれぞれ 7.8、14.9 倍、AtNUDX14 相同性遺伝子は UV-C で 2.6 倍、AtNUDX15 相同性遺伝子は UV-C で 2.0 倍、AtNUDX25 相同性遺伝子は UV-C で 1.2 倍増加した。以上の結果から、オオムギ由来 Nudix 遺伝子は紫外線の種類により応答性が異なること、4 種類の Nudix 遺伝子が UV-C に応答することが明らかとなった。

Nudix, UV, barley

講演番号：2A46p16
講演日時、会場：3 月 25 日 17:00～ A 校舎 46 会場

スペルミンは熱ショック関連遺伝子群の発現を亢進することによって宿主植物を熱ショック傷害から保護する
Spermine protects Arabidopsis from heat stress-induced damage by increasing expression of heat shock-related genes
Sagor GHM[1]、新津 勝[2]、Berberich Thomas[3]、○草野 友延[1] ([1]東北大院生命、[2]城西大薬、[3]BiK-F)
GHM Sagor[1], Masaru Niitsu[2], Thomas Berberich[3], ○Tomonobu Kusano[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Josai Univ., [3]BiK-F)

温度、塩そして乾燥等の非生物的ストレスにさらされた植物細胞ではポリアミン合成経路遺伝子の発現が変化することはよく知られている。今回、シロイヌナズナに熱ショックを与えた時のポリアミン合成経路遺伝子の発現を調べた所、スペルミン合成酵素遺伝子(*SPMS*)とS-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素遺伝子2が早期に誘導され､多少遅れてアルギニン脱炭酸酵素遺伝子2が誘導されること、が判明した。呼応するように熱ショック後、スペルミン含量が直線的に増加し、プトレシンとスペルミジン含量も増加した。しかしサーモスペルミンは量的に変化しなかった。次に、ポリアミンを外生的に与えたシロイヌナズナの熱ショック応答を調べた所、スペルミンに加えサーモスペルミンにも、熱ショック傷害から植物を保護する活性があることが判明した。スペルミジンにも弱い保護効果が見られたが、プトレシンには当該活性は見られなかった。上述の結果から、スペルミンには内生的にも外生的にも熱ショック傷害の軽減効果が期待できたため、シロイヌナズナ植物体内のスペルミン含量が異なる3種の植物-すなわち野生株に加え *SPMS* 遺伝子過剰発現植物と *spms* (スペルミン欠失植物)-の熱ショック応答性を調べた。結果は、スペルミン含量が多いほど熱ショック耐性が高くなる、との結果を得た。*spms* 植物でも熱ショック後、熱ショックタンパク質遺伝子群の発現誘導がおこるが、スペルミン含量が高いほど熱ショックタンパク質遺伝子群発現誘導の程度が高まった。さらに、4 種の熱ショックタンパク質のレベルをウエスタン解析で調べた所、産生量はスペルミン量に相関があることが判明した。

上記の結果より、スペルミンは熱ショック応答性を転写レベルおよび翻訳レベルで増強することで宿主植物を熱ショックによる傷害より保護するとの考えを提唱する。

polyamine, heat shock, *Arabidopsis thaliana*

講演番号：2A46p17
講演日時、会場：3 月 25 日 17:12～ A 校舎 46 会場

三量体 G タンパク質のγサブユニットをコードするイネ OsDEP1 遺伝子は、酵母と植物にカドミウム耐性を与える
OsDEP1 encoding a G protein gamma subunit confers Cd tolerance to yeast and plant cells
○國廣 俊太[1]、井上 雅貴[1]、斎藤 達彦[1]、松田 大樹[1]、倉俣 正人[1]、田口 文緒[2]、Youssefian Shohab[3]、Berberich Thomas[4]、草野 友延[1] ([1]東北大院生命、[2]農業生物資源研、[3]秋田県立大、[4]BiK-F)
○Shuta KUNIHIRO[1], Masataka Inoue[1], Tatsuhiko Saito[1], Taiki Matsuda[1], Masato Kuramata[1], Fumio Taguchi[2], Shohab Youssefian[3], Thomas Berberich[4], Tomonobu Kusano[1] ([1]Tohoku Univ., [2]NIAS, [3]Akita Pref. Univ., [4]BiK-F)

【背景】鉱山開発や工業廃棄物の不適切な廃棄により、重金属が生態系に流出することによる土壌や水質の汚染が社会問題となっている。現在、重金属汚染を修復する手法でとして植物を用いたファイトレメデーション法が注目されている。本手法を確立するためには、より多くの重金属リスク低減因子を明らかにすることが重要と考え、研究を行っている。
【目的】演者らは重金属でも特にカドミウムに着目して研究を行っている。今回はカドミウム感受性酵母を用いて、イネ cDNA ライブラリーから酵母にカドミウム耐性を付与するクローンの単離、さらにはそのなかの新規クローンの特徴付けを目的とした
【方法】イネ(品種、日本晴)幼植物由来の cDNA ライブラリーを構築し、カドミウム感受性酵母に導入しカドミウム耐性を付与する cDNA を探索した。重金属特異性についても、種々の重金属感受性酵母を用いて行った。遺伝子発現解析は、RT-PCR 法もしくは qRT-PCR 法を用いた。カドミウム含量測定は、原子吸光分析法を用いた。
【結果】新規クローンとして *OsDEP1* を単離した。*OsDEP1* は、三量体 G タンパク質のγサブユニットをコードする遺伝子で、穂の形態形成に関わることが報告されている。この遺伝子産物は 426 アミノ酸残基からなり、うち 120 アミノ酸残基がシステインであった。さらに、システインの分布も特徴的であり、OsDEP1 の 1-169 アミノ酸領域はβサブユニットと相互作用する領域であるが、ここにはシステインは余り含まれず、一方 170-426 のアミノ酸領域には 88 残基のシステインが含まれていた。
そこで、OsDEP1 タンパク質の 1-169 アミノ酸領域、そしてシステインリッチ領域である 170-426 アミノ酸領域と全長領域の 3 つのコンストラクトを作製し、酵母とシロイヌナズナに導入して、カドミウム耐性の有無を解析した。酵母そしてシロイヌナズナのいずれでも 170-426 アミノ酸領域が導入された個体はアミノ酸全長領域を導入された個体と同等のカドミウム耐性を示した。一方、1-169 アミノ酸領域を導入した酵母とシロイヌナズナでは、カドミウム耐性が観察できなかった。さらに、カドミウム以外の重金属である銅、ニッケル、コバルト、マンガンへの耐性の確認をした結果、アミノ酸全長と 170-426 アミノ酸領域が導入された個体は、いずれも銅耐性を示した。OsDEP1 タンパク質がカドミウム耐性を付与する機構に G タンパク質情報伝達系が関わるのかについても論議する。

cadmium, rice, heterotrimeric G protein

講演番号：2A46p18
講演日時、会場：3 月 25 日 17:24～ A 校舎 46 会場

新奇ダイズ塩ストレス応答遺伝子を導入したシロイヌナズナ培養細胞と植物体の耐塩性比較

Comparative analysis of salt tolerance of Arabidopsis cell cultures and plants overexpressing a novel salt-inducible gene of soybean

○斎藤 祐一、高原 英成、小島 俊雄 (茨城大・農・生化)
○Yuichi SAITO,Hidenari TAKAHARA,Toshio KOJIMA (Lab. Biochem. Mol. Biol., Agri, Ibaraki Univ.)

環境ストレスに曝された植物は、様々なストレス応答遺伝子の発現を制御し、分子・生理レベルから形態レベルの形質変化を通じて、ストレスに対する耐性を獲得している。本研究室では、ダイズにおける塩ストレス応答、耐性機構を明らかにするため、cDNA-AFLP法によりダイズの塩ストレス応答遺伝子群の探索を試みた。その結果、100 mM NaCl処理に対して強く転写誘導された新奇ダイズ遺伝子*GmTDF-5* (*Glycine max Transcript-Derived Fragment-5*)を同定した。*GmTDF-5* は全長 1,419 bp のイントロンレスな遺伝子であり、367 アミノ酸残基から成る機能未知なタンパク質をコードしている。また、塩ストレスに加えて、高浸透圧(100 mM マンニトール)や乾燥ストレス、アブシジン酸に対しても応答していることから、同遺伝子はダイズの広範な水分ストレス応答機構に関与していることが示唆された。

本研究では *GmTDF-5* が関与する植物の塩ストレス応答機構の解明を目的とし、*GmTDF-5* ホモログを持たないシロイヌナズナを使用して、同遺伝子の過剰発現が及ぼす塩ストレス処理後の表現型と代表的な水分ストレス応答遺伝子の発現に対する影響を特徴付けた。アグロバクテリウム感染法によって作出した *GmTDF-5* を過剰発現するシロイヌナズナ培養細胞 T87 株を用いて、塩ストレス処理(0 / 50 / 100 mM NaCl、48 時間)後の細胞生存率を Evans Blue 染色で調査した。その結果、*GmTDF-5* 導入株は、野生株と比較して細胞生存率が著しく低下しており、塩ストレスに対する感受性が高まることを明らかにした。そこで、植物体を用いた解析でも同様の結果が得られるかを確かめるため、*GmTDF-5* を導入したシロイヌナズナ 2 系統の発芽試験を行った。0～150 mM の NaCl を含む寒天培地を用いた試験の結果、塩ストレス培地における *GmTDF-5* 発現系統の発芽率が野生株よりも高い値を示し、耐塩性の上昇が確認された。以上の結果から、*GmTDF-5* の過剰発現がもたらす耐塩性への影響は、シロイヌナズナの培養細胞と各組織・器官へと分化した植物体(細胞)では異なること、*GmTDF-5* の機能発現には組織や器官特異的に発現する他の要因が必要である可能性が示された。現在、*GmTDF-5* を過剰発現するシロイヌナズナ培養細胞、植物体における水分ストレス応答遺伝子の発現量に及ぼす影響を調査している。

GmTDF-5, cultured cell, transgenic plant

講演番号：2A46p19
講演日時、会場：3 月 25 日 17:36～ A 校舎 46 会場

ダイズの耐塩性を制御する機能未知アルマジロリピートタンパク質の塩ストレス応答性

Salt response of a novel armadillo-repeat protein controlling salt tolerance of soybean

○佐藤 光朗、右田 和琴、斎藤 祐一、野口 和斗、高原 英成、小島 俊雄（茨城大・農・生化）
○Mitsuaki SATO,Wako MIGITA,Yuichi SAITO,Kazuto NOGUCHI,Hidenari TAKAHARA,Toshio KOJIMA (Lab.　Biochem. Mol. Biol., Agri, Ibaraki Univ.)

アルマジロリピートはタンパク質間相互作用に関与する機能ドメインである。このドメインを有するタンパク質は、酵母からヒトまで真核生物に広く存在しており、細胞骨格の制御や核-細胞質間輸送に関わるタンパク質に多く見られる。植物では、ホルモンを介したシグナル伝達や自家不和合性など植物特有の現象に関わることも報告されており、多様な生命現象を制御することが知られている。当研究室では、塩ストレス応答遺伝子として単離した機能未知なアルマジロリピートタンパク質をコードするダイズ遺伝子*Glycine max Transcript-Derived Fragment-5* （*GmTDF-5* ）の解析を進めている。これまでの研究で、同遺伝子の過剰発現はシロイヌナズナ培養細胞と植物体それぞれの耐塩性を変化させており、GmTDF-5 タンパク質は植物の塩ストレス応答、耐性機構を制御するアルマジロリピートタンパク質であると推測している。そこで本研究では、GmTDF-5 タンパク質の機能解明に向けて、ダイズにおける同遺伝子・タンパク質の組織特異的発現性を特徴付けた。

100 mM NaCl 処理したダイズ各組織（根、茎、成熟葉、新葉）における *GmTDF-5* 遺伝子の塩ストレス応答性を調査した結果、ストレス処理後 24 時間以内にダイズの地上部器官で強い応答が見られ、特に茎と成熟葉において強く誘導されることが明らかとなった。同組織に対して、GmTDF-5 抗体を用いたウエスタン解析を行ったところ、調査した 24 時間までに GmTDF-5 タンパク質の発現を検出できなかった。同様の現象は、GFP::GmTDF-5 を過剰発現するシロイヌナズナ培養細胞でも見られ、GFP 抗体、GmTDF-5 抗体いずれの抗体でも GmTDF-5 タンパク質の発現を確認できなかった。両実験とも、*GmTDF-5* の転写は確認されたにも関わらず、タンパク質を検出できなかったことから、転写後もしくは翻訳後に何らかの制御を受けている可能性が示唆された。GmTDF-5 の C 末端領域（約 60 アミノ酸残基）にはホモログ間で高度に保存された領域が存在しており、ユビキチン化を示唆させるリジン残基を含むコンセンサス配列が保存されている。現在、GmTDF-5 がユビキチン化修飾される可能性を考え、代表的なタンパク質分解経路であるユビキチン-プロテアソーム系の関与を調査している。

GmTDF-5, salt stress, ubiquitination

講演番号：2B20p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ B 校舎 20 会場

糸状菌におけるフィトセラミド型中性スフィンゴ糖脂質の生合成経路の解析

Analysis of biosynthetic pathway of phytoceramide-type neutral glycosphingolipids in filamentous fungus

○山下 泰典、谷 泰史、沢 良太、斎藤 茂樹、三原 久明（立命館大・生命科学・生物工）
○Yasunori YAMASHITA,Yasushi TANI,Ryota SAWA,Shigeki SAITO,Hisaaki MIHARA (Dept. Biotechnol., Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

【目的】　糸状菌のスフィンゴ糖脂質としては、フィトセラミド型酸性スフィンゴ糖脂質ならびに 1 糖を有するセラミド型中性スフィンゴ糖脂質の 2 種が従来より知られ、これらはいずれも細胞内外のシグナル伝達や分化に関与する。最近、第 3 のスフィンゴ糖脂質として、酸性スフィンゴ糖脂質の脂質構造と特異なガラ系列構造を有するフィトセラミド型中性スフィンゴ糖脂質が、接合菌類や一部の子嚢菌類に存在することが明らかになってきている。しかし、そのようなフィトセラミド型中性スフィンゴ糖脂質の生理機能や生合成経路については未だ不明な点が多い。本研究では、フィトセラミド型中性スフィンゴ糖脂質の生合成経路を解明するために、スフィンゴ糖脂質の生合成に影響を及ぼす培養条件を検討し、スフィンゴ糖脂質生合成の有無に伴って発現量が変動するタンパク質の網羅的解析を試みた。

【方法・結果】　*Mariannaea elegans* は 2 糖構造を有するフィトセラミド型中性スフィンゴ糖脂質をもつことが分かっている [1)]。そこで、本菌株と接合菌類の中性スフィンゴ糖脂質の生合成が培養条件により影響されるかを薄層クロマトグラフィー分析により検討した。本菌株では、培地組成のグルコース濃度の減少に伴い中性スフィンゴ糖脂質の菌体内含有量が低下した。一方、接合菌類では、グルコース濃度は中性スフィンゴ糖脂質の菌体内含有量に影響を与えなかった。従って、本菌株の中性スフィンゴ糖脂質は、接合菌類とは異なる役割を担う可能性が示唆された。

次に、本菌株の中性スフィンゴ糖脂質合成の有無により発現量が変動するタンパク質を二次元電気泳動法にて解析するために、糖脂質合成が行われるゴルジ体に局在する膜タンパク質画分を調製した。培養条件の異なる菌株から得た膜タンパク質の二次元電気泳動ゲルを画像解析した結果、20 種程のタンパク質の量が著しく変動することが明らかになった。現在、nano LC-Qq-TOF-MS を用いた *de novo* シーケンス解析により、発現変動が認められたタンパク質の解析を行なっている。

1）日本農芸化学会 2012 年度大会プログラム集 p102、3A32a01

Phytoceramide, Neutralglycoshingolipids, *Mariannaea elegans*

講演番号：2B20p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ B 校舎 20 会場

大型褐藻類 Ascophyllan nodosum 由来硫酸化多糖体アスコフィランの生物活性に対する脱硫酸化反応の影響

Importance of sulfate levels for the immuno-stimulating activities of ascophyllan isolated from brown alga Ascophyllum nodosum

姜 澤東[1]、冲村 崇[2]、山口 健一[1]、○小田 達也[1] ([1]長崎大水、[2]林兼産業株式会社)
Zedong Jiang[1], Takasi Okimura[2], Kenichi Yamaguchi[1], ○Tatsuya Oda[1] ([1]Nagasaki Univ., [2]Hayashikane Sangyo Co., Ltd.)

[目的] 大型褐藻類 *Ascophyllan nodosum* から精製された硫酸化多糖体アスコフィランは U937 細胞に対するアポトシース誘導、MDCK 細胞に対する増殖促進、マウスマクロファージ株化細胞 RAW264.3 からの一酸化窒素 (NO) やサイトカン (TNF-α & G-CSF) の放出誘導活性、肉腫 (Sarcoma 180) 担癌マウスでの抗腫瘍効果など多彩な生物活性を示す。さらに最近の研究により、アスコフィランは RAW264.3 細胞からの活性酸素 (ROS) 放出誘導や静注後のマウス脾臓の NK (natural killer) 細胞活性の上昇作用を示す事も見出されている。アスコフィランはフコイダンと同様、硫酸化多糖体であるが、その糖組成及び全体構造は異なることが明らかにされている。フコイダンの構造 (分子サイズ、硫酸基レベルなど) と生物活性については、多くの報告があるが、アスコフィランに関してはほとんど研究例が無い。そこで、本研究では、アスコフィランの構造と生物活性に関する知見を得る目的で、化学修飾法 (ピリジニウム塩-ジメチルスルホキシド法) により、脱硫酸アスコフィラン (D-As) を調製し、その生物活性について元のアスコフィラン (N-As) と比較した。

[方法] アスコフィランの平均分子量は Sepharose-4B gel chromatography で測定した。糖組成は HPLC (GlyScope Honenpak C18 column) 法及び Carbazol-sulfuric acid 法で解析した。硫酸基含有率は Dodgson-Price method で測定した。アスコフィランの RAW264.7 細胞に対する NO、ROS、サイトカイン (TNF-α & G-CSF) 放出の誘導活性は Griess assay、NBT assay 及び ELISA 法で、それぞれ測定した。

[結果及び考察] N-As と D-As の平均分子量は約 393 kDa と 381 kDa と推定され、D-As は脱硫酸化反応においてほとんど分解されなかったことがわかった。D-As の糖組成については、N-As に比べて、フコースとキシロースの含有率が僅かに増加していたが、各単糖成分のモル比はフコース 1 レベルを 1 とした場合、N-As と D-As の単糖比率に大差無かった。一方、D-As の硫酸基レベルは N-As に比べ明らかに低下していた。N-As 及び D-As は濃度依存的 (0～100 μg/ml) に RAW264.7 細胞からの NO やサイトカイン (TNF-α 及び G-CSF) 放出を誘導したが、D-As は N-As に比べ低活性であった。特に、3～6 μg/ml の濃度範囲で、D-As は RAW264.7 細胞からの NO 放出を誘導しなかったが、N-As は強い誘導活性を示した。さらに、N-As は RAW264.7 細胞からの ROS 放出を濃度依存的 (0～100 μg/ml) に誘導したが、D-As の ROS 誘導活性も弱いことが分かった。以上の結果から、アスコフィランの生物活性発現に硫酸基レベルが重要な構造因子として関与していると推定された。

ascophyllan, desulfated ascophyllan, sulfate level

講演番号：2B20p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ B 校舎 20 会場

グルコマンナン由来オリゴ糖の構造解析と新規性能評価

New evaluation study of degradation products to oligosaccharides from konjac glucomannan

○亀谷 奎吾[1]、岡本 真由美[2]、岩井 修一[3]、竹本 克宏[3]、小堀 深[1]、清水 功雄[1] ([1]早大理、[2]早大理工研、[3](株)スイスロワール)
○Keigo Kametani[1], Mayumi Okamoto[2], Syuichi Iwai[3], Katsuhiro Takemoto[3], FUKASHI Kohori[1], Isao Shimizu[1] ([1]Waseda Univ., [2]Waseda Riko lab., [3]Swissrowal)

コンニャクグルコマンナンは、蒟蒻芋（*Amorphophallus Konjak*）より精製される水に可溶な非イオン性の多糖類である。その構造は、マンノースとグルコースを 1.6：1.0 の比で有し、糖鎖間はランダムに β-1,4 マンノシド結合している。これまでに、グルコマンナンにおいて 2－6 %の割合で、C-6 位の水酸基がアセチル化されており、塩基を加えることにより脱アセチル化が起こり、ゲル化が起きることも報告されている。その分子量は約 100 万から 200 万であるといわれている。本研究では、コンニャクグルコマンナンを菌体 *Paenibacillus pabuli* SW10 を用いて低粘性化した分解物の構造決定および新規機能性の評価を目的としている。培養時間ごとのグルコマンナン分解液の分子量測定を行い、それぞれの単離を行った。これまでの構造解析により分解物はオリゴ糖であるとされる。その糖鎖を蛍光標識後、分子篩カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより分子量を測定した。そして分解物を透析法により単離を実施し、単離物を MALDI TOF MASS 法にて分子量を確認した。以上の結果より得られた分解物の応用性が推察されたので、その詳細について報告する。

Konjac Glucomannan, Paenibacillus pabuli SW10, oligosaccharides

講演番号：2B20p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ B 校舎 20 会場

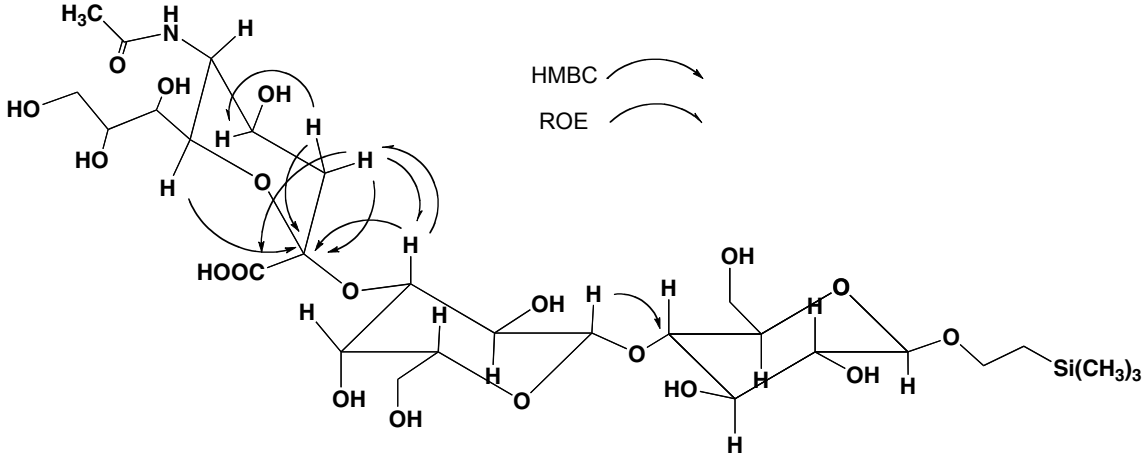
NMR による糖鎖の立体構造とダイナミックスの解析

NMR analyses of the conformation and dynamics of (sialo)glycans

○鵜澤 洵[1,2]、花島 慎弥[1]、関 宏子[2]、山口 芳樹[1] ([1]理研　糖鎖構造、[2]千葉大分析センター)
○Jun UZAWA[1,2], Shinya HANASHIMA[1], Hiroko SEKI[2], Yoshiki YAMAGUCHI[1] ([1]RIKEN Structural Glycobiology, [2]Chiba Univ. Chemical Analysis Center)

糖鎖の溶液 NMR による解析の特徴は、立体配座を含む詳細な情報に加えてダイナミクスに関する情報が得られることにある。演者らはすでにマンノースが 5 個結合した合成オリゴ糖鎖の立体構造とダイナミクスについて報告した[1)]。

今回はシアリルラクトース（Neu-5Acα2-3Galβ1-4Glcβ1-$(CH_2)_2$-Si-$(CH_3)_3$）を化学合成して二次元および一次元 NMR スペクトルより **^{1}H** および **^{13}C** の信号を帰属した。



一次元の NOE と ROE スペクトルを測定して立体構造に関する情報を得た。さらに、ダイナミクスに関する情報を得るために、温度可変による NOE 信号強度の違いを詳細に検討した。600 MHz においては ^{1}H 間の NOE がゼロになるのは相関時間が約 $1/10^{-10}$ のときであるが[2)]、この条件において NOE 信号強度は各糖残基によって異なっており、それぞれの運動のわずかな違いを検出したことになる。糖の結合様式（1-2,1-3,1-4,1-6 など、シアル酸の場合は 2-3, 2-6, 2-8 など）の違いによる微細な運動性の差異を NMR によって検出することが可能であると考えた。本発表では、温度・観測周波数を変化させた場合の NOE 信号強度の変化を詳細に解析した結果を報告する予定である。

参考文献

1. Y. Kubota, H. Hori, R. Sawa, H. Seki and J. Uzawa, *Magn. Reson. Chem.,* **50**, 659(2012).
2. R. Freeman, “Spin Choreography”, P-340, Oxford University Press, 1998.

Neu5Ac-Lactose, three dimensional structure, dynamic structure

講演番号：2B20p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ B 校舎 20 会場

ハリモグラタスマニア亜種のミルクオリゴ糖の構造解析

Characterization of oligosaccharides in milk of Tasmanian echidna

○浦島 匡[1]、関井 伸泰[1]、トーフィック エピ[2]、ダビエス ノエル[3]、福田 健二[1]、ニコル ステワルト[3]、オフテダル オラブ[4] ([1]帯広畜産大、[2]ボゴール農業大、[3]タスマニア大、[4]スミソニアン環境研)
○Tadasu URASHIMA[1], Nobuhiro SEKII[1], Epi TAUFIK[2], Noel DAVIES[3], Kenji FUKUDA[1], Stewart NICOL[3], Olav Oftedal[4] ([1]Obihiro Univ., [2]Bogor Agr. Univ., [3]Tasmania Univ., [4]Smithsonian Environ. Inst.)

哺乳動物は単孔類, 有袋類, 真獣類の 3 系統に分類され、その中で卵生の哺乳動物である単孔類はハリモグラ, カモノハシの 2 種から構成される。単孔類の乳では、多くの哺乳動物の場合とは異なりラクトースは少量で、ミルクオリゴ糖と呼ばれる還元末端側にラクトース単位を有し、それに N-アセチルグルコサミン, ガラクトース, フコース, シアル酸などが付加したオリゴ糖の方が存在量は多い。ハリモグラのミルクオリゴ糖については、これまでにカンガルー島ハリモグラ亜種についての研究例が 1 例あり、ジフコシルラクトース, 2'-フコシルラクトースの他、N-アセチルノイラミン酸の 4 位が O-アセチル化した 3'-シアリルラクトースが報告されている。今回、タスマニアハリモグラ亜種のミルクオリゴ糖を解析し、以前の分析例とは異なるパターンを明らかにしたので報告する。ホバート周辺のフィールドから採集された泌乳後期のタスマニアハリモグラの乳 5 ml から、4 倍量のクロロホルム/メタノール(2/1, v/v)抽出によって糖質画分をえ、ゲルろ過、グラファイトカーボンカラムを使用した HPLC によって各オリゴ糖を分離・精製し、1H-NMR に供して構造決定した。決定されたオリゴ糖は、4-O-acetylNeu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Glc, Gal(α1-3)[Fuc(α1-2)]Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]Glc （B５糖）, Gal(α1-3)[Fuc(α1-2)]Gal(β1-4)Glc （B４糖）ならびにラクトースだった。最大のオリゴ糖は B５糖であり、ラクトースは少量成分だった。

milk oligosaccharides, Tasmania echidna, monotremes

講演番号：2B20p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ B 校舎 20 会場

Analysis of the *N*-linked Cell Wall Glycans of *Malassezia furfur*, *Pseudozyma antarctica* and *Sympodiomycopsis pahiopedili* (Subphylum Ustilaginomycotina)

○Ronilo Jose Flores[1], Takao Ohashi[1], Kanae Sakai[2], Tohru Gonoi[2], Hiroko Kawasaki[3], Kazuhito Fujiyama[1] ([1]International Center for Biotechnology, Osaka University, Osaka, Japan, [2]Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan, [3]NITE Biological Resource Center (NBRC), National Institute of Technology and Evaluation (NITE), Chiba, Japan)

Malassezia furfur (Class Exobasidiomycetes), *Pseudozyma antarctica* (Class Ustilaginomycetes) and *Sympodiomycopsis pahiopedili* (Class Exobasidiomycetes) are basidiomycetous yeasts under the subphylum Ustilaginomycotina. Members of this subphylum are known as smut fungi which cause a number of diseases in both plants and animals. *Malassezia furfur,* even though part of the normal cutaneous microflora in warm blooded animals including humans, may become opportunistic and cause certain skin diseases such as dandruff, folliculitis, atopic dermatitis, and seborrheic dermatitis. *Pseudozyma antarctica* and *Sympodiomycopsis pahiopedili,* on the other hand, are found to be commensal organisms on several plant species. Recent advances in fungal taxonomy, however, have resulted in a number of proposed changes in its taxonomic groupings. This emphasizes the need to create a unified and more encompassing polyphasic taxonomy in basidiomycetous yeasts. The early stages of *N*-linked glycan biosynthetic pathway in yeast and other higher eukaryotes are considered to be evolutionarily conserved. Differences in the detailed terminal structures of glycans can potentially be used as an additional criterion for the study of fungal taxonomic grouping. In this study, the *N*-linked glycans from the cell wall of *M. furfur*, *P. antarctica* and *S. pahiopedili* were prepared by citrate buffer extraction followed by hydrazinolysis, *N*-acetylation and pyridylamination and were then structurally analyzed using HPLC and Mass Spectrometry. Size-fractionation HPLC revealed the presence of *N*-glycans ranging from $Man_3GlcNAc_2$ to $Man_9GlcNAc_2$ in size. Moreover, enzymatic analyses were carried out using α-1,2-mannosidase and jack bean α-mannosidase to identify the possible linkages between the residues within the glycan moiety. Mass spectrometry was conducted to confirm the composition of the peaks. Here we report the *N*-linked glycan structures of *M. furfur, P. antarctica* and *S. pahiopedili* and discuss their implications on the taxonomy of the representative species within the subphylum Ustilaginomycotina.

basidiomycetous yeast, *N*-linked glycan, Ustilaginomycotina

講演番号：2B20p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ B 校舎 20 会場

担子菌 *Agaricus bisporus* 由来エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ AB 遺伝子の発現系構築と発現酵素の性質

Functional expression of endo-β-*N*-acetylglucosaminidase AB gene from basidiomycete *Agaricus bisporus* and characterization of expressed enzyme.

○高橋 剛生 [1]、谷脇 聡 [1]、浜口 祐 [1]、Krusong Kuakarun[2]、Kaulpiboon Jarunee[3]、Limpaseni Tipaporn[2]、Pongsawasdi Piamsook[2]、伊藤 和央 [1] ([1]阪市大院・理、[2]チュラロンコン大・理、[3]タマサート大・医)

○ Go Takahashi[1], Satoshi Taniwaki[1], Tasuku Hamaguchi[1], Kuakarun Krusong[2], Jarunee Kaulpiboon[3], Tipaporn Limpaseni[2], Piamsook Pongsawasdi[2], Kazuo Ito[1] ([1]Grad. Sch. of Sci., Osaka City Univ., [2]Fac. of Sci., Chulalongkorn Univ., [3]Med. Sch. of Thammasat Univ.)

【目的】エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼは多くの担子菌で発現している。我々はこれまでに、担子菌 *Agaricus bisporus* の産生するエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ（エンド AB）を精製し、その特異性を明らかにするとともに、本酵素の遺伝子のクローニングを行い、一次構造上の特徴を明らかにしてきた。本酵素は、担子菌 *Flamulina velutipes* 由来のエンド FV とはアスパラギン結合型糖鎖に対する特異性や一次構造が異なり、GH ファミリー85 に属する酵素である。本研究では、エンド AB をコードする遺伝子の *E.coli* での発現系を構築し、発現した組換えエンド AB の精製と、その性質を調べた。

【方法】エンド AB の活性測定は、蛍光標識糖アスパラギンを基質とし、反応生成物を TLC によって分離し、蛍光デンシトメトリーによって定量した。クローニングしたエンド AB 遺伝子の発現系の構築は、pET21a をベクターとし、*E.coli* RosettaII(DE3)を用いて行った。発現した組換えエンド AB の精製は、各種カラムクロマトグラフィーを用いて行った。

【結果】組換えエンド AB は、*E.coli* 菌体中に可溶性酵素として発現した。精製した組換えエンド AB 標品は、SDS-PAGE で単一であった。本酵素は、RNase B から容易に糖鎖を遊離した。また、ヒトトランスフェリンやヒトラクトフェリンからも糖鎖を遊離した。さらに、オボアルブミンやウシフェツイン、ヒト α-1 酸性糖タンパク質への作用も認められた。このような結果から、*E.coli* で発現したエンド AB は、担子菌 *A.bisporus* で発現しているエンド AB と同様に、糖タンパク質からハイマンノース型糖鎖を容易に糖鎖を遊離するとともに、フコースの存在に関わらずコンプレックス型糖鎖も遊離することが明らかとなった。このため、組換えエンド AB は、糖タンパク質からアスパラギン結合型糖鎖を遊離するための有用酵素として期待できる。さらに、組換えエンド AB の分子量は、SDS-PAGE において、遺伝子から予想される分子量と同様の約 87000 で、ゲルろ過クロマトグラフィーでは約 530000 であり、組換えエンド AB は 6 量体のオリゴマー酵素と考えられた。一方、*A.bisporus* から得られたエンド AB は、分子量 44000 のサブユニットから成る 4 量体酵素である。このため、エンド AB は担子菌 *A.bisporus* において翻訳後にプロセシングを受けているものと考えられた。

endo-β-*N*-acetylglucosaminidase AB, *Agaricus bisporus*, endo AB

講演番号：2B20p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ B 校舎 20 会場

魚介類由来グリコサミノグリカンの含有量と繰返し二糖組成

Amounts and compositional analysis of glycosaminoglycans derived from fish

○田村 純一、藤田 裕之、問田 椋介、入江 有美、木戸口 望美、君野 大介、後藤 尚也、高田 博哉、中尾 康裕、王 恵、武田 尚子、有馬 和也（鳥取大地域環境）
○ Jun-ichi Tamura,Hiroyuki Fujita,Ryosuke Toita,Yumi Irie,Nozomi Kidoguchi,Daisuke Kimino,Naoya Goto,Hiroya Takada,Yasuhiro Nakao,Hui Wang,Naoko Takeda,Kazuya Arima (Tottori Univ.)

【目的】コンドロイチン硫酸(CS)やヒアルロン酸(HA)は、医薬品、健康食品、サプリメントとして注目されており、たいへん需要が高い。現在主に資源生物として利用されているサメやブタは、捕獲制限を受けたり感染症が危惧されるため、代替資源生物の探索が急務となっている。一方、CS や HA は動物にほぼ普遍的に存在しているが、生物や部位により組成や含有量に違いがあり、生物活性との関連は十分に明らかになっていない。今回、代替資源生物の探索を目的として、いくつかの魚介類について CS、 HA およびデルマタン硫酸(DS)の含有量と繰返し二糖の組成を分析したので報告する。

【方法と結果】対象となるいくつかの魚介類を部位別に粉砕し、有機溶媒による脱脂・乾燥後、酵素による除タンパクを行い、イオン交換樹脂と透析、ゲル濾過によって精製した。これらの精製糖鎖を、コンドロイチナーゼ ABC などの、いくつかの種類の異なる特異的糖鎖分解酵素により消化し、得られる不飽和二糖を HPLC で分析した。その結果、魚介類の種類と部位により、その繰返し二糖の組成と含有量が著しく異なることを明らかにした。

Chondroitin sulfate, Dermatan sulfate, Hyaluronic acid

講演番号：2B20p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ B 校舎 20 会場

ER α-glucosidase II のβサブユニットがグルコース切断に与える影響について

Effects of beta subunit of ER alpha-glucosidase II on glucose trimming

○武田 陽一[1]、瀬古 玲[1]、八須 匡和[1]、伊藤 幸成[1,2]（[1]JST, ERATO、[2]理研基幹研）
○Yoichi TAKEDA[1], Akira SEKO[1], Masakazu HACHISU[1], Yukishige ITO[1,2]（[1]JST, ERATO, [2]RIKEN, ASI）

「目的」
新生タンパク質は粗面小胞体内腔で $Glc_3Man_9GlcNAc_2$(G3M9)からなる糖鎖が付加され、様々なプロセシング酵素およびレクチンシャペロンの働きにより、正しい高次構造へと導かれる。このうち、ER α-Glucosidase II (G-II)は $Glc_2Man_9GlcNAc_2$(G2M9)に存在するα 1,3 結合の連続した 2 つのグルコース残基を順次切断する酵素である。G-II はαおよびβサブユニットからなるヘテロ２量体であり、活性部位はαサブユニットに存在している。一方、βサブユニットはマンノース 6-リン酸受容体相同(MRH)ドメインを有しており、MRH ドメインによる糖鎖の認識がグルコース切断に関わっていることが明らかになってきた[1]。我々も以前に *Aspergillus oryzae* のαおよびβサブユニット破壊株のミクロソーム画分を用いた実験により、βサブユニットが高マンノース型糖鎖のグルコース切断に必須であることを見出している[2]。しかしながら、αおよびβサブユニットリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* でのグルコシダーゼ活性の定量的な解析は行われていない。今回、我々は *A. oryzae* 由来の G-II αおよびβサブユニットを大腸菌リコンビナントタンパク質として調製することに成功した。そこで有機合成によって得たグルコシル化糖鎖を用いて反応の解析を行った。
「方法および結果」
蛍光官能基をアグリコンに導入した糖鎖 G2M9-Gly-BODIPY および G1M9-Gly-BODIPY を基質とし、G-IIαのグルコシダーゼ活性を評価した。次に G-IIβおよび MRH ドメインを添加して cleavage1 および 2 について反応性を比較した。その結果、αサブユニットだけではどちらに対しても不活性であったのに対し、βサブユニットを加えたところグルコースの切断が見られた。また、反応速度はβサブユニットの添加量依存的であった。一方、βサブユニットのうち MRH ドメインを含む部分領域を発現したタンパク質を添加しても活性は見られなかったことから、αおよびβサブユニットで安定な２量体を形成することで活性を発現することが見出された。さらにαおよびβサブユニットについて種々のアミノ酸置換体を作成し、両サブユニットの相互作用、および cleavage 1,2 に対する構造-機能相関について検討を行っており、その結果についても報告する予定である。

[1] Deprez et. al. Mol. Cell, **2005**, 19, 183; Hu et. al. Glycobiology, **2009** 19, 1127.
[2] Watanabe et. al. Glycobiology, **2009** 19, 834.

glucosidase II, MRH domain, high-mannose-type glycan

講演番号：2B20p11
講演日時、会場：3 月 25 日 16:00～ B 校舎 20 会場

疑似ミスフォールド糖タンパク質を用いた UGGT の機能解明

Mechanistic Analysis of UGGT by Using Misfolded Glycoprotein Mimics

○八須 匡和[1]、瀬古 玲[1]、大黒 周作[1]、武田 陽一[1]、小泉 晶彦[1]、藤川 紘樹[1]、迫野 昌文[1]、伊藤 幸成[1,2] ([1]JST・ERATO、[2]理研・基幹研)
○ Masakazu HACHISU[1], Akira SEKO[1], Shusaku DAIKOKU[1], Yoichi TAKEDA[1], Akihiko KOIZUMI[1], Kohki FUJIKAWA[1], Masafumi SAKONO[1], Yukishige ITO[1,2] ([1]JST ERATO, [2]RIKEN ASI)

【目的】UGGT (UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase) は小胞体内在性の糖転移酵素である。UGGT がミスフォールドした新生糖タンパク質を認識すると、その表面に存在する高マンノース型糖鎖の非還元末端にグルコースを転移する。モノグルコシル化された高マンノース型糖鎖は小胞体内のレクチン様分子シャペロンと高い親和性を有するため、これらシャペロンの作用によりミスフォールドした糖タンパク質のフォールディングが促進される。UGGT がミスフォールドした糖タンパク質のみを認識する“フォールディングセンサー”としての詳細な分子メカニズムは未だ解明されていない[1]。本研究では UGGT の基質となる糖タンパク質を人工的に種々調製し、その基質認識に関する構造-活性相関について検討を行う。

【方法及び結果】ミスフォールドしたタンパク質は、一般的に疎水性アミノ酸残基がタンパク質表面に露出していることから、UGGT の基質認識機構において、基質表面の疎水性ドメインが重要であると考えた。更に UGGT の基質となるためには、基質表面に高マンノース型糖鎖を有していなければならない。以上を考慮し、本研究では人工糖タンパク質モデルである “高マンノース (M9) - メトトレキセート (MTX) -ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR)” 複合体を利用した [2]。まずタンパク質表面にシステイン残基を一つのみ有する DHFR の変異体を各種調製し、システインの遊離チオール基を *N*-(1-pyrene)iodoacetamide を用いて化学修飾した。このようにして系統的に得られた DHFR 誘導体は、疎水性小分子であるピレンを位置特異的に表面に提示した疑似ミスフォールドタンパク質であるといえる。MTX の DHFR に対する強い親和性 (K_D < 1nM) を利用し、種々の DHFR 誘導体に対して M9-MTX を複合化させ、UGGT の基質となる疑似ミスフォールド糖タンパク質を調製した。これらの基質に対する UGGT のグルコース転移活性を測定し、基質上の高マンノース型糖鎖と疎水性分子との空間的な位置関係を調べることにより、UGGT の基質認識機構に関する考察を行った。

[1] Ito Y.; Takeda Y. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*. **2012**, *88*, 31.
[2] Totani, K; et al. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2005**, *44*, 7950.

ER quality control, UGGT, N-glycan

講演番号：2B20p12
講演日時、会場：3 月 25 日 16:12～ B 校舎 20 会場

糖鎖付加タグの付加による糖タンパク質分泌への影響

Effects on secretion of glycoproteins by the addition of glycosylation tag

○高島 晶、天野 純子（野口研・糖鎖生物）
○Shou Takashima,Junko Amano (The Noguchi Inst.)

【目的】糖タンパク質の糖鎖には、タンパク質のフォールディングや安定化、機能発現などにおいて重要な役割を果たすものがある。糖タンパク質製剤等の生産では、このような機能性糖鎖を効率よく付加させたり、糖鎖の数を調節することによって、活性、安定性、生産性などの向上をはかることが検討されてきている。以前に我々は、糖タンパク質糖鎖の付加状況を制御する手法を開発するために、*N*-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列(NXS/T)を含むペプチドタグ（糖鎖付加タグ）をヒトインターロイキン-6 の C 末端に付加したところ、その分泌生産が向上することを見出した。そこで今回、こうしたタグ付加が他のタンパク質の分泌生産の向上にも効果があるのかを検討した。
【方法および結果】各種糖タンパク質に糖鎖付加タグを連結したものを培養細胞で発現させ、その糖鎖付加状況や分泌生産量を調べた。その結果、Neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) やキモトリプシン C 変異体(N52S)など一部のタンパク質では、C 末端へのタグ付加によって、分泌生産向上の効果が認められた。しかし、タグを N 末端に付加した場合では、タンパク質の分泌が阻害された。また、タンパク質によっては、C 末端へのタグ付加でも却って分泌が阻害される場合があった。現在、タグ付加による分泌促進メカニズムの詳細を解析中であるが、このようなタグ付加は、一部のタンパク質の分泌生産増大に利用できる可能性があり、組換えタンパク質生産の強力なツールになるかもしれない。

glycosylation, secretion, glycoprotein

講演番号：2B20p13
講演日時、会場：3 月 25 日 16:24～ B 校舎 20 会場

合成糖鎖基質を用いたカルネキシンおよびカルメギンのシャペロン活性の比較

Comparison of chaperone activity between calnexin and calmegin with synthetic glycan substrates

○迫野 昌文[1]、瀬古 玲[1]、武田 陽一[1]、八須 匡和[1]、小泉 晶彦[1]、藤川 紘樹[1]、伊藤 幸成[1,2]([1]JST ERATO、[2]理研　基幹研)
○ Masafumi SAKONO[1], Akira SEKO[1], Yoichi TAKEDA[1], Masakazu HACHISU[1], Akihiko KOIZUMI[1], Kohki FUJIKAWA[1], Yukishige ITO[1,2] ([1]JST ERATO, [2]RIKEN ASI)

【目的】糖タンパク質の産生において、小胞体内在性レクチン様分子シャペロンであるカルネキシン(CNX)・カルレティキュリンを中心とした品質管理機構が重要な役割を果たしている。同様に、精巣において、カルメギン(CMG)・カルスペリンによる、受精に関与するタンパク質の品質管理が行われている。CNX と CMG は、配列相同性の高さから類似した特性を有することが推察されているが、十分な比較検討は行われていない。我々はこれまでに、小胞体におけるタンパク質品質管理に関わる様々なタンパク質の機能を、蛍光分子などの疎水性分子をアグリコンとした高マンノース型糖鎖プローブを用いることで明らかにすることに成功した 1)。そこで、本研究では、合成糖鎖プローブおよび凝集性タンパク質等を用いて、ヒト由来 CNX と CMG の機能特性を比較検討した。
【方法】蛍光性化合物およびベンジルオキシカルボニル基をコンジュゲートした高マンノース型糖鎖を作製し、それぞれをシャペロンの基質として用いた。ヒト CMG,CNX は、大腸菌を用いた大量発現により取得した。タンパク質の熱凝集にともなう濁度変化を、蛍光分光測定器を用いて測定した。シャペロンと基質の相互作用の割合は、複合体と未反応の基質を限外ろ過により分離し、HPLC により未反応基質濃度の測定を行うことで求めた。
【結果および考察】シャペロン活性を検討するために、糖鎖を有しない熱凝集性タンパク質 carbonic anhydrase B を用いて凝集抑制実験を行った。その結果、どちらも熱凝集を効果的に抑制したことから、レクチン活性に依存しないシャペロン活性を同程度有することが示された。次に、様々な糖鎖構造のプローブを用いてレクチン活性を検討した。どちらもグルコースが 1 つ結合した G1M9 糖鎖と相互作用し、CMG の相互作用は CNX よりも弱いことが明らかになった。また、それぞれの分子シャペロンと基質の相互作用の比較を行った。CNX,CMG ともに、G1M9-Bodipy に対して、濃度依存的な会合を示すことが明らかになった。一方、G1M9-CBZ を共存して同じ実験を行ったところ、CNX と G1M9-Bodipy の会合の割合はほとんど変わらなかったのに対して、CMG は大きく阻害される結果となった。この結果から、基質との会合において、CNX はアグリコンの構造に比較的強く影響されるのに対し、CMG はアグリコン構造に対する特異性を大きく示さない事が明らかにされた。
【参考文献】1) M. Sakono, A. Seko, Y. Takeda, M. Hachisu, and Y. Ito, Biochemical and Biophysical Research Communications, 426 (2012) 504-510.

molecular chaperone, lectin, N-linked glycan

講演番号：2B20p14
講演日時、会場：3 月 25 日 16:36～ B 校舎 20 会場

出芽酵母におけるシアル酸含有ムチン型糖タンパク質の生産
Engineering of Sialylated Mucin-type O-glycan in Yeast Cell
杜 東寧[1]、久野 敦[1]、梶 裕之[1]、成松 久[1]、○千葉 靖典[2] ([1]産総研・糖鎖医、[2]産総研・生物プロセス)
Dongning Du[1], Atsushi Kuno[1], Hiroyuki Kaji[1], Hisashi Narimatsu[1], ○Yasunori Chiba[2] ([1]AIST, [2]AIST)

ムチン型糖鎖は生体内に豊富に存在している糖鎖であり、細胞のがん化によりその構造が大きく変化し、がん特異的抗原となることからも注目されている糖鎖である。特にムチンの末端に存在するシアル酸の変化は、生物学的に重要な機能を担っていると予測される。当研究室では以前より医療応用を目的とした酵母でのヒト型（ムチン型を含む）糖鎖生産に取組んできた。本発表では、シアル酸含有ムチン型糖タンパク質の生産を報告する。

これまでに、UDP-Gal/GalNAc 4-epimerase、UDP-GalNAc/UDP-Gal トランスポーター、ヒト ppGalNAc-T などのムチン型糖鎖生合成関連遺伝子を出芽酵母細胞に導入し、*in vivo* で *O*-GalNAc あるいはコア 1 構造を生産する酵母株の育種に成功した。また酵母細胞内に CMP-シアル酸の生合成に必要な 4 つの遺伝子を導入することで菌体内に CMP-シアル酸を蓄積させることに成功している。今回は、CMP-シアル酸を生合成する haploid の酵母株に、シアル酸の付加に必要なシアル酸糖転移酵素及びシアル酸トランスポーターを遺伝子工学的手法により導入し、更に *O*-GalNAc あるいはコア 1 構造を生産する haploid 株と接合して diploid 株を取得した。この diploid 株を用いて MUC1 の部分断片ペプチドを生産し、付加した His タグによる精製を行った。HPLC 上での保持時間を比較したところ、*in vitro* で合成したシアリルコア 1 型糖ペプチドと同じ保持時間を有する糖ペプチドのピークが確認された。またレクチンアレイ、MS 解析等の結果からも、ペプチドにシアリルコア 1 型糖鎖が付加されたことが確認された。この株を用い有用糖タンパク質を発現することで、ムチン型糖鎖の機能解析のみならず、糖鎖バイオマーカーの検出系やシアル酸付加糖タンパク質医薬品の酵母細胞内での生産が期待される。

sialylation, mucin-type protein, yeast

講演番号：2C31a04
講演日時、会場：3 月 25 日 09:36～ C 校舎 31 会場

超臨界流体クロマトグラフ-Orbitrap 質量分析計を用いた農薬一斉分析法の開発

Simultaneous analysis of pesticides by supercritical fluid chromatograph-Orbitrap spectrometer

石橋 愛実[1]、酒井 美穂[2]、安藤 孝[2]、濱坂 友子[3]、坂本 茂[3]、福崎 英一郎[1]、○馬場 健史[1]([1]阪大院・工・生命先端、[2]宮崎農試、[3]サーモフィッシャーサイエンティフィック)
Ishibashi Megumi[1], Miho Sakai[2], Takashi Ando[2], Tomoko Hamasaka[3], Shigeru Sakamoto[3], Eiichiro Fukusaki[1], ○Takeshi Bamba[1] ([1]Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Miyazaki Agri. Res. Inst., [3]Thermo Fisher Scientific)

2003 年のポジティブリスト制度の導入により，食品中に残留する農薬，動物用医薬品等の分析対象成分が約 280 から約 800 成分に急増した．これまでの残留農薬分析システムは，対象成分の多様な化学的性質に対応するため，ガスクロマトグラフィー質量分析(GC/MS)や液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS)など複数の分析系を併用することにより実施されている．しかし，複数手法の併用は，システムの堅牢性のみならず，スループットやコスト面で問題となる．そこで我々は，単一手法よる分析システムの開発を目的として超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)の適用を試みた．SFC は，温度や背圧を変化，すなわち，移動相の状態を変化させることにより GC や HPLC にない幅広い分離モードを選択でき，高流速分析においても高い分離能を保つという特徴を有する．また，超臨界流体二酸化炭素はヘキサン程度の低極性とされるが，極性溶媒の添加により移動相の溶出力を大幅に変化させることが可能であるため，様々な極性と分子量をもつ農薬化合物群のハイスループット一斉分離に有用である．これまでに，タンデム型質量分析計を接続した SFC/MS/MS システムを用いて，オクタノール／水分配係数（logPow=-4.6～7.05），分子量（112～888）の範囲で選択した様々な化学構造を有する農薬標準品 17 種の迅速一斉に分析系の構築に成功している[1)]．本研究では農薬分析における SFC/MS のさらなる拡張性を検討することを目的として，精密質量の測定が可能なベンチトップ型 Orbitrap 質量分析計（Q Exactive）を SFC に接続したシステムを用いて，厚生労働省通知一斉試験法（GC/MS, LC/MS I, II）対象の 287 種の農薬化合物の一斉分析系の構築を試みた．

SFC および MS の各種分析条件の検討を行った結果，SFC-Orbitrap MS のシステムにより 271 種の農薬を 13 分以内の短時間で一斉に分析することが可能になった．ポジティブモードとネガティブモードの切り替えを用いた分析を行うことにより，一測定で数多くの化合物が検出できた．また，*m/z* が近接したアイソバリックな化合物においても，7 万の高い分解能により分離が可能であった．本研究において，通常 GC/MS および LC/MS により分析されている厚生労働省通知一斉試験法の対象農薬のほとんどが SFC/MS 一台で分析できたことにより，SFC/MS の残留農薬分析におけるさらなる有用性が示された．

1) Ishibashi, et al., *J. Chromatogr. A*, **1266**, 143 (2012)

pesticide, supercritical fluid chromatography, mass spectrometry

講演番号：2C31a05
講演日時、会場：3 月 25 日 09:48～ C 校舎 31 会場

^{1}H-NMR による血液透析メタボロミクス-その１-代謝物ピーク分離定量の新手法

^{1}H-NMR Metabolomics of Hemodialysis-Part I-Novel Method for Quantification of Metabolites

○新川 隆朗[1]、藤原 正子[1]、安藤 一郎[1]、今井 潤[1]、佐藤 博[1]、竹内 和久[1,2]、高橋 征三[1] ([1]東北大院薬、[2](医)宏人会中央クリニック)

○TAKAO SHINKAWA[1], MASAKO FUJIWARA[1], ITIRO ANDO[1], YUTAKA IMAI[1], HIROSHI SATO[1], KAZUHISA TAKEUCHI[1,2], SEIZO TAKAHASHI[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Koujinkai Hemodialysis Central Clinic)

[背景] ^{1}H-NMR を用いたメタボロミクスの医療応用としてわれわれは、透析治療を標的として研究してきた。透析廃液の多検体 NMR 測定により得たスペクトルを、パターン認識法を用いて解析してきた。

しかし透析液の構成成分である glucose のピークは、^{1}H-NMR スペクトルにおいて 3.2-5.3 ppm という広範囲にわたって出現しピーク強度も強い。そのため glucose ピークに隠れた微量代謝物の検出は従来困難であった。

NMR 以外のスペクトル解析で用いられる関数近似法などのピーク分離法では、主に下記の問題等により、十分な精度で、代謝物を分離、定量することができなかった。

① ピークが重なる場合に、選択する関数に依存してパラメータが変動すること
② ベースラインの客観的評価方法が確立されていないこと
③ 各代謝物のライン・シェープが、NMR 測定時の装置状態等により一意的に決まらないこと

[目的と方法] 上記の問題を克服するために、NMR の特徴を用いた全く新しい定量法を提案する。

通常 NMR 装置により核磁気共鳴現象により FID (Free Induction Decay) と呼ばれる時間とともに減衰する電磁波を得て、FID 信号をフーリェ変換することにより、NMR スペクトルを得る。本手法では、１つの FID 信号を逐次時間をずらし、2 次元の時間軸上に展開することにより、恣意的なパラメータを使わずに周波数分離能を向上させた形にして複数代謝物のピーク分離を行う。

透析廃液の ^{1}H-NMR スペクトルに対し、本方法を適用することにより、glucose のピークと重なった微量代謝物のピーク分離を試みた。

NMR Metabolomics, Hemodialysis, Peak Separation

講演番号：2C31a06
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ C 校舎 31 会場

^{1}H-NMR による血液透析メタボロミクス-その２-患者代謝応答の観察

^{1}H-NMR Metabolomics of Hemodialysis-Part II-Metabolic Respenses of Patients

○藤原 正子[1]、安藤 一郎[1]、佐藤 博[1]、竹内 和久[1,2]、今井 潤[1] ([1]東北大院薬、[2](医)宏人会中央クリニック)

○Masako FUJIWARA[1], Itiro ANDO[1], Hiroshi SATO[1], Kazuhisa TAKEUCHI[1,2], Yutaka IMAI[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Koujinkai Hemodialysis Central Clinic)

[背景] 最近透析患者が年々増加している。なかでも糖尿病（DM）を原疾患とする末期腎不全患者の増加が著しい。DM 透析患者の予後は極めて不良であり、透析患者全体の予後の伸びを頭打ちにしている主要因となっている。

人工腎臓は単なるふるいであり、生体腎臓のような選択性を有しないため、老廃物とともにも血中濃度を常に保たなければならない分子についても区別なく排出している。クレアチニンを代表とする老廃物の血中濃度は透析時間に従い単調減少し、通常 4 時間の透析で透析前の 1/3 程度に低下する。透析間隔は 2～3 日であるので蓄積速度の 10 倍以上の排出速度である。透析廃液中には正常血中濃度に見あう濃度のグルコースが配合され透析中に血糖値が下がらないよう工夫されているが、血中濃度を保つべきエネルギー代謝など関連する分子についての考慮はされていない。急激に体外に排出したこれらの分子を補うために生体はこれを補償する代謝応答をしている。

[目的] 我々は上記に着目し、DM 患者と非 DM 患者の代謝応答を詳細に観察し比較した。

[方法] 分析は^{1}H-NMR 一斉定量分析法を用いた。NMR 測定においてプロトン感度は分子の違いによらず一定であるので、分離手段を介さずに混合物のまま分析し、単一標準試料を添加するだけで種類の異なる分子を同時に定量することが可能である。また、透析廃液の分析から透析中の代謝物血中濃度を推定できることを既に確認している。

[結果] 老廃物の血中濃度変化は患者および原疾患によらず殆ど同じパターンで単調減少していくが、驚くべきことには透析中に血中から排出しているにもかかわらず逆に増加する分子があることが分かった。このような代謝応答は各患者固有のパターンが存在することが明らかになった。また、DM 患者は TCA 回路に直接関連する分子に関する代謝応答反応が減弱しているという特徴を持つことも新たに分かった。

NMR Metabolomics, Hemodialysis, Response

講演番号：2C31a07
講演日時、会場：3 月 25 日 10:12～ C 校舎 31 会場

培養可能な LDI 質量分析プレートの開発研究

Study of culture plate applicable to laser desorption/ionization mass spectrometry

○常盤野 哲生[1]、伊藤 一志[2]、吉澤 結子[1] ([1]秋田県大生資科、[2]秋田県大システム科技)
○Tetsuo TOKIWANO[1], Kazushi ITO[2], Yuko YOSHIZAWA[1] ([1]Akita Pref. Univ., [2]Akita Pref. Univ.)

【背景】

本研究グループでは、シリコーンポリマー／カーボンナノチューブ複合素材を用いた細胞培養容器を開発している。本複合素材は柔軟性に優れ、細胞の接着性および増殖性を向上させることが明らかになっている。このような細胞容器に吸着した生体物質を直接化学分析できれば、プロテオーム・メタボローム解析への応用が期待できる。複合素材に使用しているカーボンナノチューブは、近年、レーザー脱離イオン化質量分析（LDI-MS）のマトリックスとなることが多数報告されており、表面支援レーザー脱離イオン化法（SALDI）のプレート素材としての研究開発もなされている。シリコーンポリマーは非電導性であり通常は LDI に適さないが、 複合素材ではカーボンナノチューブが電導性を付与しイオン化促進に働く可能性がある。以上を背景に、本複合素材の SALDI プレート利用を目的として研究に着手した。

【方法】

ポリジメチルシロキサン（PDMS）を硬化剤と混合し、ウェルプレートへ分注した後に加熱硬化させて薄膜とした。カーボンナノチューブ懸濁液を PDMS 膜表面に塗布して複合素材を作製した。この複合素材上に種々の化合物溶液を供し、LDI-TOF-MS 装置により質量分析を行なった。

【結果】

複合素材を浸漬した化合物水溶液の濃度変化により、素材表面への化合物の吸着が確認された。LDI 質量分析の結果、PDMS のみの対照実験では化合物のイオンピークは全く検出されなかったが、カーボンナノチューブとの複合素材では、他のマトリックスを塗布することなく各化合物の分子イオンが観測された。化合物は脂肪酸、トリグリセリドの他、ポリフェノール配糖体やペプチドの測定も可能であった。さらに吸着化合物のイメージング解析にも利用できることが示唆された。

LDI-MS, polydimethylsiloxane, carbon nanotube

講演番号：2C31a08
講演日時、会場：3 月 25 日 10:24～ C 校舎 31 会場

質量分析イメージングを用いたトマト果実における代謝物分布の可視化

Visualization of metabolites distribution in the tomato fruits tissue using mass spectrometry imaging

○中村 純也[1]、加来 麻衣子[2]、藤村 由紀[2]、高橋 勝利[3]、三浦 大典[2]、割石 博之[4] ([1]九州大学院生資環、[2]九大レドックスナビ、[3]産総研、[4]九大基教)
○Junya NAKAMURA[1], Maiko KAKU[2], Yoshinori FUJIMURA[2], Katsutoshi Takahashi[3], Daisuke MIURA[2], Hiroyuki WARIISHI[4] ([1]Grad. Sch. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]ICMRN, Kyushu Univ., [3]AIST, [4]Fac. Arts and Sci., Kyushu Univ.)

ゲノム情報の最終表現型である代謝物の網羅的な分析・解析を行うメタボロミクス研究が盛んに行われている。一般にメタボロミクス研究では LC-MS や GC-MS などの分析法が広く用いられているが、これらの手法は広範囲な測定対象化合物を分析可能という点で優れている反面、サンプルから代謝物の抽出を必要とするため、組織・器官を有する高等生物では代謝物の空間分布情報が失われるという欠点がある。より詳細な生命現象を理解するには、各組織内における局所的な生体反応を解明する必要があり、生体分子の組織内分布情報を解析することが重要になると考えられる。近年、生体分子の *in situ* マッピング法として、マトリックス支援型レーザー脱離イオン化（MALDI）法を用いた質量分析イメージング（MSI）技術が開発されている。当研究室ではこれまでに MALDI-MSI を用いて、ラット脳組織に対し、世界初の単一細胞内代謝物検出感度でのメタボローム時系列イメージングに成功し、生体組織微小領域における代謝動態を明らかにした[1)]。

本研究では、植物組織や組織内部位ごとの機能や形態の違いを代謝物レベルで明らかにし、環境応答の制御機構を理解することを目的として、トマト果実の果皮や胎座およびゼリー質など各部を MALDI-MSI による分析を開始した。サンプル作製法を検討した結果、10 μm 厚薄切片をステンレス製サンプルプレートに貼付し、マトリックスとして 9-aminoacridine をスプレーコーティング法にて塗付（450 μL, 5 mg/mL MeOH）することで、MALDI-MSI 分析により様々な代謝物由来ピークを検出することに成功した。さらに、得られたピークを MS/MS 分析より同定を行った。その結果、複数の代謝物を同定することに成功し、果皮や胎座などの果実内各部位において中央代謝系やエネルギー代謝に関わる代謝物分布の可視化に成功した。

[1)] Miura D. *et al.* (2010) Ultrahighly sensitive in situ metabolomics imaging for visualizing spatiotemporal metabolic behaviours. *Anal. Chem.* **82** : 9789 - 9796

Metabolomics, Mass spectrometry imaging, Tomato fruits tissue

講演番号：2C31a09
講演日時、会場：3 月 25 日 10:36～ C 校舎 31 会場

IMS を用いた混合香気系の香りを分析する試み
Pereliminary study on complex aroma analysis using IMS
○藤森 嶺[1]、曽 少豊[1]、妙田 貴生[1]、戸枝 一喜[1]、西澤 信[1]、西村 敬子[2] ([1]東京農大生物産業・食香、[2]ヤナコ計測)
○ Takane FUJIMORI[1], Shaofeng TSENG[1], Takao MYODA[1], Kazuki TOEDA[1], Makoto NISHIZAWA[1], Keiko NISHIMURA[2] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Yanaco co.)

【背景・目的】ワインや緑茶などは多くの香気成分の混合香気により芳香が形成されており、特徴的な少数の香気成分のみで全体の香りを表現することは難しい。したがってそれらの香気分析を行なう場合も香気の全体像を見ることは断念して、香気成分抽出物の中から AEDA 法を使うなどして極微量の特徴香気成分を発見することに力が入れられることになる。また、香気分析の手法としても GC/MS 分析をやりやすいように抽出・分画をしていく。私たちはワインと緑茶の香気について、出来る限り本来の香りの全体像を損なうことなく香気成分解析をすることをめざして、GC/MS 分析結果と比較しながら IMS（気相移動度測定）による香気解析を試みた。

【材料・方法】ワインの香気分析には北海道産（2010 年）ケルナー、リースリング、トロリンガーおよびドイツ産ケルナー（2010 年）を用いた。緑茶は 2012 年日本産八女茶、宇治茶、狭山茶、知覧茶と台湾産高山茶を用いた。それぞれの適切な温度で 90 秒間熱湯（40 ml）抽出し、各お茶から 5 ml を用いて GC/MS 分析を行い、比較した。GC/MS 分析は （GC) Agilent 7890A 及び （MSD） Agilent 5975C を用いた。カラムは DB-Wax 30m×0.25mm×0.25μm を用いた。GC-O 法により香気の特徴を捉え、AEDA 法による重要香気成分の選び出しを行なった。また主成分分析において、Alpha M.O.S の αFOX 4000 を使用した。
IMS 分析はＧＡＳ社 FlavourSpec（ヤナコ計測）を用い、分離手段としては標準装備の Multi capillary column を使用した。

【結果・考察】ワインについては GC/MS の結果からは主要香気成分の量比が近似しているために 3 種の違いはほとんど見られず、GC-O, AEDA の結果からは cis-3-ヘキセノール、オクタン酸エチル、酢酸、リナロール、酪酸とこはく酸ジエチルなどが重要香気成分であるとされた。一方、IMS 測定では 3 種の中では母親株であるリースリングに香気成分が多種類存在していることが見られ、ケルナーとの類似性が父親株であるトロリンガーより大きいことが分かり、香気の全体像の相違を知るためには IMS の方が GC/MS より優れていると考えられた。また、緑茶において、高山茶と八女茶での IMS の結果からは高山茶の方が香気成分数が多く観測されたが、これは GC/MS の分析結果でも支持された。香気成分の全体像を比較するには明らかに IMS の方が相違を判別しやすかった。

IMS, wine aroma, tea aroma

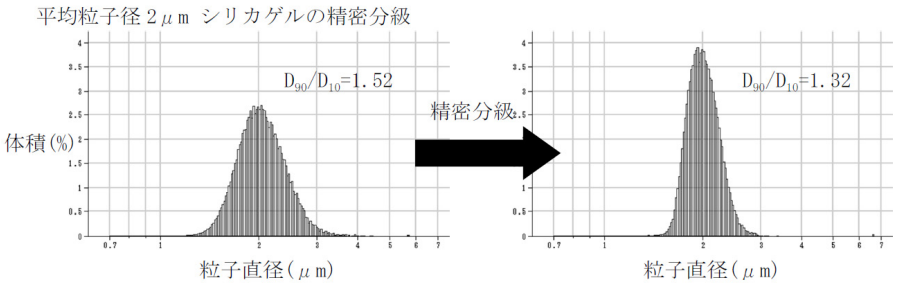
講演番号：2C31a10
講演日時、会場：3 月 25 日 10:48～ C 校舎 31 会場

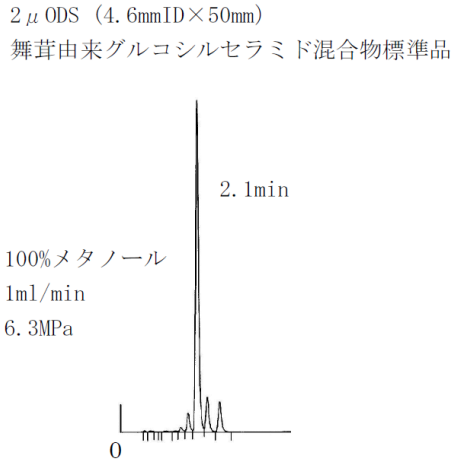
瞬速 2μmODS シリカゲルの HPLC 充填カラムの開発
Development of the 2micro meter HPLC packed column

○中塚 進一、植地 妙子（長良サイエンス株式会社）
○shinichi Nakatsuka,Taeko UEJI (Nagara Science Co., Ltd.)

目的）HPLC等のクロマトグラフィーに用いる充填剤は、その粒度分布により使用圧力や分離性能が大きく影響されることが知られている。弊社では独自の分級（粒揃え）技術を開発して低圧で使用可能なシリカゲル系充填剤の開発を試みた。

方法及び結果）目詰まりの原因となる微粒子と分離能低下の原因となる粗大粒子をカットする精密分級を行なった充填剤をHPLC用ステンレスカラムに充填してその分離性能を比較した。一般的に使用されている市販の平均粒子径2μmの球形シリカゲルを精密分級すると高分離能で使用圧力が20%以上低くなり、長寿命の充填カラムを開発できた。
その結果、超高圧（～1000 気圧）が必須とされてきた2μmODS シリカゲルの充填カラム（4.6mmID×50mm）が、通常のHPLC 装置で200 気圧程度で、約3分で分析・分取（数mg）できることがわかった。また、高価な超高圧 UHPLC 装置を用いることなく分析条件の検討や多検体の分析を極めて効率的に行なうことができることが分かった。





HPLC packed column

講演番号：2C31a11
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ C 校舎 31 会場

モノリスカラムを用いた共存プロテオーム解析

Comprehensive and mixed proteome analysis with long monolithic columns

○北原 奈緒、森坂 裕信、青木 航、黒田 浩一、植田 充美（京大院・農・応用生命）
○Nao KITAHARA,Hironobu Morisaka,Aoki Wataru,Kuroda Kouichi,Ueda Mitsuyoshi (Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

【背景と目的】

プロテオーム研究においては、生体試料由来の複雑なサンプルを網羅的に分離する手法として、ショットガン法を筆頭に様々な解析結果が報告されている。LC/MS/MS とゲル電気泳動による徹底的な分画（417 分画）によって、酵母細胞から 4399 種のタンパク質を特定したプロテオーム解析が報告された[1]。これは、ゲルからの抽出と切り出し後のペプチド断片化による、網羅的なタンパク質分析の可能性を初めて示した例であるが、分析時間、検出感度等、実用に向けての課題はまだまだ多い。そこで、質量分析の前段階であるクロマトグラフィー分離に着目し、超高性能分離媒体であるモノリスカラムの開発を背景に、プロテオーム解析システムへの適用を検討した。一方、自然界ではほとんどの生物は共存関係にあり、できる限り精製作業を行わず、自然のまま測定する意義は大きい。現在のプロテオーム解析では、生物や細胞の単離、試料の前処理・精製が必要となり、共存状態(複数種の生物)を対象にすることが困難で、単一種に絞らざるを得ない。そこで、本研究では、超高性能分析技術を背景とし、生物を自然のまま、複数種を同時に測定する共存状態のプロテオーム解析を検討した。

【方法と結果】

本研究では、モノリスカラムの超高性能分離により、前処理(アフィニティー精製等)の必要がなく、網羅的な解析が可能な LC/MS/MS [2]によるプロテオーム解析を行なった。共存状態のモデル系としては、カンジダ症の主病原真菌 *C. albicans* とマウス由来マクロファージの共培養系を用いた。この系からタンパク質群を一斉抽出し、本システムによりタンパク質を同定した結果、共存生物種分離も可能となったので、まとめて報告する[3]。

[1] M. Mann *et al*, Nature 455, 1251-1254 (2008)
[2] H. Morisaka *et al,* AMB express, 2, e37 (2012)
[3] N. Kitahara *et al,* submitted,

Proteome analysis, Monolithic column, *Candida albicans*

講演番号：2C31a12
講演日時、会場：3 月 25 日 11:12～ C 校舎 31 会場

NIRS を用いた客観的味覚評価技術の開発（１）基本味の計測
Development of the objective taste evaluation method by Near-Infrared Spectroscopy (1). Measurement of salivary hemodynamic responses to basic tastes.
○間宮 幹士[1]、星 朱香[1]、青木 宗一郎[1]、三浦 裕[2]([1]キリン（株）基盤技術研究所、[2]キリン（株）健康技術研究所)
○Kanji MAMIYA[1], Ayaka HOSHI[1], Souichirou AOKI[1], Yutaka MIURA[2] ([1]Central Laboratories for Key Technologies, [2]Research Laboratories for Health Science & Food Technologies)

【背景・目的】
飲料や食品の味覚特性を評価する際、ヒトの感覚を用いて評価する官能評価法が多く用いられている。ヒトの感覚に依存する官能評価法は高感度である一方、被験者の嗜好性や経験が影響して主観的な評価になる点や、被験者間のレベルを合わせるためにトレーニングが必要であり、そのために時間と労力がかかる点等、課題も多い。従って、客観的指標を用いて精度良く評価できる、汎用性の高い味覚評価法の開発が求められている。また、唾液腺の血流は、味覚刺激の強度に比例して反射的に変動することが示されており、客観的な評価指標となる可能性が高い。以上の背景より、唾液腺（耳下腺）の血流変動を近赤外線分光法（NIRS）で測定し、新規な客観的味覚評価系を構築することを本研究の目的とした。
【方法・結果】
これまでに、こめかみ部において耳下腺の血流変動を測定できることが示されていることから、耳下腺専用の NIRS 装置を特注し、本研究に使用した。基本味における耳下腺の応答特性を調べるため、NIRS 計測ならびに官能評価を行った。用いた基本味は、甘味（スクロース）、旨味（グルタミン酸ナトリウム）、苦味（カフェイン）、塩味（塩化ナトリウム）、酸味（クエン酸）とし、各 3 つの味強度試験区（Low、Middle、High）を設定した。官能評価は、味強度（0～10 スケール）ならびに快不快度（-5～5 スケール）の 2 項目で評価し、NIRS 計測は、基本味ごとに試験を実施した。官能評価の結果、全ての味質で、濃度依存的な味強度の上昇が見られた。また、甘味刺激は快情動を誘導したが、旨味、苦味、塩味刺激では、不快情動を誘導した。酸味刺激は、快・不快情動の誘導に被験者間で差が見られた。一方、NIRS 計測では、酸味でのみ濃度依存的な耳下腺血流の増加が認められたが、他の味質においては認められなかったことから、味質に対する計測能が異なることが明らかとなった。また、耳下腺の唾液分泌量を測定したところ、酸味でのみ濃度依存的な耳下腺唾液分泌量の有意な増加が見られたが、他の味質では見られず、NIRS の計測結果と完全に一致するものだった。以上の結果より、NIRS で測定される耳下腺応答は、酸味刺激に特異的な応答であり、酸味の客観的評価法として有用であることが示唆された。また、この応答は快不快情動に左右されないことから、ヒトの嗜好性に依存されない、より客観的な味覚評価法といえる。

NIRS, Method, Basic taste

講演番号：2C31a13
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ C 校舎 31 会場

NIRS を用いた客観的味覚評価技術の開発（２） 酸味抑制効果の計測
Development of the objective taste evaluation method by Near-Infrared Spectroscopy (2): Measurement of the acid taste suppression effect.
○星 朱香[1]、青木 宗一郎[1]、河野 惠美[2]、小笠原 正志[2]、尾中 考[2]、間宮 幹士[1] ([1]キリン（株）基盤技術研究所、[2]キリン協和フーズ（株）食品開発研究所)
○Ayaka HOSHI[1], Souichirou AOKI[1], Emi KOUNO[2], Masashi OGASAWARA[2], Takashi ONAKA[2], Kanji MAMIYA[1] ([1]Central Laboratories for Key Technologies, Kirin Co. Ltd., [2]Food Research and Development Laboratory, Kirin Kyouwa Foods Co. Ltd.)

【背景・目的】
飲料や食品に含まれる新規な味覚素材や複雑味の味覚特性を評価する場合、官能評価法が多く用いられている。官能評価法は高感度である一方、被験者間の感度を合わせるためのトレーニングが必要であることから、その実施までに多くの時間と労力を要する。また、新規な味覚素材や複雑味の味覚特性に関する官能評価の客観性を高めるためには、別のアプローチによる客観的な評価が必要となる。
前演題により、NIRS を用いた耳下腺応答が、酸味の客観的評価法として有用であることが示唆されたことから、本評価法を用いて、食品系での酸味の強度を計測することを本研究の目的とした。
【方法・結果】
本研究で用いた、米を原料として酢酸発酵により製造される酢酸発酵調味料は、強い酸味をもつ食品に添加することで、その酸味が低減される。今回は、酢酸発酵調味料の添加による酸味の強度変化を評価するため、高酸度酢のみ、高酸度酢と酢酸発酵調味料の混合、酢酸発酵調味料のみの 3 試験区を同一酢酸濃度で設定し、NIRS 計測ならびに官能評価を実施した。NIRS 計測の結果、高酸度酢の飲用時と比べて、酢酸発酵調味料を添加した試料（混合ならびに酢酸発酵調味料のみ）の飲用時で耳下腺血流の上昇程度が有意に低下した。また、官能評価でも、高酸度酢の飲用時と比べて、酢酸発酵調味料を添加した試料の飲用時で酸味の強度が有意に低下していた。以上より、官能評価と NIRS による計測の結果が一致したことから、生体応答という客観的指標を用いた NIRS と官能評価とを併用することで、より客観的に酸味強度の変化を測定できる味覚評価法となる可能性が示された。
一方、NIRS のデータを詳細に検討したところ、高酸度酢飲用時における耳下腺応答に被験者間で差が見られたことから、酸味の感度と耳下腺応答における関連性が想定された。そこで、酢酸の閾値試験を実施し、耳下腺応答との関連性を解析した。その結果、興味深いことに、高酸度酢で最も耳下腺応答が高かった（酸味を認識できる）被験者群では、それ以外の（酸味を認識できない）被験者群と比べて、酢酸の閾値が有意に低いことが明らかとなった。本結果は、耳下腺応答と酸味の感度には、相関性があることを示しており、NIRS 計測による耳下腺の応答という指標で、酸味に対する被験者の識別能を判別できる可能性を示している。

NIRS, objective taste evaluation method, vinegar

講演番号：2C31a14
講演日時、会場：3 月 25 日 11:36～ C 校舎 31 会場

ClustalW の派生プログラム、INTMSAlign 法の開発と酵素活性に重要な水素結合ネットワークの予測について

Development of derivative program of ClustalW, INTMSAlign, and prediction of hydrogen bond network of enzymes

○中野 祥吾[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Shogo Nakano[1,2], Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO)

[研究の目的] 酵素の機能改良を目指して、ある残基に部位特異的変異を導入する際、ClustalW などのマルチプルシークエンス法（MSA 法）を用いて酵素の保存部位を同定し、変異を導入する候補部位を決定することが広く行われている。多くの MSA 法で、酵素の保存部位を正しく予測することができるが、その結果を踏まえてどのような変異を導入すべきか、といったことまで示すことはできない。そこで我々は、MSA の結果から直接、このような変異箇所を予測することを目指し、ClustalW の派生プログラムである“INTMSAlign”を開発した。今回はキャッサバ由来 Hydroxynitrile Lyase (MeHNL) について解析を行い、HNL 活性に重要な水素結合ネットワークを一次配列のみから予測した結果について報告する。
[方法] INTMSAlign は、“目的タンパク質の一次配列（1 つ）と、その類縁タンパク質の一次配列で構成されているライブラリ（数百～数千）から、ランダムに数個抽出した配列の組み合わせで構成されたデータについて ClustalW を行う”というプロセスを数百回行い、目的タンパク質の一次配列をベースとして、アミノ酸出現確率を計算するプログラムである。今回は、INTMSAlign に、“ある特定部位の残基が、あるアミノ酸で完全に保存されている場合のアミノ酸出現確率を計算する（例えば 200 番目の残基が Lys の場合における配列のみを選択し、計算する)”という、残基固定の機能を追加した。
[結果と考察] HNL の類縁酵素として esterase が存在することが知られており、これらの間のアミノ酸相同性は約 30%ある。なお HNL と esterase の一次配列は、237 位のアミノ酸の違いで区別することが可能である。なお、HNL では Lys, esterase では Met となっている。そこで INTMSAlign の残基固定を用いて 237 位のアミノ酸を Lys, Met でそれぞれ固定した時のアミノ酸出現確率を計算し、両者のデータを比較して、HNL と esterase 活性を切り替えるのに重要な残基の予測を行った。
残基固定による比較の結果、237 位の残基以外にも 11, 79, 239 位の残基が、HNL と esterase 活性の切り替えに重要な役割を果たしていることが一次配列のみから予測された。なおこれら 4 残基については、量子化学計算などにより、基質へのプロトン伝達に重要であることが示されている。このように酵素の反応性切り替えに重要な残基を 1 つでも実験などにより予測できている場合、INTMSAlign の残基固定を用いることで、その他の重要な残基について抽出することが可能である。
なお INTMSAlign は酵素の一次配列のみを利用するため、汎用性が高く、その他の酵素にも容易に適用可能である。

Multiple sequence alignment, Prediction of active site residues of enzyme, Rational design

講演番号：2C31a15
講演日時、会場：3 月 25 日 11:48～ C 校舎 31 会場

シミュレーションによる植物代謝反応システムの解明
Mathematical modeling for understanding of plant metabolism
○平井 優美[1,2]、シユタサ カンスポーン[1,2]、澤田 有司[1,2]、千葉 由佳子[3,4]、山下 由衣[4]、岩田 通夫[5]、尾之内 均[2,6]、内藤 哲[4,6]、白石 文秀[5]（[1]理研 PSC、[2]JST・CREST、[3]北大創成、[4]北大院生命、[5]九大院農、[6]北大院農）
○Masami Yokota Hirai[1,2], Kansuporn SRIYUDTHSAK[1,2], Yuji Sawada[1,2], Yukako Chiba[3,4], Yui Yamashita[4], Michio Iwata[5], Hitoshi Onouchi[2,6], Satoshi Naito[4,6], Fumihide Shiraishi[5] ([1]RIKEN PSC, [2]JST/CREST, [3]Hokkaido Univ., [4]Hokkaido Univ., [5]Kyushu Univ., [6]Hokkaido Univ.)

［背景］ 代謝工学の分野では、比較的小規模の代謝経路を対象にして、インビトロで決定した個々の酵素のキネティックパラメーターを用いた代謝シミュレーションが行われている。一方、近年では網羅的な代謝産物データが得られるようになってきており、代謝反応システムをより深く理解するために、相関解析や主成分分析といった統計的な手法による研究がなされている。しかし、大規模な代謝産物データに基づいて数式モデルを構築して代謝シミュレーションを行い、代謝反応ネットワークの全体を網羅的に理解するための方法論はほとんどない。そこで本研究では、遺伝子導入や環境変動といった外的、内的代謝攪乱による代謝産物変動の予測や、代謝制御機構の推定に基づいたシステム的な代謝デザインを目的として、メタボロームの時系列データに基づいて代謝反応ネットワークを解明するための新たなシステムバイオロジー的手法を検討した。

［方法］ 本手法では、データベースに登録されている既知の代謝経路に基づいて、バイオケミカルシステム理論による、べき乗則型微分方程式を作成する。次に、実測のメタボロームデータを用いて方程式中のパラメーター(速度定数および反応次数)を適切に推定して数式モデルを構築する。ケーススタディとして、シロイヌナズナのアスパラギン酸族アミノ酸の生合成系に本手法を適用した。

［結果］ シロイヌナズナのメタボローム時系列データに基づいてパラメーターを推定し、数式モデルを構築することができた。その過程で、アスパラギン酸族アミノ酸生合成系に関連した、未知であるが可能性のある代謝経路の推定も行った。構築した数式モデルを用いることで、様々な攪乱条件での代謝産物の挙動をシミュレーションすることができた。今後は、この数式モデルに基づくシステム解析を行う予定である。

metabolic reaction network, metabolome data, biochemical system theory

講演番号：2C31p01
講演日時、会場：3 月 25 日 14:00～ C 校舎 31 会場

微生物細胞の熱膨張率と耐熱性に関する知見

The relation of linear expansion and heat resistance of microbial cells

○中西 弘一[1]、小暮 亮雅[2]、出内 桂二[1]、桑名 利津子[3]、高松 宏治[3] ([1]キリン飲料技術研究所、[2]島津総合分析試験センター、[3]摂南大薬)
○Kouichi Nakanishi[1], Akinori Kogure[2], Keiji Deuchi[1], Ritsuko Kuwana[3], Hiromu Takamatsu[3] ([1]Kirin, [2]Shimadzu, [3]Setsunan Univ.)

【目的】

飲料、食品並びに医薬品などの製造では、汚染危害微生物の耐熱性に関する情報は微生物制御において非常に重要である。現在耐熱性の評価は、対象微生物の単離、培養、加熱処理操作を行い、その生残率から求めている。演者らは、全ての微生物に対して迅速かつ簡便な耐熱性評価方法とnanoTA-SPMを2011年度の京都大会で報告した。今回、さらにこれを発展させて、微生物細胞の熱膨張率（線膨張率）を求め、耐熱性との比較検討を行なった。

【方法】

装置としてナノサーチ顕微鏡SFT-3500（島津製作所）にナノサーマルアナリシス（nanoTA、日本サーマルコンサルティング）を取り付けた。ナノサーチ顕微鏡の走査型プローブ顕微鏡（SPM）に超微小領域局所加熱型カンチレバーを装備させ、1個の微生物細胞に一定応力下、一定速度で室温から100～400℃まで昇温を行ない、Z 軸方向の微生物の熱膨張にひずみ距離の増加状態をモニターし、線膨張率αを計測した。この線膨張率αはα＝⊿L／L_0 tで求めた（ここで⊿L：熱によるZ軸方向の伸び、L_0：元の細胞のZ軸方向の高さ、 t：温度差（℃））。また生物の加熱死滅温度は、既に報告したように、加熱による物性変化が生じ、線膨張率がゼロとなる転移温度から求めた。評価対象微生物には、芽胞形成細菌として*Bacilus*属の芽胞、好熱性偏性、嫌気性細菌*Thermoanaerobacter*属、*Moorella*属の芽胞、耐熱性カビの子嚢胞子、細菌の栄養細胞、酵母を選び評価を行った。

【結果】

前回の大会で報告したように、線膨張率がゼロとなる転移温度は、加熱による微生物細胞の物性変化が発生する温度であり、微生物の加熱死滅温度と考えられる。この加熱死滅温度と今回求めた各微生物の細胞の線膨張率との間には相関があり、加熱死滅温度が高い細胞ほど線膨張率は小さく、細胞の形状や大きさの変化が小さかった。耐熱性のメカニズムに熱による細胞の大きさの変化が関係し、耐熱性の高い微生物細胞は熱膨張による細胞の大きさの変化を小さくする構造的なメカニズムがあることが推定された。

SPM, nano-thermal analysis, thermal expansion

講演番号：2C31p02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:12～ C 校舎 31 会場

バイオナノカプセルによるバイオセンサーのナノレベル表面制御及び高機能化
Bio-nanocapsules for optimizing nanostructure of biosensor surface
○飯嶋 益巳、黒田 俊一 (名大院生命農)
○Masumi IIJIMA,Shun'ichi KURODA (Grad. Sch. Biol. Agrc. Sci., Nagoya Univ.)

バイオセンサーの感度や特異性を高めるためには、センサー表面のセンシング分子の方向性をナノレベルで整列化させ、かつクラスター化することが重要とされている［１］。しかし、「整列化とクラスター化」を同時に達成する基盤技術は未だに確立していない。我々は、IgG-Fc 領域を特異的に表面に固定化出来るバイオナノカプセル（ZZ-BNC）を開発し、同カプセルが①抗体分子のクラスター化、②抗体分子の整列化、③固相上に整列化された抗体の検出を行うことを見出した。そこで、ZZ-BNC を用いて各種バイオセンサーの高機能化を検討し、下記の成果を得たので報告する。

１．ELISA 法、ウェスタンブロット法において、酵素標識二次抗体-ZZ-BNC 複合体を用いることで、固相化抗原の高感度検出を可能にした［２］。

２．水晶発振子微量天秤法および表面プラズモン共鳴法のセンサー基板に ZZ-BNC を固定して抗体を整列化することで、抗原の高感度検出を可能にした［３］。

３．高速原子間力顕微鏡を用いて、ZZ-BNC の詳細な表面構造、および金基板上に固定した ZZ-BNC 上で、概念通り抗体の Fc 部分が固定され Fv 部分が自由に動くことを明らかにした［４］。

４．各種蛍光免疫法において、蛍光標識 ZZ-BNC を用いることで、同一動物種由来の一次抗体の複数同時使用ならびに複数抗原の高感度同時検出を可能にした［５］。

５．サンドイッチイムノアッセイにおいて、ZZ-BNC を用いることで、同一動物種由来の固相抗体および検出抗体を用いた抗原検出を可能にした［飯嶋ら、投稿中］。

以上より、ZZ-BNC は、抗体の固定化・整列化の「足場」となり、各種バイオセンサーを高機能化すると共に、抗体分子の整列化度合いを評価するプローブとして有用なバイオマテリアルであることが示された。今後は同技術を抗体以外のセンシング分子にも応用することで、バイオセンサー全般の飛躍的な機能向上が期待される。

References：

１．Rao, S.V., et al. Mikrochim. Acta., **128,** 127, (1998).
２．Iijima, M., et al. Anal. Biochem., **396,** 257, (2010).
３．Iijima, M., et al. Biomaterials, **32,** 1455, (2011).
４．Iijima, M., et al. Sci. Rep., **2,** 790, doi:10.1038/srep00790, (2012).
５．Iijima, M., et al. Biomaterials, **32,** 9011, (2011).

Bio-nanocapsules, Biosensors, Oriented immobilization

講演番号：2C31p03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:24～ C 校舎 31 会場

DNA 1 分子標準物質の開発

Development of single DNA molecule standard

○真野 潤一[1]、布藤 聡[2,3]、吉井 淳治[3]、中江 裕樹[3]、高畠 令王奈[1]、橘田 和美[1]([1]（独）農研機構食総研、[2]（株）ファスマック、[3]バイオチップコンソーシアム)
○Junichi MANO[1], Satoshi Futo[2,3], Junji Yoshii[3], Hiroki Nakae[3], Reona Takabatake[1], Kazumi Kitta[1] ([1]National Food Research Institute, NARO, [2]FASMAC Co., Ltd., [3]Japan Micro Array Consortium)

【目的】近年、分析技術の高感度化によって測定対象を分子数単位で測定することが可能となっている。しかし、質量測定におけるキログラム原器のような標準物質は、分子数測定には未だ存在せず、分析の性能評価や精度管理を厳密に行うことは困難である。このため、本研究グループでは、測定対象物質の量を分子数単位で規定した標準物質の確立を目指して研究を行っている。

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法は、近年、食品分析や臨床診断、法医学検査など幅広い分野において核酸分析技術として広く利用されており、その精度管理に関心が持たれている。PCR 法は、その技術的特性から 1 分子からの DNA 増幅が理論上可能とされている。しかしながら、PCR を用いた個別の分析法については反応液の組成や PCR 装置の性能の影響により 1 分子の検出が可能とは必ずしもいうことができないため、分析法毎に検出感度の評価が必要である。そこで、本研究では PCR 分析の検出感度の評価や精度管理に役立つ DNA 1 分子標準物質の開発を試みた。

【方法及び結果】BLAST 検索を用いて自然界に存在しないことを確認した塩基配列 Art1 と遺伝子組換え農産物の PCR 検査に頻用されるダイズ由来の塩基配列 Le1 を、プラスミド pUC19 の制限酵素 BamHI サイトの両側にそれぞれ挿入し、プラスミド pSM とした。このプラスミド pSM を大腸菌を用いて大量調製し、制限酵素 BamHI で処理することで、Le1 配列と Art1 配列を両末端にもつ直鎖 pSM を調製した。この直鎖 pSM の溶液を高度に希釈した後、96 ウェル PCR プレートに平均 0.1 分子/ウェルとなるように分注し、Le1 配列を標的とするリアルタイム PCR で分析を行った。Le1 配列が検出される反応液には直鎖 pSM が高い確率で 1 分子含まれることが予想されることから、Le1 配列が検出された反応液を 1 分子標準試料とした。この 1 分子標準試料及び直鎖 pSM 溶液の段階希釈試料（500,000、40,000、3,000、250 分子/μL）を Art1 配列を標的とするリアルタイム PCR で分析したところ、分子数と DNA 増幅の立ち上がりを示す Ct 値の関係は相関係数 0.99 を超える高い直線性を示した。このことから、1 分子標準試料中の直鎖 pSM が確かに 1 分子であることが示唆された。以上の通り、限界希釈 DNA 溶液の試料群から DNA が含まれている試料のみをリアルタイム PCR で選抜するという方法で、任意の DNA 分子を 1 分子含む標準物質の生産が可能であることが示された。

Single molecule, DNA, Reference material

講演番号：2C31p04
講演日時、会場：3 月 25 日 14:36～ C 校舎 31 会場

μL オーダーの検体で多項目同時測定可能な免疫測定法「抗体チップ」
Antibody array for measuring multiple biomarkers from uL scale of body fluid
○星野 文彦[1]、渡辺 修[1]、呉 暁紅[2]、瀧本 陽介[2]、大澤 俊彦[3] ([1](株)豊田中研、[2](株)ヘルスケアシステムズ、[3]愛知学院大心身科学)
○Fumihiko HOSHINO[1], Osamu WATANABE[1], Xiaohong WU[2], Yosuke TAKIMOTO[2], Toshihiko OSAWA[3] ([1]TOYOTA R&D Labs. Inc., [2]Healthcare Systems Inc., [3]Aich Gakuin Univ.)

【目的】近年、食の重要性の認識が高まり、現在も拡大の一途をたどっている. 健康食品やサプリメントに代表される機能性食品は, 生活の質を高める上で大切な 1 アイテムである。しかしながら、機能性食品は、糖尿病, 動脈硬化, 癌などの生活習慣病予防等に有効かどうかについては未だ重要な研究課題であり, そのための研究開発ツールは必須である. 我々はスライドグラスの平面上で酵素免疫測定を行うマイクロ ELISA 法(抗体チップ法)を開発している. 本方法は分子認識光固定化法という新たな固相化法により蛋白質を固相化し, スライドグラス当たり40 個の検体(1～3μL)を複数項目測定できる. そのため、被験者に対して低負荷もしくは非侵襲で、またシンプルなシステムでかつ多項目同時測定が可能であることから低コスト化が可能である。今回, 生活習慣病の引き金として疑われている体内の酸化ストレスについて、その有用なバイオマーカーと期待されている尿中 N-hexanoyl-lysine (HEL)及び 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG)に着目し、2 項目を同時に測定できる抗体チップを開発した.
【原理・方法】アゾ色素を含有するポリマ(アゾポリマ)をスピンコートしたスライドグラスに対して, BSA に HEL 及び 8-OHdG をコンジュゲートした模擬抗原を接触式によりスポッティングし光固定化した. 1 つのスポットグループには 4 個のスポットがあり HEL 及び 8-OHdG の模擬抗原をそれぞれ 2 個ずつ配置した. 予め抗原(検体)液とビオチン化抗体液を混合した後, 1 つのスポットグループに対して 3μL の混合液を滴下し競合反応をさせた. その後, アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジン液の反応を経て, 化学発光反応による発光を CDD カメラで検出しデータ解析を行った.
【結果】1)スポットグループ内の各抗原に対して, それぞれ独立のスポットとして検出され, お互いのシグナルが干渉してないことが確認された. 2) 標準物質の検量範囲は汎用の ELISA 法と同レベルの感度を有し, HEL:2.55～249.5nM, 8-OHdG:1.024～100ng/ml であった.3) 日内変動値, 日間変動値は共に 15%以下であった.
【結言】抗体チップを用いた検査システムは, 微量の検体から定量的にかつ複数項目のバイオマーカーを測定でき, さらには検査装置としても ELISA 法より簡略化が可能なことから低コスト化が期待できる. 今後, さらなる信頼性評価の検証を進め、抗体チップが機能性食品の開発や健康管理ツールとして利用されることを期待する.

array, antibody, oxidative stress

講演番号：2C31p05
講演日時、会場：3 月 25 日 14:48～ C 校舎 31 会場

超高分解能光断層計測によるタンパク質結晶の新規観察技術
Non-invasive imaging of protein crystals using ultrahigh resolution optical coherence tomography
○松村 浩由[1]、石田 周太郎[2]、廣瀬 未果[3]、杉山 成[3]、井上 豪[1]、森 勇介[1]、伊東 一良[1]、西澤 典彦[2] ([1]阪大院工、[2]名大院工、[3]阪大院理)
○Hiroyoshi MATSUMURA[1], Shutaro ISHIDA[2], Mika HIROSE[3], Shigeru SUGIYAMA[3], Tsuyoshi INOUE[1], Yusuke MORI[1], Kazuyoshi ITOH[1], Norihiko NISHIZAWA[2] ([1]Osaka Univ., [2]Nagoya Univ., [3]Osaka Univ.)

タンパク質のX線結晶構造解析は、創薬開発や医学・生物学の進歩に欠かせないツールである。しかし、その解析に必要なタンパク質の結晶化は、その確率が極めて低い。そのため、現在では、分注ロボットを使った微量結晶化法がとられ、可能な限り多種類の調製溶剤と混合することでその確率の低さを補う試みがなされている。しかし、数多くの微小液滴から結晶を探索し、結晶化の可否を判別することは多大な手間と時間を要する。さらに、溶液の濁度が上昇することが多く、その場合の光学顕微鏡による観察は困難を極める。したがって、タンパク質結晶を高速かつ確実に観察し判別できる技術開発が必要とされている。

生体物質を非破壊かつ三次元で観測する技術として、光断層計測（Optical Coherence Tomography; OCT）が挙げられる。OCTは、近年、非侵襲光計測手法として大きな注目を集めている技術であり、医用工学を中心に精力的に開発が進められてきたが、一方で、現状のOCT技術は分解能の低さが原因で、生物固体や組織など比較的大きな物体の観察に限定されてきた。

本研究では、超高分解能OCTの開発、ならびにそれを用いたタンパク質結晶観察について報告する。スペクトル幅120nm、中心波長800nmの光を光源として用いることで、OCTの超高分解能化を実現した。さらにそれ用いてハイドロゲル中で結晶化したリゾチーム結晶を観測した結果、結晶の三次元構造をイメージングすることに世界で初めて成功した（Nishizawa, N., et al., Biomed. Opt. Express, 3, 735-740 2012)。そして、顕微鏡では観察が困難な高濁度溶液中の結晶も鮮明にイメージング可能であることを示すことができた。さらに、OCT信号の強度の違いから、タンパク質結晶と塩結晶を分別できる可能性を見出した。発表では、これらの研究成果の詳細とともに今後の展開について議論する。

Protein crystals, Non-invasive imaging, Optical coherence tomography

講演番号：2C31p06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:00～ C 校舎 31 会場

タイミング回路の進化工学と変異体解析
Evolutionary diversification of the temporal behavior of transcriptional network
○池 紘平、福冨 浩樹、河合 繁子、斎藤 恭一、梅野 太輔（千葉大院・工・共生応化）
○Kohei Ike,Hiroki Fukutomi,Shigeko Kawai,Kyoichi Saito,Daisuke Umeno (Dept. Appl. Chem. Biotech., Chiba Univ.)

【目的】細胞内の遺伝子発現は，有限なリソースを有効利用するために，構成因子の発現強度のみならず，その発現するタイミングも精密に最適化されている．タイミング／順序回路の振る舞いを定性的に再現する努力は精力的になされているが，任意のタイムプロファイルを持つ遺伝子回路をオンデマンドに創るのは困難であった．これを実現するためには，様々な時間特性を有するタイミング回路の「ライブラリ」を作製し，その中から Just-in-time 回路を迅速に選択することが肝要である．我々は，分スケールの時間分解能で任意のタイミングで遺伝子発現の ON/ OFF を選択する手法を確立し，そしてそれを実際に用いたタイミング回路を選別/取得を試みた．

【実験および結果】本研究では，DNA アルキル化剤であるメタンスルホン酸メチル(MMS)およびヒト由来アルキルアデニングリコシラーゼ(AAG)を用いた ON(ポジティブ)選択系と，変異原性ヌクレオシド dP およびウイルス由来チミジンキナーゼ(hsvTK)を用いた OFF(ネガティブ)選択系[Y. Tashiro et al., *Nucl. Acids Res.*, **39**(3), e12, 2010]を利用した．これらを用いることで，ON/ OFF 選択をそれぞれ 15 分/ 5 分の液操作で完了できる遺伝子回路の選択法を新たに構築できた．次に，複数の遺伝子制御因子の遺伝子を組み合わせて作製したタイミング回路のライブラリを各種作製した．これらに対し任意のタイミングで ON / OFF 選択を繰り返すことによって，様々なタイミングで遺伝子発現がタイマー誘導される遅延回路，様々なパルス幅をもつ「パルス回路」を取得した．本講演では，これらのタイミング回路を一部とする，更に複雑な遺伝子回路を構築する試みについても報告したい．

Directed evolution, Synthetic biology, Pulse generator

講演番号：2C31p07
講演日時、会場：3 月 25 日 15:12～ C 校舎 31 会場

水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出法による真菌の MIC 及び SMIC 測定

Determination of MIC and SMIC for fungi by microbial detection method using water-soluble tetrazolium salts

○塚谷 忠之[1]、末永 光[1]、志賀 匡宣[2]、野口 克也[2]、松本 清[3]([1]福工技セ・生物食品研、[2]同仁化学研、[3]崇城大・生物生命)
○ Tadayuki TSUKATANI[1], Hikaru SUENAGA[1], Masanobu SHIGA[2], Katsuya NOGUCHI[2], Kiyoshi MATSUMOTO[3] ([1]Fukuoka Industrial Technology Center, [2]Dojindo Laboratories, [3]Sojo Univ.)

【目的】カンジダ症など真菌による感染症は高い頻度で発生しており、その薬剤耐性化を防ぐ上で薬剤感受性試験は重要である。また、一部の真菌はバイオフィルムを形成するため、難治性疾病の要因となっている。そこで、本研究では水溶性テトラゾリウム塩 WST を用いた微生物検出法（本法）を真菌の最小発育阻止濃度(Minimum Inhibitory Concentration (MIC))及びバイオフィルムの最小阻止濃度(Sessile Minimum Inhibitory Concentration (SMIC))の測定へ適用し、その有用性を検証した。
【方法】(1)検出試薬：電子メディエータ2-methyl-1,4-naphthoquinone及び水溶性テトラゾリウム塩WST-8を10%DMSO水溶液に溶解し、検出試薬とした。
(2)MIC測定：96ウェルマイクロプレートにMOPS緩衝性RPMI-1640培地により調製した２倍希釈系列濃度の抗生剤溶液180μLを分注し、これに微生物培養液あるいは胞子懸濁液10μLを加え、35℃で22時間培養した。培養後、検出試薬10μLを添加して2時間反応させ、460nmにおける吸光度測定に供した。ブランクと比較した吸光度変化が0.1以上のウェルを生育、以下を阻止と判定し、MIC値を測定した。
(3)SMIC 測定:96 ウェルマイクロプレートに YM 培地により調製した微生物培養液 150μL を加え、35℃で 24～48 時間静置培養し、バイオフィルムを形成させた。上清を捨て、滅菌生理食塩水で洗浄後、MOPS 緩衝性 RPMI-1640 培地により調製した２倍希釈系列濃度の抗生剤溶液 200μL を分注し、22 時間培養した。再び上清を捨て、滅菌生理食塩水で洗浄後、MOPS 緩衝性 RPMI-1640 培地 190μL 及び検出試薬 10μL を添加して 2～4 時間反応させ、460nm における吸光度測定に供した。コントロール（抗生剤フリー）に対して 80%以上の阻害率を示す最小抗生剤濃度を SMIC80 とした。
【結果】*Candida*属、*Cryptococcus*属、*Trichosporon*属などの酵母様真菌、*Aspergillus*属や*Rhizopus*属などの糸状菌に対して本法（24時間）と従来法（目視判定法、48～96時間）を用いて薬剤感受性試験を実施し、MIC値を比較した。その結果、両法により得られたMIC値は良好に一致した。この結果から本法を用いることで24時間以内に正確なMIC値を測定可能であることが示唆された。また、バイオフィルムの薬剤感受性試験についても本法と従来法（コロニーカウント法）によるSMIC80測定を実施した。その結果、両者には良好な一致が認められた。バイオフィルム内の生育阻害率を正確に測定するためにはバイオフィルムから生菌を抽出した後、寒天培地でコロニーをカウントする必要がある。一方、本法はバイオフィルム内微生物の代謝活性を利用する手法であり、バイオフィルムへ検出試薬を添加するだけで生育阻害率を測定可能であるため有効な手段になると考えられる。

water-soluble tetrazolium salts, MIC, biofilm

講演番号：2C31p08
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ C 校舎 31 会場

ELISA の感度向上化を目指したベタイン型代謝産物アナログ添加によるペルオキシダーゼ活性化メカニズムの解明

Investigation of peroxidase activation mechanism by addition of betaine-type cellular metabolite analogs toward sensitive ELISA detection

○高木 琴味[1]、甲元 一也[1]、鹿島 康浩[2]([1]甲南大 FIRST、[2]耐熱性酵素研究所)
○Kotomi Takagi[1], Kazuya koumoto[1], Yasuhiro Kashima[2] ([1]konan Univ., [2]Thermostable Enzyme Laboratory)

【研究背景】

近年、ガンははじめとする種々の疾患が発症すると、健康な時にはほとんど見られないある種のタンパク質、及び、その代謝断片の血液濃度が上昇することが明らかとなってきた。これら、疾患の情報を伝える物質群は疾患マーカー（バイオマーカー）と呼ばれ、それらの濃度を定期的に計測することは、疾患に対する予防医療に有効であることが報告されている。特に、ガン発症に伴って血中濃度が上昇する腫瘍マーカーは、ガンの種類によって産生されるマーカーも異なり、予防治療においてその濃度を高精度に検出できる技術の開発が求められている。しかし、これらの腫瘍マーカーの血中濃度は数百から数千ｐｇ/ｍＬと極端に濃度が低いため、高速液体クロマトグラフィーや電気泳動のような一般的な分析、検出方法でそれらの濃度を正確に測定することは困難である。一般にこのような極微量の成分検出には、酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）という検出技術がよく使われ、極低濃度の検体を酵素反応を介することによって何千倍、何万倍にも増幅することができる。そこで、我々の研究室では、ＥＬＩＳＡで使用されている酵素である西洋わさび由来のペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）に数十mMの代謝産物アナログ（*N,N,N*-トリ-*n*-ブチルグリシネート）を添加すると、ＨＲＰが活性化し、低濃度の基質をより高濃度に検出することができることを明らかとした。一般に活性化しにくいＨＲＰでなぜ活性化が起こるのか、そのメカニズムは大変興味深い。そこでこのような背景に基づき、私は、種々の分光学的手法を駆使して、代謝産物アナログがＨＲＰに対してどのように作用しているのか、その未知のメカニズムを化学的なアプローチから明らかにするために本実験を行った。

【実験結果】

ＨＲＰの V_{max} 値も K_m 値も上昇の挙動を示した。基質結合性に関しては不利に働くことが想定されるが、ＨＲＰの場合は強い生成物阻害がかかることが知られており、それが飽和吸光度の増大へと転じていることも示唆された。ＣＤスペクトル測定によってこれらの変化は、二次構造の変化に関連していることが示唆され、代謝産物アナログが溶液中でタンパク質の揺らぎを抑制する特異な働きをしていることが推測された。講演では、細胞由来の分子量250程度の低分子添加剤である代謝産物アナログがHRPをどのような機構で活性化させているのか、そのメカニズムについて紹介する。

ELISA, horseradish peroxidase, activation

講演番号：2C31p09
講演日時、会場：3 月 25 日 15:36～ C 校舎 31 会場

放射性セシウムの生体での濃縮・排出の基礎検討

Fundamental study on the bioconcentration of radioactive cesium

○白井 理、北隅 優希、加納 健司（京都大院農）
○Osamu SHIRAI,Yuki KITAZUMI,Kenji KANO (Kyoto Univ.)

1. 緒言

平成 23 年 3 月に起きた福島第一原発の爆発事故によって大量の放射性元素が周囲に放出された。事故直後は希ガス類、ヨウ素などの影響が大きかったが、半減期が短いため、それらの元素は現在ではほとんど検出されない。しかし、比較的半減期が長いセシウムも大量に放出されており、内部被曝の影響が危惧されている。セシウムは同属のカリウムと性質が似ており、生体内に蓄積しやすいことが経験的に知られている。しかし、セシウムのトランスポーターの有無も明確にされておらず、体内への濃縮機構の詳細は解明されていない。一方、疎水的なイオンは対イオンと共に脂質二分子膜 (BLM) に分配し、膜電位印加に伴って BLM を透過することも報告されている [1)]。

本研究では、水相-BLM 間移行エネルギーを念頭に置いて各イオンの脂質二分子膜への分配挙動を予測し、対イオンの影響を考慮しながらセシウムの BLM 透過挙動を解明した。また、セシウムの細胞における濃縮機構については、混成電位の概念と細胞膜電位が主に K^+ の移動で制御されていることから解釈できることも明らかにした。

2. 方法

直径 0.8 mm の孔を開けた厚さ 0.2 mm のテフロンシートを挟んだアクリル製セルの 2 室（W1、W2）に電解質溶液を満たし、テフロンシートの孔部分に脂質溶液を塗りつけて BLM を作製した。ここで、フォスファチジルコリン（10 g/L）及びコレステロール（5 g/L）を溶解させた *n*－デカン溶液を脂質溶液とした。W1 及び W2 の各相に挿入した電位印加・測定用電極（Ag|AgCl）と電流測定用電極（Pt）を用いて、各種電気化学測定を行った。

3. 結果と考察

W1 及び W2 に 0.1 M MX (M = K or Cs、X = Cl or I) を満たしてサイクリックボルタモグラム（CV）を測定した。CV 波形は原点（0 V、0 A）に対称な定常電流となった。W1 及び W2 が 0.1 M KCl の場合、イオン透過電流はほとんど流れなかった。0.1 M CsCl の場合は、0.1 M KCl の場合と比較すると、同一膜電位（+0.1 V）を印加した際に 100 倍程度のイオン透過電流密度が生じた。これは、BLM 内に MX が分配する際に、Cs^+ と K^+ の水相-BLM 間移行エネルギーの差によって分配比が変化したためと考えられる。また、W1 及び W2 の電解質濃度を非対称にしてゼロ電流の膜電位変化を測定することで、透過選択性を評価したところ、Cl^- の膜内拡散係数は Cs^+ や K^+ のそれに比べて 10 倍程度大きいことが判明した。次に、Cl^- の代わりに I^- を用いたところ、同一印加膜電位において約 300 倍のイオン透過電流密度となった。このように、対イオンの疎水性を高くすることで分配係数が大きくなるため、BLM を介した Cs^+ の移動を促進できることも明らかにした。

1) O. Shirai et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **69** (1996) 3151-3162.

Cesium, Ion transport, bilayer lipid membrane

講演番号：2C31p10
講演日時、会場：3 月 25 日 15:48～ C 校舎 31 会場

直接電子移動型酵素の配向制御を志向した新奇機能化電極の構築

Novel electrode functionalization to tackle the orientational defect of direct electron transfer type enzyme

○宋 慶盛、北隅 優希、白井 理、小川 順、加納 健司（京大院農）
○Keisei Sou,Yuki Kitazumi,Osamu Shirai,Jun Ogawa,Kenji Kano (Kyoto Univ)

緒言：生体内酸化還元反応を触媒する多種の酸化還元酵素の中には、固体電極を基質として機能する希有な酵素がいくつか存在し、直接電子移動（DET）型酵素と呼ばれている。本酵素を用いた応用例のひとつとして DET 型バイオ電池が挙げられ、未来型電池として注目されている。しかし、溶存酸素濃度が低い上、酵素反応中心–電極間の長距離電子移動が律速となり、速度論的見地から過電圧が大きくなる欠点がある。前者の課題は、空気拡散型の空気相／酵素固定電極相／電解質相の三相界面を創生することにより大きく改善した（日本農芸化学会 2012 年度大会）。一方、長距離電子移動速度に関しては、その速度定数が反応部位間の距離とともに指数関数的に減衰するため、酵素の電極吸着時の配向制御が性能向上に不可欠である。そのため、世界中で、配向制御に関する研究がなされているが、未だ、目覚ましい成功例は報告されていない。本発表では、DET 型バイオ電池のカソード用酵素として、頻繁に利用されているビリルビンオキシダーゼ（BOD）に焦点を当てた。本酵素は O_2 の H_2O への 4 電子還元と共役し、基質であるビリルビンを電子供与体として酸化する。この特性を利用する目的で、電子供与体となる電極をビリルビンで修飾し、本酵素の配向制御を試みた。

方法：ケッチェンブラック（KB）を用いた多孔性炭素電極を作製し、この表面にビリルビン溶液を滴下し吸着させた。この電極を洗浄後、BOD を電極上に吸着させ、酵素機能電極を作製した。また、カーボンペーパー（CP）にも、同様の修飾を行い、CP 上の BOD の活性測定より、ビリルビン修飾による全酵素吸着量変化を見積もった。また、アラミド繊維と KB から構成した新規ガス拡散型電極にも、本修飾法を適用し、パッシブ条件下で、バイオカソードの性能を評価した。

結果：多孔性炭素電極上にビリルビンを修飾することで、BOD の酸素還元電極反応の過電圧が低下し、触媒電流が増加することを初めて見出した。酸素雰囲気下にて回転電極法（回転数：4000 rpm）を用い、標準電子移動速度定数、有効酵素吸着量を求めると、標準電子移動速度定数が 3.5 倍、有効酵素吸着量が 1.5 倍になっていた。CP 上での酵素活性測定結果を考慮すると、DET 型反応が可能な酵素の割合が 2 倍になったことから、配向性が格段に向上したと結論した。また、本手法を適用したガス拡散型電極でも、過電圧の低下、触媒電流の上昇が見られた。本手法を従来の DET 型バイオ電池のカソードに応用し、DET 型バイオ電池において世界一の出力である 2.4 mW cm^{-2} を達成した。

direct electron transfer, biofuel cell, enzyme orientation

講演番号：3C11a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ C 校舎 11 会場

重金属と抗生物質の二重耐性を示す *Bacillus subtilis* によるフェナントレンの分解ポテンシャル

Phenanthrene Degradation Potential of *Bacillus subtilis* Strains Showing Dual Resistance to Heavy Metals and Antibiotics

○OYETIBO Ganiyu[1,2]、簡 梅芳[2]、イロリ マシュ オルソジ[1]、オバヨリ オルワフェミ サンデェー[3]、遠藤 銀朗[2] ([1]ラゴス大学、[2]東北学院大・工、[3]ラゴル州立大学)

○ Ganiyu OYETIBO[1,2], Mei-Fang CHIEN[2], Matthew Olusoji ILORI[1], Oluwafemi Sunday OBAYORI[3], Ginro ENDO[2] ([1]Department of Microbiology, Faculty of Science, University of Lagos, [2]Tohoku-Gakuin Univ., [3]Department of Microbiology, Faculty of Science, Lagos State University)

Industrialisation often leaves behind untold consequences on the environment, with mankind at receiving end, via discharges of their multifarious effluents. Contamination of petroleum hydrocarbons (PHs) usually co-exists with heavy metals (HMs) that frustrate bioremediation strategies of systems. Active bacteria's repertoire useful to restore such polluted sites involves utilization of PHs for growth and combined resistances to HMs.

Two bacilli strains isolated from a site polluted with industrial effluents in Nigeria were identified as belonging to the genus *Bacillus* using culture techniques, API 50CH kits and sequence analysis of 16S rRNA genes. From the analytical results, the bacterial isolates were identified as *Bacillus subtilis* M19F, and *Bacillus subtilis* M16K.

The isolated bacteria were studied for degradation of phenanthrene as a representative compound of PHs and for resistance to HMs. The two isolates displayed effective degradation of 100 ppm of phenanthrene as a sole source of organic carbon (*B. subtilis* M19F, 85.73%; *B. subtilis* M16K, 87.06% within 30 days) in the minimal salt medium (MSM) laden with toxic doses of Ni^{2+}, and Co^{2+}. There was no significant ($P < 0.009$) difference between degradation potentials of the bacteria in a MSM without metals and that fortified with metals, and this depicts that the metabolic functions of the bacterial strains are not impaired by 5.0 mM Co^{2+}, and 5.0 mM Ni^{2+}. *B. subtilis* M19F showed maximum tolerances to 10.0 mM , 12.0 mM, 15.5 mM, 17.0 mM and 20.0 mM of Hg^{2+}, Cd^{2+}, Cr^{6+}, Co^{2+}, and Ni^{2+}, respectively. Similarly, *B. subtilis* M16K showed maximum tolerance to 10.0 mM, 7.0 mM, 16.0 mM, 16.0 mM, and 19.5 mM of Hg^{2+}, Cd^{2+}, Cr^{6+}, Co^{2+}, and Ni^{2+}, respectively.

We also tested multi-resistance to antibiotics of the two isolates. *B. subtilis* M19F showed resistance to 11 different antibiotics, and *B. subtilis* M16K showed resistance to 13 different antibiotics. The findings projected in this study are relevant to bioremediation campaign of sites polluted with PHs, particularly, in typical systems co-contaminated with toxic metals and antibiotics that would have impeded degraders that are sensitive to HMs and antibiotics.

heavy metals resistance, phenanthrene degredation, *Bacillus subtilis*

講演番号：3C11a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ C 校舎 11 会場

Pseudomonas stutzeri NT-I によるセレン酸還元機構の解析
Molecular mechanism of selenate reduction by *Pseudomonas stutzeri* NT-I

○黒田 真史[1,2]、三輪 恵美子[2]、清 和成[2]、惣田 訓[2]、山下 光雄[3]、池 道彦[2]（[1]阪大・CEIDS、[2]阪大院・工・環エネ、[3]芝浦工大・工・応化）
○Masashi KURODA[1,2], Emiko MIWA[2], Kazunari SEI[2], Satoshi SODA[2], Mitsuo YAMASHITA[3], Michihiko IKE[2] ([1]CEIDS, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [3]Coll. Eng., Shibaura Inst. Tech.)

【背景・目的】セレン含有排水の生物学的処理プロセスは、排水に含まれる水溶性のセレン酸イオン及び亜セレン酸イオンを、細菌の代謝を利用して水に不溶の元素態セレンや揮発性のセレン化メチル化合物にまで還元することによってセレンを水相より除去するものである。本プロセスは、既存の物理化学的処理法と比較して省エネルギー・低コストとなり得るだけでなく、除去したセレンを回収・再資源化することが可能であるため、レアメタルの一つであるセレンの持続的利用にも寄与する技術として期待される。我々がセレン精錬工場排水溝より単離した細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I は、好気及び嫌気条件下においてセレン酸を亜セレン酸に還元し、また好気条件下ではさらに亜セレン酸を元素態セレン及びセレン化メチル化合物にまで段階的に還元する高いセレン代謝能力を持ち、本プロセスを担う菌株として期待される。このセレン代謝の分子メカニズムを解明することができれば、プロセスの合理的な設計と制御に結びつくものと考えられる。本研究では、特に NT-I 株のセレン代謝の第一段階であるセレン酸還元に焦点を当て、その分子機構を解明することを目的とした。
【方法・結果】接合伝達性トランスポゾン mini-Tn*5* を用いて作製した NT-I 株の変異株ライブラリより、セレン酸還元能変異株を 3 株取得した。これら変異株のうち 2 株において同じ ORF が破壊されており、この ORF は 4 つの ORF から成るオペロンを形成していた。このオペロンは *Thauera selenatis* より単離された既報のセレン酸還元酵素をコードするオペロン *serABDC* と比較して、各 ORF の塩基配列、推定アミノ酸配列ともに 80-95%の高い相同性を示した。これより、NT-I 株は *T. selenatis* と同様に、呼吸鎖の末端還元酵素である SerABC によって、セレン酸を電子受容体とした嫌気呼吸を行うものと推測された。続いて、他の電子受容体の共存下での NT-I 株のセレン酸還元能の発現を調べた。三角フラスコを用いて好気培養した菌体にセレン酸を添加したところ、速やかなセレン酸の還元が見られたが、バッフル付き三角フラスコを用いてより好気的に培養した菌体ではセレン酸還元は生じなかったことから、セレン酸還元酵素の発現に溶存酸素濃度が大きく影響するものと考えられた。また、セレン酸と硝酸を同時に添加した場合、セレン酸のみを添加した場合と比較して若干のセレン酸還元速度の低下が見られたものの、明確な阻害は見られなかったことから、NT-I 株におけるセレン酸還元能の発現は硝酸によって抑制されないことが明らかとなった。
【謝辞】本研究は JSPS 科研費 No. 22310047 の助成を受けたものです。

Selenium, Rare metal, *Pseudomonas stutzeri*

講演番号：3C11a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ C 校舎 11 会場

Methylobacterium fujisawaense FD-1 株による高濃度ホルムアルデヒドの分解
Biodegradation of high concentrations of formaldehyde by Methylobacterium fujisawaense FD-1

○塩崎 恵未[1]、米光 裕[2]([1]和歌山高専専攻科エコ、[2]和歌山高専物質工)
○Emi SHIOZAKI[1], Hiroshi YONEMITSU[2] ([1]Wakayama NCT, [2]Wakayama NCT)

【目的】ホルムアルデヒドは、国内で年間約 120 万トン生産されており、フェノール樹脂原料、界面活性剤、農薬、防腐剤など幅広い分野で使用されている。ホルムアルデヒドは低濃度でも人体に悪影響を及ぼすことから、ホルムアルデヒド含有排水はその分解処理が必要となる。我々は、安全で安価なホルムアルデヒド分解処理システムの開発を目指し、微生物によるホルムアルデヒド分解法に着目した。本研究では、土壌よりホルムアルデヒド分解菌を分離し、その菌のホルムアルデヒド分解特性を調査した。
【方法】ホルムアルデヒド分解菌のスクリーニングは、土壌中の微生物を 0.1%ホルムアルデヒド寒天培地で培養し、生じたコロニーのホルムアルデヒド分解能を調べることにより行った。なお、ホルムアルデヒド分解能は、菌体を 0.1%ホルムアルデヒド液体培地に接種し、30℃で振とう培養後、ホルムアルデヒド濃度の減少により確認した。ホルムアルデヒド濃度はアセチルアセトン法(Nash 1953)により測定した。ホルムアルデヒド分解菌のホルムアルデヒド分解特性としては、ホルムアルデヒド濃度、至適温度、至適 pH を調べた。一方、ホルムアルデヒド分解菌の同定は、16S-rRNA 遺伝子の解析により行った。
【結果と考察】ホルムアルデヒド分解菌を土壌よりスクリーニングした結果、数種のホルムアルデヒド分解菌が得られた。その中で最も分解能の高かった菌株を FD-1 株と命名した。FD-1 株のホルムアルデヒド分解特性を調べたところ、ホルムアルデヒド液体培地に菌体を OD_{660} が 0.8-1.0 になるように接種し 30℃で振とう培養した結果、培養開始時のホルムアルデヒド濃度が 20,000 mg/L (2.0%) の場合には、47 時間でその 99%を分解した。また、30,000 mg/L (3.0%) の場合でも 71 時間で 83%を分解した。FD-1 株のホルムアルデヒド分解における至適温度は 40℃付近、至適 pH は 6 付近であった。一方、FD-1 株はピンク色のコロニーを生じる桿菌で、16S-rRNA 遺伝子の解析より非病原性菌である *Methylobacterium fujisawaense* あるいはその近縁種と同定した。以上の結果より、FD-1 株は高濃度ホルムアルデヒド含有排水の処理に応用できる候補と考える。

Formaldehyde, Biodegradation, Methylobacterium

講演番号：3C11a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ C 校舎 11 会場

Stenotrophomonas maltophilia のクロロホルムに対する走性応答
Chemotactic response of *Stenotrophomonas maltophilia* toward chloroform
○荷方 稔之、荒谷 一典、柿井 一男（宇都宮大院工）
○Toshiyuki NIKATA,Kazunori Araya,Kazuo Kakii (Utsunomiya Univ.)

【目的】　運動性を有するバクテリアは化学物質の濃度勾配を感知し，集積や忌避といった行動的応答を示す。この性質は一般に貧栄養な自然環境で，細菌が生き延びるために有利に働くと考えられる。さらにこの性質を応用することで，新規な環境モニタリングや効率的な汚染物質のバイオレメディエーションの開発につながることが期待される。活性汚泥から分離したバクテリア *Stenotrophomonas maltophilia* PNT1 株およびその標準菌株 JCM1975 株は，*p*-ニトロトルエンやクロロフェノールなどの幅広い化学物質に対して走性を示す。そこで本発表ではクロロホルムに着目し，その走性応答を調査したので報告する。
【実験方法】　細菌の走化性測定は倒立位相差顕微鏡を用いて行った。菌体を培養後，40mM MOPS 緩衝液(pH7.0)で洗浄し，濁度 0.1（OD_{660}）に調整した菌体懸濁液に，クロロホルムを含む寒天溶液をキャピラリーに吸引，挿入した。その開口付近に集積又は忌避する顕微鏡映像から画面内菌体数の経時変化を計測し、濁度あたりの集積初速度である比集積初速度を算出し走化性を評価した。
【結果及び考察】　本研究において調査したクロロホルムに対して *S. maltophilia* は強い集積応答を示した。クロロホルムは多くの細菌にとって毒性を示すため，これまで緑膿菌や海洋性バクテリアにおける忌避応答は報告されているが，クロロホルムに集積応答を示すバクテリアの報告はなく，本細菌による走性応答は比較的新規な応答であると考えられた。本測定法を用いてクロロホルムに対する応答の濃度依存性を調査したところ，3.7mM のキャピラリー内クロロホルム濃度にまで応答を検出することができた。一方で *S. maltophilia* はクロロホルムを資化しないため，本物質に対して集積応答することの生物学的意味は興味深い。現在本走性応答の特異性を調べるため，他の *Stenotrophomonas* 属細菌を含む他細菌種についてクロロホルムに対する走性応答を測定し，さらにより詳細な検討を行うためクロロホルム走性センサー遺伝子の同定を試みている。

chemotaxis, chloroform, *Stenotrophomonas maltophilia*

講演番号：3C11a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ C 校舎 11 会場

Pseudomonas fluorescens KU-7 株の 2-ニトロ安息香酸に対する走化性
Chemotaxis of *Pseudomonas fluorescens* strain KU-7 toward 2-nitrobenzoate
○藤岡 諒、岩木 宏明、長谷川 喜衛（関西大・化学生命工）
○MAKOTO FUJIOKA,HIROAKI IWAKI,YOSHIE HSEGAWA (Kansai University)

【目的】細菌は、化学的環境変動を効果的にかつ速やかに感知して、生存に有利な環境に向かって移動することが知られている。このような細菌の応答システムは、走化性と呼ばれている。細菌の中には、芳香族化合物に対し走化性を示す菌株も存在することから、それらの走化性応答を利用することで、効率的な環境汚染物質の分解法の開発への応用が期待される。*Pseudomonas fluorescens* KU-7 株は、2-ニトロ安息香酸 (2-NBA) を 3-ヒドロキシアントラニル酸 (3-HAA) を経由して分解し、2-NBA に対し走化性を示す。我々は、これまでに、*P. fluorescens* KU-7 株の 2-NBA 分解系酵素遺伝子の解析を行う過程で、2-NBA に対する走化性レセプター遺伝子 (*nbaY*) を特定している。さらに、2-NBA ニトロレダクターゼ遺伝子 (*nbaA*) 欠損変異株は 2-NBA に対して走化性を示さず、3-HAA に対して走化性を示すことから、NbaY は 2-NBA そのものではなく、2-NBA 代謝中間体を感知し 2-NBA 走化性を示すことが示唆されている。そこで、本研究では NbaY の受容基質について検討を行った。
【実験方法と結果】NbaY が感知している中間代謝物を特定するため、2-ヒドロキシルアミノ安息香酸ムターゼ遺伝子 (*nbaB*)、3-HAA 3,4-ジオキシゲナーゼ遺伝子 (*nbaC*)、2-アミノ-3-カルボキシムコン酸-6-セミアルデヒドデカルボキシラーゼ遺伝子 (*nbaD*)、2-アミノムコン酸 6-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子 (*nbaE*) 欠損変異株を造成した。これらの変異株について 2-NBA に対する走化性試験を行ったところ、*nbaB* および *nbaC* 欠損変異株は走化性を示さず、*nbaD* および *nbaE* 欠損変異株は忌避性の走化性を示した。造成した全ての欠損変異株が誘因性の走化性応答を示さなかったことから、2-NBA 分解系酵素は 2-NBA 分解の中間代謝物により誘導されていると考えた。更に、塩基配列より、*nbaY* は *nbaA* とオペロン構造を形成していることが推定されている。そこで、2-NBA 分解系の誘導物質の特定を行うため、*nbaA*、*nbaB*、*nbaC*、*nbaD* および *nbaE* 遺伝子欠損変異株を 2-NBA を含む培地で培養し、NbaA および NbaC 酵素活性の測定を行った。その結果、*nbaD*、*nbaE* 遺伝子欠損変異株ではいずれも活性が見られたが、*nbaA*、*nbaB*、*nbaC* 遺伝子欠損変異株では活性は見られなかった。このことより、2-アミノ-3-カルボキシムコン酸-6-セミアルデヒドが 2-NBA 分解系の誘導物質であることが明らかとなった。現在、各変異株で NbaY が発現しているかどうかを確認するため、RT-PCR を行っている。

Pseudomonas fluorescens, 2-nitrobenzoate, chemotaxis

講演番号：3C11a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ C 校舎 11 会場

4-Chloroaniline degradation by toluene dioxygenase pathway from *Pseudomonas putida* T-57

○Tisana Nitisakulkan[1], Daizou KUDOU[1], Shota OKU[1], Alisa S. VANGNAI[2], Takahisa TAJIMA[1], Yutaka NAKASHIMADA[1], Junichi KATO[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Chulalongkorn Univ.)

4-Chloroaniline (4CA) is a chlorinated aromatic pollutant generated by both biotransformation of herbicides and chemical reaction in drinking water treatment process. Because of its toxicity to human and living organisms in environment, it should be subjected to be treated. 4CA biodegradation/biotransformation pathways have been reported by several research groups, but gene responsible for 4CA has not yet been reported. We found that *Pseudomonas putida* T-57 (PpT57) is able to convert aromatic compounds, toluene, due to the existence of *tod* operon (*todC1C2BADE)*, which encodes toluene dioxygenase system. In this study, the *tod* operon from *P. putida* T-57 was investigated for its capability to transform 4CA. Initially, the capability of Tod system for 4CA transformation was proven by overexpression of *todC1C2BA* (encoding toluene dioxygenase) in *E. coli* DH5α. By using a resting cell technique, *E. coli* DH5α transformant harboring *todC1C2BA* could convert 25% of initial 4CA concentration, while the native host could not. Although this result showed that *todC1C2BA* may have potential ability to transform 4CA, its indigenous expression level in PpT57 was shown to be not enough for effective degradation because 4CA was only transformed by 5% of its initial concentration (2mM). To enhance the ability of Tod system in PpT57 for 4CA biotransformation, overexpression of the following two clusters of 1) *todC1C2BAD* (pHKkptCD), in which *todD* encoded *cis*-toluene dihydrodiol dehydrogenase gene, and 2) *todC1C2BADE* (pHKkptCE), in which *todE* encoded catechol 2,3-dioxygenase gene, were constructed and evaluated. The PpT57/pHKkptCD could completely transformed 2 mM 4CA with the transformation rate of 85 ± 3.80 mg/L/h. However, the transformation of 4CA by the PpT57/ pHKkptCE was only 70 ± 2.8% (with the transformation rate of 58.42 ± 2.1 mg/L/h). This result may suggest product inhibition which occurred due to the overexpression of catechol 2,3-dioxygenase gene. In addition, the transformation intermediates generated from the PpT57/pHKkptCD activity was determined by LC-MS analysis to be 4-chlorocatechol and 4-chloro-aminophenol. These results suggest that PpT57 transformants ,overexpress *tod* doperon, exhibit the height potential to convert 4CA into 4-chlorocatechol. Presently, the pathway and intermediate are investigated and further investigations will be conducted to enhance 4CA biotransformation system in PpT57 to complete mineralization

Pseudomonas putida T-57, tod operon, 4-chloroaniline

講演番号：3C11a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ C 校舎 11 会場

酢酸添加条件における好気的ジクロロメタン分解細菌の代謝関連遺伝子の発現解析

Analysis of gene expression of aerobic dichloromethane degrading bacteria grown on acetate

○細田 晃文、竹内 一貴、田村 廣人 (名城大農)
○Akifumi HOSODA,Kazutaka TAKEUCHI,Hiroto TAMURA (Meijo Univ.)

【背景・目的】現在，有機溶剤を含む排水処理は，焼却処理や触媒による化学分解等のエネルギー消費型である。さらに，法改正により浄化対象物質はオンサイト浄化が求められるようになっている。このことからも微生物を利用した浄化プロセスの構築は重要である。これまでに本研究室では，近年，その有害性が指摘されているジクロロメタン（DCM）を含有した排水の浄化能力を有する細菌の DCM 分解能の向上を目的とした培養条件の検討を試み，低濃度の酢酸添加により DCM 分解能が促進されることを明らかにした。本報告では，酢酸添加が DCM 分解にどのように作用しているのかを明らかにするために，いくつかの代謝関連遺伝子の定量解析を行い，酢酸添加時の DCM 代謝を推定した。
【方法】供試菌株には好気性塩素化アルカン類分解細菌と報告がある *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 株(ATCC 43050)を用いた。GJ10 株の DCM 分解試験は最小無機塩培地あるいは 1/10Nutrient Broth 培地 5 mL に DCM（終濃度 3.1 mM）および酢酸（終濃度 1.0 mM）を添加した液体培地を入れたブチルゴムとアルミキャップで密栓した試験管にて 27℃，21 日間振とう培養した。GJ10 株の増殖は $OD_{660\ nm}$ を経時的に測定した。GJ10 株による DCM 分解および有機酸の変化は，それぞれ，ガスクロマトグラフィー（GC2014-ECD），イオン分析計（IA-300）および高速液体クロマトグラフィーにより分析した。各試験区の細胞から抽出した RNA より cDNA 合成し，DCM 代謝に関連する遺伝子（haloalkane dehalogenase:*dhlA*, formate dehydrogenase:*fdh*, acetyl-CoA synthetase:*acs* など）と 16S rRNA 遺伝子を SYBR Green 法を用いたリアルタイム PCR（Step-One plus）により定量した。各遺伝子の変化量は，16S rRNA 遺伝子で標準化したΔΔCt 法により比較した。
【結果および考察】21 日間の培養で GJ10 株は 1.5 mM の DCM を好気的に分解する能力を有していた。また酢酸添加に伴い，DCM 分解率は 0.12 mmol/L/day から 0.20 mmol/L/day に向上し，この分解に伴ってギ酸の生成および資化が認められた。この時の DCM 代謝関連遺伝子の変化量は，酢酸添加により *dhlA* が 10 倍増加したが，*acs* はほとんど変化しなかった。また，酢酸添加の有無に関わらず，*fdh* は約 20 倍増加した。これらの結果から *X. autotrophicus* GJ10 株における DCM 分解経路は，*dhlA* による DCM 脱塩素化からのギ酸生成とそれに伴うギ酸分解であることが推定されたが，DCM と酢酸の代謝経路の関連性は明らかにできなかった。今後は，さらなる DCM および酢酸代謝関連遺伝子の発現解析を行い，酢酸が *dhlA* など DCM 代謝関連遺伝子の発現を誘導し，DCM の分解率促進に関与しているのかどうか調べる予定である。

dichloromethane, quantitative PCR, acetate

講演番号：3C11a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ C 校舎 11 会場

高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株によるビスフェノール A 代謝機構の解明
Metabolism of bisphenol A by hyper lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624
○王 剣橋[1]、山本 涼子[2]、山本 陽太郎[2]、徳元 俊伸[3]、轟 泰司[2]、平井 浩文[2]、河岸 洋和[1,2] ([1]静大創造院、[2]静大農、[3]静大理)
○ Jianqiao WANG[1], Ryoko YAMAMOTO[2], Yotaro YAMAMOTO[2], Toshinobu TOKUMOTO[3], Yasushi TODOROKI[2], hirofumi HIRAI[2], Hirokazu KAWAGISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [2]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [3]Fac. Sci., Shizuoka Univ.)

【背景・目的】ビスフェノール A（BPA）はポリカーボネート樹脂、エポキシ樹脂の原料として世界中で生産されている環境ホルモン類である。近年、人や野生動物の内分泌作用を攪乱し、生殖機能阻害、悪性腫瘍等を引き起こす可能性のある環境ホルモン類による環境汚染が世界的に問題となり、生化学的処理に関する研究が多数行われてきている。白色腐朽菌による環境ホルモン類分解機構を解明するため、我々はこれまでに、リグニン分解酵素産生条件下において *Phanerochaete sordida* YK-624 株により BPA を処理すると、BPA が酸化重合していることを報告した[1)]。そこで、本研究では BPA の完全分解を目指し、リグニン分解酵素非産生条件下における *P. sordida* YK-624 株による BPA の分解機構の解明を試みた。
【方法・結果】*P. sordida* YK-624 株を接種し、培養 3 日後のポテトデキストロース液体培地に 0.5 mM BPA を添加した結果、培養 7 日間後に約 60%の BPA が除去されることが判明した。そこで主要代謝産物の同定を試みたところ、水酸化された BPA（hydroxy-BPA）が主要代謝産物として同定された。この hydroxy-BPA はさらに代謝されていることが予想されたため、hydroxy-BPA の合成を行い、代謝実験を行ったところ、培養 7 日間後に約 77%の hydroxy-BPA が除去された。代謝産物の同定を試みた結果、4-(2-(4-hydroxyphenyl)propan-2-yl)-2-methoxyphenol 及び 4-(2-(3,4-dimethoxyphenyl) propan-2-yl)phenol）が同定された。さらにこれら代謝産物のエストロゲン様活性を測定した結果、検出された全ての代謝産物は BPA と比較してエストロゲン様活性が極めて低かった。以上の結果より、*P. sordida* YK-624 株を用いることにより、BPA を重合させることなく、毒性を除去可能であることが証明された。
1) 山本　陽太郎ら，第 60 回日本木材学会大会研究発表要旨集（宮崎）, 66, 2010.

Phanerochaete sordida YK-624, bisphenol A, metabolism

講演番号：3C11a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ C 校舎 11 会場

Sphingomonas bisphenolicum AO1 株のゲノム構造解析
Analysis of the genome structure of Sphingomonas bisphenolicum AO1.
○木場 悟、上村 真央、奥野 将司、小田 佳孝、土田 昇平、松村 吉信（関西大学）
○satoru KOBA,mao UEMURA,masashi OKUNO,yoshitaka ODA,shohei TSUTHIDA,yoshinobu MATSUMURA (Kansai univ.)

【目的】
ビスフェノール A（BPA）はポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料などとして大量に用いられる汎用性に優れた合成化合物である。一方、BPA が内分泌攪乱化学物質として生体に影響を及ぼすとの研究報告もあり、カナダではこども用の飲用ボトルへの使用禁止や工場からの排出規制が設けられている。このため、BPA の分解や無毒化処理技術の開発が重要となる。当研究室では BPA を完全分解する *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株を単離し、BPA 分解の初発反応に関わるシトクロム P450 モノオキシゲナーゼシステムの構造遺伝子が約 70kb の内在性プラスミド pBAR1 にコードされていることを明らかにしている。また、AO1 株が様々なビスフェノール類化合物やビフェニル類化合物も分解できることから、合成化合物で汚染した環境の浄化に利用可能であると予想されている。しかし、BPA の分解能は不安定で、その一要因に pBAR1 の遺伝子構造の不安定性があげられる。実際に、BPA 分解能を失った自然突然変異株 AO1L 株を AO1 株の培養細胞より単離している。そのため AO1 株を汚染環境の浄化に活用するには pBAR1 を含む AO1 株の遺伝子構造の不安定性の解消が必要と考えられる。そこで、本研究では AO1 株に含まれるすべての DNA の塩基配列決定を試み、その遺伝子構造を解析した。
【方法と結果】
AO1 株には複数のプラスミド様の DNA が存在していることを確認している。そこでパルスフィールドゲル電気泳動を用いて 250kb 未満のプラスミド DNA の確認を行った。その結果、AO1 株には約 70kb、約 80kb、約 110kb、約 250kb の四種類が確認された。さらに、BPA 非分解変異株 AO1L 株についてもプラスミド DNA を確認した結果、 AO1 株で確認された約 70kb の DNA 断片の欠落と、新たに約 20kb、約 45kb の DNA が確認された。これまでの研究で AO1L 株では pBAR1 が約 20kb 欠落していることが予想されていたが、その結果とも一致するものであった。ショットガン法による pBAR1 の塩基配列決定から約 52kb の解読に成功し、環境汚染物質分解に関わる遺伝子として、aldehyde dehydrogenase 遺伝子（*adh*）や lignostilben-α,β-dioxygenase 遺伝子（*lsd*）、4-hydroxybezoate 3-monooxygenase 遺伝子（*bisdF*）、 haloacid dehalogenase like hydrolase 遺伝子（*had*）が確認された。現在、パルスフィールドゲル電気泳動で分離した各プラスミド断片および染色体 DNA を抽出し、次世代シーケンサーでの塩基配列決定を行っている。その後、AO1 株の遺伝子構造解析を行う予定である。

bioremediation, genome structure, synthetic compound

講演番号：3C11a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ C 校舎 11 会場

石油中に含まれる芳香族化合物資化性海洋性細菌の探索と解析

Search and analysis of marine bacteria utilize aromatic hydrocarbons in oil.

○千葉 翔子[1]、木村 勇太[2]、橋爪 大輔[2]、山岡 正英[2]、若泉 博大[2]、岩田 健一[1,2] ([1]芝工大院シ、[2]芝工大シ生)
○Shoko CHIBA[1], Yuta KIMURA[2], Daisuke HASHIZUME[2], Masahide YAMAOKA[2], Hiroo WAKAIZUMI[2], Kenichi IWATA[1,2] ([1]Shibaura Institute of Technology, [2]Shibaura Institute of Technology)

【目的】石油中には主に炭化水素と微量の硫黄・酸素・窒素・金属などが含まれている。その中には、揮発性が高いヘキサン、揮発性の低いヘキサデカン・トルエン・ナフタレン、タール状で難分解性であり、残留しやすい多環芳香族化合物（polycyclic aromatic hydrocarbons：PAHs（フルオレン・ナフタレン・フェナントレン等））、硫黄・酸素・窒素を含む複素環式化合物（ジベンゾチオフェンやカルバゾール（CAR））などがある。これらは、難分解性、発癌性、変異原性等の毒性を有し、脂溶性であるため生物濃縮が懸念されている。また、石油タンカーの座礁や化学工業廃水の漏洩等においては、これらの化合物が海洋汚染の原因となっている。このような汚染を浄化するため、物理的・化学的手法が用いられるが、単独で完全に除去することは難しく、コストも掛かる。そこで汚染物質資化性菌を用いた環境浄化（バイオレメディエーション）が期待されている。以上のことから、本研究では日本各地の海水から芳香族化合物資化性海洋性細菌を探索し、解析を行った。
【方法】日本各地（富山県富山港・兵庫県神戸港・東京都東京湾（品川・越中島・葛西・浜松町）・新潟県寄居浜）から海水を採取し、菌源として用いた。培地には人口海水培地（ONR7a培地）・天然海水培地（SEA培地）を用い、基質にはカルバゾール・フェナントレン・フルオレン・ヘキサデカンを使用し集積培養を行った。生育後はそれぞれの基質を加えたONR7a培地・SEA培地・Marine Brothの平板培地にて培養した。コロニーが確認されたものから、それぞれの基質を含むONR7a培地もしくはSEA培地で液体培養し分解能を確認した。分解能の確認ができたものは、Marine Broth平板培地で培養した。
【結果】現在カルバゾール資化性のOC14株（富山県富山港)、同じくカルバゾール資化性のOC15S株（東京都東京湾（越中島))、フェナントレン資化性のOC16S株・OC17S株（兵庫県神戸港)、同じくフェナントレン資化性のOC21S株（東京都東京湾（浜松町））とOC22S株（新潟県寄居浜)、フルオレン資化性のOC18S株（東京都東京湾（品川))、ヘキサデカン資化性のOC19株（東京都東京湾（越中島))、同じくヘキサデカン資化性のOC20株（東京都東京湾（葛西））の単離に成功した。その後total DNAを抽出し、OC16S株は16S rRNA解析を行った。BLASTによる相同性検索の結果からOC16S株は*Thalassospira*属と99%の相同性を示した。この結果より、*Thalassospira* sp. OC16S株とした。現在は、他の菌株についても16S rRNA解析を続けている。

aromatic hydrocarbons, marine bacteria, bioremediation

講演番号：3C11a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ C 校舎 11 会場

揮発性有機化合物 VOC 分解菌の探索と解析
Screening and characterization of Volatile-Organic-Compound degrading bacteria
○長瀬 駿、米塚 健太、荒木 直人、笠井 大輔、政井 英司、福田 雅夫（長岡技科大・生物）
○ Shun NAGASE,Kenta YONEDZUKA,Naoto ARAKI,Daisuke KASAI,Eiji MASAI,Masao FUKUDA (Nagaoka Univ. Tech.)

【序論】トリクロロエチレン（TCE）は、かつて IC 産業などで広く用いられた、土壌、地下水汚染を引き起こす揮発性有機化合物である。TCE による土壌、地下水汚染に対し、微生物の有する物質分解能力を利用した環境浄化技術（バイオレメディエーション）が期待されており、土着細菌の分解能力を利用した汚染浄化技術（バイオスティミュレーション）は既に実用化されている。しかし、外部から分解菌を導入するバイオオーグメンテーションに関しては、分解菌の安全性確認にかかるコストから技術の普及は進んでいない。バイオオーグメンテーションの利用促進のためには、オープンに使用できる新たな TCE 分解菌の開発と提供が望まれる。本研究では、新規 TCE 分解菌の開発を目指し、環境中からの TCE 分解菌スクリーニングおよび TCE 分解能の評価を行った。
【方法】フェノールとの共代謝で TCE を好気的に分解する菌に着目し、フェノール資化菌から TCE 分解菌を探索するため、フェノール資化菌の単離を試みた。2 mM のフェノールを含む無機塩液体培地が入った 20 ml バイアルに TCE 汚染土壌を 2 g 程度添加し、1 週間室温で振とう培養した。培地が白濁した試料について、その 2%を継代培養し、これを 3 度繰り返して白濁した試料をフェノール資化群集とした。得られたフェノール資化群集を LB 寒天培地上で純粋分離し、菌を単離した。単離した菌のフェノール生育能を 2 mM のフェノールを含む無機塩寒天培地および液体培地で調べ、生育が確認されたものをフェノール資化菌とした。獲得したフェノール資化菌の TCE を含む塩素化エチレン類の分解能および誘導性を調べるため、フェノールまたはコハク酸で培養した休止細胞 1 ml を 500 nmol の TCE とともに 20 ml のガラスバイアルに密封し、経時的な残存量をガスクロマトグラフィーで定量した。
【結果・考察】TCE 汚染土壌から、13 株のフェノール資化菌を単離した。そのうち 4 株が TCE 分解能を有していた。中でもフェノール生育能が最も強い PHE3-6 株では、フェノール培養菌体で 500 nmol の TCE を 24 時間で完全に分解した。コハク酸培養菌体ではこの分解が観察されなかったため、PHE3-6 株の TCE 分解がフェノール誘導的であることが示唆された。また、塩素が一つ少ない 1,2-ジクロロエチレン（DCE）のシス、トランス異性体も分解し、PHE3-6 株が幅広い分解能を有することが示唆された。16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統解析の結果、PHE3-6 株は *Cupriavidus* 属に属することが示唆された。

Volatile organic compound, Trichloroethylene, Phenol degrading bacteria

講演番号：3C11a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ C 校舎 11 会場

ドリン系農薬分解菌の分解関連遺伝子の探索
Discovering of dieldrin-degrading ability of *Geobacillus* sp. DIL-1
○Yee Lii Mien[1]、堀嵜 允文[1]、土金 恵子[2]、細山 哲[2]、藤田 信之[2]、松本 貴嗣[3]、吉川 博文[3,4]、春田 伸[5]、朝井 計[6]、五十嵐 泰夫[7]、岡田 憲典[1]、山根 久和[8]、野尻 秀昭[1]([1]東大生物工学セ、[2]NITE、[3]東農大・ゲノム解析セ、[4]東農大応生科・バイオ、[5]首都大生命、[6]埼玉大院理工分子生物、[7]東大・応生工、[8]帝京大・バイオ)
○Lii Mien Yee[1], Tadafumi Horisaki[1], Keiko Tsutikane[2], Akira Hosoyama[2], Nobuyuki Fujita[2], Takashi Matsumoto[3], Hirofumi Yoshikawa[3,4], Shin Haruta[5], Kei Asai[6], Yasuo Igarashi[7], Kazunori Okada[1], Hisakazu Yamane[8], Hideaki Nojiri[1] ([1]The University of Tokyo, [2]NITE, [3]Tokyo University of Agriculture, [4]Tokyo University of Agriculture, [5]Tokyo Metropolitan Univ., [6]Saitama Univ., [7]The University of Tokyo, [8]Teikyo Univ.)

【目的】
Dieldrin (DIL)、endrin (END)などのドリン系農薬は日本における農薬登録が失効し使用を中止されて久しいが、環境中での長期残留性や生物への強い毒性からpersistent organic pollutants (POPs)に指定されている。我々は、以前の研究で DIL 汚染化模擬堆肥から DIL 懸濁 1/3 LB 寒天培地上で明瞭なクリアゾーンを形成する *Geobacillus* sp. DIL-1 株を単離した。60℃で 20 日間培養後、GC-MS による寒天培地中の残存基質量を測定した結果、非クリアゾーン形成領域に比べて、クリアゾーン形成領域では 75%程度の DIL が減少していることを明らかにしてきた。また、昨年度の本大会で、DIL-1 株は DIL 以外の疎水性化合物 fluoranthene (FLA)、pyrene (PYR)懸濁 1/3 LB 寒天培地においても明瞭なクリアゾーンを形成することができることを報告した。本年は、今まで明らかになっていない DIL 分解に関与する遺伝子またはタンパク質の同定を試み、DIL-1 株における DIL 分解の知見を得ることを目的とした。
【方法と結果】
DIL-1 株のゲノムを用い、Epicentre 社の CopyControl™ Fosmid Library Production Kit によりフォスミドラブラリーを作製した。得られた大腸菌クローンを DIL 懸濁 1/3 LB 寒天培地で 37℃で培養し、クリアゾーン形成能のスクリーニングを行った。しかし、約 5,400 クローンをスクリーニングしたものの、37℃でクリアゾーンを形成するクローンは得ることができなかった。DIL-1 株は好熱性細菌であり、60℃で明瞭なクリアゾーンを形成することから、目的のタンパク質が高温において活性を示す可能性があるため、フォスミドクローンを大腸菌が生育できる高温条件である 45℃で培養することにし、現在、クリアゾーン形成能のスクリーニングを試みている。
一方、DIL-1 株から DIL 分解活性を指標にタンパク質を取得するため、DIL-1 株の無細胞粗酵素液を調製し、DIL 懸濁 1/3 LB 寒天培地に滴下した。37℃、45℃、60℃で 5 日間インキュベートした結果、60℃の培地上で明瞭なクリアゾーンを観察することができた。クリアゾーン領域をくり抜き、GC-MS で培地中の DIL 残存量を測定した結果、同寒天培地上の非クリアゾーン形成領域に比べて、約 40%減少したことが明らかになった。現在、DIL-1 株の無細胞粗酵素液を用い、さらなる解析を行っており、その結果も合わせて報告する。
なお、本研究は農林水産省新農業展開ゲノムプロジェクト（GMB0003）として行われた。

Biodegradation, Dieldrin, *Geobacillus*

講演番号：3C11a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ C 校舎 11 会場

3-クロロフェノール脱塩素嫌気性集積培養物における微生物群の増殖のための炭素源の特定
Identification of carbon sources for growth of microbial communities in the 3-chlorophenol-dechlorinationg anaerobic enrichment culture
○鈴木 大典、李 智リン、章 春芳、片山 新太 (名古屋大・エコトピア)
○Daisuke SUZUKI,Zhiling LI,Chunfang ZHANG,Arata KATAYAMA (EcoTopia Science Institute, Nagoya Univ.)

【背景と目的】人の手が届きにくい地下水等の地下圏を汚染する芳香族塩素化合物を汚染原位置で嫌気性微生物群を利用して分解するバイオレメディエーション技術の開発の課題として、（１）塩素が一つ置換した芳香族塩素化合物が脱塩素されにくいこと、（２）有機物が少ない地下圏へ微生物の増殖のための炭素源の供給方法がある。本研究グループでは、脱塩素されにくい芳香族塩素化合物の内の3-クロロフェノール(3-CP)をフェノールへ脱塩素する嫌気性培養物（A3MCP培養物）の集積に成功した。この培養物は3-CPとビタミン混合物以外に有機物を含まない無機塩培地を用いて得られた。本研究では、3-CP脱塩素嫌気性微生物群の増殖に対する炭素源の特定を目的とし、A3MCP培養物を様々な条件で培養した。
【方法】電子供与体としてH_2 (1%)と電子受容体として3-CP (50 μM)を含む炭酸水素塩緩衝化嫌気性無機塩培地（気相：O_2-free N_2/CO_2 , 80%/20%）を基本培地とした。基本培地で培養したA3MCP培養物を接種源（接種量0.25%, v/v）として使用した。培養実験には、対照としての基本培地と共に、基本培地を次のように改変した培地を使用した：酢酸塩（5 mM）添加培地、ビタミン混合物無添加培地、および炭酸水素塩/CO_2除去培地。各培養物を30℃で嫌気的に保温した。各培養物の3-CPおよびフェノールの濃度を測定した。
【結果と考察】基本培地の培養物では、3-CP 脱塩素、H_2および CO_2濃度の減少が起こり、そして菌数が増加した。脱塩素産物のフェノールは分解されなかった。この培養物は酢酸塩添加培地での培養物よりも短い培養日数で添加した全ての 3-CP を脱塩素した。ビタミン混合物無添加培地の培養物では基本培地の培養物と同様に 3-CP 脱塩素が起こり、ビタミン混合物は炭素源として働かなかった。炭酸水素塩/ CO_2除去培地での培養物は 3-CP を脱塩素せず、また 3-CP も分解しなかった。これらの結果は、A3MCP 培養物の嫌気性微生物群が有機物の 3-CP およびフェノールを炭素源として利用していないことを示した。さらに、この嫌気性微生物群は増殖のための炭素源として酢酸塩のような有機物を必須とせずにむしろ無機炭素の炭酸水素塩または CO_2を炭素源として優先的に利用して独立栄養的に増殖していることが示唆された。有機物含量が低く、微生物の増殖のための炭素源となる利用可能な有機物が限られた地下圏に蓄積する芳香族塩素化合物に対する汚染原位置でのバイオレメディエーション技術開発のために本研究の培養物の嫌気性微生物群は有効な材料となるだろう。

3-chlorophenol, dechlorination, autotrophic growth

講演番号：3C11a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ C 校舎 11 会場

原油試料からの鉄腐食性硝酸塩還元菌の分離

Isolation of an iron-corroding nitrate-reducing bacterium from crude oil.

○飯野 隆夫[1]、若井 暁[2]、鶴丸 博人[3]、伊藤 公夫[4]、大熊 盛也[1]、原山 重明[5]([1]理研 BRC-JCM、[2]広島大院・生物圏、[3]NITE・NBRC、[4]新日鐵住金・先端技研、[5]中大・理工)
○Takao Iino[1], Satoshi Wakai[2], Hirohito Tsurumaru[3], Kimio Ito[4], Moriya Ohkuma[1], Shigeaki Harayama[5] ([1]RIKEN-BRC JCM, [2]Hiroshima Univ., [3]NITE・NBRC, [4]Nippon Steel & Sumitomo Metal Corp., [5]Chuo Univ.)

【目的】石油備蓄基地施設や天然ガス・パイプラインなどで問題視される金属腐食は化学的要因によるものと考えられがちである。しかし、急速な腐食の進行や局所的な腐食現象が確認され、微生物腐食による金属腐食（微生物腐食（Microbiologically influenced corrosion: MIC)）が疑われている。この問題に対して、硫酸塩還元菌が主な原因菌として頻繁に研究されているが、関与する微生物種や腐食メカニズムについて十分に知見が得られていない。そこで、本研究では原油試料から鉄腐食能を有する微生物株を分離することを目的とした。
【方法】2004 年に石油備蓄基地から原油試料を収集した。原油試料 0.5 ml を嫌気置換した人工海水培地に接種し、3 週間 25°C にて集積培養を行なった。集積培養を繰り返した後，同組成の寒天培地を用いて MIC1-1 株の純粋分離を行なった。MIC1-1 株に対し、細胞形態観察、生理・生化学試験（電子受容体など)、16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行なった。鉄顆粒を加えた人工海水培地に MIC1-1 株を接種し、25°C で 1 ヶ月静置培養を行なった。培養後の溶出鉄量、水素発生量、窒素化合物量、有機酸量を定量分析した。
【結果および考察】MIC1-1 株は通性嫌気性、非運動性、無芽胞、カタラーゼ陰性のグラム陰性桿菌であった。炭素源（D-グルコースや有機酸など）を必須に要求し、電子受容体に硝酸塩を利用する硝酸塩還元菌であった。16S rRNA 遺伝子解析を行なった結果、MIC1-1 株は海洋堆積物から電気培養で純粋分離された *Prolixibacter bellariivorans* $F2^T$ と系統的に近縁であったが、その相同性は 97.2%と低く、新規の *Prolixibacter* 属細菌であると考えられた。鉄腐食試験の結果、10 mM 硝酸塩と有機酸（酢酸塩、乳酸塩など）存在下で、MIC1-1 株の培養液が黄変し、鉄顆粒は黒く変色した。硝酸塩無添加条件では培養液および鉄顆粒に変化は見られなかった。溶出鉄量を測定した結果、MIC1-1 株は無菌区の 6 倍の Fe^{2+}を溶出していた。培養液の各種成分を分析した結果、植菌区では硝酸が減少し、産物として亜硝酸とアンモニアが検出された。以上の結果から、原油から分離された *Prolixibacter* sp. MIC1-1 は炭素源存在下、硝酸塩を電子受容体として鉄腐食を引き起こすことが明らかとなった。近年、原油採掘現場などの実環境で硫酸塩還元菌の繁殖を抑制するために硝酸塩の添加が効果的であるとの報告がされた。しかし、本研究で明らかとなった腐食性硝酸塩還元菌の存在は、硝酸塩添加が時には微生物腐食を拡大させる恐れがあることを意味する。故に、微生物腐食を抑制するためには、硫酸塩還元菌のみならず硝酸塩還元菌も含めた防食技術の開発が必要である。

Microbiologically influenced corrosion, Nitrate-reducing bacterium, Prolixibacter

講演番号：3C11p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ C 校舎 11 会場

エタノール生産担子菌 *Flammulina velutipes* Fv-1 株における外来遺伝子発現とエタノール生産能評価

Heterologous gene expression and ethanol production in ethanol-producing *Flammulina velutipes* Fv-1 strain.

○前原 智子[1]、高畠 幸司[2]、小笠原 渉[3]、五十嵐 圭日子[4]、鮫島 正浩[4]、金子 哲[1]（[1]農研機構　食総研、[2]富山県農技セ・森林研、[3]長岡技大・生物、[4]東大院農生科）
○Tomoko MAEHARA[1], Koji TAKABATAKE[2], Wataru OGASAWARA[3], Kiyohiko IGARASHI[4], Masahiro SAMEJIMA[4], Satoshi KANEKO[1] ([1]NFRI NARO, [2]Toyama PAFFRC, [3]Nagaoka Univ. Tech., [4]Tokyo Univ.)

【背景】　バイオエタノール生産において、糖化酵素生産・糖化・発酵を 1 バッチで行う連結バイオプロセス（Consolidated BioProcessing）法（以下 CBP と略）は、低コストのエタノール変換法として注目されている。我々は、担子菌エノキタケ *Flammulina velutipes* Fv-1 株がエタノール生産能とバイオマスの分解に必要な糖化酵素生産能を有していることに着目し、*F. velutipes* Fv-1 株を用いた CBP によるエタノール生産系の構築を目指した。

【方法・結果】　*F. velutipes* Fv-1 株による、より効率的なエタノール生産を目指すため、遺伝子組換えによる Fv-1 株の改良を行った。*F. velutipes* Fv-1 株の菌糸から作製したプロトプラストを用いた遺伝子導入法を構築し、外来遺伝子発現株の取得に成功した。次に、ペントース発酵に関与している遺伝子や糖化酵素遺伝子を野生型 Fv-1 株に導入し、得られた変異株のエタノール生産能の評価を行った。その結果、*Arabidopsis thaliana* xylose isomerase gene の導入株では、ペントースからのエタノール生産能は野生型 Fv-1 株の約 4 倍の値を示した。また外来遺伝子発現が大変困難と言われる *Trichoderma ressei* cellobiohydrolase gene (*cbh1*)を導入した変異株を作製し、その発現を確認した。*cbh1* 導入株を用い、結晶性セルロースであるアビセルを基質としたエタノール生産能を検討したところ、野生型 Fv-1 株と比べて高いエタノール変換能を有することが示された。

Bioethanol, *Flammulina velutipes*, Xylose isomerase

講演番号：3C11p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ C 校舎 11 会場

シアノバクテリアを糖質源としたアミラーゼ発現酵母による同時抽出糖化発酵エタノール生産
Ethanol production from cyanobacteria in consolidated process of extraction, saccharification and fermentation by using amylase expression yeast.
○藍川 晋平[1,2]、山田 亮祐[3]、中西 昭仁[1,2]、松田 史生[4]、蓮沼 誠久[2,3]、近藤 昭彦[1,2]（[1]神大院工、[2]JST CREST、[3]神大自科、[4]阪大院情報）
○ Shimpei Aikawa[1,2], Ryosuke Yamada[3], Akihito Nakanishi[1,2], Fumio Matsuda[4], Tomohisa Hasunuma[2,3], Akihiko Kondo[1,2] ([1]Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., [2]JST CREST, [3]Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ., [4]Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

【目的】現在のバイオエタノール生産は食糧生産と競合し，耕作地および淡水資源を奪っている．この問題を解決するために，広大な海洋で，海水を利用して培養できる光合成微生物を糖質源としたバイオエタノール生産が注目されている．これまでに光合成微生物の中でも緑藻を糖質源とした酵母によるエタノール生産が行われているが，使用されてきた緑藻の耐塩性が低く，バイオマス生産量・炭水化物生産量が低いことが問題であった．そこで，我々は光合成微生物の中でも高バイオマス生産能・高耐塩性をもち，グリコーゲンを生産するシアノバクテリア*Arthrospira platensis*を糖質源の候補とした．そして，これまでに光強度，硝酸塩濃度の最適化によって，バイオマス生産量を低下させることなく，乾燥重量あたりのグリコーゲン含有量を65%まで向上させ，1 g/Lのグリコーゲンを生産させることに成功している．この結果はこれまでに報告されたシアノバクテリア・緑藻による炭水化物生産量の最高値であり，*A. platensis*が高いグリコーゲン生産能を持つことを明らかにした．また，緑藻を酵母に資化させるためには，大量のアミラーゼによる糖化やアルカリ・酸溶液中での糖質抽出など，高温で複雑な前処理が必要であるが，緑藻に比べ*A. platensis*は容易に破砕でき，簡易な処理で糖質源として利用できることが期待される．しかし，*A. platensis*を糖質源とした酵母によるエタノール生産は行われていない．そこで本研究では，前処理を加えていない*A. platensis*を糖質源とした，酵母による高効率エタノール生産プロセスの開発を行った．
【方法】エタノール発酵時のアミラーゼ添加を省略するため，*Streptococcus bovis*由来のαアミラーゼ，*Rhizopus oryzae*由来のグルコアミラーゼを発現させた酵母*Saccharomyces cerevisiae* MT8-1δGS株を作製した．そして，光強度500 μmol photons m^{-2} s^{-1}，硝酸塩濃度3 mMの条件でグリコーゲンを高蓄積させた*A. platensis*を糖質源として，アミラーゼ発現酵母によるエタノール生産を行った．さらにエタノール生産効率の向上を目指し，ラン藻の細胞壁を加水分解するリゾチームを添加し，エタノール生産を行った．
【結果】アミラーゼ発現酵母 *S. cereviciae* MT8-1δGS によって，アミラーゼを添加することなく，*A. platensis* から（理論収率に対する）エタノール収率 32%でエタノールを生産できた．さらにリゾチームを添加することで，22 g 乾重量/L の *A. platensis* から 6.5 g/L のエタノールを生産でき，エタノール収率が 87%に向上した．本研究では抽出と糖化・発酵を同時進行させるプロセスで *A. platensis* を炭素源としたアミラーゼ発現酵母による高効率エタノール生産に成功した．

Bioethanol, Cyanobacteria, Glycogen

講演番号：3C11p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ C 校舎 11 会場

リグノセルロース系バイオマスからの統合型バイオエタノール生産に資する新規酵母細胞表層提示システムの開発

Development of the novel yeast cell surface display system for the consolidated bioethanol production from lignocellulosic biomass

○猪熊 健太郎、蓮沼 誠久、近藤 昭彦（神戸大院工）
○Kentaro INOKUMA,Tomohisa HASUNUMA,Akihiko KONDO (Kobe Univ.)

近年、低炭素循環型社会実現の観点から、再生可能資源である植物のリグノセルロース系バイオマスからエタノールを製造する、バイオリファイナリーの導入が望まれている。その普及を促進するためには、植物原料の前処理からエタノール生産に至る各工程の効率化、低コスト化が急務であるが、リグノセルロース系バイオマスの糖化のために添加する市販酵素剤のコストの高さが問題の 1 つとなっている。その解決法として、我々は、セルラーゼやヘミセルラーゼを細胞表層に提示した酵母(アーミング酵母)を用いた低コスト型同時糖化発酵プロセスの構築を試みている。菌体自身が糖化能力を持つアーミング酵母を用いることで市販酵素剤の添加量を大幅に削減できる他、発酵終了後に酵母菌体を回収することで酵素活性の繰り返し利用が可能になるなどの利点もあると考えられる。
細胞表層提示のための遺伝子カセットは、提示する酵素の遺伝子配列に加え、発現のためのプロモーター、輸送のための分泌シグナル、表層に酵素を固定するためのアンカー等で構成されている。本研究では、これらの構成要素についてそれぞれ有力と思われる候補を複数用意し、それらを組み合わせた様々な表層提示カセットを構築した。そして、それらを酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のゲノム DNA に組み込み、得られた酵母の表層提示活性を評価することで、表層提示システムの最適化を行った。

cell surface display, cellulase, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：3C11p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ C 校舎 11 会場

発酵阻害物存在下におけるキシロースからのエタノール発酵向上酵母の構築

Construction of the ethanol fermentation improvement *Saccharomyces cerevisiae* from xylose under acetic acid

○崎濱 由梨[1]、蓮沼 誠久[2]、近藤 昭彦[1] ([1]神戸大院工、[2]自然科学系先端融合研究環　重点研究部)
○Yuri SAKIHAMA[1], Tomohisa HASUNUMA[2], Akihiko KONDO[1] ([1]Kobe Univ., [2]Kobe Univ.)

現在、石油の代替エネルギーとしてバイオマスに由来するバイオエタノールが注目されており、バイオマス資源としては稲ワラ、麦ワラ、廃材などのセルロース系バイオマスを原料とするバイオエタノールの生産が求められる。
セルロース系バイオマスを C6 糖のグルコースや C5 糖のキシロースに糖化するには、希硫酸法や水熱分解法等の前処理が必要である。しかしながら、前処理では酢酸、ギ酸などの弱酸、フルフラール、ヒドロキシメチルフルフラールなどのアルデヒド、バニリンなどのフェノール類など、バイオマス由来の種々の過分解物を生じ、これらの副生成物がキシロースからのエタノール発酵を大きく阻害する物質であることが知られている。したがって、セルロース系バイオマスからのエタノール発酵を実用化するには、発酵阻害物質の存在下でも効率的なエタノール発酵が可能な酵母が求められる。
　一方、発酵阻害物質である酢酸に応答する遺伝子についての研究はこれまでにも行われており、Haa1 は酢酸に応答し、様々な遺伝子の転写制御することが知られている。また、*Haa1* 遺伝子は欠失すると酢酸感受性が増すことが報告されている。
そこで本研究では、*Haa1* を過剰発現させることで酢酸存在下におけるキシロースからのエタノール発酵を促進する可能性があると考え、*Haa1* 過剰発現株の構築を試みた。
Saccharomyces cerevisiae BY4741 株に *Scheffersomyces stipitis* 由来のキシロースレダクターゼ（XR）およびキシリトールデヒドロゲナーゼ（XDH）、ならびに *S.cerevisiae* 由来のキシルロキナーゼ（XK）の遺伝子を導入したキシロース資化株 BY4741XU 株を宿主として、*Haa1* 遺伝子を TDH3 プロモータの下流の連結した発現プラスミドを用いて形質転換することで *Haa1* 過剰発現株を構築した。構築した株を酢酸存在下にてキシロース単一炭素源での発酵試験を試みたところ、親株と比較し、高いエタノール生産量を示すことを確認された。

Bioethanol, Inhibitor tolerance, *Haa1*

講演番号：3C11p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ C 校舎 11 会場

ユーカリからの高濃度エタノールの生産

Production of high concentration Ethanol from eucalyptus

○高松 朋輝[1]、佐々木 千鶴[2]、浅田 元子[2]、中村 嘉利[2]([1]徳島大院・先端・生命、[2]徳島大院・ソシオ)
○ Tomoki TAKAMATSU[1], Chizuru SASAKI[2], Chikako ASADA[2], Yoshitoshi NAKAMURA[2] ([1]Dept.Biol.Sci.Tech.,Univ.Tokushima, [2]Dept.Biol.Sci.Tech.,Fac.Eng.,Univ.Tokushima)

【序論】近年、石油等の化石燃料の枯渇が危惧され、またその使用に伴う二酸化炭素の排出による地球温暖化等の環境問題も深刻化している。そこで化石燃料の代替エネルギーとしてバイオマス由来の燃料が注目を浴びている。その代替燃料の原料の１つであるセルロース系バイオマスは、食糧と競合しない原料である。セルロースは地球上で最も多く存在する高分子化合物であり手に入りやすいが、周りに存在するヘミセルロースやリグニンと複合体を形成しているため、セルロースを利用するためには前処理（脱リグニン処理）が必要である。本研究では前処理の方法として環境低負荷である水蒸気爆砕処理法を適用し、セルロース系バイオマスとして木質系バイオマスに分類される広葉樹であるユーカリを用いた。ユーカリは成長の早い樹種であり、世界中で広く植林されている。このユーカリを用いて酵素による糖化を行いバイオエタノールの前駆体となるグルコースを生産するための最適な条件について検討した。また、セルロースの糖化とそれに続く発酵を同時に行う同時糖化発酵(SSF)を利用したユーカリからの高濃度エタノール生産を行い、その最適条件も検討した。
【方法と結果】以下の①～③についての検討を行った。
①酵素糖化と SSF における水蒸気爆砕処理条件（蒸気圧 25,35,45 atm（蒸煮時間 5 min)）の検討
②基質の抽出方法（爆砕物（抽出なし)・水抽出残渣・水及びメタノール抽出残渣）の検討
③SSF における基質濃度（20,50,100,200 g/L）の検討
使用した酵素はメイセラーゼ（明治製菓（株)）で、SSF に使用した酵母は *Saccharomycess cerevisiae* BA11 である。①において、酵素糖化では爆砕処理条件 35 atm,5 min で最も高い糖化率が得られ、SSF では爆砕処理条件 25 atm,5 min で最も高いエタノール濃度が得られた。②において、酵素糖化ではどの抽出方法で得た残渣でも糖化されたが、SSF では爆砕物からはほとんどエタノールは生産されなかった。このことから爆砕物には発酵阻害物が含まれており、水抽出の操作が必要であることが示唆された。③において、基質濃度の上昇に伴いエタノール変換効率が下がることがわかった。本研究では、高濃度かつ効率的なエタノール生産が重要であると考え、基質濃度 100 g/L を最適基質濃度とした。以上の結果から、酵素糖化の最適条件である基質濃度 100 g/L、爆砕処理条件 35 atm、メタノールで抽出された残渣を用いると 85.1 g/L のグルコースが得られることがわかった。また SSF においては基質濃度 100 g/L、爆砕処理条件 25 atm、水及びメタノール抽出残渣を用いると 41.3 g/L のエタノールが得られることが明らかになった。

biomass, ethanol production, eucalyptus

講演番号：3C11p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ C 校舎 11 会場

オイルパーム廃棄木搾汁残渣からのバイオエタノール生産

Efficient ethanol production from squeezing residues of oil palm trunk

○PRAWITWONG PANIDA、小杉 昭彦、トウ ラン、荒井 隆益、村田 善則、齋藤 昌義、森 隆（国際農研センター）
○Panida PRAWITWONG, Akihiko KOSUGI, LAN DENG, Takamitsu ARAI, Yoshinori MURATA, Masayoshi SAITO, Yutaka MORI (JIRCAS)

【目的】オイルパーム伐採廃棄木中に発酵可能糖を含む樹液が大量に存在し、樹液からエタノールや乳酸が容易に生産できる[1)]。一方、樹液搾汁後に得られる固形残渣は柔組織および維管束により構成されており、デンプンやセルロースを豊富に含んでいることが知られている。そこで搾汁後に得られる固形残渣から効率的バイオエタノール生産法の開発を目的に、柔組織および維管束を用いた同時糖化発酵法の検討を行った。

【結果および考察】オイルパーム伐採幹から樹液を搾汁後、得られた残渣を篩で柔組織（約 50%）と維管束（約 50%）に分画した。柔組織には 46.7%（w/w)のデンプンが存在していたことから、アミラーゼ処理によりデンプンを糖化し、次いで繊維残渣の酵素糖化条件を検討した。前処理としてアルカリ処理（1、3、5%NaOH、150℃、1 時間）を検討し、市販セルラーゼ（*Trichoderma reesei* 由来）を用いて糖化した。脱デンプンした柔組織および維管束はいずれもアルカリ処理により、セルロースの 91%以上が 48 時間以内に糖化できた。更に、アルカリ前処理し乾燥した柔組織および維管束をそれぞれ 30%(w/v)用い、市販セルラーゼと酵母 *Saccharomyces cerevisiae* による同時糖化発酵試験行った結果、30%柔組織および維管束からそれぞれエタノール 8.2%および 8.5%（w/v)を生産することができた。柔組織中のデンプンの利用も考慮すると、パーム廃棄木搾汁後の固形残渣 100g から 25g のバイオエタノールが生産可能である[2)]。将来的なオイルパーム廃棄木の排出量と、樹液およびその搾汁後に得られる柔組織と維管束の特性を考えると、オイルパーム廃棄木はバイオエタノール生産原料として極めて有望なバイオマス資源である。

本研究は NEDO 提案公募型事業により実施された。

1) Kosugi et-al, J Biosci Bioeng. (2010) 110:322-325
2) Prawitwong et-al, Bioresour Technol. (2012) doi: 10.1016/j.biortech.2012.08.136.

Oil Palm Trunk, Cellulose, Ethanol

講演番号：3C11p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ C 校舎 11 会場

エタノール発酵接合菌を用いたペーパースラッジからの直接バイオエタノール生産
Development of direct bioethanol production from raw paper sludge by ethanol-producing Zygomycota
○高野 真希、星野 一宏（富山大院理工）
○Maki TAKANO,Kazuhiro HOSHINO (Univ. Toyama)

【目的】非食バイオマスであるリグノセルロースを原料としたバイオエタノール生産に関する研究が進められているが、その構造が強固かつ複雑であるため、バイオマスの分解に高エネルギーな前処理を必要とすることが課題となっている。そこで新たな原料として、製紙工場から多量に派生する繊維残渣、ペーパースラッジ(PS)が注目されている。PS の主な処理方法は焼却であるが、このおいて多量の灰と CO_2 が発生することが問題となっている。一方、PS には Cellulose および Hemicellulose が含まれていることから、Ethanol の原料として PS を用いることでエネルギー生産および CO_2 排出量の削減が同時に可能となることが期待される。また、PS は製紙工程において脱リグニンされているため高エネルギーな前処理が不要という利点を有する。そこで本研究では PS から効率よく Ethanol を生産できる接合菌の検索を行い、その選択した菌株とセルラーゼを用いた同時糖化発酵(SSF)による直接 Ethanol 生産について検討した。
【方法・結果】某製紙工場より譲与された生 PS を基質として使用した。PS の成分は 18% Cellulose、11% Hemicellulose、23% 有機成分、48% 灰分であった。PS 懸濁液はアルカリ性を示すため、HCl 溶液で pH を 5.5 に調整して使用した。まず、当研究室保有の *Mucor* 属、*Absidia* 属、*Gongronella* 属および *Backusella* 属接合菌 69 株のうち、PS から Ethanol 生産が可能な菌株の検索を行った。50 g/L の PS および Accellerase 1500 (AC)を 0.5 mL 添加した培地を用い、28℃で 120 h 嫌気振とう培養を行った。その結果、69 株のうち 42 株はこの環境下では増殖もしくは発酵が不可能であった。これは、PS には無機塩類や界面活性剤が含まれていることから、これらが接合菌の増殖や発酵を強く阻害したためと考えられる。一方、他の 27 株は Ethanol 生産が認められ、PS 含有の阻害物に耐性があることがわかった。そこで、27 株のうち高い Ethanol 生成量を示した *M. circinelloides* NBRC 4563 を発酵接合菌として選択した。この菌株および PS の加水分解に最適化した AC を含むセルラーゼカクテル剤を用い、SSF による Ethanol 生産について検討した。このカクテル剤を 3 g-protein/L となるよう添加し SSF を行った結果、100 g/L の PS から培養 36 h で 7.0 g/L の Ethanol を生成できた。この時の発酵効率は 49%、Ethanol 生産性は 0.19 g/L/h であった。この結果より、選択した菌株は PS 含有の阻害物が多量に存在する環境に耐性を示し、増殖可能であるとともに高いエタノール生産能力を示すということがわかった。

bioethanol, paper sludge, CBP

講演番号：3C11p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ C 校舎 11 会場

飼料イネロールベールを用いたエタノール固体発酵および簡便なエタノール回収法

Solid state bioethanol fermentation of forage rice round bale and simple method of recovery for ethanol from the fermented products

○堀田 光生[1]、北本 宏子[1]、篠崎 由紀子[1]、川出 哲生[2]、橘 保宏[2]([1]（独）農環研、[2]（独）生研センター)
○Mitsuo HORITA[1], Hiroko KITAMOTO[1], Yukiko SHINOZAKI[1], Tetsuo KAWAIDE[2], Yasuhiro TACHIBANA[2] ([1]NIAES, [2]BRAIN)

【目的】

我々はイネ植物体等のバイオマスから家畜飼料のサイレージ（乳酸発酵産物）を作る過程で、バイオマス分解酵素と酵母を同時に添加して、エタノール発酵も同時に行う固体発酵法について検討した結果、飼料イネロールベールを材料に用いた圃場試験で、発酵3ヶ月後にロール中に最大で16.8%(vol%、乾物比）のエタノールが蓄積したこと、および同ロールからエタノールを高収率で回収できたことを報告した（堀田ら、2012)。今回、飼料イネ各品種のロールを用いた固体発酵について比較検討するとともに、発酵ロールからの簡便なエタノール回収法について検討した。

【方法】

生研センター圃場（埼玉県鴻巣市）内で2009、2010、2011年にそれぞれ栽培された飼料イネ（品種リーフスター、たちすがた、たちすずか）を10～11月中に刈り取り、酵母、酵素（セルラーゼ、アミラーゼ)、サイレージ用乳酸菌をそれぞれ加えてロールベール（>300kg/個）を作成し、屋外で固体発酵試験を行った。試験開始後、ロールに蓄積したエタノールの濃度やその変化を測定した。また、固体発酵させたロールから減圧蒸留装置を用いない方法でのエタノール回収を試みた。

【結果】

1. 飼料イネロールベール固体発酵

供試した飼料イネ3品種では、ロールベール作成直後より、いずれも外気温に関係なくエタノール発酵が進み、発酵1～3ヶ月後に11.8～16.8%（vol%、乾物比）のエタノールがロール内に蓄積した。その後、供試2品種（たちすがた、たちすずか）ではロール内のエタノール濃度の低下がみられたが、リーフスターでは発酵3～15ヶ月目までエタノール濃度がほぼ安定に維持されていた。また、いずれの品種でもエタノール発酵と同時に乳酸発酵が進み、家畜飼料としてのサイレージも安定して作られていることを確認した。

2. 発酵ロールベールからのエタノール回収

エタノール固体発酵させたロールでは重量が約 2 割減少し、同時に多量（平均 41kg/ロール）のドレインがロール外部に排出されることを確認した。ドレイン中には比較的高濃度（5～10%）のエタノールが含まれており、これらドレインを回収・精製することで所定量のエタノールが回収可能であった。

bioethanol, solid state fermentation, silage

講演番号：3C11p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ C 校舎 11 会場

Neolentinus lepideus による乳製品廃棄物からのエタノールおよび抗酸化物質の生産
Production of ethanol and antioxidants from waste dairy products by *Neolentinus lepideus*
○中川 紗季[1]、金涌 龍一[1]、竹内 沙緒里[1]、小嶋 文博[2]、岡本 賢治[1]([1]鳥取大院工、[2]仙台白百合女子大人間)
○Saki NAKAGAWA[1], Ryuichi KANAWAKU[1], Saori TAKEUCHI[1], Fumihiro OJIMA[2], Kenji OKAMOTO[1] ([1]Tottori Univ., [2]Sendai Shirayuri Women's College)

【目的】森の分解者である担子菌は、自然界で木質資源の循環に重要な働きをしており、生理活性物質を生産することなどからも興味深い微生物である。これまでに、褐色腐朽菌 *Neolentinus lepideus* がキシロース、グルコース、セロビオースのほか、ラクトースなども発酵するという新たな性質を明らかにしてきた[1)]。このような担子菌の発酵能を活用した未利用資源を原料とするバイオマスリファイナリーの基盤構築の一環として、今回はチーズホエーや廃棄乳を対象にしたエタノール生産、抗酸化活性について検討を行った。
【方法】炭素源、酵母エキス、KH_2PO_4、$(NH_4)_2SO_4$、$MgSO_4・7H_2O$を含む培地に菌を接種し、28℃で培養した。経時的に採取した試料は、フィルターろ過後、高速液体クロマトグラフで糖およびエタノールの分析を行った。抗酸化活性は、分光測定法によるDPPHラジカル捕捉活性によって評価した。
【結果】*N. lepideus* をラクトースが唯一の炭素源となる培地で培養した結果、グルコースとガラクトースとに分解、速やかなエタノールへの変換が認められた。pH 値を低く設定した酸性条件下でも発酵能への影響は特になく、安定していた。そこで次に、ラクトースを主成分とする食品廃棄物の再利用化への検討として、まず、チーズホエー培地にて発酵を行ったところ、上述の合成培地の場合と同様の挙動を示し、直接的にエタノールを生産可能であった。さらに、ホエーよりも脂肪やタンパク質の含有量が多くなる廃棄乳を対象とした発酵試験の結果、脂肪の多少にかかわらず、ホエーの場合にほぼ近い収率で直接的にエタノールを生産しており、本菌は脂肪やタンパク質が混在していてもラクトース発酵能を維持できることが明らかとなった。一方、*N. lepideus* のホエー発酵ろ液には、同時に調べた発酵担子菌の中で比較的高い抗酸化活性が検出され、培養菌糸体由来エタノール抽出物の活性はより高い傾向を示した。このように、ホエーや廃棄乳を当該担子菌で発酵させることで、主成分のラクトースはエタノールに、その他成分の一部は抗酸化物質へ変換されているのではないかと考えている。

[1)] K. Okamoto *et al.*, Enzyme Microb. Technol. **50**: 96-100 (2012).

whey, ethanol, antioxidants

講演番号：3C11p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ C 校舎 11 会場

キシロース発酵における細胞融合酵母 FSC 株の in vitro 代謝解析
In vitro analysis of cell fused yeast FSC strain during xylose fermentation

○カハル プリハルディ、田中 修三 (明星大理工)
○Prihardi Kahar,Shuzo Tanaka (Meisei Univ.)

【背景・目的】セルロース系バイオマスから効率的にエタノールを生産するためには、糖化による全発酵糖を代謝利用できる酵母の確保が不可欠である。しかし、*Saccharomyces cerevisiae* はキシロース発酵代謝系をもっておらず、糖化液にグルコースの次に多く含まれるキシロースを発酵しない。キシロース代謝能の付与に関して、これまでの研究は特定遺伝子を用いた遺伝子組換えが主流であるが、遺伝子組換え酵母の代謝全体のバランスが崩れて、発酵能の不安定性や発酵収率が必ずしも向上しないなどの問題点が報告されている。そこで、我々はキシロース取り込みを改良した *S. cerevisiae* M2 変異酵母とキシロース発酵性の *Candida intermedia* m11 変異酵母の細胞融合を行い、細胞融合酵母 FSC 株を獲得した。細胞融合は特定遺伝子の導入ではなく、細胞がもつ遺伝情報の全体的な融合であり、得られた FSC 株は発酵性も安定性も高いことが確認された。本研究は異なった前培養条件下での FSC 株の発酵代謝の変化を in vitro 解析し、代謝の変化を評価した。

【方法】FSC 株の前培養はグルコースとキシロースを用いて１～３回行い、それぞれの対数増殖期の中期でシード用酵母菌体を回収した。その後、グルコース培地及びグルコース・キシロース培地でシードによるキシロース発酵を行った。グルコース発酵期、キシロース発酵期及びグルコース・キシロース発酵期からの酵母菌体から酵母抽出キットおよびバイオラッド社 Bio-Spin Bio-Gel P-6 脱塩カラムを用いて本株のサイトゾールを抽出・精製し、タンパク定量と in vitro リアルタイムアッセイによる代謝解析を行った。

【結果】FSC 株のグルコース発酵に大きな変化はなかったが、キシロース発酵では前培養の回数を重ねるごとに効率が高くなった。各前培養条件で得られたシードによる代謝の in vitro 解析により、前培養条件の違いがキシロース代謝に関わる酵素の発現量に大きな影響を与えることがわかった。

Cell fused yeast, Xylose fermentation, in vitro analysis

講演番号：3C11p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ C 校舎 11 会場

PHO13 破壊がキシロース資化性サッカロマイセス酵母のキシロースからのエタノール生産性に及ぼす効果
Effects of *PHO13* deletion on the yield of ethanol from xylose in xylose-fermenting *Saccharomyces* yeasts
○小西 仁、福田 明、牟田口 梢栄、上村 毅、雨宮 正臣（JX 日鉱日石エネルギー（株）中央技術研）
○Jin Konishi,Akira Fukuda,Kozue Mutaguchi,Takeshi Uemura,Masaomi Amemiya (JX Nippon Oil & Energy Corp. Central Technical Research Laboratory)

【目的】リグノセルロース系バイオマスからの効率的なエタノール生産には、バイオマスの主成分の１つであるキシロースの利用が必須である。酵母*Saccharomyces cerevisiae* はエタノール生産に広く用いられるがキシロースを資化できない。我々は*S. cerevisiae* に自身が持つキシロース資化に関わる酵素（XR,XDH）の遺伝子を導入することによりキシロースからのエタノール生産能を付与し、エタノール生産性のさらなる向上を目指している。*PHO13*遺伝子はその産物が*p*-ニトロフェニルリン酸（pNPP）脱リン酸化活性を有する機能不明の遺伝子である。*PHO13*遺伝子の破壊によりキシロースからのエタノール収率が向上することが報告されているが、実用酵母におけるその効果に関する知見は乏しい。そこで我々は実用酵母の*PHO13*遺伝子を破壊し、キシロースからのエタノール生産性に与える影響を調べた。
【方法・結果】協会7号の染色体上にキシロース資化遺伝子群（*GRE3, SOR1, XKS1*）を*PGK1*プロモーター支配下に連結した発現カセット株を組み込み、キシロース資化能を付与した。この株の*PHO13*遺伝子を、市販ベクターpAUR135を利用したマーカーリサイクル法により破壊しヘテロ破壊株を得た。この破壊株についてpNPP脱リン酸化活性を調べたところ、活性の低下が確認された。キシロースを炭素源とした無機塩培地による発酵試験を行ったところ、キシロース消費速度は低下したがエタノール収率は大きく向上した。次に残りの相同遺伝子にKanMX遺伝子を導入することによりホモ破壊株を得たが、更なるエタノール収率の向上はみられなかった。他の酵母で*PHO13*ヘテロ破壊株を作製し培養評価をおこなったところ、エタノール生産性向上効果にかなりの違いがみられた。

PHO13, xylose, *Saccharomyces*

講演番号：3C11p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ C 校舎 11 会場

イソプロピルアルコール高生産大腸菌の開発
Development of High Isopropyl Alcohol-Producing *Escherichia coli*
○松本 佳子[1]、藤井 亮太[2]、天野 仰[1]、白井 智量[1,3]、安楽城 正[1]、平野 淳一郎[1]、高橋 均[1]、竹林 のぞみ[1]、森重 敬[1]、舘野 俊博[1]、古澤 力[3]、平沢 敬[3]、清水 浩[3]、和田 光史[1]([1]三井化学 触媒研、[2]三井化学シンガポール R&D センター、[3]阪大院情報)
○YOSHIKO MATSUMOTO[1], Ryota Fujii[2], Koh Amano[1], Tomokazu Shirai[1,3], Tadashi Araki[1], Junichiro Hirano[1], Hitoshi Takahashi[1], Nozomi Takebayashi[1], Takashi Morishige[1], Toshihiro Tateno[1], Chikara Furusawa[3], Takashi Hirasawa[3], Hiroshi Shimizu[3], Mitsufumi Wada[1] ([1]Mitsui Chemicals, [2]Mitsui Chemicals Singapore R&D Centre, [3]Osaka Univ.)

我々は植物由来ポリプロピレン（PP）を実現すべく、その原料となるイソプロピルアルコール（IPA）をグルコースから高生産する組換え大腸菌を開発したので報告する。

我々は、アセチルCoAからIPAの生合成に必要な4遺伝子のうち、チオラーゼ、CoAトランスフェラーゼの２遺伝子を大腸菌から、アセト酢酸デカルボキシラーゼ、イソプロピルアルコールデヒドロゲナーゼの２遺伝子をクロストリジウム属細菌からそれぞれ単離し、これら4つの遺伝子を導入した大腸菌を作製した。この株について、培養条件を最適化した後に培養評価を行ったところ、グルコースからのIPA生産性は25g/L（48hr）であった。

更なる IPA 高生産を実現するため、上記大腸菌の代謝工学的改変を行い、２つの IPA 高生産大腸菌の開発に成功した。一つ目はエントナー・ドウドロフ経路を利用した IPA 生産大腸菌であり、IPA 生産性は 80g/L（48hr）に達した。二つ目の IPA 高生産大腸菌は代謝産物の解析からのチオラーゼを高発現と、大腸菌由来トランスヒドロゲナーゼとリンゴ酸デヒドロゲナーゼを高発現させた大腸菌であり、IPA 生産性は 113g/L（48hr）に達した。さらに対糖収率向上のための新たな経路の構築を行っており、その結果についても併せて報告する。

Isopropyl alcohol, *E.coli*, Metabolic engineering

講演番号：3C11p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ C 校舎 11 会場

大腸菌によるイソプロピルアルコール連続発酵技術の開発

Production of isopropyl alcohol by aerobic continuous fermentation

○柴本 寛子、上原 与志一（三井化学・生産技術センター）
○Hiroko SHIBAMOTO,Yoshikazu UEHARA (Mitsui Chemicals, Process Technology Center)

我々は植物由来プロピレンの実用化を目指し、その原料となるイソプロピルアルコール（ＩＰＡ）の高生産大腸菌の開発を進めている。発酵法の大規模な工業生産を考えた場合、バッチ発酵よりも連続発酵の方が好ましいと考えられる。なぜなら、連続発酵はバッチ発酵と比較して、洗浄殺菌回数が減るため生産性が向上し、設備も簡略化できるためである。実際に、近年エタノール発酵の工業生産においても、連続発酵プロセスが増えつつある。
今回我々は、ＩＰＡ生産大腸菌を用いた連続発酵技術を開発したので報告する。
通気攪拌槽を用いた連続発酵の結果を解析し、ＩＰＡ連続発酵における比増殖速度（＝原料供給速度［Ｌ／ｈ］／発酵槽内の液量［Ｌ］）の下限値を明らかにした。下限値以上で菌体は安定して増殖し、反応槽内の菌体濃度が一定に保持されるため、長期間運転できるようになった。更に、比増殖速度の増加に伴いＩＰＡ生産速度も向上した。また、ＩＰＡ生産大腸菌は、酸素摂取速度（ＯＵＲ）によってＩＰＡ生成や有機酸生成、完全酸化によるCO_2生成などの代謝バランスが変化するが、ＯＵＲと代謝バランスの相関を定量化し、ＩＰＡ選択率を極大化するＯＵＲが存在することを見出した。
以上の結果、原料供給速度や通気・攪拌条件等を操作し、比増殖速度とＯＵＲを制御することにより、大腸菌を用いたＩＰＡ連続発酵の長期安定運転を可能にした。併せて一ヶ月間の連続運転の結果についても報告する。

Continuous fermentation, Isopropyl alcohol, E. coli

講演番号：3C11p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ C 校舎 11 会場

RITE バイオプロセスによる非可食バイオマス由来混合糖からのエタノール生成
Ethanol production from lignocellulose-derived mixed sugars by the RITE bioprocess

○乾 将行[1,2]、城島 透[1]、信龍 亮志[1]、須田 雅子[1]、岡本 憲治[3]、郡司 貴浩[3]、岩田 孝弘[3]、藤澤 義和[3]、Nancy Dowe[4]、Daniel J. Schell[4]、Ling Tao[4]、John Ashworth[4]、湯川 英明[1,2]（[1]RITE、[2]GEI、[3]Honda R&D、[4]NREL）
○Masayuki INUI[1,2], Toru JOJIMA[1], Ryoji NOBURYU[1], Masako SUDA[1], Kenji OKAMOTO[3], Takahiro GUNJI[3], Takahiro IWATA[3], Yoshikazu FUJISAWA[3], Nancy Dowe[4], Daniel J. Schell[4], Ling Tao[4], John Ashworth[4], Hideaki YUKAWA[1,2] ([1]RITE, [2]GEI, [3]Honda R&D, [4]NREL)

【目的】バイオリファイナリー産業の将来市場規模は、今後急拡大すると予測されている。米国における燃料エタノール製造は原油価格の高騰もあり生産量が急増し、トウモロコシ生産量の 4 割がエタノール原料として消費され、穀物価格高騰の主要因と批判されている。このような背景から、米国は 2007 年にエネルギー自立・安全保障法を成立させ、バイオ燃料の生産において、非可食バイオマス原料への転換を推進し、食糧問題を回避しながら、自国での再生可能燃料の製造・消費拡大を図っている。ところが、米国における非可食バイオマス由来のバイオ燃料製造は完全にストップしている状況にある。これは、前処理工程における「発酵阻害物質」の副生がエタノール発酵工程を阻害するが、前処理条件をマイルドとすると、酵素セルラーゼ必要量の大幅アップが避けられないことが要因であり、経済性あるセルロースエタノール製造法の確立が望まれている。

我々は、コリネ型細菌（*Corynebacterium glutamicum*）が還元条件下、増殖非依存的に糖を代謝する性質を利用した RITE バイオプロセスを開発してきた（1)。これまでに「発酵阻害物質に対する高度耐性」および「混合糖の完全同時利用」に関する技術は確立済みである（2-4)。本発表では、米国エネルギー省研究所 NREL、Honda R&D、RITE との共同研究による、RITE バイオプロセスによる非可食バイオマス由来混合糖からのエタノール生成について、基礎的検討結果を報告する。

【方法と結果】エタノール生成菌株は、*C. glutamicum* R を宿主とし、alcohol dehydrogenase、pyruvate decarboxylase 遺伝子等の導入、副生物生成経路の削除、および混合糖利用能を付与することで構築した。非可食バイオマス由来混合糖は、コーンストーバーを原料とし、希硫酸前処理の後、酵素糖化によって調製した。当該生成菌株を好気条件で増殖させ、得られた細胞を用いて還元条件下において糖化液からのエタノール生成反応を行った。その結果、遺伝子組換えコリネ型細菌は、発酵阻害物質の影響を受けることなく糖化液に含まれる C5、C6 糖類を同時利用し、高効率なエタノール生成が可能であった。

1) J Mol Microbiol Biotechnol (2004) 7, 182.
2) Appl Environ Microbiol (2006) 73, 2349.
3) Appl Microbiol Biotechnol (2008) 81, 691.
4) Appl Microbiol Biotechnol (2009) 85, 105.

ethanol, *Corynebacterium glutamicum*, metabolic engineering

講演番号：3C11p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ C 校舎 11 会場

RITE バイオプロセスによる非可食バイオマス由来混合糖からのD-乳酸生成

D-lactate production from lignocellulose-derived mixed sugars by the RITE bioprocess

○加藤 直人[1]、柘植 陽太[1]、須田 雅子[1]、城島 透[1]、Nancy Dowe[2]、Daniel J. Schell[2]、Ling Tao[2]、John Ashworth[2]、乾 将行[1,3]、湯川 英明[1,3] ([1]RITE、[2]NREL、[3]GEI)
○Naoto kato[1], Yota Tsuge[1], Masako Suda[1], Toru Jojima[1], Nancy Dowe[2], Daniel J. Schell[2], Ling Tao[2], John Ashworth[2], Masayuki Inui[1,3], Hideaki Yukawa[1,3] ([1]RITE, [2]NREL, [3]GEI)

【目的】地球温暖化問題を背景に、再生可能資源を原料としたグリーン化学品の製造が大きく注目されている。ポリ L-乳酸は、生分解性プラスチックとして注目されているが、耐熱性や耐久性の問題から用途が限られてきた。これに対して、L-乳酸と D-乳酸を原料としたポリ DL-乳酸ステレオコンプレックスは、ポリ L-乳酸より優れた耐熱性を有するが、D-乳酸の高い製造コストが市場拡大の妨げとなっている。我々は、還元条件下および無機塩培地にて各種の化学品やバイオ燃料を生産する RITE バイオプロセスの開発を進めており、D-乳酸を効率的に生産する遺伝子組換えコリネ型細菌(*Corynebacterium glutamicum*)についても報告している(1)。また、C5 糖および C6 糖の混合糖を効率的に利用する菌株開発の報告を行ってきた(2)。本発表では、RITE バイオプロセスにおける D-乳酸の生産性及び収率の更なる向上について検討した。
【方法と結果】D-乳酸を生産するため L-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を破壊した株に *Lactobacillus delbrueckii* 由来 D-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を導入した株をベースに、競合経路の削除、解糖系遺伝子の強化などを行った。非可食バイオマス由来混合糖は、コーンストーバーを原料とし、希硫酸前処理の後、酵素糖化によって調製した。解糖系遺伝子を高発現した組換え菌株では、D-乳酸生産量が大幅に向上した。混合糖利用株としてキシロース代謝関連遺伝子およびトランスポーター遺伝子などを導入した菌株を構築した。当該菌株では、混合糖から高効率な D-乳酸生成が可能であった。また、非可食バイオマス由来混合糖からの D-乳酸生成に関する検討結果についても併せて報告する。

1) Appl Microbiol Biotechnol (2008) 78, 449.
2) Appl Microbiol Biotechnol (2009) 85, 105.

Corynebacterium glutamicum, D-lactate, metabolic engineering

講演番号：3C11p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ C 校舎 11 会場

RITE バイオプロセスによるバリン生産； 収率の改善および非可食バイオマスからの生産の試み

High yield valine production from lignocellulose-derived mixed sugars by the RITE bioprocess

○長谷川 智[1]、須田 雅子[1]、平賀 和三[1]、城島 透[1]、Nancy Dowe[2]、Daniel J. Schell[2]、Ling Tao[2]、John Ashworth[2]、乾 将行[1,3]、湯川 英明[1,3] ([1]RITE、[2]NREL、[3]GEI)
○Satoshi HASEGAWA[1], Masako SUDA[1], Kazumi HIRAGA[1], Toru JOJIMA[1], Nancy Dowe[2], Daniel J. Schell[2], Ling Tao[2], John Ashworth[2], Masayuki INUI[1,3], Hideaki YUKAWA[1,3] ([1]RITE, [2]NREL, [3]GEI)

【目的】近年、人口増加に伴う環境・食糧問題に対する解決策として、また狂牛病問題で安価な窒素源としての肉骨粉利用が制限されたことにより、家畜飼料用アミノ酸の需要が増加している。飼料用アミノ酸は、飼料穀物に含まれるアミノ酸の不足分を補うために用いられており、その結果、飼料穀物の節約・窒素排泄物の低減などの効果が認められている。バリンは、現在主流の飼料用アミノ酸であるリジン、メチオニン、スレオニン、トリプトファンに次いで飼料穀物に不足しがちな必須アミノ酸であるため、次世代の飼料用アミノ酸候補の一つとして期待されている。これに対して、我々はコリネ型細菌（*Corynebacterium glutamicum*）が還元条件下において増殖非依存的に糖を代謝する性質を利用した RITE バイオプロセスによる効率的な物質生産法の開発を進めており、バリンの高効率生産も既に実現している[1)]。さらに本バイオプロセスでは、非可食バイオマス由来の C5 糖も利用可能である[2)]。本発表では、既報のバリン生産株の改良、および非可食バイオマス由来混合糖を原料に用いた検討結果について報告する。
【方法と結果】RITE バイオプロセスによるバリン生産では、バリン生合成酵素 acetohydroxyacid isomeroreductase の補酵素選択性の NADPH から NADH への改変、および NAD 依存のアミノ基付与/脱離酵素 leucine dehydrogenase（*Lysinibacillus sphaericus* 由来）の導入により、バリン生合成反応における NADH/NADPH 収支を一致させることによって、高い生産性を実現している[1)]。このバリン生産株に対して、バリン収率の向上を目的として、コハク酸、酢酸、アラニン生成経路遺伝子の破壊を行って、これらの副産物の生成を抑制し、また NADH 代謝に関与する競合経路の遮断・改変により、菌体内 NADH/NAD^+比を改善することによって、高生産性・高収率のバリン生産を実現した。この改良株に C5 糖利用経路を導入し、コーンストーバーを原料として希硫酸前処理、酵素糖化によって調製した混合糖液からのバリン生産の検討を行った。本研究の一部は NEDO の委託研究の一環として行われたものである。

1) Appl Environ Microbiol (2012) 78, 865-875.
2) Appl Microbiol Biotechnol (2009) 85, 105.

valine, Corynebacterium glutamicum, metabolic engineering

講演番号：3C11p17
講演日時、会場：3 月 26 日 17:12～ C 校舎 11 会場

遺伝子組換えコリネ型細菌によるイソブタノール生産
Isobutanol production by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation
○山本 省吾[1,2]、須田 雅子[1,2]、新美 聡子[1]、乾 将行[1,2,3]、湯川 英明[1,2,3]（[1]RITE、[2]BB 組合、[3]GEI）
○ Shogo YAMAMOTO[1,2], Masako SUDA[1,2], Satoko NIIMI[1], Masayuki INUI[1,2,3], Hideaki YUKAWA[1,2,3] ([1]RITE, [2]Bio-Butanol Technology Research Association, [3]GEI)

【目的】バイオエタノールに続く次世代バイオ燃料としてバイオブタノールが注目されている。ブタノールは高エネルギー含量、低水溶性、低腐食性等エネルギーとして優れた性質を有している。現在、米国のバイオベンチャーを中心に実用化に向けた検討がなされているが、より高生産可能な菌株の育種や生産プロセスの開発、非可食バイオマスを原料としたブタノール生産への転換が望まれている。
当研究室では、これまでにコリネ型細菌（*Corynebacterium glutamicum*）が還元条件下、増殖非依存的に糖を代謝する性質を利用した RITE バイオプロセスを開発してきた。本発表では、ブタノールの構造異性体であるイソブタノールに関して、遺伝子組換えコリネ型細菌を用いた RITE バイオプロセスによる生産試験について報告する。
【方法と結果】コリネ型細菌にイソブタノール生成能を付与するために 2-ketoacid decarboxylase および alcohol dehydrogenase を導入した。遺伝子組換えコリネ型細菌を還元条件下にて反応した結果、高いイソブタノール生産を確認した。さらに、高機能酵素の探索、酸化還元インバランスの解消、イソブタノールの毒性を回避するため連続的な生成物回収等を行うことにより、イソブタノール生産量、収率が向上した。
本研究の一部は NEDO の委託研究の一環として行われたものである。

isobutanol, *Corynebacterium glutamicum*, metabolic engineering

講演番号：3C11p18
講演日時、会場：3 月 26 日 17:24～ C 校舎 11 会場

大腸菌による(*R*)-1,3-ブタンジオール生産の効率化

Improvement of (*R*)-1,3-butanediol production by engineered *Escherichia coli*

○片岡 尚也[1]、VANGNAI Alisa S.[2]、田島 誉久[1]、中島田 豊[1]、加藤 純一[1] ([1]広島大院先端物質・分子生命、[2]チュラロンコン大・理)
○ Naoya KATAOKA[1], Alisa S. VANGNAI[2], Takahisa TAJIMA[1], Yutaka NAKASHIMADA[1], Junichi KATO[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Chulalongkorn Univ.)

【背景・目的】近年、化石資源枯渇の懸念や環境問題への関心の高まりから、化石資源依存型から再生可能資源依存型の物質生産へと注目が移行している。1,3-ブタンジオール (1,3-BDO) は、β-ラクタム系抗生物質の重要中間体など、医薬・農薬の分野で広く利用されている光学活性ジオールである。これまで、微生物を利用した光学活性 1,3-BDO 生産は主に、4-ヒドロキシ-2-ブタノンの選択的還元や、ラセミ体からの光学分割により行われており、再生可能資源を原料とした生産例はほとんど存在しない。唯一の報告例は、*Ralstonia eutropha* 由来 *phbA*, *phbB* 及び *Clostridium acetobutylicum* 由来 *adhE* を大量発現させた *Escherichia coli* HB101 での 30 g/L グルコースを出発原料とした 48 時間の回分培養による(*R*)-1,3-BDO 生産であり、その収量, 収率及び光学純度は、それぞれ 1.03 g/L (11.4 mM), 6.9% (mol/mol glucose), 86.6%ee (enantiomeric excess) と、工業生産に適応するレベルではなかった。そこで本研究では、効率的な光学活性 1,3-BDO の生産を目的に設定し、研究に着手した。
【方法・結果】まず、1,3-BDO の高生産を達成するにあたり、各段階を触媒する酵素に着目し、比活性の高い酵素を利用することで生産経路が増強され、その結果、生産性の向上が期待されると考えた。そこで、報告例で採用されていた酵素 PhbA, PhbB, AdhE のアイソザイム遺伝子をリストアップし、様々な遺伝子の組み合わせを持つベクターによる *E. coli* MG1655 *lacI*^{q} 形質転換株を作製した後、比活性及び生産性を評価した。その結果、我々の意に反し、比活性と生産性の間に相関が見られない結果を得たが、AdhE の代わりに *C. saccharoperbutylacetonicum* 由来 Bld を利用することで、生産性が 3.9 倍になることを見出した。次に、構築した形質転換株の生産能力及び生産物の光学純度を、休止菌体を用いた生産により評価した。その結果、30 g/L グルコースを出発原料とした回分培養により、36 時間後に収量 3.12 g/L (34.6 mM), 収率 20.8% (mol/mol glucose)、さらに、110 時間の流加培養により、収量 9.05 g/L (100.4 mM), 収率 22.7% (mol/mol glucose), 光学純度 98.5%ee で(*R*)-1,3-BDO を生産する結果を得た。

(*R*)-1,3-butanediol, Engineered *E. coli*, Synthetic biology

講演番号：3C11p19
講演日時、会場：3 月 26 日 17:36～ C 校舎 11 会場

海洋性新規ブタノール産生クロストリジウム菌の単離

Isolation of a new butanol-producing *Clostridium* strain from marine environment

○大西 浩平[1]、黒澤 美樹[2]、高橋 亮[2]、西垣 直哉[2] ([1]高知大総研セ、[2]高知大農)
○Kouhei OHNISHI[1], Miki KUROSAWA[2], Ryo TAKAHASHI[2], Naoya NISHIGAKI[2] ([1]Kochi Univ., [2]Kochi Univ.)

【目的】偏性嫌気性細菌であるクロストリジウム属細菌によって行われるアセトン・ブタノール・エタノール発酵（ABE 発酵）研究の歴史は古いが、近年バイオ燃料としてのブタノールが注目されるようになり、再び脚光を浴びるようになっている。これまでに単離された ABE 発酵を行う細菌は、いずれも陸上由来であり、4 種に分類されている。本研究では、海洋環境からブタノールを生産する新規の微生物の探索を行なうことを目的とした。
【方法】高知県浦ノ内湾の海底土壌を単離源として、グルコースを炭素源とした嫌気培養を行った。定期的に培養液をサンプリングし、ブタノール生産が確認された集積培養液からアガーシェイク法、もしくはガスパックを用いた寒天培地により、コロニーを形成させ、約 100 株の細菌を単離した。それぞれの単離菌を人工海水で調製した ABE 発酵用培地で培養し、培養上清に含まれるソルベントの量をアミネックス HPX-87H カラム（300×7.8mm）を用いた HPLC で定量した。
【結果・考察】単離した約 100 株の細菌すべてを、人工海水で調製した ABE 発酵用培地で培養し、培養上清中のソルベント並びに有機酸を解析したところ、KB285 一株のみがブタノールを生産することが確認された。本株は 16S rRNA 遺伝子配列解析と資化性試験の結果、クロストリジウム属であると同定されたが、既存の４種のブタノール産生クロストリジウム属細菌とは系統的に離れた新規の細菌であった。近縁の株として、プロパノール生産菌 *Clostridium* sp. 17cr1 株が挙げられるが、KB285 株はプロパノールを生産しなかった。KB285 株のブタノール生産能は、既存のブタノール生産菌 *Clostridium acetobutylicum* やこれまでに当研究室で水田土壌から単離された KB187 株と比べて低いものであった。KB285 株は海底土壌から単離されたにも関わらず、その増殖に高い NaCl 濃度は要求せず、本来の生息域は汽水であることが推測された。KB285 株のドラフトゲノム配列を次世代ゲノム GS junior を用いて獲得した。Acetyl-CoA を出発とするブタノール生産に係る５つの酵素、thiolase (Thl)、3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (Hbd)、crotonase (Crt)、butyryl-CoA dehydrogenae (Bcd)、aldehyde/alcohol dehydrogenase (AdhE)をコードする遺伝子を探索した結果、いずれの orthologue も KB285 株に存在することが確認された。*thl*、*hbd*、*adhE* はいずれも２種類の paralogue が存在していた。塩基配列から予想されるアミノ酸配列を用いた相同性検索では、５つの酵素とも最も相同な配列は４種の既知のブタノール産生株のそれではなかった。このことは、KB285 株がこれらの株と系統的に離れていることをよく反映している。

ABE fermentation, Clostridium, marine sediment

講演番号：3C11p20
講演日時、会場：3 月 26 日 17:48～ C 校舎 11 会場

中温菌 *C. cellulovorans* および *C. aceetobutylicum* の共培養によるセルロースからのブタノール発酵
Butanol fermentation from cellulose co-cultured by *C. cellulovorans* and *C. acetobutylicum*

○川出 雄二郎[1]、山本 康介[1]、田丸 浩[1,2,3]（[1]三重大院・生資、[2]三重大・生命支セ、[3]三重大・新産業創生）
○YUJIROU KAWADE[1], KOUSUKE YMAMOTO[1], YUTAKA TAMARU[1,2,3] ([1]Grad. Bioresour., Mie Univ., [2]Mie Univ. LSRC, [3]Mie Univ. ITII)

【目的】近年、石油枯渇等の問題により、再生可能エネルギーの 1 つとして、セルロース系バイオマスの利用が求められている。セルロース系バイオマス利用は前処理、糖化および発酵の工程からなっているが、セルロース系バイオマスはセルロース、ヘミセルロース、リグニン等が複雑に絡み合った強固な構造をとっており、糖化が極めて困難である。その前処理・糖化工程技術として、低コスト化が可能な微生物処理が注目されており、その手段として高効率なバイオマス分解能を有するセルロソーム生産菌クロストリジウム属が注目されている。また、さらなる低コスト化を実現するには、これらの工程を一貫して行う Consolidated bioprocessing（CBP）の開発が必須である。そこで本研究では、セルロソーム生産クロストリジウム属細菌である *Clostridium cellulovorans* およびアセトン・ブタノール・エタノール発酵（ABE 発酵）菌として知られている *C. acetobutylicum* を共培養することによってセルロースからの直接発酵を試みた。
【方法および結果】リン酸膨潤セルロース（PASC）を 5% (w/v)含む培地を用いて行った。比較対象として、*C. cellulovorans* 培養区、*C. acetobutylicum* 培養区、共培養区およびコントロール区の 4 つの試験を行った。*C. cellulovorans* を 0.2 ml 植菌して 1 週間培養した後、続いて *C. acetobutylicum* を 0.2 ml 植菌して培養したものを共培養区とした。培養後、遠心分離によって回収した培養上清を Minisart RC 15 ϕ0.45 を用いてフィルターろ過し、1 μl をガスクロマトグラフィーに供した。ガスクロマトグラフィーのカラムは RT®-Q-BOND(RESTEK)を用い、SPL 温度を 250℃ 、カラム温度を 150℃ 、FID 温度を 250℃として、キャリヤーガスとして N_2 を線速度 30 cm/sec で流し、エタノールおよび 1-ブタノールの濃度を測定した。その結果、*C. cellulovorans* 区および共培養区でエタノールが検出され、一方、共培養区のみで 1-ブタノールが検出された。共培養区のみでブタノールが検出されたことから、*C. cellulovorans* が PASC を分解し、グルコースおよびそのオリゴ糖を放出し、それを *C. acetobutylicum* が利用していると考えられる。

Co-culture, ABE fermentation, Mesophilic *Clostridium*

講演番号：3C12a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ C 校舎 12 会場

キシロース資化性の強い組換え *Saccharomyces cerevisiae* の構築
Construction of a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* with a potent assimilation of xylose
○赤松 隆、田口 久貴、冨高 正隆（崇城大生物生命）
○Takashi Akamatsu,Hisataka Taguchi,Masataka Tomitaka (Sojo Univ.)

耐熱性・耐酸性・掛け合わせ・形質転換能に優れた凝集性エタノール生産実用酵母 KFG4-6B (*MATa* Flo¯) の遺伝背景に，キシロース資化性を安定に保持する組換え *Saccharomyces cerevisiae* 酵母を構築することを目的とする。そこで，*Pichia stipitis* の *XYL1* と *XYL2* を *dld3Δ::kanMX–P_{TDH3}–XYL1–T_{TDH3}* と *sed1Δ::kanMX–P_{TDH3}–XYL2–T_{TDH3}* 構造にし，キシルロキナーゼの発現を強める為に，*S. cerevisaie* の *XKS1* を *dld2Δ::kanMX–P_{TDH3}–XKS1–T_{TDH3}* 構造にする実験デザインを建てた。最初に，*kanMX–P_{TDH3}–XYL1–T_{TDH3}* を酵母Ⅴ染色体 17kb に位置する *DLD3* 遺伝子と入れ換えた形質転換体を G418 耐性株として構築した (XR 株)。次に，*XKS1* 遺伝子を酵母 IV 染色体 140 kb に位置する *DLD2* と *XYL2* 遺伝子を酵母 IV 染色体 601 kb に位置する *SED1* と入れ換えた株をそれぞれ構築した (XK 株と XDH 株)。掛け合わせで 3 重株の構築を試みたが，*XYL1 XKS1* や *XYL2 XKS1* 二重株は胞子形成能が悪く構築できなかった。そこで，Cre タンパク質発現プラスミドを用いて XR 株の *kanMX* 領域を *dld3Δ::loxP–P_{TDH3}–XYL1–T_{TDH3}* 遺伝子構造にした XR3Δ株を構築した。この株に *XKS1* を形質転換法で組み換えた *XYL1 XKS1* 二重株 KFG12 株を構築した。一方, XR3Δ株と XDH 株とを掛け合わせ *XYL1 XYL2* 二重株を構築した。この *XYL1 XYL2* 二重株 KFG11-15C は，キシロース最少培地で最少の世代時間 (G_{min})が 7 時間と非常に早い増殖を示した。KFG12 株と KFG11-15C とを掛け合わせ目的の *XYL1 XYL2 XKS1* 三重株 KFG15(2)-9C などを構築した。さらに，株内掛け合わせで KFG17-8B を構築した。キシロース最少培地で G_{min} は 5 時間と早い増殖を示した。従って，キシルロキナーゼ発現強化の影響を認めた。構築株の発酵試験評価を次の条件で行った : 初発の細胞濁度 ABS_{660nm}=20、温度 35°C、59 g/L グルコース、38 g/L キシロースを含む YPD6X4 培地 (pH 4.0)。細胞濃度は、6 時間で 65 まで増加した。グルコースは 3 時間で消費し、キシロースは、12 時間で 16 g/L、24 時間では 25 g/L 消費した。すなわち, 66%以上を消費した。加えた全糖および消費当たりのエタノール収率は 63%と 55%であった。

Saccharomyces cerevisiae, fuel ethanol, co-fermentation

講演番号：3C12a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ C 校舎 12 会場

進化工学によるキシロース資化性酵母の阻害物耐性向上

Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient xylose consumption under inhibitors derived from lignocellulose biomass

○大西 徹[1]、多田 宣紀[1]、保谷 典子[1]、片平 悟史[2]、名倉 理紗[2]、石田 亘広[2]、今村 千絵[2] ([1]トヨタ自動車、[2]豊田中研・バイオ)
○Toru Onishi[1], Nobuki Tada[1], Noriko Yasutani[1], Satoshi Katahira[2], Risa Nagura[2], Nobuhiro Ishida[2], Chie Imamura[2] ([1]Toyota Motor Corp., [2]Toyota Central R&D Labs. Inc.)

【目的】木質・草本系バイオマスを原料とする第2世代バイオエタノール生産に用いられる発酵微生物においては、エタノール収率向上のためのキシロース高効率利用、および前処理されたバイオマスから生じる発酵阻害物質に対する耐性向上が課題である。

【方法・結果】キシロースイソメラーゼ遺伝子を導入したキシロース資化性酵母を親株として、進化工学を中心とした育種を行うことにより、キシロースの資化速度が 20 倍以上向上した株を取得した。本株は、酵母を用いた合成培地条件で報告されている中では、最もキシロース資化速度が速い(>2.5 g xylose g DCW $^{-1}$ h^{-1} YNB 培地 80g l^{-1} xylose)。本株を用いることで、希硫酸前処理によって生じた阻害物を多く含む高濃度バイオマス前処理物から、短時間・高収率でエタノール生産することが可能になった。

xylose, ethanol

講演番号：3C12a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ C 校舎 12 会場

リグノセルロース系バイオマス由来発酵阻害物質による酵母 mRNP granule の形成誘導と翻訳抑制
Biomass conversion inhibitors induce the formation of mRNP granules and attenuate translation activity in yeast.

○岩城 理、河合 孝朗、NGUYEN Trinh Thi My、山本 陽佑、井澤 真吾（京都工繊大・応生）
○Aya IWAKI,Takao KAWAI,Trinh Thi My NGUYEN,Yosuke YAMAMOTO,Shingo IZAWA (Div. Appl. Biol., Kyoto Inst. Technol.)

廃木材や稲藁などのリグノセルロース系バイオマスから製造されるバイオ燃料は、食糧資源と競合しないことや未利用資源活用の観点から今後の需要と製造規模の拡大が期待されている再生可能エネルギーである。酵母によるアルコール発酵にリグノセルロース系バイオマスを用いる際には、酸や加圧熱水による糖化処理が必要であるが、この際にフラン化合物であるフルフラールや 5-hydroxymethylfurfural (HMF)、フェノール化合物であるバニリンやグアヤコールなどの生育・発酵阻害成分が副産物として生成する。フルフラールは酵母細胞内で活性酸素種の発生を引き起こすことが報告されているが、これらのフラン化合物やフェノール化合物が酵母細胞に及ぼす作用機構は十分に解明されていない。今回、新たな知見を収集するためにストレス条件下における翻訳制御に重要な働きを持つと考えられる processing body (P-body)やストレス顆粒 (SG)と呼ばれる cytoplasmic mRNP granule の形成を検討した。また、ポリソーム解析によってこれらのフラン化合物やフェノール化合物が翻訳活性に与える影響について検討した。

解析の結果、これらのフラン化合物やフェノール化合物が mRNP granule の形成を誘導することを見出した。また、これらのフラン化合物やフェノール化合物が翻訳活性を抑制する効果を持つことを確認した。さらに、それぞれ単独では SG の形成や翻訳抑制にほとんど影響しないような低濃度であっても、複数の化合物や低濃度エタノールストレスと組み合わせることによって SG の形成や翻訳抑制が誘導されることを明らかにした。mRNP granule の形成がこれら発酵阻害剤の影響を反映することから、mRNP granule の GFP マーカーが発酵過程の管理指標として活用できるのではないかと考えられた。

P-body, stress granule, lignocellulosic biomass

講演番号：3C12a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ C 校舎 12 会場

葉面酵母 *Pseudozyme antarctica* の生分解性プラスチック分解酵素が植物へ与える効果
The effects of biodegradale plastic-degradating enzyme from *Pseudozyma antarctica* on the plants

○植田 浩一[1]、釘宮 聡一[1]、渡部 貴志[1]、篠崎 由紀子[1]、光原 一朗[2]、吉田 重信[1]、田端 純[1]、北本 宏子[1] ([1]農環研、[2]生物資源研)
○HIROKAZU UEDA[1], SOUICHI KUGIMIYA[1], TAKASHI WATANABE[1], YUKIKO SHINOZAKI[1], ICHIROU MITSUHARA[2], SHIGENOBU YOSHIDA[1], JUN TABATA[1], HIROKO KITAMOTO[1] ([1]NIAES, [2]NIAS)

葉の表面（葉面）に生息する常在菌は各種の加水分解酵素を生産することが知られている。我々はこれまでに、葉面常在菌の酵母や糸状菌が生産する加水分解酵素から、強力な生分解性プラスチック分解活性を持つ酵素を単離・同定した。単離した酵素は、稲の常在菌である酵母 *Pseudozyma antarctica* の酵素（PaE）で、短鎖脂肪酸ポリエステルで構成される生分解性プラスチック性マルチフィルム（生プラマルチ）を強力に分解することを明らかにした。さらに高濃度の PaE を大量に生産する方法を開発し、作物の栽培に生プラマルチを使用後、農地に敷設した状態で分解酵素を散布処理することで、速やかな分解を促す技術の実用化を検討している。

この PaE のアミノ酸配列は、植物病原菌由来のクチナーゼと類似のリパーゼボックスを持つが、基質認識領域の相同性は低い。植物病原菌由来のクチナーゼの中には、感染に寄与するものが報告されている。一方、PaE を生産する葉面常在菌 *P. antarctica* は、国内のほとんどの稲に高密度に生息しているが、それ自体が植物に感染して病気を引き起こすようなことはない。しかし、植物への作用は明らかになっていないことから、本研究では PaE が植物体に対して、どのような影響を与えるのかを検証した。

マルチ分解に用いる場合と同等の高濃度の PaE を含む *P. antarctica* 培養ろ液（酵素液）を、トマトの切り葉に散布し、保湿した容器内で静置した結果、3 日後に葉が黄化した。給水量の少ない条件下で栽培したポット栽培トマトに酵素液を散布したところ、散布した部位の植物組織がカーリングし、縁や先端が褐変化した。同様の傾向が他の植物種でも観察された。そこで、酵素液を散布した植物の表面を電子顕微鏡で観察したところ、細胞表面が荒れ、細胞間に間隙が拡がっていることが確認された。クチクラ層は植物にとって、体内の水分蒸散を防ぎ、体外からの外敵の侵入を物理的に防ぐ役割を有している。酵素液が、クチクラ層等の植物表面構造に作用した結果、保護機能が弱まった植物体表面から水分が失われやすくなり、細胞間隙が増大したと考えられる。

本研究から、生プラマルチへの PaE を含む溶液の処理は、作物収穫後に行うのが望ましいことが明らかになった。

biodegradale plastic, cutinase, phylloplane

講演番号：3C12a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ C 校舎 12 会場

大腸菌を宿主とした生分解性共重合ポリエステルの生合成
Biosynthesis of biodegradable copolymers by *Escherichia coli*

○外村 彩夏[1]、岩崎 美佳[1]、坂本 日名子[2]、松崎 弘美[2]([1]熊本県大院・環境共生、[2]熊本県大・環境共生)
○Ayaka HOKAMURA[1], Mika IWASAKI[1], Hinako SAKAMOTO[2], Hiromi MATSUSAKI[2] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto)

【目的】多くの微生物が菌体内に合成・蓄積するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は環境調和型プラスチックとして期待されている。当研究室では、*Pseudomonas* sp. 61-3 の低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子（*phaC1*）および脂肪酸合成経路からの中鎖長 3-ヒドロキシアルカン酸（3HA）ユニットを供給する 3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ遺伝子（*phaG*）、さらには、*Ralstonia eutropha* の 3-ヒドロキシブタン酸（3HB）ユニット供給系酵素遺伝子 *phbAB* を導入したさまざまな組換え株を作製し、脂肪酸合成経路を介した物性の優れた P(3HB-*co*-3HA)共重合ポリエステルの合成を試みてきた。近年、PhaG 酵素は、3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ活性よりもチオエステラーゼ活性の方が高いことが報告された[1)]。また、これまで PHA 生産菌ではない大腸菌を宿主とした P(3HB-*co*-3HA)の報告例は少ない。そこで、本研究では、PHA 重合酵素遺伝子とともにモノマー供給系に関わる酵素遺伝子を導入した大腸菌の組換え株を作製し、糖を炭素源として 3HB 分率の高い P(3HB-*co*-3HA)共重合ポリエステルを合成することを目的とした。
【方法および結果】中鎖長の 3HA ユニットを供給するために、*Pseudomonas aeruginosa* PAO あるいは *Pseudomonas putida* NBRC100650 の推定 3-ヒドロキシアシル CoA（3HA-CoA）リガーゼ遺伝子を pBBR1MCS-3 ベクターに導入したプラスミドを構築した。これらの各プラスミドを *R. eutropha* の PHA 生合成遺伝子の native promoter によって *Pseudomonas* sp. 61-3 の *phaC1* および *phaG* 遺伝子、*R. eutropha* の *phbAB* 遺伝子が発現するように設計したプラスミド pJScK-C1GAB とともに大腸菌に導入した組換え株を作製し、糖を炭素源として培養した。合成された PHA の蓄積率およびモノマー組成をガスクロマトグラフィーにて調べた結果、pJScK-C1GAB プラスミドのみを導入した大腸菌が PHA をほとんど合成しなかったのに対して、*P. aeruginosa* PAO の推定 3HA-CoA リガーゼ遺伝子を導入した大腸菌では、PHA 蓄積率が 10%程度まで向上し、PHA 鎖中への中鎖長 3HA ユニットの取り込みを確認した。また、*P. putida* NBRC100650 の 3HA-CoA リガーゼ遺伝子を導入した大腸菌組換え株の PHA 生合成に関しても検討中であり、現在、合成した PHA の詳細な解析を進めている。

1) Wang *et al*., *Appl*. *Environ*. *Microbiol*.（2012）

polyhydroxyalkanoate, PHA, biodegradable plastics

講演番号：3C12a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ C 校舎 12 会場

組換え *Ralstonia eutropha* における脂肪酸合成経路を介した共重合ポリエステルの生合成
Biosynthesis of copolymers by recombinant *Ralstonia eutropha* through fatty acid synthesis pathway

○岩崎 美佳[1]、外村 彩夏[1]、坂本 日名子[2]、田中 賢二[3]、柘植 丈治[4]、松崎 弘美[2] ([1]熊本県大院・環境共生、[2]熊本県大・環境共生、[3]近大・産理工、[4]東工大院・総理工)
○Mika IWASAKI[1], Ayaka HOKAMURA[1], Hinako SAKAMOTO[2], Kenji TANAKA[3], Takeharu TSUGE[4], Hiromi MATSUSAKI[2] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]Dept. Biol. & Environ. Chemistry, Kinki Univ., [4]Dept. Innov. Eng. Mat., Tokyo Inst. Technol.)

【目的】微生物がエネルギー貯蔵物質として菌体内に合成・蓄積するバイオポリエステル、ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、生分解性プラスチックであり、環境調和型ポリエステルとして期待されている。*Ralstonia eutropha* は、糖や脂肪酸のみならず炭酸ガスを炭素源として PHA を合成するが、これは硬くて脆いポリ(3-ヒドロキシブタン酸)（P(3HB)）であり、実用性に乏しい。そこで本研究では、本菌の組換え株を作製し、脂肪酸合成経路を介することで糖や炭酸ガスを唯一の炭素源として炭素数 4～12 の 3-ヒドロキシアルカン酸（3HA）からなる物性の優れた共重合ポリエステル P(3HB-*co*-3HA)を合成することを目的とした。
【方法および結果】PHA 合成能欠損変異株の *R. eutropha* PHB^{-}4 および短鎖長特異的 PHA 重合酵素遺伝子破壊株の *R. eutropha* C-TnGmHX8 に、*Pseudomonas* sp. 61-3 の低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子（*phaC1*）と、脂肪酸合成経路から炭素数 6～12 の 3HA ユニットを供給する 3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ遺伝子（*phaG*）および *R. eutropha* 由来の 3HB ユニット供給系酵素遺伝子（*phbAB*）を導入し、これらを発現するプロモーターが異なる組換え株を作製した。*lac* プロモーターによって導入遺伝子を発現させた組換え株の従属栄養培養では、*R. eutropha* C-TnGmHX8 組換え株において破壊伸びが 23%の P(3HB-*co*-2.4% 3HA)が合成されたが、NMR および GC/MS 分析の結果、炭素数 10 以上の 3HA は検出されなかった。この組換え株の独立栄養培養においては、P(3HB)ホモポリマーのみが約 60 wt%合成された。一方、*R. eutropha* の PHA 生合成遺伝子の native プロモーターによって導入遺伝子を発現させた組換え株の従属栄養培養では、合成された PHA 鎖中への中鎖長 3HA ユニットの取り込みはなかった。脂肪酸合成経路の初発物質であるマロニル CoA の生成量が律速になっているため 3-ヒドロキシアシル-ACP からの 3-ヒドロキシアシル-CoA の供給量が少なく、PHA 鎖中の 3HA 分率が低くなっていると予想し、アセチル CoA カルボキシラーゼ遺伝子をさらに導入した組換え株を作製した。しかしながら、PHA の蓄積率は数%であり、PHA 鎖中への 3HA ユニットの取り込みはなかった。さらなる 3HA 分率の向上を目指して、*Pseudomonas aeruginosa* PAO 由来の推定 3-ヒドロキシアシル-CoA リガーゼ遺伝子を新たに導入した組換え *R. eutropha* の作製を試みている。

polyhydroxyalkanoate, PHA, *Ralstonia eutropha*

講演番号：3C12a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ C 校舎 12 会場

ハロモナス菌によるバイオプラスチック PHB 生産と GC-MS を用いた代謝分析
Bioplastic PHB production and metabolic analysis by GC-MS using Halomonas strains

ジン ユークン、○河田 悦和、川崎 一則、茂里 康 (産技総研健康工学)
YOUXUN JIN,○Yoshikazu Kawata,Kazunori Kawasaki,Yasushi Sigeri (AIST)

【目的】
国内外で、非可食の木材・草本、農業残渣や、食用に不適な油脂等を原料として、バイオエタノールやバイオディーゼルの生産、研究が進んでいるが、大量に副生する C5 糖やバイオディーゼル廃グリセロールの利活用が課題となっている。一方、多くのハロモナス菌は、グルコースのみならず、これら利用が難しい C5 糖キシロース、アラビノースを利用し、グリセロールも直接利用が可能である。さらに、高アルカリ中程度高塩濃度環境で生育するため、雑菌の混入を認めず、培地を殺菌する必要がない。そこで、これら余剰バイオマスの利活用を目指し、好塩、好アルカリ性のハロモナス菌生産する代謝産物を分析し、バイオプラスチック PHB の生産との関連を検討する。
【方法】
当研究室で単離した *Halomonas* sp. KM-1 の各種培養条件の代謝物を菌体内、菌体外に分けて網羅的に、GC-MS にて分析し、バイオプラスチック PHB の生産との関連を検討する。また、カルチャーコレクションの各種ハロモナス菌について、それらの PHB 生産と代謝産物を同様に、菌体内、菌体外に分けて分析し、PHB 生産の量と代謝物関連について分析する。
【結果】
単純化のために酵母エキスなどを含まない SOT 培地を用い、グルコースを炭素源として *Halomonas* sp. KM-1 株の培養を行った。グルコース濃度 5%、10%で培養した結果、乾燥菌体あたり 70-80%の PHB の蓄積を確認した。これらを経時的に分析した結果、菌体内で 53 種、菌体外で 35 種の代謝物を確認した。現在その代謝物の傾向を分析している。さらに、酵母エキスを含み、グリセリンを含む培地で 15 種類のカルチャーコレクションのハロモナス菌株を培養し、PHB の生産の有無、量、さらにその代謝物の傾向を分析した。結果、PHB を生産する菌株としない菌株の間に、PCA 解析では明らかな差が認められた。現在詳細を分析している。

Halomonas, metabolome, bioplastic

講演番号：3C12a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ C 校舎 12 会場

ポリアミド４の生分解

Biodegradation of polyamide 4

○山野 尚子、川崎 典起、中山 敦好（産技総研関西セ）
○Naoko Yamano,Norioki Kawasaki,Atsuyoshi Nakayama (AIST)

【目的】生分解性ポリマーの生分解性は用途によっては環境低負荷材料として長所になるが、一方長期安定性を求められる用途では実用化を阻む要因となる。ポリアミド４はナイロンの1種であり高性能プラスチックだが同時に生分解性を持つ[1)]。我々は生分解性の制御について検討し、長鎖脂肪酸を付加することにより生分解性を抑制する技術を昨年度の本大会に於いて報告した。生分解性は試料の形状により大きく影響を受けることが予測される。そこで形状の異なるポリマーの生分解性および物性を調べると共に、長鎖脂肪酸末端を持つ生分解性を抑制したポリアミド４についても同様の実験を行い、ポリマーの形状、物性と生分解性について比較検討した。

【方法】ポリアミド４は 2-ピロリドンを原料として開環重合により合成した。長鎖脂肪酸を持つポリアミド４は開始剤に長鎖脂肪酸塩化物を用いることにより導入した。成型品は射出成型で、フィルムは溶媒キャスト法で作成した。電界紡糸試料はトリフルオロエタノール溶液として 15kV の電圧で作成した。ポリマーの生分解性は標準活性汚泥（化学物質評価研究機構）を用い、JIS K6950 に記載されている無機培地 200mL に各種ポリマーを 30mg 加え、BOD 測定装置（タイテック, BOD tester 200F）を用いて JIS K6950 に準拠した方法にて生分解に伴う酸素消費量を測定することにより試験を行った。

【結果】同じポリアミド４試料から作成した粉末、射出成型、フィルム、電界紡糸試料の活性汚泥による生分解試験を行い、その生分解性を比較した。その結果、生分解速度は電界紡糸、粉末、フィルム、成型品となり、形状の違いにより生分解性に差が見られた。電界紡糸試料を顕微鏡で観察したところ、数百 nm 程度のファイバーが絡み合った構造をしていた。材料の表面積が生分解に関与することが示唆されたため、表面積の測定、および、材料表面の疎水基が生分解制御に関与すると考えられるステアロイルポリアミド４についても電界紡糸試料の生分解性および表面積を測定し、疎水性と表面積の生分解性への影響を検討した。

1) Yamano *et al*, J.Polym.Environ.,16,141(2008)

biodegradable polymer, polyamide

講演番号：3C12a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ C 校舎 12 会場

2-ピロリドンを含むコポリエステルアミドの生分解

Biodegradation of Copolyesteramides Based on 2-Pyrollidone

○中山 敦好、山野 尚子、川崎 典起、中村 努、上垣 浩一（産技総研関西セ）
○Atsuyoshi NAKAYAMA,Naoko YAMANO,Norioki KAWASAKI,Tsutomu NAKAMURA,Kouichi UEGAKI (AIST)

【緒言】ポリアミド 4 は従来の脂肪族ポリエステルと一線を画した、高強度、高融点を持つ生分解性ポリアミドとして注目されている。しかしながら、繰返し単位が短いため剛直な材料であり、柔軟性を持たせる工夫が求められている。我々はラクタムやラクトンとの共重合による柔軟化を検討しており、ここではコポリマー化による生分解性の変化について検討したので報告する。

【結果と考察】コポリアミドは金属ナトリウムによるモノマー活性化法で、コポリエステルアミドは n-ブチルリチウムを開始剤とした開環重合法で合成した。ポリアミド 4 の分解菌（*Pseudomonas* sp. ND-11)による生分解試験の場合、コポリアミドでは組成により生分解性が抑制されたが、カプロラクトン(CL)とのコポリエステルアミドでは分解初期では差異が見られるものの時間の経過とともに全組成範囲で生分解することがわかった(Fig. 1)。また、活性汚泥による生分解でもコポリアミドでは同様の傾向を示し、コポリエステルアミドでも最終的には組成によらず生分解されたが、PRN 含率の高いところでは生分解率が低くなる傾向が見られた(Fig. 2)。これは PRN 含率の高いものはポリマー中の N 量が多いため菌体中に取り込まれやすく、結果として無機化されない C が存在することを示唆する。コポリエステルアミドの酵素加水分解試験ではリパーゼの場合、エステル成分がリッチな領域では生分解は高いが、アミド含率が 40%を超えると加水分解性は大きく抑制された。ポリ乳酸の分解活性があることで知られるプロテネース K では広い組成範囲で良好な生分解性を示すが、ややアミドリッチな組成の方が分解は速かった。その他の酵素での結果や非生化学的な単純加水分解性についてもあわせて報告する。

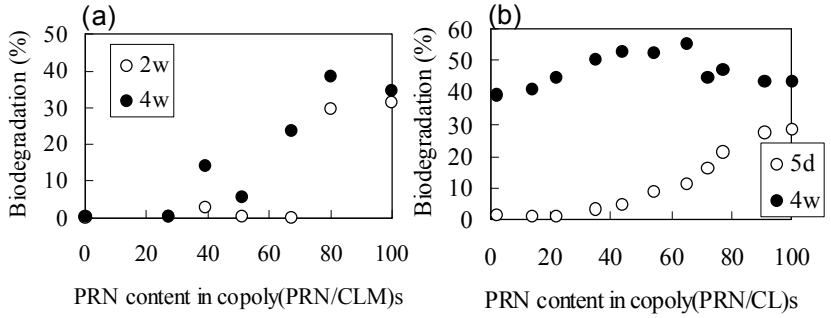


Fig.1 Biodegradation results by *Pseudomonas* sp. ND-11. (a) Copolyamides, (b) copolyesteramides.

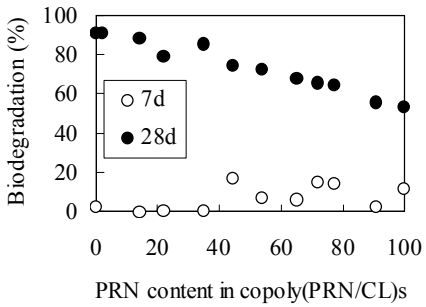


Fig.2 Biodegradation results of copolyesteramides by activated sludge.

polyamide 4, biodegradation, activate sludge

講演番号：3C12a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ C 校舎 12 会場

各種分光分析法による比較プロファイリングで示唆されたバイオマスの水陸適応戦略

Adaptive strategy of hydrophilous and terrestrial plant biomass suggested by spectroscopy-based comparative profiling

坂田 研二[1]、林 裕志[2]、伊藤 研悟[2]、篠 阿弥宇[1]、○伊達 康博[1,2]、菊地 淳[1,2,3,4]（[1]理研 PSC、[2]横市院生命、[3]名大院生命農、[4]理研 BMEP）

Kenji SAKATA[1], Hiroshi HAYASHI[2], Kengo ITO[2], Amiu SHINO[1], ○Yasuhiro DATE[1,2], Jun KIKUCHI[1,2,3,4] ([1]RIKEN PSC, [2]Grad. Sch. NanoBioSci. Yokohama City Univ., [3]Grad. Sch. Biol. Agri. Sci., Nagoya Univ., [4]RIKEN BMEP)

【研究背景・目的】原始地球に誕生した植物の祖先は、長い年月をかけて水圏環境から陸上環境へと生活環境を広げてきた。その進化の過程において、環境の変化に対応すべく植物の構成成分は多様化し、現在の陸上植物にみられるセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンを主成分とした強固で頑丈な細胞壁を構築するとともに、陸上植物の適応放散の歴史の中には、水草や海草等の一部の植物が再び水圏環境に回帰した。一方、水圏環境において進化を遂げ現在に至った海藻類は、陸上植物とは大きく異なり、アルギン酸やフコイダン、カラギーナン等の特徴的な多糖類を主成分とした柔軟なバイオマス組成を保持するようになった。このように多様性豊かな植物由来バイオマスは、グリーンイノベーションの材料・資源として注目されており、工業的価値は極めて高いと試算されているものの、その効能について評価されていないバイオマス成分も多数存在し、付加価値がなく、あるいは未利用のまま廃棄されている場合も多いことから、これら未利用バイオマス資源の有用性は計り知れない。そこで本研究では、この「宝の山」から埋もれた情報を発掘（データマイニング）するため、核磁気共鳴 (NMR) 法および赤外分光(IR)法等の各種分光分析法を基軸とした比較プロファイリング法を用い、水生および陸生植物バイオマスにおける化学的多様性の評価を試みた。

【方法・結果】天然海藻および海草サンプルは神奈川県横須賀市沿岸域より採取した。得られたサンプルは、各種破砕装置を用いて微粉化処理を施し、固体成分および各種溶媒を用いて抽出した溶液成分それぞれをNMR法やIR法、誘導結合プラズマ発光分光分析(ICP-OES)装置等を用いて計測し、各種バイオマスプロファイルを取得した。それぞれの計測法により得られた多変量データは数値化・マトリクス化し、統計学的にデータマイニングを行ったところ、海藻類バイオマスにおいては生育環境や季節変動の差異と比較し、各海藻類の系統分類学的差異（すなわち緑藻類、紅藻類、褐藻類の違い）に基づきそれぞれクラスタリングされる傾向にあり、褐藻グループ内における詳細な解析では、生育環境や地域差等もバイオマス成分の変動に大きく影響を及ぼしていた。また、同一環境にて生育しているものの進化系統学的に遠縁な海草についても同様に解析を行った結果、相対的には海藻類よりも陸上植物により近いプロファイルを示すものの、生育環境にも依存した特徴的なプロファイルを示すことが明らかとなった。以上のように、各種分光分析法による比較プロファイリングデータからバイオマスの水陸適応戦略の一端を垣間見ることができ、バイオマス組成に基づく化学的多様性は、進化の過程に応じた生物種の多様性と生育環境の両面を反映した総体的な特徴を示すことが示唆された。

Data mining, multivariate statistical analysis, plant biomass

講演番号：3C12a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ C 校舎 12 会場

糖輸送体蛋白質の無細胞合成および機能再構成系の構築

Cell-free synthesis and reconstitution of functional sugar transporters

○高林 泰斗[1]、寺本 真一[1]、泉 厚志[2]、野澤 彰[2]、渡辺 誠也[3]、戸澤 譲[2] ([1]愛媛大院理工、[2]愛媛大・無細胞セ、[3]愛媛大農)
○Taito TAKABAYASHI[1], Shinichi TERAMOTO[1], Atsushi IZUMI[2], Akira NOZAWA[2], Seiya WATANABE[3], Yuzuru TOZAWA[2] ([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Ehime Univ., [2]CSTRC, Ehime Univ., [3]Facul. Agr., Ehime Univ.)

【目的】酵母をはじめとする真菌類の糖輸送体は、そのほとんどが 12 回膜貫通型αヘリックスを有する Major facilitator superfamily (MFS)に属する。個々の生物は複数の糖輸送体を有し、相同性が高いためにアミノ酸配列情報に基づく基質特異性を類推することは困難である。従って、複数の糖輸送体遺伝子を欠失させた酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)株を宿主とする組換え体作製による遺伝子機能解析法が現在でも主流である。この方法では、基質輸送活性およびその選択性などを厳密に比較解析することが困難であり、より直接的な機能解析法の確立が望ましい。本研究で、酵母やバクテリアなどで報告のある糖輸送体およびそのホモログを対象として、コムギ胚芽抽出液を用いた無細胞翻訳系によるタンパク質の合成、ならびに人工脂質二重膜で構成されるベシクルへの合成膜タンパク質の挿入を行い、ラジオアイソトープ標識した基質を用いてグルコースをはじめとする糖の膜輸送活性の解析を進めた。
【方法】酵母ゲノムに存在する糖輸送体遺伝子の内 3 種を単離し、コムギ無細胞翻訳用プラスミドにクローニングした、次に、大豆アゾレクチンを構成成分とするリポソームを添加したコムギ無細胞翻訳系を用いて、上記 3 種の糖輸送体を合成した。続いて遠心分離による粗精製を行った後、リポソームを添加し凍結融解および超音波処理によって糖輸送体プロテオリポソームを調製した。ラジオアイソトープ標識した輸送基質のプロテオリポソーム内への輸送量を液体シンチレーションカウンターにより測定することで再構成糖輸送体の基質輸送活性の解析を進めた。
【結果】アゾレクチンで構成するリポソームを利用した系では、コムギ胚芽抽出液に含まれる内在性のグルコース輸送体の活性も検出した。酵母の高親和性グルコース輸送体を合成した翻訳反応液より再構成したリポソームでは、内在性の輸送活性と比較して有為に高いグルコース輸送活性が見られた。以上の結果より、コムギ無細胞翻訳系で合成した酵母の MFS 型の糖輸送体は、ベシクルに再構成可能であり、糖輸送活性を検証する再構成系の試験管内構築が可能であることを確認できた。現在、異なる標識基質を利用した基質特性性（選択性）の生化学的な検証を進めるとともに、バクテリアの糖輸送体の再構成系の構築を進めているので、これらの結果も含めた最新の研究成果を報告する。

cell-free protein synthesis, sugar transporters, proteoliposomes

講演番号：3C12a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ C 校舎 12 会場

ミドリムシ走光性における波長依存性
Wavelength dependency of Euglena Phototaxis

○大岡 英史[1]、石居 拓己[1]、中村 龍平[1]、橋本 和仁[1,2]([1]東大院工、[2]JST ERATO)
○Hideshi OOKA[1], Takumi Ishii[1], Ryuhei Nakamura[1], Kazuhito Hashimoto[1,2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]JST ERATO)

ミドリムシの走光性について、100 年ほどの間多くの研究がなされてきた。しかし、従来の研究は菌体一体レベルのミクロな観察に焦点を当てたものであり、菌体全体がどのように光に応答するのか、というマクロ的観点からの研究は少なかった。我々はマクロ的観点から走光性について検討を進める中で、従来の結果とは異なる挙動を観測したのでその結果を報告する。

まず、ミドリムシの走光性の大きな特徴として波長依存性があげられる。従来は「ミドリムシは青い光に寄ってくる」という見解が一般的であったが、我々はこれと一見相反する結果を得た。図 1 はアガーを貼った滅菌シャーレ上に培養液を薄く注ぎ、左から 400nm と 530nm の光を当てた後の様子である。400nm の青い光の場合、確かに殆どの菌体は光に寄ってきたことがわかる。しかし、光に近いところにいた菌体は逃げてしまったと言える。一方で、530nm の緑の光を照射すると、逃げる菌体は存在せず、全ての菌体が完全に光に吸い寄せられる分布を示した。ここで、光の強さはいずれも約 20 mw cm^{-2} であった。

波長依存性をより詳細に検討するため、菌体が最も多く分布した点における光強度を縦軸にとり作用スペクトルを作成した（図 2)。すると、過去には量子収率を縦軸にとった作用スペクトルが報告されているが、本研究で観測された 500－550 nm の間に最大値を持つような報告はない。

このように、微生物群全体の運動性を観測することで菌体一体レベルの光応答性とは異なる結果が得られた。これは、集団としての走行性のメカニズム、ならびに正の走光性に関与する受容体色素の新たな知見の獲得につながると期待される。

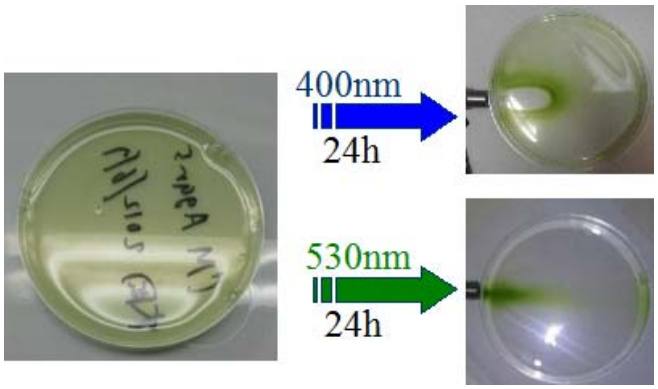


図 1 異なる波長によって菌体分布が変化する

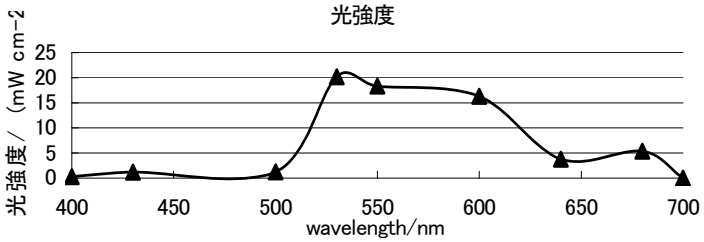


図 2　可視光域の波長依存性の作用スペクトル。

Euglena, Phototaxis, Wavelength

講演番号：3C12a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ C 校舎 12 会場

炭添加土壌における小松菜の生育と微生物叢の変化に関する研究

Effect of charcoal application to soil on the microbial community structure of Brassica rapa var.perviridis.

○澤田 直諒[1]、田中 理子[2]、吉澤 秀二[2]、後藤 純雄[3]、吉村 武朗[1]、峯木 茂[1]([1]東理大院応生科、[2]明星大総合理工、[3]麻布大環境科学)
○Naoaki Sawada[1], Satoko Tanaka[2], Shuji Yoshizawa[2], Sumio Goto[3], Takeo Yoshimura[1], Shigeru Mineki[1] ([1]Tokyo Univ. of Sci., [2]Meisei Univ., [3]Azabu Univ.)

土壌に肥料とともに炭を混合すると、植物の生育がよくなることが知られており、注目されている。しかし、炭による植物の生育促進がどのように起こるのか、詳細は十分には明らかになっていない。そこで、我々は根圏微生物に着目し植物の生育過程における微生物叢の変化を解析することで、生育促進効果を明らかにすることを目的に実験を行った。

〔方法〕炭（建築廃材を 650℃で炭化、（有）美炭産業）を添加した土壌で小松菜を生育し、その生長の変化を観察するとともに、PCR-DGGE 法を用いて細菌叢、糸状菌叢の構成の変化を解析した。

チップ状、粉末状の炭を混ぜ込んだ 2 種類の炭添加土壌を用意し、食品堆肥または牛糞堆肥を使用して小松菜の栽培を行った。土壌：肥料：炭＝1 L：50 g：0.1 L（10 g）となるように、まず土壌と肥料を混ぜて 2 週間寝かせてから炭を混ぜ込んだ。土壌は茨城県の畑土壌を使用した。

簡易ビニールハウス中で 11 月から 4 ヶ月間栽培した。栽培はプランターで行い、食品堆肥は 45×16×10 cm、牛糞堆肥では 56×15×10 cm の大きさのものを使用した。

栽培土壌から隔週で回収した土壌サンプルから DNA を抽出し、細菌・糸状菌の 16SrDNA および 18S rDNA を標的とした primer を用いて PCR-DGGE 法を行った。

〔結果〕食品堆肥を使用し栽培したものでは炭チップで重量が最も重く、コントロールと比較して約 11%増加した。牛糞堆肥を使用したものでは炭チップおよび炭粉末で重量が増加し、コントロールと比較してどちらも約 10%増加した。1）食品堆肥使用群において、生育 4 週目の炭チップ添加試料の細菌叢(16S)と糸状菌叢(18S)で特異的なバンドがみられた。2）牛糞堆肥サンプルでは土壌由来の微生物の増減はあるものの大きな違いはみられなかった。

シークエンスにより菌を仮同定した結果、食品堆肥使用群の細菌叢で炭チップ添加試料に特異的に出現したバンドは *Rhizobium* sp.および *Acidobacteria bacterium* に近縁であり、糸状菌叢で炭チップ添加試料において増加したバンドは *Rhizophlyctis* 属および *Chaetomium* 属であった。牛糞堆肥使用群では糸状菌叢で炭チップ添加試料に特異的に出現したバンドは *Botrydiopsis* 属であった。

以上の結果より、炭には植物の生育をある程度促進する効果が示唆された。また、細菌および糸状菌叢では生育期間中それぞれの試料間に大きな変化はみられなかったが、いくつか特異的なバンドを検出することができた。

charcoal, Brassica rapa var.perviridis., microbial community

講演番号：3C12a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ C 校舎 12 会場

微生物産生界面活性剤サーファクチンナトリウムの物性評価と製剤への応用

Investigation of propaties and applications of BIO-SURFACTANT (Sodium Surfactin) for formulations

○早瀬 基 ((株) カネボウ化粧品)
○Motoi Hayase (Kanebo Cosmetics Inc.)

【目的】微生物が産生する界面活性剤は安全性、生分解性などが優れているだけでなく、その特徴的な構造のため従来の合成界面活性剤では調製困難な特徴的な製剤を設計できる可能性がある。サーファクチンは枯草菌（*Busillus subtilis*）培養液由来の物質で、環状ペプチドの親水部とアルキル側鎖の疎水部を持つリポペプチドである。環状ペプチド中に遊離カルボキシル基を有するため、そのナトリウム塩はアニオン性界面活性剤としての機能を有する。工業化も進んでおり、バイオサーファクタントとして非常に期待されている物質である。しかしながら、化粧品などへの製剤適用のための基礎検討は未だ十分とはいえず、その乳化特性に関し詳細はわかっていない。これまで我々はサーファクチン塩の製剤化検討として、モノステアリン酸グリセリンと油剤を併用したときの製剤特性に関し報告を行っている。そこで今回サーファクチンナトリウムを含む単純系における挙動の確認を行った。
【方法】サーファクチンナトリウム（カネカ社製カネカ・サーファクチン）と種々の油剤との２成分混合系、およびそこに精製水加えた３成分混合系の状態を観察した。
【結果】サーファクチンナトリウムと油剤からなる２成分系混合試料を種々の配合比率で作製し、外観確認したところ、イソステアリン酸を用いた場合において、澄明に相互溶解する領域（サーファクチンナトリウム：イソステアリン酸＝１０：９０～４０：６０）と透明なゲル状の層と固体層の２層となる領域（サーファクチンナトリウム：イソステアリン酸＝５０：５０～９０：１０の）が確認された。次に精製水を加え３成分系混合試料としたところ、相互溶解する領域において良好な乳化物が調製できた。一方、オリーブ油、スクワランを用いた場合はこのような現象は見られなかった。

bio-surfactant, sodiumu surfactin, emulsion

講演番号：3C12p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ C 校舎 12 会場

Aspergillus oryzae 由来タンナーゼの特性解析
Characterization of a tannase from *Aspergillus oryzae*
○水野 聖之、塩野 義人、小関 卓也（山形大・農）
○Toshiyuki MIZUNO,Yoshihito SHIONO,Takuya KOSEKI (Yamagata Univ.)

【目的】タンナーゼはタンニンあるいはカテキンに存在する没食子酸のエステル結合（デプシド結合）を加水分解する酵素で、ワインや茶飲料の製造の際に清澄工程に利用されている。これら食品加工で利用されるタンナーゼはこれまで *Aspergillus oryzae* 由来の酵素が多く使用されてきているが特徴付けされている糸状菌タンナーゼはごくわずかである。一方、*A. oryzae* タンナーゼ遺伝子は、フェルラ酸エステラーゼ遺伝子と類似し、α/β ヒドロラーゼを分類している ESTHER データベース (http://bioweb.ensam.inra.fr/ESTHER/) ではタンナーゼファミリーに分類される。しかしながら、タンナーゼとフェルラ酸エステラーゼの基質特異性の違いについては明らかにされていない。今回は、*A. oryzae* タンナーゼの特性とフェルラ酸エステラーゼとの基質特異性の違いについて解析した。
【方法】*A. oryzae* 由来のタンナーゼは市販のタンナーゼ製剤から精製するとともに、*A. oryzae*RIB40 由来のタンナーゼ遺伝子(*AotanA*)とフェルラ酸エステラーゼ遺伝子(*AofaeB*)を *Pichia pastoris* を用いて発現させた。タンナーゼ活性は没食子酸メチル、(-)-エピカテキンガレートおよび(-)-エピガロカテキンガレートを基質に従い分光光学的な方法により、フェルラ酸エステラーゼ活性はフェルラ酸メチルを基質に HPLC を用いて測定した。
【結果】SDS-PAGE からリコンビナント AoFaeB の分子量は 60kDa 程度のバンドを示し、一方、リコンビナント AoTanA の分子量は 45kDa-70kDa の幅広いバンドを示した。また、エンドグリコシダーゼ H 処理後では、AoFaeB は 55kDa にシフトし、一方で、AoTanA は 30kDa と 34kDa の二つのバンドを示した。AoTanA はネイティブな精製酵素でも SDS-PAGE は二つのバンドを示し、リコンビナント酵素でも同様で、特異的なプロセッシングが示唆された。メチルガレート、(-)-エピカテキンガレート、(-)-エピガロカテキンガレートに対する比活性は(-)-エピカテキンガレートに対してより高い活性を示した。また、AoTanA は没食子酸（3,4,5-トリヒドロキシ安息香酸）エステルを加水分解するものの、フェルラ酸（4-ヒドロキシ-3-メトキシ桂皮酸）エステルは加水分解しなかった。逆に AoFaeB はフェルラ酸エステルを加水分解するものの、没食子酸エステルは加水分解しなかった。このように、*Aspergillus oryzae* 由来タンナーゼとフェルラ酸エステラーゼの基質特異性の相違が確認された。

Aspergillus oryzae, Tannase, Feruloyl esterase

講演番号：3C12p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ C 校舎 12 会場

緑藻ミル（*Codium fragile*）由来ハロペルオキシダーゼ

Haloperoxidase from green alga, *Codium fragile*

○大城 隆[1]、中川 諒也[2]、西野 裕貴[1] ([1]鳥取大院工、[2]鳥取大工)
○Takashi OHSHIRO[1], Ryoya NAKAGAWA[2], Yuki NISHINO[1] ([1]Tottori Univ., [2]Tottori Univ.)

【目的】ハロペルオキシダーゼは過酸化水素とハライドを基質として有機化合物のハロゲン化を触媒できる酵素である。本酵素は海藻由来の酵素としては最も研究が進んでいる酵素の一つであり、特に紅藻サンゴモ科に属するピリヒバ（*Corallina pilulifera*）由来の酵素に関しては、詳細な酵素化学的研究、遺伝子工学的研究が展開されている。海藻は紅藻、褐藻、緑藻に大別されるが、ハロペルオキシダーゼは紅藻、褐藻からはいくつか見出されているものの、緑藻由来の報告例は少ない。本研究では、日本近海に広く分布する緑藻ミル（*Codium fragile*）にハロペルオキシダーゼ活性を検出し、本酵素の諸性質の検討を実施した。

【方法】ミル藻体 10 kg（湿重量）を液体窒素で凍結させた後、ミキサーを用いて破砕し、25 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.0)を加えて一晩 4℃で放置し、この遠心上清を無細胞抽出液とした。調製した無細胞抽出液を同緩衝液に対して十分透析した後、各種カラムクロマトグラフィーにより酵素精製を行った。酵素反応は Monochlorodimedone（MCD） 法を用いて 30℃で行い、290 nm の吸光度の減少速度を測定することで酵素活性を求めた。1 unit は 30℃で 1 min に 1 μmol の MCD を消費する酵素量とした。

【結果】酵素精製の結果、比活性 3.56 units/mg の精製酵素標品を取得した。この値はピリヒバ由来の酵素の数％であった。本酵素のサブユニット分子量は 72 kDa、ネイティブ分子量は 417 kDa であり、KCl を基質とすることはできなかった。過酸化水素、KBr に対する *K*m 値はそれぞれ 0.015 mM、35 mM と求められ、今までに報告されている海藻由来のハロペルオキシダーゼに比べ、本酵素の過酸化水素に対する親和性は高かった。至適温度は 60℃、至適 pH は 6.0 であり、50℃、20 分の処理後も 50％以上の活性を保持していたが、熱安定性はピリヒバ由来の酵素よりも劣っていた。本酵素活性はいくつかの 2 価金属イオンの添加で上昇し、金属キレーターで阻害された。

haloperoxidase, bromoperoxidase, alga

講演番号：3C12p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ C 校舎 12 会場

チロシナーゼとペプチドとを用いた呈色反応

Blue pigment formed by the reaction of peptide with tyrosinase

○小西 康子[1]、堺澤 静[1]、平 修[2]、小原 涼太[3]、野田 文雄[3]、石田 信昭[1] ([1]石川県大食品、[2]北陸先端大院、[3]スギヨ)
○Yasuko Konishi[1], Shizuka Sakaizawa[1], Shu Taira[2], Ryouta Ohara[3], Fumio Noda[3], Nobuaki Ishida[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Japan Adv. Inst. Sci. Technol., [3]Sugiyo Co. Ltd.)

【諸言】

食品を美しく彩りその魅力を増して食欲と購買意欲を高めるため、食品の着色を目的にして様々な合成色素や天然系色素が使用されてきた。現在では、消費者の安全性志向から天然系色素の使用が主流になり、その需要はますます増加している。ペプチドを原料とする安定で安全な色素の供給が可能となれば、食品産業へ大きな貢献となり得る。

チロシナーゼは分子状酸素を用いてチロシンのフェノール基を酸化し、キノン基にする。このキノン基は反応性が高く、種々の官能基と結合しやすいことが知られている。昨年度、アミノ酸共存下でチロシンを含む短いペプチドとチロシナーゼを反応させると、アミノ酸の種類に依存した呈色反応がおこることを見いだした。今回はあざやかな青色を呈する反応に着目し、その反応条件および生成した色素の性質について明らかにすることを目的に実験を行った。

【方法】

チロシナーゼは、ナメコ子実体ホモジネートから硫安沈殿およびイオン交換カラムにより部分精製して用いた。ペプチド基質としては Ac-Tyr-Val-Glyを、アミノ酸としては Gly を用い、25 ℃、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 8.0）中でチロシナーゼと１時間反応させた。分子量３万カットの限外ろ過フィルターを用いて反応液からチロシナーゼを除去したのち、酸あるいはアルカリを加えてpHを調整し、－30℃で凍結保存した。

【結果】

基質ペプチドとアミノ酸の混合液にチロシナーゼを加えて反応させたところ、反応液は赤褐色になった。チロシナーゼ除去後に pH を 2～12 に調整した反応液を数日間凍結保存すると、色調が変化した。その色調変化は調整した pH に依存した。pH 8～9 に調整した反応液は凍結保存中にあざやかな青色となり、融解後に吸収スペクトルを測定したところピーク波長は 623.5 nm であった。この溶液を室温で数日間保存すると、赤色の蛍光が観察された。一方、反応液を凍結保存しない場合、あるいはアミノ酸を共存させずにチロシナーゼと反応させたペプチド溶液を凍結保存した場合には、あざやかな青色への変化は観察されなかった。

現在、青色物質の分離および構造解析について検討中である。

tyrosinase, peptide, pigment

講演番号：3C12p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ C 校舎 12 会場

Streptomyces sanglieri A14 株 glycerophosphoethanolamine ethanolaminephosphodiesterase の精製およびキャラクタリゼーション、遺伝子クローニング

Purification, characterization, and gene cloning of glycerophosphoethanolamine ethanolaminephosphodiesterase from *Streptomyces sanglieri* A14

○峯田 真吾、杉森 大助（福島大・理工）
○shingo mineta,daisuke sugimori (Dept. Symbio. Sys. Sci. Tech., Fukushima Univ.)

【目的】Glycerophosphoethanolamine ethanolaminephosphodiesterase (以下 GPE-EP と省略)はグリセロ-3-ホスホエタノールアミン (以下 GPE と省略)のリン酸ジエステル結合に作用し、グリセロールとホスホエタノールアミンに加水分解する酵素である。我々は、ホスホリパーゼ C をスクリーニングする過程で *Streptomyces sanglieri* A14 株が菌体外に GPE-EP を生産することを発見した。本発表では GPE-EP の精製およびキャラクタリゼーション、遺伝子クローニングについて報告する。
【方法・結果と考察】*S. sanglieri* A14 株の培養上清から硫安分画、疎水性相互作用、陰イオン交換を含む 5 種類のカラムクロマトグラフィーを用いて GPE-EP を精製した。本酵素はゲルろ過クロマトグラフィーおよび SDS-PAGE 分析により約 70 kDa のポリペプチド鎖からなる単量体であることが示唆された。この精製酵素を用いてキャラクタリゼーションを行った結果、至適 pH、温度はそれぞれ pH 8.4、65℃であり、GPE-EP は GPE に対して高い特異性を示し、グリセロ-3-ホスホコリンなど他のグリセロ-3-ホスホジエステルやジアシル型グリセロリン脂質にはほとんど活性を示さないことが明らかとなった。このことから本酵素はグリセロ-3-ホスホジエステルの中でもエタノールアミン型を特異的に認識する機構があると考えられる。GPE-EP に類似する酵素として動物由来の glycerophosphocholine cholinephosphodiesterase と glycerophosphoinositol inositolphosphodiesterase が報告されているが、GPE に対して特異的に作用する本酵素は、これまでにその存在すら知られていなかった新規酵素である。また、GPE-EP の N 末端および内部アミノ酸配列解析により明らかにしたアミノ酸配列をもとに PCR プライマーを設計して遺伝子クローニングを行った結果、本酵素遺伝子の ORF は 2124 bp で、48 アミノ酸のシグナルペプチドと 660 アミノ酸の成熟タンパク質から構成されていることがわかった。BLAST 検索の結果、本酵素のアミノ酸配列は *Streptomyces* sp. 由来ホスホリパーゼ C と 85%の相同性を示し、同一のファミリーに属していることが示唆された。

glycerophosphoethanolamine ethanolaminephosphodiesterase, glycero-3-phosphodiester, characterization

講演番号：3C12p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ C 校舎 12 会場

Streptomyces sanglieri 由来 glycerophosphocholine cholinephosphodiesterase の諸特性解析と発現の試み

Characterization and expression of glycerophosphocholine cholinephosphodiesterase from *Streptomyces sanglieri*

○小笠原 準季[1]、奥田 航輝[2]、杉森 大助[1] ([1]福島大院理工、[2]福島大理工)
○Junki OGASAWARA[1], Koki OKUDA[2], Daisuke SUGIMORI[1] ([1]Dept. Synbio. Sys. Sci. Tech., Fkushima Univ., [2]Grad. sch. Synbio. Sys. Sci. Tech., Fukushima Univ.)

【目的】 Glycerophosphocholine cholinephosphodiesterase(以下、GPC-CP)[EC.3.1.4.38]はグリセロ-3-ホスホコリン(以下、GPC)のリン酸ジエステル結合を加水分解し、グリセリンとホスホコリンを遊離する酵素である。これまでにヒト、ウシ、ラット、マウスなどの高等生物の脳に存在することが報告されているが、詳細な酵素学的性質の解明はなされていない。GPC は様々な生理活性機能や諸疾患との関連性が報告されている物質であり、GPC-CP は血漿中の GPC を簡便に測定できる体外診断薬酵素としての利用が期待される。本研究室では、*Streptomyces sanglieri* A14 株の培養上清より既知 GPC-CP とは諸性質が全く異なる GPC-CP を見出した。また、A14 株はグリセロ-3-ホスホエタノールアミン(以下、GPE)に特異的に作用し、グリセリンとホスホエタノールアミンに加水分解する新規酵素 glycerophosphoethanolamine ethanolaminephosphodiesterase (以下、GPE-EP)を生産することも見出している。本発表では、GPC-CP の諸特性および GPE-EP との特性比較、GPC-CP の発現について報告する。

【方法と結果】*S. sanglieri* A14 株の培養上清より、硫安分画、陰イオン交換、疎水性相互作用、ゲル濾過、等電点カラムクロマトグラフィーにより精製酵素を得た。本酵素と GPE-EP の基質特異性を比較した結果、GPE-EP は GPE にのみ活性を示したが、本酵素は GPC と GPE に同程度の活性を示したことから、GPC-CP の基質結合ポケットは GPE-EP に比べて広いために、コリンおよびエタノールアミン型の両方を認識して加水分解を行うことができると考えられた。また、本酵素は 40°C, pH 7.2 において最大活性を示したが、GPE-EP は 65°C, pH 8.4 において最大活性を示したことから、両者において触媒反応に関与するアミノ酸残基が異なることが示唆された。本酵素の遺伝子クローニングを行い、アミノ酸配列のホモロジー検索を行った結果、ホスファチジルコリン特異的 phospholipase C (以下、PLC)と高い相同性を示した。このことから本酵素は PLC と同じ phosphoesterase superfamily に属し、これまでに報告例のない基質特異性を示す酵素であると結論付けた。現在、詳細な触媒機構の解明を目的として、*E. coli* や *S. lividans* などを用いて本酵素の発現を試みている。

glycerophosphocholine cholinephoshodiesterase, glycero-3-phosphodiester, *Streptomyces sanglieri*

講演番号：3C12p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ C 校舎 12 会場

大腸菌由来の耐熱性無機ピロホスファターゼの精製と特性評価

Purification and characterization of thermostable inorganic pyrophosphatase from the *Escherichia coli*

○殷 梓蘭、中村 卓（長浜バイオ大院）
○Zilan YIN,Takasi NAKAMURA (Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

【研究背景】

我々は、超好熱菌古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 由来の推定ハロ酸デハロゲナーゼ PH0459 がハロ酸デハロゲナーゼではなくて、ホスファターゼ活性を持っているという研究結果を昨年の本大会で発表した。しかし、その後の実験結果により発表したホスファターゼ活性を持っていたのは PH0459 ではなかった。そして、タンパク質発現用 *E.coli* BL21（DE3）の中に耐熱性のホスファターゼが存在するかを調査した。

【方法】

IPTG 添加条件で培養した *E.coli* BL21（DE3）を超音波破砕と加熱処理（95℃、20 min）した後、陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。得られたフラクションの活性測定と SDS-PAGE の結果から、ホスファターゼと思われたバンドをゲルから切り出して、消化酵素処理したサンプルの質量分析とデーターベース検索を行った。データーベース検索結果により、候補と思われたホスファターゼの遺伝子を *E.coli* BL21（DE3）のゲノムから TA クローニング法により増幅した。その後に、タンパク大量発現用の pET11a ベクターに導入し、さらに *E.coli* BL21（DE3）で大量発現を行った。その菌体抽出液を超音波破砕と加熱処理し、陰イオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーにより精製を行った。精製後、ピロリン酸（PPi）を基質としたマラカイトグリーン比色定量法でホスファターゼ活性について調べた。ホスファターゼ活性を確認できた上で、基質特異性、金属要求性と熱安定性も調べた。

【結果】

データーベース検索結果により、候補となる無機ピロホスファターゼ（PPase）が推測された。そして、pET11aベクターと*E.coli* BL21（DE3）の系で大量発現と精製することにも成功した。得られたPPaseのホスファターゼ活性測定を行った結果、PPiに対するホスファターゼ活性が一番高かった。金属要求性の結果として、Mg^{2+}に対する要求性、Ca^{2+}の阻害効果が確認された。また、熱安定性を調べたところ、70℃、１時間半インキュベーションしても、活性が落ちないことも確認できた。

Escherichia coli, thermostable inorganic pyrophosphatase, characterization

講演番号：3C12p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ C 校舎 12 会場

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の新規アミノプロピル基転移酵素の同定
Identification of a novel aaminopropyl transferase from a hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*

○岡田 和真[1]、秀瀬 涼太[1]、福田 青郎[2]、大島 泰郎[3]、今中 忠行[2]、藤原 伸介[1] ([1]関学大理工、[2]立命大生命科学、[3]共和化工・環境微生物学研究所)
○ Kazuma Okada[1], Ryota Hidese[1], Wakao Hukuda[2], Tairo Oshima[3], Tadayuki Imanaka[2], Shinsuke Fujiwara[1] ([1]Kwansei-Gakuin Univ., [2]Ritumeikan Univ., [3]Kyowa Kako Co., Ltd.)

【研究目的】ポリアミンは核酸の安定化や細胞増殖・分化等、様々な生命現象に関与している低分子の塩基性物質である。好熱菌では一般的なポリアミンの他にも、長鎖または分岐型の特殊なポリアミンが発見されており、これら特殊なポリアミンは核酸の安定化能が高いという報告がある。以上のことから、長鎖・分岐型ポリアミンは好熱菌の高温環境への適応機構に関与していると考えられている。一般に細菌のポリアミン生合成系路では、アルギニンやオルニチン等のアミノ酸から脱炭酸・脱尿素を経てプトレシンが合成され、アデノシルメチルチオプロピルアミン（dcSAM）由来のアミノプロピル基が付加されることによりポリアミンの鎖長が伸びていく。しかし超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* ではアルギニンよりアグマチン、アミノプロピルアグマチンの合成を経てスペルミジンが合成されるというポリアミン生合成経路が現在判明している。スペルミジンから最終的にアミノプロピルスペルミンという分岐型ポリアミンが合成されることは知られているが、このアミノプロピルスペルミン合成経路の全容は未だ解明されていない。そこで本研究では *T. kodakarensis* を対象にポリアミン生合成系に関わる未知アミノプロピル基転移酵素を同定することを目的とした。

【実験方法及び結果】*T. kodakarensis* 野生株の細胞抽出液を硫安分画後、強酸性陽イオン交換カラムを用いて HPLC でアミノプロピル基転移酵素活性の測定を行った。酵素活性の見られた硫安画分を陰イオン交換クロマトグラフィーで分画し、酵素活性の高い画分を濃縮後、陽イオン交換クロマトグラフィーで分画した。さらにゲルろ過クロマトグラフィーで分画し、活性画分を SDS-PAGE で泳動し、タンパク質と思われる 4 つのバンドを回収した。それぞれを LC/MS を用いて質量分析し、同定した。同時に 4 種類の酵素タンパク質をコードすると考えられるタンパク質遺伝子を大腸菌を用いて発現させ、組換え体として取得した。これらのアミノプロピル基転移酵素活性の有無を精査した結果、分子量約 40k のタンパク質に分岐型ポリアミンであるアミノプロピルスペルミンの合成活性を確認した。既知のゲノムデータベースを用いて本遺伝子の拡散性を検討したところ、この酵素遺伝子は多くの好熱菌において保存されていたが、常温菌では保存されていなかった。本酵素は分岐型ポリアミンの合成に必須の酵素と考えられる。

Thermococcus kodakarensis, Polyamine, Aminopropyl transferase

講演番号：3C12p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ C 校舎 12 会場

神経剤高分解能を有する変異 Organophosphorus hydrolase の性状と迅速精製法の検討

Characterization and rapid purification of mutated Organophosphorus hydrolase with improved activity to nerve agents

○中山 公介[1]、大森 毅[2]、瀬戸 康雄[2]、有路 沙織[1]、石川 暁志[1]、川原 一芳[1]（[1]関東学院大・工・物質生命、[2]科警研）
○Kousuke NAKAYAMA[1], Takeshi OMORI[2], Yasuo SETO[2], Saori ARIJI[1], Satoshi ISHIKAWA[1], Kazuyoshi KAWAHARA[1] ([1]Kanto Gakuin University, [2]National Institute of Police Science)

【目的】*Sphingobium fuliginis* などの好気性グラム陰性細菌が産生する Organophosphorus hydrolase（OPH）は有機リン系化合物を分解する酵素である。本酵素は有機リン系農薬のみならず、構造が類似している有機リン系神経剤にも有効であることから、化学テロにおける神経剤の除染という観点から研究が進められている。しかし、強力な毒性を有する VX には分解活性が低いため、変異導入による改良が行われてきた。前年度本大会で、既報をもとに活性中心のアミノ酸を置換する事により、VX 分解活性が上昇した変異酵素の作製と、精製法の検討について報告した。本研究では野生型酵素と変異酵素について、分解活性への 2 価の金属イオンの影響について調べた。また、これまでの精製法では精製過程で活性が低下するという問題点があることから、OPH の大量産生と迅速精製を行うための方法を再検討したので報告する。
【方法及び結果】野生型酵素と変異型酵素 3 株の粗酵素液を調製し、パラオキソンと神経剤分解活性を測定した。2 価金属イオンの影響は、$ZnSO_4$ あるいは $CoCl_2$ と混合し、その後、活性を測定することにより定量した。パラオキソン分解活性はパラオキソンを基質として、410 nm の吸光度の増加により定量した。神経剤の分解活性は、神経剤を 50 ppm となるように加え、37℃、20 min 反応後、残存神経剤をジクロロメタンで抽出した後に GC-MS で分析することにより定量した。パラオキソン分解活性は、254 番目と 257 番目がともにヒスチジンとなる酵素に Co^{2+}を添加した場合、最も高かった。神経剤分解活性についても同変異酵素に Co^{2+}を添加した場合が最も高い活性を示した。これに対して、野生型酵素は Zn^{2+}添加により、最も高い活性が得られた。従って、活性中心のアミノ酸置換が 2 価イオンによる活性化に影響を及ぼしていると考えられた。次に変異 OPH を不溶化せずに産生させる方法として、アルカリフォスファターゼとの融合タンパク質作製を試みた。pTV118N に大腸菌アルカリフォスファターゼをクローニングした高産生株の ORF を *Cpo*Ⅰで切断し、*Cpo*Ⅰ、*Hin*dⅢを付加したプライマーで増幅した OPH 遺伝子をコドンフレームを合わせて連結した。今後、融合タンパク質の産生量と OPH 活性について検討する予定である。His-Tag を利用したアフィニティークロマトグラフィーについては、これまで N 末端に Tag を付加した OPH を作製したが、カラムへの吸着が不十分であった。そのため、終止コドンを除いた OPH 遺伝子を pET32b（Novagen）のクローニング部位に連結し、C 末端側に Tag を付加した変異 OPH を作製した。これによりクロマトグラフィー収量の向上が見られたので、今後は迅速な精製が可能になると考えられる。

Organophosphorus hydrolase, *Sphingobium fuliginis*, nerve agents

講演番号：3C12p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ C 校舎 12 会場

細胞性粘菌における acetoacetyl-CoA thiolase の dual-localization について
Dual-localization of acetoacetyl-CoA thiolase in *Dictyostelium discoideum*
○関場 惇史、板垣 祥子、大町 鉄雄 (弘前大・農学生命)
○Atsushi SEKIBA,Shoko ITAGAKI,Tetsuo OHMACHI (Fac. of Agr. & Life Sci., Hirosaki Univ.)

【目的】Acetoacetyl-CoA thiolase(AT)は、2 分子の acetyl-CoA を縮合し acetoacetyl-CoA を生成する反応、又その逆反応の acetoacetyl-CoA の CoA 依存チオリシス反応を触媒する酵素である。真核生物において細胞内局在性からミトコンドリア型、ペルオキシソーム型及び細胞質型の 3 種の AT が存在することが知られている。我々は、以前、細胞性粘菌の cDNA ライブラリーから単離したチオラーゼ遺伝子が AT(Ddthiolase)をコードしていることを示した。また、Ddthiolase の細胞内局在性を検討し、ペルオキシソームに局在すること、またそのペルオキシソーム移行シグナルが PTS-2 であることを明らかにした。更に、Ddthiolase の N 末端領域に PTS-2 と一部重なってミトコンドリア移行シグナル(MTS)が存在することが分かった。そこで今回、Ddthiolase の N 末端領域と細胞内局在性について詳細に検討した。
【方法】粘菌アメーバ細胞から細胞分画法によりペルオキシソームを含む沈殿画分と上清画分(細胞質)を調製し、SDS-PAGE を行った後、抗チオラーゼ抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。また、粘菌に発現した種々のチオラーゼ−GFP 融合タンパク質の細胞内局在性を蛍光顕微鏡を用いて観察・検討した。
【結果及び考察】細胞分画法による解析において、Ddthiolase は大部分が沈殿画分に検出され、また、わずかに上清細胞質画分にも検出された。Ddthiolase の 16 位にメチオニンが存在することから、N 末端 15 アミノ酸残基を欠損した ΔN15 Ddthiolase の細胞内局在を検討した結果、細胞質に局在した。また、Ddthiolase 過剰発現株の細胞質画分に分子量のわずかに異なる 2 分子種、long form と short form が検出された。プロセシング実験の結果、long form は PTS-2 を含む前駆体で、short form は 16 位メチオニンコドンから翻訳された PTS-2 を欠いた細胞質 Ddthiolase であることが示唆された。さらに、高細胞密度まで培養したアメーバ細胞におけるチオラーゼ−GFP の蛍光顕微鏡観察により、Ddthiolase はミトコンドリアに局在することが示された。以上の結果は、Ddthiolase がペルオキシソームと細胞質及びミトコンドリアに局在する multi-localizing 酵素であることを示唆している。

Dictyostelium discoideum, Acetoacetyl-CoA thiolase, Dual localization

講演番号：3C12p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ C 校舎 12 会場

新規メナキノン生合成経路酵素 MqnD の生成物・類似体複合体の X 線結晶構造解析

Crystal structure of a menaquinone biosynthetic enzyme *Tth*MqnD complexed with the product and product analogs

松尾 京子[1]、石北 央[2]、大利 徹[3]、○新井 亮一[1] ([1]信州大繊維、[2]京大 CPLS、[3]北大院工)
Kyoko MATSUO[1], Hiroshi ISHIKITA[2], Tohru DAIRI[3], ○Ryoichi ARAI[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Hokkaido Univ.)

【目的】近年、放線菌や高度好熱菌において従来知られていなかったメナキノン(ビタミン K_2)生合成経路が新たに発見された。この新規メナキノン生合成経路のみを持つ微生物の中には、病原菌である *Helicobacter pylori* や *Campylobacter jejuni* が含まれ、ヒトや乳酸菌等の共生微生物はこの経路を持たない。そのため、新規メナキノン生合成経路にある酵素は、病原菌に特異的な阻害剤開発のターゲットになりうると考えられる。そこで本研究では、新規メナキノン生合成経路の酵素の一つである MqnD の立体構造を解析し、反応機構の解明を目的とした。
【方法】高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来 MqnD を大量発現・精製し、結晶化を行った。さらに、ソーキングにより MqnD と生成物(1,4-dihydroxy-6-naphthoate)及び生成物類似体との複合体結晶をそれぞれ作製し、Photon Factory の構造生物学ビームラインを利用して X 線結晶構造解析を行った。
【結果】MqnD と生成物または３種の生成物類似体との複合体について、分解能約 1.6～2.3Å で立体構造解析に成功した。生成物や類似体は、MqnD の大小２つのドメイン間のポケット部位に結合し、Ser57 の側鎖や Thr107、Ala108 の主鎖窒素原子と生成物・類似体のカルボキシル基の酸素原子との間で水素結合を形成していた。また、Leu176 と Tyr234 は生成物・類似体と疎水結合を形成する位置にあり、His145 と Asn13 は生成物と非常に近接し、反応に適した位置にあった。これらの残基は他種間でも高度に保存されており、特に、His145 は反応活性中心の触媒塩基として働き、Asn13 は反応中間体の安定化に寄与している可能性が示唆された。さらに、Asp38 は水分子を介して His145 の塩基性を高め、反応を促進している可能性も推察された。

menaquinone biosynthetic enzyme, crystal structure, reaction mechanism

講演番号：3C12p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ C 校舎 12 会場

鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 由来テトラチオン酸ハイドロラーゼの結晶化

Crystallization of a tetrathionate hydrolase from iron- and sulfur-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans*

○中山 久之[1]、小坂 恵[2]、上村 一雄[1]、金尾 忠芳[1]（[1]岡山大院環境生命、[2]岡山大自然生命セ）
○Hisayuki Nakayama[1], Megumi Kosaka[2], Kazuo Kamimura[1], Tadayoshi Kanao[1]（[1]Okayama Univ., [2]Okayama Univ.）

【背景・目的】鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* は、二酸化炭素を唯一の炭素源とし、生育のためのエネルギーを二価鉄または還元型無機硫黄化合物を酸化することにより獲得する、好酸性の化学合成独立栄養細菌である。本菌は、二価鉄または還元型無機硫黄化合物をエネルギー源として生育した場合、その生育基質に対応して代謝を切り替える特性を持ち、異なるタンパク質を発現することが確認されている。我々は、本菌の異化的硫黄代謝における鍵酵素の一つ、テトラチオン酸ハイドロラーゼ（4THase）を分離精製し、これをコードする遺伝子（*Af-tth*）を同定した。

4THase は、本菌が無機硫黄化合物であるテトラチオン酸で生育した場合に、代謝の第一段階を担う重要な酵素である。本酵素は、テトラチオン酸（$S_4O_6^{2-}$）を加水分解し、元素硫黄（S^0）とチオ硫酸（$S_2O_3^{2-}$）、そして硫酸を生成する反応を触媒する酵素である。4THase は、*A. ferrooxidans* を含む *Acidithiobacillus* 属や *Acidianus brierleyi* など、一部の好酸性微生物から報告された極めてユニークな酵素であり、データベース上において高い相同性を示すものが存在しなかった。4THase の詳細な解析は、無機硫黄化合物に対する酵素反応機構の解明や、未解明である本菌の硫黄代謝機構の解明、あるいは 4THase の応用研究に必要不可欠である。本研究では、大腸菌を宿主とした組換え 4THase の大量発現・精製を行い、さらに結晶化することで X 線結晶構造解析などによる詳細な研究を行うことを目的とした。

【方法・結果】本遺伝子（*Af-tth*）の大腸菌を宿主とした 4THase の組換え発現において、得られたタンパク質（*Af*-Tth）は活性を持たない不溶性の封入体を形成した。この封入体を、グアニジン塩酸塩により可溶化し refolding 処理を行ったところ、活性型 4THase を獲得することができた。この活性型 4THase を疎水など各種カラムクロマトグラフィーにより高度に精製し、その結晶化を試みた。結晶化条件のスクリーニングには、Crystal Screen Kit、Crystal Screen 2 Kit (Hampton Research)、MemGold (Molecular Dimensions) を用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法により行った。いくつかの条件で結晶の形成が確認され、それらの結晶に対して Izit Crystal Dye (Hampton Research) を用いて染色を行ったところ、MemGold の一つの条件において染色が確認できたため、さらなる条件の最適化を行った。この結果、優れた結晶性を持つ *Af*-Tth のタンパク質結晶の獲得に成功した。

現在、得られた結晶を用いて X 線照射を行い、その構造解析を行っている。

tetrathionate hydrolase, refolding, crystallization

講演番号：3C12p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ C 校舎 12 会場

ファージ由来ウェルシュ菌特異的溶菌酵素 Psm の触媒ドメインの結晶構造解析
X-ray structure of catalytic domain of a phage endolysin specific to Clostridium perfringens SM101
○吉田 裕美[1]、玉井 栄治[2]、関谷 洋志[2]、牧 純[2]、神鳥 成弘[1]([1]香川大総合生命研究セ、[2]松山大薬)
○Hiromi YOSHIDA[1], Eiji TAMAI[2], Hiroshi SEKIYA[2], Jun MAKI[2], Shigehiro KAMITORI[1]
([1]Kagawa Univ., [2]Matsuyama Univ.)

【目的】食中毒の原因ともなるウェルシュ菌、*Clostridium perfringens* SM101よりクローニングされたファージ由来のウェルシュ菌特異的溶菌酵素Psmは、N末端に触媒活性ドメインであるムラミダーゼ、フレキシブルなリンカー領域を介したC末端には、２つの Src homology 3 (SH3)ドメインを有する。Psmの溶菌活性には、細胞壁構成成分に結合すると考えられるSH3ドメインが不可欠であることが示唆されており、演者らはウェルシュ菌に特異的に作用する溶菌活性のメカニズムの解明を目指し、Psmの全体構造を決定し報告してきた。しかしながら、これまでに溶菌活性を支持する細胞壁構成成分との複合体構造は得られていない。本研究では、Psmの触媒活性ドメイン（Psm CD）に集中し、Psm CDのみを発現させた酵素を調製し、溶菌活性のメカニズムの解明の糸口となる複合体構造を得ることを目的とした。
【方法】N末端にHisタグを持つPsmを発現できるプラスミドpPsm-hisを鋳型として、PCRにより触媒活性ドメイン領域のサブクローニングを行った。大腸菌BL21-RIL 株を宿主としてN末端にHisタグを持つPsm CDを発現させ、アフィニティカラムを用いて精製酵素を調製した。精製酵素を20 mM Tris-HCl pH 8.5, 10％glycerolに対して透析し、限外濾過により濃縮した酵素 73 mg/mlとリザーバー溶液(0.1M Phosphate－citrate pH 4.2, 0.2 M Lithium sulfate, 20 % (w/v) PEG 1000) を用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法により結晶を作成した。X線結晶解析には、1.5 M GlcNAc 溶液に浸した結晶を用いてRAXIS VIIによりデータ収集を行った。
【結果および考察】Psm CD の全体構造はこれまでと同様 *S. coelicolor* ムラミダーゼの全体構造と類似し、β/α バレル構造を形成していたが、基質結合部位には GlcNAc が結合している電子密度が得られた。基質結合部位において、SH3 ドメインを含む Psm の全長構造における触媒ドメインと比較すると、Psm CD のみの構造では推定触媒部位近傍の２つの残基の側鎖が基質結合部位を解放するよう分子表面上に開かれていた。触媒活性ドメインのみでは溶菌活性を示す証明はされていないが、触媒活性ドメインのみでも GlcNAc には結合できることが証明された。これより、Psm 全長においては、SH3 ドメインが細胞壁成分に結合することによって、分子全体のコンフォメーション変化を起こし、触媒ドメインが基質に結合しやすい構造をとる可能性もあるのではないかと考えられた。

X-ray structure, Clostridium perfringens, muramidase

講演番号：3C12p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ C 校舎 12 会場

ヒト由来スクアレン合成酵素の生産物特異性部位の探索
Systematic search for specificity controlling residues of human squalene synthase.
○方波見 彰仁、斎藤 恭一、梅野 太輔（千葉大院・工・共生応化）
○Akinori KATABAMI,Kyoichi SAITO,Daisuke UMENO（Dept. Appl. Chem. Biotech., Chiba Univ.）

[背景]
スクアレン合成酵素 (SQS) は, 基質となるファルネシル二リン酸 (FPP) 2 分子を 2 段階の反応を経てスクアレン (SQ) に合成する。具体的には, FPP 2 分子の head-to-head 縮合によるプレスクアレン二リン酸 (PSPP) の合成, それに次ぐ PSPP の脱リン酸化と構造異性化のカスケードによって最終生産物が得られる。2 段階目の反応において, NADPH の欠乏下では, カロテノイド色素の前駆体デヒドロスクアレン (DSQ) を含む複数の非還元型化合物が合成されるが [1], NADPH 存在下では反応が還元的に進行し, SQ が選択的に合成される (Fig.)。これまで, NADPH がどのような形で 2 段階目の反応系に正しく供給されるかなどの, SQS の生産物特異性に関わる制御機構については殆ど明らかになっていない。本研究では, SQS の生産物特異性がどのように制御されているのかを明らかにするために, SQS 遺伝子の全領域に及ぶ変異解析を行った。
[方法と結果]
ヒト由来 SQS の変異体ライブラリを作製し, 非還元型の縮合産物を与える変異体を探索した。具体的には, SQS 遺伝子にランダムな遺伝子変異の導入を行い, カロテノイド合成酵素の機能補完ができる SQS 変異体の探索を行った。15 種類の特異性変異体の遺伝型解析によって, SQ/DSQ の作り分けに関わるアミノ酸残基を少なくとも 10 箇所特定できた。これらの残基は, NADPH の結合部位と推定される領域 [2] に加え, 反応ポケット周辺の様々な部位に及んでいた。さらに, これらのアミノ酸残基への集中的な変異解析を行った結果, DSQ を選択的に合成する SQS 変異体を複数得た。本講演では, SQS やその類縁酵素の SQ/DSQ 作り分けの機構について, 得られた SQS 変異体の配列解析の結果を基に議論する。

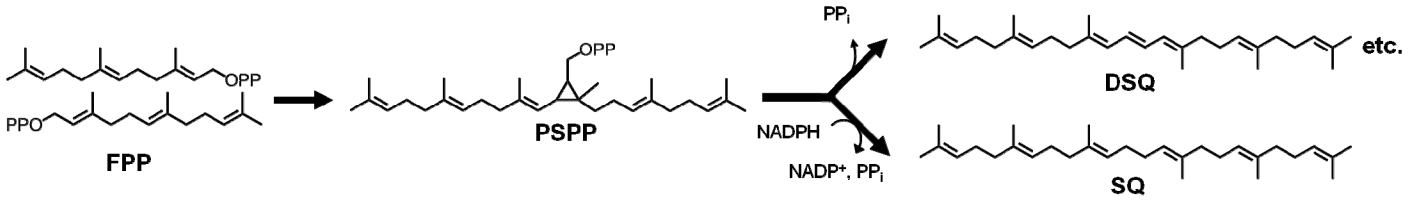


Fig. SQSの反応メカニズム

引用文献：[1] J. –J. Pan, T. S. Bugni, and C. D. Poulter, *J Org Chem*., **74**, 7562 (2009)
[2] S. Lee and C. D. Poulter, *J. Bacteriol.*, **190**, 3808-3816 (2008)

squalene synthase, mutation analysis, NADPH

講演番号：3C12p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ C 校舎 12 会場

Aspergillus oryzae フェルラ酸エステラーゼ B のリッドドメインの機能解析
Mutational analysis of feruloyl esterase B of Lid domain from *Aspergillus oryzae*
○河本 かずさ[1]、鈴木 健太郎[2]、伏信 進矢[2]、塩野 義人[1]、小関 卓也[1] ([1]山形大・農、[2]東大院農・応生工)
○Kazusa KAWAMOTO[1], Kentaro SUZUKI[2], Shinya HUSINOBU[2], Yoshihito SHIONO[1], Takuya KOSEKI[1] ([1]Yamagata Univ., [2]Tokyo Univ.)

【目的】フェルラ酸エステラーゼは植物細胞壁ヘミセルロースに存在するフェルラ酸と糖のエステル結合を加水分解する酵素で、効率的な植物バイオマス分解や、血圧降下、コレステロールの低下といった生理機能を有するフェルラ酸の酵素抽出に寄与している。*Aspergillus oryzae* 由来フェルラ酸エステラーゼ B（AoFaeB）の結晶構造から明らかとなった、触媒残基（Ser203、Asp417、His457）に隣接するジスルフィド結合（Cys202、Cys458）が、本酵素活性に重要であること、触媒残基付近のアミノ酸残基 Leu235、Tyr348、Tyr356 が基質認識にかかわることを、以前の本大会において発表した。AoFaeB の全体構造は、231～390 の 160 残基からなる、新規性が高く大きいリッドドメインを有し、リッドドメインは触媒残基付近の基質認識にかかわるアミノ酸残基を含んでいる。今回は、本酵素におけるリッドドメインの役割について検討した。
【方法】AoFaeB のアミノ酸配列はタンナーゼに類似し、タンナーゼファミリーに分類される。AoFaeB のリッドドメインを削除し解析するにあたって、リッドドメインの配列を欠失させた変異酵素 AoFaeB-ΔLid と、*A.oryzae* タンナーゼの配列に置き換えたキメラ酵素 AoFaeB-TanLid の作成を行った。２つの変異酵素はメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて生産させた。
【結果】*Pichia pastoris* での培養期間において、培養上清中にエステラーゼ活性の上昇がみられた。エステラーゼ活性は合成基質 α-ナフチル酪酸を用いて評価した。培養上清からそれぞれの酵素を精製し、精製酵素を用いて解析を行った。精製酵素においても、野生型酵素と比較して少ないものの、いずれもエステラーゼ活性を保持した。基質特異性はフェルラ酸エステラーゼの基質に用いられるフェルラ酸、p-クマール酸、カフェ酸それぞれのメチルエステルに対する活性で評価した。

Aspergillus oryzae, Feruloyl esterase, Lid domain

講演番号：3C12p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ C 校舎 12 会場

Enterococcus faecalis NP-10011 株特異的バクテリオファージのゲノム解析と組換えエンドリシンの特性

Genomic sequence of bacteriophage BC-611 from *Enterococcus faecalis* and heterologous expression of an endolysin

○粟冠 真紀子[1]、堀内 智博[1]、林 篤[2]、嶋田 貴志[2]、木村 哲也[1]、粟冠 和郎[1] ([1]三重大院生資、[2]ニチニチ製薬)

○Makiko SAKKA[1], Tomohiro HORIUTI[1], ATUSHI HAYASHI[2], Takashi SHIMADA[2], Tetuya KIMURA[1], Kazuo SAKKA[1] ([1]Mie Univ., [2]Nichinichi Pharm.)

【目的】*Enterococcus faecalis* は日和見病原性のある腸内細菌であり、菌血症，心内膜炎，尿路感染症，髄膜炎などの重篤な症状を引き起こすことがある。特に多剤耐性菌に対する有効な治療法がなく、バクテリオファージセラピーが注目されている。一方、伝統的な発酵乳やチーズ、あるいはサプリメントの製造に *E. faecalis* が使用される例があり、その場合にはバクテリオファージは有害な汚染源である。我々は、*E. faecalis* NP-10011 株に特異的に感染するバクテリオファージ BC-611 を見いだし、*Siphoviridae* 科に属するなど基本的な性質については既に報告した。今回は、ゲノム解析を行ったのでその結果について報告する。さらに、エンドリシン遺伝子を大腸菌で発現させたのでその結果についても併せて報告する。

【方法と結果】バクテリオファージ BC-611 のゲノム DNA を調製し、制限酵素処理等により断片化した DNA をプラスミド pBluescript II に連結し、塩基配列を決定した。また、得られた配列情報をもとにプライマーを合成し、ゲノム DNA を鋳型として全塩基配列を決定した。また、Roche Genome Sequencer FLX によって全塩基配列を再確認した。その結果、バクテリオファージ BC-611 のゲノムは、53,996 bp からなる直鎖状二本鎖 DNA であり、その両端に 341 bp のダイレクトリピートが存在することが明らかとなった。GeneMark VIORIN などを用いて ORF を検索した結果、87 の ORF が予想され、それらの中に、頭部タンパク質、尾部タンパク質、尾部繊維タンパク質、ポータルタンパク質、DNA ポリメラーゼ、ターミナーゼ、エンドリシン等をコードする遺伝子が同定された。予想されたエンドリシン遺伝子は 238 アミノ酸の CHAP ドメインのみからなるタンパク質をコードしており、この遺伝子を大腸菌で発現させ、*E. faecalis* 細胞などに対する溶菌活性を調べた。その結果、エンドリシンは *E. faecalis* NP-10011 株、*E. faecalis* ATCC35038 株をよく溶菌し、*E. faecalis* ATCC19433 株もほぼ同じ程度に溶菌した。しかし、*E. faecalis* 以外の *Enterococcus* 属 6 種および *Escherichia coli* K12 株、*Bacillus subtilis* IFO3336 株、*Clostridium thermocellum* ATCC27405 株は溶菌しなかった。CHAP ドメインは N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼやペプチダーゼなどに存在するドメインであるが、本酵素のペプチドグリカン内の切断部位については現在検討中である。

bacteriophage, *Enterococcus faecalis*, endolysin

講演番号：3C12p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ C 校舎 12 会場

Vibrio parahaemolyticus 由来キチンオリゴ糖デアセチラーゼの立体構造に基づいた結合ドメインの機能解析

The functional analysis of carbohydrate binding domein of chitin oligosaccharide deacetylase from Vibrio parahaemolyticus, based on three-dimensional structure.

○坂木 祐太[1]、杉山 佳奈子[3]、平野 貴子[2]、坂本 友樹[2]、前原 佑哉[1]、袴田 航[1,2]、朴 三用[3]、西尾 俊幸[1,2]（[1]日大院生資科、[2]日大生資科・生命化、[3]横市大院生命ナノ）

○Yuta Sakaki[1], Kanako Sugiyama[3], Takako Hirano[2], Yuki Sakamoto[2], Yuya Maebara[1], Wataru Hakamata[1,2], Sam-yong Park[3], Toshiyuki Nishio[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [3]Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City Univ.)

【目的】一般に *Vibrio* 属はキチナーゼを分泌し、海底土壌中に蓄積されたキチンからキチンオリゴ糖、特に$(GlcNAc)_2$を生産して栄養源としている。近年、一部の *Vibrio* 属が Carbohydrate Esterase (CE) Family 4 に属するキチンオリゴ糖デアセチラーゼ(COD)を分泌し、$(GlcNAc)_2$の還元性末端側のみを脱アセチル化してヘテロ 2 糖(GlcNAc-GlcN)を生産することが明らかとなった。我々はこれまでに、GlcNAc-GlcN は COD 生産菌に対して栄養源としてだけでなく、遊走行動やキチナーゼ生産誘導といった生理作用を引き起こすことを解明した[1, 2]。つまり、COD は本酵素生産菌にとって特異的な生理活性物質の生産に必須の酵素であり、微生物生態系において重要な役割を担うと考えられる。しかし、これらの酵素化学的性質はあまり調べられておらず、立体構造も明らかになっていなかった。そこで、我々は COD の立体構造を明らかにし、本酵素の機能を解明することにした。

【方法と結果】当研究室では既に *Vibrio parahaemolyticus* 由来 COD の大腸菌発現系を構築し、リコンビナント COD (rCOD)の単一精製に成功している[3)]。そこでまずこの rCOD を結晶化し、X 線回折による構造解析を行った結果、1.35 Å の分解能で立体構造の解明に成功した。立体構造から、Polysaccharide Deacetylase Domein を保有していることが明らかになり、本ドメインには他の CE Family 4 の脱アセチル化酵素と同様に Zn の存在が確認された。また、COD はオリゴ糖のみに作用し、長鎖のものには作用しないが Carbohydrate Binding Domein (CBD)を持つことも明らかになった。そこで、この CBD の役割を明らかにするために、遺伝子工学的手法により CBD 欠損体を作製し、大腸菌を用いて発現・分泌させ、精製を行った。そしてこの CBD 欠損体とネイティブの酵素である rCOD のキチンへの結合能を比較した。更に、これらの$(GlcNAc)_2$に対する活性について調べることで CBD が酵素活性に影響するかどうか検討を行った。

1) T. Hirano, K. Kadokura, T. Ikegami, Y. Shigeta, Y. Kumaki, W. Hakamatra, T. Oku and T. Nishio, *Glycobiology*, **19**, 1046-1053 (2009)

2) T. Hirano, M. Aoki, Y. Kumaki, W. Hakamata, T. Oku and T. Nishio, *Lett. Appl. Microbiol.*, **53**, 161-166 (2011)

3) K. Kadokura, Y. Sakamoto, K. Saito, T. Ikegami, T. Hirano, W. Hakamata, T. Oku, T. Nishio, *Biotechnol. Lett.*, **29**, 1209-1215 (2007)

Chitin oligosaccharide deacetylase, Three-dimentional structure, Carbohydrate binding domein

講演番号：3C12p17
講演日時、会場：3 月 26 日 17:12～ C 校舎 12 会場

モジュラーマンナナーゼ（Man5A)における糖質結合モジュール CBM32 の基質認識における重要性
Importance of carbohydrate binding module CBM32 to the substrate recognition in modular mannanase(Man5A)

○水谷 公也、粟冠 真紀子、木村 哲哉、粟冠 和郎（三重大院生物）
○Kimiya MIZUTANI,Makiko SAKKA,Tetsuya KIMURA,Kazuo SAKKA (Mie Univ)

【目的】*Clostridium thermocellum* は好熱性偏性嫌気性細菌であり、多酵素複合体（セルロソーム）を形成する。本研究ではこの微生物に由来するファミリー5 のマンナナーゼ Man5A(Cthe_0821)に着目し、翻訳産物の機能とドメインの役割について解析した。Man5A は N 末端側から糖質分解酵素ファミリー5 の触媒モジュール(CM5)、ファミリー32 糖質結合モジュール(CBM32; F5F8 TypeC ドメイン)、ドックリンモジュールにより構成される。これまでの研究から CBM32 はアイボリーナッツマンナンなど不溶性基質に対する酵素活性を強化している事を明らかにした。一般にモジュラー酵素において CM と CBM は独立に機能すると考えられているが、Man5A においては CBM32 の有無によってマンナンの分解産物が変化する事から CBM32 が触媒モジュールの基質認識にも関与していると予想した。そこで今回の実験では酵素が基質認識をする際に CBM32 がどのように機能しているのかを調べる為に、CBM32 や触媒モジュールなど Man5A の各モジュールを発現し、それぞれのタンパク質のマンノオリゴ糖に対する結合特性を解析した。

【方法】Man5A に存在する各モジュールの基質に対する結合特性を ITC (Isothermal Titration Calorimetry)を用いて調べるためタンパク質(rCBM32)と活性を除去した変異酵素を準備した。変異酵素は Man5A の活性部位の Nucleophile である 247 番目のグルタミン酸をアラニンへ変異させる事により構築した。変異酵素として触媒モジュールのみの rCM(E247A)と触媒モジュールと CBM32 を持つ rCM-CBM(E247A)を本実験では使用した。rCBM32、rCM-CBM(E247A)、rCM (E247A)の各タンパク質は大腸菌(BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL)によって発現した。得られたタンパク質のマンノオリゴ糖に対する親和性は ITC を用いて測定した。

【結果】rCBM はマンノビオースからマンノヘキサオースに親和性を示し、結合定数(Ka)の値は、いずれも 1×10^4 M^{-1} 程度でほぼ一定であった。一方、rCM-CBM(E247A)もマンノビオースからマンノヘキサオースに親和性を示したがテトラオース以上のオリゴ糖に対する Ka 値は $5\sim10\times10^5$ M^{-1} であるのに対し、マンノトリオースとマンノビオースに対する Ka 値はそれぞれ 1.5×10^5 と 3×10^4 M^{-1} と低下した。rCM(E247A)はマンノオリゴ糖に対して全く親和性を示さなかったが、Native affinity PAGE ではグルコマンナンやガラクトマンナンに対する結合が確認された事から、正しい立体構造をとれないためにマンノオリゴ糖に対する結合性を失った可能性は低い。マンノビオースに対する Ka 値は、rCBM32 と rCM-CBM(E247A)で比較的近い値を示した事から、マンノビオースは rCM-CBM(E247A)においても CBM32 に結合すると考えられる。rCM-CBM(E247A)はマンノテトラオース以上の基質に対しても 1:1 で結合する事からマンノオリゴ糖の非還元末端側は CBM32 に結合し、還元末端側は CM5 に結合すると予想される。この予想は Man5A が基質を 4 糖単位で分解する傾向と一致する。一般に CM と CBM は独立に働くと考えられているが、本研究の結果は、Man5A においては、CBM32 は CM5 の基質認識に直接関与している事を示唆した。

Carbohydrate-binding module, Mannanase, Cellulosome

講演番号：3C12p18
講演日時、会場：3 月 26 日 17:24～ C 校舎 12 会場

Paenibacillus sp. IK-5 キトサナーゼに存在する CBM32 糖結合 モジュールの機能解析
Functional analysis of CBM32 carbohydrate-binding modules of a chitosanase from *Paenibacillus* sp. IK-5

新家 粧子[1]、山城 玲奈[1]、大沼 貴之[1]、木元 久[2]、草桶 秀夫[3]、○深溝 慶[1] ([1]近畿大農、[2]福井県大生物資源、[3]福井工大工)
Shoko Shinya[1], Reina Yamashiro[1], Takayuki Ohnuma[1], Hisashi Kimoto[2], Hideo Kusaoke[3], ○Tamo Fukamizo[1] ([1]Kinki Univ., [2]Fukui Pref. Univ., [3]Fukui Univ. Tech.)

【目的】グラム陽性細菌 *Paenibacillus* sp. IK-5 が産生する Family GH-8 キトサナーゼは、C 末端側に CBM32 に属する 2 つの糖結合モジュール(DD1 および DD2)をもつ。Kimoto らは(*J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* (2010) **18**, 14-23)、これら糖結合モジュールの欠失変異酵素を用いて、それらがキトサンに対する結合において重要な働きをもつことを明らかにした。そこで、我々は DD1, DD2 および両者が連なった DD1-2, それぞれのリコンビナントタンパク質を発現精製し、各種オリゴ糖の結合性を熱変性実験、ITC, およびＮＭＲによって調べた。

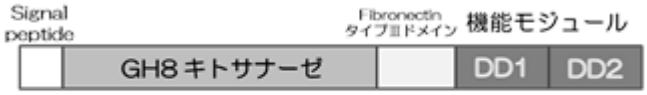


Fig. *Paenibacillus* sp. IK-5 GH-8 chitosanase

【方法】大腸菌による発現系を用いて DD1, DD2, DD1-2 の組換えタンパク質を得た。まず、これら 3 種のタンパク質とキトサンオリゴ糖、(GlcN)n (n=2～6)、との結合性を CD による熱変性実験によって評価した。すなわち、オリゴ糖添加に伴う熱変性温度(T_m)の上昇(ΔT_m)を測定し、3 種のタンパク質で比較した。次に、これらの相互作用を定量的に調べるために、MicroCal 社製 ITC200 による熱測定を行い、各オリゴ糖との相互作用の熱力学的定数を決定した。さらに、DD1-2 において二つのドメイン間の相互作用を調べるために、^{15}N-NH_4Cl を含む最少培地中で DD1, DD2 および DD1-2 の発現を行い、安定同位体 ^{15}N ラベル DD1, DD2, DD1-2 を得た。得られた ^{15}N ラベル DD1, DD2, DD1-2 を用いて 2 次元 ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルの測定を行い, スペクトルを比較した。

【結果】それぞれのタンパク質の熱変性曲線を比較したところ、DD1-2 において DD1 と DD2 が単独で存在する場合に比べて明らかに協同性が高くなっており、DD1-2 において二つのドメインは相互作用を行っていることがわかった。$(GlcN)_n$ (n=2～6)を加えると、T_m はいずれのタンパク質においても上昇したが、ΔT_m の値は$(GlcN)_3$ や$(GlcN)_5$ を添加したときに大きく、$(GlcN)_2$ や$(GlcN)_4$, $(GlcN)_6$ では小さかった。それぞれのタンパク質は、これらのオリゴ糖の比較的小さな 3 糖くらいの糖鎖で相互作用を行っているものと思われた。同様のオリゴ糖結合性を ITC によって調べると、DD1 において得られた結合自由エネルギー変化の値は、単糖、2 糖、3 糖と負の値が大きくなっていくが、4 糖～6 糖までは 3 糖と同様の値が得られた。また、DD1-2 の ITC による滴定曲線は、二つの結合サイトモデルでよりよくフィットし、DD1-2 において両者の糖結合部位はともに有意に機能していることがわかった。これら三つのタンパク質の NMR スペクトルも、その結果を支持した。

discoidin domain, chitosan binding, carbohydrate binding module

講演番号：3C32p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ C 校舎 32 会場

ウキクサ根圏細菌共生系を利用した低炭素型フェノール分解

Low carbon phenol degradation by utilizing symbiotic interaction of duckweed and its rhizobacteria

○倉科 光紀[1]、菅原 雅之[1,2]、三輪 京子[1,2]、森川 正章[1,2]([1]北大院環境、[2]ALCA)
○ koki KURASHINA[1], masayuki SUGAWARA[1,2], kyoko MIWA[1,2], masaaki MORIKAWA[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]ALCA)

【背景および目的】

環境汚染対策の一つとして、微生物を利用した環境修復技術が広く研究されてきた。しかし実用化段階で分解菌の定着率が低いことや分解活性の維持が難しいことなどの課題が指摘されている。

そこで、私たちは水生植物と微生物の共生関係を利用した、汚染物質の省エネかつ持続的な原位置浄化技術基盤の開発を目指している。既に、ウキクサ根圏から単離したフェノール分解細菌 *Acinetobacter calcoaceticus* P23 株を再付着させたウキクサが野生ウキクサに比べてより高速にフェノールを分解することを報告しているが、一週間でその活性は半減した。そこで、本研究ではより実環境に近い条件で再検討を行い、本技術の持続性を検証することにした。

【方法および結果】

まず、無菌アオウキクサへ P23 株を再付着させた。このときの付着細菌数は、ウキクサ一個体当たり約 10^5 であった。次に、P23 株付着ウキクサをフェノール含有 Hoagland 培地中で培養し HPLC によりフェノール残存割合を調べることで分解活性を評価した。ここで、開放系である自然環境に似せるため、24 時間培養ごとにウキクサを新しいフェノール含有 Hoagland 培地へ移し変えることによって、フェノール分解活性を調べた。その結果、移し変える毎にフェノール分解速度が上昇し、最初は 40 ppm フェノールの分解に 24 時間要していたのが、最大 8 時間まで加速されることが判った。また分解試験後にはアオウキクサ付着菌体数が増加すると共に、ウキクサ一個体当たりの付着細菌数も約 10^6 まで増加していた。すなわち、この分解活性の加速は P23 株のフェノールジオキシゲナーゼ遺伝子の誘導とウキクサの増殖による相乗効果であることが予想される。

更に実環境水中での性能を評価するためにフェノール含有未滅菌池水を用いた実験を行なった結果、P23 株付着アオウキクサは野生ウキクサよりも分解活性が高いことを確認した。

以上の結果から、汚染物質分解菌をウキクサ根圏に再付着させることで、光エネルギー利用による低炭素型の汚染浄化が可能であることが示された。

phenol, rhizoremediation, duckweed

講演番号：3C32p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ C 校舎 32 会場

ウキクサ根圏および活性汚泥からのエストロゲン分解細菌の単離と諸特性解析

Isolation and characterization of 17beta-estradiol degrading bacteria from the rhizosphere of duckweeds and the activated sludge

○森本 洋輔[1]、菅原 雅之[1,2]、三輪 京子[1,2]、森川 正章[1,2]([1]北大院環境、[2]ALCA)
○Yosuke MORIMOTO[1], Masayuki SUGAWARA[1,2], kyoko MIWA[1,2], Masaaki MORIKAWA[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]ALCA)

背景および目的：
私たちは、従来の活性汚泥法を補完する省エネかつバイオマス増産型の水処理技術として期待される根圏微生物共生系を活用した植生浄化技術基盤の構築を目指している。これまでに、フェノール類化合物分解細菌をウキクサ根圏に付着させることによってこれらを光合成エネルギーで分解できることおよびウキクサの成長を促進できることを示して来た。一方、近年さまざまな内分泌撹乱物質が環境中から検出され生態系へおよぼす悪影響が懸念されている。女性ホルモンであるエストロゲン類には環境基準や排水基準値は設けられていないものの家畜排水などから河川に高濃度に混入した場合、魚介類のメス化や雌雄同体化などを引き起こすことが報告されている。また、エストロゲン類は通常の活性汚泥処理においても分解が難しい難分解性汚染物質の一つでもある。そこで本研究では、ウキクサ根圏と活性汚泥からエストロゲン分解細菌を取得し、その性能を評価することを目的とした。
方法及び結果：
北海道大学植物園幽庭湖から採取したウキクサ、市販のウキクサ、および下水処理場から採取した活性汚泥からエストロゲン分解細菌を単離するために 10ppm のエストラジオール (E2)を添加して 28℃、14～30 日間集積培養を行った。集積培養後、ホモジナイザーによりウキクサを破砕した懸濁液および活性汚泥水を段階希釈して E2 を単一炭素源とする寒天培地に塗布した。30℃において生育したコロニーについて E2 を含む培地で液体培養し、HPLC 分析により E2 分解能を確認した。その結果、北海道大学植物園幽庭湖から 27 株、市販のウキクサから 39 株、活性汚泥から 32 株の E2 分解細菌を単離した。これらの菌株のほとんどが E2 分解産物としてエストロンを蓄積したが、市販のウキクサから単離した細菌のうち 1 株がさらにエストロンも分解することが判明し、これを R 13 株と名付けた。現在、R13 株をはじめとする単離菌株を用いたウキクサ根圏への再付着試験を行っている。

Duckweed, rhizobacteria, estrogen

講演番号：3C32p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ C 校舎 32 会場

モエジマシダによるヒ素高蓄積における微生物の関与
Involvement of microbes in hyper-accumulation of arsenic by *Pteris vittata*
○簡 梅芳、小畑 和貴、宮内 啓介、遠藤 銀朗（東北学院大・工）
○Meifang CHIEN,Kazuki OBATA,Keisuke MIYAUCHI,Ginro ENDO (Tohoku-Gakuin Univ.)

【目的】　ヒ素による土壌汚染の浄化には、植物を用いるファイトエクストラクションが効果的と考えられる。ヒ素の高蓄積植物として知られているモエジマシダ（*Pteris vittata*）はヒ素土壌汚染の浄化に適用可能な植物の一つである。土壌中のヒ素はヒ酸（As(V)）としてモエジマシダに吸収されることが知られているが、土壌中のヒ素形態の変換が植物自身によってなされるのか、または微生物の作用それとも植物・微生物間の相互作用によってなされているかはまだ明らかになっていない。本研究は、モエジマシダを用いたヒ素のファイトエクストラクション法による浄化技術に着目し、モエジマシダによるヒ素吸収・蓄積における微生物の関与の度合いを明らかにすることを目的として行った。

【実験方法】　モエジマシダのヒ素吸収における土壌中ヒ素形態の変化を確認するため、まず初めにモエジマシダの栽培実験を行った。この実験では、亜ヒ酸をヒ素源として添加し、ヒ素含量の高い畑土壌を微生物の植種源として栽培土に混合した。シダにおける全ヒ素含量の変化と土壌中全ヒ素含量および水溶性形態別ヒ素含量の経時変化を調べた。ヒ素酸化に関与する微生物は、シダ根圏土壌試料から抽出した全 DNA に対して、微生物由来の亜ヒ酸酸化酵素遺伝子 *aroA* の PCR-DNA ライブラリーの構築と PCR-tRFLP 解析を行った。次に、土壌におけるヒ素酸化実験を行い、畑土の添加による土壌中水溶性ヒ素の形態変化を調べるとともに、土壌試料中の亜ヒ酸酸化酵素遺伝子 *aroA* を保有する微生物の探索を行った。

【結果と考察】　栽培実験開始後 1 週間で、土壌中の水溶性亜ヒ酸はほぼなくなるまで減少したことが確認された一方、水溶性ヒ酸が検出されたことから、添加した亜ヒ酸は速やかにヒ酸に酸化されたことが知られた。これらの結果と土壌およびシダの全ヒ素含量の変化を測定した結果から、土壌中のヒ酸は一部不溶する化ものの、その多くはシダに吸収されたものと考えられた。土壌中のヒ素酸化実験では、畑土の添加により、土壌における亜ヒ酸の酸化が認められた。さらに、この酸化反応は抗生物質の添加により抑えられたことから、土壌中における亜ヒ酸の酸化は微生物による作用であることが強く示唆された。また、根圏土壌から亜ヒ酸酸化酵素遺伝子 *aroA* を保有微生物の存在が確認されたことから、モエジマシダによるヒ素吸収に先立つヒ素形態の変化には、土壌中の亜ヒ酸酸化酵素遺伝子を有する微生物が関与していると示唆された。

Pteris vittata, arsenic hyper-accumulation, arsenite oxidase gene

講演番号：3C32p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ C 校舎 32 会場

重質油汚染の好気性バイオレメディエーションのための室内試験

Treatability Test for Bioremediation of Heavy Oil Contaminated Soil.

○田中 宏幸[1]、吉浪 賢史[2]、松久 裕之[2]、野村 暢彦[1]、中島 敏明[1]、内山 裕夫[1] ([1]筑波大院生命環境、[2](株)鴻池組)
○Hiroyuki TANAKA[1], Satoshi YOSHINAMI[2], Hiroyuki MATSUHISA[2], Nobuhiko NOMURA[1], Toshiaki NAKAJIMA[1], Hiroo UCHIYAMA[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]Konoike Co. Ltd.)

高分子の鎖状有機化合物質である潤滑油を主成分と推定される重質油で汚染された土壌のランドファーミングの適用性を評価するために、室内実験を行った。

実験は、100,000 mg/kg 以上の重質油による汚染源から採取した汚染土を 8 号珪砂で希釈し、全石油系炭化水素（TPH）として 3,500～5,000 mg/kg に設定した土壌を対象として実施した。供給した栄養塩は 4 種類で、りん酸塩や微量ミネラル類のほかに、窒素源としてそれぞれ、アンモニウム塩（①）、窒素源を尿素（②）、エキス系資材（③）、緩効性肥料（④）という特色を有する溶液を、低濃度で 4 週間毎に追加した。微生物の植種は行わなかった。土壌をバットに収め、栄養塩溶液を混合した後に通気性樹脂シートで養生したうえで、20℃に維持させた室内暗所に静置した。pH 中性、含水率 15～22%に維持させ、1 回／週の頻度で撹拌し、土壌への酸素供給と均一化を促した。

分析項目は、TPH（油汚染ガイドライン法；EPA 8015B)、TPH（TNRCC 1005&1006, MADEP/EPA 5030)、油膜・油臭（油汚染ガイドライン法；嗅覚による 5 段階評価)、生菌数（平板希釈法)、栄養塩類、微生物群集解析（16S rRNA を対象とした DGGE）とした。

167 日間の処理の結果、油分の低減率は 89～66 %で、①＞②＞④＞③という順となった。TPH の画分の構成率からは、低分子化の傾向が確認された。このとき、油膜はコントロール以外の全ケースで 3→1、油膜の消失は認められなかった。最も低値となった①の TPH は 500 mg/kg 未満と、油臭レベルとともに実施工の際に浄化目標に設定される水準を満足し、好気性微生物の促進化によるランドファーミングが有効な浄化方法と評価した。

oil, bioremediation, aerobic

講演番号：3C32p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ C 校舎 32 会場

Rhodococcus erythropolis PR4 株における細胞のアルカン相への転移に対する Mg トランスポーターの影響

Effects of Mg transporter on the translocation of cells into alkane phase in *Rhodococcus erythropolis* PR4.

○瀧原 速仁[1]、荻原 淳[2]、岩淵 範之[1]、砂入 道夫[1]([1]日大・生資科・応生科、[2]日大・生資科・生化)
○Hayato Takihara[1], Jun Ogihara[2], Noriyuki Iwabuchi[1], Michio Sunairi[1] ([1]Dept. Appl. Bio. Sci., Nihon Univ., [2]Dept. Chem. Life Sci., Nihon Univ.)

【目的】

微生物と有機溶媒間の相互作用や耐性機構を理解することは、バイオレメディエーションやホワイトバイオテクノロジーへの応用の際には非常に重要な基礎的知見である。*R. erythropolis* PR4 株は、各種アルカン分解・耐性菌であり、極めて特殊な相互作用を示すことが知られている。すなわち、PR4 株は、培地/アルカン二相培養系において、アルカン相表面に吸着して存在する「吸着型」、あるいはアルカン相内に転移して存在する「転移型」というように、添加するアルカンの炭素数により細胞の局在性を変化させて生育できる能力を有している。

われわれはこれまでに、シャペロニンである GroEL2 を高発現させることで細胞の局在性を吸着型から転移型に変化させ、アルカン耐性を上昇させること、および培地中の $MgSO_4$ 濃度、添加時期等を調整することにより、例えば転移型から吸着型などのように培養中に細胞の局在性を変化させることができること等を明らかにしている。このように培養期間中に基質との空間的位置関係を調節できる技術は上述した技術開発において非常に重要であるが、現段階で、局在性の変化に対する $MgSO_4$ の影響の機構は不明である。そこで本研究では、$MgSO_4$ によってアルカンへの細胞の局在性が変化する機構を明らかにするため、プロテオゲノミクス解析および後続の分子遺伝学的解析を行った。

【方法と結果および考察】

無機塩類として N 源、P 源のみを添加した NP 培地に、C 源として *n*-ドデカン (C12)を添加した NP+C12 培地を作製し、細胞の局在性とタンパク質の発現プロファイルに対する $MgSO_4$ の影響を検討した。その結果、無添加条件では転移型を示したが、$MgSO_4$ を添加することでその局在性は吸着型に変化した。両条件より全タンパク質を抽出し、SDS-PAGE またはゲルフリー泳動解析後、LC-MS/MS 解析を行った。その結果、無添加条件では、Mg トランスポーターである MgtB、MgtC タンパクが検出されたが、$MgSO_4$ 添加条件では検出されなかった。これら MgtB、MgtC は、結核菌で Mg イオンの取り込みに関与していることが示唆されており、また、本条件下で検出された全タンパク質の 10%弱を占めていたことから、極めて重要な働きをしているものと予想された。

このことを確認するため、*mgtB*、*mgtC* 遺伝子をクローニングし、PR4 株で強制発現させ、C12 相への局在性を検討した。その結果、*mgtB-mgtC* を強制発現させた形質転換体では、$MgSO_4$ が存在しているにも拘らず、C12 相内に転移している細胞が多く確認された。現在、詳細な解析を行っている。

Rhodococcus, organic solvent tolerance, Mg transporter

講演番号：3C32p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ C 校舎 32 会場

Methanosarcina thermophila の鉄還元能と Magnetite 生成
Methanosarcina thermophila reducing iron(III) and producing magnetite
○山田 千早、石井 正治、五十嵐 泰夫（東大院農生）
○CHIHAYA YAMADA,MASAHARU ISHII,YASUO IGARASHI (Tokyo Univ., Grad. Sch. Agri. Life Sci.)

【背景･目的】

Methanosarcina thermophila は、高温嫌気消化リアクターやコンポストなどの高温環境に生息しており、酢酸、メタノールなどのメチル化合物、及びメタノール/水素からメタン生成を行う酢酸資化性メタン生成菌として知られている。*M. thermophila* は高温環境において、メタン生成を行うだけでなく carbon tetrachloride などを還元する脱ハロゲンを行うことができるため、水の浄化においても有用なメタン生成菌として注目を浴びている。

高温メタン発酵リアクターにおいて、*M. thermophila* が主要な酢酸資化性メタン生成菌として検出されており、酢酸からのメタン生成に重要な役割を果たしていると考えられている。我々は、高温メタン発酵リアクターの汚泥に生息している *M. thermophila* の新たな生理生態学的知見を得るために、鉄還元能を有するかどうかを明らかにすることを本研究の目的とした。

【方法・結果】

メタン生成菌、*Methanosarcina thermophila* TM-1^{T} (DSM 1825) と実際に分離した分離株において鉄還元能を有するかどうか調べた。メタン生成基質（メタノール、酢酸及びメタノールと水素）と 130 mM の酸化鉄（Ferrihydrite）を添加して、５５℃で培養した。その結果、メタノールと水素を基質とした条件において、44.7 mM の鉄が還元された。培養液の色は、培養前、酸化鉄の色である赤褐色を呈していたが、培養後は黒く変色した様子が観察された。その培養液を X 線回析に供したところ、Magnetite のピークが検出された。さらに、生成された Magnetite と *M. thermophila* 細胞の局在を蛍光顕微鏡と走査型電子顕微鏡（SEM－EDX）を用いて調べた。その結果、*M. thermophila* 細胞周辺に鉄元素（Fe）が分布していることが示された。以上の結果から、*M. thermophila* は水素存在下で鉄を還元し、細胞周辺に Magnetite を生成することを明らかにした。鉄呼吸を行う *Geobacter* spp. や *Shewanella* spp. などの鉄還元微生物だけでなく、鉄還元能を有するメタン生成菌も細胞周辺に Magnetite を生成することを本研究において初めて示した。

Magnetite, Iron(III) reduction, Methanogens

講演番号：3C32p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ C 校舎 32 会場

チーズホエーからの葉面酵母 *Pseudozyma antarctica* の生分解性プラスチック分解酵素の生産
Production of biodegradable plastic degrading enzyme from phyllosphere yeast *Pseudozyma antarctica* using cheese whey as substrate

○渡部 貴志[1,2]、篠崎 由紀子[1]、山下 結香[1]、小板橋 基夫[1]、吉田 重信[1]、北本 宏子[1] ([1]農環研、[2]JSPS-PD)
○Takashi WATANABE[1,2], Yukiko SHINOZAKI[1], Yuka YAMASHITA[1], Motoo KOITABASHI[1], Shigenobu YOSHIDA[1], Hiroko K. KITAMOTO[1] ([1]NIAES, [2]JSPS-PD)

【背景・目的】環境負荷と回収労力の低減のため、農業用プラスチック資材に生分解性プラスチック（生プラ）の導入が図られている。これまで我々は、葉面常在酵母 *Pseudozyma antarctica* の基質特異性が広く強力な分解酵素（PaE）が、キシロースにより生産誘導されることを見出し、PaE 生産性の良い稲籾単離菌 GB-4(1)W 株の選抜、Jar fermenter 培養による PaE の大量生産など実用化に向けた検討を行ってきた。一方、先行研究の担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 株は、植物油を主な C 源とし、少量のラクトースを誘導基質と用いた場合、生プラ分解酵素（CLE）を生産すると報告されているが、*P. antarctica* の場合は、植物油により 2 つの Lipase（CALA、CALB）が生産されることも知られており、PaE の生産は誘導されなかった。そこで、フラスコ培養で様々な検討を重ねた結果、*Cryptococcus* sp. S-2 株の場合と逆にラクトースを主な C 源とし、少量の植物油を誘導基質に用いた場合、*P. antarctica* が PaE を生産することを見出した[1), 2)]。さらに Jar fermenter 培養で検討を重ね、最適な条件を見出した。ラクトースは、酪農副産物であるチーズホエーの主成分であるため、今回我々は、安価な PaE 生産用の基質としてチーズホエーが使えるか検討を行った。
【方法・結果】まず、基本的な情報を得るために、合成培地での Jar fermenter を用いた大量培養試験を行った。培養開始時に 2%のラクトースと誘導基質の 0.5%の大豆油を加え、培養 24 時間以降にラクトースの流加を行った。また、pH 調整と窒素源の補給を兼ねてアンモニア水を用いた。結果、72 時間の培養で 7.5U/ml の PBSA エマルジョン分解活性を示す PaE を得たが、培養 48 時間以降の PaE 生産速度が減少していたので、誘導基質の大豆油が利用し尽されていることが考えられた。そこで、PaE の生産速度の維持を目的に、定期的に少量の大豆油を新たに添加したところ、120 時間の培養で 14.6U/ml まで PaE の活性を上げることが出来た。次に、チーズホエーを用いて PaE 生産を試みることにした。フラスコ培養試験での結果、チーズホエーだけでも *P. antarctica* の増殖に必要な栄養成分が十分に含まれ、PaE の生産が可能であることを確認した。また、大豆油を加えることによって、PaE の生産速度を増加できることを確認した。さらに、Jar fermenter での流加培養は、72 時間で 8.9U/ml まで PaE を生産することが可能であった。
【謝辞】本研究で使用したチーズホエーは（有）木次乳業より分譲して頂いた。
【参考文献】1）渡部ら、日本農芸化学会 2011 年度大会講演要旨集 p. 8
2）Watanabe et al., IUMS 2011 Sapporo Congress, CD-R

Pseudozyma antarctica, biodegradable plastic degrading enzyme, cheese whey

講演番号：3C32p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ C 校舎 32 会場

各地の畑土壌における生分解性ポリエステル製マルチフィルムの微生物による分解

Degradation of biodegradable plastic mulch film by microorganisms in various field soils

○山元 季実子、渡部 貴志、平舘 俊太郎、小板橋 基夫、山口 紀子、北本 宏子（（独）農環研）
○Kimiko YAMAMOTO-TAMURA, Takashi WATANABE, Syuntaro HIRADATE, Motoo KOITABASHI, Noriko YAMAGUCHI, Hiroko KITAMOTO (National Institute for Agro-Environmental Sciences)

【目的】生分解性プラスチック製の農業用マルチフィルム（以下、生プラマルチ）は、通常、土壌中の微生物の働きによって、穏やかに分解されてゆく性質をもつ。従って使用済み生プラマルチは、畑土中に鋤き込んで分解させるため、除去作業が要らず、プラスチック廃棄物の量が低減される。しかし近年、生プラマルチ資材が各地で導入されるにつれ、通常よりもフィルムの分解が速く進み、作期の早い段階でマルチングの効果が失われる事例が報告されている。この現象（以下、過分解）を引き起こす要因を明らかにするため、各地の畑地土壌を採集し、土壌の微生物学的・生化学的・理化学的性質を調べ、過分解現象との関わりを探ることにした。
【方法】（実験 1）日本各地の 6 箇所から採取した土壌 10 点に、生プラマルチ分解のモデルとして、ポリブチレンサクシネートアジペート（PBSA）のフィルム（昭和電工提供）を挟み込んで分解試験を行い、対照区には滅菌した各土壌を用いた。フィルムの分解度は、膜面積あたりの輝度によって数値化し評価した。（実験 2）各土壌サンプルの PBSA 分解菌割合を平板培養法で調べるとともに分解菌を分離した。また、過分解土壌と分解が進みにくい土壌各 1 試料について、PBSA フィルムを埋包した後、フィルム周囲の土壌の PBSA 分解菌の個体群密度を経時的に調査した。さらに、18S rDNA-ITS 領域に基づく PCR-DGGE 解析で、フィルム埋包後の土壌真菌相の変化を調べた。(実験 3)各土壌 10 点のエステラーゼ活性を測定した。さらに、過分解土壌と分解が進みにくい土壌各 1 試料については、土壌の酵素吸着力の違いを調べるため、滅菌土壌に葉面酵母 *Pseudozyma antarctica* 由来の生プラ分解酵素を添加し、水または塩化ナトリウム水溶液で数回洗浄し遊離酵素を除去した後に残存する土壌エステラーゼ活性を測定した。
【結果】土壌試料によりフィルムの分解に特徴があり、フィルムを細分するタイプと薄くするタイプの分解様式が認められた。フィルム分解速度も多様で、過分解土壌だけでなく、フィルム分解が遅い土壌も確認された。今回、各地の土壌から分離された PBSA 分解菌のほとんどが糸状菌と酵母であった。土壌に PBSA フィルムを埋包した後、PBSA 分解菌数が増加し、特に過分解土壌において増加が顕著で、かつ真菌相の DGGE バンドパターンが大きく変動した。従って、過分解土ではマルチ埋包による土壌微生物への影響が大きいことが示唆された。各土壌のエステラーゼ活性と分解菌分離率は正の相関を示した。一方、分解が進みにくい土壌は、過分解土壌に比べて添加した生プラ分解酵素の吸着力が強く、土壌の吸着性が分解抑制に関与する可能性が示された。

esterase, mulching films, PBSA

講演番号：3C32p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ C 校舎 32 会場

葉面酵母由来の酵素による圃場での農業用生分解性マルチフィルムの分解促進

Acceleration of the degradation speed of the biodegradable mulch films by treatment of enzyme from yeast *Pseudozyma antarctica*: Field study

○山下（鮫島） 結香[1]、小板橋 基夫[1]、渡部 貴志[1,2]、篠崎 由紀子[1]、北本 宏子[1]（[1]農環研、[2]JSPS-PD）
○Yuka YAMASHITA(SAMESHIMA)[1], Motoo KOITABASHI[1], Takashi WATANABE[1,2], Yukiko SHINOZAKI[1], Hiroko KITAMOTO[1] ([1]NIAES, [2]JSPS-PD)

農業用マルチフィルム（マルチ）は、保温、保湿、雑草防除などのために畑を被覆するフィルムで、高品質な作物の安定した生産に欠かせない。現在、非生分解性のポリエチレン製マルチが多く用いられているが、使用後の回収にかかる労力や排出される膨大な使用済みマルチの処理が問題となる。生分解性プラスチック（生プラ）製マルチは、主に微生物によって水と炭酸ガスに分解されることから、回収が必要なく、農作業の負担が減少できる、環境への負荷が低い資材として、従来のポリマルチに代わることが期待されている。しかし、生プラ製マルチの分解速度は、環境条件に依存するため、使用者が意図した時期に分解しない場合があることが普及上の課題である。そこで、我々は生プラ分解能が高い微生物やその酵素を利用して、意図した時期にマルチを分解する技術の開発を行っている。

我々は、作物の葉や種子の表面から分離・選抜した分解菌（酵母と糸状菌）がその培養上清中に生プラ分解酵素を分泌することを見出し[1),2)]、培養条件を検討して分解活性を高めることに成功した[3),4)]。酵母由来の酵素で、広いポリマー分解基質特異性を確認したため[5)]、この培養上清を用いて、研究所内のビニールハウス内にマルチを設置し、酵素散布による分解を試みた。

生プラマルチはポリブチレンサクシネートアジペート(PBSA)、ポリブチレンサクシネート(PBS)、市販の PBS/PBSA 混合マルチの 3 種類を用いた。生プラ分解酵素液をマルチ表面に散布した後の分解を①引張試験、②重量測定を用いて評価した。その結果、無処理のマルチと比較して、散布 1 日でいずれのマルチでも引張強度は減少し、散布 7 日後には目視により漉き込みが可能だと思われる程度まで分解が進行した。このマルチを回収し、水で付着した土壌を洗浄して乾燥後、重量を測定した結果、酵素処理を行ったマルチは、無処理区に比べ、優位に重量が減少していた。

今後、糸状菌由来の酵素に関しても同様の実験を行う予定である。

1) Kitamoto HK.ら AMB Express. 1,44 (2011)
2) Koitabashi M.ら AMB Express. 2 ,40 (2012)
3) 渡部ら：第 64 回日本生物工学会大会講演要旨集 p.78 2Hp20 (2012)
4) 山下（鮫島）ら：第 26 回高分子学会関東支部茨城地区若手の会交流会要旨集 p.49 (2011)
5) Shinozaki Y.ら Appl. Microbiol. Biotechnol. *in press*

biodegradable plastics, *Pseudozyma*, esterase

講演番号：3C32p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ C 校舎 32 会場

ダイズ根粒菌の N_2O 還元酵素によるダイズ根圏からの N_2O 発生削減
Mitigation of nitrous oxide emissions from soils by *Bradyrhizobium japonicum* inoculation

○板倉 学[1]、内田 義崇[2]、秋山 博子[2]、星野（高田） 裕子[2]、下村 有美[2]、森本 晶[2]、多胡 香奈子[2]、王 勇[2]、早川 千尋[2]、植竹 佑輔[1]、SANCHEZ Cristina[1]、江田 志磨[1]、早津 雅仁[2]、南澤 究[1]（[1]東北大院生命科学、[2]農業環境技術研究所）
○Manabu ITAKURA[1], Yoshitaka UCHIDA[2], Hiroko AKIYAMA[2], Yuko HOSHINO (TAKADA)[2], Yumi SHIMOMURA[2], Sho MORIMOTO[2], Kanako TAGO[2], Yong WANG[2], Chihiro HAYAKAWA[2], Yusuke UETAKE[1], Cristina SANCHEZ[1], Shima EDA[1], Masahito HAYATSU[2], Kiwamu MINAMISAWA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]National Institute for Agro-Environmental Sciences)

亜酸化窒素ガス(N_2O)は強力な温室効果ガスであると共に、オゾン層破壊の原因物質でもあり、発生量の削減は急務である。N_2O 発生量の約 4 割程度が農耕地由来であると言われており、その中でもダイズなどのマメ科作物の根圏が N_2O 発生のホットスポットであることが報告されている。ダイズ根圏では特に老化根粒から N_2O が発生しており、N_2O 発生にはダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* の N_2O 還元酵素遺伝子（*nosZ*）の有無が大きく関与している。土壌中の *B. japonicum* には *nosZ* を保有する株（*nosZ*+株）としない株（*nosZ*-株）が存在し、*nosZ*+株では根粒菌由来の N_2O が発生しないことに加え、他の土壌微生物由来の N_2O を除去することができる。そこで本研究では、N_2O 還元酵素（N_2OR）活性を高めたダイズ根粒菌（*nos* 強化株）の取得と N_2O 発生削減技術への応用について検討した。

B. japonicum USDA110 の *nos* 遺伝子プロモーター置換および、変異 *dnaQ* プラスミド導入によるミューテーター形質を利用して *nos* 強化株の取得を試みた。その結果、N_2OR 活性が野生株と比較し単生状態では 5~10 倍、共生状態では 2~3 倍に上昇した *nos* 強化株を取得することができた。*nos* 強化株および野生株を無菌的にダイズに接種し、30 日後に地上部を切除および土壌添加処理を行ない、処理後 15 日後に老化根粒からの N_2O 発生量を測定した。その結果、大気濃度の 0.32 ppm の N_2O 存在下では、*nos* 強化株の老化根粒では野生株の老化根粒と比べ N_2O 発生量が有意に減少していた。さらに、10 ppm の N_2O 存在下では *nos* 強化株の老化根粒でのみ N_2O の吸収が観察され、*nos* 強化株の老化根粒は高い N_2O 除去能力を持つことが明らかとなった。*nos* 強化株の接種効果を実験室レベルで検証するため、*nosZ*-株優占土壌（土着根粒菌 *nosZ*-: 98%, *nosZ*+: 2%）を用いて *nos* 強化株接種ダイズをポット栽培し、根圏からの N_2O 発生量を測定した。その結果、*nos* 強化株接種ダイズでは、根粒老化時の N_2O 発生が野生株接種と比較し 70%削減された。以上の結果より、*nosZ*-株優占土壌では N_2O 削減に *nos* 強化株接種が効果的であることが示された。そこで、N_2O 連続測定装置を備えた枠圃場にて *nos* 強化株接種効果の実証試験を行なった結果、*nosZ*-株優占土壌において *nos* 強化株接種によって収穫後の N_2O 発生量を 43%削減することができた。以上の結果より、*nos* 強化株は圃場においても N_2O 発生削減に有効であることが示された。

なお本研究は生研センターイノベーション創出事業の支援を受け行なわれた。*nos* 強化株取得はネオモルガン研究所との共同研究で行なわれた。

Nitrous oxide, *Bradyrhizobium japonicum*, N_2O reductase

講演番号：3C32p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ C 校舎 32 会場

Regulation of N_2O reduction in *Bradyrhizobium japonicum* mutants with increased N_2O reductase activity

○ Cristina SANCHEZ GOMEZ,Manabu ITAKURA,Yusuke UETAKE,Shima EDA,Hisayuki MITSUI,Kiwamu MINAMISAWA (Tohoku University)

Nitrous oxide (N_2O) is a key atmospheric green house effect gas that not only affects global warming but also leads to the destruction of the ozone layer. Emissions from agricultural fields are a major source of N_2O through the microbial transformation of nitrogen in soil and previous studies indicated that soybean nodules emit N_2O under field conditions in the late growth period. While N_2O is generated by a diversity of microbial enzymes, N_2O consumption appears to be exclusively due to the N_2O reductase (N_2OR). N_2OR enzymes are periplasmic copper proteins that catalyse the two-electron reduction of N_2O to dinitrogen, the last step in the respiratory pathway denitrification.

In the strain USDA110 of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum*, the genes encoding N_2O reduction functions are clustered in a single locus: *nosRZDFYLX*. A non-genetically modified *B. japonicum* mutant (5M09) with increased N_2O reductase activity was isolated by impairing proofreading activity and performing enrichment culture under selection pressure for N_2O respiration. In addition, a *B. japonicum* mutant (PRNOS) that overexpresses *nosZ* due to a strong *rrn* promoter was constructed as a reference.

Free-living and symbiotic cells of 5M09 and PRNOS strains showed higher N_2O reductase activity than wild-type strain. Similarly, free-living and symbiotic cells of 5M09 and PRNOS strains showed higher expression of *nosZ* (which encodes N_2OR) under both aerobic and anaerobic conditions. Expression of several genes encoding enzymes and regulatory proteins involved in the denitrification process were also analysed in 5M09 and PRNOS free-living cells. Changes in the expression of such genes were similar in both strains except for *napA* gene (which encodes the catalytic subunit of the periplasmic nitrate reductase). Interestingly, *napA* was significantly up-regulated in 5M09 mutant but down-regulated in PRNOS mutant. Together, these results suggest a common regulatory pathway for *nap* and *nos* genes expression in 5M09 mutant. We propose the involvement of an unknown regulator(s) on *nap* and *nos* genes expression in *B. japonicum*. The identity of such regulator(s) and how its regulation is accomplished remain to be explored.

Nitrous oxide reductase, *Bradyrhizobium japonicum*, Gene regulation

講演番号：3C32p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ C 校舎 32 会場

耐熱性 Protein Disulfide Isomerase を利用した効率的な BPA の回収

Development of Novel Trapping System of Bisphenol A Using Thermostable PDI

○ALSHEHRI AMIRA[1,3]、安部 芳[2]、秀瀬 涼太[3]、今岡 進[1,3]、藤原 伸介[1,3] ([1]関西学院大院・理工、[2]関西学院大学・理工、[3]関西学院大院・生命環境センター)
○ AMIRA ALSHEHRI[1,3], KAORU AMBE[2], RYOUTA HIDESE[3], SUSUMU IMAOKA[1,3], SHINSUKE FUJIWARA[1,3] ([1]Dept. of Biosci., Grad. Sch. of Sci. and Tech., Kwansei-Gakuin Univ., [2]Dept. of Biosci., Sch. of Sci. and Tech., Kwansei-Gakuin Univ., [3]Res. Cent. for Environ. Biosci., Grad. Sch. of Sci. and Tech., Kwansei-Gakuin Univ.)

【研究目的】Proteind disulfide isomerase (PDI)はタンパク質のジスルフィド結合の組み換えを促進する、小胞体に豊富に存在するタンパク質である。a,b,b’,a’,c の 5 つのドメインからなり、ビスフェノール A(BPA)結合タンパク質としてラットの脳より得られた。BPA は内分泌攪乱物質で、これが PDI に結合するとイソメラーゼ活性を阻害する。PDI には 17 種のファミリータンパク質が存在し、その中の ERp29 は PDI の触媒活性ドメインを欠き、b ドメインのみを持つ。先行研究より ERp29 には高い BPA 結合性があることが分かっている。超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* のタンパク質ジスルフィド酸化還元酵素である TK1085 の立体構造を見ると、ERp29 の His34 付近の構造と酷似している。このことから TK1085 のタンパク質も ERp29 と同様に BPA と結合する可能性があると考えた。*T. kodakarensis* のタンパク質は熱安定性が高いため、変性速度が遅く、各種の溶媒中でもタンパク質の高い安定性が期待される。本研究では、TK1085 のタンパク質安定性を評価するとともに、BPA 結合性を確認し、BPA を含む汚染溶液から BPA の特異的吸着・除去が可能かを検証することを目的とした。

【実験方法】TK1085 をコードする領域を PCR 法により増幅し、pET28a にクローン化し、構造遺伝子の N 末端領域に His タグを付加した発現用組換えプラスミドを構築した。大腸菌を形質転換し、誘導発現を試みたところ、TK1085 は可溶性のタンパク質として確認された。次に Ni-NTA アガロースを用いてタンパク質の精製を行った。精製された分子を用い、円偏向二色性分析（CD 法）により偏向スペクトルの解析を行い、タンパク質の安定性をヒト PDI と比較した。また、表面プラズモン共鳴法（SPR 法）によって TK1085 の BPA 結合性を検討した。

【実験結果】SPR 法より、TK1085 のタンパク質は BPA 結合性を有しているということが認められた。またヒト PDI と TK1085 タンパク質を CD スペクトル解析で比較した結果、両者の構造には微妙な違いが確認された。ヒト PDI が 40℃前後から変性が始まるのに対し、TK1085 は高い熱安定性を有していることが分かった。現在、安定性の違いを詳細に分析している。

Thermococcus kodakaraensis, Protein disulfide isomerase, Bisphenol A

講演番号：3C32p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ C 校舎 32 会場

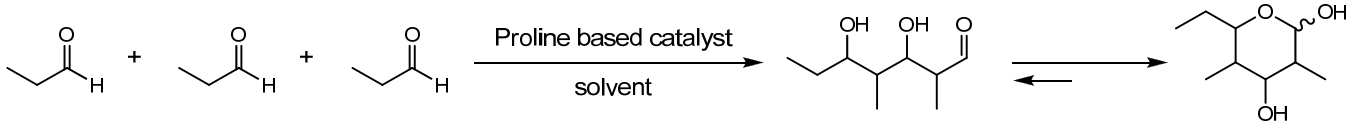
プロリン誘導体を用いた環境調和型単糖合成

Enviroment friendly monosaccharide synthesis with proline based catalyst

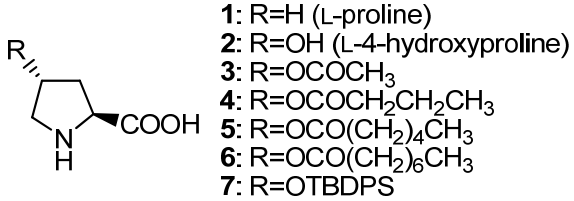
○酒井 陸[1]、新田 拓馬[2]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科、[2]日大生資科・生命化)

○Riku SAKAI[1], Takuma SHINDEN[2], Wataru HAKAMATA[1,2], Takako HIRANO[2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】現在、石油を原料として様々なプラスチック・医薬品・食品添加物等が製造されており、これら原料を石油からバイオマスに変更することが社会的要請として高まっている。本課題の解決策として、非食料である農産廃棄物などからの積極的なバイオアルコール製造が気運の高まりを見せている。これらの社会的背景から、我々はバイオアルコールがこれら要請に応えるkey物質となると考え、これらバイオアルコールから様々な化学製品の原料となるポリオール（単糖）の環境調和型合成を試みている。これまでにコルドバらは、プロリンを触媒として用いプロピオンアルデヒドをアルドール反応により重合させ単糖を合成することに成功した[1)]。（下スキーム）しかし本反応は、溶媒に有機溶媒である DMF（*N,N*-Dimethylformamide）を用い、煩雑な操作を経て4 ℃で3日間反応を行う必要がある。本研究では、コルドバらの反応を溶媒として水を用いた環境調和型反応に改良し、簡便な操作によってプロピオンアルデヒドから常温で単糖を合成する事を試みた。そこで、水中でアルドール反応を触媒するプロリン誘導体を設計・合成し、低エネルギー・低毒性・低廃棄物での単糖合成反応を開発することを目的とし、石油を原料とする化成品の原料を製造することを目指している。



【方法及び結果】これまでに林らによって、水中でアルドール反応を触媒するプロリン誘導体が報告されている[2)]。そこで本報告を参照し、置換基 R 部分が異なる 5 種のプロリン触媒（**3**～**7**）の設計・合成を行った。（下図）プロリン (**1**) およびその誘導体 (**2**～**7**) を触媒として、1.7 M プロピオンアルデヒド水溶液中、5 mol% 触媒存在下で 2 日反応させた。その結果、触媒 **3**～**5** はアルドール反応を触媒し、1 段階の操作で単糖を生成し、触媒 **5** を用いた時に最も収率が高かった。本反応の収率を改善するため、触媒 **5** を用いてプロピオンアルデヒドと触媒の濃度検討を行った。その結果、プロピオンアルデヒドが 1.5M、触媒量は 5 mol%で収率が最大となり、収率 40%で単糖が得られた。更に添加剤として酸を加え反応加速効果、収率の改善等の検討を行っている。



[1)] Naidu S.Cordova, *Tetrahed. Lett.*, **43**, 9591, 2002.

[2)] Y. Hayashi, *Chem. Eur. J.*, **13**, 10246, 2007.

green chemistry, organocatalyst, synthesis

講演番号：3C32p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ C 校舎 32 会場

オイルパーム廃棄木中の糖質加水分解酵素の特徴
Characterization of the glucide hydrolases in old oil palm trank
○脇坂 昂平[1]、荒井 隆益[2]、小杉 昭彦[2]、韮澤 悟[2]、森 隆[2]、山川 隆[1] ([1]東大院農、[2]国際農林水産業研究センター)
○ Kohei WAKISAKA[1], Takamitsu ARAI[2], Akihiko KOSUGI[2], Satoru NIRASAWA[2], Yutaka MORI[2], Takashi YAMAKAWA[1] ([1]Tokyo Univ., [2]JIRCAS)

【目的】
オイルパームは油脂生産性を維持するために 20～25 年ごとに伐採、更新される。伐採オイルパーム幹の内部に大量のグルコースを含む樹液が存在することを初めて見出し[1)]、さらに貯蔵期間を得ることで伐採パーム幹中の糖濃度が上昇することを発見している[2)]。この伐採パーム幹における糖蓄積機構は、パーム幹中のデンプンの関与が示唆されており、実際、伐採後にデンプン分解酵素遺伝子の発現が確認されている[3)]。そこで本研究では、伐採後の糖質加水分解酵素の活性動態に注目し、その特徴や諸性質に関して検討を行ったので報告する。
【方法及び結果】
伐採したパーム幹を約 60 日間、日陰で貯蔵し、伐採日から数日おきに幹破片をサンプリング、搾汁し各貯蔵日数の樹液を得た。50%硫安沈殿、限外ろ過、脱塩を行い貯蔵日数ごとの各粗酵素液を調製し、各糖質分解酵素（アミラーゼ、グルコアミラーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、スクラーゼ、ラミナリナーゼ）の活性測定を行った。グルコアミラーゼはマルトースを基質として遊離してくるグルコース濃度を測定し、また他各酵素活性は各糖質基質をそれぞれ反応させ遊離してくる還元糖を測定することで酵素活性（mU/ml）を示した。その結果、α-アミラーゼ、スクラーゼおよびラミナリナーゼ活性は、パーム幹中の糖濃度の上昇と一致して上昇してくる傾向が認められた。特に α-アミラーゼの活性は他酵素に比べ高活性を示し、パーム幹中のデンプン分解に直接関与していることが推察された。パーム幹中の α-アミラーゼの性質を検討するため、樹液からイオン交換クロマトグラフィーを用いて部分精製を行った。その結果、可溶性デンプンを使ったザイモグラム解析から、パーム幹中では主に分子量約 65kDa の α-アミラーゼ（至適温度 42℃、至適 pH6.0）が関与していることが明らかとなった。

参考文献
1）Kosugi *et al. J Biosci Bioeng.* 110:322-325 (2010)
2）Yamada *et al. Biomass and Bioenergy* 34, 1608-1613 (2010)
3）尾田ら、2011 年度日本農芸化学会大会（京都）講演要旨集、p162 (2011)

oil palm, amylase, starch

講演番号：3C32p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ C 校舎 32 会場

オイルパーム(Elaeis guineensis)古木伐採後貯蔵中にみられるデンプン分解酵素遺伝子の発現解析
Expression analysis of starch degradation enzymes in old oil palm trunks felled for replanting

○尾田 識史[1]、韮澤 悟[2]、荒井 隆益[2]、小杉 昭彦[2]、森 隆[1,2]、OTHMAN Sulaiman[3]、ROKIAH Hashim[3]、山川 隆[1] ([1]東大院・農生科・農学国際、[2]国際農研センター、[3]マレーシア理科大学)
○Satoshi ODA[1], Satoru NIRASAWA[2], Takamitsu ARAI[2], Akihiko KOSUGI[2], Yutaka MORI[1,2], Sulaiman OTHMAN[3], Hashim ROKIAH[3], Takashi YAMAKAWA[1] ([1]The University of Tokyo, [2]JIRCAS, [3]University Sains Malaysia)

【背景】オイルパーム(*Elaeis guineensis*)は果実中にパームオイルと呼ばれる植物油脂を蓄積し、その生産量は年間約 4500 万トンに達している。オイルパーム幹は樹齢に伴い生産性が低下するため、樹齢が 20~25 年に達した古木は伐採される。しかし、幹が脆弱なため大部分は破砕されプランテーション中に放置されたり、薬剤注入により立ち枯れさせたりしており、古木の幹の有効利用方法の開発が求められている。私たちはパーム幹を伐採したあと一定期間貯蔵することで、樹液中に大量の遊離糖が蓄積することを認めている [1]。さらに伐採後の幹ではアミラーゼ酵素活性が高く、デンプン分解酵素遺伝子 *AMY(α-amylase), BAM(β-amylase), AGL(α-glucosidase)*の発現量が増加していることから、幹中のデンプン分解酵素の関連性が示唆された [2]。そこで、本報告では糖蓄積現象に関連するとされるオイルパーム幹中のデンプン分解酵素の性質に関して検討を行った。

【方法・結果】
マレーシアでオイルパームの古木を伐採し、室温で貯蔵した。貯蔵開始後 0 時間、12 時間、24 時間、72 時間、360 時間のオイルパーム粉砕組織を経時的に採取し、それぞれの Total RNA を抽出した。続いて次世代シークエンスにより取得したオイルパーム mRNA 塩基配列データから、デンプン分解酵素遺伝子を 10 種取得した(*EgAMY1,EgAMY2,EgAMY3,EgBAM1,EgBAM2,EgBAM3,EgAGL1,EgAGL2, EgAGL3, EgAGL4*)の断片配列を取得した。そのうち *EgAMY1* と *EgAMY2* については cDNA を単離し、配列を決定した。その結果、両者とも Glycosyl hydrolase family 13 に属しており、微生物や植物に存在する既知アミラーゼと相同性が高いことがわかった。*EgAMY1* はバナナ(*Musa acuminata AAA Group*)の α-amylase と 82%のアミノ酸相同性を示し、N 末端領域に分泌シグナルと予想される付加配列を有していた。一方、*EgAMY2* はキウイ(*Actinidia chinensis*)の plastid alpha amylase と 70%のアミノ酸相同性を示した。他の 8 種についても cDNA の単離を進めている。現在、この取得した ORF 配列を pCold I vector の発現領域に組換えて大腸菌 BL21(DE3)株に発現させ、デンプン分解活性の特徴化を行っており、それらの結果も合わせて報告する。

参考文献
1 H. Yamada et al., Biomass and Bioenergy 34, 1608-1613 (2010)
2 尾田ら、日本農芸化学大会(京都) 講演要旨集、p162 (2011)

oil palm, amylase, biomass

講演番号：3C20a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ C 校舎 20 会場

オートムギに含まれる新規アベナンスラミド

New avenanthramides in oat seed

○石原 亨、藤田 健、小嶋 果奈、中島 廣光（鳥取大農）
○Atsushi Ishihara,Takeshi Fujita,Kana Kojima,Hiromitsu Nakajima (Fac. of Agriculture, Tottori Univ.)

【背景】

オートムギ（*Avena sativa*）は種子中に，アントラニル酸のヒドロキシ桂皮酸アミドを基本骨格とするアベナンスラミド類を蓄積している．アベナンスラミド類は，オートムギのファイトアレキシンであり抗菌活性を有する．また，抗酸化活性や抗炎症活性をもつことが報告されており，その機能性からも注目されている．オートムギの種子には，約２５種のアベナンスラミド類が存在すると推定されているが，構造が明らかにされているものはその一部に過ぎない．そこで，オートムギの種子から新たなアベナンスラミド類の単離，構造解析を試みた．

【結果と考察】

オートムギ種子（500 g）を 5 L のメタノールで抽出した．得られた抽出物を ODS カラムに吸着させ， 20%, 40%, 60%, 80%, および 100%メタノールによって溶出した．LC/MS により分析したところ，60%メタノールフラクションに新たなアベナンスラミド類と推定される３つのピークを検出することができた．そこで，これらのピークに相当する化合物を ODS カラムを用いた分取 HPLC により単離し，NMR および ESI-マススペクトルを測定した．得られた化合物は，新規アベナンスラミドである *N*-フェルロイル-4,5-ジヒドロキシアントラニル酸（**1**），*N*-カフェオイル-4,5-ジヒドロキシアントラニル酸（**2**），および，*N*-カフェオイル-4-ヒドロキシアントラニル酸（**3**）と推定された．そこで，これらの化合物の合成を行った．4,5-ジヒドロキシアントラニル酸は 4,5-ジメトキシアントラニル酸の臭化水素酸による脱メチル化により調製した．一方，4-ヒドロキシアントラニル酸は *m*-アミノフェノールに炭酸水素カリウムを作用させ合成した．これらのヒドロキシアントラニル酸類をヒドロキシ桂皮酸の *N*-ヒドロキシスクシニイミドエステルと縮合させ，目的の化合物を得た．単離したアベナンスラミド類は合成した化合物とスペクトルが一致したため，**1**～**3** であると結論した．新規アベナンスラミド類の抗酸化活性についても併せて報告する．

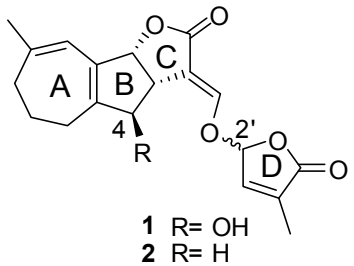
avenanthramide, oat, antioxidant

講演番号：3C20a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ C 校舎 20 会場

タルウマゴヤシの生産する didehydro-orobanchol の単離及び構造決定
Isolation and structure determination of didehydro-orobanchol produced by *Medicago truncatula*
○徳永 珠美[1]、中谷 成史[2]、秋山 康紀[2]、林 英雄[2] ([1]阪府大・生命環境、[2]阪府大院・生命環境)
○Tamami Tokunaga[1], Yoshifumi Nakatani[2], Kohki Akiyama[2], Hideo Hayashi[2] ([1]Sch.Life & Environ.Sci.,Osaka Pref.Univ., [2]Grad.Sch.Life & Environ.Sci.,Osaka Pref.Univ.)

【目的】ストリゴラクトン（strigolactone, SL）は植物においてアーバスキュラー菌根菌や根寄生雑草との相互作用における根圏情報物質として作用するのみでなく，地上部の枝分かれを制御する内生ホルモンとしても働くアポカロテノイドである。これまでに十数種の SL が天然から単離同定されており，solanacol を除いて，すべて 5-deoxystrigol を共通の基本骨格としている。これまでに単子葉モデル植物であるイネやマメ科モデル植物であるミヤコグサの生産する主要な SL は同定されている。しかしながら，ミヤコグサと並ぶもう一つのマメ科モデル植物であるタルウマゴヤシ（*Medicago truncatula*）の主要な SL については didehydro-orobanchol 異性体であることが報告されているのみであり単離されていない。今回，我々はタルウマゴヤシの生産する didehydro-orobanchol 異性体の単離・構造解析を行い，本化合物が 7 員環の A 環を持つ新規骨格の SL であることを見出し，有機合成した 4-deoxy 体とのスペクトル比較による構造決定を行ったので報告する。

【方法および結果】タルウマゴヤシ Jemalong A-17 を 1/2 x Hoagland 液で 4 週間水耕栽培した後，水耕液を水道水に置き換えて貧栄養ストレスを与えた。この水耕液を活性炭に連続的に循環して根分泌物を回収した。根分泌物の酢酸エチル可溶中性物質をシリカゲルカラムおよび、分取 ODS-HPLC により精製し、EI-MS 分析で分子量 344 を示す didehydro-orobanchol 異性体(**1**)を約 200 μg 単離した。^{1}H-NMR, ^{1}H-^{1}H-COSY, NOESY 解析の結果，本化合物が A 環に cyclohepta-1,3-diene 構造を持つ新規 SL であると推定されたので，本 SL の 4-deoxy 体(**2**)を合成し，スペクトルの比較を行うこととした。2-シクロヘキサノンカルボン酸エチルを出発原料とし，5 段階の反応により得られるヒドロキシメチル二環エノンをピリジン中で *p*-トルエンスルホニルクロライドを反応させ，トシル基を付加した。これをギ酸中でギ酸ナトリウムと反応させることにより A 環が 7 員環に拡大した AB エノンを合成した。続いて，C 環構築，フォルミル化，D 環カップリングにより 4-deoxy 体(**2**)を合成した。^{1}H-NMR スペクトルにおいて，天然 SL(**1**)と合成 4-deoxy 体(**2**)とで A 環に由来するプロトンピークのケミカルシフトとカップリングパターンはほぼ完全に一致した。現在，CD スペクトルによる絶対配置の決定を行っている。



Medicago truncatula, didehydro-orobanchol, strigolactone

講演番号：3C20a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ C 校舎 20 会場

フラバン二量体とその関連化合物によるマウス精子の超活性化様運動の誘導効果
Effect of flavan dimers and relative compounds on hyperactivation-like motility of mouse sperm
○荒舘 忠[1]、谷井 一郎[1]、小宮 顕[2] ([1]富山大医生物、[2]富山大医腎泌尿器)
○Tadashi ARADATE[1], Ichiro TANII[1], Akira KOMIYA[2] ([1]Univ. of Toyama, Medical Bio, [2]Univ. of Toyama, Urology)

【目的】哺乳類の受精には精子鞭毛運動の超活性化（ハイパーアクチベーション）が必要である。我々は精子活性化剤の開発を目指して、その誘導物質を探索している。超活性化は、精子の鞭毛が対称的で低振幅の運動から大きい振幅へ変化した運動形態で、この変化を指標として超活性化様運動を誘導するフラバン二量体、7,4'-dihydroxyflavan-(4 β → 8)-catechin （**1**） と 7,4'-dihydroxyflavan-(4 β → 8)-afzelechin（**2**）をカワラケツメイ（*Cassia mimosoides* L. subsp. *nomame*）の莢から分離した。今回は、それらを得た近傍の分画から構造の異なるフラバン二量体を分離し、3種のフラバン二量体とそれらの構成単位となる3種のフラボノイドについて、マウス精子の運動速度と超活性化様運動に対する効果を比較した。
【方法】雄マウス（ICR、12~19週齢）の精巣上体尾部より精子塊を採取してTYH培地へ入れ、37℃、5%CO2下で90分間培養した精子を各種化合物含有培地に加えて30分間培養後、評価に用いた。フラバン二量体は各種カラムクロマトグラフィーおよび逆相HPLCにより精製した。精子の生存率、直線速度、曲線速度、直進性、頭部振幅、頭部振動数および超活性化様運動した精子数は、精子運動能解析装置（SMAS）を用いて測定した。
【結果】精製した化合物は、構造解析の結果、7,3',4'-trihydroxyflavan-(4 β →8)-catechin（KA-1）（**3**）という既知物質であった。化合物 **1**～**3** の超活性化様運動の誘導効果を比較したところ、50 μM の濃度では、**3** が最も弱い効果を示し、水酸基数が少ない **2** が最も有効であった。フラボノイドの効果については、**1**、**2** の上部ユニットの代わりに用いた liquiritigenin に、**1**～**3** よりも弱い効果であるが、100 μM 以上の濃度で超活性化様運動した精子数の有意な増加が見られた。また、**2** の下部ユニットである(+)-afzelechin は 150 μM の濃度で同程度の効果であったが、**1** と **3** を構成する(+)-catechin には全く効果がなかった。これらの結果から **1**～**3** の効果には、上下ユニットの B 環構造の部分が関係している可能性が示唆された。

flavan dimer, hyperactivation, sperm motility

講演番号：3C20a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ C 校舎 20 会場

褐藻クロメ *Ecklonia kurome* の硫酸化フロロタンニンの単離と構造研究
Isolation and structural study of sulphated-phlorotannins from the brown alga, *Ecklonia kurome*
○瀬川 慎也[1]、伊藤 久富[2]、山下 まり[1] ([1]東北大院農、[2]長瀬産業)
○Shinya Segawa[1], Hisatomi Ito[2], Mari Yotsu-Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Nagase & Co. LTD)

【目的】クロメやサガラメ等の褐藻は、phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene) が重合したポリフェノール（フロロタンニン類）を含み、種々の生理活性を持つことが報告されている。我々は、これまでクロメおよびサガラメより、分子量 974 の新規フロロタンニン類 2 成分を単離、構造決定した。本研究では、さらにフロロタンニン類を探索した結果、硫酸エステル体の存在が示された。これまで、硫酸化されたフロロタンニン類は、芳香環が 2 つ以下のものしか報告されていない[1,2]。また、その生理活性については報告されていない。そこで、硫酸化されたフロロタンニン類の単離方法の検討と構造研究を行った。
【方法】クロメ(*Ecklonia kurome)*より、70% EtOH で抽出後、ダイヤイオン HP20 を用いてポリフェノール画分を得た。その画分を溶媒分画し、ESI-MS (negative mode)に供すると、芳香環の数が 3 つ以上のフロロタンニン類の硫酸エステル体と思われるイオンが観測された。その情報を基に、各種カラムクロマトグラフィーの分離条件を検討した。また、アセチル化を行い、フェノール性水酸基の数を決定した。さらに、分離の各段階で、NMR スペクトルを測定して、純度およびシグナルを確認した。
【結果】ポリフェノール画分 500 mg から、約 2 mg のフロロタンニンの硫酸エステル体を粗精製した。各種カラムでの回収率は低いが、比較的良好なカラムを選択して組み合わせることにより、精製方法を確立することができた。高分解能 ESI-MS で分子式を決定し、アセチル化される水酸基の数を決定した。さらに、ESI-Q-TOF MS/MS スペクトルを既知のフロロタンニン類と比較して、骨格構造を限定しつつある。純度を上げると、DMSO-d_6 中での NMR 測定は可能であったので、さらに精製を続けて、硫酸エステル化された位置を含めて化学構造を検討する。また、今後、抗酸化活性試験に供する予定である。

Ref.
1) Glombitza, K. W. and Knoss, W. *Phytochemistry*, 31, 279-281 (1992).
2) Peter-Katalinic, J. *et al.*, *Biomed. Envir. Mass Spectrom.*, 15, 595-602 (1988).

phlorotannin, *Ecklonia kurome*, structural determination

講演番号：3C20a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ C 校舎 20 会場

半寄生帰化雑草ヒサウチソウの成分と生物活性

Secondary metabolites of *Bellardia trixago* and their biological activities

○森本 正則、束村 聡太、松田 一彦（近畿大院農）
○Masanori MORIMOTO,Souta TSUKAMURA,Kazuhiko MATSUDA (Kinki Univ.)

【目的】ヒサウチソウ（*Bellardia trixago* (L.)All. Syn. *Bartsia trixago* L.）は、河川敷などで近年散見されるようになったハマウツボ科半寄生帰化雑草である。関東以西で分布を拡大しており、中部地方や琵琶湖周辺に広く分布する。近縁種のセイヨウヒキヨモギ（*Parentucellia viscosa* (L.)Caruel, syn. *Bartsia viscosa* L.）と同様にイネ科植物などを寄主として湿った土地を好む。このような水辺を好む帰化植物は、日本国内での分布拡大が危惧されている。本種の形態的特徴の一つは、全草に腺毛を持ち滲出物を滲出させることであり、特に開花期の生長点付近の滲出物量が多い。2012 年初夏に実施した徳島県鳴門市吉野川河川敷での調査では、この生長点付近の葉は植食性昆虫からの食害が回避されていることが観察された。一方で、下位葉である成熟葉を摂食したチョウ目昆虫の幼虫が、ヒサウチソウ上で死亡している個体が認められたため、本種の植物体内に蓄積される二次代謝産物が昆虫にとって摂食毒として機能している可能性が示唆された。これらの事実から本種の生産する防御物質の探索と帰化雑草の定着と化学防衛物質の相関性を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】本種の表面構造について低真空 SEM と光学顕微鏡観察を行ったところ、葉部表面に多くの腺毛が確認できたが、成熟葉では低密度であった。滲出物は、ジクロロメタンに数秒漬けることで得た。植物体内部に蓄積される成分は、メタノール抽出によって地上部メタノール抽出物を得た。この様にして調製した本種の開花期における滲出物量は、生長点付近の新葉と成熟葉では新葉の新種物量が 3 倍程度多いことが判明した。この滲出物中の主成分は、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、ジテルペンアルコール Trixagol のマロン酸エステルと同定した。同時に遊離のアルコールも単離・同定した。セイヨウヒキヨモギ由来のジテルペンカルボン酸である Kolavenic acid は、ハスモンヨトウ 3 齢幼虫に対して摂食阻害活性を示すことを以前に報告しているが、ヒサウチソウ滲出物由来のマロン酸エステルならびにジテルペンアルコールは、0.3 mg/cm^2 の処理量でもハスモンヨトウ（*Spodoptera litura* F.）3 齢幼虫に対して摂食阻害活性活性を示さなかった。さらに本種を食害したチョウ目昆虫の死亡原因究明の為、地上部メタノール抽出物も同様に精製を行い、最も多く含有される成分をイリドイド配糖体である Bartsioside と同定した。その他の構成成分として、同じくイリドイド配糖体である Mussaenoside、Gardoside のメチルエステル、Aucubin および Mussaenoside を単離・同定した。これらのイリドイド配糖体の昆虫に対する生物活性を検討中である。

Bellardia trixago, iridoid, diterpene

講演番号：3C20a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ C 校舎 20 会場

Oleuropein 糖加水分解産物アミノ酸複合体の構造解析

Structural analysis of Oleuropein hydrolyzed metabolite-amino acid

○池田 修也[1]、松野 聡[1]、大上 将司[1]、渡辺 修治[2]、大西 利幸[3]（[1]静大院・農、[2]静大院・創造、[3]静大・GRL）
○Shuya Ikeda[1], Satoshi Matsuno[1], Shoji Ohgami[1], Naoharu Watanabe[2], Toshiyuki Ohnishi[3] ([1]Grad. School Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad. School Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]GRL, Shizuoka Univ.)

【背景・目的】オリーブに含まれるイリドイド配糖体 Oleuropein は食害昆虫に対する防御物質として働き、植物の化学防御に寄与することが提唱されている。しかし、Oleuropein の推定化学防御機構は未だ証明されておらず、その生理学的な役割は実証されていない。これまでに我々は Oleuropein と糖加水分解酵素 β-Glucosidase（β-GH）との反応によって生じる Oleuropein Hydrolyzed Metabolite（OHM）（図 1）の化学構造を決定し、非常に強いタンパク質変性作用を示すグルタルアルデヒド様構造を有していることを明らかにした。OHM が植物体を構成するタンパク質のアミノ酸側鎖とシッフ塩基を形成することで変性タンパク質の高分子架橋体を生成し、食害昆虫に対して消化不良や栄養価の低下を引き起こしていることが推定されている。我々は OHM の有するグルタルアルデヒド様構造が植物体に存在するタンパク質だけでなく遊離アミノ酸ともシッフ塩基を形成することで OHM アミノ酸複合体（OHM-aa）を生成すると予想した。しかし、OHM-aa の化学構造は未だ明らかにされておらず、植物体に内生する OHM-aa の存在も未解明のままである。そこで本実験では OHM-aa の構造決定および植物体からの探索を目的とした。

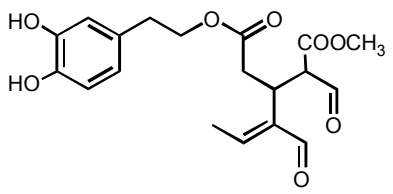


図 1. OHM の化学構造

【方法】Oleuropein を β-GH により糖加水分解することで、グルタルアルデヒド様構造を有する OHM を酵素合成した。酵素合成した OHM に L-Phe を添加し、得られた反応物を精製・単離後、HR-MS および NMR により構造解析を行った。さらに、オリーブに内生する OHM-aa の存在を証明するため、19 種類の L-アミノ酸と OHM を反応させ、19 種類の OHM-aa を酵素合成し、これらを標準品として LC-MS/MS 分析によるオリーブ葉抽出液からの内生 OHM-aa の探索および定量を試みた。

【結果】酵素合成した OHM-Phe の化学構造を解析した結果、OHM のグルタルアルデヒド様構造と L-Phe 1 分子の α-アミノ基が反応し、含窒素六員環を形成した新規化合物であることを明らかにした（図 2）。また、オリーブ葉抽出液を LC-MS/MS 分析した結果、酵素合成した OHM-Phe 標準品の保持時間および MS^2 フラグメントパターンと一致するピークを検出した。このことから OHM-Phe がオリーブに内生することを明らかにした。

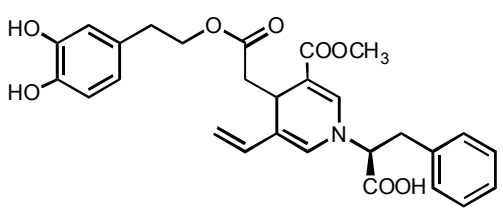


図 2. OHM-Phe の化学構造

secondary metabolite, Oleuropein, chemical defense

講演番号：3C20a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ C 校舎 20 会場

ジャバラ果皮ポリメトキシフラボノイドのヒト胃癌細胞に対する作用

Effect of polymethoxyflavonoid from *Citrus jabara* peel in human gastric cancer cell line MKN-45

○小島 直也、奥野 祥治、藤本 晶 (和歌山高専)
○Naoya Kojima,Yishiharu Okuno,Akira Fujimoto (Wakayama nct)

【目的】ジャバラ (*Citrus jabara*) は和歌山県北山村原産の柑橘類である。種が少なく、果汁が多いことからジュースやドレッシングに利用されている。ジャバラ果皮の成分としては、ポリメトキシフラボノイドおよび香気成分の報告がある。ポリメトキシフラボノイドは柑橘果皮の主要成分であり、抗炎症作用、抗酸化作用、抗変異原性作用などの様々な生理活性を持つことから注目を集めている。しかし、ジャバラ果皮に含まれるポリメトキシフラボノイドの機能性についての報告はない。本研究では、ジャバラ果皮中のポリメトキシフラボノイドのさらなる詳細な解明およびヒト胃癌細胞 MKN-45 に対する効果について検討を行った。

【実験】ジャバラ果皮をメタノールに浸して常温で 24 時間抽出した。この操作を三回繰り返して得たメタノール抽出物を減圧濃縮し、メタノール抽出物とした。メタノール抽出物を各種溶媒で順次転溶し、それぞれの抽出物を得た。フラボノイドの単離は各種カラムクロマトグラフィーにより行った。単離したフラボノイドの化学構造は 1D、2DNMR スペクトルおよび高分解能 ESI-MS により決定した。得られたポリメトキシフラボノイドの MKN-45 に対する増殖抑制効果および細胞毒性を、それぞれ MTS 試験および LDH 試験によって検討した。

【結果】ジャバラ果皮抽出物から 6 種のポリメトキシフラボノイドを単離し、これらの化学構造を 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone (**1**) 、 5,4'-dihydroxy-3,6,7,8,3'-heptamethoxyflavone (**2**) 、 3-hydroxy-5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone (**3**)、3,5,6,7,3',4'- heptamethoxyflavone (**4**) および 3-hydroxy-5,6,7,3',4'-pentamethoxyflavone (**5**) であると決定した。化合物 **6** の構造については現在検討中である。主成分は化合物 **3**、**4** であった。単離したポリメトキシフラボノイドについて、MKN-45 に対する MTS 試験および LDH 試験を行った。MTS 試験の結果、化合物 **2** 以外のすべての化合物が増殖抑制効果を示した。一方、LDH 試験では、化合物 **1** と **3** が強い細胞毒性を示し、それ以外は細胞毒性を示さなかった。化合物 **4** および **5** は、強い増殖抑制効果を示したが細胞毒性は示さなかったことから、MKN-45 に対しアポトーシスを誘導している可能性が示唆された。現在、これらのポリメトキシフラボノイドについてアポトーシス誘導活性を検討している。

Citrus jabara, Polymethoxyflavonoid, Apoptosis

講演番号：3C20a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ C 校舎 20 会場

木本由来生薬のがん細胞増殖抑制活性について

Antiproliferative activity of the traditional medicine from wood bark to HL-60

○小山 愛美[1]、常盤野 哲生[1]、川井 悟[2]、吉澤 結子[1]([1]秋田県大院生資科、[2]東京電気大理工)
○Manami OYAMA[1], Tetsuo TOKIWANO[1], Satoru KAWAII[2], Yuko YOSHIZAWA[1] ([1]Akita Pref. Univ., [2]Tokyo Denki Univ.)

【緒言】

本研究では、木本植物由来の生薬にヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制活性の報告が少ないことに着目し、HL-60 に対する報告の無い木本植物生薬 11 種類のメタノール抽出物について、HL-60 増殖抑制スクリーニングを行った。その結果、*Salix gilgiana* （和名カワヤナギ）抽出物に、IC_{50} が 15.9 ppm と特に強い活性を見いだした。カワヤナギはヤナギ科木本植物で、その枝の乾燥品が生薬カワヤナギとして用いられており、消炎・鎮痛などに効果があるとされている。*S. gilgiana* からは、Apigenin や Luteolin などのフラボンおよびフラボン配糖体の単離が報告されている。本研究では、この生薬を材料とし、HL-60 増殖抑制活性を指標に *S. gilgiana* に含まれる HL-60 増殖抑制成分の解明を目的とした。

【実験方法】

S. gilgiana 由来の生薬（枝の乾燥品）をメタノールに浸漬し、不溶物をろ過した後、メタノールを減圧留去して粗抽出物を得た。これを HL-60 に対する増殖抑制活性を指標にカラムクロマトグラフィーで分画・精製を行った。単離した化合物は NMR 等の機器分析によって構造解析を行った。HL-60 に対する活性試験は、10%牛胎児血清（FBS）を含む RPMI-1640 培地を用い 37 ºC、5% CO_2 条件下で維持した HL-60 に、最終濃度が 50.0 ppm から始まる公比 4 倍の希釈系列で抽出物試料を添加し 72 時間培養した。その後、alamar Blue® 色素を添加し、さらに 24 時間培養した。培養終了後に吸光度を測定し、IC_{50} 値を求めた。

【結果】

メタノール抽出物についてクロロホルム、酢酸エチル、アセトン、メタノール、水で固相抽出を行い、強い活性を示したクロロホルム画分について、さらにクロマトグラフィーを繰り返して分画と精製を進めた。その結果、活性の強い分画 2 種が得られた。NMR 解析により、2 種の分画ともに芳香環を持つことが示唆されている。これらの構造および生理活性の詳細について報告する。

HL-60, *Salix gilgiana*, Antiproliferative

講演番号：3C20a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ C 校舎 20 会場

コバノランタナに含まれるポリフェノール類と機能性

Polyphenols from Lantana montevidensis and Biological activity

○山崎 啓司、奥野 祥治 (和歌山高専)
○Keiji Yamasaki,Yoshiharu Okuno (Wakayama nct)

【諸言】コバノランタナ(*Lantana montevidensis*)は、ブラジル原産のクマツヅラ科シチヘンゲ属に属する植物である。茎はしなやかな匍匐性があり、初夏から晩秋にかけて淡紅色や白色の花をつける。日本では観賞用に栽培されているが、南米ではその葉が茶剤または煎剤として気管支炎、発汗、駆風、リウマチ、消化促進に用いられている。しかし、コバノランタナの化学成分については、数種フラボノイドについての報告が一報あるのみである。本研究では、コバノランタナに含まれるポリフェノール類とその機能性について検討した。

【実験】

ポリフェノール量の測定

乾燥させたコバノランタナの葉 1 g を MeOH 10 ml で 3 回抽出した後、30 ml に定容し分析サンプルとし、フォーリン-チオカルト法により測定した。

ポリフェノール類の精製

乾燥したコバノランタナの葉 40 g を MeOH 1 L で 3.5 h 還流抽出し、ろ過後、濃縮し、MeOH 抽出物を得た。この抽出物を Diaion HP20、MCI-GEL CHP-20P、Cosmosil 75C_{18}-OPN を担体としたカラムクロマトグラフィーおよび分取 HPLC により分画し、化合物 **1** および **2** を単離した。単離した化合物 **1** および **2** について、1D および 2D NMR スペクトル、HR ESI-MS により化学構造の解析を行なった。

【結果】ポリフェノール量測定の結果、乾燥したコバノランタナの葉には没食子酸量換算で 8 mg/g のポリフェノールが含有されていた。MeOH 抽出物を LC/MS により分析した結果、2 つの主要な化合物が検出された。そこで各種分離操作を行うことにより、化合物 **1**(25.6 mg)および **2**(8.0 mg)を単離した。化合物 **1** の分子量は HR ESI-MS により、*m/z* 741.2201 ([M-H]$^+$)であり、その組成式は $C_{33}H_{42}O_{19}$ であった。^{1}H NMR スペクトルより、4-5 ppm 付近に糖由来の 3 つのシグナルが見られたことから、**1** の構造には 3 つの糖が存在していることが示された。さらに NMR 解析により、化合物 **1** は phenylethanoid glycoside 類であると考えられた。しかし、構造決定にはいたっていないため、現在検討中である。また、**2** についても構造決定を行なっている。

Lantana montevidensis, phenylethanoid glycoside, polyphenol

講演番号：3C20a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ C 校舎 20 会場

梅種子に含まれる脂肪分化促進物質の探索

Differential effects of Japanese apricot components on 3T3-L1 adipogenesis.

○野村 紗希[1]、奥野 祥治[1]、河野 良平[2]、野村 幸子[2]、宇都宮 洋才[2] ([1]和歌山高専、[2]和歌山医大)
○ Saki NOMURA[1], Yoshiharu OKUNO[1], Ryohei KONO[2], Sachiko NOMURA[2], Hirotoshi UTSUNOMIYA[2] ([1]Wakayana NCT, [2]Wakayama Medical Univ.)

【緒言】肥満は、糖尿病、高血圧、動脈硬化などメタボリックシンドロームの原因となっている。肥満は高カロリー食などにより脂肪細胞が肥大化することにより起こる。一方、小型の脂肪細胞は、メタボリックシンドロームや生活習慣病を予防する生理活性物質を多く分泌する重要な細胞であることが知られている。脂肪細胞分化を促進し小さな脂肪細胞を作り出す作用を持つエキスや物質は肥満およびメタボリックシンドローム予防薬として期待できると考えられている。

我々の研究室では農産物およびそれらの廃棄物に含まれる機能性成分についての研究を行っている。そこで本研究では梅種子の機能性素材への利用を目的として梅種子に含まれる脂肪分化促進物質の探索を行った。

【実験】分化促進試験は 3T3-L1 脂肪前駆細胞を用いて行った。10% 子牛血清含有 DMEM 培地で 80% コンフレントまで培養した 3T3-L1 細胞を 96 well micro plate に 1×10^4 cell/well になるように分注した。5% CO_2 下 37℃で二日間培養後、各濃度に調整したサンプルを加えた維持培地(10%ウシ胎児血清含有 DMEM 培地＋5μg/mL インシュリン)に入れ替え、同条件で 4 日間培養後、2 日おきにサンプル未添加の維持培地に入れ替え、計 10 日間培養した。分化促進の評価は、分化した細胞を Oil red O 染色し、顕微鏡観察および 490nm の吸光度を測定することにより行った。

【結果と考察】梅種子の 60% エタノール抽出濃縮物 10 L を蒸留水で 2 倍希釈した後、ヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチルで順次抽出し抽出物を得た。各抽出物の脂肪前駆細胞に対する分化試験を行った結果、ジクロロメタン抽出物に分化促進効果があった。このジクロロメタン抽出物についてシリカゲルクロマトグラフィーによる分画を行い 6 つのフラクションを得た。分化促進試験の結果より Fr. 2、Fr. 3 が強い脂肪分化促進効果を示したため、両フラクションより脂肪分化促進物質の単離を行っている。

Japanes apricot, 3T3-L1, adipocyte

講演番号：3C20a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ C 校舎 20 会場

イヌカタヒバが生産するストリゴラクトンの探索
Characterization of strigolactones produced by *Selaginella moellendorffii*
○謝 肖男[1]、米山 香織[1]、来生 貴也[1]、高橋 明子[1]、内田 健一[2]、横田 孝雄[2]、野村 崇人[1]、米山 弘一[1] ([1]宇都宮大・雑草センター、[2]帝京大・バイオ)
○Xiaonan XIE[1], Kaori YONEYAM[1], Takaya KISUGI[1], Akiko TAKAHASHI[1], Kenichi UCHIDA[2], Takao YOKOTA[2], Takahito NOMURA[1], Koichi YONEYAMA[1] ([1]Weed Science Center, Utsunomiya Univ., [2]Deparment of Biosciences, Teikyou Univ.)

【目的】
ストリゴラクトン（SL）は、植物体内では地上部の枝分かれを制御する植物ホルモンとして機能し、植物の根から土壌根圏に放出されるとアーバスキュラー菌根菌およびストライガやオロバンキなどの根寄生雑草の宿主認識シグナルとして働いている。これまでに我々は、陸上植物の進化で最も基部で分岐したとされるコケ植物のヒメツリガネゴケ（セン類）およびゼニゴケ（タイ類）が生産する SL の報告をした。本研究では、SL の起源および植物界における分布をより明確にするため、コケ植物よりあとに分岐したシダ植物が生産する SL の解明を行った。

【材料および方法】
シダ植物としてはゲノム解読が行われたイヌカタヒバ（*Selaginella moellendorffii*）を用いた。イヌカタヒバを水道水により水耕栽培し、根浸出物を活性炭に吸着させて回収した。活性炭をアセトンで溶出し、溶出物を酢酸エチル - 水で分配後、0.2 M K_2HPO_4 水溶液と分配して酸性物質を除去した。得られた酢酸エチル可溶中性（NE）区をシリカゲルクロマトグラフィーで精製後、LC-MS/MS および GC-MS を用いて分析した。また、HPLC で分画し、各画分のヤセウツボ（*Orobanche minor*）種子に対する発芽刺激活性を検定した。

【結果および考察】
LC-MS/MS および GC-MS 分析により、イヌカタヒバは既知の SL である orobanchol, orobanchyl acetate および 5-deoxystrigol を生産していることが確認された。また、GC-MS およびヤセウツボ種子に対する発芽刺激活性の結果から、イヌカタヒバは既知 SL 以外に少なくとも 4 種類の新規 SL を生産していることが示唆された。現在、各種クロマトグラフィーによる精製を進め、これら新規 SL の構造解析を行っている。

strigolactone, plant hormone, pteridophyte

講演番号：3C20a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ C 校舎 20 会場

気孔形成に関与する新規ペプチド性因子の探索

A search of novel peptides that control stomatal formation in *Arabidopsis thaliana*

○杉田 大河、近藤 竜彦（名古屋大院生命農）
○Taiga SUGITA,Tatsuhiko KONDO (Nagoya Univ.)

【目的】気孔は植物の表皮上に形成される向かい合った 1 対の孔辺細胞からなる組織であり、蒸散、呼吸に伴うガス交換の際の通気口として機能する。植物は日照変化などの短期的な環境変化に対しては気孔の開閉を行うことによって適応するが、季節変動などの長期的な変化に対しては気孔密度を調節することで適応している。このような気孔密度の制御は、気孔の分化過程における未分化表皮細胞の細胞運命の調節によって達成される。我々は、シロイヌナズナの葉において気孔密度を増加させる活性を有するペプチドホルモンとして stomagen を単離し、その成熟型の構造を明らかにした。化学合成した stomagen は 10 nM という低濃度で気孔密度を有意に上昇させるが、その詳細な作用機構については未だ明らかとなっていない。stomagen は EPF ファミリーと命名されたシステインリッチな分泌型ペプチドの前駆体をコードした遺伝子ファミリーに属しており、その中には stomagen とは逆に、過剰発現させると気孔密度を低下させる遺伝子も存在している。このことから、気孔分化の過程において複数のペプチド性因子が共奏的に働いていることが示唆されている。本研究では、シロイヌナズナにおいて stomagen が過剰に存在し気孔密度が上昇した植物体内において、その内在量が大きく変化するペプチド性因子を探索し、単離、構造決定を行うことを目的とした。
【方法・結果】シロイヌナズナ野生型株及び *STOMAGEN* 過剰発現株の植物体からアポプラスト液を抽出した。得られた抽出液を陽イオン交換および逆相モードのチップカラムを用いて粗精製し、粗ペプチド画分を得た。さらに、逆相 HPLC を用いた分画を行い、それぞれの画分の MALDI-TOFMS を測定し、野生型株と *STOMAGEN* 過剰発現株のペプチド性因子の分子量プロファイルを作成した。この際、*STOMAGEN* 過剰発現株のアポプラスト抽出液からは、内在性の stomagen に由来するシグナルが観測されたことから、本手法により効果的に内在性のペプチドが回収、分画できることが確認できた。得られたプロファイルを比較し、野生型株または *STOMAGEN* 過剰発現株に特異的に観測されるシグナル、及びシグナル強度が大きく変化するシグナルを探索した。その結果、*STOMAGEN* 過剰発現株において野生型株に比べて量が減少していると思われる候補を複数見いだした。また、これと並行して MALDI-TOFMS を用いた微量ペプチドの簡易定量法についても検討した。現在、候補ペプチドの定量と、エキソペプチターゼを用いたアミノ酸配列解析を行っており、その結果についても併せて報告する。

stomata, peptide, *Arabidopsis thaliana*

講演番号：3C20a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ C 校舎 20 会場

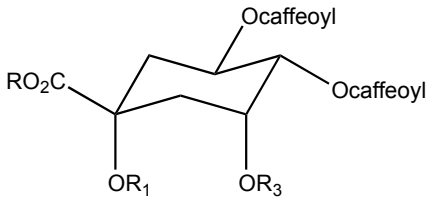
Search for intestinal maltase inhibitors from *Pluchea indica* leaves

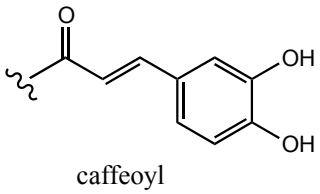
○ARSININGTYAS INES SEPTI[1], Maria D. P. T Gunawan Puteri[2], Eisuke Kato[1], Jun Kawabata[1]
([1]Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ., [2]Pelita Harapan Univ., Indonesia)

【Objective】 Many efforts have been made to identify α-glucosidase inhibitors from natural sources in order to develop functional foods or lead compounds for use against diabetes mellitus. Methanolic extract of *Pluchea indica* possessed promising rat intestinal maltase inhibitory activity. As previously reported, we have already isolated three caffeoylquinic acid derivatives (**1**-**3**) as active principles against maltase. This time, further search for other maltase inhibitors from remained active fractions of *Pluchea indica* leaves were done.

【Methods】*Pluchea indica* leaves were obtained from Yogyakarta, Indonesia. Determination of maltase inhibitory activity of Indonesian herbs was done *in vitro*. Enzymatic assay is used to evaluate their activity to inhibit maltose hydrolysis by rat intestinal glucosidase prepared from rat intestinal acetone powder.

【Results】In this part, we purified the remained active fractions of methanol extract of *Pluchea indica* using HPLC in water-methanol system. Based on the NMR and mass spectrum data, it yielded to 3,4,5-tri-*O*-caffeoylquinic acid (**4**) in addition to **1**-**3**. Further isolation of active principles and evaluation of their inhibitory activity against maltase are in progress.





1: R=Me, R_1=R_3=H, 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester
2: R=Me, R_1=H, R_3= caffeoyl, 3,4,5-tri-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester
3: R=H, R_1=R_3= caffeoyl, 1,3,4,5-tri-*O*-caffeoylquinic acid
4: R=R_1= H, R_3= caffeoyl, 3,4,5-tri-*O*-caffeoylquinic acid

Diabetes mellitus, intestinal maltase inhibitor, *Pluchea indica*

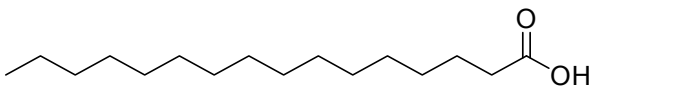
講演番号：3C20a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ C 校舎 20 会場

東南アジア産植物中からの膵リパーゼ阻害成分の探索
Search of the pancreatic lipase inhibitory principle from Southeast Asian plant
○中込 亮、グナワンプテリ マリアデウィピーティー、加藤 英介、川端 潤 (北大院農)
○RYO NAKAGOMI,Maria Dewi P.T. Gunawan Puteri,Eisuke Kato,Jun Kawabata (Hokkaidou Univ.)

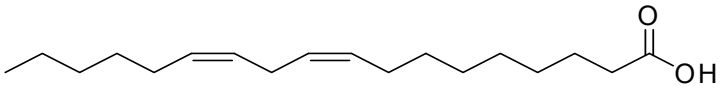
【目的】食物中の脂質の主成分であるトリグリセリドは、膵リパーゼによって遊離脂肪酸とモノアシルグリセロールへと水解され、小腸で吸収される。このため、膵リパーゼ阻害成分は脂質吸収を抑えることにより、肥満予防に効果的である。我々は今回東南アジア産の植物のスクリーニングを行い、高いリパーゼ阻害活性を示した植物のうち*Coleus scutellaroides*葉と*Lagerstroemia speciosa*葉より阻害成分の探索を行った。

【方法】各植物を50%メタノールに浸漬し、得られた抽出物を50%DMSO溶液に溶解してサンプルとした。酵素源にブタ膵臓リパーゼ、基質に4-Methylumbelliferyl oleate(4MUO)を用い、反応によって生成した4-Methylumbelliferoneの蛍光を経時的に測定することでリパーゼ阻害活性を評価した。

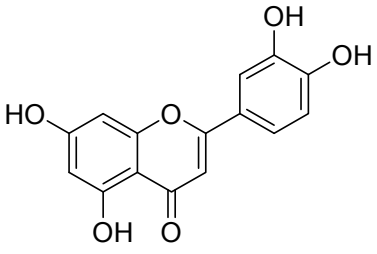
【結果】東南アジア産のシソ科の植物*Coleus scutellaroides*の乾燥葉(40 g)の50%メタノール抽出物を水と酢酸エチルで分配したところ、阻害活性は酢酸エチル可溶部に移行した。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより繰り返し分離することで、リパーゼ阻害活性を示す画分を2つ得た。このうち一つの画分は構造解析の結果palmitic acid(**1**)とlinoleic acid(**2**)の混合物と決定した。もう一つの画分は構造解析の結果luteolin(**3**)と決定した。
東南アジア産のミソハギ科の植物*Lagerstroemia speciosa*乾燥葉(80 g)の50%メタノール抽出物を水とヘキサン、酢酸エチルで分配したところ、阻害活性は酢酸エチル可溶部に移行した。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより繰り返し分離することで、リパーゼ阻害活性を示す画分を6つ得た。現在これらの画分から活性に寄与する物質を単離、構造決定を行っている。



(**1**)



(**2**)



(**3**)

Lipase inhibitor, pancreatic lipase, metabolic syndrome

講演番号：3C20a15
講演日時、会場：3 月 26 日 11:48～ C 校舎 20 会場

植物疫病菌 *Phytophthora* 無性生殖の阻害物質の探索
Search for inhibitors of *Phytophthora* asexual reproduction
○岩井 里佳、ゴビンダム スダカル、小鹿 一（名大院生命農）
○Rika IWAI,Sudhakar V. S. GOVINDAM,Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

【目的】植物疫病菌（*Phytophthora*）は植物、特に主要農作物に感染し甚大な被害を与える。植物疫病菌は無性生殖と有性生殖の両方で繁殖できるが、通常は無性生殖を営んでおり、条件が整うと無性生殖器である遊走子嚢（Fig. 1）を形成する。遊走子嚢は多数の遊泳性の遊走子を土壌･水中に放出することで急速に感染を拡大させ、植物の葉や果実に病状を引き起こす。このため、遊走子嚢の抑制は農作物の防除に重要である。しかし、遊走子嚢形成阻害物質の報告は少なく、その開発は農薬のシードとして期待される。

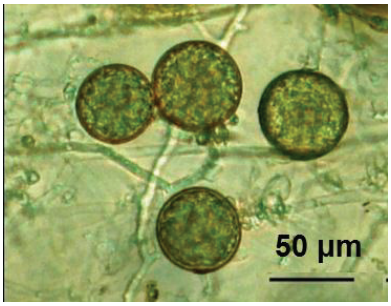


Fig. 1 遊走子嚢

V8野菜ジュースは植物疫病菌を培養する際、培地として一般的に使用されており、遊走子嚢形成促進作用を有するが、促進活性物質を探索する過程で、阻害物質が含まれている事が示唆された。本研究では遊走子嚢形成阻害活性検定法の確立と阻害物質の単離・同定を行うことを目的としている。

【方法・結果】 阻害活性は次のような検定方法を用いて評価した。遊走子嚢を効率よく形成する菌株として *P. capsici* NBRC 30696を検定菌として選定した。サンプルはDMSOと界面活性剤により培地中に拡散させ寒天プレートを作成し、疫病菌を植菌・培養後、顕微鏡下で遊走子嚢数を計測し活性評価を行った。培地としてV8-sucrose培地、PS培地(Potato extract-sucrose)、 V8-PS培地などを試した結果、3%V8-1%S培地が阻害活性を評価するのに適切であることがわかった。阻害活性の成分の分離は以下のように行った。V8野菜ジュースを40%メタノールで抽出後、濾過し、ろ液を濃縮した。得られた水溶液をODSオープンカラムで分離したところ、V8ジュース換算0.25 ml/培地 mlで80%の阻害効果を示す画分を得た。この画分をシリカゲルフラシュカラムクロマトグラフィーにより分離した結果、V8ジュース換算0.5 ml/培地 mlで50%の阻害効果を示す画分を得た。さらに、この画分をHPLCを用いて分画し、V8ジュース換算1.0 ml/培地 mlで90%の阻害効果を示す画分を得た。現在、この画分をさらにHPLCにより分離し、各画分の阻害活性を試験中である。

Phytophthora, zoosporangia, asexual reproduction

講演番号：3C20p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ C 校舎 20 会場

石サンゴ *Montipora digitata* 由来 montiporic acid D の構造決定
Structure determination of montiporic acid D isolated from *Montipora digitata*
○小谷 真也[1]、佐藤 神奈[2]、カサレト ベアトリス[1]、鈴木 款[1] ([1]静岡大院創造、[2]静岡大院農)
○Shinya Kodani[1], Kanna Sato[2], Beatriz Casareto[1], Yoshimi Suzuki[1] ([1]Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ.)

【目的】近年、世界各地の海でサンゴの白化現象が観察され問題となっており、白化現象の一因として、サンゴの病原菌が注目されている。これまで、サンゴの病原菌に対する抵抗性に関する研究例が少なく、研究が求められている。今回沖縄瀬底島周辺において石サンゴを中心に採集を行い、サンゴ組織に含まれる抗菌物質についての調査を行った。
【方法】2011 年 9 月に沖縄瀬底島周辺において沖縄県の許可のもと、石サンゴを中心にサンゴ組織の採集を行った。得られたサンゴ組織から MeOH によって抗菌物質を抽出し、代表的ないくつかの病原菌に対して抗菌活性試験を行ったところ、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* に対して高確率で抗菌活性が見られた。その中で石サンゴ *Montipora digitata* の抽出物に顕著な抗菌活性が見られたため、逆相クロマトグラフィーおよび HPLC による抗菌物質の単離を行った。
【結果】ODS を用いた HPLC 分取によって得られた抗菌物質に関して NMR および MS スペクトルを用いた構造決定を行ったところ、既知化合物の montiporic acid A および C (*Z*)-13,15-hexadecadiene-2,4-diyn-1-ol と共に新規ポリアセチレンカルボン酸の montiporic acid D を見出した。この成分はポジティブイオンモードの HR-ESI-MS 測定で m/z 311.1623 にイオンピークを与えた。組成式は $C_{18}H_{24}O_3Na$ と推定され、montiporic acid D は分子式 $C_{18}H_{24}O_3$ であると示唆された。さらに化学構造を決定するために、重アセトン中での各種 NMR スペクトラムの測定を行い、構造決定を試みた。COSY、TOCSY、HMBC、HMQC の二次元 NMR スペクトラムを測定し構造を決定した。montiporic acid A および C は 10 μg/disk の添加で枯草菌および黄色ブドウ球菌に顕著な抗菌活性を示した。一方(Z)-13,15-hexadecadiene-2,4-diyn-1-ol と共に新規ポリアセチレンカルボン酸の montiporic acid D は 250 μg/disk の添加で枯草菌および黄色ブドウ球菌に同等の抗菌活性を示した。

coral, montiporic acid, NMR

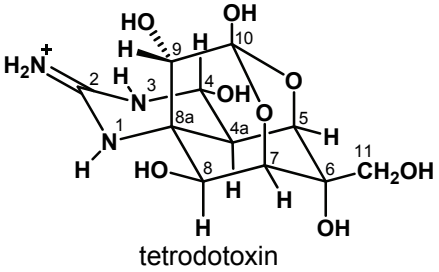
講演番号：3C20p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ C 校舎 20 会場

新規テトロドトキシン類縁体 6-デオキシテトロドトキシンの単離・構造決定

Isolation and structural determination of the novel tetrodotoxin analog, 6-deoxytetrodotoxin

○工藤 雄大、此木 敬一、長 由扶子、山下 まり（東北大院農）
○Yuta Kudo,Keiichi Konoki,Yuko Cho,Mari Yotsu-Yamashita (Tohoku Univ.)

[背景・目的] テトロドトキシン (TTX)は電位依存性ナトリウムチャネルを特異的に阻害する強力な神経毒である。我々は TTX 生合成経路の手がかりを得るため、新規 TTX 類縁体の探索を行ってきた [1)]。今回、海洋生物を対象に探索を行ったところ、ヒガンフグ (*Fugu pardalis*)卵巣より新規 TTX 類縁体と推定される化合物が検出されたため、本化合物の単離・構造決定を試みた。



tetrodotoxin

[方法] *F. pardalis* 卵巣 (250 g)を 0.2 M 酢酸で加熱抽出し、活性炭カラムで粗精製した。粗精製物を HILIC-ESI-Q-TOF-MS を用いて精査し、微量成分として$[M+H]^+$ *m/z* 304 の未知化合物 (**1**)を検出した。**1** は MS/MS 解析において、TTX 類縁体に特徴的なフラグメントイオンを生成したため、新規 TTX 類縁体であると推定された。次いで、**1** を弱酸性陽イオン交換カラム Bio-Rex 70 (Bio-Rad)、HITACHI GEL #3011-C、HITACHI GEL #3013-C などで精製し、高純度の **1** を約 40 μg 得た。得られた **1** を ^{1}H NMR, COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY 1D に供して構造解析した。

[結果・考察] 高分解能 ESI-Q-TOF-MS より、$[M+H]^+$ *m/z* 304.1138 (calcd. for $C_{11}H_{18}O_7N_3$ 304.1139, Δ 0.1 mDa)が示され、TTX の monodeoxy 体であることが示唆された。**1** と TTX の各種 2D NMR データを比較した際、**1** では COSY で H5/H6 の相関が示され、H6 と思われるシグナルが存在し、更に **1** では C6 の高磁場シフト (28.1 ppm)、H4a, H8 の高磁場シフト (0.44 ppm, 0.23 ppm)が示された。このことから、**1** は TTX の 6 位水酸基が還元された 6-deoxyTTX であることが示唆された。更に、NOESY 1D で H4a/H6 間, H6/H8 間の NOE が観測されたことなどから、6 位の立体化学は TTX と同じと考えられ、**1** を 6-deoxyTTX と決定した。我々は、5,6,11-trideoxyTTX などの TTX の各 deoxy 体が海洋生物中に広く分布することから、TTX が段階的な酸化を経て生産されると考えている。**1** もこの推定酸化経路を支持しており、**1** が TTX の前駆体である可能性が考えられた。また、これまで我々が報告した 11-deoxyTTX [2)]、及び 6,11-dideoxyTTX [3)]に電位依存性ナトリウムチャネル阻害活性があることから、**1** も活性を保持することが予想された。現在、培養細胞を用いて生理活性試験を行っており、併せて報告する。

[Reference] 1. Y. Kudo, T. Yasumoto, K. Konoki, Y. Cho, M. Yotsu-Yamashita, *Mar. Drugs,* **2012**, *10*, 655-667.

2. T. Yasumoto, M. Yotsu, M. Murata, *J. Am. Chem. Soc.,* **1988**, *110*, 2344-2345.

3. J.H. Jang, M. Yotsu-Yamashita, *Toxicon*, **2007**, *50*, 947-951.

tetrodotoxin, puffer fish, structural determination

講演番号：3C20p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ C 校舎 20 会場

サキシマベニコケガ（*Barsine expressa*,ヒトリガ科コケガ亜科）が分泌する新規性フェロモンの同定

Identification of a novel sex pheromone produced by the lichen moth, *Barsine expressa* (Arctiidae:Lithosiinae)

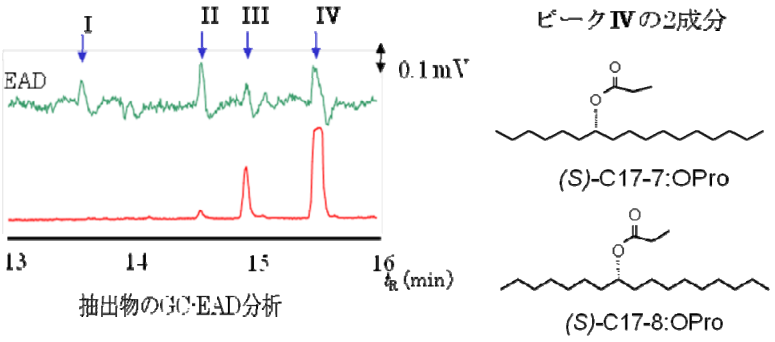
○藤井 透[1]、山川 玲[1]、寺嶋 芳江[2]、井村 信弥[2]、石垣 圭一[2]、金城 政勝[2]、安藤 哲[1]([1]東農工大院 BASE、[2]琉球大農)
○TORU FUJII[1], REI YAMAKAWA[1], YOSHIE TERASHIMA[2], SHINYA IMURA[2], KEIICHI ISHIGAKI[2], MASAKASTU KINJO[2], TESTU ANDO[1] ([1]Noko Univ., [2]Ryukyu Univ.)

【目的】 ヒトリガ科昆虫の多くはタイプⅡの性フェロモン（直鎖不飽和炭化水素とそのエポキシ化物）を分泌するが、沖縄県西表島に生息するヒトリガ科コケガ亜科の１種（*Lyclene dharma*）から新規なメチル分岐を有するケトン類が同定された。種分化を考える上で近縁種の交信システムは興味深く、今回、サキシマベニコケガ（*Barsine expressa*）を西表島にてライトトラップで捕獲し、性フェロモンの構造決定を行うこととした。

【方法と結果】 雌成虫から得られたフェロモン腺抽出物の GC-EAD 分析では、4つの EAG 活性成分（Ⅰ～Ⅳ）が認められ、GC-MS 分析の結果からケトン類は存在せず、直鎖 2 級アルコールのプロピオネート（Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ）やアセテート（Ⅲ）というように、これまで蛾類性フェロモンとしては知られていない構造であることが判明した。最終的に、加水分解等の反応物のマススペクトル解析から、主成分Ⅳは単一の化合物でなく直鎖炭素数 17 の2つの位置異性体 7-propioxyheptadecane（17:7-OPr）と 8-propioxyheptadecane（17:8-OPr）の約 1:1 の混合物であることが、またⅢはそれらに対応するアセテート、ⅠとⅡの直鎖は炭素数 15 と 16 であることが示され、雌成虫はメチル分岐を含まない多数の2級アルコールのエステル類を分泌していることがわかった。一方、ラセミ体を用いた野外試験で、雄蛾の誘引には 17:7-OPr と 17:8-OPr が不可欠であることが明らかになった。

次に、それらの立体化学を推定するため、Jacobsen 速度論的光学分割反応を利用してキラル合成をおこなった。合成化合物の光学純度を直接分析することはできなかったが、合成中間体の末端エポキシ化合物はキラル HPLC 分析で ee 98%以上であることから、同様に高い純度であることが考えられる。それら光学活性体を用いて野外試験をおこなったところ、共に(*S*)-体である 17:7-OPr と 17:8-OPr の組み合わせのみが誘引活性を示した。

さらに誘引試験を東京都八王子市にて行ったところ、同属の *B. aberrans* が、同じく(*S*)-体混合物へ特異的に誘引されることが明らかになった。最近、本学のキャンパスで採集したコケガ（*Miltochrista calamina*）からは分岐した2級アルコールが同定され、コケガ亜科では属ごとに構造の異なる化合物群を性フェロモンとしていることが考えられ、分類学的にも注目される結果を得ることができた。



抽出物のGC-EAD分析

sex pheromone, Lepidoptera, Arctiidae

講演番号：3C20p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ C 校舎 20 会場

ミッドカイン (MK) を指標とした抗腫瘍活性スクリーニング ～海洋天然物ライブラリを用いて～
Screening of a natural resource library for antitumor activities using midkine as an indicator

○祖納元 りえ[1]、山城 知佳[2]、坪田 庄真[3]、藤原 健史[4]、石見 盛太[4]、金本 昭彦[4]、高石 花蓮[5]、池松 真也[1] ([1]沖縄高専生物資源、[2]京都大院医、[3]名古屋大院医、[4]OP バイオファクトリー株式会社、[5]神戸大理)
○Rie Sonamoto[1], Chika Yamashiro[2], Shoma Tsubota[3], Takashi Fujiwara[4], Morita Iwami[4], Akihiko Kanamoto[4], Karen Takaishi[5], Shinya Ikematsu[1] ([1]ONCT, [2]Kyoto Univ., [3]Nagoya Univ., [4]OP Bio Factory Co., ltd., [5]Kobe Univ.)

【序論】本研究で指標とするミッドカイン（Midkine：MK） は，ヘパリン結合性の分泌タンパク質である．MK は多くの癌で広く発現しており，癌の発生・進展に関与し，生存・移動も促進していると考えられている．小児癌である神経芽腫の既知予後因子（MYCN の増幅，TrkA の低発現，染色体偶数倍体増加，ステージ上昇，年齢 1 歳以上）と MK の発現量は正の相関が見られ，腫瘍マーカーとしての用途が期待されている．MK はアポトーシスを抑制し，また，大腸癌において MK のノックダウンにより腫瘍の縮小が確認されていることから，MK タンパク質分泌量の抑制は抗腫瘍作用に繋がると考えた.

【目的】沖縄近海で採取される海洋資源 700 種類のライブラリ成分中に含まれる MK タンパク質分泌抑制（抗腫瘍活性）成分の探索と特定を目的とした.

【方法】本スクリーニングでは MK タンパク質を特に多く分泌している癌のひとつである神経芽腫の株化細胞（SK-N-SH 細胞）を使用した．神経芽腫株化細胞が分泌する MK タンパク質分泌量を指標に 2 段階のスクリーニングを行った．1 次スクリーニングでは，MK タンパク質分泌抑制効果のみに着目するために MK タンパク質分泌量のみを指標にし，MK-ELISA によって測定した．2 次スクリーニングでは，MK タンパク質分泌量と細胞活性との関係を明確にできるよう細胞増殖能力も併せて確認した．MK タンパク質分泌抑制効果があると判断した判定基準は，「細胞活性が著しく低下していないにも関わらず MK タンパク質分泌量が低下していること」とした.MK タンパク質分泌抑制ライブラリ特定後，発現レベルでの機作検討のため Real-Time PCR を用いて MK mRNA の発現解析を行った.

【結果】1 次と 2 次のスクリーニングの結果，MK タンパク質分泌抑制効果を示したライブラリは，700 種類中 9 種類であった．そのうち 2 種類を高分子と低分子に分画し，MK タンパク質分泌量と MK mRNA 発現量を確認した結果，抗腫瘍活性成分を含む可能性のあるライブラリを 1 つ見つけ出すことができた.

【考察】本スクリーニングで抗腫瘍活性成分を含む可能性のあるライブラリ成分は，高分子画分と低分子画分に含有されるものが協調して作用する可能性が示唆された.

【展望】今後，特定した抗腫瘍活性成分を含む可能性のあるライブラリを，他の神経芽腫株化細胞での抗腫瘍活性と比較する．つまり，神経芽腫の中でも MYCN が増幅している細胞と MYCN の増幅が認められない細胞を用いて，当該ライブラリの結果を比較していく.

Midkine (MK), antitumor, screening of a natural resource

講演番号：3C20p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ C 校舎 20 会場

アコヤガイ靭帯部に存在する低分子ペプチド（LICP）の構造・機能解析

Structural and functional analyses of a peptide (LICP) in the hinge ligament of *Pinctada fucata*.

○鈴木 道生、長澤 寛道（東大院農）
○Michio Suzuki,Hiromichi Nagasawa (Univ. Tokyo)

【目的】貝殻は軟体動物が作る炭酸カルシウムを主成分とするバイオミネラルである。バイオミネラルには無機物だけでなく少量の有機基質が含まれ、この少量の有機基質がバイオミネラリゼーションに重要な役割を果たすことが示唆されてきた。これまで、貝殻からは様々な有機基質が単離・同定され、それらの機能が推測されてきたが、炭酸カルシウムの形態や欠陥の制御などに関与する有機基質については明らかになっていない。本研究では特に炭酸カルシウムのアラゴナイト結晶において高頻度に見られる{110}双晶に着目し、その形成メカニズムを解明することを目的とした。

二枚貝貝殻の蝶番部分に存在する靭帯は、繊維状のアラゴナイト結晶を含み、各々の繊維の中央部に、伸長方向に平行に配置された 1 つもしくは 2 つの{110}双晶面を含むことが知られている。このように貝類の殻においては{110}双晶面の密度および配置が、何らかの作用により厳密に制御されている可能性が考えられた。そこで、アコヤガイの靭帯を用いて、{110}双晶面の密度および結晶形態を制御する有機基質を明らかにすることを目標とした。

【方法】アコヤガイの靭帯部を採取し、6%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で処理し、結晶間の有機基質を除去した。その後、1 M の酢酸で脱灰し、結晶の内部に存在する有機基質を抽出した。この脱灰後の有機基質抽出液を逆相 HPLC で分離し、靭帯のアラゴナイト結晶の内部に局在すると思われるペプチドの精製を行った。MALDI-TOF-MS を用いて分子量を、プロテインシーケンサを用いて配列を決定した。また、このペプチドを用いて炭酸カルシウムの結晶形成に与える影響の解析を行った。

【結果】逆相 HPLC による精製の結果、靭帯部のアラゴナイト結晶の内部に存在すると思われる分子量 1210 の低分子ペプチドを精製することができた。プロテインシーケンサを用いてこの低分子ペプチドの配列を決定したところ、10 アミノ酸から成る酸性のペプチドであることが判明した。この配列は新規のものであったことから LICP (ligament intracrystalline peptide) と命名した。この配列を元にアコヤガイゲノムデータベースより cDNA 配列の探索を試みたが、登録されている遺伝子の配列からは検索されず、ゲノム配列内に部分配列が存在するだけであった。そこで、その配列を元に RT-PCR および RACE 法を用いて全 cDNA 配列の決定を行った。また、LICP を化学合成し、炭酸カルシウム結晶形成実験を行ったところ、通常よりも非常に小さい不定形のカルサイト結晶が多数形成された。これは LICP がカルサイトの{104}面以外の面に吸着し、結晶成長を阻害したことで形成されたと考えられた。以上の結果から LICP は靭帯の石灰化に何らかの作用を持つと予想される。

aragonite, ligament, pearl oyster

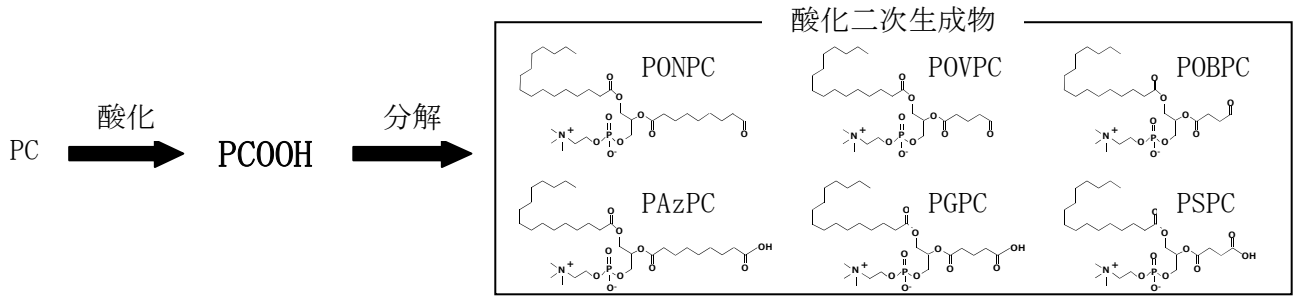
講演番号：3C20p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ C 校舎 20 会場

ヒト血漿に存在するリン脂質酸化二次生成物の LC-MS/MS 分析

LC-MS/MS analysis of oxidized phosphatidylcholine in human plasma

○澤根 健人、加藤 俊治、仲川 清隆、宮澤 陽夫（東北大院農・機能分子解析）
○Kento Sawane,Shunji Kato,Kiyotaka Nakagawa,Teruo Miyazawa (Grad. Sch. Agr. Sci. Tohoku Univ.)

【背景】生体膜脂質過酸化反応の動脈硬化症、認知症、細胞老化への関係が従来から示唆されている。当研究室では生体膜脂質の過酸化物であるホスファチジルコリンヒドロペルオキシド（PCOOH）の分析法を開発し、疾病や細胞老化への PCOOH の関与を検証してきた。とくに PCOOH の sn-2 位には、リノール酸、アラキドン酸、DHA 由来のヒドロペルオキシドが多く存在する。一方、培養細胞実験では、PCOOH 由来の酸化二次生成物（PONPC, PAzPC, POVPC, PGPC, POBPC, PSPC など 図）による動脈硬化促進作用が報告されているが、これら酸化二次生成物の実際の生体内濃度は全く不明である。本研究では、①リン脂質酸化二次生成物の分子種特異的な検出が可能な MS/MS MRM ペアを見出し、②LC-MS/MS 分析時のイオンサプレッションを回避できる分析条件を構築し、③健常者血漿中の酸化二次生成物濃度を明らかにし、PCOOH 濃度と比較しようとした。
【方法と結果】①標品（PONPC, PAzPC, POVPC, PGPC, POBPC, PSPC）をそれぞれ 5 mmol/L 酢酸アンモニウムを含むメタノールに溶解し、MS/MS（ネガティブモード）に供し、カルボキシル基を有する PAzPC, PGPC, PSPC では親イオン[M-H]-を、アルデヒド基を持つ PONPC, POVPC, POBPC では酢酸イオンとメタノールが付加した特徴的なイオンを、それぞれ見出した。これらのイオンを用いて LC-MS/MS の MRM モードで血漿抽出物を分析し、6 種の酸化二次生成物の高選択的検出に成功した。②抽出法と HPLC 条件を最適化し、血漿抽出物中の夾雑物による MS/MS イオンサプレッションを回避した。これらの手法により、血漿からの酸化二次生成物の添加回収試験では一定の回収率（70%以上）が得られた。③健常者血漿の酸化二次生成物は、いずれも 1～20 nmol/L 程度の濃度で存在することが確認された。なお、健常者血漿の酸化一次生成物である PCOOH 濃度は 250 nmol/L 程度であった。ヒト血漿中での PCOOH 濃度と酸化二次生成物濃度の間には、とくに相関が認められなかった。生体内酸化ストレスを評価するには、血漿 PCOOH 値が有効であると考えられた。



phospholipid, lc-ms/ms, oxidation

講演番号：3C20p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ C 校舎 20 会場

LC-MS/MS によるヒト血中 PCOOH の精密定量分析
LC-MS/MS determination of phosphatidylcholine hydroperoxide in human plasma
○加藤 俊治[1]、仲川 清隆[1]、浅井 明[2]、及川 眞一[2]、宮澤 陽夫[1] ([1]東北大院農・機能分子解析、[2]日医大・内分泌代謝)
○Shunji Kato[1], Kiyotaka Nakagawa[1], Akira Asai[2], Shinichi Oikawa[2], Teruo Miyazawa[1] ([1]Grad. Sch. Agr. Sci. Tohoku Univ., [2]Nippon Med. Sch.)

【目的】リポタンパク（LDL）の主要構成脂質であるホスファチジルコリン（PC）は種々の酸化ストレスにより酸化一次生成物であるホスファチジルコリンヒドロペルオキシド（PCOOH）を生成する。当研究室では、生体の酸化ストレスを評価するため、この PCOOH を高感度かつ選択的に分析できる CL-HPLC 法を開発する [1)] とともに、PCOOH の構造情報に基づく分子種解析が可能な LC-MS/MS 法を構築した。そこで、これら両分析法を併用して、生体内の膜リン脂質の過酸化と心血管疾患の関係解明を進めてきた。例えば、動脈硬化症では、心臓の左前下行枝（狭窄の頻度が最も高い冠動脈）に狭窄ができはじめると、血中の PCOOH 濃度が顕著に高まることから、動脈硬化の初期病変形成に関与する PCOOH の重要性が新たに解明されつつある。しかし、LC-MS/MS 法による PCOOH 定量は幾つかの要因に左右される。本研究では、血漿 PCOOH の定量性に深く関わる要因として、1. 標品純度 [2)]、2. PCOOH に特異的な MS/MS MRM 検出、3. アルカリ金属の影響回避、4. 血漿からの PCOOH 回収率、5. MS/MS イオンサプレッション回避による定量性の担保について検討し、LC-MS/MS によるヒト血漿 PCOOH の精密定量を可能にした。
【方法と結果】1. 2-メトキシプロペンを用いて、2 位にリノール酸ヒドロペルオキシドを有する高純度 PCOOH（＞95%）を調製し、PCOOH の精密定量の標品に使用した。2. MS/MS では親イオンに PCOOH の Na イオン付加体を用い、PCOOH に高選択的な MRM を組み込んだ。また 3. MRM に合わせた新しい HPLC 条件を構築し、安定した PCOOH の検出を可能とした。4. PCOOH の添加回収試験では、PCOOH の分解の原因がメタノールなどの抽出溶媒の組成にあることが明らかになったので、その分解を回避できる抽出法を検討し、クロロホルム-メタノール溶媒で高い回収率（87.1%）が得られることがわかった。5. これらの分析・抽出法を組み合わせたところ、イオンサプレッションは完全に回避できており、血中 PCOOH をより正確に定量することが可能となった。種々の臨床サンプルの分析を行ったところ、動脈硬化性疾患発症リスクの高い（脂質異常症）患者の血中 PCOOH は健常者に比べ、平均して 5～7 倍に高値であることを確認した。

1) Miyazawa T., Free Radical Biol. Med., 7, 209-217, (1989)
2) Ibusuki D., et al., J. Lipid Res., 49, 2668-2677, (2008)

LC-MS/MS, PCOOH, Atherosclerosis

講演番号：3C20p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ C 校舎 20 会場

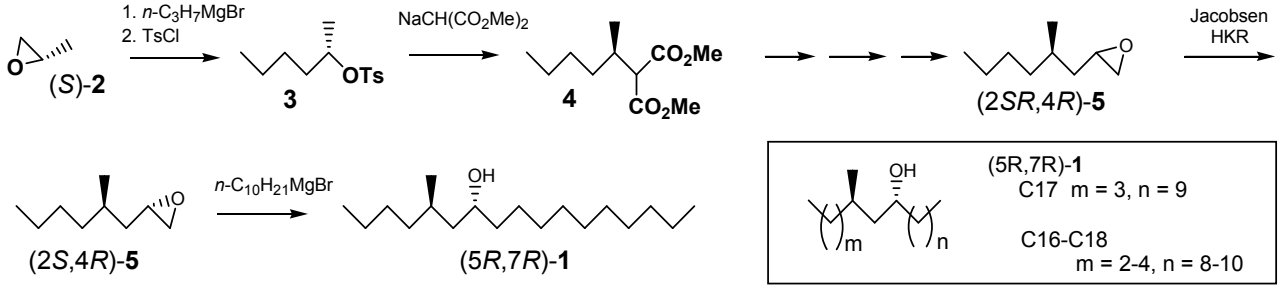
ハガタキコケガ性フェロモンとその関連化合物の不斉合成および野外誘引試験

Asymmetric synthesis and field evaluation of the sex pheromone of *Miltochrista calamina* and its related compounds

○村木 優太、田栗 知憲、山川 玲、山本 雅信、安藤 哲（農工大院・BASE）
○Yuta Muraki,Tomonori Taguri,Rei Yamakawa,Masanobu Yamamoto,Tetsu Ando (TUAT BASE)

【目的】　ハガタキコケガ(ヒトリガ科：コケガ亜科)の雌成虫は、性フェロモン成分として新規なメチル分岐を有する２級アルコール 5-methylheptadecan-7-ol（**1**）を分泌する。４つの立体異性体の誘引活性から天然フェロモンは(5*R*,7*R*)-体であることを推定したが、それらは１つの不斉中心のみを立体選択的に導入し、得られたジアステレオマーを HPLC で分離する方法で調製したものであった。そこで今回、新たに完全な不斉合成の方法を確立するとともに、直鎖炭素数の異なる幾つかの類縁化合物も合成し、野外試験にて雄蛾の分岐位置の認識能力に関する知見を得ることとした。

【方法と結果】　(*S*)-propylene oxide（(*S*)-**2**）から得られるキラルな二級アルコールのトシル化物（**3**）に、立体反転を伴う $NaCH(CO_2Me)_2$ の S_N2 反応を行った。得られたジエステル（**4**）を一連の反応（脱炭酸、還元、酸化、Corey-Chaykovsky 反応）で１炭素伸長したエポキシ化合物（**5**）に導き、Jacobsen 速度論的光学分割を利用して(2*S*,4*R*)-体のみとし、その後に必要なアルキル鎖をカップリングすることで単一なエナンチオマー(5*R*,7*R*)-**1** を得た。同様にして、(*R*)-**2** から(5*S*,7*S*)-**1** を合成し、順相キラル HPLC で各光学純度を測定したところ、どちらも高いエナンチオマー過剰率（>99 % ee）を有していた。



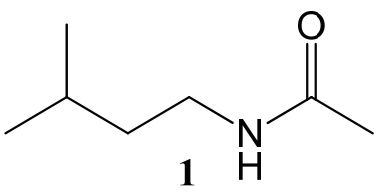
次に、Grignard 試薬を適宜替えることで、不斉中心に結合している左右の直鎖の炭素数を増減させた 6 つの化合物を不斉合成した。合成した性フェロモンとこれら類縁化合物を用いて野外試験を実施したところ、5 つの類縁化合物においても有意に雄蛾を誘引し、5-methylhexadecan-7-ol (m=3, n=8) では **1** と同様な活性であった。2-ケトンを性フェロモンとしている近縁なヒメホシキコケガではメチル基の位置を厳密に識別しており、本種での実験結果とはかなり異なる。メチル分岐を持つ蛾類性フェロモンは外にも数多く知られているが、分子構造の違いを雄蛾がどの程度正確に認識しているかはあまり知られておらず、多種での追究が求められる今後の興味深い課題と思われる。

asymmetric synthesis, sex pheromone, field evaluation

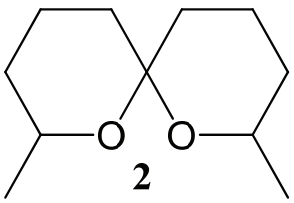
講演番号：3C20p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ C 校舎 20 会場

ウマノスズクサ花香成分のクロコバエ類に対する誘引活性
Attractants of milichiid flies in floral volatiles of a pipevine, *Aristolochia debilis*
○大野 慧[1]、酒井 圭一[1]、小野 肇[1]、吉永 直子[1]、森 直樹[1]、岩佐 光啓[2]、西田 律夫[1] ([1]京都大院農、[2]帯広畜産大畜産生命科学)
○ Satoshi OHNO[1], Keiichi SAKAI[1], Hajime ONO[1], Naoko YOSHINAGA[1], Naoki MORI[1], Mitsuhiro IWASA[2], Ritsuo NISHIDA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Obihiro Univ. of Agriculture and Veterinary Medicine)

【目的】ウマノスズクサ *Aristolochia debilis* の花はラッパ状の開口部と球状の柱頭室によって構成される．開花後の花は何らかの方法によりハエ類を花の内部に誘引し，柱頭室に閉じ込める．花は開花時においては雌性であるが，翌日には雄性に変化し花粉を放出，ハエ虫体に花粉を付着させた後に解放する．ハエが別の雌性花で同じように閉じ込められることで受粉が行われると推定される．これまでに同花が複数種のクロコバエ科 Milichiidae を特異的に誘引することを見出し，SPME を用いた花香分析により脂肪族アミド，スピロアセタールなど数種の揮発性物質を検出した．これら花香成分の同定と送粉者に対する誘引効果を調べることを目的として一連の化合物を合成した．
【方法】ウマノスズクサ花香の主成分としてアミドとスピロアセタール類を合成し，粘着トラップによる誘引試験を実施した（2012 年 7～9 月）．
【結果】花香の主成分 *N*-(3-methylbutyl)acetamide（**1**）を合成により確認した．TBS 基で保護した 4-pentyn-2-ol 2 分子をリチウムアセチリドとしてギ酸エチル 1 分子に作用させ，水素添加，クロム酸による酸化，酢酸による脱保護と脱水縮合を経て 2,8-dimethyl-1,7-dioxaspiro[5.5]undecane（**2**）を合成した（全収率 18%）．粗生成物には 2 種類のジアステレオマー (*E*,*E*) 体と (*E*,*Z*) 体がほぼ等量含まれていたことから，これをシリカゲルクロマトグラフィーで分離した．GC-MS 分析の結果，両異性体はいずれも花に含まれる成分と一致した．これらの化合物を山口県熊毛郡および京都大学構内 (京都市左京区) において誘引試験した結果，クロコバエ類 *Desmometopa sordida*, *D. microps*, *D. varipalpis* および *Neophyllomyza* sp. が多数捕獲された．これら 4 種はいずれもウマノスズクサに誘引されるハエ相と一致した．また，ジアステレオマーは 2 種類ともに強力な誘引活性を示し，活性に有意差はなかった．一方，アミド（**1**）単独での活性は微弱であったが，スピロアセタール（**2**）を併用すると捕獲数は相乗的に増加した．



1



2

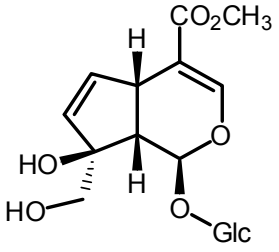
Aristolochia debilis, *Milichiidae*, spiroacetals

講演番号：3C20p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ C 校舎 20 会場

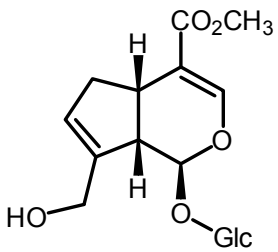
植食性昆虫の食害に対するクチナシの化学的防御機構
Anti-herbivory chemical defense in *Gardenia jasminoides*
○内藤 裕彬、網干 貴子、吉永 直子、小野 肇、西田 律夫、森 直樹（京大院農）
○Hiroaki NAITO, Takako ABOSHI, Naoko YOSHINAGA, Hajime ONO, Ritsuo NISHIDA, Naoki MORI (Kyoto Univ.)

【目的】アカネ科クチナシ属の常緑低木クチナシ (*Gardenia jasminoides*) の葉を広食性の鱗翅目ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) 幼虫に摂食させると、成育阻害効果が見られた。ところが、加熱したクチナシ葉を摂食させるとハスモンヨトウは成長した。したがって、成育阻害活性の発現には熱に不安定な化合物の関与、もしくは酵素などのタンパク質の関与が示唆された。本研究では、ハスモンヨトウを用いて、植食性昆虫による食害に対するクチナシの防御機構の解明を試みた。

【方法と結果】クチナシ葉をメタノールで抽出後、ODS カラムクロマトグラフィーを用いて精製し、イリドイド配糖体の gardenoside [1] とgeniposide [2] を同定した。特に [1] は生葉重量に対し 3% 程度と多量に含まれていた。イリドイドはモノテルペンの一種でその多くが生理活性を持ち、中には昆虫に対して成育阻害効果を持つ物質も知られている。そこで本研究では [1] に着目し、生葉あるいは加熱葉を摂食させた幼虫の糞に含まれる [1] 量を LC/MS で比較した。その結果、前者では [1] が 1/10 以下に減少していた。したがって、生葉を摂食したハスモンヨトウの腸管内では、[1] は遊離したアグリコンの形で存在していると考えた。そこで次に、[1] と [1] を β-glucosidase で処理したものをそれぞれ人工飼料に添加しハスモンヨトウに摂食させると、後者を摂食させた場合に明確な成育阻害が認められた。以上の結果から、クチナシ葉が食害を受けると葉中の β-glucosidase などの働きで [1] からアグリコンが遊離し、このアグリコンがハスモンヨトウ腸管内で成育阻害を引き起こしていると示唆された。



Gardenoside [1]



Geniposide [2]

Gardenia jasminoides, iridoid, chemical defense

講演番号：3C20p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ C 校舎 20 会場

ヤマトシロアリ（*Reticulitermes speratus*）兵隊アリに新規に見出された抗酸化物質

Newly discovered antioxidant in termite soldier.

○田崎 英祐、仁田尾 優、赤壁 義彦、松井 健二、井内 良仁（山口大農）
○ Eisuke TASAKI,Masaru NITAO,Yoshihiko AKAKABE,Kenji MATSUI,Yoshihito IUCHI (Yamaguchi Univ.)

酸素呼吸を行う生物の体内では日常的に活性酸素種（ROS）が発生しており、過剰な ROS は酸化ストレスとなって老化や疾患及び寿命短縮の原因になると考えられている。社会性昆虫であるシロアリは一般の昆虫と比べて極端に長い寿命を持っており、現在この寿命の差を酸化ストレスに対する防御システムに注目し比較検討している。その過程で、ヤマトシロアリのソルジャー（兵隊アリ）の可溶性抽出液が、他の昆虫より顕著に高いフリーラジカル消去能を有することを見いだした。このような報告は今まで無く、新規抗酸化物質である可能性が高いと考えている。本研究では、昆虫由来の新たな抗酸化物質の一つとして応用することを目的として、ヤマトシロアリのソルジャーが有するこの物質の性質について検討すると共に単離・同定を試みた。

ヤマトシロアリのカースト別に抗酸化酵素活性とフリーラジカル消去活性について検討したところ、ソルジャーは他と比べカタラーゼ活性、スーパーオキシドディスムターゼ活性が最も低かったにもかかわらず、DPPH assay で最も高い値を示した。これは、当該物質がソルジャー特異的な物質であることを示唆する。また、動物や植物の組織と比較しても、ソルジャーのフリーラジカル消去能は非常に高いということが分かった。この活性が 30 分間の煮沸やプロテアーゼ処理にもほとんど影響されなかったことから、今回見出された抗酸化物質はタンパク質ではないと考えられる。さらに、体のどの部分に存在するか調べたところ、中腸・後腸を除いた腹部に局在することが分かった。

termite, atioxidant, ROS

講演番号：3C20p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ C 校舎 20 会場

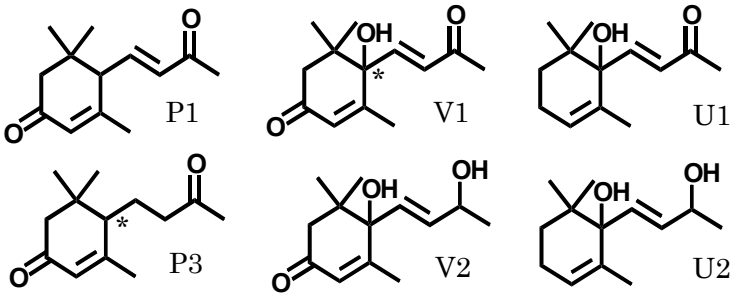
侵入害虫ナスミバエ誘引化合物の探索と立体化学
Male attractants for the solanaceous fruit fly, *Bactrocera latifrons*, and evaluation of their stereochemistry

○吉田 幸広[1]、江口 恭[1]、宇久田 理恵[2]、原口 大[2]、小濱 継雄[2]、小野 肇[1]、西田 律夫[1]([1]京大院農、[2]沖縄県農研センター)
○Yukihiro YOSHIDA[1], Takashi EGUCHI[1], Rie UKUDA[2], Dai HARAGUCHI[2], Tsuguo KOHAMA[2], Hajime ONO[1], Ritsuo NISHIDA[1] ([1]Kyoto Univ, [2]Okinawa Prefectural Agricultural Reserch Center)

研究背景・目的】ナスミバエ *Bactrocera latifrons* (Hendel) はナス科植物の害虫であり主に東南アジア諸国に分布する．日本では沖縄県与那国島に発生した個体群は不妊虫放飼法により 2011 年に根絶されたが，沖縄本島への侵入が新たに確認され，その防除が喫緊の課題となっている．ミカンコミバエにおいてはメチルオイゲノール，ウリミバエにおいてはキュールアが雄特異的誘引剤として大量誘殺や発生量モニタリングに利用されているが，ナスミバエにおいては実用的な誘引剤が開発されていない．これまでにナスミバエ雄に対する誘引剤として 3-oxo-α-ionone (P1) や 3-oxo-7,8-dihydro-α-ionone (P3) などを明らかにし[1, 2, 3] (Ishida et al., 2008; Nishida et al., 2009; Enomoto et al., 2010)，野外におけるナスミバエ不妊虫の捕獲に成功している．本研究では，P3 の光学分割を行い，光学活性体の誘引活性の差異を明らかにした．また，シソ科植物ワタチョロギに含まれる vomifoliol (V2) が強力な摂食刺激活性を持つことを見出し，V2 およびその関連物質の合成と活性評価を試みた．

【方法】P3 のラセミ混合物をキラル HPLC カラム により光学分割し，ナスミバエ雄成虫に対する誘引および摂食個体数を経時的に比較した．V2 とその類縁物質 dehydrovomifoliol (V1), 6-hydroxy-α-ionone (U1), 6-hydroxy-α-ionol (U2) を合成し，誘引・摂食刺激活性を比較検定した．V1 は光学分割により *R* 体，*S* 体に導き，活性を比較した．

【結果】ジケトン P1 を活性アルミナ触媒により空気酸化し，6-ヒドロキシ体 (V1) を得た (収率：28%). キラルカラムにより分離した P3 および V1 の光学活性体の比較においては，P3 で *R* 体, V1 で *S* 体が強力な活性を示した．$NaBH_4$ により V1 を選択的に還元し，V2 へと導いた (収率：95%). β-Ionone を *m*-CPBA によりエポキシ化し，酸触媒で開環して 6-hydroxy-α-ionone (U1) を得た (収率：4%). さらに $NaBH_4$ 還元し，U2 へと導いた (収率：94%). これら類縁体の活性を検定した結果，V2, V1, U2 および U1 の誘引活性は P3 と比較して低かったが，より持続的な摂食刺激活性を示した．



Reference
Ishida et al., *J. Chem. Ecol.* **34**: 1532 (2008)
Nishida et al., *Entomol. Exp. Appl.* **131**: 85 (2009)
Enomoto et al., *Appl. Entomol. Zool.* **45** : 551 (2010)

Bactrocera latifrons, attractant synthesis, optical resolution

講演番号：3C20p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ C 校舎 20 会場

南西諸島に生息するハグルマヤママユが分泌する性フェロモンの構造決定
Structure determination of a sex pheromone secreted by *Loepa sakaei* inhabiting in the Nansei Islands

○鐘ヶ江 明子[1]、中 秀司[2]、閻 祺[1]、立田 晴記[3]、喜友名 亮太[3]、志田 岳弥[3]、加藤 三歩[3]、藤田 新[3]、山本 雅信[1]、安藤 哲[1]（[1]東農工大院 BASE、[2]鳥取大農、[3]琉大農）
○Akiko Kanegae[1], Hideshi Naka[2], Qi Yan[1], Haruki Tatsuta[3], Ryota Kiyuna[3], Takeya Shida[3], Mitsuho Kato[3], Shin Fujita[3], Masanobu Yamamoto[1], Tetsu Andou[1] ([1]TUAT BASE, [2]Tottori Univ, [3]Ryukyu Univ)

【目的】 ヤママユガ科蛾類昆虫は世界で 1000 種以上記録されているが、日本では 14 種のみ分布し、絶滅が危惧されているものも少なくない。これまでに海外の 16 種から性フェロモンが同定されており、トリエンに加えて多くは炭素数 16 のジエンアルコールやその誘導体である。日本固有のヤママユガ科昆虫に関しては、本研究室での分析結果から 6,11-hexadecadienal がウスタビガのフェロモン候補物質であること以外はわかっておらず、さらなる研究としてハグルマヤママユの性フェロモンの解明を行うこととした。奄美大島と沖縄諸島にのみ生息する本種は、国の準絶滅危惧種に指定されている貴重な昆虫であり、合成フェロモンはその生態の詳細を知る有効な手段になると思われる。
【方法と結果】 野外から採集した幼虫を飼育し、雌雄各 3 頭の成虫を得ることができた。0.25 頭分のメスのフェロモン腺抽出物を用いた GC-EAD 分析の結果、EAG 活性を有する 1 成分の存在が確認された。次に GC-MS 分析を行ったところ、同じく 0.25 頭分の抽出物から活性物質のマススペクトルが得られた。M^+は検出されなかったが、*m/z* 192 に炭素数 14 のジエンアセテートが示す特徴的な $[M-60]^+$ が認められ、スペクトル全般のパターンが 6,11-hexadecadienyl acetate（6,11-16:OAc）の合成標品のものと類似しており、候補化合物として 4,9-tetradecadienyl acetate（4,9-14:OAc）を考えた。

そこで、1,3-propanediol を出発原料とし、4,9-14:OAc の 4 つの幾何異性体をアセチレンカップリング等を利用して合成した。三重結合を Birch 還元あるいは Lindlar 還元で選択的に *E* あるいは *Z* 体の二重結合に変換させる方法で、高純度の幾何異性体を得ることができた。NMR データ、特に ^{13}C の化学シフト値は構造を反映しており、さらにそれらのマススペクトルは天然物と一致した。

合成した 4 つの異性体を用いて、2012 年 5 月 18 日から 1 ヶ月間、沖縄県国頭郡国頭村で野外試験を実施した。その結果、ハグルマヤママユのオス成虫は、図のように(4*E*,9*Z*)-体に特異的に誘引されることが明らかになった。以上の結果から、本種の性フェロモンとして(4*E*,9*Z*)-4,9-tetradecadienyl acetate（E4,Z9-14:OAc）を同定することに成功した。

E4,Z9-14:OAc はサクサンの性フェロモンの 1 成分としてすでに同定されている既知物質であるが、この化合物のみで誘引される昆虫は本種が始めてである。



誘引されたハグルマヤママユ♂
左下：ハグルマヤママユの幼虫

Lepidoptera, Saturniidae, sex pheromone

講演番号：3C20p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ C 校舎 20 会場

イラガ幼虫分泌液由来の痛みならびに炎症の活性測定法

Bioassay for pain and inflammation of slug caterpillar(iraga) venoms

○水谷 祐輔[1]、小山 拓矢[1]、今井 邦雄[1]、西尾 昌洋[1]、新美 友章[2]、勝崎 裕隆[1] ([1]三重大院・生資、[2]名大院・生命農)

○Yusuke MIZUTANI[1], Takuya KOYAMA[1], Kunio IMAI[1], Masahiro NISHIO[1], Tomoaki NIIMI[2], Hirotaka KATSUZAKI[1] ([1]Mie Univ., [2]Nagoya Univ.)

【背景・目的】ヒトがイラガ幼虫に刺された場合の痛みは痛烈であり、さらに痛みが治まった後はかゆみと発疹が現れる。これらの症状はイラガ幼虫の分泌液によって引き起こされる。この分泌液はイラガ幼虫の背部肉質突起に生えている針毛から分泌され、それが人体に注入されることで各種症状が現れる。これらの症状は針毛由来の分泌液に何らかの活性物質が含まれていることを示唆している。しかし、これらの症状を引き起こす物質は明らかにされていない。本研究では痛みやかゆみといった症状の原因物質を特定するために、各種症状の活性測定法を構築することを目的とした。構築するにあたって“かゆみ”“痛み”“発疹”に着目した。

①かゆみの指標として、ヒスタミンに着目した。ヒスタミンはヒスタミン受容体と結合し、神経伝達を経た後にかゆみとなって人体に影響を与える。そこで、外部刺激によりヒスタミンを放出するラット好塩基球細胞ＲＢＬ－２Ｈ３を用い、ヒスタミン放出量を測定する。②痛みの指標として、痛み物質のレセプターの一つであるＴＲＰＶ１に着目した。動物由来の毒によって引き起こされる痛みや麻痺といった症状には、細胞に存在するイオンチャネルの活性化もしくは不活性化が関連している。それらチャネルにおいて近年痛みとの密な関係を示唆されているのがＴＲＰＶ１である。そこで、ＨＥＫ－２９３細胞にＴＲＰＶ１を発現させることにより、Ca^{2+}の細胞内流入を測定する。③発疹の指標として、ウサギの耳に分泌液を注射し、発疹の有無を確認する。

以上、３種類の活性測定法の構築を検討した。

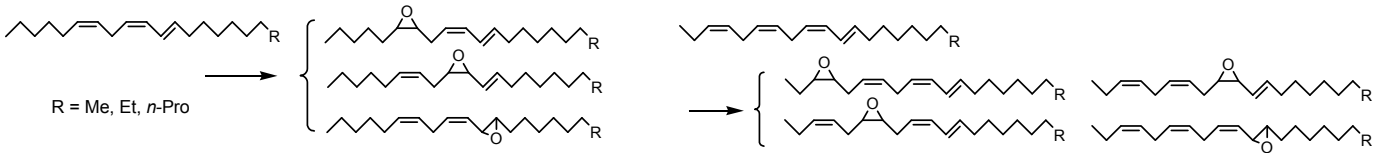
【方法・結果】①ＲＢＬ－２Ｈ３細胞を用いた活性測定では、ヒスタミンと同時に放出されるβ―ヘキソサミニダーゼ量を比色により測定し、間接的にヒスタミン放出量とした。ヒロヘリアオイラガ、アオイラガ、イラガの 3 種類の分泌液について検討を行い、全ての毒液に活性を確認することができた。これら毒液を逆相ＨＰＬＣで分取し、再度活性測定を行った。しかしながら、分取後の画分では顕著な活性を確認することは出来なかった。②マウス由来のＴＲＰＶ１をＨＥＫ－２９３細胞に導入し、ＴＲＰＶ１発現ＨＥＫ－２９３細胞を構築した。この細胞を使用し、Ca^{2+}の細胞内流入をＦｕｒａ２－ＡＭを用いた蛍光検出で測定した。現在は活性測定の条件を検討中であり、条件が整い次第、各種毒液を用いた活性測定を行う予定である。③ヒロヘリアオイラガ、アオイラガ、イラガ、クロシタアオイラガの各種分泌液をウサギの耳裏に皮下注射で投与し、投与部位の経過を観察した。その結果、各種分泌液において発疹が現れ、活性を確認できた。

pain, inflammation, slug caterpillar

講演番号：3C20p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ C 校舎 20 会場

TypeII 蛾類性フェロモン候補物質の系統的合成と分析データの集積
Systematic syntheses and spectral analyses of TypeII lepidopteran pheromone candidates
○村上 陽子、丸山 涼子、坂本 有紀、山本 雅信、安藤 哲（農工大院 BASE）
○Yoko Murakami,Ryoko Maruyama,Yuki Sakamoto,Masanobu Yamamoto,Tetsu Ando（TUAT BASE）

【目的】　蛾類性フェロモンは、生合成経路の違いから Type Ⅰと Ⅱに大別される。官能基を持たない TypeⅡフェロモンの多くはリノール酸やリノレン酸から導かれる 6,9-ジエンと 3,6,9-トリエン（二重結合はすべて *Z* 体)、およびそのエポキシ化物で、シャクガ科、ドクガ科、ヒトリガ科など比較的進化した昆虫が分泌する。ところで、それら昆虫グループの種の多様性を鑑みると、更に化学構造を修飾した化合物も雌雄間のコミュニケーションに利用されていることが考えられる。植物由来の不飽和脂肪酸に昆虫自身が新たな二重結合を導入してできるポリエン化合物やそのエポキシ化物などが想定され、実際にコシロモンドクガから、*trans*-11,12-epoxyhenicosa-6,9-diene が同定された。そこで、炭素数 19～21 の 6,9,11-トリエンおよび 3,6,9,11-テトラエン(11-位二重結合のみ *E* 体)からエポキシ誘導体を系統的に合成し、今後のフェロモン研究に活用すべく化学的特性を明らかにすることとした。



【方法と結果】　トリエンとテトラエンをそれぞれ過酸（MCPBA）で酸化し、３つのエポキシジエン混合物と４つのエポキシトリエン混合物を得た。RI および UV 検出器を備えた逆相系 HPLC で分析したところ、それらは分離可能で、いずれの混合物でも共役ジエン部分が酸化され UV 吸収を失ったモノエポキシ化合物が主成分であることがわかり、分離後の NMR 解析によりそれぞれの構造を確認し、流出順序を明らかにすることができた。

これまで 3,6,9-トリエンの MCPBA 酸化で得られる３つのエポキシジエンの分離は、比較的大量の精製が可能な中圧液体クロマトグラフィー（MPLC）によって行っていたが、本実験の混合物では新たにエポキシ構造を含まない化合物の生成が認められた。検討の結果、シリカゲルカラムのような弱酸性条件でも 9,10-エポキシ化物が 9-ケトンに異性化してしまうことがわかり、共役系を含むポリエン化合物から得られるモノエポキシ混合物の精製には適さないことが判明した。

単離したエポキシ化合物を GC-MS 分析したところ、特徴的な開裂イオンの生成を認めることができた。それらは各位置異性体の構造を反映したものであり、天然性フェロモンの同定に有効な診断イオンとなる。またこれらの化合物を性フェロモンとしている昆虫を発見するために、単離したエポキシ化合物を誘引源として野外でのランダムスクリーニングが進行中である。

Lepidoptera, sex pheromone, diagnostic fragment ions

講演番号：3C20p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ C 校舎 20 会場

トマト近縁野生種 *Solanum habrochaites* の揮発成分に含まれるタバココナジラミ バイオタイプQに対する忌避物質の探索
The mechanisms of resistance of *Solanum habrochaites* related tomato to Q biotype of *Bemisia tabaci*
○北村 登史雄[1]、武田 光能[1]、中島 修平[2] ([1]農研機構 野菜茶研、[2]岡山大院 自科)
○Toshio Kitamura[1], Mitsuyoshi Takeda[1], Shuhei Nakajima[2] ([1]NIVTS, NARO, [2]Okayama Univ.)

【目的】タバココナジラミ*Bemisia tabaci* は多くの作物における世界的な重要害虫であり、寄主範囲等の生態的特性の異なる多くのバイオタイプを持つ。特にトマトではトマト黄化葉巻病を媒介するため、要防除水準が非常低く、特にバイオタイプQは多くの殺虫剤に対し抵抗性が高度に発達しているため、その防除は非常に困難である。農業現場では防虫ネット・黄色粘着板等の物理的防除と殺虫剤を併用して行っているが、新たな防除法として抵抗性品種の開発が期待されている。これまでに抵抗性品種育成のための育種素材の探索は主にバイオタイプBを用いて行われており、バイオタイプQに対する知見はほとんどない。これまでにトマト近縁野生種である*Solanum habrochaites* および*S. pennellii*にタバココナジラミ バイオタイプQに対する抵抗性を有する系統を見出しているが、*S. habrochaites*について抵抗性機構の解明を行った。

【方法】直径12cm長さ40cmのガラス管の両端に誘引源として黄色プラスティック板を取り付けた金網を配置した。金網の中に匂い源を入れ、ガラス管の中央にタバココナジラミ バイオタイプQ 20頭放飼し、10分後にプラスティック板上のタバココナジラミ数を計数することにより、誘引・忌避性を評価した。*S. habrochaites* 7系統について、揮発成分を分析すると共にタバココナジラミに対する誘引・忌避性を解析することにより、*S. habrochaites*の抵抗性要因の解明を試みた。

【結果】タバココナジラミに抵抗性を有するトマト栽培品種“ハウス桃太郎”、*S. habrochaites* LS-2065、*S.pennellii* LS-208−3を生物試験に供したところ、コントロールでは46.7%、トマト栽培品種では90.0%、*S.pennellii*では53.8%、*S. habrochaites*では18.1%であり、タバココナジラミはトマト栽培品種に誘引され、*S. habrochaites*を忌避し、*S.pennellii*ではコントロールと有意な差は見られたかった。このため、*S. habrochaites*の抵抗性の要因はその揮発成分であると推察した。そこで*S. habrochaites* 7系統に対し、タバココナジラミによる選好性試験を行うと共にその揮発成分をGCおよびGCMSで分析することにより、タバココナジラミに対する忌避物質の特定を行っている。

Solanum habrochaites, Bemisia tabaci, resistance

講演番号：3C20p17
講演日時、会場：3 月 26 日 17:12～ C 校舎 20 会場

蒼朮抽出物中のヒアルロン酸産生促進物質の単離及び構造解析

Isolation and identification of hyaluronan production inducing substances from Atractylodes lancea

○成岡 美智（神奈川工科大学）
○MITOMO NARUOKA (Kanagawa Institute of Technology)

【目的】ヒアルロン酸は D-グルクロン酸と *N*-アセチルグルコサミンの 2 糖による交互の繰り返し構造からなり、水分を保持する能力が非常に高い高分子多糖である。ヒアルロン酸は皮膚や関節などの結合組織に広く存在し、肌のハリ、シワ、たるみに深く関っている。また、皮膚中のヒアルロン酸量は加齢とともに減少していくことが知られている。この皮膚中のヒアルロン酸の産生を促すことでアンチエイジングに繋がると考えている。ヒアルロン酸の合成は、ヒアルロン酸合成酵素（*HAS*）のみで行われている。*HAS* は 3 つのアイソザイムを持ち、線維芽細胞では *HAS2* がヒアルロン酸産生の主酵素として働くことが知られている。そのため *HAS2* の発現を促進させることが出来ればヒアルロン酸産生量を向上出来ると考えられる。本研究室では、ヒアルロン酸産生を誘導する物質（生薬）のスクリーニングを行い、既に *HAS2* の発現量とヒアルロン酸産生量が向上した生薬を数種見出している。本研究では、特に活性の高かった蒼朮を用い *HAS2* の発現量とヒアルロン酸産生量の増加を確認し、蒼朮の活性成分の単離および構造解析を目的とした。
【方法】正常ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）に種々の濃度に調製した蒼朮抽出物を添加した。添加 24 時間後に Total RNA を抽出し、cDNA を作成、リアルタイム PCR を用いて *HAS2* 発現量の測定を行った。ヒアルロン酸量に関しては、ELISA 法にて測定を行った。蒼朮の活性成分は水・ヘキサン・酢酸エチルで順次分画活性を評価した。活性が得られた分画に対してシリカゲルクロマトグラフィーにより分画後、HPLC を用いて単離を行った。
【結果】終濃度 100 μg/mL の蒼朮抽出物を作用させることにより *HAS2* 発現量が約 7 倍増加することが確認された。またヒアルロン酸量も約 3 倍増加することが示された。次いで、蒼朮抽出物について有機溶媒を用いて分画を行い、各分画物質を NHDF に作用させたところヘキサン分画に活性を認めた。更に、シリカゲルクロマトグラフィーにより分離した活性成分を NHDF に作用させたところ、*HAS2* 発現量及びヒアルロン酸量の増加を認めた。単離した蒼朮に含まれる活性成分の構造解析結果も合わせて報告する。

hyaluronan, Atractylodes lancea, HAS2

講演番号：3C21a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ C 校舎 21 会場

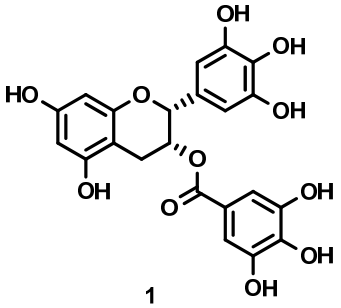
プロシアニジン・オリゴマーの構造－活性相関研究

Structure-Activity-Relationships of procyanidin oligomer

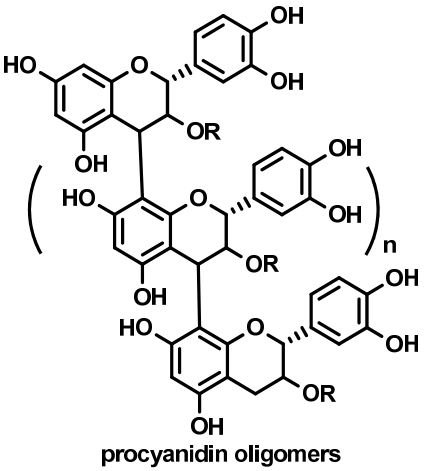
○岡本 修平[1]、石原 沙也加[1]、岡本 泰輔[1]、土井 翔馬[1]、泉野 麻友[2]、中嶋 範行[3]、齊藤 安貴子[1,2]
([1]大阪電通大院・工、[2]大阪電通大・工、[3]富山県大・工)
○Syuhei OKAMOTO[1], Sayaka ISHIHARA[1], Taisuke OKAMOTO[1], Syoma DOI[1], Mayu IZUNO[2], Noriyuki NAKAJIMA[3], Akiko SAITO[1,2] ([1]OECU, [2]OECU, [3]TPU)

【目的】

Proanthocyanidin(PAs)は、お茶やカカオの嗜好品、ブドウ等の果物類、スギ等の樹皮など、多くの植物に含まれる高機能性ポリフェノール化合物である。これらは、極めて強い抗酸化活性・動脈硬化抑制活性・抗腫瘍活性・抗炎症作用・発ガン抑制作用等、様々な生物活性を示す。しかし、天然からは複雑な類縁体化合物として得られ純粋に単離することが難しく、詳細な構造-活性相関研究や活性発現機構についてはほとんど解明されていない。その一方で、お茶カテキンとして知られる(-)-Epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) **1** は、細胞膜上の受容体として同定された 67 kDa ラミニンレセプター(67LR)を介して様々な生理活性を示すことが報告され、注目されている[1]。我々は、PAs を純粋に、かつ、大量に合成することで入手し、様々な生物活性試験における構造-活性相関研究を進めている。



1



procyanidin oligomers

【方法と結果】

立体選択的合成によって純粋に得られた種々の PAs を用いて HeLa S3 細胞、HL-60 細胞に対する増殖抑制活性試験を行った。HeLa S3 細胞では 3 量体以上のオリゴマーや、ガロイル基が結合した 2 量体が EGCG よりも強い活性を示した。HL-60 細胞に対する増殖抑制活性においては、ガロイル基の効果が顕著ではなかった。

さらに、種々の抗菌活性試験も行っており、これまでに PAs の構造によって、菌種による感受性が異なることが明らかになってきた。これまで多くの報告が混合物で行われているが、我々の研究結果から、やはり純粋な化合物を用いた構造-活性相関研究が今後有用になると考えている。

参考文献）1. Tachibana H, *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004, **11**, 380-381

Structure-Activity-Relationships, procyanidin oligomer

講演番号：3C21a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ C 校舎 21 会場

Identification of SQAP-binding proteins from a T7 phage display screen

○Jesus Izaguirre Carbonell, Hiroshi Murata, Keisuke Ohta, Tomoe Kusayanagi, Senko Tsukuda, Shinji Kamisuki, Fumio Sugawara (TUS)

Sulfoqunovosylacylpropanediol (SQAP) is a chemically derivative from sulfoquinovosylmonoacylglycerol (SQMG) which was originally isolated from sea urchins by our group. SQAP synergistically enhanced an ionizing radiation causing the inhibition of angiogenesis. Eventually, SQAP inhibited the growth of human cancer cells transplanted in mice provoking a significant reduction in the vascularity of the tumors. All together SQAP is a promising agent for cancer radiation therapy. However, the radiobiological mechanisms of SQAP remain unknown.

In order to obtain information about molecular mechanisms we applied a T7 phage display screening on the purpose to identify SQAP binding peptides *in vitro*. The selection was accomplished using phage libraries obtained from different human cancer cell lines. As a result, 4 possible SQAP binding peptides were elucidated. Homology search by FASTA demonstrated that the screened peptides conserve; sterol carrier protein 2 (SCP-2), multifunctional enzyme type 2 (MFE-2), proteasomal ubiquitin receptor (ADRM1) and UV excision repair protein (HR23B). Interestingly both binding regions of SCP-2 and MFE-2 correspond to a SCP-2 domain.

Two independent experiments were used in order to verify the interactions between SQAP and the candidate peptides: validation of affinity for single phage clone and surface plasmon resonance (SPR) analysis. Validation of affinity for single phage clone compared the affinity of the 4 clones bearing the candidate peptides with a non-inserted phage clone (control). Validation of affinity showed specific binding between the 4 candidate peptides and SQAP. In order to perform the SPR analysis recombinant histidine-tagged SCP-2 (400-547aa) and MFE-2 (598-736aa) peptides were expressed in *Escherichia coli* and purified. For ADRM1 and HR23B full-length proteins were purchased. SPR analysis corroborated the interactions and allowed to determine the K_D values.

The involvement of candidate proteins on SQAP mechanism of action is currently studied through cell-based assays.

Target identification, Angiogenesis, Phage display

講演番号：3C21a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ C 校舎 21 会場

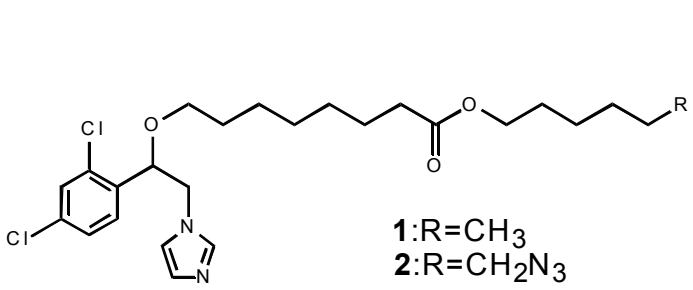
タンパク質架橋剤を用いた低分子化合物結合タンパク質の同定法の開発

new method to identify the binding-protein of small molecule

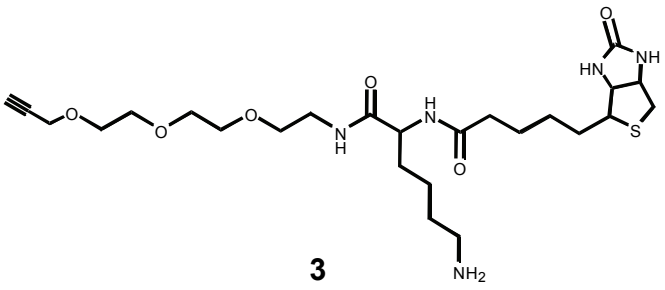
○塚原 美宙、松浦 英幸、高橋 公咲 (北大院農)
○MIU TSUKAHARA,HIDEYUKI MATSUURA,KOSAKU TAKAHASHI (Hokkaido Univ.)

【目的】薬剤や天然有機化合物の標的タンパク質の同定には、光アフィニティーラベル法が有効である。ある化合物を光アフィニティープローブ化しようとする場合、捕獲のための光反応基と検出のための官能基をその構造中に導入しなければならず、元来の化合物と比較して標的タンパク質との相互作用が損なわれてしまうという問題点があった。この問題点を克服するため、本研究では光反応基の役割をタンパク質架橋剤に代替させた新たなタンパク質の同定法の開発を試みた。

【方法・結果】植物ホルモンのジャスモン酸生合成酵素の一種であるアレンオキシドシンターゼ（AOS）の阻害剤 **1** をもとにアジド基を導入した阻害剤 **2** を合成した。[1]ヒメツリガネゴケアレンオキシドシンターゼ（PpAOS1）は大腸菌に過剰発現させ作成した。阻害剤 **1** および **2** の酵素阻害活性（IC_{50}）は 10.0 μM および 7.86 μM でほぼ同等であった。この結果から、阻害剤 **2** をアフィニティープローブとして使用できると判断した。阻害剤 **2** を PpAOS1 とインキュベートさせた。その後、末端にビオチンおよび中央部にリジン残基を有するアルキン **3** を添加しクリックケミストリーを行い、阻害剤 **2** とアルキン **3** を結合させた。タンパク質架橋剤を用いてリジンのアミノ基と連結させた PpAOS1 を SDS-PAGE に供した後、ウェスタンブロッティング法により PpAOS1 の検出を試みたところ、化学発光シグナルが確認された。以上の結果から、本方法によりアジド基を有する化合物をプローブとし、タンパク質架橋剤を用いた標的タンパク質の同定が可能であることが示された。



1:R=CH_3
2:R=CH_2N_3



3

[1]Oh K, Murofushi N, Bioorg Med Chem., 10, 3707-3711 (2002).

binding protein, crosslinker, click chemistry

講演番号：3C21a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ C 校舎 21 会場

カルジオリピン - シトクロム *c* 複合体形成の分子機構解明

Molecular Mechanism of Forming Cardiolipin-Cytochrome *c* Complex

○安部 真人、中野 正顕、小坂 亜弓、三芳 秀人（京大院農）
○Masato ABE,Masaaki NAKANO,Ayumi KOSAKA,Hideto MIYOSHI (Kyoto Univ.)

【背景】カルジオリピン（CL；図1）はミトコンドリア内膜に局在するリン脂質であり、種々の電子伝達酵素やトランスポーターの活性発現に必須とされている。最近の研究から、アポトーシス初動期におけるミトコンドリアからのシトクロム *c*（cyt *c*）の漏出に関わることがわかってきた。また、ヒトの先天性心筋症を伴うバース症候群では、CL の脂肪酸組成の異常が顕著に認められることが報告されている。CL は生合成において、一度は炭素骨格を完成させるものの、その後に脂肪酸部の組み換えを受けると考えられている。しかし、この過程の分子機構については依然として不明な点が多い。これは従来の研究に用いられてきた CL 類縁体の構造上のバリエーションに限界があることも見逃せない原因であり、多様な CL 類縁体を用いた多面的な解析が必要とされていた。

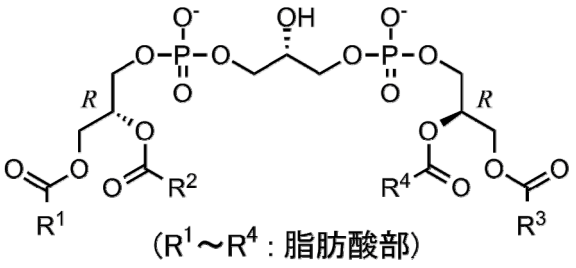


図1. カルジオリピンの化学構造

【目的】発表者らは CL の系統的な有機合成方法を確立し、10 種類あまりの CL ライブラリを有している。本研究ではこれらを用いて cyt *c* との複合体形成に対する CL の部分構造の影響を精査することを目的とした。さらに、光親和性 CL プローブを新たにデザイン合成することで、cyt *c* における CL 結合部位の同定を行うこととした。

【方法と結果】系統的に合成した CL 類縁体を用いてホスファチジルコリンとそれぞれ混合し、リポソームを作成し、次の 2 点について比較検討を行った。（1）CL–cyt *c* 複合体によって誘導されるペルオキシダーゼ活性、（2）リポソーム共沈法による CL–cyt *c* 複合体の親和性。 この結果、これまでは CL 脂肪酸部の不飽和結合がペルオキシダーゼ誘導に必須の構造因子と考えられてきたが、不飽和結合を持たないステアリン酸やミリスチン酸を脂肪酸部に持つ CL でも顕著なペルオキシダーゼ活性の誘導が認められた。また、極性頭部の構造改変を行った CL 類縁体もペルオキシダーゼ活性を示す結果となり、cyt *c* による厳密な構造認識を受けていないことが明らかになった。ペルオキシダーゼ誘導活性は、CL–cyt *c* 複合体の親和性と高い相関が認められた。このことから、CL–cyt *c* 複合体形成は、主に CL の cyt *c* への親和性によって決定されているということが明らかになった。また、CL 分子に光反応性基ジアジリンを組み込んだ光親和性 CL プローブの合成を完了しており、これらの最新状況についても報告する。

Cardiolipin, Cytochrome *c*, mitochondria

講演番号：3C21a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ C 校舎 21 会場

ユビキノンプローブの合成とユビキノン結合性タンパク質 Coq10 の解析

Characterization of the mitochondrial ubiquinone-binding protein Coq10 using a synthetic ubiquinone probe.

○松延 広平[1]、村井 正俊[1]、工藤 佐和子[1]、川向 誠[2]、三芳 秀人[1] ([1]京都大院農・応用生命、[2]島根大生物資源科学・生命工学)
○Kohei MATSUNOBU[1], Masatoshi MURAI[1], Sawako KUDOH[1], Makoto KAWAMUKAI[2], Hideto MIYOSHI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Shimane Univ.)

【背景・目的】ユビキノンに代表されるキノン類は、バクテリアから高等生物に至るまで幅広く分布する生理活性分子であり、その主な役割は呼吸鎖電子伝達系における基質（電子伝達担体）としてはたらくことである。出芽酵母や分裂酵母を用いた近年の研究で、Coq10 と呼ばれる新規なタンパク質の存在が明らかになった。ミトコンドリア内膜上に局在する Coq10 は、ユビキノン生合成には直接的に関与しないものの、生合成されたユビキノンに“シャペロン的”に作用し、ミトコンドリア内膜中で円滑な電子伝達をサポートしているのではないかと考えられているが、その役割は依然として不明である。これが事実とすれば、ユビキノンはミトコンドリア内膜中を側方拡散するだけ、というこれまでの「キノンプール」モデルが覆されることになる。我々は、合成ユビキノンプローブを用いた光親和性標識実験を切り口に、ミトコンドリアにおける Coq10 の役割を明らかにすることを目的とした。

【結果】ユビキノンのベンゾキノン骨格と分子末端にそれぞれ、アジド基とアルキンを導入した化合物 1 を合成した。本化合物は光親和性標識実験後に、クリックケミストリー（[3+2]-環化付加反応）を利用してビオチンなどの任意の検出タグを導入することができる。分裂酵母由来の Coq10 を発現させた大腸菌膜標品を、化合物 1 によって光親和性標識し、クリックケミストリーによってビオチンタグを導入した。ウエスタンブロットやアビジン沈降、および精密質量分析によって標識後の膜標品の解析を進めた結果、化合物 1 は Coq10 に対して特異的に結合していることが明らかになった。本結果は、Coq10 がユビキノンに対して高い親和性を有することを明確に実証するものである。現在、プロテアーゼ限定分解によって Coq10 のユビキノン結合部位を解析中であり、これらの結果も併せて報告する予定である。

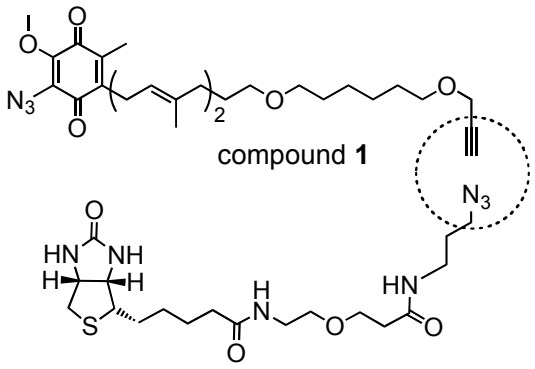


図 1. ユビキノンプローブ（化合物 1）とビオチンタグの構造.

ubiquinone, ubiquinone-binding protein, photoaffinity labeling

講演番号：3C21a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ C 校舎 21 会場

ボタンイボタケ由来 *p*-ターフェニル誘導体のがん細胞特異的な細胞毒性における作用メカニズムと構造-活性相関の解明

Mechanism of cancer selective cytotoxicity and structure-activity relationships of *p*-terphenyl derivatives from *Thelephora aurantiotincta*

○乗鞍 敏夫[1]、藤原 憲秀[2]、佐野 勇介[2]、佐藤 たくと[2]、角田 隆幸[3]、櫛部 佳祐[3]、森永 八江[1]、岩井 邦久[1]、松江 一[1] ([1]青森保健大、[2]北大院理、[3]北大理)

○Toshio Norikura[1], Kenshu Fujiwara[2], Yusuke Sano[2], Takuto Sato[2], Takayuki Tsunoda[3], Keisuke Kushibe[3], Yae Morinaga[1], Kunihisa Iwai[1], Hajime Matsue[1] ([1]Aomori Univ. Health Welfare, [2]Hokkaido Univ., [3]Hokkaido Univ.)

【目的】我々はこれまでに、食用きのこのボタンイボタケから単離・同定した *p*-ターフェニル誘導体の vialinin A（VA）と thelephantin O（TO）が、ヒト正常肝細胞に細胞毒性を示さず、ヒト大腸がん細胞（Caco2 細胞）、ヒト肝がん細胞（HepG2 細胞）の細胞生存率を低下させることを報告している。本研究は、*p*-ターフェニル誘導体のがん細胞への細胞毒性における作用メカニズムおよび構造-活性相関の解明を目的とする。

【方法】*p*-ターフェニル誘導体の構造-活性相関を解明するため、VA のフェニル基をエチル基に、水酸基をメトキシ基に置換した類似化合物を有機合成した。TO によるがん細胞への細胞毒性の作用メカニズムを明らかとするため、HepG2 細胞を用いて、細胞周期の解析と遺伝子発現解析（細胞周期の進行に関連する 84 遺伝子）を行った。

【結果】中央のベンゼン環にあるオルト位の 2 つの水酸基が、*p*-ターフェニル誘導体の生理活性（HepG2 細胞の生存率低下作用、DPPH ラジカル捕捉活性、鉄イオンキレート活性）において、重要な働きを担っていることを明らかとした。さらに、各 8 μM の $CuCl_2$、$FeCl_2$、$MgCl_2$、$MnCl_2$、$ZnCl_2$ を TO（8 μM）と同時に HepG2 細胞に添加したところ、$FeCl_2$ が TO の細胞毒性を抑制することが明らかとなった。また、TO は細胞周期の進行に関与する GADD45A、CCNG2、CDKN1A、SERTAD1、CCNG1、CCNT1 の遺伝子発現量を増加させ、CCNB1、CDKN3、CDC20、KPNA2、CCNF、CCNB2、CCND2、CDK4、RAD9A、MKI67、SKP2、CDKN2B、CCNC の遺伝子発現量を減少させることで、細胞周期の G1 期から S 期への進行を抑制し、がん細胞の増殖を抑制することが明らかになった。細胞毒性と同様に、TO による遺伝子発現量と細胞周期の進行の変化は、$FeCl_2$ によって抑制された。これらの結果より、*p*-ターフェニル誘導体は、中央ベンゼンの 2 つの水酸基が 2 価の鉄イオンをキレートすることで、がん細胞の細胞周期の G1 期から S 期への進行を抑制することが示唆された。

p-terphenyl derivatives, iron chelation, anticancer

講演番号：3C21a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ C 校舎 21 会場

Pyrrocidine A によるミトコンドリアを介したアポトーシス誘導機構

Mechanism of mitochondrial pathway-mediated apoptosis induced by pyrrocidine A

○上杉 祥太[1]、室井 誠[2]、近藤 恭光[2]、塩野 義人[3]、長田 裕之[2]、木村 賢一[1] ([1]岩手大院・農、[2]理研基幹研・ケミカルバイオロジー、[3]山形大・農)
○Shota UESUGI[1], Makoto MUROI[2], Yasumitsu KONDOH[2], Yoshihito SHIONO[3], Hiroyuki OSADA[2], Ken-ichi KIMURA[1] ([1]Grad. Sch. of Agri., Iwate Univ., [2]Chem. Biol., RIKEN ASI, [3]Fac. of Agri., Yamagata Univ.)

【目的】Pyrrocidine A は、He らにより未同定の菌類 *LL*-Cyan426 から初めて単離された、抗菌活性を有する 13 員環を含む大環状アルカロイドであるが [1)]、我々は植物寄生糸状菌 *Neonectria ramulariae* Wollenw KS-246 株から本物質を得た [2)]。これまでに、ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対して caspase-3、-8 および-9 の活性化や DNA 断片化を伴う caspase 依存的な細胞死を誘導することを見出し、その活性に α,β-不飽和カルボニル構造が重要であることなどを明らかにしてきた。これらの結果から、外因性と内因性の両経路を介したアポトーシスを誘導することが示唆されたが、その分子メカニズムは未解明であった。そこで本研究では、pyrrocidine A のミトコンドリアを介したアポトーシス誘導機構とその標的分子を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】Caspase-8 の基質である Bid の発現を western blotting により調べたところ、濃度および時間依存的に減少し、tBid の増加を認めたことからミトコンドリアに対する影響が示唆された。ミトコンドリアの膜透過性に関わる Bcl-2 ファミリータンパク質については、アポトーシスを亢進させる Bax/Bcl-2 の増加が示されたとともに、Bax のミトコンドリア外膜への転位も認められた。さらに、ミトコンドリアからの cytochrome *c* および AIF の漏出を検出したが、cytochrome *c* は完全に細胞質へ漏出したのに対し、AIF は大部分がミトコンドリアに残留していることが示された。これは、caspase 依存的なアポトーシスが誘導されるというこれまでの結果と一致するものであった。したがって、pyrrocidine A はミトコンドリア外膜の透過性を亢進することで、ミトコンドリア経路を介したアポトーシスを誘導することが示唆された。

さらに、pyrrocidine A の分子標的を明らかにするため、2D-DIGE を用いたプロテオームプロファイリングによる薬剤作用解析に供した。その結果、相関係数 0.8 以上の化合物は認められなかったが、kinase 阻害剤を中心に 5 化合物が 0.75 以上の比較的高い相関を示すことを見出した。そこで、光親和型固定化法を利用したアフィニティークロマトグラフィーにより結合タンパク質を探索したところ、pyrrocidine A 固定化ビーズに対して特異的に結合するタンパク質が複数認められた。しかし、分子内に α,β-不飽和カルボニル構造をもつ pyrrocidine A は、標的タンパク質と Michael 付加反応により共有結合することが予想されたことから、この点を考慮しながら結合タンパク質の解析を進めている。

1) He, H., *et al*., *Tetrahedron Lett.*, **43**, 1633-1636 (2002)
2) Shiono, Y., *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 6050-6053 (2008)

Pyrrocidine A, apoptosis, HL60

講演番号：3C21a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ C 校舎 21 会場

シドケ由来抗がん活性物質エンドパーオキシサイドによる酵母の細胞周期制御の解明

Cell cycle regulations by an anti-tumor substance endoperoxide isolated from Cacalia delphiniifolia in budding yeast

○今村 優子[1]、汐谷 充博[1]、木村 賢一[2]、湯川 格史[1]、土屋 英子[1]([1]広島大院先端物質・分子生命、[2]岩手大院・農)
○Yuko IMAMURA[1], Atsuhiro SHIOTANI[1], Ken-ichi KIMURA[2], Masashi YUKAWA[1], Eiko TSUCHIYA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Iwate Univ.)

【目的】

東北地方で山菜として食されている植物シドケ（モミジガサ）に含まれる、ビサボラン型セスキテルペンのエンドパーオキサイド化合物である3,6-epidioxy-1,10-bisaboladine(EDBD) は、動物レベルで抗がん活性を有する。EDBDは、Fe^{2+}存在下でラジカル体に変化することで、急性前骨髄性白血病細胞HL60においてアポトーシスによる細胞増殖抑制を引き起こし、がん細胞の増殖抑制を示すことが明らかにされているが、その分子標的は不明なままである。そこで、本研究では出芽酵母を用いたEDBDの細胞内分子標的の同定、及びその作用機序の解明を目的としている。

【方法及び結果】

酵母検定菌に対するEDBDの生育への影響を調べたところ、50%阻害値IC_{50}が4μMと強い生育阻害効果を示した。次に、EDBDの作用時期を調べるために、EDBDの最少有効濃度50μM添加後にFACS解析を行った結果、G1期とG2期の細胞の蓄積が見られ、S期の細胞が減少していた。ゆえに、EDBDはG1期とG2期の両方に作用していると考えられた。

EDBD は細胞周期特異的に作用することが明らかになったため、細胞周期の進行に必須な G1 サイクリンである Cln2 の蛋白量を調べたところ、EDBD 添加により顕著な Cln2 蛋白量の低下が観察された。EDBD の Cln2 に対する効果が転写制御を介しているかを調べるために、EDBD 添加後の *CLN2* の mRNA 量を Real-time PCR を用いて測定した。EDBD 添加後の *CLN2* の mRNA 量は顕著に減少したことから、EDBD は *CLN2* の転写を阻害することにより G1 期から S 期への進行を阻害すると考えられた。*CLN2* は、Swi4/Swi6 からなる細胞周期転写因子 SBF がプロモーター部位に結合することにより転写が誘導されている。同じ SBF のターゲット遺伝子である *CLN1* の転写に対する EDBD の効果を調べたところ、*CLN2* と同様に転写が抑制された。このことから、EDBD は SBF を介した転写制御を阻害していることが明らかになった。G1 特異的な遺伝子の発現には、SBF の他に Mbp1/Swi6 からなる細胞周期転写因子 MBF による転写制御も重要である。そこで、MBF のターゲット遺伝子である *CLB5* と *POL1* の転写に対する EDBD の効果を調べたところ、EDBD は両者の遺伝子の発現も抑制していた。これらのことから、EDBD は SBF と MBF の両方を介した転写を阻害することにより、G1 期から S 期への進行を抑制していることが明らかになった。

本研究では、さらに EDBD の SBF を介した転写制御に対する詳細な効果を調べたので報告する。

anti-tumor, cell cycle, endoperoxide

講演番号：3C21a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ C 校舎 21 会場

Fusarium graminearum のトリコテセン生産を阻害する precocene II の標的タンパク質に関する研究

Studies on the target protein of precocene II that inhibits trichothecene production of *Fusarium graminearum*

○古川 智宏、坂本 直子、露木 利枝、長澤 寛道、作田 庄平（東大院農生科・応生化）
○Tomohiro Furukawa,Naoko Sakamoto,Rie Tsuyuki,Hiromichi Nagasawa,Shohei Sakuda (The Univ. of Tokyo)

【目的】

マイコトキシンとはカビの二次代謝産物のうち、人や家畜に毒性を示すものの総称であり、マイコトキシン生産菌が感染した農作物中に蓄積する。蓄積したマイコトキシンは食品加工や調理過程の加熱では分解されず、食品中に残存する。マイコトキシンに汚染した食品を摂取すると主に消化器疾患を症状とする中毒が引き起こされる。中でも、*Fusarium graminearum* により生産されるトリコテセン系マイコトキシンの一種、デオキシニバレノール (DON)による小麦等の汚染は世界中の穀倉地帯で広く見られ、毒性、汚染量の両面から深刻な問題となっている。現在では DON 汚染防除策として殺菌剤が施用されているが、繰り返しの施用による薬剤耐性菌出現の懸念がある。そのため、DON の生産を特異的に抑制する物質の利用が DON 汚染防除に有効であると考えられ、当研究室では DON 生産阻害物質として precocene II を同定した。precocene II は抗幼若ホルモン活性物質として知られているが、DON 生産菌 *F. graminearum* の生育は阻害せず、DON 生産だけを特異的に阻害する。precocene II は、トリコテセン生合成経路において鍵となる制御タンパク質である TRI6 の発現を抑制することから、その作用点は TRI6 の発現に至る制御経路に存在すると考えられる。本研究では、DON 汚染被害に対する効果的な防除策の確立を最終目的として、まず precocene II の標的タンパク質の検出を試みた。

【方法および結果】

F. graminearum を糸状菌細胞壁分解酵素で処理することでプロトプラストを調製し、界面活性剤 Nonidet P-40 を含んだ細胞溶解バッファーを用いて菌体タンパク質を抽出した。precocene II に光反応基およびビオチン基を導入したプローブを用いて標的タンパク質を探索した結果、30 kDa 付近にプローブと結合するバンドを見出した。このバンドは 1000 倍濃度の precocene II の競合下では消失したため、バンドには precocene II に特異的に結合するタンパク質が含まれると考えられた。この precocene II 特異的タンパク質を精製するため、リガンド固定化用の磁性微粒子 FG ビーズ™ を用い、precocene II をリガンドとして結合させたアフィニティー磁気ビーズを合成した。現在、作製したビーズによる標的タンパク質の精製を行っている。

Fusarium graminearum, deoxynivalenol, precocene II

講演番号：3C21a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ C 校舎 21 会場

抗喘息作用物質アロサミジン類の標的分子の探索

Studies on target molecules of allosamidins having anti-asthmatic activity

○桑田 一平[1]、瀬口 武史[2]、村岡 聖子[1]、高城 景子[1]、遠藤 博寿[1]、井上 博雅[3]、長澤 寛道[1]、作田 庄平[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]プライムテック株式会社、[3]鹿児島大・医歯)
○Ippei KUWATA[1], Takeshi SEGUCHI[2], Seiko MURAOKA[1], Keiko TAKAGI[1], Hirotoshi ENDO[1], Hiromasa INOUE[3], Hiromichi NAGASAWA[1], Shohei SAKUDA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Primetech Co., [3]Kagoshima Univ.)

【目的】
放線菌の生産するキチナーゼ阻害物質アロサミジン(allo)は、喘息モデルマウスを用いた実験で抗喘息作用を示すことが明らかとなっており、さらにデメチルアロサミジン(dmallo)は allo よりも約 10 倍強い抗喘息作用を示す。我々は、この allo と dmallo の抗喘息活性の違いを手がかりにアロサミジン類の抗喘息作用での作用機構を解明し、新たな抗喘息薬の開発につなげることを目的に研究を行っている。アロサミジン類の標的分子は不明であるが、アロサミジン類がキチンミミックとしてキチナーゼに結合することから、標的分子はマウスの持つキチナーゼ、あるいはキチナーゼ活性は持たないがキチンオリゴ糖との結合能を有するキチナーゼ様タンパク質であると考えられる。マウスの持つキチナーゼ/キチナーゼ様タンパク質のうち喘息発症との関与の可能性が報告されているものは、acidic mammalian chitinase (AMCase)、breast regression protein 39 (BRP-39)、Ym1、Ym2 である。そこで本研究では、それら 4 種類のタンパク質と allo および dmallo の相互作用を調べることで両化合物の活性の違いを説明できる可能性があると考え、それぞれの組換え体タンパク質を作製し、生体間相互作用解析装置を用いた結合力の解析を試みることにした。
【方法と結果】
AMCase、BRP-39、Ym1、Ym2 の組換え体タンパク質を大腸菌発現系によって調製した。N 末端に His タグを付加した融合タンパク質として発現させた場合、得られた組換え体タンパク質の高濃度での凝集が見られた。そこで、N 末端にマルトース結合タンパク質(MBP)タグ、および/または C 末端に His タグを付加した融合タンパク質となるようにそれぞれ発現用プラスミドを調製した。調製したプラスミドを用いて大腸菌発現系によりタンパク質の発現を行い、4 種類の組換え体タンパク質が可溶性画分に得られた。現在、これら MBP/His 融合タンパク質を、MBP のアフィニティーカラムおよび His タグのアフィニティーカラムを用いて精製した後、ゲル濾過 HPLC によって精製し、生体間相互作用解析装置 Octet を用いて allo および dmallo との相互作用を調べている。

allosamidin, asthma, chitinase

講演番号：3C21a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ C 校舎 21 会場

細胞形態に基づいた創薬ターゲット特定のためのハイコンテントなデータベースの作成

Development of the high-content database for the drug target identification based on cellular morphology

○徳光 綾子[1]、伊藤 昭博[1,2,3]、吉田 稔[1,2,3]([1]理研・基幹研究所・ケミカルゲノミクス研究グループ、[2]理研・基幹研究所・吉田化学遺伝学研究室、[3]科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業)
○Ayako TOKUMITSU[1], Akihiro ITO[1,2,3], Minoru YOSHIDA[1,2,3] ([1]RIKEN Advance Science Institute Chemical Genomics Research Group, [2]RIKEN Advance Science Institute Chemical Genetics Laboratory, [3]CREST JST)

ユニークな生理活性を持つ化合物の作用機序を明らかにするためには、その標的タンパク質を同定する必要がある。標的タンパク質の同定方法として、目的化合物を固相化したビーズや蛍光標識プローブ等を用いる方法があるが、このような物理的相互作用は一般に不安定であったり、標的タンパク質の量が少ないなどの理由でしばしば検出が困難になるという問題点があり、化合物の標的タンパク質を同定する新規手法が求められている。ヒト培養細胞は多くの化合物に対して感受性を示し、化合物による細胞の形態変化は特定の標的タンパク質機能の欠損が原因であると考えられる。そこで本研究は、標的既知の化合物を添加した時の細胞の形態変化に基づいた表現型データベースを作成し、新規の化合物の標的同定方法を確立することを目的とした。方法は、ヒト肺がん A549 細胞を培養し、WST-1 を用いて各化合物の 100% 増殖阻害濃度である GI100 を求めた。この GI100 値に基づいた濃度で A549 細胞に各化合物を添加し、培養 24 時間後に Hoechst 33342、Mitotracker-red および Alexa Fluor 488 Phalloidin を用いて、核、ミトコンドリアおよびアクチンをそれぞれ染色した。 染色後、IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare Japan) を用いて細胞画像を撮影し、細胞の面積、核の外周、ミトコンドリアの輝度値およびアクチンの蛍光強度などを指標としてパラメーターを設け、ヒートマップおよび樹形図を作成した。その結果、樹形図およびヒートマップ上では、同じ分子を標的とする化合物が隣接することが示された。このことは、表現型としての細胞形態変化を定量化することによって、化合物を標的経路ごとに分類可能であることが明らかになった。よって、本データベースは細胞形態に基づいた作用標的の同定に有用であると考えられる。

Cellular morphology, Molecular target

講演番号：3C21a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ C 校舎 21 会場

がん細胞にアポトーシスを誘導するアセトアミド誘導体の活性評価と作用機序解析

Study on the effects and action mechanism of an acetamide derivative that induces apoptosis in cancer cells

○河村 達郎、近藤 恭光、本田 香織、関根 朋美、室井 誠、近藤 久恵、川谷 誠、長田 裕之 (理研基幹研・ケミカルバイオロジー)
○Tatsuro KAWAMURA, Yasumitsu KONDOH, Kaori HONDA, Tomomi SEKINE, Makoto MUROI, Hisae KONDO, Makoto KAWATANI, Hiroyuki OSADA (Chem. Biol., RIKEN ASI)

【目的】生理活性物質の作用機序の解明は、生命現象の理解につながる重要なプロセスである。我々は、理研天然化合物バンク(NPDepo)に収蔵されている化合物の活性を評価する過程で、がん細胞に短時間でアポトーシスを誘導するアセトアミド誘導体を見出した。本研究は、この化合物の効果の検証と作用機序の解明を目的とした。

【方法・結果】 本研究で見出したアセトアミド誘導体は、ヒトの 19 種類のがん細胞に対して細胞毒性を示した(WST-8 assay, IC50: 1-21 μM)。この化合物が誘導する細胞死は非常に早い時間に起こる点が特徴的であり、T 細胞リンパ腫 Jurkat 細胞と子宮頸がん HeLa 細胞では Caspase 依存的なアポトーシスであることを確認した。また、etoposide や camptothecin などの抗がん剤に対する Jurkat 細胞の感受性を向上させることを見出した。次に、この化合物の細胞内標的分子を同定するために、光親和型反応により化合物を固定化したアフィニティービーズを作製し、Jurkat 細胞抽出液中の結合タンパク質の解析を行った。その結果、結合タンパク質として glutathione S-transferase (GST)のアイソザイム GSTP1-1 を含む複数のタンパク質を同定した。GSTP1-1 は多くのがん細胞で過剰発現しており、細胞の抗がん剤感受性を低下させることが知られている。今回、アセトアミド誘導体の詳細な作用機序について報告する。

apoptosis, acetamide derivative, NPDepo

講演番号：3C21a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ C 校舎 21 会場

機能未知ポリ ADP リボシル化酵素 PARP10 のケミカルバイオロジーによる機能解析
Functional analysis of PARP10, a poly-ADP-ribose polymerase, by chemical biology approach

○竹本 靖[1,2]、八代田 陽子[1]、岡本 怜衣香[3]、高木 美香[3]、斎藤 臣雄[4]、長田 裕之[4]、吉田 稔[1,3] ([1]理研基幹研・ケミカルゲノミクス、[2]日本学術振興会特別研究員、[3]理研基幹研・創薬シード化合物探索、[4]理研基幹研・ケミカルバイオロジー)
○ Yasushi TAKEMOTO[1,2], Yoko YASHIRODA[1], Reika OKAMOTO[3], Mika TAKAGI[3], Tamio SAITO[4], Hiroyuki OSADA[4], Minoru YOSHIDA[1,3] ([1]Chemical Genomics Research Group, RIKEN ASI, [2]JSPS Research Fellow, [3]Seed Compounds Exploratory Unit for Drug Discovery Platform, RIKEN ASI, [4]Chemical Biology Core Facility, RIKEN ASI)

（目的）PARP10 はポリ ADP-リボシル化酵素（PARP）の一つであるが、その機能は不明である。我々はケミカルバイオロジー手法により PARP10 の機能解析を行うために、分裂酵母に PARP10 を過剰発現させるとその酵素活性に依存して生育が阻害されることを利用し、PARP10 遺伝子過剰発現株の生育阻害の回復を指標にして PARP10 阻害剤を探索した。今回、理研・NPDepo 化合物ライブラリーから活性化合物（Decaparpin-A と命名）を発見し、その作用機序について解析したので報告する。（方法と結果）Decaparpin-A（DCP-A）は in vitro で PARP10 の酵素活性を選択的に阻害し、またセミインタクト細胞で PARP10 自身のポリ ADP-リボシル化を阻害した。次に DCP-A の HeLa 細胞の増殖に及ぼす影響を検討したところ、その濃度依存的に細胞増殖は抑制された。そこで細胞周期に及ぼす影響を検討したところ、DCP-A の添加により G2/M 期の細胞の蓄積が認められた。G2 期から M 期への進行には Cyclin B1 の発現と Cdc2 の脱リン酸化が重要なステップであるが、DCP-A を添加してもこれらにはほとんど影響はなかった。一方、M 期進行時に histone H3 は Aurora B によりリン酸化されるが、DCP-A の添加により顕著に histone H3 のリン酸化が亢進した。DCP-A を HeLa 細胞に添加しても Aurora B の発現量には影響がなかったことから、次に PARP10 が Aurora B の活性を制御しているか検討した。その結果、PARP10 は Aurora B を in vitro でポリ ADP-リボシル化し、PARP10 によりポリ ADP-リボシル化された Aurora B は酵素活性が低下することを見出した。更に、DCP-A は PARP10 による Aurora B のポリ ADP-リボシル化を in vitro で阻害した。以上の結果より、DCP-A は PARP10 を阻害することで Aurora B の異常な活性化を誘導し、正常な細胞分裂期進行を妨げることで細胞増殖を抑制することが示唆された。

chemical biology, PARP10, cell cycle

講演番号：3C21a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ C 校舎 21 会場

化合物アレイによるヘッジホッグ伝達経路の阻害剤の探索

Screening for inhibitors of hedgehog signaling through chemical array

○近藤 恭光、河村 達郎、本田 香織、関根 朋美、長田 裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）
○Yasumitsu KONDOH,Tatsuro KAWAMURA,Kaori HONDA,Tomomi SEKINE,Hiroyuki OSADA (Chem. Biol., RIKEN ASI)

【目的】分泌タンパク質であるソニックヘッジホッグ(Shh)は、正常な胚発生に必須なタンパク質であるが、基底細胞腫、骨芽細胞腫、膵臓癌などの癌細胞において Shh シグナル伝達経路の異常な活性化が報告されている。Shh は、45kDa の Shh から活性型の 20 kDa の N 末端断片(ShhN)への自己切断、C 末端へのコレステロール修飾、N 末端へのパルミテート修飾が起こり、細胞外に分泌される。腫瘍細胞から分泌された ShhN が、腫瘍細胞の周囲に存在する間質細胞の Shh シグナル伝達経路を活性化させ腫瘍の成長を誘導するため、Shh シグナル伝達経路は抗がん剤の標的として非常に注目されている。我々は、構造多様性を有している天然物、天然物誘導体を固定化した化合物アレイを用いて、Shh に結合しシグナル伝達経路を阻害する化合物の探索を目的とした。

【方法と結果】ShhN タンパク質を用いた化合物アレイスクリーニングにより、ShhN に結合する化合物の探索を行った。ShhN タンパク質として、His タグ融合タンパク質またはタグを持たないタンパク質を用い、それぞれの検出は、抗 His 抗体または複数の抗 ShhN 抗体により行った。その結果、約 3 万化合物の中から 322 種のヒット化合物を見いだした。これらの中から、2 つ以上の抗体で検出された 48 化合物が再現性も見られていると考え、次に SPR イメージングにより ShhN との相互作用解析を行った。48 化合物のスポットを SPR チップに固定化し、マウス ShhN タンパク質との直接的な結合を確認した。その結果、7 化合物において ShhN との強い結合が観察された。

これらの 7 化合物に関して、次に Shh 阻害活性の評価を行った。マウス未分化間葉細胞 C3H10T1/2 に ShhN を処理すると、骨芽細胞への分化が誘導されることが知られている。骨芽細胞への分化の程度は、マーカータンパク質であるアルカリホスファターゼの活性を測定することで評価できる。そこで、これらの 7 化合物が、Shh-N が誘導する C3H10T1/2 細胞の分化を抑制するのかを確かめることにより、ShhN 阻害活性の評価を試みた。C3H10T1/2 細胞に化合物と ShhN を 96 時間処理した後、蛍光基質を用いて細胞抽出液のアルカリホスファターゼ活性を測定した。その結果、2 化合物に阻害活性が認められた。

chemical array, Sonic hedgehog, SPR imaging

講演番号：3C21a15
講演日時、会場：3 月 26 日 11:48～ C 校舎 21 会場

Proteobase を用いた新規プロテアソーム阻害剤ピロリジラクトンの標的同定
Target identification of a new cytotoxic fungal metabolite, pyrrolizilactone, by using Proteobase
○室井 誠、近藤 久恵、平田 泰子、青野 晴美、川谷 誠、野川 俊彦、長田 裕之 (理研基幹研・ケミカルバイオロジー)
○Makoto Muroi, Hisae Kondo, Yasuko Hirata, Harumi Aono, Makoto Kawatani, Toshihiko Nogawa, Hiroyuki Osada (Chem. Biol., RIKEN　ASI)

【目的】天然化合物は有用な生理活性物質の探索源として重要である。我々は、理研天然化合物バンク（NPDepo）の糸状菌フラクションライブラリーを用いたスクリーニングにおいて新規化合物ピロリジラクトン（pyrrolizilactone）の単離/構造決定をした。一方、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析システム(2D-DIGE)を用いて、薬剤処理HeLa細胞のプロテオームの変化を比較する事によって、新規化合物の標的分子の推定するシステム(Proteobase)を構築した。Proteobaseを用いて新規化合物ピロリジラクトンの標的の推定と同定を行なった。

【方法】プロテオーム解析を行う時の濃度決定をする為に、薬剤でHeLa細胞を48時間処理後、WST-8を用いて細胞数を測定した。細胞の増殖をほぼ完全に阻害する濃度でプロテオーム解析を行なった。コントロール並びに18時間薬剤処理を行なったHeLa細胞から調製したライゼートを蛍光標識した後、２次元電気泳動を行ない2D-DIGEのシステムを用いてスポット定量を行なった。約300スポットの定量データを用いて、データベースの化合物とクラスター解析を行なった。また、プロテアソーム20S画分ならびに、蛍光基質を用いてプロテアソームの活性に及ぼす作用を検討した。抗ユビキチン抗体を用いたウエスタンブロティングや、フローサイトメトリーを用いて作用を検討した。

【結果】ピロリジラクトンはHeLa細胞、並びに、HL-60細胞の増殖を阻害し、IC_{50}はそれぞれ、7.4と 2.7 μMであった。クラスター解析の結果、ピロリジラクトンはプロテアソーム阻害剤(Lactacystin, MG132)、並びに、HSP90阻害剤(Geldanamycin, Radicicol)を含むクラスターに分類された。プロテアソーム阻害剤やHSP90阻害剤で見られるHSP類のスポットの顕著な増加がピロリジラクトンでもみとめられ、特に、プロテアソーム阻害剤で顕著なHSP27のスポットの増加が認められることから、ピロリジラクトンの標的はプロテアソームである事が推測された。そこで、20Sプロテアソーム画分を用いてin vitroでのプロテアソーム阻害活性を検討したところ、ピロリジラクトンに阻害活性が認められた。また、HeLa細胞を用いて、細胞内のユビキチン化蛋白質に及ぼす作用を検討したところ、ピロリジラクトンで顕著なユビキチン化蛋白質の蓄積が認められた。また、細胞周期に及ぼす作用をプロテアソーム阻害剤MG132と比較したところ、同様のプロファイルを示した。以上の結果からピロリジラクトンの標的はプロテアソームである事が示された。

pyrrolidilactone, proteome, proteasome

講演番号：3C21p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ C 校舎 21 会場

UTKO1 を用いたホヤ脊索管形成機構の解析

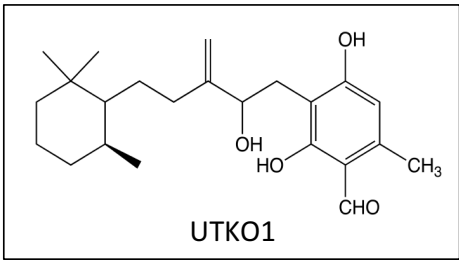
Analysis of *Ciona* Notochord Tubulogenesis by Using UTKO1

○溝谷 優治[1]、鈴木 麻友[1]、渡邉 秀典[2]、高取 聡美[2]、堀田 耕司[1]、岡 浩太郎[1]、田代 悦[1]、井本 正哉[1] ([1]慶大・理工、[2]東大院農)

○Yuji MIZOTANI[1], Mayu SUZUKI[1], Hidenori WATANABE[2], Satomi TAKATORI[2], Kohji HOTTA[1], Kotaro OKA[1], Etsu TASHIRO[1], Masaya IMOTO[1] ([1]Keio Univ., [2]Tokyo Univ.)

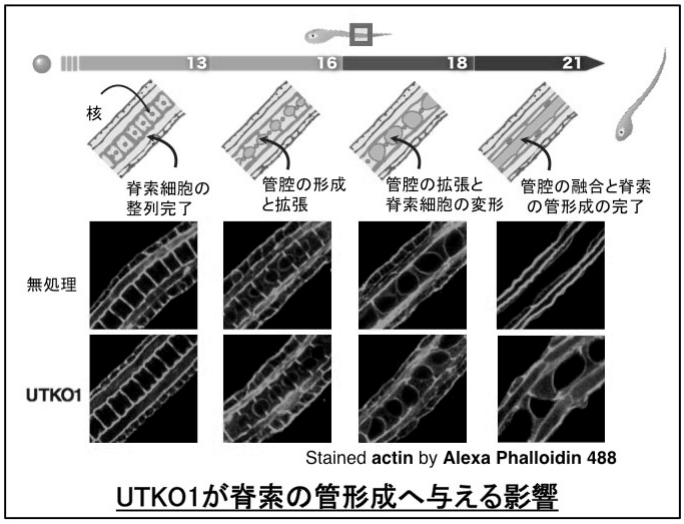
【目的】生体の組織・器官形成の分子機構の解明は生命科学の重要な課題であるが，実験動物の制約や解析の複雑性から未だ理解は遅れている．当研究室では全ゲノム配列が解読済み，また初期発生が早い等の利点を備えたヒトと近縁な脊索動物であるカタユウレイボヤとケミカルジェネティクスの手法を組み合わせることで組織・器官形成の分子機構の解析を試みてきた．

【方法と結果】がん細胞遊走阻害物質 UTKO1 を受精 6 時間後のカタユウレイボヤ幼生に作用させて，21 時間後のホヤを観察したところ尾が短くなっていることを見いだした．通常，尾の内部では脊索細胞間で管腔が生じ，それらが拡大し互いに連結することで，尾の伸長を伴いながら脊索の管形成が進行する．そこで脊索管形成を共焦点顕微鏡にて観察したところ，UTKO1 処理により，管腔の連結が完了せず途中で阻害されていることがわかった．



UTKO1

UTKO1 はヒト扁平上皮癌 A431 細胞において，タンパク質 14-3-3ζに直接結合することで細胞遊走を阻害することを我々は報告している[1)]．そこで，UTKO1 のホヤ脊索管形成阻害の標的タンパク質もホヤ 14-3-3 ホモローグであると考えた．ホヤには 4 種類の 14-3-3 ホモローグが知られており（εa, εb, γ1, γ2），それぞれのリコンビナントタンパク質とビオチン誘導体を用いてそれぞれのホヤ 14-3-3 アイソフォームと UTKO1 との結合を *in vitro* で確認した．その結果，UTKO1 は 14-3-3 εa 特異的に結合していることがわかった．以上の結果から，UTKO1 は 14-3-3 εa に直接結合することによってホヤの脊索管形成を阻害している可能性が示唆された．



UTKO1が脊索の管形成へ与える影響

1) Hiroki Kobayashi, *et al., J. Biol. Chem.* **286 (45)**:39259-39268, 2011

UTKO1, notochord tubulogenesis, *Ciona intestinalis*

講演番号：3C21p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ C 校舎 21 会場

オートファジー制御機構の網羅的解析に向けた細胞評価系の構築

Establishment of Comprehensive Analytical Methods for Autophagy-regulatory System Based on Chemical Genomics

○加藤 直裕、間木 重行、田代 悦、井本 正哉（慶大理工）
○Naohiro KATOH,Shigeyuki MAGI,Etsu TASHIRO,Masaya IMOTO (Keio Univ.)

オートファジーは低栄養やミトコンドリア損傷といった刺激に応答してタンパク質を大規模に分解する細胞内イベントであり, がんなどの難治性疾患に関与している. しかしながら, 上記のような様々なストレス環境がもたらす複雑な制御シグナルの共通性及び多様性に関しては未だ不明である．そこで我々はケミカルゲノミクスの手法に基づいて，標的分子既知の阻害剤が様々なストレスによって誘導されるオートファジーに与える影響を評価し，オートファジー制御シグナルの全容を解明することを目的とした.

上記目的の達成にはオートファジー誘導レベルの定量的な評価が必要である．しかしながら，オートファゴソーム膜に局在する LC3 タンパク質に GFP を融合させてオートファゴソームを蛍光顕微鏡により検出する従来の手法では，オートファジーの誘導とオートファゴソームの分解阻害とを区別できない. そこで我々は, オートファゴソームの成熟体であるオートリソソームを指標とした, 純粋なオートファジー誘導レベル評価系の構築に取り組んだ.

オートリソソームの検出法としては，GFP が酸性条件下で消光する性質を利用し，LC3 にさらに赤色蛍光タンパク質(mCherry)を融合させることで中性のオートファゴソームを GFP と mCherry の共局在により黄色，酸性のオートリソソームを赤色の輝点として標識する手法[1]が知られている．そこでまず，mCherry-GFP-LC3 を発現させた HeLa 細胞の stable clone を樹立した．続いて，画像解析ソフト ImageJ を用いて蛍光顕微鏡画像からオートリソソームを定量的に抽出する手法を構築し，上記 stable clone のオートリソソーム量を評価した. さらに蛍光タンパク質は分解されにくいことから，継代による蛍光タンパク質の蓄積を回避するために，Tet-On® system に応答する stable clone を樹立した．このようにして構築した細胞の蛍光顕微鏡画像を解析した結果，rapamycin によりオートファジーを誘導するとオートリソソームが増加したのに対し，bafilomycin A1 によりオートリソソームへの成熟を阻害するとオートファゴソームの増加のみが確認されたことから，構築した手法によってオートファジーの誘導レベルを定量的に評価できることが示唆された.

[1] Kimura S, et al., *Autophagy*, 2007

autophagy, quantitative analysis, imaging

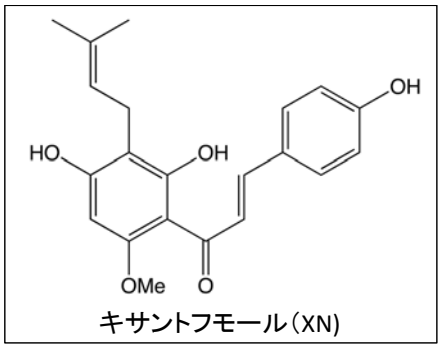
講演番号：3C21p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ C 校舎 21 会場

ホップ抽出物キサントフモールの抗がん作用解析

Antitumor Effect of Xanthohumol on human tumor cells

○金墻 周平、田代 悦、井本 正哉（慶大理工）
○Shuhei Kanagaki,Etsu Tashiro,Masaya Imoto (Keio Univ.)

【背景および目的】オートファジーはタンパク質を非選択的に分解する経路であり、がんの生存に深く関わっていることが知られている。しかしながらその詳細な機構は明らかになっていない。そこで我々はオートファジーの機能解析に有用なバイオプローブを取得する目的でオートファジー制御化合物を探索した。その結果ホップに含まれる化合物 Xanthohumol(XN)に目的の活性があることを見出してきた。さらに理研・長田先生らによって調製された XN のアフィニティービーズを用いてその標的分子を探索したところ、XN は Valosin-containing protein(VCP)と結合することでオートファジーを阻害することを明らかにした[1]。VCP は多様な細胞機能に関与していることが報告され、近年固形がんの生存への関与が注目されている。そこで本研究では XN を用いて VCP とがんとの関係性を検討することを目的とした。



キサントフモール（XN)

【方法および結果】様々な遺伝的背景を有する 16 種類のヒト腫瘍細胞株に対し、DNA 断片化を指標とし XN のアポトーシス誘導活性を評価した。その結果、XN は SW480 細胞や HCT116 細胞などの K-Ras に活性型変異を有する細胞株に対して高いアポトーシス誘導活性を示した。そこで次に K-Ras 活性型変異における XN のアポトーシス誘導能と VCP との関係性を loss-of-function(LOF)試験および gain-of-funciton(GOF)試験で評価した。LOF 試験では XN 感受性が高い K-Ras 変異株と XN 低感受性株を用いて siRNA により VCP ノックダウンによるアポトーシス誘導活性を評価した。その結果、VCP ノックダウンにより K-Ras 活性型変異株ではアポトーシスが誘導されたが，低感受性細胞株では顕著なアポトーシス誘導がみられなかった。一方，GOF 試験においては、正常 NRK 細胞と活性型変異 K-Ras を過剰発現させた K-Ras/NRK 細胞を用いて XN によるアポトーシス誘導活性を評価した。その結果、K-Ras を過剰発現させることで， XN によるアポトーシス誘導が促進された。

【結論】XN は K-Ras 活性型変異株に対して高いアポトーシス誘導活性を示し，その過程には XN の標的タンパク質である VCP が密接に関与することが示唆された.

【参考文献】

[1]Sasazawa Y., et al, Xanthohumol impairs autophagosome maturation through direct inhibition of valosin-containing protein, ACS chem. biol., 2012, 7(5), pp892-900

Xanthohumol, K-ras, Valosin-containing protein

講演番号：3C21p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ C 校舎 21 会場

ヒト大腸がん細胞 LoVo における，EGF 誘導性 E-cadherin 発現抑制機構の解析

Studies on the suppression mechanism of E-cadherin expression by Epidermal Growth Factor in human colon carcinoma LoVo cells.

○大嶽 弘之、邊見 静香、久田 明里、小林 大貴、田代 悦、井本 正哉 (慶大理工)
○Hiroyuki ODAKE, Shizuka HENMI, Akari HISADA, Hiroki KOBAYASHI, Etsu TASHIRO, Masaya IMOTO (Keio Univ.)

【背景と目的】がんの転移に深く関わる現象として Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) が新たな薬剤ターゲットとして脚光を浴びている．EMT は発生過程や創傷治癒，そしてがんの転移に関わり，上皮細胞が運動能を獲得する非常に興味深い現象である[1]．この EMT は E-cadherin(-)N-cadherin（＋），Vimentin（＋）というマーカーで規定され，細長い形態への形態変化を伴うことが知られている．これまで EMT とがんとの関連性が強く示唆されてきたにもかかわらず，そのシグナルの詳細は未解明であるため我々はこれまでに詳細な EMT シグナルの解析を行ってきた．

こうした EMT の機構解析を行うなかで，我々はヒト大腸がん LoVo 細胞に対して TGF-β1 と EGF が EMT 様形態変化を伴って E-cadherin の発現抑制を誘導することを見出した．しかしながら E-cadherin の発現抑制機構を解析したところ，TGF-β1 の場合では先に述べたマーカーの変動を伴って EMT が誘導されていたのに対して，EGF は E-cadherin 以外の分子の発現に影響なく E-cadherin の発現が抑制されていた．この現象が生体内で果たす役割に関しては報告が無いため，我々はケミカルバイオロジーの手法で EGF による E-cadherin 発現抑制シグナル解析を行い，その生理的意義に迫りたい．

【方法と結果】TGF-β1 と EGF による，上皮細胞マーカーの E-cadherin，間葉系細胞マーカーの N-cadherin，Vimentin の発現変化をウェスタンブロット法によって検出したところ，TGF-β1 は E-cadherin の発現減少，N-cadherin・Vimentin の発現上昇を誘導したことから，EMT を誘導していることを確認できた．一方で EGF は E-cadherin の発現減少を誘導したものの，その他の EMT マーカーには一切発現変化が無かった．また EMT のプロセスに誘導されることが知られる，Snail，Slug，Twist[1]といった転写因子の発現を Realtime RT-PCR 法によって検出したところ，TGF-β1 の場合ではその発現が誘導されたのに対して，EGF では誘導されなかった．このことから EGF が誘導する E-cadherin の発現抑制は EMT とは全く異なる経路で誘導されていることが示唆された．

この EGF による E-cadherin の発現抑制機構を調べるため，標的既知の化合物ライブラリーである SCADS Inhibitor Kit から，EGF による E-cadherin の発現抑制をキャンセルするような化合物を探索した．その結果， MEK/ERK/JNK 経路と PI3K 経路が EGF による E-cadherin 発現抑制に関与していることを見出した．

［1］Thiery, J. P. et al. *Cell* (2009).

Epithelial-Mesenchymal Transition, E-cadherin, Epidermal Growth Factor

講演番号：3C21p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ C 校舎 21 会場

CysLT1 シグナリングによる Tiam1 の発現制御
CysLT1 signaling regulates the expression of Tiam1
○笠松 誠人、間木 重行、田代 悦、井本 正哉（慶大・理工）
○Masato Kasamatsu,Shigeyuki Magi,Etsu Tashiro,Masaya Imoto (Keio Univ.)

[背景・目的]細胞遊走はがん転移に必須な段階であり、細胞遊走を阻害する化合物の発見は抗がん治療に大きく寄与できると考えられる。これまでに我々はヒト扁平上皮がん由来 A431 細胞における上皮成長因子（EGF）刺激依存的細胞遊走において、EGF 刺激 5 分後及び 12 時間後に細胞遊走の必須な段階であるラメリポディア伸展が起こること、そしてラメリポディア伸展を促進する低分子量 G タンパク質 Rac1 の活性化にも 2 相性があることを見出してきた。さらに 2 回目の Rac1 の活性化には EGF 刺激 6 時間後に上昇する RacGEF である Tiam1 の発現が必要であることが示されているが、その発現制御機構はいまだ不明である(i)。その一方で我々はロイコトリエン(LT)C4、LTD4 及びその受容体であるシステイニルロイコトリエン 1 型受容体(CysLT1)が A431 細胞の 2 回目の Rac1 の活性化及び細胞遊走に必須であることを見出してきた。そこで本研究では、CysLT1 下流のシグナル伝達が EGF 刺激に応答して上昇する Tiam1 の発現量を制御している可能性を検証した。
[結果]我々は CysLT1 の選択的阻害剤である MK-571 及び Montelukast を A431 細胞に添加すると、EGF による Rac1 活性化を阻害する濃度域で, EGF 刺激によって上昇する Tiam1 の発現を濃度依存的に抑制することを見出した。また siRNA 実験によって CysLT1 をノックダウンした細胞において、EGF 刺激によって上昇する Tiam1 の発現及び EGF 刺激 12 時間後の Rac1 の活性化が抑制されることを見出した。このことから EGF による Tiam1 の発現は CusLT1 シグナリングによって制御されていることが明らかになった. 一方で CusLT1 のリガンドであるロイコトリエンを産生する 5-リポキシゲナーゼ (5-LO) の阻害剤も CysLT1 の阻害剤同様に、A431 細胞に対して EGF 刺激による細胞遊走, Rac1 活性化, さらには 2 相目の Tiam1 の発現を抑制した。さらに 5-LO 阻害剤によって抑制された Tiam1 の発現は LTC4、LTD4 の添加により回復した。
[結論]以上の結果から、EA431 細胞においては, EGF 刺激によって 5-LO を介した CysLT1 シグナルが Tiam1 の発現を誘導し, その結果 EGF 刺激 12 時間後の Rac1 の活性化を制御していることが示唆された。

(i)kobayashi H et al, J Biol Chem,2011

Lamellipodia, CysLT1, Tiam1

講演番号：3C21p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ C 校舎 21 会場

膜基板型抗体マクロアレイを用いたマルホルミン A_1 の作用機序解析へのアプローチ

An approach to the analysis of the mode of action of malformin A_1 using membrane-based antibody macroarrays

○小泉 幸央[1]、長井 賢一郎[2]、高 立娜[1]、蓮見 惠司[3]、小代田 宗一[1]、杉山 俊博[1]([1]秋田大院医、[2]北里大薬、[3]東農工大院農)
○ Yukio KOIZUMI[1], Kenichiro NAGAI[2], Lina GAO[1], Keiji HASUMI[3], Souichi KOYOTA[1], Toshihiro SUGIYAMA[1] ([1]Akita Univ., [2]Kitasato Univ., [3]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】糸状菌 *Aspergillus niger* が生産する環状ペンタペプチド、マルホルミン A_1（MA_1）は植物に対する催奇形性物質として当初見出されたが、我々は血栓溶解を賦活化する低分子化合物の探索過程で本物質を再発見してきた。MA_1 はウロキナーゼ発現細胞に作用し、プラスミン活性を増加させるが、詳細な作用機序は不明である。今回、MA_1 蛍光標識体を作成して細胞局在を調べたところ、細胞内に蛍光が観察された。そこで MA_1 の活性発現に関与する細胞内調節機構を同定することを目的に、膜基板型抗体マクロアレイを行なった。
【方法】MA_1 蛍光標識体は、固相ペプチド合成により作製した $LysMA_1$ の側鎖アミノ基にローダミンを導入し作製した。細胞溶解液は、フィブリンをコートしたマイクロプレート上においてヒト血漿存在化で反応させたヒト単球様 U937 細胞から調製した。膜基板型抗体マクロアレイは R&D システムズ社の Proteome Profiler™ Antibody Arrays を用いた。*In vitro* 血栓溶解試験は、[^{125}I]標識フィブリンをコートしたマイクロプレート上でヒト血漿及び U937 細胞を反応後、反応上清に遊離した[^{125}I]標識フィブリン分解物の定量により評価した。
【結果】膜基板型抗体マクロアレイを用いて、無処理 U937 細胞溶解液と MA_1 処理 U937 細胞溶解液の間に見られるシグナル強度の差を調べた結果、リン酸化 p90 ribosomal S6 kinase 1（RSK1）（Ser380）のシグナル強度の上昇が確認された。RSK1 は、MAPK シグナリングの誘発によってリン酸化を介した活性化を受けるセリン／スレオニンキナーゼである。このシグナル強度の上昇が全 RSK1 タンパク質レベルの増加または RSK1 のリン酸化レベルの上昇に起因するのかを Western blot により調べた結果、MA_1 処理により全 RSK1 タンパク質レベルの変動が見られなかったのに対し、RSK1 のリン酸化レベルの上昇が確認された。MA_1 が賦活化する U937 細胞の血栓溶解活性に対する RSK 阻害剤である SL0101 の影響を調べた結果、SL0101 は MA_1 による血栓溶解の賦活化を濃度依存的に阻害した。以上の結果から、RSK1 の活性化が MA_1 による U937 細胞の血栓溶解の賦活化に関わることがわかった。

antibody macroarray, malformin, mode of action

講演番号：3C21p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ C 校舎 21 会場

アフリカ伝承薬成分 Voacangine はメントール受容体 TRPM8 の強力なアンタゴニストである
Voacangine, a component of an African traditional medicine, is a novel TRPM8 antagonist with high potency

○寺田 祐子[1]、堀江 俊治[2]、高山 廣光[3]、渡辺 達夫[1] ([1]静県大院薬食、[2]城西国際大薬、[3]千葉大院薬)
○Yuko TERADA[1], Syunji Horie[2], Hiromitsu Takayama[3], Tatsuo Watanabe[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Josai. Int. Univ., [3]Chiba Univ.)

【背景・目的】TRPM8 は、低温や menthol・icilin による冷感を受容するイオンチャネルである。TRPM8 は口腔内から消化器官・皮膚など、全身の感覚神経に発現している。TRPM8 は低温アロディニアや低温痛に関与することから、新たな鎮痛薬として、TRPM8 遮断薬が精力的に開発されている。これまで、天然由来の TRPM8 アンタゴニストはほとんど報告がないために、TRPM8 遮断薬の開発は合成品を基に進められてきた。しかし、既知化合物を改変するアプローチではその展開に限界があると考え、私たちは天然物から新骨格の TRPM8 アンタゴニストを探索してきた。

私たちは、*Voacanga africana* 中のアルカロイド voacangine が、TRPM8 を強力に阻害することを明らかにした。*V. africana* はアフリカに自生する樹木で、アフリカの伝承療法において、止瀉薬的に用いられている。

【方法】マウス TRPM8 を発現させた HEK 細胞を用い、サンプルによる細胞内 Ca^{2+}濃度の変化を FLEX station Ⅱ（Molecular Devices）にて測定し、受容体活性を評価した。TRPM8 アゴニストに menthol と icilin を、合成アンタゴニストに BCTC と capsazepine、天然アンタゴニストに capsaicin と resiniferatoxin、cinnamaldehyde、arachidonic acid を使用した。また阻害様式の解析は、Schild plot により行った。

【結果・考察】voacangine は、menthol・icilin による TRPM8 の活性化を濃度依存的に抑制した。voacangine の TRPM8 阻害様式を Schild plot により解析したところ、menthol を競合阻害し（$pA_2 = 5.07 \pm 0.12$, $K_B = 8.50 \pm 0.76$ μM, slope = 1.1 ± 0.0）、icilin を非競合的に阻害することがわかった。menthol、icilin に対する IC_{50} はそれぞれ、9 μM、7 μM であり、合成 TRPM8 アンタゴニストの capsazepine よりも強く、BCTC よりも少し弱い阻害作用を示した。また、天然物中では圧倒的に強い TRPM8 阻害活性を示した。

voacangine は *V. africana* に特有のアルカロイドであるが、これまでにアルカロイドの TRPM8 アンタゴニストは報告がなく、voacangine は新規骨格のアンタゴニストである。また、天然由来の TRPM8 競合アンタゴニストは全く報告がなく、合成品においても、そのほとんどが非競合アンタゴニストである。これらのことから、voacangine は menthol を競合阻害する非常に珍しい化合物であり、新たなタイプの TRPM8 遮断薬開発に貢献すると期待される。

TRPM8 antagonist, voacangine, menthol

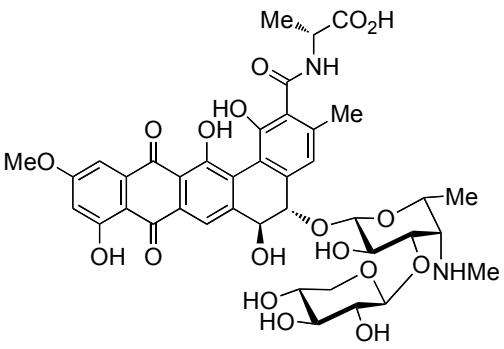
講演番号：3C21p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ C 校舎 21 会場

Pradimicin A とマンノビオース誘導体の結合解析
Binding Analysis of Pradimicin A with Mannobiose Derivatives

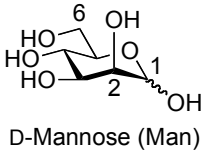
○中川 優[1]、五十嵐 康弘[2]、伊藤 幸成[1,3] ([1]理研・基幹研、[2]富山県大・生工、[3]JST・ERATO)
○Yu NAKAGAWA[1], Yasuhiro IGARASHI[2], Yukishige ITO[1,3] ([1]RIKEN, [2]Toyama Prefectural Univ., [3]JST・ERATO)

【目的】 Pradimicin A (PRM-A) は，Ca^{2+} 存在下で D-マンノース (Man) を認識するユニークな天然低分子化合物である．PRM-A は，Man を含む糖鎖に結合することにより，他に類を見ない抗菌作用および抗 HIV 作用を示す．現在のところ，PRM-A は糖鎖の非還元末端 Man 残基にのみ結合すると仮定されているが，本仮説を実証した研究例はない．我々は，固体 NMR を用いた独自の相互作用解析から，PRM-A が Man の 1 位および 6 位を認識していないことを示す知見を得ている．本知見は，非還元末端以外のα-1,6 結合で連結している Man 残基にも PRM-A が結合する可能性を示唆するものである．そこで本研究では，マンノビオース誘導体を用いて本可能性を検証した．

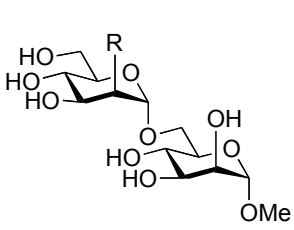
【方法および結果】 我々はこれまでに，PRM-A が Man の 2-deoxy 体とは全く結合しないことを確認している．そこで，α-1,6-およびα-1,2-マンノビオース (**1**, **3**) とそれらの非還元末端 Man 残基を 2-deoxy 体とした誘導体 (**2**, **4**) を調製し，等温滴定カロリメトリー (ITC) を用いて PRM-A との結合を解析した. その結果, **1** および **3** は Man と同様に PRM-A と結合したのに対し，α-1,2-マンノビオースの deoxy 体 (**4**) は全く結合しないことが確認された. 一方で，α-1,6-マンノビオースの deoxy 体 (**2**) は, **1** や **3** に比べて結合能は低いものの, PRM-A と顕著に結合することが明らかとなった. 本結果は, PRM-A が非還元末端 Man 残基だけでなく，6 位に糖残基を有する Man 残基にも結合することを強く示唆している.



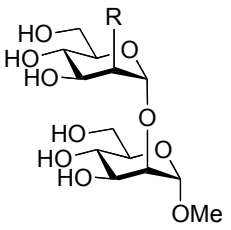
Pradimicin A (PRM-A)



D-Mannose (Man)



1 : R = OH **2** : R = H



3 : R = OH **4** : R = H

pradimicin, mannobiose, carbohydrate recognition

講演番号：3C21p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ C 校舎 21 会場

D-アロース中鎖脂肪酸エステルのヒト白血病細胞増殖抑制活性

Antiproliferative Activity of D-Allose Fatty Acid Esters against Human Leukemia Cell Line MOLT-4F

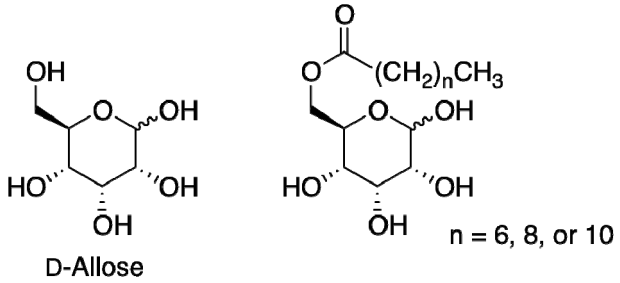
○柳田 亮、小川 知紗、小橋 克哉、川浪 康弘 (香川大農)
○Ryo C. YANAGITA,Chisa OGAWA,Katsuya KOBASHI,Yasuhiro KAWANAMI (Kagawa Univ.)

[目的]

天然に稀にしか存在しない希少糖の一種 D-allose は D-glucose の C-3 位エピマーであり，植物生長抑制作用，抗酸化作用を示すことがこれまでに明らかにされている．また，D-allose は様々な種類のがん細胞に対して増殖抑制効果を示すことから注目されている．しかしながら，D-allose のがん細胞に対する有効濃度はミリモーラーオーダーと比較的高く，活性の大幅な向上が求められている．最近研究で，D-allose の C-6 位水酸基を中鎖脂肪酸エステルとし疎水性を高めた誘導体が，植物に対して D-allose の 10 倍以上高い活性を示すことを明らかにされている.[1] 本研究では，D-allose 中鎖脂肪酸エステル誘導体のヒト白血病細胞株に対する増殖抑制活性を評価した.

[方法と結果]

脂肪酸側鎖の炭素数がそれぞれ 8，10，12 の D-allose 6 位脂肪酸エステル誘導体をリパーゼを用いた選択的アシル化反応によって調製し，D-allose に対して相対的に高い感受性を示すヒト白血病 MOLT-4F 細胞株に対する増殖抑制活性を評価した．その結果，D-allose 誘導体は D-allose よりも数十倍高い活性を示し，側鎖の炭素数 12 の誘導体の活性が最も高かった．さらに，各種 D-allose 誘導体の白血病細胞増殖抑制活性についても併せて報告する.



[1] Kobayashi, M., *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, *74*, 216.

rare sugar, allose, cancer

講演番号：3C21p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ C 校舎 21 会場

Senna occidentalis 抽出物による創傷回復効果－MMP の発現について－
Wound healing activity of *Senna occidentalis* extract with special reference to MMP expression
○元矢 知志[1]、野村 正人[2]、大谷 浩[1] ([1]島根大医、[2]近畿大工)
○Tomoyuki MOTOYA[1], Masato NOMURA[2], Hiroki OTANI[1] ([1]Shimane Univ. Med., [2]Kinki Univ. Eng.)

【目的】*Senna occidentalis*（*S.occidentalis*）の種子や葉を煎じたものは，民間伝承によると創傷や口内炎などに対する効果があるとされている。しかし，*S.occidentalis* の生理活性に関する報告は少なく，上記の効果は科学的に裏付けられていない。我々は以前の報告で，皮膚創傷モデルラットにおいて，*S.occidentalis* 抽出物が創傷治癒を促進し，肉眼観察および組織観察により，同抽出物が創傷治癒過程において，上皮細胞の伸長促進，膠原線維の増加などの効果を持つことを示唆した。本研究は，創傷治癒過程に関連する因子のうち，上皮細胞の遊走，肉芽組織のリモデリングに影響を及ぼすと考えられている matrix metalloproteinase (MMP)の発現に着目し，以前の報告と同じ手法を用いて，同抽出物の効果について詳しく検討することを目的とした。
【方法】*S.occidentalis* 種子（2009 年採取，岐阜県産)を 75℃の熱水で抽出し凍結乾燥させ，2%濃度に調整したものを water extract (WE)とした。10 週齢の雄性 SD ラットに，上皮から皮下組織にかけて直径 8 mm の円形欠損創を作成した後，創に WE を 1 日 1 回塗布したものを実験群（WE 群)とした。対照群は蒸留水塗布（DW 群)および無処置（無処置群)とした。欠損創作成後，3，5，7 日の時点で，創部組織を採取し，homogenization buffer (0.05 M Tris-HCl，0.25% TritonX-100，0.02% $CaCl_2$) 中でホモジナイズし，遠心分離（12000 rpm，15 min)したものを tissue extract とした。これを用いて，ゼラチンを基質としたザイモグラフィー（gelatin zymography)法により，創部組織における MMP の発現について定量を行ない，実験群と対照群を比較した。
【結果】創傷部の縮小について実験群と対照群を比較すると，実験群では以前の報告と同様に，早期に創収縮がみられた。MMP の発現について実験群と対照群を比較したところ，対照群では，MMP-9 (92 kD，gelatinase B)，MMP-2 (72 kD，gelatinase A)の発現が強い状態であるのに対し，実験群では 5 日目・7 日目において，MMP-9，MMP-2 とも，発現が弱い傾向が見られた。MMP-9，MMP-2 の発現は，損傷組織のリモデリングや，過剰発現したコラーゲンの代謝分解に関与するとの報告があり，発現が長期に渡ることは創傷治癒を遅延させる原因となると考えられている。実験群は対照群と比較し，早期に MMP-9 および MMP-2 の発現が減少していることから，創部のリモデリングが進み，創傷治癒がより進行した状態であると考えられる。したがって，*S.occidentalis* 抽出物の創傷回復効果には，MMP-2 および MMP-9 の発現が関与していることが示唆された。

Senna occidentalis, wound healing, matrix metalloproteinase

講演番号：3C21p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ C 校舎 21 会場

クリックケミストリー型光親和性プローブを用いた AM 菌のストリゴラクトン結合タンパクの探索
Detection of strigolactone-binding protein in AM fungi using click chemistry-type photoaffinity probes
○中谷 成史、秋山 康紀、林 英雄 (阪府大院・生命環境)
○Yoshifumi Nakatani,Kohki Akiyama,Hideo Hayashi (Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

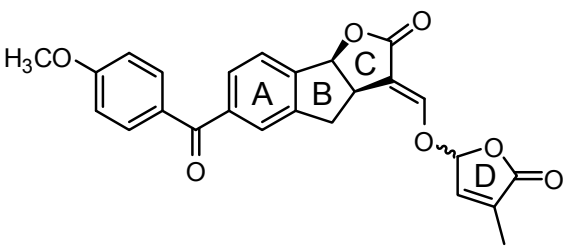
【目的】アーバスキュラー菌根菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, AM 菌) は，植物の根から分泌されるストリゴラクトン (strigolactone, SL) に応答して宿主認識反応である菌糸分岐を起こす。しかしながら, AM 菌の SL 受容体は未だ明らかになっていない。そこで, 我々は SL 受容体の単離同定を目指し，5-deoxystrigol (5DS)の A 環にオキシムを介して光親和性標識 (photoaffinity labeling, PAL) 基を導入し，タンパクの標識後に CuAAC 反応によりビオチン化するクリックケミストリー型分子プローブを設計した。これまでに 5 位にアルキニルフェニルジアジリンユニットを導入した PAL-5DS-5-oxime を合成している。今回，新たに 7 位に PAL 基を導入した PAL-5DS-7-oxime と，7-oxime プローブの D 環を 5,5-ジメチル-2-シクロヘキセン-1-オンに改変したプローブの合成と活性評価を行った。さらに，それらを用いた AM 菌抽出タンパクのラベリングを行い，検出された受容体候補タンパクの LC-MS/MS 分析を行なったので報告する。
【方法・結果】2-メチル-1,3-シクロヘキサンジオンを出発物として，13 ステップで鍵中間体である PAL-ABC ラクトン-7-oxime を得た。その後，ホルミル化を行い，ブロモブテノライドとカップリングさせることで目的の PAL-5DS-7-oxime を合成した。2'位エピマーをそれぞれ HPLC で分取し，2 つのプローブを得た。また，ホルミル化後にクロロシクロヘキセノンとカップリングさせることで D 環を改変したプローブを合成し，HPLC で精製した。7-oxime プローブの slow-moving epimer は 10 ng/disc で AM 菌 *Gigaspora margarita* の菌糸分岐を誘導し, D 環を改変したプローブは 1 μg/disc でも菌糸分岐を誘導せず，非活性であった。続いて，*Rhizophagus intraradices* から調整したタンパク抽出液に 5-および 7-oxime プローブを添加し，氷上で 365 nm の UV を照射して SL 結合タンパクを標識した後，クリック反応により標識タンパクにビオチンタグを導入した。これを二次元電気泳動で分離し，ストレプトアビジン-HRP を用いたウエスタンブロッティングによって標識されたタンパクスポットの化学発光を検出した。その結果，酸性領域側の 30 kDa から 60 kDa の領域で複数の SL 結合タンパクが検出された。そのうち比較的強く検出された 4 つのスポットについて LC-MS/MS 分析を行い, 7 つの SL 結合タンパクを同定した。また，非活性プローブについても同様の操作で菌体抽出タンパクのラベリングを行ったところ，同定した SL 結合タンパクを含むいくつかのスポットの消失が見られた。さらに，(+)-5DS によるラベリングの競合実験の結果，30 kDa 付近のタンパクのラベリングが強く阻害されることがわかった。現在，これらの受容体候補タンパクについて解析を進めている。

arbuscular mycorrhizal fungi, strigolactone, photoaffinity labeling

講演番号：3C21p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ C 校舎 21 会場

ベンゾフェノン型 GR24 光親和性分子プローブの合成と AM 菌菌糸分岐誘導活性
Synthesis and AM fungal hyphal branching-inducing activity of GR24 photoaffinity probes containing a benzophenone photophore
○秋山 康紀、山本 克治、林 英雄 (阪府大院・生命環境)
○Kohki Akiyama,Katsuji Yamamoto,Hideo Hayashi (Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Osaka Prefecture Univ.)

【目的】アーバスキュラー菌根菌（arbuscular mycorrhizal fungi, AM 菌）は植物の根から分泌されるストリゴラクトン（strigolactone, SL）を共生シグナルとして受容して宿主認識反応である菌糸分岐を起こす。この菌糸分岐は極微量の SL により構造依存的に引き起こされることから受容体を介したシグナル伝達系により誘導されると考えられている。しかしながら，これまでに AM 菌における SL の受容機構についてはほとんど全く明らかになっておらず，受容体候補タンパクも報告されていない。これまでに我々は光親和性標識法により AM 菌の受容体タンパクを同定するための分子プローブの開発を行ってきた。一昨年度の本大会では，天然 SL である 5-deoxystrigol や合成 SL アナログである GR24 の A 環に光感応基としてフェニルジアジリンを導入した分子プローブの合成と菌糸分岐活性について報告した。GR24 は A 環にベンゼン環を持つため，これをベンゾイル化することにより光感応基であるベンゾフェノン骨格を最小限の構造改変により構築することができる。今回，我々はベンゾフェノン型 GR24 分子プローブの合成と AM 菌菌糸分岐活性の評価を行ったので報告する。
【方法および結果】ベンゾフェノン骨格を構築するにあたり，まず 3-oxo-5-indanecarboxylic acid と anisole との Friedel-Crafts 反応による 5-(4'-methoxybenzoyl)-3-indanone の合成を試みた。条件検討の結果，トリフルオロメタンスルフォン酸無水物存在下で反応させることにより極めて低収率であるけれども目的物を得ることができた。この反応の主生成物の構造解析を行ったところ，3-oxo-5-indanecarboxylic acid の 3 位のオキソ基において反応が起こったものであると推測された。そこで，5-indanecarboxylic acid と anisole とを Friedel-Crafts 反応させてベンゾフェノン骨格を構築した後にベンジル位を酸化する方法を試みたところ，目的とする 5-および 6-(4'-methoxybenzoyl)-3-indanone が良好な収率で得られた。6-(4'-methoxybenzoyl)-3-indanone について GR24 合成と同じ 5 段階の反応により C 環ラクトン部分を構築して 6-(4'-methoxybenzoyl)-ABC ラクトンを得た。引き続き，ホルミル化，bromobutenolide とのカップリングを行うことにより，6 位にベンゾイル基を持つベンゾフェノン型 GR24 を合成した。現在，本化合物の AM 菌に対する菌糸分岐活性を評価すると共に，ベンゾイル部位への alkynyl-PEG リンカーの導入を試みている。



6-(4'-Methoxybenzoyl)-GR24

arbuscular mycorrhizal fungi, strigolactone, photoaffinity labeling

講演番号：3C21p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ C 校舎 21 会場

ミトコンドリア複合体－I に作用する光反応性フェンピロキシメートの結合部位の同定

Characterization of the binding site of photolabile fenpyroximate analogues in bovine mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I)

○村井 正俊、白石 悠祐、崎山 直人、三芳 秀人（京大院農・応用生命）
○Masatoshi MURAI,Yusuke SHIRAISHI,Naoto SAKIYAMA,Hideto MIYOSHI (Kyoto Univ.)

【研究の背景・目的】ミトコンドリア NADH-ユビキノン酸化還元酵素（複合体-I）は、基質の酸化還元反応と共役したプロトン輸送を行うエネルギー変換酵素であり、電子伝達を担う“**親水性ドメイン**”とプロトン輸送を担う“**膜ドメイン**”から構成される。複合体-I に対しては様々な阻害剤の存在が知られ、複合体-I に高い親和性で作用する化合物は、酵素の機能解明を行う上での強力なツールとなる。殺ダニ剤のフェンピロキシメートは、こうした特異的阻害剤の一つであり、ウシ心筋複合体-I の膜ドメインの構成成分である ND5 サブユニットに結合することが 2003 年に報告された。ところが、2010 年に明らかになった好熱細菌(*Thermus thermophilus*)複合体 - I の結晶構造を参照すると、ND5 サブユニットは膜ドメインの末端に位置し、親水性ドメインから大きく離れている。これは「**両ドメインの境界領域にユビキノンや阻害剤の結合部位が存在する**」という我々が主張してきた見解と矛盾するものである。本研究では、フェンピロキシメートを鋳型にした光親和性標識プローブを新たに 2 種類合成し、結合部位の詳細な解析を行った。

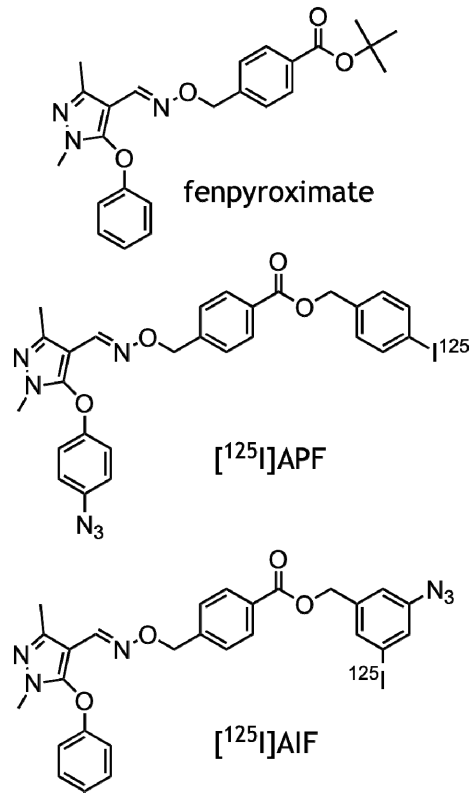


図 1. フェンピロキシメートおよびその誘導体の構造

【結果および結論】光反応性基のフェニルアジド基をフェンピロキシメートのトキソフォアであるピラゾール環近傍に導入した[125I]APF、および分子末端部に導入した[125I]AIF をそれぞれ合成した(図 1)。ウシ心筋亜ミトコンドリア粒子を実験材料として、 [125I]APF および[125I]AIF による光親和性標識実験を行った結果、両化合物は親水性ドメインの構成成分である PSST サブユニットと 49 kDa サブユニットにそれぞれ特異的に結合することがわかった。さらに、プロテアーゼ限定分解による両サブユニットの解析を進めた結果、[125I]APF および[125I]AIF の結合部位は、ユビキノンへの電子ドナーである鉄硫黄クラスター N2 近傍に位置する Ser43-Arg66 (PSST) および Asp160-Arg174(49 kDa)にそれぞれ存在することを明らかにした。

fenpyroximate, mitochondrial complex I, photoaffinity labeling

講演番号：3C21p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ C 校舎 21 会場

ミトコンドリア複合体 - I に作用するキナゾリン型阻害剤の結合部位の同定

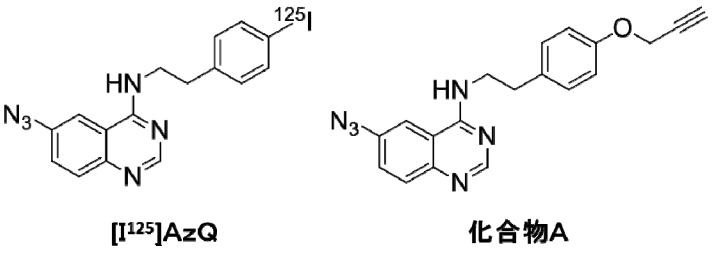
Identification of the binding site of quinazoline-type inhibitor of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I)

○浅野 周、村井 正俊、三芳 秀人（京都大院農）
○SHU ASANO,MASATOSHI MURAI,HIDETO MIYOSHI (Kyoto Univ.)

【背景と目的】ミトコンドリア電子伝達系の初発酵素である NADH-ユビキノン酸化還元酵素（複合体-I）は、異なる 45 個のサブユニットで構成される膜タンパク質であり、電子伝達を担う「親水性ドメイン」とプロトンポンプを担う「膜ドメイン」から構成されている。高い親和性で複合体-I に作用する阻害剤は、酵素の機能解明を行う上での強力なツールとなる。キナゾリン類はそうした阻害剤の一つであり、当研究室では光親和性標識プローブ[^{125}I]AzQ（図 1）を合成し、本化合物が親水性ドメインの“49 kDa”サブユニットの N 末端領域と、膜ドメインの“ND1” サブユニットのマトリックス第 3 ループ領域の境界に特異的に結合することを明らかにしてきた。

バクテリア複合体-I の結晶構造を参照すると、本領域が複合体-I の機能の中枢を担う領域であることは明らかであるが、標識部位をアミノ酸残基レベルで明らかにすることは放射性同位元素を組み込んだプローブを用いた実験では非常に難しい。本研究では、複合体-I 阻害剤の結合部位をアミノ酸残基レベルで同定することを目指し、新たなプローブ分子の合成と、これを活用した標識タンパク質の解析方法の確立を目的とした。

【方法と結果】新たに合成したキナゾリンプローブ(化合物 A)を図 1 に示した。光親和性標識した後、分子末端のアルキンにクリックケミストリー（[3+2]環化付加反応）を利用して蛍光団やビオチンを導入し、タンパク質の蛍光ラベルや架橋ペプチドの特異的精製を行うことを意図しての分子設計である。ウシ心筋ミトコンドリアを実験材料として、化合物 A による光親和性標識とクリックケミストリーによる蛍光ラベルを行った。その結果、49 kDa と ND1 サブユニットが特異的に蛍光ラベルを受け、過剰量の AzQ 存在下で両サブユニットへの標識は抑制された。現在、ビオチンタグの導入による標識タンパク質の精製を行っており、その結果についても報告を行う予定である。



[I^{125}]AzQ　　化合物A

mitochondrial complex I, quinazoline, click chemistry

講演番号：3C21p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ C 校舎 21 会場

ミトコンドリア複合体-I 阻害剤としてのアミロライド類縁体の合成と作用機構

Synthesis and characterization of amiloride derivatives as inhibitors of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I)

○土生 沙綾子、村上 園実、村井 正俊、三芳 秀人（京都大院農）
○Sayako Habu,Sonomi Murakami,Masatoshi Murai,Hideto Miyoshi (Kyoto Univ.)

【背景と目的】ミトコンドリア NADH-ユビキノン酸化還元酵素（複合体-Ⅰ）は、電子伝達系の初発酵素で、電子伝達を担う「親水性ドメイン」と、それに共役したプロトン輸送を担う「膜ドメイン」から構成されている。構造生物学や生化学研究の進展により、親水性ドメインの機能に関しては相当の知見が得られているが、プロトン輸送や電子伝達との共役メカニズムに関しては、詳細な情報がほとんど得られていない。

複合体-Ⅰの膜ドメインを構成する主要な 3 つのサブユニット（ND2, ND4, ND5）は、Na^+/H^+-アンチポーターと極めて類似した立体構造を持ち、さらに、Na^+/H^+-アンチポーターの阻害剤として知られるアミロライド類縁体が、複合体-Ⅰに対しても弱いながら阻害剤として作用することが報告されている。当然ながら、アミロライド類縁体は複合体-I の膜ドメインのサブユニットに作用する阻害剤であることが予想され、本化合物が膜ドメインの機能を解明する有力なツールとなることが期待される。本研究では、複合体-I に対するアミロライド類縁体の作用メカニズムを明らかにすることで、本酵素の膜ドメインの機能に関する新たな知見を得ることを目的とした。

【方法と結果】報告されているアミロライド類縁体の複合体-Ⅰ阻害活性は非常に弱く、強力な阻害活性を示すアミロライド類縁体の合成が重要となる。そこで、様々な構造改変を施したアミロライド類縁体の合成を行い、ウシ心筋ミトコンドリア複合体-I に対する電子伝達阻害活性を評価した。その結果、市販化合物である EIPA と比較して約 50 倍強力な活性を示す化合物 **A**（図 1）を見出した。

次に本化合物を用いて、複合体-Ⅰのプロトン輸送活性に対する阻害を評価した。電子伝達を阻害する典型的な複合体-I 阻害剤（ロテノンなど）は、電子伝達とプロトン輸送を同程度に阻害するのに対し、化合物 **A** はプロトン輸送に対してより高い阻害活性を示した。この結果は、アミロライド類縁体がプロトン輸送に関わる部位に作用することを強く示唆するものである。

光親和性標識法によるアミロライド類の作用メカニズムの解析結果についても報告する予定である。

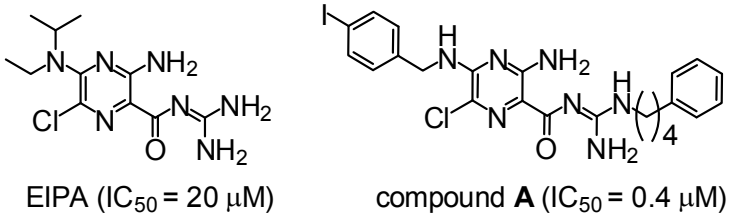


図 1. 代表的なアミロライド類縁体である EIPA と新規に合成した化合物 **A** の構造，およびウシ心筋複合体-I に対する電子伝達阻害活性.

mitochondria, complex I, amiloride

講演番号：3C21p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ C 校舎 21 会場

ネオヘスペリドースの糖取り込み促進作用機構解析

Analysis on signal transduction pathway responsible for the enhancement of glucose uptake by neohesperidose

○木村 太郎[1]、加藤 英介[2]、川端 潤[3] ([1]北大院農、[2]北大院農、[3]北大院農)
○Taro KIMURA[1], EISUKE KATO[2], JUN KAWABATA[3] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Univ., [3]Hokkaido Univ.)

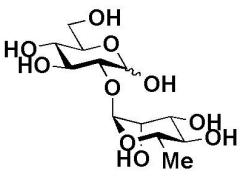
〔目的〕

フラボノイドやその配糖体の中には細胞内への糖取り込み促進作用を示すものがある。私達はナノモル濃度で糖取り込み促進活性を示すと報告されていた kaemferol 3-neohesperidoside に注目して構造活性相関研究を行った結果、二糖(**1**)が糖取り込み促進作用に寄与することを明らかにした。[1]

細胞内への糖取り込みを活性化する主要な経路にはインスリンシグナル、AMPK シグナル、PPARγによる転写活性化がある。インスリンによる活性化はインスリン受容体から始まるシグナル経路で、この細胞膜上の受容体が最初にリン酸化され、その後 IRS-1, PI3K, PKB とシグナルが伝わり、最終的に細胞内の小胞体として存在している GLUT4(グルコーストランスポーター４)が細胞膜に移動することにより、糖の取り込みが活性化される。このような GLUT4 を介した糖の取り込みは AMPK シグナルと PPARγによる転写活性化でも起こるため、糖取り込み促進作用のみで作用機構の特定はできない。従って、**1** が糖取り込み促進活性を持つことはわかっているが、その作用機構は不明である。そこで、本研究では **1** の作用機構解析を目的とした。

〔方法と結果〕

二糖(**1**)による糖取り込み促進効果が各作用経路の阻害剤である LY294002、dorsomorphin、GW9662 で阻害されるか検討した。マウス骨格筋由来の C2C12 細胞を用いて検討した結果、全ての阻害剤で **1** の活性が阻害される傾向が見られた(Fig.1)。現在、脂肪モデル細胞の 3T3L1 細胞についても同様に阻害剤による影響を検討している。また、ウエスタンブロッティングによる各経路の活性化についても解析する予定である。



neohesperidose (**1**)

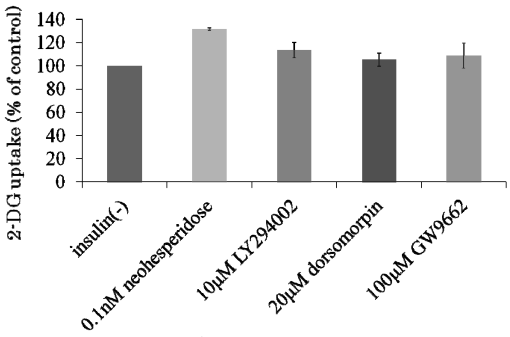


Fig.1

1) Yamasaki K, Hishiki R, Kato E, Kawabata J, *ACS Med. Chem. Lett. 2, 17-21* (2011).

insulin mimetic, diabetic mellitus, glucose uptake

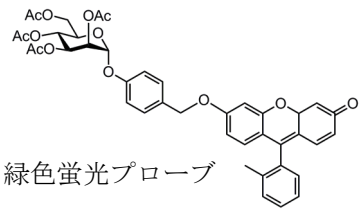
講演番号：3C21p17
講演日時、会場：3 月 26 日 17:12～ C 校舎 21 会場

ゴルジ体マンノシダーゼ特異的蛍光プローブとパスウェイ解析を用いたマンノシダーゼ阻害剤のスクリーニング系開発

Development of golgi mannosidase inhibitor screening system based on the enzyme specific fluorescent probe and pathway analysis

○鈴木 敦子[1]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科・生物資源利用、[2]日大生資科・生命化)
○Atsuko SUZUKI[1], Wataru HAKAMATA[1,2], Takako HIRANO[2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Dept. Chem. and Life Sci., Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】タンパク質品質管理機構において *N*-結合型糖鎖はタンパク質の熟成度を表す目印として機能し、その中でゴルジ体マンノシダーゼは糖鎖修飾の初期段階を担っている。しかし、細胞内 α-マンノシダーゼは小胞体・ゴルジ体・リソソームに局在し、ゴルジ体マンノシダーゼ活性のみを特異的に染色する蛍光プローブは報告されていない。そこで我々はゴルジ体マンノシダーゼ活性を培養細胞でイメージングするために、赤・青・緑の蛍光プローブの分子設計・合成を行い (下図) 、それらが 3 種のヒト培養細胞においてゴルジ体を特異的に蛍光染色することを報告した[1), 2)]。本研究では開発したこれらゴルジ体マンノシダーゼ特異的蛍光プローブを用いて、本酵素阻害剤の培養細胞におけるスクリーニング系の確立を目的とした。さらに、既知ゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤によって誘起される遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイにて網羅的に解析することにより、マンノシダーゼ阻害とパスウェイ変化の関係についても検討した。



緑色蛍光プローブ

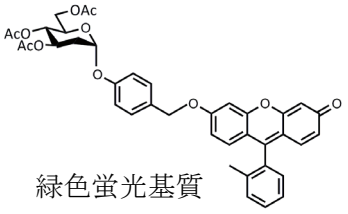
【方法および結果】培養細胞で作用するマンノシダーゼ阻害剤のスクリーニングを行うために、培養細胞を用いたゴルジ体マンノシダーゼ活性測定系の確立を試みた。96 穴プレートに細胞を播種後、緑色蛍光プローブ (上図) を添加し、既知のゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤であるデオキシマンノジリマイシン (DMJ) を添加した後、細胞中の蛍光強度をプレートリーダーで測定した。その結果、阻害剤の濃度依存的な緑色蛍光強度の減少を確認した。さらに他の既知マンノシダーゼ阻害剤であるスワインソニンおよびキフネンシンを用いて同様の実験を行ったところ、DMJ と同様に阻害剤濃度依存的蛍光の減少を確認したため、本系を用いてこれら 3 種の阻害剤の EC_{50} を算出した。次に培養細胞でのゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤の細胞毒性と阻害活性を同時に観察するため、6 穴プレートと蛍光顕微鏡を用いて撮影した細胞の蛍光染色された部分の面積から阻害剤活性を求めた。その結果、阻害剤濃度依存的な蛍光面積の減少を確認し、前述 3 種の既知マンノシダーゼ阻害剤の EC_{50} を決定した。さらにゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤によるパスウェイ解析を行うため、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現の網羅的解析を行った[3)]。その結果、インスリンおよびインテグリンパスウェイに大きな変動が見られた。今後は、本系を用いた阻害剤スクリーニングと発現解析を組み合わせ、新規の阻害剤を見出す予定である。[1)]鈴木敦子ら、ケミカルバイオロジー学会、抄録集 88 ページ、2012. [2)]鈴木敦子ら、応用糖質科学会、講演要旨集 34 ページ、2012. [3)] GEO, Accession No.GSE40279.

N-glycan, golgi body, mannosidase

講演番号：3C21p18
講演日時、会場：3 月 26 日 17:24～ C 校舎 21 会場

新規パスウェイを経由する小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤の探索
Discovery of ER glucosidase II inhibitor with novel pathway
○田村 沙緒里[1]、小林 拓人[2]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科、[2]日大生資科・生命化)
○Saori TAMURA[1], Takuto KOBAYASHI[2], Wataru HAKAMATA[1,2], Takako HIRANO[2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】現在、新興・再興ウイルス感染症が人類に脅威を与えている。しかし、細菌感染症に対する抗生物質に比べ、抗ウイルス薬の開発は大きく遅れている。そこで、抗ウイルス剤の分子標的として多くのウイルスの感染・増殖に必須な *N*-結合型糖鎖プロセシングに着目し、報告例が多い[1)]小胞体に局在するグルコシダーゼ II（GII）を分子標的とした。これまでに我々は、培養細胞で作用する GII 阻害剤を探索するため、GII の赤・青・緑の蛍光基質（右図参照）の設計・合成を行い、それらが GII の局在する小胞体を特異的に蛍光染色することを報告した[2)]。そこで、これら蛍光基質を用いた培養細胞における GII 阻害剤探索系の確立を本研究の目的とした。さらに、本探索系で得られた阻害剤と既知阻害剤の DNA マイクロアレイを用いたパスウェイ解析を行うことにより、阻害剤の違いによるパスウェイの違いを明らかにし、新しいパスウェイを経由する阻害剤を見出すことを最終的な目標とした。



緑色蛍光基質

【方法および結果】GII 阻害剤の探索を行うために、合成した緑色蛍光基質と GII 阻害剤として知られているカスタノスペルミン (CST) を用いて、培養細胞を用いた 2 種類の阻害剤探索系の構築を行った。初めに、ハイスループットスクリーニングを目指して 96 穴プレートでのアッセイ法を検討した。プレートに細胞を培養し、阻害剤と蛍光基質を加えインキュベートを行い、各ウェルの蛍光強度を蛍光プレートリーダーで測定することによって、阻害活性を評価した。その結果、阻害剤濃度依存的な緑色蛍光量の減少を確認し、CST の EC_{50} を決定することに成功した。さらに、他の既知 GII 阻害剤（デオキシノジリマイシン、*N*-ブチルデオキシノジリマイシン、*N*-ノニルデオキシノジリマイシン、ブロモコンジュリトール）の EC_{50} を決定した。次に、GII 阻害活性と細胞毒性を同時に評価することを目指して、6 穴プレートでのアッセイ法を検討した。プレートに細胞を培養し、阻害剤と蛍光基質を加えインキュベートを行い、各ウェルの細胞を蛍光顕微鏡で撮影し、細胞のもつ蛍光強度・面積を計測し、阻害活性を評価した。その結果、前述 5 種類の阻害剤の阻害剤濃度依存的な緑色蛍光量の減少を確認し、各々の阻害剤の EC_{50} を決定した。さらに、GII 阻害による網羅的な遺伝子発現解析を行うため、DNA マイクロアレイを用いて、CST による GII 阻害の発現解析を行った[3)]。その結果、CST が小胞体ストレスセンサー ATF6 を介した小胞体ストレス応答を誘起することを明らかにした。今後は、本系を用いた化合物ライブラリからの阻害剤探索を行う予定である。[1)]Drug Discov. Today, **16**, 107, 2011, [2)]田村沙緒里ら，日本応用糖質科学会抄録集 34 ページ，2012, [3)]GEO Accession No.GSE40279.

endoplasmic reticulum, glucosidase II, inhibitor

講演番号：3C21p19
講演日時、会場：3 月 26 日 17:36～ C 校舎 21 会場

ヒト赤血球に分布するアミロイドβ量の評価：赤血球膜脂質過酸化とアルツハイマー病への関与の可能性

Possible involvement of RBC membrane lipid peroxidation in the development of Alzheimer disease

○近藤 桃子[1]、喜古 健敬[1]、宮澤 大樹[1]、仲川 清隆[1]、古川 勝敏[2]、新井 啓行[2]、宮澤 陽夫[1]([1]東北大院農・機能分子解析、[2]東北大学加齢研)
○Momoko KONDOU[1], Takehiro KIKO[1], Taiki MIYAZAWA[1], Kiyotaka NAKAGAWA[1], Katsutoshi FURUKAWA[2], Hiroyuki ARAI[2], Teruo MIYAZAWA[1] ([1]Grad.Sch.Agr.Sci.TohokuUniv., [2]Insitute of Develop,Aging and Cancer,Tohoku Univ.)

【目的】Miyazawa らはアルツハイマー病（AD）患者の赤血球膜に過酸化リン脂質が多く蓄積していることを 1992 年に発見した[1)]。その後の追試によってもこの現象は再確認され[2)]、In vitro 試験で赤血球にアミロイドβ（Aβ）を処理すると、Aβが沈着し AD 患者で認められた過酸化リン脂質の蓄積が赤血球に観察された[3)]。この赤血球は、血管内皮細胞へ接着し酸化ストレスを介して血管内皮細胞の生存率を低下させた[4)]。In vivo 試験では、マウスへ Aβを静注すると赤血球膜の脂質過酸化が認められた。これらの知見から、Aβは赤血球に沈着し、血液レオロジーの悪化や赤血球の酸素運搬の機能低下を招き、AD 症悪化への関与が示唆された。ヒトでは、血漿 Aβの研究例は多いが、赤血球 Aβ濃度は知られていない。本研究では ELISA 法により、健常若者や健常高齢者、抗酸化サプリメント（アスタキサンチン）を摂取した高齢者の赤血球 Aβ濃度を測定し、抗酸化と過酸化パラメーターの関係を明らかにしようとした[5)]。

【方法と結果】ELISA（ kit WAKO）法で健常若者（24 名, 24.2 ± 0.6 才, Mean ± SE）の赤血球を分析すると、Aβ40 と Aβ42 が検出され、これらの濃度は、血漿の Aβ40 と Aβ42 に比べそれぞれ 26 倍、60 倍高いことがわかった。健常高齢者（38 名, 56.3 ± 1.0 才）の赤血球の Aβ40 と Aβ42 の濃度は、健常若者に比べて有意に高く、年齢とともに赤血球の Aβ量は高まると考えられた。赤血球膜の抗酸化キサントフィルであるアスタキサンチン（0, 1, 3, 6, 12 mg/day/man、各群 10 名）を 12 週間経口摂取した健常高齢者の赤血球を分析したが、赤血球のアスタキサンチン濃度は摂取前に比べ有意に増加し、赤血球の過酸化リン脂質と Aβ濃度は低下した。赤血球の「アスタキサンチンと Aβ濃度は逆相関」し、「過酸化リン脂質と Aβ濃度は正相関」することがわかった。こうしたことは、赤血球に移行したアスタキサンチンが、赤血球への Aβ沈着を抑制した結果と示唆された。ヒト赤血球への Aβ分布が明らかとなり、脂質過酸化と AD の関係、また AD マーカーとしての利用の可能性が考えられた。

1) Miyazawa T et al., Oxygen Radicals, Elsevier Sci, Publ., 327-330(1992)
2) Kiko T. et al., J Alzheimers Dis, 28, 593-600 (2012)
3) Nakagawa K et al., FEBS Lett, 585, 1249-1254 (2011)
4) Nakagawa K et al., Biosci Biotechnol Biochem, 75, 2030-2033 (2011)
5) Kiko T. et al., PLoS ONE, 7, e49620 (2012)

Aß, RBC, AD

講演番号：3C21p20
講演日時、会場：3 月 26 日 17:48～ C 校舎 21 会場

QTRAP MS/MS と QTOF MS/MS によるピロロキノリンキノンの定量分析法

Quantitative analysis of pyrroloquinoline quinone by QTRAP MS/MS and QTOF MS/MS

○武田 光峰[1]、中野 昌彦[2]、安藤 篤正[1]、木村 ふみ子[1]、仲川 清隆[1]、宮澤 陽夫[1]([1]東北大院農、[2]三菱ガス化学(株))
○ Mitsutaka Takeda[1], Masahiko Nakano[2], Tokumasa Ando[1], Fumiko Kimura[1], Kiyotaka Nakagawa[1], Teruo Miyazawa[1] ([1]Grad. Sch. Agr. Sci. Tohoku Univ., [2]Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc.)

【研究目的】 ピロロキノリンキノン(PQQ)は、ニコチンアミドとフラビンに次ぐ 3 番目の酸化還元補酵素として 1979 年にメタノール資化性細菌から見出された。PQQ を含まない餌をマウスに与えると成長障害や皮膚状態悪化、繁殖能低下などの異常が認められたこと、また PQQ を補酵素に利用すると考えられる酵素（アミノアジピン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ）が哺乳類（マウス）から見出されたことから、PQQ は新たなビタミン B 群の候補として注目されるようになった。近年では PQQ の神経保護作用等も報告されている。PQQ の天然分布については、LC-QTRAP MS/MS などで納豆やビールなどに極微量（ng/g オーダー）含まれると報告されている 1)。しかし、植物や食品に含まれる PQQ 量は未だ不明な点が多い。我々も LC-QTRAP MS/MS 分析を試み、PQQ 標品（および合成した PQQ アミノ酸付加体）は検出できるが、既報 1)にある天然試料の測定は困難であった。植物や食品の PQQ を定量するには分析精度の一層の向上が必要であると考えられ、本研究では“PQQ の分離能を向上できるカラム”と“QTRAP MS/MS に加えて QTOF MS/MS の活用”を検討し、PQQ の定量分析法を確立しようとした。
【方法と結果】 通常、PQQ の LC 分析には ODS カラムを用い、PQQ が高極性なので、移動相へ添加剤（塩やイオンペアー剤）を加える必要がある。しかし、添加剤を加えても ODS への PQQ の保持はあまり強まらなかった。このため、天然試料を分析すると、PQQ と極性が近い他成分との分離が難しい。そこで、ODS への保持能をさらに高めるために、両イオン交換固定相が組み込まれた ODS カラム（Scherzo SM-C18, インタクト社製）を使用した。種々の条件検討を経て、PQQ をカラムへ保持させ、明瞭なピークとして PQQ を検出できるようになった。この時、検出には従来の QTRAP MS/MS(AB SCIEX 社製)及び新たに QTOF MS/MS（Bruker Daltonics 社製）を用いた。QTRAP MS/MS の場合、Scherzo SM-C18 の使用により PQQ の測定感度が高まった（約 0.1 pmol）が、高分解能での分析は難しかった。一方、QTOF MS/MS では、PQQ（[M-H]- 329.004）を高感度（pmol オーダー）かつ高分解能（329.004±0.005）で分析でき、天然試料を分析した場合には夾雑成分を大幅に軽減できると期待された。実際に、本法（Scherzo SM-C18 と QTOF MS/MS の組み合わせ）で PQQ 生産菌の培地を測定し、PQQ 分析が十分可能であることがわかった。同定には MS/MS 情報（$[M-2COO-H]^-$ 241.024）が有用であった。したがって、本法は PQQ を含む天然資源の探索や、従来全く知られていない PQQ の動物体内における吸収・代謝の研究に応用できると考えられた。

1) Noji, N. et al., J. Agric. Food Chem, 55, 7258-7263 (2007)

Pyrroloquinoline quinone, LC-MS/MS, Ion exchange

講演番号：3C22a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ C 校舎 22 会場

ラバンドシアニン生合成における新奇プレニルジリン酸合成酵素の同定と機能解析

Identification and functional characterization of unusual prenyl diphosphate synthase in lavanducyanin biosynthesis

○尾崎 太郎、趙 平、葛山 智久、西山 真（東大・生物工学セ）
○Taro OZAKI,Ping ZHAO,Tomohisa KUZUYAMA,Makoto NISHIYAMA (Univ. Tokyo)

【目的】ラバンドシアニンは放線菌 *Streptomyces* sp. CL190 が生産する二次代謝産物である。フェナジン骨格の 5 位窒素原子にシクロラバンデュリル基が付加した特徴的な構造をしており、テストステロン 5-αリダクターゼ阻害活性を有することが報告されている。昨年度の本大会では、ラバンドシアニンの生合成におけるプレニル化を担うプレニル基転移酵素遺伝子、および 1 位の脱炭酸、酸化を担うフラビン依存型モノオキシゲナーゼ遺伝子を同定し、その機能解析を報告した。しかし、分岐鎖構造を持つ特異なモノテルペノイドであるシクロラバンデュリル基の生合成機構は未解明であった。本年度はシクロラバンデュリル基を生合成する新奇プレニルジリン酸合成酵素について発表する。
【方法と結果】シクロラバンデュリル基の生合成に関する知見はこれまで報告されていないため、酵素のアミノ酸配列を利用した相同性検索による対象遺伝子の探索は困難であると予想された。また、昨年度報告したようにラバンドシアニン生合成遺伝子は、通常の放線菌二次代謝産物の生合成遺伝子と異なり、遺伝子クラスターを形成していないので、既知遺伝子をプローブとしたスクリーニングも適用不可能であった。そこで、ラバンドシアニンと同様にシクロラバンデュリル基を持つ化合物であるラバンドキノシンに注目し、その生産菌である *Streptomyces* sp. FGK858 のドラフトシーケンス解析を行った。シクロラバンデュリル基は、炭素数 5 のイソプレン単位が二つ縮合した後に、環化した構造であるシクロラバンデュリルジリン酸に由来すると考えられるので、その生合成には少なくともイソプレン単位の縮合を触媒するプレニルジリン酸合成酵素と相同性を示す酵素が関与すると仮説を立てた。CL190 株、および FGK858 株のテルペノイド生合成遺伝子を比較したところ、他の放線菌には存在せず、両菌株にのみ特異的に存在し、プレニルジリン酸合成酵素と推定される遺伝子を見出すことができた。大腸菌より調製した組換えタンパク質を用いた実験から、本酵素がジメチルアリルジリン酸からシクロラバンデュリルジリン酸を合成することを明らかにした。本酵素はテルペノイドの縮合に加えて環化も触媒するユニークな酵素である。また、本酵素とともに、昨年度の本大会で報告したプレニル基転移酵素、およびフラビン依存型酸化酵素を用いて、ラバンドシアニン生合成を *in vitro* で再構築することにも成功した。さらに、本遺伝子の破壊株を作製し、その生産物を分析したところ、ラバンドシアニンの生産が失われることも確認した。これらの結果より、本遺伝子がラバンドシアニンの生合成においてシクロラバンジュリルジリン酸の合成を担っていること、およびシクロラバンジュリルジリン酸がプレニル基供与体となってフェナジン骨格に転移することを明らかにした。

terpenoid, biosynthesis, Streptomyces

講演番号：3C22a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ C 校舎 22 会場

フェナジノマイシン生合成遺伝子クラスターのクローニング
Cloning of the phenazinomycin biosynthetic gene cluster
○中尾 智世[1]、志波 優[2]、吉川 博文[2]、瀬戸 治男[2]、大村 智[3]、葛山 智久[1]、西山 真[1]([1]東大・生物工学セ、[2]東農大、[3]北里大)
○Tomoyo NAKAO[1], Yuh SHIWA[2], Hirofumi YOSHIKAWA[2], Haruo SETO[2], Satoshi OMURA[3], Tomohisa KUZUYAMA[1], Makoto NISHIYAMA[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Tokyo Univ. Agric., [3]Kitasato Univ.)

【目的】フェナジノマイシンは放線菌 *Streptomyces* sp. WK2057 が生産する抗菌活性および抗腫瘍活性を示す濃青色の化合物で、フェナジン骨格の窒素原子にプレニル基が付加した特徴的な構造をもつ。本研究では、フェナジノマイシンの生合成遺伝子クラスターを同定し、その生合成マシナリーの解明を目的とした。
【方法と結果】WK2057 株のドラフトゲノムシークエンスを解析することでフェナジノマイシンの生合成遺伝子の同定を試みた。フェナジン骨格を構成するフェナジン-1-カルボン酸 (PCA) はシキミ酸経路および PhzABCDEFG によって合成されると推定できることから、Phz 遺伝子群を含むコンティグを探索したところ、Phz 遺伝子群とメバロン酸経路遺伝子群が隣接して存在するコンティグを見出した。加えて、Phz 遺伝子群の近くにプレニル基転移酵素と推定される ORF を見出すことができた。次に、この領域を含むコスミドをスクリーニングし、得られたコスミドを放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 および *Streptomyces avermitilis* SUKA17 に導入して異種発現を行ったところ、フェナジノマイシンの生産を確認することができた。プレニル基転移酵素遺伝子と推定される ORF は、ピオシアニン生合成に関わる FAD 依存型のモノオキシゲナーゼである PhzS ホモログと隣接して存在していた。そこで、これらの組換えタンパク質を調製し、両酵素存在下で PCA と各種プレニルジリン酸をインキュベートしたところ、フェナジンンの窒素原子にプレニル基が付加した新たな化合物の生成が確認でき、本プレニル基転移酵素が炭素数 5 の DMAPP から炭素数 15 の FPP までのいずれのプレニル基の転移反応も触媒する寛容な基質特異性を示すことが明らかになった。また、プレニル基の伸長を担う FPP 合成酵素ホモログは、N 末端側に LytB ドメインをもつ新規なキメラタンパク質であることが分かった。LytB は、MEP 経路において 4-ヒドロキシ-3-メチル-2-*(E)*-ブテニルジリン酸 (HMBPP) から IPP および DMAPP の合成反応を触媒する酵素であるため、このキメラタンパク質が LytB ドメインで LytB 反応を触媒した後、生成した IPP と DMAPP を用いて伸長ドメインで FPP を合成すると予想している。これまでに、精製酵素を用いて FPP の合成活性は確認できたため、現在、HMBPP を基質として FPP が合成されるか否かの検討を行っている。

phenazinomycin, isoprenoid, phenazine

講演番号：3C22a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ C 校舎 22 会場

バクテリア由来のジテルペン環化酵素の探索と機能解析
Exploration and functional analysis of diterpene cyclases from bacteria
○本吉 祐大[1]、山田 佑樹[2]、池田 治生[2]、西山 真[1]、葛山 智久[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]北里大・北里生命研)
○Yudai MOTOYOSHI[1], Yuuki YAMADA[2], Haruo IKEDA[2], Makoto NISHIYAMA[1], Tomohisa KUZUYAMA[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Kitasato Univ.)

【目的】ジテルペン環化酵素(diterpene cyclase)は C_{20} のゲラニルゲラニルジリン酸(GGDP)を基質として環化反応を行うことで、ジテルペン化合物の構造多様性を生み出す鍵酵素である。植物および真菌由来の diterpene cyclase の解析についてはこれまで数多くの報告例があるが、バクテリア由来の diterpene cyclase は、多種多様な二次代謝産物を生産することが知られている放線菌由来の酵素についても、わずか 4 例が報告されているのみである。そこで、本研究では、ゲノム配列が明らかになっているバクテリア由来の新規な diterpene cyclase の発掘と機能解明を目的とした。
【方法と結果】BLAST 検索を用いたホモロジーサーチおよび周辺遺伝子の解析により、複数の diterpene cyclase の候補遺伝子を選抜し、これらを大腸菌で高発現させて組換え酵素を精製し機能解析に供した。GGDP を基質として用いた *in vitro* の機能解析の結果、グラム陰性の緑色非硫黄細菌である *Herpetosiphon aurantiacus* DSM 785 由来の Hau_1、グラム陽性のアクチノバクテリアである *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941 由来の Rxy、放線菌である *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 由来の SCLAV-p0765 の 3 つの組換え酵素を用いた反応系において反応産物の生産が確認された。これらのうち、Hau_1 および Rxy の反応産物の構造解析を行ったところ、Hau_1 の反応産物は Obscuronatin であり、Rxy の反応産物は Cembrene C であることが判明した。Obscuronatin は軟質珊瑚 *Xenia obscuronata* より、Cembrene C は軟質珊瑚 *Nephthea* sp.より単離されることが報告されているが、共に生合成酵素遺伝子の同定はされておらず、また、グラム陰性のバクテリアより diterpene cyclase が単離された例はこれまでになく、本研究により初めてそれらの存在を示すことができた。Hau_1 の反応産物である Obscuronatin は C_{15} のファルネシルジリン酸(FDP)を基質として環化、修飾されたセスキテルペン化合物でよく見られる germacrane 骨格を有していることから、FDP を基質としても環化反応を触媒すると推測し *in vitro* で解析を行ったところ、予想通り FDP に対しても生産物を与えることが明らかとなった。
今後これらの酵素反応の詳細な反応機構を明らかにすることにより、diterpene cyclase の配列と機能の相関に関する新たな展望が得られると考えている。また、ゲノム配列情報を用いて新たな diterpene cyclase の候補遺伝子をスクリーニングしていくことで、新規ジテルペンの発見につながることも期待される。

isoprenoid, cyclase, genome mining

講演番号：3C22a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ C 校舎 22 会場

放線菌由来ジテルペン環化酵素 CotB2 の反応機構

Reaction mechanism of diterpene cyclases CotB2 found in Streptomyces genome

○目黒 亜由子、富田 武郎、西山 真、葛山 智久（東大・生物工学セ）
○Ayuko MEGURO,Takeo TOMITA,Makoto NISHIYAMA,Tomohisa KUZUYZMA (Univ. Tokyo)

【目的】cyclooctatin は、*Streptomyces melanosporofaciens* MI614-43F2 から単離された原核生物由来で初めての 5-8-5 員環構造をもつジテルペン化合物であり、lysophospholipid の脂肪酸エステル結合を加水分解する lysophospholipase を阻害する。cyclooctatin のユニークな 5-8-5 員環骨格は、直鎖状基質 geranylgeranyl diphosphate (GGDP)の環化と水酸化を触媒して cyclooctat-9-en-7-ol を生成するジテルペン環化酵素 CotB2 によって形成される [1)]。これまでに反応機構の詳細が報告されたジテルペン環化酵素として、taxadiene を生成する植物由来の taxadiene synthase[2)]や、fusicoccadien を生成する真菌由来の PaFS[3)]などの報告例があるが、バクテリア由来のジテルペン環化反応機構の詳細については限定的である。今回、cyclooctatin 生合成における鍵酵素 CotB2 の環化反応機構の詳細について解析したので報告する。

【方法と結果】GGDP の 9 位に結合する 2 個の ^{1}H をいずれも ^{2}H で置換した[9,9-$^{2}H_2$]GGDP を基質に用いて CotB2 と反応させ、生じた反応産物である cyclooctat-9-en-7-ol を GC-MS と ^{1}H NMR により分析した結果、予想に反して、2 個の ^{2}H が cyclooctat-9-en-7-ol の 8 位に取り込まれたことが明らかとなった。さらに、全ての炭素を ^{13}C でラベルした[U-$^{13}C_6$]glucose を cyclooctatin 生産培地に添加して培養し、得られた cyclooctatin の ^{13}C NMR スペクトルを解析した結果も併せて、CotB2 による GGDP の環化反応の過程で生じる反応中間体の炭素 8 位と炭素 9 位の間で組換えが起こるという推定反応機構が示唆された。さらに、より詳細な NMR 解析により、この推定反応機構を支持する結果が得られたことから、CotB2 が触媒する GGDP から cyclooctat-9-en-7-ol を生成する触媒反応において、シクロプロパン環構造をもつ反応中間体を経由する環化機構を提唱した。次に、CotB2 単独や CotB2 と GGDP の基質アナログ体との複合体の X 線結晶構造解析で得られた活性中心ポケットの構造をもとに、環化反応に寄与する重要なアミノ酸残基の同定を試みた。ポケット内に存在するアミノ酸残基を中心に様々な変異を導入した各変異酵素と GGDP との *in vitro* 反応産物を GC-MS で分析し、野生型 CotB2 が生成する cyclooctat-9-en-7-ol と異なる複数の新規な反応産物を精製し NMR を用いてそれらの構造を決定した。それらの構造と、上述したラベル基質やトレーサー実験から得られた環化反応機構に基づき、CotB2 が触媒する炭素−炭素間の組換えを含む複雑な環化反応機構を提唱する。

【参考文献】(1) S-Y. Kim, *et al*. *Chem. Biol.* 16: 736, 2009. (2) Williams DC., *et al*. *Chem. Biol.* 12: 969, 2000. (3) Toyomasu T., *et al*. *Org. Lett.* 11: 3044, 2009.

geranylgeranyl diphosphate, cyclase, reaction mechanism

講演番号：3C22a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ C 校舎 22 会場

BAC を利用した 17 員環マクロサイクリック化合物 versipelostatin の異種生産

Heterologous production of the 17-membered macrocyclic compound versipelostatin using BAC vector

○橋本 拓哉[1]、橋本 絢子[2]、新家 一男[2]、池田 治生[3]、西山 真[1]、葛山 智久[1]([1]東大・生物工学セ、[2]産総研、[3]北里大・北里生命研)
○Takuya HASHIMOTO[1], Junko HASHIMOTO[2], Kazuo SHIN-YA[2], Haruo IKEDA[3], Makoto NISHIYAMA[1], Tomohisa KUZUYAMA[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]AIST, [3]Kitasato Univ.)

【目的】モジュラー型 PKS や NRPS などの二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターの多くは 100 kb を越える。従って、これらの二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターの全長を 1 つのコスミドベクターへクローニングすることは困難であり、100 kb を越える巨大生合成遺伝子クラスターのクローニングには複数のコスミドの取得が必要であった。本研究では、モジュラー型 PKS によって生合成される versipelostatin（VST）の 100 kb を越える全生合成遺伝子クラスターを染色体組込型の BAC ベクターpKU503D にクローニングし、異種放線菌において VST を生産させることを目的とした。

【方法と結果】まず、VST 生産菌である *Streptomyces versipellis* 4083-SVS6 のドラフトゲノムシーケンスを取得した。取得したドラフトシーケンスの配列を精査し、全長 103 kb 以上のモジュラー型 PKS を中心とする推定 VST 生合成遺伝子クラスターを同定した。クラスター内には VST 側鎖に存在する糖鎖の生合成に関与するヌクレオチド糖合成酵素、ヌクレオチド糖変換酵素、および 2 つの糖転移酵素をコードする遺伝子が確認できた。次に、同定した生合成遺伝子クラスター取得のため、*S. versipellis* の BAC ライブラリーを構築した。低融点アガロースと混合した *S. versipellis* の菌体をライソザイムとプロテアーゼで処理し、ゲノム入りゲルブロックを作製した。このゲルブロックに対し *Bam*HI 消化を行い、パルスフィールド電気泳動により 150-170 kb の領域を精製して pKU503D とライゲーションし、大腸菌に導入することでコロニー数 1,300 のゲノムライブラリーを得た。次いで、VST 生合成遺伝子クラスターの両末端配列を用いた PCR によるスクリーニングを行い、全長を含むと考えられる 6 クローンを取得した。そのうち 1 クローンを異種放線菌である *S. lividans* TK23 へ導入して培養した結果、VST の生産を確認することができた。以上のように、染色体組込型の BAC ベクターを用いることで 100 kb を超える巨大生合成遺伝子クラスターを宿主内で安定に保持させ、宿主染色体上での遺伝子破壊が可能となった。そこで現在、*S. lividans* TK23 のゲノムに組み込まれた VST 生合成遺伝子のうち糖転移酵素をコードする遺伝子の破壊株を作製中である。

BAC, polyketide, *Streptomyces*

講演番号：3C22a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ C 校舎 22 会場

Isolation and structure elucidation of novel compounds produced by actinomycetes that acquired rifampicin resistance

○Wei Li Thong,Makoto Nishiyama,Tomohisa Kuzuyama (Univ. Tokyo)

Characterization of potential gene clusters is a promising strategy for the identification of novel natural products and the expansion of structural diversity. However, there are often difficulties in identifying potential metabolites because their biosynthetic genes are either silenced or expressed only at a low level. In order to activate such gene clusters, we induced rifampicin resistance in 11 actinomycetes strains and obtained 164 resistant mutants. Comparative screening of metabolites produced by the wild-type strains and the mutants allowed us to find several metabolites overproduced only in the mutants. In this study, we focus on two metabolites overproduced by a rifampicin-resistant mutant TW-R50-13 derived from *Streptomyces* sp. SANK 60404. Sequence analysis of the *rpoB* gene of the mutant revealed a single C1309G mutation. Two novel compounds were isolated from 6L culture broth of the mutant and the structure of each compound was determined by NMR and HRESI-MS. BLAST searches against the draft genome sequence of SANK 60404 have led to the identification of a biosynthetic gene cluster encoding type I polyketide synthases, amide synthase, 5-aminolevulinate synthase, and acyl CoA ligase, which could be responsible for the production of the compounds. Further studies are in progress to verify the possibility and also to illustrate the biosynthetic pathway.

Actinomycetes, *rpoB* gene, secondary metabolites

講演番号：3C22a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ C 校舎 22 会場

放線菌の生産するテルペノイド - ポリケタイド融合化合物の生合成に特異的なアミノ基転移反応

Transamination specific in the biosynthesis of terpenoid-polyketide hybrids produced by Streptomyces strains

○磯貝 章太、西山 真、葛山 智久（東大院農）
○Shota Isogai,Makoto Nishiyama,Tomohisa Kuzuyama (Univ. Tokyo)

放線菌は構造多様な二次代謝産物を生産することが知られている。naphterpin と furaquinocin はテルペノイドとポリケタイドが融合した構造を有する化合物であり、それぞれ放線菌 *Streptomyces* sp. CL190 と *Streptomyces* sp. KO-3988 によって生産される二次代謝産物である。このようなテルペノイド－ポリケタイド融合化合物は、そのユニークな構造から生合成を触媒する酵素が有用物質生産に利用できることが期待される。

これまでに naphterpin と furaquinocin に共通の生合成中間体である 8-amino-2,5,7-trihydroxynaphthalene-1,4-dione (8-amino-flaviolin)を同定し、8-amino-flaviolin が naphterpin と furaquinocin の生合成遺伝子クラスター中の NphE および Fur3 の反応産物であることを証明した。また、大腸菌もしくは放線菌を宿主とした組換え酵素 NphE および Fur3 を用いて基質特異性に関する研究を行い、アミノ基受容体は 2,5,7,8-tetrahydroxynaphthalene-1,4-dione (mompain)であること、アミノ基供与体はグルタミン酸であることを明らかにした。本発表では、NphE および Fur3 の反応速度論的な特徴について発表する。また、NphE および Fur3 に保存されているアミノ酸残基に変異を導入した変異酵素を作製し、活性測定を行ったので、アミノ基転移活性におけるそれらのアミノ酸残基の重要性についても発表する予定である。さらに、最終産物である naphterpin と furaquinocin には存在しないアミノ基の果たす役割についても発表する予定である。

aromatic polyketide, aminotransferase, terpenoid

講演番号：3C22a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ C 校舎 22 会場

新規ヌクレオシド系抗生物質 A-94964 の生合成遺伝子の機能解析

Functional analysis of the biosynthetic gene cluster of a nucleoside antibiotic A94964 produced by *Streptomyces* sp. SANK60404

○白石 太郎、葛山 智久、西山 真（東大・生物工学セ）
○Taro SHIRAISHI,Tomohisa KUZUYAMA,Makoto NISHIYAMA (Univ. Tokyo)

【目的】A-94964 は Translocase I の阻害活性スクリーニングにより、*Streptomyces* sp. SANK60404 株の培養液から発見された新規ヌクレオシド系抗生物質である [1,2]。A-94964 の構造は不飽和脂肪酸やアミノ糖、リン酸ジエステル、ウリジンが互いに結合したユニークなものとなっており、その生合成研究が新たな酵素の発見や新規有用生理活性物質の創成につながることが期待される。昨年度の本体会では、A-94964 の生合成遺伝子クラスターの同定について報告した。本発表では、さらに、各生合成遺伝子の破壊株を作製し、その代謝産物を解析することで A-94964 の生合成経路の解明および生合成酵素の機能解析を目的とした。特に A-94964 生合成遺伝子クラスター中には、これまでに報告のあるヌクレオシド系抗生物質の生合成遺伝子にみられるウリジン骨格形成に関わる遺伝子のホモログは存在しなかったことから、このような反応を担う酵素の同定・機能解析を目指した。
【方法・結果】A-94964 の生合成に必要な全ての遺伝子を含むコスミド中に存在する各遺伝子の破壊コスミドを作製し、各々のコスミドを導入した形質転換株の培養抽出液を解析することでその機能解析を試みた。これまでに *orf7, orf12 ~ orf13, orf14, orf18, orf19, orf22* の破壊コスミドを作製しその形質転換株の培養抽出を解析した。その結果、SAM 依存型メチル基転移酵素ホモログである *orf18* の破壊コスミドの形質転換株ではアミノ糖の水酸基がメチル化された A-94964 類の生産性のみが失われた。また、糖転移酵素のホモログ遺伝子である *orf19* を破壊したコスミドの形質転換株では A-94964 の生産性は失われ、糖が付加していない類縁体のみが検出された。このことから、Orf18 はメチル化反応に、Orf19 は糖付加に関与する生合成酵素であり、A-94964 の生合成の最終段階で機能することが強く示唆された。また、*orf7, orf12 ~ orf13, orf14* 破壊コスミドの形質転換株では、A-94964 および全ての類縁体の生産性が失われる一方、*orf22* 破壊コスミドの形質転換株では、A-94964 類の生産性に変化はみられなかった。

以上の結果と相同性検索の結果から、機能未知遺伝子 *orf7*, *orf14* の両方またはいずれかがウリジン骨格形成に関わると推定された。そのため現在、Orf7, Orf14 組換え酵素の作製およびそれらの機能解析を行っている。

【参考文献】(1) R. Murakami, *et al*., J. Antibiot. 61(9): 537-544, 2008. (2) Y. Funaki, *et al*., J. Antibiot. 61(9): 545-549, 2008.

nucleosde antibiotics, PKS, Streptomyces

講演番号：3C22a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ C 校舎 22 会場

Saccharothrix sp. ST-888 が生産する除草剤 phosphonothrixin の 生合成遺伝子のクローニング

Cloning of the biosynthetic gene cluster of the herbicide phosphonothrixin produced by *Saccharothrix* sp. ST-888

○林 健文、西山 真、葛山 智久（東大・生物工学セ）
○Jianwen Lin,Makoto Nishiyama,Tomohisa Kuzuyama (Univ. Tokyo)

【目的】Phosphonothrixinは、エノコログサ種子の発芽と子葉鞘の発育阻止を指標とする除草活性物質スクリーニングにより、放線菌*Saccharothrix* sp. ST-888株の培養液から単離されたC-P化合物である。この化合物は、イネ科の雑草や広葉性の雑草の発芽を抑制し葉にchlorosisを誘発する除草剤であることが明らかにされている。しかしながら、これまでにphosphonothrixinの化学合成の報告例はあるものの、その生合成と作用機序に関する報告例はない。本研究では、phosphonothrixin生合成遺伝子クラスターをクローニングし、その機能解析によってphosphonothrixinの生合成経路の全容を解明することを目的としている。

【方法と結果】Phosphonothrixinの生産を確認した*Saccharothrix* sp. ST-888株のドラフトゲノムシーケンスを行った。次に、得られたドラフトシーケンスに対して、fosfomycin生産菌のPEP mutase遺伝子（*fom1*）配列を用いてBLAST検索を行ったところ、*fom1*と有為な相同性を示す*orf*を見いだした。次に、放線菌で複製可能なコスミドベクターであるpOJ446を用いてST-888株のコスミドライブラリーを作製し、*fom1*ホモログを含むコスミドクローンのスクリーニングを行ったところ、２つの陽性コスミドクローンcos-11とcos-12が得られた。そこで、それぞれのコスミドを*Streptomyces albus* G153に導入し異種発現を試みた。その結果、cos-11とcos-12のいずれのコスミドを導入した形質転換体においてもphosphonothrixinの生産を確認することができたことから、cos-11とcos-12がphosphonothrixinの生合成に必要な全ての遺伝子を含むと判断した。そこで次に、cos-12のシーケンスを詳細に解析したところ、cos-12にはPEP mutase（*orf24*）を含む35個の*orf*が存在することが判明した。次いでphosphonothrixin生合成遺伝子クラスターの最小単位を決定するため、cos-12中の複数遺伝子をデリーションしたコスミドを作製した。その結果、*orf1-20*と*orf34*はphosphonothrixinの生合成には不要であることが判明したため、*orf21*から*orf33*の機能を相同性検索により推定することで、phosphonothrixinの生合成経路を推定した。現在、各生合成遺伝子産物を用いた*in vitro*アッセイを検討中である。

phosphonate, biosynthesis, gene cloning

講演番号：3C22a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ C 校舎 22 会場

HDAC 阻害剤 trichostatin A 生合成遺伝子のクローニング
Cloning of the biosynthetic gene cluster of trichostatin A
○工藤 慧、葛山 智久、西山 真（東大・生物工学セ）
○Kei KUDO,Tomohisa KUZUYAMA,Makoto NISHIYAMA (Univ. Tokyo)

【目的】Trichostatin A (TSA)は 1976 年に抗真菌活性をもつ化合物として単離された放線菌の二次代謝産物の一つであり、複数の類縁体が報告されている。後に、TSA がヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の阻害活性や抗腫瘍活性を示すことが明らかにされたことから、エピジェネティクス研究や医薬開発に用いられるようになった。このように幅広く利用されている TSA であるが、その生合成に関しては未だ報告例がない。そこで我々は、TSA 生産菌である *Streptomyces* sp. RM72 を用いて、TSA 生合成遺伝子の同定、および生合成経路の解明を目的として研究を行った。本研究の達成により、新規 HDAC 阻害剤の発見と創薬への応用が期待される。
【方法と結果】初めに TSA の構造から I 型 PKS の関与を予想し、RM72 のドラフトゲノムシーケンスに対して BLAST 検索を行い複数の PKS 候補を得た。さらに周辺の遺伝子のアノテーションを行うと、PKS のスターター基質の合成に関わると考えられる *p*-アミノ安息香酸合成酵素（pabABC)や *N*-メチル基転移酵素（NMT)、CoA リガーゼが、また末端のヒドロキサム酸形成に関わると考えられるアスパラギンシンターゼや酸化還元酵素がクラスターを形成している領域が見出され、これを TSA の生合成遺伝子クラスターとして生合成経路を推定した。次いで pKU465cos を用いて RM72 ゲノムのコスミドライブラリーを構築し、*ORF 1* から *ORF 14* を含むコスミドをスクリーニングして複数の陽性クローンを得ることに成功した。現在、宿主に *S. avermitilis* SUKA17 を用いて TSA の異種生産を試みている。

Streptomyces, biosynthesis, cosmid

講演番号：3C22a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ C 校舎 22 会場

バクテリアにおける新規葉酸生合成経路の解明

Analysis of a novel folate biosynthesis pathway in bacteria.

○佐藤 康治、小林 大毅、大利 徹（北大院工）
○Yasuharu SATOH,Daiki Kobayashi,Tohru Dairi (Hokkaido Univ.)

【目的】

多種多様な生物のゲノム配列が決定されるにつれ、核酸、アミノ酸、補酵素など生物個体の維持・増殖に必須で普遍的に存在していると考えられてきた一次代謝経路の遺伝子群が欠落した生物の存在が認知されるようになった。我々は詳細なゲノム解析により、一部の微生物が葉酸の構成化合物であるp-アミノ安息香酸 (pABA) の生合成関連遺伝子 (*pabABC*遺伝子) を欠落した微生物を見出した。葉酸は生育に必須と考えられることから、これら微生物には新規生合成経路が存在していると予想し解析を行っている。これまでに、大腸菌の*pabABC*遺伝子欠損株を宿主に用いたショットガンクローニングにより、亜硝酸細菌*Nitrosomonas europaea*から相補遺伝子（機能未知NE1434遺伝子）を得ている (2012年度日本農芸化学会大会)。本研究では本遺伝子の機能解析を目的とした。

【方法・結果】

上記のNE1434遺伝子を持つ*pabABC*遺伝子欠損大腸菌の培養液をLC-MSで解析した結果、pABAが検出されたことからNE1434遺伝子は実際にpABA合成に関与することを確認した。次に本遺伝子産物の基質を同定するための解析を行った。C末端にHis-tag を持つNE1434組換え酵素を調製し、既知経路の出発物質であるコリスミ酸やシキミ酸経路の中間体など一次代謝経路の芳香族化合物を用い解析を行ったがpABAの合成は確認出来なかった。さらにシキミ酸経路の中間体が基質であるか検討するため、*pabABC*遺伝子欠損大腸菌を基に、さらにchorismate synthaseまたは3-dehydroquinate dehydratase遺伝子が欠損した株を構築した。いずれの株でもpABA要求性は、NE1434遺伝子の導入で回復したことから、NE1434の基質はコリスミ酸経路以外の代謝産物を基質にすると推定された（培地に添加した芳香族アミノ酸や4-hydroxybenzoateはNE1434の基質にならないことは確認した）。そこで現在、変異処理によりNE1434の基質を供給できなくなった変異株の取得を試みている。具体的には、*pabABC*遺伝子欠損株がNE1434遺伝子で相補されたことから、NE1434は何らかの代謝産物からpABAを合成すると考えられる。そこで、NE1434遺伝子が存在してもPABAを要求する変異株の取得を行っている。目的株が得られれば、宿主に用いショットガンクローニングにより相補遺伝子を取得する予定である。これらの結果についても合わせて報告したい。

Folate, p-Aminobenzoate

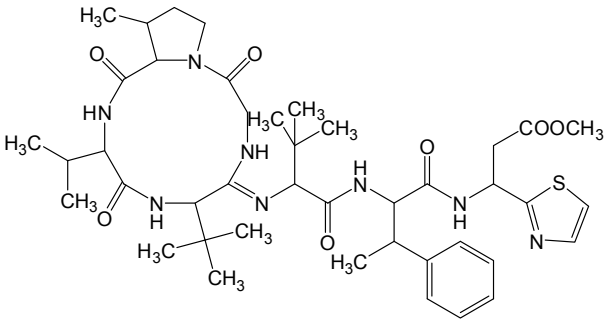
講演番号：3C22a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ C 校舎 22 会場

ペプチド系抗生物質、ボトロマイシン生合成機構の解明

Biosynthetic studies on bottromycin, a peptide antibiotic.

佐藤 康治[1]、大門 美保[1]、簗島 謙太郎[2]、尾仲 宏康[3]、石川 淳[4]、○大利 徹[1] ([1]北大院工、[2]協和発酵バイオ、[3]東大院・農学生命、[4]国立感染研)
Yasuharu Satoh[1], Miho Daimon[1], Kentaro Yanashima[2], Hiroyasu Onaka[3], Jun Ishikawa[4], ○Tohru Dairi[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Kyowa Hakko Bio, [3]Univ. Tokyo, [4]NIID)

【目的】ペプチド系抗生物質の生合成では、リボソーム関与、Non-Ribosomal Peptide Synthase (NRPS)、ATP 依存のアミノ酸リガーゼ、tRNA 依存のアミノ酸転移酵素が用いられる。放線菌では、リボソーム関与型では、セリン・システイン残基由来のオキサゾール・チアゾール環の存在、head-to-tail の環化、プレニル化、グリコシル化修飾などが知られている。他方、NRPS では、非タンパク性のアミノ酸も取り込まれ、A-ドメインによるアデニル化、T-ドメインへのロード、C-ドメインでの縮合反応によりペプチド結合が生成後、エピメリ化、環化、メチル化などペプチド骨格の修飾や、ポリケチドやリピッドなど他の骨格との結合も知られている。しかし、デヒドロアラニンやチアゾールがリボソーム関与型と NRPS で生合成される化合物中に見いだされることから、構造情報のみで生合成機構を推定することが難しい場合も多い。筆者らは、下図に示したように、環化構造とチアゾール環を有するボトロマイシン (BM) が、どちらの機構で生合成されるかに興味を持ち検討を行った。
【方法と結果】BM 生産菌のドラフトゲノム解析を行った結果、BM の出発ペプタイドと考えられる GPVVVFDC 配列を含む 44 アミノ酸からなる ORF を見出した。リボソーム関与型では、一般に N-末側にリーダーペプタイドを有する場合が多いが、本 ORF は C-末側に有していた。周辺には、3 つのペプチダーゼ、P450、メチル基転移酵素などが存在したことから、見出したクラスターは BM の生合成に関与すると推定された。そこで本クラスターを *Streptomyces lividans* で発現させた結果、BM の生産が確認された。また、幾つかの遺伝子について組換え酵素を調製し活性確認を試みたので、これらの結果について報告する。なお、つい最近、我々の得た結果と基本的に同じ内容が他の 4 つのグループにより報告された[1-4]



ボトロマイシンの構造

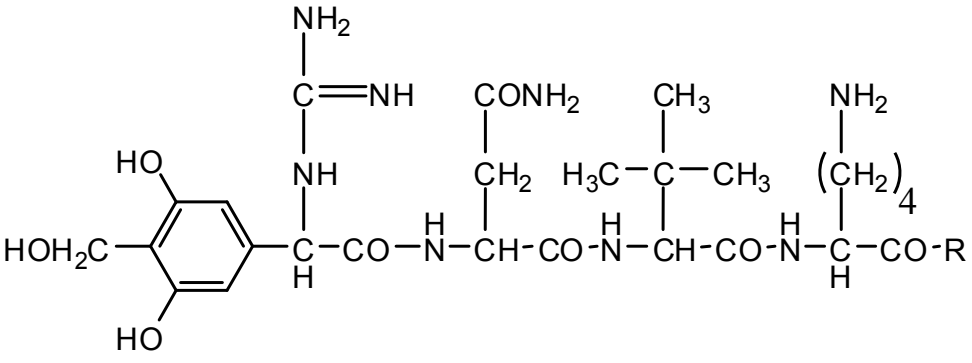
1. Org. Lett., 2012 Oct 5;**14**(19):5050-3.
2. Chem. Biol., 2012 Oct 26;**19**(10):1278-87.
3. Chem. Sci., 2012,**3**, 3516-3521
4. Chem. Sci.,2012,**3**, 3522-3525

bottromycin, peptide antibiotics

講演番号：3C22a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ C 校舎 22 会場

ペプチド系抗生物質、フェガノマイシン生合成機構の解明
Biosynthetic studies on pheganomycin, a peptide antibiotic.
○野池 基義[1]、雄谷 洸一[1]、佐藤 康治[1]、丸山 千登勢[2]、濱野 吉十[2]、石川 淳[3]、大利 徹[1]([1]北大院工、[2]福井県大、[3]国立感染研)
○ Motoyoshi NOIKE[1], Kohichi Ohya[1], Yasuharu Satoh[1], Chitose Maruyama[2], Yoshimitsu Hamano[2], Jun Ishikawa[3], Tohru Dairi[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Fukui Pref. Univ., [3]NIID)

【目的】ペプチド系抗生物質の生合成では、リボソーム関与、Non-Ribosomal Peptide Synthase (NRPS)、ATP 依存のアミノ酸リガーゼ、tRNA 依存のアミノ酸転移酵素が用いられる。放線菌では、リボソーム関与型では、セリン・システイン残基由来のオキサゾール・チアゾール環の存在、head-to-tail の環化、プレニル化、グリコシル化修飾などが知られている。他方、NRPS では、非タンパク性のアミノ酸も取り込まれ、A-ドメインによるアデニル化、T-ドメインへのロード、C-ドメインでの縮合反応によりペプチド結合が生成後、エピメリ化、環化、メチル化などペプチド骨格の修飾や、ポリケチドやリピッドなど他の骨格との結合も知られている。しかし、デヒドロアラニンやチアゾールがリボソーム関与型と NRPS で生合成される化合物中に見いだされることから、構造情報のみで生合成機構を推定することが難しい場合も多い。筆者らは、下図に示したように、非タンパク性のフェニルグリシン誘導体を含み、C-末アミノ酸配列の多様性が知られているフェガノマイシン(PM)が、どちらの機構で生合成されるかに興味を持ち検討を行った。
【方法と結果】PM 生産菌のドラフトゲノム解析を行い、NRPS を探索したが PM を構成する 8 つのアミノ酸を活性化できる A-ドメインを有する NRPS は見いだせなかった。そこで、2 つの PM に共通のアミノ酸配列である NVKD をゲノムに探索した結果、これらの配列を含む ORF を見出した。現在、本 ORF を含む周辺領域の詳細な機能解析を行っている。本発表ではこれらの結果について報告する。



フェガノマイシンの構造（R ＝ DR or DGPT）

peptide antibiotics, pheganomycin

講演番号：3C22a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ C 校舎 22 会場

糸状菌 Phomopsis amygdali が持つインドールジテルペン生合成遺伝子クラスターの解析
Functional analysis of a biosynthetic gene cluster responsible for indole diterpene produced by a fungus

○劉 成偉[1]、野池 基義[1]、田上 紘一[2]、南 篤志[2]、及川 英秋[2]、大利 徹[1] ([1]北大院工、[2]北大院理)
○Chengwei LIU[1], Motoyoshi Noike[1], Koichi Tagami[2], Atsushi Minami[2], Hideaki Oikawa[2], Tohru Dairi[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Univ.)

【目的】 これまでに我々は、糸状菌 *Phomopsis amygdali* のドラフトゲノム解析を行い、本菌が生産するジテルペン化合物、フシコクシン A の生合成遺伝子クラスターを同定し詳細な解析を行ってきた [1-6]。ドラフトゲノムを精査した結果、*Penicillium paxilli* で同定、機能解析がなされている [7]、パキシリン生合成遺伝子群のオーソログを持つクラスターを見出した。これまでパキシリンに代表されるインドールジテルペンの生合成に関しては、遺伝学的な手法による解析例はあるものの、酵素を用いた in vitro での解析例は無いことから組換え酵素を用いて機能解析を行った。

【方法と結果】

(1) インドールジテルペン生合成遺伝子クラスターの同定

テルペン化合物は全てイソペンテニル 2 リン酸 (IPP) を出発原料に生合成される。炭素数 20 のゲラニルゲラニル 2 リン酸 (GGDP) を生合成する酵素は、基質 IPP の結合部位を中心に高い相同性を有することから、フシコクシン A の生合成に関与する GGDP 生合成酵素を query にパラログをゲノムに探索した。その結果、上述したよう、1 つのパラログを見出した。周辺領域を解析した結果、本遺伝子はパキシリンの生合成に関与することが報告されている遺伝子群とクラスターを成していた。本クラスターは 2 つのプレニル転移酵素様遺伝子を含んでいたことから合計 3 つの酵素について組換え酵素を用いて機能解析した。

(2) プレニル転移酵素様遺伝子の機能解析

3 つの遺伝子の cDNA の取得を試みたが、*P. amygdali* では発現量が低かったため、異種宿主である麹菌で強制的に発現させ cDNA を調製後、組換え酵素を用いて機能解析した。その結果、1 つは予想通り GGDP 生合成活性を示し、1 つはパキシリンにジメチルアリル 2 リン酸を 2 分子転移する活性を有していた。残る 1 つは GGDP を indole-3-glycerol phosphate に転移し、3-ゲラニルゲラニルインドールを生成する活性を有していた。本酵素の基質特異性を調べた結果、ゲラニル 2 リン酸もプレニル供与体になることが解った。

[1]*PNAS*, **104**, 3084 (2007), [2]*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 870 (2009), [3]*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 5640 (2009), [4]*JACS.*, **133**, 2548 (2011), [5]*ChemBioChem.*, **13**, 566 (2012), [6]*PLoS ONE*, **7**, e42090 (2012), [7]*Mol. Microbiol.*. **39**, 754, (2001).

indole diterpene, Phomopsis amygdali

講演番号：3C22a15
講演日時、会場：3 月 26 日 11:48～ C 校舎 22 会場

ヒト P450 発現菌を用いた karahanaenone の生物変換

In Vitro Metabolism of Karahanaenone Using Human Liver Microsomes

○宮澤 三雄、中橋 浩（近畿大理工）
○Mitsuo Miyazawa,Hiroshi Nakahashi (Kinki Univ.)

【目的】我々は天然物の代謝研究を行なっている。中でも、香り物質は古来より我々の生活に密接に関係しているにも関わらず、化学的な代謝様式が未だ解明されていない分野の一つである。そこで、我々はヒト肝ミクロソームを用いた香り物質の代謝検討を行った。本研究では、基質として七員環モノテルペンである karahanaenone を用い、以下の実験を行った。
【方法・結果】まず、ヒト肝ミクロソームを用いた変換試験を行った結果、２つの代謝物が確認された。次に反応に関与する分子種を決定するために発現系および(+)-menthofuran および ticlopidine を用いた阻害試験、相関試験の結果、反応に関与する分子種は主に、CYP2A6 と CYP2B6 だと解明した。なお、２つの代謝物共に CYP2A6 によって代謝されていたことから、代謝物を大量に得る目的で、以前私達が開発したヒト CYP2A6 発現遺伝子導入菌 *Salmonella typhimurium* OY1002/2A6 を用いた変換反応についても検討した。

Karahanaenone, CYP2A6, Biotransformation

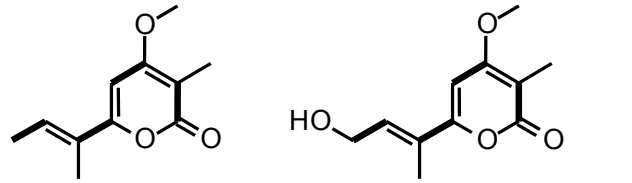
講演番号：3C22p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ C 校舎 22 会場

糸状菌の二成分情報伝達系攪乱により生産誘導されるポリケタイド化合物の生合成遺伝子クラスターの同定

Identification of the biosynthetic gene cluster for the polyketide compounds the production of which is induced by disturbance of the two-component signal transduction system of a filamentous fungus

○本山 高幸、林 敏明、廣田 洋、長田 裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）
○Takayuki MOTOYAMA,Toshiaki HAYASHI,Hiroshi HIROTA,Hiroyuki Osada（Chem. Biol., RIKEN ASI）

【目的】糸状菌は二次代謝産物の宝庫であり、医薬などのソースとして利用されてきた。最近のゲノム解析の進展により、糸状菌ゲノム中には予想以上に膨大な数の二次代謝遺伝子が存在することが明らかになってきたが、ほとんどが実験室条件では休眠状態にあるため利用することができない。二次代謝遺伝子が休眠状態にある原因として、ある特定の環境でのみ発現するように厳密な制御を受けていることが想定されている。それならば、環境応答を攪乱することにより、休眠遺伝子覚醒が可能なはずである。前回までに、モデル植物病原糸状菌であるイネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* を用いて、環境応答に関与する二成分情報伝達系因子の遺伝子破壊株を作製して、環境応答攪乱によりポリケタイド化合物 nectriapyrone（**1**）及びその新規類縁体（**2**）の生産誘導が可能であることを明らかにした。今回、生産誘導される化合物の生合成遺伝子クラスターを同定した。



nectriapyrone (**1**)　hydroxynectriapyrone (**2**)

【方法と結果】nectriapyrone（**1**）及びその類縁体（**2**）の構造から、基本骨格の生合成に関与する PKS は KS、AT、ACP の基本ドメインに加えて、KR、DH、MT の修飾ドメインを持つことが予想された。基本骨格が合成された後、*O*-メチル基転移酵素による修飾で、nectriapyrone（**1**）が生合成され、更に水酸化されることで、類縁体（**2**）が合成されることが予想された。まず、生合成に関与する PKS 遺伝子を探索した。イネいもち病菌ゲノム中には PKS 及び PKS-NRPS 遺伝子が 28 個存在する。nectriapyrone（**1**）の生産誘導条件及び非誘導条件の細胞を用いた DNA マイクロアレイ解析により、生合成遺伝子を絞り込み、nectriapyrone（**1**）生産パターンと完全に一致する発現パターンを示す PKS 遺伝子を一個見出した。この PKS 遺伝子の遺伝子破壊により、二つのポリケタイド化合物の生産が認められなくなったことから、この PKS 遺伝子が生合成に関与することが明らかとなった。この PKS 遺伝子の近傍には、nectriapyrone（**1**）生産パターンと完全に一致する発現パターンを示す *O*-メチル基転移酵素遺伝子が存在し、生合成遺伝子クラスターを形成していることが示唆された。

本研究の一部は、生研センターイノベーション創出事業による支援を受けた。

Magnaporthe oryzae, secondary metabolism, silent gene cluster activation

講演番号：3C22p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ C 校舎 22 会場

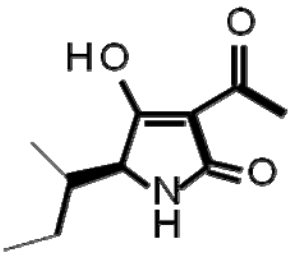
糸状菌 *Magnaporthe oryzae* の二成分情報伝達系攪乱によるテヌアゾン酸の生産誘導

Induced production of a tenuazonic acid by disturbance of the two-component signal transduction system in the *Magnaporthe oryzae*

○尹 忠銖、本山 高幸、林 敏明、廣田 洋、長田 裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）
○ Choong-Soo YUN,Takayuki MOTOYAMA,Toshiaki HAYASHI,Hiroshi HIROTA,Hiroyuki OSADA (Chem. Biol., RIKEN ASI)

【目的】近年、糸状菌のゲノム解読が急速に行われ、それらのゲノム配列情報から今まで知られている二次代謝関連遺伝子はごく一部で、糸状菌ゲノム中には予想以上に膨大な数の二次代謝遺伝子が存在することが明らかになってきた。しかし、ほとんどは実験室条件では休眠状態にあり、利用することができない。我々は、イネいもち病菌(*Maganporthe oryzae*)をモデル糸状菌として用いて、情報伝達系を攪乱することにより、二次代謝遺伝子を活性化して、休眠状態の二次代謝遺伝子を活かすことを可能にすることを目指している。現在までに、二成分情報伝達系を攪乱することにより、液体培養条件でポリケタイド化合物nectriapyroneの生産が誘導されることを明らかにしている。今回、二成分情報伝達系を攪乱することにより、固体培養条件では液体培養条件とは異なる化合物の生産誘導が可能であることを報告する。

【方法と結果】二成分情報伝達系下流で働くp38 MAPキナーゼOsm1の遺伝子破壊株および、Osm1と二成分情報伝達系のHPtの二重遺伝子破壊株を用いて解析を行った。Osm1遺伝子破壊株の固体培養条件で、ポリケタイド-非リボソームペプチド（PK-NRP）融合化合物であるテヌアゾン酸の生産が誘導された。テヌアゾン酸は*Alternaria*属糸状菌等が生産するマイコトキシンであり、タンパク質合成を阻害する。また、抗腫瘍活性などの生理作用も報告されている。Osm1遺伝子破壊によるテヌアゾン酸生産誘導とエピジェネティックな制御との関連を解析するために、野生型株をヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（SAHA）とDNAメチル化阻害剤（5-azacytidine）で処理したが、生産誘導は認められなかった。この結果から、Osm1遺伝子破壊株では、これらの化合物による生産誘導とは異なるメカニズムで生産誘導されている可能性が示唆された。糸状菌のp38 MAPキナーゼが二次代謝制御をしている例が他にも知られていたため、Osm1及び近縁菌のp38 MAPキナーゼを化合物により制御し、二次代謝を制御することを可能にすることを目的として、Osm1阻害剤を探索することにした。His-tag付きのOsm1蛋白質を調製し、本研究室で開発した化合物アレイを用いて相互作用する化合物を探索中である。



tenuazonic acid

本研究の一部は，生研センターイノベーション創出事業による支援を受けた。

Magnaporthe oryzae, MAP kinase, chemical array

講演番号：3C22p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ C 校舎 22 会場

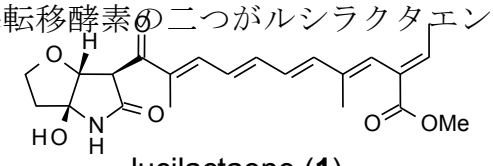
糸状菌 *Fusarium* sp. RK97-94 のルシラクタエン生合成遺伝子クラスター中のトランスポーターおよびメチル基転移酵素遺伝子の機能解析

Functional analysis of a transporter and a methyltransferase genes in the lucilactaene biosynthetic gene cluster of the producing fungus *Fusarium* sp. RK97-94

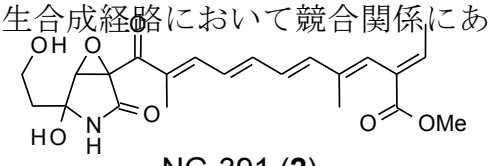
○加藤 翔[1,2]、本山 高幸[1]、林 敏明[1]、廣田 洋[1]、田中 彰[3]、安藤 直子[3]、鎌倉 高志[2]、長田 裕之[1] ([1]理研基幹研・ケミカルバイオロジー、[2]東京理科大、[3]東洋大)
○Sho KATO[1,2], Takayuki Motoyama[1], Toshiaki Hayashi[1], Hiroshi Hirota[1], Akira Tanaka[3], Naoko Ando[3], Takashi Kamakura[2], Hiroyuki Osada[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN ASI, [2]Tokyo Univ. of Sci., [3]Toyo Univ.)

【目的】ルシラクタエン(**1**)は糸状菌 *Fusarium* sp. RK97-94 が生産する低分子化合物であり、がん抑制遺伝子 p53 不活化細胞で細胞周期阻害活性を示す。そのため、抗がん剤のリード化合物として注目され、生合成経路の解明が必要とされている。ルシラクタエン(**1**)生産菌は同時に環状エーテルが開環している類縁体 NG-391(**2**)を主要代謝物として生産する。我々はルシラクタエン(**1**)と NG-391(**2**)の生合成に必須な PKS-NRPS 融合酵素遺伝子をクローニングし、その近傍に推定ルシラクタエン(**1**)生合成遺伝子クラスターが存在することを明らかにしている。遺伝子クラスター中には PKS-NRPS 融合酵素の他に、エステル分解酵素、脱水素酵素、P450、メチル基転移酵素、プロテアーゼ、トランスポーターをコードすると予想される遺伝子群が存在することを明らかにしている。今回、トランスポーター遺伝子とメチル基転移酵素遺伝子の機能解析を行った。

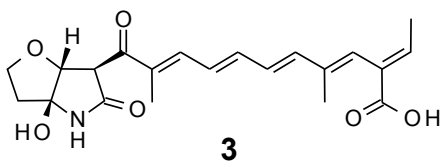
【方法と結果】トランスポーター遺伝子破壊株を作製し、代謝物を解析した。破壊株では、NG-391(**2**)の生産量と細胞外への排出量に変化は認められなかったが、ルシラクタエン(**1**)の生産量は細胞内外に関係なく大幅に低下した。このことからトランスポーター遺伝子は予想していた化合物の細胞外への排出ではなく、環状エーテル形成を促進していることが示唆された。次にメチル基転移酵素遺伝子破壊株を作製し、代謝物を分析した。破壊株は、ルシラクタエン(**1**)と NG-391(**2**)の生産能を失い、ルシラクタエン(**1**)の脱メチル化体(**3**)を主要代謝物として生産するようになったことから、メチル基転移酵素がカルボキシル基のメチル化に関与していることが明らかになった。また、NG-391(**2**)の脱メチル化体が主要ピークとして観察されなかったことから、カルボキシル基のメチル化が環状エーテル形成を阻害していることが示唆された。以上の結果から、エーテル環形成を促すトランスポーターと阻害するメチル基転移酵素の二つがルシラクタエン生合成経路において競合関係にあることが示唆された。



lucilactaene (**1**)



NG-391 (**2**)



3

Fusarium, secondary metabolism, mycotoxin

講演番号：3C22p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ C 校舎 22 会場

放線菌におけるアミノ酸キャリアタンパク質を介した二次代謝産物生合成
Secondary metabolite biosynthesis using amino acid carrier protein in *Streptomyces*.
○長谷部 文人[1]、富田 武郎[1]、高 ひかり[2]、藤村 務[2]、西山 千春[3]、葛山 智久[1]、西山 真[1]([1]東大・生物工学セ、[2]順天堂大・医・研究基盤セ、[3]順天堂大・医・アトピー疾患研究セ)
○ Fumihito HASEBE[1], Takeo TOMITA[1], Hikari TAKA[2], Tsutomu FUJIMURA[2], Chiharu NISHIYAMA[3], Tomohisa KUZUYAMA[1], Makoto NISHIYAMA[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Junten Univ, [3]Junten Univ)

【目的】一般に細菌はジアミノピメリン酸を経てリジンを生合成することが知られているが、*Thermus thermophilus*は細菌でありながらα-アミノアジピン酸(AAA)を経由してリジンを生合成する。この生合成の後半(AAAからリジンへの変換)はアルギニン生合成におけるグルタミン酸からオルニチンへの変換に似ているものの、生合成中間体のα-アミノ基をLysWタンパク質のC末端のグルタミン酸残基で保護したのちに、酵素群LysXZYJKによる反応が進行することが我々のグループにより明らかになっている。一方、放線菌*Streptomyces sahachiroi* が生産する抗腫瘍化合物であるAzinomycin Bの生合成遺伝子クラスター中に*lysWXZYK*ホモログ遺伝子が存在し、これらがazabicyclic ring骨格を有するアミノ酸骨格の生合成に関わることが示唆されている。さらに最近多数の放線菌ゲノム上に類似クラスターが発見され、アミノ酸キャリアタンパク質を利用する新規なシステムが多くの二次代謝化合物の生合成に関わることが示唆される。本研究では、放線菌*Streptomyces* sp. SANK60404（以下SANK60404株）を用い、LysWホモログが関わる二次代謝産物の生合成についての研究を行った。
【方法と結果】SANK60404株の*lysZ*または*lysK*ホモログ遺伝子の破壊株(60404ΔZ株、60404ΔK株)を作製した。これらと野生株においてN末端にStrep-tagを付加したLysWホモログを大量発現させた。それぞれの株から精製したLysWホモログのC末端構造についてMALDI-MS/MS分析を行った。*T. thermophilus*のリジン生合成経路から、60404ΔZ株ではLysWホモログのC末端に何らかのアミノ酸が付加したものが、60404ΔK株ではLysWに付加したアミノ酸が修飾を受け、LysKホモログにより切り離される前の生合成中間体が精製しているものと推測される。その結果、60404ΔZ株由来のものはC末端にグルタミン酸残基が付加されており、LysWのC末端に付加されるアミノ酸は、グルタミン酸が基質であることが明らかになった。一方、60404ΔK株由来のものはC末端に既存のアミノ酸とは異なる分子量を有する化合物が付加されていた。これにLysKホモログを反応させると付加していた化合物が切り離されることがLC-MSにより確認できた。このことからSANK60404株がLysWホモログを介して新規なアミノ酸中間体を生合成していることが明らかになった。この新規アミノ酸の生合成に関与すると推測した各遺伝子産物を調製しグルタミン酸を基質として、*in vitro*で反応後、MALDI-MS分析を行った。その結果、60404ΔK株から精製したLysWホモログのC末端に付加されたものと同じ分子量の化合物が結合していることが分かり、推測した遺伝子産物が新規化合物の生合成を担っていることが明らかになった。本発表では、この新規化合物の構造も発表する予定である。

secondary metabolism, carrier protein, amino acid

講演番号：3C22p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ C 校舎 22 会場

新規アミノ酸キャリアタンパク質を用いて生合成される天然化合物の探索
Screening of natural compounds produced by biosynthetic machinery involving novel amino acid carrier protein

○松田 研一[1]、長谷部 文人[1]、富田 武郎[1]、志波 優[2]、吉川 博文[2]、新家 一男[3]、葛山 智久[1]、西山 真[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]東農大・生物資源ゲノム解析センター、[3]産総研・バイオメディシナル情報研究センター)
○ kenichi MATSUDA[1], fumihito HASEBE[1], takeo TOMITA[1], yuh SHIWA[2], hirofumi YOSHIKAWA[2], kazuo SHIN-YA[3], tomohisa KUZUYAMA[1], makoto NISHIYAMA[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]AIST)

【目的】一般的なバクテリアはジアミノピメリン酸(DAP)を経由してリジンを生合成することが知られているが、好熱菌 *Thermus thermophilus* はバクテリアでありながらα-アミノアジピン酸(AAA)を経由してリジンを生産することが明らかになっている。この生合成の後半(AAA からリジン)はアルギニン生合成におけるグルタミン酸からオルニチンへの変換に似ているものの、LysW という新規に発見された 54 アミノ酸からなるタンパク質の C 末端のグルタミン酸残基と生合成中間体であるα-アミノ基とをイソペプチド結合させることにより、それを保護した形で酵素群 LysXZYJK による反応が進行することが当研究室により明らかになっている。一方、放線菌 *Streptomyces sahachiroi* の生産する抗腫瘍物質である Azinomycin B の生合成遺伝子クラスター中に LyasWXZYK ホモログ遺伝子が存在し、これらが azabicyclic ring 骨格を有するアミノ酸骨格の生合成に関わることが示唆されている。さらに我々はいくつかの放線菌ゲノム上にも類似の遺伝子クラスターが存在することを見出した。これらの事実はアミノ酸キャリアタンパク質を利用する新規なシステムが多くの二次代謝化合物の生合成に関わることを示唆している。本研究では放線菌ゲノムライブラリーを用いたスクリーニングを通して本遺伝子クラスターを有する菌株の探索を行い、二次代謝産物の同定を目指した。

【方法と結果】既知の LysW ホモログの保存領域に対して 2 種類のプライマーセット(griseus primer 及び SANK primer)を設計し、それぞれを用いて 846 株のゲノムライブラリーの PCR スクリーニングを行った。その結果、griseus primer で 26 株、SANK primer で 24 株で *lysW* ホモログのバンドの増幅がみられた。それぞれを griseus group, SANK group と呼ぶ。これらの株のドラフトゲノムシークエンス解析を行い、現在までにそれぞれ 17, 14 株の解析が完了している。各株の *lysW* ホモログ周辺の解析により、griseus group ではリジン生合成遺伝子に類似のクラスターを含む約 17 個の遺伝子を含む約 20 kb の領域が高度に保存されていることが分かった。この領域が一部の放線菌で共通して生産される低分子化合物の生合成に関与している可能性が考えられる。一方、SANK group の *lysW* ホモログの近傍には多くの株で複数の NRPS や PKS が見出され、周辺領域にコードされている遺伝子群も多様であることから、*lysWXZYK* ホモログ遺伝子クラスターが多様な構造を持つ二次代謝産物の生産に関わっていることが示唆された。

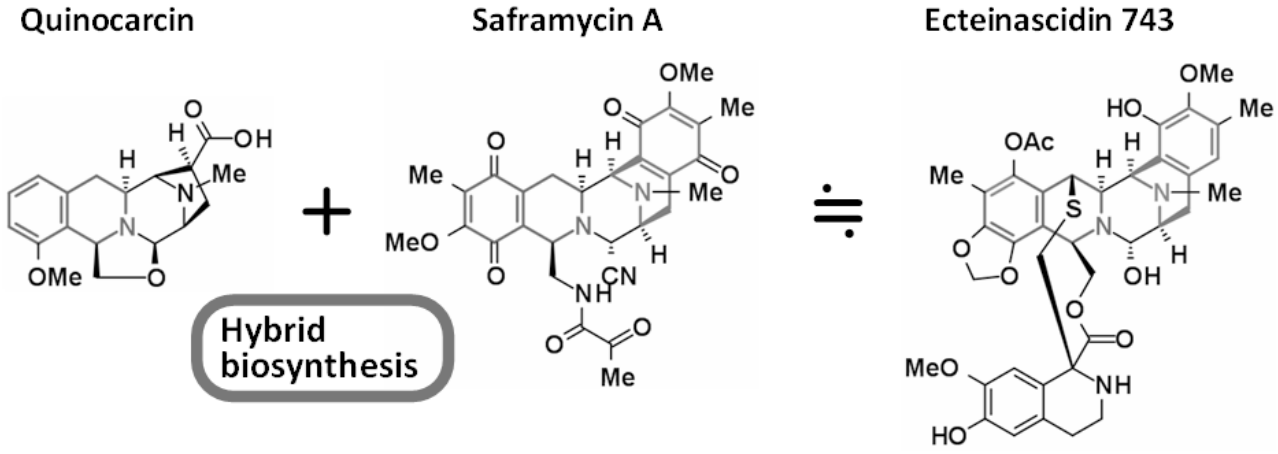
Secondary metabolism, Carrier protein, Actinomycete

講演番号：3C22p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ C 校舎 22 会場

Quinocarcin 生合成における tetrahydroisoquinoline 骨格構築機構の解明：第二報
Biosynthetic studies of the tetrahydroisoquinoline skeleton in quinocarcin biosynthesis
○平塚 知成、金子 峻輔、纐纈 健人、南 篤志、大栗 博毅、及川 英秋（北大院理）
○ Tomoshige HIRATSUKA,Shunsuke KANEKO,Kento KOKETSU,Atsushi MINAMI,Hiroki OGURI,Hideaki OIKAWA (Hokkaido Univ.)

【目的】微生物由来の tetrahydroisoquinoline 型アルカロイド ecteinascidin 743 は、強い抗腫瘍活性を持ち臨床用に使用されているが、その詳細な生合成機構は完全には解明されていない。本研究では、ecteinascidin 743 と同一な部分構造を持つ saframycin および quinocarcin の骨格構築酵素を用いてハイブリッド生合成を行うことで、ecteinascidin 743 と同等以上の抗腫瘍活性を持つ類似化合物を短工程で作ることを最終目的とする。既に我々は単一の酵素 SfmC が触媒する saframycin の骨格構築機構を明らかにしているが[1)]、今回は現在進めている quinocarcin 生合成経路の解明について報告する。

【方法・結果】放線菌 *Streptomyces melanovinaceus* の quinocarcin 生合成遺伝子クラスターに含まれる 5種の NRPS 遺伝子（*qcn12*, *13*, *15*, *17*, *19*）を放線菌 *Rhodococcus erythropolis* を宿主とする蛋白発現系で誘導発現・精製し、その機能解析を行った。 ATP-PPi exchange assay の結果、Qcn17 A-domain による基質アミノ酸の活性化には MbtH like protein (Qcn16) の存在が重要であることが明らかになった。また、Qcn 蛋白の共発現・共精製の結果、NRPS を含む複数の蛋白質間に相互作用があることが確認された。



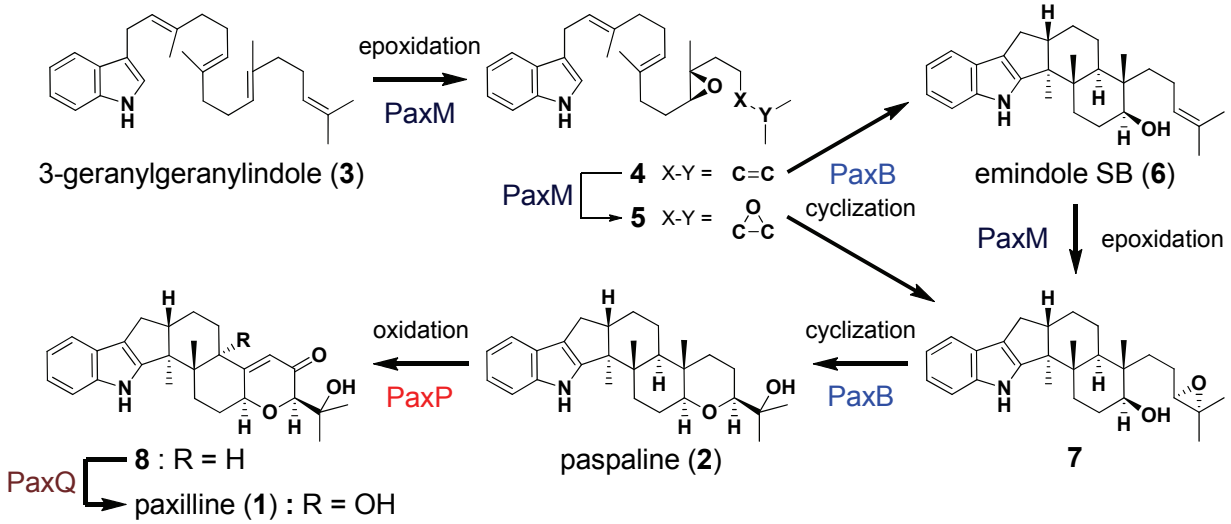
1) Koketsu K *et al. Nat Chem Biol.* **2010**, *6*, 408

Quinocarcin, Tetrahydroisoquinoline, Biosynthesis

講演番号：3C22p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ C 校舎 22 会場

インドールジテルペン・パキシリンの酵素的全合成
Reconstitution of biosynthetic machinery for indole-diterpene paxilline in *Aspergillus oryzae*
○田上 紘一[1]、劉 成偉[2]、南 篤志[1]、野池 基義[2]、井坂 哲也[3]、笛木 周平[1]、七条 好宏[1]、戸嶋 浩明[3]、五味 勝也[4]、大利 徹[2]、及川 英秋[1] ([1]北大院理、[2]北大院工、[3]茨大農、[4]東北大院農)
○Koichi Tagami[1], Chengwei Liu[2], Atsushi Minami[1], Motoyoshi Noike[2], Tetsuya Isaka[3], Shuhei Fueki[1], Yoshihiro Shichijo[1], Hiroaki Toshima[3], Katsuya Gomi[4], Tohru Dairi[2], Hideaki Oikawa[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Univ., [3]Ibadai, [4]Tohoku Univ.)

【目的】糸状菌*Penicillium paxilli* から単離されたマイコトキシンであるパキシリン(**1**)は、インドール環とテルペノイド骨格が融合したメロテルペノイドである。我々は昨年度の本会で、麹菌*Aspergillus oryzae* NSAR1株を用いた異種発現系を利用して４種の酵素遺伝子（*paxG* / *C* / *M* / *B*）を順次導入した結果、パスパリン(**2**)がエポキシ化/環化が交互に起こる(**3**→**4**→**6**→**7**→**2**)ことで生合成されると推定した。本研究では *in vivo* 変換の詳細な解析による **2** 生合成経路の決定と、上記の４重形質転換体に対してさらに２つのP450遺伝子(*paxP, paxQ*)を導入することで **1** の酵素的全合成を目指した。
【方法・結果】下図に示したエポキシ化/環化による詳細な反応機構を検討するため、麹菌に対してプロトプラストーPEG 法を用いて*paxM* と*paxB* をそれぞれ導入し、形質転換株（AO-*paxM*, AO-*paxB*）を調製した。得られた形質転換体に対して *in vivo* 変換反応を試みた。まず **3** を基質としてAO-*paxM* の*in vivo* 変換反応を行ったところ、異種発現の結果と同様に主生成物として **4** を与えた。また少量ではあるが **5** も生産した。一方、**4** と不斉ジヒドロキシ化を通して合成された **5** を基質としたAO-*paxB* の*in vivo* 変換反応では、環化体 **6** と **2** をそれぞれ与えた。以上の結果から、**2** の主要な生合成は天然物 **6** を含んだエポキシ化/環化を繰り返す経路であることを確認した。また、４重形質転換体に対し、２つの酸化酵素遺伝子を同一のベクター（pUNA）に単独で組み込んだ。構築した２種のプラスミドを同時に麹菌へ導入し、得られた複数の形質転換体を培養して代謝産物を解析した結果、**8** 及び **1** の生産を確認した。本研究により、麹菌異種発現系は生合成経路の検討と物質生産が同時に達成可能な優れた系であることを改めて実証した。

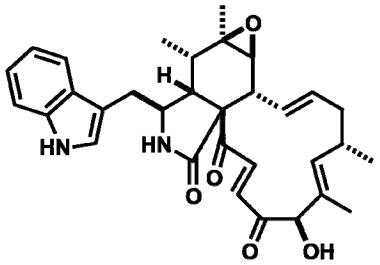


Indole-diterpene, Biosynthesis, Paxilline

講演番号：3C22p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ C 校舎 22 会場

糸状菌 *Chaetomium globosum* 由来 Chaetoglobosin A の生合成研究
Biosynthetic Study on Chaetoglobosin A
○石内 勘一郎、中沢 威人、佐藤 道大、野口 博司、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○Kan'ichiro ISHIUCHI, Takehito NAKAZAWA, Michio SATO, Hiroshi NOGUCHI, Kenji WATANABE (Univ. of Shizuoka)

[目的] Chaetoglobosin A (1)は糸状菌 *Chaetomium globosum* より単離された L-トリプトファンとポリケタイドで構成されるユニークな五環性化合物である。本研究では、*C. globosum* の遺伝子破壊実験により 1 の生合成遺伝子クラスターを特定し生合成経路を明らかにすることを目指した。



1

[方法] ホモロジー検索より、1 は 1 つの PKS-NRPS、1 つの ER (enoyl reductase)、２つの cytochrome P450、および１つの FMO (flavin monooxygenase)をコードする合計 5 つの遺伝子から生合成されることが示唆された。まず、*cgbC*(PKS-NRPS), *cgbD*(ER), *cgbF*(P450), *cgbG*(FMO), *cgbH*(P450), *cgbF*/*cgbG* 破壊カセットを構築した。*C. globosum* の*ΔligD*／*ΔpyrG* 株をプロトプラスト-PEG 法により 6 つの遺伝子破壊カセットでそれぞれ形質転換し、9 つの *C. globosum* 遺伝子破壊株*ΔcgbC*、*ΔcgbD*、*ΔcgbF*、*ΔcgbG*、*ΔcgbH*、*ΔcgbG*/*ΔcgbH*、*ΔcgbF*/*ΔcgbH*、*ΔcgbF*/*ΔcgbG*、*ΔcgbF*/*ΔcgbG*/*ΔcgbH* 株を得た。得られた遺伝子破壊株をオートミールアガー培地で 30℃ 5 日間静置培養し、菌体の MeOH 抽出物について LC-MS 分析を行った。さらに LC-MS 分析により観測された 1 の生合成中間体を示唆するピークについて化合物の精製を行い、NMR 等の分光学的手法を用いてその構造を明らかにすることで 1 の生合成経路の推定を行った。また、遺伝子破壊実験より推定した生合成酵素の機能を証明するために、３つの酸化酵素をコードする遺伝子 *cgbF*、*cgbG*、*cgbH* を出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主として異種発現させ、*in vivo* による酵素機能解析を行った。

[結果と考察] *ΔcgbC* および*ΔcgbD* 株の両株において、chaetoglobosin 類の生産が確認されないことから、*cgbC* と *cgbD* が 1 の鍵生合成遺伝子であることが明らかとなった。また、*cgbF*、*cgbG*、*cgbH* の遺伝子二重破壊株、および三重破壊株からは 1 の生産が確認されない一方で、prochaetoglobosin I、prochaetoglobosin IV、20-dihydrochaetoglobosin A、cytoglobosin D、chaetoglobosin J の生産が確認された。このことから、*cgbC* と *cgbD* が 1 の骨格構造の構築に関与し、prochaetoglobosin I が生合成され、*cgbF*、cgbG、*cgbH* は prochaetoglobosin I から 1 への酸化過程においてそれぞれ基質のエポキシ化、脱水素化、水酸化に関与することが明らかとなった。現在、*CgbF*、*CgbG*、*CgbH* の機能の詳細について出芽酵母の異種発現システムを用いて検討中である。

biosynthesis, biosynthetic pathway, chaetoglobosin A

講演番号：3C22p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ C 校舎 22 会場

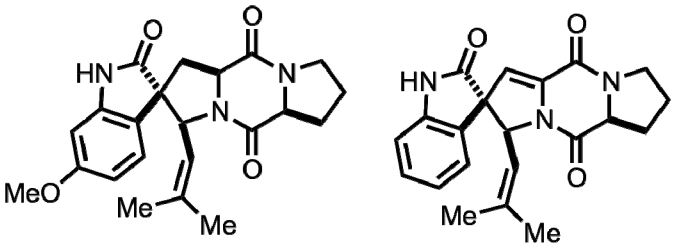
天然物生合成遺伝子の異種発現による spirotryprostatin 類の生合成研究

Total Engineered Biosynthesis of Spirotryprostatins A, B and G.

○石川 格靖[1]、恒松 雄太[1]、野口 博司[1]、守屋 央朗[2]、渡辺 賢二[1] ([1]静岡県立大学、[2]岡山大学)
○Noriyasu ISHIKAWA[1], Yuta TSUNEMATSU[1], Hiroshi NOGUCHI[1], Hisao MORIYA[2], Kenji WATANABE[1] ([1]University of Shizuoka, [2]Okayama University)

[目的]

Spirotryprostatin A (**1**) および B (**2**) は糸状菌 *Aspergillus fumigatus* BM939 株が生産する極微量天然物である。本化合物はその化学構造に特徴的なスピロ環構造を有しており、合成化学的にも興味が持たれる化合物であるが、糸状菌体内におけるスピロ環形成機構は長らく不明であった。我々はこれまでに本化合物に着目し、極微量天然物の「生合成機構の解明」と「遺伝子工学による高収量生産」という困難な課題に挑戦してきた。既に **1** についてはそのスピロ環化を担う酵素遺伝子として Afu6g12060 遺伝子(*fqzB*)を同定し、加えて異種生物による全生合成を達成することに成功している[(1)]。今回、我々は **2** の生合成経路を明らかにした後、糸状菌 *Aspergillus niger* 生体内において本化合物の全生合成に成功したので報告する。



spirotryprostatin A (**1**)　　spirotryprostatin B (**2**)

[方法・結果]

当初、**2** は demethoxyfumitremorgin C を基質として *fqzB* により生合成されると推測されたが、各種条件検討の結果、酵素反応の進行を確認することはできなかった。そこで、**2** に特徴的なオレフィン構造に着目した。この部分構造を生合成する酵素をバイオインフォマティクス解析によって探索した。その結果、*A. fumigatus* ゲノム上より候補遺伝子を見出すことができた。続いて、本遺伝子を出芽酵母細胞内で発現させ、酵素活性を測定したところ demethoxyfumitremorgin C を基質とし、**2** を生合成する活性が認められた。また、その反応機構はラジカル種による反応が関与していると推測された。続いて **2** の生合成に必要な全ての遺伝子を *A. niger* を用い強制発現可能とするシステムを構築した。得られた形質転換体の培養液から **2** を獲得することに成功した。さらに **1** の生合成中間体である fumitremorgin C を基質とし、本酵素を反応させたところ **1** および **2** と同様にスピロ環構造を有する新規化合物 spirotryprostatin G の生合成を確認した。

(1) 恒松雄太、石川格靖、野口博司、守屋央朗、渡辺賢二、第 54 回天然有機化合物討論会

spirotryprostatin, biosynthesis, heterologous expression

講演番号：3C22p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ C 校舎 22 会場

糸状菌由来 azaphilone 系天然物 cochliodone A の生合成研究

Biosynthetic study on cochliodone A from *Chaetomium globosum*

○佐藤 道大[1]、中沢 威人[1]、野口 博司[1]、守屋 央朗[2]、渡辺 賢二[1] ([1]静県大薬、[2]岡山大学・異分野コア)

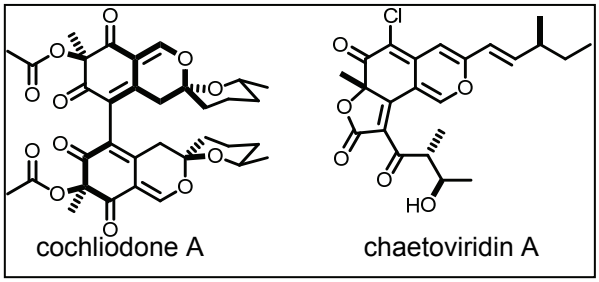
○ Michio SATO[1], Takehito NAKAZAWA[1], Hiroshi NOGUCHI[1], Hisao MORIYA[2], Kenji WATANABE[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Okayama Univ.)

【目的】

糸状菌 *Chaetomium globosum* は、ポリケチド合成酵素 (PKS)、非リボソーム依存性ペプチド合成酵素 (NRPS) などの二次代謝生合成遺伝子が他の糸状菌と比較しても数多く存在し、また実際に多様な二次代謝産物を生産することで知られている。その中のひとつである cochliodone A は 2008 年に *C. globosum* から単離された、スピロアセタール構造を有し二量体を形成している azaphilone 系天然物である。Azaphilone 類は糸状菌の代謝産物によく見られ、pyrane-quinone 骨格を有する 2 環性の化合物であり幅広い生物活性を有する。糸状菌において広く存在する azaphilone 類であるが、その生合成経路の完全な解明には至っていない。そこで今回我々は、本化合物のアセタール形成および二量体化のメカニズムを含む、全生合成経路を解明することを目的として研究を行った。

【方法・結果】

はじめに cochliodone A の生合成遺伝子クラスターを特定するために、遺伝子の探索を行った。本菌が生産する azaphilone 系化合物、chaetoviridin 類の生合成遺伝子との相同性検索を行い、予想される PKS 遺伝子を見出した。次にその PKS 遺伝子の破壊株の作成を行い、得られた破壊株の抽出物を LC-MS を用いて分析した。その結果、cochliodone A の生産が消失したことが確認され、全長 35 kb からなる cochliodone A 生合成クラスターを特定した。次いで生合成クラスターにおける修飾遺伝子群の破壊実験を行った結果、4 種の生合成中間体と考えられる化合物の獲得に成功した。現在、予想中間体とその生合成に関わる酵素の *in vitro* 反応による生合成機構の解析を行っている。



cochliodone A　　chaetoviridin A

biosynthesis, azaphilone, fungus

講演番号：3C22p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ C 校舎 22 会場

糸状菌由来休眠型生合成遺伝子の活性化によるポリケタイド系天然物合成システムの構築

Activating silenced biosynthetic pathways to produce novel polyketides in *Microsporum canis*

○猿渡 隆佳[1]、野口 博司[1]、守屋 央朗[2]、渡辺 賢二[1] ([1]静岡県大薬、[2]岡山大異分野コア)
○ Takayoshi SARUWATARI[1], Hiroshi NOGUCHI[1], Hisao MORIYA[2], Kenji WATANABE[1] ([1]University of Shizuoka, [2]Okayama University)

【目的】これまでの糸状菌に関する分子生物学的研究結果から、実験室における一般的な培養法では、糸状菌が保有する二次代謝産物生合成遺伝子のうち、その多くは転写活性が低いことが明らかとなった。すなわち糸状菌のゲノム上に生合成遺伝子はコードされているが、天然物として生産を確認できない化合物が多数存在すると考えられる。これらの遺伝子は転写活性が低いため、mRNA の取得とそれに続く cDNA の合成が困難であり、異種発現による生合成産物の獲得は困難となる。また、糸状菌の二次代謝産物生合成遺伝子はゲノム上でクラスターとしてコードされ、プレニル基転移酵素、 酸化還元酵素などの複数の遺伝子が協調的に機能することで複雑な化合物を合成することが知られている。従って、天然物の炭素骨格を構築するポリケタイド合成酵素（PKS）および非リボソーム性ペプチド合成酵素（NRPS）のみを異種発現させたとしても、生産起源の生物が持つ生合成能力を全て機能させたことにはならず、天然物を獲得することは困難となる。本発表では休眠型遺伝子クラスターを活性化することでポリケタイド系天然物の生産に成功したので報告する。
【方法・結果】本研究では皮膚糸状菌 *Microsporum canis* を実験材料として用いた。本糸状菌は白癬の原因菌であり、これまでは主に医療的な観点から研究が進められてきたが、天然物の単離構造決定に関する研究はほとんど行われてこなかった。一方で最近、本菌のゲノム配列が解読され、そのゲノム上に約 40 種の PKS および NRPS がコードされていると推定された。また、それらの半数以上がクラスター内に転写因子を持つことも合わせて予測された。続いて、RT-PCR により各遺伝子の発現量を調べることで、PKS をコードすると推定された極めて転写量の低い遺伝子を見出した。この PKS 遺伝子近傍には、プレニル基転移酵素および酸化酵素などの他に転写因子がコードされており、PKS 同様に本転写因子も転写量が極めて低いことが確認された。そこで、本転写因子を *M. canis* 内で機能するアクチンプロモーターの下流に連結し、目的遺伝子の転写活性を恒常的に増大させることができる遺伝子配列を作成した。これらの配列を PCR にて増幅後、プロトプラスト-PEG 法によって *M. canis* 染色体上へと導入し、遺伝子導入株をハイグロマイシン B 耐性により選択した。得られた変異株は野生株と比較した場合、異なる色を呈し、RT-PCR により遺伝子発現量を調べると、クラスター内に存在する遺伝子の転写量が増大しているこが明らかとなった。また、培養抽出物の HPLC および HR-MS による解析から、*M. canis* 野生株では見いだすことのできない化合物群が変異株において生合成されていることを確認した。現在これら化合物の単離・構造決定を行っている。

Biosynthesis, Fungus, Polyketide

講演番号：3C22p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ C 校舎 22 会場

糸状菌 Chaetomium globosum における chaetoviridin 類の生合成経路の解明

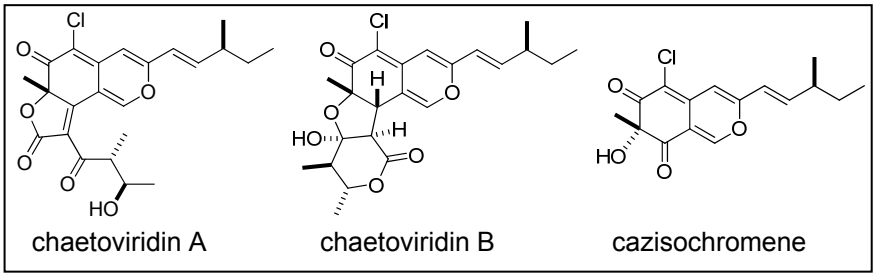
Identification and characterization of chaetoviridins gene cluster from Chaetomium globosum.

○杉本 覚、佐藤 道大、野口 博司、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○ Satoru SUGIMOTO, Michio SATO, Hiroshi NOGUCHI, Kenji Watanabe (University of Shizuoka.)

【背景】

Azaphilone 系天然物は多種にわたる真菌から 170 以上の化合物が単離され、その特徴的な構造を持つ事により多種多様な生物活性を持つことが知られている。生物活性としては、抗菌性、抗ウィルス性、抗酸化作用、細胞毒性などがあり、近年注目されている化合物群の 1 つである。今回我々は *Chaetomium globosum* が生産する azaphilone 系天然物、chaetoviridin 類に着目した。Chaetoviridin 類は、1989 年に高橋らのグループにより抗菌活性を指標に単離された化合物であり、現在までに 10 以上の類縁体が単離されている。Chaetoviridin 類は、azaphilone に特徴的なピラノキノン環だけではなく、その骨格に塩素原子が含まれた興味深い構造を有している。しかしながら、chaetoviridin 類の生合成に関する研究はほとんど行われていない。このような背景を踏まえ、我々はその骨格形成のメカニズムを解明すべく研究を行った。

【方法・結果】



実験に用いた *C. globosum* は当研究室において作製した、相同組換えが可能な *ligD* 遺伝子欠損株を使用した。Chaetoviridin 類はその構造から、2 種類のポリケタイド合成酵素 (還元型 PKS と非還元型 PKS) およびハロゲン化酵素が関わっていると考えられた。そこで、これら 2 種類の PKS およびハロゲン化酵素遺伝子が隣接する生合成クラスターを *in silico* 解析により探索した。予想された還元型および非還元型 PKS 遺伝子の破壊実験より、chaetoviridin 類の生産が消失したことから、生合成クラスターを同定した。またクラスター内に存在するアシルトランスフェラーゼを欠損することで、推定中間体 cazisochromene を獲得した。次に、酵母異種発現から得られた還元型 PKS の組換え酵素と cazisochromene を *in vitro* において反応させたところ、chaetoviridi A の生成が確認され、chaetoviridin A の生合成経路を解明した。さらに、生合成遺伝子群の欠損株の作成および組換え酵素による *in vitro* 反応から、chaetoviridin A から chaetoviridinB への代謝経路も明らかにしたので合わせて報告する。

biosynthesis, azaphilone, polyketide

講演番号：3C22p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ C 校舎 22 会場

形態形成変異を指標とした、糸状菌 *Chaetomium globosum* における休眠型生合成遺伝子の活性化変異株のスクリーニング

Screen for mutants capable of producing of natural products biosynthesized by silent gene clusters in *Chaetomium globosum*

○中沢 威人、五反田 康孝、石内 勘一郎、野口 博司、渡辺 賢二 (静岡県大・薬)
○Takehito Nakazawa,Yasutaka Gotanda,Kan'ichiro Ishiuchi,Hiroshi Noguchi,Watanabe Kenji (Unv. Shizuoka)

我々は、糸状菌 *Chaetomium globousm* における分子遺伝学実験システムの構築を通じて、本菌が産生する多様な天然物に関する生合成研究を行っている。
同時に、他の糸状菌と同様、本菌のゲノム上には膨大な数の休眠型生合成遺伝子クラスターが存在している。これらを網羅的に活性化させることが出来れば、多数の新規化合物の獲得が可能となる。しかし、従来の活性化手法は、確実性および網羅性の両面で不十分である。従って、確実に休眠型生合成遺伝子を活性化できる新しい手法の確立が求められる。本発表では、それに関する新しい手法を提案する。

モデル糸状菌である *Aspergillusi* 属をはじめとする様々な糸状菌において、天然物生合成（二次代謝）と形態形成の制御機構の間には強い関連性があることが示唆されている。以上を踏まえ、形態形成制御が不全化した変異体を取得することが、休眠型生合成遺伝子の活性化および新規天然物の獲得に繋がるのではないかと考えた。実際、*C. globosum* において LaeA・VeA などのホモログをコードする遺伝子の破壊を行ったところ、顕著な二次代謝産生の変動が観察され、野生株からは取得できなかった天然物を多数獲得できた。同時に、これらの変異体では気中菌糸および子のう殻形成が不全化していることが観察された。逆に、HepA・DmtB などのホモログをコードする遺伝子破壊株では二次代謝の変動が観察されず、同時に本菌の形態形成への影響もなかった。上記の結果からは、予想通り形態形成異常と二次代謝変動という表現型が同時に発生することが示唆された。しかし一方で、肉眼レベルでの形態形成は正常だが、有性胞子形成のみが不全化した２つの遺伝子破壊株では、二次代謝が変動しないことが分かった。これは、形態形成の最終段階（最下流の現象）である減数分裂が不全化しており、それによって影響を受ける下流の分子機構が存在しないためだと考察できる。

以上より、本菌がホモタリック菌であり、かつ有性形態形成誘導が容易であるという特徴を利用して、本菌の有性胞子（単核）に対して突然変異を導入し、肉眼で判定できる形態形成異常変異体をスクリーニングすることで、効率よく新規天然物を取得できることが期待できる。現在、有性胞子を突然変異誘起剤処理し、形態形成不全変異体をスクリーニングする最適条件を検討しており、実際に得られた変異体が産生する天然物を解析している。

secondary metabolism, forward genetics, mutagenesis

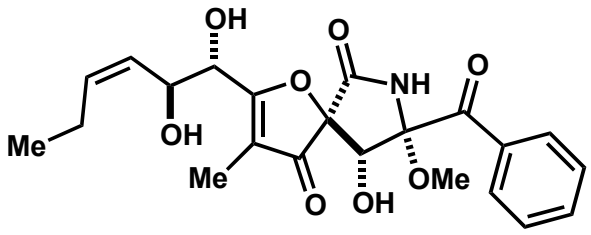
講演番号：3C22p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ C 校舎 22 会場

Pseurotin 類生合成におけるスピロ環骨格形成機構の解明
Investigation of spiro-carbon forming enzyme in pseurotin biosynthesis
○恒松 雄太、福富 愛美、野口 博司、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○Yuta TSUNEMATSU,Manami Fukutomi,Hiroshi Noguchi,Kenji Watanabe (Univ. Shizuoka)

[背景・目的]

DNA シークエンス技術の革新により多数の糸状菌のゲノム情報が解読され、一種の糸状菌のゲノム中には PKS、NRPS、テルペン環化酵素など天然物の骨格を形成する生合成酵素遺伝子が数十種類含まれることが示された。中でも PKS-NRPS hybrid 酵素遺伝子から生合成される天然物はアミノ酸とポリケタイド骨格の両方から形成されるため複雑な化学構造を有し、興味深い生物活性を示すことが多々見受けられる。本酵素遺伝子から生合成される化合物としては分子内 Diels-Alder 反応により 5-6-中員環構造を形成した chaetoglobosin 類、テトラミン酸の酸化によりピリドン環を形成した tenellin 類などが含まれ、これらの詳細な生合成機構が近年明らかにされてきている。同じくPKS-NRPS hybrid 酵素遺伝子 Afu8g00540 から生合成される pseurotin 類は分子内にオキサスピロ構造というユニークな骨格構造を持ち、様々な生物活性を示す。その主骨格を生合成する遺伝子は遺伝子破壊実験により同定されているものの [1)]、その複雑な構造がいかなる修飾酵素によって、いかにして形成されているのかについては未だ報告がなかった。我々はその興味深いスピロ構造に興味を持ち、その生合成機構を明らかにすることを目的に研究に着手した。

[方法・結果]



pseurotin A

Pseurotin 類生産菌である *Asperigllus fumigatus* A1159 株について、まずは効率的に形質転換を行うことを目的とし、遺伝子操作を施すことで uridine 要求性株 AfKW1 を構築した。続いて *A. fumigatus* 第 8 番染色体上に存在する PKS-NRPS hybrid 酵素遺伝子 Afu8g00540 の近傍に存在するいくつかの遺伝子について包括的に遺伝子破壊を行った。得られた遺伝子破壊株の代謝産物を LCMS にて解析したところ、特定の遺伝子破壊株において pseurotin 類の生産の消失が認められ、その代わりに類縁化合物と考えられる新たなピークをクロマトグラム上で観測した。続いて、本遺伝子破壊株を大量培養後、新たに生産された化合物を単離し、その化学構造を常法により決定した。得られた化学構造と破壊遺伝子の推定機能からスピロ環形成に関与する因子を同定することに成功した。

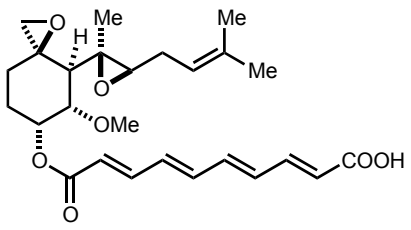
1) S. Maiya *et al. ChemBioChem* **2007**, *8*, 1736-1743.

natural product biosynthesis, fungal secondary metabolite, polyketide synthase & non-ribosomal peptide synthetase

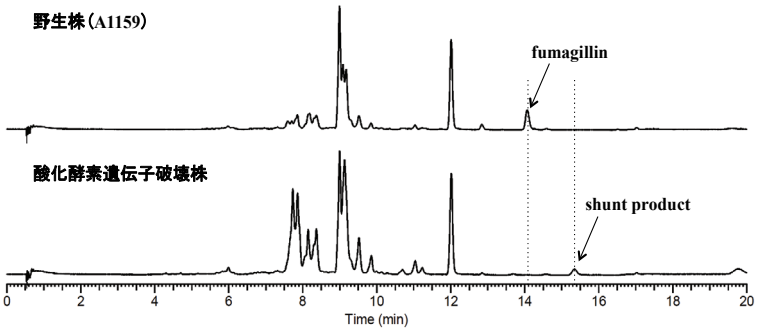
講演番号：3C22p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ C 校舎 22 会場

フマギリン生合成遺伝子クラスターの同定
Identification of fumagillin biosynthetic gene cluster
○福冨 愛実、戸塚 統子、恒松 雄太、猿渡 隆佳、佐藤 道大、野口 博司、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○Manami FUKUTOMI,Noriko TOZUKA,Yuta TSUNEMATSU,Takayoshi SARUWATARI,Michio SATO,Hiroshi NOGUCHI,Kenji WATANABE (University of Shizuoka)

[背景・目的]
Aspergillus fumigatus が生産する fumagillin (1)は血管新生阻害活性を示すことから、新しい抗癌剤として薬剤開発が行われてきた。その一方で、強い細胞毒性を有するため、医薬品として使用するには構造の最適化が必要不可欠である。そこで、より詳細な生合成機構の理解がその足がかりになると考え、1 の生合成機構の解明と新規類縁体の創出を目的として研究に着手した。
[方法・結果]
化合物 1 は部分構造としてメトキシ基を有しており、その炭素骨格はポリケタイド鎖とセスキテルペンから構成されていると予想された。従って、1 の生合成遺伝子クラスターにはメトキシ基の導入に関与する *O*-メチル基転移酵素および酸化酵素、PKS、テルペン骨格の生合成に関与する terpene cyclase をコードする遺伝子が存在すると考えられた。実際に *A. fumigatus* のゲノム解析を行ったところ、*O*-メチル基転移酵素と PKS と機能予測された遺伝子および integral membrane protein と機能予測された遺伝子を有するクラスターが第８染色体上に存在し、本領域が 1 の生合成遺伝子クラスターであると推定された。そこで同クラスター内の推定 PKS 遺伝子 Afu8g00370 の破壊を試みた。約 1 kbp の相同組換え領域とピリチアミン耐性遺伝子を含む破壊カセットをプロトプラスト-PEG 法を用い *A. fumigatus* A1159 株染色体上へ導入した。LCMS を用いて破壊株の代謝産物を解析したところ、1 の生合成が消失したことを確認することができた。続いて、その近傍にコードされる遺伝子を全て破壊した。その中で、酸化酵素と機能予測された遺伝子の破壊株から得られた培養液を分析したところ、fumagillin 生合成中間体と推定される化合物の生産を確認することができた。本破壊株を大量に培養した後、目的化合物を単離し、その化学構造を明らかにしたことで、1 の生合成経路に関する知見が得られた。



fumagillin **(1)**



fungal secondary metabolite, fumagillin, biosynthesis

講演番号：3C22p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ C 校舎 22 会場

植物病原菌 *Bipolaris coicis* の生産する植物毒素 radicinin の生合成
Biosynthesis of phytotoxin radicinin produced by phytopathogen *Bipolaris coicis*
○西田 直人、石原 亨、中島 廣光（鳥取大農）
○Naoto NISHIDA,Atsushi ISHIHARA,Hiromitsu NAKAJIMA (Fac. Agric., Tottori Univ.)

【背景と目的】*Bipolaris coicis* はハトムギやジュズダマに葉枯病を引き起こす植物病原菌である。これまでわれわれは、H-13-3 株がポリケチド植物毒素、radicinin と、その類縁体である 3-*epi*-radicinin、3-*epi*-radicinol などを生成していることを報告してきた。さらに、deoxyradicinin から radicinin への変換を触媒する monooxygenase や、radicinin から 3-*epi*-radicinin への変換を触媒する epimerase の性状を明らかにした。Radicinin の生合成については、安定同位体標識酢酸ナトリウムの取り込み実験の結果などから、ポリケチド合成酵素(PKS)によって 1 本のポリケチド鎖ではなく 2 本の異なるポリケチド鎖が合成され、それらが C-C 結合を介して結合し deoxyradicinin が生成するという生合成機構が提唱されている。これはポリケチドとしては極めて珍しい生合成機構であることから、遺伝子レベル酵素レベルでの検証が必要である。そこで本研究では H-13-3 株に存在する PKS 遺伝子を探索・解析した上で、その PKS 遺伝子を組換えて作出した遺伝子破壊株の radicinin 生産能を調べることで、radicinin 生合成に関わる PKS 遺伝子を特定し、radicinin の生合成を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】*B. coicis* H-13-3 株の菌体よりゲノム DNA を抽出し次世代シーケンサーによるゲノム解析を行った。得られた塩基配列を BLAST 解析にかけて近縁種の持つ PKS 遺伝子と相同性のある 14 個の PKS 遺伝子を推定した。その 1 つが *Cochliobolus sativus* のメラニン生合成 PKS 遺伝子と 93%の相同性を示したことから、これをメラニン生合成に関わる PKS 遺伝子と同定した。さらに、これら PKS 遺伝子のドメインの配列を推定し、mRNA の発現解析から PKS 遺伝子のそれぞれの発現量も求めた。PKS 遺伝子の塩基配列情報に基づいて、その一部と相同な配列を持った 700～800bp の異なる 2 つの遺伝子断片と、マーカーとして用いるハイグロマイシン耐性遺伝子を PCR でそれぞれ増幅した。これら 3 つの増幅産物について Fusion PCR を行うことで両端に標的の PKS 遺伝子に相同な配列を持ったハイグロマイシン耐性遺伝子断片を得、これを遺伝子破壊ベクターとして得た。現在、メラニンの PKS 遺伝子(BcPKS10)の配列情報に基づいて構築した遺伝子破壊ベクターを protoplast-PEG 法によって細胞内に導入し、相同組換えを利用して形質転換を行うことで、H-13-3 株の形質転換効率を調べている。また、その他の PKS 遺伝子に対する破壊ベクターも構築し、遺伝子破壊株の作出を行っているところである。今後は作出された遺伝子破壊株の radicinin 生産能を調べ、radicinin 生合成に関わる PKS 遺伝子を特定する予定である。

Radicinin, *Bipolaris coicis*, Phytotoxin

講演番号：3C22p17
講演日時、会場：3 月 26 日 17:12～ C 校舎 22 会場

サクラ周辺のクマリン分解微生物の単離・同定とクマリン分解代謝の追跡

Isolation and identification of a coumarin-degrading microorganism, and the metabolism of coumarin.

○田村 駿、須永 祐輔、清水 文一（東洋大生命）
○Shun TAMURA,Yusuke SUNAGA,Bun-ichi SHIMIZU (Toyo Univ.)

【目的】ソメイヨシノ（*Cerasus*×*yedoensis*）をはじめとするサクラの葉には、芳香性を示すクマリンの前駆体（*o*-クマル酸グルコース配糖体）が蓄積している。葉が傷害を受けると、この前駆体が加水分解をうけてクマリンが生成する。クマリンには、抗菌、抗酸化作用があり、生体防御に重要なはたらきをしていると考えられる。

一方、落葉によりクマリンがサクラ根元の土壌に供給されるが、土壌中においてクマリンの蓄積はみられない。このことから、サクラ周辺の環境中にはクマリンを分解する機能が存在していると考えられる。

そこで本研究では、クマリン分解能をもつ微生物のスクリーニングを行った。また単離微生物によるクマリンの代謝を追跡した。

【方法と結果】炭素源をクマリンのみとした平板最少培地を用いて、サクラ周辺環境から微生物のスクリーニングを行った。その結果、サクラ葉上で採取したアメリカシロヒトリ（*Hyphantria cunea*）幼虫の糞および腸内容物より、明所、好気条件下で、25 ℃で 72 時間培養の後、コロニーを形成する微生物 STDX-1 を単離した。STDX-1 の細胞形態は桿菌、グラム陰性であり、コロニー色調は白色であった。STDX-1 の 16S rRNA 部分配列を比較したところ *Pseudomonas taiwanensis* の配列と 99.8%の相同性を示した。STDX-1 は、グルコースおよびマンノースを炭素源とすることができたが、スクロースでは生育しなかった。また、フェノールおよびカテコールを炭素源として生育した。

0.2 %(w/v)クマリンを含む液体培地で、明所、好気条件下、25 ℃で、STDX-1 を振盪培養し HPLC を用いてクマリンの代謝を追跡した。その結果、時間の経過とともに添加したクマリンの含量が減少する一方で、培養前には見られなかった成分を確認した。これらの成分を分取用 HPLC を用いて単離・精製をしたのち、^{1}H-, ^{13}C-NMR による構造解析および質量分析を行った。その結果、代謝物の 1 つを melilotic acid （2-hydroxyphenylpropionic acid）と同定した。

Coumarin, Melilotic acid, *Pseudomonas taiwanensis*

講演番号：3C22p18
講演日時、会場：3 月 26 日 17:24～ C 校舎 22 会場

海底堆積層に見つかる多様な還元的脱ハロゲン化酵素遺伝子：天然ハロゲン化有機化合物は海底で代謝されている？
Diverse reductive dehalogenases in marine subsurface: degrader of naturally produced organohalogens?
○河合 幹彦[1]、豊田 敦[2]、高木 善弘[1]、西 真郎[1]、荒井 渉[1]、内山 郁夫[3]、伊藤 武彦[4]、諸野 祐樹[1]、青池 寛[1]、高井 研[1]、藤山 秋佐夫[2]、稲垣 史生[1]、高見 英人[1] ([1]海洋研究開発機構、[2]情報システム研究機構遺伝学研究所、[3]自然科学研究機構基礎生物学研究所、[4]東京工業大学)
○Mikihiko KAWAI[1], Atsushi Toyoda[2], Yoshihiro Takaki[1], Shinro Nishi[1], Wataru Arai[1], Ikuo Uchiyama[3], Takehiko Itoh[4], Yuki Morono[1], Kan Aoike[1], Ken Takai[1], Asao Fujiyama[2], Fumio Inagaki[1], Hideto Takami[1] ([1]Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC), [2]National Institute of Genetics, Research Organization of Information and Systems, [3]National Institute of Basic Biology, National Institutes of Natural Sciences, [4]Tokyo Institute of Technology, Japan)

ハロゲン化有機化合物はテトラクロロエチレンやポリクロロビフェニル (PCB)、ダイオキシン、DDT （ジクロロジフェニルトリクロロエタン）など、人為起源の環境汚染物質が有名である。しかし、天然にも多数の生物起源のハロゲン化有機化合物が知られている。長い地球史の過程で合成されてきたハロゲン化有機物は膨大な量になると考えられるが、天然ハロゲン化有機化合物がどこかの環境に多量に蓄積してしまっているという知見は報告されていない。合成される量と釣り合う程度に分解されているからだと考えられる。本報告では、遺伝子解析から海底下の堆積層が分解場所の一つと考えられるという知見を報告する。

我々は、深海の海底堆積層中の微生物群集の遺伝子構成をメタゲノム解析という手法で網羅的に調べている。環境中から培養を介さず直接抽出したDNAの塩基配列を決定し、コードされる遺伝子を分類して、堆積層中で頻度が高い遺伝子群を抽出した。抽出した遺伝子群の中には、嫌気的に還元的脱ハロゲン化を行う過程でエネルギーを獲得する還元的脱ハロゲン化遺伝子(*rdh*遺伝子)が含まれていた。この*rdh*遺伝子の多様性を検討したところ、今までPCRで海底下堆積層から検出されていたものよりも多様な遺伝子からなっていた。既知の*rdh*遺伝子には、異なった細菌由来でテトラクロロエチレン、塩化フェノール、塩化ベンゼンといった異なる基質を利用するものが知られている。本研究で検出した*rdh*遺伝子群には、それら既知の遺伝子のいずれとも類似性の低いものが多数含まれていた。

対象にした堆積層は古いもので15万年前に堆積していることから、人為起源の化合物でなく天然のハロゲン化有機化合物が基質になっていると考えられる。ゲノムの決まっている還元的脱ハロゲン化反応を行う細菌は、テトラクロロエチレンなど人為起源のハロゲン化物で汚染された土壌由来のものが多く、そのような特定の化合物を効率よく利用する遺伝子が選択されていると考えられる。それに対し本研究では、ハロゲン化有機化合物がほとんど検出されない海底下堆積層に多様な還元的脱ハロゲン化遺伝子群が存在することが明らかになった。したがって、これらの遺伝子産物は、自然界に微量に含まれる天然ハロゲン化有機化合物を基質とし、それらの分解に用いられているという可能性が考えられる。本発表ではその詳細について報告する。

metagenome, ocean, bioinformatics

講演番号：3C22p19
講演日時、会場：3 月 26 日 17:36～ C 校舎 22 会場

Methylococcus capsulatus 由来のスクアレン合成酵素の DxxE(D)D モチーフの機能解析
Functional analysis of DxxE(D)D motif of Methylococcus capsulatus squalene synthase

○大竹 佳奈、斎藤 直樹、仲野 千秋、佐藤 努、星野 力（新潟大院自然科学）
○Kana Otake,Naoki Saito,Chiaki Nakano,Tsutomu Sato,Tsutomu Hoshino (Niigata Univ.)

【背景】メタン酸化細菌 *M. capsulatus* は、hopene 以外に真核生物のみが産生するとされているステロール物質（ラノステロール等）を比較的多量に産生する。[1] 原核生物由来のスクアレン合成酵素（SQS）に関する研究は未だ *T. elongatus* BP-1 由来の 1 例のみしか報告されておらず [2], この細菌は hopanoid のみを生産する点で *M. capsulatus* と異なるが、C 末に膜貫通ドメインを持たないという点で共通している。ヒト SQS のＸ線構造解析が報告されているが、部位特異的変異実験による機能解析がほとんど進行してない。今回は、*M. capsulatus* 由来の SQS(*mc*SQS)の基質 FPP との結合に関与すると考えられる ^{58}DxxED^{62} 及び ^{213}DxxDD^{217} モチーフの機能解析の結果を報告する。^{213}DxxDD^{217} モチーフは、ラット由来の SQS(^{219}DxxED^{223} モチーフ)では Gu らの報告があるが、^{58}DxxED^{62} モチーフの機能解析については、未だ報告はない。【方法・結果】当研究室では、*mc*SQS の活性が低いことが問題視されていた。[3,4] 酵素精製方法や酵素活性測定方法の改善により、他の生物種由来の SQS と遜色ない活性を得ることに成功した。[5]中間体 PSPP 及びスクアレンの量を GC で定量し、活性がある場合は K_M 値や k_{cat} 値も算出した。^{58}DxxED^{62} や ^{213}DxxDD^{217} モチーフ、及びその周辺のアミノ酸残基を置換して作製された変異酵素は、D216 の変異酵素以外はほとんどが失活状態であった。SQS と First half reaction が同じデヒドロスクアレン合成酵素(CrtM)の R45,D48,D52(*mc*SQS では R55,D58,D62 に相当)は二リン酸の脱離に関与する [6]。CrtM とヒト SQS(hSQS)の X 線構造を基にした *mc*SQS のホモロジーモデルを作成したところ、CrtM の R45,D48,D52 と *mc*SQS の R55,D58,D62 はほぼ同じ位置で同じ配向を示していた。これより、変異酵素が失活した *mc*SQS の R55,D58,D62 が二リン酸の脱離に関与することが強く示唆された。さらに、ラット由来の SQS(RSS)の ^{219}DxxED^{223} モチーフの機能解析で E222(*mc*SQS では D216 に相当)が活性に関与しないことが明らかにされており、*mc*SQS の D216 も活性に関与しないことが確認された。RSS と *mc*SQS のホモロジーモデルの比較から、ほぼ同じ位置、同じ配向で存在している RSS の E222 と *mc*SQS の D216 は、いずれもアミノ酸残基が基質 FPP の方を向いていないために結合に関与せず、活性に影響を与えないアミノ酸残基であることが明らかになった。【文献】1) C. Nakano et al. *BBB,* **71**, 2543 (2007). 2) S. Lee & C.D. Poulter, *J. Bacteriol.* **190**, 3808 (2008). 3) 佐々木ら (2005)、農芸化学会要旨集 p.5. 4) 小林ら(2006).ドリコールおよびイソプレノイド研究会、p 16. 5) 斉藤、大竹ら (2012)、同誌 p.11. 6) F.Y. Lin et al. *PNAS.* **107**,21337 (2010)、7) P. Gu, et al. *JBC.* **273.** 12515 (1998)

squalene, farnesyl diphosphate, Methylococcus capsulatus

講演番号：3C22p20
講演日時、会場：3 月 26 日 17:48～ C 校舎 22 会場

黒麹菌が生産する二次代謝産物 pyranonigrin A の生合成機構

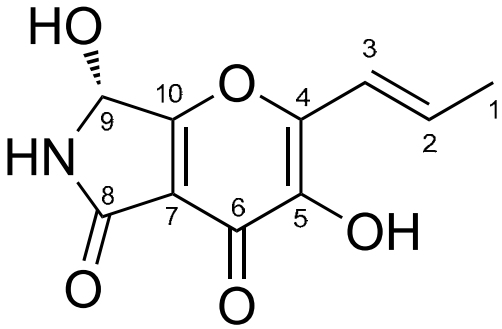
Studies on biosyntheses of pyranonigrin A produced by *Aspergillus nigar*

○新藤 一敏、中村 仁美、理光 理沙（日女大家政・食物）
○Kazutoshi SHINDO,Hitomi NAKAMURA,Risa RIKO (Japan Women's University)

【目的】*Aspergillus nigar*（黒麹カビ）を固形培地上で生育させた場合にのみ生産が認められる（液体培養では生産されない）pyranonigrin A は下図に示すような、極めて特異的な構造を有している。そこで本化合物の炭素骨格がどのような化合物に由来するかに興味を持ち、^{13}C ラベル化合物を用いて各炭素の生合成的由来を検討した。

【方法】①500 mL 容 erlenmeyer flask に potato-dextrose agar 培地を 50 mL ずつ加えてオートクレーブ殺菌後、室温で培地を固化させた。②クリーンベンチ中で寒天上に *A. nigar* の胞子液 1 mL を撒き、フラスコを傾けて寒天表面全域に行きわたらせた。その後フラスコを 30℃の恒温機中で、静置培養を行った。③培養開始後 48 hr 前後で pyranonigrins の生産が始まる（＝胞子形成開始時期）ので、培養開始後 24 hr に、各 ^{13}C ラベル化合物（[1-^{13}C]酢酸ナトリウム、[2-^{13}C]酢酸ナトリウム、[1,2-^{13}C2]酢酸ナトリウム、[1-^{13}C]グリシン）の 100 mg/ 1 mL 水溶液（ろ過滅菌済）を、各フラスコに 1 mL ずつパスツールフラスコ（滅菌）で寒天培地上に添加して（100 mg/フラスコ）、培養を継続した。④48 hr あるいは 72 hr 後（胞子着生状況を見て判断）、各フラスコにアセトン 100 mL を加えて生育を止めると同時に生産物を抽出した。⑤抽出液からの pyranonigrin A の精製は、HP20 吸脱着、LH20 ゲル濾過クロマトグラフィー、ODS HPLC (CAPCELLPAK SG)分取により実施した。各ラベル体についてフラスコ 10 本分の抽出液を出発材料として精製を行い、pyranonigrin A の純品 12 mg 前後を得ることができた。⑥純品の各 pyranonigrin A を DMSO-d_6に溶解し、定量モードで ^{13}C-NMR 測定を実施した。各シグナルの積分強度比を求め ^{13}C ラベル体非添加物の強度比と比較することにより、各炭素の起源を明らかにした。

【結果】各 ^{13}C ラベル体の実験結果より、pyranonigrin A を構成する各炭素は、4 分子の酢酸(C1 - C8)と 1 分子のグリシン(C9, C10)に由来することが明らかとなった。
また pyranonigrins は DPPH ラジカル消去活性を有することが報告されているが、これ以外の活性酸素種の消去活性を検討した結果、ラット脳脂質酸化抑制活性を強く有していること、一重項酸素の消去活性は有しないことを確認することができた。



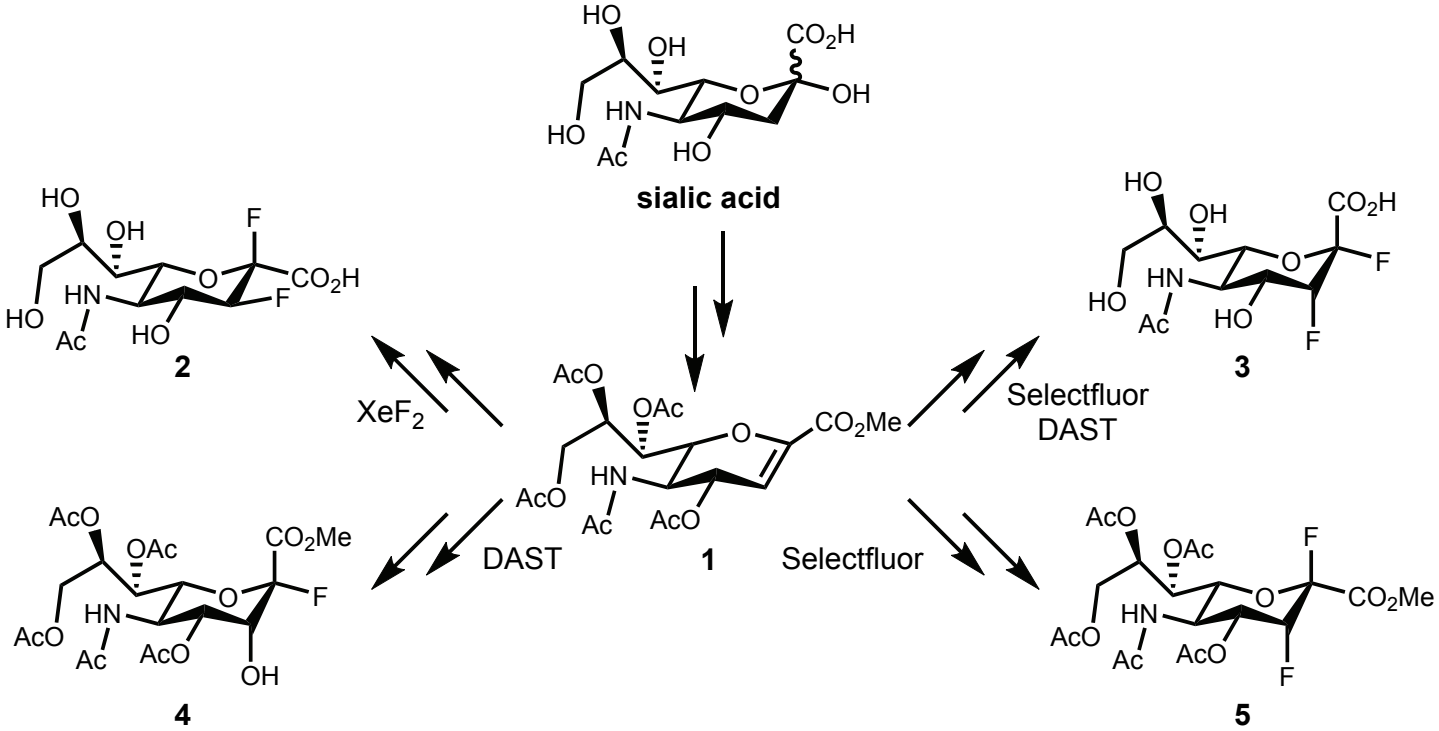
pyranonigrin A

pyranonigrin A, Aspergillus nigar, biosyntheses

講演番号：3C25a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ C 校舎 25 会場

フッ化シアル酸類の合成とシアリダーゼ阻害活性
Synthesis and Sialidase Inhibitory Activity of Fluorosialic Acids
○田中 皓祐[1]、ノングラック スリウィラジャロエン[2,3]、佐藤 宏樹[1]、山田 てい子[1]、桑原 重文[1]、大類 洋[4]、須原 義智[5]、鈴木 康夫[2]、清田 洋正[1] ([1]東北大院農、[2]中部大、[3]タマサート大、[4]横浜薬科大、[5]芝浦工大)
○Kosuke TANAKA[1], Sriwilaijaroen NONGLUK[2,3], Hiroki SATO[1], Teiko YAMADA[1], Shigefumi KUWAHARA[1], Hiroshi OHRUI[4], Yoshitomo SUHARA[5], Yasuo SUZUKI[2], Kiyota HIROMASA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Chubu Univ, [3]Thammasat Univ., [4]Yokohama College of Pharmacy., [5]Shibaura Institute of Technology.)

【目的】シアリダーゼ阻害に基づくインフルエンザ治療薬には、現在リレンザやタミフルが用いられているが、頭痛、めまい、異常行動などの副作用や抵抗性株の出現から、新規な薬剤開発が重要な課題となっている。我々は、3-フルオロシアル酸がシアリダーゼを阻害するという知見を基に、フッ素化シアル酸誘導体の合成と活性評価を目的に研究を行った。
【方法と結果】シアル酸を出発原料とし、3 工程で **1**[1)]へ導いた。さらに XeF_2、Selectfluor、DAST を種々使い分ける事で 2,3-ジフルオロ体 **2**,**3**,**5**[2,3)]及び 2-フルオロ体 **4** の合成に成功した。また、その他フッ素化誘導体の合成も検討中である。合成品のうち 2,3-ジフルオロ体 **2**,**3** の抗インフルエンザウィルス活性評価において興味深い知見が得られたので報告する。



1) P. Meindl, H. Tuppy, *Monatsh. Chem*. **1969**, *100*, 1295.
2) A. G. Watts, S. G. Withers, *Can. J. Chem*. **2004**, *8*, 1581.
3) T. Nakajima, H. Hori, H. Ohrui, H. Meguro, T. Ido, *Agric. Biol. Chem*. **1988**, *52*, 1209.

Influenza, Organofluorine compounds, Sialic acid

講演番号：3C25a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ C 校舎 25 会場

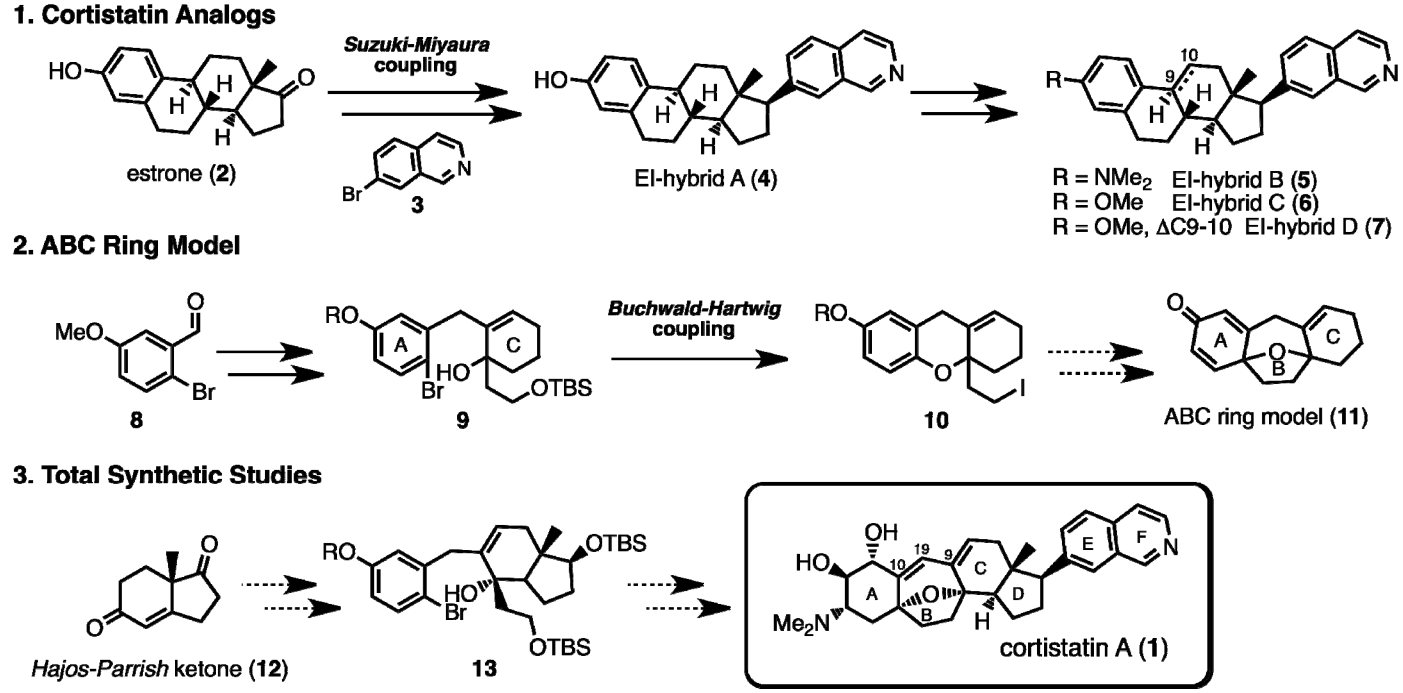
血管新生阻害物質 cortistatin A 類の合成研究

Synthetic studies of cortistatin A

○柴田 要、佐藤 勇気、山田 てい子、桑原 重文、清田 洋正（東北大院農）
○Motomu SHIBATA,Yuki SATO,Teiko YAMADA,Shigefumi KUWAHARA,Hiromasa KIYOTA (Tohoku Univ.)

【目的】 Cortistatin A (**1**) は 2008 年小林ら[1] によって、インドネシア産の海綿 *Cortisium simplex* から単離・構造決定された化合物である。強力な血管新生阻害活性（ヒト血管臍帯内皮細胞 IC_{50} = 1.8 nM）と新規な転位ステロイド母核にイソキノリン環が結合した極めて興味深い構造から、国内外の多くの研究グループが合成研究を行っている。我々は、構造活性相関解明のための有用なアナログ化合物の創製と新規な全合成経路の開発を目的に合成研究を行っている。

【方法と結果】 既に開発した方法[2] に従い estrone (**2**)に鈴木・宮浦反応でイソキノリン環を導入した後、フェノール性ヒドロキシ基部分の各種変換によりアナログ化合物 EI-hybrid A~D (**4~7**) の合成を達成した。また、cortistatin 類の特徴である 7 員環オキサビシクロ骨格（B 環部）の構築を目指し、ABC 環モデルの合成を行った。以上の研究で得られた知見をもとに Hajos-Parrish ketone (**12**)を出発原料に用いた全合成研究を行っている。



1） M. Kobayashi *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3148.
2） Y. Sato *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72*, 2992.

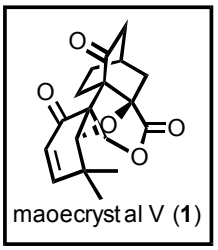
cortistatin A, anti-angiogenesis, total synthesis

講演番号：3C25a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ C 校舎 25 会場

抗腫瘍物質 Maoecrystal V の合成研究

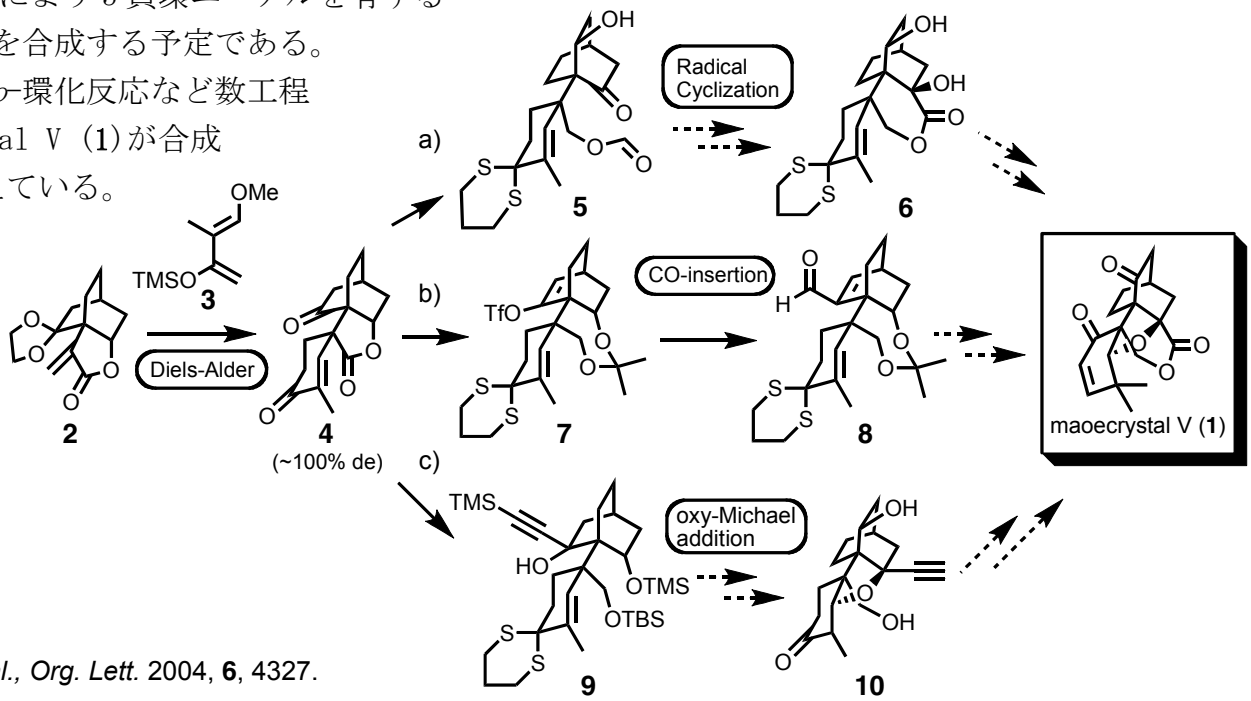
Synthetic Studies toward Maoecrystal V

○小竹 正晃、浅尾 洋樹、佐々木 郁香、島崎 泰治、桑原 重文、清田 洋正（東北大院農）
○ Masaaki KOTAKE,Hiroki ASAO,Ayaka SASAKI,Yasuharu SHIMAZAKI,Shigefumi KUWAHARA,Hiromasa KIYOTA (Tohoku Univ.)



【目的】Maoecrystal V (1)は、中国産ハーブの一種 *Isodon eriocalyx* より単離、構造決定された転位型カウレノイドである [1]。HeLa 細胞に対して選択的に強い細胞毒性(IC_{50} = 0.02 μg/ml)を示すことから、新規抗ガン剤のリードとして期待されている。我々は、高選択的な全合成を目的として研究を行っている。

【方法・結果】Cyclohexen-1-one を出発原料とし、8 工程でジエノフィル **2** を得た。**2** とジエン **3** から Diels-Alder 反応によりケトラクトン **4** を高収率かつ立体選択的に得ることに成功した。ルート a では、**4** より 6 工程でホルメート **5** を得た。**5** に SmI_2 を用いたラジカル環化でラクトン **6** を合成しようと試みたが、望む化合物は得られなかった。ルート b では、**4** より 5 工程でエノールトリフラート **7** を合成し、Pd を用いた CO 挿入反応によりアルデヒド **8** を得た。今後、エステル交換により 6 員環ラクトン形成を行う予定である。ルート c では、一方のケトカルボニル基に選択的にアルキンを求核付加させるなど **4** より 4 工程でアルコール **9** を得た。今後 oxy-Michael 付加により 5 員環エーテルを有するジオール **10** を合成する予定である。**10** より 6-*exo*-環化反応など数工程で maoecrystal V (1)が合成できると考えている。



1） S. H. Li *et al., Org. Lett.* 2004, **6**, 4327.

natural product, total synthesis, maoecrystal V

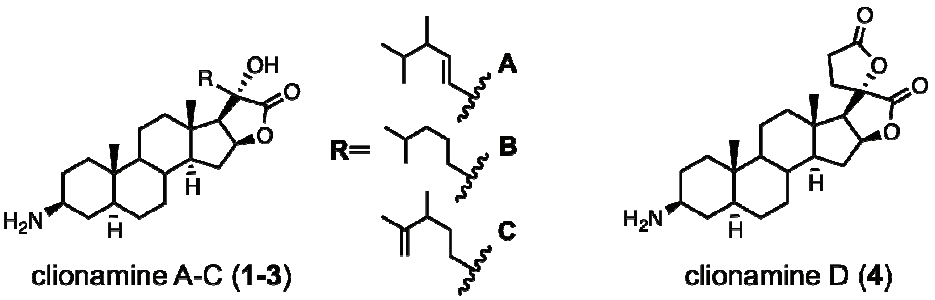
講演番号：3C25a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ C 校舎 25 会場

オートファジー促進化合物 clionamine A-D の合成研究

Synthetic studies of clionamine A-D

○吉田 晃之、平松 幸之助、佐藤 勇気、山田 てい子、桑原 重文、清田 洋正（東北大院農）
○ Akiyuki YOSHIDA,Konosuke HIRAMATSU,Yuuki SATO,Teiko YAMADA,Shigefumi KUWAHARA,Hiromasa KIYOTA (Tohoku Univ.)

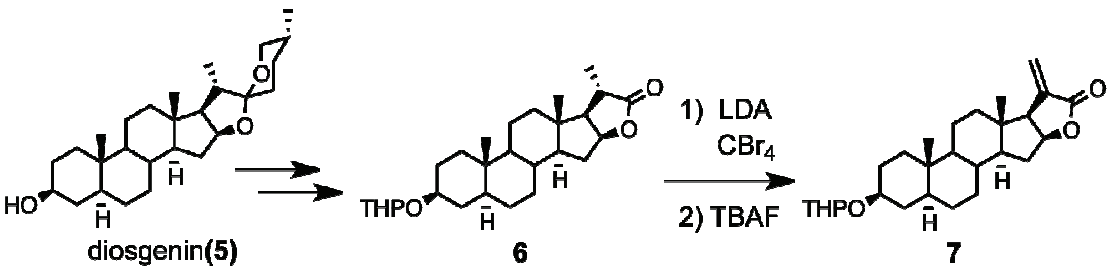
【目的】Clionamine A-D (**1-4**)は 2008 年に Keyzers らによって南アフリカ海原産の海綿 *Cliona celata* から単離、構造決定された化合物であり [1]、**1** は飢餓状態における細胞のオートファジー促進活性を示す。また、**4** は類例のないスピロジラクトン骨格を持つステロイドである。



我々は **1-4** の生物活性と構造に興味を持ち、合成研究を行っている。

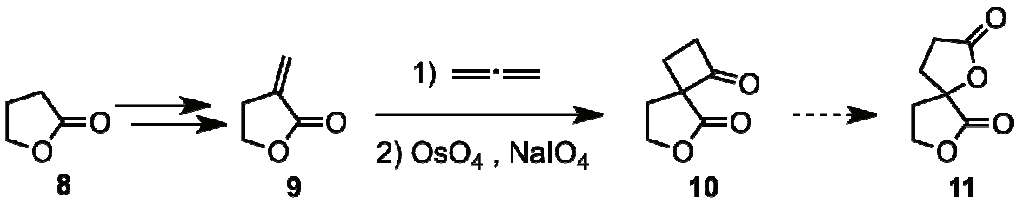
【方法・結果】**①Clionamine A-Dの半合成研究**

Diosgenin (**5**)を出発物質として水素添加、Baeyer-Villiger 様反応 [2]、ヒドロキシ基の保護を経て **6** とした。続くブロモ基の導入と脱離により、**1-4** の合成に共通の鍵中間体 **7** を得た。



② スピロジラクトン環のモデル合成研究

γ−Butyrolactone (**8**) から Eschenmoser メチレン化によって**9**を得、allene との〔2＋2〕光環化、二重結合の解裂によってスピロ化合物**10**を得た。現在、Baeyer-Villiger反応を検討中である。



1) R. E. Keyzers *et al.*, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2959.
2) B. Jiang *et al.*, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 469 .

total synthesis, autophagy, spirodilactone

講演番号：3C25a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ C 校舎 25 会場

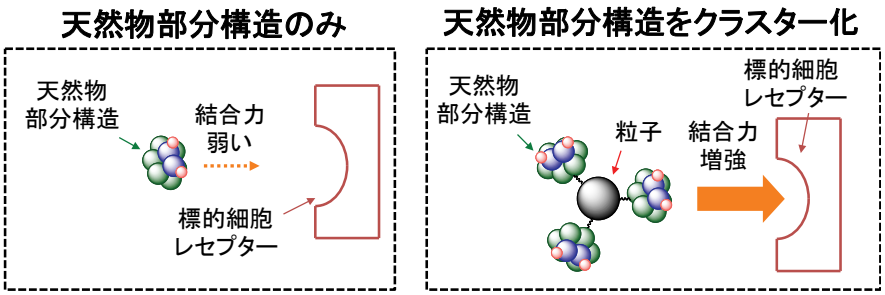
生物活性天然物部分構造を付与した金ナノ粒子の合成研究

Synthetic Studies of An Active Site of Natural Product on Gold Nanoparticles

○榎本 賢[1]、桑原 重文[2]、清水 弘樹[1] ([1]産総研北海道センター、[2]東北大農)
○Masaru ENOMOTO[1], Shigefumi KUWAHARA[2], Hiroki SHIMIZU[1] ([1]AIST, [2]Tohoku Univ.)

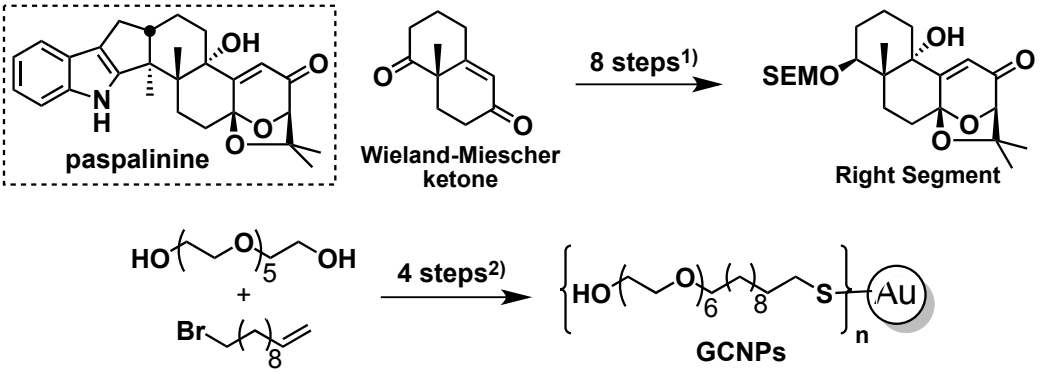
【目的】

生物活性天然物は有用な活性を示すものが数多く知られているが、その多くが複雑な構造を有するため合成経路が長くなり大量供給が難しいことが問題点となっている。その解決策の一つとして部分構造の利用が挙げられるが、一般に結合力の低下を招くことが多い。そこでこの問題の解決策としてクラスター効果に着目した。これは「分子を多量化することで結合力・認識力を増強させる」というもので、その一例として、生体内糖鎖の集合化が知られている。これにより糖鎖は結合点を増やすことによって弱い相互作用を補い、タンパク質との親和力を高めている。このような生体システムに習い、天然物部分構造をナノ粒子状にクラスター化することで結合力の増強が可能か検証することを目的とした。



【方法・結果】

部分構造を用いる天然物として、演者が昨年の大会で全合成を報告している痙攣作用インドールジテルペン paspalinine を用いることにした。全合成のスキームを参考に Wieland-Miescher ketone を出発原料として 8 工程で paspalinine 右側部位に相当する化合物を調製した。ナノ粒子については、既知の方法に従い、hexaethylene glycol と 11-bromo-1-undecene から 4 工程でリンカーを付与した金ナノ粒子（GCNPs）を調製した。現在、合成した部分構造と金ナノ粒子との連結と行っている。



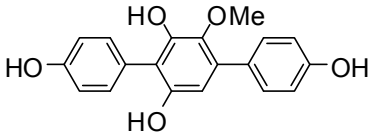
1) M. Enomoto, A. Morita & S. Kuwahara *Angew. Chem. Int. Ed.* ASAP DOI: 10.1002/anie.201206299.
2) H. Shimizu, M. Sakamoto, N. Nagahori & S. Nishimura *Tetrahedron* **2007**, *63*, 2418.

indole diterpene, gold nanoparticle, cluster effect

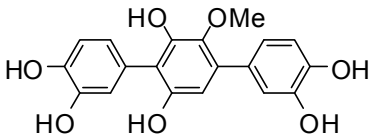
講演番号：3C25a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ C 校舎 25 会場

新規 *p*-テルフェニル類の合成と TNF-α放出抑制活性
Total synthesis of new *p*-terphenyls and their activity against TNF-α release
○浦尾 翔太[1]、矢島 新[1]、吉岡 泰淳[2]、勝田 亮[1]、阿部 尚樹[2]、額田 恭郎[1] ([1]東農大・応生・醸造、[2]東農大・応生・栄養)
○Syota Urao[1], Arata Yajima[1], Yasukiyo Yoshioka[2], Ryo Katuta[1], Naoki Abe[2], Tomo Nukada[1] ([1]Dept. of Ferment. Sccieni., Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo Univ. of Agri., [2]Dept. of Nutr. Sci., Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo Univ. of Agri.)

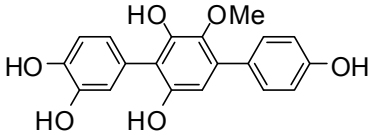
【序論】5'-*O*-desmethylterphenyllin(**1**)を含む新規 *p*-terphenyl 化合物(**2**, **3**, **4**)が 2011 年、Huang らより南シナ海マングローブ *Kandelia candel* に内生する *Penicillium chermesinum* (ZH4-E2)から単離、構造決定された。腫瘍壊死因子(TNF-α)放出抑制活性を有する vialinin A との構造類似性から、**1** 及びそれら類縁体にも vialinin 類と同様の活性が期待される。かつ **1** は vialinin 類に存在するカテコール構造を持たないためより化学的に安定であることが予想された。



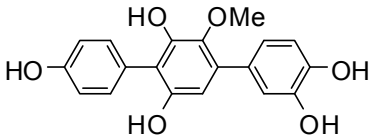
5'-*O*-desmethylterphenyllin (**1**)



3,3"-Dihydroxy-5'-*O*-desmethylterphenyllin (**2**)

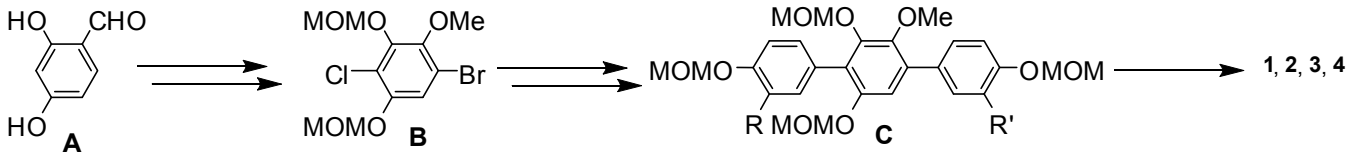


3"-Hydroxy-5'-*O*-desmethylterphenyllin (**3**)



3-Hydroxy-5'-*O*-desmethylterphenyllin (**4**)

【方法・目的】2,4-ジヒドロキシベンズアルデヒド(**A**)を出発原料とし、5 工程にてフェニルジハライド(**B**)を合成し、続いてフェニルボロン酸誘導体との鈴木−宮浦クロスカップリング反応を用いて塩化ビフェニルとした。塩化ビフェニルと次のフェニルボロン酸誘導体とのクロスカップリング反応は様々な条件を検討した結果、SPhos をリガンドとして用いる条件にて高収率でテルフェニル(**C**)を合成できた。最後に MOM 基を除去することで目的化合物 **1** と類縁体 **2**、**3**、**4** を合成した。生物活性試験を行なった結果 **1** 及び **2** は vialinin A と同様に TNF-α放出抑制活性を有することが明らかとなった。



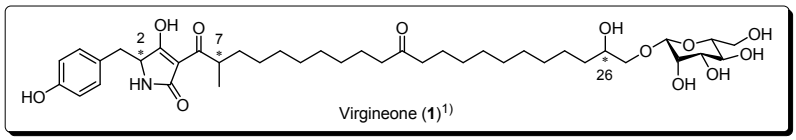
p-Terphenyl, TNF-α, Vialinin A

講演番号：3C25a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ C 校舎 25 会場

Virgineone アグリコンの全合成

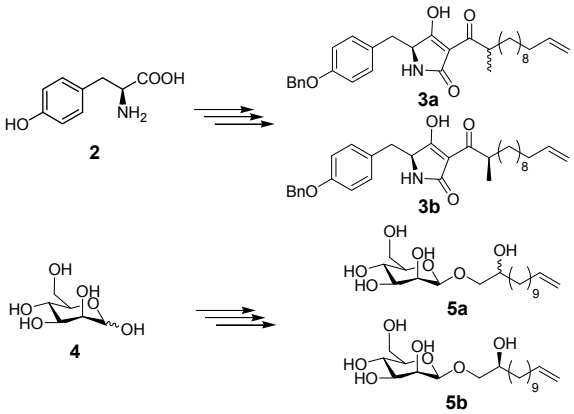
Total synthesis of virgineone aglycone

○伊田 千絵子、矢島 新、谷口 佳代子、村田 笙子、勝田 亮、額田 恭郎（東農大応生）
○Chieko Ida,Arata Yajima,Kayoko Taniguchi,Shoko Murata,Ryo Katsuta,Tomoo Nukada (Tokyo Univ. of Agric.)



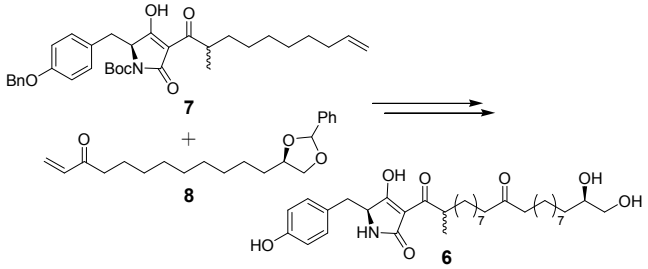
Virgineone (**1**)は *Lachnum vergineum* から単離された新規化合物であり、チロシンから生合成されたと考えられるテトラミン酸骨格とβ−マンノシド結合を分子の両端に有している。本化合物は *Candida* spp.と *Aspergillus fumigatus* に対し、抗真菌活性を有しており、新規薬剤として活用されることが期待されているが、天然物の C-2, C-7, C-26 位の絶対立体配置は未決定であるため、合成化学的手法を用いて絶対立体配置を決定することとした。まず、テトラミン酸部位とマンノース部位をそれぞれ合成し、天然物と NMR スペクトルデータを比較することにより、絶対立体配置に関する知見を得ようと試みた。

Virgineone のテトラミン酸部位は、天然に広く存在する L-チロシンより生合成されていると推測し、L-チロシン(**2**)から 3-アシルテトラミン酸誘導体 **3a, 3b** へと誘導した。天然物の ^{1}H NMR スペクトルと比較したところ、**3a** と天然物の ^{1}H NMR スペクトルが良く一致したため、天然の virgineone は C-2 もしくは C-7 のエピマー混合物であることが示唆された。



次に、C-26 位の立体化学を検討するため、β-マンノシドを合成した。D-マンノース(**4**)を出発原料とし、β-マンノシド **5a**, **5b** を合成し、天然物の ^{13}C NMR スペクトルと比較したところ、天然物の 26 位は *S* であるという知見が得られた。

次に C-2, C-7 の絶対立体配置を決定するため、Singh らが virgineone から調製したアグリコン **6** をモデル化合物として合成することとした。3-アシルテトラミン酸誘導体(**7**)と別途調製したセグメント **8** との cross-metathesis 反応により両セグメントを連結し、保護基の脱保護により virgineone アグリコン **6** の全合成を達成した。両者の比旋光度を比較することで、天然物の絶対立体配置の決定に成功したので報告する。



1) Sheo B. Singh. *et al*. *J*. *Nat*. *Prod*. **2009**, *72*, 136-141.

virgineone, tetramic acid, cross-metathesis

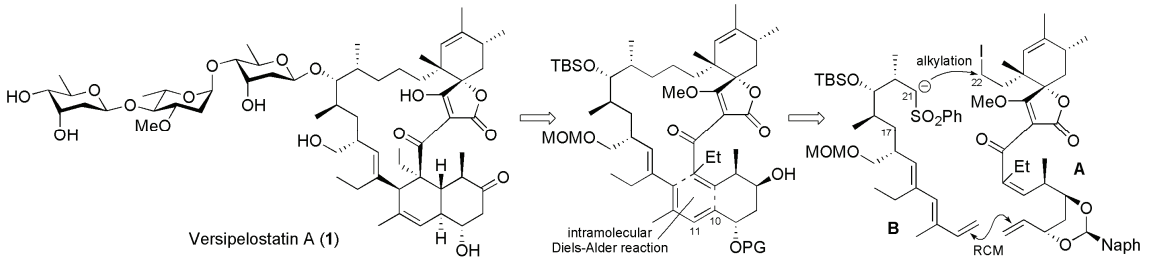
講演番号：3C25a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ C 校舎 25 会場

Versipelostatin C11-C21 ユニットの合成

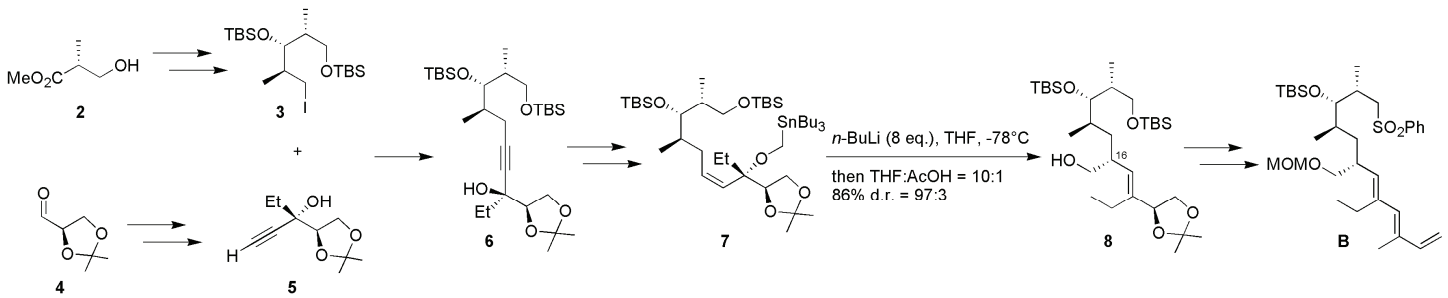
Synthesis of the C11-C21 unit of versipelostatin

○山本 健人、山下 あかね、小鷲 真衣、勝田 亮、矢島 新、額田 恭郎（東農大応生）
○Kento YAMAMOTO,Akane YAMASHITA,Mai KOWASHI,Ryo KATSUTA,Arata YAJIMA,Tomoo NUKADA (Tokyo Univ. of Agric.)

Versipelostatin A (VST A, **1**)は 2002 年新家らによって *Streptomyces versipellis* 4083-SVS6 株の培養液より単離された 17 員環ペンタデカケチド三糖配糖体である。本化合物は分子シャペロン GRP78 の誘導阻害活性を示すが、GRP78 は固形癌細胞のストレス応答において重要であるため、GRP78 誘導阻害物質は固形癌に対し特異的に作用する治療薬として期待できる。我々は VST の生理活性と特徴的な構造に対する興味から合成研究を行っている。VST アグリコンの合成計画を以下に示す。置換オクタリン部は合成の終盤に分子内 Diels-Alder 反応により構築することにし、その前駆体である 25 員環化合物は右側ユニット **A** と糖鎖結合部 **B** を C21-C22 間で連結後、C10-C11 間での閉環メタセシスにより合成しようと考えた。本研究では糖鎖結合部 **B** の合成について報告する。



はじめに光学活性エステル **2** の 2 炭素増炭、Sharpless の不斉エポキシ化と開環を伴うメチル基の導入を経て C17-C21 ユニット **3** を合成した。これを別途調製したアルキン **5** とカップリングした。Lindlar 触媒を用いて(*Z*)-選択的に三重結合を還元し、スタンニルメチルエーテル化した後、化合物 **7** に [2,3]-Wittig 転位を用いて C16 位の不斉点を構築した。最後にトリエン部分を導入し、スルホンへと変換することで糖鎖結合部 **B** の合成に成功した。



Versipelostatin, GRP78, Synthesis

講演番号：3C25a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ C 校舎 25 会場

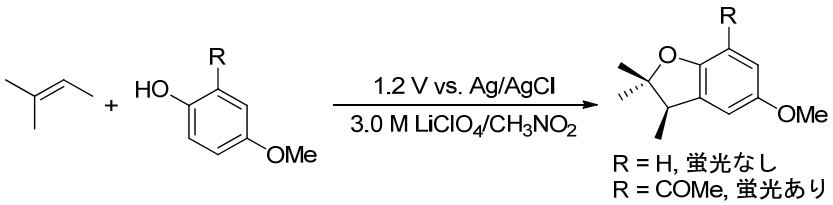
電解付加環化反応を利用した新規蛍光性核酸アナログの合成

Synthesis of novel fluorescent nucleoside analogues based on electrochemical cycloadditions

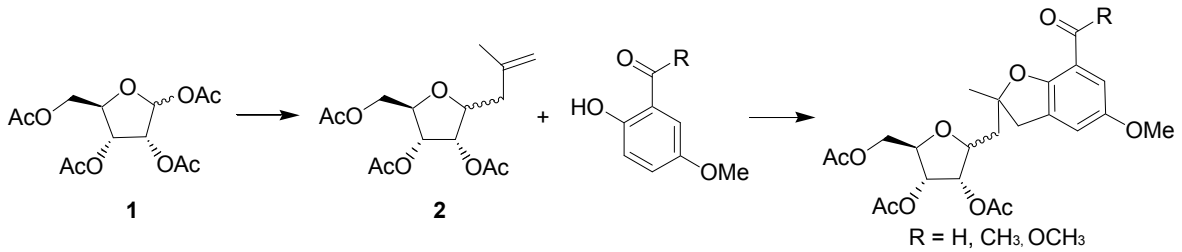
○島田 恒平、岡田 洋平、北野 克和、千葉 一裕（東京農工大院農）
○Kouhei SHIMADA,Yohei OKADA,Yoshikazu KITANO,Kazuhiro CHIBA (Tokyo University of Agriculture and Technology)

蛍光プローブを用いたイメージングは化合物の高感度かつリアルタイムでの検出を可能とし，様々な分野で利用されている．近年では，クマリンやフルオレセインといった比較的低分子でありながら充分な蛍光性を有する化合物が数多く見出され，これらを基軸とした新たな有機センサーの開発が意欲的に行われている．なかでも核酸プローブへの応用は活発であり，天然の核塩基は蛍光性を有さないことから，これに代わる多様な蛍光性の核塩基アナログが開発され大きな成果を挙げている．

当研究室ではこれまでに，過塩素酸リチウム／ニトロメタン溶液を電解メディアとして用いることで，一般に反応性の低い非活性化オレフィンが効率的に炭素求核剤として機能することを見出し，これを利用した付加環化を報告してきた．特に，脂肪族オレフィン存在下で各種フェノール化合物を陽極酸化することで対応するジヒドロベンゾフラン環が得られる．これらのベンゾフラン環化合物の中には置換基によって顕著な蛍光性を有するものが見出されており，本研究ではこれを利用した新規蛍光性核酸アナログの簡便な合成法の確立を試みた．



アセチル化保護されたリボース **1** に対しメタリル基を導入することで化合物 **2** を得た．これを過塩素酸リチウム／ニトロメタン溶液中各種フェノール誘導体と共に電解付加環化を行った結果，2 ステップで簡便に蛍光性核酸アナログを得ることに成功し，カルボニル基に結合している官能基を変えることにより，色調のチューニングにも成功した．



nucleoside analogue, fluorescence, electrochemistry

講演番号：3C25a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ C 校舎 25 会場

フラン電解を基軸とした含ピロール共役オリゴマーの合成

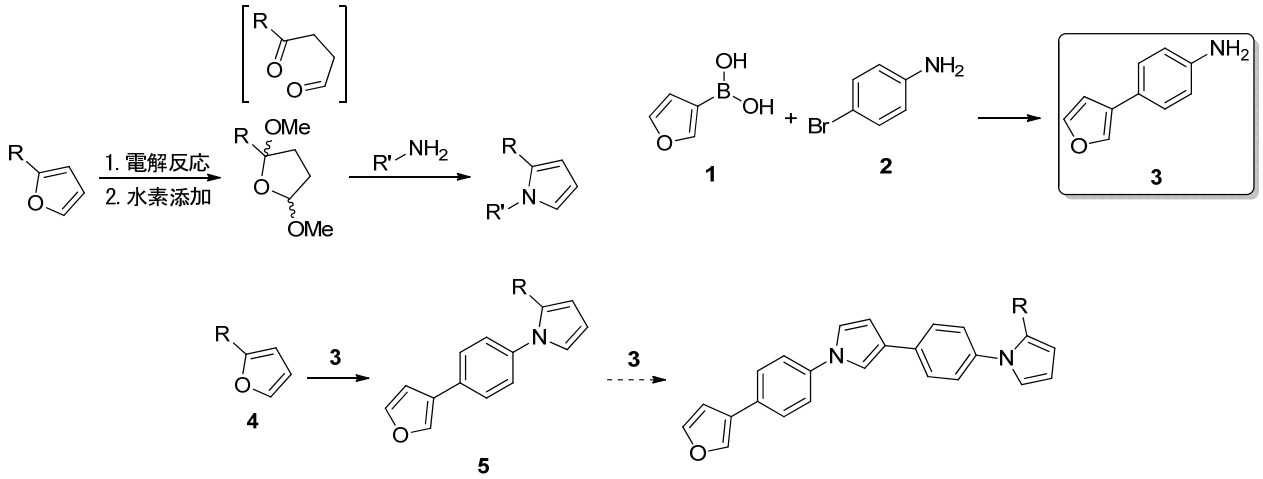
Synthesis of pyrrole-containing conjugated oligomer using electrochemical furan oxidation

○大神 啓介、岡田 洋平、北野 克和、千葉 一裕（東農工大院農）
○KEISUKE OGAMI,YOHEI OKADA,YOSHIKAZU KITANO,KAZUHIRO CHIBA (Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)

近年，フルオレセインやシアニンおよびこれらの誘導体に代表される蛍光プローブは，特にケミカルバイオロジーにおけるイメージングツールとして欠かせないものとなっている．一般に蛍光色素の発光は溶媒の極性や誘電率などの環境因子に強く依存するため，これを利用することでDNAやタンパク質の挙動をリアルタイムでモニタリングすることが可能となる．しかしながらこのような蛍光色素では構造と発光特性の相関は予測が難しく，励起および発光波長のチューニングが課題の1つとなっている．一方で，ポリアセンやポリチオフェンのようなポリマー系の色素は繰り返し構造の数によって共役系の長さを任意に調節することができる反面，重合度の正確なコントロールが課題となる．

フランの電解メトキシ化，ならびにそれに続く水素添加反応では，1,4-ジケトン等価体の生成を介したピロール合成が可能となる．そこで我々は，分子内にフラン部位とアニリン部位を併せ持つ化合物**3**のような基質を用いて順次ピロール合成を繰り返すことで，容易に共役系のチューニングが可能な新たな蛍光色素が調製できるのではないかと考えた．

本研究では，鈴木・宮浦カップリング反応を用いて 3-フリルボロン酸（**1**）と 4-ブロモアニリン（**2**）を繋ぎ合わせることで効率的に 4-(3-フリル)アニリン（**3**）を合成することに成功した．フラン誘導体（**4**）に電解メトキシ化，水素添加を行い，これを化合物 **3** と反応させることで目的とするピロール誘導体（**5**）が得られた．化合物 **5** はフラン部位を有しているため，これを再び電解メトキシ化，水素添加によって活性化させた後に **3** を連結することによって共役系の長さの調節が期待できる．



electrochemical furan oxidation, conjugated oligomer, fluorescent material

講演番号：3C25a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ C 校舎 25 会場

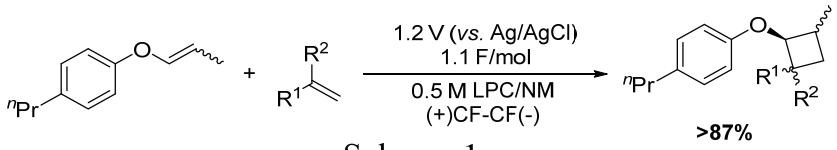
分子内電子移動プローブとしての[2+2]付加環化反応

[2+2] Cycloaddition Reaction for Probing the Electron Transfer Pathways

○山口 勇将、岡田 洋平、千葉 一裕（東農工大院農）
○Yusuke YAMAGUCHI,Yohei OKADA,Kazuhiro CHIBA (Tokyo Univ. of Agric. & Technol.)

電極電子移動による酸化還元反応はグリーンケミストリーの観点から注目されるだけでなく，電位調節による選択的な酸化・還元が可能である点などで合成化学的にも有用な手法である．特に電子密度の高いオレフィンの陽極酸化により開始される電解オレフィンカップリングは，分子内および分子間での多様な環化反応を達成し新たな環系を構築するための強力な手法となる．

我々はこれまでに陽極酸化により誘起される[2+2]付加環化反応を報告してきた(Scheme 1)．



Scheme 1

本反応では非共役系を介した分子内電子移動が 4 員環形成において鍵反応であると同時に，発生した芳香族ラジカルカチオン種 **4** と出発原料 **1** 間での分子間電子移動により触媒電気量で反応が進行すると考えられている(Figure 1)．

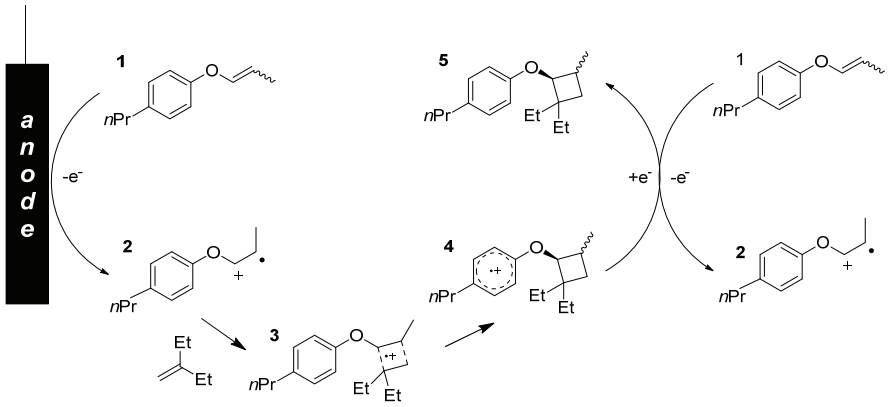


Figure 1

本研究ではこの分子間電子移動から着想を得て，炭化水素によって架橋された 2 つ目のエノールエーテルを分子内に導入することで分子内電子移動を期待した化合物 **6** を合成した(Figure 2)．

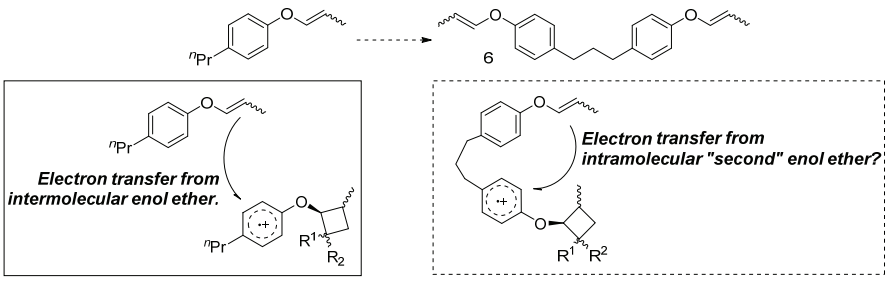


Figure 2

分子内電子移動は, 2 つ目のエノールエーテルが酸化された後に形成される 2 つ目の 4 員環により検出され，架橋構造の違いにより 2 つ目の 4 員環形成の速度に明確な違いが見られた．発表においては，合成結果に関しての詳細なデータを示し反応機構について考察する．

anodic oxidation, intramolecular electrontransfer, enol ether

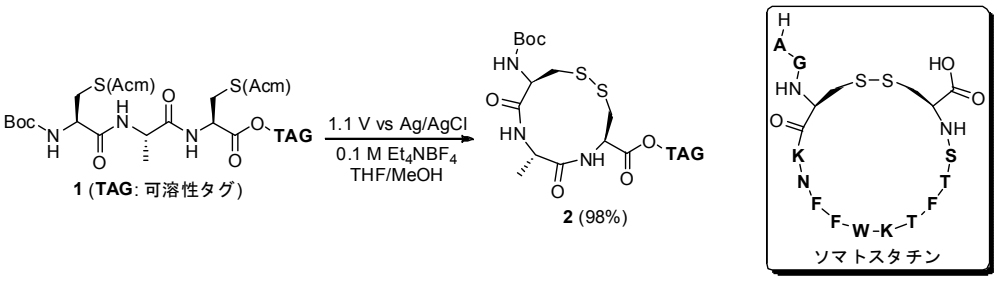
講演番号：3C25a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ C 校舎 25 会場

陽極酸化によるペプチドの分子内ジスルフィド結合形成反応
Anodic oxidation-induced intramolecular disulfide bond formation of peptide
○高橋 優士、北田 慎吾、山口 勇将、岡田 洋平、北野 克和、千葉 一裕（東農工大院）
○ Masahito TAKAHASHI,Shingo KITADA,Yusuke YAMAGUCHI,Yohei OKADA,Yoshikazu KITANO,Kazuhiro CHIBA (Tokyo Univ. of Agric. & Technol.)

不溶性担体を用いた固相合成法は，生成物の分離・精製の迅速さから学術的にも工業的にも広く利用されている．特にペプチドや核酸の化学合成においては目的の配列の生成物を容易に得ることのできる固相合成法が非常に重要な役割を果たしている．しかし，電解反応においては固体間での電子移動は非常に起こりにくいため，不溶性担体と結合した基質は電極表面で酸化・還元反応をほとんど受けない．そのため不溶性担体を電解反応に用いることは非常に困難である．一方，我々は疎水性のベンジルアルコール誘導体を可溶性のタグとして用いた液相ペプチド合成法を開発し，さまざまな配列のペプチド合成に取り組んできた．この合成法ではタグと結合したペプチドが各反応終了後に沈殿として高純度かつ定量的に回収できるため，カラムクロマトグラフィー等の分離・精製操作なしで数十段階に上る化学反応を実現することができる．今回我々はこの疎水性タグを電解反応に応用することを目指して、モデルとして酸化的分子内ジスルフィド結合の形成反応を行った．

本研究ではモデル基質として，疎水性タグを用いて Cys(Acm)-Ala-Cys(Acm)という配列のペプチド 1 を合成し陽極酸化に供した．ペプチド鎖の脱保護・縮合反応はテトラヒドロフラン中，室温条件下で行い，反応終了後に溶媒をアセトニトリルへと置換することで目的とする疎水性タグと結合したペプチドを沈殿として得た．ペプチド 1 は支持電解質として 0.1 M テトラエチルアンモニウムテトラフルオロボレートを含むテトラヒドロフラン／メタノール混合溶液中に均一に溶解し，陽極酸化によって目的とする分子内ジスルフィド結合を形成した環状ペプチド 2 が 98%の高収率で得られた．反応終了後には，再び溶媒をアセトニトリルへと置換することでタグと結合したペプチド 2 を沈殿させ，これをろ過によって簡便に回収することに成功した．

本発表では，本法のソマトスタチン合成への応用も含め，詳細な実験条件や酸化電位に基づく電気化学的な考察を報告する．



disulfide bond formation, peptide, somatostatin

講演番号：3C25a15
講演日時、会場：3 月 26 日 11:48～ C 校舎 25 会場

陽極酸化を用いたアザヌクレオシドの効率的な合成法の開発

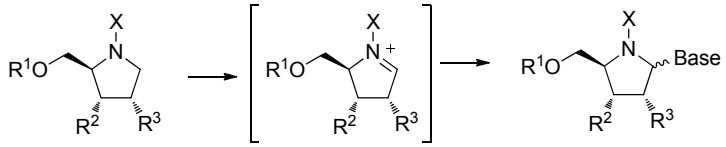
Development of efficient azanucleoside synthesis using anodic oxidation

○小路 貴生、金 承鶴、千葉 一裕（東京農工大学）
○Takao Shoji,Shokaku Kim,Kazuhiro Chiba (Tokyo Univ. of Agri. and Technol.)

【目的】人工核酸は，医薬品や診断薬，電子デバイス等，多様な分野において広く利用されており，新たな機能創出や活性向上を目指して活発に研究されている．特に，人工核酸の合成においては，糖部位の修飾・改変が重要な戦略となっており，有用な活性，性質を持つものが数多く報告されている．なかでも Azanucleoside は，リボース骨格との構造類似性や優れた生理活性から，近年大きく注目されている．しかし，その合成法は，高価な試薬や多段階プロセスが必要など，克服すべき問題が多い．とりわけ，核酸塩基を導入するための前駆体合成には，2’，3’位に目的の官能基を導入しながら，適切な脱離基を導入することが求められるが，酸化／還元，保護／脱保護を繰り返すなど、煩雑な操作を伴うのが現状である．

本研究では，容易に入手可能なプロリノール誘導体から鍵となる活性中間体を直接発生させ，核酸塩基を導入することができる，新規合成プロセスの開発を目指した．

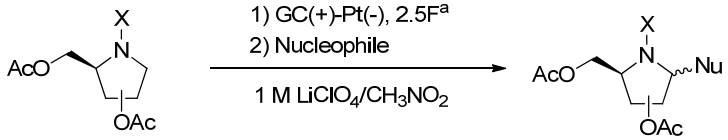
Scheme. 1



【方法】活性中間体の発生には，電極電子移動による有機電解法を用いることにした．各種プロリノール誘導体を調製し，反応条件を検討した．また，求核剤として，アリルトリメチルシラン，チオフェノール，核酸塩基等を用い，カップリング反応を試みた．

【結果】種々反応条件を検討した結果， $LiClO_4/CH_3NO_2$ において，カップリング反応が高収率で進行することが明らかになった．さらに得られた生成物については，目的とする 1 ’位に選択的に導入されていた．本システムを用いることによって，従来困難であった Azanucleoside 誘導体を簡便かつ直接的に合成することが可能になった．

Scheme. 2



X=-CO_2Me, $COCO_2$Me, Boc,Ac

Anodic Oxidation, Azanucleoside, Prolinol

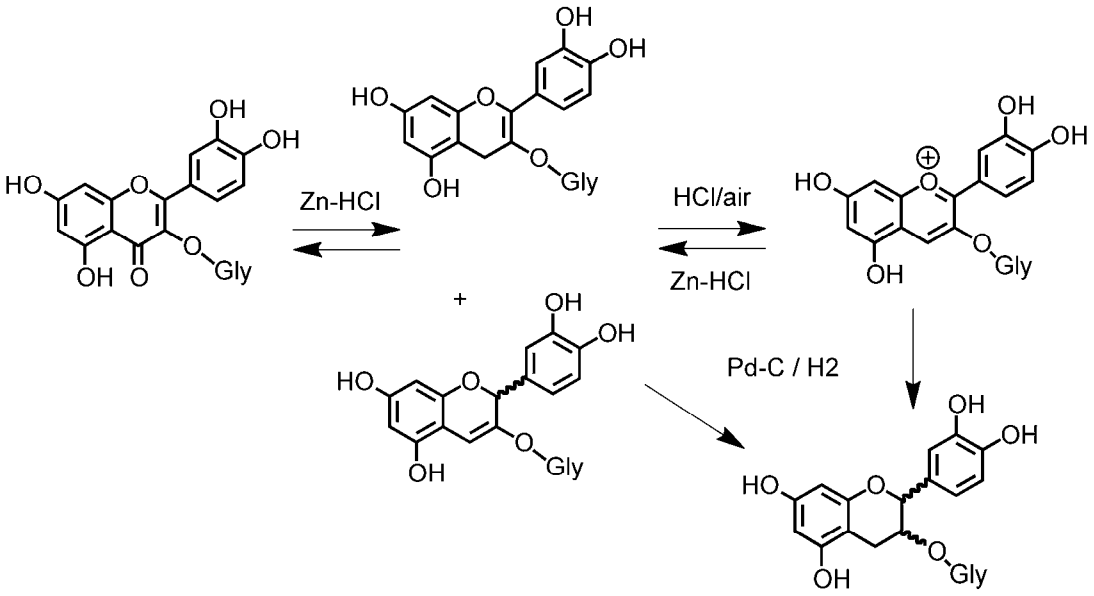
講演番号：3C25p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ C 校舎 25 会場

配糖化フラボノールから対応するアントシアニンへの変換とその関連体への誘導

Transformation of glycosylflavonols to the corresponding anthocyanins and the related compounds

○近藤 忠雄[1]、加藤 亮[1]、尾山 公一[2]、吉田 久美[1] ([1]名大院情報、[2]名大物国セ)
○Tadao Kondo[1], Ryo Kato[1], Kin-ichi Oyama[2], Kumi Yoshida[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Nagoya Univ.)

アントシアニンは、色素として植物界に広く存在して、虫媒や太陽光による遺伝子障害防御等の役割を担っている。人に対しては抗酸化力による生活習慣病の防止剤として、また、材料科学の分野では最近、太陽光発電の増感色素材として期待されている。現在、色素は主に天然から精製されているが、その種類・量には限りがあり需要を満たしておらず、多様な構造の色素の供給には合成法の確立が不可欠である。天然の配糖化フラボノールからアントシアニンへの金属還元による変換は、古くから報告されてきたが、収率、再現性に問題があった[1]。そこで我々は、効率的な変換方法の研究を行ない、この過程で、Clemmensen 還元生成物はフラベノールであり、強酸性下で空気酸化されて初めてアントシアニンに変換されることを明らかにした[2]。条件検討の結果、現在、数十グラム規模での合成が可能となった。さらに、アントシアニン生合成経路の重要段階に疑義が生じたのでこれらの問題点も 指摘する。



[1] K. Wakihara, et.al., *JP-patent*. **1975**, 75-46750; M. Elhabiri, et. al., *Tetrahedron Letters*, **1995**,*36*, 4611-4614.
[2] 吉田久美、近藤忠雄、尾山公一、特願 2007-317648、特開 2009-137904.

anthocyanin, Clemmensen reduction, flavenol

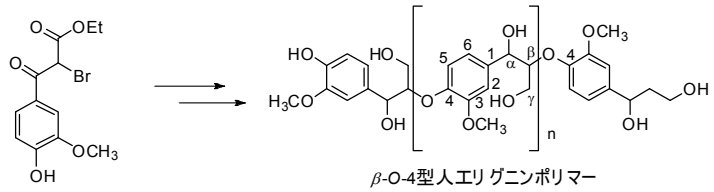
講演番号：3C25p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ C 校舎 25 会場

β-*O*-4 型リグニンオリゴマーの合成研究

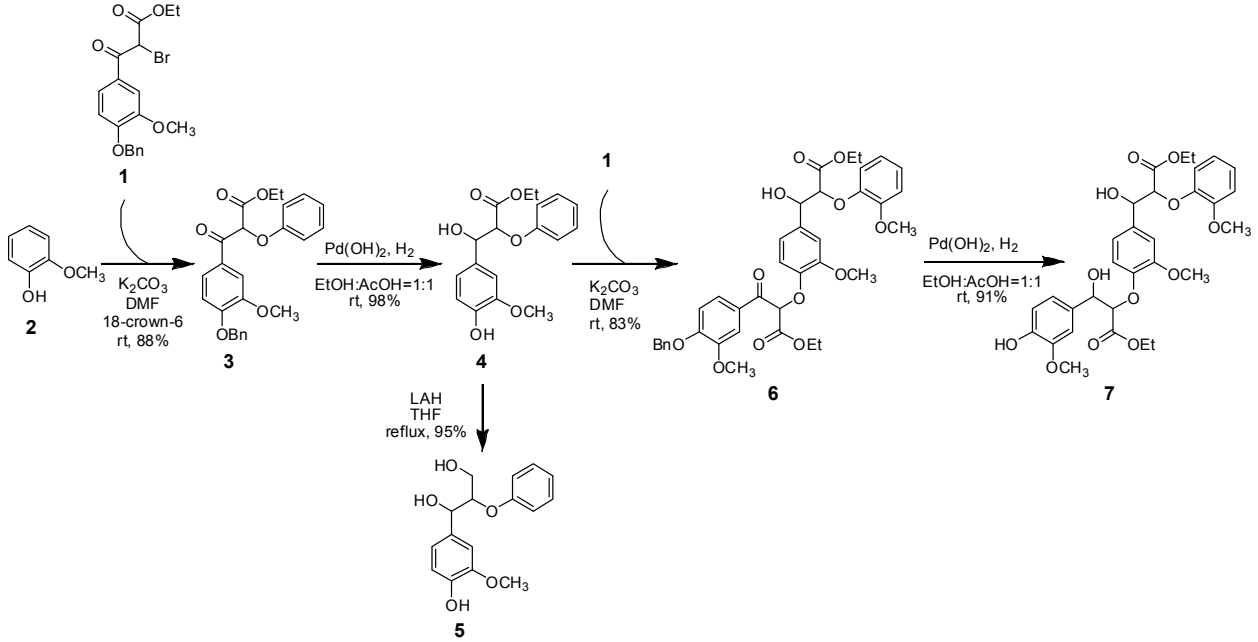
Synthetic study of *β*-*O*-4 type lignin oligomer

○板倉 圭佑、岸本 崇生、濱田 昌弘、中島 範行（富山県大工）
○Keisuke ITAKURA,Takao KISHIMOTO,Masahiro HAMADA,Noriyuki NAKAJIMA (Toyama Prefectural University)

リグニンは木化した植物の主成分の一つであり、非常に複雑な構造をしている。リグニンのモノマー間の結合で最も多い結合は*β*-*O*-4 結合であり、約 50-60%を占めている。当研究室では、既に*β*-*O*-4 型人工リグニンポリマー(DP_n=12-16) の合成に成功しているが、その重合度は一定ではない。そのため本研究では、特定の重合度を持つ*β*-*O*-4 型リグニンオリゴマーの合成に取り組んだ。



まず、**1** と **2** とのカップリングにより収率 88%で **3** を合成した。**3** を $Pd(OH)_2$ を用いた接触還元により、脱 Bn 化とケトンの還元を同時に行い、**4** を 98%で得た。**4** を LAH 還元し、二量体 **5** を収率 95%で合成した。さらに、**1** と **4** とのカップリングを行なったところ、**6** を収率 83%で合成した。その **6** を $Pd(OH)_2$ を用いて接触還元し、**7** を収率 91%で得た。今後、同様の反応を繰り返し、より重合度の高い*β*-*O*-4 型リグニンオリゴマーの合成を試みる。



artificial lignin, *β*-*O*-4, lignin oligomer

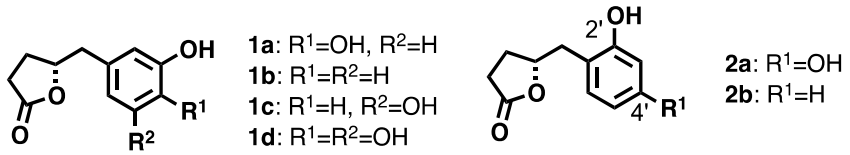
講演番号：3C25p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ C 校舎 25 会場

2'位に水酸基を有する茶カテキン代謝物の合成

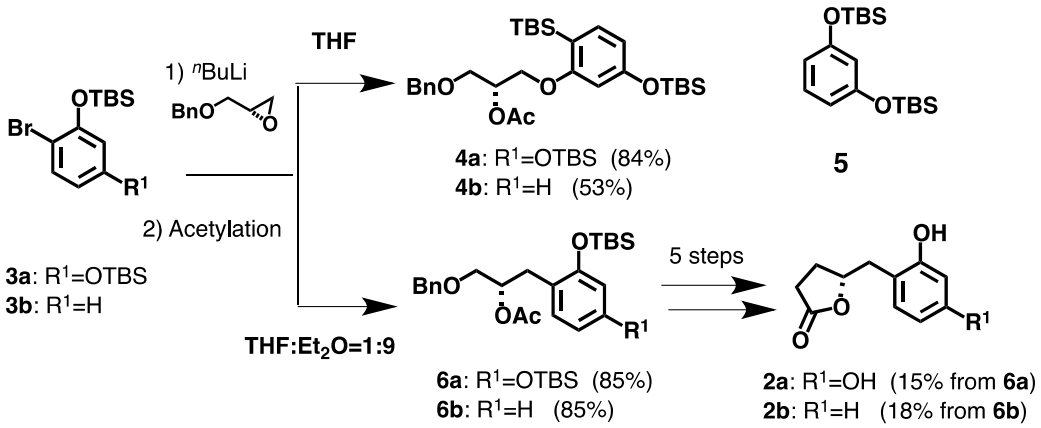
Synthesis of tea catechin metabolites with 2'-hydroxy group

○中島 範行、成瀬 俊一、濱田 昌弘、岸本 崇生（富山県大工）
○Noriyuki NAKAJIMA,Shunichi NARUSE,Masahiro HAMADA,Takao KISHIMOTO（Toyama Prefectural Univ.）

【目的】茶カテキンは腸内細菌での代謝を経て、γ-ラクトン代謝物へと変換される。当研究室では系統的なラクトン代謝物の合成を行ない、水酸基の数や置換位置の違いによる活性の詳細を検討している。天然型ラクトン誘導体（**1a**-**1d**）に加え、今回、2-'ヒドロキシフェニルおよび2',4'-ジヒドロキシフェニル-γ-バレロラクトン（**2a**,**b**）の合成を行なうことにした。



【方法】2 位に水酸基を有する **2a**,**2b** の合成の際、フェノール性水酸基の保護基として用いたシリル基の転位が観測されたため、転位反応を抑えるための条件検討を行った。TBS 基で保護した **3a**,**b** をリチオ化し、benzyl (*S*)-glycidyl ether と THF 中カップリング反応を行なったところ、転位化合物（**4a**,**b**）が 84%、53%の収率で得られた。**3a** に対して Et_2O を溶媒にカップリング反応させたところ、脱ブロモ体（**5**）と共に目的のカップリング体（**6a**）を 5%と低収率ながら得ることができ、シリル基の転位が抑えられることが分かった。THF と Et_2O の混合溶媒を用いて詳細に反応条件を検討した結果、THF:Et_2O=1:9 の時、**6a**,**b** を 85%の収率で共に得ることができた。**6a**,**b** を既知の合成経路に従い、5 工程（15%、18%）で **2a**,**b** へと導いた。これら合成の詳細を報告する。



polyphenol, valerolactone, reverse Brook rearrangement

講演番号：3C25p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ C 校舎 25 会場

環状プレニルフラボノイドの合成および天然物の立体配置の確認

Synthesis of cyclic prenyl flavonoids and structure determination of natural compounds

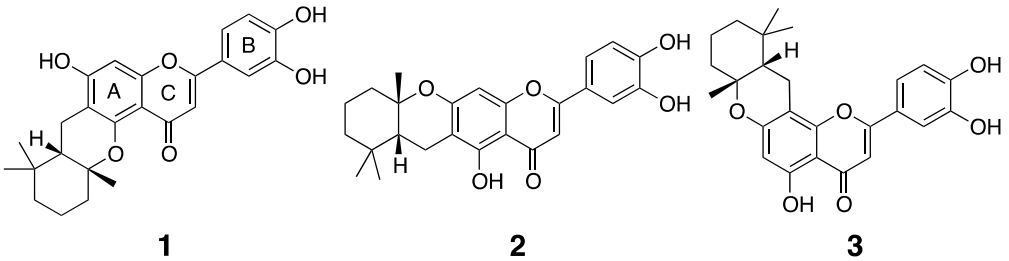
○田中 寛知[1]、常盤野 哲生[1]、川井 悟[2]、吉澤 結子[1] ([1]秋県大院生資科、[2]東電大理工)
○Hirotoshi TANAKA[1], Tetsuo TOKIWANO[1], Satoru KAWAII[2], Yuko YOSHIZAWA[1] ([1]Akita Pref. Univ., [2]Tokyo Denki Univ.)

【目的】フラボノイドはジフェニルプロパン構造を持つ植物の二次代謝産物で、抗酸化ポリフェノール化合物の一種として知られている。このフラボノイド骨格にプレニル基が付加した化合物も天然によく見出だされ、母核とは異なる生物活性が発現することが多い。2003 年にミヤコジマハナワラビから単離された化合物 **1**～**3**（Fig. 1）は、フラボノイド骨格に付加したプレニル側鎖がさらに環状化した構造を特徴としており、好中球のスーパーオキシドアニオン生成とエラスターゼ生成の阻害活性を示すことが報告されている(1)。しかし A 環に結合したエーテル環とシクロヘキサン環の縮合部に関して、文献記載の立体構造（*cis*）と NMR スペクトルデータとの間には矛盾があると考えられた。またこのような化合物は 4 級のアリール炭素が多く、構造決定が困難な場合もある。そこで本研究では、構造類縁体 **1**～**3** の合成経路を確立し、合成化合物と天然物のスペクトル比較により立体配置の確認を行った。

【方法】3,5-dimethoxyphenol にゲラニル基を導入し、シクロヘキサン環およびエーテル環が結合した A 環部分を合成した。A 環部分に対してケイ皮酸誘導体との Friedel-Crafts 反応を行ってカルコンとした後に、続く脱メチル化、酸化的環化によりフラボン骨格を構築した。合成化合物の ^{1}H および ^{13}C-NMR 解析を行い、天然物のスペクトルデータと比較した。

【結果】合成化合物との NMR スペクトルの比較により、シクロヘキサン環を含む縮合部に関して、天然物の立体配置は *trans* である、すなわち報告されている立体とは異なる配置であることが示唆された。この結果に従い、報告された他の類縁体についても立体構造の検討を行った。

また生物活性試験を行ったところ、合成化合物は細胞毒性およびグルコシダーゼ阻害を示した。



1 **2** **3**

Fig. 1

文献(1) Y.-C. Huang, *et al*., *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1273-1278.

prenyl flavonoid, Friedel-Crafts acylation

講演番号：3C25p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ C 校舎 25 会場

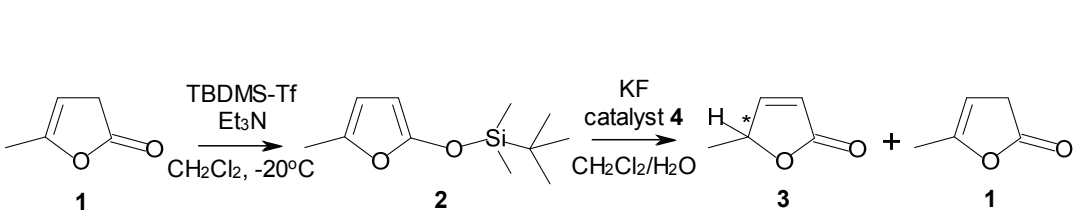
相間移動型シンコナアルカロイド触媒を用いるシリル保護ジエノラートのエナンチオ選択的遠隔位プロトン化反応の開発

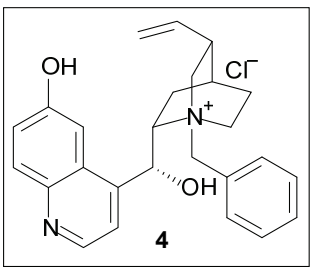
Enantioselective remote protonation for siliy-protected dienolate using phase transfer catalyst derived from cinchona alkaloid

○渡邊 雄太、稲垣 穣（三重大院生資）
○Yuta WATANABE,Minoru INAGAKI (Mie univ.)

【背景・目的】エナンチオ選択的プロトン化反応は生合成で見られる巧みな反応の一つである。この反応を有機合成反応に応用するため、これまで、カルボニル化合物がケト–エノール互変異性によって、エノール型からケト型に戻る際にα位の立体選択的なプロトン化を行う反応が数多く研究されてきた。この手法であれば、共役二重結合が伸長したカルボニル化合物についても、電子移動を経て、遠隔位にプロトン化される反応を行うことができると考えられるため、酵素が行うようなより複雑な不斉反応を有機合成反応で実現できるのではないかと考えた。そこで、不斉中心をカルボニル化合物のα位からγ位に移し、エノラートアニオンの電子が共役二重結合を伝わってγ位へ移動することでα, β-不飽和カルボニル化合物のγ位に立体選択的なプロトン化を行う、新規な不斉プロトン化反応を開発することを目的とした。

【方法・結果】出発物として、医薬品合成における基本的なビルディングブロックとして有用な、α–アンゲリカラクトン(**1**)を利用した。このラクトン **1** をエノラート型に固定するため、トリエチルアミンの存在下で *tert*-ブチルジメチルシリルトリフラートを用いてエノラートの *O*-TBDMS 保護体 **2** として単離することで、遠隔不斉プロトン化反応の基質とした。その後の脱保護–不斉プロトン化反応では、フッ化物イオンの供給源にフッ化カリウムを使用して、ジクロロメタン–水の二層系で反応を行った。不斉触媒には、天然アルカロイドの一種であるキニンの 6’位メトキシ基をアルコールに還元し、さらにキヌクリジンの窒素原子を四級化した化合物 **4** を相間移動型触媒として用いた。反応混合物を NMR およびキラルカラムを用いた HPLC により分析したところ、α位がプロトン化された **1** よりも、γ位がプロトン化されたβ–アンゲリカラクトン(**3**)を優先的に、かつ立体選択的に合成することができた。現在、この反応について、触媒の構造改変および溶媒や温度などの反応条件の検討を行って、より高い位置および立体選択性を実現する方法を検討している。





enantioselective protonation, phase transfer catalyst, silyl enolate

講演番号：3C25p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ C 校舎 25 会場

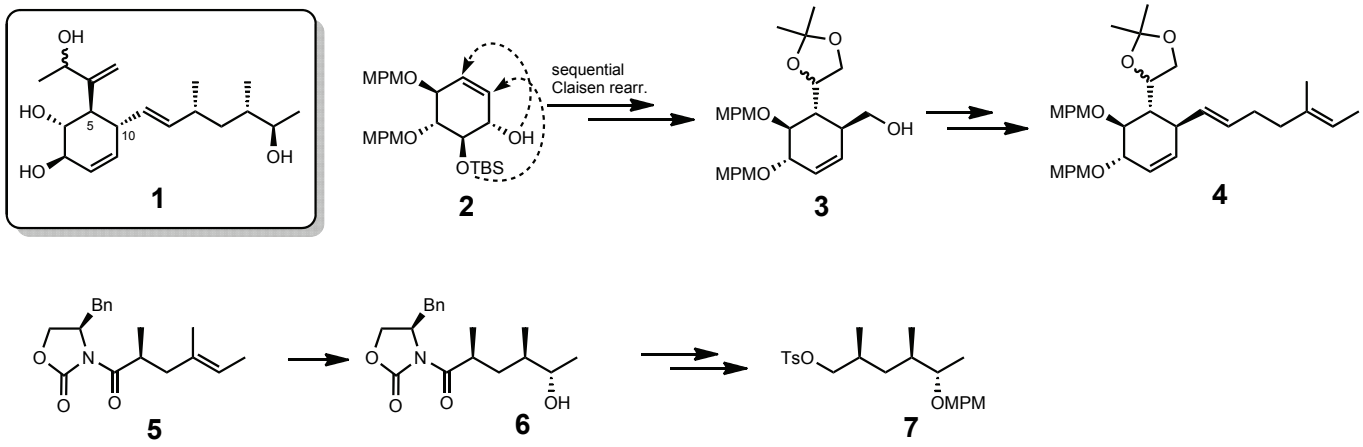
Norleptosohol の合成研究

Synthetic study of norleptosohol

○村井 嘉晃、高橋 萌子、坂元 君年、橋本 勝 (弘前大学農学生命)
○ Yoshiaki MURAI,Moyoko TAKAHASHI,Kimitoshi SAKAMOTO,Masaru HASHIMOTO (Hirosaki Univ.)

当研究室ではヨモギの茎より分離した腐生子嚢菌 *Leptosphaeria doliolum* から spiroleptosphol 類を単離、その生合成機構などを明らかにしてきた [1,2]。spiroleptosphol には、強い抗 MRSA 活性を示すものもあることから、合成類縁体より新規抗 MRSA 物質を見出すことを目標に、まず、その構造の比較的簡単な norleptosphol (**1**)の合成に着手した。

Methyl D-glucopyranoside を出発に用い、Ferrier 転位を利用してシクロヘキセノール **2** を立体選択的に導いた。次に、二度の Claisen 転位反応により 5 位、10 位炭素官能基を立体選択的に導入、さらに官能基変換を行うことで **3** に変換した。**3** の水酸基をアルデヒドへ酸化した、側鎖モデルを導入して **4** を得ることに成功した。一方 tiglyl bromide を用いて Evans 不斉アルキル化により **5** を調製した後、ヒドロホウ素化-酸化により **6** に導いた。現在、**6** の **7** への変換、さらに *ent*-**1** の合成に向けて検討している。



1) T. Murakami, M. Hashimoto *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 492-495 (2009).
2) T. Murakami, M. Hashimoto *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **19**, 1122-1125 (2009).

norleptosphol, synthesis, Claisen Rearrangement

講演番号：3C25p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ C 校舎 25 会場

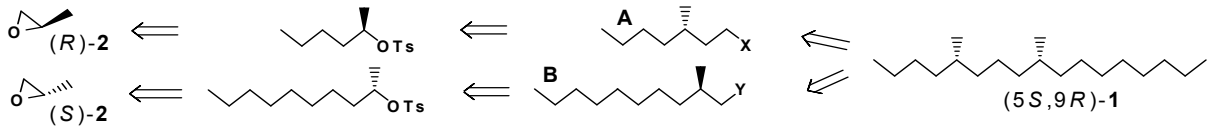
２級トシラートの立体反転を利用したハモグリガ性フェロモンのキラル合成

The asymmetric synthesis of chiral methyl-branched leafminer sex pheromones by stereospecific inversion of secondary tosylates

○田栗 知憲[1,2]、山川 怜[1]、藤井 透[1]、村木 優太[1]、安藤 哲[1] ([1]東京農工大学、[2]理化学研究所)
○Tomonori TAGURI[1,2], Rei YAMAKAWA[1], Toru FUJII[1], Yuta MURAKI[1], Tetsu ANDO[1] ([1]Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]RIKEN)

【目的】　鱗翅目蛾類の性フェロモンの多くはボンビコールの様に直鎖状の化合物であるが、メチル分岐を有する化合物も少なからず同定されている。特にハモグリガ類は、*Leucoptera scitella* の 5,9-dimethylheptadecane（**1**）の様に n,(n+4)-ジメチル構造を有する化合物を分泌し、その立体化学は光学活性な合成フェロモンの活性試験などで明らかにされ、高純度な異性体の合成の重要性が指摘されてきた。合成経路の多くは、すでにメチル分岐を有したキラルな原料を用いその立体構造を維持したものであり、立体反転を伴う S_N2 反応は、副反応の競合やラセミ化の恐れから利用されてこなかった。しかしながら、キラルな 2 級メシラートは炭素求核剤との S_N2 反応によりラセミ化せずに立体反転を伴った C-C 結合を形成するとの最近の報告を踏まえ、**1** の合成への活用を試みることとした。

【方法と結果】　まずメチル分岐を含む２つのキラルな合成ブロック（**A** と **B**）のカップリングにより(5*S*,9*R*)-**1** を合成することとし、比較的安価な合成原料であるキラルな propylene oxide（**2**）から導かれる２級トシラートのアルキル化反応によりそれぞれのブロックを得る下記の合成スキームを立案した。



３位にメチル分岐を含む **A**（X=I）は、**2** から誘導したキラルな 2 級トシラートを、$NaCH(CO_2Me)_2$ とラセミ化なく S_N2 反応させ、脱炭酸、$LiAlH_4$ 還元、ヨード化により得られた。トシラートと反転後の化合物として $LiAlH_4$ 還元で生成したアルコール(**A**, X=OH) のメチル分岐の光学純度 (>99% ee) は、順相系のキラル HPLC で確認した。

一方、２位にメチル分岐を含むブロック **B** は１炭素のみの増炭でありシアン化物など選択肢が限られているが、種々の炭素求核剤を検討した結果、強塩基性の methyl *p*-Tolyl sulhone のアニオン(pKa=28)を用いて、E2 脱離などの副反応を防ぎつつ目的の反応が進行する条件を見出すことができた。生成物(**B**, Y=Ts）のメチル分岐の光学純度（>99% ee）もキラル HPLC で確認でき、スルホンによるキラルな 2 級トシラート(OTs)の置換が完全な反転を伴った S_N2 反応で進行するという新たな知見が得られた。

最終的に **A** と **B** のカップリングにより目的の(5*S*,9*R*)-**1** を、また同様にして残り３つの立体異性体を合成できた。今回確立した経路を応用して他の n,(n+4)-ジメチル化合物のキラル合成は可能であり、更なる応用で n,(n+3)や n,(n+5)以上離れた位置に２つのメチル基を配置する合成を行っている。

scondary tosylate, C-C bond fometion, chiral methyl branch, S_N2, inversion, sex pheromone

講演番号：3C25p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ C 校舎 25 会場

抗β - 酸化型 CP-KODA（3-oxo-CP-KODA）の合成研究

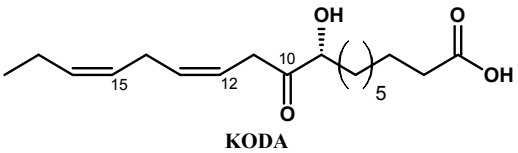
Synthetic study of 3-oxo-CP-KODA

○大山 秀芳、中山 ともみ、長谷川 守文、戸嶋 浩明（茨城大院農）
○ Shuho OYAMA,Tomomi NAKAYAMA,Morifumi HASEGAWA,Hiroaki TOSHIMA (Ibaraki Univ.)

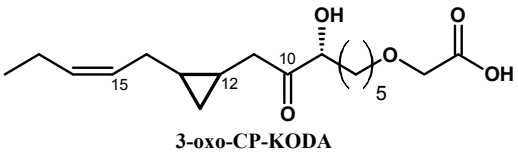
【目的】植物は葉において日長の変化を感受することで花芽を形成する。近年、アオウキクサにおける花芽形成誘導物質として 9,10-α-ketol-octadecadienoic acid (KODA)が単離・同定された。現在、KODA の動態解明や植物生長調節剤としての利用に向けた研究が盛んに行われており、著者らは化学合成による KODA 類縁体を用いた作用機構の解明を目指している。しかし、KODA には非共役のジエノン構造が存在し異性化等により活性を失ってしまう可能性が示唆される。また植物による代謝実験ではβ - 酸化を受けることが示されている。そこで、まず 12,13 位オレフィン部分のシス配置を保持したシクロプロパン環類縁体（CP-KODA）を合成した。活性試験の結果、CP-KODA においても活性が保存されていることが示された。この結果を踏まえ、次に β - 位の炭素原子を酸素原子に変換した抗 β - 酸化型 CP-KODA（3-oxo-CP-KODA）を設計した。本研究では、3-oxo-CP-KODA の合成を目的としている。

【方法及び結果】スルホン体セグメント、アルデヒド体セグメントを市販の原料よりそれぞれ合成した後、カップリングを行うことで全体の骨格を構築する収束的経路を立案した。

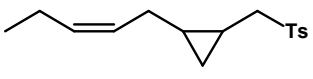
スルホン体セグメントは、dimethyl *cis*-1,2-cyclopropane dicarboxylate より誘導したメソ体ジエステルに対するブタ膵臓リパーゼによる既知の不斉導入法や、増炭反応を経て合成した。アルデヒド体セグメントは 1,6-hexanediol より誘導した末端アルケンの Sharpless AD 反応による不斉導入、およびその誘導体の再結晶化による光学純度向上を行った後に、エーテル結合導入型および非導入型の 2 種の光学活性アルデヒド体セグメントとして合成した。今後、スルホンアニオンとのカップリングを行い 3-oxo-CP-KODA の合成を進める予定である。



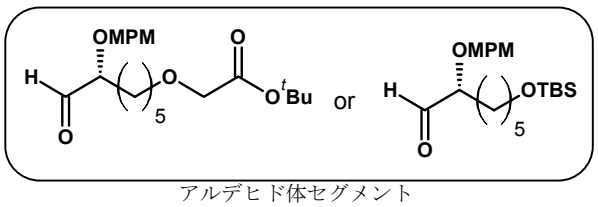
KODA



3-oxo-CP-KODA



スルホン体セグメント



アルデヒド体セグメント

KODA, flower-inducing activity, β-oxidation

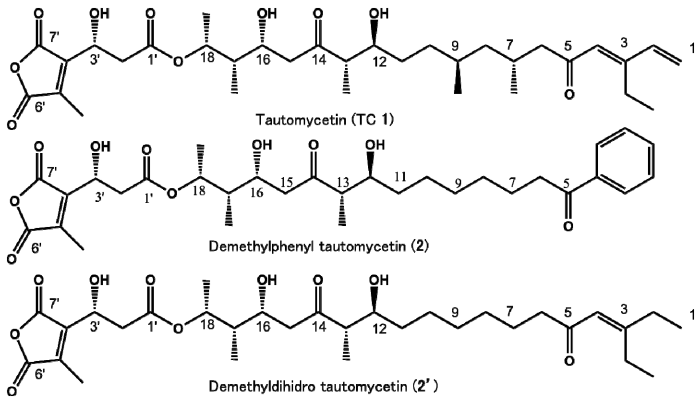
講演番号：3C25p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ C 校舎 25 会場

Tautomycetin の合成研究（６）

Synthetic study of Tautomycetin(6)

○重冨 顕吾、今村 龍太郎、生方 信 (北大院農)
○Kengo SHIGETOMI,Ryutaro Imamura,Makoto Ubukata (Hokkaido Univ.)

【研究背景】Tautomycetin(TC 1)は放線菌 *Streptomyces griseochromogenes* より単離・構造決定された化合物で、1 型のセリン/スレオニンタンパク質脱リン酸化酵素(PP1)に特異的な阻害剤であることが明らかにされており、細胞内シグナル伝達機構の解明や、抗がん剤などの薬剤としての利用が期待される。そこで当研究室では TC の全合成の検討を行った。また TC 自体の脆弱性ゆえに全合成においても収率の低下を招く可能性があるため、TC と PP1 複合体の水素結合ネットワークの観察により、PP1 との効果的な結合が予想されかつ、簡略で安定であると考えられるトウトマイセチン誘導体(dedimethylphenyl tautomycetin, 2 および dedimethyldihydro tautomycetin, 2’)を提案し、合成を検討した。



【合成計画】逆合成解析により TC 誘導体を C15、C16 間で大きく二つのセグメントに分割し、それら二つをそれぞれさらに分割した。無水マレイン酸構造を含むセグメントをセグメント A、ジチオラン環を持つセグメント B、亜リン酸エステルを持つセグメント C とし、芳香環を含むセグメントをセグメント D とした。セグメント A,B 間は光延反応、B、C 間はボランアルドール反応を用い、C、D 間は Horner-Emons 反応でカップリングし、トウトマイセチンの炭素骨格を構築することにした。

【結果】我々はまず本研究の最も重要な反応となるホウ素を用いたアルドール反応の条件検討をおこなった。モデル基質を調製し、各種ルイス酸と塩基に供しアルドール反応の条件検討を行った結果、収率 90%、96%de の高収率でアルドール付加物を得られる条件を見いだした。また、各セグメントの合成を試み、セグメント A,B,C,D すべての合成を完了した。同時に TC アナログについても、安価な原料から効率的に誘導することに成功した。現在、各セグメント間のカップリングについても検討中である。

Tautomycetin, *Streptomyces griseochromogenes*, PP1

講演番号：3C25p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ C 校舎 25 会場

Zeylanone 類の合成研究

Synthetic studies toward zeylanone and its derivatives

丸尾 紗也子、西尾 和之、○倉持 幸司、椿 一典（京府大院生命環境）
Sayako Maruo,Kazuyuki Nishio, ○ Kouji Kuramochi,Kazunori Tsubaki（Kyoto Prefectural University）

Zeylanone (**1**) はセイロンマツリ (*Plumbago zeylanica*) より単離された化合物であり、各種癌細胞に対する細胞毒性や抗菌及び抗真菌活性を有する。また類似天然物である juglocombin A (**2**) および juglorescein (**3**) は、それぞれ放線菌 *Streptomyces* sp. 815 および GW4184 より単離された化合物である (Figure 1)。これら zeylanone 類は2つの 2-アルキル-1,4-ナフトキノンのキノン部位において五員環が縮環した二量体構造であるが、その相対および絶対立体配置は決定されていない。今回我々は分子間-分子内連続 Michael 反応（double Michael 反応）を利用した 1,4-ナフトキノンの二量化反応を開発し、本反応を用いて **1** の合成を達成した。

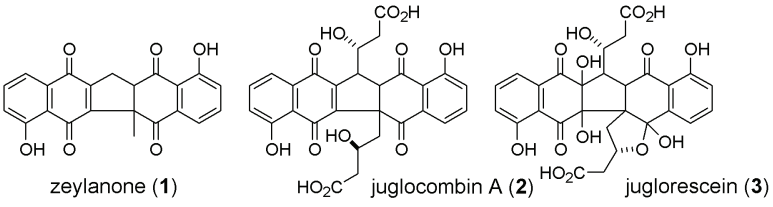
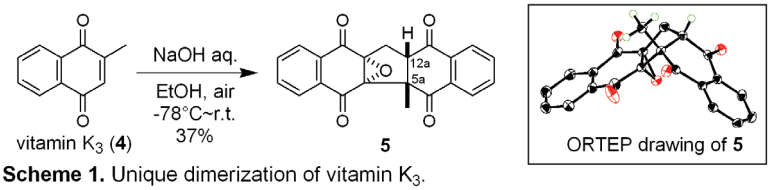


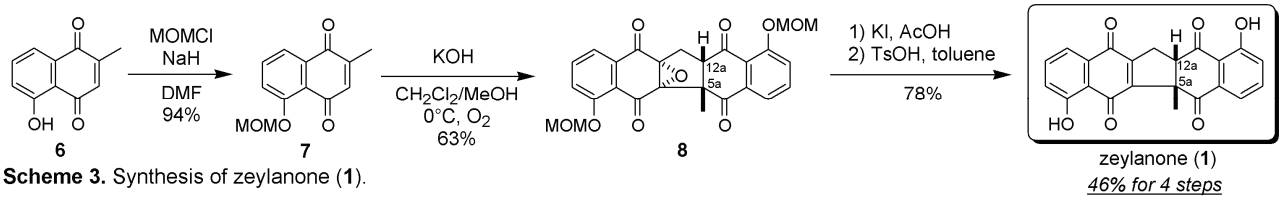
Figure 1. Structure of zeylanone (**1**), juglocombin A (**2**), and juglorescein (**3**).

Zeylanone の合成に先立ち、モデル基質として vitamin K_3 (**4**) を用いて二量化反応の条件検討を行った。Vitamin K_3 を酸素雰囲気下、メタノール中水酸化セシウム水溶液で処理すると五員環で縮環し、なおかつナフトキノン部位がエポキシ化された二量体 **5** を得た (**Scheme 1**)。**5** の X 線結晶構造解析より 5a 位メチル基および 12a 位プロトンの相対立体配置は *cis* であり、メチル基とエポキシドは *anti* であった。



Scheme 1. Unique dimerization of vitamin K_3.

本反応を利用し plumbagin (**6**) から 4 工程、総収率 46% で zeylanone (**1**) の合成に成功した (**Scheme 3**)。すなわち、**6** の 5 位水酸基をメトキシメチル (MOM) 基で保護して **7** とした後に塩基で処理することにより、所望の二量体 **8** を得た。二量体 **8** のエポキシ部位はヨウ化カリウムと酢酸により還元してアルコール体とし、*p*-トルエンスルホン酸により脱水して二重結合部位を構築した。合成した zeylanone の各種スペクトルデータは、天然物と良い一致を示した。



Scheme 3. Synthesis of zeylanone (**1**).

natural product synthesis, 1,4-naphthoquinone, dimerization

講演番号：3C25p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ C 校舎 25 会場

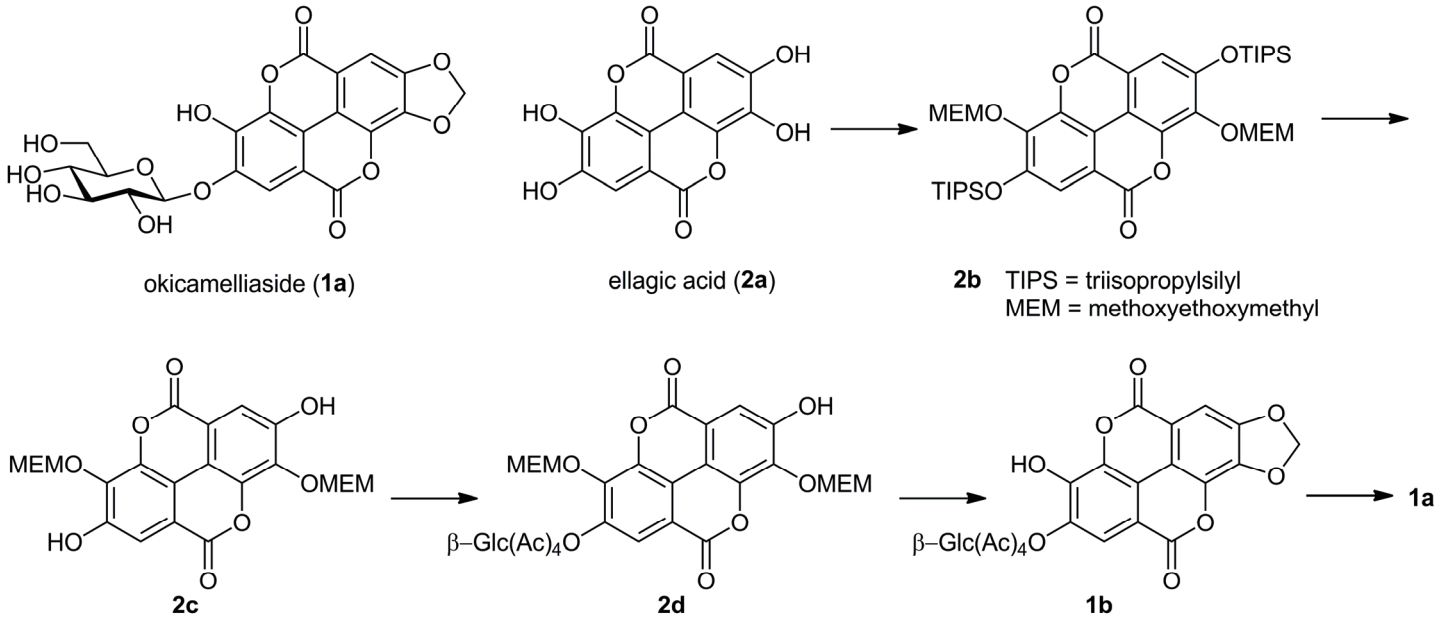
エラグ酸配糖体、オキカメリアシドの合成

Synthesis of okicamelliaside, an ellagic acid glucoside

小林 遼平[1]、花屋 賢悟[1]、庄司 満[1]、大場 茂[2]、○須貝 威[1] ([1]慶應大薬、[2]慶應大自然科学研究教育セ)

Ryohei KOBAYASHI[1], Kengo HANAYA[1], Mitsuru SHOJI[1], Shigeru OHBA[2], ○Takeshi SUGAI[1] ([1]Keio Univ., [2]Keio Univ.)

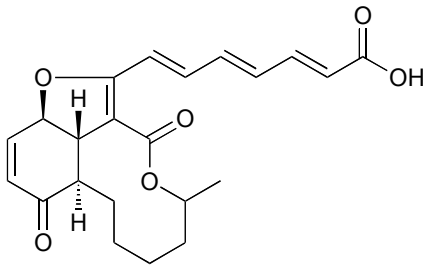
オキカメリアシド(**1a**)は小野寺・安元らによってヤブツバキから単離され、強力な脱顆粒阻害活性を有し、アレルギー疾患治療薬として有望なエラグ酸配糖体である。今回、エラグ酸(**2a**)を出発原料として **1a** を合成した。隣接するフェノール性ヒドロキシ基に対するグリコシル化の際の位置選択性に加え、エラグ酸は水にも各種有機溶媒に対しても非常に難溶性なため、全工程を通じ中間体の溶解性維持が本合成の重要な課題である。まず、カテコール部位に TIPS 基と MEM 基を位置選択的に導入した中間体(**2b**)を調製した。このものの保護基の位置は、X 線結晶構造解析により確認している。ついで **2b** に対し、TBAF を作用させ TIPS 基を除去、目的とする位置が遊離となった **2c** とした。この際、溶解性の高い第四級アンモニウム塩のまま、**2c** を単離することなく、同一容器内でβ－選択的に配糖化し **2d** とした。メチレン化(**1b**)、脱保護を経てオキカメリアシド(**1a**)の初の全合成を達成した。NMR スペクトルは天然物のそれとよい一致を示した。



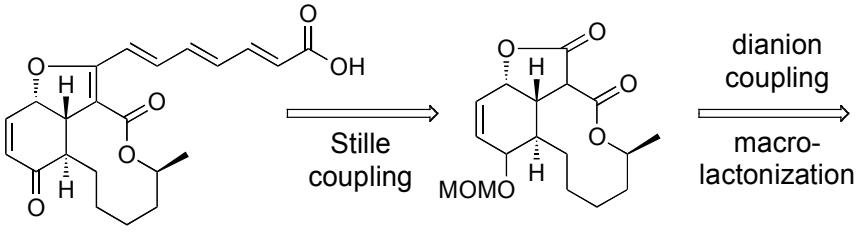
okicamelliaside, ellagic acid, glycosylation

講演番号：3C25p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ C 校舎 25 会場

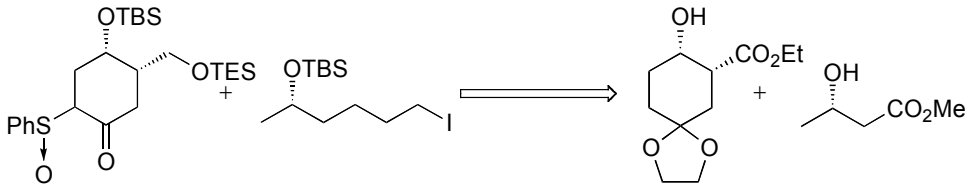
Glabramycin C の立体化学の決定を目的とした合成研究
Synthetic study of Glabramycin C to determine its stereochemistry
○山本 将起、石神 健、渡邉 秀典（東大院農生科）
○masaoki yamamoto,ken ishigami,hidenori watanabe (Univ. of Tokyo)


Glabramycin C (**1**)

（目的） Glabramycin C (1) は 2009 年にカビ類 *Neosartorya glabra* の培養液から単離されたポリケチドである。本化合物はリボソームタンパク質 S4 を標的とするスクリーニングにより発見されたが、タンパク質合成を阻害するだけでなく RNA 合成も阻害するなど、その詳細な作用機序は未だ不明である。また立体化学についても ^{1}H-NMR における結合定数により部分的な相対立体配置が推定されているのみでありその詳細は不明である。我々は、種々の類縁化合物との比較により推定した化合物 **2** を標的とした合成研究を行い、その各種スペクトルデータを比較することにより Glabramycin C の詳細な立体化学を決定することを目的として研究を開始した。
（方法・結果）パン酵母を用いてβ-ケトエステルを還元することにより得られる光学活性なヒドロキシエステル **6** 及び **7** を出発原料とし、ジアニオンを用いたアルキル化、マクロラクトン化などにより標的化合物 **2** の基本炭素骨格であるマクロラクトン **3** の合成に成功した。
現在、マクロラクトン **3** に対する側鎖の導入について検討中である。



2 **3**



4 **5** **6** **7**

Glabramycin, total synthesis

講演番号：3C25p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ C 校舎 25 会場

Okundoperoxide の合成研究

Synthetic studies on Okundoperoxide

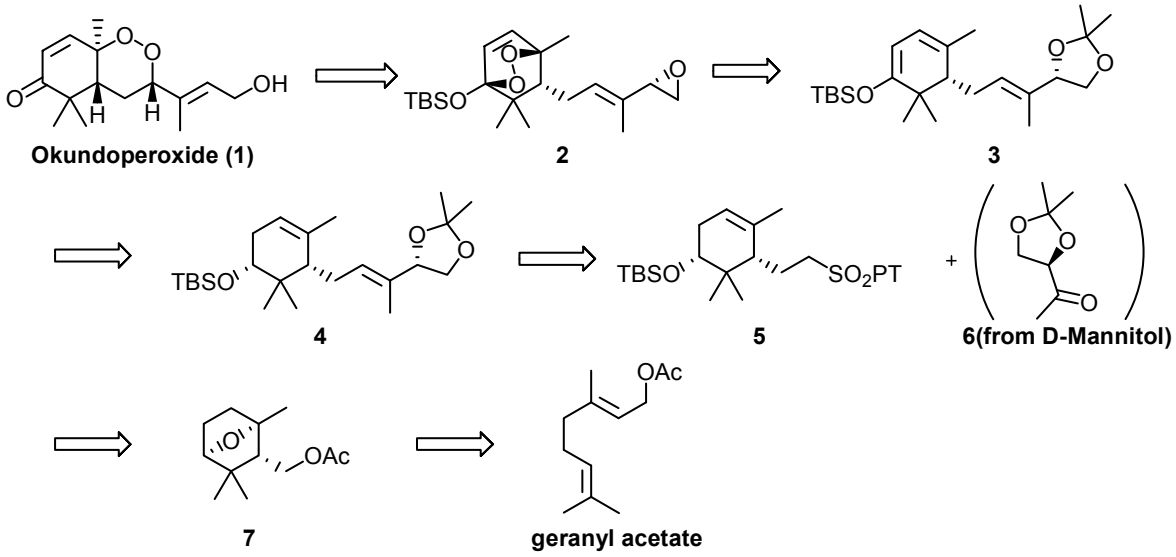
○迫田 大地、森 直紀、石神 健、渡邉 秀典（東大院農）
○Daichi SAKODA,Naoki MORI,Ken ISHIGAMI,Hidenori WATANABE (The Univ. of Tokyo)

「目的と背景」

Okundoperoxide（**1**）はカメルーンに生息するカヤツリグサ科の一種 *Scleria striatinux* の根より単離、構造決定された抗マラリア原虫活性を有するセスキテルペンである。マラリアは現在でも世界を脅かす凶悪な感染病の１つでありながら、現在薬剤として利用されているクロロキンやキニーネなどは耐性菌の存在や副作用の問題などがあり、とってかわる新薬の登場が期待されている。我々は本化合物の新規薬剤としての可能性を期待し、特徴的なエンドペルオキシド骨格の構築、絶対立体配置の決定を目的として合成研究に着手することとした。

「方法と結果」

本化合物の合成戦略を考える際には、特徴的なエンドペルオキシドの構築が鍵となる。エンドペルオキシドの不安定さを考慮して、本骨格をなるべく合成の最終段階で構築することが最適であると考えた。即ち、化合物 **3** のようなシリルジエニルエーテルと一重項酸素のディールス・アルダー反応を経て化合物 **2** を合成する。そして、化合物 **2** のＴＢＳ基を除去することによって生じるペルオキシドアニオンが、アリルエポキシドに対しＳ$_N$２’反応を起こすことで本化合物を合成しようとするものである。現在化合物 **3** の合成を終え、鍵反応の検討中であり、当発表会ではその詳細について報告する。



Okundoperoxide, endoperoxide, anti-plasmodial

講演番号：3C25p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ C 校舎 25 会場

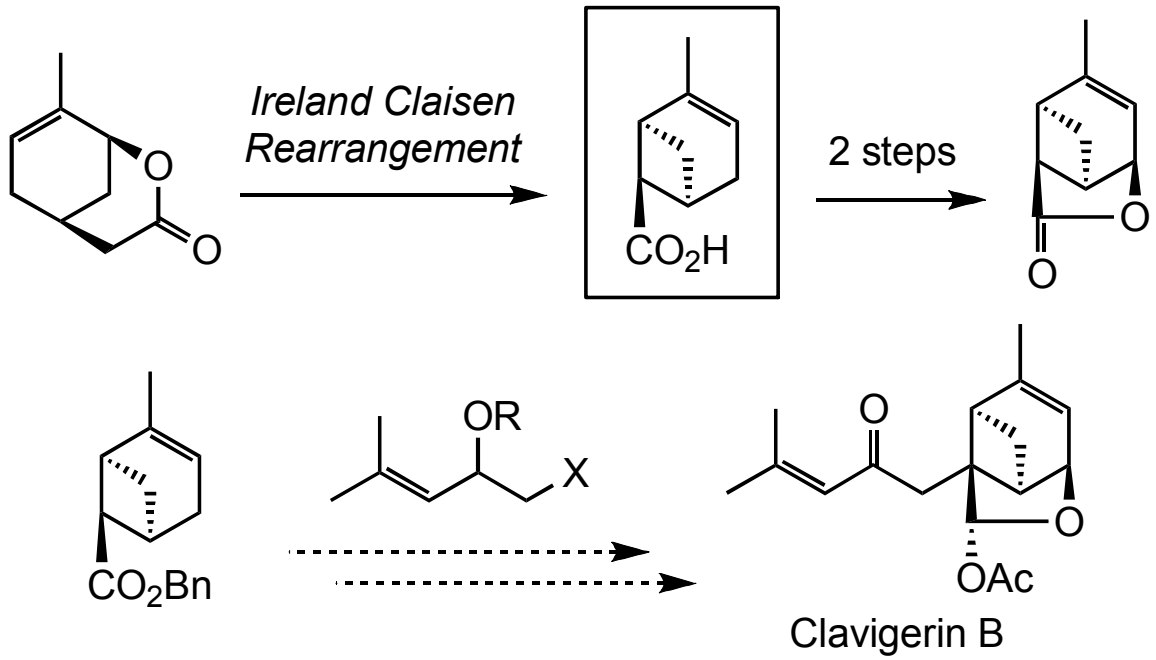
Clavigerin B の合成研究 - Claisen 転位を用いたビシクロ［3.1.1］ヘプテン骨格の構築

Synthetic study toward Clavigerin B - Construction of bicyclo［3.1.1］heptene by Claisen rearrangement

○柿本 望、渡邉 秀典（東大院農生科・応生化）
○Nozomu KAKIMOTO,Hidenori WATANABE (Tokyo Univ.)

【目的】Clavigerin B はニュージーランドのスギゴケ *Lepidolaena clavigera* より単離構造決定されたセスキテルペンであり、コイガの幼虫に対する摂食阻害活性を示すことが報告されている。本化合物は四員環、五員環、六員環の三環性のユニークな構造を有し、ビシクロ［3.1.1］ヘプテン骨格を部分構造としてもつ。ビシクロ［3.1.1］ヘプテン骨格をもつ天然物は数多く知られているものの、その合成法は限られている。そこで本研究では、Claisen 転位を用いたビシクロ［3.1.1］ヘプテン骨格の新たな構築法の確立と、本構築法を用いた天然物合成への応用を目的として Clavigerin B の合成研究を開始した。

【方法・結果】ラセミ体のラクトンを用いて鍵反応の検討を行った。高温条件に付すことで Ireland Claisen 転位が進行し、ビシクロ［3.1.1］ヘプテン骨格をもつカルボン酸の合成に成功した。続いてヨードラクトン化、ヨウ素の脱離と異性化を経て、Clavigerin B の右側の基本骨格をもつ化合物を得た。現在、鍵反応の最適化、及び側鎖とのカップリング反応等による Clavigerin B への変換を検討中である。



sesquiterpene, organic synthesis, claisen rearrangement

講演番号：3C25p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ C 校舎 25 会場

アザジラクチンの全合成研究 -右側ジヒドロフランアセタール部を中心に-

Synthetic study of azadirachtin focused on the right hand moiety

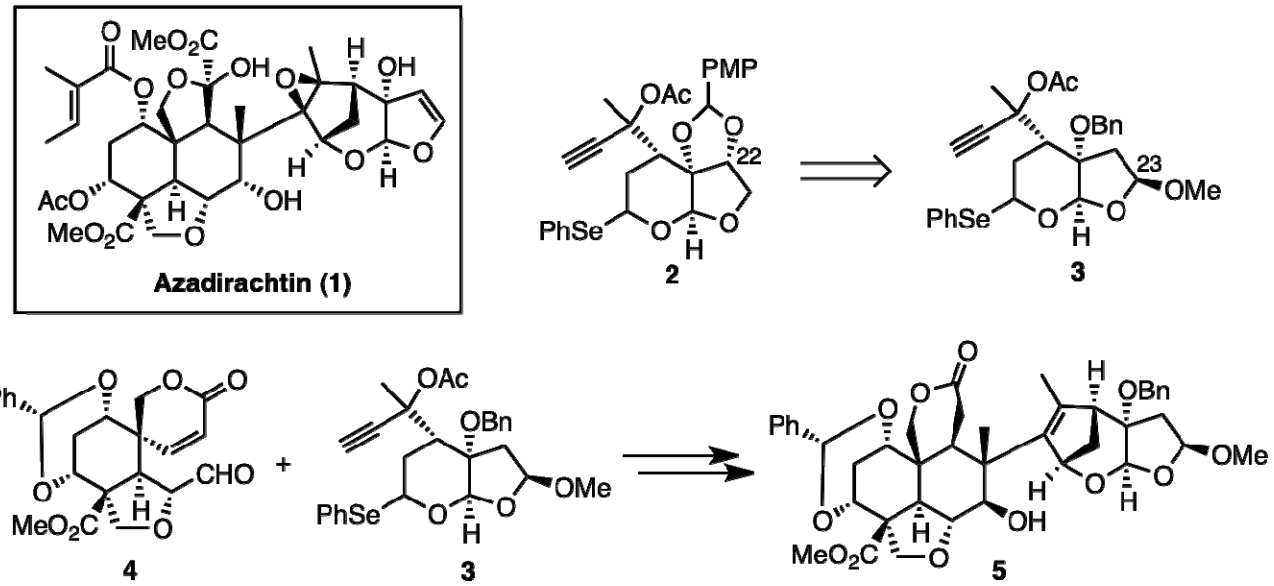
○森 直紀、石神 健、渡邉 秀典（東大院農生科・応生化）
○Naoki MORI,Ken ISHIGAMI,Hidenori WATANABE (The Univ. of Tokyo)

［目的］

アザジラクチン(1)はインドセンダンの種子より単離・構造決定されたリモノイドであり、昆虫に対する強力な摂食阻害活性および成長・変態阻害活性を有している。2007 年には Ley らによりリレー合成を駆使した本化合物の合成が報告されたが、高度に官能基化された複雑な構造ゆえ、現在においても合成例はその 1 報にとどまっている。そこで我々は、アザジラクチンの真の全合成を達成すべく研究を行っている。

［方法と結果］

これまでに我々はアザジラクチンの右側ユニットとして 2 を設定し、左右ユニットの連結および骨格構築の検討を行ってきた。その結果については 2011 年度の本大会において報告している。ところがその後の検討により、合成終盤における C22 位水酸基の脱水が困難であることが明らかとなってきたので、水酸基を C22 位から C23 位に付け替えることとした。実際に 3 を合成し、アザジラクチンの全炭素骨格を有する化合物 5 の合成まで完了したので、その詳細について報告する。



azadirachtin, limonoid, antifeedant

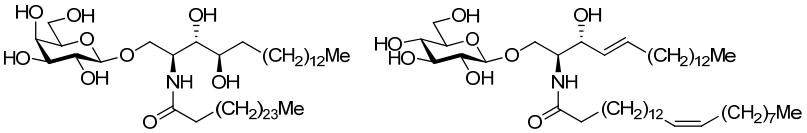
講演番号：3C25p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ C 校舎 25 会場

天然型スフィンゴ糖脂質による免疫細胞の活性化

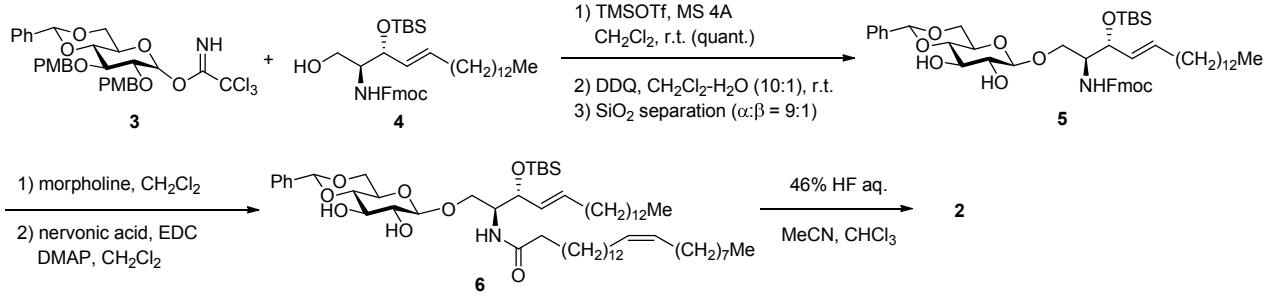
Immunostimulatory activity of natural glycosphingolipids

○田代 卓哉、汐崎 正生、重浦 智邦、渡会 浩志、谷口 克、森 謙治（理研・RCAI）
○Takuya TASHIRO, Masao SHIOZAKI, Tomokuni SHIGEURA, Hiroshi WATARAI, Masaru TANIGUCHI, Kenji MORI (RIKEN RCAI)

【目的】免疫細胞の一種であるナチュラルキラーT（NKT）細胞は、多様性の無い T 細胞受容体（TCR）を持ち、自然免疫と獲得免疫の橋渡し役を担う特異な系列の免疫細胞であり、抗原提示細胞の膜上タンパク質である CD1d とガラクトシルセラミド（GalCer）などの糖脂質との複合体を認識して活性化し、様々なサイトカインを産生する。これまで、β-体の糖脂質は NKT 細胞を活性化しないと報告されていたが、2011 年、Rossjohn らにより β-GalCer（**1**）と TCR、CD1d との三体複合体の X 線結晶構造解析が報告され(1)、さらに Brenner らによって NKT 細胞の天然型リガンドとなる糖脂質が β-GlcCer（**2**）であることが報告された(2)。我々は独自に、**1** および **2** の活性を精査することを目的として、これら糖脂質を高純度で合成することとした。



【方法と結果】以下に示す方法により、β-GlcCer（**2**）の合成を行った。**3** と **4** との反応で生じる両エピマーは PMB 基の脱保護後に分離が可能であった。HPLC によってβ-体の **5** が 99.9%以上の純度であることを確認している。我々が行った生物活性試験では、高純度の **2** は殆どサイトカイン産生を示さなかった。β-GalCer（**1**）の合成も行ったので、その生物活性についても報告する。



(1) D.G. Pellicci, et al., *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 827-833.
(2) P. Brennan et al., *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 1202-1211.

Cytokine, Glycosphingolipid, Natural Killer T cells

講演番号：3C25p17
講演日時、会場：3 月 26 日 17:12～ C 校舎 25 会場

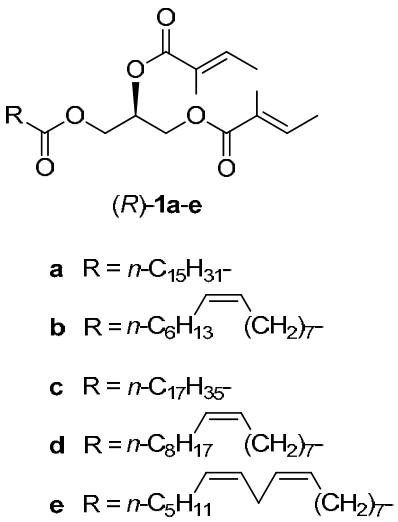
ショウジョウバエ雄中の新規トリグリセリドの両鏡像体合成

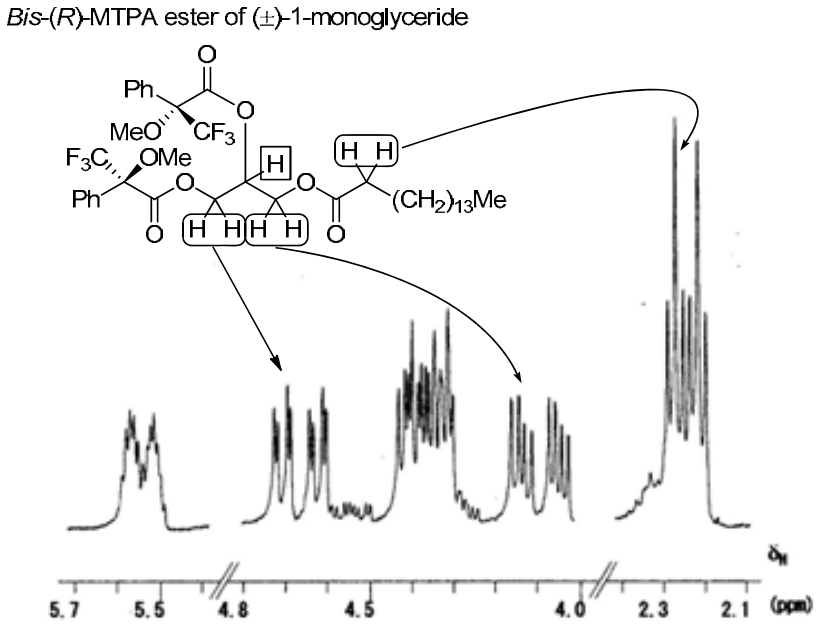
Synthesis of the enantiomers of new triglycerides of male *Drosophila* fruit flies

○森 謙治[1,2] ([1]東洋合成（株）、[2]理研)
○Kenji Mori[1,2] ([1]Toyo Gosei Co., [2]RIKEN)

【目的】ショウジョウバエ *Drosophila mojavensis* の雄から見出された新規トリグリセリド類（パルミチン酸、パルミトオレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸の 2,3-ジチグロイルオキシプロピルエステル）の両鏡像体を合成する。

【方法及び結果】上記脂肪酸と 2,3-アセトングリセロールの両鏡像体とのエステル形成及びアセトン除去により得られる 1-モノグリセリドを鏡像体的に純粋に調製する方法を見出した。その鏡像体純度はビス-Mosher エステルに誘導して ^{1}H NMR 分析に付せば決定できた。過剰量のチグリン酸クロリドで 1-モノグリセリドをエステル化してトリグリセリドとした。(K. Mori, *Tetrahedron*, 2012, *68*, 8441-8449)





Acetonide deprotection, *Drosophila* fruit flies, Enantiomeric purity determination

講演番号：3C26a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ C 校舎 26 会場

ヒト心臓由来脂肪酸結合タンパク質の脂肪酸認識機構の解明
Investigation on Molecular Recognition of Fatty Acid by Human Fatty Acid Binding Protein 3
○杉山 成[1]、廣瀬 未果[1]、松岳 大輔[1]、原 利明[1]、溝端 栄一[2]、井上 豪[2]、松岡 茂[1]、村田 道雄[1]
([1]阪大院理、[2]阪大院工)
○ Shigeru SUGIYMA[1], Mika HIROSE[1], Daisuke MATSUOKA[1], Toshiaki HARA[1], Eiichi MIZOHATA[2], Tsuyoshi INOUE[2], Shigeru MTSUOKA[1], Michio MURATA[1] ([1]Osaka Univ., [2]Osaka Univ.)

細胞の一つひとつは、外部と内部を隔てる生体膜に包まれている。この生体膜は脂質、タンパク質、少量の炭水化物が組織的に集合したものであり、脂質が形成する脂質二重層が生体膜の基本構造となっている。近年、脂質は、ただの膜の構成成分ではなく、膜の性質を左右すること、またその代謝物は生理活性物質として重要な役割をもつことがわかってきた。そのため、脂質は創薬ターゲット分子として注目され始めている。一方、脂質の機能を知るためには、生体高分子と結合した脂質リガンドの立体構造を詳細に調べることが重要であるが、一般に脂質は取り扱いが困難であることなどから、これまでに脂質リガンドの構造を分子・原子レベルで詳細に決定した例は殆どない。

我々は脂質リガンドと結合し、機能することが知られている脂肪酸結合タンパク質（fatty acid binding protein, FABP）に着目した。脂肪酸結合タンパク質は、水に難溶な脂肪酸を結合・可溶化し、脂肪酸の体内動態を制御する[1]。FABP は長鎖脂肪酸を特異的に認識するが、一方で、鎖長、不飽和度の異なる脂肪酸を、比較的高い親和性で認識することができる[2]。FABP のあいまいな分子認識は、厳密な特異性を示す酵素－基質間の分子認識とは異なっていると考えられており、その認識機構の詳細に興味が持たれる。特に、フレキシブルなアルキル鎖を認識する機構については不明な点が多い。

FABP に結合した脂肪酸の多くは U 字型に折り曲がった状態で存在しており、炭素数 12 以上 20 までの脂肪酸と結合することが知られている。しかし、これまでに構造解析がなされているのは、炭素数 18 の脂肪酸のみであり、その立体構造も原子レベルで詳細に決定されたものは殆どない。また、脂肪酸の炭素数が異なったものについては、ほとんど知見が得られていない。今回、ヒト心臓由来 FABP（FABP3）を大腸菌発現系により調製し、FABP3 の脂肪酸解離型および炭素数の異なった脂質リガンドとの複合体結晶およびその詳細な立体構造解析を試みた。しかし、この FABP3 の脂肪酸解離型を得ることは困難であった。その理由は、もともと発現系に存在する長さの異なる多種類の脂肪酸が FABP3 に結合した状態で発現しており、それらを FABP3 から取り除くことが非常に困難であったことが原因である。今回、この困難を克服し FABP3 脂肪酸解離型の作製法を確立したので報告する。また、このことによって多種多様な脂質リガンドと FABP3 との複合体の 0.9 Å 分解能を超える超高分解能Ｘ線構造解析にも成功し、精密な構造解析から脂肪酸認識機構について新しい知見を得たので報告する。
[1]*Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 1096-1116, [2]*Mol. Cell. Biochem.*, **2002**, *239*, 45-54

Fatty acid binding protein, Long-chain fatty acid, Crystal structure

講演番号：3C26a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ C 校舎 26 会場

HDL 形成における ABCA1 の細胞外ドメインの役割の解析

Functional analysis of the extracellular domains of ABCA1 in HDL generation

○石神 正登[1]、長尾 耕治郎[2]、植田 和光[1,3]([1]京大院・農、[2]徳島大院・ヘルスバイオサイエンス、[3]京大 iCeMS)
○Masato ISHIGAMI[1], Kohjiro NAGAO[2], Kazumitsu UEDA[1,3] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Inst. of Health Biosciences, Univ. of Tokushima, [3]iCeMS, Kyoto Univ.)

＜背景・目的＞

ABCA1 は、善玉コレステロールと呼ばれる高密度リポタンパク質（HDL）の形成の鍵を握るトランスポーターであり、末梢細胞の過剰なコレステロールを肝臓に逆輸送し、動脈硬化を防ぐ重要な役割を担っている。ABCA1 は ABC 蛋白質ファミリーに属し、12 の膜貫通ドメイン、2 つの細胞内 ATP 結合ドメインと 2 つの大きな細胞外ループドメインからなる。HDL 形成時には、血漿中のアポリポタンパク質 apoA-I が、ABCA1 の細胞外ドメインにまず結合し、ABCA1 からコレステロールとリン脂質を受け取って、HDL 複合体を形成すると我々は提唱している。また、apoA-I が ABCA1 の細胞外ドメインに結合するためには、ABCA1 の ATP 加水分解活性に依存した細胞外ドメインの構造変化が必要であることをこれまでに報告した(1)。しかし、ABCA1 の細胞外ドメインがどのような機構で構造変化を起こすのかはいまだ不明である。本研究では、「ABCA1 の細胞外ドメインの内部に、ABCA1 によって輸送されたコレステロールが蓄積することで、細胞外ドメインの構造が変化する」という仮説をたて、それを検証することを目的とした。

＜方法・結果＞

ABCA1 誘導発現系 BHK 細胞の細胞膜上の ABCA1 の細胞外ドメインをトリプシンによって切断することで、培地中のコレステロール量が増加するかどうかを検討した。まず、トリプシン処理後の細胞を溶解し、抗 ABCA1 抗体を用いたウェスタンブロットを行ったところ、トリプシン濃度および処理時間依存的に、ABCA1 が切断されて生じるペプチド断片が増加した。ペプチド断片のサイズは、ABCA1 の細胞外ドメインが切断された場合に生じる断片の予想サイズとおおよそ一致していた。続いて、ABCA1 発現細胞をトリプシン処理後、培地中の脂質成分を抽出しコレステロール量を測定したところ、トリプシン濃度および処理時間依存的にコレステロール量が増加した。一方、ABCA1 と同様にコレステロール排出能をもつが、大きな細胞外ドメインをもたない ABCG1 を発現した細胞に同様のトリプシン処理を行ったところ、培地中のコレステロール量の増加はみられなかった。以上の結果から、ABCA1 の細胞外ドメインにはコレステロールが蓄積していることが示唆された。

(1) Nagao, K. et al. J. Lipid Res. 53, 126-136 (2012)

ABCA1, cholesterol, transporter

講演番号：3C26a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ C 校舎 26 会場

原始腹足類の卵巣から見出された新規な奇数鎖ジエン酸の位置異性体

Novel odd-chain dienoic fatty acid isomers in ovaries of archaeogastropods

○川島 英城（岩手県立大学宮古短大部）
○Hideki Kawashima (Iwate Pref. Univ.)

【目的】原始腹足類のグループに分類されているカサガイ類は雌雄異体の巻貝である。これらの卵巣の主要な脂質クラスは、トリアシルグリセロール（TAG）及びリン脂質（PL）から構成されている。原始腹足類における性差の視点から、これまでに、主に TAG に特異的で多様な新規異性体を持つ多価不飽和脂肪酸の構造とその組成を明らかにしてきた。今回は TAG 及び PL の両クラスに存在する新規な奇数鎖ジエン酸を見出したので、その結果について報告する。
【方法】常法に従って、カサガイ類の卵巣から主要脂質クラスごとに分別後、TAG 及び PL から構成脂肪酸メチルエステル(FAME)を調製し、さらに分取用硝酸銀薄層プレートによりそれぞれの不飽和度に応じて FAME の分画を行った。得られた画分を Pyrrolidide 及び 3-Pyridylcarbinol Ester 誘導体に調製後、GC-MS を用いてこれら誘導体の構造解析を行った。なお、今回分析対象になったジエン酸の分枝鎖の有無は GC-MS の解析結果や接触還元法を用いて、最終的に決定した。
【結果】潮間帯に広く分布する優占種 2 種類のカサガイ類の卵巣から、直鎖の炭素数 23 を有する 7 種類のジエン酸異性体が検出され、これらは全て Non-Methylene-Interrupted Fatty Acid（NMIFA）であった。（二重結合同士の間に 2 個以上のメチレン基が介在する脂肪酸群）この中で、23:2Δ5,9 は既に海綿や腹足類を含む軟体動物から報告されている。しかし、未同定を含む他の 5 種類は今回同定された NMIFA は新規な不飽和脂肪酸群（23:2Δ8,14, 23:2Δ9,15, 23:2Δ7,18, 23:2Δ9,18, 23:2Δ9,20）であった。本研究の結果から、原始腹足類の卵巣には偶数鎖だけでなく、奇数鎖を持つジエン酸も、同様に多様な位置異性体が存在していることが明らかになった。さらに、これらのジエン酸の生合成経路の推定についても考察した。

archaeogastropod, fatty acid isomer, ovary

講演番号：3C26a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ C 校舎 26 会場

藻類が持つ脂肪酸の二重結合位置の網羅的な決定方法の検討

Comprehensive analysis of double bond positions in fatty acids of algae

○桜井 健太、佐藤 直樹（東京大院総）
○Kenta SAKURAI,Naoki SATO (Tokyo Univ)

藻類の脂質は光合成や生育温度変化への適応との関連から古くから研究されている。近年、分析機器の進歩により、これまで存在は認められているが完全な同定はされていない微量な脂肪酸についても構造決定できるようになった。また、藻類においてゲノム情報に基づいて同定された脂質代謝関連遺伝子の構成から脂質代謝経路が予想され、主な脂肪酸の生合成経路が説明されており、これら微量な脂肪酸の生合成経路も理解できるかどうかに興味が持たれる。そのため藻類の脂肪酸をマイナーなものも含めて検出し、二重結合位置を網羅的に決定することが必要である。本研究では藻類の脂肪酸の二重結合位置を網羅的に決定する方法を検討した。

脂肪酸の二重結合位置の決定方法であるピロリダイド法、二硫化ジメチル付加法、ヒドロキシル化－TMS 化法により脂肪酸の標準品を分析した結果、二重結合が 2 個以上の脂肪酸や複数の脂肪酸が混在する場合にはヒドロキシル化－TMS 化法が適していた。ヒドロキシル化－TMS 化法では TMS が付加した部位で開裂したフラグメントイオン群のマススペクトルを検出する。ジエン酸やトリエン酸ではこれらのフラグメントイオンに加えて TMSOH を失ったフラグメントイオンも検出される。そのため、検出されたフラグメントイオンすべての組み合わせから二重結合位置を推定する必要がある。本研究では、より客観的な判定を行うために、得られたフラグメントイオンの組み合わせとピーク強度から二重結合位置を推定するプログラムを開発し、DBpos と名付けた。

次にヒドロキシル化－TMS 化法と DBpos を組み合わせて様々な脂肪酸が混在しているサンプルの解析を試みた。実験には脂肪酸の解析例が多いシアノバクテリアや緑藻を用いた。培養液から細胞を回収し、Bligh-Dyer 法により脂質を抽出した。この脂質を塩化水素／メタノールを用いてメチル化し、さらに薄層クロマトグラフィーにより色素類を分離、除去した。得られた脂肪酸メチルエステルを硝酸銀添加薄層クロマトグラフィーにより二重結合数ごとに分画し実験に用いた。報告されている脂肪酸に加えて、18:2(11,14)を始めとした新たな脂肪酸も検出され、本方法が応用できることがわかった。18:2(11,14)は有機合成されていたが、天然由来の報告はない。この前駆体と考えられる 18:1(11)は高等植物から細菌まで広く分布するが、不飽和化されないと考えられていた。このように既知の経路だけでは説明できない脂質代謝経路の存在が示唆された。

algae, fatty acid, double bond position

講演番号：3C26a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ C 校舎 26 会場

天然物や食品中の PE プラズマローゲンの HPLC 定量法の比較検討

Comparative study of quantitative HPLC methods for PE plasmalogen in natural products and foods

○浅野 良緒、山下 慎司、串田 康子、阿部 彰宏、藤田 星子、木村 ふみ子、仲川 清隆、宮澤 陽夫 (東北大院農・機能分子解析)
○Yoshio Asano, Sinnji Yamashita, Yasuko Kushida, Akihiro Abe, Seiko Fujita, Fumiko Kimura, Kiyotaka Nakagawa, Teruo Miyazawa (Grad. Sch. Agri. Sci. Tohoku Univ.)

【背景と目的】プラズマローゲンは、グリセロール骨格の *sn*-1 位に長鎖アルコールがビニルエーテル結合したリン脂質である。ヒトの脳には、ホスファチジルエタノールアミン型プラズマローゲン (PE-Pls) として脳乾燥重量の約 6%が存在する。しかし、健常脳に比べて、Alzheimer 病脳のプラズマローゲン濃度が約 30%少ないことが知られている (1)。我々の研究により、プラズマローゲンには、ストレス暴露による神経細胞のアポトーシス誘導を防ぐ作用のあることがわかっており、Alzheimer 病の発症予防因子として大きな関心が持たれている (2)。プラズマローゲンの定量法には、様々な手法が開発され使用されているが、それぞれに長所と短所があり、これらをよく理解した上で研究を進める必要がある。そこで、本研究では、天然物や食品中の PE プラズマローゲン各種定量法の長所と短所を比較検討した。
【方法】①ジアシル型 PE と PE プラズマローゲンのリン酸エタノールアミン残基を、ホスホリパーゼ C で除去し、アセチル化し、アセチルジアシルグリセロールとアセチルアルケニルアシルグリセロールとして、それぞれ HPLC-ELSD 法で間接定量した。②PE プラズマローゲンの *sn*-1 位のビニルエーテル部分を酸分解し、Silica カラムの HPLC-ELSD に供した。酸分解前のジアシル型 PE と PE プラズマローゲンの合計クロマト面積から、酸分解後のジアシル型 PE の面積を減算し、PE プラズマローゲン量を間接定量した。③LC-MS/MS で、PE プラズマローゲン親イオンと *sn*-2 位の脂肪酸のフラグメントイオンを MRM で組み、PE プラズマローゲンを直接定量した。
【結果と考察】①ホスホリパーゼ C を用いた方法は、アセチル化体の HPLC の分離能が良い点が長所であったが、前処理が煩雑である点が短所であった。②PE プラズマローゲンの *sn*-1 位の酸分解法は、ホスホリパーゼ C を用いた方法より前処理が簡便であったが、ジアシル型 PE も分解されていたので、PE プラズマローゲンの *sn*-1 位の酸分解反応の再検討が必要であった。③LC-MS/MS 法は、PE プラズマローゲンを微量（10 fmol）で直接定量できる点が長所であった。以上より、ホスホリパーゼ C を用いた方法とプラズマローゲン *sn*-1 位の酸分解法は、高価な分析機器を必要としない点において簡便な分析法として有用であったが、一方で、LC-MS/MS 法は微量で高選択性があり直接定量できる点において優れていたので、今後の分析法においては LC-MS/MS 法が最も信頼性が高く有効と認められた。

(1) L. Ginsberg. et al., *Brain Res.* , 698, 223-6, 1995
(2)宮澤陽夫, *日本水産学会誌*, 75, 309-311, 2009

Plasmalogen, hplc-elsd, lc-ms/ms

講演番号：3C26a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ C 校舎 26 会場

リンゴ果実ワックスの分布とクチクラ膜の力学的性質への寄与

Function of cuticular wax of *Malus domestica* cv. fuji fruits

○松村 由貴[1]、椿 俊太郎[2]、本田 与一[1]、宇山 浩[3]、東 順一[3] ([1]京大院農、[2]高知大総研、[3]阪大院工)
○ Yuki MATSUMURA[1], Syuntaro TSUBAKI[2], Yoichi HONDA[1], Hiroshi UYAMA[3], Jun-ichi AZUMA[3] ([1]Kyoto Univ., [2]Kochi Univ., [3]Osaka Univ.)

【目的】

植物の表層は、クチクラ膜と呼ばれる脂質性の高い膜に覆われており、耐候性を付与するとともに、水分損失や病原菌の侵入を防ぐために重要な組織である。主に果実では、貯蔵性や棚もち性など、品質を維持する役割も果たしている。クチクラ膜は、一般的に表皮ワックス、クチン、クチン骨格内に存在する内部ワックス、多糖類および難分解性のクタンから成る。

昨年度の本学会では、ふじリンゴ（*Malus domestica* cv. fuji）のクチクラ膜の成長に伴う化学的、力学的性質の変化について報告した。本研究では、ふじリンゴ果実の成長に伴うワックスの蓄積と分布およびクチクラ膜中での機能について研究を行った。

【方法】

2011～2012 年にかけて、長野県で栽培されたふじリンゴ果実を、開花後から 1 カ月ごとに採取した。表皮ワックスはリンゴ生果から物理的な方法を用いて採取し、LV-SEM によりその効果を確認した。また、ペクチナーゼおよびセルラーゼで酵素処理してクチクラ膜を単離した。さらに、ATR 法による FT-IR 分析、GC-MS によるワックス・クチンモノマー分析を行うとともに、X 線回折および引張試験等を行った。

【結果】

リンゴクチクラ膜表層の表皮ワックスはアルカン(主に $C_{29}H_{60}$)、アルコール(主に C_{29}-10-ol)などで構成されており、果実の成長に依存して増加し続けた。一方、クチクラ膜中のワックスはオレアノール酸やウルソール酸などの 5 環系トリテルペノイドが主成分であった。5 環系トリテルペノイドはクチクラ膜内部に限定して存在していることが示された。また、ATR 分析の結果、クチクラ内部においてもワックス成分に表面に向かって濃度勾配が存在することも明らかになった。現在、ワックスの蓄積過程について調べている。一方、クチンモノマーの変化は成長の初期に限定されており、成熟に伴う目立った変化は観察されなかった。引張試験においては、脱ワックスクチクラ膜では破断強度と弾性係数の減少およびひずみの増大が見られたことから、ワックスはクチクラ膜中でフィラーとしての役割を担っていることが示唆された。

Malus domestica, cuticular membrane, mechanical property

講演番号：3C26a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ C 校舎 26 会場

ウメ果実の外果皮の特性評価

Characterization of epicarp of Japanese apricot fruits

○東 順一[1]、大江 孝明[2]、金山 裕亮[3]、宇山 浩[1] ([1]阪大院工、[2]和歌山ウメ研、[3]株サンアクティス)
○Junichi Azuma[1], Takaaki Oe[2], Hiroaki Kanayama[3], Hiroshi Uyama[1] ([1]Osaka Univ., [2]Ume Ins., [3]Sunactis Co.)

【目的】
果実の果皮は、見た目・保存性・棚持ち性等商品としての品質の決定因子となっていると同時に、機能性成分を有しており、重要である。また、果肉を食するに伴い多量の果皮バイオマスを発生しているので、その有効利用も求められている。そこで、昨年までは柿の果実表層のクチクラ膜についてその化学的・力学的性質について研究を進めてきたが、本研究では、ウメ果実の外果皮に注目し、その特性評価を試みたので報告する。
【方法】
和歌山県産の南高を含む13品種の平成24年度産成熟ウメ果実を選択し、剥皮して外果皮を調製し、その特性を比較検討した。また、南高については開花後50日目から10日毎に果実を採取し、生育に伴う外果皮の特性評価を行った。
【結果】
南高の外果皮は、開花後50日目の直径約2cmの幼若時よりシグモイド状に生育して、110日目の直径約4cmの成熟時に至るまで膜状物質として単離することができた。しかし、カキやリンゴのようにSudanIIIで明瞭に染色される厚いクチクラ膜は存在せず、表層の極薄い領域のみが染色され、毛状突起に覆われている。外果皮の存在量は6-7%（乾燥状態）であった。また、外果皮中のポリフェノールの含量は約1%で推移し、生育に伴う変化は小さかった。量的には外果皮：中果皮（果肉）：内果皮（核部）について約１：２：２であった。また、HPLC分析によるポリフェノールの組成についても、生育に伴う変化は小さく、内果皮よりも果肉と似かよっていた。
一方、他の成熟した12品種のウメ果実については、小梅系のウメでは他のウメよりも外果皮の占める割合が10-16%（乾燥状態）と高かった。青梅系統では黄色から赤色に着色する系統よりも、外果皮は薄い。また、ポリフェノール含量は着色と関係し、組成と合わせて品種依存性が高く、果肉における場合のように品種・系統の識別への利用が示唆された。その他の顕微鏡観察、化学成分分析と引張試験の結果を総合すると、ウメの果実外果皮はカキやリンゴと比較して、ワックス成分、クチン成分が少なく、セルロース系多糖に富み、乾燥状態で柔軟性に乏しく、痛み易いと結論された。本研究の結果は、今後のウメ果皮の利用等に資すると考えられる。

Japanese apricot, epicarp, characterization

講演番号：3C26a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ C 校舎 26 会場

エイコサペンタエン酸存在下における低温誘導性ポーリンタンパク質の構造と膜透過活性の解析
Analysis of structure and membrane transport activity of a cold-inducible porin in the presence of eicosapentaenoic acid

○水谷 彩乃[1]、代 先祝[1]、川本 純[1]、佐藤 智[2]、江崎 信芳[1]、栗原 達夫[1] ([1]京大化研、[2]京大 LTM センター)
○Ayano MIZUTANI[1], Xian-Zhu DAI[1], Jun KAWAMOTO[1], Satoshi SATO[2], Nobuyoshi ESAKI[1], Tatsuo KURIHARA[1] ([1]Inst. for Chem. Res., Kyoto Univ., [2]Res. Ce nt. Low Temp. Mat. Sci., Kyoto Univ.)

【目的】長鎖高度不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) はリン脂質のアシル鎖として動物や海洋性低温細菌の生体膜で機能しており、近年、機能性脂肪酸として健康食品への利用が注目されている。過去の研究より、南極海水由来の低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 においては、EPA の欠損によって低温誘導性ポーリン (Omp74) のフォールディング状態が変化することが分かった。この結果は、生体膜に含まれる EPA 含有リン脂質が、特定の膜タンパク質の低温での構造形成や機能発現に重要な役割を担っていることを示唆しているが、EPA 含有リン脂質と膜タンパク質の相互作用機構の詳細は不明である。本研究では、人工膜に再構築した Omp74 の構造や膜透過活性に対する EPA 含有リン脂質の影響を解析した。
【方法・結果】本菌の細胞膜に最も多く存在するパルミトレイン酸を有するホスファチジルエタノールアミン (PE) とホスファチジルグリセロール (PG)、および *sn*-2 位に EPA を導入した PE、PG から成るリポソームを作製した。精製した Omp74 をリポソームに再構築した結果、EPA は Omp74 のフォールディングを促進させることがわかった。Omp74 とリポソームを 18˚C で 72 時間静置し、トリプトファン蛍光スペクトル解析を行った。その結果、EPA 存在下で Omp74 のトリプトファンの蛍光強度が減少したことから、Omp74 は EPA含有リン脂質に依存してトリプトファン残基周辺の pH 環境を変化させるものと考えられた。また、Omp74 を再構成したリポソームを用いて Omp74 の膜透過活性を解析した結果、Omp74 はアラビノースの膜透過活性をもつことが示され、ポーリンとして機能することがわかった。Omp74 の膜透過活性に対する EPA 含有リン脂質の影響を解析するために、Omp74 を介して様々な分子量のポリエチレングリコールを透過させた。その結果、EPA の有無は Omp74 の膜透過活性に影響しなかった。以上の結果から、EPA の有無は、Omp74 の膜孔形成とは関連しないドメインの構造変化に影響することが示唆された。

eicosapentaenoic acid, outer membrane porin, psychrotroph

講演番号：3C26a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ C 校舎 26 会場

エイコサペンタエン酸生合成遺伝子破壊が低温菌外膜タンパク質の生合成におよぼす影響
Effects of disruption of eicosapentaenoic acid-biosynthesis gene on the production of an outer membrane protein in a psychrotrophic bacterium
○杉浦 美和、朴 貞河、代 先祝、川本 純、江崎 信芳、栗原 達夫（京大化研）
○Miwa SUGIURA,Jungha PARK,Xian-Zhu DAI,Jun KAWAMOTO,Nobuyoshi ESAKI,Tatsuo KURIHARA (Kyoto Univ.)

【目的】低温域や深海など極限環境に生育する海洋性細菌は，高度不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸やエイコサペンタエン酸 (EPA) を生産する。南極海水より単離された低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は、低温誘導的に EPA 含有リン脂質を生産する。本菌の EPA 生合成遺伝子破壊株 (ΔEPA) は、低温での生育速度が低下したことから、EPA は本菌の低温環境適応に重要であることが示された。さらに、外膜タンパク質 Omp417 の生産量が、ΔEPA で顕著に低下することがわかった。このことから EPA と Omp417 の相互作用の存在が示唆された。本研究では、Omp417 の生産における EPA の生理的役割の解明を目的とし、Omp417 のフォールディングに EPA 含有リン脂質がおよぼす影響や、Omp417 の遺伝子発現における EPA の生理的役割を解析した。
【方法・結果】リン脂質二重膜での Omp417 のフォールディングにおける EPA 含有リン脂質の影響を解析するため、*in vitro* 再構成実験を行った。*omp417* の過剰発現用ベクターを構築し、Omp417 を封入体の形で発現させ、尿素を用いて可溶化した。*sn*-1 位にパルミトレイン酸、*sn*-2 位に EPA を含むリン脂質と、パルミトレイン酸のみをアシル鎖とする EPA 非含有リン脂質を合成し、リポソームを作製した。リポソームと混合した Omp417 の Trp 蛍光の経時的な測定と、CD スペクトルの測定によってフォールディング状態を解析した。その結果、Omp417 の二次構造形成や Trp 残基周辺環境は EPA 含有リン脂質の有無によって有意に変化しないことが示された。一方、野生株と ΔEPA における *omp417* と他の外膜ポーリンタンパク質 *omp74* 及び *omp176* の転写量を、リアルタイム RT-PCR によって解析した。その結果、EPA の欠損は *omp74* 及び *omp176* の転写量に影響しなかった。一方、ΔEPA における *omp417* の転写量は、野生株の 100 分の 1 以下に抑制されていることがわかった。しかし、ΔEPA に EPA を外部添加しても、*omp417* の転写量は回復されなかった。以上の結果から、本菌には EPA 生合成遺伝子の有無に依存した *omp417* の発現調節機構が存在すると考えられた。外部添加した EPA は、ΔEPA における *omp417* の転写量の低下を抑制できなかったことから、*omp417* の発現は EPA そのものではなく、EPA の生合成酵素、あるいは生合成中間体によって調節されることが示唆された。

eicosapentaenoic acid, outer membrane protein, transcriptional regulation

講演番号：3C26a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ C 校舎 26 会場

エイコサペンタエン酸の細胞内挙動解析を目的としたω-エチニル型脂肪酸の合成

Synthesis of omega-ethynyl fatty acid to analyze the intracellular behavior of eicosapentaenoic acid

○森本 亮平[1]、川本 純[2]、上野 源次郎[3]、佐藤 翔[4]、江崎 信芳[5]、栗原 達夫[6]（[1]京大化研、[2]京大化研、[3]京大化研、[4]京大化研、[5]京大化研、[6]京大化研）
○ Ryouhei MORIMOTO[1], Jun KAWAMOTO[2], Genjirou UENO[3], Syou SATOU[4], Nobuyoshi ESAKI[5], Tatsuo KURIHARA[6] ([1]Kyoto Univ. Inst. for Chem. Res., [2]Kyoto Univ. Inst. for Chem. Res., [3]Kyoto Univ. Inst. for Chem. Res., [4]Kyoto Univ. Inst. for Chem. Res., [5]Kyoto Univ. Inst. for Chem. Res., [6]Inst. for Chem. Res.)

【目的】近年、心疾患や高脂血症などの生活習慣病に対する関心が高まる中、エイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸（DHA）などの長鎖高度不飽和脂肪酸が有する効能が大きな注目を集めている。南極海水より単離された低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は EPA を *sn*-2 位にもつリン脂質を低温誘導的に生合成する。本菌の EPA 生合成系に必須の遺伝子を破壊した EPA 欠損株では、低温での細胞形態異常や細胞分裂の停滞が確認された。これらの細胞異常は EPA を外部から添加することで抑制されたことから、本菌の低温での生育に EPA が重要な生理機能を担っていると考えられるが、その詳細な分子機構は明らかでない。本研究では、化学合成プローブを用いて *S. livingstonensis* Ac10 の細胞における EPA の局在と挙動を明らかにすることを目的とし、ω位にエチニル基を有する不飽和脂肪酸合成法の確立と脂肪酸研究のモデル微生物である *S. livingstonensis* Ac10 への応用を試みた。 エチニル基は炭素数 2 の非極性官能基であり、生体直交性に優れ、他の細胞由来成分と重複しない特徴的なラマンスペクトルを有することから、ラマン顕微鏡による生体膜、および人工膜におけるω-エチニル型不飽和脂肪酸の挙動解析を試みた。
【方法】ω-エチニル基を有するオレイン酸（cOLA）を合成した。*sn*-1 位にパルミトレイン酸を、*sn*-2 位に cOLA を持つホスファチジルエタノールアミン（PE）を合成し、ジャイアントリポソームを調製した。また、cOLA を添加した液体培地で *S. livingstonensis* Ac10 を培養し、リン脂質組成を解析した。
【結果と考察】*sn*-2 位に cOLA を導入した PE を用い、直径 50 μm 程度のジャイアントリポソームの生成条件を確立した。また、cOLA 存在下で生育した *S. livingstonensis* Ac10 のリン脂質中に、cOLA を持つ PE とホスファチジルグリセロール（PG）が検出された。以上の結果から、ω位にエチニル基を有する非天然型脂肪酸は正常に菌体に取り込まれ、各種リン脂質の形で安定な脂質二重層を形成することが示された。このことより、ω-エチニル型脂肪酸がラマン顕微鏡法における有効なプローブ分子として機能することが示唆された。

polyunsaturated fatty acid, psychrophilic bacteria, bioorthogonal tag

講演番号：3C26a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ C 校舎 26 会場

ω-エチニル型脂肪酸を用いたエイコサペンタエン酸修飾タンパク質の探索
Probing proteins modified with eicosapentaenoic acid by using ω-ethynyl fatty acid
○河合 総一郎、佐藤 翔、川本 純、江崎 信芳、栗原 達夫（京都大学化学研究所）
○Soichiro KAWAI,Sho Sato,Jun Kawamoto,Nobuyoshi Esaki,Tatuo Kurihara (Kyoto Univ. Inst. for Chem. Res.)

【目的】南極海水より単離された低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 (Ac10) は 4℃で高度不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン (EPA) を合成する。EPA 生合成遺伝子を欠損させた EPA 欠損株 (ΔEPA) は、低温での生育速度が低下したことから、Ac10 の低温での生育には EPA が重要な役割を担っていることが示唆された。本菌の低温環境適応機構における EPA の生理機能を明らかにするために、EPA によって特異的に修飾されるタンパク質の探索を試みた。
【方法】生体内においても極めて高い官能基選択性でヒュスゲン環化付加反応することが知られているアジドとアルキンによるクリックケミストリーを利用するため、脂肪酸のメチル末端にエチニル基を導入した EPA (cEPA) を合成し、ΔEPA および野生株に添加することで、ΔEPA の生育速度への影響を解析した。EPA で修飾されるタンパク質を探索するために、cEPA を含む培地で培養した ΔEPA に、アジドクマリン、もしくはアジドビオチンを添加し、ヒュスゲン環化付加反応により細胞内に取り込まれた cEPA を標識した。cEPA を介して蛍光標識されたタンパク質は SDS-PAGE と蛍光画像解析で検出した。cEPA を介してビオチン標識されたタンパク質はストレプトアビジン結合ビーズを用いてアフィニティー精製し、同定した。対照として、メチル末端にエチニル基を付加したオレイン酸 (cOLA) を用いた。cEPA 特異的に修飾されるタンパク質については、His タグ融合タンパク質発現ベクターを構築し、野生株および ΔEPA に導入した。
【結果と考察】cEPA を含む培地で ΔEPA を培養した結果、EPA の欠損による生育速度の低下は抑制されたことから、メチル末端にエチニル基を有する cEPA は、本菌において天然型の EPA と同様に機能することがわかった。cEPA を介してアジドクマリンによって蛍光標識されたタンパク質、およびビオチン標識されたタンパク質の解析から、大腸菌の Dipeptidyl carboxypeptidase (Dcp) のホモログが cEPA 特異的に修飾されることがわかった。His タグ融合型 *dcp* 高発現ベクターを Ac10 および ΔEPA に導入し、4°C で培養した両株から His タグ融合型 Dcp を精製した。

psychrophilic bacteria, eicosapentaenoic acid, click chemistry

講演番号：3C26a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ C 校舎 26 会場

ストレス下における分子シャペロン DnaK2（Hsp70）の機能と脂質・生体膜との相互作用
Role of DnaK2(Hsp70) under stress and interaction of DnaK (Hsp70) with lipids and membrane

○仲本 準[1]、Huq Saaimatul[1]、末岡 啓吾[1]、粟井 光一郎[2]、Varvasovszki Viktoria[3]、Glatz Attila[3]、Torok Zsolt[3]、Pilbat Ana Maria[3]、Horvath Ibolya[3]、Vigh Laszlo[3]（[1]埼玉大院理工、[2]静岡大若手、[3]Biol. Res. Ctr.）
○Hitoshi Nakamoto[1], Saaimatul Huq[1], Keigo Sueoka[1], Koichiro Awai[2], Viktoria Varvasovszki[3], Attila Glatz[3], Zsolt Torok[3], Ana Maria Pilbat[3], Ibolya Horvath[3], Laszlo Vigh[3] ([1]Saitama Univ., [2]Shizuoka Univ., [3]Biol. Res. Ctr.)

分子シャペロンは、「他のタンパク質の構造形成を助けるが、自らはその最終成分にならないタンパク質」と定義されている。従って、分子シャペロンはタンパク質とのみ相互作用すると一般的に考えられている。しかし、1990 年代後半になって、本共著者の László Vigh らは、大腸菌の GroEL (Hsp60) が人工脂質膜と「直接」相互作用し、その物性を変化させることを初めて明らかにした。さらに、低分子量 Hsp も膜と直接相互作用しその物性（秩序性、流動性等）を変化させること、さらにこの物性の変化により非二重膜形成が抑制されて（天然の構造である脂質二重層が維持されて)、生体膜構造の高温ストレス下における崩壊を防ぐことなどを明らかにした。本発表では、低分子量 Hsp や Hsp60 と同様に、進化的に高度に保存されている DnaK（Hsp70）と脂質・膜との相互作用とその生理的重要性を明らかにすることを目的とした。

DnaK は Hsp70 ファミリーの原核生物メンバーで、非天然タンパク質と一時的に相互作用し、補助因子である DnaJ や GrpE と共にタンパク質の折りたたみを助ける。シアノバクテリア（藍藻）には、複数種の DnaK や DnaJ が存在し、其々が異なる発現調節を受けることが知られている。本実験で用いた *Synechocystis* sp. PCC 6803 株においては、DnaK2 と DnaJ2 ホモログがストレスで誘導される。

我々は、DnaK2 の大部分は細胞の可溶性画分に存在するが、その一部がチラコイド膜画分にも存在することを明らかにした。DnaK2 の細胞機能を明らかにするためにその遺伝子破壊株を構築したところ、シアノバクテリアが保持する複数のゲノムコピーのうちの一部のみにおいて *dnaK2* 遺伝子が破壊されていた。これは、この遺伝子が必須の働きをすることを示唆するものである。この変異株における DnaK2 タンパク質蓄積量は減少しており、変異株は高温や UVB（照射）ストレスに対して感受性であった。変異株から単離したチラコイド膜の物理化学的性質が変化していたので、精製した DnaK2 と種々の脂質との相互作用を解析したところ、DnaK2 が特定の脂質と直接相互作用することが明らかになった。

Molecular chaperone, Hsp70, UVB stress

講演番号：3C26a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ C 校舎 26 会場

サルモネラ菌 LPS の糖鎖構造と荷電置換基の解析および φX174 スパイクタンパク質との親和性マッピング

Structural analysis of *Salmonella* LPS with charged substituents affinity mapping with spike protein of φX174

○篠田 佑里恵[1]、内田 智子[1,2]、小島 久毅[1,2]、稲垣 穣[1]（[1]三重大学生物資源学研究科・生理活性化学研究室、[2]株式会社日本点眼薬研究所）
○ Yurie Shinoda[1], Satoko Uchida[1,2], Hisaki Kojima[1,2], Minoru Inagaki[1] ([1]Laboratory of Biofunctional Chemistry, Department of Life Science, Faculty of Bioresorces, Mie University, [2]R&D Department, Pharmaceutical Research Division, Nitten Pharmaceutical Co.Ltd.)

【背景・目的】バクテリオファージ φX174 は、宿主細菌のリポ多糖（LPS ; Fig.1）をスパイクタンパク質で認識し、宿主選択を行っている。LPS は両親媒性物質であり、糖鎖構造とそれに結合する置換基（リン酸やエタノールアミン残基）にバリエーションが存在することから、化学的不均一性を持つ特徴がある。このときの多様な置換基がウイルスの宿主選択性に重要であると考え、サルモネラ菌の各種菌株から得られた LPS の糖鎖の構造と置換基の数についての解析を行い、それらの糖鎖とスパイクタンパク質との親和性を個々に評価するマッピングを行った。
【方法・結果】数種類のサルモネラ菌から糖鎖構造の異なる LPS を抽出し、アルカリ加水分解により *O,N*-脱アシル LPS(deON 体)を、また、弱酸加水分解により PS 体を調製した。これら糖鎖を、4 級アミンを持つ陰イオン交換カラムを用いた HPLC により分析した。さらに ESI-IT-MS によりこれらの分離ピークの分子種を同定した。次に、糖鎖誘導体とスパイクタンパク質を混合して結合させた後、遠心限外濾過によりタンパク質と結合しなかった糖鎖を含む画分を、HPLC で分析・定量した。その結果、タンパク質の濃度に依存してピーク強度が減少した(Fig.2)。ピーク強度の減少率とタンパク質濃度の関係から、50 %結合濃度を算出したところ、スパイク G タンパク質の親和性は Rb1 株で強く、Rb2 株で弱くなる、ファージの宿主選択性と共通の傾向が認められた(Table 1)。さらに、共通の糖鎖構造であっても、荷電置換基の数が異なる分子種では親和性が異なることがわかった。

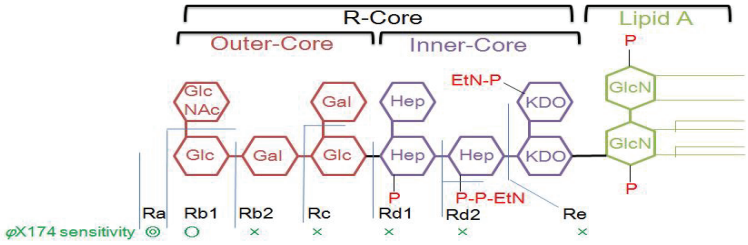


Fig.1 サルモネラ菌 LPS のコア糖鎖構造

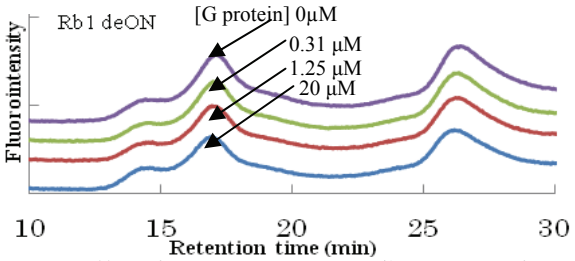


Fig.2 G タンパク質の添加による Rb1 株 deON 体のクロマトグラムの変化

Table 1 G タンパク質と deON 体の 50 %結合濃度

Salmonella Strain	Rb1		Rb2	
Saccharide Species	Rb1 3P	Rb1 4P	Rb2 3P	Rb2 4P
[G protein] for 50 % Binding (μM)	0.45 ± 0.41	0.27 ± 0.46	1.84 ± 1.51	2.83 ± 0.12

lipopolysaccharide, Salmonella, phage

講演番号：3C26a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ C 校舎 26 会場

LPS 糖鎖固定化センサーチップを用いた、表面プラズモン共鳴による、φX174 ファージ粒子の相互作用アプローチ

Approach for interaction of φX174 particle toward receptor oligosacchaoride immobiliced sensorchip by Surface Plasmon Resonance

○野々垣 拓真、南平 麻衣、稲垣 穣（三重大学）
○Takuma NONOGAKI,Mai NAMPEI,Minoru INAGAKI (Mie Univ.)

【目的】

バクテリオファージϕX174 は、正 20 面体構造カプシドに SS-DNA を含むミクロウイルス科のファージである。12 ヶ所の頂点に存在するスパイクは、5 量体の G タンパク質に 1 分子の H タンパク質が加って形成され、宿主であるグラム陰性菌表層のリポ多糖(LPS)をレセプターとして認識する。これまで我々は G タンパク質および H タンパク質それぞれが宿主大腸菌 C 株の LPS 糖鎖と強く相互作用することを確かめた。しかし、ファージ粒子は、スパイクタンパク質 G,H,に加えカプシド F タンパク質が高次の集合体を作っているため、宿主の LPS 糖鎖に対するより強い厳密な選択性が現れる可能性があると考えた。そこで、レセプター糖鎖を金薄膜固定化して、宿主大腸菌 C 株の表面に見立てたセンサーチップを調製し、表面プラズモン共鳴装置を用いて、ϕX174 ファージ粒子の相互作用を定量的に解析・比較することを目的とした。

【方法・結果】

大腸菌 C 株にϕX174 を接種し、溶菌後の上清から PEG 沈殿によりファージを濃縮した後、塩化セシウム密度勾配遠心法によって、ϕX174 ファージ粒子(3.2×10^{13} p.f.u/mL)を精製した。次に、金薄膜にカルボキシメチルデキストランがコーティングされたセンサーチップ CM3 に *O,N*-脱アシル LPS のグルコサミン残基のアミノ基を介してレセプター糖鎖をアミンカップリング法により固定化した。

そうして得られたセンサーチップにϕX174 ファージ粒子を注入して結合させ、得られたセンサーグラムから解離定数 K_D を算出した。しかし、デキストランへの非特異的吸着や立体障害による拡散速度への影響が認められたため、金薄膜に直接カルボキシル基が導入されたセンサーチップ C1 にレセプター糖鎖を固定化し同様に解析を行った。比較対象としてスパイクタンパク質の単量体 HisG および 5 量体 cHisG による相互作用も解析した(右表)。その結果、G タンパク質が 5 量体を形成することで親和性は単量体の約 4 倍となり、さらにファージ粒子では約 65 倍に上昇することが判った。

表.レセプター糖鎖とファージ粒子及び各スパイクタンパク質の親和性

		HisG	cHisG	ファージ粒子
アナライト				
解離定数 $K_{D\,(nM)}$	CM3	-	7.60±1.27	0.224
	C1	110±0.3	29.0±9.5	1.7±1.4

interaction, bacteriophage, SPR

講演番号：3C26p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ C 校舎 26 会場

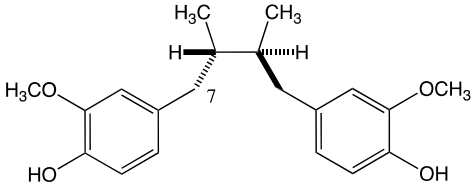
定量的構造活性相関解析による(+)-dihydroguaiaretic acid の構造と抗かび活性との関係解明

Structure-antifungal activity relationship of (+)-dihydroguaiaretic acid by employing Hansch-Fujita method

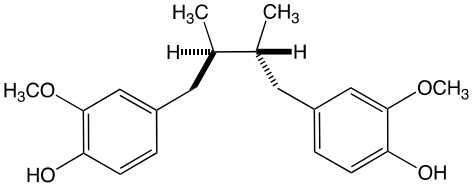
○長谷部 綾香[1]、西脇 寿[1]、秋山 浩一[2]、菅原 卓也[1]、岸田 太郎[1]、山内 聡[1] ([1]愛媛大農、[2]愛媛大総科支セ)

○Ayaka HASEBE[1], Hisashi NISHIWAKI[1], Koichi AKIYAMA[2], Takuya SUGAHARA[1], Taro KISHIDA[1], Yamauchi SATOSHI[1] ([1]Ehime Univ. Faculty of Agriculture, [2]Ehime Univ. Integrated center, Tarumi station)

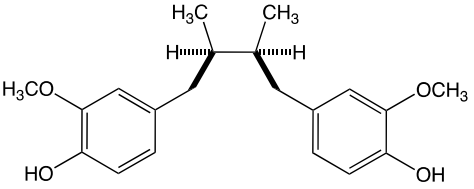
目的）dihydroguaiaretic acid (DGA) はフェニルプロパノイドが 8,8'間で結合し、酸化の程度が低い古典的なリグナンである。我々は、DGA の３つの立体異性体の *Alternaria alternata* (Japanese pear pathotype) に対する抗かび活性試験を行い、立体異性体間で活性に大きな差がないことを確認した。本研究では、構造と活性との関係を定量的に解析することを目的として、(+)-DGA の７位の誘導体の合成を行い、*Alternaria alternata* (Japanese pear pathotype)に対する EC_{50} 値を測定した。



(+)-dihydroguaiaretic acid ((+)-DGA) (**1**)

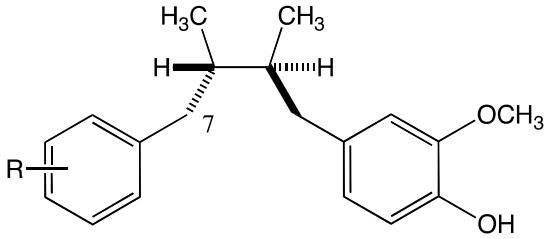


(-)-dihydroguaiaretic acid ((-)-DGA) (**2**)



meso-dihydroguaiaretic acid (*meso*-DGA) (**3**)

方法、結果）D-グルタミン酸を出発化合物として９工程で(*S*)-3-(4-benzyloxy-3-methoxybenzyl)-4-butanolide を得た。α位のベンジル化を各種ベンジルブロミドにより行い、さらに４工程で７位誘導体を３５個合成した。*Alternaria alternata* (Japanese pear pathotype)に対する抗かび活性試験を行ったところ、無置換のフェニル基を有する誘導体 **4**、2-FPh 体 **5**、3-FPh 体 **6**、3-ClPh 体 **7**、4-FPh 体 **8**、4-ClPh 体 **9** さらに、3,4-ClPh 体 **10** および 3-Cl-4-HOPh 体 **11** の EC_{50} 値が 20-34 μM であり、3-FPh 体 **5** が最も高い活性を示した (EC_{50} = 20 μM)。今回合成した化合物のうち３１個と(+)-DGA の活性結果を Hansch-Fujita 法を用いて定量的に解析した結果、DGA の７位のフェニル基上への置換基の導入は基本的に活性を低下させるが、特に３位への電子吸引基の導入により活性の上昇が可能であることが示唆された。また、3-HO-4-MeOPh 体 **12**、3-HO-4-EtOPh 体 **13** および 3-HO-4-IsoprOPh 体 **14** にメラニン生合成阻害活性が観察された。



4: R = H
5: R = 2-F
6: R = 3-F
7: R = 3-Cl
8: R = 4-F
9: R = 4-Cl
10: R = 3,4-Cl
11: R = 3-Cl-4-HO
12: 3-HO-4-MeO
13: 3-HO-4-EtO
14: 3-HO-4-IsoprO

lignan, antifungal activity, Hansch-Fujita analysis

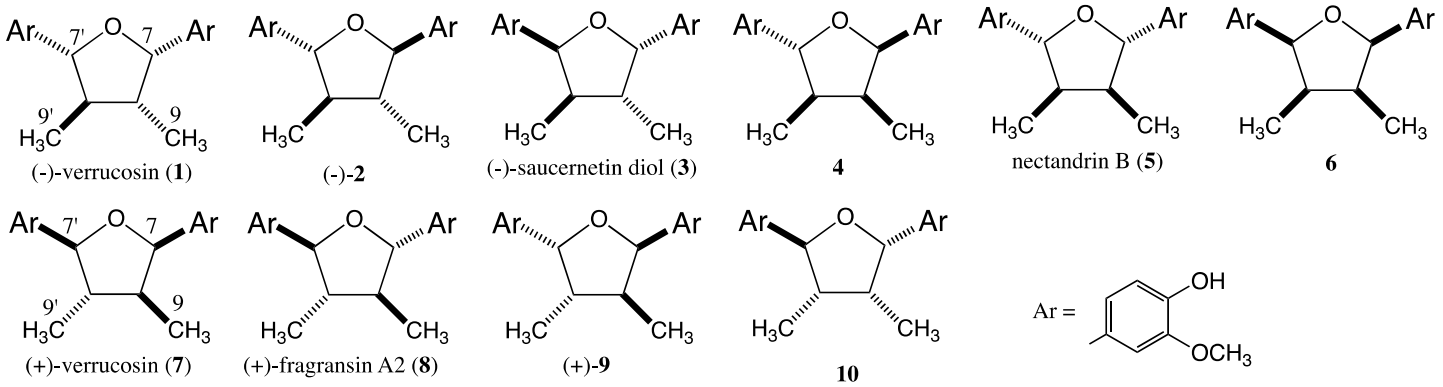
講演番号：3C26p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ C 校舎 26 会場

(+)-verrucosin のベンゼン環上の置換基が植物生長調節活性に与える影響

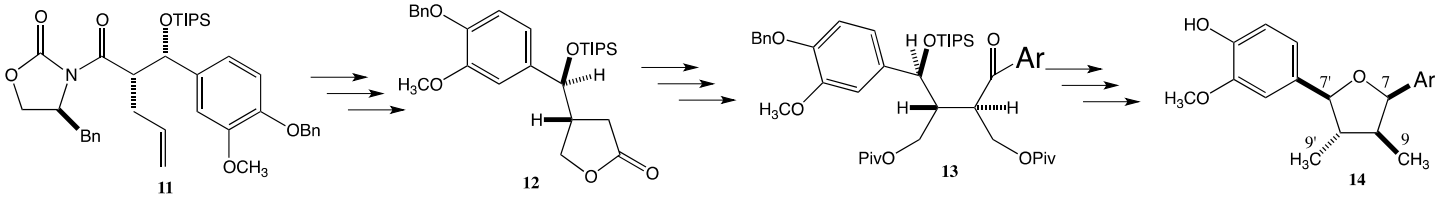
Effect of substituents at benzene ring of (+)-verrucosin on the plant growth regulatory activity

○中山 矩美子、西脇 寿、首藤 義博、山内 聡（愛媛大農）
○Kumiko NAKAYAMA,Hisashi NISHIWAKI,Yoshihiro SHUTO,Satoshi YAMAUCHI（Ehime Univ. Faculty of Agriculture）

目的）４置換テトラヒドロフラン型リグナン（7,7'–エポキシリグナン）のすべての立体異性体を合成し植物生長調節活性を調べた結果、(+)-verrucosin (**7**)がシバの根に対して最も高い活性を示し、1 mM で生長を 2%に押さえた。また、9 位および 9'位に水酸基、メトキシ基が存在すると活性が低下することも見出した。そこで今回は、７位上のベンゼン環上の置換基が活性に与える影響を調べることを目的として実験を行った。



方法、結果）Evans の *syn* アルドール縮合物 **11** の還元、オレフィンの酸化開裂、生成するヘミアセタールの酸化によってラクトン **12** を得た。次に、種々のベンズアルデヒドとのアルドール縮合を行った後、ラクトンの還元、一級水酸基の保護、ベンジル水酸基の酸化によりケトン **13** とし、脱シリル化、$Pd(OH)_2$ 存在下での水素添加を行って 7*R* の立体を持つテトラヒドロフラン環を構築した。次に、一級水酸基の脱保護の後、メシル化、還元等を経て(+)-verrucosin 誘導体 14 へ導いた。7-(3,4-dimethoxyphenyl)体、7-phenyl 体の活性が観察されず、7-(4-hydroxyphenyl)体、7-(3-hydroxyphenyl)体、7-(2-hydroxyphenyl)体、7-(3,4-dihydroxyphenyl)体、7-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)体がシバの根の生長率を 1 mM で 16-28%に抑制したことから水酸基の存在が活性発現に重要である事が示唆された。



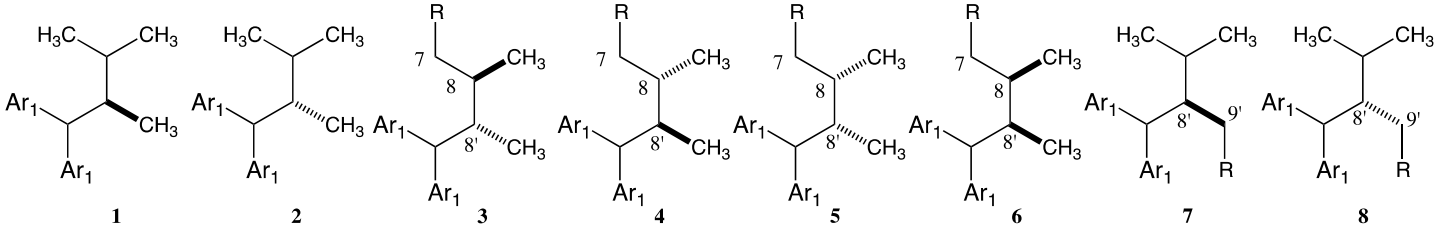
Lignan, tetrahydrofuran lignan, plant growth regulatory activity

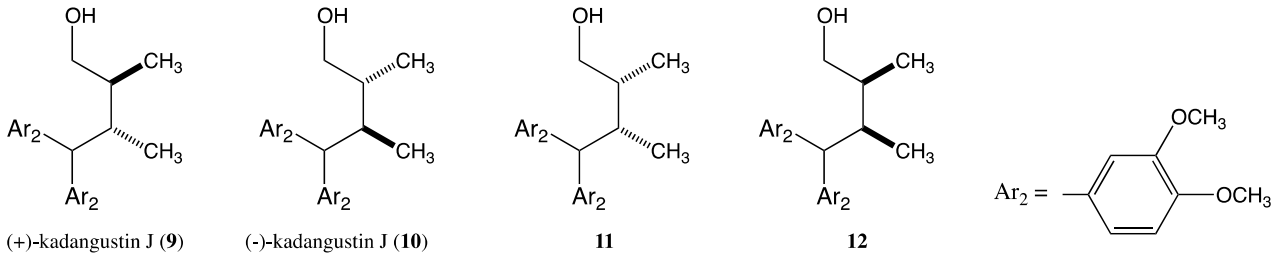
講演番号：3C26p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ C 校舎 26 会場

Cytotoxic activity of stereoisomers of 1,7-Seco-2,7'-cyclolignane

○ Tuti Wukirsari[1], Hisashi NISHIWAKI[1], Kosuke NISHI[1], Takuya SUGAHARA[1], Koichi AKIYAMA[2], Taro KISHIDA[1], Satoshi YAMAUCHI[1] ([1]Ehime Univ. Faculty of Agriculture, [2]Ehime Univ. Integrated center, Tarumi station)

Introduction) 1,7-Seco-2,7'-cyclolignane has a main structure bearing a diphenylmethyl moiety. The lignans bearing this structure have been isolated from plants. We stereoselectively synthesized both enantiomers of butane type of 1,7-seco-2,7'-cyclolignanes **1**, **2** and all stereoisomers of 7- or 9'-OH, OMe, F derivatives **3-8** to examine the effect of stereochemistry on cytotoxic activity against HeLa and HL-60. The stereoisomers **3-6** were transformed to each stereoisomers of kadangustin J **9-12**, respectively.





Method and Results) Both enantiomers **1** and **2** were synthesized by the previously described method. The chiral 8 positions of **3-6** were introduced by Evans's *anti*-aldol condensation. The chiral 8' positions of **3-8** were obtained by stereoselective alkylation using Evans's chiral auxiliary. The diphenylmethyl structure was constructed by employing Friedel-Crafts reaction by using $FeCl_3$. The methoxy groups at 7 or 9' positions were obtained by the methylations of the corresponding hydroxyl compounds. The fluorides were converted from the corresponding hydroxy compounds by mesylations followed by treatments with $(n\text{-Bu})_4NF$ or KF. The cytotoxic activities of **1-8** were examined. The most potent compounds were **1** and **2**, whose IC_{50} values were 16-20 μM. All hydroxyl compounds did not show the activity except for (-)-kadangustin J (**10**) (IC_{50}: 50-70 μM). The activities of fluorides were lower than that of **1** and **2**, however, more potent than methoxy compounds. The fluoride bearing stereochemistry **6** was less potent than the other stereoisomers.

Lignan, Cytotoxic activity, Secocyclolignane

講演番号：3C26p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ C 校舎 26 会場

amphotericin B の真菌液胞膜破壊作用を促進する *N*-methyl-*N*′′-dodecylguanidine の作用機序

A possible mechanism in the enhancement effect of *N*-methyl-*N*′′-dodecylguanidine on the vacuole disruptive action of amphotericin B

姜 昌慶[1]、山田 圭一[2]、○荻田 亮[1,3]、臼杵 克之助[1]、藤田 憲一[1]、田中 俊雄[1] ([1]阪市大院・理、[2]群馬大院・工、[3]阪市大・健康研セ)
Chang-Kyung KANG[1], Keiichi YAMADA[2], ○Akira OGITA[1,3], Yoshinosuke USUKI[1], Ken-ichi FUJITA[1], Toshio TANAKA[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Gunma Univ., [3]Res. Cntr. for Urban Health & Sports, Osaka City Univ.)

【目的】深在性真菌症の治療薬である amphotericin B (AmB) は、真菌細胞膜中のエルゴステロールと結合してイオン透過性のチャネルを形成する。また、この種のチャネルを介して K^+ などのイオンを細胞外に漏出させること、すなわち、細胞膜障害にもとづいて殺真菌作用を惹起することが知られている。AmB にはタンパク質合成阻害活性や活性酸素種の産生を促進する活性も報告されているが、上述いずれの活性も本マクロライド化合物が示す強力な殺真菌作用を十分に説明することはできない。演者らは AmB が真菌細胞の生存にとって重要な役割を果たす液胞膜を破壊する活性をもつこと、さらに、この種の液胞膜障害作用が AmB の殺真菌作用と相関関係にあることを示す結果を得ている。本研究においては、AmB と AmB の液胞膜破壊活性を増幅する *N*-methyl-*N*′′-dodecylguanidine (MC12) との相乗作用の機序について検討した。
【方法】 AmB 感受性株として *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 株ならびに同株由来のエルゴステロール合成酵素遺伝子欠損株を用いた。AmB に加えて AmB にダンシル基を導入した蛍光標識誘導体 AmB-Ds を用いた。AmB-Ds は、高濃度で AmB と同様に液胞膜破壊を伴う殺真菌活性を発揮するとともに、非致死濃度で投与された AmB-Ds が BY4741 株の液胞膜に取り込まれることが明らかになっている。また、非致死濃度の AmB-Ds に MC12 を共存させることで、液胞膜の破壊にともなう AmB-Ds の細胞質への漏出、拡散を観察することが可能である。
【結果】非致死濃度の AmB で処理した *S. cerevisiae* 細胞を洗浄し、ついで MC12 で処理した場合も、MC12 処理細胞を洗浄し、ついで非致死濃度の AmB で処理した場合も、液胞膜の破壊を伴う細胞死が観察された。この事実は、MC12 が AmB の細胞内への取り込みを促進する結果として AmB による液胞膜の破壊を促進するものではないことを示している。AmB の液胞膜破壊作用は、液胞機能への依存度が増す低浸透圧条件下 (蒸留水中など) においてより顕著に現れる。この事実にもとづいて、あらかじめ YPD 培地中で非致死濃度の AmB で処理した BY4741 株の細胞を洗浄したのちに、蒸留水中に懸濁したところ、液胞膜の破壊を伴う細胞死が観察された。さらに、蒸留水中では YPD 培地中で認められた AmB と MC12 の相乗効果は認められないが、AmB 単独の致死作用は著しく増大することが明らかになった。以上の事実は、MC12 には液胞の浸透圧調節機能を過剰に昂進する活性があり、この種の活性にもとづいて液胞膜の AmB 感受性を高めている可能性を示唆している。

amphotericin B, *Saccharomyces cerevisiae*, vacuole

講演番号：3C26p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ C 校舎 26 会場

出芽酵母の偽菌糸形成におけるアクチンパッチ形成不全の関与
Disturbance of actin patch formation in the pseudohyphal growth of budding yeast.
○村田 和加惠[1,2]、北原 望[1]、金原 聡子[1]、荻田 亮[1,3]、藤田 憲一[1]、田中 俊雄[1]([1]阪市大院理・生物地球、[2]米子高専・物質工、[3]阪市大・健康研セ)
○ Wakae MURATA[1,2], Nozomi KITAHARA[1], Satoko KINPARA[1], Akira OGITA[1,3], Ken-ichi FUJITA[1], Toshio TANAKA[1] ([1]Osaka City Univ., [2]Yonago National College of Tech., [3]Osaka City Univ.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はイソアミルアルコール（IAA）の共存下で偽菌糸を形成する。酵母体から偽菌糸への形態変化にはダイナミックな細胞骨格の変動が関与している可能性が高い。IAA によって偽菌糸が誘導される際、ウェスタン解析の結果、アクチンの細胞内レベルには変化が見られず、微小管の構成分子であるα-およびβ-チューブリンのレベルが低下する現象を本研究室にて、すでに明らかにしている。今回、偽菌糸の形態形成メカニズムを明らかにする一環として、IAA 誘導の偽菌糸における細胞骨格の分布について再検討を行った。

IAA 誘導による偽菌糸において、出芽先端におけるアクチンパッチの減少に加えて、細胞質微小管の消失および核微小管の配向異常といった細胞骨格の異常が観察された。従って、出芽酵母における偽菌糸形成には、アクチンパッチの形成不全、アクチンパッチに本来なら接続する細胞質微小管が消失し、それによって核微小管が配向異常になるという仮説が打ち立てられた。本仮説においては、上記のチューブリン細胞内レベルの低下は主として細胞質微小管が消失することに由来すると想定される。次いで、細胞骨格関連遺伝子の転写量を RT-PCR 法を用いて再検討した。その結果、IAA 共存下においてα-チューブリンをコードする *TUB1* において IAA による転写量の減少が認められたが、他の関連遺伝子に変動はみられなかった。さらに、アクチン凝集に関わる遺伝子の欠損株を用いて、IAA 処理による形態変化を観察した結果、*Δ*LSB1, *Δ*SRO9 の 2 株において、IAA 処理を行うと偽菌糸成長が促進され、*Δ*RHO4 については逆に偽菌糸成長が抑制されることがわかった。これら 3 株についてアクチンの細胞内分布を調べた結果、*Δ*RHO4 において、意外にもアクチンパッチ形成は正常であった。また、融合・分裂がアクチンフィラメントにより行われる液胞についても観察を行った結果、少なくとも BY23324 株の偽菌糸において通常よりかなり小さい液胞が多数観察された。

以上の結果から、アクチンパッチ形成不全が少なくとも偽菌糸形成に関与していることが示唆された。

Saccharomyces cerevisiae, pseudohyphae, actin patch

講演番号：3C26p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ C 校舎 26 会場

γ-ポリグルタミン酸に見いだされる理論クラスター構造に関する研究

Studies on theoretical cluster structure observed in gamma polyglutamic acid

島 友紀[1]、水原 尚子[1]、臼杵 克之助[1]、荻田 亮[1,2]、○藤田 憲一[1]、田中 俊雄[1]([1]阪市大院理、[2]阪市大健康研セ)

Tomoki Shima[1], Naoko Mizuhara[1], Yoshinosuke Usuki[1], Akira Ogita[1,2], ○Ken-ichi Fujita[1], Toshio Tanaka[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]Res. Cntr. for Urban Health & Sports, Osaka City Univ.)

納豆のネバネバの主成分の 1 つであるγ–ポリグルタミン酸（PGA）は D 体および L 体のグルタミン酸がγ位のカルボキシル基とアミノ基の間で重合して出来た一本鎖ポリマーである。PGA には D 体および L 体のグルタミン酸からなるホモオリゴマーの部分構造が見いだされ、加えて PGA 部分加水分解物より得られた 2 量体を用いる分析の結果、
理論上では、PGA は、それらのホモオリゴマーが交互に繋がっているクラスター構造をなしているとされた。PGA におけるグルタミン酸の DL 比は菌株の種類や培養条件によって変化するため、由来の異なる PGA では理論クラスター構造も異なっていると予想される。

【目的】

本研究室で分離された PGA 高生産菌である *Bacilllus* sp. F-2-01 由来、市販の納豆から分離された菌株(納豆菌)由来、市販工業製品の PGA について理論クラスター構造の違いを明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】

PGA の部分加水分解産物から得られたグルタミン酸の二量体を蛍光標識するために F-moc 化し、キラルカラムを用いる HPLC によって分離し、二量体中に含まれる 4 種の光学異性体 DD, DL,LD,LL 体 の存在比を算出した。この結果をもとに、それぞれの PGA における理論上のクラスター構造を導いた。*Bacilllus* sp. F-2-01 株および納豆菌由来の PGA は類似したクラスター構造を持ち、それらは市販工業製品の PGA のクラスター構造とは大きく異なることがわかった。

gamma poly glutamic acid, *Bacillus* sp., natto

講演番号：3C26p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ C 校舎 26 会場

セミカルバゾン類の合成とそのプロテアーゼ阻害活性
Synthesis of semicarbazones and their protease inhibitory activity
○長谷川 亮太[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県大生資科)
○Ryota Hasegawa[1], Satoru Kawaii[1], Tetuo Tokiwano[2], Yuko Yoshizawa[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Pref. Univ.)

【目的】トリパノソーマ症やマラリアなどの原虫感染症が増加しており、その治療において第一選択薬の強い副作用や薬剤耐性原虫の出現などが問題となっている。これまでにシステインプロテアーゼ阻害剤が原虫の成長や変異を阻害することが明らかにされており、さまざまな化合物がシステインプロテアーゼ阻害剤として開発されている。なかでも抗原虫薬のリード化合物としてセミカルバゾン類に期待が寄せられている。しかし、なぜセミカルバゾン類がシステインプロテアーゼを阻害するのか、その阻害様式は解明されたとは言い難い。本研究では、システインプロテアーゼ阻害に必要な最小構造単位の同定を試みるとともに、構造活性相関に関する知見を得ることを目的として、さまざまなセミカルバゾン類とその構造類似体を合成し、そのプロテアーゼ阻害活性を調べることを計画した。
【方法】セミカルバゾンのヒドラジノ基側部分（X 部分）、セミカルバジド部分（Y 部分）、およびアミノ基側部分（Z 部分）に分けて系統的合成を試みた。X 部分に芳香環を導入するため、出発物質にベンズアルデヒド類およびピリジンカルボキシアルデヒド類を使用した。セミカルバジド塩酸塩を酢酸ナトリウム存在下、水–エタノール混合溶媒中室温で撹拌することにより 1-アリールセミカルバゾン類を合成した。一方、Y 部分を検討するためカルボニル酸素原子を硫黄原子に置換したチオセミカルバゾン類の合成を行った。チオセミカルバジドをアリールカルボニル類とメタノール溶媒中で還流することでチオセミカルバゾン類を合成した。さらに、Z 部分の効果を調べるためにフェニルウレアを経由する合成方法を検討した。アニリン類をシアン酸ナトリウム存在下、酢酸水溶液中で加熱撹拌することによりフェニルウレア類を調製し、これをエタノール溶媒中でヒドラジン一水和物存在下還流することで Z 部分に芳香環を導入したセミカルバジド類を得た。これをカルボニル化合物存在下水-エタノール混合溶媒中で撹拌することにより X 部分と Z 部分に芳香環を導入したセミカルバゾン類を合成した。パパインをモデル酵素として得られたセミカルバゾン類のパパインに対する阻害効果により活性を評価した。基質には合成基質の Z-Phe-Arg-AMC を使用した。
【結果】本研究ではセミカルバゾン類 20 種およびチオセミカルバゾン類 18 種を合成した。セミカルバゾン類合成において X 部分の芳香環 4 位の官能基が合成収率に強く影響することが明らかとなった。各化合物についてパパインに対する阻害活性試験を行ったところ、Y 部分のカルボニル酸素原子を硫黄原子に置換することで活性が増強される傾向が認められた。また、X 部分の芳香環に電子吸引性基を導入することで阻害活性が増強された。

semicarbazones, protease inhibitor, Z-Phe-Arg-AMC

講演番号：3C26p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ C 校舎 26 会場

アクリドン類の合成および前骨髄性白血病 HL-60 に対する増殖抑制活性

Synthesis of acridones and their antiproliferative activity on HL-60

○岸本 真帆[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県大生資科)
○Maho Kishimoto[1], Satoru Kawaii[1], Testuo Tokiwano[2], Yuko Yoshizawa[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Pref. Univ.)

【目的】ミカン科植物が含有するポリフェノール類、フラボノイド類、カロテノイド類、クマリン類、アクリドン類などの二次代謝化合物には、健胃整腸作用、鎮咳作用、抗菌作用、抗酸化作用など人間に有用な様々な効果が認められている。このためオウバク、キジツ、サンショウ、チンピなどミカン科植物を原料とする生薬が数多く知られている。このような化合物の中にはがん細胞増殖抑制効果を示すことから注目を集めているものもある。このうちのアクリドン類は、アクリジンの 9 位がオキソ化されたケトン誘導体であり、植物アルカロイドで強い生物活性を示すことが知られている。アクリドン類は、1948 年 *Acronychia* 属植物の根皮から初めて acronycine が単離され、その後 1981 年に *Severinia*、*Glycosmis*、*Citrus* 属植物から多数のアクリドンアルカロイドが単離されている。その多くはプレニル基やピラン環を持っており活性発現にこのような置換基がどのように関与しているかに興味が持たれている。しかし、アクリドン類は天然資源中には微量にしか存在しないため、構造活性相関についての知見はあまり得られていない。また、アクリドン類をリード化合物とする創薬研究の報告も少ないことから、本研究ではアクリドン類を系統的に合成し、その化合物に対する前骨髄性白血病細胞 HL-60 の増殖抑制効果を調べることでアクリドン類の構造活性相関に関する知見を得ることを目的としている。
【方法】アクリドン類合成としては、銅触媒存在下で *o*-ヨード安息香酸などのハロゲン化アリール類とアニリンなどのアミン類を縮合させる Ullmann 反応を用いる方法が主流である。この反応は安価な触媒下で温和な条件で反応が進むため、本研究での合成方法として採用した。また、本法では二つのベンゼン環がそれぞれ別の出発物質に由来するため、多様なアクリドン類を合成できる利点がある。具体的には、*o*-ヨード安息香酸を出発物質とし、アニリン類を反応物質として加え塩基性条件下で *N*-フェニルアントラニル酸中間体を合成後、PPA 存在下で分子内 Friedel-Crafts 反応による環化反応を経てアクリドン類を合成した。合成したアクリドン類の生物活性は、がん細胞である前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制効果を調べることにより評価した。
【結果】本研究では、アクリドン骨格の 2,3,4,5 位に種々の官能基を導入することで数十種類のアクリドン類を合成した。それぞれの化合物に対して前骨髄性白血病細胞 HL-60 の増殖抑制試験による活性評価を行い、その構造活性相関についていくつかの知見が得られたので合わせて報告する。

acridone, HL-60, antiproliferative

講演番号：3C26p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ C 校舎 26 会場

フェナントレン関連化合物の合成と前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する影響

Synthesis of Phenanthrenes and their antiproliferative activity on HL-60

○渡邉 真穂[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県大生資科)
○Maho Watanabe[1], Satoru Kawaii[1], Tetuo Tokiwano[2], Yuko Yoshizawa[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Pref. Univ.)

[目的]ラン科植物などの天然資源中に存在するフェナントレン類は、coumaroyl triketide よりスチルベノイド類を経由して生合成される芳香族性代謝物質であり、多くはメトキシル基やヒドロキシル基などの酸素官能基を有している。このようなフェナントレン類は様々な生理活性を示すこと報告されている。例えば *Dendrobium thyrsiflorum* から単離された denthyrsinin は HeLa 細胞、K562 細胞および MCF-7 細胞に対し増殖抑制活性を示し，また *Combretum caffrum* から単離された hydroxytetramethoxy 体はマウス P388 細胞の増殖を阻害すること報告されている。このほかにも種々のバクテリアやカビに対する増殖抑制活性や酵素阻害活性などの興味深い生物活性が報告されている。しかし、天然資源中にはフェナントレン類は微量しか存在せず、また生合成前駆体の酸素化パターンに制限があるため、生理活性と構造の相関に関する知見は十分とは言い難い。本研究では、メトキシル基およびヒドロキシル基を有するフェナントレン類の系統的合成を行い、このような酸素官能基の種類や置換様式が生物活性にどのような影響を及ぼすかを検証し、それらの構造活性相関に関する知見を得ることを目的とした。
[方法]フェナントレン類の合成は、まずオルト位を選択的に臭素化したベンズアルデヒド類を調製し、これとアリールホスホニウム塩を強塩基存在下で Wittig 反応を行うことによりスチルベン類を合成した。この時、シス-トランス異性体が混在しているため、シス体のみをカラムクロマトグラフィーにより単離した。単離したシス体臭素化スチルベン類のラジカル環化反応を行うことによりフェナントレン類を合成した。一方、ヒドロキシフェナントレン類を合成する際には、ヒドロキシベンズアルデヒド類を出発物質としてベンジル基または TBS 基でヒドロキシル基を保護した後、上記と同様の方法により環化を行った。その後、保護基に応じた脱保護を行い、ヒドロキシフェナントレン類を合成した。合成したフェナントレン類の生物活性は、前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制試験により評価した。
[結果]メトキシル基およびヒドロキシル基を有するフェナントレン類の系統的合成を行った。本研究で合成したフェナントレン類に対する増殖抑制試験の結果、多少の例外はあるものの 1,2,3-トリメトキシル構造を有するフェナントレン類に顕著な増殖抑制活性が認められた。また、これらの化合物について DNA ラダー法によるアポトーシス誘導試験やフローサイトメーターによる細胞周期測定を行ったので、その結果についても合わせて報告する。

Phenanthrene, Stilbene, HL-60

講演番号：3C26p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ C 校舎 26 会場

ピラノフラボノイドの合成および前骨髄性細胞 HL-60 増殖抑制活性

Synthesis of pyranoflavonoids and their antiproliferative activity on HL-60

○牧田 裕史[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県立大生資科)
○hirohumi makita[1], satoru kawai[1], tetuo tokiwano[2], yuiko yosizawa[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Pref Univ.)

【目的】フラボノイド類の中には，その基本骨格にフラン環やピラン環が縮合した化合物も数多く知られており，それぞれフロフラボノイド類やピラノフラボノイド類とよばれている。ピラノフラボノイド類には単純フラボノイド骨格よりも拡張したπ電子系が存在し，このようなπ電子系が生物活性にどのような影響を及ぼすか興味が持たれている。古くから民間薬として用いられてきた *Artocarpus lanceifolius* Roxb や *Lonchocarpus heterophyllus* の抽出物は，それぞれアフリカ睡眠病病原体であるトリパノソーマの抑制活性やブラインシュリンプに対する強い毒性を持つことが報告されており，これらに含有されるピラノフラボノイド類がその活性本体であると考えられている。近年、一部のピラノフラボノイド類について生理作用や作用機序に関する研究は行われているが、構造と活性に関する体系的研究は十分とは言い難い。その理由の一つとして，天然資源中にピラノフラボノイド類は微量にしか存在しないことがあげられる。そこで本研究では 6-7 位、7-8 位にピラン環を持つピラノフラボノイド類の系統的合成を試み、それらの生物活性を通常のフラボン類と比較することで、ピラン環導入による生物活性への影響を検討した。
【方法】フラボノイドにピラン環を導入するために、出発物質のジヒドロキシアセトフェノン類に Michael 付加によりブテナール類を反応させてエーテル化を行い、続いて環化することでピラノヒドロキシアセトフェノン類を合成した。このとき 6-7 位または 7-8 位にピラン環が縮合した 2 種類の異性体が生成する可能性があったが、7-8 位にピラン環を持つものが主生成物であり、6-7 位にピラン環を持つものはわずかしか生成しなかった。このため、以後の合成には主に 7-8 位にピラン環が縮合したピラノヒドロキシアセトフェノン類を用いた。続いて安息香酸類とのエステル類を調製し、ベンゾアート中間体を得た後、Baker-Venkataraman 転位を経由して環化することでピラノフラボン骨格を構築した。合成したピラノフラボノイド類の生物活性は、前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制活性により判定した。
【結果】上記の方法でこれまでに 15 種のピラノフラボノイド類を合成した。通常のフラボノイドに比べピラノフラボノイド類の活性が増強されていることが認められたことから、ピラン環導入により拡張したπ電子系が活性発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。ピラン環酸素原子の位置、ピラン環縮合位置、ピラン環に導入した官能基の種類、フラボン骨格 B 環に導入した官能基の種類などの活性への影響についても検討したので、合わせて報告する。

Pyranoflavone, Michael addition, HL-60

講演番号：3C26p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ C 校舎 26 会場

フロフラボノイド類の合成および前骨髄性白血病細胞 HL-60 増殖抑制活性
Synthesis of furoflavonoids and their antiproliferative activity on HL-60
○齋藤 裕介[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県大生資科)
○Yusuke Saito[1], Satoru kawaii[1], Tetuo Tokiwano[2], Yuko Yoshizawa[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Pref. Univ.)

【目的】マメ科植物*Pongamia glabra*が生産するglaboneや*Lonchocarpus montanus*に含まれるlanceolatine Bをはじめとして、天然資源中にはフラボン骨格A環にフラン環が縮合したフロフラボノイド類が数多く存在する。これらは抗がん作用や抗菌作用など興味深い生理活性を有することが報告されており、縮合したフラン環がフラボノイドの生物活性にどのような影響を及ぼしているか興味が持たれている。しかし、いずれも微量にしか存在しないためその生理活性に対する知見は十分とは言い難い。そこで本研究ではフラボン骨格のA環にフラン環を導入したフロフラボノイド類を中心とした系統的合成を進めている。これらの生物活性を比較することでフラン環の縮合位置、およびその他の含酸素官能基の種類や結合位置が生物活性にどのような影響を及ぼすかを検証し、フロフラボノイド類における構造活性相関に関する知見を得ることを目的としている。生物活性は前骨髄性白血病細胞HL-60増殖抑制を指標とした。
【方法】フラボノイドにフラン環を導入するため、ジヒドロキシアセトフェノン類を出発物質としてBschlerのインドール合成に類似の環化反応を経ることで*ortho*-ヒドロキシアセチルベンゾフラン類を合成した。このベンゾフラン骨格の2,3位無置換体合成にはブロモアセトアルデヒドジエチルアセタールを、また2,3位置換体合成にはα-ハロケトン類を反応物に用いて合成した。本法ではフラン環結合位にもとづく異性体が生じ、著しく収率が低下した。そこでレゾルシノールのかわりに2-メチルレゾルシノールを用いることでフラン環結合位置の制御を行い、*ortho*-ヒドロキシアセチルベンゾフラン類を選択的に合成した。このようにして得られた*ortho*-ヒドロキシアセチルベンゾフラン類を用いて、ベンズアルデヒド類と塩基性条件下でのClaisen-Schmidt縮合反応によりフロカルコン類を合成し、種々の環化反応によりフロフラボン類、フロフラバノン類およびフロオーロン類を合成した。合成したフロフラボノイド類の生物活性は、がん細胞に対する増殖抑制活性により評価した。
【結果】本研究ではフラン環縮合位置、フラン環に置換する官能基の種類、およびフラボノイド骨格 C 環の構造改変を組み合わせることで、約 100 種のフロフラボノイド類を合成した。それぞれの化合物に対し増殖抑制試験を行ったところ、フラボン骨格 A 環の 6-7 位にフラン環を導入することで増殖抑制活性が増強される傾向が認められた。また、カルコン骨格にフラン環を導入することで活性が増強されたことより、フラボン骨格およびカルコン骨格 A 環に導入されたフラン環の重要性が示唆された。さらにカルコン類における活性発現コンホーメーションについても検討を行った。

Furoflavonoid, Benzofuran, HL-60

講演番号：3C26p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ C 校舎 26 会場

アデノシン配糖体 1 ： 皮膚細胞での安定性
Glucosyl Adenosine 1：Excellent stability in skin cells
○栢野 真由美、伊藤 理恵、山下 洋、石原 達也、太田 恒孝、福田 恵温（株式会社 林原 研究開発本部）
○ mayumi kayano,michie ito,hiroshi yamashita,tatsuya ishihara,tsunetaka ohta,shigeharu fukuda (HAYASHIBARA CO.,LTD. R&D Center)

【目的】アデノシン(Ado)は生体内に広く存在する核酸のひとつであり、細胞のエネルギー代謝や生体機能の維持・調節に深く関与している。しかしながら、Ado は生体内では極めて不安定であり、分解酵素であるアデノシンデアミナーゼ（ADA）によって速やかにイノシン、ヒポキサンチンへと代謝されてしまう。我々は、糖転移酵素である CGTase を用いて Ado を配糖化すると、2 種類のグルコシルアデノシン(G-Ado)(3’G-Ado、5’G-Ado）が生成することを報告している。
今回、Ado を配糖化することで Ado の生体内での安定性が向上できるか検討を行った。特に、Ado は化粧品素材として抗しわ剤などの用途で使用されていることから、3 次元皮膚モデルを用い、皮膚での安定性について Ado との比較を行った。

【方法】G-Ado または Ado を正常ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）の破砕液と反応させて、残存量を経時的に HPLC 法にて測定した。また、3 次元皮膚モデル(正常ヒト表皮角化細胞)の角層側に G-Ado または Ado を添加して 3 次元皮膚モデルを透過させた後、透過液の組成を HPLC にて分析した。

【結果】G-Ado または Ado を NHDF の破砕液と反応させて安定性を調べたところ、Ado は細胞破砕液に含まれる ADA によって速やかに分解されたのに対し、G-Ado は一部が分解されたのみであった。3 次元皮膚モデルを用いて皮膚透過の過程での安定性を調べたところ、3 次元皮膚モデルに Ado を透過させた場合、透過液中には Ado はほとんど認められず、ほとんどがイノシン、ヒポキサンチンへと代謝されていた。一方、G-Ado を透過させた場合、透過した G-Ado のうちイノシン、ヒポキサンチンへと代謝されたものは 30 %以下であり、残りは G-Ado のまま存在していた。
これらの結果より、G-Ado は Ado に比べて ADA による分解を受けにくく、皮膚へ適用した場合でも、皮膚中で安定に存在することが示唆された。

(1)大倉ら、日本応用糖質科学会平成 24 年度大会講演要旨集 p.30

Adenosine, glucosylation, skin cells

講演番号：3C26p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ C 校舎 26 会場

アデノシン配糖体 2： 皮膚細胞のマトリックスメタロプロテアーゼ発現に対する抑制作用
Glucosyl Adenosine 2：Suppressive effect on expression of matrix metalloproteinase by skin cells
○花岡 美穂、八木 政裕、大倉 隆則、山下 洋、石原 達也、太田 恒孝、福田 惠温（株式会社 林原研究開発本部）
○Miho Hanaoka,Masahiro Yagi,Takanori Okura,Hiroshi Yamashita,Tatsuya Ishihara,Tsunetaka Ohta,Shigeharu Fukuda (HAYASHIBARA CO.,LTD. R&D Center)

【目的】真皮の細胞外マトリックスの主成分であるコラーゲン線維は、加齢による老化とともに減少し、長期間の紫外線暴露を受けた光老化皮膚ではさらに減少が著しいことが知られている。真皮細胞では紫外線の刺激によりマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)が産生され、産生された MMP によりコラーゲンの分解や線維束の乱れが生じる。このことはしわの要因のひとつと考えられている。
アデノシン(Ado)は、抗しわ作用を有する化粧品素材として知られているが、生体内では極めて不安定で、分解酵素により速やかに分解されてしまうという欠点を持つ。我々は、糖転移酵素によって Ado の配糖化を行い、得られたグルコシルアデノシン(G-Ado)が Ado に比べ生体内で安定であることを報告してきた。今回、G-Ado の抗しわ剤としての可能性を検討するため、Ado との作用の比較を行った。

【方法】正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)を用いて、インターロイキン-1α(IL-1α)の刺激により誘導される MMP-1 発現をリアルタイム PCR にて測定した。G-Ado または Ado を IL-1α の刺激と同時に添加し、MMP-1 発現に対する作用を検討した。さらに、G-Ado または Ado を細胞に作用させて一定期間培養後、IL-1α で刺激した場合についても検討を行った。

【結果】G-Ado または Ado を IL-1α で刺激すると同時に NHDF に添加した場合、G-Ado と Ado はともに MMP-1 の発現を抑制した。しかしながら G-Ado、Ado を添加し培養した後に IL-1α で刺激した場合、Ado では発現抑制がみられず G-Ado にのみ抑制が認められた。これは、培養の過程で、Ado が速やかに分解され、培地中から消失したためと推測された。これらの結果より、G-Ado は皮膚中で分解を受けにくく Ado と比べ安定であるため、Ado よりも持続的に効果を示すことが示唆され、G-Ado は抗しわ素材として有用であると考えられた。

(1)大倉ら、日本応用糖質科学会平成 24 年度大会 講演要旨集 p. 30

Adenosine, glucosylation, matrix metalloproteinase

講演番号：3C26p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ C 校舎 26 会場

天然物のヘキサン抽出と酵素反応
Natural Product: Enzyme Reaction during Hexane Extraction
○桑原 保正[1,2]、市来 弥生[1,2]、森田 將史[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Yasumasa Kuwahara[1,2], yayoi Ichiki[1,2], Masashi Morita[1,2], Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST. ERATO)

【目的】
フェロモン研究においては、溶媒に生物種材料を長時間曝して（漬けて）目的物を抽出する場合と、新鮮な生物材料を短時間で表面を洗うように抽出する場合がある。無気門亜目コナダニ類をヘキサンで浸漬すると、分泌物のネラールとゲラニアールが相当するアルコールのネロールとゲラニオールに変化し(Kuwahara et al., 1983)、サトウダニ *Carpoglyphus lactis* から関与する酸化還元酵素が解明されている (Noge et al., 2008)。材料を溶媒浸漬している間にも、酵素が働いていた事になる。この現象が一般的に認められることかどうか、土壌動物のトビムシとコナダニ類を材料に調べた。

【方法及び結果】
対象の生物種に存在しない 1-フェニルエタノールとその酸化物アセトフェノンをそれぞれヘキサン溶液（100 ppm 濃度）とした基質を用意する。供試生物種（100 頭あるいは 50 頭）を基質ヘキサン溶液（100 μl あるいは 50 μl）に投入し、１日後ヘキサン溶液を GC/MS 分析して生成物を精査する。
基質 1-フェニルエタノールをオオフォルソムトビムシ *Folsomia candida*、トゲナシシロトビムシ *Onychiurus folsomi*、ヒメツチトビムシ *Proisotoma minuta*、未同定 3 種（加賀温泉、伊勢神宮、古洞の森)の計６種トビムシ、及びプールダニ *Schwiebea elongate*、ロビンネダニ *Rhyzoglyphus robini*、ゴミコナダニの１種 *Caloglyphus rodriguezi*、*Schwiebea* 属未同定２種(ユリネ、ノビル)、*Caloglyphus* 属未同定３種（腐植土、ニンニク、古洞の森）のコナダニ類計８種に投与したところ、すべての種で、酸化産物のアセトフェノンを検出した。
一方、逆のアセトフェノンを基質として、オオフォルソムトビムシ *F. candida*、サトウダニ *C. lactis*、 プールダニ *S. elongate*、 ロビンネダニ *R. robini*、 Caloglyphus 属未同定３種（ニンニク、古洞の森, 県立大)、*Schwiebea* 属未同定１種（ユリネ）をインキュベートすると、基質の還元された 1-フェニルエタノールを生成した。調べたコナダニのうち、ヒゲダニの未同定種１種を除き、調べたすべての生物種が溶媒ヘキサンに溶解した基質アセトフェノンに反応した。
以上の結果から、天然物を生物種から溶媒抽出する際、短時間抽出処理の方が、物理的要素による溶出混入以外に、酵素反応に起因して生成する変質や 夾雑物の混入を防止でき、単離がより容易になる事が示された。

natural product, enzyme reaction

講演番号：3C26p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ C 校舎 26 会場

畜牛のベッチ中毒とシアナミドとの関連

Vetch poisoning in cattle and cyanamide in some *Vicia* species

○加茂 綱嗣（（独）農業環境技術研究所)
○Tsunashi KAMO (NIAES)

アメリカ合衆国では、ソラマメ属のヘアリーベッチ *Vicia villosa* が優占する牧草地で飼育された畜牛が、皮膚炎、結膜炎、および下痢などの症状を呈して死亡する例（ベッチ中毒）が報告されている（Panciera et al. 1966)。オーストラリアやアルゼンチンにおいてもヘアリーベッチを食べた畜牛の死亡例が報告された（Peet and Gardner 1986; Odriozola et al. 1991)。ベッチ中毒の症状は実験的にも再現されており、植物体に付着する昆虫やカビなどには起因しないことが示されたが、原因物質は不明である（Panciera et al. 1992)。一方、演者らはヘアリーベッチがシアナミドを含むことを見出した（Kamo et al. 2003)。シアナミドは 19 世紀末に工業生産の方法が確立されて以来、世界中で用いられてきた化合物であるが、天然物としてはこれが最初の発見であった。550 種以上の高等植物を対象にシアナミド含量を測定したところ、ヘアリーベッチの他、同じソラマメ属のクサフジ *Vicia cracca*、ハリエンジュ属のニセアカシア *Robinia pseudoacacia* のみがシアナミドを含んでいたことから、植物界におけるシアナミドの分布は非常に限定的であることが示唆された（Kamo et al. 2008)。近年、ソラマメ属の分子系統樹が報告され（Endo et al. 2010)、それによるとパープルベッチ *Vicia benghalensis* がヘアリーベッチやクサフジと最も近縁であることがわかった。パープルベッチもシアナミドを含む可能性が高いと考えられたため、本研究では、この種を含むいくつかのソラマメ属植物のシアナミド含量を測定した。その結果、パープルベッチの葉からもヘアリーベッチやクサフジと同程度のシアナミドが検出された（Kamo et al. 2012)。ベッチ中毒に関する文献の中には、ヘアリーベッチの他にパープルベッチも中毒の原因とする報告がある（Green and Kleynhans 1989)。シアナミドは幅広い生物種に対して毒性を示すことが知られている（William 1988; Bletsos 2005)。さらに、牛舎の消毒に用いられているカルシウムシアナミドが、加水分解してシアナミドになり、これが畜牛にベッチ中毒と似た症状を引き起こしているという報告もある（Onda et al. 2008)。これらの知見から、畜牛におけるベッチ中毒と、その原因となるいくつかのソラマメ属植物に含まれるシアナミドの関連が強く示唆される。

cyanamide, Vicia, vetch poisoning

講演番号：3C15a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ C 校舎 15 会場

Engineering fructosyl peptide oxidase to improve activity toward the fructosyl hexapeptide standard for HbA1c measurement

○STEFANO FERRI[1], YUSUKE MIYAMOTO[1], AKANE SAKAGUCHI-MIKAMI[2], WAKAKO TSUGAWA[1], KOJI SODE[1] ([1]Tokyo Univ. Agric. & Technol., [2]Tokyo Univ. Technol.)

Adequate metabolic control of blood glucose in diabetes patients not only improves the overall quality of life but can also delay or even prevent the onset of long-term complications of hyperglycemia. The preferred method for assessing long-term control of glycemic levels is measuring the glycated hemoglobin A1c (HbA1C). The fructosyl hexapeptide (fVHLTPE) that is liberated from the amino terminus of HbA1c by proteolytic digestion has been established as an international standard for the detection of HbA1c.

Rapid and reproducible enzyme assay systems based on the enzyme fructosyl amino acid oxidase are an attractive alternative for conventional clinical tests for glycated proteins. While some of these enzymes have relatively high activity toward small glycated peptides, and are referred to as fructosyl peptide oxidases (FPOXs), none have yet been reported to react with fVHLTPE.

We recently discovered a novel FPOX from *Phaeosphaeria nodorum* (PnFPOX) with the unique property of having higher activity with glycated dipeptide than glycated amino acid. We have now demonstrated that PnFPOX reacts with the glycated hexapeptide measurement standard of HbA1c, fVHLTPE, while the highly reactive *Coniochaeta* FPOX (FPOX-C) shows no detectable activity with the hexapeptide. We identified two loop regions within these FPOXs that greatly influence their enzymatic properties. The first loop has a strong influence on the ability to bind larger glycated peptides, while the second loop has a significant effect on catalytic activity. By carrying out loop substitution experiments, we engineered FPOXs with improved activity towards fVHLTPE. Additional engineering of these FPOXs yielded an FPOX with 17-fold greater dehydrogenase activity against fVHLTPE than wild-type PnFPOX. We have moved closer to the day when the internationally recognized standard of HbA1c will be directly measured by a convenient enzyme-based system.

1) Ferri, S., Kim, S., Tsugawa, W. and Sode, K. (2009) Review of fructosyl amino acid oxidase engineering research: a glimpse into the future of hemoglobin A1c biosensing. *J. Diabetes Sci. Technol.* 3, 585-592.
2) Kim, S., Ferri, S., Tsugawa, W., Mori, K. and Sode, K. (2010) Motif-based search for a novel fructosyl peptide oxidase from genome databases. *Biotechnol. Bioeng.* 106, 358-366.
3) Kim, S., Nibe, E., Tsugawa, W., Kojima, K., Ferri, S. and Sode, K. (2012) Construction of engineered fructosyl peptidyl oxidase for enzyme sensor applications under normal atmospheric conditions. *Biotechnol. Lett.* 34(3),491-497.

FAD-dependent oxidoreductase, fructosyl peptide oxidase, hemoglobin A1c

講演番号：3C15a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ C 校舎 15 会場

コレステロール酸化酵素の脱水素酵素化戦略

Turning cholesterol oxidase into dehydrogenase

○早出 広司[1,2]、小嶋 勝博[2]、フェリ ステファノ[1]、櫻井 潤[1]、津川 若子[1]([1]東京農工大院工生命工、[2](有)アルティザイム・インターナショナル)
○Koji SODE[1,2], Katsuhiro Kojima[2], Stefano Ferri[1], Jun Sakurai[1], Wakako Tsugawa[1] ([1]Tokyo Univ. Agric. & Technol., [2]Ultizyme International Ltd.)

【目的】血中コレステロールの体外診断薬にはコレステロール酸化酵素(Cholesterol Oxidase: ChOx)が用いられている。ChOx は FAD を補酵素とするグルコース・メタノール・コリン(Glucose Methanol Choline; GMC)酸化還元酵素ファミリーに属する代表的な酵素であり、コレステロールの酸化反応、および、酸化反応物の異性化反応を触媒する酵素である。一方、POCT 等の簡易診断・計測を目指した酸化還元酵素を用いる各種バイオセンシングにおいては人工電子受容体を用いる電気化学的計測方法の原理が主流である。しかし、ChOx をはじめとする酸化酵素は酸素を電子受容体とすることから、酵素反応において酸素と人工電子受容体とが競合し、電気化学計測が溶存酸素の影響を受ける。本研究では ChOx の酸化酵素活性に影響を与える残基に変異を導入することにより溶存酸素の影響を極小化した ChOx の開発を目指した。

【方法】ChOx の結晶構造をもとに、酸素との結合に重要であると見出される残基を抽出した。これらの残基に対して Ala 置換を中心として変異導入した。さらにその中で特に影響が顕著であった残基に対しては 19 種全ての残基に置換することで最適な変異酵素を選抜した。また、野生型酵素とともにこれらの変異体を大腸菌を宿主として組み換え生産し、その特性を検討した。

【結果】大腸菌を宿主とすることで、変異体を含む ChOx は活性のある水溶性の酵素として組み換え生産された。酸素分子との電子授受に関与すると予測される FAD 近傍の残基に対して、部位特異的変異導入による Ala 置換を行った酵素は全て酸化酵素活性が低下した。多くの変異酵素においては酵素活性そのものが大幅に減少していた。しかし、これらの変異酵素の中には野生型に比べ、酸化酵素活性が大きく低下し、かつ人工電子受容体を用いた脱水素酵素活性が維持されている変異体が見出された。これらの変異体に関する詳細な特性についても報告する。

FAD dependent oxidoreductase, Cholesterol oxidase, dehydrogenase

講演番号：3C15a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ C 校舎 15 会場

グルコース酸化酵素の脱水素酵素化戦略

Turning glucose oxidase into glucose dehydrogenase

○斉藤 匠子[1]、洞口 陽平[1]、小嶋 勝博[2]、フェリ ステファノ[1]、津川 若子[1]、早出 広司[1,2] ([1]東京農工大院工生命工、[2](有)アルティザイム・インターナショナル)
○ Shoko SAITO[1], Yohei HORAGUCHI[1], Katsuhiro KOJIMA[2], Stefano FERRI[1], Wakako TSUGAWA[1], Koji SODE[1,2] ([1]Tokyo Univ. Agric. and Technol., [2]Ultizyme International Ltd.)

【目的】グルコース酸化酵素(Glucose oxidase: GOx)は多様な産業に用いられている酵素の一つであり、グルコースへの高い基質特異性と安定性から特に糖尿病診断や自己血糖診断装置で広く利用されている。自己血糖診断装置においては、人工電子受容体を利用した電気化学的手法が用いられている。しかし、GOx は酸化酵素であり、本来は酸素を電子受容体とすることから、計測値が血中の溶存酸素の濃度の影響を受ける可能性がある。そこで、本研究では、部位特異的変異導入によって、真菌由来 GOx の酸化酵素活性(酸素を電子受容体としたグルコースの酸化における触媒活性)の低下及び脱水素酵素活性(人工電子受容体を利用したグルコースの酸化における触媒活性)の上昇を目指した改良型 GOx の獲得を目的とした。

【方法】GOx への変異導入は、酸素分子との相互作用が予測される残基に対して行った。現在報告されている GOx は結晶構造中に酸素分子を含まないので、同じくグルコース・メタノール・コリン酸化還元酵素スーパーファミリーに属するコレステロール酸化酵素の結晶構造と重ね合わせることによって、酸素分子の位置を予測した。野生型 GOx 及び構築した変異型 GOx は、大腸菌を宿主とした組換え生産を行った。組換え生産においてはいずれも不溶性の封入体(Inlcusion body: IB)を形成したので、IB をリフォールディングし、活性を有する GOx を調製した。このようにして調製した GOx は酸素及びフェナジンメトスルフェート(人工電子受容体)をそれぞれ電子受容体として用いた際の酵素活性を測定し、評価した。

【結果及び考察】酸素との相互作用が予測される残基を Ala 置換した変異体の多くは、酸化酵素活性及び脱水素酵素活性のいずれもが大幅に低下した。しかし、これらの変異体の中で、野生型と比較して酸化酵素活性が大幅に低下し、脱水素酵素活性が大幅に上昇した結果、脱水素酵素活性の酸化酵素活性に対する割合が野生型の 10 倍以上に向上した変異型酵素が見出された。以上より、酸素との相互作用が予測される残基に対して部位特異的変異導入を行うことで、グルコース酸化酵素の脱水素酵素化を行うことに成功した。

FAD dependent oxidoredactase, glucose oxidase, dehydrogenase

講演番号：3C15a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ C 校舎 15 会場

ジスルフィド結合導入による真菌由来 FAD グルコース脱水素酵素の安定性改良

Improvement of stability of fungi derived FAD-dependent glucose dehydrogenase by introducing disulfide bond

森 一茂[2]、小嶋 勝博[2]、○坂井 元気[1]、大西 陽介[1]、フェリ ステファノ[1]、早出 広司[1,2]（[1]東京農工大院工生命工、[2](有)アルティザイム・インターナショナル）
Kazushige MORI[2], Katsuhiro KOJIMA[2], ○Genki SAKAI[1], Yosuke ONISHI[1], Stefano FERRI[1], Koji SODE[1,2] ([1]Tokyo Univ. Agric. & Technol., [2]Ultizyme International Ltd.)

【目的】 糖尿病の治療は血糖値をコントロールすることが基本であり、糖尿病患者自らが血糖値を測定し、管理する血糖自己測定（Self Monitoring of Blood Glucose; SMBG）が普及している。SMBG に用いられるグルコースセンサーには、グルコース酸化酵素（GOx）もしくはグルコース脱水素酵素（GDH）がセンサー素子として用いられている。真菌由来 FAD 依存性グルコース脱水素酵素（FADGDH）は基質特異性が高く、溶存酸素濃度の影響を受けないことから SMBG 用酵素として注目されている。本酵素は真菌において糖タンパク質として生産されるが、これを大腸菌で組換え生産した場合、糖鎖修飾が行われず、真菌を用いて生産した場合よりも熱安定性が低下してしまうという問題点がある。

そこで本研究では、FADGDH にジスルフィド結合を導入することで、本酵素の熱安定性を向上させることを試みた。

【方法】 これまでに当研究室では FADGDH に関する大腸菌での組み換え生産ならびに構造予測について報告している[1) 2)]。この構造をもとに、分子内にジスルフィド結合を形成すると予測された部位を Cys 残基に置換することで変異酵素を構築した。この変異酵素および野生型酵素を大腸菌を宿主として組み換え生産した。酵素の精製は陰イオン交換クロマトグラフィーによって行い、得られた精製酵素の熱安定性評価及び基質特異性評価を行った。脱水素酵素活性の測定は、電子受容体としてフェナジンメトスルフェート（PMS）及びジクロロフェノールインドフェノール（DCIP）を用いて、600 nm における DCIP の退色を指標とした。

【結果】水溶性画分に GDH 活性が観察され、野生型及び変異体は水溶性タンパク質として発現することが確認された。変異体の GDH 活性及び基質特異性は野生型と同程度であった。熱安定性評価の結果、変異体は野生型に比べ大幅に熱安定性が向上していた。このことから、本変異導入によって GDH 活性及び基質特異性を変化させることなく、熱安定性が改良されたことが確認された。

１）“Screening of *Aspergillus*-derived FAD: -glucose dehydrogenases from fungal genome database”. K. Mori et al., Biotechnol Lett. ;33(11):2255-63 (2011)
２）“Review of Glucose Oxidases and Glucose Dehydrogenases: A Bird’s Eye View of Glucose Sensing Enzymes”. S.Ferri et al., J. Diabetes Science and Technology, 5(5),1068- 1076 (2011)

FAD dependent oxido reductase, Glucose dehydrogenase, thermal stability

講演番号：3C15a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ C 校舎 15 会場

糖尿病診断に適した Fructosyl peptide oxidase の開発

Development of fructosyl peptide oxidase suitable for diabetes diagnosis

○一柳 敦[1]、鉞 陽介[1]、渡辺 文太[3]、廣川 浩三[2]、五味 恵子[1]、中津 亨[4]、加藤 博章[4] ([1]キッコーマン研究開発本部、[2]キッコーマンバイオケミファ、[3]京大化研、[4]京大院薬)
○Atsushi ICHIYANAGI[1], Yosuke MASAKARI[1], Bunta WATANABE[3], Kozo HIROKAWA[2], Keiko GOMI[1], Toru NAKATSU[4], Hiroaki KATO[4] ([1]R&D Div., Kikkoman Corp., [2]Kikkoman Biochemifa Co., [3]Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., [4]Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyoto Univ.)

【目的】糖尿病患者数は増加の一途を辿っており、世界の患者数は 2012 年の 3 億 7100 万人から、2030 年までに 5 億 5180 万人に達する見通しがある。また、2007 年の統計によると国内の患者数は予備軍を含め 2210 万人に達している。国内では 2010 年 7 月に糖尿病診断基準が改定され、糖尿病診断の生体マーカーとして HbA1c が非常に重要視されることとなった。HbA1c はヘモグロビンの β 鎖 N 末端のバリン残基に血中のグルコースが結合し、アマドリ転移して生成する糖化タンパク質であり、血中の総ヘモグロビンに占める HbA1c の割合は過去 1~2 ヶ月の平均血糖値を反映する。我々はこれまでに、HbA1c の β 鎖 N 末端から遊離される N^{α}-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-valyl-L-histidine (αF-VH)を酸化的に脱糖化する酵素 Fructosyl peptide oxidase (FPOX)を発見し、世界初の酵素による HbA1c 測定法を開発した[(1)]。本研究では、以前着手した *Coniochaeta* 属由来 FPOX (FPOX-CET) と N^{ε}-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-lysine (εF-K)アナログ複合体の X 線結晶構造解析の結果から、FPOX の基質特異性に関与するアミノ酸残基を同定し、部位特異的変異導入による機能改変を行い、糖尿病診断に極めて適した性質を有する FPOX を作製した。

【方法・結果】FPOX-CET と εF-K アナログ複合体の X 線結晶構造解析の結果から、263 位のグリシンや 355 位のアラニンを対象にアミノ酸置換を導入することで、基質特異性を改善できる可能性が示唆された。そこで、FPOX-CET の両アミノ酸残基を各種アミノ酸に置換した変異体を作製して基質特性を評価した結果、いずれの変異体も αF-VH に対する特異性の向上が確認された。さらに、これまでに見出した基質特異性改善型、および熱安定性向上型[(2)]のアミノ酸置換と、今回見出した基質特異性改善型のアミノ酸置換を蓄積させた結果、αF-VH に対する特異性、熱安定性ともに FPOX-CET よりも向上した、糖尿病診断用途の酵素として非常に優れた性質を有する改変型 FPOX の作製に成功した。

(1) Hirokawa, K. *et al*., FEMS Microbiol. Lett., 235 (2004) 157-162.
(2) Hirokawa, K. *et al*., Appl. Microbiol. Biotechnol., 78 (2008) 775-781.

fructosyl peptide oxidase, hemoglobin A1c, diabetes diagnosis

講演番号：3C15a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ C 校舎 15 会場

Burkholderia sp. AIU 129 が産生するグリコールアルデヒドに作用するアルデヒド酸化酵素

Characterization of an aldehyde oxidase with glycolaldehyde-oxidizing activity from *Burkholderia* sp. AIU 129

○小川 なつみ[1]、三坂 裕一[1]、高橋 瑞希[1]、山田 美和[1]、小川 順[2]、片岡 道彦[3]、清水 昌[4]、礒部 公安[1]([1]岩手大・農、[2]京大院農・応用生命、[3]阪府大院・生命環境、[4]京都学園大・バイオ環境)
○Natsumi OGAWA[1], Yuuichi MISAKA[1], Mizuki TAKAHASHI[1], Miwa YAMADA[1], Jun OGAWA[2], Michihiko KATAOKA[3], Sakayu SHIMIZU[4], Kimiyasu ISOBE[1] ([1]Iwate Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Osaka Pref. Univ., [4]Kyoto Gakuen Univ.)

【目的】エチレングリコールを出発原料にしてグリコールアルデヒドとグリコール酸を経由してグリオキシル酸を生成する方法を確立するために、グリコールアルデヒドをグリコール酸に酸化するアルデヒドオキシダーゼを産生する微生物をスクリーニングし、分離菌の同定、最適培養条件、分離菌が産生する酵素の精製および諸性質について検討した。
【方法】目的の酵素を産生する微生物は、2-メトキシエタノールを単一炭素源とする培地を用いて集積培養法でスクリーニングした。酵素活性は、グリコールアルデヒドを基質にして、基質の酸化で生成される H_2O_2 を比色法（555 nm）で測定して求めた。酵素は、2-メトキシエタノール培地で 5 日間培養した菌体をマルチビーズショッカーで破砕して粗酵素液を調製し、硫安塩析と DEAE-Toyopearl、Pheny-Toyopearl、Q-Sepharose、Hydroxylapatite、Toyoprearl HW-55 の各カラムクロマトグラフィーを組み合わせて精製した。
【結果・考察】分離菌は、*Burkholderia* 属細菌と同定され、2-メトキシエタノール培地で酵素を誘導生成し、酵素生成量は 5 日間培養で最大に達した。そして 40 L 培養の菌体を用いて上記の方法で酵素を精製した結果、Native-PAGE 分析で単一のタンパク質バンドが得られた。本酵素のグリコールアルデヒドに対する活性は、*Peudomonas* sp. AIU 362 由来のアルデヒドオキシダーゼ［1］よりも高く、グリコールアルデヒドとの反応の最適 pH は 5.0 以下で、pH 5.5-8.5 で 30℃，30 分間加温しても安定であった。本酵素は、グリコールアルデヒドだけでなくアセトアルデヒドやプロピオンアルデヒドなどの短鎖脂肪族アルデヒドおよびベンズアルデヒドなどの芳香族アルデヒドを酸化したが、短鎖脂肪族アルコールには作用せず、基質特異性の広いアルデヒドオキシダーゼであった。以上のように、本酵素は、グリコールアルデヒドをグリコール酸に変換するが、グリコール酸およびグリオキシル酸には作用しなかったので、グリコールアルデヒドのグリコール酸への変換、および他の酵素との組み合わせによるグリオキシル酸の生化学的な合成に有効であると考えられた。

1. Sasaki, Y. *et al.*, J. Biosci. Bioeng., **106**: 297-302 (2008).

Burkholderia sp., aldehyde oxidase, glycolaldehyde

講演番号：3C15a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ C 校舎 15 会場

Ochrobactrum sp. AIU 240 が産生するグリコール酸酸化酵素
Glycolic acid oxidase from *Ochrobactrum* sp. AIU 240
○山田 美和、東山 貴紀、佐々木 みのり、礒部 公安（岩手大・農）
○Miwa YAMADA,Takanori HIGASHIYAMA,Minori SASAKI,Kimiyasu ISOBE (Iwate Univ.)

【目的】グリオキシル酸は、医薬品、農薬、香料、化粧品などの中間体や原料として利用され、医療、農業、食品工業など幅広い分野で応用可能な有用物質である。本化合物は、現在、グリオキサールと硝酸を用いた酸化反応で化学合成されているが、不要な副反応生成物が大量に合成される欠点がある。そこで、我々は、2 種の酸化酵素を利用し、エチレングリコールからグリコールアルデヒドおよびグリコール酸を経由してグリオキシル酸を合成する系を考案し、本研究では、グリコール酸酸化酵素産生菌を探索し、分離菌が産生する酵素の性質について解明した。
【実験】グリコール酸酸化酵素活性を有する微生物のスクリーニングは、1, 2-プロパンジオールを単一炭素源とする培地を用いて集積培養法で行った。酵素活性は、グリコール酸の酸化によって生じる過酸化水素を、ペルオキシダーゼとの酸化反応に伴う 4-Aminoantipyrine と *N*-Ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline の縮合により生じた赤紫色を 555 nm の吸光度として測定する比色法によって測定した。分離菌株中で最も高いグリコール酸酸化活性を示した 1 菌株を選定し、培地に加えるコーンスティープリカー濃度および培養日数を検討することにより、高いグリコール酸酸化酵素産生量を得るための培養条件を決定した。酵素の性質検討は、最適培養条件で 20 L 培養し、得られた粗酵素液を各種クロマトグラフィーに供して部分精製した酵素標品を用いて行った。
【結果】スクリーニングで選抜した菌株は、*Ochrobactrum* sp. AIU 240 と同定された。培地の組成を検討した結果、本菌のグリコール酸化酵素産生量には、0.5% (v/v) 量のコーンスティープリカー添加が有効であった。そして、本菌は、培養 4 日目に酵素産生量が最も高くなったが、2 日培養で最大酵素産生量の約 90%に達したので、培養日数を 2 日間と決定した。また、50 mM グリコール酸を基質として 30℃で酵素活性を測定した結果、最適反応 pH は 5.5 であり、pH 5.0 から 6.0 において安定で、pH 6.5 以上では不安定であった。酵素活性反応動力学的解析の結果、本酵素のグリコール酸に対する K_m 値は約 100 mM であった。以上のように本研究では、グリコール酸に高い酸化酵素活性を示す酵素を産生する細菌を単離し、本酵素の酵素学的性質の一部を明らかとすることができた。

Ochrobactrum sp., glycolic acid oxidase, glyoxilic acid

講演番号：3C15a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ C 校舎 15 会場

4-アミノブチルアミドを酸化する酵素の探索

Screening of enzymes exhibiting oxidase activity for 4-aminobutyramide

○菅原 麻美[1]、松井 大亮[2,3]、浅野 泰久[2,3]、米田 英伸[2]、礒部 公安[1]([1]岩手大・農、[2]富山県大工・生工研セ、[3]JST, ERATO)
○ Asami SUGAWARA[1], Daisuke MATSUI[2,3], Yasuhisa ASANO[2,3], Hidenobu KOMEDA[2], Kimiyasu ISOBE[1] ([1]Iwate Univ., [2]Toyama Pref. Univ., [3]JST, ERATO)

【目的】*Pseudomonas* sp. AIU 813 由来の L-アミノ酸オキシダーゼ（L-AAO）は、L-リジン、L-オルニチン、L-アルギニンに特異的な酵素であるが、アンモニアを遊離するオキシダーゼ反応（H_2O_2 生成）と二酸化炭素を遊離するオキシゲナーゼ反応（H_2O_2 非生成）を触媒することが明らかにされている[1,2]。本研究では、L-オルニチンのオキシゲナーゼ反応生成物と推定される 4-アミノブチルアミド（4-ABAD）を酸化して H_2O_2 を生成する酵素を微生物からスクリーニングし、分離菌が産生する 4-アミノブチルアミド酸化酵素について調べた。
【方法】目的酵素を産生する微生物のスクリーニングは、*n*-ブチルアミンを単一窒素源とする培地で 2 日間培養した後、菌体を破砕した粗酵素液を用いて行った。酵素活性は、4-ABAD を基質にして、オキシダーゼ反応で生成される H_2O_2 を 555 nm で比色測定して算出した。酵素の性質は、菌体破砕した粗酵素液を DEAE-Toyopearl と Phenyl-Toyopearl のカラムクロマトグラフィーで部分精製した酵素を用いて検討した。
【結果】*Aspergillus niger* AKU 3302 由来モノアミンオキシダーゼと 4-ABAD を反応させた結果、本酵素が、4-ABAD を 4-オキソブチルアミドに酸化して H_2O_2 を生成することが明らかになった。しかし、4-ABAD に対する K_m 値が約 15 mM と高く、L-AAO との共役反応には不向きであった。そこで、*n*-ブチルアミン培地で良く生育する 13 株のカビを選抜して *n*-ブチルアミンと 4-ABAD に対する酸化活性を調べた。その結果、いずれの菌株も両化合物を酸化し、上記の方法で目的酵素が得られることが明らかになった。この中から 4-ABAD に対する K_m 値が小さい酵素を産生する 1 株を選んで 4-ABAD 酸化酵素について調べた。選抜菌が産生する 4-ABAD 酸化酵素は、Phenyl-Toyopearl カラムクロマトグラフィーで 2 つのピークに分離され、第 1 の酵素は 4-ABAD に対する K_m 値が 8.6 mM で、最適 pH は 8.5 であった。第 2 の酵素は 4-ABAD に対する K_m 値が 0.68 mM で、最適 pH は 7.5 であった。そこで、L-AAO と第 2 の酵素を L-リジン溶液に添加して反応した。その結果、第 2 の酵素の添加により強い発色が得られ、本酵素が L-AAO との共役反応に使用できることが明らかになった。

１．Isobe, K. et al., J. Biosci. Bioeng., **114**: 257-261 (2012).
２．松井、他 2 名、日本農芸化学会 2012 年度大会

4-aminobutyramide, amine oxidase, L-amino acid oxidase

講演番号：3C15a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ C 校舎 15 会場

ギ酸オキシダーゼは一酸化窒素還元活性を持つ

Formate oxidase has an activity of reducing nitrite

○内田 博之[1]、瀬古 雄亮[1]、黒柳 美莉[1]、若泉 杏奈[1]、沖 昌也[1]、櫻井 明彦[1]、三上 文三[2]([1]福井大工、[2]京大農)
○Hiroyuki Uchida[1], Yuusuke Seko[1], Miri Kuroyanagi[1], Anna Wakaizumi[1], Masaya Oki[1], Akihiko Sakurai[1], Bunzou Mikami[2] ([1]Fukui Univ., [2]Kyouto Univ.)

我々は、*Debaryomyces vanrijiae* MH201 や *Aspergillus oryzae* RIB40 の、酸素を用いてギ酸を酸化するギ酸オキシダーゼ（FOD）の研究を行ってきた。FOD は、グルコースーメタノールーコリンオキシドレダクターゼファミリーに属するが、このファミリーの他の酵素と異なり、8-formyl-FAD をコファクターとする。また、このファミリーの他の酵素では FAD 近傍に活性発現に重要な His-Asn 対又は His-His 対が存在するが、FOD では同様の場所に His-Arg 対が存在する。本発表では、FOD の、ギ酸と立体構造が類似した、亜硝酸に対する作用について報告する。

Aspergillus oryzae RIB40 の FOD 遺伝子を組み込んだ大腸菌が生産する酵素を用いた。精製した FOD 画分は 355、410、470 及び 690 nm 付近に吸収ピークを示す。355 と 470 nm 付近の吸収は酸化型 8-formyl-FAD に、410 と 690 nm 付近の吸収はセミキノン型に由来するものである。

精製した FOD と $NaNO_2$ を pH 4.0 で反応させると、スペクトル変化が起きた。透析により $NaNO_2$ を除去した後の FOD の吸収スペクトルには、410 と 690 nm 付近のピークが無く、355 と 470 nm 付近のピークだけであった。一方、精製した FOD と $NaNO_2$ を pH 7.0 で反応させた場合は、吸収スペクトルの変化は起きなかった。

精製した FOD を、嫌気的条件、pH 4.0 で 1.0 mM dithionite と反応させた後、透析した。透析後の FOD の吸収スペクトルには、355 と 470 nm 付近のピークが無く、410 と 690 nm 付近のピークは大きく、この dithionite 処理した酵素内では、8-formyl-FAD はセミキノン型として主に存在すると考えられた。この処理した FOD と $NaNO_2$ を pH 4.0 で反応させ、透析した。透析後の FOD は酸化型 8-formyl-FAD に由来する吸収ピークだけを示した。

これらの結果より、pH 4.0 において FOD 内でセミキノン型 8-formyl-FAD から亜硝酸へ一電子移動が起こる、セミキノン型 8-formyl-FAD を持つ FOD は、pH4.0 で亜硝酸を一酸化窒素に還元する活性を持つと考えられる。

嫌気的条件下、pH 4.0 で酸化型 8-formyl-FAD を持つ FOD をギ酸と反応させた後、酸素でバブリングを行った。吸収スペクトルの変化より、FOD 内のギ酸で還元された 8-formyl-FAD は、酸素により主に酸化型まで再生されるが、一部はセミキノン型までしか酸化されないことが分った。

以上の結果は、FOD が、細胞内のある条件下において、亜硝酸の一酸化窒素への還元に関与している可能性を示唆している。

formate oxidase, 8-formyl-FAD, nitrite

講演番号：3C15a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ C 校舎 15 会場

超好熱アーキアに存在する色素依存性 D-乳酸脱水素酵素の機能解析
Characterization of dye-linked D-lactate dehydrogenase from hyperthermophilic archaea
○里村 武範[1]、金子 祥[1]、大井 愛実[1]、布浦 拓郎[2]、高木 善弘[2]、高見 英人[2]、高井 研[2]、櫻庭 春彦[3]、大島 敏久[4]、末 信一朗[1] ([1]福井大院工、[2]海洋研究開発機構、[3]香川大農、[4]九州大院農)
○ Takenori SATOMURA[1], Akira KANEKO[1], Manami OI[1], Takuro NUNOURA[2], Yoshihiro TAKAKI[2], Hideto TAKAMI[2], Ken TAKAI[2], Haruhiko SAKURABA[3], Toshihisa Ohshima[4], Shin-ichiro SUYE[1] ([1]Univ. Fukui, [2]JAMSTEC, [3]Kagawa Univ., [4]Kyushu Univ)

[目的]
色素依存性 D-乳酸脱水素酵素（Dye-DLDH）は FAD を補酵素として有しジクロロインドフェノールやフェリシアン化カリウムなどの人工色素を電子受容体として D-乳酸の酸化反応を触媒する酵素である。本酵素は人工色素を介して D-乳酸と電極との間で電子授受が可能であるため、D-乳酸を電気化学的信号として簡便に測定できるバイオセンサー用素子としての利用が期待される。しかしながら、色素依存性脱水素酵素は総じて不安定であるためセンサー用素子としての応用利用はおろか酵素化学的性質の解析もほとんど行われていなかった。我々の研究グループでは、超好熱菌より安定性の高い Dye-DLDH の酵素化学的性質の解析に成功している。しかしながら、現在までに Dye-DLDH の立体構造解析にまで成功したものは報告されていない。そこで、本研究では Dye-DLDH の詳細な解析を進めるために、超好熱菌より新規 Dye-DLDH の探索し、詳細な機能解析、立体構造解析を行うことを目的として研究を行った。
[方法]
超好熱菌のゲノム情報より Dye-DLDH をコードしていると考えられるオープンリーディングフレーム（ORF）を探索した。その結果、超好熱菌アーキアである *Thermoproteus tenax*、*Caldiarchaeum subterraneum* のゲノム上に Dye-DLDH をコードすると考えられる 3 つの ORF（PRF ID: TTX_0794、TTX_1317、CSUB_C1080）を見出すことに成功した。そこで、これら ORF についてクローニングを行い、大腸菌によるタンパク質発現系の構築を行った。
[結果]
TTX_0794、C1080 をコードするタンパク質については、大腸菌にタンパク質を発現させた際、可溶性画分にタンパク質の発現が確認できた。一方、TTX_1317 をコードするタンパク質については、不溶性画分に回収されたため本タンパク質は封入体を形成していることが明らかとなった。可溶性画分に回収されたタンパク質について、色素依存性脱水素酵素活性を確認したところ、Dye-DLDH 活性を確認することに成功した。現在、酵素の詳細な機能解析をタンパク質の結晶化条件の検討を進めている。

hyperthermophilic archaea, dye-linked dehydrogenase, D-lactate

講演番号：3C15a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ C 校舎 15 会場

グラム陰性菌由来アロステリック型 D 型乳酸脱水素酵素の酵素学的解析

Allosteric activation of D-lactate dehydrogenase from Gram-negative bacteria

○古川 那由太、戸川 美里、中島 将博、田口 速男（東理大理工）
○Nayuta FURUKAWA,Misato TOGAWA,Masahiro NAKAJIMA,HAYAO TAGUCHI (Tokyo Univ Sci)

D 型乳酸脱水素酵素 (D-LDH) は、NAD(H) を用いてピルビン酸と D 型乳酸との間の酸化還元反応を触媒する。これまで、*Lactobacillus* 属乳酸菌由来の D-LDH で、構造解析や機能解析を通じて数多くの知見が得られており、D-2-ヒドロキシ酸を基質とする種々の脱水素酵素とともに D-2-ヒドロキシ酸脱水素酵素ファミリーを構成していることが明らかになっている。一方、多くのグラム陰性細菌にも D-LDH のホモログ遺伝子が分布しているが、その機能について解析されているものはほとんどない。唯一、大腸菌由来の D-LDH の性質が 1960 年代に報告されているが、基質のホモトロピックな協同効果による活性化を受けるアロステリック酵素であるなど、乳酸菌由来の酵素にはみられない特徴が記載されている。本研究では、このようなグラム陰性菌 D-LDH の構造と機能を解明するため、大腸菌の D-LDH ホモログ(ECLDH)とあわせて、*Fusobacterium nucleatum* subsp. nucleatum 由来 D-LDH ホモログ(FNLDH)を His-tag をつけて発現させ、精製してその性質を解析した。

活性の pH 依存性を調べたところ、FNLDH の最大反応速度は pH に依らず 130 U/mg 前後を示したが、解離定数は pH の上昇に伴って大きく増加した。また、酸性条件下では双曲線型のピルビン酸飽和曲線を示したが、中性からアルカリ性へ移行するにつれて、基質飽和曲線がシグモイド型へと変化し、pH 8 以上ではヒル係数が約 2 となり、顕著な正のホモトロピック効果を示すようになった。この傾向は ECLDH でも確認でき、グラム陰性菌には、アロステリック特性をもつ D-LDH が広く分布していることが示された。さらに、乳酸菌由来の D-LDH がホモ二量体であるのに対して、ゲル濾過クロマトグラフィーの結果、FNLDH は四量体を形成していることが示唆された。これらの結果は、グラム陰性菌には、乳酸菌のものとは、かなり性質や構造の異なる D-LDH が分岐進化してきたことを示している。

現在、他のグラム陰性菌由来の D-LDH の性状解析とともに、FNLDH や ECLDH の構造解析が進行中である。

D-lactate dehydrogenase, allosteric activation, Gram-negative

講演番号：3C15a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ C 校舎 15 会場

細菌アロステリック乳酸脱水素酵素の恒常的高活性型酵素への改変

Conversion of bacterial allosteric lactate dehydrogenases to constitutively active enzymes

○田口 速男[1]、池原 洋子[1]、宗田 亮輔[1]、室井 千尋[1]、荒井 一人[1]、宮永 顕正[2]、中島 将博[1]([1]東京理大理工、[2]東工大院理工)
○Hayao Taguchi[1], Yoko Ikehara[1], Ryosuke Muneta[1], Chihiro Muroi[1], Kazuhito Arai[1], Akimasa Miyanaga[2], Masahiro Nakajima[1] ([1]Tokyo Univ. of Science, [2]Tokyo Inst. of Technol.)

【目的】L-乳酸脱水素酵素（LDH）は、補酵素 NAD を用いて、ピルビン酸と L-乳酸間の酸化還元反応を触媒する。細菌には多様な性質の LDH が存在するが、その多くは活性発現に解糖系の中間代謝産物、フルクトース 1,6-二リン酸を活性化因子として要求するアロステリック型酵素である。私たちは、これらの LDH の活性調節機構を解明するとともに、こうした調節特性を改変し、より有用性の高い酵素へと改良するための設計基盤の確立を目指している。本研究では、乳酸菌 *Lactobacillus casei* と高度好熱菌 *Thermus caldophilus* のアロステリック LDH（それぞれ LCLDH と TCLDH）を素材として、それぞれの調節特性の改変を試みた。

【方法、結果】LCLDH と TCLDH の活性化状態（R 状態）と不活性化状態（T 状態）の立体構造を解析した結果、２つの酵素に共通して、α２F ヘリクスの N-末端側を軸とした回転の動きがアロステリック転移に本質的な構造変化であることが示された。すなわち、このヘリクスの動きが、同ヘリクス上にある基質結合に必須な Arg171 残基側鎖の方向を変え、酵素活性スイッチのオンオフをする役割を担っていると考えられる。これまでに、私たちは LCLDH に Glu67,Asp68,Lys178,Lys235 を部位特異的置換で導入すると、FBP 非依存的に高活性を発揮する酵素に変換されることを報告している。構造解析の結果、この変異型 LCLDH では、これらの導入残基が Q 軸サブユニット間で塩橋ネットワークを形成しており、これがα2F ヘリクスに活性型の方向をとらせる要因となっていることが示された。一方、これまでの知見から、TCLDH では、アロステリック平衡が LCLDH よりも大きく T 状態へ偏っていることが推定される。TCLDH に同様な置換を導入したところ、FBP 非依存的な酵素活性は顕著に増大したものの、FBP 存在下での高活性には大きく及ばなかった。さらに、この変異型酵素においてα２F ヘリクス上に位置する Arg173、および立体構造上同ヘリクスの C 末端近傍に位置する Arg216 をそれぞれ Gln と Leu に置換した結果、FBP 非依存的な活性は加算的に向上した。得られた変異型酵素は、FBP 存在下の野生型酵素に匹敵する高活性を FBP 非依存的に示し、野生型酵素よりもさらに高い熱安定性を示した。一方、LCLDH の場合は、Arg173 を Gln に置換しても、FBP 非依存的な酵素活性の上昇はみられず、むしろ低下する傾向がみとめられた。これらの結果から、TCLDH においては、α２F ヘリクスのC末端周辺の正電荷がうみだす静電的な反発作用が、T状態をより大きく安定化させる要因となっていることが示唆された。

lactate dehydrogenase, allosteric enzyme, lactate

講演番号：3C15a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ C 校舎 15 会場

フルクトース脱水素酵素の分子内電子移動に関する考察

Intramolecular electron transfer reaction of fructose dehydrogenase

○河井 翔太[1]、薬師 寿治[2]、松下 一信[2]、北隅 優希[1]、白井 理[1]、加納 健司[1] ([1]京大院農、[2]山口大院農)
○Shota KAWAI[1], Toshiharu YAKUSHI[2], Kazunobu MATSUSHITA[2], Yuki KITAZUMI[1], Osamu SHIRAI[1], Kenji KANO[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Yamaguchi Univ.)

【目的】

Gluconobacter sp. 由来のフルクトース脱水素酵素（FDH）はFADを有するサブユニット及びheme Cを有するサブユニットを含むヘテロトリマーであり、細胞質膜に結合して機能している．また本酵素は電極への直接電子移動（DET）反応を行うことができ，その反応性は非常に高いことが知られている．しかしながら，このDET反応の詳細なメカニズムは未だに不明である．FDHが高効率なDET反応を行う理由を解明することで，次世代バイオセンサやバイオ燃料電池への応用が期待できるだけでなく，新規有用酵素の探索にも役立つと予測される．当研究室ではこれまでFDHのDET反応がheme Cを経由して進行している可能性が高いことを示した．そこで，本研究ではFDHのheme Cに注目し，heme Cの特性解析並びに分子内電子移動について考察することを目的とした．

【方法】

Heme C含有サブユニット欠損型FDH（Δ*c*FDH）の発現系およびheme C含有サブユニット（FDH*c*）単独発現系を構築した．酵素濃度，活性はそれぞれFADあるいはheme C由来の吸光度，prussian blueによる吸光度変化より算出した．アルカリーピリジンヘモクロム法を用いてFDH1分子あたりのheme C含量を算出した．電気化学測定には作用電極として金電極，参照電極として銀/塩化銀，対極として白金を用い，McIlvaine緩衝液中にて掃引速度10mVs^{-1}で行った．

【結果・考察】

FDHのheme C含有サブユニット内にはheme C結合モチーフが3か所あった．そこで，単離精製したFDHを用いheme C含量の測定を行ったところ，1分子につき2分子以上のheme Cが含まれていることが判明した．遺伝子配列から推定した結合数より少なくなったのは測定法の精度の問題と判断した．

Δ*c*FDHおよびFDH*c*の発現系の構築を行い，それに成功した．また，基質としてフルクトースを含む緩衝液内に酸化型のFDH*c*を添加後，Δ*c*FDHを加えることで，heme Cが還元体となることを分光学的に確認した．これはフルクトースからΔ*c*FDH内のFADにより引き抜かれた電子がFDH*c*内のheme Cへ伝達されたためと考えた．

本発表では，電気化学的手法を用いてFDH*c*に対するΔ*c*FDHの二分子反応速度定数を算出し，キノン類などに対する二分子反応速度定数と比較することでFDH分子内のFAD-heme C間の分子内電子移動反応速度について述べる予定である．

fructose dehydrogenase, electron transfer, flavoheme

講演番号：3C15a15
講演日時、会場：3 月 26 日 11:48～ C 校舎 15 会場

好熱性糸状菌由来 FAD 依存型グルコース脱水素酵素の遺伝子クローニング
Gene cloning of FAD-dependent glucose dehydrogenase from thermophilic fungi
○小澤 一道、佐々木 典子、木下 菜央、平塚 淳典、横山 憲二（産総研・ナノシステム）
○Kazumichi OZAWA, Noriko SASAKI, Nao KINOSHITA, Atsunori HIRATSUKA, Kenji YOKOYAMA (NRI, AIST)

【目的】
フラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコース脱水素酵素（FADGDH, EC 1.1.99.10）は、FAD を補酵素として D-グルコースから D-グルコノ-1,5-ラクトンへの酸化反応を触媒する酵素であり、*Aspergillus oryzae* や *Aspergillus terreus* といった常温性糸状菌から発見されている。本研究では常温性糸状菌由来 FADGDH よりも耐熱性に優れた FADGDH の取得を目的として、好熱性糸状菌からの FADGDH 遺伝子のスクリーニングとクローニングと行なった。さらに、クローニングした FADGDH 遺伝子の大腸菌における発現系構築を行なった。
【方法と結果】
（独）製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター（NBRC）から 17 種の好熱性糸状菌を購入し、スクリーニング対象種とした。既報の FADGDH の一次構造に基づいて設計した縮重プライマーを用いて好熱性糸状菌ゲノム DNA を鋳型とする縮重 PCR を試みたところ、*Talaromyces emersonii* NBRC31232 と *Thermoascus crustaceus* NBRC9129 の 2 種の好熱性糸状菌から *Aspergillus* 属糸状菌由来 FADGDH 遺伝子と高い相同性を有する遺伝子断片の増幅が確認された。このことから、*Ta. emersonii* と *Th. crustaceus* のゲノムに FADGDH 遺伝子が存在することが示唆された。次に、増幅された遺伝子断片をプローブとして *Ta. emersonii* と *Th. crustaceus* のそれぞれから FADGDH 全領域を包括するゲノム DNA 断片のクローニングを行なった。塩基配列解析の結果、*Ta. emersonii* FADGDH 遺伝子 ORF は 1779 bp からなり 593 アミノ酸を、*Th. crustaceus* FADGDH 遺伝子 ORF は 1752 bp からなり 584 アミノ酸をコードしていた。いずれの FADGDH もシグナル配列と FAD 結合モチーフが存在することが推定された。
次に、組換え酵素の調製を目的として、FADGDH 遺伝子の大腸菌における発現系構築を試みた。その結果、シグナル配列を欠失させた成熟型 FADGDH をコードする遺伝子を発現させた場合に、組換え酵素は大腸菌可溶性画分に産生された。大腸菌可溶性画分に産生された組換え酵素を各種カラムクロマトグラフィーにより精製したところ、*Ta. emersonii* と *Th. crustaceus* のいずれの FADGDH も FAD を補因子として含むホロ型酵素として精製されたことがわかった。

glucose dehydrogenase, filamentous fungi, gene cloning

講演番号：3C15p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ C 校舎 15 会場

Clostridium 属細菌に由来する新規金属オキシダーゼの異種発現と性質
Heterologous expression and characterization of 2-domain multicopper oxidase from *Clostridium beijerinkii*

○原 唯歩、木村 祐二、谷村 孝将、片岡 邦重、櫻井 武（金沢大院・自然科学）
○ Yuiho HARA,Yuji KIMURA,Kousyo TANIMURA,Kunishige KATAOKA,Takeshi SAKURAI (Kanazawa Univ.)

【目的】マルチ銅オキシダーゼ（MCO）は微生物から高等動植物に至るまで広く分布し，フェノール化合物の酸化重合・分解，金属イオンのホメオスタシス等に関与している。MCO は活性発現に必要な 4 個の銅（Type I 銅，Type II 銅，複核 Type III 銅）を保持しており，その構造から 2 ドメイン型(2dMCO)，3 ドメイン型(3dMCO)，6 ドメイン型(6dMCO)に分類されている。近年，ゲノム情報から様々な生物に機能未知の MCO の存在が確認されているが，我々は偏性嫌気性桿菌 *Clostridium beijerinkii* に 2dMCO をコードする遺伝子を見出した。最もよく研究されている 2dMCO は，*Streptomyces coelicolor* 由来の SLAC であり，SLAC のアミノ酸配列と *C. beijerinkii* の 2dMCO(CbLac)のアミノ酸配列を比較したところ，SLAC には存在しない 28 アミノ酸残基の挿入配列もつことが分かった。そこで，我々は，CbLac の性質や機能を解析するために，大腸菌を宿主とした組換え型酵素(rCbLac)の発現系を構築した。
【結果と考察】 CbLac を可溶性画分に発現させるため，pMAL-c2 ベクター(NEB)に CbLac 遺伝子を合成して挿入し，マルトース結合タンパク質(MBP)を CbLac の N 末端側に連結した融合タンパク質(MBP-CbLac)の発現系を構築した。*E. coli* BL21(DE3)株を形質転換・培養し，可溶性画分に発現した MBP-CbLac をアミロースアフィニティーカラムを用いて精製後，Factor Xa を用いて MBP を切除し，rCbLac を得た。本酵素は分子量約 35kDa のサブユニットからなる 3 量体で，サブユニット当り 4 つの銅イオンを含むホロ体として発現した。rCbLac は UV-Vis スペクトルでは，Type I 銅の Cys(S_{π}^{-})→Cu^{2+}に由来する 615 nm の吸収及び Type III 銅部位の架橋 OH^{-}→Cu^{2+}に由来する 330 nm 付近の吸収を示し，EPR スペクトルでは，Type I，II 銅に由来するシグナルを与えたが，これらのスペクトルから Type I 銅の軸位には Met ではなく Asn 側鎖のアミド酸素が配位した構造が示唆された。rCbLac は Cu^{+}や Fe^{2+}のような遷移金属イオンに対して比較的活性が高く，反応系に Cu^{2+}を添加すると，guaiacol や Fe^{2+}に対する活性が~14 倍増大し，また，新たに 2,6-dimethoxyphenol，catechol に対する活性が発現した。このような Cu^{2+}の添加効果は *E. coli* の一価銅オキシダーゼ CueO が示すユニークな有機基質酸化活性と類似していた。以上のことから，CbLac は生体内において一価銅オキシダーゼとして機能する最初の 2dMCO であり，しかも，光合成植物の有するフィトシアン型の Type I 銅を有するというユニークな特徴を有していることが分かった。

multicopper oxidase, laccase, *Clostridium beijerinkii*

講演番号：3C15p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ C 校舎 15 会場

絶対嫌気性菌 *Clostridium* 属細菌の O_2 代謝機構に関する研究

Identification of O_2-metabolic enzyms in obligate anaerobic *clostridium* speceies

○熊井 康人、鈴木 一平、工藤 貴靖、渡辺 大晃、新村 洋一、川崎 信治（東農大応生科・バイオ）
○Yasuhito KUMAI, Ippei SUZUKI, Takayasu KUDOU, Hiroki WATANABE, Youichi NIIMURA, Sinji KAWASAKI (Dept. of Bioscience, Tokyo Univ.of Agric.)

【背景】代表的な絶対嫌気性菌である *Clostridium* 属細菌の O_2 代謝機構の解明を目的とし実験を行っている。全ゲノム解読種であるアセトン・ブタノール発酵菌 *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 は自身が消費可能な O_2 濃度おいて O_2 を消費し、嫌気条件下と同様に良好な生育を示す。*C. acetobutylicum* への O_2 ストレス付与後の二次元電気泳動によるタンパク質発現解析や、O_2 代謝に関与すると推定される複数のオペロン解析から、NADH を電子供与体とする NADH rubredoxin oxidoreductase（NROR）、rubredoxin（Rd）、a-type flavoprotein（FprA2）、desulfoferrodoxin（Dsr）、rubperoxin（Rpr）が互いに共役し、O_2、O_2^-、H_2O_2 を高速かつ同時に無毒化・還元する複合酵素系が明らかとなった [1]。しかし、他の *Clostridium* 属細菌におけるこれらの酵素群の分布、機能性は依然として不明であり、本研究で更なる調査を行った。

【方法・結果】

データベース解析を用い、*Clostridium* 属細菌における複合酵素系の分布調査を行った。その結果、*Clostridium* 属細菌の公的ゲノムデータベース内において NROR に高い相同性を示すタンパク質は検出されなかった。そこで反応起点となる NROR に着目し研究を行っている。

NROR ホモログを保持しない数種の *Clostridium* 属細菌を供試菌として cell free extract レベルにおける NROR 代替酵素活性の測定を行い、活性を指標とした同定を試みている。また、データベース解析により NROR 代替酵素を推定し、大腸菌による過剰発現株の構築、精製、機能解析を行っている。

1) Kawasaki et al. AEM 75:1201-1029(2009)

clostridium, oxidreductase, rubredoxin

講演番号：3C15p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ C 校舎 15 会場

絶対嫌気性菌 *Clostridium kluyveri* の酸素毒性防御酵素系
O_2 and ROS scavenging enzymes in an obligate anaerobic bacteria, *Clostridium kluyveri*
○竹内 弘貴[1]、斎藤 洋臣[1]、高橋 徹[1]、石坂 啓泰[2]、新村 洋一[3]、川崎 信治[4]([1]東京農業大学　院農、[2]東京農業大学　学生、[3]東京農業大学　教授、[4]東京農業大学　准教授)
○Hiroki TAKEUCHI[1], Hiroomi SAITOU[1], Toru TAKAHASHI[1], Hiroyasu ISHIZAKA[2], Youichi NIIMURA[3], Shinji KAWASAKI[4] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]Tokyo Univ. of Agric., [4]Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】
絶対嫌気性菌の酸素感受性機構の解明を目的とし、代表的な絶対嫌気性菌である *Clostridium* 属細菌を用いて研究を行っている。これまでに、アセトン・ブタノール発酵を行う菌として知られる *Clostridium acetobutylicum* DSM792^T（以下 *C. acetobutylicum*）において NADH : rubredoxin oxidoreductase （NROR）が rubredoxin（Rd）に電子を伝達し、さらに FprA2 、Dsr 、Rpr と共役して O_2 、O_2^- 、H_2O_2 、を同時に、かつ高速に無毒化する複合反応系が同定された[1)]。しかし、*C. acetobutylicum* 以外の他の *Clostridium* 属細菌において、これら酵素系の存在と機能性は不明である。
そこで、同じ *Clostridium* 属細菌であり、かつ炭素数の低い化合物から炭素数の多い化合物を合成する、ユニークな代謝系を持つ *Clostridium kluyveri* DSM555^T（以下 *C. kluyveri*）を供試菌として用いて実験を行った。
本学会では *C. kluyveri* 内に存在する酸素毒性防御酵素系の分布と機能性について報告する。
【方法・結果】
C. kluyveri のゲノム上に NROR と Rd は存在しなかったが、Rd をドメインとして保持する Hrb と FprA が存在した。また、Dsr と Rpr のホモログは存在した。現在、それら酵素の精製と複合反応解析を行っている。

1）Kawasaki　et al .　AEM　75：1201 – 1029（2009）

Clostridium kluyveri, oxidoreductase, rubredoxin

講演番号：3C15p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ C 校舎 15 会場

ラン藻と大腸菌の鉄還元酵素（第 5 報）
Ferric reductases in *Synechocystis* and *E. coli*

○佐藤 純一[1]、田中 英資[1]、森 鉄也[1]、武田 晃治[2]、安保 充[3]、吉村 悦郎[4]、中川 純一[5]、阿部 晃[6]、西田 雄三[7]、川崎 信治[1]、新村 洋一[1]([1]東農大応生科・バイオ、[2]東農大・教職、[3]明治大・農・農化、[4]東大院農生科・応生科、[5]東農大生物産業・食香、[6]札幌医大医・眼科、[7]金沢医大)
○Junichi SATO[1], Eisuke TANAKA[1], Tetsuya MORI[1], Kouji TAKEDA[2], Mitsuru ABO[3], Etsuro YOSHIMURA[4], Junichi NAKAGAWA[5], Akira ABE[6], Yuzo NISHIDA[7], Shinji KAWASAKI[1], Youichi NIIMURA[1] ([1]Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agric., [2]Edu. course, Tokyo Univ. of Agric., [3]Dept. of Agric, Meiji Univ., [4]Dept. of App. Biol. Chem. , The Univ. of Tokyo, [5]Dept. of Food and Cosmetic Sci. , Tokyo Univ. of Agric., [6]Dept. of Ophthal. , Sapporo Med. Univ., [7]Kanazawa Med. Univ.)

【背景・目的】　鉄は生体内で鉄硫黄タンパク質、ヘムタンパク質などに利用されており、酵素の補因子として重要な金属である。通常、鉄は三価鉄の状態で存在するが、三価鉄が生体内でタンパク質に取り込まれるには二価鉄に還元される必要がある。このように鉄の還元反応は生物の鉄利用に必須の反応であり、鉄還元酵素には遊離フラビン関与のものと、遊離フラビン非関与のものが知られている。我々は遊離フラビン関与の鉄還元酵素としてラン藻から DrgA タンパク質 [1)]、遊離フラビン非関与の鉄還元酵素としてラン藻から ferredoxin-NADP$^+$ oxidoreductase (FNR)[2)]、大腸菌から oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase (NfnB)[3)]、ferredoxin-NADP$^+$ reductase (Fpr)[3)]を精製した。精製酵素は、生体内鉄貯蔵タンパク質である ferritin (以下 Ftn) (馬由来)を含む各種鉄キレート化合物と広い反応性を示した。そのため、精製した鉄還元酵素と、生体内で鉄還元酵素の基質となりうる鉄キレート化合物との反応性に興味が持たれた。生体内鉄は、Ftn に三価状態で貯蔵されることが知られている。それ以外の鉄は有機酸やヌクレオチド（ATP など）に結合すると考えられているが、未だ不明な点が多い。そこで今回、構造が既知の鉄キレート化合物、及び精製された鉄還元酵素と同一生物由来の鉄貯蔵タンパク質を基質として選択し、鉄還元酵素との反応性の比較検討を試みた。

【方法・結果】　基質として用いる構造が既知の鉄キレート化合物は、鉄をキレートした時の構造が既知であり、キレートされている鉄イオンの数が一個 (単核)、二個 (二核)のキレーターをそれぞれ数種類選択した。鉄貯蔵タンパク質は、ラン藻の bacterioferritin (以下 Bfr)A、BfrB、MrgA、及び大腸菌の FtnA、Bfr、Dps の大量発現系を構築後、精製を行った。精製された各鉄貯蔵タンパク質には鉄が取り込まれなかったことから、同タンパク質の鉄取り込みを検討した。硫酸アンモニア鉄(II)と鉄貯蔵タンパク質を混合し、鉄取り込みによるスペクトルの変化が観察されたものを活性測定に用いた。現在、上記の鉄キレート化合物を基質とし、ラン藻、大腸菌から精製した鉄還元酵素との反応性を遊離フラビン存在下、非存在下において検討中である。

【参考文献】

1) Takeda, K. et al. (2007) FEBS J. 274, 1318-1327.
2) Sato, J. et al. (2011) Biometals 24, 311-321.
3) Takeda, K. et al. (2010) Biometals 23, 727-737.

Iron, Ferric reductase

講演番号：3C15p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ C 校舎 15 会場

マルチ銅オキシダーゼの分子表面電荷の改変によるケラチン繊維への親和性増大

Enhancement of the Affinity of Multicopper Oxidase to Keratin Fiber by the Alternation of Surfase Charge

○押川 直美[1]、原 唯歩[1]、片岡 邦重[1]、辻野 義雄[2]、櫻井 武[1]([1]金沢大院・自然科学、[2]千葉科技大・薬)
○ Naomi OSHIKAWA[1], Yuiho HARA[1], Kunishige KATAOKA[1], Yoshio TSUJINO[2], Takeshi SAKURAI[1] ([1]Kanazawa Univ., [2]Chiba Inst. of Sci.)

【目的】マルチ銅オキシダーゼ(MCO)はフェノール類及び芳香族アミン類に対する酸化活性を持つため，パルプ及び繊維の漂白，有害物質の分解処理，臨床分析などに応用されている重要な産業用酵素である。MCO を用いて色素前駆体を酸化・発色する酵素ヘアカラー法は，刺激性の高い過酸化水素で酸化重合を行なう色素形成反応と違い，毛髪や皮膚に悪影響を及ぼす可能性のある重合物を生成しないため，低刺激染毛法として期待されている。MCO の一種である糸状菌 *Myrothecium verrucaria* 由来のビリルビンオキシダーゼ(BOD)は染毛酵素の有力な候補であるが，分子表面に酸性アミノ酸残基が多く，負に帯電したケラチン繊維と静電反発を引き起こすため，重合色素が毛髪に浸透しやすい塩基性条件下での染毛活性が低い。そこで本研究は，BOD の分子表面に存在する酸性アミノ酸残基（アスパラギン酸，グルタミン酸）を塩基性アミノ酸残基（アルギニン）に置換することによりケラチン繊維との相互作用を高め，より効率的に毛髪上で色素合成反応を行なうことを目的とした。
【結果・考察】BOD の分子表面に正電荷パッチを形成するために，近接して存在する 4 つの Asp 残基(Asp265, Asp285, Asp323, Asp338)を同時に Arg 残基に置換した変異体(Asp265/285/323/338Arg)を作製し，酵母 *Pichia pastoris* をホストに発現させた。この変異体は，野生型 BOD とほぼ一致する分光学的・磁気的性質，及び触媒活性を示したことから，４つの銅からなる活性中心に変化を与えることなく表面残基を置換することに成功したと考えられる。等電点電気泳動法によりこの変異体の p*I* を野生型 BOD と比較したところ，野生型酵素（p*I* = 4.0）に比べ約 1 単位塩基性側にシフトしたことがわかった。次に，4-aminoindole を酸化染料として実際に毛髪を染色し，染色前後の色差を比較する染毛活性評価試験を行ったところ，変異体は野生型 BOD に比べわずかながら高い染毛活性を示したが，塩基性 pH における染毛効果は期待したほど増大しなかった。これは，４残基の置換ではケラチンに対する親和性が十分に増大していないことが原因と考えられる。現在，染毛活性の増大を目指し，更に多くの酸性残基をアルギニンに置換した変異体を作製すると同時に，大腸菌由来の MCO である一価銅オキシダーゼ（CueO）をベースタンパク質として用い，同様の分子表面への塩基性残基導入を行なっている。これらの結果も合わせて発表する予定である。

Multicopper oxidase, Bilirubin oxidase, Hair coloring

講演番号：3C15p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ C 校舎 15 会場

クラス IIB 型芳香環二水酸化酵素における ferredoxin reductase の X 線結晶構造解析
Crystal structure of ferredoxin reductase of class IIB ring-hydroxylating dioxygenase system, carbazole 1,9a-dioxygenase
○梅田 隆志[1]、藤本 瑞[2]、山根 久和[3]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1]([1]東大・生セ、[2]生資研、[3]帝京大・バイオ)
○ Takashi UMEDA[1], Zui FUJIMOTO[2], Hisakazu YAMANE[3], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]Tokyo Univ., [2]NIAS, [3]Teikyo Univ.)

【背景】
Carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO)は、難分解性物質 carbazole 分解細菌が有する分解経路上の初発酸化反応を触媒する酵素である。CARDO は、酸化反応を触媒する酸化酵素と電子伝達タンパク質である ferredoxin (Fd)及び ferredoxin redctase (Red)の三つのコンポーネントから構成される。CARDO は Rieske non-heme iron oxygenase (RO)と呼ばれる酸素添加酵素群に属しているが、RO は電子伝達タンパク質のタイプの違いによって 5 つに分類される。我々は、これまでに 5 つのクラスのうち 3 つの異なるクラス(IIA、IIB、III)に属する、すなわち電子伝達タンパク質が異なる CARDO を取得し、これらをモデルとして RO のタンパク質間電子伝達機構の解析を行ってきた。CARDO の Red コンポーネントはクラス IIA と IIB のものは補因子として FAD を持ち、glutathione-reductase タイプと呼ばれる reductase である。しかし、その酸化還元パートナーである Fd はクラス IIA 型では Proteo-type、IIB 型では Rieske-type であり、過去の研究でそれらの立体構造は大きく異なることが示されていて、矢じり形に近い形状をしている IIB 型 Fd よりも IIA 型 Fd はより球状に近い構造をしている。IIA 型 Red の立体構造も明らかになっており、その立体構造を BphA4 (IIB 型 RO に分類される biphenyl dioxygenase の reductase コンポーネント)と比較すると、ferredoxin 結合表面の縁に存在する helix の位置が大きく異なっており、IIA 型のそれは結合表面の 7 Å 程度外側へ位置していた。この違いは上述の Fd の立体構造の違いに起因する可能性、すなわち、より球状に近い IIA 型 Fd と相互作用するために IIA 型 Red の helix はより外側に位置している事が考えられた。よって、本研究において、IIB 型 Red の立体構造を明らかとし、仮説の検証を試みた。
【方法と結果】
酒石酸カリウムナトリウムを沈澱剤として、sitting drop 蒸気拡散法にて IIB 型 Red の結晶を取得した。Photon Factory にて、X 線回折像を取得した結果、得られた結晶の空間群は $P4_132$ であり、分解能 3.7 Å の構造データが得られた。側鎖の詳細な議論は出来ないものの、大まかな主鎖構造を比較した結果、上述の IIA 型 Red の helix とは異なる位置にループ構造が見つかった。このことから、reductase は本来の酸化還元パートナーの相互作用領域のかさ高さに応じて、その相互作用領域の大きさを変化させている事が示された。現在、更なる高分解能データの取得を目指し、条件検討を行っている。

Protein-protein interaction, Rieske oxygenase, Ferredoxin reductase

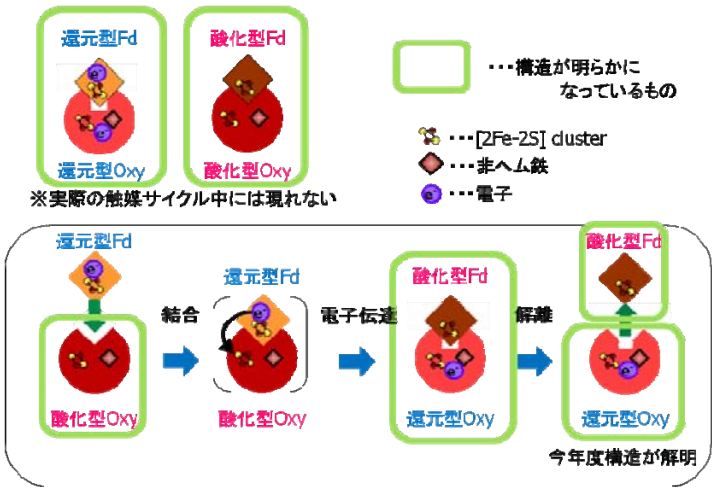
講演番号：3C15p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ C 校舎 15 会場

芳香環水酸化酵素の ferredoxin-terminal oxygenase の結合解離に関わる酸化還元状態依存的構造変化

Redox-dependent conformational changes involved in the association/dissociation of ferredoxin and terminal oxygenase components of carbazole 1,9a-dioxygenase

○松澤 淳[1]、梅田 隆志[1]、相川 大樹[1]、芦川 雄二[1]、藤本 瑞[2]、山根 久和[3]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1] ([1]東大生物工学セ、[2]農生資研、[3]帝京大・バイオ)
○Jun MATSUZAWA[1], Takashi UMEDA[1], Hiroki AIKAWA[1], Yuji ASHIKAWA[1], Zui FUJIMOTO[2], Hisakazu YAMANE[3], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]NIAS, [3]Teikyo Univ.)

【目的】細菌の carbazole 代謝の初発酸化酵素である carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO)は terminal oxygenase (Oxy)、ferredoxin (Fd)、ferredoxin reductase の 3 つのコンポーネントから構成される。Oxy の内部には Rieske [2Fe-2S]クラスターと非ヘム鉄が含まれており、同様の特徴を示す酸化酵素は Rieske non-heme iron oxygenase (RO)と呼ばれ、多くの難分解性物質分解菌から発見されている。その一群の酵素の中で、CARDO は Oxy 及び Fd の酸化状態の単体構造に加えて、唯一 Oxy-Fd 間複合体の結晶構造が解明されていることから、これまで Oxy-Fd 間の電子伝達の機構が精力的に調べられてきた。昨年度本大会までに、還元型 Oxy-酸化型 Fd 複合体の結晶構造を取得し、これまで得られていた酸化型 Oxy 酸化型 Fd 複合体との比較から複合体の結合解離に関わるアミノ酸残基を明らかにしてきた。しかし Oxy 及び Fd の還元状態の立体構造が不明だったため、酸化還元状態特異的な構造変化と複合体の結合解離に伴う構造変化の区別がつかなかった。本研究ではより詳細に Oxy-Fd 間の相互作用機構を理解するため、還元状態の Oxy 及び Fd の立体構造を解明し、立体構造比較から触媒サイクル中における構造変化を解明することを目的とした。



【方法と結果】嫌気チャンバー内で Oxy 及び Fd を亜ジチオン酸ナトリウムにより還元し、還元状態での結晶化を行った結果、Fd は 1.4 Å、Oxy は 1.7 Å分解能で X 線回折データを取得することに成功した。これらについて、吸収スペクトルから酸化還元状態を決定したところ、Fd 結晶の溶解液は酸化状態の特徴を示したことから還元後に何らかの原因で酸化してしまったと考えた。一方で Oxy の結晶母液は還元状態のスペクトルを示したことから、得られた構造データは還元型 Oxy のものであることが示された。得られた還元型構造で昨年度報告した還元型 Oxy 酸化型 Fd 複合体における Oxy の Arg118 の構造変化が同様に検出されたことから、この構造変化は還元型 Oxy に特有の構造変化であることが示された。現在、構造の精密化と既知構造との比較を行っている。加えて、還元型 Fd の構造取得を試みており、その結果を併せて報告する。

Rieske oxygenase, electron transfer, structure

講演番号：3C15p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ C 校舎 15 会場

Cellulomonas 属細菌のカルコゲンオキシアニオン還元特性

Reduction properties of chalcogen oxyanions by *Cellulomonas* sp. D3

○斎藤 茂樹[1]、岡林 拓弥[1]、加藤 元嗣[1]、谷 泰史[1]、PRAKASH N. Tejo[2]、三原 久明[1]([1]立命館大・生命科学・生物工、[2]Sch. Energy Environ. Sci.・ Thapar Univ.)
○Shigeki SAITO[1], Takuya OKABAYASHI[1], Masashi KATO[1], Yasushi TANI[1], N. Tejo PRAKASH[2], Hisaaki MIHARA[1] ([1]Dept. Biotechnol., Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Sch. Energy Environ. Sci.・ Thapar Univ.)

【目的】
セレンやテルルといったカルコゲン元素は水溶液中でオキシアニオンとして存在する。これらは細胞毒性を示し、かつ比較的安定して環境中に存在することから、これらを還元し無毒化する微生物が注目されている。これまでに単離された細菌は、嫌気条件下でセレン酸を最終電子受容体として利用し元素状セレンにまで還元するものが主である。特に嫌気性グラム陰性細菌の *Thauera selenatis* やグラム陽性細菌の *Bacillus selenatarsenatis* からは、ペリプラズム局在型酵素 SerABC (Schröder, I. et al., *J. Biol. Chem*., 1997, 272: 23765) と SrdBCA 複合体 (Kuroda, M. et al., *J. Bacteriol*., 2011, 193: 2141) がセレン酸を亜セレン酸に還元する酵素としてそれぞれ同定されている。亜セレン酸から元素状セレンへの還元については、チオレドキシン還元酵素の関与が報告されているものの (Takahata M., et al., *J. Biochem*., 2008, 143: 467)、その詳細は不明である。また近年 (亜) テルル酸を嫌気的に還元する細菌についても報告されているが、その数は限られており、(亜) テルル酸還元機構についてほとんどわかっていない。本研究では微生物のカルコゲンオキシアニオン還元機構の解明を目指し、高濃度セレン地帯の土壌から単離された菌株から、特にユニークなカルコゲンオキシアニオン還元特性を示した *Cellulomonas* 属細菌の諸性質について調べた。

【方法・結果】
単離した 12 菌株について亜セレン酸還元能を調べた結果、好気条件下では 10 菌株が、嫌気条件下では 11 株が、それぞれ亜セレン酸還元能を示した。一方、*Cellulomonas* sp. D3a ならびに D3b 株は、好気条件下では 5 mM 亜セレン酸により生育が阻害され、嫌気条件下でのみ亜セレン酸を還元し生育するという他の菌株にはない亜セレン酸還元特性を示した。また両株は 500 mM 亜セレン酸を含む TSB 寒天培地上でも生育可能であることが確認された。種々の濃度の亜セレン酸を含む TSB 液体培地で本株を生育させたところ、亜セレン酸濃度が高くなるにつれて誘導期が長くなるものの、定常期の菌体量は亜セレン酸濃度依存的に増加することがわかった。両株の亜セレン酸還元活性は亜硫酸ナトリウムにより阻害された。また両株はセレン酸還元活性を示さなかったが、好気・嫌気を問わずテルル酸を還元した唯一の菌株であり、亜テルル酸に対しては嫌気条件下でのみ還元能を示した。

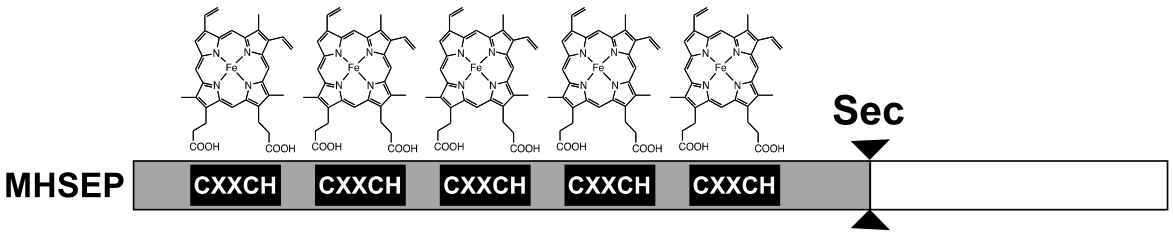
Reductase, Selenium, Tellurium

講演番号：3C15p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ C 校舎 15 会場

金属還元細菌 *Geobacter sulfurreducens* のマルチヘムセレンタンパク質の遷移金属酸化物化学変換における役割
Role of multi-heme-containing selenoprotein in chemical conversion of transition metal oxides in the metal-reducing bacterium *Geobacter sulfurreducens*
○谷 泰史、新野 絵梨奈、斎藤 茂樹、三原 久明（立命館大・生命科学・生物工）
○Yasushi TANI,Erina SHINNO,Shigeki SAITO,Hisaaki MIHARA (Dept. Biotechnol., Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

【目的】 嫌気性 *Geobacter sulfurreducens* は、111種の *c* 型シトクロム様タンパク質と 8 種のセレンタンパク質を有しており、それらは本菌の嫌気的エネルギー代謝における電子伝達と金属還元に重要であると考えられている。我々は、*Geobacter* 属細菌に特有なタンパク質であり、サブユニット当たり 5 つのヘム結合モチーフと 1 つのセレノシステイン残基を持つ MHSEP (Multi-Heme-Containing Selenoprotein) がペリプラズム間隙に局在していることを見出した（下図）。MHSEP は酸化鉄により発現誘導されることが明らかとなっているが、その生理的機能は未解明である。本研究では、本タンパク質をコードする遺伝子（*mhsep*）を破壊した *G. sulfurreducens mhsep* 欠損株の金属還元能を調べた。

【方法・結果】 *G. sulfurreducens* 野生株を酸化モリブデン (MoO_3) 存在下で培養すると、青変（最大吸収波長 : 850 nm) することを見出した。これは、モリブドリン酸アニオン ($PMo_{12}O_{40}^{3-}$) が還元されて生じる混合原子価錯体であるモリブデン・ブルーによると考えられた。しかし、*mhsep* 欠損株を酸化モリブデン存在下で同様に培養しても全く青変を示さなかった。従って、MHSEP は酸化モリブデンをモリブデン・ブルーに変換する過程に関わる機能を持つと考えられた。次に、周期表上においてモリブデン (第 6 族元素) の近辺に位置する金属の酸化物 [酸化タングステン (第 6 族元素)、酸化クロム (第 6 族元素)、酸化バナジウム (第 5 族元素)、酸化マンガン (第 7 族元素)、酸化鉄 (第 8 族元素)]を培地に加えて培養したところ、野生株は酸化タングステンと酸化バナジウムを含む培地において顕著な変色を示したが、*mhsep* 欠損株は変色を示さなかった。従って、MHSEP は酸化モリブデンだけでなく、酸化タングステンと酸化バナジウムを化学変換する際に重要な役割を担っていると考えられた。



transition metal element, selenoprotein, *Geobacter sulfurreducens*

講演番号：3C15p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ C 校舎 15 会場

常圧菌由来イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の耐圧性の獲得

Piezo adaptations of 3-isopropylmalate dehydrogenase modified from piezo sensitive bacterium.

○濱島 裕輝[1,4]、永江 峰幸[2]、渡邉 信久[2,3]、牧野 龍[1]、山田 康之[1]、今井 竹夫[1]、加藤 千明[4] ([1]立教大院生命理、[2]名古屋大院工、[3]名大 シンクロトロン、[4]海洋研究開発機構・海洋極限)
○ Yuki Hamajima[1,4], Takayuki Nagae[2], Nobuhisa Watanabe[2,3], Ryu Makino[1], Yasuyuki Kato-Yamada[1], Takeo Imai[1], Chiaki Kato[4] ([1]Rikkyo Univ., [2]Nagoya Univ., [3]NUSR, [4]JAMSTEC)

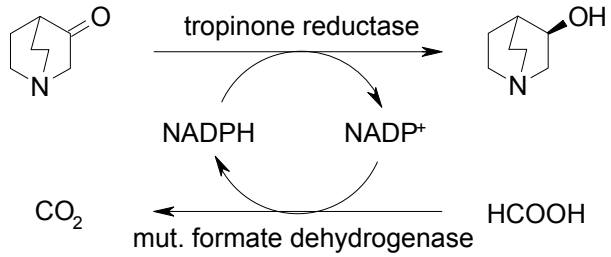
目的：深海微生物の酵素は、高圧力に適応していることが知られている。ロイシン生合成系の必須の酵素である 3-isopropylmalate dehydrogenase（IPMDH）の加圧下の活性について、*Shewanella* 属の常圧菌 *Shewanella oneidensis* と絶対好圧菌 *Shewanella benthica* DB21 MT-2 の IPMDH の酵素活性の圧力依存性を比較した。結果、常圧菌 *S. oneidensis* の IPMDH は 200MPa での加圧下における活性が 33 %と低く、絶対好圧菌 *S. benthica* DB21 MT-2 では活性が 66 %と、生育圧力と酵素の加圧下におけると活性との間に相関がみられた。本研究では、「なぜ絶対好圧菌 *S. benthica* DB21 MT-2 の IPMDH は、加圧下における活性が維持されるのか」という謎を解明することを目的に実験を行った。
方法：*S. oneidensis* の IPMDH のアミノ酸配列に、*S. benthica* DB21 MT-2 型へのアミノ酸変異を導入して、酵素の耐圧性に関与するアミノ酸の特定を行った。耐圧性の上昇した変異体について、常圧での K_M・k_{cat} 測定と高圧条件下の X 線結晶構造解析を行い、立体構造と加圧の影響に関して比較した。
結果：アミノ酸置換実験を繰り返した結果、最終的に 1 アミノ酸置換を常圧菌型 IPMDH に導入することにより、33%だった耐圧性が 61%へと著しく上昇する変異酵素の構築に成功した。このアミノ酸は、Ser 266 で Ala に置換すると常圧菌の酵素を好圧菌型の酵素に変換できることが示された。この時、常圧下での K_M・k_{cat} を比較した結果、差は見られなかった。大気圧下で、野生型常圧菌酵素と Ser266Ala 変異酵素の X 線結晶構造解析を行ったが、立体構造に違いはみられなかった。次に、高圧力下での IPMDH の立体構造を高圧 X 線結晶構造解析で比較をした。結果、高圧下では活性中心残基の裏側に溝が形成され、水分子が 3 つ侵入することが観察された。
考察：常圧菌の IPMDH の Ser266 を Ala に置換することで、耐圧性が上昇する変異体酵素を得ることができた。K_M・k_{cat} を比較した結果、常圧下では酵素間で差が見られず、耐圧性の上昇は高圧下での構造の変化に起因すると考えられる。高圧 X 線結晶構造解析の結果から、常圧菌型の IPMDH(Ser266)では、侵入した水分子の Ser266 側鎖と水素結合を形成し、溝の内部で水分子が安定化するのに対して、変異型の IPMDH(Ala266)では侵入しようとする水分子と Ala266 間には水素結合が形成されず安定化されないため、水分子が侵入しにくいことが示唆された。加圧により水分子が侵入する溝は活性中心残基の裏側にあり、本酵素では加圧により水分子が侵入して活性中心が開きにくくなり、加圧下における活性が顕著に低下すると考えられる。それに対して、Ala266 型酵素は、本変異により加圧による水分子の溝への侵入が抑えられるために、耐圧性を獲得したものと考えられた。

IPMDH, deep-sea, piezophilic bacteria

講演番号：3C15p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ C 校舎 15 会場

NADP+依存性ギ酸脱水素酵素の開発
Deveropment of NADP+ dependent formate dehydrogenase
上田 桃子[1]、○林 素子[2]、石原 浩二[3]、山本 浩明[2] ([1]ダイセル・コーポレート研、[2]ダイセル・グリーンプロダクト開発センター、[3]岡山理大・理)
Momoko UEDA[1], ○Motoko HAYASHI[2], Kohji ISHIHARA[3], Hiroaki YAMAMOTO[2] ([1]Daicel, [2]Daicel, [3]Okayama Univ. Sci.)

【目的】酵素による還元反応を行う場合、補酵素の再生をどのように行うかが重要なポイントとなる。ギ酸脱水素酵素を用いた補酵素の再生は、C1 化合物であるギ酸の塩を基質とした補酵素の再生が可能であるため、他のグルコース脱水素酵素やアルコール脱水素酵素を用いた補酵素再生と比較して環境負荷が小さいプロセスが構築可能である。しかし、従来報告されているほとんどのギ酸脱水素酵素は NAD^+ 依存性であり、NADPH の再生ができないという欠点があった。今回我々は、補酵素選択性を $NADP^+$ に変え、NADPH の再生に使用可能なギ酸脱水素酵素を開発した。
【方法】有機溶媒耐性を有する *Mycobacterium vaccae* 由来ギ酸脱水素酵素[1)]（以下、McFDH-26）の補酵素結合領域に点変異を導入し、変異体を作成した。これら変異酵素を大腸菌で生産し、補酵素選択性及び活性を評価した。
【結果】222 位 Asp 及び 224 位 His に変異を導入した結果、Asp222Gln、His224Asn 変異により補酵素選択性が NAD^+ から $NADP^+$ に逆転した。両変異を有する McFDH-40 とトロピノン還元酵素と補酵素再生用基質としてギ酸ナトリウムを添加した系で 3－キヌクリジノンの還元を行ったところ、基質濃度 5%でも反応は完結した。即ち、補酵素依存性を $NADP^+$ に変えた McFDH 変異体は、NADPH 依存性酵素の補酵素再生用酵素として十分に機能することが示された。



参考文献
1) H. Yamamoto, K. Mitsuhashi, N. Kimoto, Y. Kobayashi, N. Esaki, *Appl. Mocrobiol. Biotechnol.*, **67**, 33-39 (2005).

formate dehydrogenase, coenzyme regeneration, mutation

講演番号：3C15p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ C 校舎 15 会場

微生物による第 4 級アンモニウム化合物の分解(第 11 報) : Fusarium 属糸状菌のトリメチルアミノブタノール脱水素酵素の精製と諸性質

Microbial degradation of quaternary ammonium compounds (No.11):Purification and characterization of trimethylaminobutanol dehydrogenase produced by *Fusarium*

○谷山 優子[1]、藤光 洋志[2]、有馬 二朗[3]、森 信寛[3] ([1]鳥取大院農、[2]鳥取大連農、[3]鳥取大農)
○Yuko TANIYAMA[1], Hiroshi FUJIMITSU[2], Jiro ARIMA[3], Nobuhiro MORI[3] ([1]Tottori Univ., [2]Tottori Univ., [3]Tottori Univ.)

【目的】当研究室では，コリンや L-カルニチンなどの第 4 級アンモニウム化合物の微生物での分解経路・分解酵素の研究を行っている．コリン類縁体である 4-トリメチルアミノブタノール（TMAB）の分解経路を *Pseudomonas* sp. 13CM を用い明らかにし，その分解酵素として TMAB 脱水素酵素および 4-トリメチルアミノブチルアルデヒド脱水素酵素を精製し，諸性質を明らかにしてきた(1, 2)．さらに，真核微生物である *Fusarium* 属糸状菌の TMAB 分解経路および関与する酵素を報告した(3)．本研究では本菌の TMAB 脱水素酵素の精製と諸性質の検討を行った．

【材料と方法】*Fusarium merismoides* var. *acetilereum*（NBRC30040）を，TMAB を炭素及び窒素源とした培地（ヨウ化 TMAB;0.5%, KH_2PO_4;0.3%, K_2HPO_4;0.3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$;0.05%, Yeast extract;0.05%, Peptone; 0.3%, 金属塩混合物）で培養した．酵素活性は NADH の 340nm の吸光度の増加を経時的に測定することにより求めた〔反応液組成:Glycine-NaOH buffer(pH 9.5);150mM, ヨウ化 TMAB;30mM, NAD^+;1mM〕.硫安分画，疎水クロマトグラフィー，イオン交換クロマトグラフィー，およびゲルろ過クロマトグラフィーにより本酵素を精製した．

【結果】ゲルろ過クロマトグラフィーの結果，本酵素の分子質量は 160kDa であった．SDS-PAGE の結果から，本酵素は分子質量 40kDa の同一のサブユニット 4 個から構成されていることが明らかとなった．本酵素の基質特異性は広く，C4～C6，C8 のトリメチルアミノアルキルアルコール及びジメチルアミノアルキルアルコール，C4～C6 のアミノアルコール，C4，C6，C8 のアルキルアルコールが基質となった．

(1) BBB, 71;No.6, 1439-1446, 2007.
(2) BBB, 72;No.1, 155-162, 2008.
(3)農芸化学会西日本・中四国支部合同大会（宮崎），2011.

Trimethylaminobutanol dehydrogenase, *Fusarium merismoides*, Alcohol dehydrogenase

講演番号：3C15p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ C 校舎 15 会場

Flavobacterium 細菌における耐熱性アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子の分布とその遺伝子産物の特性解明

Distribution of thermostable aldehyde dehydrogenase genes in *Flavobacterium* species bacteria and characterization of their gene products

○下浦 正朝[1]、ドゥシャー エリック[2]、ベルナルド ジャン - フランソワ[2]、老川 典夫[1]([1]関大・化学生命工、[2]フランス国立農業研究所)
○Masatomo SHIMOURA[1], Eric DUCHAUD[2], Jean-francois BERNARDET[2], Tadao OIKAWA[1]([1]Kansai Univ., [2]INRA)

【目的】先にわれわれは、南極海洋性低温菌*Flavobacterium frigidimaris* KUC-1のアルデヒドデヒドロゲナーゼ (Ff-AldDH)が低温菌由来にも関わらず耐熱性酵素であることを明らかにした。本研究では、本酵素ホモログ遺伝子の*Flavobacterium*属細菌における分布とその遺伝子産物の特性を解明することを目的とする。
【方法】Ff-AldDHホモログ遺伝子は、*Flavobacterium*の公開ゲノムデータベースとフランス国立農業研究所(INRA)の未公開ゲノム情報で検索した。Ff-AldDHホモログ遺伝子は、そのホモログ遺伝子を有する菌株のゲノムからポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で増幅後、得られた遺伝子を高発現ベクターに挿入し大腸菌に形質転換した。得られた形質転換体から各種クロマトグラフィーで各Ff-AldDHホモログを精製した。酵素活性1 Uは補酵素NAD^+の存在下ベンズアルデヒドまたはプロピオンアルデヒドを基質として用い、1分間に1μMのNAD^+からNADHを生成する酵素量とした。
【結果及び考察】ゲノムデータベースの検索の結果、Ff-AldDHホモログ遺伝子は*Flavobacterium*属細菌のうち*Flavobacterum indicum* UN 3373と*Flavobacterium johnsoniae* NBRC 14942のゲノム中にのみ存在することが明らかとなった。一次構造の相同性は*F. johnsoniae* NBRC 14942のAldDHホモログ (Fj-AldDH)とFf-AldDHとでは約97.0%、*Flavobacterum indicum* UN 3373のAldDHホモログ (Fi-AldDH)とFf-AldDHとでは約81.6%、Ff-AldDHとFi-AldDHとでは約81.4%であった。補酵素特異性を検討したところ、Fj-AldDHとFi-AldDHはNAD^+のみを補酵素としたが、Ff-AldDHはNAD^+と$NADPH^+$を共に補酵素とした。最適反応温度は、Fj-ALDHは約45℃、Fi-AldDHは約30℃であり、Ff-AldDHの最適温度である約60℃と比べていずれも低かった。また熱安定性はFf-AldDH、Fj-AldDH、Fi-AldDHの順に高く、Ff-AldDH、Fj-AldDH、Fi-AldDHの50℃での活性の半減期はそれぞれ約65分、約15分、約13分であった。Ff-AldDH、Fj-AldDH、Fi-AldDHの最適pHはそれぞれ約10.0、約9.5、約8.5でありいずれの酵素も塩基性側で高い活性を示した。pH安定性は、Ff-AldDHでは5.5－10.0、Fj-AldDHでは7.0－8.5、Fi-AldDHでは6.5－9.5であった。基質特異性については、Ff-AldDH、Fj-AldDH、Fi-AldDHはいずれも鎖状及び芳香族アルデヒドを幅広く基質とし、炭素数が3以上の鎖状アルデヒドに対する活性が高く、炭素数が8以上になると活性が著しく低下することが明らかとなった。一方芳香族アルデヒドでは、メタ位に置換基があると活性が高くオルト位に置換基があると活性が低下することが明らかとなった。以上の結果から、*F. frigidimaris* KUC-1の耐熱性Ff-AldDH遺伝子は、進化の過程で好熱性細菌など他の生物から遺伝子の水平伝播により*F. frigidimaris*、 *F. indicum*、*F. johnsoniae*などの*Flavobacterium*属細菌のゲノム中に特異的に取り込まれたと考えられるが、これらの*Flavobacterium*属細菌のFf-AldDHホモログ間の酵素科学的性質の類似性は16SrDNAに基づくこれらの菌の類縁性とよく一致した。

Flavobacterium, aldehyde dehydrogenase, thermostable

講演番号：3C15p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ C 校舎 15 会場

メチロトローフ細菌が生産するアルデヒドオキシドレダクターゼについて

The aldehyde oxidoreductase from Methylobacterium extorquens

○高木 一好[1]、矢野 成和[2]、若山 守[3]、立木 隆[3] ([1]立命館大応化、[2]山形大院理工、[3]立命館大生工)
○ Kazuyoshi TAKAGI[1], Shigekazu YANO[2], Mamoru WAKAYAMA[3], Takashi TACHIKI[3] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Yamagata Univ., [3]Ritsumeikan Univ.)

【目的】メチロトローフ細菌が生産するアルデヒドオキシドレダクターゼ (AOR) の分子特性，ならびに，触媒特性を明らかにすることを目的とした．さらに，本酵素を用いたホルムアルデヒドをはじめとするアルデヒド類の検出・定量方法については，分子状酸素 (O_2) による反応の妨害を充分考慮したうえでの検討を行う．また，本酵素の細胞内での電子受容体の探索を行い，本酵素の生理的意義について考察する．

【方法・結果】ポリペプトン，酵母エキスを豊富に含む培地にて *Methylobacterium extorquens* を培養し, 細菌細胞の可溶性画分より AOR を精製した. ゲルろ過クロマトグラフィー, ならびに, SDS-PAGE による解析を行い，本酵素の高次構造に関する情報を得た．AOR 溶液の UV-vis 吸収スペクトルは特徴的なものであり, また, HPLC を用いて本酵素のコファクターを FAD と同定した. これらの性質は，既知のアルデヒドオキシダーゼの性質と非常に近い.

本酵素反応においては，O_2 が細菌細胞内での電子受容体として機能していることは考えられるが，一方で，ある種の人工電子受容体に対しても非常に高い親和性を示した．生化学分野で頻繁に使用されるジクロロインドフェノール (DCIP) に対しては，O_2 よりも優先的に反応すると考えられる．人工電子受容体を用いて，吸光光度分析法，ならびに，電気化学分析法に基づいて，アルデヒド類の検出・定量方法を検討し，溶存する O_2 による妨害の程度についても考察する予定である．

aldehyde oxidoreductase, Methylobacterium extorquens, xanthine oxidase family

講演番号：3C15p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ C 校舎 15 会場

嫌気性アンモニア酸化菌のヒドラジン合成

Hydrazine synthesis of an anaerobic ammonium oxidizing bacterium

○平 大輔[1]、大久保 寛幹[1]、古川 憲治[2]、藤井 隆夫[1]([1]崇城大応生命、[2]古川水環境コンサルタント)
○Daisuke HIRA[1], Hiroki OKUBO[1], Kenji FURUKAWA[2], Takao FUJII[1] ([1]Fac. Appl. Life Sci., Sojo Univ., [2]Furukawa consulting)

【目的】ある種の細菌が「嫌気性アンモニア酸化（anaerobic ammonium oxidation：anammox)」を行うことが 1995 年に発見された。anammox では、亜硝酸イオンが電子受容体となり、アンモニアが嫌気的に酸化され窒素ガスが生じる。そのため種々の排水中のアンモニアの革新的な除去法として注目され、anammox 菌の排水処理への応用研究が盛んに行われている。一方、その反応過程においてはヒドラジン（N_2H_4）が中間体となることが明らかとなっているが、anammox 反応機構の全容解明には至っていない。特に、中間体 N_2H_4 の合成反応やその酵素についての生化学的な報告はこれまで全くなかった。2011 年、オランダのグループからヒドラジン合成酵素に関する報告[1)]があったが、この論文ではヒドラジン合成の分子活性がおよそ 0.08 min^{-1} と、酵素活性としては非常に低い値だった。また、生成物である N_2H_4 そのものは検出されていなかった。他方、我々は独自に集積した anammox 菌 KSU-1 株より anammox 反応に関わる酵素群を精製し、反応機構の解明に取り組んできた。本発表では、ヒドラジン合成酵素（以下、HZS）を精製し、その性質とヒドラジン合成活性について検討したので報告する。
【方法】anammox 菌 KSU-1 株を集積した汚泥より、各種カラムクロマトグラフィにより HZS を精製した。精製試料にヒドラジン合成反応の基質と想定されるアンモニア（NH_3）、ヒドロキシルアミン（NH_2OH）一酸化窒素（NO）、亜硝酸（NO_2^-）などを添加し、これら分子とヒドラジン合成酵素タンパク質が結合するのかを UV-vis 吸収スペクトル測定により調べた。また、グルコースオキシダーゼとカタラーゼを用いた酸素除去を行い、その溶液中で基質として想定される上記窒素化合物を添加し、反応生成物である N_2H_4 を定量し、ヒドラジン合成活性を評価した。
【結果】UV-vis 吸収スペクトル測定により、HZS は NH_2OH を結合することが分かった。N_2H_4 定量による活性測定の結果、HZS の反応基質は NH_3 と NH_2OH と考えられること、反応には HZS に加えて、以前に我々が報告している難還元性 2 量体 *c* 型ヘムタンパク質（NaxLS）[2)]が必要であることが明らかとなった。この反応系における HZS の分子活性値は 0.84 min^{-1} で、オランダのグループから報告された値より約 10 倍高かった。これら結果を総合して、HZS と NaxLS の複合系によるヒドラジン合成反応機構を推定した。

1) Kartal B et al. *Nature* **479** 127-130. (2011)
2) Ukita S et al. *FEMS Microbiol. Lett.* **313** 61-67. (2010)

anammox, hydrazine, heme protein

講演番号：3C15p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ C 校舎 15 会場

嫌気性アンモニア酸化菌の HAO が触媒するヒドロキシルアミン生成

Hydroxylamine formation catalyzed by HAO from an anammox bacterium

○藤井 隆夫[1]、入佐 達也[1]、平 大輔[1]、古川 憲治[2] ([1]崇城大生命、[2]古川コンサル)
○Takao Fujii[1], Tatsuya Irisa[1], Daisuke Hira[1], Kenji Furukawa[2] ([1]Sojo Univ., [2]Furukwa Consul.)

［目的］嫌気性アンモニア酸化(anammox)菌は、亜硝酸とアンモニアの酸化還元によって脱窒を行う。この反応メカニズムは未解明であるが、中間体のヒドラジンがヒドラジン酸化酵素(HZO)とヒドロキシルアミン酸化還元酵素(HAO)の触媒作用によって、酸化され窒素ガスが生成すると考えられている。私達は既に HZO と HAO を精製し、その性質を報告している。それによると、HAO は、HZO に比べてヒドラジンに対し *Km* は高く、*Vmax* は小さい値を持っている。一方、アンモニア酸化菌(AOB)の産生する HAO は、ヒドロキシルアミン（NH_2OH）の亜硝酸（NO_2^-）への生理的な酸化と、その逆反応の NO_2^-のアンモニアへの還元を触媒できる。そこで、anammox 菌の HAO もヒドラジンの酸化と逆反応の、NO_2^-あるいは NO の還元を触媒するのではないかと考え、これを確かめることを目的とした。

［方法］Anammox 菌 KSU-1 株由来 HAO を触媒に NO_2^-あるいは NO を基質に、還元型ベンジルビオロゲン(BVred)の酸化を経時的に測定した。ただし、NO は KSU-1 株由来亜硝酸還元酵素(Nir)によって NO_2^-から生成させた。また、反応溶液をアルゴンガスで空気をパージし、無酸素で行った。反応生成物と推定されるアンモニアあるいは NH_2OH をそれぞれ定量した。

［結果と考察］亜硝酸（NO_2^-）を基質に用いた場合 BVred の酸化は起こらず、HAO は NO_2^-を基質にした還元反応を触媒しないことが分かった。一方、NO_2^-から Nir によって生成させた NO を基質にした場合、NO の還元が起こった。生成物を調べたところ、アンモニアの生成はなかったが、NH_2OH の生成を確認した。酸化された BVred と生成された NH_2OH のモル比は、3.8 となり、以下の化学式を満足することが分かった。

$$NO_2^- + 5H^+ + 4BVred \rightarrow NH_2OH + H_2O + 4BVox$$

以上から、anammox 菌の HAO は、NO_2^-を直接の基質にできないが、還元剤の存在下で、NO_2^-から生成した NO を基質にし、NH_2OH への還元反応を触媒することが分かった。このことは、NO_2^-からアンモニアまでの還元を触媒できる AOB の HAO と anammox 菌の HAO とが互いに異なる性質を持つことが明らかになった。我々は、別に、ヒドラジンの生合成について調べている。現在、ヒドラジンの生合成では、一つの基質に NH_2OH を使用していることを見いだした。以上を総合すると、本 HAO はヒドラジン合成の基質である NH_2OH を生成する生理的機能を持っている可能性が高い。

anaerobic ammonium oxidation, anammox, HAO

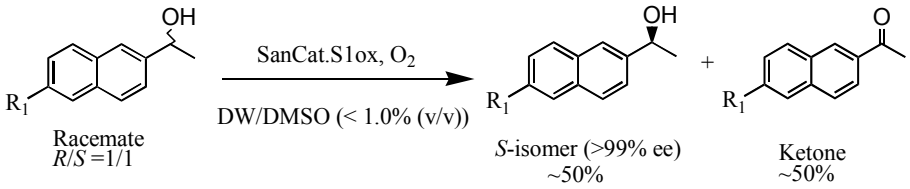
講演番号：3C15p17
講演日時、会場：3 月 26 日 17:12～ C 校舎 15 会場

植物由来鉄電子移動系を用いた不斉酸化触媒（SanCat.S1ox）の開発

Application of a Heme-binding Protein eluted from Encapsulated biomaterials to the Catalysis of Enantioselective Oxidation

○永岡 宏行（サンヨー食品開発）
○Hiroyuki NAGAOKA (Sanyo Shokuhin Co., Ltd. R & D)

酸素依存的鉄電子移動系を有する不斉酸化触媒（SanCat. S1ox：$Fe^{2+} \leftrightarrow 0_2 \leftrightarrow Fe^{3+}$）を開発した。該 SanCat. S1ox の反応は、18㎜φ×15mL 試験管中、水溶媒系（４mL）、温度環境４０℃、撹拌子 700rpm、キャップフリーにて進む。補助溶媒として、DMSO・IPA・エタノール等を使用できる。微生物由来の精製酵素（電子移動：Zn ↔ NAD(P)）に比べて、補酵素 NAD（P）添加を要せず、pH 緩衝液調整も要さず、更には、微生物反応での探索／培養／反応／取扱いに必須な専門性も要さない、平易・低コスト・高立体選択的な不斉触媒を見いだした。反応後は、濾過又は遠心分離処理により容易に SanCat. S1ox を分離除去できる。



SanCat. S1ox（HBP）反応は、N 末端シーケンス結果から、鉄結合蛋白質（酵素）の働きによるものである。具体的には、オキシダーゼと PQQ-デヒドロゲナーゼの連鎖による再合成系：Cytochrome *c* oxidase [$4Fe^{2+}$ – HBP + $8H^+_{in} + O_2 \rightarrow 4Fe^{3+}$ – HBP + $2H_2O + 4H^+_{out}$](↔) Quinoprotein ADH [$2Fe^{2+}$ – HBP + alcohols ⇄ $2Fe^{3+}$ – reduced- HBP + ketones] の働きによるものと推察する。SanCat. S1ox 活性は 36U/g/hour であり更に、５％過酸化水素水（H_2O_2）添加により激しく酸素を産生することからカタラーゼ活性も含んでいる。SanCat. S1ox（$Fe^{2+} \leftrightarrow 0_2 \leftrightarrow Fe^{3+}$）の本体は、ミトコンドリアに内在するオキシダーゼと PQQ-デヒドロゲナーゼが連なる膜蛋白質の鉄結合酵素鎖にあり、基質ラセミー2 級アルコールの片方のみを不斉酸化できる機能を有している。PQQ-脱水素酵素の公知情報として、反応式：エタノール→アセトアルデヒド（１級アルコール系の酸化反応）が確認されるが、この酵素の基質：ラセミー２級アルコール系の不斉酸化反応を示す反応系は見出すに至っていない。

以上、SanCat. S1ox は、不斉還元反応ではなく不斉酸化反応を提供するものであり、例えば、既存の不斉還元触媒にて生じた不要側の鏡像体を不斉酸化除去できる。従って、50%の鏡像体合成の他、既存技術のサポート役（不要鏡像体の不斉酸化）として活用できる [1]。

References:

1) Nagaoka, H. et. al, *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 1999, 63, 1991-1992.; *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2000, 64, 781-784. ; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001, 65, 634-637.; *Biotechnol. Prog.* 2003, 19, 1149- 1155.; *Biotechnol. Prog.* 2004, 20, 128-133. ; *Biotechnol. Prog.* 2005, 21, 405-410. ; *Biotechnol. Prog.* 2012, 28, 953- 961.; *Biotechnol. Prog.* 2013, 29, In Press.

Asymmetric oxidation, Absence of added cofactor, Iron electron transfer system

講演番号：3C15p18
講演日時、会場：3 月 26 日 17:24～ C 校舎 15 会場

超好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来の non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase におけるアロステリック制御の解析

Characterization of allosteric non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus tokodaii*

○伊藤 史晃、知識 秀祐、中村 周吾、清水 謙多郎、伏信 進矢、若木 高善（東大院・応生工）
○FUMIAKI ITO,HIDEHIRO CHISHIKI,SHUGO NAKAMURA,KENTARO SHIMIZU,SHINYA FUSHINOBU,TAKAYOSHI WAKAGI (Univ of Tokyo)

好酸好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* は、pH 2~3、75~80°C を至適生件とする絶対好気性菌で、解糖経路として分岐型の変形 Entner-Doudoroff 経路を用いている。本研究では半リン酸化型経路の中間産物である glyceraldehyde-3-phosphate (GAP)を基質とする 3 種類の酵素（推定遺伝子 st0064、st1356、st2477）のうち non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (St-GAPN)である ST2477 に注目し、組み変え酵素を精製した。St-GAPN はホモ四量体であり、補酵素として $NADP^+$を優先的に使い、無機リン酸非依存的に GAP を酸化し、GAP に対して正の協同性を示した。また、超好熱性古細菌 *Thermoproteus tenax*, *Sulfolobus solfataricus* や *Thermococcus kodakarensis* 由来の GAPN と同様にグリコーゲン代謝の中間産物である glucose 1-phosphate (G1P)によって大幅に活性化されるアロステリック酵素であることを明らかにした。

しかし、66%同一性を示す *S. solfataricus* 由来の GAPN (Sso-GAPN)と比較して、G1P による活性化のされ方が明らかに異なっていた。Sso-GAPN の場合、G1P による活性化において、V_{max} の値の上昇が顕著である、V-type と呼ばれるアロステリズムを示す。一方、St-GAPN の場合は G1P 非存在下では基質に対して協同性を示すが、G1P 存在下では協同性がなくなり、基質への親和性が大きくなる、K-type と呼ばれるアロステリズムを示すことが分かった。このような相違の原因をタンパク質工学的に解明することを目的として実験をした。

我々は GAPN のモジュール境界を算出することによってアミノ酸配列を区分けし、サブユニット会合に関わると予想される領域を含むモジュールを St-GAPN と Sso-GAPN の間で交換したキメラ体を作成したところ、K-type と V-type の変換が行われた。さらにそのモジュール内のいくつかの残基に変異を加え、K-type と V-type の差異を生み出している残基を特定した。

これらの結果から、古細菌 GAPN では四量体の中心領域がアロステリック効果の様式に関わっている事が示された。同属の古細菌のオルソログ酵素間でこのようにアロステリックな活性制御の様式が異なることは興味深い現象である。

Archaea, Allosteric enzyme, Glycolysis

講演番号：3C15p19
講演日時、会場：3 月 26 日 17:36～ C 校舎 15 会場

Ferredoxin:NADP+ oxidoreductase from Sulfolobus tokodaii

○Zhen YAN,Yoon-Woo Nam,Shinya Fushinobu,Takayoshi Wakagi (Tokyo Univ. Department of Biotechnology)

Ferredoxin:$NADP^+$ oxidoreductases (FNRs) are ubiquitous FAD-containing flavoenzymes that catalyze the electron transfer between ferredoxin and $NADP^+$. FNRs are generally classified into two types with four subclasses: the classical plant-type family including plastid and bacteria subclasses; glutathione reductase (GR) type family including adrenodoxin reductase (AdR) and oxygenase-coupled NADH-ferredoxin reductases (ONFR). Recently, another novel type FNRs have been reported; that is, thioredoxin reductase like FNR (TRLF), which physiologically functions as FNR, but shares structural homology with NADPH-dependent thioredoxin reductase (TrxR). Although a large number of FNRs have been characterized in different kinds of organisms, only one such enzyme from archaea, identified as sulfide dehydrogenase from *Pyrococcus furiosus*, has been reported to have the activity of FNR.

A putative gene of FNR from *Sulfolobus tokodaii*, a thermoacidophilic crenoarchaeon, was heterologously expressed. The purified product mainly functions as monomer containing FAD as a cofactor. Ferredoxin from *S. tokodaii* served as an electron carrier in both Fd-dependent NADPH formation and NADPH dependent Fd reduction. NADPH was much more excellent electron donor than NADH, with electron acceptors such as oxygen, dichlorophenolindophenol (DCPIP) and cytochrome c. Addition of FAD or FMN accelerated reaction rates of these oxidative activities. FMN exerted several times stimulative effect than FAD, although FAD is a cofactor bound to this enzyme.

This enzyme belongs to the thioredoxin-like protein family with slightly distant relation to FNR family proteins from bacteria, plant and human. This is the first report on FNR from crenarchaeota, giving a clue to the recycling of Fd during the archaeal metabolism.

Ferredoxin:NADP+ oxidoreductase, Thioredoxin reductase, Archaea

講演番号：3C15p20
講演日時、会場：3 月 26 日 17:48～ C 校舎 15 会場

トレオニン合成酵素におけるリン酸脱離以降の反応経路についての理論的検証

Theoretical investigation on the reaction pathways of after the phosphate desorption step in threonine synthetase

○庄司 光男[1]、花岡 恭平[1]、氏家 謙[1]、田中 弥[1]、栢沼 愛[1]、梅田 宏明[1]、町田 康博[2]、村川 武志[2]、林 秀行[2] ([1]筑波大学、[2]大阪医科大学)

○ Mitsuo SHOJI[1], Kyohei HANAOKA[1], YUZURU UJIIE[1], Wataru TANAKA[1], Megumi KAYANUMA[1], Hiroaki UMEDA[1], Yasuhiro MACHIDA[2], Takeshi MURAKAWA[2], Hideyuki HAYASHI[2] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]Osaka Medical College)

トレオニン合成酵素(TS)はトレオニン生成の最終ステップに関わり、o-phospho-L-homoserine(OPHS)から L―トレオニンを生成している。TS の反応では、副生成物生成を抑制する反応制御がなされ、多ステップにわたる極めて複雑な反応機構が考えられている[1]。しかしながらその反応機構の詳細を解明するには、電子状態に基づく理論的な検討も重要であると考えられる。

本研究では、TS の全反応過程のうち、実験的に反応中間体が観測されている、リン酸脱離以降の後半の反応過程について、リアリステックな酵素・基質複合体を用いて、量子力学／分子力学混合法: QM/MM 法レベルで精密理論解析を行った。可能な全ての反応経路のエネルギープロファイルを検討することで、本研究により初めて反応機構を明らかにした。反応ポテンシャル、構造変化、UV スペクトル帰属から、TS の持つ高度な反応制御機構について議論する。

[1]T.Murakawa,etal,J.Biol.Chem.,286,2274(2011).H.Hayashi,J.Biochem.118,463(1995)

threonine synthetase, QM/MM, reaction mechanism

講演番号：3C16a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ C 校舎 16 会場

Halomonas sp. H11 株由来α-グルコシダーゼ組換え酵素の大腸菌による生産と諸性質
Production and Characterization of Recombinant α-Glucosidase from *Halomonas* sp. Strain H11

○城戸 悠輔[1]、佐分利 亘[1]、小島 晃代[2]、森 春英[1]、松井 博和[1]([1]北大院農、[2]日本食品化工)
○Yusuke KIDO[1], Wataru SABURI[1], Teruyo OJIMA[2], Haruhide MORI[1], Hirokazu MATSUI[1]
([1]Hokkaido Univ., [2]Nihon Shokuhin Kako)

【背景・目的】*Halomonas* sp. H11 株由来 α-グルコシダーゼ(HaG)は、マルトースや *p*-ニトロフェニル α-D-グルコピラノシド(*p*NPG)などの α-グルコシド結合を加水分解する酵素であり、NH_4^+や K^+などの一価の陽イオンによる活性化を受ける。本酵素はアミノ酸配列から GH13 に分類されている。同ファミリーにおいてこのような活性化を受けるα-グルコシダーゼは 2 例の報告があるが、これらの活性化機構は明らかではない。本研究では組換え HaG を大腸菌により生産し、諸性質を解析した。

【結果・考察】HaG 遺伝子を pET-22b(+)ベクターに組み込み、大腸菌 BL21(DE3)にて発現させたところ、無細胞抽出液中の組換え酵素の分解が見られた。そこで、ベクターを pFLAG-CTS に変更し、N 末端にペリプラズム輸送シグナル OmpA を付加して組換え酵素を生産した。浸透圧ショックにより抽出した組換え酵素では分解が見られず、未分解の組換え HaG が得られた。精製した組換え酵素の至適温度は 30°C、温度安定域は 40°C 以下、至適 pH は 6.6、pH 安定域は 5.6-8.8 であった。4 mM の種々の基質に対する反応速度に基づき基質特異性を評価した。マルトース、マルトトリオース、スクロース、ニゲロース、およびトレハロースへの反応速度はそれぞれ *p*NPG への反応速度の 83%、19%、26%、13%、および 3.4%であった。イソマルトース、マルトテトラオース、およびコージビオースに対する加水分解活性は検出されなかった。活性化剤非存在下でのマルトースに対する K_m は 5.4 mM、k_{cat} は 1.5 sec^{-1} であり、NH_4^+、K^+、Rb^+、および Cs^+イオン存在下での反応速度は図 1 のモデルから導かれる反応速度式に従った。NH_4^+、K^+、Rb^+、および Cs^+の k_{cat2} はそれぞれ k_{cat} の 23 倍、29 倍、25 倍、および 15 倍であった。K_{mA} はそれぞれ K_m の 35%、27%、37%、および 8.0%であった。このことから、EA 複合体の形成による基質との親和性の上昇が示唆された。K_A はそれぞれ 8.1 mM、43 mM、9.2 mM、および 150 mM、K_{AS} は 2.7 mM、12 mM、3.4 mM、および 12 mM であり、全ての陽イオンの K_{AS} は K_A より低い値であった。よって、各陽イオンは遊離酵素より ES 複合体と結合し易いことが明らかになった。1.4 Å 程度の近いイオン半径を持つ NH_4^+と Rb^+は k_{cat2}、K_{mA}、K_A、および K_{AS} の全てが近い値であった。各陽イオン存在下(0.10 M)での至適 pH は 7.0 であり、非存在下の時と比べてアルカリ側にシフトした。

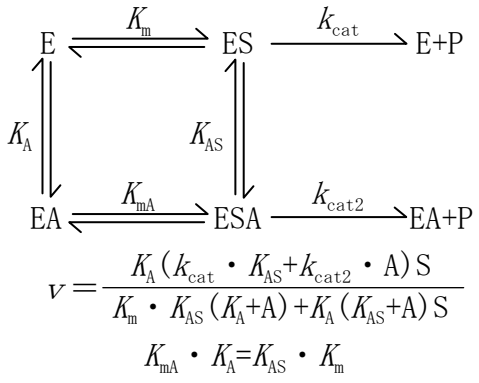


図 1 陽イオンによる活性化モデルと反応速度式

α-glucosidase, GH13, activation

講演番号：3C16a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ C 校舎 16 会場

Aspergillus aculeatus 由来 β-glucosidase 1 の基質特異性について
Substrate specificity of beta-glucosidase 1 from *Aspesrgillus aculeatus*
○馬場 祐太朗、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院・生環科）
○Yutaro Baba,shuji Tani,Jun-iti Sumitani,Takashi Kawaguchi (Grad Sch Life & Env Sci, Osaka Pref Univ)

【目的】糸状菌 *Aspergillus aculeatus* 由来の GH 3 に属する β-glucosidase 1 (AaBGL1) はセロオリゴ糖に対する比活性が高く、単糖生成力が極めて高いことが特徴的な β-glucosidase である。*Trichoderma reesei* PC-3-7 株において *xyn3* プロモーターの制御下で AaBGL1 遺伝子を発現させた X3AB1 株の培養上清は、稲わらを始めとするセルロース性バイオマスの酵素糖化において、既存のセルラーゼ剤である Accellerace 1500 や Cellic CTec よりも糖化力が高いという報告[1)]もあり、応用面で非常に有用性が高い酵素である。これまでの研究で、セロオリゴ糖の重合度依存的な比活性の増加（DP ≦ 5）や、二糖加水分解時に生成する主要な糖転移産物がゲンチオビオースであることとゲンチオビオースに対する分解能の高さを示し、酵素学的に AaBGL1 の有用性を示してきた。本研究ではさらに β 結合のオリゴ糖に対する kinetic parameters を検証すると共に、AaBGL1 とアミノ酸配列類似性の高い *Aspergillus niger* 由来 β-glucosidase (AnBGL; Identity 82.4%) に対して、高濃度 (5%) セロビオースの糖化力を比較することで AaBGL1 の糖化力の高さを明らかにすることを目的とした。
【方法及び結果】基質にセロオリゴ糖（DP = 2 — 5)、ラミナリオリゴ糖（DP = 2 — 4)、ゲンチオビオースを選択し､加水分解時のグルコース生成量を GOD 法及び HPAEC-PAD を用いて定量することで AaBGL1 の各種オリゴ糖に対する kinetic parameters を測定した。その結果、セロオリゴ糖とラミナリオリゴ糖の各重合度（DP = 2 — 4）における触媒効率（k_{cat} / K_m）は、ラミナリオリゴ糖がセロオリゴ糖の約 10 倍程度高く、AaBGL1 はセロオリゴ糖に対する高い活性に加えて、さらにラミナリオリゴ糖に対して極めて高い活性を有する β-glucosidase であることが示された。続いて *T. reesei* のセルラーゼが糖化液中にセロビオースを蓄積することから、AaBGL1 と AnBGL の 5% セロビオースの加水分解に伴うグルコース生成速度を、タイムコースを取ることで比較した。その結果、グルコース生成量は常に AaBGL1 が多かった。さらに AaBGL1 は AnBGL よりもグルコースによる活性阻害を受けにくく、主要な糖転移産物であるゲンチオビオースに対する高い分解能と合わせて、AaBGL1 が AnBGL よりも 5% セロビオースに対する糖化力が高かった。本酵素はアミノ酸配列の類似した β-glucosidase の中でも糖化力に優れたユニークな酵素であることが明らかとなった。
1) Kawai et al. *J Ind. Microbiol. Biotechol.* **39**: 1741-1749 (2012)

beta-glucosidase, *Aspergillus*, biomass

講演番号：3C16a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ C 校舎 16 会場

Geobacillus thermoglucosidasius 由来 Oligo-1,6-glucosidase のグルコース耐性向上を目指した蛋白質工学的研究

Protein engineering studies aimed at improving glucose tolerance of *Geobacillus themoglucosidasius* oligo-1,6-glicosidase

○小川 俊[1]、塩田 一磨[1]、吉田 孝[2]([1]合同酒精(株) 酵素医薬品研、[2]弘前大 農生)
○Shun OGAWA[1], Kazuma SHIOTA[1], Takashi YOSHIDA[2] ([1]GODO SHUSEI Co., Ltd., [2]Hirosaki Univ.)

【目的】

澱粉からグルコースを製造する過程において、副産物としてイソマルトースが産生されることが知られている。このイソマルトースを回収し、分解、再利用することで、グルコース製造効率の向上が期待される。この工程に Oligo-1,6-glucosidase(イソマルターゼ)を利用する場合、1：熱安定性が高いこと、２：グルコース耐性を有することなどが必要であると考えられた。特に、α-グルコシダーゼのグルコース耐性に関する知見は少ない。これらを解決するため演者らは、文献情報から高い熱安定性を持つことが知られている *Geobacillus thermoglucosidasius* 由来 イソマルターゼ(GTAGL)[1]を選択し、本酵素に部位特異的変異を加えて、グルコース耐性を付与することを目的として検討を行った。

【方法と結果】

G. thermoglucosidasius DSM2542 株より全ゲノムを抽出し、既知の配列より設計したプライマーを用いた PCR により *gtagl* 遺伝子を増幅した。増幅した配列およびプロモーター配列を *Bacillus* 用の pHY300PLK に組み込み、発現用プラスミド pHY300PLK-*gtagl* を調製した。蛋白質生産の宿主には *B. subtilis* ISW1214 株を用いた。部位特異的変異導入は、PrimeSTAR® Mutagenesis Kit を使用し、PCR 法により行った。アミノ酸の変異は、保存配列の情報および Swiss-model を用いた立体構造予測をもとに、基質結合ポケットを形成する部位、および基質の出入り口付近に導入した。本検討で得られた組換え GTAGL は、文献情報と同等の耐熱性を示した。また GTAGL は反応系に 2.2%のグルコースが存在した時、酵素反応が強く阻害されることが分かった。

種々の検討のうち、基質結合ポケットに導入した M203W、また基質の出入り口付近に変異を加えた Q216E、G259E、R298I 変異体では、グルコース耐性の向上が確認された。これらの変異を組み合わせた GTAGL-4 重変異体を作製した結果、グルコース濃度 2.7%まで反応可能であった。現在、GTAGL とその変異体について、諸性質の比較検討を行っている。

[1] J. Biol. Chem. Vol. 266, No.36, 24287-24294, 1991

Oligo-1,6-glucosidase, Glucose tolerance, *Geobacillus thermoglucosidasius*

講演番号：3C16a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ C 校舎 16 会場

β-1,6-グルカナーゼの加水分解機構に関する分子論的解析

Study on a molecular mechanism of hydrolytic action of β-1,6-glucanase

○碓氷 泰市[1,2]、尾形 慎[3]、加藤 妥奈[2]、宇野 修司[2]、服部 武史[1]([1]静岡大院創造、[2]静岡大院農、[3]福島高専物質工)
○Taichi Usui[1,2], Makoto Ogata[3], Yasuna Kato[2], Shuji Uno[2], Takeshi Hattori[1] ([1]Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ., [3]Fukushima NCT)

【目的】β-1,6-グルカナーゼは、グルコースがβ-1,6-結合で直鎖状に連結した多糖であるβ-1,6-グルカンの内部鎖を加水分解するエンド型酵素として知られている。本酵素は、多くの真菌類により産生されていることが1960年代に既に知られていた。しかしながら、β-1,6-グルカナーゼに関する酵素化学的研究例は極めて少ない。そこで我々は、*Penicillium multicolor*由来β-1,6-グルカーゼのβ-1,6-グルカン(プスチュラン)に対する加水分解機構を分子論的に解明することを目的とした。
【方法】ゲンチオテトラオースを固定化したアフィニティーカラムを用いて*P. multicolor*由来β-1,6-グルカナーゼの特異的精製を行った。精製酵素の糖転移反応を利用し、ゲンチオオリゴ糖（重合度4～9）および、アグリコンとしてメチル基と*p*-ニトロフェニル基を有するゲンチオオリゴ糖配糖体（重合度2～6）をそれぞれ合成した。これら合成ゲンチオオリゴ糖および同配糖体を用いて、精製酵素に対する初速度に基づく水解パターン解析を実施した後、これらデータに基づいてプスチュランに対する分解作用様式を解析した。
【結果】*P. multicolor*由来β-1,6-グルカナーゼの酵素精製においてリガンドとしてゲンチオテトラテオースを用いたアフィニティークロマトグラフィーが有効であることを示した。本酵素標品を用い、合成した各種ゲンチオオリゴ糖および同配糖体の水解パターンを解析したところ、β-1,6-結合糖鎖の還元末端側に位置するグルコシド結合を優先的に加水分解することが示された。次に、プスチュランに対し本酵素を作用させ、水解物の経時的分析を実施した。その際、HPAEC-PADによる高速液体クロマト法は、リアルタイムでの解析に極めて有効であった。その結果、平均重合度(DP)320のプスチュランは、水解直後（3分）DP45に、10分後にはDP15にまで速やかに水解され、その分解様式はエンド型で進行した。一方、DP15～10程度に低分子化すると水解様式は変化し、規則的に2～4糖を主水解物として生成するようになった。最終的には、これらのオリゴ糖は、長時間（90時間～）かけて2糖とグルコースにまでに完全水解された。以上より、*P. multicolor*由来β-1,6-グルカナーゼは、多糖プスチュランに対し、初反応では内部糖鎖をエンド的に加水分解し、糖鎖がDP15程度にまで断片化された段階では糖化型様式を取り、最終的には2糖およびグルコースまで完全水解されることが示された[1)]。

1) T. Hattori *et al*, *Carbohydr. Res.* (2013) in press.

β-1,6-glucanase, hydrolytic manner, β-1,6-glucan

講演番号：3C16a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ C 校舎 16 会場

Microbulbifer thermotolerans JAMB-A94 由来耐熱性β-アガラーゼの構造解析
Crystal structure analysis of a thermostable beta-agarase from *Microbulbifer thermotolerans* JAMB-A94
○高木 瑛実子[1,3]、横井 岳[2]、嶋根 康弘[3]、湯川 清孝[1,3]、大田 ゆかり[3]、秋田 昌岳[3]、西河 淳[2]、殿塚 隆史[2]、秦田 勇二[1,3] ([1]横浜市大院生命ナノ、[2]東農工大院農、[3]海洋研究開発機構)
○ Emiko Takagi[1,3], Gaku Yokoi[2], Yasuhiro Shimane[3], Kiyotaka Yukawa[1,3], Yukari Ohta[3], Masatake Akita[3], Atsushi Nishikawa[2], Takashi Tonozuka[2], Yuji Hatada[1,3] ([1]Yokohama City Univ., [2]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, [3]JAMSTEC)

【目的】　日本人が古くから食材として利用している寒天は紅藻類に属する海藻(テングサ、オゴノリなど)から抽出される。その主成分はアガロースと呼ばれる多糖であり、D-ガラクトースと 3,6-アンヒドロ-L-ガラクトースが α-1,3、β-1,4 結合で交互に繋がった構造をしている。β-アガラーゼは、アガロースのβ-1,4 結合を加水分解する酵素である。*Microbulbifer thermotolerans* JAMB-A94 由来のβ-アガラーゼ AgaA(以下 *Mt*AgaA)は高温度安定性(耐熱性)を有し、Glycoside Hydolase family (GH) 16 に属する酵素である。*Mt*AgaA はこれまでに報告されている GH16 ファミリーのアガラーゼの中で最も高い耐熱性を有していることが明らかとなっている。今回、本酵素が如何に耐熱性を示すことができるのかを解明することを目的とし、X 線結晶構造解析によって本酵素の立体構造を明らかにしたので報告する。

【方法と結果】　耐熱性β-アガラーゼ *Mt*AgaA の粗酵素液の調製は枯草菌による宿主・ベクター発現系を用いて行った。硫安分画、疎水性クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーによって粗酵素液から組換え *Mt*AgaA を精製した。精製された酵素は約 30 kDa のタンパク質であり、60 ℃までの耐熱性を有していることが確認できた。この試料を用いて結晶化を行った。本結晶を用いて得られた X 線回折データを基に立体構造解析を行った。GH ファミリー16 に属するβ-アガラーゼである *Zobellia galactanivorans* 由来の AgaB(*Zg*AgaB)の立体構造を利用した分子置換法によって、*Mt*AgaA の構造を 1.6 Å分解能で決定した。

*Mt*AgaA の立体構造は 4 枚の逆方向β-シートから構成されるβバレルであるβ-ジェリーロール構造を有していることが分かった。*Mt*AgaA は全体的に *Zg*AgaB と似た構造を取っていたが幾つかの相違点が認められた。*Mt*AgaA には 2 か所のナトリウムイオン結合部位が存在しており(*Zg*AgaB には 1 か所)、その 1 か所は *Zg*AgaB にも相当する位置に存在していた。他に大きく異なる点としては、*Mt*AgaA の Arg158～Gly160、Gly242～Gly243、Asp264～Gly266 部分は *Zg*AgaB では比較的長いループであり、*Mt*AgaA は *Zg*AgaB とフォールドはほぼ同じであるが、ループ 3 つが短いため、立体構造がよりコンパクトになっていることが分かった。また、*Mt*AgaA には *Zg*AgaB よりも Pro 残基が 9 つ多く存在した。以上の点が *Mt*AgaA の耐熱性に関与していると判断された。

thermostable beta-agarase, *Microbulbifer thermotolerans*, crystal

講演番号：3C16a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ C 校舎 16 会場

Bifidobacterium longum 由来のエキソ-β-1,3-ガラクタナーゼの機能解析
Characterization of exo-β-1,3-galactanase from *Bifidobacterium longum*
○藤田 清貴、坂口 武則、北原 兼文、菅沼 俊彦 (鹿児島大農)
○Kiyotaka Fujita,Takenori Sakaguchi,Kanefumi Kitahara,Toshihiko Suganuma (Kagoshima Univ.)

【目的】Ⅱ型アラビノガラクタン(Ⅱ型 AG)はβ-1,3-ガラクタン主鎖とβ-1,6-ガラクタン側鎖から構成され、その末端に L-アラビノース(L-Ara)が付加された複雑な構造を有する多糖として、カラマツやコーヒー豆に含まれている。また、アラビアガムを構成する Arabinogalactan-protein(AGP)の糖タンパク質糖鎖としても知られている。これまでに *Bifidobacterium longum* 等の一部のビフィズス菌だけがⅡ型 AG を利用して生育できることが報告されている[1,2]。しかし、*B. longum* のⅡ型 AG 分解酵素に関する報告は無く、*B. longum* のⅡ型 AG 分解メカニズムは謎であった。本研究では、*B. longum* のゲノム配列情報を利用し、Ⅱ型 AG のβ-1,3-ガラクタン主鎖の分解を担うエキソ-β-1,3-ガラクタナーゼのクローニングとその機能解析を目的とした。
【方法】*B. longum* JCM1217 株由来の BLLJ_1840 は、*Irpex lacteus* 由来の GH43 エキソ-β-1,3-ガラクタナーゼ[3]と 28%の identity を示す機能未知タンパク質であり、シグナルペプチドと膜アンカリング領域を有していたことから菌体表層に局在すると予想された。そこで、BLLJ_1840 をクローニングし、大腸菌での発現と His-tag を利用した精製を行った。酵素活性測定用の基質として、β-1,3-ガラクトオリゴ糖 (β-1,3-Gal_2, β-1,3-Gal_3, β-1,3-Gal_4, β-1,3-Gal_5)・β-1,4-ガラクトオリゴ糖(β-1,4-Gal_2, β-1,4-Gal_3, β-1,4-Gal_4)・β-1,6-ガラクトオリゴ糖(β-1,6-Gal_2, β-1,6-Gal_3, β-1,6-Gal_4)・カラマツ由来のⅡ型 AG を用いて、TLC・HPAEC-PAD・質量分析により分解産物の同定を行った。
【結果・考察】組換え BLLJ_1840 タンパク質をβ-1,3-ガラクトオリゴ糖に作用させたところ、ガラクトース(Gal)の遊離が確認できた。一方、β-1,4 とβ-1,6-ガラクトオリゴ糖には作用しなかった。カラマツ由来のⅡ型 AG を基質として用いて遊離糖の解析を行った結果、Gal、β-1,6-Gal_2、β-1,6-Gal_3、β-1,6-Gal_4、L-Ara で修飾されたβ-1,6-Gal_3が同定された。このため、BLLJ_1840 は側鎖が付加されたβ-1,3-ガラクタン主鎖を非還元末端側から切断するエキソ-β-1,3-ガラクタナーゼであり、*B. longum* の菌体表層に局在しⅡ型 AG の分解の主要な役割を担うと考えられる。BLLJ_1840 はⅡ型 AG の側鎖の分解に関与するエンド-β-1,6-ガラクタナーゼやα-L-アラビノフラノシダーゼと遺伝子クラスターを形成している。このため、*B. longum* はこれらの酵素群を使ってⅡ型 AG や AGP を分解・資化していると考えられる。現在、至適 pH や至適温度の測定と、酵素反応速度論的解析を行っている。
参考文献：1)F. Crociani, *et al.*, *Int. J. Food. Microbiol.*, **24**, 199(1994), 2)堀ら,日本食品微生物学会雑誌, **24**, 163(2007), 3) T. Kotake, *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2303(2009)

arabinogalactan, galactanase, *Bifidobacterium longum*

講演番号：3C16a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ C 校舎 16 会場

糸状菌イソマルターゼの発現と特性解析

Expression and characterization of isomaltases from filamentous fungi

○山口 貴央[1]、山崎 信広[1]、栄沢 大樹[1]、前川 公希[1]、小川 俊[2]、塩田 一磨[2]、吉田 孝[1]([1]弘前大農生、[2]合同酒精　酵医研)
○Takahiro Yamaguchi[1], Nobuhiro Yamazaki[1], Hiroki Eisawa[1], Kouki Maekawa[1], Shun Ogawa[2], Kazuma Shiota[2], Takashi Yoshida[1] ([1]Hirosaki Univ., [2]Godo　Shusei Co.)

【目的】

糖質加水分解酵素の分類によれば、GH Family 13 にはデンプン系糖質に作用する様々な酵素が含まれる。その中でイソマルトースに特異性の高いグルコシダーゼとして oligo-1,6-glucosidase（O1,6G、EC 3.2.1.10）がある。oligo-1,6-glucosidase はこれまで細菌や酵母から発見されているが、真核微生物である糸状菌がこの酵素を有するかは確認されていない。本研究では３種類の糸状菌（*Aspergillus oryzae*、*A.niger*、*Fusarium oxysporum*）由来のイソマルトース分解酵素について酵素特性の解析を行った。

【方法・結果】

Saccharomyces cerevisiae の O1,6G のアミノ酸配列情報を参考にして、*A.oryzae*、*A.niger*、*F.oxysporum* の各菌体より調製した cDNA から PCR により相同性の高い遺伝子（*agl1*、*agdC*、*foagl1*）を得た。各 DNA を pET ベクターに挿入した後、大腸菌を形質転換して IPTG による発現誘導を行った。菌体を超音波破砕した後、粗抽出液を Ni-キレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。酵素の活性測定はイソマルトースを基質とし、遊離した単糖をグルコースオキシダーゼ法（GOD 法）にて定量した。又、薄層クロマトグラフィーにて各酵素の糖転移活性を検討した。

【結果】

３種類の糸状菌に由来する酵素遺伝子（*agl1*、*agdC*、*foagl1*）はいずれも既知の O1,6G のアミノ酸配列モチーフを保存しており、*S. cerevisiae* O1,6G の V216 に相当する Val 残基を有していた。各酵素の最適 pH は 6.0(Agl1)、6.0(AgdC)、6.5(Foagl1)と求められた。基質としてはいずれもイソマルトースに対して高い酵素活性を示し、スクロース、コージビオース、イソマルトトリオースに対しても弱い活性を示した。一方、マルトースに対しては加水分解活性を示さなかった。反応生成物の分析から、これら糸状菌のイソマルターゼは糖転移反応をしにくい、或いは全く行わない事が示された。合成基質を用いた kinetics 解析から、3 つの糸状菌酵素はいずれも *p*-nitrophenyl-α-glucoside に対して高い加水分解活性を有する事が明らかになった。

isomaltase, glucosidase, filamentous fungi

講演番号：3C16a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ C 校舎 16 会場

好酸性カビ *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1 株は 3 種類の酸性ラクタ-ゼと 1 種類のアルカリ性ラクタ-ゼを産生する

Teratosphaeria acidotherma AIU BGA-1 produced three acidophilic and one alkalophilic lactases

○千葉 瀬里奈[1]、高橋 直巳[1]、山下 美穂[1]、小山 貴史[2]、礒部 公安[1]([1]岩大農、[2]天野エンザイム)
○Serina CHIBA[1], Naomi TAKAHASHI[1], Miho YAMASHITA[1], Takafumi KOYAMA[2], Kimiyasu ISOBE[1] ([1]Iwate Univ., [2]Amano enzyme)

【目的】乳糖不耐症者は乳糖を含む牛乳や乳製品を摂取すると下痢や腹鳴などの症状がおきるため、食品加工やサプリメントとしてラクターゼ（β-ガラクトシダーゼ）が使用されている。しかし、空腹時の胃内のような強酸性下で高い活性と安定性を示す酵素は見出されていない。本研究では、pH 1～3 で高い活性と安定性を示す耐酸性ラクターゼを産生する微生物を探索し、選抜した微生物の培養条件と酵素生成の関係、菌体内に生成される酵素の数および各酵素の酵素化学的性質を明らかにした。
【方法】スクリーニングは、酸性条件で良く生育する 90 菌株をラクトース含有液体培地（pH 4.0）で 30℃, 2 日間培養した後、菌体を破砕した粗酵素液を用いて行った。ラクターゼ活性は、2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside を基質にして、pH 1.5, 4.5, 7.0 で 30℃, 60 分間反応した後、遊離の 2-nitrophenol 量から算出した。
【結果】スクリーニングにより、上記のいずれの pH でも 5 mU/ml 以上の酵素活性を示す 9 株を見出した。この中から複数のラクターゼを産生すると推定された 1 株を選抜し、*Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1 と同定した。本菌を pH の異なるラクトース含有培地で培養したところ、本菌は pH 3.0～4.0 で良く生育し、pH 5.0 以上では生育が著しく低下した。酵素生成量も pH 3.0～4.0 が最も高く、pH 2.0 でも著量産生したが、pH 5.0 と pH 6.0 では顕著に低下した。また pH 2.0～4.0 の培養では、pH 4.5 の活性よりも pH 1.5 の活性が高く、培地の pH を高くすると pH 4.5 の活性に対する pH 7.0 の活性の比率が高くなった。また、ラクトース培地で 2 日間培養すると pH 4.5 の活性よりも pH 1.5 と pH 7.0 の活性が高く、培養時間を長くすると pH 4.5 の活性に対する pH 7.0 の活性が低下した。次に、菌体を破砕して調製した粗酵素液を DEAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィーに供した結果、3 つの活性画分（P-1, P-2, P-3）に分かれ、P-2 画分は Phenyl-Toyopearl カラムクロマトグラフィーでさらに 2 つの活性画分（P-2A, P-2B）に分離された。そして、P-1 画分酵素は pH 8.5 以上で最大活性を示すアルカリ性ラクターゼで、P-2A、P-2B、P-3 画分の酵素はそれぞれ pH 1.0～3.5、pH 1.0～2.0、pH 1.5～6.5 で高い活性を示す酸性ラクターゼであった。また、P-1 画分酵素は、中性領域で安定であったが酸性領域で極めて不安定で、他の 3 画分の酵素は強酸性領域から中性領域まで広範囲で安定であった。以上の結果より、好酸性カビに属する *T. acidotherma* AIU BGA-1 株は、菌体内に性質の異なる 4 種類のラクターゼを産生すると推定された。

Teratosphaeria acidotherma, lactase, ß-galactosidase

講演番号：3C16a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ C 校舎 16 会場

Teratosphaeria acidotherma AIU BGA-1 株が産生する pH 1.0 で作用する耐酸性β-ガラクトシダーゼの精製と性質

Purification and characterization of β-galactosidase with high activity at pH 1.0 from *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1

○礒部 公安[1]、山下 美穂[1]、千葉 瀬里奈[1]、高橋 直巳[1]、小山 貴史[2]([1]岩手大・農、[2]天野エンザイム)
○Kimiyasu ISOBE[1], Miho YAMASHITA[1], Serina CHIBA[1], Naomi TAKAHASHI[1], Takafumi KOYAMA[2] ([1]Iwate Univ., [2]Amano Enzyme Inc.)

【目的】高温酸性温泉地から分離した *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1 は菌体内に 3 種類の酸性β-ガラクトシダーゼと 1 種類のアルカリ性β-ガラクトシダーゼを産生することが明らかになった。そこで、pH 1.0 から pH 7.0 の広い範囲で活性を示す酵素を精製し、諸性質を明らかにした。
【方法】本菌を 2%ラクトース含有培地（pH 4.0）で 30℃, 3 日間培養し、得られた 40 g の湿菌体をマルチビーズショッカーで破砕して粗酵素液を調製した。酵素は、硫安塩析と 4-Aminophenyl-β-D-galactopyranoside を固定化した樹脂を含む 4 種類のカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。酵素活性は、2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside を基質にして、pH 1.5, 4.5, 7.0 の各 pH で 30℃, 15 分間反応した後、Na_2CO_3 を添加して反応を停止し、420 nm の吸光度値から遊離の 2-nitrophenol 量を求めて算出した。ラクトースの分解は、生成するグルコース量をグルコースオキシダーゼを用いて比色法で測定した。
【結果】硫安塩析と 4 種類のカラムクロマトグラフィーを用いて本酵素を精製した結果、本酵素の比活性は約 375 倍向上し、Native-PAGE で単一のタンパク質バンドが得られた。本酵素は、2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (K_m=0.19 mM) および 4-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (K_m=1.2 mM) に良く作用し、4-nitrophenyl-β-D-fucopyranoside と 4-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside にも作用した。酵素反応の最適 pH は 3.0～4.0 で、pH 1.0 および pH 7.0 でも pH 3.0 の約 50%と 45%の活性があり、広い pH 範囲で活性を示した。また、ラクトースにも酸性領域で良く作用し、ラクトースに対する K_m 値は 170 mM であった。本酵素の pH 4.5 における最適温度は 70℃ で、酵素を pH 1.5, 5.0, 7.0 で 37℃, 3 時間加温した場合、pH 1.5 では 75%の活性が残存し、pH 5.0 と pH 7.0 では全く失活しなかった。また、50℃ で 1 時間加温してもこれらの pH で 60%以上の活性が残存した。以上の結果より、本酵素は、従来報告されているβ-ガラクトシダーゼよりも広い pH 領域で活性を示し、pH 2.0 以下の強酸性領域でも安定な新規な耐熱性酸性β-ガラクトシダーゼであると考えられた。本酵素は、分子質量 85 kDa と 50 kDa のサブユニットで構成されるヘテロ 2 量体で、50 kDa 画分の N 末端アミノ酸は NTRMIIFNDK と推定された。酵素の等電点は 4.1 で、酵素活性は金属、カルボニル試薬、SH 阻害剤などで影響されなかった。これらの性質から、本酵素は、食後および空腹時の胃内でもラクトース活性を保持できる可能性があり、広い pH 範囲で利用できると考えられた。

Teratosphaeria acidotherma, lactase, β-galactosidase

講演番号：3C16a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ C 校舎 16 会場

メタゲノム由来新奇 β－グルコシダーゼの性状解析

Characterization of novel β-glucosidase from compost microbial metagenome with strong transglycosylation activity

○内山 拓、矢追 克郎、宮崎 健太郎（産総研生物プロセス）
○Taku UCHIYAMA,Katsuro YAOI,Kentarou MIYAZAKI (AIST)

［目的］一般的に β-グルコシダーゼは、自身の酵素活性によって生じた分解生成物、すなわちグルコースによってその酵素活性が阻害される、いわゆる生成物阻害を起こすことが知られている。この現象がセルロースの酵素糖化プロセスにおけるボトルネックの一つとされており、グルコースによる活性阻害が生じない β-グルコシダーゼの獲得が求められている。そこで我々は、メタゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより、グルコースによる活性阻害が生じにくい β-グルコシダーゼの獲得を試み、様々なクローンを獲得することに成功した。今回我々は、コンポスト由来メタゲノムからクローン化された β-グルコシダーゼ、Td2F2 の詳細な性状解析をおこなったので、これについて報告する。
［結果］コンポスト由来メタゲノムからクローン化された β-グルコシダーゼ、Td2F2 はグルコースによる活性阻害を受けるどころか、グルコース濃度の上昇にともない、その活性が上昇する新奇な β-グルコシダーゼとしてスクリーニングされた。Td2F2 はそのアミノ酸配列相同性検索の結果から、glycosyl hydrolase family 1 に属する β-グルコシダーゼであることが明らかとなった。また至適温度と至適 pH はそれぞれ、75˚C と pH5.5 であり、*p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (pNPGlc), *p*-nitrophenyl-β-D-fucopyranoside, *p*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside,およびβグリコシド結合を含むオリゴ糖を加水分解する活性を持つことが明らかとなった。次にグルコースによる活性阻害の有無を確認するため、高濃度グルコースの存在下で Td2F2 による pNPGlc あるいはセロビオース分解活性を測定した。その結果、グルコース 1 M 存在下で 10 mM pNPGlc あるいは 10 mM セロビオースに対する活性が、グルコース無添加の条件と比較してそれぞれ 6.5 倍、2.5 倍に上昇した。pNPGlc 分解活性上昇時の反応生成物を HPLC によって分析したところ、グルコースが２糖単位でβグリコシド結合したセロビオース、ゲンチオビオース、ラミナリビオース、ソホロースがそれぞれ生じていることが明らかとなった。この結果は、Td2F2 に強い糖転移活性があることを示しており、グルコース添加による活性の上昇は、Td2F2 の糖転移活性に由来するものであることが明らかとなった。またグルコース以外の単糖の添加によっても、Td2F2 の基質分解活性が上昇することが明らかとなった。

Glucosidase, Metagenome, Transglycosylation

講演番号：3C16a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ C 校舎 16 会場

メタゲノム由来 GH1 β-グルコシダーゼのグルコース阻害耐性と基質特異性における構造基盤
Structural basis for glucose tolerance and substrate specificity of Td-2F2, a GH1 ß-glucosidase from methagenome

○城 俊徳[1]、矢追 克郎[2]、宮崎 健太郎[2]、若木 高善[1]、伏信 進矢[1]([1]東大院農、[2]産総研・生物プロセス研究部門)
○Toshinori JO[1], Katsuro Yaoi[2], Kentaro Miyazaki[2], Takayoshi Wakagi[1], Shinya Fushinobu[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]AIST)

＜背景・目的＞
植物細胞壁の主要な構成成分であるセルロースの分解は、エンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼ、 β-グルコシダーゼ（BGL）が協奏的に作用することが知られている。BGL は他の 2 つの酵素の作用によって生じたセロビオースやその他のセロオリゴ糖などの基質に作用し、非還元末端から最終産物である β-グルコースを遊離させるエキソ型の加水分解酵素である。セルロース分解の最終段階を担う BGL の活性は、バイオマス生産の効率化という観点から非常に重要なファクターである。
ところが、BGL の多くは、10 mM 程度の低濃度のグルコース存在下でその活性が阻害されるという性質をもち、この性質がバイオマス分解の効率化のボトルネックとなっている。
Td-2F2 は、メタゲノムを用いたスクリーニングにより得られたβ-グルコシダーゼであり、糖質関連酵素データベース CAZy の Glycoside Hydrolase (GH) Family 1 に属する。 Td-2F2 は、高いグルコース阻害耐性をもち、高濃度グルコース存在下において活性が上昇する。さらに、幅広い基質特異性をもつことが分かっており、β-D-グルコシダーゼ活性のほかに β-D-ガラクトシダーゼ、β-D-フコシダーゼ活性ももつ。本研究では、X 線結晶構造解析により、Td-2F2 の持つこれらの注目すべき特徴を構造的側面から理解することを目的としている。

＜方法・結果＞
大腸菌を宿主として Td-2F2 の組み換え酵素を大量発現し、Ni-カラムにより酵素を精製した。精製酵素を用いた結晶化、酵素と D-グルコース、D-ガラクトース、D-フコース、およびイソファゴミンとの共結晶化を行い、得られた結晶を用いて KEK-PF において X 線回折データを測定した。
結晶構造から、サブサイト -1 の O6 位認識部位において Td-2F2 に特有な構造の存在を明らかにした。また、活性中心とは異なる部位でグルコース結合部位の存在が明らかとなった。さらに、+1 サブサイトの Cys169 に着目した。これらの部位の残基の変異体を作製し、動力学的解析によって、Td-2F2 の基質特異性や高いグルコース耐性との関係性を明らかにしようと試みている。

β-Glucosidase, GH1, x-ray chrystallography

講演番号：3C16a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ C 校舎 16 会場

イネ由来ツベロン酸β-グルコシドグルコシダーゼアイソザイム 1 の機能解析

Characterization of Tuberonic acid ß-D-Glucoside Glucosidase Isozyme 1

○武田 遼介[1]、姫野 奈美[1]、佐分利 亘[1]、和久田 真司[1]、森 春英[1]、松浦 英幸[1]、鍋田 憲助[1]、今井 亮三[2]、松井 博和[1]([1]北海道大院農、[2]農研機構北海道農研)
○Ryosuke TAKEDA[1], Nami HIMENO[1], Wataru SABURI[1], Shinji WAKUTA[1], Haruhide MORI[1], Hideyuki MATSUURA[1], Kensuke NABETA[1], Ryozo IMAI[2], Hirokazu MATSUI[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]National Agricultural Research Center for Hokkaido Region)

(研究背景)植物ホルモンの不活性な配糖体は,必要時に加水分解されて活性体となる.植物ホルモンの 1 つであるジャスモン酸の 12 位炭素が水酸化されたツベロン酸(TA)およびその配糖体の TA グルコシド(TAG)は植物に普遍的に存在しており,TA ではバレイショの塊茎誘導活性やトマトの傷害応答遺伝子の転写誘導活性が報告されている.このため,植物体内での TAG の加水分解は TA 量の調節に寄与すると考えられる.我々はイネにおいて TAG の加水分解活性を持つ 2 つの β-グルコシダーゼ(OsTAGG1,OsTAGG2)を同定した.OsTAGG2 は TAG よりも,植物ホルモンの 1 つであるサリチル酸(SA)の配糖体,SA グルコシド(SAG)に高い加水分解効率を示した.本研究では OsTAGG1 の生化学的,生理学的機能を明らかにすることを目的とした.

(方法および結果,考察)イネの葉の mRNA から調製した cDNA より OsTAGG1 の ORF 領域をクローニングし,メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて C 末端 His タグタンパク質として組換え酵素を生産した.培養上清から 80%飽和の硫安沈殿,Ni キレーティングカラムクロマトグラフィーおよび Resource S カラムクロマトグラフィーにより組換え OsTAGG1 を精製した.本酵素は pH 5.0,温度 55° C で最も高い加水分解活性を示し,pH 4.2-9.9,温度 55° C 以下で安定であった.本酵素の基質特異性を,2 mM の各種反応速度に基づき評価した.本酵素は,β グルコシドにのみ高い加水分解活性を示し,グルコシドの中では TAG, SAG, SAG の 2 つの位置異性体,ヘリシン,セロオリゴ糖,ソホロース,およびラミナリビオースを基質とした.TAG に対して,K_m は最も低く,k_{cat}/K_m は天然配糖体の中でヘリシンに次ぐ値であった.この TAG に対する k_{cat}/K_m は OsTAGG2 よりも約 5 倍高く,また本酵素(OsTAGG1)の SAG に対する k_{cat}/K_m の約 20 倍の値であった.すなわち OsTAGG2 が SAG をよい基質とするのに対し,本酵素 OsTAGG1 は TAG に高い特異性を示すことが明らかとなった.OsTAGG1 遺伝子の上流 2000 bp と GUS 遺伝子を連結したベクターが導入されたイネの形質転換体を作製し,OsTAGG1 のプロモーター活性の組織学的検出を行った.その結果,発芽後 2 週間目の植物体の葉脈で発現していることが明らかとなった.イネに対する TA や SA 等の植物ホルモンおよびその配糖体の処理時の OsTAGG1 遺伝子の発現量を現在解析している.

Tuberonic Acid, ß-glucosidase, rice

講演番号：3C16a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ C 校舎 16 会場

イネ由来ツベロン酸β-グルコシドグルコシダーゼのアグリコン認識メカニズムの解析

Aglycone recognition mechanism of rice tuberonic acid beta-glucoside glucosidase

姫野 奈美[1]、○佐分利 亘[1]、武田 遼介[1]、和久田 真司[1]、松浦 英幸[1]、鍋田 憲助[1]、森 春英[1]、今井 亮三[2]、松井 博和[1] ([1]北大院農、[2]農研機構・北農研)
Nami HIMENO[1], ○ Wataru SABURI[1], Ryosuke TAKEDA[1], Shinji WAKUTA[1], Hideyuki MATSUURA[1], Kensuke NABETA[1], Haruhide MORI[1], Ryozo IMAI[2], Hirokazu MATSUI[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]NARO)

【背景と目的】

β-グルコシダーゼはβ-グルコシド結合を加水分解する酵素である。植物においては植物ホルモンなどのシグナル物質の配糖体を加水分解して活性体を生成する。我々はこれまでに、ジャスモン酸の 12 位炭素が水酸化されたツベロン酸の配糖体、ツベロン酸グルコシド（TAG）への加水分解活性を指標にイネから二つのβ-グルコシダーゼアイソザイム(OsTAGG1 と OsTAGG2)を単離し、その諸性質を明らかにしてきた。これらの酵素のアミノ酸配列は 85%同一であったが、基質特異性は大きく異なっていた。OsTAGG1 は TAG に高い k_{cat}/K_m を示したが、OsTAGG2 は TAG よりむしろ病害抵抗性を誘導するサリチル酸の配糖体であるサリチル酸グルコシド（SAG）に高い k_{cat}/K_m を示した。本研究では、これらのアイソザイム間の基質特異性の違いを導く構造因子を明らかにすることを目的とし、OsTAGG2 のアグリコン結合部位変異酵素を解析した。

【結果と考察】

OsTAGG2 とジニトロフェニルβ-グルコシドの複合体において、ジニトロフェニル基と 5Å以内の距離に存在するアミノ酸残基（Trp181、Thr182、Asn186、Phe193、Val250 および His252）を OsTAGG1 と比較した。その結果、OsTAGG2 の Trp181、Asn186 および His252 に対応するアミノ酸残基が OsTAGG1 ではそれぞれ Leu、Ala および Asn であり、その他の残基は両酵素間で保存されていることが明らかになった。そこで OsTAGG2 の Trp181、Asn186 および His252 をそれぞれ OsTAGG1 型に置換した変異酵素（W181L、N186A および H252N）を作製し、基質特異性を検討した。各変異酵素は野生型酵素と同様に *Pichia pastoris* により生産し、ニッケルキレーティングカラムクロマトグラフィーにより精製して解析に用いた。W181L と N186A は、*p*-ニトロフェニルβ-グルコシド（*p*NPG）に対して野生型酵素のそれぞれ 48%および 63%の k_{cat}/K_m を示したが、これらの TAG および SAG に対する活性は野生型酵素の 3%以下であった。一方、H252N では、*p*NPG および TAG に対する k_{cat}/K_m はそれぞれ野生型酵素の 105%および 89%であったが、SAG に対する k_{cat}/K_m は野生型酵素の 28%であった。SAG に対する k_{cat}/K_m が TAG の 1/20 程である OsTAGG1 レベルまで TAG への特異性が向上しなかったが、His252 は OsTAGG2 における SAG への高活性に重要なアミノ酸残基であると考えられた。

beta-glucosidase, rice, tuberonic acid

講演番号：3C16a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ C 校舎 16 会場

黒穂病菌の生産する分泌型β-1,3-グルカン分解酵素の単離同定と機能解析

Identification and characterization of extracellular ß-1,3-glucan degrading enzymes produced by *Ustilago esculenta*

○中島 将博[1]、山下 哲郎[2]、竹田 匠[1] ([1]岩手生工研、[2]岩手大農)
○Masahiro NAKAJIMA[1], Tetsuro Yamashita[2], Takumi Takeda[1] ([1]IBRC, [2]Iwate Univ)

【目的】黒穂病菌はイネ科植物のマコモに感染する菌であり、花茎の異常な伸長肥大成長を引き起こす。この現象には、植物細胞壁の部分分解による緩みが必要であるため、黒穂病菌の分泌する細胞壁分解酵素の関与が推測される。そこで、本研究では黒穂病菌が純粋培養時に生産する細胞壁分解酵素の単離、同定と機能解析を行った。

【方法、結果】グルコースを炭素源として黒穂病菌を培養したところ、培養上清はβ-1,3-グルカンに対して最も高い分解活性を示した。また、多糖を炭素源として培養を行うと、β-1,3-グルカンのみで黒穂病菌の生育が見られた。そこで、黒穂病菌純粋培養の上清中からβ-1,3-グルカン分解酵素の精製を行った。

黒穂病菌の培養上清から、ラミナリビオースとラミナリンの分解活性を指標に強陰イオン交換カラム、弱陽イオン交換カラム、強陽イオン交換カラム、ゲルろ過カラムによって１種類のβ-グルコシダーゼと２種類のβ-グルカナーゼを部分精製した。In-gel digestion によるペプチド抽出、LC/MS/MS 解析、遺伝子クローニングにより、β-グルコシダーゼ(Lam3A)がグリコシドヒドロラーゼファミリー(GH)3 に、２つのβ-グルカナーゼ(Lam16A, Lam16B)が GH16 に属することを明らかにした。これら３つの遺伝子の麹菌での発現を試み、*Lam3A* と *Lam16A* の発現に成功したのでリコンビナント Lam3A と Lam16A(rLam3A と rLam16A)の機能解析を行った。

rLam3A の基質特異性を調べたところ、β-1,3-結合を持つ糖鎖に対して高い活性を示した。そこで、rLam3A のラミナリオリゴ糖に対するカイネティックパラメーターを調べたところ、３糖、４糖に対しては高い k_{cat}/K_m 値を示したのに対し、５糖以上の基質に対しては５倍以上低い値を示した。一方、rLam16A はβ-1,3-グルカンに高い特異性を示し、５糖以上の基質に対して高い活性を示した。そこで、一定濃度の rLam3A と各濃度の rLam16A によるβ-1,3-グルカンからのグルコース生成量を調べたところ、rLam16A の添加により、グルコースの生成量が３倍以上になった。この結果は、この２つの酵素が協同的にβ-1,3-グルカンからグルコースにまで分解できることを示している。

Lam3A と Lam16A の感染部位における遺伝子発現を調べたところ、*Lam3A* は肥大成長時期に定常的に発現し、一方 *Lam16A* は肥大成長初期に特異的に発現していた。この２つの遺伝子の肥大成長への関与が推測された。

Ustilago esculenta, ß-1,3-glucanase, *Zizania latifolia*

講演番号：3C16p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ C 校舎 16 会場

植物性多糖に作用する *Bifidobacterium longum* 由来の酵素の解析
Glycosidases from *Bifidobacterium longum* acting on plant polysaccharides
○芦田 久[1]、北村 有里奈[2]、竹内 涼子[2] ([1]近大・生物理工、[2]京大・院・生命科学)
○Hisashi Ashida[1], Yurina Kitamura[2], Suzuko Takeuchi[2] ([1]Fac. of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki Univ., [2]Grad. Sch. of Biostudies, Kyoto Univ.)

【目的】ビフィズス菌の 1 種 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* は、乳幼児から成人の腸管に広く生息し、プロバイオティクスとしても用いられている。本菌のゲノムには、ヒトミルクオリゴ糖のみならず植物由来の多糖・オリゴ糖の分解に関わることが予想されるグリコシダーゼ遺伝子がいくつか見出された。そこで、本研究では植物性多糖分解経路の解明を目的として、本菌のグリコシダーゼの生化学的な解析を試みた。
【方法】*B. longum longum* JCM 1217 より Glycoside Hydrolase Family (GH) 43 に属する BLLJ_1719 と、GH31 に属する BLLJ_0119 と BLLJ_1389 をコードする遺伝子を PCR により増幅し、pET-23b ベクターと大腸菌 BL21λDE3 を用いて組換えタンパク質を得た。
【結果】BLLJ_1719 は 850 アミノ酸残基からなり、N 末端にシグナル配列、C 末端付近に膜貫通領域をもつ、膜結合の菌体外酵素と予想された。GH43 ドメインのほかに、Carbohydrate-Binding Module Family (CBM) 32 と CBM6 を有していた。BLLJ_1719 はカラスムギキシランと *para*-nitrophenyl (*p*NP)-α-arabinofuranoside からアラビノースを遊離したが、*p*NP-α-arabinopyranoside には作用しなかった。この結果より BLLJ_1719 はα-arabinofuranosidase であることが明らかになった。BLLJ_0119 と BLLJ_1389 はそれぞれ 845 および 608 アミノ酸残基からなる菌体内酵素と予想された。これらは *p*NP-α-xylopyranoside と *p*NP-α-glucoside の両方を加水分解するα-xylosidase/α-glucosidase であり、キシログルカンやその構成２糖であるイソプリメベロース（Xylα1-6Glc）からキシロースを遊離した。本菌はアラビノースやキシロースを単一炭素源として生育できることから、これらの酵素はアラビノキシランやキシログルカンの資化に関わることが示唆された。

arabinofuranosidase, xylosidase, bifidobacteria

講演番号：3C16p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ C 校舎 16 会場

超好熱菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来キシロース関連代謝酵素の探索
Analysis of the xylose related enzyme from *Sulfolobus tokodaii*
○郷田 秀一郎、内田 拓郎、海野 英昭、畠山 智充（長崎大学院工）
○Shuichiro GODA,Takuro Uchida,Hideaki Unno,Tomomitsu Hatakeyama (Nagasaki Univ.)

超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* は、解糖経路に非リン酸化 ED 経路を利用し、その初酵素であるグルコース脱水素酵素として 2 つの相同性のない遺伝子 ST1706 と ST2556 が報告されている。このうち ST2556 はグルコースよりもキシロースに対して高い反応性を示すことから、*S. tokodaii* にはキシロース代謝経路があるのではないかと考えられた。そこで、超好熱アーキア *S. tokodaii* の培地中にキシロースを添加して培養することで、発現量の変化がみられるタンパク質の探索を行い、その酵素の機能解析を行った。

S. tokodaii の培養は、培地に 1.0 g/L のキシロースを添加したものと、通常のもので行い、SDS-PAGE によって生産量の異なるタンパク質を見出した。解析はペプチドマスフィンガープリント法によって行い、生産量が増加するタンパク質として、遺伝子番号 ST2577 を見出した。ST2577 は NAD 依存性アルコール脱水素酵素と機能が推定されている。機能解析のために大腸菌を宿主に用いた ST2577 の発現・機能解析を行った。発現ベクターは九州大学の大島教授から頂いたものを用い、大腸菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL を培養、集菌後、超音波破砕を行い、遠心分離後の上清を 90℃、30 分の加熱処理をして、大腸菌由来タンパク質を遠心分離によって除き、粗抽出液とした。粗抽出液を用いて活性染色を行ったところ、基質に ethanol, methanol, xylitol を用いた際に活性を確認した。その後、疎水性クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーを行い、SDS-PAGE により目的タンパク質が単一のバンドを示すまで精製した。ゲル濾過から分子質量は 154 kDa と求められ、単量体の分子質量が 37kDa であることから、本酵素は四量体を形成していることがわかった。酵素活性測定は、基質に methanol、ethanol、xylose、xylitol、補酵素には NAD 及び NADP を用いた。その結果、補酵素に NAD を用いた場合、xylose 以外に活性が見られ、活性値は ethanol が一番高く、methanol と xylitol の活性値はほぼ同じであった。補酵素に NADP を用いた場合は methanol、ethanol に活性が見られ、xylose、xylitol では活性は認められなかった。このことから、ST2577 は xylitol 脱水素酵素活性を有していると考えられる。

参考文献

1)Yanai, H., Doi, K., and Ohshima, T. 2009. *Sulfolobus tokodaii* ST0053 produces a novel thermostable, NAD-dependent medium-chain alcohol dehydrogenase. *App. Env. Microbiol.* **75**: 1758-1763.

xylose, alcohol dehydrogenase, Sulfolobus tokodaii

講演番号：3C16p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ C 校舎 16 会場

糸状菌由来の糖化酵素と相乗作用を示す細菌由来酵素の探索

Screening of bacterial enzymes showing synergistic action with fungal saccharifying enzymes

○篠田 優[1]、荒井 基夫[2]、金政 真[2] ([1]中部大院・応生、[2]中部大・環境生科)
○Suguru SHINODA[1], Motoo ARAI[2], Shin KANAMASA[2] ([1]Grad. Sch. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [2]Dept. Envi. Biol., Chubu Univ.)

リグノセルロース系バイオマスの糖化は、非食糧資源から燃料用エタノールを生産するためのみならず化学工業や発酵原料としての糖を生産するための重要な技術である。中でも酵素による糖化法は環境負荷の小さい方法として注目されており世界で精力的に研究が進められている。しかし糖化を行うための酵素にはいくつかの弱点が存在し、工業的な利用には更なる改良が必要である。これまで自然界より力価が高い酵素を生産する微生物の分離が行われてきたが、本研究では視点を変えて、単独で力価が高い酵素ではなく既存の糖化酵素と相乗作用を示す酵素を自然界より探索することにした。

先ず土壌より濾紙又はキシランを炭素源とする固体培地を使用してセルラーゼとキシラナーゼを生産する 200 株の細菌を分離した。これらの菌株について液体培養での濾紙崩壊活性の有無により選別したところ、2 株の細菌（AS0 株と AS14 株）が得られた。両菌株の 16S rRNA の塩基配列を基に同定したところ、両菌株ともに *Cellulomonas* 属に属する細菌であることが分かった。次にこれら 2 菌株の培養上清を使用し、糸状菌由来の糖化酵素（*Trichoderma* 属と *Acremonium* 属由来の各糖化酵素）との相乗作用を検討した。本研究で使用した AS0 株の培養上清のアビセラーゼ、CM-セルラーゼ、キシラナーゼ活性は、0.024、1.6、6.2 U/ml であり β-グルコシダーゼと β-キシロシダーゼ活性は共に検出できなかった。一方で AS14 株の培養上清のアビセラーゼ、CM-セルラーゼ、β-グルコシダーゼ、キシラナーゼ、β-キシロシダーゼ活性は、0.026、2、0.11、9.9、0.0028 U/ml であった。濾紙を基質として相乗作用を検討したところ、糸状菌由来の糖化酵素と両菌株の培養上清を組み合わせることで、生成還元糖量が 1.4 倍から 1.7 倍に増加した。また濾紙崩壊活性の向上も見られた。この結果から両菌株が生産する酵素には、本研究で使用した糸状菌由来の糖化酵素と相乗作用を示す酵素成分が含まれると考えられた。リグノセルロース系バイオマスとしてアルカリ処理した葦を基質として相乗作用を検討した。その結果、*Trichoderma* 属由来の糖化酵素と組み合わせた場合に生成還元糖量が 1.3 倍から 1.7 倍に増加した。現在、両菌株の培養上清より酵素成分の分画精製を行い、精製した細菌由来の酵素を用いて糸状菌由来の糖化酵素との相乗作用に関わる酵素成分の同定を行っている。

Cellulase, *Cellulomonas*, Synergistic action

講演番号：3C16p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ C 校舎 16 会場

Paenibacillus 属細菌由来キチン多糖分解酵素 ChiW の反応産物の解析
Characterization of the reaction products of *Paenibacillus* chitinase ChiW
○伊藤 貴文[1]、日ビ 隆雄[1]、杉本 郁美[1]、鈴木 史子[1]、藤井 豊[2]、武藤 明[3]、木元 久[1]([1]福井県大・生物資源、[2]福井大・医、[3]福井工大・工)
○Takafumi ITOH[1], Takao HIBI[1], Ikumi SUGIMOTO[1], Fumiko SUZUKI[1], Yutaka FUJII[2], Akira TAKETO[3], Hisashi KIMOTO[1] ([1]Fukui Prefectural Univ., [2]Univ. of Fukui, [3]Fukui Univ. of Technology)

【目的】*Paenibacillus* sp. str. FPU-7 は真菌細胞壁の分解能力に優れたグラム陽性の土壌細菌である。本細菌は複数種のキチン加水分解酵素(キチナーゼ)群を菌体外に分泌することが明らかとなっているが、キチナーゼ ChiW も同時に細胞表層に提示している。ChiW は自身の細胞壁に結合するための Surface layer homology (SLH)ドメインと 2 つの触媒ドメインを有し、FPU-7 株が捕食標的である真菌に取り付く際に、真菌細胞壁キチンを分解するための重要な役割を担っていることが示唆される。我々は、ChiW によるキチン分解の分子機構を明らかにすることで、環境負荷の少ない不溶性多糖の効率的な分解方法の開発を目指している。これまでに、本酵素の大腸菌大量発現系を構築し、精製酵素を得て、その諸性質を明らかにした。さらに、触媒ドメインのみであるが、立体構造を決定した。現在、キチン多糖およびオリゴ糖に対する ChiW の反応様式を解析している。
【方法】コールドショック発現ベクターに SLH ドメインを除く ChiW を連結し、発現プラスミドを作製した。このプラスミドを用いて、大腸菌 BL21 を形質転換した。そして、ChiW を大腸菌菌体内に可溶性タンパク質として発現させた後、ヒスチジンタグと固定化金属イオン(Ni^{2+})アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。ChiW と多糖キチンとの反応過程で生じる還元末端は 3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン(MBTH)を用いて定量した。ChiW のオリゴ糖に対する反応産物の解析には、アミドカラムによる順相クロマトグラフィーを利用した。
【結果】精製したChiWのキチン多糖に対する比活性を還元末端の定量法から求めたところ、約5 U/mgであった。また、その反応時間中に遊離してくる2糖を液体クロマトグラフィーにて定量し、比活性を求めたところ、約2 U/mgであった。ChiWには多糖結合ドメインが存在せず、2つの相同性の高い触媒ドメインが存在する。これらのことから、ChiWは一本のキチン鎖上を移動することで何度も加水分解する酵素ではなく、複数の鎖を次々とランダムに加水分解するエンド型のキチナーゼ(プロセッシブ度が低い)であることが示唆された。次に、キチンオリゴ糖に対するChiWの反応産物を解析した。3糖を加水分解した際に得られる2糖はほぼβ-アノマーであった。このことは、ChiWが他のグリコシドファミリー18キチナーゼと同様に、その加水分解反応の前後で新たに生成される還元末端のアノマー型を保持することを示している。現在、2つの触媒ドメインのうち一方が不活性型の変異体の反応産物についても、詳細な解析を行っている。

chitinase, *Paenibacillus*, chitin

講演番号：3C16p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ C 校舎 16 会場

Streptomyces griseus 由来の CBM33, SgCBP IV のキチン酵素分解の促進
SgCBP IV, one of CBM33s from *Streptomyces griseus* accelerated enzymatic chitin degradation
○工藤 まどか[1]、中川 裕子[1]、Vaaje-Kolstad Gustav[2]、Eijsink Vincent[2]、戸谷 一英[1]([1]一関高専・物化工、[2]Norwegian Univ. Life Sci.・Chem. Biotech. Food Sci.)
○MADOKA KUDO[1], YUKO NAKAGAWA[1], Gustav Vaaje-Kolstad[2], Vincent Eijsink[2], KAZUHIDE TOTANI[1] ([1]Ichinoseki Natl. Coll. Tech., [2]Norwegian Univ. Life Sci.)

【研究の背景と目的】

キチンを分解して得られる *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）は関節痛軽減や美肌効果が知られており，健康食品などに添加され，大きな市場を有する．GlcNAc は主に甲殻由来のα-キチンの塩酸分解や酵素分解の組み合わせにより製造されるが，環境に負荷をかけずに GlcNAc を製造するためには，酵素分解法のみを用いることが望ましい．しかし，α-キチンは水に不溶で結晶性が高く，そのままでは酵素による分解効率が著しく低いため，酵素分解法のみで GlcNAc を作る方法は未だに実用化されていない．酵素分解法を実現するためには，酵素分解の促進物質の添加が有効であると考えられる．近年，海棲細菌 *Serratia marcescens* 由来のキチン結合タンパク CBP21 (CBM33 family）が，キチンの酵素分解を促進する効果を持つことが明らかとなった．そこで我々は，食品製造用菌株として食品添加物リストに収載されている *Streptomyces* 属由来の CBM33 family を対象として，キチンの酵素分解における促進効果を調べた．本研究によって得られた基礎的知見は，最終的に効率的かつ経済的にキチンの酵素分解を達成する系を確立する上で重要になる．

【研究内容】

キチンを炭素源に *Streptomyces griseus* を培養すると, CBM33 family に属する推定キチン結合タンパク 4 種全てで mRNA 蓄積量が有意に変化した（2010 年度大会要旨）．このうちの一つ，SgCBP IV を選抜した. シグナル配列を除いた *SgCBP IV* 遺伝子を *Brevibacillus* の発現用ベクターに連結し，異種発現させた．キチンアフィニティカラムによって精製した組換え SgCBP IV（rSgCBP IV）と各種の組み換えキチナーゼ（*S. marcescens* 由来の ChiA と ChiB, ChiC）を組み合わせてキチンを酵素分解し，主な反応生成物であるキチン二糖（$(GlcNAc)_2$ を HPLC で定量することにより，rSgCBP IV がキチン分解に与える影響とα-キチン，β-キチンに対する反応性の違いを比較した．いずれの基質を用いても，また，いずれのキチナーゼとの組み合わせにおいても rSgCBP IV を加えた反応系において $(GlcNAc)_2$ の生成量が増加した．また，rSgCBP IV 添加による影響はα-キチンよりもβ-キチンの方が顕著であった. α-キチンの酵素分解においては, rSgCBP IV の添加により 24 時間後の $(GlcNAc)_2$ の生成量は 4 倍から 6 倍程度に増加した．基質にβ-キチンを供した場合は，24 時間後の $(GlcNAc)_2$ の生成量が最高で 30 倍程度まで増加し, キチンの酵素糖化において rSgCBP IV が多大な効果を与えることが明らかになった.

CBM33, chitin, *Streptomyces griseus*

講演番号：3C16p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ C 校舎 16 会場

Streptomyces griseus 由来の CBM33, SgCBP V の機能解析
Functional analysis of one of CBM33s named SgCBP V from *Streptomyces griseus*
○千葉 大介、畠山 彩乃、戸谷 一英、中川 裕子（一関高専・物化工）
○Daisuke CHIBA,Ayano HATAKEYAMA,Kazuhide TOTANI,Yuko NAKAGAWA (Ichinoseki Nacl. Coll. Tech.)

［研究背景］
カニ殻やエビ殻の主要成分であるキチンを分解することによって得られる *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）は、美容商品や健康食品として需要が増加している。しかし、従来の方法では製造に強酸・強アルカリを用いる工程が必要であり、環境への悪影響が大きい。また、日本国内では化学合成された GlcNAc は食品添加物として利用できないため、環境調和型の生産プロセスの実用化には、キチンの酵素分解反応効率の向上が不可欠である。

近年 *Serratia marcescens* 由来のキチン結合タンパク CBP21（CBM33 family: carbohydrate binding module family 33）が，キチンの酵素分解を促進する効果を持つことが明らかとなった。本研究では、CBP21 と同じく CBM33 family に属し、食品生産への応用が期待される *Streptomyces griseus* 由来の推定分泌型キチン結合タンパク SgCBP V がキチン分解に与える影響を詳細に解析した。

［研究内容］
医薬品製造にも使用され、ゲノム配列が明らかな *S. griseus* のゲノム DNA には、6 つのアノテーションされた CBM33 が存在する。このうちの一つ、Sgr199 は、推定キチン結合部位とセルロース結合部位の 2 つのドメインをもつ特徴的な遺伝子である。そこで、Sgr199 のシグナル配列を除いた全配列（SgCBP V）及びキチン結合ドメインのみ（SgCBP V $_{ChiBM}$）をシャトルベクターpNCNO2 に組み込み、*Brevibacillus* による異種発現を行った。発現した rSgCBP V はキチンアフィニティーと強陰イオン交換カラムによる精製を行った。一方、rSgCBP V $_{ChiBM}$ に関してはキチンアフィニティーカラムでの精製ができなかったため、精製方法を検討中である。精製した rSgCBP V は、組換えキチナーゼ ChiA, B, C (*S. marcescens* 由来)と共に市販の α-及び β-キチンに作用させ、酵素分解促進効果を検証した。高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて主要な酵素分解産物である $(GlcNAc)_2$ を定量したところ、α-及び β-キチンの両基質において、ChiA、及び B の酵素分解を促進することが分かった。ChiC との組み合わせでは、ほとんど効果は見られなかった。効果の大きかった rSgCBP V と ChiB の組み合わせでは、24 時間後の $(GlcNAc)_2$ 生産量が未添加の場合と比較して α-キチンで 4 倍、β-キチンで 6.5 倍に増加し、キチン酵素分解における SgCBP V の促進効果が証明された。

CBM33, *Streptomyces griseus*, chitin

講演番号：3C16p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ C 校舎 16 会場

堆肥から分離された好熱性細菌 *Paenibacillus* sp. TC22-2b 株由来キチナーゼの諸性質
Characteristics of chitinase from thermophilic bacterium *Paenibacillus* sp. TC22-2b isolated from compost

○上田 純子、黒沢 則夫（創価大院工）
○Junko UEDA,Norio KUROSAWA (Soka Univ.)

【目的】キチナーゼは *N*-アセチルグルコサミンが結合した多糖であるキチンを分解する酵素であり、*Serratia* 属細菌や *Bacillus* 属細菌、*Streptomyces* 属細菌などさまざまな系統の細菌から分離されてきた。一方で、好熱菌由来の耐熱性酵素は常温性酵素に比べて失活しにくい、また使用時に常温菌の混入を避けることができるといった利点があり、我々は新規な好熱菌の分離を試みてきた。堆肥から分離された TC22-2b 株は 50°C 付近に至適生育温度を持つ中等度好熱菌であり、16S rRNA 遺伝子塩基配列や生理・生化学的性質等から新種の *Paenibacillus* 属細菌であると推定された。また、本菌株はコロイダルキチン含有プレート上でキチナーゼ活性を示した。これまでに好熱性 *Paenibacillus* 属細菌由来のキチナーゼの報告はないため、本研究では、TC22-2b 株由来キチナーゼの酵素学的性質を明らかにする事を目的として実験を行った。

【方法】*Paenibacillus* sp. TC22-2b 株を、コロイダルキチンを含む液体培地を用いて 50°C にて振盪培養した。コロイダルキチンがほぼ目視出来なくなった時点で、培養液上清中のタンパク質を 80%飽和硫安沈殿により 10 倍濃縮し、粗酵素液とした。キチナーゼ活性は、コロイダルキチンを基質とし、Schales 変法により還元糖の生成量を測定することで定量した。また、キチナーゼの分解様式を調べるため、*N*-アセチルグルコサミンの 2～6 量体を基質として分解実験を行い、薄層クロマトグラフィー（TLC）により加水分解産物を同定した。さらに、SDS-PAGE および活性染色を行い、キチナーゼの分子量を推定した。

【結果】粗酵素液中のキチナーゼは、70°C、pH 6 付近で最大活性を示し、50～80°C、pH 5～8 の範囲で最大活性の 50%以上の活性を持つことがわかった。また、本キチナーゼは 60°C における 24 時間の熱処理後も約 76%の残存活性を示した。*N*-アセチルグルコサミンの 2～6 量体の加水分解産物を調べた結果、粗酵素液中のキチナーゼは 4 量体以上の基質のみを分解することが示された。6 量体を基質とした場合には、反応初期に分解産物として 2, 3, 4 量体が検出され、その後 4 量体は経時的に減少した。また、粗酵素液について活性染色を行ったところ、58 kDa およびわずかではあるが 97 kDa 付近にキチナーゼ活性を有するバンドが認められたことから、本菌株は少なくとも 2 種類以上の分子量のキチナーゼを分泌している可能性が示唆された。

chitinase, *Paenibacillus*, thermophilic

講演番号：3C16p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ C 校舎 16 会場

転写調節因子 ChiR を介した MicM sRNA による *Serratia marcescens* キチナーゼ遺伝子群発現制御
Regulation of chitinase genes expression by MicM sRNA through transcriptional regulator ChiR in *Serratia marcescens*

鈴木 一史[1,2]、○小川 知佐奈[1]、佐々木 直美[1]、高野 慎也[1]、清水 麻里[1]、杉本 華幸[1,2]、渡邉 剛志[1,2]（[1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大・農・応生化）
Kazushi SUZUKI[1,2], ○Chisana OGAWA[1], Naomi SASAKI[1], Shinya TAKANO[1], Mari SHIMIZU[1], Hayuki SUGIMOTO[1,2], Takeshi WATANABE[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. & Tech., Niigata Univ., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Facul. Agric., Niigata Univ.)

【目的】*Serratia marcescens* は不溶性多糖キチンの分解能に優れた細菌として良く知られており、プロセッシブ型キチナーゼ（ChiA 及び ChiB）、エンド型キチナーゼ（ChiC）、キチン鎖を切断して酸化末端を生じるキチン結合タンパク質 CBP21 を生産し、これらの相乗効果によって効率的にキチンを分解し利用している。*S. marcescens* 2170 の 3 種のキチナーゼと CBP21 の誘導生産には、分解産物である $(GlcNAc)_2$ と転写調節因子 ChiR が必須であり、$(GlcNAc)_2$ の効率的な利用には$(GlcNAc)_2$ のみならず GlcNAc の菌体内への取込み機構と$(GlcNAc)_2$ を GlcNAc に分解するキトビアーゼが重要である。また、キトビアーゼ及びキチナーゼを欠損した *S. marcescens* 2170 トランスポゾン変異株（TT327）を解析したところ、トランスポゾン挿入部位はキチンオリゴ糖取り込みに関する外膜タンパク質とキトビアーゼをコードしている *ybfMN-ctb* の 5'UTR であった。*ybfMN-ctb* 5'UTR には small RNA MicM との相補配列が存在し、さらに、MicM の一本鎖領域には *chiR* 5'UTR との相補配列が存在していた。そこで、MicM のキチン分解利用系への関与を明らかにするため、MicM による *ybfMN-ctb* 及び *chiR* の遺伝子発現調節およびキチン分解酵素生産性について調べた。

【方法・結果】クローン化した *micM* 遺伝子を *S. marcescens* 2170 に導入し、培養上清を SDS 電気泳動することでキチナーゼ生産性を確認し、また、RT-PCR によって mRNA を検出した。*micM* の過剰発現は全てのキチナーゼと CBP21 の生産を抑制し、*ybfM* と *chiR* の mRNA レベルを低下させた。また、MicM に部位特異的変異を導入した結果、MicM の機能が失われた。さらに、炭素源の異なる培地で *S. marcescens* 2170 を培養したところ、*ybfM* と *chiR* の mRNA はグルコース及びグリセロール含有培地で認められなかったが、MicM は認められた。GlcNAc 含有培地では *ybfM* の発現が認められたものの *chiR* の発現は認められず、$(GlcNAc)_2$ 含有培地では *ybfM* が GlcNAc 含有培地より多く発現し、*chiR* の発現も認められた。*ybfM*、*chiR* の発現とキチナーゼ、CBP21 及びキトビアーゼの生産には相関がみられた。一方、GlcNAc 及び$(GlcNAc)_2$ 含有培地において MicM は若干減少した。大腸菌やサルモネラの MicM が *chb* オペロン中に存在する相補配列に結合しトラップされるのとは異なり、*S. marcescens* においては *ybfM* の発現により MicM がトラップ及び分解され、*chiR* の発現が可能になると予想された。これらのことから、MicM は、キチン分解産物の取り込みと分解に関わる *ybfMN-ctb* と、キチン分解酵素の発現制御に関わる *chiR* の協調的な発現制御に関与することで、キチナーゼ、CBP21 及びキトビアーゼ等のキチン分解利用遺伝子群の発現を制御していると考えられた。

chitinase, *Serratia marcescens*, sRNA

講演番号：3C16p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ C 校舎 16 会場

放線菌由来 GH11 キシラナーゼの基質特異性の解析とキシラン分解における影響

Substrate specificity of a GH11 xylanase from Streptomyces olivaceoviridis E-86

路川 真理[1]、一ノ瀬 仁美[1]、前原 智子[1]、藤本 瑞[2]、○金子 哲[1] ([1]農研機構食総研、[2]生物資源研)
Mari Michikawa[1], Hitomi Ichinose[1], Tomoko Maehara[1], Zui Fujimoto[2], ○Satoshi Kaneko[1] ([1]NFRI, [2]NIAS)

【背景】

近年、バイオマス糖化用として開発されているセルラーゼ製剤の多くは、キシラナーゼが強化されており、ヘミセルロースの分解がバイオマスの糖化において重要であることが示唆されているが、ヘミセルラーゼの詳細な特性解析はあまりなされていない。キシラナーゼは殆どのものが糖加水分解酵素ファミリー10 (GH10)またはファミリー11 (GH11)に分類され、立体構造や基質特異性が両ファミリー間では大きく異なることが知られている。しかしながら、両ファミリー間の基質特異性の違いがキシラン分解において、どのように反映されているかについては、ほとんど明らかとなっていない。そこで、本研究では *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 株が生産する GH11 キシラナーゼの基質特異性を詳細に解析すると共に、同株が生産する GH10 キシラナーゼと比較検討することにより、GH10 キシラナーゼ、GH11 キシラナーゼのキシラン分解特性を明らかにすることを目的とする。

【方法・結果】

S. olivaceoviridis E-86 株由来 GH11 キシラナーゼ遺伝子を大腸菌で発現させ、組換え酵素を得た。Ni-アガロースカラムにより精製した組換え酵素を用いて、以下の実験を行った。長さの異なるキシロオリゴ糖に対する活性及び bond cleavage frequency より、本酵素のサブサイト数、各サブサイトにおける結合エネルギーを算出した。本酵素は 6 ～ 7 個のサブサイトを有することが示された。また、本酵素をイナワラに作用させ、側鎖を有するオリゴ糖の主生成物を単離し、構造を決定した。本酵素はキシロテトラオースの非還元末端から 2 番目のキシロースにアラビノフラノースが結合した 5 糖を主に生産することが示された。この側鎖認識機構は、本酵素の分子モデルを構築し、キシロオリゴ糖の結合構造を観察によって得られる考察と矛盾せず、本酵素は、サブサイト-3, +2, +3 にはアラビノフラノース側鎖を有するキシロース残基が結合できるが、サブサイト-2, -1, +1 には結合できないことが示唆された。この様な側鎖認識機構がキシラン分解にどの様に影響するかについて GH10 キシラナーゼと対比して説明する予定である。

xylanase, substrate specificity, glycoside hydrolase famiry 11

講演番号：3C16p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ C 校舎 16 会場

コヘシン欠損 CipA を持つ Clostridium thermocellum YM72 のセルロソームの特徴

Characterization of the cellulosome from Clostridium thermocellum YM72 with scaffolding protein CipA truncated cohesin domains

○トウ ラン、小杉 昭彦、プラウィッタウォン パニダ、森 隆 (国際農研センター)
○Lan Deng,akihiko kosugi,Panida Prawitwong,yutaka mori (JIRCAS)

【目的】セルロース分解におけるセルロソームの機能解析を目的とし、EMS 処理によりセルロソームに変異を持つ *Clostridium thermocellum* 株の取得を試みた。変異株の培養液から部分的にセルロソームを調製し、野生株の骨格タンパク質 CipA および酵素サブユニットの SDS-PAGE パターンについて比較検討した。

【結果および考察】約 500 の変異株の中から CipA の分子量サイズに相違を持つ変異株 *C. thermocellum* YM72 を分離した。この変異株から調製したセルロソームの SDS-PAGE パターンを野生株のパターンと比較した結果、酵素サブユニットの発現パターンに大きな違いは認められなかったが、CipA の分子量サイズが小さく、部分的に欠損していることが示唆された。変異株 YM72 のセルロソームによるセルロース分解活性は、可溶性基質に対する分解活性に影響は見られなかったが、結晶性セルロース分解能の低下を示した。その部分変異 CipA 構造を検討するため、遺伝子配列を解析した結果、CipA の持つ 9 個のコヘシンのうち、N 末端から 6、7 番目のコヘシン領域が欠失していることが明らかとなった。この変異型 CipA がセルロソーム構成能やセルロース分解能にどのように影響するか検討するため、野生株からの酵素サブユニットと変異株 YM72 からの組換体 CipA を調製しセルロソームの再構成を行った。結果、変異型 CipA ではセルロソーム酵素サブユニット CelJ の選択的な脱落が認められ、変異株と同様に結晶性セルロース分解能の低下を示した。CipA の 6 番目のコヘシン領域は、4、5 番目のコヘシン領域と同一配列を有していることから、変異型 CipA からの CelJ の選択的脱落は 7 番目のコヘシン領域欠失が直接の原因と考えられる。これらの結果は、*C. thermocellum* CipA の 7 番目のコヘシン領域は CelJ のセルロソーム形成に必要であると共に、セルロソームからの CelJ の脱落は結晶性セルロース分解に重要な影響を与えることが示された。

cellulosome, Clostridium thermocellum, cellulase

講演番号：3C16p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ C 校舎 16 会場

Fusarium 属菌由来キシログルカナーゼの精製と性質
Purification and characterization of xyloglucanase from *Fusarium* sp.
○佐藤 将太[1,2]、佐々木 良幸[2]、児島 薫[2]、吉田 孝[2]([1]岩手大院連農、[2]弘前大農学生命)
○Shota SATO[1,2], Yoshiyuki SASAKI[2], Kaoru KOJIMA[2], Takashi YOSHIDA[2] ([1]Iwate Univ., [2]Hirosaki Univ.)

キシログルカンは植物細胞壁に含まれるヘミセルロース多糖の一種である。キシログルカンの構造は β-1,4 グルカンを主鎖とし、側鎖に α-1,6 結合のキシロース残基を持つ。我々はこれまで、半身萎凋病菌 *Verticillium dahliae* が分泌するキシログルカン分解酵素の活性と構造について解析を行って来た。*Fusarium* 属菌は *Verticillium* 属菌と同様に、植物に感染し萎凋症状を引き起こす植物病原菌の一種である。我々はムクゲ枝枯病菌（仮称）*Fusarium* sp. 2951 株の培養液中にキシログルカン分解酵素を発見し、その酵素の精製および性質の解析を行った。

【方法】
菌株は、本学植物病理学教室によりムクゲ（学名：*Hibiscus syriacus*）の枝から単離された *Fusarium* sp. 2951 株を使用した。ポテトスクロース寒天培地にて *Fusarium* sp. 2951 株の前培養を行った後、寒天培地 20 cm^2 程度をキシログルカン含有 Czapek-Dox 液体培地に移植し、30℃で 10 日間振とう培養を行った。培養上清を回収し、硫安塩析（80%飽和）、疎水性カラムクロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー等により精製を行った。酵素活性はタマリンドキシログルカンを基質とし、生成した還元末端を Somogyi-Nelson 法により定量した。精製酵素をプロテインシーケンサーに供して N 末端アミノ酸配列分析を行い、*Fusarium* ゲノムデータベースから本酵素が属する糖質加水分解酵素ファミリー(GH family)を推定した。

【結果】
カラムクロマトグラフィーにより均一な精製酵素を得た。本酵素の分子量は SDS-PAGE より 71 kDa、最適 pH 5.5、最適温度 60℃と求められた。基質としてはキシログルカンに最も良く作用し、カルボキシセルロースにも弱い活性を示した(キシログルカン比で 8%)。N 末端アミノ酸配列を用いたホモロジー検索と基質特異性の結果から、本酵素は GH family 74 に属する xyloglucan-specific endo-β-1,4-glucanase であると結論した。

xyloglucanase, *Fusarium*, GH family 74

講演番号：3C16p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ C 校舎 16 会場

細胞質局在型 *N*-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ DasD の放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)における機能の解析
Genetic characterization of the DasD protein possesing *N*-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2)
○齋藤 明広[1]、村上 聡史[2]、海老瀬 広規[2]、杉山 裕多[1]、安藤 昭一[2]、藤井 毅[3]、宮下 清貴[3]([1]静理工大理工、[2]千葉大院融合、[3]農環研)
○Akihiro SAITO[1], Satoshi MURAKAMI[2], Hiroki EBISE[2], Yuta SUGIYAMA[1], Akikazu ANDO[2], Takeshi FUJII[3], Kiyotaka MIYASHITA[3] ([1]SIST, [2]Chiba Univ., [3]NIAES)

【背景・目的】放線菌は，土壌でのキチン分解を担う細菌である。我々は，*Streptomyces coelicolor* A3(2)をモデルとして，放線菌によるキチンの認識と分解の仕組みを分子レベルで明らかにするとともに，放線菌にとってのキチンの重要性を示すことを目指している。DasABC は，放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)において *N,N'*-ジアセチルキトビオース ｛以下，$(GlcNAc)_2$｝の細胞内への取り込みを担う ABC (ATP-binding cassette)輸送系のコンポーネントである[1)]。*dasABC* 遺伝子のすぐ下流には，*dasD* が順向きに存在する。*dasD* は，糖質加水分解酵素ファミリー3 に属する，496 アミノ酸から成るタンパク質をコードする。我々は，大腸菌で発現させた組換え DasD が *N*-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ（GlcNAcase）活性を有すること，また，細胞分画実験によって DasD が細胞質に局在することを示した[2)]。本研究では，DasD の生物学的な機能を別の観点から探ることを目的とし，*dasD* 遺伝子の転写解析を行うとともに破壊株を作成し，*dasD* 破壊のキチン分解活性への影響を調べた。
【方法・結果・考察】逆転写 PCR による転写解析の結果，*dasD* の転写は，キチナーゼ遺伝子 *chiC* と同様に，コロイド状キチン，$(GlcNAc)_2$，あるいは *N,N',N''*-トリアセチルキトトリオースの存在下で強く誘導されたが，*N*-アセチルグルコサミンやセルロースナノファイバー存在下では誘導されなかった。また，*dasC* と *dasD*，および *dasB* と *dasC* の共転写物が検出されたことから，*dasD* が *dasBC* とともに共転写されることが示唆された。一方，相同組換えによって作成した *dasD* 遺伝子欠失株（以下，*dasD* 破壊株）では，コロイド状キチンあるいは$(GlcNAc)_2$存在下で誘導されるキチナーゼ活性が親株の M145 株よりも上昇した。コロイド状キチン存在下で培養した際の培養液中の$(GlcNAc)_2$濃度を測定したところ，M145 株では検出されなかったが，*dasD* 破壊株では一過的な$(GlcNAc)_2$の蓄積が認められた。これらの結果から，*dasD* 破壊株では，$(GlcNAc)_2$消費活性の低下によって $(GlcNAc)_2$ の寿命が長くなった結果，キチナーゼ活性が上昇したことが考えられた。一方，*dasD* 破壊株の細胞内 GlcNAcase 活性が M145 株とほとんど変わらなかったことから，*S. coelicolor* A3(2)では DasD は主要な GlcNAcase ではないことが示唆された。また，*dasD* 破壊株では$(GlcNAc)_2$の輸送に関わる DasA タンパク質の生産量が M145 株に比べて低下していた。これらから，*dasD* 破壊株では，DasA を介した$(GlcNAc)_2$輸送活性の低下によって$(GlcNAc)_2$消費活性が低下した可能性が考えられた。

1) Saito *et al.* (2007) *Appl Environ Microbiol* 73:3000-3008.
2) 海老瀬ら (2011) *キチン・キトサン研究* 17:204-205.

chitin, GlcNAcase, *Streptomyces coelicolor*

講演番号：3C16p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ C 校舎 16 会場

アルカリ性嫌気下で生産される *Amphibacillus xylanus* の xylan 分解酵素
Xylanolytic enzymes produced by *Amphibacillus xylanus* cultured under alkaline and anaerobic conditions.

○西田 俊介[1]、佐藤 梓[1]、佐藤 ひかる[1]、望月 大地[1]、藤田 信之[2]、佐藤 純一[1]、川崎 信治[1]、新村 洋一[1] ([1]東農大応生科・バイオ、[2]NITE)
○Shunsuke NISHIDA[1], Azusa SATO[1], Hikaru SATO[1], Daichi MOCHIZUKI[1], Nobuyuki FUJITA[2], Junichi SATO[1], Shinji KAWASAKI[1], Youichi NIIMURA[1] ([1]Dept. Bio., Tokyo Univ. Agric., [2]NITE)

【背景・目的】Xylanはヘミセルロースの主要構成成分であり、ヘミセルロースは植物細胞壁のアルカリ抽出画分であるため、好アルカリ性菌によるxylan分解研究が行われてきた。*Amphibacillus xylanus*[1]（ *A. xylanus* ）は幅広い植物由来のxylanを資化可能であり、アルカリ性下の無酸素・有酸素条件で良好に生育し、菌体自身で強力に酸素を吸収することにより生育ニッチ（ アルカリ性下での嫌気状態 ）の確立が可能である。そのため、省エネかつ効率的なxylan分解が期待される。これまでに、本菌の効率的な生育とxylan分解条件の検討を行ってきた。本大会では、*A. xylanus*のxylan分解機構を解明すべく、嫌気培養で発現したxylanaseおよびxylosidaseに関する解析を試み、ここに発表する。

【方法・結果】Beechwood xylanを糖源とした培地で嫌気培養された*A. xylanus*培養上清を限外濾過濃縮し、得られた粗酵素液を陰イオン交換カラム（ DEAE TOYOPEARL 650S ）に供することでxylanase活性を有する3つの画分を得た[2]。これらの画分からさらにゲル濾過カラム（ Superdex 200pg ）、強イオン交換カラム（ POROS HQ/10 ）を用いて２種類のxylanase（ XYN-38,XYN-150 ）を精製し、それぞれN末端アミノ酸配列が決定した。独立行政法人NITEとの共同研究（ *A. xylanus*のゲノム解析 ）により、本菌は5種類のxylanase遺伝子を有することが示唆されており、決定されたN末端アミノ酸配列は各々5種の中の2種と一致した。

Xylanaseと同様の精製法で2種類のxylosidaseを精製し、そのN末端アミノ酸配列はそれぞれゲノム解析から推定されたxylosidase遺伝子と一致した。このことから、*A. xylanus*の嫌気下でのxylan資化には2つのxylanaseと2つのxylosidaseが関与しているものと推定される。

XYN-38はゲノム全長を、XYN-150に関してはシグナルと思われる配列を除いた領域を用いて大腸菌による大量発現系を構築した。XYN-38大量発現株を培養後集菌、破砕し、得られた粗酵素液をButyl TOYOPEARL 650S、DEAE TOYOPEARL 650S、POROS HQ/10に供し、SDS-PAGEにて均一の酵素標品を得た。XYN-150大量発現株は、低温培養ののちに集菌、破砕しその後同様に精製を行っている。大量発現系により獲得された各xylanaseに関して諸性質検討、各種xylanへの反応性の検討を行う予定である。

【引用】

[1] Niimura Y. et al. (1990) *IJSB*, vol. 40 p. 297-301
[2] 西田俊介ら　2012 年　農芸化学会年次大会

xylan, xylanase, xylosidase

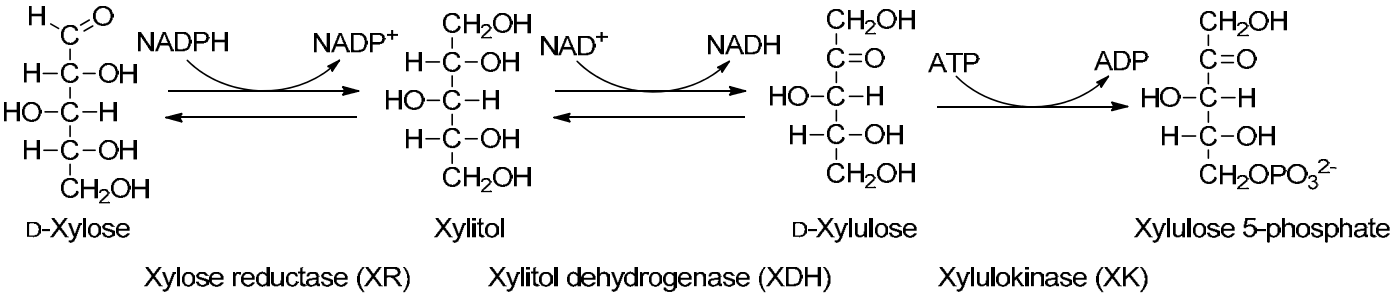
講演番号：3C16p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ C 校舎 16 会場

エタノール発酵接合菌 *Mucor circinelloides* 由来キシロースレダクターゼとキシリトールデヒドロゲナーゼの酵素化学的諸性質の検討

Properties of NADPH-dependent xylose reductase and NAD$^+$-dependent xylitol dehydrogenase from *Mucor circinelloides* NBRC4572

○濱田 龍八[1]、得野 克成[1]、山崎 思乃[1]、米田 英伸[1]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○ Tatsuya HAMADA[1], Katsushige TOKUNO[1], Shino YAMASAKI[1], Hidenobu KOMEDA[1], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO)

【目的】接合菌 *Mucor circinelloides* NBRC4572 は D-グルコースに加えて、D-キシロースからもエタノール発酵が可能なことから、農業廃棄物に豊富に含まれるリグノセルロースを原料としたエタノール生産への応用が期待されている。現在までに数種の *Mucor* 属菌株による D-キシロースからのエタノール生産の報告があるが、D-キシロース等のペントース代謝に関する研究例はない。そこで *Mucor* 属における D-キシロース代謝とエタノール発酵経路を解析することを目的として、本研究では *M. circinelloides* NBRC4572 の D-キシロース代謝酵素、キシロースレダクターゼ(XR)とキシリトールデヒドロゲナーゼ(XDH)の構造と機能の解析を行った。



【方法と結果】本菌株ゲノムのドラフト解析により、コンティグ長合計 34.7Mbp の配列ライブラリーを得た。このライブラリーの中に、ペントース(D-キシロース及び L-アラビノース)の代謝に関連する酵素遺伝子の相同配列を確認した。このうち D-キシロースをキシリトールに還元する XR とキシリトールを D-キシルロースに酸化する XDH の相同配列は各種の真核微生物由来の酵素と 45-55%の相同性を有していた。D-キシロース存在下で培養した本菌株より抽出した RNA を用いて、本酵素の cDNA クローニングを行った。さらに、組換え大腸菌より精製した酵素を用いて、酵素化学的諸性質を明らかにした。XR の分子量は 43000 であり、反応最適 pH は 5-6、で、補酵素として NADPH を必要とした。一方 XDH の分子量は 43000 であり、反応最適 pH は 10.5 で、補酵素として NAD$^+$を必要とした。

Mucor circinelloides, Xylose reductase, Xylitol dehydrogenase

講演番号：3C16p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ C 校舎 16 会場

超耐熱性エンド型セルラーゼの原子分解能による結晶構造解析
Atomic resolution of the crystal structure of the hyperthermophilic endocellulase
片岡 未有、金 翰佑、○石川 一彦（産総研バイオマスリファイナリー研究センター）
Misumi KATAOKA,Han-Woo KIM,○Kazuhiko ISHIKAWA (AIST BRRC)

【目的】木質系バイオマス有効利用技術開発において高効率糖化酵素の開発が急務となっている。我々は、超好熱性アーキアのゲノム情報を用いて、それらが生産する超耐熱性酵素群の産業利用を目的に研究を行ってきた。既に、超好熱菌アーキア *Pyrococcus horikoshii* のゲノム情報にはＧＨファミリー５に属する超耐熱性エンド型セルラーゼ酵素が存在することを報告し、その構造機能解析にも成功している(1)。一方、超好熱菌アーキア *P. furiosus* には、ＧＨファミリー5 に属する酵素は存在しないがＧＨファミリー12 に属するエンド型セルラーゼ酵素の存在が報告されている。しかし、その構造と機能の詳細は明らかになっていない。そこで、本研究では、*P. furiosus* 由来のＧＨファミリー12 の超耐熱性エンド型セルラーゼの構造機能解析を目的として実験を行った。
【方法】*P. furiosus* のゲノム情報から、セルロース加水分解酵素遺伝子を見出し、N 末端配列を改変することで pET システムにより大腸菌を用いて組換え酵素の発現調製を行った。得られた組換え酵素を用いて機能解析を行い、さらに、結晶調製の後、原子分解能において構造解析を行った。
【結果】*P. furiosus*由来のエンド型セルラーゼは、N末端領域存在するPro残基および水酸基を含むアミノ酸残基を除去することで大腸菌により高効率に発現した。調製・精製した酵素には、100℃において非結晶セルロース中のβ-1,4グルコシド結合を加水分解する活性が確認された。さらに、結晶化条件のスクリーニングを行うことで、良好なタンパク質結晶を得ることに成功した(2)。本結晶を用いて構造解析を行った結果、空間群$P\,2_12_12$，a=58.01，b=118.67，c=46.76Å、原子分解能（0.9～1.0Å）において、その立体構造を決定することに成功した(3)。本酵素の構造はβシートからなるjelly-roll構造を示し、活性部位周辺に多くのグリセロース分子を確認した。この分子の位置関係から本酵素の活性部位およびセルロース基質結合に関与するアミノ酸残基を同定した。さらに、アーキアには今まで見出されていない Ca^{2+}結合モチーフ（DxDxDG）が本酵素のN末端部分に存在し、この部分が Ca^{2+}を保持することにより当酵素の耐熱性を向上させていることが分かった。

【参考文献】
(1) Kim, H.W. and Ishikawa, K., *Biochem. J.* **437**, pp223-230 (2011)
(2) Kataoka, M. Kim, H.W. and Ishikawa, K., *Acta Cryst.* **F68**, pp328-329 (2012)
(3) Kim, H.W. Kataoka, M. and Ishikawa, K., *FEBS Lett.* **586**, pp1009-1013 (2012)

biomass, cellulase, archaea

講演番号：3C16p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ C 校舎 16 会場

NITE 保有菌株のリグノセルロース糖化に関する情報付加の概要

Usefulness of natural isolates at NITE on lignocellulosic biomass saccharification

○紙野 圭[1]、島村 麻実子[1]、堀川 祥生[2]、杉山 淳司[2]、小笠原 渉[3]、森川 康[3]([1]NITE、[2]京大生圏研、[3]長岡技科大)
○Kei KAMINO[1], Mamiko SHIMAMURA[1], Yoshiki HORIKAWA[2], Jyunji SUGIYAMA[2], Ayumu OGASAWARA[3], YASUSHI MORIKAWA[3] ([1]NITE, [2]RISH, Kyoto univ., [3]Nagaoka univ. tech.)

リグノセルロース系バイオマスは地球上で最も多く存在するカーボンニュートラルな資源であり、その変換・利用の促進は多くの産業構造を活性化する、まさに今の課題である。その成否の鍵を握るのがバイオマスの糖化である。当機構では保有菌株および新たに国内外より単離した微生物のバイオマス糖化に関連した情報付加を行っている。

NITE 保有のカビやキノコ等の真菌類から分類の偏りを排して選んだ菌株プールの、汎用的なセルロース分解スクリーニングでは、少なくとも２割が酵素（系）分泌のポテンシャルを有していた。それらの酵素（系）の有用性や新規性を見積もるためには、微生物、酵素（系）、基質のそれぞれに起因するいくつかの課題が潜在する。例えば、生育の遅さ、酵素産生能の低さ、酵素誘導の不安定さ、多糖や着色成分の菌体外生産等の天然菌株故の問題、単一に精製したセルラーゼが結晶性リグノセルロースをほとんど糖化できないことに示される、複数の酵素によるシナジーに起因する評価の問題等が挙げられる。その他、精製時のアッセイにおいて、単一精製酵素が精製不十分な酵素よりも活性が低いということも問題である。これらの課題に対して、1)精製成分酵素の *in vitro* complementary 評価、2)サブトラクションライブラリー解析を柱として、保有菌株のリグノセルロース系バイオマス糖化に関する情報付加を行っている。ここでは、NITE 菌株に対するリグノセルロース糖化関連情報付加の概要と、非 *Trichoderma reesei* 株同士の精製成分酵素のシナジーについて報告する。

NITE 保有菌株の Avicel による酵素誘導培養物から cellobiohydrolase (GH 7, GH6)等を精製した。また Accellase1000(Genencor 社)より、CBH I を除いた non-CBH I 画分を調製した。蛋白濃度は Protein assay kit(BioRad)により BSA を標準物質として求めた。それらを適当な比率で混合し、前処理バイオマス糖化測定を行った。また、結晶性セルロースミクロフィブリル分解速度を QCM-D を用いて測定した。個々の成分酵素の汎用基質に対する活性とあわせて結果を報告する。

なお、本研究は“バイオマスエネルギー先導技術開発／酵素糖化・効率的発酵に資する基盤研究”の一貫として NEDO の委託を受けて実施された。

Cellulase, Saccharification, Fungi

講演番号：3C16p17
講演日時、会場：3 月 26 日 17:12～ C 校舎 16 会場

in vitro complementary assay による天然菌株の成分セルラーゼ評価
in vitro complementary assay of mono-component cellulases from natural isolates
○島村 麻美子[1]、猪野 晋平[1]、安 善榮[1]、河合 哲志[2]、西嶋 桂子[1]、安宅 花子[1]、佐々木 和実[1]、稲葉 重樹[1]、安藤 勝彦[1]、小林 良則[2]、小笠原 渉[3]、森川 康[2,3]、紙野 圭[1] ([1]NITE、[2]JBA つくば研、[3]長岡技科大)
○Mamiko SHIMAURA[1], Shinpei INO[1], Sun-Young An[1], Tetsushi KAWAI[2], Keiko NISHIJIMA[1], Hanako ATAKU[1], Kazumi SASAKI[1], Shigeki INABA[1], Katsuhiko ANDOU[1], Yoshinori KOBAYASHI[2], Wataru OGASAWARA[3], Yasushi MORIKAWA[2,3], Kei KAMINO[1] ([1]NITE, [2]JBA Tsukuba Lab., [3]Nagaoka Univ.Tech.)

リグノセルロース系バイオマスは地球上で最も多く存在するカーボンニュートラルな資源であり、その変換・利用の促進は多くの産業構造を活性化する、まさに今の課題である。その成否の鍵を握るのがバイオマスの糖化である。当機構では保有菌株および新たに国内外より単離した微生物のバイオマス糖化に関連した情報付加を行っている。
NITE 保有のカビやキノコ等の真菌類から分類の偏りを排して選んだ菌株プールの、汎用的なセルロース分解スクリーニングでは、少なくとも２割が酵素（系）分泌のポテンシャルを有していた。それらの酵素（系）の有用性を見積もるためには、活性を測定して比較評価する必要があるが、実際にはそれは容易ではない。その原因は基質、酵素（系）、微生物のそれぞれに存在する。単一に精製したセルラーゼが結晶性リグノセルロースを実際にはほとんど糖化できないことに示されるように、酵素系としてシナジーの中で評価をせざるを得ないことがその最たる理由としてあげられる。しかしそれでは個々の成分酵素の有用性を比較評価することは難しい。また微生物の側からみれば、菌体外に分泌されるが故の問題（濃縮による多糖や着色成分等の好まざる濃縮）もその難しさを助長している。これらの問題を克服するために、個々の成分酵素遺伝子を欠損した *Trichoderma reesei* の培養上清に対する、天然菌株の精製成分酵素の活性助長・補完効果の評価(*in vitro* complementary assay)を我々は取り入れている。本研究では、NITE 保有の菌株より精製した cellobiohydrolase (GH 7, GH6)の評価について報告する。
Avicel により酵素誘導した各菌株の培養上清より各種クロマトグラフィーにより SDS-PAGE 上ほぼ単一に精製した。精製に際しては活性に基づく assay は行わず、LC-MS データの MASCOT によるデータベース検索により目的蛋白を同定し、精製を進めた。蛋白質濃度は Protein assay kit(BioRad)により BSA を標準物質として決定した。各精製酵素の評価結果と、個々の成分酵素としての汎用的な活性測定結果(pNP-C, L, G, CMCase, Avicelase, PASCase)について報告する。
なお、本研究は“バイオマスエネルギー先導技術開発／酵素糖化・効率的発酵に資する基盤研究”の一貫として NEDO の委託を受けて実施された。

Cellulase, Saccharification, Fungi

講演番号：3C16p18
講演日時、会場：3 月 26 日 17:24～ C 校舎 16 会場

真菌サブトラクション cDNA ライブラリからのリグノセルロース系バイオマス分解酵素遺伝子の網羅的かつ効率的探索

Comprehensive and Effective Screening of Genes Encoding Enzyme for Lignocellulosic Biomass Degradation from Subtraction cDNA Library of Fungi

○安 善榮、田中 文彦、市川 夏子、小口 晃央、安藤 勝彦、紙野 圭 (NITE)
○Sun-Young AN,Fumihiko TANAKA,Natsuko ICHIKAWA,Akio OGUCHI,Katsuhiko ANDO,Kei KAMINO (NITE)

リグノセルロース系バイオマスは地球上で最も多く存在するカーボンニュートラルな資源であり、その変換・利用の促進は多くの産業構造を活性化する、まさに今の課題である。その成否の鍵を握るのがバイオマスの糖化である。当機構では保有菌株および新たに国内外より単離した微生物のバイオマス糖化に関連した情報付加を行っている。カビやキノコ等の真菌類の多くがリグノセルロースを分解する酵素を菌体外に分泌する。NITE 保有の真菌類から分類の偏りを排して選んだ菌株プールの、汎用的なセルロース分解スクリーニングでは、少なくとも２割が酵素（系）分泌のポテンシャルを有していた。それらの酵素（系）の有用性を見積もるためには、活性を測定して比較評価する必要があるが、実際にはそれは容易ではない。その原因は基質、酵素（系）、微生物のそれぞれに存在する。微生物について見れば、生育の遅い株、酵素産生能の低い株、酵素誘導の不安定な株、多糖や着色成分を多量に生産する株等は、現実的に比較評価は困難である。自然界において酵素（系）の働く環境を想像すると、バイオリアクターのように懸濁された環境ではなく、菌体の足下でじんわりと分解が進むような場合が一般的であり、菌体外に多量に酵素（系）をまき散らすような株は稀であると考えるべきかもしれない。すなわち、それらの研究し難い株の酵素（系）の能力は見過ごされてきた可能性が高い。そこで、それらの株でリグノセルロース分解時に優位に発現する遺伝子情報を網羅的かつ効率的に取得するため、Suppression Subtractive Hybridization(SSH)法を用いた酵素遺伝子情報の収集を進めている。本研究では、十数株より得られた遺伝子プロファイルと定量 PCR による発現確認について報告する。酵素誘導条件として、アビセル、水熱処理エリアンサス、アルカリ処理エリアンサスの各基質を炭素源として添加した培養菌体の cDNA を調製した。非誘導条件として、Yeast ext., Sucrose, Soluble starch を添加した YSS 培地により培養した菌体から cDNA を調製した。誘導条件の cDNA と非誘導条件の cDNA との間で SSH 法によるサブトラクションライブラリー3 種を調製し、約 300 クローンの塩基配列を決定、Blast 検索による解析を行った。その結果、Glycoside Hydrolase Family 遺伝子や Carbohydrate Esterase Family 遺伝子等の糖質分解酵素に加えて、Swollenin/Expansin などの補助因子等の多様なバイオマス糖化関連遺伝子の情報が取得できた。本手法は、多様なバイオマス糖化関連酵素遺伝子情報を効率よく整備する良い手法であると考えられた。なお、これら菌株付加情報については近い将来公開していく予定である。本研究は“バイオマスエネルギー先導技術開発／酵素糖化・効率的発酵に資する基盤研究”の一貫として NEDO の委託を受けて実施された。

Lignocellulosic Biomass, Suppressive Subtraction Hybridization, Bioconversion

講演番号：3C16p19
講演日時、会場：3 月 26 日 17:36～ C 校舎 16 会場

線虫補食で知られるオルビリア目のリグノセルロース分解酵素群の解析
Enzymes for lignocellulosic biomass saccharification in nematophagous fungi, Orbiliales
○久間木 寧子、稲葉 重樹、紙野 圭 (NITE)
○Yasuko KUMAKI,Shigeki INABA,Kei KAMINO (NITE)

リグノセルロース系バイオマスは地球上で最も多く存在するカーボンニュートラルな資源であり、その変換・利用の促進は多くの産業構造を活性化する、まさに今の課題である。その成否の鍵を握るのがバイオマスの糖化である。当機構では保有菌株および新たに国内外より単離した微生物のバイオマス糖化に関連した情報付加を行っている。
NITE 保有のカビやキノコ等の真菌類から分類の偏りを排して選んだ菌株プールの、汎用的なセルロース分解スクリーニングでは、少なくとも２割が酵素（系）分泌のポテンシャルを有していた。その中で、線虫補食菌として古くより知られる、オルビリア目に属する菌株の多くがセルラーゼ活性を有することはすでに報告した【2011 年度本学会大会、猪野ら】。その分類群は、線虫への寄生様式や、植物・動物寄生性線虫の防除、高キチナーゼ活性等については研究されているが、リグノセルロース分解においては全く注目されてこなかった。そこで、*Trichoderma reesei* QM9414 株の培養上清と 40°C において同等のセルラーゼ活性を示す *Gamsylella* sp.株を中心に、その酵素（系）の解析を行ったので報告する。
Avicel により酵素発現誘導を行った *Gamsylella* sp.株培養上清の 2D-PAGE / LC-MS 解析では、リグノセルロース分解に必要とされるセルラーゼ／ヘミセルラーゼ群を有していることが確認された。そこでその培養上清から、発現量が多く分解に主要な役割を果たしていると考えられる cellobiohydrolase (GH7, GH6) 等をイオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーなどを組み合わせて精製した。精製に際しては酵素活性によるアッセイは行わず、LC-MS および MASCOT によるデータベース検索結果を指標に目的蛋白質を同定して進め、それぞれ SDS-PAGE 上単一に精製した。合成基質やバイオマス基質など各種基質に対するセルラーゼ活性を中心に、それら酵素の諸性質について報告する。
なお、本研究は“バイオマスエネルギー先導技術開発／酵素糖化・効率的発酵に資する基盤研究”の一貫として NEDO の委託を受けて実施された。

Orbiliales, cellulase, nematophagous fungi

講演番号：3C16p20
講演日時、会場：3 月 26 日 17:48～ C 校舎 16 会場

Clostridium josui の宿主ベクター系の構築

Construction of host-vector system of *Clostridium josui*

○粟冠 和郎、奥川 慶、粟冠 真紀子、木村 哲也（三重大院生資）
○Kazuo SAKKA,Kei OKUKAWA,Makiko SAKKA,Tetuya KIMURA (Mie Univ.)

【目的】*Clostridium josui* は生育至適温度 45℃の中温性偏性嫌気細菌であり、セルロソーム（セルラーゼ複合体）を形成するため高いセルロース分解能力を有している。そのため *C. josui* はバイオマス利用のための consolidated bioprocessing（CBP）の宿主として利用しうると考えられたが、遺伝子導入系が確立されていなかった。また、本菌のセルロース分解系について詳細に解析するためにも遺伝子導入系が必要とされていた。本研究では、*C. josui* に遺伝的性質の近い *Clostridium cellulolyticum* および *Clostridium paraputrificum* の形質転換法を参考として、エレクトロポレーションによる遺伝子導入法の確立を目指して研究を行い、*C. josui* の宿主–ベクター系を確立したので報告する。

【方法と結果】遺伝子導入を行う際に障害となる制限酵素の有無について検討した。*C. josui* の無細胞抽出液を調製し、λファージや幾つかのプラスミド DNA に作用させたところ明瞭な切断パターンを生じ、制限酵素の存在を示唆した。ヘパリン–セファロースを用いて制限酵素を部分精製し、プラスミドの分解パターンを既知の酵素のそれと比較しところ *Mbo*I や *Sau*3A1 と同じ認識部位（GATC）を持つことが分かった。*Mbo*I がメチル化されていない配列のみを切断し、*Sau*3A1 がメチル化されていない配列と *dam* メチラーゼで修飾された配列の両方を切断出来るのと異なり、*C. josui* 由来の制限酵素（*Cjo*I）は、*dam* メチラーゼで修飾された配列のみを切断した。*C. josui* は 2 μg/ml 以上の濃度のエリスロマイシン存在下では生育出来ないため、エリスロマイシン耐性遺伝子を持つ pJIR751（*Clostridium perfringens* 用ベクター）と pKNT19（*Clostridium acetobutylicum* 用ベクター）を使用することとし、*dam* メチラーゼを持たない大腸菌から調製した。形質転換には GS 培地で 1 日培養した *C. josui* を用いた。細胞の集菌・洗浄等のすべての作業は嫌気チャンバー内で行なった。エレクトロポレーションには Gene Pulser XceII (Bio Rad)を用い、矩形波、電圧を 750V とした。平板培地におけるコロニー形成率が低いため、菌の培養は液体培地で行った。形質転換体の生育はエレクトロポレーションの 3～5 日後に確認された。プラスミド導入の確認として *C. josui* からのプラスミド抽出とそのプラスミドの大腸菌によるプラスミドレスキューを行なった。回収したプラスミドのアガロースゲル電気泳動の結果、目的の位置にバンドが確認されたためエレクトロポレーションによりプラスミドが *C. josui* に導入されたと結論した。

Clostridium josui, transformation, electroporation

講演番号：3A11a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ A 校舎 11 会場

マベガイ真珠結晶配向性を制御する 2 種の 26kDaADP リボシルトランスフェラーゼ様タンパク質に対するモノクローナル抗体の特性と応用

Characterization and application of the monoclonal antibodies specific for two 26kDa ADP ribosyl transferase-like proteins from *Pteria penguin* pearl oyster, which control the orientation of nacre crystals.

○小野 史織[1]、小川 智久[1,2]、永沼 孝子[1,2]、村本 光二[1] ([1]東北大院生命、[2]東北大,学際センター)
○Shiori ONO[1], Tomohisa OGAWA[1,2], Takako NAGANUMA[1,2], Koji MURAMOTO[1] ([1]Tohoku Univ. Grad. Sch. of Life Sci., [2]Tohoku Univ. CIR)

【目的】マベガイ(*Pteria penguin*)は、熱帯・亜熱帯に広く分布し、貝殻内側にマベパールと呼ばれる半円形の真珠を生産する真珠貝である。真珠層はアラゴナイト結晶からなるが、その結晶配向性が良質真珠を生産する個体では整っているのに対して、不良質個体ではランダムであることが判明している(1)。また、アラゴナイト結晶配向性は、2 種の 26kDa タンパク質 ART26P-1(HSC-2)と ART26P-2(HSC-3)の組成と相関があることが示されている。本研究では、真珠層のアラゴナイト結晶配向性を制御している 2 種の 26kDa タンパク質 ART26P-1 と ART26P-2 に 特異的なモノクローナル抗体を作製し、特性を解析した。また、蛍光標識抗体を作製することにより ART26P-1/ART26P-2 の組成の高感度検出法を開発し、バイオミネラリゼーションにおける 26kDa タンパク質の機能の解明、さらに、良質真珠を生産するマベガイの選別に応用することを目的とした。

【方法と結果】

①モノクローナル抗体の作製・特性解析　モノクローナル抗体は ART26P-1 と ART26P-2 の異なる 4 アミノ酸残基のうち 55 位 Ser(26P-1)と Pro(26P-2)残基を含むペプチド抗原を用いて作製した。ELISA 法によるスクリーニングを行い、ART26P-1 と ART26P-2 にそれぞれ特異性の高い ART26P-1 特異的抗体と ART26P-2 特異的抗体を産生する単クローン、また ART26P-1 と 2 の両方を認識する抗体を産生する単クローンを得た。単クローン化ハイブリドーマの培養上清から Protein G カラムによって抗体を精製し、ART26P-1 特異的抗体、ART26P-2 特異的抗体、ART26P-1/2 特異的抗体を得た。しかし、ART26P-1 特異的抗体は、ペプチド抗原に対しては高い反応性を示したが、タンパク質には十分な反応特異性をもっていなかった。この結果から、55 位 Ser がリン酸化している可能性が示唆された。

②蛍光標識モノクローナル抗体を用いた定量性の検討　ART26P-1 特異的抗体を Alexa488(緑)、ART26P-2 特異的抗体を Alexa546(赤)で標識した。蛍光標識抗体を用いて、26kDa タンパク質 ART26P-1 と ART26P-2 の定量性を検討した。マベガイ成体の外套膜分泌液から精製した 26kDa タンパク質に対して反応させた場合には、ART26P-1 との反応性が低く定量性を検討することは難しかった。しかし、D 型幼生を用いて検討したところ、どちらの抗体も十分に反応性が高く、26KDa タンパク質 ART26P-1 と ART26P-2 の含有量の比を検討でき、良質真珠を生産するマベガイ個体の選別に応用できる可能性が示された。

1)Yoshimi et al.,Materials Transactions,45,999-1004(2004).

Biomineralization, Nacre aragonite, Monoclonal antibody

講演番号：3A11a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ A 校舎 11 会場

マベ足糸由来 TIMP 様タンパク質の構造と線維形成機構

Structure and fibril formation mechanism of TIMP-like proteins from Pteria penguin byssus

○青木 大、佐伯 友理、村本 光二、小川 智久（東北大院生命）
○Masaru AOKI,Yuri SAEKI,Koji MURAMOTO,Tomohisa OGAWA (Tohoku Univ. Grad. Sch. of Life Sci.)

【背景・目的】マベガイ(*Pteria penguin*)は、熱帯の太平洋に広く分布する真珠貝である。また、足糸は、貝本体を海中の基質に固定する二枚貝特有の付着器官であり、優れた力学的強度と機能性をあわせもった線維構造を有することが知られている。線維構造形成や基質への固着に関しては、未だ不明な点が多く、この線維化メカニズムの解明により、医療や他の産業分野における生体関連接着剤、腐食防止材などへの応用が期待できる。

これまで、マベガイ足糸から15 kDa、29 kDa、45 kDaの３種の主要タンパク質成分を精製し、それらの一次構造解析を行った。その結果、15 kDa、29 kDaタンパク質はTIMP（Tissue Inhibitor of Metalloproteinases）、45 kDaタンパク質はMMP（Metalloproteinase）と相同性を持つことがわかっている。TIMPやMMPは組織形成に重要な働きを持つタンパク質であると指摘されているが、それらの線維形成への関与は、これまで報告されておらず、ほとんど明らかになっていない。

本研究の目的は、これらTIMP様またはMMP様のマベガイ足糸由来タンパク質(15 kDa、29 kDa、45 kDa)による線維形成機構の解明とその応用にある。

【方法・結果】マベ貝足糸抽出液から主要成分である15 kDa、29 kDa、45 kDaタンパク質の分離と精製を行った。それらのうち構造が未決定であった 29 kDaタンパク質の全アミノ酸配列の決定を行った。BrCN切断により得られたペプチドの部分配列の決定を行い、得られた配列を参考にプライマーを作製した。続けて、このプライマーを用いたマベ足糸基部由来cDNAを鋳型としたPCRによって、C末端配列を決定した。また、マベ足糸基部由来cDNAに対し、RACE反応を行い、その全アミノ酸配列を決定した。この配列データを元に、15 kDa、29 kDaタンパク質や他の生物由来TIMP様タンパク質との比較を行った。さらに、15 kDa、29 kDaタンパク質に対する特異的抗体を作製し、ウェスタンブロット法によって、これらのタンパク質が組織中において、その局在に偏り（違い）があることに加えて、重合体を形成していることが明らかになった。15 kDa、29 kDa TIMP様タンパク質および45 kDa MMP様タンパク質による線維構造形成を光学顕微鏡およびチオフラビンの蛍光強度変化により、評価した。

現在、15 kDaタンパク質に加え、29 kDaタンパク質のリコンビナント発現系の構築を試みており、リコンビナントタンパク質による線維形成試験についてもあわせて議論する。

byssus, fibril formation, TIMP

講演番号：3A11a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ A 校舎 11 会場

人工細胞研究における分子ロボティクスアプローチ
Molecular robots working on artificial cell membranes

○野村 慎一郎、藤原 慶（東北大・分子ロボ）
○Shin-ichiro NOMURA M.,Kei FUJIWARA (Tohoku Univ. Molbot)

人工細胞モデルの研究とは，細胞内の生化学的過程の構成に学びつつ機能特化された人工構造を生み出そうという試みである．生命工学および計測技術の進歩により生命現象を分子解像度で記述することが可能になりつつある（トップダウン的な理解）．近年，その知見を生かして細胞構造を模倣した構造をつくることによって分子集団が生み出す生命という状態を理解しようとする試みが行われてきている（ボトムアップ的理解）．我々は，脂質分子の自己集合構造である巨大リポソームを用いて，種々の機能性分子群を導入することによって人工細胞モデルの構築を行ってきた．これまでに，無細胞タンパク質発現系を封入したリポソーム環境を構築しタンパク質を発現させること[1]，同様に膜タンパク質を発現させ機能性をリポソーム膜に付与する試みについて報告している [2]．機能するユニットはそのまま用いる，いわばミドルアウト的な構築手法である．その展開として，精製した細胞内小器官を導入した生化学過程検証用モデルの構築，また細胞内環境に近い濃度の細胞抽出液の構築を行っている．我々は，これらの技術開発が生命現象の総体を既知の生化学反応の連携現象として理解するために必要不可欠な事項と確信しており，大腸菌再構成に向けた試みについて本会で報告を行ってきている（藤原・2012 年農芸化学会年会など）．その一方，「人工」という側面により注目し，人工細胞の方向性・可能性を模索する目的で，非天然の機能性分子を設計し導入して天然の細胞の改変では得難い特徴をもつモデルの構築を行っている．機能単位を設計しシステムとして組み上げることを重視した工学的アプローチ（我々は分子ロボティクスと呼ぶ）である．具体的には，i)膜アンカー型分子ロボット（複数の機能性分子種を換装可能な人工 DNA 構造）を搭載したリポソーム，ii)膜貫通型人工ペプチドの導入による金属表面認識リポソーム，iii)外部信号により無限軌道的に回転する機構による移動を目的としたリポソーム等を構築している．これら人工分子システムは，生きた細胞が示す多彩な挙動に着想を得ているが，細胞の化学的制約に必ずしもとらわれずに目的を達成する為の構造を設計するケーススタディである．本発表ではこれらの成果について報告させていただきたい．

1） S.-i. M. NOMURA *et al.*, ChemBioChem, 4, (2003), 1172-1175.
2） M. Kaneda *et al.*, Biomaterials, 30, (2009), 3971-3977; S.-i. M. NOMURA *et al.*, J. Biotechnology, 133, (2008), 190-195.

Molecular robotics, Liposome, DNA nanostructure

講演番号：3A11a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ A 校舎 11 会場

A Noble Fluorescence Probe for Influenza A (H1N1) Virus Detection on Glass surface

○SYED Rahin AHMED[1,2], Jinhua Dong[1], Takahashi Naoto[1], Jaebeom Lee[2], Enoch Y Park[1]
([1]Shizuoka University, [2]Pusan national University)

The possibility of transmission of influenza A (H1N1) virus infection is becoming a fear for human health and society. Therefore, it is of vital importance to a rapid diagnosis of influenza viruses for the prevention, control of influenza epidemics, and the timely initiation of antiviral treatment. Recently, nanoparticle-based detection strategies have been employed in an effort to develop detection assays that are both sensitive and expedient. Specially, hybrid structure of AuNPs-QDs possesses the inherent ability to modify fluorescence properties and makes AuNPs-QDs composite interesting platforms for the development of respiratory infection diagnosis. To address the need for rapid, sensitive and simple diagnosis, a fluorescence based detection of influenza A (H1N1) virus targeting hemagglutinin (HA) gene was developed here. In this study, a novel assay system was applied on fluorescent film composed of CdTe quantum dots (CdTe-QDs) made by layer-by-layer technique (LbL). The antibody (Ab) against the HA was immobilized onto the fluorescent surface by ethyl-dimethyl-aminopropylcarbodiimide (EDC) and N-hydroxy-succinimide (NHS) coupling chemistry. The resulting QDs-Ab film was allowed to the additional binding with antibody modified gold nanoparticles (Ab-AuNPs) in the presence of different concentration of HA. The photoluminescence intensities (PL) of QDs were linearly correlated with the concentration of HA up to10 ng/ml. In the absence of HA no PL intensity was observed. This proposed diagnostic test is a feasible approach and may assist public health laboratories in the upcoming influenza season.

H1N1 Virus, QDs, Exciton-plasmon interaction

講演番号：3A11a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ A 校舎 11 会場

遺伝子導入ニワトリが生産したエピトープ含有卵白の経口摂取による花粉症治療
Oral immunotherapy for pollinosis using T-cell epitope-containing egg white produced by genetically manipulated chickens
○上平 正道、河邉 佳典、林田 悠希、沼田 健作、原田 翔太、井藤 彰（九大院工）
○ Masamichi KAMIHIRA,Yoshinori KAWABE,Yuuki HAYASHIDA,Kensaku NUMATA,Shota HARADA,Akira ITO (Kyushu Univ.)

花粉症をはじめとしてアレルギー症状に悩む患者は国内で３千万人に及ぶといわれており、アレルギーの根本的治療法の開発は、医療においても重要な課題となっている。花粉症の根本的治療法として、アレルゲン由来の T 細胞エピトープペプチドを用いた減感作療法に基づいたペプチド免疫療法が提案されている。我々はこれまでにスギ花粉症治療のために、７つのスギ花粉アレルゲン主要 T 細胞エピトープ(7crp) を、ニワトリリゾチーム（cLys）との融合タンパク質（cLys-7crp）として生産する遺伝子導入ニワトリを作製した。今回は、花粉症モデルマウスにエピトープペプチド含有卵白を計画的に経口投与した際のくしゃみ回数および血中 IgE 量を測定するとともに、肺における炎症反応について調査することで有効性を評価した。実験方法としては、まずマウスへスギ花粉抽出物を皮下投与した後、経鼻曝露することで花粉症モデルマウスを作製した。花粉症モデルマウスに、cLys-7crp を生産する遺伝子導入ニワトリが産卵した卵白を経口ゾンデにより１ヶ月間投与した後、スギ花粉抽出物を経鼻投与し、投与後のくしゃみ回数を測定した。通常のニワトリが産卵した卵白について花粉症モデルマウスに経口投与したものを対照実験として行った。それぞれのマウスから採血を行い、得られた血清中の全 IgE 量および抗原（Cry j 1）特異的 IgE 量を ELISA 法により測定した。さらに、マウスを安楽死させ肺組織における炎症反応を観察した。その結果、通常のニワトリが産卵した卵白を経口投与したマウス群では、くしゃみ回数に変化は見られなかったが、cLys-7crp 含有卵白を投与したマウス群において、経口投与を行う前と比較してくしゃみ回数の減少が観察された。経口投与を繰り返し行ったところ、くしゃみ回数のさらなる減少が観察され、個体によっては、正常時まで減少したものも見られた。血清中の全 IgE 量および抗原特異的 IgE 量に関しては、通常卵白を投与したマウス群では、卵白経口投与回数を増加させた場合でも、花粉症モデルマウス作製時と変化が認められなかったが、cLys-7crp 含有卵白を投与したマウス群では、投与回数を増加させるにつれて優位に減少した。また肺組織における炎症反応についても通常卵白を投与したマウスでは、顕著な炎症反応が観察されたが、cLys-7crp 含有卵白投与を投与したマウスでは著しい改善がみられた。これらの結果から、遺伝子導入ニワトリが生産したスギ花粉症治療用エピトープペプチド含有卵白の経口投与は、スギ花粉症治療のための減感作療法として有効であると考えられる。

transgenic chicken, Japanese cedar pollinosis, oral immunotherapy

講演番号：3A11a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ A 校舎 11 会場

新規ソマトスタチン由来ペプチドの DNA ポリメラーゼβ特異的阻害活性に基づくヒトがん細胞増殖抑制とアポトーシス誘導

Inhibitory effect of novel somatostatin peptide analogues on human cancer cell growth based on the specific inhibition of DNA polymerase beta

○栗山 磯子[1]、宮崎 杏奈[2,3]、津田 裕子[2,3]、吉田 弘美[1]、水品 善之[1,3]([1]神戸学院大・栄養、[2]神戸学院大・薬、[3]神戸学院大・ライフサイエンス産学連携セ)
○ Isoko KURIYAMA[1], Anna MIYAZAKI[2,3], Yuko TSUDA[2,3], Hiromi YOSHIDA[1], Yoshiyuki MIZUSHINA[1,3] ([1]Faculty of Nutrition, Kobe Gakuin Univ., [2]Faculty of Pharmaceut. Sci., Kobe Gakuin Univ., [3]LSC , Kobe Gakuin Univ.)

【目的】 ソマトスタチンは 14 残基からなる環状ペプチドで、成長ホルモン放出抑制などの薬理活性に関与する生体内ホルモンである。ソマトスタチンから誘導された TT-232 (H-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH_2) は、ソマトスタチン様作用を有さず、強力な抗腫瘍活性のみを示すペプチドとして報告されている。我々は、安定性・選択性に優れた抗腫瘍剤開発を目的として、これまで TT-232 のアミノ酸配列を基にした構造活性相関研究を行ってきた。そこで、今回は新たに 9 種類の新規化合物を合成し、それら化合物による DNA 合成酵素 (DNA ポリメラーゼ, pol) 阻害活性、ヒト由来大腸がん細胞 (HCT116 $p53^{+/+}$および HCT116 $p53^{-/-}$) における細胞増殖抑制活性を調べた。さらに DNA 損傷を引き起こすアルキル化剤との相関について調べるために MMS (Methyl methanesulfonate) との併用によるコロニーアッセイを行った。
【方法】 新規ソマトスタチン由来ペプチド 9 種類の合成は常法で行った。哺乳類 pol は精製酵素を準備して、*in vitro* における活性測定を実施した。ヒト大腸がん細胞 (HCT116 $p53^{+/+}$ cells, HCT116 $p53^{-/-}$cells) 増殖抑制活性は WST-1 法で測定した。細胞のアポトーシス誘導については DNA 断片化の検出と TUNEL 法を用いて調査した。
【結果および考察】 新規合成化合物 9 種類のうち N 末にチロシンおよび疎水性アミノ酸を有する化合物 **3** (Boc-Tyr-Phe-1-naphthylamide)、化合物 **4** (Boc-Tyr-Ile-naphthylamide)、化合物 **5** (Boc-Tyr-Leu-1-naphthylamide)、化合物 **6** (Boc-Tyr-Val-1-naphthylamide)の 4 つは、DNA 修復型の polβを特異的に阻害した[1,2]。一方、親水性アミノ酸を有する化合物 **1** および **2** や N 末にチロシンがない化合物 **7** (Boc-NH-$(CH_2)_2$-1-naphtylamide)、化合物 **8** (Boc-NH-$(CH_2)_4$-1-naphthylamide)、化合物 **9** (Boc-NH-$(CH_2)_6$-1-naphthylamide)では pol の阻害活性は見られなかった。さらに化合物 **3** ～ **6** の 4 種類は、HCT116 $p53^{+/+}$細胞の増殖を抑制した。特に化合物 **4** は最も強いがん細胞増殖抑制活性を示した。さらに HCT116 $p53^{-/-}$細胞においても同様の傾向がみられた[1,2]。コロニーアッセイの結果、DNA 損傷を誘発する MMS と化合物 **4** の併用によって、HCT116 $p53^{-/-}$細胞増殖抑制活性とアポトーシス誘導が増強された[1,2]。これらの結果より、ソマトスタチン由来ペプチド化合物 **4** は polβ阻害活性に基づいた抗腫瘍剤としての開発が期待できる。

[1] I. Kuriyama *et al.* (2012) ***Bioorg. Med. Chem.***, in press.
[2] 特願 2012-244575, 出願人：学校法人神戸学院, 出願日：2012 年 11 月 6 日.

somatostatin peptides, DNA polymerase beta, anticancer

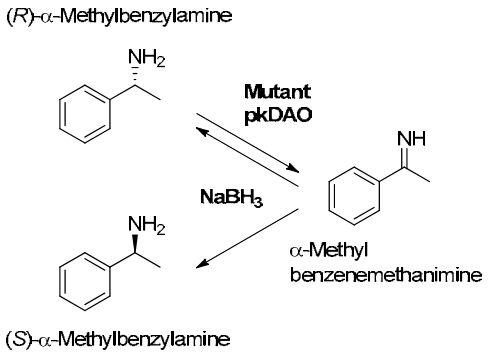
講演番号：3A11a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ A 校舎 11 会場

変異型ブタ肝臓由来 D-アミノ酸オキシダーゼを用いた(*RS*)-α-methylbenzylamine のデラセミ化反応

Deracemization of (*RS*)-alpha-methylbenzylamine using engineered D-amino acid oxidase from porcine kidney

○安川 和志[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Kazuyuki YASUKAWA[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO)

【目的】 光学活性アミン類は、塩基性光学分割剤、光学活性医薬品、農薬などの合成原料として有用である。本研究は、ブタ肝臓由来D-アミノ酸オキシダーゼ(pkDAO)に変異を導入することにより、未だ報告の無い(*RS*)-α-Methylbenzylamineに対し*R*立体選択的に作用するアミンオキシダーゼを作成し、その変異型酵素を用いたデラセミ化反応による(*S*)-α-Methylbenzylamineの合成を目的とした。
【方法】pkDAOの立体構造を基に、基質のアミノ酸のα-カルボキシル基と相互作用しているArg283とTyr228に着目して飽和変異を導入しスクリーニングを行った。得られた変異型酵素(Y228L/R283G)は、各種クロマトを用いSDS-PAGE上で単一なバンドに精製し、酵素化学的諸性質の検討を行った。デラセミ化反応は、100 mM KPB (pH8.0), 10 mM (*R*)-α-Methylbenzylamine, 100 mM $NaBH_4$そして、精製酵素を加え30℃で反応を行った。
【結果】R283の飽和変異により(*RS*)-α-Methylbenzylamineに作用する変異株を複数取得した。これらの、変異型酵素のアミノ酸配列を決定した結果、R283がGlycine, AlanineそしてCysteineのいずれかに変異していた。活性の向上を目的として、これらの変異体を親株として用い、Y228に飽和変異を行った。結果、Y228がLeucineに置換された変異株において(*RS*)-α-Methylbenzylamineの酸化活性の向上を確認した。得られた変異型酵素(Y228L/R283G)は、(*R*)-Phenylalanineに全く作用せず、(*RS*)-α-Methylbenzylamineに対して*R*立体選択的に酸化することを明らかにした。さらに我々は、$NaBH_4$などの還元剤を反応液中に添加することによって、変異型pkDAO(Y228L/R283G)は、(*R*)-α-Methylbenzylamineから継時的に(*S*)-α-Methylbenzylamineへの変換反応を触媒することを明らかにした。



Deracemization of α-metylbenzylamine

D-Amino acid oxidase, Amine oxidase, Chiral amine

講演番号：3A11a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ A 校舎 11 会場

Direct conversion of glucose to malate by synthetic metabolic engineering

○Xiaoting YE[1], Kohsuke HONDA[1,2], Yumi MORIMOTO[1], Kenji OKANO[1], Hisao OHTAKE[1]
([1]Osaka Univ., [2]JST PRESTO)

Synthetic metabolic engineering enables us to construct *in vitro* artificial synthetic pathways specialized for chemical manufacturing through the simple heat-treatment of the recombinant mesophiles having thermophilic enzymes, followed by rational combination of those biocatalytic modules. In this work, we constructed a synthetic pathway capable of direct conversion of glucose to malate. The reversible carboxylation of pyruvate catalyzed by a malic enzyme derived from *Thermococcus kodakaraensis* (*Tk*ME) ($\Delta G^{0'}$ = +7.3 kJ mol^{-1}) was coupled with a thermodynamically favorable non-ATP-forming Embden-Meyerhof pathway to balance the consumption and regeneration of redox cofactors and to shift the overall equilibrium towards malate production (glucose + 2 HCO_3^- → 2 malate + 2 H_2O; $\Delta G^{0'}$= -121.4 kJ mol^{-1}). *Tk*ME exhibited both pyruvate carboxylation (malate-forming) and pyruvate reduction (lactate-forming) activities. By increasing HCO_3^- concentration, the reaction specificity could be redirected to malate production. As a result, the direct conversion of glucose to malate was achieved with a molar yield of 60%.

Reference: Ye, X. et al Direct conversion of glucose to malate by synthetic metabolic engineering. Journal of Biotechnology (in press).

Synthetic metabolic engineering, Malic enzyme, Thermodynamic equilibrium

講演番号：3A11a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ A 校舎 11 会場

合成代謝工学による人工ピルビン酸酸化経路の構築

Construction of an artificial pyruvate oxidative pathway by synthetic metabolic engineering

○本田 孝祐[1,2]、今川 貴志[1]、Ye Xiaoting[1]、岡野 憲司[1]、大竹 久夫[1] ([1]阪大院工、[2]JST さきがけ)
○Kousuke Honda[1,2], Takashi Imagawa[1], Xiaoting Ye[1], Kenji Okano[1], Hisao Ohtake[1] ([1]Osaka Univ., [2]JST PRESTO)

【目的】
我々のグループでは「合成代謝工学」と名付けた新たな生体触媒利用技術を提案するとともに、本技術を用いたオンデマンドでの有用化学品生産に挑戦している。合成代謝工学では、好熱性微生物等に由来する耐熱性酵素遺伝子を大腸菌などの中温性宿主内で発現させ、得られた組換え菌体を熱処理に供した後、耐熱性生体触媒モジュールとして用いる。このモジュールを任意に組み合わせることで、物質生産に特化した人工代謝経路を自在にデザイン・構築することが可能となる。すでにわれわれは本法を用いてATP非生産型のキメラ型解糖系の構築に成功している[1)]。本研究では、解糖系の最終産物であるピルビン酸より、様々な代謝産物の前駆体となるアセチルCoAを生産させることを目的に、人工ピルビン酸酸化経路の構築を試みたので報告する。

【方法と結果】
多くの微生物において、ピルビン酸からアセチルCoAへの変換反応は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ多酵素複合体により触媒される。しかし、本複合体は既知の複合タンパク質の中でも最大の多酵素複合体であり、これを異種宿主内で機能的に発現させることは困難と予測された。そこで我々は、ピルビン酸デカルボキシラーゼ（PDC）によるピルビン酸からアセトアルデヒドへの脱炭酸反応と、アルデヒドデヒドロゲナーゼ（AlDH）によるアセトアルデヒドへの酸化的CoA付加反応をカップリングさせることでアセチルCoA生産のための人工経路を設計した。*Acetobacter pasteurianus*由来PDCおよび*Thermus thermophilus*由来AlDHを用いて構築した経路に、NAD^+再生用反応として*T. thermophilus*由来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GlDH)をカップリングさせることで、ピルビン酸、CoA、およびケトグルタル酸を原料としてアセチルCoAを生産させることに成功した。さらに、本経路に*Thermotoga maritima*由来*N*-アセチルグルタミン酸（NAG）合成酵素を組込むことで、CoAのリサイクルを伴ったNAGの生産経路を構築した。この結果、触媒量のNAD^+とCoAを含む反応液中において、ピルビン酸とケトグルタル酸（各10 mM）より約2.5 mMのNAGを合成することに成功した。

1) Ye, X. et al. (2012) Synthetic metabolic engineering –a novel simple technology for designing a chimeric metabolic pathway. *Microb Cell Fact* **11**, 120

synthetic metabolic engineering, pyruvate oxidation, N-acetyl-L-glutamate

講演番号：3A11a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ A 校舎 11 会場

Novel non-natural n-butanol synthetic pathway design by synthetic metabolic engineering

○ Borimas Krutsakorn[1], Takashi IMAGAWA[1], Xiaoyu Bei[1], Xiaoting YE[1], Kenji OKANO[1], Kohsuke HONDA[1,2], Hisao OHTAKE[1] ([1]Osaka Univ., [2]JST PRESTO)

[Background]
Synthetic metabolic engineering (SME) is a novel, simple, and universal strategy, in which heat-treated mesophilic recombinant cells having thermo-stable enzymes are used as biocatalytic modules for pathway construction. The use of recombinant mesophiles producing thermo-stable enzymes at high temperature results in the denaturation of indigenous enzymes and elimination of undesired side reactions. In this study, we could construct a "novel non-natural *n*-butanol synthetic pathway" through the rational combination of heat-treated 16 thermo-stable enzymes derived from different thermophiles.

[Results]
The designed pathway was constructed by coupling a chimeric glycolytic pathway [1)] with thermo-stable enzymes, including pyruvate decarboxylase (PDC), aldehyde dehydrogenase (AlDH), acetoacetyl-CoA synthetase (AACS), hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HCDH), enoyl-CoA dehydratase (ECD), acyl-CoA dehydrogenase (ACDH), and alcohol dehydrogenase (ADH). In the metabolic pathway of a natural butanol producing strain, *Clostridium acetobutylicum*, the butyryl-CoA dehydrogenase (BCDH) catalyzes the reduction C=C double bond of an intermediate, crotonyl-CoA, to form butyryl-CoA. However, BCDH requires a specific redox partner protein for electron transfer and is highly sensitive to oxygen stress; therefore the enzyme cannot be used *in vitro*. In order to avoid the employment of BCDH, the downstream enzyme, ACDH was directly used to catalyze the removal of CoA residue from crotonyl-CoA. The reduction C=C double bond of the resulting intermediate, croton aldehyde, could be catalyzed by a thermophilic old yellow enzyme from *Thermus thermophilus*. Through this artificial pathway, we could achieve the direct conversion of glucose to *n*-butanol with a molar yield of 60%.

1) Ye, X. et al. (2012) Synthetic metabolic engineering –a novel simple technology for designing a chimeric metabolic pathway. *Microb Cell Fact* **11**, 120

synthetic metabolic engineering, thermophilic enzyme, n-butanol synthetic pathway

講演番号：3A11a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ A 校舎 11 会場

炭素間二重結合を還元する耐熱性酵素の探索と同定
Screening, purification and characterization of a thermo-tolerant C=C double bond reducing activity
○辻 直人[1]、本田 孝祐[1,2]、岡野 憲司[1]、大竹 久夫[1]([1]阪大院・工、[2]JST さきがけ)
○Naoto TSUJI[1], Kohsuke HONDA[1,2], Kenji OKANO[1], Hisao OHTAKE[1] ([1]Osaka Univ., [2]JST PRESTO)

【目的】
演者らの研究室では、有用化学品生産のための人工代謝経路の簡便な構築を目的に、合成代謝工学と称した新たな技術の開発に取り組んでいる。合成代謝工学は、以下の4つの過程から成り立っている。まず代謝経路を組み立てるモジュールとなる酵素群を好熱菌より選択し、それらを大腸菌のような中温菌に発現させる。こうして得られた組換え菌体を熱処理に供することで、中温菌由来の酵素が失活し、極めて選択性の高い生体触媒を簡便に調製することが可能となる。これらの触媒モジュールを任意に組み合わせることで、化学品生産のための代謝経路を*in vitro*で構築することができる。現在、われわれは本技術を用いることで、第3世代バイオ燃料として注目が集まるブタノールの生産を目指している。今回、グルコースからのブタノール生産経路構築に利用可能な炭素間二重結合還元活性を有した耐熱性酵素の取得を試みたので報告する。

【方法と結果】
大阪大学構内から採取した土壌サンプルの懸濁液をジェランガムにて固化させた栄養培地上に塗布し、70℃で1～2日間の静置培養後、生育したコロニーを単離した。分離された約70株の湿菌体を目的反応の基質であるクロトンアルデヒドを含む反応液に懸濁し、70℃で一晩インキュベートした。残存基質と目的反応産物であるブタナールをガスクロマトグラフィーにて定量することで酵素活性を評価したところ、14株にブタナールの生産が確認された。更にスクリーニングを進めた結果、比較的活性の高いNo. 30株を選出するに至り、16S rDNA配列解析により、当株は*Geobacillus*属であると同定された。次に目的酵素の同定を行うべく、タンパク質精製を行った。選抜された株を大量培養し、超音波破砕処理後の遠心上清を無細胞抽出液とした。ここから硫安分画ならびに3種類のカラムクロマトグラフィーを経て、目的酵素を約39倍にまで精製することができた。本粗酵素標品は、SDS-PAGE上で2つのメジャーバンドを与える。現在、LC/MS/MSを用いたペプチドの部分アミノ酸配列決定を進めている。

themophile, synthetic metabolic engineerig, enzyme purification

講演番号：3A11p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ A 校舎 11 会場

Depletion flocculation 現象によりクリーミングする乳化系の流動特性の解析に対する相対流動性指数及び相対粘稠性係数の適用の試み

Rheological properties and stability of oil-in-water emulsions containing tapioca maltodextrin in the aqueous phase

○合谷 祥一[1]、池田 新矢[1]、ウドムラチ サンサニー[2,3] ([1]香川大農、[2]愛媛大院連農、[3]カセサート大)
○Shoichi Gohtani[1], Shinya Ikeda[1], Sunsanee Udomrati[2,3] ([1]Kagawa Univ., [2]Ehime Univ., [3]Kasetsart Univ.)

低分子乳化剤で得られたエマルション系にマルトデキストリン（以下 MD と表記）を添加すると、ある濃度領域で Depletion flocculation 現象によりクリーミングが生じるが、さらに MD 添加量を増大させるとクリーミングが見られなくなる。この現象は MD のＤＥ値によって異なり、ＤＥ値が小さいほど著しい[1)]。これは、MD による Depletion flocculation 効果と、連続相中での MD 自身による粘性効果の相対的な強さによると推測された。今回は、このような複雑な乳化系の流動特性を解析するために、Herschel–Bulkley 式より得られる粘稠性係数の相対値の適用を試みたので、その結果[2)]について報告する。

［方法］乳化剤は Tween80 相当品を、油は大豆油を、MD はタピオカ澱粉由来のＤＥ値が 9(DE9)、12(DE12)及び 16(DE16)のものを用いた。エマルションは、乳化剤水溶液と油を予め高速ディスパーサーで乳化後、高圧ホモジナイザーを使用して得、これに MD 水溶液を添加した。実験に供したエマルションの組成は、乳化剤 0.02%、油５.00%、水溶液（MD 濃度 5～35%）94.08%（いずれも重量%）である。エマルションの粘度はコーンプレート型粘度計（ブルックフィールド：DV-III Ultra あるいは東機産業：TV-20H）を用いて測定した。

［結果］調製されたエマルションに DE9、12 及び 16 の MD を添加すると、11、９及び７%濃度（以下、CFC と表記）で凝集よりクリーミングが著しく促進された。どの MD を添加したエマルションにおいても、その流動特性は Herschel–Bulkley 式によって統計的に有意にフィッティングできた。エマルションの粘稠性係数は MD 濃度の増加により増大し、同一濃度で DE 値の増加により低下した。流動性指数は MD 濃度が CFC 以下ではほぼニュートン流動を示したが、CFC より高くなると、ズリ流動性を示すようになった。しかし、さらに MD 濃度が増大すると流動性指数の値は再び 1 に近づいた。Herschel–Bulkley 式から得られたエマルションの粘稠性係数を、連続相に相当する MD 水溶液の粘稠性係数で除して、相対的粘稠性係数を得た。相対的粘稠性係数は CFC 以上で著しく増大し、最大で 4 程度の値を示しさらに MD 濃度が増大すると低下し 1 に近づいた。これらのことから、MD を添加したエマルション系の粘性挙動は、CFC 濃度以上では凝集体形成の影響を受け、さらに高濃度の MD 存在下では、連続相の粘性挙動が優位になると考えられた。

1) Udomrati, S. et al., Starch, 347, 63(2011), 2) Udomrati, S. et al., J. Food Eng., (2012) in press.

depletion flocculation, shear thinning behavior, maltodextrin

講演番号：3A11p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ A 校舎 11 会場

W/O/W エマルジョン型凝固剤を用いた豆腐加工

Utilize W/O/W controlled-release coagulant to improve the quality of tofu

○辰巳 英三[1]、LI Jinlong[2]、程 永強[2]、齋藤 昌義[1]、殷 麗君[2] ([1]国際農研、[2]中国農大・食品科学)
○Eizo TATSUMI[1], Jinlong LI[2], Yongqiang CHENG[2], Masayoshi SAITO[1], Lijun YIN[2] ([1]JIRCAS, [2]China Agric. Univ.)

【目的】中国の北豆腐は苦汁（にがり）を凝固剤として製造される日本の木綿豆腐に相当する伝統的豆腐食品である。しかし、硫酸カルシウムやグルコノデルタラクトンのような遅効性の凝固剤とは異なり、苦汁は即効性の凝固剤であるため、北豆腐製造に際しては高度な技術と熟練が要求される。これを解決する手段として、W/O エマルジョン型の凝固剤を用いた場合には、北豆腐加工特性は向上するものの、凝固剤を豆乳に均一に分散させる方法に課題が残されていた[1), 2)]。豆乳への分散特性改善のため、W/O/W エマルジョン型の凝固剤を調製することにした。
【方法】W/O/W エマルジョンの調製は二段階乳化法を用いた。まず、苦汁液、市販の大豆油、疎水性乳化剤を用いて W/O エマルジョン化し、親水性乳化剤を用いて水に分散させることにより、W/O/W エマルジョン型凝固剤を調製した。得られた凝固剤を用い、凝固剤の乳化特性、加熱豆乳に対する凝固速度の変化、調製された北豆腐の加工特性を検討した。
【結果】W/O/W エマルジョンには、親水性の活性物質を閉じ込め、ゆっくりと放出する物理的性質を有するため、食品・化粧品・医薬品をはじめとする様々な産業分野での応用にポテンシャルが高い。産業利用へのブレークスルーの一つである、ダブルエマルジョンの安定化のため、乳化剤濃度・混合比率・混合条件等の乳化条件を検討し、苦汁と大豆油の W/O/W エマルジョンを調製した。得られた W/O/W エマルジョン型凝固剤を用いて北豆腐を調製したところ、滑らかで、ほどよい堅さの豆腐を高い歩留まりで調製できることを確認した。

1）Li *et al.,* Food Bioprocess Tech. (2012) doi: 10.1007/s11947-012-0896-4
2）Li *et al.,* Food Bioprocess Tech. (2012) doi: 10.1007/s11947-012-0849-y

W/O/W emulsion, Tofu, Bittern

講演番号：3A11p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ A 校舎 11 会場

ゼラチンのゲル形成に対するキチンナノファイバー添加の影響

Effect of Addition of Chitin nanofiber on Gelling Behavior of Gelatin

○小谷 正男[1]、阿部 賢太郎[2]、矢野 浩之[2]、松宮 健太郎[1]、松村 康生[1]（[1]京大院農、[2]京大生存圏）
○ Masao KOTANI[1], Kentaro ABE[2], Hiroyuki YANO[2], Kentaro MATSUMIYA[1], Yasuki MATSUMURA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ.)

【緒言】　ゼラチンは主にゲル化剤として食品に広く利用され、牛骨皮、豚皮由来のものに加え、近年では魚類起源のものもよく使われている。ゼラチンは温度変化により可逆的にゾルーゲル転移することから、一旦温度が上がると軟弱になる上、機械的な撹拌等によっても崩壊しやすいという問題点も有り、その性質の改善が求められている。一方、キチンは甲殻類の外骨格に豊富に存在する不溶性の直鎖状多糖類である。キチンの側鎖を脱アセチル化することで可溶性を付与したキトサンに関しては、ゼラチンとの相互作用について研究が行われてきたが、キチンは不溶性のため食品への応用例はほぼなく、ゼラチンとの相互作用についても不明な点が多い。本研究では、キチンを微細化処理し、水に安定的に分散する状態にしたキチンナノファイバー（以下、ＣＮ）をゼラチンに添加した場合にゼラチンのゲル形成過程がどのような影響を受けるのかを、ゼラチンのゾルーゲル転移および 3 重ヘリックス形成に着目して検討を行った。
【材料および方法】　ゼラチンは豚皮および魚皮の酸処理ゼラチンを用いた。ＣＮ分散液（0.083M の酢酸に分散）はカニ甲羅を微細化処理することにより調製した。ゼラチン水溶液とＣＮ分散液を混合し、ｐＨを 6.0 に調整してサンプル混合液を調製した（最終濃度は、ＣＮが 0.3%、ゼラチンが 3%）。混合液をウォーターバス（60℃）で 30 分間加熱しながら撹拌した後、アルミ皿（直径 25ｍｍ、高さ 5ｍｍ）に分注して冷蔵庫（4℃）で 17 時間ゲル化させた。動的粘弾性測定装置（ＵＢＭ社製）を用いて温度変化時（5℃から 50℃、50℃で保持後、50℃から 5℃）の貯蔵弾性率を測定し、得られた値から溶融過程およびゲル化過程を検討した。また円二色性分散計（ＪＡＳＣＯ社製）を用いて円二色性偏光（ＣＤ）スペクトルを測定し、221ｎｍ付近に現れる 3 重ヘリックス特有のピークの増減を比較することで、ＣＮがゼラチンの 3 重ヘリックス構造形成に与える影響を評価した。
【結果および考察】　動的粘弾性測定では、ＣＮを添加することで両ゼラチンにおいてG’が増加し、ゲル化温度が上昇した。ＣＤスペクトルの測定では、ＣＮ無添加のゼラチン水溶液で低温時（5～10℃）に３重ヘリックス形成を表す 221ｎｍ付近における正のピークが観察された。そのピーク強度はＣＮを添加することによってもほとんど変化が無かった。これらの結果より、ＣＮを添加した場合にはゼラチンの３重ヘリックス形成は阻害されないこと、より高温でのゲル形成が促進されること、ゲル強度も上昇することが明らかになった。以上の結果は、ＣＮをゼラチンゲルの物性改良剤として利用できる可能性を示唆している。

gelatin, chitin nanofiber, gelation

講演番号：3A11p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ A 校舎 11 会場

大豆タンパク、多糖の混合ゲルの物性に関する研究

Physical properties of soy protein and polysaccharide mixed gels

○安藤 為明[1]、田中 克幸[1]、畠中 芳郎[2]、室 哲雄[2]、山内 朝夫[2] ([1]奥野製薬工業株式会社、[2]地方独立行政法人 大阪市立工業研究所)
○TAMEAKI ANDO[1], KATSUYUKI TANAKA[1], YOSHIRO HATANAKA[2], TETSUO MURO[2], ASAO YAMAUCHI[2] ([1]OKUNO CHEMICAL INDUSTRIES CO.,LTD, [2]OSAKA MUNICIPAL TECHENICAL RESEARCH INSTITUTE)

【目的】大豆タンパクは物性改良の目的で加工食品の品質改良に広く利用されている。我々は、大豆タンパクに多糖を混合して物性がどのように変化するか、また、大豆タンパクと多糖の混合物の加熱混練処理による物性変化について検討した。
【方法・結果】大豆タンパクに各種比率の多糖を混合した水溶液を加熱処理して円柱状のゲルを作製し、圧縮変形測定法により物性を比較した。物性測定の結果よりサイリウムシードガム、グァーガム、タラガム、ローカストビーンガムの添加区において、特徴的なゲルの物性変化が確認できた。特にサイリウムシードガムを混合したゲルについては、従来の大豆タンパクと比較し粘弾性に変化が見られた。
また、大豆タンパクとサイリウムシードガムの混合物に加熱混練処理（エクストルーダー）を施す事により、加熱ゲルの物性変化、特に粘弾性に顕著な変化が見られ、物性の改変効果を高める事が確認できた。

Physical properties, soy protein, polysaccharide

講演番号：3A11p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ A 校舎 11 会場

ヨーグルトのカード凝固に及ぼす乳タンパク質表面疎水性度の影響

Effect of the surface hydrophobicity of milk protein on the yogurt coagulation

○大原 慎太郎[1]、岡 大貴[2]、野口 智弘[2]、高野 克己[3]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・食加技セ、[3]東京農大応生・化学)
○ Shintaro OHARA[1], Daiki OKA[2], Tomohiro NOGUCHI[2], Katsumi TAKANO[3] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch., [2]Dept.Appl.Biol.chem.,.FPC, [3]Dept.Appl.Biol.chem.,Fac.Bisci.,Tokyo Univ.Agr.)

【目的】

ヨーグルトカードの凝固特性およびテクスチャーについては、脱脂乳の成分の差異や内在酵素、乳酸菌などのほか、脱脂乳中の乳タンパク質の熱変性の視点から研究が行われている。高度の加熱処理を施した脱脂乳はカード形成が良好で強固なカードとなるが、低度加熱では軟弱なカードとなる。両者のこのような違いは、乳タンパク質の熱変性の状態の差異に由来するとされている。乳タンパク質は熱を受けるとホエー成分のβ-ラクトグロブリン（β-Lg）がκ-カゼイン（κ-CN）とジスルフィド結合にて複合体を形成する。その複合体が凝固特性に影響していると推論されているが、詳細な機構は解明されていない。そこで本研究では、β-Lg とκ-CN の加熱複合体がヨーグルトカードの凝固特性およびテクスチャーに与える影響について、乳タンパク質の表面疎水性度に焦点をあて解明することを目的とした。

【方法】

生乳より調製した非加熱脱脂乳を 60～90℃で 30 分間処理し加熱脱脂乳試料とした。ヨーグルトは、試料 30g にスターター（ *L.bulgaricus* 約 4.5×10^{7}cfu , *S. thermophilus* 約 4.5×10^{8}cfu ）を添加し、37℃にて 24 時間発酵させ調製した。ヨーグルトカードの物性は直径φ 7 mm のプランジャーを用い、破断強度を圧縮型物性測定機（インストロン社製）にて測定した。タンパク質表面疎水性度（F.I./ mg タンパク質）は ANS 法にて測定した。

【結果】

60～90℃処理した脱脂乳では、乳タンパク質の表面疎水性度が上昇し、ヨーグルトカードの強度が高くなった。非加熱脱脂乳に非加熱のβ-Lg を脱脂乳中の存在量の倍量となるよう添加しヨーグルトを調製したところ、無添加と比較してもカードの強度に差はみられなかった。また、非加熱のβ-Lg を添加した非加熱脱脂乳のタンパク質表面疎水性度においても差はみられなかった。しかし、非加熱脱脂乳に非加熱のβ-Lg を添加後に加熱処理（80℃、30 分間）しヨーグルトを調製したところ、カードの強度は高くなり、無添加の加熱脱脂乳（80℃、30 分間）よりも高くなった。タンパク質表面疎水性度においても無添加の加熱脱脂乳より上昇した。加熱脱脂乳に疎水性相互作用を弱めるチオシアン酸ナトリウム（NaSCN）を添加しヨーグルトを調製したところ、NaSCN の添加濃度依存的にカードの強度が低くなった。

surface hydrophobicitiy, yogurt curd, milk protein

講演番号：3A11p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ A 校舎 11 会場

小麦粉生地形成における β-Lg がグリアジンの表面疎水性度に与える影響

Effect of β-Lg on the surface hydrophobicity of gliadin in dough development

○岡 大貴[1]、大原 慎太郎[2]、野口 智弘[1]、高野 克己[3] ([1]東京農大応生・食加技セ、[2]東京農大院農・農化、[3]東京農大応生・化学)
○Daiki OKA[1], Shintaro OHARA[2], Tomohiro NOGUCHI[1], Katsumi TAKANO[3] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., FPC, [2]Agrichem. Agr., Grad. Sch., [3]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Biosci., Tokyo Univ. Agr.)

【目的】

製パンには、栄養および風味改善のため脱脂粉乳が副原料として使われているが、加熱変性度の低い脱脂粉乳ほど製パン性が低下することが知られている。しかし、これらの要因は未解明である。これまでに、乳タンパク質の加熱変性に主眼を置き研究を進め、未変性の α-ラクトアルブミン（α-La）と β-ラクトグロブリン（β-Lg）が製パン性を阻害することを明らかとした。また、β-Lg はグルテンの粘弾性に関与するグリアジンと相互作用し、グリアジンからω-グリアジンを引き抜き、グリアジンの粘性および疎水性度に影響を与えることを明らかとした [1)]。これらの結果より、製パン性の低下はω-グリアジンの遊離が原因で惹起されると推論した。そこで本研究では、ω-グリアジンがグリアジンから脱離することによるグルテン形成の阻害機序を検討することを目的とした。

【方法】

小麦粉には強力粉（カメリア・日清製粉）を用い、グリアジンは市販品（TCI 社製）を用いた。β-Lg は非加熱脱脂乳から Aschaffeburg らの方法により分画した。グリアジンの表面疎水性度（F.I./タンパク質 1g）を ANS 法にて測定した。なお、グリアジンは 0.1M 酢酸に溶解させ試験に用いた。混捏時の生地強度はドウグラフ（アトー社製）にて消費電力を測定し、発酵時の生地のガス保持力をメスシリンダー法により測定した。

【結果】

グリアジンに β-Lg を作用させたところ、グリアジンの表面疎水性度が増加した。タンパク質の疎水性相互作用を強めるプロピレングリコール（PG）、および弱めるチオシアン酸ナトリウム（NaSCN）をグリアジンに加え各々の表面疎水性度を測定したところ、PG 添加ではグリアジンの表面疎水性度は増加し、NaSCN では低下した。次に、両試薬を小麦粉に加え、混捏時の生地強度およびガス保持力を測定したところ、PG では添加濃度依存的にピーク到達時間が早まり、ディベロップ後の生地強度の低下が著しく、ガス保持力も低下した。一方、NaSCN では添加濃度依存的にピーク到達時間が遅れ、ディベロップ後の生地強度の低下が抑制され、ガス保持力も上昇した。

1) 日本食品科学工学会第 59 回大会講演要旨集, p.146

gliadin, β-Lg, surface hydrophobicity

講演番号：3A11p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ A 校舎 11 会場

キャッサバおよびわらび澱粉の湿熱処理による物性改変効果

Effect of heat-moisture treatment on the structure and rheological properties of cassava and warabi starches

○阿久澤 さゆり[1]、阿部 知美[1]、土田 杏里[1]、松森 慎悟[2]、松島 良[3]([1]東京農大・応用、[2]駒沢女子大・人間健康、[3]岡山大・資源)
○ Sayuri AKUZAWA[1], Tomomi ABE[1], Anri TSUCHIDA[1], Shingo MATSUMORI[2], Ryo MATSUSHIMA[3] ([1]Tokyo Univ of Agri., [2]Komazawa Woman Univ, [3]Okayama Univ)

【目的】 澱粉は食品から工業原料にいたるまで多岐にわたって利用されており、要求される特性を付加するためにトウモロコシ、ジャガイモなど収穫量の多い植物澱粉に架橋・修飾など化学的処理を施している。演者らは、多種にわたる澱粉の構造と物性発現の相互関係について検討を行っており、さらに、澱粉の構造を改変する手段として、物理的方法および育種学的方法を用いて、物性の改変と新規機能性澱粉の創出をめざしている。物理的方法である湿熱処理に関して、澱粉粒の膨潤および粘度の低下など多くの報告が見られるが、わらび澱粉とキャッサバ澱粉におよぼす湿熱処理の効果に関する報告は見られない。本研究では、湿熱処理を施したわらび澱粉とキャッサバ澱粉のレオロジー特性を測定し食品への利用性を検討した結果を報告する。
【方法】キャッサバ澱粉は三和澱粉工業（株）の未処理および湿熱処理（125℃・20 分）と、わらび澱粉は、広八堂（鹿児島県）で製造された粗澱粉を研究室内で常法に従って精製し、湿熱処理（125℃・20 分）を施した 4 種類を測定用試料として用いた。測定項目は、一般特性として、澱粉粒の顕微鏡観察（SEM)、X 線回折、アミロペクチンの鎖長分布測定を行った。糊化特性は、膨潤度・溶解度測定、ペースト特性（RVA)、示差走査熱量測定（DSC）を検討し、糊液の特性では、糊液の水可溶性（低分子画分）および不溶性画分（高分子画分）の分子量分布、粘度特性および動的粘弾性特性の測定を行い湿熱処理の効果を比較した。
【結果】澱粉粒の形状観察では、湿熱処理によりわらび澱粉は中央が窪み、扁平に粒が変形していることが観察された。この変化はすでに報告しているジャガイモやトウモロコシ澱粉粒と同様であったが、キャッサバ澱粉粒の形状変化は観察されなかった。X 線回折ではわらびは C 形から A 形に変化し、キャッサバは未処理・湿熱処理ともに A 形を示した。膨潤度・溶解度では、わらびの膨潤度が顕著に低下し、キャッサバの変化はわずかであった。DSC 特性値ではわらびはピーク温度が 8℃上昇し吸熱エンタルピーは 5.0mJ/mg で約 1/3 に減少したが、キャッサバの変化はわずかであったことから、アミロースの有無にかかわらず、粒構造に及ぼす湿熱処理の効果が異なることが示された。糊液の特性では、わらびは湿熱処理によって水可溶性画分（低分子画分）中のアミロースの溶出量が減少し、動的粘弾性によるゾルーゲル転移濃度も未処理 2.5wt%、湿熱処理 3.5wt%であったが、キャッサバは糊液の粘弾性特性においても顕著な違いは見られなかったことから、湿熱処理による効果は、アミロースとアミロペクチンの分散性の変化が粘弾性に現れていると考えられた。

heat-moisture treatment, starch, rheological properties

講演番号：3A11p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ A 校舎 11 会場

Physical Properties and Solubility Behavior of Aqueous Solution of Coenzyme Q10 in γ-Cyclodextrin-Surfactant Mixed Systems

○Yukiko UEKAJI[1,2], Mayu ONISHI[2], Daisuke NAKATA[2], Keiji TERAO[2], Arja PAANANEN[3], Riitta PARTANEN[3], Hidefumi YOSHII[1] ([1]UGAS Ehime Univ., [2]CycloChem Bio, [3]VTT)

【Purpose】Nano-emulsions or micelles are widely used within the food and cosmetic industries. The transparent emulsion could be obtained by the formation of nano-emulsion. Cyclodextrin (CD) has unique bucket shape and form inclusion complexes with various hydrophobic substances and its molecule size is approximately 1 nm. We developed the formation of nano-emulsion of coenzyme Q10 (CoQ10) by the interchange reaction between CoQ10 as the guest compound in γCD and dipotassium glycyrrhizate (GZK_2) as a surfactant. In this study, the formation of nano-emulsion as the micelle solution of CoQ10 and GZK_2 was investigated. Especially, the zeta potential and the size distribution of nano-emulsion solution containing CoQ10, GZK_2 and γCD were measured by laser doppler velocimetry and dynamic light scattering.

【Methods】CoQ10-γCD inclusion complex containing 73 μmol of CoQ10 and 182 μmol of γCD were mixed with GZK_2 for γCD to 0.1 ~ 4 molar ratio. The suspension was stirred at 30ºC and 1,000 rpm for specified time. The solution was centrifuged and filtered with through 0.2 μm PTFE filter. The concentrations of CoQ10 and γCD in water were measured by the high-performance liquid chromatography (HPLC; LC-2010, Shimadzu). The apparent dissolution rate constant of CoQ10 and γCD were obtained by *Noyes-Whitney*'s dissolution rate equation. The visual structures of nano-emulsion were observed by atomic force microscope (AFM; NanoScope IIIa MultiMode, Bruker), and the zeta potential and average diameter were measured by laser doppler velocimetry and dynamic light scattering (Zetasizer Nano ZS, Malvern).

【Results】Solubility of CoQ10 and γCD were investigated by addition of GZK_2 with the combination of CoQ10-γCD inclusion complex and GZK_2. The apparent dissolution rate constants of CoQ10 and γCD increased as the addition molar ratio of GZK_2 to γCD. The apparent solubility of CoQ10 containing GZK_2 and γCD was obtained about 2.5 mM at 30ºC. This solubility was remarkably increased (about 800 times than the inclusion complex solubility) with the nano-emulsion formation. The zeta potential was about -50 ~ -60 mV. These results suggest that the micelle of CoQ10 and GZK_2 was formed via the interchange of CoQ10 to GZK_2 as the guest compound in γCD. The average diameter of nano-emulsion was about 40 nm by dynamic light scattering (Zetasizer Nano ZS, Malvern), or about 60 nm by the another dynamic light scattering (FPAR-1000, Otsuka Electronics). The AFM images showed small particles for dried solutions of varying concentrations, the particle sizes being typically less than 30 nm for the smallest concentrations.

Coenzyme Q10, Cyclodextrin, solubilization

講演番号：3A11p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ A 校舎 11 会場

中華麺の調理工程における放射性セシウムの挙動

Dynamics of radioactive cesium during cooking of Chinese noodles

○濱松 潮香[1]、八戸 真弓[1]、内藤 成弘[1]、佐々木 朋子[1]、明石 肇[2]、等々力 節子[1]、松倉 潮[1]、川本 伸一[1] ([1]（独）農研機構食品総合研究所、[2]（株）日清製粉グループ本社 QE センター)
○ Shioka HAMAMATSU[1], Mayumi HACHINOHE[1], Shigehiro NAITO[1], Tomoko SASAKI[1], Hajime AKASHI[2], Setsuko TODORIKI[1], Ushio MATSUKURA[1], Shinichi KAWAMOTO[1] ([1]NFRI, [2]Nisshin Seifun Group Inc. QE Center)

［背景］　平成 23 年 3 月 11 日の東日本大震災後､我々は平成 23 年 3 月 25 日に放射性物質影響ワーキンググループを組織し、食品の加工・調理における放射性セシウム濃度の動態解析を検討してきた[1)−3)]。今回は、小麦の加工食品のひとつである中華麺における製麺および調理工程での放射性セシウムの動態について報告する。中華麺は小麦粉にかん水を加えて製麺されるものであり、中華麺を使用したラーメンは日本人が好む麺料理のひとつである。かん水を添加した本来の中華麺（かん水中華麺）と、かん水の代わりに食塩を添加した麺（食塩中華麺）を作成し、生麺、茹で麺、茹で液における放射性セシウム濃度を測定した。さらに、製麺および調理工程における加工係数を算出し、比較検討を行った。

［方法］　放射性セシウム（^{134}Cs+^{137}Cs）を含む平成 23 年産小麦を用いて製粉[1)]した小麦粉を使用した。小麦粉 100 に対し、粉末状かん水 1.3、水 28、エタノール 2 を加えて、生麺の調製を行った。生麺は、10 倍量の沸騰水で 2 分 30 秒間茹でた後、茹で麺と茹で液をそれぞれ回収した。放射性セシウム濃度は、ゲルマニウム半導体検出機（CANBERRA GC2020-7500SL-2002CSL）を用いたγ線スペクトロメトリにより測定した。小麦粉、生麺および茹で麺の水分含量を測定し、乾燥重あたりの放射能濃度を算出した。さらに茹で麺の圧縮荷重値を測定し、麺の硬さを評価した。すべての測定は 3 回繰り返し行い、その測定値の平均について有意差検定を行った。

［結果］　製麺工程においては、かん水中華麺と食塩中華麺の放射性セシウム濃度に関して有意差は認められなかった。調理後の茹で麺の放射性セシウム濃度は、かん水中華麺が食塩中華麺より有意に高く（$p<0.01$）、一方、茹で液では、かん水中華麺が食塩中華麺より放射性セシウム濃度が有意に低かった（$p<0.01$）。加工係数（加工前後の放射能濃度比）は、かん水中華麺が 0.49 であり、食塩中華麺の 0.35 よりも有意に高い（$p<0.05$）ことが明らかとなった。調理前後のかん水中華麺は食塩中華麺より麺が有意に硬い（$p<0.05$）ことから、放射性セシウムの茹で液への移行は、食塩中華麺に比べかん水中華麺で抑制されると考えられた。以上の結果から、中華麺に含まれる放射性セシウムは茹で工程で約 50%が除去されることが明らかとなった。

1) Kimura K et al., J. Food. Prot., 75(10), 1823-1828, 2012
2) 八戸・他, 日本食品科学工学会誌, 60(1), 印刷中, 2013
3）等々力・他, 日本食品科学工学会誌, 60(1), 印刷中, 2013

radioactive cesium, Chinese noodles, brine powder

講演番号：3A11p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ A 校舎 11 会場

低温貯蔵後室温においたニンニクにおけるくぼみ症発生の MRI による追跡

Tracing changes of garlic bulbs at room temperature after low temperature storing by MRI

○石田 信昭[1]、堀金 明美[2]、関山 恭代[2]、小野 祐嗣[2]、庭田 英子[3]、山崎 博子[4] ([1]石川県大、[2]農研機構食総研、[3]青森野菜研、[4]農研機構東北農研)
○Nobuaki Ishida[1], Akemi Horigane[2], Yasuyo Sekiyama[2], Hiroshi Ono[2], Eiko Niwata[3], Hiroko Yamazaki[4] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]NFRI, [3]Inst. Vegetable Res. Aomori Pref., [4]NARC Tohoku)

【目的】ニンニクは夏に収穫され、乾燥後発芽を防ぐため低温下で貯蔵されて次の夏まで周年供給される。低温下における貯蔵中の障害として、ニンニク表面がくぼむ「くぼみ症」が問題となっており、乾燥条件及び貯蔵温度との関連について検討を行ってきた。その中で、低温貯蔵されたニンニクは、出庫時は正常でも室温に置かれた後、1-2 週間で急速にくぼみ症が進むことがあることがわかった。ここでは、出庫後のくぼみ症の発生について、内部構造およびそれに対応した組織の水の状態変化を MRI により追跡した。
【方法】青森県で栽培された「福地ホワイト」を試料とし、7 月初旬に収穫後、34℃で乾燥を行った。所定の乾燥仕上がりの後、1 週間さらに 34℃(34/34 乾燥)または 22℃(34/22 乾燥)で乾燥後、-1.8℃で 3 ヶ月貯蔵したものを試料とした。MRI の測定は Bruker DRX300WB NMR 装置に取り付けたミクロ MRI 装置(検出器：径 25㎜)を用い、同一の試料について、室温に静置したときの変化を観測した。
【結果】34℃乾燥、-1.8℃貯蔵はくぼみ症の出やすい条件であり、1 週間の過乾燥はさらにそれを助長することがこれまでの研究でわかってきている。3 ヶ月貯蔵で出庫時くぼみ症の症状の認められなかった 34/34 乾燥の試料では、くぼみ症のニンニク特有の、組織によるコントラストが出にくく維管束などの構造の見えない特徴的な MR 画像を示し、くぼみ症が出ていないにもかかわらず、くぼみ症の出にくい 34/22 乾燥試料と比べ、出庫時の MR 画像で明らかな違いが認められた。各部位の T1,T2 画像では、34/22 乾燥試料と比べ、T1 画像ではくぼみの出やすいりん片表面直下に T1 値の短い部位が認められ、T2 画像でも同様に短い値を示した。これらの試料を室温に置いたところ、34/34 乾燥の試料では数日でくぼみが認められるようになり、2 週間後にはかなり激しいくぼみを生じたが、34/22 乾燥の試料ではくぼみの発生は認められなかった。34/34 乾燥試料ではくぼみ症の発生にともない、くぼみの発生したりん片表面の少し内部で、(T1 強調画像では) MR 信号が強い部分が認められた。この部分は放置時間が長くなるにつれて T1 画像では T1 値が短くなり、T2 画像では T2 値が長くなる部位として認められた。くぼみ症発生部位の顕微鏡による観察では、くぼみ症はまず表面から少し下の組織がつぶれ始めることから発生することが示されており、MRI の結果は、これと対応していると考えられた。34/34 乾燥でもくぼみ症の発生しない試料では、このような MR イメージや T1,T2 画像の変化は認められず、34/22 乾燥の試料と近いイメージを示したことから、これらの変化はくぼみ症特有のものと考えられた。

garlic, MRI, low temperature

講演番号：3A11p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ A 校舎 11 会場

苦味受容体 hT2R16 に対する鶏卵抗体の作製およびその特性評価

Production and the assessment of the chicken egg yolk antibody against the bitter taste receptor hT2R16

○佐藤 創平[1]、藤戸 洋聡[1]、水谷 公彦[1]、三上 文三[1]、伏木 亨[1]、前橋 健二[2]、山下 裕輔[3]、伊井野 貴史[3]、堀江 健二[3]、金 武祚[3]、松村 康生[1]、林 由佳子[1] ([1]京大院農、[2]東農大応生科、[3]ファーマーフーズ)

○Sohei SATO[1], Hirotoshi FUJITO[1], Kimihiko MIZUTANI[1], Bunzo MIKAMI[1], Akira FUSHIKI[1], Kenji MAEHASHI[2], Yusuke YAMASHITA[3], Takashi IINO[3], Kenji HORIE[3], Mujo KIM[3], Yasuki MATSUMURA[1], Yukako HAYASHI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Tokyo Univ. Agri., [3]Pharma Foods International co.,Ltd.)

【目的】ヒトの苦味は、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）である苦味受容体（hT2Rs）によって受容される。hT2Rsは25種類存在するといわれており、そのリガンドも次第に明らかになってきている。しかしその立体構造や味物質の受容機構については未だ解明されていない部分が多く、受容体レベルでの解析が求められている。

苦味受容体は細胞外ドメインが短く大部分が細胞膜に埋まっているため精製が難しく、このことが苦味受容体の性質に関する研究を困難にしている。以前の大会で、苦味受容体のひとつ（hT2R16）を大量調製する方法について報告した。本研究では、この大量調製法を用いて精製したhT2R16を抗原として用いて鶏卵抗体を調製し、その特性を調べることを目的とした。

【方法】酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）を用いてHisタグおよびFLAGタグ融合型のhT2R16を大量精製した。精製したhT2R16をニワトリに免疫（0.2～0.4 mg/羽）することによりhT2R16に対する鶏卵抗体を作製した。この抗体の物理化学的特性、受容体発現HEK293細胞株への応答ならびに官能検査による苦味への影響を調べた。

【結果】卵黄242 gから純度98%のIgYが1.880 g得られた。現在得られた抗体に関して、リガンドであるsalicinの刺激に対する受容体発現HEK293細胞株のカルシウム応答や官能評価を実施し、アゴニスト活性もしくはアンタゴニスト活性の可能性を調べている。もし抗体が苦味受容体の活性化を特異的に阻害する作用を持てば、苦味軽減剤としての利用や苦味受容体の機能解析ツールとしての応用が期待される。

bitter taste, antibody, hT2R16

講演番号：3A11p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ A 校舎 11 会場

GC/MS・LC/MS を用いたメタボリックプロファイリングによるしょうゆ旨味成分の探索

Screening of Umami Compounds in Soy sauce with Metabolic Profiling using GC/MS and LC/MS

○志賀 一樹[1,2]、山本 慎也[1]、中島 文子[2]、小玉 侑加子[2]、今村 美穂[2]、馬場 健史[1]、福崎 英一郎[1] ([1]阪大院工・生命先端工、[2]キッコーマン・研開本)
○ Kazuki SHIGA[1,2], Shinya YAMAMOTO[1], Ayako NAKAJIMA[2], Yukako KODAMA[2], Miho IMAMURA[2], Takeshi BAMBA[1], Eiichiro FUKUSAKI[1] ([1]Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]R&D Div., Kikkoman Corp.)

【目的】近年、複雑な食品成分と品質の関係を明らかにするための研究手法として、メタボリックプロファイリングが注目されている。本法は品質に寄与する可能性の高い成分の解析が可能なため、食品の品質向上への応用が期待されている。醸造品であるしょうゆには多種多様な成分が含まれており、それらがしょうゆの品質に複雑な影響を及ぼしていると考えられる。我々はこれまでに、本法をしょうゆに適用し、GC/MS による成分測定データと官能評価の相関解析について報告した[1)]。今回、より多くのしょうゆ中の成分を対象として解析を行うために、GC/MS と LC/MS を併用して測定対象成分を広げ、「旨味」に寄与する成分の探索を行った。
【方法】国内外のしょうゆ 25 種について、成分測定データおよび官能評価データを取得した。成分測定データについては、GC/MS ではしょうゆ中から親水性成分を抽出し誘導体化して分析した。一方、LC/MS は脱塩後直接分析に供した。官能評価は、一般人から選抜し訓練したしょうゆ専門パネル 13 人を対象に、線尺度を用いて旨味強度を定量化した。得られた成分測定データを説明変数、旨味強度を応答変数として、PLS(partial least squares projections to latent structures) 解析を行い、旨味強度を予測するモデルを構築した。また、モデルの予測性能への寄与を表す VIP(variable importance in the projection)値を指標にして、旨味強度に重要な成分の選抜を行った。
【結果】しょうゆの成分分析の結果、GC/MS では 122 成分、LC/MS では 309 成分が検出された。これらの成分測定データを用いて PLS 解析を行った結果、成分測定データから旨味強度を予測する信頼性の高いモデルが構築できた (R^2=0.91、Q^2=0.88)。このモデルにおける各成分の VIP 値を比較すると、4 成分がグルタミン酸よりも高かった。最も VIP 値の高かった成分は LC/MS で得られた *m/z* 310 の未知成分であり、MS/MS 等を用いて構造解析した結果、フルクトシルグルタミン酸であることが判明した。この成分をしょうゆに添加して官能評価を行ったところ、旨味強度の増加が確認された。この結果は、メタボリックプロファイリングを用いて選ばれた成分の一つであるフルクトシルグルタミン酸が、しょうゆの旨味に寄与している可能性を示している。
以上の事から、メタボリックプロファイリングは、食品中に含まれる数多くの成分から品質に影響を与える可能性の高い成分を選抜することが可能であり、食品の品質向上を検討する上で非常に有用な手法であると考えられた。

1) S. Yamamoto *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 170-175 (2012)

Soy sauce, Metabolic profiling, Sensory evaluation

講演番号：3A11p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ A 校舎 11 会場

クーロアレイ HPLC を用いたカテキン類とテアフラビン類の酸化安定性の評価

Evaluation of oxidative stability of catechins and theaflavins by HPLC-coulometric-array detection

○松浦 加奈子、臼井 由美子、石井 剛志、中山 勉（静岡県大・食品栄養）
○Kanako MATSUURA,Yumiko USUI,Takeshi ISHII,Tutomu NAKAYAMA (Univ. Shizuoka)

【目的】緑茶に含まれるカテキン類と紅茶に含まれるテアフラビン類はどちらも中性以上の pH で酸化安定性が低い。本研究ではカテキン類およびテアフラビン類の酸化機構を解析するために、クーロアレイ検出器を備えた HPLC を用いてカテキン類およびテアフラビン類の電極反応が起こる電位を詳細に調べ、さらに酸化過程における過酸化水素の生成量を測定することで、その安定性との関係を明らかにすることを目的とした。
【方法】ESA 社製の CoulArray-HPLC を用いて、−400～+860 mV の範囲で電位を設定し、カテキン類およびテアフラビン類に由来するピークを検出した。CAPCELL PAK C18 UG120 をカラムとして用い、移動相には有機溶媒を含むリン酸緩衝液のグラジエント混合溶液を使用した。さらに詳細な解析を行うために、−150～+200 mV の範囲で電位を設定してピークを検出した。カテキン類とテアフラビン類が有する部分構造のモデル化合物として、ピロガロール、カテコール、没食子酸メチルおよびレゾルシノールについて、上記と同様の電位で測定を行った。また、Fe^{2+} が Fe^{3+} に酸化されるとキシレノールオレンジと紫色錯体を形成することを利用した ferric-xylenol orange (FOX) assay により、各化合物が 37℃で酸化される際に生成する過酸化水素を定量した。
【結果】カテキン類およびテアフラビン類に由来するピークを、−400～+860 mV の範囲で 180 mV ずつ変化させながら検出すると、いずれの場合も 140 mV 付近と 500～680 mV 付近で電極反応が観測された。また、−150～+200 mV の範囲で電位を 50 mV ずつ変化させながら検出すると、ピロガロール構造を持つ物質とピロガロールは 0 mV 付近の電位で観測され、カテコール構造を持つ物質とカテコールは 50 mV 付近で観測され、ガロイル基を持つ物質と没食子酸メチルは 100 mV 付近で観測され、レゾルシノール構造を持つ物質とレゾシノールは 680 mV 付近で観測された。テアフラビン類は 0 mV 付近で反応した。さらにテアフラビン類と、ピロガロール構造を有するカテキン類は酸化過程で過酸化水素が生成することが明らかになった。
【考察】本実験の条件において、カテキン類は、カテコール構造、ピロガロール構造、レゾルシノール構造、ガロイル基に基づく電極反応がそれぞれ独立して起こり、テアフラビン類においてはテアフラビンの基本骨格とガロイル基に基づく電極反応がそれぞれ独立して起こると考えられる。また、−150～+200 mV の測定において 0 mV で電極反応が観測された物質は酸化安定性が低く、過酸化水素が生成しやすいと考えられる。

coulometry, catechin, theaflavin

講演番号：3A11p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ A 校舎 11 会場

冷凍魚肉の解凍過程における臭気発生に関する研究

Influence of thawing condition on the odor in frozen-thawed fishes.

○小池 恭平[1]、吉江 由美子[2]、渡辺 学[1]、鈴木 徹[1]([1]海洋大院海洋科、[2]東洋大生命科)
○Kyohei KOIKE[1], Yumiko YOSHIE[2], Manabu WATANABE[1], Toru SUZUKI[1] ([1]Tokyo Univ. of Marine Science and Technology, [2]Toyo Univ.)

【目的】魚臭の主成分はトリメチルアミンなどのアミン化合物であることが一般的に知られているが、実際に生成する魚臭には、脂質やアミノ酸が分解されることによって生成されるカルボニル化合物や揮発性脂肪酸などが含まれる。冷凍魚肉を解凍する際、高鮮度であっても解凍に要する時間や温度などの条件によっては不快な生臭いにおいが発生する。本研究では、GC-MS、におい分析装置を用いて、解凍時に発生する不快なにおいを定量的、定性的に分析し、より良い解凍条件を検討した。
【方法および結果】凍結マグロ赤身サンプルを氷水に漬けて解凍したもの、流水にさらして解凍したもの、冷蔵庫に入れて解凍したもの、そして未凍結マグロ赤身サンプルの計 4 サンプルをそれぞれ、HS-SPME法で 7μm、30μm、および 100μmポリジメチルシロキサンPDMSファイバーを用いて捕集し、GC-MS(DSQ II Single Quadrupole GC/MS , Thermo Scientific)で分析した。魚臭の主要成分として知られているTMAは検出されなかったが、2,4-Heptadienal等のカルボニル化合物が流水解凍サンプルで最も多く検出された。におい識別装置(FF-2A 、島津製作所)により、生マグロ赤身サンプル、それぞれの解凍法で解凍したマグロ赤身サンプルのHSガスを分析し、得られたセンサーの応答からSPSSソフト(IBM SPSS Statistics 19)を用いて、主成分分析などの多変量解析を行った。3 つの解凍サンプルの中でも、氷水解凍サンプルがもっとも未凍結サンプルに近い結果となった。また、絶対値表現ソフトを用いて、それぞれサンプルのにおいの強度、質を数値で表現し、解凍法によってにおいが変化していることが証明された。

fish odor, thaw, gas chromatography

講演番号：3A11p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ A 校舎 11 会場

FAD 依存性グルコース脱水素酵素を用いた自己駆動型バイオクーロメトリーによる日本酒モロミ中のグルコース定量

Determination of glucose in sake moromi using self-driven bio-coulometry with FAD-dependent glucose dehydrogenase

○川嶋 浩平、三木 功次郎 (奈良高専)
○Kohei KAWASHIMA,Kojiro MIKI (Nara Natl. Col. Tech.)

【目的】クーロメトリーは、電解反応によって流れた電気量を測定することで目的物質の絶対量を求める方法である。簡便かつ高精度な測定法であるため、様々な物質を分析するために応用されている。さらに、作用極に注入した試料物質と対極に含まれる電池活物質との酸化還元電位の差を駆動力として、自発的に放電電流を発生させ、電解に電源を必要とせずに迅速に測定できる自己駆動型クーロメトリー法が報告されている[1)]。本研究では、この自己駆動型クーロメトリー法と FAD を補酵素とするグルコース脱水素酵素（FAD-GDH）を組み合わせて、グルコースの迅速・簡便な測定法について検討し、日本酒モロミ中のグルコース測定に応用した。

【実験】アクリル樹脂製の透析セル（サンプラテック製）を用い、作用極（カーボンフェルト、約 5 cm^3）と対極（カーボンフェルト、約 5 cm^3）を陽イオン交換膜で隔てたものをクーロメトリックセルとして使用した。作用極には Mcllvaine 氏緩衝液（pH 7.0）、対極には被還元物質として 0.45 M $K_3[Fe(CN)_6]$を Mcllvaine 氏緩衝液（pH 7.0）に溶解した溶液をそれぞれ浸透させ、両極間に 100 Ω の抵抗を接続した。37℃において、FAD-GDH の酵素触媒作用によりグルコースを酸化し、電子受容体となる 2,3-ジメトキシ-5-メチル-*p* -ベンゾキノン（UQ_0）を還元した。酵素反応が終了したこの溶液をクーロメトリックセルに 10 μL 添加し、デジタルマルチメーターを用いて電流を測定して、還元型 UQ_0 量を求め、グルコース濃度を算出した。

【結果・考察】FAD-GDH によるグルコースの酸化反応に伴い生成する還元型 UQ_0 と被還元物質 $[Fe(CN)_6]^{3-}$の酸化還元電位の差により、自己駆動により電解電流が流れることを確認した。10 mM グルコース溶液 50 μL をサンプルに用い、酵素量・UQ_0 量・pH について検討した。その結果 10000 units/mL FAD-GDH 溶液 50 μL、1000 units/mL、ムタロターゼ溶液 50 μL、25 mM UQ_0 溶液 150 μL（それぞれ Mcllvaine 氏緩衝液（pH 6.0）に溶解）を添加（合計液量 300 μL）した場合、3 分以内に反応が終了し、ほぼ理論値に等しい電気量が得られた。また、既存のグルコース測定キットであるグルコース CⅡ-テストワコー（和光純薬工業(株)）を用いて測定した値と比較したところよく一致した（相関係数 r = 0.999）。本法を用いて日本酒モロミのグルコース濃度を測定したところ、良好な結果が得られた。日本酒モロミ中には、グルコース測定に影響を与える酸化還元物質もなく、本法は迅速・簡便・安価なグルコース定量方法として利用可能である。

1) 内山俊一 編、高精度基準分析法クーロメトリーの基礎と応用、学会出版センター、1998

glucose, coulometry, sake

講演番号：3A11p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ A 校舎 11 会場

正化学イオン化 GC-MS/MS 法(GC-MS/MS(CI))を用いた食品中の脂肪酸分析

The analysis of fatty acids in food using GC-MS/MS with positive chemical ionization

○坂本 雄紀、川名 修一、工藤 恭彦、中川 勝博、宮川 治彦（島津製作所）
○Yuki Sakamoto,Shuichi Kawana,Yukihiko Kudo,Katsuhiro Nakagawa,Haruhiko Miyagawa (Shimadzu Corporation)

【目的】

食品に含まれる脂肪酸は、種類に応じて人へ与える影響が異なる。例えば、食品中のトランス脂肪酸は心血管系疾患のリスクを増加させるが、n-3 系脂肪酸である EPA や DHA は、血中の中性脂肪を下げる等の生活習慣病の予防に役立つことが明らかになってきている。これらの食品中の脂肪酸類の測定には GC-MS を用いる。また、MS のイオン化には電子イオン化法（EI)や化学イオン化法（CI）を用いる。EI はフラグメントイオンが多いため、妨害成分の影響を受けにくいモニタイオンを選択できるが、感度が不十分な場合がある。一方、CI は主に分子関連イオンを生成しそれをモニタイオンとするため、妨害成分の影響を受けると他に適切なモニタイオンが存在しないという問題がある。

我々は、イオン化法に CI を用い、MS にトリプル四重極型質量分析計(GC-MS/MS)を用いて、CI で問題となる妨害成分の影響を MS/MS で除去する方法を検討した。

【方法】

GC-MS/MS に GCMS-TQ8030(㈱島津製作所）を使用した。カラムは SP-2560 長さ 100m, 0.25mm I.D., df=0.2 μm (SUPELCO)を用い、試薬ガスはイソブタンを用いた。なお、GC-MS/MS(CI)のプリカーサーイオンは、脂肪酸のプロトン化分子とし、プロダクトイオンとコリジョンエネルギーを最適化した。食品の前処理法には AOAC 996.06[1] を用い、メチル化を行い、分析試料とした。なお、内標準物質としてノナデカン酸(C19:0)を添加した。

【結果】

食品から抽出した脂肪酸を分析した結果、GC-MS(CI)では妨害成分の影響を受けた成分が、GC-MS/MS（CI）により妨害成分の影響が除去され、定量限界が一桁から二桁向上したが、一部の脂肪酸は GC-MS/MS（CI）を用いても妨害成分の影響が除去されなかった。これらの成分については試薬ガス、プロダクトイオン等の更なる検討が必要であると考える。

今回検討した食品中の脂肪酸分析において、GC-MS(CI)より、MS の分離能が高い GC-MS/MS(CI)を用いたほうが定性・定量を行う上で有効であった。

1) AOCC Official Method 996.06 Fat (Total, Saturated, and Unsaturated in Foods) Hydrolytic Extraction Gas Chromatographic Method First Action 1996 Revised 2001

Fatty acid, GC-MS/MS

講演番号：3A11p17
講演日時、会場：3 月 26 日 17:12～ A 校舎 11 会場

食品中の微量成分の同定および定量のための Broad Band WET 法

Broad Band WET method for identification and quantification of minor components in foods

○張 晶（東大院農生科）
○Jing Zhang (Univ.Tokyo)

NMR は非破壊的な測定技術であり原理的に全ての有機低分子成分に由来するシグナルを検出できる特徴をもつ。NMR を食品に適用する際には、特別な前処理を必要としない、あるいは前処理が簡単で変質を最小限に抑えることができるため、NMR スペクトルは食品に含まれる成分をありのままに反映し、その食品の特徴を捉えることができる。こうした食品の NMR プロファイル分析は、既にコーヒーやワインなどの飲料、リンゴやトマトなどの果物に広く適用されている。しかし、これら食品の NMR 測定における問題点として、しばしば糖のシグナルが他の成分と比べて圧倒的に強く観測されることが挙げられ、NMR のダイナミックレンジによる制約のため糖以外の相対的に微量な成分の検出を困難にする。この問題を解決する方法として、微量成分のシグナルには影響を与えず、糖に由来するシグナルを低く抑えることが重要になる。その解決法の 1 つとして、我々は微量成分のみを選択的に励起するための DPFGSE 法を検討し、実際にマンゴー果汁に応用してその有効性を示してきた（1）。DPFGSE 法は、糖に由来するシグナル及び軽水のシグナルが検出される領域（3.1～？5.3ppm）を避けて低磁場側と高磁場側に分けて測定しなければならない。また、励起範囲を糖及び軽水のシグナルから 1 ppm 以上離されなければ､それらのシグナルを十分に低く抑えることが困難であり、シグナルの観測範囲が制限される点で改善の余地があった。

本研究では、糖と軽水のシグナルを選択的に低く抑えて微量成分を観測する新しい方法を検討した。軽水のシグナルを抑制するために用いられる pre-saturation 法や WET 法、あるいは water gate 法では、糖のような励起範囲の広いシグナルを軽水と同時に消去することはできなかったが、Broad Band WET 法により良好な結果を得ることができた。この方法は、選択的励起パルスを広幅に設定することにより、軽水と糖のシグナルを同時に飽和させ PFG でそれらを消去することが可能である。さらに z-filter を導入することにより、検出コイルからはみ出した軽水および糖シグナルを低く抑えることができ、微量成分のシグナルをより効果的に観測することに成功した。これまでに NMR を用いて成分分析がされていなかった柿果汁に Broad Band WET 法を適用し、柿果汁の微量成分を分析した。

1) Koda, M, et al. Metabolic discrimination of mango juice from various cultivars by band-selective NMR spectroscopy. J. Agric. Food.Chem. 60, 1158-1166 (2012).

NMR, Broad Band WET, minor components

講演番号：3A11p18
講演日時、会場：3 月 26 日 17:24～ A 校舎 11 会場

NMR によるヨーグルトの非破壊分析

Nondestructive observation of yogurt by NMR spectroscopy

○盧 翌（東大院農生科）
○YI LU (Univ. Tokyo)

【背景と目的】NMR は非破壊的な分析技術の 1 つとして有用であり、NMR 試料管内で食品の発酵過程を再現しリアルタイムに分析することが可能である。本研究では、ヨーグルトの品質管理・評価に応用することを目指して、3 種類のヨーグルトの発酵過程を追跡し、各ヨーグルトにおける特徴的な成分変化を検出することを目的とした。
【方法】市販のブルガリアヨーグルトを NMR 試料管に入れ、各種 NMR スペクトル（^{1}H, ^{13}C, ^{31}P, ^{1}H-^{13}C HSQC, ^{1}H-^{1}H DQF-COSY, ^{1}H-^{31}P CT-HMBC , ^{1}H-^{13}C CT-HMBC）を測定してシグナルの帰属を行った。市販の 3 種類のヨーグルト（ブルガリア、カスピ海、ケフィア）の種菌やグレインを牛乳に加えて NMR チューブ内で発酵させ、1D ^{1}H NMR スペクトルと 1D DOSY スペクトルを測定した。発酵過程における各成分を 1D ^{1}H NMR スペクトルと DOSY スペクトルの差スペクトルで定量し、その変化を追跡した。
【結果】ブルガリアヨーグルトに含まれる 7 種類及び 3 種類の成分が ^{1}H-^{13}C NMR スペクトル及び ^{1}H-^{31}P NMR スペクトルにより同定された。α/β ガラクトースと α/β ラクトースのシグナルは ^{1}H NMR スペクトル上で明確に区別して検出された。また、^{1}H-^{31}P CT-HMBC NMR スペクトルを用いることにより、ヨーグルトから *N*-アセチルグルコサミン 1-リン酸を初めて検出することに成功した。
ブルガリアヨーグルトの帰属結果を踏まえて、3 種類のヨーグルトの発酵過程を追跡した結果、各ヨーグルトにおいて特徴的な成分変化をリアルタイムで検出した。(1) ブルガリアヨーグルト：発酵一定時間以後から乳酸のシグナルが観測され、その強度は急劇に増加し、一定時間後強度の増加速度は徐々に低下した。クエン酸は発酵一定時間から増加し、その後変化しなかった。α/β ガラクトースは発酵一定時間から大きく増加し、α/β ラクトースは発酵一定時間から減少した。(2) カスピ海ヨーグルト：発酵一定時間から乳酸が急に増加し、その後は変化しなかった。クエン酸は発酵一定時間から増加し、その後一時的に減少して定常状態になった。α/β ラクトースは発酵一定時間から減少し、α/β ガラクトースのシグナルは検出されなかった。(3) ケフィアヨーグルト：乳酸、クエン酸、α/β ガラクトース及び α/β ラクトースの変化はブルガリアヨーグルトとほぼ同じであった。それに加えて、エタノールのシグナルが発酵一定時間以後から観測され、その後増加を示した。

nondestructive, yogurt, NMR

講演番号：3A12a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ A 校舎 12 会場

甲州種ワインに含まれるヒドロキシシンナム酸エチルエステルの生成機構

Formation mechanism of hydroxycinnamic acid ethyl ester in Koshu wine

○斉藤 史恵、山本 祐梨子、久本 雅嗣、奥田 徹（梨大・ワイン研）
○ Fumie SAITO,Yuriko Yamamoto,Masashi Hisamoto,Tohru Okuda（Enol. Vitic. Univ. Yamanashi）

【目的】国産白ワインである甲州種ワインは、辛口になるにつれて後味に独特の苦味を呈することが知られている。これまでに、その苦味に関わる物質として *p*-coumaric acid や caffeic acid、これらの酒石酸エステルである coutaric acid と caftaric acid、エチルエステルである ethyl *p*-coumarate と ethyl caffeate の寄与について報告した。このうちエチルエステルは、ブドウ果汁中には含まれないことから醸造中に生成していると考えられるが、その生成機構については不明である。一方、果汁の清澄化に用いられる *Aspergillus niger* 由来のペクチナーゼ製剤にエステラーゼ活性が含まれることから、この逆反応によりこれらエチルエステルが生成する可能性が考えられる。そこで、本研究ではワイン醸造に用いられる市販のペクチナーゼ製剤について *p*-coumaric acid および caffeic acid のエチルエステル生成能の測定を行った。さらに活性が認められたペクチナーゼ製剤を甲州種ブドウ果汁に添加して発酵試験を行い、醸造過程でエチルエステルが生成するか検討を行った。

【方法・結果】*p*-coumaric acid または caffeic acid を 50 mg/L 含む 10%エタノール溶液に 10 種類のペクチナーゼ製剤（EP-1～10）をそれぞれ 200 mg/L になるように添加して pH 4、30°C で反応させた。10 種類のペクチナーゼ製剤のうち、EP-1 に高いエチルエステル生成能が認められた。また EP-2 も中程度のエチルエステル生成能が認められた。次に甲州種ブドウ果汁（coutaric acid、caftaric acid、*p*-coumaric acid、caffeic acid をそれぞれ 83、230、0.3、0.3 mg/L 含む）に EP-1 または EP-2 を 200 mg/L になるように添加し、酵母を添加または無添加の条件で発酵試験を行った。その結果、EP-1 添加区では coutaric acid および caftaric acid が減少し、同時に *p*-coumaric acid と caffeic acid の増加が見られた。さらに酵母添加区では発酵開始 2 日目より ethyl *p*-coumarate と ethyl caffeate の生成が認められ、12 日目では coutaric acid、caftaric acid、*p*-coumaric acid、caffeic acid、 ethyl *p*-coumarate、ethyl caffeate の濃度がそれぞれ 1.0、32、2.5、53、2.9、21 mg/L となった。EP-2 添加区も EP-1 と比較して活性は低いが同様の結果がみられた。以上の結果より、ペクチナーゼ製剤はまず coutaric acid と caftaric acid から酒石酸を分離して *p*-coumaric acid と caffeic acid を生成し、続いて発酵により生成したエタノールとエステル化反応を起こして ethyl *p*-coumarate と ethyl caffeate を生成するものと推測された。

Koshu wine, hydroxycinnamic acid, enzyme preparation

講演番号：3A12a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ A 校舎 12 会場

界面前進凍結濃縮法による日本酒濃縮

Concentration of Japanese sake by progressive freeze-concentration

○新村 希世美[1]、ミヒリ グナティラカ[1]、松田 章[2]、中村 静夫[2]、辻 奈緒子[1]、道善 倫子[1]、矢野 俊博[1]、宮脇 長人[1] ([1]石川県大院生資環、[2]石川県工業試)
○kiyomi shinmura[1], Gunathilake Mihiri[1], Akira Mathuda[2], Shizuo Nakamura[2], Naoko Tsuji[1], Michiko Dozen[1], Toshihiro Yano[1], Osato Miyawaki[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Ind.Res.Inst.Ishikawa)

【目的】液状食品はその殆どが水分であるため、保存性の向上や運搬コストの削減のために濃縮操作が必要不可欠である。濃縮操作には大別して蒸発濃縮法、膜濃縮法、凍結濃縮法の 3 つが挙げられるが、それぞれ長所、短所があることから濃縮する目的成分に対して適した方法を選択することが重要である。このうち、低温で溶媒である水を氷に変化させて除去する凍結濃縮は 最も高品質な濃縮が行えるが、従来法である懸濁結晶法は複雑なシステムで、高コストで用途が大きく限られていた。これに対して我々が開発している界面前進凍結濃縮法は、単純なシステムであることからコスト低下が期待される。本研究では界面前進凍結濃縮による日本酒の濃縮結果について報告する。
【方法】凍結濃縮法は、小型界面前進凍結濃縮装置を用いた。この装置は長円筒状の試料容器内に溶液を入れ、攪拌しながら一定速度で冷媒中に降下していくことで容器底面より氷結晶を成長させ、凍結濃縮を行う方法である。ステンレス容器(直径 9.3cm、高さ 26.5cm)に日本酒(大吟醸酒二種類と純米酒)ならびに 15%エタノール溶液 700mL を氷結晶成長速度 1.0cm、撹拌速度 600rpm で界面前進凍結濃縮を行った。濃縮後、濃縮酒と生成氷結晶の融解液の体積を測定し、日本酒に関しては濃縮前試料と濃縮酒のアルコール度数、日本酒度、酸度、アミノ酸度、香気成分を測定した。
【結果】日本酒の界面前進凍結濃縮では、体積濃縮比で約 2.5 倍の濃縮を行い、アルコール度数に関しては、大吟醸酒においては 26%、純米酒においては 22%の濃縮酒を得られ、酸度や酢酸エチル、n-プロパノール、イソアミルアルコール等の香気成分に関してもそれに応じて濃縮されていることがわかった。また、香気成分に関しては大吟醸酒より純米酒の方がやや香気成分の濃度濃縮比が高いという結果も得られた。エタノールの凍結濃縮に関しても、Brix 基準の濃度比で約 2 倍の濃縮が行えた。日本酒は高浸透圧であるため氷結晶への成分の取り込みが避けられず収率が低下してしまうことが重大な弱点であるが、この問題には氷結晶部分融解法が有効である。この方法では、生成氷結晶を融解するとき、溶質を多く含む濃厚部分から順次溶出してくるため、初期に溶出する濃度の高い画分を回収することで必要なレベルまでの収率改善が可能である。今回の場合、約 50%の氷結晶部分融解により収率は約 90%となった。更に収率を上げるためには、得た氷結晶を全融解し、二段濃縮を行うことも有力な手段である。
【謝辞】本研究の一部は戦略的基盤技術高度化支援事業による助成により実施した。

freeze-concentration, sake, liquid food

講演番号：3A12a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ A 校舎 12 会場

Progressive freeze-concentration of liquid food by tubular ice system with circulating flow

○Mihiri Gunathilake,Kiyomi Shimmura,Michiko Dozen,Osato Miyawaki (Ishikawa Pref. Univ.)

【Introduction】Freeze-concentration is the best method for concentrating high quality liquid products due to its low processing temperature which prevent undesirable chemical and biological changes. Progressive freeze concentration (PFC) is a new method of freeze concentration, where a single ice crystal is formed by a moving ice front from the cooling surface to the other end. Therefore it is easy to separate ice crystals from the concentrated solution than in commercially available suspension crystallization system. A closed, tubular ice system with a circulating flow was developed to increase productivity of the PFC.
【Materials and Methods】Peach condensate, watermelon juice, and high concentrated sucrose solutions were concentrated using the tubular ice system. In order to evaluate the separation efficiency of flavor components in peach condensate, chemical components in original solution, concentrate, and ice phase were analyzed using SPME method by Gas Chromatography. Concentration of watermelon was evaluated by measuring the brix value and analyzing the sucrose, fructose and glucose concentration in original solution, concentrate, and ice phase. Concentration of sucrose solutions were evaluated by measuring brix value. Partial melting of ice phase was carried out to watermelon and sucrose solutions as a method of improving the yield for solutions with high osmotic pressure.
【Results and Discussion】Almost all the flavor components of the peach condensate were efficiently concentrated in the liquid phase giving a concentration ratio close to the volumetric concentration ratio. This proves that PFC is ideal for concentration of solutions with low osmotic pressures. Watermelon solution with medium osmotic pressure also gave an efficient concentration, especially with high concentration ratio for sucrose, glucose and fructose. For high concentrated sucrose solutions, concentration ratio was not very high with a contaminated ice phase with sucrose. However with partial melting of ice the yield of concentration was improved for both watermelon and sucrose solutions.
【Acknowledgment】This research was supported by Japan Science and Technology Agency (A-Step, No.AS2321218E).

progressive freeze-concentration, peach condensate, watermelon

講演番号：3A12a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ A 校舎 12 会場

高温高圧水処理による三陸産サンマ魚鱗からのコラーゲンペプチド生成

Production of collagen peptide from *Cololabis saira* scales in Sanriku region by high-temperature and high-pressure water treatment

○長田 光正、千葉 美和、戸谷 一英、渡邊 崇（一関高専・物化工）
○ Mitsumasa OSADA,Miwa CHIBA,Kazuhide TOTANI,Takashi WATANABE（Chem. Eng., Ichinoseki Natl. Coll. Tech.）

【目的】岩手，宮城の三陸沖でのサンマの漁獲量は年間 7.7 万トン（平成 20 年度）にのぼっており，そこから副生する鱗（乾燥重量で年間推定 77 トン）は利用されずに廃棄されている．鱗中にはコラーゲンが多量に含まれており，医薬品や食料，健康補助食品製造などの新たな産業創出への展開が期待できる．一般的な魚鱗由来コラーゲンペプチドの製造工程は，酸・アルカリ処理による環境負荷が大きいことや，工程数が多く所要時間がかかることなどの問題を抱えている．そこで本研究では，環境に優しい溶媒である高温高圧水処理と酵素処理を組み合わせることで，上記課題を克服できる新たなコラーゲンペプチド製造法の検討を行った．
【方法】A. 高温高圧水による処理（本実験での方法） 洗浄・乾燥済みのサンマの鱗（カッターミルでの粉砕なし）100 mg，蒸留水 3.0 mL を高温高圧対応の回分式反応管（SUS316 製，内容積 6 mL）に仕込み，それを反応温度 200°C に設定した溶融塩炉に入れることで反応を開始させた．0～60 min 処理後，反応器を溶融塩炉から取り出し，冷水浴に浸すことで反応を停止させた．その後，蒸留水で反応器から鱗コラーゲンを含むタンパク質溶液を回収した．Lowry 法によりタンパク質の定量（標準タンパク:牛血清アルブミン）を行い，粗コラーゲンペプチドの抽出量を求めた．各試料の分子量をゲル濾過クロマトグラフィーにより測定した．B. 従来法による抽出 洗浄したサンマの鱗をカッターミルで粉砕し，試料 100 mg，蒸留水 10 mL を三角フラスコに入れ，反応時間 240 min，95 °C で熱水抽出し，冷却後に反応液を回収し，その後，プロテアーゼ処理を行った．
【結果】サンマの鱗 100 mg から，A の方法では 5 min で 25 mg の粗コラーゲンペプチドを回収できた．これに対し B の方法では 240 min で 20 mg であり，A の方法では短時間でより多く得られることがわかった．酵素処理の影響については，A の方法では酵素処理の有無に関係なく 25 mg 得られることがわかった．また B の方法において酵素処理を行わない場合，粗コラーゲン量は 240 min で 17 mg と低かった．方法 A（本実験法）により方法 B（従来法）よりも多くの粗コラーゲンペプチドが得られた理由としては，従来法では回収が困難であった魚鱗中のヒドロキシアパタイトと結合していたコラーゲンも，本実験法では回収できたためと考えている．方法 A で得られた粗コラーゲンの平均分子量は，処理時間の増大とともに 8,000 Da 程度から 5,000 Da 程度まで連続的に減少した．これは処理時間の増大にともないタンパク質の加水分解が進行し，低分子化されたことを示している．
*本研究は JST の復興促進プログラム(マッチング促進)により実施された．

collagen, peptide, protein

講演番号：3A12a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ A 校舎 12 会場

豆乳を原料とした効率的発酵製造技術の開発
Development of a novel high-performance fermentation for soymilk products
○伊藤 淑恵[1]、石川 潤一[1]、毛利 哲[1]、中村 茂雄[1]、池戸 重信[1]、齋藤 静香[2]、井戸川 詩織[2]、岩元 靖[2]、塚田 義弘[2]、上野 茂昭[3]、藤井 智幸[3]([1]宮城県産業技術総合センター、[2]太子食品工業株式会社、[3]東北大院農)
○Yoshie ITO[1], Junichi ISHIKAWA[1], Satoshi MOHRI[1], Shigeo NAKAMURA[1], Shigenobu IKEDO[1], Shizuka SAITO[2], Shiori IDOGAWA[2], Yasushi IWAMOTO[2], Yoshihiro TSUKADA[2], Shigeaki UENO[3], Tomoyuki FUJII[3] ([1]The Industrial Technology Institute, Miyagi Pref. Govt., [2]Taishi Foods Inc., [3]Tohoku Univ.)

【背景および目的】
食品加工において酵素反応、特に食品自身に内在する酵素が活用されている。紅茶やわさびのように、細胞破壊がトリガーとなって酵素反応が始まる現象を利用した食品は数多く知られている。物理的に細胞を破壊する方法のひとつが高圧処理である。細胞破壊は起こるが内在する酵素が失活しない条件を選ぶことによって、高圧と酵素反応を組み合わせた加工が可能となり、ユニークな食品開発につながると考えられる。本研究では、豆乳に着目し、乳酸菌による発酵と、乳酸菌に内在するプロテアーゼによる分解反応を複合化させたプロセスについて検討した。
【方法および結果】
宮城県産業技術総合センターが保有している、植物や食品から分離した乳酸菌 377 株から、発酵形式、プロテアーゼ活性、豆乳での増殖性、香り、高圧感受性を指標として実証試験で用いる菌株を選抜した。
香りの評価は、あらかじめ *Streptococcus sojalactis* による豆乳発酵物を対象に 6 グループ 18 語の評価用語を収集・選択しておき、低脂肪豆乳に乳酸菌を添加後 30℃、5 日間培養した豆乳発酵物を用いて、6 段階評点法（感じない用語に零点、感じる用語に 1 ～ 5 点を定義づける）による絶対評価を行った。そして「熟成臭」グループのスコアから上位群と下位群に分類した。
上位群に分類された菌株に対して 350MPa、25℃で高圧試験を行った。一次反応形式で死滅すると仮定して死滅曲線から死滅速度係数を算出した結果、死滅速度係数はおよそ 0.1～0.6 min^{-1}の範囲であった。死滅速度係数が最も大きい MBR261 株（*Lactobacillus sakei* ）を実証試験に供した。
実証試験では、原料に乳酸菌培養液を添加して高圧処理を施した後、除圧して保存する形式とした。原料には減圧濃縮して調製した高濃度低脂肪豆乳を用い、高圧処理条件は 350MPa、25℃、60 分とした。高圧処理後の高濃度低脂肪豆乳は凝固しており、乳酸菌は 300cfu/g 以下まで減少していた。
高圧処理後に 30℃で保存したところ pH が低下していき、5 日後には pH 4.5 を下回った。乳酸菌は 3 日後には 10^8cfu/g 程度まで増殖し、10 日後までほぼ一定であった。保存温度を 45℃としたところ乳酸菌の増殖は抑制され、pH 変化もほとんど認められなかった。その一方、遊離アミノ酸量は経時的に増加しており、保存中にタンパク質の分解反応が進行したことが示された。
本研究は、平成 23 年度戦略的基盤技術高度化支援事業として実施された。

high pressure, soymilk, lactic acid bacteria

講演番号：3A12a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ A 校舎 12 会場

短波帯交流瞬間加熱による豆乳、牛乳中の枯草菌芽胞の失活

Inactivation of *Bacillus subtilis* spore in soybean milk and cow milk by radio frequency flash heating

○植村 邦彦、高橋 千栄子、小林 功（農研機構食総研）
○Kunihiko UEMURA,Chieko TAKAHASHI,Isao KOBAYASHI (NFRI)

【目的】豆乳および牛乳に添加した枯草菌芽胞を、短波帯交流電界瞬間処理（RF-FH）および低温加熱処理の併用により効率的に失活することで、安全性が高く、高品質な食品加工を目指す。
【方法】十勝産の乾燥大豆 900g を洗浄し、蒸留水に浸漬（5℃, 12 時間）後、ステンレスざるで水を切り、7.1kg の蒸留水とともに、家庭用ジューサー（National, MJ-M30）で搾汁し、生絞り豆乳を得た。作成した豆乳並びに市販の牛乳 2L に対して、10mL の枯草菌芽胞懸濁液を添加した原料を、モーノポンプ（兵神装備、4NVL10PU）で 600mL/min の流速で搬送し、長さ 500mm のリング状通電加熱ユニットを通過する 4s 間で 10℃から 90℃まで昇温後、100μm 厚のテフロンフィルムで覆った平衡平板電極（幅 6mm, 電極間距離 5mm, 電極長 80mm）に短波帯交流電界（ノダ RF, NR5N27/40/54M-01, 27MHz, 2kW）を印加した電極間を 0.3s で通過して 100～120℃に昇温し、温度保持管でその温度を 1.0 秒間保持し、直ちにプレート式熱交換で 40℃まで冷却し、圧力調整弁で系内の圧力を 0.6MPa に維持しながら RF-FH 処理を行った。また、65℃または 85℃の恒温水槽で 30 分間低温加熱処理を行った。RF-FH の各種温度で処理したサンプル、並びに低温加熱処理を併用したサンプルの菌数を、初期値を基準とした残存率として求めた。また、得られたサンプル中の枯草菌のコロニー成長過程は、細菌検査システム（マイクロバイオ、S12）を用いて径時的に観察した。
【結果】短波帯処理の出口温度が 100℃以上のとき、温度の上昇に比例して、枯草菌の対数値が減少したが、115℃以上の温度では、その失活効果が低下し、120℃のとき 2.5 対数の失活にとどまった。一方、RF-FH 処理を行った各サンプルを 85℃または 65℃、30 分間の再加熱を行ったところ、RF-FH で 110℃以上まで処理したものはその失活効果が低下することなく、120℃の RF-FH 処理と低温再加熱処理の併用により残存菌数を 5 対数まで失活可能なことが分かった。細菌検査システムによるコロニー成長過程の観察の結果、高温の RF-FH 処理により十分に失活せずに残った芽胞は増殖開始時間が早まることが分かった。それらは再度の低温加熱処理により容易に失活したものと考えられる。また、本発表では RF-FH 処理が豆乳や牛乳の品質に与える影響について、併せて報告する予定である。

Radio frequency, Bacillus subtilis, inactivation

講演番号：3A12a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ A 校舎 12 会場

ホエイタンパク質モデル共存系における熱凝集とステンレス鋼表面に対する付着挙動
Adhesion of whey proteins to stainless steel surface in relation to their thermal aggregation: case of a whey protein mixture
○金子 英基、萩原 知明、崎山 高明 (海洋大海洋科)
○Eiki KANEKO,Tomoaki Hagiwara,Takaharu Sakiyama (kaiyodai)

［目的］熱凝集性の高いホエイタンパク質は熱交換器内壁に付着しやすく、乳製品の連続加熱時にその付着が問題となる。加熱時の付着は食品本体内でのホエイタンパク質の熱凝集と競合して起こるため、付着挙動を解明するためには食品本体内での熱凝集挙動と併せて検討することが重要である。演者らは前回、ホエイタンパク質の主成分であるβ-ラクトグロブリン(β-Lg)単一系を試料として、溶液中における熱凝集体形成がステンレス鋼表面に対する付着性を低下させる機構について検討した。ホエイにはβ-Lg 以外に多くのタンパク質が含まれるが、第二成分であるα-ラクトアルブミン(α-La)とβ-Lg でホエイ中総タンパク質の約 7 割を占める。また、α-La は遊離の SH 基を持たないことから、β-Lg とは異なる熱凝集性を示すことが知られている。そこで今回は、α-La をβ-Lg と共存させた系をモデルとして、加熱による熱凝集とステンレス鋼表面への付着における両タンパク質の役割を検討することを目的とした。
［方法］β-Lg とα-La を、ホエイ中での構成比に近い 7：3 の質量比で、pH 6.85 の 25 mM Bis-tris 緩衝液に溶解して共存試料（総タンパク質濃度 10 mg/ml）を調製した。さらに、この共存試料を 65～85℃で 1 時間予備加熱した試料を調製し、凝集体の形成状況を非還元 SDS-PAGE により調べた。未加熱試料を含む上記各試料に、ステンレス鋼(316L)粉体 2g を懸濁して 75℃で 1 時間振とうした。ステンレス鋼粒子を懸濁せずに試料溶液のみを同様に操作して対照試料とした。付着実験終了後の各試料上清中のタンパク質濃度を BCA 法により測定し、対照試料との濃度差からステンレス鋼粉体表面へのタンパク質付着量を算出した。また、付着実験前後の試料溶液を SDS-PAGE に供して両タンパク質の付着による減少を確認するとともに、非還元 SDS-PAGE を行って凝集状態を対照試料と比較した。
［結果］予備加熱試料の非還元 SDS-PAGE では、75℃以上の温度で予備加熱を行った試料の場合にβ-Lgとα-La の両単量体バンドが顕著に減少し、凝集体のバンドが現れた。したがって、共存系の熱凝集は、β-Lg の熱変性開始が契機となり、α-La を巻き込んで凝集体形成が進むものと考えられる。付着実験の結果、共存試料を 75℃以上の温度で予備加熱を行った場合に付着量が顕著に減少することが示された。予め凝集体が形成された試料で高温での付着量が減少するのはβ-Lg 単一系の結果と同様であり、付着量についてもβ-Lg 単一系の場合と有意な差がないことが示された。凝集体が形成されていない共存試料の付着挙動については、付着タンパク質の主要成分はβ-Lg であり、溶液中の凝集体形成に比べてα-La の寄与が低いことが示唆された。

whey protein, thermal aggregation, adhesion

講演番号：3A12a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ A 校舎 12 会場

エビ・タンパク質のステンレス鋼表面への付着挙動に及ぼす温度の影響

Effects of temperature on adsorption of shrimp proteins onto a stainless steel surface

○萩原 知明、鈴木 円香、長谷川 友紀、崎山 高明 (海洋大食品)
○Tomoaki Hagiwara,Madoka Suzuki,Yuki Hasegawa,Takaharu Sakiyama (Tokyo Univ. Marine Sci. & Technol.)

【緒言】

食品や医薬品の製造機器表面に付着した汚れを取り除く洗浄は、微生物汚染防止や製品への異物混入を防ぐために欠かせない操作である。一方で、洗浄は多量の資源（水、エネルギー、洗剤）と時間を要する過程であり、効率化が求められている。確実かつ効率的な洗浄を実現するためには、汚れの付着挙動を把握することが必要である。本研究では、食物アレルギーの特定原材料に指定されているエビについて、抽出液中のタンパク質のステンレス表面に対する付着挙動について、加熱温度がエビタンパク質の付着量におよぼす影響について調べ、タンパク質の加熱凝集との関連から考察を試みた。

【方法】

付着量測定

ステンレス鋼粒子(SUS 粒子;比表面積 0.57m^2/g)2g と、アマエビ水抽出液(タンパク質濃度 1.5mg/ml) 1ml をバイアル瓶にいれ、30～95℃の恒温槽内で 2 時間振盪し、付着操作を行った。次に上澄み液中の総タンパク質濃度を BCA 法で測定した。そして付着前後のタンパク質濃度の差より、SUS 表面積 1m^2 あたりの総タンパク質付着量を求めた。

FT-IRによる加熱凝集の進行程度の評価

30℃～80℃でそれぞれ 2 時間加熱した 1.5mg/ml のアマエビミズ抽出液を冷却後、限外濾過フィルターで濃縮してから、1 回反射型ダイヤモンド ATR を備えた FT-IR 装置を用いて、IR スペクトルを測定した。得られたスペクトル中のタンパク質由来のアミド I ピークを、ピーク分割することによりタンパク質の二次構造分率を算出した。

【結果】

総タンパク質の吸着量は加熱温度 60℃以上で増加がみられた。また FT-IR の測定結果より、60℃を越えると、タンパク質分子間の凝集構造を反映している分子間 β 構造が二次構造に占める割合が増加する傾向が見られた。以上の事から、60℃を越えるとエビ抽出液内のタンパク質同士で加熱変性による凝集体形成が促進されたことが強く示唆され、60℃以上でみられた付着量の増加は加熱変性に伴うタンパク質の凝集が原因であると考えられた。

protein adsorption, shrimp, protein aggretation

講演番号：3A12a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ A 校舎 12 会場

両性イオン交換樹脂に対する二価塩化物塩の吸着平衡

Adsorption of divalent chloride salts on to zwitterionic exchange resin

○武田 健一郎、謝 祐基、安達 修二（京大農）
○Kenichiro TAKEDA,Yuki SHA,Shuji ADACHI (Kyoto Univ.)

【目的】イオン交換樹脂は，水処理，脱塩，濃縮などに使用されている．一般的には，分離の目的により陽イオンまたは陰イオン交換樹脂が用いられるが，正電荷と負電荷を併せもつ両性イオン交換樹脂がある．この両性イオン交換樹脂は，非電解質と電解質の相互分離に優れ，交換基が電気的中性を保つため膨潤・収縮し難い特性をもつ．しかし，本樹脂に対する電解質の吸着平衡に関する知見は少なく，また吸着平衡を説明する理論も十分ではない．演者らは，同樹脂に対する一価塩の分配特性について報告したが[1]，本研究では二価塩化物塩の吸着平衡を測定し，その結果について前報のモデルを拡張して考察した．

【方法】両性イオン交換樹脂 AMP03 の見かけ密度はピクノメトリーにより，気孔率は乾燥法により測定した．同樹脂をガラスカラム（内径 1.57 mm）に約 26 cm の層高（実験ごとに正確に測定）で充填し，ジャケットに恒温水に循環することにより 25℃に保持した．同樹脂に対する糖の吸着平衡は Henry 型である[1]ので，糖（分子量 180～1459）の吸着平衡は 0.5 mL の 1% (w/v)糖水溶液をパルス状に負荷して，水で溶離したときの応答曲線を示差屈折率計で測定し，その 1 次絶対モーメントより分配係数 K_{app} を推測した. なお, ベッド空隙率は樹脂内に浸透できない 1 % (w/v)Dextran T70 水溶液のパルス応答曲線から決定した．また，種々の濃度の二価塩化物塩（$MgCl_2$，$CaCl_2$，$SrCl_2$，$BaCl_2$）水溶液を連続的に通液し，カラム出口液を適当な間隔で分取した．分画液中の塩濃度を塩分計で測定して得た破過曲線を数値積分することにより吸着量を求めた．なお，対照として一価塩である NaCl についても同様の測定を行った．

【結果】モル体積の異なる糖の分配係数から既報[2]の方法に従って，樹脂の膨潤圧は 5.6 MPa と推定した．二価塩化物塩の吸着平衡はいずれも上に凸で非線形であり，見かけの分配係数は塩の濃度が低いほど大きかった．樹脂内における電気的中性と，固定陽イオンと陰イオン（Cl^-）の複合体形成を考えるモデルにより，両性イオン交換樹脂の固定イオン濃度と二価塩と固定イオンの結合定数を算出した．二価塩化物塩の結合定数は NaCl のそれの約 3 倍であった．

謝辞：両性イオン交換樹脂 AMP03 は三菱化学より供与いただいた．

引用:1）長谷川絢子ら:日本食品工学会第 12 回年次大会講演要旨集 p. 82 (2011). 2) S. Adachi *et al.*, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3203 (1989).

zwitterionic exchange resin, Adsorption, divalent chloride salts

講演番号：3A12a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ A 校舎 12 会場

デンプンゲルに対する非電解質および電解質の分配平衡
Distribution of non-electrolytes and electrolytes on starch gels
○謝 裕基、安達 修二（京大院農）
○Yuki SHA,Shuji ADACHI (Kyoto Univ.)

【目的】 食品素材にはデンプンやアルギン酸などの中性または高分子電解質のゲル状物質がある．一方，主要な調味成分である砂糖（スクロース），塩（NaCl）および酢（酢酸）はいずれも低分子であるが，それぞれ非電解質，強電解質，弱電解質と化学的な特性が異なる．これらの調味成分の食品高分子ゲルへの分配平衡（味付け）は豊富な経験に基づいているが，分配平衡を支配する要因に関する知見は必ずしも十分とは言えない．そこで本研究では，中性高分子ゲルであるデンプンゲルへの糖（非電解質）および各種塩類（強電解質）の分配平衡について検討した．

【方法】 デンプンゲルは市販の乾燥キャッサバデンプン球を沸騰水中で 20 分間加熱して使用した．ゲルの見かけ密度および細孔空隙率（気孔率）はそれぞれピクノメトリと加熱乾燥法（105℃，5 日間）により 25℃～80℃で測定した．各種溶質の見かけの分配係数 K_{app} は，デンプンゲルを所定濃度の溶質溶液に浸漬して平衡化したのち，ゲルを一定量の水中に移して脱着させて溶質濃度を測定する吸・脱着法によって測定した．なお，分子量の異なる非電解質としてエチレングリコール，グリセロール，D-グルコース，D-フルクトース，スクロースおよび D-ラフィノースを使用し，これらの濃度は糖度計で測定した．また，強電解質には NaF，NaCl，NaBr，NaI，LiCl，KCl および CsCl を使用し，これらの濃度は塩分計で測定した．

【結果および考察】 デンプンゲルの見かけ密度および気孔率はそれぞれ温度の上昇とともに低下および増加した．これは温度の上昇に伴ってゲルが膨潤したことを示す．25℃におけるスクロースの分配係数は 0.66±0.06 であった．さらに，温度が一定の下では，非電解質の分配係数はモル体積が大きいほど小さかった．そこで，既報[1]に基づき（$\ln K_{app} = -\Pi v_S/(RT) + \ln \gamma_0$），非電解質の分配係数 K_{app} と溶質のモル体積 v_s を片対数プロットし，ゲル内外の圧力差として定義される膨潤圧 Π を推定した．ここで，R は気体定数，T は絶対温度，γ_0 はゲルの細孔空隙率およびゲル内外での溶質の活動度係数の比を包含したパラメータである．デンプンゲルの膨潤圧は温度が 25，40，50℃と上昇するにつれて約 1～3 MPa の範囲で上昇したが，60℃では逆に低下した．さらに，25℃から 50℃までの膨潤圧よりエンタルピー変化を算出したところ約 30 kJ/mol であった．次に，25℃における塩の見かけの分配係数は 0.55 から 0.80 の値をとり，体積が大きいほど塩ほど小さな値であった．塩のモル体積としてどのような値が妥当であるかについて考察する．

1) S. Adachi *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3203-3208 (1989).

starch gel, distribution coefficient, swelling pressure

講演番号：3A12a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ A 校舎 12 会場

パスタの乾燥条件が吸水特性およびアミロース溶出に及ぼす影響

Effects of drying condition for pasta on water absorption and amylose elution into water

○中島 理絵[1]、張 麗芬[2]、西津 貴久[3]、後藤 清和[3]([1]岐阜大院・応生、[2]岐阜大院・連農、[3]岐阜大・応生)
○Rie NAKASHIMA[1], Lifen ZHANG[2], Takahisa NISHIZU[3], Kiyokazu GOTO[3] ([1]Grad. Sch. of Applied Biological Sciences, Gifu Univ., [2]The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu Univ., [3]Fac. of Applied Biological Sciences, Gifu Univ.)

【目的】低温長時間で乾燥したパスタと高温短時間で乾燥したパスタでは，食感が異なり，それぞれに特徴のある食感が付与される。これまでの研究から，乾燥条件により茹で時の吸水速度に差異がみられることが明らかになっている。本研究では，パスタの主成分であるデンプンのアミロース・アミロペクチンの割合に着目し，乾燥条件によるパスタの吸水特性との関係について検討した。
【実験方法】乾燥条件の異なる（50℃，70℃，85℃乾燥：各々以下 LT，HT，VHT と称す）3 種類の平板状パスタ（23×45×0.9 mm）を恒温水槽中で所定時間浸漬させ，真空凍結乾燥し粉砕したものを用いて BAP 法により糊化率を求めた。また，平板状パスタをミルで粉砕し，目開き 1 mm と 500 μm のふるいで分級した。500 μm ふるい上の粉末を 90℃に保った恒温水槽中で浸漬させて真空凍結乾燥し粉砕したものを用いて Megazyme 社製測定キットによりアミロース・アミロペクチンの割合を測定した。同試料 1 g にメタノール 1 ml，蒸留水 49 ml を加えて 20 分間振とうした後，4500 rpm，30 分遠心分離し，上清の固形分と沈殿部の質量から，溶解度及び膨潤度を算出した。
【結果・考察】LT の吸水速度は VHT より大きく，そして吸水時間が長くなるほどパスタのアミロース割合は低下することが明らかになった。パスタに含まれるデンプン粒が膨潤し，吸水・糊化が進行していく過程で，茹でどけが生じ，特にパスタ表面からアミロースが溶出することで，残存するアミロペクチンの割合が相対的に増加すると考えられる。乾燥条件の異なるパスタを比較すると，吸水・糊化後の LT のアミロース割合は VHT よりも低下傾向を示した。一般にアミロペクチン割合が大きくなるほど膨潤性が増すため，VHT と比べてアミロペクチン割合の大きい LT の方が，吸水量が大きくなると考えられる。また，吸水・糊化はパスタの表面から進行するため，浸漬後，表面の糊化率は速やかに 100%に達すると考えられる。糊化率 100%の試料を用いた膨潤度測定の結果， LT の膨潤度は VHT よりも高く，LT の吸水量が VHT よりも大きいことを示す結果を得た。以上から，茹で途中のパスタ表面における吸水能の差がパスタの吸水速度差をもたらす原因のひとつである可能性があると考える。

pasta, drying condition, amylose

講演番号：3A12a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ A 校舎 12 会場

グルテン不添加米粉パンの製パン法でグルテリン単量体は発酵及び焼成で気泡を安定化する

Glutelin monomers stabilize air bubbles during fermentation and baking processes in making rice bread from gluten-free rice flour

○川越 靖 (農生資研)
○Yasushi KAWAGOE (NIAS)

【目的】小麦グルテンを必要としない米粉 100%の製パン法として、グルタチオンを添加する方法が開発された(Yano, 2010, J Agric Food Chem, 58, 7949-7954)。本研究は米の貯蔵蛋白質含量が減少した品種の製パン特性を調査して、米粉 100%の製パン法における貯蔵蛋白質の機能、及びグルタチオンが製パン特性を向上させるメカニズムを明らかにすることを目的とした。
【方法】米の貯蔵蛋白質グルテリンの含量が低下したゆめかなえ、α-グロブリンが欠損し、グルテリン含量がさらに低下した LGC 潤、コシヒカリの精米を材料とした。精米 310ｇを水洗し、脱イオン水と合わせて 600ｇを GOPAN（三洋電機）のミル機能でペースト状に粉砕した。この粉砕液 560ｇを小麦パンケースに移し換え、グルタチオンを 0.75ｇ添加・撹拌し、室温で５時間放置した。その後、砂糖 15g、ドライイースト 6g を加えて通常の方法（小麦おいそぎコース）で製パンした。グルタチオンの添加後 1 時間毎に生地から蛋白質を抽出し、非還元条件下で SDS-PAGE を行った。
【結果と考察】ゆめかなえの精米をペースト状に粉砕し、その粉砕液にグルタチオンを添加すると１時間後には、グルテリン多量体の殆どは単量体まで還元された。しかしながら、５時間の還元処理後の発酵過程においても、グルテリンの酸性、塩基性サブユニット、還元型のα-グロブリンは検出されなかった。コシヒカリとゆめかなえでは、グルタチオン添加の有無で、発酵での生地の膨らみに大きな違いは無かった。しかし、グルタチオンを添加しない生地では、膨らんだ生地は焼成が始まると直ぐに底まで陥没した。これに対し、グルタチオンを添加したコシヒカリの焼成では生地の陥没はなかった。一方、LGC 潤 では、グルタチオン添加の有無にかかわらず、発酵による生地の膨らみはコシヒカリの半分以下であった。LGC 潤の発酵過程を詳細に観察したところ、生地の内部から気泡が表面に上昇し、活発に湧き出る様子が観察された。更に、発酵及び焼成過程で生地内部に生じた気泡は、融合して大きくなると湧き出やすいことが示唆された。これらの結果から、グルタチオンで単量体に還元されたグルテリンは、発酵及び焼成過程で、隣接する気泡の融合を阻害し、生地中の細かな気泡を安定化する作用があることが示唆された。グルテリン単量体は、製パン特性を向上させる機能性蛋白質であることが示唆されたことから、100%米粉の製パン法においても貯蔵蛋白質が製パン特性に大きく影響することが明らかになった。グルテリン単量体が気泡の融合を阻害するメカニズムは不明であり今後の解析が待たれる。応用面では、グルテリン単量体と同様の機能を有するペプチド、蛋白質、その他の添加物の探索、及び利用法の開発が期待される。

rice bread, glutathione, glutelin

講演番号：3A12a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ A 校舎 12 会場

超硬質米の麦味噌浸漬による食味及び機能性の改善

Improvement of palatability and bio-functionality by soaking super-hard-rice in miso soup

○中村 澄子[1]、仲野 洋平[1]、三浦 清之[2]、笹原 英樹[2]、重宗 明子[2]、佐藤 光[3]、大坪 研一[1]([1]新潟大農、[2]農研機構、[3]九州大院農)
○Sumiko NAKAMURA[1], Yo-hei NAKANO[1], Kiyoyuki MIURA[2], Hideki SASAHARA[2], AKIKO SHIGEMUNE[2], Hikaru SATOH[3], Ken'ichi OHTSUBO[1] ([1]Niigata Univ., [2]NARO, [3]kyusyu Univ.)

【目的】Izumi らは、米を味噌に浸漬することでアレルゲンタンパク質を分解できることを報告している。[1)] 本研究では、超硬質米などの粉状質の米を麦味噌に浸漬することにより、超硬質米の食味を向上させると同時に、機能性をも向上させることを目的とした。
【方法】米試料は、一般米（コシヒカリ）および超硬質米（EM10 および北陸粉 243 号）を用いた。味噌は麦味噌を用いた。試料米を米重量の麦味噌 10%を含む水溶液（米重量の２倍）に 5 時間浸漬し、水挽きして粉末を得た。定法により、この粉末の成分分析（食物繊維、タンパク質、糖質、ナトリウム、イソフラボン、ポリフェノール、グルタミン酸、難消化性デンプン）、糊化粘度特性（フォス・ジャパン製 RVA）、α―アミラーゼ活性、タンパク質の SDS-PAGE、米飯物性測定（タケトモ電機製テンシプレッサー）を行った。
【結果】麦味噌のαアミラーゼ活性が高いので、味噌浸浸・水挽き粉は糊化特性試験において最高粘度が顕著に低下した。特に粉状体である北陸粉 243 号・EM10 は、麦味噌のαアミラーゼ等各種酵素の影響を受けやすいことが示された。麦味噌浸漬炊飯米の物性は、味噌の酵素の影響を受け、EM10 の物性が軟らかくなり、北陸粉 243 号・コシヒカリも同様の傾向を示した。特に、炊飯後 4 時間の米飯物性測定（老化試験）では噛み応えが、水浸漬の場合に比べて、それぞれ 40%（EM10)、35%(北陸粉 243 号)、55%(コシヒカリ）を示し、老化抑制効果が示された。また、グルタミン酸含量が約 4 倍、食物繊維含量およびポリフェノール含量も高い値を示した。難消化性デンプンは、0.79%（コシヒカリ)、4.91%（北陸粉 243 号)、11.6%（EM10）であった。味噌浸漬精米粉（EM10）では食物繊維が 4.4%と高い値を示し、大豆イソフラボン含量も 2m g（EM10)を示し、また味噌浸漬米（EM10）は、低カロリーであることが確認できた。麦味噌浸漬後の各種精米および炊飯米タンパク質の SDS－PAGE を行った結果、グルテリンの各サブユニットが分解されていることが確認された。

1) Izumi H. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 64(10), 2250-2253, 2000.

rice, miso, bio-functionality

講演番号：3A12a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ A 校舎 12 会場

高圧酵素処理を用いた超微細米粉の開発

Super-fine rice flour by the enzyme with high pressure treatment

○木戸 みゆ紀[1,4]、小林 兼人[2,4]、知野 秀次[3,4]、西脇 俊和[3,4]、本間 紀之[3,4]、林 真由美[1]、山本 和貴[5]、重松 亨[1]([1]新潟薬大・応生科、[2]新潟製粉、[3]新潟農総研・食研セ、[4]にいがた産業創造機構、[5]農研機構・食総研)
○Miyuki KIDO[1,4], Kaneto KOBAYASHI[2,4], Shuji CHINO[3,4], Toshikazu NISHIWAKI[3,4], Noriyuki HONMA[3,4], Mayumi HAYASHI[1], Kazutaka YAMAMOTO[5], Toru SHIGEMATSU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Niigata Seifun Co. Ltd., [3]Food Res. Center, Niigata Agri. Res. Inst., [4]NICO, [5]National Food Res. Inst., NARO)

【目的】新潟県が開発したペクチナーゼ酵素剤を用いた酵素処理製粉法により、微細(体積基準の平均粒径 40 μm)で澱粉損傷度の低い(5%以下)の微細米粉が製造されている。しかし、米粉の用途拡大に伴い、さらに微細な米粉が求められている。本研究では、酵素処理製粉法と高(静水)圧処理を組み合わせることにより、さらに粒径が細かい超微細米粉の製造を目指した。
【方法】酵素処理に及ぼす処理圧力の影響を調べるため、0.1(常圧)～300 MPa でのペクチナーゼ酵素剤(スミチーム PTE)の活性を、ペクチンを基質として測定した。新潟県産コシヒカリの精白米をペクチナーゼ及び有機酸塩を含む水溶液に浸漬させて 40℃で高圧処理(0.1～300 MPa、0～2 h)を施した(酵素溶液区)。対照として、白米を水(無添加区)または有機酸塩水溶液(有機酸塩区)に浸漬して高圧処理を行った。各試験区の白米中のグルコース含量及び水分含量を経時的に測定した。また、各試験区の高圧処理後の白米をブレードミル粉砕機(8,500～12,000 rpm)で湿式気流粉砕して米粉を製造し、平均粒径及び澱粉損傷度を測定した。
【結果・考察】ペクチナーゼ活性に及ぼす処理圧力の影響を解析した結果、反応初速度は、0.1 MPa から 200 MPa にかけて処理圧力の増加に伴い増加したが、300 MPa では減少した。このことから、ペクチナーゼの至適圧力は 200 MPa であると示唆された。澱粉分解物であるグルコースの含量を澱粉損傷の指標として測定したところ、グルコース含量は全ての試験区で経時的に増加したが、この経時的な増加は 200 MPa まで処理圧力に依存して抑制された。このことから、圧力により澱粉損傷が抑えられることが示唆された。水分含量を経時的に測定し、吸水性を解析した結果、各試験区ともに圧力により吸水速度定数及び飽和含水率が向上した。3 つの試験区の中では無添加区において吸水速度定数及び飽和含水率が最も高かった。これらから、圧力は、水の米組織内への浸透を促進し、微細化及び澱粉損傷の抑制に寄与すると考えられた。各試験区で 0.1 MPa での処理により米粉を製造した結果、粉砕機の回転数の増加に伴い、平均粒径は減少したが、澱粉損傷度は増加した。一方、100 MPa、200 MPa での処理では、粉砕機の回転数によらず、処理圧力の増加に伴い平均粒径及び澱粉損傷度が減少した。酵素溶液区と無添加区とにおいて、200 MPa、1 h の高圧処理を行い 11,000 rpm で粉砕することで、平均粒径 20 μm、澱粉損傷度 5%以下の超微細米粉が得られた。このことから、超微細米粉の製造には圧力による吸水性能の向上が関与し、酵素溶液区においてはペクチナーゼの活性化も関与していると考えられた。本研究は JST-CREATE により実施した。

super-fine rice flour, enzyme activity, water absorption

講演番号：3A12a15
講演日時、会場：3 月 26 日 11:48～ A 校舎 12 会場

高圧下における油脂結晶化の速度論的解析

Kinetic analysis of the fat and oil crystallization under high pressure

山本 英二、○中崎 千尋、岡田(勝部) 泰子、岡林 優子、高橋 裕子、高橋 沙織、遠藤 芙美、松井 芳佳、三宅 沙織、江坂 知美（福山大学）
Hideji Yamamoto, ○ Chihiro Nakazaki,Yasuko Okada(Katsube),Yuko Okabayashi,Yuko Takahashi,Saori Takahashi,Fumi Endou,Yoshika Matsui,Saori Miyake,Tomomi Esaka (Fukuyama Univ.)

【目的】チョコレートは固形油脂の混合物であり、バターやマーガリンは油中水系のエマルジョンである。これらは、いずれも油脂の結晶の多形や粒度などの性状によって食感が異なるので、食品油脂の製造方法において、原料油脂の結晶析出を制御することが非常に重要である。食品油脂の製造において、従来冷却のみによる結晶化が行われていたが、生産効率を重視するために製造における結晶化時間が短く結晶化が不十分であった。さらに、製造後冷蔵室で保存している間に結晶化が継続し、結晶の粗粒化が起こる（ポストクリスタリゼーション）という問題があった。そこで、近年、食用固体油脂の製造方法として圧力を加えることで細かく粒度の揃った油脂結晶を得、マーガリンなどの食品油脂を用いた製品に今までにはなかった特徴を付加する試みがされている。本研究では、加圧によって所望の大きさの油脂の微粒子を生成するための基礎データを得ることを目的として、食用固体油脂の主成分であるトリアシルグリセロール（TAG）の１種類あるいは、２種類を菜種油と混合した液を油脂のモデルとして使用し、多形結晶の圧力･温度相図の測定および核化、成長挙動の検討をおこなった。圧力・温度相図については、Clapayron-Clausius の式で表すことができるか検討した。
【方法】トリラウリン（LLL)、トリパルミチン（PPP）および LLL･PPP 混合物をそれぞれ所定の濃度（10～100%）で菜種油に混合して油脂のモデルとした。それぞれの融点より高い温度で融解し、昇圧・降圧操作を行うことで多形結晶の析出と融解を観察し、多形結晶が融解する圧力を固液平衡圧力とした。①各温度の平衡圧力を繋いで圧力・温度相図を作成し、この相図を基に②結晶核化速度、③成長速度を測定した。なお、圧力・温度相図については、相平衡の熱力学的な関係を表す Clapayron-Clausius の式に回帰し、実測値との一致を検討した。
【結果・考察】①常圧での融点の低い LLL の融解圧力は融点の高い PPP の融解圧力よりも高いことがわかった。準安定な多形結晶の融解圧力は安定な多形結晶よりも融解圧力が高いことがわかった。LLL36%PPP10%混合油脂の固液平衡圧力曲線は、PPP10%の平衡曲線に近かった。平衡圧力の自然対数を絶対温度の逆数に対してプロットした際、直線性を示したので Clapeyron-Clausius の式への近似も可能であることがわかった。②核化速度を過飽和圧力の関数として表した。LLL36%PPP10%混合物の核化速度は PPP10%の場合に近いことが分かった。③成長速度を過飽和圧力の関数として表した。LLL36%PPP10%混合物の成長速度は LLL36%の場合に近いことがわかった。

crystal polymorphism, pressure crystallization, fat and oil

講演番号：3A12p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ A 校舎 12 会場

シクロデキストリンによるホップ抽出物からの高純度キサントフモールの製造

Production of the high purity xanthohumol from the hop extracts by cyclodextrin

○和田 幸樹、石田 英誠、高田 正保、戸塚 篤史（日本食品化工(株)）
○Koki WADA,Hideaki ISHIDA,Masayasu TAKADA,Atsushi TOTSUKA (Nihonshokuhinkako.co., ltd)

【目的】キサントフモール（xanthohumol; 以下 XN）は、ホップに由来する癌細胞増殖抑制作用や骨粗鬆症改善作用等の生理活性を有する機能性素材としてヨーロッパを中心に注目されている。XN は、ビールに含まれていることが知られているが、ビール製造時にイソキサントフモールへ異性化することや難水溶性であることから、ビールの摂取により XN を有効量摂取することは不可能である。XN の生理効果を得るため、有機溶媒抽出や超臨界抽出等により XN 純度を 60~90% に高純度化した製品の製造法が報告されているが、安全で効率的な製造法とは言い難かった。一方、環状オリゴ糖であるシクロデキストリン（cyclodextrin; 以下 CD）は、グルコースが α-1,4 結合で環状に結合したオリゴ糖の総称であり、一般にグルコース数 6、7 及び 8 個のそれぞれ α-、β- 及び γ-CD が知られている。CD は、環状構造の内部に疎水性空洞を有し、CD の種類によって様々な疎水性のゲスト分子を取り込む包接現象により、ゲスト分子の溶解性改善や安定性向上等の効果を有する。今回我々は、CD の包接による XN の可溶化を利用した XN の高純度化法について検討を行った。
【方法・結果】XN を約 2% (w/v) 含有するホップ抽出物を各 2% (w/v) CD 水溶液に添加し撹拌を行った後、上清を HPLC にて分析したところ、α-及び γ-CD 水溶液において XN は抽出されなかったものの、β-CD 水溶液において XN が抽出された。抽出時の XN の純度を向上させるために、ホップ抽出物を 20~60℃の温水にて洗浄したところ、温度依存的に XN 以外の可溶性成分は除去されるが、XN は 60℃の温水で洗浄後においてもホップ抽出物中に 98% 残存することが明らかとなった。温水洗浄後のホップ抽出物 100 mg に種々の濃度の β-CD 水溶液 10 mL を添加し、60℃ で 24 時間抽出を行い、上清中の XN 抽出量を HPLC にて測定したところ、XN の抽出量は β-CD 濃度依存的に増加し、β-CD 濃度 10% (w/w) 以上においてプラトー（約 0.19 mg/mL）となった。XN の精製を種々の吸着樹脂を用いて検討したところ、吸着樹脂としてダイヤイオン HP2MG を用いるとエタノールによる樹脂からの XN の溶出が良好であり、XN 回収量が最も高いことが明らかとなった。さらに、XN/β-CD 混合溶液を HP2MG 樹脂へアプライ後にエタノール濃度をステップワイズで変化させて溶出したところ、30% (v/v) 以下のエタノール濃度で β-CD、40% (v/v) 以上のエタノール濃度で XN が溶出され、溶出された XN の純度は 93% であった。さらに、ホップ抽出物に含まれる XN 量から算出した XN 回収率は約 42% であり、β-CD を用いることでホップ抽出物から XN を簡便且つ高純度に抽出可能であることが示唆された。

hop extract, xanthohumol, cyclodextrin

講演番号：3A12p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ A 校舎 12 会場

力感フィードバックを用いた連続強度評定測定方法の開発

Development of time intensity method, using inner force sense

○小早川 達[1]、後藤 なおみ[1]、芥川 晃士[2]、土門 さや香[2]、早川 義信[2]、片岡 潔[2] ([1]産総研、[2]花王 ヘルスケア食品研)
○Tatsu KOBAYAKAWA[1], Naomi GOTOW[1], Akihito AKUTAGAWA[2], Sayaka DOMON[2], Yoshinobu HAYAKAWA[2], Kiyoshi KATAOKA[2] ([1]AIST, [2]Kao Corp.)

【背景】
パネルの内省感覚の時間的変化を捉える手法の一つとして連続感覚強度測定法があるが、その報告例は多くない。その一因として操作方法の複雑さがあると考えられる。発表者のグループは以前より、連続感覚強度評定法を用い、ニオイの順応特性について調べてきた。この時はスライドレバーを横方向に移動させることで、10 分間の連続強度評定を行っていた。しかし比較的短い時間でその変化が終了する食品の後味などの評価においては、スライドレバーを用いる方法ではパネルが自分の感覚を十分に表現できないと考えた。そこでバネとひずみゲージを用い、比較的早い時間的変化の追従が可能な装置を新たに開発した。またその装置を用いることでコーヒー飲料の後味の評価を行った。
【装置の概要】
新規に開発された装置は水平方向に設置された引張型の歪みゲージに対し、やはり水平方向にバネが取り付けられた。そのバネの先端に取り付けられた紐が滑車を経由し、垂直方向に動くように設置した。紐の先端には金属製のリングが取り付けられ、パネルはそのリングを垂直方向に引くことで評定値を表現した。バネにストッパーをつけることで、最小評定値(本実験では「0-何も感じない」)と最大評定値(5-強烈)の範囲に稼働領域を限定し、紐の可動範囲は12cm程度であった。また得られた評定値をディスプレイ上にリアルタイムで表すことで視覚によるフィードバックも行った。
【計測方法】
パネルが実際に飲料を飲み込んだかどうかの確認を他覚的に行うために、額にアース、顎から喉の移行部に3～4センチの間隔で二個の電極をつけ、その差分電圧を嚥下時における筋電として計測を行った。筋電ならびにパネルの強度評定値はADボードを経由して1kHzのサンプリング周波数でデジタル値に変換され、コンピューターに取り込まれた。20-40代男女のパネルに試験飲料を5 ml摂取させ、口に含んだ状態の口腔内の苦味、また嚥下後5分間にわたり**舌上の苦味**および**喉の奥で感じる香り**の強さ(retronasal aroma-口腔香気)の連続強度測定を行った。
【結果と考察】
数十名のパネルから得られたコーヒー飲料の舌上の苦味、ならびに喉の奥の香りのそれぞれの時刻における強度の平均を計算したところ、それぞれが指数関数的に減少していることがわかり、時定数を求めることが可能となった。

Time intensity, feedback of inner sense, exponential reduction

講演番号：3A12p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ A 校舎 12 会場

連続強度評定による雑味成分を低減したコーヒー飲料の風味特徴の解析

Time intensity evaluation of bitterness and retronasal aroma in astringency reduced coffee

○土門 さや香[1]、芥川 晃士[1]、早川 義信[1]、片岡 潔[1]、後藤 なおみ[2]、小早川 達[2] ([1]花王 ヘルスケア食品研、[2]産総研)
○sayaka DOMON[1], Akihito AKUTAGAWA[1], Yoshinobu HAYAKAWA[1], Kiyoshi KATAOKA[1], Naomi GOTOW[2], Tatsu KOBAYAKAWA[2] ([1]Kao Corp., [2]AIST)

【背景】
食品の味と香りといった風味特徴の把握には知覚強度の測定や、アンケートを用いた官能評価が用いられる。知覚強度の測定については、飲料で知覚される短時間での味・香りの評価は困難であった。この課題を解決するために、新規の強度評定装置を開発した(今大会 演題：力感フィードバックを用いた連続強度評定測定方法の開発)。

【目的】
コーヒー飲料は、焙煎、抽出、殺菌の工程で様々な成分が変化する。それら成分の変化が風味特徴に大きく影響を及ぼす。苦味や香りが強いコーヒーは、濃くコーヒー感があるとして一般的に好まれる。しかしながら、通常の工業的な抽出方法では、苦味を強化することにより渋味や収斂味などの雑味も増加し、一方で雑味を低減すると苦味も低減し全体的な味が薄くなる。そこで今回、抽出工程で吸着濾過処理をおこなうことにより、苦味や香りを維持しつつ、焙煎により生成する雑味成分を選択的に吸着除去した。この雑味を低減したコーヒー飲料の風味特徴を明らかにすることを目的に、新規の強度評定装置を用いた摂取時の風味の Time Intensity・TI（連続感覚強度）測定と官能評価をおこなった。

【方法】
焙煎コーヒー豆から抽出したコーヒー(試料A)と、これに吸着濾過を施したコーヒー(試料B)を試験飲料とした。コーヒー飲用者(20歳～49歳 男女)に試験飲料を5 ml摂取させ、口に含んでからの “舌上の苦味”および“retronasal aroma（口腔香気）”の持続性を新規強度評定装置によりTI測定をおこなった。また、同試験飲料の“苦味”及び“retronasal aroma”の強度に関する官能評価を実施した。

【結果と考察】
TI測定の結果、“苦味”の持続時間は、試料Aに比べ試料Bは短かった。また嚥下後の“苦味”に対する“retronasal aroma”の感覚強度は、試料Ａに比べ試料Ｂは高かった。つまり試料Ｂにおいては“苦味”のキレ改善により、“retronasal aroma”を優位に知覚できることが確認できた。またこの結果は、官能評価と相関が認められた。これは吸着濾過により低減した“苦味”が“retronasal aroma”の知覚を阻害する雑味であると推察された。現在、吸着濾過により低減した雑味成分を同定し、知覚強度や嗜好性との相関を解明中である。

coffee, astringency, time intensity

講演番号：3A12p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ A 校舎 12 会場

少量試料による米粉生地の膨化測定

Small Scale Swelling Method to Find Possible Flour as Bread-making

○奥西 智哉[1]、宮下 香苗[1]、大江 翔太郎[2]、萬代 悠太[2]、増村 威宏[2]、黒田 昌治[3] ([1]農研機構・食総研、[2]京都府大生命環境、[3]農研機構・中央農研北陸)
○ Tomoya OKUNISHI[1], Kanae MIYASHITA[1], Shotaro OE[2], Yuta MANDAI[2], Takehiro MASUMURA[2], Masaharu KURODA[3] ([1]NFRI, NARO, [2]Kyoto Pref. Univ., [3]NARC, NARO)

近年，パンへの米粉利用の取り組みは盛んであるが，米タンパク質は製パン重要因子であるグルテン形成能がない．遺伝子組み換え技術によって米にグルテニンとグリアジンを発現させ，米粉パンの開発につなげる研究がなされている．この研究は系統育種の極初期段階に相当することから，１）得られる試料が極端に少量である，２）作出される試料の種類は非常に多い，３）発現するグルテンについても量と質の両面で十分なものは期待できない，という問題点を抱えている．これらの問題に対応した試験方法の検討を行った．

【方法】活性グルテンを 0-10%含む米粉試料 2.5 g に，上白糖 1.7 g およびドライイースト 0.3 g を脱イオン水 18 g に溶解した液体試料 2.0 g を加えスパーテルでドウにまとめた．液体試料は作業直前に調製した．得られたドウを一分間スパーテルで 100 回程度捏ねた後，樹脂製チューブふたのセーフティカバーにドウを満たした．35℃のインキュベータ中で発酵させ，所定時間ごとにドウ上端とすりきり面からの高さを測定し，初期高さとの比を膨張率とした． 実機での製パンはストレート法により行った．活性グルテンを 0-20%含む米粉 1kg，ドライイースト 15g，ショートニング 50g，脱脂粉乳 20g，上白糖 60g および食塩 20g を用いた．たて型ミキサーに，ショートニング以外のすべての材料を入れ，低速 3 分・中速 5 分で混捏し、油脂投下後さらに低速 3 分・中速 4 分の混捏を行った．捏上げ目標温度は 27℃で誤差は±0.5℃以内であった．ドウを 420 g に分割し，ドウコンディショナー中で 27℃，75%R.H.条件で 25 分間ベンチタイムをとった. モルダーにてクリアランス 4.5mm, 展圧 4.0 mm - 4.0 mm にてカール状に加圧成形し，これをワンローフタイプの 1 斤焼型に入れ，ホイロ（38℃，85 %R.H.）発酵を行った．生地上端高さが焼型縁と一致した時点，あるいは 80 分経過時点を発酵終了とし，熱風式ロータリーオーブンにて 200℃で 20 分焼成した．焼成したパンは 1 時間室温にて放冷した後，レーザー体積計で比容積を求めた．

【結果】プラスチックチューブ内のドウは発酵初期において膨張を続け，ある時点以降は膨張率を維持した．グルテン 0.1%区の膨張率はグルテン 0%区と有意な差がなかったが，45 分以上の発酵時間で 1%区および 10%区は 0%グルテン区に対して有意に大きい膨張率を示した．一方，実機を用いた製パン試験では米粉に含まれるグルテンの割合と比容積は正の相関を持っているが， グルテン 1%区とグルテン 0%区では有意な差は見出せなかった．

今回開発した評価法は，必要試料量の少なさ，および感度の両方について，これらのスクリーニング実験に適していることが示唆された．つまり，この方法で発酵 45 分間以上での膨張率 0.7 以上のものは 1%以上の活性グルテンと同等の力価のタンパク質が含まれ，パン用米粉としての可能性が認められるため，遺伝子組み換えイネの製パン性評価に利用が期待できる．

rice flour bread, swelling rate, gluten

講演番号：3A12p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ A 校舎 12 会場

茶生葉含有酵素が緑茶の香気成分に及ぼす影響

Effects of enzyme contained in fresh tea leaves on flavor of green tea

○池ヶ谷 篤[1,2]、油上 保[1,2]、渡瀬 隆也[1,2]、本杉 正義[2]（[1]静岡県工業技術研究所、[2]公益財団法人静岡県産業振興財団）
○Atsushi Ikegaya[1,2], Tamotsu Yugami[1,2], Takaya Watase[1,2], Masayoshi Motosugi[2] ([1]Industrial Research Institute of Shizuoka Prefecture, [2]Shizuoka Industrial Foundation)

【目的】
チャ（*Camellia sinensis*）は収穫後に異なる製造方法を用いることで、それぞれ不発酵茶（緑茶等）、半発酵茶（ウーロン茶等）、発酵茶（紅茶等）に加工される。国内では主に緑茶が製造されているが、リーフ茶の需要減等により、新たな需要を開拓するため、これまでにない味・香りを持った商品の開発が望まれている。
茶の発酵は茶葉自身が持つ酵素によって行われるが、本研究では緑茶として製造し、製造過程で加熱により酵素活性を失活させた茶に対して、茶生葉から抽出した酵素を添加し、改めて発酵処理を行うことで生じる香気成分の変化を分析し、茶生葉含有酵素が茶の香気成分の変化に及ぼす影響を明らかにし、新商品の開発に活用する。
【方法】
-30℃で保存した冷凍茶生葉に加水、粉砕して作成した酵素液を緑茶に加え混合した後、発酵処理を行った。作成したサンプルは熱水で抽出し、抽出液中の香気成分を GC/MS で分析した。なお、緑茶は秋冬番茶を使用した。
【結果】
緑茶からは 149 ピークが検出され、そのうち 40 成分が推定された。また、発酵処理を行った茶からは 195 ピークが検出され、53 成分が推定された。
推定された成分の中では、グリーンでさわやかな印象を与える成分と考えられる青葉アルコール、1-ヘキサノール等が、フローラルな印象を与える香気成分としてリナロール、ネロール、フェニルエチルアルコール等が、その他の特徴的な香気成分としてベンジルアルコールやサリチル酸メチル等が大幅に増加しており、発酵処理を行った茶からは緑茶様のさわやかな香りと紅茶様のフローラルな香りを合わせた良好な香りになったと考えられた。

本研究は、独立行政法人科学技術振興機構の静岡県・静岡市地域結集型研究開発プログラム「静岡発　世界を結ぶ新世代茶飲料と素材の開発」の一環として行った。

tea, flavor

講演番号：3A12p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ A 校舎 12 会場

新潟県の新形質米の利用適性
Characteristics of specialty rice developed in Niigata Prefecture
○渡辺 一成[1]、中村 澄子[1]、石崎 和彦[2]、松井 崇晃[2]、田村 良浩[2]、大坪 研一[1] ([1]新潟大農、[2]新潟農総研作研センター)
○Kazuaki WATANABE[1], Sumiko NAKAMURA[1], Kazuhiko ISHIZAKI[2], Takaaki MATSUI[2], Yoshihiro TAMURA[2], Ken'ichi OHTSUBO[1] ([1]Niigata Univ., [2]ARINIIGATA)

【目的】わが国の食料自給率は 39%と低く、自給可能な米の消費を拡大することで向上を図る必要がある。近年、主食用以外の用途向けに、新規の形態や特性の各種の新形質米が全国で育成されている。本研究では、新潟県で育成された低グルテリン米などの各種の新形質米の理化学特性を評価し、適正用途を探索することを目的とした。
【方法】試料米は新潟県農業総合研究所作物研究センターで育成・生産された新形質米を用いた。水分は乾燥法、タンパク質は近赤外法、アミロースはヨード比色法、粘度は RVA 法、米飯物性はテンシプレッサー法、アミラーゼ、セルラーゼなどの酵素活性はメガザイムキット法を用いて測定した。タンパク質を抽出し、Laemmlli の方法で SDS-PAGE を行い、タンパク質組成を比較した。試料米を用いて米粉パン、米粉麺を試作し、パンの膨化性、物性を測定し、米粉麺をゆでて麺物性を測定した。
【結果】
(1)新形質米(有色素米、香り米、低アミロース米、高アミロース米、低グルテリン米)を含む 16 品種について、一般成分、糊化粘度特性、米飯物性、各種酵素活性、さらに SDS-PAGE により米タンパク質の分子組成を調べた。
(2)こしのめんじまんはアミロース含量が高く、硬く粘りが弱いため食味が低かった。また、越佳香は香ばしい香りがするものの、食味は中程度であった。低アミロース米の夏雲、長 2022 は、糊化ブレークダウンが大きく、コンシステンシーが小さく、米飯が軟らかくて粘りが強いために良食味であった。糯品種(こがねもち、紅香、紫宝、長 1995)は、アミロースをほとんど含まず、非常に軟らかく、コンシステンシーが顕著に低く、老化しにくかった。
(3)紫黒もち米である紫宝は、α―アミラーゼ活性が強く、各種タンパク質変異米はα―グルコシダーゼ活性が強かった。理化学測定結果を主成分分析することにより、各種の試料米は、うるち米、タンパク質変異米、低アミロース米、もち米の群に分類された。
(4)低グルテリン米同士でも理化学特性が異なっており、米飯食味の点では、長 2147、長 2022、長 2145 が良食味である可能性が示された。タンパク質変異米は、他の米に比べて製パン性が良く、米粉パンの膨化性もタンパク質変異米同士で異なっており、それぞれのパン生地物性も特徴的であった。米粉麺としては、こしのめんじまんが適しており、麺同士の付着が弱く、ゆで後の物性が良好であった。

rice, texture, protein

講演番号：3A12p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ A 校舎 12 会場

沖縄県産シークヮーサー（*Citrus depressa* Hayata）の多変量解析による機能性成分の特性評価

The characteristic evaluation of the functional ingredient by the multivariate analysis of Shiikuwasha（*Citrus depressa* Hayata） from Okinawa

○當山 瑛子[1]、藏屋 英介[2]、神谷 志織[3]、池松 真也[4]（[1]沖縄高専 専攻科、[2]沖縄高専 技術支援室、[3]静岡大院農、[4]沖縄高専 生物資源）
○Akiko TOUYAMA[1], Eisuke Kuraya[2], Shiori Kamiya[3], Shinya Ikematsu[4]（[1]ONCT, [2]ONCT Technical support center, [3]Shizuoka Univ., [4]ONCT）

【背景・目的】沖縄県では，酸味があり，熟すと黄色くなる小型の柑橘類は総称してシークヮーサー（*Citrus depressa* Hayata）と呼ばれ，産地によって様々な品種や系統がある．これまで発表者らは，シークヮーサー果皮に着目し，ポリメトキシフラボノイド類（PMFs）やフラバノン配糖体の分析を行ってきた[1)]．また，ある特定の産地の果皮にはフラバノン配糖体のネオヘスペリジンとナリンギンを含有することが明らかとなった[2)]．本研究では，沖縄県本島北部で栽培され，2009 年と 2011 年の 9 月から 11 月に収穫された 6 種のシークヮーサー果皮中に含有される機能性成分について品種や産地，収穫時期，年度による機能性成分の特性を多変量解析により評価することを目的とした．

【方法】本研究のサンプルには，名護市勝山（勝山クガニー，カーアチー），大宜味村（大宜味クガニー，無核シークヮーサー），本部町伊豆味（伊豆味クガニー，伊豆味大宜味クガニー）の 3 産地の農家より提供して頂いた計 6 種のシークヮーサー果実を用いた．シークヮーサー果皮中の各機能性成分として PMFs を 3 種類，フラバノン配糖体を 4 種類，フラボノール類を 1 種類の計 8 種類のフラボノイドを超高速 LC/MS により定量した．試料調製は各シークヮーサー果実から果皮を分離後乾燥，粉砕し，果皮粉末 0.2 g に 75 %エタノール 5 ml を加え抽出し，4 ℃，10000 rpm で遠心分離後，0.2 μm メンブレンフィルターで濾過し，試料溶液とした．

【結果】各シークヮーサー含有の機能性成分について主成分分析を行った結果，6 種のシークヮーサーは大きく 3 つのグループに分けることができた．それぞれのグループ分類には PMFs だけでなく，フラバノン類のヘスペリジン，ネオヘスペリジン，ナリンギンの含有量も考慮されている．この結果より，シークヮーサーの品種や機能性の評価には，PMFs だけでなくフラバノン類など複数の成分についての分析の必要性が考えられた．今回の結果を月別にみると年度によらず機能性成分の含有量は 9 月に多く 11 月にかけて減少傾向を示し，品種ごとの分布は年度によらず同様の傾向を示した．

【考察】年度や月によって機能性成分の含有量が異なる原因として気温や日照時間，土壌など様々な影響が考えられるため，継続的に分析を行いデータベース化し，評価する必要がある．また，その産地特有の機能性成分を特定することで，より簡易的にシークヮーサーの産地や付随する機能性を評価することができると考えた．

1) 當山瑛子，神谷志織，藏屋英介，濱田泰輔，池松真也，“高感度分析機器を用いた沖縄県産柑橘類中有効成分の分析比較”平成 24 年度農芸化学会
2) 藏屋英介，當山瑛子，池松真也，“超高速 LC/MS による沖縄産柑橘類中の機能性成分の解析”平成 24 年度機器・分析技術研究会

principal component analysis, Shiikuwasha, flavonoid

講演番号：3A12p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ A 校舎 12 会場

トマト加工・調理条件がオキソ酸生成に与える影響

Effect of processing and cooking conditions on preparation of octadecadienoic acid in tomato fruits

○江口 由[1]、松宮 健太郎[1]、水谷 由記子[1]、高橋 春弥[1]、高橋 信之[1]、河田 照雄[1]、高橋 延行[1]、鈴木 達哉[2]、荒 武[3]、櫻井 望[3]、鈴木 秀幸[3]、柴田 大輔[3]、松村 康生[1]（[1]京都大院農、[2]千葉農林総研、[3]かずさ DNA 研）
○Yui EGUCHI[1], Kentaro MATSUMIYA[1], Yukiko MIZUTANI[1], Haruya TAKAHASHI[1], Nobuyuki TAKAHASHI[1], Teruo KAWADA[1], Nobuyuki TAKAHASHI[1], Tatsuya SUZUKI[2], Takeshi ARA[3], Nozomu SAKURAI[3], Hideyuki SUZUKI[3], Daisuke SHIBATA[3], Yasuki MATSUMURA[1]（[1]Kyoto Univ., [2]Chiba Prefectural Agriculture and Forestry Research Center, [3]Kazusa DNA Res. Inst.）

【目的】トマト中にはα型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体（PPARα）のアゴニストである 9-oxo-10,12-octadecadienoic acid（9-oxo-ODA）が含まれている。PPARα は脂質代謝や糖代謝を制御しており、ODA は脂質異常症や糖代謝改善の有効成分として知られている。最近ではトマトジュースからさらに強力なアゴニストとして作用する 13-oxo-9,11-octadecadienoic acid（13-oxo-ODA）が 9-oxo-ODA に加え発見されて注目を浴びている。このことから、このような機能性成分の生成にはトマトの加工、調理条件が大きく影響を与える可能性が考えられる。一方 ODA は LOX の反応産物として生じる可能性が示唆されていることから、LOX がトマト加工品中での ODA 生成と関わっていることが考えられる。本研究ではさまざまな温度条件でトマトを水煮したものに含まれる ODA 量を測定し、トマトの加工・調理条件が ODA の生成に与える影響を調べた。
【方法】実験には千葉県農林総合研究センターより提供を受けたミニトマト‘ラブリー藍’を供試した。果実の果柄を除き蒸留水で洗浄後、トマトを水煮した。水煮の温度条件はホールド（25□→40□→90□）、通常（25□→90□）、急速（95□）、未加熱の 4 処理とした。また、トマト果実の前処理は丸ごと（果柄を除いただけのもの）、カット（1/4 にカットしたもの）、ミキサー（ミキサーにかけたもの）の 3 処理を設定し、実験では前処理及び加熱それぞれの条件を組み合わせた処理をおこなった。加熱処理後は凍結乾燥し、粉末化したものからエタノールで ODA を抽出し、UPLC-MS で定量分析した。
【結果】丸ごとをホールド条件で加熱したもの（丸ごと・ホールド）、1/4 カットにして加熱したもの（カット・ホールド）では ODA は検出されなかったが、ミキサーして加熱したもの（ミキサー・ホールド）で ODA が検出された。ODA がどの時点から増え始めるのかを調べるため、加熱せずにミキサーのみを行ったもの（ミキサー・未加熱）と、ミキサーで破砕後通常の温度条件で加熱したもの（ミキサー・通常）と、ミキサー時に熱湯と共に破砕したもの（ミキサー・急速）で分析を行ったところ、ミキサー・未加熱とミキサー・通常で ODA が検出されたが、ミキサー・急速では検出されなかった。これらの結果より、ODA の生成には、植物体の破砕時に働く酵素であるリポキシゲナーゼが関与している可能性が考えられる。また、ODA の生成を加工・調理条件によって制御できる可能性が示された。

tomato, octadecadienoic acid

講演番号：3A12p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ A 校舎 12 会場

紅麹菌を用いた新規チーズ開発のための基礎的研究

Fundamental study for development of the novel type of cheese using *Monascus* species.

○小柳 遥佳、帯刀 実穂、小林 謙、玖村 朗人（北大院農）
○Haruka KOYANAGI,Miho TAITO,Ken KOBAYASHI,Haruto KUMURA (Hokkaido Univ.)

[目的]我々はホエーの有効活用を視野に入れながら紅麹菌(*Monascus purpureus*)を用いた新規チーズの開発に向けた研究を行っている。今回は本目的に適した菌株や培養条件を検討した結果を報告する。
[方法]ホエーに乳糖発酵性酵母(*Kluyveromyces lactis*)を添加し、25℃で培養後、遠心分離によって菌体を回収した。酵母菌体添加または無添加のホエーを湿熱滅菌した後、タンパク質と破壊された酵母菌体成分とからなる加熱凝集物を回収した。これを所定の pH に調整した後、紅麹菌 6 株を播種し、25℃で培養を行った。培養産物にエタノールを添加し、抽出物中のシトリニンを HPLC で定量すると共に 500 nm における吸光度を測定した。
[結果]まず酵母菌体内容物を含まない培地上で各紅麹菌株を培養した結果、シトリニンや色素の産生は菌株毎に著しく異なると共に培地の pH の影響を受けた。酵母菌体内容物存在下で培養した場合、殆どの菌株において色素産生性が向上した一方で、シトリニン産生に関しては亢進した株や逆に低減した株が認められた。以上の結果、ホエータンパク質をベースとした固形培地上で培養した紅麹菌のシトリニンや色素の産生は僅かな培養環境の違いによる影響を受けることが明らかとなった。

Monascus, citrinin

講演番号：3A12p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ A 校舎 12 会場

カマボコ廃棄物を利用した *Rhizopus* 属菌による新規水産発酵食品
Novel fish fermented food using KAMABOKO by *Rhizopus* strain
○福田 翼、吉山 慧、原田 和樹、古下 学、芝 恒男（水大校院）
○ Tsubasa FUKUDA,Akira YOSHIYAMA,Kazuki HARADA,Manabu FURUSHITA,Tsuneo SHIBA (National Fisheries Univ.)

【目的】製造時に大量に排出されるカマボコ廃棄物の発酵基質としての利用は、非常に有意義である。しかしながら、水産発酵食品は独特のにおいを有するため、敬遠されている。一方、*Rhizopus*属菌はテンペの主要な発酵スターターとして知られ、芳香性に関与する有機酸生成能を有している。カマボコ廃棄物はタンパク質を主成分としており、有機酸の生成に必要な炭素源が不足している。したがって、炭素源の添加が必要である。本研究では、カマボコ廃棄物を利用した*Rhizopus* 属菌によるにおいの良い水産発酵食品の創生を目的とし、最適な*Rhizopus*属菌の選定およびカマボコ廃棄物への炭素源（コメ）添加効果について調査を行った。
【方法】カマボコ廃棄物は約 0.5 cm 角にカットしたものを利用した。添加デンプン源はコメ（山口県産）とした。*Rhizopus* 属菌はテンペおよび土壌より分離された 23 菌株を用いた。これらの菌株におけるグルコアミラーゼ生産性およびプロテアーゼ生産性を調査し、スクリーニングを行った。得られた *Rhizopus* 属菌を用い、カマボコ廃棄物に対するコメ添加効果について検討を行った。さらに、においの官能評価を行った。
【結果】カマボコを発酵基質として利用可能である *Rhizopus* 属菌のスクリーニングを行った。その結果、14 菌株において増殖が確認された。しかしながら、増殖が確認されたいずれの菌株においてもアンモニアもしくはカビ臭が確認された。添加デンプン源としてコメを選択し、カマボコ廃棄物上で増殖可能であった *Rhizopus* 属 14 菌株におけるグルコアミラーゼ生産性およびプロテアーゼ生産性を調査した。その結果、グルコアミラーゼ生産性は *R. cohnii* P5 菌株が最も高かった。同様に、プロテアーゼ生産性も高い数値を示した事から以後の研究では *R. cohnii* P5 菌株を使用した。
　次に、カマボコ廃棄物に対するコメ添加効果を調査した。グルコアミラーゼの場合、コメの添加により生産性が向上し、コメの混合比が 25-75%時には約 200 U/g -substrate-と同等であった。一方、プロテアーゼの場合、コメの混合比が低いほど、生産性は高かった。25%添加時は約 800 U/g -substrate-であったが、50-75%時には約 300 U/g -substrate-となった。さらに、コメの添加により pH が低下する事が確認された。コメ混合比 0%・25%・50%においの官能評価を行った結果、カマボコ廃棄物を基質とした場合（コメ混合比 0%）よりもカマボコ廃棄物にコメを添加した基質（コメ混合比 25%・50%）の方が評価が高かった。しかしながら、コメの混合比 25%と 50%間での有意差は見られなかった。現在、これらのサンプルにおけるにおい成分分析を行っている。

Fish fermentation food, *Rhizopus* strain, Flavor

講演番号：3A12p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ A 校舎 12 会場

担子菌を用いた発酵梅製造法の確立

Establishment of manufacturing method of fermented plum by mushroom

○西田 菜津美[1]、谷 奈津樹[2]、前川 愛[1]、田畑 麻里子[2]、松井 徳光[2]([1]武庫川女大院食栄、[2]武庫川女大食栄)
○Natsumi NISHITA[1], Natsuki TANI[2], Ai MAEKAWA[1], Mariko TABATA[2], Tokumitsu MATSUMI[2]([1]Mukogawa Women's Univ., [2]Mukogawa Women's Univ.)

【目的】梅干しは古くから日本人に食されてきた発酵させない漬物である。しかしながら、梅を担子菌で発酵させることにより機能性が高まり、線溶活性や抗酸化活性など生理活性を有する発酵梅の生産が可能であると考えられた。そこで本研究では、無塩で保存性に優れ、かつ形の崩れにくい発酵梅の安定な製造法の確立を目的として、発酵中における担子菌の生育速度のばらつきや、長期培養による発酵梅の形状維持の改善法を見出すと共に、新たな生理活性を付加させた発酵梅の製造法について検討を行った。
【方法】発酵梅の製造には、冷凍梅を用いた。マンネンタケ（*Ganoderma lucidum* NRBC 31863）を発酵菌とし、炊飯米・豆乳・梅酢・水を組み合わせた 3 つの条件下で培養法の検討を行った。条件 1 では培養液の量を通常量（400ml）、梅の個数を 8 個とし、条件 2 では培養液の量（400ml）は変えず、梅の数を半数（4 個）とした。条件 3 では培養液の量（200ml）、梅の個数（4 個）ともに半量・半数で行った。 また、一定期間ごとに梅の入れ替え操作を行い、さらに発酵終了後、取り出した発酵梅を冷蔵庫および室温で 10 ヵ月間保存した。得られた発酵梅については定法に従い、糖度、線溶活性、抗酸化活性、遊離アミノ酸濃度を測定した。
【結果および考察】発酵梅の製造を行った結果、一定期間冷凍梅の培養を行った後、梅を取り出し、新たな冷凍梅を入れ替えて培養を行うことで、線溶活性や抗酸化活性において良好な結果が得られることが明らかとなった。また、発酵梅の製造は、①培養中における菌糸の生育速度にばらつきがあること、②長期の浸漬培養による発酵梅の形状維持が困難であること、③保存性に関して未検討であることが問題点となっていたが、発酵に使用するビーカーに入れる液量を半量とし、さらに梅の個数を半数にすること（条件3）で①の問題点は解決された。また、オートクレーブせずに、梅酢で殺菌した梅を一定期間ごとに入れ替えることによって②の問題点が解決された。さらに10ヶ月間にわたって、冷蔵庫および室温で保存した発酵梅において、細菌、酵母、カビ等の増殖が認められなかっただけではなく、食味検査の結果、マイルドな酸味を呈していたことから、長期間の保存においても発酵梅が腐敗することなく美味しさを維持していたことが確認され、③の問題点も解決することができた。 以上のことから、マンネンタケの発酵能で製造した液に冷凍梅を入れ替え培養することによって、安定した発酵梅を生産する製造法を確立することができた。

mushroom, fermentation, plum

講演番号：3A12p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ A 校舎 12 会場

担子菌の発酵能による昆布および鰹節だしがらの有効利用
Utilization of grounds used kelp and dried bonito by mushroom fermentation
○梶野 美紀[1]、田畑 麻里子[2]、小倉 真紀[2]、松井 徳光[2] ([1]武庫川女大院食栄、[2]武庫川女大食栄)
○ Minori KAJINO[1], Mariko TABATA[2], Maki OGURA[2], Tokumitsu MATSUI[2] ([1]Mukogawa women's Univ., [2]Mukogawa women's Univ.)

【目的】 日本食に不可欠なだし汁は、昆布や鰹節から抽出されている。だし汁は、日本人の食生活を豊かにし、その旨味は昔から慣れ親しまれてきた。しかし、だし汁を取った後のだしがらは産業廃棄物や生ゴミとして処理されており、現在では、生産量抑制、減量とリサイクルの促進が望まれている。一方、担子菌(きのこ)はビタミンやミネラル、食物繊維が豊富な食品素材であり、古くからわが国の食生活において、食感、味ともに親しまれてきた。担子菌はプロテアーゼを分泌してたんぱく質を分解し、呈味成分であるアミノ酸を生成することが報告されている。さらに、だしがらには、未分解のたんぱく質が残存しているため、だしがらを担子菌で分解させることで、呈味性を示す成分が得られると推察できる。そこで、本研究ではだしがらの有効利用法の開発を目的とし、担子菌の発酵能を利用して、だし汁抽出後の昆布および鰹節を分解させ、新規の呈味性を有する調味原料の開発を試みた。
【方法】 担子菌の中でもプロテアーゼ活性の高いスエヒロタケ(*Schizophyllum commune*)を用いて、だし汁抽出後の昆布及び鰹節のだしがらを発酵させた。昆布だしがらと水道水(条件 A)、昆布だしがらと昆布だし汁(条件B)、鰹節だしがらと水道水(条件C)、昆布だしがらと鰹節だしがらの混合物(1:1)と水道水(条件 D)について、それぞれだしがらを一定の濃度に調製した。それらにスエヒロタケの菌糸体を植菌し、好気的に室温で 8 週間回転振とう培養(100rpm)を行った。発酵前及び発酵 8 週目の遊離アミノ酸濃度を定法に従い測定した。
【結果と考察】スエヒロタケの顕著な菌糸の生育が確認されたのは、昆布だしがらあるいはだし汁が使用されている条件 A、B、D であった。また、発酵 8 週目に高い総遊離アミノ酸濃度を示したのは条件 D であったことから、遊離アミノ酸濃度の大幅な増加には、昆布だしがらと鰹節だしがらが共存していることが必要であると示唆された。総遊離アミノ酸濃度や旨味を呈するアスパラギン酸とグルタミン酸の濃度の和においては、条件 D のだしがら濃度 20%を 8 週間発酵させた試料が最も高い値を示し、それぞれ発酵前に比べ約 60 倍と 20 倍の増加を示した。しかし、総遊離アミノ酸濃度に対してアスパラギン酸とグルタミン酸の占める割合が最も高い値を示したのはだしがら濃度 2%であった。以上の結果より、産業廃棄物や生ゴミとして処理されているだし抽出後の昆布および鰹節だしがらを担子菌で発酵させることにより、旨味成分を活かした調味原料製造の可能性が示唆され、将来の食品への有効利用法として期待される。

mushroom, fermentation, Umami

講演番号：3A12p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ A 校舎 12 会場

担子菌の発酵能を利用した酵母エキスの製造
Production of the yeast extract using mushrooms fermentation
○田畑 麻里子[1]、玉田 萌子[1]、衛藤 静乃[2]、八木 芙雪[2]、西川 健一[2]、矢内 徳正[2]、尾畑 賢一[3]、松井 徳光[1] ([1]武庫川女大食栄、[2]三菱商事フードテック(株)開発部、[3]三菱商事フードテック(株)開発担当役員付)
○Mariko Tabata[1], Moeko Tamada[1], Shizuno Eto[2], Fuyuki Yagi[2], Kenichi Nishikawa[2], Norimasa Yanai[2], Kenichi Obata[3], Tokumitsu Matsui[1] ([1]Mukogawa Women's Univ., [2]R&D Department, Mitsubishi Shoji Foodtech Co., Ltd., [3]Assistant to Senior Officer R&D, Mitsubishi Shoji Foodtech Co., Ltd.)

目的： 酵母エキスは酵母の有用成分を抽出したエキスで，主成分としてアミノ酸,ペプチド，核酸関連物質，ミネラル，ビタミンを含み，調味料や微生物の培地などに利用されている．現在酵母エキスの製造法には自己消化法，酵素分解法，熱水抽出法などが用いられているが，自己消化法は低コストだが雑味がある，酵素分解法は風味が良いが高コストである，熱水抽出法は低コストで風味が良いが収率が低いなど，いずれも一長一短があり，新たな手法が望まれている．一方，担子菌は細胞壁成分としてβ-1,3-/1,6-グルカンを生成し，生長や代謝のためにグルカナーゼを分泌する．酵母の細胞壁の主成分もグルカンであるため，担子菌の分泌する酵素によって酵母の細胞壁が分解され，エキスが回収できる可能性が示唆される．また，既存の酵母エキスはいずれの製造方法でも酵母の味がベースで大きな差は認められないが，担子菌で発酵させた酵母エキスは，エキスの味に担子菌の風味が加わると予想される．そこで，本研究では，酵母を担子菌で発酵させることで新規な呈味性を示す酵母エキスの製造を試みた．
方法： 乾燥酵母は，酵母濃度 10%または 20%となるよう 1%グルコース溶液に懸濁し，オートクレーブで滅菌（120℃，20 分）した後，担子菌の菌糸体を植菌し，25℃で 22～33 日間振盪培養（100rpm）を行った．得られた発酵酵母は遠心分離（15000rpm，10 分）し，上清液を発酵酵母エキスとした．発酵酵母エキスの総窒素は改良デュマ法で，遊離アミノ酸濃度は高速液体クロマトグラフで，抗酸化活性は化学発光法を用いて測定を行った．
結果・考察： 発酵酵母エキスの製造に適した担子菌を検索するため，担子菌 91 種 232 株で 20%酵母懸濁液の発酵を行ったところ，45 種 100 株で菌糸の生育が認められ，担子菌の発酵による酵母エキスの製造が示唆された．窒素回収率および食味検査で良好な結果が得られた 5 種 11 株でさらに 10%酵母懸濁液の発酵を行った．発酵酵母エキスの窒素回収率は，培養日数の経過とともに増加した．食味検査を行ったところ，NBRC30494 (エノキタケ) , NBRC30749 (スエヒロタケ) , NBRC30905 (エノキタケ) で発酵させたエキスが高評価であった．発酵酵母エキスの遊離アミノ酸濃度は，NBRC6504 (スエヒロタケ) , NBRC30494 (エノキタケ) , NBRC30749, NBRC30905 で発酵させたエキスが高い値を示し，食味検査において高評価のエキスは，遊離アミノ酸濃度も高い傾向が認められた．また，発酵酵母エキスの抗酸化活性は担子菌の発酵により増加した．今後，製造した発酵酵母エキスを用いたメニューを考案し，発酵酵母エキスの料理への使用について検討する予定である．

mushroom, fermentation, yeast extract

講演番号：3A12p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ A 校舎 12 会場

担子菌の発酵能によるきのこワインの開発および非還元 SDS-PAGE と活性染色を用いた簡便な分子量測定法の確立

Development of wine by mushroom fermentation, and establishment of handy molecular weight metrology by non-reduction SDS-PAGE and activity stain

○松井 徳光[1]、久保田 英博[2]、居村 真依[1]、寺前 友美子[1]、奥野 公美子[1]、藤生 弘子[2]、浅川 篤[2]、田畑 麻里子[1]（[1]武庫川女大食栄、[2]アトー株式会社技術開発部）
○ Tokumitsu MATSUI[1], Hidehiro KUBOTA[2], Mai IMURA[1], Yumiko TERAMAE[1], Kumiko OKUNO[1], Hiroko FUJIU[2], Atsushi ASAKAWA[2], Mariko TABATA[1] ([1]Mukogawa Women's Univ., [2]Atto Corporation)

（目的）古来から現在に至るまで、アルコール飲料の製造は酵母のアルコール発酵能を用いて行われてきている。しかしながら、本研究室では、すでに担子菌（きのこ）のアルコール発酵能を見出し、ワイン、ビール、清酒などのアルコール飲料の製造に関する特許を取得しているが、特にワイン製造においては呈味性やアルコール生産性に問題点があった。そこで本研究では、担子菌の発酵能によるきのこワインの製品化を主目的として、より良好な嗜好性を示す安定なワイン製造法の検討を行うと共に、非還元 SDS-PAGE と活性染色を用いた簡便な分子量測定法を確立したので報告する。
（方法）供試菌には 227 種類の担子菌を用い、糖度 15%の赤ブドウ果汁液に植菌し、25℃で 2 カ月間培養を行い、アルコール濃度が 1 %以上で、抗酸化活性が高く、呈味性に優れたワインを生産する担子菌を選択した。アルコール濃度は GC-MS、抗酸化活性は化学発光法で測定した。また、非還元 SDS-PAGE と活性染色による分子量測定には「デヒドロゲナーゼキット」（アトー株式会社）の試作品を用いた。LDH および ADH の活性染色およびタンパク質染色は定法に従った。
（結果・考察）227 種類の担子菌で発酵させたワインの中で、16 種類が 1%以上のアルコール濃度を示した。特に、2 種類のスエヒロタケ（NBRC4929、NBRC4928）、ムラサキシメジ（NBRC8104）が高濃度のアルコールを生産した。アルコール濃度が 1%以上のワインについて抗酸化活性を測定したところ、アラゲカワキタケ（NBRC6516）、ムキタケ（NBRC30362）、エノキタケ（NBRC31862）、ハタケチャダイゴケ（NBRC9076）、ヒラタケ（W351-1）を用いたワインが高い抗酸化活性を示した。官能検査では、アラゲカワキタケ（NBRC6516）、ムキタケ（NBRC30362）、ムキタケ（NBRC30526）、エノキタケ（NBRC31862）、ムラサキシメジ（Ms-1）、ハタケチャダイゴケ（NBRC9076）を用いたワインで高い評価が得られた。特にアラゲカワキタケ（NBRC6516）は、非常にまろやかな独特の風味を持つワインをつくり出し、25℃がアルコール発酵における最適温度であった。また、非還元 SDS-PAGE と活性染色を用いた分子量測定では、予備試験的に実施した市販の LDH（豚心臓由来 F.W. 140,000〔4 量体〕、F.W.36,500〔1 量体〕オリエンタル酵母製）および ADH（酵母由来 F.W. 141,000〔4 量体〕、F.W.35,300〔1 量体〕オリエンタル酵母製）を用いたところ、活性染色バンドが分子量を示すバンドと一致し、アト―株式会社の試作品である「デヒドロゲナーゼキット」が簡便な分子量測定に適していることが明らかとなった。現在、担子菌の ADH の分子量を測定中である。

mushroom, fermentation, wine

講演番号：3A12p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ A 校舎 12 会場

新規セラクルミン配合飲料は既存のクルクミン飲料よりも高い吸収効率を示 した
Novel drinkable of Theracurmin exhibited high absorption efficiency compared to existing curcumin beverages

○砂川 陽一[1,6]、刀坂 泰史[1,6]、平野 早絵[1]、並木 雅俊[1]、渡辺 雄一[1]、土井 修[2]、鈴木 清美[2]、山内 みゆき[2]、横地 常弘[2]、大塚 喜彦[3]、浜田 友子[3]、今泉 厚[3]、野中 裕司[4]、不破 喬[4]、寺本 貴則[4]、掛谷 秀昭[5]、和田 啓道[6]、島津 章[6]、長谷川 浩二[6]、森本 達也[1,2,6] ([1]静県大薬、[2]静県総病院、[3](株)セラバリューズ、[4](株)サントリー食品、[5]京大院薬、[6]京医センター)
○ Yoichi Sunagawa[1,6], Yasufumi Katanasaka[1,6], Sae Hirano[1], Masatoshi Namiki[1], Yuichi Watanabe[1], Osamu Doi[2], Kiyomi Suzuki[2], Miyuki Yamauchi[2], Tsunehiro Yokoji[2], Yoshihiko Otsuka[3], Tomoko Hamada[3], Atsushi Imaizumi[3], Yuji Nonaka[4], Takashi Fuwa[4], Takanori Teramoto[4], Hideaki Kakeya[5], Hiromichi Wada[6], Akira Shimadu[6], Koji Hasegawa[6], Tatsuya Morimoto[1,2,6] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Shizuoka General Hosp., [3]Theravalues corporation, [4]Suntory Beverage & Food Limited, [5]Kyoto Univ., [6]Kyoto Medical Center)

（背景）天然物ウコンの主成分であるクルクミンは抗酸化作用、抗炎症作用、アルコール解毒作用など多くの生理活性を有し、健康食品として古くから広く用いられている。しかしながら、クルクミンは腸管からの吸収効率が悪く、十分な生理活性を得ることが難しい。そこで我々は、腸管からの吸収効率を高めた高吸収クルクミン製剤セラクルミンを作成した（***Biol Pharm Bull.*** 2011;34(5):660-5）。セラクルミンはラットにおいて血中濃度が約 60 倍、ヒトにおいても約 27 倍となることを確認した。さらに、このセラクルミンは低用量で心不全ラットモデルの心機能を改善することも見出した（***Biol Pharm Bull.*** 2012;35(2):139-44）。セラクルミンは健康食品としてカプセル状のものが使用されてきたが、一般人にとって身近な液状の高吸収クルクミン製剤服用により、生理活性を発揮する血中濃度が得られるかは不明である。そこで我々はセラクルミン配合ドリンク製剤を作成し、日本でよく販売されている他のクルクミンドリンク製剤と血中濃度を比較した。
（方法）試験は、静岡県立総合病院臨床研究倫理委員会での審査にて許可を取得し、健常ボランティに十分な説明をした後、文書による同意を得た。健康成人男女 24 名の被験者に、セラクルミン配合ドリンク剤 A および市販のドリンク剤 3 種類（ドリンク剤 B，C，D）の合計 4 種類を摂取させた。試験は、無作為割付クロスオーバー2 重盲検試験とし、それぞれの飲用を 1 週間あけた。摂取前、摂取後 0.5、1、2、4、8 時間後に採血し、クルクミンの血中濃度を測定した。
（結果）健康成人 24 名の内訳は、男性 13 名、女性 11 名、年齢は 23～32 (平均 24.4)歳であった。内服前のスクリーニング検査で、肝機能、腎機能など異常は認めなかった。24 人全員が試験を脱落することなく試験を終了し、特に副作用も見られなかった。AUC 0-8hr では、A は B，C，D に比べて、それぞれ 1.5 倍、3.0 倍、4.0 倍と有意に高かった。さらに 8 時間での最高血中濃度では、A は B，C，D に比べて、それぞれ 1.7 倍、3.0 倍、3.8 倍と有意に高かった。また、男女間でも差を認めず、同様の結果を得た。
（考察）以上より、セラクルミン配合ドリンク剤は他製品と比べて、吸収スピードが速く、血中濃度も十分高く持続することが判明した。クルクミンは様々な生理活性を有することから、セラクルミン配合ドリンク剤はこれらの活性を発揮する上で、他製品より有効な飲料となる可能性が示唆された。

curcumin, bioavailability

講演番号：3A15a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ A 校舎 15 会場

ホップ水抽出物中の TRPV1 アゴニストの探索

Identification of TRPV1 agonist in hop water extract

○佐藤 千鶴、黒田 久夫、執行 達朗（サッポロビール(株)）
○Chizuru SATO,Hisao KURODA,Tatsuro SHIGYO (SAPPORO BREWERIES LTD.)

【目的】Transient Receptor Potential チャネル（以下、TRP チャネル）は 6 回膜貫通領域を有する非選択性の陽イオンチャネルであり、生体内において熱や酸、化合物刺激などの受容に関わっている。近年、口腔内での発現も確認されており、TRP チャネルが口腔内においても刺激の受容に関与していると考えられる。例えば、TRP チャネルの 1 種である TRPV1 チャネルは、43 度以上の熱で活性化する他、トウガラシの辛味成分であるカプサイシンによっても活性化されることが知られている。

我々はビール中の成分が TRP チャネルに作用することで、口腔内に何らかの感覚をもたらしているのではないかと考え、ビールやビール原料に含まれる成分の TRP チャネルアゴニスト活性を調べた。

【方法・結果】動物培養細胞に TRPV1, A1 および M8 チャネルをそれぞれ一過的に発現させ、細胞内のカルシウム濃度変化を測定することにより、TRP チャネルアゴニスト活性を評価した。その結果、ホップを冷水抽出した後、加熱することで得られる「ホップ水抽出物」に TRPV1 アゴニスト活性が認められたため、当アゴニストの特定を試みた。ホップ水抽出物を膜透析およびポリビニルポリピロリドン（以下、PVPP）により順次分画し、分画物について TRPV1 チャネル活性を調べたところ、PVPP に吸着される画分に TRPV1 チャネル活性を見出した。現在、この画分の詳細な解析を行っているところである。

TRP channel, hop, beer

講演番号：3A15a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ A 校舎 15 会場

白血球型 12-リポキシゲナーゼに対する中国茶葉抽出物の阻害効果
Inhibitory effect of extracts from Chinese tea on catalytic activity of leukocyte-type 12-lipoxygenase

○川上 祐生[1]、大槻 朱美[1]、平野 詩織[1]、木下 麻衣[1]、山本 登志子[1]、辻 英明[1]、木本 眞順美[1]、山下 広美[1]、伊東 秀之[2]、FANG Ding Zhi[3]、高橋 吉孝[1]（[1]岡山県大保福、[2]岡山大院医歯薬、[3]Sichuan Univ.）
○ Yuki KAWAKAMI[1], Akemi OTSUKI[1], Shiori HIRANO[1], Mai KINOSHITA[1], Toshiko SUZUKI-YAMAMOTO[1], Hideaki TSUJI[1], Masumi KIMOTO[1], Hiromi YAMASHITA[1], Hideyuki ITO[2], Ding Zhi FANG[3], Yoshitaka TAKAHASHI[1] ([1]Okayama Prefectural Univ., [2]Okayama Univ., [3]Sichuan Univ.)

【目的】12-リポキシゲナーゼ（LOX）はアラキドン酸に酸素 1 分子を添加して、12-ヒドロペルオキシ酸を生成する酵素で、これまでに多くのアイソザイムがクローニングされている。低密度リポタンパク質（LDL）の酸化はアテローム性動脈硬化発症の引き金として働くが、この過程に白血球型 12-LOX が重要な役割を果たしていることが知られている。我々は、白血球型 12-LOX を過剰発現させたマウスマクロファージ由来 J774A.1 細胞を用い、本酵素がマクロファージによる LDL の酸化に必須であることを明らかにしてきた。今回我々は、効果的に白血球型 12-LOX を制御できる食品の検討を進める過程で、中国茶の可能性に興味を持ち、中国茶葉抽出物の白血球型 12-LOX 活性への影響を調べるとともに、その阻害成分を明らかにすることを試みた。
【方法】12 種類の中国茶葉をそれぞれ 50%エタノールで抽出し、中国茶葉抽出物を得た。マウスマクロファージ由来 J774A.1 細胞に白血球型 12-LOX を過剰発現させ部分精製したものを酵素標品として、各種中国茶葉抽出物の存在下でアラキドン酸とインキュベートして白血球型 12-LOX 活性を測定した。中国茶葉抽出物を逆相 HPLC でメタノール 30%から 100%のグラジエントを用いて、2 分毎の溶出液をそれぞれ分取し、各画分の白血球型 12-LOX 阻害効果を検討した。
【結果】12 種類の中国茶葉抽出物の白血球型 12-LOX 阻害効果を検討したところ、7 種類が 20 μg/ml 以下の IC_{50} で阻害した。この中で本酵素を阻害することがすでに知られているカテキンの含有量が最も少なかった青山緑水にターゲットを絞り、研究を進めた。青山緑水に含まれる阻害成分を明らかにするために、青山緑水の茶葉抽出物を逆相 HPLC で 30 画分に分画し、各画分の白血球型 12-LOX 阻害効果を調べると、24-26 分に溶出された画分に比較的強い白血球型 12-LOX 阻害活性が認められた。この画分に含まれる白血球型 12-LOX 阻害成分の 1 つは、白血球型 12-LOX 発現 J774A.1 細胞より調製した部分精製酵素のほか、ウサギ赤血球 15-LOX-1、ヒトシクロオキシゲナーゼ（COX）-1 あるいは COX-2 発現ヒト大腸癌細胞 COLO320DM 細胞より調製した可溶化酵素も濃度依存的に阻害したが、ヒト血小板より調製した血小板型 12-LOX の部分精製酵素はほとんど阻害しなかった。逆相系分取 HPLC により単離した阻害活性成分は、各種 2 次元 NMR および高分解能エレクトロスプレーイオン化質量分析の解析結果などから、新規モノテルペン配糖体であることが明らかになった。

Lipoxygenase

講演番号：3A15a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ A 校舎 15 会場

チロシナーゼ阻害作用を示す米糠タンパク質由来新規ペプチドの同定と機能解析

Identification and functional analysis of novel peptides with tyrosinase inhibitory activity from rice bran protein

○落合 秋人、田中 聖也、吉田 久志、田中 孝明、谷口 正之 (新潟大自然研)
○Akihito OCHIAI,Seiya TANAKA,Hisashi YOSHIDA,Takaaki TANAKA,Masayuki TANIGUCHI (Grad. Sch. of Sci. Technol., Niigata Univ.)

【目的】細胞での過剰なメラニン生産は色素沈着疾患を引き起こす。そのため、メラニン生産過程の律速酵素であるチロシナーゼ制御（阻害）が色素沈着防止や美白に効果をもたらす。近年、ヒト細胞に強い毒性を示すアルブチンやコウジ酸などの既存のチロシナーゼ阻害剤に代わり、ペプチド性の安全な阻害剤が注目されている。一方，精白米や米糠中のタンパク質やペプチドの生理活性に関する報告は少ない。当研究室ではこれまでに、米糠タンパク質のプロテアーゼ消化により多数のチロシナーゼ阻害成分が派生することを見出している。本研究では，新たなメラニン合成阻害剤の開発を目的として，米糠タンパク質を酵素加水分解して得られた画分からチロシナーゼ阻害活性を有するペプチドを単離・同定し、マウスメラノーマ細胞によるモデル系を用いてメラニン合成阻害への効果を検証した。
【方法】チロシナーゼ阻害ペプチドは、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーを用いて単離精製した。チロシナーゼ阻害試験には、市販のマッシュルームチロシナーゼを用いた。精製したペプチドは、現有の MALDI TOF/MS（マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計）による質量分析を行い、イネゲノムデータベース(The Rice Annotation Project Data Base)と照合することによって同定した。メラニン合成阻害試験および細胞毒性試験には、マウス B16 メラノーマ細胞を用いた。
【結果と考察】米糠タンパク質のプロテアーゼ消化産物から、チロシナーゼ阻害活性を示す 3 種類のペプチドを同定した。これらのペプチドの一次構造には有意な相同性はみられなかったが、共通してチロシン残基を有しており、それぞれ 150～400 μM 程度の濃度で約 50%のチロシナーゼ活性を阻害した。チロシナーゼは L-Tyrosine から L-DOPA chrome への二段階の酸化反応を触媒する酵素であることから、これらのペプチドは L-Tyrosine のアナログ基質として活性阻害に関与することが示唆された。また，マウス B16 メラノーマ細胞のメラニン形成に対する阻害と細胞毒性試験の結果を踏まえて、これらのペプチドの化粧品素材としての有用性を検証する。

tyrosinase inhibitor, melanogenesis, peptide

講演番号：3A15a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ A 校舎 15 会場

アピオスイソフラボン類における生理活性の評価

Evaluation of biological activities of groundnut (*Apios Americana* Medik) isoflavones

○奈良 一寛[1]、堀江 祐範[2,3]、高島 瑞紀[3]、二木 鋭雄[3]、吉田 康一[3]、萩原 義久[3] ([1]東京家政学院大、[2]産業医大、[3]産総研・健康工学)

○ Kazuhiro NARA[1], Masanori HORIE[2,3], Mizuki TAKASHIMA[3], Etsuo NIKI[3], Yasukazu YOSHIDA[3], Yoshihisa HAGIHARA[3] ([1]Tokyo Kasei-gakuin Univ., [2]Occupational and Environmental Health Univ., [3]AIST)

【目的】アピオス（*Apios americana* Medik）は、地下茎に小さな芋を数珠状につけるマメ科植物である。アピオスがマメ科植物であることから、様々な生理活性の報告があるイソフラボン類に注目し、検索したところ、主要なイソフラボンとして、ダイズにも含まれない Genistein-7-O-genitiobioside が見出された。イソフラボンの摂取は、日常の食生活では、大豆およびその加工品以外からは難しいとされることから、新たなイソフラボンの摂取源としてアピオスが利用できる可能性が示唆された。しかしながら、新規に見出されたイソフラボン類をはじめとして、アピオスの機能性については十分な検討が行われていない。そこで本研究では、アピオスイソフラボン類における生理活性の評価を行うこととした。

【方法】アピオスを 80%メタノールにて抽出しアルコール可溶性画分を得た。アルコール可溶性画分をダイヤイオン HP-20 カラムに供し、アルコール濃度を段階的に上昇させることで吸着物を溶出させた。イソフラボン類を含む画分をアピオスイソフラボン画分として回収し、生理活性の評価を行った。さらに、市販の大豆イソフラボン混合物（アグリコン）を用いて、アピオスイソフラボン画分との差異についても比較した。

【結果および考察】アピオスのアルコール可溶性画分をダイヤイオン HP-20 に供したところ、40%メタノールにてイソフラボン類が溶出された。アピオスイソフラボン画分の組成について HPLC によって解析したところ、乾燥粉末 100 mgには、Genistein-7-O-genitiobioside が 37.5mg 含まれていることが確認された。

アピオスイソフラボン画分におけるエストロゲン様活性について検討したところ、大豆イソフラボン混合物におけるエストロゲン受容体 (ER) αおよび ERβへの結合率をそれぞれ 100%とした場合、アピオスイソフラボン画分では約 77%および 87%と非常に高い結合能を示した。また、ヒト乳がん由来 MCF-7 細胞を用いて、細胞に対するイソフラボン類の影響について調査したところ、アピオスイソフラボン画分および大豆イソフラボン混合物ともに 100μg/ml の濃度で、抗酸化作用に機能するヘムオキシゲナーゼ-1 の発現上昇が認められた。さらに、アピオスイソフラボン画分の投与により、細胞に対する酸化ストレスの負荷が軽減された。

apios, isoflavone, heme oxygenase-1

講演番号：3A15a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ A 校舎 15 会場

バンウコン（*Kaempferia galanga* L.）に含まれる TRPA1 活性化成分

TRPA1 agonists from *Kaempferia galanga* L.

○竹内 俊介[1]、寺田 祐子[2]、増田 秀樹[3]、後藤 洋子[3]、廣岡 沙織[3]、西村 修[3]、渡辺 達夫[1]([1]静県大食栄、[2]静県大院薬食、[3]小川香料（株）健康素材研)
○Shunsuke TAKEUCHI[1], Yuko TERADA[2], Hideki MASUDA[3], Yoko GOTOU[3], Saori HIROOKA[3], Osamu NISHIMURA[3], Tatsuo Watanabe[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Univ. Shizuoka, [3]Ogawa & Co., Ltd.)

【背景・目的】

TRPA1・TRPV1 の活性化はエネルギー代謝を亢進させる。よってこれらを活性化させる成分の摂取は消費エネルギーの増大に有効と考えられる。一方、バンウコン（*Kaempferia galanga* L.）はインド原産の植物であり、東南アジアでは料理のハーブとして重要な役割を担っている。インドネシアではバンウコンの根が体を温める目的で使用されている。そこでバンウコン中の TRPA1・TRPV1 の活性化成分を探索した。

【方法】

TRPA1・TRPV1 活性の測定

TRPA1 または TRPV1 を発現した HEK293 細胞を用いた。細胞に蛍光色素 Fluo-4 を取り込ませ、サンプル投与時の細胞内 Ca^{2+}濃度の変化を FLEXstation™ II で測定し、活性とした。

活性成分の同定

バンウコンの根の 50%アルコール抽出液を凍結乾燥させ、機器分析にて活性成分を同定した。

【結果】

バンウコンの根の抽出物の TRPA1・TRPV1 活性を測定したところ、TRPA1 活性がみられた。TRPV1 活性はなかった。バンウコン抽出物の主成分と報告されている Ethyl 4-MethoxyCinnamate（EMC）、Ethyl Cinnamate（EC）の活性を測定した結果、どちらもともに TRPA1 活性をもつことが判明した（EC_{50} は EMC 21.65 uM、EC 59.79 uM）。バンウコン抽出物を HPLC 分析した結果、主成分は EMC であり、含量は 24%であった。EC は含まれていなかった。^{13}C NMR 分析により、主成分は EMC であることが確認された。EMC の含量から算出したバンウコン抽出物の EC_{50} は 11.95 uM であり、EMC 単体の EC_{50} と近い値を示し、活性は EMC によるものであることがわかった。つまり、バンウコンは TRPA1 活性成分を含み、その成分は Ethyl 4-MethoxyCinnamate であることが判明した。

TRPA1 agonist, *Kaempferia galanga* L., calcium imaging

講演番号：3A15a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ A 校舎 15 会場

国内流通クローブ(*Syzygium aromaticum*)に含有される CYP3A4 阻害活性物質

Effective cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) inhibitors isolated from clove (*Syzygium aromaticum*) purchased from a Japanese market.

○牧内 麻緒、平山 遥子、柵木 美沙、三橋 可歩、高佐 幸郎、横井 大、飯田 恭兵、菅谷 紘一、小野瀬 淳一、阿部 尚樹（東農大・応生科・栄養）
○Mao Makiuchi, Youko Hirayama, Misa Masegi, Kaho Mitsuhashi, Yukio Takasa, Dai Yokoi, Kyo-hei Iida, Kouichi Sugaya, Jun-ichi Onose, Naoki Abe (Dept. of Nutr. Sci. , Faculty of Applied Bio. , Tokyo Univ. of Agri.)

【目的】

近年、疾病の予防・治療や健康の維持・増進を目的として、様々な機能性を有する食品が利用されるようになるとともに、医薬品と同時に摂取する機会も増えることが予想される。それに伴いこれら食品と医薬品との相互作用が懸念されるが、ハーブを含め様々な食品素材と医薬品の相互作用に関する報告は、医薬品同士の相互作用についての報告に比べ少ないのが現状である。そこで、8 種類の食用ハーブに対し薬物代謝の主要酵素であるシトクロム P450（CYP）3A4 阻害活性を指標にスクリーニングした結果、市販されているフトモモ科フトモモ属クローブ（*Syzygium aromaticum*）に強い CYP3A4 阻害活性が認められた。クローブは香辛料として肉料理やカレーに用いられるほか、殺菌作用、鎮痛作用を有していて歯の治療など薬用としても用いられている。そこで本研究では、国内で流通しているクローブに含有される CYP3A4 阻害活性物質を明らかにし､その活性を評価することを目的とした。

【方法・結果】

CYP3A4 阻害活性試験は、CYP3A4 による testosterone の 6β位水酸化反応を利用して、基質代謝物である 6β-hydroxytestosterone の生成量を DAD により定量することで評価した。市販乾燥クローブ(100 g）を 80%含水アセトンで抽出し、その抽出物を pH3.0 に調整後、溶媒分画により中・酸性画分を得た。クローブ中・酸性画分の CYP3A4 に対する阻害活性試験において、IC_{50} 値 25.0±2.4 μg/mL を示したことから、中・酸性画分を Sephadex LH-20 やシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画後、分取用 TLC を用いて活性物質の精製を行った結果、化合物 **1**（2.5 mg）及び **2**（16.7 mg）を単離した。単離したそれぞれの化合物の ^{1}H-並びに ^{13}C-NMR スペクトルなどの機器分析データを詳細に解析することにより化学構造の検討を行った結果、文献記載のデータとの比較から化合物 **1** を bancroftinone、化合物 **2** を eugenol とそれぞれ同定した。これら物質の CYP3A4 阻害活性を調べたところ弱いながらも阻害傾向が認められた。現在、詳細な活性評価とともにさらなる活性物質の探索を行っている。

clove, cytochrome P450, 6β-hydroxytestosterone

講演番号：3A15a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ A 校舎 15 会場

リファンピシン処理 HepG2 における CYP3A4 mRNA 誘導に対するローズマリー（Rosmarinus officinalis L.）の抽出物の効果

Effects of Extracts of Rosemarinus officinalis L. on Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) mRNA Induced by Rifampicin in HepG2 cells

○常岡 美紀、尾形 ひとみ、佐古 いづみ、永松 朋子、元田 智子、菅谷 紘一、小野瀬 淳一、阿部 尚樹（東農大・応生科・栄養）
○ Miki Tsuneoka,Hitomi Ogata,Izumi Sako,Tomoko Nagamatsu,Tomoko Motoda,Kouichi Sugaya,Jun-ichi Onose,Naoki Abe (Dept. of Nutr. Sci., Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo Univ. of Agri.)

【目的】香辛料として広く用いられているシソ科マンネンロウ属ローズマリーには、抗酸化作用、抗菌活性、アルツハイマー患者の症状の改善作用等の報告がある。我々は、種々の生理活性を示すローズマリーが薬物代謝の主要酵素の一つであるシトクロム P450 (CYP)、特に CYP3A4 の誘導に対しても影響を及ぼすと考え、リファンピシン処理 HepG2 細胞を用いて検討を行った。
【方法・結果】ローズマリー抽出物の CYP3A4 mRNA 誘導に対する影響を検討するため、ローズマリー乾燥葉（200 g）を 80%含水アセトン 2.0 L で抽出し、その抽出物を pH3.0 に調整後、溶媒分画することにより得られた中・酸性画分（19.87 g）を用いて検討を行った。ローズマリーの中・酸性画分の細胞実験における濃度は MTT アッセイより 10 μg/mL で実験を行うこととした。リファンピシン処理 HepG2 細胞にローズマリー中･酸性画分を添加し 0 および 3 時間経過後に､RNA 抽出を行い、リアルタイム PCR に供した。その結果、ローズマリー中・酸性画分の添加により CYP3A4 mRNA の発現を減少させる傾向が認められた。そこでローズマリー中・酸性画分に含有される活性物質を明らかにするため、中・酸性画分を Sephadex LH-20 およびシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いることにより分画後、主要含有成分を分取 HPLC により単離した。NMR 等の機器分析による解析からカルノシン酸と同定した。単離したカルノシン酸を活性試験に供したところ、予想に反しカルノシン酸は、むしろ CYP3A4 mRNA の誘導を増進させることが示唆された。この結果より、ローズマリー中･酸性画分中の CYP3A4 mRNA 誘導阻害活性物質は､他の物質であると考えらえたことから、現在、CYP3A4 mRNA 誘導阻害活性物質の探索を行っている。

Rosemary, Cytochrome P450 3A4, HepG2

講演番号：3A15a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ A 校舎 15 会場

タウリンによる TXNIP 発現制御に関する研究
The study on the regulation of TXNIP expression by taurine
○権藤 祐輔[1]、薩 秀夫[1]、朴 聖俊[2]、若林 俊一[2]、中井 謙太[2]、清水 誠[1] ([1]東大院・農生科、[2]東大・医科研)
○ Yusuke GONDO[1], Hideo SATSU[1], Sung-Joon PARK[2], Shunichi WAKABAYASHI[2], Kenta NAKAI[2], Makoto SHIMIZU[1] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]Ins. of Med. Sci., Univ. of Tokyo)

【目的】遊離アミノ酸の1つであるタウリンは、各組織において抗酸化作用・抗炎症作用・浸透圧調節作用といった多彩な生理作用が知られているものの、その詳細な分子レベルでの作用機序についてはほとんど明らかとなっていない。演者らはこれまでヒト結腸ガン由来Caco-2細胞においてタウリンがthioredoxin interacting protein (TXNIP) のmRNA発現量を顕著に誘導し、さらに転写活性レベルにおいても亢進することを見出した。さらに、タウリンによるTXNIP転写活性の誘導にはTXNIPプロモーター配列中の+143 / +256領域が重要である可能性を報告してきた。本研究では、タウリンによるTXNIP mRNA発現亢進機構の解析として、TXNIPプロモーター領域中におけるタウリン応答配列の同定およびmRNA発現亢進に関わるシグナル伝達経路の解明を主な目的として研究を進めた。
【方法】TXNIPプロモーター中のタウリン応答配列を同定するために、+143 / +256領域をさらに3つに分割した配列をそれぞれ含むレポーターベクターを構築した。そのベクターをCaco-2細胞にトランスフェクションした後、タウリンを添加し24時間後にルシフェラーゼアッセイをおこない転写活性を調べた。またCaco-2細胞に各種シグナル伝達阻害剤を含んだ培地で3時間インキュベートし、その後タウリンとシグナル伝達阻害剤を添加して48時間培養した。その後RNAを回収し、リアルタイムRT-PCRを用いてTXNIP mRNA発現量を検討した。さらに阻害がみられたシグナル伝達経路について、タウリンによってその経路が活性化されているかについてwestern blot法により確認した。
【結果】タウリンが TXNIP プロモーター部分配列を含むレポーターベクターに及ぼす影響を検討したところ、+162 / +218 の領域を含むレポーターベクターでルシフェラーゼ活性の増加が認められ、他の 2 つの領域を含む配列では認められなかった。これよりタウリンによる TXNIP の転写活性亢進には、TXNIP プロモーター領域中の+162 / +218 が重要であることが示唆された。一方で、タウリンによる TXNIP mRNA の誘導に対する各種シグナル阻害剤の影響を調べた結果、ERK-MAPK シグナル伝達経路の阻害剤である PD98059 添加によってタウリンによる TXNIPmRNA 発現亢進は抑制された。さらにタウリンによって ERK1/2 の活性化が確認され、タウリンは ERK-MAPK 経路を介して TXNIP mRNA を誘導することが明らかとなった。並行して、タウリンが TXNIP の発現を誘導することで Caco-2 細胞に与える影響として、ATP 産生について検討をおこなった。その結果、タウリン添加により Caco-2 細胞内 ATP 量の増加がみられ、タウリンは Caco-2 細胞においてエネルギー代謝に関与することが示唆された。

taurine, TXNIP, Caco-2

講演番号：3A15a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ A 校舎 15 会場

畜産草地研究所保有乳酸菌を用いた発酵乳の官能評価

Sensory evaluation of fermented milk made by lactic acid bacteria of National Institute of Livestock and Grassland Science.

○吉村 望[1]、佐々木 啓介[2]、萩 達朗[2]、橘内 克弘[2]、成田 卓美[2]、田川 佳男[3]、斉木 理彩[4]、田島 淳史[1]、野村 将[2] ([1]筑波大院生命環境、[2]農研機構・畜産草地研、[3]鳥取県農林総合研、[4]筑波大学)
○NOZOMI YOSHIMURA[1], KEISUKE SASAKI[2], TATSURO HAGI[2], KATSUHIRO KITSUNAI[2], TAKUMI NARITA[2], YOSHIO TAGAWA[3], RISA SAIKI[4], ATSUSHI TAJIMA[1], MASARU NOMURA[2] ([1]Tsukuba Univ., [2]NILGS, [3]Livestock Research Center (pigs and poultry) of Tottori, [4]Tsukuba Univ.)

【目的】私たちは特徴ある乳製品の開発を目指し、これまでに乳酸菌 23 株の乳発酵特性および機能性について明らかにしてきた。今回は、6 株の乳酸菌で製造した発酵乳について、官能評価を用いて味、香り、食感の特徴を明らかにした
【方法】乳製品由来の *Streptococcus thermophilus* AY、9Y、510 株、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SY、B-5b 株、*Lb. helveticus* B-1 株を用い、AY 株と SY 株の混合(AY+SY)、9Y 株と SY 株の混合(9Y+SY)、510 株と B-5b 株の混合(510+B-5b)、および B-1 株(B-1)をスターターとして発酵乳を製造した。原料乳には、茨城県つくば市および北海道で生産された牛乳を使用し、63℃・30 分殺菌処理後、スターター1%を接種し、37℃で 24 時間発酵した。発酵後、ショ糖 7%を添加しホモジナイザーで均質化後、4℃に冷却して官能評価に供した。官能評価パネルは、味覚、嗅覚等に関するテストで選抜され、官能評価の訓練を受けた 17 名を分析型パネルとして用いた。
【結果】実験１：つくば産牛乳により製造した発酵乳 4 種の識別性を、AY+SY をコントロールとして 3 点識別法により評価した。510+B-5b および B-1 はコントロールに対して有意に識別され、これらは「食べてわかる違い」があることが明らかになった。しかし、9Y+SY は識別されなかった。実験２：原料乳の「食べてわかる違い」が発酵乳でも識別されるかどうかを 3 点識別法により評価した。試験に用いたつくば産牛乳と北海道産牛乳は有意に識別された。つくば産牛乳で製造した発酵乳および北海道産牛乳で製造した発酵乳は、試験した 3 種のスターター（9Y+SY、510+B-5b、および B-1）いずれにおいても有意に識別された。これより「飲んでわかる違い」がある牛乳は、発酵乳に加工しても「食べてわかる違い」があることが示唆された。実験３：実験２の発酵乳について、味・香り・食感に関する各 7 語、合計 21 語の用語から当てはまるものを選ばせ、コレスポンデンス分析により識別される特徴を解析した。つくば産牛乳を用いて製造した発酵乳は、AY+SY:「とろみがある」「味が濃い」「しゅわしゅわした食感」510+B-5b:「甘味が強い」「甘い香り」「もそもそした食感」B-1:「草の香り」「苦味が強い」「酸味が強い」と特徴づけられた。また、北海道産牛乳の発酵乳は、AY+SY:「酸味が強い」「なめらかな食感」「ヨーグルトの香り」510+B-5b:「あぶらの香り」「チーズの香り」「粉っぽい食感」B-1:「さらりとした食感」「乳の香り」「獣の香り」と特徴づけられた。なお、本研究は、農林水産省委託プロジェクト「国産飼料」によって行われた。

fermented milk, sensory evaluation

講演番号：3A15a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ A 校舎 15 会場

アルカリ水の口腔内油脂に及ぼす影響

Influences of alkali ion water on oil sensations in mouth

○佐藤 愛[1]、金子 裕司[2]、形山 幹生[2]、小西 豊[1]([1]キリン（株）飲料技術研究所、[2]キリン（株）健康技術研究所)
○ Ai SATO[1], YUJI KANEKO[2], MIKIO KATAYAMA[2], YUTAKA KONISHI[1] ([1]Research Laboratories for Beverage Technologies, Kirin Company Limited, [2]Research Laboratories for Health Science & Food Technologies, Kirin Company Limited)

【目的】　アルカリ性電解水（以下、アルカリ水）に関して、炊飯特性などの調理効果、腹部愁訴や腸内環境改善などの生理効果などが報告されている。本研究では、欧米型食生活の普及により摂取量が増加している油脂に着目し、油脂を多く使用する食事を摂取した時のアルカリ水の効果について、「油脂との相互作用」および「官能評価による口腔内のさっぱり感」を検討した。
【方法】　22 歳－53 歳の健康な日本人男女 11 名（男性 5 名、女性 6 名）を被験者として、油脂を多く含むマヨネーズを用いて、口腔内の油脂残存強度を評価して「さっぱり感」を検証した。試験飲料には市販の容器詰めアルカリ水（pH8.8-9.4）を、対象飲料には市販の容器詰め天然水（軟水、pH 約 7）を用いた。

まず、食事中の口腔内を再現するために、マヨネーズと試験飲料を続けて摂取させた。その後、再びマヨネーズと試験飲料を続けて摂取させ、試験飲料飲用前後における舌上の油脂残存感の感覚強度を VAS（100 ㎜）により測定した。

口腔内の油脂とアルカリイオン水との相互作用を検証するためにマヨネーズと水を混合し、油水界面の経時変化を測定した。マヨネーズ 3g とアルカリ水または天然水 27g を混合し、1 分間ボルテックスした後に静置し、10 分おきに試験容器底面からの油水界面の浮上距離を測定した。更に、上記混合液の乳化状態を共焦点顕微鏡を用いて観察した。
【結果と考察】飲用前後でのアルカリ水群の油脂残存感低減率は 48.3%、天然水群の 38.5%に比べて有意に高く、アルカリ水の油脂洗い流し効果は天然水よりも 25%高い事が示された。
また *in vitro* 乳化試験の結果から、天然水に比べアルカリ水では油水の分離が有意に抑制されており、乳化状態を長く維持する事が示唆された。天然水では油滴が凝集しているが、アルカリ水では油滴が分散しており、アルカリ水の乳化維持に寄与していると推察された。
以上より、アルカリ水は、油滴の分散・乳化を維持する事によって、物理的な洗い流しによる天然水よりも、口腔内の油脂を低減し「さっぱり感」を上昇したと推察された。日々の食事の際に、口腔内を「さっぱり」・「すっきり」させる、アルカリ水の新たな効果として期待したい。

alkali ion water, natural water, oil sensations in mouth

講演番号：3A15a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ A 校舎 15 会場

シンナムアルデヒドの歯科疾患抑制作用

Inhibitory effect of cinnam aldehyde on dental disease

○伊藤 央貴、湊 健一郎、小原 章裕（名城大院農）
○Oki ITO,Kenichirou MINATO,Akihiro OHARA (Meijo Univ.)

【目的】

シナモンの主な香気成分であり，う蝕原因細菌 *Streptococcus mutans* に対して抗菌作用を示すシンナムアルデヒドを用いて，歯科疾患に対する抑制作用を検討した。

【方法】

シンナムアルデヒドの抗う蝕作用について検討するため，*S. mutans* の生育，歯への菌体付着，不溶性グルカン合成，バイオフィルム形成，有機酸産生に対するシンナムアルデヒドの抑制作用を調べた。*S. mutans* の生育に対する抑制作用は比濁法により調べた。歯への菌体付着に対する抑制作用は，ハイドロキシアパタイト（HA）ビーズへの付着菌数の測定と，付着の主な因子である菌体疎水性の測定により調べた。不溶性グルカン合成に対する抑制作用は，合成酵素であるグルコシルトランスフェラーゼを電気泳動し，合成されたグルカンを PAS 染色で検出した。バイオフィルム形成に対する抑制作用は，バイオフィルムをクリスタルバイオレットで染色し，吸光度測定により調べた。有機酸産生に対する抑制作用は培養液の pH 測定と，HPLC を用いた有機酸の定量により調べた。

【結果】

シンナムアルデヒド（0.3mM≦）は *S. mutans* の生育に対して抑制作用を示し，最低生育阻止濃度（MIC）は 2.5mM だった。しかし，MIC 未満の濃度では，時間経過に伴って *S. mutans* の生育が確認された。また，シンナムアルデヒド（1.3mM）はバイオフィルムの形成に対して抑制した。さらに，シンナムアルデヒド（1.3mM）は *S. mutans* による培養液の pH 低下を抑制し，コントロールと比較して培養液中の乳酸と酢酸が減少した。一方で，歯への菌体付着に対する阻害作用については，HA ビーズへの付着菌数が減少せず，菌体疎水性も低下しなかったため，シンナムアルデヒドは歯への菌体付着を阻害しないと考えられた。また，シンナムアルデヒドは不溶性グルカン合成を抑制しない傾向がみられた。以上の結果から，シンナムアルデヒドは *S. mutans* によるバイオフィルム形成と有機酸産生に対して抑制作用を示し，その要因として *S. mutans* に対する生育抑制作用が考えられた。

cinnam aldehyde, *Streptococcus mutans*, dental caries

講演番号：3A15a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ A 校舎 15 会場

LC-Orbitrap MS によるトウモロコシ中のかび毒配糖体（マスクドマイコトキシン）の検出（第 2 報）
Detection of mycotoxin glucosides (masked mycotoxins) in corn by LC-Orbitrap MS (2nd report)
○中川 博之[1]、坂本 茂[2]、佐合 由紀[1]、長嶋 等[1] ([1](独)農研機構・食総研、[2](株)サーモフィッシャーサイエンティフィック)
○Hiroyuki NAKAGAWA[1], Shigeru SAKAMOTO[2], Yuki SAGO[1], Hitoshi NAGASHIMA[1] ([1]NARO National Food Research Institute, [2]Thermo Fisher Scientific)

【目的】かび毒（マイコトキシン）は一部の糸状菌が産生する二次代謝産物であるが、各種の農作物においてその汚染がしばしば問題になっている。近年、かび毒にグルコースが付加したかび毒配糖体（マスクドマイコトキシン）の存在が穀類等において報告されている [1)]。これらの配糖体は加水分解によって元のかび毒を遊離する可能性があることから、新たなかび毒潜在リスクとして注目されている。演者らはこれまでに、かび毒汚染を受けたトウモロコシ試料においてトリコテセン系かび毒（T-2 トキシン、HT-2 トキシン）由来の配糖体が存在することを報告している [2)]。今回、同試料において新たなマスクドマイコトキシンを検出したので報告する。

【方法】かび毒による汚染を受けたトウモロコシ粉末試料にアセトニトリル/水混合液（80/20, v/v）と酢酸を添加して抽出を行った後、遠心分離を行った。得られた上清の一部を採取し窒素ガス気流下で乾燥し、アセトニトリル/水/酢酸混合液（5/94/1, v/v/v）に再溶解した。この試料について高分解能液体クロマトグラフ-質量分析装置（LC-Orbitrap MS）を用いて分析を行った。イオン化には electrospray ion source（ESI）を使用し、正および負イオン化条件による分析を行った。LCにおける移動相は酢酸および酢酸アンモニウムを添加した水/アセトニトリル混合溶液を用い、C18逆相分離カラムを用いたアセトニトリル直線濃度勾配により溶出を行った。

【結果】設定分解能10万の full MS scanモード（外部標準法）にて得られたMSクロマトグラムについて、精密質量によるスクリーニングを行ったところ、新規マスクドマイコトキシンと思われるピークが検出された。そこで、collision energy 付加条件下で得られるフラグメントイオンの情報に基いて構造推定を行った。MSクロマトグラム上に糖が付加していないかび毒由来のピークも検出されたため、試薬標品による同定を行い、これらのピークの保持時間の比較から、糖（グルコース）が付加することによって極性が増していることが示唆された。

1) 中川博之, 農研機構食品総合研究所研究ニュース, 28, 4-7 (2012)
2) Nakagawa H et al., World Mycotoxin Journal, 5, 271-280 (2012)

masked mycotoxin, LC-Orbitrap MS, corn

講演番号：3A15a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ A 校舎 15 会場

蛍光色素 FITC 修飾タンパク質に対する抗体の作製とその応用

Preparation and application of antibodies against FITC modified protein

○松本 亮[1]、礒見 みづき[1]、中村 宜督[2]、北元 憲利[1]、加藤 陽二[1]([1]兵庫県大院環境人間、[2]岡山大院環境生命)
○Ryo MATSUMOTO[1], Mizuki ISOMI[1], Yoshimasa NAKAMURA[2], Noritoshi KITAMOTO[1], Yoji KATO[1] ([1]Univ of Hyogo., [2]Okayama Univ.)

【目的及び背景】蛍光色素フルオレセインにイソチオシアネート官能基を結合させた FITC（Fluorescein Isothiocyanate）は、生体分子の蛍光標識などに広く用いられている。また蛍光標識した抗原物質に対して、抗蛍光物質抗体を用いることで、抗原に対する検出感度が上がることが知られている。本研究ではイソチオシアネートの機能性を探るツールとして FITC 修飾タンパク質に対するモノクローナル抗体を作製して特異性解析を行った。また得られた抗体を用いて FITC のタンパク質との反応性を免疫化学的に検討した。
【実験方法】FITC 修飾 Keyhole limpet hemocyanin を免疫源としてマウスに免疫し、マウス脾臓細胞とミエローマ細胞の細胞融合を行った。FITC 修飾ウシ血清アルブミンに対する反応性を指標にハイブリドーマを選択して、最終的に２種の抗体産出株（2B2, 2B12）を得た。特異性解析には競争 ELISA やスロットブロットを用いた。FITC の反応性解析については、FITC とタンパク質を中性条件化で保温し、付加体を蛍光及び抗体を用いて検出した。
【結果】ハイブリドーマを増殖させた無血清培地から抗体を精製する過程で、抗体が培地中の色素と結合することを見出した。用いた無血清培地は pH 指示薬であるフェノールレッドを含有していることから、このフェノールレッドと抗体が結合していることが考えられた。このため、マウスにハイブリドーマを注射し、腹水から抗体を調製・精製した。得られた精製抗体を用いてフルオレセイン、フェノールレッドとの交差性を検討した。抗体は低濃度のフェノールレッドを認識しなかったが、高濃度領域において交差性を示した。さらにスロットブロット法を用いてフェノールレッドと抗体との反応性を検証した。あらかじめ PVDF 膜に抗体をブロットし、フェノールレッドを含む緩衝液や培地とインキュベートしたところ、ブロット部位がフェノールレッドの赤色で特異的に染色されたため、抗体を培養細胞に用いる際には特異性の検証が必要であることがわかった。FITC とタンパク質との反応を検討したところ、フルオレセインに由来する蛍光を追跡することで付加体生成が簡便に検出された。更に抗体の使用により同等以上の感度で検出が可能となり、将来的には免疫沈降法などへの応用が可能となる。現在、抗体を用いて更なる検出感度増加の検討を行っている。

Fluorescein isothiocyanate

講演番号：3A15a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ A 校舎 15 会場

色素添加によるプルランフィルムの安定性
Stability of pullulan films with Perilla herb extract.
○河村 沙也加[1]、内野 昌孝[2]、廣澤 竜太郎[3]、赤地 利幸[3]、高野 克己[2]([1]東京農大院・農化、[2]東京農大応生・化学、[3]大和製罐(株)・総研)
○Sayaka KAWAMURA[1], masataka UCHINO[2], Ryotaro HIROSAWA[3], Toshiyuki AKACHI[3], Katsumi TAKANO[2] ([1]Agrichem., Agr., Grad. Sch., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Biosci., Tokyo. Univ. Agr., [3]Daiwa Can. Co. Cent. Lab.)

【目的】
近年、食品包材の環境負荷への懸念から、生分解性・可食性フィルムへの関心が高まっている。その一つとしてプルランフィルムが挙げられる。プルランは 3 個のグルコースがα-1,4 結合したマルトトリオースがα-1,6 結合で繋がった構造を持つホモ多糖であり、プルランフィルムはプルランを主成分とした無味無臭、透明な可食性フィルムである。易水溶性で、ガスバリヤー性が高いことなどが知られている。また、着色性に優れているため可食性インクを利用した食品への印刷、装飾にも利用されており、今後さらなる応用が期待される。しかし、フィルム自体の基礎物性の報告はあるものの、色素等を添加した際の物性の変化についての報告は数少ない。そこで本研究ではプルランフィルムの応用の為、色素を添加した際の色の安定性および物性の変化について調べることを目的とした。
赤を含む暖色系の色には食欲増進効果があることが知られていることから、本研究では赤色色素として赤シソ抽出物を選択した。また、赤シソにはアントシアニンやロスマリン酸などのポリフェノールが含まれており、抗酸化作用や抗炎症作用などの機能性がフィルムに付与されることが期待される。
【方法】
プルランフィルムに赤シソ抽出物を 1%添加し、赤色プルランフィルムを作成した。作成したフィルムを、湿度 40%、温度 60～80℃および温度 25℃、湿度 50～70%に保った恒温恒湿器(IG420、ヤマト科学社製)内でそれぞれ 1 時間保存し、温度および湿度に対する安定性の確認を行った。また、作成したフィルムの色調を分光色差計(CM-5, コニカミノルタ社製)により測定した。また、フィルムに UV を照射後、色調を測定し、赤色プルランフィルムの色の安定性を確認した。
【結果】
プルランフィルムに赤シソエキスを添加してフィルムを添加した結果、無添加のプルランフィルムと比べ、大きな外観上の変化は観察されなかった。また、保存温度による大きな変化はみられなかったが、吸湿による軟化がみられた。
UV 照射後のフィルムでは、照射前と比べ L^*値の上昇と a^*の低下が確認され、UV により若干の退色が確認された。

edible films, pullulan, stability

講演番号：3A15a15
講演日時、会場：3 月 26 日 11:48～ A 校舎 15 会場

ポリフェノールーカフェイン複合体の形成を介した紅茶クリームダウンの分子機構解析

Characterization of molecular mechanisms for creaming (cream down) through formation of polyphenol-caffine complexes in black tea

○石井 剛志[1]、太田 有香[1]、浅沼 俊倫[2,3]、鈴木 俊美[4]、望月 一男[2]、中山 勉[1]（[1]静岡県大食品栄養、[2]静岡県工技研、[3]静岡県産業振興財団、[4]住友電工（株））
○ Takeshi ISHII[1], Yuka OHTA[1], Toshimichi ASANUMA[2,3], Toshimi SUZUKI[4], Kazuo MOCHIZUKI[2], Tsutomu NAKAYAMA[1] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Ind. Res. Inst. of Shizuoka Pref., [3]Shizuoka Ind. Foundation, [4]Sumitomo Elec. Inds Ltd.)

【目的】紅茶は、冷却することで白く濁ることがある。これは「クリームダウン」とよばれる現象であり、茶やコーヒーに含まれるポリフェノールやカフェインなどが結合し不溶性の複合体（クリーム）を形成することに起因する。クリームダウンは、紅茶の色調を変化させるとともに、味や機能性を変化させるため好ましくない。そのため、一般的な紅茶飲料では、品質の保持・向上を目的として、製造工程でポリフェノールやカフェインが取り除かれている。本研究では、ポリフェノールの含有量を低下させることなくクリームダウンを抑制できる技術の構築を目指して、ポリフェノールーカフェイン複合体の形成を起因とするクリーム形成機構を分子レベルで解明することを目的とした。
【方法】紅茶の熱湯抽出液および紅茶ポリフェノール（カテキン類やテアフラビン類）を試料として用いた。試料のクリームダウンの程度を濁度測定法により評価した。試料の成分変化を近赤外光スペクトル解析により評価した。試料中やクリームに含まれるポリフェノールを液体クロマトグラフィーにより定量した。試料中で生じる分子間相互作用を等温滴定型カロリメトリにより検出した。
【結果】紅茶の熱湯抽出液のクリームダウンは冷却（10℃付近）によって惹起されるが、その開始温度はカフェインの添加濃度に依存して上昇した。紅茶成分はクリームの形成が確認できない温度帯（30～70℃）において温度低下に伴い何らかの変化を示したが、ポリフェノールの量自体は温度が低下しても殆んど変化しなかった。紅茶成分間の相互作用（発熱反応）はクリーム形成の有無に関わらず観測されたが、その際の発熱量は温度低下に依存して増大した。紅茶ポリフェノールを用いて詳細な解析を行ったところ、(1) ガレート型カテキンやガレート型テアフラビンは非ガレート型カテキンや非ガレート型テアフラビンに比べてカフェインと相互作用し易いこと、(2) ガレート型テアフラビンはクリーム形成能が高くクリーム中に移行し易いこと、(3) ガレート型テアフラビンとカフェインの複合体はガレート型カテキンなどを引きつけてクリームを形成できることが示唆された。
【結論】紅茶クリームダウンには、クリームの形成を伴わない初期段階の反応とクリームの形成を伴う後期段階の反応が存在することが明らかになった。ガレート型テアフラビンは温度低下に伴いカフェインと相互作用して可溶性の複合体を形成し、さらにガレート型カテキンなどを引きつけて不溶性の複合体を形成することが予想される。今回明らかになった初期段階の反応をタンナーゼ処理（ガレート部分の酵素的切断）やガレート部分を包接できる食品素材の添加によって抑制することができれば、ポリフェノールを豊富に含みクリームダウンを起こし難い紅茶飲料の開発が期待できる。

black tea, creaming, theaflavins

講演番号：3A15p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ A 校舎 15 会場

アラニン点変異体を用いた味覚修飾タンパク質ネオクリンの甘味受容体相互作用部位の探索
Search of sweet receptor binding site of taste-modifying protein neoculin by alanine using site-specific mutagenesis
○小泉 太一[1]、寺田 透[2]、金田 康平[1]、三坂 巧[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]東大院農生科・アグリバイオ)
○Taichi KOIZUMI[1], Tohru TERADA[2], Kohei KANEDA[1], Takumi MISAKA[1] ([1]The Univ. Tokyo, [2]The Univ. Tokyo)

【目的】ネオクリンはマレーシア産の食用果実クルクリゴより発見された甘味タンパク質で、それ自身が甘味を呈するだけでなく、酸味を甘味に変換する味覚修飾活性を持つ。この性質はpH低下によりタンパク質そのものの甘味が増強するためであるが、そのメカニズムは十分に解明されていない。我々の研究室では、ネオクリン分子がpH低下によって立体構造変化を起こし、甘味受容体を強く活性化するという仮説を提唱している。この仮説を検証するために、NMR法を用いて、pHに依存して立体構造が変化するネオクリンのアミノ酸残基を明らかにした。本研究では、その結果からネオクリンの甘味強度決定に重要な役割を果たしていると予想されたアミノ酸残基を中心に、点変異体解析を行うことにより、甘味強度決定残基およびそれらが集中したタンパク質分子上の特定構造領域を新たに同定することを目指した。
【方法】変異を導入するアミノ酸残基として、pHに依存した主鎖のアミド水素・アミド窒素の化学シフト変化が大きいアミノ酸残基を3つ、この周辺に位置し構造揺らぎのためにシグナルが観測されないアミノ酸残基を4つ、計7つのアミノ酸残基を選抜した。選抜したアミノ酸残基について、Alaに置換したネオクリン点変異体を大腸菌発現系により取得し、その甘味活性を評価した。まずpH7.4およびpH4.0の溶液中で示す甘味強度を官能試験によりそれぞれ評価した。さらにヒト甘味受容体を一過的に発現させた培養細胞系を用いて、pH7.4およびpH6.2の溶液中で示す甘味強度を測定した。
【結果】NMRスペクトル上でpHに依存して立体構造変化すると予想された3つのアミノ酸残基は、Alaに置換しても甘味活性に大きな影響を及ぼさなかった。一方、構造揺らぎが大きい4つのアミノ酸残基のうち2残基のAla置換点変異体は、酸性pHにおいて野生型ネオクリンよりも強い甘味を呈した。これより、これら2つのアミノ酸残基がネオクリンの甘味強度決定に寄与していることが示された。2つのアミノ酸残基はどちらもネオクリン分子表面に存在しており、かつ空間的に近接している。したがって、これら2つのアミノ酸残基を含む構造領域が、甘味受容体との直接相互作用に関与していることが強く示唆された。

sweet, taste-modifying protein, nmr

講演番号：3A15p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ A 校舎 15 会場

システイン変異体を用いた味覚修飾タンパク質ネオクリンの機能解析
Functional characterization of neoculin, a taste-modifying protein using point mutants introducing cysteine residue.
○金田 康平、小泉 太一、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Kohei KANEDA,Taichi Koizumi,Takumi Misaka (Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

【目的】ネオクリンはマレーシア原産の植物であるクルクリゴの果実に含まれるタンパク質である。このタンパク質はそれ自身弱い甘味を持つうえに、一度口に含んだ後、酸を味わうと強い甘味を呈する味覚修飾活性を持つ。ネオクリンは酸性サブユニット(NAS)と塩基性サブユニット(NBS)がジスルフィド結合で架橋されたヘテロダイマーで、大腸菌発現系を用いて活性を有するネオクリンならびにその変異体タンパク質を得ることができる。これまでにNBSの11番目に位置するヒスチジン残基への変異導入が行われた。これらの変異導入はpHに依存した甘味活性の変化には影響を与えたが、甘味活性そのものが失われることはなかった。

この過程でNBSの11番目に位置するヒスチジンをシステインに置換した点変異体NAS＋NBS(H11C)を作製した。この大腸菌発現系を用いたネオクリンの発現精製の過程でグルタチオンを用いたリフォールディングを行っていることから、精製した点変異体NAS＋NBS(H11C)にSH基を介してグルタチオンが導入されてしまっていることが抗グルタチオン抗体を用いたウェスタンブロッティングにより示された。このグルタチオンを解離させることで、SH基を介した蛍光物質や巨大分子などの化学修飾が可能になると考え、精製した点変異体からグルタチオンを解離させる条件の検討を行った。
【方法・結果】まず精製したNAS+NBS(H11C)を用いてグルタチオンを還元反応により解離させるための条件検討を行った。10 mM DTTを反応させるとネオクリンが本来持つジスルフィド結合を切断せずにグルタチオンの90%以上を解離可能であることを、定量ウェスタンブロッティングで確認した。またCDスペクトル測定により、DTT反応は変異体の二次構造に大きな影響を与えないことが判明した。このことからDTT反応は構造変化による活性への影響は無いことが示唆された。

一方、以上の知見をもとに様々な残基をシステイン残基に置換したネオクリン点変異体の網羅的な作製を行った。ネオクリンの分子表面に存在する14種類の残基を選択し、システインに置換した点変異体を大腸菌発現系により順次作製している。得られた点変異体を活用して分子表面上の様々な部位に修飾を施すことにより、甘味活性および味覚修飾活性に関する構造的な知見を得ることが期待される。

neoculin, taste-modifying, cysteine

講演番号：3A15p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ A 校舎 15 会場

LC-MS/MS を用いた揮発性アルデヒドータンパク質付加体の高感度検出

Highly sensitive detection of volatile aldehyde-protein adducts using LC-MS/MS

平野 啓太、○清水 和真、柴田 貴広、河合 慶親、内田 浩二（名大院生命農）
Keita Hirano, ○ Kazuma Shimizu,Takahiro Shibata,Yoshichika Kawai,Koji Uchida (Nagoya Univ.)

【目的】
酸化ストレス条件下において、リノール酸やアラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸は脂質過酸化反応を介して反応性の高い短鎖揮発性アルデヒド類を生じる。このようなアルデヒド類は、高い親電子性を有しており、タンパク質中の求核性アミノ酸であるヒスチジン残基やリジン残基を修飾して様々な付加体を形成することが知られている。これらアルデヒド付加体は、LDL の酸化により生成することが確認されており、動脈硬化症の発症や進展への関与が示唆されている。本研究では揮発性アルデヒドの中でも最も反応性の高いことが知られるアクロレイン（ACR）および 2-ノネナール（NE）に着目し、タンパク質との反応により生成する付加体について LC-MS/MS を用いた高感度検出法の確立を試みた。
【方法・結果】
いずれのアルデヒドともタンパク質との反応により、リジンおよびヒスチジンの減少が顕著であった。そこでヒスチジンについて、その付加体の LC-MS/MS を用いた検出系の確立を試みることにした。ACR をヒスチジンとリン酸バッファー中 37 ℃で 24 時間反応させ、HPLC 分析を行ったところ、新たに生成するピークが確認された。このピークを分取し、NMR による構造解析を行ったところ、ヒスチジンに対して ACR が 1 分子 Michael 付加したものであった。この付加体を水素化ホウ素ナトリウムにより還元した後に酸加水分解を行い、付加体の安定性を LC-MS/MS を用いて検討した。その結果、この付加体は酸加水分解に対して安定であることが確認された。さらに検出限界がおよそ 50 fmol であったことから、タンパク質中から付加体を高感度に検出することが可能であると示唆された。そこでこの方法を用いて、酸化 LDL 中の ACR-ヒスチジン付加体の検出を行うこととした。LDL (0.5 mg/ml) を 5 μM の $CuSO_4$ により PBS 中で酸化させ、得られた酸化 LDL を還元処理および酸加水分解を行った後に、LC-MS/MS 解析に供した。その結果、48 時間酸化した LDL において、ACR-ヒスチジン付加体の有意な生成が認められた。現在 ACR-ヒスチジン付加体について、安定同位体標識した内部標準物質を作成しており、定量法の確立を試みている。また NE についても、リン酸バッファー中でヒスチジンと反応させ HPLC 分析を行ったところ新たに生成するピークが確認されたことから、構造解析を行うとともに定量法の確立を目指している。

oxidazed LDL, LC-MS/MS

講演番号：3A15p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ A 校舎 15 会場

麦茶の焙煎に伴う香気成分の変化
Changes in flavor components of roast barley by roasting conditions
○神山 紀子[1]、金子 成延[1]、青木 恵美子[1]、吉岡 藤治[2]、平 将人[1]、柳澤 貴司[1]、一ノ瀬 靖則[1]、小前 幸三[1] ([1]農研機構作物研、[2]農研機構近中四農研)
○Noriko Kohyama[1], Shigenobu Kaneko[1], Emiko Aoki[1], Toji Yoshioka[2], Masato Taira[1], Takashi Yanagisawa[1], Yasunori Ichinose[1], Kozo Komae[1] ([1]NARO NICS, [2]NARO WARC)

【目的】麦茶は大麦加工品の 1 つであり、その香りは品質を左右する重要な要素である。これまでに原料大麦の違いや焙煎条件の違いが麦茶の香りに影響することが知られており、麦茶の香気成分として多くの化合物が報告されているが、どのような香気成分が香りの違いに影響するのかは明らかにされていない。本研究では、麦茶の焙煎条件の違いによる香気成分の変化を明らかにするため、2 品種の大麦を原料とし、焙煎度の異なる麦茶の香気成分の差異を調べた。
【方法】H23 年栃木県産のビューファイバー（BF）と H23 年茨城県産カシマムギ（KS）の玄麦を原料として用いた。麦茶の焙煎はコーヒー焙煎器を用い、1 回に 50g の玄麦を一定の出力（300W、200W または 180W）で攪拌しながら時間を変えて加熱し、焙煎中の品温を記録した。焙煎後の麦茶粒の明度（L^*値）を分光測色計で測定した。麦茶粒の香気成分は、粒 1.0ｇのヘッドスペースガスを SPME ファイバー（DVB/CAR/PDMS）で 60℃、30 分間抽出し、GC-MS で分析した。マススペクトルおよび RI から同定した 25 成分のピーク面積を TIC により定量し、相関分析ならびに主成分分析を行った。
【結果と考察】BF を出力と時間の異なる 12 種類の焙煎条件で焙煎した結果、各出力ごとに焙煎時間とともに品温が上昇した。GC-MS で得られた 25 成分の含量を主成分分析したところ、主成分 1 は焙煎終了時の品温（163～228℃）と高い相関を示し、焙煎の強さを示すと考えられた。香気成分の中には焙煎終了時の品温が高いほど含量が多い 2-methylfuran、1-(2-furanylmethyl)-1H-pyrrole や、品温 180～200℃で多く含まれる 2-methylbutanal、2,6-dimethylpyrazine 等があり、焙煎条件により組成が変わることが分かった。
BF と KS を 180W で 11、14、17、20、23 分間焙煎したところ、焙煎終了時の品温は BF が 162～233℃、KS が 162～230℃と同様に変化したが、麦茶粒の明度は、BF が著しく低下するのに対し KS では緩やかに低下したことから、麦茶粒の色相と品温の関係は原料の品種により異なることが分かった。麦茶香気成分は、BF では 2-methylfuran、furfural、5-methylfurfural 等が KS よりも顕著に多いのに対し、KS ではピラジン類が焙煎の強さとともに増加し、焙煎の強さに対する香気成分の変化は BF と KS では大きく異なることが分かった。

roast barley, flavor, GCMS

講演番号：3A15p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ A 校舎 15 会場

酵母による醤油の重要香気成分 2-furanmethanethiol の生成

Formation of 2-furanmethanethiol in soy sauce by yeast

○孟 き[1]、畑山 誠[2]、菅原 悦子[3] ([1]岩手大院農、[2]岩手県工業技術センター、[3]岩手大教)
○ QI MENG[1], MAKOTO HATAKEYAMA[2], ETUSKO SUGAWARA[3] ([1]Iwate Univ, [2]Iwate Industrial Research Institute, [3]Iwate Univ)

目的:我々はすでにチオール化合物である 2-furanmethanethiol(2FM)が醤油の香気に重要な役割を果していることを報告した。一方、火入れ前の生揚げ醤油からも 2FM を同定し、醤油発酵熟成中に酵母の関与により 2FM が生成されることをモデル醤油の仕込み実験で確認した。そこで、本研究では醤油のモデル培地を用い、酵母による 2FM 生成への影響要因を検討し、醤油発酵熟成中の 2FM の生成機構の解明を目指した。

方法:醤油中の酵母による 2FM の生成では、前駆物質として furfural と含硫アミノ酸である cysteine、methionine が推定される。そこで、これらを含む醤油のモデル培地を調製し、前培養した醤油酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* 061 を 10^6cells/ml となるように添加した。この培地を 27℃で 4 日間培養し、1,16,24,48,72,96 時間で培養物中の酵母の菌数と 2FM の濃度を測定した。また、前駆物質の furfural と含硫アミノ酸の添加量を三段階に変化させるとともに、培地中の酵母の添加濃度を 10^6 及び 10^7cells/ml に調整し、2FM の生成量と酵母菌数の関係を検討した。得られた酵母培養物から遠心分離で菌体を除き、ジクロロメタンを用いて 2FM を抽出し、香気濃縮物を調製した。香気濃縮物は GC-MS の SIM モードで分析し、2FM を定量した。

結果：furfural と cysteine を添加した培地で酵母を培養したところ、2FM の生成は確認されたが、酵母無添加の培地では確認できなかった。しかし、cysteine の代わりに methionine を添加した培地では、2FM は生成しなかった。この結果から、furfural と cysteine は酵母による 2FM の生合成の有効な前駆物質であることが判明した。また、frufural と cysteine を添加した培地では、酵母培養開始後 48 時間で 2FM の生成量は最大値の約 50μg/L になった。furfural と cysteine の添加量を変化させて 2FM の生成量を比較したところ、cysteine の添加量が 2FM の生成量に強く影響した。従って、2FM の生成において cysteine は furfural より重要な前駆物質であることが判明した。また、酵母菌数の増加量が多いほど、2FM の生成量が多いことより、2FM の生成量は酵母の増殖と関連していると推察された。以上の結果から、醤油発酵熟成中の 2FM 生成は酵母の cysteine 代謝によって生成したチオール基と、麹原料の大豆や小麦の加熱によって生成された furfural との反応によると推測された。

Soy sauce, Yeast, 2-Furanmethanethiol

講演番号：3A15p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ A 校舎 15 会場

ジャバラ（*Citrus jabara* Hort. ex Tanaka）の香気成分

Volatile Components of Jabara (*Citrus jabara* Hort. ex Tanaka)

○富山 賢一、矢口 善博、櫻井 和俊、川上 幸宏（高砂香料工業株式会社 研究開発本部）
○ Kenichi TOMIYAMA,Yoshihiro YAGUCHI,Kazutoshi SAKURAI,Yukihiro KAWAKAMI (Takasago International Corporation)

【目的】ジャバラはユズ、スダチ、カボスの近縁種であり、和歌山県東牟婁郡北山村に自生する香酸柑橘である。ナルニチンなどのフラボノイドを多く含むためアレルギー抑制効果を有することが報告されており、花粉症に効果があるとして注目度が高まってきている。本研究では、ジャバラの香りの構成要素と特徴香気成分を明らかにすることを目的として、果皮と果汁について詳細な香気成分分析を行った。

【方法】試料は 2010 年に北山村で収穫されたジャバラ生果を用いた。果皮と果汁から溶剤抽出後に SAFE (Solvent Assisted Flavor Evaporation) を行って香気抽出物を調製し、GC/MS 分析を行った。次に、香気抽出物を炭化水素画分と含酸素画分(極性画分)に分けた。含酸素画分にジャバラの特徴香気が認められたため、含酸素画分について詳細な成分分析を行った。続いて、AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis) 法により香気貢献成分の探索を行った。更に、香気特性を詳しく把握するため、不斉炭素を有する香気貢献成分について multidimensional GC/MS を用いて光学異性体比の分析を行った。

【結果】ジャバラの果皮の香気抽出物は、僅かにユズ様の芳香を伴ったグリーンかつオイリーで強いメタリック様の香気を保持しており、果汁の香気抽出物はミカン様でカボスに似た酸味を想起させる香りを有していた。果皮と果汁の主要な香気成分は、共に myrcene, limonene, *γ*-terpinene, *β*-phellandrene, *α*-pinene であった。一般的な柑橘類に最も多く含まれる香気成分は limonene であるが、ジャバラのように limonene よりも myrcene が多い品種は珍しく、近縁種であるユズ、スダチ、カボスとは組成比が大きく異なっていた。

続いて、含酸素画分について詳細な分析を行い、果皮と果汁の含酸素成分の組成比が大きく異なることを明らかにした。果皮と果汁から rose oxide が、果汁から mintsulfide が検出されたが、これらの化合物がジャバラから検出された報告例はこれまでに無い。また、果汁から柑橘の香気成分として初めて 1,2-epithiohumulene, 4,5-epithiohumulene, mesifuran, 5-ethyl-4-methoxy-2-methyl-3(2*H*)-furanone, 2-ethyl-4-methoxy-5-methyl-3(2*H*)-furanone, marmelolactone が同定された。AEDA において香気貢献度が高いと判断された linalool と *cis*-rose oxide について光学異性体比の分析を行ったところ、果皮と果汁ともに linalool は(*S*)-体が、果汁中の *cis*-rose oxide は(2*S*,4*R*)-体がリッチであった。以上の分析の結果、ジャバラの果皮と果汁それぞれの香りの構成要素と特徴香気成分を明らかにすることができた。

Jabara (*Citrus jabara* Hort. ex Tanaka), oxygenated compounds, odor-active components

講演番号：3A15p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ A 校舎 15 会場

寒天ゲルの破壊によるフレーバーリリース
flavor release from agar gel by homogenization
○山田 恭正[1]、垣見 奈々美[1]、玉井 愛海[1]、西成 勝好[2]([1]同志社女大・食栄、[2]大阪市大院・生活科学)
○ Yasumasa YAMADA[1], Nanami KAKIMI[1], Manami TAMAI[1], Katsuyoshi NISHINARI[2] ([1]Doshisha Women's Coll. of Lib. Arts, Food Sci. and Nutrition, [2]Osaka City Univ. Grad. School, Human Life Sci.)

【目的】最近、咀嚼・嚥下が困難な高齢者のためにゲル化剤を用いてテクスチャーを調整した介護食や医療食の利用が増加している。このようなゲル状食品は栄養的に優れていることは勿論必要であるが、同時に味や香りなどおいしさに関わる因子も重要である。先に演者らは、エステル類が特徴的な香気成分であるバナナをモデルとしたフレーバー組成比の寒天を密封容器内で破壊し、GCMS でフレーバーリリースについて調べた。その結果、エステルは、炭化水素のみからなるテルペンとは異なる挙動を示すことが示唆された。[1)] そこで、フレーバーの疎水性以外に、分子サイズやエステルの構造などが、破壊された寒天からのリリースに影響を与えるかどうか調べることを目的とした。
【方法】バナナの主要な香気成分であるイソアミルアセテート(isoamyl acetate)、イソアミルイソブチレート(isoamyl isobutylate)、イソアミルバレレート(isoamyl valerate)、ブチルバレレート(butyl valerate) などを含む 21 種のエステルを、GCMS の TIC 保持時間に適度な差がある 7 種ずつ 3 グループに分けて、密封容器内の寒天（0.5%寒天、ショ糖 0%と 20%）に 60℃で添加して固化させ、一晩 8℃で静置した。寒天ゲルを窒素気流下、37℃でホモジナイズし、排出されたガスをアセトンの入った 2 連のバブラー内に通じてフレーバーをトラップした。内部標準物質に 1,2,4,5-テトラメチルベンゼン(1,2,4,5-tetramethylbenzene)を用いて、寒天からリリースされたアセトン溶液中のフレーバーを GCMS で分析した。なお、寒天ゲルの固化後、フレーバーの熱分解や酸化による損失を避けるために気流からの固相抽出・熱脱着法（SPEM、thermodesorption）を行わなかった。
【結果】香気成分であるエステル分子の炭素数が多いほど疎水性が高くなり、寒天からのリリース量が増加すると推測されたが、GCMS 分析による結果では、むしろエステル分子の炭素数が多いほどリリース量が減少する傾向が見られた。この現象はエステルの分子サイズや、炭素鎖が直鎖状か分岐状かという構造の違いが、フレーバー分子と多糖マトリクスとの相互作用に影響を与えることに起因していると考えられた。

[1)] 山田恭正、玉木友梨、西成勝好、日本食品科学工学会第 59 回大会講演集 p. 166（2012 年）

flavor release, agar gel, ester

講演番号：3A15p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ A 校舎 15 会場

Full Evaporation Dynamic Headspace GC-MS による煎茶の香気成分分析
Analysis of odor compounds in green tea (sen-cha) using full evaporation dynamic headspace GC-MS

○岡野谷 和則[1]、冨田 佳祐[1]、荒木 義晴[1]、沢村 信一[1]、笹本 喜久男[2]、落合 伸夫[2] ([1]（株）伊藤園、[2]ゲステル株式会社)
○kazunori OKANOYA[1], keisuke TOMITA[1], yoshiharu ARAKI[1], shin-ichi SAWAMURA[1], kikuo SASAMOTO[2], nobuo OCHIAI[2] ([1]ITO EN,LTD., [2]GERSTEL K.K.)

[目的]　煎茶の香気成分は他の茶と比べて少なく、僅かな差でも香味が異なる。通常煎茶の香気分析は液々分配（LLE）や固相抽出（SPE）で有機溶媒に溶解させ、さらに減圧蒸留により不揮発性成分を除いた後、脱水、濃縮を経て GC-MS や GC-Olfactometry（GC-O）を行う。しかし手間や時間がかかるため多サンプルの分析には不向きである。また SPME 法などの簡便な方法ではサンプルの香気組成が保たれていない。一方、抽出液 100μL を完全に気化させ GC に導入する Full Evaporation Dynamic Headspace (FEDHS)では、簡便な分析方法に関わらず香気組成が保持されていた[1)]。今回 FEDHS を用いて、大量の有機溶媒を GC に導入する高感度な分析方法を検討した。
[方法]　FEDHS にはゲステル社 Dynamic Headspace 装置(DHS)を用いた。サンプルを入れたバイアルを 80℃に加温し、窒素気流下で 30 分間 Tenax® TA への香気成分の吸着と溶媒の除去を同時に行った。回収率は hexyl acetate、2,5-dimethylpyrazine、1-hexanol、γ-hexalactone、guaiacol、indole、coumarin を用いて測定した。
①前処理方法検討： LLE-FEDHS[2)]では、サンプル 1mL、アセトン 3mL、NaCl0.3g を攪拌後、分離したアセトン層を得た。また SPE-FEDHS では、サンプル 10mL を OASIS® HLB に吸着させ、アセトン 2mL で溶出させた。これらのアセトン層を脱水し分析に供した。②サンプル量の検討：標準物質を溶解させたサンプル 100μL～1500μL を分析した。③煎茶の香気分析：2012 年川根産の一番茶荒茶の抽出液を SPE-FEDHS で前処理し、GC-O により香気分析を行った。
[結果及び考察]　各前処理方法による回収率は、LLE-FEDHS では 95～124%、SPE-FEDHS では 92～120%と良好であった。サンプル量に関しては容量依存的に成分量も増加し、1500μL でも分析が可能であったが、添加した脱水剤により溶剤の全量回収が困難なため、以下の実験は 1000μL で分析した。煎茶抽出液を SPE-FEDHS-GC-O で分析した結果、様々な香調を示す匂いを 58 ヶ所で確認した。以上の結果から Tenax®での水の除去を考慮すると、水 100μL 以上の分析は困難であったが 、LLE や SPE と FEDHS を組み合わせることで、通常の FEDHS と比較して 50 倍量のサンプル供与ができ、煎茶の微量で複雑な香りを解明するために有効な方法であると考えられた。

1）N. Ochiai, K. Sasamoto, A. Hoffmann, K. Okanoya, J. Chromatogr. A, 1240(1), 59-68 , 2012
2) J. Tsunokawa, N. Ochiai, K. Sasamoto, A. Hoffmann, in: Abstracts of 36th ISCC, Riva del Garda, Italy, 2012, C25.

green tea (sen-cha), odor analysis, full evaporation dynamic headspace

講演番号：3A15p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ A 校舎 15 会場

GC-C-IRMS および FT-IR によるチャ香気成分，カフェイン、チャ葉のδ13C の解析
δ13C of volatile compounds, caffeine, and green teas based on the GC-C-IRMS and FT-IR analyses

○土屋 諒[1]、村田 有明[2]、Uli Engelhardt[3]、山田 桂大[4]、吉田 尚弘[4]、渡辺 修治[2] ([1]静岡大・農、[2]静岡大院・創造、[3]ブラウンシュバイク工科大・食品化学、[4]東工大理工・化学環境)
○Ryo TSUCHIYA[1], Ariaki MURATA[2], Uli Engelhardt[3], Keita YAMADA[4], Naohiro YOSHIDA[4], Naoharu WATANABE[2] ([1]Faculy Agriculture.Shizuoka Univ., [2]GSST,Shizuoka Univ., [3]Institute Food.Chem. Braunshweig.Univ Technol., [4]Tokyo Inst. Technol. Envir .Chem.)

【目的】植物の炭素同位体比（$\delta^{13}C$）は光同化によって吸収される大気中の二酸化炭素の炭素同位体比に由来している。二酸化炭素の炭素同位体比は地球上でほぼ一定であるが、地域ごとの C3 植物と C4 植物の比率によって地域によりわずかに異なっている。そのため、植物個体に含まれる炭素の同位体比は生育地域によって異なる値を示す。これまでに、植物全体の炭素同位体比を測定するバルク分析では生育地域によって同位体比が異なることが知られているものの、植物体を構成する化合物単位では同位体比測定は行われていない。そこで本研究は昨年度に引き続き、国内外各地で栽培されているチャ葉から製造された荒茶を試料とし、香気成分に加え主要成分である caffeine の炭素同位体比を測定し、バルク分析との相違を明らかにすることにした。
【方法】国内 5 ヶ所（埼玉・静岡・京都・種子島・徳之島)、中国 2 ヶ所（江蘇・浙江)から 2010 年度に収穫された *Camellia sinensis* var Yabukita の荒茶を試料とした。昨年度報告したとおり荒茶から抽出液を得て、2-phenylethanol，(*Z*)-3-hexenol 、benzyl alcohol をアグリコンとする3種類の香気成分配糖体を単離した。配糖体を酵素(primeverosidase)により加水分解し2-phenylethanol，(*Z*)-3-hexenol 、benzyl alcoholを得た。また荒茶の抽出液から液液分配・再結晶・HPLC精製を経て主要成分の一つである caffeine を単離した。7 地点すべての試料から各化合物を単離した後、香気成分は GC-IRMS に、caffeine は赤外レーザー分光器に供し炭素同位体比を測定した。測定は香気成分で n=3、caffeine で n=5 で行なった。また、バルク分析としてチャ葉自体の炭素同位体比も赤外レーザー分光器を用いて n=5 で分析を行なった。
【結果】各生育地域での$\delta^{13}C$ はバルク分析で -28.3～-25.8‰、2-phenylethanol で $\delta^{13}C$ -28.1～-26.4‰,(*Z*)-3-hexenol で -31.7～-27.5‰, benzyl alcohol で -36.6～-28.8‰、caffeine で -39.2～-29.6‰ であった。バルク分析および各化合物における分析値を基に有意差検定した。その結果、バルク分析ではいずれの生育地域でもほぼ同様な $\delta^{13}C$ であり、生育地域間での区別はできなかった。一方、香気成分では複数の香気成分の $\delta^{13}C$ を組み合わせることにより、全ての生育地域を区別できた。また caffeine単一化合物で全ての生育地域が区別できた。このことから生育地域による $\delta^{13}C$ の差異はバルク分析よりも化合物単位の炭素同位体比で大きい傾向にあった。またバルク分析と各化合物の炭素同位体比測定の結果から、炭素同位体比は同一の生育地域であっても化合物ごとに異なること、生育地域間の $\delta^{13}C$ の大小、差違の傾向が化合物間で異なることが明らかとなった。

carbon isotope ratio, caffeine, FT-IR

講演番号：3A15p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ A 校舎 15 会場

チャ花に蓄積される 1-phenylethanol 配糖体の同定
Characterization of 1-phenylethyl glycosides in tea flowers
○国政 亜衣子[1]、DONG Fang[3]、YANG Ziyin[2]、村田 有明[3]、渡辺 修治[3]([1]静岡大院農、[2]South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences、[3]静岡大院創造)
○Aiko KUNIMASA[1], Fang DONG[3], Ziyin YANG[2], Ariaki MURATA[3], Naoharu WATANABE[3] ([1]Shizuoka Univ., [2]South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, [3]Shizuoka Univ.)

【目的】1-Phenylethanol (1PE) は acetophenone (AP) とともにチャ (*Camellia sinensis*) の花器官に主要に蓄積される。花に蓄積される (*S*)-/(*R*)-1PE=1/9 である一方、発散される (*S*)-/(*R*)-1PE=1/1 と相対的に (*R*)-1PE の割合が低下する。この原因は、1PE と AP との酸化還元反応における立体選択性、あるいは、1PE と 1PE 配糖体生成、加水分解反応における酵素の立体選択性に起因すると考えられる。本研究では後者の可能性を検討している。チャ花より抽出した 1PE 配糖体画分を酵素加水分解したところ (*S*)-/(*R*)-1PE=2/8 の割合で生成した。本研究においては、まず、チャ花より 1PE glucopyranoside、二糖配糖体 primeveroside の単離を試みた。またこれらの配糖体のアグリコン部の立体化学の決定、各配糖体の同定を目的とし、各配糖体の合成を試みた。

【方法・結果】凍結チャ花 (0.8 kg) を 80% エタノールで抽出後、Amberlite XAD-2、ODS カラムクロマトグラフィー、HPLC (ODS, aq. CH_3CN) で順次 1PE 配糖体を精製した。各配糖体を完全アセチル化後、^{1}H-, ^{13}C-NMR, HRMS により 1-phenylethyl β-D-glucopyranoside (1PEG) および、1-phenylethyl β-primeveroside であると同定した。別途、糖供与体として 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-glucopyranosylbromide を用いてまず (*R*)-1PE を、グリコシル化後、脱保護反応を経て、(1*R*)-1PEG を得た。次にラセミ混合物 (*R*)-/(*S*)-1PE を反応基質として同様の方法で (1*R*)-/(1*S*)-1PEG を得、Recycle HPLC で立体異性体を分離した。先に合成した (1*R*)-1PEG を基に立体化学を決定し、(1*R*)-1PEG および (1*S*)-1PEG を得た。チャ花から単離した 1PEG と合成標品との ^{1}H-, ^{13}C-NMR の比較により、アグリコンの立体配置を含めて構造を確認した。単離した二糖配糖体 1PE β-primeveroside のアグリコンの立体配置は、酵素 (primeverosidase) 加水分解により生成した 1PE をキラルカラムを装備した GC-MS 分析により分析し、(1*S*)-1PE β-primeveroside と同定した。最終的には (1*R*)- および (1*S*)-1PE β-primeveroside の合成標品とを直接比較し、同定する目的で (1*R*)- および (1*S*)-1PE β-primeveroside の合成を試みている。

1-phenylethanol, 1-phenylethyl ß-D-glucopyranoside, 1-phenylethyl ß-primeveroside

講演番号：3A15p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ A 校舎 15 会場

萎凋により生成するチャ葉香気成分の同定とその香気寄与度の解析
Analysis of aroma volatile compounds produced by withering in leaves of tea *(Camellia sinensis)* plants

○友村 美穂[1]、勝野 剛[2,3]、楊 子銀[4]、中村 順行[3]、渡辺 修治[1,2]（[1]静岡大院農、[2]静岡大創造科学技術大学院、[3]静岡県農林技術研究所茶業研究センター、[4]中国科学院）
○ Tomomura Miho[1], Tsuyoshi Katsuno[2,3], Ziyin Yang[4], Yoriyuki Nakamura[3], Naoharu Watanabe[1,2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Graduate School of Science and Technology Shizuoka Univ., [3]Shizuoka Prefectural Research Institute of Agriculture and Forestry Tea Research Center, [4]Chinese Academy of Sciences)

【目的】茶の香りは、その品質と特徴に影響を与える要因の１つであり、摘採後のチャ葉の萎凋、揉捻等の加工段階で生成・増加する。我々は烏龍茶製造時とは異なる低温下での萎凋処理で製造された茶 (低温萎凋処理茶) が甘く花様の香りを有することを見出した。本研究において、はじめに、低温萎凋処理茶の香気成分を同定、定量した。次にそれらの香気寄与度を解析した。
【方法】 1) 香気成分の分析 : 静岡県農林技術研究所茶業研究センターにおいて露地栽培されている、「さやまかおり」を一番茶期 (4 月－5 月) に摘採し、低温萎凋処理 (15℃、8, 16, 24 時間) および常温萎凋処理 (25℃、8, 16, 24 時間) 後、荒茶を製造した。各処理茶 8 g に熱水 (90℃) を 160 mL 加え、抽出液を得た。冷水で冷却後、遠心分離し上清をフィルターろ過した。この抽出液をポラパック Q カラム (1 mL) に供し、香気成分をカラムに吸着した。内部標準 (Ethyl decanoate, 100μM, 10μL) を含む pentane: diethyl ether =1 : 1 混合溶媒 (4 mL) によりカラムから香気成分を溶出した。Na_2SO_4 により脱水後、常温・常圧条件下で 150 μL に濃縮し、GC-MS 分析に供した。2) 香気寄与度の解析 : 上記香気濃縮液から 4 倍希釈系列を調製し、香気抽出物希釈分析 (AEDA 法) を用いて GC-O (olfactometry) 分析に供した。各保持時間に、においが検出されることができる濃度の閾値である FD ファクター (Flavor dilution factor) を算出することで、その成分の香気寄与度を数値化した。
【結果】1) 萎凋することなく製造した荒茶および常温萎凋処理茶に比べ、低温萎凋処理茶の香気成分量は著量増加することが明らかになった。このなかでも 16 時間低温萎凋をした荒茶では、萎凋することなく製造した荒茶に比べ GC-MS 上 8.9 倍多量の香気成分が検出され、常温萎凋処理茶に比べ 6.4 倍多量の香気成分が検出された。特に著しく増加する香気成分として indole, jasmine lactone, linalool を同定した。これらは、16 時間低温萎凋で最大値に達し 24 時間後には低下した。2) FD ファクター 4^5 ～4^7 の成分は少なくとも 12 種検出した。標準品の GC-MS 分析データに基づき、これらのうち 7 種は geraniol, methyl anthranilate, jasmine lactone, methyl jasmonate, indole, coumarin, vanillin であると同定し、FD ファクターはいずれも 4^5 であった。これら以外に、より FD ファクターが大きい (4^6 , 4^7) 化合物の存在を確認している。
以上のことから低温萎凋処理茶の甘く花様の香りは上記の FD ファクターが大きい香気成分に起因することが示唆された。常温萎凋処理茶に比べ低温萎凋処理茶での香気成分量が高い理由は、萎凋時に生成する香気成分の代謝分解が低温下では抑制されているためであると考えられる。

withering, volatile, identification

講演番号：3A15p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ A 校舎 15 会場

クロモジ精油の抗炎症作用
Anti-inflammatory effects of Kuromoji (*Lindera umbellata*) essential oil.
○堂黒 翔太、山崎 真央、片方 陽太郎、前多 隼人 (弘前大学農学生命科学)
○Syouta DOUGURO,Mao YAMAZAKI,Yohtaro KATAGATA,Hayato MAEDA (Hirosaki Univ.)

[目的]炎症は細菌やウイルスの感染などの刺激反応に対応する重要な免疫反応である。一方で、リウマチや炎症性腸疾患などの多様な疾患の原因の一つでもある。炎症状態では、血液中のマクロファージをはじめとする免疫細胞が、窒素酸化物や Interleukin (IL)-6、Tumor necrosis factor (TNF)-αのようなサイトカイン類を大量に発生させる。クロモジ (*Lindera umbellata*) は日本原産クスノキ科の樹木である。青森県において、クロモジは森林育成のために間伐される未利用木材である。本研究ではクロモジの有効活用をめざし、クロモジから抽出した精油の抗炎症作用について検討した。
[方法]マウス由来マクロファージ様細胞 (RAW 264.7) を 24 時間前培養の後、LPS (lipopolysaccharide) 0.1 μg/ml とクロモジ精油、Linalool、Geranyl acetate をそれぞれ 25, 50 μg/ml ずつ添加した。2~24 時間後に培地および細胞を回収した。炎症の指標となる培地の NO_2^-濃度を Griess 法で測定した。IL-6、TNF-α、Inducible nitric oxide synthase (iNOS)、Cyclooxygenase (COX)-2 の mRNA 発現量の変化を real-time RT-PCR 法により評価した。細胞培養培地中の炎症性サイトカインである IL-6 と TNF-αの濃度は ELISA 法により測定した。また細胞内でのタンパク質発現量の変化を Western Blot 法で評価した。
[結果]LPS を添加した RAW264.7 細胞は NO_2^-の培地中の濃度が約 10 倍に上昇した。一方、クロモジ精油、Linalool、Geranyl acetate を添加した細胞では、添加濃度に依存してその上昇を 25～50 %抑制した。また IL-6、iNOS、COX-2 mRNA 発現量はクロモジ精油で約 25～50%の抑制効果が確認された。培地中のサイトカイン濃度もクロモジ精油添加細胞では添加濃度に依存して低下した。Mitogen-activated protein kinase (MAPK) の p38、Extracellular signal-regulated kinase (ERK)、c-Jun amino-terminal kinase (JNK) のリン酸化がクロモジ精油と Geranyl acetate を添加した細胞で抑制されている事が確認された。
[考察]クロモジ精油は LPS 刺激による RAW264.7 細胞の NO_2^-濃度の上昇を抑制し、炎症性サイトカイン類の mRNA とタンパク質の発現を抑制した。またサイトカインの発現に関わるタンパク質の抑制効果を示した。この作用機構としては、p38、ERK、JNK などの MAPKs のリン酸化の抑制であることが示唆された。これらの結果から、クロモジ精油による抗炎症作用が示された。

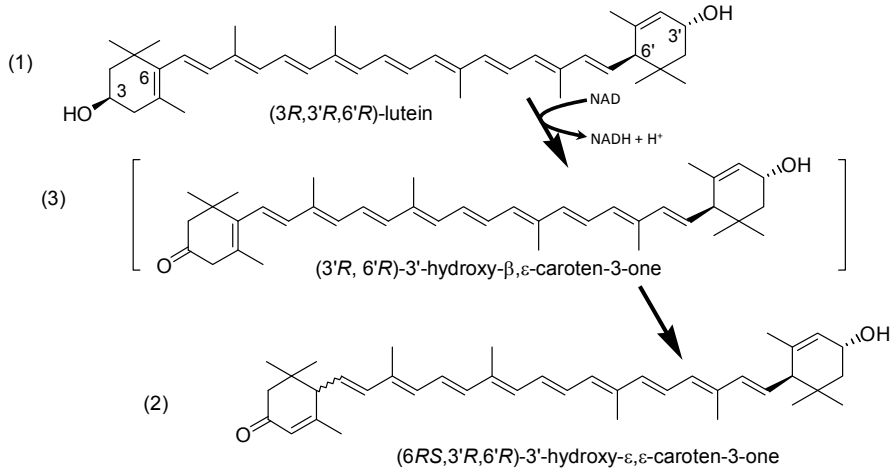
essential oil, linalool, inflammation

講演番号：3A15p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ A 校舎 15 会場

キサントフィルの酸化的代謝と生物活性
Metabolism and biological activities of xanthophylls

○長尾 昭彦[1]、眞岡 孝至[2]、小林 みゆき[1]、小竹-奈良 英一[1]、小野 裕嗣[1] ([1]農研機構・食総研、[2]生産開発科学研)
○Akihiko Nagao[1], Takashi Moka[2], miyuki Kobayashi[1], Eiichi Kotake-Nara[1], Hiroshi Ono[1] ([1]NFRI/NARO, [2]SEIKEN)

［目的］演者らはこれまでにルテインやフコキサンチンなどのキサントフィルをマウスへ投与すると酸化的代謝産物が蓄積すること，肝臓ホモジネートがキサントフィルの水酸基に対し酸化的代謝活性をもつことを明らかにした。また，ルテイン(1)の酸化的代謝反応では，β 環の 3 位の水酸基が酸化され 5 位の二重結合の移動によって(6*RS*,3'*R*,6'*R*)- 3'- hydroxy-ε,ε-caroten-3-one（2）が生成することを報告した。本研究では，さらに，ルテイン反応中間体の特性や他のキサントフィルに対する反応性を調べた。また，酸化的代謝産物の生物活性を検討した。
［方法］キサントフィルとマウス肝臓ホモジネートを補酵素 NAD 存在下, 37℃で数時間インキュベーションし，生成した反応産物を TLC や HPLC により分離精製した。単離した反応産物について，高分解能 MS，NMR，CD スペクトル等から構造を解析した。キサントフィル及びその酸化的代謝産物の抗炎症作用をマウスマクロファージ由来 RAW264 細胞による NO 産生に対する影響から評価した。
［結果と考察］ルテインと同様にβ－クリプトキサンチンのβ環に結合する 3 位の水酸基がマウス肝臓ホモジネートによって酸化された。中間体と考えられる β,β-caroten-3-one が反応初期に生成し，β,ε-caroten-3'-one が最終産物として得られた。β 環をもたない lactucaxanthin やルテイン代謝産物(2)を基質とするとε環の 3 位の水酸基が酸化されたが，その生成量はごくわずかであり，マウス肝臓の酸化的代謝はβ環の 3 位の水酸基に特異的であった。ルテインの反応初期に集積する酸化産物(3)は，酵素反応条件下で一部が(2)へ異性化したことから，反応中間体と考えられた。しかし，その大部分は速やかに消失したことから著しく不安定であると考えられた。ルテインは RAW264.7 細胞による NO 産生を抑制することが報告されているが，ルテイン代謝産物(2)にはルテインより強い NO 産生抑制活性が見いだされ，代謝による抗炎症作用の増強が示唆された。



lutein, β-cryptoxanthin, carotenoid

講演番号：3A15p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ A 校舎 15 会場

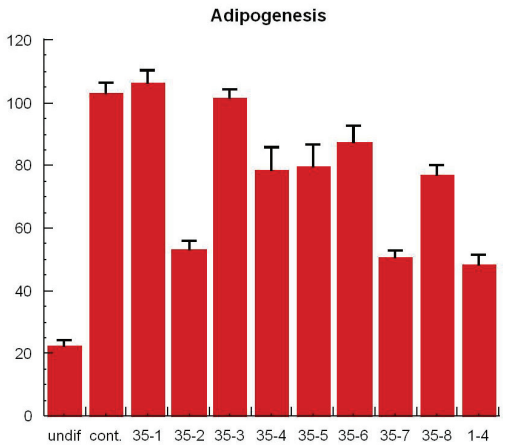
イチゴポリフェノールエキス（Fragrasia X ananassa）の抗肥満効果

Adipogenesis inhibitory factor from Fragrasia X ananassa

○朴 奎珍[1]、川畑 哲郎[2]、高野 英文[3]、只野 武[2]、豊田 剛史[1]、太田 富久[2]([1]株式会社 テラ・サイエンス、[2]金沢大学、[3]日本薬科大学)
○Gyujin PARK[1], Testuro KAWABATA[2], Fumihide TAKANO[3], Takeshi TADANO[2], Takeshi TOYODA[1], Tomihisa OHTA[2] ([1]Terra Science Co.,Ltd., [2]Kanazawa Univ., [3]Nihon Pharmaceutical Univ.)

【目的】筆者は食品のフレーバーとして身近な食材であるイチゴ (Fragarasia X amamassa) に着目した。ラット白色脂肪細胞を用いたスクリニーグの結果、イチゴポリフェノールエキスの分画物には抗肥満作用がみだされ、香りの成分が含まれてある fr. にもその効果がしめされた。< 図 1>

本研究では、イチゴポリフェノールエキスの分画を行い、香り成分が含まれてある fr. 2 をマウスにかかせることによる体重変化の比較を指標とし、抗肥満作用を明らかにした。



< 図 1 >

【方法】イチゴポリフェノールエキスを 2 倍量の EtOAc を用いて、3 回液液分配を行った。得られた EtOAc 層を SiO_2 クロマトグラフィーで分画を行い、fr. 2 を香りの成分として *in vivo* の実験に用いた。

マウスの群は大きく強制運動有・無の 2 グループに分けて、強制運動有・無をまた、普通食のコントロール、抗肥満食のコントロール、抗肥満食のイチゴの香り、ポジティフコントロール群で抗肥満食のリモネン群に分けた。各サンプルを全体の**空気の約** 0.5% の濃度でかかせた後、強制運動群は運動をさせた。

【結果】マウスの体重変化を指標とし比較した結果、コントロール群に比べ、イチゴポリフェノールエキスから分画した香りの成分が含まれてある fr. 2 は体重の増加を抑制させた。特に強制運動をさせてないグループはコントロールに比べ約 4 週後から体重増加の抑制がみだされたが、強制運動をさせたグループは最初から体重の増加量が少なく上々にコントロールとの差が大きくなった。

これらの結果から、イチゴポリフェノールエキスには体重増加の抑制を示す効果がある香りの成分が含まれてあると考えられる。

Floavor of strawberry, Obesity, Adipogenesis inhibitory factor

講演番号：3A15p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ A 校舎 15 会場

熟成中の赤ワインのアントシアニン誘導体の分析

Changes in Anthocyanin Derivatives in Red Wines during Bottle Storage

○久本 雅嗣、藤原 陽、鈴木 淳平、田村 彰吾、斉藤 史恵、奥田 徹（山梨大・ワイン研）
○Masashi HISAMOTO, Akira FUJIWARA, Junpei SUZUKI, Shogo TAMURA, Fumie SAITOH, Tohru OKUDA (Enol. Vitic. Univ. Yamanashi)

【目的】製造間もない赤ワインの赤色は、ブドウ果皮から溶出するアントシアニンに由来する。しかし、ワインの熟成が進むにつれて、ブドウ果皮由来のアントシアニン量は減少し、製造後数年経過するとほとんど存在しない。この間に赤ワイン中では、スタッキングなどによるコピグメンテーションや、アントシアニンと他の化合物の間で新しい色素成分を形成して、赤ワインの色調を安定化している。発酵・熟成中に新たに形成される赤ワイン中のアントシアニン系色素成分には、アントシアニン縮合重合体、アントシアニンーフラバノール縮合重合体、アセトアルデヒドを介したアントシアニンーフラバノールエチルブリッジ体、アントシアニンと*o*-キノン体との色素付加体、ピラノアントシアニン及び高分子色素重合体（Polymeric pigments）が存在する。本研究は、瓶内で熟成中の赤ワインのアントシアニンモノマーや発酵・熟成中に形成される赤色色素体の量と推移を広範囲で測定するため、2000年から2008年のCabernet Sauvignon（CS）とMuscat Bailey A（MBA）ワインを１年ごとに４年間、超高速液体クロマトグラフィー－飛行時間型質量分析装置（UPLC-DAD-TOFMS）でそれぞれのワイン中に含まれるアントシアニンとその誘導体の変化を測定した。
【方法・結果】CSとMBAのワインを試験試料のワインを１年ごとに４年間全フェノール量、全アントシアニン量及びUPLC-DAD-TOFMSでワイン中に含まれる各成分の定性・定量分析を行った。
製造年が新しいワインは、ブドウ果皮由来のアントシアニンが赤色色素成分の全体の大部分を占めており、時間が経過するにつれて、ブドウ果皮由来のアントシアニンが減少し、2000～2003年に製造したワインには、ほとんどなかった。MBAワインでもCSワインと同じような減少傾向を示したが、製造から３年以上経過したワイン中のブドウ果皮由来のアントシアニンの大半は、Malvidin-3-(6-*p*-coumaroyl),5-*O*-diglucosideであった。ピラノアントシアンは、熟成年数とともに増減の変化が見られたが、ピラノアントシアニンの全体量としては、時間が経過してもその量に大きな変化はなかった。
高分子色素重合体は、同じ製造年でも時間が経過すると、特に製造年が古いCSワインでは、高分子色素重合体の占める割合が多くなった。MBAワインは、CSワインと比較すると高分子色素重合体の量は少なかったが、いずれの品種の熟成したワインも、高分子色素重合体が赤ワインの色調に大きく影響していると示唆された。

Polymeric Pigment, Pyranoanthocyanin, Wine

講演番号：3A15p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ A 校舎 15 会場

カムカム色素(アントシアニン)の退色および加工原料の色調安定性について

Color stability of process materials and discoloration of Anthocyanin pigment from Camu-Camu

○村山 梢[1]、野口 治子[2]、飯島 健[2]、内野 昌孝[2]、津久井 亜紀夫[2]、高野 克己[2] ([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・化学)
○kozue MURAYAMA[1], haruko NOGUCHI[2], ken IIJIMA[2], masataka UCHINO[2], akio TSUKUI[2], katsumi TAKANO[2] ([1]Agrichem., Agr., Grad. Sch., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Biosci., Tokyo Univ. Agr.)

【目的】

ペルー原産のフトモモ科植物 カムカム(学名 *Myrciaria dubia*)は、ビタミン C やポリフェノールを豊富に含む新たな機能性食品素材として注目されている。現地では果汁を搾り、飲料や冷菓などに利用されており、我が国では、果汁 10%以下の清涼飲料水が市販されている。しかし、カムカム果汁は光、熱、酸素などの要因により褐変が進行し、容易に商品価値が低下する。そこで、カムカム果汁の色調の安定化を目指し、果汁の pH および加熱処理による色調変化について検討した。

【方法】

供試材料にはペルーで果皮および種子を除去後、冷凍された加工原料を用いた。加工原料(pH2.7)を 10%ギ酸および 1M NaOH を用いて、pH2.0, 2.9, 3.5 および 4.1 に調整し、遠心分離、ろ過し、得られたろ液を分析試料とした。これを 80℃にて加熱処理し、経時的な色調変化を分光測色計と分光光度計にて確認した。また、5 分間加熱試料を急冷させ冷暗所にて 24 時間後の色調の保持状態を同様の方法にて確認した。試料中のアントシアニン量の変化についても HPLC による分析（TSK-gel ODS80Ts、移動相には 0.1%TFA とアセトニトリルを用い、アセトニトリル濃度は 10 分で 2~-10%、40 分で 10~30%、10 分で 30~80%）を行った。次に、カムカム果汁の色調を安定化する添加物の探索を行った。各添加物を加工原料に添加し、氷中にて 30 分間振とう後、冷暗所にて 30 分間静置し、遠心分離およびろ過し、得られたろ液を分析試料とした。上記と同様に分析を行った。

【結果】

pH 調整を行った試料のうち、pH3.5 以上では調整直後の a*値が負となり、カムカムの加工原料は pH3.5 以上で赤色が失われることを確認した。各試料を 5 分間加熱したところ、全ての試料で a*値は上昇していた。また、pH 無調整(pH2.7)の非加熱時の a*値を 100%とし、各試料の加熱 5 分後の赤色度を比較した。変化率が大きい順に無調整、pH2.9, 2.0 となった。更に 30 分加熱後の赤色度は、pH 2.0, pH2.9、無調整の順となった。HPLC 分析からも同様の結果が得られた。このことから、pH2.0 の試料は最も高い赤色度を示すが、加熱による赤色度の上昇は小さく、その後急速に減少することが確認できた。そのため、発色と色調の安定性の機序は異なることが示唆された。色調の安定化は、グルコース、グルタチオンおよびシステインの添加に効果がみられた。

Camu-Camu, anthocyanin, browning

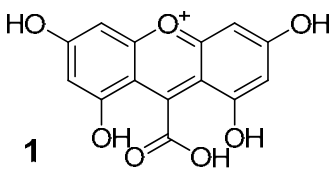
講演番号：3A15p17
講演日時、会場：3 月 26 日 17:12～ A 校舎 15 会場

赤タマネギ外皮に黄色色素は含まれているか？

Does the dried outer scale of Red onion contain Yellow pigments?

○伊藤 裕才[1]、坂本 祐実[2]、杉本 直樹[1]、穐山 浩[1] ([1]国立医薬品食品衛生研、[2]東理大院薬)
○Yusai Ito[1], Yumi Sakamoto[2], Naoki Sugimoto[1], Hiroshi Akiyama[1] ([1]National Institute of Health Sciences, [2]Tokyo Univ. of Science)

【目的】黄色タマネギの乾燥外皮（乾燥した鱗茎）から得られる黄色色素は、光と温度に対して安定であることから、織物の染色や食品の着色料（食品添加物）として用いられている。色素は複雑な混合成分であり、そのため化学構造は長い間不明であった。近年、演者は黄色タマネギの乾燥外皮の抽出液から、低分子量の黄色色素 cepaic acid (**1**, 9-carboxy-1,3,6,8-tetrahydroxyxanthylium)を主色素として単離・構造決定した。**1** は、鱗茎に含まれるクエルセチン配糖体が乾燥過程で酸化分解し、生成したフロログルシノールがグリオキシル酸へ求核反応で架橋された後、酸化によって閉環して形成すると推定されている。タマネギ(*Allium cepa*)には黄色タマネギだけでなく、赤タマネギや白タマネギが知られているが、色調の差異を産むメカニズムは未解明である。そこで、黄色色素 **1** がクエルセチン由来であるという仮定のもと、赤タマネギ、白タマネギについて、鱗茎中のクエルセチン配糖体および乾燥外皮中の **1** の有無を分析した。



1

【方法】黄色、赤、白タマネギの鱗茎をメタノールで抽出した。得られた抽出液を逆相 LC/ MS を用いて分析し、クエルセチン配糖体の確認を行った。LC/MS の移動相にはギ酸を 0.1%添加した水/アセトニトリルの混合溶媒を用いた。乾燥外皮については、ミルサーで粉末にした後、20%メタノールで抽出した。抽出液を逆相 LC/ MS で分析し、**1** について ESI-MS の SIR 分析を用いて検出し、さらに Photo diode array 検出器を用いて紫外可視吸収スペクトルの確認を行った。なお、**1** の標品はフロログルシノールとグリオキシル酸より合成した。

【結果】各タマネギの鱗茎を分析した結果、黄色および赤タマネギの鱗茎にはクエルセチンーモノグルコシドおよびジグルコシドがフラボノイドの主成分として含まれていた。一方で白タマネギの鱗茎にクエルセチン配糖体は含まれていなかった。赤タマネギの乾燥外皮の抽出液を分析した結果、赤色色素であるシアニジン配糖体と重なって **1** が溶出することが SIR 分析によって確認された。溶出条件を調整した結果、**1** をシアニジン配糖体から分離することに成功し、PDA で **1** の吸収スペクトルを確認することができた。このように赤タマネギの外皮にも黄色色素である **1** が含まれていることが明らかとなった。白タマネギの結果と併せて、タマネギ外皮の黄色色素はクエルセチン由来であることが強く示唆された。

onion, cepaic acid, quercetin

講演番号：3A15p18
講演日時、会場：3 月 26 日 17:24～ A 校舎 15 会場

メイラード反応で生じる高分子色素化合物を分解する微生物の探索

Research on the melanoidin decolorization by microorganism

○松井 芳光[1]、岡戸 茉凛[2]、高城 裕子[2]、小林 謙一[1]、山本 祐司[1]、中西 康博[2]、本間 清一[3]([1]東農大生応化、[2]東農大開発、[3]お茶の水女子大)
○ Yoshimitsu MATSUI[1], Marin OKADO[2], Hiroko TAKAGI[2], Ken-Ichi KOBAYASHI[1], Yuji YAMAMOTO[1], Yasuhiro NAKANISHI[2], Seiichi HOMMA[3] ([1]TUA Appl. Biol. Chem., [2]TUA Inter. Agri. Dev., [3]Ochanomizu Univ.)

「目的」
還元糖とアミノ酸によるメイラード反応は食品の加工・貯蔵の過程で一般的におこる反応であり、高分子の褐色色素化合物であるメラノイジンは最終反応生成物である。メイラード反応は食品の色、香り、呈味性の品質形成に寄与する一方で、食品の風味、色調の劣化にも関わっている。本研究は、高分子の色素化合物であるメラノイジンから化学的部分構造を反映する成分を調製し、メラノイジンの高分子構造を推測することを目的とする。その調製手段として、温和な条件下で高分子を分解して、低分子成分を生じる微生物の探索を行った。

「方法および結果」
サトウキビから製糖する際に副生する廃糖蜜（モラセス）は黒褐色の粘張な成分であり、色素の主体はメラノイジンである。その高分子の色素化合物の化学構造の繰り返し単位には多種類の化合物があると推測される。そこで、複雑な高分子であるメラノイジンを分解する微生物を探索するために、モラセスの脱色を指標として、微生物のスクリーニングを行った。
鹿児島県や沖縄諸島のサトウキビ畑、長年にわたりモラセスが継続的に廃棄されていた土地の土壌や近辺の河川、さらにマングローブ林の周辺から土壌ならびに液体試料を採取した。これらの試料を用い静置培養を行った結果、その多くでモラセスを含む YP 培地（モラセス培地）の脱色がみとめられた。それらの中から菌を単離し、モラセス培地を脱色する菌を 3 株分離した。興味深いことに、これらはマングローブ林から分離された菌であった。
また、16 r RNA 塩基配列の解析結果から、３株とも乳酸菌（*Lactobacillus plantarum*）であった。これまでに、乳酸菌がメラノイジンを脱色する報告もあり、東京農業大学の保存菌株である乳酸菌（碁石茶や阿波番茶から分離）10 株を用いてメラノイジンの脱色試験を行った。その結果、すべての乳酸菌株においてモラセス培地の脱色を確認した。また、分離株や保存菌株の培養液を 3 D-HPLC にかけたところ、脱色の培養の前後で比較すると、吸収スペクトルの変化が観察された。今後、これらの微生物を用いて、メラノイジンを低分子化し機器分析などによる構造解析ができるものと期待される。

melanoidin, molasses, decolorization

講演番号：3A15p19
講演日時、会場：3 月 26 日 17:36～ A 校舎 15 会場

フィブロネクチンによる大豆ペクチンの構造認識機構の解明
Elucidation of the recognition mechanism of fibronectin against the soybean pectin structure
○纐纈 洋平[1]、松下 裕昭[2]、古林 万木夫[2]、金丸 義敬[1]、矢部 富雄[1] ([1]岐阜大院応生・資源生命、[2]ヒガシマル醤油・研)
○Youhei KOUKETSU[1], Hiroaki MATSUSHITA[2], Makio KOBAYASHI[2], Yoshihiro KANAMARU[1], Tomio YABE[1] ([1]Gifu Univ., Grad. Sch. of Appl. Biol. Sci., [2]Research Laboratory, Higashimaru Shoyu Co., Ltd.)

【背景および目的】近年，食物繊維の摂取により小腸形態や細胞分裂に変化が生じることが明らかとなり，腸管上皮細胞が食物繊維を認識して直接的に相互作用する機構の存在が示唆されている。水溶性食物繊維の一種であるペクチンは，物理化学的作用による血中コレステロール上昇の抑制や，腸内微生物のはたらきによる大腸がん発症抑制効果など，その生理機能に注目が集まっているが，腸管上皮細胞と直接相互作用することを示す報告はまだない。当研究室ではこれまでに，細胞外マトリックスタンパク質のフィブロネクチンが，ペクチンと構造特異的に結合することを報告している。本研究では，表面プラズモン共鳴法（SPR）により，さまざまな条件下での大豆ペクチンとフィブロネクチンとの結合力を測定し，フィブロネクチンの多糖構造識別機構の解明を目的とした。
【材料および方法】大豆ペクチンおよびレモンペクチンは，人工胃液（0.2% NaCl; pH 2）に溶解した後，Ca^{2+}を含む PBS を外液として透析を行い，サンプルとして調製した。また，ペクチンの主鎖であるポリガラクツロナンを分解する酵素群が含まれる Pectinex 3XL により各ペクチンを酵素処理した後，高分子画分を調製してサンプルとした。それぞれの処理前後のペクチン分子量をゲル濾過クロマトグラフィーにより測定するため，Shodex SUGAR Ks-804 および 805 カラムを用いて，0.1 M NaCl を移動相溶媒として，流速 0.5 ml/min，カラム温度 45℃の条件で，HPLC を行った。多糖の検出には示差屈折計を用いた。各ペクチンとフィブロネクチンとの結合力の解析には，SPR を利用した分子間相互作用解析システムである BIAcore J を用いた。
【結果および考察】人工胃液による処理前の各ペクチンとフィブロネクチンとの結合力は，レモンペクチンが K_D=2.06×10^{-3} M と弱い結合力を示したのに対し，大豆ペクチンは K_D=1.13×10^{-7} M と非常に強い結合力を示すことが分かった。次に，ペクチンが胃を通過して腸に達することを模して，人工胃液によってペクチンを処理した場合，強い結合力を示した大豆ペクチンにおいては，フィブロネクチンとの結合力が保たれていることが分かった。この際，人工胃液中に 0.2% NaCl を含まない場合は，酸性下でペクチンが低分子化することにより，フィブロネクチンとの結合力が失われることが示された。さらに，ポリガラクツロナンから成るペクチンの主鎖領域を酵素処理によって分解して生成した高分子画分のうち，大豆ペクチン由来サンプルは，フィブロネクチンとの結合が認められたことから，フィブロネクチンは大豆ペクチンの一部の側鎖を介して，相互作用していることが示唆された。

pectin, soybean, fibronectin

講演番号：3A16a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ A 校舎 16 会場

ツバキ種子熱水抽出物の AGE s (終末糖化産物)生成抑制作用

Inhibitory Effect of Camellia Japonica extract on Advanced Glycation Endproducts.

○史 文磊、野崎 勉、石原 健夫 (ビーエイチエヌ株式会社)
○Wenlei Shi,Tsutomu Nozaki,Ken-o Ishihara (BHN Co.,Ltd.)

【目的】糖とタンパク質の非酵素的な反応により糖化最終産物（AGEs：advanced glycation end products）が生成される。AGEsは、生体内の各組織に蓄積され、AGEsの受容体を介して、糖尿病合併症や骨粗鬆症、アルツハイマー病などの疾患に関与することが報告されている。また、皮膚組織（表皮、真皮）においてAGEsが蓄積すると、肌の老化（例えば、皮膚の変色、透明感やハリ、弾力性の低下）の一因になることが示唆されている。従って、AGEsの生成を抑制することは、肌の老化防止作用が期待される。これまでの研究において、ツバキの種子を搾油し、その油粕の熱水抽出物を紫外線照射を施したマウスに投与すると、肌のシワが改善されることを明らかにしている。本研究は、ツバキ種子熱水抽出物が*in vitro*で糖化初期生成物であるアマドリ化合物(ケトアミン)、蛍光性AGEs、及び、AGEsの一種でコラーゲンに特異的に蓄積する（N^{ε}-(Carboxymethyl)arginine(CMA)の生成を抑制する作用等を見出したので報告する。
【方法】ツバキの種子を搾油し、その油粕から熱水抽出した物を試料とした。AGEs生成抑制試験は、試料存在下および非存在下で、タンパク質（BSAもしくはゼラチン）と糖（グルコースもしくはリボース）を混合し、一定温度でインキュベートして各AGEs試料を調製した。ケトアミン含量はNBT色素還元法で測定し、蛍光性AGEs含量は、蛍光（励起波長375 nm、蛍光波長440 nm）で測定した。CMA含量については、ELISA法で測定した。また、各AGEs試料を用いて、正常皮膚繊維芽細胞の生存への影響についても検討した。
【結果】ツバキ種子熱水抽出物は、ケトアミンの生成を抑制し、蛍光性AGEsおよびCMAの生成を強く抑制した。現在、AGEsによって誘導される細胞死を抑制できるか否かについて検討中である。以上のことからツバキ種子熱水抽出物には糖化を抑制する作用が認められ、皮膚においても肌のハリ、シワなどの老化の予防作用が示唆された。

Camellia Japonica, Advanced Glycation Endproducts (AGEs), NHDF cell

講演番号：3A16a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ A 校舎 16 会場

オオヤマザクラ（*Cerasus sargentii* ）実抽出エキスの皮膚酸化ストレスに対する抑制効果

Repression effects of Ooyamazakura（*Cerasus sargentii* ）extract on oxidative stress in human skin

○岩間 直子[1]、河合 貴弘[2]、北村 裕志[3]、正木 仁[4]、阿部 馨[5]([1]（地独）青森県産技セ・弘前研、[2]六花酒造株式会社、[3]六花酒造株式会社、[4]東京工科大・応用生物、[5]（地独）青森県産技セ・弘前研)
○Naoko IWAMA[1], Takahiro KAWAI[2], Hiroshi KITAMURA[3], Hitoshi MASAKI[4], Kaoru ABE[5] ([1]Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center, [2]Rokka Shuzo Co., Ltd., [3]Rokka Shuzo Co., Ltd., [4]Bioscience and Biotechnology, Tokyo University of Technology, [5]Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center)

【目的】皮膚老化は主に、紫外線等による ROS（活性酸素種）の産生亢進と生体内の抗酸化システムの機能低下等による酸化ストレスによって引き起こされることが知られている。我々はこれまでに青森県内で植樹されているオオヤマザクラ（*Cerasus sargentii*）の実の抽出エキスにおいて、非常に強い抗酸化活性があることを見出し、生体内酸化ストレスの緩和作用が期待された。そのため、今回は皮膚に対するオオヤマザクラ実抽出エキスの抗酸化ストレス作用について評価を行い、アンチエイジング化粧品素材としての有用性を検討した。
【方法】オオヤマザクラ実抽出エキスについて、*in vitro* 評価として ROS の化学的な消去作用評価法及び培養細胞の細胞傷害を指標とした生物学的な消去作用評価法を実施した。化学的な消去作用評価法としては、宮本らの 4-aminoantipyrine を用いた比色分析方法及び Nitroblue tetrazolium による比色分析方法により、代表的な ROS である過酸化水素及びスーパーオキシドアニオン（・O^{2-}）の消去作用を分析した。また、生物学的な消去作用評価方法としては、ヒト培養表皮角化細胞（HaCaT keratinocyte）を用いて、紫外線（UVB）及び過酸化水素曝露による細胞傷害に対する緩和作用をニュートラルレッド法にて細胞生存率を測定することにより評価した。また、過酸化水素曝露培養細胞における細胞内残存過酸化水素を 2,7-dichlorodihydrofluorescin diacetate（DCHFDA）と反応させて蛍光測定することにより、細胞内残存過酸化水素の消去作用についても評価した。
【結果と考察】オオヤマザクラ実抽出エキスについて比色分析による各種 ROS 消去作用評価を行った結果、過酸化水素とスーパーオキシドアニオンに対する消去作用が何れも見出され、どちらの ROS に対してもオオヤマザクラ実エキス濃度 0.5mg/ml で約 50%の消去率を示した。一方、培養細胞 HaCaT Keratinocyte を用いた評価では、過酸化水素曝露培養細胞にオオヤマザクラ実抽出エキスを添加することにより、細胞生存率が約 70%から 90%に有意に向上し、濃度依存的な傾向も認められた。さらに、過酸化水素曝露培養細胞内に残存する過酸化水素量がオオヤマザクラ実抽出エキス添加によって有意に減少しており、細胞内過酸化水素消去作用が明らかとなった。また、UVB 曝露による細胞傷害に対する緩和作用を検討した結果、UVB 曝露後の培養細胞へのオオヤマザクラ実抽出エキス添加によって細胞生存率が約 30%から 50%にまで有意に向上したことから、UVB 細胞傷害緩和作用が確認された。
　以上の結果から、オオヤマザクラ実抽出エキスは、UVB 等によって誘導された細胞内 ROS による酸化ストレスを抑制する効果があり、皮膚のアンチエイジングに有効な素材であると考えられた。

Cerasus sargentii , antioxidative stress, keratinocyte

講演番号：3A16a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ A 校舎 16 会場

漢薬 蝋梅花（*Chimonanthus praecox*, 花部）のメラニン産生抑制アルカロイド成分

Effects of constituents from flowers of *Chimonanthus praecox* on melanin production in B164A5 melanoma

○中西 勇介[1]、森川 敏生[1]、二宮 清文[1]、松田 久司[2]、中嶋 聡一[2]、三木 尚子[2]、宮下 優[2]、吉川 雅之[2]、早川 堯夫[1]、村岡 修[1] ([1]近畿大・薬総研、[2]京都薬大)
○ Yusuke Nakanishi[1], Toshio Morikawa[1], Kiyofumi Ninomiya[1], Hisashi Matsuda[2], Souichi Nakashima[2], Naoko Miki[2], Yuu Miyashita[2], Masayuki Yoshikawa[2], Takao Hayakawa[1], Osamu Muraoka[1] ([1]Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki Univ., [2]Kyoto Pharmaceutical Univ.)

【目的】 ロウバイ科 (Calycanthaceae) 植物ロウバイ (*Chimonanthus praecox*) は, 主に中国南部などの亜熱帯地域に分布する落葉低木である. その花部はロウバイカと称され, 中国伝統医学において, 風邪や高血圧, リウマチなどの改善, 鎮咳を目的に利用されてきた. 我々は, ロウバイカの新規機能開拓研究の一環で, ロウバイカ MeOH 抽出エキスにマウスメラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 細胞におけるテオフィリン誘発メラニン産生抑制活性を見い出したことから, その活性寄与成分の探索研究を行ったので報告する.

【方法・結果】〈含有成分の分離〉 中国四川省産ロウバイカ (1.5 kg) を MeOH で環流抽出し, MeOH 抽出エキス (490.0 g, 生薬からの収率 32.7%) を得た. 得られた MeOH 抽出エキスについて, メラニン産生抑制活性試験を実施したところ強い活性が認められた (IC_{50} = 2.1 μg/mL). 次いで MeOH 抽出エキスを EtOAc および H_2O で溶媒分配し, さらに H_2O 移行部を HP-20 カラムクロマトグラフィーに付し, H_2O および MeOH で順次溶出させて, 各移行部を得た. 得られた各分画を順相および逆相カラムクロマトグラフィー, 次いで HPLC により繰り返し分離精製することで 4 種のセスキテルペン, 5 種のインドールアルカロイド, 5 種のフラボノイドを含む計 26 種の化合物を単離・同定した.

〈メラニン産生抑制活性〉 24 穴培養プレートに B16 melanoma 4A5 細胞 (RCB0557) を播種し, 24 時間前培養後, 被験物質及び theophylline (終濃度 1 mM) を添加した. 72 時間培養後, 0.25% trypsin により細胞を剥離, 回収し, 1 M NaOH を加え, 80°C で 30 分加温した. 得られた細胞溶解液の O.D. をマイクロプレートリーダーにて測定した (405 nm). なお, 被験物質は DMSO に溶解し, 培地に添加した (DMSO 終濃度 0.1% (v/v)).

ロウバイカより得られた成分についてメラニン産生抑制活性を検討した結果, アルカロイド成分である (–)-chimonanthine (**1,** IC_{50} = 0.9 μM) および (–)-folicanthine (**2,** IC_{50} = 1.4 μM) およびセスキテルペン成分である α-elemol (**3,** IC_{50} = 6.0 μM) および α-eudesmol (**4,** IC_{50} = 2.3 μM) などに強い活性が認められた. また, これらの作用機序を検討する目的で, メラニン産生の律速酵素である tyrosinase に対する酵素阻害活性についても検討したが, tyrosinase に対する阻害活性は認められなかった. さらに, tyrosinase, TRP-1 および TRP-2 mRNA の発現に与える影響について検討した結果, 作用機序として tyrosinase mRNA 発現の低下が関与することが示唆された.

Chimonanthus praecox, alkaloid, melanin

講演番号：3A16a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ A 校舎 16 会場

アムラ抽出物とコラーゲンペプチドの抗老化作用

Inhibitory effects of amla extract and collagen peptide on aging

○藤井 孝[1]、奥田 貴博[1]、安井 菜穂美[2]、若泉 賢功[1]、伊神 孝生[1]、池田 克巳[2]([1]三基商事・総研、[2]武庫女・薬)
○Takashi Fujii[1], Takahiro Okuda[1], Naomi Yasui[2], Masanori Wakaizumi[1], Takao Ikami[1], Katsumi Ikeda[2] ([1]MIKI Corporation, [2]Mukogawa Women's University)

【目的】アムラ(*Emblica officinalis* Gaertn.)はトウダイグサ科の植物であり、インド、中国、インドネシア、マレーシアに分布している。その果実はビタミン C、ミネラル、アミノ酸、そして加水分解性タンニンなどのフェノール性化合物を豊富に含む。また、アムラはインド伝承のアーユルヴェーダにおける代表的な果実生薬として、下痢や炎症など種々の疾病に対して古くから用いられてきた。近年、アムラの機能性研究が数多く行われ、脂質低下、抗炎症、抗ウイルス、及び抗ガン作用などが明らかにされている。本研究では、アムラの光老化抑制作用(実験１)と骨粗しょう症抑制作用(実験２)を in vivo で評価した。その際、アムラと、美肌素材として知られるコラーゲンペプチドを併用した場合の作用についても検討した。
【方法】実験１：7週齢ヘアレスマウスにアムラ抽出物(AE)、コラーゲンペプチド(CP)、及びAEとCP(AECP)を7週間混餌投与した。投与3週目から紫外線(UVB)を背部に照射し、光老化を誘導した。皮膚水分量は水分計で経時的に測定した。飼育終了後、背部皮膚をCCDカメラで撮影し、シワの量を数値化した。表皮厚と8-OHdG陽性細胞数は、背部皮膚切片をそれぞれHE染色、または免疫染色し測定した。表皮中コラーゲン量の指標として、ヒドロキシプロリンをHPLCで定量した。実験２：卵巣摘出(OVX)した8週齢ddYマウスに低カルシウム(LCa)食、カルシウム(Ca)食、Ca+AE食、Ca+CP食、またはCa+AECP食を8週間投与した。骨密度は、大腿骨をDXAで測定した。骨吸収の指標として、尿中のデオキシピリジノリン(DPD)をELISAで測定した。
【結果】実験１： AE、CP、またはAECPの投与により、UVB照射による表皮の肥厚、8-OHdG陽性細胞数の増加、及び表皮水分量の減少は抑制された。また、UVB照射により皮膚中の可溶性コラーゲン量は有意に減少したが、CP、またはAECPを投与すると有意な減少は認められなかった。さらに、UVB照射により背部のシワは増加したが、AECPの投与により有意に抑制された。実験２：大腿骨の脛骨側骨端部において、OVX+LCa食に比べOVX+Ca食では有意な骨密度の増加は認められなかったが、OVX+Ca+AE食、OVX+Ca+CP食、またはOVX+Ca+AECP食の投与で骨密度は有意に増加した。また、試験食投与4週間後の尿中DPDはOVX+LCa食で増加したが、OVX+Ca+AECP食で有意に減少した。
【考察】AE、または CP の投与により、光老化と骨粗しょう症に関連するいくつかのパラメータが改善された。また、AECP の投与でのみ有意に改善されたパラメータもあることから、アムラ抽出物とコラーゲンペプチドの併用は優れた抗老化作用を示すことが示唆された。

amla, collagen peptide, aging

講演番号：3A16a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ A 校舎 16 会場

抗老化効果をもつカロリー制限模倣物質の探索－希少糖 D-アロースの線虫寿命延長効果とその作用メカニズム

Exploration of calorie restriction mimetics － lifespan-extending effect of the rare sugar D-allose and its mechanism of action

○佐藤 正資[1]、砂古口 博文[1]、新谷 知也[2]、大隈 一裕[2]、何森 健[3] ([1]香川大・農、[2]松谷化学工業、[3]香川大・希少糖研究セ)
○Masashi Sato[1], Hirofumi Sakoguchi[1], Tomoya Shintani[2], Kazuhiro Okuma[2], Ken Izumori[3] ([1]Fac. of Agric., Kagawa Univ., [2]Matsutani Chemical Industry CO.,LTD, [3]Rare Sugar Reseach Center, Kagawa Univ.)

【目的】食餌における摂取カロリーの制限は，線虫，ショウジョウバエ，ラット，アカゲザルなどの実験動物の寿命を延長することが報告されている。ヒトにおいても，カロリー制限は糖尿病，癌，アルツハイマー病など老化に伴う疾患の発症を遅らせ，その結果，寿命を延長すると考えられている。その詳細な分子メカニズムは明らかではないが，細胞内エネルギーレベルの低下がインスリン/IGF-Iシグナリング(IIS)経路，サーチュイン（Sir2/Sirt1），TOR などの複数のエネルギーセンサーによって媒介され，抗酸化酵素の発現増強やミトコンドリア機能の保全などが誘導される。その結果，寿命延長が起こると考えられている。このように注目を集めるカロリー制限であるが，栄養のバランスを保ちながらカロリー制限を長期間続けることは困難と苦痛を伴う。そこで，食事と一緒に摂取することでカロリー制限と同様の抗老化効果が得られるカロリー制限模倣物質の開発が注目されている。これまで，カロリー制限模倣物質の候補として，解糖系酵素の阻害剤 2-デオキシ-D-グルコース，サーチュインを活性化するレスベラトロールなどが報告されているが，毒性や効果に問題があり，薬剤として実用化されたものは無い。演者らは，すでに D-フルクトースの C3 エピマーである希少糖 D-プシコースが線虫の寿命を延長することを報告している。今回，D-グルコースの C3 エピマーである D-アロースの寿命延長効果について報告する。また，シグナル伝達系に変異を持つ線虫株を用いて，希少糖の寿命延長メカニズムについて検討を行った。

【方法】線虫寿命延長試験には*C. elegans* 野生株 N2と*daf-16*（IIS経路下流の転写因子FOXO1の線虫ホモログ）変異体，*sir-2.1*(Sir2/Sirt1の線虫ホモログ）変異体を用いた。同調培養によって得られた若成虫を，D-アロースを含む液体培地へ移し，20℃で振とう培養した。一日おきに観察，生死を判定し，生きている線虫のみを新しい培地に移しかえた。すべての線虫が死ぬまで培養を続け，平均寿命を算出した。結果はLog-rank 法により有意差を検定した。

【結果】N2において，28mM D-アロース処理線虫の平均寿命は22.9日（対照区，19.4日）となり約20%の延長が認められた。一方，*daf-16*変異体において寿命延長は認められなかった。この結果から，D-アロースによる寿命延長は IIS経路を介して発現していると考えられた。現在*sir-2.1*変異体での試験を行っている。

calorie restriction mimetics, D-allose, *C. elegans*

講演番号：3A16a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ A 校舎 16 会場

セサミン・エピセサミンの代謝および医薬品との相互作用

The metabolism of sesamin and episesamin in human body and sesamin-drug interaction

○安田 佳織[1]、上野 千来[1]、西川 美宇[1]、生城 真一[1]、鎌倉 昌樹[1]、太田 美穂[2]、榊 利之[1]([1]富山県大・工、[2]相愛大・人間)
○ Kaori YASUDA[1], Sera UENO[1], Miyu NISHIKAWA[1], Shinichi IKUSHIRO[1], Masaki KAMAKURA[1], Miho OHTA[2], Toshiyuki SAKAKI[1] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Soai Univ.)

セサミンはゴマに含まれるリグナン類の一つであり、さまざまな生理作用を持つことが知られている。その生理作用の中には、抗酸化作用のように代謝物による作用と考えられるものもあり、生理作用のメカニズムを知る上で、ヒト体内での代謝を知ることが重要となる。一方で、医薬品との安全な併用という観点から、薬物代謝酵素に与える影響を調べることも重要な課題である。セサミンはゴマ油からの精製過程で約半分がエピセサミンに転換し、健康食品として市場に出ているものは、セサミンとエピセサミンの等モル混合物となっている。

これらセサミン類のヒト体内での代謝を予測するために、まず、市販のヒト肝ミクロソーム画分を用いて代謝を調べたところ、セサミン、エピセサミンともに、シトクロム P450(CYP、P450) により抗酸化作用の高いモノカテコール体へと変換された。エピセサミンの場合には、モノカテコール体として 2 種の立体異性体が存在するが、ヒト肝ミクロソームにおいてそれらがほぼ同量生成されることがわかった。次に、セサミンおよびエピセサミンのモノカテコール体を基質とし、市販のヒト肝ミクロソーム画分もしくは細胞質画分により代謝させたところ、両モノカテコール体ともに、P450 によってさらに抗酸化能の高いジカテコール体へと変換されたほか、UDP-グルクロン酸転移酵素(UGT)によるグルクロン酸抱合体やカテコールメチルトランスフェラーゼ(COMT)によるメチル化体へと変換されたが、各反応における速度論的解析からセサミンと比べてエピセサミンの方が P450 や UGT による代謝を受けにくいことがわかった。すなわち、ヒト体内においてエピセサミンはセサミンよりも代謝されにくく、代謝されない状態で生理活性を発揮する場合にはエピセサミンの方が有利であるといえる。一方、抗酸化能のように、代謝されカテコール体になることによって効果が現れるものについてはセサミンの方が有利である可能性が高い。

代謝に関与する P450 分子種を詳細に解析した結果、セサミンのモノカテコール化には CYP2C9 が主に寄与していたのに対し、エピセサミンのモノカテコール化には CYP2C9 と CYP1A2 とがほぼ同程度に寄与しており、*S*-モノカテコール生成には CYP2C9 が、*R*-モノカテコール生成には CYP1A2 が寄与していた。両者とも、CYP2C9 に対して不可逆阻害(MBI)剤となる可能性が示唆されたことから、CYP2C9 代謝型医薬品とセサミンとの相互作用について、現在動物実験により検討中である。

Sesamin, P450, Metabolism

講演番号：3A16a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ A 校舎 16 会場

統合失調症関連エンドフェノタイプ発症に及ぼす妊娠期及び授乳期低タンパク質栄養の影響

The effects of feeding low protein dish for mother mouse at the gestation and lactation period to offspring

○市瀬 嵩志[1]、小河 匡[2]、安尾 しのぶ[3]、古屋 茂樹[2,4]([1]九州大農、[2]九州大院生資環、[3]九州大院資生科、[4]九州大バイオアーキ)
○Takashi ICHINOSE[1], Tadashi OGO[2], Shinobu YASUO[3], Shigeki HURUYA[2,4] ([1]Kyushu Univ., [2]Kyushu Univ., [3]Kyushu Univ., [4]Kyushu Univ.)

発生・発達期の低栄養状態はその個体の成熟期や次の世代にまで継続して体内における様々な疾患に関わる機能的変化を引き起こす原因となることが知られている。精神疾患の疫学的研究からは、胎児期から幼年期に低栄養を経験することにより、成人期の統合失調症発症リスクが約 2 倍高まることが報告されている（Brown and Susser, *Schizophr. Bull.*, 2008）。統合失調症は、罹患率が全人口の約 1%と大きな割合を占めており、患者の社会生活は大変困難となる場合が多い。統合失調症の病因解明と根本的な治療方法の開発が望まれているが，複数の疾患脆弱性遺伝子に加え、環境要因も発症に寄与するため，GWS による遺伝学的解析が必ずしも有効に機能していない。低栄養による統合失調症発症リスク増大に関わる栄養素の実体については、様々な候補が挙げられているが、タンパク質/アミノ酸の欠乏が原因であるという可能性については詳細な解析が行われていない。そこで本研究では、妊娠期及び授乳期における低タンパク食摂取が成熟期の統合失調症関連エンドフェノタイプを発症するリスク評価を目的に、マウスを用いて主に行動学的解析から検討を行ったので報告する。

DBA/2JJcl(雌)と C57BL/6(雄)の交配により D2B6F1 マウスを得た。その際、交配（雌雄の同居）開始当日より DBA/2JJcl を AIN-93G 準拠通常タンパク質食給餌群（カゼイン 20%）（以下対照群）及び低タンパク質食給餌群（カゼイン 10%）（以下制限群）に分割した。離乳まで合計約 7 週間雌性マウスに同給餌を続け、生後約 4 週での離乳後、仔マウスを通常タンパク食給餌で飼育し、生後 10～11 週で感覚フィルター機能を評価するプレパルス阻害（PPI）を測定した。PPI の異常はヒト統合失調症患者及び齧歯類モデルに共通して観察される行動レベルでのエンドフェノタイプである。PPI 測定時において、雌性雄性のいずれも群間で体重及び脳重量に有意な差は認められなかった。しかし、PPI は制限群の雌性マウスにおいて対照群に比べ有意に低下していた。一方、雄性マウスでは群間で PPI に有意差は認められなかった。以上の結果は、妊娠期及び授乳期における母体の低タンパク食摂取が、新生児雌性選択的に統合失調症関連行動異常を誘発する環境要因であることを示す。今後、発生・発達期低タンパク質栄養摂取マウスをモデル動物として、中枢神経系での遺伝子やタンパク質等の物質レベルでの解析を進めることにより、統合失調症発症に及ぼす環境要因としてのタンパク質/アミノ酸低栄養の分子基盤の解明が期待される。

early life protein restriction, schizophrenia, PPI

講演番号：3A16a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ A 校舎 16 会場

低アルギニン食による脂肪肝モデルラットの確立と脂肪蓄積メカニズムの解析

Establishment of fatty liver model rats using low arginine diet and the exploration of the underlying mechanism

○小山 彩香[1]、大谷 りら[1]、佐藤 正幸[1]、高橋 伸一郎[2]、加藤 久典[1]([1]東大院・総括・食と生命、[2]東大院・農生科・応動科)
○Ayaka KOYAMA[1], Lila OTANI[1], Masayuki SATO[1], Shin-Ichiro TAKAHASHI[2], Hisanori KATO[1]
([1]Food for Life, The Univ. Tokyo, [2]Grad. School. Agr. Life Sci., The Univ. Tokyo)

【目的】我々はラットに低タンパク質食を給餌すると、インスリン分泌は低下するが、肝臓でインスリン応答性が増加し肝臓に中性脂肪（TG）が蓄積することを報告してきた。今回は特定のアミノ酸の不足が脂質の蓄積を誘導するか調べるために、特定のアミノ酸を不足させた飼料を雄性 Wistar ラットに給餌するスクリーニング実験を行った。続いて、作成した脂肪肝モデルの肝臓への脂肪蓄積機序を調べるために、インスリン分泌能および血糖値を調べた。
【飼育条件】〈実験 1〉6 週齢の雄性 Wistar ラットに特定のアミノ酸含量の低い飼料（必須アミノ酸およびアルギニンを 1 種類ずつ対照群の 3 分の 1 に調製した)、および総アミノ酸含量の低い飼料 (5%タンパク質相当食）を 16 日間与えた。なお、対照群にはカゼインと類似した組成のアミノ酸ミックスをタンパク質源として用いた。飼料は AIN76 組成に準じて調製した。ホルチ法によって肝臓から脂質を抽出し、TG を測定した。
〈実験 2〉6 週齢の雄性 Wistar ラットを対照群、低タンパク質食群、低アルギニン食群に分け、15 日間飼育した。飼育 12 日目に 16 時間絶食させ、空腹時と糖負荷後 15、30、60 分後に尾静脈より採血を行い、空腹時の血中 TG、FFA、および糖負荷前後のグルコース・インスリン濃度を測定した。
【結果】〈実験 1〉低タンパク質食群ではこれまでの結果と同様、肝臓中 TG 量の増加が認められた。さらに、低アルギニン食群の肝臓中 TG 量が著しく増加した。低リジン、低イソロイシン、低バリン食については、わずかに肝臓中 TG 量が増加した。
〈実験 2〉実験 1 の結果と同様に、低アルギニン食給餌により肝臓中 TG 量が著しく増加した。このラットに経口糖負荷試験を行った結果、低タンパク質食群と低アルギニン食群ともに、糖負荷後の血糖値とインスリン濃度は対照群に比べ低値を示した。一方、低タンパク質食群の場合、空腹時の血糖値とインスリン濃度は対照群と同程度であった。低アルギニン食群の場合、空腹時の血中インスリン濃度および血糖値は対照群に比べ高値を示した。
【結論】低タンパク質食群と低アルギニン食群ともに、糖負荷後のインスリン応答性が増加していたことから、肝臓における脂肪合成が促進され脂肪肝が誘導されることが示唆された。この研究は生物系特定産業技術研究支援センターイノベーション創出基礎的研究推進事業の支援により行われた。

arginine, fatty liver, protein restriction

講演番号：3A16a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ A 校舎 16 会場

I 型糖尿病モデルラットにおけるキヌレン酸産生制御を介したドーパミン代謝の調節

Dietary manipulation of dopamine turnover via kynurenic acid production in streptozotocin-induced type I diabetes model rats

○福渡 努[1]、奥野 海良人[1,2]、藤本 亜希子[1]、佐野 光枝[1]、柴田 克己[1] ([1]滋賀県大人間文化、[2]国立長寿医療研究センター)
○Tsutomu FUKUWATARI[1], Alato OKUNO[1,2], Akiko FUJIMOTO[1], Mitsue SANO[1], Katsumi SHIBATA[1] ([1]Univ. of Shiga Pref., [2]NCGG)

【目的】トリプトファン代謝産物キヌレン酸は α7 ニコチン作動性アセチルコリン受容体のアンタゴニストとして作用し，生理的濃度でシナプスからのドーパミン放出を抑制する．我々はこれまでに，高トリプトファン食の摂取がラット線条体におけるキヌレン酸産生を亢進し，細胞外ドーパミン濃度を低下させること,この作用は高リジン食によって抑制できることを明らかにしてきた．しかし，キヌレン酸を介してドーパミン機能に影響を与える他の生理的因子については不明である．本研究では，ドーパミン機能低下を示すストレプトゾトシン（STZ）誘発 I 型糖尿病モデルラットを用い，糖尿病がキヌレン酸産生およびドーパミン代謝におよぼす影響について検討した．さらには，高リジン食によるキヌレン酸産生制御を介したドーパミン代謝調節を試みた．
【方法】8 週齢の Wistar 系雄ラットに 70 mg/kg bw の STZ を腹腔内投与し，7 日間飼育した．線条体におけるキヌレン酸，キヌレニン，ドーパミン，ドーパミン代謝産物（3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸およびホモバニリン酸）の濃度を測定した．キヌレニンを含む緩衝液中で，STZ 投与ラットの大脳皮質から作製した組織切片を培養し，緩衝液に放出されたキヌレン酸量をキヌレン酸産生能として測定した．
【結果・考察】STZ 投与ラットの線条体におけるキヌレン酸濃度は対照群の 2 倍に増加し，ドーパミン代謝産物/ドーパミン比は 60%に低下した. キヌレン酸前駆体であるキヌレニンの濃度には影響は認められなかった．脳組織切片を用いてキヌレン酸産生能を測定すると，STZ 投与ラットのキヌレン酸産生能は対照群の 1.4 倍を示した．キヌレン酸産生はリジン代謝産物 2-アミノアジピン酸によって阻害されることから，リジン添加食を STZ 投与ラットに与えると，線条体におけるキヌレン酸濃度の上昇およびドーパミン代謝産物/ドーパミン比の低下が抑制された．以上の結果から，STZ 投与ラットにおいて，キヌレニンからキヌレン酸への産生能が亢進したためにキヌレン酸濃度が上昇し，ドーパミン放出が抑制されたことが示唆された．また，食餌によってキヌレン酸産生を制御することにより，ドーパミン放出を亢進できることが示唆された．

Brain, Dopamine, Tryptophan

講演番号：3A16a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ A 校舎 16 会場

C2C12 筋管細胞におけるリジンによる筋肉タンパク質の分解抑制機構

The mechanisms of suppression on skeletal muscle protein degradation by lysine in C2C12 myotubes

○佐藤 友紀、伊藤 芳明、長澤 孝志（岩手大院農）
○Tomonori Sato,Yoshiaki Ito,Takashi Nagasawa (Iwate Univ.)

【目的】骨格筋の萎縮は、日々の活動を低下させ、深刻化すると寝たきりの状態を招くため、その予防や改善が求められている。骨格筋の萎縮を防ぐためには、骨格筋タンパク質の分解速度を減少させ、合成速度を高めることが重要である。我々は、必須アミノ酸である lysine (Lys)をラットに投与すると、主要なタンパク質分解系であるオートファジー–リソソーム系が抑制され、後肢筋のタンパク質分解速度が減少することを明らかにした。オートファジー–リソソーム系の制御機構としては、mTOR や Akt の活性化を介した抑制が報告されている。しかし、Lys 摂取によるオートファジー–リソソーム系阻害の作用機序は明らかとなっていない。そこで本研究では、マウス骨格筋由来の細胞株である C2C12 細胞を用いて、Lys による骨格筋タンパク質分解抑制の作用機序を検討した。
【方法】C2C12 筋芽細胞を DMEM+10% fetal bovine serum でコンフルエント直前まで培養した後、DMEM+2% horse serum で 6 日間培養・分化誘導し、筋管細胞に分化させた。分化後、C2C12 筋管細胞を 20 mM leucine (Leu)または 10 mM Lys、20 mM Lys を含む無血清・アミノ酸欠乏培地で 4 時間培養し、筋管細胞からの 3-methylhistidine（MeHis）放出速度を測定した。また、C2C12 筋管細胞を無血清培地で 6 時間培養後、培地を 10 mM Leu または 10 mM Lys を含む無血清培地に交換し、0-3 時間後のオートファジー-リソソーム系活性を LC3-II/I の比と Beclin-1 量から、mTOR 活性を S6K1 と 4E-BP1 のリン酸化量から、Akt 活性をリン酸化 Akt 量から評価した。さらに、mTOR 活性を 100 nM rapamycin (Rap)で阻害し、上記と同様の条件で Lys による MeHis 放出速度、およびオートファジー-リソソーム系の活性への影響を評価した。
【結果および考察】C2C12 筋管細胞からの MeHis 放出速度は 20 mM Leu、10 mM Lys、20 mM Lys でそれぞれ有意に抑制され、20 mM Lys による抑制効果は 20 mM Leu よりも顕著であった。LC3-I と LC3-II の量比と Beclin-1 量は Lys 処理 30 分後でそれぞれ有意な低値を示した。また、4E-BP1、S6K1、Akt のリン酸化量は Lys 処理 30 分後でそれぞれ有意に増加した。Rap 処理により mTOR 活性を阻害した場合にも、Lys による MeHis 放出速度の低減作用は残存していたが、Rap 処理をせずに Lys を添加した場合と比較して、Lys による低減作用は抑制されていた。また、Rap 処理によって Lys による mTOR の活性化は抑制されたが、オートファジー-リソソーム系活性への抑制効果は残存していた。
以上より *in vitro* において、Lys は mTOR と Akt の活性化を介してオートファジー-リソソーム系の活性を阻害し、骨格筋タンパク質の分解を抑制することが示唆された。

lysine, skeletal muscle, protein degradation

講演番号：3A16a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ A 校舎 16 会場

ローヤルゼリー由来タンパク質中の酸化型トリプトファンの生理機能

Physiological function of tryptophan oxidation in royal jelly proteins

○大島 和也[1]、松岡 拓磨[2]、中村 正[2]、金丸 義敬[1]、矢部 富雄[1]([1]岐阜大院応生・資源生命、[2]（株）秋田屋本店)
○Kazuya OSHIMA[1], Takuma MATSUOKA[2], Tadashi NAKAMURA[2], Yoshihiro KANAMARU[1], Tomio YABE[1] ([1]Gifu Univ., Grad. Sch. of Appl. Biol. Sci., [2]Akitaya Honten Co., Ltd.)

【目的】ローヤルゼリー（RJ）は，ミツバチ幼虫を女王蜂に成長させる物質であり，豊富な栄養素を含み，さまざまな生理機能をもつことが古くから知られている。当研究室ではこれまでに，RJ 中の主要タンパク質（MRJPs）の生理機能を研究する過程で，MRJP1～4 に共通する配列 YPDWSFA に細胞増殖作用があることを見出した。また天然の MRJP1, 2 中のトリプトファンのうち，この配列中のトリプトファンを含め，8 つのトリプトファンが酸化されていることを確認した。酸化型トリプトファンが存在する天然の物質は，ヒト心臓ミトコンドリアやウシのシトクロム c など，これまでに数例しか報告されていない。このように希有な物質が RJ に含まれていることは，RJ の生理機能と何らかの関係があると考えられる。そこで本研究では，酸化型トリプトファンの生理機能を解明することを目的とし，通常のペプチドと，酸化型トリプトファン含有ペプチドが，株化培養腸細胞に与える影響を比較した。
【方法及び結果】RJ から得られるペプチドは極微量であるため，はじめに合成ペプチド中トリプトファンの人工的酸化を試みた。合成ペプチド YPDWSFA に，硫酸鉄(Ⅱ)水溶液と過酸化水素を加えることでフェントン反応を起こし，ペプチド中のトリプトファンの酸化を行った。MALDI-TOF MS による分析でトリプトファンの酸化が確認されたため，このペプチドを酸化型トリプトファン含有ペプチドとした。続いてペプチドを培地に溶解させてラット小腸上皮細胞 IEC-6 に添加し，WST-1 試薬を用いて生細胞数を測定した。その結果，通常のペプチドを添加した場合には，細胞数は濃度依存的に増加した。これに対して酸化型トリプトファン含有ペプチドの場合には，低濃度の添加では細胞数は増加したが，高濃度の添加では細胞数は減少した。続いて細胞核を Hoechst 33342 で染色し，蛍光顕微鏡で観察したところ，高濃度で酸化型トリプトファン含有ペプチドを添加した場合，細胞核が小さく凝縮している様子が確認された。細胞核の凝縮は，アポトーシスの特徴のひとつであり，酸化型トリプトファン含有ペプチドは，細胞にアポトーシスを誘導している可能性が示唆された。

royal jelly, apoptosis, oxidized tryptophan

講演番号：3A16p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ A 校舎 16 会場

澱粉から酵素的に生成する多分岐グルカン ™ の *In vitro* 消化性
In vitro digestibility of a highly branched alpha-glucan enzymatically produced from starch
○渡辺 光、黒瀬 真弓、櫻井 岳夫、西本 友之、福田 恵温（（株）林原　研究開発本部）
○Hikaru WATANABE,Mayumi KUROSE,Takeo SAKURAI,Tomoyuki NISHIMOTO,Shigeharu FUKUDA ((HAYASHIBARA CO., LTD. R&D Center))

【目的】多分岐グルカン(HBG)は、*Paenibacillus* 属細菌が菌体外に産生するα-グルコシル転移酵素とα-アミラーゼの協同作用により、澱粉から 100%の生成率で得られる新規α-グルカンである[1)]。HBG は公定法[2)]で測定した水溶性食物繊維含量が 80%と高いことを特徴としているが、生体内での消化性には不明な点が多い。今回、HBG の生体内での消化性を推定することを目的に *in vitro* 消化性試験を行った。
【方法】試験 1. *In vitro* 消化性試験：消化性試験は岡田らの方法[3)]に従い、HBG (Mw:4,100)を 20 g 摂取した場合の条件で行った。唾液アミラーゼはヒト由来、胃液は人工胃液、膵臓アミラーゼはブタ由来、小腸粘膜酵素はラット由来のものをそれぞれ用いた。なお、小腸粘膜酵素による消化性については、市川らの方法[4)]でも検討した。各消化に適した条件下でそれぞれ消化試験を行い、消化前後のグルコース量、全糖量を測定することにより消化率を算出した。
試験 2. マルトデキストリン(MD)との *in vitro* 消化性の比較：岡田らの方法に準じて HBG の消化率を経時的に測定し、HBG と同程度の分子量を有する MD の消化率と比較した。
【結果】試験 1. *In vitro* 消化性試験： HBG は唾液アミラーゼ、胃液、膵臓アミラーゼでは全く消化を受けなかった。一方で、小腸粘膜酵素では部分的に消化された。小腸粘膜酵素での消化率は、岡田らの方法で 16%、市川らの方法で 43%であった。
試験 2. MD との *in vitro* 消化性の比較： HBG と MD の消化性について、経時的に比較を行った。その結果、反応 4 時間後において、MD は 80%消化されたのに対して、HBG は 17%しか消化されなかった。反応 24 時間後では、MD は 100%消化されたのに対して、HBG は 45%しか消化されなかった。反応 24 時間後に残存した HBG の Mw は 2,900 であった。
【考察】HBG は消化管内では小腸で部分的に消化を受けることが予想された。また消化を受ける部分については、易消化性である MD と比較して、ゆっくりと消化されると考えられた。小腸で消化されない部分も存在すると考えられ、それらは大腸にまで到達することが予想された。
[1)] *Carbohydr. Res.*, 344, 2151-2156 (2009) [2)] AOAC2001.03 法
[3)] 栄食誌, 43, 23-29 (1990) [4)] 医学と生物学, 126, 161-163 (1993)

alpha-glucan, digestibility, enzyme

講演番号：3A16p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ A 校舎 16 会場

多分岐グルカン™のラットにおける消化吸収性の検討

Digestibility of a highly branched alpha-glucan in rats

○井上 紳一郎、谷口 美文、新井 成之、吉實 知代、宮田 聡美、黒瀬 真弓、渡辺 光、西本 友之、福田 恵温（（株）林原　研究開発本部）
○ Shin-ichiro INOUE,Yoshifumi TANIGUCHI,Shigeyuki ARAI,Chiyo YOSHIZANE,Satomi MIYATA,Mayumi KUROSE,Hikaru WATANABE,Tomoyuki NISHIMOTO,Shigeharu FUKUDA (HAYASHIBARA CO.,LTD)

【目的】 多分岐グルカン(HBG)の生体内での消化吸収性を明らかにするため、ラットに経口投与した際の糞便・尿への排泄および、消化管(胃、小腸、盲腸)内容物の推移をマルトデキストリン(MD)と比較して検討した。
【方法】 試験1. 8週齢Wistar雄ラットを6匹ずつ3群に分けて、4時間絶食後に水、HBGおよびMD30%液を3ml経口投与した。1日ずつ3日間の糞便および1日分の尿を採取し、中性糖量を測定した。
試験2. 1晩絶食させた8週齢Wistar雄ラットにHBGあるいはMD30%液、3mLを経口投与した。投与1、3および6時間後に消化管（胃、小腸、盲腸）を摘出し、内容物を採取した。各消化管内容物中の中性糖量を測定し、投与量を100%として残存率を算出した。また、HBG投与3時間後の小腸内容物およびHBG投与6時間後の盲腸内容物の重量平均分子量(Mw)をHPLCで測定した。
【結果】 試験1. HBGの糞便への排泄率は投与量の2.6%と算出された。MDの糞便への排泄は認められなかった。また HBGおよびMDはともに尿への排泄は認められなかった。
試験2. 各消化管内容物の中性糖を測定した結果、
1. MDは投与3時間後でほぼ消化管内から消失したため、速やかに消化・吸収されたと考えられた。
2. 投与3時間後の小腸内容物における残存率は、MDと比較してHBGは27.8%と高かった。
3. 投与3時間後の盲腸内容物における残存率も、MDと比較してHBGは3.5%と高かった。
4. 投与6時間後の盲腸内容物において、残存率はMDと比較してHBGは13.8%と高かった。
5. HBG投与3時間後の小腸内容物はMw2,800、6時間後の盲腸内容物はMw2,620であり、ほぼ一致していた。

【考察】以上より、HBGはMDと比較して小腸内容物における残存率が有意に高いことから、消化吸収速度がMDよりも遅いことが考えられた。また、HBG投与3時間後の小腸内容物と6時間後の盲腸内容物のMwがよく一致していたことから、HBG投与3時間後の小腸内容物は難消化物と推測された。
ここで、HBG投与3時間後の小腸内容物と盲腸内容物における残存率が合計31.3%であったことから、残りの約70%が消化吸収されると考えられた。更に、HBGは糞便への排泄率が低値であることから、小腸で消化されない難消化物がさらに盲腸に流入し腸内細菌に資化されることが考えられた。

alpha-glucan, digestibility, rat

講演番号：3A16p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ A 校舎 16 会場

多分岐グルカン ™ のラット・ヒト経口負荷試験

Oral administration tests of a highly branched alpha-glucan in rats and healthy volunteers

○吉實 知代、新井 千加子、宮田 聡美、谷口 美文、渡辺 光、西本 友之、福田 恵温 ((株) 林原 研究開発本部)
○Chiyo YOSHIZANE, Chikako ARAI, Satomi MIYATA, Yoshifumi TANIGUCHI, Hikaru WATANABE, Tomoyuki NISHIMOTO, Shigeharu FUKUDA (HAYASHIBARA CO., LTD. R&D Center)

【目的】澱粉を原料とし酵素法により調製した多分岐グルカン(HBG)の *in vivo* での血糖値、インスリン値に与える影響を検討するため、ラットおよびヒトについて経口負荷試験を行った。
【方法】試験 1. ラットにおける HBG の経口負荷試験
9 週齢の雄性 Wistar ラットを体重が均等になるように 1 群 7-8 匹ずつ 2 群に分けて、一晩絶食後 2g/kg の経口負荷試験を行った。1) グルコースと HBG との比較、2) マルトデキストリン(MD)と HBG との比較。 1)2)ともに経時的に尾静脈から採血し、血糖値、インスリン値およびインクレチンである GIP(glucose-dependent insulinotropic polypeptide)を測定した。
試験 2. ヒトでの HBG の経口負荷試験
健常人 11 名（男性 4 名、女性 7 名）を対象とし、一晩絶食した後、50g の HBG またはグルコースを水に溶解して摂取させ、経時的に採血して、血糖値、インスリン値を測定した。
【結果】試験 1. 1) HBG 負荷時の 血糖値は、負荷 30 分後にグルコースより低い傾向が認められ、血糖値⊿AUC^{0-2h}はグルコース負荷時の約 90%であった。また、インスリン値は負荷 30、60 分後で有意に低く、インスリン値⊿AUC^{0-2h}はグルコース負荷時の約 40%であった。一方、GIP は負荷 15、30、60 分後でグルコース負荷時より有意に低く、GIP の⊿AUC^{0-2h}はグルコース負荷時の約 60%であった。
2) HBG 負荷時の血糖値は、負荷 30 分後に MD より有意に低く、血糖値⊿AUC^{0-2h}は MD 負荷時の約 90%であった。また、インスリン値は負荷 30 分後で有意に低く、インスリン値⊿AUC^{0-2h}は MD 負荷時の約 70%であった。一方、GIP は負荷 15、30、60 分後で MD 負荷時より有意に低く、GIP の⊿AUC^{0-2h}は MD 負荷時の約 60%であった。
試験 2. HBG 負荷時の血糖値は、負荷 30 分以降でグルコースに比べて有意に低値を示し、血糖値⊿AUC^{0-2h}はグルコース負荷時の約 60%であった。また、インスリン値の上昇も緩やかで、負荷 15 分以降グルコースに比べて低値で推移し、インスリン値⊿AUC^{0-2h}はグルコース負荷時の約 50%であった。
【考察】ラットおよびヒトでの経口負荷試験の結果から、HBG は血糖値の上昇が緩やかで、低インスリン刺激性の糖質であることが確認された。また、ラットでの実験結果から、HBG はグルコースや MD に比べて消化吸収速度が遅いため、消化管での GIP 分泌刺激が少なく、GIP 分泌量が低いと考えられた。そして GIP 分泌量が低いことが、インスリン低刺激であることの要因の一つではないか、と考えられた。

alpha-glucan, insulin, glycemic index

講演番号：3A16p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ A 校舎 16 会場

多分岐グルカン™の生理作用（1）： 高脂肪食負荷マウスにおける肝脂肪蓄積の予防効果

Physiological effects of a highly branched alpha-glucan (1) : Preventive effects on hepatic steatosis induced in mice fed with high fat diet.

○紙谷 隆志、谷口 美文、井上 紳一郎、池田 広司、渡辺 光、西本 友之、新井 成之、福田 恵温（(株)林原 研究開発本部)
○Takashi KAMIYA, Yoshifumi TANIGUCHI, Shin-ichiro INOUE, Koji IKEDA, Hikaru WATANABE, Tomoyuki NISHIMOTO, Shigeyuki ARAI, Shigeharu FUKUDA (HAYASHIBARA CO., LTD. R&D Center)

【目的】 酵素法により調製した多分岐グルカン(HBG)の生理作用解明の一環として、食餌誘導性肥満モデルマウスにおける HBG の効果を評価した。

【方法】 C57BL/6J 雄マウス 7 週齢を 1 群 7 匹ずつ 3 群に分けた。それぞれ、1）通常食－水、2）高脂肪食－水、3）高脂肪食－2%HBG 溶液を与えて 8 週間飼育した。高脂肪食は HFD32（日本クレア）を使用した。投与 7 週目に経口糖負荷試験を行った。翌 8 週目に一晩絶食（飲料は水に置換）の後、血漿、肝臓、脂肪組織、盲腸を採取した。血漿からは、空腹時血糖値、インスリン、トリグリセリド(TG)、遊離脂肪酸（NEFA)、GPT 値を測定した。肝臓、脂肪組織は湿重量を秤量した。肝臓の一部は脂質抽出に用い、TG 含量を測定した。

【結果】 高脂肪食を与えた 2 群では、顕著な肥満が誘導された。群 2）高脂肪食－水、と群 3）高脂肪食－2%HBG 溶液との比較から、以下のことがわかった。

1. 2%HBG 摂取群では、投与 6 週目以降で有意な肥満の抑制がみられた。また、8 週目の肝臓重量も水投与群に比べて有意に低かった。
2. 脂肪組織（腎臓周囲、精巣周囲、腸間膜）重量には差はなかった。なお、総摂餌量は若干低下（約 95%）していたが、飲水分を含めた総摂取カロリーに差はなかった。
3. 糖負荷試験において、2%HBG 摂取群で血糖値曲線下面積（AUC）が有意に低かった。
4. 血漿中の空腹時血糖値、インスリン、TG、NEFA、GPT は、2%HBG 摂取群で有意に低かった。また、肝臓 TG 含量にも顕著な低減が認められた。

【考察】 HBG を継続飲水摂取することで、耐糖能の改善、空腹時血糖値・血中脂質の低減などの作用が認められ、特に肝脂肪蓄積が顕著に抑制されることが明らかとなった。

alpha-glucan, fatty liver, mouse

講演番号：3A16p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ A 校舎 16 会場

多分岐グルカン™の生理作用(2)： 高脂肪食負荷マウスにおける食後の血中脂質上昇低減効果

Physiological effects of a highly branched alpha-glucan (2) : Reducing effects on the postprandial triglyceridemia in high fat diet-fed mice

○谷口 美文、池田 広司、井上 紳一郎、紙谷 隆志、渡辺 光、西本 友之、福田 恵温（(株) 林原 研究開発本部)
○Yoshifumi TANIGUCHI, Koji IKEDA, Shin-ichiro INOUE, Takashi KAMIYA, Hikaru WATANABE, Tomoyuki NISHIMOTO, Shigeharu FUKUDA (HAYASHIBARA CO., LTD. R&D Center)

【目的】 食餌誘導性肥満モデルマウスで、多分岐グルカン(HBG)の継続飲水摂取により肝臓での脂肪蓄積は有意に低減される成績を得た。そこで HBGの脂肪吸収・代謝に及ぼす作用について検討した。
【方法】 試験1. HBGの単回摂取による脂質負荷試験
7週齢のC57BL/6J雄マウス 7匹ずつを1晩絶食後、2%HBG溶液あるいは水を0.2ml/body胃内投与し、ただちにオリーブ油0.2ml/bodyを同様に投与し、経時的に尾静脈より採血して血漿トリグリセリド(TG)を測定した。
試験2. HBGの継続摂取による脂肪吸収抑制作用
7週齢のC57BL/6J雄マウスに高脂肪飼料(HFD32,日本クレア)と2%HBG溶液または水を2～5週間与えた。試験期間中に1晩絶食（飲料は水に置換）後、脂質負荷試験を行った。
さらに 5週間目に1晩絶食後、リポ蛋白リパーゼ(LPL)阻害剤のチロキサポール(500mg/kg)を腹腔内投与し、30min後に脂質負荷試験を行った。
試験3. 未処置マウスでの脂質負荷試験との比較
7週齢のC57BL/6J雄マウスを1群7匹ずつ3群に分け、それぞれ 1)通常食-水、2)HFD32-水、そして 3)HFD32-2%HBG溶液を与えて3週間飼育した。1晩絶食後に脂質負荷試験を行った。
【結果】
試験1で、HBGとオリーブ油の同時投与では、血漿TGは2時間後に最高値を示したが対照群と差はなく、血漿TG曲線値面積（TG-⊿AUC）も同様に差はなかった。
試験2で、HBG摂取3週目以降の脂質負荷試験において、HBG投与群の血漿TG値は対照群よりも有意に低く、TG-⊿AUCも60%に低減した。この作用は、2%HBG溶液の2週間摂取では認められなかった。またLPL阻害剤の投与により脂質負荷後の血漿TGの上昇は対照群と差は見られなかった。
試験3で、HFD32-2%HBG群の血漿TGの上昇は通常食-水群と同程度であり、HFD32-水群よりも有意に低かった。
【考察】以上より、HBGの直接的な脂質吸収抑制作用は認められなかったが、3週間以上継続摂取することで脂質負荷後の血中脂質上昇が低減される作用が認められた。またこの作用は血漿TG上昇を速やかに低下させる作用（脂質代謝の亢進）と考えられた。これらの成績は、高脂肪食摂取系における肝臓脂肪蓄積の低減作用に関して、そのメカニズムを考える上で手がかりになるものと考えられた。

alpha-glucan, triglyceridemia, mouse

講演番号：3A16p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ A 校舎 16 会場

魚醤油（しょっつる）の ACE 阻害活性について

ACE inhibitory activity in fish sauce (syotturu)

青柳 智則[1]、後藤 猛[2]、塚本 研一[3]、○高橋 砂織[3]（[1]秋田大学工学資源、[2]秋田大学大学院、[3]秋田県総食研）
Tomonori Aoyagi[1], Takeshi Gotoh[2], Kenichi Tsukamoto[3], ○Saori Takahashi[3] ([1]Akita Univ., [2]Akita Univ., [3]Akita Res. Inst. Food & Brew.)

【目的】

レニン・アンギオテンシン系（RAS）は、哺乳類における血圧調節系として重要な役割を持っている。その中でアンギオテンシン変換酵素（ACE）は、レニンにより生じた不活性ペプチドのアンギオテンシン I を活性型ペプチド、アンギオテンシン II に変換する RAS 系の制御酵素の役割を持っている。これまで ACE に注目して様々な食材より阻害物質の探索が行われてきた。我々は、豆乳に注目し ACE 阻害ペプチドの探索を行い、プロテアーゼ処理豆乳に新規の ACE 阻害ペプチドを見出した[1)]。今回、秋田特産の魚醤油（しょっつる）における ACE 阻害活性について検討した。また、魚種の違いや発酵過程における ACE 阻害活性の消長についても検討したので報告する。

【方法】

ACE 活性は新規蛍光消光基質、*N*-methylanthranyl-Phe-His-Lys(2, 4-dinitrophenol)を用いて測定した[2)]。組換え型ヒト ACE（Sigma 社製）に阻害物質を加え室温で 5 分間インキュベートする。これに最終濃度 0.02mM となるように基質溶液を加え 37 ℃で 30 分間反応後、励起波長 340nm および蛍光波長 440nm で蛍光を測定した。 試験醸造魚醤油は原料魚 100 に対して食塩 30、プロテアーゼM「アマノ」ＳＤ（天野エンザイム製）0.3 を加え混合し、熟成初期には毎日撹拌しながら 1～24 ヵ月熟成した。熟成終了後は 85℃10 分加熱後冷却し、濾過した試料を ACE 阻害活性測定及び成分分析に供した。

【結果】

市販の魚醤油（しょっつる）では、製造法の違いにより ACE 阻害活性に大きな違いが認められた。試験醸造の魚醤油では、熟成後に ACE 阻害活性の増加し、長期熟成で阻害活性の低減する傾向が観察された。一方、魚種の違いや内臓の割合によっても ACE 阻害活性に違いが認められた。現在、ハタハタしょっつるからの ACE 阻害ペプチドの同定を試みている。

【参考文献】

1) Tomatsu M., Shimakage A., Shinbo, M., Yamada S., and Takahashi S., *Food Chemistry* (2013) *in press*
2) Takahashi S., Ono H., Gotoh, T., Yoshizawa-Kumage K., and Sugiyama T., *Biomedical Research*, **32**, 407-411 (2011)

Angiotensin converting enzyme, Inhibitor, Fish sauce

講演番号：3A16p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ A 校舎 16 会場

後発酵茶抽出物の降圧作用
Antihypertensive effect of a post-fermentation tea extract
○中村 彰男[1]、河原田 律子[1]、吉山 伸司[1]、高澤 香葉[2]、清水 比以呂[2]、増田 春菜[1]、井上 菜津子[3]、井上 孝彦[3]([1]群馬大院医・病態腫瘍薬理、[2]日本語 高崎健大・健康福祉・栄養学、[3]日本黒茶研究所)
○Akio NAKAMURA[1], Ritsuko KAWAHARADA[1], Shinji Yoshiyama[1], Kayo Takazawa[2], Hiiro Shimizu[2], Haruna Masuda[1], Natsuko Inoue[3], Takahiko Inoue[3] ([1]Dept. Mol. & Oncol. Pharmacol., Gunma Univ., Grad., Sch. Med.,, [2]Dept. Health & Nutri., Takasaki Univ. of Health and Welf., [3]BLACK TEA INSTITUTE OF JAPAN)

【目的】古来より薬であったお茶は、緑茶、烏龍茶、紅茶、プーアル茶など製造過程が異なるだけで全て茶の木（*Camellia sinensis*）の葉より作られ世界中で愛飲されている。その中でも微生物の発酵過程を経た後発酵茶（プーアル茶や碁石茶）には古くから他のお茶には見られないユニークな生理活性機能（体脂肪の分解促進効果など）が知られているが、その薬理メカニズムは解明されていない。我々はこの後発酵茶抽出物に血管平滑筋に対する強力な弛緩作用を見いだした。そこで高血圧モデル動物を用いてその降圧作用に関して調べた。
【方法】緑茶、烏龍茶、紅茶、黒茶（後発酵茶）など 50 種類以上の茶葉熱水抽出物がラット摘出大腿動脈標品の収縮弛緩にどの様な影響を与えるかを血管平滑筋の張力測定法により調べた。弛緩作用が見られた抽出物をさらに有機溶媒により抽出し、再び血管平滑筋の張力測定を行った。また、高血圧自然発症ラット(*SHR*)を用いて、これらの抽出物を経口あるいは静脈投与して非観血・観血血圧測定を行いその血圧降下作用を調べた。また、これらの茶葉熱水抽出物に含まれる ACE 阻害効果についても検討を行った。
【結果】血管平滑筋の張力測定から後発酵茶（プーアル茶や碁石茶）には緑茶、烏龍茶や紅茶には見られない強い血管平滑筋に対する弛緩作用が見られた。さらに有機溶媒抽出画分を行ったところ、主に酢酸エチル分画にこれらの弛緩作用を持つ化合物が含まれる事がわかった。さらに、非観血血圧測定ではこれらの抽出物の連続または単回投与試験のいずれにおいても蒸留水（対照）と比較して有意に血圧を降下させることが示された。また、これらの有機溶媒抽出画分には ACE 活性に対する阻害効果も含まれることもわかった。
【結論】プーアル茶や碁石茶のような後発酵茶の茶葉抽出物には血管平滑筋に直接作用し、弛緩させる事により降圧作用がある事がわかった。この降圧作用は微生物による発酵過程を経た後発酵茶特有の作用である事から、発酵過程で微生物が茶葉を分解することにより新しく生じる化合物である可能性が考えられる。血管平滑筋に直接作用する薬物は少ないことから、今後、新規の降圧剤の開発に新しい途が開かれる可能性が示唆される。

post-fermentation tea, Anti-hypertension, blood pressure

講演番号：3A16p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ A 校舎 16 会場

大豆タンパク質発酵抽出物の血圧降下作用

The hypotensive effect of the fermented soy protein extract

○中山 克大、冨永 隆生（（株）ラフィーネインターナショナル・研究開発部)
○ Katsuhiro Nakayama,Takanari Tominaga (Research and Development Div., Raffinee International Co., Ltd.)

近年、生活習慣病が増加の一途をたどっている。特に高血圧に関しては、我が国において総人口の約３割が高血圧であるとされ、大きな問題となっている。高血圧は動脈硬化や心臓病、脳卒中など主要臓器を傷害する大きな要因となっているため、血圧の適切なコントロールは予防医学の面からも重要な課題である。血圧降下剤としてアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤が汎用されているが、副作用等の観点で、より安全な天然物由来の ACE 阻害剤の開発が望まれているのが現状である。

伝統的な発酵食品は多様な機能性を有していることが知られており、特に生活習慣病に対する有益な作用についての研究が近年進められている。今回、我々は、大豆タンパク質の納豆菌発酵物を加水分解して得られた抽出物中に強い ACE 阻害活性を見出した。また、同抽出物より ACE 阻害活性を有する新規ペプチドを単離同定したので合わせて報告する。

市販の大豆タンパク質を蒸留水に懸濁後、納豆菌を接種し発酵を行った。この発酵液に中性プロテアーゼを加えて加水分解し、抽出を行った。得られた抽出液を大豆タンパク質発酵抽出物 OE-1 とした。In vitro における ACE 阻害活性を評価したところ、OE-1 は用量依存的な阻害活性を示した。また、OE-1 の ACE 阻害活性は、代表的な食品由来 ACE 阻害成分であるサーデンペプチドと同等以上であることが示された。さらに、高血圧自然発症ラット（SHR）への単回投与試験を行ったところ、OE-1 投与群は用量依存的な血圧降下作用を示した。また、OE-1 の血圧降下活性は持続的で、投与後 24 時間には回復するが比較的強い作用を有することも示された。

そこで、OE-1 に含有される ACE 阻害活性成分を同定するために、複数のカラムクロマトグラフィーを組み合わせて粗精製を行った。その結果、比較的高い ACE 阻害活性を有するペプチド含有画分が得られた。これらの画分をゲルろ過によりさらに精製を進め、単離したペプチドをアミノ酸分析および N 末端アミノ酸シークエンス分析に供した。その結果、新規と考えられるトリペプチドが同定された。この分析結果に基づいて合成したペプチドは ACE 阻害活性を有していたことから、今回同定されたペプチドは OE-1 の血圧降下活性の原因物質の一つであると考えられた。

これらの結果より、大豆タンパク質発酵抽出物 OE-1 は、活性成分として新規の ACE 阻害ペプチドを含有しており、レニン-アンジオテンシン系への介入を作用機序とした血圧降下作用により、高血圧の予防および改善に効果を示すと推測される。

angiotensin-converting enzyme, peptide, soy bean

講演番号：3A16p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ A 校舎 16 会場

加熱処理したユリネのラット腸内環境と脂質代謝への影響

Effect of steamed lily bulb on intestinal luminal environment and lipid metabolism in rats

○岡崎 由佳子[1]、福田 絵里[1]、知地 英征[1]、加藤 範久[2] ([1]藤女子大人間生活、[2]広島大院生物圏科学)
○Yukako OKAZAKI[1], Eri FUKUDA[1], Hideyuki CHIJI[1], Norihisa KATO[2] ([1]Fujijoshi Univ., [2]Hiroshima Univ.)

【目的】ユリネは，西洋では食されておらず，古くから日本で食されている伝統的な食材であり，国内生産量の 90%以上は北海道で作られている。主成分は糖質で，タンパク質や食物繊維も多く含まれている。また，トリプシンインヒビターも存在することが知られている。最近，我々は未加熱のユリネ摂取がラット糞中の Mucin（腸管バリア機能の指標），IgA（腸管免疫の指標），盲腸内容物の有機酸含量，*Bifidobacterium* および *Lactobacillales* を増加させることを見出し，腸内環境を改善させる可能性を示した。本研究ではさらに，加熱処理したユリネ摂取が高脂肪食摂取ラットの腸内環境と脂質代謝に及ぼす影響について，未加熱のユリネと比較検討した。
【方法】ユリネ（北海道産）は，未加熱あるいは蒸し加熱（T-fal スチームクッカー，25 分）したものを凍結乾燥後，粉末化し試料として用いた。4 週齢の SD 系雄ラットを 1 週間予備飼育後，高脂肪食（30%牛脂）を基本食として，未加熱あるいは蒸し加熱したユリネ粉末を 7%添加した飼料を与え，3 週間飼育した。なお, ユリネのタンパク質や食物繊維等の量はカゼインやセルロース等で補正した。糞及び盲腸内容物中のムチンについては蛍光光度分析法を用いて測定し，糞中 IgA は ELISA 法により測定した。盲腸内容物中の有機酸は HPLC により分析した。血清, 肝臓および糞中の脂質含量はキットを用いて測定した。
【結果】食餌摂取量と体重増加量は本食餌組成による影響を受けなかった。盲腸内容物重量は未加熱及び蒸し加熱ユリネ群で有意に増加し，内容物の pH は有意に低下した。糞と盲腸内容物中の Mucin 含量は，未加熱および蒸し加熱ユリネ群で顕著に増加し，糞中 IgA 含量も同様にユリネ関係 2 群で増加した。盲腸内容物中の乳酸，プロピオン酸，酢酸及び酪酸は，未加熱及び蒸し加熱ユリネ群で有意に増加し，特にコハク酸については蒸し加熱ユリネ群で顕著に増加した。血清及び肝臓の脂質含量は，3 群間で変化していなかった。腸間膜脂肪組織重量は，蒸し加熱ユリネ群で有意に減少し，副睾丸周囲脂肪組織重量も同様の傾向を示した。また，蒸し加熱ユリネ群において糞中の中性脂肪量は有意に増加することが認められた。一方，未加熱のユリネ摂取による脂肪組織重量や糞中中性脂肪量への有意な影響は認められなかった。以上の結果より，蒸し加熱ユリネは，未加熱ユリネを摂取させた場合とほぼ同様に，高脂肪食摂取ラットの Mucin と IgA 産生および腸内発酵を促進させ，腸内環境を改善する可能性が示された。さらに，蒸し加熱ユリネは，糞中への脂肪排泄を高め，内臓脂肪の蓄積を抑制することが推察された。

Steamed lily bulb, Intestinal luminal environment, Rats

講演番号：3A16p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ A 校舎 16 会場

アポリポタンパク C-II の凝集に及ぼす食品因子の影響

Effect of plant polyphenols on the apolipoprotein C-II oligomerization.

○丹羽 利夫[1,2]、大澤 俊彦[1,3] ([1]名古屋大生命農、[2]尚絅学院大総合人間科学、[3]愛知学院大心身科学)
○Toshio Niwa[1,2], Toshihiko Osawa[1,3] ([1]Nagoya Univ., [2]Shokei Gakuin Univ., [3]Aichi Gakuin Univ.)

目的

近年ある種のタンパク質の凝集が、アルツハイマー病をはじめとする多くの疾病に関与すると考えられている。我々はいくつかのアポリポタンパクの凝集がヒト動脈硬化巣に見出されていることに着目し、リポタンパクリパーゼの活性因子であり、血中トリグリセライド濃度に影響するとされるアポリポタンパク C-Ⅱ（アポ C-Ⅱ）の凝集と、食品成分によるアポ C-Ⅱ凝集への影響について調べることとした。

方法及び結果

これまでと同様の手法（*1*）により抗ヒトアポ C-Ⅱモノクローナル抗体の作成を行った。すなわちヒトアポ C-Ⅱをマウスに免疫することによりいくつかのモノクローナル抗体を得た。これらについてヒト血清アルブミンやアポ C-Ⅲをもちいて特異性解析を行うことにより、高い特異性をもつ抗ヒトアポ C-Ⅱモノクローナル抗体を得た。アポ C-Ⅱの凝集についてはアポ C-Ⅱを PBS 中 37 ℃で 4 日間インキュベートし、SDS-PAGE ののち得られたアポ C-Ⅱ抗体を用いたウェスタンブロッティングにより行った。これらの結果、アポ C-Ⅱのみではこのような条件でのインキュベートでは、明らかな変化は生じなかった。その一方 EGCG を添加したところ、明らかな高分子領域の増加が見られるとともに、curcumin では高濃度において有意に重合を促進した。さらに大豆イソフラボノイドである genistein, equol についても検討したところ、両者とも高濃度においてもほとんど影響を示さなかった。

そこで EGCG, curcumin の活性として報告されるキレート作用について検討するため EDTA を添加したところ、有意な作用は見られなかった。 次いで、一般にポリフェノールが持つとされる抗酸化性に着目し、DPPH ラジカル消去能について比較したところ EGCG が最も強く、次いで curcumin の順で抗酸化性は見られたが、genistein では DPPH ラジカル消去能は見られなかった。

(1) T. Niwa, S. Yokoyama, T. Osawa, Preparation of soy isoflavonoids for the production of anti-equol monoclonal antibody. *Phytochem. Lett.*, **2**, 220 (2009).

protein oligomerization, polyphenol, antioxidation

講演番号：3A16p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ A 校舎 16 会場

腸管上皮細胞におけるリゾホスファチジルイノシトールの生理機能解析

The analysis of phisiologycal function of lysophosphatidylinositol in intestinal epithelial cells

○宮崎 悠[1]、金 然正[2]、平林 義雄[2]、清水 誠[1]、薩 秀夫[1] ([1]東大院・農生科、[2]理研・脳科学)
○Chikashi MIYAZAKI[1], Yeon-Jeong KIM[2], Yoshio HIRABAYASHI[2], Makoto SHIMIZU[1], Hideo SATSU[1] ([1]Dept.Appl.Biol.Chem,The Univ. Tokyo, [2]RIKEN Brain Science Institute)

【目的】リゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルイノシトール（LPI）は生理活性脂質として多様な生理作用が知られている。LPI の生理作用は主として G タンパク共役型受容体の一種である GPR55 を介していることが報告されており、神経における痛みや骨の再吸収、血管新生、がん細胞の増殖や転移などに関わっていることが明らかとなっている。しかしながら GPR55 は消化管での発現が高いことが報告されているにもかかわらず、消化管特に腸管上皮細胞における GPR55 の発現及び LPI の生理機能については未だ明らかとはなっていない。そこで本研究ではヒト腸管上皮モデル細胞株を用いて、GPR55 の腸管上皮細胞における発現を検討すると共に、その生理機能の解析特に LPI による遺伝子発現制御を中心に解析することとした。
【方法】腸管上皮モデル細胞として、ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞及び LS180 細胞を用いることとした。プレート上に 2 週間培養し腸管上皮様に分化した Caco-2 細胞及び LS180 細胞より RNA を抽出し、GPR55 の mRNA 発現について RT-PCR 法により解析した。また分化した Caco-2 細胞に LPI を一定時間添加して培養した後 RNA を抽出し、さらに cDNA 合成をおこない real time RT-PCR 法によって長官上皮細胞に発現する様々な遺伝子の mRNA 発現量の変化を解析した。またサイトカインについては、その産生量の変化を ELISA 法によって解析した。
【結果】RT-PCR の結果、GPR55 は腸管上皮モデル Caco-2 細胞に mRNA レベルで発現していることが見出された。また LS180 細胞においても同様に GPR55 の発現が確認された。次に Caco-2 細胞に LPI を一定時間添加したところ、ある種のサイトカインの mRNA 発現が増加することが示された。また LPI 添加によって、そのサイトカイン産生量も増加傾向にあることが示された。現在さらにサイトカインに加えて、LPI が腸管上皮モデル細胞の遺伝子発現に及ぼす影響について検討中である。

lysophosphatidylinositol, GPR55, intestinal epithelial cells

講演番号：3A16p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ A 校舎 16 会場

DSS 誘導性大腸炎モデルマウスにおける食餌性植物および動物スフィンゴ脂質の効果

Effect of dietary plant and animal sphingolipids on DSS-induced colonic inflammation in mice

○荒井 克仁[1]、木下 幹朗[2]、三明 清隆[3]、間 和彦[4]、大西 正男[2]([1]岩手大院・連農、[2]帯畜大・食品、[3]丸大食品・中研、[4]日本製粉・中研)
○Katsuhito ARAI[1], Mikio KINOSHITA[2], Kyotaka MIAKE[3], Kazuhiko AIDA[4], Masao OHNISHI[2] ([1]UGAS, Iwate Univ., [2]Department of Food Science, Obihiro Univ., [3]Central Research Institute, Marudai Food Co. Ltd., [4]Central Laboratory, Nippon Flour Mills Co. Ltd.)

研究背景

スフィンゴ脂質は様々な生理機能を持ち，機能性食品素材として利用されている．演者らは，スフィンゴ脂質の新たな機能性として，近年罹患者数が急増している炎症性腸疾患に対する食餌性スフィンゴ脂質の効果に注目した．この疾患に対する食餌性スフィンゴ脂質の効果については，これまでスフィンゴミエリン(SM)についてのみ報告があり[(1)(2)]．一方，植物由来のグルコシルセラミド(GlcCer)については検討されていない．また，報告されている SM の効果に関しても炎症改善と悪化の双方の結果が示されている．そこで本研究では，デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導性大腸炎モデルマウスに対して SM および GlcCer を経口投与して，その効果の検証および作用機序の解析を行った．

実験方法

実験動物には Balb/c マウス(♀，4 週齢)を用い，試験験飼料は AIN-76 を基本飼料として，0.1%の SM または GlcCer を添加した飼料を使用した．試験飼料および DSS を 2%濃度で溶解した飲水を投与して 14 日間飼育し大腸炎を誘導した．炎症抑制効果の評価は，飼育期間中の炎症性指標（体重変動，便潜血ならびに体毛などの外見状態）および屠殺後の腸の状態と好中球浸潤の指標であるミエロペルオキシダーゼ(MPO)の Western blot 解析により行った．

結果および考察

DSS 投与 3 日目まではいずれの群においても体重の増加が認められたが，4 日目以降では各群ともに体重は減少した．しかしながら，両スフィンゴ脂質投与群ではコントロール群と比較して 3 日目から 6 日目までの間で体重の減少が有意に抑制されていた．大腸組織における MPO はコントロール群と比較し，SM および GlcCer 投与の両群ともに有意な減少が認められた．今回の研究から，両スフィンゴ脂質は構成スフィンゴイド塩基の構成が異なるが，いずれも経口投与することにより炎症初期状態において炎症緩和作用，あるいは炎症の予防効果があることが考えられる．

(1) Furuya H *et al.*, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 78, 2008,41-9.
(2) Fisghbeck A *et al.*, *Gut*, 2011, 61, 55-65.

Sphingolipid, Inflammatory bowel disease, Dextran sodium sulfate

講演番号：3A16p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ A 校舎 16 会場

にごり酒の胆汁酸吸着能とその有効成分の同定

Binding capacity of bile acid by cloudy sake and identification of the active component

○榊原 舞子、小高 敦史、鈴木 佐知子、芦田 優子、松村 憲吾、石田 博樹、秦 洋二（月桂冠総研）
○Maiko SAKAKIBARA, Atsushi KOTAKA, Sachiko SUZUKI, Yuko Ashida, Kengo MATSUMURA, Hiroki ISHIDA, Yoji HATA (Res. Inst., Gekkeikan Sake Co.)

【目的】　胆汁酸は肝細胞でコレステロールから生成され、腸管で脂質をミセル化して消化・吸収を助ける成分である。胆汁酸がタンパク質や食物繊維に吸着され、体外に排出されると、新たな胆汁酸の生成が促進され、結果として体内のコレステロール濃度が低下する。我々は酒粕が胆汁酸吸着能を有することを報告した[1)]が、その有効成分の同定には至っていなかった。本研究では、酒粕に含まれる胆汁酸吸着能の有効成分を特定した。さらに、有効成分を摂取する手段のひとつとしてにごり酒に着目し、その胆汁酸吸着能を評価した。

【方法と結果】　まず、酒粕の胆汁酸吸着能を示す有効成分の特定を試みた。酒粕をプロテアーゼやセルラーゼ等の酵素剤で消化試験した結果、その不溶性残渣の胆汁酸吸着能に変化はなかった。また、酒粕から溶媒分画により可溶性タンパク質を除去しても、その不溶性残渣の胆汁酸吸着能に変化はなかった。これらの結果から、有効成分は難消化性かつ不溶性のタンパク質（レジスタントプロテイン）および食物繊維であろうと推察した。酒粕を人工消化処理した不溶性残渣を SDS-PAGE に供した結果、分子量 10 kDa から 15 kDa の範囲に、3 本のタンパク質バンドが確認された。各タンパク質バンドの N 末端アミノ酸配列を決定し、NCBI のタンパク質データベースを検索した結果、いずれも米由来のタンパク質であった。酒粕の胆汁酸吸着能を示す有効成分は、分子量 10 kDa から 15 kDa の米タンパク質であることが明らかとなった。

次に、にごり酒の胆汁酸吸着能について評価を行った。その結果、にごり酒の固形分の胆汁酸吸着量は、固形分のレジスタントプロテイン、食物繊維およびそれらの和と強い相関を示した。したがって、にごり酒においても、レジスタントプロテインと食物繊維の両方が胆汁酸吸着能に寄与していると考えられた。にごり酒を消化試験した不溶性残渣にも胆汁酸吸着能が残存し、SDS-PAGE で酒粕と同じサイズの 3 本のタンパク質バンドが確認された。以上の結果より、にごり酒の飲用によって、酒粕の胆汁酸吸着能を示す有効成分を摂取可能であることが示唆された。

1）芦田等：農化，71，137-143（1997）

sake lees, cloudy sake, bile acid

講演番号：3A16p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ A 校舎 16 会場

カテキン類が腸管上皮細胞におけるフルクトース吸収活性に及ぼす影響

Effect of catechins on the activity of fructose absorption in intestinal epithelial cells

○淡 壮平、薩 秀夫、権藤 祐輔、清水 誠（東大院農）
○Sohei AWARA,Hideo SATSU,Yusuke GONDO,Makoto SHIMIZU (Tokyo Univ.)

【目的】近年清涼飲料などに使用される果糖ブドウ糖液糖の摂取量の増加と肥満や生活習慣病の増加との関連が指摘されている。その構成成分であるフルクトースがこれらの疾患の悪化の一因である可能性が示唆されている。フルクトースは腸管上皮細胞の管腔側に存在するグルコーストランスポーターの一つである GLUT5 を介して体内に吸収される。これまでの研究で、我々は柑橘に含まれるノビレチンが腸管上皮モデル細胞におけるフルクトース吸収・透過を抑制することを報告してきた。そこで本研究では引き続きフルクトース過剰摂取による肥満・生活習慣病の予防を目的として、腸管上皮細胞におけるフルクトース吸収活性を阻害する食品因子の探索・解析をさらに進めることとした。
【方法】ヒト腸管上皮モデル細胞として、ヒト結腸癌由来Caco-2細胞を用いた。Caco-2細胞をプレート上に2週間培養し腸管上皮様に分化させた後、^{3}H標識したフルクトースを添加して一定時間インキュベートし、その後細胞を回収し細胞内に取込まれたトリチウム量を測定することでフルクトース吸収活性とした。
【結果】約 40 種類のフィトケミカルを用いて腸管上皮フルクトース吸収活性に及ぼす影響を検討した結果、前述のノビレチンの他に緑茶に含まれるエピカテキンガレートが高いフルクトース吸収阻害活性を有していることが見出された。エピカテキンガレートはフルクトースの他にグルコースの吸収活性も阻害するがアミノ酸およびジペプチドの吸収活性は阻害しないことから、グルコーストランスポーターに特異的であることが示唆された。またその他のカテキン類について検討したところ、カテキンガレートでは同様な阻害活性がみられたものの、様々な生理活性が報告されているエピガロカテキンガレートなどではフルクトース吸収阻害活性がみられず、エピカテキンガレート及びカテキンガレートの特異性が高いことが示唆された。エピカテキンガレートによるフルクトース吸収阻害様式を検討した結果、エピカテキンガレートは Km 値には大きな影響は与えず、一方 Vm 値を半分程度に減少させることが示された。さらに Caco-2 細胞を透過性膜上に培養して腸管上皮細胞層を形成させ、これを用いてフルクトース透過に対するエピカテキンガレートの影響を検討した。その結果、添加したエピカテキンガレートの濃度依存的にフルクトースの透過は阻害されることが見出された。以上より、エピカテキンガレートは腸管上皮におけるフルクトースの吸収および透過を阻害することが示唆された。

GLUT5, fructose, epicatechin gallate

講演番号：3A16p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ A 校舎 16 会場

ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 によるカロテノイドの取込みに対するグリセロ糖脂質の影響
Effect of glyceroglycolipids on carotenoid uptake by human intestinal Caco-2 cells
○小竹 英一、ヨネクラ リナ、長尾 昭彦（独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所）
○Eiichi KOTAKE-NARA,Lina YONEKURA,Akihiko NAGAO (Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization)

［目的］ カロテノイドは様々な生物活性を示すことが報告されているが、その生体利用性は低い。我々はこれまで、食品カロテノイドの腸管吸収においてリン脂質や水溶性食物繊維が大きな影響を及ぼすことを明らかにしてきた。例えば、ホスファチジルコリンは吸収を阻害、リゾリン脂質は促進、食物繊維は吸収を遅らせる。グリセロ糖脂質は葉緑体チラコイド膜を構成する主要成分で、緑葉野菜からカロテノイドとともに摂取しているが、野菜カロテノイドの吸収におけるグリセロ糖脂質の影響についてはよく分かっていない。そこで本研究では、緑葉野菜の主要カロテノイドである β-カロテンとルテインの腸管吸収に対する 6 種類のグリセロ糖脂質の影響を調べた。

［方法］ 市販のモノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG)、ジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG)、スルフォキノボシルジアシルグリセロール (SQDG) を精製し、これらを酵素処理後、さらに精製してリゾ体(MGMG、DGMG、SQMG)を調製した。Caco-2 細胞を 24 ウェルプレート上で 3 週間培養して分化させ、ヒト小腸上皮細胞モデルとして使用した。カロテノイドは腸管で盤状の混合ミセルに可溶化されて細胞による取込みが可能となるため、タウロコレート、モノアシルグリセロール、オレイン酸、調製したグリセロ糖脂質あるいはリン脂質からなる混合ミセルにカロテノイドを可溶化させて Caco-2 細胞へ添加した。37℃で 2 時間インキュベートした後、細胞に取込まれたカロテノイドを定量して、グリセロ糖脂質の効果を比較した。

［結果］ DGDG 及び SQDG は、長鎖ジアシル型ホスファチジルコリン同様に、β-カロテン及びルテインの細胞への取込みを抑制した。ミセル中のカロテノイドの波長スペクトルを分光光度計で測定したところ、これらを含まない混合ミセルと比較して、β-カロテンのスペクトルはブロードになり、ルテインはスペクトルのピーク数が変化した。カロテノイドはこれらジアシル型グリセロ糖脂質との強い相互作用によりミセル内部から遊離しにくくなり、細胞への取込みが抑制されると考えられた。一方、モノアシル型糖脂質では、DGMG と SQMG が長鎖モノアシル型リン脂質同様に、β-カロテン及びルテインの細胞への取込みを促進した。促進メカニズムについても検討した。これらの結果から、グリセロ糖脂質は食品カロテノイドの腸管吸収に大きな影響を与えることが明らかとなった。

Caco-2, carotenoid, glyceroglycolipids

講演番号：3A16p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ A 校舎 16 会場

小腸および肝臓モデル培養細胞の共培養系を用いたフラボイノイドの吸収代謝評価

Flavonoid metabolism in the co-culture system with human intestinal Caco-2 and hepatoma HepG2 cells

○室田 佳恵子[1]、中村 俊之[2]、熊本 舜[1]、生城 真一[3]、加藤 陽二[4]、寺尾 純二[2] ([1]近大・理工、[2]徳島大院・HBS 研、[3]富山県大・工、[4]兵庫県大・環境人間)
○Kaeko MUROTA[1], Toshiyuki NAKAMURA[2], Shun KUMAMOTO[1], Shin-ichi IKUSHIRO[3], Yoji KATO[4], Junji TERAO[2] ([1]Kinki Univ., [2]Univ. Tokushima, [3]Toyama Pref. Univ., [4]Hyogo Pref. Univ.)

［目的］フラボノイドは植物性食品に広汎に含まれる機能性成分である。フラボノイドの生体内代謝は主に小腸と肝臓に存在する第二相抱合酵素により行われるが、抱合部位の違いは生理活性に影響することが示唆されている。そのため、フラボノイドの生体内代謝を明らかにすることは、疾病予防における作用機序を解明する上で重要である。本研究ではフラボノイド代謝を培養細胞レベルで評価するために、ヒト小腸および肝臓モデル細胞共培養系を用いた検討を行った。
［方法］ヒト結腸がん由来培養株であり小腸上皮細胞モデルとして汎用されている Caco-2 細胞およびヒト肝がん由来培養株であり肝臓における代謝研究にもよく用いられる HepG2 細胞をモデル細胞として使用した。選択透過性フィルター上に培養し分化させた Caco-2 細胞に対し、代表的なフラボノイドである quercetin と genistein を頂端膜（AP）側に添加して 2 h インキュベートした。このとき、Caco-2 細胞を培養したインサートを、マルチウェルプレートにコンフルエントとなるよう培養した HepG2 細胞に上層し、Caco-2 細胞の基底膜（BL）側培地が HepG2 細胞とインキュベートされるようにした。インキュベート後の培地を回収し、未代謝アグリコン量ならびに、脱抱合処理後に得られる総抱合体量を評価した。さらに LC-MS/MS を用いて産生された代謝物の構造解析を行った。
［結果および考察］Caco-2 細胞単独培養時と比べて、共培養系においては AP 側培地に排出されるフラボノイド代謝物量に減少傾向が見られた。quercetin 添加時には、BL 側培地において、未代謝物が減少傾向を示すとともにメチル化抱合体が増加した。MS/MS 解析の結果、Caco-2 細胞は少なくとも 2 種のグルクロン酸抱合体と 2 種の硫酸抱合体を産生していた。また、HepG2 細胞も同様の抱合体を産生していた。共培養の結果、BL 側培地中の抱合体パターンが変化し、quercetin 3 or 7-glucuronide 以外のグルクロン酸抱合体が著しく減少した。硫酸抱合体は全体的に減少する傾向がみられたが、生成量の多い quercetin 3’ or 4’-slufate はインキュベート後にも残存していた。genistein 添加時には、共培養により未代謝物が顕著に減少し抱合体が著しく増加した。MS/MS 解析より、genistein の場合にもグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体がそれぞれ 2 種ずつ産生されていたが、共培養時にはグルクロン酸抱合体ならびに硫酸抱合体のうち 1 種ずつについてのみ産生量の増加がみられた。
以上の結果より、Caco-2 細胞および HepG2 細胞が産生する代謝物の種類は単独培養系においてはヒト血漿中代謝物のパターンとは異なっていたが、これら 2 種の細胞を共培養することにより、ヒト血漿で観察されるものにより近い代謝物パターンを得られる可能性が示された。

Caco-2, HepG2, flavonoids

講演番号：3A16p17
講演日時、会場：3 月 26 日 17:12～ A 校舎 16 会場

酵素グルコシダーゼや腸管モデル培養細胞を用いた配糖体 Leptosin の代謝研究

Study on metabolism of glycoside, leptosin, by caco2 cells and glycosidases

○荒木 裕佳子[1]、松本 大樹[1]、北元 憲利[1]、室田 佳恵子[3]、伊藤 美紀子[1]、菊崎 泰枝[2]、瀧本 陽介[4]、加藤 陽二[1] ([1]兵庫県立大環境人間、[2]奈良女子大生活環境、[3]近畿大理工生命科、[4](株)ヘルスケアシステムズ)

○Yukako ARAKI[1], Daiki MATSUMOTO[1], Noritoshi KITAMOTO[1], Kaeko MUROTA[3], Mikiko ITO[1], Hiroe KIKUZAKI[2], Yousuke TAKIMOTO[4], Yoji KATO[1] ([1]UNIVERSITY OF HYOGO, [2]Nara women's Univ., [3]KINKI Univ., [4]Healthcare Systems)

［目的・背景］　マヌカ(Leptospermum scoparium)はニュージーランドのマオリ族により古くから創傷、歯周病、十二指腸、胃潰瘍の治療に用いられてきた。マヌカの花より得られるマヌカハニーは高い抗菌活性を持ち、抗炎症作用などの機能性を有することが知られている。演者らはマヌカハニーからの特有の成分として、ゲンチオビオース(二糖)を持つメチルシリンゲート(MSYR)の配糖体 Leptosin を同定した。(J. Agric. Food Chem. 2012)。本研究では Leptosin がマヌカハニーの機能性の一端を担っている可能性を考え、Leptosin およびそのアグリコンである MSYR の代謝を、腸のモデル細胞である Caco2 細胞を用いて調べた。また、精製 Leptosin のα及びβ-グルコシダーゼによる分解についても調べた。

［実験方法］ Caco2 細胞をトランズウエルに定着させ、15%FBS-DMEM 培地で 3 週間培養し、細胞を分化させた。培地を HBSS(20 mM グルコース、10 mM HEPES)緩衝液に交換し、最終濃度 100μM の Leptosin あるいは MSYR を添加し、apical 側と basolateral 側から培養液を経時的にサンプリングした。その後、代謝物を HPLC あるいは LC/MS 分析した。また、精製 Leptosin をαあるいはβ-グルコシダーゼ処理し、その分解物についても分析した。

［結果］ Leptosin を添加した培地では、apical 側で MSYR に由来するピークが検出された。MSYR を添加した培地では 24 時間後から apical 側、basolateral 側の両方に新規ピークが認められ、LC/MS による解析から、MSYR の硫酸抱合体であることがわかった。精製 Leptosin はβ-グルコシダーゼ処理によってのみ分解が認められ、アグリコンである MSYR と分子量 374 の物質が検出された。この物質を更に解析したところ、Leptosin にあるゲンチオビオースが一分子切断されて出来た単糖タイプの MSYR 配糖体であることが明らかとなった。

［考察］ これらの結果より、Caco2 細胞により Leptosin は分解されてアグリコンである MSYR を生じること、MSYR は硫酸抱合体化されることが分かった。また、Leptosin はβ-グルコシダーゼによってのみ分解され、MSYR と単糖タイプの MSYR 配糖体の両方が生じた。現在は MSYR のグルクロン酸抱合化について検討を行っている。

Caco2, metabolite, Manuka honey

講演番号：3A16p18
講演日時、会場：3 月 26 日 17:24～ A 校舎 16 会場

γ-グルタミルメチルアミドの輸送分子の同定
The Involvement of L-Type Amino Acid Transporters in gamma-glutamylmethylamide Transport
○山本 幸子[1]、木村 徹[2]、立木 隆[3]、丑丸 真[1] ([1]杏林大・医・化学、[2]杏林大・医・薬理学、[3]立命館大・生命)
○Sachiko YAMAMOTO[1], Toru KIMURA[2], Takashi TACHIKI[3], Makoto USHIMARU[1] ([1]Kyorin Univ. Med. Chem., [2]Kyorin Univ. Med. Pharm., [3]Ritsumeikan Univ.)

【目的】γ-グルタミルメチルアミド（GMA）は、茶のうま味成分で種々の好ましい生理作用を持つアミノ酸 テアニン（γ-グルタミルエチルアミド）の構造類似化合物である。テアニン同様、茶葉にわずかに含まれる。以前、GMA に、テアニンと同様に、病的な高血圧症ラットの血圧を低下させる作用があることが報告された。しかし、GMA が、どこでどのように機能するのかは全く明らかでない。我々は、テアニンが、ロイシンなど側鎖の大きな中性アミノ酸の輸送を担う輸送系 L アミノ酸トランスポーターを経由して、この標的組織に運搬される事を見出した[1]。そこで、本報では、GMA を輸送する分子を同定することで、この化合物の作用機構を推測する。
【方法・結果】[^{3}H]標識 GMA を、*Methylovorus mays* No. 9 の GMA 合成酵素を用いて、[^{3}H]グルタミン酸とメチルアミン、そして ATP から合成した。得られた[^{3}H]標識 GMA の、種々の哺乳類培養細胞への取り込みを観察した結果、GMA の取り込みが、程度の差はあれ、検討した全て細胞に認められることが分かった。その取り込み反応は、Na^+非依存的に進行し、かつロイシンと輸送系 L トランスポーター特異的阻害剤 BCH の共存で強く阻害された。さらに、輸送系 L トランスポーターを構成する分子 LAT1 と LAT2 が、GMA を輸送することを、LAT1 と LAT2 異種発現細胞を用いて認めた。以上の結果から、GMA は、テアニンと同じく、主に輸送系 L トランスポーターで運搬されることを見出した。この結果は、GMA がテアニンと同様の機構で生理作用を発揮する可能性を示した。
[1] 山本ら, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76, in press, 2012

γ-glutamylmethylamide, theanine, L-type amino acid transporter

講演番号：3A16p19
講演日時、会場：3 月 26 日 17:36～ A 校舎 16 会場

サラシア属植物エキスの吸収動態解析
Absorption kinetics of Salacia extract
○小田 由里子、植田 文教、石川 静、柿沼 千早（富士フイルム株式会社）
○ Yuriko ODA,Fumitaka UEDA,Shizuka ISHIKAWA,Chihaya KAKINUMA (Fujifilm Corporation)

【目的】デチンムル科のサラシア属植物（Salacia reticulata, Salacia oblonga 等）の根部や幹はアーユルヴェーダの有用植物として、特に糖尿病の治療に有効であるとされている。これらには、サラシノール、コタラノール、ネオサラシノール、ネオコタラノールなどの特徴的な成分が含まれ、小腸で二糖類の分解を抑え、糖吸収を阻害する働きがある。その結果、腸内環境改善作用をもたらし、腸管免疫機構を通じた生体調整の効果を有する。このようにサラシア属植物に関しては、近年様々な機能が明らかになってきているが、サラシア属植物有効成分の生体内での挙動は不明であった。

そこで本検討では、サラシア属植物エキス投与ラットの糞便中に排出される有効成分を定量することにより、有効成分が吸収されるか否かを明らかにすることを目的として、実験を行った。

【方法】試験には 11 週齢のオスの SD ラットを用い、1 週間の予備飼育後、400mg/kg のサラシア属植物エキスを胃内投与した。その後、ラットを代謝ケージに移し、投与後 24 時間、48 時間、72 時間で糞便の採取を行い、直ちに凍結保存した。また、飼育期間中、水と餌は自由摂取とした。

採取した糞便に水を加え、懸濁液を作成した。懸濁液を用いて、不純物の分解・除去処理を行い、LC/MS/MS により有効成分（サラシノール、コタラノール、ネオサラシノール、ネオコタラノール）の定量を行った。

【結果･考察】サラシア属植物エキス有効成分 4 種は､エキス投与後 72 時間でほぼ 100％回収できた。成分の違いによる排出タイミングの差は、ほとんど見られず、投与後 24 時間で約 60％、48 時間までで約90％､72時間までに約100％サラシア属植物有効成分が排出されることが明らかになった｡また、以前行った予備試験において血中からサラシア属植物エキスの有効成分が検出されなかったことから、サラシア属植物エキス有効成分（サラシノール、コタラノール、ネオサラシノール、ネオコタラノール）は生体内に吸収されることなく、消化管に長時間留まり糖吸収抑制作用を示した後、糞便中に排出されると考えられる。

以上の結果から、サラシア属植物エキス摂取による生体内での糖吸収抑制効果の高さ及び効果持続時間の長さは、有効成分が生体内に吸収されることなく、消化管内で長時間作用し続けるためであることが示唆された。

Salacia, absorption kinetics

講演番号：3A16p20
講演日時、会場：3 月 26 日 17:48～ A 校舎 16 会場

ラット小腸におけるクラスリン依存性エンドサイトーシスを介したサケ鼻軟骨由来プロテオグリカン吸収

Absorption of proteoglycan from the nasal cartilage of the salmon via clathrin-mediated endocytosis in the small intestine of rats

○土谷 庸[1]、富田 雅弘[1]、坪井 誠[2]、高橋 達治[2]、米塚 正人[3]、花田 玲子[1]、齋藤 望[1]([1]東北女子大学家政学部、[2]一丸ファルコス株式会社、[3]株式会社角弘プロテオグリカン研究所)
○Yo Tsuchiya[1], Masahiro Tomita[1], Makoto Tsuboi[2], Tatsuji Takahashi[2], Masato Yonezuka[3], Reiko Hanada[1], Nozomi Saitoh[1] ([1]Tohoku women's college, [2]Ichimaru Pharcos Co., Ltd., [3]Proteoglycan Laboratory, Kakuhiro Co., Ltd.)

【目的】プロテオグリカンは細胞外マトリックスの主要な非コラーゲン性構成物質であり、軟骨や皮膚において外部からの物理的衝撃を緩衝する役割を担っている。サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンの摂取により、皮膚および関節疾患における改善作用が報告されているが、摂取後の腸管における吸収機序は明らかになっていない。そこで本研究では、ラット空腸・回腸・大腸でのサケ鼻軟骨由来プロテオグリカンの吸収を解析した。

【方法】ラット空腸・回腸・大腸の反転腸管を作成し、管腔側プロテオグリカン 0.15, 0.3, 1.5mg/ml の濃度下で 2 時間培養した。漿膜側へ吸収されたプロテオグリカン量は、カルバゾール硫酸法を用いて検出したウロン酸量から換算した。

【結果】空腸および回腸では、プロテオグリカンの濃度依存的な吸収量増加が見られた。特に空腸部は、回腸と比べ有意に高いプロテオグリカン吸収量を示した。また空腸でのプロテオグリカン吸収量は、プロテオグリカン糖鎖部分の構成物質であるコンドロイチン A および C 吸収量に比べ有意に高かった。クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤のフェニルアルシンオキシド添加により、空腸プロテオグリカン吸収量は 45%抑制された。一方で、マクロピノサイトーシス阻害剤とカベオリン依存性エンドサイトーシス阻害剤添加では、空腸プロテオグリカン吸収量の変化は見られなかった。

【考察】腸管でのサケ鼻軟骨由来プロテオグリカン吸収量は空腸部が最大であり、その吸収は一部クラスリン依存性エンドサイトーシスを介していることが示唆された。

proteoglycan, jejunum, endocytosis

講演番号：3A20a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ A 校舎 20 会場

ラットにおける離乳期の食事制限が成熟後の糖・脂質代謝に与える影響

Effects of diet restriction during weaning in rats on metabolism of glucose and fat in maturation

○望月 和樹[1]、池田 美沙[2]、合田 敏尚[2]([1]山梨大生環、[2]静岡県立大薬食)
○Kazuki MOCHIZUKI[1], MISA IKEDA[2], TOSHINAO GODA[2] ([1]Univ. of Yamanashi, [2]Univ. of Shizuoka)

【目的】ラットの離乳期では、脂質の多い母乳から糖質の多い固形食へと食事形態が変化していく。食餌の変化に伴いインスリンなどの血中ホルモン濃度が上昇することによって、肝臓および脂肪組織では、脂肪酸合成などが盛んになるとともに、各組織が成熟する。この時期には、食事に伴う劇的な組織の形態形成がおこなわれるため、乳幼児期および胎児期のストレスや栄養不良は、成熟期に代謝性疾患の発症リスクを増大させると考えられている。本研究では、離乳期のラットにおける絶食刺激が、成長後に耐糖能異常および脂肪組織の機能の変化をもたらすかを検討した。
【方法】生後 18 日目から 3 日間絶食させたラット（対照として非絶食ラット）に標準固形飼料を 19 週間与え、その後高脂肪高スクロース食（エネルギー比率で脂肪 64%、スクロース 14%、デンプン 7%）あるいは低脂肪高デンプン食（エネルギー比率で脂肪 22%、デンプン 58%）を投与した。投与後 12 週目に耐糖能試験を行い、14 週目に肝臓および脂肪を採取した。それぞれのラットから肝臓および腸間膜脂肪組織を摘出し、重量を測定した。肝臓および脂肪組織の機能変化を調べるため、脂肪酸合成関連酵素（FAS、ACCα）、糖新生関連酵素 PEPCK1、リポタンパク質リパーゼ LPL、脂肪細胞の分化マーカーALBP および PPAR-γ2、脂肪細胞から分泌されるインスリン感受性指標タンパク質であるアディポネクチンについて mRNA 発現量を測定した。
【結果と考察】高脂肪高スクロース食を投与した両群（離乳期摂食群および離乳期絶食群）では、低脂肪食を投与したそれぞれの群と比べ、体重、肝臓重量、腸間膜重量が高いとともに、耐糖能の悪化およびインスリンの分泌の亢進が観察された。また離乳期絶食群では、同じ食餌を投与した離乳期摂食群と比較して糖負荷 120 分後の血糖値が高く、15-30 分後のインスリン値が低い傾向を示した。さらに、低脂肪・高糖質食を投与した群の肝臓では、離乳期絶食群における ACCα および PEPCK1 の mRNA が、離乳期摂食群と比べ顕著に高かった。さらに、腸間膜脂肪組織では、離乳期絶食群におけるアディポネクチンおよび LPL の mRNA 発現量は、離乳期摂食群と比べ顕著に低かった。以上の結果より、離乳期の低栄養は、成熟期に低脂肪・高糖質食を与えた群において、肝臓の糖新生関連酵素の遺伝子発現の増大および、脂肪組織のインスリン感受性遺伝子発現の低下をもたらすことによって耐糖能異常を誘導する可能性が示唆された。

DoHaD, metabolism of glucose and fat, diet restriction

講演番号：3A20a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ A 校舎 20 会場

田七人参由来ダンマラン系トリテルペンによる骨格筋の糖取込み亢進効果の作用メカニズム解析

Molecular mechanisms of dammarane-type triterpenes derived from *Panax notoginseng* on glucose uptake in skeletal muscle

○岩本 拓[1]、高村 裕介[1]、北村 久美子[1]、生駒 桂子[1]、野村 充[1]、小野 知二[1]、村越 倫明[1]、眞鍋 康子[2]、西野 輔翼[3,4]、藤井 宣晴[2]([1]ライオン（株）、[2]首都大学東京院、[3]京都府立医大、[4]立命館大)
○Taku IWAMOTO[1], Yusuke TAKAMURA[1], Kumiko KITAMURA[1], Keiko IKOMA[1], Mitsuru NOMURA[1], Tomoji ONO[1], Michiaki MURAKOSHI[1], Yasuko MANABE[2], Hoyoku NISHINO[3,4], Nobuharu L. FUJII[2] ([1]LION Corporation, [2]Tokyo Metropolitan University, [3]Kyoto Prefectural University of Medicine, [4]Ritsumeikan University)

【目的】我々は独自の手法を用いて薬用人参の一つである田七人参から、ダンマラン系トリテルペン類を高含有したエキス（田七人参加工粉末）を作製した。この田七人参加工粉末に空腹時、及び食後血糖値の上昇を抑制する効果があることを、動物、及び予備的ヒト試験により示している。さらに、田七人参加工粉末中の主要なダンマラン系トリテルペンであるパナキサトリオールが、血糖値上昇抑制効果の有効成分の一つであることを動物試験により示している。昨年度の本大会において、パナキサトリオールには骨格筋細胞に対する糖取込み亢進効果があることを報告した。本年度は、パナキサトリオールによる骨格筋での糖取込み亢進効果の作用メカニズムを解析した結果について報告する。
【方法】１）ラット骨格筋由来細胞株 L6-C11 を、2%FBS を含む MEM 培地で培養し、筋管様に分化させた。その後、パナキサトリオールを 24 時間添加し、細胞への ^{3}H ラベルされた 2-deoxyglucose の取込み量を測定することで、糖取込みを評価した。また、Akt、AMPK のリン酸化量をウエスタンブロット法により測定した。２） KK-Ay マウスに 1%田七人参加工粉末を混餌で与え、12 日間飼育後にヒラメ筋を摘出し、インスリン存在下又は非存在下にて 20 分間培養の後、Akt のリン酸化量をウエスタンブロット法により測定した。
【結果】１）パナキサトリオールの添加は骨格筋細胞の Akt のリン酸化量を有意に増加させたのに対し、AMPK のリン酸化量には影響を与えなかった。加えて、PI3 kinase 阻害剤である wortmannin 、Akt1/2 kinase 阻害剤である Akt inhibitor VIII の添加により、パナキサトリオール添加により亢進する骨格筋細胞への糖取込みは完全に抑制された。２）田七人参加工粉末を摂取させた KK-Ay マウスから摘出したヒラメ筋では、インスリンにより誘導される Akt のリン酸化量が有意に増加した。
以上の結果から、田七人参加工粉末中のパナキサトリオールは骨格筋においてインスリンにより制御される PI3 kinase-Akt シグナル伝達系路を活性化し、糖取込みを亢進することで血糖値上昇を抑制することが明らかとなった。

Panax notoginseng, Insulin signaling, skeletal muscle

講演番号：3A20a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ A 校舎 20 会場

サフランは protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B)の阻害を介してインスリンシグナリングを活性化する

Saffron activates insulin signaling pathway through the inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B)

○前田 歩海[1]、甲斐 建次[1]、石井 剛志[2]、赤川 貢[1] ([1]大阪府大院生命環境、[2]静岡県大食栄)
○Ayumi MAEDA[1], Kenji KAI[1], Takeshi ISHII[2], Mitsugu AKAGAWA[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]Shizuoka Prefecture Univ.)

【目的】2 型糖尿病は，インスリン抵抗性が主因となって起こる代謝異常症であり，世界的な患者数の増加が社会問題化している．インスリンシグナリングは，インスリンがインスリン受容体 (IR) に結合するとそのチロシンキナーゼが活性化され自己リン酸化することで発動し，インスリン受容体基質-1 (IRS-1) のチロシンリン酸化を促す．リン酸化シグナルは下流のシグナル分子に伝達され，細胞内小胞に存在するグルコース輸送体 (GLUT4) に作用し，GLUT4 が細胞膜へ移行することで，グルコースの取り込みを促進する．このインスリンシグナリングを，負に制御しているのが protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) であり，リン酸化 IR，及び IRS-1 を脱リン酸化することでシグナル伝達を遮断する．PTP1B の阻害によりインスリンシグナルが増強されるため，PTP1B 阻害剤は新規糖尿病治療薬としてその開発が期待されている．本研究では古来より生薬としても使用されてきた香辛料に着目し，PTP1B を阻害してインスリンシグナリングを増強する成分の探索を行った．

【方法と結果】12 種類の香辛料の DMSO 抽出物とリコンビナント PTP1B をインキュベートして酵素活性を測定した結果，サフランの抽出物が顕著な阻害を示した．次にマウス由来の C2C12 筋芽細胞をインスリンの標的である筋管細胞に分化させ，香辛料抽出物がインスリンシグナリングに与える影響を調べた．その結果，サフラン抽出物が IR とその下流のシグナル伝達分子 (IRS-1, Akt, 及び Erk1/2) を 1 μg/mL の濃度でインスリン非依存的に活性化することが判明した．そこで，サフラン中の PTP1B 阻害活性をもつ成分の同定するためサフランを段階的に抽出し，PTP1B 阻害活性が認められた $CHCl_3$ を GC/MS で解析したところ，サフランの主香気成分である safranal が同定され，濃度依存的に PTP1B を阻害することを明らかにした．その阻害機構として共役不飽和アルデヒド構造を持つ safranal が PTP1B の活性中心である Cys 残基の反応性 SH 基と Michael 反応する分子機構が推定されたため検証を行ったところ，safranal とのインキュベートにより PTP1B の反応性 SH 基の減少と，カルボニル基の生成が観察された．また，グルタチオンとのモデル反応物を解析することで，Cys 残基の SH 基と safranal が Michael 付加体を形成することが確認できた．Safranal は筋管細胞においても濃度依存的 (1–20 μM) に PTP1B を阻害してインスリンシグナリングを活性化し，GLUT4 の細胞膜への移行を誘導することでグルコースの取り込みを促進した．以上の結果より，サフラン及び safranal は糖尿病を改善する新たな機能性食品，または治療薬として応用できる可能性が示唆された．

Diabetes, Insulin signaling, Saffron

講演番号：3A20a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ A 校舎 20 会場

ヒシ外皮の血糖値上昇抑制作用

Effect of Japanese water chestnut husk on postprandial blood glucose level

○安田 みどり[1]、安武 健一郎[1]、日野 まど香[1]、宮山 瞳[1]、武富 和美[2] ([1]西九大健栄、[2]西九大短大)
○Midori YASUDA[1], Kenichiro Yasutake[1], Madoka Hino[1], Hitomi Miyayama[1], Kazumi Takedomi[2] ([1]Nishikyusyu Univ., [2]Nishikyushu Junior College)

【目的】一年草の水草であるヒシは、日本全土およびアジア地域に広く自生している。ヒシの実は茹でて食用とするだけでなく、様々な疾病の民間薬としても用いられてきた。最近、ヒシの実のデンプンを利用したヒシ焼酎が開発され、ヒシの外皮が大量に廃棄されている。ヒシ外皮には多くのポリフェノールが含まれ、抗酸化性等様々な生理機能性を有することが明らかになっていることから、機能性素材としての利用が期待される。本研究では、ヒシ外皮の血糖値上昇抑制作用に着目し、ヒシ外皮に含まれる主要ポリフェノールの *in vitro* における糖質分解酵素に対する阻害作用やヒトに対する食後血糖値上昇抑制作用について調べた。
【方法】佐賀県産のワビシ（*Trapa japonica*）の外皮（乾燥物）を 60%アセトンにて抽出し、カラムクロマトグラフィー（Sephadex LH-20）および HPLC によりポリフェノール成分の分取・精製を行った。糖質分解酵素であるα-アミラーゼ、α-グルコシダーゼに対するヒシ外皮のポリフェノールの阻害活性を調べた。比較として、緑茶に含まれる（-）-エピガロカテキンガレート（EGCG）についても同様の実験を行った。ヒトに対する食後血糖値上昇抑制作用については、健常人 21 名（平均年齢 20.7±0.6 歳、空腹時血糖値 86.7±6.5 mg/dL）を対象として無作為に 2 群にわけ、クロスオーバー比較試験により実施した。絶食状態の被験者に、食事負荷（包装米飯、200 g）と同時にポリフェノール約 400 mg を含むヒシ外皮熱水抽出液（または水）200 ml を摂取させ、摂食直前以降 20、30、45、60、90、120 分後に自己血糖測定器にて血糖値を測定した。十分な休止期間の後に、食事負荷と同時に水（またはヒシ皮熱水抽出液）200ml を摂取させ、同様に血糖値を測定した。
【結果】ヒシ外皮から主要な３つのポリフェノールを分取・精製し、糖質分解酵素の阻害活性について調べたところ、いずれのポリフェノールにおいても阻害活性を示した。特に、α-アミラーゼの阻害活性は、EGCG にはほとんど認められなかったが、ヒシ外皮のポリフェノールは、強い阻害活性を示した。また、ヒトに対する食事負荷試験の結果、ヒシ外皮熱水抽出液を摂取した場合の血糖値は、水の場合に比べて食後 20 および 30 分に有意に低下した（$p<0.01$）。また、最高血糖値までの到達時間が有意に遅延した($p<0.05$)。これは、ヒシ外皮に含まれるポリフェノールによってグルコースへの分解が阻害され、血中へのグルコースの吸収が遅延・抑制されたことによるものと推察される。以上のことから、ヒシ外皮は、血糖値上昇抑制作用が認められ、糖尿病を予防する新規食品素材として利用できる可能性が示唆された。

water chestnut, postprandial blood glucose level, polyphenol

講演番号：3A20a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ A 校舎 20 会場

落花生渋皮ポリフェノールの精製とその性質

Purification and characterization of polyphenol from peanut seed skin

○辻田 隆広、高久 武司（愛媛大総合科学研究支援）
○Takahiro tsujita,Takeshi takaku (Ehime Univ.)

【目的】アミラーゼ阻害作用を指標にピーナツ渋皮ポリフェノールを精製し、その機能について検討したので報告する。

【方法】ピーナツ渋皮ポリフェノールの精製は、ピーナツ渋皮を含水アセトンで抽出した。この抽出物を 70%エタノールに溶解し、限外ろ過（Ultra filter、ADVANTEC）により分別した。分子量 20 万以上のフラクションを濃縮、凍結乾燥後、SephadexLH-20 カラムに吸着させ、アセトンの濃度ステップワイズで溶出した。50～60%アセトンの溶出フラクションを ODS-SM カラムに吸着させ、メタノールの濃度勾配で溶出した。アミラーゼ活性は、酵素として豚膵アミラーゼ、基質として可溶性デンプンを使用し、遊離するオリゴ糖の還元力の増加を測定した。ラットへの糖負荷試験はラットに、澱粉を 2g/Kg 体重で経口投与すると同時にピーナツ渋皮抽出物を経口投与した。試料投与後、経時的に血糖値を測定した。

【結果】ピーナツ渋皮のアミラーゼ阻害活性は限外ろ過では分子量 20 万以上のフラクション、Sephadex LH-20 カラムでは 50～60%アセトン溶出フラクションに強い阻害活性が認められた。ODS カラムではアミラーゼ阻害活性とポリフェノール濃度は同じパターンで溶出された。この精製によりアミラーゼ阻害の比活性は 25 倍上昇した。しかし、ポリフェノール含量は 1.2 倍、DPPH の抗酸化能は 1.4 倍増加したに過ぎなかった。ラットへの澱粉負荷試験ではその濃度に依存して血糖値の上昇が穏やかになり、総吸収量も濃度依存的に抑制した。マルトース、スクロース及びグルコース付加試験では、血糖値上昇抑制効果はほとんど認められなかった。従ってピーナツ渋皮ポリフェノールの血糖値上昇抑制はアミラーゼ阻害作用によるものと推測された。

【結論】ピーナツ渋皮よりアミラーゼ阻害を指標として、ポリフェノールを精製した。精製標品はデンプン付加による血糖値上昇を濃度依存的に抑制した。

polyphenol, peanut seed skin, amylase inhibition

講演番号：3A20a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ A 校舎 20 会場

Aspergillus oryzae FS001 株を用いて発酵させたトウガラシ発酵物の生理活性
Bioactivity of fermented red pepper by *Aspergillus oryzae* FS001

○佐々木 文生[1]、三沢 宏[2,3]、矢澤 一良[3]、濱田 奈保子[3]([1]海洋大院、[2]日本・バイオ、[3]海洋大)
○fumio sasaki[1], hiroshi sansawa[2,3], kazunaga yazawa[3], nahoko hamada[3] ([1]Tokyo University of Marine Science and Technology, [2]nihon・bio, [3]Tokyo University of Marine Science and Technology)

【目的】
トウガラシは南米原産で、世界中でスパイスとして利用されている。近年、トウガラシに含まれているカプサイシンなどについて様々な健康機能性が研究されている。一方、大豆由来イソフラボンを *Asprergillus oryzae* を用いて発酵することにより抗酸化活性が上昇することや、オタネ人参を *Lactobacillus paracasei* を用いて発酵することにより抗ストレス効果が上昇するなどのことが報告されている。そこで我々は、トウガラシを *A.oryzae* FS001 株を用いて発酵することにより、生理活性を向上させることを目的とした。

【方法】
各種トウガラシを蒸留水に懸濁し、*A.oryzae* FS001 株を植菌し、27℃で振盪培養した。得られた発酵物をエタノール抽出したものを試料とした。この試料の DPPH ラジカル消去活性、チロシナーゼ阻害活性、アミラーゼ阻害活性および α-グルコシダーゼ阻害活性を測定し、発酵前後で比較した。血中グルコース濃度への影響は、ddY マウスを用いた糖負荷試験を行い、発酵前後で比較した。

【結果】
DPPH ラジカル消去活性、チロシナーゼ阻害活性およびアミラーゼ阻害活性については発酵前後で大きな変化はみられなかった。一方、α-グルコシダーゼ阻害活性は、発酵前では活性が全くみられなかったが、*A. oryzae* FS001 株を用いて発酵することにより、活性が経時的に上昇し、培養 5 日目でピークに達した。そのときの IC_{50} 値は 82.5μg/ml であった。現在検討中の活性画分および *in vivo* による糖負荷試験についても併せて発表を行う。

red pepper, α-glucosidase, anti-obesity

講演番号：3A20a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ A 校舎 20 会場

砂漠人参カンカニクジュヨウ（*Cistanche tubulosa*, 肉質茎）成分の α-グルコシダーゼおよびアルドース還元酵素阻害作用

Inhibitory effects of constituents from stem of *Cistanche tubulosa* on alpha-glucosidase and aldose reductase

○今村 美緒[1]、森川 敏生[1]、藤倉 翔太[1]、二宮 清文[1]、赤木 淳二[1]、潘 英媛[3]、居村 克弥[1]、吉川 雅之[2]、袁 丹[3]、賈 暁光[4]、李 征[5]、村岡 修[1]（[1]近畿大・薬総研、[2]京都薬大、[3]瀋陽薬大、[4]新疆中薬民族薬研、[5](株) 栄進商事）

○Mio Imamura[1], Toshio Morikawa[1], Shouta Fujikura[1], Kiyofumi Ninomiya[1], Junji Akaki[1], Yingni Pan[3], Katsuya Imura[1], Masayuki Yoshikawa[2], Dan Yuan[3], Xiaoguang Jia[4], Zheng Li[5], Osamu Muraoka[1] ([1]Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki Univ., [2]Kyoto Pharmaceutical Univ., [3]School of Traditional Chinese Medicines, Shenyang Pharmaceutical Univ., [4]Xinjiang Institute of Chinese Materia Medica and Ethical Materia Medica, [5]Eishin Trading Co. Ltd.)

【目的】本邦を含め全世界において糖尿病の罹患者数は増加の一途を辿っており，これへの対策は急務を要する．我々の研究室では，生活習慣病の予防・改善に寄与する物質の探索を行っており，その一環として本研究を実施した．ハマウツボ科植物カンカニクジュヨウ (*Cistanche tubulosa*) は，ベニヤナギの根部に寄生する植物で，おもに中国新疆ウイグル自治区やパキスタンなどの砂漠地帯に自生している．カンカニクジュヨウの同属植物として，「神農本草経」の上品に収載され，補腎・滋養強壮の漢方方剤に多く処方されているニクジュヨウ (*C. salsa*) があり, その肉質茎はインポテンツや不妊症の治療および虚弱体質の改善などに用いられている．また，主産地のひとつである新疆ウイグル自治区のタクラマカン砂漠周辺では，カンカニクジュヨウを羊肉とともに煮込み料理に供したり，酒に漬けて飲用するなど，食用としても用いられている．我々は，これまでに肉質茎の含有成分の精査を行うとともに，血管収縮抑制および肝保護作用成分について明らかにしている.[1–5)] 今回，カンカニクジュヨウ肉質茎から得られた成分に，抗糖尿病作用の期待できるα-グルコシダーゼ阻害活性および抗糖尿病性末梢神経障害作用の期待出来るアルドース還元酵素 (AR) 阻害活性を見い出したので報告する.【方法・結果】[α-グルコシダーゼ阻害活性] Wistar 系雄性ラットの小腸から調製した粗酵素を使用して，maltase および sucrase に対する阻害活性を，それぞれ maltose および sucrose を基質として，粗酵素により遊離するグルコースを指標に検討した．その結果，maltase 阻害活性について，カンカニクジュヨウ肉質茎より得られた化学成分のうち， echinacoside (**1**, IC_{50} = 149 μM), acteoside (188 μM) および isoacteoside (70 μM) などのフェニルエタノイド配糖体に maltase 阻害活性が認められた．さらに，上記化合物のヒト小腸由来酵素における maltase 阻害活性についても検討したので，あわせて報告する． [AR 阻害活性] Wistar 系雄性ラットのレンズから調製した粗酵素を使用して実験を行った．カンカニクジュヨウ肉質茎含有成分について検討した結果，2'-acetylacteoside (0.071 μM), campneoside I (0.53 μM) や syringalide A 3'-α-L-rhamnopyranoside (1.09 μM) などのフェニルエタノイド配糖体などに AR 阻害活性が認められた．加えて，*in vivo* での echinacoside および acteoside を用いたデンプン負荷試験における血糖値上昇抑制活性についても検討したので，あわせて報告する.

1) *Chem*. *Pharm*. *Bull*., **54**, 669–675 (2006)., 2) *Bioorg*. *Med*. *Chem*., **14**, 7468–7475 (2006)., 3) *Bioorg*. *Med*. *Chem*., **18**, 1882–1890 (2010)., 4) *Chem*. *Pharm*. *Bull*., **58**, 575–578 (2010)., 5) *Chem*. *Pharm*. *Bull*., **58**, 1403–1407 (2010).

Cistanche tubulosa, glucosidase, aldose reductase

講演番号：3A20a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ A 校舎 20 会場

デイジーフラワー（*Bellis perennis*, 花部）成分の脂質代謝改善作用
Effects of constituents from flowers of *Bellis perennis* on lipid metabolism
○森川 敏生[1]、二宮 清文[1]、李 雪征[2]、西田 枝里子[1]、山下 千裕[2]、山田 友視[1]、松田 久司[2]、中村 誠宏[2]、吉川 雅之[2]、早川 堯夫[1]、村岡 修[1]（[1]近畿大・薬総研、[2]京都薬大）
○Toshio Morikawa[1], Kiyofumi Ninomiya[1], Xuezheng Li[2], Eriko Nishida[1], Chihiro Yamashita[2], Tomomi Yamada[1], Hisashi Matsuda[2], Seikou Nakamura[2], Masayuki Yoshikawa[2], Takao Hayakawa[1], Osamu Muraoka[1] ([1]Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki Univ., [2]Kyoto Pharmaceutical Univ.)

【目的】　キク科植物デイジー (*Bellis perennis* L.) は, 和名をヒナギク (雛菊), エンメイギク (延命菊) およびチョウメイギク (長命菊) などとも称される多年生植物である. 西ヨーロッパおよび北アフリカ原産で, 広くヨーロッパ, 西アジアに分布し, 日本には明治時代の初期に渡来したとされている. デイジーの若葉, 蕾や花部は, サラダに加えて食用として用いられ, 根部はおもに薬用としてリウマチの治療や去痰薬などとしても用いられていた. これまでに我々は世界各地の機能性食品や和漢生薬などから，生活習慣病の予防改善に寄与する物質の探索を行っており，本研究はその一環として実施した．今回新たに，*B. perennis* 花部の MeOH 抽出エキスに脂肪の吸収に関与する酵素であるリパーゼに対する阻害活性を見い出したことから，活性成分を明らかにする目的で，成分探索を行い，得られた成分についてリパーゼ阻害活性を検討した．さらに，得られた成分が，肝細胞中の中性脂肪含量を低下させることを明らかにしたので，あわせて報告する．
【実験・結果】　*B. perennis* 乾燥花部を MeOH にて環流抽出して，MeOH 抽出エキスを得た (生薬からの収率 25.8%). 得られた MeOH 抽出エキスを EtOAc および H_2O で溶媒分配して，EtOAc 可用性分画および H_2O 可用性分画を得た．得られた H_2O 可用性分画を HP-20 カラムクロマトグラフィーに付し，H_2O，次いで MeOH で順次成分を溶出させて， H_2O 溶出部および MeOH 溶出部を得た．MeOH 抽出エキスおよび得られた分画のリパーゼ阻害活性を検討した結果，MeOH 抽出エキスにリパーゼ阻害活性 (IC_{50} = 455 μg/mL) が認められるとともに，活性が EtOAc 可溶成分画 (263 μg/mL) および MeOH 溶出部 (360 μg/mL) に集約された．そこで，これらの分画から成分探索を行い，新規サポニン成分として perennisosides I–XIII，perennisaponin A–M を単離・構造決定するとともに，8 種のサポニン，13 種のフラボノイドなどを単離・同定した．得られた化学成分について，リパーゼ阻害活性を検討した結果，新規成分として得られた perennisoside I (**1**, 145 μM) および II (**2**, 55 μM) などにリパーゼ阻害活性が認められた．そこで，*in vivo* での活性を確認するため，オリーブ油負荷マウスにおける血中中性脂質上昇抑制活性について検討した．その結果，**1** および **2** は，それぞれ 100 および 25 mg/kg の経口投与により, 有意な血中中性脂質上昇抑制活性を示すことが明らかになった．この他，脂肪肝の予防・改善作用を検討する目的で，得られた成分の肝細胞中中性脂肪含量に与える影響についても検討した．その結果，*B. perennis* 花部より得られたフラボノール配糖体などに有意な脂肪蓄積抑制活性を見い出したので，あわせて報告する．

Bellis perennis, perennisoside, perennisaponin

講演番号：3A20a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ A 校舎 20 会場

デイジーフラワー（*Bellis perennis*, 花部）成分のコラーゲン産生促進作用

Effects of constituents from flowers of *Bellis perennis* on collagen production in NHDF cells

○高森 康暢[1]、森川 敏生[1]、二宮 清文[1]、李 雪征[2]、西田 枝里子[1]、松田 久司[2]、中村 誠宏[2]、吉川 雅之[2]、早川 堯夫[1]、村岡 修[1]（[1]近畿大・薬総研、[2]京都薬大）
○Yasunobu Takamori[1], Toshio Morikawa[1], Kiyofumi Ninomiya[1], Xuezheng Li[2], Eriko Nishida[1], Hisashi Matsuda[2], Seikou Nakamura[2], Masayuki Yoshikawa[2], Takao Hayakawa[1], Osamu Muraoka[1] ([1]Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki Univ., [2]Kyoto Pharmaceutical Univ.)

【目的】 加齢や紫外線への暴露による真皮細胞への障害は，真皮におけるコラーゲンの変性を惹起する．その結果，加齢などによる変性の特徴である肌のしわや弾性の低下を引き起こすことが知られている．これらの進展を予防・改善する物質を探索する目的で，本研究を実施した．キク科植物デイジー (*Bellis perennis* L.) は，雛菊，延命菊および長命菊とも称される多年生植物である．*B. perennis* はヨーロッパおよび西アジアに広く分布し，日本には明治初期に渡来したとされている．また，本植物の若葉および花部は食用としても用いられる他，根部は主に薬用としてリウマチの治療や去痰薬などとして利用されてきた．本発表では，*B. perennis* 花部の新規機能性開拓研究の一環として行った，正常ヒト新生児包皮由来線維芽細胞 (Normal Human Dermal Fibroblast, NHDF, クラボウ) からのコラーゲン産生促進活性成分について報告する．

【実験・結果】 NHDF を 10% (v/v) FBS 含有 DMEM (Sigma-Aldrich) にて培養して実験に供した．細胞を 96 穴培養プレートに播種 (2.5×10^4 cells/well, 100 μL/well) して，5% CO_2 存在下 37°C にて 24 時間培養した．培養後，培地を被験物質 (0.5% (v/v) DMSO) を含む FBS 不含 DMEM に交換して，さらに 48 時間培養した．その後，培養上清中に分泌された procollagen type I C-peptide (PIP) 濃度を PIP EIA Kit (Takara) を使用して定量した．また，被験物質の細胞増殖に与える影響については，別に MTT assay により評価した． *B. perennis* 乾燥花部を MeOH により，環流抽出して得た MeOH 抽出エキスに 10 μg/mL の濃度で有意なコラーゲン産生促進活性 (140.2% (% of control)) が認められたことから，*B. perennis* 花部から得られている化学成分のコラーゲン産生促進活性を検討した．その結果，*B. perrrennnis* 花部より新規サポニンとして得られている perennisosides I (175.1% (% of control at 10 μM)), VII (132.0%) および IX (133.9%) などが，細胞増殖を大きく亢進することなく有意にコラーゲン産生を促進することを明らかにした．この他，*B. perennis* 花部から得られているフラボノイド成分についても，同活性を検討したが，顕著な活性が観察されなかったことから，*B. perennis* 花部のコラーゲン産生促進活性は，一連のサポニン成分によるものであることが示唆された．また，*B. perennis* 花部より得られているサポニン成分の構造と活性の相関については，oleanene 型トリテルペンサポニンの 3 位置換基の立体, 23 位の置換基の構造および 3 位と 28 位に結合する糖の種類などにより，活性が大きく変動することが観察された．さらに，活性成分の機序を検討する目的で，Smad 2 mRNA の発現に与える影響について検討したので，あわせて報告する．

Bellis perennis, collagen, daisy flower

講演番号：3A20p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ A 校舎 20 会場

海藻アカモクの有用ミネラルの季節変動
Seasonal variation in the mineral contents of a marine brown alga, *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh

○村上 香[1,2]、岡 聡子[1]、貞森 康平[2] ([1]広島工業大生命、[2]広島工業大健康情報)
○Kaori Murakami[1,2], Satoko Oka[1], Kouhei Sadamori[2] ([1]Hiroshiama Institute of Technology, [2]Hiroshiama Institute of Technology)

【目的】我々はこれまでに、アカモク*Sargassum horneri* (Turner) C. Agardhの食糧資源としての有効活用のために栄養成分および生理作用の評価を行ってきた。経口摂取によるラットの糞便増加や腸内細菌叢への影響を確認し、機能性食品としての可能性を示した[*]。また、アカモクの成長・成熟に伴う食品一般成分および食物繊維含量の変化を調べ、食物繊維および灰分を豊富に含み、水溶性および不溶性食物繊維やミネラルの供給源として有用であることを示した[**]。しかし、ミネラルの内訳とその季節変動についてまだ知見が少ない。そこで、本研究では、アカモクの有用ミネラル含量の季節変動について調べた。
【方法】平成17年12月から平成18年4月まで毎月1回、水深5 m海域で採取されたアカモク原藻の上部2/3（可食部）を洗浄、凍結乾燥後に粉砕・混合し、酸分解法で湿式灰化して測定試料を調製した。原子吸光分析器を用いて、カリウム、カルシウム、マグネシウムおよび亜鉛はフレーム原子吸光法で、鉄、銅およびマンガンは電気化熱原子吸光法で測定した。なお、食糧資源としての評価のために測定値は可食部の湿重量に換算した。
【結果】鉄含量は変動が大きく雌雄ともに3月中旬に最大値（雄株21.6±1.4；雌株19.7±0.2 μg/g）となっていた。一方、マグネシウム含量は成熟とともに減少していた。また、マンガンおよび銅含量では、未成熟、雄株および雌株間で同様の変動傾向が見られたが、その他のミネラルには成熟度、雌雄による有意差があり、変動についての特徴はあまりみられなかった。
　また、調査期間を通しての含有量平均値では、カリウムは雌株（5.30±0.83 mg/g）に比べて未成熟株（5.75±0.75 mg/g）が有意に高く（p<0.03)、マグネシウムは未成熟（2.01±0.16 mg/g)、雄株（1.46±0.39 mg/g）および雌株（1.23±0.32 mg/g）間で有意差がみられ（p<0.001)、カルシウムは雄株（1.33±0.19 mg/g）が未成熟株（1.21±0.23 mg/g）および雌株（1.13±0.16 mg/g）に比べて有意に高く（p<0.05)、亜鉛は雌株（4.43±0.81 μg/g）に比べて未成熟株（5.94±0.93 μg/g）および雄株（5.87±1.00 μg/g）が有意に高く、鉄（11.1±5.1 μg/g)、マンガン（528±154 ng/g）および銅（312±98 ng/g）には未成熟、雌雄株間に有意差がみられなかった。さらに、ワカメと比較して、各ミネラル含有量は同程度もしくはそれ以上であった。

[*] 日本農芸化学会 2010 年度大会講演要旨集 p.172
[**] *J Food Compost Anal*, 24 (2011) 231–236, 日本農芸化学会 2011 年度大会講演要旨集 p.233

seasonal variation, mineral, seaweed

講演番号：3A20p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ A 校舎 20 会場

高リン食摂取がラット肝臓及び白色脂肪組織に及ぼす影響：DNA マイクロアレイによる解析

Effect of a high-phosphorus diet on rat liver and white adipose tissue: a DNA microarray analysis

○千 善宇[1]、石島 智子[1]、陶山 達也[1]、阿部 啓子[1,2]、中井 雄治[1]([1]東大院・農生科・応生化、[2]KAST)
○Sunwoo CHUN[1], Tomoko ISHIJIMA[1], Tatsuya SUYAMA[1], Keiko ABE[1,2], Yuji NAKAI[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]KAST)

【背景および目的】近年、慢性腎臓病(CKD)患者だけでなく、腎機能に異常がない場合も食品添加物によるリンの過剰摂取が心血管障害を引き起こす可能性が指摘されていることから、リンの過剰摂取が生体に及ぼす影響についてより詳しい解析が求められている。当研究室では、高リン食摂取ラット腎臓の DNA マイクロアレイ解析により、石灰化、繊維化、炎症、免疫に関連する遺伝子群の発現が上昇することを確認するとともに、2b 型ナトリウム-リン酸共輸送体が発現上昇することを見いだした（Suyama et al. PLoS One 7, e29483,2012)。本研究は、高リン食摂取が代謝の主要臓器である肝臓及び脂肪組織に及ぼす影響をトランスクリプトームレベルで明らかにすることを目的とした。
【方法】4 週齢の Wistar 系雄ラットを 1 週間の馴化後、コントロール食(リン含量: 0.3%)摂取群と高リン食(リン含量: 1.2%)摂取群に分け、24 日間飼育した。その後解剖を行い、肝臓、精巣上体周囲白色脂肪組織(以下 WAT)を摘出した。また、解剖前 3 日間の糞、尿を採取し、出納試験を行った。摘出した肝臓及び WAT から total RNA を抽出し、GeneChip Rat Genome 230 2.0 (Affymetrix 社) を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。得られたマイクロアレイデータを qFARMS によって正規化した後、Rank products 法による二群間比較を行い、発現変動遺伝子を選抜した。False Discovery Rate(FDR)が 0.05 未満を有意な発現変動遺伝子とした。これらについては DAVID を用いて gene annotation enrichment analysis を行い、発現変動遺伝子セット中に有意に濃縮された GO(Gene Ontology)term を抽出した。抽出された GO term は QuickGO を用いて階層化した。
【結果および考察】肝臓の DNA マイクロアレイ解析の結果、発現変動遺伝子からは主に脂質代謝、アミノ酸代謝に関わる GOterm が抽出された。各 GOterm に含まれる発現変動遺伝子を代謝経路にマップした結果、脂肪酸β酸化の亢進、脂肪酸合成の抑制、コレステロール合成の抑制、アミノ酸異化の抑制、尿素回路の抑制という代謝の変化が認められた。一方、WAT 重量は高リン食摂取によって有意に減少していた。これらの結果より、高リン食摂取群ではエネルギー消費が亢進していることが示唆された。WAT の DNA マイクロアレイ解析の結果、脂肪酸β酸化の亢進、細胞増殖及び炎症関連遺伝子の低下が確認され、脂肪細胞においてもエネルギー消費が増大していることと共に、炎症作用にも何らかの変化が起こっていることが示唆された。以上の結果より、24 日間の高リン食摂取が肝臓および脂肪組織でのエネルギー代謝に影響を与える可能性が示唆された。今後、今回得られた mRNA レベルでの変化をタンパク質レベル、代謝物レベルでも検証していく予定である。

High phosphorus diet, DNA microarray, Rat WAT

講演番号：3A20p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ A 校舎 20 会場

鉄欠乏食投与がマウス心臓のレドックスホメオスタシスに及ぼす影響

Effects of an iron-deficient diet on the redox homeostasis of mouse heart

○井上 博文[1]、小林 謙一[2]、山本 祐司[2]、勝間田 真一[1]、鈴木 和春[1]、上原 万里子[1] ([1]東農大・応生・栄養科学、[2]東農大・応生・化学)
○ Hirofumi INOUE[1], Ken-Ichi KOBAYASHI[2], Yuji YAMAMOTO[2], Shin-Ichi KATSUMATA[1], Kazuharu SUZUKI[1], Mariko UEHARA[1] ([1]Tokyo University of Agriculture, Department of Nutritional Science, [2]Tokyo University of Agriculture, Department of Applied Biology and Chemistry)

【目的】鉄はヘムをはじめ、様々なタンパク質の補因子として機能するのみならず、生体内レドックス反応において重要な役割を担っている必須微量元素である。過剰な鉄は酸化ストレスの増強を招くことで疾患リスクを上昇させる。その一方で、鉄欠乏は心肥大といった循環器系疾患の発症に関与すること報告されているが、これを制御する分子の作用機序は明らかではない。興味深いことに我々は、鉄欠乏下で肝中脂質過酸化量が増大することから、鉄欠乏と酸化ストレスとの関連を見出した。そこで本研究では、鉄欠乏性心肥大と酸化ストレスとの関連を解明することを目的とし、生体防御分子群およびその他ミネラルトランスポーターの発現解析を行った。
【方法】被験動物として 4 週齢の雄性 BALB マウスを用い、正常食(CTL)、鉄欠乏群(ID)、鉄再供給群(IR:4 週間の鉄欠乏食投与後、1 週間の正常食)の計 3 群に分け、5 週間の飼育観察を行った。飼育期間終了後、臓器重量を測定した。また血液を採取し、血中ヘモグロビン濃度(Hb)と心臓における生体防御分子群(Nrf2, HO-1, MnSOD, CuZnSOD)、ミネラルトランスポーター(Zip14, CTR1, DMT1, ABCB8)およびタンパク質分解関連分子(LC3-II)を Real time PCR 法および Western blot 法にて解析した。
【結果】摂餌量、体重増加量は ID 群と IR 群で CTL 群と比較して有意に減少した。血中 Hb は CTL 群に対して ID 群で有意に減少し、心臓重量は CTL 群に対して ID 群で有意な増加を示した。これらに対して IR 群は ID 群より抑制傾向を示した。生体防御分子群に関して、Nrf2 の核移行が認められ、HO-1,NQO1, MnSOD は ID 群と IR 群ともに発現が増加した。興味深いことに、CuZnSOD, Zip14, CTR1 は ID 群と比較して、IR 群より顕著な上昇を示した。タンパク質代謝関連分子において、CTL 群に対して ID、IR 群でタンパク質のカルボニル化ならびに LC3-II の発現上昇が認められた。
【結論】鉄欠乏性心肥大において、Nrf2 を介したレドックスシグナルの活性化およびミネラルトランスポーターの遺伝子発現が上昇することを明らかにした。加えて、鉄欠乏時にタンパク質の酸化が亢進され、これに対する防御機構として、オートファジーが活性化することを明らかにした。以上より、鉄欠乏時にレドックス応答を活性化させることで、生体内恒常性を維持することが示唆された。

iron deficient diet, redox homeostasis, mouse heart

講演番号：3A20p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ A 校舎 20 会場

鉄過剰食摂取ラットの血球細胞の遺伝子発現プロファイル解析

Effects of an iron-overload diet on the gene expression profile in rat blood cell

○亀井 飛鳥[1]、渡部 由貴[1]、篠崎 文夏[1]、荒井 綜一[1,2]、阿部 啓子[1,3]（[1]KAST、[2]東農大・総研、[3]東大院・農生科・応生化）
○Asuka KAMEI[1], Yuki WATANABE[1], Fumika SHINOZAKI[1], Soichi ARAI[1,2], Keiko ABE[1,3]
([1]KAST, [2]Tokyo University of Agriculture, [3]The University of Tokyo)

[目的]

鉄は、酸素の運搬体や酵素の補欠分子族などとしての役割を担う必須のミネラルである。出血や摂取不足などにより体内の鉄が不足すると、臓器中の貯蔵鉄が利用されて減少し、やがて貧血に至る。我々はこれまで、鉄欠乏食摂取による生理変化について、ラット肝臓を対照とした遺伝子発現解析を行った[1)]。一方、鉄の過剰摂取は臓器内の不安定鉄プールを増加させる。不安定鉄は、タンパク質と結合せずに存在し、Fenton反応によりヒドロキシルラジカルを産生して酸化ストレスを誘導し、臓器にダメージを与える。食餌性鉄過剰の影響を明らかにする目的で、血液を対象とした網羅的な遺伝子発現解析を実施した。

[方法]

3週齢の雄性SDラットを予備飼育後、AIN93G食を与える群（通常食群）、AIN93G食に鉄を10倍量添加した食餌を与える群（鉄過剰食群）とに分け、8日間飼育した。飼育期間中は、食餌および水を自由摂取させた。9日目に麻酔下で血液を採取し、血清中の生化学パラメータ測定および血球細胞のDNAマイクロアレイ解析を行った。

[結果および考察]

飼育期間中の摂食量、体重増加に2群間での差は認められなかった。また、血清中フェリチン濃度は鉄過剰食群で有意に増加した。血清中フェリチン濃度は生体内の貯蔵鉄量を反映して変動することから、鉄過剰食摂取ラット体内では、通常食摂取ラットに比べ、鉄が多く蓄積されていることが示唆された。そこで肝臓中の鉄量を測定したところ有意な増加が認められた。さらに肝臓の網羅的な遺伝子発現解析を実施したところ、栄養素代謝を中心とする変化が明らかになり、昨年度の本大会にて発表した。このように生体の鉄貯蔵量が顕著に増加した状態のラット血球細胞のDNAマイクロアレイ解析を実施した結果、免疫機能を中心とする変化が明らかになった。

Kamei, A. et al., *Physiol. Genomics*, 42, 149-56, 2010

iron overload, blood cell, DNA microarray

講演番号：3A20p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ A 校舎 20 会場

短期亜鉛欠乏におけるラットの味嗜好性変化の解析
The effect of short-term zinc deficiency on salt preference in rat
○山本 遼、岡田 晋治、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Ryo Yamamoto,Shinji Okada,Takumi Misaka (Dept.Appl.Biol.Chem., The Univ.Tokyo)

【目的】
必須微量元素である亜鉛の欠乏は、味嗜好性の変化を引き起こす。その原因としてこれまで、味蕾のターンオーバーの遅れや鼓索神経応答の低下、視床下部での遺伝子発現変動など、様々な報告がなされてきたが、詳細な発症機構は未だ不明な点が多い。そこで本研究では、複合的な要因が少ないと考えられる短期間での亜鉛欠乏に焦点を当て、味嗜好性変化の発症機構の解析を行った。長期的な亜鉛欠乏では塩味・苦味・酸味・甘味など、複数の基本味の嗜好性変化が過去に報告されているが、短期的な亜鉛欠乏の味嗜好性変化については知見が少なかった。我々のグループは亜鉛欠乏食投与後8日目のラットの味嗜好性変化を解析し、本来ラットが忌避する高濃度塩化ナトリウム・嗜好する低濃度塩化ナトリウム（塩味）において亜鉛欠乏群で有意な嗜好性の増大が起こること、そして、スクロース（甘味）・クエン酸（酸味）・デナトニウム（苦味）では有意な変化が見られないこと、を明らかにした（山本ら、2012年度本大会発表）。今回はこれらの結果から、亜鉛欠乏によってミネラル全体の欲求が高まっている可能性を考え、各種の金属塩化物に対する嗜好性評価を行った結果を報告する。
【方法と結果】
4週令のSD系雄性ラットを1週間予備飼育した後に、ペアフィーディング群（以下PF群）と亜鉛欠乏群（以下ZD群）に群分けし、PF群には亜鉛含有量30 mg/kg餌、ZD群には亜鉛含有量＜0.6 mg/kg餌を与えて飼育を開始した。嗜好性評価には30秒間のbrief access testを用い、各種の金属塩化物に対して亜鉛欠乏食投与開始8日目から順に同様の評価を行った。その結果、塩化カリウム・塩化マグネシウム・塩化カルシウム・塩化鉄・塩化銅では両群で有意な差は見られなかったが、塩化亜鉛ではZD群で有意な嗜好性の増大が確認された。このことから、短期亜鉛欠乏状態では塩化ナトリウムと塩化亜鉛の嗜好性が特異的に高まることが示唆された。

zinc deficiency, taste, salt

講演番号：3A20p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ A 校舎 20 会場

潰瘍性大腸炎モデルラットにおける生体内亜鉛動態の解析
Zinc Dynamics on Experimental Colitis in Rats
○常木 生也[1]、岩谷 一史[2]、原 博[2]、石塚 敏[2]([1]北海道大・農・生機化、[2]北海道大・院農・応生科)
○Ikuya TSUNEKI[1], Hitoshi IWAYA[2], Hiroshi HARA[2], Satoshi ISHIZUKA[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Univ.)

【目的】
潰瘍性大腸炎は発症原因不明の難病である。実験動物を用いた潰瘍性大腸炎モデルとして、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を経口投与して腸炎を誘導する方法がある。我々はこれまでに、摂食量の低下がみられない軽度の亜鉛欠乏食摂取ラットで、亜鉛充足食摂取ラットに比べ、血清中の亜鉛濃度が低下すること、およびDSS腸炎症状が悪化することを見出した。一方、亜鉛充足食であってもDSS投与刺激によって血清中の亜鉛濃度が低下することも確認した。これらのことから、DSS腸炎症状進展のカギは血清中の亜鉛濃度低下ではないかと考えられるが、そのメカニズムはわかっていない。この機構を明らかにする事は、炎症疾患の予防・治療を考える上で大切である。本研究では、DSS投与刺激による亜鉛吸収・排出・臓器移行の動態を解析した。
【方法】
4週齢のF344/Jcl雄ラットに卵白をタンパク源としたAIN93G準拠の飼料を9 日間自由摂取させた後、対照群・1% DSS投与群・2% DSS投与群の3 群に分けた。DSSは脱塩水に溶解した状態で自由摂取させた。ただし、2%群では症状の著しい進行が予想されたため、投与3日後から脱塩水に切り替えた。体重減少・便の性状を基準とした臨床症状の評価(DAI)を経時的に実施した。投与3～4日後、および7～8日後の2期について亜鉛の出納試験を行った。
【結果】
DSS の投与濃度に依存して摂食量・体重が減少した。対照群に比べ、1% DSS 群では 6 日後に摂食量が、9 日後に体重が減少し、2% DSS 群では 3 日後に摂食量が、6 日後に体重が減少した。2% DSS 群については著しい症状悪化のために 7 日後に解剖した。
3～4 日後の体内亜鉛保有率は 2% DSS 群で減少した一方、7～8 日後の保有率は 1% DSS 群で対照群に比べ上昇した。通常、ミネラル摂取量が減少すると吸収率が補償的に増加することが知られている。2% DSS 群では補償的な亜鉛吸収率の増加が観察されなかった一方で、1% DSS 群では補償的な亜鉛吸収率の増加が観察された。症状が軽度な場合には吸収率増加機能が作用しうると考えられる。しかし、吸収率が増加した 1% DSS 群においても血清中の亜鉛濃度が低下した。この原因として、摂食量低下による亜鉛保有量の減少と、血清中から臓器への亜鉛移行が考えられる。肝臓・腎臓・脾臓中の亜鉛濃度については現在分析中である。

ulcerative colitis, dextran sulfate sodium, zinc

講演番号：3A20p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ A 校舎 20 会場

葉酸欠乏ラットを用いたホウレンソウとタンパク質との併用摂取によるホモシステイン低減効果
Combination effects of spinach and protein intake on hyperhomocysteinemia in folate-deficient rats.

○宮下 達也[1]、劉 軼群[2]、劉 穎[2]、稲熊 隆博[1]、杉山 公男[3]([1]カゴメ（株）総研、[2]岐阜大院・連農、[3]静岡大・農)
○Tatsuya Miyashita[1], Yi-qun Liu[2], Ying Liu[2], Takahiro Inakuma[1], Kimio Sugiyama[3] ([1]KAGOME CO., [2]Gifu Univ., [3]Shizuoka Univ.)

【目的】血漿ホモシステイン（Hcy）の上昇は、動脈硬化の独立したリスク因子として広く認識されている。Hcyの代謝には葉酸を中心とするビタミンB群やタンパク質から供給されるアミノ酸など様々な栄養成分が関係しており、これらの栄養成分の食事からの摂取が血漿 Hcy に大きな影響を与える。本研究は、Hcy を低減する食事の知見を蓄積するため、葉酸もしくは葉酸を多く含む野菜であるホウレンソウ(SP)とタンパク質（カゼイン）との併用摂取が Hcy に与える影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】試験には 7 週齢の Wister 系雄ラットを用いた。試験食は AIN-93G から葉酸を除いたものを基本組成とした。群分けは、カゼインを 10%含み葉酸を添加せず欠乏させた群（10CFD)、SP 粉末を葉酸含量が 2mg/kg diet となるよう 13%添加した群(10C+SP)、葉酸を 2mg/kg diet で添加した群(10C+FA)の 3 群に加え、カゼイン含量を 25%に増やし、同様に葉酸を欠乏させた群（25CFD)、SP 粉末を添加した群（25C+SP)、葉酸添加した群(25C+FA)の合計 6 群（各 n=8）とした。4 週間試験食で飼育した後に解剖を行い、血漿 Hcy を測定した。また、Hcy 代謝に関わる酵素として、肝臓のシスタチオニン合成酵素 (CBS)、ベタイン-HCY メチル転移酵素 (BHMT) およびメチオニン合成酵素(MS)の活性を測定した。
【結果と考察】10CFD 群と比較して 10C+SP 群、10C+FA 群および 25CFD 群では血漿 Hcy が有意に低く、SP、葉酸およびタンパク質単独摂取による Hcy 低減効果がそれぞれ確認された。また、25C+FA 群は 10C+FA 群と血漿 Hcy に有意な差はなかったが、25C+SP 群は 10C+SP 群よりも有意に血漿 Hcy が低く、SP とタンパク質との併用摂取による Hcy 低減効果が示唆された。さらに、25C+SP 群の血漿 Hcy は 25C+FA よりも有意に低く、SP の効果は葉酸以外の要因が影響していることが示唆された。肝臓の酵素活性は、25C+SP 群では 10C+SP 群および 25CFD 群と比較して全ての酵素活性が有意に高く、25C+FA 群との比較においてもベタインが関与する経路である BHMT 活性が有意に高かった。よって、SP とタンパク質とを併用摂取することで 3 つの Hcy 代謝酵素が活性化すること、SP の効果は葉酸単独よりも強く、その要因としてベタインが関与していることが示唆された。
【結論】Hcy を低減させる食事の摂り方として、SP とタンパク質とを組合せた食事が有効であることが示唆された。

homocysteine, folate, spinach

講演番号：3A20p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ A 校舎 20 会場

ウェルナー症候群患者由来細胞に対するビタミン C の細胞老化改善作用

Vitamin C improves senescent phenotypes of Werner syndrome fibroblasts.

○小山 浩史[1]、澁谷 修一[1]、嶋本 顕[2]、横手 幸太郎[1]、清水 孝彦[1] ([1]千葉大院医、[2]広島大院医歯薬保)
○Hirofumi Koyama[1], Shuichi Shibuya[1], Akira Shimamoto[2], Koutaro Yokote[1], Takahiko Shimizu[1] ([1]Grad. Sch. of Med., Chiba Univ., [2]Grad.Sch. of Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ.)

ウェルナー症候群は、DNA ヘリカーゼである *WRN* 遺伝子のホモ変異により発症する遺伝性早老症の一種である。ウェルナー症候群患者は 20 歳代から若年性白内障や軟部組織石灰化等の症状を呈し、悪性腫瘍または心血管障害の為、40～50 歳代で死亡する。ウェルナー症候群の顕著な症状として、肘や踵等の関節の石灰化により生じる皮膚潰瘍の重篤化による四肢切断がある。我々は、皮膚潰瘍症状の軽減を目指し、ウェルナー症候群患者由来の皮膚線維芽細胞(WS 細胞)を用い解析を行った。また、コントロール細胞として正常若齢者由来皮膚線維芽細胞および正常高齢者由来皮膚線維芽細胞を用いた。

はじめに各細胞が示す表現型の解析を行った。WS 細胞は若齢者由来細胞と比較して細胞増殖速度が 5 倍以上遅く、細胞形態が平坦で大きかった。このことから、WS 細胞が細胞老化(senescence)状態になっていることを予想し、細胞老化マーカーについて調べた。その結果、細胞老化関連βガラクトシダーゼ(senescence-associated β-galactosidase ： SA-β-gal)染色陽性細胞の割合が若齢者由来細胞では 1%以下なのに対して、WS 細胞は 60%以上と高頻度であった。また、別の細胞老化マーカーである senescence-associated secretory phenotype (SASP)の発現を RT-PCR で解析したところ、*IL-6* と *IL-8* の遺伝子発現が WS 細胞において若齢者由来細胞と比較して増加していた。さらに細胞内の活性酸素発生量を測定した結果、WS 細胞では活性酸素産生が有意に増加していた。高齢者由来細胞は、若齢者由来細胞よりも早く細胞老化様表現型を示した。

次に、SA-β-gal 染色を指標にして WS 細胞が示した表現型を改善出来る薬剤を調べた結果、ビタミン C が改善効果を示した。また、細胞膜透過性を高めたビタミン C 誘導体である ascorbyl 2-phosphate 6-palmitate trisodium (APPS)は、ビタミン C よりも強い改善効果を示した。さらに、SA-β-gal 染色以外の表現型に対する改善効果を調べたところ、ビタミン C および APPS の投与により *IL-6* の発現低下、活性酸素発生量の低下が認められた。また、senescence 関連分子である *p53* の発現を RT-PCR で調べた結果、ビタミン C および APPS により発現が抑制されていた。

以上のことから、ビタミン C は WS 細胞の老化表現型の改善効果を持つことが明らかとなった。また、細胞膜透過性の高い APPS がウェルナー症候群患者の皮膚潰瘍の症状改善に有用である可能性が示唆された。

vitamin C, Werner syndrome, cellular senescence

講演番号：3A20p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ A 校舎 20 会場

ビタミン D による細胞増殖抑制の作用機構
Inhibition of cell proliferation by 25-hydroxyvitamin D3
○西川 美宇、河南 理恵、宗綱 栄二、岩崎 典子、生城 真一、榊 利之（富山県立大　生物工）
○ Miyu NISHIKAWA,Rie KAWANAMI,Eiji MUNETSUNA,Noriko IWASAKI,Shin-ichi IKUSHIRO,Toshiyuki SAKAKI (Dep. of Biotech., Toyama Pref. Univ.)

【目的】従来、ビタミン D3 の生理活性については、1α, 25-ジヒドロキシビタミン D3 (1,25D3)が活性型ビタミン D3 であり、25-ヒドロキシビタミン D3 (25D3) はプロホルモンであると考えられてきたが、近年、25D3 自身がホルモン作用を示す可能性を示唆する報告が相次いでいる。細胞内で 25D3 が直接作用することを証明するためには、代謝物の分析が必須であるが、これまでの報告では十分な解析がなされていない。我々は 25D3 のトリチウム標識体を用いて、ヒト前立腺由来培養細胞 PZ-HPV-7 内の代謝物を経時的に定量するとともに、ビタミン D 受容体(VDR)の核内移行、CYP24A1 遺伝子の発現誘導、細胞増殖に与える影響を調べた。
【方法】PZ-HPV7 に 3H-25D3(0.005nM)と 25D3(10nM, 100nM)を同時投与し、2～20 時間培養した。培養後の細胞および培地を HPLC で分析し、回収した移動相の放射活性を測定して代謝解析を行った。また、25D3 および 1,25D3 を投与した後免疫染色を行って VDR の核内移行を調べ、定量的 RT-PCR にて活性型ビタミン D3 の標的遺伝子である CYP24A1 の発現変化を解析した。細胞増殖抑制効果を検証するために、25D3 および 1,25D3 を PZ-HPV7 に投与して 4 日間培養した後細胞数を測定した。細胞増殖抑制に関わる遺伝子を同定するために、25D3 および 1,25D3 を投与した細胞を用いてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、候補遺伝子特定した。候補遺伝子である cyctatin M および semaphorin 3B のノックダウンを行い、25D3 による細胞増殖抑制への影響を調べた。
【結果・考察】PZ-HPV-7 に 25D3 (10, 100 nM) を作用させると、90 分以内に VDR の核内移行が完了し、2 時間後から顕著な CYP24A1 遺伝子の転写誘導が見られた。25D3 (10, 100 nM)の添加 2 時間後に細胞内で合成される濃度である 0.01、0.06 nM の 1,25D3 を添加した場合、核内移行および CYP24A1 転写誘導効果は、25D3 (10, 100 nM)の効果よりもはるかに低かった。また、PZ-HPV-7 に 25D3 を添加し、4 日間培養を続けたところ、濃度依存的な細胞増殖抑制が観察され、がん抑制遺伝子である cystatin M および semaphorin 3B 遺伝子の発現が誘導された。これらの遺伝子をノックダウンすると細胞増殖が促進され、25D3 による細胞増殖抑制効果は減弱した。以上の結果から、PZ-HPV-7 において、25D3 は直接 VDR に結合し、核内に移行した VDR が CYP24A1 遺伝子の発現を誘導するとともに cystatin M および semaphorin 3B 遺伝子の発現を誘導し、細胞増殖を抑制したと考えられる。

vitamin D metabolism, human prostate cells, antitumor effect

講演番号：3A20p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ A 校舎 20 会場

NIH/3T3 繊維芽細胞中のピロロキノリンキノン（PQQ）結合タンパク質の探索
Search for pyrroloquinoline quinone (PQQ)-binding proteins in NIH/3T3 fibroblasts
○峰松 謙治[1]、幾島 知世[1]、太田 優香[1]、石井 剛志[2]、赤川 貢[3]([1]大阪府大生命環境、[2]静岡県大食栄、[3]大阪府大院生命環境)
○Kenji MINEMATSU[1], Tomoyo IKUSHIMA[1], Yuka OTA[1], Takeshi ISHII[2], Mitsugu AKAGAWA[3]
([1]Osaka prefecture Univ., [2]Shizuoka prefecture Univ., [3]Osaka prefecture Univ.)

【目的】
ピロロキノリンキノン（PQQ）は、メタノール資化性細菌から発見されたニコチンアミドとフラビンに次ぐ酸化還元補酵素であり、肉類や野菜、豆類など多彩な食品に微量に含有されている。哺乳類は PQQ を生合成することができず、PQQ 欠乏餌で飼育したマウスにおいて成長不良や皮膚の脆弱化、繁殖能力の低下などの異状が観察されるため、ビタミンである可能性が示唆されている。しかしながら PQQ を補酵素として利用する酵素が発見されていないため、未だにビタミンとして認定されていない。このような背景から本研究は PQQ がビタミンである可能性を探ることを目的とし、マウス由来の培養細胞中から PQQ 結合タンパク質の探索を行った。
【方法・結果】
PQQ 結合タンパク質を探索する手法として、アフィニティービーズを使用した pull-down 法による精製法を構築した。アフィニティービーズはカルボジイミドを架橋剤として EAH-Sepharose 4B のアミノ基に PQQ をカップリングさせて作製した。この PQQ 固定化ビーズ（PQQ-Sepharose）を評価するために *A. calcoaceticus* 由来の PQQ 依存性グルコース脱水素酵素（GDH）から PQQ を解離させて apoGDH を調製した。この apoGDH の PQQ-Sepharose への結合によって GDH 活性の回復が確認されたことにより、PQQ に結合するタンパク質をアフィニティー精製することが可能であると判断した。そこで、マウス繊維芽細胞株 NIH/3T3 細胞を PQQ 欠乏培地で培養した後に細胞溶解液を調製し、PQQ-Sepharose および EAH-Sepharose を用いた pull-down 法を行い、PQQ 結合タンパク質の探索を行った。それぞれのビーズへ結合したタンパク質を SDS-PAGE で分析した結果、PQQ-Sepharose に特異的に結合するいくつかのタンパク質のバンドを検出することができた。また、免疫化学的手法を用いて細胞内における PQQ の動態を明らかにするため、抗 PQQ ポリクローナル抗体を作製した。この抗 PQQ 抗体を使用して、蛍光抗体免疫染色法、および免疫沈降法を行い、PQQ 結合タンパク質の検出を行った結果、PQQ が細胞内に取り込まれ細胞内タンパク質と結合していることが明らかになった。現在、検出されたタンパク質の解析を進めている。

pyrroloquinoline quinone, quinone cofactor, affinity purification

講演番号：3A20p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ A 校舎 20 会場

KK-A^yマウスの糖代謝に及ぼすビタミン K 欠乏食の影響
The role of vitamin K on glucose metabolism in KK-A^y mice
○平原 啓甫、白川 仁、齋藤 正頼、Puspo E. Giriwono、桂井 朋子、後藤 知子、駒井 三千夫（東北大院農）
○Keisuke HIRAHARA, Hitoshi Shirakawa, Masayori Saito, Giriwono Puspo E., Tomoko Katsurai, Tomoko Goto, Michio Komai (Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

【目的】ビタミンK（VK）は、VK依存性タンパク質のGlu残基のγ位カルボキシル化（Gla化）を行う酵素γ-glutamylcarboxylaseの補因子として作用し、血液凝固や骨代謝に関与する。天然のVKには植物由来のVK1（フィロキノン）と主に微生物が産生するVK2（メナキノン類：MK-n）が存在し、摂取されたVKの一部は生体内においてVK2の一種であるメナキノン-4（MK-4）に変換されることが知られている。特に脳や膵臓、精巣において変換活性が高く、多量のMK-4が含まれている。本変換の生理的意義は未だ明らかにされていないが、Gla化を介さないMK-4特異的作用（アポトーシス誘導、転写因子PXRのリガンドなど）が報告されており、それらの組織において何らかの機能に関わると考えられている。疫学調査結果などから、VKと糖代謝の関係が示唆されているが十分に解析が行われていない。本研究では、遺伝的糖尿病モデルマウスを用いて、VK無添加飼料が糖代謝に及ぼす影響について解析した。
【方法】KK-A^yマウス（4週齢、雄）を2群に分け、AIN-93G組成の標準飼料（VK1を0.75 mg/kg添加：cont群）、またはVK無添加飼料（K free群）を与え、20日間および60日間飼育した。飼育期間中は体重、摂食量、摂食時血糖値の測定を行った。60日間の飼育では、飼育33日目に経口糖負荷試験（OGTT）、41日目にインスリン負荷試験（ITT）を実施した。飼育期間終了後、無麻酔下・断頭により解剖に供し、血清、各臓器を採取した。得られた血清を用いて、血糖値、インスリン値、脂質パラメーターの測定を行った。臓器中のVK量は、定法に従い蛍光HPLC法で定量した。また、膵臓、肝臓、筋肉、脂肪組織からtotal RNAを調製し、定量RT-PCR法によって糖代謝関連遺伝子の発現量を測定した。
【結果】体重、摂食量は群間で差は見られなかった。摂食時の血糖値は、飼育日数に従い両群で上昇したが、K free群においてcont群に比べ有意な増加が観察された。OGTTでは、cont群と比較してK free群で耐糖能が悪化する傾向が見られた。また、糖負荷後の血漿インスリン濃度は、糖負荷後60分、120分においてK free群でcont群に比べ低下傾向が観察された。ITTでは、K free群でインスリン抵抗性が増大していた。肝臓中および膵臓中の総VK量、MK-4量は、K-free群で有意に減少していた。また、肝臓において解糖系関連遺伝子のmRNA量がK free群において有意に減少していた。膵臓において糖負荷時インスリン分泌の律速酵素であるグルコキナーゼ遺伝子が有意に減少していた。以上のことから、VK欠乏飼料は、膵臓中のMK-4量を低下させ、糖負荷時のインスリン分泌量を低下させること、また、肝臓におけるインスリン感受性の低下をもたらす可能性が示唆された。

Vitamin K, Diabetes, Insulin

講演番号：3A20p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ A 校舎 20 会場

ビオチンのテストステロン産生の促進とその作用機序の解明
Clarification of biotin effect on testosterone production in mouse testis tumor derived cells
○前田 美里[1]、白川 仁[2]、桂井 朋子[2]、駒井 三千夫[2]([1]東北大・農・栄養、[2]東北大院・農・栄養)
○misato maeda[1], hitoshi shirakawa[2], tomoko katsurai[2], michio komai[2] ([1]Faculty of Agriculture, Tohoku University, [2]Graduated of Agricultural Science, Tohoku University)

【背景・目的】高齢化社会、ストレス社会と言われる現代、加齢男性性腺機能低下症候群（LOH 症候群）が注目されている。この LOH 症候群の主な原因は、男性の加齢に伴うテストステロン（Ts）産生の低下のほか、重度のストレスにより若齢においても発症することが指摘されている。男性ホルモン産生は、20 歳代にピークを迎え加齢とともに徐々に低下し、筋肉機能、性機能の低下を招く。今日、健康志向の意識が高まり、薬学的治療やホルモン療法に加えて、食品による症状改善にも関心が集まっている。我々はこれまでに、ラットにビオチンを薬理量投与した場合、黄体形成ホルモン非依存的に、血漿、精巣での Ts 値が上昇することを明らかにした。本研究は、精巣由来培養細胞を用いて、ビオチンによる Ts 産生上昇、およびその分子機構の解明を目的として行った。
【方法】マウス精巣由来癌細胞 I-10 は、cAMP 依存的に Ts 産生を示す精巣ライディッヒ細胞様の培養細胞である。I-10 細胞をビオチンの存在下・非存在下で一定時間培養した後、培地中に分泌された Ts 量を ELISA 法により測定した。また、I-10 細胞は Ts 産生経路の中間体に当たるプロゲステロン（Ps）も分泌することから、培地中の Ps 量を同様に測定した。また、アデニル酸シクラーゼや PKA の阻害剤で細胞を処理し、ビオチンの作用点を推定した。
【結果】ビオチンは、添加量・時間依存的に I-10 細胞の Ts 分泌量を有意に増加させた。Ps 分泌量も Ts と同様にビオチン添加量・時間依存的に増加したことから、ビオチンは Ts 合成経路の Ps 産生よりも上流の経路に作用することが示唆された。また、アデニル酸シクラーゼ阻害剤（MDL12,330A）や PKA 阻害剤（H89）の処理によってそれぞれ Ts 産生促進作用が阻害された。以上のことから、ビオチンは I-10 細胞において、テストステロン分泌量を増加させ、その作用はアデニル酸シクラーゼの活性化、PKA のリン酸化（活性化）を介することが示唆された。

biotin, testosterone

講演番号：3A22a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ A 校舎 22 会場

ロタウイルスを経口感染させた乳飲みマウスの糞便に含まれるウイルス抗原の定量

Quantitive determination of rotavirus antigen in stools from suckling mice infected by rotavirus

○稲垣 瑞穂[1]、栗本 聖羅[1]、山田 佳太[2]、内山 昇[3]、矢部 富雄[1,4]、中込 とよ子[5]、中込 治[5]、金丸 義敬[1,4]（[1]岐阜大応生・応用生命、[2]近畿大薬、[3]株式会社レグザム、[4]岐阜大院応生・資源生命、[5]長崎大院医歯薬総合）

○ Mizuho INAGAKI[1], Seira KURIMOTO[1], Keita YAMADA[2], Noboru UCHIYAMA[3], Tomio YABE[1,4], Toyoko NAKAGOMI[5], Osamu NAKAGOMI[5], Yoshihiro KANAMARU[1,4] ([1]Gifu Univ., Facul. of Appl. Biol. Sci., [2]Kinki Univ., Facul. of Pharm. Sci., [3]Rexxam Co., Ltd., [4]Gifu Univ., Grad. Sch. of Appl. Biol. Sci., [5]Nagasaki Univ. Grad. Sch. of Biomed. Sci.)

【目的】ヒトロタウイルス（HRV）は乳幼児下痢症の主因ウイルスである。ロタウイルスワクチンが世界中で認可されつつあるが、免疫系が未熟な乳幼児に対し、ワクチンとは異なる受動免疫の開発も重要視されている。我々はこれまでに、食品素材を用いた HRV 下痢症に対する予防と症状の軽減化を提案してきた。その評価系は、細胞を用いた in vitro 試験だけでなく、実用的な効果をみるため、乳飲みマウスによる in vivo 試験を取り入れてきた。乳飲みマウス試験では、ウイルス感染後の糞便状態を観察することにより抗 HRV 効果を評価するのであるが、目視による症状判定となり詳細な評価ができないという問題点を抱えている。実際に、以前、市販の臨床用ロタウイルス検出キットを用いた糞便中のウイルス抗原定量を試みたが、乳飲みマウスの糞便が微量であることから検出ができなかった。本研究では、微量・微弱な相互作用解析に優れているエバネッセント蛍光検出装置を用いることで、糞便中の HRV 抗原定量を試みた。

【方法】出生 5 日目の乳飲みマウスに対して、個体識別を行い、HRV MO 株（G3P[8], 3.7×10^6 fcfu/ml）を経口接種した。HRV 接種から 24,48,72,96 時間毎に、腹部触診による糞便観察および糞便を回収した。糞便 1mg に対して 30μl の PBS に溶解し、その上清を糞便サンプルとして使用した。エポキシコートスライド上に糞便サンプルを固定化した。ブロッキングした後、HRV で過免疫したウシ初乳 IgG 抗体および Cy3 標識化抗ウシ IgG 抗体を用いた間接蛍光抗体法により検出し、Bio-Rex scan 200（Rexxam）を用いて測定した。接種に用いた HRV MO 株を希釈することで検量線を作成し、下痢・軟便時における糞便中の HRV 抗原量を算出した。

【結果】個体により差が見られるが、糞便観察によって下痢と判定される黄色水様性便では、1.4×10^5 fcfu/ml、また軟便と判定されるオレンジ色で粘性便では、1.1×10^5 fcfu/ml、正常便と軟便の中間の糞便では、0.6×10^6 fcfu/ml のウイルス抗原量が観察された。従来の評価法である目視による症状判定とエバネッセント蛍光検出装置を用いた糞便中の HRV 抗原量における相関が保たれていたことから、特に、目視による効果の判定が難しい場合に有効であると考えられる。現在、実際の食品素材を用いた場合の乳飲みマウスの糞便中の HRV 抗原の検出について取り組んでいる。

human rotavirus, evanesent detection, diarrhea

講演番号：3A22a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ A 校舎 22 会場

牛乳ラクトフォリンは細胞内在化を介して感染細胞のウイルスタンパク質合成を阻害する。
Inhibition of protein synthesis for rotavirus by the lactophorin in bovine milk through internalization into target cell.

○大野 翔平[1]、稲垣 瑞穂[2]、山田 佳太[3]、矢部 富雄[1,2,4]、鈴木 徹[4]、松田 幹[5]、高橋 毅[6]、杉山 誠[1,2,4]、中込 とよ子[7]、中込 治[7]、金丸 義敬[1,2,4]([1]岐阜大院応生・資源生命、[2]岐阜大応生・応用生命、[3]近畿大薬、[4]岐阜大院連農、[5]名古屋大農、[6](株)明治・研究本部、[7]長崎大院医歯薬総合)
○Shohei OHNO[1], Mizuho INAGAKI[2], Keita YAMADA[3], Tomio YABE[1,2,4], Tohru SUZUKI[4], Tsukasa MASTUDA[5], Takeshi TAKAHASHI[6], Makoto SUGIYAMA[1,2,4], Toyoko NAKAGOMI[7], Osamu NAKAGOMI[7], Yoshihiro KANAMARU[1,2,4] ([1]Gifu Univ., Grad. Sch. of Appl. Biol. Sci., [2]Gifu Univ., Facul. of Appl. Biol. Sci., [3]Kinki Univ., Facul. of Pharm. Sci., [4]Gifu Univ., United Grad. Sch. of Agric. Sci., [5]Nagoya Univ., Grad. Sch. of Bioagr. Sci., [6]R&D Div. Meiji Co., Ltd., [7]Nagasaki Univ. Grad. Sch. of Biomed. Sci.)

【目的と意義】ヒトロタウイルス（HRV）は乳幼児下痢症の主因ウイルスである。事実上，すべての小児が３～５歳までにこのウイルスに感染し，発展途上国を中心に毎年約 50 万人以上の乳幼児が命を落としている。疾病対策としてはワクチンによる感染予防が第一選択であるが，これを補完する機能性食品素材の開発も重要視されている。我々はこれまでに，HRV に対して牛乳乳清糖タンパク質ラクトフォリンの 18kDa フラグメント（LP18）が強力な阻害活性を示すことを報告してきた。興味深いことに，LP18 の HRV 阻害は，LP18 を細胞に予め 1 時間添加し，除去・洗浄後にウイルス接種を行っても HRV 感染の抑制が認められる（稲垣ら，2012 年農芸化学会にて発表）。即ちこの結果は，LP18 の事前添加により，細胞が HRV に耐性となるメカニズムが存在する事を示している。本研究では，LP18 が持つユニークな HRV 感染阻害メカニズムの解明を目指し，①免疫染色法による LP18 の細胞内局在の観察，②^{35}S-methionine/cysteine（Met/Cys）を用いた HRV 感染細胞におけるウイルスタンパク質合成の経時的追跡とその合成に与える LP18 の影響を検討した。
【材料と方法】いずれの試験にも，アカゲザル胎児腎臓由来 MA104 細胞を用いた。①免疫染色試験では，サンプルを 37℃で MA104 細胞に 1 時間添加した後，Anti-LPmAb を用いた免疫染色を行い，共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。サンプルには LP18 と，LP18 が持つ N 結合型糖鎖を除去した N 型糖鎖除去 LP18 を用いた。②RI トレーサー試験では，96-well プレートで単層培養が完成した MA104 細胞に LP18 を 1 時間添加した後に洗浄し，HRV MO 株（G3P[8]）を 1 時間接種した。維持培地に置き換えて所定の時間（1，4，7 時間）まで培養した後，^{35}S-Met/Cys を 1.5MBq/ml 添加し，30 分間ラベルをおこなった。ラベル後，細胞を回収して SDS-PAGE に供し，オートラジオグラフィーを BAS-2500（富士フィルム）によって取得した。
【結果および考察】①37℃において，LP18 は細胞内に取り込まれ，核周辺に凝集して観察された。一方，N 型糖鎖除去 LP18 では細胞内取り込みは観察されなかったことから，この反応は N 型糖鎖が不可欠であることが明らかになった。②RI トレーサー試験において，HRV 接種 1 時間前に LP18 で処理した細胞では，HRV 接種のみの細胞と比較して，ウイルスタンパク質の発現が抑えられていた。以上の結果は，LP18 の抗ウイルス作用は，細胞外でウイルスと結合し中和するばかりでなく，宿主細胞に取り込まれて HRV 複製を阻害していることを意味している。これは，病原体に対するミルクタンパク質の新しい役割を強く示唆している。

Lactophorin, Bovine milk, Rotavirus replication

講演番号：3A22a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ A 校舎 22 会場

ニンニク抽出物に含まれる TLR 阻害物質の探索

Inhibition of toll-like receptor signaling by the garlic extract.

柴田 貴広、○盧 育章、本多 和也、河合 慶親、内田 浩二 (名大院生命農)
Takahiro Shibata,○Yu-Jhang Lu,Kazuya Honda,Yoshichika Kawai,Koji Uchida (Nagoya Univ.)

【目的】
生体異物や酸化物などの認識に関与する Toll-like receptor (TLR) と呼ばれる受容体は、自然免疫の分子実体としてその重要性が示唆されている。TLR による炎症応答は、微生物などの異物を認識し、速やかに生体防御応答をする上で重要な役割を担っている一方、過度の TLR の活性化は、炎症の慢性化を引き起こし、様々な炎症性疾患のリスクを増大させる可能性が考えられている。こうした点から、TLR を阻害する食品成分の探索は、慢性炎症性疾患の予防に寄与するものと考えられる。
ユリ科ネギ属の多年草植物であるニンニク (*Allium sativum*) は古来より万病に効くといわれ、香辛料として食用にするほか、広く薬用に用いられてきた。ニンニクには、ビタミンやミネラルの他に含硫化合物が豊富に含まれており、抗菌・殺菌作用などの様々な保健機能を有することが知られている。そこで本研究では、ニンニクの油浸出物における TLR 阻害活性を評価し、その活性物質の探索を行うこととした。
【方法・結果】
TLR2 および TLR4 を NF-κB のレポーターベクターとともに安定発現させた HEK293 細胞を用いて検討を行った。ニンニクの油浸出物を細胞に前処理した後、TLR のリガンドである LPS および Pam3CSK4 を投与し、24 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、ニンニク油浸出物の濃度依存的に NF-κB 転写活性を抑制することが明らかとなった。次に、ニンニク油浸出物に多く含まれるアホエンに注目し、その活性を評価したところ、NF-□B 転写抑制活性を有することが明らかとなったが、ニンニク油浸出物の有する活性の強さを説明するには十分ではなかった。そこでニンニク油浸出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し、それぞれのフラクションの活性を評価したところ、ヘキサン：酢酸エチル 1：1 で溶出されるフラクションに強い活性が認められた。このフラクションをさらに HPLC で分析し、それぞれのピークについて活性評価を行い、強い阻害活性を有するピークを同定した。現在、このピークを単離・精製し、NMR および質量分析などを用いて構造解析を行っている。

Toll-like receptor, Inflammation, Garlic

講演番号：3A22a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ A 校舎 22 会場

たまねぎ抽出物に含まれる TLR 抑制物質の同定と作用機序解析

Identification of TLR inhibitors by components of the onion extract

柴田 貴広[1]、○中島 史恵[1]、本多 和也[1]、河合 慶親[1]、牛田 悠介[2]、相澤 宏一[2]、稲熊 隆博[2]、内田 浩二[1]([1]名大院生命農・応用分子生命科、[2]カゴメ（株）総研)
Takahiro SHIBATA[1], ○Fumie NAKASHIMA[1], Kazuya HONDA[1], Yoshichika KAWAI[1], Yusuke USHIDA[2], Koichi AIZAWA[2], Takahiro INAKUMA[2], Koji UCHIDA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Res. Inst. Kagome)

【目的】免疫系は外来異物から生体を守るために発達したシステムであり、哺乳動物では自然免疫と獲得免疫に大別することができる。獲得免疫は遺伝子再構成により無数の抗原特異的受容体を作り出すことであらゆる未知の外来抗原に対処するシステムである。一方、自然免疫はこれまで個体に元々備わっている感染抵抗で、非特異的な防御機構であると考えられてきた。しかし近年になって自然免疫に関わる免疫細胞も極めて特異的な受容体である Toll-like receptors (TLRs) を介して微生物の侵入を認識していることが明らかとなった。また、TLR は微生物感染に対する防御機構において重要な役割を果たしている一方、感染や炎症、酸化ストレス等によって産生された内因性因子を認識することで生体内の恒常性を維持していることも明らかとなってきた。これまでに様々な食品成分が TLR シグナリングを阻害し、抗炎症作用を発揮することが報告されている。TLR シグナリングを抑制する食品成分の探索とその標的分子や作用機序の解明により様々な炎症性疾患の予防および治療への応用が期待される。これまでに当研究室において 24 種類の野菜抽出物のスクリーニングを行った結果、たまねぎの酢酸エチル抽出画分により TLR2 および TLR4 安定発現 HEK293 細胞の NF-κB 抑制活性が確認された。そこで、本研究では TLR シグナリングを抑制するたまねぎに含まれる成分の探索、同定およびその作用機構解析を行うこととした。
【方法・結果】HEK293 細胞に TLR2、pNF-κBMetLuc2 あるいは TLR4、MD-2、pNF-κBMetLuc2 を導入した安定発現株に、たまねぎの酢酸エチル抽出画分を 30 分間投与後、TLR2 および TLR4 のリガンドである Pam_3CSK_4 あるいは LPS を 24 時間投与し、ルシフェラーゼアッセイにより NF-κB の活性化を評価した。その結果、たまねぎ酢酸エチル抽出画分濃度依存的に NF-κB の抑制活性が確認された。たまねぎ酢酸エチル抽出画分を HPLC により分画した後に、得られた画分を TLR2 および TLR4 安定発現 HEK293 細胞に投与し NF-κB の活性化を評価した結果、NF-κB 抑制活性を示す単一ピークが 2 つ確認された。さらに抑制活性が確認された 2 つのピークを NMR および High-MS を用いて構造解析を行い、それぞれ Quercetin、Quercetin 4'-glucoside (Q4'G) であることが明らかとなった。実際に、標品の Quercetin および Q4'G によっても TLR2 および TLR4 安定発現 HEK293 細胞の NF-κB が濃度依存的に抑制されることを確認した。現在、Quercetin および Q4'G の抗炎症作用機構についても解析中である。

Toll-like receptor, inflammation, Quercetin

講演番号：3A22a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ A 校舎 22 会場

キャベツ由来イソチオシアネートの TLR 抑制機構
Inhibition of TLR signaling by cabbage derived isothiocyanate
○本多 和也[1]、柴田 貴広[1]、河合 慶親[1]、田中 浩士[2]、高橋 孝志[2]、牛田 悠介[3]、相澤 宏一[3]、稲熊 隆博[3]、内田 浩二[1]（[1]名大院生命農・応用分子生命科、[2]東工大院理工・応化、[3]カゴメ（株）総研）
○Kazuya Honda[1], Takahiro Shibata[1], Yoshichika Kawai[1], Hiroshi Tanaka[2], Takashi Takahashi[2], Yusuke Ushida[3], Koichi Aizawa[3], Takahiro Inakuma[3], Koji Uchida[1]（[1]Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [2]Tokyo, Inst. Technol., [3]Res. Inst. Kagome.）

【目的】自然免疫におけるパターン認識受容体であるToll-like receptor (TLR) は、病原体に存在するリポタンパク質やリポ多糖、核酸といった特定の分子パターンを認識し、下流シグナルを活性化することで炎症応答を引き起こし、感染防御において重要な役割を果たしている。しかしながら近年では、熱ショックタンパク質や酸化LDLなどといった種々の内因性物質がリガンドとなることでTLRのシグナル伝達を活性化することも明らかとなりつつあり、ウイルス感染や酸化ストレス等により炎症応答が慢性化した際に、動脈硬化やがん、自己免疫疾患といった慢性炎症性疾患へと発展することも示唆されている。そこで、抗炎症という観点からTLRシグナリングを抑制する食品成分の探索および作用機構の解析を試みた。我々は昨年度の本大会において、キャベツ酢酸エチル抽出物より同定されたイソチオシアネート化合物iberin (3-(methylsulfinyl)propyl isothiocyanate) によるTLRシグナル抑制作用および抗炎症活性について報告した。そこで今回、iberinの有するTLRシグナル伝達抑制の作用機構についての解析を行ったので報告する。
【方法・結果】RAW264.7細胞において、TLRリガンド刺激によるNF-κBの核移行、IκBの分解、MAPキナーゼのリン酸化およびIRAK4の分解がiberin処理により抑制されたことから、iberinはTLRシグナル伝達経路の上流に対して作用している可能性が示唆された。さらに、TLR過剰発現によるNF-κB活性化はiberinによる抑制を受けるが、MyD88過剰発現によるNF-κB活性化はiberinによる抑制を受けないことから、iberinはTLRに対して作用していることが想定された。また、*N*-acetylcysteineやDTTなどのチオール化合物は、iberinによるTLRシグナル抑制活性を阻害することや、iberin処理を行った細胞では非還元SDS-PAGEを行った際にTLRのバンドシフトが見られることから、タンパク質中のCys残基がその活性制御において重要である可能性が示唆された。そこでまず、末端にアルキンを付加したiberinを作製し、クリックケミストリーを用いてTLRとiberinとの相互作用についての検討を行ったところ、TLRがiberinによる直接的な修飾の標的になり得ることが確認された。そこで現在、iberin処理によるTLRの翻訳後修飾についての解析を進めている。

Toll-like receptor, inflammation, isothiocyanate

講演番号：3A22a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ A 校舎 22 会場

高圧下酵素処理による β-ラクトグロブリンの低アレルゲン化

Preparation of hypoallergenic β-lactoglobulin by hydrolysis under high hydrostatic pressure

○藤原 麻美、原 理恵子、呉 曦、友野 美怜、古田 早紀、東 徳洋、山田 潔 (宇都宮大農)
○Asami FUJIWARA, Rieko HARA, Xi WU, Misato TOMONO, Saki FURUTA, Norihiro AZUMA, Kiyoshi YAMADA (Utsunomiya Univ.)

【目的】β-ラクトグロブリン（β-LG）は主要な牛乳アレルゲンである。これまでに、高圧下でタンパク質分解酵素の処理を行うことによる様々なアレルゲンタンパク質の低アレルゲン化が報告されているが、β-LG における手法は確立されていない。本研究では高圧下酵素処理によるβ-LG の低アレルゲン化の検討を行った。
【方法】β-LG 水溶液（10 mg/ml）に各種酵素（基質：酵素＝100：1）を添加し、400 MPa で 5 分または 20 分、及び 600 MPa で 5 分高圧処理して、酵素消化物を得た。また、常圧下で 90 分の酵素処理も行い、これらをトリシン SDS-PAGE に供した。また、それぞれの条件で酵素処理したβ-LG を C8 カラム（Xbridge）を用いて逆相 HPLC で解析した。マウスへの抗原性の試験は次のように行った。BALB/c マウス（5 週齢、メス）を用い、2 週間ごとに 1 回 50 μg のβ-LG を Alum アジュバントと共に腹腔内に 2 回注射した。最初の Alum 免疫から 28 日目に採血と皮膚アナフィラキシーの誘導を行った。この血清を用いてβ-LG 特異的 IgG1 との結合度を競合 ELISA 法によって測定した。皮膚アナフィラキシー応答は、Alum 免疫を行なったマウスの背部皮内に抗原を注射することで誘導し、尾静脈からエバンスブルーを投与することで確認した。30 分後に皮膚を切除し、*N,N*-ジメチルホルムアミドを使用して血管外漏出色素を抽出定量した。
【結果】トリシン SDS-PAGE 解析の結果、高圧下でペプシン処理した場合、β-LG の顕著な分解が認められたが、パンクレアチンではβ-LG が残存した。一方、高圧処理後に酵素処理を行った場合、いずれの酵素でもほとんど分解は認められなかった。さらに、逆相 HPLC 解析の結果、400 MPa で 5 分のペプシン処理では認められたβ-LG の残存が、 400 MPa で 20 分及び 600 MPa で 5 分の処理では認められなかった。一方、高圧下ペプシン処理したβ-LG のβ-LG 特異的マウス IgG1 との結合度を競合 ELISA 法により測定した結果、 400 MPa で 20 分及び 600 MPa で 5 分酵素処理したβ-LG では 400 MPa で 5 分酵素処理したβ-LG と比べて IgG1 結合度が顕著に低下していた。また、誘導した皮膚アナフィラキシー応答の強度を比較した結果、未処理のβ-LG では強いエバンスブルーの血管外漏出が認められたのに対し、600 MPa で 5 分の処理では有意に漏出が減少し、抗原性の低下が認められた。これらの結果から、600 MPa で 5 分の高圧下ペプシン処理により、β-LG の低アレルゲン化が可能なことが示唆された。

allergy, IgE, milk

講演番号：3A22a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ A 校舎 22 会場

小麦グリアジンの脱アミド化によるアレルゲン性低減化の in vivo における評価

In vivo evaluation of reduction in allergenicity of wheat gliadin by deamidation

○安田 果倫[1]、阿部 竜典[1]、伊藤 みさき[1]、内田 裕紀[1]、赤尾 真[1]、熊谷 仁[2]、熊谷 日登美[1]([1]日大院・生資科、[2]共立女子大・家政)
○Karin Yasuda[1], Ryosuke Abe[1], Misaki Ito[1], Yuki Uchida[1], Makoto Akao[1], Hitoshi Kumagai[2], Hitomi Kumagai[1] ([1]Dept. Chem. Life Sci., Nihon Univ., [2]Dept. Food Sci. Nutr., Kyoritsu Women's Univ.)

【目的】小麦は、鶏卵、乳製品と共に、三大アレルゲンの一つであるが、動物性のアレルゲンとは異なり、成長過程でのアレルギー症状の緩和が起こりにくい。小麦グリアジンは、運動誘発性アナフィラキシーの主要アレルゲンであり、そのエピトープには、グルタミンの連続配列が数多く存在するため、脱アミド化はアレルゲン性低減化に有効な手段の一つと考えられる。我々はこれまでに、陽イオン交換樹脂で脱アミド化することにより、小麦グリアジンのアレルゲン性が低減化することを、*in vitro* の系で示してきた。脱アミド化処理により、水に対する溶解性および消化性の向上も見られたことから、脱アミド化小麦グリアジンを経口摂取した場合には、アレルゲン性がさらに低下することが期待できる。そこで本研究では、小麦グリアジンアレルギーモデルマウスを用い、経口摂取した脱アミド化グリアジンのアレルゲン性を評価した。
【方法】小麦グルテンからエタノール／クエン酸溶液により得られた抽出物を未処理グリアジンとした。この未処理グリアジンをカルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂により脱アミド化した。まず、未処理小麦グリアジンをマウス腹腔内に投与し、小麦グリアジンアレルギーモデルマウスを作製した。このマウスに未処理または脱アミド化グリアジンを経口胃内投与した後、小腸、腹腔内のマスト細胞、血液を採取した。小腸では、アレルギー発症に伴う高分子タンパク質の透過性増加を、腸管ループ法により測定した。血液では、アレルゲン量を小麦アレルギー患者血清を用いた inhibition ELISA により測定した。腹腔内マスト細胞では、IgE 高親和性レセプターである FceRI の発現量をフローサイトメーターにより測定した。さらに、血清中の遊離ヒスタミン濃度も蛍光法により測定した。
【結果】小麦グリアジンを陽イオン交換樹脂で処理することにより、脱アミド化度約 24%の試料が得られた。未処理グリアジンを小麦アレルギーモデルモデルマウスに腹腔内投与した結果、小腸における高分子タンパク質の透過性、血中のアレルゲン量、腹腔内マスト細胞における FceRI の発現量、血清中遊離ヒスタミン量が増加した。しかし、このマウスに脱アミド化グリアジンを 1 日おきに 7 回経口胃内投与したところ、未処理グリアジンを投与した場合に比べ、腸管における高分子タンパク質の透過性、血中のアレルゲン量、腹腔内マスト細胞における FceRI の発現量、血清中遊離ヒスタミン量は、いずれも有意に低下した。これらのことから、脱アミド化小麦グリアジンが、*in vivo* においてもアレルゲン性が低いことが示された。

wheat gliadin, deamidation, reduction in allergenicity

講演番号：3A22a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ A 校舎 22 会場

Three different CD103+ dendritic cell subsets in mesenteric lymph node have distinct functions in relation to oral tolerance induction

○Aya SHIOKAWA,Satoshi HACHIMURA (Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

Oral tolerance (OT) has been classically defined as the antigen (Ag)-specific suppression of immune responses by prior administration of antigen via the oral route. Dendritic cells (DC) have been revealed as important regulators in oral tolerance induction. It has been proposed that OT requires mesenteric lymph nodes (MLN), and CD103+ DC and PD-L1+ DC in the MLN are suggested to be critical for the induction of oral tolerance. However, the relationship of these DC subsets remains unclear. Therefore we aimed to clarify the phenotypes and functions of MLN DC subsets in relation to oral tolerance induction. Flow cytometric analysis demonstrated that CD103+ DC in MLN are divided into distinct three populations by CD11b and PD-L1 expression. CD11b+PD-L1+CD103+ DC and CD11b-PD-L1+CD103+ DC prominently expressed CCR7, which is the chemokine receptor required to migrate to MLN from LP. CD11b+PD-L1+CD103+ DC presented orally administrated antigen (Ag) to CD4+ T cells and strongly induced T cell proliferation. On the other hand, CD103+CD11b-PD-L1+ DC prominently expressed retinaldehyde dehydrogenase 2 (Raldh2) compared to other CD103+ DC subsets, and strongly induced Foxp3 expression in CD4+ T cells by producing retinoic acid. CD103+CD11b-PD-L1- DC could not present orally administrated Ag, but promptly induced IFN-γ production in CD4+ T cells via IL-12 independent mechanism *in vitro*. These results suggested that the three CD103+ DC subsets have distinctive functions, and may play different roles in inducing oral tolerance.

Dendritic cell, Oral tolerance

講演番号：3A22a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ A 校舎 22 会場

Effects of tamarixetin on the induction of regulatory B cell population with immune suppressive properties

○Chenhao YEH,Makoto SHIMIZU,Mamoru TOTSUKA (Dept. Appl. Biol. Chem.,The Univ. of Tokyo.)

【**Aim**】In addition to the convinced antibody-secreting function of B cells to prime and activate the immune system, a specific subset of regulatory B cell (Bregs) has been functionally defined in human and mice by their ability to suppress immune responses. Since tamarixetin, an O-methylated flavonol, exhibited the greatest IL-10-inducing profile on B cell in our previous screen study, we made an investigation to evaluate the effects of tamarixetin on the differentiation and function of murine Bregs.

【**Methods**】$B220^+$ B cells isolated from spleens, mesenteric lymph nodes, Peyer's patches and peritoneal cavity of C57BL/6 mice were cultured with tamarixetin in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS) and anti-CD40 antibody co-stimulation. The development and/or maturation of Bregs were evaluated by ELISA assay for cytokine secretion, flow cytometry, and suppression assay for $CD4^+$ T cells' proliferation and polarization.

【**Results and Discussion**】Tamarixetin was found to effectively enhance the proliferation and interleukin-10 (IL-10) production of B cells derived from spleen, mesenteric lymph node, Peyer's patch and peritoneal cavity in LPS co-stimulation. Moreover, adoptive transfer of these tamarixetin-primed Bregs reduced the inflammation and retarded disease progression of EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) *in vivo* mice model. Our results strongly suggest that tamarixetin may be a potent regulator of Bregs' development and thus provide an important means for the maintenance of immune tolerance against allergy or autoimmune diseases.

Polyphenol, Interleukin-10, Experimental autoimmune encephalomyelitis

講演番号：3A22a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ A 校舎 22 会場

ダイゼインによる 2 型ヘルパーT 細胞（Th2）への機能分化の抑制
Inhibitory effect of daidzein on functional differentiation of Th2 cells
○石原 惟志、ベ ミンジョン、清水 誠、戸塚 護（東京大院農）
○Tadashi Ishihara,Min Jung Bae,Makoto Shimizu,Mamoru Totuka (Tokyo Univ.)

【目的】大豆イソフラボンの一種であるダイゼインは、抗酸化、抗ガン作用を有し、細胞分化・増殖などを調節することが知られている。しかし、T 細胞の機能分化に対する影響は十分に明らかにされていない。これまでの研究でダイゼインが 1 型ヘルパーT 細胞(Th1)を誘導する効果を報告した。一方、2 型ヘルパーT 細胞(Th2)機能分化への効果に関しては未だ明らかにされていない。そこで本研究では、マウス脾臓由来の抗原未感作 $CD4^+$T 細胞の Th2 への機能分化に対するダイゼインの効果について解析を行った。
【方法】BALB/c マウス由来抗原未感作 $CD4^+$T 細胞を抗 CD3 及び抗 CD28 抗体刺激存在下で、ダイゼインと共に 7 日間培養してサイトカイン産生量及び mRNA 発現量の経時変化を観察した。また、上記の方法で 7 日間培養し分化誘導した $CD4^+$T 細胞を、抗 CD3 及び抗 CD28 抗体で再刺激してサイトカイン産生量と mRNA 発現量を測定し、Th1 及び Th2 機能分化への影響を解析した。
【結果】ダイゼイン存在下で刺激した抗原未感作 $CD4^+$T 細胞では、IFN-γ産生には変化が見られないのに対して IL-4 産生が著しく低下した。また、Th2 特異的な転写因子である GATA-3 の発現低下、Th1 特異的な転写因子である T-bet の発現増加が認められた。ダイゼイン存在下で分化誘導した $CD4^+$T 細胞においては、再刺激後の IL-4 産生の減少および IFN-γ産生の増加が認められた。これらの結果より、ダイゼインは抗原未感作 $CD4^+$T 細胞における IL-4 産生を抑制する事により Th2 への分化を抑制し、Th1 への分化を促進する事が示唆された。

daidzein, Th2, CD4+ T cell

講演番号：3A22a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ A 校舎 22 会場

T 細胞アナジーにおけるユビキチン化タンパク質の分解の役割
The degradation of ubiquitinated ptoteins in anergic T cell
○安達 悠、水口 洋平、中嶋 暁子、山本 愛、服部 誠、好田 正（東農工大、応生化）
○Yu ADACHI, Yohei MIZUGUCHI, Akiko NAKASHIMA, Ai YAMAMOTO, Makoto HATTORI, Tadashi YOSHIDA (Tokyo Univ. Agricul. & Technol.)

【背景と目的】経口摂取した食物抗原に対して誘導される経口免疫寛容の成立と維持において、T 細胞のアナジー化が重要な役割を果たしていると考えられている。近年、アナジー化 T 細胞において、いくつかの E3 ユビキチンリガーゼの発現上昇とその基質タンパク質がユビキチン化・分解されていることが報告された。しかしながら、E3 ユビキチンリガーゼの発現上昇とその基質タンパク質の分解が、T 細胞アナジーの誘導と低応答性にどのように関与しているかは未解明である。そこで本研究では、*in vitro* において T 細胞アナジーの誘導におけるユビキチン化タンパク質の量的な変化とその分解の役割を調べた。

【方法】卵白アルブミン (OVA) 特異的 T 細胞受容体 (TCR) -Tg マウス (DO11.10) 由来の脾臓細胞を IL-12 存在下で抗原刺激し Th1 細胞を誘導した。得られた Th1 細胞を 1 μg/ml の抗 CD3 抗体で 24 時間刺激することで T 細胞にアナジーを誘導した。レスティング 7 日目の Th1 細胞を、5 μg/ml の抗 CD3/28 抗体で再刺激した。このアナジー誘導もしくは再刺激の際に、それぞれの Th1 細胞を 10 μM のプロテアソーム阻害剤 MG132 で前処理した。再刺激 30 分後の Th1 細胞を抗 DO.11.10 TCR 抗体および抗 K48 ユビキチン抗体を用いて細胞内ユビキチン化タンパク質を染色し、フローサイトメトリーにより測定した。再刺激 3 日後、BrdU ELISA により Th1 細胞の増殖応答を測定した。

【結果】細胞内ユビキチン化タンパク質量を測定した結果、アナジー化 T 細胞内におけるユビキチン化タンパク質量は、正常な T 細胞と比較して有意に増加していた。また、アナジー化 T 細胞におけるユビキチン化タンパク質の量は、再刺激により有意に減少していた。また、アナジー誘導もしくは再刺激時における MG132 の影響を調べた結果、アナジー誘導時における MG132 処理はアナジー化 T 細胞の低応答性に影響を与えなかった。一方、再刺激時に MG132 で処理することにより、Th1 細胞の増殖応答の有意な回復が見られた。

【結論】本研究の結果は、T 細胞内のユビキチン化タンパク質はアナジーを誘導する刺激により増加して蓄積し、蓄積したユビキチン化タンパク質の再刺激に応答した分解がアナジー化 T 細胞の低応答性に寄与していることを明らかとした。

T cell anergy, ubiquitin

講演番号：3A22a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ A 校舎 22 会場

大腸と小腸における免疫関連遺伝子の網羅的解析

Transcriptome analysis of the immune-related genes in the immunocytes from the large intestine and the small intestine

○鴨井 大樹、細野 朗、鈴木 誠、今野 拓馬、高橋 恭子、上野川 修一（日大生資科・食品生命）
○Daiki KAMOI, Akira HOSONO, Makoto SUZUKI, Takuma KONNO, Kyoko TAKAHASHI, Shuichi KAMINOGAWA (Department of Food Bioscience and Biotechnology, Nihon University)

【目的】ヒトをはじめ多くの哺乳類において、腸内共生菌は小腸に比べて大腸部位に大量に存在しているが、なぜ大腸では強い炎症反応を起こさずに腸内共生菌との共生が維持できるのかは不明な点が多い。また、マウスの盲腸リンパ節細胞(CeP)は小腸パイエル板細胞(PP)に比べて、菌体成分の刺激に対する炎症性サイトカイン IL-12p40 産生が低いことからも、大腸内では腸内共生菌に対する免疫応答が抑制されていると考えられる。しかし、本来は生体外異物である腸内共生菌が大腸内では完全に排除されることなく共生できること、さらに、腸管免疫系応答においては過剰な炎症反応が見られないことは、腸管における独特の制御機構が関与していると考えられるが，このメカニズムについては不明な点が多い。そこで、本研究では、腸内共生菌の環境が大きく異なる大腸と小腸での免疫系細胞について、その免疫関連遺伝子の発現を比較検討するため、それぞれの部位の主要なリンパ組織である CeP と PP の免疫応答に関する遺伝子発現の網羅的解析を目的とした。
【方法】BALB/c マウス（10～12 週齢）の腸管より CeP および PP を採取して細胞を調製し、微生物抗原に対する自然免疫応答などを解析する目的で、まず磁気ビーズ細胞分離法により T 細胞除去(Thy1.2$^-$細胞)画分を精製した（純度 95%以上）。さらに、それぞれの細胞画分より RNA を抽出し、DNA マイクロアレイシステムにより、両細胞に発現している遺伝子についての網羅的な解析を行った。
【結果】CeP および PP において発現している遺伝子について Gene ontology で生物学的プロセスに注目した解析を行った。細胞内プロセスに関連する遺伝子 588 個、代謝プロセスに関連する遺伝子 504 個では PP に比べて CeP の方が 3 倍以上高い発現が認められた。また、免疫系プロセスに関連するものは 40 個であった。一方で、CeP に比べて PP で 3 倍以上高い発現がみられた遺伝子は、細胞内プロセスに関連する遺伝子 631 個、代謝プロセスに関連する遺伝子 463 個、免疫系プロセスに関連するものは 39 個であった。特に、CeP に比べて PP の方が発現の高い遺伝子にはケモカインや炎症性サイトカイン IL-12p40、補体成分など、自然免疫系細胞が抗原感作によって誘導される免疫反応の初期にみられる分子に関するものが特徴としてみられた。一方、微生物抗原のパターン認識受容体に関連する遺伝子発現については，PP と CeP では大きな差はみられなかった。さらに、タンパク質レベルでの両細胞の細胞応答についても検討中である。

transcriptome analysis, commensal bacteria, gut-associated lymphoid tissue

講演番号：3A22a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ A 校舎 22 会場

グリケーションタンパク質（AGEs）を認識する自然抗体に関する研究

Natural antibody recognizing glycated protein (AGEs)

○近澤 未歩[1]、宮下 宙士[1]、大瀧 菜月[1]、柴田 貴広[1]、河合 慶親[1]、丸山 彰一[2]、豊國 伸哉[2]、松田 幹[1]、内田 浩二[1] ([1]名大院生命農、[2]名大院医)

○Miho Chikazawa[1], Hiroaki Miyashita[1], Natsuki Otaki[1], Takahiro Shibata[1], Yoshichika Kawai[1], Shoichi Maruyama[2], Shinya Toyokuni[2], Tsukasa Matsuda[1], Koji Uchida[1] ([1]Nagoya Univ. Grad. Sch. Bioagri. Sci., [2]Nagoya Univ. Grad. Sch. Med.)

【背景・目的】　糖化や脂質過酸化などの酸化修飾は加齢・疾病に伴い生体内で形成され、組織に蓄積することで機能障害を引き起こす。タンパク質の糖化修飾により形成される糖化最終産物（AGEs）は自然免疫系受容体のリガンドとして作用し、様々なシグナル伝達、免疫応答を引き起こすことが知られるが、その修飾因子や修飾構造については未知な点が多い。

本研究室におけるこれまでの検討において、AGEs-KLH を Balb/c マウスに免疫して作製した抗 AGEs IgM モノクローナル抗体は DNA に対しても結合する多重交差性抗体であること、またアポトーシス細胞を認識し結合することが明らかとなった。また抗 DNA 抗体産生を主徴候とする自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス（SLE）のモデルマウスからも AGEs、DNA、アポトーシス細胞に対して交差性を有する IgM モノクローナル抗体が得られ、多重交差性 IgM 抗体は生体保護作用を担う因子として生体内で増加することが示唆された。そこで本研究では AGEs によって誘導される IgM 抗体の産生機構について、また多重交差性抗体の抗原認識機構についての詳細な解析を行った。

【方法・結果】　これまでの検討により、健常な Balb/c マウス個体の血清中に AGEs を認識する IgM 抗体が存在すること、Balb/c マウスへの AGEs の免疫により抗 AGEs IgM 抗体産生が強く誘導されることを確認した。これより、AGEs の生体内における蓄積が自然免疫系を活性化していると予測し、Balb/c マウスへの AGEs 免疫が腹腔内の B 細胞ポピュレーションに及ぼす影響を解析することとした。AGEs-KLH を隔週で３回免疫後、腹腔細胞を採取しフローサイトメトリーにより細胞を解析した。その結果、AGEs-KLH 免疫マウスでは KLH 免疫マウスと比較して自然抗体産生細胞である B-1 細胞の割合が増加していることが確認された。

一方、抗 AGEs モノクローナル抗体多重交差性については分子の荷電状態の変化から検討した。タンパク質の糖化による求核性アミノ酸残基の修飾や細胞のアポトーシスに伴い、分子の陰性荷電が増加することが知られている。また DNA は強い陰性荷電を有する分子である。このことより、AGEs 免疫 Balb/c マウス、SLE モデルマウスより得られた多重交差性抗体が陰性荷電を抗原として認識する可能性が考えられた。そこで、BSA のリジン残基を無水酢酸との反応によりアセチル化し、ELISA により交差性を確認したところ、多重交差性 IgM 抗体がアセチル化 BSA を抗原として認識することが分かった。このことより、IgM 自然抗体や SLE において産生される自己抗体による認識は、抗原における陰性荷電の増大と関連しているものと推測された。

natural antibody, AGEs, SLE

講演番号：3A22p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ A 校舎 22 会場

蒸し発芽大豆の DNA 合成酵素阻害活性と大豆イソフラボンの生理活性

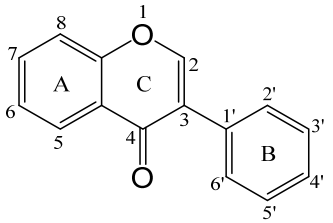
Effect of steamed germinating soybean on DNA polymerase inhibitory activity and effect of isoflavones form soybean on biological activity

○水品 善之[1,2]、高橋 義洋[3]、栗山 磯子[1]、塩見 一明[1]、見通 真衣[1]、吉田 弘美[1] ([1]神戸学院大・栄養、[2]神戸学院大・ライフサイエンス産学連携研究セ、[3](株)小倉屋柳本・開発研)
○Yoshiyuki MIZUSHINA[1,2], Yoshihiro Takahashi[3], Isoko Kuriyama[1], Kazuaki Shiomi[1], Mai Mitoshi[1], Hiromi Yoshida[1] ([1]Faculty of Nutrition, Kobe Gakuin Univ., [2]Kobe Gakuin Univ., LSC, [3]Oguraya Yanagimoto, Co. Ltd.)

【目的】　近年、大豆（*Glycine max* L.）の健康機能性が注目されている。大豆加工食品のうち「水煮大豆」、「蒸し大豆」、「蒸し発芽大豆」を準備して、これら抽出物の生理活性を比較した。また、大豆イソフラボンに注目して、哺乳類の DNA 合成酵素（DNA ポリメラーゼ、pol）と DNA のねじれを巻き戻す DNA トポイソメラーゼ（topo）の阻害活性に基づいた抗がん機能性を検討した。

【方法】　加工大豆については全て同一品種（北海道産のトヨマサリ）であり、「水煮大豆」は研究室で調整して、(株)小倉屋柳本（マルヤナギ）の商品『やわらか蒸し大豆』、「蒸し発芽大豆」はマルヤナギの商品『スーパー発芽大豆』を使用した。大豆イソフラボンは、ゲニステイン、ダイゼイン、グリシテインの３種類（**図１**）と、それぞれの配糖体であるゲニスチン、ダイジン、グリシチンについて、市販試薬を使用した。哺乳類 pol は精製酵素を準備して、*in vitro* における活性測定を実施した。topo は pBR322 スーパーコイル DNA を基質として nicking/catalytic 活性を測定した。ヒト大腸がん細胞（HCT116 cells）増殖抑制活性は、WST-1 法で測定した。

【結果】　大豆加工食品の熱水抽出物を比較すると「蒸し発芽大豆」＞「蒸し大豆」＞「水煮大豆」の順にアミノ酸量が多かった。また、有機溶媒（$CHCl_3$：MeOH＝1：1）抽出物を比較するとイソフラボン含量は「蒸し発芽大豆」＞「蒸し大豆」＞「水煮大豆」の順に多かった。イソフラボンとその配糖体６物質のうち、100 μM の濃度でヒト topo II を阻害したものは、ゲニステインだけであった。一方、これらは哺乳類の pol 群やヒト topo I を阻害しなかった。二本鎖 DNA の熱変性解析により、ゲニステインは基質である二本鎖 DNA に結合（インターカレート）しなかったことから、酵素タンパク質に結合することで阻害活性を示すと考えられる。ゲニステインはヒト大腸がん細胞の増殖を抑制し、細胞周期を G2/M 期で停止して、アポトーシスを誘導した。



	5	6	7	4'
ゲニステイン	OH	H	OH	OH
ダイゼイン	H	H	OH	OH
グリシテイン	H	OCH_3	OH	OH

図１：大豆イソフラボン

【考察】　ゲニステインは topo II 阻害活性に基づいたヒトがん細胞増殖抑制が示唆され、抗がん作用が期待できる。大豆加工食品のうちイソフラボン（ゲニステイン）を高含有する「蒸し発芽大豆」は、がん対策の健康機能性食品としての可能性が示唆される。

【謝辞】　本研究は「平成 24 年度兵庫県ＣＯＥプログラム推進事業（本格的研究開発移行枠）」の補助金を受けた。

steamed germinating soybean, isoflavones, DNA polymerase

講演番号：3A22p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ A 校舎 22 会場

乳がん細胞を用いたアドレナリン受容体へのノルアドレナリン結合に対するフラボノイド類の抑制効果

Effect of flavonoids against adrenergic receptor in breast cancer cells

○山崎 隼輔[1]、榊原 啓之[2]、下位 香代子[1,3]([1]静岡県立大学大学院 生活健康科学研究科、[2]宮崎大学農学部、[3]静岡県立大学大学院 薬食生命学科総合学府)
○SHUNSUKE YAMAZAKI[1], HIROYUKI SAKAKIBARA[2], KAYOKO SHIMOI[1,3] ([1]Grad. Sch. of Nutr. Environ. Sci. Univ. of Shizuoka, [2]Dept. of Agricul. Univ. of Miyazaki, [3]Grad. Sch. of Integra. Pharma. and Nutr. Sci. Univ. of Shizuoka)

【目的】近年、日常生活で暴露されるストレスが乳がんを増加させる可能性が疫学調査や動物試験の結果から指摘されている（KLillberg et al., *Am. J. Epidemiol.*, 157, 415-423, 2003)。17β-estradiol (E_2) の長期暴露は、乳がんの重要なリスク因子であり、E_2の代謝物である4-OHE_2は発がん性を有する。一方、ストレスが負荷された時の生体内では、カテコールアミン類（アドレナリン、ノルアドレナリン）が副腎髄質より分泌され血中濃度が増加する。昨年度の大会で、我々は、4-OHE_2とノルアドレナリン共存下で、α_2-アドレナリン受容体を介して、DNA損傷の指標とされるヒストンH2AXのリン酸化（γ-H2AX）が誘導されることを見いだした。さらに日常生活において植物性食品から摂取しているフラボノイド類がα_2-アドレナリン受容体に作用することによってγ-H2AXの誘導を抑制することを明らかにした。そこで本研究では、正常乳腺細胞および数種類の乳がん細胞を用いて、各細胞において発現しているアドレナリン受容体を調べ、各アドレナリン受容体へのノルアドレナリンの結合に対するフラボノイド類の影響を検討した。

【方法】正常乳腺細胞および乳がん細胞におけるアドレナリン受容体の発現は、リアルタイムPCR法やWestern blot法を用いて調べた。また、アドレナリン受容体へのノルアドレナリンの結合に対するフラボノイド類の影響はBinding assayを用いて行った。アドレナリン受容体各サブタイプの阻害剤で前処理し、フラボノイド類と[^{3}H]-noradrenalineを作用させた後、細胞を回収してシンチレーションカウンターにより測定した。

【結果】正常乳腺細胞であるMCF-10A細胞は、α_2B、α_2C、β_2-アドレナリン受容体が発現していることが分かった。また、ケルセチンとケルセチン抱合体およびルテオリンは、α_2-アドレナリン受容体へのノルアドレナリンの結合を阻害することがわかった。しかしながら、ケルセチンやルテオリンのメチル化体、ゲニステインの阻害効果は見られなかった。α_2-アドレナリン受容体へのノルアドレナリンの結合阻害効果は、これまでに報告例がなくフラボノイド類の新しい作用であり、また、カテコール構造が重要である可能性が示唆された。現在、その他のフラボノイド類、或いはカテコール構造を有するフェノール酸の効果について、乳がん細胞（MCF-7、MDA-MB-231）を用いて実験を行っている。

Flavonoids, Adrenergic receptor, Noradrenalin

講演番号：3A22p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ A 校舎 22 会場

レスベラトロールによる前立腺がんの増殖抑制効果とその分子機構について

The suppressive mechanism of resveratrol on tumor growth in prostate cancer

○三谷 塁一[1]、淺野 茂三[1]、原田 直樹[1]、諫山 篤[1]、谷森 紳治[1]、中野 長久[2]、乾 博[3]、山地 亮一[1] ([1]大阪府大院・生命環境、[2]大阪女子短大、[3]大阪府大院・栄養)
○ Takakazu MITANI[1], Shigezo ASANO[1], Naoki HARADA[1], Atsushi ISAYAMA[1], Shinji TANIMORI[1], Yoshihisa NAKANO[2], Hiroshi INUI[3], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]Osaka Woman's Junior College, [3]Osaka Pref. Univ.)

【目的】前立腺がんの増殖や進行には男性ホルモンであるアンドロゲンと転写因子であるアンドロゲン受容体 (AR) が重要な役割を果たす。AR は N 末端ドメイン (NTD)、DNA 結合ドメイン (DBD)、C 末端側のリガンド結合ドメイン（LBD）の大きく三つの機能的領域から構成されており、リガンド結合時に AR は NTD と LBD による相互作用(N-C 相互作用)を惹起する。N-C 相互作用は AR のタンパク質の安定性を高めることで強い転写活性化能を示す。前立腺がんの発症には食習慣との関連が考えられており、食品機能性成分による前立腺がん予防効果が期待されている。これまでの研究でブドウ果皮に著量含まれるレスベラトロール（3,4',5-trihydroxy-*trans*-stilbene）は AR の N-C 相互作用を阻害すること、AR の転写活性を抑制することを見出した。しかしその詳細な阻害機構は不明である。そこで本研究ではレスベラトロールが N-C 相互作用を阻害する機構について解析し、さらに AR シグナルを抑制し、前立腺がんの増殖を抑制・遅延できるかについて評価した。
【方法と結果】前立腺がん細胞における AR の N-C 相互作用をレスベラトロールは濃度依存的に阻害した。*in vitro* においてレスベラトロールはリガンドに依存した組換え体 NTD と LBD の結合を阻害した。レスベラトロールの 4'位の水酸基をメトキシ基に置換した誘導体は AR の N-C 相互作用と転写活性を阻害したが、3 位と 5 位の水酸基をメトキシ基に置換した誘導体では阻害効果は示されなかった。レスベラトロールをセファロース担体と結合させたレスベラトロールアフィニティー担体を作製し、レスベラトロールと AR の相互作用を検討した。その結果、レスベラトロールは前立腺がん細胞の AR と相互作用し、AR の DBD、LBD ではなく、NTD と直接結合することが明らかとなった。また AR の NTD を前立腺がん細胞で高発現させたところ、レスベラトロールは濃度依存的に AR の NTD の発現量を減少させたが、LBD の発現量には影響を与えなかった。前立腺がん細胞を移植したヌードマウス（BALB/cSlc-*nu/nu*）にレスベラトロール（4 g/kg diet）を 5 週間摂食させた結果、コントロール群と比較して有意に腫瘍の増殖が抑制された。腫瘍における AR、および前立腺がんのマーカータンパク質である PSA の発現量はレスベラトロールの摂食により減少した。以上の結果から、AR の N-C 相互作用の阻害にレスベラトロールの 3 位と 5 位の水酸基が重要であることが示され、レスベラトロールは AR の NTD に直接結合することでリガンドと非競合的に N-C 相互作用を抑制し、AR の発現量を減少することが明らかとなった。さらにレスベラトロールの摂食は腫瘍の AR を減少させ、前立腺がんの増殖を抑制・遅延することが示された。

resveratrol, androgen receptor, prostate cancer

講演番号：3A22p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ A 校舎 22 会場

レスベラトロールによるカルボニルレダクターゼ 1 の阻害は低酸素誘導性の薬剤耐性を改善する
Resveratrol improves hypoxia-induced drug resistance via inhibition of carbonyl reductase 1.
○伊藤 雄太[1]、原田 直樹[1]、諫山 篤[1]、谷森 紳治[1]、中野 長久[2]、乾 博[3]、山地 亮一[1] ([1]大阪府大院・生命環境、[2]大阪女子短大、[3]大阪府大院・栄養)
○Yuta ITO[1], Naoki HARADA[1], Atsushi ISAYAMA[1], Shinji TANIMORI[1], Yoshihisa NAKANO[2], Hiroshi INUI[3], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]Osaka Women's Junior College, [3]Osaka Pref. Univ.)

[目的]　レスベラトロール（3,4',5-trihydroxy-*trans*-stilbene）はブドウの果皮に含まれるポリフェノールの一つである。レスベラトロールは抗酸化効果以外に様々な生理機能を発揮するが、生体内におけるレスベラトロールの分子標的は明らかではない。これまでに我々はレスベラトロールアフィニティ担体を作製し、レスベラトロール結合タンパク質として carbonyl reductase 1 （CBR1）を同定した。CBR1 は、肝がんにおいて固形がんの生育環境である低酸素によって誘導発現され、また乳がんの治療薬である抗がん剤ドキソルビシン（DXR）を代謝して、抗がん性が消失したドキソルビシノール（DXROL）へと変換する。そこで本研究では、乳がん細胞（MCF-7）における CBR1 による DXR 代謝に及ぼすレスベラトロールの効果を検討し、レスベラトロールの新規機能を明らかにすることを目的とする。
[方法]　レスベラトロールが CBR1 と直接結合しているかを CBR1 の組換えタンパク質を作製して検討した。基質である DXR の代謝物の DXROL を HPLC（Ex: 480 nm, Em: 560 nm）で定量して CBR1 の酵素活性を測定した。MCF-7 細胞の増殖に及ぼすドキソルビシンとレスベラトロールの影響は常酸素下または低酸素下で測定した。さらに DXR と DXROL の細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察した。
[結果]　組換えタンパク質 CBR1 はレスベラトロールアフィニティ担体と結合したことから、CBR1 はレスベラトロールと直接結合することが明らかになった。DXR（K_m 値= 199 μM）を基質とする CBR1 活性に及ぼすレスベラトロールの影響を検討したところ、レスベラトロールは混合型非競合的に CBR1 活性を阻害（K_i 値 = 47.5 μM）した。MCF-7 細胞の増殖は用量依存的に DXR によって阻害されたが、低酸素下で培養したとき CBR1 の発現が誘導され、DXR に対する抵抗性が増加した。低酸素による DXR 抵抗性は CBR1 に特異的な siRNA によって解除されたことから、MCF-7 における DXR の主要な代謝酵素が CBR1 であることが判明した。そこで DXR とレスベラトロールとの共存下で MCF-7 細胞の増殖能を測定したところ、低酸素下で生じた DXR 抵抗性はレスベラトロールとの共存によって抑制された。さらに MCF-7 細胞を常酸素下で DXR 存在下において培養したところ、蛍光物質が核で検出されたが、低酸素環境下では蛍光物質は核だけでなく、細胞質においても検出された。一方、レスベラトロール共存下では蛍光物質は核に集積した。DXR は核に局在し、DXROL は細胞質に局在することから、レスベラトロールが CBR1 による DXR の DXROL への変換を阻害していることが示唆された。これらの結果から、乳がん治療に DXR を使用する際、レスベラトロールを併用することで DXR の使用量を減らすことができるというメリットが示唆された。

resveratrol, carbonyl reductase 1, doxorubicin

講演番号：3A22p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ A 校舎 22 会場

Anti-cancer effect of γ-T3 via proto-oncogene Hras-1 down regulation

○Gregor Burdeos[1], Kiyotaka Nakagawa[1], Akio Watanabe[2], Fumiko Kimura[1], Teruo Miyazawa[1]
([1]Tohoku Univ, Grad. Sch. Agr. Sci., [2]Japan Food Research Lab.)

[Introduction] Vitamin E is the generic name for tocopherol (Toc) and tocotrienol (T3), which have saturated and unsaturated side chains, respectively. Previous reports showed the potential anti-cancer effect of T3 both in vitro and in vivo by inducing cell cycle arrest, down-regulation of c-Myc, activation of p53, and caspase-8. But however, the mechanism behind in this biological activity is still needs to be verified due to the complexity of the different processes involve in cancer pathways. Recently, we found new mechanisms of the anti cancer effect of T3 (especially γ-T3) by regulation of proto-oncogene Hras-1 in mouse hepatocellular carcinoma hepa 1-6 cells.

[Methods] Mouse hepatocellular carcinoma hepa 1-6 cells were incubated in experimental medium containing 0-50 μM γ-T3 in 24 h. After 24 h of incubation, cellular proliferation was measured. Gene expression of Hras-1 in different time intervals (6, 12, and 24 hours) was measured. Moreover, Western blotting analysis for Hras-1 was also investigated.

[Results] γ-T3 treatment to hepa 1-6 cells showed significant cytotoxic effect at higher dose (20-50 μM γ-T3 concentrations). RT-PCR analysis showed significant down regulation of Hras-1 gene expression level especially at 6 and 12 hours incubation time. Furthermore, Western blotting analysis revealed significant down regulation of Hras -1 intracellular protein. Therefore, the current findings demonstrated the possibility of Hras-1 gene as the novel target for the anti-cancer effect of T3.

Tocotrienol, Cancer, Proto-oncogene

講演番号：3A22p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ A 校舎 22 会場

DNA 損傷応答反応に対する米ぬか抽出物の作用
The effect of Rice bran extract on DNA damage response
○舘脇 直人、鷲尾 知佳、小日山 惇、永塚 貴弘、西田 浩志、小西 徹也（新潟薬大応生科）
○ Naoto TATEWAKI,Chika WASHIO,Makoto KOHIYAMA,Takahiro EITSUKA,Hiroshi NISHIDA,Tetsuya KONISHI (Niigata Univ. of Pharm. and Appl. Life Sci.)

【目的】米ぬかは玄米を精米して白米にした時に除去される部分であり、ビタミン、ミネラル、食物繊維などの機能性成分が豊富に含まれている。利用例としては、米ぬか油、ぬか床、家畜飼料などがあるが、大部分は廃棄されていることから新たな利用法の開発が求められている。研究レベルでは抗酸化作用や血圧降下作用、発ガン予防作用といった機能性が報告されているが、その詳細なメカニズムに関する報告は十分蓄積されているとは言えない。我々はこれまで、細胞の DNA 損傷の修復やアポトーシス誘導に関わる「DNA 損傷チェックポイント」に作用する食品機能因子の探索を進めてきた。DNA 損傷に応答して活性化されるチェックポイント機能は、ATM（毛細血管拡張性運動失調症(AT)原因遺伝子）および ATR（AT および Rad3 関連遺伝子）をはじめとした様々なチェックポイント分子によって制御されている。この機能は正常細胞だけではなくガン細胞にも同様に備わることから治療時の耐性要因の一つとされ、チェックポイント制御は治療の効率化を図る上で有用であると考えられる。本研究では米ぬかの新たな機能性成分の探索を目的に、米ぬか抽出物（RB）によるチェックポイント阻害を介した、ガン治療増感作用因子の有無について検討した。
【方法】RB を 80% MeOH で抽出し凍結乾燥したものを実験に用いた。A549 ヒト肺ガン細胞を用いてドキソルビシン（DOX）による DNA 損傷応答実験を行い、RB の作用を調べた。細胞生存率を MTT 法により、DNA 損傷チェックポイントシグナル伝達分子 p53、SMC1、Chk1 に対する影響をウエスタンブロット法により観察した。G2/M 期チェックポイント活性は、分裂細胞期の指標であるヒストン H3 のリン酸化をフローサイトメトリーにより観察した。また、免疫蛍光染色法により DNA 損傷の指標であるリン酸化ヒストン H2AX（γ-H2AX）の核内集積（foci）を免疫組織科学的に蛍光顕微鏡で観察した。
【結果・考察】RB の細胞致死効果を観察したところ、RB 単独では細胞の生存率に関してほとんど影響を与えなかったが、DOX による細胞死を RB 濃度依存的に増強した。チェックポイント分子のリン酸化を調べたところ、DOX 処理により観察された p53、SMC1、Chk1 のリン酸化は、RB 処理により抑制された。また、DOX によって減少する分裂細胞数は、DOX と RB を併用することで増加する傾向が見られた。さらに、DNA 二本鎖切断の修復過程初期に出現する γ-H2AX の foci は DOX により増加したが、RB 処理により減少傾向を示した。これらの結果から、米ぬか抽出物には G2/M 期などの DNA 損傷チェックポイント機能を阻害し、DOX による細胞死を増強させる成分が含まれることが示唆された。現在、チェックポイント分子阻害機構や作用成分の詳細な解析を進めているところである。

Rice bran, DNA damage, checkpoint

講演番号：3A22p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ A 校舎 22 会場

発酵米糠抽出物のヒト急性Ｔ細胞性白血病細胞株に対するアポトーシス誘導作用

Extract of fermented rice bran induces apoptosis of human leukemia cells.

○堀江 裕紀子、根本 英幸、小坂 弘明（コーケン・研究開発）
○Yukiko HORIE,Hideyuki NEMOTO,Hiroaki KOSAKA (Research and Development Division, Koken Co. Inc.)

米は日本人の主食であるが、ほとんどは玄米を精米した胚乳のみが食される。精米時に産出される米糠は米油の生産や家畜飼料などに利用されているが、多くは廃棄されている。米糠はビタミン・ミネラル・食物繊維を豊富に含み、γ-オリザノールに代表される生理活性物質は食品分野でも注目されている。発酵米糠食品（FBRA）は米糠を麹菌 *Aspergillus oryzae* で発酵させた食品である。FBRA には米糠由来の生理活性に加え、麹菌の発酵により代謝・産生された成分の機能性も期待されることから、研究を進めている。今回は、FBRA 抽出液がヒト急性Ｔ細胞性白血病細胞株 Jurkat へのアポトーシス誘導作用が見出されたので報告する。

FBRA粉末に5倍量の蒸留水を加え、オートクレーブで121℃、30分間熱水抽出し、遠心上清をフィルター滅菌した物をFBRA抽出液として使用した。10%FBS含有RPMI培地中で前培養したJurkat細胞にFBRA抽出液を添加した。一定時間培養した後、細胞増殖率を測定したところ、濃度依存的に細胞増殖の抑制が確認された。そこで、カスパーゼ3活性とDNAの断片化を確認したところ、無処理のコントロール群に比べFBRA添加48時間の細胞ではカスパーゼ3活性が2倍高くなった。同様にFBRA添加48時間処理の細胞にDNAの断片化が確認された。以上の事より、FBRA抽出液はJurkat細胞に対してアポトーシス誘導による細胞増殖抑制作用があると示唆された。さらに、抗酸化物質存在下でFBRAの作用を確認したところ、細胞増殖抑制作用に影響は無かったため、酸化ストレスによるアポトーシス誘導以外の可能性が示唆された。FBRA抽出液のアポトーシス誘導経路については今後詳しく調査する予定である。

FBRA抽出液を限外濾過によって分子量分画し、Jurkat細胞に作用させたところ、10kDa以下の分画に活性が確認された。今後は麹菌の発酵で生産された米糠由来の低分子成分に注目し、活性物質の探索を行う予定である。

rice bran, Aspergillus oryzae, apoptosis

講演番号：3A22p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ A 校舎 22 会場

ラット神経膠腫細胞に対する山菜抽出物のアポトーシス誘導効果
Induction of apoptosis by extract from edible wild plants on C6 glioma cells
○櫻林 ひかる、福井 智、窪島 愛華、野田 聖子、名取 貴光（山梨学院大健）
○ hikaru sakurabayashi, satoru fukui, aika kubozima, seiko noda, takamitsu natori (Yamanashi-Gakuin Univ.)

野山に自生する山菜の多くは古くより食用として好まれてきた。また、これら山菜は様々な効能をもつことから民間療法として薬用にも用いられている。山菜を含めた植物由来成分には、抗腫瘍効果や抗酸化作用、抗菌活性、抗肥満作用などが報告されており、多種多様な生理活性物質が含まれている。我々は、山梨県内で採取される山菜に着目し、その機能性成分と生理活性について検討を行った。その結果、山梨県で採取した数種類の山菜の中から抗酸化活性が高く、ラット神経膠腫（C6 glioma）に対するアポトーシス誘導効果を有するものを見出したので報告する。

試料は、山梨県総合農業技術センター、八ヶ岳薬用植物園で採取した山菜を使用した。総ポリフェノール含量は Folin-Denis 法により没食子酸相当量として、総カロテン量は吸光光度法により β-カロテン相当量として、DPPH ラジカル消去活性は Trolox 相当量として算出を行った。一方、ラット神経膠腫（C6 glioma）に対する増殖抑制効果については、山菜 80%メタノール抽出画分を濃縮・乾固して再度各濃度に調製したものを用いた。各サンプルを細胞培養液中に添加して 24 時間後に MTT アッセイにより細胞生存率を測定した。また、Calcein-AM、Propidium iodide (PI)及び Hoechst 33342 を用いて多重染色を行い、生死細胞の判定・解析を行った。更に、増殖抑制及び細胞死誘導効果の認められたサンプルに対しては、Annexin V Apoptosis Detection Kit および Caspase3 活性測定キットを用いてアポトーシスの判定を行った。

17 種類の山菜の総ポリフェノール量および総カロテン量、DPPH ラジカル消去活性を測定したところ、数サンプルにポリフェノールおよびカロテンが多く含まれており、抗酸化活性がたかいことが確認された。次にこれらサンプルの C6 glioma に対する増殖抑制効果について検討を行った。その結果、オオバギボウシ、ギョウジャニンニク、ヒメツルニチニチソウ、モミジガサ、ワラビ、ワレモコウに濃度依存的な増殖抑制効果が認められ、特にオオバギボウシとヒメツルニチニチソウにおいて低濃度で顕著な増殖抑制効果が確認された。これらについて、Calcein-AM 及び PI を用いた生死細胞の解析を行った結果、死細胞が顕著に増加していることが観察され、これらの細胞死がアポトーシスであることが明らかとなった。現在、更に検討を進めている。

apoptosis, edible wild plants, cell death

講演番号：3A22p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ A 校舎 22 会場

加工時に黄変しない新形質ダイコンとそのスプラウトの生理機能性について

Studies on the novel strain of Japanese radish and its sprout for functionality.

○森光 康次郎[1]、大賀 智世[1]、深尾 友美[1]、久保田 紀久枝[1]、石田 正彦[2]([1]お茶大院食物、[2]農研機構野茶研)
○Yasujirou MORIMITSU[1], Tomoyo Oga[1], Tomomi Fukao[1], Kikue Kubota[1], Masahiko Ishida[2] ([1]Ochanomizu Univ., [2]NARO)

【目的】ダイコンのグルコシノレート組成は glucoraphasatin だけで 90%以上を占め、そのミロシナーゼによる生成物であるイソチオシアネートの raphasatin は、第二相解毒酵素誘導による発がん抑制効果などの生理機能を示すことが報告されている。一方、ルッコラに多く含まれている同族体の glucoerucin や、そのイソチオシアネートである erucin も第二相解毒酵素誘導能を有することが知られている。本研究では、加工時に黄変しない新形質ダイコンの開発に成功し、その加工品や種子から育成したスプラウトの生理機能性評価を実施した。
【方法】開発した新形質ダイコン（中間母本だいこん農 5 号）を代表的な大根加工品であるたくあん漬（糖絞り）に加工し、成分分析と RL34 細胞を用いて第二相解毒酵素である Glutathione *S*-transferase (GST)の誘導能を調べ、さらには ICR マウスへの投与実験を行った。また、成分による GST 誘導能の違いについては、RL34 細胞で raphasatin と erucin を、ICR マウスで glucoraphasatin と glucoerucin をそれぞれ比較検討した。さらには、新形質ダイコンの種子から 6 日間育成したスプラウトについても、in vitro と in vivo での第二相解毒酵素誘導能を調べた。
【結果】新形質ダイコンをたくあん漬に加工し成分分析を行ったところ、従来ダイコンでは raphasatin が分解したのに対し、新形質ダイコンでは erucin が多く残存した。このことから、新形質ダイコンのたくあん漬は従来ダイコンに比べて高い GST 誘導能を示すと考え、RL34 細胞へ投与した結果、新形質ダイコンでは従来ダイコンより高い GST 誘導能を示した。しかし、ICR マウスに投与した結果、両者間に有意差は見られなかった。RL34 細胞において、raphasatin と erucin いずれにも同等の GST 誘導活性があった。また、ICR マウスへの投与実験結果より、肝臓や膀胱で glucoraphasatin より glucoerucin の方が有意に高い GST 誘導活性を示した。このことから、加工品および生理条件下での erucin の安定性（glucoerucin の bioavailability）の方が高いと推察した。
さらに、新形質ダイコンの種子から育成したスプラウトは、ダイコンでありながらブロッコリーと同じ sulforaphane を含有しており、in vitro での高い GST 誘導能を確認した。現在、in vivo での効果を比較検討中である。

Japanese radish, detoxification enzymes, sprout

講演番号：3A22p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ A 校舎 22 会場

アマドリ型糖化リン脂質のテロメラーゼ活性に与える影響

The effect of Amadori-PE on cellular telomerase activity

○永塚 貴弘[1]、仲川 清隆[2]、西田 浩志[1]、倉田 忠男[1]、宮澤 陽夫[2]([1]新潟薬大・応生科、[2]東北大院農・機能分子解析)
○Takahiro EITSUKA[1], Kiyotaka NAKAGAWA[2], Hiroshi NISHIDA[1], Tadao KURATA[1], Teruo MIYAZAWA[2] ([1]Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences, [2]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

【目的】アミノリン脂質（PE）のグリケーション（メイラード反応）産物であるアマドリ型糖化リン脂質（Amadori-PE）が酸化ストレスや血管新生を引き起こすこと、糖尿病患者の血中に多く蓄積することがわかり[1]、脂質グリケーション産物による糖尿病合併症の発症・進展への関与が示唆されている。最近の疫学研究で、糖尿病により癌の罹患率が上昇することが明らかになり、例えば膵臓癌ではリスクが 2 倍に増大すると報告された。また、近年の日本人糖尿病患者は特に癌による死因が高頻度であることからも、糖尿病と癌の関わりを解明することは喫緊の課題と言える。本研究では、癌細胞に無限の増殖能を与える酵素テロメラーゼに対する Amadori-PE の影響を調べることで、糖化脂質と癌の関わりを明らかにしようとした。
【方法・結果】Amadori-PE を培地に添加してヒト膵臓癌由来細胞 PANC-1 を培養後、MTT 法で細胞増殖能を調べた。Amadori-PE は PANC-1 の増殖を濃度依存的に亢進した。テロメラーゼ活性を stretch PCR 法で測定した結果、Amadori-PE の濃度依存的な酵素活性の増大が認められ、5μM Amadori-PE を 48 時間処理することで約 2 倍に活性が高まった[2]。テロメラーゼ活性化の機構解析のため、リアルタイム RT-PCR とウエスタンブロットによりテロメラーゼの活性制御に関わる遺伝子の発現レベルを評価した。その結果、Amadori-PE は癌遺伝子 c-myc とテロメラーゼ触媒サブユニット hTERT (human telomerase reverse transcriptase) の発現誘導を介してテロメラーゼ活性を促進することがわかった。次に、DCFH 法によって細胞内の活性酸素種（ROS）を測定したところ、Amadori-PE は ROS レベルを有意に上昇させた。そこで、抗酸化物質であるα-トコフェロール（α-Toc）を Amadori-PE と同時に処理してテロメラーゼ活性を評価した結果、α-Toc は Amadori-PE の作用を顕著に抑制することがわかった。このことから、Amadori-PE は酸化ストレスの誘発によってテロメラーゼを活性化すると考えられた。以上より、Amadori-PE は ROS 産生を介してテロメラーゼを転写レベルで調節することが明らかになり、Amadori-PE によるテロメラーゼの活性化が糖尿病における癌の増悪化に繋がる可能性が新たに示唆された。

[1] K. Nakagawa et al., J. Lipid Res., 46, 2514-2524 (2005)
[2] T. Eitsuka et al., FEBS Lett., 586, 2542-2547 (2012).

glycation, telomerase, Amadori product

講演番号：3A22p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ A 校舎 22 会場

Lactobacillus 属を用いた飲酒後の口腔内アセトアルデヒド除去技術の開発
Catalytic removal of acetaldehyde associated with consumption of alcoholic beverages in saliva by a Lactobacillus sp.
○長瀬 昭広、下山 武文、櫻井 明徳、細矢 美穂、中山 亨（東北大院・工・生工）
○Akihiro Nagase,Takefumi Shimoyama,Akinori Sakurai,Miho Hosoya,Toru Nakayama (Dept. Biomol. Eng., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

【目的】飲酒に伴い体内で生成，蓄積されるアセトアルデヒド(AA)は二日酔いや不快な口臭の生成，発がんなど様々な健康被害をもたらすことが知られており，体内で発生した AA を速やかに除去する技術には大きな潜在的需要が見込まれる．特に，日本，中国，韓国といったアジア圏の国々においては，民族的に AA の主要な代謝酵素であるアルデヒド脱水素酵素アイソザイム 2（ALDH2）の欠損者の割合が高く，AA による健康被害を受けやすいため，有効な AA 除去技術の確立が望まれている．従来の AA 除去技術としてシステイン製剤を用いる化学量論的除去方法が存在するが，多量摂取によるアミノ酸インバランスの懸念や，除去効果の持続性など幾つかの問題点が存在していた．そこで，我々は微生物の AA 分解酵素活性に着目し，AA の触媒的除去技術の開発を行った．本技術は，システイン製剤を用いる化学量論的方法とは異なり触媒量で効果を発揮できるので，同活性が微量でも存在する限り，口腔内で持続的に生成・循環する AA を分解し続けることが可能となり，アミノ酸インバランスの懸念もない．本研究では微生物を用いて飲酒後の口腔内 AA を効率的に除去することを目的に，有用微生物の取得を試みた．次に得られた微生物株の AA 分解機構を推定し，分解酵素のクローニング，大腸菌異種発現酵素を用いた解析をおこなった．
【方法・結果】ヒトへの安全性を考慮し，当研究室で単離したヒト大腸由来の乳酸菌群(*Lactobacillus* 属，*Streptococcus* 属，*Bifidobacterium* 属)を対象に飲酒時の口腔内を模した高濃度エタノールと AA の共存下で AA 除去試験を行った．その結果，短時間で効率的に AA を除去する乳酸菌の取得に成功した．また，本菌の有する AA 分解活性の補酵素依存性評価から AA 分解活性がアルコール脱水素酵素（ADH）によるものであることを推定し，本菌の有する ADH のクローニングを行い，大腸菌異種発現酵素の解析から本菌の AA 分解酵素を特定した．精製酵素を用いた実験から，本菌の有する ADH は飲酒後口腔内様環境である高濃度エタノールの共存下においても酵素活性を維持し，エタノールから AA を生成することなく AA を還元し，長時間にわたって反応液中 AA を低い濃度に維持できることが示された．今後は異種発現酵素の解析から得られた知見をもとに，生菌としての利用について検討をおこなう．

carcinoma, alcohol consumption, acetaldehyde

講演番号：3A22p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ A 校舎 22 会場

β-1,3-キシロオリゴ糖のヒト白血病細胞株 HL60 に対するアポトーシス誘導作用の重合度依存性
Effect of DP of β-1,3-xylooligosaccharides toward Induction of Apoptosis in HL60 Cells
○明田川 育生[1]、吉田 剛[2]、吉田 理佐[2]、吉田 滋樹[2]([1]筑波大・生物資源、[2]筑波大院・生命環境系)
○Narumi AKETAGAWA[1], Takeshi YOSHIDA[2], Risa YOSHIDA[2], Shigeki YOSHIDA[2] ([1]Tsukuba Univ, [2]Tsukuba Univ)

【目的】β-1,3-キシランはハモネ科やイワヅタ科の緑藻中に存在する多糖である。陸生植物の構成多糖として知られるβ-1,4-キシランに比べ、β-1,3-キシランの天然界での存在量が少ない。しかし、β-1,3-キシランの分解物であるβ-1,3-キシロオリゴ糖はヒト白血病細胞株 HL60 やヒト乳ガン細胞株 MCF-7 に対してアポトーシス誘導作用を有することが報告された。そこで、緑藻由来の機能性素材開発の一環として本研究では、各重合度のβ1,3-キシロオリゴ糖を調製し、ヒト白血病細胞株 HL60 に対するアポトーシス誘導作用の重合度依存性を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】沖縄産緑藻クビレヅタ(*Caulerpa lentillifera*)からアルカリ抽出によりβ-1,3-キシランを調製した。調製の結果、乾燥クビレヅタに対してのクビレヅタキシランの収率は 26.7%となった。得られたキシランを終濃度 0.25 M の希硫酸で 90℃、15 分間加熱し加水分解反応を行い、β-1,3-キシロオリゴ糖混合液を得た。得られた加水分解糖液を BioGel P-2 及び P-4 を用いて各重合度ごとに分画し、粗分画の精製は BIoGel P-4 及び TOYOPEARL HW-40F を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより行った。精製したβ-1,3-キシランの純度は TLC 及び FACE で検定した。ヒト白血病細胞株 HL60 細胞の培養には 10% FBS、1% penicillin/streptomycin を含む RPMI-1640 培地を用いた。β-1,3-キシロオリゴ糖の HL60 細胞に対する作用はキシロース及び重合度 2 から 5 の同オリゴ糖を培地に添加した後 2 日間培養し、生細胞数を Trypan blue 法で測定した。また、クロマチンの凝集は Hoechst 染色により観察した。その結果、キシロースを添加した場合は生存率に変化は見られなかった。一方、β-1,3-キシロオリゴ糖を添加した場合、二糖では生存率が著しく低下したが、重合度が大きくなるに従い生存率は上昇した。また、Hoechst 染色の結果、二糖を添加したものでは明らかなクロマチンの凝集が見られた。
【考察】β-1,3-キシロビオースを添加した場合、HL60 細胞の生存率は著しく低下しクロマチンの凝集も観察されたことから、アポトーシス誘導作用を有すると推定された。また、このアポトーシス誘導作用には明らかな重合度依存性が観察されたことから、既に報告されているβ-1,3-キシラン分解物の HL60 および MCF-7 に対する抗腫瘍作用は主にβ-1,3-キシロビオースが担っているものと推察した。

β-1,3-xylosaccharide, apoptosis, HL60

講演番号：3A25a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ A 校舎 25 会場

卵黄由来ペプチドの経口摂取による骨代謝改善効果

Effects of oral administration of yolk-derived peptides on bone metabolism in human

○渡部 和哉[1]、磯野 正幸[2]、岡村 好孝[2]、川人 誠二[3]、丸 勇史[1]、金 武祚[1]、山根 哲郎[4]([1]株式会社ファーマフーズ、[2]ワダカルシウム製薬株式会社、[3]イワキ株式会社、[4]松下記念病院)
○KAZUYA WATABE[1], MASAYUKI ISONO[2], YOSHITAKA OKAMURA[2], SEIJI KAWAHITO[3], ISAFUMI MARU[1], MUJO KIM[1], TETSURO YAMANE[4] ([1]Pharma Foods International Co., Ltd., [2]Wada Calcium Pharmaceutical Co., Ltd., [3]IWAKI&Co.,Ltd., [4]Matsushita Memorial Hospital.)

【目的】

骨粗鬆症の予防には、若年期での最大骨量を高めること、さらに加齢とともに高まる骨量の減少を抑えることが重要である。これまでに我々は、卵黄由来ペプチド（ボーンペップ ™）に骨成長促進効果及び骨吸収抑制効果があることを細胞試験及び動物試験で明らかにしてきた。本研究では、臨床試験での経口摂取による卵黄由来ペプチドの骨代謝に与える影響について検討した。

【方法】

本試験は、パナソニック保険組合（松下記念病院）で実施した。被験者は、骨密度減少傾向から骨粗鬆症境界域にある可能性がある 40 歳代以上の女性に、十分な説明後、参加に同意して頂いたボランティア 65 名とした。被験群は、対照群 1：カルシウム、対照群 2：カルシウム＋ビタミン、試験群：カルシウム＋ビタミン＋卵黄由来ペプチドとした。被験者数は、対照群 1：21 名、対照群 2：21 名、試験群：23 名とし、1 日 2 回（卵黄由来ペプチド：100mg/日）摂取し、6 ヶ月間連続摂取いただいた。

評価については、(1) 各種マーカーとして、骨吸収マーカー：I 型コラーゲン架橋 N-末端テロペプチド（NTx)、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ（TRAP)、骨形成マーカー：カルシトニン（CT)、骨型アルカリフォスファターゼ（BAP)、(2) 骨量測定は、試験期間内の骨量変化を摂取前（0 ヵ月)、6 ヶ月後の計 2 回測定した（レントゲン法／腰椎正面撮影／開始時からの BMD 変化率（%/Year))、および（3）アンケート調査として食事状況、運動状況の簡単なアンケート、VAS 検査を実施した。

【結果】

血液の一般生化学検査に関して、3 群間で全項目において正常範囲内であった。骨形成マーカーは 3 群間において有意な差は観察されなかった。骨吸収マーカーである TRAP は 3 ヶ月目においては、試験群で対照群 2 よりも有意に低値を示した。また、骨中のコラーゲン溶出マーカーである NTx の値は試験群で 6 ヵ月後に有意に低い数値となっていた。骨密度変化（BMD 変化 vs ベースライン）は、摂取 6 ヵ月後、試験群のみが骨密度の減少を抑えており、対照群 1 及び対照群 2 では、骨密度は低下傾向を示した。本試験の結果より、骨形成マーカーでは、40 歳代以上の被験者を用いたことから 3 群間で有意な差は得られなかった。一方、骨吸収マーカーは試験群のみ 6 ヵ月後に有意に低い数値となった。更に、骨密度においても試験群のみが唯一骨密度減少を抑制する結果を得られた。以上一連の結果から、卵黄由来ペプチドを経口摂取することにより骨粗鬆症への予防効果が期待される。

peptide, egg yolk, bone metabolism

講演番号：3A25a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ A 校舎 25 会場

骨代謝におよぼすロバスタチン（ラクトン型・アシッド型）投与の影響
Effects of deltalactone formed lovastatin and hydroxyacid formed lovastatin on bone metabolism
○藤井 駿吾[1]、勝間田 真一[1]、井上 博文[1]、鈴木 和春[1]、長谷川 森一[2]、車 炳允[2]、禹 済泰[2]、藤森 賢一[3]、西川 正洋[3]、上原 万里子[1]([1]東農大・応生・栄養、[2]中部大院応生、[3]グリコ栄養食品（株）開発部)
○Shungo FUJII[1], Shin-ichi KATSUMATA[1], Hirofumi INOUE[1], Kazuharu SUZUKI[1], Shin-ichi HASEGAWA[2], Byung-Yoon CHA[2], Je Tae WOO[2], Ken-ichi FUJIMORI[3], Masahiro NISHIKAWA[3], Mariko UEHARA[1] ([1]Tokyo University of Agriculture, [2]Chubu University, [3]GLICO NUTRITION CO.,LTD)

【目的】スタチン系薬剤は、肝臓でのコレステロールの合成を低下させ、それに付随して破骨細胞の制御にかかわるイソプレノイドも低下させるため、骨吸収抑制効果が期待されている。また、骨形成においても、BMP-2 を活性化させ、骨芽細胞の分化を誘導することが報告されている。そのため、脂質異常症の治療薬として利用されるだけでなく、骨粗鬆症にも効果を発揮する可能性を有している。また、近年一部の紅麹から、ロバスタチンが発見されており、生活習慣病予防の観点より注目されている。そこで本研究では構造（水溶性）の異なる 2 種（ラクトン型、アシッド型）のロバスタチンを用いて閉経後骨粗鬆症モデルマウスの肝臓中脂質および骨量減少に対する影響、また破骨細胞および骨芽細胞分化に対するスタチンの影響についても検討した。**【方法】**実験 1：被験動物に 8 週齢の ddY 系雌マウスを用い、卵巣摘出術（OVX）もしくは偽手術（Sham）を施した後、Sham 群、OVX 群、LL（ロバスタチンラクトン型）群、LA（ロバスタチンアシッド型）群、その 2 倍量の同 2 群（2LL, 2LA）および SIM（シンバスタチン）群の計 7 群に分け、8 週間の飼育を行った。実験 2：マウス骨髄由来破骨細胞前駆細胞およびマウス骨髄細胞を用いて、LL 型、LA 型および SIM を添加し培養後、TRAP 染色を行い、破骨細胞形成率を測定した。実験 3：骨芽細胞用細胞（MC3T3-E1）細胞を用いて LL 型、LA 型および SIM を添加し培養後、骨芽細胞分化の指標として ALP 活性を測定し、アリザリン染色でミネラルの沈着状態を検討した。**【結果】**実験 1：肝臓中総コレステロール（TC）及びトリグリセライド（TG）濃度は OVX 群に比較し、各種スタチン投与群で低値を示した。骨密度では各種スタチン投与による影響は認められなかった。骨吸収マーカーである尿中 I 型コラーゲン C 末端テロペプチド（CTx）濃度については 2LA および SIM 群で骨吸収抑制傾向がみられた。実験 2：各種スタチン投与により濃度依存的に破骨細胞形成は抑制されたが、その抑制効果は SIM 投与で強く表れた。実験 3：各種スタチン投与により濃度依存的に骨芽細胞の分化が促進される傾向を示したが、LL、SIM では、10μM 以上で細胞毒性を示したのに対し、LA では 10μM 投与で最も骨芽細胞分化が促進された。
【結論】各種スタチンの肝臓における脂質降下作用が再確認された。また、破骨細胞形成は各種スタチン投与によりほぼ用量依存的に抑制され、骨芽細胞分化は各種スタチン投与により促進されたが、OVX マウスを用いた試験において骨量減少抑制作用はみられなかった。生体へのスタチンの経口投与では、腸管における吸収のステップや体内での分解などにより、骨組織へ充分量が到達していないことが推察された。

lovastatin, bone, osteoporosis

講演番号：3A25a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ A 校舎 25 会場

しょうが抽出物が骨代謝に与える作用効果
Effects of ginger extract on bone metabolism
○伊藤 克[1]、籠谷 和弘[1]、大見 亮宏[1]、浅沼 伸吾[1]、荒木 裕子[1]、金岡 秀明[2]、矢野 竹男[2]、奥村 克純[3]、西村 訓弘[4] ([1]辻製油(株)、[2]三重大院・地域イノベーション、[3]三重大院・生資、[4]三重大院・医)
○SUGURU ITO[1], KAZUHIRO KAGOTANI[1], AKIHIRO OHMI[1], SHINGO ASANUMA[1], YUKO ARAKI[1], HIDEAKI KANEOKA[2], TAKEO YANO[2], KATSUZUMI OKUMURA[3], NORIHIRO NISHIMURA[4] ([1]Tsuji Oil Mills Co., Ltd., [2]Graduate School of Regional Innovation Studies, Mie University, [3]Graduate School of Bioresources, Mie University, [4]Graduate School of Medichine, Mie University)

【目的】骨粗鬆症の罹患者は日本国内で 1000 万人以上に上り、社会的に大きな影響をもたらす問題となっている。骨組織では、絶えず骨形成と骨吸収が営まれており、適切なバランスにより正常性が維持されている。加齢等の原因でそのバランスが崩れ骨の吸収側に傾き、この状態が長期間続くと骨量が減少し、骨粗鬆症に至る。本研究は、食品素材として使用可能な骨形成促進作用および骨吸収抑制作用を有する物質を得る事を目的とし、しょうが（*Zingiber officinale*）のヘキサン抽出物に着目し、骨代謝に与える影響について検討を行った。
【方法・結果】骨芽細胞による石灰化促進効果は、マウス由来前駆骨芽様細胞 MC3T3－E1 を用いた骨芽細胞分化誘導系に、しょうがヘキサン抽出物を添加培養後、Alizarin Red（AR）染色を実施し石灰化領域を定量解析することにより評価した。その結果、しょうがヘキサン抽出物処理群で石灰化領域が有意に増加し、骨芽細胞による石灰化を促進する事が示された。一方で、破骨細胞の成熟抑制効果は、マウスマクロファージ由来細胞 RAW264.7 を用いた破骨細胞分化誘導系にしょうがヘキサン抽出物を添加培養後、酒石酸耐性フォスファターゼ（TRAP）染色および一細胞当たりの核数の計数により評価した。その結果、しょうがヘキサン抽出物処理群で、細胞の融合が抑制され、多核化した成熟破骨細胞の出現頻度が減少する事を確認した。さらに、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を実施したところ、しょうがヘキサン抽出物処理群において破骨細胞分化に関わる遺伝子群の発現が抑制されている事を確認した。以上より、しょうがヘキサン抽出物は骨芽細胞の石灰化を促進する効果および破骨細胞の成熟を抑制する効果を併せ持ち、骨粗鬆症の発症原因となる骨形成と骨吸収のアンバランスを予防・改善する効果を有することが示唆された。

ginger, bone formation, bone resorption

講演番号：3A25a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ A 校舎 25 会場

破骨細胞の分化と機能に対する米糠タンパク質 OsCYT1 の影響

Effects of OsCYT1, which is a rice protein, on differentiation and cellular functions of osteoclasts

○大坪 貞視、太養寺 真弓（新潟農総研食研セ）
○Sadami Ohtsubo,Mayumi Taiyoji (Niigata Agric. Res. Inst.)

骨組織は骨吸収と骨形成のバランスによって維持される動的組織であり、このバランスが骨吸収の方向に傾くと骨量が低下し、骨粗鬆症などの様々な骨関連疾患が誘発される。骨吸収の亢進には老化などの要因が関係しており、高齢化社会が進行している現状において、健全な骨組織を維持するための対策は大きな社会的意義を持っている。こうした背景から、骨吸収を司る破骨細胞には多大な関心がもたれており、破骨細胞の機能を抑制できる食品成分に関しては多くの研究が実施されている。発表者らは、破骨細胞の骨吸収活性に重要な役割を担っているシステインプロテイナーゼ（カテプシン K）に着目し、カテプシン K を阻害できる機能性食品成分について検討を進めてきた。その過程で、米糠タンパク質 OsCYT1(オリザシスタチン I)がカテプシン K 活性を強く阻害することを見いだした。そこで今回、OsCYT1 が破骨細胞に対する抑制因子として利用できるか否かを in vitro で検証した。

OsCYT1 には大腸菌で発現・精製した組換えタンパク質を用い、sRANKL による RAW264 細胞の破骨細胞分化系で、OsCYT1 の影響を破骨細胞分化と骨吸収活性の両面から調べた。破骨細胞分化は TRACP（酒石酸耐性酸性ホスファターゼ）陽性の破骨細胞数で、骨吸収活性は骨吸収活性評価プレート（PG リサーチ製）を用いた pit assay により評価した。また、OsCYT1 に対する抗血清を作製し、これを用いた ELISA で精白米や米糠中の OsCYT1 量を定量した。

OsCYT1 は 5 μM 以下の濃度で破骨細胞の分化を抑制し、その作用点は細胞分化の初期段階であると推察できた。また、破骨細胞の骨吸収活性も OsCYT1 によって抑制できることがわかった。コメにおける OsCYT1 の存在量と併せて、OsCYT1 ならびに OsCYT1 を含むコメタンパク質は、骨関連疾患予防の機能性食品素材として有望であると推察した。

Rice Protein, Osteoclast, Cysteine Proteinase Inhibitor

講演番号：3A25a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ A 校舎 25 会場

ヒト単球 THP-1 を用いた食品の破骨細胞分化への影響
Influence of foods on differentiation to osteoclast in THP-1.
○渡辺 広大[1]、安藤 恵[1]、湊 健一郎[1]、小原 章裕[2] ([1]名城大学農、[2]名城大学院農)
○Koudai WATANABE[1], Megumi ANDO[1], Ken-ichiro MINATO[1], Akihiro OHARA[2] ([1]Meijo Univ., [2]Meijo Univ.)

[目的]
骨のホメオスタシスは，骨の吸収を行う破骨細胞と骨の形成を行う骨芽細胞のバランスによって維持されているが，このバランスが崩れると正常な骨代謝を妨げてしまう。骨代謝とは,破骨細胞がつくった骨吸収窩を骨芽細胞が新生骨で元通りに埋めることにより骨量とその形態を保つことである。そのため，このバランスを調節する食品因子を探索することには意義がある。
本実験では上記 2 細胞の共培養系での実験の前段階として，破骨細胞をヒト単球 THP-1 から分化させ，食品抽出物添加による影響を調べた。

[方法]
ヒト単球細胞株 THP-1 を用いて Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA),Macrophage clony stimulating factor(M-CSF),Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand(RANKL)を培地中に添加して 7 日間培養した。破骨細胞への分化は TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase)染色による形態観察，酵素活性による TRAP activity の測定およびウエスタンブロット法による RANK の検出により確認した。
また，タモギタケ，ナメコ，エゾイラクサそれぞれの熱水抽出物を終濃度 100μg/mL で PMA, M-CSF,RANKL と共に添加し破骨細胞への分化に対する影響を調べた。

[結果]
各熱水抽出物添加での TRAP 染色による形態観察およびウエスタンブロットによる RANK の検出では破骨細胞分化への影響は確認できなかったが，タモギタケおよびエゾイラクサ熱水抽出物添加における TRAP activity では破骨細胞分化に対する影響を及ぼすことが示唆された。

osteoclast, THP-1, food

講演番号：3A25a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ A 校舎 25 会場

ミクログリアMG6 におけるシンナムアルデヒドの抗炎症作用

Anti-inflammation effect of cinnamaldehyde in MG6

○早坂 真依[1]、湊 健一郎[2]、小原 章裕[3] ([1]名城大学農、[2]名城大学農、[3]名城大学院農学研究科)
○Mai HAYASAKA[1], Ken-ichiro MINATO[2], Akihiro OHARA[3] ([1]Meijo Univ., [2]Meijo Univ., [3]Meijo Univ.)

【目的】

中枢神経系を構成しているグリア細胞であるミクログリアは、ストレス等の外的な刺激を受けることで、炎症性サイトカインであるインターロイキン(IL-)1β や TNF-α などを放出する。これら炎症性サイトカインの放出が継続すると、慢性疲労が誘発されることが示唆されている。本実験では炎症ミクログリアを用いて、香辛料シナモンの主成分のひとつであるシンナムアルデヒドの炎症性サイトカイン産生抑制効果を調査した。

【方法および結果】

LPS で炎症反応を誘発させたマウスミクログリア細胞株 MG6 を用いて、シンナムアルデヒドの炎症抑制効果を調査した。炎症性のサイトカインである IL-1β 及びケミカルメディエータである NO(nitric oxide)の産生抑制効果を指標として調べた。シンナムアルデヒド添加により、LPS による炎症刺激を受けた MG6 由来の NO の産生が抑制された。また、Western blotting 法による IL-1β 検出の結果、シンナムアルデヒドは本炎症性サイトカインの産生を抑制することが示唆された。以上のことより、シンナムアルデヒドにはミクログリアの炎症を抑制する作用を有することが示唆された。尚、MTT 法により、添加したシンナムアルデヒド量は細胞毒性を示さないことを確認している。

MG6, cinnamaldehyde, anti inflammation

講演番号：3A25a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ A 校舎 25 会場

食用キノコ「アンニンコウ」由来多糖画分の免疫調節作用

Immunomodulating action of polysaccharide from an edible mushroom, Grifola mushroom.

○森田 友[1]、湊 健一郎[2]、原田 栄津子[4]、森園 智浩[4]、小原 章裕[3]（[1]名城大学農、[2]名城大学農、[3]名城大学院農、[4]（株）岩出菌学研究所）
○Yuu MORITA[1], Ken-ichiro MINATO[2], Etsuko HARADA[4], Toshihiro MORIZONO[4], Akihiro OHARA[3] ([1]Meijo Univ., [2]Meijo Univ., [3]Meijo Univ., [4]Iwade Research Institute of Mycology Co.Ltd.)

【目的】
我々は，食用キノコであるアンニンコウの熱水抽出物における，マクロファージ活性化作用について，昨年度の本大会で報告した [1]。そこで，本実験では本抽出物をさらに分離・精製して活性本体の構造および生理活性について，さらに詳細に検討を実施した。
【方法および結果】
本実験では，アンニンコウ子実体の熱水抽出物について，限外濾過により分子量 6000 以上の画分について，サイズ排除クロマトグラフィーにより分離・分画をおこなった。その結果，分子量が 40 万以上の画分と 2 万の画分とに分離できた。これら得られた画分はともにフェノール―硫酸法による検出の結果，糖画分であることが示唆された。そこで，さらにこれらの画分を 0.05M および 2M の TFA によりそれぞれ完全および部分加水分解をおこなって，構成糖を TLC および GC/MS で検出した結果，グルコースが主な構成糖であることが示唆された。
本画分は，マウス由来のマクロファージ様細胞株について，活性化作用があることを報告しているが，ヒトマクロファージ様細胞株に対しても，同様の効果が認められるか検証中である。

1）山田ら，日本農芸化学会 2012 年度大会

edible mushroom, IL-1beta, beta-glucan

講演番号：3A25a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ A 校舎 25 会場

生野菜および漬け物より単離された乳酸菌の諸性状解析

Properties of lactic acid bacteria isolated from fresh vegetables and pickles

○松崎 千秋[1]、神島 香織[1]、松本 健司[2]、片山 高嶺[1]、山本 憲二[1]、久 景子[3]([1]石川県大・資源研、[2]石川県大・生資環、[3]日東薬品工業（株））
○ Chiaki Matsuzaki[1], Kaori Kamishima[1], Kenji Matsumoto[2], Takane Katayama[1], Kenji Yamamoto[1], Keiko Hisa[3] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ., [3]Nitto Pharmaceutical Inds. Ltd.)

[目的]最近、生野菜や漬け物等のさまざまな植物より乳酸菌が単離され、その一部はプロバイオティクスとして食品や飲料に添加されている。本研究は、さまざまな生野菜および漬け物より単離した約 200 株の乳酸菌の中から、粘膜免疫系において重要な免疫グロブリン A（IgA）の産生促進能に優れた菌株を選抜し、得られた乳酸菌のプロバイオティクスとしての可能性を検討する目的で行った。

[方法]単離した菌株はグラム染色とカタラーゼ試験によって簡易的に乳酸菌であることを確認した。これらの菌株について、マウス小腸パイエル板細胞を用いた IgA 産生促進能を検討した。7 週齢の BALB/cA マウスより小腸パイエル板細胞を摘出し、コラゲナーゼ調整法により得られたパイエル板細胞の濃度を 2.5×10^5 cells/ml に調整した。これらのパイエル板細胞懸濁液に、MRS 培地にて液体培養し 10 μg/ml に菌体濃度を調整した乳酸菌を等量加え、37ºC、5% CO_2 嫌気条件下で 5 日間反応後、産生した総 IgA 量を ELISA 法により測定した。

[結果]単離した乳酸菌株について IgA 産生促進能を調べた結果、有意に高い IgA 産生能を有する乳酸菌 2 株（NP047、NP048）を選出した。この 2 株について 70℃、30 min 処理し、得られた死菌体について同様にパイエル板細胞を用いた IgA 産生能を調べたところ、生菌体と同様の IgA 産生促進能が確認された。この結果から NP047 株および NP048 株による IgA 産生誘導物質は菌体壁または菌体外成分であることが示唆された。さらに 16S rDNA 配列解析により菌種同定を試みたところ、これら 2 株は同一菌株であることが明らかになり、新たなプロバイオティクスとしての可能性を有する乳酸菌株であることが推察された。

lactic acid bacterium, IgA, probiotics

講演番号：3A25a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ A 校舎 25 会場

イヌのオーラルケアにおける抗歯周病原菌バイオフィルム鶏卵抗体の効果

Oral care effect on the dog by the chicken egg antibody against the biofilm derived from periodontal bacteria

○山下 裕輔[1]、弓場 安紀子[2]、丸 勇史[1]、森 尚志[2]、金 武祚[1]([1]株式会社ファーマフーズ、[2]ダクタリ動物病院 京都病院)
○ Yusuke YAMASHITA[1], Akiko YUMIBA[2], Isafumi MARU[1], Takashi MORI[2], Mujo KIM[1] ([1]Pharma Foods International Co., Ltd., [2]Daktari Animal Hospital Kyoto)

【目的】
2 歳以上のイヌの 80%以上が、歯周病をはじめとする何らかの歯周疾患に罹患している。これらの疾患の予防のひとつは、歯垢（バイオフィルム；BF）内の歯周病原菌を除去することである。我々は、これまでにヒト口腔内由来の BF に対する鶏卵抗体（BF IgY）を作製し、唾液中嫌気性細菌の減少効果と口臭減少等オーラルケア効果をイヌ数頭への摂取試験にで調べた（前年度本大会)。今回は、試験頭数を増やして実施すると共に、飼い主へのアンケートも行い、オーラルケア効果を総合的に評価した。
【材料および方法】
ヒトの歯周病原菌として知られる *Porphyromonas gingivalis* と *Fusobacterium nucleatum* を混合培養して得た BF を産卵鶏へ免疫し、抗体力価が上昇した卵黄を粉末化し摂取サンプル（BF IgY）とした。供試動物は、種々の犬種からなる飼いイヌ 22 頭（2～17 歳齢の雄 12 頭、雌 10 頭）を使用した。BF IgY（5 mg/回）は、1 日 3 回 2 週間口腔内投与した。試験開始前後に口腔内検査として、前臼歯、犬歯において歯垢、歯石の付着程度、歯肉の充血、および口臭官能検査を行い、各々をスコア化した。飼い主に対しては、歯垢、歯石および口臭に関するアンケートを試験前後に実施した。
【結果】
BF IgY 投与前と比べ、投与期間後には犬歯において、歯垢および充血スコアがそれぞれ 17.5%、18.5%と、有意に減少した（$p<0.05$)。口臭スコアは 22.9%の有意な減少が認められた（$p<0.01$)。歯石に関しては有意な減少が確認されなかった。飼い主アンケートにおいて、口臭の改善が 64%、歯垢、歯石の改善が 27%のイヌに関して体感できると回答が得られた。本研究を通じて、BF IgY 摂取による副作用は認められなかった。
【結論】
BF IgY は、イヌの口腔内バイオフィルムと交差反応性を示し、菌数を減少させることにより歯垢、口臭を低減させ、炎症指標となる歯肉の充血を低減する作用があると推察された。イヌの歯周病対策には歯磨きが最良だが、イヌが嫌がることも多い。BF IgY は、口腔内フローラを保ちつつ歯周病原菌を減少させることが期待でき、ペットオーラルケアの新たな機能性素材として有用であることが示された。

chicken egg antibody, biofilm, dog oral care

講演番号：3A25a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ A 校舎 25 会場

フェルラ酸の２型糖尿病モデルマウスにおける炎症性遺伝子発現への影響
Effect of ferulic acid on inflammatory genes in diabetic mouse
○上野 有紀、西川 佳那、濱田 愛、山田 雄太、大池 真央、濱島 佑弥、池山 将成、大澤 俊彦（愛知学院大心身科学）
○Yuki Ueno,Kana Nishikawa,Ai Hamada,Yuta Yamada,Mao Oike,Yuya Hamajima,Masanari Ikeyama,Toshihiko Osawa (Aichi Gakuin Univ.)

【背景・目的】糖尿病の患者数は増加の一途をたどっており、その治療・予防の対策は急務とされている。２型糖尿病の発症要因として、エネルギーの過剰摂取による肥満症が注目されている。肥満症では、組織における酸化ストレスが亢進しており、糖尿病の発症・進展ならびに糖尿病性合併症の発症に関与することが知られている。本研究では、植物が含有するフェノール性化合物のフェルラ酸(FA)に着目した。FA の生理作用は、抗酸化作用および抗腫瘍活性等が報告されている。また、肥満を伴う 2 型糖尿病マウスにおいて FA による血糖値低下が報告されているが、その作用機序の詳細は解明に至っていない。我々はこれまでにマウス由来前駆脂肪細胞株 3T3-L1 を用いて、FA が炎症性サイトカイン産生を抑制することを見出した。そこで本研究では FA の抗炎症作用に着目し、糖尿病における慢性炎症を FA が抑制することによって糖尿病状態の改善に作用するかを検討した。２型糖尿病マウスに FA を経口摂取させ、肥満・糖尿病由来の組織における炎症性遺伝子の発現への影響を調べるために、DNA マイクロアレイを用いて網羅的解析を行った。
【方法】肥満を伴う 2 型糖尿病モデル ob/ob マウス（６週齢、雄）とその対照系統+/+マウス（６週齢、雄）を１週間予備飼育後、+/+マウス＋control diet（nonDM+Cont）群、ob/ob マウス＋control diet(DM+Cont)群、ob/ob マウス＋0.5% FA diet(DM+FA)群の３群に分けて飼育し、血清、肝臓、腎臓、脂肪組織を得た。各組織における遺伝子発現プロファイルを知るために、DNA マイクロアレイ解析を行った。
【結果・考察】DM+Cont 群は nonDM+Cont 群と比較して、体重・血糖値いずれも有意に高値であった。DM+Cont 群と DM+FA 群を比較すると、体重・血糖値の有意差は見られなかった。DNA マイクロアレイ解析の結果、DM+Cont 群は nonDM+Cont 群と比較して、肝臓において数種の炎症関連遺伝子の発現上昇が認められたのに対し、DM+FA 群は DM+Cont 群を比較すると、その中で多くの炎症関連遺伝子の発現を抑制した。脂肪組織と腎臓においても同様に DNA マイクロアレイ解析を行った結果、DM+FA 群での炎症関連遺伝子の発現抑制傾向はみられたが、変動した遺伝子群は共通するものと共通しないものがあることが明らかとなった。このことから、ob/ob マウスの組織では種々の炎症性遺伝子発現が上昇しており、FA の経口投与が ob/ob マウスにおける数種の炎症性遺伝子を抑制することが分かった。

ferulic acid, inflammation, DNA microarray

講演番号：3A25a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ A 校舎 25 会場

自然免疫応答を用いた新規食品機能性評価法で判明したアントシアン類の機能性

Health progress for human on Anthocyan assessed by new evaluation method using the innate immune response of neutrophils

○數村 公子[1]、佐藤 由紀子[1]、里園 浩[1]、望月 美佳[2]、呉 暁紅[3]、土屋 広司[1]、小池 隆[4]、岡崎 茂俊[5]、大澤 俊彦[2]（[1]浜松ホトニクス・中研、[2]愛知学院大・心身、[3]ヘルスケアシステムズ、[4]浜松ホトニクス・電子管、[5]浜松医大・MPRC）

○Kimiko KAZUMURA[1], Yukiko SATO[1], Hiroshi SATOZONO[1], Mika MOCHIZUKI[2], Xiaohong WU[3], Hiroshi TSUCHIYA[1], Takashi KOIKE[4], Shigetoshi OKAZAKI[5], Toshihiko OSAWA[2]（[1]Hamamatsu Photonics CRL, [2]Aichi Gakuin Univ., [3]Healthcare Systems, [4]Hamamatsu Photonics Electron, [5]Hamamatsu Univ. Sch. Med.）

【目的】免疫細胞である好中球の自然免疫応答を、光情報に変換し検出する技術を構築し、食品成分の抗酸化（活性酸素消去作用）、抗炎症（活性酸素産生を抑え過剰な炎症反応を抑制する作用）、自然免疫賦活作用の 3 つの生理活性を同時に評価出来る手法を開発した。さらに発光計測において、試料の持つ着色による光吸収（内部露光効果）に由来する誤差を、試料の吸収スペクトルと化学発光試薬の発光スペクトルを用いて補正する方法も考案し、適用した。本評価手法を用いて、着色試料であるアントシアン類（シアニジン、デルフィニジン、シアニジン配糖体、デルフィニジン配糖体）の抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活機能を評価した結果を報告する。

【方法】ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 より得た好中球様細胞懸濁液（1×10^5cells/ml）に、アントシアン類を添加し（0μM～33μM）、好中球刺激誘引物質 fMLP で刺激した際に現れる細胞内 Ca^{2+}濃度上昇と O_2^-（スーパーオキシド）産生を、蛍光と化学発光にて同時に検出した。アントシアン類の添加による蛍光と化学発光の発光量変化より、アントシアン類が自然免疫反応に及ぼす影響を評価した。さらに、本評価法の結果を、従来から用いられている抗酸化能測定法であるヒポキサンチンーキサンチンオキシダーゼ反応を用いた化学発光法で評価した結果と比較した。化学発光法で得られた結果についても、先述した補正方法を適用し、内部露光効果に由来する誤差を補正した。

【結果】アグリコンであるシアニジン、デルフィニジンを添加した好中球様細胞懸濁液の場合、fMLP にて刺激した際の細胞内 Ca^{2+}濃度上昇と O_2^-産生は、コントロール（試料無添加の好中球様細胞懸濁液）の場合と比較して、共に添加濃度依存的に抑制された。これは、細胞内への Ca^{2+}の流入を抑えることにより、O_2^-の産生を抑制したと考えられるため、シアニジン、デルフィニジンは、抗炎症作用を有していることが推測される。また従来法である化学発光法による測定結果より、これらの試料は O_2^-を消去する作用があることも確認されたため、併せて抗酸化作用も有していると示唆される。

また、内部露光効果の補正効果を評価するため、本評価法の結果（補正あり・補正なし）と従来法の化学発光法で得られた結果（補正あり・補正なし）より IC_{50} 値（50%発光阻害濃度）を算出し、比較をした。その結果、一部の試料においては補正有りの場合、今回の設定濃度範囲では IC_{50} 値が範囲外となり算出不能となったが、補正なしの場合は IC_{50} 値が算出された。この結果は、内部露光効果を補正しないと IC_{50} 値を過大評価する場合があることを示唆している。

health progress for human, innate immune respons, Anthocyan

講演番号：3A25a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ A 校舎 25 会場

植物由来成分によるヒストン脱アセチル化酵素の活性調節と抗腫瘍及び抗炎症作用の関連について

Plant-derived component exerts an anti-tumor and anti-inflammatory effect through regulation of histone deacetylase activity.

○名取 貴光[1,2]、福井 智[1]、桜林 ひかる[1]、野田 聖子[1]、窪島 愛華[1]、長井 薫[2] ([1]山梨学院大健、[2]山梨大院医)
○Takamitsu Natori[1,2], Satoru Fukui[1], Hikaru Sakurabayashi[1], Seiko Noda[1], Aika Kuboshima[1], Kaoru Nagai[2] ([1]Yamanashi-Gakuin Univ., [2]Yamanashi Univ.)

野菜や果物には、ポリフェノール類やカロテノイド類など体の機能を調節しうる成分が豊富に含まれている。近年、これら植物由来の成分にヒストン脱アセチル化酵素（Histone deacethylase：HDAC）の活性調節のあることが報告されている。HDAC は、アセチル化されたヒストンのアセチル基を除去することで遺伝子転写を調節する酵素であり、この HDAC の阻害剤には、抗腫瘍活性や抗炎症性作用のあることが報告されている。そこで我々は、野菜や果物に含まれる機能性成分のもつ生理活性が HDAC の調節を介して行われているか否か検討を行った。その結果、供試した数種類の野菜の中から抗酸化活性が高く、ラット神経膠腫（C6 glioma）に対する細胞死誘導効果と抗炎症作用を有するサンプルを見出し、これらの効果が HDAC を介した機能調節である可能性を示唆する結果を得たので報告する。

山梨県内で生産されている野菜と果物を市場より購入し、凍結乾燥したものを試料として用いた。アセトン抽出と熱水抽出を行い、各画分の総ポリフェノール含量は Folin-Denis 法により没食子酸相当量として、総カロテン量は吸光光度法により β-カロテン相当量として、DPPH ラジカル消去活性は Trolox 相当量として算出を行った。一方、ラット神経膠腫（C6 glioma）に対する増殖抑制効果については、各サンプルを細胞培養液中に添加して 24 時間後に MTT アッセイにより細胞生存率を測定した。また、一酸化窒素（NO）及び炎症性サイトカインの産生調節の検討では、マウス脳由来のミクログリア細胞株（BV-2）を用いた。NO の産生については、Griess 試薬法、サイトカインは ELISA 法を用いて検討を行った。なお、細胞内のヒストンのアセチル化と HDAC 活性は、市販の測定キットを用いて測定を行った。

野菜に含まれる総ポリフェノール量、DPPH ラジカル消去活性を測定したところ、青シソやホウレン草にポリフェノールが多く含まれており、抗酸化活性が高いことが確認された。そこで、これら抽出画分の C6 glioma に対する増殖抑制効果と BV-2 における NO 産生抑制効果について検討を行ったところ、アセトン抽出画分に強い増殖抑制効果と NO 産生抑制効果が認められた。細胞内ヒストンのアセチル化への影響と HDAC 阻害活性を測定したところ、これら抽出画分に強い HDAC 活性阻害効果がみとめられたことから、青シソやホウレン草による C6 glioma 増殖抑制効果と NO 及び炎症性サイトカイン産生抑制は、エピジェネティックな発現調節を受けている可能性が示唆された。

Histone deacethylase, acethylation, epigenetic regulation

講演番号：3A25a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ A 校舎 25 会場

血管新生に及ぼすカロテノイドの影響

Effects of Carotenoids on Angiogenesis

○梅原 平三郎、菅原 達也、平田 孝 (京大院農)
○HEIZABURO UMEHARA,TATSUYA SUGAWARA,TAKASHI HIRATA (Kyoto Univ.)

【目的】生体における血管新生は悪性腫瘍、動脈硬化症や糖尿病などの生活習慣病の進展と深く関わっていることが知られており、血管新生抑制物質によるこれらの病態の抑制が期待されている。一方血管新生促進物質は、近年注目されている再生医療の現場において、虚血性疾患などの病態の治療に応用される可能性がある。演者らはこれまでに、海洋生物に特有のカロテノイドである褐藻由来フコキサンチンや緑藻由来シフォナキサンチンが血管新生に対して強い抑制作用を示すことを見出している(1,2)。しかしながら、これら以外のカロテノイドが血管新生に与える影響は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、様々な生物由来のカロテノイドについて血管新生に与える影響を評価した。
【方法】血管内皮細胞モデルとしてヒトさい帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を用い、基底膜マトリックス上で形成される管腔構造を血管新生の指標とした。HUVEC を各カロテノイドの共存下で BD マトリゲル上に播種し、12 時間培養後、画像解析ソフトを用い形成された管腔の長さを定量化した。
【結果と考察】非環式カロテノイドであるリコペン及び高度好塩菌由来バクテリオルベリンは血管新生を有意に促進した。一方、柑橘類に多く含まれるβ-クリプトキサンチン、サケやカニなどに多く含まれるアスタキサンチン、フェニコキサンチンは血管新生を有意に抑制した。また、ホタテ由来ペクテノロンやマボヤ由来ハロシンチアキサンチン、アロキサンチンなど分子内に三重結合をもつカロテノイドでは有意な変化は認められなかった。以上の結果から、カロテノイドの血管新生に与える影響はその化学構造の違いによって異なることが分かった。
(1)J. Agric. Food Chem., 54, 9805-9810 (2006)
(2)Phytomedicine, 17, 1140-1144 (2010)

carotenoid, angiogenesis

講演番号：3A25a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ A 校舎 25 会場

発酵大麦エキス（FBE）は LPS と TLR4 の結合を阻害することにより抗炎症作用を示す

Fermented barley extract shows anti-inflammatory effect by inhibition LPS-TLR4 interaction

○小口 一起[1]、Giriwono E. Puspo[1]、外薗 英樹[2]、白川 仁[1]、駒井 三千夫[1]([1]東北大院農、[2]（株）三和酒類)
○Kazuki OGUCHI[1], Giriwono Puspo E.[1], Hideki Hokazono[2], Hitoshi Shirakawa[1], Michio Komai[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Sanwa Shurui Co.,Ltd.)

【目的】焼酎粕は焼酎製造過程において、もろみを蒸留した後に残る不揮発性物質である。従来、飼料や肥料(一部は廃棄)など限定的に利用されているのみで、その高付加価値利用が期待されている。大麦焼酎粕の水溶性画分である発酵大麦エキス（FBE）は、アルコール性肝障害や脂肪肝を抑制することが知られている。本研究室では、FBEを摂取することにより、LPS誘発の肝障害が抑制されることを明らかにした。FBEを含む試験飼料を10日間給餌したラットに、リポポリサッカライド（LPS）を投与すると、LPS誘導の血漿AST、ALT活性が有意に減少し、肝障害が抑制された。また、抗酸化酵素の活性が上昇した。以上のことから、FBEはLPS誘発の炎症反応を抑制し、その一部はFBEが持つ抗酸化作用によることが示唆された。しかし、FBE中の抗炎症作用物質の分離・同定は行われていない。そこで本研究では、FBEを分画して得られた各フラクションの抗炎症作用を実験動物、および培養細胞を用いて解析した。
【方法】FBEの分画：FBEをスチレン系吸着樹脂に吸着させ、エタノールでステップワイズ溶出させた(P-10、P-20、P-99画分)。得られたP-10画分をシリカゲルで分離した（10-1、2、3画分)。動物実験：Wistar系ラット8週齢雄に、FBEおよびFBEの分画画分(5 mg/kg体重)を単回経口投与し、LPS(0.5 mg/kg体重）を腹腔内投与した。18時間後解剖に供し、血漿ALT,AST活性、血漿IL-6濃度、肝臓での炎症関連遺伝子のmRNA量を測定した。培養細胞試験：P画分のサブフラクションでマウス由来マクロファージ様細胞（RAW264.7）を処理した後、LPS（1μg/ml）で処理した。一定時間後、Total RNAを回収し、炎症性サイトカインのmRNA量を測定した。また、P-10画分と蛍光標識LPS（1μg/ml）でRAW細胞を処理し、細胞内のLPS量を測定した。
【結果】FBE および FBE サブフラクションをラットに経口投与すると、LPS による血漿 AST,ALT 活性、IL-6 濃度の上昇が抑制された。RAW 細胞を用いた細胞実験において、P-10、P-20 画分は、LPS 処理による炎症性サイトカインの mRNA 発現量を有意に抑制した。さらに、P-10 画分は LPS と同時添加した際にも炎症性サイトカインの mRNA 発現を抑制したことから、細胞内変化を介さない抗炎症作用機構が示唆された。そこで、蛍光標識 LPS を用いて、細胞内への LPS の取り込み量を測定すると、P-10 および 10-1 画分で有意に低下した。さらに、LPS 結合タンパク質（LBP）を用いた in vitro 実験において、10-1 画分中の成分は LPS と LBP の結合を阻害することが示された。以上より、FBE の抗炎症作用の一部は、LPS と LBP の結合を阻害することに起因することが示唆された。

Fermented barley extract, LPS, LBP

講演番号：3A25a15
講演日時、会場：3 月 26 日 11:48～ A 校舎 25 会場

発酵大麦エキスは脳卒中易発性高血圧自然発症ラットの高血圧症を改善する

Supplementation of fermented barley extract has capacity to improve hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats

○植田 一馬[1]、Ardyansyah Ardy[2,3]、白川 仁[2]、Puspo Giriwono[2]、小口 一起[2]、外薗 英樹[4]、樋渡 一之[5]、高橋 沙織[5]、駒井 三千夫[2]([1]東北大・農・栄養学、[2]東北大・院農・栄養学、[3]Food science and Technology Study Program, Universitas Bakrie, Indonesia、[4]三和酒類（株）、[5]秋田県総食研)
○ Kazuma UEDA[1], Ardy Ardyansyah[2,3], Hitoshi SHIRAKAWA[2], Giriwono Puspo[2], Kazuki OGUCHI[2], Hideki HOKAZONO[4], Kazuyuki HIWATASHI[5], Saori TAKAHASHI[5], Michio KOMAI[2] ([1]Faculty of Agriculture, Tohoku University, [2]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [3]Food Science and Technology Study Program, Universitas Bakrie, Indonesia, [4]Research Laboratory, Sanwa Shurui Co.,Ltd., [5]Akita Research Institute for Food and Brewing)

【目的】生活習慣病を引き起こす危険因子は血圧と直接的に関わっており、血圧の 5 mmHg の減少によって生活習慣病の発症が 16%減少するといわれている。焼酎かすは焼酎製造過程において、もろみを蒸留した後に残る不揮発性物質であり、従来、飼料や肥料などにしか利用されず、一部は廃棄されており、その高付加価値利用が期待されている。これまでに、本研究室では焼酎かすから調製される発酵大麦エキス（FBE）が、慢性アルコール摂取ラットやリポ多糖誘発性の肝障害モデルラットにおいて、肝障害を抑制することを見出した。本研究では、脳卒中易発性高血圧自然発症ラット（SHRSP）に FBE のポリフェノール画分を投与し、血圧や血糖値に及ぼす影響を解析した。
【方法】＜FBE の分画＞FBE をスチレン系吸着樹脂で吸着させ、エタノールで溶出させたものを FBEP とした。＜単回投与試験＞雄性 15 週齢の SHRSP/Izm を 16 時間絶食後、FBEP（2.0 g/kg b.w.）を経口投与し、投与後 0、1、2、4、6 時間後の収縮期血圧、および血漿パラメーター（中性脂肪、コレステロール、グルコース）を測定した。＜長期投与試験＞雄性 10 週齢の SHRSP/Izm を 3 群に分け、それぞれ飼料として、コントロール食（AIN-93M 組成）、FBEP 1 食（FBEP 4g/kg 飼料含有）、FBEP2 食（FBEP 20g/kg 飼料含有）を与え、3 週間飼育した。飼育期間中、収縮期血圧、拡張期血圧を毎週 tail-cuff 法により測定した。また、12 週齢時に経口糖負荷試験（OGTT）を行った。飼育終了後、16 時間絶食させ解剖し、血漿、肝臓などを採取した。
【結果】＜単回投与試験＞FBEP 投与後 1 時間から 6 時間まで、収縮期血圧が有意に低下した。また、血漿中性脂肪、総コレステロール、グルコース値も減少した。＜長期投与試験＞3 群間で、体重、摂食量、臓器重量に差は見られなかった。飼育 2 週目から両 FBEP 投与群で収縮期血圧、拡張期血圧が有意に減少し、高血圧症の改善が見られた。FBEP は in vitro 試験において、アンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性を有していたことから、本阻害活性により血圧低下が見られること考えられた。OGTT では、群間で顕著な差は見られなかったが、解剖時の血漿グルコース、インスリン値が FBEP1 群でコントロール群に比べ有意に低下しており、インスリン抵抗性の改善が示唆された。また、血漿中のカタラーゼ、SOD 活性の有意な上昇、および 8-OHdG 量の低下が、FBEP1 群で見られた。さらに、肝臓での抗酸化関連遺伝子 mRNA 量が FBEP1 群で有意に上昇していた。以上の結果から、FBEP は肝臓での抗酸化遺伝子の発現を上昇させ、SHRSP が示す病態を改善することが示唆された。

Stroke, Hypertension, Antioxidant

講演番号：3A25p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ A 校舎 25 会場

セサミンとエピセサミンの経口投与によるマウス肝臓の遺伝子発現変動の比較解析

Comparative analysis of hepaticgene expression fluctuations in mice given sesamin and episesamin per os

○姚 瑞卿[1]、安岡 顕人[2]、檜木 智裕[3]、北川 義徳[3]、柴田 浩志[3]、阿部 啓子[1,4]、三坂 巧[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]前工大・生物工、[3]サントリーウエルネス・健康科学研、[4]神奈川科学技術アカデミー)

○ruiqing YAO[1], akihito YASUOKA[2], tomohiro ROGI[3], yoshinori KITAGAWA[3], koushi SHIBATA[3], keiko ABE[1,4], takumi MISAKA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Maebashi Inst. of Tech., [3]Suntory Wellness Ltd., [4]KAST)

【目的】ゴマリグナンの一種であるセサミンは、アルコール代謝の促進、脂肪酸合成の抑制、脂肪酸分解の促進など、エネルギー代謝に関する広範な生理作用を示すことが知られている。しかし、セサミンをゴマ油から精製する過程においては、異性体のエピセサミンも生成される。従って、報告されてきたセサミンの生理作用は両者合同作用であると考えられる。本研究では、マウスに純品のセサミンとエピセサミンを投与し、これらの生理作用の相同点と相違点を検討する目的で実施された。
【方法】C3H/HeNCrlCrlj系統6週齢オスに、対照としてコーンオイル(3ml/kg)、コーンオイルに溶解したセサミン(35.44mg/kg)、同様のエピセサミン(35.44mg/kg)を一日一回3日間経口投与し、最後の投与の24時間後に解剖した。肝臓の全RNAを抽出し、DNAマイクロアレイ解析を行った。各遺伝子の発現量をqFARMS法で正規化し、rank product法を用いてコントロール群とセサミン群、コントロール群とエピセサミン群の組み合わせで二群間比較を行った。得られた遺伝子群について、DAVIDを用いたgene annotation enrichment analysisを行った後、Benjamini(FDR補正したEASE score)＜0.05となる機能分類としてのgene ontology(GO)termsを抽出した。抽出されたGOtermsについて、QuickGOを用いて階層化し、最下層のGOtermsに含まれる遺伝子を解析した。
【結果】2 群比較の結果に基づき、KEGG pathway データベースを用いて最下層 GOterms に含まれた遺伝子の代謝への影響を検討した。セサミン投与で発現が変動した遺伝子群については、解糖系と TCA 回路の促進、コレステロール合成の抑制、リン脂質代謝の促進、ステロイドホルモン合成の調節、糖源性アミノ酸代謝の促進などが見られた。エピセサミン投与で発現が変動した遺伝子群については、コレステロール合成と胆汁酸合成の抑制、長鎖脂肪酸と不飽和脂肪酸合成の抑制、リン脂質代謝の抑制、糖源性アミノ酸代謝の抑制などが見られた。また、両者共通に発現が変動した遺伝子については、脂肪酸酸化の促進、コレステロールの肝臓への輸送の抑制などが予想された。以上より、通常生体内における各代謝経路に対するセサミンの機能とエピセサミンの機能の異同が明らかになった。

sesamin, episesamin, DNA microarray

講演番号：3A25p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ A 校舎 25 会場

総エネルギー量一定条件下で PFC バランスの異なる食餌を摂取させたラットの肝臓における比較遺伝子発現解析

Comparative hepatic gene expression analysis of rats fed isoenergetic diets with different PFC balances

○永井 俊匡[1]、熊倉 慧[1]、新井 栞[1]、黒田 萌珠[1]、赤石 結美[1]、石丸 喜朗[2]、中井 雄治[2]、阿部 啓子[2]、朝倉 富子[2]([1]高崎健大・栄養、[2]東大院農生科・応生化)
○Toshitada NAGAI[1], Kei KUMAKURA[1], Shiori ARAI[1], Moemi KURODA[1], Yumi AKAISHI[1], Yoshiro ISHIMARU[2], Yuji NAKAI[2], Keiko ABE[2], Tomiko ASAKURA[2] ([1]Takasaki Univ. of Health and Welfare, [2]Tokyo Univ.)

【目的】Protein, Fat, および Carbohydrate（PFC）のバランスは、栄養学において最も重要な食事パラメーターの 1 つである。しかし摂取エネルギーを統一して PFC の比率を変化させた報告、特に遺伝子発現変化を網羅的に解析した報告はほとんどない。本研究では、摂取エネルギーを一定にし、PFC バランスを変化させた場合の体重増加率及び肝臓の代謝変動などを比較し、PFC バランスの生体へ及ぼす影響を解析することを目的とした。

【方法】3 週齢の Wistar 系雄ラットを、2 週間の予備飼育後に 3 群に分け、PFC 比率の異なる飼料（low-fat diet, L 群, P:F:C=20:15:65; middle-fat diet, M 群, 20:20:60; および high-fat diet, H 群, 20:45:35 エネルギー換算比率）を、ペア・フィーディングによってエネルギー摂取量を揃え、9 週間飼育した。

飼育終了後、ラットより肝臓および精巣上体白色脂肪組織（WAT）を摘出した。肝臓から RNA を抽出し、Affymetrix Rat Genome 230 2.0 Array を用いた DNA マイクロアレイ解析を行った。データを robust multi-array average (RMA) 法で正規化し、階層的クラスタリングを行った。さらに rank products 法を用いて 2 群間比較を行い、false discovery rate (FDR) <0.05 のプローブセットを有意に発現変動した遺伝子として抽出した。

【結果と考察】体重推移については、3 群とも同様の成長曲線を描き、解剖時の体重も 3 群間で有意差はなかった。このことから、摂取エネルギーを一定にした場合、PFC バランスが変化しても体重は変化しないことが示された。解剖時の肝臓重量および WAT 重量を比較したところ、H 群の WAT 重量に増加傾向がみられたが、有意な差はなかった。

L, M, H 群についてサンプル間階層的クラスタリングを行った結果、H 群のクラスターと、L 群と M 群からなるクラスターの 2 つに分離した。L 群 vs M 群、M 群 vs H 群、L 群 vs H 群で 2 群間比較を行ったところ、どの 2 群間でも FDR が 0.05 未満の変動遺伝子は全体の 0.75%以下であった。

これらのことから、脂質含量の増加に伴って、肝臓のごく一部の遺伝子しか発現変動しないことが示された。現在、Gene Ontology 解析を行い、肝臓代謝における PFC バランスの影響を検討している。

PFC balance, DNA microarray, liver

講演番号：3A25p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ A 校舎 25 会場

アミノ酸サプリメントを経口投与したマウス白色脂肪組織の遺伝子発現プロファイリング
Gene expression profiling of mice white adipose tissue given orally a supplement with special amino acid composition of *Vespa* larval saliva origin

○篠崎 文夏[1]、亀井 飛鳥[1]、渡部 由貴[1]、荒井 綜一[1,2]、熊谷 弘太[3]、阿部 岳[4]、阿部 啓子[1,5]（[1]KAST、[2]東京農業大学・総研、[3]協和発酵バイオ、[4]Hornet Research Center、[5]東大院農生科・応生化）
○Fumika SHINOZAKI[1], Asuka KAMEI[1], Yuki WATANABE[1], Soichi ARAI[1,2], Kota KUMAGAI[3], Takashi ABE[4], Keiko ABE[1,5] ([1]KAST, [2]Tokyo University of Agriculture, [3]KYOWA HAKKO BIO., LTD., [4]Hornet Research Center, [5]The University of Tokyo)

【目的】スズメバチ(*Vespa*)栄養液に含まれる特異な組成のアミノ酸混合液*V.*A.A.M.は、他の組成のアミノ酸混合液よりも効果的に運動時の持久力を向上させ、血中のアミノ酸バランスの恒常性を維持に寄与することがわかっている。また、我々は単離脂肪細胞において*V.*A.A.M.はカテコールアミンなどの刺激物の非存在下で中性脂肪の分解を惹起し、*V.*A.A.M.が脂肪組織に対して直接的に作用することを報告した。このことから運動時のみならず運動を伴わない平常時においても*V.*A.A.M.は脂肪分解機能を示すと考えられる。これまでに平常時に*V.*A.A.M.投与後の肝臓遺伝子発現解析を行い、コレステロール代謝に影響することを見いだした。本研究では運動を伴わない平常時の白色脂肪組織に対する*V.*A.A.M.の効果をDNAマイクロアレイによって解析した。
【方法】動物はマウス(ddY、雄、5週齢)を用い、通常飼料および水を自由摂取させた。1週間馴化した後、群分けを行い、脱イオン水もしくは1.8%*V.*A.A.M.をそれぞれ37.5μL/g体重の用量で１日１回、５日間、経口投与した。また、*V.*A.A.M.の対比アミノ酸混合液として1.8%カゼインアミノ酸混合液(CAAM)を投与した。最後の投与から4時間後に白色脂肪組織を摘出し、トータルRNAを抽出し、DNAマイクロアレイ解析を行った。
【結果】*V.*A.A.M.投与群と脱イオン水投与群の階層的クラスター解析の結果、それぞれおおまかな群に分離され遺伝子発現パターンの違いがあることがわかった。CAAM 投与群と脱イオン水投与群でも同様であった。発現変動遺伝子は *V.*A.A.M.と CAAM で比較すると、発現上昇した遺伝子数は *V.*A.A.M.の方が多く、逆に発現低下した遺伝子数は *V.*A.A.M.の方が少なかった。また *V.*A.A.M.と CAAM で共通して変動する遺伝子は *V.*A.A.M.の変動遺伝子数の３分の１程度であり、アミノ酸組成比によって変動遺伝子は異なっていることがわかった。*V.*A.A.M.投与によってどのような遺伝子が変動しているかを濃縮度解析で調べたところ、代謝関係では中性脂肪の代謝、グリセロール代謝、脂肪酸生合成など脂質代謝関係の遺伝子が変動していることがわかった。中性脂肪生合成経路では、グルコースからの生合成経路でホスファチジン酸からジアシルグリセロールの生合成が抑制されるとともに、逆にジアシルグリセロールからホスファチジン酸生合成を促進するように遺伝子発現が変動しており、ジアシルグリセロールの生合成量は低下すると考えられた。
以上の結果から、*V.*A.A.M.投与はジアシルグリセロール量を低下させて中性脂肪生合成量を抑制すると推測された。

amino acid, white adipose tissue, DNA microarray

講演番号：3A25p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ A 校舎 25 会場

シナモン熱水抽出物が骨格筋細胞における糖の取り込みに及ぼす影響
The effect of cinnamon on glucose uptake by skeletal muscle cells.
○本間 夏実[1]、飯塚 望[2]、石林 千早[2]、小林 克也[2]、佐野 佑果[2]、沈 燕[1]、細野 崇[1,2]、有賀 豊彦[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日大院・応生科、[2]日大・生命化)
○Natsumi HONMA[1], Nozomi IIZUKA[2], Chihaya ISHIBAYASHI[2], Katsuya KOBAYASHI[2], Yuka SANO[2], Yan SHEN[1], Takashi HOSONO[1,2], Toyohiko ARIGA[1,2], Taiichiro SEKI[1,2] ([1]Nihon Unv., [2]Nihon Univ.)

【目的】シナモン（*Cinnamomum zeylanicum*）はクスノキ科のケイおよびその同族植物の樹皮を乾燥させたもので、香辛料のみならず生薬としても利用され、抗炎症作用や発汗作用を示す。我々は、これまでにシナモン熱水抽出物 (CE) が 1 型糖尿病に特徴的な体重の減少と高血糖、および糖尿病性腎症を改善することを明らかにした(*BBB*, 2010)。さらに、昨年度の本会では 2 型糖尿病モデルラットにおいて、CE がインスリン感受性の改善とは異なるメカニズムで糖尿病を予防することを報告した。本研究は、CE の耐糖能改善メカニズムを明らかにする目的で、主要なインスリン標的組織である筋肉に焦点を当て、培養筋管細胞を用いた検討を行った。
【方法】マウス骨格筋由来細胞株である C2C12 筋芽細胞を 10%FBS, DMEM (High glucose) でセミコンフルエントになるまで培養後、2%FBS, DMEM で 10 日間培養して筋管細胞への分化を誘導した。分化誘導後の C2C12 筋管細胞に insulin (100 nM) または CE (300 μg/mL) を添加して 1 時間培養した。CE が糖の取り込みに及ぼす影響を ^{3}H 標識 2 デオキシグルコースの細胞内への取り込みにより解析した。また、CE の作用メカニズムを明らかにするために、PI3 kinase 阻害剤である LY294002 (30 μM) およびインスリン受容体チロシンキナーゼの阻害剤である AG1024 (60 μM) を添加して 30 分間培養後、insulin (100 nM) または CE (300 μg/mL) を添加して 1 時間培養し上記と同様の方法により、糖の取り込みに及ぼす影響を解析した。さらに、CE がインスリンシグナル関連タンパク質のリン酸化状態に及ぼす影響をウェスタンブロット法により解析した。
【結果】C2C12 筋管細胞への insulin の添加培養は、細胞内への糖の取り込みを Control と比較して 2.5 倍増加させた。CE の添加培養は、Control と比較して細胞内への糖の取り込みを約 2 倍増加させた。さらに、インスリンシグナルにおいて重要な役割を担っている Akt のリン酸化が増加した。CE により引き起こされた糖の取り込みおよび Akt のリン酸化は、LY294002 により Control レベルにまで抑制された。また、AG1024 を処理することで CE により引き起こされた糖の取り込みは Control レベルまで抑制された。
【結論】シナモンは insulin 非依存的にインスリン受容体のチロシンキナーゼ活性を増強し、糖の取り込みを促進させることで耐糖能を改善することが示唆された。

cinnamon, insulin signal, glucose uptake

講演番号：3A25p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ A 校舎 25 会場

イソマルチュロースが運動時のグリコーゲン蓄積に及ぼす影響

Effect of isomaltulose on glycogen accumulation before the race

○笹川 克己[1]、石川 修平[1]、峰尾 茂[1]、西田 浩志[2]、佐藤 眞治[2]、平山 匡男[1] ([1](株)ブルボン健康科学研、[2]新潟薬大応生)
○Katsumi SASAGAWA[1], Syuhei ISHIKAWA[1], Shigeru MINEO[1], Hiroshi NISHIDA[2], Shinji SATO[2], Masao HIRAYAMA[1] ([1]Bourbon Institutes of Health, [2]NUPALS)

【背景/目的】グリコーゲンは運動時の重要なエネルギー源であり、運動前に体内にグリコーゲンを多く蓄積させることが運動パフォーマンスの向上につながると考えられている。スクロースの構造異性体であるイソマルチュロース(Palatinose®、6-*O*-D-glucopyranosyl-D-fructose)は、ゆっくりと消化吸収されるため、急激な血糖値の上昇を引き起こさず、過剰なインスリン分泌を抑制することが報告されている。昨年、我々はイソマルチュロースの糖取り込み促進作用について報告しており、本研究ではグリコーゲン蓄積に及ぼす影響についてスクロースとの比較検討を行った。
【方法】 ＜短期摂餌試験＞Wistar 系雄性ラットを、スクロース配合飼料またはイソマルチュロース配合飼料で飼育する 2 群に分け、ペアフィーディングで 3 日間個別飼育した。飼育中は毎日 1 時間の強制水泳を行い、飼育終了後に肝臓および骨格筋を摘出した。＜単回投与試験＞Wistar 系雄性ラットにスクロースまたはイソマルチュロースを 0.83g/kg 経口投与し、投与前、30 分、60 分、90 分、120 分、180 分後に肝臓および骨格筋を摘出した。＜2 食目投与試験＞Wistar 系雄性ラットにスクロースまたはイソマルチュロースを 0.83g/kg 経口投与し、90 分後にグルコース（2 食目）を 0.83g/kg 経口投与した。グルコース投与 30 分後に肝臓および骨格筋を摘出した。＜グリコーゲン測定＞組織を 0.3M 過塩素酸でホモジネートし、上清をグルコアミラーゼで加水分解させ、グルコース量を測定することによりグリコーゲン量を求めた。
【結果】短期摂餌後の骨格筋グリコーゲン量は群間で差がみられなかったが、肝臓グリコーゲン量はスクロース群に比べイソマルチュロース群で有意に増加した。単回投与後の骨格筋グリコーゲン量は両群とも投与前の値から変化がみられなかったが、肝臓グリコーゲン量は両群とも投与 60 分後から有意に増加し、120 分以降はスクロース群に比べイソマルチュロース群で高値を示した。2 食目投与後の肝臓グリコーゲン量は群間で差がみられなかったが、骨格筋グリコーゲン量はスクロース群に比べイソマルチュロース群で有意に増加した。
【考察】イソマルチュロースがグリコーゲンとして肝臓に蓄積しやすいこと、また骨格筋に作用することで同時に摂取する糖質のグリコーゲン蓄積を促進することが明らかとなった。作用メカニズムについては現在検討を行っている。以上の結果より、イソマルチュロースはグリコーゲンローディングのような体内のグリコーゲン量を高める場合に有用な糖質であり、持続的な運動における運動パフォーマンスを向上させる可能性を有することが示唆された。

Isomaltulose, Glycogen, Exercise

講演番号：3A25p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ A 校舎 25 会場

食用菊熱水抽出成分による抗糖尿病作用の検討

Antidiabetic effects of hot water extract of Shokuyogiku (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.).

○山本 純平、要 秋蘭、豊田 理恵、服部 一夫、大石 祐一（東農大応生科・栄養）
○Jyunpei Yamamoto,Akira Kaname,Rie Toyoda,Kazuo Hattori,Yuichi Oishi (Tokyo University of Agriculture.)

【目的】現在、わが国の糖尿病患者数は、予備軍を含めて約 2200 万人以上と推定されている。肥満と合併したⅡ型糖尿病の第一選択薬として用いられるチアゾリジン誘導体（TZD）は、脂肪細胞の分化促進によるインスリン抵抗性改善作用を有する。しかし、副作用として浮腫や肝肥大、体重増加が引き起こされることがあるため、副作用のない抗糖尿病薬の開発が期待されている。抗糖尿病作用を有する食品由来の成分についての報告は数多くあるが、食用菊に関してはほとんど報告がない。そこで本研究では、脂肪細胞を用いて、食用菊熱水抽出成分による抗糖尿病効果の可能性を検討した。
【方法】マウス由来脂肪前駆細胞 3T3-L1 の分化誘導時に、終濃度で 0.1, 0.3, 1 mg/ml となるように食用菊熱水抽出成分を培地に添加した。ポジティブコントロールには TZD である Rosiglitazone (Rosi) を用いた。誘導後 8 日目に、Oil Red O 染色法により、細胞中の脂肪滴を染色、観察を行った。また、培地中のアディポネクチン量と脂肪細胞分化のマーカーである GPDH 活性は市販のキットを用いて測定し、脂肪細胞分化関連遺伝子の mRNA 発現量は、リアルタイム PCR 法により測定した。さらに、3T3-L1 細胞への糖取り込み量を評価するために、分化誘導 8 日目に本成分を添加し、さらに蛍光標識グルコースを添加（9 日目に）後、蛍光強度を測定した。
【結果】分化誘導 8 日後、食用菊熱水抽出成分添加によって、脂肪滴の顕著な増加と GPDH 活性の有意な増加が認められた。また、培地中のアディポネクチン量は有意に上昇し、糖取り込み量はインスリン非添加時で有意な増加、インスリン添加時で増加傾向が認められた。さらに、脂肪細胞分化関連遺伝子（*PPARγ*、*C/EBPα*、*aP2*、*GLUT4*）の mRNA 量は有意に上昇した。加えて、*PPARγ* mRNA 発現量の経時変化を測定した結果、分化誘導 2 日目に、コントロールと Rosi に比して有意に上昇した。また、*PPARγ* の発現を制御する *C/EBPβ*、*C/EBPδ*、*KLF15* の mRNA 量を測定したところ、分化誘導 3 時間で *C/EBPδ* が、分化誘導 2 日目に *KLF15* が、コントロールと Rosi に比して有意に上昇した。
【結論】食用菊熱水抽出成分は脂肪細胞の分化を促進し、アディポネクチン分泌や GLUT4 発現量を上昇させることで、細胞内への糖取り込みを促進することが示唆された。また、この分子メカニズムは C/EBP δ、KLF15 を介した PPAR γ の発現上昇によることが考えられた。以上の結果から、食用菊熱水抽出成分は、PPARγ のリガンドである TZD とは異なるメカニズムの抗糖尿病作用を有する可能性が示唆された。

Shokuyogiku (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.), PPAR γ, C/EBP δ

講演番号：3A25p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ A 校舎 25 会場

短時間吸水により機能性を高めた小麦素材の特性
Properties of wheat sample after short-term imbibitions
○田村 倫子[1]、清水 寛喜[1]、八田 花澄[1]、阿久澤 さゆり[1]、村 清司[1]、荒井 綜一[2]([1]東農大応生科・栄養、[2]東農大・総研)
○Tomoko TAMURA[1], Hiroki SHIMIZU[1], Kasumi HATTA[1], Sayuri AKUZAWA[1], Kiyoshi MURA[1], Soichi ARAI[2] ([1]Nutri. Sci., Tounodai, [2]NRI, Tounodai)

【目的】乾燥種子を吸水させると、種子の代謝全体が急激に変動し、食品としての機能性が変化する。しかし、発芽に先立つ短時間吸水時における成分変化は詳しく解析されていない。本研究では物性が損なわれず食品の機能性が向上した小麦加工食品を得ることを目的に、吸水後 8 時間おきに 48 時間までの小麦種子を対象として、経時的な機能性成分の変化を検討した。
【方法】小麦（農林 61 号）を 25℃、恒暗条件下において、湿潤した脱脂綿上で吸水させた。吸水後 0、8、16、24、32、40、48 時間の種子をドライアイスとともに粉砕して試料とした。GABA およびビタミン B1 含有量は CrestPak C18S カラムを用いて HPLC で測定した。全 RNA は小麦の胚から QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit を用いて抽出し、cDNA を合成した後 RT-PCR に供した。また、吸水種子を乾燥し製粉した後に、ラピッド・ビスコ・アナライザー（RVA）を用いて粘度測定を行った。α-アミラーゼ活性は合成基質 N3-G5-β-CNP（キッコーマンバイオケミファ）を用いて測定した。
【結果・考察】種子の重量は吸水後徐々に増加し 48 時間で 1.9 倍になった。GABA 量は、吸水前は 4.4 mg/100 g dry seed であったが、吸水 16 時間で 1.8 倍、24 時間で 2.9 倍に増加し、48 時間後に 113 mg/100 g dry seed となった。GABA の合成に関与するグルタミン酸デカルボキシラーゼの mRNA は吸水後 32 時間までは大きな変動がなく、それ以降に急激に増加した。一方 GABA 分解に関わる酵素である GABA トランスアミナーゼの mRNA は、吸水後 32 時間までは徐々に増加し、それ以降大きく増加した。ビタミン B1 は吸水とともに徐々に増加し吸水 16 時間後に 2 mg/100 g dry seed になったが、その後大きな変動はなかった。RVA 特性値では、最高粘度は吸水 16 時間まで 130～140 RVU 程度であったが、24 時間以降は製パン性が著しく劣るとされる 50 RVU を下回った。よって吸水 16 時間と 24 時間の間で小麦粉の性状が顕著に変化することが示された。そこで種子中のα-アミラーゼ活性を測定すると、吸水 32 時間以降から活性が大きく上昇したが、乾燥種子においても活性が観察された。このことから、吸水前の種子に内在するα-アミラーゼが、吸水 16 時間から 24 時間に働きデンプンの糊化特性を変化させたことが予測された。以上の結果から、加工適性を保持したまま機能性を増加させた種子の作出には、16 時間吸水が最も適していると示唆した。

wheat, short-term imbibition, functionality

講演番号：3A25p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ A 校舎 25 会場

アルギン酸はストロンチウムおよびセシウムの吸収を抑制し，排泄を促進する

Alginate Enhances Excretion and Reduces Absorption of Strontium and Cesium in Rats

○原田 瞳[1]、井戸田 陽子[1]、森本 かおり[1]、矢野 健太郎[1]、小林 彰子[2]、柿沼 千早[1]、宮島 千尋[3]、笠原 文善[3]、荻原 琢男[1] ([1]高崎健康福祉大学薬学部、[2]東京大学大学院農学生命科学研究科、[3]株式会社キミカ)
○Hitomi HARADA[1], Yoko IDOTA[1], Kaori MORIMOTO[1], Kentaro YANO[1], Shoko KOBAYASHI[2], Chihaya KAKINUMA[1], Chihiro MIYAJIMA[3], Fumiyoshi KASAHARA[3], Takuo OGIHARA[1] ([1]Faculty of Pharmacy, Takasaki University of Health and Welfare, [2]Graduate School of Agricultural and Life Science, The University of Tokyo, [3]Kimica Corporation)

【目的】アルギン酸（alginic acid :ALA）は天然の褐藻類に含まれる多糖類であり，食品添加物や健康食品あるいは医薬品の原料として使用されている．また，そのナトリウム塩(ALA-Na)はストロンチウム(Sr)の体内取り込みを低減させる作用を有することが報告されている[1)]．しかしながら ALA-Na の服用はナトリウムの過剰摂取に繋がる危険性がある．そのため，他の塩においても同様な Sr 吸収抑制効果が認められ，さらに Sr に対してだけでなくセシウム(Cs)においても同様な作用が認められれば，ALA の有用性はさらに増すものと期待される．そこで本研究では ALA-Na およびアルギン酸カルシウム(ALA-Ca)による Sr および Cs の吸収抑制および排泄促進効果を検討すると同時に，その安全性を検討した．

【方法】各種濃度の ALA-Na 溶液に塩化ストロンチウム($SrCl_2$)または塩化セシウム(CsCl)を加え，メンブレンフィルターを用いて遠心分離し，フィルター透過率を算出することにより ALA-Na の Sr および Cs 吸着作用を検討した．また，ラットに通常飼料(control 群)または ALA-Na あるいは ALA-Ca 含有飼料を 14 日間与え，経時的に血漿中 Sr または Cs 濃度を測定し，その排泄促進効果を検討した．さらに，これらの飼料を 14 日間与えたラットに Sr または Cs の溶液を経口投与し，経時的に血漿中の Sr または Cs 濃度を測定し，吸収抑制効果を検討した．加えて，同様に 14 日間飼育したラットの生化学検査および病理解剖を行い，各種血中パラメータおよび主要臓器への影響を観察し，安全性を評価した．

【結果・考察】*in vitro* の検討において，ALA-Na はその濃度依存的に Sr および Cs を吸着した．またその効果は，Sr，Cs 共存下では Sr の方が強く現れた．ラットに ALA-Na または ALA-Ca 含有飼料を与えたところ，control 群と比較して血中の Sr 濃度は徐々に低下したが，Cs の濃度は ALA-Ca 投与群でのみ低下した．さらに，Sr または Cs 溶液を経口投与したとき，control 群と比較して Sr のラット血漿中濃度は ALA-Na および ALA-Ca いずれでも低下したが，Cs の濃度は ALA-Ca においてのみ低下が認められた．安全性評価において，ALA-Na 摂餌ラットでは，腎乳頭上皮細胞および腎盂上皮細胞へのミネラルの沈着が観察された．一方，ALA-Ca 摂餌ラットにおいてはこのような異常は観察されなかった．これらのことから ALA-Ca には Sr のみならず Cs の排泄促進および吸収抑制効果があるものと考えられ，安全性評価の結果からも ALA-Ca の有用性が支持された．

1) Hesp R., Ramsbottom B., *Nature*, **5017**, 1341-1342 (1965).

Alginate, Cesium, Strontium

講演番号：3A25p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ A 校舎 25 会場

高血圧自然発症ラットにおけるボイセンベリー果汁および果実酢の抗高血圧作用

Antihypertensive effect of boysenberry juice and the vinegar in Spontaneously Hypertensive Rats.

○松嶋 全人[1]、古内 亮[1]、横山 忠幸[1]、西田 浩志[2]、平山 匡男[1,2] ([1]ブルボン・健康科学研、[2]新潟薬大・応生)
○ Akito Matsushima[1], Ryo Furuuchi[1], Tadayuki Yokoyama[1], Hiroshi Nishida[2], Masao Hirayama[1,2] ([1]Bourbon Corporation, [2]Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences)

【目的】様々なポリフェノール成分の健康評価が進められる中で、カカオに代表されるポリフェノール成分が循環器機能の改善作用を示すことが注目されている。我々は、多様なポリフェノール成分を含むベリー類に着目し、特に低重合のプロアントシアニジンを特徴的に含むボイセンベリーの機能性検証を進めてきた。その結果、ボイセンベリー果汁は in vitro 試験において、血管弛緩作用を有することを見出した。また、単回投与試験において、高血圧を発症したラットの血圧降下作用を有することを明らかにした。本研究では、ボイセンベリー果汁を SHR に長期摂取させた時の血圧への影響を評価することを目的とした。また、既知の血圧降下食品成分である酢酸との相乗効果についても評価した。
【方法】6 週齢の雄性高血圧自然発症ラット（SHR）を 3 週間予備飼育した後、3 群(n=6)に分け、ボイセンベリー果汁混餌食（標準実験飼料 +ボイセンベリー濃縮果汁 10%;Bj 群)、ボイセンベリー果実酢混餌食（標準実験飼料 +ボイセンベリー濃縮果汁 10% +酢酸 0.13%;BjV 群)、対照食（標準実験飼料 +濃縮果汁 10%混餌相当量の糖；対照群）を 4 週間自由摂餌させた。血圧は給餌開始後 0、4、7、14、21、28 日目に tail-cuff 法により測定した。摂餌量、体重は試験期間中、毎日同一時間帯に計測した。
【結果・考察】摂餌量、体重共に 3 群間に有意な差はみられなかった。収縮期血圧を比較すると、Bj 群、BjV 群共に対照群に対して、給餌後 28 日に有意な血圧上昇抑制が認められた。Bj 群と BjV 群間には有意な差はみられなかった。拡張期血圧では、BjV 群と対照群間において、給餌後 21 日目に有意な差が認められたが、Bj 群と対照群には有意な差はみられなかった。この結果はボイセンベリー果汁と酢酸が血圧に相乗的な作用を示す可能性があると考えられる。
【結論】ボイセンベリー果汁および果実酢は、SHR を用いた 4 週間の長期摂取において抗高血圧作用を示した。また、酢酸との相乗的な作用の可能性も得られ、ボイセンベリー果汁食品の利用法の一つの可能性を示したものと考えられる。

boysenberry, anti-hypertension, SHR

講演番号：3A25p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ A 校舎 25 会場

大豆サポニン生合成の活性化メカニズムとサポニン生合成を活性化させた大豆種子における機能性
Mechanism of activation of soybean saponin biosynthesis and functionality of soybean seed that saponin biosynthesis was activated

○斉藤 哲史、白岩 雅和（茨城大院農）
○Akifumi Saitou,Masakazu Shiraiwa (Ibaraki Univ.)

【目的】大豆には真正サポニンとして A グループサポニンと DDMP グループサポニンが存在する。A グループサポニンが大豆の苦みや収斂味の主原因物質となっている一方、DDMP およびその派生物である B、E グループサポニンは抗ガン活性や抗ウイルス活性など様々な薬理作用を持つことが報告されている。昨年度の本大会において演者らは、発芽期大豆および完熟期大豆をストレス負荷条件で栽培あるいは保存することで DDMP グループサポニン含量が上昇することを報告した。今回は、大豆種子におけるサポニン生合成の活性化のメカニズムと種々条件下でサポニン含量が高まった大豆種子の機能性と呈味性について調査したので報告する。
【方法】完熟大豆種子をバーミキュライト中で発芽させ、種々の条件下（メチルジャスモン酸（MeJA）添加、温水処理、冷水処理）で水耕栽培し、DDMP グループサポニン高含有発芽期大豆（大豆もやし）を調製した。また、完熟大豆種子の保存中に低温および高温処理を行い、DDMP グループサポニン高含有大豆種子を調製した。得られた大豆もやしおよび大豆種子からタンパク質を抽出し、Blue-native PAGE に供してタンパク質を分離した後、Nitro blue tetrazolium (NBT)染色を用いて NADPH オキシダーゼ（NOX）活性を調査し、Reactive Oxygen Species(ROS)の生成とサポニン生合成の関連性について調査した。また、同様の大豆もやしおよび大豆種子から 70%エタノールを用いてサポニン成分を抽出し、Super Oxide Dismutase（SOD）活性を測定することで抗酸化性について評価した。さらに、大豆種子から豆乳を作成し、一般パネラーに対して呈味性試験を行うことで、DDMP グループサポニンの含量の差が呈味性におよぼす影響について調査した。
【結果】まず、ストレス処理による ROS 生成とサポニン生合成活性化との関係性を調べるために、ストレス処理を施した発芽期大豆子葉と胚軸、完熟期大豆子葉と胚軸における NOX 活性を調べた結果、その活性は全てのサンプルで上昇していた。このことからストレス処理によって ROS の発生が誘導され、この ROS の発生により SOD 様作用を持つ DDMP グループサポニンの生合成が誘導されてくることが推測された。また、ストレス処理し DDMP グループサポニン濃度が高まった大豆もやしおよび完熟大豆種子はコントロールに比べて高い SOD 活性を有することが明らかとなった。また、サポニン濃度の上昇率と SOD 活性の強さには相関性が見られたことから、DDMP グループサポニンが抗酸化機能上昇の一つの要因となっていることが推測された。現在、呈味性試験によって DDMP グループサポニン濃度の上昇が大豆（豆乳）の呈味性におよぼす影響について調査を行っている。

Soybean, Saponin, Reactive oxygen species

講演番号：3A25p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ A 校舎 25 会場

大豆イソフラボン腸内細菌代謝物エコールの飼料摂取量低下効果への腸肝循環の関与

Contribution of equol enterohepatic circulation to the decreasing effect of equol, metabolite of Soy isoflavone by microorganism on food intake

○岸田 太郎、藤谷 美菜、水重 貴文、山内 佳也、村上 聖、山内 聡、海老原 清 (愛媛大農)
○Taro Kishida,MIna Fujitani,Takafumi Mizushige,Yoshiya Yamauchi,Satoru Murakami,Satoshi Yamauchi,Kiyoshi Ebihara (Ehime Univ.)

【目的】我々は、大豆イソフラボン・ダイゼイン腸内細菌代謝産物エコールが雌特異的に飼料摂取量を減少させることを見出し、その機構解明を目指している。先の研究で、エコールは腸肝循環し小腸に比較的多量に存在すること、ダイゼイン混餌投与によって小腸粘膜のコレシストキニン (CCK) mRNA 量が増加することが示された。これらから我々は、腸肝循環エコールが直接、小腸粘膜で食欲抑制を指令する消化管ホルモンの分泌を増加させ、飼料摂取量を減少させるという仮説を立てた。そこで無麻酔無拘束下でダイゼイン摂取時に採取したエコール高含有胆汁をダイゼイン無摂取ラットの十二指腸に直接注入し、飼料摂取量や小腸粘膜遺伝子発現に与える影響を検討した。その結果、注入開始数時間で飼料摂取量が低下し、この際小腸粘膜の CCK を含む食欲抑制を指令する消化管ホルモンの遺伝子発現増加が観察された。しかし、この際血中のエコール濃度も混時投与の 3 倍以上の高い値となってしまい、作用点が小腸であるか、体内の他の部位であるか判断できなかった。本研究ではエコールを非経口投与した場合に短期的な食欲抑制効果をもたらすか (実験 1)、小腸以外の重要な作用点である脳に食餌されたエコールが到達し得るか (実験 2) を検討するとともに、腸肝循環モデルを精査し、エコール高含有胆汁注入量を先の試験の約 3 分の 1 に改め、先の高含有エコール胆汁注入実験を再検討し (実験 3)、エコールの腸肝循環が食欲抑制効果に関与するか検証することにした。
【方法】実験 1:7 週齢の SD 系雌ラットをコントロール飼料(AIN93G)またはダイゼイン飼料(300 mg/kg 飼料)で 2 週間飼育し、最終日に血液および脳脊髄液を採取した。実験 2：同様のラットに DMSO 溶液またはこれに 10 mg/mL でエコールを添加した溶液を 0.5 mL/100 g 体重/日で 4 日間単回皮下投与した。実験 3：7 週齢の SD 系雌ラットをコントロール飼料またはダイゼイン飼料(300 mg/kg 飼料)で 2 週間飼育し、胆汁を採取した。コントロール胆汁またはエコール高含有胆汁を、十二指腸カテーテルを施しコントロール飼料で飼育した同様のラットラットに、無麻酔無拘束下で 4 時間連続注入し、注入開始より 24 時間飼料摂取量変動を追跡した。注入終了後の視床下部、小腸粘膜を採取し、摂食調節因子の mRNA 量を RT-PCR 法により測定した。
【結果および考察】実験 1：ダイゼイン摂取により血液中のエコール濃度は上昇したが脳脊髄中ではエコールは検出できなかったことより、エコールは中枢に達していないことが示唆された。実験 2：エコールを皮下投与しても 4 日間では飼料摂取量に影響は見られなかったことより、エコールは腸肝循環してはじめて作用する可能性が示唆された。実験 3：現在検討中である。

Soy isoflavone, Enterohepatic circulation, Food intake

講演番号：3A25p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ A 校舎 25 会場

カルノシン酸及びスルフォラファンの神経細胞保護作用機序

Neuroprotective Mechanisms of Carnosic acid and Sulforaphane

○柴田 紗知[1]、萱島 知子[2]、松原 主典[1] ([1]広島大院教育、[2]佐賀大文化教育)
○Sachi SHIBATA[1], Tomoko KAYASHIMA[2], Kiminori MATSUBARA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Saga Univ.)

【目的】シソ科のハーブであるローズマリーの主な機能成分として知られているカルノシン酸やブロッコリーのスプラウト等に含まれるスルフォラファンは、抗酸化作用や細胞の Keap1-Nrf2 系を介して酸化ストレス生体防御機能活性作用が報告されている。我々は、カルノシン酸の新規機能として、血管新生抑制作用を明らかにしており、スルフォラファンも血管新生抑制作用が報告されている。血管新生抑制作用はガンとの関係がよく知られているが、近年脳疾患のリスク低下との関連性が注目されている。血管新生抑制物質による脳機能保護作用は、血管への作用による間接的な効果と神経細胞に対する直接的な効果が考えられる。そこで本研究では、カルノシン酸とスルフォラファンの神経細胞に対する直接的な保護効果について、酸化ストレス・飢餓・神経毒を対象として検討した。また、細胞保護作用機序についても検討を加えた。
【方法】実験には、ヒト神経芽細胞腫由来の SH-SY5Y 細胞を用いた。酸化ストレス・飢餓・神経毒に対するカルノシン酸及びスルフォラファンの細胞保護効果については、細胞を予め両物質による処理をした後に実験した。このことにより、両物質によって誘導される細胞の変化による効果を検討した。酸化ストレス・飢餓・神経毒の処理後、生存している細胞は、発色試薬による細胞数測定法で評価した。細胞保護効果の作用機序については、主要な細胞情報伝達タンパク質に対する抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法やリン酸化酵素に対する阻害剤による保護効果の消失を検討した。さらに、細胞保護に重要な役割を果たすことが知られているオートファジーについても、特異的抗体を用いたウエスタンブロット法や蛍光顕微鏡観察で検討した。
【結果】カルノシン酸及びスルフォラファン共に、酸化ストレスと飢餓において細胞保護作用を示した。酸化ストレス及び飢餓に対して保護作用を示す作用機序について、主要な細胞情報伝達系リン酸化酵素のリン酸化について検討したところ、これらの情報伝達系タンパク質のリン酸化が両物質によって亢進することが確認された。また、これらの情報伝達系タンパク質のリン酸化に対する阻害剤を用いて検討したところ、保護作用が消失した。従って、両物質の細胞保護作用には、これらの情報伝達系タンパク質のリン酸化が重要な役割を果たすことが分かった。さらにオートファジー誘導による保護効果の可能性が示された。一方で神経毒においては、カルノシン酸は保護作用を示さず、スルフォラファンのみ MPTP に対して保護作用を示した。このことから、スルフォラファンはカルノシン酸とは異なる作用機構を介して細胞死を防ぐ可能性が示唆された。

Carnosic acid, Sulforaphane, SH-SY5Y cell

講演番号：3A25p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ A 校舎 25 会場

抗発がん性テルペノイド zerumbone による異常タンパク質分解系の活性化

Zerumbone, a chemopreventive sesquiterpene, activates intracellular proteolysis mechanisms

○大西 康太[1]、石坂 朱里[2,3]、河合 慶親[2,4]、寺尾 純二[2]、入江 一浩[1]、村上 明[1] ([1]京大院農・食生科、[2]徳島大院・ヘルスバイオサイエンス、[3]くらしき作陽大・食文化、[4]名大院・生命農学)
○Kohta OHNISHI[1], Akari ISHISAKA[2,3], Yoshichika KAWAI[2,4], Junji TERAO[2], Kazuhiro IRIE[1], Akira MURAKAMI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Univ. of Tokushima, [3]Kurashiki Sakuyo Univ., [4]Nagoya Univ.)

【目的】発がん抑制活性を有するセスキテルペン zerumbone（ZER）は、その活性発現に必須なα,β-不飽和カルボニル基を介し、生体タンパク質のチオール基に対して非選択的に付加する。このような非特異的修飾は、生体タンパク質に対してストレスを与える可能性が考えられる。事実、培養細胞を ZER で処理すると、タンパク質変性ストレスに対する適応応答である heat shock response が誘導される。本研究では、ZER が細胞内タンパク質分解系を活性化させる可能性を検証した。
【方法と結果】Hepa1c1c7 マウス肝臓がん細胞を ZER で処理したところ、細胞内ユビキチン化タンパク質が増加した。これに対し、変性タンパク質のユビキチン化に重要なリガーゼである CHIP をノックダウンした細胞においては、ZER によるタンパク質のユビキチン化が顕著に抑制された。また、分子ローター色素を用いて細胞内凝集タンパク質を染色したところ、ZER 処理細胞において、陽性染色が認められた。以上の結果から、本物質が生体タンパク質に対して変性ストレスを与えることを確認した。このようなタンパク質ストレスに対する適応応答として、ユビキチン-プロテアソーム系（UPS）及びオートファジー（AP）などのタンパク質分解系が活性化される可能性を想定した。事実、ZER は、プロテアソーム構成因子である β5 の発現を誘導し、そのプロテアーゼ活性を有意に増強した。一方で、AP のマーカー分子である LC3-II のタンパク質発現レベルの増加も認めた。ZER による AP 活性化機構を解明するため、PCR アレイを用いて計 84 種の AP 誘導に関わる遺伝子発現を評価したところ、p62 を含む 5 種の AP 促進遺伝子に対する有意な誘導作用を認めた。p62 は、異常タンパク質に対する選択的 AP のカーゴレセプターであることから、ZER がその発現を誘導することで、タンパク質品質管理機構を活性化させる可能性を想定した。内因性の過酸化脂質分解物である 4-hydroxy-2-nonenal（HNE）で細胞を処理すると、HNE 修飾タンパク質が増加し、細胞死が誘導された。これら HNE によるタンパク質修飾及び細胞毒性は、細胞を ZER で前処理することにより、有意に緩和された。さらに、このような ZER による細胞保護作用は、p62 のノックダウンにより、ほぼ完全に消失した[1)]。
【結論】ZER は、非特異的修飾を介し、生体タンパク質に対して変性ストレスを与えるが、その一方で、UPS および AP を活性化させることが明らかとなった。また、このようなタンパク質品質管理機構活性化メカニズムにおいて p62 が鍵分子の一つであることを見出した。本活性は、ZER により引き起こされる生体ストレスに対する適応応答（ホルミシス）の一端であると考えている。

1) Ohnishi, K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012 *in press*

zerumbone, autophagy, hormesis

講演番号：3A25p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ A 校舎 25 会場

質量分析イメージング法による緑茶カテキンおよびその代謝物の生体組織内分布情報の非標識可視化
Label-free visualization of green tea catechin and its metabolites in mouse tissue by mass spectrometry imaging

○金 允喜[1]、藤村 由紀[2]、萩原 立春[1]、佐々木 雅子[1]、行平 大地[2]、山口 歩[2]、永尾 達彦[2]、齋藤 和徳[3]、三浦 大典[2]、割石 博之[1,2,4]、田中 浩士[5]、山田 耕路[1]、立花 宏文[1,2,4,6] ([1]九大院農、[2]九大レドックスナビ、[3]ブルカーダルトニクス、[4]九大バイオアーク、[5]東工大院理工、[6]九大食品機能デザイン)
○Yoonhee Kim[1], Yoshinori Fujimura[2], Takatoki Hagihara[1], Masako Sasaki[1], Daichi Yukihira[2], Ayumi Yamaguchi[2], Tatsuhiko Nagao[2], Kazunori Saito[3], Daisuke Miura[2], Hiroyuki Wariishi[1,2,4], Hiroshi Tanaka[5], Koji Yamada[1], Hirohumi Tachibana[1,2,4,6] ([1]Kyushu Univ., [2]Kyushu Univ. Redox navi., [3]Bruker Daltonics, [4]Kyushu Univ. Bio-architecture center, [5]Tokyo Institute of Technology, [6]Kyushu Univ. Food functional design research center)

【目的】多彩な生理作用が報告されている緑茶カテキン Epigallocatein-3-*O*-gallate (EGCG) の詳細な作用機構の解明には、組織内微小領域における EGCG の局在情報が必要不可欠である。しかしながら、現状では、EGCG の組織内微小領域における空間分布情報は明らかにされておらず、これは現状の分子イメージングでは、標識化に基づく時間・コスト・特異性などの問題を抱えていることに起因している。一方、近年生体分子の局所変動を非標識で捉える *in situ* 生体分子マッピング法（質量分析イメージング）の開発が新たな分子イメージング法として注目されており、我々も本法を独自に最適化することで一連の組織内微量低分子代謝物の時空間動態の一斉可視化に世界に先駆けて成功している（*Anal. Chem.*, 82, 9786, 2010)。そこで本研究では、非標識で低分子化合物を可視化できるマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング法(MALDI-MSI)を開発し、これまで追跡不可能であった EGCG の組織内微小領域における分布情報の可視化を試みた。
【方法】MALDI 法における EGCG のイオン化に最適なマトリックス（イオン化助剤）を見出すため、EGCG と一連のマトリックス混合物をサンプルプレートおよびマウス組織切片上にスポットし、MALDI-TOF-MS に供することで最適イオン化条件を検討した。さらに、C57BL/6J マウスに EGCG を経口投与した 1 時間後に肝臓、腎臓、脳を摘出し、LC-MS を用いて各組織中の EGCG レベルを検討した。また、各マウス組織凍結切片を作成、そこに選別されたマトリックスを塗布し、MALDI-MSI に供してイメージング実験を行った。なお、組織上の EGCG およびその代謝物の同定は超高分解能フーリエ変換イオンサイクロトン共鳴質量分析装置にて行った。
【結果】低分子化合物の可視化で汎用されるマトリックス（DHB、CHCA、SA、9-AA）を含む 41 種類の化合物の中で、β-Carboline 化合物や CHCA 構造類似物ならびに naphthalene 誘導体が EGCG に対する高い検出能(pmol オーダー)を示した。また、これら候補化合物の中でも naphthalene 誘導体のみがマウス肝臓、腎臓、脳組織切片上に直接スポットした EGCG を可視化した。さらに、本マトリックスを用いることで、EGCG を投与したマウス肝臓と腎臓で EGCG の可視化に成功し、それと同時にマウス肝臓と腎臓で EGCG 代謝物の同時画像化が可能となった。
【結論】EGCG 摂取後 EGCG ならびにその代謝物の生体組織内分布情報を非標識で可視化できる質量分析技術の開発に世界に先駆けて成功した。これにより、実態が不明瞭な標的組織中の EGCG の詳細な作用機構の解明につながるとともに EGCG 以外の様々な食品成分の可視化が期待される。

EGCG, MALDI-MSI, label-free imaging

講演番号：3A25p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ A 校舎 25 会場

動植物体内における機能性食品成分の分布変動解析
Visualization of distribution of functional food factor in plant and animal
○財満 信宏、吉村 征浩、山本 彩実、田中 照佳、森山 達哉、河村 幸雄（近大院農）
○Nobuhiro ZAIMA, Yukihiro Yoshimura, Ayami Yamamoto, Teruyoshi Tanaka, Tatsuya Moriyama, Yukio Kawamura (Kinki Univ.)

【目的】機能性食品成分の機能を評価するうえで、その機能性成分が植物中のどこに存在するのかという分布情報と、摂取した機能性成分がどのような代謝を受け、どの臓器に分布するのかという体内動態情報を理解することは非常に重要である。しかしながら、低分子で複雑な構造を持つ機能性成分は、特異的抗体やプローブの作出が困難であり、現段階で、機能性成分を可視化して解析する汎用的な手法は確立されていない。そこで本研究では、機能性成分の可視化解析を可能にする手法を実証することを目的として、イメージングマススペクトリメトリー（IMS）による機能性成分の動態可視化を試みた。機能性成分モデルには、クズに特徴的なイソフラボンであり、骨代謝改善作用を有するプエラリンを用い、プエラリン投与マウス及びクズにおけるプエラリンの分布を解析した。
【方法】クズ根は採取後、液体窒素で凍結しクライオスタット（Leica Microsystems）で 10μm の切片を作成した。ddy マウス（13 週齢、オス）は、コントロール群と投与群の二群に分けた。投与群は、プエラリンを投与し（40μmol/匹）、30 分後に臓器を摘出した。摘出した臓器は、液体窒素で凍結し、クライオスタットで 10μm の切片を作成した。その後、切片にマトリックスとして DHB（2,5-Dihydroxybenzonic acid）溶液を塗布し、質量分析装置（MALDI LTQ-XL (ThermoFisher Scientific)）に供した。プエラリンの可視化には、Image Quest(ThermoFisher Scientific)を用いた。
【結果】プエラリンは、季節によりクズ根における分布パターンが変化することが分かった。マウスにプエラリンを投与後、摘出した臓器（肝臓、腎臓、心臓、脳、脾臓、肺、大腿骨）を解析した結果、肝臓、腎臓、心臓、大腿骨においてプエラリン由来のピークが検出された。コントロール群と比較し、投与群では、m/z 417.3 のピークが特徴的に検出された。このピークは、配糖体の形の未分解なプエラリンに由来するものであり、プエラリンは消化酵素による分解をうけずに臓器に移行することが示唆された。プエラリン由来ピークを画像化した結果、腎臓の腎盤、大動脈起始部血管壁、大腿骨全域に分布していることがわかった。この結果から、プエラリンは未分解な形のまま尿中に排出されることと、プエラリンの骨代謝改善作用は骨に移行した未分解のプエラリンによるものであることが示唆された。大動脈起始部血管壁に及ぼすプエラリンの影響は今後の検討が必要である。
本研究によって、植物内での機能性成分の分布可視化、および動物体内での動態解析が IMS を用いることによって可能になることが示された。本手法は、機能性食品研究における新たなツールになると期待される。

Imaging mass spectrometry, neutrikinetics, puerarin

講演番号：3A25p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ A 校舎 25 会場

四重極・飛行時間型質量分析計を用いた Flavanol 類（catechin, epigallocatechin gallte, procyanidin dimer)のラット尿中代謝物のメタボロミクス解析

Metabolomic approaches using a liquid chromatography-quadrupole time-of-fright /mass spectrometry (LC-QTOF/MS) for the differences of the metabolite profiles of flavanols (epicatechin, epigallocatechin gallte, procyanidin dimer) in rat urine

○庄司 俊彦[1]、三浦 富智[2]、石川（高野） 裕子[3]、尾崎 嘉彦[4]([1]農研機構・果樹研、[2]弘前大・保健、[3]農研機構・食総研、[4]近大・生物理工)
○Toshihiko SHOJI[1], Tomisato Miura[2], Yuko Ishikawa-Takano[3], Yoshihiko Ozaki[4] ([1]National Institute of Fruit Tree Science, [2]Hirosaki Univ., [3]National Food Research Institute, [4]Kinki Univ.)

【目的】フラバノール類はリンゴや茶などの食品中の主要なフラボノイド類の一種である。これらの食品には、フラバノール骨格を有するカテキン（CA)、エピガロカテキンガレート（EGCG)、プロシアニジン類（PB）が含まれるが、吸収・代謝などの生体利用性や腸内細菌叢による分解物が異なることが知られている。本研究では、四重極・飛行時間型質量分析計（Q-TOF/MS）を用い、メタボロミックス解析を実施し、これら三種のフラバノール類（CA,EGCG,PB）を投与したラット尿中メタボライトの差異について検討する。
【方法】CA、EGCG および PB を雄性 8 週齢ウィスターラット（ｎ＝６）に経口投与（1g/kg Body Weight）し、代謝ケージを用いて経時的（0-8、8-24、24-48 時間）に蓄尿、採取した。尿は四重極・飛行時間型質量分析計（Q-TOF/MS）により分析した後、保持時間と *m/z* から得られるメタボライトのデータをアライメントし、MarkerView®（AB Sciex）による主成分分析（PCA）行った。PCA によるスコアプロットによって、各群間のグルーピングを行った。さらに、ローディングプロットによって、各投与群のグルーピングに寄与するメタボライトを特定し、精密質量や MS/MS によるプロダクトイオンのピークリストからその構造を推定した。
【結果と考察】PCA 解析の結果、供試した３種のフラバノール類投与群は明確にグルーピングされ、各投与物に特異的なメタボライトが関与していると思われた。CA 群のメタボライトには、メチル化体あるいは硫酸、グルクロン酸抱合体が多数みられた。一方、PB 群や EGCG 群では、投与物の抱合体に加えて、腸内細菌による分解が示唆されるメタボライトが多数検出された。更に、これら以外に、生体応答の結果生じたと考えられるメタボライトが複数検出された。以上のように、投与したフラバノール類によって、メタボライトが異なっていたことから、これらの機能性の発現には、吸収後、生体内で直接的に作用するもののほか、腸内環境の変化や生体恒常性を間接的に作用させるものもあることが示唆された。

Metabolomics, Flavanols, HPLC-QTOF/MS

講演番号：3A25p17
講演日時、会場：3 月 26 日 17:12～ A 校舎 25 会場

ゴマリグナンのアフィニティークロマトグラフィーのための固定化に関する検討

Immobilization of Sesame lignan's for affinity chromatography.

○水野 裕紀、鈴木 健太、今井 邦雄、勝崎 裕隆（三重大院・生資）
○Yuki MIZUNO,Kenta SUZUKI,Kunio IMAI,Hirotaka KATSUZAKI (Mie Univ.)

【背景・目的】

ゴマ種子に含まれるリグナン類は、様々な生物機能を示すことで非常に注目されている。この生物機能に関連するタンパク質を網羅的に解析するためにリグナンをゲルやビーズに固定化し、それと相互作用するタンパク質を得ることを考えた。

相互作用分子の探索をアフィニティークロマトグラフィーを用いて行うこととし、その構築を進めている。その際、NHS(N-ヒドロキシスクシンイミド)で活性化法を使用することとした。構築の前段階として、リグナンの部分構造であるセサモールで条件検討をすることにした。まずはセサモールの水酸基をエステル結合を介した方法で誘導体化した。さらに化合物の加水分解に対する安定性や収率の改善のためエーテル結合を介した方法も検討した。

【方法・結果】

セサモール 5.4 mg(0.04 mmol)、N,N'-Disuccinimidyl carbonate 5.4 mg(0.02 mmol)をそれぞれ DMF 100 μL に溶解し、4-Dimethylaminopyridine 0.5 mg(0.004 mmol)を pyridine 100 μL に溶解し、すべて混合して常温で 5h 反応させた。その結果、3.8 mg 得られ、収率が 63.3 %であった。次に NHS 固定化の反応を行ったが、反応は進行しなかった。

次にエーテル結合を介した中間体を作成するためにセサモール 165.6 mg(1.2 mmol)、K_2CO_3 276 mg(2.0 mmol)を DMF 2 mL に溶解し､そこに N-(2-Bromoethyl)phthalimide を 253 mg(1.0 mmol)入れ、常温で 10～12 時間反応させた。反応後、水で反応を停止させ、EtOAc で抽出した。EtOAc 抽出物は逆相 HPLC を用いて分取した。それらを NMR 測定、質量分析で確認したところ、目的物のスペクトルと質量が見られた。その化合物は 10.8 mg 得られ、収率は 3.5 %であった。

この低収率を改善するため、反応温度を常温から 70 ℃へ変化させたり、塩基を変更したが改善されなかった｡そこでハロゲンの反応性を変化すべく原料である N-(2-Bromoethyl)phthalimide を臭素からヨウ素へと置換を試みた｡N-(2-Bromoethyl)phthalimide 5 g(0.02 mol)、NaI 6 g(0.04 mol)を Acetone 20 mL に溶解し、5h 還流した。反応後濾過し、逆相 HPLC で分析したところ、単一ピークが得られたので、質量分析、NMR 測定を行った。その結果、ともに目的物のスペクトルと質量が見られた。原料であるヨウ素体合成物は 5.30 g 得られ、収率は 87.8 %であった。得られたヨウ素体を上述の条件で反応させたが、臭素体の時の反応と比べ中間体の収率の向上は見られなかった。

immobilization, lignan, affinity chromatography

講演番号：3A25p18
講演日時、会場：3 月 26 日 17:24～ A 校舎 25 会場

テアフラビン類と蛋白質チオールとの共有結合反応
Covalent binding of theaflavins with protein thiols
○林 美香[1]、石井 剛志[1]、浅沼 俊倫[2,3]、望月 一男[2]、中山 勉[1] ([1]静岡県大院食品栄養、[2]静岡県工技研、[3]静岡県産業振興財団)
○Mika HAYASHI[1], Takeshi ISHII[1], Toshimichi ASANUMA[2,3], Kazuo MOCHIZUKI[2], Tsutomu NAKAYAMA[1] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Ind. Res. Inst. of Shizuoka Pref., [3]Shizuoka Ind. Foundation)

【目的】テアフラビン類は、カテキン類の酸化重合により生成する紅茶の赤色色素成分のひとつである。前大会で我々はテアフラビン類と蛋白質との反応性を解析し、テアフラビン類が蛋白質中のチオール基に共有結合する可能性を報告した。本研究では、チオール化合物（アミノ酸、ペプチドおよび蛋白質）を用いて反応性や結合構造を解析し、テアフラビン類の蛋白質に対する反応機構を解明することを目的とした。

【方法】テアフラビン類として、ガロイル基を持たないテアフラビンを用いた。チオール化合物として、システイン、システイン類縁体、チオール含有ペプチドおよびグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素を用いた。テアフラビンとチオール化合物を異なる pH のリン酸緩衝液中でインキュベートし、DTNB 法、HPLC 法、質量分析法あるいは電気泳動法により反応性や結合構造を解析した。

【結果】DTNB 法、HPLC 法および質量分析法による解析の結果、テアフラビンは、システインのチオール基に共有結合し、安定性の低い複数の付加体を形成することを見出した。また、1 分子のテアフラビンには少なくとも 2 分子のチオール化合物が結合できることが示唆された。電気泳動法による解析の結果、テアフラビンの蛋白質に対する共有結合反応がシステインやチオール修飾試薬の存在下では阻害されるが、アスコルビン酸の存在下では阻害されないことが明らかになった。

【結論】本研究により、(1) テアフラビンがシステインやチオール基を持つ蛋白質に共有結合すること、(2) 共有結合反応がチオール基やチオール修飾試薬の存在下で阻害されること、(3) 共有結合反応が自動酸化を抑制するアスコルビン酸存在下でも進行することを明らかにした。以上のことから、テアフラビン類は自動酸化を経ずに蛋白質に共有結合すると推察される。カテキン類は、自動酸化を経て蛋白質中のチオール基に共有結合するため、生体内などの酸素分圧の低い嫌気性条件下においては蛋白質と反応し難い。テアフラビン類は、自動酸化を経ずに共有結合反応できるために、嫌気的な生体内においても蛋白質と反応し生理機能を発現することが期待できる。現在、ガロイル基を持つ他のテアフラビン類についても同様の解析を進めている。

theaflavins, protein thiols, reaction mechanism

講演番号：3B11a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ B 校舎 11 会場

メチロトローフ酵母 *Pichia pastoris* シトクロム *c* の発現制御とメタノール代謝における役割
Physiological role of *CYC1* in methanol metabolism of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*
○岡田 一真[1]、栗本 将太[1]、早川 享志[1,2]、中川 智行[1,2] ([1]岐阜大院応生、[2]岐阜大応生)
○Kazuma OKADA[1], Shota KURIMOTO[1], Takashi HAYAKAWA[1,2], Tomoyuki NAKAGAWA[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]Gifu Univ.)

【目的】
メチロトローフ酵母のメタノール代謝は、ペルオキシソーム（Ps）に局在するアルコールオキシダーゼ（AOX）とミトコンドリア（Mt）呼吸鎖のシトクロム *c* オキシダーゼの両者において多量の酸素が消費される好気代謝である。よって、メタノール代謝を円滑に行うために、Ps と Mt 間の酸素消費バランスを巧妙に保つためのメカニズムが存在することが推測されている。これまで、我々は呼吸鎖を阻害すると AOX の遺伝子発現が低下することを見いだし、AOX の遺伝子発現制御には呼吸鎖活性が重要な役割を果たしていることを示してきた[1)]。このような背景から、本研究では呼吸鎖を構成する因子シトクロム *c*（Cyc1p）に着目し、*Pichia pastoris* における *CYC1* の発現制御とその欠損株の特性について解析を行った。
【方法・結果】
P. pastoris のゲノム情報を基に PAS_chr4_0018 を *PpCYC1* として同定した。PpCyc1p は 110 アミノ酸残基からなり、*P. angusta* Cyc1p と 93%、*Saccharomyces cerevisiae* Cyc1p と 78%の相同性を示した。また、*PpCYC1* プロモーターの発現挙動を、*LacZ* をレポーター遺伝子として観察したところ、*PpCYC1* の転写活性は好気条件下ではグルコース、メタノールおよびグリセロールなどの炭素源ではほとんど差がなく、メタノール濃度を変化させても *PpCYC1* の転写活性には影響がなかった。一方、静置培養による低酸素条件下では、グルコース、メタノールともに、好気条件に比べ、その転写活性は半分以下にまで低下していた。これらのことは *PpCYC1* の発現は炭素源には依存しないものの、*ScCYC1* と同様に酸素依存的に転写が制御されていることを示している。
さらに、*PpCYC1* の遺伝子破壊株 *Ppcyc1Δ* 株を作製し、その表現系について解析した。*Ppcyc1Δ* 株は好気条件下においてグルコースを炭素源とした際に生育の遅延が見られ、メタノールやグリセロールなどの非発酵炭素源には全く生育できなかった。また、*Ppcyc1Δ* 株におけるメタノール代謝酵素群の誘導を酵素活性レベルで観察したところ、カタラーゼ活性およびホルムアルデヒド脱水素酵素活性は野生株と同程度の誘導が観察されたが、AOX 活性は野生株に比べて著しく低値を示した。よって AOX の発現誘導において PpCyc1p はなんらかの役割を持つことが推測された。
1）Fujimura *et al.* 2007. *Yeast* **24:** 491-498.

Pichia pastoris, cytochrome *c*, alcohol oxidase

講演番号：3B11a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ B 校舎 11 会場

糸状菌 A.nidulans の二次代謝制御に関わるグリコーゲン分解機構の解析

Investigation of the glycogenolysis mechanism involved in regulation of secondary metabolism in filamentous fungus A.nidulans

○小松崎 愛里（筑波大学生命環境）
○Airi KOMATSUZAKI (Tsukuba Univ.)

【目的】*A. nidulans* の AmyR は、アミラーゼ遺伝子の転写を活性化させる転写因子として知られる。これとは別に、我々は、AmyR が、本菌の二次代謝産物であるステリグマトシスチン（ST）の生産を抑制するとともに、細胞内のグリコーゲン量を低下させる機能を持つことを見出した。本研究では、ST の生産とグリコーゲン代謝の関連性を明らかにすることを目的として、アミラーゼをコードする *amyB* と本菌では未解明であるグリコーゲンホスホリラーゼをコードすると予想される AN1015（*gphA*）に着目し、詳細な解析を行った。
【結果】*amyB* 遺伝子破壊株（ΔamyB）を作製し、細胞内のグリコーゲン量と ST の生産量を測定した。その結果、野生株と比較してΔamyB は大量のグリコーゲンを細胞内に蓄積したものの、ST の生産量は野生株と同程度であったことから、AmyB は ST の生産に関与しないことが示された。また、*gphA* 遺伝子破壊株（ΔgphA）を作製し、細胞抽出液中のグリコーゲンホスホリラーゼの活性を測定したところ、野生株のそれと比較し低下していた。このことから、本菌の *gphA* はグリコーゲンホスホリラーゼをコードすることが示された。またΔgphA を用いてΔamyB と同様の解析を行ったところ、ΔgphA の細胞内グリコーゲン量は、野生株のそれと比較して増加していることが示された。*gphA* の発現量は、培養時間の経過と培地中のグルコース低下に伴って上昇し、これは、ST の生産と相関していた。このことから、GphA による細胞内グリコーゲンの分解とそれによるグリコーゲン濃度の調節が ST の生産に関係すると考えられた。一方、*amyR* 遺伝子破壊株は野生株と同レベルの *gphA* を発現していたことから、AmyR は GphA とは別の機構で ST の生産を調節することが予想された。

A.nidulans, sterigmatocystin, glycogenolysis

講演番号：3B11a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ B 校舎 11 会場

酵母 *Yarrowia lipolytica* の *n*-アルカン資化に関わる長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の同定と機能解析

Identification and characterization of genes encoding fatty aldehyde dehydrogenase involved in assimilation of *n*-alkane in *Yarrowia lipolytica*.

○岩間 亮[1]、小林 哲[1]、志波 優[2]、吉川 博文[2,3]、堀内 裕之[1]、福田 良一[1]、太田 明徳[3] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東京農大・ゲノム解析セ、[3]東京農大・応生科・バイオ)
○Ryo IWAMA[1], Satoshi KOBAYASHI[1], Yuh SHIWA[2], Hirofumi YOSHIKAWA[2,3], Hiroyuki HORIUCHI[1], Ryouichi FUKUDA[1], Akinori OHTA[3] ([1]Dept. Biotech., Univ. Tokyo., [2]Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

n-アルカン資化性酵母 *Yarrowia lipolytica* は *n*-アルカンや脂肪酸などの疎水性物質を単一の炭素源として生育できる酵母であり、これら疎水性物質資化のモデル生物として利用されている。*Y. lipolytica* において、細胞内に取り込まれた *n*-アルカンは、小胞体でシトクロム P450 の一種である P450ALK により末端が水酸化されアルコールへと酸化された後、小胞体またはペルオキシソームでアルデヒド、脂肪酸へと酸化され、最終的に生成した脂肪酸は脂質合成に使われるか、β酸化により分解され細胞内でのエネルギー源として利用されると考えられている。しかし、これまで長鎖アルコールや長鎖アルデヒドの酸化に関わる酵素は不明であった。

今回、我々は *Y. lipolytica* のゲノムから長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードすると推定される 4 つの遺伝子を見出した。長鎖 *n*-アルカンを単一の炭素源とした場合、それぞれの遺伝子の単独破壊株の生育は野生型株と変化が見られなかったが、これらの遺伝子を全て破壊した四重破壊株では著しい生育の遅れが観察された。また、ノーザン解析や定量的リアルタイム PCR 解析により、4 つの遺伝子のうち 3 つは *n*-アルカンにより転写産物量が増加することが明らかになった。さらに、野生型株は *n*-アルカンで培養すると細胞破砕液中の長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性が大きく上昇するが、四重破壊株では長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の大きな上昇は見られなかった。以上の結果から、これら 4 つの遺伝子の産物が *Y lipolytica* 内で *n*-アルカンの中間代謝産物である長鎖アルデヒドを酸化する酵素であると考えられた。

Yarrowia lipolytica, Fatty aldehyde dehyderogenase, *n*-alkane

講演番号：3B11a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ B 校舎 11 会場

メチロトローフ酵母 *Pichia pastoris* の高メタノール生育変異株の構築
Isolation of *Pichia pastoris* mutant that shows high growth rate in high methanol concentration
○岩田 昇悟[1]、早川 享志[1,2]、中川 智行[1,2] ([1]岐阜大院応生、[2]岐阜大応生)
○Shogo IWARA[1], Takashi HAYAKAWA[1,2], Tomoyuki NAKAGAWA[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]Gifu Univ.)

【目的】
メタノールは、天然ガスや CO_2 などから直接合成で　き、燃焼の際、水と CO_2 にまで　完全酸化される特徴を持ち合わせることから、現在、最も環境負荷の少ない次世代型エネルギ　一源・炭素源のひとつに数えられている。私たちは、メタノールを唯一の炭素源として利用できるメチロトローフ酵母を用いることで、安価でかつクリーンな炭素源であるメタノールを出発原料とした発酵生産系の構築が可能であると考えている。しかし、メチロトローフ酵母は 5%を超えるような高メタノール環境下で生育が困難になることが知られており、メタノールを出発原料とした高効率な発酵生産系の構築が期待できないのが現状である。つまり、メチロトローフ酵母の多様な産業分野への応用を達成するには本酵母のメタノール生育能をより強化することが必要不可欠である。これら背景から、私たちは高メタノール条件下においても十分な生育能を持つメチロトローフ酵母の「高メタノール生育株」の育種を試みることにした。
【結果および考察】
まず最初に、*Pichia pastoris* GS115 株のメタノール生育限界濃度について検討を行った。GS115 株は 1%メタノール濃度までは十分な生育を示したが、2.5%から徐々に生育阻害が認められはじめ、7.5%メタノール培地には全く生育することができなかった。また、これらメタノール生育中における毒性代謝中間体ホルムアルデヒドの挙動について観察を行ったところ、1%メタノール生育では、GS115 株は培地中に 0.15 mM のホルムアルデヒドを蓄積し、その後減少した。一方、3%メタノール生育では培地中のホルムアルデヒド濃度は 0.3 mM 以上にも達していた。つまり、GS115 株は高メタノール濃度での生育の際、毒性の高いホルムアルデヒドを高生産してしまうことが生育阻害の原因のひとつであると推測できる。
さらに、EMS 処理法にて GS115 株の高メタノール耐性変異株の取得を試みた。EMS 処理細胞を YNB-MeOH 液体培地にて 30ºC で培養し、7.5%メタノール条件下で野生株よりも生育が良好な株を 1 株選抜し、SH1 株と命名した。SH1 株は、1%の低メタノール濃度下では野生株と同等のメタノール生育を示すが、野生株では生育阻害が見られる 5%以上のメタノール培地にも良好に生育でき、その生育限界濃度は 12.5%であった。今後、SH1 株のホルムアルデヒド耐性能およびメタノール代謝酵素群の発現挙動についても検討を行う予定である。

Pichia pastoris, methylotrophic yeast, methanol growth

講演番号：3B11a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ B 校舎 11 会場

糸状菌によるフミン酸の分解と吸着

Degradation and adsorption of soil humic acids by various fungal species

○老沼 研一[1]、中澤 奈美[1]、岡田 元[2]、大熊 盛也[2]、高谷 直樹[1]([1]筑波大院生命環境、[2]理研 BRC-JCM)
○Ken-Ichi OINUMA[1], Nami NAKAZAWA[1], Gen OKADA[2], Moriya OHKUMA[2], Naoki TAKAYA[1]
([1]Univ. of Tsukuba, [2]RIKEN BRC-JCM)

【目的】土壌には、生体由来有機化合物が様々な微生物的あるいは化学的な分解や重合を受けることにより生成・蓄積する、腐植質（構造不定の有機物）が豊富に含まれている。その一つの分類群であるフミン酸は、芳香環を多く含む褐色の難分解性化合物であるが、白色腐朽菌等の一部の担子菌はこれを分解することが知られている。また、ある種の嫌気性細菌は、エネルギー代謝によって生じた還元当量をフミン酸（あるいはその他の腐植質成分）を仲介物質として環境中の不溶性金属に伝達し、生育することが報告されている。しかし、フミン酸に関連した微生物の生理機能については、これらに関するもの以外にはほとんど知見が得られていない。そこで我々は、多様な糸状菌がフミン酸に及ぼす作用およびフミン酸が糸状菌の生育に与える影響を検討し、土壌中での糸状菌の生理・生態に関する新たな知見を得ることを試みた。
【方法と結果】土壌分離株を含む 193 種の糸状菌を、終濃度 0.05%のフミン酸（Aldrich 製）を含み褐色の Potato dextrose (PD)（Difco 製）寒天固体培地を用いて培養したところ、26 種においてコロニー周辺に脱色が観察された。これらのうち 11 種は、PD 液体培地中でも顕著なフミン酸脱色活性を示した。液体培養後の培地をゲルろ過法により分析した結果、脱色活性を示した菌の多くがフミン酸の分子量分布を変化させていることが判明した。また、ほとんどの菌では、培養後の菌糸が褐色に強く染まっていた。培養後の菌糸を 0.1M 水酸化ナトリウム溶液中で 24 時間振盪したところ、著量のフミン酸が菌糸から抽出されたことから、これらの菌が高いフミン酸吸着能を有することが明らかとなった。フミン酸の吸着に関して *Aspergillus nidulans* を対象としてより詳しく解析した結果、フミン酸による菌糸の着色は培養初期にはほとんど起こらないことが判明した。また、0.05%フミン酸を含む 10～100 倍希釈 PD 液体培地中では菌糸が着色されにくいことが明らかとなった。これらのことから、*A. nidulans* は生育条件に依存してフミン酸を吸着する何らかの物質を細胞表層に産生するものと考えられた。更に、本菌を含むいくつかの糸状菌は、フミン酸を添加した PD 液体培地で培養すると、フミン酸を添加しない場合と比べ生育量が顕著に増加することを発見した。以上の結果から、糸状菌には、フミン酸を分解し炭素源として利用するもの（白色腐朽菌以外）や、吸着し生育に役立てるものが存在することが推察された。

humic acid, fungi, adsorption

講演番号：3B11a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ B 校舎 11 会場

糸状菌による芳香族アミノ酸代謝とフェネチルアルコール生産

Aromatic amino acid metabolism and phenethyl alcohol production by filamentous fungi

○長田 理沙、高谷 直樹（筑波大院 生命環境）
○Lisa OSADA,Naoki TAKAYA (Tsukuba Univ.)

【目的】石油由来の化成品を代替できる多様な化合物をバイオマスを原料として微生物を用いて生産させるバイオリファイナリー技術は低炭素社会の実現のために重要である。特に、発酵法での生産の報告が少ない芳香族化合物に着目し、それらの発酵生産技術の開発を目的とした。その中でも着目したのは、フェネチルアルコールである。比較的高価であり、農産加工品、化粧品の添加物、香料の原料として広く利用されている。本研究では、グルコースを原料とした、微生物の発酵によるフェネチルアルコールの大量生産系を構築することを目指す。そのために、当該化合物の合成に関わる代謝機構の解明と、合成に関わる酵素の性質を明らかにすることを試みた。
【方法・結果】研究室が保有する糸状菌 150 株をグルコース、フェニルアラニン、チロシンを共に含む最少培地を用いて 30℃で 3 日間培養した。得られた培地を GC 質量分析、HPLC 解析に供し、培地中に生産される芳香族化合物を分析した。質量フラグメントパターンから計 24 種の化合物が同定され、これらには、フェニルピルビン酸、フェニル乳酸、フェニル酢酸、ホモゲンチジン酸などが含まれていた。また、これらの濃度は 1 mg/l～0.2 g/l であった。また、非バイオマス工業原料として利用されているフェネチルアルコール、マンデル酸なども見られた。次に、フェネチルアルコール生産菌として見出された *Aspergillus oryzae* RIB40 に着目し、フェネチルアルコールの生産に関わる代謝経路の解明を試みた。本菌には、Aromatic amino acid aminotransferase (1)、Phenylpyruvate decarboxylase (2)、Aromatic L-amino acid decarboxylase (3)、Monoamine oxidase/ Primary amine oxidase (4)のアミノ酸配列と高い相同性をもつアミノ酸配列をコードする遺伝子が見出され、定量 PCR によりこれらの転写産物が確認できた。このことから、本菌には、(1)と(2)または(3)と(4)を経る 2 つの経路でフェネチルアルコールを生産する可能性が考えられた。休止菌体反応によって、(1)と(4)の酵素活性の発現も確認された。L-[$^{2}H_{8}$]フェニルアラニンを培地に添加して培養した後、得られた培地を GC 質量分析に供した結果、重水素化されたフェネチルアルコールとフェニルピルビン酸が検出されたことから、*A. oryzae* は主に(1)と(2)を経由する生合成経路でフェネチルアルコールを生産していることが示唆された。

Aromatic amino acid metabolism, Phenethyl alcohol, *Aspergillus oryzae*

講演番号：3B11a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ B 校舎 11 会場

糸状菌が産生する有用芳香族化合物の探索

Screening for industrially useful aromatic compounds from metabolites of various fungal strains

○茂本 亮輔[1]、老沼 研一[1]、岡田 元[2]、大熊 盛也[2]、高谷 直樹[1]([1]筑波大学、[2]理研 BRC-JCM)
○ Ryosuke SHIGEMOTO[1], Ken-Ichi OINUMA[1], Gen OKADA[2], Moriya OHKUMA[2], Naoki TAKAYA[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]RIKEN BRC-JCM)

【目的】芳香族化合物には、高機能性プラスチックや液晶性または導電性材料の原料として有用なものが多く含まれる。特に、芳香環に窒素原子が付加した構造を持つ芳香族アミン化合物は、強度と耐熱性に優れたスーパーエンジニアプラスチックや他の機能性材料の原料となるものが多い。現在、これらの材料は石油由来のものがほとんどであり、これらをバイオマス由来の化合物で置き換えようとする試みは極めて少ない。そこで、本研究では、未知な芳香族代謝経路を多く持つと期待される糸状菌を対象として、バイオマス（グルコースやスクロース）を原料として有用芳香族化合物を産生する菌の探索を行うこととした。
【方法と結果】本研究では、分類学上広範な種を含む様々な糸状菌を 200 種選抜し検索した。これらをポテトデキストロース培地またはスクロースを含んだ Yeast-Malt 培地を用いて 7 日間培養し、得られた培養液を酸性またはアルカリ性の酢酸エチルを用いて抽出した。予備的な実験により芳香族アミン類がジメチルアミノベンズアルデヒドと反応し発色する性質を持つことが確認されたため、これらの抽出物を薄層クロマトグラフィー(TLC)によって展開後、本化合物を用いて発色させることにより、芳香族化合物の探索を行った。その結果、100 種中 30 種で特に顕著な呈色が見られ、芳香族アミン化合物の存在が示唆された。また、種によって移動度、発色度合が異なることから、これらの菌が産生する化合物は多様であるものと考えられた。ガスクロマトグラフィー質量分析計や液体クロマトグラフィー質量分析計を用いてこれらの質量フラグメントの解析を行った結果、検出されたフラグメントパターンから、少なくとも 2 種の菌がアニリン骨格を有する化合物を産生することが示された。これらの結果は、糸状菌が多種多様の芳香族化合物を産生することを示すとともに、新規芳香族アミン化合物を探索する上で優れたスクリーニング源となることを示す。

fungi, aromatic amine, biomass

講演番号：3B11a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ B 校舎 11 会場

分裂酵母の酸化ストレス感受性に対するシステインの影響
Effect of cysteine for the sensitivity of oxidative stress in fission yeast
○竹内 佳奈[1]、古田 奈々[1]、中川 強[2]、戒能 智宏[1]、川向 誠[1] ([1]島根大・生物資源・生命工、[2]島根大・総科センター)
○Kana TAKEUCHI[1], Nana FURUTA[1], Tsuyoshi NAKAGAWA[2], Tomohiro KAINO[1], Makoto KAWAMUKAI[1] ([1]Dept. of Life Sci. & Biotech., Fac. of Life & Env. Sci., Shimane Uni., [2]Cent. for Int. Res. in Sci.)

【目的】コエンザイム Q(CoQ)はミトコンドリア呼吸鎖における必須因子であり、ヒトが生合成できる唯一の脂溶性抗酸化物質である。分裂酵母の CoQ 非生産株は呼吸欠損の他に、最少培地での生育遅延、高濃度の硫化水素発生、酸化ストレス感受性という表現型を示す。また、分裂酵母において CoQ は Sulfide の代謝にも関わっている。Sulfide は含硫アミノ酸であるシステインなどの基質として使われるほか、sulfide:quinone oxidoreductase(Hmt2)と CoQ により無毒化されると考えられる。含硫アミノ酸であるシステインは CoQ と同様に抗酸化物質として働くことが知られている。CoQ 非生産株にシステインを添加すると、最少培地での生育遅延の回復や硫化水素発生量の減少といった表現型の抑制が見られることから、CoQ の欠損による細胞内抗酸化の低下をシステインが補っていると推定される。そこで本研究では、CoQ 非生産株の表現型の一つである酸化ストレス感受性に着目し、酸化ストレス時のシステインの抗酸化物質としての効果の解明を目的とした。
【方法・結果】過酸化水素(H_2O_2)とパラコート(PQ)を用いて酸化ストレス感受性試験を行ったところ、分裂酵母 CoQ 非生産株は感受性を示し、同じ濃度の場合では PQ に対してより強い感受性を示した。この感受性は培地へのシステインの添加によって抑圧され、システインの代謝物であるグルタチオンの添加ではより顕著な抑圧がみられた。また、CoQ 非生産株において細胞内アミノ酸量の変化を測定したところ、システイン量に減少がみられた。このため、CoQ 非生産株の酸化ストレス感受性には細胞内で減少したシステインが関与していることが示唆された。そこで、分裂酵母におけるシステインの重要性を調べるために、システイン合成酵素遺伝子である *cys1a* の破壊株を用いて CoQ 非生産株と同様の酸化ストレス感受性試験を行ったところ、H_2O_2、PQ どちらへの感受性も CoQ 非生産株よりも強いものであった。また、*cys1a* 破壊株を用いて酸化ストレスを付与したときの細胞内の ROS 量の測定を Fluorescence activated cell sorter(FACS)を用いて行った。*cys1a* 破壊株では、酸化ストレス付与後の時間、濃度依存的に細胞内の ROS が増加する傾向が見られた。また、システインを培地内に添加した場合には ROS 発生が抑制された。以上のことから、システイン非生産株が CoQ 欠損株よりも酸化ストレスに対して強い感受性を持つことが明らかとなった。システインから合成されるグルタチオンは強い抗酸化能を持つことから、*cys1a* を破壊することで代謝系が機能しなくなり、細胞内の抗酸化能が著しく低下していることが考えられるため、現在、システイン合成のさらに下流の遺伝子の解析を行っている。

Coenzyme Q, cysteine, oxidative stress

講演番号：3B11a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ B 校舎 11 会場

分裂酵母の protein kinase A がコエンザイム Q の生合成に及ぼす影響

Effect of protein kinase A on the synthesis of coenzyme Q in fission yeast

○横見 和誠、松尾 安浩、戒能 智宏、川向 誠（島根大生物資源）
○Kazumasa YOKOMI,Yasuhiro MATSUO,Tomohiro KAINO,Makoto KAWAMUKAI (Shimane Univ.)

【背景】　コエンザイム Q(CoQ)はミトコンドリア呼吸鎖における電子伝達系の必須因子であり、生体内において重要な脂溶性の抗酸化物質でもある。分裂酵母の CoQ10 量は 1%、2%といった比較的低濃度のグルコース存在下で増加し、10%といった高濃度のグルコース存在下では CoQ10 量は減少する。このことから、分裂酵母における CoQ10 の生合成はグルコース応答によって制御されていることが示唆され、我々は主要なグルコース応答経路である cAMP/PKA 経路に着目した。この経路ではグルコースが存在すると、アデニル酸シクラーゼである Cyr1 により ATP から cAMP が合成される。Protein kinase A(PKA)は調節サブユニットである Cgs1 と、触媒サブユニットである Pka1 がヘテロテトラマーを形成しており、Cgs1 が Pka1 と結合することで PKA を不活性化している。グルコースの存在時に合成された cAMP が Cgs1 と結合することで、Cgs1 と Pka1 との結合が外れ PKA が活性化し、糖新生やストレス応答などの様々な細胞内の制御を行っている。本研究では、分裂酵母の cAMP/PKA 経路と CoQ10 生合成の関連性について解析を行った。

【結果】　3%グルコースを含んでいる YES 完全培地で分裂酵母の *Δcyr1* 株、*Δcgs1* 株、*Δpka1* 株それぞれの CoQ10 量を測定したところ、*Δcyr1* 株、*Δpka1* 株の CoQ10 量は野生株の約 2 倍に増加していることが判明した。一方で、*Δcgs1* 株は野生株の約半分に CoQ10 量が減少していた。この結果はグルコース濃度依存的に CoQ10 量が変化する結果と一致しており、分裂酵母において CoQ10 の生合成は PKA によって負に制御されている可能性が示唆された。同様に、分裂酵母の Protein kinase をコードしている遺伝子の破壊株 87 株を用いて、網羅的な CoQ10 量の測定を行った結果、*Δpka1* 株で顕著に CoQ10 量が増加していることを確認できた。*Δcyr1* 株、*Δcgs1* 株、*Δpka1* 株での CoQ10 量の変化が細胞にどのような影響を及ぼしているかを調べるため、ミトコンドリアを膜電位依存的に染色する蛍光試薬である Mitotracker Red を用いて蛍光観察を行ったところ、*Δcyr1* 株、*Δpka1* 株では蛍光シグナルが強く観察された。さらに、2%グリセロール+1%エタノールの非発酵性の炭素源を用いた培地での増殖を調べると、*Δcyr1* 株、*Δpka1* 株は野生株よりも増殖が速く *Δcgs1* 株はほとんど増殖しなかった。これらのことから、*Δcyr1* 株、*Δpka1* 株では CoQ10 量が増加したことにより電子伝達系が昂進している可能性が考えられる。現在、分裂酵母で PKA が CoQ10 の生合成をどのように制御しているか解析を行っている。

coenzyme Q, protein kinase A, *Schizosaccharomyces pombe*

講演番号：3B11a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ B 校舎 11 会場

In-silico MS/MS ライブラリ（LipidBlast）を用いた *Euglena gracilis* の極性脂質プロファイリング

Metabolic profiling of polar lipids in *Euglena gracilis* using an *in-silico* MS/MS database

○小川 拓水[1]、中井 来[1]、岡澤 敦司[1]、Kind Tobias[2]、Fiehn Oliver[2]、太田 大策[1]（[1]阪府大院生命環境、[2]UC Davis Genome Center）

○Takumi OGAWA[1], Rai NAKAI[1], Atsushi OKAZAWA[1], Tobias Kind[2], Oliver Fiehn[2], Daisaku OHTA[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]UC Davis Genome Center)

【背景】

現在，藻類などの微生物の脂質代謝機能を工業原料生産に応用するための研究が進められているが，利用可能な形式で公開されている脂質マススペクトラムデータは限定されている．今回我々は，脂質分子種の同定を目的として，インシリコ脂質 MS/MS スペクトラムライブラリを構築した(LipidBlast)．このライブラリは実測値と文献値に基づいてインシリコでデザインされた約 12 万の脂質 MS/MS スペクトラムデータが格納されている．本研究では，この脂質 MS/MS スペクトラムライブラリを *Euglena gracilis* の極性脂質プロファイル解析に適用した．

【材料と方法】

E. gracilis Z 系統（野生株）および SM-ZK 系統（葉緑素欠損変異株）を Koren-Hutner 培地に継代し，28℃，連続日長条件下で 4 日間培養した．培養した *E. gracilis* から培地成分を除去し，速やかに液体窒素中で凍結した．凍結乾燥試料より改変 Folch 法により総脂質を抽出し，LC-iontrap TOF/MS 分析に供試した．抽出液中に含まれる極性脂質分子種の構造情報を取得するために，自動分析モードにより包括的 MS/MS データを取得した．具体的には，各 MS スキャンにおいてイオン強度順に上位 2 番目までのイオンの MS/MS データを取得し，LipidBlast を用いて試料中の脂質分子種の同定とそれぞれの蓄積量の網羅的解析を試みた．

【結果】

E. gracilis Z 系統と SM-ZK 系統の脂質抽出液の LC-MS 分析を行い，それぞれ 224 件と 215 件の MS/MS スペクトラムデータを取得した．これらの実測データに対して，上記の LipidBlast 検索を実施した．検索結果の最上位の脂質分子種のドットプロダクト値が 400 以上のデータを採用し，各実測データのアノテーション情報とした．この条件に該当する 321 件の MS/MS データ（Z 系統では 162 件，SM-ZK 系統では 159 件）のアノテーション情報を解析した結果，Z 系統ではホスファチジルエタノールアミン，SM-ZK 系統ではホスファチジルコリンと推定される脂質分子が多いことが分かった．炭素数と不飽和結合数を調べたところ，Z 系統では炭素数 30 前後，SM-ZK 系統では炭素数 40 前後の脂質分子が多く含まれ，また，SM-ZK 系統では多価不飽和脂肪酸から構成される脂質分子が多く含まれると推定された．現在，異なる生育条件で培養したサンプルを用い，同様の解析を進めている．

Polar lipid profiling, *Euglena gracilis*, *in-silico* MS/MS database

講演番号：3B11a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ B 校舎 11 会場

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* 由来システインデスルフラーゼに依存する含硫化合物の探索

Exploration of sulfur-containing compounds depending on cysteine desulfurase from a hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*

○秀瀬 涼太[1]、井上 貴央[2]、藤原 伸介[1,2] ([1]関学大院理工生命環境科学研究セ、[2]関学大理工)

○Ryota HIDESE[1], Takahiro INOUE[2], Shinsuke FUJIWARA[1,2] ([1]Res. Cent. for Environ. Biosci., Grad. Sch. of Sci. and Tech., Kwansei-Gakuin Univ., [2]Sch. of Sci. and Tech., Kwansei-Gakuin Univ.)

【目的】システインデスルフラーゼ（CDS）は L-システインの硫黄を脱離する反応を触媒する。バクテリアやユーカリアで CDS が硫黄転移系において必須な役割を担う。CDS の活性中心システイン残基上に生成する sulfanylcysteine (CDS-S-SH) の硫黄が、鉄硫黄クラスターやチアミンなどの含硫ビタミンなどの含硫化合物の硫黄源として必須である。一方、アーキアにおける硫黄転移系は不明である。*Thermococcus kodakarensis* は硫黄還元型の超好熱性アーキアであるが、元素状硫黄が存在しない環境で、糖を代謝して水素発生型呼吸を行うことで生育できる。これまでに、糖を含まない硫黄含有培地では KU216 株と∆*tkcds* 株で生育の違いは見られない一方で、糖を含む硫黄非含有培地では ∆*tkcds* は生育しないという知見を得ている。また、硫黄含量 0.02%(w/v)の糖を含む培地での∆*tkcds* 株の比増殖速度と最終菌体濁度は KU216 株の 1/2 倍まで回復する。このため、*T. kodakarensis* には CDS に依存する硫黄転移系と依存しない硫黄転移系が存在する事を示しており、CDS の獲得によって硫黄の存在しない環境で本菌の生育が可能になったと考えられた。本研究では、元素状硫黄依存性の代謝から元素状硫黄に依存しない呼吸・代謝が成立する機構を解明することを目的とし、CDS に依存する含硫化合物の探索を試みた。

【結果】チアミンは生育に必須な糖代謝やアミノ酸資化に関わる酵素の補因子として活性発現に付与するため、チアミンの欠損が生育に影響を与えたと考えられた。*T. kodakarensis* KU216 株と∆*tkcds* 株のそれぞれを糖を含まない硫黄含有培地 ASW-YT-S^0 と硫黄含量 0.02%(w/v)の糖を含む培地 ASW-YT-Pyruvate-S^0 で対数期後期まで培養した。細胞内のチアミンを定量するため、細胞抽出液から Thiochrome 法を用いてチアミンに由来する蛍光物質を得た後、それらを HPLC で定量解析した。その結果、両株のチアミン含量に顕著な違いは認められなかった。このため、*T. kodakarensis* においてバクテリアやユーカリアとは異なり、CDS に非依存的な新規なチアミン生合成機構が存在することが明らかとなった。他方、KU216 株と∆*tkcds* 株の生育に必須で糖代謝やアミノ酸資化に関わる鉄硫黄クラスター含有酵素の活性比較の結果も合わせて報告する。

Cysteine desulfurase, Sulfur-containing compound, Hyperthermophilic archaeon

講演番号：3B11a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ B 校舎 11 会場

物質生産菌の培養液ライブラリーの構築

Extract library of microorganisms producing bioactive compounds.

○中島 琢自[1]、野中 健一[2]、増間 碌郎[2]、鈴木 賢一[2]、高橋 洋子[2]、大村 智[2] ([1]北里大学・感染制御研究機構、[2]北里大学・生命研)
○Takuji NAKASHIMA[1], Kenichi Nonaka[2], Rokuro Masuma[2], Kenichi Suzuki[2], Yoko Takahashi[2], Satoshi Omura[2] ([1]Kitasato Univ., [2]Kitasato Univ.)

【目的】

微生物代謝産物は人知の及ばない多彩な化学構造を有する物質の宝庫であり、医薬品の供給源として活用され、多くの医薬品が開発されてきた。Newman らの報告[1)]によると、ここ 30 年間で FDA が認可した医薬品のうち、約 65%が天然物もしくはその誘導体から創出されている。本研究は、北里大学創薬グループが保有する物質生産菌の培養液ライブラリーを構築することを目的とした。

【方法】

北里大学創薬研究グループは 40 年以上に渡って微生物代謝産物から有用物質を探索し、400 以上の新規化合物を発見してきた。Avermectin、Staurosporine や Lactacystin など、医薬品や生化学試薬として用いられている有用物質生産菌を凍結乾燥法等で長期保存している。長期保存された物質生産菌 641 株を復元後、4 種類の生産培地を用い 6 日間 27°C で培養した。培養後、エタノールを等量添加し、遠心により上清（培養抽出物）を回収した。培養抽出物に含まれる代謝産物を LC/UV および LC/MS で解析した。

【結果および考察】

641 株中 629 株（98%）の生存が確認された。この培養液ライブラリーの LC/UV および LC/MS 解析を行い、データベースを構築した。このデータベースには微生物情報、生産物質情報、培養液機器分析情報が含まれている。このライブラリーおよびデータベースから、抗嫌気性菌活性を有する Luminamicin の生産菌 *Streptomyces* sp. OMR-59 株は 18 年間の長期保存後も 60 μg/ml の生産性を保持していることがわかった。同様に、前述の 3 化合物を含め、抗 MRSA 活性を有する Bottromycin、抗マラリア活性を有する Boromycin 等の生産性も保持されていた。これらの結果について詳細に報告する。

1) Newman DJ., et al. *J. Nat. Prod*. **75**, 311-335 (2012)

microbial resources, bioactive compounds, extract library

講演番号：3B11a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ B 校舎 11 会場

フラボノイド代謝微生物の探索
Screening of microorganisms involved in flavonoid metabolism
○千野 貴裕、橋本 義輝、小林 達彦（筑波大院・生命環境）
○Takahiro Chino,Yoshiteru Hashimoto,Michihiko Kobayashi (Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. of Tsukuba)

【目的】
カテキンはフラボノイドの一種であり、茶カテキンなどで知られる各種誘導体は血圧上昇抑制、血中コレステロール調節作用、血糖値調節作用、抗酸化作用などの様々な生理活性を持つため、食品・健康分野での応用が期待される化合物である。微生物によるカテキンの分解・代謝についてはいくつか報告があるものの、代謝に関わる酵素を精製し、詳細な解明を行った例は無い。本研究では、カテキンを代謝する微生物を探索し、その代謝に関わる酵素の諸性質を解明することを目的とする。

【方法・結果】
各所から土壌サンプルを採集し、0.05 %カテキンを単一炭素源とする最少培地に添加し、28℃で 4 日間振盪培養を行った。培養液を新しい液体培地に 1%植菌し、同条件で繰り返し集積培養を行った。培養液をカテキン最少寒天培地に塗布し、コロニーを単離した。得られた複数の微生物のカテキン代謝活性を、無細胞抽出液を用いて高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により測定した。最も高いカテキン代謝活性を持つ菌株の菌学的諸性質を調べ、その後、本株を用いて炭素源、金属添加などの培地組成および培養液量、培養時間を検討した。カテキン代謝活性が最大となるような最適培養条件を決定し、大量培養で得られた菌体を超音波破砕して無細胞抽出液を調製した。現在、いくつかのカラムクロマトグラフィーに供し、本酵素を精製しているところである。

screening, microorganism, metabolism

講演番号：3B11a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ B 校舎 11 会場

Validation of the applicability of discriminant marker for authenticity assessment of Luwak coffee

○Udi JUMHAWAN[1], Sastia Prama PUTRI[1], Yusianto YUSIANTO[2], Takeshi BAMBA[1], Eiichiro FUKUSAKI[1] ([1]Grad.Sch.Eng.,Osaka Univ., [2]Indonesian Coffee and Cocoa Research Institute)

Coffee is an important agricultural product, worldwide, that accounts for billions US dollar annually. Owing to unique flavor and unexpected processing, civet (Luwak) coffee acclaimed as world’s most expensive coffee, with price tag of 300 to 400 US dollar per kilogram. Luwak coffee made from coffee berries that have been eaten by Asian palm civet (*Paradoxurus hermaphroditus*) or Luwak; enzymatic processes might be occurred to coffee bean, yielding coffee with unique flavor. Despite its profitable prospect, there is no available method to determine originality of Luwak coffee. Therefore, rapid and robust methods are required, for ensuring authenticity of Luwak coffee, to prevent adulteration in coffee market.

A combination of GC/MS and multivariate data analysis was applied to elucidate variation in coffee beans imposed by physical and enzymatic stresses inside animal digestive tract, thereby finding discriminant marker for authentication. In previous work, discrimination of Luwak coffee and regular coffee as well as identification of discriminant marker was successfully achieved on coffee samples (Luwak coffee and regular coffee) from various geographical origins in Indonesia. Organic acids were found to significantly contribute to Luwak coffee properties. The present study showed validation of the applicability of discriminant marker for authentication. The samples for method validation include authentic coffee, imitation coffee (regular coffee that have been processed in such way to mimic characteristics of Luwak coffee), regular coffee, and blend coffee of authentic coffee and regular coffee with ratio of 25:75, 50:50, 75:25 (w/w), respectively. Samples differentiation was successfully observed in PCA (Principle Component Analysis). Relative peak intensity for discriminant markers were compared and displayed in boxplot. By employing selected discriminant marker, samples were separated clearly. The result proved a utility of metabolic profiling for authentication of Luwak coffee.

Luwak coffee, GC/MS, Authenticity assessment

講演番号：3B11a15
講演日時、会場：3 月 26 日 11:48～ B 校舎 11 会場

ピペロナール代謝酵素の精製
Purification of the enzyme involved in aldehyde metabolism
○土居 志織（筑波大院）
○Shiori DOI (Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. of Tsukuba)

【目的】
ピペロナール（3-ベンゾジオキソール-5-カルボアルデヒド）は独特の甘い芳香を有する芳香族アルデヒドであり、香水や一般化粧品、食品香料の調合基剤、医薬品や麻薬の合成原料として使用され、今後も多分野での応用が期待される化合物である。ピペロナールはイソサフロールの酸化などによって化学的に合成されるが、コショウやバニラなどの植物から抽出される精油にも含まれ、自然界にも存在する天然化合物である。しかし、微生物によるピペロナール分解・代謝についてはこれまで全く報告がなく、生物における分解経路および代謝に関わる酵素は未解明である。本研究では、ピペロナールを代謝する微生物を探索し、その代謝に関与する酵素の諸性質を解明することを目的とする。

【方法・結果】
我々は既に土壌からピペロナールを単一炭素源とする最少培地を用いた集積培養により、ピペロナール代謝活性を持つ微生物の単離に成功している。最も高いピペロナール代謝活性を示した微生物は、運動性を持つグラム陰性の桿菌であり、反応生成物をHPLCから分取・精製し、同定した。本株を用いて炭素源、窒素源などの培地組成を検討し、ピペロナール代謝活性が最大となるような最適条件で大量培養した。菌体を超音波破砕し、無細胞抽出液を調製した後、硫安分画、疎水クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーなどの各種クロマトグラフィーに供することで本酵素の精製を行った。現在、精製標品を用いて本酵素の諸性質の解析を行っている。

pirification, enzyme, metabolism

講演番号：3B11p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ B 校舎 11 会場

好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 の持つ Heterodisulfide reductase の機能に関する研究
Study on the function of heterodisulfide reductase in a thermophilic hydrogen-oxidizing bacteria, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6
○石崎 優、佐藤 由也、新井 博之、石井 正治、五十嵐 泰夫（東大院農生科・応生工）
○Masaru ISHIZAKI,Yuya SATO,Hiroyuki ARAI,Masaharu ISHII,Yasuo IGARASHI (The Univ of Tokyo)

H. thermophilus TK-6 は二酸化炭素を唯一の炭素源に 70℃で生育する化学独立栄養性細菌である。本菌は水素やチオ硫酸をエネルギー源として利用することが知られている。本菌は還元的 TCA 回路という特徴的な経路で二酸化炭素を固定するが、本経路では Ferredoxin という電子伝達タンパク質が主要な電子供与体として働いている。本菌のもつ主要な Ferredoxin の一つである Fd1 は酸化還元電位が非常に低く、その還元機構は未解明である。
近年 Ferredoxin のような酸化還元電位が低い物質を還元するための反応機構として Electron Bifurcation というシステムが提唱されている。これは電位の違う複数の電子受容体の酸化還元反応を同時に行うことによりエネルギー的に不利な反応を進める機構であり、古細菌や細菌のいくつかの酵素においてそのような反応が報告されている。その一例として、メタン生成古細菌における Heterodisulfide reductase (Hdr)というタンパク質が CoB-CoM 間のジスルフィド結合の還元にカップリングして Ferredoxin 還元を行う酵素として報告されている。この *hdr* は *H. thermophilus* を含む複数の細菌のゲノム中においてもその相同遺伝子が発見されているものの、細菌においてどのような機能を担っているかは報告がまだない。そこで本研究では *H. thermophilus* における Hdr の機能解明を目的として研究を行った。
H. thermophilus の *hdrA* 破壊株を作成し生育測定を行ったところ、水素酸化条件においては野生株と同様の生育を見せたのに対し、チオ硫酸酸化条件においてはその生育が抑制された。この結果より Hdr は *H. thermophilus* における硫黄化合物酸化の機構に関与していると考えられる。一方、細胞破砕液におけるチオ硫酸酸化活性を測定したところ、野生株と破壊株に有意差が見られなかったことから、チオ硫酸代謝の中でも下流においてなんらかの機能を持つと予想される。

Sulfur, redox, metabolism

講演番号：3B11p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ B 校舎 11 会場

好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 の酸素耐性型 hydrogenase の機能解析
Study on an oxygen-tolerant hydrogenase of thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6

○山口 依里香、佐藤 由也、新井 博之、石井 正治、五十嵐 泰夫（東大農生科）
○Erika YAMAGUCHI,Yuya SATO,Hiroyuki ARAI,Masaharu ISHII,Yasuo IGARASHI（Univ. Tokyo）

好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 は水素をエネルギー源、二酸化炭素を唯一の炭素源として生育する独立栄養性細菌である。本菌は還元的 TCA 回路で二酸化炭素を固定している。この回路は TCA 回路の逆回りの反応であり、通常酸化方向に回る反応を逆行するために細胞内を常に還元的に保つ必要がある。そのため、還元的 TCA 回路を利用する生物のほとんどが酸素感受性であることが知られている。しかし本菌は 30%以上という極めて高い酸素濃度で生育することが可能である。本研究では本菌の高酸素濃度下における生存戦略を明らかにすることを目的とした。

着目したのは生育に必要不可欠であるエネルギー代謝の中でも、最も上流に位置するヒドロゲナーゼである。本菌はヒドロゲナーゼを使って水素から電子を獲得しており、ヒドロゲナーゼはエネルギーの取り込み口として重要な役割を果たしている。近縁種ではあるが、酸素感受性の高い *Aquifex aeolicus* とゲノム比較をした結果、*A. aeolicus* が 3 種類のヒドロゲナーゼ遺伝子を持つのに対し、本菌はそれらに加えて *hox* というヒドロゲナーゼ遺伝子を持っていることが知られており、Hox の酵素学的諸性質も報告されている。さらにトランスクプリトーム解析の結果、嫌気条件と比較して、好気条件では *hox* 遺伝子の発現量が高くなっていることが分かっている。そこで本研究では Hox の高酸素濃度下における機能を生理学的に解析した。

hox 遺伝子破壊株を作製し、様々な酸素濃度下での生育を観察した。その結果、2-10%の低酸素濃度下では生育に影響がなかったが、15, 20%といった高酸素濃度下では *hox* 破壊株は生育不可能となることが確認された。本菌は水素以外にもチオ硫酸をエネルギー源として利用することができる。高酸素濃度下で培地にチオ硫酸を添加すると *hox* 破壊株は生育可能となった。これは Hox 以外のヒドロゲナーゼが高酸素濃度下で機能しえなかったために生育が困難になったということを示している。これらより、Hox は高酸素濃度下での生育に必須であり、他のヒドロゲナーゼには代替できない酸素耐性型のヒドロゲナーゼとして働いていることが示唆された。

hydrogenase, oxgen-tolerance, thermophiles

講演番号：3B11p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ B 校舎 11 会場

好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 の酸化ストレス防御酵素 bacterioferritin comigratory protein に関する研究

Study on an oxidative-stress defense enzyme, bacterioferritin comigratory protein, of *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6

○佐藤 由也、新井 博之、石井 正治、五十嵐 泰夫（東大院・農生科）
○Yuya SATO,Hiroyuki ARAI,Masaharu ISHII,Yasuo IGARASHI (Univ. Tokyo)

好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 は、還元的 TCA 回路という特徴的な炭酸固定経路により二酸化炭素を同化している。この経路では、多くの生物に利用される TCA 回路を逆回転させることにより CO_2 が固定されている。還元的 TCA 回路は酸化ストレスに非常に弱く、この経路を利用するほとんどの生物が酸素感受性であることが知られているが、*H. thermophilus* は例外的に酸素存在下でも旺盛に生育する。我々はこの事実に着目し、本菌における酸化ストレス防御系について研究を進め、これまでに好気生育に必須な新規の酸化ストレス防御酵素(Ferriperoxin (Fpx))を見出している。

本菌ゲノムからは Fpx の他にも数種類の酸化ストレス防御酵素遺伝子が見出されており、本研究ではそれらの中から Bacterioferritin comigratory protein (BCP)に着目した。BCP は過酸化物還元酵素(peroxidase)の一種であり、2 つの Cys 残基が活性中心として働くことが報告されている。BCP のアミノ酸配列中には 2 つもしくは 3 つの Cys 残基が保存されていることが一般的だが、本菌由来 BCP は 4 つの Cys 残基を含んだ特徴的な一次構造を有する。本大会では本菌由来 BCP を対象に *in vivo* および *in vitro* の機能解析を行った結果について発表する。

BCP の生理学的機能を解析するため、*H. thermophilus* の *bcp* 遺伝子破壊株を構築した。酸化ストレスに対する耐性を観察することを目的に、0, 2, 20, 25%の酸素存在下で野生株および遺伝子破壊株の培養を行ったが、生育に大きな違いは見られなかった。

H. thermophilus 由来 BCP 遺伝子を大腸菌において異種発現し、発現タンパク質の精製を行った。精製された BCP を用い、dithiothreitol を電子供与体として過酸化物の還元活性を測定したところ、過酸化有機物(*t*-butyl hydroperoxide)等に対して還元活性を示した。このことから、生理学的な機能は明らかではないが、*in vitro* では BCP が peroxidase として機能しうることが示された。さらに、BCP 分子内に保存される 4 つの Cys それぞれのアミノ酸置換体の構築、大腸菌での異種発現を行った。各 Cys 残基の過酸化物還元活性における寄与について解析を行った結果についても発表する。

oxidative stress, peroxidase, bacterioferritin comigratory protein

講演番号：3B11p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ B 校舎 11 会場

Trichosporonoides megachiliensis は 3 種の *glucose-6-phosphate dehydrogenase* をストレスの種類によって使い分けている

Three *glucose-6-phosphate dehydrogenase* isogenes from *T. megachiliensis* function depending on the type of stress

○岩田 悠志[1]、荻原 淳[1,2]、加藤 順[2]、春見 隆文[1,2]([1]日大院生資研究科・生資利用、[2]日大生資科・生命化)

○Hisashi IWATA[1], Jun OGIHARA[1,2], Jun KATO[2], Takafumi KASUMI[1,2] ([1]Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ., [2]Dept.Chem.Life.Sci.,Nihon Univ.)

(背景・目的)

乾燥果実から分離した担子菌様酵母 *Trichosporonoides megachiliensis* は、*S. cerevisiae* より高糖濃度条件下を好んで生育する酵母であり、適合溶質としてグリセロールの代わりに、主にエリスリトールを生成する。このエリスリトールは、ペントースリン酸経路(PPP)を介して生成され、 *S. cerevisiae* におけるグリセロールと同様、細胞内の浸透圧調節を行うための適合溶質であると推定されている。エリスリトール生成には、複数の酵素が関与しているが、中でも解糖系から PPP に代謝を分ける最初の酵素 Glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PDH)が重要な役割を担う一つであると予想される。そこで、本菌における *G6PDH* の取得及び、その遺伝子が浸透圧及び酸化ストレス応答時にどのような発現動態や機能を発揮し、エリスリトール生成及び糖代謝制御に寄与しているのかを解明することを目的とした。

(方法・結果)

本菌において 3 種の *G6PDH* isogene(*g6pdh1, g6pdh2, g6pdh3*)が存在することが明らかとなり、それら 3 種には配列の相違がみられたが、本質的な機能を持つ領域は保存されていた。また、転写因子により浸透圧(STRE) に関与する結合部位を有する *g6pdh2, g6pdh3* と、酸化ストレス(AP-1)応答に関与する結合部位を有する *g6pdh1, g6pdh2* が存在した。そのため、浸透圧ストレス(1.2 M NaCl)及び酸化ストレス(0.15 mM Menadione)条件下で培養初期段階の mRNA 発現動態を半定量的 PCR により解析をしたところ、ストレスの種類により、各遺伝子の発現量に差があることが判明した。また同時に種々のストレスとポリオール生成との関連性及び、それら 3 種の遺伝子の mRNA 発現動態との相関性を解析したところ、浸透圧及び酸化ストレス共にポリオールの蓄積量が増加したことから、これらのストレスとポリオール生成には、密接な関連性があることが示唆された。また、浸透圧ストレス下では、エリスリトール蓄積量と *g6pdh3* の発現動態で相関性がみられ、*g6pdh1, g6pdh2* では相関性がみられなかったことから、*g6pdh3* がエリスリトール生成に直接関与しているが明らかとなった。酸化ストレス下に関しては、*g6pdh3* は相関性がみられず、*g6pdh1* 及び *g6pdh2* で制御されていたが、エリスリトール生成時期と遺伝子の発現時期がずれていたことが明らかとなった。

glucose-6-phosphate dehydrogenase, stress response, polyol

講演番号：3B11p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ B 校舎 11 会場

枯草菌のコエンザイム A 生合成
Biosynthesis of coenzyme A in *Bacillus subtilis*

○緒形 雄太、朝山 宗彦、長南 茂（茨城大農）
○Yuta OGATA,Munehiko ASAYAMA,Shigeru CHOHNAN (Ibaraki Univ.)

【目的】コエンザイム A（CoA）はアシル基のキャリアとして機能する補酵素である。CoA はパントテン酸から 5 段階の酵素反応で生合成され、その初発反応を触媒するパントテン酸キナーゼ（CoaA）は唯一多様性を示し、アミノ酸配列により原核生物では原核 I 型 CoaA、原核 II 型 CoaA、原核 III 型 CoaA（CoaX とも呼ばれる）の 3 種、真核生物では PanK の 1 種、計 4 種に分類されている。CoaA は CoA 生合成経路の鍵酵素としてだけでなく、近年、この多様性がドラッグターゲットとしても注目されており、CoaA の機能解析はさらに重要性を増している。通常、微生物は *coaA* を 1 つしか保有していないが、なかには型の異なる 2 種の *coaA* を有する微生物がいる。枯草菌（*Bacillus subtilis*）もその一つで、ゲノム DNA 上に原核 I 型 CoaA（*Bs*CoaA）および原核 III 型 CoaA（*Bs*CoaX）遺伝子を持っている。そこで、本研究は枯草菌の 2 つのパントテン酸キナーゼの役割を解析した。
【方法】*B. subtilis* の *coaA* および *coaX* は PCR を用いて pET-28a(+)の T7 プロモーターの下流にクローニングされ、大腸菌で発現された組換え *Bs*CoaA および *Bs*CoaX は Ni sepharose で均一に精製された。酵素活性測定には ^{14}C-パントテン酸を使用し、生成した 4'-ホスホパントテン酸の放射活性を液体シンチレーションカウンターで定量した。細胞内 CoASH、アセチル-CoA、およびマロニル-CoA はマロン酸脱炭酸酵素を用いたアシル-CoA サイクリング法で定量した。*B. subtilis* の *coaA* 遺伝子破壊株である MGNA-C399 および *coaX* 遺伝子破壊株である MGNA-B923 は国立遺伝学研究所から購入した。
【結果および考察】大腸菌で発現された枯草菌由来 *Bs*CoaA および *Bs*CoaX はパントテン酸キナーゼ活性を示した。*Bs*CoaA は CoASH およびアシル-CoA に感受性を示し、200μM で 95%以上阻害された。一方、*Bs*CoaX は 200μM の CoA およびマロニル-CoA でおよそ 50%阻害されたが、活性は残存していた。両酵素ともリン酸供与体としてヌクレオチド三リン酸を幅広く受け入れ、*Bs*CoaA のパントテン酸および ATP に対する K_m 値は 147μM および 971μM、*Bs*CoaX は 192μM および 1,628μM で、両酵素とも ATP で高い値を示した。次に、*coaA* および *coaX* 遺伝子破壊株を解析した。パントテン酸キナーゼ活性は両株から検出され、細胞内では CoaA および CoaX とも機能していることが明らかとなった。また、*coaA* 遺伝子破壊株のパントテン酸キナーゼ活性は野生株のおよそ 1/6 に低下し、かつ細胞内 CoA レベルは野生株および *coaX* 遺伝子破壊株でほぼ同じ値を示したが、*coaA* 遺伝子破壊株は前者の約 1/2 に低下していた。これらの結果は、枯草菌の細胞内では原核 I 型 CoaA の *Bs*CoaA が優勢で、CoA 生合成系により寄与していることを示唆している。

coenzyme A, pantothenate kinase, *Bacillus subtilis*

講演番号：3B11p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ B 校舎 11 会場

鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* のロダネース様タンパク質の機能解析
Functional study of a rhodanese-like protein in *A. ferrooxidans*
○上村 一雄、濱崎 良太、スルタナ シャーミン、金尾 忠芳（岡山大院環境生命）
○Kazuo Kamimura,Ryota Hamasaki,Sharmin Sultana,Tadayoshi Kanao (Okayama Univ.)

【目的】鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* は，二価鉄および還元型硫黄化合物を唯一のエネルギー源とし，二酸化炭素を炭素源として生育する好酸性の化学合成独立栄養細菌である。本菌は，この酸化能力に加えて高い重金属イオン耐性を持つため，バクテリアリーチングにおける重要な細菌の一つとして考えられており，二価鉄や還元型硫黄化合物の酸化について多くの研究がなされてきた。本菌の鉄酸化機構はすでに明らかになっているが、硫黄化合物の酸化機構には不明な点が多く残されている。硫黄酸化酵素の多くはペリプラズムに存在していると考えられるため、硫黄やテトラチオン酸で生育した細胞のペリプラズムタンパク質を二次元電気泳動(2D-PAGE)によって解析した結果、鉄生育細胞では検出されないロダネース様ドメインを持つタンパク質（Rho）を検出した。Rho は、チオ硫酸デヒドロゲナーゼ（Tsd）をコードしている遺伝子とオペロンを形成しているため、チオ硫酸酸化に関与していることが強く示唆された。そこで、本研究ではこのタンパク質の機能を明らかにするため、大腸菌で発現させた Rho の解析を行った。
【方法・結果】PCR によって増幅した *rho* 遺伝子を pET21a に組み込み、*E. coli* BL21 株に導入した。発現タンパク質は、N－末端に His タグを持っているため、Ni－カラムを用いて均一に精製した。Rho のアミノ酸配列の解析によって C－末端には鉄硫黄クラスターの結合部位の存在が明らかとなっており、タンパク質には鉄硫黄クラスターが結合していることが推測された。鉄硫黄クラスターは酸素存在下では不安定であるため、嫌気条件下で精製したタンパク質の鉄含有量を測定したが、組換えタンパク質には鉄は含まれていなかった。ロダネースは、通常チオ硫酸を硫黄と亜硫酸に分解する反応を触媒するため、酵素活性は、シアンの存在下で生じたチオシアンを検出する方法で測定した。本菌のペリプラズムが酸性であるため、酵素活性を３～７の範囲で測定したが、ロダネース活性は検出されなかった。また、本菌の硫黄代謝に関与する酵素は硫酸イオンを活性発現に必要とするが、硫酸イオンを添加しても活性は検出されなかった。基質としてポリサルファイドも検討したが、硫黄の遊離は認められなかった。*A. ferrooxidans* は、Tsd を用いてチオ硫酸を代謝するが、この酵素はテトラチオン酸や硫黄で生育した細胞内で検出される。このことは、硫黄の代謝中間体としてチオ硫酸が形成されることを示唆しているが、チオ硫酸形成に関与する酵素は明らかになっていない。チオ硫酸生成に Rho が関与していることも考えられるため、さらなる機能解析を行っている。

rhodanese, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, sulfur oxidation

講演番号：3B11p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ B 校舎 11 会場

アーキアが有する phosphoribulokinase ホモログの酵素学的解析
Function analysis of archaeal phosphoribulokinase homologues

○河野 卓成、遠藤 千夏子、横田 明穂、蘆田 弘樹 (奈良先端大バイオ)
○Takunari Kono,Chikako Endo,Akiho Yokota,Hiroki Ashida (Grad. Sch. of Biol. Sci., NAIST)

【背景・目的】カルビンサイクルは植物や藻類、光合成細菌などの光合成生物が利用する主要なCO_2固定回路である。この回路を構成する１１酵素の中でも、CO_2固定酵素ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO)と、RuBisCOの基質リブロースビスリン酸 (RuBP) を合成する phosphoribulokinase (PRK)はこの回路の鍵酵素である。近年のゲノム解析から、多くのアーキアがRuBisCO遺伝子を有することが明らかにされている。しかし、アーキアがPRKを有しているという報告はこれまでにない。超好熱性アーキア*Thermococcus kodakaraensis*はPRKを有していないため、カルビンサイクルとは異なり、アデノシンモノリン酸から合成されたRuBPに対しRuBisCOがCO_2固定を行うことが報告されている (Sato et al., 2007) 。このため、このアーキアにおいてRuBisCOは核酸代謝とペントース代謝のリンカーとして機能していると予想されている。我々は、*Methanospirillum hungatei*を含む、いくつかのメタン産生アーキアがRuBisCO、PRKホモログ遺伝子を同時に有していることを見出した。これらメタン産生アーキアのRuBisCOとPRKホモログは、光合成RuBisCO、PRKと約30%のアミノ酸配列相同性を示す。光合成PRKは系統樹において、光合成細菌PRKによって形成されるPRK-Iと、植物、藻類、シアノバクテリアのPRKによって形成されるPRK-IIグループに分類されるが、アーキアのPRKホモログはこれらとは独立したクレードを形成し、第３のPRKグループといえる。本研究では、アーキアPRKホモログの機能解析を目的とし、生化学的解析を行った。
【結果】メタン産生アーキアである、*M. hungatei*、*Methanosaeta thermophila*、*Methanosaeta concilii*三種のPRKホモログを、大腸菌リコンビナントタンパク質として発現し、精製酵素を用いてPRKとしての酵素学的解析を行った。その結果、全てのPRKホモログが、PRK活性を示した。それぞれ、*M. hungatei* PRKが (V_{max} = 29.3 ±1.7 μmol/min/mg protein, $K_{m(Ru5P)}$ = 0.28 ±0.05 mM, $K_{m(ATP)}$ = 12 ±0.4 μM)、 *M. thermophila* PRKが (V_{max} = 19.1 ±0.6 μmol/min/mg protein, $K_{m(Ru5P)}$ = 0.23 ±0.05 mM, $K_{m(ATP)}$ = 5.6 ±0.2 μM)、*M. concilii* PRKが (V_{max} = 43.8 ±2.8 μmol/min/mg protein, $K_{m(Ru5P)}$ = 0.31 ±0.08 mM, $K_{m(ATP)}$ = 18 ±2 μM) であった。これらの結果から、アーキアPRKホモログは光合成PRKと同様の反応を触媒する正真正銘のPRKであることが明らかになった。しかし、これらアーキアは、カルビンサイクルを構成する酵素の内、fuructose-6-phosphateからribulose-5-phosphateへの反応ステップを触媒する酵素遺伝子を欠いているため、アーキアPRKはカルビンサイクルとは異なる代謝経路で働いていると考えられる。本発表では、アーキアPRKが機能する代謝経路について議論したい。

archea, phosphoribulokinase, Calvin cycle

講演番号：3B11p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ B 校舎 11 会場

Streptococcus bovis のグルタミン酸脱水素酵素(GDH)特性について
Properties of the Glutamate dehydrogenase (GDH) from *Streptococcus bovis*
○安藤 太助[1]、菅原 瑶子[2]、西尾 僚平[3]、磯貝 恵美子[4]、米山 裕[5] ([1]東北大院農、[2]東北大院農、[3]東北大院農、[4]東北大院農、[5]東北大院農)
○Tasuke ANDO[1], Yohko SUGAWARA[2], Ryohei NISHIO[3], Emiko ISOGAI[4], Hiroshi YONEYAMA[5] ([1]Tohoku Univ., [2]Tohoku Univ., [3]Tohoku Univ., [4]Tohoku Univ., [5]Tohoku Univ.)

【目的】*S.bovis* は反芻動物の第一胃内に常在する乳酸菌であり、ルーメンアシドーシスの原因菌であることが知られている。本菌は乳酸菌の中で生体含窒素化合物を全て自己合成して増殖するという特異な性状を有しているが、窒素同化の詳細は明らかにされていない。そこで、主要な窒素同化酵素である GDH を本菌より精製し、その特性を探ることとした。
【方法】*S.bovis* JCM5802 株の *gdh* を組み込んだプラスミド pet15b-GDH をエレクトロポレーション法により *E.coli* BL21 (DE3)に導入し、IPTG 誘導により his-taq 付き GDH を大量発現する BL21 (DE3) pet15b を取得した。L 培地にて IPTG を添加して培養を行い、培養菌体を超音波処理して、細胞粗抽出液を調整した。HisTrap Chelating カラムを用い、イミダゾールバッファーで溶出し、活性の高い部分を回収、限外ろ過することで精製して性状を調べた。
【結果】GDH はイミダゾール濃度約 240mM で溶出された。精製後の GDH は 6.3 倍に濃縮され、収率は 13%、比活性は 361units/mg であった。約 48 kDa のサブユニットからなる 6 量体であることが明らかとなった。GDH の至適 pH は 7.5 および至適温度は 65℃であった。20~70℃、30 分間の加温処理後も 70~80%の比活性を保っていた。重金属イオン中では Cu^{2+}が最も強く GDH 活性を阻害し、Fe^{2+}および Mn^{2+}も強い阻害活性を示した。また、本 GDH はピルビン酸および NH4Cl からアラニンを生成するアラニンデヒドロゲナーゼ（ALD）活性を有することが示され、NADH ではなく NADPH を補酵素とすることが明らかとなった。アラニンからピルビン酸を生成する反応は、ほとんど活性が認められなかった。

Streptococcus bovis, glutamate, alanine

講演番号：3B11p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ B 校舎 11 会場

メチトロトーフ酢酸菌 *Acidomonas methanolica* における炭素源に応答した呼吸鎖電子伝達系の変換
Conversion of respiratory chain in response to carbon source in methylotrophic acetic acid bacterium, *Acidomonas methanolica*
幡田 准也、丸山 雅史、○阿野 嘉孝（愛媛大・農）
Junya HATADA,Masafumi MARUYAMA,○Yoshitaka ANO (Fac. Agr., Ehime Univ.)

【目的】*Acidomonas methanolica* JCM 6891 は、培地中の炭素源に応答して、酢酸菌型呼吸鎖とメチロトローフ型呼吸鎖を変換させるユニークな酢酸菌である。一般の細菌に比べ短絡的な酢酸菌型呼吸鎖は、酢酸発酵などの高速・高効率な有用物質生産に優位に機能し、メチロトローフ型呼吸鎖は、メタノールなどの C1 化合物からの効率の良いエネルギー生成に機能する。いずれの呼吸鎖も好気的呼吸鎖にもかかわらず、本菌は初発脱水素酵素だけでなく末端酸化酵素までも炭素源に特異的に誘導していることが報告されている(1)。本研究では、この呼吸鎖変換メカニズムおよび生理学的意義を明らかにするために、さまざまな炭素源で本菌を培養し、得られた菌体の呼吸鎖の形成を追跡して呼吸鎖変換要因の特定を試みた。
【方法】炭素源として、エタノール、グルコース、グリセロールおよびメタノールを用い、対数増殖期後期の菌体を回収した。得られた菌体をフレンチプレスにて破砕し、超遠心分離により可溶性画分と細胞膜画分を調製した。各画分の呼吸鎖関連酵素の活性およびシトクロム成分を SDS-PAGE にて解析し、形成された呼吸鎖型を確認した。
【結果】酢酸菌培養のよい炭素源であるエタノール、グルコース、グリセロールで培養した菌体の細胞膜画分には、初発脱水素酵素としてアルコール脱水素酵素（ADH）の活性が確認でき、ADH 由来のシトクロムサブユニット（75 kDa, 48 kDa）が SDS–PAGE 上で確認できた。一方、メタノールで生育させた菌体では、可溶性画分にメタノール脱水素酵素（MDH）の活性と、それとともに機能するシトクロム *c*（17 kDa）の誘導を確認した。興味深いことに、グルコース培養菌体の可溶性画分にも MDH 活性およびシトクロム *c* が確認できたことから、本菌のメチロトローフ型呼吸鎖の誘導はメタノール分子を認識しているのではないということが示唆された。また、グリセロール培養中の細胞にメタノールを添加して培養した菌体ではメチロトローフ型呼吸鎖が誘導され酢酸菌型呼吸鎖と共在したのに対し、メタノール培養中の細胞にグリセロールを添加した培養菌体ではメチロトローフ型呼吸鎖が単独で維持されていた。このことから、本菌は酢酸菌型呼吸鎖よりも、メチロトローフ型呼吸鎖を優先的に利用していることが推測された。末端酸化酵素についても調査したが、メチロトローフ型呼吸鎖で機能するシトクロム *c* 酸化酵素の活性は恒常的に発現していたのに対し、酢酸菌型呼吸鎖のユビキノール酸化酵素の活性は炭素源に応答した誘導が確認された。
(1) Matsushita K. *et al.*, *J. Biochem.,* 111, 739-747 (1992)

methylotroph, acetic acid bacteria, respiratory chain

講演番号：3B11p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ B 校舎 11 会場

Acetobacter 属酢酸菌における AarC の機能の検証
Function of AarC in acetic acid bacteria belonging to genus *Acetobacter*
貝沼（岡本） 章子[1]、○山本 有紀[1]、石川 森夫[1]、志波 優[2]、吉川 博文[2,3]、伊藤 公一[4]、小泉 幸道[1] ([1]東農大応生科・醸造、[2]東農大・ゲノムセンター、[3]東農大応生科・バイオ、[4]ミツカン中研)
Akiko Okamoto-Kainuma[1], ○ Yuki Yamamoto[1], Morio Ishikawa[1], Yuh Shiwa[2], Hirofumi Yoshikawa[2,3], Kouichi Itoh[4], Yukimichi Koizumi[1] ([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [2]Genome Research Center, Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Biosci., Tokyo univ. Agric., [4]Central Research Institute, Mizkan Group Corporation)

【目的】 酢酸菌は、酸化発酵により細胞表層のみでエネルギー代謝を行う一方、細胞内にも他の微生物と同様の基幹代謝経路を有しており、環境により使い分けを行って生育していると考えられている。酢酸菌の基幹代謝系の特徴としては、TCA サイクルにおいて、succinyl-CoA synthetase をバイパスする AarC の存在が挙げられる。本酵素は、acetic acid+succinyl-CoA→acetyl-CoA+succinic acid という反応を触媒し、酢酸発酵により生成する酢酸を直接 TCA サイクルの中間体に変換する機能を持つ。これにより酢酸菌は、酢酸発酵により大量に生じた酢酸に対して耐性を示すとともに、これを主要な代謝中間体として利用することができる（酢酸の過酸化現象）と言われているが、本酵素の機能及び菌体生理における役割についての検証は、いまだ充分には行われていない。本研究では、*Acetobacter* 属酢酸菌を用いて、本菌 AarC の機能について検証を行うことを目的とした。
【方法】*Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 株を供試菌株として使用した。培養は、YP 培地(yeast extract 1%, polypepton 1%）を基本培地とし、適宜炭素源（170mM）を加えて行った。プロテオーム解析にはアガロース 2 次元電気泳動法を用い、タンパク質スポットの同定は ESI-IT MS/MS 解析により行った。遺伝子の転写量は、ABI 7300 Real Time PCR System を用いた qRT-PCR 法により解析した。*aarC* 遺伝子の破壊は、カナマイシン耐性遺伝子をマーカーとし、相同組換えによる遺伝子置換により行った。*Acetobacter* 属酢酸菌 18 種からの *aarC* 遺伝子の抽出は、各菌株のドラフトゲノム配列上を検索して行った。
【結果】 プロテオーム解析及び qRT-PCR 解析の結果、エタノールを炭素源として培養した場合、酢酸発酵により生成した酢酸の過酸化期に AarC の発現量が増大することが確認された。*aarC* 遺伝子の破壊は酢酸の過酸化能の欠失を引き起こし、また破壊株の酢酸蓄積期の生菌数は著しく減少した。このことより、本酵素が *Acetobacter* 属酢酸菌の過酸化に必須であることが確認された。ゲノム配列検索の結果、*Acetobacter* 属酢酸菌は全て AarC を有しており、酢酸発酵を主要なエネルギー代謝経路とする本属酢酸菌の対酢酸戦略上、本酵素が重要であることが明らかとなった。また、グリセロールを炭素源とした時の挙動から、AarC が本菌株 TCA サイクルにおいて、succinyl-CoA synthetase の欠損を相補する主要酵素として機能していることも推測された。しかし、本酵素の破壊株は、グリセロールを炭素源とした好気条件下でも生育が可能であり、他の代謝経路が存在する可能性も示唆された。

Acetobacter pasteurianus, AarC, TCA cycle

講演番号：3B11p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ B 校舎 11 会場

酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 株における基幹代謝経路の動作機序
Probable flow manner of the central metabolic pathway in *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283

貝沼（岡本） 章子[1]、○吉田 将也[1]、石川 森夫[1]、小寺 義男[2]、大石 正道[2]、前田 忠計[2]、伊藤 公一[3]、小泉 幸道[1] ([1]東農大応生科・醸造、[2]北里大・理、[3]ミツカン中研)
Akiko Okamoto-Kainuma[1], ○Masaya Yoshida[1], Morio Ishikawa[1], Yoshio Kodera[2], Masamichi Oishi[2], Tadakazu Maeda[2], Kouichi Itoh[3], Yukimichi Koizumi[1] ([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [2]Center for Disease Proteomics. Sci., Kitasato Univ., [3]Central Research Institute, Mizkan Group Corporation)

【目的】食酢醸造に用いられる酢酸菌群は、エネルギー代謝経路としては、細胞膜上に存在する酸化発酵経路以外に、細胞内に通常の好気性細菌同様の基幹代謝経路を有しており、両者が連動して機能していると考えられている。しかし、これらの菌は、解糖系・TCA サイクル等に一部欠損が見受けられるものが多く、また AarC が TCA サイクルをバイパスしていることが特徴として知られている。酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* は静置発酵法で利用される酢酸菌であるが、グリオキシル酸経路を欠損しており、また TCA サイクル中、succinyl-CoA synthetase の欠損及び malate quinone oxidoreductase による malate dehydrogenase の代替がゲノム解析により明らかになっている。本研究では、本菌のこの特徴的な基幹代謝経路の動作機序について解析を行うことを目的とした。
【方法】*A. pasteurianus* NBRC3283 を供試菌株とし、YP 基本培地（yeast extract 1%, polypepton 1%）に各種炭素源（170mM）を加え、振とう培養（121rpm）を行った。プロテオーム解析はアガロース二次元電気泳動後、ESI-IT MS/MS 解析によりタンパク質スポットを同定して行った。各遺伝子の転写量の解析は、ABI 7300　Real Time PCR System を使用し、CYBR Green を用いた qRT-PCR 法により行った。各遺伝子の破壊は、相同組換えによる遺伝子置換により行った。
【結果】プロテオーム解析の結果、エタノールを炭素源として培養した時に、解糖系の二つの酵素 pyruvate phosphate dikinase と phosphopyruvate hydratase(enolase)の発現量が特徴的に増加することが観察された。qRT-PCR 解析の結果、これらの酵素遺伝子の転写量は、エタノール酸化期から生成酢酸の完全酸化期（過酸化期）にかけて顕著に増大することが確認され、酢酸発酵時に解糖系の末端 2 酵素が関与している可能性が示唆された。両酵素遺伝子の破壊は、いずれもエタノールの酸化（酢酸生成）には影響しなかったが、酢酸の過酸化能の欠失を引き起こし、また、乳酸を炭素源として培養した際の生育遅延も引き起こした。以上の結果から、本菌の TCA サイクルは、代謝中間体のリンゴ酸を malic enzyme によりピルビン酸に変換し、それを pyruvate phosphate dikinase の働きによりホスホエノールピルビン酸とした後、phosphoenolpyruvate carboxylase によりオキサロ酢酸を生成するというバイパス経路を主体としていることが強く示唆された。本経路は、AarC を介した酢酸のバイパスにより亢進した TCA サイクル後半部分の処理を行う上で機能的であり、酢酸発酵生理と整合性が高いと考えられる。

Acetobacter pasteurianus, TCA cycle, pyruvate phosphate dikinase

講演番号：3B11p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ B 校舎 11 会場

酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 株における GntR の機能
Function of GntR in *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283

貝沼（岡本） 章子[1]、○石川 泰平[1]、石川 森夫[1]、志波 優[2]、吉川 博文[2,3]、伊藤 公一[4]、小泉 幸道[1]([1]東農大応生科・醸造、[2]東農大・ゲノムセンター、[3]東農大応生科・バイオ、[4]ミツカン中研)
Akiko Okamoto-Kainuma[1], ○ Taihei Ishikawa[1], Morio Ishikawa[1], Yuh Shiwa[2], Hirofumi Yoshikawa[2,3], Kouichi Itoh[4], Yukimichi Koizumi[1] ([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [2]Genome Research Center, Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [4]Central Research Institute, Mizkan Group Corporation)

【目的】酢酸菌は酢酸発酵と呼ばれる特徴的なエネルギー代謝を行い、細胞膜上の脱水素酵素によるエタノールの酢酸への酸化と連動して ATP を生成する。本菌の細胞膜上に存在するアルコール脱水素酵素（Alcohol dehydrogenase ： ADH）は、この生理の中心的な役割を担い、細胞外のエタノールをアセトアルデヒドに酸化して酢酸発酵を開始する。我々は、酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 株において、転写調節因子 GntR が本酵素サブユニット I 遺伝子上流に結合し、その発現をポジティブに制御していることを見出した。[1,2)] しかし、本因子の酢酸菌生理および酢酸発酵における役割に関しては、不明瞭な部分が多い。本研究では、本因子について更なる知見を得ることを目的として種々の解析を行ったので報告する。
【方法】菌体は *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 株及びその *gntR* 破壊株[2)]を供試し、培養は、YP 基本培地(yeast extract 1%、polypepton 1%）にエタノールを適宜添加して行った。遺伝子の転写量解析は SYBR Green を用いた qRT-PCR 法により定量を行い、解析装置には ABI 7300 Fast Real-Time PCR System を使用した。トランスクリプトーム解析は、Illumina HIseq 2000 を用いた RNA-seq 法で行った。
【結果】本 GntR は、本菌 ADH の三つのサブユニット遺伝子を全てポジティブに制御しており、また他の主要膜結合性デヒドロゲナーゼ遺伝子の上流域とは結合しないことから、酢酸発酵に特異的な制御を行っている可能性が示唆された。*gntR* の破壊は、5%エタノール存在下ではアルデヒド生成量の低下を招き、本因子の ADH ポジティブレギュレーターとしての機能が確認されたが、1%エタノール存在下では、生成酢酸の完全酸化（過酸化）に遅延を引き起こし、本因子の酢酸菌生理への複雑な関与が示唆された。親株と本 *gntR* 破壊株においてトランスクリプトーム解析を行ったところ、酢酸発酵時及び過酸化への移行期に、*adh* を含む複数の遺伝子の発現量の差異が確認された。これらの遺伝子の多くは、上流域に本 GntR 結合配列を有していたが、本因子による制御様式は遺伝子により正・負いずれも存在することが示唆された。以上のことより、本 GntR は、*Acetobacter* 属酢酸菌において、多くの遺伝子を正負それぞれに制御して酢酸発酵生理全体をコントロールしている重要な因子であることが推測された。

1） 貝沼 （岡本）ら: 日本生物工学会 平成 23 年度大会講演要旨集, p. 172（2011）.
2） 貝沼 （岡本）ら: 日本生物工学会 平成 24 年度大会講演要旨集, p. 206（2012）.

Acetobacter pasteurianus, alcohol dehydrogenase, GntR

講演番号：3B11p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ B 校舎 11 会場

A Role of Transcriptional Regulator LldR in the Glutamate Metabolism in *Corynebacterium glutamicum*

○Tanyanut SUPKULSUTRA,Tomoya MAEDA,Kosuke KUMAGAI,Masaaki WACHI (Tokyo Inst. of Tech.)

Corynebacterium glutamicum is a gram positive, rod-shaped, aerobic bacterium used for the fermentative production of L-glutamate. LldR (NCgl2814) is known as a repressor for *ldhA* and *lldD* encoding lactate dehydrogenases. LdhA is responsible for production of L-lactate, while LldD is for its assimilation. Since lactate production was observed as a by-product of glutamate production under biotin-limited conditions, LldR might play a regulatory role in the glutamate metabolism. Here for the first time, we investigated effects of overproduction or deletion of LldR on the glutamate metabolism in *C. glutamicum*.

It was found that glutamate production under biotin-limited conditions was decreased by overproduction of LldR. In the wild-type cells, lactate was produced in the first 24 h and it was re-consumed thereafter. On the other hand, in the overproduced cells, lactate was produced like wild type, but it was not re-consumed. This means that lactate assimilation, which is catalyzed by LldD, was suppressed by the overproduction of LldR, but lactate production, which is catalyzed by LdhA, was not affected, indicating that LldR functions as a repressor for *lldD* but not for *ldhA* under biotin-limited conditions. This was confirmed by quantitative real-time RT-PCR. From these results, it is suggested that lactate metabolism, which is controlled by LldR, has a buffering function of pyruvate pool for glutamate production.

Reference:

Gao, Y.G., Suzuki, H., Itou, H., Zhou, Y., Tanaka, Y., Wachi, M., Watanabe, N., Tanaka, I., and Yao, M. (2008) Structural and functional characterization of the LldR from *Corynebacterium glutamicum*: a transcriptional repressor involved in L-lactate and sugar utilization. *Nucleic Acids Res.*, 36, 7110-7123.

Corynebacterium glutamicum, LldR, glutamate production

講演番号：3B11p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ B 校舎 11 会場

Corynebacterium glutamicum がグルタミン酸を排出する生理的意義の解析

Why does *C. glutamicum* secrete glutamic acid?

○高田 明香、山下 周子、和地 正明（東工大院生命理工）
○Haruka TAKADA,Chikako YAMASHITA,Masaaki WACHI (Tokyo Inst. of Tech.)

［はじめに］

Corynebacterium glutamicum は 1956 年にグルタミン酸生産菌として発見され、以来、グルタミン酸生産量の増加やグルタミン酸生産機構の解明を目指して精力的に研究されてきた。本菌にビオチン制限やペニシリン処理といった表層構造を変化させる処理を施すと、生育を止め、著量のグルタミン酸を生産する。本研究では *C. glutamicum* がなぜ特定の条件でグルタミン酸を生産するのか、その生理的意義の解明を目指した。

近年、グルタミン酸排出チャネルタンパク質 NCgl1221 が見出された。NCgl1221 欠損株は、グルタミン酸生産誘導処理を施してもグルタミン酸をほとんど排出せず、細胞内にグルタミン酸を蓄積する(1)。NCgl1221 はメカノセンシティブチャネル (MscS) のホモログで、膜張力の変化でチャネルが開閉する。現在知られている MscS の生理的機能は浸透圧ダウンショック時の細胞の浸透圧調節であるが、グルタミン酸排出能は *C. glutamicum* に特異的であり、何らかの特異な生理的機能を担うと考えられる。

［結果と考察］

野生株とグルタミン酸排出チャネル NCgl1221 欠損株を用い、両者の表現型の差を探索した。栄養培地およびビオチン制限による生産誘導培地での生育比較より、NCgl1221 欠損は *C. glutamicum* の通常の生育にほとんど影響を与えないことがわかった。また、グルタミン酸生産誘導時に NCgl1221 欠損株でのみ過剰発現する約 80 kDa のタンパク質を発見した。L 培地等の通常の培養では 80 kDa のタンパク質の過剰発現は認められないことから、細胞内へのグルタミン酸の蓄積に反応して 80 kDa タンパク質の発現が誘導されたと考えられる。今後、MALDI-TOF MASS によりタンパク質の同定を行う予定である。

(1) Nakamura J. Hirano S. Ito H. Wachi M. (2007) Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. Appl Environ Microbiol. **73**, 4491–4498

Corynebacterium glutamicum, glutamic acid, NCgl1221

講演番号：3B11p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ B 校舎 11 会場

Corynebacterium glutamicum のオキサロ酢酸供給強化に向けた代謝改変
Metabolic engineering for enhanced supply of oxaloacetate in *Corynebacterium glutamicum*
○萩原 拓也、下野 雄太、澤田 和典、和田 大、横田 篤（北大院農・応生科）
○Takuya Hagiwara,Yuta Shimono,Kazunori Sawada,Masaru Wada,Atsushi Yokota (Hokkaido Univ.)

【目的】アスパラギン酸やグルタミン酸を始めとするアミノ酸の発酵生産において，オキサロ酢酸（OAA）を TCA サイクルへ効率的に供給することは重要である．そこで我々は，アミノ酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* の OAA 供給能強化に向けた代謝改変を目指している．これまでの研究で，ピルビン酸キナーゼ（PYK）を欠失した株では基質であるホスホエノールピルビン酸（PEP）の過剰な蓄積を避けるためにアナプレロティック経路の酵素活性が変化し，PEP から OAA 生成方向へと代謝が傾いて，結果として OAA の供給が強化されていることが示唆された [1)]．ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PPC）は，PEP から OAA へのアナプレロティック反応を触媒している．またその活性は，アスパラギン酸およびα-ケトグルタル酸によってフィードバック阻害を受けることが知られている．したがって，PPC のアスパラギン酸によるフィードバック阻害の解除は OAA 供給強化に寄与すると考えられる．そこで，本研究では PPC フィードバック阻害脱感作（PPC^{fbr}）変異がアミノ酸生産に与える影響を解析した．また，PYK 欠失変異と PPC^{fbr} 変異を組み合わせた二重変異についても解析した．

【方法】野生株である *C. glutamicum* ATCC 13032 のゲノム上に二重相同組換え法により PYK 欠失変異または PPC^{fbr} 変異を導入した株，並びに両変異を導入した二重変異株を構築した．得られた株を種々のグルタミン酸発酵条件下で 2L ジャーファーメンターを用いて培養し，その発酵特性について解析を行った。

【結果】どの培養条件下でも，PPC^{fbr} 変異株は野生株よりもグルタミン酸およびアスパラギン酸生産量が増大しており，OAA の供給が強化されていることが示唆された．また，二重変異株では PYK 欠失並びに PPC^{fbr} の単独変異株よりもさらにアミノ酸生産量が増大したことから，2 つの変異は相乗的に OAA 供給強化に作用し，アスパラギン酸だけでなくグルタミン酸生産量の増加にも寄与することが示された．これらの結果を受けて，現在はオキサロ酢酸供給強化がリジン生産に与える影響の解析を行なっている．

1) Sawada, K., *et. al.*, *Metabolic Engineering*, **12**, 401-407 (2010).

Corynebacterium glutamicum, amino acid production, central metabolism

講演番号：3B11p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ B 校舎 11 会場

放線菌の新規窒素代謝の生理的意義

The physiological role of a novel nitrogen metabolism in actinomycete *Streptomyces coelicolor*

○小口 悠[1]、小林 卓矢[1]、高谷 直樹[2]、矢嶋 俊介[1]、祥雲 弘文[1]、池田 治生[3]、高野 英晃[4]、大澤 貫寿[1]、佐々木 康幸[1] ([1]東農大応生、[2]筑波大・生命研、[3]北里大・北里生命研、[4]日大生資科・生命セ)
○Haruka Oguchi[1], Takuya Kobayashi[1], Naoki Takaya[2], Shunsuke Yajima[1], Hirofumi Shoun[1], Haruo Ikeda[3], Hideaki Takano[4], Kanjyu Osawa[1], Yasuyuki Sasaki[1] ([1]Dept. of. Biosic., Tokyo Univ. of Agri., [2]Grad. Sci. of Life and Env. Sci., Univ. of Tukuba, [3]Inst. For Lifesci., Kitasato Univ., [4]LSRC. Fac. of Biore., Nihon Univ.)

【背景　目的】
近年、我々は脱窒放線菌 *Streptomyces antibioticus* に有機体窒素からの NO_2^-生産能を見いだし、NO を介した新規窒素代謝系の作業仮説を示した。全ゲノム解読済みである *S. coelicolor* A3 (2) M145 を用い、作業仮説の検証を行った。その結果 、新たに当初の仮説とは異なった [NO_3^-→NO_2^-→NO→NO_3^-]をたどる代謝系の存在を明らかとした。本代謝系は、好気的かつ窒素酸化物無添加条件において機能していた。興味深いことに、本代謝系には嫌気かつ NO_3^-存在下で生産される硝酸呼吸系の酵素として知られている膜結合型硝酸還元酵素 nitrate reductase (dNar)、そして外来の nitrosative stress の解毒酵素として知られる flavohemoglobin (Fhb)が関与していた。このような代謝系はこれまでに報告例がなく、本代謝系の生理的意義を解明することは、大変意義深い。

【結果】
本代謝系に関与する dNar および Fhb をコードする遺伝子の破壊株を作成した。固体培地上での親株と破壊株の形態観察を経時的に行った結果、NO_2^-生産条件下では作成した遺伝子破壊株すべてにおいて、親株とは異なる表現型が見られた。このユニークな代謝系は抗生物質生産と気中菌糸形成時期に顕著に影響しており、本菌の二次代謝に深く関与していた。さらに、関与が考えられる遺伝子群の発現解析や本代謝系の産物と表現型の関連を検証することにより、*S. coelicolor* A3 (2) M145 の新規窒素代謝系の意義を考察した。

streptomyces, nitric oxide, nitrogen metabolism

講演番号：3B12a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ B 校舎 12 会場

病原真菌 *Aspergillus fumigatus* の胞子におけるストレス耐性機構の解析
Stress torelance of conidia in a pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus*
○萩原 大祐、五ノ井 透、川本 進（千葉大真菌センター）
○Daisuke HAGIWARA,Tohru GONOI,Susumu KAWAMOTO (Chiba Univ.)

Aspergillus fumigatus はアスペルギルス症の主要な原因菌であり、免疫疾患を持つ患者に易感染性の日和見病原菌である。肺への胞子吸入が主な感染経路であるが、正常な免疫状態であれば免疫細胞の貪食により肺中の胞子は除去される。一方で免疫細胞が減少した状態では、貪食を回避するものや貪食されてもそれに打ち勝って発芽できる胞子が相対的に増加する。つまり、胞子の貪食耐性は病原性の強さを規定する要因の一つであると考えられる。

そこで本研究では *A. fumigatus* の胞子ストレス耐性機構の解明を目的とする。まず、胞子ストレス耐性能に関与すると考えられる bZIP 型の転写因子 AtfA に焦点を当て、遺伝子破壊株を作製した。*ΔatfA* 株は胞子が酸化ストレスや熱ストレスに感受性を示した。さらに、ストレス耐性に機能すると考えられているトレハロースの胞子内蓄積量が減少していることが解った。次に、AtfA を制御していると予想される HOG 経路に着目した。HOG 経路は二成分制御系と SakA MAPK カスケードから構成されており、それぞれの構成因子 SskA と SakA の遺伝子破壊株を作製した。*ΔsskA* 株の胞子は *ΔatfA* 株ほど顕著ではないものの、酸化ストレスや熱ストレスに弱く、胞子内トレハロース量も減少していた。一方で、*ΔsakA* 株ではストレス耐性能もトレハロース量も野生株と同等レベルであった。近縁の *A. nidulans* では SskA と SakA/HogA MAPK が共に胞子ストレス耐性能に機能しているが、*A. fumigatus* では異なる結果が得られた。これらの結果から、胞子ストレス耐性機構において SakA の機能をバイパスする因子の存在が示唆される。今後さらに、胞子ストレス耐性の制御経路の解明を目指すとともに、貪食耐性能や病原性についても調べる予定である。

Aspergillus, conidia, stress tolerance

講演番号：3B12a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ B 校舎 12 会場

糸状菌 *Aspergillus nidulans* リン酸基中間因子 YpdA とレスポンスレギュレーター SskA、SrrA の関係性の解明

Analysis of interactions between phospho-transmitter protein YpdA and response regulator SskA or SrrA in *Aspergillus nidulans*.

○緑川 裕良[1]、萩原 大祐[3]、中山 真由美[2]、吉見 啓[2]、阿部 敬悦[1,2] ([1]東北大院・生物産業創成、[2]東北大・未来研、[3]千葉大・真菌センター)
○ Yura MIDORIKAWA[1], Daisuke HAGIWARA[3], Mayumi NAKAYAMA[2], Akira YOSHIMI[2], Keietsu ABE[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]NICHe., Tohoku Univ., [3]MMRC, Univ. of Chiba)

【目的】His-Asp リン酸リレー情報伝達系はバクテリアから高等植物にまで保存される普遍的な環境応答機構であり、糸状菌でも広く保存されている。我々は，これまでに *Aspergillus nidulans* の高浸透圧応答経路について解析し、ヒスチジンキナーゼ NikA、リン酸転移中間因子 YpdA、レスポンスレギュレーター SskA および SrrA が浸透圧応答や酸化ストレス応答などに関与していることを明らかにしている[1)]。YpdA は、遺伝学的に欠損が致死であることが証明されているが、その原因の解明には至っていない。我々は、 YpdA の機能を解析するため、*alcA* プロモーターを用いて *ypdA* 遺伝子の発現を制御可能な Conditional-*ypdA* 株（ CypdA 株）を造成し、その表現型解析を進めてきた。これまでに、 *ypdA* の発現を抑制すると液体培養において著しい生育悪化を示すことや菌糸形態の異常を示すこと、下流の HOG 経路が活性化することが明らかになっている。また、CypdA 株において *sskA* 遺伝子を破壊すると、CypdA 株に認められた *ypdA* 抑制時の生育悪化が限定的に回復することも報告している。しかしながら、SskA 経路遮断による C*ypdA* 株の生育回復が限定的な理由や、SrrA 経路との関係性については何の知見も得られていない。そこで本研究では、*srrA* 遺伝子を破壊した CypdA 株(CypdA-*srrA*Δ 株)および *sskA* と *srrA* を破壊した CypdA 株 (CypdA-*sskA*Δ*srrA*Δ 株) を造成し、その表現型解析から、YpdA と SskA、SrrA の関係性について解明することを目的とした。
【方法・結果】CypdA-*srrA*Δ 株を造成するため、まず *srrA*Δ 株を造成し、*srrA*Δ 株における *ypdA* 遺伝子のプロモーター領域を炭素源により発現制御可能な *alcA* プロモーターへと置換した。次に、CypdA-*sskA*Δ*srrA*Δ 株を造成するため､以前より取得していた *sskA*Δ 株の *srrA* 遺伝子を破壊した *sskA*、と *srrA* の二重破壊株を造成し、この二重破壊株を基に CypdA-*sskA*Δ*srrA*Δ 株を造成した。得られた CypdA-*sskA*Δ*srrA*Δ 株の表現型を解析したところ、Cypd 株にみられた *ypdA* 発現抑制時の生育悪化は認められず､*ypdA* 発現抑制時の生育悪化は *sskA* と *srrA* の両遺伝子を破壊することで大幅に回復することが明らかになった。また、HOG 経路の下流遺伝子の異常活性化、菌糸形態の異常も示さず、YpdA 欠損の致死性メカニズムが SskA 経路 と SrrA 経路の両方に依存することが示唆された。現在、取得した CypdA-*srrA*Δ株を用いて､YpdA と SrrA 経路の関係について詳細に解析を進めるとともに､ウェスタン分析により各変異株における *ypdA* 発現制御時の YpdA タンパク質の発現量の変動, および YpdA 発現量と HOG 経路のリン酸化レベルの関係性について解析を進めている。(生研センターイノベーション創出基礎的研究推進事業の支援を受けた。) 1)Furukawa K, Mol Microbiol. 2005 Jun;56(5):1246-61.

Aspergillus nidulans, His-asp phosphorelay, Response regulator

講演番号：3B12a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ B 校舎 12 会場

糸状菌 *Cryphonectria parasitica* の低分子量 GTP 結合タンパク質

Small GTP-binding proteins in the filamentous fungus *Cryphonectria parasitica*.

○望月 翔子[1]、山内 優輝[1]、後藤 由貴[1]、高橋 拓也[1]、鈴木 信弘[2]、笠原 紳[1] ([1]宮城大・食産業・環境、[2]岡山大・資植研)
○Shoko MOCHIZUKI[1], Yuki YAMAUCHI[1], Yuki GOTO[1], Takuya TAKAHASHI[1], Nobuhiro SUZUKI[2], Shin KASAHARA[1] ([1]Miyagi Univ., [2]Okayama Univ.)

糸状菌 *Cryphonectria parasitica*（旧 *Endothia parasitica*）は，凝乳活性をもつ酸性プロテアーゼを高産生し，農芸化学分野では古くから研究の対象とされてきたが，クリなどの果樹に対して胴枯病を引き起こす植物病原菌でもあり，100 年余り前に日本から米国東部に貨物に付着してもたらされた本菌が，感受性の高いアメリカグリ（American Chestnut）を山野からほぼ一掃したことは植物病理学史上，特に有名である。本菌のゲノム解析はほぼ終了しており，Ras スーパーファミリーに属する低分子量 GTP 結合タンパク質が，少なくとも 4 つ存在することが認められている。そのうち 3 つ（RAS1, RAS2 および RAS3）について，主に遺伝子破壊により機能の推定を行ったので報告する。

① RAS1 遺伝子である *ras1* の破壊株（Δ*ras1*）は，野生株と比較して細胞およびコロニーの形態は非常に大きく変化しており，細胞は酵母状・卵形で，寒天培地上の成長速度は著しく低下していた。一方，液体培地中においては，多くの細胞が菌糸状の正常形態を維持していた。クリ幹への病原性は消失していた。また，野生株と比較した場合，細胞壁溶解酵素により容易にスフェロプラスト化されることから，細胞壁多糖の構成や構造に変化が生じている可能性が考えられた。現在，細胞壁多糖を分画し，各々の構造を NMR 解析やメチル化分析により解明している。

② RAS2 遺伝子である *ras2* の破壊株（Δ*ras2*）は，野生株と比較して寒天培地上では約 55%の成長速度低下が見られた。顕微鏡観察では，野生株と比較して細胞形態は変化していなかったが，クリ幹に対する病原性は低下していた。

③ RAS3 遺伝子である *ras3* の破壊株は，上記Δ*ras2* と同様に，野生株と比較して寒天培地上では約 40%の成長速度低下が見られた。顕微鏡観察では，野生株と比較して細胞形態は変化していなかったが，クリ幹に対する病原性は低下していた。低分子量 GTP 結合タンパク質の多くは，C 末端に CAAX box と呼ばれる脂質付加コンセンサス配列をもち，その配列中のシステインがファルネシル化等されて細胞膜へのアンカーリングが行われているが，RAS3 はこの CAAX box を欠いていた。RAS3 の細胞内局在を観察するために GFP と融合させた RAS3 を発現させたところ，細胞表層に強い蛍光が認められた。C 末端 32 アミノ酸を欠失させた RAS3 は，この局在を示さず，細胞質全体に分散して発現していた。このことから，C 末端 32 アミノ酸がファルネシル基に替わり膜結合に関与している可能性が示された。また，RAS3 の GTP 結合能や GTPase 活性等の生化学的性質を調べるために，大腸菌中で RAS3 を発現させ，精製した。

filamentous fungus, signal transduction, G-protein

講演番号：3B12a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ B 校舎 12 会場

酵母の鉄硫黄クラスタータンパク質形成に関わる Tah18 タンパク質の NOS 様活性の制御機構
Regulation of NOS-like activity of Tah18 that is involved in Fe-S cluster protein biogenesis in yeast

○川原 寛弘、西村 明、高木 博史（奈良先端大バイオ）
○Nobuhiro KAWAHARA,Akira NISHIMURA,Hiroshi TAKAGI (Grad. Sch. Biol. Sci. , Nara Inst. Sci. Tech)

【目的】当研究室では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において一酸化窒素（NO）が高温や酸化ストレス耐性に寄与することを明らかにし、酵母の NO 合成酵素（NOS）様タンパク質として Tah18 を同定している。哺乳類では、NOS がアルギニンを基質とし、NADPH と酸素を消費することで NO とシトルリンを合成する。しかし、Tah18 の一次構造には NOS 活性に必須であるオキシゲナーゼドメインが欠落しており、NO の合成機構は明らかになっていない。最近、Tah18 は Dre2 タンパク質と複合体を形成し、細胞質や核の鉄硫黄クラスタータンパク質の形成に関わることが報告された。また、高濃度の過酸化水素処理によって両者の相互作用が解離し、Tah18 がミトコンドリアに局在することで細胞死を誘導すると考えられている。そこで、本研究では高温ストレス下での NO 生成機構の解明を目的とし、Dre2 が Tah18 の NOS 様活性に及ぼす影響、および高温ストレス下での NO 生成とその制御機構について解析した。

【方法・結果】Dre2との相互作用がTah18のNOS様活性に及ぼす影響を検討するため、Dre2遺伝子の上流にガラクトース誘導性プロモーターを組み込んだ条件的破壊株を作製し、細胞内のDre2発現量を変化させながらNOS活性を測定した。その結果、細胞内のDre2発現量の減少に伴い、NOS活性が上昇することが明らかになった。次に、Dre2がTah18のNOS様活性を直接的に阻害しているかを検討した。大腸菌から精製した組換えタンパク質を用いて、*in vitro*の反応系にDre2を添加し、Tah18のNOS様活性を測定した。その結果、Dre2含量の増加に伴い、生成するNOレベルは顕著に低下した。これらの結果から、Dre2はTah18と相互作用することで、Tah18のNOS様活性を抑制する因子であると考えられた。通常、Tah18-Dre2複合体は鉄硫黄クラスタータンパク質の形成に関与しているが、酸化ストレス時にはこの相互作用が解離し、Tah18が遊離することでNOS様タンパク質として機能するという可能性が示唆された。さらに、高温ストレス下では極めて早い時間から細胞内にNOが生成するが、その機構はTah18やDre2の転写レベルの誘導ではなく、タンパク質レベルの制御によるものであると考えられた。

また、酵母では Tah18-Dre2 複合体が解離すると、細胞死が誘導されるが、この複合体はストレスに応答して、細胞の生死を NO によって制御する機能を有しているのではないかと考え、現在、各条件下における Tah18-Dre2 複合体の形成や解離の検出を試みている。

nitric oxide, yeast, Fe-S cluster

講演番号：3B12a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ B 校舎 12 会場

出芽酵母におけるチオレドキシンの生理学的役割
Physiological roles of thioredoxin in the budding yeast
○奥 公秀、島並 祐子、阪井 康能（京都大学大学院　農学研究科　応用生命科学専攻）
○Masahide OKU,Yuko SHIMANAMI,Yasuyoshi SAKAI (Div. of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ.)

研究の背景
チオレドキシンは細胞内の重要な電子供与体として機能するタンパク質であり、出芽酵母の細胞質には 2 種類存在することが知られている。そのうちのひとつをコードする遺伝子（TRX2）は、活性酸素種（ROS）の添加時や増殖定常期に転写量が増大することが報告されている。これまでにこの遺伝子破壊株の表現型として、外部からの ROS 添加に対する耐性の低下があることが知られてきたが、より生理学的な条件での表現型はほとんど知られていなかった。そこで本研究で私たちは TRX2 の新たな生理学的役割を見出すことを企図した。
方法と結果
私たちが開発した細胞内レドックス状態を検知するセンサータンパク質、レドックスフロールを複数のチオレドキシン遺伝子破壊株に導入し、細胞内レドックス状態を顕微鏡観察により可視化し野生株と比較した。通常の培養条件（グルコース培養）では TRX2 破壊株と野生株とではレドックス状態に顕著な差は見られなかった。そこで私たちは、酵母を非発酵炭素源培養や飢餓・高温といった様々な条件に移し、TRX2 破壊株と野生株とでレドックス状態に差が生じる条件を探索したところ、複数の条件で TRX2 遺伝子破壊株の細胞内酸化が見出された。これらの条件では TRX2 破壊株の生育度、生存率も野生株と比較して低下していたことから、TRX2 が細胞内レドックスの制御を通じた生理学的役割を担っていることが示された。

redox, thioredoxin, yeast

講演番号：3B12a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ B 校舎 12 会場

遺伝子発現プロファイル解析により示された *Saccharomyces cerevisiae* における圧力感受性と呼吸欠損の関連性

Relationship between barosensitivity and respiration deficiency indicated by genomics in *Saccharomyces cerevisiae*

○野村 一樹[1]、岩橋 均[1]、井口 晃徳[2]、重松 亨[2] ([1]岐阜大院連農、[2]新潟薬大応生科)
○Kazuki NOMURA[1], Hitoshi IWAHASHI[1], Akinori IGUCHI[2], Toru SHIGEMATSU[2] ([1]Gifu Univ., [2]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

【目的】高圧技術は、従来の加熱加工技術に比べて食品の品質劣化が少ない非加熱加工技術のひとつであり、新規の食品加工技術として注目されている。しかし、主な発酵食品生産に利用される酵母株は、高圧技術を用いた発酵制御が難しい。我々は、高圧技術を発酵制御に応用するために、圧力感受性機構の解明を目指して研究を進めている。実験室酵母株 *Saccharomyces cerevisiae* KA31a 株を親株として UV 照射法により取得した変異株 a924E1 株は、EtOH 発酵能が親株と同等でありながら圧力に対して有意に感受性を示す、発酵制御への応用に理想的な圧力感受性変異株である。実用株へ応用するには圧力感受性変異遺伝子の特定が必須であるが、UV 照射法による変異導入の為に難しい。DNA microarray 法を用いて、圧力感受性変異導入による遺伝子発現量の変動を解析した結果、変異株の呼吸機能の欠損が示唆された。そこで呼吸機能が圧力感受性にどのような影響を与えるか解析した。
【方法・結果】遺伝子発現量は、変異株および親株の定常期細胞から total RNA を抽出し、Yeast オリゴ DNA microarray を用いて、1 色アレイ法により解析した。クオンタイル法により正規化し、MPIS データベース(http://www.helmholtz-muenchen.de/en/ibis)で機能分類解析を行った結果、‘Energy’機能に分類される“Respiration”や、 ‘Biogenesis of cellular components’機能に分類される “Mitochondrion”に関連する機能を持つ遺伝子の発現量低下が認められた。また局在位置で分類した結果、‘Mitochondria’に局在するタンパク質をコードする遺伝子の発現量低下が認められた。これらの結果は mitochondrial DNA (mtDNA)に起因する呼吸機能の欠損を示唆した。Glycerol 寒天培地上でコロニー形成能を解析した結果、変異株のコロニーが確認できず、呼吸機能の欠損が認められた。PCR 法により mtDNA の欠失領域を解析したところ、変異株の *COX1* 遺伝子近傍の領域の欠失が示された。*COX1* がコードする Cytochrome C oxidase は電子伝達系において､複合体Ⅳとして電子伝達に関連する重要な酵素である。これらの結果は、変異株が電子伝達系の機能低下により呼吸機能欠損を引き起こしたことを示している。このことは呼吸機能欠損の為に圧力傷害からの回復に必要なエネルギーが不足した結果、間接的に圧力感受性が寄与された可能性を示唆した。しかし、呼吸機能欠損と圧力感受性の関連は明らかとなってはいない。そこで我々は、親株から新たな呼吸欠損株を単離して、それらの圧力感受性を解析した。呼吸欠損株は自然突然変異で出現するマイクロコロニーから単離した。PCR 法により mtDNA を解析したところ、mtDNA を持たない ρ^0 変異株の可能性が示唆された。ρ^0 株と変異株、親株の圧力死滅を比較して、呼吸機能欠損が圧力感受性に及ぼす影響を評価した。

Saccharomyces cerevisiae, barosensitivity, mitochondria

講演番号：3B12a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ B 校舎 12 会場

Saccharomyces cerevisiae UV 変異株の圧力損傷からの回復機能に関わる変異の解析
Mutation of recovery function from high pressure damage of *Saccharomyces cerevisiae*
○南波 優[1]、野村 一樹[1]、斎木 朋恵[1]、木戸 みゆ紀[2]、林 真由美[1]、井口 晃徳[1]、重松 亨[1]([1]新潟薬大・応生科、[2]新潟産業創造機構)
○Masaru NANBA[1], Kazuki NOMURA[1], Tomoe SAIKI[1], Miyuki KIDO[2], Mayumi HAYASHI[1], Akinori IGUCHI[1], Toru SHIGEMATSU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]NICO)

発酵食品の製造において過発酵が起こると味の劣化や容器の膨張を引き起こす。我々は、これを防ぐ発酵制御技術として、食品の有用成分や構造の破壊が少ない圧力処理による非加熱殺菌を応用するための研究を進めている。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の不活性化には 100 MPa 以上の超高圧を必要とする。*S. cerevisiae* の圧力耐性・感受性機構を解明し、耐性・感受性を制御することは、より低い圧力条件での発酵制御を可能とする。これまでに、一倍体酵母 *S. cerevisiae* KA31a 株へ紫外線照射を行い、圧力耐性変化株 a1210H12 株を取得した。225 MPa の圧力処理を行い、a1210H12 株の死滅挙動の解析を行った。コロニーカウント法および 960 本 MPN 法から求めた生菌数と、HT-PIKAS 法[1]によって求めた液体培養における増殖曲線を比較することで、圧力損傷からの回復に要する時間(lag time)の算出を行った。親株では圧力損傷からの回復のため、増殖の遅れた細胞の存在が示された。a1210H12 株ではこの増殖遅延細胞が存在しなかったため、圧力損傷からの回復機能の欠損が示唆された[2]。

本研究では、我々が保有する圧力感受性株 a924E1 と紫外線照射により新しく取得した圧力耐性株 a2568D8 に 225 MPa の圧力処理を施し、a1210H12 株と同様の手法で (lag time)の算出を行った。コロニーカウント法と HT-PIKAS 法による生菌数の比較の結果、a924E1 株、a2568D8 株共に HT-PIKAS による見かけの生菌数が低い結果となり、コロニーカウント法と 960 本 MPN 法による生菌数の比較ではどちらの株もほぼ同等の生菌数であった。この結果から、コロニー形成能の低下による生菌数の差ではなく、圧力処理により lag time が増大した可能性が示された。圧力処理後、寒天培地上に形成されたコロニーのサイズを測定したところ小さなコロニーの形成が確認された。以上の結果から a924E1 株、a2568D8 株では圧力損傷により生じた増殖遅延細胞が存在することが示唆された。これをもとに圧力による損傷を致死の損傷、増殖遅延を起こす損傷、増殖に影響のない損傷に分類し、それぞれの株における損傷細胞の割合を比較した。a2568D8 株では親株に比べ増殖遅延細胞の割合が増加していた。a924E1 株では増殖遅延細胞の割合と増殖に影響のない細胞の割合が減少していた。以上のことから a2568D8 株は圧力損傷からの回復機能が増加し圧力耐性を獲得し、a924E1 株は圧力損傷からの回復機能が減少し圧力感受性を獲得した可能性が示された。増殖遅延細胞を引き起こす圧力損傷からの回復機能を変化させる変異が生じることで、圧力耐性・感受性が変化することが示された。本研究の一部は、JST-CREATE により実施した。

[1] Hasegawa *et al*. J. Biosci. Bioeng. (2012), [2]南波ら 日本農芸化学会 2012 年次大会

Saccharomyces cereviciae, barotolerance, UV mutagenesis

講演番号：3B12a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ B 校舎 12 会場

出芽酵母のアセトアルデヒド耐性機構における NADP 依存型アセトアルデヒド脱水素酵素の役割
Physiological role of NADP-dependent aldehyde dehydrogenase in the acetaldehyde tolerance of the yeast

○松山 明加[1]、松藤 淑美[2]、太田 真由美[3]、早川 享志[1,3]、中川 智行[1,3]（[1]岐阜大院応生、[2]岐阜大、[3]岐阜大応生）
○Haruka MATSUYAMA[1], Yoshimi MATSUFUJI[2], Mayumi OHTA[3], Takashi HAYAKAWA[1,3], Tomoyuki NAKAGAWA[1,3] ([1]Gifu Univ., [2]Gifu Univ., [3]Gifu Univ.)

【目的】

アセトアルデヒドは、タンパク質や DNA などと生体内で付加体を形成することで毒性を示す揮発性化学物質である。アセトアルデヒドはアルコール発酵においても重要な代謝中間体であることから、出芽酵母はアセトアルデヒドに対する何らかの耐性機構を獲得しているものと考えられる。これまでに我々は、ペントースリン酸経路（PPP）がアセトアルデヒド耐性機構において非常に重要な役割を担っていることを明らかにしてきた[1,2]。PPP の主な役割として NADPH の産生が挙げられるため、これまではオレイン酸合成やグルタチオン還元といった NADPH の消費系に着目し、解析を行ってきた[1,3]。その一方で、アルデヒド脱水素酵素（ALD）も NADPH 再生系として重要な機能をもつことが知られており[4]、中でも *ALD6* はアセトアルデヒド耐性関連遺伝子として同定されている[1]。本研究では、NADP 依存型 ALD に着目し、アセトアルデヒド耐性機構における役割について検討した。

【方法・結果】

出芽酵母の細胞内 NADPH および NADP 量を測定したところ、細胞にアセトアルデヒドストレスを加えることで細胞内 NADPH および NADP 量が有意に増加した。また、炭素源としてグルコース、グリセロール、エタノールを用いた時の出芽酵母のアセトアルデヒド耐性能を比較したところ、グルコース生育に比べ、その代謝過程で PPP を経由しないグリセロールとエタノール生育では出芽酵母のアセトアルデヒド耐性能は明らかに低下した。よってアセトアルデヒド耐性では、PPP は NADPH 再生系として重要であることが推測される。一方、ALD のうち、NADP 依存型として知られているものに *ALD4*、*ALD5*、*ALD6* があり、特に *ALD6* は PPP 欠損において非常に重要な NADPH 再生系としての役割を担っていることが既に報告されている[4]。*ald6*Δ株がアセトアルデヒドに対して非常に強い感受性を示すことをふまえると、Ald6p はアセトアルデヒドの消去のみならず、NADPH 再生系としても重要な役割を果たしていることが推測される。

1）Matsufuji *et al*. 2008. *Yeast* 25:825-833.
2）Matsufuji *et al*. 2010. *J. Basic Microbiol*. 50:494-498.
3）Matsufuji *et al*. 2012. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. in press.
4）Grabowska *et al*. 2003. *J. Biol. Chem*. 278:13984-13988.

acetaldehyde tolerance, Saccharomyces cerevisiae, aldehyde dehydrogenase

講演番号：3B12a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ B 校舎 12 会場

過酷な環境から単離された藻類の環境ストレス耐性機構

Mechanism of environmental stress tolerance of microalgae isolated from severe environments

○二ノ宮 千夏、甫木 隼貴、高橋 妙華、尾関 海、加藤 ひとみ、新村 洋一、川崎 信治（東農大応生科）
○Chinatsu NINOMIYA,Junki HOKI,Taeka TAKAHASHI,Kai OZEKI,Hitomi KATOU,Youichi NIIMURA,Shinji KAWASAKI (Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agric)

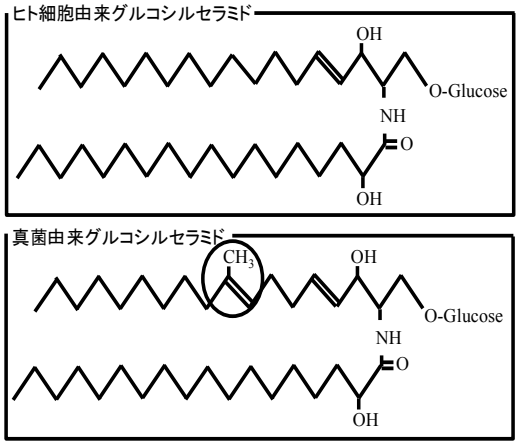
【目的】光合成生物は、強光が付随する高塩濃度、乾燥、高温や低温などの環境ストレスが混在する過酷な環境下では、光合成反応が阻害され生育は困難である。当研究グループでは、生物の生存が一見不可能かと思われる真夏のアスファルトや砂漠土壌などの、自然界の様々な過酷な環境から藻類の単離に成功した。単離された藻類はその単離源の特徴から、高度なストレス耐性機構を有していることが推察された。本学会では過酷な環境に生育する藻類の探索と、単離された藻類のストレス耐性期の分子応答に関して報告する。
【方法・結果】過酷な環境の表面土壌から単離された藻類のうち、培養に成功した菌体を使用して強光条件下で乾燥ストレス、塩ストレスを付与しその経過を観察した。モデル藻類であるクラミドモナスが白色化し死滅したが、単離株は長期間生存し、その後の回復実験で緑色に回復した。現在は単離株中で優れたストレス耐性能を示した株数種を用いて、ストレス耐性期のプロテオーム解析や HPLC による色素、糖などの生体内成分解析を行い、個々の菌株に応じたストレス耐性機構の推定を行っている。

microalgae, environmental stress

講演番号：3B12a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ B 校舎 12 会場

植物抗菌性蛋白質 AFP1 の標的認識部位の同定
Identification of the target recognition site of plant antifungal peptide AFP1
○小黒 芳史、山崎 晴丈、高木 正道、高久 洋暁（新潟薬大応生科）
○ Yoshifumi OGURO,Harutake YAMAZAKI,Masamichi TAKAGI,Hiroaki TAKAKU（Niigata Univ of Pharmacy and Applied Life Sciences）

植物には哺乳動物のような適応免疫がないため、自然免疫である抗菌性蛋白質による生体防御機構は非常に重要なシステムである。我々は前大会までに、植物抗菌性蛋白質の 1 つであるカラシナ由来ディフェンシン AFP1 が、日和見感染菌 *Candida albicans* に作用し、細胞膜の脱分極及び活性酸素種の誘導蓄積を引き起こし、高い抗菌作用を示すことを明らかにしてきた。さらに、細胞膜に存在するグルコシルセラミド(GlcCer)が、抗菌活性に関する重要な因子であることも明らかにしてきた。本大会では、すでに構築済みの組換え酵母を利用した大量生産・精製システムより得られた AFP1 を利用して、抗菌活性に関する重要因子 GlcCer の分子構造と AFP1 抗菌活性強度の関連性ついて解析した結果を報告する。



GlcCer は、ある種の真菌、ヒト細胞も有しており、特にヒト細胞では、恒常性の維持に関与する重要な因子として知られている。これまでに GlcCer は、抗菌活性に関する重要な因子であることを報告し、GlcCer を有する生物は、AFP 感受性を示すことが予想されていた。しかしながら、ヒト細胞は AFP1 非感受性を示した。そこで AFP1 感受性真菌とヒト細胞の GlcCer 構造の相違点に注目し、比較した結果、AFP1 感受性真菌の有する GlcCer は、ヒト細胞の有する GlcCer と次の 2 点で異なることが判明した（右図参照）。①長鎖塩基側鎖の 9 番目の炭素にメチル基を有する。②長鎖塩基側鎖の 8、9 番目の炭素間に二重結合を有する。そこで我々は、AFP1 感受性真菌 *C. albicans* を利用して、メチル基・二重結合を欠失した GlcCer 構造を有する *C. albicans* 変異株(*Δsld1*) とメチル基を欠失した GlcCer 構造を有する *C. albicans* 変異株(*Δmts1*)を作製した。しかし、作製した変異株は、野生株と比較して GlcCer 含有量が低下していたため、GlcCer 合成酵素遺伝子を過剰発現させ、細胞あたりの GlcCer 含有量を野生株と同程度以上まで増加させ、AFP1 抗菌活性強度の検討を行った。その結果、*Δsld1* 株、*Δmts1* 株は、共に野生株と比較して AFP1 低感受性を示した。特にメチル基・二重結合欠失 GlcCer 構造を有する*Δsld1* 株の低感受性の程度は大きかった。すなわち、AFP1 の抗菌活性強度には、GlcCer 分子構造上のメチル基、二重結合部位の認識が大きく関与していることが示唆され、また、AFP1 の抗菌作用は、特異性が高いことが考えられた。

defensin, antifungal activity, *C. albicans*

講演番号：3B12a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ B 校舎 12 会場

高温条件下における耐熱酵母の阻害剤に対する検討
The investigation of thermotolerant yeast against the inhibitors under high temperature
○村田 善則[1]、アピワタナピワット ワラポーン[2]、廣岡 明子[1]、ダンジャレーン ハタイラット[2]、ラグサワ―ン プラパソン[2] ([1]国際農研センター、[2]カセサート大・生産改良研究所)
○ Yoshinori MURATA[1], Wraporn Apiwatanapiwat[2], Akiko Hirooka[1], Hatairat Dangjarean[2], Prapassorn Rugthaworn[2] ([1]JIRCAS, [2]KAPI)

＜はじめに＞
高温におけるエタノール生産は、冷却エネルギーの削減、並行複発酵の効率化の向上、発酵タンクへのコンタミネーションの減少などの点から有利な発酵技術と考えられる。我々はタイにおいてキャッサバ廃棄物からエタノール生産を目指した酵母の開発を行っている。これまで自然界から耐熱酵母 *Kluyveromyces marxianus*Y2 株を分離した。本研究では、分離した *K. maxianus* 株を用いて阻害剤（5-hydroxymethylfurfural、furfural）及び有機酸（酢酸、乳酸）の生育への影響について調べた。また *S.cerevisiae* ゲノム由来の酢酸耐性に係る遺伝子を Y2 株に導入し、酢酸ストレスに対する効果について調べた。
＜方法＞
Y2 株を YPD 培地で前培養し、その後 5-HMF, furfural、酢酸、乳酸をそれぞれ添加した YPD 培地に接種し 600nm で生育を測定した。阻害剤を添加した培地での Y2 株の生育は、30℃と 42℃で測定した。遺伝子導入の際の栄養要求株分離のため Y2 株を 5-FOA を含む SD plate に塗布して Ura-変異株（Au15 株）を取得した。*S.cerevisiae* ゲノムより PCR 増幅した URA3 を pBluescript SK(+/-) にライゲーションし、同様に *S.cerevisiae* ゲノムから PCR 増幅した遺伝子（genes: *ARL1*, *MNN9*, *ERG3*, *NRG1*, *KRE9*, and *SCH9*）を URA3 とタンデムになるように挿入した pBlue URA3/gene を構築した。このプラスミドベクターより遺伝子を調製し Ura-変異株に導入した。
＜結果＞
フラール類では、5-HMF が 50mM で furfural は 70mM でそれぞれ Y2 株の生育を阻害した。有機酸については、50mM 酢酸により Y2 株の生育が阻害されたが、乳酸は 300mM でも完全には阻害されなかった。同じ濃度の有機酸の場合温度が 30℃と 42℃では、高温のほうがより大きな生育阻害を示した。*S.cerevisiae* 由来の酢酸ストレスに関わる遺伝子を *K. marxianus* へ導入するため、*K. marxianus* Y2 株から誘導した Ura-変異株のうち、高い形質転換効率を示す株を選抜した（Au15）。Au15 株に pBlue URA3/gene から調整した遺伝子を酢酸リチウム法により導入し、Ura-変異株への相補により形質転換株を選別した。形質転換株のうち親株よりも酸耐性が向上した株を分離した。酸耐性を示す株について導入した遺伝子が Y2 株染色体に局在することを確認した。導入した遺伝子の機能から、形質転換体の酸耐性機構について考察する。

Inhibitors, High temperature, Kluyveromyces marxianus

講演番号：3B12a15
講演日時、会場：3 月 26 日 11:48～ B 校舎 12 会場

DNA マイクロアレイを用いたタイプ B トリコテセン系マイコトキシンの毒性評価
A comprehensive gene expression analysis of type B trichothecenes and the evaluation of the toxicity.
○鈴木 忠宏、岩橋 由美子 (農研機構.食総研)
○Tadahiro SUZUKI,Yumiko IWAHASHI (NARO/NFRI)

【目的】デオキシニバレノール (DON) やニバレノール (NIV) 等のタイプ B トリコテセン系マイコトキシンによる作物汚染は、世界各地で頻繁に報告されている。これまで動物試験による急性毒性及び慢性毒性が報告され、細胞レベルの毒性試験によってタンパク質合成阻害のような代表的な毒性作用機構が明らかにされてきた。しかし、DON や NIV の中間体であり、汚染報告も多い 3-あるいは 15-acetyl-DON, 4-acetyl-NIV 等の毒性に関する詳細な評価は、親化合物である DON や NIV と比べて報告が少ない。これは代謝によって各アセチル化体が脱アセチル化されることに起因する。しかし、細胞レベルの試験においては各アセチル化体及びその親化合物の毒性が異なる事が報告されていた。そこで、本研究では網羅的遺伝子発現解析によって細胞レベルにおける毒性の違いを明らかにし、各化合物の潜在的な毒性のリスクを評価した。

【方法】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4743 の多剤耐性トランスポーター遺伝子 *PDR5* の変異株培養液に対して DON, 3-acetyl-DON, 15-acetyl-DON, NIV, 4-acetyl-NIV をそれぞれ終濃度が 25ppm となるように添加し、ジメチルスルホキシド(DMSO)を添加したものをコントロールとして 25℃で 2 時間振盪培養した。この培養液から集菌を行って RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を実施した。

【結果】培養試験において、*PDR5* 変異株は 15-acetyl-DON に対して最も強い感受性を示し、DON 及び 4-acetyl-NIV に対しても感受性を示したが、3-acetyl-DON 及び NIV に対する感受性は示さなかった。これらの毒性傾向は動物細胞試験における報告と一致した。DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析から得られた階層的クラスタリングの結果も、培養試験の結果と同様の傾向を示した。また、最も顕著な変化を示した機能遺伝子群はタンパク質合成であり、DON, NIV の示す毒性症状であるタンパク質合成阻害と一致した。タンパク質合成に関連して細胞内のリボソーム合成遺伝子を調べた結果、強い感受性を示すグループではミトコンドリア内において遺伝子発現の抑制が生じ、核や細胞質では発現が誘導される傾向にあった。更に、細胞周期を G2/M 期に停滞させてシトクロム C をミトコンドリアから排出する MCA1 遺伝子の誘導と、シトクロム C 酸化酵素遺伝子群の抑制が観察された。これらの発現傾向から、感受性の強い条件下における酵母細胞は、細胞周期の停滞とタンパク質合成阻害が引き起こされ、更にミトコンドリアの機能不全により細胞死へ向かうものと考えられた。

mycotoxin, DNA microarray, yeast

講演番号：3B12p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ B 校舎 12 会場

微生物が分泌するメンブランベシクル（膜小胞体）の解析

Membrane vesicle production under anaerobic conditions in *Pseudomonas aeruginosa*

○豊福 雅典、内山 裕夫、野村 暢彦（筑波大院生命環境）
○Masanori TOYOFUKU,Hiroo UCHIYAMA,Nobuhiko NOMURA (Tsukuba Univ.)

【背景・目的】微生物は従来考えられていたよりも遥かにお互いに相互作用を及ぼし、ダイナミックなネットワークを形成していることが明らかになりつつある。その実態に迫るべく、化学物質やタンパクなどを介した相互作用の他に我々はメンブランベシクル（MV）に注目している。MV は nm オーダーの膜小胞体であり、多くのグラム陰性細菌でその生産が確認されている。分泌された MV は周囲の細胞に付着／融合することが示唆され、宿主に対する病原性因子のキャリヤーや、シグナル物質のキャリヤーとして微生物間コミュニケーションに関与していることも報告されている。さらに、MV はバイオフィルムの細胞外タンパクのキャリヤーとして働いていることが示唆された(Toyofuku et al. J. Proteome.Res. 2012)。このように MV は様々な物質の運搬・伝達を担い、微生物の生態に多大なインパクトをもたらしていると考えられる。さらに応用面においては、物質生産や微生物のターゲティング技術などに利用出来る可能性がある。しかしながら、MV に関する研究例は限られており、その全貌についてはほとんど把握されず、積極的な利用もされていない。
【方法・結果】本研究では、モデル細菌である緑膿菌において、新奇 MV 生産機構を明らかにした。これまでの MV 生産機構に基づくと、緑膿菌は嫌気環境下においては MV を生産しないことが予想されていた。しかしながら、当研究室で詳細に解析すると、嫌気環境下においても MV が生産されることを発見した。そこで、その生産機構を解析したところ、好気環境下とは全く異なる経路によって MV 生産が誘導されていることが明らかとなった。例えば、緑膿菌は嫌気条件下では脱窒を行い、その中間代謝産物として一酸化窒素(NO)が蓄積する。嫌気条件下における MV 生産には NO が関与していることが示され、緑膿菌は環境によって巧みに MV 生産機構を調節していることが示された。このような知見は自然界における MV の役割の理解へと繋がると共に、MV を介した微生物制御へと発展すると期待される。今後は様々な微生物において MV を解析し、それを利用した新たな微生物制御技術の創出を目指す。

Vesicle, Cell-cell interaction, Bacteriocin

講演番号：3B12p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ B 校舎 12 会場

Rhodococcus 属細菌の糖脂質合成は二成分制御系によって制御される
Two-component regulatory system regulates the glycolipid synthesis in *Rhodococcus* sp.
○稲葉 知大、菊子 拓真、中島 敏明、内山 裕夫、野村 暢彦（筑波大院生命環境）
○ Tomohiro INABA,Takuma KIKUKO,Toshiaki NAKAJIMA,Hiroo UCHIYAMA,Nobuhiko NOMURA (University of Tsukuba)

【目的】当研究室保有菌株である *Rhodococcus* sp. SD-74 株は Succinoyl Trehalose Lipid (STL)と呼ばれる糖脂質型のバイオサーファクタントを生産する．バイオサーファクタントには界面活性剤としての機能以外にも自己組織化や生理活性と行った機能を持つものが多く，高機能材料としてその利用が期待されて来た．近年では数多くのバイオサーファクタント生産菌が報告され、今では数多くのバイオサーファクタントとその生産菌が知られている．しかしながら，その大部分は非常に生産性が低く，商業的利用に適さないばかりか，生合成経路や生産制御機構といった基礎的な知見についてもほぼ得られていないのが現状である．そこで本研究では，STL を多量に生産し，先行研究によりその生合成経路がある程度知られている SD-74 株を材料として, STL の生産制御機構を解明する事を目的とした．
【方法および結果】トランスポゾンを用いたランダム遺伝子破壊により、破壊体ライブラリを作成した．破壊体ライブラリより STL 非生産株のスクリーニングを行い，STL 非生産株 1 株を取得する事に成功した．得られた非生産株のシークエンス解析の結果，二成分制御系のヒスチジンキナーゼと推定される遺伝子(*tlrB*)が STL の生産に必須である事が示された．また，*tlrB* の直上に位置するレスポンスレギュレータと推定される遺伝子(*tlrA*)は STL の生産には関与しない事が示された．
【考察】破壊体ライブラリからのスクリーニングの結果, STL 非生産株を 1 株取得した. 得られた STL 非生産株のシークエンス解析の結果, 破壊された遺伝子(*tlrB*)は二成分制御系のセンサーキナーゼと推定され，STL の生産は二成分制御系によって制御されている可能性が示唆された．しかしながら，*tlrB* の同族と推定されたレスポンスレギュレータ遺伝子(*tlrA*)は STL の生産に関与しておらず，STL の生産制御は TlrB を介した別のレスポンスレギュレータにより行われている可能性が示唆された．

Rhodococcus, Trehalose lipid, Two-coomponent regulatory system

講演番号：3B12p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ B 校舎 12 会場

ロドコッカス属細菌の微生物凝集には細胞外 DNA が関与する

Extracellular DNA mediates bacterial aggregation in *Rhodococcus* sp. SD-74

○長田 啓司、菊子 拓真、稲葉 知大、中島 敏明、内山 裕夫、野村 暢彦（筑波大院生命環境）
○Keiji NAGATA, Takuma KIKUKO, Tomohiro INABA, Toshiaki NAKAJIMA, Hiroo UCHIYAMA, Nobuhiko NOMURA (Tsukuba Univ.)

現在、微生物は有用物質生産、汚染物質分解、発酵産業などに広く利用され、我々人間の社会生活にも密接に関与し大きな恩恵を与えている。近年、微生物が環境中において単菌ではなく集合体として存在しているということが明らかとなってきた。そういった微生物集団構造体の一つとして、微生物凝集というものが存在する。微生物凝集は菌体同士が集まってできる微生物集団構造体であり、水処理に用いられる活性汚泥やグラニュールも環境中に存在する微生物凝集体として挙げられる。微生物凝集は、凝集体自体が酵素の固定化担体のような働きを有すること、物理的せん断力に強いこと、培養後の固液分離過程を容易化することなど、産業上多くの利点を有すると考えられる。一方で、微生物凝集についての知見はいまだに少ないのが現状であり、微生物凝集に対する知見を深めることが微生物の産業利用に大きく貢献すると考えられる。

当研究室が保有している *Rhodococcus* sp. SD-74 株は、ミコール酸菌群のグラム陽性細菌であり、液体培地中で強い凝集性を示す。今回、当研究室独自の顕微鏡法を用いた継時的な三次元構造解析により、成分の異なる培地における凝集体の形成過程を動画として取得した。そこから、本株は成分の異なる培地中において弱凝集性から強凝集性といった異なる凝集性を示すことが明らかとなった。本研究では、SD-74 株の凝集性に関与する要因を明らかにし、微生物凝集を制御することを目的とした。そのためにまず、物理的要因を比較した。DLVO 理論によると、粒子の接着には付着力として疎水性、反発力として表面電荷が関与しており、付着力が反発力を上回った時に粒子の接着が起きると考えられている。そこで我々は菌体を粒子として見なし、成分の異なる培地中における菌体の細胞疎水性と表面電荷を比較した。その結果、表面電荷、細胞疎水性ともに差異は見られなかった。そのため、微生物凝集には物理的要因ではなく生物学的要因が関与するという可能性が考えられた。そこで、我々は細胞外基質(EPS)に着目した。EPS は多糖類、タンパク質、核酸(DNA や RNA)などを含む高分子の複合体であり、微生物凝集体形成に重要な役割を担っていることが知られている。一方で、*Rhodococcus* 属細菌の微生物凝集への EPS の関与は知られていないため、凝集性と EPS の関係を明らかにするために各 EPS 成分の解析を行った。その結果、細胞外 DNA が菌体の凝集に関与していることが示唆された。さらに、弱凝集性を示す培地中に比べて強凝集性を示す培地中において多くの細胞外 DNA が細胞表層に存在することが示された。今後は、微生物凝集に関与する細胞外 DNA の長さ・修飾の度合いなど、細胞外 DNA の諸性質に着目した解析を行っていく予定である。

mycolic acid-containing bacteria, bacterial aggregation, extracellular DNA

講演番号：3B12p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ B 校舎 12 会場

細胞間シグナル物質による緑膿菌バイオフィルム脱離の誘導
Induction of Dispersion by Cell-to-Cell Communication Signalling Molecules in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm
○伊藤 聡志、柿原 健佑、豊福 雅典、中島 敏明、内山 裕夫、野村 暢彦（筑波大院生命環境）
○Satoshi Ito, kensuke Kakihara, Masanori Toyofuku, Toshiaki Nakajima, Hiroo Uchiyama, Nobuhiko Nomura (Grad. Sch. of Life and Env. Sci. Univ. of Tsukuba)

【背景・目的】実環境中の多くの微生物は浮遊形態という単体ではなく、固体表面に付着したバイオフィルム形態という集団の状態で存在している。バイオフィルムは細胞外高分子化合物（EPS）で覆われることにより、細胞を物理的、化学的に保護する役割を持ち、バイオフィルム形態の細胞では浮遊形態とは異なった遺伝子群が発現している。バイオフィルムの発達サイクルは、固体表面への付着、成熟、脱離という段階で構成されている。バイオフィルム中の生育環境が好ましくない状態になると脱離が開始され、バイオフィルムから脱離した菌は自由に活動できる浮遊形態となって新たな場所でバイオフィルムを形成する。そのため、脱離は微生物が繁殖する上で重要な段階となる。バイオフィルムの脱離を制御することは菌の抵抗性を弱め、感染拡大を防止する上で重要と考えられる。また、バイオフィルム中ではシグナル物質を介した細胞間コミュニケーションが行われており、多くの遺伝子発現制御が行われている。今まで脱離に関して様々な環境因子の関与が報告されているが、細胞間シグナル物質と脱離の関係については完全に理解されていない。当研究室の先行研究では、バイオフィルム研究のモデル細菌である緑膿菌を用いてバイオフィルム形成実験を行ったところ、細胞間シグナル物質である *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS)がバイオフィルム脱離に影響を与えることが観察された。そこで、本研究においては PQS によるバイオフィルムの脱離の誘導機構の解析を行った。
【方法・結果】バイオフィルムの脱離には一酸化窒素（NO）が関与しているため、PQS が NO の制御を介して脱離を促していることが考えられる。そこで、NO の生産に関与する遺伝子（*nir*）のレポーター株を用いてバイオフィルムを形成させたところ、野生株では脱離の直前に *nir* が発現するが、破壊株では同時期に脱離が起こらず、*nir* の発現も見られなかった。また、定量 PCR による遺伝子発現の定量を行ったところ同様の結果が得られた。さらに、*nir* 欠損株においては野生株と PQS 非生産株において脱離に差は見られなかった。このことから、PQS は脱離の直前に *nir* の発現を促進させ、脱離を誘導することが示唆された。現在は、脱窒関連遺伝子の発現解析を中心に、PQS によるバイオフィルム脱離誘導機構の詳細なメカニズムを解析中である。

biofilm, dispersion, cell-to-cell signalling molecules

講演番号：3B12p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ B 校舎 12 会場

嫌気環境下における緑膿菌の Biofilm 形成メカニズムの解析
Analysis of the mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation under anaerobic conditions
○清川 達則、豊福 雅典、八幡 穣、内山 裕夫、野村 暢彦（筑波大院生命環境）
○Tatsunori KIYOKAWA,Masanori TOYOFUKU,yutaka YAWATA,Hiroo UCHIYAMA,Nobuhiko NOMURA (Grad. Sch. of Life and Env. Sci., Univ. of Tsukuba)

【背景・目的】
グラム陰性細菌である緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* は土壌や水圏など多様な環境に存在しているが、本菌がこのように様々な環境に適応できる要因の一つとして、高い Biofilm(BF)形成能が挙げられる。BF とは微生物が集団で形成する高次構造体のことで、自然界の微生物の多くはこの BF 状態で生存していると考えられている。微生物は BF を形成することでストレス耐性が飛躍的に上昇するなど、浮遊状態と比較して性質が大きく異なることから、医療や産業の分野では BF についての理解が求められている。

この BF 研究のモデル微生物である緑膿菌は好気環境および嫌気環境の両方で生育できるが、嫌気環境下における BF 形成機構についてはほとんど知られていない。近年、当研究室の先行研究により嫌気環境下における BF は好気環境下の BF とは構造が大きく異なることを明らかとした。そこで、本研究では緑膿菌の嫌気環境下における BF 形成メカニズムを解明することで、微生物の BF による環境適応能力について新たな知見を提供することを目的とした。

【方法・結果】
供試菌株には緑膿菌の標準株 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株を用いた。嫌気環境下における BF の形成過程の観察には AFGAS 法による嫌気 flowcell chamber 法による連続培養と COCRM 法による非染色、非破壊的な共焦点顕微鏡観察手法を用いた。

嫌気環境下における BF の形成過程を顕微鏡により観察した結果、好気環境で知られているような、菌体の基質表面への付着から BF の成熟、そして BF 形成量が減少する脱離が観察された。続いて BF の構成要素として重要な細胞外多糖を、好気環境下の BF と嫌気環境下の BF において観察した結果、BF 中の細胞外多糖の分布に大きな差が見られた。現在、細胞外多糖と BF 構造の関係を調べるために、好気環境と嫌気環境における細胞外多糖の制御機構について解析を行っている。

Biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, Anaerobic conditions

講演番号：3B12p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ B 校舎 12 会場

毒素産生及び胞子形成に関与するグローバルな転写調節因子はウェルシュ菌バイオフィルム形成を制御する

Transcriptional regulatory factors involved in toxin production and sporulation control *Clostridium perfringens* biofilm formation

○尾花 望、中村 幸治、野村 暢彦（筑波大生命環境）
○nozomu OBANA,Kouji Nakamura,Nobuhiko Nomura (Tsukuba Univ.)

ウェルシュ菌（*Clostridium perfringens*）はグラム陽性偏性嫌気性桿菌であり、食中毒やガス壊疽の原因となる。ウェルシュ菌は内生胞子を形成することによって高いストレス耐性を得ることができるため、偏性嫌気性にも関わらず環境中に広く在住する。近年、ウェルシュ菌をはじめとする *Clostridium* 属細菌は内生胞子だけでなく、バイオフィルムと呼ばれる集合体を形成することによっても酸化ストレスや抗生物質耐性を得ることが明らかとなりつつある。多くの細菌は実環境中において細胞外マトリクスを産生し、バイオフィルムを形成して生育しており、本菌は胞子形成よりも素早いストレス応答としてバイオフィルム形成を行うと考えられる。実環境中における細菌の挙動の理解には、バイオフィルム形成がどのように制御されているかを理解する必要があるが、ウェルシュ菌バイオフィルム形成を制御する因子の多くは不明である。

ウェルシュ菌を GAM 培地中で 25°C 条件下において培養すると、粘性に富んだ膜状のバイオフィルムを形成した。共焦点レーザー顕微鏡によってバイオフィルム構造を観察したところ、バイオフィルム中の菌体密度は低く、細胞外マトリクスが豊富に含まれていると考えられた。ウェルシュ菌において多くの毒素遺伝子を制御するヘテロ転写因子複合体 CPE1447-CPE1446(1)、または、胞子形成のマスターレギュレーターである *spo0A* 遺伝子欠損株においては上述のような膜状バイオフィルムは形成されず、多くの菌体が基質底面に付着し、密に集合していた。ウェルシュ菌においては IV 型繊毛が菌体の付着に関与することから、繊毛構成成分である pilin をコードする *pilA2* 遺伝子の発現を解析したところ、CPE1447-CPE1446 及び *spo0A* 欠損株では 25°C 条件下における *pilA2* 発現量が増加していた。つまり、CPE1447-CPE1446 及び Spo0A は IV 型繊毛関連遺伝子を制御することによって菌体の付着能を調節し、バイオフィルム形成に影響を与えていると考えられた。

以上の結果より、ウェルシュ菌バイオフィルム形成は複数のグローバルな転写調節因子によって制御されることが明らかとなった。さらに、CPE1447-CPE1446 は多くの毒素産生に関与すること(1)、また、Spo0A は胞子形成に関与することから、ウェルシュ菌バイオフィルムは本菌の病原性やストレス耐性に深く関連していると予想される。

(1) Obana and Nakamura. **J. Bacterial.** (2011) **193**: 4417-4424.

biofilm formation, global transcriptional regulators, *Clostridium perfringens*

講演番号：3B12p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ B 校舎 12 会場

Pseudomonas aeruginosa PAO1 株バイオフィルムの D-アミノ酸処理に対する挙動
Effect of D-amino acid mixture on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm
○大田 隼矢[1]、サンチェス ゾイ[1]、青木 真央[1]、谷 明生[2]、新谷 政己[1]、金原 和秀[1] ([1]静大・工、[2]岡大・植物研)
○Toshiya Ota[1], Zoe Sanchez[1], Mao Aoki[1], Akio Tani[2], Masaki Shintani[1], Kazuhide Kimbara[1] ([1]Shizuoka Univ., [2]Okayama Univ.)

【目的】自然環境中における細菌の大部分は、水分を含む基質表面にバイオフィルムという粘性の集合体を形成して生息している。バイオフィルムは水質浄化など、環境浄化に役立つ一方、工業分野では製造プラントでの熱交換効率の低下や、医療分野では院内感染の原因になるなど、多くの問題を引き起こしている。特に、感染菌はバイオフィルムを形成することで薬剤耐性を増加させることが広く知られており、バイオフィルムがどのように形成され、薬剤に対してどのような挙動を示すのかを調べ、制御することは重要な課題である。最近の研究で、D-アミノ酸は様々な微生物によって生成されているが、バイオフィルムの脱離を引き起こすことが報告されている[1)]。*Bacillus subtilis*は静置条件下でD-アミノ酸混合物(D-leucine, D-tyrosine, D-methionine, D-tryptophan)を添加すると、TasA fiberの分解が起こり、バイオフィルムが崩壊した[2)]。本研究は、*P. aeruginosa* PAO1株のバイオフィルムをフローセル中で形成させ、D-アミノ酸添加によるバイオフィルム内部の細胞の生存性とExtracellular Polymeric Substances(EPS)マトリックス量の変化を調べ、D-アミノ酸のバイオフィルム中の細胞に対する作用を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】Multichannel Microdeviceに1/3希釈LB培地を供給し、PAO1株の連続培養を行った。2日間の連続培養後、形成したバイオフィルムにD-アミノ酸混合物(D-leucine, D-tyrosine, D-methionine, D-tryptophan)を16 h供給し、共焦点レーザー顕微鏡により得たデータをCOMSTATソフトウェアで解析して生死細胞・EPSマトリックスの観察・定量を行った。その結果、D-アミノ酸処理により、バイオフィルム中の生細胞数は75%減少した。その一方、EPSマトリックス量は30%増加し、厚さも微量ながら増加した。そこで、D-アミノ酸の添加がEPSマトリックス中のどの成分に対して影響を与えているのか調べるため、D-アミノ酸処理をしたものと処理していないものからEPSマトリックスを抽出し、糖類、タンパク質濃度などを定量している。糖類はフェノール硫酸法、タンパク質はブラッドフォード法により定量し、D-アミノ酸処理によるEPSマトリックス量/厚さの増加がEPSのどの成分に対する影響によるものかを調査している。
1) Cava, F. et al., Cell Mol. Life Sci. 68, 817-831(2011)
2) Kolodkin-Gal, I. et al., Science 328, 627-629(2010)

Biofilm, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, D-amino acid mixture

講演番号：3B12p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ B 校舎 12 会場

Purification and characterization of autoinducer-2-inactivating enzyme from *Eikenella corrodens*

○Minnatul KARIM[1], Jasin MANSUR[1], Ayako NAGAO[1], Yuichiro NOIRI[2], Shigeyuki EBISU[2], Akio KATO[1], Hiroyuki AZAKAMI[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Osaka Univ.)

In our laboratory, the relationship between QS and pathogenicity has been studied using periodontopathogenic bacterium, *Eikenella corrodens*. Previously, it was reported that *E. corrodens* produces autoinducer-2 (AI-2) in mid log phase and its biofilm formation might be regulated by AI-2 (Azakami *et al*., ***J. Biosci. Bioeng.***, 2006). However, the amount of AI-2 was decreased dramatically after stationary phase. Moreover, strain 23834, which forms little biofilm, produced AI-2 even after stationary phase. These results suggested that *E. corrodens* might produce any degradation enzyme and the biofilm formation might be regulated by AI-2 degradation. As concerns acyl homoserine lactone, which is one of the AIs, it has been reported that there are their degradation enzymes, such as lactonases and acylases. However, there is little report about AI-2 degradation.

We found that *E. corrodens* produced AI-2 inactivating enzyme into culture supernatant during stationary phase and characterized this enzyme. We detected AI-2 activities using *Vibrio harveyi* BB170 as sensor strain, because this strain can produce luminescence in response to extracellular AI-2. However, this strain could not respond to the inactivated AI-2 after incubation with this enzyme. Moreover, we found that this enzyme can produce a same effect against MHF (methyl hydroxyl furanone), which is similar compound as AI-2, and demonstrated that this enzyme converted MHF to another form by using reverse phase chromatography and gas chromatography. These results suggested that *E. corrodens* might degrade self-produced AI-2 using this enzyme or *E. corrodens* might convert their AI-2 to another form which is undetectable by *V. harveyi*.

To purify AI-2 inactivation factor, ammonium sulfate precipitation was performed for the supernatant of the stationary phase of *E. corrodens* culture and fractionated to 30%, 50% and 70%. AI-2 activity was decreased after incubating 30% ammonium sulfate precipitation fraction with MHF or purified AI-2. AI-2 activity was confirmed through AI-2 assay using *V. harveyi* BB170 as a reporter strain. For further purification, DEAE chromatography and Q-Sepharose chromatography was performed. SDS-PAGE result suggests that AI-2 inactivating enzyme was purified completely.

quorum sensing, autoinducer, *Eikenella corrodens*

講演番号：3B12p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ B 校舎 12 会場

Indole acts as an intergenus cross-talking signal between *Escherichia coli* and active indole-degrading *Burkholderia unamae* CK43B

○ Dongyeop Kim[1], Irnayuli R Sitepu[2], Yasuyuki Hashidoko[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]FNRDC, Indonesia)

【Objective】 *Escherichia coli* highly forms the biofilm through the cell signal to regard as cell density recognition with indole. As bacterial cells in a biofilm have frequent chances to adapt and survive toward environmental stresses as they are protected within the matrix. *Burkholderia unamae* CK43B formally identified as an active L-Trp degrader that also showed a capability of indole degradation. Here we show that the indole decomposition by *B. unamae* CK43B is highly correlated with repression of *E. coil* biofilms in a co-culture growth, although gallic acid as phenolic additive restored *E. coli* biofilm formation that resulted from remained indole in extracellular part by suppressing indole degradation of *B. unamae* CK43B.

【Methods】 The attenuating effect of indole degrading *B. unamae* CK43 against biofilm formation of *E. coli* was investigated as follows: in 2 mL of Luria-Bertani broth medium, co-culture of *E. coli* with *B. unamae* CK43B was standing-cultured at 28°C in the dark for 24 h in polystyrene petri-dish (ϕ35×10 mm). The biofilm of *E. coli* was quantitatively analyzed by crystal violet staining method and their distribution as planktonic and biofilm cells state in a co-culture growth was observed under a fluorescence microscope that employed fluorescence *in situ* hybridization and SYTO9/propidium iodide fluorochrome uptake. Also the content of extracellular indole in a co-culture growth between *E. coli* and *B. unamae* CK43B with/without 1mM gallic acid was quantitatively analyzed by HPLC.

【Results】 In mixed culture of *E. coli* with *B. unamae* CK43B, an indole degrader repressed biofilm formation of *E. coli* due to effective degradation of extracellular indole produced by *E. coli*. *B. unamae* CK43B did not show any cell growth competition against *E. coli* and co-culture in which they were almost equally inhabited as planktonic cells. The biofilm cells viability assay showed that *B. unamae* CK43B inhibited colonization of *E. coli* biofilm cell due to degrading indole, a biofilm forming signal. However, indole degradation of *B. unamae* CK43B was inhibited when it was exposed to supplemental gallic acid and that resulted in thick biofilm formation since indole remained seems to play a role for biofilm forming signal either *E. coli* or *B. unamae* CK43B. This new finding reveals that indole acts as an intergenus cross-talking signal between indole- degrading β-Proteobacteria (*B. unamae* CK43B) and indole-producing γ-Proteobacteria (*E. coli*) when it was remained in a co-culture growth due to the inhibition of indole decomposition suppressed by gallic acid.

biofilm, indole, indole degrader

講演番号：3B12p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ B 校舎 12 会場

Synechocystis sp. PCC6803 の細胞外多糖生産を調節する機構解析
Regulation mechanism of exopolysaccharide production in *Synechocystis* sp. PCC 6803
○冨永 昂、三浦 のぞみ、佐伯 千香、七谷 圭、魚住 信之（東北大院工）
○Akira TOMINAGA,Nozomi MIURA,Tika SAEKI,Kei NANATANI,Nobuyuki UOZUMI (Tohoku Univ.)

【目的】ラン藻の生産する細胞外多糖は大気中の二酸化炭素を光エネルギーによって固定化した有用な産物であり，光エネルギーを利用した多糖生産系として期待される．しかしながら，*Synechocystis* の細胞外への多糖生産に関する知見は乏しく，生産メカニズムに関する報告は少ない．我々は,これまでにラン藻に塩ストレスを与えることで細胞の周囲に多糖形成を誘導することを見いだしている． さらに,DNA の複製，細胞分裂,各種ストレス適応などにおいて重要な役割を果たしているポリアミンが *Synechocystis* の細胞外多糖生産に関与することを明らかし，*Synechocystis* の主要なポリアミン生合成経路は，アルギニンを前駆体としアルギニン脱炭酸酵素(ADC)によるアグマチンへの変換を経由することを示してきた.一方、動物細胞などでは，ポリアミンの生合成にはオルニチンを経由することが知られている．*Synechocystis* ゲノムには，オルニチンを介してポリアミンを生産する酵素の存在も推定される．そこで，本研究ではゲノム情報からオルニチンの代謝系にかかわると推定される遺伝子の破壊株を作成して，塩ストレスによって誘導される細胞外の多糖形成を観察し，オルニチンによるポリアミン生成と多糖形成の関係を検討した．加えて，*Synechocystis* が細胞外の塩ストレスに応答してバイオフィルム形成を行うことから,細胞膜でポリアミンを認識する機構が予測される。ゲノム中に存在するポリアミンの結合が推定される蛋白質を検討することにより、細胞外のストレス感知の可能性とバイオフィルム形成に関係を探るために，この遺伝子の破壊株を作製してバイオフィルム形成への関与を検討した.
【方法・結果】*Synechocystis* の代謝およびゲノム情報から推定されたオルニチンの代謝に関与する酵素をコードする各遺伝子に薬剤耐性マーカーを導入した欠損変異株を作成した.塩ストレスとして 250mM または 500mM の NaCl を含有した BG11 で培養し,細胞外多糖生産量をクリスタルバイオレット染色法によって測定した．その結果，オルニチンの代謝に関与する経路に関連する遺伝子の破壊株は,野生株と同程度の塩ストレスに応じたバイオフィルム形成を示した.一方,ポリアミンの結合が推定される蛋白質の欠損株は塩ストレスによる多糖生産量の増加を示さなかった.これらの結果は，ラン藻におけるオルニチン代謝にかかわる経路はポリアミン生合成において中心的な経路ではないことを示している．また，ポリアミンとの結合が予測される蛋白質の遺伝子変異株は、塩ストレスに応答しなかった。これにより、本蛋白質は、細胞外多糖生産を制御する因子の一つとして機能する可能性が示唆された.

Cyanobacteria, Salt stress response, Exopolysaccharide

講演番号：3B12p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ B 校舎 12 会場

K^+トランスポーターKup の輸送活性に必要な負電荷アミノ酸の同定

Identification of the negatively charged residues conferring K^+ uptake activity in *E.coli* Kup

○清水 真[1]、七谷 圭[2]、浜本 晋[2]、黒澤 友世[2]、水谷 昭文[2]、魚住 信之[2] ([1]東北大工、[2]東北大院工)

○Makoto SHIMIZU[1], Kei NANATANI[2], Shin HAMAMOTO[2], Tomoyo KUROSAWA[2], Akifumi MIZUTANI[2], Nobuyuki UOZUMI[2] ([1]Tohoku Univ., [2]Tohoku Univ.)

【目的】細胞の浸透圧，生体膜を介する物質輸送において，細胞内主要陽イオンの K^+は重要な役割を担っている．真核細胞や原核細胞における K^+輸送を担うタンパク質は，K^+輸送速度や駆動力の違いから K^+チャネルと K^+トランスポーターの 2 種類に分類されている. さらに，Trk/Ktr/HKT 型 K^+トランスポーターと Kdp 型 K^+トランスポーターは，同一の super family に属しており，類似したイオン選択性フィルターを有する．一方，Kup/HAK/KT 型 K^+トランスポーターは Trk/Ktr/HKT 型 K^+トランスポーターとの類似性を持たず，膜構造や基質輸送メカニズムがほとんど明らかにされていない．本研究では，原核生物から真核生物に存在する Kup/HAK/KT の K^+輸送メカニズムを明らかにするため，*Escherichia coli* の K^+トランスポーターEcKup の解析を行った．EcKup の膜貫通領域内または細胞外に存在すると推定される 17 個の負電荷アミノ酸の重要性を検討するため, これらを中性アミノ酸であるアラニンに 1 残基ずつ変異させた置換体を作成した．これらの置換体を K^+輸送体欠損株である *E. coli* LB2003 に導入し，低 K^+培地における生育を観察することにより，K^+輸送に関連している負電荷アミノ酸を探索した.

【方法】*E. coli* LB2003 に，EcKup 置換体 17 種類をそれぞれ導入し，コントロールとして pPAB404 ベクターと EcKup-WT 導入株を合わせた合計 19 種類の菌を，KCl 0mM，0.05mM，0.1mM，0.25mM の合成培地(固体)にて 30℃，2 日間生育させた．さらに，この 19 種類の菌株を KCl 0mM，0.5mM，2mM，5mM の合成培地(液体)にて 12 時間生育させて, 培養液の吸光度の時間経過を測定した.

【結果】合成培地において, EcKup-WT を導入した LB2003 の生育が観察される KCl 濃度にて, D23A, E34A, E45A，E116A，E229A，D408A は生育が観察されなかった. さらに，E34A や E45A 変異体は生育速度が遅いものの，最終的には 12 時間以内に EcKup-WT と同様の吸光度まで上昇した．また, E133A, D234A は WT では生育できない K^+低濃度で生育を示した．本研究の結果から，D23，E116，E229，D408 の 4 つのアミノ酸残基が K^+輸送に関与する可能性が示された．今回同定された 4 つの残基は，Kup ファミリーに属するトランスポーターで高度に保存されていた．さらに，この 4 つのアミノ酸残基は膜貫通領域内に位置すると推定される．以上のことから，EcKup の K^+輸送メカニズムにおいて，膜貫通領域中の 5 つの負電荷アミノ酸の内 4 つが重要な役割を果たしていることが明らかになった．これら 4 残基は，正電荷のアミノ酸残基や K^+などと相互作用をすることにより，構造の維持や輸送活性に貢献すると推定される.

K^+ transporter, *Escherichia coli*, ion transport mechanism

講演番号：3B12p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ B 校舎 12 会場

Corynebacterium glutamicum のグルタミン酸透過性機械受容チャネル NCgl1221 の gain-of-function 変異

A gain-of-function mutation of the glutamate-permeable mechanosensitive channel NCgl1221 in *Corynebacterium glutamicum*

○中山 義敬、飯田 秀利（東京学芸大教育）
○Yoshitaka Nakayama,Hidetoshi Iida (Tokyo Gakugei Univ.)

【目的】

Corynebacterium glutamicum はビオチン制限下の培養で細胞表面構造が変化したときに多量のグルタミン酸を菌体外へ放出する。グルタミン酸生産時に機械受容チャネル NCgl1221 は、膜張力の変化によって開口し、グルタミン酸を細胞外へ放出する。NCgl1221 の予想されるポア領域に変異(A111V)が入ると恒常的なグルタミン酸の生産が引き起こされる。これは NCgl1221 の恒常的な構造変化がグルタミン酸の放出を促している可能性を示唆する。本研究において、NCgl1221 によるグルタミン酸放出の仕組みを明らかにするために野生型(WT)と変異型(A111V)の NCgl1221 の電気生理学的解析を行った。

【方法】

MscS を欠損した大腸菌に WT と A111V の NCgl1221 をそれぞれ発現させて、細胞を巨大化させた後にパッチクランプ法を適用した。パッチ膜に陰圧を与えることで膜張力を変化させて、NCgl1221 の機械受容性電流を測定した。

【結果】

WT と A111V のどちらの NCgl1221 も膜張力の大きさに依存した機械受容性電流を計測できたが、膜張力に対する閾値に大きな違いが観察された。A111V は WT に比べて、小さな膜張力で開き、完全に圧力が解放された後に閉じた。一方、WT は開く時と同程度の膜張力の大きさで閉じた。これらの結果から、A111V 変異は NCgl1221 を開き易く、閉じにくくする”gain-of-function” 変異であることが明らかとなった。以上から、恒常的なグルタミン酸の放出は NCgl1221 の開閉機構における変異によって引き起こされているものと推測される。

mechanosensitive channel, glutamate production, Corynebacterium glutamicum

講演番号：3B12p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ B 校舎 12 会場

大腸菌外膜リポ蛋白質輸送不全による Rcs リン酸リレー系に依存した lolA 転写活性化の機構
Defective lipoprotein sorting activates lolA transcription through the Rcs phosphorelay system.

○垰 和之[1]、徳田 元[2] ([1]東京大ＲＩセンター、[2]盛岡大栄養科学)
○Kazuyuki TAO[1], Hajime Tokuda[2] ([1]Univ. Tokyo, [2]Univ. Morioka)

大腸菌 Lol システムは外膜リポ蛋白質を選択的に内膜から遊離し、外膜へ輸送するシステムであり LolABCDE の５種の蛋白質から構成されている。LolA 蛋白質は内膜上の ABC トランスポータ LolCDE 複合体から、外膜リポ蛋白質を受取り、外膜の受容体 LolB に引き渡す役割を持つペリプラズム蛋白質である。

LolA の構造･機能を解析する過程で作成した変異体 LolA(I93C/F140C)は内膜の LolCDE 複合体と結合することによりリポ蛋白質の輸送を阻害し、野生型大腸菌の増殖を強く抑制するドミナントネガティブ型変異体であった。この変異体を発現する大腸菌では、*lolA* 遺伝子自身の転写が増大していた。LolA または LolB を欠乏させ、外膜へのリポ蛋白質の輸送を阻害すると、同様の *lolA* の転写活性化が起こることから、外膜リポ蛋白質の輸送不全が *lolA* の転写を活性化していることが示唆された。この転写誘導の分子機構を明らかにする目的で *lolA* 遺伝子の転写活性化の起こらない変異体をスクリーニングしたところ、*rcsF* と *rcsC* 遺伝子の変異体を得ることができた。*rcsF* と *rcsC* 遺伝子は二成分遺伝子発現制御系の一つである Rcs リン酸リレー系を構成する遺伝子であることから、外膜リポ蛋白質輸送阻害による *lolA* 遺伝子転写活性化は Rcs リン酸リレー系により制御されると考えられた。実際に、*lolA* の転写活性化は *rcsA* には依存しないが *rcsBCDF* に依存することが *rcs* 遺伝子を欠く変異体を用いた実験で明らかとなった。

Rcs リン酸リレー系を構成する蛋白質の中で、RcsF は遺伝学的解析からシグナル伝達経路において内膜上のキナーゼ RcsCD の上流に位置する外膜リポ蛋白質であり、キナーゼへのシグナル入力を行う分子であると考えられている。また、これまで研究で、RcsF の増産、内膜及びペリプラズムへの局在変化は Rcs 系の構成的活性化をもたらすことが知られている。これらの結果と、外膜リポ蛋白質の輸送不全により Rcs リン酸リレー系が活性化することを考え合わせると、RcsF は輸送途上で内膜に留まることにより、Rcs 系を活性化するのではないかと考えられる。また、このことは、RcsF が外膜リポ蛋白輸送状況をモニターするセンサーとして働くことを示唆している。

実際に RcsF が内膜上の RcsCD キナーゼやその他の因子と相互作用するかどうかについて、RcsF の様々な位置に、光架橋性の人工アミノ酸（ベンゾイルフェニルアラニン）を部位特異的に導入した蛋白質を発現させる in vivo 光架橋実験により解析しているので、その結果についても報告する。

envelope stress, two component system, lipoprotein sorting

講演番号：3B12p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ B 校舎 12 会場

コリネ型細菌における *gnd* 遺伝子の発現制御解析

Coordinated regulation of *gnd* encoding 6-phosphogluconate dehydrogenase by two transcriptional regulators GntR1 and RamA in *Corynebacterium glutamicum*

○田中 裕也、寺本 陽彦、乾 将行、湯川 英明 (RITE)
○Yuya TANAKA,Haruhiko TERAMOTO,Masayuki INUI,Hideaki YUKAWA (RITE)

[目的] ペントースリン酸経路は糖代謝の過程においてNADPH還元力を供給し、さらに核酸やビタミン、芳香族化合物等の生成材料の形成に関わる。そのため有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* におけるペントースリン酸経路の解析は様々な有用物質生産を行う上で重要である。しかしながら、*C. glutamicum* でのペントースリン酸経路の遺伝子発現制御機構については、転写因子 GntR1 による抑制が報告されたのみであり未解明の部分が多い。そこで本研究では、6-phosphogluconate dehydrogenase をコードする *gnd* 遺伝子について転写制御機構の解析を行った。

[方法と結果] *gnd* プロモーターDNA を用いたアフィニティ精製により、GntR1 と RamA の 2 つの転写因子を見出した。*gnd-lacZ* レポーター系を利用した *gntR1*、*ramA* 破壊株の解析から、GntR1 は *gnd* のリプレッサーであり RamA はアクチベーターとしてそれぞれ働くことが判明した。DNaseI フットプリンティング法からは GntR1、RamA が *gnd* プロモーター領域のそれぞれ 2 個所を認識することが明らかとなり、さらに GntR1 存在下では RamA による *gnd* プロモーター結合が阻害された。この結果から、GntR1 による発現抑制は、*gnd* プロモーターへの RamA 結合と RNA ポリメラーゼ結合の両者の阻害に起因することを示した。また RamA *in vitro* DNA 結合解析からは高濃度の NADH、NADPH 存在下での DNA 結合阻害が観察されたことからこれらの基質により RamA の活性が制御されている可能性が考えられた。以上の結果から、我々は GntR1、RamA による *gnd* プロモーターの複合的制御の存在を明らかとすることができた。

本研究の一部は NEDO の委託研究の一環として行われたものである。

1) J. Bacteriol (2012) 194, 6527

Corynebacterium glutamicum, pentose phosphate pathway, transcriptional regulation

講演番号：3B12p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ B 校舎 12 会場

コリネ型細菌 Riboflavin transporter 遺伝子の発現制御

Regulation of riboflavin transporter gene expression in Corynebacterium glutamicum

○竹本 訓彦、田中 裕也、乾 将行、湯川 英明 (RITE)
○Norihiko Takemoto,Yuya Tanaka,Masayuki Inui,Hideaki Yukawa (RITE)

【目的】FAD や FMN は様々な酸化還元反応の補酵素として働く。Riboflavin は FAD,FMN の前駆体であり、多くの細菌は ribulose-5 リン酸と GTP からの Riboflavin 合成経路を有する。一部の細菌では Riboflavin 合成経路に加え、細胞外からの Riboflavin 取込みを担う輸送体が同定されており、Riboflavin 合成・取込み経路遺伝子の発現制御が細胞内 flavin 補酵素レベルの維持のために重要である。我々は有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* の代謝調節機構を解明するため、様々な物質代謝遺伝子の発現制御機構の解析を進めている。本研究では、*C. glutamicum* の riboflavin transporter 遺伝子(*ribM*)の発現制御解析を行った。
【方法と結果】細胞内 flavin 濃度と RibM 発現量との関連を調べるため、野生株と Riboflavin 合成経路遺伝子(*ribA*)破壊株で細胞内 flavin 濃度の測定を行った。細胞内には主に FMN と FAD が存在しており、野生株では培養過程で大きな変化は見られなかった。*ribA* 破壊株は riboflavin 要求性となり、riboflavin を 1μM 以上添加することで野生株と同等の生育が観察された。*ribA* 破壊株では 50μM riboflavin 添加時には細胞内 flavin 濃度が野生株と同様の挙動を示すのに対し、1μM riboflavin 添加時には培養時間に伴って細胞内 FMN,FAD 濃度が減少した。Western blot により RibM 発現量を測定したところ、細胞内 flavin 濃度減少時に発現量が大幅に上昇することが明らかとなった。*ribM* 遺伝子の 5’UTR には FMN-riboswitch に相同な配列が存在する。この配列を欠失させると riboflavin 応答が消失した。これらの結果から、*ribM* は 5’UTR に存在する FMN-riboswitch により細胞内 flavin 濃度をモニターし、発現量を調節していることが示唆された。

Corynebacterium glutamicum, riboswitch

講演番号：3B12p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ B 校舎 12 会場

コリネ型細菌が有する 3 種のシキミ酸デヒドロゲナーゼの機能解析

Characterization of shikimate dehydrogenase homologues of Corynebacterium glutamicum

○久保田 健、田中 裕也、平賀 和三、乾 将行、湯川 英明 (RITE)
○Takeshi KUBOTA,Yuya TANAKA,Kazumi HIRAGA,Masayuki INUI,Hideaki YUKAWA (RITE)

【目的】*Corynebacterium glutamicum* はアミノ酸等の生産に広く利用される有用工業微生物として知られている。ゲノム情報を精査した結果、*C. glutamicum* はシキミ酸デヒドロゲナーゼ(SDH)とアミノ酸配列レベルで相同性を示す遺伝子を 3 種有することがわかった。SDH はシキミ酸経路内に位置するため芳香族アミノ酸等の生産研究において当該酵素の特性を知ることは重要である。本研究では *C. glutamicum* R 株が有する 3 種の SDH ホモログ(*cgR_0495*, *cgR_1216*, *cgR_1677*)の機能解析を行った。

【方法と結果】それぞれの SDH について遺伝子破壊株を作製し最少培地を用いて増殖能を検討した。培地に添加する単一の炭素源としてグルコース、シキミ酸、キナ酸を用いた。*C. glutamicum* 野生株はこれらの炭素源を利用して増殖可能である。*cgR_1216* の遺伝子破壊株は野生株と同等の増殖を示したが *cgR_0495* または *cgR_1677* の遺伝子破壊株はそれぞれ特定の炭素源を利用できなくなった。次に単離精製した SDH の活性評価を行った。3-デヒドロキナ酸または 3-デヒドロシキミ酸を基質として最大の反応速度を示す pH 条件を検討し最適な条件での反応速度定数を決定した。その結果これらの SDH は酸化、還元両方向に活性を示し低 pH 条件では還元反応が、高 pH 条件では酸化反応が相対的に効率良く進むことがわかった。今回は以上の検討結果などから推察される 3 種の SDH ホモログの機能的役割分担について考察する。

shikimate, quinate, enzyme activity

講演番号：3B12p17
講演日時、会場：3 月 26 日 17:12～ B 校舎 12 会場

コリネ型細菌を利用した、アニリンを生成可能な脱炭酸酵素の探索と解析

Screening and characterization of decarboxylase for production of aniline in *Corynebacterium glutamicum*.

○藤倉 慶太郎[1,2]、平賀 和三[1]、乾 将行[1]、湯川 英明[1] ([1]RITE、[2]住友ゴム工業(株))
○Keitaro Fujikura[1,2], Kazumi Hiraga[1], Masayuki Inui[1], Hideaki Yukawa[1] ([1]RITE, [2]Sumitomo Rubber Industries, Ltd.)

【目的】

Corynebacterium glutamicum は、アミノ酸等の物質生産に用いられている有用工業微生物である。我々は、地球温暖化対策や将来の化石燃料枯渇に備えたグリーンプロセス技術として、当該菌による芳香族化合物のバイオ生成系構築に取り組んでいる。今回、タイヤ材料として使用される「アニリン」を生成可能な脱炭酸酵素と、それに対応する遺伝子を特定し、解析を行ったので報告する。

【方法と結果】

これまで、アニリン生成可能な酵素遺伝子について論文報告された例は無い。我々は、まず初めに、様々な脱炭酸酵素遺伝子を対象とした機能スクリーニングを行った。その結果、*Enterobacter cloacae* 由来 4-ヒドロキシ安息香酸デカルボキシラーゼ(4HBDC)をコードする遺伝子を導入した *C. glutamicum* が、4-アミノ安息香酸を基質としてアニリンを生成することを見出した。

さらに、4HBDC をコードする遺伝子をターゲットとしたランダムミューテーション導入を行い、アニリン生成量が増大した変異株の取得に成功した。この変異株では、4HBDC の 3 つのサブユニット(21.7kDa, 52.5kDa, 8.6kDa)のうち、52.5kDa サブユニット中の保存領域中にアミノ酸変異が導入されていた。この変異部分を全アミノ酸へ置換した部位特異的変異導入体を作成して解析した結果、アニリン生成量がさらに増大した変異が明らかとなった。

Corynebacterium glutamicum, 4-hydroxybenzoate decarboxylase, aniline

講演番号：3B12p18
講演日時、会場：3 月 26 日 17:24～ B 校舎 12 会場

コリネ型細菌におけるプラスミドの構造不安定性に関わる遺伝子の同定
Identification of the genes for structural instability of plasmid in *Corynebacterium glutamicum*
○北出 幸広、沖野 祥平、郡司 渉、平賀 和三、須田 雅子、沖部 奈緒子、鈴木 伸昭、乾 将行、湯川 英明 (RITE)
○ Yukihiro KITADE,Shohei OKINO,Wataru GUNJI,Kazumi HIRAGA,Masako SUDA,Naoko OKIBE,Nobuaki SUZUKI,Masayuki INUI,Hideaki YUKAWA (RITE)

【目的】*Corynebacterium glutamicum* は、アミノ酸、有機酸等の生産に利用されている有用工業微生物である。我々は本菌におけるベクター開発を進めてきた[1,2]。しかし、導入遺伝子により生成される生産物毒性やその遺伝子発現量によって分解等、構造不安定性を示す場合がある。本菌における種々の物質生産系の構築に際して、このプラスミド不安定性の問題の克服は重要な技術課題の一つである。本研究では、プラスミドの構造不安定性に関する機構の解明を目的とし、関与する遺伝子の同定と機能解析に取り組んだ。
【方法と結果】*C. glutamicum* R 株のゲノム情報より、プラスミドの構造不安定性に関与が予想される候補遺伝子をリスト化した。また、これらの遺伝子破壊株に、野生株において構造不安定性を示すプラスミドを導入し、得られた形質転換体から抽出したプラスミドの変化を調べた。133 種の遺伝子破壊株をスクリーニングした結果、プラスミドの構造変化が回避される単一遺伝子破壊株が 1 株見つかった。この株の破壊遺伝子は、エンドヌクレアーゼ活性を持つタンパク質をコードしていた。さらに、Type IV 制限酵素と有意な配列類似性を示す遺伝子の破壊を重ねることでプラスミドの構造安定性がさらに増大した。*C. glutamicum* において、プラスミド安定保持のために宿主の遺伝的背景を改変した報告例は過去になく、本菌の産業上のより広範な利用に寄与することが期待される。本研究の一部は NEDO の委託研究の一環として行われたものである。
1) Appl Microbiol Biotechnol (2009) 81, 1107.
2) Appl Microbiol Biotechnol (2010) 87, 1855.

plasmid stability, *Corynebacterium glutamicum*, nuclease

講演番号：3B13a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ B 校舎 13 会場

胞子形成欠損を示す枯草菌 S10 リボソームタンパク質遺伝子、*rpsJ*、変異体の単離と解析
Isolation and characterization of sporulation defective mutants of S10 ribosomal protein gene, *rpsJ*, in *Bacillus subtilis*.

○鈴木 祥太[1]、難波 恵理[1]、矢野 晃一[1]、赤沼 元気[2]、吉川 博文[3]、関根 靖彦[1]、河村 富士夫[1] ([1]立教大・理・生命理、[2]中央大・理工・応用化学、[3]東農大・応生科・バイオ)
○Shota SUZUKI[1], Eri NAMBA[1], Koichi YANO[1], Genki AKANUMA[2], Hirofumi YOSHIKAWA[3], Yasuhiko SEKINE[1], Fujio KAWAMURA[1] ([1]Rikkyo Univ., [2]Chuo Univ., [3]Tokyo Univ. of Agriculture)

いくつかのリボソームタンパク質は翻訳以外に転写や DNA 複製の制御などに関与していることが報告されている。そこで、本研究ではリボソームタンパク質が枯草菌の胞子形成に関与しているのではないかと考え、リボソームタンパク質遺伝子内の点変異により胞子形成能が低下した変異体の取得を試みた。枯草菌は 57 種のリボソームタンパク質遺伝子を染色体 DNA 上に有しており、そのいくつかはオペロンの形で存在している。その中でも、S10-*spc* オペロンが最も大きく、21 種のリボソームタンパク質遺伝子が集中して存在している。そこで、本研究では、S10-*spc* オペロンの前半の S10 オペロンに着目した。エラー校正活性の低い PCR 酵素を利用して、S10 オペロンと上流領域に薬剤マーカー遺伝子を含んだ PCR 断片を作成後、自然形質転換能を利用して形質転換した。そして、薬剤耐性および高温で胞子形成率が低下した変異株を選択したところ、S10 リボソームタンパク質の H56R の変異で胞子形成能が欠損した *rpsJ56* 株を取得した。*rpsJ56* 株の増殖速度を測定したところ、野生株に比べて低温では低下するが、高温では回復することが分かった。次に、37℃の対数増殖期におけるリボソームのプロファイルを求めたところ、野生株と変化がないことが分かった。胞子形成率を 32℃、37℃、45℃の各温度条件下で測定した結果、どの温度においても胞子形成が見られないことが分かった。さらに、胞子形成期の細胞を顕微鏡観察で観察した結果、胞子形成過程の stage II で見られる細胞膜による不等分裂、および染色体 DNA の凝集が見られなかった。この結果から、S10 リボソームタンパク質は胞子形成の開始に必要な Spo0A のリン酸化の過程に関与していることが示唆された。そこで、*rpsJ56* 株から胞子形成率が回復した復帰突然変異体を 4 株単離したところ、すべて同じ位置のアミノ酸の R56C の変異であることが分かった。現在、新たに S10 リボソームタンパク質の L52P の変異により胞子形成能が低下した *rpsJ52* 株を用いて、胞子形成率の回復したサプレッサー変異体の単離を試みた。その結果、*rpsJ* 遺伝子以外の変異によるサプレッサー変異体を取得した。本大会では、*rpsJ52* のサプレッサー変異体を含めた解析結果を報告する。

Bacillus subtilis, ribosomal protein, *rpsJ*

講演番号：3B13a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ B 校舎 13 会場

枯草菌の緊縮応答制御時、定常期、胞子形成期の三期におけるダイマーリボソーム形成

Analysis of a regulatory mechanism for the dimerization of ribosome during stringent response, stationary phase and sporulation phase in *Bacillus subtilis*.

○田上 和美[1]、渡辺 和哉[1]、尾崎 克也[2]、花井 亮[1]、河村 富士夫[1] ([1]立教大学理学部生命理学科、[2]花王生科研)
○Kazumi TAGAMI[1], Kazuya WATANABE[1], Katsuya OZAKI[2], Ryo HANAI[1], Fujio KAWAMURA[1] ([1]Rikkyo Univ., [2]Kao Corporation)

多くのバクテリアは、生育環境中のアミノ酸の枯渇を感知すると、ATP と GTP から ppGpp（グアノシン四リン酸）を合成し、DNA 複製や rRNA 合成、タンパク質合成を阻害することで細胞の増殖を停止させる緊縮応答制御機構を有している。枯草菌における ppGpp 合成酵素は、ppGpp の合成と分解の両機能を有する RelA と ppGpp の合成ドメインのみを有する YjbM と YwaC の三種の存在が知られている。ppGpp 合成酵素の三重遺伝子欠失株において YwaC の発現を誘導させたところ、細胞の増殖が約 20 分で停止し、細胞内には、休眠・不活化状態であるダイマーリボソームが蓄積されていた。さらに、このダイマーリボソーム形成には、胞子形成開始期特異的なシグマ因子である SigH に依存して発現する *Bs*HPF が必須であることを明らかにした(Tagami *et al*., *MicrobiologyOpen* 1(2):115-134, 2012)。これらの結果より、枯草菌におけるダイマーリボソームの形成には ppGpp 合成酵素が関与することが示唆されたため、ppGpp 合成酵素単一保有株(Δ*relA* Δ*ywaC* 株, Δ*relA* Δ*yjbM* 株, Δ*jbM* Δ*ywaC* 株)と三重欠失株(Δ*relA* Δ*jbM* Δ*ywaC* 株)で人為的に緊縮応答を引き起こすことで、ダイマーリボソーム形成への影響を解析した。その結果、野生株、および ppGpp 合成酵素単一保有株では *Bs*HPF タンパク質の合成が起こりダイマーリボソームが形成されるのに対し、ppGpp 合成酵素三重欠失株では *Bs*HPF タンパク質は合成されずにダイマーリボソームも形成されなかった。以上の結果より、ppGpp 合成酵素はダイマーリボソームの形成に直接的には作用しないが、三種の ppGpp 合成酵素を欠失させるとリラックスの表現型になりダイマーリボソームは形成されないことが明らかになった。

枯草菌野生株は通常のライフサイクルの定常期や胞子形成期初期においてもダイマーリボソームを形成するが、これらの条件下では、ppGpp 合成酵素単一保有株や三重欠失株も野生株と同様にダイマーリボソームを形成した。また、YwaC 誘導系ではダイマーリボソーム形成に必須な因子である *Bs*HPF は SigH 依存的に発現する一方、定常期や胞子形成期初期における形成時には SigB と SigH 依存の両プロモーターから転写が誘導されていた。以上の結果から、枯草菌は緊縮応答時と定常期および胞子形成期初期では異なる機構でダイマーリボソームが形成されるということが示唆された。

Bacillus subtilis, stringent response, ribosome dimerization

講演番号：3B13a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ B 校舎 13 会場

枯草菌の胞子形成期において EndoA が rRNA の分解に関与する
EndoA is involved in the rRNA degradation during sporulation in *Bacillus subtilis*

○渡辺 和哉、矢野 晃一、田上 和美、河村 富士夫（立教大学理学部生命理学科）
○Kazuya WATANABE,Koichi YANO,Kazumi TAGAMI,Fujio KAWAMURA (Rikkyo Univ.)

枯草菌は栄養源の枯渇など、生育条件の悪化により胞子を形成することが知られている。胞子形成は、Spo0A タンパク質がリン酸化することで開始し、Spo0A リン酸はσ^Hの転写を上昇させる。不等分裂後、前胞子細胞側でσ^Fの発現が、次に母細胞側でσ^Eの発現がそれぞれ誘導されることで胞子形成の初期過程は進行する。枯草菌の野生株のリボソームは、対数増殖期ではタンパク質合成を活発に行う 70S リボソームを形成するが、胞子形成期においては 70S リボソームが 2 つ結合したダイマーリボソームを形成する。また、胞子形成初期に rRNA が分解され、続いてリボソームタンパク質が減少することが、当研究室で見出された。そこで、rRNA を特異的に分解する RNase が胞子形成初期に発現すると考え、胞子形成初期の様々な遺伝子の転写因子やシグマ因子との関係を調べるために、*spo0A*、*sigH*、*sigF*、*sigE* の各遺伝子欠失株の胞子形成過程におけるリボソームと、rRNA のプロファイル解析を行った。その結果、*spo0A* 遺伝子欠失株と *sigH* 遺伝子欠失株では、野生株のような rRNA の分解を確認することができなかった。一方で、*sigF* 遺伝子欠失株と *sigE* 遺伝子欠失株では、rRNA の分解を確認することができた。このことから、rRNA を特異的に分解する RNase は、*spo0A* 遺伝子や、*sigH* 遺伝子に依存して発現することが強く示唆された。

大腸菌の rRNA を分解する RNase として、MazF が報告されている。MazF のホモログとして、枯草菌では EndoA が存在する。EndoA は *ndoA* 遺伝子によってコードされている endoribonuclease である。*ndoA* 遺伝子欠失株では、ダイマーリボソームが形成されるが、rRNA の分解は、野生株と比べて明らかに阻害されていた。このことから、EndoA は rRNA を分解する RNase であることが示唆された。

Bacillus subtilis, rRNA, EndoA

講演番号：3B13a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ B 校舎 13 会場

ビフィズス菌のリボゾーム結合部位の解析と翻訳効率の向上

Analysis of ribosome binding site in *Bifidobacterim* to improve translation efficiency

○鈴木 徹、賀 建龍、坂口 広大（岐阜大学連合農学研究科）
○ Tohru Suzuki,Jianlong He,Kouta Sakaguchi (Gifu Univ. United Graduate School of Agricultural Science)

【目的】翻訳は発現において重要なプロセスであり、4 つのフェーズに分かれている：開始、伸長、終結、およびリボソームリサイクリングである。これらのフェーズのなかで、翻訳開始は一番重要である。多くの結果から、翻訳開始にとって、RBS の塩基配列やスペーサーが重要である事が示されている。しかし、RBS に関する研究は主に大腸菌で行われており、ビフィズス菌の情報は非常に限られている。そこで、効率的な RBS 配列とスペーサーの長さを調査するためにインフォマティクスと実験的評価を行った。

【方法･結果】*B. longum* の CDS の開始コドン上流-1～-18 から 5 nt と 6 nt と 7nt のシーケンスを数えた。ほとんどすべてのシーケンスは *B. longum* の 16S rRNA の 3’末端に相補する、AAGGAG であり、6 nt なかで最も高い頻度を示した。*B. longum* の 16S rRNA の 3’末端（5’-･･･CACCUCCUUUCU -3’）配列情報から、AAGGAG の 6 nt スペーサーを中心に、5 nt から 11nt の様々な長さの RBS を設計した。これらのシーケンスを発現ベクターに導入し、活性を検定した。RBS は、統計データと一致し AAGGAG（6 nt）のときに最大の活性を有していた。RBS が 6 nt より長いとき、活性は減少した。原因としてリボソームと mRNA の結合が強すぎ、翻訳を開始するためリボソームの解放を妨げているという可能性が考えられる。*B. adolescentis* ATCC15703 と *B. bifidum* PRL2010、*B. animalis* subsp. *lactis* AD011 の RBS 配列の頻出回数を調べたところ、同じ方法で、6 nt では AAGGAG が最も多く使用されているシーケンスだった。これらの結果により、AAGGAG が Bifdobacteria における標準的な RBS 配列であることが明らかとなった。

B. longum と他の数種のビフィズス菌における AAGGAG と開始コドンの間のスペーサーを分析した。*B. longum* NCC2705 のスペーサーの長さは主に 5 nt～8 nt で、他のビフィズス菌でも類似の結果が得られた。我々は、開始コドンと RBS の間が 4 nt～9 nt を様々な長さのスペーサーを持つ RBS（GAAGGA 又は AAGGAG）を設計した。その結果、5 nt スペーサーの時に活性が最も強かった。4 nt スペーサーは活性が低く、5 nt スペーサーの活性のわずか 15%～30%しかなかった。

以上の結果により、*B. longum* における、効率的な RBS の配列は AAGGAG であり、最も適したスペーサーは 5 nt であることが示された。実験結果とインフォマティクスの結果は相関を示したことから、我々はこれらの予測方法は他の細菌にも適用できると考える。

Jianlong He, Kouta Sakaguchi, Tohru Suzuki (2012) J. Biosci.Bioeng.133, 442–444

Ribosome binding site, Shine-Dalgarno sequence, catalase

講演番号：3B13a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ B 校舎 13 会場

大腸菌 RNA ポリメラーゼ RpoA タグ株のリボソーム形成能の解析

Effect of ribosome assembly by modification of RNA polymerase alpha subunit at N terminus in Escherichia coli

○平 優季[1]、片山 映[3]、矢野 晃一[4]、河村 富士夫[4]、石浜 明[1,2]、山本 兼由[1,2]（[1]法政大学・生命科学、[2]マイクロナノセンター、[3]日本医科大学院・医、[4]立教大学・理、生命理学研究センター）
○Yuki TAIRA[1], Akira KATAYAMA[3], Koichi YANO[4], Fujio KAWAMURA[4], Akira ISHIHAMA[1,2], Kaneyoshi YAMAMOTO[1,2] ([1]Dept. Frontier Biosci., Hosei Univ., [2]Research Center for Micro-Nano Tech., Hosei Univ., [3]Dept. Biochem., Nippon Med. Sch., [4]Mol. Biol., Dept. Life Sci., Research Center for Life Sci., Rikkyo Univ.)

細菌の転写装置 RNA ポリメラーゼは 5 種類のサブユニットから構成される。コア酵素は 4 サブユニットααββ'であり、αサブユニットはコア複合体の集合核であるとともにプロモーターの認識で重要な機能をもつ。大腸菌ゲノム上の *rpoA* 遺伝子の開始コドン上流に in frame で 3 X FLAG タグ配列を導入した大腸菌 RNA ポリメラーゼ RpoA タグ株（KAN034）を作製した。ゲノム上の *rpoA* 遺伝子へのタグ配列導入にはクロラムフェニコール耐性遺伝子をマーカーとして用いており、KAN034 はクロラムフェニコール耐性により単離した。KAN034 は親株と比較して増殖に変化はなかったが、クロラムフェニコールに対して高い感受性を示すことが確認された。O'Farrell 二次元電気泳動法により親株と KAN034 の全タンパク質可溶画分を比較した結果、少なくとも 2 つのスポットが KAN034 で顕著に減少していることを確認し、トリプシン消化産物の質量分析からこれらのタンパク質はグルコース PTS タンパク質 Crr とリボソームサブユニットタンパク質 RpsF であることを同定した。つぎに、ショ糖密度勾配遠心分離法を用いたリボソームサブユニット量の測定を行った。親株では増殖相の対数増殖期から定常期かけて 50S サブユニットが減少し、定常期にはほぼ消失するが、KAN034 ではこの 50S サブユニット量の十分に消失しなかった。これらの結果より、大腸菌の RNA ポリメラーゼ RpoA タグ株におけるリボソーム形成について考察する。

Escherichia coli, RNA polymerase alpha subunit, ribosome assembly

講演番号：3B13a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ B 校舎 13 会場

大腸菌の酸性と嫌気環境へ同時に適応する分子機構

Molecular mechanism for Simultaneous adaptation to both acid and anaerobic conditions in *Escherichia coli*.

○山中 幸[1]、石浜 明[2]、山本 兼由[1,2] ([1]法政大生命科学、[2]マイクロナノセンター)
○Yuki Yamanaka[1], Akira Ishihama[2], Kaneyoshi Yamamoto[1,2] ([1]Dept. Frontier Biosci., Hosei Univ., [2]Research Center for Micro-Nano Tech., Hosei Univ.)

大腸菌は環境中から動物ホスト腸内に定着するまで様々な環境変化へ適応する必要がある。経口から侵入した大腸菌は食道を通り、胃で強酸に晒されると同時に酸素量が少ない嫌気環境への適応が必須となる。様々な環境変化においても生存できる多様な適応能力をもつ大腸菌が、強い酸性環境適応と同時に嫌気条件への適応機能を発現するシステマティックネットワークについて報告する。

大腸菌の主要な酸性適応システムであるグルタミン酸依存的（GAD）酸耐性機構は、グルタミン酸脱炭酸酵素 GadAB とグルタミン酸／©-アミノ酪酸のアンチポーターGadC により構成され、転写レベルでの遺伝子発現によって制御される。これら遺伝子群（*gadA*、*gadBC*）は、AraC/XylS ファミリーに属する YdeO が GAD システム遺伝子群のマスターアクチベーターである GadE 発現を活性化する。ChIP-chip 解析により大腸菌細胞内での YdeO ゲノム分布を調べた結果、7 カ所に特異的に結合していることが明らかとなった。さらに Transcriptome 解析から、これら 7 カ所の YdeO 結合位置周辺に位置する *nhaA*、*hyaA*、*appC*、*gadE*、*gadW*、*slp*、*yiiS* の転写が YdeO により活性化されていた。これらのプロモーター活性についてレポーター解析を行った結果、*nhaA*、*appC*、*yiiS* を除く 4 つプロモーターが YdeO により活性化されることを確認した。核様体タンパク質の H-NS によりジーンサイレンシングされる *gadE*、*gadW*、*slp* プロモーターは *hns* 欠失株においても YdeO による発現が誘導された。また、YdeO による *hyaA* プロモーター発現誘導に必要な 20 塩基の領域をレポーター解析から特定し、特徴的なリピート配列（YdeO-box）を見出した。YdeO-box は *nhaA* を除く全ての YdeO 結合領域に存在していた。また、*ydeO* 遺伝子の発現は酸性条件だけでなく嫌気条件で誘導されるとともに、嫌気条件での対数増殖期細胞では細胞内 YdeO 量が増加した。これらの結果より、YdeO は GAD 酸耐性、Na^+/ H^+対向輸送、嫌気呼吸鎖の遺伝子発現を活性化する嫌気条件で機能するアクチベーターであり、細胞内外のプロトンを利用して酸性と嫌気環境へ適応する生理機能を担っていることが示唆される。

Escherichia coli, YdeO regulon, acid and anaerobic responses

講演番号：3B13a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ B 校舎 13 会場

口腔内連鎖球菌 *Streptococcus mutans* における RNA ポリメラーゼ結合タンパク質を介した酸素応答機構の解析

Evaluation of RNA polymerase binding-protein mediated oxygen sensing mechanism in *Streptococcus mutans*

○安部 達也、高橋 徹、市村 浩樹、粕谷 晴美、山本 裕司、向井 孝夫（北里大・獣医）
○Tatsuya ABE, Toru TAKAHASHI, Hiroki ICHIMURA, Harumi KASUYA, Yuji YAMAMOTO, Takao MUKAI (Kitasato Univ.)

＜目的＞齲蝕原性菌である *Streptococcus mutans* は、好気的な環境の歯の表面から嫌気的なプラーク内まで様々な環境に生息するため、幅広い酸素分圧に適応しなければならない。*S. mutans* では幾つかの環境の変化に応答する制御因子が報告されており、抗酸化酵素を含む種々の遺伝子の発現を制御する蛋白質として 2 つの Spx ホモログ（SpxA、SpxB）が同定されている。これまでに我々は、*S. mutans* の抗酸化因子の酸素による誘導には SpxA、SpxB 両蛋白質が必要であることを明らかにしてきた。Spx は枯草菌で見出された RNA ポリメラーゼ結合蛋白質であり、①分子内のシステイン残基の酸化により RNA ポリメラーゼへの作用が変化すること、② ClpXP プロテアーゼ複合体による分解で Spx の細胞内濃度が調節されることの 2 つによって遺伝子の発現を制御すると報告されている。枯草菌とは異なり、幅広い酸素分圧に適応する *S. mutans* では、いずれかの制御機構が酸素の感知に関与すると推測される。本研究では Spx 分子を介した酸素応答機構を明らかとするため、①各 Spx のシステイン残基に変異を導入した株を構築し抗酸化蛋白質の発現様式を解析するとともに、②Spx の分解系と推定される ClpX 及び ClpP の欠損株を作製し、細胞内の両 Spx 蛋白質の濃度と抗酸化タンパク質の発現に対する影響を検討した。
＜方法＞Spx 分子内の CXXC モチーフを SXXS あるいは AXXA モチーフに置換したプラスミドを構築し、下流に導入した抗生物質耐性遺伝子をマーカーとして、２点相同組換えによってゲノム上に導入し変異株を作製した。ClpX 及び ClpP 欠損株は、ゲノム上の構造遺伝子に抗生物質耐性遺伝子を導入することで作製した。これらの変異株を好気・嫌気条件下で培養し、抗酸化タンパク質（Dpr, Nox-2, AhpC）及び両 Spx の発現様式を解析した。
＜結果＞SpxA は培養条件や ClpXP 欠損の影響を受けず、一定の細胞内濃度を保ったが、SpxA システイン変異株（SXXS 変異）では減少した。システイン変異株では、SpxA 濃度の減少に伴い Dpr と AhpC の発現量が低下したが､Nox-2 の嫌気での発現量は好気と同程度まで増加した｡これらの結果から SpxA のシステイン残基が酸素による遺伝子の発現に重要な役割を持つことが示された。一方 SpxB のシステイン残基の置換は、抗酸化蛋白質と SpxB の発現に影響を与えなかった。SpxB の細胞内濃度は、酸素への暴露や ClpXP の欠損によって増加したため、ClpXP による分解によってその細胞内濃度が調節されると推測された。しかし、ClpXP の欠損によって嫌気での SpxB 濃度が増加しても、抗酸化蛋白質の発現は誘導されず、SpxB 以外に抗酸化因子の発現を抑制的に制御する因子の関与が示唆された。

regulator, Spx, oxygen sensing

講演番号：3B13a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ B 校舎 13 会場

LysR ファミリー転写制御因子 TTC1871 の機能解析

Functional analysis of TTC1871 LysR-type transcriptional regulator

○松下 創、富田 武郎、葛山 智久、西山 真（東大・生物工学セ）
○Hajime Matsushita,Takeo Tomita,Tomohisa Kuzuyama,Makoto Nishiyama (Univ.Tokyo)

【目的】

LysR-type transcriptional regulators (LTTRs)はバクテリアにおける転写制御因子の中でも最も大きなファミリーの一つである。LTTRs の多くは細胞内の小分子を感知して転写を正や負に制御し、その制御様式もローカルな制御からグローバルな制御まで様々である。70℃で生育する高度好熱性細菌である T. thermophilus HB27 はそのゲノム内に TTC1800 および TTC1871 という二つの LTTRs 遺伝子を有しているが、それらの機能解析は未だなされていない。そこで我々はまず TTC1871 に焦点を当て、その機能解析を行った。

【結果と考察】

TTC1871 は TTC1870 (branched-chain amino acid aminotransferase 遺伝子; ilvE)の上流に隣接して存在する遺伝子であり、TTC1871 の 3’端および TTC1870 の 5’ 端の一部はオーバーラップしている。この遺伝子配置から TTC1871 と TTC1870 はポリシストロニック mRNA として転写されることが予想されたが、RT-PCR を行ったところ TTC1870 は TTC1871 プロモーターからの転写とは異なる独自の転写ユニットを有していることが示唆された。そこで TTC1870 の上流域に対して S1 ヌクレアーゼマッピングを行うことで TTC1870 が開始コドンの約 10 bp 上流に転写開始点を持つことを明らかにした。TTC1871 の TTC1870 の転写制御に対する関与を調べるため、Escherichia coli を用いて C 末端に His タグを付加した TTC1871 を発現・精製し、EMSA を行ったところ、TTC1871 は TTC1870 上流には結合せず、TTC1871 自身の上流部分に結合することが明らかになった。DNase I フットプリントによりその結合部位を特定したとろ、TTC1871 の上流に広い範囲にわたって保護が見られ、また-10 領域と思われる箇所にも保護が見られたことから TTC1871 は自己の転写を抑制していることが示唆された。また、TTC1871 のアミノ酸配列において、酸化還元ストレス応答を担う OxyR という転写制御因子に高度に保存される Cys199 と Cys208 という二つのシステイン残基が保存されていることが見出された。そこでアッセイ系における DTT の有無による DNA 結合能の変化を EMSA により観察したところ、TTC1871 は DTT 存在下でのみ TTC1871 上流に結合することが明らかになった。また、TTC1871 の上流に逆向きにコードされた遺伝子 TTC1872 が Pseudocatalase をコードしていることからも、TTC1871 は還元状態において DNA に結合し、TTC1872 の制御を介した酸化ストレス応答を行う酸化ストレス応答レギュレーターであることが示唆された。

transcriptional regulation, oxidative stress response, *Thermus thermophilus*

講演番号：3B13a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ B 校舎 13 会場

Pseudomonas putida のペルオキシレドキシン AhpC 遺伝子（*ahpC*）の調節機構の解析
An analysis of the regulatory mechanism of *Pseudomonas putida ahpC*
伊藤 史浩[2]、田村 知佳[1]、小林 絵梨[1]、○志川 佳奈美[1]、福森 文康[1]（[1]東洋大生命、[2]東洋大院生命）
Fumihiro ITO[2], Chika TAMURA[1], Eri KOBAYASHI[1], ○ Kanami SHIKAWA[1], Fumiyasu FUKUMORI[1] ([1]Toyo Univ., [2]Grad. School Toyo Univ.)

【目的】我々はこれまでに、*Pseudomonas putida*のペルオキシレドキシンとその還元酵素AhpCF、カタラーゼ(KatA, KatB)、チオレドキシン還元酵素TrxBなどの遺伝子が、転写因子OxyRによる発現調節を受けることを明らかにしている。*ahpC*の発現量は過酸化物による誘導を受けることで著しく増加し、その転写開始点は経時的に9塩基下流に移行するが、この現象は*ahpC*以外のOxyR依存性の遺伝子では見出されず、他のOxyR依存性遺伝子と調節機構が異なる可能性が示唆されている。*ahpC*はOxyRにより制御されるが、転写調節については不明な部分が多く、認識するσ因子についても推定されていない。本研究は、*ahpC*のプロモーター領域およびOxyR結合領域の配列を改変し、発現量の変化を調べることで、*ahpC*の転写機構についての理解を深めることを目的としている。
【方法・結果】*P. putida* KT2442-oxyR1 株(oxyR1 株)は、*oxyR* の点変異により構成的に OxyR 依存性遺伝子が誘導されている株である。*ahpC* のプロモーターおよび構造遺伝子を含むプラスミド(pUCP26Km-ahpC)を用いてプロモーター領域の改変と解析を行うために、oxyR1 株の染色体の *ahpC* プロモーター領域から OxyR 結合領域(OBD)欠損した株を、スーサイドベクターpKNG101 を用いた相同組換えにより作出した。RT-PCR による mRNA 量の定量から、OBD の欠失により *ahpC* の発現量は約 3 オーダー減少することが示され、*ahpC*の発現における OxyR の重要性が確認された。OBD 欠損株はアルキル過酸化物に対する耐性が著しく低下したが、過酸化水素に対してより耐性となった。OBD 欠損株に pUCP26Km-ahpC を導入し、過酸化物に対する耐性を調べたところ、oxyR1 株に匹敵する耐性度を示した。染色体の OBD の欠失により *ahpF* の発現は過酸化物による誘導を受けないことから、*oxyR1* 変異により高発現した AhpC が基質を還元することで酸化された際に、非誘導時に細胞内に存在する AhpF 量でこれを再生可能であることを示唆するものと考えられる。プロモーター領域の塩基配列の重要性について検討するために、インバース PCR による変異の導入を行った。これまでに、－35 領域へランダムな変異の導入により、*ahpC* の発現誘導が抑制されることが判明している。過酸化物による誘導により *ahpC* の転写開始点が経時的に移動する現象が、複数のプロモーターの存在を意味するものと考え、変異株をアルキル過酸化物により処理して *ahpC* の誘導を調べたが、発現量がより低下した変異の株ほど誘導がかかりにくいことが示されており、作業仮説の再構築を行っている。OBD、－35 領域および－10 領域へ変異を導入することにより、OxyR 結合性や *ahpC* の発現量の変化について解析を行い、結果を併せて報告する予定である。

ahpC promoter, OxyR, gene expression

講演番号：3B13a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ B 校舎 13 会場

細胞外電子伝達に関与する外膜シトクロム遺伝子の発現制御機構の解析

Analyses of mechanism for transcriptional regulation of outer membrane cytochrom genes in *Shewanella oneidensis* MR-1

○笠井 拓哉、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Takuya KASAI,Atsushi KOUZUMA,Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. of Pharmacy and Life Sciences)

【背景・目的】*Shewanella oneidensis* MR-1 株は微生物燃料電池 (microbial fuel cells; 以下 MFC) におけるモデル電流生産細菌として知られており、その電流生産メカニズムについて世界的に研究が進められている。MR-1 株は細胞外膜に局在する導電性シトクロムタンパク質等 (OmcA, MtrA, MtrB, MtrC) から構成される細胞外電子伝達経路 (Mtr 経路) を有しており、本経路を介して細胞内の基質代謝により放出された電子を細胞外の電極に伝達することによって電流を生産することが明らかとなっている。Mtr タンパク質の生成量を制御・維持することは、MFC の電流生産量を向上させ、またその電流生産活性を持続させるうえで非常に重要であると考えられる。しかし Mtr 経路の構成タンパク質をコードする遺伝子 (*omcA, mtrC, mtrA, mtrB*) の発現制御メカニズムは未だに解明されていないのが現状である。本研究ではこれら *mtr* 遺伝子群の転写制御機構を明らかにすることを目的とし、*mtr* 遺伝子群の転写単位および発現制御パターンに関して詳細な解析を行った。

【方法・結果】MR-1 株は全ゲノム配列が公開されており、*mtr* 遺伝子群 (*omcA, mtrC, mtrA, mtrB*) は同一方向にクラスターとして存在することが明らかとなっている。しかしそのオペロン構造は未解明であったため、RT-PCR による転写単位の解析を行った。その結果、*omcA* から *mtrB* までのクラスター領域（遺伝子間領域を含む）が全て mRNA として転写されていることが明らかとなった。一方、定量的 RT-PCR により各遺伝子の発現パターンを詳細に解析した結果、*omcA* は嫌気的な条件で発現が誘導されるが、*mtrC* はむしろ好気的な条件で発現が誘導されることが明らかとなり、両遺伝子の発現パターンには明確な違いが存在することが示された。またプライマー伸長法により *omcA* および *mtrC* 上流域の転写開始点を解析した結果、*omcA* 上流と *mtrC* 上流にそれぞれ異なる転写開始点が見出された (図)。以上の結果から、*omcA* と *mtrC* 上流にはそれぞれ異なる転写調節領域が存在することが示唆された。*omcA* および *mtrC* は共に細胞外膜に局在するシトクロムをコードする遺伝子であり、両遺伝子の機能的な違いは不明確であったが、本研究により両遺伝子が異なる様式にて発現制御を受けることで生理学的に異なる役割を果たしている可能性が示唆された。現在 *lacZ* 遺伝子を用いたレポーターアッセイにより、*omcA* および *mtrC* 上流の転写調節領域についてさらに詳細な解析を行っている。

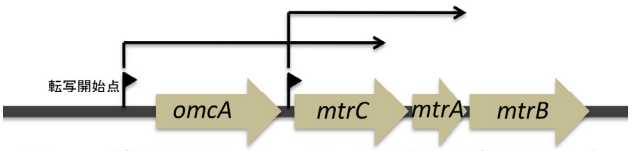


図　*mtr*遺伝子クラスター内に見出された転写開始点

Shewanella oneidensis, extracellular electron transfer, outer membrane cytochrome

講演番号：3B13a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ B 校舎 13 会場

鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* におけるテトラチオン酸ハイドロラーゼ遺伝子の転写と制御に関する研究
Transcriptional regulation of a tetrathionate hydrolase gene in *Acidithiobacillus ferrooxidans*
○金尾 忠芳[1]、伊藤 恵[2]、村上 知佐[3]、上村 一雄[1] ([1]岡山大院環境生命、[2]岡山大農、[3]岡山大院自然)
○Tadayoshi Kanao[1], Megumi Ito[2], Chisa Murakami[3], Kazuo Kamimura[1] ([1]Okayama Univ., [2]Okayama Univ., [3]Okayama Univ.)

【背景と目的】鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* は二価鉄および還元型無機硫黄化合物をエネルギー源として二酸化炭素を同化する好酸性の化学合成独立栄養細菌であり、生育するエネルギー源（二価鉄または還元型無機硫黄化合物）に依存してその代謝を切換えることが知られている。我々は、本菌の異化的硫黄代謝における鍵酵素の一つ、テトラチオン酸ハイドロラーゼを分離精製し、これをコードする遺伝子（*Af-tth*）を同定した。*Af-tth* の発現量を定量的 RT-PCR によって解析したところ、二価鉄生育菌体における発現量を 1 とした場合、硫黄生育菌体では 60±20、テトラチオン酸生育では 180±5 となり、*Af-tth* の発現は生育基質により転写レベルで調節されていることが分かった。染色体上の本遺伝子周辺を解析した結果、この上流に 422bp の間隙領域を挟んで２組の二成分制御系に相当するタンパク質をコードすると推定される４つの遺伝子が確認された。本研究では、*Af-tth* の転写および転写制御とその上流に位置する遺伝子との関係について調べることを目的とした。
【方法および結果】二成分制御系をコードすると推定される遺伝子の大腸菌による組換え発現は不溶性となり、正常な組換えタンパク質の獲得には至らなかった。そこで、それぞれの遺伝子をまたがる様にプライマーをデザインし、RT-PCR により各遺伝子の転写を調べた結果、これら４つの遺伝子および *Af-tth* は共転写されていることが分かった。さらにこれら二成分制御系遺伝子においても定量的 RT-PCR によって生育基質の違いによる発現レベルの解析を行った。その結果、二価鉄・硫黄・テトラチオン酸の各生育菌体においてほとんど変化せず、*Af-tth* の場合に確認された顕著な差は認められなかった。このため *Af-tth* の発現を直接支配するプロモーターの存在が示唆された。プライマー伸長法によって *Af-tth* の転写開始点を決定するとともに、推定されるプロモーター配列を同定した。さらに *Af-tth* の開始コドンの上流 422bp の遺伝子間領域をβ–ガラクトシダーゼ遺伝子の直前に挿入したプラスミドを構築し、これで大腸菌 DH5α株を形質転換して LacZ 活性を測定した。この結果、僅かながら活性が検出され、この遺伝子間領域がプロモーター活性を有することが実証された。
現在、*A. ferrooxidans* の無細胞抽出液よりこの領域に特異的に結合するタンパク質の探索を行っている。

tetrathionate hydrolase, transcriptional regulation, sulfur metabolism

講演番号：3B13a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ B 校舎 13 会場

Bacillus megaterium の光応答：カロテノイド生産の光誘導と細胞外粘性物質生産の光抑制
Photoresponese of *Bacillus megaterium* : photoinducible carotenoid production and photoinhibition of extracellular viscosity substance production
○見世 光、高野 英晃、上田 賢志（日大生資科・生命セ）
○Kou Mise,Hideaki Takano,Kenji Ueda (Nihon Univ.)

【目的】LitR はビタミン B_{12} を光受容分子として利用する光感受性のリプレッサー蛋白質であり、その類似体はグラム陰性・陽性を問わず多様なバクテリアのゲノムにコードされている。我々は前大会において、*Bacillus megaterium* QM B1551 のカロテノイド（Crt）生産は明条件下において顕著に促進され、そこに LitR が関与することを報告した。ここでは、本菌における Crt 生産の光誘導機構の詳細と、新たに見いだした細胞外粘性物質生産の光抑制の機構を解明することを目的とした。
【方法と結果】温度感受性ベクターを用いた遺伝子破壊実験により、*crt* 破壊株、*litR* 破壊株、コバラミン合成破壊株の作製を行った。取得した破壊株を明・暗条件下で培養し、Crt ならびに細胞外粘性物質の生産に対する光の影響を調べた。*crt* 破壊株は明・暗条件下で Crt 非生産性であった。一方、*litR* 破壊株では明・暗に関わらず顕著な Crt 生産がおこった。また、ビタミン B_{12} の合成に関わる遺伝子の破壊株では、明・暗に関わらず低いレベルで Crt が生産された。これらの破壊株の表現型は、ビタミン B_{12} を光受容分子とする LitR タンパク質が *crt* 遺伝子の発現に対する光感受性リプレッサーであるという生化学的な解析結果とよく一致していた。
Crt 生産とは逆に、暗条件で培養した *B. megaterium* 野生株は菌体外に粘性物質を生産したのに対して、明条件ではそれが生産されないことが観察された。この野生株で観察された細胞外粘性物質生産は、*litR* 破壊株においては明・暗両条件下において顕著に低下していた。また、*crt* 破壊株でも明・暗両条件下で生産性が低いレベルで確認された。このことから、LitR によって生産が制御されている Crt が細胞外粘性物質生産に関わっていることが示唆された。細胞外粘性物質の生産は、サイズの異なる 7 種のプラスミドを保持する *B. megaterium* QM B1551 では認められた一方で、プラスミド非保持菌である *B. megaterium* DSM319 では認められなかった。両菌株のゲノムは高い類似性を示すことから、細胞外粘性物質の合成遺伝子は *B. megaterium* QM B1551 が有するプラスミド上にコードされている可能性がある。このことは、*B. megaterium* QM B1551 の全プラスミドが欠落した PV447 株では細胞外粘性物質の生産が認められなかったことからも支持された。

Bacillus megaterium, LitR, carotenoid

講演番号：3B13a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ B 校舎 13 会場

枯草菌におけるラムノース異化に関わる遺伝子群の発現制御機構の解析

Transcriptional regulation of genes involved in rhamnose catabolism in *Bacillus subtilis*

○広岡 和丈、枝廣 貴成、木村 晃輔、藤田 泰太郎（福山大生命工・生物工）
○Kazutake HIROOKA,Takayoshi EDAHIRO,Kosuke KIMURA,Yasutaro FUJITA (Fukuyama Univ.)

【目的】枯草菌は植物根圏の土壌中で普遍的に存在し、植物と直接共生関係にはないがその生育促進に作用する有用根圏微生物であることが知られている。我々は、植物から浸潤するフラボノイドを枯草菌が根圏環境を認識するためのシグナル分子として感知し、それに適応するために遺伝子発現制御を行うと考え、フラボノイド応答性転写制御系の研究を進めてきた。植物が生産するフラボノイドの多くは、グルコースやラムノース等で配糖化されている。枯草菌において、これまで明らかにされていなかったラムノース異化に関わる酵素群とその発現制御を担う転写因子をコードする遺伝子群（*yuxG-yulBCDE*）が見出され、その解析を行うことで根圏土壌中での枯草菌の炭素代謝調節機構の一端を知ることを目的とした。
【実験・結果】ノザンブロットおよびプライマー伸長解析によって、*yuxG-yulBCDE* がオペロンを成すことと、その転写開始点を明らかとした。また、このオペロンの発現が炭素源としてラムノースを培地に添加することで誘導されることも示された。*yulB* は DeoR ファミリーに属する転写因子をコードし、これを大腸菌で大量発現させて調製した組換えタンパク質と、*yuxG* 上流制御領域に対応した DNA プローブを用いて DNase I フットプリント解析を行った結果、YulB がダイレクトリピートを含む領域に結合することが示された。また、この制御領域にはカタボライト制御を司る CcpA の認識配列である CRE が含まれていたので、CcpA とその活性化に必要な P-Ser-HPr の組換えタンパク質を用いて、同様のフットプリント解析を行い、CcpA 複合体が CRE に結合することを示した。しかし、YulB と CcpA 複合体の結合領域は部分的に重複しており、両制御因子を添加した条件でのフットプリント解析では、CcpA 複合体の CRE への結合は認められなかった。また、組換え YulB タンパク質と *yuxG* 制御領域の DNA プローブを用いたゲルシフト解析では、YulB の DNA 結合はラムノースによって阻害されなかった。一方、*yuxG* 制御領域と *lacZ* との連結を保持した枯草菌株を用いたレポーター解析では、グルコースを炭素源に用いた培地で生育させたときに比べ、ラムノースを用いた場合にβ-Gal 活性の著しい上昇がみられたが、グルコースとラムノースの両方を添加した条件ではラムノースの誘導効果はグルコースが消費されるまで抑制された。以上の結果から、*yuxG-yulBCDE* オペロンは YulB によって抑制され、他の DeoR ファミリーの転写因子の場合と同様に、ラムノースが加えられるとその代謝中間体であるリン酸化糖が誘導物質となって脱抑制されるが、グルコースが存在すると CcpA によってカタボライト抑制を受けることが推測された。

Bacillus subtilis, rhamnose, transcriptional regulation

講演番号：3B13a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ B 校舎 13 会場

転写開始機構に内在する熱ショック応答モデルの提唱

Novel heat shock response mechanism inherent in intrinsic mechanism of transcription initiation.

○佐藤 絢[1]、岩本 裕太[1]、松本 貴嗣[2]、小林 郷菜[1]、小川 陸雄[1]、渡辺 智[1]、千葉櫻 拓[1]、吉川 博文[1] ([1]東京農大・応生科・バイオ、[2]東京農大・ゲノム解析セ)
○Aya SATO[1], yuta IWAMOTO[1], takashi MATUMOTO[2], satona KOBAYASHI[1], michio OGAWA[1], satoru WATANABE[1], taku CHIBAZAKURA[1], hirofumi YOSHIKAWA[1] ([1]Dept of Biosci., Tokyo Univ. of Agric., [2]Genome Res. center, Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】　枯草菌の主要シグマ因子 SigA に依存したプロモーターでは転写調節因子の関与があって初めて熱ショックに応答することが知られていたが、我々は既知の転写調節因子の関与がなくても、熱ショックによって転写量が増加するという現象を見出した。このことからコアプロモーターの配列に依存した新規熱ショック応答の存在が明らかとなった。この熱ショック応答を規定している配列を探索するため、熱ショック応答を示すプロモーターと示さないプロモーターとのキメラプロモーターを作製し、*in vivo* プロモーターアッセイを用いて解析したところ、転写開始点(+1)の G を A に置換すると熱ショック応答の強度が下がり、T または C に置換すると基盤レベルの転写量まで減少したことから、この新規熱ショック応答では転写開始点の塩基が非常に重要であるとわかった。そこで、+1 に依存した熱ショック応答のさらに詳細な分子機構を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】　枯草菌 RNA ポリメラーゼを精製し *in vitro* 転写実験による詳細な解析を試みた結果、+1 の G に依存した転写量の増加には NTP 添加前の pre-initiation の段階で高温であることが重要であった。また、この時、開鎖複合体を定量する過マンガン酸フットプリントを行ったところ、高温処理をしたものでは開鎖複合体の量が増加していた。さらに abortive 転写産物を検出したところ、高温時には abortive 転写産物量が減少することが明らかとなった。これらの結果から、転写開始点に依存した新規熱ショック応答は、RNA ポリメラーゼの温度依存的な開鎖複合体の形成と abortive 転写産物の減少による正規産物の増加、ならびに転写開始における GTP とのアフィニティーによる相乗的効果ではないかと考察した。そこで次に、枯草菌以外の生物の RNA ポリメラーゼでもこのような性質を持つのか検証するため、大腸菌の RNA ポリメラーゼ(シグマ 70 ホロ酵素)を用いて *in vitro* 転写実験を行った。その結果、大腸菌の RNA ポリメラーゼも枯草菌と同様に転写開始点に依存した熱ショック応答を示したことから、これが生物に広く保存された現象である可能性が示唆された。さらに、今回は次世代シーケンサーを用い、枯草菌の転写開始点を non-heat と heat で網羅的に調べる TSS-seq 解析を行った。その結果、有為に熱ショックを示した転写開始点は、ほとんどが G または A であった。

transcription, heat shock, initial nucleotide

講演番号：3B13a15
講演日時、会場：3 月 26 日 11:48～ B 校舎 13 会場

枯草菌における熱ショック応答と転写開始点の網羅的な解析

Comprehensive analysis of transcription start sites in heat shock response of *Bacillus subtilis*

○松本 貴嗣[1]、吉川 博文[1,2] ([1]東京農大ゲノム解析セ、[2]東京農大応生科・バイオ)
○Takashi MATSUMOTO[1], Hirofumi YOSHIKAWA[1,2] ([1]NGRC, Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

4.2 Mb の枯草菌ゲノムには 4422 遺伝子が存在し、様々な培養条件で行われたアレイ解析の結果から約 3000 の転写単位が報告されている。高密度タイリングアレイを用いることで転写開始点のおおよその位置を推定できるが、1 塩基レベルで正確な位置が明らかになっているのは 600 転写単位ほどに過ぎない。また、高発現の遺伝子はシグナル強度が飽和してしまうため、遺伝子内から転写が起きていても上流からの転写と区別できない事例が見られた。より広いダイナミックレンジを持ち、1 塩基の解像度で解析することが可能な次世代シーケンサーを用いて転写開始点の網羅的な決定を試みた。

LB 液体培地, 37℃で対数増殖期初期まで培養後、半量を 49℃へ移して 20 分間の熱ショック処理を行った。各菌体から RNA を抽出し、発現定量解析用の RNA-seq ライブラリーと転写開始点解析用の TSS-seq ライブラリーを作製した。インタクトな RNA の 5’末端がトリリン酸であるのに対し、プロセシングや分解を受けた RNA の 5’末端はモノリン酸になっている。TSS-seq ライブラリーでは特異的な酵素活性を持つヌクレアーゼにより 5’末端がモノリン酸の RNA を分解し、トリリン酸を持つ RNA にのみ合成オリゴを付加することで選択的にシーケンスできるようにした。

イルミナ社の Genome Analyzer II で Paired-End シーケンスを行い、それぞれ 250 万フラグメントのリードデータが得られた。解析の精度を高めるため、同一フラグメントに由来するリードペアは除外し、マッピング位置が遺伝子間の場合はフラグメント数が 3 以上、遺伝子内の場合はフラグメント数が 5 以上の条件を満たすものを転写開始点とした。37℃と 49℃、それぞれの条件で 1000 転写単位に相当する転写開始点が見出され、6 割が共通していた。過去の知見とデータの統合を進めており、概要を報告したい。

本研究は文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業の一環として実施したものである。

Bacillus subtilis, next generation sequencer, transcription start site

講演番号：3B13p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ B 校舎 13 会場

メチロトローフ酵母 $Zn(II)_2Cys_6$ 型転写活性化因子 CbMpp1p のメタノール誘導性プロモーター領域への結合

Binding to the methanol-inducible promoters of a $Zn(II)_2Cys_6$-type transcription factor CbMpp1p in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*

田畑 一巌、○由里本 博也、阪井 康能（京大院農・応用生命）
Kazuyoshi Tabata,○Hiroya Yurimoto,Yasuyoshi Sakai (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】メタノールを単一の炭素源・エネルギー源として利用できるメチロトローフ酵母では、メタノール培養時にアルコールオキシダーゼ（AOD）やジヒドロキシアセトンシンターゼ（DAS）などのメタノール代謝関連酵素が大量に誘導され、強力なメタノール誘導性遺伝子プロモーターは、本酵母を宿主とする異種遺伝子大量発現系に利用されている。我々はこれまでにメチロトローフ酵母 *Candida boidinii* において、メタノール誘導性遺伝子発現に関わる複数の転写活性化因子（CbTrm1p、CbTrm2p、CbHap3p、CbMpp1p など）を取得してきた。この内 $Zn(II)_2Cys_6$ 型 DNA 結合ドメインをもつ CbMpp1p については、自身の発現がグルコース抑制を受け、メタノールにより特異的に誘導されること、その誘導には CbTrm1p、CbTrm2p、CbHap3p が関与すること、CbMpp1p の核局在には CbTrm1p、CbTrm2p が必要であることを明らかにしてきた [1)]。本研究では、CbMpp1p によるメタノール誘導性遺伝子発現制御の分子機構を明らかにするため、CbMpp1p のメタノール誘導性プロモーター領域への結合に関する解析を行った。

【方法と結果】我々は既に *DAS1* プロモーターのメタノール応答領域として MRE1 と名付けた約 20 bp の配列を特定し、CbTrm1p が MRE1 依存的なメタノール誘導に関与すること、CbTrm1p が複数のメタノール誘導性プロモーターに結合することを明らかにしている [2)]。CbMpp1p の遺伝子破壊株（*Cbmpp1*⊗）での MRE1 依存的なメタノール誘導性遺伝子発現を、酸性ホスファターゼをレポーターとして測定したところ、レポーター活性は野生株と比較して 15%程度まで低下したことから、CbMpp1p も MRE1 依存的なメタノール誘導に関与することを明らかにした。次に、CbMpp1p のメタノール誘導性プロモーターへの結合を調べるため、蛍光タンパク質との融合タンパク質（CbMpp1p-YFP）を発現する株を用い、クロマチン免疫沈降（ChIP）解析を行った。メタノール培養菌体を用いて処理したサンプルでは、*DAS1* プロモーター中の MRE1 周辺領域、および *AOD1* プロモーター中の MRE1 相同領域をそれぞれ増幅するように設計したプライマーを用いた際に、PCR による増幅が確認された。一方、グルコース培養菌体を用いて処理したサンプルでは、PCR による増幅が確認されなかった。以上の結果から、CbMpp1p はメタノール培養時に *AOD1* および *DAS1* プロモーターに結合することが明らかとなった。

1) 日本農芸化学会 2012 年度大会講演要旨集 2C21p12
2) Sasano et al., Eukaryot Cell 7, 527-536 (2008).

transcription factor, methanol, *Candida boidinii*

講演番号：3B13p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ B 校舎 13 会場

出芽酵母ターミネーター活性の網羅的な評価
A “terminatome” toolbox in Saccharomyces cerevisiae.
○松山 崇、山西 守、伊藤 洋一郎、今村 千絵、片平 悟史、池内 暁紀（（株）豊田中央研究所)
○Takashi Matsuyama,Mamoru Yamanishi,Yoichiro Ito,Chie Imamura,Satoshi Katahira,Akinori Ikeuchi (TCRDL Inc.)

代謝工学的な手法を用いて、バイオ樹脂原料やバイオ燃料を生産する遺伝子組換え酵母を開発するには、目的物質の代謝に関わる酵素遺伝子を導入し、強力に発現させることが求められる。そのための基本的な手段として、強力なプロモーターが探索・改良され、用いられてきた。

プロモーターとターミネーターは相乗的に作用すると考えられるが、強力なプロモーターの探索が中心的に行われていたので、ターミネーターの探索や開発は進んでいない。

遺伝子のターミネーター領域は、転写の終了や polyA の付加などの役割に加え、3′-UTR として、mRNA 半減期・翻訳効率・細胞内局在等の制御を通じて遺伝子発現を調節している。これまでに我々は、GFP 遺伝子をレポーターとして用いて、遺伝子発現量をフローサイトメーターで測定する手法を確立し [1,2]、*TPS1* ターミネーター（*TPS1t*）が、導入遺伝子の発現ベクターに用いられてきた *PGK1t* や *CYC1t* と比較して、1.2 倍程度、高い活性を持つことを報告してきた [3]。

今回、我々は、導入遺伝子の発現量を向上させるターミネーター領域を同定するため、出芽酵母ターミネーター活性を網羅的に評価した。

まず、CEN 型プラスミドを用い、*TDH3* プロモーター下流に GFP 遺伝子のコード領域、その下流に制限酵素 *KpnI* 部位を配置したコンストラクトを作製した。

次に、ゲノムから PCR 増幅した各ターミネーター領域を Gap Repair Cloning 法を用いて上記の *KpnI* 部位にクローニングした。これら形質転換酵母の発する GFP 蛍光をフローサイトメーターで測定し、*PGK1* ターミネーターを基準として 5,302（全体の約 90%）のターミネーターについての相対的な活性を決定した [4]。

1. Matsuyama T*, Yamanishi M, Takahashi H. (2011) Improvement of galactose induction system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* **111**, 175–177
2. Yamanishi M, Matsuyama T*. (2012) A modified Cre-*lox* genetic switch to dynamically control metabolic flow in transgenic *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol*, **1**, 172-180.
3. Yamanishi M, Katahira S, Matsuyama T*. (2011) *TPS1* terminator increases mRNA and protein yield in *Saccharomyces cerevisiae* expression system. *Biosci Biotechnol Biochem*, **75**, 2234-2236
4. Yamanishi M, Ito Y, Imamura C, Katahira S, Ikeuchi A, Matsuyama T*, *submitted.*

Transgene expression, Teminator, Omics

講演番号：3B13p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ B 校舎 13 会場

Trichoderma reesei のセルラーゼ誘導物質認識および取り込み系に関する研究
Studies on the transportation and the recognition systems for cellulase inducers in *Trichoderma reesei*

○古川 隆紀、日下 秀行、志田 洋介、小笠原 渉 (長岡技科大　生物)
○Takanori FURUKAWA,Hideyuki KUSAKA,YOSUKE SHIDA,Wataru OGASAWARA (Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech.)

【目的】

Trichoderma reesei はセルラーゼ・ヘミセルラーゼ類を大量に分泌生産する糸状菌であり、古くからセルラーゼ生産のモデル微生物として様々な研究の対象となってきた。これまでの研究により、*T. reesei* におけるセルラーゼの生産は転写レベルで制御されており、細胞外にセルロースやその誘導体が存在する場合にのみ遺伝子の誘導発現が起こることが明らかにされている。しかし、セルラーゼ誘導物質の膜輸送システムや誘導シグナル認識機構についてはほとんど知見が得られておらず、セルラーゼ生産制御機構を解明する上での大きなブラックボックスとなっている。我々はこれまでに *T. reesei* におけるセルラーゼ誘導物質の取り込み・認識経路の解明を目的として、遺伝子発現プロファイリングに基づく推定トランスポーター遺伝子の選抜と遺伝子破壊株の表現型解析を行ってきた。本発表ではこれまでに得られた一連の研究成果について報告する。

【方法と結果】

T. reesei ゲノム内に存在する全ての推定 MFS(Major Facilitator Superfamily)トランスポーター遺伝子を対象にマイクロアレイを用いて発現応答解析を行い、セルラーゼ生産に関与すると考えられる遺伝子の選抜を行った。選抜された遺伝子のうち、特に結晶性セルロース培養条件下で高発現していた遺伝子グループに着目して遺伝子破壊株の構築を行い、表現型の詳細な解析を行った。その結果、MFS031 破壊株は野生株と同等のセルロース分解産物取り込み能を示すにも関わらず、セルラーゼ遺伝子の誘導発現能を欠損していることが明らかとなった。この結果より、推定トランスポーターMFS031 はセロオリゴ糖の基質認識に関与しており、*T. reesei* のセルラーゼ誘導生産に重要な役割を果たしていると考えられた。

一方、MFS030 破壊株においては、結晶性セルロース、セロビオースおよびラクトースを炭素源とした培養において大幅なセルラーゼ生産の遅延と菌体生育の遅れが観察された。このことから、MFS030 はセルロースから遊離されたオリゴ糖類の主要なトランスポーターとして機能していると考えられた。しかし、MFS030 破壊株はセロオリゴ糖の取り込み能を完全に欠損していなかったことから、*T. reesei* は複数の糖質トランスポーターからなるセルラーゼ誘導物質輸送システムを持つと推察された。

Trichoderma reesei, sugar transporter, cellulase

講演番号：3B13p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ B 校舎 13 会場

Trichoderma reesei のセルラーゼ生産に関与するラクトーストランスポーターの同定と機能解析
Functional analysis and characterization of two transporters involved in lactose uptake in Trichoderma reesei

○谷口 大樹[1]、Juliano de Oliveira Porciuncula[2]、古川 隆紀[3]、志田 洋介[4]、小笠原 渉[5] ([1]長岡技科大　生物、[2]長岡技科大　生物、[3]長岡技科大　生物、[4]長岡技科大　生物、[5]長岡技科大　生物)
○Hiroki TANIGUCHI[1], Juliano PORCIUNCULA[2], Takanori HURUKAWA[3], Yousuke SHIDA[4], Wataru OGASAWARA[5] ([1]Dept. of Bioeng.,Nagaoka Univ. of Tech., [2]Dept. of Bioeng.,Nagaoka Univ. of Tech., [3]Dept. of Bioeng.,Nagaoka Univ. of Tech., [4]Dept. of Bioeng.,Nagaoka Univ. of Tech., [5]Dept. of Bioeng.,Nagaoka Univ. of Tech.)

【目的】

糸状菌 *Trichoderma reesei* はセルラーゼ高生産菌であり、植物バイオマス糖化への応用という観点から注目されている。*T. reesei* においてセルラーゼの生産は誘導的に行われることが知られており、転写レベルでセルラーゼ発現を誘導する複数の誘導物質が見出されている。これまでの研究より、セルロースの分解産物であるセロオリゴ糖やその糖転移産物であるソホロースが自然状態での誘導物質として作用していると推察されているが、セロオリゴ糖とは全く異なるラクトースによってもセルラーゼが誘導されることが報告されている。ラクトースは乳製品加工業において副産物として大量に得られる安価な糖であることから、*T. reesei* を用いた工業的なセルラーゼ生産におけるラクトースの利用が期待されている。本研究ではラクトースによるセルラーゼ誘導生産機構の解明と酵素生産への応用を目的とし、セルラーゼ高生産変異株 *T. reesei* PC-3-7 株を対象にラクトース取り込みに関与するトランスポーターの同定を試みた。

【方法と結果】

T. reesei ゲノムデータベース内に存在する全推定遺伝子から糖質輸送に関与すると推定される Major facilitator superfamily (MFS)に属するトランスポーター遺伝子情報の抽出を行った。これらの遺伝子に対して、マイクロアレイおよび qRT-PCR 解析を用いて発現解析を行い、ラクトース培養条件下で高発現する 3 つの推定トランスポーター遺伝子 MFSA, MFSB, MFSC を特定した。これらのトランスポーター翻訳産物ついて相同性検索を行った結果，推定トランスポーターMFSA および MFSC はラクトーストランスポーターと、推定トランスポーターMFSB はガラクトーストランスポーターと高い相同性を有することが明らかとなった。そこでラクトース取り込みへの関与が強く示唆された MFSA および MFSB について遺伝子破壊株の構築を行い、ラクトース取込みにおける遺伝子破壊の影響を解析した。その結果、両破壊株においてラクトース取込み能の顕著な低下と菌体生育速度の低下が観察された。さらにラクトース培養条件下でのセルラーゼ生産性を解析した結果、両破壊株においてセルラーゼ生産性の低下が観察された。以上の結果から，セルラーゼ高生産変異株 *T. reesei* PC-3-7 においてラクトース取込みには、推定トランスポーターMFSA および MFSB が重要な働きを担っていることが明らかとなった。

Trichoderma reesei, sugar transpoter, cellulase

講演番号：3B13p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ B 校舎 13 会場

Regulation of cellulolytic genes by interaction of transcription factors McmA and ManR in *Aspergillus nidulans*

○Nuo Li[1], Miki AOYAMA[1], Masahiro OGAWA[2], Kyoko KANAMARU[1], Makoto KIMURA[1], Yasuji KOYAMA[2], Tetsuo KOBAYASHI[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Kikkoman Corp.)

Aspergillus nidulans produces two major endoglucanases EglA and EglB upon induction by CMC or cellobiose. The inductive expression of *eglA* is attributable to the *cis*-element CeRE (Cellulose Responsive Element) in its promoter as well as the MADS box transcription factor McmA that binds to CeRE. MADS box proteins generally regulate global cellular functions through interaction with various cofactors, and in fact, mutation in *mcmA* causes defects not only in cellulase production but also in vegetative growth and sexual development. ManR/ClrB, which is classified into the fungal specific $Zn(II)_2Cys_6$ transcription factors, is expected to be the most probable interacting factor in case of regulation of cellulolytic genes, considering that ManR in *A. oryzae* and its ortholog ClrB in *A. nidulans* are responsible for cellulase induction. Here we provide evidences that these two transcription factors cooperatively regulate the expression of cellulolytic genes.

Effects of McmA mutation and ManR/ClrB disruption on genome-wide gene expression were compared by RNA sequencing. The comparative analysis displayed that seven cellulolytic genes were highly expressed in the presence of cellobiose in the wild type strain, and expression of all these genes was dependent on both ManR/ClrB and McmA. Our previous studies have proved the existence of two McmA binding sites within the 50 bp region of the *eglA* promoter, which overlapped with CeRE. To clarify whether ManR/ClrB also binds to this region, electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was performed in the presence and absence of McmA. His-tagged McmA and Flag-tagged ManR/ClrB-DBD (DNA Binding Domain) were expressed in *E .coli*, purified, and subjected to the analyses. EMSA with ManR/ClrB-DBD alone showed very weak binding to the probe, and McmA alone bound to the probe with two shifted bands corresponding to the single and double occupation of the binding sites. When both ManR/ClrB-DBD and McmA were applied, extremely intensive signal of the shifted band was observed as the slowest migrating protein-DNA complex. Presence of McmA and ManR/ClrB-DBD in the complex was confirmed by addition of the anti-his-tag antibody and anti-flag-tag antibody, which resulted in appearance of super shifted bands. The results suggested cooperative binding of McmA and ManR/ClrB-DBD to the *eglA* promoter. We are currently searching for ManR/ClrB recognition sequence by mutational analysis of the CeRE-containing region.

This work was supported by the Programme for Promotion of Basic and Applied Researches for Innovations in Bio-oriented Industry.

Aspergillus nidulans, transcription factor, cellulase regulation

講演番号：3B13p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ B 校舎 13 会場

Aspergillus aculeatus セロビオース応答因子 ClbR とそのパラログ因子 ClbR2 の機能解析
Functional analysis of cellobiose response regulator (ClbR) and its paralog (ClbR2) in *Aspergillus aculeatus*
○川村 彩乃、國武 絵美、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院　生環科）
○Ayano KAWAMURA,Emi KUNITAKE,Shuji TANI,Jun-ichi SUMITANI,Takashi KAWAGUCHI (Osaka Pref. Univ.)

【目的】糸状菌 *Aspergillus aculeatus* においてセルロースによる遺伝子発現誘導を正に制御する因子 cellobiose response regulator (ClbR) は、セルロースに応答して XlnR 非依存的に誘導される cellobiohydrolase I (*cbhI*), carboxymethyl cellulase 2 (*cmc2*), FIa-xylanase (*xynIa*), Hydrocellulase (*cbhIb*) 遺伝子及び XlnR により誘導される carboxymethyl cellulase 1 (*cmc1*), FIb-xylanase (*xynIb*) 遺伝子の発現を制御する。我々は、*clbR* を翻訳伸長因子遺伝子 (*tef1*) プロモーター制御下で構成的に高発現させた株を作製し、*clbR* 高発現がセルロース系バイオマス分解酵素生産に与える影響を解析した。*clbR* 高発現株とコントロール株を小麦ふすまを炭素源として培養した際の Xylanase, Endoglucanase 活性を測定したところ、両方において *clbR* 高発現株ではコントロール株よりも高い活性を培養後期まで維持していた。これらの活性に寄与する各酵素成分を調べるため、培養 4 日目と 8 日目の培養上清中の分泌タンパク質をペプチドマスフィンガープリント法を用いて同定した。その結果、*clbR* 高発現株では ClbR 制御下の遺伝子産物のうち XynIa の分泌量が劇的に増加していた一方で、CbhIb の分泌量は減少していた。そこで、我々は現在、この現象に帰結する ClbR 作用機序を分子レベルで解明することを目指している。
【方法・結果】各酵素生産量と各転写産物量の相関を調べるため、ClbR 制御下にある遺伝子発現量をノーザンブロット法を用いて定量したところ、*clbR* 高発現株において、アビセル培地では *xynIa* の発現量に顕著な差は確認できなかったが、*cbhIb* の発現量は減少していた。一方、小麦ふすま培地では *clbR* 高発現株における *xynIa* の発現量が劇的に増加していた。これらの結果から、ClbR は小麦ふすま由来の糖に応答して遺伝子発現を誘導する因子と相互作用していることが想定された。そこで既知の糖質加水分解酵素遺伝子の転写因子である XlnR や β-マンナン分解に関わる酵素遺伝子発現を誘導する転写因子 ManR などと ClbR の相互作用を Yeast Two Hybrid 法により解析したところ、それら既知の因子ではなく、ClbR と相同性 42% のパラログ(ClbR2）が相互作用因子として取得された。ClbR2 の機能は未知であるため、*clbR2* 単独破壊株と *clbR* との二重破壊株を作製し、各株における遺伝子発現量を定量した結果、ClbR2 は、ClbR 制御下にある遺伝子の発現を同様に制御しているだけでなく、*manR* の発現も ClbR と協調的に制御していることが示唆された。現在、ClbR と ClbR2 の作用機序解析を行っているところである。

Aspergillus, gene regulation, cellulase

講演番号：3B13p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ B 校舎 13 会場

糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるセルラーゼ生産の pH 依存的制御

pH-dependent regulation of cellulase synthesis in *Aspergillus nidulans*

○宮本 健太郎、青山 未来、金丸 京子、木村 真、小林 哲夫 (名大院生命農)
○Kentaro MIYAMOTO, Miki AOYAMA, Kyoko KANAMARU, Makoto KIMURA, Tetsuo KOBAYASHI (Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

クロモソームⅣマッピング用変異株である *Aspergillus nidulans* A517 は、セルラーゼ生産性が極めて低い。これまでの研究において、本菌株におけるセルラーゼ生産欠損の原因遺伝子は、クロモソームⅣ上に存在していることが示唆されていたが、その同定まで至っていなかった。本研究では、原因遺伝子を同定し、同定された因子とセルラーゼ生産との関連性について解析した。

遺伝学的手法により原因遺伝子と各種マーカー遺伝子とのリンケージを検討した結果、*palC*遺伝子のごく近傍にマップされた。*palC*近傍には*Aspergillus*属においてセルラーゼ生産に関与する*xlnR*が存在していたため、*palC*と*xlnR*について原因遺伝子である可能性を相補試験により検討した結果、*xlnR*はセルラーゼ生産性を相補しないのに対し、*palC*の導入によりA517のセルラーゼ生産性が完全に回復した。また、野生株における*xlnR*の破壊もセルラーゼ生産性に影響を与えなかった。PalCはpHシグナリングに関与する因子であり、その下流にある転写因子PacCが環境pHに応答した転写を制御する。PacC結合配列(GCCARG)は、*eglA*、*eglB*を含む数種類のセルラーゼ遺伝子及びその発現制御に関わる転写因子遺伝子である*manR* (*clrB*)、*mcmA*、*creA*のプロモーター領域に存在していた。そこで、*pacC*破壊株を作製し、carboxymethylcellulose (CMC)を単一炭素源とする酸性(pH4.2)、中性(pH7.0)液体培地でのセルラーゼ誘導をZymographyにより解析したところ、酸性条件では野生株、A517、*pacC*破壊株におけるEglA、EglB誘導に大きな違いは見られず、一方、中性条件では、野生株が酸性条件より多量のEglA、EglBを生産するのに対し、A517及び*pacC*破壊株では激減していた。A517、*pacC*破壊株はアルカリ条件(pH8.2)で生育しないが、野生株は生育可能である。野生株でのEglA、EglBの生産を酸性、中性、アルカリ性で比較すると、特にアルカリ条件で生産量の著しい増加が見られた。以上から、pHシグナリング経路がセルラーゼ生産を制御することが明らかとなった。

PacCが直接*eglA*遺伝子の発現を制御する可能性について、推定PacC結合配列が欠失した*eglA*プロモーターを用いたレポーターアッセイにより検討した。その結果、pHに対する応答性が見られたため、PacCは間接的にセルラーゼ遺伝子発現を制御すると思われる。現在、*pacC*株の作製及びセルラーゼ遺伝子群やその発現に関与する転写因子遺伝子の発現解析を行っており、これについても併せ報告する予定である。

●本研究は，生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業の一環として行われたものである。

Aspergillus nidulans, Cellulase, pH Regulation

講演番号：3B13p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ B 校舎 13 会場

糸状菌 *Aspergillus nidulans* における糖飢餓条件に応答したセルラーゼ遺伝子群発現制御メカニズムの解析

Carbon starvation-induced expression of cellulase genes in *Aspergillus nidulans*

○浅井 雄一郎[1]、小川 真弘[2]、金丸 京子[1]、木村 真[1]、小山 泰二[2]、小林 哲夫[1] ([1]名大院生命農、[2]キッコーマン)

○ Yuichiro ASAI[1], Masahiro OGAWA[2], Kyoko KANAMARU[1], Makoto KIMURA[1], Yasuji KOYAMA[2], Tetuo KOBAYASHI[1] ([1]Nagoya Univ., [2]kikkoman)

【目的】糸状菌 *Aspergillus nidulans* の転写因子 AcuK および AcuM は糖新生酵素をコードする遺伝子 *acuF*(PEPCK)および *acuG*(FBP)の発現を正に制御する。一方で、*acuK* 破壊株、*acuM* 破壊株では CMC 誘導によるセルラーゼ活性が低下し、その原因はセルラーゼをコードする遺伝子の発現量の低下にあることを明らかとした（2012 年度大会)。そこで本研究では糖新生とセルラーゼ生産の共通点であるグルコース生産に着目し、糖飢餓条件での AcuK および AcuM によるセルラーゼ遺伝子群発現制御の可能性について検証した。

【方法と結果】野生株と *creA204* 変異株における糖飢餓条件でのセルラーゼ遺伝子および関連遺伝子の発現量を qPCR によって解析した。その結果、野生株においてセルラーゼ遺伝子（*egl1A*、*egl1B* ）は糖飢餓条件 180～240 分後に発現量が上昇すること、この発現上昇は CreA による抑制からの解除ではないことが明らかとなった。また、*egl1A* と *egl1B* で CreA の役割は異なり、前者では発現上昇に無関係であったのに対して、後者では CreA が必須であった。発現上昇レベルはセロビオース依存的な誘導と比較し、*egl1A* で約 1/50～1/100、*egl1B* で約 1/5～1/10 程度であり、主として EglB が糖飢餓条件での主要エンドグルカナーゼ活性を担っていると考えられる。

acuK 破壊株および *acuM* 破壊株における *egl1A* と *egl1B* の発現量を野生株と比較したところ、いずれの破壊株においても低下が見られ、特に *acuK* 破壊株で顕著であった。また、ManR（セルラーゼ遺伝子群のセロビオース誘導を制御する転写活性化因子）破壊株、および McmAI70A 変異株（広域転写因子 McmA が関与するセルラーゼ遺伝子群発現誘導が欠損した株)における糖飢餓に応答した *egl1A*、*egl1B* の発現量を野生株と比較したところ、*egl1B* で顕著な低下が見られた。従って、*egl1B* の糖飢餓に応答した発現上昇には AcuK、AcuM、ManR、McmA、CreA が必要であると考えられる。さらに、*acuF*、*acuG* の糖飢餓に応答した発現量の変化を同様な実験で比較したところ、両者で糖飢餓に応答した発現上昇が見られた。また、*acuF* の発現上昇は *acuK* 破壊株、*acuM* 破壊株で顕著な低下が見られたが、*manR* 破壊、McmAI70A 変異の影響は見られなかった。以上から AcuK および AcuM は糖飢餓に応答し、グルコース生産に関与する遺伝子（セルラーゼ、糖新生酵素）の発現を直接的または間接的に制御することが示唆され、また、遺伝子によってこの制御に関わる転写因子構成には違いがあることも示唆された。

本研究は，生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業の一環として行われたものである。

Aspergillus nidulans, cellulase, AcuK/AcuM

講演番号：3B13p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ B 校舎 13 会場

Aspergillus nidulans 転写因子 ManR ManS 遺伝子によるマンナナーゼ生産制御
ManR and ManS coordinately regulate mannanase production in *Aspergillus nidulans*
○渡邉 亜也子[1]、青山 未来[1]、小川 真弘[2]、金丸 京子[1]、木村 真[1]、小山 泰二[2]、小林 哲夫[1] ([1]名大院生命農、[2]キッコーマン株式会社)
○Ayako WATANABE[1], Miki AOYAMA[1], Masahiro OGAWA[2], Kyoko KANAMARU[1], Makoto KIMURA[1], Yasuji KOYAMA[2], Tetsuo KOBAYASHI[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Kikkoman Corporation)

【目的】*A. oryzae* において同定された転写因子 ManR は，マンナナーゼ・セルラーゼ生産に必須の因子である。一方, *A. nidulans* では *manR* 遺伝子の破壊がマンナナーゼ生産性に大きな影響を与えない。*A. nidulans* は *manR* ホモログである *manS* を有していたため, 本研究では *A. nidulans* における *manR* と *manS* のマンナナーゼ生産制御への寄与を調べた。
【方法】1. Δ*manR*，Δ*manS*，Δ*manR*/Δ*manS* の三種の破壊株におけるエンドマンナナーゼ生産性を野生株と比較する為にプレートアッセイを行った。2. CMC，konjac glucomannan (KG)，及び locust bean gum 由来 galactomannan (GM)を単一炭素源として液体培養した培養上清を，KG，GM を基質とするザイモグラフィーにより解析した。
【結果】1. KG を基質とするプレートアッセイでは，Δ*manR* 株でのエンドマンナナーゼ生産性がわずかに低下し，Δ*manS* 株では大幅に低下した。Δ*manR*/Δ*manS* 株では生産性が完全に消失した。2. 野生株では CMC 誘導で 2 種，GM で主に 2 種のエンドマンナナーゼ活性が検出され，KG ではこれらを合わせた 4 種となった。CMC 誘導型の 2 種の移動度は EG A，EG B に一致し，これらの活性は *manR* 破壊で消失し，GM 誘導型の 2 種は *manS* 破壊で消失した。3. 精製 EG A，B は KG に対して分解活性を有していたが，GM 分解活性は持たなかった。以上から ManR 依存的かつ CMC 誘導型の主要エンドマンナナーゼ 2 種は EG A，B であり，KG のグルコースオリゴマー部分を切断していることが示唆され，純粋な意味でのエンドマンナナーゼは ManS により制御されていると考えられる。
KG，GM を誘導基質とした場合、*manR* 破壊によって EG A，B 生産量は大幅に減少したが残存しており，二重破壊株で完全に消失した。従って、KG，GM 誘導条件では ManS も EG A，B 生産誘導に関与していると考えられる。また、*manS* 破壊株において EG B 生産量の増加が見られたが、これは ManR と ManS の競合を示唆している。このような 2 種の転写活性化因子間の競合は XlnR と AraR でも知られている 。現在、1 % KG を誘導物質として、*manS* 破壊が推定マンナナーゼ遺伝子群の発現に与える影響を qRT-PCR により解析しており、その結果についても併せ報告する予定である。

●本研究は，生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業の一環として行われたものである。

Aspergillus nidulans, mannanase, transcription factor

講演番号：3B13p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ B 校舎 13 会場

麹菌ペントース代謝経路の遺伝子破壊による検証と新規遺伝子による補完
Validation by gene disruption of the pentose catabolic pathway in *Aspergillus oryzae* and its completion by an uncharacterized gene
○井上 泰宏、渥美 元規、金丸 京子、木村 真、小林 哲夫 (名大院生命農)
○Yasuhiro INOUE,Motoki ATSUMI,Kyoko KANAMARU,Makoto KIMURA,Tetsuo KOBAYASHI (Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

D-キシロースと L-アラビノースは植物細胞壁を構成するヘミセルロースの主要構成五単糖であり、炭素源として多くの糸状菌に利用されている。*Aspergillus oryzae* においては、これらペントースの代謝は転写因子 XlnR とそのホモログである AraR により制御されており、我々はこれら因子の制御下遺伝子の DNA マイクロアレイ解析による同定、ペントース代謝系を構成する候補遺伝子の抽出、大腸菌を宿主とした候補遺伝子産物の発現と基質特異性の解析などを通して、*A. oryzae* におけるペントース代謝経路の構築を行った。すなわち、D-キシロースは XyrA による 1 段階、L-アラビノースは LarA、LadA、LxrA の 3 段階の酸化還元反応によりキシリトールに変換され、キシリトールは XdhA により D-キシルロースへと変換されるという経路である。さらに、本経路を構成する全遺伝子についての破壊株を作製し、構築した代謝経路の検証を行った結果、D-キシロースと L-アラビノース代謝の初発反応は XyrA と LarA のいずれかが存在すれば可能であること、LadA は L-アラビニトールの変換に必須であることなどが明らかとなっている。一方、*lxrA* や *xdhA* の単独破壊株は D-キシロース、L-アラビノースの資化が可能であることから、バイパス経路あるいは酵素の重複が存在すると考えられた。

本報告では、本経路を構成する遺伝子ならびに新規候補遺伝子の単独破壊および多重破壊株を作製することにより、ペントース代謝の全体像を明らかにすることを目的とした。*A. nidulans* が有する L-キシルロースレダクターゼ(Lxr)活性の測定結果から、NADPH 依存型の LxrA に加えて NADH 依存型の酵素の存在が示唆されていた。そこで、NADH 依存型 Lxr の候補遺伝子(*lxrB*)破壊株、*lxrA*/*lxrB* 二重破壊株を新たに作製し、L-アラビニトール資化能を検討した。先に報告したとおり *lxrA* 破壊では資化能の部分的欠損が起こる。一方、*lxrB* 単独破壊株では資化能に大きな影響は観察されず、二重破壊株ではほぼ消失した。すなわち、L-キシルロースからキシリトールへの変換は NADPH と NADH 依存型 Lxr の両者が担うことが示唆された。また、キシリトールデヒドロゲナーゼに関しては、*xdhA* のホモログとして *xdhB* が存在していたため、これらの二重破壊株を作製しキシリトール資化能を検討した。しかし、キシリトール資化は二重破壊株でも可能であった。これは、他の酵素もこの反応に関与する可能性を示唆している。現在、Lxr による L-キシルロースから D-キシルロースへの変換について解析しており、この結果についても併せ報告する予定である。

Aspergillus oryzae, pentose catabolism

講演番号：3B13p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ B 校舎 13 会場

麹菌における炭素源依存的な CreA タンパク質量の制御
Effect of carbon sources on CreA protein level in *Aspergillus oryzae*
○田中 瑞己、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大院農）
○Mizuki TANAKA,Takahiro SHINTANI,Katsuya GOMI (Tohoku Univ.)

麹菌は多様な多糖類分解酵素を生産するものの、その発現はグルコースによるカタボライト抑制を受ける。糸状菌におけるカーボンカタボライト抑制は、広域制御型転写因子 CreA によって制御されることが知られている。*A. nidulans* では、カーボンカタボライト抑制に関わる他の因子としてユビキチン化・脱ユビキチン化に関与すると推定される因子が同定されている。このことから、カーボンカタボライト抑制は CreA のユビキチン化・脱ユビキチン化を介して制御されていると予想されている。しかし、CreA のタンパク質レベルでの挙動についてはほとんど解析がなされていない。そこで、本研究では N 末端に 4xHA タグを融合した CreA を麹菌で発現させ、ウェスタン解析により CreA タンパク質の炭素源に対する挙動を解析した。
creA のプロモーター領域に 4xHA-CreA を連結した発現コンストラクトを *creA* 破壊株に導入した。*creA* 破壊株が著しい生育抑制を示すのに対し、 4xHA-CreA 導入株の生育は野生株とほぼ同等であった。また、グルコースとデンプンを混合したプレート培地におけるハロー形成能を比較した結果、*creA* 破壊株ではカタボライト抑制の解除により明瞭なハローが形成されるのに対し、野生株と 4xHA-CreA 導入株ではグルコース添加によりハロー形成能が低下した。これらの結果から、4xHA タグを融合した CreA が機能を有していることが示された。各種炭素源での培養時における定常状態の発現量を比較した結果、マルトースを炭素源とした場合に CreA タンパク質量が減少した。このマルトース依存的な CreA の減少は、構成的に発現するエノラーゼ遺伝子のプロモーターを用いて 4xHA-CreA を発現させた場合にも観察された。次に、フルクトースを炭素源とした培地で培養後、菌体をグルコースおよびマルトースを炭素源とした培地に移して CreA の挙動を調べた。その結果、マルトースを炭素源とした培地に移した場合に CreA タンパク質の急速な減少が観察された。また、CreA タンパク質量の急速な減少はキシロースを炭素源とした場合にも観察された。これらの結果から、多糖類分解酵素遺伝子の発現誘導基質存在条件下では CreA タンパク質が一時的に分解されることが示唆された。一方で、グルコースとマルトースを混合した場合においては、CreA タンパク質量の減少が観察されなかったことから、グルコース存在条件下では CreA タンパク質が安定化することが示唆された。以上の結果から、CreA タンパク質量が翻訳後過程において炭素源依存的に制御されている可能性が示された。
（本研究は生研センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」の支援を受けて行われた。）

Aspergillus oryzae, carbon catabolite repression, CreA

講演番号：3B13p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ B 校舎 13 会場

Aspergillus の転写因子 AtrR は薬剤排出 ABC トランスポーター遺伝子とエルゴステロール生合成酵素遺伝子の発現を制御する
The transcription factor, AtrR, regulates the expression of ABC transporter genes and ergosterol biosynthesis genes in aspergilli.
○大場 歩[1]、清水 公徳[2]、萩原 大祐[2]、新谷 尚弘[1]、川本 進[2]、五味 勝也[1] ([1]東北大院農・生物産業創成、[2]千葉大・真菌センター)
○Ayumi OHBA[1], Kiminori SHIMIZU[2], Daisuke HAGIWARA[2], Takahiro SHINTANI[1], Susumu KAWAMOTO[2], Katsuya GOMI[1] ([1]Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]MMRC, Chiba Univ.)

我々はこれまでに，麹菌においてアゾール系薬剤排出に関与する複数の ABC トランスポーター遺伝子の発現を同時に制御する Zn_2Cys_6 型の転写因子 AtrR を見いだしている．AtrR は *Aspergillus* 属に幅広く保存されており，病原性真菌 *Aspergillus fumigatus* においても，*atrR* を破壊することでアゾール系薬剤に関して超感受性を示すことを明らかにしている．本研究では，*A. fumigatus* の *atrR* 破壊株における遺伝子発現プロファイルを網羅的に調べるために，次世代シークエンサーを用いた RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った．

野生株と破壊株において発現量を比較した結果，野生株において薬剤存在下で少なくとも 1 種類の ABC トランスポーター遺伝子の発現量が増加していたが，破壊株では薬剤非存在下で発現量が著しく低く，薬剤添加後も発現量の上昇が見られなかった．このことから，*A. fumigatus* の *atrR* も麹菌同様に ABC トランスポーター遺伝子の発現を制御していることが示された．興味深いことに，野生株ではアゾール系薬剤の標的因子である *erg11*(*cyp51A*)を含む複数のエルゴステロール生合成系遺伝子の発現量が薬剤添加により上昇するのに対して，破壊株では薬剤非存在下でも発現量が著しく減少しており，薬剤添加によってもほとんど変動しないことが明らかになった．このことから，AtrR は ABC トランスポーター遺伝子のみならず，エルゴステロール生合成系遺伝子の発現も制御していると考えられる．これまでに，*A. fumigatus* においては bHLH 型転写因子 SrbA が *erg11* を含む複数のエルゴステロール生合成系遺伝子の発現を制御すること，また *srbA* 破壊株はアゾール系薬剤に対して感受性を示すことがすでに報告されている．今回の RNA-seq の結果から，*atrR* 破壊株において発現が抑制されるエルゴステロール生合成遺伝子は，*erg11* も含めて SrbA の制御下にある遺伝子とほぼ重複していることが明らかになった．麹菌において *atrR* 破壊株と *srbA* 破壊株の ABC トランスポーター遺伝子，およびエルゴステロール生合成系遺伝子の発現量を比較した結果，*atrR* と *srbA* はどちらもエルゴステロール生合成系遺伝子の発現を制御するものの，ABC トランスポーター遺伝子の発現については SrbA は関与せず AtrR によってのみ制御されていることが考えられた．また，*atrR* 高発現株では，ABC トランスポーター遺伝子の発現量は上昇するのに対し，エルゴステロール生合成遺伝子の発現は上昇しないことが明らかになった．以上の結果は，エルゴステロール生合成系遺伝子の発現制御に SrbA と AtrR が協調して関わっている可能性を示唆するものである．AtrR と SrbA のエルゴステロール生合成系遺伝子制御機構について詳細を解明すべく，さらなる解析を行っているところである．

Aspergillus, transcription factor, drug resistance

講演番号：3B13p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ B 校舎 13 会場

麹菌 GABA パーミアーゼの解析
Analysis of GABA permease in *Aspergillus oryzae*
○佐野 元昭、北川 治恵、大箸 信一 (金沢工大)
○Motoaki Sano,Harue Kitagawa,Shinichi Ohashi (KIT)

【目的】
麹菌(*Aspergillus oryzae*)は約 12,000 個の遺伝子を有しており、そのうち 600 個程度はトランスポーターとして働くと考えられている。また、アミノ酸トランスポーター遺伝子に限定しても、少なくとも 80 個程度を麹菌は有していると推測される。このように麹菌中に多数存在するトランスポーターであるがその解析はあまり進んでいない。
昨年度の本大会では、酵母のアミノ酸やγ-アミノ酪酸(GABA)の取り込みにかかわる General amino acid permease(*Gap1*)と高い相同性を有する麹菌の遺伝子(*AO_Gap1*)について報告を行った[1)]。また、酵母で GABA の取り込みにかかわる 2 つのアミノ酸透過酵素である proline permease(*PUT4*), γ- aminobutyric acid permease (*UGA4*)と高い相同性を有する麹菌の遺伝子についても解析をおこなっている[2)]。そこで今回、GABA の透過にかかわる麹菌 GABA permease 遺伝子(*gabA*)に関して解析を行ったので報告する。
【方法と結果】
麹菌のGABA permease遺伝子(*gabA*)をデータベースから検索を行い抽出した。この*gabA*は培地中にGABAを添加することで遺伝子発現が上昇することが確認され、GABAの取り込みにかかわると推測された。そこで次に、*A. oryzae ligD*破壊株を宿主にして、遺伝子破壊株の作製を行った。作製した破壊株では、*gabA*発現量の著しい低下が確認され、GABAを単一窒素源とした培地で生育確認を行ったところ顕著な生育不良が確認された。これらの結果から、今回破壊した*gabA*は、GABAの取り込みに関わる重要な遺伝子であることが判明した。現在、その他の影響についても詳細な解析を行っている。

1) 佐野ら　：　日本農芸化学会 2012 年度大会
2) 佐野ら　：　日本生物高分子 2012 年度大会

Aspergillus oryzae, GABA permease, GABA

講演番号：3B13p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ B 校舎 13 会場

糸状菌 *Aspergillus nidulans* における α-1,3-グルカンの生物学的役割
Biological role of alpha-1,3-glucan in *Aspergillus nidulans*.
○稲葉 梓[1]、吉見 啓[2]、阿部 敬悦[1,2] ([1]東北大院農・生物産業創成、[2]東北大・未来研)
○Azusa Inaba[1], Akira Yoshimi[2], Keietsu Abe[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]NICHe., Tohoku Univ.)

【背景・目的】我々は *Aspergillus nidulans* の細胞壁構築シグナル伝達経路について、MAP キナーゼ MpkA 経路を中心に解析を進めてきた。これまでに、本菌の MpkA 経路は、出芽酵母には存在しない α-1,3-グルカン合成酵素（AGS）遺伝子 *agsA*、*agsB* の転写制御に特化していることを明らかにしている[1)]。近年、ヒト感染症の病原真菌 *Histoplasma capslatum* や植物病原性のイネいもち病菌 *Magnaporthe grisea* において、α-1,3-グルカン（AG）が感染過程で重要な役割を担うことが明らかになり、真菌の生存戦略における AG の重要性が認識されつつある。これらの背景から、本研究室では *A. nidulans* に存在する 2 種の AGS 遺伝子について破壊株（*agsA* 破壊株、*agsB* 破壊株、*agsAagsB* 二重破壊株）を作製し、AGS 遺伝子の機能解析を進めてきた。その結果、本菌において（i）通常生育条件下での生育には AG が必須ではないこと、（ii）AG の合成には主として AgsB が関与すること（iii）AG 欠失により Congo red（CR）に対する感受性が上昇すること、（iv）AG の欠失により菌糸への CR 吸着性が上昇すること等が明らかになった[2)]。今回、本菌における AG の生物学的意義を解明するために、さらなる表現型解析を行ったので報告する。
【方法・結果】まず、様々な AG 破壊株を用いて β-グルカナーゼ、キチナーゼ活性を有する Lysing enzyme に対する感受性の評価を行った。AG 欠失株は野生株と比較して Lysing enzyme に高い感受性を示し、細胞壁が容易に分解され、より短時間でプロトプラストが遊離することを確認した。また、野生株を α-1,3-グルカナーゼで処理した際には、AG 欠失株と同様にプロトプラストの遊離が早まることが明らかになった。次に、本菌の主要な細胞壁構成多糖に対する CR の吸着性を評価した。その結果、AG と比較して、β-1,3-グルカンとキチンに対して CR の吸着性が高いことが明らかになった。これらのことから、本菌における AG は、生育に必須ではないものの、細胞壁の主要骨格である β-1,3-グルカンやキチンを細胞外ストレスから保護する重要な役割を担うことが強く示唆された。

さらに、AG 欠失株を液体振盪培養したところ、菌糸が培地中に分散し野生株と大きく異なる表現型を示した。このことから、AG は菌糸の凝集性にも大きく寄与している可能性が考えられた。現在はこの凝集性にも注目し、本菌における AG のさらなる生物学的意義の解明を目指している（本研究は生研センターの支援を受けた）。

1) Fujioka *et al*., *Eukaryot. Cell*. 6:1497-1510 (2007)
2) Yoshimi *et al*., *PLoS One*. In press

Aspergillus nidulans, cell wall, alpha-1,3-glucan

講演番号：3B13p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ B 校舎 13 会場

Aspergillus nidulans における α-1,3 グルカン 欠損株の高密度培養性と物質生産性の評価
Study on the relationships of high density-cultivation and productivity in *A. nidulans* alpha-1,3-glucan deficient mutants.

○一杉 昌玄[1]、吉見 啓[2]、稲葉 梓[1]、萩原 開[1]、阿部 敬悦[1,2] ([1]東北大院農、[2]東北大未来研)
○Masahiro Hitosugi[1], Akira Yoshimi[2], Azusa Inaba[1], Kai Hagiwara[1], Keietsu Abe[1,2] ([1]Tohoku Univ., [2]NICHe, Tohoku Univ.)

【背景・目的】
我々は、糸状菌のモデル生物である *Aspergillus nidulans* において、細胞壁構成多糖である α-1,3 グルカンの合成酵素（AGS）遺伝子 *agsA*、*agsB* の機能解析を進めてきた。これ迄に、本菌における α-1,3 グルカン（AG）の 合成は主に *agsB* 遺伝子に依存することを明らかにした[1)]。また、AG 欠損株(*agsB* 破壊株および *agsA-agsB* 二重破壊株)は、液体培地での振盪培養において特徴的な生育性状を示すことも明らかになっている。通常、本菌の野生株は液体振盪培養時に菌体が凝集し球形に生育するのに対し、AG 欠損株は菌体が培地中に均一に分散した。そこで Czpex-Dox（CD）最小培地における液体培養 24 時間後の菌体重量を測定したところ、AG 欠損株では野生株と比較して、約 2.6 倍もの菌体重量の増加が認められた[2)]。本研究では、AG 欠損株の菌糸分散性を活用して、糸状菌の高密度培養による物質生産の高効率化を目的に AG 欠損株の物質生産能を評価した。
【方法と結果】
まず蛋白質生産能を評価するため、モデル酵素として培地中に分泌されるアミラーゼの活性を測定した。CD 最小培地に炭素源として生澱粉および可溶性澱粉を添加し、野生株および AG 欠損株の培養を行った。両澱粉培地において AG 欠損株は野生株と比較して有意な菌体量の増加を示し、生澱粉培地における培養上清中におけるアミラーゼ活性は、野生株が約 3.3 U/L を示したのに対して、AG 欠損株では約 6.3 U/L と約 1.9 倍の値を示した。また、可溶性澱粉培地においても、野生株の 7.8 U/L に対し、AG 欠損株では約 1.8 倍の 14.0 U/L を示した。次いで、*A. nidulans* が持つペニシリン生産能を利用し、低分子化合物の物質生産性を評価した。まず、CD 最小培地での培養上清について、ペーパーディスク法によりペニシリン生産量を測定したところ、本培地ではペニシリンを生産しないことが明らかになった。そこで、富栄養素培地での液体培養条件を検討したところ、本菌は YPD 培地においてペニシリンを生産し、24 時間培養後の培養上清 1 ml あたり、野生株では 15.9 ng のペニシリンを生産したのに対して、AG 欠損株では 58.6 ng ものペニシリンを生産した。以上の結果から、AG 欠損株は、高密度培養による物質の高生産に適している可能性が示唆された。
[本研究は、JST・研究成果最適展開支援プログラム（A-STEP）の支援を受けた。]
1) Yoshimi *et al.*, *PLoS One*. In press
2) Yoshimi *et al.*, (第 12 回糸状菌分子生物学コンファレンス、講演番号 P-12, pp.40)

Aspergillus nidulans, alpha-1,3 GLUCAN synthase genes, productivity of substance

講演番号：3B13p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ B 校舎 13 会場

酵母の脂肪滴動態における Atg8 の機能解析

Functional analysis of Atg8 on lipid droplet dynamics in yeast

○前田 佑一郎、奥 公秀、阪井 康能（京大院農）
○Yuichiro MAEDA,Masahide OKU,Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ.)

脂肪滴は真核生物において高度に保存されているオルガネラである。主にトリアシルグリセロール（TAG)、ステロールエステル（STE）などの中性脂質で構成されており、外膜をリン脂質一重膜で覆われた構造をしている。脂肪滴は、エネルギーの貯蔵場所あるいは膜成分の供給源であると考えられていたが、近年の研究からほ乳類細胞において、タンパク質分解系の足場としてなどの様々な生理的機能があることが明らかになってきている。ところが、脂肪滴の合成から分解に至るまでの動態とそのメカニズムには不明な点が数多くある。これまでに、我々は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、オートファジーに関わる因子である Atg8 が脂肪滴動態に関わっていることを見出している。そこで、今回は Atg8 の脂肪滴動態への作用機構の解明を目的とした。

これまでに、*atg8*Δ 株において脂肪滴のサイズ及び数が減少することを明らかにしていた。そこで、今回は細胞内の Atg8 のコピー数を変えて発現させ、脂肪滴動態にどのような影響を与えるかを検討した。その結果、Atg8 を過剰発現すると、野生株と比較して脂肪滴のサイズは大きくなった。したがって、脂肪滴のサイズは Atg8 のコピー数に依存して変化することが明らかになった。

Atg8 は Atg4 によって C 末端のアルギニン残基が切断され、露出したグリシン残基が Atg7(E1)、Atg3(E2)によるユビキチン様の反応を経て、フォスファチジルエタノールアミンと結合(脂質化)し、機能することが明らかになっているが、Atg8 脂質化できない変異体では脂肪滴のサイズ、及び数が減少していたため、Atg8 の脂質化が脂肪滴動態に重要であることが示唆された。

また、Atg8 は tethering 及び hemifusion 活性（膜融合活性）を有しており、オートファゴソーム形成時の隔離膜の伸張に関与することがこれまでの研究により明らかにされている。そこで、Atg8 の膜融合活性の低下する Atg8 変異体を作製し、膜融合活性が脂肪滴動態に関連しているかどうかについても現在検討中である。

yeast, lipid droplet, Atg8

講演番号：3B13p17
講演日時、会場：3 月 26 日 17:12～ B 校舎 13 会場

Lactobacillus gasseri SBT2055 由来 aggregation-promoting factor1 (APF1)のフィブロネクチン結合特性の評価

Characterization of fibronectin-binding properties of the aggregation-promoting factor1 (APF1) from *Lactobacillus gasseri* SBT2055

○西山 啓太[1]、遠藤 沙織[1]、中里 彩季子[1]、瀬戸 康幸[2]、中島 肇[2]、山本 裕司[1]、向井 孝夫[1]([1]北里大獣、[2]雪印メグミルク・ミルクサイエンス研)

○ Keita NISHIYAMA[1], Saori ENDO[1], Akiko NAKAZATO[1], Yasuyuki SETO[2], Hajime NAKAJIMA[2], Yuji YAMAMOTO[1], Takao MUKAI[1] ([1]Kitasato Univ., [2]Megmilk Snowbrand Co.,Ltd.,)

【目的】*Lactobacillus gasseri* SBT2055 は フィブロネクチン(Fn)に対して高い付着性を示す菌株である。本株は 2 種類の Aggregation-promoting factor (APF1 および APF2)を菌体表層に発現していることを特徴とする。これまで APF は、*L. johnsonii* や *L. acidophilus* など複数の乳酸菌で確認されており、菌体の凝集や形態維持に関与することが報告されてきたが、我々は新たに APF1 が Fn に対して結合能を有することを見出した。また、APF1 と APF2 の相同性を比較すると、相同性 42%の N 末端領域と相同性 94%の C 末端領域が存在した。APF1 と APF2 の各相同領域の断片を組換えタンパク質として発現させ、Fn への結合性を解析した結果、APF1 の 155 アミノ酸残基からなる N 末端領域(APF1-N)のみ顕著な結合性を示すことを明らかにしてきた[1)]。そこで本研究では、APF1-N における Fn 結合領域の探索を行うとともに、約 80 アミノ酸残基からなる C 末端領域(APF1-C)の菌体細胞壁に対する結合性への関与ついても評価することとした。

【方法・結果】Fn への結合能が低い APF2 とアミノ酸を比較し、APF1 に特異的な配列を含む幾つかの配列を欠失させた APF1 変異体を作製し、大腸菌にタグ付き融合タンパク質として発現させ精製した。Fn に対する結合性の評価は ELISA あるいは表面プラズモン共鳴を利用した Biacore を用いて行った。APF1 変異体：APF1(35-124aa)および APF1(44-118aa)は結合性を示したが、APF1(119-181aa)は結合性を示さなかった。さらに、APF1(44-118aa)に含まれる 84-118 アミノ酸領域は、APF2 と 70%以上アミノ酸が一致することから、APF1(44-83aa)と APF1(84-118aa)の結合性を評価した結果、APF1(44-83aa)のみ結合性を示した。したがって、APF1 の Fn への最小結合領域は、APF1 の 44-83 アミノ酸領域に存在することが強く示唆された。これらの情報をもとに、アミノ酸置換体を作製し、Fn 結合領域を決定する予定である。

APF1-C 領域を欠失した変異体を *apf*1 欠損株で発現させ、APF の局在変化をウエスタンブロットにより確認した。APF1-C 領域を欠失すると APF1 は菌体表層画分から検出されず、培養上清画分からのみ検出された。また本株の Fn への結合性は、有意に低下した($p < 0.05$)。これらの結果から、APF1-C 領域は APF の菌体表層保持に重要な役割を担っていることが示された。

[1)] 日本乳酸菌学会 2012 年度大会講演要旨集 p. 26

aggregation-promoting factor, fibronectin, *Lactobacillus gasseri*

講演番号：3B13p18
講演日時、会場：3 月 26 日 17:24～ B 校舎 13 会場

Lactobacillus gasseri JCM1131^T に見出された新規なリポテイコ酸の構造

Novel structure of lipoteichoic acid identified in *Lactobacillus gasseri* JCM1131^T

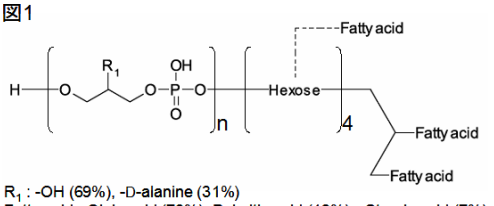
○白石 宗[1]、横田 伸一[2]、森田 直樹[3]、吹谷 智[1]、冨田 理[4]、田中 尚人[5]、岡田 早苗[5]、横田 篤[1]
([1]北大院農・応生科、[2]札医大医・微生物、[3]産総研・生物プロセス、[4]NIZO food research、[5]東農大・応生科)
○ Tsukasa SHIRAISHI[1], Shin-ichi YOKOTA[2], Naoki MORITA[3], Satoru FUKIYA[1], Satoru TOMITA[4], Naoto TANAKA[5], Sanae OKADA[5], Atsushi YOKOTA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Sapporo Med. Univ., [3]AIST, [4]NIZO food res., [5]Tokyo Univ. Agr.)

【背景と目的】リポテイコ酸 (LTA) は，グラム陽性細菌の主要な表層構成因子の一つであり，一般的にグリセロールリン酸 (GroP) を繰り返し単位とするポリマーと糖脂質から成り，糖脂質の部分で細胞膜にアンカーされている．LTAの構造を明らかにすることは，宿主との相互作用を理解する上で重要であり，特にプロバイオティクスは，LTAの免疫刺激を介した免疫賦活作用が報告されているにも関わらず，これらのLTAに関する情報は不十分である．その中でも *Lactobacillus gasseri* は，プロバイオティクスとして利用される腸管由来の乳酸菌であり，口腔や膣，尿や血液などからも分離され，ヒトとの密接な関連が推測される．しかし，本菌種のLTAは全く解析されていない．そこで我々は，*L. gasseri* と宿主との相互作用をより深く知るために，*L. gasseri* JCM1131^T のLTAの構造を明らかにすることを目的として研究を行った．

【方法】菌体からブタノール抽出法と疎水性クロマトグラフィーによってLTA画分を得て，この構造をNMRにより解析した．また，LTA画分のGroPポリマー部位を酢酸処理によって除去し，アンカー糖脂質画分を得た．さらにこのアンカー糖脂質画分から，アンモニア処理によって脂肪酸を除去し，アンカー糖画分を取得した．両画分をMALDI-TOF MSにより分析した．また，アンカー糖脂質の脂肪酸をGCによって分析した．

【結果と考察】構造解析の結果，本株の LTA は，GroP を繰り返し単位に持ち, GroP の 2 位の水酸基の約 30%が D-アラニンで置換されている主鎖構造であること，主要なアンカー糖脂質として，テトラヘキソシルジアシルグリセロールとアシルヘキソシルジアシルグリセロールを持つことが明らかになった. また，アンカー糖脂質の脂肪酸の 70%がオレイン酸であった (図 1).

図1



R_1 : -OH (69%), -D-alanine (31%)
Fatty acid : Oleic acid (70%), Palmitic acid (19%), Stearic acid (7%)

一般的な LTA の構造は, 糖および D-アラニンなどで置換された GroP を繰り返し単位としたポリマーを持ち，アンカー糖脂質はジヘキソシルジアシルグリセロールであることが多い．これに対して，本研究で明らかになった *L. gasseri* JCM1131^T の LTA は，GroP ポリマー部位に特徴はなかったが，アンカー糖脂質部位では，これまでに報告されている *Lactobacillus* 属細菌の LTA に共通して観察される 3 分子のアシル基を持つ構造が確認された．さらに，本株は，アンカー糖が四糖という，これまでグラム陽性細菌の LTA では報告されていない新規の構造の LTA を有することが明らかになった．

Lactobacillus gasseri, Lipoteichoic acid, structure

講演番号：3B13p19
講演日時、会場：3 月 26 日 17:36～ B 校舎 13 会場

Lactococcus lactis ssp. *lactis* C59 株の細胞表層に存在するルテニウムレッド結合因子
Ruthenium red binding substance on the cell surface of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C59
○鈴木 チセ、木元 広実、小林 美穂（農研機構・畜草研）
○Chise SUZUKI,Hiromi KIMOTO-NIRA,Miho KOBAYASHI (NILGS)

【背景・目的】乳酸球菌 *Lactococcus lactis* の中には細胞の周囲に莢膜をもつ株がある。莢膜は蛋白質や莢膜多糖(CPS)によって構成されるが、菌株によってその糖組成や修飾が異なっており乳酸菌の菌株特異性の要因の一つと考えられる。チーズから分離された *L. lactis* ssp. *lactis* C59 株は、細胞外多糖合成酵素遺伝子クラスターを有する CPS 生産菌であり、オボアルブミン感作マウスへの生菌経口投与により IgE 抗体産生を抑制するプロバイオティック作用をもつ(1)。カチオン性色素ルテニウムレッド(RR)を含む寒天培地上では、通常 *L. lactis* の CPS は RR を排除するため CPS 生産菌のコロニーは白色となるが、C59 株のコロニーは RR により染色され赤いコロニーとなる特徴がある。本研究は、C59 株の細胞表層の特異性を明らかにするため RR 結合因子の性質を明らかにする。

【方法】C59 株を MRS 培地またはスキムミルクをアクロモペプチダーゼ E で分解した培地(DSM)で 30℃一日培養し、集菌後、菌体を生理食塩水で洗浄した。CPS など莢膜成分は 0.1M 炭酸ナトリウム（SC）処理（洗浄菌体を SC に懸濁、氷上にて 1 時間インキュベート）後、遠心して得た上清中に得られる（SC 画分）。RR との結合活性の検出はニトロセルロース膜にスポット後、ニトロセルロース膜を RR 溶液に浸漬後水洗することにより行った。

【結果】C59 株は MRS、DSM いずれの培養でも CPS を生産する。MRS 培養菌体から得た SC 画分には RR 結合活性がみられた。DSM 培養菌体より得られた SC 画分では結合活性がみられなかったが、SC 画分を 50mM EDTA 共存下で TCA 沈殿を行うと、RR 結合活性が認められた。一方、RR 結合が見られたニトロセルロース膜を 0.1M 塩化カルシウム溶液に浸漬すると RR の結合は消失した。以上より RR 結合因子の RR への結合はカルシウムにより阻害されると考えられる。RR 結合因子は SC 画分への塩化カルシウム添加で沈殿し、EDTA で可溶化した。排除限界が 3000 の限外濾過膜で濃縮可能であることから、RR 結合因子はカルシウム結合性の高分子と考えられる。

本研究は JSPS 科研費 23580124 の助成による。
(1) Yoshida et al. FEMS Immunol Med Microbiol 61(3):315-322(2011)

Lactococcus lactis, ruthenium red, calcium

講演番号：3B13p20
講演日時、会場：3 月 26 日 17:48～ B 校舎 13 会場

細胞性粘菌の細胞質分裂に関わるタンパク質 nenkyrin(D411-2p)と相同領域を持つタンパク質の機能解析

Analysis of proteins that have the homologous region between nenkyrin (D411-2p) involved in cytokinesis of *Dictyostelium discoideum*

○稲葉 弘哲、依田 幸司、足立 博之（東京大院農生科・応生工）
○Hironori Inaba,Koji Yoda,Hiroyuki Adachi (Univ. of Tokyo)

【目的】我々はこれまで細胞性粘菌 *Dictyostelium* の細胞質分裂変異株から同定した細胞質分裂に関わるタンパク質 nenkyrin(D411-2p)の機能について報告してきた。その中で nenkyrin の C 末端領域が機能的に重要であることが示唆され、相同性検索によりこの領域(conserved domain 1; CD1)と相同性の高い領域を持つタンパク質がアメーバ類に保存されていることが明らかとなった。細胞性粘菌にも CD1 を持つタンパク質が nenkyrin の他に 3 つ存在した(CD1A, CD1B, CD1C)。CD1 の機能を明らかとする為にこれらのタンパク質の機能解析を進めており、これまでに CD1A の遺伝子破壊株では目立った欠損が見られないことを報告している。今回は CD1B の遺伝子破壊株と過剰発現株の表現型及び細胞内局在を解析した。
【方法・結果】CD1B は低分子量 G タンパク質の制御ドメインを持ったタンパク質である。まず相同組換えにより CD1B の遺伝子破壊株を作製した。基質培養では *cd1B* 破壊株は単核であったが、親株 AX2 と異なり細胞が細長く極性化していた。一方、GFP-CD1B 過剰発現株は基質上で細胞が球形化し、僅かながら親株より多く多核細胞が見られた。また、懸濁培養では両株共に多核化し、特に *cd1B* 破壊株では細胞はほとんど分裂せず巨大多核化した。GFP-CD1B は間期には F アクチンに富む細胞の裏打ち骨格である cortex や糸状仮足、マクロピノサイトーシス時の王冠状突起である crown への局在が見られた。また、分裂時にも両極で F アクチンとの共局在が見られた。これらのことから、CD1B は F アクチン細胞骨格の制御をしていることが示唆された。そこで、*cd1B* 破壊株の F アクチンを染色して観察したところ cortex が親株に比べ濃く染色されることが分かった。界面活性剤 Nonidet P-40 によって細胞を溶解した際に不溶画分に回収される cytoskeleton ghost の F アクチンを定量すると、*cd1B* 破壊株では親株に比べ増加し、細胞内における F アクチンの G アクチンに対する割合の増加が示唆された。続いて、形態形成と細胞質分裂以外の F アクチンの関与する細胞運動として知られるファゴサイトーシスとマクロピノサイトーシスへの関与について調べた。それぞれ酵母の取り込み速度と培地の取り込み速度を調べたところ、共に *cd1B* 破壊株において速度低下が見られた。以上より、CD1B は F アクチン細胞骨格の制御によって細胞形態、細胞質分裂、ファゴサイトーシス、マクロピノサイトーシスに関与していることが示唆された。

Dictyostelium, F-actin, cytokinesis

講演番号：3B14a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ B 校舎 14 会場

セルラーゼ分泌性 *Streptomyces* 属放線菌からのセルラーゼ遺伝子群の単離・解析および異種放線菌と大腸菌における発現

Cloning and sequence analysis of cellulase genes from cellulolytic streptomycetes and heterologous expression in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*

○友常 久実子[1]、土田 美帆[1]、春日 和[1]、小林 正之[1]、上松 仁[2]、池田 治生[3]、石川 淳[4]、小嶋 郁夫[1]([1]秋田県大院、[2]秋田工業高等専門学校、[3]北里大・北里生命研、[4]感染研・生物活性物質)
○ Kumiko Tomotsune[1], Miho Tsuchida[1], Kano Kasuga[1], Masayuki Kobayashi[1], Hitoshi Agematsu[2], Haruo Ikeda[3], Jun Ishikawa[4], Ikuo Kojima[1] ([1]Akita Pref. Univ., [2]Akita Natl. College Technol., [3]Kitasato Inst. Life Sci., Kitasato Univ., [4]National Institute of Infectious Diseases)

【目的】
稲わら，林地残材などのセルロース系バイオマス (CB)は，セルロースなどの大量の多糖類を含むにもかかわらず，これまでに有効利用されていない。一方，*Streptomyces* 属放線菌は主に土壌中に生息し，ゲノム中に複数のセルラーゼ（推定）遺伝子群が存在することが明らかになっており，実際に一部の菌株において，セルラーゼ遺伝子群の分離と酵素の精製が報告されている。しかしながら，抗生物質を生産する放線菌の多くはセルロース資化性が低いことから，我々は，CB を原料として有用な抗生物質を発酵生産できる菌株の育種をめざしている。本研究では，セルラーゼ分泌性放線菌の探索とセルラーゼ遺伝子群の単離・解析，および異種放線菌と大腸菌における発現について報告する。
【方法・結果および考察】
(1)セルラーゼ分泌性放線菌の分離
秋田県内外の土壌より分離した *Streptomyces* 属放線菌約 4,000 株より，カルボキシメチルセルロース(CMC)の分解をコンゴーレッド染色により判別して，2 株のセルラーゼ高分泌性株(*S. thermocarboxydus* C42 および *S. argenteolus* M178)を分離した。
(2)セルラーゼ遺伝子群のクローニングと遺伝子解析
C42 および M178 について，それぞれの染色体より約 5～10 kb の部分分解物を調製し，多コピーベクターに連結後，*Streptomyces lividans* TK21 に導入して，約 3,000 の形質転換株を分離した。さらに，CMC の分解に基づいて，セルラーゼ分泌性株を選抜し，クローン化 DNA 断片の塩基配列を決定して，遺伝子機能を推定した。その結果，C42 および M178 より糖質加水分解酵素(GH)ファミリーに属する 4 種の遺伝子群を分離した。すなわち，C42 より *cel5A*$_C$ (GH5)および *cel9A*$_C$ (GH9)，M178 より *cel5A*$_M$(GH5)，*cel12A*$_M$ (GH12)が得られた。また，C42 のゲノム情報を基に *cel12A*$_C$ (GH12)を分離した。
(3)クローン化セルラーゼ遺伝子群の異種放線菌および大腸菌における発現
これら 5 種の遺伝子群について，C 末端に His-Tag を付加し，放線菌高発現 *rpsJ* プロモーターに連結して TK21 に導入したところ，いずれの導入株も菌体外にセルラーゼを分泌した。さらに，大腸菌 JM109 を用いて，これら遺伝子群を *lac* プロモーターにより強制発現させたところ，C42 の *cel5A*$_C$ および *cel12A*$_C$，M178 の *cel5A*$_M$および *cel12A*$_M$の導入株は，セルラーゼを菌体外に分泌した。現在，これら 4 種のセルラーゼの精製と活性について検討を行っている。

Streptomyces, cellulase

講演番号：3B14a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ B 校舎 14 会場

Pseudomonas putida の *dnaJ* 欠損株の作出とその解析
Construction and characterization of a *Pseudomonas putida dnaJ*-null mutant
○伊藤 史浩[1]、近藤 亮[2]、福森 文康[2] ([1]東洋大院・生命、[2]東洋大・生命)
○Fumihiro Ito[1], Ryo Kondo[2], Fumiyasu Fukumori[2] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ., [2]Faculty of Life Sciences, Toyo Univ.)

【目的】DnaJは、DnaKおよびGrpEとともに働く分子シャペロンタンパク質の1つである。DnaKシステムは、新生タンパク質の折りたたみの介助を行うのに加えて、ストレス応答やClpBとともに凝集タンパク質の再生に関わり、タンパク質の品質管理に非常に重要であることが知られている。当研究室で得られた*Pseudomonas putida* KT2442-R2株（R2株）は、トルエン耐性および温度感受性で、種々のヒートショックタンパク質を高発現するが、これらの形質に*dnaK*の点変異が深く関わることが明らかとなっている。これまで*dnaK*欠損株の作出を試みてきたが、成功していない。本研究では、*P. putida*のDnaKシステムにおけるDnaJの機能解析を行うために、*dnaJ*およびそのアナログと考えられる遺伝子の欠損株の作出を行い、DnaJの機能について明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】スーサイドベクターpKNG101を用いた相同組換えにより、野生株*P. putida* KT2442株（KT株）およびR2株において*dnaJ*欠損株の作出に成功した。LB培地での倍加時間は、いずれの株においても1.6－1.7倍に増加し、*dnaJ*の欠損が生育に対して悪影響を及ぼすことが推測された。また、KT株の*dnaJ*欠損株はLB平板上では35℃以上で生育せず、*dnaK*の変異株であるR2株と同程度の温度耐性を持つことが分かった。KT株において*dnaJ*のアナログである*cbpA*、*djlA*の欠損株については温度感受性を示さなかったことから、DnaKシステムが*P. putida*の温度耐性に関わり、DnaJの機能をそのアナログが相補できないことが示唆された。一方、最少培地においても生育温度を調べたところ、KT株の*dnaJ*欠損株はKT株と同様に37℃まで生育し、LB培地とは温度耐性度が異なっていた。*P. putida*は高い有機溶媒耐性を持つことが知られており、KT株はキシレンに対して、R2株はより毒性が高いとされるトルエンに対して耐性を持っている。それぞれの*dnaJ*欠損株の有機溶媒に対する耐性度を調べたところ、有機溶媒重層下でのコロニー形成においては影響が無いが、有機溶媒重層下では通常培養に比べてコロニー形成速度が著しく遅くなり、コロニーの形成まで数日を要すること分かった。このことから、*dnaJ*は、ストレス環境において細胞の生育に非常に重要であることが明らかとなった。温度感受性および有機溶媒存在下での生育の遅延に*dnaJ*が関わることを確認するために、プラスミドを利用して*dnaJ*を相補したところ、KT株の*dnaJ*欠損株において温度感受性が復帰し、KT株と同様に37℃まで生育が確認できたが、キシレンの存在下での増殖速度の回復は見られなかった。この理由については現在検討中である。現在、酸化ストレスなどの他のストレスに対する耐性におけるDnaJの関与の役割について解析を行っており、その結果についても併せて報告する予定である。

dnaJ, chaperon, *Pseudomonas putida*

講演番号：3B14a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ B 校舎 14 会場

Pseudomonas putida の *htpG* および *clpB* 欠損株の作出とその解析
Construction and characterization of *Pseudomonas putida clpB*- and *htpG*-null mutants
伊藤 史浩[2]、○鈴木 由人[1]、槇石 隆志[1]、稲葉 雅人[1]、福森 文康[1] ([1]東洋大生命、[2]東洋大院生命)
Fumihiro ITO[2], ○ Yuto SUZUKI[1], Takashi MAKIISHI[1], Masato INABA[1], Fumiyasu FUKUMORI[1] ([1]Toyo Univ., [2]Grad. School Toyo Univ.)

【目的】熱ショック応答は、種々のストレスによる変性タンパク質の増加に対応する普遍的な細胞応答であり、熱ショックタンパク質（HSP）と呼ばれるシャペロンやプロテアーゼを含む一群のタンパク質濃度が上昇する。本研究室で得られた*Pseudomonas putida* KT2442株(KT株)のトルエン耐性変異株である*P. putida* KT2442-R2株(R2株)は、DnaK, GroEL, GroES(Hsp10), ClpB (Hsp104), HtpG(Hsp90), HslUを過剰蓄積することが分かっている。AAA+スーパーファミリーに含まれるClpBは、DnaKと協同的に働きシャペロンとして凝集したタンパク質を脱凝集し、活性状態に戻す機能をもつことが細菌や酵母において報告されている。また、Hsp70やHsp60が通常の生育条件においてもタンパク質の正しい立体構造の形成・維持に重要な役割をはたす一般的なシャペロンであるのに対して、HtpGは限られたタンパク質の成熟に関わると考えられている。本研究では、これらのHSPをコードする遺伝子の欠損株の作成と、それらの各種ストレスに対する耐性を調べることにより、*P. putida* におけるこれらのタンパク質の機能解析を目的とした。
【方法・結果・考察】スーサイドベクターpKNG101 を用いた相同組換えにより、KT 株および R2 株において *clpB* および *htpG* 欠損株の作出に成功した。これまでの検討では、KT 株の *clpB* 欠損による温度耐性、有機溶媒（キシレン）耐性、過酸化物耐性において大きな形質の変化は観察されていない。なお、濁度の上昇から求めた LB 培地における KT 株の *clpB* 欠損株の倍加時間(32 分)は KT 株(36 分)よりも短く、増殖の過程で細胞内に生じた凝集タンパクの再生を行わないまま細胞体積が増加するために、見かけの増殖速度が増加すると推測された。また、R2 株では *clpB* の欠損によりアルキル過酸化物に対する耐性が下がる傾向があり、細胞内タンパク質の酸化に伴う変性タンパク質の増加に対して、DnaK が十分機能しないために、R2 株では *clpB* の欠損による影響が強く出ているものと考えられた。同様に、KT 株においても *htpG* 欠損株については倍加時間、温度耐性、有機溶媒耐性、過酸化物耐性において大きな形質の変化は観察されなかったが、R2 株の *htpG* 欠損株では倍加時間(60 分)が R2 株(45 分)に比べて顕著に長く、また過酸化物に対する耐性やトルエンに対する耐性が低下していた。KT 株の *htpG* 欠損株において明確な形質の変化が観察されなかったことは、DnaK システムが正しく機能している細胞においては、HtpG の役割は限定的であることを示すものと考える。一方、R2 株の *htpG* 欠損株においてトルエン耐性が低下したことは、有機溶媒の耐性に関わるタンパク質あるいはその転写因子等の成熟に、HtpG が関与することを示唆するものと思われる。

clpB, *htpG*, heat shock protein

講演番号：3B14a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ B 校舎 14 会場

Geobacillus kaustophilus HTA426 において DNA 変異を誘発する遺伝子改変
Genetic modification for inducing DNA mutations in *Geobacillus kaustophilus* HTA426
○鈴木 宏和、古川 恵（九大院農）
○Hirokazu SUZUKI,Megumi FURUKAWA (Faculty of Agric., Kyushu Univ.)

【目的】汎用的な酵素安定化（耐熱化）技術の確立は，酵素触媒の経費削減，酵素産業実用性の向上，そして酵素を利用した新産業の創出などといった様々な波及効果を生むと期待できる．そこで我々は耐熱化指向性の酵素分子進化に有用なDNA高変異性好熱菌宿主の開発を目的とし，*Geobacillus kaustophilus* HTA426におけるDNA変異に関する研究を行った．本好熱菌はマリアナ海溝深海から単離された好熱性のグラム陽性桿菌で，中等度の高温領域で迅速に増殖する点（生育可能温度，42ºC–74ºC；生育至適温度，60ºC；好気的LB培養における倍化時間，約20 min），生物学的知見が蓄積されている枯草菌と近縁である点，およびゲノム配列が公開されている点など，好熱菌応用研究のモデル生物として有利な要素を多く備えている．本大会では，*G. kaustophilus*において発生するDNA自然変異と，その発生に影響する遺伝子改変を報告する．
【方法】これまでの研究で作製した高形質転換性の*G. kaustophilus* MK242株に，染色体挿入型発現プラスミド（pGKE70）を挿入して，MK370株を作製した．本株の保存液をLB液体培地に接種し，60ºCで振盪培養した．菌体濁度OD_{600}が1.0の時（対数増殖中期），それから2時間後（対数増殖後期），4時間後（定常期初期），および6時間後（定常期中期）に培養液を採取し，寒天培地（LB，リファンピシン含有LB，ストレプトマイシン含有LB）に塗布した．60ºCで24時間培養後，生育した菌体コロニー数を計測し，変異発生率（リファンピシンもしくはストレプトマイシン含有LB培地のコロニー数/LB培地のコロニー数）を用いて，MK370株における変異発生頻度を解析した．
【結果】一般にリファンピシン耐性株は *rpoB* 遺伝子の変異によって，ストレプトマイシン耐性株は *rpsL* もしくは ^{16}S rRNA 遺伝子の変異によって発生する．対数増殖中期の MK370 菌体を塗布したところ，リファンピシン含有 LB 培地に有意なコロニー形成が観察された．その確率は高く，変異発生率は 0.1%以上であった．一方，ストレプトマイシン耐性株は定常期の菌体において有意に出現した（変異発生率，約 0.00001%）．MK370 株の *mutSL* 遺伝子を破壊したところ，定常期菌体からのリファンピシン耐性株発生率が約 10^2 倍上昇した．さらに対数増殖期菌体からのストレプトマイシン耐性株発生率も約 10^2 倍上昇し，*mutSL* 遺伝子破壊が *G. kaustophilus* における DNA 変異の発生を促進することが示された．現在，得られた耐性株における DNA 変異と，他遺伝子の改変が DNA 自発変異に及ぼす影響を解析している．本研究は生研センターイノベーション創出事業の支援を受けて行った．

Geobacillus, DNA mutation, spontaneous mutation

講演番号：3B14a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ B 校舎 14 会場

Analysis of the essential gene for a linear topology of the *Streptomyces rochei* replicons

○Yosi NINDITA[1], Zhisheng CAO[1], Yuh SHIWA[2], Hirofumi YOSHIKAWA[2], Kenji ARAKAWA[1], Haruyasu KINASHI[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Tokyo Univ. Agri.)

Streptomyces rochei 7434AN4 is a producer of two structurally unrelated polyketide antibiotics, lankamycin and lankacidin. This strain carries three linear plasmids, pSLA2-L (211 kb), pSLA2-M (113 kb), and pSLA2-S (18 kb), whose complete sequences have been determined. From the sequence analysis, the biosynthesis genes of both lankamycin and lankacidin were found to be located on pSLA2-L. In addition, pSLA2-L and pSLA2-M shares identical 14.6 kb of their rightmost sequences, while pSLA2-S has no homology with pSLA2-L or pSLA2-M. Southern hybridization analysis using 3.7 kb of pSLA2-L right-end probe revealed that the *S. rochei* chromosome shares 3.1 kb of homology with the right end of pSLA2-L and pSLA2-M. However, the plasmidless strain 2-39 showed no positive signal with this probe, suggesting that the chromosome had lost the telomere concomitant to the loss of linear plasmids, which followed by circularization. Chromosome circularization in this strain was confirmed by finding a fusion sequence in the draft sequences of strain 2-39 obtained by an Illumina GAII sequencer. In the meantime, new plasmidless mutants were generated from strain 51252 (pSLA2-L^{+}) by protoplast regeneration method. Among 200 colonies obtained from the protoplast regeneration, two colonies (YN-P7 and YN-P145) showed no antibiotic activity in bioassay against *Micrococcus lutheus*. As expected, both mutants showed no telomere signals. pSLA2-L and pSLA2-M contain the terminal protein gene (*tpg*), while pSLA2-S does not. Together with the fact that no additional intact *tpg* genes have been found on the chromosome, we hypothesized that one of the *tpg* genes on pSLA2-L and pSLA2-M is essential to maintain the linear topology of the chromosome and pSLA2-S. To prove this hypothesis, disruption of the *tpg* genes is in progress, the result of which will be described.

Terminal inverted repeat, *Streptomyces*, Linear plasmid

講演番号：3B14a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ B 校舎 14 会場

放線菌線状プラスミド SAP1 上の接合伝達関連遺伝子の機能解析

The functional analysis of conjugal transfer related genes on *Streptomyces* linear plasmid SAP1

○遠藤 翔太[1]、池田 治生[2]、片岡 正和[1] ([1]信州大工、[2]北里大北里生命研)
○Shota ENDO[1], Haruo IKEDA[2], Masakazu KATAOKA[1] ([1]Fac.Eng.Shinshu Univ., [2]Kitasato Inst. Life Sci. Kitasato Univ.)

【目的】無性生物である放線菌が高い遺伝的多様性を獲得している要因の一つとして、遺伝子水平移動機構の接合伝達が挙げられる。接合伝達では、プラスミドが遺伝子交換におけるベクター、あるいはメディエーターとして機能する。現在まで接合伝達性環状プラスミドにおける伝達機構の解析が行われ、TraB 依存的伝達や染色体移行能など多くのことが明らかになった。放線菌プラスミドには特徴ある染色体と同様の線状形態のプラスミドが存在する。放線菌線状プラスミドの接合伝達機構に関しては、環状プラスミドと比較すると、未だ明らかにされていない点が多い。本研究では *Streptomyces avermitilis* 由来の線状プラスミド SAP1 を研究対象とし、SAP1 上の接合伝達関連遺伝子の機能解析を行うことにより、線状プラスミドにおける伝達機構の解明を目的とする。
【方法】過去の環状プラスミドにおける接合伝達機構の研究で、伝達に関与する遺伝子がいくつか発見されており、それらの遺伝子と高い相同性を示す遺伝子が SAP1 上にも確認されていた。SAP1 上の接合伝達に関与すると示唆される遺伝子の欠損を行い、野生株と欠損株の伝達能の比較を行った。
【結果】接合伝達性環状プラスミド pSN22 の接合伝達において、それぞれ菌糸間伝達および菌糸内伝達に関与することが明らかとなっていた伝達関連遺伝子 *traB* および *traA* に相同の配列をもつ、SAP1 上の *traB* および *traA* の欠失変異株を作製し、機能解析を行った。野生株と欠損株の伝達能の比較を行ったところ、SAP1*traB* 欠損株は伝達能を失い、SAP1*traA* 欠損株は伝達能の低下がみられた。したがって、SAP1*traB* および SAP1*traA* はそれぞれ菌糸間伝達および菌糸内伝達に関与していると示唆され、pSN22 上の *traB* および *traA* との相同性が確認された。現在、他の伝達に関連すると考えられる遺伝子、*parA* 、*parB*、*ztx* の機能解析を行うため、それらの遺伝子の欠損株を作製中である。また、SAP1 を保有する菌株の染色体移行能の評価も行っている。

Streptomyces, linear plasmid, conjugal transfer

講演番号：3B14a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ B 校舎 14 会場

人為起源環境汚染物質分解能を有するスフィンゴモナス細菌群のゲノムと可動性遺伝因子に関する研究

Genomes and mobile genetic elements of sphingomonad strains that degrade man-made environmental pollutants

○永田 裕二、田端 理朗、大畑 智史、大坪 嘉行、津田 雅孝（東北大院生命）
○ Yuji Nagata,Michiro Tabata,Satoshi Ohhata,Yoshiyuki Ohtsubo,Masataka Tsuda（Tohoku Univ.）

【背景・目的】α-Proteobacteriaに属するsphingomonadsと総称される細菌群（以下スフィンゴモナス細菌群）は、環境中に広く棲息し、各種有機塩素系農薬、ダイオキシン類、リグニン関連物質、各種ポリマー類など、高度に難分解性の多様な物質分解能を持つ株が知られていることから、多彩な物質代謝能を有すると考えられているが、それぞれの株は特定の物質の分解能に特化したスペシャリストである。我々は、スフィンゴモナス細菌群に属し、人工の有機塩素系殺虫剤で難分解性のγ-hexachlorocyclohexane（HCH)分解能を有する*Sphingobium japonicum* UT26株のHCH分解代謝経路の全貌を解明すると共に、本株の全ゲノム配列を完全決定した。本ゲノム配列を他のスフィンゴモナス細菌株のものと比較することで、本株がゲノム構造的にもHCH分解のスペシャリストであることが支持された。さらに、他のHCH分解能を有するスフィンゴモナス細菌株のゲノムとの比較などの解析を行うことで、スフィンゴモナス細菌群が高度に難分解性の多様な物質代謝能を獲得する機構に関する知見が得られると期待された。
【方法・結果および考察】UT26株の全ゲノム配列情報を、前回の解析後、新たにデータベースに登録されたHCH分解能を持たないスフィンゴモナス細菌群のゲノム情報、および我々が新たに決定した３株のHCH分解細菌、*Sphingomonas* sp. MM-1株、*Sphingobium* sp. TKS株、*Sphingobium* sp. MI1205株のドラフトゲノム配列情報と比較した。その結果、(i) HCH分解細菌は、ある種のABCトランスポーターシステムや芳香族化合物の下流代謝系などのスフィンゴモナス細菌群が共通に有する因子と、HCH分解に特異的な*lin*遺伝子群が組み合わさることで世界各地で「同時多発的に」創出されたこと、(ii) 特異的な*lin*遺伝子群の獲得には、挿入配列IS*6100*やスフィンゴモナス細菌群に特徴的な複数のプラスミドなどの可動性遺伝因子が重要な役割を果たしていること、が示唆された。一方、UT26株に存在する13コピーのIS*6100*の末端配列の解析から、IS*6100*の転移に伴う染色体とプラスミド間のDNA交換の痕跡が見出された。また、*sacB*遺伝子を利用したIS entrapment法により、UT26内で内在性のIS*6100*の転移が検出された。これらの結果は、UT26株での特異的な*lin*遺伝子群の自然欠失にIS*6100*が関与しているというこれまでの知見と併せて、IS*6100*がHCH分解遺伝子の獲得と、それに伴うゲノム再編成に重要な役割を果たしていることを強く示唆している。現在、上記３株のHCH分解細菌ゲノムの完全決定を進めており、スフィンゴモナス細菌群のゲノム動態に関するさらに詳細な知見が得られると期待される。

sphingomonads, hexachlorocyclohexane, mobile genetic element

講演番号：3B14a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ B 校舎 14 会場

γ-HCH 分解細菌 *Sphingomonas* sp. MM-1 株が有する多重プラスミドに関する研究

Studies on multiple plasmids ofγ-HCH-degrading bacterium *Sphingomonas* sp. MM-1

○田端 理朗、大畑 智史、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院生命科学研究科）
○Michiro TABATA, Satoshi OHHATA, Yoshiyuki OHTSUBO, Yuji NAGATA, Masataka TSUDA (Tohoku Univ.)

難分解性の有機塩素系殺虫剤γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) 分解細菌が世界各地で取得され、これらの株からγ-HCH 分解に関与するほぼ同一の *lin* 遺伝子群が見出されている。我々は *Sphingobium japonicum* UT26 株において *lin* 遺伝子群の詳細な解析を実施し、(i) *linA* から *linF* の遺伝子産物がγ-HCH のβ-ketoadipate への変換を担うこと、(ii) *linD* と *linE* はプラスミド pCHQ1 上に存在するが、それら以外の *lin* 遺伝子群は染色体上に散在していることを明らかにしている。一方、UT26 株以外のγ-HCH 分解細菌では、これらの *lin* 遺伝子群はプラスミド支配である場合が多く、また、*lin* 遺伝子群近傍領域に高頻度で挿入配列 IS*6100* が見出されている。これらのことから、*lin* 遺伝子群の環境中での挙動にはこれら因子が関与していると推測されている。我々はこれまでにインドの HCH 汚染土壌から取得したγ-HCH 分解細菌 *Sphingomonas* sp. MM-1 株が、(i) 4 つのプラスミド pISP1 (約 200 kb)、pISP2 (約 53 kb)、pISP3 (約 44 kb)、pISP4 (約 33 kb) を保持し、(ii) *linA* は pISP1 上に、*linB* は pISP4 上に、*linC*、*linF* は pISP 1 および pISP4 上に、*linD*、*linE* は pISP3 上に存在していていること、(iii) いずれのプラスミド上にも IS*6100* が存在していることを明らかにした。本研究では、第二世代シーケンサーを用いた 4 つのプラスミドの全塩基配列解析の結果にもとづき、(i) IS*6100* が高頻度で存在する *lin* 遺伝子群近傍領域の詳細な解析、(ii) 新規性の高いこれらプラスミドの複製・維持装置をコードしている遺伝子領域の推定と機能解析を行った。シーケンス解析の結果から *linA*、*linB*、*linC*、*linDE* および *linF* 部分配列の近傍に IS*6100* が見出され、これら *lin* 遺伝子群と IS*6100* 間の領域は、これまでに他株で報告されている *lin* 遺伝子と IS*6100* 間の配列と高い相同性を有していた。また pISP2 を除く 3 つのプラスミドについて、推定複製維持関連遺伝子を有するミニプラスミドを作製し、これら遺伝子が実際に複製維持機能を有していることを示した。以上の結果から、MM-1 株は環境中に存在する *lin* 遺伝子を含む領域を IS*6100* を介して新規性の高い多重プラスミド上に取り込むことによってγ-HCH 分解能を獲得したと推測された。

hexachlorocyclohexane, Sphingomonas, plasmid

講演番号：3B14a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ B 校舎 14 会場

放線菌伝達性プラスミド pSN22 上にコードされる伝達関連遺伝子 *traA* の機能解析
Function analysis of *traA* that is gene related to transfer encoded on *Streptomyces* transmissible plasmid pSN22
○神戸 麻依、片岡 正和（信州大院理工）
○MAI KOBE,MASAKAZU KATAOKA (Shinshu Univ.)

【目的】放線菌は、接合伝達性プラスミドを有していることが多く、土壌中で主に遺伝子水平移動の 1 つであるプラスミドの接合伝達により遺伝的多様性を獲得していると考えられる。伝達性プラスミドの 1 つである *Streptomyces nigrifaciens* 由来の pSN22 は接合伝達に 4 つの遺伝子座が関与しており、 菌糸間伝達には *traB* が、菌糸内伝達には *traA*、*spdB* が、これらの制御因子として *traR* がそれぞれ関与していることが明らかにされている。これらの遺伝子座のうち *traA* は変異解析による遺伝学的性状については知られているが、それ以外の生化学的性状などについてはほとんど不明である。本研究は、菌糸内伝達における *traA* およびこの遺伝子から生成される TraA タンパク質の機能について明らかにすることを目指した。
【方法・結果】*S.lividans* を用い、pSN22 上の *traB* 欠損株と非欠損株を培養し、遠心分離を行った。細胞画分ごとのサンプルを作成し、Western blotting 法により TraB タンパク質の有無による TraA タンパク質の局在の変化を確認した結果、TraA は TraB の有無に関係なく細胞膜局在であることが確認できた。現在は TraA と TraB の相互作用を pull-douwn 法および表面プラズモン共鳴を原理とした Biacore を用いて検討を行っている。また、*traA* 欠損の供与菌から受容菌への接合伝達について、*traA* 機能の発現時期や相補の時空間性について検討した結果についても報告する。

mkybuozkujuo

講演番号：3B14a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ B 校舎 14 会場

Streptomyces nigrifaciens 由来の伝達性プラスミド pSN22 における TraB の ATP 利用と接合伝達機能の関連性

The relationship between the ATPase activity and the conjugative transfer of TraB protein on *Streptomyces nigrifaciens* plasmid pSN22

○伏屋 友希弘、宮武 徹、片岡 正和（信州大院工）
○Yukihiro FUSEYA,Tetsu MIYATAKE,Masakazu KATAOKA (Shinshu Univ.)

【目的】*Streptomyces nigrifaciens* 由来の伝達性プラスミド pSN22 にコードされる TraB は、接合伝達の菌糸間伝達において不可欠な役割を持つ(Kataoka *et al., J. Bacteriol.,* 1991)。TraB は ATP 結合に関与する Walker type A (270-GMTGSGKT-277)、type B (378-YLLTWFEEA-386) ドメインを有しており、これらのドメインへの突然変異導入は、pSN22 の接合伝達機能を消失させることが報告されている (Kataoka *et al., Plasmid,* 1994, Kosono *et al., Mol Microbiol.,* 1996)。この事実は、TraB の機能に ATPase 活性が必要であることを示すが、現在までその ATPase 活性の生化学的証拠は示されていない。我々は、TraB の点突然変異体に加えて部分的欠損体を作成、発現、精製し、変異導入がもたらす ATPase 活性の変化と pSN22 の伝達機能の関連性を明らかにすることを目的とした。
【方法】我々は、Wild type、部分的欠損体、部位特異的変異を TraB の Walker type A (G273A、G273S、S274T、G275A、G275S、K276M、K276R、それぞれ置換)、type B (E384A と E385A、両アミノ酸を同時置換)ドメインに加えた変異 TraB を大腸菌内で発現、精製した。Wild type を用いて測定最適条件を検討後、各タンパク質の ATPase 活性を測定し、点突然変異体に関してプラスミド伝達効率との比較を行った。さらに我々は 4 つの変異 TraB(T277A、T277S、E384Q、E385Q)を作製し、同様に定量化を行った。
【結果・考察】部分的欠損体では、Walker type A, Walker type B の双方の欠損のみ活性が失われた。また点突然変異体に関して、T277S で ATPase 活性、プラスミド伝達効率が共に保存されたが、他の変異に関しては ATPase 活性、プラスミド伝達効率両者が消失した。これらの結果は、ATPase 活性並びに接合伝達、両機能が密接な関連性を持つことを示す。また同時に、Thr277 位では OH 基が重要であり、Thr と Ser の OH 基の配向性の違いは TraB の機能に影響を与えないことも示している。

Streptomyces, conjugative transfer, ATPase

講演番号：3B14a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ B 校舎 14 会場

IncP-9 群 NAH 7 接合伝達系の oriT を中心とした解析

Analysis of oriT site of conjugative transfer system in IncP-9 plasmid NAH7

○岸田 康平[1]、井上 慧[1]、宮崎 亮[2]、大坪 嘉行[1]、永田 裕二[1]、津田 雅孝[1] ([1]東北大学、[2]ローザンヌ大学)
○Kohei Kishida[1], Kei Inoue[1], Ryo Miyazaki[2], Yoshiyuki Ohtsubo[1], Yuji Nagata[1], Masataka Tsuda[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Lausanne Univ.)

接合伝達とは細菌細胞同士が接触し合うことで遺伝情報を伝達する機構で、本機構による遺伝子の水平伝播は微生物の進化に大きく貢献していると考えられている。接合伝達機構は共通した部分も多くある一方で、プラスミドごとに伝達機構の違いや宿主域の違いもあり、プラスミドの多様な接合伝達機構の解析が重要である。

IncP-9 群に属する 82 kb のナフタレン分解プラスミド NAH7 は *Pseudomonas putida* G7 由来の自己伝達性プラスミドである。これまでの研究により、NAH7 は全塩基配列の決定、接合伝達起点(*oriT*)近傍遺伝子の *traDEF* の解析が行われてきた。本研究では、接合伝達の開始点として働く *oriT* に焦点を当てて実験を行った。*oriT* は接合伝達の鍵酵素である Relaxase が Nicking を行う配列である。Nicking により2本鎖 DNA を開裂させ、Relaxase-ssDNA 複合体を形成し、この複合体が Mpf システムを経由し、受容菌へ受け渡される。広宿主域性の IncW プラスミドの R388 の *oriT* についての研究はよく行われているが、IncP-9 群のプラスミドではほとんどされていない。また、接合伝達機構に対して段階的なアプローチを行う必要があり、プラスミドの接合伝達起点としての役割を担う *oriT* の決定はその第 1 段階であると考え、*oriT* の解析を行った。

NAH7 から *oriT* 領域を推定するために、*oriT* が判明している R388 や pWW0 と塩基配列比較を行い、*traD-traA* 間の *oriT* があると予想した。また、*oriT* は特異性が高く、特定 Relaxase のみしか働かない。だが、*oriT* 配列さえプラスミド上にあれば、同じ宿主内の別プラスミド由来の接合伝達機構を借りて、接合伝達されるという性質を持つ。*In silico* での予想と上記の *oriT* の性質を利用して、推定 *oriT* が実際に働くかどうかを下記の実験で証明した。供与菌に NAH7 の推定 *oriT* 領域(430bp)を含むプラスミドと NAH7 を保持させ、受容菌に *oriT* プラスミドが接合伝達をするかどうかを指標に *oriT* の決定を行った。さらに、*oriT* 領域を狭めることや他プラスミドの *oriT* との比較するために、推定 Nicking site を含むような *oriT* 領域を６つの分断し、*oriT* として働くのに必要不可欠な配列を決定した。現在、*oriT* の更なる詳細な解析を行うために *In vitro* で Nicking site の決定を行っている。タンパク質を大量発現させる pET システム、His タグにより Relaxase を精製し、*oriT* プラスミドと反応させることによって Nicking を起こさせて、どの塩基配列部位に nick が入ったかを検討する実験を行なっている。

plasmid, conjugation, oriT

講演番号：3B14a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ B 校舎 14 会場

IncP-7 群プラスミド pCAR1 の接合伝達に関与する ORF145 および ORF146 の機能解析
Functional analysis of ORF145 and ORF146 of IncP-7 plasmid pCAR1

○新谷 政己[1,2]、徳丸 裕樹[2]、金原 和秀[1]、野尻 秀昭[2] ([1]静大・工、[2]東大・生物工学セ)
○ Masaki SHINTANI[1,2], Hiroki TOKUMARU[2], Kazuhide KIMBARA[1], Hideaki NOJIRI[2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Univ. Tokyo)

【背景】不和合性群 IncP-7 群プラスミド pCAR1 は，主として *Pseudomonas* 属細菌間を接合伝達によって移動可能であり，宿主にカルバゾール資化能をもたらす 200 kb の環状プラスミドである．pCAR1 の接合伝達に関与すると推定される遺伝子群のうち，機能未知の ORF145 および ORF146 を含む遺伝子領域は，同一オペロン上に存在し，異なる宿主間でその転写量が大きく変動することがタイリングアレイを用いた比較実験より明らかになっている．[1)] また pCAR1 は供与菌と受容菌の組合せによって，その接合伝達頻度が大きく変動する．[2)] 本研究では，ORF145，146 の機能解析の一環として，これらの ORF が pCAR1 の接合伝達能に及ぼす影響を調べることを目的とした．

【方法】*P. putida* KT2440 株を pCAR1 の宿主とし，本菌株内における相同性組換えを利用して，ORF145，ORF146 それぞれの遺伝子欠失株を作製した．また，ORF145-146 の遺伝子領域全体を欠失させた菌株も作製した．その後，各種受容菌との接合伝達頻度を野生型の pCAR1 と比較した．また，欠失させた遺伝子については相補用プラスミドを構築し，接合伝達頻度が回復するかどうか相補実験を行って確かめた．

【結果と考察】供与菌・受容菌とも KT2440 株由来の菌株を用いて接合実験を行ったところ，野生型の pCAR1 の接合伝達頻度（供与菌あたり 10^{-2} 程度）に比べて，ORF145，ORF146，または両遺伝子領域を欠失した pCAR1 は，接合伝達能は失っていなかったが，その接合伝達頻度は 1/100~1/10 程度にまで有意に低下し，ORF146 を含む遺伝子領域を単独で欠失したプラスミドの接合伝達頻度が最も低かった．相補用プラスミドを供与菌，あるいは受容菌に挿入して相補したが，接合伝達頻度の回復は認められなかった．一方，供与菌の染色体上に ORF145，ORF146 双方を含む遺伝子領域をトランスポゾンで挿入したところ，接合伝達頻度の回復が認められた．現在受容菌の種類を変更した場合についても実験を行っている．

(1) Shintani et al., 2011. Plasmid 66: 85–92.
(2) Shintani et al., 2005. Biotechnol. Lett. 27: 1847–1853.

plasmid, conjugative transfer, Pseudomonas

講演番号：3B14a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ B 校舎 14 会場

IncP-1 不和合性群内におけるプラスミド宿主域の多様化
Diversification of plasmid host range within IncP-1 group
○矢野 大和[1,2]、ノックス モーリー[1]、ロジャーズ リンダ[1]、ブラウン セレスト[1]、トップ エヴァ[1]
([1]アイダホ大学 IBEST、[2]東大院新領域)
○Hirokazu Yano[1,2], Molly Knox[1], Linda Rogers[1], Celeste Brown[1], Eva Top[1] ([1]University of Idaho, [2]University of Tokyo)

細胞の寄生体である細菌のプラスミドは、細菌の遺伝子交換を媒介する可動遺伝因子でもある。プラスミドを介した抗生物質耐性の病原細菌への伝達は、現在人類にとって脅威であるため、プラスミドが細菌宿主に適応する仕組みを理解することは重要な課題である。

IncP-1 プラスミド群は、自己伝達性プラスミドの一群で、広範囲のグラム陰性細菌を宿主とする。IncP-1 群の主なメンバーは、抗生物質耐性や農薬の分解を担う遺伝子を有しており、病院や土壌、排水処理場の汚泥などから発見されてきた。これまで 50 種類以上の IncP-1 プラスミドのゲノムが解読され、系統解析の結果から、これらは 6 つの亜群に分類されてきた。しかし分類の根拠となっているプラスミド配列の多様化が、中立な変異の蓄積によるものか、プラスミドの性質の分化を伴っているのかは不明であった。そこで発表者らは「IncP-1β亜群プラスミドと IncP-1γ亜群プラスミドは異なる範囲の宿主に適応してきた」という仮説を立て、これを実験によって検証した。モデルプラスミドとして、pBP136（IncP-1β亜群)、 pKS208（IncP-1γ亜群)、 pMBUI1（IncP-1γ亜群）を用い、モデル宿主として *Alphaproteobacteria* 綱の *Agrobacterium tumefaciens* および *Sphigobium japonicum*、 *Betaproteobacteria* 綱の *Cupriavidus necator*、*Gammaproteobacteria* 綱の *E. coli* および *Pseudomonas putida* の 5 つを用いて解析を行った。

IncP-1β亜群プラスミドは実験に用いたすべての細菌宿主集団内で維持されたが、IncP-1γ亜群プラスミドは *S. japonicum* で複製できなかった。また、*A. tumefaciens* では pMBUI1 は複製できなかったが、pKS208 は複製できた。しかし、選択圧のない条件では pKS208 は直ちに *A. tumefaciens* 集団から消失した。よって、IncP-1®亜群と IncP-1γ亜群のプラスミドが存続できる細菌宿主集団の範囲は異なることが判明した 。一方、通常条件よりも 3−4 倍量の複製開始タンパク質を生産する両 IncP-1γ亜群プラスミドのミニレプリコンは、どちらの *Alphaproteobacteria* 宿主内でも複製できた。このことから、野生型の IncP-1γ亜群プラスミドが *Alphaproteobacteria* 宿主内で維持されない原因の一つとして、それらの宿主中での複製開始タンパク質遺伝子の発現レベルが最適化されていないことが示唆された。また、*P. putida* では IncP-1β亜群プラスミドよりも IncP-1γ亜群プラスミドの方が安定して維持された。このことから、同一不和合性群内でのプラスミド配列の多様化は、プラスミドの宿主範囲の特殊化と関連していることが判明した。

plasmid, host range, replication

講演番号：3B14a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ B 校舎 14 会場

放線菌ファージ TG1 インテグラーゼによる微生物ゲノムへの部位特異的遺伝子導入

Actinophage TG1 integrase-mediated site-specific gene integration into bacterial genomes

○石澤 崇昭[1]、室井 哲朗[1]、平野 展孝[1,2]、高橋 秀夫[3]、春木 満[1]（[1]日大・工・生命応化、[2]JST・PRESTO、[3]日大・生資・応生科）
○Takaaki Kokuzawa[1], Tetsuro Muroi[1], Nobutaka Hirano[1,2], Hideo Takahashi[3], Mitsuru Haruki[1]
([1]Nihon Univ., College of Eng., Dept. of Chem. Bio. & Appl. Chem., [2]JST, PRESTO, [3]Nihon Univ., College of Bio. Sci., Dept. of Appl. Bio. Sci.)

有用微生物ゲノムの構造を改変し、その遺伝子発現制御を操作するゲノム工学技術は、有用物質生産を目的とした微生物育種において重要な技術である。中でも、複数の遺伝子産物が反応に関与する代謝・生合成経路遺伝子群の異種微生物への導入においては、長大な外来遺伝子の異種細胞ゲノムへの高効率な組み込み技術が特に重要となる。このため、部位特異的組み換え反応を触媒する組み換え酵素（リコンビナーゼ）を利用した遺伝子導入法が広く研究されている。高効率な遺伝子導入を目的とするゲノム工学では、異なる配列（ファージゲノム上の *attP* と宿主ゲノム上の *attB*）間でのみ部位特異的組み換え反応を触媒し、逆反応が酵素単独では起こらないファージインテグラーゼが適していると考えられる。本研究では、組み換え反応に宿主細菌由来因子を必要としないため、広範な微生物種に対して適用可能と考えられる活性部位に Ser 残基を持つセリンタイプ・ファージインテグラーゼの放線菌ファージ TG1 由来インテグラーゼを用いて、多様な微生物ゲノムを対象に部位特異的に遺伝子導入出来る手法の開発を行った。まず、大腸菌ゲノムを対象に、Tn5 トランスポゾンによってゲノム上へインテグラーゼ組み換え部位（*attP*）のランダムな挿入を行った後、TG1 インテグラーゼによって *attB* 含有環状 DNA を高効率に部位特異的導入出来るゲノム上部位を同定した。その結果、大腸菌ゲノムを対象とした場合、複製起点 *oriC* 近傍に挿入された *attP* 部位に対して、プラスミド DNA による形質転換効率の約 1/100 の効率で部位特異的に遺伝子導入が可能であった。現在、より広範な微生物種への本遺伝子導入法の適用を目指して、枯草菌ゲノムを対象に同様の手法で遺伝子導入を行っている。

Genome engineering, Serine-type integrase, Site-specific recombination

講演番号：3B14a15
講演日時、会場：3 月 26 日 11:48～ B 校舎 14 会場

Lactococcus lactis の新規シトシン特異的 DNA メチル化酵素遺伝子
Novel C(5)-cytosine DNA methyltransferases in *Lactococcus lactis*
○小林 美穂、萩 達朗、野村 将、木元－新良 広実、守谷 直子、鈴木 チセ (畜草研)
○ Miho Kobayashi,Tatsuro Hagi,Masaru Nomura,Hiromi Kimoto-Nira,Naoko Moriya,Chise Suzuki (NILGS)

［背景・目的］細菌のファージ耐性機構として働く Type II 制限・修飾システム（Type II R-M）は、特定の塩基配列を切断する制限酵素と DNA メチル化修飾酵素（MTase）から成る。MTase による DNA メチル化は、制限酵素による分解から自己 DNA を保護するだけでなく、自己遺伝子の発現調節に関わる場合もある。乳酸球菌（*Lactococcus lactis*）の Type II R-M の報告は少なく、認識配列の明らかなものはさらに限られている。しかし近年、多くの *L. lactis* 菌株で全ゲノムが解読され、それらの情報から、多様な Type II R-M の存在が推定されている。本研究では *L. lactis* における C(5)-シトシン MTase（m5C MTase）の多様性とその機能について調べる。
［方法］既知の *L. lactis* m5C MTase 遺伝子の配列をもとに縮重プライマーを作成し、畜草研 *L. lactis* ライブラリー42 株から m5C MTase 遺伝子保有株をスクリーニングした。次に inverse PCR 法および vectorette PCR 法を用いて、推定 MTase 遺伝子の全長を含む遺伝子断片を取得し塩基配列を決定した。得られた断片を pGEM® T Easy vector にクローニングし、CopyCutter™ EPI400™ *E. coli* に導入して、単離した推定 MTase 遺伝子の機能を調べた。
［結果］*L. lactis* ssp. *lactis* 2 菌株および *L. lactis* ssp. *cremoris* 2 菌株から m5C MTase 遺伝子と相同性の高い遺伝子配列を得た。そのうち *L. lactis* ssp. *cremoris* 2 菌株の ORF は推定アミノ酸配列が同一で、REBASE（制限酵素データベース）で相同性解析を行ったところ、M.EcoRI をプロトタイプとする推定 MTase と 64%の相同性があった。一方、*L. lactis* ssp. *lactis* 2 菌株から得られた ORF は推定アミノ酸配列が異なっていた。そのうち 1182 bp の ORF(M.Lla1257ORF1182P)は、既知の M.TspRI と 47%の相同性があった。また 1157 bp の ORF（M.LlaS1ORF1157P）は、認識配列不明の推定 MTase と 68%の相同性があった。M.LlaS1ORF1157P 遺伝子を pGEM® T Easy vector に結合したプラスミド pMCS13 を大腸菌で増幅し、制限酵素 MspI による切断パターンを調べたところ、塩基配列から予想される切断パターンと一致しなかった。pMCS13 上の 13 箇所の MspI サイトの切断を個々に調べたところ、M.LlaS1ORF1157P 遺伝子上の 1 箇所の MspI サイトおよび vector 上の少なくとも 3 箇所の MspI サイトにおいて切断阻害を確認した。また M.LlaS1ORF1157P 遺伝子に 4 塩基欠失を導入した pMCS13d では MspI の切断阻害は観察されなかった。このことから M.LlaS1ORF1157P は大腸菌においても m5C MTase として作用することが示唆された。本研究は JSPS 科研費 24580400 の助成を受け実施した。

Lactococcus lactis, DNA methyltransferase

講演番号：3B14p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ B 校舎 14 会場

枯草菌ファージ防御遺伝子 *nonA* の転写制御と機能解析

Transcriptional and functional analysis of phage resistance gene, *nonA*, in *Bacillus subtilis*.

○山本 達也[1]、イー リーメン[2]、朝井 計[3]、中村 幸治[1] ([1]筑波大院生命環境、[2]東大生物工学セ、[3]埼玉大院理工)
○Tatsuya Yamamoto[1], Lii Mien Yee[2], Kei Asai[3], Kouji Nakamura[1] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]The Univ. of Tokyo, [3]Saitama Univ.)

枯草菌 Marburg 株は *nonA*、*nonB* という 2 つの遺伝子により SP10 ファージに対して抵抗性を持ち、両遺伝子に同時に変異が入ることで抵抗性を失う（Saito H *et al.* 1979. Mol Gen Genet.)。*nonB* は制限修飾系であり（Matsuoka S *et al.* 2004. Genes Genet Syst.)、*nonA* はプロファージ SPβ 領域の *bnrdE-bnrdF* 遺伝子間領域に存在する事が示唆されている (Yee LM *et al.* 2011. Genes Genet Syst.)。これまでの解析により、*nonA* はこの遺伝子間領域から 350 nt の RNA として転写されており、ファージ非感染時には発現せず、ファージ感染時にファージ後期遺伝子と同じ時期に発現していることが明らかとなっている。また、*nonA* は膜貫通領域をもつ 72 アミノ酸の蛋白質をコードしていた。本研究では、*nonA* の発現制御機構と SP10 ファージに対する防御機構の解明を目的とした。

nonA の発現時期は SP10 ファージ後期遺伝子の発現時期と同じであり、また、制限系が存在し、ファージ遺伝子の発現が見られないときには *nonA* の転写は見られず、SP10 ファージ後期遺伝子の発現を制御している因子が同時に *nonA* 遺伝子の発現を制御していることが考えられた。そこで、SP10 ファージのゲノムにコードされている 3 つのσ因子、Orf183、Orf199-200、Orf120 をそれぞれキシロース添加により発現誘導できるプラスミドを作製し、枯草菌内で各σ因子を発現させたところ、SP10 ファージ後期遺伝子の転写を制御していると考えられる Orf199-200 を発現させたときに *nonA* RNA の転写がみられた。従って、*nonA* は枯草菌のσ因子ではなく、感染した SP10 ファージのσ因子、Orf199-200 により転写されていることが明らかとなった。

ファージ非感染時に *nonA* を発現させた時の影響を調べるため、IPTG 添加により *nonA* を発現できる株を作製した。この *nonA* 誘導株は IPTG を含むプレート上では生育出来ず、また、液体培養において対数増殖期に IPTG を添加すると生育の阻害が見られた。このことから、NonA は枯草菌に対して毒性を示すことが明らかとなった。NonA には膜貫通領域が予測された。ファージ感染後の菌体ライセートを超遠心により分画し、ウェスタンブロットを行ったところ、NonA-His タグ融合蛋白質は膜画分で検出され、NonA は膜に局在し、細胞傷害を引き起こすことが示唆された。

以上の結果から、SP10 ファージにより発現が誘導された NonA は SP10 ファージに直接作用しているのではなく、枯草菌に対して毒性を示し、枯草菌の細胞死を誘導することで SP10 ファージに対する防御機構として機能している事が考えられる。

bacteriophage, phage resistance, abortive infection

講演番号：3B14p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ B 校舎 14 会場

酢酸菌 *Gluconacetobacter europaeus* における遺伝子破壊系の構築

Specific targeted gene disruption in an acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus*

○赤坂 直紀[1]、佐古田 久雄[1]、秀瀬 涼太[3]、藤原 伸介[2,3] ([1]マルカン酢株式会社、[2]関西学院大理工生命科学、[3]関西学院大理工生命環境科学研究セ)
○Naoki Akasaka[1], Hisao Sakoda[1], Ryota Hidese[3], Shinsuke Fujiwara[2,3] ([1]Marukan Vinegar Co. Ltd., [2]Kwansei Gakuin Univ., [3]Kwansei Gakuin Univ.)

酢酸菌 *Gluconacetobacter europaeus* は高いエタノール酸化能力および酢酸耐性を有し、食酢の工業生産において世界中で広く利用されている。しかし、当該酢酸菌の代謝工学技術は現時点で報告されてはおらず、近年タイプ株のドラフトゲノム配列が決定されたばかりでもあり[1)]、今後の研究の発展が期待される微生物である。一方、食酢製造原料に乳酸等の炭素源が過剰に存在する場合、これら過剰炭素は酢酸菌によりアセトインへと転換される。この代謝は overflow metabolism の一種であると考えられ、その代謝経路遺伝子として *aldC*(アセト乳酸デカルボキシラーゼをコード)が知られている。アセトインは食酢における不快臭の一つであり、その蓄積量を低減させる事は食酢の品質設計における重要な課題である。

Ga. xylinus[2)]や *Acetobacter aceti*[3)]等類縁酢酸菌での遺伝子破壊は既に行われているものの、これら事例では外来薬剤耐性遺伝子が選抜マーカーとして用いられているため、得られた形質転換体は「遺伝子組換え体」と定義され、実際の食酢生産に用いるには克服すべき課題を有する。これを回避する手法として、形質転換体の遺伝子構成が親株と同一であるセルフクローニング法が用いられるが、ピリミジン生合成系遺伝子を選抜マーカーとし、5-フルオロオロト酸(5-FOA)/ウラシル要求性を選択圧とした遺伝子破壊系がその代表例として広く知られている[4)]。これらの背景を踏まえ、我々は *pyrE*(オロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼをコード)を選抜マーカーとした、*Ga. europaeus* の遺伝子破壊系構築を試みた。すなわち、食酢発酵液より単離した *Ga. europaeus* M0119 株へ、*pyrE* 遺伝子の上流および下流領域を連結した *pyrE* 破壊ベクターをエレクトロポレーションにより導入し、5-FOA 耐性およびウラシル要求性を指標として、導入ベクターと double crossover を起こした *pyrE* 欠失株(⊿*pyrE*)を単離した。更に、得られた⊿*pyrE* 株に、*aldC* ORF を *pyrE* で置換したカセットを持つ *aldC* 破壊ベクターを導入し、ウラシル原栄養性を指標として *aldC* 破壊株(⊿*aldC*::*pyrE*)を選抜・作出した。現在、⊿*aldC*::*pyrE* 株の生育特性、並びにアセトイン生成能を解析中である。本技術により酢酸菌の機能改変への応用が期待される。

1)Andrés-Barrao C. et al.: *J. Bacteriol.*, 193, 2670 (2011)
2)Shigematsu T. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, 99, 415 (2005)
3)Sakurai K. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, in press (2012)
4)Sato, T. et al.: *J. Bacteriol.*, 185, 210 (2003)

acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter europaeus*, gene disruption

講演番号：3B14p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ B 校舎 14 会場

線状プラスミド SAP1 を用いた遺伝子クラスター輸送システムの構築

Construction of a gene cluster transfer system with linear plasmid SAP1

○藤森 友真[1]、松田 卓也[1]、池田 治生[2]、片岡 正和[1] ([1]信州大院理工、[2]北里大北里生命研)
○Yuma FUJIMORI[1], Takuya MATSUDA[1], Haruo IKEDA[2], Masakazu KATAOKA[1] ([1]Grad. Sc. Eng. Shinshu Univ., [2]Kitasato Inst. Life Sci. Kitasato Univ.)

【目的】放線菌は、市場の約８割の抗生物質を産出するなど、多種多様な２次代謝産物を生産し、それらを工業規模で生産する代謝能を持つことが知られている。生物工学分野では、ゲノムマイニングによって二次代謝系を設計する、いわゆる生合成マシナリー構築が今後主流になってくると思われる。放線菌は、高い代謝のロバスト性や生産性から生合成マシナリーの宿主として有望な細菌であるが、大腸菌や枯草菌のようにゲノムデザイン手法が確立されつつあるわけではなく、生合成遺伝子クラスターといった大型の DNA を導入する事は一般的に困難である。本研究では *Streptomyces avermitilis* 由来の接合伝達性線状プラスミド SAP1 を用いた大型遺伝子クラスターの導入、種間伝達システムの構築、遺伝子の発現や導入可能な遺伝子サイズの検証などを行っていく。
【方法】二次代謝産物を生産する遺伝子クラスターは 20~100kbp 程度で、このような長大な DNA を環状プラスミドに持たせて放線菌で安定保持することは困難である。一方線状プラスミドは、大きさが 10kbp 程度から 2Mbp 程度までと多岐にわたり、染色体と同様の線状構造を持ち、環状プラスミドよりも高い構造上の安定性を期待できる。本研究では、大腸菌で調整した遺伝子クラスターを RP4tra システムを用いて大腸菌－放線菌間接合で制限修飾系の緩い *Streptomyces lividans* に導入後、actinophage の *att-int* システムにより SAP1 ベクター上へ展開する系を構築し、さらに SAP1 の接合伝達システムで *S. avermitilis* へ導入を試みた。SAP1 は *S.avermitilis* 由来の線状プラスミドであるため、多様な放線菌への導入可能性を調べるため、*S.coelicolor* への導入を試みた。構築した系を用いてクロラムフェニコール生合成遺伝子クラスターを SAP1 ベクターに導入し、外来性のクロラムフェニコール生産を試みた。
【結果】宿主菌開発として宿主菌の染色体への *att-int* 系での組み込みを防止するため、部位特異的組み込みを利用して *S. lividans* 染色体上の *attB* 配列を除去した *S. lividans (attB-)*を構築し、SAP1 *(attB+)*を導入した。大腸菌内で調整した DNA を、大腸菌−放線菌の接合伝達により *S.lividans (attB-)* の保有する SAP1(*attB+)*へ組み込み、その SAP1 上に展開した遺伝子クラスターを放線菌間の接合伝達により *S. avermitilis* や *S.coelicolor* へ導入可能であることを確認した。また、クロラムフェニコール生合成遺伝子の発現を *S. lividans* と、*S.avermitilis* において確認した。

Streptomyces, conjugation, linear plasmid

講演番号：3B14p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ B 校舎 14 会場

枯草菌 168 株における挿入配列への適応性の解明

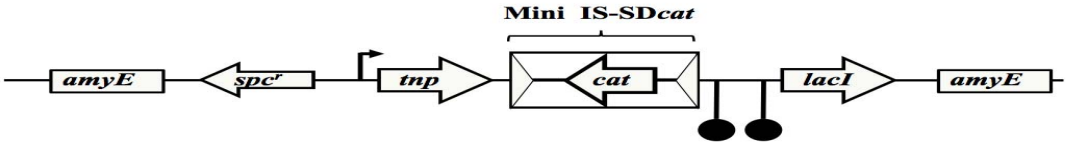
Adaptation strategy of *Bacillis subtilis* 168 to IS*256Bsu1*

○原田 翔太[1]、明石 基洋[1]、志波 優[2]、吉川 博文[1] ([1]東京農大・応生科・バイオ、[2]東京農大・ゲノム解析セ)

○Shota HARADA[1], Motohiro AKASHI[1], Yu SHIWA[2], Hirohumi YOSHIKAWA[1] ([1]Dept of Biosci., Tokyo Univ. of Agric, [2]Genome Res. center, Tokyo Univ. of Agric)

[目的] 挿入配列は転移することで DNA を改変し、生物の進化に寄与する因子の１つであるが、枯草菌 168 株は IS（挿入配列）を持たない稀な細菌である。これに近縁である納豆菌の IS を導入したところ、高頻度で転移する IS（IS256Bsu1）を見出した。この IS256Bsu1 は、納豆菌の中で複製型転移し、多コピー存在している。そこで、長期間の継代培養により 168 株と IS がどのような挙動をとるか検証した。

[方法]納豆菌の IS の中で、枯草菌 168 株において高頻度で転移する IS*256Bsu1*（*tnp*）が見いだされたので、次のように構築して *amyE* 領域に導入した。



この株において、トランスポゼース(*tnp*)を誘導発現させることで下流の Mini IS-SD*cat* が転移すると、転移先で *cat* が発現することでクロラムフェニコール（Cm）耐性菌として間接的に IS の転移した株を選択できる。LB 培地で 37℃一晩振盪培養後、新たな LB 培地に 100 倍希釈で植菌することを繰り返し、継代培養した。

[結果] 約 300 世代まで継代培養して観察したが、約 160 世代で IS の転移が確認できなくなった。継代培養株は世代を重ねるごとに集団の中での Cm 耐性菌（IS 転移株）の割合が減少した。そこで、IS のコピーが蓄積したことが原因ではないかと考え、サザン・ブロッティングにより IS のコピー数を確認した。しかし、IS を数コピー持つ納豆菌とは異なり、IS が転移したバンドは検出されたが、複数コピーのバンドは見られなかった。従って、168 株は IS を多コピーで保持できないことが示唆された。以上より、168 株は納豆菌とは異なり、IS の転移を抑制するように適応進化したのではないかと推測する。

Bacillis subtilis, insertion sequence, genomic evolution

講演番号：3B14p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ B 校舎 14 会場

3'-5' exonuclease ドメインを有する枯草菌 dinG の変異解析

Mutational analysis of dinG in *Bacillus subtilis* 168, which contains 3'-5' exonuclease domain.

○明石 基洋[1]、志波 優[2]、吉川 博文[1] ([1]東京農大・応生科・バイオ、[2]東京農大・ゲノム解析セ)
○Motohiro AKASHI[1], Yu SHIWA[2], Hirofumi YOSHIKAWA[1] ([1]Dept of Biosci., Tokyo Univ. of Agric., [2]Genome Res. center, Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】バクテリアの DNA 複製は特に大腸菌において詳細な解析がなされているが、複製の主要な役割を担う DNA ポリメラーゼ III alpha subunit は DnaE サブユニットである。一方で、枯草菌の DNA ポリメラーゼ III では PolC と DnaE が担い、リーディング鎖を PolC が、ラギング鎖は DnaE がそれぞれ複製する。ここで、DNA 複製における校正機能に着目すると、大腸菌では DnaQ と呼ばれる酵素が 3'->5' exonuclease 活性を有しているのに対し、枯草菌では DnaQ がなく、PolC のドメインとして 3'->5' exonuclease が存在する一方で、DnaE には当該ドメインが存在しない。したがって、ラギング鎖の複製における校正装置は謎であった。そこで、大腸菌の DnaQ 配列を用い、枯草菌ゲノムを BLAST 検索したところ、*dinG* と呼ばれる遺伝子内に大腸菌のものと相同性の高い 3'->5' exonuclease 配列を見出した。この遺伝子は、黄色ブドウ球菌でその存在が既知であったが、DNA 複製との関連は不明なままであった。本研究では、*in vivo* における *dinG* 遺伝子の校正機能について解析した。

【方法・結果】始めに、グラム陽性菌における DnaE、PolC、3'->5' exonuclease の保存性を *in silico* により確認したところ、アクチノマイセス群(高 GC グラム陽性菌群)には DnaE および大腸菌型の 3'->5' exonuclease が保存されていた。一方、低 GC グラム陽性菌には DnaE、PolC が保存されており、3'->5' exonuclease は枯草菌の DinG と相同性が高いもの、および大腸菌のものと相同性が高いものが混在していた。次に、DinG の *in vivo* における校正機能を確認するため、*dinG* の破壊株、3'->5' exonuclease の活性予測部位に変異を導入した株をそれぞれ作製し、リファンピシン耐性を指標として変異頻度を測定した。その結果、DinG の破壊株、変異株では野生株と比べてリファンピシン耐性株の出現頻度が約２倍高かった。また、リファンピシンの作用点である RpoB の変異パターンを株間で比較したところ、DinG の破壊株、変異株は固有の変異パターンを示すことが分かった。以上から、枯草菌の *dinG* は機能的に保存された遺伝子であり、DNA の複製時に校正活性を賦与しているものと考えている。

Bacillus subtilis, mutation, genomic evolution

講演番号：3B14p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ B 校舎 14 会場

PBP1B と MreB の同時欠損による大腸菌の溶菌機構の解析

The mechanism of cell lysis caused by simultaneous defects in PBP1B and MreB in E.coli

○松倉 智史、小坂 智恵、和地 正明（東工大院生命理工）
○SATOSHI MATSUKURA,CHIE KOSAKA,MASAAKI WACHI (Tokyo Inst. of Tech.)

[目的]

大腸菌の桿菌形態維持を担う因子としてペプチドグリカン層、およびアクチン様細胞骨格タンパク質 MreB が知られている。ペプチドグリカンはペニシリン結合タンパク質（PBP）よって合成される。一方、MreB は細胞膜の内側にらせん状の構造体を形成しており、ペプチドグリカン合成の足場となっていることが示唆されている。この MreB の特異的阻害剤としてベンジルイソチオウレア誘導体 A22（*S*-(3,4-dichlorobenzyl)isothiourea）が当研究室で見出された。A22 処理によって MreB らせん構造が破壊されると大腸菌は球菌化し、増殖は停止するが溶菌はしない。一方、これまでの研究により主要な PBP の一つである PBP1B の欠損株に対して A22 処理を行うと溶菌することが見出された。しかし、PBP1B と同様の活性を有するといわれている PBP1A の欠損株に対し A22 処理を行っても溶菌は起こらない。本研究では、この PBP1B と MreB の同時欠損により溶菌を引き起こすメカニズムの解明を目的とした。

[方法と結果]

PBP1B 欠損（*mrcB* 変異）と温度感受性 *mreB* 変異の二重変異株 JST17 を、対数増殖期で温度シフトアップ（30℃→41℃）すると、MreB らせん構造が破壊され溶菌が引き起こされる。植え継ぎシフトアップを繰り返すと、5 回目のシフトアップでは溶菌しなくなった。ここからシングルコロニーアイソレーションにより温度のシフトアップによって、溶菌が引き起こされない株を選出した。PBP1B 欠損株は PBP2 の特異的阻害剤である mecillinam 処理でも溶菌が引き起こされるが、これらの株が mecillinam 処理にも耐性化しているかを調べた。その結果、選抜した株のうちの 1 株においてのみ mecillinam 処理による溶菌が抑制された。この株を JST17-2 株と命名した。次に、JST17-2 株にとって MreB が生育に必須ではないかどうかを調べるため、MreB 欠損株（*mreB*::*cat*）K51 株を供与株、JST17-2 株、コントロールとして PBP1B 欠損株および、JST17 株を受容株として、クロラムフェニコール耐性を指標に P1 ファージによる形質導入を行った。その結果、JST17-2 株にのみ *mreB*::*cat* 変異が導入できた。これらのことから JST17-2 株には MreB 非依存的な増殖を許容する変異があると推測された。今後ゲノムシーケンスにより変異遺伝子の同定を行う予定である。

MreB, PBP, cell lysis

講演番号：3B14p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ B 校舎 14 会場

好アルカリ性細菌の Na^+駆動型べん毛モーター固定子 MotPS への変異導入により中性環境での共役イオン透過を高めるアミノ酸残基の同定
Critical amino acid residues for coupling-ion permeability at neutral pH of Na^+-driven flagellar motor stator MotPS in *Bacillus pseudofirmus* OF4
○高橋 優嘉[1,2]、野口 有希奈[1]、伊藤 政博[1,2]（[1]東洋大院生命、[2]東洋大バイオナノ）
○Yuka TAKAHASHI[1,2], Yukina NOGUCHI[1], Masahiro ITO[1,2] ([1]Toyo Univ., [2]Bio-nano, Toyo Univ.)

【背景】
多くの細菌が持つべん毛と呼ばれる運動器官は、特異的なイオン(H^+または Na^+)が膜を通過する際に形成される電気化学ポテンシャル差を回転駆動力として用いている。

好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 株(以降は、OF4 株と略す)は pH10 以上の高アルカリ環境で良好に生育し、中性環境でも生育することができる通性好アルカリ細菌である。OF4 株のべん毛の回転には Na^+を共役イオンとする Na^+駆動型固定子 MotPS を利用している。OF4 株の運動性は、pH が pH8 以上の環境中で良好な遊泳を示す。しかし、中性環境である pH7 では極端に運動性が低下する。この要因として中性環境の H^+濃度がアルカリ性環境中よりも非常に高いために固定子にイオンが流入する際に H^+との競合阻害を受ける可能性が示唆されていた。好中性細菌である枯草菌は OF4 株同様に Na^+駆動型固定子 MotPS を持っているが、中性環境においても Na^+濃度に依存した遊泳を示す。

当研究室の以前の研究により、枯草菌の固定子欠損株の染色体上に OF4 株の *motPS* 遺伝子を導入した株を取得し、pH7 でも運動性を示す運動性向上株を取得した。運動性向上株の *motPS* 遺伝子領域をシークエンス解析した結果、2 種類の変異が同定された。

そこで本研究では、運動性復帰株から同定された変異箇所が運動性の復帰にどのように関与しているのか解明することを目的とした。

【方法】
運動性向上株から同定された変異を導入した枯草菌変異株を作製した。作製した変異株を用いて運動性試験や固定子タンパクの膜画分における発現を検出した。

【結果・考察】
同定された 2 種類の変異を両方導入した変異株(M1 株)、RBS 領域に挿入変異がある変異株(M2 株)、*motP* に非同義置換変異がある変異株(M3 株)をそれぞれ作製した。作製した変異株の NaCl 添加量の違いによる運動性を観察した。その結果、M1 株と M3 株で Na^+濃度に依存した運動性を観察することが出来た。これより、*motP* の非同義置換変異が中性環境下における運動性復帰に関与していることが示唆された。

本実験から、好アルカリ性細菌の固定子 MotPS 中には、好中性細菌の MotPS とは異なり中性環境での Na^+の流入を制御している部位があることが示唆された。

flagellar motor, *Bacillus pseudofirmus* OF4, Na^+-driven type stator MotPS

講演番号：3B14p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ B 校舎 14 会場

大腸菌の L-アラニン排出輸送体 YgaW の C 末端領域欠失誘導体の機能解析

Functional analysis of the L-alanine exporter YgaW lacking C-terminal region in *Escherichia coli*

○伊原 航平、金 世怜、堀 初弘、佐藤 一樹、安藤 太助、磯貝 恵美子、米山 裕（東北大院農）
○ Kohei IHARA,Seryoung KIM,Hatsuhiro HORI,Kazuki SATO,Tasuke ANDO,Emiko ISOGAI,Hirosi YONEYAMA (Tohoku Univ.)

【目的】本研究室では大腸菌で初めてとなる L-アラニン特異的な排出輸送体 YgaW を同定することに成功した（Appl Environ Microbiol 77;4027-4034,2011)。YgaW は 149 アミノ酸残基からなる内膜に局在するタンパク質であり、4 回の膜貫通領域をもつことが予測されている。YgaW の構造と機能に関する詳細な研究は緒に就いたばかりであり、その基質排出メカニズムはまったくわかっていない。そこで、本研究では YgaW の第 4 膜貫通領域とそれ以降の細胞質内に局在する領域の基質排出における役割を調べるために、YgaW の C 末端より数アミノ酸から数十アミノ酸残基をトランケートした変異型 YgaW を作製しその活性を評価した。
【方法】膜トポロジー予測プログラム TMHMM ver2.0 を用いて YgaW の膜貫通領域の予測を行ったところ、YgaW は 4 回の膜貫通領域をもつことが示唆された。本研究ではこの予測結果に基づいて、細胞質内にその局在が予測される C 末端から第 4 膜貫通領域までの数個から数十個のアミノ酸残基をトランケートした変異型 YgaW をコードする組換え *ygaW* 遺伝子を、インバース PCR 法を用いて終止コドンを挿入することによって作製した。そして、これらの組換え遺伝子を染色体上の *ygaW* 遺伝子を欠損した L-Ala,D-Ala 要求変異株（MLA301Δ*ygaW*）に形質転換し、アラニルアラニン（Ala-Ala）に対する感受性を調べることによって、各変異型 YgaW の活性を評価した。
【結果】MLA301Δ*ygaW* は取り込んだ Ala-Ala に由来する L-Ala を代謝および排出することができず、高濃度の L-Ala を細胞内に蓄積するため Ala-Ala 存在下では生育できないことが既に明らかとなっている。この MLA301Δ*ygaW* に野生型 *ygaW* 遺伝子を形質転換した細胞は L-Ala 排出能を獲得するためその生育は回復する。C 末端より数個から数十個のアミノ酸残基を欠損した変異型 *ygaW* 遺伝子をもつ形質転換体の Ala-Ala に対する最小発育阻止濃度（MIC）を調べた結果、C 末端の親水性領域内のアミノ酸残基までトランケートしたものについて、野生型 YgaW と比較すると活性は低下していたものの MLA301Δ*ygaW* より高い MIC 値を示した。一方、第 4 膜貫通領域内のアミノ酸残基までトランケートした変異型 *ygaW* 遺伝子を有する細胞は Ala-Ala に対して高感受性を示した。これらのことから、YgaW の C 末端側数アミノ酸残基は基質の排出には重要ではないこと、および第 4 膜貫通領域は機能上重要であることが示唆された。今後、さらに変異型 YgaW の数を増やし、より詳細な解析を行っていく予定である。

L-alanine exporter, YgaW, *Escherichia coli*

講演番号：3B14p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ B 校舎 14 会場

大腸菌のアラニン排出輸送体 YgaW のシステインレス変異体の作製と活性評価

Construction and evaluation of cysteine-les mutant of L-alanine exporter YgaW in *Escherichia coli*

○金 世怜、堀 初弘、安藤 太助、磯貝 恵美子、米山 裕 (東北大院農)
○Seryoung Kim,Hatsuhiro Hori,Tasuke Ando,Emiko Isogai,Hiroshi Yoneyama (Tohoku Univ.)

【目的】大腸菌の L-アラニン（Ala）特異的排出輸送体である YgaW は、149 アミノ酸残基からなる膜タンパク質であり 4 個の膜貫通領域（TM１～TM４）をもつことが予想されている。この YgaW は分子内に 3 つのシステイン（Cys）をもちそのうち２つが TM1 に、残りの１つが C 末端側細胞質内に存在している。そこで本研究において、膜タンパク質の構造と機能を解析する強力な方法であるシステインスキャニング法を用いて YgaW の構造と機能に関する詳細な研究を行うために、野生型 YgaW に存在する３つの Cys を Ala に置換したすべての組み合わせの変異型 YgaW を構築しその活性を評価することにした。

【方法】YgaW に存在する 3 個のシステイン Cys22 (TM1), Cys28 (TM1), Cys135 (cytoplasm)を部位特異的変異法を用いて Ala に置換した各種変異型 *ygaW* 遺伝子を構築し、染色体上の *ygaW* 遺伝子を欠損した D-Ala, L-Ala 要求性変異株（MLA301Δ*ygaW*）に形質転換した。MLA301 は３つの L-Ala 合成酵素と２つのアラニンラセマーゼを欠損しているため、*ygaW* 遺伝子を欠損した MLA301Δ*ygaW* は Ala-Ala に高感受性を示す（MIC, 5μg/ml)。そこで各種変異型 YgaW を発現する形質転換体の Ala-Ala に対する感受性を評価するとともに、放射性標識された ^{3}H-Ala の細胞内への蓄積量を調べた。

【結果と考察】 各形質転換体の感受性を評価した結果、クローン化した野生型 *ygaW* 遺伝子を導入した MLA301Δ*ygaW* の Ala-Ala に対する MIC は親株と同様に高かった（ MIC, >20,000 μg/ml)。 一方、3 つの Cys をすべて Ala に置換した Cys-less YgaW を含むすべての変異型 YgaW は、野生型 YgaW と同等の活性を示すことが明らかとなった（MIC, ≥20,000 μg/ml)。また、細胞内の ^{3}H-Ala 蓄積量を調べた結果、 YgaW 欠損変異株は野生株に比べ高いレベルの ^{3}H-Ala を蓄積していたが、クローン化した野生型 *ygaW* 遺伝子をもつ形質転換体は、野生株よりも蓄積レベルは低かった。変異型 YgaW を発現する MLA301Δ*ygaW* の ^{3}H-Ala 蓄積量は YgaW 欠損変異株の蓄積量より程度の差はあったが低かった。これらのことから、Cys-less YgaW は活性を保持しており、システインスキャニング法の材料として使用できることが明らかとなった。

Escherichia coli, Cysteine-less mutant, Exporter

講演番号：3B14p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ B 校舎 14 会場

食用藍藻 *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* NIES-39 の制限修飾系 *Apl*I の解析

Characterization of a restriction-modification system *Apl*I in an edible cyanobacterium, *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* NIES-39

○白石 英秋、田伏 洋介 (京大院生命)
○Hideaki SHIRAISHI,Yosuke TABUSE (Kyoto Univ.)

Arthrospira platensis はアフリカのチャド湖を原産地とするシアノバクテリアで、古くから現地の人々によって食品として利用されてきた糸状性藍藻である。この生物は近縁の *A. maxima* とともに「スピルリナ」と通称されており、現在は、食品、食品添加物、飼料などの原料として、世界中の温暖地域で生産が行われている。この生物は、他の生物が増殖しにくい高塩濃度のアルカリ性条件を好むため、屋外での培養であっても、他の藻類の混入を起こさずに簡単に単藻培養することができる。そのため、食品としてだけでなく、遺伝子操作などの技術で有用物質を生産するための基盤的な生物としても将来有望な微生物である。しかしながら、この生物では、これまでに調べられたすべての株において複数種類の制限酵素の存在が確認されており、外部から導入された DNA は、そのままでは細胞内で分解されてしまう。したがって、この生物で効率の良い形質転換系を確立するためには、この生物がどのような制限修飾系を持っているかを知ることが重要である。それによって、制限酵素切断部位の無い塩基配列を持つ DNA をデザインしたり、あらかじめ修飾酵素で DNA を修飾したりすることによって、*Arthrospira* 細胞内の制限酵素で切断されない DNA を作れるからである。

本報告では、*A. platensis* NIES-39 株のゲノム中に存在する制限修飾系遺伝子候補のうちの、一対の遺伝子（NIES39_K04640、および、NIES39_K04650）の産物の解析結果を中心に報告する。NIES39_K04640 遺伝子は、II 型制限酵素と予想される遺伝子産物をコードしている。大腸菌内でこの遺伝子を過剰発現させ、遺伝子産物の活性を調べたところ、DNA 中の 5’-CTGCAG-3’という塩基配列を認識して A と G の間で切断する制限酵素活性を持っていた。この制限酵素を、*Apl*I と名付けた。また、*Apl*I 遺伝子に隣接する NIES39_K04650 遺伝子の産物は、そのアミノ酸配列から、DNA のシトシンの 5 位にメチル基を転移する酵素と予想される。実際に大腸菌で発現させたその遺伝子産物は、*Apl*I の認識配列の 5’末端から 4 番目の C を修飾する活性を持っており、修飾された DNA は *Apl*I による切断を受けなくなった。したがって、この遺伝子産物は、*Apl*I に対応する修飾酵素、M.*Apl*I であることが明らかになった。本研究で明らかになった *Apl*I の認識配列の情報や、本研究で過剰発現に成功した M.*Apl*I は、形質転換実験の際に、DNA を *Apl*I 抵抗性にするのに有用であると考えられる。現在、*A. platensis* NIES-39 株の細胞抽出液中に存在する *Apl*I 以外の制限酵素についても解析を進めている。それについても、併せて報告する予定である。

cyanobacteria, restriction enzyme, DNA methyltransferase

講演番号：3B14p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ B 校舎 14 会場

緑膿菌おけるナフタレン誘導体に対して応答する遺伝子群の解析
Analysis of gene clusters that respond to naphthalene derivatives in *Pseudomonas aeruginosa*
○上田 考摂[1]、大浦 啓[1]、李 昇ウク[2]、野尻 秀昭[2]、豊福 雅典[1]、田代 陽介[1]、中嶋 敏明[1]、内山 裕夫[1]、野村 暢彦[1] ([1]筑波大・院・生命環境科、[2]東大・院・生物工学セ)
○Kousetu Ueda[1], Hiromu Ooura[1], Seunguk Lee[2], Hideaki Nojiri[2], Masanori Toyohuku[1], Yousuke Tasiro[1], Tosiaki Nakajima[1], Hiroo Utiyama[1], Nobuhiko Nomura[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]The Univ. of Tokyo)

【背景、目的】
通性嫌気性のグラム陰性桿菌である緑膿菌*Pseudomonas aeruginosa* は、免疫力の低下した患者や高齢者に対して日和見感染を引き起こす病原菌として知られている。緑膿菌の病原性の一部は、細胞間コミュニケーション物質であるPQSにより制御されている他、運動性も緑膿菌の病原性に関与する事が報告されている。当研究室の先行研究により、ナフタレン誘導体を緑膿菌に添加することで、緑膿菌の増殖に影響を与えずに、PQS生産、及び運動性を抑制できる事が報告されている。これらの形質を制御することにより緑膿菌の病原性を制御することができると考えられるが、ナフタレン誘導体応答機構に関する遺伝子レベルの知見はほとんど得られていない。本研究ではナフタレン誘導体に対する応答機構について解析することで、緑膿菌の制御に関する新規知見を提供する事を目的とした。
【方法、結果】
高密度タイリングアレイを用いたトランスクリプトーム解析によりナフタレン誘導体添加時に発現量が顕著に変化した遺伝子の発現の変化が観察された。
ナフタレン誘導体によって薬剤の細胞外への排出に関与するポンプの関連遺伝子を含む 6 つの遺伝子発現が 2 倍以上誘導され、1/2 以下に転写が抑制される遺伝子として機能未知のレギュレーター、運動性関連遺伝子、代謝関連遺伝子を含む 62 個の遺伝子が見出された。現在これらの候補遺伝子のナフタレン誘導体への感受性、PQS 生産及び運動性への影響について更なる解析を行っている。

Pseudomonas aeruginosa, naphthalene derivatives, transcriptome

講演番号：3B14p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ B 校舎 14 会場

ルーメン細菌 *Selenomonas ruminantium* subsp. lactilytica TAM6421 株のゲノム解析
Genome analysis of ruminal bacteria *Selenomonas ruminantium* subsp. lactilytica TAM6421

○小野寺 智子[1]、山田（成田） 佐知子[1,2]、阿部 直樹[1]、菅 英一郎[1]、児島 征司[1]、宮崎 隆雄[1]、小口 晃央[2]、安海 明百[2]、市川 夏子[2]、中澤 秀和[2]、福井 重広[2]、高橋 幹男[2]、山崎 秀司[2]、藤田 信之[2]、神尾 好是[1,3]、金子 淳[1]([1]東北大院農・生物産業創成、[2]NITE、[3]東北大院生命)
○ Tomoko ONODERA[1], Sachiko YAMADA(NARITA)[1,2], Naoki ABE[1], Eiichiro KAN[1], Seiji KOJIMA[1], Takao MIYAZAKI[1], Akio OGUCHI[2], Akiho ANKAI[2], Natsuko ICHIKAWA[2], Hidekazu NAKAZAWA[2], Sigehiro FUKUI[2], Mikio TAKAHASHI[2], Syuji YAMAZAKI[2], Nobuyuki FUJITA[2], Yoshiyuki KAMIO[1,3], Jun KANEKO[1] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]NITE, [3]Grad. Sch. Life Sci., Tohoku Univ.)

【背景と目的】*Selenomonas rumiantium* は羊ルーメンの主要細菌であり、16S rRNA による分子系統では Firmicutes 門に属するが、LPS を含む外膜を保有しているグラム陰性偏性嫌気性桿菌である。本菌は乳酸を炭素源として利用でき、その性質は反芻獣のルーメンアシドーシス防止に有用である。しかし乳酸を炭素源としたときのエネルギー生産系は不明である。また本菌はグルコースでは主に乳酸発酵を行うが、その際短鎖直鎖飽和脂肪酸を要求し、培地に添加した ^{14}C 標識脂肪酸の標識は、優先的に膜脂質の脂肪酸に取り込まれる。一方、乳酸を炭素源とした場合はビオチン要求となり、主としてプロピオン酸を生産し膜脂質の脂肪酸は主に奇数脂肪酸となる。我々は微生物分類の重要な指標である細胞表層構造と系統発生の関連の解明、およびルーメン細菌の生理を理解することを目標として *S. ruminantium* subsp. lactilytica TAM6421 のゲノムを解読した。本発表はその第 1 報である。
【方法】乳酸培地で培養した菌体から調整したゲノムを用い、3 段階の長さの断片群をクローニングしたライブラリーを作成した。結合したショットガンクローンの塩基配列は optical mapping で検証した。Orf のアノテーションは BLAST 解析、ドメイン解析、および KEGG pathway への割り付け情報に加え、Uniprot, Interpro, BRENDA などの情報を加味して総合的に検討して行った。
【結果】本菌は 3,003,680 bp、2,827 *orf*s をコードする染色体に加え、285,449 bp の巨大プラスミドである pSRC1 をはじめ、9 個のプラスミドを有していた。リボゾーム RNA は 7 コピー存在し、多数の IS、4 カ所のプロファージ挿入があった。本菌は EMP 経路を有するが TCA 回路は完結しない。またキノン生合成系と電子伝達系を欠く一方、FoF1-型 ATP synthase の遺伝子を有し、Fo 阻害剤である N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCCD) により生育が完全に抑えられた。Fo ローターC サブユニットおよび鞭毛モーターMotB に Na^+駆動型の特徴を有すること、electron transport complex protein (Rnf)複合体および Na^+-transporting methylmalonyl-CoA decarboxylase という 2 つの Na^+ 排出系を有することから、本菌が Na^+勾配を利用して F 型 ATP synthase をおよび鞭毛を駆動しているモデルを提唱する。このうち後者はビオチン酵素であり、乳酸資化時の奇数脂肪酸合成のプライマーである propionyl-CoA を供給しており、ビオチン要求性への関与が考えられた。さらに、脂肪酸合成における低級脂肪酸の脂肪酸鎖長による要求量の違いとビオチン要求の関係を、脂肪酸取り込みに関わる膜酵素 Long chain FA-CoA ligase (FadD)、脂肪酸合成開始と伸長を司るβ-Ketoacyl-ACPsynthase (FabF)の基質特異性、および propionyl-CoA の供給が関与するモデルによって考察する。

Selenomonas ruminantium, genome, lipid metabolism

講演番号：3B14p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ B 校舎 14 会場

L-乳酸高生産菌 *Enterococcus mundtii* QU25 株のゲノム解析

Genome Analysis of *Enterococcus mundtii* QU25, an efficient L-(+)-Lactic Acid-Producing Bacteria

○志波 優[1]、簗瀬 弘明[2]、広瀬 侑[3]、児島 友子[2]、星野 英章[2]、渡辺 智[2]、善藤 威史[4]、千葉櫻 拓[2]、園元 謙二[4]、門多 真理子[2,5]、吉川 博文[1,2] ([1]東農大・ゲノムセンター、[2]東農大応用生科・バイオ、[3]豊橋技科大・EIIRIS、[4]九大院・農、[5]武蔵野大・環境)
○ Yu Shiwa[1], Hiroaki Yanase[2], Yuu Hirose[3], Tomoko Kojima[2], Hideaki Hoshino[2], Satoru Watanabe[2], Takeshi Zendo[4], Taku Chibazakura[2], Kenji Sonomoto[4], Mariko Kadota[2,5], Hirofumi Yoshikawa[1,2] ([1]NGRC., Tokyo Univ. Agri., [2]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agri., [3]Toyohashi Tech. EIIRIS, [4]Dept. Agri., Kyushu Univ., [5]Dept. Env. Sci., Musashino Univ.)

【背景・目的】 *Enterococcus mundtii* QU25 株はグルコースやキシロースから L-乳酸を高効率で生産できる菌株である[1)]。QU25 株は高濃度キシロースのみの糖源で培養すると、光学純度 99.9%以上の L-乳酸を、対キシロースのモル比で 1.41 倍生産することができた[2)]。また酢酸をほとんど生産しないホモ乳酸発酵であったことから、代謝経路としてペントースリン酸経路を用いていることが示唆された。これらの性質の遺伝的背景を明らかにし、より効率的な乳酸生産を目指すため、全ゲノム解析を行った。

【方法・結果】 公開されている *Enterococcus* 属に近縁種が存在しないため、第二世代シークエンサーである Illumina Genome Analyzer II、Roach GS FLX に加えて、第三世代シークエンサーである PacBio RS を用いて全ゲノム配列を取得した。また、Optical Mapping 法を用いて NcoI 制限酵素地図を作製した。

アセンブルの結果、PacBio の 10kb CLR リードと 1kb CCS リードのデータのみで、約 3Mb の染色体コンティグ 1 本と数十から数百 kb のプラスミドと推定されるコンティグが 4 本得られた。また、Illumina と GS FLX の結果からさらに数 kb のプラスミド配列が 1 本得られた。NcoI 制限酵素地図を用いてアセンブルを検証した結果、3Mb の染色体コンティグにミスアセンブリは見られなかった。

ドラフト解析の結果、GC 含量は約 38%で、3000 個程度の ORF がアノテーションされた。また、プロファージや IS を複数保持していると予想された。乳酸発酵に関わる遺伝子としては、ペントースリン酸経路の遺伝子であるトランスケトラーゼ遺伝子、トランスアルドラーゼ遺伝子に加えて、ヘテロ乳酸発酵に通常使われるとされるホスホケトラーゼ遺伝子も見出すことができた。また、キシロース代謝に関わる遺伝子であるキシロースイソメラーゼ、キシロシダーゼ、キシルロースキナーゼの各遺伝子とその他のいくつかの ORF がオペロン構造をとっていると推測された。

1) M.A. Abdel-Rahman et al., Appl Microbiol Biotechnol. 2011 Feb;89(4):1039-49.
2) M.A. Abdel-Rahman et al., Appl Environ Microbiol. 2011 Mar;77(5):1892-5.

genome, lactic acid, xylose

講演番号：3B14p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ B 校舎 14 会場

新規海洋性アクチノバクテリア YM16-304 株の全ゲノム解析
Complete genome sequence of the novel marine actinobacterium YM16-304.
○藤浪 俊[1,3]、笠井 宏朗[2]、堀川 博司[1]、加藤 裕美子[1]、原田 健史[1]、細山 哲[1]、関根 光雄[1]、宝田 裕美[1]、宮澤 せいは[1]、中澤 秀和[1]、藤田 信之[1] ([1]NITE・バイオ、[2]北里大・海洋バイオ、[3]東洋大・バイオ・ナノ)
○Shun FUJINAMI[1,3], Hiroaki KASAI[2], Hiroshi HORIKAWA[1], Yumiko KATO[1], Takashi HARADA[1], Akira HOSOYAMA[1], Mitsuo SEKINE[1], Hiromi TAKARADA[1], Miyazawa SEIHA[1], Hidekazu NAKAZAWA[1], NOBUYUKI FUJITA[1] ([1]NITE, [2]Kitasati Univ., [3]Toyo Univ.)

新規海洋性アクチノバクテリア YM16-304 株(以下 YM16-304 株とする)は、2005 年に株式会社海洋バイオテクノロジー研究所の松尾らによって、日本海の海底泥から分離された細菌である。YM16-304 株は、16S rRNA 遺伝子による系統解析から、近年分離された *Ilumatobacter fluminis* YM22-133^T や未培養カイメン共生細菌と近縁であることが示唆され、これらの細菌とともに新しい分類群を形成している可能性が示唆された。YM16-304 株の全ゲノム解析によって、この新しい分類群の特徴、知見が得られることが期待されたため、我々は本菌の全ゲノム解析を行った。さらに予測された ORF の詳細なマニュアルアノテーションを行った。

YM16-304 株のゲノムは単一の環状で 4,830,181 bp、GC 含量は 67.29%、予測 ORF 数は 4,291 であった。またオメガ 3 不飽和脂肪酸合成遺伝子クラスターと推定される ORF 群など特徴的な ORF がいくつか見出された。ゲノム解析から推定された代謝経路などについてもあわせて報告する。

genome, *Ilumatobacter*, ω-3 fatty acid

講演番号：3B14p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ B 校舎 14 会場

Phase I study of Asian Microbiome Project: Diversity of intestinal microbiota in Asian youngsters profiled by 16S rRNA gene pyrosequencing

○Jiahui JIANG[1], Naoshige SAKAMOTO[1], Koichi WATANABE[2], Kazunori MATSUDA[2], Takashi KURAKAWA[2], Hirokazu TSUJI[2], Fazheng REN[3], Ying-Chieh TSAI[4], Yuan-Kun LEE[5], Sunee NITISINPRASERT[6], Endang S. RAHAYU[7], Chii-Cherng LIAO[8], Kenji SONOMOTO[1], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Yakult Central Institute, [3]China Agric. Univ., [4]National Yang-Ming Univ., [5]National Univ.of Singapore, [6]Kasetsart Univ., [7]Gadjah Mada Univ., [8]Food Industry R&D Institute)

INTRODUCTION: As Phase one of Asian Microbiome Project to investigate bacterial community structure in Asian gut microbiota and its correlation with varied ethnic characteristics, we analyzed fecal bacterial composition of healthy youngsters living in 10 cities in Asia [Lanzhou (LZ), Beijing (BJ), Tokyo (TK), Fukuoka (FK), Taipei (TP), Taichung (TC), Khon Kean (KK), Bangkok (BK), Yogyakarta (YY) and Bali (BL)]. The bacterial composition was analyzed by using pyrosequencing-based 16S rRNA profiling which has become an advantaged way for visualizing the community structure of gastro-intestinal (GI) tract microbiota.
MATERIALS & METHODS: Fecal samples were collected from healthy children aged 7 to 11 years living in the 10 cities with in total 303 subject samples (at least 25 subjects from one city) used for flora analysis. The V6-V8 segment of fecal bacterial 16S rDNA was amplified by PCR using eubacterial universal primers with barcode-sequence tag and subjected to sequence analysis by 454 GS FLX Titanium Sequencing System (Roche). After the chimera check, 1,689,054 reads were obtained and dereplicated into 20,654 OTUs with 97% identity. The RDP Classifier search and the RDP Seqmatch search were employed to identify taxonomy of each OTU. Relative abundance of each taxon from phylum to species was determined individually and subjected to statistical analysis, e.g., ANOVA and Mann Whitney U-test and multivariate analyses, e.g., principal component analysis (PCA) and random forest analysis.
RESULTS & DISCUSSION: Comparative analysis of bacterial composition among 10 cities indicated dominance of *Prevotella* in KK, YK and BL instead of dominance of *Bifidobacterium* and *Bacteroides* in the other cities. PCA showed two distinctive enterotypes: one was cored by *Bacteroides* and *Bifidobacterium*, which mainly found in Chinese, Taiwanese and Japanese as well as the other one was observed in most of KK, YK and BL subjects, which was cored by *Prevotella* and some other related genera, e.g., *Xylanibacter*, *Desulfovibrio* and *Slackia*. Also, alpha diversity simulation based on OTU profile in each subject indicated that children in KK, YK, and BL have higher diversity and richness in their microbiota composition than in the rest of the countries, especially Japan. Children in Japan showed some other distinct features in their microbiota, such as high abundance in *Bifidobacterium* and low abundance in *Enterobacteriaceae*, *Phascolarctobacterium*, and *Clostridium perfringens*. These differences in bacterial community structure found in Asian youngsters may reflect different dietary habit and living environment.

Gut microbiota, Enterotype, 454 pyrosequencing

講演番号：3B14p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ B 校舎 14 会場

次世代シーケンサーを用いたスギヒラタケのゲノム及びトランスクリプトーム解析
Genome and transcriptome analyses of the mushroom *Pleurocybella porrigens* using next generation sequencing

○鈴木 智大[1]、五十嵐 香理[2]、道羅 英夫[1]、染谷 拓海[2]、高野 知之[2]、大前 沙央理[3]、平井 浩文[3]、矢野 健太郎[2]、河岸 洋和[3,4] ([1]静大・遺伝子、[2]明大農・生命科、[3]静大農・応生化、[4]静大院・創造)
○ Tomohiro SUZUKI[1], Kaori IGARASHI[2], Hideo DOHRA[1], Takumi SOMEYA[2], Tomoyuki TAKANO[2], Saori OMAE[3], Hirofumi HIRAI[3], Kentaro YANO[2], Hirokazu KAWAGISHI[3,4] ([1]Institute for Genetic Research and Biotechnology, Shizuoka University, [2]Bioinformatics Laboratory, Faculty of Agriculture, Meiji University, [3]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】

スギヒラタケ（*Pleurocybella porrigens*）はキシメジ科スギヒラタケ属のキノコであり、北陸、中部、東北地方を中心に食用とされてきたが、2004 年 9 月以降、新潟、山形、秋田の各県で原因不明の急性脳症が相次いだ。この急性脳症の解明は困難を極め、厚生労働省は「原因不明」と結論付けた。我々は現在までに、毒性に関与する可能性のある糖タンパク質、レクチン、低分子化合物を単離しているが、未だその毒性の全容解明には至っていない[1,2,3)]。

ゲノム解析やトランスクリプトーム解析といった大規模なオミックス情報は、スギヒラタケの毒化メカニズムの解明の一助となるが、未だその解析は行われていない。そこで今回、我々は次世代シーケンサーを用いて、スギヒラタケの子実体のゲノム解析、及び子実体と菌糸体のトランスクリプトーム解析を行った。

【方法及び結果】

シーケンス解析には Illumina 社の Genome analyzer IIx を用いた。スギヒラタケ子実体より抽出したゲノムから、ペアエンド法ではインサート長が 300 bp、メイトペア法では 3 kbp となるライブラリーを作成した。また別途、スギヒラタケ子実体及び菌糸体から total RNA を抽出し、インサート長が 300 bp となるライブラリーを作成した。作成したライブラリーをそれぞれシーケンスし、両末端 100 bp のショートリードを得た。

得られたショートリード配列をVelet、Oasesを用いてアセンブルした後、genome signatures解析、Gene Ontology やKEGGを用いた機能解析を行った。その結果、1) スギヒラタケはデータベース上に登録されているハラタケ目のその他の菌と比較しても特徴的なgenome signaturesを有すること、2) 新規の遺伝子を多数有する事が明らかになった。

1) 鈴木ら、第 52 回天然有機化合物討論会講演要旨集、p. 655
2) Wakimoto, T., et al., *Angewandte Chemie Int. Ed.*, 123, 1200–1202 (2011).
3) Suzuki, T., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 13, 100-709 (2009)

Genome and transcriptome, mushroom, *Pleurocybella porrigens*

講演番号：3B14p17
講演日時、会場：3 月 26 日 17:12～ B 校舎 14 会場

Pleurotus spp.とその新規種間雑種における遺伝的解析

Genomic analysis in *Pleurotus* spp. and its interspecific hydrids

○原田 慎嗣、石川 真梨子、大内 謙二、稲冨 聡（ホクト（株）きのこ総合研究所）
○ Shinji HARADA,Mariko ISHIKAWA,Kenji OUCHI,Satoshi INATOMI（Hokuto Co.,ltd Mushroom Reseach Laboratory）

当研究所では、*Pleurotus* spp.を網羅的に交配させることで数種の種間雑種を得ることができた。その種間雑種菌株について遺伝学的観点から解析を行った。

交配に用いた当研究所で保有している *Pleurotus eryngii*（Dcex Fr.）Quel.、*Pleurotus ostreatus*（Fr.）Quel.、*Pleurotus nebrodensis*（Dcex Fr.）Quel.、*Pleurotus eryngii*（Dcex Fr.）Quel. var. *elaeoselini*、そして新しく得られた *Pleurotus* spp.の種間雑種に関して、ITS 領域の塩基配列、ミトコンドリア SSU rDNA の V4, V6 および V9 ドメインの塩基配列の解析を行った。ITS 領域を解析した結果、*P. eryngii* と *P. eryngii* var. *elaeoselini* は配列の一致率が 99%であった。そして、*P. ostreatus*、*P. nebrodensis* および *P. eryngii* の 3 種間では 97%の一致率であった。*Pleurotus* spp.の種間雑種をこれら 4 種間で比較解析した結果、種間雑種は *P. eryngii* と *P. ostreatus* との両方の遺伝的特徴を示す結果が得られた。また、ミトコンドリア SSU rDNA の V4,V6 および V9 ドメインの塩基配列を解析した結果、*P. eryngii*、*P. ostreatus*、*P. nebrodensis* および *P. eryngii* var. *elaeoselini* は、それぞれ独自の配列を示していたが、種間雑種は *P. ostreatus* と 100%一致するもの、また *P. eryngii* と 100%一致するもの両方が存在するという結果が得られた。本発表ではこれらに関する詳細な知見を報告する。

Pleurotus, Internal Transcribed Spacer region, mitochondrial small subunit ribosomal DNA

講演番号：3B14p18
講演日時、会場：3 月 26 日 17:24～ B 校舎 14 会場

ゲノムシグネチャーを用いた麹菌の遺伝子解析

Gene analysis of *Aspergillus oryzae* using genome signature

○相良 純一（金沢工業大学)
○Jun-Ichi SAGARA (Kanazawa Institute of Technology)

【目的】

麹菌は日本の国菌として認定され、醤油・酒・味噌などの伝統的な発酵食品のみならず、タカジアスターゼなど医薬品や化粧品などに含まれる有用物質の生産まで幅広く活用され、日本の醸造産業の中で重要な役割を果たしている。しかし麹菌を用いた醸造産業が古くから栄えている一方で、物質生産プロセスに関わる研究はまだ少なく、麹菌の有用物質生産能力についての詳細は未解明である。そこで有用物質の生産過程やそれに関わる物質（酵素）を解明し、麹菌の持つ能力を知ることにより有用物質の生産効率の向上や新たな有用物質の生産を行うことなどが期待されている。本研究は麹菌の代謝物の生産コントロールを行う遺伝子を検出することを目的とし、（１）麹菌マイクロアレイを用いた生育条件による発現遺伝子の検出と、（２）ゲノムシグネチャー（Genome Signature: 以下 GS）を用いた配列類似性に依らない特徴的な GS（塩基組成）パターンをもつ遺伝子の抽出を行い、（１）と（２）の結果を比較解析することにより生育条件と発現遺伝子の相関を明らかにし、生育条件による麹菌の物質生産能のコントロールを可能とする技術の確立を目指している。

【方法と結果】

本研究では麹菌の遺伝子配列を GS と呼ばれる生物種の特徴を塩基配列の組成により表す指標を用い、特定の共通配列や配列長の類似度を考慮せずに遺伝子配列のクラスタリング解析を行う。配列類似度を用いた解析では遺伝子配列の類似度を用いて分類を行うため、類似性が高く、かつ長さ（塩基数）がほぼ等しい配列の間でしか比較を行うことができず、また得られる結果は配列の進化的変化を示しており、一生物種の特徴を表す指標として用いることは困難である。そこで GS を用いることにより、配列の類似性を用いることなく、配列に含まれる塩基組成のパターンを用いた解析を行うため、生物進化に依らない他の因子、例えば、生育温度や、湿潤などの環境因子（外的因子）により生じた一生物種内の持つ塩基配列の共通性について解析を行うことが期待できる。本手法を麹菌（*A.oryzae*）ゲノムに適用し、特徴的な GS パターンを持つ遺伝子群の抽出を行ったところ、ミトコンドリア由来の遺伝子を含む、多くの遺伝子配列と特徴的な GS パターンが得られた。現在、条件の異なるマイクロアレイデータより得られた遺伝子発現情報を用いて解析を行っており、発現に関与する遺伝子の抽出が期待される。

genome signature, Aspergillus oryzae, gene expression

講演番号：3B21a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ B 校舎 21 会場

Ca^{2+}と Mg^{2+}がプラスミドの接合伝達に与える影響の定量的評価

Analysis of Ca^{2+} and Mg^{2+} effects on plasmid conjugation

○松井 一泰[1]、新谷 政己[2]、岡田 憲典[1]、山根 久和[3]、野尻 秀昭[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]静大・工、[3]帝京大・理工)
○Kazuhiro MATSUI[1], Masaki SHINTANI[2], Kazunori OKADA[1], Hisakazu YAMANE[3], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Shizuoka Univ., [3]Teikyo Univ.)

【背景と目的】

当研究室で詳細な解析が進められているカルバゾール分解に関わる IncP-7 プラスミド pCAR1 は，接合伝達に二価の陽イオンである Ca^{2+} と Mg^{2+} の存在が重要であることが示されている(Shintani *et al.*, 2008, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **80:** 485-497)．また，15 種の受容菌候補株（一種類ずつで接合させた場合は接合伝達が観察される菌株）が混在するモデル環境中に pCAR1 の供与菌を接種すると，特定の属種の接合伝達体しか得られなかった．さらに，供与菌の属種によっては Ca^{2+} と Mg^{2+} が系に含まれているにも関らず接合伝達現象が起こらない宿主が存在した．これらのことは，二価の陽イオンが環境中での pCAR1 の宿主域にも影響を与えていることを示唆している(Shintani *et al.*, 2010, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74(2):** 343-349)．そこで本研究では，種々のプラスミド，供与菌，受容菌の組み合わせを用いて，Ca^{2+} と Mg^{2+} が接合伝達頻度にどのような影響を与えるかを定量的に評価した．

【結果】

初めに，Ca^{2+} と Mg^{2+} が他のプラスミドの接合伝達頻度にも影響を与えるか確認した．供与菌，受容菌ともに *Pseudomonas putida* KT2440 株を用いたところ，pCAR1 では二価の陽イオンをそれぞれ終濃度 400 μM とした場合の接合伝達頻度は供与菌あたり 1.2×10^{-4} であったが，陽イオンを添加しない場合にはその接合伝達を検出できなかった（供与菌あたり 3.5×10^{-7} 以下）．これに対し，pB10（IncP-1 群）および R388（IncW 群）については，陽イオンの有無にかかわらず，接合伝達頻度は供与菌あたりそれぞれ 1.7×10^{-3}~7.3×10^{-3}，6.3×10^{-5}~1.4×10^{-4} であり，陽イオンは接合に影響しないか，あるいは pCAR1 と比べて影響は非常に小さいことが判明した. 次に, Ca^{2+} と Mg^{2+} の濃度を変化させ（0, 0.4, 4, 40, 400 μM）pCAR1 の接合実験を行ったところ，Ca^{2+} ，Mg^{2+} ともに濃度の上昇に伴い接合伝達頻度が上昇すること，等濃度添加の条件では Ca^{2+} より Mg^{2+} の方が接合頻度が高いこと，Ca^{2+} と Mg^{2+} が共存する場合は単独よりも接合伝達頻度が高いことが確認された. 同様に, 供与菌 *P. putida* KT2440 ，受容菌 *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株の組み合わせで実験を行ったところ，Ca^{2+} ，Mg^{2+} ともに濃度の上昇に伴い接合伝達頻度が上昇することは確認されたが, 陽イオンを添加しない場合でも 2.0×10^{-4} と受容菌が *P. putida* KT2440 株の場合と比較して高い頻度で接合伝達することが判明した．今後は供与菌と受容菌の組み合わせを増やし，同様の接合実験を行い，結果を本大会で発表する．

plasmid, conjugation, bivalent cation

講演番号：3B21a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ B 校舎 21 会場

環境条件がプラスミドの接合伝達頻度に与える影響の解析

Effects of environmental conditions on conjugation frequency of various plasmids

○李 美英[1]、松井 一泰[1]、新谷 政己[2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1]([1]東大・生物工学セ、[2]静大・工)
○Meiying LI[1], Kazuhiro MATSUI[1], Masaki SHINTANI[2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1]
([1]The Univ. of Tokyo, [2]Shizuoka Univ.)

【背景と目的】プラスミドは遺伝子の水平伝播において重要な因子の一つである．しかし，伝達頻度の評価が菌密度・純粋培養・富栄養など，環境中では起こりえない条件下で行われてきた経緯があり，また自然界では難培養性菌も受容菌となりうることなど考えても，実環境中でのプラスミドの伝播に影響を与える因子についての検証は未だ不十分と言わざるをえない．接合伝達頻度は，プラスミドが細菌間をどの程度伝播するかを示す指標であり，接合伝達頻度を比較することは，プラスミドの拡散を理解する上で重要である．そこで本研究では，4 種類のモデルプラスミドの接合伝達頻度を様々な条件下で評価することを目的とした．将来的には，プラスミド特異的，あるいは接合条件特異的な接合伝達頻度の変化を検出して，その原因・メカニズムを遺伝子レベル，さらにはタンパク質レベルで解明することを目指している．
【方法と結果】異なる不和合性(Inc)群に属している，カルバゾール分解プラスミド pCAR1 (IncP-7)，～耐性プラスミド pB10 (IncP-1)，～耐性プラスミド R388 (IncW)，ナフタレン分解プラスミド NAH7 (IncP-9)をモデルプラスミドとし，共通の供与菌として *Pseudomonas putida* KT2440 株を用いた．受容菌としては，*P. putida* KT2440 株と *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株を単独で，あるいは混合して用いた．KT2440 株から KT2440 株，KT2440 株から CA10dm4 株の 2 通りの供与菌・受容菌の組み合わせで，接合時の培地成分（富栄養，貧栄養），温度（25，30，37 ℃），pH（5，7，9），接合時間（3，6，12，24，48 h）を変化させた際の各プラスミドの接合伝達頻度を評価した．pCAR1 の接合伝達頻度は Ca^{2+} ，Mg^{2+} の有無で 1,000 倍以上の差がみられ，他のプラスミドでは顕著な差は見られなかった．また，受容菌を CA10dm4 株にした際の接合伝達頻度が受容菌を KT2440 株とした際の頻度より低い傾向が見られた．30，37 ℃での KT2440 株から CA10dm4 株への NAH7 の接合伝達は検出されなかった(検出限界 9.2×10^{-7} transconjugant/donor 以下)のに対し，25 ℃では検出されその頻度は 3.0×10^{-6} (transconjugant/donor)であった．次に，KT2440 株（染色体上に赤色蛍光タンパク質をコードする遺伝子を挿入）と CA10dm4 株（緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子を挿入）を等量混合した菌液を受容菌として用い，それぞれの菌株への接合伝達頻度を評価した．プラスミドとして pCAR1 と NAH7 を用い，接合時の培地成分を 1/2LB とした場合に，頻度は若干下がる傾向が認められたものの，単独の受容菌を用いた場合と類似した傾向が観察された．他の条件での結果も含めて発表する．

plasmid, Pseudomonas, conjugation frequency

講演番号：3B21a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ B 校舎 21 会場

環境細菌群集の解析・改良に利用可能なプラスミドの取得

Isolation of plasmids for functional analysis of bacterial consortia

○柳田 晃輔[1]、松井 一泰[1]、新谷 政己[2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]静大・工)
○Kosuke YANAGIDA[1], Kazuhiro MATSUI[1], Masaki SHINTANI[2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Shizuoka Univ.)

【背景・目的】　バイオレメディエーションやメタン発酵などの、多種の細菌から構成される微生物コンソーシャが関与する微生物現象では、注目する微生物反応の主体となる微生物が不明なことも多く、さらにコンソーシャ内でのメンバーの役割分担も不明なため、機能を改善・強化するには困難を極めることが多い。一方、自然界には染色体とは別に自立的に複製し、異種細胞間を接合により行き来するプラスミドが存在する。プラスミドの“遺伝子を水平伝播させる”機能は、難培養性細菌を含めた微生物コンソーシャへの機能性遺伝子や転写活性化用タグのデリバリーシステムとして、微生物機能の向上や機能性遺伝子のクローン化に利用できる可能性がある。このためには、微生物コンソーシャのより多くのメンバーに対し遺伝子を効率よく導入したり、逆に限定されたメンバーにのみ遺伝子を導入したりする仕組みの開発が重要である。過去に類似の目的で IncP-1 群のプラスミドに由来する接合伝達系を利用した例があるが、微生物種の多様性やプラスミドの種類の多さを考えると、IncP-1 群以外のより多くの種類のプラスミドの利用性を検討する必要が考えられる。
　本年度は、上記目的に利用するために、環境中より様々な種類の新規プラスミドを取得することを目的に、微生物コンソーシャ中からの新規プラスミドの単離を試みた。

【方法と結果】　上記目的を考えると、接合伝達性プラスミドを取得することが重要である。そこで、環境中の細菌集団に受容菌を添加し、接合伝達の結果生じた接合伝達体を分離することでプラスミドを単離することとした。まず、河川水や湖沼水などの環境サンプルを採取し、0.2 μm フィルターを用いて濾過・濃縮して環境細菌試料を調製した(菌体濃度は約 6×10^9 cell/ml)。受容菌としては、大腸菌 HMS174 株(Rif^r)、QC774 株(Sm^r, Km^r, Cm^r)、*Pseudomonas putida* KT2440 株(Rif^r, Gm^r)や *P. resinovorans* CA10 株(Rif^r, Gm^r)、*Sphingomonas sp.* 株(Gm^r)など薬剤耐性を持っているものを 1 種ずつ加えた。液体状態での接合を 160～200 時間行った後に、受容菌が耐性を持っている抗生物質に加えて、耐性を持っていない抗生物質 1 種を含んだ培地に、適宜希釈して播種することで接合伝達体候補を選抜、単離した。Ka and Tiedje の方法（Ka and Tiedje *et al.,* 1994）を用いてプラスミドが実際に保持されていること、BOX-PCR（de Bruijin *et.al.,* 1992）を用いて単離したものが受容菌であることを確認することで、薬剤耐性を持つ接合伝達性のプラスミドを取得できたことを確かめた。その他の実験結果についても報告する。

plasmid, conjugation

講演番号：3B21a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ B 校舎 21 会場

シロアリ腸内共生細菌の 1 細胞解析
Single-cell analysis of symbiotic bacteria in termite
○雪 真弘[1,2]、新谷 政己[2,3]、大熊 盛也[1,2] ([1]理研 BMEP、[2]理研 BRC-JCM、[3]静岡大・工)
○Masahiro YUKI[1,2], Masaki SHINTANI[2,3], Moriya OHKUMA[1,2] ([1]RIKEN, BMEP, [2]RIKEN, BRC-JCM, [3]Fac. Eng. Shizuoka Univ.)

【目的】シロアリは腸内に共生する原生生物、細菌等の微生物群と協調して木材を効率よく分解していることが知られている。共生微生物の多くは難培養性であり、複雑な群集構造となっていることから研究が遅れていたが、近年、メタゲノム解析やメタ EST 解析など培養を介さない手法を用いて、シロアリ腸内微生物群全体の解析が進められている。その結果、セルラーゼなどの有用遺伝子の取得やシロアリと腸内微生物の共生関係の解明が行われつつある。しかし、これまでの解析の多くが微生物群全体を対象にした研究であるため、共生する個々の微生物種がシロアリ腸内においてどのような役割を担っているのかは、一部をのぞきほとんど解明されていないのが現状である。本研究では、原生生物と細菌が混在した腸液から細菌のみを 1 細胞毎に単離する手法を確立し、これまで解析されていなかった個々の細菌種の共生系における機能を解明することを目指した。
【方法】ヤマトシロアリの腸内共生微生物をフローサイトメーターで分離するために、生細胞に透過し細胞質内のチオール基と反応する蛍光標識試薬を用いて染色した。次にフローサイトメーターの分離ゲートを幾つか設定し、その中で原生生物や木材などの夾雑物が少なく細菌を多く取得できるゲートを決定した。このゲートを用いて腸内細菌を 96 ウェルプレートに 1 細胞ずつ分離後、Phi29DNA ポリメラーゼを用いた等温ゲノム増幅法で 1 細胞から全ゲノムを増幅した。増幅ゲノムを鋳型にユニバーサルプライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子を PCR 法により増幅した。増幅が確認されたサンプルはダイレクトシークエンスにより配列を決定した。さらに品質評価で広く使用される Phred スコアを指標に得られた波形データの評価を行って、1 細胞から増幅した可能性が高いサンプルを選択した。次に選択したゲノム増幅サンプルを用いて、窒素固定遺伝子 *nifH* などの機能性遺伝子の増幅を行い、増幅が確認されたサンプルに関しては配列を決定した。
【結果】現在までに、588 個の増幅ゲノムサンプルから、16S rRNA 遺伝子の増幅が確認されたのが約 43%にあたる 253 個であり、そのうち 1 細胞からの増幅が確認できたのは 115 個であった。このサンプルを用いて *nifH* 遺伝子の増幅を行った結果、少なくとも 1 種の細菌種から増幅が確認され、原生生物、細菌が混在した腸液より細菌のみを 1 細胞で取り出す手法を確立することに成功したと考えられる。今回構築した手法を環境中に存在する様々な難培養で複雑な微生物群集に対して応用することにより、これまで困難であった個々の細菌種の機能解析を 1 細胞レベルで解析することが可能になると期待できる。

single-cell, termite, symbiotic bacteria

講演番号：3B21a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ B 校舎 21 会場

ジャガイモに優占的な共生細菌群の生化学的特性と組織局在性
Biochemical characterization and plant tissue localization of the dominant symbiotic bacteria in potato

○大和田 琢二[1]、梨本 智也[1]、八木 星伍[1]、蓮見 圭悟[1]、染谷 信孝[2]([1]帯畜大・食品科学、[2]農研機構・北農研)
○ Takuji Ohwada[1], Tomoya Nashimoto[1], Shogo Yagi[1], Keigo Hasumi[1], Nobutaka Someya[2] ([1]Obihiro Univ., [2]NARO・HARC)

【目的】植物は多種多様な微生物群と相互に作用し合う共生関係にあることが知られている。これらの共生微生物群は、植物の成長促進をはじめ、耐病性や環境への適応力の付与に関わっていると考えられていることから、植物に親和性の高い有用な共生微生物群を探索・特定し、その制御技術を開発することは、安定的・持続的な農業の推進に重要である。本研究では、十勝の代表的な作物であるジャガイモから親和性の高い共生微生物群を網羅的に単離し、ジャガイモの生育に及ぼす影響と共生微生物の生化学的な特性を調べるとともに、組織局在性の観察を検討した。
【方法】ジャガイモ共生細菌の群集構造解析は、北海道の慣行施肥条件下で栽培されたジャガイモ（品種マチルダ）を用いて、非培養法は遠心濃縮法、培養法は R2A 培地から、各々細菌細胞を回収し、16SrRNA 遺伝子により網羅的に行った。生育促進効果は、培養土にジャガイモ種子（北海コガネ）を播種し、菌液（$5x10^7$cfu/g soil）を接種後、人工気象器内で 4 週間栽培した。インドール化合物（主にインドール酢酸）は、培養菌液上清の生成量をサルコフスキー発色法により定量した。シデロフォア生成能は、CAS 溶液を含む R2A 寒天培地のウエルに培養菌液を入れ、培養後に形成されたハローの径から測定した。リン可溶化能は、不溶リン（主にヒドロキシアパタイト）を含む Rennie 寒天培地（無機リン酸を除く）上に培養菌液をスポットし、培養後に形成されたハローの径から測定した。また、窒素固定能は、バイアル中の Rennie 軟寒天培地に培養菌液（10^8cfu/ml）とアセチレンガス（530ppm）を封入し、生成されたエチレンをガスクロマトグラフィーで測定した。
【結果】ジャガイモ根の細菌相を解析した結果、非培養法で 102 種、培養法で 57 種の細菌が検出された。優占的で親和性が高いと考えられた 19 株（Proteobacteria 12 株、Actinobacteria 5 株、Bacteroidetes 2 株）を選抜し、ジャガイモの生育促効果を調べた結果、Proteobacteria 3 株、Actinobacteria 2 株に有意な効果が認められた。この 5 株は全てインドール化合物（主にインドール酢酸）とシデロフォア生産能を有しており、特にインドール化合物の生産は Proteobacteria の 3 株が高かった。しかし、窒素固定能は設定した条件では検出されなかった。Actinobacteria の 2 株は多剤耐性を示したため、Proteobacteria の 3 株についてレポーター遺伝子（GFP/GUS）の導入により標識株の構築を検討した。構築された 1 株について感染初期の組織局在性を観察した結果、側根の基部周辺などの主根表面に局在化していた。

endophyte, potato, symbiosis

講演番号：3B21a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ B 校舎 21 会場

メタン資化性細菌－ウキクサ共生系によるメタン酸化
Methane oxidation by the methanotroph-duckweed symbiotic system
○井口 博之[1]、梅田 涼平[1]、多賀 寛樹[1]、由里本 博也[1]、小山 時隆[2]、阪井 康能[1] ([1]京大院・農・応用生命、[2]京大院・理・植物)
○Hiroyuki IGUCHI[1], Ryohei UMEDA[1], Hiroki TAGA[1], Hiroya YURIMOTO[1], Tokitaka OYAMA[2], Yasuyoshi SAKAI[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Dept. Botany, Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

【背景】湖や水田といった水圏は温室効果ガスであるメタンの主要な発生源となっている。一方で、同環境中に生息するメタン資化性細菌が好気的にメタンを酸化することで、大気中への放出が抑制されている。我々は 2009 年度の本大会で、湖の水草上に多様なメタン資化性細菌が生息し、高いメタン酸化活性を持つことを報告している(1)。それ故に、メタン資化性細菌－水生植物の相互作用は、水圏でのメタン消失や物質循環において重要な役割を果たしていると考えられた。ウキクサは池や湖などに広く生息する植物で、増殖が速く栽培が容易であり、また炭水化物含量が高いためバイオエネルギー資源としても期待されている。そこで本研究では、ウキクサに生息する C1 微生物叢ならびに、ウキクサ共生系によるメタン酸化の解析を行った。
【方法・結果】琵琶湖から採取したウキクサについて、16S rRNA、*pmoA*、*mxaF*遺伝子のメタゲノム解析を行った。ウキクサから抽出した DNA を鋳型にして PCR を行い、増幅産物を用いてプラスミドライブラリーを構築、シークエンスした結果、多様なメタン資化性細菌やメタノール資化性細菌がウキクサ上に生息していることが明らかになった。また、採取したウキクサ（に付着するメタン資化性細菌）のメタン消費も測定した。その結果、湖水と比べて高いメタン酸化活性を示すウキクサがあったことから、メタン資化性細菌がウキクサ上に集積されていることが示唆された。一方で、メタン酸化活性が低いウキクサもあり、同地点でも採取時期によって活性が異なるなど、メタン酸化活性に差異が認められた。現在、無菌のウキクサにメタン資化性細菌を接種してメタン消費を評価することにより、ウキクサがメタン酸化に与える影響について検討を行っている。

(1) 吉田ら、日本農芸化学会 2009 年度大会講演要旨集 p.86、2P0688B

methanotroph, duckweed, methane oxidation

講演番号：3B21a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ B 校舎 21 会場

アカシソ種子由来 *Methylobacterium* sp. OR-01 株のアカシソ上での動態

Dynamics of *Methylobacterium* sp. strain OR-01 on red perilla plant

○水野 雅之[1]、井口 博之[1]、谷 明生[2]、由里本 博也[1]、阪井 康能[1]([1]京大院農・応用生命、[2]岡山大・植物研)
○Masayuki Mizuno[1], Hiroyuki Iguchi[1], Akio Tani[2], Hiroya Yurimoto[1], Yasuyoshi Sakai[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric. Kyoto Univ., [2]Institute of Plant Science and Resources, Okayama Univ.)

【目的】植物葉圏には、*Methylobacterium* 属細菌に代表されるPink Pigmented Facultative Methylotroph (PPFM)が優占種として広く棲息し、その相利共生系における植物生長促進作用などが生物間相互作用と生産性向上の観点から注目されている。我々はこれまでに、種々の野菜葉圏に生息する PPFM の分布を調べた結果、シソ葉に多数の PPFM が検出されること、アカシソ種子から分離したPPFM(*Methylobacterium* sp. OR-01株)は*Methylobacterium fujisawaense* DSM5686と最も近縁であることを明らかにした[1)]。このアカシソ種子を、2010年に４地域（山形、静岡、三重、京都）でプランター栽培し、新鮮葉と収穫種子から PPFM を分離したところ、三重で栽培された葉から分離されたPPFMを除いた全ての菌株は、*M. fujisawaense* DSM5686が最近縁種であった。さらに、土井志ば漬本舗より入手した3年分(2009年～2011年産)のアカシソ種子および同社八瀬圃場で採取した新鮮葉・栽培土壌・周辺環境(2011年)から分離した PPFM も、すべて、*M. fujisawaense* DSM5686が最近縁種であった[2)]。これらの結果から、シソ類とPPFMの間に、種レベルで特異的相互作用のあること、その特異性が世代や地理的要因を超えて維持されていることが示唆された。本研究では、アカシソ種子に接種した*Methylobacterium* sp. OR-01株のシソ上での動態について調べた。

【結果】春化処理(40℃ 5分間処理)、70%-EtOH処理(1分間)および1%-アンチフォルミン処理(5分間)による滅菌処理を施したアカシソ種子に、同種子より分離したOR-01株のカナマイシン耐性株、ならびに*Methylobacterium* 属細菌のモデル菌株である*M. extorquens* AM1株のテトラサイクリン耐性株の培養菌体を、単独または混合して接種し、PPFM相互間の定着性に関する比較競争試験を行った。PPFMを接種した種子を、人工気象器内で発芽後2,3週間栽培し、各苗葉を滅菌水に懸濁・超音波処理して得た懸濁液を、メタノールを炭素源とする平板培地に塗布し、菌数測定、抗生物質耐性菌と感受性菌の菌数を比較し、分離菌についてMALDI-TOF/MSを用いた系統解析および16S rRNA解析を行った。カナマイシン耐性を付与したOR-01株が苗葉上から検出されたことから、アカシソ種子に接種した菌が、発芽後、シソの成長とともに葉に移行することが確認された。アカシソに対するOR-01株と*M. extorquens* AM1株ならびにそれらの抗生物質耐性菌の定着性について、比較試験を進めている。

1) M.Mizuno et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 578-580, 2012
2) 水野ら、日本農芸化学会2012年度大会講演要旨集 2C23a06

Methylobacterium, perilla, phyllosphere

講演番号：3B21a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ B 校舎 21 会場

水回りに発生するピンクぬめり構成細菌によるバイオフィルム形成の解析

Biofilm formation pink-pigmented bacteria isolated from wet areas in the house

○諸星 知広、徐 芳芳、山口 友香、王 文昭、池田 宰 (宇都宮大院工)
○Tomohiro MOROHOSHI, Fang-Fang XU, Yuka YAMAGUCHI, Wen-Zhao WANG, Tsukasa IKEDA (Utsunomiya Univ.)

【目的】ピンクぬめりは風呂場や流しに発生するだけでなく、工場や水処理現場においても膜の目詰りなどを引き起こすなど問題となっている。このピンクぬめりの正体は微生物が形成したバイオフィルムである。ピンクぬめりを構成する微生物については不明な点が多く、ピンクぬめりを効果的に除去する手法を開発するためにはさらなる解析が必要である。本研究では、家庭環境に発生したピンクぬめりからピンク色を呈する微生物を分離し、菌種を同定すると共に、各菌株のバイオフィルム形成能について解析を行った。
【実験方法】水回りに発生したピンクぬめりを綿棒で採取し、メタノール添加培地にストリークし、30℃で 2 日以上培養することでシングルコロニーを形成させ、ピンク色を呈するコロニーのみ純化させた。単離した菌株は 16S rRNA 領域の塩基配列を決定することで菌種を同定した。また、ピンクぬめりから染色体抽出キットを用いて直接メタゲノムを抽出し、16S rRNA 領域を増幅することでライブラリー解析も行った。バイオフィルム形成は、液体培地で培養した菌株を希釈して 96 穴マイクロタイタープレートに分注し、30℃で 2 日間インキュベートした後、クリスタルバイオレットを用いて染色し、波長 570 nm の吸光度を測定することで定量した。
【実験結果】5 ヶ所の家庭環境から採取したピンクぬめりから 21 株のピンク色を呈するコロニーを単離し、菌種を同定したところ、16 株が *Methylobacterium* 属細菌であった。また、その中から 3 ヶ所についてはピンクぬめり構成細菌のメタゲノム解析を行った。その結果、1 ヶ所のピンクぬめりからは *Methylobacterium* 属細菌が約 27%、もう 1 ヶ所からは約 63%と非常に高い割合で検出されたことから、家庭環境のピンクぬめりの主な構成因子は *Methylobacterium* 属細菌である可能性が示唆された。次に、各種菌株のバイオフィルム形成能を調べたところ、菌種の違いによりバイオフィルム形成量に差が見られたが、バイオフィルム形成量の高い株については、ばらつきが非常に大きく、構造が不安定である可能性が示唆された。次に、バイオフィルム形成量の高い 2 株について別の菌株との複合バイオフィルム形成を調べたところ、ある種の組み合わせでバイオフィルム形成量が大きく増加し、ばらつきも軽減された。以上より、ピンクぬめりでは複数の菌株が複合バイオフィルムを形成することで、バイオフィルムの構造が強固になったものと考えられる。

biofilm, methylobacterium, pink-pigmented bacteria

講演番号：3B21a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ B 校舎 21 会場

大腸菌のコロニー形成能を失った変異株の性質
Properties of *Escherichia coli* mutants defective in colony formation
○三井 智玄、納庄 一樹、高丸 玲子、小川 哲弘、日高 真誠、正木 春彦（東大院農）
○ Tomohiro Mii,Kazuki Nosho,Reiko Takamaru,Tetsuhiro Ogawa,Makoto Hidaka,Haruhiko Masaki (Univ. of Tokyo)

【目的】旧来、バクテリアの生死は、おもにコロニー形成能の有無で定義されてきた。しかし近年、環境中では、生きていてもコロニーを形成しないバクテリアが多数派であることが認識されるようになった。コロニー形成とは、単なる生存以上のどういう現象であるかを改めて問い直す必要がある。我々はそのためにコロニー形成能を失った大腸菌変異を求め、脂肪酸生合成系の縮合酵素FabBの欠損変異株が、L-broth液体培地では不完全ながら増殖できる（一旦10^6 cells/mL程度まで増えた後コロニー形成能を失っていく）が、同寒天培地上では全くコロニーを形成できないことを見出した。*ΔfabB*株は脂肪酸を要求するが、オレイン酸の供給を制限した場合にこの現象が見られることが判った。

この現象が*ΔfabB*変異に特異的なものであるかどうかを調べるために、*fabA*破壊株を作製し、そのコロニー形成能を解析した。FabAは脂肪酸合成系において不飽和結合の導入に必須な酵素である。
【方法】大腸菌MG1655株をもとに、オレイン酸添加培地を用いて、Red/ET組換え法により*ΔfabA*株を作製した。この株で、固体培養での生菌数（コロニー形成数CFU）と液体培養での生菌数（最確数MPN）を比較した。またコロニーの有無にかかわらない寒天培地上での増殖の程度と、液体培養における増殖の程度を、オレイン酸添加寒天培地にまいた時のCFUとして経時的に追跡比較した。
【結果】*ΔfabA*株は、オレイン酸非存在下では、肉眼で確認できる濁りやコロニーを形成しなかったのでCFUとMPNの比較はできなかった。しかし増殖の程度を追跡する実験では、寒天培地上では、初期接種量にかかわらず増殖はみられず、経時的にCFUが減少していくのに対して、液体培養では、一旦10^4 cells/mL程度まで増殖し、その後CFUは減少していった。*ΔfabA*株と*ΔfabB*株とで液体培地での到達菌密度に差はあるものの、液体培養では一度増殖するが固体培地では全く増殖しないという現象は、*ΔfabB*株に特異的なものではなく*ΔfabA*株でも見られた。これは、有効な脂肪酸の供給が制限された場合に起こる一般的現象であることが示唆された。現在、固体培養で全く増殖しない原因と、液体培養では一旦増殖したのち生菌数が減少する原因の解明を進めている。

Escherichia coli, colony formation, fatty acid synthesis

講演番号：3B21a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ B 校舎 21 会場

アミノ酸資化性酢酸還元菌と還元的酢酸生成菌の共培養系の構築
Construction of defined coculture of amino acid-oxidizing, acetate-reducing bacterium and acetogen
○阿藤 真、石井 正治、五十嵐 泰夫（東大院農生・応生工）
○MAKOTO ATO,MASAHARU ISHII,YASUO IGARASHI (Dept. Biotech.Grad. Sch. Agri. Life. Sci. Univ. Tokyo)

【背景】アミノ酸資化性酢酸還元菌はアミノ酸の酸化的脱アミノ化反応で生じた余剰還元力を、「酢酸の酪酸への還元」で消費する嫌気性細菌である。我々はアミノ酸資化性酢酸還元菌の生態への興味から、自然界からのアミノ酸資化性酢酸還元菌の集積培養を行ってきた。その過程で、水田土壌から酢酸非存在下にも関らずロイシンの分解に伴って酪酸を生成する集積培養系を取得した。同系内ではアミノ酸資化性酢酸還元菌と還元的酢酸菌が共存していた。酢酸還元菌は酢酸依存的なロイシン分解を行う際に H_2 を生成する性質があり、還元的酢酸菌は H_2 と CO_2 から酢酸を生成する。両者は酢酸と H_2 を相互供給して生育していたものと予想された。そこで本研究では、還元的酢酸菌（*Acetobacterium woodii*）とアミノ酸資化性酢酸還元菌(*Clostridium acetireducens*)の共培養系の構築を試みた。
【方法】*A. woodii* と *C. acetireducens* をそれぞれフルクトースとロイシン＋酢酸を含有する炭酸塩培地に接種し 24 時間前培養した後､それぞれ 2.5 % 濃度で以下の条件の培地に接種し､共培養した。培養条件は 1）ロイシンのみ、2）ロイシン＋酢酸、3）ロイシン＋H_2、4）基質なし、の 4 条件を設定し、それぞれの条件での有機酸の生成を比較した。同時に *A. woodii* を条件 1）と 3）で、*C. acetireducens* を条件 1）と 2）の条件で純粋培養した。
【結果・考察】*A. woodii* は条件 3）ロイシン＋H_2 で生育したが、条件 1)ロイシンのみでは生育しなかった。条件 3)の培養後の上清には酢酸が蓄積していたが、ロイシン酸化産物であるイソ吉草酸は生成しなかった。このことから *A. woodii* はロイシンを資化せず、H_2/CO_2 を用いた還元的酢酸生成により生育したと考えられた。また、*C. acetireducens* は条件 2）ロイシン＋酢酸で生育したが、条件 1）では生育は見られなかった。ロイシンは酢酸依存的にイソ吉草酸へと酸化され、酢酸は酪酸へと変換された。共培養系においては条件 1）ロイシンのみではイソ吉草酸、酪酸生成量は、条件 4）基質なしとほとんど変わらず、ロイシンの分解と酪酸の生成は進行しなかった。イソ吉草酸と酪酸の蓄積が顕著に見られたのは 2）ロイシン＋酢酸と 3）ロイシン＋H_2 の条件であった。条件 3）の共培養系では *A. woodii* が H_2 由来の還元力を利用して CO_2 から酢酸を十分量生成し、*C. acetireducens* がさらにロイシン由来の還元力により酢酸を酪酸へと還元していたものと考えられたが、集積培養系で見られていた 2 者間の水素-酢酸相互供給は成立しなかった。

anaerobic bacteria, amino acid, acetate

講演番号：3B21a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ B 校舎 21 会場

Bradyrhizobium japonicum USDA110 の La^{3+}依存型のメタノール生育と根粒形成に関する研究
La^{3+}-dependent methylotrophic growth in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, and nodule formation in *Glycine max*.
○三井 亮司、松崎 亮平、大谷 由起、田中 三男 (岡山理大理)
○Ryoji Mitsui,Ryohei Matsuzaki,Yuki Otani,Mitsuo Tanaka (Okayama Univ. of Science)

【目的】*Bradyrhizobium japonicum* USDA110 株はダイズに根粒を形成することで共生し、窒素固定を行う根粒菌として知られる。この *B. japonicum* USDA110 株はゲノム中にメタノールデヒドロゲナーゼ(MDH)と相同性を持つ *xoxF* と呼ばれる遺伝子を持つ。最近この *xoxF* がメチロトローフ細菌の *Methylobacterium extorquens* AM1 株において、希土類元素として知られる La を補欠分子として利用する La 依存型 MDH をコードするものであることが報告された[1)]。そこで本研究では *B. japonicum* USDA110株における *xoxF*の役割をメタノール生育とダイズへの根粒形成の観点から明らかにすることを目的とした。
【結果と考察】*B. japonicum* USDA110 株を完全合成培地にメタノールを単一炭素源として添加し、La^{3+}存在下で培養すると、メチロトローフとして生育出来ることが明らかになった。そこで La^{3+}存在下で炭素源をメタノールまたはグルコースとして生育させた菌体より無細胞抽出液を調製し、MDH 活性を測定したところ、メタノール生育菌体において高い活性を示すことから、*xoxF*はメタノールに誘導され、La は補欠分子として機能するものであることが示唆された。La 等の希土類はレアアースエレメント(REE)として注目される稀少な遷移元素群ではあるが、微量には土壌中に広く存在することが報告されている。また、植物葉上においても土壌由来と考えられる REE が存在しており、葉上より多く分離される *Methylobacterium* 属の *xoxF* は MDH として機能していると考えられる。このことから *Methylobacterium* 属は植物の生育に伴い蒸散されるメタノールを *xoxF* と関連して利用していることが示唆される。一方、根圏でも同様に根からメタノールが供給されていることが考えられ、土壌中に存在する希土類を利用することで *B. japonicum* USDA110 株がメチロトローフとして生育しうると考えられる。そこでメチロトローフとしての生育能が *B. japonicum* USDA110 株のダイズとの共生に影響を及ぼすのか検討した。栽培には Nitrogen-free plant nutrient medium を用い、根粒形成に十分な菌体を接種した。三週間栽培後、La の有無により葉数、茎長、根粒数、平均根粒重量に差があるか比較したが、優位な差は見られなかった。このことから *B. japonicum* USDA110 のメタノール資化能は根粒形成よりもむしろ、根に吸着するまでの段階に関与するものではないかと推定している。

1) T. Nakagawa *et al.*, A Catalytic Role of XoxF1 as La^{3+}-Dependent Methanol Dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* Strain AM1. PLoS ONE 7: e11 (2012).

Bradyrhizobium japonicum, Methylotroph, Rare-earth element

講演番号：3B21a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ B 校舎 21 会場

Oryza longistaminata X O. sativa　交雑後代系統と窒素固定微生物の関係解明
Investigation of relationship between crossed rice Oryza longistaminata X O. sativa and nitrogenfixing bacteria
○白 啓鈴[1]、磯田 玲華[1]、工藤 亮太[1]、前川 雅彦[2]、橋床 泰之[1]([1]北海道大院農、[2]岡山大資源植物科学所)
○Gye-ryeong Bak[1], Reika Isoda[1], Ryota Kudo[1], Masahiko Maekawa[2], Yasuyuki Hashidoko[1]([1]Hokkaido University, [2]Okayama University)

目的）無施肥圃場での収穫を完全持ち出しで 10 年続けても充分な収量を保つことができる *Oryza longistaminata*×*O. sativa* 交雑後代系統イネと，そのイネ組織内で活動するイネ内生あるいは無施肥水田土壌生の窒素固定細菌との関係を探り，それら窒素固定微生物の効率的窒素固定とイネの窒素獲得過程を解明する。交雑後代および対照とした農林 18 号もしくはコシヒカリそれぞれの種子内着生窒素固定細菌を CDGGE 法による菌相解析にかけ，また着生菌体を分離同定し，それらの窒素固定に対する寄与を追跡する。
方法および結果）資源植物科学研究所で前川が作出した *Oryza longistaminata* と *O. sativa* との交雑後代系統イネ種子から得た芽生えを用いて，これらの種子内着生微生物の培養と同定，比較を行った。この結果，比較対照とした農林 18 号やコシヒカリには存在しない特徴的なイネ種子内着生細菌として，コムギやサトウキビの根面着生細菌としてよく知られる *Herbaspirillum* 属細菌を分離同定したが，この単生窒素固定細菌は，単独のカルチャー法ではアセチレン還元を示さなかった。この交雑後代系統イネ種子からは，これらの他に *Sphingomonas* sp. と *Xanthomonas* sp. が特徴的な着生細菌として分離されたが，これらの共培養でも活性は認められなかった。また，オートクレーブにかけた川砂 10 mL でイネ種子を発芽させ，得られた 7 日生の芽生えを 2 日間のアセチレン還元に供した場合，コシヒカリや農林 18 号では比較的良好なアセチレン還元が認められたが，*O. longistaminata* と *O. sativa* との交雑後代系統イネでは全く活性を示さなかった。しかしながら，ここに無施肥圃場の生土を 10 mg 添加し，別途アセチレン還元を測定したところ，交雑後代系統イネ芽生えで極めて強力な活性を検出した。これらのイネ根から DNA を回収してイネ芽生え根面細菌相を PCR-DGGE 法によって解析したところ，交雑後代系統イネ芽生え根から特に強い *Clostridium* のバンドならびに *Paenibacillus* と *Rhizobium* のバンドが特徴的に検出された。これらの結果からイネ種子内着生細菌は，無施肥･完全持ち出し水田土壌で大きなバイアスがかかった土壌細菌群集のいずれかと協働的に窒素固定を活性化させていることが強く示唆された。従って，交雑後代系統イネの登熟期に採取したイネ茎や根の菌相解析を行うとともに，これら機能性細菌の純粋分離とイネ芽生えへの再接種を試みた。内生窒素固定細菌と土壌細菌の協調による高い窒素固定能発動を確認する目的で，完全滅菌種子から作成した無菌イネ芽生え根面に共培養を試み，これをアセチレン還元に供し，イネの窒素獲得に最も寄与している微生物の組み合わせの特定を試みた。これらの結果について報告する。

Biological fertilization, Nitrogen fixation, Cross between Oryza longistaminata and O. sativa

講演番号：3B21a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ B 校舎 21 会場

ガンコウランリターがスウェーデン高山森林限界付近ツンドラ土壌微生物群集の窒素固定に及ぼす影響とその主要因子の探索

Contribution of *Empetrum hermaphroditum* and main active compound from the leaf litter to nitrogen fixation of soil microbial community in Scandinavian subarctic tundra in Sweden

○礒田 玲華[1]、原 新太郎[1]、小林 真[2]、Giesler Reiner[3]、橋床 泰之[1]([1]北大院農、[2]横国院環、[3]Umea Univ.)

○Reika Isoda[1], Shinaro Hara[1], Makoto Kobayashi[2], Reiner Giesler[3], Yasuyuki Hashidoko[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Yokohama National Univ., [3]Umea Univ.)

【背景・目的】森林限界線上の植生は，わずかな気候変動でも多大な影響を受けやすいため，昨今の温暖化による森林限界のドラスティックな北上が予測されている．また，森林限界線付近の森林では林床を覆う蘚類に着生するシアノバクテリアによって窒素が供給されているとの報告があるが，それよりも標高の高い meadow(イネ科やスゲ科などの草本植物が優占する植生)では蘚苔類がほとんど分布しておらず，窒素の供給源は必ずしも明らかになっていない．我々は，森林限界線における森林成立制限要因としての窒素動態について各種検証を試みている．本研究では植生と土壌微生物の窒素固定の関係に着目し，meadow ならびにツンドラ帯ヒース(heath)の土壌を用い，ツンドラ帯において普遍的に分布するガンコウラン *Empetrum hermaphroditum* ssp. *nigrum*(ツツジ科)の窒素固定に対する寄与について検討した．

【方法】スウェーデン Abisko 周辺の高山森林限界付近の亜寒帯ツンドラ域(N68° 26’ E142° 28’, Alt. 647 m)において，スゲ科やイネ科などの草本植物が優占する meadow で有機物層(O 層)および無機物層(A 層)土壌を採取し，これを接種源とした．比較としてツツジ類が優占する heath 直下の O 層，E 層，B 層も得た．また，付近のガンコウランのリターを採取し，リターMeOH 抽出物を得た。抽出物は最終的に分画に供し，液液分配によってそれぞれ水層，Hexane 層，EtOAc 層，BuOH 層を得た．ガンコウランの leaf litter 1 mg 相当の MeOH 抽出物(0.265 mg)または同じ litter 10 mg 相当の抽出物を DMSO 溶液あるいは acetone 溶液として 10 mL の培地に添加し(溶媒終濃度 0.5%)，抽出物が土壌微生物群集に与える影響を検証した．培地は Winogradsky’s 無機塩無窒素培地(ジェランガム 0.3%含有，混合炭素源 0.1%または 0.5%)を基本培地とし，ガスクロバイアル内で 15 ℃，7 日間前培養し，気相 10%相当のアセチレンガスを封入後，培養 3 日目のアセチレン還元量を測定した．また，培養物の菌叢解析を行う場合は，培養後の培地から DNA を抽出し，16S rRNA 遺伝子を標的とした DGGE 解析を行った．

【結果】10 mL の培地に 300 mg の meadow 土壌を接種した場合，A 層土壌を接種源とした 0.1%，0.5%混合炭素源培地双方において，抽出物添加区でアセチレン還元が高まった．現在，これらの培養物中の微生物群集について PCR-DGGE を用いる方法によって菌叢解析を進めており，並行してガンコウランリター抽出物に含まれると予想されるアセチレン還元の亢進または抑制に強く影響を及ぼしている化学物質も追跡している．

acetylene reduction, tundra soil, DGGE

講演番号：3B21a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ B 校舎 21 会場

水生植物の成長を促進する新規根圏微生物の探索

Isolation and characterization of novel rhizobacteria promoting aquatic plant growth

○牧野 彩花[1]、玉木 秀幸[1]、田中 靖浩[2]、遠山 忠[2]、森 一博[2]、池 道彦[3]、森川 正章[4]、鎌形 洋一[1] ([1]産総研生物プロセス、[2]梨大院医工、[3]阪大院工、[4]北大院環境)
○Ayaka MAKINO[1], Hideyuki TAMAKI[1], Yasuhiro TANAKA[2], Tadashi TOHYAMA[2], Kazuhiro MORI[2], Michihiko IKE[3], Masaaki MORIKAWA[4], Yoichi KAMAGATA[1] ([1]AIST, [2]Yamanashi Univ., [3]Osaka Univ., [4]Hokkaido Univ.)

【目的】湖沼や河川に棲息する水生植物は、窒素・リンの吸収等の水質浄化機能を有しており、水圏の環境保全に貢献している。近年、水生植物のみならず、その根圏に棲息する微生物もまた水質浄化機能（環境汚染物質の分解能）を持つことが明らかにされ、さらに水生植物と根圏微生物の相互作用によって互いの水質浄化機能を向上させる効果が報告されるなど、水生植物と根圏微生物の共生系が水圏環境の保全・浄化に果たす役割に高い関心が集まっている。また、ごく最近になって、陸生植物と同様に、水生植物においても、その成長を促進する根圏微生物（PGPR：Plant Growth Promoting Rhizobacteria）の存在が発見された。こうしたPGPRを探索し、その成長促進機構を解明することは、水生植物と根圏微生物の共生系を理解する上で非常に重要であるが、水生植物の PGPR は未だ1種しか報告がない。そこで、本研究では、様々な水生植物の根圏環境から新しい PGPR を広範に探索し、それらの分子系統学的解析を行うとともに、植物成長促進効果を検証することを目的とした。
【方法】まず、ウキクサ、ミソハギ、ヨシ、マコモ等の水生植物の根圏環境から多様な根圏微生物を分離収集し、根圏微生物ライブラリーを構築し、PGPR 探索に供試した。本 PGPR 探索には、薬剤により無菌化処理を行い「無菌コウキクサ（*Lemna minor*）」を用いた。Hoagland 培地で維持した無菌コウキクサに供試菌株を接種した菌株添加系とともに菌株を接種しない無添加系を作製し、25℃、15000Lux、16h-Light/8h-Dark の条件で14日間培養した。その間、コウキクサの葉状体数の推移を測定することにより、各菌株の植物成長促進度を判定した。取得した PGPR については、さらに、自然の状態に近い条件での植物成長促進効果を検証するため、環境水に無菌コウキクサを接種したマイクロコズムを作製し、候補PGPRを接種して14日間上記と同様に培養し、成長促進度を判定した。
【結果】様々な水生植物の根圏環境から分離した根圏微生物を対象として PGPR の探索を実施した。その結果、菌株無添加のコントロール系に比べて2倍以上の植物成長促進効果のある PGPR を4株以上見出した。効果の高い PGPR について、さらに自然状態（水圏環境）を模擬したマイクロコズムにおいて、植物成長促進効果を調べたところ、菌株無添加系に比べて高い水生植物成長促進効果が認められた。また、本研究で見出した PGPR について、16S rRNA 遺伝子情報に基づいた分子系統解析を実施したところ、*Alphaproteobacteria* 綱, *Gammaproteobacteria* 綱, *Verrucomicrobia* 門等に属するが、いずれも既知細菌種との遺伝子配列相同性が低く（94%以下）、系統学的に新規性の高い細菌種であることが示唆された。本研究により、水生植物の PGPR は系統学的に多様であり、新規性の高い細菌種も含まれることが明らかとなった。

aquatic plants, growth-promoting, rhizobacteria

講演番号：3B21a15
講演日時、会場：3 月 26 日 11:48～ B 校舎 21 会場

外生菌根菌の菌糸生長を促進する宿主植物由来シグナル分子の探索
Searching for signal molecules of host plants inducing hyphal growth of ectomycorrhizal basidiomycetes
○足立 亜衣、加瀬谷 泰介（公益財団法人 東洋食品研究所）
○AI ADACHI,TAISUKE KASETANI (Toyo Institute of Food Tchnology)

[背景および目的]外生菌根菌と宿主植物の相互作用については、古くから研究されており、これまでに植物由来の何らかのシグナル分子が菌糸生育促進に作用して、菌根共生の成立の一端を担っていることが指摘されてきた。しかし、その物質は近年報告のあった *Pisolithus* sp. におけるユーカリ由来の Rutin などの報告はあるものの、特定されているものは極僅かであり、宿主植物由来のシグナル分子は未だ不明な点が多い。そこで今回、外生菌根菌 *Boletellus elatus*、 *Lyophyllum shimeji* を用いて、その物質の探索および同定を行った。

これまでに宿主植物コナラ、アカマツの根抽出液を液体および寒天培地へ添加することで、*L. shimeji* および *B. elatus* の菌体量が増加する傾向を確認している。また、アカマツ、クヌギの幼根と寒天培地上で二員培養することで、両菌株の菌糸伸長速度が速まることもわかっている。そこで、これら宿主植物が生産する水溶性および揮発性のシグナル分子の探索を行った。

[方法] 水溶性シグナル分子の探索：アカマツ根の水抽出物を分取 LC を用いて粗分画し、各粗分画区を添加した培地での菌根菌の生育評価を行った。生育促進効果が確認された区画において、作用物質の探索およびその構造決定を行った。構造解析には、FT-IR、NMR（^{1}H-NMR、^{13}C-NMR、H-H-COSY、DEPT、HMQC）および LC/Q-TOFMS を用いた。

揮発性シグナル分子の探索：アカマツ、クヌギ由来の揮発性成分を SPME およびエーテル抽出より成分を回収し、GC/MS によって同定した。確認された成分は、その標品を培地に添加し、生育評価を行った。

[結果]水溶性シグナル分子の探索：作成した粗分画添加培地のうち、一粗分画区が顕著な菌糸生育促進作用を示すことを確認した。その粗分画区より作用物質を探索し、構造解析を行った結果、その物質は Taxifolin-3-*O*-glucoside であると同定した。

揮発性シグナル分子の探索:各宿主植物の揮発性物質を探索した結果、計 35 物質を同定できた。このうち *B. elatus* に対して 3 物質、*L. shimeji* に対して 5 物質が菌糸伸長を促進することを明らかにした。

以上の結果は、上記宿主植物が生産する水溶性および揮発性の物質が、*B. elatus* 、 *L. shimeji* の菌糸生育に対してシグナル分子として作用し、それらの菌糸伸長等を促進していることを示唆した。

Ectomycorrhizal fungi, Signaling molecules, Flavonoid

講演番号：3B21p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ B 校舎 21 会場

Lactobacillus reuteri 腸管付着因子と受容体様因子の結合特性
Binding properties of the interaction of adhesion factor of *Lactobacillus reuteri* to receptor-like molecules
○松尾 洋輔、梶川 揚申、岡田 早苗、佐藤 英一（東農大応生科・化学）
○Yousuke MATSUO,Akinobu KAJIKAWA,Sanae OKADA,Eiichi SATOH (Dept. Appl. Biol. Chem. Tokyo Univ. Agr.)

【目的】我々は、*Lactobacillus reuteri* をモデルケースとした乳酸菌の付着機構について研究を行なっている。これまでに、*L. reuteri* の付着因子の一つである Mucus adhesion promoting protein (MapA) を介した腸管上皮細胞への付着性について研究を行なってきた。MapA は、腸管上皮細胞(Caco-2 細胞)上の受容体様因子(Annexin A13 (ANX A13)および Paralemmin (PALM))に結合することを報告した(1)。さらに本研究において演者らは、MapA と ANX A13 および PALM の結合特性について調べることを目的とした。
【方法】受容体様因子の共通項目として ANX A13 の N 末端、PALM の C 末端に脂質修飾を受けること、両因子が酸性タンパク質であることに着目した。ANX A13 と PALM の脂質修飾部位に対して MapA が結合するか検証するため、タグタンパク質の付加およびアミノ酸置換し脂質修飾を阻害した。また、ANX A13 および PALM は酸性タンパク質であり、MapA が塩基性タンパク質であることから、電気的作用により結合していることが考えられた。このことから、結合時の pH を 7.4 から低下させ、その結合性について検討した。さらに、脂肪酸を添加し菌体レベルにおける付着性について検討した。
【結果】N 末端に Tag を付加し脂質修飾を阻害した ANX A13 には MapA との結合性が無く、結合時の pH を変動させることによりその結合性が無くなることが解った。このことから、MapA と ANX A13 の結合は、受容体様因子の脂質修飾部位とタンパク質自体の電荷の関係により結合の有無が決まると推定される。さらに、PALM に対しても同様の試験を行った結果、全てのパターンの PALM に対して MapA との結合が確認された。また、pH 変動による結合の影響も確認できなかった。さらに脂肪酸添加による競合阻害試験を行った結果、ミリスチン酸濃度依存的に MapA の付着量が減少するのを確認した。さらに、*L. reuteri* DSMZ 20016^T のミリスチン酸添加における Caco-2 細胞への付着菌数の影響について検討した結果、無添加時と比べ付着菌数が減少するのが確認した。本結果から、*L. reuteri* DSMZ 20016^T は MapA と腸管上皮細胞上の受容体様因子を用いて、疎水的結合および電荷的結合により付着性を生み出していることを明らかとした。さらに MapA は、pH および受容体様因子の脂質修飾の有無に左右されない別の結合性を持つことが推定された。さらに MapA は受容体様因子に対して異なる結合性をことから、それぞれに対して MapA 内の異なるドメインを用いて結合性を生み出しているのではないかと示唆する。
(1)Matsuo Y, *et al.*, BMFH., 31, 93-102 (2012).

Lactobacillus reuteri, adhesion, receptor-like molecule

講演番号：3B21p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ B 校舎 21 会場

ラフィノース摂食マウスの腸内フローラ解析とメタボローム解析
Analysis for the effect of raffinose on murine microbial community by the 16S rRNA gene pyrosequencing and metabolomic analysis

○中西 裕美子[1,2]、榎木 満里奈[1,3]、森 雅代[1]、曽我 朋義[1,2,4]、五十嵐 喜治[5]、冨田 勝[1,2,4]([1]慶大・先端生命研、[2]慶大・政策・メディア、[3]鶴岡中央高、[4]慶大・環境情報、[5]山形大・農)
○Yumiko NAKANISHI[1,2], Marina ENOKI[1,3], Masayo MORI[1], Tomoyoshi SOGA[1,2,4], Kiharu IGARASHI[5], Masaru TOMITA[1,2,4] ([1]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [2]Grad. Sch. Media & Governance., Keio Univ., [3]Tsuruoka Chuo High Sch., [4]Dept. Env. & Info. Studies., Keio Univ., [5]Fac. Agr., Yamagata. Univ.)

機機能性食品であるプレバイオティクスは腸内環境を改善する効果があり、プレバイオティクスの一種であるラフィノースは、腸内のビフィズス菌を増加させ即時性食物アレルギーを抑制する等の報告もあるが、ヒトにおいては約 1000 種の細菌が存在する腸内フローラは複雑であり、プレバイオティクス効果のメカニズムについても不明な部分が多い。このメカニズムに迫り腸内フローラを制御・改善するために、我々は、摂取したプレバイオティクスにより変化する腸内フローラと代謝物に着目し、腸内フローラ解析とメタボローム解析を統合し、腸内環境の評価を行った。

BALB/c マウスに 5%ラフィノース食を 1 週間摂取させ、経時的に糞便を採取した。採取した糞便を用いて腸内フローラ解析とメタボローム解析を行った。腸内フローラ解析は次世代シーケンサー（GS Junior）を用いて網羅的 16SrDNA 解析を行った。また、メタボローム解析はキャピラリー電気泳動質量分析装置を用いて糞便中のイオン性代謝物の分析を行った。腸内フローラ解析の結果、ラフィノースを 1 週間摂取させることで、*Clostridiales* 目菌が減少し、*Bacteroidale* 目菌や *Bifidobacterium* 属菌が増加する傾向にあった。ラフィノース摂食の効果として予測される *Bifidobacterium* 属菌の増加が顕著な個体に着目すると、ラフィノース摂食後、糞中では Aspartate や Glutamine 代謝に関連する代謝物が増加し、Malate や Fumarate など中心代謝系の代謝物が減少する傾向が見られた。また、*Bifidobacterium* 属菌の増加が見られた個体のフローラでは他の個体と比較し、*Parabacteroides* 属菌の割合が減少しており、ラフィノース摂食により *Bifidobacterium* 属菌の増加だけでなく、他の細菌の構成も変化し、腸内の代謝が大きく変化している可能性が示唆された。

prebiotics, microbiota, metabolomics

講演番号：3B21p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ B 校舎 21 会場

マウス消化管内容物のマルチオミクス解析
Multi-omics analysis for the contents of murine gastrointestinal compartments
○山本 優理[1,2]、中西 裕美子[1,2]、村上 慎之介[1,2]、野津 量子[4]、植野 昌未[4]、日置 恭司[4]、高倉 彰[4]、中東 憲治[1,2]、平山 明由[1]、杉本 昌弘[1,2,5]、曽我 朋義[1,2,3]、伊藤 守[4]、野村 達次[4]、福田 真嗣[1,2]、冨田 勝[1,2,3]（[1]慶大・先端生命研、[2]慶大・政策・メディア、[3]慶大・環境情報、[4]実中研、[5]京大・医科研）
○Yuri YAMAMOTO[1,2], Yumiko NAKANISHI[1,2], Shinnosuke MURAKAMI[1,2], Ryoko NOZU[4], Masami UENO[4], Kyouji HIOKI[4], Akira TAKAKURA[4], Kenji NAKAHIGASHI[1,2], Akiyoshi HIRAYAMA[1], Masahiro SUGIMOTO[1,2,5], Tomoyoshi SOGA[1,2,3], Mamoru ITO[4], Tatsuji NOMURA[4], Shinji FUKUDA[1,2], Masaru TOMITA[1,2,3] ([1]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [2]Grad. Sch. Media & Governance., Keio Univ., [3]Dept. Env. & Info. Studies., Keio Univ., [4]Cent. Inst. Exp. Animal., [5]Grad. Sch. Med. and Fac. of Med., Kyoto Univ.)

【目的】腸内細菌叢（腸内フローラ）は動物の腸内に生息している細菌群の総称であり、様々な物質の生産や宿主の代謝・免疫において重要な役割を果たしていることが知られている。特に腸内フローラが産生する代謝物の解析に関する研究はいくつか報告があるが、消化管各部位ごとの代謝物について、細菌叢と代謝物の変動を網羅的に解析し、宿主ー細菌間相互作用の解明に焦点をあてた研究は少ない。そこで本研究では、メタボローム解析と腸内フローラ解析を統合したマルチオミクスにより、消化管各部位における代謝物と細菌叢との関係を明らかにすることを目的とした。
【方法】５週齢の無菌（ＧＦ）マウス、及びＳＰＦマウスについて６ヶ所の消化管部位（胃、小腸上部、小腸下部、盲腸、結腸上部、結腸下部）の内容物を採取し、イオン性化合物のメタボローム解析と消化管細菌叢の解析を行った。メタボローム解析にはキャピラリー電気泳動質量分析装置を用いてイオン性代謝物の網羅的定量を行い、細菌叢解析には次世代シーケンサー（ＧＳ　ｊｕｎｉｏｒ）を用いて網羅的１６Ｓ　ｒＤＮＡの解析を行った。
【結果】ＧＦマウスとＳＰＦマウスの消化管内容物の代謝物プロファイルを比較したところ、マウス間の違い（腸内フローラの有無）よりも、各マウスにおける消化管各部位ごとの違いの方が大きい結果が得られた。消化管各部位別に特徴的な代謝物に着目したところ、ＧＦマウスの胃ではエネルギー代謝に関連した物質、小腸ではアミノ酸やアミノ酸前駆体、盲腸ではN−アセチルアミノ酸に関連した物質の濃度が高かった。一方、ＳＰＦマウスの小腸ではアミノ酸やペプチドに関連する代謝物、盲腸ではポリアミンやビタミン、セロトニン関連代謝物の濃度が高かった。両者の詳細な比較解析結果から、腸内フローラ由来と推測されるビタミンＢ６などの代謝物も同定した。ＳＰＦマウスの腸内フローラ解析の結果から、胃と小腸上部ではＦｉｒｍｉｃｕｔｅｓ門の細菌群が優勢であり、小腸下部から結腸ではＢａｃｔｅｒｏｉｄｅｔｅｓ門の細菌が優勢であることが明らかとなった。消化管各部位の代謝物と腸内フローラの詳細なプロファイルと統合解析により、消化管各部位における腸内環境についての新たな知見をえることが出来た。

Gastrointestine microflora, Metabolomic analysis

講演番号：3B21p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ B 校舎 21 会場

食事と加齢が腸内環境に与える影響についてのマルチオミクス解析
Evaluation of the effects of age and diet on the gut ecosystem via multiple omics
○石井 千晴[1,2]、中西 裕美子[1,2]、村上 慎之介[1,2]、野津 量子[4]、植野 昌未[4]、日置 恭司[4]、高倉 彰[4]、中東 憲治[1,2]、平山 明由[1,2]、曽我 朋義[1,2,3]、伊藤 守[4]、野村 達次[4]、福田 真嗣[1,2]、冨田 勝[1,2,3]
([1]慶大・先端生命研、[2]慶大・政策・メディア、[3]慶大・環境情報、[4]実中研)
○Chiharu Ishii[1,2], Yumiko Nakanishi[1,2], Shinnosuke Murakami[1,2], Ryoko Nozu[4], Masami Ueno[4], Kyouji Hioki[4], Akira Takakura[4], Kenji Nakahigashi[1,2], Akiyoshi Hirayama[1,2], Tomoyoshi Soga[1,2,3], Mamoru Ito[4], Tatsuji Nomura[4], Shinji Fukuda[1,2], Masaru Tomita[1,2,3] ([1]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [2]Sys. Biol. Program, Grad. Sch. Media & Governance., Keio Univ., [3]Dept. Env. & Info. Studies., Keio Univ., [4]Cent. Inst. Exp. Animal.)

腸内細菌は消化管での消化吸収や粘膜免疫システムの構築、さらにはビタミンの供給など種々の役割を担っていることが知られている。しかし腸内細菌叢（腸内フローラ）が乱れると、肥満や糖尿病、炎症性腸疾患など多くの疾患発症につながることも近年報告されている。高脂肪・低繊維の食事や加齢は腸内フローラのバランスを乱すため、食生活や年齢と腸内フローラの関係についての知見を得ることは健康維持・疾患予防の観点から重要な課題である。腸内フローラは細菌同士さらには宿主細胞と相互作用することで腸内生態系（腸内エコシステム）を形成している。

そこで本研究では、食事と加齢が腸内フローラと宿主に与える影響を明らかにするため、次世代シーケンサーによる腸内フローラ構成の網羅的解析と、メタボローム解析による糞便中代謝物の解析を用いて腸内フローラ側と宿主側の両面からアプローチした。CIEA フローラ定着マウス（79 種の細菌を人工的に定着させたマウス）に通常食または高脂肪食を 52 週間摂取させ、その間経時的に糞便を採取した。腸内フローラの構成は GS Junior を用いて網羅的 16S rDNA 解析を行った。糞便中代謝物質のメタボローム解析はキャピラリー電気泳動質量分析装置を用いて分析を行った。通常食群と高脂肪食群の腸内フローラについて多変量解析手法の一つである判別分析を行った結果、高脂肪食群で *Prevotellaceae* および *Lachnospiraceae* の割合が多く、通常食群では *Porphyromonadaceae* の割合が多いことが明らかとなった。また代謝物プロファイルから、通常食群においてアミノ酸やビタミン B6 生成に関わる代謝物が蓄積していることも示唆された。腸内フローラと代謝物質の加齢に伴う変動パターンの類似性を相関解析により算出した結果、通常食群と高脂肪食群ではその変動パターンが異なることが示唆された。

gut microflora, multiple omics, high fat diet

講演番号：3B21p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ B 校舎 21 会場

豚ふん尿通気処理過程で出現する *Acholeplasma* 属細菌の機能と処理過程におけるその存在の普遍性
Role and prevalence of *Acholeplasma* occurred in aerated pig manure slurry
○花島 大[1]、堀 知行[2]、前田 高輝[1]、青柳 智[2]、森岡 理紀[1] ([1]農研機構・北農研、[2]産総研つくば)
○Dai HANAJIMA[1], Tomoyuki HORI[2], Koki MAEDA[1], Tomo AOYAGI[2], Riki MORIOKA[1] ([1]NARO NARCH, [2]AIST)

【目的】豚ふん尿を肥料として利用する際には、通気により悪臭の低減や植物の生育障害をもたらす易分解性有機物の分解を促進する通気処理を実施することが奨励されている。この過程では、酸素供給により増殖した好気性の細菌群が各種有機物の速やかな分解を担っていると考えられるが、ふん尿中に含まれる有機物は未消化飼料、腸内細菌死菌体、剥離した消化管壁など多様であり、特定の有機物の代謝にいかなる細菌が寄与しているかは明らかでない。そこで本報告ではふん中の有機成分のうち死菌体に着目し、^{13}C ラベルをした死菌体を処理過程に添加し、RNA を対象とした Stable Isotope Probing 法による死菌体の代謝に関わる細菌群の特定を試みた。更に国内 4 カ所の養豚場から収集したふん尿サンプルについて通気処理を行い、処理過程における本菌の普遍性について検証を行った。
【方法および結果】40℃恒温としたジャーファーメンターに 1.5L の豚ふん尿を充填し、350rmp の割合で攪拌を行うとともに連続通気を行った。試験開始後 3 日目に ^{13}C、または ^{12}C ラベルをした大腸菌死菌体を別々のジャーに添加､経時的にふん尿サンプルを採取し､それぞれについて RNA の抽出を行った。抽出した RNA は密度勾配遠心法により分画した後に、16S rRNA 遺伝子をターゲットとした逆転写反応を行い、T-RFLP 法による細菌群集のプロファイリングを行った。各分画ごとに得られた T-RFLP プロファイルの比較から、^{13}C ラベル大腸菌死菌体を添加したサンプルの“重い”分画に特徴的なピークが認められ、クローニングの結果から本ピークが *Acholeplasma* 属細菌に由来するものであることが明らかとなった。さらに国内 4 カ所の養豚場から収集したふん尿に通気処理を行い、処理過程で出現する微生物群について次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子をターゲットとしたアンプリコンシーケンスを実施した結果、相対的な存在比は高くないが（～4.5%）いずれの養豚場のサンプルからも *Acholeplasma* 属細菌が検出された。以上から本菌は、豚ふん尿の通気過程において広く存在し、死菌体の資化に関与していると考えられた。

aerated pig manure slurry, stable isotope probing, *Acholeplasma*

講演番号：3B21p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ B 校舎 21 会場

メタン集積培養におけるメタン酸化菌とメタノール資化性菌の共生関係

The relationship between methanotrophs and methylotrophs in methane enrichment cultures

○下村 義典[1]、山岸 卓弥[1]、久後 貴寛[2]、北川 航[1,3]、片山 泰樹[4]、佐藤 朋之[3]、田中 みち子[1]、浅野 行蔵[1]、鎌形 洋一[1,3]([1]北大院農、[2]北大農、[3]産総研・生物プロセス、[4]産総研・地圏資源)
○Yoshinori SHIMOMURA[1], Takuya YAMAGISHI[1], Takahiro KUGO[2], Wataru KITAGAWA[1,3], Taiki KATAYAMA[4], Tomoyuki SATO[3], Michiko TANAKA[1], Kozo ASANO[1], Yoichi KAMAGATA[1,3]([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Univ., [3]Bioproduction Res. Ins., AIST, [4]GREEN, AIST)

【目的】湿地や池、水田など自然環境から放出されるメタンガスは、二酸化炭素の 20 倍以上の温室効果を持つため地球温暖化への影響が危惧されている。一方、メタン発生源に生息するメタン酸化微生物は、メタンを酸化分解することで大気中へのメタン放出を抑制しているためメタン循環において重要な役割を担っている。また、それらのメタン分解過程で生じるメタノールなどの中間代謝物はその資化性微生物などにより利用されると考えられているが、メタン酸化微生物との詳細な相互関係については明らかになっていない。そこで、分離培養技術ならびに分子遺伝学的手法を用いてメタン酸化微生物叢の変化を解析し、さらにメタン酸化微生物の生態学的特徴および他の微生物との共存関係について明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】北海道大学大野池の堆積物を試料とし、メタン濃度 0、0.1、10%の系及びメタン濃度 10%で継代を行う系でメタン酸化微生物群の集積を図った。およそ 50 日間の集積培養後、最終培養物から全 DNA を抽出し、パイロシーケンシング法により 16S rRNA 遺伝子部分配列の大量配列解析を行った。その結果、異なるメタン濃度で選択圧を与えることにより、集積されるメタン酸化微生物に違いが見られた。また、メタン濃度や継代により選択圧が高くなるほど特定の微生物が集積され、特にメタン濃度 10%継代培養の系では、メタン酸化細菌としては *Methylomonas* のみが集積された。さらに興味深いことに、この系で優占的に集積されたのはメタノール資化性細菌である *Methylophilus* であり、メタンを直接利用できる *Methylomonas* よりも圧倒的に多く存在していたことが示された。この量比関係についてさらに詳しく調べるため、再び大野池の堆積物を採取し、同様に集積培養を行った。この集積培養物に対して 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローンライブラリー解析を行ったところ、メタン酸化細菌とメタノール資化性細菌の量比はおよそ 1:1 であり、前回とは異なる結果となった。しかし、前回と同様に *Methylomonas* と *Methylophilus* の 2 者が優占的に集積され、高濃度メタン環境におけるこれらの菌の強い関連が示唆された。そこで、集積培養物より単離した *Methylomonas* と *Methylophilus* を用い、メタンを唯一の炭素源とした培地で共培養を行うと、共生関係の再構築が可能であることがわかった。現在は、*Methylomonas* と *Methylophilus* の共生関係について明らかにするため、単独培養及び共培養条件におけるメタン・メタノール代謝関連酵素遺伝子の発現解析を行なっている。また、メタン培養時における *Methylomonas* と *Methylophilus* の共生の様子を明らかにするため、FISH 法による解析を進めている。

methane, methanotroph, methylotroph

講演番号：3B21p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ B 校舎 21 会場

高濃度セシウムが土壌微生物動態へ及ぼす影響

Effects of high concentration cesium on dynamics of soil-microbial community

○呉屋 恵里[1]、加藤 創一郎[1,2]、菊池 義智[1,2]、北川 航[1,2]、田中 みち子[1]、浅野 行蔵[1]、鎌形 洋一[1,2] ([1]北大院農・応生科、[2]産総研・生物プロセス)
○Eri Goya[1], Souichiro Kato[1,2], Yoshitomo Kikuchi[1,2], Wataru Kitagawa[1,2], Michiko Tanaka[1], Kozo Asano[1], Yoichi Kamagata[1,2] ([1]Grad. Sch. Agr., Hokkaido Univ., [2]Bioproduction Res. Inst., AIST)

【目的】微生物のもつ金属蓄積・吸着能を利用した環境浄化技術の有効性はすでに知られるところであり、現在問題視されている放射性セシウムの回収にも適用が期待されている。セシウムあるいは放射性セシウムは、その物理化学的性質がカリウムと類似することから、カリウムイオン輸送系を介して生物の細胞内に取り込まれることが知られている。またこれまでに放線菌やきのこ類などがセシウムを蓄積、あるいは吸着することが報告されている。一方で、高濃度のセシウムは大腸菌などの微生物の増殖に阻害的に働くことも報告されている。しかし、セシウムが環境微生物の動態にどのような影響を及ぼしうるのか、また微生物細胞内に流入したセシウムが微生物生理にどのような影響を与えるのかは不明な点が多い。そこで本研究では、高濃度のセシウムの存在下で土壌微生物を培養し、その群集構造がどのように変化するのかを調査した。また高濃度セシウム存在下で増殖可能な微生物を純粋分離し、その特徴を調べることでセシウムの生物学的意義を明らかにすることを目的とした。
【方法】森林土壌を微生物源とし、高濃度の塩化セシウム（ 50 mM あるいは200 mM）を添加しグルコースを栄養源とした低栄養液体培地で集積培養を行った。対照実験として、同濃度の塩化カリウムを添加した集積培養も行った。継代培養を 3 回行った後、16S rRNA遺伝子配列に基づく微生物群集構造解析を行った。また集積培養と同様の培地を用いて微生物を単離培養し、16S rRNA遺伝子配列解析により微生物種を同定した。
【結果・考察】微生物群集構造解析の結果、塩化カリウムを添加した集積培養系では*Bacillus*、*Acinetobacter*、*Enterobacter*など多様な微生物がみられたが、塩化セシウムを添加した集積培養系では*Flavobacterium*属細菌が約80％を占める単純な菌叢へと変化していた。この結果は、塩化セシウムの添加による塩濃度や浸透圧の変化ではなく、セシウムイオン自体が微生物群集構造に多大な影響を及ぼしたことを示唆する。塩化セシウムを添加した集積培養系から微生物の分離を試みた結果、優占種である*Flavobacterium*属細菌の分離に成功した。分離した*Flavobacterium*属細菌のセシウム存在下での増殖試験、ならびに細胞内へのセシウム流入の観察結果についても報告する予定である。

cesium, microbial community, Flavobacterium

講演番号：3B21p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ B 校舎 21 会場

アルミニウム・重金属耐性菌 *Pullulanibacillus* 属細菌 CA42 株の生産するアルミニウム、金属吸着性多糖の機能・構造
Structural and functional analysis of polysaccharide produced by an aluminum and heavy metal-tolerant bacterium, *Pullulanibacillus* sp. CA42
佐藤 准貴、○相澤 朋子、浦井 誠、砂入 道夫（日大生資科）
Junki SATO,○Tomoko AIZAWA,Makoto URAI,Michio SUNAIRI (Nihon Univ.)

酸性土壌では、強酸性、アルミニウム・重金属などの金属過剰害、リン酸の不溶化によるリン不足、窒素固定菌の活性低下による窒素不足などが複合して植物の生育阻害が起こり、農業上の問題となっている。特に、アルミニウムは酸性環境下ではイオン化し、細胞膜、細胞壁、DNA など生体物質へ結合し、植物の根の伸長阻害などを引き起こす。この酸性土壌のうち、硫化鉄を多く含む海成粘土層が開墾などにより地表に露出・酸化して生じる硫酸が原因となり、土壌および周辺水域が pH1～4 という強酸性を示す酸性硫酸塩土壌（acid sulfate soil：以降 ASS）と呼ばれる土壌はベトナムなどの東南アジアに広く存在し、作物植物への影響が特に深刻である。

われわれは ASS では限られた種類のイネ科植物などが生育し、その表面に多数の微生物がバイオフィルムを形成して共生していることを見出しており、これら共生系の環境適応機構を解析・活用することで、有効な環境修復技術や作物栽培技術の開発ができると期待している。

われわれは ASS に適応するカヤツリグサ科植物 *Eleocharis dulcis* （シログアイ）から、アルミニウムイオン耐性、pH 上昇能、インドール酢酸生産能を有している *Pullulanibacillus* 属細菌 CA42 株をすでに単離している。この CA42 株を酸感受性イネ(IR36)の根に接種し、pH 3.5 で $AlCl_3$ を添加した条件で栽培実験を行ったところ、CA42 株を接種したイネは生育が促進された。この際に、イネの根にバイオフィルム状の物質が見られ、このバイオフィルム状物質がアルミニウムイオンからイネの根を保護している可能性が考えられた。これまでに、CA42 株が培地上で生産する多糖(CA42-PS)は、アルミニウムイオン吸着能がある事が示唆されており、CA42-PS の組成について HPLC、GCMS で調べたところ、糖の構成成分として Glc のみが検出された。また、メチル化分析・NMR を用いて結合様式の解析をしたところ、主鎖に α1-4 結合を持ち、主鎖のグルコース残基約 10 個ごとに α1-6 結合を介した側鎖を持つ構造からグリコーゲンである事が示唆された。

本研究では、ゲルろ過、GCMS を用いて、平均分子量、側鎖長、D, L 体の判定を行い、CA42 株の生産する多糖の構造の決定を行った。さらに、CA42-PS の機能解析のために、様々な pH、競合イオン存在下でのアルミニウムやその他金属の吸着能についても ICP 発光分析装置、原子吸光計を用いて検討を行ったので報告する。これらの情報が、CA42-PS が CA42 株ならびに植物根圏の ASS 適応に寄与する役割の一端の理解につながると期待している。

acid soil, polysaccharide, aluminum

講演番号：3B21p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ B 校舎 21 会場

ドクゼリの重金属吸着能と *Paenibacillus* 属が生産する EPS との関係性の解析
Analysis of the relationship between heavy metal adsorption of *Cicuta virosa* and EPS produced by *Paenibacillus* sp.
○市橋 明大、大嶋 俊介、長田 賢志、山路 恵子、野村 暢彦（筑波大・院・生命環境系）
○ Akihiro ICHIHASHI,Shunsuke OSHIMA,Satoshi NAGATA,Keiko YAMAJI,Nobuhiko NOMURA (Tsukuba Univ.)

【背景・目的】重金属汚染土壌が世界で大きな問題となっている中、植物を用いた低コストかつ効率的な土壌浄化法であるファイトレメディエーションが注目されてきている。近年、ファイトレメディエーションに微生物が関与していることが報告されているが、現在の研究は根圏の土壌微生物と植物との関係を中心に研究されている。一方で植物組織内に内生している微生物との関係についての報告は少ないことが現状である。本研究では、日立鉱山から採取された、細根部分に高い重金属（特に亜鉛）蓄積能をもつドクゼリと根部の内生細菌間の相互作用に着目し研究を行っている。先行研究において重金属蓄積は内生細菌が寄与していることが示唆され、16S rRNA の相同性解析により内生する微生物の多くは *Paenibacillus* sp. であることが同定された。そこで、まずは重金属吸着メカニズムを調べるために *Paenibacillus* sp. が生産する細胞外物質（EPS）に着目し、EPS の重金属吸着能及び EPS 構成成分と考えられる多糖、タンパク質、DNA の分解を行うことで、各構成成分の重金属吸着能を調べた。また、植物組織間で亜鉛の蓄積能に差があることから、先行研究よりドクゼリの根の内部にも濃度差があることが示されているドクゼリの二次代謝産物が *Paenibacillus* sp. の EPS 生産、重金属吸着に与える影響についても調べた。本研究では植物−微生物間の相互作用による重金属吸着メカニズムを調べることで、ファイトレメディエーションに関する新規知見の獲得を目的とした。
【方法】ドクゼリの根より単離した *Paenibacillus* sp. から EPS を抽出後、重金属吸着試験を行った。重金属の定量はプラズマ発光分光分析装置（ICP）を用いて定量した。なお、重金属はドクゼリの中で高い濃度で存在していた亜鉛を用いた。多糖、タンパク質、DNA の分解は抽出した EPS にそれぞれの分解酵素及び薬剤を加えて反応させた後、ICP に供した。また、*Paenibacillus* sp. 培養時にドクゼリの二次代謝産物の一種を添加した区と添加していない区における EPS 生産性、重金属吸着能を測定した。
【結果・考察】ICP に供した結果、*Paenibacillus* sp. から抽出した EPS が亜鉛を吸着することがわかった。また、EPS の構成成分を分解した後に重金属の吸着を比べてみたところ、吸着量の減少がみられ、特にタンパク質を分解したところ他の構成成分を分解した場合と比べ大きな減少がみられた。そして、ドクゼリ二次代謝産物添加区から抽出した EPS は、構成成分及び重金属吸着能が非添加区と比べ変動することが観察できた。以上のことから、重金属吸着には *Paenibacillus* sp. の関与が示唆され、植物により内生細菌の EPS 生産及び重金属吸着が制御されている可能性が予想された。

heavy metal, endophyte, phytoremediation

講演番号：3B21p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ B 校舎 21 会場

シグナル物質を用いた活性汚泥の硝化活性向上の検討

Influence of AHL signals on activated sludge nitrification.

○河嶋 伊都子[1]、豊福 雅典[1]、小林 裕子[1]、橋本 英樹[2]、稲葉 康平[2]、内山 裕夫[1]、野村 暢彦[1] ([1]筑波大院・生命環境系、[2]住友重機械工業（株）技術研究所)
○Itsuko Kawashima[1], Masanori Toyofuku[1], Yuko Kobayashi[1], Hideki Hashimoto[2], Kouhei Inaba[2], Hiroo Uchiyama[1], Nobuhiko Nomura[1] ([1]Tukuba Univ., [2]Sumitomo Heavy Industries, Ltd)

【背景・目的】

排水処理工程に用いられる活性汚泥は、多種多様な微生物種を含む複合微生物系として存在している。それ故、効率の良い水質浄化のため活性汚泥の有用微生物の活性をいかにして高めるかが現在の課題である。

従来は活性汚泥による排水処理効率化の方法として微生物の生育環境を適切にコントロールする物理化学的な方法が用いられてきた。しかし、これらの物理化学的な手法では特定の菌の制御ができないため、複合微生物系の一部として存在する有用微生物の活性化には限界があると指摘されていた。

そこで当研究室が注目したのが、近年明らかにされてきた微生物細胞間シグナルである。微生物はこのシグナル物質を受け取ることにより自身の遺伝子発現を変化させ、個々の生育や代謝、さらには集団としての挙動を変えることが示唆されている。シグナル物質を用いた生物学的手法ならば、従来の方法とは違い、活性汚泥中のシグナル物質を感知できる有用微生物のみの活性化が期待できる。そして、興味深いことに当研究室の先行研究において活性汚泥に対して細胞間シグナル物質を添加することで、排水中のアンモニアを硝酸まで酸化する硝化反応が活性化されることが分かってきている。

本研究では、シグナル物質が硝化反応のどの段階に作用しているのか、またどのように作用しているかについて、より詳細なメカニズムを解明していくことを目的としている。

【方法・結果】

どのようなシグナル物質が活性汚泥の硝化細菌に影響を与えるか調べるため、様々な微生物シグナル物質を活性汚泥に添加しその硝化活性を調べた。その結果、グラム陰性菌において広く利用されているアシル化ホモセリンラクトン(AHL)の一種が活性汚泥の硝化活性を促進した。また、AHL が硝化活性のプロセスのどの段階に作用しているかを明らかにするため、硝酸と亜硝酸の定量を経時的に行った。その結果、AHL を投与した系において、AHL 添加から初期と後期でそれぞれ硝酸と亜硝酸の増加が確認できた。さらに硝化反応のうち律速段階として問題視されているアンモニア酸化に着目し、その一端を担う AmoA 遺伝子を定量してアンモニア酸化細菌数を評価したところ、硝化反応の活性化に伴いアンモニア酸化細菌が増加している傾向が観察された。

これらの結果は、複合微生物系において微生物細胞間シグナル物質である AHL が、アンモニア酸化細菌によるアンモニア酸化のプロセスに影響を与えていることを示唆している。

cell-cell communication, activated sludg, nitrification

講演番号：3B21p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ B 校舎 21 会場

放射性セシウムの糞便における濃縮と腸内細菌による放射性セシウムの取り込み

Radioactive cesium uptake in vivo and in vitro by intestinal bacteria

○磯貝 恵美子[1]、関根 勉[1]、鈴木 理絵[1]、黒田 健吾[1]、渡邊 裕一[1]、福田 智一[1]、木野 康志[1]、福本 学[1]、山城 秀昭[2]、阿部 靖之[3]、小林 仁[4] ([1]東北大、[2]新潟大、[3]山形大、[4]宮城大)
○Emiko ISOGAI[1], Tsutomu SEKINE[1], Rie SUZUKI[1], Kengo KURODA[1], Hirokazu WATANABE[1], Tomokazu FUKUDA[1], Yashishi KINO[1], Manabu FUKUMOTO[1], Hideaki YAMASHIRO[2], Yasuyuki ABE[3], Jin KOBAYASHI[4] ([1]Tohoku Univ., [2]Niigata Univ., [3]Yamagata Univ., [4]Miyagi Univ.)

Ⅰ目的

2011年3月に起きた東日本大震災に伴う東京電力福島第一原子力発電所の爆発事故によって大気中に放出された放射性物質は福島県を中心に広範な地域に環境汚染をもたらした。放射性セシウムによる食品汚染は大きな問題となった。体内に取り込まれた放射性セシウムの腸内フローラ構成細菌による取り込みの可能性と生体からの効果的早期除染方法を探るため腸内細菌による放射性セシウムの取り込みの検討を行った。

II 材料及び方法

福島原発５ｋｍ圏内の特養家畜（イノブタ）からサンプリングを行い、諸臓器、胃内容物および糞便の線量をゲルマニウム測定機器によって測定した。ここで、糞便での濃縮が起こっているかどうかを確認した。さらに、腸内フローラの主要構成細菌である,*Bifidobacterium longum, Clostridium perfringens, Clostridium ramosum, Bacteroides fragilis, Bacteroides vulgates*を用いて、放射性セシウム含有固形培地をからの放射性セシウム取り込みを調べた。細菌の回収は固形培地に接種後、48 時間目に行った。菌液は培地と同じ重量になるように調整した。

III. 結果および考察

イノブタでは放射性Csは筋肉で最も高く、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、肺などからも検出された。筋肉からAg-110mおよびTe-129mは検出できなかった。臓器に比べて、糞便からCs-137 およびCs-134 が最も高いレベルで検出された。イノブタNo.1 ではCs-137 が胃内容物では 1700 Bq/kg、糞便では 5700 Bq/kg、濃縮倍率は 3.3 倍であった。また、Cs-137 の濃縮倍率はNo.2 では 16 倍、No.3 では 3.2 倍であった。なお、Cs-134 の濃縮倍率はどの個体でもCs-137 と大差はなかった。この結果から、胃から糞便に至る過程で腸内細菌による放射性セシウムの取り込みがあることが示唆された。そこで、腸内細菌による取り込みを調べたところ、いずれの細菌においてもガンマ線スペクトルとしてCs-137 およびCs-134 のピークを認めた。もっとも効率の良い取り込みを示したものは*B. vulgates*であった。その他の細菌もよく放射性セシウムを取り込んだ。たとえば、 *B.longum*では調整菌液でCs-137 の濃度は 5.98±1.37 Bq/kg、培地で 9.84±8.02 Bq/kgであった。微生物から哺乳類に至るまでカリウムチャンネルの存在が報告されており、放射性セシウムも微生物によって効率よく取り込まれると考えられる。腸内細菌が生体内からの効果的な排出に寄与していることが示唆された。

radioactive cesium, intesitnal flora, bacterial uptake

講演番号：3B21p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ B 校舎 21 会場

土壌常在菌によるセシウム取り込み機構の解析

Mechanism of cesium uptake by soil bacteria

○根岸 真之[1]、張 鵬尧[1]、井戸田 陽子[1]、矢野 健太郎[1]、森本 かおり[1]、辻 彰[2]、荻原 琢男[1]([1]高崎健康福祉大学薬学部、[2]金沢大学薬学部)
○Masayuki NEGISHI[1], Pengyao ZHANG[1], Yoko IDOTA[1], Kentaro YANO[1], Kaori MORIMOTO[1], Akira TSUJI[2], Takuo OGIHARA[1] ([1]Faculty of Pharmacy, Takasaki University of Health and Welfare, [2]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University)

【目的】2011 年 3 月に発生した東日本大地震に伴う原子力発電所の事故により，多量の放射性物質が環境中に放出された．特にセシウム 137 は約 30 年の半減期を有し，環境へ長期に渡って甚大な影響を与えることから，その環境からの効率的な除去技術の確立は危急の課題である．一方，細菌には生命の維持に必要なカリウムを能動的に取り込むトランスポータータンパクが備わっており，細菌の膜表面に発現していることが知られている．「松本常在菌」[1)]は宮城県石巻市で採取された土壌中の常在菌を起源とする完熟堆肥調製用の細菌の総称であり，その菌体内にセシウムを取り込むことが示唆されているが，そのメカニズムの詳細については明らかではない．そこで本研究では，このセシウムの取り込み機構が細菌に発現しているカリウムトランスポーターを介するものであるとの仮説をたて，これを確認することを目的とした．
【方法】カリウム除去処理を施した松本常在菌を培養液中に懸濁させ，これに一定量の塩化セシウムを添加し，25℃にて一定時間培養後に菌体内に取り込まれたセシウムの量を原子吸光光度計を用いて測定した．同一検体を用いて細菌数を測定し，単位菌体数あたりに取り込まれたセシウム量を算出した．さらに濃度依存性，pH 依存性，温度依存性およびカリウムの添加による阻害やその阻害様式を検討した．
【結果･考察】菌体内に取り込まれたセシウム量は，培養開始後 4 時間までは直線的に増加し，その後頭打ちとなった．濃度依存性の検討では，濃度の増加に伴って取り込み量は増加したが，1.0 mmol/L 近辺から頭打ちの現象が観察された．速度論的な解析によってこの取り込みの Km 値（ミカエリス定数）は約 540 μmol/L，Vm 値（最大速度）は約 340 pmol/4hr/×10^6cell と算出された．また Eadie-Hofstee Plot により一相性を示したことから、この取り込みは単一の能動輸送系が関与していることが示唆された．さらにこのセシウムの取り込みはカリウムの添加により濃度依存的に阻害され，また培養温度を 4℃とすると取り込みは抑制された．これらの結果から，この土壌常在菌に対するセシウムの取り込みは，カリウムトランスポーターを介したものであることが示唆された．
1)http://www.matsumotojuku.jp/

cesium, uptake mechanism, soil bacteria

講演番号：3B21p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ B 校舎 21 会場

細菌芽胞に対する乳化剤の抗菌効果における脂肪酸鎖長の影響

The antibacterial effect of fatty acid chain length of emulsifying agent on bacterial spore

○島谷 佳奈果[1]、野中 愛[2]、池田 圭亮[2]、倉八 正篤[2]、中山 素一[1]、人見 潤[1]、宮本 敬久[3]（[1]花王(株)安全性評価研、[2]九大院生資環、[3]九大院農院）
○Kanami SHIMATANI[1], Ai NONAKA[2], Keisuke IKEDA[2], Masahiro KURAHACHI[2], Motokazu NAKAYAMA[1], Jun HITOMI[1], Takahisa MIYAMOTO[3] ([1]Kao Corp., [2]Kyusyu Univ., [3]Kyusyu Univ.)

【目的】*Bacillus* 属細菌は、熱や薬剤に対する耐性の高い芽胞を形成するため加熱殺菌後も生存し、食中毒や品質の劣化の原因となる。このため芽胞の発芽・増殖の制御のため、脂肪酸エステル類が使用されているが、その抗菌作用機構は明らかにされていない。本研究では脂肪酸鎖長の異なるモノグリセリン脂肪酸エステル(MFE)およびショ糖脂肪酸エステル(SFE)を用いて,数種のバチルス属細菌芽胞に対する抗菌効果を調べたので報告する。
【方法】*Bacillus coagulans*, *B. cereus*, *B. megaterium*,および *B. subtils* の芽胞を常法に従って調製した。この芽胞を種々の濃度の脂肪酸エステルを添加した 50%濃度の LB 培地または TSB 培地中（pH6 または pH8）で、最適温度にて 48 時間培養後の生菌数を、TSA 培地を用いた平板塗抹法にて測定して最小生育阻止濃度（MIC）を求めた。
【結果および考察】脂肪酸鎖長 8,10,12,14,16,18 の MFE（MFE8～MFE18）および SFE(SFE8～SFE18)を用いて 0.0000125～0.05%の終濃度範囲で試験した結果、*B. coagulans* において、MFE では pH6 および 8 において MFE12 および 14 の効果が最も高かった。これに対して、SFE では、pH6 および 8 において SFE16 および 18 の効果が最も高かった。*B. cereus* においては、MFE では pH6 および 8 において MFE12 の効果が最も高かった。これに対して、SFE では、pH6 では SFE14 および 16 の効果が高かったが、pH8 ではいずれの SFE も抗菌効果を示さなかった。*B. megaterium* においては、MFE では pH6 では MFE12 および 14、pH8 では MFE12 の効果が最も高かった。これに対して、SFE では、pH6 では SFE14 の効果が高かったが、pH8 ではいずれの SFE も抗菌効果を示さなかった。*B. subtilis* においては、MFE では pH6 および 8 において MFE12 の効果が高く、SFE では、pH6 において SFE14、pH8 においては SFE14 および 16 の効果が高かった。このように MFE では ｐH には関係なく,試験した菌株では、脂肪酸鎖長 12 または 14 のエステルの抗菌効果が高かった。これに対して、SFE は,菌種によって効果が異なり、pH には関係なく *B. coagulans* では脂肪酸鎖長 16 が、*B. subtilis* では脂肪酸鎖長 14 が高い抗菌効果を示したが、pH6 において *B. cereus* では鎖長 14 および 16, *B. megaterium* では鎖長 14 の効果が高かったが、pH8 ではいずれの鎖長の SFE も試験した濃度範囲では抗菌効果は認められなかった。今後、芽胞及び栄養細胞との脂肪酸エステルの親和性と抗菌活性との関連、芽胞の表面疎水性と脂肪酸エステルの物理化学的性質の関連等を調べて抗菌作用機構の解明を試みる。

bacterial spore, emulsifying agent, fatty acid chain length

講演番号：3B21p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ B 校舎 21 会場

選択的リグニン分解菌のバニリンに対する細胞応答

Cellular response of a selective lignin-degrading fungus to vanillin

○渡邊 崇人、森 賢一郎、木戸 彩子、長谷川 隆大、和泉 千尋、津田 冴子、西村 裕志、渡辺 隆司 (京大・生存研)
○Takahito WATANABE, Kenichiro MORI, Ayako KIDO, Takahiro HASEGAWA, Chihiro IZUMI, Saeko TSUDA, Hiroshi NISHIMURA, Takashi WATANABE (RISH, Kyoto Univ.)

【目的】白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* は，セルロースを極力壊さずにリグニンを高選択的に分解するユニークな特徴を有する．また，本菌が産生する新規代謝物 ceriporic acid は Fe^{3+} の還元を阻害し, フェントンサイクルによる水酸化ラジカルの生成とセルロースの分解を抑える [1-3]. さらに，最近，ceriporic acid の類縁体の 1 つがマンガンペルオキシダーゼを介した脂質過酸化の初発に関与することを本研究室で明らかにした [4]．一方，*C. subvermispora* は，リグニンペルオキシダーゼ活性を持たないが，酵素から遠く離れた場で非フェノール性のリグニンを分解する．なお，その機構としては，マンガンペルオキシダーゼを介した不飽和脂肪酸の酸化によるラジカル連鎖反応が注目されている．以上，*C. subvermispora* は他の白色腐朽菌とは大きく異なる特徴を有することから，本研究では，その選択的リグニン分解機構の解明の一環として，今回は，リグニン分解時に大量に見出されるバニリンに対する細胞応答について基礎知見を得ることを目的とした．
【方法・結果】バニリン添加及び非添加の最少培地に *C. subvermispora* をそれぞれ培養したところ，バニリンによる生育阻害は認められなかったが，白色腐朽菌のモデル種である *Phanerochaete chrysosporium* と同様にグルコース消費量は著しく増加していた [5]. また, 培養ろ液をアセトン抽出し，メチル化後，GC-MS 解析に供して，主な脂質関連代謝物の定量を行ったところ，長鎖の飽和・不飽和脂肪酸及び ceriporic acid の産生量がバニリン添加時において 2.2 ~ 3.2 倍に増加した．一方，バニリン添加時に転写が誘導される遺伝子を解析するために，バニリン添加・非添加の両培養条件より mRNA を調製し, 二本鎖の cDNA を合成後, suppression subtraction hybridization を行った. その結果，バニリン代謝に関与する遺伝子や脂質過酸化の基質となるリノール酸の生合成に関与する遺伝子等が単離された.

1) Watanabe, Takashi *et al*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297,** 918-923 (2002).
2) Rahmawati, N. *et al. Biomacromolecules* **6,** 2851-2856 (2005).
3) Ohashi, Y. *et al. Org. Biomol. Chem.* **5,** 840-847 (2007).
4) Nishimura, H. *et al*. *Org. Biomol. Chem.* **10,** 6432-6442 (2012).
5) Shimizu, M. *et al. Proteomics* **5,** 3919-3931 (2005).

selective lignin degradation, white rot fungi, vanillin

講演番号：3B21p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ B 校舎 21 会場

マイタケ由来グルタミン酸デカルボキシラーゼの精製と性質

Purification and characterization of glutamate decarboxylase from Grifola frondosa

○白坂 憲章、岩本 和子、福田 泰久（近大院農）
○Norifumi SHIRASAKA,Kazuko IWAMOTO,Yasuhisa FUKUTA (Kinki Univ.)

非タンパク質アミノ酸の一種であるγ-アミノ酪酸（Gamma-Amino Butyric Acid；GABA）は生体内では抑制性神経伝達物質として働き，血圧降下作用，利尿作用，糖尿病の予防といった様々な生理機能が期待される機能性成分である．生体内において，GABA はピリドキサール 5'-リン酸（PLP）依存酵素であるグルタミン酸デカルボキシラーゼ（Glutamic Acid Decarboxylase；GAD）による L-グルタミン酸の脱炭酸反応によって生成される．これまでに動物，植物，細菌，菌類由来の GAD が精製され，その特性について報告されているが，担子菌由来GADについての報告はない．本実験では食用きのこの中でも比較的にGAD活性の強いマイタケに着目し，マイタケの子実体を用いてGADの精製を試みた．

実験には市販のマイタケ子実体を用い，酵素活性は PLP 存在下で L-グルタミン酸を基質とした反応による GABA の生成を薄層クロマトグラフィー（TLC)で半定量的にチェックするとともに，Ez faast アミノ酸定量 kit を用いた定量値より活性を算出した． マイタケの子実体を破砕後，遠心分離より得られた上清を粗酵素液とし，粗酵素液に硫酸アンモニウムを加えたものを butyl-Toyopearl に供して酵素タンパク質を吸着後，硫酸アンモニウムの濃度勾配にて溶出を行った．活性が認められた画分を集め，一晩透析後，DEAE-Toyopearl に供して，塩化ナトリウムの濃度勾配にて溶出を行った．得られた活性画分を集めて限外濾過にて濃縮後，Toyopearl HW65F, Sephacryl S-200HR を用いたゲル濾過に供したところ，1.26%の収率で精製酵素が得られた．精製酵素の分子量は SDS-PAGE より約 42kDa，TSK-gel G3000SWXL を用いた高速液体クロマトグラフィーにより約 97kDa であったことから，本酵素は二量体であることが示唆された．本酵素の至適 pH は 3.5，至適温度は 37℃であり，pH2.5 から 5.5 および 37℃まで安定であった．本酵素は L-グルタミン酸のみを基質とし，Hg^{+}と Ag^{+}によって活性が阻害された．得られた酵素の N-末端配列を分析したところ，相同性を示すタンパク質は見つからなかった．現在，本酵素をコードする遺伝子のクローニングを進めている．

Grifora frondosa, Glutamic acid decarboxylase, γ-amino butyric acid

講演番号：3B21p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ B 校舎 21 会場

新規腋臭菌 *Anaerococcus* sp.株の発見
DISCOVERY OF NEW AXILLARY ODOROUS BACTERIA -*ANAEROCOCCUS*-
○篠崎 純子、藤井 孝吉、梶浦 貴之、岩崎 敬治、不藤 亮介（味の素（株）イノベーション研）
○Junko Shinozaki,Takayoshi Fujii,Takayuki Kajiura,Keiji Iwasaki,Ryosuke Fudou (Institute for Innovation, Ajinomoto Co., Inc.)

【背景・目的】腋臭は、体内から分泌された無臭の前駆体が皮膚に存在する細菌によって変換されて発生する。既存デオドラント剤は殺菌成分を含有するが、充分な消臭効果が感じられないといった課題がある。その為、既存の殺菌成分が効き難い腋臭菌が存在する可能性が考えられた。そこで、新たな腋臭菌を見出す事を目的とした。
【方法】①腋部位の擦り取り液から好気及び嫌気条件で菌株分離を行った。②並行して、同液からＤＮＡ抽出を行い、Ｔｅｒｍｉｎａｌ　Ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｌｅｎｇｔｈ　Ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍ（Ｔ－ＲＦＬＰ）分析により腋の細菌叢解析を実施した。③分離株について腋臭成分３－ｈｙｄｒｏｘｙ－３－ｍｅｔｈｙｌｈｅｘａｎｏｉｃ　ａｃｉｄ（HMHA）発生を確認した。④新たに見出した腋臭菌*Ａｎａｅｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ.*株に対して、既存殺菌成分の最小発育阻止濃度を調べた。
【結果】①嫌気性菌９株、好気性菌２１株を分離株として取得した。②主要な菌である*Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ*属、*Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ*属、*Ｐｒｏｐｉｏｎｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ*属とは別のメインピークを確認した。③分離株３０株及び基準株７株の中で、*Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ*属よりHMHA高生成株を見出した。１６ｓｒＤＮＡシークエンスにより*Ａｎａｅｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ.*株と同定した。この新たに腋臭菌として見出した*Ａｎａｅｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ.*株の制限酵素断片長から、Ｔ－ＲＦＬＰ　プロファイル中のメインピークと一致する事を確認した。④市販のデオドラント剤に汎用されている殺菌成分であるイソプロピルメチルフェノール（ＩＰＭＰ）やトリクロサン（ＴＣＳ）に対して、*Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ*属と比較して、この株が高い抵抗性を示す事を確認した。
【考察】これらの事から、新たに見出した*Ａｎａｅｒｏｃｏｃｃｕｓ*菌は、腋の主要な常在菌であり、腋臭発生の重要な菌種と考えられた。本菌種に対して、デオドラント剤に含有される既存の殺菌成分では殺菌効果が低く、腋臭が充分に抑制出来ない課題の理由と考えられた。

axillary odour, *Anaerococcus*, skin microbiota

講演番号：3B21p17
講演日時、会場：3 月 26 日 17:12～ B 校舎 21 会場

新規腋臭抑制剤ペンタガロイルグルコースの発見と皮膚細菌叢への影響

Discovery of new axillary odorous inhibitor, Pentagalloylglucose and effects on skin microbiota

○藤井 孝吉[1]、篠崎 純子[1]、久永 真央[2]、梶浦 貴之[1]、岩崎 敬治[1]、津田 孝雄[2]、不藤 亮介[1]([1]味の素（株）イノベーション研、[2]（有） ピコデバイス)
○Takayoshi Fujii[1], Junko Shinozaki[1], Mahoro Hisanaga[2], Takayuki Kajiura[1], Keiji Iwasaki[1], Takao Tsuda[2], Ryosuke Fudo[1] ([1]Institute for Innovation, Ajinomoto Co., Inc., [2]Pico-Device Co., Ltd.)

【目的】近年、清潔志向の高まりから体臭への関心が大きくなっている。特に腋臭は、性別を問わず最も気になる体臭の１つである。皮膚上には皮膚細菌叢が形成されており、この細菌叢の一部によって、皮膚上に分泌された無臭の前駆物質から腋臭成分へ変換されている。よって、腋臭を抑制するためには、これら腋臭菌をイソプロピルメチルフェノール（ＩＰＭＰ）などの抗菌剤で殺菌することが有効である。しかし、ＩＰＭＰなどの抗菌剤は、腋臭菌以外の皮膚にとって有益な細菌も殺菌させてしまうため、肌荒れやリバウンドなどの問題点が指摘されている。加えて、我々は既存の抗菌剤が効きにくい新規腋臭菌である*Ａｎａｅｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ.* の存在も明らかにしている。そこで我々は、新規腋臭菌に対して強い抗菌性を持つ素材の探索と評価を目的とした。
【方法及び結果】新規腋臭菌に強い抗菌性を持つ素材を取得するために、約５００種類の植物抽出液を用いた抗菌アッセイを行った。その結果、ポリフェノールの一種であるペンタガロイルグルコース（ＰＧＧ）を見出した。ＰＧＧは、ＩＰＭＰなどの抗菌剤と比較して*Ａｎａｅｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ.* に対して高い抗菌性を示していた。次に、ＰＧＧのｉｎ　ｖｉｖｏにおける効果を評価するため、ヒト塗布試験を行った。試験は、１週間のデオドラント剤制限期間の後、ＰＧＧを含む溶液を利き手の腋部位に、ＰＧＧを含まない同一組成の溶液を反対の腋部位に１日１回、入浴後に１ｍｌの塗布を２週間行った。着用下着を用いた官能ＶＡＳ評価、及びＧＣ－ＭＳによる腋ガス中の腋臭成分の定量で体臭に関する評価を行い、Ｔｅｒｍｉｎａｌ　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｌｅｎｇｈｔ　Ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍ（Ｔ－ＲＦＬＰ）と腋臭菌などを標的とした定量ＰＣＲによる菌数測定で皮膚細菌叢への影響を評価した。腋臭成分の定量では、ＰＧＧ塗布により腋臭成分の減少を示した被験者が多く観察されたものの、ＰＧＧを含まない溶液との有意な差は得られなかった。しかし、官能評価ではＰＧＧ塗布により明確にシャツ腋部位の臭いの減少が確認された。一方、ＰＧＧ含有と非含有間でのＴ－ＲＦＬＰによる細菌叢への明確な影響は見られなかったが、菌数測定により腋臭菌がＰＧＧ塗布により有意に減少していた。以上の結果から、ＰＧＧは既存素材にはない、皮膚細菌叢に大きな影響を与えず、腋臭菌のみを抑制できることが示唆された。

axillary odour, skin microbiota, Pentagalloylglucose

講演番号：3B21p18
講演日時、会場：3 月 26 日 17:24～ B 校舎 21 会場

黄色ブドウ球菌の 2 成分性膜孔形成血球崩壊毒素 S 型成分の細胞特異性に関与する領域の解析
Analysis of regions involving hemolysis in S-components of Staphylococcal bi-component toxins

○竹下 珠由[1]、田中 良和[2]、神尾 好是[3]、金子 淳[1] ([1]東北大院農、[2]北大院先端生命科学、[3]東北大院生命科学)
○MIYU TAKESHITA[1], Yoshikazu Tanaka[2], Yoshiyuki Kamio[3], Jun Kaneko[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Hokkaido Univ., [3]Tohoku Univ.)

【背景・目的】黄色ブドウ球菌の二成分性膜孔形成毒素群は、F 型成分および S 型成分という二成分の存在下でのみ血球崩壊活性を示す。F 型成分である LukF はγ-ヘモリジン(Hlg)とロイコシジン（Luk）の共通成分であり、その赤血球結合にはホスファチジルコリン(PC)結合ドメインと血球に接する rim ドメインのループ上の Y72 が重要である。一方、血球特異性を規定している S 型成分である Hlg2 と LukS は共に PC 結合ドメインを欠き、血球認識・結合に関わる領域は不明であった。昨年、我々は Hlg の 8 量体膜孔構造を二成分性毒素の膜孔構造として世界で初めて明らかにした[1)]。その結果､既知の各種 S 型成分のリムドメインの 1 次構造が大きく異なる領域が､標的細胞に接する rim ドメインのループ領域に該当することが明らかになった。そこで、我々は Hlg2 とヒト白血球特異的な Panton-Valentine leukocidin (PVL)の S 型成分 LukS-PV の rim ドメインのアミノ酸残基/配列を部分的に入れ替えた変異毒素の作成し、標的細胞認識と溶血活性発現に必要な毒素成分上の最小領域の同定を試みた。

【方法・結果】　ヒト赤血球に活性を示すγヘモリジン(Hlg)と Hlg2 とヒト白血球特異的な Panton-Valentine leukocidin の LukS-PV のリムドメインに存在する 3 箇所のループ領域のアミノ酸配列を部分的に入れ替えた変異毒素を作成し、LukF と共にヒト赤血球に対する溶血活性と赤血球への結合を調べた。コントロールの Hlg は 10 pmol/10^8 cells の濃度で 37℃、10 分の反応で完全溶血したが、Hlg2 の各ループを LukS-PV 型に置き換えた変異体の溶血活性は、ループ 1 の変異体 Hlg2-$N^{64}TDH^{67}$、ループ 2 の変異体 Hlg2-N167L では Hlg2 の 60%程度に低下し、ループ 4 の変異体 Hlg2-$Y^{240}GNSY^{244}$ は溶血活性を失った。Hlg2 変異体の赤血球への結合量はほぼ活性に応じて減少した。一方 LukS-PV の 3 箇所の相当部位を逆に Hlg2 型に置換した変異毒素について解析した。LukS-PV と LukF の組み合わせでは、Hlg の 100 倍（1000 pmol/10^8 cells）濃度で 37℃、180 分作用させても溶血しないが、ループ 1 では 50%程度、ループ 2 およびループ 4 では 20%程度の溶血活性が観察され、これらは変異 LukS-PV の赤血球への結合能と相関していた。また LukS-PV のループ 4 にあるロイコシジン活性に必須なリン酸化部位(RRTT)の除去は、LukS-PV 変異体の赤血球崩壊活性により有効であった。

１）PNAS 108:17314-17319 (2011).

staphylococcal γ-hemolysin, PVL

講演番号：3B21p19
講演日時、会場：3 月 26 日 17:36～ B 校舎 21 会場

ノロウイルス様中空粒子の腸上皮細胞株 Caco-2 への結合に関与するタンパク質のプロテオミクス解析

Proteomics analysis for screening of candidate receptor involved in binding of norovirus VLP to Caco-2 cells

○村上 耕介[1]、岡 智一郎[1]、下池 貴志[1]、藤井 克樹[1]、朴 英斌[1]、戸高 玲子[1]、脇田 隆字[1]、松田 幹[2]、片山 和彦[1]([1]感染研ウイルス２、[2]名大院生命農)
○Kosuke MURAKAMI[1], Tomoichiro OKA[1], Takashi SHIMOIKE[1], Yoshiki FUJII[1], YoungBin PARK[1], Reiko TODAKA[1], Takaji WAKITA[1], Tsukasa MATSUDA[2], Kazuhiko KATAYAMA[1] ([1]Natl. Inst. of Infect. Dis., [2]Nagoya Univ.)

【背景と目的】ヒトに感染するノロウイルス（HuNoV）は、冬季に流行する感染性胃腸炎や非細菌性食中毒の主要原因である。HuNoV は感染力が強く、しばしば数百人規模の集団食中毒事例を引き起こすため、食品衛生上重要なウイルスである。*In vitro* 実験において、HuNoV のウイルス様中空粒子（VLP）が組織血液型抗原（HBGA）と特異的に結合することから、HuNoV は細胞へ感染する際に HBGA を利用すると考えられている。しかし、HuNoV は培養細胞で効率良く増殖させることができないため、細胞への結合から脱殻に至るまでのメカニズムは不明である。これまでに我々は、VLP は腸上皮細胞株 Caco-2 のいくつかの細胞集団に特異的に結合することを免疫蛍光染色法により明らかにした。さらに、VLP が HBGA を発現していない細胞にも結合すること、また、分化培養した Caco-2 では VLP 結合細胞の割合が増加することを報告した。本研究では、細胞分化に伴い発現量の増加するタンパク質が VLP の結合に関与するとの仮説を元に、プロテオミクスによりこのタンパク質のスクリーニングを行った。また、ウイルス結合タンパク質の探索法として用いられる VOBPA（virus overlay binding protein assay, *J Virol*, 2000）を利用したプロテオミクスも実施し、VLP に結合するタンパク質候補の絞り込みを行った。
【材料と方法】Caco-2 細胞をカバースリップ上で 3 日間培養したものを未分化 Caco-2、セルカルチャーインサート上で 21 日間培養したものを分化 Caco-2 として実験に供した。各細胞から膜画分を分離した後、二次元電気泳動によりタンパク質を展開した。各泳動図を比較し、分化 Caco-2 での発現量が未分化 Caco-2 に比べて 3.5 倍以上多いスポットを、LC-MS または MALDI-TOF-MS で解析した。VOBPA には Ueno 7k 株（GII.6）VLP を使用した。VLP が結合したバンドに相当する部分を、別途泳動したゲルから切り出し、LC-MS または MALDI-TOF-MS で解析した。
【結果と考察】未分化および分化 Caco-2 の膜画分の二次元電気泳動図を比較し、3.5 倍以上の差がある 15 個のスポットを解析した結果、FABP、KRT8 などが同定された。また、VOBPA を実施したところ、40 kDa、50 kDa、100 kDa および超高分子量の位置のバンドに NoV VLP が検出された。これらのバンドに相当する箇所から、プロテオミクスにより、それぞれ 9-17 個のタンパク質が同定された。これら 2 つの解析に共通する幾つかのタンパク質が同定された。今後は、これらのタンパク質を中心にして、VLP の細胞への結合に関与するタンパク質の解析を進めていく予定である。

Norovirus, Virus-like particle, Caco-2

講演番号：3B21p20
講演日時、会場：3 月 26 日 17:48～ B 校舎 21 会場

Bacillus thuringiensis が産生するがん細胞傷害性タンパク質の担癌マウスに対する抗腫瘍効果
Antitumor effects of parasporin-4 produced by *Bacillus thuringiensis* A1470 against KMGC cells in tumor-bearing mice

○奥村 史朗[1]、古賀 浩徳[2]、井上 國世[3]、水城 英一[1] ([1]福岡県工技セ、[2]久留米大医・内科学、[3]京大院農・食品生物)
○Shiro OKUMURA[1], Hironori KOGA[2], Kuniyo INOUYE[3], Eiichi MIZUKI[1] ([1]Fukuoka ITC, [2]Kurume Univ., [3]Kyoto Univ.)

【目的】*Bacillus thuringiensis* A1470 株が産生するパラスポリン 4（PS4）はヒト培養がん細胞に対して特異的に細胞傷害活性を示すタンパク質で CACO-2、Sawano、MOLT-4 などのヒト培養がん細胞に対して細胞傷害活性を示す一方で、ヒト正常 T 細胞には活性を示さない[1)]。PS4 は 31kDa の前駆体が組換え体大腸菌により封入体として産生され、この前駆体封入体を 10 mM の塩酸により可溶化し、ペプシンによりプロセッシングを行うことで、27kDa の活性体となり、はじめて細胞傷害活性が発現する。*B. thuringiensis* が産生する殺虫活性を持つタンパク質は、ほとんどの場合酸性の溶液中で凝集して失活するが、PS4 は酸性でも安定してその細胞傷害活性が維持される[2)] ことから、PS4 を哺乳動物に経口投与すると、その消化器内で可溶化・活性化されることが予想される。今回は PS4 のマウスに対する急性毒性を測定し、PS4 投与時のマウス死亡の原因について検討を行った。また、ヌードマウスにヒト肝内胆管がん細胞由来の KMGC 細胞を担がんし、PS4 を投与してがん縮小試験を行った。

【方法および結果】活性化した PS4 を ICR マウスの腹腔内へ投与し、48 時間以内での死亡による LD_{50} を計算したところ、290 μg/kg であった。PS4 活性体を腹腔内投与されたマウスについては、通常より色の薄い尿を多量に排出したことから、PS4 投与後に尿及び血液を経時的に採取し、腎機能の指標であるクレアチニンおよび尿素窒素濃度と Na^+、K^+、$NH4^+$、Ca^{2+}、Mg^{2+} イオン濃度を測定したところ、尿中のナトリウム以外の陽イオン濃度の低下が見られた。クレアチニンおよび尿素窒素濃度については、投与直後から尿中にはほとんど排出されなくなり、血清中の濃度が次第に増加したことから、なんらかの腎障害が発生し、マウスが死に至ったものと推察された。ヌードマウスに KMGC 細胞を担がんし、腫瘍部分に 2 μg/150 μL の PS4 を注射し、経時的に腫瘍体積を測定した。担がんはマウスの左右の側面に行い、腫瘍が 150 mm^3 程度になってから、同じマウスの右側面には PS4 を、左側面にはコントロールとして BSA を注射し、腫瘍体積を比較したところ、BSA を投与した腫瘍は 25 日後に 300mm^3 まで体積が増加したが、PS4 投与の腫瘍の体積はほとんど変化しなかった。

1) Shiro Okumura *et al.*, *J Agric Food Chem*, **53**(16), 6313-8 (2005)
2) Shiro Okumura *et al.*, *Protein Expr Purif,* **47**(1), 144-51 (2006)

parasporin, Bacillus thuringiensis, KMGC cell

講演番号：3B22a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ B 校舎 22 会場

泡盛の伝統的熟成法「仕次ぎ」による泡盛品質への影響の解析
Analysis of quality *Awamori* by "Shitsugi" traditional maturing method
○塚原 正俊[1,2]、冨木 崇史[1]、當間 士紋[1]、伊波 朋哉[1]、鼠尾 まい子[1] ([1]（株）バイオジェット、[2]沖縄県酒造組合仕次ぎ検討委員会)
○Masatoshi TSUKAHARA[1,2], Takashi TOMIKI[1], Simon TOMA[1], Tomoya IHA[1], Maiko NEZUO[1] ([1]Biojet Ltd., [2]Brewing Association Okinawa - board of Shitsugi)

沖縄は 600 年以上の歴史を有する沖縄県の伝統的蒸留酒である。泡盛は、酒類の中でも熟成により香味豊かな「古酒（クース)」が生成されることが大きな特徴である。古酒は、芳醇でまろやかな味と香りを有し、極めて付加価値の高い泡盛として評価されている。一方、泡盛の伝統的熟成法として「仕次ぎ」という技法がある。仕次ぎは、異なる熟成期間の泡盛を保持し一定期間ごとに一部を連続的に継ぎ足す、という泡盛特有な熟成方法で、古酒の風味維持および付加価値上昇に大きく寄与すると言われている。この仕次ぎによる熟成方法が伝えられているのは、世界中でも泡盛とシェリー酒のみである。このように、泡盛の文化的及び商品的な価値における仕次ぎの重要性は認識されているものの、これまで仕次ぎに関する科学的評価はほとんどなされていない。本研究においては、仕次ぎの有無による泡盛の風味の差異を科学的に評価することで、新たに仕次ぎの付加価値を見出すと共に、仕次ぎに適した条件を明らかにすることで泡盛振興につなげることを目的とした。

我々は、これまでに、古酒香成分の一つであるバニリンの前駆物質 4-ビニルグアヤコール（4-VG）について、4-VG からバニリンへの仕次の影響を評価し、一定量の仕次ぎがバニリン濃度の上昇に寄与することを示した。今回、この要因を詳細に解析することで、4-VG からバニリンへの変換に初発 4-VG 濃度が影響していることが明らかとなった。さらに仕次ぎによりバニリン濃度を高めるための効果的な条件に関する成果が得られた。また、バニリン以外の成分について詳細に分析することで、「仕次ぎ」の泡盛酒質への効果について網羅的な解析を行った。その結果、いくつかの成分の濃度が仕次ぎの有無で影響を受けることが分かった。

以上の結果から 4-VG/バニリンへの変換をはじめ、複数の成分にを指標として、泡盛における伝統的熟成技術である「仕次ぎ」が泡盛古酒香に影響をあたえることを示すことができた。

沖縄県酒造組合では 2013 年 3 月（予定）に「琉球泡盛　古酒の郷」が開所する。本施設では、各酒造所が醸造した泡盛を厳選し共同で大量に長期間熟成することを主な目的としている。今後、泡盛の熟成や仕次ぎに対する科学的解明を進めることで、泡盛文化や醸造技術、新たな付加価値につながる情報を得て、当該施設を含め短期間での産業応用を目指す。

vanillin, flavor, Okinawa

講演番号：3B22a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ B 校舎 22 会場

α-エチル-D-グルコシド高含有焼酎仕込法の開発

Development of high producing ethyl α-D-glucoside on shochu brewing method.

○宮西 史則、関澤 今日子、浜中 大夢、尾関 健二、大箸 信一（金沢工大・ゲノム研）
○Fuminori MIYANISHI, Kyouko SEKIZAWA, Hiromu HAMANAKA, Kenji OZEKI, Shinichi OHASHI (KIT)

【目的】

清酒成分であるα-エチル-D-グルコシド（αEG）は、清酒製造時に蒸米のデンプン質の分解からのマルトース以上のデキストリンと酵母発酵でのエタノールを基質として、麹中のα-グルコシダーゼにより生産される配糖体で、清酒中には 0.2～0.7%程度含有されている。また 1%αEG を含有する清酒を 270ml 摂取した時、ヒトで飲用保湿効果があることが証明されている。

我々はこれまでに、清酒仕込でαEG 含量が 3%を超える配合は、麹のα-アミラーゼおよびα-グルコシダーゼと酵母がアルコール発酵できるグルコース供給のための最低限のグルコアミラーゼのバランスが重要であること。またαEG 濃度 2.5%の清酒を用いて、ヒト肌試験で 2 時間後の水分保持量にαEG と発酵物の相乗効果による有意差があることを確認した。今回αEG と発酵物が濃縮された保湿効果がより期待できる焼酎仕込の発酵（蒸留）残渣を取得するために、αEG 高含有の最適な焼酎仕込および発酵残渣へのαEG の移行および焼酎の官能評価の検討を行った。

官能評価で差が無い米および麦焼酎が開発できれば、発酵残渣に保湿効果が付与でき、廃棄物からドリンク剤およびサプリメントなど新たな商品開発の展開が期待できる。

【方法および結果】

清酒仕込でαEG を高含有させるためには、麹の量を減らし、その分のα-アミラーゼおよびα-グルコシダーゼ（共存するグルコアミラーゼにより増やし過ぎるとαEG の生産が低下する）を補強し、アルコール発酵力が旺盛な焼酎酵母を用いることが重要であることが分かっている。米および麦焼酎仕込の配合では、清酒仕込を参考に麹の量を減らし、その分α-アミラーゼおよびα-グルコシダーゼを補強する時期は二次仕込時が最適であることが分かった。更には 2 次仕込以降の温度を 20℃と通常の仕込み温度よりやや低温での発酵が、αEG 高生産に有効であることが分かった。蒸留した発酵残渣には醪で製造したαEG が濃縮されることが明らかとなり、清酒発酵物と同様なαEG と発酵物との相乗効果による保湿効果が期待できる。

また通常の米および麦焼酎仕込とαEG 高含有の各焼酎仕込により取得できる焼酎の官能評価についても報告する。

ethyl α-D-glucoside, shochu, shochu distillery wastewater

講演番号：3B22a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ B 校舎 22 会場

清酒及びみりんのフェルラ酸エチルの生成について

Formation of ethyl ferulate in sake and mirin

○橋爪 克己、伊藤 俊彦、石塚 隆弘、武田 尚基（秋田県大・生物資源）
○Katsumi Hashidume,Toshihiko Ito,Takahiro Ishizuka,Naoki Takeda (Akitaken Univ.)

【目的】清酒の疎水性呈味成分として見出されたフェルラ酸エチルは、甘味を伴った温和な苦味、渋味を持つ。フェルラ酸エチルはこれまでみりんの特徴的な香味成分とされてきたが、最近、みりんよりも高いレベルのフェルラ酸エチルを含む市販清酒が存在し、その中には活性炭素未処理清酒が含まれた。このような清酒ではフェルラ酸エチルのレベルは閾値を超えており、官能的品質への関与が推定された。また、フェルラ酸エチルは共存するフェルラ酸の持つ苦味、渋味を緩和する効果を示した。清酒やみりんのフェルラ酸エチルは、その中に存在しているフェルラ酸とエチルアルコールが化学反応を起こして生成すると考えられているが、その詳細は明らかではない。そこで、清酒とみりんのフェルラ酸エチルの生成機構について検討した。
【方法及び結果】（１）フェルラ酸及びフェルラ酸エチルを含まない市販清酒に両成分を添加し、121℃、60 分間加熱処理して化学反応の寄与を調べた。フェルラ酸を添加した場合には添加量の約 1/1000 量のフェルラ酸エチルが生成し、フェルラ酸エチルを添加した場合には添加量の約 8%に相当するフェルラ酸が生成した。これらの結果から、清酒及びみりん中でフェルラ酸とエチルアルコールからフェルラ酸エチルが化学反応により生成することはほとんどないことが推定された。（２）4mM のフェルラ酸又はフェルラ酸エチルと 9.5%エチルアルコールが共存する溶液中（pH5.0）で、麹エキスで静置培養したきょうかい酵母の生菌体又は清酒用米麹を添加して 30℃で 4 時間反応し、フェルラ酸エチルの生成、分解の有無を調べた。その結果、検討した清酒酵母 10 株は全て両成分に対して作用しなかった。一方、米麹にはフェルラ酸エチルの生成及び分解活性が見出された。米麹のフェルラ酸エチル生成と分解を比較すると分解活性が約 25 倍大きかった。麹が示したフェルラ酸エチルの生成、分解活性は、既に報告されている麹菌が生産するフェルラ酸エステラーゼによるものと推定された。（３）米麹の抽出濃縮物（酵素）を陰イオン交換 HPLC にかけて活性の溶出を調べたところ、フェルラ酸エチルの生成活性と分解活性は同一フラクションに見られた。（４）米麹抽出酵素の基質特異性、基質濃度依存性、pH 依存性などの性質を調べるとともに、清酒やみりんを想定したエチルアルコール存在条件下で米麹による蒸米の消化試験を行い、フェルラ酸とフェルラ酸エチルの生成レベルを調べたところ、米麹のフェルラ酸エステラーゼ活性を示す酵素の性質が、清酒及びみりんのフェルラ酸エチルレベルに影響を及ぼしていることが推定された。

ethyl ferulate, sake, mirin

講演番号：3B22a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ B 校舎 22 会場

清酒醸造における放射性セシウムとカリウムの挙動

The transfer of radioactive cesium and potassium from rice to sake

○奥田 将生[1]、橋口 知一[1]、上用 みどり[1]、塚本 香[1]、遠藤 路子[1]、松丸 克己[1]、後藤 奈美[1]、山岡 洋[1]、下飯 仁[1]、鈴木 賢二[2] ([1]酒総研、[2]福島県ハイテクプラザ)
○Masaki OKUDA[1], Tomokazu Hashiguchi[1], Midori Joyo[1], Kaori Tsukamoto[1], Michiko Endo[1], Katsumi Matsumaru[1], Nami Goto-Yamamoto[1], Hiroshi Yamaoka[1], Hitoshi Shimoi[1], Kenji Suzuki[2] ([1]NRIB, [2]Fukushima Technology Centre)

【目的】東北地方太平洋沖地震に伴う福島第一原子力発電所事故により、農産物への放射性セシウム(Cs)の汚染が心配されたが、米を原料とする清酒醸造においても同様であった。我々は、これまでに清酒の製造工程において非放射性セシウム（^{133}Cs）が放射性 Cs と同様な挙動を示すと仮定し、製造工程における ^{133}Cs の挙動を解析した [1)]。その結果、玄米中の ^{133}Cs は精米及び洗米により大部分が除去され清酒にはほとんど残存しなかった。従って、基準値の濃度で放射性 Cs に汚染された玄米で醸造しても、製品中の放射性 Cs 濃度は基準値から大幅に下回ることが推定された。この推定が正しいことを確認するため、今回、放射性 Cs に汚染された玄米を用い放射性 Cs と、Cs と挙動が類似するカリウム（K）について清酒醸造における挙動を解析した。
【材料と方法】材料には平成 23 年福島県産コシヒカリ（^{134}Cs 64.5Bq/kg, ^{137}Cs 86.7Bq/kg）を用いた。精米は 1 俵張り式醸造用小型精米機（チヨダ HS08）で行い、精米歩合別試料と小仕込み試験用試料を調製した。小仕込み試験は、精米歩合 70%白米を用い総米 10kg x 2 系列で次のように行った。原料処理は、洗米 1 分、水切り 30 秒を 2 回繰り返し、2 時間浸漬後一晩水切りした。製麹は恒温恒室器により温度と湿度を制御して行った。酵母は K-701 号、仕込み水は水道水を用い、酒母は中温速醸とした。三段で仕込み、留後もろみ 19 日目に小型圧搾装置で上槽した。醸造工程の各試料について、放射性 Cs（^{134}Cs,^{137}Cs）濃度は Ge 半導体検出器で、K は試料の湿式分解後 ICP-AES で分析した。
【結果】放射性 Cs 濃度は、精米により玄米から精米歩合 70%まで低下し、精米歩合 70%で玄米濃度に対して約 20%となり、以後精米を進めてもほとんど変化しなかった。小仕込み試験により醸造工程の放射性 Cs の挙動を解析した。各工程における放射性 Cs 濃度（^{134}Cs+^{137}Cs）は、玄米の 151Bq/kg から精米・洗米により減少し、最終的に製成酒で 6.7Bq/kg、酒粕で 33Bq/kg まで低下した。玄米中の放射性 Cs の移行割合は玄米から製成酒に 6%、酒粕に 4%で、残りの 90%が精米、洗米・浸漬工程で除去された。この結果は、前回の非放射性 Cs の結果 [1)]と概ね一致した。一方、K は、精米、洗米・浸漬工程までは Cs と同様な挙動を示したが、醗酵後の酒・酒粕への移行割合は酒粕の方が高く Cs の挙動とは異なった。酒粕への移行割合が Cs と K で異なる理由は、酵母による Cs の取込みが K より少ないためと考えられた。以上、平成 24 年 4 月以降の基準値 100Bq/kg の濃度で汚染された玄米を清酒製造に使用しても、精米、洗米工程により除去され清酒にはほとんど移行しないことが確認された。

1) Okuda *et al*., *J.B.B.*114,6,600-605 (2012)

cesium, potassium, sake brewing

講演番号：3B22a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ B 校舎 22 会場

清酒老香の主成分 Dimethyl trisulfide の生成に影響を与える製造条件の統計解析

Statistic analysis of *Sake*-brewing condition to affect the production of dimethyl trisulfide

○佐々木 慧[1,2]、藤井 力[1,2]、西堀 奈穂子[2]、金井 宗良[2]、磯谷 敦子[2]、山田 修[2]、後藤 奈美[1,2] ([1]広大院・生物圏、[2]酒総研)
○Kei SASAKI[1,2], Tsutomu FUJII[1,2], Nahoko NISHIBORI[2], Muneyoshi KANAI[2], Atsuko ISOGAI[2], Osamu YAMADA[2], Nami GOTOU[1,2] ([1]Grad. Sch. Biosph.Sci. Hiroshima Univ, [2]NRIB)

【目的】
清酒では貯蔵の過程で Dimethyl trisulfide (DMTS)を主成分とする劣化臭(老香)が生じることが知られている。しかしながら清酒における DMTS の生成機構には未だ不明な点が多い。そこで、DMTS の生成に影響を与える製造条件の抽出を目的に統計解析を行った。
【方法・結果】
清酒製造場の協力のもと、上槽直後の清酒及び製造条件等を収集した。提供された清酒について 70℃で 1 週間の貯蔵（劣化処理）後に生じる DMTS 濃度（DMTS 生成ポテンシャル）を GC/MS にて測定した。提供された清酒のうち製造条件などの情報量が十分な 80 点を用い DMTS 生成ポテンシャルを目的変数とした統計解析を行った。提供された製造条件、及び測定項目のうち、文字で表される定性データにはマン・ホイットニーの U 検定を、数字で表される定量データに対してはケンドール法を用いた。定性データでは「使用酵母の系統」や「アルコール添加の有無」などのカテゴリーが抽出された。定量データでは DMTS 生成ポテンシャルと有意な相関のある項目として 260 nm の吸光度､劣化処理後の 260 nm の吸光度、S 濃度、Mg 濃度、アミノ酸度、もろみ期間中の品温の合計値（積算温度）等が抽出された。ただしこれらの項目は相互に有意な相関があるものが多く、直接関与していない項目が含まれている可能性がある。直接 DMTS 生成ポテンシャル増大に関与している真の要因の抽出のため、現在これらの説明変数の絞込み及びステップワイズ法による重回帰分析や、抽出された項目について実際に添加試験を行うなど、実証試験による確認を行っている。

Sake-brewing, dimethyl trisulfide, statistic analysis

講演番号：3B22a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ B 校舎 22 会場

清酒の低分子オリゴペプチドの網羅的解析

Comprehensive analysis of low-molecular oligopeptides (dipeptides) in Japanese sake

○高橋 圭[1]、徳岡 昌文[2]、河野 弘美[1]、澤村 宣子[1]、妙見 夕佳[1]、岩下 和裕[1] ([1]酒総研、[2]東農大)
○kei takahashi[1], masafumi tokuoka[2], hiromi kohno[1], nobuko sawamura[1], yuka myoken[1], kazuhiro iwashita[1] ([1]NRIB, [2]Tokyo Univ. of Agric.)

【背景および目的】

醸造酒や発酵食品はジペプチドを中心に様々な低分子オリゴペプチドを含んでおり、呈味や生理機能に影響を与えると考えられている。しかし、醸造酒や発酵食品のジペプチドの網羅的解析法は未だ確立していない。そこで、ジペプチドの定性（プロファイリング）・定量方法を開発し、醸造酒のジペプチドの情報を収集することを目的とした。

【方法】

ジペプチド標準品および醸造酒中に含まれるアミノ基／イミノ基を持つ化合物を、市販誘導体化試薬である 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC)を用いて誘導体化した。誘導体化ジペプチドを２本の ODS 系カラムを用いた UHPLC により高度に分離した。ジペプチドのプロファイリングと定量は三連四重極質量分析計(MS/MS)を用いて行なった。ジペプチドの構造推定には Q-TOFMS を用いた。清酒中から見出されたジペプチドについて米タンパク質との関連性を解析した。

【結果】

UHPLC を用いたジペプチド高分離に続く、プレカーサーイオンスキャン法による解析の結果、ジペプチドの種類と量は、清酒・ビール・赤ワインにおいて著しく異なっていることが分かり、中でも清酒には多くの種類のジペプチドが存在していることが明らかとなった。AQC に相当する分子イオンをモニターする多重反応モニタリング(MRM)法を用いたジペプチド定量解析の結果、32 種類のジペプチドについて清酒には約 1-100 μM の濃度で含まれていることが分かった。さらに、UHPLC-Q-TOFMS による精密質量を元にした構造推定の結果、清酒には 40 種類以上のジペプチドの存在が確認された。UHPLC-MS/MS と UHPLC-Q-TOFMS の解析を併せると清酒中から 60 以上のジペプチドを発見することができた。 これらのジペプチドは米のグルテリンタンパク質の分解に由来していることが示唆された。

oligopeptide, Japanese sake, dipeptide

講演番号：3B22a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ B 校舎 22 会場

「LC-Q/TOF MS による醸造酒の分析法の開発とメタボローム解析」
Metabolome analysis of brewed beverage using LC-QTOF MS
○森 雄太郎[1,2]、豊浦 利枝子[2]、徳岡 昌文[3]、岩下 和裕[1,2]([1]広島大院・先端研、[2]酒総研、[3]東農大)
○ Mori YUTARO[1,2], Toyoura RIEKO[2], Tokuoka MASAHUMI[3], Iwasita KAZUHIRO[1,2]
([1]AdSM,Hiroshima Univ, [2]NRIB, [3]Tokyo University of Agriculture)

【背景】清酒をはじめとする醸造酒には多くの成分が含まれており、例えば清酒中には約 250 種類の成分が報告されている。これらの成分の分析はこれまでは各成分に合せ様々な分析法を使用する必要があり、多大な時間を要するものであった。近年の精密質量分析の技術の向上により、より短時間に多くの成分を分析出来る可能性が示された。また、これまでに報告の無い成分が見出される可能性を有する。しかし、清酒のメタボロミクス分析法は十分に確立技術されておらず、広範な清酒に関する研究報告はない。そこで本研究では、質量分析（LC-Q/TOFMS）による醸造酒の分析技術の開発を行う事を目的とした。また、開発した方法により広範囲な清酒およびワインの分析および解析を行った。
【方法】これまでに報告されている清酒中の代謝物から、物性等を考慮して 69 成分を選抜し、各清酒中のおおよそ最大量となるように配合したモデル清酒を作製した。続いて、本モデル清酒を用いてカラムや溶出条件等の検討を行う事により分析条件の開発を行うとともに、各標準品単独の分析も行った。さらに、広範なタイプの清酒を用いて本分析法の評価を行った。また、本法を用いて同様に広範なタイプのワインの解析を行った。
【結果】分析に先立って、溶離液については不純物の検討、器具については溶出成分の検討を行った。続いて、モデル清酒を用いてカラム 7 本を含む 25 通りの条件について検討を行い、最終的に Waters 社製の HSS T3ODS カラムを用い、最も分離の良かった条件を決定した。なお、MS 条件は 50 – 1,000 m/z のポジティブモードとした。本方法により標準品単品では 57 成分が検出され、これらを混合したモデル清酒では、50 成分が検出された。

続いて、広範な清酒について分析を行ったところ、各清酒から 1,000-2,000 ピークが得られた。得られたピークリストを元に主成分分析を行ったところ、製法表示基準によりグループ化出来ることが明らかとなった。しかし、特定名称酒においては完全には分離されておらず、検討の余地が残された。しかし、精米歩合でプロットを行った所、第一主成分については、精米歩合との関連が示唆された。同主成分分析のローディングプロット解析により寄与の大きいパラメーターとして、アルギニン、フェニルアラニン等が抽出された。

続いて、原料ぶどう、産地が異なる赤白両ワインについても解析を行った。同様に主成分分析の結果、栽培品種によるグループ化が可能であったが、栽培地域の差は明瞭に検出されなかった。ローディングプロット解析の結果、プロリン、アルギニンといった成分の寄与が比較的大きかった。

Metabolome, Brewing beverage, LC-QTOF MS

講演番号：3B22a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ B 校舎 22 会場

清酒粕保存における機能性成分の安定性についての検討
Stability of bioactive components in sake cake.
○森本 朋子[1]、藤井 力[1]、金井 宗良[1]、濱田 由紀雄[2]、山田 修[1] ([1]酒総研、[2]日本酒造組合中央会)
○ Tomoko MORIMOTO[1], Tsutomu FUJII[1], Muneyoshi KANAI[1], Yukio HAMADA[2], Osamu YAMADA[1] ([1]NRIB, [2]JSS)

【背景・目的】醸造副産物である清酒粕には、原料や醸造微生物由来の機能性成分が多く含まれていることが知られている。その中で本研究室では、酵母の代謝産物であり、特に清酒酵母が高蓄積することが知られている葉酸および S-アデノシルメチオニン(SAM)に注目してきた。これまでに新鮮な清酒粕約 100 点中の葉酸および SAM 含量を調査したところ、両成分とも個々の清酒粕によって含量が幅広く異なるものの、多くの清酒粕で高濃度に機能性成分を含有し、他の食品と比較しても十分に含量が高いことが判明した。一方、流通や保管の間にこれらの成分が分解することも懸念されるため、さまざまな温度条件での安定性についての調査や、安定性を向上させる方法の検討が必要である。そこで、新鮮な清酒粕の保存試験を行い各成分の挙動を調べるとともに、凍結乾燥等による安定性向上方法の検討を行った。
【方法】保存試験は、-30℃、4℃、25℃において新鮮な清酒粕を遮光保存し、6 ヶ月間行った。保存中の清酒粕をサンプリングし、葉酸含量を HPLC、SAM 含量をキャピラリー電気泳動により分析した。機能性成分の安定性向上の検討として、新鮮な清酒粕を凍結乾燥後に粉末化し、同様に-30℃、4℃、25℃において 6 ヶ月間の保存試験を行った。
【結果】生清酒粕を新鮮なうちに-30℃で冷凍保存した場合、6 ヶ月後の残存率は葉酸が約 70%、SAM が約 90%であり、安定に保持されていた。しかし、4℃保存では SAM の残存率は 6 ヶ月後に約 50%と比較的高いものの、葉酸は 3 ヶ月後には約 10%に減少し、25℃保存では葉酸・SAM ともに 1 ヶ月後には 20%以下となった。一方で、凍結乾燥粉末の状態で清酒粕を保存した場合は、特に葉酸の安定性が著しく向上し、6 ヶ月後に-30℃および 4℃保存で 70%以上、25℃保存で 50%以上の葉酸が保持されていた。SAM の安定性については、凍結乾燥粉末保存の場合 6 ヶ月後に 4℃で約 70%、25℃で約 15%の SAM が残存しており、生清酒粕を同条件で保存した場合の 4℃で約 50%、25℃で 0%の残存率と比較すると改善がみられた。清酒粕を凍結乾燥粉末にすることで、冷凍だけでなく、冷蔵や室温での保存においてもこれらの機能性成分、特に葉酸の安定性が向上することが明らかとなった。凍結乾燥粉末化には、安定性が向上することに加え、清酒粕を摂取するときの注意点としてよく挙げられるアルコール分をなくすことができ、子供や妊婦、運転前の人も安心して摂取できるという利点もあると考えられる。現在、凍結乾燥することで葉酸の安定性が向上する機構について検討している。

sake cake, folate, S-adenosylmethionine

講演番号：3B22a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ B 校舎 22 会場

黒麹菌の菌種が泡盛粕成分に及ぼす影響
Effect of black koji molds on the useful component in awamori distillery lees
○渡邉 泰祐[1]、鼠尾 まい子[2]、當間 士紋[2]、冨木 崇史[2]、外山 博英[1]、塚原 正俊[2]([1]琉球大農・亜熱生資、[2]株式会社バイオジェット)
○Taisuke WATANABE[1], Maiko Nezuo[2], Simon Toma[2], Takashi Tomiki[2], Hirohide Toyama[1], Masatoshi Tsukahara[2] ([1]Dept. Biosci. Biotech., Fac. Agr., Univ. the Ryukyus, [2]Biojet Co., Ltd.)

【目的】泡盛粕には有効成分が数多く含まれており、健康食品「琉球もろみ酢」に利用されている。しかし、その成分は泡盛の製造条件により異なり安定しないため、多くが利用されずに廃棄されている。泡盛醸造では、*Aspergillus awamori* と *A. saitoi* の 2 種類の株を混合した“複菌麹”が用いられており、これらの黒麹菌株が泡盛の風味に異なる影響を与えることが報告されている。したがって、単一の菌株を用いた麹（単菌麹）を使用した場合に泡盛粕成分が影響を受ける可能性がある。そこで我々は、各株の単菌麹を使ってアルコール発酵を行い、蒸留後に得られた泡盛粕中の成分に違いがあるかを調べた。
【方法】*A. awamori* または *A. saitoi* 菌株を単独で用いて、38°C、40 時間の条件で製麹を行った。小仕込み試験（100 mL スケール）として、22°C、14 日間のもろみ発酵を行い、蒸留液のアルコール濃度が 50 度となるように蒸留を行った。蒸留後の泡盛粕の液体部分について、HPLC を用いたアミノ酸分析、クエン酸リアーゼを用いたキット法によるクエン酸分析、GC-MS による香気成分分析を行った。
【結果】各単一菌株のみの麹から得られた泡盛粕に含まれるアミノ酸量を調べた結果、チロシンを除く 19 種類のアミノ酸量は、*A. awamori* のみの泡盛粕の方が高い値を示した。特に、アスパラギン酸、トレオニン、バリン、システイン、トリプトファンは、*A. awamori* の方が *A. saitoi* に対して 1.5 倍以上高い値を示した。クエン酸量については *A. saitoi* のみの方が *A. awamori* に対して 1.2 倍高い値を示した。麹中のクエン酸量は、*A. saitoi* のみの方が高くなることが報告されており、泡盛粕でも麹と同様の傾向を示した。また香気成分を比較した結果、全体的に *A. saitoi* のみの方が、香気成分値が高くなる傾向が見られた。*A. awamori* に対して 1.2 倍以上高い値を示した香気成分として、酢酸イソアミル、オクタン酸エチル、フルフラール、オクタン酸イソアミル、コハク酸ジエチル、酢酸デシル、デカン酸イソブチル、酢酸フェネチル、2-フェニルエタノール、パルミチン酸エチルの 10 種が検出された。中でもフルフラールと酢酸デシルは 3.5 倍と非常に高い値を示した。一方、1-オクテン-3-オール、酢酸オクチル、ノナン酸エチル、オクタン酸イソブチルの 4 成分については、*A. saitoi* のみの泡盛粕では *A. awamori* の 0.6 倍以下であった。以上の結果から、黒麹菌株の違いによって泡盛粕成分中に含まれる様々な成分の割合が変化することが明らかとなった。変化が大きい成分については、泡盛粕の品質を安定させる上で重要な指標となり得ると考えられた。

Aspergillus, black koji mold, awamori

講演番号：3B22a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ B 校舎 22 会場

音響製麹米麹の酵素活性に及ぼす周波数と音量の影響
Effect of frequency and volume of sound on the enzyme activities of rice koji during sound koji making.
○今山 聖加、三枝 敬明、寺本 祐司（崇城大院）
○seika IMAYAMA,noriaki SAIGUSA,yuji TERAMOTO (Sojo Univ.)

【目的】本研究室では、音によるストレス応答反応を応用した音響製麹技術の確立と、音響米麹を用いた発酵食品の開発を目的として研究を進めている。これまで、周波数 6.3 kHz の音響下において製麹した米麹は無音下の米麹に比べグルコアミラーゼ活性が低く、さらにこの音響米麹を用いた甘酒中にマルトースが多く含まれることを報告した[1)]。一方、エチルα-D-グルコシド（α-EG）は、清酒モロミにおいて、エタノールをアクセプターとする酵素的糖転移反応によりマルトオリゴ糖やデキストリン成分から生成されることが知られており、この反応を触媒する酵素は、麹菌によって生成される一種のトランスグルコシダーゼであると報告されている[2)]。また、α-EG には製肌作用があり、UV による肌荒れを抑制するとの報告があり、これまで多くの研究が進められている。本研究室では現在、α-EG を多く含んだ美肌効果のある飲料開発を目的として研究を進めている。本報では、その原料となる高マルトース含有甘酒の製造における最適音響条件について検討を行った。

【方法・結果】市販精白米と糖化用種麹 *Aspergillus oryzae*（株式会社　河内源一郎商店）を用いて 30℃で 40 時間製麹した。但し、はじめの 20 時間は無音化で製麹し、その後の 20 時間は、オーディオジェネレーター MINIRATOR MR2（NTi Audio AG）に接続したスピーカー内臓のインキュベータを用い、周波数 6.3 kHz（－40 dBv と－50dBv）の音響下にて製麹した。米麹の酵素活性は、グルコアミラーゼとα-アミラーゼについて分析し、音響製麹 0、14、17、20 時間後に各々測定した。グルコアミラーゼ活性は、音響下・無音下ともに培養時間とともに増加したが、音響製麹以降は無音に比べ－50 dBv と－40 dBv の活性の増加が緩やかになった。また、音響製麹 20 時間においては、－40 dBv と－50 dBv に有意差はなく、音量に影響を受けないことが確認された。α-アミラーゼ活性は、グルコアミラーゼ活性と同様に製麹時間とともに増加したが、音響製麹 20 時間においては、－50 dBv が約 1527 U、無音下が約 1353 U と無音下よりも高くなることが確認された。これらの結果をもとにα-アミラーゼ活性/グルコアミラーゼ活性の酵素比（音響製麹 20 時間）について比較したところ、無音下に比べ－40 dBv、－50 dBv ともに高く、その比は無音下で約 2.8 に対し、各々約 3.6 と約 3.4 であった。以上の結果より、周波数 6.3 kHz の音響製麹は、酵素活性のバランスを制御し、高マルトース含有甘酒の製造に有効である可能性が示唆された。また、音響製麹 20 時間において酵素バランスは音量に関係なく、周波数が重要である可能性が示唆された。

1)山内祥平,三枝敬明,寺本祐司,第 25 回熊本県産学官技術交流会講演論文集，18-19（2011）
2)岡智,岩野君夫,布川弥太郎,日本農芸化学会誌,**50**,463-468（1976）

koji, enzyme, stress

講演番号：3B22a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ B 校舎 22 会場

無通風箱培養における酵素生産と菌体量の相関

Correlation between enzyme production and mycelial content in solid-state fermentation using non-airflow box

○伊藤 一成[1]、五味 勝也[2]、狩山 昌弘[3]、三宅 剛史[1]([1]岡山県工技セ、[2]東北大院農・生物産業創成、[3]フジワラテクノアート)

○Kazunari ITO[1], Katsuya GOMI[2], Masahiro KARIYAMA[3], Tsuyoshi MIYAKE[1] ([1]Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, [2]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [3]Fujiwara Techno-Art)

【目的】 糸状菌の固体培養における問題点として、基質全体を均一に培養できず再現性が低下することや、培養中に培養条件を制御することが難しいことが挙げられる。これらの問題を解決するために我々は無通風箱培養法を以前に考案した。この方法で培養すると、均一な培養経過と酵素生産が可能で、それに伴い再現性も向上させることができた。また、基質当たりの酵素生産量も増加させることができた。この無通風箱培養法のさらなる有効性を探るため、従来法と同様の品温経過をたどり、全体的に酵素生産性が高い培養条件において培養を行い詳細に比較した。その結果、従来法よりも酵素生産速度が早いことが分かった。この現象は菌体量増殖に起因していることが示唆された。本発表では、酵素生産速度と菌体量増殖の関係について詳しく述べる。

【方法】 従来の固体培養法として蓋付き金属製トレイ、我々が考案した方法として ePTFE (expanded polytetrafluoroethylene) 膜を装着した木製の無通風箱を使用した。基質の初期水分量 100 wt%、25℃、相対湿度 95%で 4 日間に設定し、酵素活性や菌体量、水分活性などを経時的に調べた。

【結果】 無通風箱培養では、18-24 h の培養で出麹重量と水分量が急激に減少した。菌体量増殖経過や品温経過からこの時間帯は、菌体が活発に増殖している対数増殖期であり、無通風箱内から発酵熱により生じる潜熱を持った水蒸気が活発に箱外へ放出されているため、急激な水分の減少が起こったと考えられる。そしてこの水分の放出により、この時の基質の水分活性が菌体増殖に適した値となり、従来法より菌体の増殖速度が急激に早まることが示唆された。これにより酵素生産が早くなったと考えている。

solid-state fermentation, non-airflow box culture, enzyme production

講演番号：3B22a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ B 校舎 22 会場

米麹の酵素生産における蛋白質成分添加の影響

Effects of addition of protein components in the enzyme production of rice koji

○兼時 健人、前橋 健二、柏木 豊（東農大院農）
○Takehito KANETOKI,Kenji MAEHASHI,Yutaka KASHIWAGI (Tokyo University of Agriculture)

［目的］ 米麹は日本の醸造発酵食品の製造に不可欠の原料であり，米味噌の発酵・熟成においては，米麹の酵素活性によって大豆の蛋白質や脂肪，米の澱粉等の原料成分を分解する度合いが異なり，異なる味の味噌が出来上がる。主に味噌用米麹はアミラーゼやプロテアーゼを多く生産し，味噌製造において重要な役割を担っている。実用の米麹においては酵素活性が高いことが望まれている。そこで本研究では米麹に様々な栄養成分を添加することにより，酵素活性を上昇させることを目的とした。
［方法］ 米麹は 1 日浸漬した米を蒸煮し市販味噌用種麹の *Aspergillus oryzae* を接種し,3 日間,25℃の保温庫で製麹した。無添加米麹，1.25～30 %大豆粉(きなこ)，1.8～10.8 %Bacto-Soytone，1.25～5 %ポリペプトン，0.05～1 %無機塩類等の栄養成分を添加した米麹を製麹した。3 日後に出麹した米麹の酵素活性(α-アミラーゼ，グルコアミラーゼ，α-グルコシダーゼ，酸性カルボキシペプチダーゼ (ACP)，中性・酸性プロテアーゼ，及びリパーゼ)については市販酵素力価測定キットを用いて測定した。以上の酵素について米麹 1 g 当たりの酵素活性(Unit)，及び麹菌菌体 1 mg 当たりの酵素活性を算出した。麹菌菌体量は Yatalase(Takara Bio)を用いる方法で測定した。
［結果］ 米麹 1 g 当たりの酵素活性は，大豆粉や Bacto-Soytone，ポリペプトン等の蛋白質成分を添加した場合に高く検出された。無添加米麹と比較して大豆粉添加米麹はα-アミラーゼが 2～3 倍，ACP は約 6 倍，プロテアーゼは約 3 倍の活性が得られた。この結果は，大豆粉を米麹に添加すると酵素生産が誘導されるとともに，菌体量の増加によって酵素活性が高くなると考えられた。

次に麹菌菌体 1 mg 当たりの酵素活性を比較すると，無添加米麹と比較して大豆粉添加米麹はα-アミラーゼが 1.2～1.4 倍，ACP は 3～4 倍，中性・酸性プロテアーゼは約 1.7 倍の活性が得られた。この結果より，α-アミラーゼに比べて ACP とプロテアーゼ活性はより強く誘導されると考えられる。

Bacto-Soytone やポリペプトンは酵素生産性を上昇させるが，大豆粉に比較すると ACP の上昇が低かった。

以上のことから大豆粉の添加によって全体的な酵素活性の上昇が得られることが判明した。今後は酵素生産の発現の要因を解明することが必要である。

Aspergillus oryzae, koji, enzyme production

講演番号：3B22a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ B 校舎 22 会場

宮古島産酵母 MY17 株を用いた宮古島産糖蜜における発酵抑制要因の解析

Study on the suppression factors in alcohol fermentation of Miyakojima molasses by *Saccharomyces cerevisiae* MY17.

○中村 薫[1,2]、藤井 力[1,2]、京極 理人[1,2]、吉田 聡子[1,2]、川本 佑太[1,2]、寺本 拓生[1,2]、奥島 憲二[3]、山田 修[2] ([1]広大院・生物圏、[2]酒総研、[3]りゅうせき)
○Kaoru NAKAMURA[1,2], Tsutomu FUJII[1,2], Masato KYOGOKU[1,2], Satoko YOSHIDA[1,2], Yuta KAWAMOTO[1,2], Takumi TERAMOTO[1,2], Kenji OKUSHIMA[3], Osamu YAMADA[2] ([1]Grad. Sch. Biosph. Sci. Hiroshima Univ., [2]Natl. Res. Inst. Brewing, [3]RYUSEKI CORP)

【背景・目的】宮古島では地産地消型で持続可能な社会循環型システムを構築するプロジェクトの一環として宮古島産糖蜜を利用したバイオエタノール生産が行われて来た。宮古島産糖蜜は海外の糖蜜に比べ塩濃度が高く，ポリフェノール類を多く含み発酵が難しかった。そこで我々は，亜熱帯気候の宮古島自然環境から優良な発酵性能を示す酵母をスクリーニングし, バガスから MY17 株を単離した。MY17 株は 38℃という高温での発酵に優れ, 夏場にチラーを使わない省エネ型の発酵が可能であった。また，発酵終了後に凝集性を示し固液分離が容易という特長を持っている。一方，低希釈・高糖濃度の宮古島産糖蜜を基質とした場合，MY17 株でも長期の回分発酵を続けることは難しく，実証プラントで糖度 16%の糖蜜を発酵した場合には 4 バッチ目で発酵速度が著しく低下することが観察された。そこで， MY17 株の発酵が高糖濃度の糖蜜で抑制される要因を調べるとともに，発酵工程の改善を目指した。
【方法・結果】MY17 株を用いて糖度 13%，16%，20%の糖蜜の発酵試験をしたところ，糖蜜の糖度が高くなるほど MY17 株の増殖が抑制されること，1 バッチあたりのアルコール濃度が 7%を超える発酵が難しいことがわかった。そこで、実験室レベルで糖度約 12.5%にまで希釈した回分発酵試験を行ったところ，約 30 バッチ目まで発酵能が低下しなかった。実証プラントでも糖度 12.5%程度まで希釈した試験ではアルコール濃度 6%程度を約 8 時間で発酵する運転を少なくとも 13 回続けることが可能であった。糖蜜を希釈すると発酵回数が約 30 回維持できる理由を調べるため，糖度 13%の糖蜜にショ糖, 塩類, 糖蜜由来ポリフェノールを糖度 16%, 20%の糖蜜に含まれる各成分の濃度で添加し，38℃の回分発酵試験を行った。さらに初期アルコール濃度の影響を調べるため糖蜜にアルコール添加した発酵試験を行った。糖度 20%の糖蜜と同程度となるよう KCl, K_2SO_4 を添加した試験では, MY17 株の発酵能はあまり抑制されなかったが，ショ糖を添加し糖度 16%，20%に調整した場合は，いずれもアルコール濃度 7%を超える発酵が難しく，また、2 バッチ目から徐々に発酵能が低下することが分かった。初期アルコール濃度を高くした試験では，アルコール濃度が上昇するに従って発酵速度が徐々に低下し, アルコール濃度約 7%で発酵が止まることがわかった。ポリフェノール添加試験では，糖蜜中のポリフェノール濃度が高くなるに従って、酵母の増殖及び発酵が抑制された。これらの結果は MY17 株の発酵抑制要因として糖蜜中の塩濃度はあまり関係なく, 糖蜜中のポリフェノール濃度や発酵液中のアルコール濃度の影響が大きいことを示している。

bioethanol production, thermotolerant, molasses

講演番号：3B22a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ B 校舎 22 会場

幻の湖－富士六湖（赤池）からの発酵性酵母の分離とワイン醸造特性

Isolation of fermentative yeast from Fuji six lakes(Akaike)-Lake of a phantom, and the wine brewing characteristic.

○柳田 藤寿、高橋 千秋、乙黒 美彩、岸本 宗和（山梨大・ワイン科学研究センター）
○Fujitoshi YANAGIDA,Chiaki TAKAHASHI,Misa OTOGURO,Munekazu KISHIMOTO (Univ. of Yamanashi)

【目的】ワイン醸造には，ブドウやワインの発酵醪から分離・選抜された酵母，または，それらをもとに育種した酵母がスターター（酒母）として一般的に用いられている。ワイン醸造以外の環境から分離した酵母は，ワイン酵母とは異なる醸造学的性質を有することが期待され，演者らはこれまでに海洋環境や河川などから酵母を分離して，香味に特徴をもつ新たなワインの開発を進めてきた [1-3]。本研究では，富士五湖に 2011 年 9 月に 7 年ぶりに出現した幻の湖と呼ばれる富士六湖赤池（山梨県）から *Saccharomyces* 属酵母の分離を試み，分離株の生化学的性質とワイン醸造特性を調べることを目的とした。

【方法】赤池より採水した水サンプル全 18L を 350mL ずつメンブレンフィルターでろ過し，YPS（スクロース 20%，ポリペプトン 0.3%，酵母エキス 0.3%，プロピオン酸 Na 0.64%，クロラムフェニコール 0.01%）寒天平板培地で 25℃，3 週間嫌気培養した後，メンブレンフィルターを YPS 液体培地に移してさらに培養を行った。旺盛な炭酸ガスの発生が認められたサンプルから，酵母を単離した。分離株の中から *Saccharomyces* 属酵母を選抜するために，形態学的・生理学的性質および 5.8S rDNA を含む ITS 領域の PCR-RFLP 解析を行い，さらに 26S rDNA D1/D2 領域の塩基配列解析から種の同定を行った。また，ワインの試験醸造は，甲州種およびマスカット・ベリーＡ種ブドウを用いて 4L の規模で実施し，ワインの成分分析と官能検査を行った。

【結果】赤池より発酵性を有する酵母 13 株を分離した。そのうちの 11 株は，形態学的・生理学的性質および 5.8S rDNA を含む ITS 領域の PCR-RFLP 解析結果から *Saccharomyces* 属の酵母として同定した。この 11 株の中からブドウ果汁において旺盛な発酵力を有し，亜硫酸耐性に優れ，窒素要求性が低い YAK-1101，YAK-1104，YAK-1107，YAK-1110 の 4 株を選抜した。これらの 4 株は 26S rDNA D1/D2 領域の塩基配列解析の結果から，*S. cerevisiae* と同定された。さらに，これらの 4 株を用いたワインの試験醸造において YAK-1104，YAK-1107，YAK-1110 の 3 株は旺盛な発酵力を示し，糖分を完全に消費して 13.1～13.4%(v/v)のアルコールを生成した。製成ワインの成分分析および官能検査の結果についても併せて報告する。

1）柳田藤寿ら，醸協，97，150-161(2002)
2）柳田藤寿ら，J. ASEV Jpn.，**13**，76-77(2002)
3）高橋千秋ら，J. ASEV Jpn.，**23**，80-81(2012)

wine, yest, identification

講演番号：3B22a15
講演日時、会場：3 月 26 日 11:48～ B 校舎 22 会場

伝統的な壺作り純米黒酢醸造における酢酸菌の多様性の解析
The diversity of acetic acid bacteria in traditional pot fermentation of rice vinegar
○菅原 圭悟[1]、桜井 健太[2]、橋口 和典[3]、長野 正信[3]、新井 博之[1]、石井 正治[1]、五十嵐 泰夫[1] ([1]東大院農生科、[2]東大、[3]坂元醸造)
○ KEIGO SUGAWARA[1], KENTA SAKURAI[2], KAZUNORI HASHIGUCHI[3], MASANOBU NAGANO[3], HIROYUKI ARAI[1], MASAHARU ISHII[1], YASUO IGARASHI[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Tokyo Univ., [3]Sakamoto brewery)

【背景】
鹿児島県霧島市福山町で 200 年余り続けられている伝統的な壺作り純米黒酢醸造では、原料に蒸し米・米麹・地下水だけを用いており、麹菌以外の微生物の添加を行っていない。にもかかわらず、壺畑に並べられた約 5 万 2 千個の壺で再現的に酢が生産されている。壺は酢を回収した後、洗浄乾燥してまた次の醸造に繰り返し用いられている。
酢酸発酵の担い手である酢酸菌は、洗浄乾燥後も壺の内壁に留まり次の発酵に関与していることが過去の知見で明らかになっていた。内壁の拭き取り調査では、食酢醸造の代表株である *Acetobacter pasteurianus* 以外にも *A. aceti* や *A. tropicalis, Gluconacetobacter xylinus*, *Ga. europaeus* など醸造とかかわりの深い酢酸菌も多く単離されていたが、実際の発酵液中の酢酸菌の多様性は明らかにされていない。そこで本研究では、発酵液から酢酸菌の単離と同定を行った。
また酢酸菌は遺伝的な易変異性があり、16S rRNA レベルで同一種であっても生理機能が異なることが報告されている。そこで本研究では、上記で単離した株の生理的特徴も調べた。
【方法】
酢酸発酵が始まった時期(仕込後 30~40 日)と熟成期(仕込み後 100 日以降)を中心として、様々な壺の発酵液を液面 15 ㎝下から採取し適宜希釈して GYP + 1%ethanol の寒天培地に塗布した。2 回純化を行い単離した後、DNA を抽出して 16S rRNA 領域配列より種を同定した。また同定した株を用いて、コロニー形態・Growth・ペリクル形成能・酸生成度を調べた。
【結果】
約 100 株に及ぶ単離同定の結果、ほぼ大多数が *A. pasteurianus* であった。仕込み直後には様々な酢酸菌が混在する中、酢酸発酵期の優占種は *A. pasteurianus* であり実際に酢酸発酵を担っていると考えられた。また熟成期の 1 つの壺からは *Ga. xylinus* のみが単離された。いくつかの壺では優占種が途中で入れ替わっている可能性が示唆された。
単離株から代表株を選び、生理学的な実験を行ったところコロニー形態やペリクル形成能に差異があることが認められた。

acetic acid bacteria, rice vinegar, diversity

講演番号：3B22p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ B 校舎 22 会場

清酒酵母と乳酸菌の複合バイオフィルム形成と共凝集

Mixed-species biofilm formation and co-aggregation between sake-yeasts and lactic acid bacteria

土屋 典子[1]、○平山 悟[1]、古川 壮一[1]、渡辺 大輔[2]、下飯 仁[2]、森永 康[1] ([1]日大院、[2]酒総研)
Noriko TSUCHIYA[1], ○ Satoru HIRAYAMA[1], Soichi FURUKAWA[1], Daisuke WATANABE[2], Hitoshi SHIMOI[2], Yasushi MORINAGA[1] ([1]Nihon Univ., [2]Natl. Res. Inst. Brewing)

【目的】鹿児島県の伝統発酵食品である福山酢より分離した乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ML11-11（以下、ML）は出芽酵母と共培養すると顕著な複合バイオフィルム（BF）を形成し、この複合 BF 形成には乳酸菌と酵母の細胞間接着（共凝集）が関与することが明らかになっている。また、種々の酵母を用いて BF 形成量評価や共凝集試験を行ったところ、清酒酵母の高泡形成株（以下、泡有り株）・非形成株（以下、泡無し株）の間に差異があり、泡有り株に比較して、泡無し株の方が ML との複合 BF 形成や共凝集性が大きいことが見出された。この結果から、高泡形成に必要とされる AWA1 タンパク質（Awa1p）が ML との複合 BF 形成や共凝集を阻害することが示唆されたが、その詳細は明らかでなかった。そこで本研究では、清酒酵母 701 号（泡無し株）に *AWA1* 遺伝子全長を導入した相補株や、701 号に GPI アンカーシグナル領域などが部分欠損した *AWA1* 遺伝子(*AWA1*Δ*GPI*)を導入した形質転換株を用いて、Awa1p が複合 BF 形成や共凝集に及ぼす影響について検討した。
【方法】〈BF 形成量評価〉乳酸菌及び酵母の前培養菌液を YPD 培地に接種し、それらをマイクロタイタープレート（96 well）に 100 µl ずつ分注した。その後 30℃にて 24 h 培養し、洗浄後 0.1% クリスタルバイオレットで染色を行い、70% エタノールで抽出して 590 nm の吸光度を測定した。
〈共凝集試験〉洗浄した乳酸菌及び酵母の菌液を同量混合し、経時的に定位置からサンプルを採取して、凝集・沈降に伴う濁度の変化を測定することで、凝集性を定量的に評価した。
【結果】これまでの研究で 701 号（泡無し株、*AWA1* 遺伝子欠損）が 7 号（泡有り株、野生型）よりも ML との複合 BF 形成や共凝集性が大きいことが示されていた(日本農芸化学会 2012 年度大会､2C25p17)。今回、701 号に *AWA1* 全長配列の遺伝子を導入・相補した株、あるいは部分配列を欠損させた遺伝子を導入した株を用いて検討したところ、いずれの遺伝子導入株においても、701 号で観察される ML との高い複合 BF 形成能が 7 号と同等レベルにまで低下した。一方、*AWA1*Δ*GPI* 導入株の複合 BF 形成能は他の遺伝子導入株と同じように低下したものの、共凝集能は 701 号と同程度に保持していた。また、*AWA1* 遺伝子全長を導入した相補株では、*AWA1*Δ*GPI* 導入株よりも、共凝集性が低下していた。この株では、ML との共凝集を阻害する Awa1p が酵母表層に固定されていないため、共凝集試験の際の洗浄で取り除かれたものと考えられた。以上の結果から、Awa1p が清酒酵母と ML との共凝集（接着）を阻害し、それを通じて複合バイオフィルム形成を阻害することが確認された。その阻害機序としては、ML の結合部位であるマンノース糖鎖を Awa1p が覆うことに基づく立体障害が考えられた。

sake yeast, lactic acid bacteria, co-aggregation

講演番号：3B22p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ B 校舎 22 会場

耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* における食塩依存的な産膜形成機構の解析

Analysis of NaCl dependent flor formation in osmo-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*

○渡部 潤、上原 健二、茂木 喜信（ヤマサ醤油）
○Jun WATANABE,Kenji UEHARA,Yoshinobu MOGI (Yamasa Corporation)

【目的】醤油醸造において，*Z. rouxii* はアルコールや香気成分の生成を担う重要な微生物である。しかし，特定の株は醤油諸味上に産膜を形成し，それに伴うイソ吉草酸やイソ酪酸の生成により，醤油の品質が著しく損なわれる [1]。そのため，これまで産膜形成を阻害する様々な方法が考案されてきたが，どのようなメカニズムで *Z. rouxii* が産膜を形成するのか？という本質的な疑問は未解明のままであった。既にモデル酵母である *Saccharomyces cerevisiae* では，*FLO11* 遺伝子が産膜形成に中心的な役割を果たしていることが知られている。しかし，*Z. rouxii* の産膜は食塩を含む環境においてのみ形成されることが示されており [1]，*S. cerevisiae* の産膜形成機構とは異なる可能性がある。演者らのグループでは醤油酵母の高度利用に関する研究を進めており，その一環として，既に効率的な *Z. rouxii* の遺伝子操作系を確立している [2]。そこで，本研究ではこの系を利用した遺伝学的アプローチで，*Z. rouxii* の産膜形成に関る遺伝子の同定と機能解析を行った。

【結果】遺伝子破壊株の解析の結果，*Z. rouxii* CBS732 のゲノムデータベースから見出された *S. cerevisiae* の *FLO11* ホモログである *FLO11A*, *FLO11B* 及び *FLO11C* 遺伝子は産膜形成には関与しないと考えられた。そこで, 非産膜性の *Z. rouxii* NBRC1877 に醤油諸味から単離された産膜性の *Z. rouxii* Z3 のゲノムライブラリーを導入し，産膜形成能を獲得した株をスクリーニングした。得られた 4 株のポジティブクローンからプラスミドを回収し，インサートのシーケンスを確認した結果，いずれのクローンもほぼ同じ配列を有しており，*FLO11A*, *FLO11B* 及び *FLO11C* とは異なる新規の *FLO11* 様遺伝子（*FLO11D* とした）をコードすることが明らかになった。*FLO11D* 遺伝子は *Z. rouxii* の産膜形成において必須で，且つ，グルコース非存在下において浸透圧ストレスにより誘導されたことから，このことが *Z. rouxii* の食塩依存的な産膜形成の原因であると考えられた。興味深いことに，*Z. rouxii* 株間において *FLO11D* のコピー数に変動が認められた。*FLO11D* のコピー数が異なる株を混合培養した結果，産膜形成条件において，コピー数が多い株が次第に優勢となった。以上の結果から， *FLO11D* のコピー数の増加は，産膜形成可能な環境において *Z. rouxii* の生存戦略の一つとして機能することが示唆された。

1. 富田実, 醸協, **92**, 853-859 (1997)
2. Watanabe *et al*., *Biosci*. *Biotechnol*. *Biochem*., **74**, 1092-1094 (2010)

biofilm, soy sauce, yeast

講演番号：3B22p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ B 校舎 22 会場

醤油の機能性香気成分 HEMF の高生産に関わる酵母遺伝子のスクリーニング

Screening of high HEMF-producing strains from yeast knock-out strain collection

○上原 健二[1]、渡部 潤[1]、赤尾 健[2]、渡辺 大輔[2]、茂木 喜信[1]、下飯 仁[2] ([1]ヤマサ醤油株式会社、[2]酒総研)
○Kenji UEHARA[1], Jun WATANABE[1], Takeshi AKAO[2], Daisuke WATANABE[2], Yoshinobu MOGI[1], Hitoshi Shimoi[2] ([1]YAMASA Corp., [2]Natl. Res. Inst. Brewing)

【背景】

4-hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF) は醤油中に 20－100ppm含まれ、醤油の特徴香を形成する香気成分の一つとして同定されている。この物質は香気以外に甘味の増強効果や抗腫瘍作用を持つことなどから、醤油中の含有量を高めることができれば、醤油の官能特性の改変や機能性の付与が可能になると考えられる。HEMFは主に酵母の働きにより生成されることから、その含有量を高める手段の一つとしてHEMF高生産酵母の育種が試みられてきたが、HEMF生合成経路が未解明であることや効率的なスクリーニング技術が確立されていないことなどの理由から、未だ成功には至っていない。

【目的】

本研究では、醤油酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の HEMF 高生産株の取得とその産業利用を最終目標として掲げている。HEMF は *Z. rouxii* のみならず出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においても生産されることから、*S. cerevisiae* の非必須遺伝子破壊株ライブラリーから HEMF を高生産する株を網羅的にスクリーニングすることにより、*Z. rouxii* における育種の手かがりを得ることにした。

【方法・結果】

約 5000 株ある *S. cerevisiae* 非必須遺伝子破壊株ライブラリーを、HEMF 生成に適した培地で 1 株ずつ培養し、酢酸エチルにて HEMF を抽出した。酢酸エチル画分を乾固後、メタノールに再溶解させて HPLC に供し、HEMF を高生産する株をスクリーニングした。

その結果、14 の遺伝子破壊株において HEMF 生産性の向上が認められた。中でも、*ADH1* 遺伝子を破壊した破壊株は顕著な HEMF 生産性の向上を示し、これはアセトアルデヒドが HEMF の前駆体であるという報告と一致していた[(1)]。さらに、*S. cerevisiae* の ADH1p と相同性の高い配列が *Z. rouxii* にも存在しており、この遺伝子破壊によっても同様の効果が見られることが確認された。現在、酵母におけるアセトアルデヒドと HEMF 生産性との間の詳細な解析を行っている。

(1) M. Ohata et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 71(2), 407-413, 2007

yeast, aroma compound, screening

講演番号：3B22p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ B 校舎 22 会場

低価値な農産物からの *Lipomyces* 酵母による油脂生産におよぼす培地組成の影響
Effect of medium composition on lipid production by yeast *Lipomyces* from agricultural products of low utility value.

○田邉 聡[1]、柳場 まな[1]、黒川 博史[2]、浜本 友佳[2]、大木 亨[2]、二階堂 雅則[2]、前納 克裕[2]、長沼 孝文[1] ([1]山梨大院生命、[2]ライオン株式会社)
○SATOSHI TANABE[1], MANA YANAGIBA[1], HIROSHI KUROKAWA[2], YUKA HAMAMOTO[2], TOHRU OHKI[2], MASANORI NIKAIDO[2], KATUHIRO MAENO[2], TAKAFUMI NAGANUMA[1] ([1]Yamanashi Univ., [2]Lion Corporation.)

【目的】バイオディーゼルや製品原料として利用可能な植物油脂は、カロリーベースでの自給率が現在 2%と極めて低く、世界人口の増大に伴って今後更に輸入量の悪化が予想される。この植物油脂をタンク培養により発酵生産できれば、広い耕地を必要とせずかつ気候条件の影響を受けにくく、通年的な生産が可能になる。我々は、この植物性油脂を広範囲な炭素源資化性を有する *Lipomyces* 酵母による大量生産を目指している。

本報告では、炭素源として低利用価値の農産物を用いた場合の、油脂生産にとって最適な培地の開発を試みた。

【方法】基本培地として多量のペプトンと酵母エキスからなる天然培地（YEPD）、少量の酵母エキスと無機塩類からなる半合成培地（S）、無機塩類からなる合成培地を用いた。合成培地は一般的に知られている培地（W）とこの酵母の脂肪球肥大と菌体増殖に関係がある亜鉛とマンガンの量を多くした培地（CG）と少なくした培地（LS）を用いた。これら 5 種類の培地で培養した結果を本に、構成成分の種類および量を変えて、それぞれの炭素源に対して最適かつ低コストとなる培地を決定した。

炭素源はでんぷん系として馬鈴薯澱粉、単糖・二糖類系としてモモ・スモモ果汁、オリゴ糖系としてヤーコンの塊根汁を使用した。

培養後の菌体をガラスビーズで破砕し中性脂質定量キットを用いて油脂量の測定をおこない、油脂生産速度（油脂生産量／day）を算出した。

【結果】馬鈴薯澱粉では YEPD 培地の油脂生産速度が最も高く次が S 培地であったが、その差が小さかった。両培地間のコストを比較すると YEPD 培地がかなり高いことから、S 培地を本に組成や酵母エキスの種類を変えて、より油脂生産性が高く低コスト培地の開発を行った。また、この酵母のアミラーゼ活性を考慮して培地 pH の影響についても検討した。

モモ・スモモ果汁では低コストである LS 培地と CG 培地が高い油脂生産速度を示した。天然物の組成は変動しやすいことを想定し、成分量が多い CG 培地を本としてより油脂生産速度が高くなる培地の作成を試みた。ヤーコンの塊根汁についても同様の検討をおこない、油脂生産速度が高くコストの低い培地の決定を行っている。

本研究は、「南アルプス市－山梨大学包括的連携協定」および独立行政法人科学技術振興機構(JST)「研究成果最適展開プログラム　A-STEP　ハイリスク挑戦タイプ」により実施した。

Lipomyces, lipid production, medium

講演番号：3B22p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ B 校舎 22 会場

未精製グリセロールを炭素源とした *Lipomyces* 酵母による油脂生産

Lipid production by yeast *Lipomyces* from crude glycerol

○黒川 博史[1]、大木 亨[1]、浜本 友佳[1]、田邉 聡[2]、長沼 孝文[2]、二階堂 雅則[1]、大寺 基靖[1]、前納 克裕[1] ([1]ライオン株式会社、[2]山梨大院生命)
○Hiroshi KUROKAWA[1], Tohru OHKI[1], Yuka HAMAMOTO[1], Satoshi TANABE[2], Takafumi NAGANUMA[2], Masanori NIKAIDO[1], Motoyasu OODERA[1], Katsuhiro MAENO[1] ([1]Lion Corporation, [2]Yamanashi Univ.)

【目的】人口増加に伴う食糧問題を考慮した場合、食用に使用できる動植物油脂は全て食用に使うべきであると我々は考える。そこで、燃料・工業・飼料用などの非食用に使われる油脂の候補として酵母生産油脂に着目し、種々のバイオマスを酵母により油脂へ変換する技術確立を目指している。種々のバイオマスを資化することを目標とするため、油脂産生酵母として、幅広い炭素源を資化し菌体内に油脂を高濃度で蓄積する*Lipomyces*酵母を選定した。*Lipomyces*酵母は、精製グリセロールも油脂へ資化することが知られているが、未精製グリセロールを資化したという報告はない。そこで我々は、メチルエステル（BDF）製造時に副生する未精製グリセロールの*Lipomyces*酵母による資化性と油脂生産性に着目した。未精製グリセロールは一般的にメチルエステルなどの不純物が含まれており、その不純物が菌体の生育阻害を起こす恐れがある。本報告では、この未精製グリセロールを炭素源とした*Lipomyces*酵母による油脂の生産性について検討し、蓄積した油脂の物性、性状についても確認した。
【方法・結果】まず、比較となる精製グリセロールの培養特性を明らかにするため、炭素源として精製グリセロールを用いて基本培地として天然培地、半合成培地の2種類を用い培地組成による菌体生育への影響を確認した。また、培養条件に関してはpH、温度、溶存酸素制御の有無による油脂生成率の変化についても検討を加えた。さらに、培地中の配合量を変えて、油脂生産性への影響を調べた。次に、未精製グリセロールに炭素源を置き換え、含まれる不純物が菌体の生育と油脂生産性に与える影響を中心に比較した。その結果、炭素源を未精製グリセロールに変えた場合でも、精製グリセロールと同様に油脂を生産することを確認した。また、得られた油脂の物性や性状についても報告する。本研究は独立行政法人科学技術振興機構「研究成果最適展開プログラム　A-STEP　ハイリスク挑戦タイプ」により実施した。

Lipomyces, lipid production, medium

講演番号：3B22p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ B 校舎 22 会場

高温でエタノールを生産する酵母の探索

Screening of yeast for producing ethanol at high temperature

○伴野 太平、梶川 揚申、佐藤 英一、小玉 健太郎、岡田 早苗（東農大応生科・化学）
○Taihei Banno,Akinobu Kajikawa,Eiichi Satoh,Kentaro Kodama,Sanae Okada (Dept. Appl. Biol. Chem. Tokyo Univ. Agr.)

【背景・目的】 地球温暖化防止の方策のひとつとして、ガソリンの代替燃料としてバイオエタノールが用いられる傾向にあるが、さらなる普及のために発酵技術の改良が求められている。発酵微生物の改良点としては高温で発酵が可能な酵母の開発が望まれている。その理由は発酵熱に起因する発酵液の温度上昇、これに伴う発酵の抑制を防ぐための冷却コストの削減や、高温で発酵を行うことでの雑菌による汚染のリスク低減、糖化酵素の使用量削減などが見込めるためである。

最近耐熱性を有する酵母として *Kluyveromyces marxianus* が報告され、従来バイオエタノール生産に利用されてきた *Saccharomyces cerevisiae* が生育・発酵できない温度でも増殖・エタノール発酵が可能であることから応用利用に向けた研究が行われている。*K. marxianus* はタイやフィリピンなどの熱帯地域からの分離報告が主であるが、その生育可能温度域は広く、日本などの温帯地域にも生息していることが考えられる。さらに耐熱性に関与する遺伝子は広く微生物に存在していると言われていることから、*K. marxianus* 以外の耐熱性を有する酵母が分離できると考えられる。
しかし、日本国内において高温発酵が可能な酵母の分離を目的とした研究は行われていない。そこで本研究では日本国内より試料を採集し、高温でエタノールを生産する酵母の探索を行った。

【方法・結果】 試料として果実や樹皮、土壌など 143 点を採集し、それらから酵母 62 株を分離した。分離株について Glucose20%(w/w)にした培地を用いて 42℃培養におけるエタノール生産能を調べ、比較的高い値を示した株を選抜した。選抜株の同定を行った結果、*Candida glabrata*、*Ogataea polymorpha*、*Pichia kudriavzevii* であった

ethanol fermentation, yeast

講演番号：3B22p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ B 校舎 22 会場

Candida glabrata 硫酸耐性変異株の分離と特性解析
Isolation and characterization of sulfate-tolerant *Candida glabrata* mutants
○中村 敏英[1]、渡邉 樹[1]、島 純[2] ([1]農研機構・食総研、[2]京都大・微生物科学)
○Toshihide NAKAMURA[1], Itsuki WATANABE[1], Jun SHIMA[2] ([1]Natl. Food Res. Inst., [2]Kyoto Univ.)

【背景・目的】　リグノセルロース系バイオマスや澱粉作物からのバイオエタノール製造工程では、バイオマスを糖化処理した後、酵母等の微生物を利用してエタノール発酵を行う。バイオマスの糖化処理には様々な方法が考案されていて、硫酸で糖化する方法（濃硫酸糖化法、希硫酸糖化法など）も比較的よく研究されている。硫酸糖化液は中和を調整することで雑菌の増殖を抑制できることから、発酵微生物の硫酸耐性は硫酸糖化液の発酵効率化やエタノールの生産コスト削減に重要な因子の一つであると考えられる。本研究では、バイオマスの硫酸糖化液を効率良く発酵することを目的として、硫酸耐性の高い酵母株の分離とその特性を解析した。我々はこれまでに、乳酸耐性の高い酵母 *Candida glabrata* NFRI 3164 株を用いた乳酸添加培地でのエタノール生産について報告している（Watanabe et al. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 35, 1117-1122, 2008)。培地中に乳酸を添加することで雑菌の増殖を抑制し、乳酸耐性酵母を利用してエタノールを生産することができた。そこで今回は硫酸糖化液の発酵を想定して、*C. glabrata* NFRI 3164 株の硫酸耐性を変異育種により強化することを試みた。

【方法】　*C. glabrata* NFRI 3164 株をメタンスルホン酸エチル（EMS）で変異処理を行った後、定常期まで培養した。EMS 処理細胞を硫酸で pH 1.8 に調整した最小培地で集積培養を行い、親株よりも生育良好な変異株を分離した。得られた変異株については、硫酸で pH 2.0 に調整した YPD 培地で培養を行い、生育およびエタノール生産性について調べた。

【結果】　*C. glabrata* NFRI 3164 株の変異処理、その後の集積培養により、硫酸耐性の向上した変異株２株を得た。親株は pH 2.0 の YPD 培地では生育ができずエタノールを生産しなかったが、硫酸耐性変異株は２株とも生育が可能であり、良好なエタノール生産性を示した。現在、硫酸耐性に関する遺伝子の発現変化について解析を行っている。

yeast, sulfate tolerance, bioethanol

講演番号：3B22p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ B 校舎 22 会場

産業プロセスに有用な酢酸ストレス耐性酵母の同定と耐性メカニズムの解析

Identification of an acetic acid-tolerant strain of *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of stress-tolerant mechanisms.

○田中 晃一[1]、灰谷 豊[1]、吉山 洋子[1]、山本 まみ[2]、中村 敏英[2]、安藤 聡[2]、小川 順[3]、島 純[1]([1]京大・微生物科学、[2]食総研、[3]京大院農・応用生命)
○Koichi TANAKA[1], Yutaka HAITANI[1], Yoko YOSHIYAMA[1], Mami YAMAMOTO[2], Toshihide NAKAMURA[2], Akira ANDO[2], Jun OGAWA[3], Jun SHIMA[1] ([1]Res. Div. Microbial Sci., Kyoto Univ., [2]Natl. Food Res. Inst., [3]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景・目的】

バイオエタノールの製造プロセスにおいて、糖化・発酵過程での雑菌混入はエタノール収率を大きく低下させる。有機酸添加による雑菌抑制は、低エネルギー、低コスト、低環境負荷といった利点も多く、産業レベルでのエタノール製造において最も実用的な雑菌汚染低減法である。有機酸添加条件におけるエタノール発酵生産の効率化を図る目的で、酸ストレスに耐性を有する出芽酵母株の同定と耐性メカニズムの分子機能解析をおこなった。

【方法・結果】

実験室保存酵母株および自然界分離酵母株を含む約 1700 株を対象として、酢酸存在下における生育特性を評価した。エタノール発酵特性と併せたプロファイリングを駆使して有用菌株の絞り込みをおこない、高度な酢酸耐性およびエタノール生産性を有する出芽酵母株（ATCC38555）を同定した。DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析をおこなったところ、弱酸ストレス応答性転写因子 Haa1 と鉄代謝応答性転写因子 Aft1 の標的遺伝子群の発現上昇が見いだされ、これらの転写因子による遺伝子発現制御が酢酸ストレス耐性に関与している可能性が示唆された。特に Haa1 は、その標的遺伝子群の発現が弱酸刺激により上昇すること、*HAA1* 遺伝子破壊株が弱酸感受性を示すことなどが報告されていたため、ATCC38555 株の酢酸ストレス耐性に重要な役割を果たしているのではないかと考えた。そこで、実験室酵母 S288C を用いて、Haa1 の活性化が細胞に酢酸耐性を付与できるかどうかを確かめた。*HAA1* 遺伝子のプロモーター領域を強い転写活性を有する *TDH3* プロモーターに置換し、*HAA1* 遺伝子を過剰発現する株を作成した。定量 PCR 解析により、この株では栄養増殖過程においても *TPO2, TPO3, YGP1, YRO2* といった Haa1 標的遺伝子群の発現が顕著に亢進していることが明らかとなった。さらに *HAA1* 遺伝子過剰発現株では酢酸ストレス耐性が飛躍的に向上しており、野生型株が全く増殖することが出来ない高濃度の酢酸を含む培地でも増殖することができた。また、高濃度の酢酸を含む培地中でも細胞内の酢酸濃度は低く抑えられていたため、*HAA1* 遺伝子の過剰発現は酢酸の細胞外への排出活性または細胞内への流入防止活性を増強することが示唆された。*HAA1* 遺伝子の過剰発現という非常に簡便な操作で強い耐性を付与できるため、この方法は酢酸ストレス耐性株の育種戦略として極めて有用だと考えられる。

Saccharomyces cerevisiae, weak organic acid, stress

講演番号：3B22p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ B 校舎 22 会場

芳香族アミノ酸の代謝調節による酵母の酢酸ストレス耐性化戦略

Improvement of acetate stress tolerance in Saccharomyces cerevisae by regulation of aromatic amino acids metabolisms.

田中 晃一[1]、小松崎 典子[2]、藤原 しのぶ[2]、日比 慎[3]、小川 順[4]、○島 純[1]([1]京大・微生物科学、[2]聖徳大・人間栄養、[3]京大院・農・産業微生物、[4]京大院・農・応用生命)
Koichi TANAKA[1], Noriko KOMATSUZAKI[2], Shinobu FUJIWARA[2], Makoto HIBI[3], Jun OGAWA[4], ○Jun SHIMA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Seitoku Univ., [3]Kyoto Univ., [4]Kyoto Univ.)

【背景・目的】バイオエタノール製造工程には、酵母等の微生物によりバイオマス由来の糖をエタノール変換する発酵プロセスが含まれる。発酵プロセスでは、乳酸菌をはじめとする細菌による汚染が生じる可能性があり、エタノール収率の低下や高コスト化の一因となり得る。我々はこれまでに、酢酸等の有機酸添加条件において有機酸ストレス耐性酵母によりエタノール変換を行うことで、細菌汚染を低減しつつ高効率のエタノール変換が可能であることを報告してきた。本研究では、高度な酢酸ストレス耐性を有する *Saccharomyces cerevisae* 株の構築に向けて、細胞内芳香族アミノ酸の機能解析及び芳香族アミノ酸の代謝調節を行った。

【方法・結果】　近年、*S. cerevisiae* において、細胞内のアミノ酸プールが種々の環境ストレスに対する耐性に関与する可能性が指摘されている。我々は芳香族アミノ酸（トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン）合成欠損株の解析により、チロシンが酢酸ストレスやエタノールストレスへの耐性に、トリプトファンが冷凍ストレス耐性に寄与していることを示した。芳香族アミノ酸生合成制御の鍵酵素は 3-デオキシ-7-ホスホヘプツロン酸（DHAP）合成酵素であり、*S. cerevisae* には Aro3 と Aro4 の二種が存在する。Aro3 はフェニルアラニン、Aro4 はチロシンにより活性が負に制御されるが、このフィードバック抑制がおこらない変異型酵素を過剰発現させたところ、細胞内の芳香族アミノ酸、特にチロシンの濃度が顕著に上昇した。チロシン蓄積株は野生型株がほとんど増殖できない高濃度の酢酸を含む培地でも増殖可能であった。以上の結果より、チロシン蓄積量の増強は酢酸ストレス耐性化戦略の 1 つとして有効であることが示唆された。

Saccharomyces cerevisiae, aromatic amino acid, stress

講演番号：3B22p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ B 校舎 22 会場

酵母のストレス耐性強化に向けたエルゴステロール蓄積増強に寄与する生合成遺伝子の探索

Screening of the ergosterol biosynthetic genes involved in ergosterol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*

○藤井 茂貴[1]、櫻谷 英治[1]、田中 晃一[2]、小川 順[1]、島 純[2]([1]京大院農、[2]京大・微生物科学)
○Shigeki FUJII[1], Eiji SAKURADANI[1], Kouichi TANAKA[2], Jun OGAWA[1], Jun SHIMA[2] ([1]Kyoto Univ., [2]Res. Div. Microb. Sci., Kyoto Univ.)

【背景・目的】

産業利用の過程において、酵母には化学物質、温度、乾燥などの様々な環境ストレスが負荷される。我々は、*Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子破壊株セットを用いた解析等により、バイオマスの前処理や糖化のプロセスで生じるバニリンやフルフラール等の発酵阻害物質に対する耐性に細胞膜の構成成分であるエルゴステロールの蓄積量が重要である可能性を報告してきた(Endo *et al.* Biotechnol. Biofuel 1:3) 。

このような背景から、高度な発酵阻害物質耐性を有する *S. cerevisiae* 株の構築に向けて、エルゴステロール蓄積量の増強に寄与する遺伝子の探索を目的に研究を行った。

【方法および結果】

S. cerevisiae BY4741 株を親株として、アセチル CoA からエルゴステロールまでの各代謝ステップを触媒する酵素をコードする遺伝子の過剰発現株を作製した。次に、各遺伝子過剰発現株のエルゴステロール蓄積量及び化学ストレス等の環境ストレスに対する耐性を評価した。現在までの解析の結果、phosphomevalonate kinase をコードする *ERG8* を過剰発現させた株において、有意にエルゴステロールの蓄積量が増加することが示された。

現在、エルゴステロール生合成に関与することが報告されている全ての遺伝子の過剰発現株の作製を行い、エルゴステロール及び中間代謝産物蓄積量への寄与及び発酵阻害物質等のストレスに対する耐性への寄与について網羅的な評価を行っている。

Saccharomyces cerevisiae, ergosterol biosynthetic genes, stress tolerance

講演番号：3B22p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ B 校舎 22 会場

優良清酒酵母菌株の迅速かつ高精度な識別法の確立と保存菌株への適用

Genotyping study of contemporary and classical sake yeast strains with the high-resolution melting method

○赤尾 健、周 延、水野 恵、渡辺 大輔、下飯 仁 (酒総研)
○Takeshi AKAO,Yan ZHOU,Megumi MIZUNO,Daisuke WATANABE,Hitoshi SHIMOI (Natl. Res. Inst. Brewing)

【緒言】これまでに清酒酵母のゲノム情報を利用した取組みによって、K7 と近縁の優良菌株（K7 グループ：K6、K7、K9、K10 と派生株）のみに共通かつ特異的に存在する遺伝的多型をいくつか明らかにした。これらのうち SNP のように同じ遺伝子型が別系統で独立して生じる可能性が低いものを複数組合せることで、K7 グループと同系統の、すなわち清酒醸造への適性が高い株を高精度で識別可能と考えている。最近、自然界から新たな酵母を分離し、醸造現場での実用に供しようとする試みが多くなされている。こうした作業においても、分離されてきた候補菌株が K7 グループの系統なのか否かという識別段階を含めることで、株の選抜方針が安全醸造を優先する場合、あるいは新奇な遺伝子資源の探索を優先する場合のいずれであっても、選抜過程の効率的に有効である。SNP レベルのタイピングには、多型部位のダイレクトシーケンスが確実性の高い方法だが、コストと迅速性の面で多検体への適用には不向きである。そこで本研究では、Real Time(RT)-PCR ベースのタイピング手法である高解像度融解曲線分析（High Resolution Melting: HRM）法を利用し、迅速かつ高精度で、多検体にも容易に対応可能な K7 グループ菌株の識別系の検討を行った。
【方法】K7 グループに特異的な DNA マーカーには、SNP マーカーとして *RIM15* のフレームシフト変異 *rim15*^{5055insA}、*MSN4* のナンセンス変異 *msn4*^{C1540T}、加えて染色体構造の多型マーカーである Ty2 置換による *Δppt1* (null)変異を採用した。これらは、いずれも K7 グループの高発酵性とストレス応答不全に関与し、なおかつホモザイガスな変異である。SNP タイピング法には、HRM 法の 1 バリエーションである非対称 PCR を利用した非標識プローブ法を採用し、プローブは K7 型に完全マッチする配列とした。飽和型 DNA 結合色素には ResoLight Dye（Roche）、RT-PCR 装置には LightCycler Nano（Roche）を用いた。*Δppt1* 変異のタイピングには、PCR 増幅断片長多型を利用した。
【結果】HRM 法の諸条件の最適化の後に、*rim15*^{5055insA} と *msn4*^{C1540T} の有無がシーケンスによって既知である約 20 菌株についてタイピングを行ったところ、シーケンスと HRM 法の結果は全て一致しており、K7 グループの HRM 識別系を確立できた。次に本識別系に *Δppt1* 変異の識別も併せ、今日までに清酒酵母として分離・保存されている多数の菌株を対象に K7 型の識別を試みたところ、K7 グループの株として保存されているもの以外では、ほとんどが非 K7 型と識別された。非 K7 型の株は今日の酒造現場では使用されていないと推測され、K7 グループがその醸造適性から他系統を凌駕していったと考えられた。なお、マーカーの一部が K7 型、一部が非 K7 型である株は存在しなかった。

sake yeast, genotyping, high-resolution melting (HRM)

講演番号：3B22p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ B 校舎 22 会場

清酒酵母特異的な *RIM15* 機能欠失変異による高発酵性メカニズムの解析
Mechanism of high fermentation ability caused by a sake yeast-specific *RIM15* loss-of-function mutation

○渡辺 大輔[1]、周 延[1]、平田 愛子[2]、大矢 禎一[2]、藤谷 典志[1]、赤尾 健[1]、下飯 仁[1]（[1]酒総研、[2]東大院新領域）
○Daisuke WATANABE[1], Yan ZHOU[1], Aiko HIRATA[2], Yoshikazu OHYA[2], Yoshiyuki FUJITANI[1], Takeshi AKAO[1], Hitoshi SHIMOI[1] ([1]Natl. Res. Inst. Brewing, [2]Grad. Sch. Frontier Sci., Univ. of Tokyo)

清酒酵母は、分類学上は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に属するにも関わらず、清酒もろみにおいて他の出芽酵母菌株には見られない高い発酵性を示す。この原因を明らかにするために、我々は、清酒酵母と実験室酵母のゲノム及びトランスクリプトーム情報に関する詳細な比較解析を行った。その結果、出芽酵母のストレス応答において中心的な役割を果たす *RIM15* プロテインキナーゼ遺伝子において、きょうかい 7 号を中心とする清酒酵母菌株群（K7 グループ）に特異的な機能欠失変異を高発酵性原因変異として同定するに至った。また、この変異により、K7 グループの清酒酵母は、外界からのストレスに対する耐性が低いことも明らかになった。従来、ストレス耐性を向上させることによって発酵性を改善する事例は多く報告されているが、酵母のストレス応答機構がアルコール発酵を抑制するというのは新規な知見であるため、このメカニズムを解明するために、今回 *RIM15* 遺伝子破壊株を用いたメタボローム解析を実施したのでその結果を報告する。

まず、解糖系の中間代謝産物に着目したところ、前半（グルコース-6-リン酸 1 分子からグリセルアルデヒド-3-リン酸 2 分子を生成する反応）と比べて、後半（グリセルアルデヒド-3-リン酸をピルビン酸に変換する反応)の化合物の濃度が *RIM15* 遺伝子破壊により大きく上昇することが見出された。この結果から、Rim15p の欠損は、解糖系前半から分岐する解糖系以外の代謝経路を抑制することによって解糖系後半の代謝フラックスを増強し、その結果としてアルコール発酵の促進につながるのではないかと推測された。具体例として、グルコース-6-リン酸を用いてトレハロースやグリコーゲン、細胞壁グルカンを合成するグルコース同化経路について調べてみると、*RIM15* 破壊株においてはこの経路の中間代謝産物である UDP-グルコースの合成が抑制されていた。また、UDP-グルコースの合成に必須な *UGP1* 遺伝子のプロモータ領域には、Rim15p の下流で働く転写因子 Msn2/4p の認識配列が複数存在し、Rim15p の欠損により *UGP1* 遺伝子の発現が抑制されることがわかった。さらに、実験室酵母において人為的に *UGP1* の発現量を減少させると発酵速度が向上することを明らかにした。以上の結果から、Rim15p 機能欠損による *UGP1* 遺伝子の発現量低下が清酒酵母の高発酵性の一因であるという結論に達した。同様に、解糖系前半の化合物を利用するペントースリン酸経路も *RIM15* 破壊株において抑制されており、そのことが高発酵性と関連していることを支持するデータも得られた。以上の結果から、Rim15p が複数の代謝関連遺伝子の発現調節を介して解糖系とアルコール発酵を負に制御するメカニズムの詳細が明らかになってきた。

sake yeast, *RIM15*, alcohol fermentation

講演番号：3B22p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ B 校舎 22 会場

清酒酵母におけるリボソーム生合成調節因子 *SFP1* と発酵性に関する研究

Relationship between fermentation ability and *SFP1*, the transcription regulator of ribosomal biogensis in sake yeast

○周 延、渡辺 大輔、呉 洪、赤尾 健、下飯 仁（酒総研）
○YAN ZHOU,DAISUKE WATANABE,HONG WU,TAKESHI AKAO,HITOSHI SHIMOI (Natl. Res. Inst. Brewing)

我々は、清酒酵母の高いアルコール発酵力を生み出す分子メカニズムに関する研究を行っており、現在までに、清酒酵母と実験室酵母の遺伝子発現プロファイルの比較から、Rim15p-Msn2/4p を介したストレス応答経路がアルコール発酵を抑制しているという新しい知見を得ることができた。今回は、清酒酵母の高発酵性の原因となる新規因子を明らかにするために、両者の遺伝子発現の差を生み出すストレス応答関連因子以外の要因に着目して解析を行った。

その結果、Msn2/4p を介した遺伝子発現が抑制されているのとほぼ同時期である清酒もろみ初期（2～5 日目）において、PAC（polymerase A and C）モチーフを有する遺伝子の発現レベルが清酒酵母において高いことが見出された。また、実験室条件のエタノールストレス存在下において、清酒酵母はこの PAC モチーフをもつ遺伝子に加え、rRPE（ribosomal RNA processing element）モチーフを有する遺伝子の発現レベルも高いことがわかった。これらは、リボソーム生合成に関与することが知られている RiBi（ribosome biogenesis）と呼ばれる遺伝子群であり、主に転写因子 Sfp1p によって発現誘導されることから、発酵中／エタノールストレス存在下の清酒酵母においてこの Sfp1p の活性が高いことが示唆された。

清酒発酵における Sfp1p の機能を明らかにするために、清酒酵母きょうかい 7 号（K7）の *SFP1* 遺伝子破壊株を作成して清酒小仕込試験を行い、発酵経過を詳細に解析したところ、発酵速度のピーク値のみが有意に減少し、その結果、製成酒のアルコール度数も低下した。一方、実験室酵母 X2180 において *SFP1* 遺伝子を過剰発現させると、発酵速度が著しく向上し、清酒酵母に近いレベルの高い発酵性を示すようになった。以上の結果から、Sfp1p にはアルコール発酵を特に初期段階において促進させる作用があり、清酒もろみ初期の清酒酵母においてこの転写因子の活性が亢進していることが高発酵性の一因であると推測された。このことから Sfp1p のアミノ酸配列に原因があるのではないかと考え、調べてみたが、清酒酵母特異的に活性を変化させるような変異は見出されなかった。したがって、清酒酵母の Sfp1p の活性調節機構に何らかの差異が生じているのではないかと考えられる。この点に関するより詳細なメカニズムを明らかにするために、現在 Sfp1p の発現や細胞内局在について解析を行っている。また、Sfp1p の活性化を介したリボソーム生合成がどのようにアルコール発酵を促進するのかについても考察したい。

SFP1, sake yeast, fermentation

講演番号：3B22p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ B 校舎 22 会場

S.cerevisiae の持つアルファーグルコシドトランスポーターの諸性質に関する研究
Characterization study of alpha-glucoside transporters in *S.cerevisiae*

○畠中 治代[1]、大村 文彦[1]、石黒 正路[2] ([1]サントリービジネスエキスパート（株）微生物科学研、[2]新潟薬科大学　応用生命科学部)
○ Haruyo Hatanaka[1], Fumihiko Omura[1], Ishiguro Masaji[2] ([1]SUNTORY B.E.LIMITED, Institute for Microbial Science, [2]Niigata Univ. of Pharmacy and Applied Life Science)

S. cerevisiae は、マルトースを取り込むトランスポーターとして、*MALX1*(X=1,2,3,4,6)を、マルトースとマルトトリオースの両方を取り込むトランスポーターとして、*AGT1* を持っている。これらの遺伝子はカタボライトリプレッションを受けるため、グルコースの存在下では発現されない。またこれらのタンパクは細胞膜上に局在した後も、グルコース存在下ではすみやかにエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれ、液胞にて分解される事(glucose-induced degradation)が知られている。ビール発酵においては、麦汁中のグルコースが資化された後、マルトースとマルトトリオースの資化へスムーズに移行する事が求められるため、これらのトランスポーターの性質を知る事は重要である。

我々は、今までに、III 番染色体に存在する Mal21p が、glucose-induced degradation に対して耐性を持つ事を見い出しており、その醗酵の高速化への利用を考えている。本研究では、Agt1p について、glucose-induced degradation に対する耐性を持つ変異体の取得を試みた。Mal21p について得られた情報を元に、Agt1p と Mal21p とのハイブリッドを作製したところ、Agt1p の N 末の細胞質ドメインを Mal21p と交換したハイブリッド MAAp は Agt1p より長い半減期を持ち、さらに C 末の細胞質ドメインも Mal21p と交換したハイブリッド MAMp は、Mal21p と同等の半減期を持つことがわかった。

また、Mal21p の glucose-induced degradation に対する耐性の決定因子は Gly46 と His50 であることから、Agt1p において、それに相応するアミノ酸、Glu51 を Gly に、Leu55 を His に置換した変異型 Agt1p(Agt1GHp)を作製したところ、半減期が長くなった。さらに Glu51 を Pro に置換した Agt1-51Pp と、Leu55 を Pro に置換した Agt1-55Pp を作製したところ、Agt1-55Pp は非常に長い半減期を持つことがわかった。一般的にトランスポーターの分解は、リン酸化とそれに続くユビキチン化によって誘導されると考えられているが、Mal21p について調べたところ、リン酸化には影響がないが、ユビキチン化が起こりにくくなることで、耐性を獲得していた。本研究で取得した Agt1-55Pp についても同じではないかと考えている。

また、Mal61p と Agt1p の取り込み活性に必須なアミノ酸の同定も試みた。これらのトランスポーターはプロトンシンポーターである事から、基質の通り道では、プロトンリレーが生じていると考えられる。そこで、膜貫通ドメインと推測される領域に存在する、酸性アミノ酸、Glu161(Mal61p)と Glu167(Agt1p)を Ala に置換したところ、活性は顕著に減少し、これらの Glu が活性に必須である事が確認された。

beer fermentation, sugar transporter, glucose-induced degradation

講演番号：3B22p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ B 校舎 22 会場

清酒もろみから分離したリンゴ酸高生産清酒酵母の特性（その２）
Property of high malate-producing *Saccharomyces cerevisiae* isolated from sake-mash (Part 2)
○大場 孝宏[1]、中山 俊一[2]、田代 康介[3]、久原 哲[3] ([1]福岡工技セ生物食品研、[2]東農大応生科、[3]九大院農)
○Takahiro OBA[1], Shunichi NAKAYAMA[2], Kosuke TASHIRO[3], Satoru KUHARA[3] ([1]Fukuoka Indust. Tech. Center, [2]Tokyo Univ. Agric., [3]Kyushu Univ.)

【目的】我々は酒質の多様化を目指し、清酒もろみから爽やかな酸味を示すリンゴ酸の生産性が増大した清酒酵母の取得を行った[1)]。これまでに取得したリンゴ酸高生産清酒酵母の特性について報告している[2)]。取得したリンゴ酸高生産株のうち、16BY7-6 株と親株である K901 株の酵素活性比較を行ったところ、16BY7-6 株の pyruvate carboxylase 活性ならびに malate dehydrogenae 活性が K901 に対して上昇していた。このことから我々は、リンゴ酸高生産株のリンゴ酸の生産量が増大した理由はミトコンドリアの活性が低下することで、細胞質内にピルビン酸が蓄積しオギザロ酢酸を経てリンゴ酸が生成する経路が活性化されたためであると推察し、フローサイトメトリーを用いてリンゴ酸高生産性とミトコンドリア活性低下に相関があることを報告している[3)]。今回、16BY7-6 株以外のリンゴ酸高生産株について、リンゴ酸またはピルビン酸代謝に関わる酵素活性比較や遺伝子発現解析を行ったので報告する。
【方法】協会酵母 K901 及び K901 の清酒もろみから分離したリンゴ酸高生産株を用いた。培地は YM-10 液体培地を用いた。各供試菌株について前培養を行い、初発菌密度を揃えて 20℃での静置培養後適宜サンプリングを行い、サンプルとした。酵素活性の測定方法は、それぞれ常法に従った。また、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。
【結果】リンゴ酸高生産株 15BY14-6 及び 16BY8-9 と親株である K901 株の酵素活性比較を行ったところ、16BY7-6 株場合と同様の pyruvate carboxylase 活性ならびに malate dehydrogenae 活性が K901 に対して上昇していた。このことから、清酒もろみから分離したリンゴ酸高生産株ではミトコンドリアの活性低下により細胞質内にピルビン酸が蓄積し、オギザロ酢酸を経てリンゴ酸が生成する経路が活性化されたためであると推察した。さらに、リンゴ酸高生産株 16BY7-6、15BY14-6 及び 16BY8-9 と親株である K901 に対する遺伝子発現解析を行った結果、リンゴ酸高生産株３株において TCA 回路に関連する遺伝子やミトコンドリア輸送体遺伝子の発現量が減少していた。この結果からもリンゴ酸高生産株におけるミトコンドリアの活性低下が起きていることが示唆された。
1) 大場ら：醸造協会誌，103，949-953 (2008)
2) 田中ら：日本農芸化学会 2009 年度大会要旨集 P104
3) 吉瀬ら：第 64 回日本生物工学会大会要旨集 P163

Saccharomyces cerevisiae, malate, enzyme activity

講演番号：3B23a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ B 校舎 23 会場

酢酸菌 *Gluconacetobacter xylinus* NBRC 3288 におけるアルコール脱水素酵素サブユニットの欠損株作製と表現型の解析

Construction and characterization of mutant strains of *Gluconacetobacter xylinus* NBRC 3288 lacking genes for quinohemoprotein alcohol dehydrogenase

○向井 妃奈[1]、薬師 寿治[2]、松谷 峰之介[2]、松下 一信[2] ([1]山口大院農、[2]山口大農)
○Mukai HINA[1], Yakushi TOSHIHARU[2], Matsutani MINENOSUKE[2], Matushita KAZUNOBU[2] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Yamaguchi Univ.)

酢酸菌のアルコール脱水素酵素(ADH)はエタノール：ユビキノン酸化還元活性をもち、本菌の酢酸発酵能に不可欠な酵素である。*Acetobacter* 属、*Gluconobacter* 属酢酸菌から精製された ADH は３つのサブユニットから構成されており、*adhA* 遺伝子にコードされているサブユニット I は脱水素酵素サブユニット、*adhB* 遺伝子にコードされているサブユニット II は、ユビキノンとの反応を司るシトクローム *c* サブユニットである。*Acetobacter* 属酢酸菌において、*adhS* にコードされるサブユニット III を欠く変異株では、サブユニット I は活性、タンパク質共に検出できなくなるほど不安定になる。このため、サブユニット III はシャペロンサブユニットであると考えられている。一方、*Gluconacetobacter* 属酢酸菌から精製された ADH には、サブユニット III は確認されていない。しかし、我々が最近報告した *Gluconacetobacter xylinus* NBRC3288 株の完全ゲノム(1)には、サブユニット III をコードすると考えられる *adhS* 遺伝子ホモログが２つ存在する。

昨年の本大会において我々は、*adhS* のホモログ遺伝子(GLX 16410)の破壊株を作製し、その表現型を報告した。すなわち、エタノール酸化活性、脱水素酵素活性共に検出されたため、ADH の分子構築においてこの *adhS* ホモログ遺伝子は必要ないことが分かった。

そのため本研究では、もう一つの *adhS* ホモログ遺伝子(GLX 17920)の遺伝子破壊株を作製した。*adhS2*(GLX 17920)の破壊株では、エタノール酸化活性、脱水素酵素活性共に野生株と同じ程度検出されたため、ADH の活性および分子構築において２つの *adhS* ホモログ遺伝子(GLX 16410 と GLX 17920)が必要ないことが分かった。

次に、本菌の ADH はサブユニット I と II のみで活性を持つことが考えられたため、異種発現を試みた。サブユニット III を失った *Acetobacter pasteurianus* 変異株に *Ga. xylinus* の *adhAB* を遺伝子導入したところ、ADH 活性が検出された。これらから、*GLX-adhAB* は他の酢酸菌株でも発現・機能し ADH 活性を持ったことから、異種発現系においても *adhS* 遺伝子が必要ないことが示唆された。

1 **Ogino, Y., et al.** 2011. Complete geneome sequence of NBRC 3288, a unique cellulose-nonproducing strain of *Gluconacetobacter xylinus* isolated from vinegar. J. Bacteriol. **193**:6997-6998

acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter* sp., alcohol dehydrogenase

講演番号：3B23a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ B 校舎 23 会場

乳酸菌由来 Aspartate:Alanine 交換輸送体（AspT）の基質結合によるコンフォメーション間の競合
Analysis of conformational changes by substrate binding in the bacterial Aspartate:Alanine antiporter（AspT）

○鈴木 聡美[1]、木村 拓哉[1]、笹原 綾子[1]、七谷 圭[2]、阿部 敬悦[3]（[1]東北大学院農、[2]東北大学院工、[3]東北大学未来研）
○Satomi SUZUKI[1], Takuya KIMURA[1], Ayako SASAHARA[1], Kei NANATANI[2], Keietsu ABE[3]（[1]Tohoku Univ. Agr., [2]Tohoku Univ. Eng., [3]Tohoku Univ. NICHe.）

【目的】醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来 L-Aspartate（Asp）: L-Alanine（Ala）antiporter（AspT）は，エネルギー生成と共役した電位差形成的な Asp:Ala 交換輸送反応を触媒し，Aspartate : Alanine Exchanger（AAEx）Family（TC# 2.A.81）という独自の輸送体ファミリーを形成する．AAEx ファミリーの輸送基質は Asp や Ala に留まらず，*Corynebacterium glutamicum* の同ファミリーに属する輸送体（SucE1）は，コハク酸発酵においてコハク酸の排出を担う．AspT は 10 回膜貫通型（TM）の膜蛋白質で，第 3 膜貫通領域（TM3）の親水性領域が Asp の輸送経路であることが示唆されている[(1)]．また，Asp，Ala それぞれのアナログである L-Cysteine（Cys），L-Serine（Ser）を用いた輸送阻害実験から，Cys は Asp，Ser は Ala の輸送を選択的に阻害することが示された．これにより Asp と Ala は異なる基質結合サイトを有することが強く示唆された[(2)]．しかしながら，AspT の基質輸送メカニズムについて詳細は明らかにされていない．そこで，本研究では反応動力学的アプローチにより，Asp ，Ala 両基質の相互の輸送阻害形式を解析することを目的とした．
【方法】大腸菌に発現させた His-tag 付加 AspT を界面活性剤 n-dodecyl-β-D-maltoside（DDM）で可溶化し，Co^{2+} レジンを用いて精製した．精製 AspT を大腸菌由来のリン脂質を用いて作製した人工脂質二重膜小胞（プロテオリポソーム）に再構成し，Asp および Ala を基質として自己交換輸送反応を行った．輸送開始時に，Asp および Ala の放射性基質と，阻害剤としてもう一方の非放射性基質を同時に添加し，初速 1 分間における放射性基質の取り込み量を測定した．測定結果を Dixon plot を用いて解析し，阻害様式と阻害定数（*Ki*）を決定した．
【結果】解析の結果，Ala 輸送に対して Asp は *Ki* = 3.08±0.15 mM の拮抗阻害を示し，Asp 自身の *Km* = 0.35 mM に比較して大きな値を示した．一方 Asp 輸送に対する Ala は *Ki* = 118.6±79.4 mM となり，Ala は Asp の自己交換輸送を殆ど阻害しなかった．両基質による *Ki* 値の差は，親和定数（*Km*）に由来するものと考えられる（Asp *Km* = 0.35±0.03 mM≪Ala *Km* = 26±2 mM）．両基質は AspT において異なサイトに結合すると推定されることから，今回の Asp による見かけ上の拮抗阻害は，Asp と Ala それぞれの結合コンフォメーション間の競合によるものと推論された．

(1) Nanatani K., Abe K., *et al. J. Bacteriol.* 191:2122-2132 (2009)
(2) Sasahara A., Abe K., *et al. J. Biol. Chem.* 286:29044-29052 (2011)

amino acid transporter, competitive inhibition, confomational change

講演番号：3B23a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ B 校舎 23 会場

Achromobacter obae 由来アミノ酸アミドラセマーゼの基質特異性に関する研究
Study on substrate specificity of amino acid amide racemase from *Achromobacter obae*
○松村 汐莉[1]、丸山 沙都子[1]、大塚 稔[1]、徳南 宏祐[1]、鈴木 淳巨[2]、岡崎 誠司[3]、渡邉 信久[2]、山根 隆[2]、米田 英伸[1]、浅野 泰久[1,3] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]名大院・工、[3]JST, ERATO)
○Shiori MATSUMURA[1], Satoko MARUYAMA[1], Minoru OTSUKA[1], Kousuke TOKUNAN[1], Atsuo SUZUKI[2], Seiji OKAZAKI[3], Nobuhisa WATANABE[2], Takashi YAMANE[2], Hidenobu KOMEDA[1], Yasuhisa ASANO[1,3] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Grad. Sch. Engi., Nagoya Univ., [3]JST, ERATO)

【目的】*Achromobacter obae* 由来のα-アミノ-ε-カプロラクタム (ACL) ラセマーゼは、ACL などのα-アミノラクタムを基質とする PLP 依存型ラセマーゼである。我々は、本酵素が ACL 以外にもアラニンアミドやアミノ酪酸アミドなどのアミノ酸アミドに対しラセミ化活性を有することを見出し、本酵素と立体選択的なアミノ酸アミド加水分解酵素を組み合わせたアミノ酸アミドのダイナミックな光学分割を既に報告している [1)]。さらに、アミノ酸アミドラセマーゼの構造解析を行い、阻害剤 ε-カプロラクタムとの複合体の立体構造を決定した [2)]。一方で、本酵素がラセミ化活性を示すアミノ酸アミドの側鎖は直鎖状の比較的炭素鎖が短いものに限られ、芳香族を側鎖にもつフェニルアラニンアミドなどのアミノ酸アミドに対する活性は極めて低い。そこで、立体構造に基づき、進化分子工学的手法によって作製したライブラリーから、キノンイミン化合物による発色を用いた酵素的検出法 [3)]によりフェニルアラニンアミドに対する活性が向上した変異酵素 (L19V/L78T) を取得している [4)]。本研究では、この変異酵素の 2 か所の変異点について、最適なアミノ酸残基を決定し、変異したアミノ酸残基の性質と酵素活性との関連から、活性中心への影響を調べることを目的とした。
【方法および結果】まず、ACL ラセマーゼの 78 番目のロイシン残基に対して飽和変異を行い、19 種類のアミノ酸に変異した変異型酵素を取得した。得られた 1 点変異の変異型酵素 19 種を精製し、ACL とフェニルアラニンアミドに対するラセミ化活性を測定した。フェニルアラニンアミドに対して最も高い活性を示した変異型酵素遺伝子を鋳型として、更に 19 番目のロイシン残基に対して飽和変異を行った。得られた 2 点変異 ACL ラセマーゼ 19 種類を精製し、両基質に対するラセミ化活性を測定した。合計 38 種の変異型酵素の活性を比較した結果、野生型酵素に比べてフェニルアラニンアミドに対する活性が向上した酵素を数種得ることに成功し、最適なアミノ酸残基の組み合わせは L19V/L78T であることが明らかになった。これら、フェニルアラニンアミドに対して活性が向上した変異型酵素について、動力学的解析を行った。各アミノ酸の性質と活性中心への影響についても報告する。

1) Asano Y, and Yamaguchi S, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 7696-7697 (2005).
2) Okazaki S, et al., *Biochemistry*, **48**, 941-950 (2009).
3) Maruyama S, et al., JSBBA, 2A11p08 (2007).
4) Otsuka M, et al., JSBBA, 2Aep01 (2010).

amino acid amide racemase, mutagenesis, evolutionary molecular engineering

講演番号：3B23a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ B 校舎 23 会場

N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を含む新規オリゴ糖の酵素合成

Enzymatic synthesis of new oligosaccharides containing N-acetylglucosamine (GlcNAc)

○重網 麻依[1]、瀬能 宙希[2]、和田 徹[1]、小森 航[2]、平野 貴子[2]、袴田 航[1,2]、田代 充[3]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科・生物資源利用、[2]日大生資科・生命化、[3]明星大理工・化学)

○ Mai Juami[1], Hiroki Senou[2], Toru Wada[1], Wataru Komori[2], Takako Hirano[2], Wataru Hakamata[1,2], Mituru Tashiro[3], Toshiyuki Nishio[1,2] ([1]Graduate School of Bioresoure Sciences,Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci.,College of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [3]Program in Chem. and Life Sci.,College of Science and Engineering, Meisei Univ.)

【目的】

ヒトミルクオリゴ糖中には、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) のような *N*-アセチルアミノ糖を構成糖として含む数種のヘテロオリゴ糖があり、これらにはビフィズス菌増殖促進効果や病原菌の腸管細胞接着抑制効果などの様々な有用機能があることが確認されている。このように、GlcNAc を含む種々のヘテロオリゴ糖には有用機能が期待できるが、このようなタイプの機能性オリゴ糖の開発は今まで積極的に行われてこなかった。そこで、我々は GlcNAc を含むヘテロオリゴ糖の有用性に着目し、スクロース中のグルコース残基が GlcNAc 残基に置き換わった大変興味深い構造をした非天然糖である *N*-アセチルスクロサミン (SucNAc) を対象オリゴ糖として定め、糖転移型 β-フルクトフラノシダーゼを含む *Aspergillus oryzae* 菌糸を用い、本オリゴ糖を生産することに成功した[1)]。また、菌糸充填カラムリアクターによる連続生産法により、大学の研究室内でも SucNAc を 100 グラムスケールで生産し、高収率で容易に精製することにも成功した[2)]。現在、SucNAc については用途開発を行っているが、それと並列して我々はさらに SucNAc を原料とした新たな GlcNAc 含有ヘテロオリゴ糖の酵素合成に着している。本発表では、これまでに本研究で得られた結果を報告する。

【方法・結果】

スクロースを含む液体培養液中で *A.oryzae* を培養することで、糖転移型 β-フルクトフラノシダーゼを含む菌糸を得た。得られた菌糸から本酵素を抽出し、イオン交換クロマトグラフィーにより部分精製したものを 30% (w/v) 濃度の SucNAc を含む緩衝液に添加し反応生成物を TLC によって確認したところ、2 つのメインスポットが確認された。これらの生成物を反応液から活性炭カラムクロマトグラフィーと中圧カラムクロマトグラフィーにより精製し、FABMS と H-H Cosy、HMQC、および HMBC NMR によって構造を確認したところ、1-ケストースとニストースのグルコース残基が GlcNAc 残基に置き換わった新規のオリゴ糖であることが明らかとなった。我々は、糖転移型 β-フルクトフラノシダーゼを含む *A.oryzae* 菌糸を用いてこれらのオリゴ糖を量産するため、最適な酵素含有菌糸の作成にも着手した。本発表では、その研究結果についても報告する。

1) Takako Hirano, Toru Wada, Sumire Iwai, Hitoshi Sato, Makoto Noda, Mai Juami, Masatoshi Nakamura, Yasuko Kumaki, Wataru Hakamata, and Toshiyuki Nishio, *Carbohydr.Res*.,**353**,27-32 (2012)
2) Hitoshi Sato, Saeko Yokochi, Terumi Kasama, Takako Hirano, Wataru Hakamata, and Toshiyuki Nishio., *J.Appl.Glycosci.*,**59** (2012)

oligosaccharide containing GlcNAc, N-acetylsucrosamine, β-fructofuranosidase

講演番号：3B23a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ B 校舎 23 会場

腸内細菌 *Prevotella copri* 由来キシロシダーゼ 43A（Xyl43A）の特性解析
Characterization of Xylosidase 43A (Xyl43A) from *Prevotella copri* isolated from human gut
○佐藤 玲央奈、田中 芳貴、佐々木 謙次、林 秀謙（前橋工科大学）
○Reona Sato,Yoshiki Tanaka,Kenji Sasaki,Hidenori Hayashi (Maebashi Institute of Technology.)

【目的】難消化性食物繊維は大腸内において腸内細菌が生産する糖質加水分解酵素によって、短鎖脂肪酸などに変換される。短鎖脂肪酸の中でも酪酸は発ガン・炎症性腸疾患の抑制、腸管上皮細胞の発達と代謝に重要な役割を果たしている。*Prevotella copri* は多くのヒト腸内に存在し、ヒトの腸内における優勢菌種の 1 つある。最終生産物として短鎖脂肪酸を生産することが明らかになっている。そのゲノム DNA 解析によって食物繊維分解に関与する糖質加水分解酵素遺伝子が見出された。これまでに、食物繊維の主要な構成成分であるキシランの分解に関与する *xyn10A* 遺伝子産物の酵素特性の解析と発現解析を行った。また、*xyn10A* 遺伝子はクラスターを形成しており、*xyn10A* の上流にはキシローストランスポーター遺伝子（*xynT*）が、下流にはキシロシダーゼ遺伝子（*xyl43A*）が存在している。本研究は、*P. copri* の食物繊維分解に関連する糖質加水分解酵素の解析の一環として、Xyl43A の酵素特性の解析および発現解析について報告を行う。
【方法】*P. copri* のゲノム DNA から *xyl43A* 遺伝子を PCR で増幅後、プラスミドベクターに導入し、大腸菌を形質転換した。His タグ融合タンパクとして発現させた Xyl43A をアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、諸性質の解析を行った。基質として pNPX を使用し、至適 pH、至適温度、熱安定性、pH 安定性、基質特異性を決定した。*xyn43A* の発現解析のため、キシラン、キシロース、グルコースおよびセロビオースのそれぞれの炭素源で *P. copri* の培養を行い、菌体を回収し、RNA の抽出を行った。抽出した RNA を用いて RT-PCR を行い、*xyn43A* の発現解析を行った。
【結果】*xyl43A* 遺伝子は 963bp の塩基配列、321 残基のアミノ酸からなるタンパク質をコードしており、分子量は約 37kDa と推定された。これは精製 Xyn43A の分子量と一致した。大腸菌で発現・精製した Xyl43A を用いて酵素特性を測定したところ、至適 pH は 6.5、至適温度は 30℃、熱安定性は 30℃まで約 80%以上の活性を示し、pH 安定性は pH6 から pH10 で 90%以上の安定性を示した。基質特異性については pNPAf では活性を示したが、pNPG、pNPC、キシランに対しては認められなかった。キシロピラノースとアラビノフラノースの立体配座は類似しており、キシロシダーゼにはアラビノフラノース分解活性を持つものがあるという報告と一致する。RT-PCR によって *xyn43A* の発現解析を行ったところ、キシランおよびセロビオースで転写が確認された。キシロースとグルコースでは転写が確認されたが、キシランと比較すると転写が低下していた。これは何らかの転写制御が行われていることが示唆された。今後、酵素特性の解析を進める予定である。

Prevotella copri, xylanase, xylan

講演番号：3B23a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ B 校舎 23 会場

Bacteroides plebeius の *Xyn10A* と *Xyl43A* の特性解析

Characterization of *xyn10A* and *xyl43A* from *Bacteroides plebeius*

○佐々木 謙次、田中 芳貴、對馬 裕誠、田中 裕興、林 秀謙（前橋工科大院工）
○Kenji SASAKI,Yoshiki Tanaka,Yuusei Tushima,Hiroki Tanaka,Hidenori Hayashi（Mabashi institute of technology）

【目的】ヒトが摂取した食物繊維は分解を受けることなく大腸に達し、腸内細菌の発酵により、一部が酪酸やプロピオン酸のような短鎖脂肪酸に変換されてエネルギー源として吸収される。ヒトの腸内細菌の主要な構成グループの一つである *Bacteroides* グループは食物繊維分解に関与していることが知られている。*Bacteroides* 属の一種である *Bacteroides plebeius* は分子生物学的な解析により日本人の腸内に特有に存在する菌種であることが分かった。またこの *B. plebeius* は多くの糖質分解酵素遺伝子を保有していることから、食物繊維の分解に大きく関わっていると推測される。本研究は *B. plebeius* のキシラン分解に関与している遺伝子の酵素特性を明らかにすることを目的とし、今回はキシラナーゼ 10A（*xyn10A* ）、キシロシダーゼ 43A（*xyl43A* ）について報告する。

【方法】*B. plebeius* のゲノム DNA よりキシラナーゼおよびキシロシダーゼの遺伝子を PCR により増幅させた。各遺伝子をベクターに組み込み、大腸菌を形質転換し、各酵素を生産させた。各酵素の精製を行い、至適温度、至適 pH、熱安定性、pH 安定性、基質特異性、TLC による分解産物の解析を行った。また炭素源の異なる培地で生育させた菌体から RNA を抽出し RT-PCR による発現解析を行った。

【結果および考察】Xyn10A は分子量約 42kDa を示し、至適 pH6.5、至適温度 40℃、熱安定性は 50℃、pH 安定性は 2～11 で約 80%の活性を示した。TLC を用いた分解産物の解析ではキシロビオースは分解されず、キシロテトラオースからキシロヘキサオースはキシロースとキシロビオースに分解した。また Xyn10A は xylan、CMC、pNPC に対して活性を見せたが pNPG、pNPX に対しては見られなかった。Xyl43A は分子量約 38kDa を示し、至適 pH6.5、至適温度 35℃、熱安定性は 30℃、pH 安定性は 5.5～10 まで約 80%の活性を示した。Xyl43A は pNPX、pNPAF に対して活性が見られたが、xylan、CMC、pNPG、pNPC に対する活性は見られなかった。2 つの酵素はともに至適条件がヒトの腸内環境に近い条件だと考えられ、これらの酵素はヒトの腸内で食物繊維分解に関与している可能性がある。ゲノム DNA の情報より、上流から xylose transporter、*xyn10A* 、*xyl43A* のクラスターを形成している。グルコース、キシロース、キシランを炭素源に培養を行い RT-PCR で各遺伝子の発現量を定性的に比較したところ、*xyn10A* はすべての炭素源で転写されていた。一方、xylose transporter、*xyl43A* はグルコースとキシランでは転写されていたが、キシロースでは抑制されており、何らかの制御がかかると考えられる。

Xylanase, Xylosidase, *Bacteroides plebeius*

講演番号：3B23a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ B 校舎 23 会場

椎茸菌体内の同質倍数核数増大に伴う微結晶セルロース分解力の向上

Enhancement of the micro-crystalline cellulose degrading ability in the mycelial mat of *Shiitake* strain by increasing the number of autopolyploid nucleus

○外山 英男（南九州大学）
○Hideo Toyama (Minamikyushu Univ.)

実験目標：椎茸菌体が 1% (w/v)微結晶セルロース含有寒天培地において寒天培地中の微結晶セルロースを分解して寒天培地を半透明化できる程度に微結晶セルロース分解力を向上させることを目標にした。演者はこれまでに考案した低温倍数化処理法により椎茸菌体中に同質倍数核を安定に形成することに成功し、同質倍数核を一定の割合より多く含む椎茸菌体では微結晶セルロース分解力が向上することを平成 24 年度日本生物工学会大会で報告した。その時までに分解に成功した微結晶セルロースの濃度は 0.5% (w/v)であった。今回はさらに高い濃度の微結晶セルロースを分解できる椎茸同質倍数体の構築を試みたので、セルラーゼ高生産株として知られる *Trichoderma reesei* QM 9414 株での結果と合わせて報告する。

実験方法：椎茸菌体（IFO 30724）を有糸分裂阻害剤を含む液体培地に加え、菌体中の同質倍数核の割合が一定以上になるように低温下で静置培養して同質倍数化を行った。菌体中の核観察にはギームザ染色液を使用した。処理菌体の微結晶セルロース分解力は、1% (w/v)微結晶セルロース含有寒天培地上に椎茸菌体を置き、寒天培地全面に菌体が広がった時点で 50℃において、寒天培地中の微結晶セルロースの分解状況を観察した。菌体内の核径分布は核径を計測後ヒストグラムを作成して比較した。

実験結果：*T. reesei* QM 9414 株では、1.0% (w/v)微結晶セルロース含有寒天培地上でコロニーが全面に広がった時点で 50℃に置いても培地中の微結晶セルロースは分解されず寒天培地の裏面は白いままであった。ところが低温倍数化処理した菌体は同条件で、培地中の微結晶セルロースの大半を分解し寒天培地を半透明化した。これにより椎茸処理株は *T. reesei* QM 9414 株よりも高い微結晶セルロース分解力を発揮したと考えられた。この椎茸処理株中の核径の分布を調べると倍数核の割合が 0.5% (w/v)微結晶セルロースまでしか分解できなかった椎茸処理株より増大していることが判明した。よって、椎茸菌においても寒天培地中の 1.0% (w/v)微結晶セルロースの分解は可能であり、その微結晶セルロース分解力の向上は菌体中に一定の割合で存在する同質倍数核によるものと考えられた。
また、この結果から菌体中の倍数核の割合をさらに増加させれば、微結晶セルロース分解力をさらに向上させられる可能性があることも示唆された。

Shiitake, *Lentinula edodes*, cellulose

講演番号：3B23a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ B 校舎 23 会場

スーパーフォルダーGFP のジスルフィド架橋導入効果の検討

Effect of disulfide bridge formation in superfolder GFP

○森 祐磨、須藤 慎也、田村 隆、稲垣 賢二（岡山大院・環境生命）
○Yuma MORI,Shinya SUDO,Takashi TAMURA,Kenji INAGAKI (Okayama Univ.)

【目的】GFP はオワンクラゲ由来の蛍光タンパク質であり，青紫色の光を吸収し，緑色光を発光することが知られている。GFP は生体内で融合タンパク質として発現させることで，標的タンパク質の分布や動態の観察に役立っている。現在, 最も構造安定性が高く, 自己フォールディング能力の高いスーパーフォルダーGFP が報告されている。本研究では，高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 における GFP 発現を目的として，まず大腸菌におけるスーパーフォルダーGFP 発現系構築を行い，発現させたスーパーフォルダーGFP の熱安定性，リフォールディング速度について解析した。また，PDI に代表されるジスルフィドイソメラーゼの機能解析を行う上で必要となる基質として GFP を用いるために，4 種類のジスルフィド架橋導入 GFP を作製した。作製した 4 種類のジスルフィド架橋導入 GFP について，蛍光確認，熱安定性測定を行った。

【方法】部位特異的変異導入とライゲーションにより，GFP 発現ベクター（pGLO）の GFP 遺伝子にスーパーフォルダーGFP に特徴的な 6 つの部位特異的変異（S30R，Y39N，N105T，Y145F，I171V，A206V）を導入した。さらに, インバース PCR により, GFP 遺伝子の C 末端に His-tag を連結し, Ni-NTA カラムを用いてスーパーフォルダーGFP と野生型 GFP をそれぞれ精製した。精製した各 GFP を 30℃から 90℃の温度で 30 分間インキュベートし，その後の蛍光強度を測定することで，熱安定性を比較した。リフォールディング反応については，精製した各 GFP 濃度を 5 mg/ml に調製し，6 M グアニジン塩酸塩を添加後，95℃で 5 分間加熱することで完全変性させ，リフォールディング緩衝液で希釈した。相対蛍光回復からリフォールディング速度を比較した。また，GFP の 8 箇所にシステイン残基（T9C-T38C，P56C-L141C，F83C-I161C，Y143C-K208C）を導入することで，4 種類のジスルフィド架橋導入 GFP を作製した。作製したジスルフィド架橋導入について，蛍光確認を行い，上記の方法で熱安定性測定を行った。

【結果・考察】熱安定性測定の結果，70℃において，野生型 GFP は蛍光強度が約 20%に低下したが，スーパーフォルダーGFP は約 90%の蛍光強度を維持していた。また, リフォールディング反応の結果，最終的な蛍光回復量に大きな変化は確認できなかったが，スーパーフォルダーGFP は野生型 GFP と比較して，リフォールディング初速度が約 2 倍に向上した。また, 4 種類のジスルフィド架橋導入 GFP の蛍光確認を行った結果，F83C-I161C 導入 GFP を除いて，緑色蛍光を確認することができた。蛍光が確認できた 3 種類のジスルフィド架橋導入 GFP の熱安定性測定を行った結果, スーパーフォルダーGFP が最も熱安定性が高いことが確認できた。以上の結果から，スーパーフォルダーGFP は，高度好熱菌における発現やリフォールディング反応における基質としての利用が期待できる。

GFP, refolding, disulfide

講演番号：3B23a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ B 校舎 23 会場

Amphibacilus xylanus における遊離フラビン関与の酸素代謝（ 第三報 ）
Oxygen metabolism involved in free flavins in *Amphibacillus xylanus*

○木俣 真弥[1]、望月 大地[1]、新井 俊晃[1]、藤田 信之[2]、阿部 晃[3]、中川 純一[4]、佐藤 純一[1]、川崎 信治[1]、新村 洋一[1]（[1]東農大応生科・バイオ、[2]NITE、[3]札幌医大医・眼科、[4]東農大生物生産・食香）
○Shinya KIMATA[1], Daichi MOCHIZUKI[1], Toshiaki ARAI[1], Nobuyuki FUJITA[2], Akira ABE[3], Junichi NAKAGAWA[4], Junichi SATO[1], Shinji KAWASAKI[1], Youichi NIIMURA[1] ([1]Dept. Bio., Tokyo Univ. Agri., [2]NITE, [3]Dept. Oph., Sapporo Med. Univ., [4]Dept. Food and Cosmetic., Tokyo Univ. Agri.)

【背景・目的】

一般的にフラビンは酵素タンパクに結合する補欠分子族として知られている。一方、タンパクに結合しないフラビン (遊離フラビン) 関与の酵素反応が報告されつつあるが、遊離フラビンの実体 (存在、濃度、発現条件) は不明である。我々は、呼吸鎖を欠如する *Amphibacillus xylanus* (*A. xylanus*) 細胞中に遊離フラビンを見いだし、酸素代謝酵素 NADH oxidase (Nox) の遊離フラビン存在下での活性化を報告した[2)]。本発表では *A. xylanus* における酸素代謝機構の解明を目的として、各酸素濃度 (0, 10, 21, 40 %) における遊離フラビン依存性酸素代謝酵素の細胞内発現と遊離フラビン濃度を検討した。

【結果・考察】

① 酸素吸収能の比較：呼吸鎖を欠如する菌株として *A. xylanus* Ep01, *L. plan.* P1-2, 呼吸鎖を有する菌株として *E. coli* JM109 生菌体における酸素吸収活性を酸素電極により比較した。酸素吸収活性は *E. coli* ≧ *A. xylanus* ＞ *L. plan.* であり、*A. xylanus* が呼吸鎖に匹敵する酸素代謝系を有すことを示唆した。

② 酸素代謝酵素 ：*A. xylanus* は酸素代謝酵素として NADH oxidase (Nox) – AhpC (Prx) 系[1, 2)]と NAD (P) H oxidoreductase (NPO)[3)] を有している。大腸菌で NPO 発現系 (pET101 / D – TOPO)を構築し、発現された NPO を精製した (Butyl TOYOPEARL 650S, DEAE Sepharose Fast Flow, POROS HQ / 10, HiLoad 26 / 60 Superdex 200 prep grade) 。精製 NPO も Nox 同様、遊離フラビン存在下で NADH oxidase 活性が顕著に上昇した。

③ 0～40 %酸素による発現解析：Nox, NPO は mRNA、タンパクレベルにおいて 10 %酸素で発現するが、Prx は酸素濃度の上昇に伴い発現量がさらに増大した。

④ 遊離フラビン濃度：膜遠心分離装置を用いた遊離フラビン抽出法を確立し、*A. xylanus* 細胞中より遊離フラビンを検出した。遊離フラビン (FAD) 濃度は酸素存在下で上昇した。現在、Nox, Prx, NPO の細胞内濃度の定量を行っている。

以上の結果に基づき、*A. xylanus* における遊離フラビン関与の酸素代謝について考察する。

1) Ohnishi K. et al. *J. Biol Chem.* ; 269 : 31418 – 31423 (1994)
2) Nishiyama Y. et al. *J. Bacteriol.* ; 183 : 2431 – 2438 (2001)
3) 望月大地ら　2011 農芸化学会　年次大会　要旨集　P107

Amphibacillus xylanus , free flavins, NAD(P)H oxidoreductase (NPO)

講演番号：3B23a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ B 校舎 23 会場

緑膿菌のカイコへの病原性に対する一酸化窒素解毒酵素の役割
Role of nitric oxide-detoxifying enzymes in the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* against the silkworm, *Bombyx mori*
○新井 博之[1]、飯山 和弘[2]、石井 正治[1]、五十嵐 泰夫[1] ([1]東大院農生科・応生工、[2]九大院・農)
○Hiroyuki ARAI[1], Kazuhiro IIYAMA[2], Masaharu ISHII[1], Yasuo IGARASHI[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Kyushu Univ.)

【目的】緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)は日和見感染性の病原菌であり、ヒトを含めた多くの動物、植物、昆虫に対して病原性を示す。感染宿主免疫系のマクロファージは、毒性の高いフリーラジカルである一酸化窒素(NO)を放出して感染菌を攻撃することが知られているが、緑膿菌自身は NO 解毒作用のある一酸化窒素還元酵素(NOR)とフラボヘモグロビン(Fhp)を持っており、NO に対して耐性が高い。NOR は嫌気的生育に必要な脱窒酵素の１つであり、NO を亜酸化窒素に還元する。Fhp は NO ジオキシゲナーゼ活性を持ち、好気条件下で NO を硝酸に変換する。カイコ等の昆虫でも NO 合成酵素を持っていることが知られていることから、本研究ではカイコを感染宿主のモデル生物として用い、緑膿菌の病原性に対する NOR と Fhp の役割を調べることを目的とした。
【方法・結果】緑膿菌の野生株(PAO1)と、NOR および Fhp の遺伝子欠損株の培養液を段階的に希釈し、カイコの４齢幼虫に接種後、カイコの死亡率を 10 日間にわたり測定した。NOR 欠損株においては、野生株と比べてカイコの死亡率の有意な低下が認められ、NO 還元能が緑膿菌の感染力に関与していることが示唆された。しかし、NOR 欠損がカイコの死亡率に影響するのは、比較的少量（～10^3）の菌体を接種した場合に限られ、NOR の効果はカイコ免疫系による貪食またはノジュール形成後に限定的であると予想された。Fhp 欠損株では、逆に野生株よりも若干の病原力の増加が見られ、Fhp はカイコへの感染力には寄与しないことが示された。カイコの体腔内の酸素濃度は比較的低いため、嫌気的 NO 還元、または、脱窒による嫌気呼吸が緑膿菌の生存に有利に働く可能性があるのに対し、Fhp により NO から生成した硝酸は、脱窒酵素の硝酸還元酵素と亜硝酸還元酵素の働きにより再び NO に還元されるため、Fhp による解毒効果は低いことが考えられた。

nitric oxide reductase, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bombyx mori*

講演番号：3B23a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ B 校舎 23 会場

緑膿菌における *cbb*$_3$ 型シトクロム *c* 酸化酵素への電子供与体に関する研究

Study on the electron donor for *cbb*$_3$-type cytochrome *c* oxidases of *Pseudomonas aeruginosa*

○平井 猛博、石井 正治、五十嵐 泰夫、新井 博之（東大院農生科・応生工）
○Takehiro Hirai,Masaharu Ishii,Yasuo Igarashi,Hiroyuki Arai (Univ. of Tokyo)

【目的】緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）は好気呼吸鎖の末端酸化酵素を複数保持しており、生育環境に応じて、これらを使い分けることにより多様な環境下で生育が可能である。これまでの研究で、主要な 5 種の末端酸化酵素の発現制御、プロトン排出効率、酸素親和性について詳細な解析がなされている。5 種類のうち、恒常的に発現する *cbb*$_3$ cytochrome *c* oxidase-1 (Cbb3-1)、低酸素条件下で発現する *cbb*$_3$ cytochrome *c* oxidase-2 (Cbb3-2)、飢餓条件で発現が誘導される *aa*$_3$ cytochrome *c* oxidase (Aa3)の 3 種類はシトクロム *c* 酸化酵素であるが、それぞれの酵素が電子供与体としてどのシトクロム *c* を特異的に利用しているのかは示されていない。特に、Cbb3-1 と Cbb3-2 にはプロトン排出効率、酸素親和性の違いが見られないことから、電子供与体の利用性に違いがあるのかどうかに興味がもたれた。そこで、本研究では緑膿菌が持つ 2 種類の *cbb*$_3$ 型シトクロム *c* 酸化酵素における電子供与体シトクロム *c* の利用性についての詳細な知見を得ることを目的とした。

【方法・結果】緑膿菌のゲノム上に存在する *c* 型シトクロム遺伝子のうち、マイクロアレイ解析により比較的発現量が高く、末端酸化酵素への電子供与体として働く可能性のある 3 種類のシトクロム *c* 遺伝子（*cycB*, *cc4*, PA5491）について解析を行った。これらはそれぞれ、cytochrome *c*$_5$、cytochrome *c*$_4$、モノヘムの新規シトクロム *c* をコードしている。末端酸化酵素として Cbb3-1 または Cbb3-2 のみが発現する多重破壊株を親株として、各シトクロム *c* 遺伝子の欠損株を作製し、それらの嫌気、好気条件下における生育の測定を行った。その結果、どちらの親株を用いた場合にも、*cc4* 欠損により好気的生育の大きな低下が観察された。また、これらの生育の低下はプラスミドによる *cc4* の相補によって回復することを確認した。以上の結果から、Cbb3-1、Cbb3-2 ともに cytochrome *c*$_4$ を主要な電子供与体として利用することが示された。

cytochrome *c*, terminal oxidase, *Pseudomonas aeruginosa*

講演番号：3B23a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ B 校舎 23 会場

好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* OCh114 の持つ alternative oxidase の機能解析
Functional analysis of an alternative oxidase from an aerobic photosynthetic bacterium *Roseobacter denitrificans* OCh114
○青山 晴菜、木村 真人、石井 正治、五十嵐 泰夫、新井 博之（東大院農生科・応生工）
○Haruna AOYAMA,Makoto KIMURA,Masaharu ISHII,Yasuo IGARASHI,Hiroyuki ARAI (the Univ.of Tokyo)

Alternative oxidase (AOX) は、植物のミトコンドリアで発見された好気呼吸鎖末端酸化酵素の一種であり、キノンから直接電子を受けとるキノールオキシダーゼとして、シアン耐性呼吸酵素や熱産生に関わることが知られている。また、AOX は好気呼吸鎖末端酸化酵素ではあるが、酸素還元に共役したプロトン排出活性を持たないため、ATP 産生に直結せず、キノンプールからの電子を積極的に酸素に捨てているという特徴を持つ。そのため、AOX は、エネルギー生産よりもむしろ膜内の過還元状態を解消し、細胞内の酸化還元バランスを保つことで活性酸素の発生を防ぐ役割があると考えられており、実際に低温や強光などのストレス条件下で重要な働きを持つことがわかっている。近年の環境微生物を対象にした大規模なメタゲノム解析の結果、この植物の *aox* 遺伝子と相同な遺伝子がバクテリア、特に海洋性細菌のゲノム中に広く存在することが明らかとなっている。しかし、バクテリアの AOX についての研究は現在までほとんど行われておらず、その機能については未知の部分が多い。

Roseobacter denitrificans OCh114 は、α–プロテオバクテリアに属する、海洋性の好気性光合成細菌の一種であり、ゲノム中に AOX をコードする遺伝子 *aox* を 1 つもつ。好気性光合成細菌は海洋に広く分布しており、海域によっては優占種の一つであるとも考えられている。ある環境で優占化するためは、様々環境ストレスに適応することが重要である。本研究では、*R. denitrificans* における AOX の役割を解明することを本研究の目的とした。

まず、好気生育が出来ない緑膿菌の末端酸化酵素多重欠損株に、*R. denitrificans* の *aox* 遺伝子をプラスミドにより相補したところ、相補株は好気生育が可能になったことから、*R. denitrificans* の AOX は末端酸化酵素として機能し得ることが示唆された。そこで、相補株を用いて AOX の酸素親和性とプロトン排出効率などの酵素機能の解析を行った。さらに、*R. denitrificans* の *aox* 破壊株を作製し、その表現型解析を行った。

terminal oxidase, respiration, photosynthetic bacteria

講演番号：3B23a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ B 校舎 23 会場

染色体因子によりプラスミドの負荷が軽減した自然変異株の解析
Analysis of mutants whose fitness cost is reduced by host chromosomal factor
○能登 優[1]、高瀬 識之[1]、高橋 裕里香[1]、松本 貴嗣[2]、吉川 博文[2]、土金 恵子[3]、細山 哲[3]、藤田 信之[3]、岡田 憲典[1]、山根 久和[4]、野尻 秀昭[1]([1]東大・生物工学セ、[2]東農大・生物資源ゲノム解析セ、[3]NITE、[4]帝京大・バイオ)
○SUGURU NOTO[1], NORIYUKI TAKASE[1], YURIKA TAKAHASHI[1], TAKASHI MATSUMOTO[2], HIROFUMI YOSIKAWA[2], KEIKO TSUCHIKANE[3], AKIRA HOSOYAMA[3], NOBUYUKI FUJITA[3], KAZUNORI OKADA[1], HISAKAZU YAMANE[4], HIDEAKI NOJIRI[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Univ. of Agriculture, [3]NITE, [4]Teikyo Univ.)

【目的】プラスミドは遺伝子の運び手として宿主間を伝播し、多剤耐性能や特殊な代謝能等を与え得る一方、宿主の生育にとって負荷となるため、プラスミド保持菌が他の細菌との集団内では淘汰されやすい事が報告されている。そこで本研究では、プラスミドの持つ有益な性質を効率よく利用するという観点から、プラスミド保持菌の集団中での生き残りに着目し、プラスミドの負荷を軽減する原因因子の探索及びその作用機序の解明を目的としている。
【昨年度までの結果】IncP-7群プラスミドpCAR1は主に*Pseudomonas*属細菌を宿主とする自己伝達性プラスミドであり、難分解性物質であるカルバゾールの分解遺伝子群を有する。このpCAR1を元に作製した選抜用プラスミドpCAR1PKを用い、*Pseudomonas putida* KT2440株のpCAR1PK保持株と非保持株を混合後、コハク酸を唯一の炭素源とする液体培地で継代培養すると、144 時間（5回の継代培養）後に、pCAR1PK保持株は集団の0.1%以下まで淘汰された。しかし、淘汰された株を再びpCAR1PK非保持株との競合培養に供する課程を繰り返し約350世代長期培養すると、逆に集団中でpCAR1PK保持株が優占化した。この進化実験により自然変異株a501,a502,b501,b502の4株を単離し、親株KT2440(pCAR1PK)と共に次世代シーケンサを用いて全塩基配列情報を取得した。これより親株に存在せず自然変異株のみに存在する変異を検出した結果、宿主染色体上の計18種の遺伝子内部に変異が確認され、これらの遺伝子がプラスミドの負荷を軽減する因子の候補である事が示唆された。
【本年度の結果】本年度はまず、上記の自然変異株 4 株がプラスミド非保持株との競合培養の際に“プラスミドを有するにも関わらず優占化する”要因となりうる各形質について、進化前の親株KT2440(pCAR1PK)株と比較しつつ、精査した。まずは生育評価の指標として、各株の単独培養時の生育曲線の作製及びコロニー形成能の観察を行った。その結果、各自然変異株の最大到達濁度は親株よりも高い事が明らかになった。次に、各株が有する接合伝達能の評価を、接合伝達の際の供与菌及び接合伝達体の菌数を計数する事で行った。pCAR1 は自己伝達性を有するため、その接合頻度について親株よりも向上し、結果プラスミド非保持株との競合培養において有利になる可能性が考えられたが、固体表面上、液体中での接合頻度各々について、親株との間で顕著な差は見られなかった。本大会では、上記の様な実験において観察された各形質の違いと共に、自然変異株において検出された各変異との関係について、現在解析が進んでいる段階までを発表する予定である。

Plasmid, Fitness cost, *Pseudomonas*

講演番号：3B23a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ B 校舎 23 会場

糸状菌由来 adenosine deaminase-related growth factor 類似遺伝子の解析

Characterization of genes coding for putative adenosine deaminase-related growth factor in filamentous fungi

○西川 良平[1]、藤田 将幸[1]、稲冨 聡[2]、田口 悟朗[1]、下坂 誠[1] ([1]信州大・繊維、[2]ホクトきのこ総合研)
○Ryohei Nishikawa[1], Masayuki Fujita[1], Satoshi Inatomi[2], Goro Taguchi[1], Makoto Shimosaka[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Mushroom Lab. Hokuto Co.)

昆虫などで報告されている adenosine deaminase-related growth factor (ADGF) は、adenosine deaminase (ADA) 活性中心配列を保持し、ADA 活性を介して細胞増殖や分化を制御する新規の growth factor である。これまでに *Sarcophaga peregrina*（センチニクバエ）や *Drosophila melanogaster*（ショウジョウバエ）、*Homo sapiens*（ヒト）などで細胞増殖や形態分化に ADGF が関与することが示されている。ADGF の報告は他にもあるが、詳細な作用メカニズムは未だ明らかになっていない。

これまでに我々は、担子菌 *Flammulina velutipes*（エノキタケ）細胞より子実体特異的に発現する ADGF 類似遺伝子（*Fv-ada*）を単離し、*Pichia* 酵母で発現させた組換えタンパク質が ADA 活性を有することを確認した。*Agrobacterium tumefaciens* を用いた形質転換法（*Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation*: ATMT）を用いて、エノキタケ細胞内にて *Fv-ada* 遺伝子発現を抑制（RNAi）したところ、抑制度に応じて生育が遅延したことから、エノキタケにおいても ADGF は growth factor として機能することが示唆された。

ADGF 類似遺伝子は菌類に広く存在していることが明らかになっている。また、動物や昆虫の ADGF の多くがシグナル配列を持つのに対し、菌類の ADGF にはシグナル配列が存在しないため、その作用機構が異なることが示唆された。そこで、ゲノム解析が行われている糸状菌で見つかった ADGF の解析を行い、糸状菌における ADGF の機能を明らかにすることを目的として研究を行った。

Aspergillus nidulans および *Neurospora crassa* のゲノム中には、それぞれ 2 個の ADGF 類似遺伝子が存在した。各遺伝子の cDNA を RT-PCR により獲得し、大腸菌にて異種宿主発現を行った。得られた各組換えタンパク質を Ni^{2+}アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製し、ADA 活性の有無を確認した。その結果、adenosine を inosine に変換する ADA 活性が確認できた。現在、活性の得られた組換えタンパク質の機能を解析中である。

adenosine deaminase-related growth factor, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*

講演番号：3B23p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ B 校舎 23 会場

腸内細菌による鉄還元

Ferric reduction by intestinal bacteria

○櫻井 友樹、鈴木 義規、斎木 博（工科大）
○Yuuki Sakurai,Yosinori Suzuki,Hiroshi Saiki (Tokyo univ.technol.)

【背景･目的】 地球上に存在するほとんどの生物は生体元素として鉄を必要としている。しかし、環境中の鉄は三価鉄であり、不溶性の化合物として存在している。 そのため生体内に取り込むには三価鉄を還元しニ価鉄として可溶化するか、キレーターと反応させて可溶化させることが必要である。よって不溶性の三価鉄を吸収させることは腸内環境においても同様であると考えられる。そこで本研究では、腸内細菌の不溶性の 3 価鉄を還元し、可溶化させているのかに絞って検証した。
【実験方法】腸内細菌を 4 種(大腸菌(*Escherihia coli*) 酪酸菌(*Clostridum butyricum*) 乳酸菌(*Lactobacillus casei* NBRC15883 株) ビフィズス菌（*Bifidobacteriumbifidum*) NBRC100015 株）) それぞれ三価鉄を加えた培地で培養した。また三価鉄として Fe(Ⅲ)EDTA、マグネタイト、オキシ水酸化鉄を用いた。培地は *L.casei* は BCP 培地、 *B.bifidum* は NBRC に記載されているビフィドバクテリウム培地、*E.coli* は有機酸としてクエン酸または酢酸を加えた合成培地、*C.butyricum* はグルコースを加えた合成培地を使用した。嫌気条件としてバイアル瓶を密閉し、N_2(窒素)100%、150kPa で気相置換して行った。菌体密度測定として顕微鏡で調べ、鉄還元能測定としてオルトフェナントロリン吸光光度法を用いた。
【結果・考察】どの 4 つの微生物はすべて増殖にともない Fe(Ⅲ)EDTA の鉄還元が確認できた。また *E.coli* では鉄 10 mM 中約 5 mM がニ価鉄に変化した。培養 72 時間後には鉄 0 mM が最大菌体密度 3.43×10^7cells/ml に対して 10 mM のサンプルでは 1.68×10^8cells/ml と約 5 倍増殖の差が確認できた。*C.butyricum* では 24 時間後に鉄 50 mM 中 2 mM 還元して、最大菌体密度 2.57×10^8 cells/ml と 0 mM より約 2 倍増殖した。*L.casei* では 24 時間後に鉄 5 mM 中 1.2 mM 還元した。*B.bifidum* では 24 時間後に鉄 5 mM 中 1.5 mM 還元した。しかし、*L.casei.*と *B.bifidum* の増殖の差は鉄 0mM と比べあまり見られなかった。これは鉄を呼吸(異化的)の基質としては利用していないと考えられる。また *L.casei.*と *B.bifidum* では鉄濃度を 20mM 以上に上げると増殖量が減少していくのが確認されたことから、過剰な摂取による生育に影響していると考えられる。低濃度(1mM~10 mM の間)の鉄が適度な濃度である。よってこの 4 つの細菌は鉄還元能を有していることがわかり、不溶性の三価鉄化合物を腸内で吸収しやすいように還元してニ価鉄として可溶化していると考えられる。

Intestinal bacteria, iron reduction, solubilization

講演番号：3B23p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ B 校舎 23 会場

肺炎連鎖球菌の病原性に寄与する酸素耐性因子の同定
Identification of aerotolerance gene required for virulence of *Streptococcus pneumoniae*
○山本 裕司、高田 美佐子、新里 恵、主藤 理奈、岩間 然花、向井 孝夫（北里大獣）
○Yuji YAMAMOTO,Misako TAKATA,Megumi NIIZATO,Rina SHUTOU,Saho IWAMA,Takao MUKAI (Kitasato Univi)

【背景と目的】肺炎連鎖球菌 *Streptococcus pneumoniae* は、ヒトの鼻腔や咽頭に棲息する常在菌の一種であるが、宿主の免疫が低下すると、肺炎や敗血症、髄膜炎などを引き起こす。本菌の棲息及び感染部位はいずれも好気的環境であることから、酸素への適応能力は病原性と密接に関連すると推測される。しかし本菌は呼吸鎖やカタラーゼを持たず、酸素への適応機構については不明な点が多い。また、本菌は典型的な H_2O_2 産生菌であり、産生された H_2O_2 は他の細菌の増殖阻害や組織の炎症に関与するとされているが、肺炎連鎖球菌自身がどのように H_2O_2 の毒性から身を守っているかは分かっていない。

今回我々は、肺炎連鎖球菌の酸素耐性因子として鉄結合蛋白質である Dpr のホモログに注目した。Dpr は、我々が口腔内連鎖球菌より発見した酸素耐性因子であり、細胞内の鉄イオンをキレートすることで、H_2O_2 のヒドロキシラジカルへの変換を妨げ、その毒性から細胞を守る（J Bacteriol. 182:3740）。Dpr 分子は肺炎連鎖球菌の H_2O_2 耐性機構を説明しうるため、これまで２つのグループが *dpr* 欠損株の作製を試みたが、いずれも失敗に終わっていた（J Bacteriol.185:6815, J Bacteriol. 186:8123）。今回我々は全ての作業を嫌気箱内で行うことで欠損株の取得に成功したので、これを報告する。
【実験方法】本実験では標準菌株の NCTC7465 と感染試験に一般的に用いられる D39 株の２株を親株として用いた。*dpr* 欠損株の作製には、２点相同組換えを用いゲノム上の *dpr* 遺伝子にスペクチノマイシン耐性遺伝子を挿入した。肺炎連鎖球菌の酸素耐性への関与が報告されている *sod* 欠損株も同様に作製した。D39 株については、それぞれの欠損株ゲノム上の CEP 領域にプロモーター領域を含む *dpr* あるいは *sod* 遺伝子を導入することで、相補株を作製した。
【結果と考察】嫌気箱を用いることで、NCTC7465 と D39 株の *dpr* 欠損株取得に成功した。生育試験を行った結果、*sod* 欠損株は大気下で野生株と同等の生育能を示したが、いずれの *dpr* 欠損株も顕著な酸素感受性を示し、大気下の振盪培養では完全に生育が停止した。また、D39 株の *dpr* 相補株は大気下で野生株と同等の生育能を示した。D39 株、NCTC7465 株の両株を好気的に培養すると～2 mM 程度の H_2O_2 の蓄積が見られたこと、カタラーゼの培地への添加で *dpr* 欠損株の生育が回復したことから、Dpr 分子が肺炎連鎖球菌の H_2O_2 存在下での生育を可能にしていると考えられた。当日はマウス感染モデルを用いた *dpr* 欠損株の病原性の評価と精製 Dpr 蛋白質の諸性質についても併せて報告する予定である。

oxygen, virulence, Streptococcus

講演番号：3B23p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ B 校舎 23 会場

酸素耐性乳酸菌育種方法の検討
Investigation of the methods for breeding of oxygen tolerant lactic acid bacteria
○佐々木 諒子、喜多 隆文、三宅 香名芽、山本 裕司、向井 孝夫（北里大学院獣）
○Ryoko SASAKI,Takahumi KITA,Kaname MIYAKE,Yuji YAMAMOTO,Tkao MUKAI (Kitasato Univ.)

【目的】乳酸菌の酸素に対する応答は種や株によって異なり、酸素存在下の生育や生残性に影響を与える。酸素に感受性を示す株では食品への利用やプロバイオティクスとしての有効性が制限されるため、なんらかの対策が必要とされる。このような問題の解決を目的として、本研究室では活性酸素発生剤である Streptonigrin (SN) を用いて酸素耐性株の育種を試みてきた。これまでに SN で選抜を行うことで、*Lactobacillus acidophilus* と *Lactobacillus gasseri* から酸素存在下での生育能や低温生残性が向上した株を取得した。得られた株の生残性向上機構を解析した結果、*L. acidophilus* では過酸化水素産生量の低下が生残性の向上に関与していることが示唆された。一方、*L. gasseri* では *L. acidophilus* ほど生残性が大きく向上した株は得られていない。本研究では、*L. gasseri* からの新たな酸素耐性株の取得を目的とし、耐性株取得の条件を検討するとともに得られた株の性状を解析した。
【方法・結果】*L. gasseri* からの酸素耐性株の取得には、昨年度分離した SN 耐性株を材料とし、① SN による選抜を繰り返す方法と、②低温保存時に生き残った株を分離する２つの方法を用いた。SN による選抜を繰り返すことで新たに SN 耐性株を分離し、好気条件下における生育能および低温生残性を評価した結果、いずれの測定項目についても親株より向上した株が確認された。この結果から SN による選抜を繰り返すことで、酸素耐性能を向上させることができると考えられた。もうひとつの方法として、SN 耐性株を２８日間低温保存し、生き残った菌を分離した。分離した１０株の低温生残性を評価した結果、２８日間保存した時点で野生株よりも約１００倍生残性が向上した株が 1 株得られた。次に、得られた株の生残性向上機構を解析するために過酸化水素の産生能と分解能を測定したが、野生株との大きな差は認められなかった。*L. acidophilus* の SN 耐性株では、過酸化水素産生量の低下が生残性の向上に寄与すると推測されたが、今回の結果から *L. gasseri* の生残性向上機構は *L. acidophilus* とは異なる機構であることが示唆された。

oxidative stress, survival, probiotics

講演番号：3B23p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ B 校舎 23 会場

過酸化物還元活性を有する乳酸菌の酸素関連代謝系

Oxygen metabolism of lactic acid bacteria with hydroperoxide reducing activity

○梅澤 秀幸[1]、村岡 洋輔[1]、横塚 敢[1]、田代 光[1]、大山 修平[1]、下薗 建志[1]、深谷 太樹[1]、渡邊 昭夫[2]、佐藤 純一[1]、新村 洋一[1] ([1]東農大応生科・バイオ、[2]大洋香料)
○ Hideyuki UMEZAWA[1], Yousuke MURAOKA[1], Tuyoshi YOKODUKA[1], Hikari TASIRO[1], Syuuhei OYAMA[1], takeshi SIMOZONO[1], Taiki FUKAYA[1], Akio WATANABE[2], Junichi SATO[1], Youichi NIIMURA[1] ([1]Nodai University of Agriculture , Department of Bio-Science, [2]TAIYO Corporation)

【 背景・目的 】私達は菌体外の H_2O_2 を還元する乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* Be1 株、過酸化脂質を還元する *Lactobacillus plantarum* P1-2 株を分離し、その投与効果と過酸化物分解機構について研究してきた。両株の投与効果検討では、線虫短寿命突然変異体に両分離乳酸菌株を投与し、平均寿命の延長、加齢性色素の蓄積抑制効果を観察した。鉄剤で消化管の脂質過酸化を誘導したラットに *L. plan.* P1-2 株を投与したところ、大腸粘膜中の脂質過酸化反応指標が低値を示す結果を得た[1)]。子豚に *L. plan.* P1-2 株を投与した結果、子豚の増体重促進効果を示し、投与後の血清中脂質過酸化反応指標は低値であった[2)]。

L. plan. P1-2 株の過酸化物分解機構の検討では、過酸化物（ 過酸化脂質、過酸化水素 ）還元酵素として NAD(P)H 依存性還元酵素を見いだしている。*L. plan.* P1-2 株は好気条件下でも良好に生育し、酸素吸収活性を示した。本発表では、同菌株の酸素関連代謝酵素（ O_2、H_2O_2)について報告する。

【 方法と結果 】① H_2O_2 分解酵素 ： *L. plan.*では、Mn-catalase、heme 添加時の heme-catalase の報告がある。そこで heme 添加培養菌体での検討を行った。heme 添加で catalase 活性が観察され、この活性は NaN_3 存在下で不活性化されるため、heme-catalase と推察された。また無細胞抽出液中に NADH peroxidase 活性が検出され、同酵素精製に成功した(Butyl-TOYOPEARL 650S 、Red sepharos、Superdex 200pg カラムクロマトグラフィー)。② O_2 代謝酵素 ：*L. plan.* P1-2 株の無細胞抽出液の中に NADH oxidase 、pyruvate oxidase 活性を検出した。乳酸菌同様に呼吸鎖と catalase を欠如するグラム陽性菌 *Amphibacillus xylanus* は遊離フラビン添加による NADH oxidase 活性の上昇を観察した[3)]。本菌株でも遊離フラビンを添加したところ顕著な活性上昇が示された。*L. plan.* P1-2 における遊離フラビン存在の有無を解明するため細胞破砕条件検討を行った結果、無細胞抽出液中に遊離フラビンを見いだした。

【 考察 】1：*L. plan.* P1-2 株のゲノム解析から heme-catalase 遺伝子の存在が示された。本株は heme 非添加で heme-catalase 活性を誘発しないため、heme 合成能の欠如が考えられる。heme 非存在下の H_2O_2 分解は NADH peroxidase が関与すると推測される。

2：*L. plan.* P1-2 株の無細胞抽出液の中に遊離フラビンが見いだされた。今後、細胞中遊離フラビン濃度を測定するとともに、遊離フラビン関与の酸素代謝酵素を明らかにしたい。

1) 脂質過酸化を誘導したラットへの過酸化物還元活性を有する乳酸菌の投与効果 渡邊ら、本大会、2012年
2) 過酸化物還元活性を有する乳酸菌の豚への投与効果 渡邊ら、第65回日本酸化ストレス学会学術集会
3) Nisiyama Y. et al . *J. Bacteriol* . 183,2431-2438 (2001)

Lactic acid bacteria, Lipid peroxide, Probiotics

講演番号：3B23p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ B 校舎 23 会場

Lactobacillus pentosus KB612 の耐塩性と保有プラスミドとの関連性の検討
Study of plasmids potentially related to salt tolerance in *Lactobacillus pentosus* KB612

○杉本 渓[1]、小林 靖尚[1]、中野 綾子[1]、渕田 琢[1]、吉川 悠子[1]、大橋 典男[1]、脇 尚子[2]、菅沼 大行[2] ([1]静岡県大・食栄、[2]カゴメ（株））
○Kei Sugimoto[1], Yasutaka Kobayashi[1], Ayako Nakano[1], Taku Fuchita[1], Yuko Yoshikawa[1], Norio Ohashi[1], Naoko Waki[2], Hiroyuki Suganuma[2] ([1]Dept. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2]KAGOME CO. LTD.)

【目的】
乳酸菌の生育には、環境ストレスが影響を及ぼす。漬物などから分離される乳酸菌は食塩濃度に適応して生存している。乳酸菌の耐塩性については、分子シャペロンの関与などの報告があるが、未だ不明な点が多い。我々は、植物が原材料である漬物などから分離した *Lactobacillus* 属菌の耐塩性を調べ、その中で最も高塩濃度下で生育できる *L. pentosus* KB612 の耐塩性が保有プラスミドと関連する可能性を見出したので報告する。
【方法および結果】
漬物などから分離した 27 菌株の *Lactobacillus* 属菌について、異なる食塩濃度の MRS 培地で培養したところ、ほとんどの菌株は 7.5%より高い塩濃度で増殖できなかったが、しば漬けから分離した *L. pentosus* KB612 と KB611 は 10.5%の塩濃度まで生育可能で、また *L. pentosus* KB639 は 8.5%の塩濃度まで生育できることが判った。一方で、*L. pentosus* JCM1558（基準株）を調べたところ、7.5%の塩濃度が生育限界であった。上記の結果から、我々は同一菌種の菌株間における耐塩性の差異の一部は、保有するプラスミドの違いによるものと仮説を立て、これらの菌株からプラスミド抽出を行い、電気泳動により解析した。その結果、KB612 と KB611 は 14 本のバンドからなる同一の泳動パターンを示し、KB639 はそれとは異なるパターンであることが判った。また、基準株ではバンドは検出されなかった。次に、最も耐塩性が強い菌株を代表して KB612 を選び、これをノボビオシン処理してプラスミド欠損株を作製し、それらの異なる塩濃度下における生育状況を調べた。その結果、6 本のバンドの欠損株は耐塩性に変化がなかったが、8 本のバンドの欠損株は耐塩性が減少し、これにより 2 つのバンドのプラスミドが耐塩性に関与している可能性が示唆された。これら 2 つのうち、より主要なバンドの p-11 プラスミドに着目し、これをクローニングして p-11 欠損株を形質転換し復帰株を作製して耐塩性試験を行ったところ、得られた復帰株では耐塩性の回復傾向が認められた。続いて、次世代シーケンサーGS-FLX により、p-11 の全塩基配列を決定した結果、このプラスミドの全長は 8,880 bp で、キムチから分離された *L. brevis* の pLB925A03 プラスミドと 99%の相同性を示すことが判明した。この pLB925A03 には、*L. rhamnosus* HN001 の hypothetical secreted protein と 99%の相同性を示す機能不明な orf2 が含まれていた。
以上、本研究により得られた成果は、今後、*Lactobacillus* 属菌における耐塩性機構の解明に大きく貢献するものと考える。

Lactobacillus pentosus, salt tolerance, plasmid

講演番号：3B23p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ B 校舎 23 会場

Eggerthella sp. YY7918 の持つダイゼインレダクターゼの諸性質
Characterization of daidzein reductase from *Eggerthella* sp. YY7918

○川田 結花[1]、横山 慎一郎[2]、野村 泉[3]、中塚 進一[4]、服部 正平[5]、大島 健志朗[5]、鈴木 徹[3]([1]岐阜大・院・応用生物、[2]岐阜県・生物工学研究所、[3]岐阜大・連農、[4]長良サイエンス、[5]東大・院・新領域)
○ Yuika KAWADA[1], Shin-ichiro YOKOYAMA[2], Izumi NOMURA[3], Shinichi NAKATSUKA[4], Masahira HATTORI[5], Kenshiro OHSHIMA[5], Tohru SUZUKI[3] ([1]Gifu Univ., [2]Gifu Pref., [3]Gifu Univ., [4]Nagara Science, [5]Tokyo Univ.)

【目的】エクオール (Eq) は、特定の腸内細菌により大豆イソフラボンのダイゼイン (Dz) を基質として生産される.その構造は女性ホルモンのエストラジオールに類似しているため、エストロゲンレセプターへの結合活性を示す. EqはDzの約100倍の親和性を示し、更年期の女性ホルモンの減少に起因する各種症状に効果を示すとして注目され、Eqの研究が進んでいる.ところでEqは、Dzより、ダイゼインレダクターゼ (DZNR) 、ジヒドロダイゼインレダクターゼ (DHDR) 、テトラヒドロダイゼインレダクターゼ (THDR) の触媒する、3段階の水素添加反応によって生産される。また、我々はこれまでに、成人の糞便よりEq産生能を持つ*Eggerthella* YY7918株を単離し[1)]、全ゲノム配列の解析を行ってきた[2)]. 今回、本株のEq合成経路における関連酵素のクローン化と精製を行い、反応メカニズムを解析した.

【方法】YY7918株のゲノム配列から、DZNRと予想されるEGA1573遺伝子をpCold2にクローン化し、*E.coli* BL21 (DE3) へ導入した。細胞溶解液中では、NAD(P)H存在下でDzのDHDzへの転換反応が確認された.また、DZNRをHis-Tag精製し、純度約50%の精製表品を得た.これを用い、諸性質の解析を行った. また、基質としてDzの他、Genistein、Glycitein、それぞれの7位配糖体であるDaidzin、Genistin、Glycitin、更に7-methyl-Daidzein (7MeDz) 及び4'-methyl-Daidzein (4'MeDz) と反応させ、DZNRの反応部位についての解析も行った.

【結果・考察】YY7918株および組換え大腸菌の培養液中で転換反応が確認されたのはDzだけであった.全ての配糖体は、組換え大腸菌*in vitro*の系においてのみ反応が進行した.*in vivo*、*in vitro*の系において7MeDz及び4' MeDzの還元反応が確認されたがDzに比べ反応性は低かった.これらの結果から、腸内ではYY7918株以外の細菌の生産するグルコシダーゼにより、菌体外で、配糖体がアグリコンに変換された後、本菌の細胞に取り込まれ変換反応が起きると考えられる. また、本酵素はDzの5位および6位を認識し、更に7位と4'位のヒドロキシ基も本酵素の基質認識に部分的に関与していることが明らかになった.

1) Yokoyama S et al. Biosci Biotechnol Biochem. 2008 72: No.10 2660-2666
2) Yokoyama S et al. J Bacteriol. 2011 193: 5570-5571.

Equol, Reductase, Soy Isoflavonoids

講演番号：3B23p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ B 校舎 23 会場

揮発性酢酸イソアミルの *Escherichia coli* に対する生育阻害機構の解析
Analysis of the growth inhibition mechanism by volatile isoamyl acetate against *Escherichia coli*
○安藤 仁、安井 杏奈、倉田 淳志、岸本 憲明（近畿大農）
○Hitoshi ANDO,Anna YASUI,Atsushi KURATA,Noriaki KISHIMOTO (Fac. of Agric., Kinki Univ.)

【目的】
酢酸イソアミルは清酒酵母がもろみ中に生産する吟醸香の主成分で香料として添加されている。本研究室では、揮発性酢酸イソアミルが糸状菌、酵母、細菌の生育を幅広く阻害することを見出した。なかでも、*Escherichia coli* は揮発性酢酸イソアミルに高い感受性を有していた。揮発性酢酸イソアミルに 5 h 曝露した *E. coli* の細胞膜は損傷を受け、呼吸活性も消失していた。また、曝露した *E. coli* をプロテオーム解析すると、酸およびアルコールストレスに応答するタンパク質の発現量が変動していることを明らかにした[1)]。そこで本研究では、揮発性酢酸イソアミルの *E. coli* に対する生育阻害機構について解析した。
【方法および結果】
プロテオーム解析の結果から、揮発性酢酸イソアミルは *E. coli* 表層に吸着されたのち、酢酸とイソアミルアルコールに加水分解されている可能性が示唆された。そこで、*p*-ニトロフェニル酢酸を基質に用いた時、*E. coli* 菌体からエステラーゼ活性が検出された。また、揮発性酢酸とイソアミルアルコールの抗菌活性を vapor-agar contact 法を用いて試験したところ、揮発性酢酸は 8 h で、揮発性イソアミルアルコールは 17 h の曝露で *E. coli* を死滅させた。殺菌に要する曝露時間が酢酸イソアミル（5 h）より長かったのは、酸やアルコールの揮発速度がエステルより遅いためと考えられる。また、揮発性酢酸とイソアミルアルコールに曝露した *E. coli* は、酢酸イソアミルと同じように、細胞膜が損傷を受け、呼吸活性も消失していることを蛍光染色で確認した。
これらの結果から、揮発性酢酸イソアミルの *E. coli* に対する生育阻害機構を次のように推察した。揮発性の高い酢酸イソアミルは *E. coli* の細胞膜に付着、蓄積し、*E. coli* の生産するエステラーゼで酢酸とイソアミルアルコールに加水分解される。これらの分解物は細胞膜を損傷して、膜内外で形成されていた膜電位やプロトン濃度勾配を消失させて膜機能を阻害し、呼吸活性を消失させたと考えられる。
1)安藤ら：日本農芸化学会 2012 年度大会，講演番号 3B19p05

isoamyl acetate, antimicrobial, volatile compound

講演番号：3B23p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ B 校舎 23 会場

大腸菌アラニン要求性変異株由来のアラニン非要求性変異株はアラニン飢餓に応答して出現する
L-alanine non-requiring mutants emerge from the L-alanine auxotrophs in response to alanine starvation in Escherichia coli

○渡邉 裕一、内ヶ崎 啓、関 翔太、佐藤 一樹、安藤 太助、磯貝 恵美子、米山 裕 (東北大院農)
○Hirokazu Watanabe,Kei Utigasaki,Syota Seki,Kazuki Sato,Tasuke Ando,Emiko Isogai,Hiroshi Yoneyama (Tohoku Univ.)

【目的】モデル生物である大腸菌はこれまで多くの遺伝学的および生化学的研究がなされ主要な代謝経路のほぼすべてが解明されてきた。しかし、解糖産物であるピルビン酸から生成するアラニン合成経路はアラニン要求変異株が分離されていなかったことから近年に至るまで不明であった。我々は最近遺伝学的手法を用い初めて大腸菌のアラニン要求変異株の取得に成功し、これまで知られていたアラニンバリントランスアミナーゼ（AvtA）に加え新規の 2 つのアミノトランスフェラーゼ（YfbQ, YfdZ）が本菌の主要なアラニン合成酵素であることを見出した（Biosci. Biotechnol. Biochem. 75 : 930-938, 2011）。これら 3 つのアミノトランスフェラーゼ（AvtA , YfbQ, YfdZ）の欠損株はアラニンを含まない最少寒天培地で生育しないが、興味あることに培養を継続するとサプレッサー変異株と思われるクローンが出現してきた。このアラニン非要求性変異株の出現は、近年細菌で見いだされたストレス誘導性突然変異により変異株が出現する現象と類似していた。そこで本研究ではアラニン飢餓条件下で誘導されるアラニン非要求性変異株の出現頻度に及ぼすアラニンの影響を評価した。

【方法】アラニン要求性変異株の生育に及ぼす L-Ala の影響を評価するために、富栄養培地で一夜培養した細胞を生理食塩水で洗浄後、様々な濃度の L-Ala（100, 50, 10, 1, 0.1 μg/ml）を含む最少培地に摂取（0.1% v/v）し 37 ℃にて振盪培養してその濁度（OD_{660nm}）を測定した。また、アラニン非要求性サプレッサー変異の出現頻度に及ぼす L-Ala の影響を調べるために L-Ala（100, 50, 10, 1, 0.1 μg/ml）を含む最少液体培地で対数後期まで生育した細胞を最少寒天培地に塗布し 37 ℃で 48 時間培養後出現したコロニー数を計測して評価した。

【結果と考察】本実験で使用したアラニン要求株は最少液体培地に添加したアラニン濃度に依存してその生育が回復したが、興味あることに培養を継続するとアラニンを含まない培地でも 50 時間以降増殖が認められた。次にこのアラニン非要求株の出現を最少寒天培地で観察したところ培養日数に依存して出現するコロニー数が増加した。この最少寒天培地に出現したアラニン非要求性を示す複数の独立したクローンを富栄養培地で 7 回継代を行った後、アラニンを含まない最少培地でそれらの生育能を評価した結果、いずれのクローンも親株であるアラニン要求株より増殖の開始が早く野生株に近い生育を示すクローンも認められた。このことから、アラニンを含まない最少培地に出現したコロニーのアラニン非要求性は安定した性質であり、これらのクローンはアラニン非要求性サプレッサー変異株であることが明らかとなった。次いで、各濃度のアラニンを添加した最少培地で生育してきた対数後期の細胞集団に占めるサプレッサー変異株の割合を評価した結果、その出現頻度は添加アラニン濃度の減少に伴い上昇したことから、アラニン要求株より誘導された非要求性変異株はアラニン飢餓ストレスに応答して出現したと考えられた。以上より、本実験システムはストレス誘導性突然変異を解析するためのモデルシステムとなりうることが明らかになった。

Escherichia coli, suppressor mutation, L-alanine auxotroph

講演番号：3B23p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ B 校舎 23 会場

大腸菌におけるチオ硫酸の選択的利用によるシステイン合成機構（チオ硫酸リプレッション）
Mechanism of cysteine synthesis based on the thiosulfate-selective utilization (thiosulfate repression) in *Escherichia coli*.
○仲谷 豪、大津 厳生、高木 博史 (奈良先端大・バイオ)
○Takeshi Nakatani,Iwao Ohtsu,Hiroshi Takagi (Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

【目的】多くの微生物には、同種の栄養源が培地中に複数存在する場合、炭素や窒素のカタボライトリプレッションのようにより好ましい栄養源を優先的に利用する機構が備わっている。一方、硫黄は炭素、窒素とともに生育に必要な三大元素であるが、硫黄源に関する選択的な利用機構はほとんど知られていない。

大腸菌は、硫酸イオンとチオ硫酸イオンの2種類の無機硫黄源からシステインを合成できる。*cysK* 遺伝子がコードする*O*-アセチルセリンスルフヒドラーゼAにより*O*-アセチルセリン（OAS）と硫酸から合成する硫酸経路と、*cysM* 遺伝子がコードする*O*-アセチルセリンスルヒドラーゼBによりOASとチオ硫酸から*S*-スルホシステインを経由して合成するチオ硫酸経路が存在する。硫酸経路から1 分子のシステインを合成する場合、2 分子のATP を必要とするのに対して、チオ硫酸経路では、ATP 消費を伴わず2 分子のシステインを合成できる。本研究では、培地中に硫酸イオンとチオ硫酸イオンが同時に存在する場合の両Cys生合成経路の応答を解析した。

【方法と結果】チオ硫酸経路を遮断した*cysM* 遺伝子欠損株は、硫酸イオンを唯一の硫黄源とした培地では良好に生育できるが、チオ硫酸イオンを同時に添加するとほとんど生育できないことを見出した。このことは、硫酸イオンとチオ硫酸イオンが培地中に共存する場合、大腸菌は硫酸経路を抑制し、チオ硫酸経路を優先的に利用してシステインを合成する可能性を示している。そこで我々は、この現象を新規に「チオ硫酸リプレッション（TSR)」と名付けた。

まず、転写レベルでの発現制御の可能性を想定し、野生株を用いてチオ硫酸イオン添加条件での硫酸経路上の各遺伝子の転写量をリアルタイム PCR により調べた。その結果、チオ硫酸イオン添加時には硫酸経路上の遺伝子の発現が有意に抑制されることが判明した。さらに、^{35}S で標識した硫酸イオンを用いて、チオ硫酸イオンによる硫酸イオンの取り込みへの影響についても調べた。その結果、チオ硫酸添加時では細胞内への硫酸の取り込み量が著しく減少することが明らかになった。次に、*cysM* 遺伝子欠損株と Keio collection を用いて作製した二重欠損株ライブラリーを構築した。これを用いてチオ硫酸リプレッションに関わる遺伝子のスクリーニングを行い、TSR の制御に関与する 2 つの候補遺伝子を同定した。また、TSR が解除されたサプレッサー変異株も単離でき、現在その変異点の解析を進めている。今後、絞り込んだ候補遺伝子の解析から TSR の制御機構の詳細を明らかにする予定である。

cysteine, thiosulfate, catabolite repression

講演番号：3B23p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ B 校舎 23 会場

大腸菌の液固培養シフトによる酸化損傷と酸化ストレス応答関与の解析

Involvement of oxidative stress in the liquid-solid shift-induced cell death of *Escherichia coli*

○土戸 哲明[2]、佐々木 洋行[1]、坂元 仁[2]([1]関西大院理工、[2]関西大化生工)
○Tetsuaki Tsuchido[2], Hiroyuki Sasaki[1], Jin Sakamoto[2] ([1]Kansai Univ., [2]Kansai Univ.)

【目的】細菌を扱う研究において液体培養した細菌細胞を寒天などの固体培地に塗布して培養するコロニーカウント法が広く利用されているが、この環境変化（液固培養シフト）のストレスによって、コロニー形成数が変動して正確な細菌数を測定できていない可能性がある。当研究室では、大腸菌と過酸化水素応答レギュロン転写制御遺伝子 *oxyR* の欠損株を用いて、液固培養シフトによる酸化ストレスと制御因子 OxyR の関係について報告している[1)]。これまでの結果から、液固培養シフトストレスは好気呼吸の電子伝達系で発生する活性酸素種に起因する酸化ストレスであることを示唆した。本研究では、液固培養シフトによる酸化ストレスと酸化ストレス応答遺伝子の関係についてさらなる検討を行った。

【方法】各菌株を 0.1%カザミノ酸含む M9（EM9）液体培地で対数増殖期まで培養し、集菌後 50mM リン酸カリウム緩衝液（pH7.0、以下 KPB）で洗浄した。ペレットを KPB で段階希釈し希釈系列を作製した。一部の実験においてゲル化剤の違いによる生育状況の変化を調べるため寒天の代わりにゲランガムを用い、ゲランガム濃度は 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2%の 5 段階の濃度とした。活性酸素消去剤の影響を調査する場合は 12000U/ml カタラーゼまたは 1%ピルビン酸ナトリウムを添加した。また寒天濃度が異なることで過酸化水素の拡散がどのように変化するのかを調査した。寒天濃度の異なるヨウ化ナトリウム（KI）を含む寒天培地の中心に、過酸化水素をしみ込ませたペーパーディスクを設置した。時間経過により平板は褐色に変化するので、撮影した画像を解析し褐色領域の広がりと時間の関係を調査した。

【結果】ゲル化剤の違いによる生育状況の生存性については、*oxyR* 欠損株においてゲランガム濃度が低下することで形成コロニー数が増加した。以前の報告[1)]で EM9 寒天培地でも寒天濃度を低下することでコロニー形成数が上昇することを報告している。また EM9 ゲランガム培地における活性酸素消去剤の影響について調査したが、寒天と同様に、カタラーゼやピルビン酸ナトリウムを添加することで、ゲル化剤濃度に関係なく欠損株の CFU が野生株のレベルに達した。したがって、液固培養シフトによる酸化ストレスは寒天に特異的ではなく、平板培地に塗布した際の寒天濃度による細胞由来の過酸化水素の拡散の程度への影響が関与するものと推察された。寒天中における過酸化水素の拡散速度について、現在検討中である。

[1)] 井上裕介ら（2009）．第 36 回日本防菌防黴学会年次大会講演要旨集

E. coli, oxidative stress, liquid-solid shift

講演番号：3B23p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ B 校舎 23 会場

抗菌剤処理した大腸菌細胞で発生する活性酸素種と細胞死滅との関連性に関する研究
Investigation on the relevance between generation of reactive oxygen species and cell death of Escherichia coli treated with antimicrobial reagents.
中田 訓浩[1]、Qiuchen Gu[2]、○松村 吉信[1,2] ([1]関西大 ORDIST、[2]関西大化学生命)
Kunihiro Nakata[1], Qiuchen Gu[2], ○Yoshinobu Matsumura[1,2] ([1]Kansai Univ., [2]Kansai Univ.)

［目的］近年、微生物汚染とこれに起因する感染症の集団発生がメディアを通してクローズアップされるようになり、快適でかつ衛生的な生活環境が求められている。そのため、自然環境からの汚染菌の効果的な殺滅技術の開発が早急な課題であるが、これまでに開発された多くの抗菌剤は、その普及後に耐性菌が出現し、新たな微生物汚染を引き起す原因にもなっている。そこで、耐性菌を出現させずかつ既存の耐性菌にも効果的な新規殺滅技術の開発が今後重要と考えられ、少なくとも抗菌剤の殺滅機序に関する詳細な情報が必要である。我々は、抗菌剤として抗菌性界面活性剤である臭化セチルトリメチルアンモニウム（CTAB）を用い、野生株の CTAB ストレス応答を解析した結果、Mn-SOD 活性の低下や活性酸素の過剰な発生が認められた。また、種々の CTAB 耐性変異株の耐性特性解析において、スーパーオキシド（O_2^-）ストレス応答として知られている *soxRS* レギュロンに属するタンパク質の合成量が増加しており、これらの結果は抗菌性界面活性剤の活性発現に O_2^-を含む活性酸素の発生が重要であることを示している。そこで本研究では、CTAB を含む抗菌剤で処理した大腸菌細胞における活性酸素の発生がそれらの細胞死滅に及ぼす影響について調査した。
［方法・結果］供試菌株は *E. coli* OW6（野生株）と研究室で単離した CTAB 耐性自然突然変異株を用いた。抗菌剤には抗菌性陽イオン界面活性剤や抗生物質を使用し、増殖阻害を引き起こす濃度の抗菌剤を対数増殖期の中期細胞に曝露した。死滅細胞の検出には propidium iodide を用いた。活性酸素を検出する蛍光プローブとしてそれぞれ BES-So-AM (O_2^-) / BES-H_2O_2-Ac (H_2O_2) / hydroxyphenyl fluorescein (•OH)を用い、抗菌剤処理した大腸菌細胞における活性酸素の発生や死滅細胞は蛍光顕微鏡で調査した。CTAB 処理した OW6 株で、O_2^-や H_2O_2 に加えて OH•の過剰な発生が認められた。また、CTAB 以外の抗菌性界面活性剤である塩化ベンザルコニウムや塩化セチルピリジニウム、殺菌型抗生物質であるアンピシリンやシプロフロキサシンで処理した OW6 株においても、O_2^-の過剰な発生が認められた。一方、抗菌性界面活性剤耐性変異株ではその顕著な発生は認められなかった。さらに、CTAB 接触直後（0～10 分間）の大腸菌細胞の変化を蛍光顕微鏡で調査した結果、O_2^-や H_2O_2 の発生の後に細胞の死滅が観察され、細胞死滅過程の初期で活性酸素が発生しているものと予想された。一般に細胞内で発生する活性酸素種は O_2^-を初発に H_2O_2 や•OH に変換されると予想されていることから細胞内での O_2^-発生が抗菌剤の殺滅活性の発現に必要であると推察された。

antimicrobial reagent, reactive oxygen species, disinfection

講演番号：3B23p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ B 校舎 23 会場

切断された tRNA がリボソームに運ばれて翻訳を阻害する
Nicked-tRNA binds to ribosome A-site and induces translational arrest.
○小川 哲弘、中西 孝太郎、高橋 一敏、伊藤 考太郎、石田 亘、日高 真誠、正木 春彦（東大院農）
○Tetsuhiro Ogawa,Kotaro Nakanishi,Kazutoshi Takahashi,Kotaro Ito,Wataru Ishida,Makoto Hidaka,Haruhiko Masaki (Tokyo Univ.)

【目的】コリシンは、プラスミドにコードされたタンパク質毒素であり、同種のプラスミドを持たない他の大腸菌を殺す。我々の研究室では、コリシン E5、コリシン D が、感受性菌 tRNA のアンチコドンループを特異的に切断し、翻訳を阻害することを明らかにした。コリシン D は、ICG をアンチコドンに持つ $tRNA^{Arg}$($tRNA^{Arg}$ICG)を最も効率良く切断する。本研究では、コリシン D の $tRNA^{Arg}$ICG 切断がタンパク合成を阻害する分子機構を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】切断による正常 $tRNA^{Arg}$ICG の枯渇が翻訳阻害の原因であるならば、感受性菌の $tRNA^{Arg}$ICG 量を強化すれば、コリシン D に対して耐性となると予想された。そこで、$tRNA^{Arg}$ICG を高発現する大腸菌にコリシン D を作用させ、tRNA 切断の様子と生菌数との関係を調べた。ところが、未切断の $tRNA^{Arg}$ICG が充分に存在しても、コリシン D に耐性とはならなかった。すなわち、コリシン D の翻訳阻害は、$tRNA^{Arg}$ICG の絶対量に依存しない。一方で、切断された $tRNA^{Arg}$ICG は、細胞内で高次構造を維持することが分かった。このことから、切断された $tRNA^{Arg}$ICG がリボソームに運ばれる可能性を考えた。そこで、切断された $tRNA^{Arg}$ICG と、tRNA をリボソームへと運搬する因子である EF-Tu との結合能を調べた。その結果、切断された $tRNA^{Arg}$ICG は、未切断 $tRNA^{Arg}$ICG と同等に EF-Tu と結合した。更に、EF-Tu と結合した $tRNA^{Arg}$ICG は、コリシン D により効率良く切断された。以上の結果から、切断された $tRNA^{Arg}$ICG は EF-Tu により積極的にリボソーム A 部位へと運搬されるが、コドン-アンチコドンの対合が形成されないためペプチド転移が起こらず、翻訳が阻害されると結論した。

tRNA, ribonuclease, translational arrest

講演番号：3B23p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ B 校舎 23 会場

枯草菌の胞子形成に関与するクエン酸回路因子の新規機能解析

Functional analysis of TCA cycle component for sporulation initiation in *Bacillus subtilis*

○山下 悠美[1]、横川 朋美[1]、鷲見 彰吾[1]、田中 早苗[1]、松本 貴嗣[2]、吉川 博文[1] ([1]東農大院農、[2]東農大ゲノム解析セ)

○ Yuumi YAMASHITA[1], Tomomi YOKOKAWA[1], Syougo SUMI[1], Sanae TANAKA[1], Takashi MATSUMOTO[2], Hirofumi YOSHIKAWA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric, [2]NGRC)

＜背景・目的＞

枯草菌の胞子形成は細胞分化の典型的モデルであるが、栄養増殖から胞子形成に移行する遷移期の分子機構については未解明な点が多い。また、胞子形成にはクエン酸回路の活性化が必須であることが報告されている(*)が、その理由は明らかでない。本研究では、クエン酸回路因子の中でも唯一生育に必須であると報告されていた 2-オキソグルタル酸脱水素酵素の E2 サブユニットである OdhB に着目し、解析を行った。

＜結果・考察＞

当研究室において OdhB の必須性を再検討した結果、*odhB* 破壊株は栄養増殖期のみを持つ細胞として取得出来ることを見出した。*odhB* 破壊株を用いてその表現型の観察を行ったところ、破壊株は胞子形成能を完全に欠いていることがわかった。そこで、胞子形成開始のマスターレギュレーターである Spo0A のレギュロン SpoⅡG・SpoⅡA の転写活性について解析したところ、*odhB* 破壊株では Spo0A レギュロンのプロモーター活性は完全に無くなっていた。これは、活性型 Spo0A 変異である Sad67 を誘導発現しても Spo0A レギュロンの発現は回復しないことから、OdhB は Spo0A が転写因子として働く段階に関与していることが示唆された。また、*spo0A* 自身の発現制御については、*odhB* 破壊株では *spo0A* の胞子形成主要シグマ SigH に認識されるプロモーターによる転写が行われていないことを突き止めた。そこで、*odhB* 破壊による胞子形成主要シグマ SigH への影響を解析したところ、SigH のプロモーター活性、タンパク発現量共に、破壊株では野生株に比べ減少していることが分かった。

以上の結果から、OdhB は胞子形成開始に重要な役割を担っていると考えた為、本発表ではその詳細な解析結果を報告する。

* R.A.CARLS et al., 1971, J.Bacteriol, 106(3), pp848-855

Bacillus subtilis, sporulation, TCA cycle

講演番号：3B23p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ B 校舎 23 会場

枯草菌リボソーム 30S サブユニットタンパク質 RpsK, RpsU の機能解析

Functional analysis of 30S ribosomal proteins, RspK and RpsU in *B. subtilis*

○高田 啓[1]、盛田 雅人[1]、杉本 竜馬[1]、大竹 俊平[1]、鈴木 祥太[2]、志波 優[3]、河村 富士夫[2]、吉川 博文[1,3] ([1]東京農大・応生科・バイオ、[2]立教大・理、[3]東京農大・資源ゲノム解析セ)
○Hiraku Takada[1], Masato Morita[1], Ryoma Sugimoto[1], Shunpei Otake[1], Shota Suzuki[2], Yuh Siwa[3], Fujio Kawamura[2], Hirofumi Yoshikawa[1,3] ([1]Tokyo Univ. Agric., [2]Rikkyo Univ., [3]NGRC)

【目的】枯草菌は、増殖が盛んな対数増殖初期において細胞分離があまり起こらず、連鎖状の連なった形態を示す。一方で、栄養が枯渇し始める対数増殖後期から定常期にかけて、細胞分離が進行し、鞭毛を形成し、栄養を求め泳ぎはじめる。これは、細胞分離酵素 (LytC, LytF) や鞭毛形成関連蛋白質(Hag)などの発現を誘導する SigD の活性が定常期に向かうに連れて上昇していくことに起因する。しかし、栄養状態に応じて SigD の活性を制御する機構に関しては不明な点が多い。
【方法・結果】我々は運動性が著しく低下する変異を、30S リボソームサブユニットタンパク質遺伝子 *rpsU* (S21), *rpsK* (S11)の ORF 内に同定した。*rpsU* に関しては stop codon になるような変異が入っており、実質上の *rpsU* 破壊となっていた。一方で、*rpsK* に関しては RpsU と相互作用する領域に変異(D114N)が同定された。このことから、正常な RpsK・RpsU 間の相互作用が運動性に重要であることが示唆された。そこでまず細胞形態を観察したところ *sigD* 破壊株と同様、これら変異株は定常期においても連鎖状の細胞形態を示し、細胞分離に異常があることが分かった。また *lacZ* を用いてプロモーター活性を測定したところ、野生株に比べ *lytC* や *lytF*, *hag* の発現が著しくて低下しており、SigD による転写誘導が阻害されていた。一方で、ショ糖密度勾配超遠心法を用いリボソームのプロファイルを求めたところ、野生株と比べ 70S リボソームのピークに変化は見られなかった。このことから、RpsU, RpsK が翻訳活性とは別に、SigD の活性化に作用していることが考えられる。次に、RpsU, RpsK が SigD の活性化にどのように関与しているか検証するため、*rpsU* 破壊株より、運動性低下が抑圧された変異株の取得を試みた。次世代シーケンサーを用いて抑圧変異株のリシーケンスを行った結果、複数の抑圧変異を同定した。この中で、SigD の転写を負に制御する因子であると報告されている RemA にマップされた *remAA54V* に着目した。作製した *remAA54V* 変異株は *remA* 破壊株と類似したコロニー形態を示すことから、RemA の機能が欠失していると考えられる。このことから、RpsK, RpsU は SigD の発現レベルで関与していることが示唆された。これら抑圧変異の詳細な解析結果を踏まえ、栄養状態に応じて RpsU, RpsK が SigD の活性化を制御する機構に関して議論したい。

Bacillus subtilis, ribosomal protein, SigD

講演番号：3B23p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ B 校舎 23 会場

好酸性・耐酸性芽胞形成細菌の自己溶菌特性
Induction of Cell Autolysis in Acidophilic and Acidotolerant Spore-Forming Bacteria
○坂元 仁[1]、原 裕人[2]、土戸 哲明[1] ([1]関西大化生工、[2]関西大院理工)
○Jin Sakamoto[1], Hiroto Hara[2], Tetsuaki Tsuchido[1] ([1]Kansai Univ., [2]Kansai Univ.)

[目的] 近年、酸性果実飲料の汚染菌として*Bacillus coagulans* と *Alicyclobacillus acidoterrestris* がなどの好酸性細菌が問題視されている。当研究室では、これまで枯草菌や *Geobacillus stearothermophilus* を対象に低温ショック処理や温和な界面活性剤処理によって自己溶菌酵素としての細胞壁分解酵素が活性化されることを報告し、自殺誘発殺菌法の適用を提唱している。本研究では、上記好酸性細菌における低温ショック処理による自己溶菌誘発特性を調査するとともに、細胞壁分解酵素を活性化して自己溶菌を誘発する物質の探索を行なった。
[方法] *B. coagulans* と L 培地中で対数期まで、*Alicyclobacillus acidoterrestris* は YSG 培地中で対数期および定常期まで、37 および 45℃で培養した。溶菌誘発処理は、低温誘発の場合は細胞懸濁液を 0℃、30 分保温後 37、45℃に昇温し、食品乳化剤や脂肪酸の場合はそれらを含む緩衝液中に懸濁し、同温度で濁度変化を追跡した。活性染色は細胞壁を含むゲルを用いた SDS-PAGE によった。
[結果] *B. coagulans* において、低温ショック誘発溶菌の pH 依存性を検討した。その結果、①pH 5.0 においては、溶菌酵素活性が抑制された。②培養、処理温度に関わらず、pH 9.0 でより顕著な溶菌が観察された。③培養、処理温度で比較すると、37℃と比べて 45℃の方が、より大きな溶菌が観察された。この特性は活性染色においても確認された。*A. acidoterrestris* では、酸性領域、とくに pH 3.0、pH 5.0 で顕著な溶菌が観察された。そこで、活性染色により細胞壁分解酵素を調査したところ、主要バンドとして分子量 53、60kDa のものが認められ、培養 pH が 3.0 の際に 60kDa の酵素活性のバンドが顕著であった。次に、細胞壁分解酵素の活性化作用をもつ物質を探索し、各物質の溶菌活性を調査した。対数増殖期細胞において、金属イオン、とくに、マグネシウム、カルシウム、およびマンガンイオンの添加が自己溶菌を促進させることがわかった。一方、鉄イオンは自己溶菌を阻害した。しかし、定常期細胞においては鉄イオンによる細胞壁分解酵素の活性が観察された。枯草菌などでも細胞壁分解酵素の金属による活性化が報告されており、*B. coagulans* においても上記金属イオン添加による細胞壁分解酵素の活性を確認したことから、細胞壁分解酵素は金属イオンにより活性化される酵素であることがわかった。

acidophilic bacteria, peptidoglycan hydrolase, suicide-inducing system

講演番号：3B23p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ B 校舎 23 会場

鉄呼吸微生物による不溶性鉄酸化物の還元

Reduction of insoluble iron oxiside by iron respiration microorganism

○水沼 環[1]、田中 崇之[1]、鈴木 義規[2]、齋木 博[2] ([1]東京工科大学大学院、[2]東京工科大学)
○Tamaki MIZUNUMA[1], Takayuki TANAKA[1], Yoshinori SUZUKI[2], Hiroshi SAIKI[2] ([1]Toukyo Universitu of Technology Graduate School, [2]Toukyo Universitu of Technology)

【はじめに】鉄呼吸微生物とは嫌気条件下で三価鉄を異化的に還元することでエネルギーを得る呼吸形式をもつ微生物である。これらの鉄呼吸微生物は、環境中において不溶性の三価鉄を還元し、生態学的に重要な二価鉄イオンを生成していると考えられる。しかし、鉄呼吸微生物が一般的に利用しにくい不溶性の三価鉄をどのように還元しているかは十分に明らかにされていない。本研究では、水田土壌より鉄呼吸微生物を単離し、単離した微生物を用いて不溶性鉄酸化物の還元について調べた。また、細胞外電子シャトルやキレート剤としての役割を有すると考えられているフミン酸の影響についても検討した。
【実験方法】八王子市内の水田土壌を採取し、電子供与体として水素、電子受容体として Fe(Ⅲ)-EDTA を用いた鉄呼吸微生物用の嫌気培地に入れ、集積培養を行った。微生物の単離は、段階希釈法及び平板分離培養法を用いて行った。単離した菌の 16S rRNA 遺伝子解析を行った。鉄呼吸微生物用の嫌気培地で単離菌の純粋培養を行い、菌の増殖及び鉄還元量の経時変化をそれぞれ直接計数法及びフェナントロリン吸光光度法により調べ、鉄呼吸の検証を行った。最後に、鉄呼吸微生物用の培地の Fe(Ⅲ)-EDTA をマグネタイトに変えて、単離菌の鉄還元を調べた。また、フミン酸を添加した培地でも同様に培養実験を行った。
【結果と考察】段階希釈法及び平板分離培養法を用いることで鉄還元能を有する微生物を単離でき、この菌を TS-1 と名付けた。また、TS-1 の 16S rRNA 遺伝子解析を行い、BLAST による塩基配列の相同性検索を行ったところ、97%を超えていたのは *Clostridium* 属であった。*Clostridium* 属は土壌に広く生息している微生物で、グラム陽性の嫌気性菌である。鉄呼吸の検証の結果、鉄還元が確認でき鉄呼吸能を有する可能性が高いことが確認できたが、菌の増殖との相関は取れなかった。TS-1 のマグネタイト還元の検証の結果、これも微生物の増殖と鉄還元が確認でき、双方の相関がとれていた。また、フミン酸を添加した場合、フミン酸を添加しない場合と比べて、TS-1 の増殖における倍加時間が短縮された。また二価鉄イオン濃度も上昇し、フミン酸を添加しない場合と比べて多くのマグネタイトを還元していた。これより、フミン酸の添加により不溶性鉄酸化物の還元が促進されることがわかった。

iron respiration, humic acid, iron oxisid

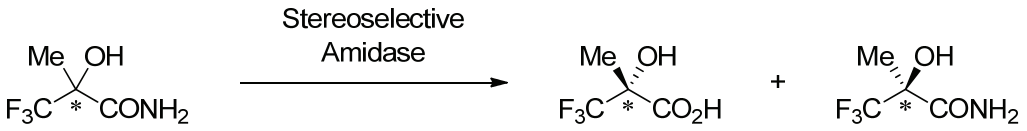
講演番号：3B24a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ B 校舎 24 会場

立体選択的にα-トリフルオロメチル乳酸アミドを加水分解する微生物酵素の探索

Screening of stereoselective amidases acting on α-(trifluoromethyl)lactamide

○渡部 俊介[1]、冨宿 賢一[1]、西井 哲郎[3]、石井 章央[3]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO、[3]セントラル硝子)
○Shunsuke WATANABE[1], Ken-ichi FUHSHUKU[1], Tetsuro NISHII[3], Akihiro ISHII[3], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO, [3]Central Glass Co., Ltd.)

【目的】構造内にフッ素原子を含む化合物は、フッ素原子の大きな電気陰性度に起因する顕著な特性を示すことが多く、近年フッ素原子を有する合成原料の需要は増している。このような状況下、光学活性なα-トリフルオロメチル乳酸は、医薬品や農薬などの合成原料として非常に有用であり、両鏡像体の簡便な合成法の開発が望まれている。光学活性なα-トリフルオロメチル乳酸の両鏡像体を、酵素を用いる速度論的光学分割により合成することを目的として、α-トリフルオロメチル乳酸アミドに作用する立体選択的なアミダーゼを産生する微生物の探索に取り組んだ。



【方法】富山県立大学保存菌株（TPU）について、グリセロール（1.0%）を炭素源、α-トリフルオロメチル乳酸アミド（0.20%）を単一窒素源とする培地を用い培養した。この培地で旺盛に生育し、α-トリフルオロメチル乳酸アミドに対して高い分解能を有する微生物を選抜した。選抜した微生物を液体培養後集菌し、静止菌体を用いてラセミ体のα-トリフルオロメチル乳酸アミドを基質とする加水分解反応を行った。その立体選択的なアミダーゼ活性をHPLC分析により評価した。一方、各地の土壌サンプルに対する上述の培地を用いた集積培養により、α-トリフルオロメチル乳酸アミドを分解する微生物を単離した。集積培養により単離した微生物も同様に菌体反応を行い、立体選択的なアミダーゼ活性を評価した。高い立体選択性を示した微生物は、16S rDNA解析と形態観察、生理・生化学的性状試験により同定し、酵素の産生条件を検討した。
【結果】富山県立大学保存菌株（TPU）からは、上述の培地で基質を窒素源として利用する微生物を見出すことはできたものの、いずれもそのアミダーゼの立体選択性は低かった。一方、土壌サンプルの集積培養により単離した微生物からは、(*R*)-体あるいは(*S*)-体のα-トリフルオロメチル乳酸アミドをそれぞれ高立体選択的に加水分解する微生物を 1 菌株ずつ見出した。これら 2 種の菌株が有する酵素のうち、(*S*)-体を立体選択的に加水分解する酵素は、構成的に産生されることが示唆された。一方、(*R*)-体を立体選択的に加水分解する酵素は、α-トリフルオロメチル乳酸アミドの他に、乳酸アミドやイソブチルアミド、ペンタンアミドなどによって誘導される誘導酵素であることがわかった。

amidase, kinetic resolution, screening

講演番号：3B24a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ B 校舎 24 会場

ホモフェニルアラニン合成遺伝子の同定と物質生産への応用

Identification of Homophenylalanine Biosynthetic Genes and Application to Its Microbial Production

○纐纈 健人、三橋 敏、田畑 和彦（協和発酵バイオ）
○Kento KOKETSU,Satoshi MITSUHASHI,Kazuhiko TABATA (Kyowa Hakko Bio)

【目的】

L-ホモフェニルアラニン（L-Hph）は、医薬品合成のキラルビルディングブロックとして有用な非天然型アミノ酸である。L-Hph の工業的製法としては、トランスアミナーゼによる 2-オキソフェニルピルビン酸のトランスアミノ化など、化学ー酵素プロセスによる製法が確立されている。今回、我々は、より効率的な L-Hph 生産方法として，微生物による発酵生産プロセスの可能性を検証した。

【方法・結果】

L-Hph は、フェニルアラニン(L-Phe)の側鎖炭素が 1 炭素長い化合物であることから、ロイシン生合成（α-ケト吉草酸→α-ケトイソカプロン酸）と同じような 1 炭素伸長反応により、フェニルピルビン酸から生合成されると予想した。そこで、L-Hph 残基を含む環状ペプチド（Anabaenopeptin）を生産するシアノバクテリウム *Nostoc punctiforme* PCC73102 のゲノム情報を元に、 ロイシン生合成遺伝子と類似する遺伝子を探索した。結果、本生合成遺伝子クラスターの周辺に、3 つの遺伝子; *hphA* (α-Isopropylmalate synthase ホモログ)、*hphB* (3-Isopropylmalate dehydrogenase ホモログ)、*hphCD* (3-Isopropylmalate isomerase ホモログ) を見出した。これら 3 種の遺伝子を共発現する組み換え大腸菌を作製し、L-Phe 添加培地で培養した。培養上清を HPLC で分析した結果、L-Hph の標品と一致するピークを検出することができた。

さらに、L-Hph 生産性を向上させるべく、遺伝子発現最適化検討を実施し、生産量が向上する株を構築することができた。また、L-Hph 合成遺伝子と Leu 合成遺伝子について相補能を調査した。結果、*hphB* と *leuB* 間でのみ、機能相補が可能であることを確認した。最後に、L-Hph 生産菌の基質特異性を調査した。*m*-Fluoro-Phe, *o*-Fluoro-Phe、チロシンは、 基質として受容され、対応するホモアミノ酸を与えることを見出した。

【考察】

今回の検討により、L-Hph 発酵生産が可能であることを実証することができた。さらに、本技術を応用することで、様々な L-Hph 誘導体の創出も可能になると期待される。

homophenylalanine, microbial production, biosynthesis

講演番号：3B24a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ B 校舎 24 会場

放線菌 *Nonomuraea sp.*AHU1850 が持つ IFT 遺伝子のクローニングと発現およびダリア球根からの DFAIII 生産

Cloning and expression of inulin fructotransferase gene from *Nonomuraea sp.*.AHU1850 and production of DFAIII from dahlia tuber

○高野 七海[1]、スリ プジラハティ[2]、大谷 翠[1]、杉本 敬祐[3]、曾根 輝雄[1]、田中 みちこ[1]、浅野 行蔵[1] ([1]北大院農、[2]LIPI、[3]旭川高専)
○Nanami TAKANO[1], Pudjiraharti Sri[2], Midori OHTANI[1], Keisuke SUGIMOTO[3], Teruo SONE[1], Michiko TANAKA[1], Kozo ASANO[1] ([1]Hokkaidou Univ., [2]LIPI, [3]Asahikawa Nat.Coll.of Tech.)

【背景】難消化性オリゴ糖 DFAⅢは Ca， Mg， Fe，Zn の吸収の促進，二次胆汁酸の生成の抑制などの機能を持ち，その安全性も確認されている。イヌリン（果糖のポリマー）を基質としてイヌリン果糖転移酵素(以下 IFT と略す)によって DFAⅢを作ることができる。イヌリンは，チコリ，ダリアの根に多い。一方で，過去に 1 件ダリア球根に自律神経毒であるアトロピンを含有していたという報告がある。そこで，ダリア球根中のアトロピンに関する安全評価及び基質であるイヌリンの含有量を調べることで，ダリア球根の DFAⅢ生産原料としての利用の可能性を評価した。インドネシアで分離された *Nonomurae* sp. AHU1850 は，IFT を生産する。IFT 遺伝子と思われる部分をクローニングし，大腸菌で発現させた IFT の活性を確認したので報告する。

【方法】

ダリア球根の乾燥チップを粉砕し，10mM 水酸化ナトリウムクエン酸緩衝液(pH5.5)を加えた後，*Nonomurae* sp. AHU1850 が菌体外に生成した IFT を加えて 65℃で反応させた。DFAIII 濃度は HPLC によって分析した。放線菌 *Arthrobacter* sp. H65-7 が持つ IFT 遺伝子情報をもとに，インバース PCR により *Nonomurae* sp. AHU1850 が持つ IFT 遺伝子を増幅し，クローニングした。クローニングした IFT 遺伝子を発現ベクターである pET28 へ挿入し，大腸菌を用いて IPTG 誘導により組換えタンパク質として発現させた。pET28 が有している His-tag を利用したアフィニティクロマトグラフィーによる精製の後，IFT 活性を調べた。

【結果】ダリア球根粉末に対して DFAIII は約 50% (v/v)生成された。純粋なイヌリンから得られた DFAIII の量と比較するとダリア球根には約 60%のイヌリンが含まれていることがわかった。アトロピンおよびスコポラミンについては，抽出濃縮して分析を進めた。*Nonomurae* sp. AHU1850 の IFT 遺伝子は 1,326bp であった。*Arthrobacter* sp. H65-7 が持つ IFT 遺伝子との相同性は 54%と低かった。最も高い相同性を示したのは，放線菌 *Frankia* sp. EAN1pec が持つ IFT 遺伝子で，相同性は 72%であった。この遺伝子の IFT 活性は確認されていない。発現ベクターpET-IFT の構築後，大腸菌に導入し，発現させ，無細胞抽出液をアフィニティクロマトグラフィーにより精製し，SDS-PAGE に供した。期待されたタンパク質サイズである約 45 kDa の位置にバンドが確認され，この画分は IFT 活性を有しており，*Nonomurae* sp. AHU1850 の IFT 遺伝子を活性の面からも確認できたことになる。

dfaIII, inulin fructotransferase

講演番号：3B24a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ B 校舎 24 会場

甘草成分グリチルリチン酸の微生物変換によるグリチルレチン酸類縁体の生産

Production of glycyrrhetic acid analogs by microbial transformation of glycyrrhizic acid

○大塚 百合、三好 省三、村上 敏之、屋敷 圭子、田村 幸吉 (丸善製薬)
○Yuri OTSUKA,Shozo MIYOSHI,Toshiyuki MURAKAMI,Keiko YASHIKI,Yukiyoshi TAMURA (Maruzen Pharmaceuticals Co.,Ltd.)

[目的]

甘草は中国、中央アジアなどを原産地とするマメ科の多年生植物であり、医薬品、化粧品、食品の原料として広く利用されている。甘草根はトリテルペン配糖体グリチルリチン酸を多く含み、抗炎症作用などの生物活性を有することでも知られている。また、グリチルリチン酸を微生物変換することで、グリチルレチン酸モノグルクロナイド、グリチルレチン酸が生産されることが知られている [1)]。我々は、微生物による物質変換によって甘草由来成分の新たな有用性の探索を目指した。

[方法及び結果]

炭素源にグリチルリチン酸ジカリウムを用いて、グリチルリチン酸資化性及び培養液の HPLC 分析をもとにスクリーニングを行った。その結果、土壌より分離した *Graphium* sp. MZ08121 の培養液にグリチルリチン酸の成分変化を見出した。培養液から 3 成分を分離・精製し、LC/MS、NMR 解析を行った結果、グリチルリチン酸のアグリコンであるグリチルレチン酸に水酸基が導入された 15α-hydroxyglycyrrhetic acid、7β-hydroxyglycyrrhetic acid、7β,15α-dihydroxyglycyrrhetic acid であることが分かった。これら水酸化グリチルレチン酸の各種溶媒への溶解性を検討した結果、グリチルレチン酸と比較して親水性溶媒への溶解度の向上が確認された。また、工業的にも甘草根エキスを原料に *Graphium* sp. MZ08121 を利用した発酵処理によって、効率的に水酸化グリチルレチン酸を生産できることを見出した。さらに、甘草根エキス発酵物及び水酸化グリチルレチン酸には、B16 メラノーマ細胞を用いたメラニン産生抑制作用が認められた。ヒト皮膚 3 次元モデルにおいてもメラニン産生抑制作用が確認され、水酸化グリチルレチン酸の美白分野での応用が期待された。

1) Biosci.Biotech.Biochem., **58**(3), 455-458,1994

glycyrrhizic acid, hydroxyglycyrrhetic acid, microbial transformation

講演番号：3B24a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ B 校舎 24 会場

N-アセチルスクロサミンの物理化学的及び生化学的な性質について
Physicochemical and Biochemical Properties of *N*-Acetylsucrosamine

和田 徹[1]、小森 航[2]、○中村 成寿[1]、篠崎 佑子[2]、平野 貴子[2]、袴田 航[1,2]、八田 珠郎[3]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科、[2]日大生資科・生命化、[3]独・国際農林水産業研究センター)
Toru Wada[1], Wataru Komori[2], ○Masatoshi Nakamura[1], Yuko Shinozaki[2], Takako Hirano[2], Wataru Hakamata[1,2], Tamao Hatta[3], Toshiyuki Nishio[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [3]JIRCAS)

【目的】我々は、糖転移型 β-フルクトフラノシダーゼを含む *Aspergillus oryzae* 菌糸とセライトから成る複合体を，*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)とスクロースの高濃度混合溶液中に添加して作用させることで、GlcNAc とフルクトースから成る二糖である *N*-アセチルスクロサミン(SucNAc)を合成することに成功した [1)]。SucNAc はスクロースのグルコース残基が GlcNAc に置き換わったユニークな構造を有した二糖である。我々はさらに、本菌の菌糸を充填したカラムリアクターを用いて SucNAc の連続生産にも成功した [2)]。こうして得られた SucNAc を用い、用途開発のための機能性調査を行っている。その一環として、今回、SucNAc の物理化学的性質および酵素による分解性や微生物による資化性などの生化学的性質を調べ、構造類似糖であるスクロースとの比較を行った。
【方法・結果】SucNAc を水および含水有機溶媒から結晶化することはできなかったが、メタノールからは針状の結晶が得ることができた。SucNAc とスクロースの溶液を様々な温度と pH で 1 時間インキュベーションした後、TLC および HPLC によってそれらの分解の様子を調べたところ、SucNAc はスクロースよりも熱や酸に対して安定なオリゴ糖でることが明らかとなった。酵母のインベルターゼやラット小腸のスクラーゼなどの様々なスクロース分解酵素をスクロースや SucNAc 溶液に作用させたところ、SucNAc はスクロースと比較して反応性が非常に低いことが分かった。また、スクロースや SucNAc を添加した液体培地や寒天プレートを用いて、嫌気性条件下で *Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* 属の乳酸菌の培養を行い、TLC と HPLC により SucNAc の資化性について調べ比較したところ、多くの菌で SucNAc の資化性が低いことが分かった。しかし、その中では *Lactobacillus gasseri* JCM1131 が SucNAc を比較的良く資化していた。また、SucNAc 資化性の高い土壌由来微生物のスクリーニングを行ったので、その結果についても報告する。

1) Takako Hirano, Toru Wada, Sumire Iwai, Hitoshi Sato, Makoto Noda, Mai Juami, Masatoshi Nakamura, Yasuko Kumaki, Wataru Hakamata, and Toshiyuki Nishio, *Carbohydr. Res.*, **353**, 27-32 (2012)
2) Hitoshi Sato, Saeko Yokochi, Terumi Kasama, Takako Hirano, Wataru Hakamata, and Toshiyuki Nishio, *J. Appl. Glycosci.*, **59** (2012)

N-acetylsucrosamine, functional oligosaccharide, biochemical property

講演番号：3B24a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ B 校舎 24 会場

シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ BM-3 を用いた EPA 変換反応

Application of $P450_{BM-3}$ for conversion of EPA

○石川 千弘[1]、木村 隆利[2]、日比 慎[3]、小川 順[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大・微生物科学、[3]京大院農・産業微生物）
○CHIHIRO ISHIKAWA[1], TAKATOSHI KIMURA[2], MAKOTO HIBI[3], JUN OGAWA[1]（[1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Kyoto Univ.）

【目的】

Bacillus megaterium 由来シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ BM-3（BM-3）は、P450 本体であるヘムドメインと、ヘムドメインの還元を担う P450 還元酵素ドメインが一本のポリペプチド鎖上にある構造を持ち、他の P450 よりも反応効率が高いことから、実用化に向けたアプローチが比較的容易であると考えられている。脂肪酸に対して本酵素が触媒する反応は、亜末端（ω-1～ω-3）の水酸化反応や炭素-炭素間二重結合のエポキシ化反応である。我々は本酵素の活性中心の構造を基に部位特異的変異を導入し、最近では、機能性が向上した変異型酵素群を作製している。

一方、エイコサペンタエン酸（*cis*-5,*cis*-8,*cis*-11,*cis*-14,*cis*-17-eicosapentaenoic acid; EPA）は、閉塞性動脈硬化症や高脂血症の治療薬として用いられており、最近では、エイコサペンタエン酸にエポキシ構造や水酸基が導入された化合物に様々な生理活性が見出されている。そこで、本研究では、BM-3 変異型酵素群を用いたエイコサペンタエン酸変換反応について検討した。

【方法・結果】

エイコサペンタエン酸を基質とし、BM-3 変異型酵素群を発現する大腸菌を触媒として用いた。各形質転換株を LB 培地で振とう培養（28℃、300 rpm）し、OD_{600} 0.4 で IPTG（終濃度 0.5 mM）を添加することにより、導入タンパク質の誘導（28℃、300 rpm）を行った。IPTG 添加 18 時間後にエイコサペンタエン酸（終濃度 2 mM）を添加し、さらに 28℃、300 rpm で 6 時間インキュベートした。培養液より基質や生成物をクロロホルム・メタノールで抽出し、遠心エバポレーターで濃縮した後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析に供した。その結果、BM-3 変異型酵素群の触媒作用により生成したと考えられるいくつかの化合物が確認できた。

また、各形質転換株を上記と同様に培養・導入タンパク質の誘導を行った後、得られた菌体よりビーズショッカーを用いて cell-free extracts を調製し、エイコサペンタエン酸を基質とする反応に供したところ、同様の化合物の生成を確認した。そこで、これらの化合物の同定を試みると共に、反応条件の検討を行った。

P450BM-3 variant, EPA, regioselectivity and stereoselectivity

講演番号：3B24a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ B 校舎 24 会場

カルボン酸還元能を有する嫌気性細菌の探索

Screening of anaerobic bacteria reducing carboxylic acids

○中谷 友樹、岸野 重信、笠井 渉、石渡 隆之、小川 順（京大院農・応用生命）
○Yuki Nakatani,Shigenobu Kishino,Wataru Kasai,Takayuki Ishiwata,Jun Ogawa (Kyoto Univ.)

【目的】

バイオマスからの化成品生産に対する関心が高まるなか、石油に由来する高還元物質をいかにバイオマスから誘導するかが課題となっている。我々は油脂を高還元物質としてとらえ、その微生物変換反応の開発に取り組んでいる。例えば、有用な生理活性をもつ共役リノール酸(CLA)を乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a を用いて生産するなど、微生物による脂肪酸代謝に焦点を当てた研究を行っており、乳酸菌の不飽和脂肪酸飽和化反応について新たな知見を得ている。

本研究では、研究例の少ないカルボキシル基の還元反応に着目し、嫌気性細菌を対象とした微生物変換反応の探索を試みた。

【方法・結果】

約 300 株の研究室保存嫌気性細菌を対象に、オクタン酸を添加した培地を用いて嫌気性細菌を培養し、その培養液を分析することによって、オクタン酸の変換能を有する微生物の探索を行った結果、15 株において脂肪酸をアルコール(1-オクタノール)へ還元する活性を見いだした。

最も高い脂肪酸還元能を示した *Eubacterium limosum* JCM 9976 において、様々な基質を対象に脂肪酸還元能を調べた結果、炭素数 6 以上の飽和脂肪酸や炭素数 10 以上のジカルボン酸のほか、水酸化脂肪酸、芳香族脂肪酸、さらにアルデヒドをそれぞれ対応するアルコールへと還元することを明らかにした。また炭素数 4 以下の短鎖脂肪酸変換能を有する嫌気性微生物の探索をプロピオン酸を基質として行ったところ、土壌単離嫌気性細菌において炭素数 3～8 の飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸および分枝脂肪酸をそれぞれ対応するアルコールに還元する活性を見いだした。

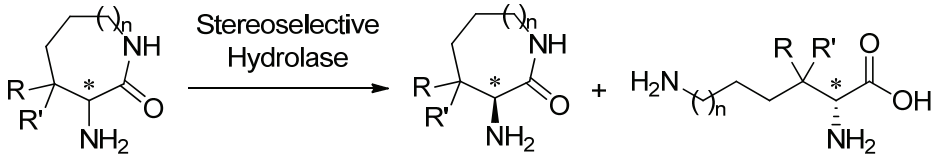
また土壌より単離した嫌気性細菌 G49 株の洗浄菌体を触媒として中鎖脂肪酸の還元能を調べたところ、同様に対応するアルコールへの還元能を見いだした。

anaerobic bacteria, carboxylic acid reduction, fatty alcohols

講演番号：3B24a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ B 校舎 24 会場

α-アミノラクタムを立体選択的に加水分解する微生物酵素の探索
Screening of stereoselective hydrolases acting on α-aminolactams
○冨宿 賢一[1]、高田 桃子[1]、岩坪 宏香[1]、浅野 泰久[1,2]([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○ Ken-ichi FUHSHUKU[1], Momoko TAKATA[1], Hiroka IWATSUBO[1], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO)

【目的】α-アミノラクタムは、α-位にアミノ基を有し、カルボキシ基と末端アミノ基が脱水縮合により閉環した化合物である。その中でも特に、七員環のα-アミノ-ε-カプロラクタム（ACL）はリジンの閉環により生成し、Bengamide 類や Capuramycin 類など多くの天然物の部分構造として存在する。工業的には、シクロヘキセンから合成される DL-ACL を用い、L-立体選択的な加水分解酵素を産生する酵母 *Cryptococcus laurentii* と、ラセミ化を触媒する ACL ラセマーゼを産生する細菌 *Achromobacter obae* を組み合わせ、ダイナミックな光学分割による L-リジンの定量的な合成法が、東レにより開発され利用されていた。また、上述の ACL ラセマーゼは、ACL などのα-アミノラクタムだけでなく、鎖状アミノ酸アミドに対するラセミ化も触媒することが浅野らにより見出され、立体選択的なアミノ酸アミド加水分解酵素と組み合わせることにより、ダイナミックな光学分割として光学活性なアミノ酸の定量的な合成に利用されている。我々は、アミノ酸誘導体としてのα-アミノラクタムの微生物代謝に興味を持ち、α-アミノラクタムに立体選択的に作用する新しい加水分解酵素を見出すことを目的に研究を開始した。



【方法】立体選択的な加水分解酵素を生産する微生物を探索するために、各地の土壌サンプルを用い ACL やα-アミノ-δ-バレロラクタム（AVL）を単一の炭素源や窒素源とする集積培養を行った。ACL はリジンから、α-アミノ-δ-バレロラクタム（AVL）はオルニチンから合成して用いた。集積培養により単離した微生物を液体培養後集菌し、静止菌体を用いて DL-ACL を基質とする加水分解反応を行った。一定時間後回収し、その反応性と立体選択性を HPLC により評価した。優れた反応性と立体選択性を示す微生物を選抜し、その微生物変換の反応条件や、酵素の産生条件を検討した。
【結果】土壌サンプルの集積培養により単離した微生物から、ACL を D-立体選択的に加水分解する微生物を見出すことはできなかったが、L-立体選択的に加水分解する微生物を複数見出した。その中でも 1 菌株は特に高い立体選択性を示し、L-体のみを加水分解し D-体に対しては全く作用しなかった。

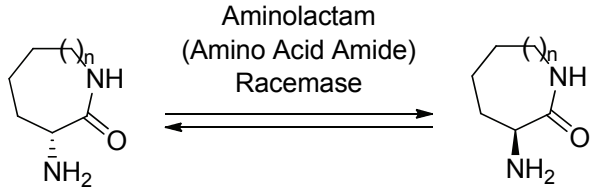
α-aminolactam, hydrolase, kinetic resolution

講演番号：3B24a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ B 校舎 24 会場

α-アミノラクタムやアミノ酸アミドに作用する新しいラセミ化酵素の探索
Screening of racemases acting on α-aminolactams and amino acid amides

○永森 慎吾[1]、高田 桃子[1]、冨宿 賢一[1]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○ Shingo NAGAMORI[1], Momoko TAKATA[1], Ken-ichi FUHSHUKU[1], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO)

【目的】ダイナミックな光学分割に用いられるラセミ化酵素（ラセマーゼ）の代表的な例として、左右田らにより精製された *Achromobacter obae* 由来のα-アミノ-ε-カプロラクタム（ACL）ラセマーゼが挙げられる。この酵素はリジンの工業生産に一時用いられていたが、近年、浅野らにより、鎖状アミノ酸アミドに対するラセミ化を触媒することが新たに見出された。これにより、立体選択的なアミノ酸アミド加水分解酵素と組み合わせ、ダイナミックな光学分割による光学活性なアミノ酸の定量的な合成が可能になった。しかし、*A. obae* 由来の ACL ラセマーゼは、ACL に比べアミノ酸アミドに対する活性が低く、また、嵩高い官能基や極性官能基、芳香環を含むアミノ酸アミドに対してほとんど作用しないという問題点を有していた。我々は、α-アミノラクタムやアミノ酸アミドに異なる基質特異性で作用する新しいラセミ化酵素を見出すことを目的に、集積培養したα-アミノラクタムを分解する微生物群からの酵素の探索に取り組んだ。



【方法】ACL やα-アミノ-δ-バレロラクタム（AVL）を単一の炭素源や窒素源とする土壌サンプルの集積培養から、それぞれのアミノラクタムを非立体選択的に分解し、旺盛に生育する微生物を単離した。単離した微生物を液体培養後集菌し、静止菌体を用いて D-体あるいは L-体の ACL を基質とする菌体反応を行った。一定時間後回収し、残存する ACL の鏡像体過剰率を HPLC により測定し、そのラセミ化活性を評価した。高いラセミ化活性を示した微生物は、16S rDNA 解析と形態観察、生理・生化学的性状試験により同定した。無細胞抽出液での酵素反応により、ACL に対するラセミ化活性と共に、アミノ酸アミドに対するラセミ化活性も評価し、酵素の産生条件を検討した。
【結果】土壌サンプルの集積培養により単離した微生物から、ACL に対して再現性良くラセミ化活性を示す 8 菌株を見出した。この 8 菌株はそれぞれ *Shinella* sp.と *Rhizobium* sp.、*Sinorhizobium* sp.に分類された。無細胞抽出液を用いた酵素反応により、α-アミノラクタムだけでなくアミノ酸アミドに対してもラセミ化活性を示すことがわかった。

α-aminolactam, amino acid amide, racemase

講演番号：3B24a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ B 校舎 24 会場

Rhodococcus sp. ST-10 由来スチレンモノオキシゲナーゼ(SMO) を利用した光学活性エポキシド生産プロセスの構築
Efficient biocatalysis for the production of enantiopure epoxides using styrene monooxygenase (SMO) of *Rhodococcus* sp. ST-10.
○戸田 弘、今江 龍太、伊藤 伸哉（富山県大工・生物工）
○Hiroshi TODA,Ryouta IMAE,Nobuya ITOH (Toyama Pref. Univ.)

【目的】各種光学活性なエポキシ化合物は、医農薬・機能性高分子の合成中間体として利用される。従来の化学触媒を用いる合成法では、重金属や過酸を使用するなど環境負荷や設備管理の点で課題が残る。これに替わる新たな手法として、生体触媒を用いたバイオプロセスが注目され研究されている。本研究では、各種アルケン化合物を光学活性なエポキシドへ変換可能なスチレンモノオキシゲナーゼ(SMO)を *Rhodococcus* 属細菌より見出し、その応用を目指して研究を行った。
【手法】土壌より単離したスチレン資化性菌 *Rhodococcus* sp. ST-10 より、SMO をコードする遺伝子 *styAB* を単離し、組換え酵素を用いて酵素特性・基質特異性を解析した。さらに、SMO 発現菌体を用いた効率的な光学活性エポキシド生産プロセスの構築を目指し、NADH 再生系である *Leifsonia* sp. S749 由来アルコール脱水素酵素(LSADH)との共発現菌体を作成した。変換試験には有機溶媒-水系からなる二相系反応を用い、反応条件の最適化を行った。各種アルケン化合物およびスルフィド化合物を基質とした変換反応試験を行い、基質特異性および反応産物の立体選択性の解析を行った。さらに、エポキシド生産効率の向上を目的とし、Error Prone PCR を利用した変異 SMO ライブラリーの構築とスクリーニングを行った。
【結果】大腸菌により異種宿主発現させた組換え StyAB の酵素特性を解析した結果、本酵素は各種スチレン誘導体を含む様々なアルケンに対してエポキシ化活性を有することが明らかになった。特に、これまで報告が無い直鎖アルケン化合物に対するエポキシ化活性を有し、本酵素の汎用性が高いことが期待された。また、スルフィド化合物に対しても酸化活性を有し、光学活性な(*S*)-スルフォキシドを生産することができる。*Leifsonia* sp. S749 由来 LSADH と共発現を行うことにより、2-プロパノールを水素供与体としたエポキシド生産が可能であることが示された。二相系反応を用いたスチレン変換試験の結果、有機溶媒に酢酸オクチルを用い、2-プロパノール濃度を最適化することにより終濃度約 170 mM, 鏡像体過剰率(*ee*) 99.8%以上の光学活性な(*S*)-スチレンオキシドを生産することができた。また各種アルケン基質に対しても変換活性を示し、いずれも高い光学活性を有する(*S*)-体のエポキシドを生産することができた[1)]。
　変異 SMO ライブラリーからのスクリーニングにより、生産物阻害の緩和および活性の向上が見られた変異体を取得できた。現在これらを用いたスチレン変換試験およびさらなる改変を試みている。
1) H. Toda, R. Imae, N. Itoh, Tetrahedron; Asymmetry, 2012, doi: 10.1016/j.tetasy.2012.09.017

Rhodococcus, styrene monooxygenase, (*S*)-epoxide

講演番号：3B24a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ B 校舎 24 会場

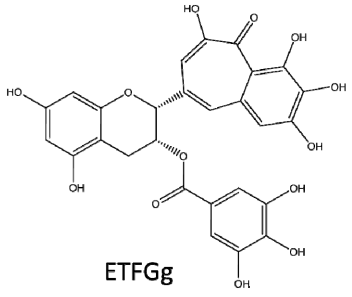
白色腐朽菌 *Hericium coralloides* 由来ラッカーゼの異種宿主発現とポリフェノール酸化

Heterologous production of a novel laccase from *Hericium coralloides* and the oxidation of polyphenols

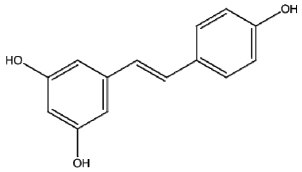
○伊藤 伸哉、太田 可奈、高木 伸也、黒川 純司（富山県大・工・生物工）
○Nobuya ITOH,Kana OTA,Shinya TAKAGI,Junji KUROKAWA (Toyama Pref. Univ)

エピテアフラガリン 3-*O*-ガレート(ETFGg)は紅茶に微量に含まれる成分であり、いくつかの有用な生理活性効果を示す。この ETFGg はラッカーゼによるエピガロカテキンガレートと没食子酸の酸化により生成される。この酸化に適したラッカーゼのスクリーニングを行い、*Hericium coralloides* NBRC7716 株の小麦ふすま培地より精製したラッカーゼ(Lcc2)の酵素特性とそれをコードする塩基配列について昨年度大会で報告した。今回、Lcc2 の異種宿主による発現とその組換え酵素によるポリフェノールの酸化について報告を行う。

*lcc2*遺伝子をプラスミド pTrc99A または pAUR112、pPICZα にクローニングしてそれぞれを *E. coli*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris* に導入した。*E. coli* JM109 株による発現系において培養温度条件やプラスミド pG-KJE8 によるシャペロンタンパクの共発現を試みたがラッカーゼ活性は確認できなかった。酵母による発現系では *S. cerevisiae* 形質転換体の細胞破砕液と培養液からラッカーゼの活性がみられた。培地中の硫酸銅を 0.1 から 3mM の濃度条件で培養した結果、0.5mM 硫酸銅を含む 40ml の培養液から 1.2 単位(U)のラッカーゼの発現が確認できた。また分泌に必要なシグナルペプチドの変更も行った。*P. pastoris* による発現系において 0.5mM 硫酸銅を添加した 10ml の培養液から約 1.6U のラッカーゼの発現が確認できた。*H. coralloides* 固体培地より精製した酵素と同様に組換えラッカーゼによる ETFGg の生産量は *Trametes* 属由来ラッカーゼよりも優れていた。この組換え酵素によるレスベラトロール等のポリフェノールの酸化についても報告する予定である。



ETFGg



Resveratrol

Reference, N.Itoh *et al.*, Tetrahedron, 63, 9488(2007)

laccase, heterologous expression, *Hericium coralloides*

講演番号：3B24a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ B 校舎 24 会場

Leifsonia sp. S749 由来アルコール脱水素酵素（LSADH）ホモログ遺伝子のメタゲノムスクリーニングと解析

Screening and characterization of homologous genes of LSADH from metagenome

○狩谷 理美、黒川 純司、伊藤 伸哉（富山県大・工・生物工）
○Satomi KARIYA,Junji KUROKAWA,Nobuya ITOH (Toyama Pref. Univ.)

【目的】

Leifsonia sp. S749 由来アルコール脱水素酵素（LSADH）は、ケトン類の不斉還元を進めると同時に、2-プロパノールを用いて補酵素 NADH の再生を可能とする有用な酵素である[1]。LSADH より広い又は異なる基質特異性、高い安定性を持つアルコール脱水素酵素の取得を目的に、メタゲノムから直接 PCR を用いてホモログ遺伝子のスクリーニング及びその翻訳産物の解析を行った。

【方法】

土壌及び堆肥、活性汚泥サンプルよりメタゲノムを抽出し、*lsadh* のホモログ遺伝子を取得するために設計した縮重プライマーを用いて PCR を行い、当該遺伝子の増幅を試みた。また、増幅した遺伝子を LSADH のキメラ酵素として発現するためのベクターを作製した。ベクターは、pKELA (LSADH の発現ベクター）を制限酵素処理し、活性中心部位をデリーションさせたものを使用した。*lsadh* のホモログ遺伝子を In-Fusion 反応により同ベクターと融合させ、ライブラリー作製に *E. coli* JM109 を用いた。このライブラリーより LSADH と異なる基質特異性や熱耐性、有機溶媒耐性等を示すクローンを選別し、それぞれプラスミドを抽出してシーケンス解析を行った。

【結果】

メタゲノムを鋳型に PCR を行った結果、土壌及び堆肥、活性汚泥由来のメタゲノムから短鎖アルコール脱水素酵素と一致するサイズのバンドをゲル電気泳動により確認した。形質転換体の酵素活性を確認し、LSADH では活性を示しにくい 1-Boc-3-ピロリジノンやアセトフェノンに対する還元活性、75℃の熱耐性、15% 1-プロパノール存在下での 2,2,2-トリフルオロアセトフェノン還元活性等、目的の酵素活性がいくつか認められた。さらに これらの遺伝子解析を行った結果、多数の *lsadh* のホモログ遺伝子を取得することに成功した。

metagenome, *Leifsonia* sp., alcohol dehydrogenase

講演番号：3B24a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ B 校舎 24 会場

フェニルアセトアルデヒド還元酵素（PAR）相同遺伝子のメタゲノムスクリーニングとその解析
Screening and characterization of homologous genes of phenylacetaldehyde reductase (PAR) from soil metagenome

○礒谷 健太郎、黒川 純司、竹内 奈美、牧野 祥嗣、伊藤 伸哉（富山県立大学）
○Kentaro ISOTANI,Junji KUROKAWA,Nami TAKEUCHI,Yoshihide MAKINO,Nobuya ITOH (Toyama Pref.Univ.)

【目的】*Rhodococcus* sp. ST-10 由来の phenylacetaldehyde reducatse (PAR) は2-propanol を水素供与体とした補酵素NADHの再生と同時に、各種ケトンからの光学活性アルコールの高効率な生産を可能とする酵素である[1)]。PARは水素移動型不斉還元触媒として有用な酵素であるが、本酵素が触媒しない基質化合物もあり、多種の光学活性アルコール生産において、本酵素のアナログライブラリーの必要性があげられる。このことから、土壌由来の環境ゲノム(メタゲノム)より当該酵素遺伝子のアナログ酵素遺伝子の分離と解析を試みた。

【方法】 ISOIL for Beads Beating^{TM} (ニッポンジーン社)を用いて約90種の土壌よりメタゲノムの取得を行い、アナログ酵素ライブラリーを作製した。取得したメタゲノムを鋳型に用いたPCR法により、アナログ酵素遺伝子の増幅を行った。PCR法での使用プライマーには、PARのN末端とC末端の相同性の高い配列部分でベクターと結合できるように設計したものを用いた。ベクターは pSAR268 [2)]の酵素遺伝子の大部分を除き、N末端はSar268 (PARの極性有機溶媒高活性変異体)のキメラ酵素となり、C末端には his-tag が組み込まれるように設計した。PCRにより直接増幅した遺伝子を当ベクターに組み込み、*E. coli* に形質転換、IPTG 誘導後、それらの酵素活性、熱安定性、遺伝子配列を解析した。

【結果】約 90 サンプルの土壌（0.5 g 湿重量）よりメタゲノムが取得できた。これらを鋳型に PCR を行った結果、18 サンプルに遺伝子増幅が認められた。これらの増幅産物を精製し、上記ベクターに連結後、*E. coli* に形質転換した。取得コロニーよりランダムに選択した約 170 個の *E. coli* 形質転換体を、コロニーPCR 及び酵素活性で確認した。増幅と酵素活性が認められたライブラリーの遺伝子解析を行った結果、一部重複した遺伝子等を除き、PAR とアミノ酸配列の異なる相同性遺伝子（HPAR と命名）が取得できた。これらを発現させ、各 HPAR の熱安定性や基質特異性を調べた結果、PAR とは基質特異性や熱安定性が大きく変化した相同性酵素群が取得できた。その解析により、熱安定性や極性有機溶媒に対する安定性の向上に関与するアミノ酸変異の部位が特定できた。

1) N.Itoh et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 93: 1075-1085 (2012).
2) Y. Makino et al., Appl. Environ. Microbiol., 71: 4713-4720 (2005).

metagenome, phenylacetaldehyde reductase, homologous gene

講演番号：3A37a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ A 校舎 37 会場

比較定量オミクスを用いた新規ケトン体トランスポーターの生体における機能の解析

Analysis of a novel ketone body transporter by using comparative quantitative "omics"

○永森 收志[1]、平田 拓[2]、何 新[2]、Pattama Wiriyasermkul[1]、中込 咲綾[1]、石川 貴正[3]、曽我 朋義[4]、金井 好克[1]（[1]大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理、[2]杏林大学　医学部、[3]HMT、[4]慶応大学　先端生命研究所）

○Shushi NAGAMORI[1], Taku Hirata[2], Xin He[2], Wiriyasermkul Pattama[1], Saya Nakagomi[1], Takamasa ishikawa[3], Tomoyoshi Soga[4], yoshsikatsu Kanai[1]（[1]Osaka Univ. Grad Schl Med. Bio-system Pharmacol., [2]Kyorin　Univ., [3]HMT, [4]Keio Univ.）

トランスポーターの輸送基質は、培養細胞などを用いた *in vitro* 実験系により良く研究されているが、それらの物質が生体内における本来の基質であるか明らかにすることは、一部のトランスポーターにとっては非常に困難であった。そこで、新規に遺伝子が単離された有機アニオントランスポーターOatn1 の生理的な基質を、近年著しい発達を見せている比較定量オミクス技術である比較定量メタボロミクスおよび比較定量プロテオミクスを用いてにより同定することを試みた。Oatn1 は Slc22 ファミリーの新規因子として同定された。mRNA は腎臓のみに発現が見られ、なかでも近位尿細管に強く発現しており、タンパク質は管腔側に局在していた。従って Oatn1 欠損の影響が尿中の物質組成に反映すると考え、*oatn1* ノックアウト（KO）マウスと野生型の尿を CE-MS で比較定量メタボロミクス解析した。その結果、β-ヒドロキシ酪酸（β-HB）、乳酸やホモバニリン酸が KO マウスの尿に多く見られ、*in vitro* でこれらが輸送されることが示された。一方で、KO マウス尿で変動が見られた化合物のうち、複数の化合物には Oatn1 との相互作用が見られなかった。そこで野生型マウスおよび KO マウスから調製した腎皮質刷子縁膜小胞を比較定量プロテオミクスによって解析した結果、KO マウスにおいて発現変動しているトランスポーターが明らかになった。これらのトランスポーターのうち一部が、尿中で変動するが Oatn1 との相互作用しない化合物を基質とすること示唆された。次に、CE-MS 解析により変動が見られ、*in vitro* 実験系で Oatn1 に輸送されることが示された化合物のうち β-HB を、野生型マウスおよび KO マウスに尾静脈より投与した。KO マウスにおいては尿中に排泄される β-HB が多かったことから、*in vivo* で Oatn1 によって輸送されることが確認された。β-HB は飢餓や糖尿病時に存在量が上昇することが知られている。糖尿病モデルマウスを作成すると KO マウスで尿中の β-HB が増加していた。以上より、定量オミクス技術を用いることで、β-HB が Oatn1 の生理的基質の一つであることが明らかになった。β-HB は特に飢餓時などにおける脳へのエネルギー代謝に重要なケトン体の 1 種であることから、Oatn1 はエネルギー代謝において重要な働きを持つケトン体トランスポーターであることが明らかになった。

metabolomics, proteomics, transporter

講演番号：3A37a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ A 校舎 37 会場

卵巣摘出マウスにおいてダイゼイン摂取は長趾伸筋重量を増加させる

Daidzein increases extensor digitorum longus muscle mass in ovariectomized mice.

○石川 真菜[1]、小川 真弘[1]、北風 智也[1]、原田 直樹[1]、中野 長久[2]、乾 博[3]、山地 亮一[1]([1]大阪府大院・生命環境、[2]大阪女子短大、[3]大阪府大院・栄養)
○Mana ISHIKAWA[1], Masahiro OGAWA[1], Tomoya KITAKAZE[1], Naoki HARADA[1], Yoshihisa NAKANO[2], Hiroshi INUI[3], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]Osaka Women's Junior College, [3]Osaka Pref. Univ.)

[目的]　先進諸国で高齢者が自立した健全な生活を送るためには寝たきりを予防する必要がある。寝たきりは筋重量と筋機能の低下する廃用性筋萎縮を惹起するので、日常的に摂取する食品成分で健常時から骨格筋量を維持・増強できれば寝たきり防止に役立つ。骨格筋には２種類のタイプ（遅筋と速筋）があり、遅筋は持久力に優れ、体幹を支える一方で、速筋は瞬発力に富み、寝たきりの原因となる転倒を防止するのに役立つ。女性は男性よりも速筋量が少なく、加齢にともなって遅筋よりも速筋の量が大きく低下する。我々はこれまでに女性ホルモンのエストロゲンがエストロゲン受容体（ERα と ERβ）を介して筋形成を調節することを見いだした[1]。本研究では、閉経後の女性高齢者を模倣したモデル動物である卵巣摘出マウスにおいて、エストロゲン様生理活性を持つ大豆イソフラボン（ダイゼインとゲニステイン）が筋量に影響を及ぼすか検討した。
[方法]　7 週齢の雌性 ddY マウスを卵巣摘出（OVX）して 1 週間後にエストロゲン（エストラジオール吉草酸エステル）または vehicle を筋肉注射（0.1 mg/kg body weight、１回）し、その後 1 週間 0.1%の大豆イソフラボン（ダイゼインまたはゲニステイン）を含む AIN-76 改変飼料またはコントロール飼料を自由摂食させた。筋肉を単離し、重量測定後、RNA を抽出し、筋量調節に関わるインシュリン様成長因子-1（IGF-1）の発現レベルについて解析した。さらに筋芽細胞（C2C12）の筋管細胞への分化に及ぼす大豆イソフラボンの効果を検証した。
[結果]　OVX マウスの骨格筋量に及ぼすエストロゲン及び大豆イソフラボンの効果を検討したところ、速筋である長趾伸筋（つま先が段差を越えるのを助ける筋肉）の重量が、エストロゲン投与の有無に関わらず、ダイゼインの摂取によって有意に増加した。一方、ゲニステインの摂取は長趾伸筋重量に影響を全く及ぼさなかった。IGF-1 は２つのスプライシングバリアントから構成され、それらの C 末端領域に由来する IGF-1Ea と MGF が存在する。長趾伸筋ではダイゼイン摂取により総 IGF-1 mRNA の発現量が増加しており、主要なバリアントは IGF-1Ea であったが、IGF-1Ea と MGF の両方が増加した。一方、C2C12 細胞を分化誘導後にダイゼイン存在下で培養したところ、IGF-1Ea ではなく、MGF の mRNA の発現が増加した。しかしダイゼインによる MGF mRNA の発現上昇は、ERαのノックダウンによって影響はなかったが、ERβのノックダウンによって消失した。これらの結果より、ダイゼインは OVX マウスの速筋である長趾伸筋の重量を増加させること、また ERβを介して MGF の発現を上昇させることが判明した。

[1] Ogawa M. et al., *J. Biol. Chem*. 2011, 286, 41455-41465.

daidzein, skeletal muscle, insulin-like growth factor

講演番号：3A37a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ A 校舎 37 会場

Lgr4 ノックアウトマウスにおける雌生殖器の雄化

Lgr4 knockout mice show female hermaphroditism.

○小泉 雅江 [1,2] ([1] 東北大院農、[2] 愛媛大医)
○MASAE KOIZUMI[1,2] ([1]Tohoku Univ., [2]Ehime Univ.)

LGR4 (Leucune-rich repeat containing G-protein coupled receptor 4) は 7 回膜貫通GPCR (G-protein coupled receptor)と共通の構造を持つ膜受容体である。LGR4 は FSHR (Follicle-stimulating hormone receptor) や LHR (Luteinizing hormone receptor)などと高い相同性を示す。我々はLGR4 が眼瞼、毛包、乳腺、腎臓、腸管上皮などで重要な役割を担っていることを報告してきた。また、近年の報告でLGR4 が R-spondin1 をリガンドとして、Wnt/β-catenin 経路を仲介することを明らかとしてきた。これまで*R-spondin1*、*Wnt4*、*β-catenin* のノックアウトマウスはほぼ共通の表現型、すなわち雌生殖器の異常を認めることが報告されている。Lgr4 ノックアウトマウスにおける、*R-spondin1*、*Wnt4*、*β-catenin*ノックアウトマウスに類似した生殖器の発達異常について報告する。

われわれは *Lgr4* 遺伝子の膜貫通ドメインをコードする領域をホモで欠損させたノックアウトマウスを作成し、新生児の生殖器における発達と分化について解析した。その雌生殖器において雄化を認める。具体的には、本変異雌マウスで精管と精巣上体様構造物を認める。また、RT-PCR や免疫染色を行った結果、*Lgr4* ノックアウトマウスの卵巣において、男性ホルモン合成酵素の発現を認め、異所性男性ホルモンの産生が示唆される。

Lgr4, reproductive tract, steroid genesis

講演番号：3A37a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ A 校舎 37 会場

老齢マウスにおける摂食量低下のメカニズム

Mechanism underlying decrease in food intake in aged mice

○宮崎 由理[1]、金子 賢太朗[1]、水重 貴文[1,2]、金本 龍平[1]、清水 孝彦[3,4]、大日向 耕作[1]（[1]京大院・農・食品生物、[2]京大・学際融合・生理化学研究ユニット、[3]千葉大院・医・先進加齢医学、[4]都健康長寿研）

○ Yuri MIYAZAKI[1], Kentaro KANEKO[1], Takafumi MIZUSHIGE[1,2], Ryuhei KANAMOTO[1], Takahiko SHIMIZU[3,4], Kousaku OHINATA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Chiba Univ., [4]Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital)

【目的】一般に高齢者では食欲が低下するといわれている。この食欲低下は、身体的要因や病的要因、ストレス要因等が関係するが、特に原因がないことも多くあり、anorexia of aging と呼ばれている。しかしながら加齢による食欲不振のメカニズムの詳細は不明な点が多い。そこで本研究では、老齢マウスの摂食量や代謝、視床下部における摂食調節ペプチドの遺伝子発現変化を解析した。

【方法】実験動物は 2、5、15、27 ヵ月齢の雄性 C57BL/6 系マウスを個別飼育し、固形飼料と水を自由に摂取させた。摂食量と体重を 1 週間ごとに測定した。これらのマウスの酸素消費量および行動量を小動物用代謝計測システム（MK-5000）と自発運動量測定システム（supermex）を用いて測定した。採血後、臓器重量を測定するとともに、視床下部を摘出し摂食調節関連遺伝子の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法により測定した。

【結果】摂食量は加齢に伴い減少し、27ヵ月齢マウスでは15ヵ月齢と比較し摂食量が有意に減少した。一方、体重は2、5、15ヵ月齢マウスで加齢に伴い増加したが、27ヵ月齢では15ヵ月齢よりも低い値を示した。体重当たりの酸素消費量は15ヶ月齢と27ヶ月齢では差が認められなかった。なお、27ヶ月齢の行動量はむしろ低下していた。したがって、27ヶ月齢における体重減少は摂食量低下によるものと考えられた。さらに、各月齢の視床下部を摘出しmRNA発現量を測定したところ、強力な摂食促進ペプチドとして知られるニューロペプチドY（NPY）およびアグーチ関連ペプチド（AgRP）の発現量は2、5、15ヵ月齢マウスよりも27ヵ月齢マウスでむしろ増加していることがわかった。以上の結果より、老齢マウスでは中枢に飢餓シグナルが伝達され、視床下部NPYおよびAgRPという摂食促進系が活性化されているにもかかわらず実際には摂食量が低下するものと考えられ、加齢によりNPYおよびAgRPシグナルの下流が障害を受けている可能性が示唆される。

aging, anorexia, NPY

講演番号：3A37a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ A 校舎 37 会場

リポ蛋白質受容体ファミリーによる Wnt/β-catenin シグナル伝達経路の活性化調節

Effects of lipoprotein receptor family to Wnt/beta-catenin signaling pathway

○鬼丸 祐二、細田 明美、山岸 あづみ、福村 智恵、金 東浩、佐伯 茂（大阪市大・生活科学・生体情報）
○Yuji ONIMARU, Akemi HOSODA, Azumi YAMAGISHI, Tomoe FUKUMURA, Dong-Ho KIM, Shigeru SAEKI (Lab. of Mol. Biochem. Nutr., Osaka City Univ.)

【目的】低密度リポ蛋白質(LDL)受容体は、細胞内コレステロール量の恒常性を維持するセンサーとして働くことが知られている。LDL受容体は5つの機能ドメインから構成され、LDL受容体遺伝子に異常があると、LDLが細胞内にエンドサイトーシスされず、高コレステロール血症が発症する。リポ蛋白質にはLDL以外に複数のものが存在することから、その他のリポ蛋白質の代謝に関与する受容体の探索が行われた。その結果、リポ蛋白質受容体ファミリーが約10種類から構成され、リポ蛋白質受容体が、リポ蛋白質代謝以外に重要な働きをしていることが明らかになった。例えば、VLDL受容体は、脳神経の発達と修復、家禽動物の卵母細胞の発達に関与すること、ApoER2は、脳神経の発達と修復、セレニウムの代謝に関与することなどが相次いで発見された。更に、LRP6と呼ばれるリポ蛋白質受容体が、Wnt受容体として機能し、Wnt/β-cateninシグナル伝達経路を活性化させることが発見された。Wntが骨代謝や糖質代謝に関与することを考え合わせると、リポ蛋白質受容体ファミリーは、コレステロール代謝のみならず、Wnt/β-cateninシグナル伝達経路を介して、骨粗鬆症や糖尿病の発症を左右する鍵分子であると期待されている。一方、私たちが発見したLRP10は、LRP6と同様に、LDL受容体に特徴的な5つの機能ドメインを有しているにも関わらず、LRP6とは逆に、Wnt/β-cateninシグナル伝達経路の活性化を抑制するという結果を見出した。そこで本研究では、LRP6やLRP10以外のリポ蛋白質受容体が、Wnt/β-cateninシグナル伝達経路を活性化させるか否かについて検討した。
【方法と結果】ヒト由来の細胞から作製したcDNAを鋳型としてPCRを行い、リポ蛋白質受容体ファミリーLDL受容体、VLDL受容体、LRP3、LRP4、LRP5、LRP6、LRP8(ApoER2)、LRP10の遺伝子をクローニングした（LRP7とLRP9は新規の遺伝子として報告されたが、LRP7はLRP5と、LRP9はLRP3と同一の遺伝子である)。各々のリポ蛋白質受容体遺伝子を動物細胞発現ベクターpcDNA3.1とライゲーションし、各遺伝子が過剰発現するプラスミドを得た。HEK293細胞にTCFレポータープラスミド(TOP-Flash)を、Wnt遺伝子およびリポ蛋白質受容体ファミリー遺伝子と共にトランスフェクションし、48時間後にTCFの転写活性をルシフェラーゼアッセイにより測定した。その結果、Wnt/β-cateninシグナル伝達経路はWnt3aによって活性化され、LRP6は活性化を亢進し、LRP10は活性化を抑制することが確認された。現在、その他のリポ蛋白質受容体遺伝子のWnt/β-cateninシグナル伝達経路に対する作用を検討している。

LDL receptor, LRP, Wnt signaling

講演番号：3A37a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ A 校舎 37 会場

小胞体ストレスによる FGF21 遺伝子発現誘導機構の解析
ER stress-induced FGF21 gene expression
○丸山 竜人、Shimizu Makoto、李 娟、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農生科・応生化）
○Ryuto Maruyama,Makoto Shimizu,Juan Li,Jun Inoue,Ryuichiro Sato（Dept. of Applied Biol. Chem., Grad . Sch. of Agri. and Life Sci., Univ. Tokyo,）

【目的】FGF21(Fibroblast Growth Factor 21)は肝臓で高発現する分泌性線維芽細胞増殖因子(FGF)である。FGF21 は白色脂肪組織での脂質分解の亢進や肝臓でのケトン体合成の亢進、インスリン感受性の改善に関与している。また、FGF21 の遺伝子発現は PPARα(Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha)や ChREBP(Carbohydrate Response Element-Binding Protein)によって制御されることが知られている。我々は、これら以外にも FGF21 の発現制御に関与する因子があると考え、様々な化合物を用いたスクリーニングを行った。その結果、小胞体ストレスにより FGF21 の発現亢進が見られた。そこで、FGF21 が小胞体ストレスによって活性化される新規の因子であると推定し、作用機序について解析することを目的とした。
【方法及び結果】マウスの初代培養肝細胞やヒト肝癌由来細胞である Huh7 細胞に小胞体ストレス誘導剤を添加したところ、小胞体ストレスによって誘導される BiP(Immunoglobulin Heavy Chain-binding Protein)の発現亢進とともに FGF21 の mRNA 発現の亢進が見られた。次に、野生型のマウスに小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを経口投与したところ、肝臓における FGF21 の発現上昇及び血中への FGF21 の分泌の増加が確認された。さらに、小胞体ストレスによる FGF21 の発現制御を解析するため、ヒト FGF21 プロモーター配列を含むルシフェラーゼベクターを作成した。そして、小胞体ストレス関連の転写因子を Huh7 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、ATF4（Activating Transcription Factor 4）が FGF21 のプロモーター活性を亢進させることが示された。次に、ATF4 の応答領域を検索した結果、FGF21 プロモーター配列の上流に ATF4 が結合する配列 AARE(Amino Acid Response Element)が存在することが示された。また、ゲルシフト法により FGF21 プロモーター上の AARE に ATF4 が結合することが示された。以上のことから、小胞体ストレスは ATF4 を介して FGF21 の発現を亢進することが考えられる。ATF4 は小胞体ストレス以外にも酸化ストレスやアミノ酸枯渇によっても活性化されることが知られている。マウスを用いた実験からも FGF21 の発現はこれらの刺激によって亢進することが示された。

FGF21, ER stress, ATF4

講演番号：3A37a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ A 校舎 37 会場

胆汁酸受容体 TGR5 の各種リガンド結合能の解析

Ligand-binding ability of bile acid receptor TGR5

○碇 菜穂[1]、Shimizu Makoto[1]、石黒 正路[2]、井上 順[1]、佐藤 隆一郎[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]新薬大・応生科)
○Naho Ikari[1], Makoto Shimizu[1], Masaji Ishiguro[2], Jun Inoue[1], Ryuichiro Sato[1] ([1]Dept. of Applied Biol. Chem. , Grad. Sch. of Agri. and Life Sci. , Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Pharm. , Grad. Sch. of Pharm. Sci. , Niigata Univ.)

【目的】TGR5 は、褐色脂肪組織や小腸 L 細胞、筋肉などに高発現する G タンパク質共役受容体である。TGR5 は細胞膜貫通領域に疎水ポケットを形成し、そこに胆汁酸などのリガンドが結合することで活性化される。それに伴い、細胞内の cAMP 濃度が上昇し、PKA が活性化される。その結果、褐色脂肪組織や筋肉では cAMP 応答配列結合タンパク質のリン酸化により cAMP 応答配列の下流に存在する Dio2 の mRNA 発現が昂進し、それに伴う甲状腺ホルモン経路を介したエネルギー消費の昂進が起こる。さらに小腸での GLP-1 分泌促進など、TGR5 の活性化は抗肥満・血糖低下効果を示すことが知られている。我々はこれまでに TGR5 を活性化するかん橘成分ノミリンを同定し、その抗肥満効果を報告した[1)]。TGR5 が構造の異なるリガンドを結合して活性化される分子メカニズムは不明である。そこで本研究では、胆汁酸、ノミリン、ベツリン酸をリガンドとして、それぞれによる TGR5 活性化機構の解析を行った。

【方法】ヒト TGR5 のアミノ酸配列に基づいて、食品成分との結合に重要と思われるアミノ酸残基を、分子シミュレーションにより推定した。その結果、TGR5 の膜貫通領域に存在する複数のアミノ酸がリガンドとの水素結合や疎水ポケットの形成に重要である可能性が示された。次にこれらのアミノ酸をアラニンに変換した TGR5 変異体を作製し、cAMP 応答配列を組み込んだルシフェラーゼベクターと共にヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイにより、TGR5 のリガンドへの応答を検討した。

【結果】分子シミュレーションで同定したアミノ酸の変異により、胆汁酸への応答性は変動しないにも関わらず、ベツリン酸に対する著しい応答性の低下が見られる変異体が見出された。さらに、リガンド非添加時の活性が高くなり、リガンドに対する応答性は低くなる変異体も存在した。また、野生型 TGR5 に対する各リガンドの EC_{50} 値を算定することに成功した。

1）E. Ono et al. Biochem Biophys Res Commun. 410. 677-81. (2011)

TGR5, bile acid, food factor

講演番号：3A37a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ A 校舎 37 会場

脂肪細胞分化過程における BCL11B の機能解析
Role of the transcription factor BCL11B in adipocyte differentiation
○井原 悠介、塚本 大介、橋詰 力、Shimizu Makoto、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農生科・応生化）
○Yusuke Ihara,Daisuke Tsukamoto,Tsutomu Hashidume,Makoto Shimizu,Jun Inoue,Ryuichiro Sato (Univ. of Tokyo)

【目的】BCL11BはT細胞の初期分化を制御する、Kruppel様C_2H_2型Znフィンガーモチーフを持つ転写因子であり、*Bcl11b*ノックアウトマウスは生後24時間以内に死亡する。我々は*Bcl11b*ノックアウトマウスの胎仔では肩甲間皮下脂肪組織が萎縮することを発見し、脂肪細胞分化におけるBCL11Bの機能解析を開始した。その結果、BCL11Bが脂肪細胞分化の初期に一過的に発現すること、マウス線維芽細胞株3T3-L1におけるBCL11Bの発現をノックダウンすると脂肪細胞への分化が抑制されること、レポーターアッセイによりBCL11Bが、脂肪細胞分化の開始に重要な役割を担う転写因子C/EBPβの転写活性を上昇させることを明らかにした。これらの結果は、BCL11Bが脂肪細胞分化の初期に必要なタンパク質であることを示唆している。本研究ではBCL11Bがマウス生体において脂肪の蓄積に関与するか検証するとともに、BCL11Bによる脂肪細胞分化の制御機構を解明することを目的とした。
【方法】（１）野生型および*Bcl11b*ノックアウトマウスの胎児線維芽細胞（MEF）を調製し、脂肪細胞分化を誘導して脂肪蓄積や脂肪細胞分化マーカーの発現を比較した。（２）野生型および*Bcl11b*ヘテロマウスに高脂肪食を10週間与え、体重増加や脂肪の蓄積を比較した。（３）HEK293T細胞にBCL11BとC/EBPβをトランスフェクションし、免疫沈降法により両者の結合を確認した。
【結果・考察】（１）*Bcl11b* ノックアウトの MEF では野生型よりも脂肪の蓄積が低かった。また脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPARγや C/EBPαおよびその下流の遺伝子の発現が抑制されていた。（２）*Bcl11b* ヘテロマウスは野生型と比較し、高脂肪食負荷による体重増加量および白色脂肪組織の重量が低下しており、BCL11B がマウス生体においても脂肪の蓄積に関与することが示された。（３）免疫沈降法により BCL11B が C/EBPβと相互作用することが示され、この相互作用を介して C/EBPβの転写活性を上昇させ、脂肪細胞分化を制御することが示唆された。現在ゲルシフトアッセイを用いて BCL11B が C/EBPβの DNA 結合能を亢進するか検証している。

adipocyte, differentiation, BCL11B

講演番号：3A37a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ A 校舎 37 会場

MIG12 によるトリグリセリド合成促進作用の解析

Analysis of MIG12 in Triglyceride Synthesis

○和泉 彬子、宮田 慎吾、Shimizu Makoto、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農生科・応生化）
○Akiko Izumi,Shingo Miyata,Makoto Shimizu,Jun Inoue,Ryuichiro Sato (Univ. of Tokyo)

【目的】LXR(Liver X Receptor)は、脂質代謝関連遺伝子の転写制御に関わる核内受容体である。我々は、LXR の新規標的遺伝子として MIG12 を同定し、本遺伝子が脂肪酸・トリグリセリド合成に関与することを示してきた [1)]。MIG12 は脂肪酸合成の律速酵素である ACC(Acetyl-CoA Carboxylase)のポリマー化を亢進することにより ACC を活性化し、脂肪酸合成を上昇させるが、トリグリセリド合成の亢進機構については明らかになっていない。そこで本研究では、MIG12 が脂肪酸からトリグリセリドへの変換に関与するかどうか、およびその作用機構について検証した。
【方法】ラット初代培養肝細胞にアデノウイルスを用いて MIG12 を過剰発現させ、新規脂肪酸・トリグリセリド合成量を測定した。[^{14}C]-酢酸あるいは[^{14}C]-オレイン酸を添加し 6 時間後に脂質成分を抽出し、TLC により展開した。脂肪酸およびトリグリセリドに取り込まれた[^{14}C]量を定量し、タンパク質量で補正することにより合成量を算出した。同時に、RNA を抽出し、Real-time PCR 法により DGAT(diacylglycerol acyl-transferase)やMGAT(monoacylglycerol acyltransferase)などのトリグリセリド合成関連遺伝子の mRNA 量を測定した。さらに同様の検討を、ラット肝がん由来 H4ⅡE 細胞を用いて行った。
【結果と考察】ラット初代培養肝細胞への MIG12 の過剰発現により、[^{14}C]-酢酸の添加時には、これまでの報告と同様に、[^{14}C]の脂肪酸・トリグリセリドへの取り込み量は上昇した。一方で、[^{14}C]-オレイン酸の添加時にも、MIG12 の過剰発現により[^{14}C]のトリグリセリドへの取り込み量が上昇したことから、MIG12 が脂肪酸からトリグリセリドへの変換に関与することが示唆された。H4ⅡE 細胞を用いて同様の検討を行ったところ、[^{14}C]-酢酸の添加時には、MIG12 の過剰発現により[^{14}C]のトリグリセリドへの取り込み量は上昇したが、脂肪酸への取り込み量は変化が見られなかった。この結果より、H4ⅡE 細胞では MIG12 過剰発現による ACC 活性化が起こらず、脂肪酸合成が上昇しない可能性が考えられる。その一方で、トリグリセリド合成の上昇が観察されたことから、MIG12 は脂肪酸合成亢進を介することなくトリグリセリド合成を上昇させることが示唆された。現在、MIG12 過剰発現がトリグリセリド合成関連遺伝子の mRNA 量に影響を及ぼすかどうかについて検討を行っている。

1) J. Inoue *et al.* Mol. Endocrinol. **25**, 995–1005. (2011)

MIG12, LXR, Triglyceride

講演番号：3A37a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ A 校舎 37 会場

脂肪滴局在タンパク質 ADRP の翻訳後修飾

Posttranslational modification of lipid droplet-associated protein ADRP

○篠田 旭弘[1]、鎌田 春彦[2]、Shimizu Makoto[1]、井上 順[1]、佐藤 隆一郎[1] ([1]東大院農、[2]医薬基盤研究所)
○Akihoro SHINODA[1], Haruhiko Kamada[2], Makoto Shimizu[1], Jun Inoue[1], ryuichiro sato[1] ([1]Tokyo Univ., [2]National Institute of Biomedical Innovation)

【目的】
脂肪滴局在タンパク質 ADRP はユビキチン化、リン酸化の翻訳後修飾を受けることが報告されている。そこで本研究では ADRP の翻訳後修飾のメカニズムを解析した。
【方法】
NIH-3T3 細胞に 3xFlag タグを付加した ADRP wild type および deletion, point mutant を強制発現させ、種々の試薬で刺激後、翻訳後修飾および ADRP のタンパク質発現を解析した。
【結果】
・LC-MS/MS を用いた解析の結果、ADRP wild type は N 末端のメチオニンが除去され、2 番目のアラニンがアセチル化を受けることが明らかとなった。一方 2 番目のアラニンをアスパラギン酸に置換した ADRP A2D mutant は N 末端のメチオニンは除去されず、N 末端のメチオニンがアセチル化を受けることが明らかとなった。以上の結果から ADRP の N 末端の翻訳後修飾には 2 番目のアラニンが重要であることが示された。
・ADRP wild type および 4 番目のアラニンをアスパラギン酸に置換した ADRP A4D mutant はプロテアソーム阻害剤によりタンパク質発現が増加し、分解を受けていることが認められた。一方、ADRP A2D mutant または 3 番目のアラニンをアスパラギン酸に置換した ADRP A3D mutant はプロテアソーム阻害剤を処理してもタンパク質発現は変化せず、分解が阻害されていることが示された。この時、ADRP wild type と比較して ADRP A2D mutant, ADRP A3D mutant はユビキチン化が減弱していた。以上の結果から、ユビキチン化を介した ADRP の分解に 2 番目および 3 番目のアラニンが重要であることが示された。
・ADRP wild type はオレイン酸処理によりリン酸化セリンが検出され、脂肪滴に局在することが認められた。一方 C 末端側を切除した ADRP C del mutant はオレイン酸処理によりリン酸化セリンは検出されず、脂肪滴に局在することが認められた。また、N 末端側を切除した ADRP N del mutant はオレイン酸処理によりリン酸化セリンは検出されたが脂肪滴には局在しなかった。以上の結果から ADRP はオレイン酸処理により細胞質で C 末端側のセリンがリン酸化されること、セリンのリン酸化は脂肪滴への局在に関与しないことが示された。

ADRP, lipid droplet, posttranslational modification

講演番号：3A37a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ A 校舎 37 会場

糖新生ならびにホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼのフェノバルビタールに抑制メカニズム

Molecular mechanism for suppressions of gluconeogenesis and PEPCK gene expression by phenobarbital

○小田 裕昭、奥田 祐司（名大院生命農学）
○Hiroaki ODA,Yuji OKUDA (Nagoya Univ.)

糖尿病では、筋肉のインスリン抵抗性の増大だけでなく、肝臓でのインスリンによる糖新生の抑制が起こらなくなるため高血糖が続いてしまう。対処療法ではあるが、肝糖新生を抑えることができれば高血糖は改善されることが期待されている。様々な薬の開発がされてきており、これまでの報告からも、フェノバルビタール（PB）などの生体異物が糖尿病を改善させる可能が示唆されてきたが、演者らは PB がホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（PEPCK）遺伝子発現を介して糖新生系を抑制することを見つけ出した。本研究では、生体異物である PB が PEPCK の遺伝子発現を制御し、結果として糖新生系を制御するメカニズムを検討した。さらに糖尿病ラットにおける糖新生活性を実際に PB が抑制するかを検討した。

ラット初代培養肝細胞を I 型コラーゲン上で平面培養させると、わずかにしか PEPCK やチロシンアミノトランスフェラーゼ（TAT）mRNA 量は検出できない。しかし、EHS-gel 上で 3 次元培養させると、無血清培地においても両 mRNA 量を高く維持できることが分かったので、以下にこの 3 次元培養肝細胞を用いた。cAMP で誘導した PEPCK 遺伝子発現を PB は抑制したが、TAT 遺伝子発現の誘導を変動させることはなかった。HepG2 細胞において、PEPCK プロモーター活性を PB は抑制した。糖尿病ラットに、PB の長期投与すると血糖値と PEPCK mRNA 量が減少したが、TAT 遺伝子では変化が見られなかった。ピルビン酸チャレンジテストを行い、糖新生系の活性を検討したところ、糖尿病ラットで起きている糖新生の亢進が PB の投与により抑制されていた。PB は核受容体の CAR を介して CYP2B1/2B2 を誘導することが知られているが、CAR が HNF-4 と競合するというが報告されている。しかし、今回の結果は CAR を介するものではないことを示唆している。まだ未同定の PB の PEPCK 遺伝子への作用機序は、新たな糖尿病に対する薬や食品の開発を助けるものと考えられる。

PEPCK, phenobarbital, hepatocyte

講演番号：3A37p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ A 校舎 37 会場

脂肪肝感受性を規定する候補遺伝子の肝細胞脂質代謝に対する作用の解析

Effect of candidate gene causing fatty liver on hepatic lipid metabolism

○都築 佳奈[1]、小林 美里[1]、鈴木 京[1]、大野 民生[2]、村井 篤嗣[1]、堀尾 文彦[1] ([1]名大院生命農、[2]名大院医学系)
○KANA TSUZUKI[1], MISATO KOBAYASHI[1], MIYAKO SUZUKI[1], TAMIO OHNO[2], ATSUSHI MURAI[1], FUMIHIKO HORIO[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Nagoya Univ.)

【目的】　A/J マウスと SM/J マウスから作出された組換え近交系統群の 1 系統である SMXA-5 は、高脂肪食摂取により著名な脂肪肝を呈するマウスである。我々は、脂肪肝感受性の SMXA-5 と脂肪肝抵抗性の SM/J との交雑群における遺伝解析により、脂肪肝感受性を規定する遺伝子座 *Fl1sa* を第 12 番染色体上に同定した。そして、*Fl1sa* の存在する A/J の 12 番染色体のみを SM/J に置換したコンソミックマウス（A/J-12^{SM}）において、A/J に比べ脂肪肝の軽減を確認できたことから、脂肪肝感受性遺伝子がマウス第 12 番染色体に存在することを証明した。さらに肝臓を用いた網羅的な遺伝子発現量解析により、脂肪肝感受性の A/J に比べて脂肪肝抵抗性の A/J-12^{SM} において約 4 倍の発現上昇レベルを示す *Iah1* 遺伝子を候補遺伝子として見出した。しかし、動物において *Iah1* 遺伝子の機能は明らかにされていない。そこで本研究では、肝細胞を用いて脂質代謝における Iah1 タンパク質の機能を解析することとした。
【方法】　（実験１）Iah1 が肝細胞内トリグリセリド（TG）含量に与える影響を検討するため、マウス由来の肝細胞株である Hepa1-6 細胞に SM/J マウスの Iah1 の cDNA を挿入したプラスミドベクターを導入し、Iah1 安定過剰発現株を作成した。この細胞にオレイン酸を添加して 48 時間後に細胞を回収し、Iah1 の mRNA およびタンパク質レベル、TG 含量測定に加え、脂質代謝系遺伝子の mRNA レベルを測定した。（実験２）Hepa1-6 細胞に Iah1 過剰発現ベクターを導入し、一過性過剰発現細胞においても同様の解析を行った。
【結果】　（実験１）Iah1 の mRNA およびタンパク質レベルは、Iah1 安定過剰発現株で約 12 倍に上昇し、TG 含量は有意な低値を示した。また、過剰発現株では脂質取り込み系および合成系遺伝子の mRNA レベルが有意に低下した。（実験２）Iah1 の一過性過剰発現細胞では、TG 合成経路の酵素である GPAT（Glycerol-3-phosphate acyltransferase）の mRNA レベルが有意に低下した。
【結語】 Hepa1-6 細胞での Iah1 タンパク質の過剰発現は､脂質合成関連遺伝子(GPAT)の mRNA レベルを低下させ、肝細胞内 TG 含量を低下させると考えられた。この Iah1 タンパク質の脂質合成経路への影響にを検証するために、Iah1 安定過剰発現株に対する Iah1 の siRNA 実験を試みている。

Lipid metabolism, Fatty liver, Triglyceride

講演番号：3A37p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ A 校舎 37 会場

マスト細胞がインスリン抵抗性に及ぼす影響
The role of mast cell in the insulin resistance
○関根 瞳[1]、小林 奈保子[2]、江口 輝[2]、金子 愛果[2]、佐藤 明日香[1]、佐藤 友宏[1]、有賀 豊彦[1,2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日大院　生資科　応生、[2]日大生資科　生命化)
○Hitomi SEKINE[1], Naoko KOBAYASHI[2], Akira EGUCHI[2], Aika KANEKO[2], Asuka SATO[1], Tomohiro SATO[1], Toyohiko ARIGA[1,2], Takashi HOSONO[1,2], Taiichiro SEKI[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ.)

［背景・目的］ マスト細胞は細胞質内にヒスタミンなどの生理活性物質を包含する顆粒を有し、様々な刺激に応答して脱顆粒し、アレルギー反応などを引き起こす。近年、肥満した白色脂肪組織にマスト細胞が浸潤し、インスリン抵抗性に関与する可能性が明らかとなってきた。そこで本研究では、マスト細胞の脱顆粒促進剤および抑制剤の短期間投与が、耐糖能や白色脂肪組織の炎症に及ぼす影響について検討を行った。

［方法］ レプチン受容体欠損マウスである C57BL/6J Iar-+Lepr^{db}/+Lepr^{db} (db/db マウス、6 週齢)にマスト細胞脱顆粒促進剤 compound 48/80 (0.5 mg/kg b.w.)、脱顆粒抑制剤 ketotifen (1.0 mg/kg b.w.)を週 2 回腹腔内投与した。Vehicle 群には生理食塩水を投与した。投与開始 3 週間後に経口糖負荷試験(グルコース、2 mg/kg b.w.)を実施し、耐糖能について検討した。その後、白色脂肪組織を回収して total RNA を調製し、リアルタイム PCR 法により炎症性サイトカインの mRNA 発現について検討を行った。

［結果］ 実験期間中の db/db マウスの体重は compound 48/80 投与群、ketotifen 投与群ともに vehicle 投与群と比較して有意な差はなかった。投与開始 3 週間後に実施した経口糖負荷試験では、compound 48/80 投与群の初期血糖値は vehicle 投与群と比較して高く、また、グルコース投与後 30, 90, 120 分の血糖値は有意に高値を示したことから、脱顆粒の促進によって耐糖能が悪化することが明らかとなった。一方、ketotifen 投与群ではグルコース投与後 120 分の血糖値は vehicle 投与群と比較して有意に低下し、脱顆粒の抑制によって耐糖能が改善することが明らかとなった。脱顆粒の促進による耐糖能の悪化が白色脂肪組織での炎症性サイトカインによるものかを検討する目的で、インスリン抵抗性に関与するアディポサイトカインやマクロファージ表面マーカーの mRNA 発現量を測定した。その結果、compound 48/80 投与群の皮下脂肪組織、精巣上体脂肪組織における TNF-α, IL-6, MCP-1, F4/80 の mRNA 量は vehicle 投与群との間に差はなかった。

［結論］ マスト細胞の脱顆粒がインスリン抵抗性に関与することが示唆された。

mast cell, diabetes, insulin resistance

講演番号：3A37p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ A 校舎 37 会場

ガーリック由来 diallyl trisulfide によるアセトアミノフェン誘導性肝障害の抑制
Protection of acetaminophen-induced liver injury by diallyl trisulfide.

○木村 広慈[1]、内田 真由子[2]、久保 瞳美[2]、山崎 祥一[2]、日吉 滉平[2]、今井 孝俊[1]、渡辺 師成[1]、深尾 友美[3]、有賀 豊彦[2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日大院・応生科、[2]日大・生命化、[3]お茶大・生環研)
○KOJI KIMURA[1], MAYUKO UCHIDA[2], HITOMI KUBO[2], SYOHICHI YAMAZAKI[2], KOHEI HIYOSHI[2], TAKATOSHI IMAI[1], KAZUNARI WATANABE[1], TOMOMI FUKAO[3], TOYOHIKO ARIGA[2], TAKASHI HOSONO[1,2], TAIICHIRO SEKI[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ., [3]Ochanomizu Univ.)

【目的】我々は、ニンニク由来香気成分diallyl trisulfide (DATS) が薬物代謝酵素CYP2E1の発現および活性を抑制することを報告した(J Nutr, 139, 2252-6, 2009)。CYP2E1は、アルコールや薬物の代謝に関わる酵素であり、その代謝産物の多くは毒性を示すことが知られている。またCYP2E1ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較してエタノール誘導性肝障害が軽度であることが報告されている。これらのことから、CYP2E1の発現や活性の抑制は薬物誘導性肝障害の予防につながる可能性が考えられた。アセトアミノフェン(APAP)は解熱鎮痛剤の一種であり、過剰摂取による肝障害が問題となっている。そこで本研究では、DATSがAPAP誘導性肝障害を抑制できるか明らかにしようとした。また、DATSによるCYP2E1の抑制メカニズムについて、培養細胞を用いて検討を行なった。
【方法】Wistar系ラット(8週齢雄性)にコーン油に溶解したDATS(500 μmol/kg body weight/day)ならびに対照としてコーン油を5日間経口投与し、DATSの最終投与24時間後にAPAP(500 mg/kg body weight)を腹腔内投与した。APAP投与24時間後に心臓から全採血し、血漿中のASTとALTを測定した。また、ヒト肝がん細胞であるHepG2細胞をDATS（100 μM）存在下、非存在下でAPAP(10 mM) を添加して48時間培養後、これらの細胞を回収し、トリパンブルー染色法により生細胞率を算出した。また、APAPのCYP2E1による代謝産物であり肝毒性を有する*N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine(NAPQI；300 μM)に対するDATSの影響についても同様に検討した。
【結果】ラットを用いた実験では、対照群と比較してDATS投与群のASTとALT活性は有意に減少し、APAPによる肝障害がDATSにより抑制されることが明らかになった。HepG2細胞へのAPAPの添加培養により、細胞生存率は約10%に減少した。一方、DATSとAPAPの共添加群の生細胞率は40%であり、DATSはAPAPの肝細胞に対する毒性を低減させた。また、APAPの代謝物であるNAPQIによる細胞毒性に対しては、DATSはほとんど影響を及ぼさず、細胞生存率は上昇しなかった。
【結語】DATS は、CYP2E1 を抑制し APAP 誘導性肝障害を予防することが明らかとなった。DATS による CYP2E1 抑制メカニズムについて、現在さらに検討中である。

APAP, NAPQI, CYP2E1

講演番号：3A37p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ A 校舎 37 会場

TAFI による肝細胞の生存、細胞死の制御
Regulation of the survival and apoptosis by TAFI in the hepatocytes
○石井 佳澄[1]、大路 拓巳[1]、小田 誠[2]、田中 伸尚[2]、三浦 徳[2]、奥村 暢章[1]、細野 崇[1,2]、有賀 豊彦[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日大院　生資科　応生、[2]日大生資科　生命化)
○Kasumi ISHII[1], Takumi OJI[1], Makoto ODA[2], Nobutaka TANAKA[2], Atsushi MIURA[2], Nobuaki OKUMURA[1], Takashi HOSONO[1,2], Toyohiko ARIGA[1,2], Taiichiro SEKI[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ.)

【背景と目的】Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) は肝臓で合成される血漿カルボキシペプチダーゼB (CPB) の前駆体である。TAFIはトロンビン、トロンビン/トロンボモジュリン複合体などによって活性型(TAFIa)に変換されると、リシン残基を切断するCPB活性を示し、fibrinのC末端リシン残基を除去することにより線溶を阻害する。一方、細胞表面に存在するリシン残基に線溶酵素が結合して、細胞周囲に限局して作用することは細胞線溶と呼称されている。我々はこれまでにplasmin (ogen) の肝細胞膜表面への結合が肝再生を促進すること、TAFIの発現が肝再生において抑制されること、またTAFIが肝細胞の増殖に対して抑制的に働くことなどを明らかにした (J Biol Chem, 2009)。本研究では肝臓におけるTAFIのさらなる機能解明を目的として、TAFIと肝細胞の生存、細胞死の関連について研究を行った。
【方法】Wistar ラットからコラゲナーゼ灌流法を用いて肝細胞を単離し、初代培養した。初代培養肝細胞に TAFI siRNA を導入して TAFI をノックダウン後、トラネキサム酸により肝細胞膜に結合した plasmin (ogen) を回収し、fibrinogen を基質とした Zymography を用いて plasmin の細胞膜表面への局在を検討した。また、これらの細胞について、アポトーシス実行因子である caspase-3 の活性化、生存シグナルである Akt のリン酸化をウェスタンブロッティングにより検討した。さらに TAFI 過剰発現 plasmid を初代培養肝細胞に導入し、細胞膜表面に局在する plasmin, caspase-3 の活性化、Akt のリン酸化について同様に検討した。
【結果】TAFI siRNA 導入細胞では、導入後４８時間において TAFI のタンパク質の発現は 90%以上抑制された。これらの細胞の細胞膜表面の plasmin 局在量は、contorl siRNA 導入細胞と比較して増加した。また caspase-3 の活性化は抑制され、相反的に Akt のリン酸化は 2.5 倍増加した。TAFI 過剰発現細胞では、TAFI タンパク質の発現は 2 倍に増加した。Plasmid 導入後４８時間において、TAFI 過剰発現細胞では mock と比較して細胞膜表面の plasmin の局在量は減少し、caspase-3 の活性化は 2 倍に増加し、Akt のリン酸化は減少した。
【結論】TAFI は plasmin の局在を変化させ、肝細胞の生存や細胞死を制御することが示唆された。

TAFI, apoptosis, hepatocyte

講演番号：3A37p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ A 校舎 37 会場

プリオン感染 N2a 細胞での異常プリオン蛋白蓄積におけるアクチン骨格及び PI3 キナーゼ経路の関与

Possible role of the actin cytoskeleton and PI3 kinase signaling pathway in the accumulation of a protease-resistant form of prion protein in ScN2a cells.

○竹之内 敬人[1]、岩丸 祥史[2]、今村 守一[2]、佐藤 充[1]、横山 隆[2]、毛利 資郎[2]、木谷 裕[1]([1]農生資研・動物生体防御、[2]動衛研・プリオン病研究センター)
○ Takato TAKENOUCHI[1], Yoshifumi IWAMARU[2], Morikazu IMAMURA[2], Mitsuru SATO[1], Takashi YOKOYAMA[2], SHIROU MOHRI[2], Hiroshi KITANI[1] ([1]Anim. Immune and Cell Biol. Res. Unit, Natl. Inst. Agrobiol. Sci., [2]Res. Cent. for Prion Dis., Natl. Inst. Anim. Health)

【目的】感染性病原体“プリオン”の主要構成成分である異常プリオン蛋白は、宿主細胞に発現する正常プリオン蛋白を異常型に変換することで複製･増幅する。正常プリオン蛋白はグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカー型膜糖蛋白であり、その細胞膜表面からのエンドサイトーシスあるいはリサイクリングエンドソームへの局在が異常型への変換に重要であることが報告されているが、異常プリオン蛋白の増幅･蓄積に関与する細胞内機構の詳細は未解明である。本研究では、プリオン感染マウス神経芽細胞腫（ScN2a）細胞での異常プリオン蛋白蓄積に対する各種細胞骨格阻害剤の影響について検討した。
【方法】N2a 細胞を羊スクレイピー由来チャンドラー株プリオン感染マウス脳ホモジネートに暴露し、プリオンが持続感染した ScN2a 細胞を作製した。薬剤処理後 24 時間培養した細胞の溶解液をプロテイナーゼ K（PK）で処理し、PK 抵抗性の異常プリオン蛋白をウエスタンブロット法で検出した。また、薬剤処理した ScN2a 細胞を 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定し、各種蛋白に対する特異的抗体を用いて免疫染色した。
【結果】ScN2a 細胞における異常プリオン蛋白蓄積はアクチン骨格阻害剤であるサイトカラシン D 処理によって増加したが、微小管阻害剤（コルヒチン、ノコダゾール、パクリタキセル）では影響がなかった。サイトカラシン D 処理による異常プリオン蛋白増加は PI3 キナーゼ阻害剤（wortmannin）及び Akt 阻害剤で抑制された。また同時に、サイトカラシン D 処理は ScN2a 細胞でβIII-Tubulin 陽性の神経様突起伸長を伴う形態変化を誘導するが、それは wortmannin 処理で抑制された。以上の結果から、ScN2a 細胞での異常プリオン蛋白蓄積におけるアクチン骨格及び PI3 キナーゼ-Akt 経路の関与が示唆され、また神経様細胞への形態変化が異常プリオン蛋白増加と関連する可能性も示唆された。

prion, ScN2a cells, cytochalasin D

講演番号：3A37p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ A 校舎 37 会場

3T3-L1 脂肪前駆細胞の分化に伴う phospholipid scramblase 3 の発現および細胞外分泌の解析
Analyses of expression of phospholipid scramblase 3 and its secretion during differentiation of 3T3-L1 preadipocyte

○猪川 亮、犬塚 達俊、柴田 秀樹、牧 正敏（名大院生命農）
○Akira INOKAWA,Tatsutoshi Inuzuka,Hideki Shibata,Masatoshi Maki (Grad.Sch.Bioagric.Sci., Nagoya Univ.)

【目的】Phospholipid scramblase(Scr)は Tubby-like protein スーパーファミリーに属す。Scr ファミリーには 5 種類のアイソフォーム(Scr1-5)が存在する。Scr3 はカルジオリピンの合成やアポトーシスに関与することなどが報告されている。また、Scr3 ノックアウトマウスでは腹部脂肪の蓄積、血中の脂質濃度の上昇、インシュリン抵抗性の生活習慣病症状を示すことが知られている。しかし、未だ Scr3 の機能についての詳細は不明である。本研究では、Scr3 のノックアウトマウスで脂肪の蓄積に影響が出ることから Scr3 と脂質代謝の関係を明らかにするために、マウスの脂肪前駆細胞である 3T3-L1 細胞を用いて解析を行った。
【方法および結果】3T3-L1 細胞を脂肪細胞へ分化させた際の Scr3 の存在量の変化を mRNA レベルとタンパク質レベルで調べた。18S rRNA、36B4 および PPIB をリファレンス遺伝子として定量的リアルタイム PCR 法を行ったところ Scr3 の mRNA 存在量は分化させると約 30-50 %減少した。一方、Scr3 特異的抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ Scr3 のタンパク質存在量は分化させることで約 80 %減少した。また、3T3-L1 細胞の培養上清を 100,000×g で沈殿画分を回収し、Scr3 特異的抗体でウエスタンブロットを行ったところ脂肪細胞への分化前後で細胞外に分泌される Scr3 タンパク質の量の差は認められなかった。回収した 100,000×g 遠心沈殿画分をショ糖密度勾配による遠心分画法で分画しウエスタンブロットを行ったところ、エキソソームが検出される密度の画分に Scr3 を検出した。
【考察】3T3-L1 細胞内の Scr3 タンパク質の存在量は、分化に伴い顕著に減少するが、これは mRNA 存在量の減少とともに、細胞外にエキソソームとして放出される Scr3 タンパク質の量が増加したためと考えられる。しかし、脂肪細胞分化にともなってエキソソーム分泌そのものが亢進するのか、あるいは Scr3 の分泌が特異的に亢進するのか、これを明らかにするため現在、エキソソームマーカーを用いて解析中である。また、エキソソーム分泌に影響を与える因子についても検討中である。

Phospholipid scramblase, adipogenesis, exosome

講演番号：3A37p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ A 校舎 37 会場

ALG-2 相互作用因子 CHERP の細胞内局在および選択的スプライシング制御機能

Intracellular localization of ALG-2-interacting protein CHERP and its function of alternative splicing regulation

○大杉 桂奈江、井元 千晶、柴田 秀樹、牧 正敏（名大院生命農・応用分子生命科）
○Kanae OSUGI,Chiaki IMOTO,Hideki SHIBATA,Masatoshi MAKI (Dept. Appl. Mol. Biosci., Grad. Sch. Bioagric. Sci ., Nagoya Univ.)

[背景と目的] CHERP (Calcium Homeostasis Endoplasmic Reticulum Protein) は、IP_3R (Inositol 1,4,5-triphosphate receptor) 誘導型 Ca^{2+}放出を阻害する抗体の標的蛋白質として単離され、T 細胞系では小胞体に局在し、細胞内 Ca^{2+}動員制御や細胞増殖への関与が報告されていた。一方でプロテオーム解析により、CHERP がスプライソソーム複合体や、スプライシング因子が豊富に存在する、核スペックルという核内構造物に含まれていることが報告されている。さらに CHERP の構造に着目すると、SURP モチーフや G-patch、RNA ポリメラーゼ II の C 末端と相互作用する CID など、RNA プロセシングに関与する領域が複数存在する。特に Arg と Ser に富む領域は、一般にエキソンに結合し、構成的・選択的スプライシングを制御すると考えられている SR 蛋白質が共通してもつ RS (Arg/Ser-rich) ドメインと相同性が高い。我々は、Ca^{2+}結合蛋白質 ALG-2 (Apoptosis-Linked Gene 2) と CHERP が Ca^{2+}依存的に相互作用することを明らかにした。また、これまでの報告とは異なり、CHERP が小胞体ではなく主に核質に存在し、核スペックルに一部局在すること、CHERP に存在する Arg と Ser に富む領域が恒常的にリン酸化された RS ドメインであることを確認した。本研究では、CHERP が SR 様蛋白質として機能している可能性を検討するため、細胞内局在や選択的スプライシングに対する影響を明らかにすることを目的とした。
[方法と結果] GFP 融合 CHERP RS ドメイン欠損変異体 (ΔRS) を HeLa 細胞に発現させて局在観察したところ、全長が核質のみに局在するのに対し、ΔRS は核質だけでなく、細胞質で斑点状に存在し、一部の細胞では小胞体にも局在することを発見した。ΔRS は、ALG-2 相互作用因子の 1 つで小胞体付近に局在し、小胞輸送に関与する Sec31A とも一部共局在した。ジギトニンによる前膜透過処理を行った HeLa 細胞を用いた免疫染色の結果、内在性 CHERP やスプライシング制御因子 SC35 が示す核スペックルへの、ALG-2 の特異的な集積が観察された。また、CHERP に存在する Pro に富む領域の一部のアミノ酸配列を欠損させると、核スペックルへの局在が妨げられ、CHERP における核内での適切な局在に関与する領域が判明した。IP_3R1 について報告されている選択的スプライシングに対し、CHERP の影響を調べたところ、CHERP を発現抑制させた細胞では IP_3R1 のエキソン 42 を含む mRNA の割合が増加した。さらに RNA-蛋白質複合体免疫沈降を行ったところ、抗 CHERP 抗体の免疫沈降産物から、コントロール IgG と比較して有意に IP_3R1 の mRNA が検出された。以上の結果から、CHERP が SR 様蛋白質として機能することが示唆された。

SR-like proteins, alternative splicing, nuclear speckles

講演番号：3A37p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ A 校舎 37 会場

樹状細胞において PU.1 は CCR7 の発現を制御する

PU.1 regulates an expression of CCR7 in dendritic cells

○八代 拓也、原 むつ子、小川 秀興、奥村 康、西山 千春（順大医）
○Takuya YASHIRO,Mutsuko HARA,Hideoki OGAWA,Ko OKUMURA,Chiharu NISHIYAMA (Juntendo Univ.)

【目的】全身に広く分布する樹状細胞 (DC)は抗原を取り込むと活性化し、脾臓やリンパ節などの二次リンパ器官に移行してT細胞に抗原提示を行う。これにより抗原特異的な免疫反応が惹起されることから、DCは「免疫系の司令塔」と呼ばれる。これまでに我々は、DCにおいて転写因子PU.1が、抗原提示に必須なMHC class IIの発現を制御していることをはじめとして、DC機能に重要であることを報告してきた。本研究では、DCの二次リンパ器官への移行に関わるケモカインレセプターCCR7の遺伝子発現にPU.1が関与するかについて検討した。
【方法・結果】BALB/cマウス由来骨髄細胞をGM-CSF存在下で培養し、BMDC (Bone marrow-derived DC)を得た。これにPU.1 siRNAを導入した後、LPSで刺激して、CCR7の発現をReal-time RT-PCR及びFACSにて解析した。その結果、PU.1ノックダウンによりCCR7のmRNA量およびタンパク質量共に減少することが確認された。マウスCCR7のプロモーター領域をクローニングし、構築したレポータープラスミドをマウス樹状細胞株JAWSIIに導入して、挿入断片のプロモーター活性をLuciferase assayにて評価した。その結果、転写開始点直上域に転写調節領域が複数存在することが示唆された。BMDCにおいて、クロマチン上のこの領域へのPU.1の結合をChIP assayにより解析したところ、その他の領域に比べて有意にPU.1の結合が多いことが示された。さらに、ヒト末梢血由来単核細胞をGM-CSF及びIL-4存在下で培養して作製したヒトDCにおいても、同様にChIP assayを行ったところ、転写開始点直上域にPU.1が結合していることが示された。以上の結果から、DCにおいてPU.1は、CCR7のプロモーター領域に結合し、転写を正に制御していることが明らかになると共に、この機構は種間で保存されていることが示唆された。

PU.1, CCR7, dendritic cells

講演番号：3A37p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ A 校舎 37 会場

p53KO マウス脂肪由来クローナル間葉系幹細胞の樹立と解析

Establishment of adipose-derived mesenchymal stem cell lines from a p53-knockout mouse

○佐伯 俊幸（東北大　農）
○TOSHIYUKI SAEKI (Tohoku Univ)

＜背景・目的＞

間葉系幹細胞（MSCs）は様々な細胞に分化する多分化能を有していることから、怪我・病気に対する再生治療の材料になると期待されている。MSCs は骨髄・脂肪・筋・軟骨・腱等に存在していることが報告されている。中でも骨髄由来の MSCs を用いた研究が盛んに行われているが、再生治療時のリスクや簡便性から脂肪由来（AD）MSCs が注目されている。しかしながら、細胞老化による細胞分裂回数に限りがあることやヘテロな細胞集団という問題がある。そこで本研究では、p53KO マウスより不死化したクローン性 AD-MSC 株細胞を樹立することにより AD-MSC の分化誘導研究に有用なツールを作出することを目的とする。

＜方法・結果＞

P53KO マウスより AD-MSC bulk を樹立し MSC マーカーである CD105、CD29、CD44 の発現を確認した。また脂肪・骨芽・軟骨細胞への分化実験を行ったところ、その分化能を有していた。

続いて AD-MSC bulk から限界希釈法により株細胞を樹立し、その形態から 6 グループに分類した。これらの株細胞の MSC マーカー発現を確認したところポジティブな株細胞が確認できた。各種細胞分化誘導培地に培養し脂肪・骨芽・軟骨細胞への分化実験を行ったところ、その分化能を示した。また、足場非依存性増殖が見られないことから癌化はしていなかった。さらに物理的に肝臓に傷を付けたマウスの尾静脈に株細胞を移植することで傷害部位に移動し肝臓細胞に分化していた。

＜まとめ＞

以上の結果から樹立された p53KO マウス由来クローン性 AD-MSC 株細胞は MSC マーカーの発現や、多分化能を有することから AD-MSC の特徴を維持しており、AD-MSC の分化誘導研究に有用なツールであると期待される。

(Komine,A　et al., 2012　BBRC)

established AD-MSC cell lines from a p53-knockout (KO) mouse, differentiated into adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes by treatment with certain stimuli, clonal cell lines will serve as important tools to study the mechanism of differentiation of MSCs

講演番号：3A37p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ A 校舎 37 会場

上皮細胞の抗ウイルス応答に対するメイラード反応後期段階生成物の作用解析

Effect of advanced glycation end-products on the anti-vairal response of epithelial cells

○藤野 麻美[1]、布野 絢子[1]、早瀬 文孝[2]、渡辺 寛人[1]([1]明治大農・生命科、[2]明治大農・農化)
○Asami FUJINO[1], Ayako FUNO[1], Fumitaka HAYASE[2], Hirohito WATANABE[1] ([1]Faculty of Agriculture,Meiji Univ., [2]Faculty of Agriculture,Meiji Univ.)

【目的】糖尿病患者の体内では糖とタンパク質の非酵素的化学反応である「メイラード反応」が亢進し、メイラード反応後期段階生成物（advanced glycation end products; AGE）が蓄積する。蓄積した AGE はさまざまな細胞機能障害をひきおこし、糖尿病合併症の発症に関与することが知られている。われわれは AGE 構造のなかでもとくに細胞傷害作用が強いグリセルアルデヒド（GLA）由来 AGE が細胞へ与える影響について解析してきた。これまでに、GLA 由来 AGE がマウスマクロファージ様細胞株に作用し、Type Ⅰ IFN（インターフェロン）シグナルを抑制して抗ウイルス遺伝子群の発現を低下させることを見出している[1]。

Type Ⅰ IFN シグナルは感染初期の抗ウイルス応答に重要な自然免疫反応の 1 つであり、生体内のさまざまな非免疫担当細胞においても重要な役割を果たしている。本研究では、上皮細胞における抗ウイルス応答に対する AGE の作用を解明することを目的とした。

【方法および結果】GLA 由来 AGE のモデルとして GLA 修飾 BSA（GLA-BSA）を用い、これをヒト腸管上皮細胞株 HT-29 に作用させて mRNA 発現変化について解析を行った。ウイルス二本鎖 RNA の類似分子として poly(I:C)を作用させたところ、HT-29 細胞において poly(I:C)の濃度依存的に Type Ⅰ IFN の発現が上昇した。一方、GLA-BSA の作用により Type Ⅰ IFN により誘導される OAS3 や IFNAR2 の発現が抑制された。またその抑制作用は濃度依存的なものであった。

一方、上皮細胞においては、TypeⅢIFN が抗ウイルス応答に重要な役割をもつことが近年明らかになってきている。そこで TypeⅢIFN に対する AGE の作用を解析したところ、GLA-BSA の作用により HT-29 細胞における TypeⅢIFN の発現が有意に低下することが明らかとなった。

本研究により AGE が上皮細胞における抗ウイルス応答を低下させることが示された。これらの結果は、体内で生成・蓄積する AGE が、糖尿病などの病態において自然免疫機能に影響を及ぼしうることを示唆するものである。

[1]渡邉、中森、早瀬、渡辺　平成 21 年度日本農芸化学会大会要旨集 p146

innate immunity, advanced glycation end-products, intestinal epithelial cells

講演番号：3A37p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ A 校舎 37 会場

抗 CD98 抗体依存性細胞融合阻害物質の新規評価系の構築

Development and evaluation of the novel assay for anti-CD98 antibody-induced cell fusion

○桂川 美咲[1]、秋山 智美[1]、坂野 貴志[1]、伊藤 守弘[2]、伊藤 康彦[2]、中川 大[1]、禹 済泰[1,3]、車 炳允[3]、大西 素子[1]([1]中部大・応生、[2]中部大・生命、[3]中部大・生物機能開発研)
○Misaki KATSURAGAWA[1], Satomi AKIYAMA[1], Takashi BANNO[1], Morihiro ITO[2], Yasuhiko ITO[2], Hiroshi NAKAGAWA[1], Je-Tae WOO[1,3], Byung-Yoon CHA[3], Motoko OHNISHI[1] ([1]College of Bioscience and Biothechnology, Chubu Univ., [2]College of Life and Health Science, Chubu Univ., [3]Research Institute for Biological Science, Chubu Univ.)

【目的】CD98 は T 細胞活性化抗原として見出された重鎖（CD98hc）と、アミノ酸輸送体である軽鎖から成る膜貫通タンパク質であり、細胞融合の制御に関わることが知られている。本研究では細胞融合の分子機構を明らかにするため、HIV 外膜蛋白 gp160 を発現するヒト単球由来 U937 細胞株（U2ME-7 細胞）を用いて、抗 CD98hc モノクローナル抗体依存性の細胞融合を阻害する化合物を探索し、これまでに Na^+/K^+-ATPase の特異的な阻害剤として知られる一連の強心ステロイド類が融合を阻害することを見出した。このたび CD98 依存性の細胞融合を定量できる評価系を新たに構築し、二種類の Na^+/K^+-ATPase 阻害剤、ouabain と oligomycin の作用を比較検討したので報告する。
【方法および結果】U2ME-7 細胞は 10μM の $CdCl_2$ を含む MEM 培地を用いて培養した。96 well プレートに播種すると同時に化合物を加えて 1 時間培養後、抗ヒト CD98hc モノクローナル抗体を添加し、さらに 24 時間培養を行った。全凝集塊数および融合細胞を含む凝集塊数を計測した結果、ouabain は両者を減少したものの、oligomycin は小さな凝集塊を数多く生じ、全凝集塊数および融合細胞を含む凝集塊数をともに増加した。そこで細胞融合に対する oligomycin の作用を検討するため、凝集塊を懸濁し、個々の細胞を分散後、メッシュサイズ 40μm のセルストレーナーで融合細胞を分離することによって、融合細胞数を直接計測し得る評価系を構築した。この系を用いて、ouabain の細胞融合に対する影響を調べたところ、濃度依存的な融合抑制効果が確認できたため、この評価系により低分子化合物の細胞融合阻害活性の評価が可能であると考えられた。さらに oligomycin の作用を検討した結果、ouabain と同様に CD98 依存性細胞融合を阻害することが明らかとなった。以上の結果より、Na^+/K^+-ATPase が CD98 依存性細胞融合の制御に関与する可能性が高いと考えられた。

cell fusion, CD98, Na^+/K^+-ATPase

講演番号：3A37p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ A 校舎 37 会場

Vinculin と Rab5 が関与するエンドサイトーシス機構の解明

Analysis on Molecular Mechanism of vinculin and Rab5-dependent endocytosis

○萩原 真[1]、国分 栄仁[2]、杉浦 進介[1]、小松 寿明[1]、多田 浩之[1]、磯田 竜太朗[1]、谷川 順美[1]、加藤 佳子[1]、石田 直之[1]、小林 かおる[1]、石原 和幸[2]、松下 健二[1] ([1]国立長寿研、[2]東京歯科大)
○Makoto HAGIWARA[1], Kokubu Eitoyo[2], Shin-suke Sugiura[1], Toshinori Komatsu[1], Hiroyuki Tada[1], Ryutaro Isoda[1], Naomi Tanigawa[1], Yoshiko Kato[1], Naoyuki Isida[1], Kaoru Kobayashi[1], Kazuyuki Ishihara[2], Kenji Matsushita[1] ([1]NCGG, [2]Tokyo Dent. Col.)

vinculin は分子量 116 kDa の膜骨格タンパク質である。多くの研究によって vinculin は細胞接着に関わることが報告されているが、他の細胞現象における vinculin の機能については詳細が不明である。本研究では、vinculin がエンドサイトーシスに重要な因子である低分子量 G タンパク質 Rab5 と相互作用することを見出し、エンドサイトーシスによる黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)の細胞内への移行に関わることを明らかにしたので報告する。

まず始めに、vinculin と Rab5 の結合状態を明らかにするために、免疫沈降法や GST プルダウンで解析した。その結果、vinculin と Rab5 が結合した。次に、vinculin がどのような物質の取り込みに関与するか、培養細胞を用いて過剰発現とノックダウンの実験系で検討した。その結果、vinculin は *S. aureus* の細胞内への移行に関与するが、トランスフェリン、アルブミン、ルシファーイエロー、FM-4-64 細胞内取り込みには関与しなかった。そして、vinculin と Rab5 の活性との関連性について明らかにするために GST-R5BD プルダウンで検討した。その結果、*S. aureus* の細胞内への移行時に vinculin は Rab5 の活性化に関与した。次に、vinculin の PIP2 結合能及び vinculin の活性と *S. aureus* の細胞内への移行との関連性を明らかにするため、PIP2 結合能が低下した vinculin 変異体と活性型 vinculin 変異体を用いて解析を行った。その結果、PIP2 結合能が低下した vinculin 変異体は *S. aureus* の細胞内への移行に変化はなかったが、活性型 vinculin 変異体は *S. aureus* の細胞内への移行が促進した。また、S. aureus の細胞内への移行と、MAPK との関連性について検討した。その結果、vinculin をノックダウンした細胞では、*S. aureus* による MAPK(JNK、p38、ERK)のリン酸化が低下し、炎症性サイトカイン IL-6 の発現が低下していた。さらに、*S. aureus* の細胞内への移行と vinculin の関連性を *in vivo* で解析した。その結果、vinculin siRNA をマウスの肺に導入すると、肺において *S. aureus* の細胞内への移行が抑制された。

以上のことより、vinculin は細胞接着だけではなく、Rab5 と相互作用し、エンドサイトーシスによる *S. aureus* の細胞内への移行に関与することが明らかとなった。

vinculin, Rab5, endocytosis

講演番号：3A37p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ A 校舎 37 会場

ＡＢＣＧ１発現による脂質ラフトを介した細胞機能の変化

Changes of cellular functions via lipid raft in ABCG1-expressions cells

○伊藤 志帆[1]、渡邊 太郎[1]、松尾 道憲[1]、植田 和光[1,2]（[1]京大院・農・応用生命、[2]京大・物質－細胞統合システム拠点）

○ Shiho Ito[1], Taro Watanabe[1], Michinori Matsuo[1], Kazumitsu Ueda[1,2] ([1]Div.Appl.Life Sci.,Grad.Sch.of Agric.,Kyoto Univ., [2]iCeMS,Kyoto Univ.)

【目的】ＡＢＣＧ１はＡＢＣタンパク質スーパーファミリーに属しており、末梢細胞や神経細胞において余剰のコレステロールを排出する機能をもつ。脂質ラフトは細胞膜上でスフィンゴ脂質やコレステロールに富んだ領域である。脂質ラフトにはさまざまなシグナル伝達分子が会合しており、炎症や接着、細胞周期などにおいて重要な役割を果たすことが知られている。当研究室の研究によりＡＢＣＧ１の発現によってラフトマーカーであるカベオリン１のラフトにおける局在が減少し、脂質ラフトが破壊されることが示唆された。そこで本研究では、ＡＢＣＧ１の発現によって脂質ラフトの構造が破壊されて様々な現象が起きるのではないと考え、脂質ラフトを介するシグナルに関わる遺伝子の変動を解析することを目的とした。

【方法、結果】ＡＢＣＧ１を安定発現するＨＥＫ２９３細胞株から抽出したｍＲＮＡよりｃＤＮＡを作成し、定量的ＰＣＲによって炎症や接着、細胞周期に関わる各種遺伝子の発現量を網羅的に解析した。その結果、ＡＢＣＧ１を安定発現させたＨＥＫ２９３細胞では、親株細胞と比べてＩＣＡＭ－１（ｉｎｔｅｒｃｅｌｌｕｌａｒ ａｄｈｅｓｉｏｎ ｍｏｌｅｃｕｌｅ－１）、ＣＣＬ－２（ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ ｌｉｇａｎｄ－２）で８倍、ｃａｄｈｅｒｉｎ－１、ｉｎｔｅｇｒｉｎβ４、ＴＧＦＢＩ（ｔｒａｎｓｆｏｒｍｉｎｇ ｇｒｏｗｔｈｆａｃｔｏｒ，ｂｅｔａ ｉｎｄｕｃｅｄ）で４倍の遺伝子の発現上昇がみられた。これらの大きく変動があった遺伝子について、内在性のＡＢＣＧ１を発現するＴＨＰ－１細胞(ヒト単球系細胞)、ＳＨ－ＳＹ５Ｙ細胞(ヒト神経芽細胞種)、ＣＣＦ－ＳＴＴＧ１細胞(ヒト星状細胞種)を用いて発現量を解析した。核内転写因子ＬＸＲ、ＲＸＲのリガンドであるＴＯ９０１３１７と9-シス-レチノイン酸を添加してＡＢＣＧ１の発現を上昇させると、ＩＣＡＭ－１、ＣＣＬ－２の発現が上昇し、ＡＢＣＧ１をノックダウンさせると発現が減少する傾向が見られた。ＩＣＡＭ－１、ＣＣＬ－２は炎症反応に応答して発現が上昇することが知られている。

これらの結果からＡＢＣＧ１を発現させると、炎症に関わる遺伝子の発現が上昇することが示唆された。

ABCprotein, lipid raft, inflammation

講演番号：3A37p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ A 校舎 37 会場

ビネキシンは細胞外基質の硬さに依存したアクチン繊維の増強に必要である

Vinexin is required for the strengtheing of actin stress fiber depending on ECM stiffness

○市川 尚文[1]、山下 寛[1]、木村 泰久[1]、植田 和光[1,2]、木岡 紀幸[1] ([1]京都大院農、[2]京都大 iCeMS)
○Takafumi ICHIKAWA[1], Hiroshi YAMASHITA[1], Yasuhisa KIMURA[1], Kazumitsu UEDA[1,2], Noriyuki KIOKA[1] ([1]Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ.)

【背景・目的】動物細胞はコラーゲンなどの細胞外基質(ECM)との接触部位に接着斑と呼ばれるタンパク質複合体を形成する。近年、細胞が ECM の硬さ(粘弾性)を感知して分化や運動などの運命を決定することがわかってきた。現在のところ、細胞は接着斑にアクチン繊維を繋ぎ留めて、アクチン繊維が生み出す細胞内張力を ECM の硬さに応じて変化させることで、ECM の硬さを感知していると考えられている。我々は接着斑にアクチン繊維を繋ぎ留めるタンパク質「ビンキュリン」と、その結合タンパク質「ビネキシン」に着目し、その相互作用が「ECM の硬さを感知するメカノセンサー」として機能する可能性を検証してきた。昨年度までの本大会で、異なる架橋度のアクリルアミドゲルを用いて硬さの異なる培養基板を作製し、マウス胎児繊維芽細胞(MEF)を培養した際に、ECM が硬い時ほどビンキュリンの接着斑上でのターンオーバーが低下することを報告した。このビンキュリンの ECM の硬さ依存的なターンオーバーの変化にはビネキシンとの相互作用が必要であることがわかっている。また、精製タンパク質を用いた *in vitro* 実験から、ビネキシンはビンキュリンに結合することで、ビンキュリンとアクチン繊維との結合を促進していることも報告した。そこで本研究では「ECM の硬さに応じてビンキュリンとビネキシンの結合量が変化し、接着斑に繋ぎ留められるアクチン繊維の量が変化する」という仮説を立てて検証した。
【方法・結果】ECM の硬さと細胞内張力が相関していることから、プラスチック(硬い培養基板)上で培養した MEF をミオシン II 阻害剤によって処理して細胞内張力を低下させた。この MEF を用いて抗ビネキシン抗体による免疫沈降実験を行ったところ、コントロールに比べてミオシン II 阻害剤で処理した細胞ではビネキシンと共沈降するビンキュリンの量が減少していた。これは ECM の硬さが軟らかいとみなすことのできる条件下で、ビンキュリンとビネキシンの相互作用が減少していることを示唆していた。次に接着斑に繋ぎ留められるアクチン繊維の量を評価するため、硬さの異なるアクリルアミドゲル培養基板上で MEF を培養し、固定後にアクチン繊維をファロイジンで染色した。この染色画像を Erosion Filter 処理することで接着斑に繋ぎ留められているアクチン繊維の太さを解析したところ、ECM が硬い時ほどアクチン繊維の太さが有意に増加していた。また、ビネキシン遺伝子欠損 MEF に比べてビネキシン再発現 MEF では、より顕著にアクチン繊維の太さが増加していた。以上の結果から、ECM が硬い時ほどビンキュリン-ビネキシン相互作用が促進され、接着斑に繋ぎ留めるアクチン繊維の量が増加することで強い細胞内張力を発生していることが示唆された。

mechanosensing, vinculin, actin

講演番号：3A37p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ A 校舎 37 会場

接着斑タンパク質ビンキュリン、ビネキシンは間葉系幹細胞の脂肪細胞分化を調節している
Adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by vinculin and vinexin

○和田 洋樹[1]、山下 寛[3]、植田 和光[1,2]、木岡 紀幸[1] ([1]京大院・農・応用生命、[2]京大 iCeMS、[3]京大再生医科学研・生体分子設計)
○Hiroki WADA[1], Hiroshi YAMASHITA[3], Kazumitsu UEDA[1,2], Noriyuki KIOKA[1] ([1]Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ., [3]Department of Cellular Differentiation, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto Univ.)

【目的】

多分化能を持つ間葉系幹細胞は「細胞外マトリクス(ECM)の硬さ」という情報に基づいて、脂肪細胞、骨芽細胞などへの分化方向、すなわち細胞の運命を決定している。細胞は ECM との接着構造(接着斑)を介して ECM の硬さを感知していると考えられているが、接着斑がどのような仕組みで ECM の硬さを感知し、分化を制御しているのかは解明されていない。我々は接着斑に集積するタンパク質のうち、アクチン繊維と結合し、アクチン繊維からの張力に応じて構造を変化することが知られているビンキュリンに着目している。これまでに ECM が堅くなるにつれ、接着斑においてアクチン繊維と高親和型（TritonX-100 耐性）のビンキュリンの量が増え、接着斑に安定的に留まっていること、この現象にはビンキュリンの結合パートナーの 1 つであるビネキシンの発現が必要であることを示してきた。これらの結果はビンキュリンービネキシン複合体が ECM の硬さを感知する装置の一部として機能している可能性を示しているが、実際にビンキュリンやビネキシンが、ECM の硬さに応じた間葉系幹細胞の分化に与える影響はわかっていない。そこで本研究では、ビンキュリンまたはビネキシンの発現を抑制したときに、間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化が受ける影響について検証した。

【方法・結果】

間葉系幹細胞としてマウス骨髄由来の ST2 細胞を使用し、レンチウイルスを用いて shRNA によるビンキュリン、ビネキシンの発現抑制株を作成した。プラスチックシャーレ（堅い培養基盤）上で、インスリン、IBMX、デキサメタゾンで処理し、脂肪細胞への分化を行った。脂肪細胞への分化の指標としては、細胞より RNA を抽出し、脂肪細胞分化マーカー(PPARγ, aP2, adiponectin)の mRNA 発現を定量的リアルタイム PCR により定量化したものを用いた。コントロール株に比べ、ビンキュリン発現抑制株は、分化誘導後の脂肪細胞分化マーカーの mRNA 発現が上昇していた。一方、ビネキシン発現抑制株では分化マーカーの発現がコントロール株に比べ減少していた。ECM の硬さに応じて細胞内におけるビンキュリン、ビネキシンの挙動が変化することを合わせて考えると、間葉系幹細胞が ECM の硬さに応じて分化を制御する仕組みにビンキュリン、ビネキシンが関与する可能性が示された。

vinculin, mesenchymal stem cells, mechanosensor

講演番号：3A37p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ A 校舎 37 会場

接着斑タンパク質ビンキュリンの脂質ラフト局在化には PIP_2 との相互作用が必要である

Vinculin localization at lipid rafts requires an interaction with PIP_2

○長里 彩花[1]、山下 寛[1]、市川 尚文[1]、松尾 道憲[1]、植田 和光[1,2]、木岡 紀幸[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大・iCeMS）
○Ayaka NAGASATO[1], Hiroshi YAMASHITA[1], Takafumi ICHIKAWA[1], Michinori MATSUO[1], Kazumitsu UEDA[1,2], Noriyuki KIOKA[1] ([1]Div. of Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ.)

[目的]
脂質ラフトは、コレステロールやスフィンゴ糖脂質、PIP_2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) を多く含む膜領域で、シグナル伝達のプラットホームとして機能している。細胞と細胞外基質との接着部位である接着斑は、動物細胞の生存や増殖に必須の役割を担っており、最近脂質ラフトとの関連が示唆されつつある。例えば、接着斑の構成因子である細胞外基質受容体インテグリンは脂質ラフトにおいて活性化調節を受けることが報告されている。これまでに我々は、接着斑タンパク質ビンキュリンが、脂質ラフトに局在すること、それには別の接着斑タンパク質ビネキシンとの結合が必要なこと、また、この脂質ラフト局在化は細胞接着により調節されていることを示してきた。しかし、ビンキュリンやビネキシンが脂質ラフトに局在化する分子メカニズムについては不明であった。ビンキュリンは PIP_2 と *in vitro* で相互作用することが報告されている。そこで本研究では、この相互作用がビンキュリンの脂質ラフト局在化において果たしている役割について検討した。
[方法・結果]
脂質ラフトは 4℃で非イオン性界面活性剤に不溶性であることが知られている。そこで、野生型または PIP_2 と結合できないビンキュリンの変異体(LD 変異体)をマウス胎児繊維芽細胞(MEF)に発現させ、これらの細胞から細胞膜を単離し、4℃の TritonX-100 における可溶性画分と不溶性画分に分離した。その結果、不溶性画分における LD 変異体の存在量は野生型ビンキュリンと比較すると、減少していることが分かった。さらに、OPTI-PREP の密度勾配遠心法を行うことにより脂質ラフト画分を分離したところ、野生型ビンキュリンは脂質ラフト画分に検出できたが、LD 変異体は脂質ラフト画分に検出できなかった。また、ビネキシン精製タンパク質を用いたプルダウン実験を行ったところ、LD 変異体はビネキシンとの結合能を消失していないことも確認できた。以上の結果から、ビンキュリンの脂質ラフト局在化には、ビンキュリンと PIP_2 の相互作用が必要だと考えられた。

lipid rafts, focal adhesion, vinculin

講演番号：3A37p17
講演日時、会場：3 月 26 日 17:12～ A 校舎 37 会場

繊維状コラーゲンの小胞体からの搬出におけるカルシウム結合タンパク質 ALG-2 の必要性の検討

Investigating the requirement of the calcium-binding protein ALG-2 for the fibrillar collagen export from the endoplasmic reticulum

○京 卓志、三宅 博、牧 正敏、柴田 秀樹（名大院生命農）
○Takashi KANADOME,Hiroshi MIYAKE,Masatoshi MAKI,Hideki SHIBATA (Nagoya Univ.)

[背景と目的]

粗面小胞体で新規に合成されたタンパク質は COPII 被覆小胞に積み込まれることで小胞体から搬出される。COPII 被覆小胞は ERES（endoplasmic reticulum exit site）と呼ばれる小胞体膜上の特別な領域に、細胞質に存在している被覆構成タンパク質が動員されることによって形成される。これまでに私たちは、5 つの連続した EF-hand を有するカルシウム結合タンパク質 ALG-2 が、被覆構成タンパク質の一つである Sec31A と相互作用し、Sec31A 陽性の ERES に局在することを見出している。また、ALG-2 の発現抑制によって積荷のモデルタンパク質として分泌経路の研究に広く用いられている VSV-G tsO45 の小胞体からの輸送が促進されることを明らかにしている。

本研究では、繊維状コラーゲンの輸送における ALG-2 の発現抑制の影響を検討した。繊維状コラーゲンは典型的な COPII 被覆小胞には収容できないほど巨大であり、このため大型の輸送装置が必要であると考えられている。この詳細な機構については不明な点が多いが、COPII 被覆を必要とすることが明らかになっている。

[方法と結果]

はじめに緑色蛍光タンパク質を融合させたプロコラーゲン α1（I）鎖（Col1A1-GFP）を恒常的に発現する HT1080 細胞を樹立した。この細胞に ALG-2 に対する siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に 2,2'-dipyridyl を処理し、ヒドロキシ化を阻害させることで Col1A1-GFP を小胞体に留めた。さらにその 24 時間後に 2,2'-dipyridyl を除去するとともにアスコルビン酸を添加し、Col1A1-GFP の小胞体からの輸送を開始させた。経時的に細胞を固定し、蛍光顕微鏡を用いて Col1A1-GFP の局在を観察した。ALG-2 を発現抑制させることで、アスコルビン酸処理後 2 時間において Col1A1-GFP が小胞体内に異常に凝集している細胞が増加した。このことから ALG-2 は繊維状コラーゲンの小胞体からの正常な搬出に関与している可能性が示唆された。

次に ALG-2 を発現抑制させた HT1080 細胞の電子顕微鏡観察を行った。ALG-2 の発現抑制細胞ではゴルジ体付近に観られる輸送小胞が比較的小さい傾向があった。以上の解析結果をもとに ALG-2 の発現抑制が小胞体からの搬出に与える影響が積荷タンパク質によって異なることについて議論したい。

calcium-binding protein, COPII, collagen

講演番号：3A37p18
講演日時、会場：3 月 26 日 17:24～ A 校舎 37 会場

抗老化素材としてのマルメロ種子エキスの検討

Anti aging　effects of quince seed extract and its mechanism of action

○萬治 愛子、山田 昌良、桜井 哲人、粂井 貴行（ファンケル総合研究所）
○Aiko Manji,Masayoshi Yamada,Tetsuhito Sakurai,Takayuki Kumei (Fancl Corp.)

【背景】皮膚は老化するとシワやたるみを引き起こす。これは加齢などの内的因子、紫外線や大気汚染などの外的因子に起因しており、皮膚の老化の 90%は紫外線による影響だといわれている。皮膚は表皮層・真皮層・皮下組織層の三層構造をとっており、この中で真皮層が皮膚の張りや弾力に大きく関与している。紫外線は真皮層のコラーゲン産生量を低下させ、コラーゲン分解酵素を増加させる。その結果、真皮層中の総コラーゲン量は減少し、皮膚はシワやたるみを引き起こす。コラーゲンは細胞外マトリックスの主要タンパク質であり人体の組織、細胞の周囲の微小環境を形作る主要な構成要素として細胞の主機能と密接な関わりを持っている。真皮層においてコラーゲンは線維芽細胞から産生され、その 80%が I 型コラーゲンであることが知られている。そこで、本研究では線維芽細胞における I 型コラーゲンの産生量を指標とした抗老化素材の探索、およびその作用メカニズムの検討を行った。
【方法】新生児ヒト包皮由来線維芽細胞(NHDFneo)を用いて実験を行った。72 時間前培養した NHDFneo にサンプルを添加し、48 時間後の細胞上清中の I 型コラーゲン量をドットブロット法にて評価した。さらにその作用メカニズムを DNA マイクロアレイにて網羅的に解析した。そして、遺伝子発現をリアルタイム PCR 法、タンパク質発現をウェスタンブロット法、酵素活性をザイモグラフィー法にて評価した。また、抗シワ作用についてはコラーゲンゲル収縮法にて検討を行った。
【結果・考察】1690 種のサンプルの中から I 型コラーゲンの産生量の多い素材としてマルメロ種子抽出物を選定した。マルメロ種子抽出物は NHDFneo において I 型コラーゲン合成遺伝子であるヒトα 1 鎖 I 型コラーゲン遺伝子(*Col1a1*)、ヒトα 2 鎖 I 型コラーゲン遺伝子(*Col1a2*)、その上流遺伝子である結合組織成長因子(*cTgf*)、形質転換増殖因子 b(*Tgfb*)、そして、コラーゲン線維形成に寄与する遺伝子であるデルマタン硫酸プロテオグリカン(*Dcn*)の発現を亢進させた。さらには、ヒアルロン酸合成酵素 2(*Has2*)の発現亢進を示した。また、コラーゲン分解酵素である細胞外マトリックス分解酵素 2(MMP2)の活性化が抑制されることも明らかとなった。そして、マルメロ種子抽出物はコラーゲンゲル収縮作用を示したことから、抗シワ作用を有することが考えられる。これらの結果よりマルメロ種子抽出物は様々な機能を有する抗老化素材であることが示唆された。

anti aging, collagen, quince seed

講演番号：3A37p19
講演日時、会場：3 月 26 日 17:36～ A 校舎 37 会場

ヒト Rab GTPase の膜テザリング活性の解析

Analysis of the intrinsic membrane tethering activity of Rab GTPases

○田村 直輝、三間 穣治（阪大蛋白研）
○Nokai TAMURA,Joji MIMA (Osaka Univ. IPR)

【目的】

真核細胞の細胞内膜交通における膜融合過程にはテザリング（繋留）段階が存在する。テザリングとは、膜融合の前段階で隣接する脂質二重膜の膜同士が可逆的に結合し繋留している状態である。p115(Uso1p)、GM130、EEA1 などテザリングに関与するタンパク質分子はテザリング因子と呼ばれている。Rab タンパク質は低分子量 GTPase であり、細胞内膜交通の制御に重要な役割を果たすことが報告されてきた。また、Rab は GTP 依存的に、テザリング因子を含めた様々な結合タンパク質（Rab effector）と脂質膜上で協調的に働き、膜融合を促進していると考えられている。しかし、近年、出芽酵母 Rab タンパク質の一つの Vps21p が単独でテザリング活性を保持することが in vitro の実験から報告され、テザリングにおける Rab の新たな分子機能が示唆された。今回、ヒト Rab タンパク質である Rab1a、Rab2a、Rab3a、Rab5a ならびに Rab7a のテザリング活性について評価を行った。

【方法】

テザリング活性の評価は人工膜リポソームと磁性ビーズを用いた in vitro リポソーム膜テザリング解析により検証した。具体的には、まず、蛍光色素であるローダミンを含んだリポソームとビオチンを含んだリポソームの２種類のリポソームをポリカーボネート膜の通過により作製した。次に、ビオチンに特異的に結合するストレプトアビジンが固定化された磁性をビーズを２種類のリポソームと混ぜ、磁石によって磁性ビーズに結合しているリポソームの単離を行った。最終的に、単離したリポソームのローダミンの量を蛍光分光光度計により測定し、Rab タンパク質のテザリング活性によって結合した非ビオチン化リポソームの量を測定した。

【結果】

ヒトの Rab タンパク質が単独でテザリング活性を持つことを明らかにした。他の低分子量 GTPase である HRas にはテザリング活性はなかった。また、Rab タンパク質によってテザリング活性に違いがあり、この活性は GTPase 活性とは相関しない可能性が示唆された。

Rab, liposome, tethering

講演番号：3A37p20
講演日時、会場：3 月 26 日 17:48～ A 校舎 37 会場

サイクリン A と複製開始因子 Mcm7 のヒト染色体上での相互作用解析

Interaction analysis of Cyclin A and replication initiation factor Mcm7 in human chromatin.

○田辺 史行[1]、松本 貴嗣[2]、志波 優[2]、渡辺 智[1]、千葉櫻 拓[1]、吉川 博文[1,2] ([1]東農大・応生科・バイオ、[2]東農大・ゲノム解析セ)

○Fumiyuki TANABE[1], Takashi MATSUMOTO[2], Yuh SHIWA[2], Satoru WATANABE[1], Taku CHIBAZAKURA[1], Hirofumi YOSHIKAWA[1,2] ([1]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [2]NGRC)

サイクリン-サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 複合体は細胞周期進行に中心的な役割を担っており、その活性制御機構は非常に厳密である。中でもサイクリン A (CycA) -CDK2 は S 期および M 期への移行を制御する重要なサイクリン-CDK 複合体であるが、G1/S 遷移期において CycA が DNA 複製開始を制御する上での特異的かつ必須な作用基質は未だ同定されていない。そこで S 期移行を促進できない変異型ヒト CycA(CycA-C1)を用いて、酵母２ハイブリッド法により野生型 CycA と相互作用し CycA-C1 とは相互作用しない因子として、DNA 複製ライセンス化因子 Mcm7 を分離した。また、ヒト培養細胞のクロマチン画分において内在性の CycA と Mcm7 が結合していることを確認した。さらに CycA-C1 と結合できるような変異型 Mcm7(Mcm7-3)を分離し、動物細胞内で CycA-C1 及び Mcm7-3 を一過性共発現させたところ、S 期移行促進機能が回復したことから、CycA-CDK2 は Mcm7 との相互作用を介して S 期移行を促進させることが示唆された。加えて Mcm7 は CycA-CDK2 の直接の基質ではないことから、CycA-CDK2 は Mcm7 を足場として DNA 複製開始複合体に結合し、他の複製開始制御因子をリン酸化することが示唆される。

そこで本研究では CycA および Mcm7 の染色体上の DNA 複製開始領域への結合動態について、ChIP-seq 法を用いてゲノムワイドに解析した。ヒト細胞抽出液より CycA、Mcm7、および複製開始領域結合タンパク質 Orc2 の各抗体を用いてクロマチン免疫沈降(ChIP)を行い、それぞれに含まれる DNA を分離し次世代シーケンサー(Illumina 社製)により解読し、得られた DNA 断片をリファレンスゲノム配列上にマッピングした。

その結果 Orc2、Mcm7、CycA 全てに共通するピークが複数見出された。これは CycA、Mcm7 が DNA 複製開始領域で相互作用している可能性を示している。現在それらのピークを詳細に検証中であり、その結果について報告したい。

Cyclin A, Mcm7, DNA replication

講演番号：3A41a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ A 校舎 41 会場

米糠抽出物の間葉系幹細胞に対する効果

Effect of rice bran extract on rat mesenchymal stem cells

○山内 莉奈佳[1]、福本 健[1]、森山 聖子[1]、寺田 聡[1]、谷口 正之[2]、森山 茂[3]、築野 卓夫[3]([1]福井大工、[2]新潟大、[3]築野食品工業)
○Rinaka Yamauchi[1], Ken Fukumoto[1], Satoko Moriyama[1], Satoshi Terada[1], Masayuki Taniguchi[2], Shigeru Moriyama[3], Takuo Tsuno[3] ([1]Fukui Univ., [2]Nigata Univ., [3]Tsuno Co.,Ltd.)

1.諸言

間葉系幹細胞(MSC)は骨髄や脂肪中に含まれ、多様な細胞へ分化する能力を持っている。臨床で実際に再生医療に用いるためには、患者から取得した少量の MSC を体外で培養し、必要な量まで増幅させる必要がある。細胞の体外培養には生体内で接していた生理学的体液、すなわち血清が添加されているが、血清には未知の危険因子や人獣共通感染症が懸念され、無血清培地の開発が強く望まれている。そこで血清の代替として、植物由来の因子に着目した。これまでに当研究室では、米糠抽出物 RB に様々な細胞に対して増殖促進や細胞機能強化の効果があることを見いだしている。そこでこの米糠抽出物を MSC の無血清培地に添加することで、分化能を維持したまま細胞の増幅を目指す。

2.方法

ウイスターラット(3 週齢/♂)の骨髄から MSC 画分を採取し、15%牛胎児血清(FBS)を含む培地で培養した。付着して生存した細胞は MSC であり、これを 0.1%トリプシン EDTA を用いて回収し、無血清培養を行った。具体的には、細胞を RB を含む無血清培地と血清含有培地で、播種密度 3.5×10^3cells/well でプレートで培養し、培養中の形態を観察し、評価した。

培養期間 3 日の細胞を使用して、リアルタイム PCR を行った。未分化マーカーの発現をハウスキーピング遺伝子と比較して、相対的に遺伝子発現量を評価した。

つづいて、骨分化能力を評価した。培養開始から 3 日後に骨分化誘導を開始した。28 日間誘導した後、アリザリンレッド S 法により細胞を染色し、画像解析ソフト ImageJ を用いて評価した。

3.結果と考察

培養中の形態を観察したところ、RB を含む無血清培地中でのみ MSC は集合体を形成し、細胞-細胞間の相互作用に影響しているようであった。リアルタイム PCR 解析によると、MSC マーカー CD44, 105, 166 の発現はあまり変化しておらず、このことから、RB 添加による集合体形成は、MSC の特性に影響せず、分化能が保持されていることが期待された。実際、この集合体を骨分化誘導したところ、無血清培地での培養で生じる骨分化能力の消失を、RB は有意に骨分化能の低下を防いだ。これにより RB による培養は無血清培地での MSC の骨分化能の低下を抑制する効果があると示唆された。

しかしながら、RB 添加だけでは、血清を含む従来の培地と比較すると骨分化能力は著しく低下しており、無血清培養の完成には、さらに他の因子を添加するなど、改善が求められる。

mescenchymal stem cell, rice bran, serum-free medium

講演番号：3A41a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ A 校舎 41 会場

3 次元ヒト皮膚モデルを用いた核酸素材オリゴＤＮＡのコラーゲン代謝活性効果の検討

Collagen metabolism effect of Oligonucleotid by 3D Human skin model

○杉 正人[1]、鈴木 健[1]、永井 展裕[3]、高橋 環奈[2]、西原 雅夫[2]、松永 政司[1]([1]NPO 法人遺伝子栄養学研究所、[2]日生バイオ株式会社、[3]東北大学医学系研究科附属創生応用医学研究センター先進医療開発コアセンター細胞治療分野)
○ Masahito SUGI[1], Takeshi SUZUKI[1], Nobuhiro NAGAI[3], Kanna TAKAHASHI[2], Masao NISHIHARA[2], Masaji MATSUNAGA[1] ([1]Gene Trophology Institute, [2]Nissei Bio Company, Limited, [3]Tohoku Univ.)

【目的】皮膚は上皮組織の表皮、結合組織の真皮、脂肪組織の皮下組織の 3 層から構成されている環境から生体を守るための特殊な防御器官であり、緻密な自律系制御システムを持つことが示唆されている。近年、抗老化素材の皮膚に対する機能性が注目される中、生体に近い機能を持つ *Ex. vivo* 系、特に培養細胞を用いた 3 次元ヒト皮膚モデル系による研究が増えてきた。しかし紫外線などの外因ストレスに応答する表皮 - 真皮の組織間、角化細胞と線維芽細胞間の相互防御作用を有した評価系はまだ確立されていない。我々は、角質層及び真皮コラーゲンマトリックスを有する表皮 - 真皮層 2 層からなる細胞シートの 3 次元ヒト皮膚モデルを作成し、真皮層のコラーゲン代謝能向上などについて評価できる系を確立した。このモデルを用いて、抗老化素材である鮭白子由来核酸について評価を行った。
【方法】ヒト由来正常線維芽細胞（NHDF）を人工コラーゲン線維ゲル上培養法により、重層培養を行い、コラーゲンマトリックスを有する真皮層細胞シートを作成した。この上部にヒト由来角化細胞（NHDF）を播種し、気 - 液界面培養を行うことで、角質層を有する表皮層を作成、3 次元ヒト皮膚モデルとした、市販されている 2 層の 3 次元ヒト皮膚モデルと組織切片観察、コラーゲンタイプⅠ産生量、薬剤耐性能を比較した。更に鮭白子由来核酸を上部より添加して、コラーゲンタイプⅠ産生、MMP-1、TIMP-1 の遺伝子発現量を real-timePCR 法により、蛋白質発現量を ELISA 法により、分析した。
【結果】本試験により、細胞シートによる 3 次元ヒト皮膚モデルは、市販の 3 次元ヒト皮膚モデルと比べ、より生体内の皮膚に近い機能を有していることが確認できた。この評価系を用いて鮭白子由来核酸のコラーゲン代謝活性を調べたところ、低分子化した加水分解核酸（オリゴＤＮＡ）で、細胞あたりのコラーゲン産生能が、遺伝子発現及び蛋白質発現レベルで経時持続的に向上することが確認できた。濃度 1mg/ml を 100μl 添加することにより、コントロールと比べ、２４時間後に蛋白質発現が 212%向上した。また MMP-1 量、TIMP-1 量も向上していることから、鮭白子由来核酸は細胞のコラ - ゲン代謝能全体を持続的に活性化することが示唆された。

skin model, collagen, Oligo dna

講演番号：3A41a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ A 校舎 41 会場

細胞/組織培養における血清代替品としての米糠抽出物とセリシン加水分解物

Rice bran extract and sericin hydrolysate as alternatives to serum in mammalian cell and tissue culture

○岡田 悠衣[1]、森山 聖子[1]、寺田 聡[1]、谷口 正之[2]、森山 茂[3]、簗野 卓夫[3]、國富 芳博[4]、佐々木 真宏[4]([1]福井大工、[2]新潟大学、[3]簗野食品工業、[4]セーレン(株))
○Yui OKADA[1], Satoko MORIYAMA[1], Satoshi TERADA[1], Masayuki TANIGUCHI[2], Shigeru MORIYAMA[3], Takuo TSUNO[3], Yoshihiro KUNITOMI[4], Masahiro SASAKI[4] ([1]Fukui Univ., [2]Niigata Univ., [3]Tsuno Co.,Ltd, [4]Seiren Co.,Ltd)

1. 諸言

動物細胞の培養は、抗体医薬を初めとする組替えタンパク質生産で広く利用されている。さらに、再生医療の目的で、幹細胞や膵臓ランゲルハンス島のような組織（細胞の集団）が培養されている。これら細胞／組織の培養には、増殖因子として、哺乳動物由来の因子、たとえば牛胎児血清などが添加されることが多い。しかし、動物由来因子には、狂牛病などの人獣共通感染症の懸念があること、高価であることなど様々な問題があるため、無血清培地の開発が望まれている。本研究では、哺乳動物由来の増殖因子の代替品として米糠抽出物（RB)とカイコの繭タンパク質セリシン加水分解物（セリシン）に着目し、検討した。

2. 実験方法

工業的な組み換えタンパク質生産のモデルとして、ヒト化抗体を生産する CHO-DP12 細胞を対象に検討した。RB、セリシン、RB とセリシン両方、を無血清培地 ASF104(味の素)に添加し、４日間の培養を行い、細胞増殖と、組み換えタンパク質生産で評価した。ポジティブコントロールとしては、5%牛胎児血清入りの DMEM 培地を用いた。

再生医療での組織の体外培養のモデルとして、ラット膵臓ランゲルハンス島（膵島）を用いた。LEW/SsNSIc ラット(♂、8-9 週齢)より膵島を分離した。RB、または牛胎児血清(FBS)を添加した基礎培地 RPMI に膵島を懸濁し､10 個/well 程度で浮遊細胞用 96 穴プレートに播種した。2 週間の培養後、損なわれていない膵島の個数を計数し、添加因子の効果を評価した。

3.結果と考察

CHO-DP12 細胞については、RB の添加により、細胞増殖、組み換えタンパク質生産ともに、無添加の ASF104 培地での培養よりも有意に促進された。さらに、セリシンと同時添加することで、増殖、生産が大きく改善し、相乗効果が認められ、この時、牛胎児血清を含む従来の培養よりも、増殖や生産が勝っていた。相乗効果があることから、二つの因子の細胞への作用機構が異なると考えられる。

膵島の無血清培養については、体外培養 2 週間で、無添加では膵島の生存率は 20%に低下した。RB を添加したことで、生存率は 50%となり、FBS の 80％には及ばないものの、RB は膵島の培養に有効であった。今後は、RB に加えてセリシンなど他の因子と併用することで、従来の血清を含む培養と同等以上の培養成績を目指す。

rice bran, sericin, serum-free

講演番号：3A41a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ A 校舎 41 会場

米糠中の哺乳類細胞活性因子の探索

Identification of factor activating mammalian cells in rice bran

○鈴木 陽子[1]、山内 莉奈佳[1]、森山 聖子[1]、寺田 聡[1]、森山 茂[2]、築野 卓夫[2]、谷口 正之[3]([1]福井大学工、[2]築野食品工業、[3]新潟大学)
○ Yoko SUZUKI[1], Rinaka YAMAUCHI[1], Satoko MORIYAMA[1], Satoshi TERADA[1], Shigeru MORIYAMA[2], Takuo TSUNO[2], Masayuki TANIGUCHI[3] ([1]Fukui Univ., [2]Tsuno Food Industrial Co., Ltd., [3]Niigata Univ.)

1. 緒言

我々の研究室では、米糠抽出物(RB)に哺乳動物細胞に対する増殖促進効果やアポトーシス抑制効果があることを見出し、哺乳動物細胞のための培地の添加剤としての利用を目指している。RB は栽培植物である米由来なので、BSE などの感染症の懸念がなく、さらに安定的に供給できる。しかし、我々が活性を見いだした現行の抽出物には複数の成分が含まれており、有効成分が同定されていない。本研究では、RB 中の有効因子が何であるのか、その同定を目指した。RB の成分分析により、およそ半分がタンパク質、約２割が糖、5%程度が脂質であったことから、タンパク質であろうという見込みで検討を行った。

2. 方法

【RB の加熱処理】RB を 121℃、20 分間オートクレーブ滅菌処理した。この RB を用いて、細胞増殖促進活性を測定し、評価した。

【RB のトリプシン処理】RB を 0.115mg/mL のトリプシンで 37℃で 24 時間処理した。続いて、トリプシンインヒビター―を加えてトリプシンの失活処理を 37℃で 30 分間行った。その後、これら因子を添加して細胞培養を行い、細胞増殖促進活性を測定し、評価した。

【限外濾過膜による分画】5 種類(3、10、30、50、100kDa)の限外濾過膜を用いて、RB 溶液を透過画分と残留画分に分画し、それぞれの細胞増殖促進活性を測定し、評価した。

3. 結果及び考察

【RB の加熱処理】加熱処理した RB は、未処理の RB と比較して、細胞増殖促進活性は大きく低下していた。このことから、熱に感受性の成分が活性因子であると考えられる。

【RB のトリプシン処理】トリプシン処理した RB は、未処理の RB と比較して、ほとんどその増殖促進活性を失っていた。なお、トリプシンインヒビターのみの添加は、細胞増殖には何ら影響を与えなかった。このことから、有効成分はトリプシン感受性、すなわち、タンパク質であると考えられる。

【限外濾過膜による分画】5 種類の膜を用いて、その透過画分と残留画分、10 種の分画品が得られた。これらの内、30kDa 残留画分において最も強い細胞増殖促進効果を示し、未分画品を上回っていた。

以上の結果より、RB 中のタンパク質が細胞増殖促進に関与し、さらに 30kDa 以上の成分に有効な因子が含まれていることが推定された。今後はさらに詳細に検討し、有効なタンパク質の同定を目指す。

Rice bran, protein, serum-free

講演番号：3A41a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ A 校舎 41 会場

マウス ES 細胞および iPS 細胞の神経細胞および筋肉細胞への分化解析

Differentiation of mouse ES cells and iPS cells into neurons and muscle cells

○中村 麻衣、上芝原 佑、川口 英夫、清水 範夫（東洋大院生命）
○Mai NAKAMURA,Yu KAMISHIBAHARA,Hideo KAWAGUCHI,Norio SHIMIZU (Toyo Univ.)

【目的】マウス胚性幹細胞（embryonic stem cell: ES 細胞）はマウス胚の発生 3.5 日目の胚盤胞から樹立され、無限に増殖が可能で多分化能を有している。また、マウス人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell: iPS 細胞）はマウス繊維芽細胞に 4 つの転写因子遺伝子（*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*）を組み込むことで再プログラム化して作製された細胞である。iPS 細胞は ES 細胞と同様の性質を有しているため、様々な細胞に分化誘導できることが知られている。我々の研究室では、以前に ES 細胞培養液にニワトリ脊髄後根神経節（dorsal root ganglion: DRG）培養上清液（conditioned medium: CM）である DRG-CM を添加すると、主に神経細胞に効率よく分化できること、また一部は筋肉細胞にも分化していることを明らかにしている。本研究では、幹細胞である ES 細胞および iPS 細胞を神経細胞に効率よく分化させる方法を開発するため、これらの培養液に DRG-CM を添加して神経細胞および筋肉細胞に分化していく過程を各種細胞マーカー遺伝子の発現量の解析により検討した。
【方法と結果】ニワトリ 8 日胚から採取した DRG を 100 mm 径シャーレに神経成長因子(NGF)を 10 ng/ml 添加して培養し、2 日後に回収した上清液を DRG-CM として使用した。ES 細胞または iPS 細胞コロニー培養液に DRG-CM を 5%添加して分化培養した。分化培養後、抗βIII-tubulin 抗体(神経細胞マーカー)、抗 nestin 抗体（神経幹細胞マーカー）で免疫蛍光染色し、分化した iPS 細胞コロニーを共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光を観察した結果、DRG-CM 0%と比較して DRG-CM 5%を添加した場合では神経幹細胞及び神経細胞に分化した細胞や神経突起が観察された。DRG-CM 添加による iPS 細胞コロニーの神経細胞への分化誘導効果が得られた。つぎに、ES 細胞と iPS 細胞コロニーの各種神経細胞と筋肉細胞への分化過程を、RT-PCR を用いて検討した。その結果、神経幹細胞では ES 細胞、iPS 細胞ともに発現量は 9 日目でピークに達し、神経細胞では ES 細胞で 9 日目、iPS 細胞で 15 日目で発現量がピークに達した。このことから、ES 細胞が神経細胞に分化する速度は iPS 細胞よりも速いことが分かった。ES 細胞における筋肉細胞への分化については、神経細胞と比較して遺伝子発現量のピークが遅くなる傾向があった。
　以上のことから、目的の細胞に効率的に分化させるためには、目的の細胞の分化時期を考慮する必要があることを明らかにできた。

ES cell, iPS cell, differentiation

講演番号：3A41a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ A 校舎 41 会場

ROCK 阻害剤による幹細胞の神経細胞への分化誘導

Induction of stem cell differentiation into neurons by ROCK inhibitor

○上芝原 佑[1]、太田 麗央[2]、中村 麻衣[1]、清水 範夫[1] ([1]東洋大院生命、[2]東洋大生命)
○Yu KAMISHIBAHARA[1], Reo OTA[2], Mai NAKAMURA[1], Norio SHIMIZU[1] ([1]Toyo Univ., [2]Toyo Univ.)

【目的】胚性幹細胞（embryonic stem cell：ES 細胞）や人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell ： iPS 細胞）は、*in vitro* において神経細胞を含む様々な細胞に分化する多分化能があり、半永久的に増殖することが可能なため、特定の細胞に分化させて、薬剤の効果・毒性試験や再生医療などに用いることが考えられている。しかし、これらの幹細胞を分散培養すると、多くの細胞が細胞死（アポトーシス）を起こすことが知られており、幹細胞研究の障壁の一つとなっている。最近、分散培養により生じるアポトーシスには、ROCK の経路が関わっていることが明らかになり、ROCK の働きを阻害する Y-27632 を培養液に添加することにより、分散培養により起こるアポトーシスを効率的に抑制できることが明らかになった。そこで、我々は ROCK 阻害剤を培養液に添加してアポトーシスを抑制することで、ES 細胞や iPS 細胞から効率よく神経細胞に分化誘導する方法について検討した。
【方法】ROCK 阻害剤の添加がマウス ES 細胞やマウス iPS 細胞の分化に及ぼす影響を調べるために、分化抑制因子（LIF）を添加した浮遊培養により、直径 200 μm の細胞コロニーを作製した。その後、細胞コロニーに ROCK 阻害剤または ROCK 阻害剤と同時に神経成長因子（nerve growth factor ： NGF）を添加して分化培養した。培養 12 日目にβIII-tubulin（神経細胞マーカー）、Brn-3（感覚神経細胞マーカー）、Lim3 及び HB9（運動神経細胞マーカー）の抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、フルオロ・イメージアナライザーを用いて蛍光強度を測定し、神経細胞への分化割合を検討した。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、分化培養後の iPS 細胞コロニーの観察を行った。
【結果】ROCK 阻害剤を細胞コロニーに添加し分化培養を行った結果、ES 細胞および iPS 細胞とも無添加の場合に比較して、神経細胞に分化した割合が高くなった。さらに、ROCK 阻害剤と同時に NGF を添加した場合、ROCK 阻害剤のみに比較して、神経細胞に分化した割合が高くなった。また、分化した ES 細胞は、Lim3 や HB-9 に比べて Brn-3 の蛍光が高くなっていたことから、主に感覚神経細胞に分化しているのが分かった。共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果、先ほどの結果と同様、ROCK 阻害剤を添加したものに比べて、ROCK 阻害剤と NGF を同時に添加した場合に、神経突起のより強い蛍光を観察できた。
以上の結果から、ROCK 阻害剤を添加して幹細胞を分化誘導させることで神経細胞に効率よく分化誘導できることが明らかになった。

ROCK inhibitor, Stem cell, Differentiation

講演番号：3A41a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ A 校舎 41 会場

上下動撹拌装置の動物細胞培養における評価

Evaluation of Animal Cell Cultivation using Reciprocal Motion Mixer

○丹生 徳行[1,2]、植木 雅志[1]、佐藤 誠[1,2]、遠藤 勲[1]、加藤 好一[1,2]、金森 久幸[1,2]（[1]理研・動物細胞、[2]佐竹化学機械工業（株））
○Noriyuki TANSHO[1,2], Masashi UEKI[1], Makoto SATO[1,2], Isao ENDO[1], Yoshikazu KATO[1,2], Hisayuki KANAMORI[1,2] ([1]Animal Cell, RIKEN, [2]Satake Chemical Equipment Mfg., Ltd.)

【背景・目的】動物細胞は細胞壁を持たないため非常に脆弱で、剪断力に弱いとされている。従来から動物細胞培養に広く用いられる回転式撹拌装置は、撹拌翼を回転させることで培養槽内各成分の均質化、必要酸素量の供給を行うが、これにより生じる剪断力は細胞にとって好ましくなく、撹拌翼形状や運転条件等の工夫による対策は講じられているものの最善とは言えない。そこで我々は、低い剪断力にて穏やかに撹拌する装置として、上下動撹拌装置（VMOVE ミキサー）の開発に至った[1,2,3]。新開発撹拌翼の緩やかな上下運動は、低剪断でありながら良好な流体混合を与える。また、構造面においても、回転式撹拌装置のような軸封構造が不要で、槽内完全密閉が可能になり、外部からの汚染リスクが極めて低い特徴も動物細胞培養装置に適している。本報では、上下式ならびに回転式の撹拌装置を用い動物細胞培養を行い、細胞増殖速度・死細胞濃度等の培養パラメータを比較することにより、上下動撹拌装置の動物細胞培養への適性を評価した。
【実験方法】動物細胞は HL-60 細胞、培地は RPMI1640+10%FBS を用いた。培養槽はガラス製円筒槽を用い、培地容量 2400mL にてバッチ培養を行なった。回転式撹拌は、撹拌翼に 6 枚フラットタービン翼を用い、4 枚邪魔板を設置した。上下動撹拌は、撹拌翼に楕円翼 2 枚を用い、邪魔板なしとした。各種センサー（pH、DO、DCO_2、濁度）を培養槽内に設置し、培養槽内の状態を記録した。所定の培養時間に培養液を採取、顕微鏡にて細胞数をカウントし、細胞濃度を算出した。また、培養液上清の乳酸脱水素酵素（LDH）活性を測定することによって、死細胞濃度を算出した。
【結果】従来の回転式撹拌において、低回転数では溶存酸素量の維持が難しく、細胞増殖速度が著しく低下した。酸素供給能を向上させるために、回転数を上げると、増殖速度は増加するものの、槽内の剪断力が高まることで、死細胞濃度が増加することが分かった。一方、上下動撹拌は、低速かつ低エネルギーながら、必要酸素量を十分に維持でき、細胞への物理的ダメージも確認されず、良好な細胞増殖を与えることが分った。以上の結果より、上下動撹拌装置は動物細胞の培養により適切であることが分かった。
【参考文献】

1）佐藤ら，化学工学会第 41 回秋季大会要旨集 I120(2009)
2）関塚ら，化学工学会第 41 回秋季大会要旨集 I120(2009)
3）丹生ら，化学工学会第 43 回秋季大会要旨集 R116(2011)

Mixing, Reciprocal Motion, Animal Cell Incubator

講演番号：3A41a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ A 校舎 41 会場

キメラニワトリによるヒトエリスロポエチンへのガラクトース付加

Galactosylation of human erythropoietin by chimeric chickens

○小島 佑介[1]、脇田 潤[1]、小島 康裕[2]、山田 裕貴[3]、西島 謙一[1]([1]名大院工、[2]生化学工業株式会社、[3]アステラス製薬株式会社)
○Yusuke KOJIMA[1], Jun WAKITA[1], Yasuhiro KOJIMA[2], Yuki YAMADA[3], Kenichi NISHIJIMA[1]
([1]Nagoya Univ., [2]SEIKAGAKU CORPORATION, [3]Astellas Pharma)

【目的】
遺伝子組換え技術を用いて、哺乳類の乳汁や鶏卵中にバイオ医薬品を大量に生産させることができれば、医薬品を安価に生産できる新たな生産技術となりうる。我々は高タンパク質かつ比較的組成のシンプルな鶏卵の卵白に着目し、抗体やエリスロポエチンなどを生産させるトランスジェニックニワトリの作製を行ってきた。しかし、卵白を生産する卵管において、ガラクトース転移酵素 GalT1 の発現が低いことが原因で、生産タンパク質の N 型糖鎖においてガラクトース以降の修飾が十分行われないことが分かった。今回は、ヒトエリスロポエチン(hEPO)とニワトリ GalT1(ckGalT1)を同時に発現できるレトロウィルスベクターを用いてトランスジェニックニワトリを作製し、ガラクトース付加が行われたヒトエリスロポエチンを卵白中に生産させることを目的とした。
【方法及び結果】
hEPO 遺伝子と ckGalT1 遺伝子を IRES(internal ribosomal entry site)でつなぐことで、1 つのベクターコンストラクトから 2 つのタンパク質を発現するレトロウィルスベクターを作製した。このレトロウィルスベクターをニワトリ 2.5 日胚の心臓に注入することでトランスジェニックニワトリ(hEPO-ckGalT1 ニワトリ)を作製した。これらの個体から得られた卵白と、当研究室で以前作製した hEPO 遺伝子のみを導入したトランスジェニックニワトリ(hEPO ニワトリ)の卵白について、ウェスタンブロットやレクチンブロットなどを用いて hEPO タンパク質の発現とその糖鎖修飾に関して比較を行った。結果として、hEPO-ckGalT1 ニワトリの卵白中で hEPO タンパク質、ckGalT1 タンパク質両方の発現が確認された。さらに、ckGalT1 の酵素活性により、hEPO タンパク質だけでなく、卵白を構成する主要タンパク質にもガラクトースが付加されることが確認された。これらの結果から、目的タンパク質遺伝子とその糖転移酵素遺伝子を同時に導入することで、目的タンパク質の糖鎖制御を卵白中で行うことが出来ることが示された。

Transgenic chicken, human erythropoietin, galactosylation

講演番号：3A41a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ A 校舎 41 会場

ニワトリ卵膜形成機構の生化学的研究―ドメイン特異的な抗体を用いた血清 ZP1 の構造・機能解析
Biochemical investigations of chicken egg-coat formation mechanisms ― structural and functional analyses of serum-ZP1 using domain specific antibodies

○福島 英晃、今 友里恵、廣瀬 なつみ、氏田 稔、奥村 裕紀（名城大院農）
○Hideaki FUKUSHIMA,Yurie IMA,Natsumi HIROSE,Minoru UJITA,Hiroki OKUMURA (Meijo Univ.)

卵細胞と精子が融合することを受精といい、これにより新個体の発生が開始される。脊椎動物の受精の際に重要な働きをするのが、卵細胞を覆う卵膜という細胞外マトリックスである。卵膜は卵の保護、精子との結合、精子先体反応の誘導、多精子受精の防止などの生理的機能を有しており、正常な受精に不可欠な組織である。そのため、卵膜の詳細な構造・機能を理解することによって得られる知見は、有害鳥獣の個体数制御、新規避妊薬の開発、不妊治療などの技術へ応用できると考えられる。我々はニワトリの卵膜を対象に研究を行っている。卵膜は生物種に応じて 3～5 種類の ZP 糖タンパク質から成り立っており、特にニワトリの卵膜は ZP1、ZP3、ZPD がその大部分を占めている。ZP3 と ZPD が卵巣の顆粒膜細胞で合成されるのに対して、ZP1 は肝臓で合成され血液中を卵巣まで運ばれ、ZP3 との複合体を形成することによって卵膜に組み込まれることが示されている。また、ZP1 は血液中では自身または他の分子と共有結合を形成していないが、卵膜に組み込まれると一部が分子間ジスルフィド結合によってホモダイマーを形成することが示されている。しかし血液中の ZP1 がどのように卵膜に組み込まれるか、またホモダイマー形成の詳細な機構については明らかになっていない。これまでの研究では、ニワトリの血液から調製した血清に対して液相等電点電気泳動を行うと、ZP1 が等電点の異なる複数の画分に分画されるという実験結果が得られている。また、尿素の存在下で同様に血清を分離すると、ZP1 が検出される画分が変化した。このことから、血清中では ZP1 が別の分子と非共有結合で会合していると考えられた。本研究では血清中の ZP1 がどのような状態で存在しているのかを明らかにすることを目指して実験を行った。まず大腸菌発現系によって ZP1 の各構造ドメインを組換えタンパク質として発現させ、それらによってマウスを免疫することでこれら ZP1 の各構造ドメインに特異的なポリクローナル抗体を調製した。そしてこれら抗体を用いて、上記の液相等電点電気泳動で分画した各画分に対して免疫沈降を行い、血清中で ZP1 分子がどのような状態で存在しているのか解析した。また、これらのドメイン特異的抗体が ZP1-ZP3 間の相互作用に与える影響をリガンドブロッティングによって解析した。以上の結果を報告する。

zona pellucida, extracellular matrix, immunoprecipitation

講演番号：3A41a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ A 校舎 41 会場

オオマリコケムシの産生するゲル状物質化学構造

Chemical analysis of the gel-material produced by *Pectinatella magnifica*

○関根 美祈、清水 文一（東洋大院生命）
○Miki SEKINE,Bun-ichi SHIMIZU (Toyo Univ.)

【目的】オオマリコケムシ（*Pectinatella magnifica*）は、淡水に生息する触手動物門外肛綱掩喉目に属する動物の一つである。個体の体長は 1.5 mm 程度で、6 ~ 9 月にかけて、2 m 近いゲル状物質（以下 PGM とする）を産生し、その表面に個体が付着した大きな群体を形成する。北アメリカ原産で、近年では東アジアにまで生息域を広めている。日本でも、*P. magnifica* の群体が工場の取水口や農業用水路が詰まるなどの問題が生じることで認知され始めている。群体の内部にある PGM は透明で、オートクレーブ後でもその形が崩れない。また乾燥重量の約 160 倍の水を湿重量で含む性質を示すが、PGM の化学構造に関しては知見がない。本研究では、PGM の化学構造を明らかにすることを目的とした。酸加水分解もしくはタンパク質分解酵素処理を行い、上清と沈殿に分け、上清に含まれている部分分解分物を分析し、PGM 構造の解明を試みた。

【方法・結果】*P. magnifica* の群体を群馬県館林市多々良沼で 2011 年 7 ~ 9 月に採取した。群体表面に存在している *P. magnifica* 個体と汚れを取り除き、内部の透明な PGM のみにした。この PGM を 2 cm 角に切断し、一晩、流水中で洗浄した後、PGM 重量の約 3 倍量の蒸留水を加えオートクレーブ（121 ℃、20 分）した。さらにフードプロセッサーにて粉砕したのち、アセトンに一晩浸漬し内部に含まれている水分を除き、風乾した。これを乳鉢で磨砕し分解実験に用いた。

PGM を 6 M HCl に懸濁し 110 ℃、24 時間反応させたのち遠心分離し、その上清をアミノ酸分析計にて分析したところ、20 種類のアミノ酸が検出された。一方、酸加水分解後の不溶物は乾燥重量で加水分解前の PGM 乾燥重量の 17%であった。次に、PGM をタンパク質分解酵素で処理したところ、キモトリプシン、コラゲナーゼおよびトリプシン処理により反応前の乾燥重量に比べ、反応後の重量がそれぞれ 62 %、 64% および 45%であった。この酵素処理後の上清中に含まれているペプチド鎖を LC /MS で分析し、アミノ酸の配列を取得した。

Pectinatella magnifica, Gel material, Chemical analysis

講演番号：3A41a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ A 校舎 41 会場

ヒト由来β-グルコセレブロシダーゼの安定な分泌生産を目指した昆虫細胞発現用ベクターの構築

Construction of an insect-expression vector for stable secretion and production of human beta-glucocerebrosidase

白神 有基、○三崎 亮、梶浦 裕之、藤山 和仁（大阪大・生物工国セ）
Yuki SHIRAKAMI, ○ Ryo MISAKI,Hiroyuki KAJIURA,Kazuhito FUJIYAMA（Osaka Univ. ICBiotech）

【背景および目的】

近年、昆虫細胞あるいは幼虫を利用した異種タンパク質生産が、良好な生産性を示すことや真核生物翻訳後修飾機構を持つといった利点から脚光を浴びている。特に、高い生産性を持つバキュロウイルスを利用した昆虫細胞発現系が注目されている。しかしながら、一方で、ウイルス感染による細胞の溶菌やタンパク質精製の段階でウイルスを除去する必要性があるといった問題も残されている。そこでこの問題を解決するために、本研究では、１）ウイルスベクターを媒介しないゲノム組込み型の昆虫発現用ベクターを構築し、２）組換えタンパク質を培養液中に安定かつ効率よく分泌生産させることを目的とした。まず、目的遺伝子発現を制御するプロモーターを改変し、ゲノム組込み型安定発現系の発現量の増加を目指した。また、目的タンパク質を培養液中に分泌させるためにシグナル配列を付加した。目的タンパク質としてヒト由来β-グルコセレブロシダーゼ（β-GC）を選択し、本発現系で生産した当該タンパク質の活性について検証した。

【方法および結果】

遺伝子発現効率に影響を与えることで知られる配列を導入したバキュロウイルス由来の改変プロモーターを構築した。発現効率へのプロモーター改変の効果を検証するために、モデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein : GFP）を Sf9 細胞で発現させた。この結果、今回プロモーターに導入した配列の中で GFP の発現効率を高めるものが見つかった。次に、この改変プロモーターを用いて分泌シグナル配列を持つ β-GC を生産したところ、同様に培養液中への効率的な β-GC 分泌を確認した。さらに、昆虫細胞より培養液中に分泌された β-GC が活性を有することを確認した。

insect cell, glucocerebrosidase, secretion

講演番号：3A41a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ A 校舎 41 会場

芳香族化合物群の置換基の種類・位置を識別する嗅覚メカニズムの解析

Olfactory recognition and discrimination of various aromatic compounds

○安原 雅恵、高井 佳基、白須 未香、東原 和成（東大院農生科応生化）
○Masae YASUHARA,Yoshiki TAKAI,Mika SHIRASU,Kazushige TOUHARA (Tokyo Univ.)

マウス嗅覚系では一つの嗅神経は約千種のうち一種の嗅覚受容体を発現しており、同一受容体を発現する嗅神経は嗅覚一次中枢である嗅球上の特定糸球体に収束投射する。従って、ある匂い分子が活性化する受容体の組み合わせは糸球体の応答パターンとして観察できる。このような匂い分子特有に見られる糸球体応答パターンは匂い地図と呼ばれている。また、似た構造をもつ匂い分子群は嗅球上で近くに位置する糸球体の応答を引きおこすことがわかっており、このような匂い分子の物理化学構造に起因する糸球体応答パターンは“chemotopic map”と呼ばれている。さらに、匂いの質の違いをもたらす因子は炭素骨格と官能基であると長く考えられており、この２因子に着目した嗅覚受容体レベルや嗅球レベルでの構造活性相関が調べられてきた。しかし炭素骨格と官能基が全く異なる匂い分子が同じ受容体に認識される例、その逆といった例も見られる。また、立体構造が似ている同族置換物質であっても異なる質の匂いを呈すと共に嗅球レベルで異なる応答性を示すことがある。こうした知見より、嗅覚受容体は匂い分子の炭素骨格や官能基以外の側面を認識している可能性が示唆される。

そこで本研究ではアニソールを基本骨格とし、ハロゲン元素４種や各種官能基が *o,m,p* 位に置換されている物質群に着目し、マウス嗅球における匂い応答カルシウムイメージングを行い、匂い分子の大きさ・形・電気的勾配が嗅覚受容にどのように寄与しているのかを解析した。これらの匂い物質群はベンゼン環を有し立体構造が固定されるため構造活性相関やベンゼン環に対する電気的勾配が議論しやすい。まず置換基原子団のベンゼン環に対する電気的勾配と大きさに着目した結果、置換基の大きさよりも電気的性質を優位に識別する傾向のある糸球体群や、特定の官能基置換化合物を認識する傾向のある糸球体群が見られた。次に置換基の部位の違いに注目して解析した結果、*o,p* 位置換化合物群それぞれに特異的に応答する糸球体群が見られ、*o,m,p* 位の違いを識別する受容体が存在することが示唆された。また、ヒト官能評価を行ったところ、*o,m,p* 位置換化合物群それぞれに似た匂いを感じているという結果が得られた。これはマウス嗅球イメージングの結果と一致するものであった。さらに嗅球上での匂い応答部位に関する解析を行ったところ、匂いに対して類似の構造活性相関をもつ糸球体は近くに位置しているということも示唆された。

本研究ではベンゼン環置換基に着目することで、匂い分子の立体構造や電気的勾配の違いによる嗅覚応答性の変化を嗅球応答レベルで詳細に解析した。そして特有の応答プロファイルをもつ糸球体群が各種存在すると共に、似た応答プロファイルを持つ糸球体は各々近くに存在することを示した。

olfacrory bulb imaging, odor map, aromatic compounds

講演番号：3A41a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ A 校舎 41 会場

カイコ由来転写制御因子 FMBP-1 の特異的 DNA 認識に関する研究

Research of transcription factor FMBP-1 derived from silkworm about specific DNA sequence recognition

○黒澤 大[1]、相沢 智康[1]、菊川 峰志[1]、神谷 昌克[1]、河野 敬一[1]、出村 誠[1]、滝谷 重治[2] ([1]北大院生命・生命科学、[2]北大院理・生物科学)
○Dai KUROSAWA[1], Tomoyasu AIZAWA[1], Takashi KIKUKAWA[1], Masakatsu KAMIYA[1], Keiichi KAWANO[1], MAKOTO DEMURA[1], Shigeharu TAKIYA[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Univ.)

【目的】カイコシルクの主成分であるフィブロインは、時期特異的に後部絹糸腺と呼ばれる組織でのみ大量に発現する。その時間的・空間的な転写制御に関わる因子は複数発見されているが、その中の一つに FMBP-1(fibroin modulator binding protein-1)がある。FMBP-1 は、フィブロイン遺伝子の上流とイントロンに含まれる ATNTWTNTA 配列に対して特異的に結合することでフィブロインの転写制御に寄与していると考えられている。218 アミノ酸残基からなる FMBP-1 の C 末端側には非常に相同性の高い 23 残基の配列が 4 回繰り返した STPR(one-score-and-three-amino acid peptide repeat)ドメインが存在し、このドメインが FMBP-1 の DNA 結合領域であることが明らかになっており、その立体構造に関する研究も進められている。しかし、ごく最近、STPR ドメインのみでは DNA 結合時の特異性が不完全であることが明らかになった。そこで本研究では、特異的配列認識に関わる領域を特定することを目的として研究を進めた。
【方法・結果】大腸菌を宿主として用いた大量発現系を構築し、FMBP-1 の様々なトランケート体を調製して特異的認識配列やランダム配列を持つ DNA を用いて EMSA での結合解析を行った。
解析の結果、STPR 領域の上流に位置する塩基性残基に富んだ HBR(hyper basic region)を持つ STPR(残基番号 83-193)は結合特異性が保たれているのに対して、HBR のトランケートにより特異性がほぼ失われてしまうことが明らかとなった。HBR を含む STPR の結合特異性は高く、特異的認識配列に対する解離定数は約 10nM であるのに対して、ランダム配列に対しては少なくとも 10μM 以上であった。興味深い事に、STPR 領域単独では結合特異性が失われており、ランダム配列に対する結合の解離定数は約 10nM であった。ランダム配列に対しても HBR を含む場合と変化無く強い DNA 結合能を有することから、HBR 領域は特異的認識配列以外への結合を妨げることにより DNA 結合における特異性を高める機能を持つと考えられる。
本研究により FMBP-1 の特異的配列認識に関わる最小領域の決定に成功したため、今後は FMBP-1 の DNA 結合状態に関する立体構造解析等を進めることも期待できる。また、HBR はアミノ酸 13 残基の短い領域であることから、アラニンスキャンによる重要残基の特定を進め、特異的配列の認識機構を明らかにしていく計画である。

transcription factor, EMSA, silkworm

講演番号：3A41p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ A 校舎 41 会場

酸化亜鉛ナノ粒子による急性期肺における酸化ストレスに対するアスコルビン酸の効果
The effects of ascorbic acid on oxidative stress induced by zinc oxide nanoparticles in the lung in the acute phase

○福井 浩子[1]、堀江 祐範[2]、遠藤 茂寿[3]、萩原 義久[4]、岩橋 均[1] ([1]岐阜大院連農、[2]産医大、[3]単層 CNT 融合開発機構、[4]産総研)
○Hiroko FUKUI[1], Masanori Horie[2], Shigehisa Endoh[3], Yoshihisa Hagihara[4], Hitoshi Iwahashi[1] ([1]Gifu Univ., [2]UOEH, [3]TSAC, [4]AIST)

≪背景≫主要な金属酸化物ナノ粒子の一つである酸化亜鉛ナノ粒子（N-ZnO）は、触媒などの工業的利用のみならず、化粧品原料として我々の身近な製品に使用されており生産量も多い。一方で、N-ZnO は呼吸器への曝露などによる有害性も指摘されている。これまでの研究から、N-ZnO による急性期肺への影響には酸化ストレスが関与し、粒子からの亜鉛イオンの溶出がその大きな要因である事が指摘されている。一方で、生体内で強い還元力によって抗酸化作用を示すアスコルビン酸（AA）は、金属によるいくつかの細胞毒性において、酸化ストレスのみならずアポトーシスや DNA の損傷の抑制にも効果を示したという報告がある。このような背景から、N-ZnO によって引き起こされる肺の急性期影響に対する AA の効果を、酸化ストレスの軽減を中心に検討した。≪方法≫9 週齢のラットに 0.2 mg/0.4 mL の N-ZnO 分散液を気管内注入し、注入直後から 1 %の AA 溶液を給水した（ZnO + 1% AA 群）。更に陰性対照群（Non-treated 群）、溶媒（5 % FBS）注入 + 水道水（Control + Water 群）、Control + 1% AA 群、陽性対照群として ZnO + Water 群を設定した。注入 1 日、1 週間後に解剖を実施し、気管支肺胞洗浄液（BALF）および肺組織中の酸化ストレス、炎症、傷害関連マーカーを測定した。更にメカニズムの検討を行うために、0.1 mg/mL の N-ZnO と 5 mM AA を混合し、ヒト肺腺がん由来Ⅱ型肺上皮細胞の A549 に曝露した（ZnO + 5 mM AA 群）。また培地のみを曝露した陰性対照群（Control 群）と AA および N-ZnO のみをそれぞれ曝露した、5 mM AA 群、ZnO 群を設定した。曝露 6 時間後に細胞を回収し、細胞内の酸化ストレスおよび炎症関連マーカーを測定した。更に Zn による細胞内 ROS の産生に対する AA の効果と、細胞内への Zn の取込みに対する AA の影響を確認するために塩化亜鉛（ZnCl2）についても同様に試験を実施した。≪結果と考察≫インビボ試験において N-ZnO 気管内注入後の AA の給水は、N-ZnO による酸化ストレス関連マーカーの上昇を抑え、更に細胞傷害マーカーや炎症関連マーカーの上昇も抑えた。同時に AA を給水した群の血中の AA 濃度の上昇も確認された。インビトロ試験でも、AA の同時処理によって N-ZnO による細胞内の酸化ストレスおよび炎症関連マーカーの上昇が抑えられた。更に細胞内 ROS 産生の増加に対して AA は、N-ZnO および ZnCl2 のどちらについても抑制効果を示した。一方で AA の処理によって N-ZnO および ZnCl2 を曝露したどちらの群も細胞内の Zn イオン濃度の上昇が確認された。これらの結果、AA は抗酸化物質として N-ZnO による急性期肺の酸化ストレスを抑制するだけではなく、炎症や傷害も軽減する効果を持つことが分かった。一方では AA が、Zn の細胞内取込みの調節機能に関与する可能性も示唆された。

oxidative stress, zinc oxide nanoparticles, antioxidant

講演番号：3A41p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ A 校舎 41 会場

カキドオシエキスによるマウス B16F10 メラノーマ細胞のメラニン生成に対する抑制作用

Anti-melanogenesis effect of Glechoma hederacea L. extract on mouse B16F10 melanoma cells

○喬 志偉（秋田大院医）
○Zhiwei QIAO (Akita University Graduate School of Medicine)

【目的】メラニンはチロシンから生合成されるフェノール類がチロシナーゼやチロシナーゼ関連タンパク質による酵素的ならびに非酵素的酸化反応などによって生合成された色素である。肌の基底膜に存在するメラノサイトが、長時間紫外線照射などの刺激により活性化され、過剰にメラニンを放出する。シミ、ソバカスなどはこのメラニン色素が沈着することにより生成する。シソ科のカキドオシ（*Glechoma hederacea* L.）は、利尿作用や消炎作用などを有する植物として古くから民間療法において広く用いられている。演者らはカキドオシエキスが有する新しい生理作用の探索過程においてメラニン生成の抑制効果を見出した。さらに、メラニン生成抑制効果の作用機構を調べたので報告する [1)]。
【方法】メラニン生成はマウスB16F10メラノーマ細胞株を用いて、培養3日後に生成したメラニンの吸光度を測定することにより評価した。細胞毒性はMTTアッセイにより評価した。チロシナーゼの酵素活性はマッシュルーム由来のチロシナーゼとL-ドーパを反応させ、生成したメラニン量を評価した。細胞内チロシナーゼ活性は細胞抽出液とL-ドーパを反応させ、生成したメラニン量を評価した。メラニン生成に関連するタンパク質の発現量はWestern Blotting、遺伝子の発現量はRT-PCRで評価した。
【結果】カキドオシエキスはB16F10細胞のメラニン生成を濃度依存的に抑制した。MTTアッセイの結果、メラニン生成を抑制する濃度のカキドオシエキスは細胞毒性を示さなかった。カキドオシエキスはコウジ酸と異なり、チロシナーゼの酵素活性に影響を与えなかった。しかし、カキドオシエキス反応後の細胞内チロシナーゼ活性は低下していた。次に、メラニン生成に関連するタンパク質の発現量を調べた結果、カキドオシエキスはチロシナーゼおよび転写因子MITFの発現量を抑制した。さらに、RT-PCRの結果から、チロシナーゼ遺伝子の発現量の抑制も観察された。以上の結果から、カキドオシエキスは美白化粧品の有効成分や色素沈着症の予防や治療薬などへの応用が期待される。

1) Qiao Z. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **76**, 1877-1883 (2012).

melanogenesis, Glechoma hederacea, tyrosinase

講演番号：3A41p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ A 校舎 41 会場

分化阻害剤の細胞内へのダイレクト・インジェクションによる PC12 細胞の神経分化の定量的制御
Quantitative inhibition of PC12 neural differentiation by direct injection of an inhibiting agent

○鄭 智恵[1]、三浦 夏子[1]、伊藤 昭夫[2]、沢田 宗孝[2]、西川 茂道[3]、黒田 浩一[1]、植田 充美[1]([1]京大院・農・応用生命、[2]富士通株式会社、[3]ワケンビーテック株式会社)
○Jihye CHUNG[1], Natsuko MIURA[1], Akio ITO[2], Munetaka SAWADA[2], Shigemichi NISHIKAWA[3], Kouichi KURODA[1], Mitsuyoshi UEDA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Fujitsu Ltd., [3]WakenBTech Co. Ltd.)

【目的】

近年、体細胞の分化制御に関する研究が盛んに行われており、再生医療等の分野への応用が期待されているが、細胞改変効率が低く、予期していなかったがん化や突然変異等の危険性が高いという問題が存在する。このような問題を解決し、安全かつ高効率に形質転換するためには、遺伝子組換えや細胞膜透過性物質の培地添加等、定量性が劣る現行の手法に代わり、より定量的に分化過程を調節しその効果を評価するための新しい手法を導入する必要がある。自動マイクロインジェクション装置（CI-2500）を用いることにより、直径 1 μm 以下の細いガラスキャピラリーで様々な分化制御因子を細胞に直接注入することが可能になってきており、因子の細胞内導入量と時間を厳密にコントロールできる。本研究では、このマイクロインジェクション装置を用いて分化阻害剤を直接培養細胞に導入することにより、阻害剤の細胞内導入量の変化による分化阻害効果の差異を定量的に解析することを目的としている。

【方法及び結果】

ラット副腎褐色細胞腫由来の細胞株である PC12 は神経成長因子（NGF, Nerve Growth Factor）の刺激に応答して神経細胞様の分化を示すことが知られている。この分化は、MAPK（Mitogen-Activated Protein Kinase）/ERK（Extracellular signal-Related Kinase）シグナル経路の阻害剤である U0126 により抑制される。本研究では、自動マイクロインジェクション装置を用いて、分化阻害剤 U0126 を直接細胞内に注入することにより、既存の培地添加法では不可能であった細胞内導入量の正確な調節と抑制効果の定量的解析を試みた。ターゲット細胞は 60 時間以上観察可能な蛍光試薬で染色して標識し、阻害剤を注入した細胞の経時変化をシングルセルレベルで解析した。ターゲット細胞の神経分化を解析するためには、一細胞あたりの神経突起の長さの測定を行い、阻害剤の導入量による突起長の差異を解析した。その結果、U0126 の直接インジェクションにより、PC12 細胞の神経分化が量依存的に阻害されることが確認できた。また、既存の培地添加法では測定することが不可能であった、阻害剤の実際の細胞内導入量とその抑制効果を定量的に解析することが可能であった。本研究の結果から、細胞分化の定量的で厳密な制御及びメカニズムの解析に関する研究における自動マイクロインジェクションによる分化制御因子の導入法の有効性が示唆された(1)。

（1）J. Chung *et al.* submitted

Automated microinjection, PC12, Differentiation regulation

講演番号：3A41p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ A 校舎 41 会場

PP2C 活性化物質 glabridin の破骨細胞分化抑制機構の解析

Inhibitory mechanism of RANKL-induced osteoclastogenesis by glabridin, an activator of protein phosphatase 2C

○秋山 智美[1]、青山 友果[1]、油井 信弘[2]、木村 賢一[2]、永井 和夫[1]、禹 済泰[1]、大西 素子[1] ([1]中部大・応生、[2]岩手連大・農)
○Satomi AKIYAMA[1], Yuka AOYAMA[1], Nobuhiro ABURAI[2], Ken-ichi KIMURA[2], Kazuo NAGAI[1], Je-tae WOO[1], Motoko OHNISHI[1] ([1]Graduate school of Bioscience and Biotech., Chubu Univ., [2]Uni. Grad. Sch. of Agri. Sci., Iwate Univ.)

【目的】プロテインホスファターゼ 2C(PP2C)は、PPM ファミリーに属するセリン／スレオニンホスファターゼであり、ストレス応答、細胞周期、AMPK シグナル伝達経路などの制御に関与することが知られている。我々はこれまでに、PP2C が破骨細胞分化に必須である RANKL/RANK シグナル伝達経路を抑制し、破骨細胞分化を制御することを報告してきた。また、PP2C 活性化物質として見出した glabridin と pisiferdiol は、RANKL によって活性化する MAPK シグナル伝達経路を抑制し、NFATc1 の発現を抑制することで破骨細胞分化を阻害することを明らかにした。そこで glabridin と pisiferdiol の、RANKL/RANK シグナル伝達経路に対する作用をより詳細に解析するために、RANKL によって活性化する NFκB 経路に対するこれらの化合物の影響を検討した。
【方法】マウスマクロファージ・単球由来 RAW264 細胞は、可溶性破骨細胞分化因子(sRANKL)存在下で 72 時間培養後、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ陽性の多核巨細胞数を計測した。RAW264 細胞における、RANKL/RANK シグナル伝達経路への PP2C 活性化物質の影響は、抗リン酸化 IκB 抗体、抗 IκB 抗体、抗リン酸化 IKKα/β抗体、抗 IKKβ抗体、抗β-actin 抗体を用いて、ウエスタン・ブロット法により検討した。
【結果】NFκB の活性化には NFκB の結合タンパク質として知られる IκB のリン酸化とそれに続く IκB の分解が必要である。pisiferdiol は RANKL によって亢進する IκB のリン酸化を抑制するが、glabridin は IκB のリン酸化を抑制しないことがわかっている。そこで RANKL によって促進される、IκB の分解に対するこれらの化合物の作用を調べたところ、pisiferdiol は IκB の分解を阻害するが、glabridin は IκB の分解に影響を与えないことがわかった。IκB のリン酸化は、上流のキナーゼである IKKβのリン酸化により引き起こされることが報告されているため、次に IKK のリン酸化に対するこれらの化合物の影響を調べた。その結果、glabridin と pisiferdiol はともに、RANKL による IKK のリン酸化を抑制した。今回 IKK のリン酸化の検出に使用した抗体は、リン酸化 IKKβと同時にリン酸化 IKKαを検出するため、glabridin は IKKαのリン酸化を抑制する可能性が示唆された。

protein phosphatase, osteoclasts, RANKL

講演番号：3A41p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ A 校舎 41 会場

香気成分の NMDA 型グルタミン酸受容体および不安に対する効果

Effects of various fragrant compounds on NMDA subtype of glutamate receptors and anxiety

○山田 康枝[1]、増田 修一[1]、伊豆 英恵[2]、松丸 克己[2]、青島 均[3]（[1]近畿大院工、[2]酒総研、[3]山口大院）

○ Yasue YAMADA[1], Shuichi MASUDA[1], Hanae IZU[2], Katsumi MATSUMARU[2], Hitoshi AOSHIMA[3] ([1]Grad. Sch. of Sys. Eng. Kinki Univ., [2]NRIB, [3]Yamaguchi Univ. Grad. Sch. Med.)

【目的】NMDA 型グルタミン酸受容体（NMDA 受容体）は脳に多く存在し，高い Ca^{2+}透過性を有するイオンチャネル型グルタミン酸受容体のひとつであり，神経可塑性の中心的役割を担い，記憶形成や学習、神経細胞死、神経疾患に深く関与している．Memantine は NMDA 型受容体の部分アンタゴニストであり，認知症の治療薬として用いられているが，近年では不安に対する効果も知られている．香気成分は，鎮静効果やリラックス効果などをもたらすと考えられ，アロマテラピーなどに使用されているが，その作用機序は不明な点が多く，また神経機能や神経細胞に対する直接的な影響については明らかにされていない．今回，様々な香気成分の神経機能への効果を検討するために精油や焼酎に含まれる香気成分 14 種類の NMDA 受容体活性への効果を検討した．また，受容体阻害活性が見られた成分について，抗不安効果も検討した．

【方法】脳において大脳皮質や海馬に多く発現しているマウスNMDA受容体のGluN1/GluN2AとGluN1/GluN2Bサブタイプ NMDA受容体のmRNAをアフリカツメガエルの卵母細胞にインジェクションし，20℃で，24～48 時間インキュベートし発現させたものを受容体活性測定に使用した．膜電位を‐70 mVに固定して，二電極膜電位固定法によりグルタミン酸100 μM /グリシン100 μMを潅流し受容体活性を測定した．香気成分の受容体活性への効果を検討するため，グルタミン酸100 μM /グリシン100 μMの活性をコントロール（100%）として測定後，香気成分を潅流しながら測定した．抗不安効果は，マウスに香気成分を腹腔内注射後，高架式十字迷路試験により測定した．

【結果】測定した香気成分全てで，NMDA 受容体の活性が阻害された．特に furfural, nerol, citronerol は高い阻害活性を示した．GluN1/GluN2A と GluN1/GluN2B 受容体への効果を比較すると，isoamyl alcohol，n-propyl alcohol，nerol，citronerol， geraniol ではサブタイプ間で阻害率に違いがみられた．複数の香りについて高架式十字迷路試験をしたところ、NMDA 受容体阻害活性の高い citronerol は有意に抗不安作用を示し、他の香りも有意ではないが同様の作用をみせた．以上の結果から，香気成分には NMDA 受容体阻害活性と抗不安効果があることが示された．今後 NMDA 受容体活性阻害と抗不安の関係について検討していく予定である．

NMDA receptor, fragrance, anxiety

講演番号：3A41p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ A 校舎 41 会場

解糖系代謝物メチルグリオキサールによる IRS-1 のリン酸化を介したインスリン抵抗性の可能性
A model of insulin resistance through the methylglyoxal-induced phosphorylation of IRS-1

○野村 亘[1]、後藤 剛[1]、河田 照雄[1]、井上 善晴[2] ([1]京大院・農・食品生物、[2]京大院・農・応生科)
○Wataru NOMURA[1], Tsuyoshi GOTO[1], Teruo KAWADA[1], Yoshiharu INOUE[2] ([1]Div. of Food Sci. Biotech., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Div. of Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ.)

解糖系代謝物であるメチルグリオキサール（MG）は典型的な 2-オキソアルデヒドであり、解糖系を有する生物種において広くその存在が認められている。古くから MG は糖尿病との関連が指摘されており、糖尿病患者の血中 MG 濃度は健常者に比べて高いことが知られている。しかしながら、MG と糖尿病病態の因果関係、ならびに MG の作用機構については未だ不明な部分が多い。

これまでに我々は出芽酵母を用いた解析から、MG が target of rapamycin 複合体 2（TORC2）シグナルを活性化すること見いだした。さらに、動物細胞のインスリンシグナル系においても、MG は哺乳類 TORC2（mTORC2）を活性化することを明らかにしてきた（2012 年度本大会）。

インスリン刺激は IRS（インスリン受容体基質）の Tyr 残基のリン酸化を促進することで、mTORC2 を含むインスリンシグナル系を活性化し、最終的にグルコース輸送体 GLUT4 の細胞膜輸送を促進する。その一方で、活性化したインスリンシグナル系は IRS の Ser/Thr 残基のリン酸化を引き起こし、IRS のインスリン受容体との結合を阻害することでインスリンシグナル系を遮断する。そこで我々は、MG と糖尿病を関連づけるメカニズムの一つとして、MG によるインスリンシグナル系のネガティブフィードバック機構の活性化が、インスリン抵抗性を惹起するのではないかと考えた。

インスリンシグナル系のネガティブフィードバック機構のリードアウトである IRS-1 のリン酸化レベルを検討したところ、脂肪細胞に分化した 3T3-L1 細胞において、MG は IRS-1 のリン酸化を促進することを見いだした。MG 処理による IRS-1 の Tyr 残基のリン酸化は起こらなかったことから、MG による IRS-1 のリン酸化は Ser/Thr 残基のリン酸化であると考えられた。次に、MG によりインスリン抵抗性が惹起されるか検討した。その結果、MG 処理はインスリンによる Akt の活性化を阻害した。mTORC1-S6K は、インスリンシグナル系の活性化による IRS-1 の Ser/Thr 残基のリン酸化に関与することが知られている。そこで、MG による IRS-1 のリン酸化、ならびにインスリン抵抗性の惹起に mTORC1-S6K が必要であるかどうかについて、mTORC1 の阻害剤である rapamycin を用いて検討した。その結果、rapamycin 処理は MG による IRS-1 のリン酸化を阻害した。さらに、MG で処理した際のインスリンによる Akt 活性化の阻害は、rapamycin 処理により解除された。以上のことから、MG は mTORC1-S6K を介した IRS-1 の Ser/Thr 残基のリン酸化を誘導し、インスリン抵抗性を引き起こす可能性が示唆された。

methylglyoxal, insulin resistance, IRS-1

講演番号：3A41p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ A 校舎 41 会場

5-アミノレブリン酸による温熱条件下でのがん細胞死増強作用の検証

Enhancement of cancer cell death under the thermal stress by 5-aminolevulinic acid.

○鳥谷部 唯[1]、千葉櫻 拓[1]、高橋 究[2]、川上 茉利子[1]、芳賀 葉月[1]、小倉 俊一郎[3]、安部 史紀[2]、中島 元夫[2]、吉川 博文[1]、田中 徹[2] ([1]東京農大・応生科・バイオ、[2](株)SBI ファーマ、[3]東工大・フロンティア研機)

○ Yui TORIYABE[1], Taku CHIBAZAKURA[1], Kiwamu TAKAHASHI[2], Mariko KAWAKAMI[1], Hazuki HAGA[1], Shun-ichiro OGURA[3], Fuminori ABE[2], Motowo NAKAJIMA[2], Hirofumi YOSHIKAWA[1], Tohru TANAKA[2] ([1]Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agric., [2]SBI Pharmaceuticals Co., Ltd., [3]Frontier Res. Center., Tokyo Inst. of Tech.)

【背景・目的】 温熱療法はがん細胞が正常細胞に比べ温熱に感受性を示すことを利用した治療法である。がん選択性が高く、副作用の少ない治療法として近年注目されているが、温熱によるがん細胞死の誘導機構は未だ不明な点が多い。また化学療法や放射線療法など主力の治療法と比べ効果が穏やかであるため、現在は主にそれらの治療法と併用した補助的療法として用いられており、その効果の増強が期待されている。一方、ポルフィリン経路の共通前駆物質として知られる5-アミノレブリン酸（5-ALA）は動植物の生体内に含まれる天然のアミノ酸である。生体内に投与された5-ALAは、正常細胞ではヘムまで代謝されるのに対し、がん細胞ではヘムの前駆体であるプロトポルフィリンIX（PpIX）が細胞内に蓄積する。PpIX は光照射により活性酸素（ROS）を生じ、細胞毒性を発揮することから、5-ALAは光線力学療法においてがん特異的細胞死を誘導する薬剤として期待されている。しかし光線力学療法はその適用範囲に限界があり、また光照射に依存しない5-ALAのがん治療への応用については未知であった。本研究では温熱療法の効率化を目的とし、光照射に依存しない5-ALAの温熱増感剤としての可能性を検証した。

【方法・結果】 ヒトがん細胞株として、胃がん由来KATOⅢ、大腸がん由来Caco-2、肝臓がん由来HepG2、骨肉腫由来U2OS、乳がん由来MCF7、線維肉腫由来HT-1080、上皮がん由来A431、アデノウイルスでトランスフォームされたヒト胎児腎細胞 HEK293、ヒト正常細胞株として繊維芽細胞由来 WI-38を用いて、5-ALAによる温熱条件下での細胞死増強作用を検証した。これらの細胞に5-ALAを取り込ませた後に37℃または42℃で24時間培養した。その結果、がん細胞株であるKATOⅢ、Caco-2、HepG2およびHEK293においては、42℃において5-ALA濃度依存的に細胞死が増加することが示されたが、がん細胞株 U2OS、MCF7、HT-1080、A431 および正常細胞株 WI-38では、42℃での5-ALA依存的な細胞死の増強は見られなかった。また、細胞内 PpIX 量をHPLCを用いて、細胞内ROS産生を蛍光試薬（APF）を用いてそれぞれ検証した。その結果、５－ALAと温熱の併用に感受性の見られた4種のがん細胞株KATOⅢ、Caco-2、HepG2、HEK293では42℃条件下において、５－ALA濃度依存的に PpIX の顕著な蓄積およびROS産生が確認された。一方、感受性のなかったがん細胞株U2OSおよび正常細胞株WI-38ではppⅨの蓄積、ROS産生共にほぼ見られなかった。さらに、感受性のなかった細胞株U2OSとWI－38にPpIXを細胞外に排出するトランスポーターであるABCG2の阻害剤（fumitremorgin C）を投与したところ、これら2細胞株においても、42℃条件下でPpIXの蓄積が見られ、5-ALA と温熱に感受性を持つようになった。

これらの結果から、５－ALAと温熱療法の併用により、いくつかのがん細胞株において細胞死を増強できることが示された。また、この増強効果には細胞内のppⅨ蓄積の有無とROS産生が関与していることが示唆された。

5-aminolevulinic acid, cancer, hyperthermia

講演番号：3A41p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ A 校舎 41 会場

粘膜型マスト細胞の分化・成熟における Notch シグナルの役割

Role of Notch signaling in the differentiation and maturation of mucosal mast cells

○中野 信浩、西山 千春、奥村 康、小川 秀興 (順天堂大医・アトピー疾患研究センター)
○Nobuhiro NAKANO,Chiharu NISHIYAMA,Ko OKUMURA,Hideoki OGAWA (Atopy (Allergy) Research Center, Juntendo University School of Medicine)

【目的】粘膜型マスト細胞は消化管、気道、結膜等の粘膜組織に分布しており、結合組織に存在するマスト細胞とは形態や機能がやや異なっている。粘膜型マスト細胞は寄生虫感染時の生体防御やアレルゲンに対するアレルギー反応等において重要な役割を担っているが、その分化、成熟過程に関する知見は少ない。TGF-β や IL-10 は粘膜型マスト細胞の成熟を促すサイトカインとして知られているが、我々は *in vitro* の培養系において、Notch レセプターを介したシグナルがサイトカイン非依存的に粘膜型マスト細胞の分化・成熟を誘導することを見いだした。本研究では、Notch シグナルによって誘導されたマスト細胞の形質と機能を解析した。
【方法】BALB/c マウスから骨髄細胞を採取し、IL-3 と SCF 存在下で分化誘導させた骨髄由来培養マスト細胞を、各種 Notch リガンドを強制発現させた CHO 細胞株と 6 日間共培養させた後、各種解析を行った。
【結果】Notch リガンド Jagged 1(Jag1), Jagged2 (Jag2), Delta-like 1 (Dll1), Delta-like 4 (Dll4) は成熟した粘膜型マスト細胞のマーカー分子である mouse mast cell protease (mMCP)-1, -2, -4 と αE integrin (CD103) の発現を誘導した。Jag2 と Dll1 はセリンプロテアーゼの一種である granzyme A の発現も誘導し、Notch リガンドの種類によってプロテアーゼ組成の異なるマスト細胞が誘導されることが示された。次に、マウスマスト細胞は細胞表面に Notch1 と Notch2 を恒常的に発現していることから、レトロウイルスベクターを用いた Notch1 または Notch2 細胞内ドメイン過剰発現系での検討を行った。mMCP-1, -2, -4 の発現は Notch1 細胞内ドメイン過剰発現マスト細胞と Notch2 細胞内ドメイン過剰発現マスト細胞で見られたのに対し、granzyme A 発現は Notch1 細胞内ドメイン過剰発現マスト細胞にのみ見られた。この結果から、Notch シグナルによる発現誘導の機序が mMCP と granzyme A で異なることが示された。また、Notch リガンドによってプライミングされたマスト細胞では、高親和性 IgE レセプター Fc ε RI の架橋刺激によって誘導されるシグナル伝達分子のチロシンリン酸化が亢進しており、それに伴う脱顆粒も増強されていたが、脱顆粒増強の程度は Notch リガンドの種類によって異なっていた。
【結論】Notch シグナルが粘膜型マスト細胞の分化・成熟および機能の多様性獲得に寄与している可能性が示された。

Notch signaling, Mast cell, Maturation

講演番号：3A41p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ A 校舎 41 会場

PKG Iβと TRPC6 との相互作用に寄与する両蛋白質内のアミノ酸の同定
Identification of amino acids responsible for interaction between PKG I beta and TRPC6
○本田 啓、井上 隆司 (福岡大医)
○Akira HONDA,Ryuji INOUE (Fukuoka Univ.)

【目的】血管内皮細胞や神経終末から放出される一酸化窒素（NO）を起点とするNO-cGMP-I型cGMP依存性キナーゼ（PKG）情報伝達系は、血管平滑筋の弛緩反応において重要な役割を担っている。その中でもI型PKGは、血管の弛緩や神経情報伝達等で重要な役割を果たしているにも関わらず、その基質蛋白質の同定、基質認識に関するPKGの構造機能相関等の知見はあまり明らかではなかった。一方、これまでに我々は、PKGが細胞内へのCa^{2+}流入を制御する受容体作動型Ca^{2+}チャネルであるTRPC6をリン酸化する事で負に制御すること（Takahashi *et al. J. Physiol.* 2008）、逆に細胞を長期間cGMPに暴露するとTRPC6の自発活性が上昇すること（未発表データ）を明らかにしてきた。そこで今回、このI型PKGとTRPC6 Ca^{2+}チャネルの相互作用機構の詳細を明らかにすべく以下の実験を行った。
【方法】スプライスバリアントである PKG type Iαと PKG type Iβを Bait、PKG でリン酸化を受ける部位を含む TRPC6 の N 末側細胞質領域を Prey として酵母 two-hybrid screening 系を構築し、両者の相互作用及び cGMP 依存性の変化について PKG、TRPC6 双方に様々な点変異体を用いて検討を行った。
【結果】野生型 PKG Iαと TRPC6 の間には cGMP 依存的な相互作用が見られたのに対し、PKG Iβと TRPC6 の間では cGMP 非依存的な相互作用が見られた。TRPC6 に存在する I 型 PKG リン酸化モチーフに変異を導入した TPRC6 変異体を用いたところ、PKG Iαの TRPC6 に対する相互作用が失われたのに対し、PKG Iβと TRPC6 との間の相互作用に変化が認められなかったことから、PKG Iβと TRPC6 の間には酵素-基質間相互作用以外の直接相互作用部位が存在する可能性が示唆された。そこで、その直接相互作用部位を同定するため、PKG Iβの N 末側に存在し、蛋白質相互作用に関与するといわれているロイシンジッパーモチーフ及びその周辺に存在する塩基性アミノ酸や酸性アミノ酸の繰り返し配列に変異を導入したところ、特定の酸性アミノ酸を塩基性アミノ酸に置換した PKG Iβ変異体で TRPC6 との相互作用が観察されなくなった。また、TRPC6 上に存在し、蛋白質相互作用に関与すると言われるアンキリンリピート上に存在する塩基性アミノ酸を酸性アミノ酸に置換した TRPC6 変異体も PKG Iβとの相互作用が観察されなくなった。以上の結果から、PKG Iβは N 末領域に存在する酸性アミノ酸を、TRPC6 は N 末に存在する塩基性アミノ酸をそれぞれ介して相互作用し、その領域を足場としてリン酸化反応を行っている可能性が示唆された。

PKG type I, TRPC6, protein interaction

講演番号：3A41p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ A 校舎 41 会場

異なる強度の酸化ストレスに対するマウス海馬由来 HT22 細胞の適応メカニズム
Adaptive mechanisms against different levels of oxidative stress in HT22 mouse hippocampal cells

○石井 雅也[1]、石橋 和悟[1]、小倉 友里奈[2]、三浦 和典[2]、根建 拓[1,2]([1]東洋大生命、[2]東洋大院生命)
○Masaya Ishii[1], Kazusa Ishibashi[1], Yurina Ogura[2], Kazunori Miura[2], Taku Nedachi[1,2] ([1]Toyo Univ., [2]Toyo Univ.)

神経細胞における酸化ストレスは、生体を構成する分子(タンパク質・DNA ・脂質・酵素など)を修飾し、神経変性の原因となることが知られている。しかし近年、神経細胞への持続的な弱ストレス刺激によって、その後の強い酸化ストレスによる細胞障害が減弱されることなどが報告され、ストレスに対する神経細胞の応答は、予想以上に複雑であることがわかってきた。そこで本研究では、マウス海馬由来 HT22 細胞を用いて、強度の異なる酸化ストレスに対する細胞応答とそのメカニズムを調べることを目的とした。

まず、HT22 細胞に種々の濃度の H_2O_2 及びグルタミン酸を用いて酸化ストレスを与え、MTT assay により細胞生存率を測定した。その結果、H_2O_2 処理群、グルタミン酸処理群ともに、高濃度で処理した場合は細胞死が亢進するが、低濃度で処理した場合は逆に細胞生存率が上昇することが明らかとなった。すなわち、HT22 細胞では、酸化ストレスの強度に応答して全く異なる生理変化を示すことが示された。次に、低濃度 H_2O_2 依存的な細胞生存率上昇を仲介する分子メカニズムを解明することを目的に、低濃度 H_2O_2 を添加した際に変動する細胞内シグナルを解析した。その結果、低濃度 H_2O_2 に応答して MAP kinase family のひとつ Erk1/2 のリン酸化が上昇していることを見出され、これが細胞生存率上昇に重要である可能性が示唆された。

一方、先述したように HT22 細胞を高濃度 H_2O_2 で処理すると細胞死が亢進するが、この際、別な種類の細胞保護機構が稼働していることがわかった。HT22 細胞を高濃度 H_2O_2 で処理し、各種成長因子の発現を解析したところ、神経保護効果を持つ成長因子プログラニュリン (PGRN)の遺伝子発現が有意に増加することが明らかとなった。この PGRN 遺伝子発現上昇の生理的意義を調べるために、HT22 細胞を種々の濃度の PGRN で前処理した後に、高濃度 H_2O_2 を添加して細胞生存率を解析した結果、1 ng/ml の PGRN で 24 時間処理することによって HT22 細胞のストレス耐性が増強し、高濃度 H_2O_2 依存的な細胞死が抑制されることが明らかとなった。

以上の結果より、HT22 細胞は酸化ストレスの強度に応じて、異なる細胞保護機構を稼働していることが示唆された。すなわち、低強度酸化ストレスは細胞の生存率をあげる一方、高強度酸化ストレスは PGRN を発現上昇させ、オートクライン／パラクライン様式で細胞を保護していることがはじめて示された。

Oxidative stress, HT22 cells, Growth factor

講演番号：3A41p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ A 校舎 41 会場

プレコンディショニングによる神経細胞保護機構の解明
Mechanisms of neuroprotection by oxidative preconditioning in PC12 cells
○小倉 友里奈、根建 拓（東洋大院生命）
○Yurina OGURA,Taku NEDACHI (Toyo Univ.)

認知症をはじめとする神経変性疾患の発症やその進行には、脳内の神経細胞の加齢、遺伝、環境要因の変化などによるストレスの蓄積が関与している。しかし、神経細胞のストレス応答、特に強度の異なるストレスに対する細胞応答については未だ不明な点が多い。近年の研究で、神経細胞に対して細胞死を引き起こさない程度の弱い酸化ストレスを負荷しておくと、後の強い酸化ストレスに対する耐性を獲得することが報告されており、このような弱い酸化ストレスへの曝露は酸化プレコンディショニング（PC）と呼ばれている。この PC が生じるメカニズムの詳細が明らかとなれば、神経細胞の酸化ストレスに対する耐性を制御することも可能となり、神経変性疾患を予防・治療することができる新しい方法の開発につながる可能性が高い。そこで本研究では、ラット褐色細胞腫 PC12 を用い、PC による神経細胞保護メカニズムを明らかにすることを目的とした。

まず、PC の効果が PC12 細胞においてもみられるかを確認するために、極めて低濃度の H_2O_2（1～10 μM)で前処理を行い、その後酸化ストレスを引き起こすのに十分な高濃度の H_2O_2（100～500 μM)で処理したところ、前処理せずに高濃度 H_2O_2 で処理したものに比べて、PC12 細胞の細胞死が減少することを見出した。また低濃度 H_2O_2 前処理のみでは、細胞死誘導効果は観察されなかったことから、低濃度 H_2O_2 前処理によって PC12 細胞が酸化ストレス耐性を獲得したことが強く示唆された。次に、この PC による神経細胞保護メカニズムを解明することを目的に、細胞内シグナル分子の修飾と分泌タンパク質の変化を解析した。まず、細胞内シグナルの変化を調べたところ、24 時間の低濃度 H_2O_2 前処理によって MAP kinase family のひとつである Erk1/2 の活性化が促進されることを見出した。一方、他の MAP kinase である p38 や JNK の活性化に変化は見られなかった。その他の結果もあわせると、PC による神経細胞保護メカニズムに Erk1/2 が関与している可能性が示唆された。次に、PC による分泌タンパク質変動の候補として成長因子に着目し、リアルタイム PCR 法を用いて遺伝子発現を測定した結果、低濃度 H_2O_2 処理によって、脳由来神経栄養因子（BDNF）の発現が誘導されることが明らかとなった。また、PC12 細胞における BDNF に対する受容体、TrkB および $p75^{NTR}$ の発現を調べたところ、$p75^{NTR}$ のみが発現していることがわかったため、現在、PC12 細胞において $p75^{NTR}$ を介した BDNF の生理作用を解析している。

以上の結果から、低濃度 H_2O_2 依存的な酸化ストレス耐性は、抗酸化酵素の発現だけでなく、MAP kinase 活性化の制御や成長因子の発現など複数のメカニズムによることが強く示唆された。

preconditioning, oxidative stress, neuroprotection

講演番号：3A41p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ A 校舎 41 会場

栄養条件における神経細胞内 SIRT1 の機能変化
Nutrient availability defines the expression and localization of SIRT1 in PC12 cells
○藤野 耕太郎、橋本 祐樹、根建 拓（東洋大院生命）
○Kotaro Fujino,Yuki Hashimoto,Taku Nedachi (Toyo Univ.)

栄養物質のひとつであるグルコースは、細胞にとって極めて重要なエネルギー源であると同時に、細胞外の栄養状態を細胞に伝えるシグナル分子として重要な働きを果たしている。近年、細胞外栄養状態に応答した細胞の生理変化を仲介している分子としてNAD$^+$依存性脱アセチル化酵素Ｓｉｒｔｕｉｎ1（SIRT1）が同定され、大きな注目を集めている。脳神経系においてもＳIRT1は発現しており、神経保護作用を示すことが知られているが、細胞外糖濃度の変化に応答した機能制御については未だ不明な点が多い。そこで、本研究では、SIRT1ならびにその下流分子であるＦｏｒｋｈｅａｄ ｂｏｘ03（FoxO3）に着目し、神経細胞における（１）細胞外糖濃度の変化によるＳIRT1／Ｆｏｘ03の量的調節とそのメカニズム（２）細胞外糖濃度に応答したＳIRT1／Ｆｏｘ03の局在変化（３）SIRT1／Ｆｏｘ03機能制御における細胞外糖濃度と増殖因子の相互作用について明らかにすることを目的とした。

まず、ラット神経細胞モデルPC12細胞を用いて、細胞外糖濃度の変化が両タンパク質ならびに遺伝子発現量に与える影響について解析した（細胞外糖濃度としてＨｉｇｈ ｇｌｕｃｏｓｅ［HG;22.5mM ｇｌｕｃｏｓｅ］あるいはＬｏｗ ｇｌｕｃｏｓｅ ［LG;5mM ｇｌｕｃｏｓｅ］の二つの条件を設定した）。その結果、LG条件下において、SIRT1／Ｆｏｘ03の発現量が上昇することが明らかとなった。次にSIRT1／Ｆｏｘ03の細胞内局在比を免疫染色によって調べたところ、LG条件下では核内ＳIRT1／Ｆｏｘ03の割合が増加していることが明らかとなった。このように細胞外糖濃度の変動による両タンパク質の変化は酷似していることが明らかになったが、一方、興味深いことに増殖因子による制御については両タンパク質に大きな違いが見られた。すなわち、LG条件下におけるＮｅｒｖｅ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ （NGF） 同時処理によって、SIRT1の発現量はさらに増加したが、Ｆｏｘ03の発現量は逆に抑制されることが明らかとなった。

まとめると、神経細胞において細胞外糖濃度の変動が生じるとＳIRT1とＦｏｘ03は共役して挙動変化するが、増殖因子の濃度変化が生じた場合、ＳIRT1とＦｏｘ03は個別に制御されていることが示唆された。神経細胞において、Ｆｏｘ03はＳIRT1の下流分子として働くが、SIRT1は細胞生存促進、Ｆｏｘ03は細胞死促進と異なった生理機能を持つことが知られている。以上の結果をあわせると、細胞外栄養と増殖因子はＳIRT1とＦｏｘ03を介してクロストークしながら、神経細胞の生死を統合的に制御している可能性が考えられた。

SIRT1, Fox03, Glucose

講演番号：3A41p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ A 校舎 41 会場

マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞の cholesterol 25-hydroxylase および Cyp7b1 の発現は上昇する

Ch25H and Cyp7b1 expressions in adipocyte are upregulated by interaction with macrophages

○真田 洋平[1]、山本 岳史[2]、加藤 範久[1]、西村 英紀[3]、矢中 規之[1] ([1]広島大院　生物圏科学、[2]広島大　生物生産、[3]広島大院　医歯薬学)
○Yohei Sanada[1], Takafumi Yamamoto[2], Norihisa Kato[1], Fusanori Nishimura[3], Noriyuki Yanaka[1] ([1]Hiroshima Univ, [2]Hiroshima Univ, [3]Hiroshima Univ)

〈目的〉
内臓脂肪型肥満を背景として発症するメタボリックシンドロームは，生活習慣病と深く関連している．肥満脂肪組織においては，単球･マクロファージの浸潤に伴った慢性炎症が病態形成に深く関与するが，特に脂肪細胞とマクロファージの相互作用は極めて重要な病態のシグナルと考えられている．以前，抗炎症作用を有する vitamin B6（B6）を摂取させた際の白色脂肪組織の遺伝子発現を網羅的に解析した結果， B6 の摂取によって白色脂肪組織への単球･マクロファージの浸潤が抑制されたことから，マクロファージの浸潤を特異的に抑制するモデルとして利用することを考えた．肥満モデルマウス(db/db マウス)の白色脂肪組織で発現変動する遺伝子群との比較解析を行い，肥満発症において単球･マクロファージの浸潤に関連して応答する因子群の選抜を行うことで,脂肪細胞における炎症に関連した因子群の単離を試みた.
〈方法・結果〉db/db マウスの白色脂肪組織で著しい発現上昇が認められ，単球･マクロファージの浸潤が抑制される B6 の摂取によって発現が抑制される因子群としてコレステロール水酸化酵素である cholesterol 25-hydroxylase(CH25H)，および Cyp7b1 を見出した．特に，db/db マウスの白色脂肪組織において CH25H は 4.1 倍，および Cyp7b1 は 4.5 倍発現が増加した．さらに，マウス脂肪細胞株 3T3-L1 細胞とマウス単球系 RAW264.7 細胞の共存培養を行い，活性化マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞の CH25H の発現量は 26.7 倍，および Cyp7b1 の発現量は 6.9 倍増加した．また，活性化 RAW 細胞の培養上清，および TNFαの添加においても，脂肪細胞における CH25H, および Cyp7b1 の発現量が増加した. これら二つのコレステロール水酸化酵素によって産生すると考えられる oxysterol の一つである 7α-25 dihydroxycholesterol (7α-25OHC)は, 最近，７回膜貫通型受容体 Epstein-Barr virus-induced receptor 2（EBI 2）の内在性リガンドとして見出され，B 細胞の遊走に関わることが報告された．一方，本研究において，3T3-L1 細胞に EBI2 受容体が発現しており，また骨髄細胞を M-CSF で分化誘導した後， IL-4 刺激により M2 マクロファージへ誘導した際に，EBI2 は高発現していた．現在，GC/MS 法を用いた 7α-25OHC など oxysterol の測定系を確立し，培養脂肪細胞内、および白色脂肪組織内の oxysterol 濃度の分析を行う予定であるが，今後は脂肪細胞において産生された oxysterol のマクロファージや脂肪細胞に対する影響などの生理的な意義についても検討を行う予定である．

oxysterol, adipocyte, Ebi2

講演番号：3A41p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ A 校舎 41 会場

新規酵素 GDE7 はオートタキシン活性を有し，LPA および alkyl-LPA の産生に関与する
New membrane-bound glycerophosphodiester phosphodiesterases: GDE4 and GDE7 hydrolyse lysophosphatidylcholine and lyso-PAF
工藤 尊裕[1]、大嶋 紀安[2]、Stefania Mariggio[3]、本田 絢子[1]、長野 友美[1]、加藤 範久[1]、Daniela Corda[3]、和泉 孝志[2]、○矢中 規之[1]([1]広島大院生物圏科学、[2]群馬大医、[3]National Research Council, Italy)
Takahiro KUDO[1], Noriyasu OHSHIMA[2], Stefania MARIGGIO[3], Ayako HONDA[1], Tomomi NAGANO[1], Norihisa KATO[1], Daniela CORDA[3], Takashi IZUMI[2], ○ Noriyuki YANAKA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Gunma Univ., [3]National Research Council, Italy)

glycerophosphodiesterはリン脂質の2つのacyl基が切断されることによって生じる水溶性の細胞内物質であり，phosphatidylcholineから生じるglycerophosphocholine (GroPCho)やphosphatidylinositolから生じるglycerophosphoinositol (GroPIns)などは，それぞれ浸透圧ストレス調節や,細胞増殖,細胞分化などに深く関与する細胞内シグナル伝達物質として知られている．glycerophosphodiesterの分解酵素として知られるGDE (glycerophosphodiester phosphodiesterase)ファミリーには6種類存在し，それぞれGroPChoやGroPInsを選択的に分解することで，細胞内濃度の調節を担うことが示されている．本研究ではGDEファミリーに認められる酵素活性領域のアミノ酸配列を指標にゲノム配列よりvirtualに探索し，新規酵素GDE7を単離した．GDE7は2回膜貫通構造を有し，アミノ酸配列においてGDE4と極めて高い相同性を示した．GDE7は消化管や皮膚細胞などにおいて発現し，ISHによる発現解析の結果，胃腺上皮細胞などでの発現が認められた．また，培養細胞において発現させたところ，GDE7は核周縁部の膜構造に局在した．GDE7と高い相同性を示すGDE4においても酵素活性が明らかにされていないことから，両酵素の酵素活性についての解析を行ったところ，GroPChoやGroPInsに対する分解活性が検出されず，GDEに認められる酵素活性領域と相同性を有するものの，glycerophosphodiesterの分解には関与しないと考えられた．そこで，GDE4とGDE7の酵素活性の詳細な解析を行ったところ，興味深いことに，phosphatidylcholineの2位のacyl基が切断されたlysophosphatidylcholine (LPC)に対するlysophospholipase D活性を有することで，lysophosphatidic acid (LPA)を産生し，オートタキシン様活性を有することが明らかとなった．さらに，昆虫細胞において組換えタンパク質を作製し，精製したマウスGDE4タンパク質を用いて酵素活性の確認を行った．その結果，LPCに対するlysophospholipase D活性を有し，LPAを産生し,さらに,興味深いことに,GDE4はplatelet-activating factor (PAF)のlyso体であるlyso-PAFに対してもlysophospholipase D活性を有し,alkyl-LPAを産生することが明らかとなり,GDE4,およびGDE7はLPCやlyso-PAFの代謝を担うと考えられた. alkyl-LPAもLPA受容体を介した細胞内シグナリングが報告されていることから，GDE4，およびGDE7はLPAやalkyl-LPAの新規合成系として機能することで情報伝達を担う新規酵素群としての可能性が示された.

LPA, alkyl-LPA, lysophosphatidylcholine

講演番号：3A41p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ A 校舎 41 会場

Siglec-9 によるマクロファージの機能調節
Siglec-9 Regulates Macrophage Function
○庄司 徹、西島 謙一、飯島 信司（名大院工）
○Toru SHOJI,Ken-ichi Nishijima,Shinji Iijima (Nagoya Univ.)

【背景】
シアル酸は細胞表面の糖鎖末端に付加され、細胞機能の調節に関わる重要な分子である。このシアル酸を認識するレクチンとして Siglec が知られている。我々はマクロファージに発現する Siglec-9 が LPS などの炎症誘導物質によって引き起こされるマクロファージ細胞株の炎症性サイトカイン産生を抑制することを明らかにしている。
マクロファージは炎症反応を担う M1 型と炎症抑制や創傷治癒などを担う M2 型の 2 つのフェノタイプに大別できることが知られ、実験的には IFN-γ + LPS により誘導される M1 型と IL-4 により誘導される M2 型との比較がなされている。本発表ではこれらの刺激に対して、炎症抑制活性を持つ Siglec-9 がどのような影響を及ぼすのか検討した。
【方法】
Siglec-9 を強制発現させたマクロファージ様細胞株 RAW264 を用いた。IFN-γ + LPS 及び、IL-4 で刺激した際の遺伝子発現を RT-PCR で解析した。また、グリース法により一酸化窒素（NO)の産生、ELISA により TNF-α の産生、酵素活性で生成される尿素を検出することによりアルギナーゼ活性を測定した。
【結果・考察】
M1 マクロファージのマーカーとされる iNos を解析した。LPS 単独で誘導される iNos は Siglec-9 により強く抑制された。IFN-γ + LPS で約 3 倍誘導が増強されるが、この場合も Siglec-9 は iNos を抑制した。この Siglec-9 の抑制の強さは IFN-γを加えた方が弱かった。mRNA の発現低下を反映して、Siglec-9 により NO の産生も減少していた。一方、IL-4 で誘導される M2 マーカーのアルギナーゼ I については、その mRNA の発現、タンパク質の酵素活性いずれも Siglec-9 により顕著に増加していた。また、M2 マーカーとして知られるマンノースレセプターの発現も同様に増加していた。
以上より、Siglec-9 は IFN-γ + LPS のシグナルを抑制するだけでなく、IL-4 シグナルを増強することで炎症抑制する強い活性を持つものと考えられた。

Siglec, macrophage, inflammatory

講演番号：3A41p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ A 校舎 41 会場

in vitro 実験系における腸管上皮細胞とマスト細胞の相互作用の解析
Analysis of the interaction between intestinal epithelial cells and mast cells, using *in vitro* system
○西 真名美、田中 大季、望月 鉄之祐、薩 秀夫、戸塚 護、清水 誠（東大院農）
○Manami Nishi,Daiki Tanaka,Tetsunosuke Mochizuki,Hideo Satsu,Mamoru Totsuka,Makoto Shimizu (The University of Tokyo)

【目的】腸管上皮細胞の粘膜固有層には、リンパ球や形質細胞、マクロファージ、樹状細胞、マスト細胞など様々な免疫担当細胞が分布しており、これらの免疫担当細胞と腸管上皮細胞は相互に作用し合っている。本研究では、特にマスト細胞と腸管上皮細胞の間で起こる相互作用の一端を明らかにすることを目標に、ヒト腸管上皮細胞（Caco-2）とヒト未分化マスト細胞（HMC-1）を用いた *in vitro* 実験での解析を行った。
【方法】2週間培養し分化させたCaco-2の培養上清(C-CM)を回収し、C-CM中でHMC-1を培養した。8日間培養後、HMC-1の形態を観察するとともに、マスト細胞の分化マーカーであるβ-tryptase、腸管への遊走に関わるケモカイン受容体であるCXCR2、細胞接着分子であるβ7 integrinのmRNA発現をリアルタイムPCRで調べた。またTrans-wellを用いて透過性膜上にCaco-2を2週間単層培養したのち、その基底膜側にHMC-1を播種し共培養した。共培養開始48時間後のCaco-2細胞層側の変化を経上皮電気抵抗値（TER）とLDH放出率により測定した。
【結果】C-CM 中で培養した HMC-1 では、細胞質顆粒の数が増加している細胞や脱顆粒を起こしているような形態の細胞が多く観察された。またβ-tryptase、CXCR2、β7 integrin のmRNA 発現上昇が見られた。NGF 中和抗体を培地中に添加することにより、CXCR2、β7 integrin ではともにmRNA 発現上昇の抑制が見られなくなったが、β-tryptase のmRNA 発現上昇は顕著に抑制された。以上のことから、C-CM 中に存在する NGF が HMC-1 のβ-tryptase 発現上昇を誘導している可能性が示唆された。一方 Caco-2 と HMC-1 の複合培養により Caco-2 細胞層の TER 値が低下し、LDH 放出率が増加するなど、Caco-2 細胞層の損傷が誘導されていることが示された。tryptase 阻害剤であるプロタミンを添加することにより、TER 値、LDH 放出率ともに回復が見られたことから、本障害には tryptase が関わっている可能性が示唆された。過敏性腸症候群（IBS）では腸管でのマスト細胞の活性化が観察されているが、マスト細胞 - 腸管上皮細胞間の相互作用は IBS の病態に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。

intestinal epithelial cell, mast cell

講演番号：3A41p17
講演日時、会場：3 月 26 日 17:12～ A 校舎 41 会場

細胞を用いた酵母エキスの辛味増強効果の評価

The evaluation of spicy taste enhancement by yeast extract using cell assay

○加藤 直樹、指原 浩一、加藤 史佳、佐見 学、北川 泰（アサヒグループ HD（株））
○Naoki KATO,Koichi SASHIHARA,Humika KATO,Manabu SAMI,Yasushi KITAGAWA (ASAHI GROUP HD,LTD.)

【目的】

グルタミン酸を高含有した酵母エキス（以下 HG）には、グルタミン酸によるうま味の付加・増強効果の他、辛味やスパイス感などの増強効果が官能検査で捉えられた。しかし、この辛味の増強効果を官能検査で客観的に評価・測定することは難しい。

そこで本研究では、ヒト生体内での辛味受容過程をヒト培養細胞で再現し、辛味刺激受容によって発生するシグナルを検出し数値化することにより、ヒトの感覚に近い形で、辛味刺激・辛味増強効果を客観的に捉えられる系を構築することを目的とした。

【方法・結果】

唐辛子の辛味成分カプサイシンによる辛味刺激は、感覚神経自由終末に局在する Transient Receptor Potential Channel V1(TRPV1)によって受容されることが知られている。演者らは、まずガラスベースディッシュ上で培養した HEK293T 細胞（ヒト胎児腎臓由来培養細胞）に、Lipofectamine2000(Invitrogen 社)を用いてヒト発現ベクターに組み込んだ TRPV1 遺伝子を導入した。この細胞を灌流条件下に置いて、HG を添加したカプサイシン溶液を流した場合、カプサイシン単独の時よりも辛味刺激による細胞応答が強いという官能特性と合致する結果が得られた。以上より、今回構築した細胞による評価系は、HG による辛味増強効果を評価できる系であることが明らかとなった。

cell assay, spicy taste, yeast extract

講演番号：3A41p18
講演日時、会場：3 月 26 日 17:24～ A 校舎 41 会場

CDK ファミリーPCTK3 の活性化因子の同定

Identification of an activator of PCTK3, a member of the CDK family

○松田 真弥、篠倉 悠久、辻 明彦、湯浅 恵造（徳島大院 STS 研究部）
○SHINYA MATSUDA,TOWA SASAKURA,AKIHIKO TSUJI,KEIZO YUASA (The University of Tokushima)

PCTAIRE kinase 3 (PCTK3)/cyclin-dependent kinase 18 (CDK18)は脳や精巣で高度に発現している Ser/Thr キナーゼであり、CDK ファミリーに属している。CDK ファミリーは、cyclin との結合や CDK-activating kinase などのプロテインキナーゼによるリン酸化によって活性制御を受け、細胞周期の進行をはじめとした様々な細胞機能の制御に関与している。PCTK3 は有糸分裂後のニューロンでの発現が認められることから、CDK ファミリーに属するにもかかわらず、細胞周期の制御以外の生理機能を発揮することが推測されている。しかしながら、PCTK3 の活性制御因子は未だ同定されておらず、その生理機能は明らかにされていない。ごく最近、PCTK3 と最も配列相同性が高い PCTK1 が cyclin Y によって活性化され、精子形成に関与することが報告された。このことから、PCTK3 も同様に cyclin Y をはじめとする cyclin ファミリーによって活性化する可能性が考えられた。そこで、本研究では、PCTK3 の生理機能を明らかにするために、その活性化因子の同定を試みた。初めに、HEK293T 細胞に Strep-tag PCTK3 を遺伝子導入し、プルダウン実験を行った。各種抗 cyclin 抗体を用いたウェスタンブロッティングによる解析の結果、PCTK3 結合タンパク質として cyclin A 及び cyclin E1 を同定した。そこで、次に、GST-PCTK3 と FLAG-cyclin A2、E1、Y をそれぞれ共発現させ、GST プルダウンアッセイによる結合解析を行った。PCTK3 は cyclin A2 及び E1 と結合することが確認できたが、cyclin Y との結合は認められなかった。さらに、cyclin A2、E1 との結合による PCTK3 の活性化への影響を調べるために、CDK の基質の 1 つである retinoblastoma (Rb)タンパク質を基質として *in vitro* キナーゼアッセイを行った。PCTK3 は cyclin A2 依存的に Rb タンパク質をリン酸化したのに対して、cyclin E1 による活性化は認められなかった。また、他の CDK ファミリーの kinase-dead 変異体を基に作製した PCTK3 K150R 変異体では、野生型と比較して cyclin A2 との結合に影響は見られなかったが、Rb タンパク質のリン酸化はほぼ完全に消失したことから、このリン酸化が cyclin A によって活性化される他の CDK ファミリーによるものでなはなく PCTK3 活性由来であることが考えられた。以上の結果より、PCTK3 は cyclin A2 によって活性化されることが明らかとなった。cyclin A2 は細胞周期の制御因子であり、核内で主に Cdc2 や CDK2 を活性化することが知られている。一方で、cyclin A2 は細胞質と核の間を移行することが報告されており、細胞質での cyclin A2 の役割は十分な解析がなされていない。最近、cyclin A2 が細胞周期以外の生理機能を有することが示唆されており、PCTK3 は細胞質に局在していることから、細胞質での cyclin A2 の結合パートナーとして機能する可能性が考えられた。

CDK, cyclin, signal transduction

講演番号：3A41p19
講演日時、会場：3 月 26 日 17:36～ A 校舎 41 会場

メラノサイトの機能に影響を及ぼすアーユルヴェーダハーブの探索
Screening of ayurvedic plants that affect melanocyte function
○三木 健輔[1]、粕谷 裕樹[1]、モハマド ナジール ホサイン[1]、山下 律郎[2]、藤井 道彦[1]、鮎沢 大[1]([1]横浜市大・生命ナノ、[2]（株）SLH BCL カンパニー)
○Kensuke MIKI[1], YUKI KASUYA[1], Hossain MOHAMMAD Nazir[1], Ritsuo YAMASHITA[2], Michihiko FUJII[1], DAI AYUSAWA[1] ([1]Yokohama City Univ., [2]SLH BCL COMPANY)

メラノサイト（色素細胞）は表皮最下層の基底層に存在し、紫外線など外的刺激を受けるとメラニンを産生する。メラニンは表皮細胞の損傷を防ぐ働きをもつが、シミの原因ともなる。またメラノサイトの機能は髪の色にも深い関係があり、加齢などによって機能が弱まるとメラニンが産生されなくなり、白髪になると考えられている。そのため、メラノサイトの機能制御は、色素沈着や白髪予防に重要である。

そこで我々は、世界最大の植物利用学であるアーユルヴェーダに着目し、種類のハーブ抽出液について、メラノサイトの増殖やメラニン合成能に影響を与えるハーブの探索を行った。専用培地を含むシャーレに細胞を植え込み、ハーブエキスを適当量添加して 1-2 週間培養した。その結果、細胞の増殖やメラニン合成能に効果を示すハーブをいくつか見出した。色素沈着や白髪予防への応用が期待される。

Melanocyte, Melanin, Herb

講演番号：3A41p20
講演日時、会場：3 月 26 日 17:48～ A 校舎 41 会場

準致死量の界面活性剤によるヒト正常細胞の未成熟老化の誘導機構
Molecular Basis for Premature Senescence Induced by Surfactants in Normal Human Cells
○山上 義巳、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大（横浜市大・ゲノムシステム）
○YOSHIMI YAMAKAMI,KENSUKE MIKI,MICHIHIKO FUJII,DAI AYUSAWA (Yokohama City Univ.)

準致死量の界面活性剤はヒト正常細胞において未成熟老化を誘導する。その作用機構を解明するために研究を行った。ヒトの正常細胞等を用い、界面活性剤が誘導する未成熟老化において種々の阻害剤がどのような影響を及ぼすかを調べた。MAPK 阻害剤の中で p38 の阻害剤は NP-40 により誘導される老化を抑制したが、ERK1/2 や JNK の阻害剤は何の効果も示さなかった。

今回、他の界面活性剤としてオレイン酸及び SDS について。MAPK 阻害剤の及ぼす未成熟老化への影響を調べた。その結果、NP-40 と同様に p38 の阻害剤のみが未成熟老化を抑制した。

またウェスタンブロット解析により、界面活性剤による未成熟老化の際に MAPK の酵素がどのように活性化されているかを調べた。NP-40 による老化の際には JNK が特に活性化されており、p38 も強く活性化されていた。ERK もある程度活性化されていた。オレイン酸が誘導する老化においても、同様に JNK や p38 を中心に活性化されていた。JNK は p38 よりも強く活性化されていたが、阻害剤を用いた実験では特に細胞の増殖に対する効果を示さなかった。このことより、細胞老化の際、増殖の停止に関与しているのは p38 と思われ、JNK は細胞の増殖の停止ではなく、それ以外の作用を細胞に及ぼしていたと考えられる。

surfactant, oleic acid, cellular senescence

講演番号：3A44a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ A 校舎 44 会場

シロイヌナズナにおけるリン酸欠乏とストリゴラクトンの関係
Relationships between strigolactone and phosphate starvation signaling in arabidopsis
○伊藤 晋作[1]、野副 朋子[2]、石毛 太一郎[3]、志波 優[3]、今井 美咲[3]、中西 啓仁[2]、西澤 直子[2]、浅見 忠男[4]、矢嶋 俊介[1]（[1]東農大バイオ、[2]東大院農生科農学国際、[3]東農大生物資源ゲノム研究センター、[4]東大院農生科応生化）
○Shinsaku ITO[1], Tomoko NOZOE[2], Taichiro ISHIGE[3], Yu SHIWA[3], Misaki IMAI[3], Hiromi NAKANISHI[2], Naoko NISHIZAWA[2], Tadao ASAMI[4], Shunsuke YAJIMA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Univ. of Tokyo, [3]Tokyo Univ. of Agric., [4]Univ. of Tokyo)

【目的】
リンは植物の生長に必須の栄養素であり、リンを獲得するために植物は様々な適応戦略（根毛形成の促進、リン酸トランスポーターの発現上昇、酸性ホスファターゼの分泌の促進等）を発達させてきた。我々はこれまでにこれらの戦略の一部に植物ホルモンであるストリゴラクトンが関与していることを明らかにしており、今回ストリゴラクトンとリンの獲得戦略との間の分子機構を明らかにするためにシロイヌナズナにおいて RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った。

【結果】
これまでに Mashiguchi らが播種後２週間のシロイヌナズナ seedling を用いてマイクロアレイ解析を行い、いくつかのストリゴラクトン応答遺伝子を同定したものの、その中には栄養応答遺伝子は含まれていなかった。今回我々は栄養吸収に関連する遺伝子を多く得るため、根をサンプルとして用いることとした。播種後３週間のシロイヌナズナ野生型株、ストリゴラクトン生合成変異体 *max1-1* の根を用いて RNA-seq 解析を行った結果、複数のリン酸トランスポーターやホスファターゼ、リン酸欠乏応答遺伝子の発現量が変化していることを見いだした。これまでに我々はストリゴラクトン処理によりリン酸欠乏応答と同様の形態が誘導されること、また地上部におけるリンの含有量が増加することを見いだしており、ストリゴラクトンがリン酸欠乏応答遺伝子の一部の発現を制御することでこれらの現象が引き起こされている可能性が考えられた。また、この他にも鉄等の応答遺伝子の発現が複数変化していたことから、現在これらの栄養とストリゴラクトンの関連性の解析も行っており同時に発表する予定である。

strigolactone, phosphate starvation

講演番号：3A44a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ A 校舎 44 会場

ストリゴラクトン生合成阻害剤を利用したイネの枝分かれ抑制変異体の探索

Screening of rice low tillering mutants by strigolactone biosynthesis inhibitor

○山上 大智[1]、福井 康祐[1]、伊藤 晋作[1]、中村 英光[1]、市川 裕章[2]、羽方 誠[2,3]、浅見 忠男[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]農業生物資源研究所、[3]中央農研・北陸)
○Daichi Yamagami[1], Kousuke Fukui[1], Shinsaku Ito[1], Hidemitsu Nakamura[1], Hiroaki Ichikawa[2], Makoto Hakata[2,3], Tadao Asami[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]National Institute of Agrobiological Sciences, [3]National Agricultural Research Center)

【背景と目的】

ストリゴラクトンは、アフリカや地中海沿岸において農作物に大きな損害を与えているストライガ属などの根寄生植物の発芽刺激作用を示す化合物として発見された。近年、植物と広く共生してリンなどを植物に供給するアーバスキュラー菌根菌（AM 菌）の菌糸分岐誘導作用を持つ他、植物の枝分かれを抑制することが発見されたため新しい植物ホルモンとして認識されるようになり、生合成や生理作用について活発に研究が行われているが、ストリゴラクトンの生合成・シグナル伝達機能に関わる遺伝子はまだ多くが未同定のままである。そこで FOX ラインとストリゴラクトン生合成阻害剤を組み合わせた変異体スクリーニング法を考案し、新しいストリゴラクトン関連変異体の探索、原因遺伝子の同定とその機能解析を行うことにした。

【方法及び結果】

我々はこれまでにトリアゾール基を持つストリゴラクトン生合成阻害剤 TIS13 を創製し報告してきた。TIS13 はイネの根や根浸出液に含まれる主なストリゴラクトンである 2'-*epi*-5-deoxystorigol の内生量を減少させ、分げつを伸長させる効果を有する。本研究では、TIS13 を与えてイネ内生ストリゴラクトンのレベルを落とし、その形態を無処理のイネと比較することで、ストリゴラクトン情報が過剰状態の変異体の選抜を容易にするというスクリーニング戦略をとり変異体探索を行った。具体的には、完全長 cDNA 過剰発現変異体ラインである FOX ラインに TIS13 を処理した状態においても、分げつの伸長が抑制されている変異体をスクリーニングするという手法を用いた。

スクリーニングの結果、複数の候補ラインを選抜することができたため、本発表ではこれら各ラインの特徴について報告する。また、候補ラインの中にはジベレリン応答性転写因子をコードする遺伝子が高発現状態になっているものなどいくつかの先行研究が存在するラインも含まれていたため、候補ラインに関係するそれら因子とストリゴラクトンとの関係性も調べた。

strigolactone, plant hormone, branching

講演番号：3A44a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ A 校舎 44 会場

ストリゴラクトンシグナル因子 D14 による加水分解と植物の分げつ抑制活性の関係
Comparison of the structure-activity relationships of SL D-ring derivatives between for hydrolysis by D14 and for inhibition of shoot branching
○戸塚 直哉、加藤 雄太、侯 峰、石 玄、宮川 拓也、福井 康祐、中村 英光、田之倉 優、浅見 忠男（東大院・農生科）
○Naoya Totsuka,Yuta Kato,Feng Hou,Xuan Shi,Takuya Miyakawa,Kosuke Fukui,Hidemitsu Nakamura,Masaru Tanokura,Tadao Asami (Grad. Sch. Agr Life Sci., Univ. Tokyo)

【背景と目的】
ストリゴラクトン(SL)は、根寄生植物の種子発芽誘導活性、アーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導活性をもつ 4 環性のアポカロテノイドであり、近年になって、植物の枝分かれを抑制する植物ホルモンであることが明らかになった。SL の受容体についてはこれまで同定されていなかったが、最近になり、ペチュニアの SL シグナル関連タンパク質 DAD2 が、SL シグナルの中心となるタンパク質である PhMAX2A と SL 依存的に結合すること、また DAD2 が合成 SL である GR24 を加水分解することが報告され、DAD2 の機能と SL シグナルの関係に注目が集まっている。そこで、イネにおける DAD2 のオーソログである D14 を用いて、種々の化合物の D14 による被加水分解性と SL 活性の関係について研究を行った。

【方法と結果】
SL は加水分解により、ABC 環部分と D 環の結合が切断されると考えられているが、その生理的意義は不明である。そこでこの点を解明するために、D14 による加水分解反応に対する各種 SL の反応性と生理活性の関係についての関係を調べることにした。まず部分構造として D 環およびその類似構造をもつ化合物を合成し、D14 による被加水分解性を LC-MS/MS を用いて調べた。化合物としては、GR24、 GR7 や SL の加水分解の結果生じる水酸化された D 環部分である 5-hydroxy-3-methylfuran-2(5*H*)-one のアセチル化体、ベンゾイル化体、3, 5-ジメトキシベンゾイル化体、アントラセン-9-カルボニル体について検討を行った。植物に対する SL 活性は、イネ SL 生合成変異体 *d10* に化合物処理した際の第 2 分げつの伸長抑制活性によって評価した。また、D14 の他のタンパク質に対する SL 依存的な結合についても、酵母 two-hybrid 法を用いた検討を行った。その結果、エノールエーテル結合を介して D 環が結合している SL 誘導体では、被加水分解活性と生理活性が符号していること、アシル化体ではアシル基の種類によりばらつきがあることが明らかとなってきた。この結果は SL 類縁体の活性発現機構が複数存在していることを示唆している。D 環部分が直接フェノールと結合したデブラノン誘導体についても同様の検討を行う予定である。

strigolactone, D14, structure-activity rerationships

講演番号：3A44a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ A 校舎 44 会場

枝分かれ抑制におけるストリゴラクトンとジベレリンのクロストーク

Cross-talk between strigolactone- and gibberellin-signaling pathways in inhibition of shoot branching

○中村 英光[1]、伊藤 瑛海[2]、Park Seung-Hyun[1]、伊藤 晋作[1]、福井 康祐[1]、吉澤 真人[1]、侯 峰[1]、石 玄[1]、宮川 拓也[1]、上田 貴志[2]、田之倉 優[1]、浅見 忠男[1] ([1]東大院農生科、[2]東大院理)
○Hidemitsu Nakamura[1], Emi Ito[2], Seung-Hyun Park[1], Shinsaku Ito[1], Kosuke Fukui[1], Masato Yoshizawa[1], Feng Hou[1], Xuan Shi[1], Takuya Miyakawa[1], Takashi Ueda[2], Masaru Tanokura[1], Tadao Asami[1] ([1]Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)

【背景と目的】ストリゴラクトン（SL）は、収量を大きく左右するために農業上重要な形質となっている枝分かれを抑制する植物ホルモンであるが、世界の様々な地域で農作物に甚大な被害を及ぼしている根寄生植物の発芽誘導物質や、作物の根からの無機栄養物質の吸収を助けるアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導物質としても機能することが知られている。そのため、SL の受容およびシグナル伝達機構を解明することは農業上非常に重要な課題であるが、まだまだ未解明な点が多い。一方、ジベレリン（GA）も枝分かれの制御に関与しているという報告があるが、その機構も不明である。我々は、SL の受容・シグナル伝達に重要な働きをするα/β加水分解酵素 D14 と GA 伝達において中心的な働きを行う DELLA タンパク質に着目し、枝分かれ抑制作用における二つの植物ホルモンシグナル伝達のクロストークの解明を試みた。
【方法及び結果】イネ D14 とイネにおける唯一の DELLA タンパク質である SLR1 とが相互作用するかどうかを酵母 2 ハイブリッド(Y2H)系により検討したところ、枝分かれ抑制活性をもつ SL 依存的に D14 と SLR1 が相互作用することが判明した。また蛍光タンパク質再構成法（BiFC 法）によりこの相互作用は植物細胞の核内で起こっていることが観察され、さらに、Y3H 系による解析から、GA 受容体 GID1-GA-SLR1 複合体の形成と D14-SL-SLR1 複合体の形成は競合することが示唆された。以上の結果から、SL シグナルと GA シグナルが D14 と DELLA タンパク質の相互作用を介してクロストークしていることが示唆された。現在、この相互作用の生理的意義について検討を行っているとともに、Y2H 系を用いた点変異導入やデリーション解析、SL の構造活性相関解析などにより、D14-SL-SLR1 複合体の形成機構についても検討を行っているので合わせて紹介したい。

strigolactone, gibberellin, plant hormone

講演番号：3A44a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ A 校舎 44 会場

ストリゴラクトンにより誘導される転写因子の光応答シグナルにおける機能の解析
Characterization of transcription factors induced by GR24 treatment
○永井 優子[1]、長江 未有[1]、増口 潔[2]、中村 英光[1]、浅見 忠男[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]理研・PSC)
○Yuko NAGAI[1], Miyu NAGAE[1], Kiyoshi MASHIGUCHI[2], Hidemitsu NAKAMURA[1], Tadao ASAMI[1] ([1]Dept. of Appl. Biol. Chem.,Univ. of Tokyo, [2]RIKEN,PSC)

【背景と目的】ストリゴラクトンは、植物体内で枝分かれを抑制する新規植物ホルモンである。植物ホルモン活性以外の他の生理作用として、根寄生植物の発芽誘導活性や、アーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導活性が知られている。枝分かれが多くなる形態を示すシロイヌナズナ *max2* 変異体の解析から、植物体内におけるストリゴラクトンの情報伝達には、F-box タンパク質である MAX2 が関わることが報告されている。しかし、*max2* 変異体は枝分かれが多くなる形質の他にも様々な形態を示すことから MAX2 は枝分かれ以外の制御にも関わっていると推測されている。そこで MAX2 を経由してストリゴラクトンが示す多機能性の機構を解明するために、MAX2 下流の情報伝達因子について追究する必要があると考え、ストリゴラクトンの新しい生理機能と、そこで働く因子の解明を目的として、ストリゴラクトン応答性遺伝子の解析を行った。

【方法及び結果】我々はこれまでに、マイクロアレイを用いて、シロイヌナズナにおいてストリゴラクトン処理により発現が上昇する 31 の遺伝子を見出し、また、それらの遺伝子が MAX2 の下流で働くことも確認している。現在、これらの遺伝子を過剰発現、あるいは機能抑制するシロイヌナズナを作製、もしくは入手し、その表現系の解析を行っている。これらの過剰発現体の形態を野生型株と比較したところ、胚軸の長さなど、光応答に関係する形質の変化が見られたことから、この３つの転写因子は、光応答に関連する遺伝子であることが推測された。興味深いことに、そのうち 2 つは光シグナルを正に制御する転写因子で、１つは負に制御する転写因子であると考えられた。そこで我々は、これら転写因子の発現のストリゴラクトン誘導性と光応答性を詳細に解析するとともに、これらがストリゴラクトンの下流で光応答に関係する形質を制御するという推察のもと、過剰発現体・機能抑制体の形態や光関連遺伝子の応答について解析している。本発表ではこれらの解析から推定されるストリゴラクトン誘導性転写因子の機能について考察する。

Strigolactone, transcription factor, Arabidopsis

講演番号：3A44a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ A 校舎 44 会場

シロイヌナズナの根毛伸長におけるストリゴラクトンミミック debranone の作用解析

Analysis of strigolactone mimic debranones in root hair of *Arabidopsis*

○福井 康祐、浅見 忠男（東大院農）
○Kosuke Fukui,Tadao Asami (The Univ. of Tokyo)

【背景】

Debranone はイネストリゴラクトン生合成変異体 *d10* を用いた化合物スクリーニングから見出された、天然型より単純な構造を有するストリゴラクトンミミックである。本化合物群はフェノールとフラノン環から容易に合成可能な化合物であり、植物体内でストリゴラクトン情報伝達経路を介して低濃度で枝分かれを抑制する。しかし根寄生植物である *Striga* 属や *Orobanche* 属の種子発芽誘導に関しては、既存のストリゴラクトン類と比較して著しく高い濃度が必要であった。そこでこの特性に着目して debranone 類の構造活性相関について追究したところ、フェニル環上の官能基や官能基の位置を変えることで活性が変化し、枝分かれ抑制活性のみが強い化合物や、根寄生植物の種子発芽誘導活性のみが強い化合物を見出すことに成功している。

【目的】

ストリゴラクトンの新たな生理作用として、シロイヌナズナの根毛伸長促進活性が報告されたことから（Kapulnik et al., 2011, Planta)、debranone の根毛伸長促進活性と枝分かれ抑制活性の相関について調べることにした。

【方法】

1/2MS 培地上に播種したシロイヌナズナ種子を 4 ℃にて二日間春化処理し、その後 22 ℃にて 5 日間生育した。生育したシロイヌナズナの芽生えを化合物含有 1/2MS 培地上に移植し、4 日後の根毛の長さを測定した。根毛の伸長促進作用を相対的に評価するため、汎用性の高いストリゴラクトンアナログである GR24 との比較を行った。

【結果・考察】

枝分かれ抑制活性が高い debranone 類の根毛伸長促進活性は、いずれも GR24 と比較して低かった。一方、枝分かれ抑制活性は弱いが根寄生植物の種子発芽誘導活性を有する debranone 中に、GR24 より強く根毛の伸長を促進する化合物を見いだすことができた。この結果より、植物体内で枝分かれ抑制に関わるストリゴラクトン情報伝達因子と、根毛伸長促進に関わる情報伝達因子が受容の段階で異なる可能性が示唆された。そこで、ストリゴラクトンの受容体であると予想されている D14 タンパクのホモログをコードする遺伝子が欠損した変異体等を用いて解析を行った結果、*d14* 変異体が最も化合物に対する感受性が低く、その他の変異体では顕著な感受性の低下は観察されなかった。

strigolactone, root hair, d14

講演番号：3A44a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ A 校舎 44 会場

植物細胞分裂における C24 エチルステロールの生理機能の解明
Studies on essential roles of C24-ethylsterol in plant cell division
○中本 雅俊、太田 大策（大阪府大院生命環境）
○Masatoshi NAKAMOTO,Daisaku OHTA (Life and Envi, Osaka Pref Univ)

植物が産生するステロールはステロール側鎖 C24 位のアルキル化修飾が異なる C24 メチルステロールと C24 エチルステロールに大別される．C24 位のアルキル化反応には 2 種類の S-アデノシルメチオニン依存のメチル基転移酵素が関与する．すなわち第一段階の反応は酵母など真核微生物にも保存された SMT1 が反応を触媒し，C24 メチルステロールが生合成される．第 2 段階は植物に特異的な SMT2 および SMT3 が反応を触媒し，1 段階目の反応で付加されたアルキル基炭素へのメチル基付加によって C24 エチルステロールが生合成される．本研究では，植物に特異的な C24 エチルステロールが担う生理機能解明を目的とし，シロイヌナズナの *SMT2* と *SMT3* の二重変異体（*smt2-smt3*）を作出した．*smt2-smt3* 変異体は極度な生育遅延，根の発達阻害，子葉維管束の発達異常などの多様な異常表現型を示した．またこれらの異常組織では，細胞の巨大化や細胞整列の撹乱など細胞形態に異常が見られた．そこで *smt2-smt3* 変異体において DR5:GUS レポーター，PIN2-GFP 融合タンパク質を発現させオーキシン局在と輸送の観察を行った．根の DR5:GUS レポーター遺伝子発現の結果から，*smt2-smt3* 変異体では根端部での著しいオーキシン局在性の異常が示唆された．また，PIN2-GFP タンパク質局在性も部分的な異常が観察された．すなわち，C24 エチルステロールの欠損による細胞分裂と組織形成の異常が原因となって PIN2-GFP タンパク質の正常な局在がかく乱され，その結果，オーキシン輸送にも影響が及んだと推察された．そこで，アクチン結合タンパク質-GFP，およびチューブリン-GFP 融合タンパク質を発現させ，細胞骨格構造の比較観察を行った．さらに，これらの GFP 発現系統から単離したプロトプラストを培養し細胞分裂を観察した．*smt2-smt3* 変異体におけるアクチン結合タンパク質-GFP，およびチューブリン-GFP 発現系統における根組織には細胞骨格の配向性に異常が認められた．また，*smt2-smt3* 変異体では根端部の細胞で細胞分裂段階の細胞が多数観察された．そこで，チューブリン-GFP 発現系統からプロトプラストを調製し細胞分裂の観察を行った．その結果，野生株と比較して *smt2-smt3* 変異体では細胞質分裂期の細胞の増加が認められた．また，*smt2-smt3* 変異体では細胞質分裂期に分裂面に形成され，細胞板形成の足場を構築するフラグモプラストの形態異常が観察されたことから，細胞質分裂の遅延あるいは細胞板形成の停滞が起こっていると考えられた．さらに，このプロトプラスト培養培地に C24 エチルステロールを添加することにより，細胞質分裂期の細胞数の増加が回復した．これらの結果から，植物に特異的な C24 エチルステロールは，正常な細胞分裂に必須であると考えられた．

plant sterol, cell division, cytoskeleton

講演番号：3A44a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ A 校舎 44 会場

ブラシノステロイド生合成阻害剤 Brz 耐性突然変異体群 *bil* 原因遺伝子による情報伝達制御の分子機構と応用展開

Molecular mechanism for cellular development of brassinosteroid signaling mutants *bil*

○中野 雄司[1,5]、山上 あゆみ[1]、嶋田 勢津子[1]、宮地 朋子[1,3]、森 昌樹[4]、長田 裕之[1]、Joanne Chory[2]、浅見 忠男[3]（[1]理研・基幹研、[2]Salk Inst.、[3]東大院・農生科、[4]農業生物資源研、[5]JST-CREST）

○Takeshi Nakano[1,5], Ayumi Yamagami[1], Setsuko Shimada[1], Tomoko Miyaji[1,3], Masaki Mori[4], Hiroyuki Osada[1], Chory Joanne[2], Tadao Asami[3] ([1]RIKEN ASI, [2]Salk Inst., [3]Univ.Tokyo, Agri., [4]NIAS, [5]JST-CREST)

【目的】ブラシノステロイドは発生・成長・生殖などの植物生長の様々な過程で重要な生理機能を発現している。特に、初期成長期と栄養成長期における、ブラシノステロイド欠損状況によって促進される光形態形成や葉緑体発達の制御機構は、ブラシノステロイド生理活性の大きな特徴の一つである。本研究は、ブラシノステロイド生合成阻害剤Brzによる形態変化を指標として変異体を単離する化学生物学（ケミカルバイオロジー）を用いることにより、未解明な部分が多く残るブラシノステロイド細胞内情報伝達機構の解明を試み、その総体として植物の栄養成長期制御の分子機構を解明することを目的としている。

【方法と結果】暗所 Brz 存在下において発芽した野生型 *Arabidopsis* は暗所下ながら胚軸が矮化し子葉が開く、暗所光形態形成を示す。この条件下において光形態形成を示さない胚軸徒長形質 *bil* (*Brz-insensitive-long hypocotyl*)変異体は、ブラシノステロイド情報伝達の活性型突然変異体であると考え、第一に単離した EMS 変異 *bil1* に続いて、Fast Neutron 変異種子から半優性形質の *bil5* を単離した。この *bil5* は、細矮性 slender dwarf 様の特徴的な形質を示し、細胞生物学解析により、維管束数が増加しながら、維管束形成細胞数は減少する細胞分化への関与が明らかとなった。さらに、fine mapping により、新規遺伝子 ORF 内および隣接類縁遺伝子のイントロン領域の脱メチル化変異とそれに伴う当該両遺伝子の高発現化が変異原因であることが明らかになった。

続いて、遺伝学解析、生化学解析、およびブラシノステロイド応答性遺伝子群の発現解析等により、BIL5 は、ブラシノステロイド情報伝達の主要経路とされる受容体 BRI1 と転写因子 BES1, BIL1/BZR1 の間に位置づけ得ると考察している。さらに、類似の Brz 耐性変異体 *bil4* や Brz 高感受性変異体 *bss1* の解析も行っている。

また、ブラシノステロイドは器官伸長の活性化や病害抵抗性の向上など、総じて成長に促進的に作用することが生理学的研究により明らかになっている。アラビドプシス *bil* 変異体で得られている遺伝子群は多くが機能獲得型の変異体であるため、アラビドプシス由来 *bil* 変異体を直接に導入することによっても、それらの有用形質をイネなどの実用化植物に付与することが出来ると考え、試行を開始した。第一に、この *bil* 遺伝子についてイネに導入した *bil* 形質転換イネにおける一株当たりの増収効果、バイオマス増大効果の解析を行っている。さらに、マメ科のミヤコグサに導入した場合の虫害耐性機能の付与についても紹介したい。

Plant Hormone, Brassinosteroid, Signaling

講演番号：3A44a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ A 校舎 44 会場

ブラシノステロイド不活性化に関わるシトクロム P450 酵素 CYP72C1 の機能解明
Functional characterization of CYP72C1 involved in brassinosteroid catabolism

○佐原 瑞穂[1]、水谷 正治[2]、渡辺 修治[3]、大西 利幸[4]([1]静大・農、[2]神大院・農、[3]静大院・創造、[4]静大・GRL)
○Mizuho Sahara[1], Masaharu Mizutani[2], Naoharu Watanabe[3], Toshiyuki Onishi[4] ([1]Facul. Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad.School agric., Kobe Univ., [3]Grad.School Sci. Technol., Shizuoka Univ., [4]GRL, Shizuoka Univ.)

【目的】ブラシノステロイド（BR）は、伸長促進作用や発芽促進作用などの成長調節作用をもつ植物ステロイドホルモンの一つである。これまでに BR 生合成に関与する酵素遺伝子や BR 生合成中間体について多くの知見が報告されている一方で、BR 不活性化機構については分子生物学的、酵素学的解析についての報告は少ない。2005 年、アクティベーションタギングラインから矮性を示す突然変異体（*chi2*/*sob1*/*shk-1*）が選抜され、その原因遺伝子は一原子酸素添加酵素シトクロム P450 の一つである *CYP72C1* であることが明らかにされた（Nakamura *et al.*, 2005, Turk *et al.*, 2005, Takahashi *et al.*, 2005)。突然変異体 *Chi2* の BR 内生量分析の結果、生理活性の高い BR であるブラシノライド、カスタステロン、さらにその生合成上流 BR である 6-デオキソカスタステロン（6-deoxoCS）が野生株に比べて著しく減少していた。これらの BR の中でも特に 6-deoxoCS は野生株の内生量（3396 ng/g FW）に比べて *chi2* の内生量（19 ng/g FW）が 1/170 以下に減少していたことから、CYP72C1 の基質は 6-deoxoCS であると推定され、酵素機能の研究が進められてきた。しかし、CYP72C1 の酵素反応代謝物の構造は未同定であり、その酵素機能は未だ明らかにされていない。そこで本研究では CYP72C1 の酵素学的機能解明を目的として、CYP72C1 の酵素反応代謝物の構造決定に取り組んだ。

【方法】バキュロウィルス-昆虫細胞発現系によりシロイヌナズナ由来 CYP72C1 酵素を発現した。発現酵素に一酸化炭素を添加し、一酸化炭素結合型酵素の分光学的解析を行った。その結果、発現した CYP72C1 酵素が活性型 P450 酵素であることを確認した。次に、得られた CYP72C1 と NADPH-シトクロム P450 還元酵素、基質に 6-deoxoCS を用いて酵素反応を行った。酵素反応代謝物を酢酸エチルで抽出した後、フェナントレンボロン酸で蛍光誘導体化し、HPLC を用いて分析した。

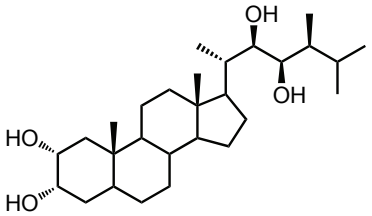


図　6-deoxoCS

【結果】NADPH 無添加のコントロール（非酵素反応処理）区のピークと比較して、酵素反応処理区に 3 本の酵素代謝物由来と考えられるピークを検出した。本研究室ではこれまでに 6-deoxoCS が CYP72C1 によりはカルボン酸に酸化されることを推定しており、これらの 3 本のピークは 6-deoxoCS が CYP72C1 により酸素原子が挿入された水酸化体、アルデヒド体、カルボン酸体であると推定した。

brassinosteroid, cytochrome P450, CYP72C1

講演番号：3A44a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ A 校舎 44 会場

オーキシン・ブラシノステロイド信号伝達同時制御剤の探索と生理機能
Screening of novel compounds regulating auxin and brassinosteroid response
○ジャルンサンティ ナイヤネート[1]、中嶋 正敏[1]、尹 禎敏[1]、大谷 征史[1]、Park Seung-Hyun[1]、林謙一郎[2]、浅見 忠男[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]岡山理大・生物化学)
○ NAIYANATE JAROENSANTI[1], Masatoshi Nakajima[1], Jung-Min Yoon[1], Masato Otani[1], Seung-Hyun Park[1], Ken-ichiro Hayashi[2], Tadao Asami[1] ([1]Dept.Appl.Biol.Chem.,Univ.of Tokyo., [2]Dept.Biochemistry,Okayama Univ.of Science.)

[目的]
植物における生理現象は体内で生産される多数の植物ホルモンが相互作用することによって制御される。これらの相互作用は植物ホルモンの生合成やシグナル伝達の過程で行われていると予想されるが、その分子レベルでの知見は少ない。本研究は植物ホルモン間、特にシグナル伝達経路における相互作用の解析ツールの取得を目的とし、オーキシン・ブラシノステロイド信号伝達を同時に制御する化合物の探索を実施した。本大会では、選抜化合物の中で両ホルモンに対して阻害を示す NJ15 の作用解析について報告する。

[方法および結果]
オーキシン・ブラシノステロイドのいずれにも応答して伸長するアズキ上胚軸切片を用いたスクリーニング系を構築し、両ホルモンと共に化合物を処理することで、アズキ切片の伸長阻害剤の一次選抜を市販の化合物ライブラリーを対象に行った。アズキ上胚軸試験で選抜された化合物に対しては、引き続いてシロイヌナズナを対象にした二次選抜を行った。化合物を一律 100 μM の濃度でシロイヌナズナ幼植物体に与えその影響を調べた結果､明瞭に生育阻害が認められる化合物 NJ15 を選抜した。NJ15 はテトラゾール骨格を有する化合物である。NJ15 についてシロイヌナズナに対する生理作用を調べたところ、明所および暗所において胚軸の伸長に阻害効果を示すほか、地上部のみの重力応答に影響を与えることが認められた。
現在、NJ15 の作用点を解析することを目的に、オーキシン及びブラシノステロイド関連変異体を用いて解析を行い、またいくつかの両ホルモン関連遺伝子の発現についても調べている。

Auxin, Brassinosteroid, Regulating

講演番号：3A44a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ A 校舎 44 会場

ブラシノステロイド拮抗剤の創出
Development of a brassinosteroid antagonist
○野武 晃[1]、武藤 拓也[1]、轟 泰司[2] ([1]静大院・農、[2]静大・農)
○Akira NOTAKE[1], Takuya MUTO[1], Yasushi TODOROKI[2] ([1]Grad. Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ.)

ブラシノステロイド（BR）は，植物の細胞分裂や細胞伸長に関与する植物ホルモンである．BR は受容体 BRI1 と複合体を形成し，共受容体である BAK1 と相互作用してシグナル伝達を活性化する．BRI1 を阻害する BRI1 アンタゴニストを用いれば，容易に BRI1 欠損状態を再現できることから，BRI1 欠損変異体を作出できない植物種や特定生育段階の植物種における BR の生理的意義を解明できると期待される．そこで我々は，BR 構造活性相関と BRI1 結晶構造の知見に基づき，BRI1 アンタゴニストの創出に取り組んだ．ブラシノライド（BL）の 2 位又は 3 位の水酸基をメチル化すると，生物活性は 1/10-1/100 に低下するにも関わらず，BRI1-BL 複合体結晶構造を見るといずれの水酸基も BRI1 側には向いていないことから,2,3-diol はBRI1 ではなく BAK1 との相互作用に関与すると強く示唆される．従って 2,3-diol を適切に改変した BL アナログは,BRI1-BAK1 相互作用を阻害し BRI1 アンタゴニストとして機能するかもしれない．この仮説に基づき，我々は BL 2,3-diol を改変した BL 2,3-acetonide を設計・合成した．イネラミナジョイントアッセイにおいて，BL に対して 10 倍量の BL 2,3-acetonide を同時投与することで，BL による葉身屈曲効果が抑制された．この結果より，BL 2 位，3 位水酸基の片方又は両方を改変した化合物は BR 拮抗剤として機能すると示唆されたが，どちらの水酸基の改変が BR 拮抗活性の発現に寄与するかは不明である．そこで次に，BL と同程度の活性を持つホモブラシノライド（HBL）の 2 位，3 位又はその両方の水酸基にそれぞれエチル基を導入した化合物を設計・合成し，BR 拮抗活性における構造活性相関研究を行った．まず stigmasterol から，Aburatani および McMorris らの方法に従い 22-ene 構造を持つホモカスタステロン様の合成中間体を得た．2,3-Diol をアセチル保護し，カルボニル基をアセタール保護した後，2,3-ジアセチル基を脱保護した．次に 2 位，3 位又はその両方の水酸基をエチル化し，それぞれの中間体の 22-ene の diol 化，B 環ラクトン化を行い 2-*O*,3-*O*-diethyl-HBL（**1**），2-*O*-ethyl-HBL（**2**），3-*O*-ethyl-HBL（**3**）を得た．イネラミナジョイントアッセイにおいて，単独投与では **1**，**2**，**3** 全てが弱い葉身屈曲効果を示し，**3** が最も高活性だった．一方，BL 0.1 μg に対して 10 倍量投与することにより，**1** と **2** は BL による葉身屈曲効果を抑制した．以上より，BRI1 アンタゴニスト創出には 2 位水酸基の改変が有効だと示唆された．又，エチル基の嵩高さではBRI1-BAK1 相互作用を完全に阻害できず **1** と **2** が弱いアゴニスト活性を示したと考え，現在，より嵩高いブチル基を 2 位に導入したアナログの合成と活性評価を進めている．

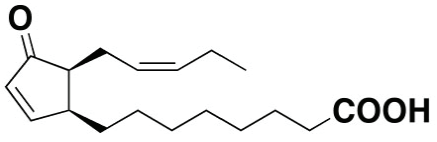
brassinosteroid, BRI1, antagonist

講演番号：3A44a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ A 校舎 44 会場

12-オキソファイトジエン酸で処理したヒメツリガネゴケのプロテオーム解析
Proteome analysis of *Physcomitrella patens* treated with 12-oxo-phytodienoic acid
○戸島 江里香[1]、阿部 達也[2]、南條 洋平[3]、小松 節子[3]、松浦 英幸[2]、高橋 公咲[2] ([1]北大農、[2]北大院農、[3]作物研)
○ Erika TOSHIMA[1], Tatsuya ABE[2], Yohei NANJO[3], Setsuko KOMATSU[3], Hideyuki MATSUURA[2], Kosaku TAKAHASHI[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Univ., [3]NICS)

【背景】
ジャスモン酸および 12-オキソファイトジエン酸（OPDA）等のオキシリピン類は、高等植物の老化促進、病害および傷害応答において重要な役割を果たしている。しかしながら、コケ植物におけるオキシリピン類の作用に関する知見は少ない。近年、ヒメツリガネゴケ（*Physcomitrella patens*）の植物体内にジャスモン酸が観測されない一方で、OPDA のヒメツリガネゴケに対する生育阻害活性が報告された [1)]。我々は、ヒメツリガネゴケにおける傷害による内生 OPDA 量の変化、および OPDA がヒメツリガネゴケのタンパク質発現に与える影響を解析した。

【方法および結果】
ヒメツリガネゴケに傷害を与え、その内生 OPDA 量の変化を UPLC MS/MS で解析した。その結果、OPDA 量は傷害後 1 時間をピークに一過的に上昇していた。また、ヒメツリガネゴケのアレンオキシドシンターゼ遺伝子（*PpAOS1*）欠損株を作成したところ、OPDA 量は著しく減少していた。さらに、OPDA 処理および傷害処理を行ったヒメツリガネゴケの *PpAOS1* 遺伝子発現を半定量 PCR により解析した結果、いずれの処理においても *PpAOS1* 遺伝子発現が一過的に上昇していたことから、ヒメツリガネゴケにおいて OPDA による正のフィードバック機構が機能していることが示唆された。10 μM の OPDA を添加した寒天培地で生育させたヒメツリガネゴケからタンパク質を抽出し、nano-LC MS/MS を用いてプロテオーム解析を行った。本解析により、1456 個のタンパク質が同定された。その中で 44 個のタンパク質の発現量が有意に 2 倍以上変化していた。タンパク質の発現が上昇していたタンパク質は、ヒートショックタンパク質および Late Embryogenesis Abundant（LEA）タンパク質等であった。その一方で、光合成電子伝達系、タンパク質合成およびフラボノイド生合成に関与するタンパク質の発現が減少していた。



(+)-*cis*-OPDA

1）Ponce De León I et al., Mol. Plant Pathol., 13, 960-974, 2012.

12-oxo-phytodienoic acid, *Physcomitrella patens*, proteome analysis

講演番号：3A44p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ A 校舎 44 会場

基部陸上植物ゼニゴケにおける高効率形質転換系とそれを用いたジーンターゲティング法の開発
Development of efficient Agrobacterium-mediated transformation and gene-targeting in the liverwort *Marchantia polymorpha*
○石崎 公庸、河内 孝之（京大院・生命）
○Kimitsune ISHIZAKI,Takayuki Kohchi (Grad. Sch. of Biostudies, Kyoto Univ.)

コケ植物苔類は、現世陸上植物の中で最も古く分岐したグループとされる。ゼニゴケ（*Marchantia polymorpha* L.）は苔類に属し、根・茎・葉を持たない単純な体制と半数体世代中心の生活環を有する一方で、植物形態形成の特徴である頂端成長や環境応答の基本的な仕組みをもつ。さらに半数体が主となる生活環、高い再分化能と増殖能、雌雄異株であることに基づく交配の簡便さ、制御系遺伝子の冗長性の低さなど実験モデルとして様々な利点を備えている。本研究では、モデル生物としてのゼニゴケの可能性に着目し、分子遺伝学の実験基盤整備として遺伝子導入および改変技術の開発を行った。まず、アグロバクテリウムを介した高効率核ゲノム形質転換系を確立した。胞子発芽後５～７日目のゼニゴケ配偶体を、薬剤耐性マーカーをもつバイナリーベクターを形質転換したアグロバクテリウムと共培養することで、胞子嚢１個（直径１㎜、約１０万個の胞子を持つ）あたり数百個の形質転換体が得られる。現在までに 4 種類の選抜マーカーが確立され、β-glucronidase (GUS) や Luciferase (LUC)、蛍光タンパク質などのレポーター遺伝子が利用可能である。様々な遺伝子コンストラクトの導入のみならず、T-DNA 挿入変異体の作出にも利用されている。さらに強力なポジティブ・ネガティブ選抜法を用いて、高頻度の形質転換系に基づくジーンターゲティング法の確立に成功したので報告する。

bryophytes, evolution, molecular genetics

講演番号：3A44p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ A 校舎 44 会場

植物への遺伝子導入の効率を改善したスーパーアグロの作製
Construction of “Super-Agro” that improve gene transfer efficiency into plant cells
○染谷 龍彦、野中 聡子、平井 正良、中村 幸治、江面 浩（筑波大生命環境）
○Tatsuhiko Someya,Satoko Nonaka,Tadayoshi Hirai,Kouji Nakamura,Hiroshi Ezura (Univ. of Tsukuba)

植物に対する遺伝子導入法の一つであるアグロバクテリム法は、土壌細菌であるアグロバクテリウムの性質を活用し、植物へ導入したい遺伝子をアグロバクテリウムに保持させ、ターゲットとなる植物に感染させることで植物のゲノムに組み込むことが出来る。しかし、遺伝子導入の手法について確立されている系の多くはシロイヌナズナなどのモデル植物用であり、それ以外の植物への効率的遺伝子導入については確立されていないものが多い。

そこで、難形質転換植物においても遺伝子導入が容易にできるよう、形質転換に用いるアグロバクテリウムの改良を行ってきた。植物はアグロバクテリウムが感染時に、植物ホルモンの一種であるエチレンを生合成し、バクテリアからの遺伝子導入を抑制する。そこで、エチレン前駆体である 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸を分解する ACC デアミナーゼ遺伝子を保持させたアグロバクテリウム株（以下、スーパーアグロと呼ぶ）を作製した。このスーパーアグロはメロンとシロイヌナズナにおいてエチレン生成を抑制することができ、さらに一過的発現系を用いた実験系によって、従来型のアグロバクテリウムより遺伝子導入効率が高いことを示している。

植物への更なる遺伝子導入効率の向上を目指し、二つの改良を行った。第一点として、プロモーター配列の改変を行った。既存のスーパーアグロは大腸菌の *lac* プロモーターで発現させているが、アグロバクテリウム由来でなおかつ共存培養中に発現する *vir* 遺伝子のプロモーターを用いた。その結果、アセトシリンゴンを含む MS 培地中において ACC デアミナーゼは発現量が増加し、なおかつ発現させ続けることができた。第二の改良点として、共存培養中でも安定に保持させるためにアグロバクテリウムのゲノム上に挿入することを試みた。相同組換え法によりゲノム上に導入したことにより、抗生物質を添加しない液体培地で 20 回継代培養させても、ACC デアミナーゼ遺伝子を安定に保持することができ、更に導入する ACC デアミナーゼ遺伝子の個数を増やすことで、ACC デアミナーゼの発現量を増加させることが出来た。これらの改良を加えた次世代スーパーアグロを用いることにより、エネルギー植物であるエリアンサスに対する遺伝子導入効率が従来型のアグロバクテリウムと比較して約 3 倍～4 倍に向上した。

本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）から受託された「バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発」の一環として行ったものである。

gene transfer, improvement of bacteria

講演番号：3A44p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ A 校舎 44 会場

アグロバクテリウムを用いたウメ（*Prunus mume*）培養細胞の形質転換

Agrobacterium-mediated transformation of cultured cells of Japanese apricot (*Prunus mume*).

○岡本 侑也[1]、米光 裕[2] ([1]和歌山高専専攻科エコ、[2]和歌山高専物質工)
○Yuya OKAMOTO[1], Hiroshi YONEMITSU[2] ([1]Wakayama NCT, [2]Wakayama NCT)

【目的】我々はウメ（*Prunus mume* Sieb. et Zucc.）果実のアントシアニン合成に関する遺伝子解析を行っている。その中で、クローニングした遺伝子の機能解析を行うために、遺伝子を任意のウメ品種の細胞中で強制発現させる必要がある。しかし、ウメへの遺伝子導入技術に関する報告は、未成熟の子葉にアグロバクテリウムを用いて導入した例（Gao 2010）しかない。そこで、我々は任意の品種の細胞への遺伝子導入系を確立するために、今回、試験管内でクローン増殖させたウメのシュートの葉より培養細胞（カルス）を誘導し、それにアグロバクテリウムを用いてβ-glucuronidase（GUS）遺伝子を導入した。

【方法】ウメは品種‘二青’を用いた。ウメのシュートは、1 mg/L 6-Benzylaminopurine（BAP）を含む Woody Plant 寒天培地にて、25℃、16 時間光照射下で１～２ヶ月毎に継代培養した。カルス誘導は、シュートより葉を切り取り、1 mg/L BAP および 0.3 mg/L α-Naphthaleneacetic acid を含む Woody Plant 寒天培地に置床し、25℃、暗所にて 2～4 週間培養した。カルスへの GUS 遺伝子の導入は、葉柄に生じたカルスに pRI201AN-GUS（タカラバイオ）を保持した *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株を感染させた後、50 mg/L カナマイシンと 100 mg/L セフォタキシムを含むカルス誘導用培地にて、25℃、暗所下で 1 週間培養した。形質転換細胞は、培養後のカルスを 1 mM 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide cyclohexylammonium salt を含む 50 mM リン酸緩衝液（pH 7）に 37℃にて一晩浸し、生じた青色のスポットとして検出した。

【結果】ウメ‘二青’のシュートの葉由来カルス（直径 2～5 mm）に pRI201AN-GUS を保持した *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株を感染させた結果、カルス１個当たり平均 1.5 個の青色スポットが生じた。これより、本方法によりウメの培養細胞（カルス）にアグロバクテリウムを用いて遺伝子導入できるとわかった。

Prunus mume, transformation, Agrobacterium

講演番号：3A44p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ A 校舎 44 会場

多重パルスを用いたエレクトロポレーション法による珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* の高効率形質転換

Highly Efficient Transformation of the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Using Multi-Pulse Electroporation

○伊福 健太郎[1]、宮原 窓[1]、青井 政樹[1]、井上 名津子[2]、菓子野 康浩[2]([1]京大院・生命、[2]兵庫県立大院・生命)
○Kentaro IFUKU[1], Mado MIYAHARA[1], Masaki AOI[1], Natsuko INOUE[2], Yasuhiro KASHINO[2] ([1]Grad. Sch. of Biostudies, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)

【目的】珪藻（Diatom）は、地球上の全光合成的 CO_2 固定の 25%を担う重要な微細藻類である。加えて、有用な脂質の蓄積やシリカ被殻形成の能力を有し、生物資源として期待も大きい。一部の珪藻に関しては、ゲノムが解読され、形質転換等の遺伝子操作も可能になってきている。しかしながら、形質転換の効率はそれほど高くないため、本研究ではより高効率かつスループット性の高い手法の開発を試みた。
【方法】被殻を有する珪藻に効率的に遺伝子を導入するため、多重パルスを制御できる NEPA ジーン社の NEPA21 エレクトロポレーターを用いて、モデル珪藻の一つである *Phaeodactylum tricornutum* の形質転換条件を検討した。
【結果】*P. tricornutum* は海洋性の珪藻であるため、培養液そのままでエレクトロポレーションを行うことはできない。そこで第一に細胞にダメージを与えずに塩分を除去するエレクトロポレーション用溶液の検討を行った。ついで細胞に穿孔を生じさせるためのパルスの電圧と回数、用いるプラスミド DNA の量を最適化した。形質転換には、フコキサンチン・ クロロフィル *a*/*c* 結合タンパク質（FCP）プロモータ支配下でゼオシン耐性遺伝子を発現させるプラスミドを用いた。その結果、およそ 4,500 コロニー／10^8 細胞という、従来のパーティクルガンを用いた方法に比べて極めて高い形質転換効率で薬剤耐性の細胞を得ることに成功した。形質転換された珪藻では、レポーター遺伝子として導入した GFP や GUS 遺伝子の発現も高い頻度で認められた。本手法は、他の珪藻や細胞壁を有する藻類の形質転換への応用が期待される。

diatom, transformation, electroporation

講演番号：3A44p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ A 校舎 44 会場

ホップ雌株から誘導した雄花を用いた交配
Crossing using male flowers induced on a female plant of hop.
○門馬 孝之、岡村 正愛、百瀬 眞幸、梅基 直行（キリン（株）基盤技術研究所）
○Takayuki MOMMA,Masachika OKAMURA,Masaki MOMOSE,Naoyuki UMEMOTO（Kirin Company, Ltd.）

ホップ（*Humulus lupulus* L.）は雌雄異株の植物であり、雌株に着生する毬花は、ビール醸造に利用される重要な原料である。毬花には、苦味酸、テルペノイド、ポリフェノール等が含まれており、ビールの香味に深く関与している。ホップの育種は、雄株に着生する雄花の花粉を雌花に交配し、得られる種子由来の個体を選抜することにより行われる。しかし、雄株には毬花が着生しないため、品質や生産性を評価できない雄株を使用しなければならず、育種の効率は他植物に比べて大きく劣っていた。今回われわれは、雌株に雄花を誘導する条件を発見した。この手法を用いれば、特性が明らかな雌株同士の交配が可能となり、ホップ育種の革新的な進歩に繋がり得る。われわれは、エチレンの作用に着目し、エチレン作用阻害剤の $AgNO_3$、STS(Silver thiosulfate complex), Chrysal K-20C(STS 化剤)及びエチレン合成阻害剤の AVG(Aminoethoxyvinyl glycine)を用い、雄花誘導への効果を検討した。処理法は葉への塗布とし、品種にはキリン 2 号、かいこがね、きたみどり、とよみどり、ハラタウミッテルフリュー、ヘルスブルッカーの 6 品種を使用した。上記薬剤のうち $AgNO_3$、STS、Chrysal K-20C、AVG では、検討した 6 品種すべてにおいて、雄花が形成された。 雄花の形成状況は、使用品種、塗布濃度、塗布回数等によって異なっていた。花粉の稔性は、酢酸カーミンによる染色性及び寒天培地上での花粉管の伸長により確認できた。また、キリン 2 号に誘導した雄花から採取した花粉を 5 品種の雌花に交配したところ、種子が形成された。 このうち、キリン 2 号，ハラタウミッテルフリューの 2 品種で得られた種子の発芽を確認した。交配後代の DNA 解析を実施したところ、雄親の DNA 多型が後代へ遺伝されることが明らかとなった。このようにこれまで成しえなかった、既に評価の定まった品種間（雌株）や同一品種内の交配が可能となった。この手法を用いることにより、育種効率の改善に加え、様々な遺伝解析も容易になり、優良品種の育成に従来にない新たな貢献ができると考えている。

dioecy, hop, sex

講演番号：3A44p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ A 校舎 44 会場

バクテリア由来のピノレジノール変換酵素遺伝子(*pinZ*)を発現させた組換えシロイヌナズナのリグナン組成解析

Analysis of transgenic plants with the bacterial gene for pinoresinol reductase, *pinZ*, which has been isolated from bacteria

○田村 尚之[1]、辻 幸子[1]、楠瀬 達也[2]、岡澤 敦司[3]、上村 直史[4]、菱山 正二郎[5]、福原 優樹[4]、原 啓文[6]、佐藤 かんな[1]、村中 俊哉[2]、片山 義博[7]、福田 雅夫[4]、政井 英司[4]、梶田 真也[1] ([1]東農工大院・BASE、[2]阪大院・工、[3]阪府大院・生命環境、[4]長岡技術大・生物、[5]森林総研、[6]岡山理大工・生体、[7]日大生資料)

○ Masayuki Tamura[1], Yukiko Tsuji[1], Tatsuya Kusunose[2], Atsushi Okazawa[3], Naofumi Kamimura[4], Shojiro Hishiyama[5], Yuki Fukuhara[4], Hirofumi Hara[6], Kanna Sato[1], Toshiya Muranaka[2], Yoshihiro Katayama[7], Masao Fukuda[4], Eiji Masai[4], Shinya Kajita[1] ([1]Tokyo Univ. A&T., [2]Osaka Univ., [3]Osaka Pref. Univ., [4]Nagaoka Univ. Tech., [5]FFPRI, [6]Okayama Univ. Sci., [7]Nihon Univ.)

[目的] 我々は低分子芳香族化合物を代謝する微生物の酵素遺伝子を用いて、リグナンやリグニンの構造や蓄積量の改変を試みている。本研究では、*Sphigobium* sp. SYK-6 株から単離されたピノレジノール変換酵素遺伝子(*pinZ*)に着目した。PinZ はピノレジノールとラリシレジノールをそれぞれラリシレジノールとセコイソラリシレジノールへと変換する。また、PinZ はピノレジノールをラリシレジノールへと変換する比活性が非常に高いことが福原ら(Fukuhara et, al., 2012)によって報告された。これを用いて、植物に蓄積するリグナンの組成や蓄積量を改変することを目的とした。

[方法] 野性型系統と *pinZ* 組換え系統から凍結乾燥した 4 週齢の根及び 6 週齢の茎をそれぞれボールミルで破砕した。破砕した個体から 50%メタノールを用いて 60℃ 、1 時間の抽出を 2 度繰り返し、得られた抽出液を UPLC-MS を用いて分析した。

[結果] 前回 2012 年度大会では、*pinZ* が導入された組換えシロイヌナズナを作出し、同植物内で PinZ が生産されたことを報告した。今回は、この組換え系統におけるリグナン含有量を定量した。UPLC-MS を用いた分析の結果、野性型系統と比較して *pinZ* 組換え系統の根では、ピノレジノールとピノレジノールグリコシドの含有量が有意に減少したが、対照的にラリシレジノールがやや増加していた。また、*pinZ* 組換え系統の根において、野生型系統では通常検出されないセコイソラリシレジノールを検出した。茎におけるリグナン含有量は、野生型及び組換え系統を通じて根よりも低く、野生型ではピノレジノールと同グリコシドが微量検出された。一方、これら 2 つの分子種は組換え系統では検出されず、これらに代わって微量のラリシレジノールが検出された。また、組換え系統の根で検出されたセコイソラリシレジノールは、野生型および組換え系統の茎では検出されなかった。以上の結果から、組換え系統では *pinZ* の発現によりリグナンの組成が変化していることが明らかとなった。現在、更なる詳細な解析を行っている。

・Y, Fukuhara et, al.,(2012)*Enzyme and Microbial Technology*. 52(1):38-43

lignan, pinoresinol reductase, sphingobium sp. SYK-6

講演番号：3A44p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ A 校舎 44 会場

センブリ培養物に含まれるキサントン配糖体

The xanthone diglycoside from cultures of *Swertia japonica*

○川上 寛子[1]、木下 薫[2]、原 光二郎[1]、小峰 正史[1]、山本 好和[1] ([1]秋田県大院生資、[2]明治薬大)
○Hiroko KAWAKAMI[1], Kaoru KINOSHITA[2], Kojiro HARA[1], Masashi KOMINE[1], Yoshikazu YAMAMOTO[1] ([1]Akita Prefectural Univ., [2]Meiji Pharmaceutical Univ.)

【背景および目的】

センブリ（*Swertia japonica* Makino）は日本固有の民間薬として利用される有用植物である。天然植物体が持つ有効成分として主成分の secoiridoid、xanthone、flavonoid が知られている。センブリは日本において重要な生薬であるにもかかわらず、現在まで効率的な培養方法や培養物の成分は明らかになっていない。我々は 2012 年度農芸化学会大会において、センブリの不定根が secoiridoid を含有することを報告したが、今回はカルスと不定根に共通に含まれる xanthone を単離し、構造を推定したので、その結果を報告する。

【方法】

センブリ不定根（10.0 g DW）を methanol で抽出し、減圧濃縮して得られた粗抽出物を *n*-hexane、ethyl acetate、*n*-butanol、water の順に分配抽出した。次に *n*- butanol 層を水に溶解し、silica gel、HP20、ODS それぞれを用いて目的化合物を単離した。単離した化合物を NMR、HR-ESI-MS、LC-ESI-MS で分析した。

【結果および考察】

^{1}H および ^{13}C NMR、HMQC、HMBC、^{1}H-^{1}H COSY の結果より、単離した化合物は、センブリの天然植物体に含まれる bellidifolin をアグリコンとして、2 糖がアグリコンの 1 位に結合した構造であることが明らかになった。HR-ESI-MS より、化合物の分子式を $C_{26}H_{30}O_{16}$ と決定した (*m/z* 597.1446 $[M-H]^-$) 。ESI-MS において、糖部分が脱離したアグリコン部分に特徴的な 273 のフラグメントイオンを検出した（negative ion mode)。以上の結果より、単離化合物は xanthone diglycoside であることが明らかになった。

現在まで、センブリの毛状根が xanthone diglycoside である 8-*O*-primeverosylbellidifolin、swertianolin、xanthone である bellidifolin、methylbellidifolin を含有すると報告されているが（Ishimaru *et al.*, 1989)、本研究で単離された化合物は糖の結合位置が異なる配糖体であり、不定根と毛状根では異なる配糖化機構を持つ可能性が示唆された。また、アグリコン部分の bellidifolin は抗酸化活性を有することが報告されており（Ashida *et al.*, 1994)、単離化合物も抗酸化活性を有する可能性があると考えられる。

Swertia japonica, callus, xanthone diglycoside

講演番号：3A44p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ A 校舎 44 会場

植物型糖鎖修飾が抑制されたモノクローナル抗体の植物生産
Production of monoclonal antibodies by glycoengineered plant
○松尾 幸毅[1]、加賀谷 羽衣子[2]、一町田 紀子[2]、松村 健[1]([1]産総研生物プロセス、[2]ホクサン（株））
○KOUKI MATSUO[1], UIKO KAGAYA[2], NORIKO ITCHOUDA[2], TAKESHI MATSUMURA[1]
([1]AIST, [2]Hokusan Co. Ltd.)

【概要】
現在、植物を用いた有用物質の生産に関する研究開発が進められており、植物を用いて生産した医療用蛋白質も間もなく市販される段階にある。蛋白質への代表的な翻訳後修飾として、糖鎖修飾が挙げられる。蛋白質への主要な糖鎖修飾として、$Man_3GlcNAc_2$ からなる共通のコア構造を有するアスパラギン結合型糖鎖（N-結合型糖鎖）が存在する。抗体をはじめとした医療用糖蛋白質を酵母や植物で生産させた場合、蛋白質は動物由来とは異なる構造の N-結合型糖鎖により修飾される。植物由来 N-結合型糖鎖のコア糖鎖部分は、動物では認められない植物特有の α-1,3-フコース、β-1,2-キシロース修飾（植物型糖鎖修飾）を受ける。抗体等の医療用糖蛋白質を遺伝子組換え植物で生産する場合には、植物特有の構造が抑制されることが好ましいと考えられることから、植物型糖鎖修飾を抑制するための技術開発を行った。

【方法及び結果】
N-結合型糖鎖へのフコース修飾を抑制するために GDP-フコースの合成に関与する GDP-D-mannose 4,6-dehydratase（GMD）遺伝子を抑制した遺伝子組換え *Nicotiana benthamiana*（rGMD 植物体）を作出した。更に、N-結合型糖鎖への β-1,2-キシロース修飾を行う β-1,2-キシロース転移酵素を抑制した遺伝子組換え *N. benthamiana*（rXT 植物体）を作出し、両植物体を交配することにより、N-結合型糖鎖への植物型糖鎖修飾が同時に抑制された植物体（rGMDrXT 植物体）を得た。
野生型 *N. benthamiana* 及び rGMDrXT 植物体を用いて、マウスモノクローナル抗体をバキュームインフィルトレーション法により一過性生産した。抗体を精製後、その糖鎖構造をマトリックス支援レーザー脱離イオン化－飛行時間型質量分析計（MALDI–TOF MS）により解析した。その結果、野生型で生産したモノクローナル抗体では $GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2XylFuc$、$GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2Fuc$、$GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ が主要な糖鎖として検出され、また、高マンノース型糖鎖も多く認められた。rGMDrXT 植物体を用いて生産したモノクローナル抗体では、植物型糖鎖修飾が抑制された $GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ が主要なものとして検出された一方、高マンノース型糖鎖は少なく、非常に均一な糖鎖により修飾されていることが明らかとなった。

gene silencing, monoclonal antibody, glycoengineering

講演番号：3A44p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ A 校舎 44 会場

タケ懸濁細胞を用いた合理的代謝フロースイッチングによる外来二次代謝産物生産
Production of exogenous secondary metabolites in bamboo suspension cells by a rational metabolic-flow switching
○野村 泰治、塩澤 舞、荻田 信二郎、加藤 康夫（富山県大・生工研セ）
○ Taiji NOMURA,Mai SHIOZAWA,Shinjiro OGITA,Yasuo KATO（Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ.）

【目的】近年、大腸菌や酵母等の微生物宿主を用いて有用植物二次代謝産物を生産させる試みが盛んに行われているが、その一方で植物細胞は、増殖が遅いことや遺伝子組換え操作が煩雑であることなどから、物質生産宿主としての利用は進んでいない。当研究室で樹立されたハチク(*Phyllostachys nigra*)タケノコ由来の H4 懸濁細胞は、非常に高い増殖性を有していることに加え、増殖/リグニン化促進等の培養フェーズ調節法や高効率の遺伝子組換え技術が確立されており、有用物質生産宿主としての高いポテンシャルを有していると考えられる。本研究では、H4 懸濁細胞における主要二次代謝系を明らかにした上で、当該生合成中間体から分岐する新たな二次代謝生合成系を遺伝子組換えにより導入し高生産に導く「合理的代謝フロースイッチング」による高効率物質生産系の確立を目的とした。
【方法・結果】培養 8 日目の H4 懸濁細胞の酸性メタノール抽出物を 280 nm における紫外吸収を指標に逆相系 HPLC にて分析した結果、クロマトグラム中でほぼ排他的に検出される主要未知化合物が見出された。精製した本化合物の各種分光学的手法による構造解析および化学合成標品との一致から、本化合物は feruloylputrescine (FP)であることが明らかとなった。また、マイナー成分として *p*-coumaroylputrescine (pCP)も見出された。このことから、H4 懸濁細胞ではフェニルプロパノイド代謝系とポリアミン代謝系が極めて活発であると考えられた。そこで、これらの生合成中間体を基質とする外来の二次代謝生合成酵素の導入による「代謝フロースイッチング」の可否を検討するため、*p*-coumaroyl-CoA/feruloyl-CoA と、putrescine の生合成中間体である agmatine の縮合反応を触媒するオオムギ由来の agmatine coumaroyltransferase (ACT) 遺伝子を CaMV35S プロモーター制御下で高発現する組換え株を作製し、組換え細胞における代謝物の分析を行った。その結果、予想通り ACT 組換え株の細胞内には ACT 反応産物である *p*-coumaroylagmatine (pCA)と feruloylagmatine (FA)が高蓄積する一方で、H4 野生株にもともと高蓄積していた pCP や FP の蓄積量は顕著に減少していたことから、pCP/FP 生合成系が pCA/FA 生合成系へとスイッチングされていることが示唆された。H4 野生株懸濁細胞では増殖促進条件よりもリグニン化促進条件において主要代謝物である FP の蓄積量が多かったが、ACT 組換え株における主要代謝物である pCA の蓄積量についても同様の傾向が認められた。ACT 組換え懸濁細胞における pCA の生産量は、リグニン化促進条件での培養後期に最大となり、150～350 mg/L にも達した。以上の結果から、植物培養細胞を用いた高効率物質生産系の確立における「合理的代謝フロースイッチング」の有用性が強く示唆された。

secondary metabolite, bamboo suspension cells, metabolic engineering

講演番号：3A44p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ A 校舎 44 会場

チューリップバイオマスを原料とした石油非依存的プロセスによる抗菌化合物チューリッパリン B の調製

Environment-Conscious Process for the Preparation of Antimicrobial Tulipalin B from Tulip Biomass

野村 泰治、林 絵美子、川上 祥平、荻田 信二郎、○加藤 康夫（富山県大・生工研セ）
Taiji NOMURA, Emiko HAYASHI, Shohei KAWAKAMI, Shinjiro OGITA, ○Yasuo KATO (Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)

【目的】チューリップ組織中には糖エステルであるチューリッポシド（Pos）類（PosA、PosB）が二次代謝産物として著量含まれている。Pos類はチューリップ組織内在のPos変換酵素によって抗菌活性を有するチューリッパリン（Pa）類（PaA、PaB）へと変換される。Pa類はその化学的特性から、様々な分野への利用が期待される有用化合物であり、特にPaBはPaAに見られるアレルゲン性を示さないことから、医薬品、トイレタリー製品や化粧品添加物としての実用可能性が高いと考えられるが、煩雑かつ非効率的な化学合成による調製法しかなく、実用化の妨げとなっている。本研究ではPos変換酵素によるPaB調製法に着目した。チューリップ球根栽培においては、球根の肥大化のための摘花によるチューリップ花部と商品価値のない規格外球根が大量に副生する。花部はPos含有量が高く、球根は高いPos変換酵素活性を有することから、これらを基質源および酵素源として用いるPaB調製プロセスを確立することができれば、未利用資源の高度利用につながるだけでなく、わずか一段階の酵素反応に基づく簡便かつ環境負荷の小さいPaB調製プロセスとなる。本研究では、原料調達から精製PaBを得るまでの全プロセスにおいて、簡便性、廉価性、効率性を維持しながら、環境負荷を最小化することを念頭に置いたPaB調製プロセスを確立することを目的とした。
【方法及び結果】本プロセスは PosB 含量／含有率の高いチューリップ品種を基質原料とすることが鍵となることから、まず、123 品種のチューリップの花部構成組織（花弁、雄しべ、雌しべ）における Pos/Pa 含量を調べた。その結果、PosB/PaB をほぼ独占的（全 Pos/Pa 合計量の 90%以上）に蓄積している 29 品種/48 組織を見出した。酵素反応に用いる Pos 変換酵素は球根から抽出後、強陰イオン交換樹脂である HPA25L 上に効率的かつ安定的に固定化する方法を確立した。PosB/PaB 独占含有品種の花部組織から 40% EtOH にて抽出し活性炭ヤシコールにて粗精製した濃縮基質液に固定化 Pos 変換酵素を添加し、中性付近の pH 下、室温で数時間ゆるやかに攪拌することで、反応液中の Pos 類をほぼ完全に Pa 類へと変換することができた。濾別により固定化酵素を除いた反応液に、活性炭ブロコールを添加し PaB を吸着させ、蒸留水による洗浄後、20% EtOH にて PaB を溶出した。溶出液中の PaB を再びブロコールに吸着させ、蒸留水による洗浄後、EtOH にて溶出することでほぼ純粋な PaB を得ることができた。本プロセスはチューリップバイオマスを基質および酵素原料としており、抽出・精製の過程で活性炭と EtOH のみを用い、かつ煩雑なクロマトグラフィー工程を経ることのない極めて簡便かつ環境適合性の高いものである。

Tulip, biomass, Tulipalin

講演番号：3A44p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ A 校舎 44 会場

サツマイモ形質転換法の改良と FBP/SBPase 導入による光合成能および生産性への影響

Effect of introduction of FBP/SBPase on photosynthetic capacity and productivity in sweet potato

○大鳥 久美[1,2]、窪 康至[1]、Daniel Padilla-Chacon[1,2]、田茂井 政宏[1,2]、横田 明穂[2,3]、重岡 成[1,2] ([1]近畿大・農・バイオ、[2]JST, CREST、[3]奈良先端大・バイオ)
○Kumi Otori[1,2], Koji Kubo[1], Daniel Padilla-Chacon[1,2], Masahiro Tamoi[1,2], Akiho Yokota[2,3], Shigeru Shigeoka[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [2]JST, CREST, [3]Grad. Sch. Biosci., NAIST)

【目的】イモ類は単位面積当たりの収穫量とハーベストインデックスが高い作物である。その中でもサツマイモはシンク能力が高く、光合成代謝産物（デンプン）を塊根に大量に蓄積可能であることから、バイオマス増産において重要な作物として注目されている。しかし、サツマイモは雄性不稔、不和合性、６倍体であるため従来の品種改良では、収量を増大させた品種を作出するのは難しい。そこで、サツマイモにおいて遺伝子組換え技術の利用が検討され、ここ数年で形質転換体の作出が報告されるようになったが、未だに収量が飛躍的に増大した形質転換体の作出には至っておらず、さらにタバコと比較してカルスから植物体への再分化効率が非常に悪いことが問題となっていた。そこで、本研究ではサツマイモ（高系 14 号）再分化効率を向上させるための条件を検討すると共に、サツマイモの収量の増大を目指し、ラン藻由来 FBP/SBPase の導入を試みた。
【方法と結果】先ず FBP/SBPase の遺伝子をトマト由来の rbcS プロモーター下流に連結し、アグロバクテリウム法によりサツマイモの胚形成カルスに感染させた。次に既報の培地組成で再生を試みたところ、形質植物体を得るのに 10 ヶ月以上を要した。そこで、植物体再生培地に含まれるホルモンの種類および濃度、ショ糖濃度を再検討したところ、2 ヶ月で 9 株の形質転換体（IP-rbcS-FS）を得ることが出来た。次に、この再分化条件により CaMV35S プロモーター制御下で *fbp/sbp* を発現させた IP-35S-FS を 5 株作出した。両形質転換体について、ゲノミック PCR により FBP/SBPase 遺伝子の導入を確認し、抗 FBP/SBPase 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、FBP/SBPase タンパク質の発現を確認した。その結果、IP-rbcS-FS における FBP/SBPase タンパク質の発現量は非常に少なく、IP-35S-FS での FBP/SBPase 発現量の約 1/5 であった。光強度 300 µmol photons/m^2/s、明期 14 時間(28℃)/暗期 10 時間(25℃)の環境で栽培したところ、FBP/SBPase の高発現が見られた IP-35S-FS 20-1 株では、FBPase 活性は野生株の約 2.2 倍に、光合成活性は野生株の約 1.9 倍に上昇していたが、IP-rbcS-FS ではいずれの系統においても野生株と同程度であった。現在、IP-35S-FS の光合成代謝産物および生産性を野生株と比較検討するとともに、サツマイモの緑色組織で明期特異的に発現させるためのプロモーターをサツマイモおよびジャガイモから単離し、サツマイモの光合成強化に適したベクターの構築を行っている。

sweet potato, transgenic, photosynthesis

講演番号：3A44p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ A 校舎 44 会場

藻類バイオ燃料増産を目指したユーグレナ形質転換技術の確立と光合成機能強化

Establishment of gene transfer technology in Euglena for enhancement of productivity

○三根 彩佳[1]、作山 治美[2,3]、杉崎 円香[2]、西川 綾香[2]、加藤 貴大[2]、吉田 絵梨子[3,4]、鈴木 健吾[3,4]、丸田 隆典[3,5]、石川 孝博[3,5]、田茂井 政宏[1,2,3]、重岡 成[1,2,3] ([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]JST, CREST、[4](株)ユーグレナ、[5]島根大・生資科・生命工)

○Ayaka Mine[1], Harumi Sakuyama[2,3], Madoka Sugizaki[2], Ayaka Nishikawa[2], Takahiro Kato[2], Eriko Yoshida[3,4], Kengo Suzuki[3,4], Takanori Maruta[3,5], Takahiro Ishikawa[3,5], Masahiro Tamoi[1,2,3], Shigeru Shigeoka[1,2,3] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]JST, CREST, [4]euglena Co.,Ltd., [5]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ.)

【目的】最近の化石燃料などの需要／供給の問題から、代替燃料として藻類バイオ燃料が注目されている。真核微細藻類ユーグレナ（*Euglena gracilis* Z）は、好気条件において貯蔵多糖パラミロン（β-1,3-グルカン）を多量に蓄積（従属栄養条件では最大乾燥重量の 50%以上）し、嫌気条件に移行することで中鎖脂肪酸と脂肪アルコールから構成されるワックスエステルを乾燥重量あたり約 20～25%生産する。このパラミロンからワックスエステルへの変換は ATP の生産を伴うため、ワックスエステル発酵と呼ばれる。ユーグレナが生産するワックスエステルの主成分はミリスチルミリステート C_{28} であり、その構成脂肪酸ミリスチン酸 C_{14} は、耐ノック指数のセタン価が 66.2 と高くバイオディーゼル燃料や代替ジェット燃料としての利用が期待できる。他の微細藻類の多くは鎖長 C_{16} 以上の脂肪酸が主要な生成物であることから、ユーグレナの C_{14} 合成能は際立った特徴である。このように藻類バイオ燃料生産原料として多くの有用形質を有しているにもかかわらず、これまでユーグレナの有用性を理解するための遺伝子・タンパク質情報や、形質転換法などの基盤技術はほとんど整備されていないのが現状であった。そこで本研究では、ユーグレナによるワックスエステル生産性向上を目的として、カルビン回路構成酵素遺伝子を核ゲノムへ導入する技術の確立を試みた。

【方法と結果】植物核ゲノムへの遺伝子導入に一般的に用いられているベクターを用いて、ラン藻由来カルビン回路構成酵素遺伝子をユーグレナ核ゲノムに導入するためのプラスミド DNA を構築し、パーティクルガンにより導入を行った。抗生物質を含むプレート上で選抜を繰り返し、3 株の薬剤耐性株を得た。薬剤耐性株よりゲノム DNA を単離し、導入遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR により遺伝子が導入されていることを確認した。さらに、抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、タンパク質の発現が確認された。現在、形質転換株と野生株を用いて、様々な培養条件における生育、光合成特性、パラミロン量、総脂質量などの比較を行っている。

transformation, biodiesel, photosynthesis

講演番号：3A44p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ A 校舎 44 会場

シアノバクテリアを用いたエタノール生産のための代謝改変
Metabolic engineering of cyanobacteria to produce ethanol
○蘆田 弘樹[1,2]、向川 佳子[1]、小林 知佑[1]、横田 明穂[1] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]JST-さきがけ)
○Hiroki Ashida[1,2], Keiko Mukougawa[1], Tomosuke Kobayashi[1], Akiho Yokota[1] ([1]Grad. Sch. Biosci., NAIST, [2]JST-PRESTO)

【目的】近年、シアノバクテリアや藻類を利用した、CO_2から光合成的に直接バイオ燃料を生産する研究に期待が持たれている。特に、高い光合成能を持つシアノバクテリアの代謝改変により、エタノール、ブタノール、イソブタノールなどのバイオ燃料生産研究が進んでいる。本研究では、シアノバクテリアの代謝改変によるエタノール高生産を目指し、研究を行った。
【方法】*Synechococcus elongatus* PCC7942 にエタノール産生菌 *Zymomonas mobilis* のエタノール合成代謝酵素 Pyruvate decarboxylase (PDC)と NADH 依存型 Alcohol dehydrogenase II (ZmADHII) 遺伝子発現カセットを neutral site I に導入した形質転換体 Sy–adhII 株を作製した。また、*Z. mobilis* の *adhII* を NADPH 依存型 ADH をコードする *Synechocystis* PCC6803 由来の *adhA* または大腸菌由来の *yqhD* に置換した発現カセットを同様に neutral site I に導入した形質転換体 Sy–adhA と Sy–yqhD 株を作製した。形質転換体の各培養時間における培地へのエタノールまたはアセトアルデヒド蓄積量をガスクロマトグラフィーにより解析した。
【結果】*Z. mobilis* の *pdc* と *adhII* 遺伝子を導入した Sy–adhII 株におけるエタノール生産性を解析した。その結果、通常大気 CO_2 濃度下、培養 6 日目における培地中に最大である 6.9 mM のエタノールが蓄積していた。しかし、PDC の反応産物であり、エタノール合成代謝中間物であるアセトアルデヒドが 0.4 mM と高濃度に蓄積していた。この結果から、AdhII によってアセトアルデヒドからエタノールに最適に変換されていないことが示唆された。この原因が、AdhII が NADH 依存型であることと予想し、AdhII を NADPH 依存型 ADH に置換した Sy–adhA と Sy–yqhD 株を作製した。Sy–adhA と Sy–yqhD 株の培養 6 日目において、エタノール生産量はそれぞれ 13.7 mM、13.1 mM であり、Sy–adhII 株の約 2 倍に増加した。また、Sy–adhA と Sy–yqhD 株におけるアセトアルデヒド蓄積量はそれぞれ 0.01 mM、0.05 mM と Sy–adhII 株と比較して大きく低下した。Sy–adhA 株を 0.3%の高 CO_2 濃度下で培養した場合のエタノール生産量は通常大気下培養の 4 倍に増加し、54.9 mM であった。これは、1 L 培養で 2.5 g のエタノール生産量に相当した。

cyanobacteria, ethanol production, metabolic engineering

講演番号：3A44p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ A 校舎 44 会場

抗体遺伝子組換えタバコ（*N. benthamiana*）の閉鎖型完全人工光植物工場内での高収量養液栽培技術の開発

High yield production of anti-human antibody expressing transgenic tobacco plants（*N. benthamiana*）using hydroponic culture system in plant production system with artificial lamp alone.

○田坂 恭嗣[1]、福澤 徳穂[1]、一町田 紀子[1]、加賀谷 羽衣子[2]、田林 紀子[1,2]、松村 健[1]（[1]産総研・生物プロセス、[2]ホクサン・植物バイオセンター）
○ Yasushi TASAKA[1], Noriho FUKUZAWA[1], Noriko ITCHODA[1], Uiko KAGAYA[2], Noriko TABAYASHI[1,2], Takeshi MATSUMURA[1] ([1]AIST Bioproduction Res. Inst., [2]Hokusan Plant Biotech. Center)

【目的】遺伝子組換え植物を用いた医薬品原材料の生産をはじめ、他の有用物質生産の宿主植物として、その利便性からタバコが多用される傾向にある。そこで、本研究では、完全人工環境下において物質生産に適した環境条件、養液栽培方法の検討をヒト型抗ヒト TNF-α モノクローナル抗体（adalimumab：ADM）を発現する組換えタバコ（*N. benthamiana*）を用いて行った。
【方法】本研究に用いた ADM 抗体を発現する *N. benthamiana* は、H 鎖、L 鎖とも 35S プロモーター支配下での発現カセットをタンデムに連結した遺伝子を導入して作製した。得られた形質転換タバコの抗体発現を解析し、発現量をもとに選抜した系統の後代種子を栽培試験に供試した。
人工環境下でのタバコの栽培試験は、室温 23℃、相対湿度 50%、薄膜水耕法（NFT）、日長を 16 時間明期 8 時間暗期の条件に固定し、種子発芽から幼苗期までの養液組成、生育期の光強度、栽培密度について検討を行った。また、5 月から 10 月にかけて温度 23℃設定、湿度成行き、夜間補光により日長を 16 時間明期 8 時間暗期としたガラス温室内にてポット土耕栽培を行った同一タバコ系統株を対照とした。
【結果】発芽から幼苗期における養液組成は、本試験で設定した処理区の中では、1 倍濃度の大塚 A 処方を基本とした組成が最も生育が旺盛であった。生育期の光強度は、本試験で最も強光条件である 600 μmol/m²/s で顕著な生育を示した。一方、栽培密度は、生育に大きな影響を与えないことが明らかになった。播種後 71 日目において、対照の土耕栽培株は草丈 18 cm、葉の新鮮重が約 13 g であったのに対し、強光区の水耕栽培株は草丈 45 cm、葉新鮮重は約 590 g、すなわち 45 倍以上の生育差が観察された。また、植物工場においては、定植した全ての組換え体においてほぼ同程度の IgG タンパク質の発現が確認された。また、カラムを用いて精製した結果、新鮮重 1 g の葉から平均 52 μg/g の IgG が得られることが分かった。播種後 112 日目の植物工場栽培タバコ 1 株から新鮮重 900g 以上の葉が収穫されたことから、植物工場での水耕栽培面積 1 ㎡あたり 700 mg 以上の簡易精製抗体が得られると試算された。（本研究は、独立行政法人医薬基盤研究所の「保健医療分野における基礎研究推進事業」によるものである）

molecular farming, plant Factory, hydroponic culture

講演番号：3A44p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ A 校舎 44 会場

小規模種子生産を目的としたグロースチャンバーでの作物のミニチュア水耕栽培法

A simple hydroponics method for small-scale crop seed production in a plant incubator

○黒田 昌治[1]、池永 幸子[2] ([1]農研機構中央農研、[2]農研機構東北農研)
○Masaharu Kuroda[1], Sachiko Ikenaga[2] ([1]NARO Agric. Res. Cent., [2]NARO Tohoku Agric. Res. Cent.)

＜研究目的とこれまでの経過＞

植物体が大きくなる作物の研究を行うには、温室等の設備に依存する部分が大きい。そこで、小規模な施設でも効率よく作物の研究が行えるように、汎用機材を用いる簡便な種子生産用水耕栽培法の確立を試みた。その結果、イネをモデルとして平面あたり独立な 144 系統以上を同時栽培できる系を昨年報告した。本年は、栽培試験を反復するとともに、得られたコメの特性を評価した。またイネ以外の作物の育成を試みた。

＜方法と結果＞

栽培方法は昨年度大会で報告したものを踏襲した。すなわち、側面蛍光灯照射タイプの普及型グロースチャンバー（東京理化 FL2000A）を用いて、昼 12 時間 27 度／夜 12 時間 22 度の短日条件に統一し、その他の条件調整は一切行わなかった。植物体については、穴をあけたポリプロピレンチューブに直接苗を入れ、それごと希釈した MS 培地で満たした深型ステンレスバットに入れてチャンバーに設置した。培地交換は 2 週間ごと、その間は週 3 回水道水を補給するにとどめた。

上記条件でインディカを含むイネ 10 品種を栽培できた。ジャポニカイネの場合は、植物体の高さがおおむね 65cm 前後にとどまり、グロースチャンバー（庫内の高さ 100cm）の上部 1/3 は、育苗等の別目的に使用できるなど効率的な運用が可能であった。日本晴の場合は、1 世代は 4 ヶ月以内で完結し、個体当たり種子数はおおむね 20-30 粒、最大で 100 粒程度であった。1 粒重量は約 20mg で胚乳外観はほぼ透明、発芽率もほぼ 100%となり、人工環境下で収穫した種子としては十分な品質となった。

同じ方法を用いて、短日植物であるダイズ、アズキ、トウモロコシを育ててみたところ、少量ながらいずれの作物でも種子を収穫できた。ダイズ（エンレイ）の場合、1 粒重量は野外栽培のものより軽くなるものの、発芽は良好であった。1 世代は約 2.5 ヶ月と短いため、世代促進など最低限の種子数を確保すれば良い場合は、このままの方法でも活用できると考えられる。

以上のように、この方法ではハイグレードなチャンバーは必要なく、その他の機材や培地も汎用品で再利用もできる。また栽培手技も最低限に抑えてあり、低コスト・省スペース・省エネルギーな設計となっている。作物の多系統少量種子生産が求められる場面では、本方法はとりわけ有用である。

hydroponics, crop seed, rice

講演番号：3A44p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ A 校舎 44 会場

ダイズβ-コングリシニンを高集積したイネの特性解析

Analysis of properties of transgenic rice accumulating soybean ß-conglycinin at a high level

Cabanos Cerrone[1]、黒田 昌治[2]、加藤 直樹[1]、澤田 真千子[1]、奥田 英子[1]、長岡 利[3]、高岩 文雄[4]、内海 成[1]、○丸山 伸之[1] ([1]京大院農、[2]中央農研・北陸セ、[3]岐阜大、[4]農生資研)
Cerrone Cabanos[1], Masaharu Kuroda[2], Naoki Kato[1], Machiko Sawada[1], Eiko Okuda[1], Satoshi Nagaoka[3], Fumio Takaiwa[4], Shigeru Utsumi[1], ○Nobuyuki Maruyama[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Nat. Agr. Res. Ctr., Joetsu, [3]Gifu Univ., [4]Nat. Inst. Agr. Sci.)

【目的】ダイズの主要な種子貯蔵タンパク質であるβ-コングリシニン(ダイズ 7S グロブリン)には脂質代謝を調整する機能があることが報告されている。我々は生活習慣病を予防する作物を開発するため、β-コングリシニンを種子胚乳に集積する形質転換米の作出を試みてきた。これまで、イネ種子の主要貯蔵タンパク質であるグルテリンの一部を欠失している良食味系統である a123 を用いるとともに、イネ種子の主要な貯蔵タンパク質であるグルテリンやプロラミンの発現を RNAi によって抑制することにより、β-コングリシニンのα’サブユニットを高集積できることを報告した。本研究では、イネ種子に蓄積されたα’サブユニットの構造特性を明らかにする一環として、イネ種子に蓄積したα’サブユニットの糖鎖構造を解析し、ダイズ種子で蓄積されるものとの比較を行った。さらに、α’サブユニットを高集積するイネの種子成分を分析するとともに、形質転換体の栽培特性について調査した。

【方法および結果】

1) 糖鎖構造の解析：形質転換体より得られた種子より塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液を用いて抽出したのち、クロマトグラフィーによりα’サブユニットを精製した。酵素による糖鎖の脱離後、ゲル濾過クロマトグラフィーにより糖鎖画分を分取した。さらに、逆相クロマトグラフィーにより分離し、検出された複数のピークについて標準品との比較などから糖鎖構造を推定した。同定したピークの多くは高マンノース型の糖鎖であり、ダイズ種子でのα’サブユニットと同様にイネ種子で蓄積された場合にも高マンノース型の糖鎖が主に付加されていることが明らかになった。

2) 種子成分の分析：形質転換体より得られた種子（コメ）の一般成分およびアミノ酸含量について分析した。形質転換体より得られたコメは、タンパク質及び脂質含量について原品種のものと大きな違いは見られなかった。アミノ酸分析では、コメの制限アミノ酸であるリジン含量について原品種に対して約 1.5 倍高い値を示した。コメの主要な貯蔵タンパク質であるグルテリンなどに置き換わってα’サブユニットが高レベルで蓄積したことにより、栄養価が高まったと考えられた。

3) 生物多様性評価：特定網室において栽培し、栽培特性について調査したところ、原品種と比較して背丈がやや低く茎数が多い傾向が見られた。また、穂数、稔実率、粒重についても違いが見られたが、一株当たりの籾数については同等であった。

・本研究において京都大学生存圏研究所・生態学研究センターDASH システムを利用した。

soybean, rice, seed

講演番号：3A44p17
講演日時、会場：3 月 26 日 17:12～ A 校舎 44 会場

イネ植物体におけるトコトリエノール生合成機構の解明

Investigation of tocotrienol in rice

○阿部 伎[1]、松塚 健太郎[1]、木村 映一[2]、木村 俊之[2]、村田 和優[3]、仲川 清隆[1]、宮澤 陽夫[1]([1]東北大院農・機能分子解析、[2]東北農研セ、[3]富山農総技セ)
○Takumi ABE[1], Kentaro MATSUZUKA[1], Eiichi KIMURA[2], Toshiyuki KIMURA[2], Kazumasa MURATA[3], Kiyotaka NAKAGAWA[1], Teruo MIYAZAWA[1] ([1]Grad. Sch. Agri. Sci. Tohoku Univ., [2]Tohoku Agri. Res. Center, [3]Toyama Pref. Agri., Forestry & Fish. Res. Center)

【目的】米（特に糠部）には不飽和ビタミン E であるトコトリエノール（T3）が特徴的に含まれ、T3 による抗血管新生や脂質代謝改善、抗アレルギー効果などの新たな機能性が明らかにされている[1)]。我々は T3 高含有米の作出による血管新生病予防に向けた新食品の開発研究を進めているが、“なぜイネの糠部分で T3 が多く生産されるのか”はほとんど解明されていない。この糠部での T3 生産の理由として、他の部位に比べて、①T3 生合成に関わる酵素遺伝子の発現が亢進している、あるいは、②T3 前駆体の量が増加していると予想した。そこで本研究ではイネの糠部と、比較として止葉について、T3 とともにトコフェロール（Toc）を定量し、T3 生合成酵素遺伝子の発現量と前駆体の生成量の変動を解析し、イネ植物体における T3 生合成機構の解明を目指した。

【方法と結果】成熟の盛んな出穂 14 日後のイネより糠と止葉を採取し、T3 と Toc を蛍光-HPLC 法[2)]で定量して、イネの糠部には止葉に比べて T3 が多く生産されていることを確認した。次いで、①の可能性を調べるために、出穂 14 日後の糠から Total RNA を抽出し、純度確認後、逆転写酵素により cDNA を合成して、9 種（ホモゲンチジン酸ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ（HGGT）やゲラニルゲラニルレダクターゼ（GGR）など）の T3 生合成酵素遺伝子の発現を半定量的 PCR で調べた。その結果、糠部では、止葉と比較して、HGGT が顕著に発現していることを見出した。また、他の遺伝子発現には、糠と止葉で大差がないこともわかった。そこで、これらの知見をより明確にするために、出穂 8 日後から収穫時期（44 日後）までの糠と止葉を得て、リアルタイム PCR で 9 種の T3 生合成酵素遺伝子の発現量の変化を経時的に調べた。加えて、これらのビタミン E を定量した。出穂 8 日以降から、糠部で HGGT 遺伝子の発現量と T3 量が共に増加することが判明し、HGGT が T3 生合成を誘導していることが示唆された。しかし、HGGT は出穂 44 日後まで多く発現し続けたのに対し、T3 は出穂 16 日以降は増加しなくなった。従って、出穂 16 日頃から組織内で T3 前駆体が減少したか、T3 利用量が増えたか、が予想され、T3 高生産における律速については、HGGT 酵素ではなく、前駆体（可能性②）であることが新たに示唆された。そこで、6 種の T3 前駆体（ホモゲンチジン酸（HGA）やゲラニルゲラニル二リン酸（GGPP）など）の LC-MS/MS 分析法を構築し、このことを確認した。こうした生合成に関する知見を育種にフィードバックすることで、さらなる T3 高含有米の作出が可能になると考えられた。

1) 宮澤陽夫, *食品新素材会誌*, 14, 1-8 (2011) ; 2) P. Sookwoog, K. Nakagawa, Y. Yamaguchi, T. Miyazawa, S. Kato, F. Kimura, T. Miyazawa, *J. Agric. Food Chem.,* 58, 3350-3355 (2010)

Tocotrienol, Rice grain, biosynthesis

講演番号：3A44p18
講演日時、会場：3 月 26 日 17:24～ A 校舎 44 会場

経口ワクチン用キャリアーを目指したイネ種子 PB-I の特定部位への外来タンパク質局在化と消化酵素耐性に関する研究

The study of controlled localization of foreign proteins to rice seed PB-I and its resistance to digestive enzymes as an application for the carrier of oral vaccines

○佐生 愛[1]、重光 隆成[1]、齊藤 雄飛[1]、田中 愛実[1]、森田 重人[1,2]、佐藤 茂[1,2]、増村 威宏[1,2]（[1]京府大院、[2]京都農技セ・生資セ）
○Ai SASOU[1], Takanari Shigemitsu[1], Yuhi Saito[1], Manami Tanaka[1], Shigeto Morita[1,2], Shigeru Satoh[1,2], Takehiro Masumura[1,2] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]Kyoto Pref. Agric., Foristry and Fisheries Technol. Research Center)

【目的】近年，感染症を予防するための新たなアプローチとして，形質転換植物を用いたヒト用経口ワクチンの開発が試みられている．しかし，消化管内の胃酸や消化酵素の分解作用からワクチンタンパク質を保護し，免疫原性を保ったまま，粘膜免疫の誘導に関与する腸管上皮組織まで到達させなければならず，その実用化は難しいのが現状である．そこで本研究では，イネ種子のタンパク質貯蔵オルガネラであるI型プロテインボディ（PB-I）に着目した．これまでの研究で，PB-Iには，10，13，16 kDaのプロラミンが層状に蓄積しており，ヒトの消化管では難消化性であることが明らかとなっている．PB-Iの特徴的な層状構造と，難消化性の性質を利用し，ワクチンタンパク質をPB-Iの特定部位に蓄積させ，腸管へ目的タンパク質を輸送する経口薬品用キャリアーとして利用することを考えた．その第一段階として，緑色蛍光タンパク質（GFP）をワクチンタンパク質のモデルとし，プロラミンとGFP融合タンパク質をイネ種子胚乳内で発現させ，そのPB-I内における局在性の解析と消化酵素への耐性能を調査することを目的とした．
【方法】10 kDa，13 kDaプロラミンとGFPの融合タンパク質を胚乳組織で発現する形質転換イネを作出した．それらのイネ種子を粉末化し，*in vitro*で消化酵素反応を行い，その試料からタンパク質を抽出し，SDS-PAGEを行った．また，抗GFP抗体を用いたウエスタンブロット解析を行い，バンド強度の数値化によりGFPの残存率を比較した．更に，消化酵素反応後のPB-Iについて免疫電子顕微鏡観察を行った．
【結果および考察】*in vitro*消化酵素反応後の試料を用いてSDS-PAGEを行ったところ，プロラミン-GFP融合タンパク質と内在性のプロラミンが消化後8時間において残存していることが確認された．また，ウエスタンブロット解析の結果，プロラミン-GFP融合タンパク質が，PB-Iの中間層に蓄積する13 kDaプロラミン-GFP系統よりも，中心部に蓄積する10 kDaプロラミン-GFP系統でGFPの残存量が多かった．この結果，標的タンパク質のPB-I内部における局在部位とペプシン耐性には関連性があると推測された．さらに，免疫電子顕微鏡観察では，消化酵素反応後もGFPがPB-I内に局在している事が示された．以上の結果より，PB-Iに蓄積した標的タンパク質は，胃を通過して腸管まで到達する可能性が示唆された．本システムを用い，PB-I内部におけるワクチンタンパク質の局在制御が可能となれば，腸管免疫をより効果的に誘導することが可能となるだろう．

seed storage protein, prolamin, green fluorescence protein

講演番号：3A46a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ A 校舎 46 会場

アブシジン酸のシグナル伝達に対するフシコクシンの影響

Effects of fusicoccin on signal transduction of abscisic acid

○小松 由貴[1]、松田 詩織[1]、梅津 麻美[1]、深澤 壽太郎[2]、山口 信次郎[2]、南原 英司[3]、神谷 勇治[2]、三橋 渉[1]、加藤 修雄[4]、豊増 知伸[1]([1]山形大農、[2]理研 PSC、[3]トロント大・細胞システム生物学科、[4]大阪大産研)

○Yuki Komatsu[1], Shiori Matsuda[1], Asami Umetsu[1], Jutarou Fukazawa[2], Shinjiro Yamaguchi[2], Eiji Nambara[3], Yuji Kamiya[2], Wataru Mitsuhashi[1], Nobuo Kato[4], Tomonobu Toyomasu[1] ([1]Yamagata Univ., [2]RIKEN, [3]Toront Univ., [4]Osaka Univ.)

【目的】

フシコクシン（FC）はモモ枝折れ病菌が生産する二次代謝ジテルペン配糖体で、これが植物原形質膜上にある H+-ATPase の C 末端側と 14-3-3 タンパク質の複合体に直接結合することで複合体を安定化し、植物体に対してオーキシン様活性を発現させることが知られている。14-3-3 タンパク質は全ての真核生物に普遍的に存在し、標的タンパク質のリン酸化部位を認識・会合することで、多くの細胞内信号伝達経路を制御する重要なアダプタータンパク質である。一方、FC はシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）種子においてアブシジン酸（ABA）処理による発芽抑制を打ち消して発芽を促進することから、演者らは ABA シグナルの負の制御という観点からフシコクシンの作用機構を追究してきた。2011 年度の本大会において、ABA シグナルを正に制御する bZIP 型転写因子 ABI5 が、C 末端の 14-3-3 結合モチーフを介して 14-3-3 と相互作用し、さらにその複合体は FC により安定化される可能性を示した。本研究では、ABI5 と 14-3-3 の相互作用することが、ABI5 の転写因子としての機能に及ぼす影響について追究することにした。

【方法と結果】

ABI5 は特定のシス配列 ABRE と結合することが知られているので、その結合に対する 14-3-3 結合モチーフ中のリン酸化ターゲットのセリンをアスパラギン酸に置換した変異体（ABI5-S439D）の大腸菌発現組換えタンパク質と ABRE を含む標識 DNA 断片を用いたゲルシフトアッセイ系を構築した。このアッセイ系を利用して、ABI5 の ABRE への結合への結合に対する 14-3-3 添加の影響を調べたところ、ABI5 と 14-3-3 が相互作用することで ABI5 の ABRE への結合量が若干ながら減少することを示唆する結果が得られた。現在、組換え ABI5 をプルダウンした時に共沈する ABRE 断片を定量する DNA プルダウン法、あるいは酵母 1-ハイブリッド法などによっても検討しており、FC 共存の影響についてもあわせて報告する予定である。

14-3-3 protein, abscisic acid, protein-protein intraction

講演番号：3A46a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ A 校舎 46 会場

bZIP 型転写因子と 14-3-3 相互作用に関する研究

Studies on interaction of bZIP transcription factor to 14-3-3 protein

○千葉 光浩[1]、深澤 壽太郎[2]、三橋 渉[1]、加藤 修雄[3]、豊増 知伸[1] ([1]山形大農、[2]広島大院理、[3]大阪大産研)
○Mitsuhiro CHIBA[1], Jutarou FUKAZAWA[2], Wataru MITSUHASHI[1], Nobuo KATO[3], Tomonobu TOYOMASU[1] ([1]Yamagata Univ., [2]Hiroshima Univ., [3]Osaka Univ.)

【背景・目的】14-3-3 タンパク質は全ての真核生物に存在する制御タンパク質で、ターゲットにおける結合モチーフにはリン酸化 S/T を含み、転写因子や酵素等のタンパク質リン酸化を介する制御に深く関係すると考えられている。演者らは、シロイヌナズナでのアブシジン酸シグナルを正に制御する bZIP 型転写因子 ABI5 は 14-3-3 と結合し、その複合体は糸状菌二次代謝物フシコクシンにより安定化する可能性を 2011 年の本大会で発表した。一方、イネにおいて bZIP 型転写因子の一つである OsFD1 は花成形成遺伝子の発現を制御するが、その機能制御には 14-3-3 との相互作用が関与することが最近報告された。そこで本研究では OsFD1 のシロイヌナズナホモログである bZIP 型転写因子 AtFD1 と 14-3-3 との相互作用について生化学的に検討することを目的とした。
【方法・結果】AtFD1 の全長野生型に加え、切断変異体、点変異体等を用いた。点変異体は、推定 14-3-3 結合モチーフ内のリン酸化標的スレオニンをアラニン置換、グルタミン酸置換し、それぞれ非リン酸化状態、恒常的リン酸化状態を模倣した。これらの AtFD1 タンパク質とシロイヌナズナの 14-3-3 を用いて、in vitro 組換えタンパク質プルダウンアッセイ、および酵母ツーハイブリッド法により検討したところ、AtFD1 は 14-3-3 結合モチーフを含む C 末端側で 14-3-3 と相互作用する可能性が示された。しかしながら、これらのアッセイ系においては、ABI5 の場合とは異なり、フシコクシンがそれらの複合体を安定化することを示す結果は得られなかった。

14-3-3 protein, transcription factor, protein-protein interaction

講演番号：3A46a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ A 校舎 46 会場

Analysis of sugar signaling pathway via plastid invertase in Arabidopsis seedlings

○ Daniel Padilla-Chacon[1,2], Kumi Otori[1,2], Takanori Maruta[3], Masahiro Tamoi[1,2], Shigeru Shigeoka[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [2]JST, CREST, [3]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ.)

Chloroplast biogenesis is the most important event during the leaf development in higher plants. Despite its importance, little is known how plants regulate the development of photosynthetic apparatus via sugar signals. Sucrose provides energy and carbon skeletons for growth and reserve storage and acts as a signal molecule. Recent findings suggest that the route of sucrolysis is of great relevance for sugar signalling in different subcellular locations in plant cells. In particular, the subsequent increase in sucrose and/or glucose concentration triggers the repression of genes involved in the photosynthetic components, suggesting that sugar signaling pathway exists also in the chloroplasts. Recently, we isolated an *Arabidopsis* gain-of-function mutant of plastidic neutral/alkaline invertase (INV-E), *sicy*-192, as a sucrose sensitive mutant and found that INV-E participates in the regulation of carbon/nitrogen (C/N) balance (*J. Biol. Chem*. 2010). In the mutant, INV-E was point-mutated at codon 294, with Tyr substituted for Cys (C294Y). However, it is still unclear why the s*icy*-192 mutant delays the greening cotyledon under sucrose-containing medium. To clarify the function of INV-E in the chloroplasts, we studied the INV-E-interacting protein using a yeast two hybrid system. We screened the transformants and isolated two positive colonies, named INV-E-Interacting Protein (IIP-1,-2). The cDNAs were ligated into pGADT7 vector and then retransformed into yeast 2YH Gold cells with pGBKT7-INV-E, pGBKT7-INV-E C294Y and pGBKT7-emphy as a negative control. Then we confirmed that IIP-1 and IIP-2 interacted with INV-E independently of substitution C294Y. Transcript levels of IIP-1 were similar to those of INV-E during germination with various sugar treatments. However, those of IIP-2 increased in response to various sugar treatments. These results indicated that IIP-2 is regulated in transcript level by sugar contents and might function in early stage of seedling by interacting with INV-E. Now we are trying to analyze the interactions and characterizing the subcellular locations.

plastid signaling, invertase, sugar signaling

講演番号：3A46a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ A 校舎 46 会場

プラスチドシグナリングを介したインベルターゼの炭素・窒素バランス制御への関与
Involvement of an invertase in the regulation of carbon and nitrogen balance via the plastid signaling

○宮崎 望[1]、Daniel Padilla-Chacon[2,3]、野坂 亮太[1]、田中 裕之[1]、大鳥 久美[2,3]、丸田 隆典[4]、吉村 和也[3,5]、田茂井 政宏[1,2,3]、重岡 成[1,2,3]（[1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]JST, CREST、[4]島根大・生資科・生命工、[5]中部大・応生・食栄）
○Nozomi Miyazaki[1], Daniel Padilla-Chacon[2,3], Ryota Nosaka[1], Hiroyuki Tanaka[1], Kumi Otori[2,3], Takanori Maruta[4], Kazuya Yoshimura[3,5], Masahiro Tamoi[1,2,3], Shigeru Shigeoka[1,2,3] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]JST, CREST, [4]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [5]Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ.)

【目的】高等植物の炭素（C）と窒素（N）の代謝は、それらの絶妙なバランス（C/N バランス）により厳密に制御されている。これまでに我々は、ショ糖を含む培地上でシードリングの緑化が抑制される変異株（*sicy-192*）を単離し、本変異株がプラスチド型インベルターゼ（INV-E）の機能獲得型変異株であることを明らかにした(*J. Biol. Chem.* 2010)。ショ糖添加培地上における *sicy-192* では、光合成系および窒素同化系遺伝子群の発現がそれぞれ抑制および誘導されていたことから、INV-E は C/N バランス制御に関与することが示された。ところで、核コードの光合成系遺伝子の発現は、プラスチド遺伝子発現（PGE）を発端としたプラスチドから核への逆行性シグナリング（プラスチドシグナリング）により制御されることが知られている。そこで、*sicy-192* におけるプラスチドシグナリングに関与する遺伝子群の発現について調べるとともに、プラスチドシグナリングのマスターレギュレーターである GENOME UNCOUPLED1 欠損株（*gun1-101*）との二重変異株を用いた解析を試みた。
【結果・考察】ショ糖添加培地上の *sicy-192* において、プラスチドコード RNA ポリメラーゼ（PEP）の下流遺伝子の発現の抑制が認められ、*sicy-192* 変異は PGE を抑制することが明らかになった。さらに、ショ糖添加培地上の *sicy-192* で認められた光合成系遺伝子群の発現抑制および窒素同化系遺伝子群の発現誘導は、*sicy-192 gun1-101* 二重変異株において部分的に回復していた。次に、*sicy-192* と二重変異株を用いてマイクロアレイ解析を行った。野生株と比較して、*sicy-192* では 1017 遺伝子の発現が 2 倍以上または 1/2 以下に変化していたが、その約 40%にあたる 420 遺伝子の発現は GUN1 欠損により有意に回復していた。それらには、C/N 代謝に関わる遺伝子だけではなく、PGE、テトラピロール生合成やプラスチドシグナリングに関連する遺伝子が数多く含まれた。したがって、*sicy-192* 変異は PGE を抑制し、GUN1 を介したプラスチドシグナリングを活性化することにより C/N 代謝系遺伝子を含む核コード遺伝子の発現を変化させることが明らかになった。興味深いことに、*sicy-192* のショ糖高感受性は *gun1-101* 欠損により促進されたことから、本変異株におけるシードリング緑化抑制は GUN1 の上流で生じていること、また GUN1 経路はプラスチド異常の回復に必要であることが示唆された。現在、*sicy-192* 変異に起因するプラスチドシグナリングとプラスチド型ヘキソキナーゼ（HXK3）の関連を明らかにするため、*sicy-192* および HXK3 欠損株の二重変異株を用いた解析を進めている。

invertase, C/N balance, plastid signaling

講演番号：3A46a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ A 校舎 46 会場

光合成強化植物における C/N バランス制御の初期応答
Early response to maintenance of C/N balance in photosynthesis-enhanced plants
○丸山 俊樹[1]、西中 大記[2]、大鳥 久美[2,3]、Daniel Padilla-Chacon[2,3]、田茂井 政宏[1,2,3]、重岡 成[1,2,3]
([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]JST,CREST)
○Toshiki Maruyama[1], Hiroki Nishiaka[2], Kumi Otori[2,3], Daniel Padilla-Chacon[2,3], Masahiro Tamoi[1,2,3], Shigeru Sigeoka[1,2,3] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]JST,CREST)

【目的】植物は炭素(C)と窒素(N)の代謝調節に関する個別の調節機構に加えて、細胞内のCおよびN代謝物の相対量比（C/Nバランス）を感知し、環境に適応する能力を備えているが、その詳細は明らかにされていない。これまでに我々は、ラン藻由来FBP/SBPaseを葉緑体で発現させることにより光合成能が増大し、生育促進が見られることを明らかにしてきた。これらの形質転換体ではC代謝のみを強化したのにもかかわらず、C/Nバランスに変化が認められなかった。そのためCO_2固定能の増大に伴いN代謝系が促進されたと考えられる。そこで、C/Nバランスの制御機構を明らかにすることを目的として、シロイヌナズナ葉緑体でのFBP/SBPase発現による光合成能強化にともなうC代謝の変化がN代謝産物、関連酵素の活性および遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。
【結果】FBP/SBPase を葉緑体で発現させたシロイヌナズナ(ApFS)は、生育初期（2 週齢）においてデンプンが増加し、成熟期（5 週齢）ではデンプンに加えショ糖も増加していた。また、カルビン回路関連酵素の遺伝子発現量が 2 週齢、5 週齢いずれにおいても減少していた。一方、N 代謝産物は 2 週齢では多くの遊離アミノ酸量が減少していたが、5 週齢では増加していた。N 代謝に関連する遺伝子は 2 週齢においてはアスパラギン合成酵素 *ASN1* および硝酸トランスポーターファミリーの１つである *NRT2.5* の遺伝子発現量が増加していたが、他の多くの *NRT* ファミリーの遺伝子発現量は減少していた。5 週齢においては *ASN1* のみならず硝酸還元酵素 *NR1* の発現量も増加していた。興味深いことに 2 週齢で増加していた *NRT2.5* の遺伝子発現量は 5 週齢では減少していたが、2 週齢で減少していた *NRT* ファミリーの遺伝子発現量は 5 週齢では増加していた。以上の結果より、生育初期では光合成能の上昇により増加した代謝中間体が、タンパク質合成に用いられることから、一時的な N 不足状態になり、アミノ酸の生合成を促進するための遺伝子が誘導される。その C/N バランスの変化を感知して、C 代謝関連遺伝子の発現は抑制、N 同化系遺伝子の発現を誘導することにより、C/N バランスを維持していると考えられる。

photosynthesis, C/N balance, nitrogen metabolism

講演番号：3A46a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ A 校舎 46 会場

シロイヌナズナサイトゾル型グルタミン合成酵素 1;2 は根でアンモニウムによって誘導されアンモニウムを同化する

Arabidopsis cytosolic glutamine synthetase 1;2 is induced by ammonium supply and assimilates ammonium in root

○小西 範幸、早川 俊彦、山谷 知行、小島 創一（東北大院農）
○Noriyuki Konishi,Toshihiko Hayakawa,Tomoyuki Yamaya,Soichi Kojima (Tohoku Univ.)

窒素栄養の効率的な吸収と同化は、植物の成育を規定する重要な因子の一つである。外界から植物細胞内へ輸送された硝酸やアンモニウムは、グルタミン合成酵素（GS）によりグルタミンへ同化される。シロイヌナズナの根は、酵素学的な性質の異なる 4 つのサイトゾル型グルタミン合成酵素（GS1）を有している。これらのアイソザイムの中で、GLN1;2 は根へ供与されたアンモニウムの同化を中心的に担っている可能性を示すいくつかの事実がある。第一に、窒素欠乏条件下のシロイヌナズナ根へアンモニウムを供給すると、*GLN1;2* の転写産物量は増大する。第二に、GLN1;2 の酵素学的な性質はアンモニウムに対する親和性が低い。第三に、*GLN1;2* のプロモーター活性はアンモニウムの供給後に根の表皮と根毛で集積する。
我々は、アンモニウム同化における GLN1;2 の役割を明確にするために、T-DNA の挿入によって機能が不全となった GLN1;2 の機能欠損変異体を獲得し、この成育を野生型と比較することで、GLN1;2 の機能を詳細に解明することに取り組んだ。その結果、GLN1;2 を欠損すると、根へアンモニウムを供給したときに、アンモニウムがグルタミンへ変換される反応が顕著に滞ることが判明した。さらに、地下部におけるグルタミンを除く遊離アミノ酸が全体的に増加することとは対照的に、地上部における遊離アミノ酸が減少することが判明した。また、蛍光緑色タンパク質（GFP）をレポーターとして、*GLN1;2* 遺伝子のプロモーター領域を連結した融合遺伝子を導入し、プロモーターの欠損解析を行った。その結果、*GLN1;2* 遺伝子の開始コドンから約 3.6 kb 上流にある 21 bp の配列が *GLN1;2* 遺伝子のアンモニウム供給に応答した発現に必要であることを見いだした。さらに、GLN1;2 プロモーター領域内に見いだされた、アンモニウムへの応答性に必要な領域を、ベータグルクロニダーゼタンパク質（GUS）へ連結した融合遺伝子を導入し、この配列が単独でアンモニウム応答性を示すか検討した。
また、この領域に結合するタンパク質を、酵母ワンハイブリッド法で単離することに取り組んだ。

plant nutrition, nitrogen metabolism

講演番号：3A46a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ A 校舎 46 会場

シロイヌナズナ由来葉緑体局在芳香族アミノ酸トランスポーター候補遺伝子産物の機能解析

Functional analysis of a chloroplastic aromatic amino acid transporter candidate from Arabidopsis

○秋田 充、SATTASUK Kwanchanok、清水 綾子、河野 真央（愛媛大農）
○Mitsuru AKITA,Kwanchanok SATTASUK,Ayako SHIMIZU,Mao KOHNO (Ehime Univ.)

【目的】芳香族アミノ酸は、植物の二次代謝産物合成の前駆物質として重要であり、葉緑体で合成される。しかし、合成後の芳香族アミノ酸がどのような輸送蛋白質を利用し、どのようなメカニズムで葉緑体外に移動するのかについてはこれまで未解明であった。そこで、われわれは、シロイヌナズナゲノム中から葉緑体の局在が予想される芳香族アミノ酸トランスポーター候補遺伝子（At5g19500）を見出した。まず、この遺伝子産物（At5g19500p）を*in vitro*葉緑体蛋白質輸送実験系に適用することで、At5g19500pが葉緑体へ輸送され、内包膜に局在することを明らかにした（１）。このことは、この実験系によりアミノ酸トランスポーターの葉緑体局在を証明した世界で初めての例となった。At5g19500pを過剰発現した大腸菌を用いたアミノ酸輸送実験を行うことで、At5g19500pのさらなる機能解析を現在行っている。
【方法及び結果】内在性のアミノ酸輸送活性を抑制するために、大腸菌に存在する5種の主要な芳香族アミノ酸トランスポーター遺伝子を破壊した大腸菌変異株をまず作製した。At5g19500pを過剰発現したり、恒常的に発現させた大腸菌変異株の取り込んだ放射ラベルしたアミノ酸の放射活性を測定することで、輸送されるアミノ酸の特異性や輸送活性、さらには、アミノ酸輸送の形態を調べている。また、葉緑体でのAt5g19500pの配向性のヒントを得るために、カルボキシ末端にプロテアーゼ認識配列とエピトープタグを連結したAt5g19500pを過剰発現した大腸菌から得たスフェロプラストをプロテアーゼ処理することで、大腸菌細胞質に埋め込まれたAt5g19500pの配向性をエピトープタグのプロテアーゼ感受性を指標に調べている。今回の発表においては、これら一連の実験から得られた結果について発表する。

引用文献

１． Sattasuk *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**(11): 2200-2206 (2011)

chloroplast, amino acid transporter

講演番号：3A46a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ A 校舎 46 会場

アジサイのアルミニウム集積と耐性に関わる輸送体遺伝子の取得と機能解明
Studies on genes involved in aluminum transport and tolerance of *hydrangea macrophylla*
根岸 孝至[1]、大島 健志郎[2]、服部 正平[2]、金井 雅武[3]、真野 昌二[3]、西村 幹夫[3]、○吉田 久美[1] ([1]名古屋大情報科学、[2]東京大新領域、[3]基礎生物学研)
Takashi Negishi[1], Kenshiro Oshima[2], Masahira Hattori[2], Masatake Kanai[3], Shoji Mano[3], Mikio Nishimura[3], ○Kumi Yoshida[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Univ. Tokyo, [3]NIBB)

［**目的**］酸性土壌の主たる害は、土壌中の可溶化したアルミニウムイオン（Al^{3+}）による。アジサイ（*Hydrangea macrophylla*）は酸性土壌耐性植物として知られ、その青色ガク片の発色にはAl^{3+}が必須である。液胞中でアントシアニンのデルフィニジン 3-グルコシドがAl^{3+}と錯体を形成し、助色素の 5-アシル化キナ酸エステル類（ネオクロロゲン酸、5-*O*-*p*-クマロイルキナ酸）がこれを安定化、可溶化して青色が発色する。しかし、Al^{3+}が土壌中から根に吸収されて地上部へ移行した後、ガク片の液胞まで到達する仕組み、およびアルミニウム耐性の仕組みは全く不明であった。今回、アジサイからアルミニウム輸送に関わる遺伝子を単離し、これらの発現、局在、および機能解明を行なった。さらに、シロイヌナズナに導入してアルミニウム耐性を調べた。

［**方法と結果**］着色ステージにわけて採取したアジサイ青色ガク片から調製した cDNA ライブラリーより、約 12,000 の遺伝子配列を読みマイクロアレイを作製した。ステージ別の発現量変化と配列情報による局在と機能の予測により、液胞型 Al 輸送体候補を選んだ。アルミニウム感受性酵母株を用いた活性試験により機能を確認し、液胞型 Al 輸送体遺伝子（*HmVALT*）を同定した。さらに、細胞膜 Al 輸送体遺伝子候補を選び出し、同様の試験により細胞膜に局在する 2 種類の Al 輸送体遺伝子を取得した（*HmPALT1*、*HmPALT2*）。

HmVALT と *HmPALT1* はアクアポリンファミリーに、*HmPALT2* はアニオントランスポーターに属していた。*HmPALT1* はガク片でのみ発現していた一方、*HmVALT* と *HmPALT2* はガク片のみならず根、茎、葉など他の組織でも発現が見られた。これらの遺伝子をシロイヌナズナに導入して過剰発現株を作製し、Al に対する感受性を根の伸長を指標に調べた。*HmVALT* を導入すると Al 耐性になったのに対し、*HmPALT1*、あるいは *HmPALT2* 導入株は野生株と比較してより Al 感受性になった。また細胞膜型と液胞型の両遺伝子を導入した株は再び Al 耐性を示した。これらの結果は、アジサイの根では HmPALT2 により Al が吸収された後、HmVALT により液胞へ一旦隔離されること、さらに長距離輸送された後のガク片組織では、HmPALT1 と HmPALT2 の両輸送体により細胞質へ運ばれ、HmVALT が液胞への集積を担っていることを示唆する。現在、遺伝子発現の制御機構も含め調べている。

ゲノム情報の無い非モデル植物から、新規遺伝子を取得しその機能研究を行うために、本手法が有効であることを実証できたものと考える。

Negishi, T. et al. *PLOS ONE*, **7**, e73189 (2012).

hydrangea macrophylla, aluminum transport, aluminum tolerance

講演番号：3A46a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ A 校舎 46 会場

タバコ培養細胞 BY2 株における大豆アレルゲン Gly m Bd 28K の液胞選別輸送シグナルの解析
Characterization of the vacuole sorting signal of Gly m Bd 28K, a soybean allergen in tobacco BY2 cells

○弓岡 仁美[1]、三崎 亮[2]、横路 三有紀[3]、近藤（比江森）美樹[4]、木本 眞順美[1]、山下 広美[1]、辻 英明[1]、藤山 和仁[2]（[1]岡山県大保福・栄養、[2]阪大・I.C. Biotech.、[3]久留米大・医、[4]徳島文理大・食物栄養）
○Hitomi YUMIOKA[1], Ryo MISAKI[2], Miyuki YOKORO[3], Miki HIEMORI-KONDO[4], Masumi KIMOTO[1], Hiromi YAMASHITA[1], Hideaki TUJI[1], Kazuhito FUJIYAMA[2] ([1]Okayama Prefectural Univ., [2]Osaka Univ., [3]Kurume Univ., [4]Tokushima Bunri Univ.)

【目的】大豆は我が国において主要なタンパク質の供給源の一つであり、栄養価の優れた食品素材であるが、食物アレルギーを惹起する原因食品でもある。大豆の主要アレルゲンの 1 つである Gly m Bd 28K は、クローニングされた cDNA から得られる推定アミノ酸配列のホモロジー検索及び大豆抽出タンパク質の N 末端アミノ酸配列分析により、N 末端側にシグナルペプチド、C 末端側に 23-kDa ペプチドを有する前駆体型として生合成され、N 末端側が切断された後、大豆種子中で Gly m Bd 28K と 23-kDa ペプチドとして液胞由来のプロテインボディに局在すると推定された。しかし、遺伝子レベルにおいてもその前駆体の完全 5'側塩基配列は明らかにされていない。そこで、本研究では、推定 N 末端シグナルペプチド配列の構造を調査し、その配列の植物細胞内での機能について検討した。
【方法及び結果】大豆登熟種子より Gly m Bd 28K をコードする全 cDNA をクローニングし、N 末端から 24 アミノ酸残基がシグナルペプチドであると推定した。植物細胞内における機能を検証するため、タバコ培養細胞 BY2 株 (*N.tabacum* L. cv. Bright Yellow 2) で推定シグナルペプチドを発現した。緑色蛍光タンパク質（Enhanced green fluorescent protein, EGFP）と前駆体型 Gly m Bd 28K の融合タンパク質を BY2 細胞に導入し、BY2 細胞における EGFP の局在を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。この結果、推定シグナルペプチドはタンパク質を液胞へ輸送するために必要であるが十分ではないことが分かった。EGFP の N 末端側にシグナルペプチドを付加した SP-EGFP は安定して液胞へ輸送されず、その多くが小胞体や培地中で見られた。一方、SP-EGFP の C 末端側に Gly m Bd 28K 配列を付加した SP-EGFP-Gm28K 及びその C 末端側に 23-kDa ペプチドを付加した SP-EGFP-Gm28-23K は、安定して液胞へ輸送された。また、SP-EGFP の C 末端側に 23-kDa ペプチドを付加した SP-EGFP-Gm23K は、液胞へは輸送されずに小胞体に留まった。したがって、N 末端から 24 アミノ酸残基は液胞輸送シグナルとして機能するが、安定した液胞輸送にはシグナルペプチドとともに少なくとも Gly m Bd 28K の内部配列が必要であることが明らかになった。

soybean, allergen, signal peptide

講演番号：3A46a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ A 校舎 46 会場

トウガン篩管滲出液由来新規耐虫タンパク質 BPLP の遺伝子クローニングと精製タンパクおよび発現タンパク質の生理・生化学活性について

Purification, cDNA cloning, and gene expression of a phloem lectin-like anti-insect defense protein BPLP found from the phloem exudate of wax gourd, *Benincasa hispida*

太田 英司、土屋 渉、山崎 俊正、中村 匡利、平山 力、○今野 浩太郎（農業生物資源研究所）
Eiji OTA, Wataru TSUCHIYA, Toshimasa YAMAZAKI, Masatoshi NAKAMURA, Chikara HIRAYAMA, ○Kotaro KONNO (National Institute of Agrobiological Sciences)

トウガン(*Benincasa hispida*、ウリ科)の葉はエリサン（ヤママユガ科）などいくつかの鱗翅目幼虫に対して毒性を示し、鱗翅目幼虫はトウガンの葉を食べてもほとんど成長しない。トウガン葉の耐虫活性は、葉を傷つけたときに葉脈から滲出する篩管液によって担われており、篩管液自体がエリサンに対して顕著な成長阻害活性を示したため､耐虫性物質の精製を試み 35kDa の新規耐虫性タンパク質 BPLP（*Benincasa hispida* Phloem Lectin-like Protein から命名）を精製した。精製 BPLP は 70μg/g 人工飼料（湿体）（0.007%）の低濃度でエリサン 1 齢幼虫に対して有意な成長阻害活性を示し、105μg/g では成長を完全に阻害するなど強い耐虫活性を示し、応用上の有用性が示唆された。そこで、この耐虫性タンパク質のクローニングを試み、トウガン篩管液由来耐虫性タンパク質 BPLP の完全長 cDNA（1076 塩基）のクローニングに成功した。ORF は 909 塩基からなり、BPLP が 303 残基のアミノ酸からなることを意味したが､予測される分子量 34973.49Da は SDS-PAGE から予測された 35kDa と一致した。BPLP はウリ科植物篩管レクチン（PP2 ウリ科篩管液の凝固反応に関与）と 51%の相同性を示し、ウサギ赤血球凝集活性を示し、それがキチンオリゴマーで阻害されるなどキチン特異性レクチンであることを示唆したが、1. 約 150 アミノ酸残基からなる配列が 2 回繰り返した構造のみから成り立つ点、2. PP2 では凝固機能への関与が推測されているシステイン残基を欠く点、で PP2 と異なり、BPLP が PP2 と本質的に異なる機能を持つタンパク質であることが示唆された。さらに、本遺伝子を発現ベクター（pET100/D-TOPO）に組み込み大腸菌での発現を試みた。発現タンパク質はN末端にベクター由来の"Pro-Phe-Thr"の 3 アミノ酸が付加されている点が精製品と異なっていた。しかし、発現タンパク質は昆虫に対する耐虫活性が天然品精製タンパク質よりは低いものの、0.1-0.2%の濃度（湿体人工飼料中）でエリサン 1 齢幼虫に対して有意な成長阻害活性を示した。またキチンビーズに完全に吸着されるなどキチン特異性レクチンとしての性質を示した。

defense protein, phloem sap-derived chitin-binding lectin, plant-insect interactions

講演番号：3A46a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ A 校舎 46 会場

NMR メタボロミクスによるジャガイモ疫病抵抗性マーカーの探索
NMR-based metabolite profilings in potato cultivars with different susceptibility to late blight
○関山 恭代[1,2]、池田 成志[3]、津田 昌吾[3]、染谷 信孝[3]、近山 英輔[2,4]、菊地 淳[2,5,6,7]、小野 裕嗣[1] ([1]農研機構・食総研、[2]理研 PSC、[3]農研機構・北農研、[4]新潟国際情報大・情報システム、[5]横市大院・生命ナノ、[6]名大院・生命農学、[7]理研 BMEP)
○Yasuyo SEKIYAMA[1,2], Seishi Ikeda[3], Shogo Tsuda[3], Nobutaka Someya[3], Eisuke Chikayama[2,4], Jun Kikuchi[2,5,6,7], Hiroshi Ono[1] ([1]Nat. Food Res. Inst., [2]RIKEN PSC, [3]NARO Hokkaido Agric. Res. Center, [4]Dept. Inf. Cult., Niigata Univ. Int. Inf. Stud., [5]Grad. Sch. NanoBiosci., Yokohama City Univ., [6]Grad. Sch. Bioagri. Sci, Nagoya Univ., [7]RIKEN BMEP)

【目的】
ジャガイモ疫病は、疫病菌 *Phytophthora infestans* によって引き起こされる重要病害であり、茎葉枯死および塊茎の腐敗による減収などの被害をもたらす。*P. infestans* の特定のレース に対しては、種々の抵抗性遺伝子（R 遺伝子）とこれらの組み合わせを持つバレイショ品種が育種されており、特異的な抵抗性を示す（真性抵抗性）。一方、疫病菌レース の方も次々と分化し、レース 1～11 をはじめ種々の病原性のものが見出されている。R 遺伝子による抵抗性は強力であるが、一旦対応するレースが発生するとひどく罹病するため，近年は圃場抵抗性に着目した育種が進められている。疫病圃場抵抗性は複数の遺伝子に支配されるものといわれ、どの疫病菌レースにも同様の抵抗性を示し、罹病しても病状が軽い。圃場抵抗性を評価するためには真性抵抗性遺伝子型の把握が重要であるが、その判別に必要な疫病菌レースが保存されていない場合が多い。室内での接種試験では期待した通りの抵抗性を発揮しない場合があり、また、無防除栽培圃場等での検定は、結果を得るまでに数ヶ月の期間と多くの労力を要するなどの問題があった。本研究では、ジャガイモ疫病抵抗性の判別のための新たな指標を探るべく、メタボローム解析によりマーカー成分を探索したので報告する。
【方法および結果】
疫病抵抗性の異なるバレイショ 6 品種について、病徴が観測される前の側枝をサンプリングした（北海道農業研究センター新生圃場、2010 年 7 月）。感受性品種として‘男爵薯’、‘コナフブキ’ ‘さやか’、圃場抵抗性品種として‘マチルダ’および‘さやあかね’、真性抵抗性品種として‘ゆきつぶら’を用いた。各品種 3 個体ずつについて、^{1}H-NMR スペクトルを用いたプロファイリングを行い、2 次元スペクトルにより代謝物の同定を行った。リン酸緩衝液およびメタノール混合緩衝液抽出物のそれぞれについて、抵抗性の強弱を特徴づけるマーカー成分を同定した。より簡易で安価な抵抗性の判別方法として、マーカー成分の 1 つである L-リンゴ酸について、市販のキットを用いた酵素法による定量を検討した。L-リンゴ酸は、乾燥重量 1 mg の側枝に約 10μg～50μg 程度含まれ、罹病度を表す AUDPC 値が低い（すなわち、抵抗性が強い）品種ほど含量が多くなり、この方法による抵抗性の判別が可能であることが示唆された。今後は、適正なサンプリング時期や年次間差などについて検討していく必要がある。

Metabolomics, NMR, Potato late blight

講演番号：3A46a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ A 校舎 46 会場

Scopolia 属植物の葉切片からの不定器官形成および不定芽の特性について
Formation of adventitious shoots from leaf segments of *Scopolia* plants and their characteristics
○小畑 瑛理、佐々木 和生、下村 講一郎（東洋大院・生命）
○Eri OBATA,Kazuo SASAKI,Koichiro SHIMOMURA (Toyo Univ.)

Scopolia 属植物はナス科の多年草で、根にトロパンアルカロイドを含んでいる。日本に自生しているハシリドコロ（*S. japonica*）の根茎は、ロート根として鎮痙、鎮痛薬に用いられている重要な薬用植物の一つである。近年、個体数の減少から生薬原料としての枯渇が懸念される。葉を用いての不定器官形成による大量増殖法の確立を目的に、培養条件を検討した。また、ネパール原産で根の形態が異なる *S. tangutica* でも同様の実験を行い不定器官の形成を試みるとともに、形成された不定シュートのうち形態異常を示した個体に関して、ITS 領域における DNA レベルでの変異の有無を調べた。

〈材料および方法〉
無菌培養している *S. japonica* および *S. tangutica* の葉から主脈を含む５㎜角の切片を切り出し、植物ホルモンを種々の濃度で組み合わせた 1/2MS 固形培地に植え付け、培養を行った。
形成された不定芽は植物ホルモン無添加の固形培地に移植し、培養を続けた。
形態異常を示した不定芽に関して ITS 領域の DNA レベルでの変異の有無を確認した。

〈結果・考察〉
これまで、*S. japonica* 野生植物体の茎切片あるいは根茎切片からの不定芽形成の成功例が報告されているが、今回初めて、thidiazuron を用いて培養系植物体の葉切片からの不定芽形成に成功した。このことにより、本植物の大量増殖が可能になると考えられる。
S. tangutica においても、培養系の葉切片からの不定芽形成の報告はなく、本植物について検討した結果、葉切片あたり 4.6±0.7 本の不定芽が形成されることが判った。形成された不定芽のうち形態異常を示すものは、不定芽が形成された切片あたり 2.3 本観察され、これらの不定芽に関して、ITS 領域の変異を調査したが、DNA レベルでの変異は見られなかった。これらのシュートをホルモンフリーの固形培地に移植し、フィルター付きのアルミフォイルを用いて培養容器内の換気を良好に保つことにより、正常な形態にもどることが判った。

adventitious bud, *Scopolia tangutica*, hyperhydricity

講演番号：3A46a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ A 校舎 46 会場

植物ゲノムの突然変異検出法の開発 II
Development of a mutation-detection system for plant genomes (II)
○平津 圭一郎[1]、平野 雅士[1]、塩谷 詩織[1]、牧野 耕三[1]、布柴 達男[2]([1]防衛大・応化、[2]国基大・教養)
○Keiichiro Hiratsu[1], Masashi Hirano[1], Shiori Shiotani[1], Kozo Makino[1], Tatsuo Nunoshiba[2] ([1]NDA, [2]ICU)

【目的】植物における突然変異は、種の多様化や栽培植物の育種に寄与する重要な生命現象だが、その変異誘発機構やDNA修復機構の知見は微生物や哺乳類のそれと比して少ない。シロイヌナズナのゲノム配列情報からは、DNAの複製･修復にかかわる遺伝子産物には他の真核生物との高い共通性が示されたが、例えば転写因子に多くみられる植物特異的な遺伝子の変異誘発機構への関与は未解明の部分が多い。

本研究では植物の突然変異に関与する因子を同定するための初期段階として、ゲノムに生じる変異を幅広いスペクトルで検出できる実験系の開発を行った。

【方法】変異の標的遺伝子として、大腸菌の*supF*遺伝子を用いた。*supF*はアンバー変異に対してチロシンを挿入するtRNAをコードしている。*supF*を含み大腸菌で自律複製可能なプラスミドを植物ゲノムに挿入して変異固定を行い、植物ゲノムからプラスミドを回収して変異検定用大腸菌で変異導入された*supF*を選択する突然変異検出系の構築を試みた。日本農芸化学会2012大会では、１）*supF* バイナリーベクターの作製、２）コントロールT-DNA(*supF* plasmid-35S-Nos-bar)のシロイヌナズナへの導入、３）ビアラホス耐性のT２植物体（ビアラホス耐性：感受性＝3：1）を用いた自然突然変異の検出を報告した。

本研究報告では、定量的な実験を行うために1コピーのT-DNAホモ挿入株をサザン解析により同定し、これを用いて自然突然変異およびEMS処理による誘発変異の検出を行った。また変異検出では、変異*supF* plasmidをもつ大腸菌の選択法を、偽陽性の多いLacZ+/-選択から改良型のナリジキシン酸/ストレプトマイシン2重薬剤耐性選択に変更した。

【結果】EMS処理による変異頻度は自然突然変異と比べて3倍高かった。変異スペクトルは、自然突然変異では1～数塩基の欠失に対し、EMS処理ではG:C→A:T塩基置換がそれぞれ約8割を占める主要な変異であった。これらの結果をもとに、本検出法の有効性を検討して報告する。

mutation, plant, supF

講演番号：3A46a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ A 校舎 46 会場

自家不和合性ペチュニアの花粉側因子 SLF の自他識別機構の解析

Molecular characterization of the pollen determinant *S*-locus F-box protein in self-incompatible *Petunia*.

○久保 健一、円谷 徹之、梶原 貴映、高山 誠司 (奈良先端大バイオ)
○Ken-ichi KUBO,Tetsuyuki ENTANI,Kie KAJIHARA,Seiji Takayama (NAIST Bio.)

【目的】多くの植物種は、自己と非自己の花粉を識別し自殖を回避する自家不和合性と呼はれる仕組みを発達させてきている。自家不和合性は、一般に一つの遺伝子座(*S* 遺伝子座)によって調節されており、ここには構造多型性を示す少なくとも二つの因子(雌ずい因子と花粉因子)がコードされている。ナス科植物ペチュニアにおいては、雌ずい因子はリボヌクレアーゼ活性をもつ酵素(S-RNase)であり、自己花粉管に特異的な細胞毒として機能して自家受精を妨げていると示唆されている。一方、花粉側因子は SLF（*S*-locus F-box）であり、これは E3 ユビキチンリガーゼの構成因子の一つ、F-box タンパク質であることから、SLF が花粉管内に侵入してきた非自己 S-RNase を特異的に認識・ユビキチン化し、プロテアソームを介して分解（無毒化）すると考えられてきた。近年、我々は花粉側因子として複数のタイプの SLFs が機能していることを証明し、多数存在する非自己 S-RNase を協調的に認識、解毒しているという、「協調的非自己認識システム」を提唱した(文献 1)。しかし、個々の SLF が自己・非自己の S-RNase を識別する仕組みは判っていない。そこで、本研究は SLF の自己・非自己識別に関わるアミノ酸部位の同定を目的とした。

【方法】自家不和合性ペチュニアの 2 つの対立遺伝子産物、S_5-SLF1 と S_9-SLF1 は、アミノ酸配列同一性が 97.4%と極めて高いにも関わらず、S_9-RNase の認識において違いを示す。そこで、S_5-SLF1 において、化学的性質が S_9-SLF1 と大きく異なる残基を選び、それらを S_9-SLF1 と同じアミノ酸にそれぞれ置換した変異型 S_5-SLF1 タンパク質を発現するコンストラクトを作成し、ペチュニアに導入して *in vivo* で機能解析を行った。

【結果】変異型 S_5-SLF1 は、本来野生型 S_5-SLF1 が持つ S_9-RNase に対する認識を失っていることが示唆された。従ってこれらのアミノ酸残基は、S_5-SLF1 が S_9-RNase を認識する上で重要なアミノ酸残基であると考えられる。

【参考文献】1. Kubo, K., Entani, T., Takara, A., Wang, N., Fields, A. M., Hua, Z., Toyoda, M., Kawashima, S., Ando, T., Isogai, A., Kao, T.-h., and Takayama, S. (2010). Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. ***Science*** 330, 796-799.

self-incompatibility, reproduction, self/non-self discrimination

講演番号：3A46p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ A 校舎 46 会場

根寄生雑草ヤセウツボの発芽過程におけるノジリマイシンによる糖代謝阻害と発芽抑制の関連性
Relationship between inhibitory effects of nojirimycin on sugar metabolism and germination of a root parasitic weed, *Orobanche minor*

○若林 孝俊[1]、安本 周平[1]、明石 智義[2]、青木 俊夫[2]、米山 弘一[3]、杉本 幸裕[4]、太田 大策[5]、村中 俊哉[1]、岡澤 敦司[1,5] ([1]阪大院・工、[2]日本大・生物資源、[3]宇都宮大・雑草研セ、[4]神戸大院・農、[5]阪府大院・生命環境・応用生命)
○Takatoshi WAKABAYASHI[1], Shuhei YASUMOTO[1], Tomoyoshi AKASHI[2], Toshio AOKI[2], Koichi YONEYAMA[3], Yukihiro SUGIMOTO[4], Daisaku OHTA[5], Toshiya MURANAKA[1], Atsushi OKAZAWA[1,5] ([1]Osaka Univ., [2]Nihon Univ., [3]Utsunomiya Univ., [4]Kobe Univ., [5]Osaka Pref. Univ.)

ハマウツボ科の根寄生雑草であるオロバンキ（*Orobanche* spp.）とストライガ（*Striga* spp.）は、アフリカを中心とした世界の乾燥～半乾燥地域における農業へ甚大な被害を及ぼしている．根寄生雑草の防除は急務な課題であるが，効果的な防除法は未だ確立されていない．これらの根寄生雑草は，宿主植物から浸出するストリゴラクトンを感知しなければ発芽できないという特異な発芽様式を有している．我々はこの特異な発芽過程に着目し，発芽時に起こる代謝を阻害することで新たな防除法を確立することを目的としている．

当研究グループにおいて行われた根寄生雑草ヤセウツボ（*Orobanche minor*）の発芽過程におけるメタボロミクスにより，ヤセウツボの発芽時に種子中の三糖が急速に減少し，同時に単糖が増加することが見出された．糖の代謝とヤセウツボの発芽の関係について知見を得るために，発芽刺激処理時に数種の糖加水分解酵素阻害剤を添加したところ，ノジリマイシン亜硫酸付加物（NJ）によりヤセウツボの発芽が顕著に抑制されることが明らかとなった．NJ はヤセウツボだけでなく他の根寄生雑草の発芽（*Striga gesnerioides*）や幼根の伸長（*S. hermonthica*）を抑制したが，ヤセウツボの宿主となるアカクローバーやシロイヌナズナ種子の発芽は阻害しなかった．このことから，NJ が根寄生雑草選択的な発芽阻害効果を有していることが示唆された．

NJ を添加し発芽が抑制された種子と，正常に発芽している種子中に含まれる糖の構成を分析した結果，NJ 処理種子では三糖が発芽種子と同様に減少していたが，その一方で代謝中間体と想定される二糖は顕著に蓄積しており，単糖は発芽種子と比較して減少していた．このことから，NJ はヤセウツボ種子の発芽に必要な単糖の供給を阻害することによって発芽を抑制していると考えられた．そこで，ヤセウツボ種子に NJ 添加と同時に三糖の構成糖である単糖を過剰量投与したところ，特定の単糖の投与によって，NJ による発芽率の低下が回復した．このことは，NJ が三糖の代謝を阻害し単糖の供給を抑制することで，発芽を阻害しているという我々の仮説を支持した．

本研究では，NJ がヤセウツボの発芽過程における糖代謝を阻害することで，その発芽を選択的に抑制することが示された．しかし，発芽過程における糖代謝経路もしくは発芽に関与するシグナル伝達経路のどの部分を NJ が阻害しているかについては未だ明らかになっておらず，その解明が今後の課題である．今後，NJ を使用することにより根寄生雑草の発芽メカニズムを解明することで，新規な根寄生雑草の防除法が確立出来ると期待される．

parasitic plant, Orobanche, germination

講演番号：3A46p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ A 校舎 46 会場

ソヤサポニン生合成に関わる配糖化酵素 Sg-3 及び Sg-4 の機能解析

Functional analysis of Sg-3 and Sg-4 glycosyltransferases involved in soyasaponin biosynthesis

○土永 浩輝[1]、鈴木 宗典[1]、高木 恭子[2]、高田 吉丈[3]、塚本 知玄[4]、關 光[1]、石本 政男[2]、村中 俊哉[1] ([1]阪大院・工・生命先端、[2]農業生物資源研、[3]農研機構・近中四農研、[4]岩手大院・農)
○Hiroki Tsuchinaga[1], Munenori Suzuki[1], Kyoko Takagi[2], Yoshitake Takada[3], Chigen Tsukamoto[4], Hikaru Seki[1], Masao Ishimoto[2], Toshiya Muranaka[1] ([1]Osaka Univ., [2]National Institute of Agrobiological Sciences, [3]NARO Western Region Agricultural Research Center, [4]Iwate Univ.)

【背景】ダイズはトリテルペノイド配糖体であるソヤサポニンを含有する。ソヤサポニンの一種である DDMP サポニン及びその分解物であるグループ B サポニンは抗ウイルス活性及び抗ガン活性などといった様々な薬理作用を有している。そのため、ソヤサポニンの生合成に関わる酵素群の機能解明により、付加価値の高い大豆品種を育成することが期待される。ソヤサポニンの生合成にはさまざまな配糖化酵素 (UGT) が関与しており、ソヤサポニンの構造多様化の一端を担っている。これまでに、C-3 位の第 2 糖としてガラクトース (Gal) を付加する UGT73P2 及び第 3 糖としてラムノース (Rha) を付加する UGT91H4 が報告されている [1]。一方、Takada らは、複数のサポニン組成変異体と野生型の交雑集団を用いることにより、C-3 位の第 2 糖としてアラビノース (Ara) を付加する UGT 遺伝子 *Sg-4* ならびに第 3 糖としてグルコース (Glc) を付加する UGT 遺伝子 *Sg-3* の存在を推定した [2]。本研究では、ポジショナルクローニングにより単離された *Sg-3* ならびに *Sg-4* の候補遺伝子を大腸菌で発現させ、Sg-3 ならびに Sg-4 の酵素機能解析を行うことを目的とした。
【方法・結果】ダイズ品種の茨城豆 7 号から単離した *Sg-4* (I)、Williams 82 から単離した *Sg-3* 及び *Sg-4* (W) の cDNA をそれぞれ pCold TF ベクターに挿入した。各遺伝子が挿入されたベクターを用いて、大腸菌 Rosetta™ (DE3) 株を形質転換し、リコンビナントタンパク質を発現させた。SDS-PAGE によるタンパク質の発現確認後、粗タンパク質 (Sg-4 (I)及び Sg-4 (W))、基質 (Soyasapogenol B mono glucuronide) 及び糖供与体 (UDP-Ara あるいは UDP-Gal) の 3 種をインビトロで反応させ、反応生成物を LC/MS 分析に供した。その結果、基質に Ara が付加した化合物が確認され、Sg-4 (I) ならびに Sg-4 (W) が基質に対して UDP-Gal よりも UDP-Ara により高い糖供与体選択性を示した。このことから、*Sg-4* が C-3 位の第 2 糖として Ara を付加する UGT 遺伝子であると強く示唆された。
現在、Sg-3 の機能解析を同時に進めており、さらに、Sg-4 (I) 及び Sg-4 (W) については His タグを用いて精製した後，各種糖供与体 (UDP-Gal, Ara, Glc, Rha) を用いて糖供与体の選択性を解析する予定である。
なお、本研究は生物系特定産業技術研究支援センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」の支援を受けて実施した。

[1] M. Shibuya *et al*., FEBS letters 584, 2258–2264 (2010) [2] Y. Takada *et al*., Breed. Sci. 61(5): 639-645 (2012)

soyasaponin, glycosyltransferase, soybean

講演番号：3A46p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ A 校舎 46 会場

コムギの Bx:UDP-Glc グルコシルトランスフェラーゼの性状解析

Characterization of Bx:UDP-Glc glucosyltransferase

○中村 ちひろ、仲下 英雄、須恵 雅之（東農大・応生化）
○Chihiro NAKAMURA,Hideo Nakashita,Masayuki Sue (Tokyo Univ. Aglicul. Dep. Appl. Biol. Chem.)

植物は様々な二次代謝化合物を配糖体として体内に蓄積している。配糖化は化合物の生理活性や化学的安定性などに大きな影響を与えるため、この反応を行う配糖化酵素は植物二次代謝において重要な役割を果たしているといえる。植物二次代謝に関与する配糖化酵素は、これまでに多くの植物からクローニングされているが、その結晶構造については 2 種の植物における配糖化酵素があるのみである。また、一般に植物二次代謝化合物配糖化酵素のアミノ酸配列は、互いにそれほど高い相同性を示さないため、基質認識に関与するアミノ酸残基などの情報についてはまだ不明な点が多い。そのため、これら酵素の機能解析は植物二次代謝研究において依然重要な研究対象となっている。コムギ、トウモロコシなどのイネ科植物がもつ耐病性二次代謝産物として知られるベンゾキサジノン類(Bx) も、グルコース配糖体（BxGlc）として液胞内に蓄積されている。そこで、本研究ではコムギ耐病性に関与するグルコシルトランスフェラーゼ（GT）の基質認識機構に関する研究を行うことにした。

パンコムギ（*Triticum aestivum*）より、これまでに 4 つの同祖遺伝子由来のアイソザイム(TaGTa~TaGTd）が単離されている。今回はこの中でもっとも多く発現している TaGTa を用いてその解析を行った。TaGTa は N-末端側に His タグを付加したものを大腸菌内で過剰発現させ、HisTrap カラムで精製した酵素を用いて活性の評価を行った。また、基質結合部位の推測は、これまで構造が知られている *Medicago truncatula* および *Vitis vinifera* の一次構造との二次構造予測に基づいたアライメントをした後、*Medicago truncatula* の GT (PDB: 2ACW) を鋳型としてホモロジーモデリングすることにより行った。酵素の触媒反応に直接関与すると思われる His19 を Ala に置換した変異体では、DIBOA および DIMBOA (7-methoxy-DIBOA) に対する酵素活性が完全に消失した。また、His19 の活性化に関与すると考えられる Asp114 を Ala に置換した変異体においてもそれらに対する活性は失われた。このことから、これら二つの残基は既知 GT と同様に酵素活性発現に直接的に関与していると考えられた。さらにグルコース供与体である UDP-Glc の保持に機能すると思われる Asp376、グルコース受容体の保持に関与すると考えられる Phe142 にそれぞれ変異を導入した酵素においても酵素活性は認められなかったことから、今回モデリングで得た TaGTa の構造はある程度の信頼性がおけるものと考えられた。今後は、TaGTa のグルコース受容体である Bx の認識に関わるアミノ酸残基を特定してゆく予定である。

Benzoxazinone, Glucosyltransferase, Wheat

講演番号：3A46p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ A 校舎 46 会場

ヤマノイモ属における有用ステロイドサポニン生合成に関わる β-グルコシダーゼの同定
Characterization of ß-glucosidase involved in steroid saponin biosynthesis in *Dioscorea esculenta*
○水谷 正治[1]、中安 大[1]、李 榮宰[1]、山村 理恵[1]、川崎 崇[1]、遠城 道雄[2]、杉本 幸裕[1]([1]神戸大院農、[2]鹿児島大農)
○ Masaharu Mizutani[1], Masaru Nakayasu[1], Hyoung Jae Lee[1], Rie Yamamura[1], Takashi Kawasaki[1], Michio Onjo[2], Yukihiro Sugimoto[1] ([1]Kobe Univ., [2]Kagoshima Univ.)

【目的】ステロイドのC-3位水酸基に糖が結合したステロイドサポニンは、様々な生物活性を持つ天然の界面活性剤である。ヤマノイモ属（*Dioscorea*）は、医薬ステロイドの合成原料として重要なステロイドサポニンであるジオシンを多量に蓄積している。ジオシンは6環性のスピロスタン構造をもつジオスゲニンをアグリコンとする。また、その生合成中間体として、F環が開環したフロスタンのC-26位水酸基にグルコースが結合したプロトジオシンも見いだされる。これらのステロイドサポニンはコレステロールを出発物質として、酸化と配糖化から成る連続的な修飾により生合成されると推定されている。C-16、C-22、C-26位の酸化反応にはP450が、C-3とC-26位への糖転移反応にはUDP依存性糖転移酵素が、プロトジオシンのC-26位グルコシド結合の加水分解反応にはβ-グルコシダーゼが、それぞれ関与することが示唆されているが、各酵素遺伝子に関する情報は全く不明である。本研究では、ヤマノイモ属におけるステロイドサポニンの生合成を研究するため、ジオシン含量が高いことが知られている沖縄原産のトゲドコロ（*D. esculenta*）からステロイドサポニン生合成酵素遺伝子の探索を行なった。また比較対象として、中央アフリカ原産のイエローギニアヤム（*D. cayenensis*）、および日本産のダイジョ（*D. alata*）を用いた。
【結果】上記ヤムイモ 3 種におけるサポニン内生量を LC-MS により分析した結果、トゲドコロおよびイエローギニアヤムには多量のサポニンが蓄積しているのに対し、タイジョではほとんど検出されなかった。また、C-3 位に 4 糖が結合したと推定される未知サポニンを多量に検出した。一方、地下部ではジオシンおよびプロトジオシンが蓄積しているのに対し、葉ではフロスタン型が主要サポニンであった。次に、トランスクリプトーム解析を行い、ステロイドサポニン生合成に関与する候補遺伝子として、P450、UGT、β-グルコシダーゼをそれぞれ多数選抜した。β-グルコシダーゼを機能解析するため全長 cDNA 配列を決定した結果、本遺伝子はファミリー 1 グルコシダーゼに属することが判明した。*N* 末端にはプラスチド移行シグナル様配列を有し、GFP 融合タンパク質は葉緑体に局在した。組換え酵素を作製した結果、本酵素はプロトジオシンを加水分解しジオシンを生成することを LC-MS 分析により確認し、また、基質特異性について検討した。以上の結果から、本酵素はフロスタノール-26-*O*-グルコシド β-グルコシダーゼ（DeF26GH）であることが明らかとなった。

saponin, steroid, glcosidase

講演番号：3A46p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ A 校舎 46 会場

ハマナス花弁の芳香成分に関する研究

Studies on the aroma constituents related to petals of *Rosa rugosa*

○中島 広也、熊谷 順、妙田 貴生、中澤 洋三、相根 義昌、戸枝 一喜、藤森 嶺、西澤 信（東農大生物産業・食香）
○Hiroya Nakashima,Jun Kumagai,Takao Myouda,Yozo Nakazawa,Yoshimasa Sagane,Kazuki Toeda,Takane Fujimori,Makoto Nishizawa (Tokyo Univ. of Agriculture Faculty of Bio-industry)

【背景・目的】

ハマナス(*Rosa rugosa*)は、日本原産のバラであり Japanese rose と呼ばれている。バラ類の芳香成分に関する研究報告例は多くあるものの、ハマナスについての報告は少ない。本研究ではハマナスの開花に伴う芳香成分の推移と、芳香に関与する β-glucosidase 活性ならびにその遺伝子発現との関係性について検討した。

【材料・方法】

ハマナス花冠を蕾から満開まで 7 段階に分けて採取し、液体窒素に浸漬後-80℃で保存した。実験時に花弁を分離し酵素活性の測定、遺伝子クローニングおよび遺伝子発現に使用した。芳香成分の捕集には Dynamic-Head Space 法を用い、ハマナス生花より放出される芳香成分を Tenax-TA に吸着させて、GC–MS で分析をした。β-glucosidase 活性は、ハマナス花弁より調製した粗酵素に、基質として *p*-Nitrophenyl-β-D-glucopyranoside を用いて測定した。凍結花弁より total RNA を抽出し、3'-RACE 法および 5'-RACE 法にて β-glucosidase の全長 cDNA をクローニングした。

【結果・考察】

Dynamic-Head Space 法を用いた芳香成分の経時変動の結果より、主要成分は phenylethyl alcohol、citronellol、geraniol、nerol であった。芳香成分は五分咲きで最大になり、八分咲きで低下し、満開になると再び芳香成分の放出が見られた。その時成分割合は、開花直後で phenylethyl alcohol を 1 としたとき、citronellol が 0.3、geraniol が 0.14 であったが geraniol は以後検出されなかった。五分咲きで phenylethyl alcohol を 1 としたとき、citronellol が 0.88、nerol が 0.48 であった。八分咲きで citronellol が 0.52、nerol が 0.36 であった。満開で citronellol が 1、nerol が 0.80 であった。これらの結果より、開花段階によって香調が変化すると考えられた。芳香成分の放出に関与する酵素 β-glucosidase の活性は三分咲きから五分咲きにかけて急激に上昇し、八分咲きで最大に達した後、満開で低下した。このことより、芳香成分の放出には複数の酵素が関与していると推察された。β-glucosidase 遺伝子をクローニングしたところ、2 つのアイソタイプが確認された。今後、開花段階におけるテルペン配糖体の含量と β-glucosidase 遺伝子の発現量について検討する予定である。

Rosa rugosa, β-glucosidase, gene

講演番号：3A46p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ A 校舎 46 会場

ソバ(*Fagopyrum esculentum*)のルチン生合成に関わるラムノシル化酵素の解析

Characterization of rhamnosyl transferase from *Fagopyrum esculentum*

○古謝 詠喜 (信州大繊維)
○eiki KOJA (Shinshu Univ.)

【研究背景】　ソバ(*Fagopyrum esculentum*)はルチンやビテキシン、イソビテキシンなど種々のフラボノイド配糖体を蓄積することが知られている。その中でもルチンは、ヒトが摂取することにより抗酸化作用、抗アレルギー作用、血圧降下作用などの生理活性を示す健康増進物質として注目を浴びている。ルチンはフラボノールであるケルセチンの３位にグルコースが結合し、そのグルコースにさらにラムノースが 1,6-結合した構造をとる。

これまでにいくつかの植物からラムノシル化酵素が報告されているが、ルチン生合成に関わるラムノシル化酵素は報告されていない。そこで、本研究ではソバのルチン生合成に関わるラムノシル化酵素を解析し、その反応機構を明らかにすることを目的とした。

【研究方法】　ソバ子葉から抽出した酵素について、硫安沈殿、疎水性クロマト、ゲルろ過、陰イオン交換、群特異的アフィニティーの各クロマトグラフィーを組み合わせて精製を行った。精製した酵素をリシルエンドペプチダーゼ処理によりペプチド断片とし、LC-MS/MS 解析を行って、そのアミノ酸配列を推定した。

【研究結果】　精製した酵素はケルセチン-3-O-グルコシドに対する高いラムノシル化活性を示し、グルコシル化活性は示さなかった。また、精製した酵素は約 50 kDa であり、一般に知られている配糖化酵素(45～60 kDa)のサイズと同様であった。以上から、精製したタンパク質が目的のラムノシル化酵素であると判断し、プロテアーゼ処理により断片化したペプチドのアミノ酸配列を LC-MS/MS 解析により推定した。得られた部分アミノ酸配列のうち、3 つが既知のラムノシル化酵素と高い相同性を示した。

現在、縮重プライマーを作成して、ソバ子葉の cDNA ライブラリーに対して PCR を行いラムノシル化酵素遺伝子の獲得を試みている。

rhamnosyl transferase, rutin, Fagopyrum esculentum

講演番号：3A46p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ A 校舎 46 会場

ソバのフラボノイド *C*配糖化酵素の機能解析
Functional characterization of UDP-glucose:flavonoid-*C*-glucosyltransferases from *Fagopyrum esculentum*
○伊藤 崇充、臼井 栞理、古謝 詠喜、長友 仁寿、下坂 誠、田口 悟朗（信州大・繊維）
○Takamitsu Ito,Shiori Usui,Eiki Koja,Yoshihisa Nagatomo,Makoto Shimosaka,Goro Taguchi (Shinshu Univ.)

［背景］ ソバ(*Fagopyrum esculentum*)はその植物体中にルチンなど種々のフラボノイドを蓄積しており、特に子葉には、フラボノイド *C*配糖体であるビテキシンやイソビテキシンを特異的に蓄積している。これらは強い抗酸化作用や抗アレルギー作用を示すことから注目されている物質である。*C* 配糖体は、その特徴的な結合様式によりグルコシダーゼや酸による加水分解を受けないといった特徴を持つ。しかし、植物の *C*配糖化酵素遺伝子は、イネから一例の報告があるのみである。そこで、ソバのフラボノイド *C*配糖化酵素の機能解析を目的とし、研究を行なった。

［実験・結果］ ソバ子葉よりフラボノイド *C*配糖化酵素の精製を行い、得られた 2 つの酵素をそれぞれ CGT-A および CGT-B と命名した。それぞれをリシルエンドペプチターゼで内部消化し、生成したペプチドの LC-MS/MS 分析により部分アミノ酸配列を推定した。部分アミノ酸配列情報をもとに縮重プライマーを作成し、ソバ子葉より作成した cDNA ライブラリーをテンプレートに PCR を行い、さらに RACE を行って、２種の完全長 cDNA を獲得した。これらの cDNA の推定アミノ酸配列は互いに 96%の同一性を示し、それぞれ CGT-A および CGT-B の酵素消化ペプチドのアミノ酸配列情報とほぼ一致した。獲得した完全長 cDNA を大腸菌で異種宿主発現したところ、得られた組換えタンパク質はいずれも *C* 配糖化酵素の基質である 2-ヒドロキシナリンゲニンに対して活性を示した。また、RT-PCR の結果、*C* 配糖化酵素遺伝子の発現はソバ植物体中で *C*配糖体が特異的に蓄積される子葉にのみで発現しており、ソバ子葉のフラボノイド *C*配糖化に関与することが示唆された。これらの酵素は至適温度が CGT-A は 45℃、CGT-B は 55℃であったが、至適 pH はいずれも 6.5～7.0 であり、pH6.0～8.5 の間では至適 pH の 80%以上の活性を示した。さらに、酵素は 2-ヒドロキシフラバノン類の他、フロレチンや 2-フェニル-2',4',6'-トリヒドロキシアセトフェノンなどの 2-ヒドロキシフラバノン類の開環構造と同様の構造をもつ化合物に対する *C*配糖化活性を示した。現在、これらの酵素について反応速度論的解析を行っている。

C-glucosylation, flavonoid-*C*-glucosides, *Fagopyrum esculentum*

講演番号：3A46p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ A 校舎 46 会場

クマリン生合成に関わるソライロアサガオの桂皮酸オルト位水酸化酵素遺伝子の機能解析とゲノム配列の解析

Functional analysis and the genomic sequences of the genes encoding the *ortho*-hydroxylases involved in coumarin biosynthesis in *Ipomoea tricolor*

○田辺 綾野、清水 文一（東洋大生命）
○Ayano TANABE,BUN-ICHI SHIMIZU (Toyo Univ.)

【背景】

植物の二次代謝産物の一つであるクマリン化合物はリグニンなどを合成するフェニルプロパノイド経路から分岐して生合成される。この分岐反応は桂皮酸類のオルト位水酸化によって進行する。スコポレチン(7-hydroxy-6-methoxycoumarin)とウンベリフェロン(7-hydroxycoumarin)を蓄積するサツマイモ（*Ipomoea batatas*）では feruloyl-CoA オルト位水酸化酵素（Ib1）と *p*-coumaroyl-CoA/feruloyl-CoA オルト位水酸化酵素(Ib2)が同定されている。いずれも 2-オキソグルタル酸ジオキシゲナーゼ(2OGD)ファミリーに属する。クマリン化合物は広く植物界にみられることから本酵素ホモログは多くの植物がもつものと考えられるが、現在までに 3 つの植物で同定されたのみである。

サツマイモと近縁にあるソライロアサガオ(*Ipomoea tricolor*)において、病原菌の一つフザリウムの感染刺激に応答してスコポレチンとウンベリフェロン、およびそれぞれの配糖体であるスコポリン(6-methoxy-7-(β-D-glucopyranosyloxy)coumarin)とスキミン(7-(β-D-glucopyranosyloxy)coumarin)が蓄積される。本研究ではソライロアサガオのクマリン生合成に関わる桂皮酸オルト位水酸化酵素遺伝子のクローニングと機能解析を目的とした。

【方法・結果】

サツマイモで同定された桂皮酸オルト位水酸化酵素 *Ib1* と *Ib2* 配列を参考にプライマーを設計し、ソライロアサガオ(cv.heavenly blue)の totalRNA から作製した cDNA を鋳型とし部分配列を取得した。こののち RACE 法にて 2 種類の全長 ORF 配列(*It1-1* と *It1-2*)を取得した。得られた配列を大腸菌を用いて組換え酵素として発現させ酵素活性を測定した。いずれも *p*-coumaroyl-CoA および feruloyl-CoA に対するオルト位水酸化反応を触媒した。また発現している 2OGD 配列の解析を進め、*It1-1* や *It1-2* とは異なる *It1-3* 配列を取得した。その酵素活性は It1-1 および It1-2 とは異なり *p*-coumaroyl-CoA に対しては活性を示さない一方で feruloyl-CoA に対して触媒活性を示した。
さらに取得した 2ODG 遺伝子の cDNA 配列をもとにゲノム配列のクローニングを行ったところ、*It1-1* および *It1-2* 遺伝子はそれぞれ 89 および 95 bp のイントロンをもつ一方、*It1-3* はイントロンを持たない遺伝子であった。

Coumarins, *Ortho*-hydroxylases, *Ipomoea tricolor*

講演番号：3A46p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ A 校舎 46 会場

サツマイモ桂皮酸類オルト位水酸化酵素の基質認識部位の探索
Domain swapping of the *ortho*-hydroxylases involved in coumarin biosynthesis in sweetpotato.
○岩田 友子、柴田 行範、槇田 雄太、和田 瞭典、清水 文一（東洋大院生命）
○Tomoko IWATA,Yukinori SHIBATA,Yuta MAKITA,Ryousuke WADA,Bun-ichi SHIMIZU (Toyo Univ.)

【目的】クマリン化合物はさまざまな植物に見られ、抗菌、抗酸化活性を持つことから植物の生体防御に関わっていると考えられている。サツマイモ（*Ipomoea batatas*）ではクマリン化合物であるスコポレチン（7-hydroxy-6-methoxycoumarin）、ウンベリフェロン（7-hydroxycoumarin）およびそれらそれぞれのグルコース配糖体が蓄積する。その生合成経路は、桂皮酸類のオルト位水酸化、シストートランス異性化、ラクトン化を経て進行する。特に桂皮酸類のオルト位水酸化は、クマリン生合成経路とリグニン生合成経路との分岐点として重要なステップで、2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼファミリーに属する酵素によって触媒される。サツマイモにはオルト位水酸化を触媒する酵素が 2 グループ（Ib1 および Ib2）あり、互いに 70%のアミノ酸配列相同性を示す。Ib1 はフェルロイル-CoA に対して触媒活性を示すのに対して、Ib2 はフェルロイル-CoA だけでなく *p*-クマロイル-CoA に触媒活性を示す。また、これらの酵素はフェルラ酸や *p*-クマル酸には活性を示さない。*p*-クマロイル-CoA とフェルロイル-CoA の構造上異なる点は、ベンゼン環 3' 位のメトキシ基である。Ib1 と Ib2 の間には基質認識に明確な違いが見られるが基質構造を認識するメカニズムは不明である。本研究は Ib1 および Ib2 の基質認識にかかわる領域を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】Ib1 と Ib2 の C-末端側 42 アミノ酸残基（316 番目のプロリン以降）を入れ換えた組換え酵素、Ib1/316P/Ib2 および Ib2/316P/Ib1 を作成し C-末端側の機能解析をした。

まず PCR 法にて目的酵素のアミノ酸配列をコードする DNA を作成、これを含む発現用ベクターを構築した。これをタンパク質発現用の大腸菌に導入し組換えタンパク質として発現させた。これら酵素の活性測定した結果、Ib1/316P/Ib2 はフェルロイル-CoA と *p*-クマロイル-CoA に触媒活性を示したことから、Ib1 において C-末端側 42 アミノ酸残基からなる領域は、基質認識において重要な役割を果たしているということが明らかとなった。

Substrate recognition, *Ortho*-hydroxylase, Domain swapping

講演番号：3A46p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ A 校舎 46 会場

ダイジョ（*Dioscorea alata L.*）の葉における色素変異に関する研究
Somaclonal variation of anthocyanin biosynthesis in leafs of *Dioscorea alata* L.
○飯島 健[1]、バビル パチャキル[2]、井土 岳[1]、松原 紀嘉[3]、川原 玲香[4]、野口 治子[1]、内野 昌孝[1]、高野 克己[1]（[1]東京農大応生・化学、[2]東京農大 （現 JIRCAS)、[3]千葉大学、[4]東京農大・生物資源ゲノム解析センター）
○Ken IIJIMA[1], P.K. Babil[2], Gaku IZUCHI[1], Kiyoshi MATSUBARA[3], Ryouka KAWAHARA[4], Haruko NOGUCHI[1], Masataka UCHINO[1], Katsumi TAKANO[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Biosci., Tokyo Univ. Agr., [2]JIRCAS, [3]Center Environ. Health and Field Sci. Chiba Univ., [4]NGRC, Tokyo Univ. Agr.)

[目的]
ダイジョ（*Dioscorea alata* L）は雌雄異株植物で開花結実がまれであるため、塊茎分割により栄養繁殖される。クローンであるにもかかわらず、種内には多様な遺伝的変異が観察される。2000 年以来 11 年間にわたり、ダイジョの地方品種「沖縄 A」の塊茎分割によるクローン増殖を継続し、繰り返し発生する体細胞変異の系譜的解析を行なってきた結果、「沖縄 A」のクローン増殖過程において、アントシアニンによるとみられる色素発現が高まる変異が繰り返し出現した。また、変異型の一部の系統の色素が元の原型に戻る復帰型変異が生じた他、変異型の一つの塊茎片から本来の変異型とともに、アントシアニン色素をほとんど形成しない新変異型の特徴をもつシュートが発生するなどの変異がみられた。本研究では，クローン増殖しているにもかかわらず表現形質に頻繁に変異が生ずるサンプルを用い、ヤムイモにおける色素発現のメカニズム解明にアプローチした。
研究方法は、温室内で栽培した赤色の原型および緑色の変異型の葉を試料とし、フラボノールの分析とともに、アントシアニンの種類の同定および蓄積量を調査した。また、次世代シーケンサーによる mRNA の解析を行い、アントシアニン色素合成にかかわる酵素群の発現量を比較した。

[結果および考察]
アントシアニンは、変異型の緑色の葉では検出されず、原型の赤色の色素を発現している系でのみシアニジンが検出された（蓄積量：159μg/g FW)。mRNA の発現量は、原型と変異型に CHS、CHI、F3H、F3'H、DFR では発現量に大きな差はみられなかったが、ANS および FGT では原型は変異に比べてそれぞれ 84 倍、38 倍、発現量が増えていた。また、フラボノールの分析結果から、ケンフェロールおよびケルセチンが赤、緑ともに合成されていること、CHS から DFR までのアントシアニン合成経路の構造遺伝子の発現には大きな変化が無いことから、ロイコアントシアニジンまでは合成されていると考えられた。
以上のことから、表現形質に見られる色素発現の変異は、緑色の葉の ANS の発現が抑制されていることに起因し、ANS 構造遺伝子そのもの、あるいは ANS の発現を制御する転写因子に変異があると示唆された。

vegetative propagation, anthocyanin biosynthesis, somaclonal variation

講演番号：3A46p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ A 校舎 46 会場

ゼニゴケのカロテノイド生合成系遺伝子の解析

Analysis of the carotenoid biosynthesis genes in a liverwort, *Marchantia polymorpha*

○竹村 美保、三沢 典彦（石川県大資源研）
○Miho TAKEMURA,Norihiko MISAWA (Ishikawa Pref. Univ.)

これまで、高等植物のカロテノイド合成経路はよく研究されていて、それに関与する遺伝子も多数単離・解析されている。一方、コケ植物のカロテノイド合成経路についての研究は進んでいない。本研究では、コケ植物のカロテノイド合成経路を解明し、カロテノイド生合成系の進化について考察するために、基部陸上植物と言われているゼニゴケのカロテノイド合成系遺伝子の単離と機能解析を行った。

まず初めに、ゼニゴケに含まれるカロテノイドを分析した結果、ルテインとβ-カロテンが主要なカロテノイドであり、高等植物と同様のカロテノイド組成であることがわかった。また、ゼニゴケのゲノム配列ならびに EST/cDNA 配列に対する相同性検索の結果、高等植物のカロテノイド生合成系遺伝子と相同な 12 の配列が見つかった。これらの結果から、ゼニゴケが高等植物と同様のカロテノイド合成経路を有することが示唆された。

次に、カロテノイドを合成する大腸菌を用いて、単離した遺伝子の機能解析を行った。まず、GGPP までを合成できる大腸菌に、*MpPSY* (*Marchantia polymoprha Phytoene Synthase*) 遺伝子を形質転換した。その結果、phytoene が合成され、MpPSY は Phytoene Synthase の活性を持つことがわかった。また、リコピンまでを合成できる大腸菌に、*MpLCYb* (*Marchantia polymorpha Lycopene Cyclase b*) 遺伝子を導入したところ、β-カロテンが合成された。さらに、このリコピン合成大腸菌に *MpLCYb* と *MpLCYe* (*Marchantia polymorpha Lycopene Cyclase e*) の両遺伝子を導入した結果、α-カロテンが合成された。これらのことから、MpLCYb と MpLCYe はそれぞれβ環とε環を形成する活性を有することが明らかとなった。以上の結果から、ゼニゴケが高等植物と同様のカロテノイド合成系遺伝子を有することが考えられた。

carotenoid, liverwort, E. coli

講演番号：3A46p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ A 校舎 46 会場

シロイヌナズナにおけるセリン生合成制御の分子基盤
Molecular basis of regulatory mechanism of serine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*
○岡村 英治[1,2]、平井 優美[1,2] ([1]理研 PSC、[2]JST CREST)
○Eiji OKAMURA[1,2], Masami HIRAI[1,2] ([1]RIKEN PSC, [2]JST CREST)

セリンは、生命においてタンパク質の構成成分として重要であり、解糖系の中間体を初発物質とするリン酸化経路から生合成される。また、核酸や硫黄の代謝、植物ホルモンであるオーキシンの前駆アミノ酸であるトリプトファン、細胞膜を構成するリン脂質であるホスファチジルセリンの代謝に関わる。さらに、リン酸化経路に関わる遺伝子の欠損は、大腸菌においては栄養要求性の形質を示すほか、植物（シロイヌナズナ）や動物（マウス）においては胚性致死や胎生致死の形質を示す。さらに、ヒトやマウスにおいて神経細胞の発達や神経伝達に関わるほか、腫瘍細胞の増殖因子であることが知られている。従って、その制御は細胞増殖の制御に直結していると言える。

リン酸化経路は、最終産物である L-セリンによる負のフィードバック制御を受ける。大腸菌や酵母では、初発反応を触媒する酵素 PGDH（3-**p**hospho**g**lycerate **d**e**h**ydrogenase）が、セリンによるアロステリックな活性制御を受けることで負のフィードバック制御が成立する。このアロステリック制御は構造生物学的な観点から解明されており、PGDH のアミノ酸配列上 C 末端側に存在する ACT（**A**spartate kinase-**C**horismate mutase-**T**yrA）ドメインと呼ばれる領域に L-セリンが結合して、PGDH の立体構造が変化して酵素の活性が低下する。これらのバクテリアと比較して、陸上植物やシダ、コケ、ラン藻などの光合成生物では、リン酸化経路の制御機構は未だ明らかにされていない。そこで、本研究では、光合成生物におけるリン酸化経路の制御機構解明に取り組んでいる。前大会において、陸上植物であるシロイヌナズナ由来 PGDH 組換えタンパク質が、当初の予測に反してセリンによる活性低下ではなく、含硫アミノ酸であるホモシステインやメチオニンを添加した場合に活性の上昇が観察されることを報告した。ダイズやエンドウ由来の PGDH においても、含硫化合物により酵素活性が上昇する現象が報告されているほか、独立栄養性を示すいくつかの古細菌においても、それらの生育に適した環境に存在する塩などの低分子化合物により酵素活性が上昇することが知られている。我々は、この PGDH の活性化現象が光合成生物に広く存在しており、陸上植物に複数見いだされる PGDH アイソザイムのオルガネラ局在を明らかにすることで、光合成生物の単細胞から多細胞への進化、並びに陸上植物における細胞内小器官の起源の一端を説明できるのではないかと考えた。そこで、現在シロイヌナズナにおけるセリン生合成に関わる遺伝子群のオルガネラ局在や組織局在の解析に取り組んでいる。また、PGDH 活性化の分子基盤を生化学的な観点から解明するため、PGDH 組換え酵素に対する部位特異的な変異導入を行い、その変異酵素の酵素学的性質の解析に取り組んでいる。

amino acid, serine, ACT domain

講演番号：3A46p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ A 校舎 46 会場

登熟期イネ種子の遺伝子発現に及ぼす追肥の影響

The effect of nitrogenous fertilizer in maturing rice seeds.

○緑川 景子[1]、黒田 昌治[2]、寺内 かえで[1]、田村 倫子[3]、石丸 喜朗[1]、阿部 啓子[1,4]、朝倉 富子[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]中央農研北陸、[3]東大院農生科・応生化（現東農大応生科・栄養）、[4]神奈川科学技術アカデミー)
○keiko MIDORIKAWA[1], masaharu KURODA[2], kaede TERAUCHI[1], tomoko TAMURA[3], yoshiro ISHIMARU[1], keiko ABE[1,4], tomiko ASAKURA[1] ([1]Tokyo Univ., [2]NARO Agric. Res. Cent., [3]Tokyo Univ.(Nutri. Sci., Tounodai.), [4]KAST)

[目的] 食糧種実の食味に関わる構成成分の多くは種子の生長期に貯蔵されるため、登熟期の栽培条件が食味に影響を与えることが予想される。登熟期には多様な遺伝子の発現が変動し、食糧種実の品質を左右する。コメの生長過程では収量の増加や収穫時期を早めるために出穂 10 日前後までに追肥を行う場合があるが、特定時期に窒素追肥することで玄米中のタンパク質含量が増加し食味の低下を招くことが報告されている。コメの食味は一般的に香りや粘り、硬さなど複数の要因によって評価され、これらは種子のタンパク質含量だけでなく、その他の構成成分の変化が関与している可能性がある。しかしこの追肥によって引き起こされる種子内の貯蔵物質の変化について成分の網羅的解析は行われていない。そこで、本研究では DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行うことで、種実中の成分変化を遺伝子レベルから解析することを試みた。
[方法・結果]今回、開花時に追肥を行った稲（追肥群）と追肥を行わず生育させた稲（コントロール群）において、それぞれ開花後 2 週目の種子から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析に供した。得られたデータから DFW、RMA、MAS5 の 3 種の正規化法によりクラスターデンドログラムを作成したところ、最もクラスターが明確に分離された DFW による正規化法を採用した。以降 Rank Products 法を用いて 2 群間比較を行った。それにより得られた偽陽性率（FDR）0.05 未満の変動遺伝子を追肥によって遺伝子発現に有意差が認められた遺伝子群として抽出した。その結果、追肥により発現が増加したものが 678 個、減少したものが 687 個得られた。これらの遺伝子群を NETAffx より得た Gene Ontology（GO）による機能分類の結果、追肥により発現が上昇した遺伝子群として光合成関連、アミノ酸合成関連、病害抵抗性関連の遺伝子群が濃縮された。また、発現が減少した遺伝子群としては細胞壁合成関連が濃縮された。細胞壁は種実の食感に関連があるという知見から、これらの濃縮された遺伝子についてさらに詳細なアノテーションを調べたところ、追肥によって遺伝子発現が変動したものとして、xyloglucan endotransglucosylase / hydrolase、cellulose synthase、trehalose-6-phosphate phosphathase、chitinase-like protein、などが挙げられた。また、種子内の糖の分配において重要であると考えられている sucrose synthase 3、OSK3 (*oryza sativa* SNF1-like protein kinase 3)、OSK5 も抽出されており、イネ生長期の施肥の時期や量によって細胞内での栄養分配が変化しており、これらの因子が種子内の成分組成に関与している可能性が示唆された。

rice, DNA microarray, cell wall

講演番号：3A46p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ A 校舎 46 会場

分子育種によるスクアレンを高蓄積するクラミドモナス形質転換体の作出

High accumulation of squalene in the transgenic *Chlamydomonas reinhardtii*

○梶川 昌孝[1,3]、木平 成子[1,3]、下山 未希[2,3]、加藤 美砂子[2,3]、福澤 秀哉[1,3]（[1]京大院・生命、[2]お茶の水大院・ライフサイエンス、[3]JST・ALCA）
○Masataka KAJIKAWA[1,3], Seiko KINOHIRA[1,3], Miki SHIMOYAMA[2,3], Misako KATO[2,3], Hideya FUKUZAWA[1,3] ([1]Kyoto Univ., [2]Ochanomizu Univ., [3]JST ALCA)

スクアレンはステロール生合成経路の重要な中間生成物であり、また様々な機能性化合物の原材料となる。現在深海サメの肝油が主要な供給源であるが、海洋資源保護の観点からオーランチオキトリウムなどのスクアレン高蓄積性の藻類が持続可能な供給源の候補として注目されている。一方でこれらの藻類は野菜や穀物のように長期に栽培されたことのない野生種であり、育種によって実用生産により適した「栽培品種」を作出する必要がある。そこで、藻類スクアレンの産業利用に向け育種ターゲットを絞り込むために、モデル藻類クラミドモナスを用いて、スクアレン生合成経路を構成する酵素遺伝子を同定し、それらを用いた分子育種によるスクアレン高蓄積形質転換株の作出を試みた。

スクアレンはファルネシル 2 リン酸からスクアレン合成酵素により生合成され、さらにスクアレンエポキシダーゼによりスクアレンエポキシドに代謝される。まずクラミドモナスのゲノム情報（phytozome v5.3）を元に相同性検索により、スクアレン合成酵素およびスクアレンエポキシダーゼをコードすると予想される遺伝子 *CrSQS* および *CrSQE* を選び出した。CrSQS については大腸菌で発現精製した組換えタンパク質を用いた *in vitro* 酵素アッセイにより、CrSQE については SQE 欠損酵母変異体の機能相補実験により、それぞれ目的の酵素活性をもつことを示した。野生型クラミドモナスにおいてスクアレンはステロール生合成経路の中間生成物であるため、ほとんど蓄積しない。そこでクラミドモナスのスクアレン蓄積量を増大させるために、*CrSQS* 遺伝子について過剰発現体を 8 株、*CrSQE* 遺伝子について発現抑制体を 5 株作出した。ガスクロマトグラフィー分析により 3 日間酢酸含有培地（TAP 培地）で培養した細胞内のスクアレン量を定量したところ、CrSQS 過剰発現体ではいずれも野生型と同様検出限界以下だったが、CrSQE 発現抑制体では 5 株全てでスクアレンが検出され、その中の 1 系統では細胞乾燥重量（mg）あたり 0.8μg 蓄積していた。この結果から、*CrSQE* 遺伝子は藻類にスクアレンを高蓄積させるための有力な育種ターゲットになると考えられる。現在、相乗的なスクアレン蓄積量の増大を狙って、CrSQE 発現抑制株に CrSQS 過剰発現ベクターを導入し、CrSQS 過剰発現-CrSQE 発現抑制株の作出を試みている。

microalga, squalene, molecular breeding

講演番号：3A46p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ A 校舎 46 会場

ミカン科ミカン属由来カフェインシンターゼ相同遺伝子群の機能解析

Characterization of homologous genes for caffeine synthase from Citrus.

藤田 ゆり[1]、加藤 美砂子[2]、吉澤 結子[1]、○水野 幸一[1]([1]秋田県立大生物資源、[2]お茶の水大院ライフサイエンス)
Yuri FUJITA[1], Misako KATO[2], Yuko YOSHIZAWA[1], ○Kouichi MIZUNO[1] ([1]Akita Pref. Univ., [2]Ochanomizu Univ.)

【背景・目的】カフェインの生合成を司る酵素遺伝子群は、コーヒーやチャで単離・機能解析されている。これらは、植物の生長制御に関わる化合物のメチルエステル化を行う酵素の一群と類似の構造を有し、モチーフ B'-メチルトランスフェラーゼファミリー（B'-MTs）を形成している。一方、ミカン科ミカン属において、花器にカフェインが存在するとの報告があり、虫媒との関係も議論されているが、その生合成経路は未だに不明のままである。本研究ではそれらのカフェイン生合成においてもコーヒーやチャと同様に B'-MTs の酵素が関与しているとの仮説のもと、ウンシュウミカン、スダチおよびレモンを材料に、カフェイン合成系酵素（CS）遺伝子の単離をめざした。
【方法】はじめに、オレンジおよびウンシュウミカンの EST データベースに対して B'-MTs 相同遺伝子の探索を行い、カフェイン合成系酵素遺伝子の候補遺伝子を選抜した。平行して、ミカンおよびスダチの花器より調製した RNA と、候補遺伝子の配列をもとに作製したオリゴヌクレオチドを用いて RT-PCR を行い、全長を単離した。これらを pET-23d に連結し大腸菌で組換え型酵素を生産した。カフェインの前駆体であるキサンチン誘導体や B'-MTs の代表的な化合物を基質に、[^{14}C-methyl]SAM（*S*-adenosyl-L-methionine）をメチル基供与体として反応させ活性を調べた。活性は、液体シンチレーションカウンターによる合成産物の放射活性の測定、および薄層クロマトグラフィーにて展開しスポットを FLA3000 にて検出した。一方、得られた候補遺伝子断片をプローブとしてノーザンブロット解析を行い、それらの発現部位・時期を同定した。
【結果】得られた６つの候補遺伝子ついて調べたところ、２つの遺伝子が B'-MTs の典型的な基質であるジャスモン酸またはサリチル酸をメチル化する酵素遺伝子であることが判明した。これらをそれぞれ *Cit-JAMT1*、および *Cit-SAMT1* と命名した。Cit-JAMT1 は 366 、Cit-SAMT1 は 370 アミノ酸残基からなり、至適 pH はそれぞれ pH 8.5 および 7.5 であった。一方ノーザンブロット分析の結果、今回用いた基質では活性が見られなかったものの花器で強く発現している酵素遺伝子３種を見いだした。以上を踏まえ、ミカン属中で比較的高濃度（285 nmol/g FW）のカフェインを含むことが知られているレモン花器を用いて cDNA ライブラリーを調製し、B'-MTs 相同領域のディジェネレートプライマーを用いた PCR により新奇 CS 候補遺伝子を得た。６種の酵素遺伝子が得られ、先の花器で発現していたウンシュウミカン由来の３種とそれぞれ 80%程度の高い相同性を有していた。これらについて大腸菌での発現系を構築し、現在機能解析を行っている。

caffeine, citrus, N-methylation

講演番号：3A46p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ A 校舎 46 会場

除虫菊 GDSL リパーゼの加水分解活性に関わるアミノ酸のピレスリン合成活性に対する役割
Role in the pyrethrin synthesizing activity of amino acids involved in the hydrolytic activity of *Tanacetum cinerariifolium* GDSL lipase

○光森 智紀[1]、山田 現[1]、竹内 孝幸[1]、菊田 幸雄[2]、中山 幸治[2]、勝田 純郎[2]、畑中 顯和[3]、松田 一彦[1]([1]近畿大院農、[2]大日本除虫菊、[3]山口大)
○ Tomonori MITSUMORI[1], Gen YAMADA[1], Takayuki TAKEUCHI[1], Yukio KIKUTA[2], Koji NAKAYAMA[2], Sumio KATSUDA[2], Akikazu HATANAKA[3], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Kinki Univ., [2]Dainihon Jochugiku Co, [3]Yamaguchi Univ.)

〔目的〕シロバナムシヨケギク(除虫菊；学名：*Tanacetum cinerariifolium*) は飛翔性昆虫に対して優れた殺虫活性を示す 6 種のピレスリン類を生産する。ピレスリン類はいずれもエステル化合物であり、その中でもピレスリンⅠが最も殺虫活性に優れ、成分量も多い。これまでにわれわれは、ピレスリンⅠのエステル結合の形成が GDSL リパーゼの一種(TcGLIP と命名)により触媒されることを明らかにしている。一般に GDSL ファミリーに属するリパーゼは、GDS(L)配列を N 末端側にもち、その加水分解活性においてブロックⅠのセリン、ブロック II のグリシン、ブロック III のアスパラギンおよびブロック V のヒスチジンとアスパラギン酸が重要な役割を果たしているといわれている。その中でも、ブロックⅠのセリンは、加水分解反応において基質のカルボニル基を求核攻撃し、アシル化されると推測されている。本研究では、ピレスリンⅠのエステル結合形成活性に対して、これらのアミノ酸がどのように関わるのかを部位特異的変異実験によって調べたので報告する。
〔方法〕TcGLIP の遺伝子配列は Quikchange kit を用いて改変した。野生型および変異をもつ TcGLIP はマルトース結合タンパク質(MBP)として大腸菌(DE3 pLysS 株)で発現誘させた。それぞれの酵素タンパク質は、アフィニティークロマトグラフィー等により精製した。酵素反応により生成したピレスリンⅠは HPLC で定量した。
〔結果と考察〕MBP はプロテアーゼで処理することで酵素自体の配列から切断可能である。そこで、MBP 融合酵素と MBP を切断した後の酵素のピレスリンⅠ合成活性のキネティクスを比較したところ、基質の解離定数、触媒効率ともに MBP 除去の前後で有意差は認められなかった。したがって、この後の実験では、MBP 融合酵素として野生型と変異を有する酵素の比活性を求め、比較することにした。GDSL リパーゼの加水分解活性に寄与すると言われている Ser13、Gly37、Asn140、Asp291 および His294 をそれぞれアラニンに置換するとともに、C 末端付近の GDS 配列に存在する Ser339 もアラニンに置換し、大腸菌で発現させたところ、変異体はいずれも可溶性タンパク質として発現した。そこでこれらの変異体を野生型の酵素と同様に精製し、それぞれのピレスリン Ⅰ 合成活性を測定した。その結果、酵素活性は S339A 変異によってほとんど影響を受けないのに対して、S13A、G37A、D291A および H294A 変異によって完全に消失した。また、N140A 変異によっても酵素活性は野生型のそれに比べて 1/5 程度にまで低下した。これらの結果から、ピレスリン合成に関わる本酵素のアシル基転位活性においても Ser13、Gly37、Asn140、Asp291 および His294 は重要な役割を果たしていることが示唆された。

Tanacetum cinerariifolium, Pyrethrin, GDSL lipase

講演番号：3A46p17
講演日時、会場：3 月 26 日 17:12～ A 校舎 46 会場

傷害葉での短鎖アルデヒド還元活性の生理学的意義の解明

Study on an activity to reduce short chain-aldehydes at wounded leaves

志岐 和美、長井 直子、○松井 健二（山口大院医）
Kazumi Shiki,Naoko Nagai,○Kenji Matsui (Yamaguchi Univ.)

【目的】植物は機械傷や食害を受けると脂肪酸からリポキシゲナーゼ、ヒドロペルオキシドリアーゼ反応により(*Z*)-3-ヘキセナール(Z3al)などの短鎖アルデヒドを生成する。Z3al はある程度の抗菌性を有しており、植物の傷口での消毒に寄与していると考えられている。しかし、Z3al の生成は一過的で、傷害処理後数分以内に消失し、その代わりに還元体である(*Z*)-3-ヘキセノール(Z3ol)が一過的に生成する。Z3ol は反応性に乏しく、傷口の消毒にはあまり寄与しないが、植物と相互作用する植食者やその天敵は Z3ol を餌や宿主の発見に利用している。このように、Z3al 生成は植物の適応度を直接高めるが、現在知られている Z3ol の生態学的機能だけでは Z3ol への還元は植物の適応度に寄与しているとは考えにくい。そこで、植物がなぜ Z3al 還元能力を獲得したのか、について、植物傷害処理後の揮発性化合物生成様式の精査、植物への Z3al、Z3ol 曝露、さらに Z3al 還元酵素の精製により検討した。

【方法・結果】無傷シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)に Z3al 蒸気を曝露すると、光合成能が低下し、クロロシスを生じた。一方、Z3ol 曝露ではこうした障害は認められなかった。この時、低濃度の Z3al 曝露では曝露に用いた Z3al がシロイヌナズナに直ちに吸収され、その大部分が Z3ol へと還元された。このことからシロイヌナズナは Z3al の解毒のために Z3al を Z3ol へと還元していると考えられた。一方、シロイヌナズナ破砕時に NADPH を投与すると Z3al 生成量が低下し、Z3ol 生成が促進されたが、NADH ではこうした効果はほとんど見られなかったため、シロイヌナズナには NADPH 依存に Z3al を Z3ol へと還元する酵素、Z3al 還元酵素が恒常的に存在していることが示唆された。そこで、シロイヌナズナと同じアブラナ科のキャベツから NADPH 依存的に Z3al を Z3ol に還元する酵素を精製し、その特性を調べた。キャベツから水溶性タンパク質を抽出し、硫安分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換 HPLC の 5 段階で Z3al 還元酵素を精製した。精製酵素は 40 kDa であり、炭素数が 4 以上の直鎖飽和アルデヒドを良い基質とする短鎖アルデヒド還元酵素であった。短鎖ケトンは還元しなかった。NADPH を使った時の Z3al に対する *Km* 値は 97 μ M で、検討した短鎖アルデヒドの中で最も k_{cat}/Km 値が高かった。また、活性は $CuSO_4$ と $ZnSO_4$ で阻害されたことから、活性中心には SH 基が関与していると考えられる。現在、精製酵素の部分アミノ酸配列を決定し、その遺伝子の単離を進めている。

green leaf volatiles, aldehyde reductase, mechanical wounding

講演番号：3A46p18
講演日時、会場：3 月 26 日 17:24～ A 校舎 46 会場

ダイズ Ero1 によるプロテインジスルフィドイソメラーゼファミリーの活性化に関する研究
Activation of Protein Disulfide Isomerase Family Proteins by Ero1 in Soybean

○松崎 元紀、小石原 克典、三田 竜太、成尾 由理香、増田 太郎、裏出 令子 (京大院農・農学)
○Motonori MATSUSAKI, Katsunori KOISHIHARA, Ryuta MITA, Yurika NARUO, Taro MASUDA, Reiko URADE (Kyoto Univ.)

【背景と目的】真核細胞の粗面小胞体で生合成されるタンパク質の多くは、小胞体内腔で分子内ジスルフィド結合形成を伴ってフォールディングされる。新生タンパク質への正しいジスルフィド結合の導入には、複数の Protein Disulfide Isomerase (PDI)ファミリーが作用していると考えられる。一方、PDI ファミリーの活性中心ジスルフィドは基質タンパク質のチオール基の酸化反応を触媒することによって還元されるが、特定の PDI ファミリーは Endoplasmic reticulum oxidoreductin-1 (Ero1)によって活性中心が酸化されることにより再活性化される。酵母及び哺乳動物の Ero1 の活性制御機構や PDI ファミリーに対する基質特異性などについては、詳細な研究が行われてきた。一方、植物細胞にも Ero1 オーソログ及び多種類の PDI ファミリーが存在するが、それらの相互作用の分子機構の詳細は不明である。ダイズ種子には全重量の約 40%に相当するタンパク質が含まれ、それらの大部分が登熟期に子葉細胞の小胞体で合成されジスルフィド結合形成を伴ってフォールディングされる種子貯蔵タンパク質である。これらの構造形成における PDI ファミリー及び Ero1 の作用機構を分子レベルで明らかにするためにダイズ *Ero1* 遺伝子を同定し、その酵素学的性質を明らかにすることを目的に研究を行った。

【方法と結果】ダイズゲノムデータベースでのホモロジーサーチにより見いだした 2 種類の *Ero1* 遺伝子ホモログ *GmEro1-a* と *GmEro1-b* の cDNA を、特異プライマーを用いた PCR によりクローニングした。GmEro1-a cDNA を用いて膜貫通領域配列などを除いたリコンビナント GmEro1-a(rGmEro1-a)の大腸菌発現系を構築し、大量発現させ純化した。純化した rGmEro1-a に対する抗血清を用いたウエスタンブロット法及び RT-PCR 法により、根、茎、葉、子葉すべてで Ero1 が発現していることを確認した。さらに、登熟期子葉では種子貯蔵タンパク質が生合成される時期に Ero1 が高発現していることを明らかにした。rGmEro1-a が FAD 結合タンパク質であることを分光学的に確認した。酸素電極を用いて rGmEro1-a が DTT を酸化し O_2 を還元することにより H_2O_2 が生成することを明らかにした。また、5 種類の主要ダイズ PDI ファミリー (GmPDIL-1, GmPDIL-2, GmPDIM, GmPDIS-1, GmPDIS-2)の rGmEro1-a による再活性化を、各 PDI ファミリーによる還元変性 RNaseA のリフォールディングを指標として検討した。その結果、いずれのダイズ PDI ファミリーも rGmEro1-a により再活性化されるが、植物にのみ存在する特有のドメイン構造を持つ GmPDIS-1 と GmPDIS-2 の活性化が顕著であることを見いだした。

Ero1, Protein Disulfide Isomerase, Folding

講演番号：3A46p19
講演日時、会場：3 月 26 日 17:36～ A 校舎 46 会場

ダイズ QSOX によるタンパク質のジスルフィド結合形成

Disulfide bond formation by the soy bean quiescin sulfhydryl oxidase, GmQSOX

○奥田 綾、松崎 元紀、三田 竜太、増田 太郎、裏出 令子（京大院農）
○Aya OKUDA,Motonori MATSUSAKI,Ryuta MITA,Taro MASUDA,Reiko URADE (Kyoto Univ.)

【目的】真核細胞の粗面小胞体で生合成されるタンパク質の多くは分子内あるいは分子間ジスルフィド結合を有しており、これらは立体構造の安定化やタンパク質の機能発現に重要な役割を果たしている。真核細胞には小胞体内腔で作用する Ero1 とプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)ファミリーの共同経路を初めとして、複数のタンパク質ジスルフィド結合形成経路が存在する。これらのうち、クイエシンスルフヒドリルオキシダーゼ(QSOX)は、Ero1/PDI ファミリー経路とは異なり、単独でタンパク質ジスルフィド結合を形成し酸素を還元して過酸化水素を生成する酵素であることが動物細胞で明らかにされてきた。本研究は、植物 QSOX がタンパク質のジスルフィド結合形成や立体構造形成に果たす役割を解明することを目指してダイズ QSOX オーソログを同定し、変性タンパク質の酸化的フォールディング活性について検討した。

【方法・結果】ダイズ EST データベース上でのホモロジーサーチにより、ヒト QSOX と相同性の高い EST クローンを見いだした。その塩基配列情報からデザインしたプライマーを用いて、3’RACE 法および5’RACE 法によりダイズ子葉の mRNA から 2 種類の QSOX オーソログ(GmQSOX-1a, GmQSOX-1b)をコードする cDNA をクローニングした。推定アミノ酸配列から、GmQSOX-1a と GmQSOX-1b はともにチオレドキシンドメイン-ヘリックスリッチ領域-Erv/ALR ドメインというドメイン構造を有していることが明らかとなった。また、N 末端にはシグナル配列が C 末端近傍には 1 回膜貫通領域と推定される配列が存在していた。GmQSOX-1a cDNA を用いて、シグナルペプチドと膜貫通領域以降の C 末端領域を除いたリコンビナント GmQSOX(rGmQSOX)の大腸菌発現系を構築し、IPTG 誘導条件下で発現させた可溶性 rGmQSOX の精製標品を調製した。rGmQSOX を抗原として作製した抗体を用いたウエスタンブロット分析および RT-qPCR により、GmQSOX が根、茎、葉、子葉に発現していることを確認した。rGmQSOX のタンパク質ジスルフィド結合形成活性は、還元変性 RNaseA を基質として反応前後に基質のチオール基を Ellman 法により定量し、その減少量から算出した。また、還元変性 RNaseA をリフォールディングする活性は RNaseA の cCMP 分解活性の回復量から算出した。rGmQSOX は強力なタンパク質ジスルフィド結合形成活性を有し、その *Kcat/Km* 値はトリパノソーマの QSOX と同等のレベルであるが、還元変性 RNaseA のリフォールディング活性は有さないことが明らかとなった。一方、rGmQSOX と活性中心を還元したリコンビナントダイズ PDI ファミリー(GmPDIL-2)とを共存させると共同的に作用し、ほぼ全ての還元変性 RNaseA が速やかにリフォールディングされ活性が回復することが明らかとなった。

QSOX, Disulfide bond, Protein Disulfide Isomerase

講演番号：3B20a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ B 校舎 20 会場

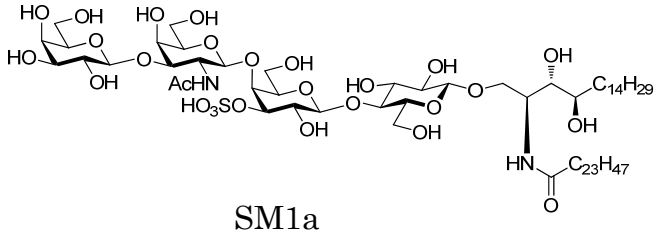
硫酸化スフィンゴ糖脂質 SM1a、SB1a の合成研究

Synthetic study on sulfated glycosphingolipids SM1a and SB1a

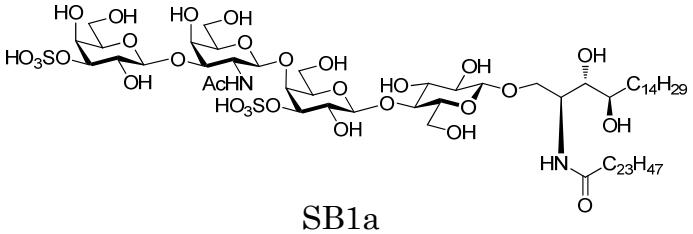
○廣瀬 遥[1]、玉井 秀樹[1,2]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Haruka HIROSE[1], Hideki TAMAI[1,2], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【目的】スフィンゴ糖脂質の中で糖鎖部分が部分的に硫酸化された硫酸化スフィンゴ糖脂質は、シアル酸を含有するガングリオシドと並ぶ主要な酸性スフィンゴ糖脂質ファミリーの一群である。しかしながら、その生物学的な機能はガングリオシドと比べて未解明な点が多い。我々は、ガングリオシド合成の化学を応用して、硫酸化スフィンゴ糖脂質を幅広く合成し、その機能解明を推進したいと考えている。本研究では、グリーンモンキーの腎臓から発見された、ガングリオシド GM1 のシアル酸残基が硫酸基に置き換わった SM1a と、ガングリオシド GD1a の二つのシアル酸残基が硫酸基に置き換わった SB1a の系統的合成を行うこととした[1]。

【方法と結果】SM1a と SB1a は共通の糖鎖を有することから、硫酸化部位にオルソゴナルな保護基(レブリノイル基とベンジル基)を導入した糖脂質保護体を共通中間体とする合成経路を設計した。この共通中間体を三糖部分とグルコシルセラミドに分割し、糖鎖部分は、3 位をレブリノイル基で保護した非還元末端側のガラクトースユニットと、ガラクトースの 3 位をベンジル基で保護し、その他をアシル基で保護した二糖ユニット(GalN-Gal)より導くこととした。ガラクトースの 2,6-ベンゾイル体より 3 位レブリノイル体及びベンジル体を合成し、ベンジル体を二糖ユニットへと導いた後、3 位レブリノイル体とのグリコシル化を経て三糖供与体を合成した。続いてグルコシルセラミドとの反応により糖脂質保護体を得、ベンジル基の脱保護、硫酸化、全脱保護により SM1a の合成を行った。同様の方法で SB1a の合成を検討している。



SM1a



SB1a

1) Y. Niimura, I. Ishizuka, *Glycobiology* **2006**, *16*, 729-735.

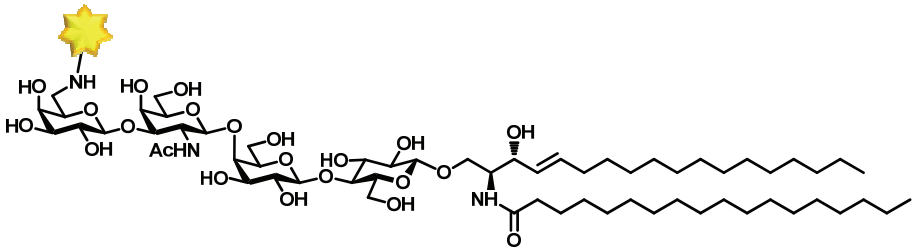
sulfated glycosphingolipid, glycolipid, oligosaccharide synthesis

講演番号：3B20a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ B 校舎 20 会場

ラフト分子の一分子追跡に向けた蛍光ガングリオシドプローブの合成と機能評価 5
Synthesis and functional evaluation of fluorescent ganglioside probes for the single molecule tracking of raft marker 5

○河村 奈緒子[1,2]、安藤 弘宗[1,2]、鈴木 健一[2]、CHADDA Rahul[2]、池田 泰祐[2]、石田 秀治[1]、楠見 明弘[2]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Naoko KOMURA[1,2], Hiromune ANDO[1,2], Kenichi SUZUKI[2], Rahul CHADDA[2], Taisuke IKEDA[2], Hideharu ISHIDA[1], Akihiro KUSUMI[2], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【目的】我々は 1 分子追跡法によりラフトマーカーの離合集散を直接観察することで、ラフトマーカーの機能及び静的、動的挙動の解明を目指している。この目的を達成するためには、シグナル分子受容体と協奏的に機能するガングリオシドの 1 分子追跡用プローブが必須であるが、これまではプローブのラフトマーカーとしての性質を検証することなく、ラフト中のガングリオシドの挙動について論じられてきた。我々は、昨年度の本会にて蛍光分子の糖鎖への導入位置がガングリオシドのラフトマーカー特性に大きく影響することを示し、糖鎖の末端に蛍光分子を導入したガングリオシド GM3 及び GM1 がラフトマーカーとして機能する可能性が高いことを報告した。今年度は、さらに蛍光アシアロ GM1 を合成し、シグナル分子受容体に対するこれらの蛍光ガングリオシドの親和性の比較、及びガングリオシド間の相互作用の解明を目指した。
【結果】蛍光 GM1 プローブでの結果を踏まえ、アシアロ GM1 の非還元末端 Gal6 位に蛍光分子を導入することとした。そこで、6 位をトリフルオロアセトアミド化した非還元末端 Gal 供与体を合成し、内部 GalNAcβ(1→4)Gal 受容体とのグリコシル化反応によりアシアロ GM1 コア三糖を構築した。これを供与体へと変換し、Glc-Cer 受容体とのグリコシル化反応に供してアシアロ GM1 骨格を構築後、保護基の脱保護、蛍光標識の導入により蛍光アシアロ GM1 プローブの合成を達成した。
合成した蛍光ガングリオシドがラフトマーカーの性質を保持することを種々の評価法で確認した後、生細胞膜上で他のラフトマーカーとの 2 色同時 1 分子観察を行った。その結果、EGF 受容体に対する蛍光ガングリオシドの共局在の観察から、蛍光 GM3 が極めて高頻度かつ長期間の共局在を示すことを確認した。さらに、この蛍光 GM3 の EGF 受容体に対する親和性は、受容体の二量体形成後には顕著に低下する観察結果を得たので報告する。



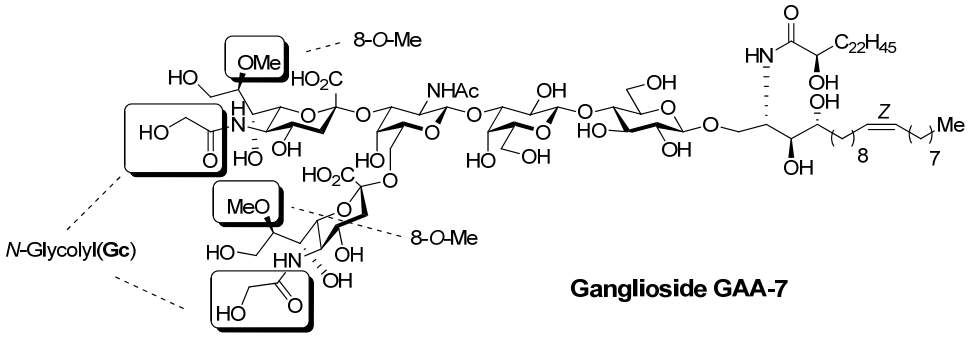
ganglioside, raft, single molecule tracking

講演番号：3B20a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ B 校舎 20 会場

N-Troc シアル酸誘導体を鍵化合物とする修飾シアル酸含有ガングリオシド GAA-7 の全合成
Total Synthesis of Ganglioside GAA-7 Containing Unusually Modified Sialic Acids through the Use of *N*-Troc-Sialic Acid Derivative as a Key Unit

○玉井 秀樹[1,2]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Hideki TAMAI[1,2], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gofu Univ., [2]iCeMS)

【目的】シアル酸は、50種類を超える類縁体からなる酸性九炭糖のファミリーである。近年、これら多様なシアル酸類縁体（8-*O*-sulfo-Neu, 8-*O*-Me-Neu, 9-*O*-Me-Neu, Neu5Gc, etc.）を糖鎖構造内に持つ新奇なガングリオシドが棘皮動物から数多く発見され、それらは哺乳動物ガングリオシドよりも強力な神経突起伸展活性を有することが報告された。我々は、これら棘皮動物ガングリオシドに見られる修飾シアル酸の生物学的意義の解明と生理活性の医薬応用を目的として、シアル酸の分子多様性に対応可能な修飾シアル酸合成法の開発とガングリオシド合成への応用を目指している。本発表では、修飾シアル酸合成法の開発および、ガングリオシドGAA-7の全合成について報告する。
【方法・結果】当研究室ではこれまでに、8-*O*-メチル体、8-硫酸体、*N*-グリコリル体、5-アミン体といった修飾シアル酸の合成法を報告している[1,2,3]。しかしながら、これらはシアル酸の水酸基またはアミノ基のうち一箇所を修飾する手法であるため、5 位アミノ基および 8 位水酸基の二箇所に化学修飾を受けたシアル酸残基を有するガングリオシド GAA-7 の合成には適用できない。そこで、本研究では部分修飾シアル酸の合成における新しいシアル酸鍵中間体として、5 位アミノ基を Troc 基で 9 位水酸基をクロロアセチル基にて保護したシアル酸誘導体を設計し、化学選択的なクロロアセチル基の除去と分子内アシル基転位の制御により、8-*O*-メチル化 *N*-グリコリルシアル酸誘導体の効率的合成に成功した。更に、ダブルシアリル化、グルコシルセラミドカセットアプローチを経て、ガングリオシド GAA-7 の全合成を達成した。



1) Ando H. *et al. Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6883-6886.
2) Ando H. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6759-6763.
3) Tamai H. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2330-2333.

gangliosides, sialic acids, double sialylation

講演番号：3B20a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ B 校舎 20 会場

糖鎖受容ペプチドの簡便な合成法の開発

Prompt Preparation of Sugarchain Acceptor for Chemoenzymatic Synthesis of Glycoprotein

○朝比奈 雄也[1,2]、神田 美華[1]、北條 裕信[1,2] ([1]東海大工生命、[2]東海大糖鎖研)
○Yuya Asahina[1,2], Mika Kanda[1], Hironobu Hojo[1,2] ([1]Tokai Univ., [2]Inst. Glycoscience, Tokai Univ)

天然に存在する糖タンパク質糖鎖は高度に不均一化しており、糖タンパク質の機能解明のためには均一かつ、多様なグライコフォームに対応することのできる、効率的な合成法が必要とされている。近年、当研究室では Glycosynthase（変異型 Endo-M）の糖鎖転移反応を用いることで、均一な N-結合型複合型糖鎖を有する糖タンパク質 Saposin C の合成に成功した。本合成は、先に GlcNAc 残基を導入したタンパク質を合成し、最終段階にて糖鎖オキサゾリンと Glycosynthase を利用して、目的の糖鎖骨格を構築することにより達成された。糖受容体である GlcNAc 残基を有するペプチド、もしくはタンパク質を効率良く得ることが出来れば、糖鎖転移反応により多様のグライコフォームに対応した糖タンパク質の調製が可能となる。現在、糖受容ペプチドは Fmoc 固相法にて、ベンジル基で保護したアスパラギン誘導体[Fmoc-Asn(GlcNAcBn$_3$)-OH]を導入した後、TFA カクテルにて脱樹脂とペプチド側鎖保護基の脱保護、引き続いて Low-TfOH 法により糖水酸基のベンジル基を除去する、２段階の工程を要していた。糖鎖転移酵素を用いることの有用性が高まった今、より効率の良い糖受容ペプチドの合成法が必要とされる。そこで、糖水酸基の保護基をベンジル基から、より酸に対して感受性の高い保護基に変更し、ペプチドの脱保護の段階で同時に糖水酸基の脱保護を行うことができる、効率的な糖受容体の合成ルートを確立するにした。

まず、既知のアジド糖から TFA 処理にて除去が可能と思われる４、６位ベンジリデン基及び,３位メトキシベンジル基にて保護したアジド糖へと誘導した。次にアジド糖とアスパラギン酸ペンタフルオロフェニルエステル[Fmoc-Asp(OPfp)-OPac]を HOOBt 共存下、含水 THF 中にてホスフィンを用いることで還元と同時にアシル化を行い、糖アミノ酸誘導体へと導いた。しかしながら得られた糖アミノ酸誘導体は溶解性に乏しく、続く工程を行うことが困難であった。１位、及び２位のアミド基が分子間で会合することが難溶性の主な原因であると推測し、２位のアミド基を N-アルキル化した後、同様にアスパラギン酸と縮合することにした。その結果、先の誘導体とは異なり非常に溶解性の高い糖アミノ酸誘導体へと導くことに成功した。次に、脱フェナシル化することで目的の TFA 感受性保護基を有する糖アミノ酸ユニットの合成に成功した。この誘導体を常法の TFA カクテルにて処理すると、脱保護体であるトリオールが効率良く得られることが確認された。そこで、得られた誘導体をペプチド固相合成に用いることで、この糖アミノ酸ユニットが糖ペプチド合成において、有用であるか検証した。

glycoprotein, Endo-M (Glycosynthase), Glycoamino acid

講演番号：3B20a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ B 校舎 20 会場

クルマエビのインスリン様造雄腺因子の化学合成研究
Synthetic study on insulin-like androgenic gland factor from the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*

○片山 秀和[1]、窪田 のぞみ[1]、粂 圭一郎[1]、大平 剛[2]、北條 裕信[1,3] ([1]東海大工・生命化学、[2]神奈川大理・生物科学、[3]東海大・糖鎖科研)
○Hidekazu KATAYAMA[1], Nozomi KUBOTA[1], Keiichirou KUME[1], Tsuyoshi OHIRA[2], Hironobu HOJO[1,3] ([1]School of Engineering, Tokai Univ., [2]Kanagawa Univ., [3]Institute of Glycoscience, Tokai Univ.)

【目的】甲殻類の性は、オス特有の性ホルモンである造雄腺ホルモン（AGH）によって決定される。すなわち、体内で AGH が機能すればオスに、AGH が存在しなければメスとなる。これまでに、オカダンゴムシにおいて AGH の構造が解析されており、インスリン様ヘテロ二量体糖ペプチドであることが明らかにされている。一方、クルマエビ *Marsupenaeus japonicus* の AGH の構造は明らかになっていない。最近になって、クルマエビの造雄腺で特異的に発現するインスリン様造雄腺因子（IAG）の遺伝子がクローニングされた。クルマエビ IAG は、オカダンゴムシ AGH と同様にインスリン様ヘテロ二量体の構造的特徴を有し、B 鎖内に 1 カ所の N-結合型糖鎖付加モチーフが存在することから、AGH と同様に糖ペプチドであることが予想されている。そのため、IAG はクルマエビ AGH の候補分子と考えられているが、その直接的な証拠は未だ得られていない。IAG は生体内にごく微量しか存在しないことから、天然物を精製して機能解析に用いることは困難である。そこで、IAG の機能解析を目的として、IAG の化学合成を行うことにした。
【方法・結果】オカダンゴムシ AGH と他のインスリンファミリーのペプチドとでは、ジスルフィド結合架橋様式が異なることから、天然 IAG のジスルフィド結合架橋様式を推定することは困難である。そのため、双方のジスルフィド異性体を化学合成することとした。また、B 鎖内の糖鎖が機能に必須であるか不明であるため、まず糖鎖を含まない IAG の合成を行うことにした。常法による Fmoc 固相合成法によって、IAG-A 鎖および IAG-B 鎖の合成を行った。その際、A 鎖に含まれる 4 つの Cys 残基側鎖保護基を使い分けることによって、両異性体の合成が可能となる部分的に保護された 2 種類の A 鎖を得た。これらを用いて、位置選択的に A 鎖内および A 鎖-B 鎖間のジスルフィド結合を順次架橋していくことによって、2 種類の IAG 異性体を得た。今後、糖鎖を含んだ IAG の化学合成、および生物検定について検討を行っていく予定である。

glycopeptide, insulin-like androgenic gland fator, *Marsupenaeus japonicus*

講演番号：3B20a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ B 校舎 20 会場

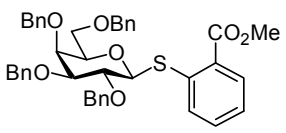
チオサリチル酸誘導体を脱離基にもつ各種糖供与体の反応挙動

Reactivity of thioglycosyl donors carrying thiosalicylic acid derivatives as leaving group

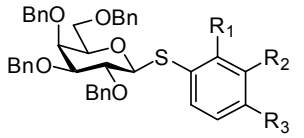
○櫻井 理沙、土肥 博史、西田 芳弘（千葉大院融合）
○Risa SAKURAI,Hirofumi DOHI,Yoshihiro NISHIDA (Chiba Univ.)

【目的】我々が以前に設計したチオサリチル酸メチルを脱離基にもつグリコシルドナー**1**[1, 2]は、調製時に不快臭を発しないという利点がある一方、カルボキシメチル基が塩基性条件下に弱いため、保護・脱保護反応時に一部分解するといった欠点がある。本研究では、グリコシルドナー**1** の化学的安定性の向上、およびカルボキシル基の保護基による反応性および立体選択性に対する影響を調べることを目的として、メチルエステルをジエチルアミド、*n*−ブチルアミド、およびトリクロロエチルエステルに置換したドナー**2**−**4** を設計・合成した。また、チオサリチル酸メチルの位置異性体である *m*−及び *p*−メトキシカルボニルチオ基を脱離基にもつグリコシルドナー**5**,**6** も調製し、**2**−**4** とともにグリコシル化に供してその反応性と立体選択性を検討した。

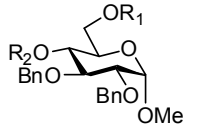
【方法及び結果】*per*−*O*−アセチル−α−D−ガラクトシルブロミドに *o*−, *m*−, *p*−メトキシカルボニルチオフェノールをそれぞれ作用させて脱離基を導入後、糖の保護基をベンジル基へと変換し、グリコシルドナー**1**, **5**, **6** を得た。**1** のメチルエステルをけん化して得たカルボン酸に対して、アルコールやアミン等を脱水縮合してグリコシルドナー**2**−**4** を合成した。得られたグリコシルドナー**1**−**6** をグリコシルアクセプター**7**, **8** とグリコシル化反応を行って、その反応性と立体選択性を既存のチオフェニルドナー**9** と比較した。その結果、同一条件下において立体選択性に違いはあまり見られなかったが、反応性は、*m* 体(**5**)≧チオフェニルドナー(**9**)＞トリクロロエチルエステル体(**4**)＞*o* 体(**1**)＞*p* 体(**6**)＞ジエチルアミド体(**2**)＞*n*−ブチルアミド体(**3**)の順であった。反応性の低かったアミド系ドナー**2**, **3** は、活性化剤の等量を増やすことで反応性が向上した。



1



2: R_1 = $CONEt_2$, R_2 = H, R_3 = H
3: R_1 = $CONH^nBu$, R_2 = H, R_3 = H
4: R_1 = $CO_2CH_2CCl_3$, R_2 = H, R_3 = H
5: R_1 = H, R_2 = CO_2Me, R_3 = H
6: R_1 = H, R_2 = H, R_3 = CO_2Me
9: R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H



7: R_1 = H, R_2 = Bn
8: R_1 = Bn, R_2 = H

(1) Dohi, H.; Nishida, Y., et al. *Synlett* **2001**, 1446−1448.
(2) Miyachi, A.; Dohi, H.; Nishida, Y., et al. *Carbohydr. Res*. **2009**, *344*, 36−43.

Glycosylation, Thioglycoside, Oligosaccharide

講演番号：3B20a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ B 校舎 20 会場

植物病害を抑制する新規サリチル酸糖コンジュゲートの分子設計と機能解析
Molecular design and synthesis of novel salicyl glycoconjugates against plant diseases
○西田 芳弘[1]、崔 紫寧[1]、土肥 博史[1]、伊藤 潤[2]、雨宮 良幹[2] ([1]千葉大院融合、[2]千葉大院園芸)
○Yoshihiro NISHIDA[1], Zining Cui[1], Hirofumi Dohi[1], Jun Ito[2], Yoshimiki Amemiya[2] ([1]Chiba Univ. Nanobiology, [2]Chiba Univ. Horticulture)

［目的］人工糖鎖コンジュゲートには、生物毒素の中和活性など、さまざまな生物機能が確認されており、世界中で実用化研究が繰り広げられている。その一方で、構造が複雑な糖鎖コンジュゲートは、仮に、高い機能が確認されたとしても、大量供給が困難であるなど、実用化には高いハードルが存在する。この問題を克服するには、より簡単な操作で、目的とする糖鎖コンジュゲートを供給する新技術の開発に加えて、簡単な分子構造でありながら、高い生物機能を発現する新規分子の設計が重要である。本研究では、安価に入手可能な乳糖（ラクトース）とサリチル酸誘導体を用いて、サリチル酸ラクトース誘導体(以下、i-LSH と略す）を化学合成し、得られた化合物に対して、植物病原菌を用いた機能解析を行った。

［方法］ ラクトースの完全アセチル体を酢酸中で臭化水素を反応させて、１－臭素化体を得た。これに、チオサリチル酸メチルエステルをアセトン中(室温)で求核置換反応させて、サリチル酸誘導体とした。糖のアセチル基をメタノール中で脱保護し、サリチル酸部位のメチルエステルをエタノール中、ヒドラジン水和物と加熱反応させてアシルヒドラジンとして、目的とする化合物（i-LSH）を得た。合成は、アセチル化ラクトースを出発原料として、計 2 日以内で完了し、総収量は８０－８５％であった。生物機能解析は、in silico 解析、ならびに、数種の植物病原菌を用いて行った。

［結果］ 配糖化には、通常、操作が煩雑なグリコシル化反応を必要とするが、求核性の高いチオサリチル酸を用いることで、これを回避することができた。得られた i-LSH は、水に可溶な白色固体で、in silico 解析では、細胞毒性や変異原性が確認されなかった。次に、数種の植物病原菌を用いて、生物活性試験を行った。キュウリを用いた試験において、i-LSH を処理した植物では、「うどんこ病菌」と「炭そ病菌」に対する発病抑制効果が観察された。既存の抵抗性誘導剤にみられた薬害は、一切、観察されなかった。一方、i-LSH は、病原菌の菌糸生育には、ほとんど抑制作用を示さないことを確認した。これらのことから、i-LSH はキュウリ細胞に抵抗性を誘導して、発病を抑制するものと判断された。抵抗性関連遺伝子の発現解析を行った結果、i-LSH を処理したキュウリでは、ジャスモン酸合成に関わる酵素をコードする Lox1 遺伝子の発現がみられ、抵抗性の発現には、ジャスモン酸を介したシグナル伝達系が関与していると考えられた。

plant disease, glycoconjugate, molecular design

講演番号：3B20a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ B 校舎 20 会場

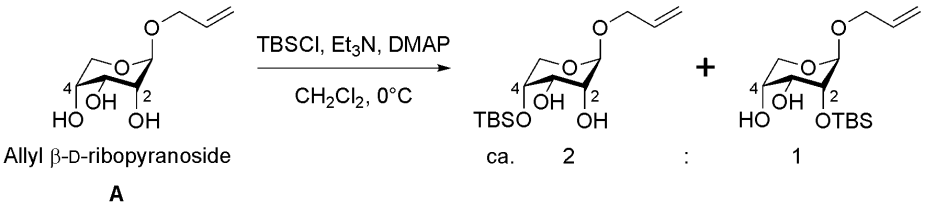
アンヒドロ糖を経由するジギトキソースの新規合成経路の開発

A nobel synthesis of digitoxose using an anhydro sugar as a synthetic intermediate

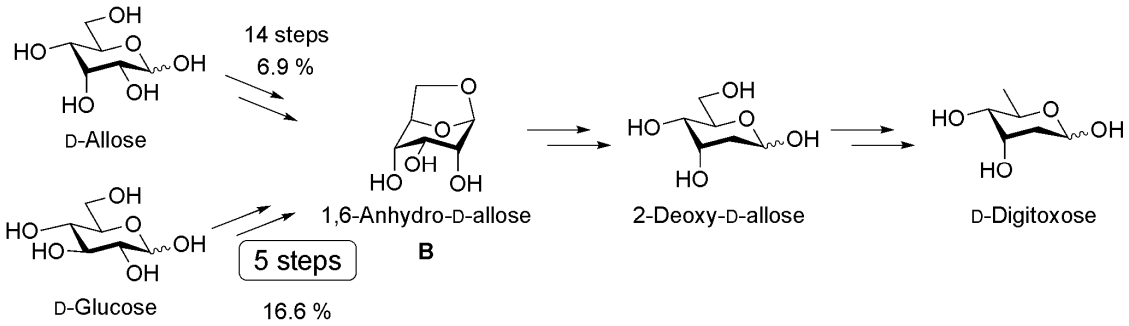
○中島 優子、勝田 亮、矢島 新、額田 恭郎（東農大応生）
○Yuko NAKASHIMA,Ryo KATSUTA,Arata YAJIMA,Tomoo NUKADA (Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】核酸の構成糖である D-ribose には furanose 型および pyranose 型の 2 種類が存在しており、後者の位置選択的修飾に関する研究はこれまでほとんど行われていなかった。このため、当研究室では allyl β-D-ribopyranoside(A)の水酸基修飾における位置選択性について検討を行ってきた。この結果、化合物 A においては 2 位に比べて 4 位水酸基が優先的に修飾されるという知見が得られており、この際化合物 A の立体配座は $^1C_4$ であることが推測された。本研究では化合物 A の立体配座を決定するため 1,6-anhydro-D-allose(B)を合成した。併せて上記の知見を応用し digitoxose の合成研究を行った。

【結果・考察】 D-Allose を出発原料として分子内グリコシル化反応を用いることにより 14 段階 6.9 % で 1,6-anhydro-D-allose (B)を合成した。一方、本合成法は高価な D-allose を出発原料とするうえ多段階を要したので化合物 B の改良合成法も開発した(5 段階 16.6 %)。次に、合成した化合物 B と allyl β-D-ribopyranoside (A)の ^{1}H NMR スペクトルを比較したところ化合物 A の立体配座を当初の予測通り $^1C_4$ であると確認することができた。



アンヒドロ糖 B はデオキシ糖合成における有用中間体となり得る。よって、この化合物を用いた強心配糖体や分子シャペロン GRP78 誘導阻害活性を有する versipelostatin 類の構成糖である digitoxose の新規合成法の開発に成功したので併せて報告する。



digitoxose, anhydro sugar, synthesis

講演番号：3B20a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ B 校舎 20 会場

糖オキサゾリンを糖供与体とする Lacto-*N*-tetraose の酵素合成

Enzymatic synthesis of lacto-*N*-tetraose using sugar oxazoline as a glycosyl donor

○小林 厚志[1]、瀬野 宗[1]、黄 偉峻[1]、野口 真人[1]、片山 高嶺[2]、正田 晋一郎[1] ([1]東北大院工、[2]石川県大生資工研)
○Atsushi KOBAYASHI[1], Hiromu SENO[1], Wei-Shun Huang[1], Masato NOGUCHI[1], Takane KATAYAMA[2], Shin-ichiro SHODA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

緒言：ヒトミルクオリゴ糖は、ビフィズス菌の増殖活性や肺炎菌の感染阻害活性等、乳児に対して有効な生理活性を示すことが知られている。ラクト-*N*-テトラオース(LNT)はヒトミルクオリゴ糖のコア構造の一つであり、LNT の大量合成法の確立はその誘導体の合成およびそれらの生理作用について検討するための基盤合成技術となる。これまでに、LNT の合成前駆体であるラクト-*N*-ビオース(LNB)の酵素合成法の確立、並びに、LNT を基質として認識する加水分解酵素であるラクト-*N*-ビオシダーゼ(LNB-ase)が報告されているが、高効率な合成反応の確立に至っていなかった。今回、LNB-ase による糖転移反応の優れた糖ドナーとして期待できる LNB の糖オキサゾリン誘導体化をおこない、LNB-ase による LNT 合成について報告する。

結果と考察:LNB を水中でトリエチルアミン存在下、水溶性脱水縮合剤である 2-クロロ-1,3-ジメチルイミダゾリニウムクロリド(DMC)を作用させることにより糖オキサゾリン化した後、HPLC を用いて単離し、収率 76%で糖オキサゾリン誘導体を得た。

任意の変異体 5 種を選抜し糖転移反応について検討したところ、Y427F 変異体が優れた活性を示した。Y427F 変異体を用いて反応至適条件を検討したところ、反応温度 4 °C、pH 10.0 の条件下において、反応時間 4 時間において LNT が収率約 65%で生成した。LNB-ase の加水分解反応の至適温度は 30 °C、pH 6.0 であり、これら条件は糖オキサゾリンの水溶液中での安定化にもなることから優れた条件であると言える。また、ワンポット化学-酵素合成反応条件についても併せて報告する予定である。

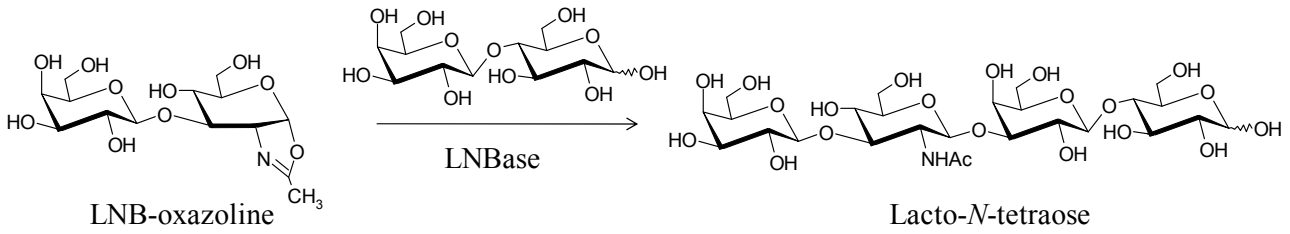


Fig. 1. 化学-酵素法による LNT の合成

謝辞:LNB および LNT を提供して頂いた食品総合研究所の北岡本光博士に感謝いたします。

Lacto-N-tetraose, Sugar oxazoline, Chemo-enzymatic synthesis

講演番号：3B20a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ B 校舎 20 会場

アマドリ転位反応を経由する化学-酵素法により生成した人工糖タンパク質の解析

Analysis of artificial glycoprotein produced by chemo-enzymatic process through the Amadori rearrangement

○吉田 尚生、酒井 謙介、小林 厚志、正田 晋一郎（東北大院工）
○Naoki YOSHIDA,Kensuke SAKAI,Atsushi KOBAYASHI,Shin-ichiro SHODA (Tohoku Univ.)

【目的】酵素触媒によるタンパク質への糖鎖導入反応は，温和な条件で実施可能なことからその適用が検討されているが，高分子であるタンパク質表面上に酵素が作用するためには足場となる部位が必要であるために，その構築反応が鍵となる．我々はこれまでに，温和な条件で糖鎖の導入が可能な，アマドリ転位反応を足場構築法とする，化学-酵素法による糖タンパク質合成について報告してきた (図 1)．しかし，修飾度の異なる糖タンパク質の精製条件が未決定であった．今回，本手法により *N*-結合型糖鎖を導入したニワトリ卵白リゾチーム（HEL）の精製条件およびその構造について検討したので報告する．

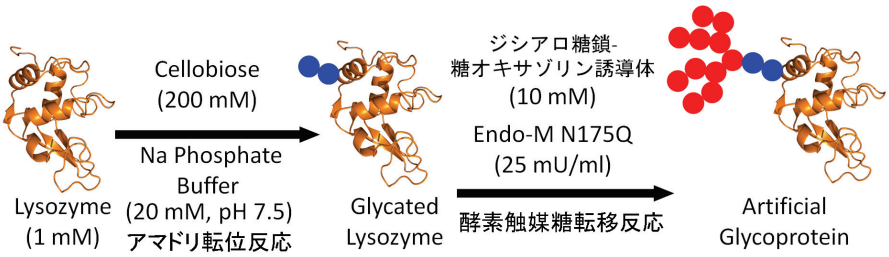


図 1 アマドリ転位反応と糖転移反応による人工糖タンパク質の合成

【結果・考察】HEL (1 μmol) 及びセロビオース (200 μmol) をリン酸緩衝液 (1 ml, 20 mM , pH 7.5) 中で 30 °C, 2 週間インキュベートし，糖化 HEL を得た．この糖化 HEL を強陽イオン交換カラムである，Shodex SP-825 カラムで分離を試みた所，糖化 HEL と考えられる複数のピークが検出された (図 2)．これを MALDI-TOF-MS により分析した結果，これらのピークは複数の糖化リゾチーム混合物であることが分かった。．次にジシアロ型 *N*-結合型糖鎖を 2-Chloro-1,3-dimethylimidazolinium chloride の作用により糖オキサゾリン化し，*Mucor hiemalis* 由来の endo-β-*N*-acetylglucosaminidase 変異体 (Endo-M N175Q)を用いて糖化 HEL に対する糖鎖導入を行った．反応物を MALDI-TOF-MS 及び SDS-PAGE にて解析した所，所望の分子量を示す糖鎖導入 HEL の生成が確認できた．現在，糖鎖導入 HEL の構造解析を行っており，併せて報告する予定である．

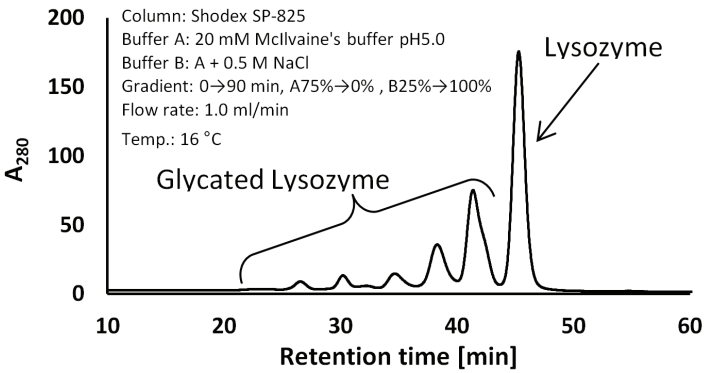


図 2 糖化リゾチームの HPLC による分析

glycoprotein, Amadori rearrangement, chemoenzymatic glycosylation

講演番号：3B20a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ B 校舎 20 会場

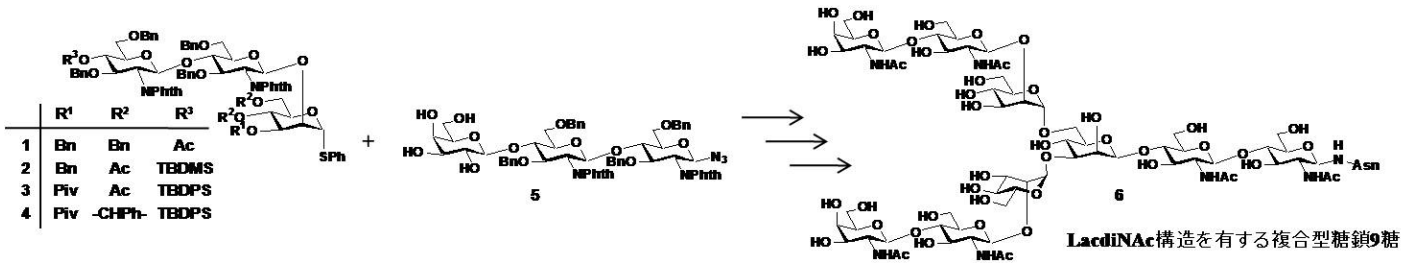
LacdiNAc 構造を有する複合型糖鎖 9 糖の全合成研究

Synthesis of complex-type nonasaccharide containing LacdiNAc structure

○宮沢 進平、松尾 一郎（群馬大院工）
○Shinpei Miyazawa,Ichiro Matsuo (Gunma Univ.)

【目的】LacdiNAc(GalNAcβ1-4GlcNAc)構造を有する糖鎖は, マウスの ES 細胞における分化や受精に関与するなど機能が注目されている。しかし，生物試料には微量しか存在せず，その機能を分子レベルで明らかにするためには十分量の糖鎖サンプルが必要である。そこで我々は LacdiNAc 構造を有する複合型糖鎖 9 糖の合成を目的とし，効率的かつ簡便な合成法の開発を目指した。

【方法・結果】糖鎖を合成するにあたり，共通シントンを利用して 3 糖供与体および 3 糖受容体を合成，さらに位置選択的グリコシル化反応により糖鎖構築を行なうことで保護・脱保護の合成工程を省略した。また立体選択的合成が困難なβ-マンノース残基はβ-ガラクトース残基から，入手が困難な LacdiNAc 構造はキトビオース構造から，それぞれ水酸基の立体を反転することにより簡便かつ確実に構築した。具体的には，アジド基を還元末端部分に有するキトビオース誘導体を共通シントンとして 20g 合成した。得られたアジドキトビオース 4 位のアセチル基を除去後, ガラクトース残基を導入，ガラクトース部分のアセチル基を除去することで 2,3,4,6 位に遊離の水酸基を有する 3 糖受容体 **5** を合成した。一方，還元末端部分のアジド基の選択的除去，糖供与体へと変換後，3,4,6,位をベンジル基で保護したマンノース誘導体と結合することで非還元末端部分 3 糖供与体 **1** を得た。同様に保護基のパターンが異なる 3 糖供与体 **2**，**3**，**4** を合成した。まず 3 糖供与体 **1** を 2 当量用い，3 糖受容体 **5** と反応させた。反応液をゲルろ過クロマトグラフィーにて精製後，HPLC にて解析した結果，十数種類の 9 糖異性体の生成を確認した。一方，3 糖供与体 **2** を用いてグリコシル化反応を行い，HPLC にて解析した結果，選択性の向上が示唆された。現在さらなる選択性の向上を目指し，糖供与体 **3**，**4** を用いたグリコシル化反応を検討している。得られた 9 糖は，4 つの水酸基の同時立体反転による目的糖鎖への変換を試みている。

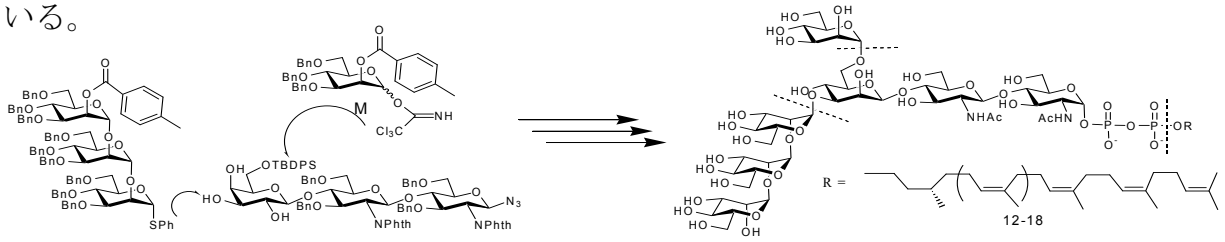


LacdiNAc, glycosylation, N-glycan

講演番号：3B20a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ B 校舎 20 会場

ドリコール結合 7 糖合成
Synthesis of heptasaccharide linked Dolichyl Pyrophosphate
○宇津井 隆志[1]、宮沢 進平[2]、岩本 将吾[2]、松尾 一郎[1,2] ([1]群馬大工、[2]群馬大院工)
○Takashi UTSUI[1], Shinpei MIYAZAWA[2], Syogo IWAMOTO[2], Ichiro MATSUO[1,2] ([1]Gunma Univ., [2]Gunma Univ.)

【目的】*N*-結合型糖鎖の生合成は，ER 膜の細胞質側で酵素によって *N*-アセチルグルコサミンがドリコールにピロリン酸を介して付加されることから始まる。７糖（$Man_5GlcNAc_2$）まで糖鎖が伸長すると細胞質側から ER 内腔側に反転する[1]。その際，フリッパーゼ（Rft1）が関与していると考えられているが，その詳細は明らかになっていない。そこで本研究では，フリップ・フロップする構造の７糖（$Man_5GlcNAc_2$）-PP-Dol を合成し，Rft1 の機能を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】目的の化合物を合成するにあたり，糖鎖部分とドリコール部分の二つに分けて合成することとした。７糖部分の合成は分岐部分で分割し，β-マンノシド結合を有する３糖，３位から分岐するマンノトリオース部分（Ｍ３），６位から分岐するマンノース部分（M）の３つのユニットをデザインした。チオフェニルマンノシド受容体に対しマンノース供与体を順次カップリングすることでＭ３供与体を合成した。キトビオース誘導体の非還元末端４位にガラクトースを導入，３糖とした後に，ガラクトース部分のアセチル基を除去，６位水酸基を TBDPS 基で保護したガラクトシルキトビオース誘導体を合成した。得られた，２，３，４位遊離の水酸基を有するガラクトシルキトビオース誘導体の３位水酸基に対して位置選択的にＭ３供与体を導入，６糖とした後に，TBDPS 基を除去，マンノース残基を導入することで７糖骨格を構築した。得られた非天然型７糖のガラクトース部分２，４位水酸基の立体を反転することにより β-マンノース残基へと変換，天然型の糖鎖へと導いた。一方，ドリコール部分はイチョウの葉より植物型ドリコールを単離，ヒト型ドリコールへと誘導することとした。イチョウの葉８００ｇを乾燥後，ヘキサンにて抽出，アルカリ処理することで５ｇのドリコール混合物を得た。MALDI-TOF MS より *cis*-イソプレンユニット１３－１７からなるポリプレノールの存在を確認した。現在，ポリプレノールのヒト型への変換およびリン酸基を介した糖鎖への導入を検討している。



1) S. Sanyal, A. K. Menon, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 2009, 106, 767-772.

Synthesis, *N*-Glycan, Dolichol

講演番号：3B20a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ B 校舎 20 会場

ヘキソピラノース供与体の反応性に 4 位水酸基保護基がもたらす効果の検証

Examination of how a protecting group of C4 hydroxyl group influences on the reactivity of hexopyranosyl donor.

○松本 佳央梨[1]、中島 慎也[1,2]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2]([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Kaori MATSUMOTO[1], Shinya NAKASHIMA[1,2], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【背景・目的】グリコシド化反応は糖鎖合成の成否を左右する鍵となる反応であり、世界中で新たな手法が次々と開発されている。グリコシド化反応に影響を与える要因は数多く存在するが、中でも保護基の電子的特性が糖供与体及び糖受容体の反応性に大きく影響することが知られている。当研究室では、糖環内の C-O 結合に対してアンチペリプラナーの配置をとるシアル酸 5 位アミノ基やグルコース 4 位水酸基の保護基が糖供与体の反応性に強い影響を及ぼす現象を見出してきた。[1][2]本研究では、糖供与体の反応性に対する遠隔位の置換基効果の作用機構の理解を目指し、ヘキソピラノース供与体 4 位水酸基の保護基が及ぼす反応性への影響を調べることとした。

【方法・結果】電子供与性保護基である Bn 基、TBS 基と電子求引性保護基である Ac 基、CAc 基、Ms 基を 4 位にそれぞれ導入したグルコース及びガラクトース供与体を合成し、グリコシド化反応に供することで反応性の違いをみることとした。その結果、グルコース及びガラクトース供与体の両者において、電子供与性保護基である Bn 基と TBS 基を用いた場合では供与体としての反応性が向上し、電子求引性保護基である Ac 基、CAc 基、Ms 基では反応性を低下させることが分かった。この結果を受け、種々の保護基が反応性に与える影響を順位付けするため、二種類の糖供与体を用い、競合グリコシド化反応を行った。各反応のグリコシド成績体の生成比をもとに反応性の順位を割り出した結果、Bn 体≒TBS 体＞Ac 体＞CAc 体＞Ms 体の順となり、これは Masuda らの報告した官能基の電気陰性度[3]に準じていた。同様に 6 位水酸基の保護基の影響も検証したところ、4 位の時と同様な反応性の傾向が見られた。また、4 位置換体と 6 位置換体との競合グリコシド化、ガラクトース、グルコース供与体との競合グリコシド化も行ったのでその結果についても報告する。

[1]Ando, H.; Koike, Y.; Ishida, H.; Kiso, M. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6883-6886.

[2]Tamai, H.; Ando, H.; Tanaka, H.; Yabe, R.; Yabe, T.; Ishida, H.; Kiso, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2330-2333.

[3]Inamoto, N.; Masuda, S. *Chem. Lett.* **1982**,1003-1006.

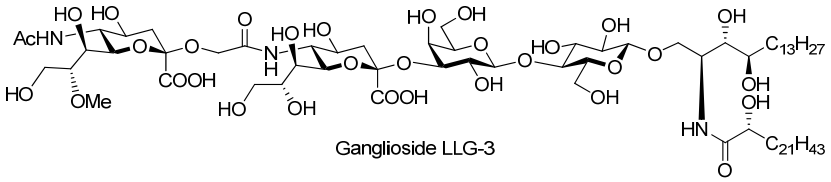
Glycosidation, Reactivity of donor, Effect of protecting groups

講演番号：3B20a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ B 校舎 20 会場

神経突起伸展活性をもつガングリオシド LLG-3 の構造活性相関研究
Structure-activity relationship study on neuritegenic ganglioside LLG-3

○山岸 愛実[1]、矢部（細田） 律子[1,2]、玉井 秀樹[1,2]、小西 美紅[1,2]、今村 彰宏[1,2]、矢部 富雄[1]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Megumi YAMAGISHI[1], Ritsuko HOSODA-YABE[1,2], Hideki TAMAI[1,2], Miku KONISHI[1,2], Akihiro IMAMURA[1,2], Tomio YABE[1], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【目的】ガングリオシドは哺乳類をはじめとする脊椎動物に広く存在するが、無脊椎動物では、棘皮動物から哺乳類のものとは構造を異にするガングリオシドが見出されている。近年、その棘皮動物由来ガングリオシドの多くはラット副腎髄質由来褐色細胞腫（PC12）に対して神経成長因子（NGF）存在下において神経突起伸展活性を示すことが明らかとなり、神経疾患治療のシードとして注目されている。アオヒトデから単離されたガングリオシド LLG-3 は比較的構造が単純な直鎖四糖構造とセラミドから成るが、調べられた棘皮動物ガングリオシドの中で二番目に強力な神経突起伸展活性を有している。これに着目し、本研究では構造活性相関の解明や最小有効構造の決定に向け、ガングリオシド LLG-3 の類縁体を有機化学的アプローチによって合成し、それらの PC12 に対する神経突起伸展活性試験を行った。
【方法・結果】まず、セラミドが神経突起伸展活性に影響を及ぼしていると考え、糖鎖部分のみの類縁体を設計した。5 位に Troc 基を有する共通シアル酸ユニットを用いる効率的な合成経路をガングリオシド LLG-3 の合成に基づいて考案し、合成を達成した。この類縁体を用いて PC12 に対する神経突起伸展活性試験を行ったところ活性を示し、セラミドは活性発現に必須ではないことが示唆された。そこで次に、非還元末端側のシアル酸における 8 位水酸基のメチル基による修飾が重要であると推測し、8 位にメチル基のある類縁体とメチル基のない糖鎖類縁体をそれぞれ合成し、活性試験を行った。その結果、メチル基のある類縁体のみが活性を示し、ガングリオシド LLG-3 の神経突起伸展活性には非還元末端側シアル酸における 8 位水酸基のメチル基による修飾が重要であることが示唆された。



Ganglioside LLG-3

1) M. Kaneko, K. Yamada, T. Miyamoto, M. Inagaki, R. Higuchi, *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 462–463.
2) H. Tamai, H. Ando, H.-N. Tanaka, R. Hosoda-Yabe, T. Yabe, H. Ishida, M. Kiso, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2330–2333.

ganglioside, neurite outgrowth, PC12 cell

講演番号：3B20a15
講演日時、会場：3 月 26 日 11:48～ B 校舎 20 会場

分子内アグリコン転移反応を利用した、β-L-アラビノフラノシド誘導体の合成研究

Synthetic study of β-L-arabinofuranoside derivatives using intramolecular aglycon delivery

○石渡 明弘[1]、Kaeothip Sophon[2]、伊藤 幸成[1,2] ([1]理研・基幹研、[2]ERATO・JST)
○Akihiro ISHIWATA[1], Sophon Kaeothip[2], Yukishige Ito[1,2] ([1]RIKEN・ASI, [2]ERATO・JST)

【目的】 植物などには、翻訳後修飾としてヒドロキシプロリンに結合したオリゴ L-アラビノフラノシドを含むヒドロキシプロリンリッチな糖タンパク質 (HRGP) が見いだされている。HRGP に分類される extensin や、ペプチドホルモンの構造には、β-L-アラビノフラノシド構造がある。extensin の消化では L-アラビノースへ加水分解されていると考えられていたが、ごく最近、ビフィズス菌より２種の β-L-アラビノフラノシダーゼが見いだされ[1,2]、報告された。しかし、化学合成上、β-L-アラビノフラノシドの調達は困難で、基質の入手が問題となっている。そこで、当研究室で開発した分子内アグリコン転移反応[3]を用い、β-L-アラビノフラノシド誘導体の立体選択的合成研究を行った。

【方法と結果】β-L-アラビノフラノシダーゼの基質の構造は合成上困難な β-L-アラビノフラノシドを有する。まず、当研究室で開発した、3,5位を環状保護基の TIPDS 基で保護したアラビノフラノース供与体[4]を用い、パラニトロフェノールとの分子間反応を検討したところ、予想に反し α-L-アラビノフラノシドが主生成物であった。そこで、ナフチルメチルエーテル (NAP) を介した分子内アグリコン転移 (IAD) を利用し、検討をおこなうこととした。パラニトロフェノールを受容体とする、IAD を検討したところ、DDQ 酸化による混合アセタールの形成を経て、DTBMP の存在下、MeOTf による活性化により、目的の β-L-アラビノフラノシドを立体選択的に調製することに成功した。環状保護基ではない 3,5-di-*O*-TIPS 基へと変換し、IAD を行ったところ、反応性が向上し、室温でも IAD が進行した。脱保護をおこない、β-L-アラビノフラノシダーゼの基質となるパラニトロフェニル β-L-アラビノフラノシドの立体選択的合成に成功した。さらに、オリゴアラビノフラノシドのモチーフである β-L-アラビノフラノシル-(1□2)-L-アラビノフラノシドの合成なども検討したので、合わせて報告する。

参考文献

1) Fujita, K. et al. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 38079.
2) Fujita, K. et al. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 5143.
3) Ishiwata, A. et al. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 4250.
4) Ishiwata, A. et al. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5525.

Stereoselective glycosylation, β-L-arabinofuranoside, hydroxyproline rich glycoprotein

講演番号：3B20p01
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ B 校舎 20 会場

ジシアリルガラクトースユニットの実用的合成法の開発研究

Study on the development of a practical synthetic method for disialyl galactose unit

○廣瀬 裕哉[1]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Yuya HIROSE[1], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【目的】ジシアリルガラクトース（Neuα(2→8)Neuα(2→3)Gal; NNG）配列は GQ1b を始めとする高次シアロ化ガングリオシドに見られる糖鎖末端構造である。高次シアロ化ガングリオシドは中枢神経系に特異的に発現し、神経細胞の発生、分化、神経回路網形成、記憶形成維持に関与していることが報告されており、これらの機能発現の分子基盤の解明は、神経疾患治療薬の開発という観点からも重要である。当研究室では過去にシアル酸のポリマーであるコロミン酸の限定加水分解によって調製したジシアル酸を出発物質とした GQ1b の全合成およびその改良合成を報告してきた[1] [2]。しかしながら、これらの手法には、プローブ合成を指向したジシアル酸部の構造修飾が困難であることや、ジシアル酸の安定供給のルートが確立していないなどの問題があり、さらなる研究進展の障壁となる可能性がある。そこで、本研究ではシアル酸モノマーを用いる NNG ユニットの効率的な合成法の確立を目指した。
【方法・結果】シアル酸８位水酸基は主に５位アセトアミド基との水素結合により反応性が低下していると考えられている。その低反応性を、過去の報告に倣い、１位カルボキシル基と５位アミノ基でラクタムを形成して改善することとした[3]。出発物質として大量合成が可能な *N*-Troc シアリルガラクトースユニット[4]を用い、５段階の反応を経てラクタム体へと導いた。水酸基のうち最も反応性の高いシアル酸９位水酸基をベンジル基で保護することとし、その他の水酸基の保護基を種々検討した。ガラクトースの４位とシアル酸８位水酸基を無保護として、シアル酸供与体とのグリコシル化に供すると、ガラクトース４位もシアリル化される結果が得られ、シアル酸８位と近似の反応性を４位水酸基が有することが示唆された。この知見をもとに、ガラクトース４位、シアル酸４位、７位水酸基の保護を再検討し、収率よく NNG 構造を得られる反応系を模索した。本発表では、これらの結果の詳細について報告する。

[1] H. -K. Ishida, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *Carbohydr*. *Res.* **1994**, *260*, C1-C6.
[2] A. Imamura, H. Ando, H. Ishida, M. Kiso, *J*. *Org*. *Chem*. **2009**, *74*, 3009-3023.
[3] H. Ando, Y. Koike, S. Koizumi, H. Ishida, M. Kiso, *Angew*. *Chem*. *Int*. *Ed*. **2005**, *44*, 6759-6763.
[4] T. Fuse, H. Ando, A. Imamura, N. Sawada, H. Ishida, M. Kiso, T. Ando, S. C.- Li, Y. T.-Li, *Glycoconjugate. J.* **2006**, *23,* 329-343.

sialic acid, disialyl galactose, lactamized sialyl acceptor

講演番号：3B20p02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:12～ B 校舎 20 会場

II 型 H 抗原糖鎖の効率的合成

Efficient synthesis of the type II H-antigen trisaccharide

○原 温[1]、今村 彰宏[1,2]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大院応生、[2]京都大・iCeMS)
○Atsushi HARA[1], Akihiro IMAMURA[1,2], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]Kyoto Univ. iCeMS)

＜目的＞　II 型 H 抗原糖鎖（Fucα1→2Galβ1→4GlcNAc）は、赤血球膜上の複合糖質中に存在し血液型糖鎖抗原として広く認識されている。H 抗原は、そのガラクトース 3 位にα-GalNAc あるいはα-Gal 残基が結合するとそれぞれ A 型、B 型抗原となるため、糖鎖の生合成上重要なコア構造と言える。また、フコシル化糖は、細胞間あるいは細胞–マトリックス間相互作用、アポトーシスなどに深く関与する事が知られており、加えて、ある種のガン細胞には H 抗原を含む特異的な糖鎖構造が見つかっている。このように、H 抗原糖鎖は細胞社会において重要な役割を担っているのは明らかだが、その生理機能解明は決して進んでいるとは言えない。そこで本研究では、有機合成によって効率的に H 抗原糖鎖を合成し、その機能解明研究を推進することを目的とする。
＜方法・結果＞　II 型 H 抗原糖鎖は、*N*–アセチルラクトサミンのガラクトース 2 位にフコースが結合した構造を持つ。従来汎用されてきた合成方法は、まずガラクトース供与体とグルコサミン受容体をそれぞれ別途調製しカップリングさせることでラクトサミン二糖骨格を構築し、最後にフコースを導入するというものであった。すなわち、三糖骨格を単糖ユニットに分解し、それぞれをつなぎ合わせるという手間が掛っていた。そこで我々は、三糖骨格を単糖単位で誘導するのではなく、ラクトサミンの合成前駆体であるラクツロース二糖を出発物質にすることでより効率的に H 抗原へ導けると考えた。ラクツロース（ガラクトースβ1→4 フルクトース）は比較的安価で入手可能な二糖であり、Heyns 転位反応によりラクトサミンに導けることが知られている。[1]　本研究では、まずラクツロースから *N*–フタロイル–ラクトサミン誘導体を合成した後、各種保護基の変換を効率的に行い、ガラクトース 2 位水酸基のみが遊離の二糖誘導体を得た。続いて簡便に調製したフコース供与体とのカップリング反応を経て目的とする II 型 H 抗原三糖誘導体へと導いた。本合成戦略は、II 型の A, B 抗原への応用も可能であり、今後はそれらの抗原を含む糖鎖の合成研究へ展開する予定である。

[1] Heyns, K.; Koch, W. *Z. Naturforsch*. **1952**, *7*, 486–488.

H antigen, blood type antigen, Heyns rearrangement

講演番号：3B20p03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:24～ B 校舎 20 会場

マンノース結合タンパク質の認識機構解明に向けたルイス A タンデムリピートの効率的合成研究

Synthetic study of Lewis A tandem repeat for elucidating the recognition mechanism of mannose-binding protein

○山路 智也[1]、植木 章晴[1,2]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Tomoya YAMAJI[1], Akiharu UEKI[1,2], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【背景・目的】動物レクチンの一種であるマンノース結合タンパク質（mannose-binding protein : MBP）は、マンノース、*N*-アセチルグルコサミンおよびフコースに特異的に結合する。マンノース、*N*-アセチルグルコサミンおよびフコースに富む糖鎖は、種々の微生物表面に幅広く見出されており、MBP は、その糖鎖を介して微生物の認識・排除に関与しているものと考えられている。また、最近の研究では、顕著な癌増殖抑制作用が確認されており[1)]、非常に興味深いタンパク質である。この MBP に特異的に結合するリガンド糖鎖の構造は、ガラクトース、グルコサミンからなるラクト I 型のラクトサミンがフコシル化されたルイス A と呼ばれる特殊な 3 糖の繰り返し構造が、最低 4 回続いている長鎖であることが知られている[2)]。そこで本研究では、MBP の糖鎖認識における最小構造の探索を目的とし、ルイス A 型糖鎖、4～6 量体（12～18 糖）の合成を行うこととした。

【方法・結果】ルイス A タンデムリピートの合成においては、合成経路の終盤で、目的物の確認が困難になることが予想されたため、^{1}H-NMR において特徴的なピークを示し、簡便な脱保護が可能な保護基を単糖に導入することとした。この条件を満たす保護基として、ガラクトースの 3 位にアリル基を、またグルコサミンの 1 位に TBDPS 基をそれぞれ導入した。また、多量化に伴いグリコシル化反応における基質の反応性の低下が考えられたため、電子的に豊富な糖ユニットを用いることとした。そこで電子供与性基であるベンジル基を多数有するガラクトースを糖供与体とするβ-ガラクトシル化法[3)]を用いたところ、より簡便に目的とするラクトサミンユニットが得られた。さらに、エーテル系溶媒の溶媒効果[4)]を用いてα選択的にフコースを導入し、本研究での核となるルイス A コアユニット（3 糖）の合成を達成した。一般的な糖鎖合成では、グリコシル化反応と官能基変換を繰り返して単糖を順次結合するため、工程が長くなる場合が多い。しかし本研究では、ルイス A コアユニット共通中間体から導かれる、糖供与体、糖受容体を用いてグリコシル化反応を行うことにより短工程化を図り、高収率での 2 量体（6 糖）合成を達成した。さらに合成した 2 量体を先と同様に糖供与体、糖受容体へと変換して 4 量体合成を行ったところ、反応性が低下することなく高収率で 4 量体（12 糖）を合成することに成功した。

1) T. Kawasaki, *et al*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 371-375.; 2) N. Kawasaki, *et al. J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 10897-10913.; 3) A. Ueki, *et al. Tetrahedron* **2008**, *64*, 2611-2618.; 4) A. Ishiwata, *et al. Tetrahedron* **2008**, *64*, 92-102.

Lewis A epitope, Lewis A tandem repeat, mannose-binding protein

講演番号：3B20p04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:36～ B 校舎 20 会場

LPS/LOS の酸性内部コア糖鎖の合成研究
Synthetic study of acidic inner-core oligosaccharides of LOS/LPS
○一柳 剛、庄野 結大、蟻 瑞欽、島田 麻衣、大柿 敦嗣、門脇 拓也（鳥取大農）
○Tsuyoshi Ichiyanagi,Keita Shono,RuiQuin Yi,Mai Shimada,Atsushi Oogaki,Takuya Kadowaki (Tottori Univ)

グラム陰性細菌は細胞外膜にリポ多糖(LPS)/リポオリゴ糖(LOS)を産生する，LPS/LOS は多糖あるいはオリゴ糖が，属により保存されたコア糖鎖を介して Lipid A に結合した構造を有している，多くのグラム陰性菌はコア糖鎖に１～３分子の２-デオキシ-D-マンノオクツロン酸(Kdo)を有している．LPS の Kdo を含むコア糖鎖に結合するヒト抗体の存在が示唆されており，そのエピトープ解明に向けた構造の明らかな糖鎖が必要になっている．我々は Kdo 糖鎖を含む分岐オリゴ糖鎖の効率的な合成方法に取り組んできており，これまでに Kdo の４，５位と７，８位に異なる保護基を有する Kdo 糖鎖合成に適した中間体の開発と，２種類の Kdo2 糖[Kdo(⟨2-4)Kdo，Kdo(⟨2-8)Kdo]の合成を達成してきた．[1]しかし 2-8 結合を有する２糖合成では収率を改善する必要があった．本研究では，２糖合成でのグリコシル化反応における Kdo 供与体の脱離基および活性化方法を変更することにより収率改善を目指した．また４，５分岐構造を持つオリゴ糖の合成について取り組んだので報告する．

既にマンノースから９段階で合成可能である 7,8-ジ-O-ベンゾイル-4,5-O-イソプロピリデン-D-マンノオクツロン酸メチルから３種の糖供与体（フッ化糖，トリクロロアセトイミデート，N-フェニルトリフルオロアセトイミデート）および２位にアリル基を導入した２種のジオール受容体と８位に遊離水酸基を有する受容体を合成した．Kdo 誘導体２位水酸基は反応性が低く，トリフルオロアセトイミデート合成では反応の完結まで室温で１週間必要であった．これらを用いて２-４結合および２-８結合を有する Kdo２糖を合成した．続いて遊離している５位水酸基に対して，マンノヘプトース，ヘキソース，ヘキソサミンのそれぞれの誘導体導入を試みた．その結果，マンノヘプトース誘導体では(選択的に 87%の収率でグリコシル化を達成した．

脱保護反応は，はじめにトリフルオロ酢酸を用いてイソプロピリデン基を除去したのち，水酸化ナトリウム水溶液を用いた加水分解を行うことにより，糖鎖の切断を起こすことなく行うことが可能であった．以上のことから我々がデザインした Kdo 合成中間体が LPS/LOS の 4,5 分岐型コア糖鎖の合成に利用可能であることを実証した．

[1] Ichiyanagi, T. et. al. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 5964–5971.

LPS/LOS, 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid, inner-core oligosaccharide

講演番号：3B20p05
講演日時、会場：3 月 26 日 14:48～ B 校舎 20 会場

位置選択的に硫酸化されたグリコサミノグリカンオリゴ糖の合成

Synthesis of glycosaminoglycan oligosaccharide with sulfates at the specific poositions

○武田 尚子[1]、田村 純一[2] ([1]鳥取大院工、[2]鳥取大地域)
○Naoko TAKEDA[1], Jun-ich TAMURA[2] ([1]Tottori Univ., [2]Tottori Univ.)

【目的】グリコサミノグリカン（GAG）は直鎖状の硫酸化多糖であり、コンドロイチン硫酸（CS)、ヘパラン硫酸（HS）やケラタン硫酸（KS）など様々な種類が存在している。これまでに種々の GAG について、いくつかの生理活性が報告されている。GAG によって発現される生理活性は糖鎖の構造に対応しており、特に硫酸化パターンに密接に関係し、糖鎖の複雑な配列、硫酸基の数や位置、糖残基の立体化学などを正確に読み取る。そのため、どのような GAG の糖鎖構造と生理活性の相関を明らかにするためには、構造が明確なオリゴ糖を得ることが重要となってくる。GAG の生理活性を調べる際に使用される基質は天然由来の市販品を用いることが多い。天然由来の GAG は単一な硫酸化パターンをもたないヘテロ構造であるため、分子の微細構造と生理活性との関係を議論しにくい。そこで本研究では、GAG の生理活性を分子レベルで明らかにするため、位置選択的に硫酸基を導入した GAG オリゴ糖を合成することを目的とした。

【方法】GAG が繰り返し二糖構造からなることに着目し、複数の硫酸化パターンが存在する GAG オリゴ糖を効率的に合成するために、硫酸化する水酸基を選択的に保護した二糖を共通の原料とした。この二糖同士を縮合することによって、いくつかの硫酸化パターンをもつオリゴ糖を効率的に合成した。

glycosaminoglycan, oligosaccharide

講演番号：3B20p06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ B 校舎 20 会場

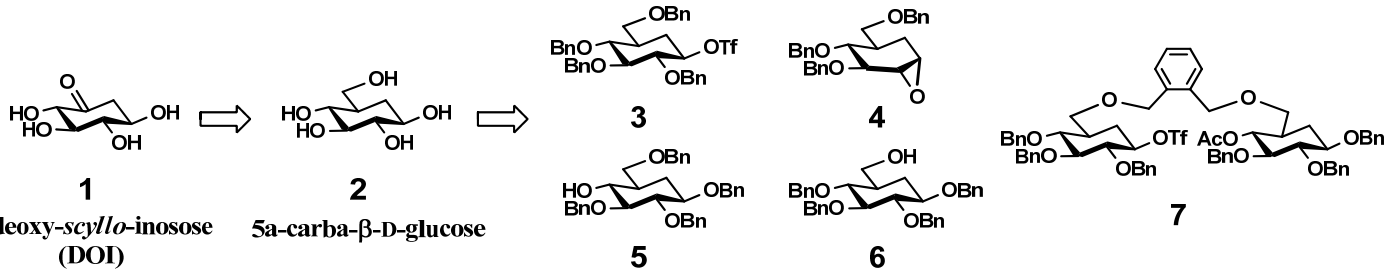
カルバグルコースを構成糖とする 5a,5a'-ジカルバ-β-D-グルコビオースの合成研究

A study on the synthesis of 5a,5a'-Dicarba-β-D-glucobiose composed of carbaglucose residues

○館田 尚家、宮崎 達雄、鰺坂 勝美（新潟薬大院応用生命科学）
○naoya tateda,tatsuo miyazaki,katsumi ajisaka (Grad. School of Niigata Univ. of Pharmacy and Applied Life Sciences)

単糖の環酸素原子がメチレン基に置き換わったカルバ糖は、相当する単糖とは異なりヘミアセタール部位（アルデヒド基）を持たないので、水溶液中でのα体とβ体の平衡反応がなく、非酵素的なメイラード反応を起こさない利点がある。さらに相当する単糖とよく似た三次元構造をとるものの、ピラノース環に比べて化学的に強固なシクロヘキサン環を有するので、酵素的な糖代謝反応を受けない特徴がある。そのため、これまでにさまざまな種類のカルバ糖が合成され、生体内安定性に優れた単糖ミミック分子として利用されてきた。一方、カルバ糖を糖鎖の非還元末端部分に有する擬似糖鎖の合成もいくつかのグループにより報告されている。これらの糖鎖アナログは、相当するエキソ型の糖加水分解酵素による分解を受けない分子ツールとして用いられてきた。しかしながら、カルバ糖を糖のヒドロキシ基などに導入する反応の報告例はわずかであり、限られた糖鎖シーケンスに対してしか試されていない。そこで我々は、当研究室にて 2-デオキシ-*scyllo*-イノソース（DOI）**1** から高効率的に大量合成したカルバ-β-D-グルコース **2** を鍵原料として、カルバ糖を組み込む手法を検討することとした。ターゲットとしては、代謝酵素による反応と非酵素的な反応のどちらに対しても耐性を示すので *in vivo* において分子安定性が期待できる 5a,5a′-ジカルバ-β-D-グルコビオースを選択した。本発表では、カルバグルコースのみで構成された新規二糖ミミック分子の合成について報告する。

カルバグルコース同士を繋ぐ反応は、アノメリック位にトリフレート基を有するカルバグルコース **3** および 1,2-アンヒドロ-カルバグルコース **4** に対して、遊離のヒドロキシ基をひとつ有するカルバグルコース **5** および **6** を求核試薬として作用させた結果について述べる。また、カルバマルトースの合成に関しては、分子間カップリング反応の結果に加えて、6 位と 6′位を *o*-キシリレンリンカーを介して結合させた化合物 **7** による分子内カップリング反応についても述べる。



Carbaglucose, Disaccharide mimics, Intramolecular coupling reaction

講演番号：3B20p07
講演日時、会場：3 月 26 日 15:12～ B 校舎 20 会場

多糖ナノ粒子を構造基盤としたインフルエンザウイルス結合性糖鎖クラスター材料の機能設計
Functional design of high-avidity glycoclusters as probes for influenza virus

○尾形 慎[1]、杉山 尚弘[2]、朴 龍洙[3]、渡邊 浩史[4]、柳瀬 美千代[4]、鷹羽 武史[4]、門川 淳一[5]、鈴木 哲朗[6]、碓氷 泰市[2,3]([1]福島高専物質工、[2]静岡大院農、[3]静岡大院創造、[4]江崎グリコ（株）健康科学研、[5]鹿児島大院理工、[6]浜松医大医)
○Makoto Ogata[1], Naohiro Sugiyama[2], Enoch Y. Park[3], Hiroshi Watanabe[4], Michiyo Yanase[4], Takeshi Takaha[4], Jun-ichi Kadokawa[5], Tetsuro Suzuki[6], Taichi Usui[2,3] ([1]Fukushima NCT, [2]Shizuoka Univ., [3]Shizuoka Univ., [4]Ezaki Glico Co., Ltd., [5]Kagoshima Univ., [6]Hamamatsu Univ. School of Medicine)

【目的】本研究では、非還元末端グルクロン酸修飾型デキストリンナノ粒子（DNP）の粒子表面に存在するグルクロン酸残基を介して、化学ー酵素的手法によりα2,6シアリルオリゴ糖鎖を多価に配位することで、多糖ナノ粒子を骨格構造に有する新規インフルエンザウイルス結合性糖鎖クラスター材料の合成を目的とした。さらに、このように糖鎖修飾したナノ粒子を阻害剤として、ヒト型インフルエンザウイルスヘマグルチニンおよびニホンニワトコ由来シアル酸結合性レクチンとの結合親和性を指標とした構造活性相関より、それぞれに対する最適粒子径および糖鎖密度効果について考察した。
【方法および結果】始めに、*N*-アセチルラクトサミン（LacNAc、Galβ1-4GlcNAc）をβ-グリコシルアミノ化後、スペーサー部(4-trifluoroacetoamidobutanoic acid)と縮合し、N結合型二糖配糖体{*N*-(γ-trifluoroacetoamidobutyryl)β-LacNAc}を収率74％で得た。続いて、本配糖体のアグリコン部末端を脱保護し*N*-(γ-aminobutyryl)β-LacNAcを定量的に得た。次に、平均分子量と非還元末端グルクロン酸修飾率の異なる計6種類のDNP表面グルクロン酸残基を介しLacNAc配糖体の導入を試みた。即ち、粒子グルクロン酸残基のカルボキシル基とLacNAc配糖体のアグリコン部末端アミノ基との縮合反応により各種LacNAc配糖体含有アシアロ型DNPを調製した。最後に、本アシアロ型DNPを受容体基質、CMP-Neu5Acを供与体基質としてα2,6-シアリルトランスフェラーゼによりガラクトース残基への位置選択的なシアリル化を行い、平均分子量や平均粒子径さらにはシアロ糖鎖導入率の異なる計6種類のNeu5Acα2,6LacNAc配糖体含有シアロ型DNPライブラリーを構築した。

これら一連のアシアロ型およびシアロ型DNPの粒子の形態を動的光散乱法と透過型電子顕微鏡で観察したところ、平均粒子径はおよそ15-40 nmであり、均一性と分散性が示された。これら糖鎖置換ナノ粒子を用い、ヒト型インフルエンザウイルス{A/Beijing/262/95 (H1N1)}に対する赤血球凝集阻害試験を行った結果、シアロ型粒子に関しナノ粒子表面に配位したシアロ糖鎖間距離と阻害活性との間に活性と構造の相関が確認された。即ち、その阻害活性は糖鎖間距離に依存し糖鎖密度が高いシアロ型DNP粒子ほど強い活性を示した。さらに、糖鎖間距離がほぼ同等で平均粒子径が異なるシアロ型DNP間の比較においては、平均粒子径が大きい方が阻害活性も強い傾向が得られた。現在は、シアル酸結合性レクチンであるニホンニワトコレクチンを用いた相互作用解析ついても検討中である。

influenza virus, glycocluster, nanoparticle

講演番号：3B20p08
講演日時、会場：3 月 26 日 15:24～ B 校舎 20 会場

志賀毒素に対する機能性多価糖鎖の合成

Synthesis of Functional Multivalent Glycoside against Shigatoxin

○大泉 貴宏[1]、村川 明子[2]、碓氷 泰一[2]、朴 龍洙[1,2] ([1]静岡大・農、[2]静岡大・創科院)
○Takahiro OIZUMI[1], Akiko Murakawa[2], Taiichi Usui[2], Yong-soo Park[1,2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ.)

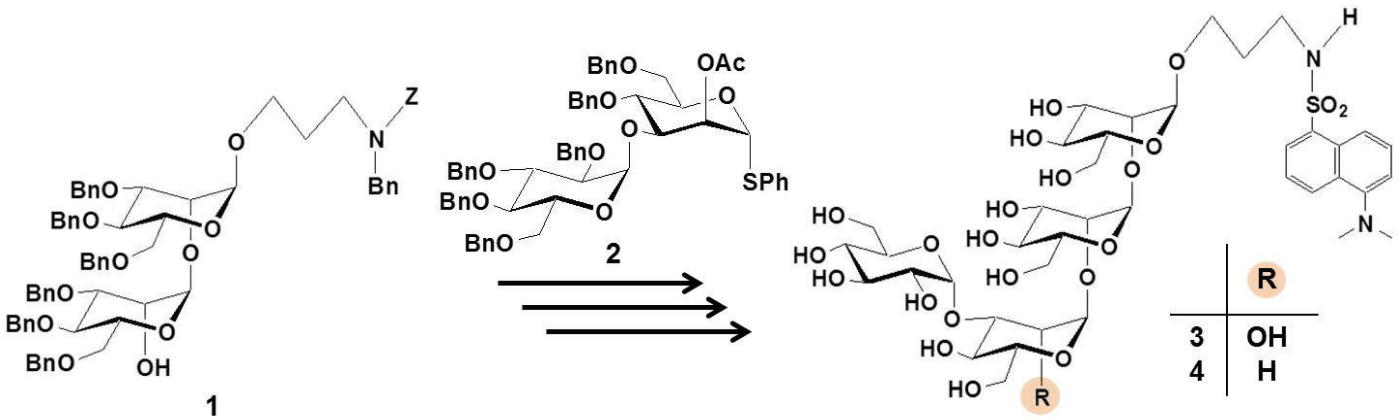
背景・目的】*O*-157 等の出血性大腸菌による被害は例年世界各地で報告されている。出血性大腸菌は志賀毒素と呼ばれる毒素タンパク質を産生するが、その構造は毒性部位である A サブユニットと標的細胞への結合を司る B サブユニット五量体の二部から成り、B サブユニットが標的細胞表面上の Gb3(Galα(1-4)-Galβ(1-4)-Glcβ1-ceramide)の三糖部を認識・結合し、細胞内に取り込まれた A サブユニットはリボソームを攻撃、感染した細胞のタンパク質合成能が奪われる。現在、志賀毒素タンパク質に対する有効な感染阻害剤や迅速な検出技術の確立が望まれている。そこで、本研究では志賀毒素 B サブユニットの発現と精製、糖転移酵素を用いた志賀毒素認識糖鎖の簡便な合成とその応用を目指した。
【方法】志賀毒素Ⅰ型およびⅡ型の B サブユニット遺伝子を、His タグを含めて pET32b ベクターに組み込み、大腸菌 BL21 株に形質転換し、それぞれの B サブユニットを発現した。菌体破砕液を Ni-NTA super flow resin を担体としたカラムに供し、B サブユニットを精製した。
志賀毒素認識糖鎖である 5-(trifluoroacetamidopentyl)-β-globotrioside (Galα(1-4)-Galβ(1-4)-Glcβ1-5TFAP)を酵素合成するために、髄膜炎菌由来の α1,4-galactosyltransferase (A4GalT)を大腸菌にて発現した。蛍光標識ラクトースを用いて同酵素の活性を確認した後、ラクトースを原料に 5-(trifluoroacetamidopentyl)-β-globotrioside を酵素合成した。合成した 5-(trifluoroacetamidopentyl)-β-globotrioside を水酸化ナトリウムによる脱保護反応に供して末端をアミノ基に変換後、ゲルろ過クロマトグラフィーに供して精製した。カルボキシル基修飾された金ナノ粒子表面へ、EDC-NHS 反応で精製したグロボ三糖を配置させた。
【結果】ヒスタグを用いて精製した志賀毒素 B サブユニットと、α1,4-galactosyltransferase を SDS-PAGE で確認した。予め合成したラクトース配糖体を受容体基質、UDP-Gal を供与体基質として α1,4-galactosyltransferase を添加後、37℃で 4 時間ガラクトース転移反応を行った。反応停止液を濃縮後、シリカゲル 60N カラムおよび ODS カラムクロマトグラフィーを用いて単離・精製し目的物である 5-(trifluoroacetamidopentyl)-β-globotrioside を糖受容体あたり収率 65%で得た。グロボ三糖の有機合成には水酸基の保護など多くのステップを要するが、本研究で発現した α1,4-galactosyltransferase は非常に高い活性を持ちながら簡便かつ大量に精製できるため、安価な原料から志賀毒素認識糖鎖のグロボ三糖の大量合成が可能である。また、グロボ三糖でコーティングした金ナノ粒子の毒素検出技術への応用を検討している。

Shigatoxin, alpha-1,4-galactosyltransferase

講演番号：3B20p09
講演日時、会場：3 月 26 日 15:36～ B 校舎 20 会場

エンド-α-マンノシダーゼ解析のための阻害剤の合成
Synthesis of endo-α-mannosidase inhibitor
○笠原 佑太[1]、岩本 将吾[1]、亀井 健一[1]、飯野 健太[1]、瀬古 玲[2,3]、伊藤 幸成[2,3]、松尾 一郎[1]([1]群馬大院工、[2]理研基幹研、[3]ERATO-JST)
○Yuta KASAHARA[1], Shogo IWAMOTO[1], Kenichi KAMEI[1], Kenta IINO[1], Akira SEKO[2,3], Yukishige ITO[2,3], Ichiro MATSUO[1] ([1]Gunma Univ., [2]RIKEN-ASI, [3]ERATO-JST)

【目的】エンド−α−マンノシダーゼは *cis*−ゴルジに局在し、*N*−結合型糖鎖の非還元末端側の Glcα1-3Man 残基を切断する糖加水分解酵素である。我々はエンド− α−マンノシダーゼの機能に興味を持ち、酵素活性測定のための蛍光標識 4 糖の合成および基質特異性解析研究をおこなってきた。近年本酵素の酵素活性メカニズムは糖の 2 位水酸基がアノメリック位に作用し、エポキシド中間体を経由して進行すると示唆された［1]。今回、酵素活性メカニズムを考慮し、2 位水酸基を水素原子に置換した 2−デオキシ誘導体 4 糖の合成およびその酵素阻害活性を評価したので報告する。
【方法・結果】還元末端部分にアミノプロピル基を有する 2 糖(Manα1-2Man)受容体 **1** に対し、別途合成した 2 糖(Glcα1-3Man)供与体 **2** を結合、4 糖（Glcα1-3Manα1-2Manα1-2Man）誘導体へと導いた。得られた 4 糖誘導体の 2 位 Ac 基を除去後、ラジカル的にデオキシ化することで水酸基をデオキシ化した 4 糖（Glcα1-3Ara(Ara = 2-deoxy-arabinose)α1-2Manα1-2Man）誘導体へと導いた。脱保護後、還元末端部分に蛍光性置換基（Dansyl 基）を導入した。得られた 4 糖デオキシ体 **4** をエンド−α−マンノシダーゼにより処理した結果、加水分解されなかった。この結果から合成した 4 糖デオキシ体 **4** は阻害剤として機能することが示唆された。



［1］Thompson A. J., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, 109, 781-786.

endo-α-mannosidase, N-glycan, inhibitor

講演番号：3B20p10
講演日時、会場：3 月 26 日 15:48～ B 校舎 20 会場

Siglec-2 阻害剤としてのシスリガンドミミックの合成とその生物学的評価

Synthesis and biological evaluation of the mimics of cis ligand for Siglec-2

○菅沼 勇輝[1]、松原 直子[3]、岩山 祐己[1,2]、植木 章晴[1,2]、今村 彰宏[1,2]、安藤 弘宗[1,2]、鍔田 武志[3]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS、[3]東京医科歯科大・疾患生命)
○Yuki SUGANUMA[1], Naoko MATSUBARA[3], Yuki IWAYAMA[1,2], Akiharu UEKI[1,2], Akihiro IMAMURA[1,2], Hiromune ANDO[1,2], Takeshi TSUBATA[3], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS, [3]Tokyo Medical and Dental Univ.)

【目的】糖鎖が機能的に働くためには、糖鎖を構造特異的に認識するレクチンの存在が重要である。生体内に存在するシアル酸認識型レクチン Siglec-2 は、B 細胞表面上に発現し、隣接する Neuα(2,6)Galβ(1,4)GlcNAc を認識する。Siglec-2 は、同一細胞上のシスリガンドを認識することで B 細胞増殖抑制シグナルを放出し、免疫機能を抑制していると考えられている。したがって、外因性の Siglec-2 リガンドのミミックにより免疫機能の抑制を解除し、活性化することが可能であると予想される。本研究室では、Siglec-2 に対して顕著な阻害活性を持つ化合物 (GSC-718) を報告しているが[1]、in vivo 試験のための大量合成や、より強力な阻害活性を持つ化合物を得るための構造展開を行う上で種々の合成上の問題点が存在していた。本研究では、シアル酸のラクタム体を経由した GSC-718 の効率的合成法を開発し、従来の問題点の克服に成功したことを前回大会にて報告している。そこで、今大会ではこの合成経路を利用した種々のアグリコンを導入した GSC-718 類縁体の合成及び、それらの生物試験 (ELISA、B 細胞増殖試験) の結果について報告する。
【方法・結果】共通ドナー (9-N_3-シアル酸ドナー) を用いて種々のアクセプターとのグリコシド化反応を行い、ゲルろ過クロマトグラフィーにより過剰の試薬を除いた粗精製物をα体特異的な 1,5-ラクタム化反応 (NaOMe, MeOH, reflux) に供した[2]。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて単離したラクタム体は Ac 化、選択的脱 *N*-Ac 化、*N*-Boc 化を経た後、ラクタムを開環させた。続いて、N_3 基の還元及び 9 位アミド形成を行った後、脱 *N*-Boc 化、*N*-アセトキシアセチル化を行うことで目的化合物の骨格構造を得た。最後にこの化合物を脱保護することにより、各目的化合物 (GSC-718 類縁体) を合成した。
各化合物の生物試験結果から、アグリコンの芳香環の電子密度が Siglec-2 との親和性に影響を与え、芳香環内の電子密度が高い化合物が高い親和性を持ち、電子密度が低い化合物は低い親和性を持つことが分かった。この結果から Siglec-2 の糖鎖認識ポケットのアミノ酸残基とアグリコン残基間における π-π 相互作用がこれらの親和性に影響しているのではないかという可能性が示唆された。

[1] H. H. M. Abdu-Allah *et al*., *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2011**, *19*, 1966-1971.
[2] H. Tanaka *et al*., *Tetrahedron Lett*. **2009**, *50*, 4478-4481.

Sialic acid, Siglec-2, Lactamization

講演番号：3B20p11
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ B 校舎 20 会場

効率的な小胞体関連糖鎖ライブラリー構築を志向した高マンノース型糖鎖の合成

Synthesis of high-mannose type glycan derivative for efficient construction of endoplasmic reticulum-related glycan library

○藤川 紘樹[1]、小泉 晶彦[1]、八須 匡和[1]、迫野 昌文[1]、高谷 万紀[1]、松尾 一郎[2]、武田 陽一[1]、瀬古 玲[1]、伊藤 幸成[1,3] ([1]JST, ERATO、[2]群馬大院工、[3]理研基幹研)
○Kohki FUJIKAWA[1], Akihiko KOIZUMI[1], Masakazu HACHISU[1], Masafumi SAKONO[1], Maki TAKATANI[1], Ichiro MATSUO[2], Yoichi TAKEDA[1], Akira SEKO[1], Yukishige ITO[1,3] ([1]JST, ERATO, [2]Gradurated School of Engineering, Gunma Univ., [3]RIKEN, ASI)

【目的】小胞体でタンパク質に付加される高マンノース型糖鎖は、カルネキシン/カルレティキュリンサイクルによるタンパク質の品質管理機構に重要な役割を果たしている。これら品質管理機構に関連する高マンノース型糖鎖の構造と機能の詳細な検討には、厳密な構造と高い純度を持つ十二糖から三糖まで50種類の糖鎖のライブラリーが必要となる。これまでに我々は、高マンノース型糖鎖の3分岐構造の末端をグルコース、ガラクトース、*N*-アセチルグルコサミンで保護した共通基質十四糖を合成し、7種類の酵素でトリミングを行い、31種類の糖鎖を構築する事に成功している[1]。このトリミング反応のうち、十四糖から中央の分岐末端に配置したガラクトースを加水分解する反応の効率がその他の糖加水分解反応に比べて悪く、大量の酵素を必要とする事が課題として明らかとなった。本研究ではこの課題改善を目的に、中央の分岐末端を酸性条件下簡便に脱保護可能なアセタール系の保護基で保護した高マンノース型糖鎖を共通基質として設定した。

【方法及び結果】共通基質となる高マンノース型糖鎖の合成では、還元末端側に存在するManβ(1-4)GlcNβ(1-4)GlcN三糖受容体にトリマンノース供与体を縮合後、グルコース供与体を縮合して七糖受容体を合成した。さらに中央の分岐構造を形成するトリマンノース受容体と*N*-アセチルグルコサミンで保護された三糖供与体を縮合して2分岐構造を含む六糖供与体を合成した。この六糖供与体を七糖受容体との縮合反応に供する事で目的の十三糖骨格を構築した。続いて中央の分岐末端に存在するマンノースの4、6位水酸基にアセタール系保護基を導入し、脱保護及び蛍光分子の導入を行う事で、高マンノース型糖鎖プローブの合成を達成した。得られた糖鎖プローブを用いて酵素によるトリミングを検討した。

[1] Koizumi, A.; Matsuo, I.; Takatani, M.; Seko, A.; Hachisu, M.; Takeda, Y.; Ito, Y. **2012**, *submitted.*

high-mannose type glycan, glycan library, endoplasmic reticulum

講演番号：3B20p12
講演日時、会場：3 月 26 日 16:12～ B 校舎 20 会場

ヒト ER α-1,2 mannosidase I の酵素 活性を加速する因子の探求
Exploration of factors to accelerate enzymatic activities of human ER α-1,2 mannosidase I
○相川 順一[1]、武田 陽一[2]、松尾 一郎[3]、伊藤 幸成[1,2] ([1]理研基幹研、[2]ERATO・JST、[3]群馬大院工)
○Jun-ichi Aikawa[1], Yoichi Takeda[2], Ichiro Matsuo[3], Yukishige Ito[1,2] ([1]RIKEN ASI, [2]ERATO, JST, [3]Gunma Univ.)

「目的」
ER α-1,2 mannosidase I(ERManI)はアスパラギン結合型糖鎖 $Man_9GlcNAc_2$ から、主に B 鎖のα-1,2 結合したマンノース(Man)を遊離させる酵素である。一方、ER で最終的に正しく折り畳まれなかった糖蛋白質は、その糖鎖のマンノースがより多く刈り込まれ、ER-associated degradation へと導かれる。我々は１）ヒト ERManI(hERManI)が化学合成した $Man_9GlcNAc_2$-PA 及び $GlcMan_9GlcNAc_2$-PA から複数の Man を 1 時間以内に刈り込むこと、及び２）hERManI が変性条件にさらされた $Man_9GlcNAc_2$ 及び $GlcMan_9GlcNAc_2$ を有する糖蛋白質から、より多くの Man を刈り込むことを示してきた[1、2)]。そこでさらに、糖鎖及び糖蛋白質上の糖鎖に対する hERManI の反応系において、pH の変化や分子クラウデイング効果を引き起こすことにより、糖鎖の分解効率がどのように変動するかを解析し、細胞内において予想される hERManI の機能を明らかにすることを目指した。
「方法」
組換え型 hERManI[1)] を用い、１）蛍光糖鎖を基質とした反応、及び、２）加熱処理した糖蛋白質を基質とした反応を行った。まず、反応を酸性領域で実施し、活性の変化を解析した。また、分子クラウデイング効果の誘因が期待される物質[3)] を共存させ、糖鎖の分解効率の解析を行った。
「結果」
まず、Man-Man-Man の構造を有する三種類の合成基質に対する反応を pH 7.0 と 5.0 の間で実施した場合、分解反応の極大は pH 5.0 であった。一方で加熱処理したイムノグロブリンＹの糖鎖に対する分解反応の極大は pH 5.5 であった。また、$GlcMan_9GlcNAc_2$-PA を基質とした反応では $GlcMan_{8B}GlcNAc_2$-PA へと分解する活性が見られるが、$GlcMan_7GlcNAc_2$-PA へとさらに分解する活性は微弱である[2)]。しかしながら、終濃度５０％のポリエチレングリコール４００を添加することにより、$GlcMan_9GlcNAc_2$-PA から $GlcMan_7GlcNAc_2$-PA への分解が促進された。従って、*in vitro* における反応条件の至適化により、hERManI が効率よく $GlcMan_9GlcNAc_2$-PA を $GlcMan_7GlcNAc_2$-PA へと分解することが示された。

[1)] J. Aikawa, I. Matsuo & Y. Ito *Glycoconj. J.* **29**, 35-45 (2012)
[2)] 相川、武田、松尾、伊藤　２０１２年農芸化学会大会要旨（京都）
[3)] K. Totani, Y. Ihara, I. Matsuo & Y. Ito *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 2101-2107 (2008)

N-glycosylation, mannosidase, ERAD

講演番号：3B20p13
講演日時、会場：3 月 26 日 16:24～ B 校舎 20 会場

ヘパラン硫酸 6 位硫酸基転移酵素の発現を誘導するシグナル伝達経路の解明

Signaling pathway in the expression of heparan sulfate 6-*O*-sulfotransferase-1

○西田 光貴[1]、永見 圭太郎[2]、金丸 義敬[1,2,3]、矢部 富雄[1,2,3]（[1]岐阜大院・連農・生物資源、[2]岐阜大院・応生科・資源生命、[3]岐阜大・応生科・応用生命）
○Mitsutaka NISHIDA[1], Keitaro NAGAMI[2], Yoshihiro KANAMARU[1,2,3], Tomio YABE[1,2,3] ([1]Unit. Grad. Sch. of Agric. Sci., Gifu Univ., [2]Grad. Sch. of Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., [3]Fact. of Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.)

【目的】ヘパラン硫酸（HS）糖鎖は，プロテオグリカンの糖鎖部分であるグリコサミノグリカンの一種として，細胞表面や細胞外マトリクスに普遍的に存在する。HSはその基本構造が形成された後に，複数の酵素により硫酸基がランダムに付加されるため，非常に多様な構造を形成する。HSはその多様な硫酸基修飾を介してタンパク質と相互作用し，生理機能を調節していることが明らかにされたが，細胞がHSの硫酸化構造を制御する仕組みは未だ解明されていない。そこで，アドレナリン投与により神経成長因子（NGF）の分泌が促進されるマウス線維芽細胞（L-M細胞）をモデルに用いて，アドレナリンが細胞表面HSの硫酸化構造に与える影響を明らかにし，硫酸基修飾を担う硫酸基転移酵素の発現を制御する細胞内シグナル伝達機構の解明を目指した。
【方法】アドレナリンを添加したL-M細胞と添加しない細胞から細胞表面HSを精製し，それらをHS分解酵素により二糖単位に分解してHPLCのピークを比較することにより，硫酸化構造の変化を解析した。次に硫酸化構造の変化をもたらす硫酸基転移酵素に注目して，アドレナリン添加の1.5時間，3時間，6時間後のmRNA発現量をReal Time RT-PCRにより解析し，アドレナリン添加後の発現量の変化を分析した。さらに遺伝子発現を制御する経路を特定するために，各種アドレナリン受容体拮抗薬やSrc阻害剤，ERK1/2阻害剤が酵素の遺伝子発現に与える影響を調べた。最後に， HSがアドレナリン刺激により構造を変化させる意義を検討するために，アドレナリンを与えたL-M細胞と与えない細胞からHSを精製して，NGFとの相互作用に与える影響をSPR法により分析した。
【結果】アドレナリンを L-M 細胞に添加すると，非硫酸化二糖の割合が減少し，6 位硫酸化二糖の割合が有意に増加した。L-M 細胞には 6 位硫酸基転移酵素のうち 6-OST-1 のみが発現しており，6-OST-1 の遺伝子発現量は，アドレナリン添加 1.5 時間後に有意に上昇した。この 6-OST-1 の遺伝子発現上昇は，β3 アドレナリン受容体拮抗薬と Src 阻害剤，ERK1/2 阻害剤により完全に抑制された。また ERK1/2 阻害剤を反応させた細胞にアドレナリンを与えても HS の硫酸化構造の変化が抑制されることを確認した。以上より，L-M 細胞においてアドレナリン刺激に応じて発現する 6-OST-1 は，Src-ERK 経路により調節されていることを発見した。さらに，アドレナリン刺激によって 6 位硫酸化二糖の増加した HS は，アドレナリンを与えない HS と比べて NGF との相互作用が有意に増加したことから，L-M 細胞はアドレナリン刺激に応じて細胞表面 HS の硫酸化構造を変化させ，NGF との相互作用を高めることにより，NGF の標的細胞への分泌を調節している可能性が示唆された。

heparan sulfate 6-*O*-sulforansferase-1, adrenaline, nerve growth factor

講演番号：3B20p14
講演日時、会場：3 月 26 日 16:36～ B 校舎 20 会場

ブタ精子 CD52 の同定と細胞内カルシウム調節機能の解明

Identification of pig sperm CD52 and its regulatory function of intracellular calcium ion

○北島 健[1,2,3]、金澤 尊[1,2,3]、ガレノ エステル[2]、カセカーン ワラポン[2]、堀 和紀[1,2]、安江 博[4]、佐藤 ちひろ[1,2,3] ([1]名大院生命農学、[2]名大生物機能セ、[3]名大リーディング院 IGER、[4]農業生物資源研家畜ゲノム)
○Ken KITAJIMA[1,2,3], Takeru Kanazawa[1,2,3], Estelle Garenaux[2], Waraporn Kasekarn[2], Kazuki Hori[1,2], Hiroshi Yasue[4], Chihiro Sato[1,2,3] ([1]Nagoya Univ. Grad sch Bioagr Sci., [2]Nagoya Univ. BBC., [3]Nagoya Univ. PLGS-IGER., [4]NIAS)

我々はマイクロドメイン局在複合糖質の糖鎖の機能解明を目的として、精子マイクロドメインの研究を行っており、世界に先駆けてウニの精子からマイクロドメインを単離して、その受精における重要性を証明してきた。その過程で、マイクロドメインに存在し、ポリシアル酸構造をもつ糖タンパク質 flagellasialin を発見し、その糖鎖部分が精子細胞内のカルシウムイオン濃度を調節することによって運動性を制御することを明らかにした。その後、ブタの精子において flagellasialin と同等の分子を探索し、タンパク質および糖鎖の構造は flagellasialin とは異なるものの、小麦胚芽アグルチニン(WGA)と高い結合性をもち糖鎖に富む糖タンパク質を見出し、WGA-gp と命名した[Kasekarn et al., Biochem Biophys Res Commun 426, 356-362, 2012]。昨年までに、WGA-gp の精製、WGA-gp 特異的モノクローナル抗体の調製、精巣上体での発現を同定している。今回、WGA-gp の同定とその生理機能の解明を目的として、cDNA クローニング、タンパク質および糖鎖構造解析、カルシウムイオン調節への関与を調べた。

まず、精製 WGA-gp のエドマン分解法によるアミノ酸配列解析および糖鎖構造解析の結果から、WGA-gp には N-型糖鎖が 1 本と O-型糖鎖が 2 本結合していることが明らかになった。また、WGA-gp は、ホスファチジルイノシトール-ホスホリパーゼ C (PI-PLC)感受性があることから、GPI-アンカータンパク質であることがわかった。WGA-gp のアミノ酸配列をもとに精巣上体 cDNA ライブラリーから cDNA クローニングを行い、その塩基配列を決定した。その結果、WGA-gp は cDNA 塩基配列から CD52 と同定された。さらに、ブタ精子に WGA-gp に対する抗体を添加したところ、細胞内カルシウムイオン濃度が激しく変動し、この変動が特定のカルシウムイオンチャンネルおよびカルシウムポンプの阻害剤で抑制されることが観察された。したがって、WGA-gp/CD52 は精子の特定のカルシウム輸送体と相互作用して細胞内カルシウム調節に関与することが推定される。

Microdomain, sperm, Ca oscillation

講演番号：3B20p15
講演日時、会場：3 月 26 日 16:48～ B 校舎 20 会場

統合失調症患者に見出された ST8SiaII/STX が生合成するポリシアル酸の構造解析

Structural analysis of polysialic acid biosynthesized by the ST8SiaII/STX reported from schizophrenic patient.

○羽根 正弥[1,2,3]、北島 健[1,2,3]、佐藤 ちひろ[1,2,3] ([1]名大・生物機能セ、[2]名大院・生命農学、[3]リーディング大学院プログラム)
○Masaya HANE[1,2,3], Ken KITAJIMA[1,2,3], Chihiro SATO[1,2,3] ([1]BBC, Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [3]Program for Leading Graduate Schools IGER, Nagoya Univ.)

統合失調症は罹患率が人口の1%に達する重篤な精神疾患である。その発症機序は遺伝的および環境的要因が報告されており多因性である。また、ドーパミンやBDNFといった脳内に存在するいくつかの神経作用因子の異常と統合失調症の関係も報告されている。近年、ヒトゲノムに対するポリシアル酸（polySia）転移酵素の一塩基多型（SNPs）解析によりpolySia転移酵素ST8SiaII/STXのプロモーター領域と統合失調症の関連性が示唆された。

polySia転移酵素により生合成されるpolySiaはシアル酸（Sia）がα2,8 結合で縮重合した構造をとり、胎児期の脳において神経細胞接着分子（NCAM）上に一過的に発現する。また、成体脳では、海馬や嗅球などの神経の再構築が行われている部位で確認されている。polySiaの機能としては自身の持つ大きな負電荷と立体障害による反接着機能が知られている。しかし、近年、我々はpolySiaの新たな機能としてドーパミン、BDNF、FGF2などの神経作用因子と直接結合するリザーバーとしての機能を明らかにしている。

本研究ではpolySiaの構造と機能の関係性を明らかにするため統合失調症との関連が注目されているST8SiaII/STXの翻訳領域に存在し、アミノ酸変異を伴うSNP、SNP-7に着目し、その反応産物であるpolySia-NCAMの構造解析を行うことを目的とした。分泌型NCAMを導入したCHO細胞にヒトST8SiaII/STXの野生型およびSNP-7 変異体を発現させ分泌型polySia-NCAMを調製した。NCAM上のpolySia構造はDMB標識HPLC法及びpolySia認識抗体によるウエスタンブロッティングにより詳細に解析した。また、細胞表面上のpolySia-NCAMの構造を解析するためNeuro2a細胞に野生型及びSNP-7変異体ST8SiaII/STXを発現させ、polySia認識抗体を用いてフローサイトメトリー解析した。その結果、変異体由来のpolySia-NCAMはpolySia構造の量及び重合度が著しく損なわれていることが明らかになった。

polysialic acid, polysialyltransferase, schizophrenia

講演番号：3B20p16
講演日時、会場：3 月 26 日 17:00～ B 校舎 20 会場

Characterization and intracellular localization of the insect CMP-sialic acid syntheses

○di wu[1,2,3], Akiko Fujita[1], Kayo Hamaguchi[1,3], Anne Harduin-Lepers[4], Philippe Delannoy[4], Vladislav M. Panin[5], Chihiro Sato[1,2,3], Ken Kitajima[1,2,3] ([1]Biosci. Biotech. Center, [2]Program for Leading Graduate Schools IGER, [3]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [4]Univ of Lille, Villeneuve d'Ascq, [5]Texas A&M Univ.)

Sialic acid (Sia) is a family of nine-carbon sugars with a carboxylate group, consisting of *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac), *N*-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc), deaminoneuraminic acid (Kdn), and their modified forms. Many studies have been done with sialylation in prokaryotes and mammals. However, very little has been studied on sialylation in protostomes such as insects. We thus started studying biosynthetic mechanism of Sia in insects. In this study, we focused on the CMP-Sia synthetases (CSSs), which are prerequisite for the expression of Sia on the cell surface glycoconjugates. Here we report: (i) We cloned the CSS genes from *Tribolium castaneum*, *Aedes aegypti*, and *Drosophilla melanogaster*. The insect CSSs were shown to share high sequence identities with the vertebrate CSSs in the catalytic domain, but do not contain the C-terminal domain; (ii) We measured the *in vitro* activity using bacterially expressed recombinant CSSs. No activity was detected for any of the insect CSSs, while high activity was detected for vertebrate CSSs; (iii) Intracellular localization of these insect CSSs was examined in mammalian cells by transfecting with the insect CSS-AG plasmids. It has been shown that Drosophila CSS is localized in the Golgi. Preliminary results suggest that other two insect CSSs were not always in the Golgi.

sialic acid, cmp-sialic acid synthetase, insect

講演番号：3C31a01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ C 校舎 31 会場

Cell-free Synthesis of Horseradish Peroxidase C for Bead Display-based High-throughput Screening

○Bo ZHU,Takaaki KOJIMA,Yugo IWASAKI,Hideo NAKANO (Dept. Bioeng., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

The C isoenzyme of horseradish peroxidase (HRP C) is an important heme-containing enzyme which has been studied for more than a century and utilized for many applications, including fine chemicals synthesis, medical diagnostics and bioremediation. Recently, directed evolution techniques have been applied to HRP C using yeast expression system in an attempt to improve several important qualities for its practical applications, such as activity, thermal stability and resistance to inactivation by peroxides. In this study, we established the cell-free synthesis method of HRP C, which can be used in bead display system for high-throughput molecular evolution of this enzyme.

The sequence of mature HRP C with HA and His tags was first optimized for *E. coli* expression by removing rare codon, adjusting GC content and avoiding the formation of secondary structure of its messenger RNA. T7 promoter was used to start the expression. Then, this sequence was synthesized and utilized as the template in cell-free protein synthesis (CFPS). The soluble and active expression was successful after the optimization of calcium ion concentration at 2 mM, hemin concentration at 16.7 μM, redox potential (1 mM reduced glutathione and 0.1 mM oxidized glutathione) and temperature at 21°C in CFPS reaction. The soluble HRP C was purified and its specific activity was 80% of that of the native enzyme commercially available. Next, the activity of immobilized HRP C on magnetic bead was detected by a tyramide-based fluorogenic assay using flow cytometry, suggesting that our system is promising to carry out a high-throughput screening of the mutant library of HRP C.

horseradish peroxidase C, cell-free protein synthesis, bead display

講演番号：3C31a02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:12～ C 校舎 31 会場

卵白アルブミン、β-ラクトグロブリン、およびグリアジンのアレルゲン高感度測定

A Simple and Sensitive Immunoassay for Allergen Determination of Egg-ovalbumin, ß-lactoglobulin and Gliadin

○大岡 尚貴、鈴木 義規、斎木 博（東京工科大学）
○Naoki OOOKA,Yoshinori SUZUKI,Hiroshi SAIKI (Tokyo University of Technology)

[背景・目的] 食物アレルギーは先進国で特に問題視されており、成人人口の約 2%、小児人口の約 8%に影響している。そして、食物アレルギーの原因食物の一つである鶏卵は子供の食物アレルギーの最も頻繁な原因となっている。この他にも多くの食品でアレルギー症状がみられ、牛乳、小麦、えび、かに等が日本の法令により特定原材料に指定されている。
[測定方法] PMMA ビーズ（ガンツ化成）と抗原との結合は抗原タンパクの疎水性部分と PMMA との疎水結合により吸着された。KinExA のフローセル中にビーズを固定し、サンプルを流して抗原と結合していない遊離抗体のみがビーズ上の抗原と結合する。そこに、Cy5 二次抗体を流すことで遊離抗体に結合し蛍光強度を得ることが出来き、蛍光強度によりサンプル中の遊離抗体濃度から抗原濃度を求めることが可能である。使用試薬は以下の通りである。卵白アルブミン（Sigma、A5503）、β-ラクトグロブリン（L3908、Sigma）、グリアジン（Sigma、48960）、マウス由来のモノクローナル抗卵白アルブミン（Sigma、A6075）、ラビット由来のβ-ラクトグロブリン抗体（ethyl、A10-125A ）、マウス由来のモノクローナル抗グリアジン（Cosmo Bio、CH-013）、ヤギから精製したマウス IgG(H+L)に結合する Cy5（Jackson Immuno Research、115-176-003）
[結果・考察] 卵白アルブミン抗体を 14nM の濃度でビーズ上に 30 秒間流して Cy5 二次抗体を流した結果 1.3V 充分なシグナル強度を得ることが出来た。この条件で卵白アルブミンの濃度を変えて検量線を作成した。実験データから、KinExA によって検出した卵白アルブミンの検量線から測定法の検出限界を 1×10^{-8} M(0.44 μg/ml)と測定範囲は $1\sim30\times10^{-8}$ M(1.32～13.2 μg/ml)である。また、この抗体の Kd は 25.81nM であった。同様にβ-ラクトグロブリンの検出限界は 2×10^{-11} M(0.37 ng/mL)、測定範囲は $10^{-10}\sim10^{-7}$ M(0.002~1.8 μg/mL)である。グリアジンの検量線から測定限界は 2×10^{-11} M (0.37 ng/mL)、測定範囲は 10^{-10}~10^{-7} M (0.002~ 1.8 μg/mL)であった。KinExA を用いることにより高感度、簡易的、迅速、再現性のある食物アレルゲン測定法の開発をすることができた。

KinExA, Food Allergy, Egg-ovalbumin

講演番号：3C31a03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:24～ C 校舎 31 会場

水溶液中での DNA 核酸の結合定数
Binding constant of DNA in aqueous solution

○鈴木 孝浩[1]、渡部 翔[2]、鈴木 義規[1]、斎木 博[1] ([1]東京工科大学、[2]東京工科大学大学院)
○Takahiro SUZUKI[1], Sho WATANABE[2], Yoshinori SUZUKI[1], Hiroshi SAIKI[1] ([1]Tokyo University of Technology, [2]Tokyo University of Technology Graduate School)

【目的】現在までに、1 塩基の DNA の結合定数はクロロホルム中にて測定されているが、水溶液中の DNA の結合定数は求められていない。そこで、高感度かつ簡易的に物質と物質を結合させることで結合定数の測定が出来る KinExA を用いて、アデニン-チミン間、シトシン-グアニン間の結合定数の測定を行った。

【KinExA の測定原理】今回用いた KinExA の測定原理は固相にビーズを用いるフロー式である。フロー式のメリットはビーズにサンプルを流し続けることにより、低濃度の物質でもビーズに蓄積でき十分なシグナルが得ることができることや、測定誤差が非常に少なくなることである。今回はビーズに固定化したリガンドにグアニンやチミンを、リガンドに反応する物質を 6-fam-シトシンや 6-fam-アデニンを用いて K_d(解離定数)測定を行う。

また、バッファーの種類により測定結果にどのような変化が現れるのかを求めるため、リン酸バッファー、PCR バッファーを用い再度同じ実験を行った。

【結果・考察】初めにリン酸バッファーでビーズに固定化したグアニンと様々な濃度の 6-fam-シトシンを KinExA 内にて反応させた場合、1 μM でハイブリダイゼーションに基づくシグナル、約 1.3 V の強さを得られた。グアニンの濃度を 1 M~1 mM の範囲で K_d カーブ(図 1)を作成し解離定数の測定をした結果、10.80 mM となり、結合定数は約 93 M^{-1} と算出することができた。また PCR バッファーで同じ測定をしたところ、ハイブリダイゼーションに基づくシグナルは、同じく 1 μM で得られ、K_d カーブを作成し解離定数の測定した結果、4.68 mM となり、結合定数は約 214 M^{-1} と算出することができた。この結果、リン酸バッファーより PCR バッファーで測定したほうが約 2 倍、結合定数が強くなることが分かった。これは塩濃度の差により結合力に違いが出てくることを示している。また、どちらのバッファーで測定しても結合定数はクロロホルム中でのグアニン-シトシン間の結合定数(10^4~10^5 M^{-1})より約 10^2~10^3 倍弱いことが分かる。理由は疎水溶媒中では親水的結合である水素結合に由来するハイブリダイゼーションがより強くなるためと考えられる。

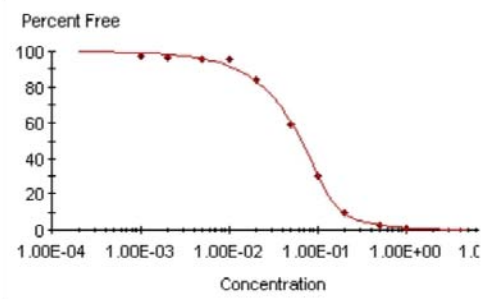


図 1　リン酸バッファーで測定したグアニン-シトシンの K_d カーブ

KinExA, DNA, binding

講演番号：3C31a04
講演日時、会場：3 月 26 日 09:36～ C 校舎 31 会場

海底下堆積物からの細胞分離手法、およびフローサイトメトリーによる細胞計数手法の確立

Establishment of modified cell separation and cell counting with flow cytometry protocol from subseafloor sediment

○寺田 武志[1]、諸野 祐樹[2]、稲垣 史生[2] ([1]（株）マリン・ワーク・ジャパン、[2]（独）海洋研究開発機構 高知コア研究所)
○Takeshi TERADA[1], Yuki MORONO[2], Fumio INAGAKI[2] ([1]MWJ, [2]JAMSTEC)

【目的】地球表面積の 7 割を占める海洋、さらにその下に広がる海底下空間には膨大な数の微生物を有する生命圏が広がっている。この広大な空間に存在する微生物数の計数は、生命圏の分布を規定する第一義的な情報をもたらす一方、海底下の泥（堆積物）中には多くの非生物的有機・無機粒子が存在し、微生物を選択的に計数する上で、大きな技術的困難が存在していた。本研究では、このような海底下堆積物の微生物計数をより正確、精密、高速に行うことを可能とするためフローサイトメトリーによる計数を目指し、海底下堆積物試料中の微生物を密度の違いを利用して堆積物から細胞を分離するなど、試料調製に関する手法の確立を行った。
【方法】試料は地球深部探査船「ちきゅう」などによって採取された海底下堆積物を用いた。分離に際しては既報の単層密度分離法、および密度の異なる複数の層からなる分離による検討を行った。分離操作による細胞分離効率については分離前、分離後の試料をポリカーボネートメンブレンに捕集、SYBR Green I による染色後、画像認識自動細胞検出蛍光顕微鏡(DiCE システム Morono et al. 2009, 2010)で計数することで算出した。また、同じ試料について、フローサイトメトリーによる測定も行い、得られる蛍光シグナルでの細胞選択的認識が可能かどうかを検討した。
【結果と考察】既報の方法による分離を試みたところ、密度境界層に細胞が濃縮することは確認できたが、堆積物粒子の沈降とともに一部の細胞も沈降してしまうことが分かり、堆積物の種類によっては分離効率が 10%以下にまで低下した。そこで、高密度の重液組成を変更し、さらに密度の異なる複数の層を作成して分離を行ったところ、堆積物の種類によらず 80%程度の細胞回収率を得ることが出来た。分離は密度によってのみ行われているので、分離後の懸濁液には細胞だけでなく密度の低い堆積物粒子が含まれていたが、これを SYBR Green I により染色し、フローサイトメトリーで解析したところ、堆積物粒子と微生物細胞とで異なる蛍光パターンとして検出することができ、細胞のみを選択的に計数することが可能となった。また、細胞密度が高い場合（10^5 細胞/cm^3 以上)、単純にサイズの大きい粒子を除くことで計数が可能であった。本法を用いることで、深度方向の高解像度細胞分布解析や、広範囲にわたる細胞分布の計測など、多数の試料をハイスループットかつ高精度に計測するという技術的課題を乗り越えることが可能となる。

Morono *et al.* (2009) *ISME J.* 3(5):503-511
Morono and Inagaki (2010) *Sci. Drilling* 9(9):32-36

cell separation, flow cytometry, cell count

講演番号：3C31a05
講演日時、会場：3 月 26 日 09:48～ C 校舎 31 会場

飲料中の微量アルコールの簡易測定法の開発

Development of simple analytical method for small amount of ethanol in bevarage

○高柳 純司、渡辺 敬之、大嶋 利幸 (サッポロビール株式会社)
○JUNJI TAKAYANAGI, TAKAYUKI WATANABE, TOSHIYUKI OOSHIMA (SAPPORO BREWERIES LTD.)

近年、アルコール 0.00%表示の飲料のニーズが高まっており、それらの飲料についてアルコール濃度が 0.00%以下であることを保証する必要がある。そのための検査法として、市販の酵素法を利用した測定キットやガスクロマトグラフを用いた測定法がある。しかし、このような方法では分光光度計やガスクロマトグラフ等の分析装置が必要であり、これらの装置が無い場合には測定することが困難であった。また、アルコールの大まかな濃度を目視で判断できる検査キットも市販されているが、これらの測定法では 0.00%以下の濃度を検査することが困難な場合があり、また検査コストも 1 試料当り千円程度を要する。そこで我々は分析装置を用いず、安価で簡易にアルコール濃度が 0.00%以下であることを保証できる検査法の開発を試みた。

検査の手順は、アルコール濃度既知の対照試料(例えばアルコール濃度 0.005%)とともに検査試料に数種の試薬を順次添加し、最終的な発色を目視で比較することで、検査試料のアルコール濃度が対照試料よりも高いか低いかを判断するという流れで行う。また測定原理は、飲料中のアルコールに酸化型のニコチンアミドアデニンヌクレオチド(NAD$^+$)存在下、アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)を作用させることにより還元型のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)を生じさせ、更にフェナジンメト硫酸塩を介してニトロテトラゾリウム(NTB)を還元してジホルマザンによる発色を生じさせる。

検査法開発にあたり、アルコール濃度の比較的高い試料(数%)を希釈して最後に目視で確認する既存の簡易検査法を参考とした。しかしこの方法でアルコール 0.00%表示の飲料を希釈せずに検査したところ、発色が弱く測定が困難であった。反応条件を新たに検討した結果、試料を希釈せず 0.00%以下のアルコールを、既存の測定キットよりも安価で簡易に検出できる検査法を確立することができた。

この方法を用いて市販の飲料を測定したところ、微量のアルコールを含む様々な飲料でアルコール 0.00%の保証が可能と考えられたものの、一部の製品では測定が困難な場合が認められた。その原因の 1 つとして、飲料に含まれるアスコルビン酸の影響が考えられた。アスコルビン酸は強い還元作用を持ち、発色剤である NTB に直接作用して発色を促進する作用がある。そこでアスコルビン酸の影響を抑制する方法を検討したところ酸化剤の使用が有効であった。適切な酸化剤の使用法を検討した結果、アスコルビン酸の影響の認められる飲料についても簡易にアルコールを検査できるようになった。

Alcohol 0.00%, bevarage, simple analytical method

講演番号：3C31a06
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ C 校舎 31 会場

Multiplex (4-plex) TaqMan real-time PCR を用いた食品中に含まれる肉の種識別の検討

Examination of species identification of meat in foods by TaqMan multiplex (4-plex) real-time PCR

○有賀 博文[1,2]、Stevens Junko[2] ([1]Life Technologies Japan、[2]Life Technologies)
○HIROFUMI ARUGA[1,2], Junko Stevens[2] ([1]Life Technologies Japan, [2]Life Technologies)

加工食品にどの様な種類の食材がどの程度入っているのかを調べることは、その製品の表示が正しく為されているかという確認に必要な作業であり、いわゆる「食の安心」を裏付けることとなる。日本における食肉はその種類により大きく単位価格が異なるため、未だに食肉の表示偽装が話題として絶えない。また、宗教上の理由や食物アレルギーを持つという理由から特定の肉種の摂取を忌避したいというニーズが多かれ少なかれ存在することは広く知られている。こうした現状を踏まえて、食肉の種類を簡便かつ正確に判別できる検査技術の確立が望まれている。今回我々は数多くある食材の中の“食肉”に焦点を当て、それらを効率良く検出・判別する方法の構築を試みた。

我々は、鶏肉、豚肉、牛肉、羊肉に対してそれぞれ特異的に設計された 4 種類の TaqMan® probe に、新規に開発した ABY™ と JUN™ を含む 4 種類の蛍光色素（残る 2 種類は FAM™ と VIC®）をそれぞれ修飾して、4 組の食肉判別用 TaqMan® probe セットを作成し、それらを同一 well 内で同時に反応させる Multiplex (4-plex) の反応系の最適化を行った。反応には TaqMan® Fast Multiplex Master Mix Reagents with Mustang Purple™ 試薬 (Life Technologies 社)を用いた。最初に、精製したそれぞれの動物種の gDNA を用いて multiplex 反応の最適化を行い、最終的には加工食品から得られたサンプルを使用して食肉のタイピングを行った。測定には予想される 4 種類の蛍光色素の蛍光と反応試薬に含まれるリファレンス蛍光色素を加えた計 5 色の蛍光を同時に検出･解析可能な 7500 Fast Real-Time PCR System あるいは ViiA™ 7 Real-Time PCR System（いずれも Life Technologies 社）を使用した。また、判別に用いたサンプルは市販のコロッケ、ハンバーグなどの加工食品を破砕機にて破砕し、その破砕液から gDNA を精製することなく DNA Extract All Lysis Reagents (Life Technologies 社) により数分間の簡易抽出で得られた溶液である。

今回最適化を行った 4-plex の multiplex 反応系では、ターゲット以外のサンプル 1ng/reaction をバックグラウンドとした場合に、ターゲットを 100fg/reaction まで定量的に検出することが可能であった。また、難易度が高く時間も要した加工食品からの肉種の判別は、本手法では gDNA の精製を必要とせず、同時に 4 種類の食肉の判別が 1 時間という短時間で可能となるだけで無く、簡易化された操作過程でのコンタミネーションの抑制も期待できる。今後は、加工の程度による検出感度の確認を進めるとともに、今回用いた 4 種の食肉以外にも対象を広げて汎用性の高い検出法の確立を目指したい。

species identification of meat, TaqMan multiplex real-time PCR, Beef Pork Chicken Mutton

講演番号：3C31a07
講演日時、会場：3 月 26 日 10:12～ C 校舎 31 会場

リアルタイム PCR による遺伝子解析方法の検討

A study on a gene analysis method with real-time PCR

○渋井 達郎、坂口 大介、須藤 達也、佐藤 美香子、原 宏佳（日本獣医生命科学大学　応用生命科学部　食品科学科　食品バイテクノロジー教室)
○TATSURO SHIBUI,DAISUKE SAKAGUCHI,TATSUYA SUDO,MIKAKO SATO,HIROYOSHI HARA (Nippon Veterinary and Life Science University)

食品材料の多くは生物由来であり、生物は DNA を遺伝物質として利用している。よって、多くの場合、食品には食材由来の DNA が残存していると考えられる。

一方、様々な生物の遺伝子（DNA）配列の解析が進められており、配列解析の結果はデータベス化され、現在、一般に利用可能となっている。

タンパク質や他の物質の解析に比べ DNA は複製・増幅が可能なことから、DNA は解析を行う上で多くの利点がある。さらに、DNA は比較的安定で、様々な加工食品等においても完全には分解されずに解析可能な状態で保存されているケースも多い。また、遺伝子の配列は生物に固有のもので、食品に残存する DNA の配列を解析することで食材に使われた生物の種類等が特定可能となる。

残存する DNA より食材を解析する方法としては、簡便な PCR 法が最も普及している。解析する DNA の対象としては、核由来のゲノム DNA が一般的であるが、細胞あたりのコピー数が多い細胞内器官（ミトコンドリア等）の DNA を解析することも有利な方法とされている。

さらに、リアルタイム PCR 法では、PCR 法における最終ポイントのみでの DNA 増幅産物確認とは異なり、解析対象 DNA 断片の増幅状況をモニターすることにより、DNA 増幅産物の確認のみならず標準 DNA に比較したサンプル中の目的 DNA の相対量を算出できるという利点がある。

一方、リアルタイム PCR 法での定量において、標準品 DNA を充分量用意することは不可欠であり、全てのケースで標準 DNA を簡便に入手できるとは限らないという不便さもあった。

本発表では、リアルタイム PCR を行うに当たり、当研究室で開発した標準品の簡便な調製方法を紹介し、同方法にて地鶏およびブロイラーの遺伝子解析を行なった結果について報告する。

gene copy number, real-time PCR, nested PCR

講演番号：3C31a08
講演日時、会場：3 月 26 日 10:24～ C 校舎 31 会場

マルチプレックス LAMP 法による深在性カンジダ症起因菌および深在性トリコスポロン症起因菌の迅速・簡便な検出法

Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification to detect medically important yeasts in dairy product.

○笠原 浩平、石川 紘司、佐藤 澄江、渡辺 幸一、島川 康久（ヤクルト中研）
○Kohei KASAHARA, Hiroshi ISHIKAWA, Sumie SATO, Koichi WATANABE, Yasuhisa SHIMAKAWA (Yakult Central Institute for Microbiological Research)

＜目的＞
現在、食品の酵母汚染検査では培養法が多く用いられているが、検査結果を得るまでに多くの時間が必要である。酵母の中には病原性を有しているものもあり、病原性酵母の迅速な検出、同定は品質管理において非常に重要である。そこで我々は、病原性酵母である深在性カンジダ症起因菌（*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*）および深在性トリコスポロン症起因菌（*Trichosporon asahii, Trichosporon mucoides*）を標的菌種として、LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法による乳製品からの迅速・簡便な検出、同定法の確立を試みた。

＜方法＞
病原性酵母である深在性カンジダ症起因菌 4 菌種、および深在性トリコスポロン症起因菌 2 菌種に対する LAMP プライマーセットを作製し、近縁種酵母を含む 38 菌種 50 菌株に対し特異性を検討した。次に LAMP 法による純培養菌液および疑似汚染乳製品からの検出感度を解析した。さらに、複数菌種を一度の反応で検出する multiplex LAMP 法についても応用可能か検討を行った。

＜結果および考察＞
作製したプライマーセットを用いた LAMP 法によって、標的菌種を特異的に検出することができた。純培養菌液からの検出感度は 10^0 ~ 10^2 cells/ml 程度、疑似汚染乳製品からの検出感度は 10^0 ~ 10^3 cells/ml 程度であった。さらに、multiplex LAMP 法による検出感度は、純培養菌液および疑似汚染乳製品からのいずれの検出においても 10^0 ~ 10^3 cells/ml 程度であった。以上の結果から、本プライマーセットを用いた LAMP 法は、迅速・簡便な食品汚染の一次検査として応用可能と考えられる。

＜参考文献＞Makino H., Fujimoto J., Watanabe K., Int J Food Microbiol. 140: 76-83 (2010)

multiplex LAMP, Candida, Trichosporon

講演番号：3C31a09
講演日時、会場：3 月 26 日 10:36～ C 校舎 31 会場

乳製品中 *Filobasidiella neoformans* の迅速・簡便な検出法

Rapid and simple detection of *Filobasidiella neoformans* in dairy product

○石川 紘司、笠原 浩平、佐藤 澄江、渡辺 幸一、島川 康久（ヤクルト中研）
○Hiroshi ISHIKAWA, Kohei KASAHARA, Sumie SATO, Koichi WATANABE, Yasuhisa SHIMAKAWA (Yakult Central Institute for Microbiological Research)

【目的】酵母による食品汚染の検査には主に培養法が用いられているが、検査開始から終了までに数日以上を要する。数種類の酵母は日和見感染を引き起こすことが知られており、これらの迅速な検出・同定は、食品の品質管理上極めて重要である。これまでに、定量的 PCR (qPCR) 法によって、乳製品中の病原性酵母を 5 時間以内に検出・同定する方法が報告されている(1)。我々は、より迅速かつ簡便な病原性酵母の検出･同定法を構築するため､クリプトコッカス症起因菌 *Filobasidiella neoformans* を標的とし、LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法の適用を検討した。

【方法】*F. neoformans* に対する LAMP プライマーセットを作製し、近縁酵母 11 菌属 41 菌種に対して特異性を評価した｡*F. neoformans* の純培養菌液､あるいは純培養菌体を添加した疑似汚染乳製品から、ベンジルクロライド法(2)で DNA を抽出・精製し、LAMP に供試して検出感度を解析した。さらに、食品の品質管理への応用を想定し、検査工程の簡便化・短縮化を図るために、プロテアーゼ消化とボイリングを組み合わせた DNA 簡便抽出法の適用を評価した。

【結果および考察】作製したプライマーセットは、近縁酵母とは交叉反応性を示さず、*F. neoformans* を特異的に検出可能であった。精製した DNA を鋳型とした際の検出感度は 10^2 cells/mL であり、既報の qPCR 法と同等であった。一方、簡便法で抽出した DNA を鋳型とした場合には、qPCR 法の検出感度は 10^5 cells/mL と著しく低下したのに対して、LAMP 法では 10^3 cells/mL の高感度で検出可能であった。この DNA 簡便抽出法を LAMP に適用した場合、検体から全ての結果を得るまでの所要時間は 1 時間以内であった。以上の結果から、LAMP 法と DNA 簡便抽出法の組み合わせは乳製品中の病原性酵母の迅速かつ簡便な検出・同定において有効な手法であると考えられた。

【参考文献】
(1) Makino H., Fujimoto J., Watanabe K. Int J Food Microbiol. 140: 76-83 (2010)
(2) Zhu H. *et al*., Nuc Acids Res. 21: 5279-5280 (1993)

LAMP, detection, Simple DNA extraction

講演番号：3C31a10
講演日時、会場：3 月 26 日 10:48～ C 校舎 31 会場

ローリングサークル増幅法のベロ毒素 mRNA 検出への応用

Application of rolling circle amplification to detection of verotoxin mRNA

○小堀 俊郎[1]、高橋 宏和[1]、山嵜 裕之[2]、千室 智之[2]、小林 崇良[2] ([1]農研機構食総研、[2]関東化学)
○Toshiro Kobori[1], Hirokazu Takahashi[1], Hiroyuki Yamazaki[2], Tomoyuki Chimuro[2], Takayoshi Kobayashi[2] ([1]Nat Food Res Inst, [2]Kanto Chemical)

ローリングサークル型増幅法を基盤として開発した RNA の特異的検出技術である RPRCA 法は、RNA 検出にあたって逆転写反応が不要であることに加えて室温付近で反応が進行するといった特色がある。そこで本研究では腸管出血性大腸菌 O-157 のベロ毒素 mRNA の簡易検出技術の確立を目指して、化学合成したベロ毒素 mRNA を用いて RPRCA 法の改良に取り組んだ。

ベロ毒素 mRNA の配列に対応した DNA プローブを環状化して通常の RPRCA 反応に適用したところ、10^9 コピー/mL のベロ毒素 mRNA を検出することが可能であった。一方、腸管出血性大腸菌 O157（ATCC35150）を 6 時間培養した際に発現するベロ毒素 mRNA を RT-PCR にて定量した。ベロ毒素には stx1 と stx2 の遺伝子が存在するが、1 μg 中の全 RNA に各々8.2×10^5 コピーと 3.6×10^5 コピーであり、培養液中の濃度は 4.9×10^7 コピー/mL と 1.6 $\times10^7$ コピー/mL と換算できた。そのため、従来の RPRCA 法ではベロ毒素を検出するには感度が不十分であり、高感度化に向けて諸条件の最適化を行った。

RPRCA 法における検出感度は、標的 RNA と環状 DNA プローブとの相補鎖形成率に大きく影響を受ける。そこで標的 RNA と 1 本鎖環状 DNA プローブとの相補鎖形成効率を向上させるために、カリウム塩およびマグネシウム塩濃度を中心とする反応溶液の組成を詳細に調査した。その結果、従来の塩化物イオンに代えて酢酸を対イオンとした塩（酢酸カリウムおよび酢酸マグネシウム）を用いることにより反応効率が向上することを見出した。

一方、反応溶液中の塩濃度を高めると非特異的な相補鎖形成も同時に促進される。そこで、環状 DNA プローブ中の 1 本鎖 DNA 領域を減少させること、つまり、1 本鎖環状 DNA プローブ中の一部に 2 本鎖形成させた領域を持つ 1 本鎖 DNA プローブを採用することにより、非特異的な相補鎖形成を回避することを試みた。この結果、反応溶液組成の改変と 1 本鎖 DNA プローブの構造制御により、RPRCA による stx1 mRNA の検出感度は従来法に比べ約 1000 倍（10^6 コピー/mL）に上昇した。一方、stx2 mRNA についても、DNA プローブの構造制御と蛍光測定を行うことにより、10^6 コピー/mL の感度で検出できることが判明した。

以上より、RPRCA 法で用いる反応溶液組成の最適化と 1 本鎖 DNA プローブの構造制御により、ベロ毒素 mRNA の検出感度を実用感度にまで向上させることができた。今後、大腸菌培養液から調整した全 RNA を用いて実用性の評価を行う予定である。

rolling circle amplification, φ29 DNA polymerase, mRNA detection

講演番号：3C31a11
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ C 校舎 31 会場

サルモネラ属細菌結合アプタマーの取得
In vitro selection of DNA aptamers binding *Salmonella sp.*
○皆川 宏貴、秋富 穣、古市 真木雄、堀井 克紀、和賀 巌（ＮＥＣソフト・ＶＴＣ）
○Hirotaka Minagawa,Joe Akitomi,Makio Furuichi,Katsunori Horii,Iwao Waga (NEC Soft, Ltd.)

【目的】食品関連分野において、食中毒菌の簡便な検出が重要な課題の一つとなっている。我々はアプタマーを用いた検出技術の開発を行っており、代表的な食中毒原因菌であるサルモネラ属細菌に結合するＤＮＡアプタマーを取得した。
【方法と結果】*Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Infantis の加熱処理死菌体の混合物を１ラウンドあたり約 10^8 cfu 用い、ランダムＤＮＡプールを用いた Whole Cell SELEX（Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment）によりポジティブセレクションを１０ラウンド行った。シーケンス解析の結果、クローンの濃縮が確認され、表面プラズモン共鳴(SPR)測定および ELAA(Enzyme-Linked Aptamer Assay)によりサルモネラに結合するＤＮＡアプタマーが取得できた。得られたアプタマーはすべて G リッチな配列であり、結合にはカリウムイオンおよびマグネシウムイオンが必要であることがわかった。本研究は生研センターイノベーション創出事業の支援を受けて行った。

aptamer, *Salmonella*, SELEX

講演番号：3C31a12
講演日時、会場：3 月 26 日 11:12～ C 校舎 31 会場

最確数・制限酵素断片長多型解析法の食品微生物分析への適用

Application of MPN/MERFLP method to microbiological analysis of food

○渡辺 克二、木塚 遼、平井 駿、梅田 葉介 (福工大・工・生命環境)
○Katsuji Watanabe,Ryou Kizuka,Syun Hirai,Yousuke Umeda (FIT)

【目的】これまでに開発してきた最確数・制限酵素断片長多型解析法を用いて、ﾏｲｸﾛﾁｯﾌﾟ電気泳動装置(MCE-202 MultiNA;島津製作所)で得た制限酵素切断長データから、抗生物質多剤耐性菌群等の細菌群集の同定・定量が迅速に可能であることを見いだしてきた。また糸状菌・酵母等の真核微生物の同定・定量への適応も可能であることから、この方法で得られた同定・定量結果を検証するためにこの方法で分析したサンプルを DGGE 法で解析し、分析精度の検証試験も開始している。

一方で、この方法では PCR 反応による増幅バイアスを無くすため最確数法で計数し、分離せずに正確に同定するため培養法を併用している。よって用いる培地の種類により結果に変動が生じ、すべての微生物群が正確には測定できない場合があることが予想される。よって今回は食品微生物の解析に用いた場合に、どのような微生物群が正確に測定できどのような微生物群が正確に測定できないか適応性を把握することを目的として、様々な流通食品中の様々な微生物群を本法で解析した。

【方法】段階的に希釈した試料をそれぞれの培養液で一定期間培養後、増殖してくる菌群由来のDNAを鋳型として用い、原核微生物を解析する場合は16S rDNA用のﾕﾆﾊﾞｰｻﾙﾌﾟﾗｲﾏｰ(41f/1066r)で、真核微生物を解析する場合は18S rDNA用のﾕﾆﾊﾞｰｻﾙﾌﾟﾗｲﾏｰ(EF31/EF41)で増幅される遺伝子の制限酵素断片長をﾏｲｸﾛﾁｯﾌﾟ電気泳動装置(MCE-202 MultiNA;島津製作所)で読み取り、対照用ﾃﾞｰﾀﾍﾞｰｽとの比較により属名を推定した。推定された菌群を各希釈段階毎に集計し最確数法で計数した。

1)真核微生物群はﾎﾟﾃﾄﾃﾞｷｽﾄﾛｰｽ培地で増殖してきた菌群を測定した。2)乳酸菌群はMRS培地で増殖してきた菌群を測定した。3)大腸菌群はﾃﾞｵｷｼｺﾚｰﾄ培地及び乳糖ﾌﾞｲﾖﾝ培地で増殖してきた菌群を測定した。

【結果】1) 試験した市販のﾊﾟﾝ酵母中には、ﾎﾟﾃﾄﾃﾞｷｽﾄﾛｰｽ培地で増殖し安い真核微生物群として*Saccaromyces*属酵母が検出され、その数は2.2x10^8MPN/g 質重であった。一方、市販の塩麹にはﾃﾞｵｷｼｺﾚｰﾄ培地で増殖し易い菌として*Aspergillus*属が主に検出された。

2)試験した市販のﾖｰｸﾞﾙﾄには、MRS培地では*Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius*等が検出されてくることが判明した。現在その他の食品についても検討を行っている。

3)試験した市販のﾐﾆﾄﾏﾄには、ﾃﾞｵｷｼｺﾚｰﾄ培地で増殖し易い菌として*Serratia* 属細菌が検出された。現在その他の食品についても検討を行っている。

Identification, Quantification, Food microbiology

講演番号：3C31a13
講演日時、会場：3 月 26 日 11:24～ C 校舎 31 会場

バックグラウンドがゼロの DNA クローニング法
Zero Background DNA Cloning System

○後藤 健太[1,2]、永野 幸生[2] ([1]佐賀大院農、[2]佐賀大総分セ)
○kenta goto[1,2], Yukio Nagano[2] ([1]Saga Univ., [2]Saga Univ.)

分子生物学において DNA クローニングは基幹的な技術である。しかしクローニング効率は決して高いものではない。酵母は他の生物より高い相同組換え能を持つ。酵母相同組換えを利用したクローニング法では、まずクローニングしたい DNA 断片の両端にプラスミドベクターと相同な配列を付加し、この DNA 断片とベクターを酵母へ形質転換する。すると酵母内で相同配列が組換わり、DNA 断片がプラスミドベクターにクローニングされる。この方法の他の特長としては巨大 DNA のクローニングや多断片 DNA のクローニングが挙げられる。しかし、この方法でも副産物は発生する。そこで副産物の発生をほぼ完全に排除し、さらに日常的に使われる大腸菌ベクターにも適用できる”Zero Background DNA Cloning System”の開発を行った。

我々は酵母と大腸菌の複製開始点を選抜に利用すれば副産物の発生を抑えられると考え研究を行った。まず大腸菌複製開始点を持たない変換カセットという DNA 断片を作成した。変換カセットは Amp^r の 5’領域とコード領域、酵母複製開始点 *ARS/CEN*、酵母選択マーカー *TRP1*、そして Amp^r の 3’領域の順で並ぶ DNA 断片である。Amp^r 配列を持つ大腸菌ベクター（pUC など）と変換カセット、そしてこのベクターと相同配列を持ち、ベクターにクローニングする DNA 断片を酵母に形質転換した。変換カセットとこのベクターの Amp^r 配列で相同組換えが起こり、大腸菌/酵母シャトルベクターとなる。同時に、このベクターとクローニングする DNA 断片の相同配列で相同組換えが起こり、DNA 断片はこのベクターにクローニングされる。ここで酵母複製開始点を持たない副産物のベクターは排除される。次に酵母から DNA を抽出し、大腸菌へ形質転換した。ここで大腸菌複製開始点を持たない副産物のベクターは排除される。さらにこれらの過程で排除しきれない副産物を除く方法も考案し、その結果、副産物の発生をほぼゼロにできる”Zero Background Cloning System”の開発に成功した。

DNA cloning, plasmid, homologous recombination

講演番号：3C31a14
講演日時、会場：3 月 26 日 11:36～ C 校舎 31 会場

クエン酸の特異的検出を可能とするインジケータ蛍光タンパク質の創製

Genetically Encoded Fluorescent Indicators for Citrate

○本田 裕樹、桐村 光太郎（早大・理工・応化）
○Yuki HONDA,Kohtaro KIRIMURA (Dept. Appl. Chem., Fac. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】クエン酸は柑橘類に多く含まれる有機酸であり、飲料や食品の酸味料など各種産業で多様な用途がある。ヒトをはじめ各種生物の細胞に普遍的に存在し、生化学的にも解糖系や脂質代謝における重要な生体分子である。しかし、クエン酸を特異的に検出するための迅速かつ簡便な方法は確立されていなかった。そこで、本研究では、クエン酸を濃度依存的かつ特異的に検出可能なインジケータ蛍光タンパク質を創製し、試験管内での使用条件を検討した。さらに、当該インジケータ蛍光タンパク質遺伝子を大腸菌で発現させ、細胞内のクエン酸の検出が可能であることを明らかにした。
【方法および結果】遺伝子工学を利用して、クエン酸と特異的に結合し構造が変化する細菌由来クエン酸センサータンパク質（CitA）のペリプラズムドメイン（CitA のアミノ酸残基 45-176 に相当）と環状異性化変異を加えた蛍光タンパク質（circularly permuted fluorescent protein、cpFP）との融合タンパク質について、結合位置を変化させたものを多数作製した。この融合タンパク質は、CitA においてクエン酸との結合により大きく構造変化する部位（アミノ酸残基 97-105）に、リンカーを介して cpFP を挿入することによって作製し、一次構造は CitA45-*N*-SAG-cpFP-GT-CitA(*N*+1)-176 である（*N* は cpFP が挿入される部位の CitA アミノ酸残基を示す）。大腸菌を利用した各遺伝子の発現により組換え融合タンパク質を生産し、この中から優良な特長を示すものを２種（CF98 および CF99 と命名）選択し、精製タンパク質を用いて蛍光特性を評価した。精製した CF98 の励起スペクトルは 413 nm と 504 nm にピークを示し、クエン酸濃度の上昇により 504 nm での蛍光強度（FI504）が増大し、413 nm での蛍光強度（FI413）が減少した。一方、CF99 の励起スペクトルは 413 nm と 504 nm にピークを示し、クエン酸濃度の上昇により FI504 が減少し、FI413 nm が増大した。この蛍光変化はクエン酸の濃度が数十μM から数十 mM の範囲で確認された。また、CF98 や CF99 はクエン酸以外の有機酸（イソクエン酸、α-ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、オキサロ酢酸およびピルビン酸）には応答せず、クエン酸に極めて特異的な応答を示した。以上より、CF98 および CF99 を代表とするクエン酸特異的検出に応用可能な蛍光タンパク質インジケータの作製に成功した。すなわち、補酵素の添加などの煩雑な操作がなく、蛍光測定によるクエン酸の直接的かつ迅速（数μsec 以内）な微量検出が可能なことを明らかにした。さらに、CF98 遺伝子を発現させた大腸菌について、生細胞の状態で細胞内のクエン酸の検出が可能なことを明らかにした。

circularly permuted fluorescent protein, citrate, indicator

講演番号：3C31a15
講演日時、会場：3 月 26 日 11:48～ C 校舎 31 会場

“自分の” ヒト皮膚常在菌を活用した新しいスキンケア法の開発
Development of a novel skin care method which utilized own human indigenous skin bacteria
○野嶽 勇一[1]、松本 菜季[2]、三浦 良子[2]、藤本 京子[1]、林田 友紀[2]、深澤 昌史[1]、本多 英俊[2]、出来尾 格[3]、榊原 隆三[1]([1]長崎国際大薬、[2]（株）バイオジェノミクス、[3]英国健康保護局微生物部)
○ Yuichi NODAKE[1], Saki MATSUMOTO[2], Ryoko MIURA[2], Kyoko FUJIMOTO[1], Yuki HAYASHIDA[2], Masashi FUKASAWA[1], Hidetoshi HONDA[2], Itaru DEKIO[3], Ryuzo SAKAKIBARA[1] ([1]Nagasaki International University, [2]BIOGENOMICS Co., Ltd., [3]Health Protection Agency, London, UK)

多岐にわたる皮膚常在菌の中には、肌の健康増進に寄与する表皮ブドウ球菌の一種（*Staphylococcus epidermidis*；「美肌菌」と命名されている）が存在し、その美容効果が脚光を浴びている。近年、*S. epidermidis* の増殖を促す物質が基礎化粧品中に添加されることが多くなったが、その使用効果は個人の肌質の影響もあり未だ十分とは言えない状況である。

我々は、「皮膚上の美肌菌数の意図的な増加を介して、皮膚に有用な美肌菌産生物質量の増大を図った場合、より一層のスキンケア効果をより確実に期待できる」という戦略に基づき、「被験者から採取して人工的に増大させた *S. epidermidis* を、その本人に戻してより多くの *S. epidermidis* を皮膚に定着させる美肌菌戻し作業」に関する臨床試験を実施した。まず、被験者の額部に生息する皮膚常在菌を Dekio 法によって採取し、定性試験及び遺伝子解析を経て *S. epidermidis* だけを同定・選抜した。次いで、単離した *S. epidermidis* を一定量まで培養・増殖した後に凍結乾燥標品とした。最終的に、専用ジェルへの混和を介して就寝時に被験者自身の皮膚に塗布させた（週 2 回・4 週間）。

本臨床試験の結果、平均値レベルで開始前の 10 倍以上の *S. epidermidis* が検出されるようになったことから、美肌菌戻し作業の継続が *S. epidermidis* のより確実な定着に有効であることが示された。さらに、皮膚の油分量の増加に伴って水分蒸散量が抑制され、皮膚の保湿が顕著に改善されることを見出した。また、美肌菌戻しは皮膚の弱酸性化に対しても有効であったことから、皮膚に悪影響を及ぼす雑菌や黄色ブドウ球菌の増殖抑制に効果を示すことが示唆されたとともに、キメの改善効果が確認され、美白の観点からも有効性が期待された。一方、本臨床試験期間を通して、被験者の紅斑値には有意な変化は見出されず、被験者を対象としたアンケートからも否定的な意見は出なかった。これらは、本試験の条件下においては赤みや炎症等をはじめとする悪影響（副作用）が生じる可能性が低いことを示唆しており、*S. epidermidis* の生理機能を活用した世界に類を見ない新規オーダーメード型基礎化粧品の開発を目指す上で極めて大きな安全性上の利点になると考えた。

今後の研究においては、美肌菌戻しによる定着 *S. epidermidis* 量の増大から導かれるスキンケア効果を、その代謝産物の解析を中心に分子レベルで解明することを試みる。

skin care, indigenous bacteria, *Staphylococcus epidermidis*

講演番号：4C11a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ C 校舎 11 会場

琵琶湖深湖底由来菌類によるセレンオキサニオン還元とナノ微粒子への変換

Reduction and conversion of selenium-oxyanion by eucaryotic microbes isolated from deep sediments in Lake Biwa

○阪口 利文[1]、田邊 伸康[1]、有馬 寿英[1]、宮下 英明[2]、石川 可奈子[3]、岡村 好子[4] ([1]県立広島大環境科学、[2]京都大人間環境、[3]県立琵琶湖環境科学研、[4]広島大先端物質科学研)

○ Toshifumi SAKAGUCHI[1], NOBUYASU TANABE[1], TOSHIHIDE ARIYA[1], HIDEAKI MIYASHITA[2], KANAKO ISHIKAWA[3], YOSHIKO OKAMURA[4] ([1]Dept. of Environ. Sci., Pref. Univ. of Hiroshima, [2]Graduate School of Human and Environ. Studies, Kyoto Univ., [3]Lake Biwa Environ. Research Institute, [4]Graduate School of Adv.Sci. of Matter, Hiroshima Univ.)

【目的・背景】演者らはこれまで、日本最大の淡水湖である琵琶湖深湖底から採取した泥質試料からセレン（テルル）オキサニオンの回収、及び単体セレン元素への変換が可能な新規セレン（テルル）オキサニオン還元性細菌の分離・培養に関する研究を行ってきた。これらの研究を通じて、セレン汚染の環境修復やセレンオキサニオンの物質変換に貢献できうる微生物種が深湖底泥質に多数存在していることを明らかにしてきた。そこで、本研究ではさらに細菌種だけでなく酵母類、糸状菌についても琵琶湖深湖底由来の泥質から探索し、セレンオキサニオンに対して還元・元素変換が期待できる菌株の分離、培養について検討した。さらに得られた菌体の性状、形成されたナノ微粒子の観察などを行った。

【方法、及び結果】琵琶湖の最深部周辺（N4）から採取された泥質を接種源として培養を行った後、形成された培養物からセレンオキサニオンを添加した直接平板寒天への線画によって生じたコロニーを取得し、純化を繰り返すことで、真核微生物（酵母・糸状菌類）と考えられる菌体を獲得した。プレートに添加したセレンオキサニオンに対する形成コロニーの差異から少なくとも 2 つの菌体が得られた。これらはそれぞれ LBfA、LBfB と名付けられた。これら 2 つについて、様々な培地における形成コロニーの経時変化に伴う観察を行ったところ、YM 培地のプレートではセレン酸、亜セレン酸いずれを添加した場合でもコロニーの形成が確認された。形成されたコロニーはセレンオキサニオン非添加の場合とは異なっており、光沢のある半球状の形態であった。また、LBfA、LBfB 両菌体とも亜セレン酸を添加したプレートでは赤橙色のコロニーが形成され、両菌によって亜セレン酸が還元され、単体セレンが形成されていると考えられた。このうち同条件で培養された LBfA 菌体の TEM 観察、並びに形成微粒子の元素分析を行ったところ、中～長桿状の菌体周辺に電子線を通さないナノ微粒子が多数観察された。これらの微粒子に対して元素分析を実施したところ、ほぼセレン元素のみで構成されていることが確認できた。また、その形状は細菌類によって形成された明瞭な球状ものとは異なっており、大きさが 30～100 nm 程度の球体～立方体のような不定形の形態であった。次に各種プレート培地でのコロニーの形成について調査したところ、セレン酸を含むプレートでは LBfA と比較して LBfB の方が明瞭で多くの淡橙色のコロニーの形成が確認され、両菌の間でセレンオキサニオンの種類に対してコロニー形成に差異が認められた。これらの結果から最深部を含む琵琶湖底質においてセレン元素の回収に有効な多数の真核微生物の存在が推察された。

sediment, selenium oxyanion, eucaryotic microbes

講演番号：4C11a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ C 校舎 11 会場

ブロッコリー実生におけるセレン化合物の酸化ストレス感受性に及ぼす影響

The effect of selenium-containing compounds on oxidative stress sensitivity in broccoli seedlings

○武田 徹、藤原 知也、関根 康平（近畿大・農・バイオ）
○Toru Takeda,Tomoya Fujihara,Kohei Sekine (Kinki Univ)

【目的】微量のセレン（Se）はヒトや動物にとって必須元素であるが、過剰に摂取すると強い毒性を示す。それゆえ、高濃度のSeは土壌汚染物質のひとつとみなされ、近年では、Seを効率よく吸収し、蓄積することができるSe蓄積植物を用いたファイトレメディエーションが注目されてきた。一方、植物に存在するSe分子種がメタロミクスの手法を用いて解析され、それらの一部に強い抗腫瘍活性が見いだされてきた。しかし、植物にとってSeは必須微量元素ではなく、植物細胞におけるSe代謝やSe化合物の生理機能については不明な点が多く残されている。そこで本研究では、植物におけるSeの生理機能の解明を目的として、Se蓄積能を有するブロッコリー実生のSe化合物の解析と、Se化合物の酸化ストレス感受性に及ぼす影響を検討した。
【方法】滅菌した脱脂綿に種々の濃度の硫酸塩およびセレン酸塩を組み合わせた溶液を含ませ、そこにブロッコリー種子を播種した。播種後、3日間暗黒下（20～25°C）に置き、その後、明期12時間（240 μmol/m^2/s ：24°C）／暗期12時間（20°C）の条件で7日間生育させた。Se分子種（Se-メチルセレノシステイン：MeSeCysおよびγ-グルタミル-Se-メチルセレノシステイン：GGMeSeCys）はQ-TOF/MSにより解析した。酸化ストレス感受性は、上記播種後10日目の植物体に100 μMパラコートを噴霧し、48時間連続光（400 μmol/m^2/s ：24°C）を照射した後の、葉のクロロフィル量および過酸化脂質量で評価した。
【結果】硫酸塩を含まない条件では、播種後 10 日目までのブロッコリー実生の生育にセレン酸塩（～400 μM）付与はほとんど影響しなかった。しかし、硫酸塩存在下（800 μM）では、100～400 μM セレン酸塩付与により、実生の生育は乾燥重量で 1.37 ± 0.11 倍、実生丈で 1.41 ± 0.13 倍と有意に増加した。これら生育促進が認められた植物のシステインおよび GSH 量は、セレン酸を付与していないコントロール植物に比べて、1.22 ± 0.12 倍および 2.05 ± 0.08 倍に増加していた。また、これら植物の Se 分子種を解析したところ、MeSeCys の有意な増加と、GGMeSeCys の存在が確認された。MeSeCys と GGMeSeCys が存在する実生の酸化ストレス感受性をパラコート処理により評価した。その結果、これら Se 化合物は植物に酸化ストレス耐性を付与する可能性が示唆された。

selenium, broccoli, oxidative stress

講演番号：4C11a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ C 校舎 11 会場

コメに蓄積するヒ素の化学形態と土壌中の動態に関する微生物の影響いついて

Bacterial effect on arsenic speciation accumulated in rice and its dynamics in soil

○倉俣 正人[1]、片岡 良太[1,2]、榊原 風太[1]、安倍 匡[1]、高木 和広[1]、石川 覚[1] ([1]農環研、[2]山梨大)
○ MASATO KURAMATA[1], RYOTA KATAOKA[1,2], FUTA SAKAKIBARA[1], TADASHI ABE[1], KAZUHIRO TAKAGI[1], SATORU ISHIKAWA[1] ([1]NIAES, [2]Yamanashi Univ.)

【目的】　ヒ素は WHO により発癌性があると勧告されている元素である。我々の日常生活におけるヒ素の摂取は食品の中では主食であるコメに由来するところが大きい。イネにおけるヒ素の吸収経路は主にケイ酸トランスポーターであることが知られている。イネがケイ酸の高集積植物であることからもヒ素吸収リスクは他の作物に比べて高い。

環境中には様々なヒ素化合物が存在するが、コメには主に無機ヒ素とメチル化されたヒ素の一種であるジメチルアルシン酸（DMA）が検出される。基本的に土壌溶液中の DMA 濃度は低く、土壌溶液とコメの DMA 濃度間には直接的な関連性は見られない。同様の現象は多数報告されているが、その原因は未だ不明である。

近年、微生物からヒ素のメチル化酵素遺伝子が同定されたことから、土壌微生物によってヒ素がメチル化され、それをイネが直接吸収している可能性が考えられた。そこで、イネ根圏で無機ヒ素のメチル化を行い、コメに蓄積するヒ素の化学形態に影響しうる微生物の存在について研究を行った。

【方法】　高ヒ素濃度の土壌で栽培したイネの根圏から平板希釈法により細菌の分離を行い、その中からヒ素を代謝する細菌の探索を行った。なお、細菌の培養には R2A 培地を用いた。

ヒ素の化学形態分析では 4 種のヒ素標品［3 価無機ヒ素, 5 無機ヒ素,モノメチルアルソン酸(MMA), DMA]を用い HPLC-ICP-MS で分析した。また、16S rRNA の塩基配列をもとに細菌の同定を行った。

【結果】　分離した細菌から無機ヒ素を DMA に変換する菌株を発見し、16S rRNA の塩基配列から *Streptomyces* 属細菌であると同定した。さらに本菌からヒ素のメチル化酵素遺伝子の単離に成功し、その遺伝子を大腸菌に導入しメチル化活性を確認した。このようにイネの根圏にはヒ素メチル化酵素遺伝子を持った微生物が確かに存在していたことから、コメに蓄積するヒ素の化学形態には根圏微生物の影響が十分に考えられる。

arsenic speciation, rice, rhizobacteria

講演番号：4C11a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ C 校舎 11 会場

セイタカアワダチソウの PCB 同族体の取り込み・移行促進物質の探索

Search for substances promoting the uptake and transportation of PCB congeners from *Solidago canadensis*

○嶋津 小百合[1]、内山 琢磨[2]、太田 雅也[3]、芦田 均[1] ([1]神戸大院・農、[2]神戸大・農、[3]福山大生命工・生物工)
○Sayuri SHIMAZU[1], Takuma UCHIYAMA[2], Masaya OHTA[3], Hitoshi ASHIDA[1] ([1]Kobe Univ., [2]Kobe Univ., [3]Fukuyama Univ.)

【目的】
セイタカアワダチソウ（*Solidago canadensis*）はPCB同族体の高蓄積植物であることが知られているが、その機構については明らかにされていない。そこで、セイタカアワダチソウの葉茎部分から脂溶性成分と水溶性成分を抽出し、PCB同族体の植物体への取り込み・移行に関与する物質の探索を行った。モニタリングは、これまでに構築した組換え型モルモットAhR (gAhR) /β-グルクロニダーゼ (GUS) レポーター系遺伝子導入シロイヌナズナを用いたPCB同族体のアッセイ系[1, 2)]を利用し、PCB126誘導GUS活性を指標にして行った。
【方法】
セイタカアワダチソウにエタノールを加えて抽出し、溶媒を留去して粗抽出物を得た。粗抽出物をフォルチ分配して脂溶性成分と水溶性成分に分けた。脂溶性成分はシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、単純脂質、糖脂質およびリン脂質画分に分画し、糖脂質画分は、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーで、TLC上で移動度の異なる6つの画分に分画した。分画した画分とPCB同族体を添加したムラシゲ・スクーグ培地に組換え型gAhR/GUSレポーター遺伝子系導入シロイヌナズナXgD2V11-6系統を播種して2週間培養した後、シロイヌナズナ植物体のGUS活性を測定した。
【結果】
PCB126添加培地に単純脂質、糖脂質およびリン脂質画分を加えてアッセイを行ったところ、糖脂質画分を添加して培養したシロイヌナズナ植物体にPCB126誘導GUS活性の増加が認められたことから、PCB同族体の吸収に関与している物質の存在が示唆された。そこで、糖脂質画分から得られた6つの画分について同様にアッセイを行ったところ、クロロホルム:メタノール=98:2 (v/v) と96:4 (v/v) で溶出された2画分の添加により、GUS活性の増加が認められた。現在、これらの画分の有効成分について検討中である。

本研究はJSPS科学研究費補助金（特別研究員奨励費 24･3482）の助成を受けたものである。

参考文献

1) S. Shimazu *et al.*, *J. Environ. Sci. Health B.*, **45**, 750-756 (2010).
2) S. Shimazu *et al.*, *J. Environ. Sci. Health B.*, **47**, 925-932 (2012).

PCB congeners, Phytoextraction

講演番号：4C11a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ C 校舎 11 会場

ヒノキ木紛の生分解性向上のための白色腐朽菌処理

Biodegradability improvement of Japanese cypress powder by white-rot fungi

○小島 豪[1]、時本 景亮[2]、西野 直樹[1]、仁戸田 照彦[1]、神崎 浩[1] ([1]岡山大院環境生命、[2]日本きのこセ菌蕈研)
○Takeshi Kojima[1], Keisuke Tokimoto[2], Naoki Nishino[1], Teruhiko Nitoda[1], Hiroshi Kanzaki[1] ([1]Okayama Univ., [2]Japan Kinoko Research Centre Foundation)

【目的】岡山県北部ではヒノキの生産が盛んであり，その間伐材やおが屑はセルロース系バイオマスとして利用可能であると期待されている。経済面を考慮するとバイオマスの地産地消が重要であり，その一つの方向性としてバイオマス生産地域における家畜飼料への利用が挙げられる。我々は栄養価が高い発酵混合飼料に含まれるバガス等のセルロース系資材の代替にヒノキ木粉を利用することを試みてきた。ヒノキ木粉は生分解性が他のセルロース系資材と比較して低いため，木材の爆砕と白色腐朽菌処理の組み合わせによる処理に焦点を当てた。40 種類の白色腐朽菌の中からスクリーニングを行ったところ，シハイタケとシイタケがヒノキ爆砕木粉の生分解性を向上させることが判明した[1)]。本研究では，ヒノキ爆砕木粉の生分解性を向上させる培地条件を検討するとともに，経済性をさらに高めるため爆砕を行っていないヒノキおが粉の白色腐朽菌処理についても検討することにした。
【方法】栄養剤の米ぬかまたは小麦フスマの割合を変えてヒノキ爆砕木粉に添加し，シハイタケまたはシイタケを生育させ白色腐朽菌処理を行なった。微生物セルラーゼを用いた糖化試験と岡山大学津高牧場で飼育しているウシの胃液を用いた消化試験より糖化率と消化率を算出して，処理木粉の生分解性を判定したところ糖化率と消化率には正の相関が見られたので，本研究では主に糖化試験により生分解性を判定することにした。
【結果】ヒノキ爆砕木粉に添加する栄養剤の割合を変えて白色腐朽菌処理を行うと 2 菌株とも栄養剤の割合が増えると糖化率が上昇する傾向であった。シハイタケで最も高い糖化率を示したのは木粉:米ぬか=8:2 の条件で 2 ヶ月間処理した時で，未処理のヒノキ爆砕木粉の糖化率は 7.2%であるのに対し 35.1%まで増加した。シイタケでは木粉:米ぬか:小麦フスマ=8:1:1 の条件で 3 ヶ月間処理した時に最も高い 32.9%という糖化率を示した。この結果から，より高い生分解性を示す木粉を得る処理条件は菌株により異なっていたが，いずれの場合もバガスの糖化率に匹敵する素材が得られることが判明した。次に，未処理のヒノキおが粉の糖化率を測定したところ 1.5%であり，その低生分解性が実証されたが，おが粉:米ぬか=9:1 の条件で白色腐朽菌処理を行い，生分解性が向上するか検討した。糖化率はシハイタケで 2 ヶ月間処理すると 18.6%，シイタケで 3 ヶ月間処理すると 11.2%まで増加し，おが粉であっても白色腐朽菌処理により生分解性の向上が可能であることが判明した。今後は処理条件を詳細に検討し，より経済的なヒノキの家畜飼料としての用途開発を試みる予定である。

[1)] 小島, 光永, 時本, 西野, 仁戸田, 神崎, 日本農芸化学会中四国支部第 34 回講演会要旨集, P. 33 (2012)

white-rot fungus, bioconversion, biomass

講演番号：4C11a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ C 校舎 11 会場

アルカリ蒸解スギ基質での *Trichoderma reesei* PC3-7 株の培養と基質糖化に関する研究

Study on Cultivation of *Trichoderma reesei* PC3-7 on alkaline exploded cedar and saccharification by culture supernatant

○脇山 慎平[1]、石倉 喜郎[2]、金子 舞[2]、野尻 昌信[3]、新井 博之[1]、石井 正治[1]、五十嵐 泰夫[1]([1]東京大院農、[2]地域環境資源センター、[3]森林総合研究所)
○Shimpei WAKIYAMA[1], Yoshiro ISHIKURA[2], Mai KANEKO[2], Masanobu NOJIRI[3], Hiroyuki ARAI[1], Masaharu ISHI[1], Yasuo IGARASHI[1] ([1]Tokyo Univ., [2]JARUS, [3]FFPRI)

[背景と目的]現在普及しているバイオエタノールは食糧を原料としており、食糧価格高騰に影響を与えることから世界的に問題となっており、セルロース系バイオマスを原料とするエタノール生産が脚光を浴びている。日本においては、賦存量が大きく間伐材として毎年大量に廃棄されるスギが原料として注目されている。しかし、糖化工程で必須のセルラーゼのコストが依然として高く、スギの糖化に最適化されたセルラーゼ群についてもこれまで報告が得られていない。そこで今回は、森林総合研究所で研究がすすめられているアルカリ蒸解法で前処理したスギで *Trichoderma reesei* PC3-7 株を培養した時に、原料に最適な酵素群が誘導されるかどうかを検証することを目的とした。
[方法と結果]アルカリ蒸解スギ、イナワラ、アビセルを基質として Mandels 培地で PC３－７株の培養を行った。培養上清について CMCase、Xylanase、PNPGase の酵素活性測定をそれぞれ行ったところ、３種の培養上清で異なる酵素活性パターンが得られた。イナワラでは PNPGase と Xylanase が高いのに対して、アビセル培養上清では低かった。また、培養上清を SDS-PAGE したところ、アルカリ蒸解スギ、イナワラ、アビセルで異なるバンドパターンが見られた。アビセル、アルカリ蒸解スギでは、50-70ｋDa にほとんどのバンドが検出されたが、イナワラ培養上清では 50kDa 以下でも濃いバンドがいくつか確認された。培養日数ごとの上清液でバンドパターンを同様に確認したところそれぞれほぼ同一のパターンを示したことから、アルカリ蒸解スギに適応したタンパク質群を PC3-7 株が生産したと考えられる。これら３種類の培養上清を用いてタンパク質量 2mg/Cellulose となるように、3% (w/v) アルカリ蒸解スギ糖化試験を行ったところ、アルカリ蒸解スギ培養上清サンプルによる糖化率が最も高くなった。
以上の結果より、アルカリ蒸解スギを基質として酵素群を誘導する場合において、その原料の糖化に適した酵素を入手できる可能性が示された。
＊本研究は、林野庁　平成 24 年度森林整備効率化支援機械開発事業「木質バイオマスの大規模利用技術の開発」の委託により行われた

Trichoderma reesei, cellulase, bioethanol

講演番号：4C11a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ C 校舎 11 会場

堆肥熟成過程における稲ワラ有機物中炭素の残存率

Remaining carbon derived from rice straw through cattle manure fermentation

○永井 勝[1]、坂田 洋[1]、佐藤 義人[2]、多胡 靖宏[1]、中村 裕二[1] ([1]環境研、[2]青森産技セ)
○Masaru NAGAI[1], Hiroshi SAKATA[1], Yoshihito SATO[2], Yasuhiro TAKO[1], Yuji NAKAMURA[1]
([1]IES, [2]Aomori Industrial Technology Research Center)

稲わらを燃焼させずに再資源化することは環境保護や資源有効利用の観点から重要であり、その手法としては水田への全量鋤き込みや堆肥原料としての利用がある。しかし、原子力施設周辺で大気中の ^{14}C が固定された稲わら又は稲わらを原料とした堆肥を土壌に施用した場合の ^{14}C の挙動は良く知られていない。稲わらを堆肥原料とした場合、稲わらに含まれる有機物の一部は堆肥化の過程で分解され、有機物中の炭素は二酸化炭素やメタンとして放出されるが、リグニンなど難分解性有機物は未分解のまま堆肥に残留し、そのまま土壌へと施用される。そこで、本試験では、^{13}C によって標識した稲わらを作成し、堆肥化に伴う稲わら中の ^{14}C 残存率を検討した。

イネに $^{13}CO_2$ をばく露して ^{13}C 標識稲わらを作成した。作成した標識稲わら（^{13}C 含有率 2.0 atom%）と牛ふん(同 1.07 atom%)を炭素量で 1：1 になるように混合し、発酵容器に入れ、37℃ で保温し、稲わら牛ふん堆肥を作成した。堆肥熟成のため、24 時間に一度切り替えしを行う事で通気を行った。熟成開始から 5 日間、温度は 60℃ に上昇し、その後は徐々に低下し、2 週間後には 37℃ で安定した。C/N 比は堆肥の熟成により、35%から 18%に低下し、有機物分解による炭素の放出が示された。堆肥から放出される二酸化炭素の ^{13}C 含有率を測定したところ、熟成開始直後には稲わらの ^{13}C 含有率である 2.0 atom%を示したが、初期に急激な含有率の減少が見られ、その後は緩やかに減少した。熟成 60 日後には 1.2 atom%に低下した。また、堆肥に含まれる全炭素の ^{13}C 含有率は 1.7 atom%であったが、熟成 60 日後には 1.4 atom%に低下した。

これらの結果より、堆肥中の稲わら由来の炭素の残存量を ^{13}C 含有率より算出し、稲わら中の有機物は分解速度の異なる 2 成分から成ると仮定して回帰分析を行い、以下の式を導出した。

$$R(\%)=50.5e^{-0.135t}+46.7e^{-0.0054t}$$

R(%)：稲わら由来の有機物中炭素の残存量、t：熟成日数

これにより、堆肥化の過程における稲わら由来の ^{14}C 残存率推定が可能となった。

本記載事項は青森県からの受託事業により得られた成果の一部である。

rice straw, manure, carbon

講演番号：4C11a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ C 校舎 11 会場

堆肥化プロセスにおける亜酸化窒素発生に硝化・脱窒細菌が与える影響
Influence of nitrifying and denitrifying bacteria on nitrous oxide emission during composting processes

○大坪 和香子[1]、進藤 絵里香[1]、上田 英代[2]、上田 裕一[2]、宮内 啓介[1]、遠藤 銀朗[1] ([1]東北学院大学、[2]有限会社日本ライフセンター)
○Wakako Ikeda-Ohtsubo[1], Erika Shindo[1], Hideyo Ueda[2], Yasuichi Ueda[2], Keisuke Miyauchi[1], Ginro Endo[1] ([1]Tohoku Gakuin Univ., [2]Japan Life Center Ltd)

堆肥化プロセスでは、有機物だけではなく、無機窒素化合物の微生物変換が堆肥の熟成に重要であり、その過程で発生する温室効果ガス亜酸化窒素（N_2O）は環境へ大きな影響をもたらす。本研究では、養豚場の排水処理プロセスにおいて生じる搾汁後の固体残渣および排水処理からの余剰汚泥を材料とし、堆肥化実験を行った。100℃の高温前処理（HTPRT）を行った場合と行わなかった場合とで N_2O 発生を比較したところ、HTPRT を行った堆肥山において、N_2O 発生時期の遅延と N_2O 発生量の低下が認められた。そこで、堆肥中の無機窒素化合物量の変化を比較したところ、両手法において、N_2O 発生の直前にアンモニウム態窒素量の顕著な減少が見られた。これはアンモニア酸化反応によるものであると考え、アンモニア酸化細菌の保有するアンモニアモノオキシゲナーゼ遺伝子（*amoA*）の定量 PCR 解析を行ったところ、HTPRT を行わなかった場合は、*amoA* が堆肥化初期から検出されたのに対し、HTPRT を行った場合は堆肥化開始後 4 週目以降の堆肥にのみ検出された。このことから、堆肥からの N_2O 発生の発生時期は、堆肥中のアンモニア酸化細菌の出現時期に依存することが明らかとなった。また、脱窒関連遺伝子である亜硝酸還元酵素遺伝子（*nirK*/*nirS*）および N_2O 還元酵素遺伝子（*nosZ*）の定量 PCR 解析をおこなったところ、*nirK* と *nirS* のコピー数に対する *nosZ* のコピー数の比は、N_2O 発生量が少なかった HTPRT を行った堆肥中において高くなっていた。このことから、脱窒細菌群集における N_2O 還元ポテンシャルを有する *nosZ* 保有細菌の割合が、堆肥山からの N_2O 発生量に影響していることが考えられた。さらに、これらの遺伝子の系統解析を行ったところ、HTPRT を行わなかった堆肥中で優勢化していたアンモニア酸化細菌は、堆肥の材料由来であるが、脱窒細菌は HTPRT を行った場合と同様に土着細菌である可能性が示唆された。

composting, nitrous oxide, nitrification/denitrification

講演番号：4C11a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ C 校舎 11 会場

畑土壌表面に施用した有機質肥料からの糸状菌脱窒による N_2O 発生
N_2O emission from surface-applied organic fertilizer on upland field soil through fungal denitrification
巍 魏[1]、磯部 一夫[1]、白鳥 豊[2]、西澤 智康[1]、大塚 重人[1]、○妹尾 啓史[1] ([1]東大院農生科、[2]新潟農総研)
Wei WEI[1], Kazuo ISOBE[1], Yutaka SHIRATORI[2], Tomoyasu NISHIZAWA[1], Shigeto OTSUKA[1], ○Keishi SENOO[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Niigata Agric Res. Inst.)

農耕地土壌は温室効果ガス N_2O の大きな発生源の一つである。肥料や作物残渣に含まれる窒素が土壌微生物による形態変換を受けて N_2O が生成する。近年、食品製造残渣や畜産廃棄物を原料とした有機質肥料を粒状やペレット状に加工した肥料が資源循環の観点や土壌への施用のしやすさから普及している。このような有機質肥料を土壌に施用した場合にも N_2O が発生し、発生削減が求められている。N_2O は硝化や脱窒反応のプロセスで発生することが知られているが、有機質肥料に由来して実際に N_2O を生成している微生物に関する知見は限られていた。本研究は、有機質粒状肥料を土壌表面に施用した際の N_2O 生成に寄与している土壌微生物を特定・分離することを目的として行った。

新潟県農業総合研究所内の畑圃場（黒ボク土）に、有機質粒状肥料を基肥では土壌に混合施用、追肥では土壌表面に施用する試験区を設置した。いずれの施肥の後にも土壌からの N_2O 発生が観測された。表面施肥後の N_2O 発生が観測されている時期に、粒状肥料の周囲に糸状菌が生育していることが目視により観察され、糸状菌脱窒が N_2O 発生に寄与している可能性が考えられた。事実、室内土壌ミクロコズムに抗生物質や硝化阻害剤を添加した試験により表面施肥後の N_2O 発生の 80%以上が糸状菌脱窒に由来することが確認された。圃場での表面施肥後の N_2O 発生時期の施肥部位の土壌を採取して粒状肥料画分と土壌画分に分けた。粒状肥料画分、土壌画分、ならびに無施肥土壌のそれぞれについて糸状菌密度を平板法により測定したところ、粒状肥料画分の菌密度が他に比べて著しく高かった。両画分と無施肥土壌から DNA を抽出し、18S rRNA 遺伝子ならびに 18S-28S ITS 領域をターゲットとした PCR-DGGE 解析を行ったところ、施肥土壌（粒状肥料画分と土壌画分）と無施肥土壌とでは糸状菌の群集構造が大きく異なっていた。PCR-DGGE 解析において粒状肥料で特異的に現れるバンドを複数切り出して塩基配列を決定し、バンドの由来する糸状菌の分類群を推定した。また、粒状肥料画分、土壌画分、無施肥土壌から平板法により糸状菌の分離を行った結果、32 株が得られ、18S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析および形態学的特性から *Fusarium* 属をはじめとする 11 属に分類された。このうち 20 株は室内の培養条件下で亜硝酸または硝酸から脱窒により N_2O を生成し、好気条件下で初期培養を行うことでより高い N_2O 生成活性を示す株が多かった。PCR-DGGE 解析ならびに分離菌株解析のそれぞれから得られた結果を総合して、*Actinomucor elegans*, *Bionectria* sp., *Fusarium oxysporum*, *Fusarium avenaceum* ならびに *Nectria* sp. の脱窒が表面施用した有機質粒状肥料からの N_2O 発生に大きく寄与していると考えられた。

N_2O emission, organic fertilizer, fungal denitrification

講演番号：4C11a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ C 校舎 11 会場

人工土壌作出による有機質資源からの無機肥料製造技術と有機質肥料活用型養液栽培

Inorganic nutrients production from organic resources by construction of artificial soil and organic hydroponics

○篠原 信[1]、岩井 喬[2]、藤原 和樹[1,2]、青山 ちひろ[2]、小川 順[3]、安藤 晃規[3,4]、加藤 康夫[5]、宮本 憲二[6]、高野 雅夫[2]([1]農研機構、[2]名大院・環境、[3]京大院農・応用生命、[4]京大・生理化学、[5]富山県大工・生物工、[6]慶大・理工)
○Makoto SHINOHARA[1], Takashi Iwai[2], kazuki Fujiwara[1,2], Chihiro Aoyama[2], Jun Ogawa[3], Akinori Ando[3,4], Yasuo Kato[5], Kenji Miyamoto[6], Masao Takano[2] ([1]NARO, [2]Nagoya Univ., [3]Kyoto Univ., [4]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [5]Toyama Pref. Univ., [6]Keio Univ.)

【背景・目的】有機質肥料は土耕栽培で一般的な肥料だが、土壌を使用しない養液栽培では使用できないとされてきた。土壌では自然に進行する二つの分解過程（アンモニア化成、硝酸化成）が水中でうまく進行せず、有機成分が腐敗して根を傷めるためである。２００５年、この課題を克服するため、土壌微生物の培養法を検討した結果、アンモニア化成、硝酸化成を水中で同時並行的に進める並行複式無機化法を２００５年に開発した。これにより、養液栽培で有機質肥料の利用を可能にした有機質肥料活用型養液栽培を実用化することができた。だが、現在の栽培法では有機質肥料の分解は根に付着する微生物群が行うため、施肥量を増やした場合、根に過負荷を与える恐れがある。これを回避するには、あらかじめ並行複式無機化法により有機質肥料を無機化しておくことが考えられるが、従来の水中での分解は約２週間の時間を要するため、現実的ではない。そこで本研究では、種々の多孔質担体に微生物を固定化したカラムを作成し、分解効率が高く、分解速度が速い手法の開発を目的として、検討を進めた。
【方法・結果】並行複式無機化反応（有機態窒素を硝酸態窒素に変換する反応）を触媒する微生物群を培養し、鉱物（バーミキュライト、軽石)、人工鉱物（パーライト、ロックウール)、ウレタン、籾殻燻炭、蛎殻、ヤシ殻など、各種多孔質担体に微生物群を固定化した。担体をカラム状に整形し、鰹煮汁（鰹節工場の副産物）を添加、一晩静置後、蒸留水で洗浄し、流出液を回収した。その結果、鰹煮汁に含まれる有機態窒素はアンモニウムイオン、亜硝酸イオン、硝酸イオンなどの無機態窒素イオンに変換することを確認した。無機態窒素イオンの回収率が３０％以上と高い多孔質担体として、ロックウール、ウレタン、籾殻燻炭、蛎殻、ヤシ殻などを選抜することができた。ロックウール、ウレタン、ヤシ殻、バーミキュライトを培地とし、トマトの固形培地耕（養液栽培の一手法）を行ったところ、いずれも健全にトマトが生育した。特にウレタンは非常に軽量であり、人工土壌として有望であることが明らかとなった。

1) 篠原信(2008)「化学と生物」, **46**, 230-232.
2) Shinohara M, Aoyama C, Fujiwara K, Watanabe A, Ohmori H, Uehara Y, Takano M (2011) *Soil Sci. Plant Nutr.*, **57**, 190-203.

organic hydroponics, organic resources, inorganic fertilizer

講演番号：4C11a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ C 校舎 11 会場

有機質肥料活用型養液栽培における Fusarium oxysporum f. sp. lactucae の動態解析

Analysis for population and morphological dynamics of Fusarium oxysporum f. sp. lactucae in an organic hydroponics system

○藤原 和樹[1,2]、飯田 祐一郎[1]、青山 ちひろ[2]、大西 純[1]、安藤 晃規[3,4]、小川 順[4]、加藤 康夫[5]、宮本 憲二[6]、高野 雅夫[2]、寺見 文宏[1]、篠原 信[1]（[1]農研機構、[2]名大院環境、[3]京大・生理化学、[4]京大院農・応用生命、[5]富山県大・生物工、[6]慶大・理工）

○Kazuki FUJIWARA[1,2], Yuichiro IIDA[1], Chihiro AOYAMA[2], Jun OHNISHI[1], Akinori ANDO[3,4], Jun OGAWA[4], Yasuo KATO[5], Kenji MIYAMOTO[6], Masao TAKANO[2], Fumihiro TERAMI[1], Makoto SHINOHARA[1] ([1]NARO, [2]Nagoya Univ., [3]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [4]Res. Div. Microb. Sci., Kyoto Univ., [5]Toyama Pref. Univ., [6]Keio Univ.)

【目的】有機質肥料活用型養液栽培は微生物生態系を水中に構築することで有機質肥料を分解し、養分を供給する栽培方法である[1)]。この微生物生態系は有機質肥料を無機化するだけではなく、根部病害を抑止する効果も保持している[2)]。従来の無機養液栽培では培養液中に競合する微生物がいないため、病原菌の侵入を許すと容易に蔓延し深刻な被害を受けるが、有機質肥料活用型養液栽培は病原菌を潅注接種しても根部病害が発生しない。本研究では本栽培技術での培養液中で病原菌がどのような動態を示すのかを解析した。

【方法】並行複式無機化法（有機成分のアンモニアへの分解と更なる硝化が効率的に進行する培養条件）により土壌微生物を培養し、この培養液に根部病原菌（レタス根腐病菌*Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*）を接種し、その消長を調べた。また、微生物生態系が根部病原菌の形態に及ぼす影響を観察した。

【結果】培養液中の根部病原菌の消長について、無機培養液中では菌密度の上昇が確認されたのに対し、有機培養液中では病原菌が検出されるものの菌密度の上昇は認められず、根部病原菌が静菌化している可能性が示唆された。無機培養液中の病原性*F. oxysporum*を観察した結果、菌密度が上昇し、増殖することでしか形成されない大型胞子の形態が観察された。一方、有機培養液中では大型胞子は検出されず、越冬時などに形成される耐久生存器官である厚膜胞子が検出された。これらの結果から、有機培養液中の微生物生態系では、耐久器官である厚膜胞子の形成が誘導され、根部病原菌の菌密度の上昇が抑制されることが明らかとなった。

1) M. Shinohara, C. Aoyama, K. Fujiwara, A. Watanabe, H. Ohmori, Y. Uehara, and M. Takano, *Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 57. No. 2, p. 190-203 (2011)
2) K. Fujiwara, C. Aoyama, M. Takano, and M. Shinohara, *Journal of General Plant Pathology*, vol. 78. No. 3, p. 217-220 (2012)

Organic hydroponics, Disease suppression, Biofilm

講演番号：4C11a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:12～ C 校舎 11 会場

有機質肥料活用型養液栽培を応用した有機質肥料の効率的無機化

Application of organic hydroponics for effective mineralization of organic fertilizers

○青山 ちひろ[1]、藤原 和樹[2]、高野 雅夫[1]、篠原 信[2] ([1]名大院環境、[2]農研機構)
○Chihiro AOYAMA[1], Kazuki FUJIWARA[2], Masao TAKANO[1], Makoto SHINOHARA[2] ([1]Nagoya Univ., [2]NARO)

【目的】有機質肥料活用型養液栽培は従来の無機養液栽培に比べ、環境負荷を低減でき、有機質資源を肥料として直接利用できることから注目されている[1, 2)]。しかし有機質肥料の特性や、耕水工程（微生物により養液中で有機態窒素を無機態窒素に変換する手法）による効率的な無機態窒素（アンモニア、亜硝酸、硝酸イオン）生成条件の検討はほとんど行われていない。そこで本研究では、有機質肥料の形状（固体か液体か）やC/N比、耕水方法における酸素供給方法に着目し、無機態窒素回収率（生成された無機態窒素／投入した窒素量）を指標として、効率的な耕水方法の検討を行った。
【方法・結果】13 種類の有機質肥料について、振とう機を用いた振とう法による耕水工程を行った結果、有機質肥料のC/N比が低いほど高い無機態窒素回収率が得られ、C/N比が大きくなるにつれ回収率は低下し、C/N比が 10 を超える有機質肥料では無機態窒素の回収は困難であることが明らかになった。また耕水工程で必須となる酸素供給方法として、エアーポンプを用いた曝気法、水流ポンプや撹拌機を用いた撹拌法による無機態窒素回収率を調べた。液肥であるCSL（トウモロコシ浸漬液）を用いた場合は曝気法や撹拌機による撹拌法で 60%を超える高い無機態窒素回収率を得ることができた。一方、固体である菜種油粕を用いた場合は、撹拌機を用い液肥の場合より撹拌強度を 2 倍ほど大きくした場合のみ、60%を超える無機態窒素回収率を得ることができた。液肥は養液中へ比較的均一に拡散するのに対し、固体肥料は沈殿しやすく厚いバイオフィルムが形成されることで、窒素成分の菌体内への取り込みや脱窒が生じ、無機態窒素回収率が低くなると思われる。固体の有機質肥料を用いる場合は、効率的な耕水のために養液の均一な撹拌が可能な方法を用いることが重要と思われる。

1)篠原信 2008「化学と生物」,vol.46. p.230-232.
2) Shinohara M, Aoyama C, Fujiwara K, Watanabe A, Ohmori H, Uehara Y, Takano M 2011 Soil Sci. Plant Nutr., Vol.57, p.190-203.

organic hydroponics, C/N ratio, inorganic nitrogen recovery

講演番号：4C11a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:24～ C 校舎 11 会場

有機質肥料活用型養液栽培における有機態窒素の硝化と菌相推移の解析

Analysis of the microbial consortia related to nitrification of organic nitrogen for an organic hydroponics

○犬飼 龍矢[1]、安藤 晃規[1,2]、池本 成美[3]、島 純[3]、青山 ちひろ[4]、吉田 昭介[5]、宮本 憲二[5]、加藤 康夫[6]、藤原 和樹[4,7]、篠原 信[7]、小川 順[1]([1]京大院農・応用生命、[2]京大・生理化学、[3]京大・微生物科学、[4]名大院・環境、[5]慶大・理工、[6]富山県大・生物工、[7]農研機構)

○Ryuya Inukai[1], Akinori Ando[1,2], Narumi Ikemoto[3], Jun Shima[3], Chihiro Aoyama[4], Syosuke Yoshida[5], Kenji Miyamoto[5], Yasuo Kato[6], Kazuki Fujiwara[4,7], Makoto Shinohara[7], Jun Ogawa[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [3]Res. Div. Microb. Sci., Kyoto Univ, [4]Div. Earth. Emviro. Sci. Grad. Sch. Enviro Stu., Nagoya Univ, [5]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ, [6]Dept. Biotech., Toyama Pref., [7]NARO)

【目的】

有機養液栽培は環境負荷の低減と効率的な栽培を実現しうる水耕栽培法として期待を集めている[1)]。本技術は、通気下にて有機体窒素の硝化に有効な微生物群を馴養する耕水工程と、植物定植後、有機物の硝化と栽培を同時に行う工程で構成される。我々は、これまでに微生物源として硝化特性の良い土壌を選抜し、硝化後の微生物群が再現性よく安定した硝化特性を示したことから、有機養液栽培用の微生物剤として活用できることを報告した。本研究では、硝化工程における環境中の窒素動態と併せて、菌相の推移を PCR-DGGE 法にて解析したので報告する。

【方法】

有機廃棄物としてのポリペプトン NF（0.5 g/L）、炭酸カルシウム（1 g/L）、微生物源としてのバーク堆肥（5 g/L）を含む溶液（20 ml）を試験管に分注し、28ºC、300 rpm にて硝化反応を行った。随時、窒素動態のモニタリングと微生物群の回収を行い、抽出したゲノムを対象に 16S r RNA V6-V8 領域、ならびに、アンモニア酸化菌群、アンモニア酸化アーケア群、亜硝酸酸化菌群に特異的なプライマーを利用し、PCR-DGGE 解析を行った。また、各バンドに対応する遺伝子配列を解析し、個々の菌の簡易的な同定を行った。

【結果】

硝化工程中の細菌相は、土壌の細菌相にくらべ単純化されており、一定の菌相に収斂していることが明らかになった。また、硝化に関わる菌群は再現性良く、窒素動態と連動して推移していた。現在、個々のバンドに対応する菌種のシークエンス解析を行っている。

1) M. Shinohara, C. Aoyama, K. Fujiwara, A. Watanabe, H. Ohmori, Y. Uehara, and M. Takano, *Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 57. No. 2, p. 190-203 (2011)

organic hydroponics, microbial consortia, nitrification

講演番号：4C11a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:36～ C 校舎 11 会場

次世代シークエンサーによる有機養液栽培における微生物叢の網羅的解析

Next-generation sequencing based metagenomic analysis of microbial community in an organic hydroponics

○吉田 昭介[1]、小野 瑞季[1]、篠原 亘[1]、榊原 康文[1]、安藤 晃規[2,3]、小川 順[2]、加藤 康夫[4]、篠原 信[5]、宮本 憲二[1] ([1]慶大・理工、[2]京大院農・応用生命、[3]京大・生理化学、[4]富山県大・生物工、[5]農研機構)

○Shosuke YOSHIDA[1], Mizuki Ono[1], Wataru Shinohara[1], Yasubumi Sakakibara[1], Akinori Ando[2,3], Jun Akinori[2], Yasuo Kato[4], Makoto Shinohara[5], Kenji Miyamoto[1] ([1]Keio Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Kyoto Univ., [4]Toyama Pref. Univ., [5]NARO)

【目的】

有機質肥料活用型養液栽培（有機養液栽培）は、有機物を養液栽培に利用できる画期的な方法である[1,2)]。有機養液栽培では、栽培植物の根面にバイオフィルムが形成され、共生する微生物群が高施肥効率や病害抑止効果の獲得に関与していると考えられているが、そのメカニズムは明らかではない。本研究では、バイオフィルムに含まれる極めて多様な微生物のメタゲノムを次世代シークエンサーを用いることにより解読し、遺伝子組成、菌種組成、及びそれらの変化を解析した。

【方法】

異なる栽培ステージのバイオフィルムからメタゲノムを抽出し、次世代シークエンサー（Illumina 社、Genome Analyzer IIx）により大規模塩基配列の解読を行った。得られたリード配列をアセンブリし、contig 配列を構築した後、ORF の推定を行った。Blast 解析により、それぞれの ORF を有する菌種を推定し、サンプル間での菌種組成を比較した。

【結果】

栽培ステージ間で、バイオフィルムの菌種組成が大きく変化することが明らかとなった。特に、硝化反応が進んだサンプルでは、ある硝化菌の存在量が著しく上昇していることが明らかとなった。

[1)]篠原信「化学と生物」, vol. 46. No. 4, p. 230-232 (2008)

[2)]M. Shinohara, C. Aoyama, K. Fujiwara, A. Watanabe, H. Ohmori, Y. Uehara, and M. Takano, *Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 57. No. 2, p. 190-203 (2011)

organic hydroponics, metagenomics, next-generation sequencing

講演番号：4C12a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ C 校舎 12 会場

ポリヒドロキシアルカン酸生産菌 *Ralstonia eutropha* におけるグリセロール資化能の強化

Improvement of glycerol assimilation ability of polyhydroxyalkanoate-producing *Ralstonia eutropha*

○福居 俊昭[1]、向山 正治[2]、折田 和泉[1]、中村 聡[1]([1]東工大院生命理工、[2]日本触媒)
○Toshiaki Fukui[1], Masaharu Mukouyama[2], Izumi Orita[1], Satoshi Nakamura[1] ([1]Tokyo Tech., [2]Nippon Shokubai)

【目的】微生物産生ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）はバイオマス由来であり、かつ生分解性の環境低負荷型プラスチックとして期待されている。水素細菌 *Ralstonia eutropha* H16 株はフルクトース・グルコン酸、脂肪酸・植物油などで良好に増殖してポリ（(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸）[P(3HB)]を効率良く蓄積する。我々はこれまでに *R. eutropha* の代謝改変によって、柔軟性に富む共重合 PHA を植物油原料から高生産する株を作製している。一方で、*R. eutropha* H16 株はグリセロールに対しては非常に遅い増殖しか示さない。グリセロールはバイオディーゼル生産における主要副産物であり有効利用が望まれていることことから、本研究では *R. eutropha* のグリセロール資化能の強化を行った。

【方法および結果】*Escherichia coli* などでは好気的条件においてグリセロールを GlpF（glycerol facilitator）により取り込み、GlpK（glycerol-kinase）、GlpD（*sn*-glycerol-3-phosphate dehydrogenase）によりジヒドロキシアセトンリン酸に変換する G3P 経路が知られている。ゲノム情報から *R. eutropha* H16 株は *glpF* を有さず、グリセロール取り込み能が低いことが推測された。そこで広宿主域ベクターを用いて *E. coli* 由来 $glpFK_{Ec}$ を *R. eutropha* H16 株に導入したところ、プラスミド欠失により目的の組換え株は取得できなかった。一方で、*R. eutropha* H16 株においてフルクトース培養時の増殖期および PHA 生合成期に強力に転写される機能未知遺伝子の上流に $glpFK_{Ec}$ を相同性組換えにより挿入した組換え株を取得できた。さらに同部位に $glpF_{Ec}$、$glpK_{Ec}$ をそれぞれ単独で挿入した株を作製した。グリセロールを単一炭素源とした合成培地での生育を検討したところ、H16-$glpFK_{Ec}$ 株および H16-$gkpK_{Ec}$ 株において H16 株より有意に速い増殖を示したが、H16-$glpF_{Ec}$ 株は H16 株と同定度の遅い増殖であった。このことから、H16 株では細胞内に取り込んだグリセロールのリン酸化が律速となっていることが強く示唆された。H16-$glpFK_{Ec}$ 株および H16-$gkpK_{Ec}$ 株のグリセロールにおける増殖速度はフルクトースにおける増殖速度よりやや低いものの、フルクトースの場合と同程度の菌体収量および P(3HB) 蓄積率 63-64 wt%を示し、グリセロールと原料とした PHA 生産が可能であった。また *Aeromonas caviae* 由来の広基質特異性 PHA 合成酵素遺伝子 $phaC_{NSDG}$ を機能させた *R. eutropha* P(3HB-*co*-3HHx)生合成株を宿主として $glpFK_{Ec}$ を導入し、各種炭素源における PHA 生産能について検討した。

polyhydroxyalkanoate, glycerol, *Ralstonia eutropha*

講演番号：4C12a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ C 校舎 12 会場

Methylobacterium extorquens の代謝改変によるメタノールを原料とした共重合 PHA の生産
Metabolic engineering of *Methylobacterium extorquens* for production of PHA copolymer from methanol
○折田 和泉、中村 聡、福居 俊昭（東工大院生命理工）
○Izumi ORITA,Satoshi NAKAMURA,Toshiaki FUKUI (Tokyo Tech.)

【目的】自然界の多くの微生物は、菌体内にエネルギー貯蔵物質としてポリヒドロキシアルカン酸（PHA）を蓄積する。PHA は、生分解性・生体適合性を有する環境低負荷型プラスチックであり、石油由来プラスチックの代替としての利用が期待されている。一方、メタノールは天然ガスやバイオマスから合成される安価かつ持続供給可能な次世代資源であり、有用物質生産の発酵原料としても注目されている。このようなメタノールを単一炭素源として生育出来る微生物をメチロトローフという。代表的なメチロトローフである *Methylobacterium extorquens* AM1 株は、メタノールを炭素源として生育中に炭素数 4 のモノマーのみからなるホモポリマーP(3HB)を蓄積することが知られているが、P(3HB)の固くて脆い性質と生産効率の低さが問題であった。本研究では、*M. extorquens* を宿主とした代謝改変によって、メタノールを原料として PHA の高物性共重合体を効率的に生合成する菌株を育種することを目的とする。
【方法および結果】これまでの研究により、*M. extorquens* AM1 野生株が生合成する PHA は、炭素数 5 のモノマーが共重合した共重合 PHA であることを明らかにし、さらに本菌に広基質特異性 PHA 重合酵素を導入することでメタノールを単一炭素源として僅かではあるが炭素数 6 のモノマーが共重合した PHA を合成することに成功している。本研究では、この PHA 重合酵素を置換した AM1CAc 株を宿主として生産効率や C_5、C_6 モノマー分率を強化するための代謝改変を行った。まず、AM1CAc 株内で、*M. extorquens* 由来 PHA モノマー合成酵素遺伝子群（*phaA-phaB*）を発現した。その結果、乾燥菌体重量あたりの PHA 蓄積量が宿主株に比べて 10 wt%程度向上し、さらに C_5 モノマー分率も約 4 倍の値を示した。また、本菌はメタノールを炭素源として成育中、グリオキシル酸の再生のためにエチルマロニル-CoA 経路（EMCP）を利用するが、本経路上には C_5 モノマーの前駆体となるプロピオニル-CoA が存在する。そこで、細胞内のプロピオニル-CoA 量を増やすことを目的として、EMCP 上でプロピオニル-CoA からメチルマロニル-CoA への変換反応を触媒するプロピオニル-CoA カルボキシラーゼ酵素遺伝子を破壊した。その結果、組換え株はメタノール生育能を失ったが、一段目にコハク酸を炭素源として培養し、二段目に窒素源を添加しない培地にメタノールを加えた培地で培養する二段培養を行った結果、C_5 モノマー分率の著しい上昇を認めた。これらの結果により、本菌内でモノマー供給バランスを制御することで、メタノールを原料として様々なモノマー組成を有する PHA を合成することが可能になることが示された。

polyhydroxyalkanoate, methanol, *Methylobacterium extorquens*

講演番号：4C12a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ C 校舎 12 会場

植物油を単一炭素源としたポリ(3-ヒドロキシブタン酸-*co*-3-ヒドロキシアルカン酸)の微生物合成

Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-mcl-3-hydroxyalkanoate) from Vegetable Oil by Engineered *Ralstonia eutropha*

○明智 聡、清水 理恵、折田 泉、中村 聡、福居 俊昭（東工大院生命理工）
○Satoshi Akechi,Rie Shimizu,Izumi Orita,Satoshi Nakamura,Toshiaki Fukui (Tokyo Tech.)

【目的】ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は多くの微生物が細胞内で蓄積するポリエステルであり、生分解性・生体適合性・熱可塑性の性質から生分解性プラスチックとしての利用が期待されている。代表的な PHA 生産菌 *Ralstonia eutropha* は糖や植物油から P(3HB) ホモポリマーを蓄積するが、P(3HB)は硬く脆い物性のため構造材料としての利用は困難である。一方、*Pseudomonas* sp. 61-3 は中長鎖のユニットを含む P(3HB-*co*-3HA)共重合体を生合成する。この共重合体は P(3HB)と比較して融点・結晶化度が低下し、柔軟性が改善されたポリエステルであることが報告されている。*Pseudomonas* sp. 61-3 由来 PHA シンターゼ 1（PhaC1$_{Ps}$）は広基質特異性であり炭素数 4 の 3HB-CoA と炭素数 6～12 の mcl-3HA-CoA を重合できるが、mcl-3HA-CoA に対して高い活性を示す。これまでに本酵素の進化工学的改変が試みられ、重合特性の異なる様々な変異体が取得されている。本研究では *phaC1*$_{Ps}$ を *R. eutropha* の染色体に導入することにより、物性の優れた P(3HB-*co*-3HA)を効率的に生産することを目的とした。

【方法および結果】植物油から P(3HB-*co*-3HHx)を効率的に生産する *R. eutropha* 改変株 NSDG 株を親株として相同性組換えにより PHA シンターゼ遺伝子が *phaC1*$_{Ps}$ およびその変異遺伝子に置換された組換え株を作製した。作製した組換え株を大豆油とフルクトースを炭素源とし培養し、得られた菌体から PHA 蓄積率と共重合組成を決定した。その結果、野生型 *phaC1*$_{Ps}$ 導入株は大豆油から 3HB 分率 63.2%の P(3HB-*co*-3HA)を生合成し、また変異型 *phaC1*$_{Ps}$ 導入株では得られた共重合体中の 3HB 分率が上昇した。NSDG 株の *pha* オペロンに *phaA*（チオラーゼ）欠失や *phaJ*（R-ヒドラターゼ）挿入を行った改変株についても同様に *phaC1*$_{Ps}$ 置換株を作製したところ、*pha* オペロンの構成による組成制御が可能であり、適度な柔軟性を示す約 10 mol%の mcl-3HA 分率の共重合 PHA の生合成が可能であった。しかし *phaC1*$_{Ps}$ 置換株の PHA 蓄積率は 3～31 wt%と親株に比べ顕著に低下した。これら *phaC1*$_{Ps}$ 置換株にさらに *phaC1*$_{Pa}$ 発現ベクターを導入したところ、PHA 蓄積率が 40 wt%に向上した。また特異的抗体を用いたウェスタンブロッティング解析を行ったところ、*phaC1*$_{Ps}$ の発現はフルクトース培養では確認されたものの、大豆油培養ではプラスミド導入株においても検出できないほど低いレベルであった。これらの結果から、*phaC1*$_{Ps}$ 導入株の低い PHA 蓄積率は *phaC1*$_{Ps}$ 発現量が十分でないことに起因すると強く示唆され、*phaC1*$_{Ps}$ の高発現により生産効率を改善できる可能性が考えられた。

polyhydroxyalkanoate, PHA synthase, *Ralstonia eutropha*

講演番号：4C12a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ C 校舎 12 会場

組換え *Escherichia coli* によるポリ(3-ヒドロキシプロピオン酸)の生合成

Biosynthesis of poly(3-hydroxypropionate) by recombinant *Escherichia coli*

○渡辺 将史[1]、堀川 洋[2]、向山 正治[2]、折田 和泉[1]、中村 聡[1]、福居 俊昭[1] ([1]東工大院生命理工、[2]日本触媒)
○Masashi Watanabe[1], Hiroshi Horikawa[2], Masaharu Mukouyama[2], Izumi Orita[1], Satoshi Nakamura[1], Toshiaki Fukui[1] ([1]Tokyo Tech., [2]Nippon Shokubai)

【目的】ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は様々な微生物がエネルギー貯蔵物質として蓄積する生分解性バイオマスプラスチックである。多くの微生物が蓄積する PHA であるポリ(3-ヒドロキシブタン酸）[P(3HB)]は硬く脆いため実用化には適していない。一方、ポリ(3-ヒドロキシプロピオン酸)[P(3HP)]は P(3HB)とは異なる結晶構造をとることから生分解性プラスチックの多様性を拡大できることに加え、加水分解によって得られる 3HP やその脱水物であるアクリル酸は工業原料として重要である。そこで本研究では、物質生産の宿主として優れ、PHA 合成能を有さない *Escherichia coli* に 3-ヒドロキシプロピオニル-CoA（3HP-CoA)生成経路を構築し、PHA シンターゼ（PhaC）により重合することでバイオマス原料から P(3HP)を生合成することを目的とした。

【方法および結果】3HP-CoA 生成経路として、*Chloroflexus aurantiacus* が有する炭酸固定経路中の酵素であるマロニル-CoA 還元酵素とアシル-CoA 合成酵素により細胞内アセチル-CoA から 3HP-CoA を生成する経路 （MCR 経路)と、*Klebsiella pneumoniae* および *Lactobacillus reuteri* が有するジオール脱水酵素と CoA 依存型プロピオンアルデヒド脱水素酵素によりグリセロールから 3HP-CoA を生成する経路（DD 経路）を *E. coli* で構築することを試みた。それぞれの経路を構成する遺伝子の発現ベクターを作製し、P(3HB)生産菌 *Ralstonia eutropha* 由来 *phaC* の発現ベクターと共に *E. coli* JM109(DE3)に導入した。作製した組換え株を 100 mM グリセロールを含む LB 培地で培養し、菌体内 PHA をメタノリシスしたのちにガスクロマトグラフィーにより分析した。MCR 経路を導入した組換え株では P(3HP)の蓄積は見られなかった。そこで、細胞内マロニル-CoA 濃度を高めるために *Corynebacterium glutamicum* 由来アセチル-CoA カルボキシラーゼ遺伝子を共発現させた結果、微量の P(3HP)を検出した。一方、DD 経路を導入した組換え株についても当初の培養では P(3HP)蓄積は見られなかったが、ビタミン B_{12} 依存型ジオール脱水酵素の機能発現を促すことを目的としてビタミン B_{12} を培地中に添加したところ、約 2.4 wt%の P(3HP)の蓄積を確認した。それぞれの経路を導入した組換え株について、各種培養条件を検討した結果を合わせて報告する。

polyhydroxyalkanoate, poly(3-hydroxypropionate), *Escherichia coli*

講演番号：4C12a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ C 校舎 12 会場

Ralstonia eutropha 由来 PHA 重合酵素の改変による 2-ヒドロキシブタン酸重合能力の強化
Engineering of PHA synthase from *Ralstonia eutropha* for enhanced 2-hydroxybutyrate polymerizing activity

○越智 杏奈[1]、大場 貴史[1]、坂井 浩平[1]、松本 謙一郎[1,2]、柘植 丈治[2,3]、田口 精一[1,2]([1]北大院工、[2]JST-CREST、[3]東工大)
○ ANNA OCHI[1], TAKASHI OOBA[1], KOUHEI SAKAI[1], KENICHIRO MATSUMOTO[1,2], TAKEHARU TSUGE[2,3], SEIICHI TAGUCHI[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]JST-CREST, [3]Tokyo Inst. Technol.)

【目的・背景】

ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、バイオマスから微生物によって生産されるバイオポリマーであり、PHA 重合酵素による 3-ヒドロキシアルカン酸の CoA 体の重合によって合成される。PHA 重合酵素は、これまでに 60 種類以上が単離・同定されており、その構造および基質特異性に基づいて 4 つの Class に分類されている。

最もよく研究されている PHA 合成菌である *Ralstonia eutropha* 由来 PHA 重合酵素($PhaC_{Re}$)は、Class I に属しており、主に 3-ヒドロキシブタン酸(3HB)を重合して P(3HB)を合成する。一方、近年 *in vitro* の研究で、野生型 $PhaC_{Re}$ が 2-ヒドロキシ基を持つ 2-ヒドロキシブタン酸(2HB)にも微弱な活性を持っていることが報告された。このことから、我々は、$PhaC_{Re}$ を用いて大腸菌内で 2HB を含むポリマーを合成することが出来ないかと考えた。

今回、$PhaC_{Re}$ の 2HB への活性を強化するために、2HB と同じく 2-ヒドロキシ基を持つ乳酸を重合可能な「乳酸重合酵素」に着目した。乳酸重合酵素は、本研究室において、Class II に属する *Pseudomonas* sp. 61-3 由来 PHA 重合酵素の高活性変異体($PhaC1_{Ps}$ ST/QK)として発見され、この酵素を用いて乳酸ポリマーの完全生合成系が構築されている[1]。さらに、最近の研究で本酵素が他の 2-ヒドロキシアルカン酸も重合可能であることが示されている。

そこで、本研究では、初代乳酸重合酵素である $PhaC1_{PS}$ ST/QK で得られた知見を用い、$PhaC_{Re}$ の 2HB に対する活性の強化、および得られた変異体を用いての 2HB ポリマーの生合成を目指した。

【方法・結果】

初代乳酸重合酵素である $PhaC1_{Ps}$ において、乳酸重合活性を付与する変異(Q481K)は他の 2HA モノマーの重合にも重要であることが分かっている。そこで、Q481 位に該当し、$PhaC_{Re}$ の A510 位に飽和変異を行い、変異型酵素遺伝子を作製した[2]。本遺伝子をモノマー供給系遺伝子と共に大腸菌に導入し、ポリマー蓄積条件で培養した。得られたポリマーを解析した結果、2HB ポリマーの合成が確認出来、$PhaC_{Re}$ 中 A510 位の変異が 2HB モノマーの重合に重要であることが分かった。

[1] Taguchi, S. *et al.* (2008), *Proc Natl Acad Sci USA,* 105(45): 17323.
[2] A. Ochi *et al.*(2012), *Appl Microbiol Biotechnol,* DOI 10.1007/s00253-012-4231-9

polyhydroxyalkanoate, PHA synthase, lactic acid

講演番号：4C12a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ C 校舎 12 会場

Delftia acidovorans DS-17 由来ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)重合酵素の特徴づけ及び組換え大腸菌を用いた PHA 生産への影響

Characterization of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase derived from *Delftia acidovorans* DS-17 and the influence of PHA production in *Escherichia coli*

○廣江 綾香、牛丸 和乗、柘植 丈治（東工大院総理工）
○Ayaka HIROE,Kazunori USHIMARU,Takeharu TSUGE (Tokyo Tech.)

【背景・目的】ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、糖や植物油など再生可能な資源から微生物によって合成されるバイオポリエステルであり、低環境負荷型のプラスチック材料として広く研究が進められている。PHA 合成関連遺伝子を導入した組換え大腸菌によって生産される超高分子量ポリ-3-ヒドロキシ酪酸(Poly-3-hydroxybutyrate; P3HB) (Mw≧300 万 g/mol)は、高強度な繊維やフィルムに加工できる点から、高効率な生産系の確立が望まれている。これまでに、*Delftia acidovorans* DS-17 由来の PHA 重合酵素($PhaC_{Da}$)を導入した大腸菌 JM109 株での PHA 生産では、特に分子量が高い超高分子量 P3HB の効率的な生産が報告されており、本研究では $PhaC_{Da}$ の特徴づけを行うと共に、本重合酵素がもたらす高分子量・高効率な PHA 生産メカニズムの検証を行うことを目的とした。
【実験】$PhaC_{Da}$ の特徴づけとして、界面活性剤による活性化効果及びキネティクスの解析を行った。$PhaC_{Da}$ 活性は、分光学的な測定から算出した。大腸菌 JM109 株内への $PhaC_{Da}$ 及び比較対象とした $PhaC_{Re}$ の導入による P3HB 生産への影響は、ガスクロマトグラフィー(GC)・ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)を用いた生産量と分子量の測定により評価した。さらに、組換え大腸菌 2 株の代謝解析として、リアルタイム PCR による P3HB 合成関連遺伝子(*phaA*, *phaB*, *phaC*) の転写解析、ウエスタンブロッティング及び活性測定による酵素(チオラーゼ(PhaA)・レダクターゼ(PhaB)・重合酵素(PhaC))の発現量及び活性解析を行った。
【結果・考察】$PhaC_{Da}$ は検証した 5 つの界面活性剤のうち TritonX-100 により最も活性化され、これは $PhaC_{Re}$ と同様であった。キネティクス解析からは、基質との親和性は、$PhaC_{Re}$ が $PhaC_{Da}$ よりも高く、一方で最大反応速度は $PhaC_{Da}$ が $PhaC_{Re}$ よりも高いことが示された。しかしながら、このキネティクスの違いは P3HB 生産には大きく影響しなかった。一方、組換え大腸菌株の代謝解析により、2 株間の P3HB 合成関連遺伝子の転写量は大きく変わらず、翻訳レベルにおいても PhaA 及び PhaB の発現量・活性レベルは同じであった。唯一の違いは、P3HB 合成の要である PhaC の発現量であり、可溶性 PhaC の存在量は $PhaC_{Da}$ が $PhaC_{Re}$ の 1/3 量であることがわかった。これらの解析から、$PhaC_{Da}$ 導入株における高分子量化と高生産化には、同等なモノマー量に対する $PhaC_{Da}$ の発現量の低さが最も重要な因子として作用していることが示唆された。

Polyhydroxyalkanoate, PHA synthase, Enzyme expression level

講演番号：4C12a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ C 校舎 12 会場

フェイシンタンパクが PHA 重合酵素の in vitro 重合活性に与える影響

An in vitro effects of phasin proteins on polymerization reaction by PHA synthase

○牛丸 和乗、柘植 丈治（東工大院総理工）
○Kazunori USHIMARU,Takeharu TSUGE (Tokyo Inst. Technol.)

【諸言】ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は糖や植物油といったバイオマス資源から微生物合成可能な生分解性プラスチックであり、環境低負荷型の高分子材料として注目を集めている。この PHA の生合成において最も重要な役割を果たすのが PHA 重合酵素(PhaC)である。PhaC 以外にも PHA 生合成に関するタンパク質は多数知られている。なかでも、細胞内で生成される PHA 顆粒に結合し、顆粒サイズ制御に関与していると考えられる PHA 顆粒結合性タンパク質であるフェイシン(PhaP)については、それ以外の機能を有する可能性が考えられる。本研究ではアフィニティークロマトグラフィーにより精製した *Aeromonas caviae* 由来 PhaC ($PhaC_{Ac}$) および PhaP ($PhaP_{Ac}$)と、化学合成により調製したモノマーから成る in vitro 反応系を用いて、PhaP が PhaC の重合活性に及ぼす影響を調べた。

【方法および結果】PhaC および PhaP は、遺伝子組換え大腸菌を用いて過剰発現後、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。精製した PhaC と PhaP、化学合成した(*R*)-3HB-CoA（モノマー）を混合し、チオエステル結合の減少を 236 nm における吸光度変化から追跡することで、重合反応をモニターした。

$PhaC_{Ac}$ の重合活性を精製 $PhaP_{Ac}$ 存在下で測定したところ、$PhaP_{Ac}$ 濃度に依存して $PhaC_{Ac}$ による重合反応が活性化されることを見出した。

また、この現象の更なる解析として異なる細菌である *Ralstonia eutropha* 由来および *Delftia acidovorans* の精製 PhaC ($PhaC_{Re}$, $PhaC_{Da}$)を用いた解析も行ったところ、$PhaP_{Ac}$ による活性化は確認されず、逆に $PhaP_{Ac}$ 濃度依存的な重合阻害効果を示した。

PhaC の種類による違いに加えて PhaP の種類による効果の違いを検証するために *R. eutropha* 由来の PhaP ($PhaP_{Re}$)を精製し同様の試験に供したところ、$PhaP_{Re}$ も $PhaP_{Ac}$ と同様に $PhaC_{Ac}$ に対する活性化効果および $PhaC_{Re}$、$PhaC_{Da}$ に対する阻害効果を示した。

$PhaC_{Ac}$、$PhaC_{Re}$、$PhaC_{Da}$ はサブユニット構造や重合可能な基質の特異性から、いずれも同様の Class I 型の PhaC に分類されているが、PhaP による活性化効果は共通ではないことが分かった。一方で、$PhaP_{Ac}$ と $PhaP_{Re}$ は相同性が低いにもかかわらず、$PhaC_{Ac}$ に対して同様の活性化効果を示すことから、特定のアミノ酸配列やモチーフではなく PhaP の有する PHA 吸着能という機能がこの活性化に関与している可能性が考えられる。

polyhydroxyalkanoate, PHA synthase, phasin

講演番号：4C12a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ C 校舎 12 会場

PhaB 高活性体を用いた光学活性(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸生産の向上
Improvement of (*R*)-3-hydroxybutyrate production using engineered PhaB
○大井 俊彦[1,2]、本間 以祝[1]、渡辺 剛志[1,2]、松本 謙一郎[1,2]、田口 精一[1,2] ([1]北大院工、[2]CREST-JST)
○Toshihiko OOI[1,2], Inori HONMA[1], Tsuyoshi WATANABE[1,2], Ken'ichiro MATSUMOTO[1,2], Seiichi TAGUCHI[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]CREST-JST)

【目 的】微生物が菌体内に蓄積するポリヒドロキシブタン酸[P(3HB)]は、バイオポリエステルとしての利用が注目されているが、そのモノマー成分である 3-ヒドロキシ酪酸（3HB）は、光学活性を持つことから抗生物質や生理活性物質などのキラル合成の出発物質として有用である。微生物を利用した 3HB の生合成は、*R* 体特異的な高キラル選択性の酵素反応により進行するため、光学純度の高い(R)-3HB を生産することが可能である。(R)-3HB の生合成系はいくつか知られているが、いずれも P(3HB)の生合成経路を利用しており、グルコースから解糖系を経て生じるアセチル CoA（Ac-CoA）からβ-ケトチオラーゼ(PhaA)による二量化、NADPH 依存性アセトアセチル CoA リダクターゼ(PhaB)による還元反応で合成中間体である 3HB-CoA が生じるまでは共通している。演者らが新しく開発した(R)-3HB の生産システムは、3HB-CoA から 3HB を生成する反応にプロピオニル CoA 転移酵素(PCT)を用いることで、CoA 転移反応によりエネルギー損失なしに 3HB-CoA から 3HB が合成されると同時に、培地中に添加した酢酸から Ac-CoA が再生され 3HB 生合成に利用される効率的な生合成系となっている(1)。さらに本 3HB 生合成系によって 3HB 生産性を向上させることを目的に、本研究では各酵素反応の中で、唯一生体内で不可逆的に進行していると考えられるアセトアセチル CoA から 3HB-CoA への還元反応を触媒する PhaB に注目し、新しく取得した2種の PhaB の高活性変異体(2)を用いて 3HB 生産性向上について検討した。

【方法と結果】比活性が向上した 2 種の PhaB 高活性変異体の遺伝子を大腸菌に導入した。得られた組換え大腸菌は、グルコースを含む LB 培地で 30℃、24hr 振盪培養した。培養上清の 3HB は HPLC にて定量し、野生型 PhaB の場合と比較した。炭素源としてグルコースのみの培養条件では 3HB 生産量は、PhaB 高活性変異体と野生型 PhaB では変化しなかった。一方、さらに種々の濃度で酢酸を添加した条件で培養した場合、野生型 PhaB の場合と比較して、培養上清中の 3HB 生産量は 15-18%向上した。現在、さらに 3HB 生産性を向上させるために各種生産条件を検討している。

(1) Matsumoto K. et. al., Appl. Microbiol. Biotechnol. (2013) in press.
(2) 渡辺ら、平成 23 年度 日本農芸化学会大会講演要旨集、p.4.

3-hydroxybutyrate, 3HB, PhaB

講演番号：4C12a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ C 校舎 12 会場

動力学的解析および立体構造に基づいた進化型アセトアセチル-CoA レダクターゼの高活性化メカニズムの解明

Analysis of activity enhancing mechanism of engineered Acetoacetyl-CoA reductases based on their kinetics and crystal structures

○渡辺 剛志[1,3]、松本 謙一郎[1,3]、本橋 廉[1]、池田 弘二[2]、田中 良和[2]、姚 閔[2]、田中 勲[2]、田口 精一[1,3]([1]北大院工、[2]北大院生命、[3]JST-CREST)
○Tsuyoshi Watanabe[1,3], Ken'ichiro Matsumoto[1,3], Ren Motohashi[1], Koji Ikeda[2], Yoshikazu Tanaka[2], Yao Min[2], Isao Tanaka[2], Seiichi Taguchi[1,3] ([1]Grad. Sch. of Eng. Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. of Life Sci. Hokkaido Univ., [3]JST-CREST)

【目的】

NADPH 依存アセトアセチル-CoA レダクターゼ(PhaB)は、ポリヒドロキシブタン酸(PHB)のモノマーとなる 3-ヒドロキシブチリル(3HB)-CoA を生成する酵素である。我々は PHB および 3HB ベースポリマーの生産性向上を目的に、進化工学的手法を用いて PhaB 高活性化を試み、これまでに 2 種類の PhaB 高活性変異体(変異体 1 および変異体 2)の取得に成功した。本研究では、取得した変異体に関して、基質である NADPH とアセトアセチル-CoA に対する酵素動力学的解析を行うと共に、 PhaB 野生型および高活性変異体の結晶構造の比較を行い、高活性化メカニズムの解明を試みた。

【方法と結果】

野生型および変異型 PhaB の His-tag 融合タンパク質を大腸菌を用いて発現し、アフィニティーカラムにより精製した。動力学的解析の結果、Lineweaver-Burk プロットのパターンから PhaB の反応機構は逐次反応であり、PhaB は両基質と三者複合体を形成することが示唆された。変異体 1 および変異体 2 の k_{cat} 値は、野生型に比べて、それぞれ 2.5 倍、3.6 倍高く、ターンオーバーの向上が高活性化の主な要因であると考えられた。また、変異体 1 は NADPH に対する k_{cat}/K_m 値が野生型と比べて高く、一方、変異体 2 はアセトアセチル-CoA に対する k_{cat}/K_m 値が高くなっており、これら変異体は両基質に対する親和性に違いがあることが分かった。

次に 2 つの PhaB 高活性変異体がなぜ異なる基質親和性を持つかを構造から理解するために、野生型および変異型 PhaB の X 線結晶構造解析を行った。変異部位 1 および変異部位 2 は、それぞれ NADPH、アセトアセチル-CoA の基質結合部位に比較的近い位置に存在しており、基質認識に影響を与えていることが示唆された。この結果は、動力学的解析より示された PhaB 高活性変異体の基質に対する親和性の違いと一致した。また、PhaB を NADP+とアセトアセチル-CoA を用いて共結晶化させたところ、三者複合体の構造が観察され、動力学的解析の結果を強く支持した。

以上より変異型 PhaB の高活性化は、1)ターンオーバーの向上と 2)基質結合部位の微妙な変化によって成し遂げられたと考えられた。

Acetoacetyl-CoA reductase, in vitro evolution, activity enhancing mechanism

講演番号：4C12a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ C 校舎 12 会場

改変型重合酵素による 2-ヒドロキシブタン酸ベースポリマーの生合成と物性解析

A new engineered polymerase producing the 2-hydroxybutyrate-based polymers and their physical properties

○青木 駿介[1]、大場 貴史[1]、越智 杏奈[1]、松本 謙一郎[1,2]、田口 精一[1,2]（[1]北大院工、[2]JST-CREST）
○Shunsuke AOKI[1], Takashi OOBA[1], ANNA OCHI[1], Ken’ichiro MATSUMOTO[1,2], Seiichi TAGUCHI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Eng. Hokkaido Univ., [2]JST-CREST)

微生物が有するポリヒドロキシアルカン酸(PHA)合成酵素は、3-hydroxyacyl-CoA を重合して PHA を合成する。PHA は、近年石油資源の枯渇問題などから、バイオマスを原料として生産できるプラスチックとしても注目されている。PHA 合成酵素 PhaC は、3-hydroxybutyryl-CoA(3HB)などの 3 位以上に水酸基を有する基質しか認識しないと考えられていたが、当研究室では PhaC の機能改変により、2 位に水酸基を有する 2-hydroxybutyryl(2HB)-CoA をモノマーとして重合可能な変異型 PHA 合成酵素を取得することに成功した。本酵素を用いると、これまでの PHA には見られない 2HB ユニットを含む新規な２HB ベースポリマーが合成可能であるが、これまでに同定された 2HB 重合酵素によって合成されるポリマーの分子量が低い事が問題であった。そこで本研究では、2HB モノマーをより効率的に重合できる PHA 合成酵素を探索し、2HB ベースポリマーの材料物性を解析することを目的とした。

当研究室で保有する様々な PhaC およびその改変体についてポリマー合成を指標とした機能スクリーニングを行ったところ、由来の異なる二つの PhaC を融合させて作られたキメラ酵素が有意な 2HB の重合能力を有することを見出した。それぞれの野生型酵素は 2HB 重合能が微弱または検出されないことから、キメラ化によって 2HB 重合能が大幅に増強した事が分かった。本酵素を発現する組換え大腸菌を 2HB や 3HB を添加した培地で培養し、得られた菌体中に含まれるポリマーをガスクロマトグラフィーにより分析した結果、P(2HB-*co*-3HB)共重合体が合成されていることがわかった。得られたポリマーの分子量は 30 万程度とフィルム化するのに十分な値であり、且つこれまでに同定されていた 2HB 重合酵素によって合成されるポリマーよりも約 5 倍高かった。しかし、本共重合体中の 2HB 分率は 10 mol%程度で低い値であった。そこで、2HB 分率を向上させるために、過去の研究において PHA 合成酵素の基質特異性に影響を与える事を見出していた重要残基に変異を導入したところ、2HB 分率が向上した共重合体を合成可能な新たな変異酵素を創出することができた。次に、本酵素を用いて、培地中に添加する基質濃度の検討により、ポリマー中の 2HB 分率が異なる共重合体を合成した。ソルベントキャスト法によりポリマーのフィルムを作成し、これらのポリマーの熱的・機械的性質の解析を行った。

2-hydroxybutyric acid, Biobased polymer, PHA synthase

講演番号：4C12a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ C 校舎 12 会場

Metabolic engineering of b-oxidation pathway in *Ralstonia eutropha* for production of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) from biomass

○CHAYATIP INSOMPHUN, Jun Mifune, Yui Kawashima, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui (Tokyo Institute of Technology)

[Objective] Bacterial polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biodegradable thermoplastics produced from renewable biomass. Poly((*R*)-3-hydroxybutyrate-*co*-(*R*)-3-hydroxyhexanoate) [P(3HB-*co*-3HHx)] is one of the most useful PHAs, because it exhibits a lower melting point and higher flexibility than poly((*R*)-3-hydroxybutyrate), the most abundant PHA in nature. Our research group has developed recombinant strains of *Ralstonia eutropha* capable of producing P(3HB-*co*-3HHx) copolymer from vegetable oils. However, further efficient microbial production and compositional regulation are required to be developed for the practical applications. In this study, β-oxidation in *Ralstonia eutropha* was genetically modified for enhancement of 3HHx fraction in P(3HB-*co*-3HHx).

[Methods and Results] Based on *R. eutropha* H16 genome information, we estimated that three *fadB* homologs (*fadB1*, *fadB2* and *fadB*) may encode bifunctional enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase involved in β-oxidation pathway. These genes were individually disrupted in one of the P(3HB-*co*-3HHx)-producing strain of *R. eutropha*, a strain NSDG. The effects of gene disruption were investigated on both fructose and soybean oil in a nitrogen-limited mineral salts medium. Deletion of *fadB*s from the chromosome did not affect to PHA production when fructose was used as a carbon source. On soybean oil, no change was observed with deletion of *fadB2*. *fadB'* deletion resulted in decrease of PHA productivity caused by decrease of 3HB monomer, while *fadB1* deletion could slightly enhance 3HHx composition with only little decrease of PHA content. Double deletion of *fadB1* and *fadB'* led to drastic decrease of PHA productivity, indicating that the two *fadB* homologs played major roles in β-oxidation by *R. eutropha*. We further examined the effects of *fadB1* deletion in several strains of *R. eutropha* previously engineered for P(3HB-*co*-3HHx) production. The results demonstrated that the modification in β-oxidation was effective for increase of 3HHx composition in the copolyester without negative impact on cell growth and PHA production on soybean oil, probably due to increased intracellular concentration of 2-enoyl-CoA intermediates by the *fadB1* deletion.

polyhydroxyalkanoate, beta-oxidation, *Ralstonia eutropha*

講演番号：4C12a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:12～ C 校舎 12 会場

Corynebacterium glutamicum をプラットフォームとしたポリ乳酸様ポリマー合成系の効率化のための代謝工学および培養工学的アプローチ

Metabolic and fermentation engineering for efficient production of polylactate-like polyester in *Corynebacterium glutamicum*

○飛谷 康太[1]、宋 育陽[1]、松本 謙一郎[1,2]、田口 精一[1,2] ([1]北大院工、[2]JST-CREST)
○Kota TOBITANI[1], Yuyang SONG[1], Ken'ichiro MATSUMOTO[1,2], Seiichi TAGUCHI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Eng. Hokkaido Univ., [2]JST-CREST)

【目的】ポリ乳酸(PLA)は高い透明性と優れた加工性を兼ね備えたバイオプラスチックであり、石油由来樹脂の代替材料として最も実用化が進んでいる。PLA は、乳酸発酵と重金属触媒を用いた化学重合を組み合わせたプロセスで生産されており、有害な触媒の残留が問題点として指摘されていた。我々はこれまでに、微生物のポリヒドロキシアルカン酸(PHA)重合酵素の改変により天然では見られない乳酸モノマーを重合可能な乳酸重合酵素(LPE)を創出し、乳酸発酵と重合が一体化した一段階のバイオプロセスにより乳酸ポリマーを合成することに成功した。さらに我々は、モデル系として用いた大腸菌から、内毒素を含まず安全性の確立された宿主として工業的に広く利用されているコリネ菌(*Corynebacterium glutamicum*)へとプラットフォームを拡大した。その結果、大腸菌では合成が不可能だった高分率の LA(99.3 mol%)を含む PLA 様ホモポリマーを合成することに成功したが、そのポリマーの蓄積率は乾燥菌体重量の 1.7 wt%と低いものであった。そこで本研究では、コリネ菌を用いた乳酸ベースポリマーの生産性の増強を目的として、種々の検討を行った。
【方法】乳酸ベースポリマーの生合成に必要な酵素 D-lactate dehydrogenase(DLDH)、Propionyl-CoA transferase(PCT)、乳酸重合酵素 PhaC1(ST/QK)をコードする遺伝子群をエレクトロポレーション法で *C. glutamicum* に導入した。得られた組換え株を、グルコースを炭素源とする無機塩培地で培養し、乳酸ベースポリマーを生合成した。合成されたポリマーおよび培地上清中の乳酸の分析は HPLC で行った。
【結果】複数の *C. glutamicum* 菌株を用いてポリマー生産を行い、乳酸ポリマーの合成能の高かった宿主を選択した。コリネ菌による乳酸の生産は嫌気条件で促進することが知られていたため、ジャーファーメンターを用いて酸素供給速度を変えて培養を行った。その結果、嫌気培養下では、乳酸ポリマーの蓄積率は上昇するものの菌体量が減少したため、総ポリマー生産量は好気条件と大きく変わらないことが分かった。さらに、乳酸ポリマーの合成が天然の PHA モノマーである 3HB の添加により促進される事が知られていたため、3HB を培地中に添加した条件で乳酸ポリマーの合成を試験管で行い、その効果を調べた。その結果、3HB の添加により乳酸ポリマーの蓄積量が増大する事が分かった。以上の条件検討の結果、これまで行っていた試験管での振とう培養に比べ、乳酸ポリマーの生産性を約 10 倍に向上させる事ができた。

Polyhydroxyalkanoate, Lactic acid, Biobased plastic

講演番号：4C12a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:24～ C 校舎 12 会場

Geobacillus sp. UZO 3 株が持つダイオキシン・2,3,7,8-TCDD 分子内ジアリールエーテル結合還元開裂酵素の生化学的・遺伝学的研究
Biochemical and genetic studies on the reductive cleavage of diaryl ether bonds of dioxin "2,3,7,8-TCDD" by *Geobacillus* sp. UZO 3

○鈴木 悠造[1]、中村 雅哉[2]、大塚 祐一郎[2]、川上 健志[1,3]、佐藤 かんな[1]、梶田 真也[1]、菱山 正二郎[2]、亀山 敏治[4]、高橋 惇[3]、片山 義博[5] ([1]東農工大 BASE、[2]森林総研、[3]高砂熱学工業株式会社、[4]環テックス株式会社、[5]日大生資科)
○Yuzo SUZUKI[1], Masaya NAKAMURA[2], Yuichiro OTSUKA[2], Takeshi KAWAKAMI[1,3], Kanna SATO[1], Shinya KAJITA[1], Shojiro HISHITAMA[2], Toshiji KAMEYAMA[4], Atsushi TAKAHASHI[3], Yoshihiro KATAYAMA[5] ([1]Tokyo Univ. Agri. Tech., [2]FFPRI, [3]Takasago Thermal Engineering Co. Ltd., [4]Kantteku Co. Ltd., [5]Nihon Univ.)

ダイオキシン類をはじめとする環境ホルモンと称された環境化学物質は、数年前までマスコミ・社会を大いに賑わせ、その問題を解決するために多面的な取り組みがなされてきた。中でもダイオキシンに関する研究は一種の研究ブームとまでなった。しかし、環境化学物質に関する研究の難しさから、期待されたような科学的・社会的に認知される成果を得るには至らなかった。2000 年に施行された「ダイオキシン類特別措置法」により、発生源の改善策が進められたため、産業廃棄物処理施設などからのダイオキシン類の排出量は大幅に減少し、推計排出量はピーク時と比べて約 95%まで削減されたことが確認された。しかし、2004 年の中央環境審議において、ダイオキシン類は環境中で分解しにくく、一度排出されたものの多くは土壌や湖沼・港湾の底質に蓄積されていくため、長期的にそのリスクを管理していくことが必要であるとの提言がなされた（環境省より）。さらに、近年ではダイオキシン類において最強毒性を持つ異性体 2,3,7,8-TCDD の病理作用に関する医学研究が進み、従来から知られている Ah receptor を介した生殖制御の撹乱だけでなく、ユビキチン・リガーゼ複合体形成に作用してタンパク質分解に影響し、発ガンや奇形を誘発する事、染色体のエピジェネティクスを撹乱して、生物の基本的な制御機構に深刻な影響を及ぼす事が示されている。これら最新の医学研究は、土壌や湖沼の底質に広く蓄積している 2,3,7,8-TCDD の分解処理技術研究の重要性を改めて提起している。

本研究で用いた *Geobacillus* sp. UZO 3 株は、2,3,7,8-TCDD を含む複数のダイオキシン異性体を網羅的に焼却飛灰中から減少させることが報告された好気高温菌である。本菌の機能解析により、ダイオキシン汚染浄化システムの開発が期待される。本研究は、*Geobacillus* sp. UZO 3 株における 2,3,7,8-TCDD 分解反応機構を解明し、分解酵素遺伝子をクローニングする事により、科学的に認知される 2,3,7,8-TCDD 分解酵素研究を確立する事を目的とした。

我々は、農芸化学会 2012 年度大会において、*Geobacillus* sp. UZO 3 株の培養細胞から調製した cell-free extract が、2,3,7,8-TCDD の diaryl ether 結合を順次還元的に開裂する事を報告した。検出された分解中間体の構造から、2,3,7,8-TCDD の diaryl ether 結合を還元的に開裂する酵素が、これまでに例のない新規のダイオキシン分解酵素であり、glutathione-S-transferase に類似した還元開裂酵素の一種であることが示唆された。今回、我々は、*Geobacillus* sp. UZO 3 株が持つ 2,3,7,8-TCDD 分子内 diaryl ether 結合還元開裂酵素の機能をさらに明らかにし、構造を決定するために、酵素遺伝子のクローニングを行った。

dioxin, 2,3,7,8-TCDD, microbial degradation

講演番号：4C12a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:36～ C 校舎 12 会場

油兆試料から構築した n-アルカン分解メタン発酵共生系の群集構造解析

Microbial community analysis on an n-alkane-degrading methanogenic community from an oil indication

○中村 浩平[1]、早川 沙也加[1]、小栗 正大[2]、新里 尚也[3]、高見澤 一裕[1] ([1]岐大応生、[2]岐大院応生、[3]琉大熱生研)
○Kohei NAKAMURA[1], Sayaka HAYAKAWA[1], Masahiro OGURI[2], Naoya SHINZATO[3], Kazuhiro TAKAMIZAWA[1] ([1]Gifu Univ., [2]Gifu Univ., [3]Univ. Ryukyu)

【背景・目的】原油貯留層から原油を回収する際，貯留層圧力の低下とともに原油の産出量は低下する。そのため，貯留層内にガス，液体，化学薬品などを添加し，圧力の回復，または原油粘度を低下させ原油の回収する Enhanced Oil Recorvery (EOR)技術がある。しかし，これらの技術を活用しても層内には多くの原油が残存する。そこで，原油をメタン発酵し，①原油粘度の低下，②メタン発生による層圧力回復，③原油及びクリーンエネルギーであるメタン回収，を行う Methanogenic EOR ('MeEOR')技術に注目が集まっている。Zengler ら(1999 年)によって、原油の主成分である *n*-アルカンのメタン発酵が報告されて以降，いくつかの油田やその関連施設から同様の現象が見出されている。しかし，このような環境において，*n*-アルカンを分解し水素発酵を行う微生物の詳細は未解明のままである。我々は'MeEOR'技術のカギ微生物ともいえる *n*-アルカン分解水素発酵微生物の取得と性状の解明を目指し，油兆試料から *n*-アルカン分解メタン発酵共生系を構築しその群集構造を解析した。
【方法】新潟県内の油兆から試料を採取し，*n*-アルカン混合物(C_8H_{18}, $C_{12}H_{26}$, $C_{16}H_{34}$)を添加した嫌気無機塩培地に植種した(w/ alkane 培養系)。同時に *n*-アルカン混合物を添加しない培養系，高圧蒸気滅菌した試料を植種し *n*-アルカン混合物を添加した培養系(kill ctrl)を準備した。これらを 30℃で静置培養し，経時的に気相メタン量を GC-FID で測定した。培養 441 日後に w/ alkane 培養系と kill ctrl 培養系に heptamethylnonane を添加してアルカンを抽出し，GC-MS で定量した。培養前後の細菌群集構造の変化を 16S rRNA 遺伝子に基づくクローンライブラリー法で解析した。
【結果・考察】w/ alkane 培養系からは培養に伴いメタンが生成され，その培養 441 日後のメタン量は他 2 つの培養系のものと比較して顕著に大きく，*n*-アルカン分解によるメタン生成が示唆された。培養 441 日後の w/ alkane 培養系と kill ctrl 培養系の残存 *n*-アルカン量を定量した結果，両培養系の C_8H_{18} 量に顕著な差がみられ，メタン発酵が C_8H_{18} 分解のみに基づくと仮定した場合，メタン生成量は化学量論のおよそ 8 割であった。クローンライブラリー解析の結果，油兆試料中の細菌群集(*n*=142)は 14 門から成り，Proteobacteria 門が全体の 46%を占めた。441 日培養後の w/ alkane 培養系(*n*=92)は 9 門で構成され，Firmicutes 門が 56%を占め，Proteobacteria 門は 18%となった。培養後，Proteobacteria 門内では Syntrophaceae 科の未培養細菌のみとなり，Firmicutes 門では Peptococcaceae 科の未培養細菌が優占化した。これらの未培養細菌は，アルカン分解メタン発酵培養系内や原油汚染土壌等からも検出されており，アルカン分解に関与する可能性が示唆された。

MEOR, syntroph, crude oil

講演番号：4C12a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:48～ C 校舎 12 会場

セルロース系バイオマスを原料とした微生物燃料電池の開発

Development of microbial fuel cells generating electricity from a cellulosic biomass.

○小嶋 章宏[1]、中村 浩平[2]、高見澤 一裕[2] ([1]岐大院応生、[2]岐大応生)
○Akihiro KOJIMA[1], Kouhei NAKAMURA[2], Kazuhiro TAKAMIZAWA[2] ([1]Gifu Univ., [2]Gifu Univ.)

【背景及び目的】

セルロース系バイオマスからのエネルギー回収方法として微生物燃料電池 (Microbial Fuel Cell, MFC)を検討した。鉄還元菌とエタノール発酵性酵母の共培養系を利用した MFC によってセルロース系バイオマスである刈り芝酵素糖化液からの電気生産を試みた。また比較として、水田土壌集積培養系中の微生物群集を用いた芝糖化液からの電気生産を行った。

【方法及び材料】

共培養系には､本研究室で分離したエタノール資化性鉄還元菌 *Geobacter* sp. OSK2A 株及びエタノール発酵性酵母 *Saccharomyces cerevisiae* NBRC2343 を用いた。また水田土壌集積培養系は、セルロースパウダーを基質とした MFC リアクター内で 5 ヶ月間集積培養を行い構築した。

N_2/CO_2 ガスで嫌気状態した無機塩培地にアクレモニウムセルラーゼによって芝粉末を酵素処理した糖化液を添加し、上記 2 種類の培養液を植種した。植種を行った槽には炭素繊維フェルトで作成したアノードを挿入し、カソードには白金触媒を塗布した炭素繊維紙を利用してエアカソード式の MFC リアクターを構築した。それぞれの電極を 510 Ωの外部抵抗を経由して電気回路で接続した。電圧の経時変化をデジタルマルチメーターで記録し、適宜サンプリングした試料から低級脂肪酸及び糖の濃度を HPLC、エタノール濃度を酵素法を用いて測定して MFC の評価を行った。

【結果】

共培養系では培養 40 時間で芝糖化液中の 2.6 mM D-グルコースを完全に消費し、最大 230 mW/m^2-Cathode を出力した。また、D-グルコース消費に伴ってエタノール及び酢酸の生成が確認されたことから、芝糖化液中の D-グルコースが *S. cerevisiae* NBRC2343 によってエタノールに、エタノールが *Geobacter* sp. OSK2A 株によって酢酸へと変換されて電気生産に使用されたと考えられる。この系の D-グルコース消費量から算出したクーロン効率は 3.6 %となった。

水田土壌集積培養系では 48 時間で 2.6 mM D-グルコースが完全に消費されると共に電気生産が確認され、最大 44 mW/m^2-Cathode を出力した。D-グルコース消費量から算出したクーロン効率は 2.2 %であった。酢酸濃度の増加は確認されず、*S. cerevisiae* と *Geobacter* sp. OSK2A 株の共培養系における電気生産までの物質変換プロセスとは別の物質変換が起きたと考えられる。

Microbial fuel cell, Cellulosic baiomass, Air cathode

講演番号：4C20a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ C 校舎 20 会場

海洋共生渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp.由来の新規巨大代謝産物の単離、構造解析

Isolation and structural elucidation of a novel large metabolite from the marine symbiotic dinoflagellate, *Symbiodinium* sp.

○小野寺 健一 (高知大, 総合研, IMT)
○KENICHI Onodera (Science Research Center, Kochi Univ., IMT)

【目的】海洋渦鞭毛藻類は海洋に生息する単細胞の微小藻類である。この藻類は巨大で多様な化学構造を有する生理活性物質を生産することで知られている。中でも *Symbiodinium* sp. はサンゴ等の海洋無脊椎動物と共生をしており、その現象も大変興味深い。演者らは共生渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp. が生産する巨大代謝産物に興味をもち、それらの化学構造を決定してきた。今回、この藻類について更なる巨大分子の発見を目的とし探索を行ったところ、新規代謝産物を発見したので、これの単離と構造解析を行った。

【方法、結果】代謝産物探索を行う為に、まず *Symbidinium* sp. の培養を行った。*Symbidinium* sp. (Y6 株) を ES 海水培地で 25℃、12 時間明、暗の条件で 40 日間培養を行った。得られた藻体は 70% エタノールで抽出し、その抽出物をブタノールで液々分配を行った。新規巨大代謝産物はブタノール層に検出されたため、ブタノール溶出画分をポリスチレン、イオン交換の 2 度のカラムに付し精製を行い、さらに 2 度の逆相 HPLC を行って単離した。ブタノール溶出画分 2.1 g から 2.8 mg の代謝産物を獲得した。巨大代謝産物は MALDI-TOF-MS 測定で *m/z* 2860 のイオンを示した。また、^{1}H-NMR 測定の結果より、この代謝産物はラクトン化合物であり、また 1 個の硫酸基を含有することが示唆された。各種 NMR 測定を行い、この巨大代謝産物の構造を解明すべく現在構造解析中である。

Symbiodinium, dinoflagellate, zooxanthella

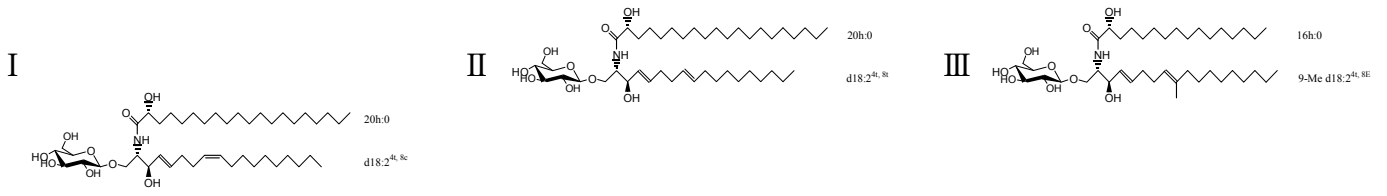
講演番号：4C20a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ C 校舎 20 会場

紫外線エンド吸収と分取セルを利用した脂質、糖質等の新規定量法

Quantitative HPLC analysis of lipids and saccharides using uv end-absorption

○松本 恵実、藤野 和孝、牧岡 富広、山本 諭志、石野 暢好、沢田 義治、中塚 進一 (長良サイエンス株式会社)
○Emi MATSUMOTO,Kazutaka FUJINO,Tomihiro MAKIOKA,Satoshi YAMAMOTO,Nobuyoshi ISHINO,Yoshiharu SAWADA,Shin-ichi NAKATSUKA (Nagara Science Co., Ltd.)

【目的】
脂質、糖質等は微量での定量分析法が求められているが、特徴的な UV 吸収がないため HPLC で一般的に用いられる UV 検出器による定量が極めて困難である。脂質の一種であるグルコシルセラミドは微量でも活性を発現することが知られ、ELSD 等の各種分析法が検討されてきた。しかしこれらの方法は定量の再現性、汎用性に限界がある。そこで UV 検出器でエンド吸収(UV_{200nm})と分取セルを用いた新規定量法を検討した。またその他の脂質、糖質等特徴的な UV 吸収がない化合物の定量への応用についても併せて検討した。
【方法】
1) グルコシルセラミドには二重結合が 1 つ以上存在し、UV_{200nm} 付近のエンド吸収があるので UV 検出器による定量が可能と考えた。しかしながらグルコシルセラミドの構成成分は二重結合の数やその幾何異性が異なる場合があり構成成分ごとに係数を検討する必要がある。そこでこれまでに分離精製した構成成分のうち、二重結合の数、ヒドロキシル基の数、側鎖の有無、幾何異性等で代表的な構造を持つ 6 種類を用いて定量法を検討した。
2) HPLC 用溶媒は溶媒中の不純物による UV 吸収の影響を低減したもので高価である。そこで UV 検出器のセルを分析用セル(セル長 10㎜)よりも狭い分取用セル(セル長 1㎜)にし、溶媒中の不純物の影響を低減させて通常の特級、一級の溶媒を使用できるか検討した。
3) 本法を用いて脂肪酸、糖鎖の分析を行なった。
【結果】
1) グルコシルセラミド構成成分 6 種類を UV 検出器のエンド吸収(UV_{200nm})で分析し検出感度を比較したところ構造による定量係数が得られ、0.5μｇの定量が可能であった。
2) UV 検出器のセルを分取用セルにすることにより、特級溶媒、一級溶媒でも UV_{200nm} の分析が可能となり、安価な定量・分取法を確立できた。
3) 本法が脂質、糖質等特徴的な UV 吸収がない化合物の定量に応用できることが分かった。



HPLC, quantitative analysis, uv end-absorption

講演番号：4C20a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ C 校舎 20 会場

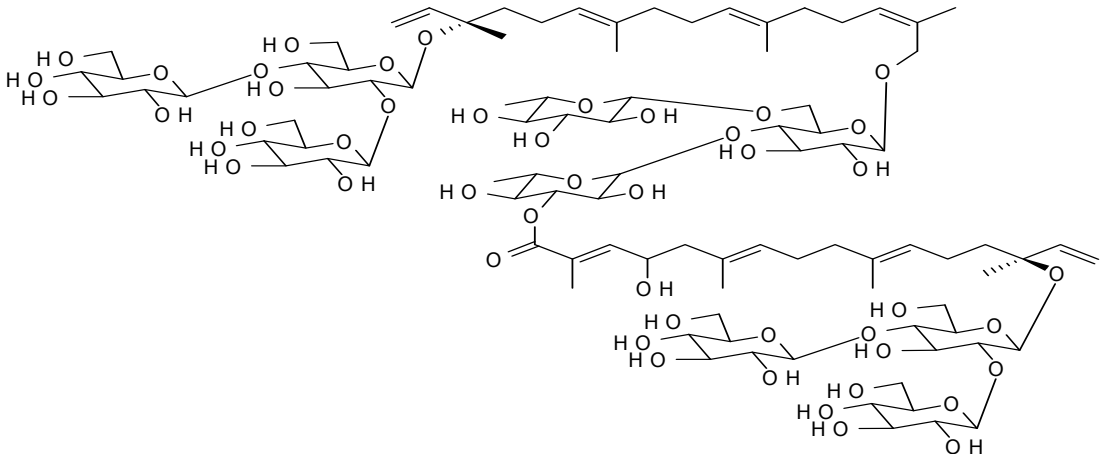
ピーマン胎座由来のマウス腸管免疫に影響を及ぼす物質の探索

Searching for compounds from placenta of green pepper which affect in mice Peyer's patch

○長谷川 功[1]、加藤 光[1]、高野 文英[2]、只野 武[1]、太田 富久[1] ([1]金大院薬、[2]日薬大)
○ Isao Hasegawa[1], Hikaru Kato[1], Takeshi Tadano[2], Takeshi Tadano[1], Tomihisa Ohta[1] ([1]Kanazawa Univ., [2]Nippn Pharm. Univ.)

ピーマンはよく知られている食材であり、料理によく使われている。カロテノイド、ビタミン、フラボノイドなど多数の栄養素を含んでいることが知られているが、生理活性についてはよく知られていない。先の研究において、トウガラシに含まれるカプサイシンが、マウスパイエル板におけるヘルパーT（Th）細胞由来のサイトカインを誘導させることが判明した。その他にもカプサイシンには TRPV1 に作用することが知られている。そこで、同属亜種であるピーマンにも、類似する作用を持つ化合物が含まれているのではないかと考え、ピーマンの胎座を分画することにした。ピーマン胎座の熱水抽出物から 1 種の新規化合物 capsianoside K (**11**) と 10 種の既知化合物、capsidiol (**1**), 9,10,11-trihydroxy-(12*Z*)-2-octadecenoic acid (**2**), capsianoside C (**3**), capsianoside XIII (**4**), capsianoside 1a (**5**), capsianoside D (**6**), 3-methoxy-4-(β-D-glucopyranosyloxy)-benzoic acid (**7**) and capsianoside IX (**8**), Feruloyl-β-D-glucopyranoside (**9**) and 2-(β-D-glucopyranosyloxy)-1-(4-hydroxy- 3-methoxyphenyl)-ethanone (**10**) を単離した。

単離された化合物、**1**, **3**, **6**, **7**, **8**, **9**, **10** についてマウスパイエル板におけるイムノグロブリン(Ig) A,G 産生量を測定したところ、**1** は LPS 刺激下、未刺激下両方において IgA, IgG の産生を抑制した。**3**, **6**, **7**, **8**, **9**, **10** は LPS 刺激下において抑制傾向を示した。



capsianoside K (**11**)

placenta of green pepper, Peyer's patch, capsianoside

講演番号：4C20a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ C 校舎 20 会場

Anti-inflammatory constituents from *Tabebuia avellanedae*

○Li Zhang[1], Suo Maorong[1], Isao Hasegawa[1], Tetsuro Kawabata[1], Fumihide Takano[2], Takeshi Tadano[1], Tomihisa Ohta[1] ([1]Kanazawa Univ., [2]Nippon Pharm. Univ.)

Background and Purpose

Tabebuia avellanedae is a tree in northeast of Brazil. The purple bark of this tree are called Taheebo and externally used as a poultice or concentrated tea for teeating a variety of skin inflammatory diseases including eczema, psoriasis, fungal infections and even skin cancer. The authors describes the isolation and structural determination of four lignan and four benzoyl apiosides from Taheebo, and anti-inflammatory activity.

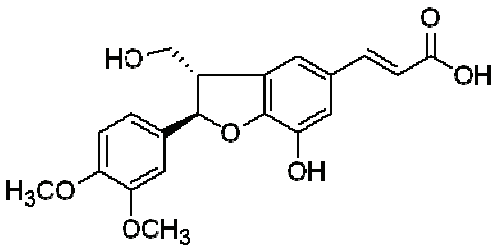
Method

Tabebuia avellanedae extracts was partitioned between EtOAc and H_2O. The EtOAc-soluble was subjected to column chromatography on silica gel and ODS, and finally obtained five new compounds (**1**-**5**) and three known compounds (**6**-**8**) by HPLC.

To measure cytokines production in cultured THP-1 cells, cultured THP-1 cells, culture supernatants were collected at 48 h and stored at -80˚C unit use. The TNF-α and IL-1β supernatant levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay using commercial kits according to the manufacturer's instructions.

Results

Five new compounds (**1**-**5**) and three known compounds (**6**-**8**) were isolated from the bark of *Tabebuia avellanedae*. These structiures of **1**-**5** was determined by 1D, 2D NMR and MS spectroscopic analyses. Compounds **1**-**5** (25 μM) decreased production of inflammatory cytokines, tumor necrosis factor-α and interleukin-1β, in cultured human monocytic THP-1 cells in response to lipopolysaccharide (LPS).



Compound **1**

tabebuia avellanedae, anti-inflammatory, lignan

講演番号：4C20a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ C 校舎 20 会場

固定化ウレアーゼを用いた新規ウレアーゼ阻害剤のスクリーニング

Screening of urease irreversible inhibitor with use of immobilized urease

○菅原 美花子 (神奈川工科大学)
○Mikako SUGAWARA (Kanagawa Institute of Technology)

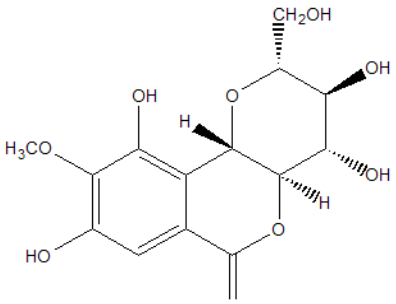
【目的】ピロリ菌(ヘリコバクター・ピロリ：*Helicobacter pylori*)は、ウレアーゼと呼ばれる酵素を生成し胃の内部を局所的に中和することで胃に着床し、胃潰瘍や胃癌の発症に関与することが知られている。尿素排出系の哺乳類は、ウレアーゼを有していないためウレアーゼ阻害剤が生理的な影響(副作用)の少ない抗ピロリ菌剤のターゲットとして期待されている。本研究室では固定化酵素を用いて阻害活性評価を行うことにより、持続性を有する（あるいは不可逆的な）阻害効果を持つ物質を容易に評価することができることを示してきている。これは、はじめに固定化酵素の活性を評価し、続いて阻害剤を作用させた状態で活性を評価することにより阻害能を、その後阻害剤を取り除き、基質を作用させ酵素活性を評価することで、阻害効果が持続しているか否かを評価することができることを原理としている。本研究では、固定化酸性ウレアーゼに対して持続的な阻害能を有する物質のスクリーニングを行った。
【実験方法】酵素の固定化は、ワコーゲル(C-300)を硝酸溶液で洗浄後、γ-APTES 処理によりアルキルアミノ化させ、グルタルアルデヒド処理を行った後、酸性ウレアーゼをカップリングさせることにより行った。酵素の活性評価は、尿素を基質にして 96 well プレート内にて固定化酵素と 5 分間、37℃で反応させた後に OPA 試薬と反応させて蛍光強度を測定することにより行った。阻害剤添加後、複数回基質を作用させることにより阻害の持続を評価した。阻害剤には市販生薬の 50 %エタノール抽出物を用いた。固定化酸性ウレアーゼを用いて尿素を基質として 288 種の生薬抽出物に対する阻害スクリーニングを行った。
【結果】スクリーニングの結果、34 種の生薬抽出物から阻害活性を得ることができた。また、阻害様式を既存のウレアーゼ阻害剤であるヒドロキシ尿素（拮抗阻害）やアセトヒドロキサム酸（非拮抗阻害）と比較した結果、楊梅皮や樸樕などにアセトヒドロキサム酸に似た持続性の阻害活性を見出した。特に楊梅皮抽出物の酢酸エチル層に含まれる水溶性の分画および樸樕抽出物の水層から高い持続性が確認された。楊梅皮に関しては単離・精製・構造解析を行い、阻害能を有している物質が myricitrin であることを確認した。樸樕に含まれる阻害物質に関しても併せて報告する。

urease inhibitor, crude drug, enzyme

講演番号：4C20a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ C 校舎 20 会場

Bergenia ligulata に含まれる DPPH ラジカル消去活性成分について
On the DPPH active constituents from *Bergenia ligulata*
○武山 佳代、貫名 学 (山形大農)
○Kayo TAKEYAMA,Manabu NUKINA (Yamagata Univ.)

【目的】*Bergenia ligulata*（パシャンベ）はユキノシタ科ヒマラヤユキノシタ属に属する多年草の植物である。ヒマラヤからインド北部の高原に自生し、耐寒性が非常に強い。この根は薬理効果として解熱、鎮咳効果を持つため、古来インド生薬として使用されてきた。しかし、その成分については多くは知られていない。そこで本研究では *Bergenia ligulata* の根に含まれる成分の中で特に DPPH 消去活性を示す成分を明らかにすることを目的とした。
【方法】*Bergenia ligulata* の乾燥根(156g)を、順次、ヘキサン、酢酸エチル、アセトン、メタノール、水(それぞれ 0.6 L x 2)に浸漬し、それぞれの抽出液を得た。ヘキサン、酢酸エチル、アセトン、メタノール画分はそれぞれ２回の抽出液を合わせた後、減圧濃縮し、また水画分は凍結乾燥した。ついで各抽出物の DPPH ラジカル消去活性の分析結果から、酢酸エチル区、アセトン区、水区の 3 つの画分について分画を進めた。酢酸エチル区と水区は、順相 SiO_2 クロマトグラフィー(それぞれ Hexane-EtOAc 系と CH_2Cl_2-MeOH-H_2O 系)で分画した。アセトン区は HPLC(ODS：CH_3CN-H_2O グラディエント溶出)を用いて更に分画を行った。各画分の DPPH ラジカル消去活性が強い部分について NMR 及び UPLC-ESI-MS 解析を行った。
【結果】最も多くの抽出物量が得られた水区（10.8g）の順相 SiO_2 クロマト(CH_2Cl_2:MeOH:H_2O=10:4:1)で溶出された分画（Fr.21）に見られた DPPH ラジカル消去活性物質は、スペクトル解析により β-arbutin であると思われ、その標品との比較により確認した。また、水区のクロマトの前半の画分(CH_2Cl_2:MeOH=10:1～CH_2Cl_2:MeOH:H_2O=10:2:0.5、Fr.1～20 を合わせた分画)からは弱い DPPH ラジカル消去活性を示す固体(57.4mg)が得られた。そのスペクトル解析により bergenin であると思われたので、標品との比較により同定した。また、アセトン区は最も強い DPPH ラジカル消去活性が見られ、arbutin が含まれていた。酢酸エチル区(9.4g)の TLC 分析では、多くの DPPH ラジカル消去活性を示すスポットが見られた。



bergenin

Bergenia ligulata, arbutin, bergenin

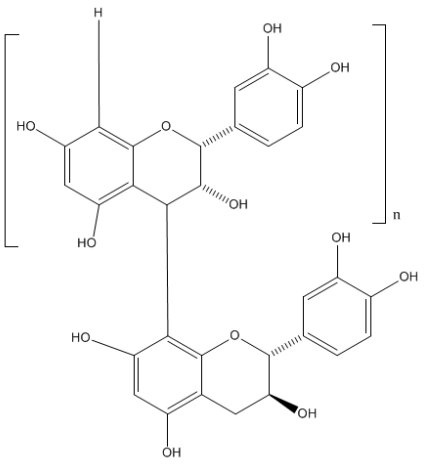
講演番号：4C20a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ C 校舎 20 会場

ヤマブドウ種子中の DPPH ラジカル消去活性物質について

On the DPPH active constituents from wild grapevine seed

○戸塚 紘二郎、貫名 学 (山形大農)
○Koujirou TOTSUKA,Manabu NUKINA (Yanagata Univ.)

【目的】庄内地方のワインの原料であるヤマブドウは、実に占める種子の割合が多く、果汁が原料の55%程で残りの 45%は廃棄されている。一般にブドウの種子中にはカテキン類やビタミン E などの抗酸化物質と共に特に強い抗酸化能を示すプロアントシアニジンが注目されている。そこでワイン製造過程で廃棄されているヤマブドウ種子等に含まれる抗酸化物質を明らかにすることを目的とした。
【方法】凍結乾燥させたヤマブドウ種子(100g)をミルで粉末にし、順次、ヘキサン、酢酸エチル、アセトン、メタノール、水（各々200ml で 2 回抽出し、各抽出液は合わせた）で抽出し、各抽出液を得た。それぞれの抽出物を順相および逆相の TLC で展開し、DPPH ラジカル消去活性を調べた。その結果、アセトン区とメタノール区に強いラジカル消去活性があった。メタノール抽出物(4.5g)を SiO_2 カラム（①Hexane-EtOAc=1:1,②EtOAc, ③EtOAc: MeOH=9:1,④EtOAc: $(CH_3)_2CO$=1:1,⑤$(CH_3)_2CO$:MeOH=9:1～1:9, ⑥MeOH,⑦MeOH:H_2O=9:1,⑧H_2O）で分画し Fr.1～fr.33 を得た。DPPH ラジカル消去活性は Fr.4～Fr.32 に見られた。Fr.4, Fr.7, Fr.11, Fr.13 については HPLC(ODS)と UPLC-ESI-MS(positive)で解析した。なお Fr.7 は NMR 解析も行った。
【結果】HPLC 分析(ODS(4.6x150mm),UV(254nm),0.8ml/min, CH_3CN:H_2O=15 : 85)により Fr.4(24.0mg)にカテキン(t_R=5.4min)およびエピカテキン(t_R=7.6min)を検出し、UPLC-ESI-MS 測定および標品との比較により同定した。Fr.7(111.6mg)の HPLC チャートには、t_R=2.0min ～12.0min にプロアントシアニジンと思われるピーク群が検出された。その UPLC-ESI-MS では、プロアントシアニジンの 2 量体(t_R=2.2min, m/z 579.1484 $[M+H]^+$)、3 量体(t_R=2.4min,m/z 867.2101 $[M+H]^+$)、4 量体 (t_R=2.5min, m/z 1155.2733 $[M+H]^+$) に相当するピークが得られた。この帰属は、市販されている OPC(oligomeric proanthocyanidins, USP Rockville, MD)の UPLC-ESI-MS 測定により確認された。



今回分析を行った4フラクション以外のフラクションやアセトン抽出区にもラジカル消去活性が見られたので、これらの活性物質についても報告する予定である。

proanthosyanidin, grape seed, antioxidant

講演番号：4C20a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ C 校舎 20 会場

アムラ果実エキスの成分研究

Polyphenolic constituents of Amla extract.

○好村 守生[1]、山上 沙織[1]、高田 瞳[1]、吉田 隆志[1]、吉川 伸二[2]、天倉 吉章[1] ([1]松山大薬、[2]日本新薬食開研)
○Morio YOSHIMURA[1], SAORI YAMAKAMI[1], Hitomi TAKATA[1], Takashi YOSHIDA[1], Shinji YOSHIKAWA[2], Yoshiaki AMAKURA[1] ([1]Matsuyama Univ., [2]NIPPON SHINYAKU CO., LTD.)

【目的】アムラ（Amla, *Emblica officinalis*）は Indian gooseberry とも呼ばれるトウダイグサ科植物で，インドではその果実あるいは果実の砂糖漬け等が一般食品として流通している．また，インド伝統医学（アーユルヴェーダ）においては強壮薬等に使用されており，重要な健康維持食品素材として扱われている．アムラ果実の成分としては，多量のビタミン C，ペクチンの他，タンニン類の報告もあり，ポリフェノール含有素材の一つにあげられる．当研究室では天然素材中のポリフェノール成分についての研究を行っており，本研究ではその一環として，アムラ果実から調製した抽出エキスに含まれるポリフェノール類について成分精査を行った．また，アムラには抗酸化活性に関する報告もあることから，Oxygen Radical Absorbance Capacity（ORAC）法による抗酸化活性を指標とした分画を行うとともに，単離した各化合物を評価した．

【方法と結果】アムラ果実エキス（アムラエキスパウダー）を *n*-ヘキサン，酢酸エチル，*n*-ブタノールで順次分配し，各分画物を得た．ORAC 法による抗酸化能評価で強い活性を示した酢酸エチルおよび *n*-ブタノール分画物について，Diaion HP-20，Sephadex LH-20，MCI-gel CHP20P 等の各種カラムクロマトグラフィーによる分離，精製を繰り返し，12 種の化合物を単離した．そのうち 10 種は既知化合物で，NMR 等の各種機器分析データの解析および標品との直接比較に基づき，*trans*-cinnamic acid，gallic acid，ellagic acid，malic acid 2-*O*-gallate，5-hydroxymethyl-2-furaldehyde，1-*O*-cinnamoyl-β-D-glucose ， 1,6-di-*O*-galloyl-β-D-glucose ， 1,2-di-*O*-galloyl-3,6-HHDP-glucose ，1-*O*-galloyl-2,4:3,6-bis-HHDP-glucose，mucic acid 2-*O*-gallate と同定した．他 2 種は文献未記載の化合物で，二次元 NMR 等を含めた構造解析の結果，それぞれ mucic acid 6-butyl ester 2-*O*-gallate (**1**), mucic acid 6-butyl ester 2,4-di-*O*-gallate (**2**) と構造決定した．また，単離した各化合物について ORAC 法による抗酸化活性を評価した結果，新たに構造解明した化合物 **1**, **2** を含む 7 種の化合物が高い ORAC 値（約 5,000 μmol TE (=Trolox equivalent)/g 以上）を示し，そのうち gallic acid が最も高い値を示した（約 13,000 μmol TE/g）．本エキスの成分精査で得られた化合物の大半が gallic acid のエステル体であることを考慮すると，gallic acid およびその誘導体がアムラ果実エキスの抗酸化活性に大きく寄与していることが考察された．

Amla, *Emblica officinalis*, polyphenol

講演番号：4C20a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ C 校舎 20 会場

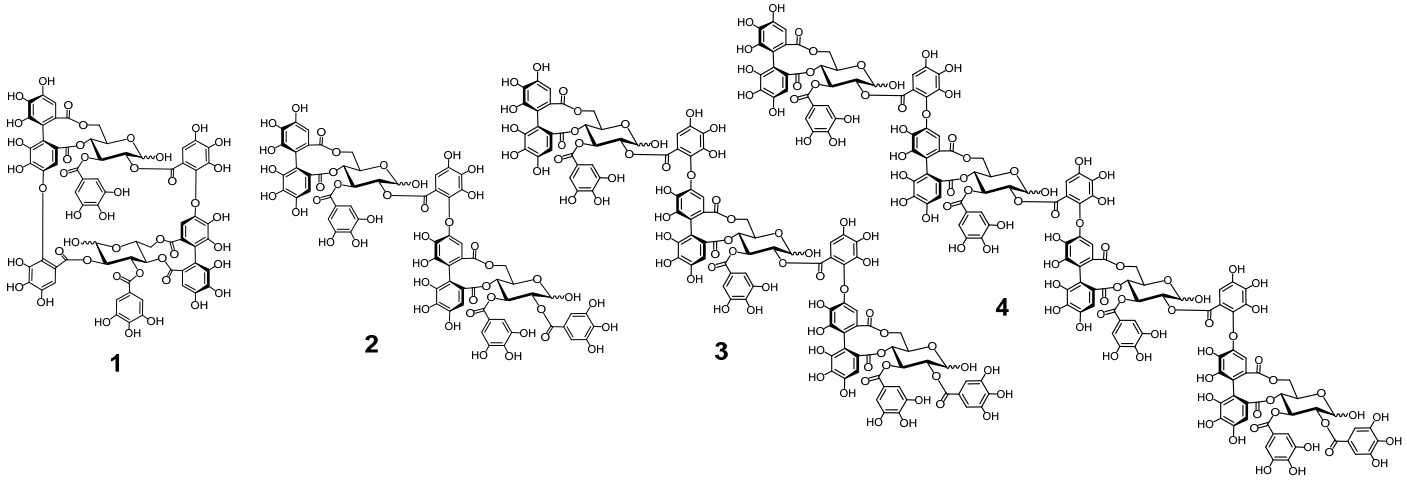
ザクロの新規エラジタンニンオリゴマーの構造

New ellagitannin oligomers from pomegranate pulp

○烏日娜[1]、李 鵬[1]、長友 暁史[2]、西田 典永[2]、伊東 秀之[1]([1]岡山大院医歯薬、[2]森下仁丹株式会社)
○Wurina[1], Peng Li[1], Akifumi Nagatomo[2], Norihisa Nishida[2], Hideyuki Ito[1] ([1]Okayama Univ., [2]Morishita Jintan)

【目的】ザクロ（*Punica granatum* L.）の果皮は中国で駆虫作用や整腸作用に使用され，欧米ではザクロの搾汁は飲料として広く親しまれている。我々は，ザクロ果皮エキスおよびザクロ由来ポリフェノール成分の Punicalin にビフィズス菌の減衰期における生存維持作用を有することを見出し、ザクロの伝承的な効能効果のひとつである整腸効果の作用機序解明に繋がる基礎データを得ている。[1)] さらに果実や各種市販飲料におけるザクロポリフェノールの組成分析の結果を報告したが，[2)] その際未同定成分の存在が認められた。そこで今回未同定成分の構造を明らかにするために，ザクロ果肉を分離，精製し，単離した成分の構造解明を行った。

【方法・結果】ザクロ果肉を 70% 含水アセトンでホモジナイズを行い，濃縮後，Diaion HP-20 に続き Toyopearl HW-40 カラムクロマトによる分離，精製を繰り返し，既知エラジタンニン２量体の Oenothein B (**1**), Eucalbanin B (**2**) を同定すると共に，新規エラジタンニン３量体および４量体も単離，構造解明し，それぞれ Pomegraniin A (**3**) および Pomegraniin B (**4**) と命名した。今回，ザクロに既知エラジタンニン２量体を含むエラジタンニンオリゴマーが存在することを初めて見出し，これらオリゴマーが各種市販ザクロジュースに含まれていることも明らかにした。さらにザクロの産地や成長過程において，エラジタンニンの成分組成が異なることも認められた。ザクロの機能性を検討するには，今回明らかにしたエラジタンニンオリゴマーも評価する必要性が示唆された。



1) 伊東秀之ら, 第 65 回日本栄養・食糧学会大会（2011, 東京）, 2) 李鵬ら, 第 66 回日本栄養・食糧学会大会（2012, 仙台）

Pomegranate, Ellagitannin, Pomegraniin

講演番号：4C21a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ C 校舎 21 会場

放線菌 *Streptomyces* sp. MK-19 株からの新規 bafilomycin 類縁体の単離と構造の決定
Isolation and structure determination of a new bafilomycin analogue from *Streptomyces* sp. MK-19

○肥田木 道生[1]、吉田 充[2]、小川 直人[3]、小谷 真也[4]（[1]静岡大院農、[2]農研機構食総研、[3]静岡大農、[4]静岡大院創造）
○Michitaka Hidaki[1], Mitsuru Yoshida[2], Naoto Ogawa[3], Shinya Kodani[4] ([1]Shizuoka Univ., [2]NFRI, NARO, [3]Shizuoka Univ., [4]Shizuoka Univ.)

【目的】抗生物質の探索源として放線菌は非常に重要な微生物であり、二次代謝産物の多様性から現在でも抗生物質探索の研究が世界中で行われている。本研究において新たに茶園土壌から放線菌の単離を行い、アセトン抽出物を用いた抗微生物活性のスクリーニングを行った。その結果、*Streptomyces* sp.MK-19 株において抽出物から抗酵母活性が見られたので、抗酵母物質の単離と構造決定を行った。
【方法】牧の原市の茶園土壌由来の *Streptomyces* sp.MK-30 株から新規マクロライド makinolide を得ている[1]。さらに詳細な活性試験を行ったところ、同時に得られた MK-19 株に酵母に対する生育抑制活性が見られた。そこで、MK-19 株の 16S rDNA の配列の解析を行ったところ、MK-30 株と相同性が 99%であることを明らかにした。寒天培養菌体をアセトン抽出し、抽出液を減圧濃縮後、逆相オープンカラムを用いた含水メタノールによって溶媒分画した。活性の見られた 100 %メタノール溶出画分から ODS カラムを用いた HPLC 分取によって新規抗酵母物質を単離した。
【結果】本物質はポジティブイオンモードの HR-ESI-MS 測定で *m/z* 611.39 にイオンピークを与えた。組成式は $C_{35}H_{56}NaO_7$ と推定され、Na イオン付加のイオンピークであることが示唆された。よって分子式 $C_{35}H_{56}O_7$ で分子量 588 Da であることが示唆された。さらに化学構造を決定するために、重アセトン中での各種 NMR スペクトラムの測定を行い、構造決定を試みた。COSY、TOCSY、HMBC、HMQC の二次元 NMR スペクトラムの測定の結果、新規 bafilomycin 類縁体であることが明らかとなった。その詳細な構造に関しては、現在解析中であり、本大会において発表する予定である。

1. Kodani S, Murao A, Hidaki M, Sato K, Ogawa N.
   Isolation and structural determination of a new macrolide, makinolide, from the newly isolated *Streptomyces* sp. MK-30. J. Antibiot 2012

Streptomyces, macrolide, antiyeast compound

講演番号：4C21a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ C 校舎 21 会場

Streptomyces sp. No.6982 株が産生する新規αアミラーゼ阻害剤 ASP5034
ASP5034, a novel α-amylase inhibitor from *Streptomyces* sp. No.6982

○笹村 智司[1]、笹村 裕美[2]、西脇 真哉[2]、村松 秀行[2]、田原 敦生[1]、松山 晃子[1]、高瀬 茂弘[1]、羽鳥 英孝[2]、中島 秀典[1] ([1]アステラス製薬株式会社、[2]アステラスリサーチテクノロジー株式会社)
○Satoshi Sasamura[1], Hiromi Sasamura[2], Shinya Nishiwaki[2], Hideyuki Muramatsu[2], Atsuo Tahara[1], Akiko Matsuyama[1], Shigehiro Takase[1], Hidetaka Hatori[2], Hidenori Nakajima[1] ([1]Astellas Pharma Inc., [2]Astellas Research Technology Co., Ltd.)

【目的】糖尿病治療薬の創製を目的に、微生物培養抽出物からαアミラーゼ阻害活性を有する化合物の探索を行った。
【結果】微生物培養抽出物からの探索の結果、放線菌 No.6982 株の培養抽出物がαアミラーゼ阻害活性を有することを見出した。No.6982 株は沖縄県西表島の土壌より分離された野生株であり、化学分類学的性状、生理的性状検討、形態観察および 16S rDNA 配列による系統解析の結果、*Streptomyces* 属に属すると考えられた。本株の培養抽出物よりαアミラーゼ阻害活性を有する ASP5034 を単離し、各種機器分析による解析を行ったところ、本化合物は分子式 $C_{94}H_{156}N_4O_{64}$ であり、アミノ糖構造を持った新規化合物であることが明らかとなった。ASP5034 はαアミラーゼに対して強力かつ選択的な阻害活性を有し、マウスを用いた in vivo 試験においてデンプン負荷による食後血糖上昇を抑制することが示された。以上の結果より、*Streptomyces* sp. No.6982 株が生産する新規αアミラーゼ阻害剤 ASP5034 に糖尿病治療薬として適用の可能性が示された。

alpha-amylase inhibitor, fermentation, natural product

講演番号：4C21a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ C 校舎 21 会場

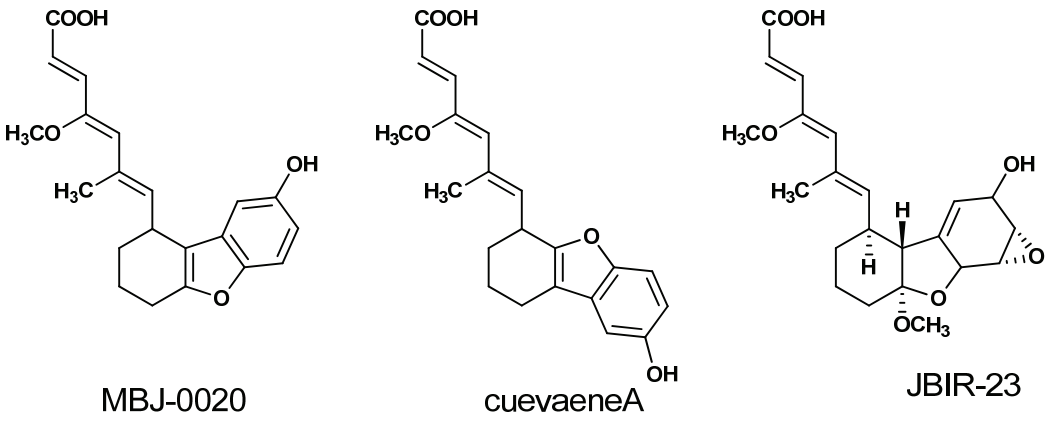
中皮腫細胞に対して細胞毒性活性を示す化合物 MBJ-0020 に関する研究

Studies on the cytotoxic compound MBJ-0020 acting on malignant pleural mesotheliona

○泉川 美穂[1]、伊藤 将士[2]、河原 哲平[1]、坂田 紀秋[2]、土田 外志夫[2]、新家 一男[3] ([1]JBIC、[2]日本マイクロバイオファーマ、[3]産総研)
○ Miho IZUMIKAWA[1], Masashi ITOH[2], Teppei KAWAHARA[1], Noriaki SAKATA[2], Toshio TSUCHIDA[2], Kazuo SHIN-YA[3] ([1]JBIC, [2]MBJ, [3]AIST)

【目的】悪性胸膜中皮腫は、胸膜を覆う中皮腫細胞由来の悪性腫瘍であり、その発症原因の多くはアスベストの暴露によるものである。現在、外科手術等を含め、有効な治療法が無いため、有効な治療薬の開発が望まれている。そこで本研究では、放線菌の二次代謝産物を主とした天然物から、中皮腫細胞に対して細胞毒性を示す化合物のスクリーニングを行った。

【方法と結果】ヒト由来中皮腫細胞である MESO-1 細胞に対する細胞毒性を指標に、微生物二次代謝産物を用いてスクリーニングを行った。その結果、*Streptomyces* sp. 30503 の培養液が、MESO-1 細胞に対して細胞毒性を示すことを見出した。細胞毒性活性を指標に、培養液のブタノール抽出物より、各種クロマトグラフィーにより精製を行い、活性化合物 MBJ-0020 を単離することに成功した。この化合物について、主に NMR を用いて構造解析を行った結果、中皮腫細胞に対する細胞毒性を示す化合物として報告している、JBIR-23 の構造類縁化合物であることが判明した。さらに、その構造は抗菌活性化合物 cuevaene A と類似するものであった。各種 NMR スペクトルの詳細な解析、JBIR-23 との構造類似性、および安息香酸を出発物質と考えられる生合成経路などの情報より、報告されている cuevaene A の構造は、本発表で示す MBJ-0020 の構造であると考えられた。本発表では、MBJ-0020 の単離・精製、構造解析、および細胞毒性活性について報告する。



MBJ-0020、cuevaene A、および JBIR-23 の構造

cuevaene A, JBIR-23, malignant pleural mesotheliona

講演番号：4C21a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ C 校舎 21 会場

植物から分離された希少放線菌の生産する新規物質の探索(2)
search for the new substance produce by rare actinomycetes isolated from plants (2)
○富田 智宏[1]、岩月 正人[2]、奥山 竜輝[1]、中島 琢自[3]、松本 厚子[2]、高橋 洋子[1,2]、森 美穂子[1,2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2] ([1]北里大感染制御、[2]北里大生命研、[3]北里大感染制御研究機構)
○Tomohiro Tomita[1], Masato Iwatuki[2], Ryuki Okuyama[1], Takuji Nkasima[3], Atuko Matumoto[2], youko Takahasi[1,2], Mihoko Mori[1,2], Satosi Oomura[2], Kazurou Siomi[1,2] ([1]Graduate School of Infection Control Sciences,Kitasato University, [2]Kitasato Institute for Life Sciences Kitasato University, [3]Research Organization for Infection Control Sciences Kitasato University)

【目的】放線菌の二次代謝産物からは多くの抗生物質が発見されている。しかし近年、新規物質の発見頻度の低下が問題となっている。そこで我々のグループでは新規物質をより効率良く発見するための工夫として代謝産物解析があまり進んでいない希少放線菌の分離を行っている。このような背景のもと植物から分離された希少放線菌の二次代謝産物解析を行い、それをもとに新規物質の探索を行った。

【方法】植物より分離された希少放線菌のうち生育の良好な 12 属 41 株の培養液を用いて、(1)LC-UV によるケミカルスクリーニング、(2)代表的なグラム陽性および陰性細菌、真菌からなる 6 種類の検定菌（*Bacillus subtilis, Kocuria rhizophila, Escherichia coli, Xanthomonas oryzae, Candida albicans, Mucor racemosus*）に対する抗菌活性スクリーニングを行った。
【結果】昨年度の年会においてクリーニングの結果、*X. oryzae* に対して抗菌活性を示し、植物分離希少放線菌の複数の菌株で生産される化合物群が aranciamycin 類であることを報告した [1)]。本年会ではその他の植物分離希少放線菌の代謝産物についても解析を行ったので報告する。

【K10-0487 株の生産物】抗菌活性スクリーニングより *Sphaerisporangium* 属の数株が *B. subtilis* に対する強い抗菌活性物質を生産することを見出した。そこで *Sphaerisporangium* sp. K10-0487 株培養液(10 L)より精製を行うことで活性物質一種を単離した。本物質は酸、メタノール、濃縮乾固に不安定であった。各種機器分析のより、本物質は新規ペプチド化合物と推定された。

【K11-0033 株の生産物】HPLC データのパターン比較より *Sphaerisporangium* 属の数株が特徴的な UV 吸収(λ max 299 nm) を有する化合物群を生産することを見出した。そこで *Sphaerisporangium* sp. K11-0033 株培養液(3 L)より化合物を精製している。

[1)]日本農芸化学会 2012 2A04p17

rare actinomycetes, plants, new substance

講演番号：4C21a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ C 校舎 21 会場

細菌 No.27 株の生産するアフラトキシン生産阻害物質の同定と No.27 株を用いたアフラトキシン汚染防除

Identification of aflatoxin production inhibitors produced by a bacterium No.27 and prevention of aflatoxin contamination by strain No.27

ジャムナク ウスマ[1]、チナプチ アマラ[2]、ポアポラセップ アムナート[3]、河合 亮[1]、長澤 道[1]、○作田 庄平[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]タイ農業協同組合省、[3]カセサート大学)
Jermnak Usuma[1], Amara Chinaphuti[2], Amnart Poapolathep[3], Ryo Kawai[1], Hiromichi Nagasawa[1], ○Shohei Sakuda[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Agriculture, [3]Kasetsart Univ.)

【目的】
熱帯、亜熱帯地域での農作物のアフラトキシン汚染は、深刻な健康被害および莫大な経済的損失を引き起こしている。しかし現在、実用的な汚染防除方法はほとんどなく、より効果的な防除方法の開発が急務となっている。当研究室では、アフラトキシン生産菌の成育には影響を与えず、二次代謝産物であるアフラトキシンの生産を抑制する物質は、早期に耐性菌が蔓延する恐れの少ないアフラトキシン汚染防除剤となり、また、カビの二次代謝の制御機構を探る上で有用であると考え、天然物由来のアフラトキシン生産阻害物質に関する研究を行っている。その中で昨年度の大会において、土壌より分離した細菌 No.27 株がアフラトキシン生産阻害物質を生産することを報告した。本研究では、No.27 株の生産する活性物質を単離・同定し、活性物質および No.27 株を用いてアフラトキシン汚染防除試験を行うことを目的とする。
【方法および結果】
No.27 株はグラム陰性細菌であり 16S rDNA 配列等より、生物農薬としての高いポテンシャルを持つ *Stenotrophomonas rhizophila* に最も近縁の *Stenotrophomonas* sp.と同定された。No.27 株の培養液上清を活性炭、溶媒抽出、逆相 HPLC で精製し、主要な活性物質として cyclo(L-Ala-L-Pro)および cyclo(L-Val-L-Pro)を単離・同定した。両化合物ともに *Aspergillus parasiticus* および *Aspergillus flavus* の液体培養におけるアフラトキシン生産を IC_{50} 値が 0.7 mM 程度で阻害したが、同濃度でアフラトキシン生産菌の成育には影響を与えなかった。Cyclo(Ala-Pro)の４種の立体異性体中、L-L 体のみがアフラトキシン阻害活性を示した。また、両活性物質は、アフラトキシン生合成中間体であるノルソロリン酸の生産を阻害し、アフラトキシン生合成制御タンパク質(AflR)および生合成酵素(PksA、OmtA) をコードする遺伝子の mRNA レベルを低下させたことより、AflR の発現に至る制御機構に作用点を持つと考えられた。液体培地で No.27 株とアフラトキシン生産菌を共培養すると、カビの成育は阻害されずにアフラトキシンの生産が強く阻害された。その No.27 株の強いアフラトキシン生産阻害効果は、生ピーナッツを用いた固体培養においても認められた。さらに、実際にアフラトキシン汚染が問題となるタイのピーナッツ貯蔵庫において試験を行ったところ、No.27 株の培養液で浸漬処理したピーナッツでは顕著なアフラトキシン汚染防除効果が認められ、No.27 株が生物農薬として有効であることが示された。

aflatoxin, inhibitor, Stenotrophomonas

講演番号：4C21a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ C 校舎 21 会場

タイ王国由来海洋放線菌からの新規生理活性物質の探索

Identification of novel bioactive compounds produced by marine actinomycetes

○上口 達也[1]、木谷 茂[2]、アリンチップ タムチャイピネット[3]、五十嵐 康弘[4]、仁平 卓也[2] ([1]阪大院工、[2]阪大生物工学国際交流セ、[3]カセサート大、[4]富山県立大生工セ)
○Tatsuya UEGUCHI[1], Shigeru KITANI[2], Thamchaipenet Arinthip[3], Yasuhiro IGARASHI[4], Takuya NIHIRA[2] ([1]Osaka Univ., [2]Osaka Univ., [3]Kasetsart Univ., [4]Toyama Pref. Univ.)

【目的】

生理活性物質の探索源として、土壌微生物として知られる放線菌は重要な役割を果たしてきた。しかし、土壌放線菌からの探索研究が進むにつれ、新規生理活性物質を得る割合は徐々に低下している。一方、地球表面積の約 70%を占める海洋には、高濃度塩分や低酸素濃度など過酷な環境にも関わらず、多様な生物種が棲息している。したがって、海洋に由来する放線菌は、土壌放線菌とは異なった代謝系を発達させている可能性が高く、新規生理活性物質を高効率で発見できることが期待される。

本研究では、生物多様性に富む熱帯域から海洋放線菌を分離し、その生物活性物質生産能力を評価すると共に、新規生物活性物質を同定することを目的とする。

【方法・結果】

タイ王国周辺の海底堆積物や海綿動物を回収し、その希釈サンプルを抗生物質を含む培地に塗布、多様な形態分化を示す放線菌様微生物を多数、分離した。次に、分離株の生理活性物質生産能を細菌または真菌を用いたバイオアッセイにより検討した。調査した 35 菌株の内、3 種類の固体培養条件下では 19 菌株が抗菌活性を、また 8 菌株が抗真菌活性を、一方 5 種類の液体培養条件下では 23 菌株が抗菌活性を、また 22 菌株が抗真菌活性を示した。したがって、分離した海洋放線菌群は生理活性物質の探索源として適していると考えた。

液体培養抽出物の HPLC/DAD 解析から、海洋放線菌 GKU220 株が複数の rakicidin 様化合物を生産する可能性が高いことがわかった。そこで、GKU220 株の液体培養液（3 L）を酢酸エチルで抽出し、その濃縮物をシリカゲルクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーにより精製、GKU220-A 成分 7.9 mg と GKU220-B 成分 5.1 mg を得た。HRFABMS および各種二次元 NMR スペクトルに基づく構造解析より、GKU220-A 成分は既知物質 rakicidin C であったが、GKU220-B 成分は分子式 $C_{27}H_{44}N_4O_6$ を示す新規 rakicidin C 類縁体であることが明らかとなった。現在、GKU220-B 成分の生理活性を検討している。

以上より、本研究で得た熱帯由来海洋放線菌は生理活性物質の有望な探索源となりうることが示唆された。

Actinomycetes, Marine, Antibiotics

講演番号：4C21a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ C 校舎 21 会場

放線菌の生産する新規物質 mangromicin A および B の培養条件による生産性の向上と立体構造の研究

Improvements of culture conditions for the productivity and research of stereochemistry of mangromicins A and B

○神谷 義之（北里大院・感染制御）
○yosihyuki kamiya (kitasato Univ.)

【目的】 沖縄県西表島のマングローブ域の土壌から分離された放線菌 *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216 株の代謝産物から抗トリパノソーマ活性を有する新規物質 mangromicin A および B を単離した[1)]。Mangromicin A および B は tetrahydrofuran 環及び 5, 6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrone 環を含む cyclopentadecan 骨格を有するユニークな構造であった。今回、mangromicin A および B の立体構造を明らかにすることを目的に大量取得のための培地検討による生産性向上を試みた。

【方法】 Mangromicin 類の生産性向上のために 2% soluble starch, 1% defatted wheat germ, 0.5% glycerol, 0.3% dry yeast, 0.3% meat extract, 0.5% $CaCO_3$ の培地組成を基本培地とし、soluble starch, defatted wheat germ, dry yeast の 3 成分に注目し検討した。また、得られた mangromicin B を用い、ROESY、カップリングコンスタントおよび新モッシャー法により相対および絶対立体構造を決定した。

【結果および考察】 Mangromicin 類の生産は dry yeast の濃度が大きく影響していた。dry yeast を 2%以上の濃度にすると mangromicin 類の生産は確認されず、1%が最適であることがわかった。Defatted wheat germ は 0.5%～1%で mangromicin B の生産が 2 倍以上に向上した。また、soluble starch の濃度を高めることにより、mangromicin A の生産向上が確認でき、5%に設定した。改良生産培地（5% soluble starch, 1% defatted wheat germ, 0.5% glycerol, 1% dry yeast, 0.5% $CaCO_3$）を用いることで mangromicin A および B の生産性は 10 倍以上向上した（Fig. 1）。次に、上記の方法により mangromicin B の絶対立体構造の決定を行った。その結果、mangromicin B の 10 位の水酸基は S 体であることがわかった。ROESY およびカップリングコンスタントの結果から mangromicin B の絶対立体構造を決定した（Fig. 2）。さらに、mangromicin B の NMR データを比較することにより mangromicin A の相対立体構造も決定した。

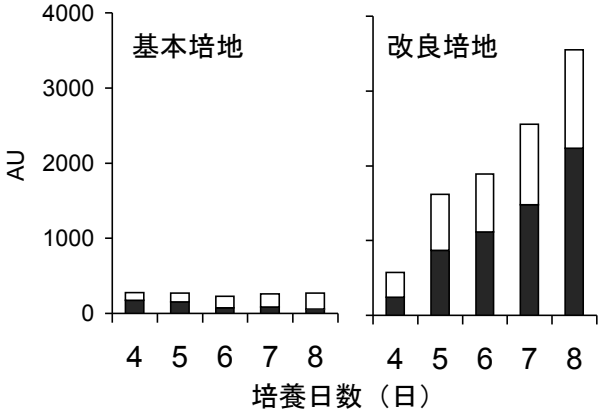


Fig. 1 Mangromicin A (■) および B (□) の生産性比較

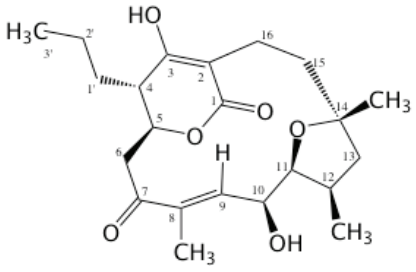


Fig. 2 Mangromicin B の立体構造

1) Ochiai J. et al., IUMS 2011 (Sapporo)

culture conditions, stereochemistry, mangromicins

講演番号：4C21a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ C 校舎 21 会場

糸状菌より単離した新規ピロリジジノン化合物、ピロリジラクトンの構造

Pyrrolizilactone, a new pyrrolizidinone metabolite isolated from a fungus

○野川 俊彦、川谷 誠、浦本 昌和、岡野 亜紀子、青野 晴美、高橋 俊二、長田 裕之 (理研基幹研・ケミカルバイオロジー)
○ Toshihiko NOGAWA, MAKOTO KAWATANI, MASAKAZU URAMOTO, AKIKO OKANO, HARUMI AONO, SHUNJI TAKAHASHI, HIROYUKI OSADA (Chem. Biol., RIKEN ASI)

【目的】放線菌や糸状菌を始めとする微生物は、多様な構造を有する代謝産物を生産することで知られている。それら代謝産物の中には有用な活性を有し医薬品や農薬として利用されているものが多い。さらに、ケミカルバイオロジー研究においてはバイオプローブとして生物機能解明のためのツールとして利用されているものもある。これら多様な構造の代謝産物を効率良く探索し有効利用するために、我々の研究室では粗精製物からなるフラクションライブラリーとそれを基にした代謝産物のスペクトルデータベースを構築している。前年度の本大会において、ライブラリーおよびスペクトルデータベースの作製とそれを用いた新規化合物の探索について報告しその有用性を示した。今回、そのデータベースを利用し糸状菌抽出物のフラクションより新規化合物の探索を行うことを目的とし実験を行った。

【方法と結果】データベース検索には、ACD スペクトルデータベースおよび独自に開発を行った NPPlot（Natural Products Plot）を用いた。これらは我々の保有する微生物代謝産物フラクションライブラリーの PDA-LC/MS 分析より得られた UV 吸収およびマススペクトルを基に構築したものである。

糸状菌培養液約 18 L に等量のアセトンを加え撹拌後ろ過することで含水アセトン抽出液を得た。エバポレータによりアセトンを除去後、等量の酢酸エチルにより２回液液分配を行うことで酢酸エチル可溶性画分を得た。これをエバポレータにより濃縮・乾固し 16.6 g の抽出物を調製した。この抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、$CHCl_3$/MeOH の混液を用いてステップワイズ溶出（MeOH: 0 ~ 100）を行い８フラクションに分画した。第２画分（$CHCl_3$/MeOH 100:1 溶出画分）をさらに Sephadex LH-20（$CHCl_3$/MeOH 1:1）により３フラクションに分画した。この第３画分に LC/MS 分析よりデータベース未収載のスペクトルを示すピークを確認したので、さらに C_{18}-HPLC により分画・精製を続けて行い、化合物 1（5.5 mg）を無色無晶形として単離した。化合物 1 は、HRESIMS 測定より分子量 $C_{24}H_{33}NO_5$ であることがわかった。IR スペクトルからはヒドロキシル基およびカルボニル基の存在が示唆された。構造決定は２次元 NMR を含む詳細な NMR スペクトルの解析より行い、その結果構造をピロリジジノン骨格とγ-ラクトンが縮合した特異な３環性構造とデカリン構造がケトンにより結合した特徴的化合物ピロリジラクトン（pyrrolizilactone）と決定した。化合物 1 の癌細胞に対する細胞毒性と大腸菌に対する抗菌活性を評価した。今回この新規化合物の単離と構造決定および生物活性について報告する。

filamentous fungi, structure elucidation, spectral database

講演番号：4C21a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ C 校舎 21 会場

ミコール酸含有細菌との複合培養により誘導生産される放線菌由来抗菌物質の構造
Identification of antibacterial substances produced by an actinomycete co-cultured with the mycolic acid-containing bacterium

○武村 思音[1]、前田 智也[1]、福田 隆雄[1]、奥 直也[1]、五十嵐 康弘[1]、尾仲 宏康[1,2]（[1]富山県大・生工研セ、[2]東大院農生科・応生工）
○Shion Takemura[1], Tomoya Maeda[1], Takao Fukuda[1], Naoya Oku[1], Yasuhiro Igarashi[1], Hiroyasu Onaka[1,2] ([1]Toyama Prefectural Univ., [2]Dept. Biotechnology, Univ. of Tokyo)

【目的】放線菌はミコール酸を細胞壁に含有する細菌との共在下において、純粋培養時には生産しない物質を生産する様になる[1)]。我々はこの様な仕組みを利用した二次代謝活性化法を複合誘導と名付け、薬物資源探索に活用し、これまでに特異な骨格を持つ抗菌性ポリケタイド alchivemycin 類を発見している[2)]。本研究では、複合培養の薬剤探索における有効性を確証するために、引き続きミコール酸含有菌 *Tsukamurella pulmonis* を用いた放線菌の誘導二次代謝産物の抗菌スクリーニングを行った。

【方法及び結果】石川県舳倉島由来放線菌株を純粋培養および *Tsukamurella pulmonis* との複合培養し、その培養抽出物をペーパーディスクを用いた *Bacillus subtilis* および *Streptmyces lividans* に対する抗菌活性で評価したところ、複合培養時特異的に培養抽出物が抗菌活性を示す株、*Streptomyces* sp. HEK740 を得た。HPLC による予備的な分画の抗菌活性から複合誘導される活性物質は極性が高く活性の低い成分と、極性が低く活性の高い成分の 2 種類存在することが判明した。HEK740 と *T. pulmonis* の複合培養 3 L 分をブタノール抽出し、溶媒分画および LH20、ODS、逆相 HPLC の 3 段階のカラム精製を行い、後者の活性成分を 3.3 mg 精製した。NMR 及び MS 分析により構造解析した結果、後者の成分は streptogramin B であることが判明したが、これまで streptogramin B に関しては既知 NMR スペクトルの報告がないため、今回精製した産物について NMR 帰属を行った。また、現在、前者の活性成分の精製を進めており、合わせて報告する予定である。

1) H. Onaka *et al.*, ***Appl Environ Microbiol.*** 77(2): 400-406 (2011)
2) Y. Igarashi *et al.*, ***Org Lett.*** 12(15): 3402-3405 (2010)

combined culture, Streptomyces, antibiotic production

講演番号：4C21a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ C 校舎 21 会場

rakicidin A の全立体構造および構造活性相関

stereochemistry and structure-activity of rakicidin A

○的場 翔平[1]、奥 直也[1]、山崎 洋子[2]、嶋崎 良子[1]、宮永 賢[1]、五十嵐 康弘[1] ([1]富山県大・生工セ、[2]微化研・沼津)
○ Shouhei MATOBA[1], Naoya OKU[1], Yohko YAMAZAKI[2], Ryoko SHIMASAKI[1], Satoshi MIYANAGA[1], Yasuhiro IGARASHI[1] ([1]Toyama Prefectural Univ., [2]Inst. Microbial Chemistry, Numazu)

【目的】rakicidin A は *Streptomyces* および *Micromonospora* 属放線菌が生産する細胞毒性物質であり、*in vivo* での免疫抑制活性および低酸素下にてガン細胞に対する毒性を増強することが報告されている。rakicidin A 自体は抗腫瘍活性を示さないものの、創薬リードとして非常に魅力的であり、薬剤創製に向け構造展開を行っていく上で精密な構造情報の取得は不可欠である。しかし、これまで 3 種類の類縁化合物が発見されているにもかかわらず、いずれも rakicidin A 同様、極度に低い溶解性のため溶液中での誘導体化反応に適さず、立体化学は決定されていない。そこで、rakicidin A の絶対立体化学の決定を試みた。また、本物質の構造活性相関についての知見を得るため、新規類縁体の取得も試みた。

【方法および結果】本物質は極めてユニークなγ-アミノ酸である vinylogousdehydroalanine、*N*-Methyl glycine、β-hydroxyasparagine (βOHAsn)、3-hydroxy-2,4,16-trimethylheptadecanoic acid (Htha)から成る環状デプシペプチドであり、5 つの不斉中心はすべてβOHAsn 及び Htha に局在している。

まず、ピリジン存在下で水素添加することにより、溶解性が改善された誘導体を得た。これにより、酸加水分解における収率が誘導体化させなかった場合に比べ、飛躍的に上昇した。この誘導体を酸加水分解後、エーテル抽出することで、水層にβOHAsn、有機層に Htha を得た。前者の相対立体配置は、薄層クロマトグラフィーで標品と *Rf* 値を比較することにより、*threo* と決定した。絶対立体配置は、L-FDLA (1-difluoro-2,4-dinitrophenyl-5-leucinamide)によるジアステレオマー誘導と HPLC 分析により、2*R*,3*R* と決定した。一方、後者のユニットについては、^{1}H NMR データを類似物質の文献値と比較することにより、その相対立体配置を決定した。絶対立体配置は PGME アミド化によるキラル異方性分析により 2*S*, 3*S*, 4*R* と決定した。

一方、rakicidin A の逆相クロマト精製過程において保持時間の長い類縁体が見られたため、機器分析にて構造を解析したところ、脂肪酸の鎖長が rakicidin A より二炭素長い新規類縁体と判明し、rakicidin E と命名した。さらに、旋光度および円二色性スペクトルを rakicidin A の論文値と比較することにより同様の絶対立体であると決定した。現在、構造研究の過程で得られた誘導体を用いて構造活性相関を検討している。

rakicidin A, absolute stereochemistry, structure-activity relationship

講演番号：4C21a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ C 校舎 21 会場

食用ラン藻由来リポペプチド nostofungicidine の絶対立体化学の解明

Determination of the absolute stereochemistry of nostofungicidine, an antifungal lipopeptide from the edible cyanobacterium *Nostoc commune*

○米島 洸佑、奥 直也、五十嵐 康弘（富山県大工・生工研セ）
○Kousuke YONEJIMA,Naoya OKU,Yasuhiro IGARASHI (Toyama Prefectural Univ.)

【目的】イシクラゲ(*Nostoc commune*)は、地表に寒天質の不定形コロニーを形成する特異なラン藻の一種であり、日本各地で古来より食されてきた。小林らは本ラン藻よりコロニー中の微生物叢を維持する化学防御物質としてリポペプチド nostofungicidine を発見した。本物質は、4 種類の植物病原菌(*Aspergillus candidus, Cladosporium herbarum, Botrytis fabae, Cercospora beticola*)に対して MIC 0.8~3.1 μg/mL の濃度で生育阻害活性を示す。本物質は食品由来であるため、人体への高い安全性が期待できるものの、その立体構造が未解明であることから医農薬への応用研究は行われていない。本物質をリードとした新規医薬の開発を促進するため、nostofungicidine の立体構造の解明を試みた。
【方法と結果】nostofungicidine はβ-ヒドロキシチロシン(βOHTyr)、γ-ヒドロキシプロリン(γOHPro)、グリシン(Gly)、β-アミノ脂肪酸(3-amino-6-hydroxystearic acid、Ahsa)、および 2 残基のβ-ヒドロキシアスパラギン(βOHAsn)とセリン(Ser)から構成される。まず標品の存在するγOHPro、βOHAsn、Ser については、FDLA(1-difluoro-2,4-dinitrophenyl-5-leucinamide)を用いたジアステレオマー誘導体化法(Marfey 法)により、キラリティを決定した。nostofungicidine の酸加水分解物を誘導体化後、LC/MS にて分析した結果、γOHPro および 2 残基のβOHAsn を L-*trans* 、L-*erythro* 体と決定した。一方、Ser に関しては L および D 両異性体が検出された。現在、両残基のキラリティを特定するとともにβOHTyr、Ahsa の絶対立体配置も検討中である。

Nostoc commune, nostofungicidine, absolute stereochemistry

講演番号：4C21a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:12～ C 校舎 21 会場

水圏由来粘液細菌の生産する新規 rhizopodin 類縁体の構造

Structure of new rhizopodin analogs from an aquatic myxobacterium isolate

○松本 綾香[1]、奥 直也[1]、朝野 裕貴[1]、松永 孝之[2]、笠井 宏朗[3]、五十嵐 康弘[1] ([1]富山県立大工・生工研セ、[2]富山県　薬事研、[3]北里大・海洋バイオ)
○Ayaka Matsumoto[1], Naoya Oku[1], Yuki Asano[1], Takayuki Matsunaga[2], Hiroaki Kasai[3], Yasuhiro Igarashi[1] ([1]Toyama Prefectural Univ., [2]Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research, [3]Kitasato Univ.)

【目的】微生物は、抗生物質などの医薬の主要な探索源として活用されてきた。しかし、近年その中核であった放線菌から新規化合物を発見することは難しくなっている。粘液細菌は滑走運動をし、飢餓状態で子実体を形成する特徴的な生活環を持つグラム陰性菌である。本菌株からは放線菌のものとは異なる骨格を有する二次代謝産物が多数見つかっており、医薬探索源として有望ではあるものの、菌の分離が困難なため、現在までに報告されている総化合物数は放線菌のわずか 4%程度に止どまっている。そこで本研究では、特に水圏環境の粘液細菌に着目し、菌の収集と分離株からの生理活性物質の探索を試みた。
【方法および結果】富山県小川温泉にて、源泉および排水溜め池等に堆積している植物遺骸、泥、沈着物等の環境試料 13 検体を分離源として採取した。これらを凍結乾燥処理に供して生菌を殺した後、濾紙を重層した無機塩寒天培地上に接種し、室温で培養した。2 週間後、粘液細菌の子実体が試料もしくは濾紙上に形成されたので、これを実体顕微鏡下検鏡しつつ釣菌を行い、ビタミン B_1-酵母培地で単菌化した結果、計 10 株の粘液細菌を取得した。各株は 4 種類の液体培地で培養し、その抽出物をマウス白血病細胞 P388 に対する細胞毒性およびカビ、酵母、グラム陽性、グラム陰性菌に対する生育阻害試験にてスクリーニングした。細胞毒性を示すエキスの大部分が糸状菌 2 株および酵母 2 株に対する生育阻害活性を示し、その活性の本体は HPLC 分析の結果、myxothiazole と判明した。一方、myxothiazole を生産せず、*S. cerevisiae* のみに活性を示すエキスを 2 種類見出した。生産株を大量培養後、ブタノール抽出物について細胞毒性を指標に溶媒分画および各種クロマトグラフィーにて精製し、強い細胞毒性を示す 3 成分を得た。二次元 NMR および HRESITOFMS スペクトル解析の結果、これらは既知物質 rhizopodin と共にそのエステル交換型新規類縁体 isorhizopodin および isoisorhizopodin であることが判明した。

myxobacteria, rhizopodin, cytotoxicity

講演番号：4C21a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:24～ C 校舎 21 会場

海洋由来 *Firmicutes* 門細菌の生産する新規 acyloin 化合物の構造

New acyloins from an Okinawan marine bacterial isolate of the phylum *Firmicutes*

○朝野 裕貴[1]、奥 直也[1]、宮永 賢[1]、笠井 宏朗[2]、五十嵐 康弘[1] ([1]富山県大・生工研セ、[2]北里大・海洋バイオ)
○Yuki ASANO[1], Naoya OKU[1], Satoshi MIYANAGA[1], Hiroaki KASAI[2], Yasuhiro IGARASHI[1] ([1]Toyama Prefectural Univ., [2]Kitasato Univ.)

【目的】現在用いられている医農畜薬の半数以上は天然物そのものあるいは天然物をヒントとして作られたものである。放線菌や真菌からの生理活性物質は抗生物質や抗ガン剤等実用化されたものが多く、重要な薬物資源として活用されてきた。しかし近年、これらからの新規化合物発見頻度が低下しており、新たな探索源が求められている。*Bacillus* 属に代表される *Firmicutes* 門細菌からは放線菌、真菌に次ぐ 860 の二次代謝物質が報告されている。本菌群からは gramicidin や bacitracin など医薬として活用されているものもあり、有用な薬物資源の一つである。近年、その海洋由来株からは抗菌活性を示すペプチド bogorol 類やガン細胞に対する細胞毒性を示すマクロライド化合物 macrolactin 類などが発見されており、新たな薬物資源として実績を重ねつつある。当研究室においても岩手県大槌湾の未同定カイメンから分離した *Brevibacillus* sp.より、新規浸潤阻害物質 ulbactin F, G を発見している。引き続き薬物探索資源開拓の一環として、海洋由来 *Firmicutes* 門細菌の二次代謝産物を調査した。
【方法と結果】沖縄県未同定カイメンから単離した 4 株の培養液抽出物を UV スペクトルと保持時間を指標にした HPLC 分析に供したところ、GB6-OK 株が当研究室独自の化合物データベース中に登録されていない成分を複数生産することが明らかとなった。新規物質と期待できたため、大量培養を行い、そのブタノール抽出物を各種クロマトグラフィーによる分離を経て精製した。NMR 及び MS スペクトル解析により構造解析を行ったところ、これらは acyloin 化合物 soraphinol A と kurasoin B の新規互変異性体であると判明し、それぞれ isosoraphinol A 及び isokurasoin B と命名した。現在、絶対立体配置を検討中である。

Okinawan marine *Firmicutes*, Isokurasoin B, acyloin tautomer

講演番号：4C21a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:36～ C 校舎 21 会場

Arthrobacter 属放線菌の生産する新規デプシペプチド arthroamide の構造
Arthroamide, a novel depsipeptide from *Arthrobacter*.
○山本 和樹[1]、Martha E. Trujillo[2]、五十嵐 康弘[1] ([1]富山県大・生工研セ、[2]スペイン Salamanca 大)
○Kazuki YAMAMOTO[1], Martha E. Trujillo[2], Yasuhiro IGARASHI[1] ([1]Toyama Prefectural Univ., [2]Spain Salamanca Univ.)

【目的】*Streptomyces* のように糸状菌様に形態分化する放線菌に比べて、球菌や桿菌の形態を呈する放線菌からの二次代謝物の報告は少なく、それらの二次代謝能に興味が持たれる。今回、我々は糸状菌様の形態を示さない放線菌株を対象に、PKS と NRPS 遺伝子の保存領域配列に基づくプライマーを用いた PCR スクリーニングを行った。その結果、NRPS 遺伝子の増幅が認められた *Arthrobacter* sp. PGVB-1 を培養したところ二種類のデプシペプチドを生産することを見出した。本発表ではその単離・精製、構造決定について報告する。
【方法及び結果】スペイン Salamanca 地方の Villamayor 砂岩を用いた建造物の壁面より分離された *Arthrobacter* sp. PGVB-1 の培養液をブタノール抽出し、その濃縮物を各種クロマトグラフィーにより精製することにより、二種類の化合物を得た。各種二次元 NMR スペクトル及び HR-ESITOFMS に基づく構造解析により、一つは既知化合物 EGM-556 であること、また、もう一つの化合物はバリン 3 残基、アラニン 1 残基、(*E*)-3-hydroxy-5-phenyl-4-pentenoic acid がアミド結合とエステル結合を介して結合した新規環状デプシペプチドであることを明らかにし、arthroamide と命名した。アラニン残基の絶対配置は Marfey 法を適用することにより *R*-配置と決定した。バリン残基は酸加水分解中にラセミ化したため、DCl/D_2O 中での加水分解物に Marfey 法を適用し、LC-MS で分析することにより、その絶対配置を *S* と決定した。β-ヒドロキシ酸の 3 位の立体配置はメタノリシスによりエステル結合を開環し、水酸基を MTPA エステルに誘導し Mosher 法を適用することにより *R*-配置と決定した。本化合物の生物活性は種々のアッセイ系で評価中である。

arthroamide, *Arthrobacter*, depsipeptide

講演番号：4C21a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:48～ C 校舎 21 会場

Fusarium 属糸状菌の生産する新規デプシペプチド Hikiamide 類の構造決定
Hikiamides A-C, cyclic pentadepsipeptides from *Fusarium* sp. TAMA 456

○福田 隆雄[1]、須藤 ユリ[2]、土屋 有紀[2]、奥田 徹[2,4]、藤森 文啓[3,4]、及川 勉[5]、五十嵐 康弘[1]([1]富山県立大学・生工研セ、[2]玉川大、[3]東京家政大、[4]ハイファジェネシス、[5]神奈川県保健福祉大)
○Takao FUKUDA[1], Yuri SUDOU[2], Yuki TSUCHIYA[2], Toru OKUDA[2,4], Fumihiro FUJIMORI[3,4], Tsutomu OIKAWA[5], Yasuhiro IGARASHI[1] ([1]Toyama Prefectural Univ., [2]Tamagawa Univ., [3]Tokyo Kasei Univ., [4]Hyphagenesis, [5]Kanagawa Univ. of Human Services)

【目的】微生物代謝物からの新規生理活性物質探索の過程において、埼玉県比企郡で採取した朽木より分離した *Fusarium* sp. TAMA 456 が 3 種類の新規デプシペプチドを生産する事を見出した。本発表ではそれらの単離・精製、構造決定、及び活性について報告する。
【方法及び結果】本菌株の培養液 1 L をブタノール抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー及び ODS カラムクロマトグラフィーを用いて粗分画した後、HPLC により hikiamide A (**1**), B (**2**), C (**3**) をそれぞれ 419, 81, 14 mg 得た。NMR 及び高分解能 MS データの解析により、**1** はフェニルアラニン(Phe)2 残基、バリン(Val) 1 残基、および *N*-メチルロイシン(*N*-Me-Leu) 1 残基と 1 つのα-ヒドロキシロイシン酸からなる新規デプシペプチドであることを明らかにした。各アミノ酸残基とロイシン酸の結合は、NOESY 及び CT-HMBC スペクトルの解析により決定した。同様に、**2** は **1** の Phe の一つがトリプトファン(Trp)に置換した類縁体であり、**3** は **1** の *N*-Me-Leu がロイシン(Leu)に置換した類縁体である事を明らかにした。いずれの化合物も新規デプシペプチドであった。

各化合物の構成アミノ酸の絶対立体配置は、Marfey 法により決定した。6N HCl 中での酸加水分解により生じたアミノ酸を FDLA(1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-leucinamide)誘導体に導き LCMS で分析した結果、Phe、Val 及び Trp 残基はいずれも L 体であった。しかし、*N*-Me-Leu と Leu については、L 体と D 体が約 2.5 対 1 の比率で検出された。加水分解反応中のラセミ化が疑われたため、DCl 溶液中で加水分解したところ、ラセミ化により生じる deuterium を取り込んだ *N*-Me-Leu は D 体でのみ確認されたことから、*N*-Me-Leu は L 体であると決定した。α-ヒドロキシロイシン酸の絶対配置は、各化合物の酸加水分解物をキラルカラムで分析し、その溶出時間より全ての化合物で *S*-配置である事を明らかにした。Hikiamide はいずれも ST-13 マウス前駆脂肪細胞に対し 2 μM の濃度で強い分化誘導活性を示した。**2** は *Micrococcus luteus* に対し MIC 17 μg/mL で抗菌活性を示し、Hela 細胞及び MCF-7 細胞に対し IC_{50} 値 3.3 μM で細胞増殖阻害活性を示したが、**1** と **3** は活性を示さなかった。

hikiamide, *Fusarium*, depsipeptide

講演番号：4C22a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ C 校舎 22 会場

Penicillium purpurogenum IAM15392 株におけるアンモニウムトランスポーターの同定及び、アザフィロン色素生産時における機能解析

The identification and functional analysis of the ammonium transporter at the azaphilone pigment production in *Penicillium purpurogenum* IAM15392

○小嶋 涼[1]、亀山 歩美[2]、新居 鉄平[1]、荻原 淳[1]、加藤 順[2]、春見 隆文[1] ([1]日大院生資研究科・生資利用、[2]日大生資科・生命化)

○Ryo Kojima[1], Ayumi Kameyama[2], Teppei Arai[1], Jun Ogihara[1], Jun Kato[2], Takafumi Kasumi[1] ([1]Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ, [2]Dept.Chem.Life.Sci.,Nihon Univ)

Monascus 色素は古来より利用されている微生物由来天然物色素である。土壌より単離された糸状菌、*Penicillium purpurogenum* IAM 15392 株は可溶性デンプン、酵母エキス、クエン酸緩衝液という極めて単純な培地にて Azaphilone 系 Monascus 色素同族体を生産する。主として、橙色色素 PP-O を生産するが、培地中に硝酸アンモニウムを添加することによってアミノ酸誘導体である紫色色素 PP-V を生産するようになる。本糸状菌の色素生合成機構において特徴的なのは、PP-O の 7−O から PP-V の 7−NH_2^+への置換反応である。このアミノ基置換反応における無機窒素源の影響を検証したところ、硝酸態窒素塩に比べ、アンモニア態窒素塩のほうが優位に利用されていることが明らかとなり、アンモニア態窒素が直接菌体内に取り込まれ、色素生合成に利用されることを予測した。そこで本発表では、本糸状菌において色素生合成に関与すると予測されるアンモニウムトランスポーターの同定及び、その機能解析を目的とした。

P.purpurogenum IAM15392 株のドラフトゲノムシーケンスを用いてアンモニウムトランスポーターの配列の検索・抽出を行った。その結果、4 つ（AMT A、AMT B、AMT C、AMT D）のアンモニウムトランスポーターの存在が確認できた。それら遺伝子の完全長 cDNA を取得し、推定されるアミノ酸配列から、膜タンパク質の判別及び膜貫通領域の解析を行った。さらに、同定したアンモニウムトランスポーター遺伝子が、PP-V および PP-O 生産条件で発現しているか確認を行った結果、*AMT B* および *AMT D* は PP-V 生産培地において発現することが分かった。このことから、両アンモニウムトランスポーターは色素生産時における窒素源の取り込みに関与していることが示唆された。そこで、この 2 つのアンモニウムトランスポーターの機能解析を行うために、RNAi 用ベクターを構築、プロトプラスト PEG 法により導入し、*AmtB*、*AmtD* のダウンレギュレートを行った。その結果、形質転換体 4 菌株で PP-V の生産低下を確認した。

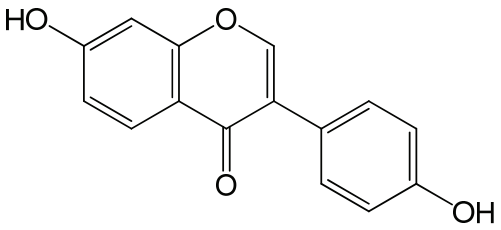
Penicillium purpurogenum, ammonium transporter, azaphilone

講演番号：4C22a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ C 校舎 22 会場

ハスモンヨトウ腸管内容物で誘導されるダイズ二次代謝物質
Secondary metabolites induced by the gut contents of *Spodoptera litura*.
○村上 真一郎[1]、網干 貴子[1]、吉永 直子[1]、石原 亨[2]、寺石 政義[1]、小野 肇[1]、西田 律夫[1]、奥本 裕[1]、森 直樹[1] ([1]京都大院農、[2]鳥取大)
○ Shinichiro MURAKAMI[1], Takako ABOSHI[1], Naoko YOSHINAGA[1], Atsushi ISHIHARA[2], Masayoshi TERAISHI[1], Hajime ONO[1], Ritsuo NISHIDA[1], Yutaka OKUMOTO[1], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Tottori Univ.)

【目的】
植物は昆虫の食害や病原菌の感染に対して様々な誘導性の防御機構を持つ．本研究ではダイズ *Glycine max* 葉に鱗翅目幼虫の腸管内容物抽出液を塗布し，誘導される成分に注目した．また，誘導抵抗性における品種間差を調べるため，タマホマレおよび Peking の 2 品種を用いた．

【方法・結果】
ダイズ第一本葉にピンで穴をあけ，ダイズの害虫であるハスモンヨトウ *Spodoptera litura* 5 齢幼虫腸管内容物の 50 mM リン酸バッファー（pH 8.0, 0.025 匹当量）抽出液を塗布した．処理は 16L8D 条件のインキュベータ（25℃）中で 1 日 2 回，2 日間行った．処理後，葉を 80% メタノールで抽出し，その抽出液を LC/MS で分析した．得られた結果を主成分分析により解析し，腸管内容物抽出液処理により，ダイズ葉に誘導される成分を調べた．
その結果，両品種においてフラボノイドである daidzein およびその配糖体の増加が認められた．Daidzein については，保持時間およびマススペクトルを標品と比較して同定した．タマホマレでは Peking よりも，より多くの daidzein が誘導された．また，13.3 分にタマホマレでのみ誘導される未知成分も検出された．
これらのことから，ハスモンヨトウ腸管内容物中にはダイズに二次代謝物質を誘導するエリシター活性物質が存在すること，腸管内容物中のエリシターに対するダイズの感受性が品種によって異なることが示唆された．また，今回の処理で増加した未同定成分についても同定を進める予定である．



Daidzein

glycine max, flavonoid, induction

講演番号：4C22a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ C 校舎 22 会場

アワヨトウ幼虫腸管内容物で誘導されるイネの代謝物質の品種間差

Varietal difference of rice metabolites induced by the gut contents of *Mythimna separata*

〇松本 ふう香[1]、網干 貴子[2]、吉永 直子[2]、石原 亨[3]、寺石 政義[2]、小野 肇[2]、西田 律夫[2]、奥本 裕[2]、森 直樹[2] ([1]京大農、[2]京大院農、[3]鳥取大農)

〇Fuka Matsumoto[1], Takako Aboshi[2], Naoko Yoshinaga[2], atsushi Ishihara[3], Masayoshi Teraishi[2], Hajime Ono[2], Ritsuo Nishida[2], Yutaka Okumoto[2], Naoki Mori[2] ([1]Kyoto Univ, [2]Kyoto Univ, [3]Tottori Univ)

【目的】

植物は昆虫の食害や病原菌の感染により，様々な二次代謝物質を生合成し，防御に役立てている．本研究ではイネ *Oryza sativa* 葉片に鱗翅目幼虫の腸管内容物抽出液を塗布し，誘導される成分を解析した．また，Nipponbare (Japonica) と Kasalath (Indica) を用い，誘導反応の品種間における差も比較した．

【方法・結果】

第 4 葉完全展開したイネ 6 株の第 4 葉にピンで穴を開け，イネの害虫であるアワヨトウ *Mythimna separata* 5 齢幼虫の腸管内容物のリン酸バッファー抽出液を塗布した．処理後，吸着剤（HayesepQ）を取り付けた捕集管に入れ，吸引ポンプで 15 時間揮発成分を捕集した．吸着成分をヘキサン/ジクロロメタンで溶出し，GC/MS で分析した．また，同様に処理したイネを 2, 4, 24, 48 時間後に 0.1 N 塩酸溶液で抽出し，そのアミノ酸成分を 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate（AQC）で誘導体化後，LC/MS で分析した．

その結果，揮発成分として，Nipponbare, Kasalath 両種から limonene, β-linalool, methyl salicylate, β-elemene, β-caryophyllene を同定した．各化合物は，GC/MS の保持時間，質量スペクトルを標品と比較して，同定した．β-linalool は Kasalath で多く誘導されたのに対し，他の化合物は品種間で顕著な差は無かった．なお，未処理では，これらの揮発成分は検出されなかった．一方，アミノ酸成分として，処理後 24 時間の Nipponbare では γ-aminobutyric acid (GABA) が顕著に増加していたが，Kasalath では増加していなかった．興味深いことに，Nipponbare では GABA の増加と共にグルタミン酸量が減少していたことから，グルタミン酸から GABA へ変換されていると推察された．

以上，アワヨトウの腸管内容物中にはイネに対するエリシター活性物質が存在し，その感受性は品種間に差があると推察された．

sesquiterpene, Oryza sativa, inductuion

講演番号：4C22a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ C 校舎 22 会場

フジコナカイガラムシ色素の生合成機構に関する研究
Studies on the mechanism of pigments biosynthesis in the mealybug *Planococcus kraunhiae*
○山城 敬範、菊池 直也、長澤 寛道、作田 庄平（東大院農生科・応生化）
○Takanori YAMASHIRO,Naoya KIKUCHI,Hiromichi NAGASAWA,Shohei SAKUDA (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】
カイガラムシは、その体内に鮮やかな色素をもつことから資源生物としての役割を持っている。カイガラムシ色素の大量生産技術としては、生合成遺伝子を利用した方法が挙げられるが、その生合成遺伝子は明らかになっていない。本研究では、飼育方法が確立され、ライフサイクルの比較的短いフジコナカイガラムシ（*Planococcus kraunhiae*）を用い、その体内で生産される主な色素である、endocrocin の生合成遺伝子の獲得を目的としている。

【方法・結果】
カイガラムシの EST データベースを作成し、各々の断片配列の BLAST 検索の結果の中で相同性の最も高い遺伝子名に対してキーワード検索を行い、3 種の候補生合成遺伝子を選出した。それら遺伝子と endocrocin 生産量との関係を明らかにするために、RNAi 法を用いたノックダウン実験を行い、endocrocin 生産量の変化を調べることで生合成遺伝子の同定を試みることにした。まず、dsRNA 溶液を個体に注射する方法でノックダウン実験を試みたところ、RT-PCR による発現解析で、各々の候補生合成遺伝子の mRNA レベルが、注射して生育させた 2 日後及び 4 日後の個体で低下することが確認できた。また、一個体につき湿重量の増加に対する endocrocin の増加量を定量する方法を確立した。さらに、ノックダウンが確実に起こっている個体での endocrocin を定量するための、トータル RNA の抽出と endocrocin の定量を一個体で行う手法を確立した。現在、3 種の候補生合成遺伝子それぞれの dsRNA 溶液を注射して生育させた 5 日後の個体に対し、虫体の湿重量の増加に対する endocrocin の増加量の割合を求め、候補生合成遺伝子のノックダウン効果による endocrocin の産生量への影響を調べることで、生合成遺伝子の同定を行なっている。

endocrocin, mealybug, polyketide

講演番号：4C22a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ C 校舎 22 会場

epsilon-ポリ-L-リジンのペプチド鎖長制御に関わる合成酵素アミノ酸残基の同定
Amino acid residues involved in the regulation of epsilon-poly-L-lysine peptide-chain length in the synthetase.
○鬼頭 奈央子、喜多 彰洋、芋川 祐紀、丸山 千登勢、片野 肇、濱野 吉十 (福井県立大学)
○ NAOKO KITO,AKIHIRO KITA,YUUKI IMOKAWA,CHITOSE MARUYAMA,HAJIME KATANO,YOSHIMITSU HAMANO (Fukui Pref. Univ.)

【背景】天然に存在するホモポリアミノ酸としては、*Bacillus* 属が生産するγ-ポリ-グルタミン酸と放線菌が生産する ε-ポリ-L-リジン（ε-PL）のみが知られている。ε-PL は、L-リジンのα-カルボキシル基と ε - アミノ基がペプチド結合で繋がった 25－35 残基からなる抗菌性ホモポリアミノ酸であり、高い安全性も認められていることから、数少ない天然の食品保存料として実用化されている。当研究室は、ε-PL 生産放線菌 *Streptomyces albulus* のε-PL 合成酵素（Pls）とその遺伝子（*pls*）を同定し、長年不明であったε-PL の生合成メカニズムを明らかにした。さらに、Pls がどのようにε-PL のペプチド鎖長を制御しているのかを検証するために、Pls に存在する 6 つの膜貫通ドメイン（TM-ドメイン）および 3 つのペプチド合成ドメインで構成される領域に、error-prone PCR によるランダム変異を導入し解析した。その結果、TM1-ドメインと TM2-ドメインのリンカー部である 646 番目のトリプトファン残基、および、TM3-ドメインと TM4-ドメインのリンカー部である 883 番目のロイシン残基がε-PL のペプチド鎖長制御に関与していることを見出している。そこで本研究では、さらに、883 番目のロイシン残基周辺配列に限定してランダム変異を導入し、L883 以外にε-PL のペプチド鎖長制御に関与しているアミノ酸残基が存在するか検証した。
【方法と結果】TM3-ドメインと TM4-ドメイン、および、そのリンカー部の配列に限定してランダム変異を error-prone PCR により導入し、得られた変異ライブラリーにて *Streptomyces lividans* TK23 株の形質転換を行った。ペプチド鎖長が変化したε-PL を生産する形質転換体を約 2000 株からスクリーニングしたところ、S880I の変異によって ε-PL のペプチド鎖長が短くなることが分かった。このように、L883 以外にもε-PL のペプチド鎖長制御に関与しているアミノ酸残基が存在することから、10 数残基で構成されるリンカー部の構造が ε-PL のペプチド鎖長を制御していることが示唆された。
これまでに得られた変異型酵素のうち、W646G、L883H、S880I の変異型酵素は、いずれも短鎖長のε-PL を生産するが、その鎖長分布は異なる。そこで、これら短鎖長のε-PL について、生理学的・化学的性質がどのように変化しているか、その検証の第 1 歩として抗菌活性を評価した。まず、従来法にて培養液から短鎖長ε-PL の単離精製を行ったが、時間がかかり操作も煩雑であったため、これら短鎖長のε-PL を培養液から簡便に精製できる tetraphenylborate anion を利用した簡易精製法を確立した。精製した各短鎖長ε-PL について生理活性を調べた結果、興味深いことに、通常のε-PL と比較して S880I が生産する短鎖長のε-PL の方が強い抗菌活性を示した。

peptide synthetase, NRPS, biopolymer

講演番号：4C22a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ C 校舎 22 会場

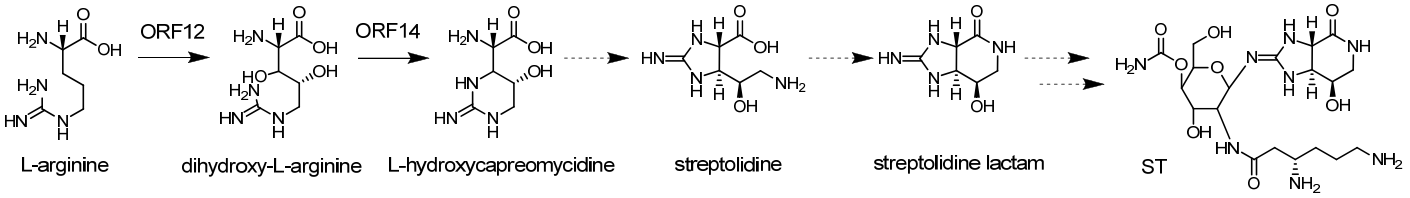
Streptolidine の生合成に関与する aminotransferase の機能解析

Functional analysis of the aminotransferase involved in the biosynthesis of streptolidine

○丸山 千登勢[1]、佐橋 周作[1]、泉川 美穂[2]、新家 一男[3]、濱野 吉十[1]([1]福井県大・生物資源、[2]JBIC、[3]産総研)
○ Chitose MARUYAMA[1], Shusaku SAHASHI[1], Miho IZUMIKAWA[2], Kazuo SHIN-YA[3], Yoshimitsu HAMANO[1] ([1]Fukui Pref. Univ, [2]JBIC, [3]AIST)

【目的】Streptothricin（ST）の生合成中間体 streptolidine lactam は、L-arginine を生合成出発物質として生合成されることがトレーサー実験によって明らかにされているが、その生合成の詳細は未解明のままである。最近我々は、ST の生合成遺伝子クラスターに存在する L-arginine β-hydroxylase に相同性を示す ORF12 が L-arginine の 3 位と 4 位の水酸化を触媒し、dihydroxy-L-arginine を生成することを明らかにした。さらに、dihydroxy-L-arginine は aminotransferase に相同性を示す ORF14 によって次の生合成中間体へと変換されることが推測された。そこで本研究では、ORF14 の機能解析を目的に反応産物の同定を行った。

【方法と結果】ORF14 の組換え酵素を大腸菌で構築し、dihydroxy-L-arginine を基質として酵素反応を行った。反応液を LCMS にて分析したところ、L-hydroxycapreomycidine あるいは streptolidine の分子量 188 に一致する反応産物を検出した。本化合物がこれら 2 つの化合物のどちらであるか検証するために、ST の塩酸加水分解物から streptolidine の調製を行い、LCMS で比較分析した。その結果、ORF14 産物は streptolidine と一致しなかったことから、L-hydroxycapreomycidine であることが示唆された。



streptothricin, streptolidine, aminotransferase

講演番号：4C22a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ C 校舎 22 会場

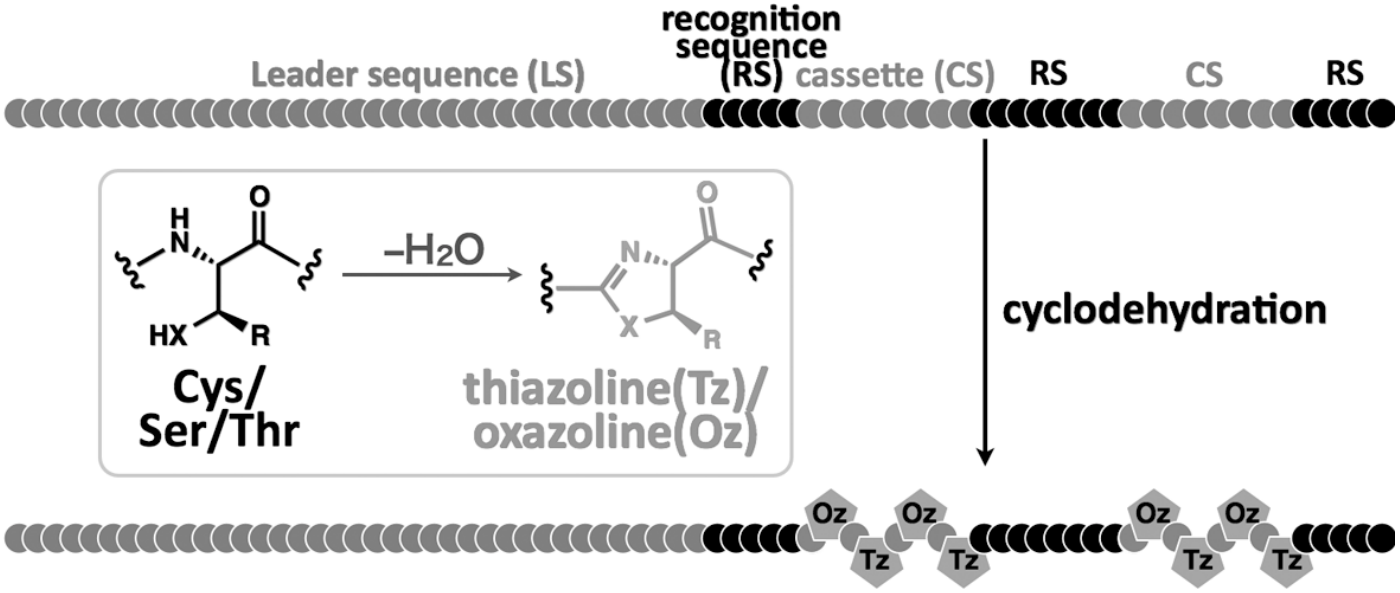
再構成天然物生合成系を利用した翻訳後ヘテロ環化酵素の触媒能解明

A reconstituted natural product biosynthesis system reveals a unique catalytic activity of a posttranslational heterocyclase

○後藤 佑樹[1,2]、伊藤 悠美[3]、加藤 保治[1]、角田 翔太郎[1]、菅 裕明[1]（[1]東大院理、[2]JST さきがけ、[3]東大院工）
○Yuki GOTO[1,2], Yumi ITO[3], Yasuharu KATO[1], Syotaro TSUNODA[1], Hiroaki SUGA[1] ([1]Grad. School of Science, Univ. of Tokyo, [2]PRESTO, JST, [3]Grad. School of Engineering, Univ. of Tokyo)

シアノバクチンの生合成に関わる翻訳後修飾酵素 PatD は、基質ペプチド配列中の Ser/Thr/Cys 残基をアゾリン骨格へと変換する酵素である。PatD に代表される二次代謝産物の生合成に関与する翻訳後ヘテロ環化酵素によって修飾を受ける基質ペプチドには、リーダー配列や認識配列と呼ばれる複数の基質間で保存された配列要素が含まれることが分かっている。これらの修飾酵素は、アゾリン骨格含有化合物を合成するための有用な生化学的ツールとして応用が期待されるが、「基質に保存された配列要素の機能は何であるのか？」、「どれほど幅広い基質を修飾できるのか？」といった点についての明確な知見はこれまで得られていない。

これまでに我々は、in vitro で活性を再構成した PatD と無細胞翻訳ペプチド生合成系とを組み合わせた新規人工生合成システムの構築に成功している。今回本生合成系を活用することで、PatD によって修飾されうるペプチド配列を網羅的に調査し、基質上のリーダー配列及び認識配列の PatD 反応における役割を明らかにした。さらに、遺伝暗号のリプログラミング法と組み合わせることで、PatD が非天然型の様々なアゾリン環を合成し得ることも見出した。



engineering of secondary metabolite biosynthesis system, posttranslational modification enzyme, artificial azoline molecules

講演番号：4C22a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ C 校舎 22 会場

テトラプレニル-β-クルクメン環化酵素のさらなる能力の解析
Analyses of further potency of tetraprenyl-beta-curcumene cyclase
佐藤 努[1,2]、○上田 大次郎[2]、岡本 渉[1]、仲野 千秋[1]、星野 力[1,2] ([1]新潟大院自、[2]新潟大農)
Tsutomu SATO[1,2], ○DAIJIRO UEDA[2], Wataru OKAMOTO[1], Chiaki NAKANO[1], Tsutomu HOSHINO[1,2] ([1]Niigata Univ., [2]Niigata Univ.)

【背景】

最近、我々は、*Bacillus*属細菌に存在するセスクアテルペン（C_{35}テルペン）の生合成研究から、４環を形成するテトラプレニル-β-クルクメン環化酵素（TC）も同定した[1)]。さらに、*B. megaterium*の生体内において、TCはC_{30}のスクアレンも基質として、２環性トリテルペン**1**を形成する二機能性テルペン環化酵素であることも証明している[2)]。

今回、TC を新たに２つの基質と反応させて解析したところ、５環を形成する能力があること、およびスクアレンの両末端から環化する能力があることが明らかになったので報告する。

【結果と考察】

好アルカリ性の*B. clausii* から単離した非環状トリテルペン**2** [3)]を精製組換えTCと反応させたところ、２つの生成物を確認できた。10 mgの**2**を組換えTCを含む大腸菌無細胞抽出液と反応させ、２つの生成物**3**と**4**を単離した（**3**: 3.1 mg, **4**: 1.4 mg)。NMRとMSの解析から、**3**と**4**は、５環性トリテルペンであることを決定できた。したがって、TCは５環まで形成する能力があることが判明した。我々の知る限りhead-to-tail型の環状トリテルペンの酵素合成は初めてである。また、好アルカリ性*Bacillus*属にはTCホモログが存在していないことから、**3**と**4**は非天然型であると考えている。

精製組換えTCをスクアレンと反応させると微量の副生成物**5**が検出された。**5**は２環性トリテルペン**1**を基質とすると生成することから、スクアレンの両末端から環化したトリテルペン（オノセロイド）である可能性が高い。**5**は*B. megaterium*の菌体からも見出せており、天然物である。現在、**1**を組換えTCを含む大腸菌無細胞抽出液と反応させ、生成物**5**の単離・構造決定を行っている。オノセロイドは主にシダ植物から単離されているトリテルペンであるが、オノセロイド合成酵素の同定は今まで報告されていない。

【文献】

1) T. Sato et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 9734-9737 (2011).
2) T. Sato et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 17540-17543 (2011).
3) 佐藤ら：2012 年度日本農芸化学会大会（3A06a12）

isoprenoid, terpenoid, terpene synthase

講演番号：4C22a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ C 校舎 22 会場

植物毒素チコリン生合成遺伝子の全塩基配列の決定
Determination of whole gene sequence responsible for biosynthesis of phytotoxin cichorin
佐藤 努[1,2]、○山之内 健太[1]、若林 広恵[1]、橋本 昌征[3]、兼目 裕充[4]、浅川 義範[4]、白川 隆[5]、仲野 千秋[1]、星野 力[1,2] ([1]新潟大院自、[2]新潟大農、[3]成功大・分医研、[4]徳島文理大薬、[5]農研機構)
Tsutomu SATO[1,2], ○Kenta YAMANOUCHI[1], Hiroe WAKABAYASHI[1], Masayuki HASHIMOTO[3], Hiromichi KENMOKU[4], Yoshinori ASAKAWA[4], Takashi SHIRAKAWA[5], Chiaki NAKANO[1], Tsutomu HOSHINO[1,2] ([1]Niigata Univ., [2]Niigata Univ., [3]National Cheng Kung Univ., [4]Tokushima Bunri Univ., [5]NARO)

【背景】

我々は*Pseudomonas cichorii*が生産するペプチド系のレタス腐敗性植物毒素チコリンの単離・構造決定を報告している[1)]。チコリンは非タンパク性アミノ酸を含む22個のアミノ酸と脂肪酸から構成され一部環状構造をとっていることから、非リボソーム依存性ペプチド合成酵素（NRPS）によって生合成されていることが予想される。酵素は22個のモジュールをもつと予想され、シリンゴペプチン合成酵素と並んで最多のモジュールをもつNRPSであると考えられる。既に、最下流に位置するタンデムTEドメインをクローニング後、遺伝子破壊実験の結果からチコリン遺伝子であることを確認し、最下流部約7kbの塩基配列を報告している[2)]。ゲノム内に類似したNRPSのモジュール遺伝子が数多く存在することから、配列の解読には紆余曲折があったが、今回、全長配列（約70kb）の決定の目途が立った。

【結果と考察】

遺伝子破壊株の染色体を BAC ベクターにショットガンクローニングし、破壊株に挿入されたアンピシリン耐性遺伝子を利用したスクリーニングによって、チコリン生合成遺伝子の最下流部を得ることができた。ショットガンシーケンスによって最下流部約 20 kb の塩基配列を決定することができた。また、次世代シーケンサーによって *P. cichorii* のゲノムを解析したが、数多くの類似した NRPS のモジュールが存在しているようで、長いコンティグを得ることができなかった。しかし、開始部に位置する Dht-Pro と、中央部に位置する Val-Ile-Ser のモジュールと考えられる短いコンティグを見つけることができた。Dht-Pro を遺伝子破壊したところ、チコリンが生産されなくなったので、Dht-Pro はチコリン生合成遺伝子の開始部であることが判明した。Val-Ile-Ser と BAC クローニングで明らかになった下流部の間（約 12kb）で PCR を行ったところ、両末端の配列が一致した断片を増幅できた。一方、開始部と Val-Ile-Ser の間（約 21kb）は 1 回の PCR で増幅することができなかった。詳細を省略するが結果的に４回の PCR によって全ての配列がつながった４つの断片を得ることができた。したがって、チコリン生合成遺伝子の全断片を得ることに成功した。現在、全塩基配列の決定を行っている。

【文献】

1) 小松英一、白川隆、内山武夫、星野力、日本農芸化学会講演要旨集 **1999**, 313.
2) 佐藤努、竹内俊介、白川隆、星野力、日本農芸化学会講演要旨集 **2008**, 172.

Nonribosomal peptide synthetase, phytotoxin, NRPS

講演番号：4C25a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ C 校舎 25 会場

モノクロロジメドン測定法の根底
The bottom of monochlorodimedone assay

○知名 秀泰、岡田 豊（立命館大生命科学）
○Hideyasu CHINA,Yutaka OKADA (Ritsumeikan Univ.)

【目的】モノクロロジメドン測定法は、モノクロロジメドン(MCD)を基質にハロゲン化や酸化などの活性を紫外吸収の減衰から評価する方法であり、特にハロゲン化酵素における唯一の活性評価法として古くから用いられてきた。しかし、生成物であるモノブロモモノクロロジメドン(MBMCD)の検出や基質の異性化において不明な点が多く、未だ不確定要素が存在する。本研究では、ハロゲン化酵素における正確な活性評価法の構築を目的とし、モノクロロジメドン測定法を詳細に調査した。
【方法・結果】まず、ケトーエノール互変異性を有するとされてきた MCD の異性化を動的 NMR によって検討した。MCD の NMR スペクトルは、濃度、温度、及び pH などにより顕著に変化するが、温度制御下での二次元 NMR と MCD 誘導体の NOE 実験により MCD の構造はエノール体と決定し、横緩和時間(T_2)の変化からこれら依存性はエノールーエノール互変異性によるものであることが示された。次に Perhydrolase の活性測定条件をモデルとし、NaBr 存在下の基、過酢酸を用いてブロモ化反応を検討した。与えられた生成物は、MBMCD、ハロカルボン酸体(**1a-b**)、ハロラクトン体(**2a-b**)、及びハロ不飽和ケトン体(**3**)であり（図１）、これら生成物の同定は合成によっても確かめられた。しかし、種々の生成量は pH に強く依存し、MBMCD は中性付近で速やかに MCD や化合物 **1-3** に変換され、また化合物 **1a-b** も脱ハロラクトン化により化合物 **2a-b** へと変換された。それ故、MBMCD を鍵中間体とする反応経路が明らかとなり（図１）、各段階の反応機構においても詳細に検討した。

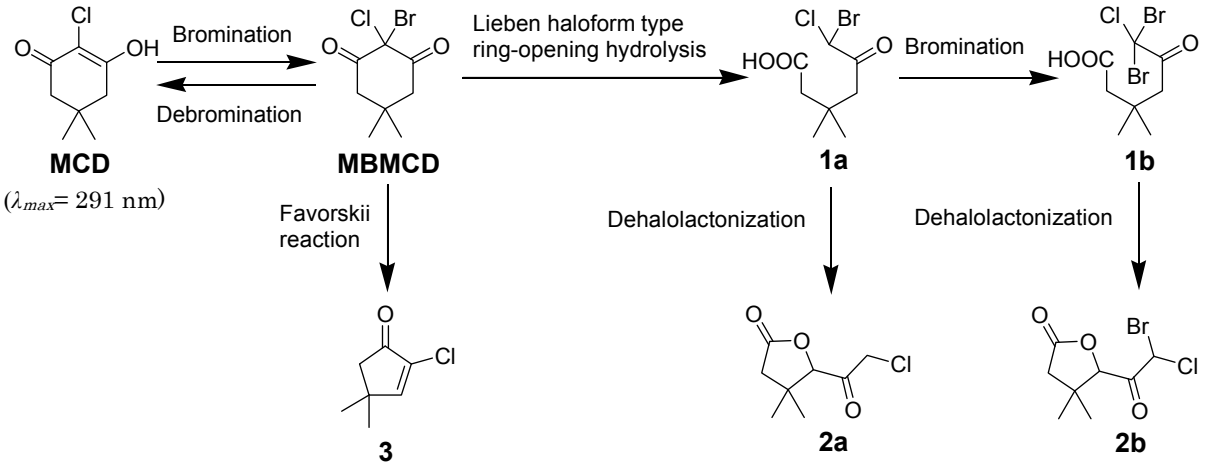


図１　MCD のブロモ化における反応経路

Monochlorodimedone, Bromination, Dynamic NMR

講演番号：4C25a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ C 校舎 25 会場

ヤエヤマサソリ毒液中に含まれる機能未知のペプチド La1 の化学合成

Total chemical synthesis of La1, the most abundant peptide in the venom of the scorpion Liocheles australasiae

○長尾 淳也、宮下 正弘、中川 好秋、宮川 恒（京大院農）
○ Junya NAGAO,Masahiro MIYASHITA,Yoshiaki NAKAGAWA,Hisashi MIYAGAWA (Kyoto Univ.)

【目的】サソリ毒液中には多数の生理活性成分が存在し、その多くは各種イオンチャネルに作用する神経毒ペプチドである。我々はこれまでに、ヤエヤマサソリの毒液から 3 種類のペプチド LaIT1、LaIT2、La1 を単離構造決定し、LaIT1 と LaIT2 については殺虫活性をもつことを明らかにしている。しかしながら、La1 についてはヤエヤマサソリ毒液中に最も多く存在するペプチドであるにも関わらず、生物学的役割は不明である。La1 は 73 残基のアミノ酸からなり、4 組のジスルフィド結合を含むが、近年、La1 に類似した構造をもつ機能未知のペプチドが、他のサソリだけでなくダニ、昆虫などからも発見されており、La1 の役割に関心が持たれている。本研究では、La1 の機能解明に必要な試料供給を目的として、La1 の化学合成を行った。

【方法と結果】直鎖状 La1 の合成には、ペプチドフラグメント縮合法の一つである Native Chemical Ligation（NCL）法を用い、3 つのフラグメント（C 末端側、中間、N 末端側）の連続的な縮合を行った。まず、それぞれのフラグメント La1(43-73)、[Thz^{29}]La1(29-42)-チオエステル、La1(1-28)-チオエステルを Fmoc 固相合成法によって調製した。ペプチドチオエステルは、N-acylurea 中間体を経由する方法により調製した。次に、4-メルカプトフェニル酢酸を含む水溶液中で[Thz^{29}]La1(29-42)-チオエステルと La1(43-73)を縮合させた。縮合後に、メトキシアミン塩酸塩を NCL 溶液に加えて N 末端 Thz 残基を Cys に変換し、La1(29-73)を得た。これを HPLC で精製した後、同じ条件で La1(1-28)-チオエステルとの縮合を行った。精製して得られた直鎖状の La1 を 10%(v/v)酢酸に溶かして透析膜に入れ、グルタチオンを含む酸化還元緩衝液に対して透析することで、ジスルフィド結合を形成させた。得られたペプチドは HPLC 上の挙動の比較により、天然 La1 と同一であることを確認した。



La1 のアミノ酸配列。矢印は縮合位置を示す。C 末端はアミド化されている。

scorpion venom, native chemical ligation, folding

講演番号：4C25a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ C 校舎 25 会場

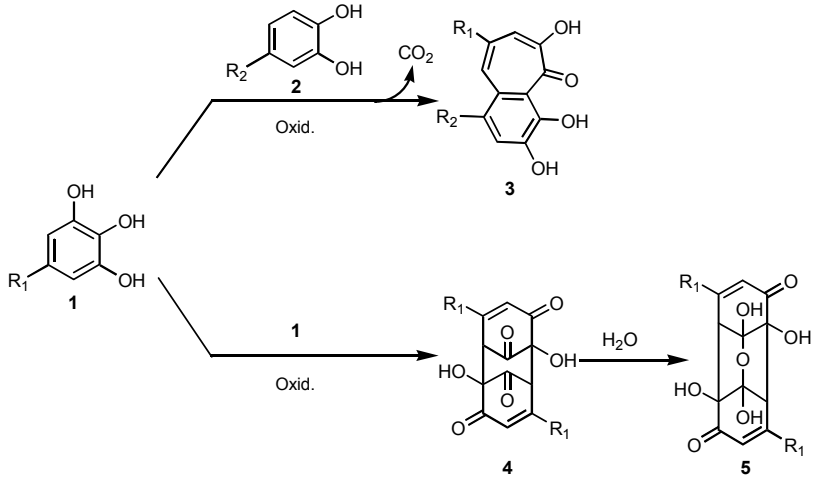
茶カテキン B 環部の酸化生成物に関する研究

The oxidation study of model compounds of tea catechin

○廣瀬 紗弓、柳瀬 笑子（岐阜大院応生）
○Sayumi HIROSE,Emiko YANASE (Gifu Univ.)

【目的】カテキンは茶葉に多く含まれており、抗酸化作用、抗がん作用などの生理的機能が注目されている。一方、茶の製造過程の発酵により茶葉中のカテキン類が酸化、重合してできる紅茶色素成分のテアフラビン類は、カテキン類と同等、もしくはそれ以上の生理的機能が期待されている。しかしテアフラビン類の紅茶中の含量は非常に少なく、また有機化学的合成法も確立されているが収率は低いため、その作用機構等の解明のための十分な量が得られていない。そこで本研究では、テアフラビン類が合成される際の反応部である茶カテキン B 環部のモデル化合物を用いて、その反応性を検討した。

【方法・結果】酸化剤としてフェチゾン試薬を用い、5 位置換ピロガロール (**1**)と 4 位置換カテコール (**2**)でベンゾトロポロン類縁体 (**3**)を合成した。カテコール (R_2=H)と R_1 に様々な置換基をもつ **1** を反応させた結果、**3** の収率はどれも 70%前後となった。一方、5-メチルピロガロール (R_1=Me) と R_2 に様々な置換基をもつ **2** を反応させると、収率は置換基の種類によって変化した。その原因として、置換基の立体障害や電子供与性が影響している可能性が示唆されたため、さらに様々な置換基をもつ **2** を用いて **3** の合成を検討した。その結果、置換基の立体障害による影響が大きいことがとわかった。また、**3** の合成の際の HPLC 分析と ^{1}H-NMR 測定から副生成物の存在が明らかとなり、各種機器分析及び誘導化反応の結果、**1** が酸化されて 2 分子縮合した **4** であると判明した。**4** の反応性についても検討すると、水と反応してより安定な **5** となることがわかったので、これについても報告する。



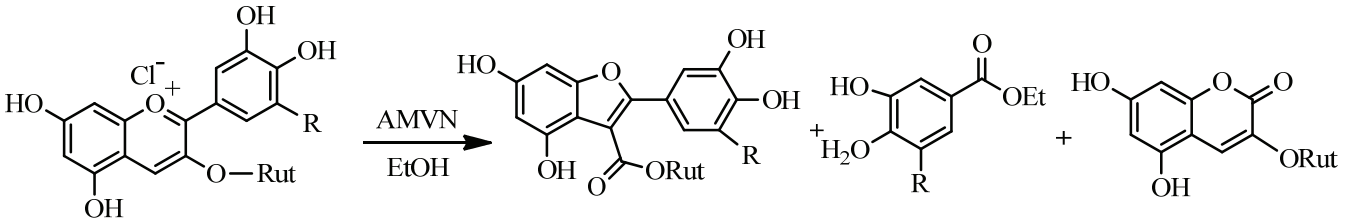
Catechin, Theaflavin, Benzotropolone

講演番号：4C25a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ C 校舎 25 会場

アントシアニン類のラジカル酸化反応
The radical oxidation of anthocyanins
○長谷川 和俊、柳瀬 笑子（岐阜大院応生）
○Kazutoshi Hasegawa,Emiko Yanase (Gifu Univ.)

【目的】　アントシアニン類はポリフェノールの一種であり、赤色から紫色を呈する色素成分として果物や花など自然界に多く分布し、食品中にも多く含まれる。また、強い抗酸化作用、抗ガン作用、抗炎症作用など様々な生理活性を有することが注目されている。しかし、化学的に不安定であり、その反応性や反応機構に関する報告が少ない。我々はこれまでにカシス中の主要アントシアニンである Cyanidin 配糖体 (**1**)を用いたラジカル酸化反応について詳細に検討し、ベンゾフラン骨格を持つ化合物 (**3**)および B 環部由来の化合物 (**4**)の単離に成功している。本研究では B 環部の構造が異なる Delphinidin 配糖体 (**2**)を用い、同様にラジカル酸化反応を行い、その反応機構の解明を目的とした。

【方法・結果】　Delphinidin 3-*O*-rutinoside (**2**)を EtOH 中でラジカル開始剤の AMVN を用いて、ラジカル酸化反応を行ったところ、**1** の場合と同様に相当する化合物 **3**, **4** の生成が確認された。さらに **1** では見られなかった分解生成物が確認できたため、逆相 HPLC で分取し、NMR、MS 等を用いて構造決定を行ったところ、Delphinidin の B 環部が脱離したクマリン骨格を持つ化合物 (**5**)であると明らかになった。次に各種ラジカル開始剤を用いて、この反応を検討したところ、これまで用いてきた AMVN より反応性の高い V-70 を用いた方が **5** が多く生成することが明らかになった。また、**1** と **2** の EtOH 中における V-70 に対する安定性を調べたところ、Delphinidin の方が 2 倍近く不安定であることが分かった。これらを踏まえ、ラジカル酸化機構について考察した。



1 : R = H, Cyanidin 3-*O*-rutinoside
2 : R = OH, Delphinidin 3-*O*-rutinoside

anthocyanins, radical, oxidation

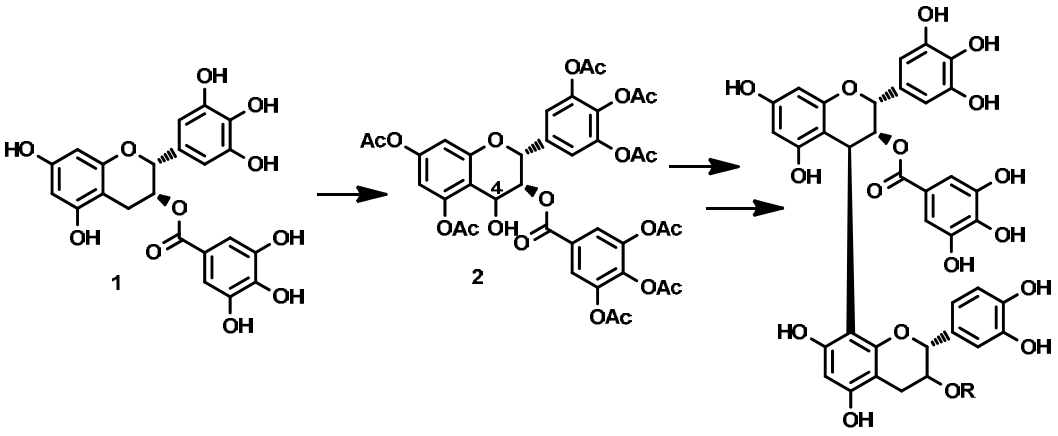
講演番号：4C25a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ C 校舎 25 会場

アセチル化求電子体を用いたプロアントシアニジンの合成研究
Synthetic study of proanthocyanidins using peracetyl electvophiles
○土井 翔馬[1]、春井 宏太[2]、岡本 泰輔[1]、石原 沙也加[1]、岡本 修平[1]、中島 範行[3]、齊藤 安貴子[1,2]
([1]大阪電通大院・工、[2]大阪電通大・工、[3]富山県大・工)
○Syoma DOI[1], Kota HARUI[2], Taisuke OKAMOTO[1], Sayaka ISIHARA[1], Syuhei OKAMOTO[1], Noriyuki NAKAJIMA[3], Akiko SAITO[1,2] ([1]OECU, [2]OECU, [3]TPU)

【目的】

Proanthocyanidin(PAs)は、お茶やカカオの嗜好品、ブドウ等の果物類など、多くの植物に含まれる高機能性ポリフェノール化合物である。これらは、極めて強い抗酸化活性・動脈硬化抑制活性・抗腫瘍活性・抗炎症作用・発ガン抑制作用等、様々な生物活性を示す。しかし、天然からは複雑な類縁体化合物として得られ純粋に単離することが難しく、詳細な構造-活性相関研究や活性発現機構についてはほとんど解明されていない。その一方で、お茶カテキンとして知られる(-)-epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) **1** は、細胞膜上の受容体として同定された 67 kDa ラミニンレセプター (67LR) を介して様々な生理活性を示すことが報告され、注目されている[1]。我々は、オリゴマーの一部に EGCG を持つオリゴマーの活性に注目して研究を進めている。我々は、ガロイル基を有する procyanidin 2 量体が HeLa.S3 細胞に対して EGCG よりも強い細胞増殖抑制活性を有することを明らかにしている。ならば、EGCG を持つオリゴマーの活性はより強いと予想される。しかし、現在行われている EGCG を持つオリゴマーの合成はステップ数が多いうえ、高価な試薬を必要とする。そこで我々は、大量に入手可能な EGCG を原料として簡単・効率的にオリゴマーを合成可能な方法の開発を進めた。

【方法と結果】



EGCG **1** をアセチル化し、ほぼ定量的に peracetate を得、4 位を選択的に臭素化、次いで、水酸基への変換を効率よく行うことが出来た。この 4 位に水酸基を持つ求電子体に求核体を Lewis 酸存在下縮合させることで EGCG を分子内に持つオリゴマーの合成を行うことが出来た。この方法は、他の市販の単量体にも応用でき、それらをまとめて報告する。

参考文献) 1. Tachibana H, *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004, **11**, 380-381

proanthocyanidin, EGCG, peracetyl electvophiles

講演番号：4C25a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ C 校舎 25 会場

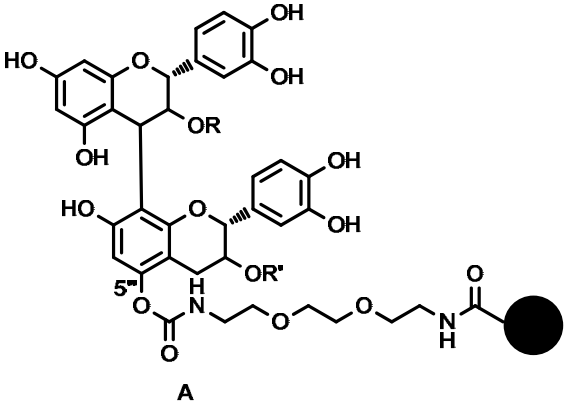
プロシアニジン・オリゴマーのプローブ化研究
Synthesis of procyanidin oligomer probes
○岡本 泰輔[1]、東野 雄祐[2]、濱田 義知[2]、石原 沙也加[1]、岡本 修平[1]、土井 翔馬[1]、中島 範行[3]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大院・工、[2]大阪電通大・工、[3]富山県大・工)
○Taisuke OKAMOTO[1], Yusuke HIGASHINO[2], Yoshitomo HAMADA[2], Sayaka ISHIHARA[1], Syuhei OKAMOTO[1], Syoma Doi[1], Noriyuki NAKAJIMA[3], Akiko SAITO[1,2] ([1]OECU, [2]OECU, [3]TPU)

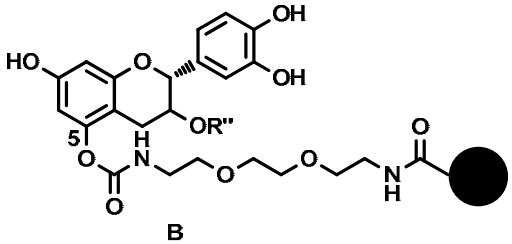
【目的】

Proanthocyanidin(PAs)は、お茶やカカオの嗜好品、ブドウ等の果物類、スギ等の樹皮など、多くの植物に含まれる高機能性ポリフェノール化合物である。これらは、極めて強い抗酸化活性・動脈硬化抑制活性・抗腫瘍活性・抗炎症作用・発ガン抑制作用等、様々な生物活性を示す。しかし、天然からは複雑な類縁体化合物として得られ純粋に単離することが難しく、詳細な構造-活性相関研究や活性発現機構についてはほとんど解明されていない。我々は、高機能の PAs を立体選択的に合成し、それぞれの機能を詳細に確認するために、立体選択的合成研究、および、構造-活性相関研究を進めている。発表者はこれまでに、プロシアニジン 2 量体の合成中間体において、5”位を選択的に脱保護する手法の開発に成功している。5”位は、生物活性に対する関与が低い位置として知られており、これを利用することで分子プローブの作成が可能だと考えた。本発表においては、5”位の選択的修飾および、プローブ化について、さらにそれらを用いた化学生物学的研究について報告する予定である。

【方法と結果】

2 量体の 5”位を修飾したプロシアニジン・オリゴマーの分子プローブを合成するために様々な検討を進めた結果、イソシアネート誘導体が収率良く得られることが確認された。今回は triethylene glycol から誘導したイソシアネートを導入し、2 量体からは A を合成することが出来た。また、生物活性の低い単量体から、コントロール化合物として B を合成した。現在、リンカーの長さが異なるプローブの合成、および、リンカーの性質が異なるプローブ等の合成をさらに進めている。





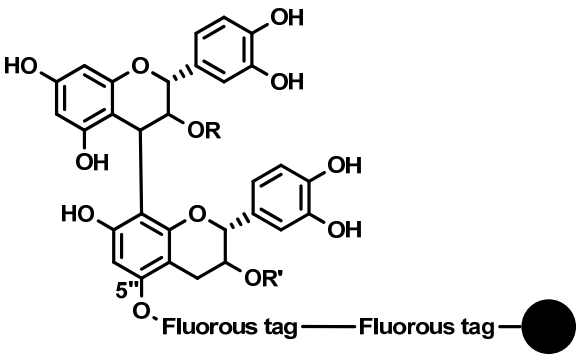
Procyanidin, stereoselective synthesis, molecular probe

講演番号：4C25a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ C 校舎 25 会場

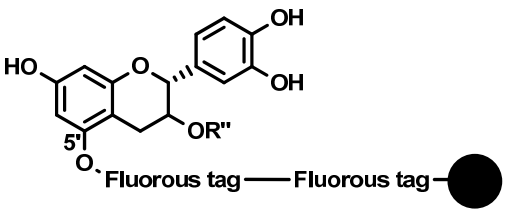
フルオラス・タグ化したプロシアニジンの合成と化学生物学研究
Synthesis of F-tag-procyanidins and chemical biological study.
○森口 正太郎[1]、石原 沙也加[2]、岡本 泰輔[2]、東野 雄祐[1]、春井 宏太[1]、小芦 貴弘[1]、齋藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大・工、[2]大阪電通大院・工)
○Shotaro MORIGUCHI[1], Sayaka ISHIHARA[2], Taisuke OKAMOTO[2], Yusuke HIGASHINO[1], Kota HARUI[1], Takahiro KOASHI[1], Akiko SAITO[1,2] ([1]OECU, [2]OECU)

【目的】

Proanthocyanidin(PAs)は、お茶やカカオの嗜好品、ブドウ等の果物類、スギ等の樹皮など、多くの植物に含まれる高機能性ポリフェノール化合物である。これらは、極めて強い抗酸化活性・動脈硬化抑制活性・抗腫瘍活性・抗炎症作用・発ガン抑制作用等、様々な生物活性を示す。しかし、天然からは複雑な類縁体化合物として得られ純粋に単離することが難しく、詳細な構造-活性相関研究や活性発現機構についてはほとんど解明されていない。我々は、高機能の PAs を立体選択的に合成し、それぞれの機能を詳細に確認するために、立体選択的合成研究、および、構造-活性相関研究を進めている。また、フルオラス・タグとは、フッ素化した脂肪酸を用いた「タグ」（目印）であり、フッ素化脂肪酸同士の強い相互作用を利用することで、ケミカルバイオロジー研究に使用可能な分子団である。フルオラス化合物の特徴は、疎水性が非常に高く、有機合成で使用する一般の溶媒と混合しにくい性質から抽出・精製・合成の各過程において、フッ素含量の高い化合物を分配操作のみで選択的に得ることが出来る事から、主にコンビナトリアル合成に用いられている。我々は、PAs の機能を解明するため、様々なタイプのプローブ分子の合成を進めている。本発表では、プロシアニジン・オリゴマーにフルオラス・タグの導入、および、その応用について発表する予定である。



A



B

【方法と結果】

我々が開発した手法を用いて、プロシアニジン・オリゴマーの 5”位に選択的にフルオラス･タグを導入した。様々な生物活性試験において、単量体は対タンパク質に対する活性が低いことが確認されている。そこで、単量体と 2 量体のそれぞれにフルオラス・タグを導入し、それらのタンパク質との相互作用を検出することが可能ならば、活性が物理的な相互作用によるものか確認できると考えた。現在、プロシアニジン・オリゴマーが阻害活性を有するタンパク質を用いた結合実験を進めている。

Proanthocyanidin, F-tag, Chemical biology

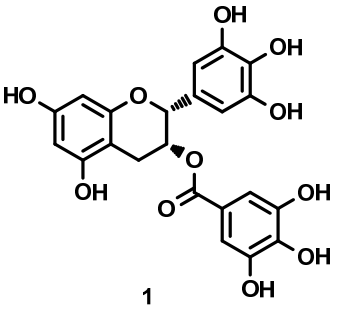
講演番号：4C25a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ C 校舎 25 会場

プロシアニジン 2 量体の 3,3''-ジガレート体は HeLa S3 細胞の増殖を強く阻害する
Procyanidin-dimer-3,3''-digallates inhibit HeLa S3 cells proliferation strongly.

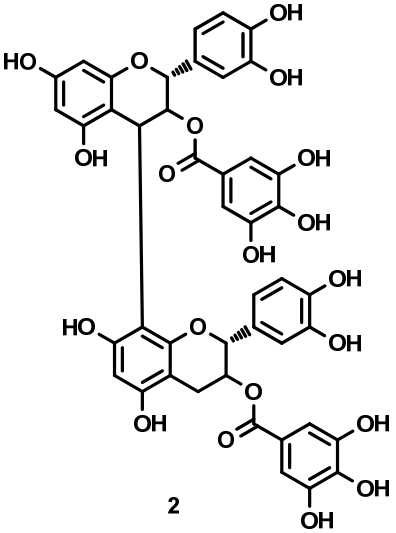
○石原 沙也加[1]、岡本 修平[1]、土井 翔馬[1]、岡本 泰輔[1]、綾野 義博[2]、奥谷 晃平[2]、須藤 龍彦[3]、長田 裕之[3]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大院・工、[2]大阪電通大・工、[3]理研基幹研・ケミカルバイオロジー)
○Sayaka ISHIHARA[1], Shuhei OKAMOTO[1], Syoma DOI[1], Taisuke OKAMOTO[1], Yoshihiro AYANO[2], Kohei OKUTANI[2], Tatsuhiko SUDO[3], Hiroyuki OSADA[3], Akiko SAITO[1,2] ([1]OECU, [2]OECU, [3]Chem. Biol., RIKEN ASI)

【目的】

Proanthocyanidin(PAs)は、お茶やカカオの嗜好品、ブドウ等の果物類、スギ等の樹皮など、多くの植物に含まれる高機能性ポリフェノール化合物である。これらは、極めて強い抗酸化活性・動脈硬化抑制活性・抗腫瘍活性・抗炎症作用・発ガン抑制作用等、様々な生物活性を示す。しかし、天然からは複雑な類縁体化合物として得られ純粋に単離することが難しく、詳細な構造-活性相関研究や活性発現機構についてはほとんど解明されていない。その一方で、お茶カテキンとして知られる(-)-Epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) **1** は、細胞膜上の受容体として同定された 67 kDa ラミニンレセプター (67LR) を介して様々な生理活性を示すことが報告されている[1]。さらに、EGCG は 67LR を介する情報伝達の過程で p38MAPK を含む MAPK のリン酸化を阻害することが報告された[2]。我々は、PAs の抗炎症作用などの活性発現が EGCG と同様の経路によるものか、また、全く異なる活性発現機構を持つのか化学的・生物学的に証明するため研究を進めている。



1



2

【方法と結果】

立体選択的合成によって純粋に得られた種々の PAs を用いて HeLa S3 細胞に対する増殖抑制活性試験を行った。その結果、**2** のようなガロイル基を 2 分子導入した 2 量体数種類が、EGCG よりも高い増殖抑制活性を示した。さらに、これらの化合物が p38MAPK の細胞内残存量に影響を与えることを確認した。EGCG では同様な現象が見られない事から、EGCG とは異なる機構で活性を発揮している可能性が示唆された。現在、さらに検討を行っており、本大会において詳細を報告する予定である。

参考文献）1. Tachibana H, *et al.*, *Nat Struct Mol Biol.* 2004, **11**, 380-381
2. Eui-Baek Byun, *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 2012, **426**, 480-485

proanthocyanidin, cell cytotoxicity, structure-activity-relationships

講演番号：4C25a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ C 校舎 25 会場

白血病細胞分化誘導物質 indoluidin の構造活性相関研究
Structure-activity relationships of indoluidin, a differentiation inducer of HL-60 cells
○大倉 彰太[1,2]、清水 猛[1]、川谷 誠[1]、青野 晴美[1]、篠崎 開[2]、長田 裕之[1] ([1]理研基幹研・ケミカルバイオロジー、[2]東電大院工)
○Shouta Ohkura[1,2], Takeshi Shimizu[1], Makoto Kawatani[1], Harumi Aono[1], Hiraku Shinozaki[2], Hiroyuki Osada[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN ASI, [2]Tokyo Denki Univ.)

【目的】我々は動物細胞の増殖や分化を制御する生理活性小分子化合物（バイオプローブ）の探索および作用機序・作用標的に関する研究を行っている。ヒト急性前骨髄性白血病細胞株であるHL-60細胞は、細胞分化機構の解析や分化誘導剤のスクリーニングに用いられる細胞としてよく知られている。今回、HL-60細胞を用いてスクリーニングした結果、強い分化誘導活性物質としてindoluidinが見出された。しかしながら、indoluidinは立体異性体の混合物であった。そこでindoluidinの可能な四種の光学異性体A,B,CおよびDを合成し、強い分化誘導活性を有する活性の本体を解明することとした。また、更なる活性の向上を期待し、誘導体合成を行うこととした。
【方法・結果】最初に、考えられる異性体のうちの(*S,S*)の立体配置を有する indoluidin A を合成することとした。L-Tryptophan を出発原料として、そのアミノ基を Boc 基で保護した後、toluidine と縮合した。次に得られた縮合体の Boc 基を除去後、3*S*-*N*-(Boc)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline carboxylic acid と縮合した。さらに得られた縮合体の Boc 基を除去し、(*S,S*)の立体配置を有する indoluidin A を合成した。同様にして残りの三種類の光学異性体を合成した。これら四種の光学異性体の分化誘導活性を調べたところ、(*R,R*)の立体配置を有する indoluidin D が最も強い活性を示すことが明らかになった。Indoluidin の様々な誘導体合成およびそれらの活性についてもあわせて報告する。

indoluidin, differentiation-inducer, SAR

講演番号：4C25a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ C 校舎 25 会場

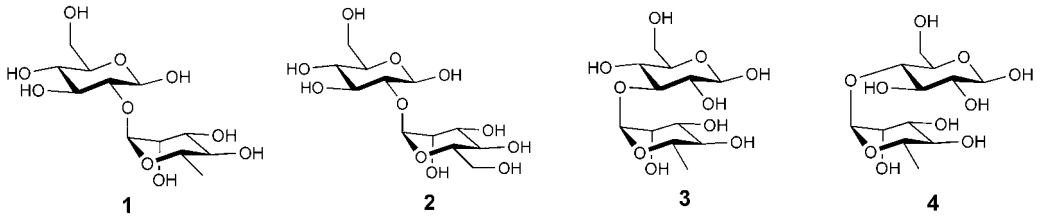
インスリン様作用を有する二糖 neohesperidose の構造活性相関研究

Structure activity relationship study on insulin mimetic activity of neohesperidose

○新谷 卓士[1]、加藤 英介[2]、川端 潤[2] ([1]北大農・生機科、[2]北大院農・応生科)
○Takushi ARAYA[1], Eisuke KATO[2], Jun KAWABATA[2] ([1]Fac. Agr. Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Agr. Hokkaido Univ.)

【目的】当研究室で行われた単独で細胞に糖吸収を促進させる作用（インスリン様作用）を示す化合物 Kaempherol-3-*O*-neohesperidoside の構造活性相関研究によって、その活性は二糖部分の neohesperidose (**1**)が担っていると判明した。しかし **1** がインスリン様作用を示すメカニズムと、その活性に重要な構造上の特徴に関しては未解明である。これを解明することは現在深刻な国民病になりつつある糖尿病治療に対する新たなアプローチを探るうえで有用であり、またインスリンを用いる従来の治療方法の代替となる可能性をもつ。そこで本研究では、neohesperidose (**1**)と構造が類似した二糖類を合成し、そのインスリン様活性を測定することで、活性に重要な構造上の特徴を探ることを目的とした。

【方法と結果】有機化学的手法を用いてそれぞれの糖部分の誘導体を合成し、それらをカップリングさせることで様々な二糖を合成してそのインスリン様作用を評価した。インスリン様活性の評価は、筋細胞モデルを用いた 2-deoxyglucose 取り込み量の定量により行った。現在、**1** の構造中の **L**-rhamnose を **L**-mannose に変えた **2**、二糖間の結合位置を 1→2 結合から 1→3、1→4 結合に変えた **3**,**4** の合成を達成し、その活性を検討している。また、糖の組み合わせを変えた 1→2 結合を有する各種の二糖の合成も行っている。



disaccharide, diabetes mellitus, glucose uptake

講演番号：4C25a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ C 校舎 25 会場

霊長類モデルにおける SMTP-7 の脳梗塞改善作用

Pharmacological activity of SMTP-7 in a primate thrombotic stroke model

○蓮見 惠司[1]、庄 杰[1]、澤田 裕伸[2]、西村 直子[2]、長谷川 啓子[2]、鈴木 絵里子[1] ([1]東京農工大農、[2]株式会社ティムス)
○Keiji Hasumi[1], Getsu Sho[1], Hironobu Sawada[2], Naoko Nishimura[2], Keiko Hasegawa[2], Eriko Suzuki[1] ([1]Tokyo Noko Univ., [2]TMS)

［背景・目的］
脳梗塞急性期の治療においては、より長い治療可能時間域を有する治療薬の開発が急務である。プラスミノーゲンモジュレーター活性を有する小分子化合物 SMTP-7 はげっ歯類を用いた血栓性脳梗塞モデルにおいて優れた効果を示し、現在医薬開発段階にある。SMTP-7 の優れた薬理活性は、プラスミノーゲンモジュレーター活性による血栓溶解促進に加えて抗炎症作用にも起因することが明らかとなりつつある。一方、国内外で行われた脳梗塞治療薬開発の幾多の挫折例の経験から、ヒトへの外挿性に優れた動物種および病態モデルでの有効性の根拠が求められている。また、現在、脳梗超塞急性期の唯一の治療薬である組織プラスミノーゲンアクチベーター（t-PA）は、出血リスクを増加させる有害事象をもつため、SMTP-7 の出血リスクを知ることも重要である。このような観点から、本研究は、①霊長類（カニクイザル）の血栓性脳梗塞モデルを用いた SMTP-7 の薬効評価、②健常カニクイザルを用いた、凝固・線溶および一般薬理パラメーターへの SMTP-7 の影響評価、③げっ歯類（マウス、ラット）を用いた、凝固・線溶への影響と出血リスクの評価を行い、総合的に SMTP-7 の医薬ポテンシャルを理解することを目的とした。
［結果・考察］
カニクイザルを用いた血栓性脳梗塞モデル（血栓性中大脳動脈閉塞モデル）において、SMTP-7（10 mg/kg）投与により、梗塞領域の縮小、神経脱落症状の低減、炎症性の出血性変化を有意に抑制した。この薬効用量において、SMTP-7 は、健常カニクイザルの血液生化学、循環薬理、血小板凝集、血液凝固、および線溶のパラメーターに変化をもたらさなかった。ラットを用いた炎症性血管閉塞モデルにおいて、SMTP-7（10 mg/kg）の投与は、血栓性血管閉塞を有意に減少させた。この活性は t-PA 0.55 mg/kg に比肩するものであったが、マウス断尾試験において、t-PA (>0.1 mg/kg) 投与群で認められる出血時間の延長は、SMTP-7 (<30 mg/kg) 投与群においては認められなかった。これは、t-PA が直接プラスミノーゲンを活性化する薬剤であるのに対し、SMTP-7 はプラスミノーゲンのコンフォメーションを変化させ、内因性プラスミノーゲンアクチベーターによる活性化（プラスミンへの変換）を受けやすくするためと考えられる。加えて、SMTP-7 の抗炎症作用（別の演題で発表する、可溶性エポキシドハイドロラーゼの阻害と関連する）が、梗塞性出血の緩和に寄与している可能性が高く、SMTP-7 は脳梗塞急性期の新しい治療薬として有望である。

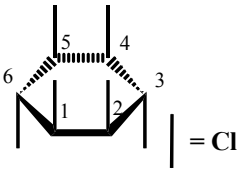
SMTP, plasminogen, thrombolytic

講演番号：4C25a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:12～ C 校舎 25 会場

γ-BHC 類縁体の合成とその活性
Synthesis of γ-BHC analogues and their insecticidal activities.
○永崎 果鈴[1]、辰己 侑加理[1]、田中 啓司[2]、松田 一彦[1]、森本 正則[1]、尾添 嘉久[3]、栗原 紀夫[4] ([1]近畿大農、[2]近畿大農・名古屋大エコトピア科、[3]島根大生物資源、[4]京都大)
○Karin NAGASAKI[1], Yukari TATSUMI[1], Keiji TANAKA[2], Kazuhiko MATSUDA[1], Masanori MORIMOTO[1], Yoshihisa OZOE[3], Norio KURIHARA[4] ([1]Kinki Univ., [2]Kinki Univ., Nagoya Univ., [3]Shimane Univ., [4]Kyoto Univ.)

目的：戦後の食糧生産に多大の貢献をしながら、長期残留性の為に使用禁止となった有機塩素系殺虫剤の BHC（1,2,3,4,5,6-Hexachlorocyclohexane）には、理論上 8 種類の立体異性体が存在し、単離可能な 7 種の立体異性体（α，β，γ，δ，ε，η，θ）の内、γ−BHC にのみ高い殺虫活性が認められている。 その作用部位は神経系、特に GABA 作動性の抑制性 Cl イオンチャンネルであることが知られている[1)]。 この部位には、ピクロトキシニンや環状エステル・オルトエステル（EBOB など）や最近開発された新規殺虫剤など、一見構造的に共通性のない様に思える化合物も共通に作用するとして注目を集めている。 先に、γ−BHC の塩素原子（Cl）の立体配位（*eeeaaa*, 1245/36）を維持したまま、Cl を他の置換基(H、F、Br、I、CH_3、OCH_3 など)で置き換えたγ−BHC 類縁体を合成し、構造活性相関研究を行った[2)]が、これらの置換基はいずれも疎水性の基であった。 最近、1 つの Cl を親水性の OH で置換しても殺虫活性を維持していることを見出し、今回、さらに 2 個以上の Cl を OH や OCH_3 などの基で置換した化合物を合成し、活性が維持されるかを調べた。

方法：BTC（3,4,5,6-Tetrachlorocyclohex-1-ene）を出発原料として、いくつか のγ-体の立体配位を有するγ−BHC の OH や OCH_3 置換類縁体を合成した。 そして、イエバエ、チャバネゴキブリ、カイコガに対するこれらの化合物の *in vivo* での殺虫活性を局所施用法やフィルム-コンタクト法で調べた。 *in vitro* での活性評価としては、イエバエ頭部の膜画分を用いた[^{3}H]-EBOB バインディング阻害活性、アフリカツメガエルの卵母細胞に発現させたイエバエ GABA 受容体-Cl イオンチャンネルの GABA 誘起電流阻害活性を調べた。



γ−BHC

結果：γ−BHC の 1 個の Cl を OH や OCH_3 などで置換した類縁体の中には、[^{3}H]-EBOB バインディング阻害活性や Cl イオンチャンネルの GABA 誘起電流の阻害活性が認められるものがあったが、これらの *in vitro* での活性から予想される殺虫活性は認められなかった。 その原因として、OH などの親水性基が分子内に置換されたことにより、作用点への透過性が低下したこと、さらには代謝や体外への排泄が高まったことなどが考えられた。 したがって、複数個の OH を置換した誘導体に関しては、[^{3}H]-EBOB バインディングの阻害活性や Cl イオンチャンネル GABA 誘起電流の阻害活性を調べ、これらの結果に基づいて構造と活性について考察した。

1) Pestic. Biochem. Physiol. 22 124 (1984) 2) Pestic. Biochem. Physiol. 8 33 (1978)

γ-BHC, Binding assay, GABA receptor Cl ion channel

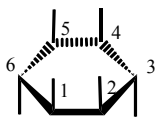
講演番号：4C25a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:24～ C 校舎 25 会場

α-BHC ラセミ体の光学分割とその鏡像異性体の活性

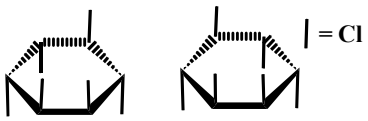
Optical resolution of α-BHC racemate and the insectcidal activities of its enantiomers

○田中 啓司[1]、永崎 果鈴[2]、辰己 侑加理[2]、松田 一彦[2]、森本 正則[2]、栗原 紀夫[3] ([1]近畿大農、名古屋大エコトピア科、[2]近畿大農、[3]京都大)
○Keiji Tanaka[1], Karin Nagasaki[2], Yukari Tatsumi[2], Kazuhiko Matsuda[2], Masanori Morimoto[2], Norio Kurihara[3] ([1]Kinki Univ., Nagoya Univ., [2]Kinki Univ., [3]Kyoto Univ)

目的：BHC には理論上 8 種類の立体異性体（α，β，γ，δ，ε，η，θ，ι）が存在し、その中で γ−BHC（*eeeaaa,* (1245/36)）に高い殺虫活性が知られている。　しかし他の異性体に関しては、γ−BHC と塩素原子の配位が一か所しか違わない α−BHC（*eeeeaa,* (124/356)）に弱いながらわずかの殺虫活性が認められる以外に殺虫活性はない。　BHC で、どうして殺虫活性発現に塩素原子の厳密な立体配位が必要かは不明で、極めて不思議なことである。　その不思議を解明するためのヒントが、α−BHC にあると考え、その詳細を調べることとした。　α−BHC はキラル化合物でラセミ体として存在するが、その鏡像異性体間で、弱いながら存在する殺虫活性に違いがあるかはこれまで不明であった。



γ−BHC
(*eeeaaa,* (1245/36))



α−BHC
(*eeeeaa,* (124/356))

方法：セルロース誘導体キラルカラム Chiralpak IC (ダイセル)を用いて、α−BHC のラセミ体分割を行い、光学純度 98%以上のそれぞれの鏡像異性体を得た。 *in vivo* での活性評価として、イエバエ、チャバネゴキブリ、カイコガを用い、局所施用法、フィルム-コンタクト法で殺虫活性を、また、*in vitro* での活性評価として、イエバエ頭部の膜画分を用いての[^{3}H]−EBOB バインディング阻害活性、アフリカツメガエルの卵母細胞に発現させたイエバエ GABA 受容体-Cl イオンチャンネルの GABA 誘起電流阻害活性等を調べた。

結果：α−BHC のイエバエ、チャバネゴキブリに対する殺虫活性はきわめて弱く、局所施用法では殺虫活性を厳密に評価することは非常に難しかったが、チャバネゴキブリに対してのフィルム-コンタクト法で活性評価が可能であった。　γ−BHC では、0.5 mg/UM サンプル瓶（450 ml 容量）のフィルム処理で、放虫後 30 分以内にすべてのチャバネゴキブリはひっくり返り痙攣するが、α−BHC では、5 mg/UM サンプル瓶でも中毒症状の発現には時間がかかり、翌日になって初めてひっくり返り痙攣した。　なお、α−BHC それぞれの鏡像異性体では、活性発現に至る時間経過や中毒症状の質に差は認められなかった。　[^{3}H]−EBOB バインディング阻害活性、イエバエ GABA 受容体-Cl イオンチャンネルの GABA 誘起電流阻害活性等でも、両鏡像異性体間に差は認められなかった。

α-BHC, enantiomer, optical resolution

講演番号：4C25a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:36～ C 校舎 25 会場

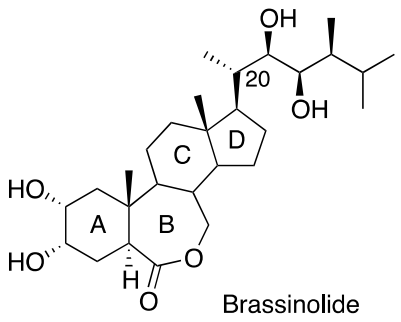
インシリコスクリーニングによるブラシノライド様化合物の探索

In silico screening of brassinolide-like compounds

○瀧本 征佑、中川 好秋、宮川 恒（京大院農）
○Seisuke TAKIMOTO,Yoshiaki NAKAGAWA,Hisashi MIYAGAWA (Kyoto Univ.)

目的) ブラシノライド(BL)をはじめとする植物ステロイドホルモンであるブラシノステロイド(BR)は，伸長成長や細胞分裂の促進，ストレス耐性の誘導などの活性を示す．その結果，実用的には BL 処理を行うことによって寒冷地における作物栽培が容易となること，果実重量の増加による増収が見込めることなどから，植物生長調節剤としての利用が期待されている．しかし，実用化にあたっては，BR がステロイド骨格をもっていることから，合成面で経済的問題点がある．その問題点の解消の手段として，ステロイド構造の簡略化が一つの鍵と考えられる．実際に，昆虫やほ乳類のステロイドホルモンに関しては，非ステロイドアゴニストが農薬，医薬として実用化されている．前世紀においては，新規構造の発見を目指した研究は，ランダム合成や類縁体合成に頼っていたが，近年においては，コンピューターの計算能力が高まったこと，酵素や受容体などの立体構造のデータベースも豊富となったことによって，インシリコでの分子設計が容易に行えるようになってきた．ブラシノステロイド研究においても，2011 年には，BL 受容体の立体構造が X 線解析によって解明され[1,2]，リガンド結合部位も明らかとなって，インシリコスクリーニングの手法を用いた分子設計が可能となった．本研究ではファーマコフォアベースのインシリコスクリーニングによって，BL の非ステロイド型アゴニストの探索を行った．

方法) これまでの研究により得られている構造活性相関に関する知見，および BL-受容体複合体から得られる情報をもとに，LigandScout（inte:ligand）を用いてファーマコフォアを作成し， 500 万化合物のデータベースから候補化合物のスクリーニングを行った．候補化合物の選別には，候補化合物と受容体とのドッキングシュミレーションを利用し，ドッキングシミレーションには FRED(Openeye),GOLD(CCDC), Isolated FAMS（インシリコサイエンス）などのソフトウエアを用いた．生理活性は，クレスにブラシノステロイド生合成阻害剤 Brz2001 で矮化を誘導し，BL および供試化合処理によって矮化が抑制されるかどうかによって判定した．



Brassinolide

結果および考察) インシリコスクリーニングによって候補化合物を見いだし，候補化合物の中から 8 個の化合物を購入し，活性の評価を行った．

[1] M,Hothorn, 2011, *NATURE*, 474, 467-471, [2] J.She, 2011, *NATURE*, **474**, 472-476

Brassinosteroid, In silico screening, Plant hormone

講演番号：4C25a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:48～ C 校舎 25 会場

植物病原菌に対する gallic acid 誘導体の抗真菌効果
Effects of gallic acid on plant pathogenic fungi
○中川 泰伯、伊藤 晋作、佐々木 康幸、矢嶋 俊介（東農大院）
○Yasutaka NAKAGAWA,Shinsaku ITO,Yasuyuki SASAKI,Shunsuke YAJIMA (Tokyo of Univ. of Agric.)

【目的】
我々はこれまでに植物からメラニン合成経路の鍵酵素であるチロシナーゼタンパクに対する阻害剤の探索を行い、いくつかの生理活性物質を精製してきた。そのうち、Beket（*coriaria sp*）の葉から単離した gallic acid は多くの植物に存在する加水分解型タンニンの一つであり、チロシナーゼ阻害作用の他に、抗酸化作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用等の生理活性を有する化合物である。また gallic acid 誘導体は大腸菌、酵母、バチルス属に対する抗菌作用も有することで知られている。しかし、これらの化合物の植物病原菌に対する抗菌作用はあまり知られていない。
そこで、今回、我々は複数の gallic acid 誘導体を合成し、植物病原菌として知られている *Fusarium solani*、*Alternaria brassicicola*、*Colletotrichum dematium*、*Colletotrichum acutatum* に対する効果の検討を行った。

【結果・考察】
複数の gallic acid のエステル誘導体を合成し、これらの化合物について PDA 培地での植物病原菌の生育阻害試験を行った結果、gallic acid 誘導体でアルキル直鎖が長いほど活性が強くなる傾向が見られ、octyl 基を持つ誘導体が 4 種の植物病原菌の生育を阻害した。この化合物はこれまでに大腸菌や酵母、バチルス属に対し直鎖アルキル誘導体の中で最も強い活性を有することが報告されており、今回の結果はこれまでの結果と同様の傾向を示した。しかし分岐鎖アルキルである 3-methylbutyl 基を持つ誘導体が特に *F. solani* に対して octyl 基を持つ誘導体よりも強い活性が見られた。これにより、少なくとも *F. solani* において直鎖アルキル基より分岐鎖アルキル誘導体の方が強い活性を有する可能性が考えられた。この結果を踏まえ、更なる分岐鎖アルキル基を持つ誘導体を合成し抗真菌試験を行ったところ、多くの誘導体において *F. solani* 以外の植物病原菌に対しても活性が強くなる傾向が見られた。
現在、これらの誘導体の抗真菌活性作用メカニズムの解明も試みている。

gallic acid, plant pathogenic fungi

講演番号：4C26a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ C 校舎 26 会場

フェノールカルボン酸類のラジカル消去機構(33)―プロトカテキュ酸の水系での二量化反応機構の解析―

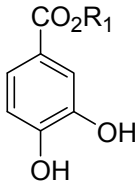
Radical-scavenging mechanism of phenolic carboxylic acids(32)-Analysis of oxidative dimerization of protocatechuic acid in an aqueous medium-

○武田 直樹、加藤 英介、川端 潤（北大院農）
○Naoki TAKEDA,Eisuke KATO,Jun KAWABATA (Hokkaido Univ.)

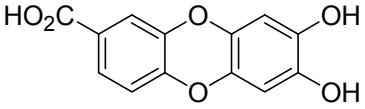
目的：プロトカテキュ酸（**1**）およびそのメチルエステル（**2**）は、ラジカル消去反応の過程で条件によりさまざまな酸化生成物を与え、また遊離酸とエステルでは異なった反応挙動を示すことが知られている。これらフェノールカルボン酸のラジカル消去機構の解明の一環として行った **1** および **2** の酸化反応生成物の探索の結果、これまでに種々のタイプの酸化二量体（ジベンゾジオキシン(**3**)、ベンゾクマリン(**4**)など）が同定されている。また、ジアセトキシヨードベンゼン（DAIB）酸化して得たキノン体に水を加えたときに酸化二量体（**5**）の生成が確認されている。しかしながら必ずしもその生成機構は明らかになっていないため、こうした反応機構解明のために HPLC および NMR を用いて追跡を行ってきた。[1)]今回はこの経過に加えて、反応機構の解明と特に酸化初期過程でのキノン体への位置特異的求核付加反応について調べるために重水素ラベル体 **6** での反応を試みた。

方法および結果 : HPLC による反応の追跡は各標品と反応液の保持時間の比較、NMR による分析は重溶媒中で反応を進行させることで直接反応液を測定することで行った。選択的重水素の導入は対応するニトロ化物を還元、アミノ化の後重水素化次亜リン酸処理によって行うこととした。ラベル体としてまず、2 位重水素化物（**6**: R_1=D, R_2=R_3=H）を得るためバニリン酸メチルを出発物質として、ニトロ化、還元によって 2 位にアミノ選択的に基を導入し、重水素化次亜リン酸による水素置換反応を用いてアミノ基と重水素を交換する反応を検討している。

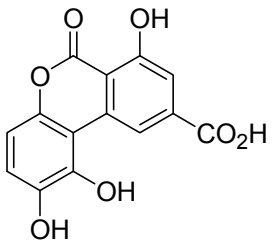
1)武田ら、農化 2012 春大会、京都



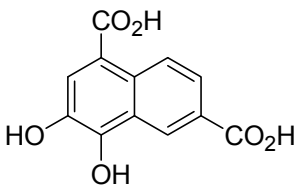
1:R_1=H, R_2=H
2:R_1=Me, R_2=H



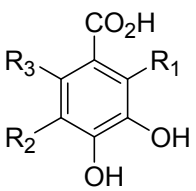
3



4



5



6:R_1-R_3= H or D

phenolic acid, phenol oxidation, antioxidant

講演番号：4C26a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ C 校舎 26 会場

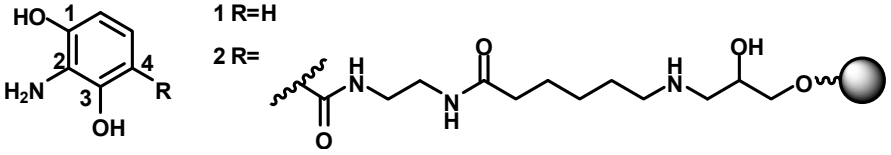
不拮抗阻害剤によるラット小腸α-グルコシダーゼの選択的な精製法の開発

Selective purification of rat intestinal α-glucosidase by using uncompetitive inhibitor

○辻 裕貴、加藤 英介、川端 潤（北大院農）
○hiroki tsuji,eisuke kato,jun kawabata (Hokkaido Univ.)

【目的】哺乳動物の小腸で糖の消化吸収を担うα-グルコシダーゼには、マルターゼ・グルコアミラーゼ（MG）、スクラーゼ・イソマルターゼ（SI）の 2 つのユニットが存在する。これらα-グルコシダーゼに対する阻害剤は、食後の血糖値上昇を抑制するため糖尿病の治療薬として有用である。ところが、阻害剤の候補化合物を探索する際、阻害活性は MG、SI の混合物を対象として算出する場合が多いため、阻害剤が主にどの酵素に作用しているか不明瞭な場合が多い。これは阻害剤の構造活性相関研究の際にも当てはまり、構造改変によりどの酵素に対する活性が変化したのか不明瞭になってしまう。そこで本研究ではこれらの酵素の効率的な精製法の開発を目的とした。

【方法・結果】不拮抗阻害剤である 2-アミノレゾルシノール（**1**）をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィー法により MG、SI の精製を行うこととした。不拮抗阻害剤は基質の共存下でのみ酵素と親和性を示すため、酵素の精製時に共存させる基質を変えることで MG、SI の精製が可能だと考えられたためである。**1** のベンゼン環 4 位にアミド結合を介してアルキルアミンを導入した化合物を市販のゲルと結合しアフィニティーゲル（**2**）を作成した。アフィニティーゲル（**2**）を用いて酵素を吸着させる際には基質を添加し、溶出時には基質を除去することで、各酵素の選択的な精製が可能かどうか確かめた。ラット小腸アセトンパウダーより調製した粗酵素を **2** により精製したところ、マルターゼについては粗酵素と比べて比活性の上昇が確認された。一方、スクラーゼに関しては、粗酵素と比べた比活性上昇はさほど見られなかった。



intestinal glucosidase, uncompetitive inhibitor, affinity chromatography

講演番号：4C26a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ C 校舎 26 会場

^{33}S 標識によるタンパク質の高感度 ^{33}S-NMR に向けて

Toward high-sensitive ^{33}S-NMR of proteins by ^{33}S labeling

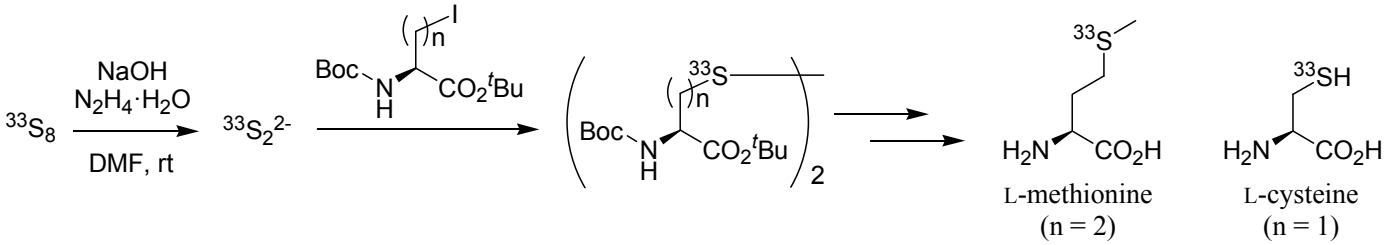
○増田 裕一[1]、松尾 真嗣[2]、水野 敬[3]、野田 泰斗[2]、竹腰 清乃理[2]、土井 隆行[1] ([1]東北大院薬、[2]京大院理、[3]JEOL RESONANCE)
○ Yuichi MASUDA[1], Shinji MATSUO[2], Takashi MIZUNO[3], Yasuto NODA[2], Kiyonori TAKEGOSHI[2], Takayuki DOI[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Kyoto Univ., [3]JEOL RESONANCE)

【目的】

硫黄原子はメチオニンやシステインに含まれており、タンパク質の高次構造形成および機能発現において重要な役割を果たしている。従って、タンパク質中の硫黄原子を NMR により解析する方法が希求されている。しかしながら、核スピンを有する ^{33}S は天然存在比が低く(0.76%)、低磁気回転比や四極子核の特性のため、^{33}S-NMR の検出感度は極めて低い。本研究では、^{33}S-NMR の感度向上を目的として、^{33}S 標識したメチオニンおよびシステインを合成した。

【方法と結果】

^{33}S 標識アミノ酸の合成は、市販されている ^{33}S 単体を原料として行った。ヒドラジン存在下において硫黄単体と水酸化ナトリウムを反応させると、安定な二硫化物イオンが生成する。これを、側鎖がヨウ素化されたアミノ酸誘導体と求核置換反応させてジスルフィドとすることにより、硫黄原子を導入した。本法により、^{33}S 標識したメチオニンおよびシステインを合成することに成功した。合成した ^{33}S 標識メチオニンを用いて ^{33}S-NMR を測定したところ、メチオニンの ^{33}S シグナルを初めて検出した。現在、NMR プローブのコイルを極低温に冷却することにより、絶対感度の向上を目指している。



Scheme Synthesis of L-methionine and L-cysteine from elemental ^{33}S

sulfur, NMR, amino acid

講演番号：4C26a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ C 校舎 26 会場

ピーマンにおけるフラボノイド蓄積に対する光の影響

Light effects for accumulation of flavonoids on sweet pepper

○手林 慎一[1,2]、竹尾 洋平[1]、大西 信太郎[2]、吉田 勝平[3]（[1]高知大農、[2]愛媛連大農、[3]高知大理）
○shinichi Tebayashi[1,2], Yhohei Takeo[1], Shintaro Ohonishi[2], Katsuhira Yoshida[3]（[1]Kochi Univ, Agri., [2]Ehime Univ, UGAS, [3]Kochi Univ, Sci.）

【目的】　演者らはピーマン(*Capsicum annuum*)の葉にハモグリバエに対して産卵阻害活性を示すルテオリン二配糖体（Luteolin 7-*O*-*β*-apiosyl-(1→2)-*O*-*β*-glucoside）が多量に蓄積されることを報告している。アグリコンであるルテオリンは抗酸化活性や抗炎症作用などの薬理作用が報告されていることから健康食品などへの利用が検討され、ピーマンの葉を利用したルテオリン生産への期待が高まっている。ところが現在栽培されている主要なピーマン品種ではルテオリンの蓄積量が低く、またアピゲニンを副生することも報告されている。そこで本研究ではピーマン栽培における光条件とフラボノイド生産性の関連を調査することでルテオリン高生産技術の可能性探索を行った。
【方法】　ピーマン（品種：京波）の種子は１日吸水させた後、バーミキュライトを充填した２x 2cm セルトレーに播種し、人工気象器中で栽培した（25±3℃，16L:8D)。双葉期のピーマン(品種：京波)苗を人工気象器内で４種類の波長変換フィルム（赤：青～緑色光を吸収し赤色を発光、黄：紫色光を吸収し黄色を発光、青：紫外領域を吸収し青色を発光、近赤外：青～橙光を吸収し近赤外光を発光）の被覆下で２週間栽培した（25±3℃，16L:8D)。栽培後、草丈、葉長、生鮮重を計測後、メタノールで抽出し、HPLC を用いてアピゲニン配糖体及びルテオリン配糖体を定量した。さらに５種の LED 光源（赤:極大 637nm，黄:極大 601nm，緑:極大 521nm，青:極大 463nm，白:極大 557，447）下で２週間栽培し、同様に生育調査・成分分析を行った。また、栽培期間中は 2000 倍希釈ハイポネックス®を常時施用した。
【結果】　すべての波長変換フィルム処理下での栽培において、植物の生育の変化はほぼ 10%以内であった。一方、アピゲニンおよびルテオリンの含有量は黄色・赤色蛍光フィルム処理では増大し、青色・近赤外蛍光フィルム処理では若干減少していた。さらに LED 光源下での栽培実験では、植物の生育は光波長に大きく依存し、白色光源に対し赤色・青色・緑色の光源では若干の生育不良が観察されるにとどまったが、黄色光源下では葉の伸展遅滞・植物生鮮重の大きな低下が観測された。この時のアピゲニンおよびルテオリンの含有量は、緑色光源では白色光源に対して 1/5 以下に、黄色光源では 1/20 以下に低下していた。一方で青色光源、赤色光源の処理では白色光源と比べて約 70%、50%のフラボノイドの蓄積が観測された。これらのことからフラボノイドの蓄積には赤色光および青色光が必要であり、これらに他の光源が付加されることによりフラボノイド蓄積がより促進されるものと考えられた。

luteolin, light, accumulation

講演番号：4C26a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ C 校舎 26 会場

オオツマキヘリカメムシ臭気成分の成長に伴う変化と警報フェロモン活性

The secretory components of *Hygia lativentris*: their changes during the developmental stages and the alarm pheromone

○角田 友美、田母神 繁、阿部 誠、野下 浩二（秋田県大生資科）
○Tomomi KAKUDA,Shigeru TAMOGAMI,Makoto ABE,Koji NOGE (Akita. Pref. Univ)

【目的】カメムシは刺激を受けると，炭素数 6 ～ 10 のアルデヒド，アルコール，エステルなどからなる特有の臭気を出す．その臭気は外敵に対する防御だけでなく，性・集合・警報フェロモンとして同種間のコミュニケーションに役立つ．また，この臭気成分の組成は成長に伴って変化することが知られているが, その要因は詳しく解明されていない. オオツマキヘリカメムシ *Hygia lativentris* は，ヘリカメムシ科に属するカメムシで，交尾時に集団を形成する珍しい習性がある．その集団内の個体に刺激を与えると他の個体が一斉に逃げることから，このカメムシの臭気に警報フェロモン活性があると予想した．本研究では、オオツマキヘリカメムシの臭気成分およびその警報フェロモンの同定を試みた．また，成分変化の一因として分泌腺中の酵素に着目し，関係しうる酵素の探索を行った．
【方法】若虫，脱皮後 3 日以内の若い成虫，成熟した成虫をヘキサンで抽出し，各成育段階での臭気成分を定量的に分析した．次に，同定した各成分を用いて成熟した成虫に対する警報フェロモン活性を調べた．各成分をカメムシに提示してから反転するまでの時間と反転後の逃避距離から，フェロモン活性を評価した．さらに成熟した成虫の分泌腺からタンパク質を抽出し，native-PAGE で分離した後，エステラーゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼ（ADH）の活性染色を行った．
【結果と考察】1 齢若虫では hexanal，(*E*)-2-hexenal，4-oxo-(*E*)-2-hexenal，2 ～ 5 齢若虫では 1 齢で見られた 3 成分に加え，1-hexanol を同定した．一方，成虫の主要な成分として hexanal，1-hexanol，*n*-hexyl acetate を同定し，オオツマキヘリカメムシでも成長に伴い臭気の組成変化を確認した．すなわち，成虫が飽和の炭素鎖からなる化合物のみを持つことに対して，若虫は不飽和の炭素鎖からなる化合物を持つ．若虫と成虫では分泌腺が異なり，それが成分の違いと関連すると考えられる．また，成虫では加齢に従い *n*-hexyl acetate と 1-hexanol が減少し, hexanal が増加していた. このことから，成虫の加齢に伴いエステルがエステラーゼによって分解され，さらに生じたアルコールが ADH によって酸化されると考えられる．実際に，カメムシの分泌腺中にエステラーゼが少なくとも 3 つ，1-hexanol を基質とし得る ADH が 2 つ存在することを見出した．同定した成虫の 3 成分を用いたフェロモン活性試験の結果，成虫は hexanal に対してのみ反転して逃げたが，他の 2 成分に対しては反転するものの，その後ほとんど動かなかった．以上の結果から，hexanal を成虫の警報フェロモンと同定した．

alarm pheromone, hexanal, *Hygia lativentris*

講演番号：4C26a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ C 校舎 26 会場

日本在来カンキツ類の果実及び葉に含まれるフラボノイドの定量分析及び多変量解析

Multivariate analysis of flavonoid composition in fruits and leaves of *Citrus* cultivars indigenous to Japan

○浅井 智紀[1]、岡谷 早矢加[2]、松川 哲也[1]、梶山 慎一郎[1]([1]近畿大院生物理工、[2]近畿大生物理工)
○Tomonori Asai[1], Sayaka Okatani[2], Tetsuya Matsukawa[1], Shin'ichiro Kajiyama[1] ([1]Grad. Sch. BOST, Kinki Univ., [2]Dep. Biotechnol. Sci., Kinki Univ)

[目的]カンキツ類は商業上有用な果樹作物の一つであり、アメリカやヨーロッパ、アフリカ、アジアなどに広く分布し、古くから栽培されている。しかしながら、カンキツ類は種間あるいは属間における交配親和性が高く容易に雑種形成が行われるため、系統分類の確立が困難な状況にあり、世界各地に生育する自然発生種や栽培種の詳細な起源は明らかになっていない。このような背景から、塩基配列の情報を元にした分子系統分類学的手法による研究が試みられてきたが、選択する分子マーカーにより得られる結果に差が生じるため、統一的な系統分類の確立には至っていない。そこで、本研究では日本在来の雑柑類とされるカンキツ系統を対象とし、果皮、果汁、葉に含まれる主要二次代謝物質であるフラボノイドを定量的に分析し、化学分類を試みた。
[方法及び結果]近畿大学付属農場に管理されるカンキツ系統より、日本在来系統及びレモン、オレンジ、グレープフルーツ等の外来系統を合わせた 35 系統から未熟・完熟果実及び葉を採取した。採取した果実から果皮と果汁を得た後、果皮は凍結乾燥後に破砕機を用いて破砕し、葉は液体窒素中で凍結した後に粉末状になるまで磨砕した。得られた粉末に内部標準試料としてマメ科植物由来のフラボイドである daizein とメタノールを加えて懸濁し、遠心分離により得た上清を粗抽出液とした。また、果汁は蒸留水で 10 倍に希釈し、内部標準試料（daizein）を添加した。これらの溶液は、逆相固相抽出カラムに吸着させた後にメタノールで溶出し、溶出液を減圧乾固させ 1ml のメタノールで再溶解した。得られた分析試料を LC/MS/MS に供し、rutin、nobiletin、narirutin、poncirin、neoponcirin、sinensetin、saponarin、hesperedin、neohesperedin、eriocitrin、neoeriocitrin、diosmin、naringenin、tangeretin、naringin の 15 種類のフラボノイドを対象にした定量分析を行なった。分析の結果、同一系統における果皮、果汁、葉の各フラボノイド含有量には明らかな相違が見られ、また、系統間における含有量の違いにも多様性が見出された。現在、得られた定量結果を基に、クラスター分析および主成分分析を進めている。

Citrus, flavonoid, multivariate analysis

講演番号：4C26a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ C 校舎 26 会場

大規模分子化学計算による酵素リパーゼの鏡像体選択性の予測

Prediction of the enantioselectivity of enzyme lipase using large-scale molecular chemical computations

○矢城 陽一朗[1,2]、木村 崇知[3]、亀澤 誠[3]、直島 好伸[1,2]（[1]岡山理大自然科学研、[2]岡山理大院総合情報、[3]甲南化工）
○Yoichiro Yagi[1,2], Takatomo Kimura[3], Makoto Kamezawa[3], Yoshinobu Naoshima[1,2] ([1]Institute of Natural Science, Okayama Univ. of Sci., [2]Graduate School of Informatics, Okayama Univ. of Sci., [3]Konan Chemical Industry Co., Ltd)

【目的】最近、我々は、従来からの合成実験に加え、スーパーコンピュータ「京」に代表されるコンピュータシミュレーションを用いる計算機実験によって、酵素リパーゼの鏡像体選択性やその程度の予測、ならびに鏡像体認識の機構解明を検討している。本研究は、我々が、生物活性物質の不斉有機合成に多用しているリパーゼの一つである*Burkholderia cepacia* Lipase（BCL）について、基質である芳香族および脂肪族型のアルコール系エステルに対する鏡像体選択性やその大小を、分子動力学法による計算化学実験で、明確に予測することを目指したものである。
【方法と結果】まず、BCLに関しては、Protein Data Bankからダウンロードした X線解析構造（PDB code : 1HQD）を、生体分子計算ソフトウェアAMBERによるエネルギー極小化計算で調整した。一方、基質エステルは量子化学計算プログラムGaussian 03で構築し、構造を最適化した。つぎに、AMBERを用いて、BCLの活性中心であるSER87付近に基質エステルを配置し、BCLと基質の複合体を構築した。ついで、複合体の周囲8Åに水分子を配置してエネルギー極小化計算を行った後、AMBER－GPGPU計算システムによる2000psの分子動力学計算を行い、基質の(*R*)-体および(*S*)-体のカルボニル炭素とSER87の側鎖水酸基酸素間のC-O原子間距離の時間変化を追跡した。
その結果、選択性の程度の違い（*E* 値の大小）に関わらず、計算した全ての基質において、合成実験で優先的に変換される(*R*)-体の C-O 原子間距離は、(*S*)-体の距離よりも短いことがわかった。また、選択性が高い ($E > 100$) 芳香族エステルでは、(*R*)-体は BCL の活性中心付近に留まっているが、(*S*)-体は時間の経過と共に、BCL の活性中心から次第に離れていく様子が観察された。一方、選択性が低い ($E < 20$) 脂肪族エステルでは、時間が経過しても、(*R*)-体、(*S*)-体共に BCL の活性中心付近にあることが認められた。さらに、2000ps での(*R*)-体と(*S*)-体の C-O 原子間距離の差と *E* 値との比較から、選択性が高い基質では、(*R*)-体と(*S*)-体の C-O 原子間距離の差は約 9Å 以上であるのに対し、選択性が低い基質では、約 3Å 以下であることが判明した。これに加え、選択性の異なる、ベンジル基やフェノキシ基を有するいくつかの第 1 級アルコール系エステルについて同様な計算を行ったところ、その C-O 原子間距離に関し、第 2 級アルコール系エステルの場合と類似する結果を得た。以上のことを踏まえ、*Candida antarctica* Lipase typeA や typeB などについて上記のような大規模分子計算を行い、計算機実験による有機合成基質に対する酵素リパーゼの鏡像体選択性やその程度（*E* 値の大小）の予測を、より確実なものにしたいと考えている。

Computational chemistry, Lipase, Enantioselectivity

講演番号：4C26a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ C 校舎 26 会場

ロドデンドロール型チロシナーゼ阻害剤の合成と生理活性評価

Chemical synthesis and tyrosinase ibhibitory activity of rhododendrol derivatives

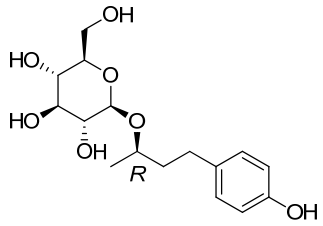
○岩舘 丈央[1]、柏倉 裕[2]、二瓶 賢一[1] ([1]宇都宮大農、[2]フジグリーン)
○Takehiro IWADATE[1], Yutaka KASHIWAKURA[2], Ken-ichi NIHEI[1] ([1]Utsunomiya Univ., [2]Fuji Steel Industry)

【目的】

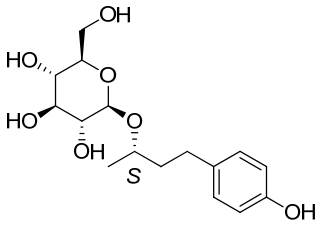
チロシナーゼは，チロシンからドーパキノンに至る酸化反応を触媒する．この反応を阻害することにより，生体内で起こるメラニン色素の沈着を調節できる．従って当研究室では，チロシンに類似した基質アナログ型のチロシナーゼ阻害剤の設計・開発を進めてきた．最近の研究において，天然に存在するロドデンドロール配糖体の(-)-rhododendrin (**1**)および(+)-epirhododendrin (**2**)の構造に注目し，それぞれの芳香環をレゾルシノール構造に変化させた誘導体 **3** および **4** を化学合成して生理活性を評価したところ，どちらのエピマーも強いチロシナーゼ阻害活性を示した．特に，**3** は **4** の約２倍，代表的なチロシナーゼ阻害剤であるコウジ酸の約４倍の活性を持つことが明らかとなった．そこで本研究では，阻害活性と立体構造の相関解析および高親水性阻害剤の開発を目的に，**3** および **4** の糖部分を変化させた様々な誘導体を合成し，それらのチロシナーゼ阻害活性の評価を行った．

【結果】

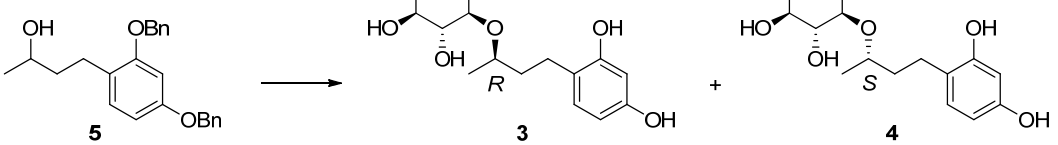
誘導体 **3** および **4** の化学合成経路の中間体 **5** を利用して，トリクロロアセトイミデート法もしくは Koenigs-Knorr 反応により，第２級水酸基に種々の糖を導入した．さらに，加水素分解等で全ての保護基を除去し，複数のロドデンドロール誘導体を得た．現在，それらのチロシナーゼ阻害活性の評価を行っている．



(-)-rhododendrin (**1**)



(+)-epirhododendrin (**2**)



rhododendrol, enzyme inhibitor, tyrosinase

講演番号：4C26a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ C 校舎 26 会場

非ステロイド性抗炎症薬のプロドラッグ化修飾による皮膚透過性増大戦略

The strategy for increase of skin permeability by prodrug derivatization of non-steroidal anti-inflammatory drugs.

○森 亮貴[1]、守金 大蔵[2]、高橋 秀久[3]、稲垣 穣[1] ([1]三重大院・生資、[2]ダイヤ製薬株式会社、[3]ＡＴＭ株式会社)
○ Akitaka Mori[1], Daizou Morikane[2], Hidehisa Takahashi[3], Minoru Inagaki[1] ([1]Faculty of Bioresources, Mie university, [2]DIA Pharmaceutical Co., Ltd., [3]ATM Co., Ltd.)

【目的】皮膚は多層構造を有しており、角質層では水溶性物質、その内側の表皮では脂溶性物質の侵入・拡散を阻むバリヤー機能を備えている。しかし、そのようなバリヤー機能にも関わらず一部の化合物が皮膚を透過し、さらに血管中にまで浸透する経皮吸収が起こる例があり、安全な薬剤の投与法のひとつとして注目されている。そこで本研究では、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)の分子構造を化学的に修飾した誘導体を合成し、それらの皮膚透過性を評価することで経皮吸収が可能なプロドラッグを見出すことを目的とした。
【方法】これまでに、NSAIDs のジクロフェナクとインドメタシンにおいて、様々なエステル化誘導体を合成した。その中で、エチレングリコール(EG)やプロピレングリコール(PG)などのジオール修飾において、比較的高い皮膚透過性を確認した。そこで本研究では、新たな NSAIDs としてイブプロフェンを選択し、ジオール修飾による効果を再度検証するとともに、さらに様々なアルコール誘導体を合成し、皮膚透過性を評価した。ヘアレスマウス皮膚を用いた皮膚透過実験の概要を、Fig. 1 に示す。上部のドナー液から皮膚を通過して下部のレセプター液に浸透した化合物を HPLC で定量し、透過量を計測した(Table 1)。
【結果】レセプター液から、エステルが切断された薬剤のみが検出されたことから、誘導体がプロドラッグとして機能することを確認した。EG や PG でイブプロフェンを修飾した誘導体は、良好な皮膚透過性は見られなかった。それに対し、トリフルオロエタノールなどのフルオロアルコールによる修飾で合成した誘導体で、高い皮膚透過率が認められた。

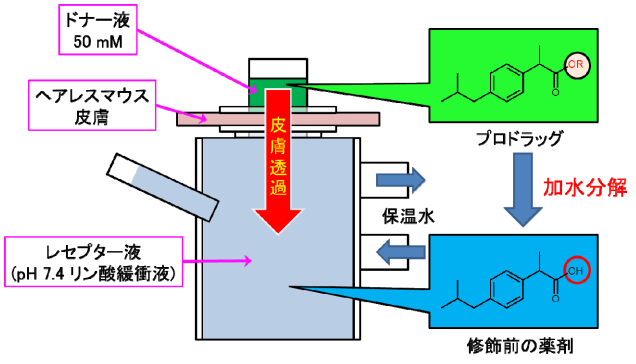
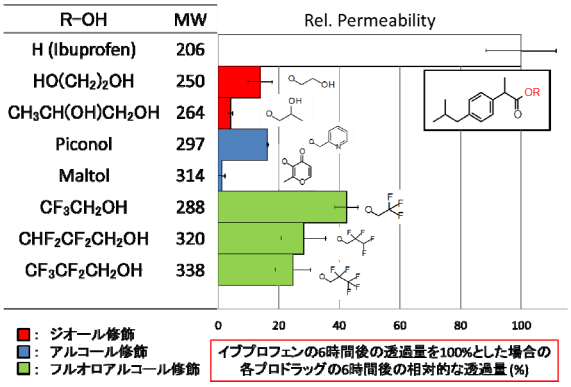


Fig. 1 皮膚透過実験の模式図

Table 1 イブプロフェンの皮膚透過実験結果

R–OH	MW	Rel. Permeability
H (Ibuprofen)	206	
HO(CH$_2$)$_2$OH	250	
CH$_3$CH(OH)CH$_2$OH	264	
Piconol	297	
Maltol	314	
CF$_3$CH$_2$OH	288	
CHF$_2$CF$_2$CH$_2$OH	320	
CF$_3$CF$_2$CH$_2$OH	338	

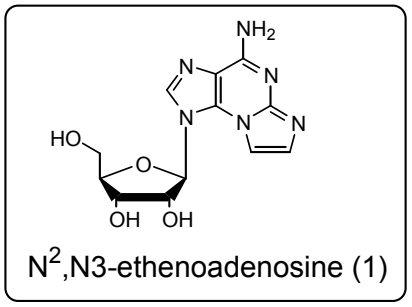


skin permeability, NSAIDs, prodrug

講演番号：4C26a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ C 校舎 26 会場

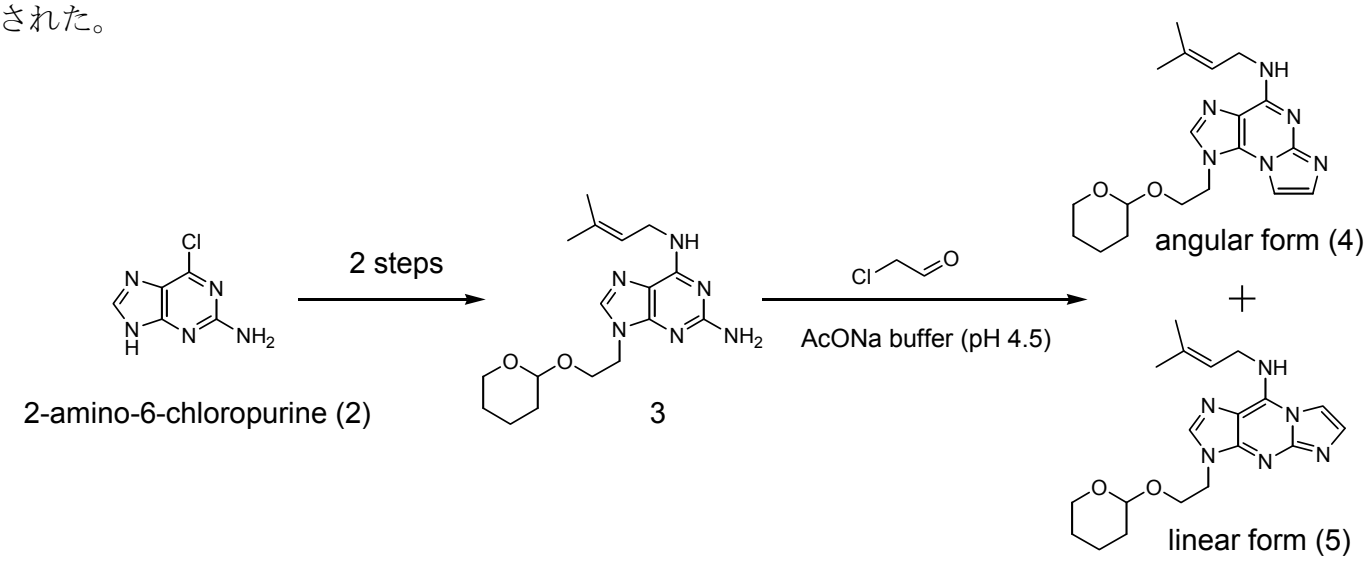
Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase の蛍光基質の合成及び機能評価
Design and synthesis of fluorescent substrate for Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase
○竹井 昭登、北詰 千恵、杉山 民二 (明治大院農)
○Akito TAKEI,Chie KITADUME,Tamizi SUGIYAMA (Meiji Univ.)

【目的】Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase (CKX)はイソペンテニルアデニン(iP)をアデニンと 3-メチル-2-ブテナールに不可逆的に分解する酵素である。CKX の活性は DCPIP を用いる方法や[^{3}H]iP を基質として用いる方法により測定されている。E.sharon(2006)らにより N^2,N3-ethenoadenosine(1)が強い蛍光性を示すことが報告された。この化合物の示す強い蛍光に着目して ethenoadenine を母核とした CKX の蛍光基質の開発を本研究の目的とした。



N^2,N3-ethenoadenosine (1)

【方法・結果】2-amino-6-chloropurine(2)を出発原料として 9 位をアルキル化した後、6 位にイソペンテニルアミノ基を導入した。化合物 3 を酢酸緩衝液（pH4.5）中でクロロアセトアルデヒドと反応させてエテノ環を形成した。この反応ではスキームに示すように angular 型（4）と linear 型(5)の 2 種類の化合物が生成した。サツマイモ形質転換細胞から硫安分画により調製した CKX の粗酵素液を化合物(4)及び(5)に作用させた。酵素反応液を HPLC で分析した結果、angular 型(4)ではイソペンテニル基が除かれた分解生成物を確認した。一方の linear 型(5)では分解生成物は検出されなかった。以上の結果より、angular 型の N^2,N3-etheno-iP は CKX の蛍光基質として利用できる可能性が示唆された。



2-amino-6-chloropurine (2)　　3

cytokinin oxidase/dehydrogenase, fluorescent substrate, synthesis

講演番号：4C15a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ C 校舎 15 会場

深海脱窒細菌における 2 種の異化型硝酸塩還元酵素の生理的役割の解明

Pysiological roles of two dissimilatory nitrate reductases in the deep-sea denitrifier

○及川 勇二[1]、加藤 千明[2]、掘越 弘毅[2]、川本 純[3]、栗原 達夫[3]、為我井 秀行[1] ([1]日大院相関理化、[2]海洋研究開発機構、[3]京大化学研究所)
○Yuji OIKAWA[1], Chiaki KATO[2], Koki HORIKOSHI[2], Jun KAWAMOTO[3], Tatsuo KURIHARA[3], Hideyuki TAMEGAI[1] ([1]Nihon Univ., [2]JAMSTEC, [3]Kyoto Univ.)

【背景・目的】脱窒は硝化や窒素固定と共に窒素サイクルの一翼を担っており、地球環境を考える上で決して欠かすことができない。この脱窒は 4 段階の反応によって構成されており、各反応をそれぞれ異なる酵素が触媒している。一般的に、脱窒の最初の過程である硝酸塩還元にはペリプラズム型硝酸塩還元酵素(Nap)と膜結合型硝酸塩還元酵素(Nar)という 2 種の異化型硝酸塩還元酵素が関与している。マリアナ海溝チャレンジャー海淵水深 11,000 m より単離された深海脱窒細菌 *Pseudomonas* sp. strain MT-1 は近縁である *Pseudomonas stutzeri* との生育を比較すると、低温や高圧条件下での生育により適応していることが知られている。本細菌を用いた研究を行うことで、深海における呼吸系と窒素サイクルについて解明されることが期待できる。これまでの研究で、本細菌においても Nap と Nar が大気圧下における硝酸塩還元に関与し、さらに Nar が低温・高圧条件下における主要な異化型硝酸塩還元酵素である可能性が示唆されている。そこで本研究では、MT-1 が持つ 2 種の異化型硝酸塩還元酵素がそれぞれ大気圧または高圧条件下においてどのような役割を果たすのかを検討するため、各酵素のαサブユニットをコードする遺伝子(*napA*、*narG*)に対する遺伝子破壊株(Δ*napA*、Δ*narG*)を構築し、野生株との生育を比較した。
【方法】自殺ベクターpKNOCK-Km を用いた相同遺伝子組換えにより、遺伝子破壊株(Δ*napA*、Δ*narG*)を構築し、PCR によって標的遺伝子への pKNOCK-Km の挿入を確認した。そして、構築した 2 種の遺伝子破壊株及び野生株を嫌気・30℃・大気圧または 30 MPa・硝酸塩存在下で培養した。660 nm で濁度測定を行い、生育曲線を作成した。
【結果・考察】野生株に対し、遺伝子破壊株では pKNOCK-Km の挿入による増幅断片長の増加が見られ、pKNOCK-Km に特異的なプライマーを使用した時、遺伝子破壊株のみ増幅した。この結果から、標的遺伝子への pKNOCK-Km の挿入が確認できた。大気圧条件下において、野生株に比べて Δ*napA* では生育速度は変わらないが誘導期の遅延が見られ、Δ*narG* では生育速度の大幅な低下が見られた。また、高圧条件下では全ての株において生育速度が半減したが、Δ*narG* のみ最大濁度が低下した。以上のことから、必須異化型硝酸塩還元酵素はなく、どちらか一方の酵素が存在すれば生育可能であるが、Nar が大気圧における主要な異化型硝酸塩還元酵素であり、高圧下ではさらに重要であることがわかった。さらに、Nap は誘導期の遅延が見られたことから、生育初期の脱窒に関与、もしくは同化など、異化とは異なる代謝に寄与している可能性が示唆された。

nitrate reductase, hydrostatic pressure, deep-sea denitrifier

講演番号：4C15a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ C 校舎 15 会場

Shewanella 属のシトクロム c_4 の酸化活性の圧力における影響
The effect of hydrostatic pressure on cytochrome c_4 oxidase activity in *Shewanella*
○迫田 彩日[1]、羽賀 みなみ[1]、加藤 千明[2]、栗原 達夫[3]、三本木 至宏[4]、為我井 秀行[1] ([1]日大院相関理化、[2]海洋研究開発機構、[3]京大化学研究所、[4]広大院生物圏科学研究所)
○ Ayaka SAKODA[1], Minami HAGA[1], Chiaki KATO[2], Tatsuo KURIHARA[3], Yoshihiro SAMBONGI[4], Hideyuki TAMEGAI[1] ([1]Niohon Univ., [2]JAMSTEC, [3]Kyoto Univ., [4]Hiroshima Univ.)

[目的]南極の海水から単離された *Shewanella livingstonensis* Ac10 は、生育温度 4～25℃、至適生育圧力 0.1 MPa で生育する好冷常圧性細菌である。*Shewanella* 属の一部の細菌では、シトクロム c_5(Cyt c_5)とシトクロム c_4(Cyt c_4)の 2 つの可溶性シトクロム *c* が存在することが明らかになっている。好冷好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 の場合、Cyt c_5 は生育圧力に関わらず常に発現しているが、Cyt c_4 は高圧培養時に発現が抑制されていることが報告されている。これは *S. violacea* DSS12 のみで言えることなのか、*Shewanella* 属で一般的に言えることなのか知られていない。そこで、Cyt c_4 の機能を明らかにするために、本研究では *S. livingstonensis* Ac10 の Cyt c_4(SL cytc_4)とその相同性が 75%である *S. violacea* DSS12 の Cyt c_4(SV cytc_4)に注目し、*Shewanella* 属の Cyt c_4 の機能・役割の解明に繋げることを目的とする。
[方法] SL cytc_4 および SV cytc_4 遺伝子を PCR で増幅し、構築した発現用プラスミドを大腸菌に導入した。構築した発現系から SL cytc_4 と SV cytc_4 を精製した。また、*S. livingstonensis* Ac10 と *S. violacea* DSS12 を培養し、得られた菌体を破砕して *S. livingstonensis* Ac10 の膜画分(SLmf)と *S. violacea* DSS12 の膜画分(SVmf)の調製を行った。そして、精製した Cyt c_4 と調製した膜画分を用いて、Cyt c_4 酸化活性における温度依存性、熱安定性、耐圧性の測定を行った。
[結果・考察]SL cytc_4 と SV cytc_4 とも 1 分子あたりヘムの数は 2 個であった。さらに N 末端アミノ酸配列を確認することにより、ヘムが正しく挿入された SL cytc_4 と SV cytc_4 が発現していることが確認できた。SL cytc_4 と SLmf、SV cytc_4 と SVmf を用いた活性測定では、いずれの場合も温度が上がるにつれて活性が上昇した。また SL cytc_4 と SLmf、SV cytc_4 と SVmf において、Cyt c_4 を 40℃で 10 min インキュベート後に 10℃で活性測定を行っても、10℃で活性測定を行った値と近い値を示した。これより、SL cytc_4 と SV cytc_4 の酸化活性は高温側で高くなり、低温菌のタンパク質であるが温度に不安定ということではないと考えられる。そして、SL cytc_4 と SLmf、SV cytc_4 と SVmf の高圧における活性測定では、SV cytc_4 は 150 MPa でも活性が見られるのに対し、SL cytc_4 は 75 MPa～100 MPa でほぼ活性が見られなくなった。また、SL cytc_4 と SVmf 、SV cytc_4 と SLmf の高圧における活性測定を行ったところ、SL cytc_4 と SVmf では SV cytc_4 と SLmf の場合よりも低い耐圧性を示した。これより、圧力の影響を受けているのは、SLmf ではなく SL cytc_4 であることが示唆され、この違いは菌の性質に反映していると考えられる。

cytochrome c_4, hydrostatic pressure, cytochrome *c* oxidase

講演番号：4C15a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ C 校舎 15 会場

新規二機能性フラビン酵素 Pseudomonas sp. AIU 813 由来 L-アミノ酸モノオキシゲナーゼ/オキシダーゼの X 線結晶構造解析

Structure based study of a novel bifunctional flavoenzyme L-amino acid monooxygenase/oxidase from Pseudomonas sp. AIU 813

○イム ドヒョン[1]、松井 大亮[2,4]、礒部 公安[3]、浅野 泰久[2,4]、伏信 進矢[1,4]（[1]東大農・応工、[2]富山県大工・生工研セ、[3]岩手大農、[4]JST, ERATO）
○Dohyun IM[1], Daisuke Matsui[2,4], Kimiyasu Isobe[3], Yasuhisa Asano[2,4], Shinya Fushinobu[1,4] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Toyama Pref. Univ., [3]Iwate Univ., [4]JST, ERATO)

【目的】*Pseudomonas sp*. AIU 813 から L-アミノ酸オキシダーゼとして発見された本酵素[1)]は、その後モノオキシゲナーゼとしての酸化的脱炭酸反応とオキシダーゼとしての酸化的脱アミノ反応の両方を触媒する新規二機能性酵素 L-アミノ酸オキシダーゼ/オキシゲナーゼ(L-AAOd/Og)であることが明らかになっている[2)]。また、この酵素に *p*-クロロ水銀安息香酸(*p*CMB)を添加することによってモノオキシゲナーゼ活性が減少し、オキシダーゼ活性が上昇することに着目して、変異体酵素 L-AAOd/Og C254I が作成された。L-AAOd/Og C254I は、*p*CMB の修飾を受けず、高いオキシダーゼ活性のみをもつことが報告されている。我々は、アミノ酸配列の比較や系統樹解析を通して L-AAOd/Og がオキシダーゼとモノオキシゲナーゼの活性を両方持つ新規のファミリーに属する可能性があると判断し、その立体構造を明らかにすることを目指した。また、L-AAOd/Og の活性の転換を構造生物学的観点から解釈し、その転移メカニズムを明らかにすることを試みた。

【方法】大腸菌で発現させた L-AAOd/Og の組み換え蛋白質を精製、結晶化し、KEK-PF にて X 線回折測定を行った。構造既知の類似酵素との配列相同性が 22%以下であるため、分子置換法は適用できず、Se-Met 置換体を用いてその位相の決定を行った。

【結果】沈殿剤として PEG3350 を用いてシッティングドロップ蒸気拡散法により結晶を作成した。Native L-AAOd/Og 及び Se-Met 置換体の結晶を用いて、最大分解能 1.9 Å で立体構造を決定した。L-AAOd/Og は、結晶格子中二量体で存在しており、各単量体は FAD 結合ドメイン、基質結合ドメイン、7 つの α-ヘリックスが集まった Helical ドメインの 3 つのドメインで構成されている。基質が結合すると予測される活性中心は、Trp235、Trp418、Phe416 などの芳香環を持つ残基による疎水性ポケットが形成されており、また Trp516 と Phe473、FAD のフラビン環によって形成された Aromatic cage が基質との結合に重要な役割をすると予測された。一方、活性転移の鍵であると予測される 254 番目のシステイン残基は Trp516 の隣に位置していた。

1) Isobe, K., et al., J. Biosci. Bioeng., 2012. **114**(3): 257-61.
2) 松井ら、日本農芸化学会 2012 年度大会

L-amino acid monooxygenase/oxidase, bifunctional enzyme, X-ray structure analysis

講演番号：4C15a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ C 校舎 15 会場

基質特異性の高い L-アルギニンオキシダーゼの探索

Screening of highly substrate-specific L-arginine oxidase for L-amino acid determination

○寺井 杏奈[1]、松井 大亮[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Anna TERAI[1], Daisuke MATSUI[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO)

【目的】血中の各種アミノ酸濃度は様々な疾病検出のために有用なマーカーとなることが近年明らかとなっている。アミノ酸の分析法としては、HPLC などの機器分析法を用いることが可能であるが、高価な分析機器や技術を要することから、医療の場での使用は限られているのが現状である。一方、酵素法による定量では簡便・迅速な測定が可能であり、我々の研究グループではこれまでに多くの種類のアミノ酸定量用酵素の開発に成功している。本研究では、基質特異性の高いアミノ酸定量用酵素を土壌中から探索し、特に L-アルギニンオキシダーゼについての特性解明、および定量への応用を目的とした。
【方法】土壌からのスクリーニング：様々な場所で土壌サンプルを採取した後、各アミノ酸を終濃度 0.2 %になるように添加して、30°C、300 rpm で 24 時間培養し、継代培養後、固体培地から単一コロニーを得た。活性測定：L-アルギニンを基質とした酸化反応に伴い生成する過酸化水素をペルオキシダーゼと 4-アミノアンチピリン、フェノールによって生成するキノンイミンを 505 nm の吸光度の経時変化を測定した。精製と特性解明：L-アルギニン含有培地で 24 時間培養後、粗酵素抽出液を調製し、各種クロマトグラフィーで精製した。SDS-PAGE によりバンドの確認を行った後、N 末端アミノ酸解析を行った。また、MS 分析により反応生成物を同定した。
【結果】L-アルギニンオキシダーゼの特性解明：L-アルギニンオキシダーゼを有する未同定細菌 BYC41-1 から L-アルギニンオキシダーゼを精製した結果、比活性が約 19.2 U/mg の精製酵素を得た。分子量は約 71 kDa であり、N 末端配列において、他の L-アミノ酸オキシダーゼと低い相同性を示した。本酵素の諸性質を検討した結果、最適温度は 70°C、最適 pH は 5.5 から 7.5 であった。L-アルギニンとの反応生成物として、2-ケトアルギニンが同定され、本酵素はα-オキシダーゼであることが示唆された。L-アルギニンに基質特異性の高いオキシダーゼの酵素化学的な諸性質解明は未だされておらず(EC1.4.3.-)、これが初めての報告例となる。血漿サンプル中の L-アルギニン定量：高い基質特異性と親和性を有し、L-アルギニン定量用酵素として優れた性質を備えていた。さらに本酵素は、ヒト血漿サンプルにおいても高い定量性を示したことから、生体試料中の L-アルギニン定量にも有用な酵素であることが明らかとなった。

L-Amino acid determination, L-Arginine α-oxidase, Screening

講演番号：4C15a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ C 校舎 15 会場

Penicillium sp. KAIT-M-117 由来新規γ-アミノ酪酸オキシダーゼ遺伝子のクローニング
Cloning of the gene encoding novel gamma-amino butyric acid oxidase from *Penicillium* sp. KAIT-M-117

○糸我 美瑞[1]、山村 晃[2]、松本 邦夫[2]、谷 修治[1]、炭谷 順一[1]、川口 剛司[1]（[1]阪府大院生環科、[2]神工大応用バイオ）
○Misu ITOGA[1], Akira YAMAMURA[2], Kunio MATSUMOTO[2], Shuji TANI[1], Jun-ichi SUMITANI[1], Takashi KAWAGUCHI[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]Kanagawa Institute of Technology Univ.)

【目的】γ-アミノ酪酸（GABA）は精神安定，血圧降下作用など様々な生理機能があるため，機能性食品の有効成分として広く利用されている。現在, 食品中の GABA の定量は HPLC が主流であるが，操作の煩雑さや測定時間の長さなどから多検体測定には不向きである。そこで酵素法に着目し，GABA を基質として過酸化水素を生成する酵素生産菌が土壌より検索され，*Penicillium* sp. KAIT-M-117 株が得られた。本菌株が生産する GABA オキシダーゼは，調べた限りにおいて GABA 特異的に酸化反応を行い，酸化的脱アミノ反応によりコハク酸セミアルデヒド，アンモニア，過酸化水素を生成する新規な酵素であると考えられる。しかし本菌では生産性が極めて低いことから，遺伝子をクローニングし異種宿主での大量発現を行うことで実用に供することを目的とした。
【方法・結果】本酵素の精製を行うために，まず本菌株の培養条件を検討し，1% GABA を含む最少培地にて 4 日間培養することに決定した。また培養中は GABA 資化に伴って生成するアンモニアの影響で培養液の pH が顕著に上昇することから，培養液の pH 調整を行い 5.6 に保つことで大量の菌体を得ることに成功した。培養後，菌体を超音波破砕し得られた無細胞抽出液を粗酵素液とした。なお酵素活性は GABA を基質とし生成する過酸化水素をペルオキシダーゼで定量する比色法により行った。次に各種クロマトグラフィーを用い粗酵素液の精製を試みたが, 分画のために塩を加えたり，担体に吸着させたりするような条件で行う陽イオン交換クロマトや疎水性クロマトでは活性が検出されない，もしくは活性が著しく低下するという結果になった。一方，目的酵素が非吸着画分に分画される条件で行う陰イオン交換クロマトや，塩を加えずに行うゲル濾過クロマトでは，比較的活性収率も良く有効な方法であることがわかった。そのため，粗酵素液を 80%硫安沈殿，陰イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーを用い，電気泳動的にほぼ二種類のタンパク質にまで部分精製した。目的酵素だと推測される約 50 kDa のタンパク質の N 末端アミノ酸配列解析を行った結果，N 末端修飾により同定できなかったため，内部アミノ酸配列解析を行った。エンドプロテイナーゼ Asp-N 消化により数個のペプチド断片が得られ，うち 2 種類の断片の N 末端アミノ酸配列解析を行った結果，本酵素はアミンオキシダーゼの一種であることがわかった。本酵素の部分アミノ酸配列や糸状菌由来アミンオキシダーゼにおいて高度に保存されている配列をもとに縮重プライマーを作製し PCR を行った結果，895 bp の部分遺伝子取得に成功した。現在ゲノムライブラリを作製し，遺伝子全長を取得中である。

GABA, amine oxidase, *Penicillium*

講演番号：4C15a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ C 校舎 15 会場

Phialemonium sp. AIU 274 が産生する中鎖アミン酸化酵素の精製と性質
Purification and characterization of a medium-chain amine oxidase from *Phialemonium* sp. AIU 274

○佐々木 朋子[1]、相上 雄亮[1]、山田 美和[1]、岸野 重信[2]、小川 順[2]、礒部 公安[1] ([1]岩手大農、[2]京都大院農)
○Tomoko SASAKI[1], Yuusuke AIGAMI[1], Miwa YAMADA[1], Shigenobu KISHINO[2], Jun OGAWA[2], Kimiyasu ISOBE[1] ([1]Iwate Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】短鎖脂肪族アミンや芳香族アミンを酸化するアミンオキシダーゼは古くから研究されてきたが、中鎖脂肪族アミンに良く作用するオキシダーゼや中鎖アミノカルボン酸に作用するオキシダーゼの研究は極めて少ない。そこで、本研究では、中鎖脂肪族アミンや中鎖アミノカルボン酸に作用するオキシダーゼを産生する微生物を自然界からスクリーニングし、分離菌の最適培養条件、酵素の精製および諸性質について検討した。
【方法】目的の酵素を産生する微生物は、6-アミノヘキサン酸を単一窒素源とする培地を用いて集積培養法でスクリーニングした。酵素活性は、6-アミノヘキサン酸および 1,8-ジアミノオクタンを基質として、基質の酸化で生成される H_2O_2 を比色法（555 nm）で測定して求めた。酵素の精製は、1 日培養した菌体をマルチビーズショッカーで破砕して粗酵素液を調製し、硫安塩析と GigaCap Q-Toyopearl、Phenyl-Toyopearl、DEAE-Toyopearl の各カラムクロマトグラフィーを組み合わせて行った。
【結果・考察】6-アミノヘキサン酸培地で集積培養して 6 -アミノヘキサン酸や 1,8-ジアミノオクタンに高いオキシダーゼ活性を示す酵素を産生する微生物を単離し、*Phialemonium* sp. AIU 274 と同定した。本菌の酵素生成量は、6-アミノヘキサン酸培地で 1-2 日間培養すると最大に達し、培養時間を長くすると急激に減少した。1 日培養した菌体から調製した粗酵素液を用いて上記の方法で目的酵素を精製した結果、約 1,500 倍精製され（活性回収率は約 40%）、Native-および SDS-PAGE で単一のタンパク質バンドが得られた(サブユニット＝76.5 kDa)。本酵素は、中鎖脂肪族アミン、中鎖アミノカルボン酸、中鎖脂肪族ジアミンに良く作用したが、短鎖脂肪族アミン、短鎖アミノカルボン酸、短鎖脂肪族ジアミンおよび L-アミノ酸には作用しなかった。以上の結果より、本酵素は、幅広いω-アミノ化合物から酸化的にアンモニアを遊離する酵素であると推定された。本酵素の最適反応 pH は、ヘキシルアミンで pH 7.0、6-アミノヘキサン酸で pH 7.5、1,6-ジアミノヘキサンで pH 8.0、6-アミノヘキサノールで pH 6.5～pH 8.0 であった。酵素は中性付近で安定であったが、酸性および塩基性領域では不安定であった。本酵素の等電点は 5.7 付近で、精製酵素のスペクトルから本酵素はフラビン酵素ではないと推定された。

Phialemonium sp., medium-chain amine oxidase, aminocarboxylic acid

講演番号：4C15a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ C 校舎 15 会場

Aspergillus aculeatus 由来糖化アミノ酸オキシダーゼホモログの基質特異性について
Substrate specificity of fructosyl amino acid oxidase homologs from *Aspergillus aculeatus*
○宮武 はる香、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司 (阪府大院生環科)
○Haruka MIYATAKE,Shuji TANI,Jun-ichi SUMITANI,Takashi KAWAGUCHI (Osaka Pref. Univ.)

［目的］糖尿病の臨床診断項目の一つである糖化ヘモグロビン（HbA_{1C}）は過去 1 ヶ月の血糖の平均値を反映し、血糖値と異なり直前の食事の影響を受けないというメリットがある。糖化アミノ酸オキシダーゼ（FAOD）は、糖化アミノ酸を酸化的に加水分解し、アミノ酸、グルコソン、H_2O_2 を生成する酵素であり、peroxidase 法にて H_2O_2 を定量することにより糖化アミノ酸の定量が可能である。そのため、検体をプロテアーゼで前処理することにより、FAOD を HbA_{1C} のような糖化タンパクの測定に利用可能である。糖化アミノ酸には糖が N 末端のα-アミノ基に結合したものと、Lys 側鎖のε-アミノ基に結合したものが存在し、FAOD はα-糖化アミノ酸を認識するもの、ε-糖化アミノ酸を認識するもの、両方を認識するものの 3 つに分類される。HbA_{1C} はβ鎖 N 末端のバリン残基が糖化されているため、糖化バリンを特異的に測定することができれば、HbA_{1C} を特異的に定量することが可能となる。当研究室にてゲノム情報が明らかとなった糸状菌 *Aspergillus aculeatus* は FAOD ホモログ遺伝子を 5 つ持つことが判明した。そこで、ホモログ遺伝子 *fao1～5* を大腸菌で発現させ、発現産物の基質特異性について明らかにすることを目的とした。
［方法・結果］ホモログ遺伝子 *fao1～5* について、発現プラスミドや発現条件を検討することで、全て可溶性タンパクとして発現させることに成功した。基質として認識されることが期待される糖化アミノ酸｛N^{ε}-fructosyl N^{α}-Z-lysine (FZL), fructosyl valine (F-Val)｝, pipecolinic acid, L-proline, D-proline, L-hydroxy proline, sarcosine, saccharopine を対象に、発現産物の基質特異性について調べたところ、FAO2 は pipecolinic acid, L-proline, D-proline, FAO3 は FZL, FAO5 は FZL, F-Val に反応することが明らかとなった。FAO1 と FAO4 については、どのような基質にも反応しなかった。
Fusarium oxysporum 由来 FAOD はα-糖化アミノ酸、ε-糖化アミノ酸の両方を認識するが、K373 を別のアミノ酸に置換するとα-糖化アミノ酸に対する活性を失う [1]。この Lys 残基は、α-糖化アミノ酸を認識する FAO5 では保存されていたが、α-糖化アミノ酸を認識できない FAO3 では Met であった。そこで、Lys と Met を入れ替えた変異体 FAO3 M375K, FAO5 K366M を作製したところ、FAO3 M375K はε-糖化アミノ酸だけでなくα-糖化アミノ酸にも反応したが、FAO5 K366M では、逆にα-糖化アミノ酸に対する活性を失った。
1) Fujiwara *et al. Appl Microbiol Biotechnol*, 74, 813-819, 2007

fructosyl amino acid oxidase, HbA_{1C}, clinical diagnosis

講演番号：4C15a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ C 校舎 15 会場

非リボソーム型ペプチド合成酵素のアデニル化ドメインを利用したアミノ酸アミド合成法の開発

Amino Acid Amide Synthesis Using Adenylation Domain of Non-ribosomal Peptide Synthetases

○鈴木 亮平[1]、原 良太郎[2]、木野 邦器[1,2]([1]早大理工・応化、[2]早大・科健機構)
○Ryohei SUZUKI[1], Ryotaro HARA[2], Kuniki KINO[1,2] ([1]Dept. Appl. Chem., Fac. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]ASMeW)

【目的】アミド化合物は医薬品やポリマーの原料として有用な化合物であるが、その合成に関わる触媒的なアミド結合形成反応として技術的に確立されている例は少ない。非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)では、その構成モジュールにおいてアデニル化(A)ドメインによりアデニル化された基質アミノ酸は、チオレーション(T)ドメイン上の 4’-ホスホパンテテインを介してチオエステル結合を形成し、縮合(C)ドメインによりアミド結合を形成する。我々は、この NRPS の反応機構に着目し、Tyrocidine A 合成酵素の構成モジュール TycA による基質アミノ酸の活性化と求核剤であるアミンの求核置換反応により多様なアミド化合物が合成可能であることを明らかにしている[1)]。さらに、基質アミノ酸活性化の観点からアデニル化に着目し、A ドメインのみを用いた場合にも種々のアミンを求核剤として用いることでアミド結合の形成が可能であると予想した。本発表では、TycA の A ドメイン(TycA_A)による各種アミノ酸アミド化合物合成の可能性を検討した。また、本反応が他の NRPS の A ドメインを用いた場合にも適用可能であるかどうか、その一般性を検証した。
【方法・結果】TycA_A の基質を L-トリプトファン(L-Trp)求核剤を L-プロリン(L-Pro)をとして ATP および $MgSO_4$ 存在下で反応させたところ、TycA と同様に TycA_A を用いた場合にも L-Trp-L-Pro が生成した。また、D-アミノ酸および L-アミノ酸を用いた反応では基質のキラリティーを反映したジペプチドが生成した。さらに、求核剤として L-Pro の代わりに種々のアミンを用いた反応を検討した。プロリンアナログや誘導体、メチルアミン、ジメチルアミン、4 員環から 8 員環までの環状アミン、さらにβ-アミノ酸やγ-アミノ酸を用いた反応を行った。HPLC および LC-ESI-MS で分析したところ、多くの組み合わせでアミノ酸アミド化合物の合成が明らかとなった。次に、TycA_A 以外の A ドメインを用いた場合にも同様の反応が可能であるかを検証するために、L-アスパラギン酸(L-Asp)をアデニル化する Bacitracin 合成酵素由来の A ドメイン(BacC4_A)を用いて反応を実施した。BacC4_A の基質を L-Asp 求核剤を L-Pro とする反応を行ったところ L-Asp-L-Pro が生成した。以上の結果から、NRPS の A ドメインによる基質アミノ酸のアデニル化とそれに続く求核剤の求核置換反応によりアミド結合形成が可能であることが強く示唆された。また、A ドメインのみを用いる本反応系では T ドメインのホロ酵素化が不要となる。したがって、本手法によって、ホスホパンテテイン転移酵素および Coenzyme A を必要としない簡便かつ汎用性のあるアミド化合物の新規合成法が提供できるものと期待される。

1）佐藤ら，第 64 回日本生物工学会大会講演要旨集，講演番号 3Cp06，p. 124（2012）

non-ribosomal peptide synthetase, amide bond formation, dipeptide

講演番号：4C15a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ C 校舎 15 会場

Pseudomonas 由来β-peptidyl aminopeptidase の酵素特性評価
β-Peptidyl aminopeptidase from *Pseudomonas aeruginosa*
○有馬 二朗、田中 あゆみ、森本 正純、森 信寛（鳥取大農）
○Jiro ARIMA,Ayumi TANAKA,Masazumi MORIMOTO,Nobuhiro MORI (Tottori Univ.)

【目的】我々は、セリンペプチダーゼが持つアミノリシス触媒能に着目し、その機能を利用した短鎖ペプチド類の合成を試みている。MEROPS ペプチダーゼデータベース上で S58 ファミリーに分類されるペプチダーゼは、β-Ala や D-アミノ酸の pNA 誘導体に対して加水分解活性を示すことが知られている。これに加え、*Ochrobactrum* や *Sphingosinicella* 由来の同類酵素からは、高いアミノリシス活性を有することも報告された。同類の酵素の遺伝子は、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株のゲノム中にも存在する。本研究では、*P. aeruginosa* PAO1 株由来の S58 ファミリーに属するペプチダーゼ（β-peptidyl aminopeptidase）に焦点を当て、組換え酵素の取得と性質検討、及び活性中心の変異による酵素機能への影響について検討した。本発表では、アミノリシス活性に焦点を当てた諸性質と、活性中心の変異によるアミノリシス活性への影響について報告する。
【方法及び結果】*P. aeruginosa* PAO1 株のゲノム情報を基に、β-peptidyl aminopeptidase 遺伝子を PCR で増幅し、大腸菌での発現系を構築した。本酵素の推定アミノ酸配列から算出された分子質量は約 40 kDa であったが、組換え酵素の SDS-PAGE からは、25 kDa と 17 kDa のフラグメントが確認され、本酵素が発現後、なんらかの切断受けていることが示唆された。諸性質を検討した結果、本酵素は熱に対して 50℃まで、pH に対しては 6.0～9.8 の間で安定であり、β-Ala、D-Ala、Gly それぞれの pNA 誘導体に対し、pNA 遊離活性が確認された。また、β-Ala-pNA に対する pNA 遊離活性の最適 pH は 6.0 であったが、D-Ala-pNA 及び Gly-pNA に対する最適 pH は 8.0 付近にあり、pNA 遊離活性に対する pH の影響は、基質ごとに大きく異なった。更にはβ-Ala-pNA に対するアミノリシス反応の最適 pH は 8.0 であり、pH 6.0 で確認される pNA 遊離活性は、加水分解であることが示唆された。次に活性中心である Ser247 を Cys に置換し、変異酵素（S247C）を構築した。S247C はβ-Ala-pNA に対してのみ pNA 遊離活性を示したが、生成物は全てβ-Ala-β-Ala-pNA であり、その最適 pH は 9.0 と野生型酵素と大きく異なった。本実験結果から、活性中心の変異により加水分解活性は失われ、アミノリシス活性のみ維持していることが示唆された。精製 S247C の性質を野生型酵素と比較したところ、安定性は野生型酵素と殆ど変わらなかったが、アミノリシスにおける基質特異性は野生型と S247C の間で大きく異なる結果となった。

β-peptidyl aminopeptidase, Pseudomonas aeruginosa, peptide bond formation

講演番号：4C15a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ C 校舎 15 会場

エリンギ由来セリンアミノペプチダーゼの一次構造解析と酵素化学的性質

Primary structure and properties of serine aminopeptidase from *Pleurotus eryngii*

○東海 彰太、千葉 真範、森 信寛、有馬 二朗（鳥取大農）
○Shota TOKAI,Masanori CHIBA,Nobuhiro MORI,Jiro ARIMA (Tottori Univ.)

【目的】エリンギ（*Pleurotus eryngii*）の子実体には、他のきのこには見られない特有のセリンペプチダーゼが存在する。本酵素は分子質量が約 79kDa のモノマー酵素で、pH や熱に対して比較的安定である。また、加水分解と拮抗してアミノリシス反応も触媒し、その基質特異性も広いため、多様なジペプチドが生成物として観察される。これまでに本酵素のアミノリシス触媒能を利用し、L-Tyr-NH_2 と L-Arg-OMe から鎮痛作用を示す kyotorphin の合成が可能であることを明らかにした。我々は、当酵素が持つアミノリシス活性を利用したペプチド合成への利用と汎用性拡大に向け、遺伝子の取得と発現系の構築、そして酵素活性や基質特異性に重要と思われるアミノ酸残基の同定を試みている。本発表では、本酵素遺伝子のクローニングと変異解析、そして酸化処理による性質改変について報告する。
【方法及び結果】エドマン分解法による N 末端アミノ酸配列解析を試みたが、解読が不可能であったため、本酵素は N 末端が何らかの修飾を受けていることが示唆された。そこで、Lysyl endopeptidase 及び V8 protease を用いて本酵素を断片化し、内部配列の解析を行った結果、3 つのアミノ酸内部配列が得られた。配列情報を利用したインバース PCR により、エリンギのゲノム上に存在する 3.2kbp の本酵素遺伝子領域を解読すると共に、RACE 法により本酵素をコードする cDNA を得た。ゲノムの本酵素遺伝子上には 4 か所のイントロン領域が見られた。また、668 残基からなる推定アミノ酸配列の Pfam 解析から、本酵素はファミリーS9 に属するアミノペプチダーゼであることが強く示唆された。活性中心と思われる 523 番目の Ser を Cys、Ala、Thr に置き変えた変異酵素（S523C、S523A、S523T）を作製し、それぞれの部分精製酵素における性質を検討した。S523A は活性が完全に失われたが、S523T や S523C ではわずかに活性を保持していた。また、各変異酵素の Km 値は野生型酵素とほぼ変化はなく、kcat 値が極端に低下していたことから、Ser523 の変異は反応回転数のみに影響することが示され、本残基が活性中心であると裏付けられた。一方で、本酵素を過酸化水素で酸化すると、基質特異性の変化が観察された。そこで、8-Anilino-naphthalene sulfonate による蛍光プローブ法を利用して構造変化を観察した結果、酸化による基質特異性の変化は、立体構造の変化により引き起こされるものではないことが示された。現在は、トリプシン処理分解後の MALDI TOF MS 解析による、酸化箇所の特定を試みている。

aminopeptidase, aminolysis, Pleurotus eryngii

講演番号：4C15a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ C 校舎 15 会場

ミミズ（Eisenia foetida)由来の抗植物ウイルス性メタロプロテアーゼ遺伝子のクローニングと発現
Cloning and expression of an anti-plant viral metalloprotease gene from Eisenia foetida

○上田 光宏[1]、谷川 元子[2]、中澤 昌美[3]、宮武 和孝[4]、脇本 吉清[5]、坂口 実[6]、井上 國世[7]([1]阪府大院生環科、[2] 阪府大院生環科、[3] 阪府大院生環科、[4] 帝塚山学院大、[5] ワキ製薬、[6] 大阪薬科大学、[7] 京都大学)
○Mitsuhiro Ueda[1], Motomi Tanigawa[2], Masami Nakazawa[3], Kazutaka Miyatake[4], Yoshikiyo Wakimoto[5], Minoru Sakaguchi[6], Kuniyo Inouye[7] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]Osaka Prefecture Univ., [3]Osaka Prefecture Univ., [4]Tezukayama Gakuin Univ., [5]Waki pharmaceutical Co., [6]Osaka Univ. of Pharm. Sci., [7]Kyoto Univ.)

【目的】植物病原性微生物や植物ウイルスの感染によって植物の生育が阻害されたり，枯死することによって収穫量の減少や品質の低下を招いている．この内植物ウイルスを防除する方法として農薬の利用や遺伝子組換え，ワクチン療法の開発などが挙げられる．しかしながら，農薬や遺伝子組換えは安全性や生態系への影響が問題となっている．ワクチン療法は弱毒ウイルスの開発に労力を要することやワクチンの効力に注意をはらう必要がある．そこで，環境に優しい生物系農薬を見出すために抗植物ウイルス性物質のスクリーニングを行った．その結果土壌動物であるミミズ由来の成分に高い抗植物ウイルス活性を示す物質が存在することを明らかにした．ミミズからその物質を精製したところプロテアーゼ（セリンプロテアーゼ[1)] とメタロプロテアーゼ[2)]）であることを明らかした．本研究ではミミズ由来抗植物ウイルス性メタロプロテアーゼ遺伝子のクローニングと異種宿主発現について報告する．

【方法と結果】　シマミミズの乾燥粉末から total RNA を単離し，逆転写により cDNA を合成した．さらに，これを鋳型として PCR を行った．この PCR に用いた縮重プライマーは，すでに解析されている本酵素の N-末端アミノ酸配列を基に縮重プライマーを設計した．また，5’ RACE 法を用いて 5’ 上流領域の塩基配列を明らかにした．cDNA クローニングの結果，本酵素は 351 bp（分子質量：13269 kDa）からなるシグナルペプチド・プロペプチド領域と 918 bp（分子質量：34146 kDa）からなる触媒ドメインから構成されていた．BLAST による相同性検索を行った結果，本酵素がメタロプロテアーゼファミリーのひとつである M14 メタロペプチダーゼに属することが分かった。本ファミリーに属するプロテアーゼは多くの脊索動物で見出されている。次にベクターに pET Blue1 を用い，触媒ドメイン部分の配列をベクターに挿入し，大腸菌を用いて発現を試みた．しかしながら，発現タンパク質は菌体内で封入体を形成し不活性の状態であった．そこで，次に酵母(*Pichia pastoris*) を用いた発現を試みた．発現ベクターには pPICZαA を用い，全長配列あるいは触媒ドメイン部分のみをベクターに挿入し，*Pichia* での発現を行った．発現後の培養上清を回収し，ゼラチンを用いて活性染色を行ったところ 30 kDa 付近にバンドを確認できた．現在，本酵素の精製を行っている．

引用文献

1. Ueda et al., Comp Biochem. Physiol. B 151, 381-385, 2008.
2. Ueda et al., Process Biochem. 46, 1711-1716, 2011.

earthworm, protease, anti-plant viral activity

講演番号：4C15a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:12～ C 校舎 15 会場

カニより分離した *Bacillus megaterium* 由来プロテアーゼの精製と特性評価

Purification and characterization of protease from *Bacillus megaterium* isolated from crab.

○小山 秋平[1]、山下 隆[2] ([1]東京工科大院・バイオニクス、[2]東京工科大・応用生物)
○ Syuhei KOYAMA[1], Takashi YAMASHITA[2] ([1]Tokyo Univ. of Technology, [2]Tokyo Univ. of Technology)

【目的】
当研究室では、ムール貝の中に生息していた小型のカニから、*Bacillus megaterium* を分離した。また、この菌株が培養上清中にプロテアーゼを産生していることが判明した。本研究では、酵素の精製を行い、その性質を解明することを目的とした。

【方法】
カニより分離した *B. megaterium* を供試菌株として用いた。SCD 培地を用いて 20℃、48 時間振盪培養し、培養上清を回収した。得られた培養上清を粗酵素液として、疎水性相互作用クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーを行い、酵素の精製を行った。酵素の精製純度は、SDS-PAGE を行って確認した。酵素活性は、カゼインを基質とし、プロテアーゼによって遊離したチロシン量を Folin 試薬で測定して評価した。

【結果】
本酵素は、40℃、pH8.0 において最大の活性を示し、高塩濃度環境下でも活性を有していた。pH7.0-8.0 および 40℃以下の条件において、高い安定性を示していることが確認できた。また、本酵素は EDTA および EGTA によって強く阻害されたことから、金属プロテアーゼであることが示唆された。

Bacillus megaterium, protease, purification

講演番号：4C15a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:24～ C 校舎 15 会場

耐熱性セリン-カルボキシルプロテアーゼ、クマモリシンの活性化機構の解析

Analysis of the activation mechanism of kumamolisin , a thermostable serine-carboxyl proteinase

○塩川 史弥[1]、尾山 廣[2]、伊東 昌章[3] ([1]沖縄高専　専攻科、[2]摂南大　理工　生命科学、[3]沖縄高専　生資工)
○Fumiya SHIOKAWA[1], Hiroshi OYAMA[2], Masaaki ITO[3] ([1]ONCT, [2]Setsunan Univ., [3]ONCT)

【目的】クマモリシンは、好熱菌 *Bacillus* novosp. MN-32 株が産生する酸性プロテアーゼ（反応最適条件：pH3.0、70℃）であり、セリン - カルボキシルプロテアーゼに分類される。クマモリシンの基本骨格は subtilisin と類似しており、触媒残基が Ser278-Glu78-Asp82 の catalytic triad で構成され、それらの中の Glu78 が酸性条件下において general base として働くことを特徴としている。さらに、catalytic triad の水素結合ネットワークが Glu32 と Trp129 へと伸びており、高温下での触媒効率の向上に寄与している。クマモリシンは、N 末端側にプロペプチドを有する前駆体タンパク質（プロクマモリシン）として生合成され、プロペプチドが分子シャペロンとして機能し、周辺環境が酸性になると活性中心部位の電荷が変化し、リンカーペプチドが切断されて成熟型のクマモリシンに変換される。本研究では、変異体解析が容易な無細胞タンパク質合成系を用いてプロクマモリシンの活性化機構を解析することを目的とした。
【方法】クマモリシン無細胞合成系の構築には、昆虫培養細胞由来の無細胞タンパク質合成系を用いた。まず、昆虫無細胞系発現ベクター pTD1 の C 末端に Strep-tag II 配列を付加しプロクマモリシン遺伝子を挿入した発現プラスミド（pTD-Pro-Kumamolisin）を作製し、PCR を用いた直鎖化、mRNA 合成、精製 mRNA を鋳型としたプロクマモリシンの無細胞合成を行った。活性化処理は、合成産物を pH4.0, 4℃で 12 時間インキュベーションすることで行った。活性化の状態は、ウエスタンブロットにより調べた。また、プロ領域のリンカーペプチドの P1-P4 に相当する部位を欠損させた変異体、触媒残基 Ser278 を Ala に変換した変異体および Ser278 を欠損させた変異体は常法により作製した。
【結果】無細胞合成されたプロクマモリシンは、活性化処理により、成熟型クマモリシンと同じサイズに変換されることが確認できた。また、P1-P4 を欠損させた変異体では、成熟型クマモリシンのサイズにほとんど変換されないことから、成熟型への変換にはリンカーペプチドのアミノ酸配列が重要な役割をしていることが示された。さらに、触媒残基 Ser278 を Ala に変換した変異体および Ser278 を欠損させた変異体では、活性化処理を行っても成熟型クマモリシンと同じサイズに全く変換されなかった。これらのことより、無細胞合成されたプロクマモリシンの成熟型クマモリシンと同じサイズへの変換は自己触媒的に起こることが示唆された。現在、活性化処理を行ったクマモリシンの活性について蛍光合成基質を用いて調べており、その結果と合わせて報告する。

Kumamolisin, Cell-free protein synthesis, Activation

講演番号：4C15a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:36～ C 校舎 15 会場

大腸菌発現系を用いたヒツジアンジオテンシノーゲンの大量生産

Large-scale production of recombinant sheep angiotensinogen using an *E. coli* expression system

○安部 江里香[1]、稲山 亜由美[2]、山口 貴士[1]、朴 明宣[3]、大野 敏[3]、横川 隆志[3]、西川 一八[3]、鈴木 文昭[2]、中川 寅[2]、海老原 章郎[2] ([1]岐阜大院・応生、[2]岐阜大・応生、[3]岐阜大・工)
○Erika ABE[1], Ayumi INAYAMA[2], Takashi YAMAGUCHI[1], Akiyoshi BOKU[3], Satoshi OHNO[3], Takashi YOKOGAWA[3], Kazuya NISHIKAWA[3], Fumiaki SUZUKI[2], Tsutomu NAKAGAWA[2], Akio EBIHARA[2] ([1]Grad. Sch. of Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., [2]Fac. of Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., [3]Fac.of Eng., Gifu Univ.)

【目的】アンジオテンシノーゲン（Angn）は、血圧調節に重要な生理活性ペプチド、アンジオテンシンの前駆体タンパク質である。アンジオテンシンの生産経路の起点は、酵素レニンによって基質 Angn が特異的に切断される反応である。アンジオテンシンには特徴的なモチーフ配列（His^{6}-Pro^{7}-Phe^{8}）が存在し、その 2 残基 C 末端側（His^{9}-Leu^{10}）でレニンによって切断される。また、レニンに対する Angn のミカエリス定数(K_m)は合成ペプチド基質のそれより約 10 倍低いことから、基質の本体部分（アンジオテンシン以外の部分）が酵素との親和性を向上している。酵素レニンの特異的切断はこれらの要因によって成り立っている。この反応機構を立体構造に基づいて解明するため、本研究では、立体構造解析に必要となる Angn の大量生産系の確立を試みた。
【方法】ヒツジ Angn をコードする遺伝子をプラスミド pTAC-MAT-Tag（Sigma 社）に組み込み、大腸菌 BL21 株に形質転換した。LB 培地 15 L を用いて、温度 37℃にて IPTG 誘導によりヒツジ Angn を発現させた。大腸菌を超音波破砕し、菌体破砕液の上清画分について 3 段階のカラムクロマトグラフィーにて精製を行った。用いたカラムは、精製順に、アフィニティー（Ni-NTA superflow)、陰イオン交換（HiTrap Q FF)、ゲルろ過（HiLoad 16/60 Superdex 200 pg）である。精製過程の画分を SDS-PAGE で電気泳動後、CBB 染色で純度を確認した。最終標品に対し、紫外部吸収スペクトル測定によって総タンパク質濃度を、酵素レニンにより産生したアンジオテンシン I を ELISA で定量しアンジオテンシノーゲン濃度をそれぞれ算出した。反応速度論的解析によって K_m 値を、示差走査蛍光定量によって変性中点温度(T_m)をそれぞれ求めた。
【結果・考察】本研究で得られたヒツジ Angn 精製標品は CBB 染色でほぼ単一バンドであり、定量法に基づく純度は 9 割であった。培養液 15 L から 2.8 mg の精製標品が得られた。反応速度論的解析を行った結果、得られた K_m 値は 0.1 μM であった。これは、動物細胞で発現した組換え型ヒツジ Angn 精製標品が示す K_m 値と同程度である。示差走査蛍光定量の結果、ヒツジ Angn 精製標品が示す T_m 値は 53℃であった。これは、動物細胞で発現した組換え型ヒツジ Angn 精製標品の T_m 値（熱変性後の残存活性より決定）と同程度である。以上の結果より、大腸菌発現系を用いて生産したヒツジ Angn は、動物細胞で生産した標品と同様に正しく折りたたまれており、結晶構造解析にも利用可能であると考えられる。

angiotensin, renin, folding

講演番号：4C15a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:48～ C 校舎 15 会場

全 400 種ジペプチドの網羅的解析により解明された真核生物ペプチドトランスポーターの基質多選択性

Substrate multispecificity of PTR family peptide transporter revealed by exhaustive analysis of dipeptide-library using Fluorescence-based Competitive Uptake (F-CUp) assay system

○伊藤 圭祐[1]、疋田 礼[1]、本山 貴康[2]、加藤 竜司[3]、河原崎 泰昌[1]([1]静県大院・生活健、[2]不二製油・フードサイエンス研、[3]名大院・創薬)
○Keisuke ITO[1], Aya HIKIDA[1], Takayasu MOTOYAMA[2], Ryuji KATO[3], Yasuaki KAWARASAKI[1]
([1]Univ. Shizuoka, [2]Fujioil Co., Ltd., [3]Nagoya Univ.)

[目的] ペプチド輸送システムは生体内への栄養源アミノ酸の高効率な取り込みに重要であり、微生物から高等動・植物まで広く保存されている。輸送担体である Peptide TRansporter (PTR)ファミリーのペプチドトランスポーターは 8400 種類のジ・トリペプチドを多選択的に輸送すると考えられており、ヒト小腸・腎臓においては薬物輸送体としても機能することが知られている。しかし、その基質多選択性の詳細や基質認識メカニズムは明らかとされていない。そこで本研究では、新規に開発した迅速・簡便なペプチドトランスポーター解析システム（Fluorescence-based Competitive Uptake assay: F-CUp 法）を用いて全 400 種ジペプチドライブラリーを網羅的に解析し、その結果を元に PTR ファミリーペプチドトランスポーターの基質多選択性決定要因の特定を試みた。

[方法及び結果] *Saccharomyces cerevisiae* BY4742-*ptr2Δ* 株を宿主として、細胞膜上に出芽酵母の主要ペプチドトランスポーターである Ptr2p を強制発現させた。基質として用いた蛍光ラベル化ペプチド（βAla-Lys(AMCA)）は濃度依存的に細胞内へ取り込まれ、液胞に蓄積した（*Km*=0.16 mM）。アミノ酸および鎖長の異なる各種オリゴペプチドの競合阻害定数（*Ki*）を算出し、逆数（1/*Ki*）を吸収特性として評価した。その結果、ジ・トリペプチドにおいてのみ吸収特性が算出された。開発した F-CUp 法のハイスループット性を活用し、<u>全 400 種ジペプチドライブラリーを網羅的に解析</u>した結果、各ジ・トリペプチド間の吸収特性には最大で 2400 倍以上の差があることが明らかとなった（図参照）。また、吸収特性の高いペプチド群には酵母の生育改善効果がみとめられた。これらの結果から、ペプチドの吸収特性は“鎖長”および“アミノ酸配列”に依存して大きく異なること、吸収特性に優れたペプチド素材には発酵促進効果が期待できることが示された。アミノ酸残基の出現頻度解析、および各種物理化学的指標を用いた重回帰分析により Ptr2p の<u>基質多選択性は基質構成アミノ酸の芳香環や電荷等に依存する</u>ことが示唆された。今回初めて明らかとなった真核生物ペプチドトランスポーターの基質多選択性から、その存在意義と基質認識メカニズムについても考察する。

N-terminal \ C-terminal	A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
A	2.50	<1.30	<1.30	13.60	<1.30	16.65	2.04	1.64	3.23	2.17	N.T.	<1.30	1.75	3.13	2.50	2.70	14.00	25.79	22.02
D	<1.30	<1.30	N.T.	<1.30	<1.30	<1.30	N.T.	<1.30	<1.30	<1.30	<1.30	<1.30	<1.30	<1.30	<1.30	<1.30	<1.30	<1.30	<1.30
E	<1.30	<1.30	<1.30	N.T.	<1.30	<1.30	<1.30	<1.30	<1.30	<1.30	<1.30	<1.30	<1.30	<1.30	<1.30	<1.30	<1.30	1.59	<1.30
F	35.45	<1.30	<1.30	32.94	10.00	16.72	27.60	5.26	29.00	22.15	26.51	N.T.	16.00	21.63	2.76	17.39	16.24	23.56	19.44
G	<1.30	<1.30	<1.30	3.70	<1.30	<1.30	3.13	N.T.	1.67	1.43	<1.30	<1.30	<1.30	1.59	<1.30	<1.30	<1.30	1.64	<1.30
H	22.18	<1.30	<1.30	22.69	N.T.	14.05	18.65	1.35	20.00	14.53	14.12	2.56	N.T.	5.88	13.80	14.93	16.15	17.74	20.34
I	4.76	<1.30	<1.30	14.84	N.T.	2.78	3.23	14.22	<1.30	13.32	13.29	<1.30	3.70	14.99	1.52	1.89	3.70	15.76	N.T.
K	1.79	<1.30	<1.30	2.94	1.85	13.37	2.44	<1.30	1.87	2.00	2.50	2.38	1.94	2.02	2.38	1.89	3.23	16.25	24.62
L	6.67	1.54	1.47	17.76	2.78	7.69	15.93	N.T.	3.23	14.27	17.98	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6.67	15.31	24.16	3.70
M	3.85	2.50	<1.30	17.66	9.09	8.33	18.81	2.50	16.95	17.36	18.06	N.T.	2.63	19.58	2.44	<1.30	8.33	16.99	16.46
N	4.35	<1.30	<1.30	25.10	2.33	5.26	13.86	1.51	4.76	4.55	4.00	<1.30	2.56	13.28	N.T.	2.70	21.92	24.67	17.06
P	<1.30	<1.30	<1.30	5.00	<1.30	<1.30	1.72	<1.30	N.T.	2.86	2.13	<1.30	<1.30	N.T.	<1.30	<1.30	<1.30	4.17	<1.30
Q	2.17	<1.30	<1.30	17.76	<1.30	<1.30	4.00	1.52	2.94	3.33	1.39	1.92	<1.30	N.T.	2.00	2.44	2.94	24.67	3.45
R	12.50	1.51	1.69	13.66	2.27	2.44	9.09	<1.30	10.83	5.56	7.69	4.35	N.T.	3.03	2.56	3.85	8.88	17.24	N.T.
S	1.92	<1.30	<1.30	18.11	N.T.	3.21	16.86	<1.30	5.26	2.33	3.13	<1.30	<1.30	2.33	<1.30	5.00	3.85	16.82	9.09
T	2.00	<1.30	<1.30	23.77	<1.30	3.45	2.22	<1.30	3.23	3.13	2.04	<1.30	1.59	9.09	<1.30	3.57	5.26	26.21	2.04
V	3.13	<1.30	<1.30	17.24	3.33	4.17	3.45	2.50	7.69	13.13	17.57	2.13	3.33	16.73	3.13	3.45	N.T.	19.32	17.08
W	36.11	14.51	4.17	49.62	25.90	7.69	18.54	2.86	22.03	21.24	29.35	15.53	19.97	26.53	39.88	35.81	41.67	22.30	20.28
Y	7.14	<1.30	<1.30	23.21	3.13	5.88	17.11	1.64	26.16	20.00	4.17	2.13	12.42	6.25	13.03	15.83	15.57	30.30	15.70

1/*Ki* (mM)

oligopeptide transporter, exhaustive analysis, substrate multispecificity

講演番号：4C16a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ C 校舎 16 会場

Family GH19 キチナーゼ－基質複合体の立体構造解析

Crystal structure of Family GH19 chitinase in complex with its substrate

○近藤 香織[1]、梅本 尚之[1]、大沼 貴之[1]、稲永 英子[2]、大澤 拓生[2]、沼田 倫征[2]、深溝 慶[1]([1]近畿大院農・バイオ、[2]産総研・バイオメディカル)
○Kaori KONDO[1], Naoyuki UMEMOTO[1], Takayuki OHNUMA[1], Hideko INANAGA[2], Takuo OSAWA[2], Tomoyuki NUMATA[2], Tamo FUKAMIZO[1] ([1]Kinki Univ., [2]Biomed. Res. Inst., AIST)

【目的】当研究室では、Family GH19 キチナーゼの構造と機能に関する研究を行っている。これまでにライムギ種子由来キチナーゼ（RSC-c）および RSC-c と$(GlcNAc)_4$ 複合体の結晶構造を明らかにし、アグリコン結合部位には 4 つのサブサイト (+1、+2、+3、+4) が存在することがわかった。また、基質結合クレフトの最も外側、サブサイト+4 に存在する Trp72 が、糖残基とのスタッキング相互作用に関与していることも明らかにした（Ohnuma *et al*. *FEBS J*. 2012, 279, 3639-51）。本研究では、１）Trp72 をアラニンに変異させ、変異酵素の機能解析によって Trp72 の役割を解明すること、２）グリコン結合部位にキチンオリゴ糖が結合した結晶を得、GH19 キチナーゼの基質結合様式の全貌を明らかにすること、以上二つの目的に従って研究を行った。

【方法】大腸菌 Origami(DE3)による発現系を用いて、野生型 RSC-c と変異型 RSC-c（E67Q、W72A および W72A/E67Q）を発現させ、イオン交換およびゲル濾過によって精製した。酵素活性はグリコールキチンおよび 4-ニトロフェニルペンタ-*N*-アセチル-β-キトペンタオシド [$(GlcNAc)_5$-pNP]を用いて測定した。キチナーゼの結晶化は、シッティングドロップ/蒸気拡散法により行った。

【結果と考察】グリコールキチンを基質に用いた速度論的解析の結果、W72A 変異体において K_m 値が上昇し、明らかな基質に対する親和力の低下がみられた。また、$(GlcNAc)_5$-pNP の分解産物を HPLC で分析した結果、野生型 RSC-c を加えた反応液からは主に $(GlcNAc)_3$-pNP (73%）と$(GlcNAc)_2$-pNP (25%) が得られた。一方、W72A 変異体を加えた反応液からは主に $(GlcNAc)_3$-pNP（27%）と $(GlcNAc)_2$-pNP（66%）が得られた。これらの結果から、Trp72 の Ala への変異により+4 サイトでの糖残基との相互作用が弱められ、$(GlcNAc)_5$-pNP の結合様式が非還元末端側に移動したものと思われた。

野生型 RSC-c および E67Q 不活性変異体を用いて、キチンオリゴ糖との共結晶化を試みたが、酵素基質複合体の結晶を作製することはできなかった。しかしながら、W72A/E67Q 不活性変異体と $(GlcNAc)_4$ の共結晶化を行ったところ、酵素に$(GlcNAc)_4$ が 2 分子結合した結晶構造が得られた。解析の結果、$(GlcNAc)_4$ はアグリコンおよびグリコン結合部位にそれぞれ 1 分子ずつ結合していることがわかった。以上より、Family GH19 キチナーゼのサブサイトは触媒基 (Glu67) の両側に 4 個ずつ存在し、基質結合クレフトは合計 8 個のサブサイトからなることがわかった。

chitinase, crystal structure

講演番号：4C16a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ C 校舎 16 会場

ナガハハリガネゴケ由来キチナーゼ Loop 挿入変異体の作製と機能解析

Characterization of a loop insertion mutant of family GH19 chitinase from moss (*Bryum coronatum*)

○竹中 祥子、大沼 貴之、深溝 慶 (近大院農)
○SHOKO TAKENAKA,Takayuki Ohnuma,Tamo Fukamizo (Kinki Univ.)

【目的】植物 Family GH-19 キチナーゼには、基質結合領域の両端に五つのループ構造をもつ“loopfull”型といくつかのループ構造を欠失した“loopless”型が存在している。ループ構造の存在は、Family GH-19 キチナーゼの基質特異性や反応特性を支配しているものと思われる。我々の研究室にでは、植物キチナーゼの中で最も分子量が小さい(22 kDa)ナガハハリガネゴケ由来キチナーゼ(BcChi-A)の構造と機能について研究を行っている。本酵素は“loopfull”型であるライムギ種子由来 Family GH-19 キチナーゼ(RSC-c)と比べると、ループ I、II、IV および V を欠失している。BcChi-A と RSC-c のキチンオリゴ糖に対する活性測定を行ったところ、BcChi-A では長鎖基質と短鎖基質に対する比活性に大きな差はないが、RSC-c では比活性に関して明確な重合度依存性が存在することが分かった。以上より、BcChi-A にループ構造の挿入を行うことによって BcChi-A のオリゴ糖基質に対する活性の制御および生成物分布の改変が可能であると思われた。本研究では、ループ構造の役割の解明および BcChi-A の反応特性の改変を目的とし、BcChi-A に RSC-c のループ II 配列を挿入したハイブリッド酵素を発現、精製し、得られた酵素の機能解析を試みた。
【方法】RSC-c のループ II 配列の前半ヘプタペプチドと、後半ヘキサペプチドを挿入するプライマーを設計した。部位特異的変異導入法を用いて、BcChi-A ループ II 挿入（ハイブリッド酵素）遺伝子の作製を行った。野生型 BcChi-A と同様の方法で、ハイブリッド酵素の発現と精製を行った。CD スペクトルを用いて、野生型 BcChi-A、野生型 RSC-c およびハイブリッド酵素の二次構造、熱安定性を調べた。また、HPLC を用いて、各酵素によるオリゴ糖の分解様式を継時的に調べた。
【結果】得られたハイブリッド酵素の CD スペクトルの結果から、ループ II 挿入により BcChi-A の構造に大きな変化が生じていないことを確認した。また、各酵素の熱安定性を調べたところ、それぞれ 73.2 ℃、63.3 ℃、53.7 ℃ であった。グリコールキチンとキチンオリゴ糖を用いて比活性の測定を行った結果、ハイブリッド酵素は野生型 BcChi-A の 12.1%、15.7%、13.1%であった。キチンオリゴ糖分解産物のアノマーを調べたところ、ハイブリッド酵素ではオリゴ糖分解切断部位において、明確に野生型との違いがみられた。以上より、BcChi-A へのループ II の挿入は、酵素の熱安定性を低下させ、生成物分布に相違をもたらすことがわかった。

chitinase, loop, glycoside hydrolase

講演番号：4C16a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ C 校舎 16 会場

高い糖転移活性を示すソテツ由来クラス V キチナーゼ CrChiA の構造と機能

Structure and function of a class V chitinase with high transglycosylation activity from cycad, Cycas revoluta

神田 有華[1]、梅本 尚之[1]、○大沼 貴之[1]、平良 東紀[2]、大澤 拓生[3]、沼田 倫征[3]、深溝 慶[1]([1]近畿大院農、[2]琉球大農、[3]産総研)

Yuka Kanda[1], Naoyuki Umemoto[1], ○ Takayuki OHNUMA[1], Toki Taira[2], Takuo Osawa[3], Tomoyuki Numata[3], Tamo Fukamizo[1] ([1]Kinki Univ., [2]Univ. of the Ryukyus, [3]AIST)

[目的]

我々は、植物クラス V キチナーゼの構造と機能に関する研究を行ってきた。これまでにタバコおよびシロイヌナズナ由来のクラス V キチナーゼ（NtChiV および AtChiC）の酵素学的性質と、立体構造を明らかにした。ソテツ由来クラス V キチナーゼ CrChiA には、NtChiV や AtChiC と 35%程度同一のアミノ酸残基が保存されているが、両酵素とは異なり、高い糖転移活性を示すことが報告されている（Taira T *et al*., *Glycobiology*, 19, 1452-61, 2009）。本研究では CrChiA が示す高い糖転移活性の構造的要因を明らかにすることを目的とし、CrChiA 単独および基質との複合体構造の決定を試みた。また、以前 AtChiC のサブサイト+1 に Trp を導入することにより、糖転移活性が顕著に増強されることを報告した（Umemoto *et al*., *Glycobiology*, in press, 2012）。本研究では、同様の手法により CrChiA の糖転移活性の増強が可能かどうかを検討した。

[結果と考察]

野生型 CrChiA と CrChiA-E119Q（不活性）変異体の結晶構造を、それぞれ 1.6 Å の分解能で決定した。NtChiV と AtChiC の立体構造と比較したところ、幾つかのループ領域に違いがみられた。また、活性中心における DxDxE モチーフにおいても以下のような違いがみられた。基質非存在下において、NtChiV と AtChiC の DxDxE モチーフ中央の Asp 残基の側鎖は、最初の Asp 残基側に向いていた。一方野生型 CrChiA と CrChiA-E119Q 変異体の同側鎖は、触媒基である Glu 残基（変異体では Gln 残基）側に向いていた。現在このような構造上の相違と糖転移活性との関連について調べている。酵素－基質複合体の構造決定を決定するため、野生型 CrChiA と$(GlcNAc)_3$の共結晶化を行った。その結果、CrChiA のサブサイト-2、-1 および+2、+3 サイトに$(GlcNAc)_2$がそれぞれ結合した構造が得られた。これまでに構造決定された Family GH18 キチナーゼと基質複合体において、-1 サイトに結合した糖はすべてボート型配座であるのに対して、CrChiA においてはイス型配座であった。

CrChiA のサブサイト+1 に Trp を導入するために、CrChiA-G77W 変異体を作製した。キチンオリゴ糖を基質に用いて反応産物を HPLC により調べた結果、基質分子よりも長鎖のオリゴ糖が検出されたことから、糖転移活性が増強されていることがわかった。

chitinase, crystal structure

講演番号：4C16a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ C 校舎 16 会場

GH18 キチナーゼのアロサミジン結合性：植物酵素と微生物酵素の比較
Allosamidin-Binding Property of Family GH-18 Chitinases: Comparision between Plant enzymes and Bacterial enzymes

○梅本 尚之[1]、大沼 貴之[1]、平良 東紀[3]、作田 庄平[2]、深溝 慶[1] ([1]近大院農、[2]東大院農生科、[3]琉球大農)
○ Naoyuki UMEMOTO[1], Takayuki OHNUMA[1], Toki TAIRA[3], Shohei SAKUDA[2], Tamo FUKAMIZO[1] ([1]Kinki Univ., [2]The Univ. of Tokyo, [3]Univ. of the Ryukyus)

【目的】Family GH-18 に分類されるキチナーゼは多くの生物種で見出されているが、立体構造においてはバリエーションがみられる。微生物由来 GH-18 キチナーゼでは、キチン結合ドメインが存在や芳香族アミノ酸残基が直線状に並んだ基質結合クレフト構造がよくみられる。一方、植物由来 GH-18 キチナーゼには付加的なドメイン構造はほとんどなく、基質結合クレフトにおいてもいくつかの芳香族アミノ酸残基が欠失している。さらに、微生物由来 GH-18 キチナーゼでは、基質が活性中心を跨ぎ、-1 サブサイトに位置する糖がボート型配座に歪んでいる結晶構造が頻繁に見出されているが、植物クラスⅤ(GH-18)キチナーゼではすべて非生産性複合体であり、基質が活性中心を跨いだ構造は見出されていない。以上より、同じ GH-18 に分類されるキチナーゼとはいえ、微生物由来のものと植物由来クラスⅤの基質結合様式には何らかの違いがあるものと考えられる。本研究では、等温滴定カロリメトリー(ITC)により植物由来クラスⅤ(GH-18)キチナーゼのアロサミジン結合性を調べ、セラチア由来キチナーゼＢ(SmChiB)の ITC データと比較を行った。
【方法】大腸菌を用いた発現系により、植物由来クラスⅤキチナーゼであるタバコ由来キチナーゼ(NtChiV)、シロイヌナズナ由来キチナーゼ(AtChiC)およびソテツ由来キチナーゼ(CrChiA)を発現させた。その後、陽イオン交換、疎水性相互作用およびゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより、SDS-PAGE で均一なまでに精製した。精製した酵素タンパク質とリガンドとしてアロサミジンを用いて、20 mM リン酸カリウムバッファー、pH 6.0、30°C の条件下で、MicroCal 社製 iTC200 を用いて測定を行い、それらの結果を、結晶構造を考慮しながら、SmChiB で得られたデータ[1)]と比較した。
【結果】NtChiV に対してアロサミジンを滴定したところ、シャープな熱放出が検出された。Origin を基にした解析ソフトウェアを用いてデータフィッティングを行ったところ、結合比 1:1 の結合モデルを用いて実験データと理論曲線を一致させることができた。得られた熱力学的定数をみてみると、この相互作用はエンタルピーとエントロピーの両方で駆動していることが分かった。しかし、SmChiB はエントロピー駆動であり、両者の相互作用は熱力学的に著しい対称をなしていることが分かった。現在、AtChiC と CrChiA について解析中である。

1) Cederkvist FH, Saua SF, Karlsen V, Sakuda S, **Eijsink** VG, Sørlie M. *Biochemistry* **46**, 12347-12354 (2007)

allosamidin, plant chitinase, bacterial chitinase

講演番号：4C16a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ C 校舎 16 会場

Pseudomonas sp. KN501 の生産するキチナーゼに関する研究

Studies of the chitinase from Pseudomonas sp. KN501

○横地 佐江子[1]、松永 彩[2]、平野 貴子[2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資料、[2]日大生資科・生化)
○Saeko Yokochi[1], aya Matsunaga[2], Takako Hirano[2], Wataru Hakamata[1,2], Toshiyuki Nishio[1,2] ([1]Granduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】エビやカニ、昆虫などの外骨格の主成分であるキチンは、*N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）が β-1,4 グリコシド結合で連なった構造多糖であり、セルロースに次いで自然界に多く存在する豊富なバイオマス資源である。しかし、その多くが利用されずに廃棄されている。キチンの加水分解により得られる GlcNAc やそのオリゴ糖は、生理機能性物質として期待されている。現在、それらの生産法は化学法が一般的であるが、環境汚染や副産物生成などの様々な問題点が挙げられている。そこで我々は、酵素を利用したキチン糖化を検討した。酵素によるキチンの糖化は、環境への負荷が少ない製造方法である。しかし、キチンは強固な結晶構造をしており、酵素分解を受けにくく糖化に長時間を要するため酵素が失活してしまうため、大量の酵素が必要となる。そこで連続的に新しい酵素を生産しながらキチン分解を行う発酵法が適しているのではないかと考えた。そこで我々は、発酵法によるキチン糖化に用いるキチナーゼ生産菌を土壌よりスクリーニングを行った。本研究では、スクリーニングにより得られた菌の同定、酵素生産のための培養条件検討及び酵素の精製について報告する。
【方法・結果】連続準個相培養によるキチンの糖化に用いる高キチン分解細菌を 3 段階のスクリーニングにより選抜した。選抜した高キチン分解土壌細菌について、16SrDNA のヌクレオチド配列より同定を行ったところ *Pseudomonas* 属であった。そこで本菌を *Pseudomonas* sp. KN501 と命名した。まず、本菌株におけるキチナーゼの生産条件の検討を行った。炭素や無機塩などの組成を変えた α−キチン含有培地で本菌を培養し、経時的にサンプリングを行った。サンプリングした培養液は、遠心分離を行い菌体を除去し、上清のキチナーゼ活性を測定した。活性測定は、Schales 変法に準じて行った。
酵素活性は、毎分 1 μmol の GlcNAc に相当する還元糖を生成する酵素量を 1 単位とした。その結果、Polypepton, K_2HPO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ と β−キチン 2%を含む培地で培養 3 日目において安定的にキチナーゼを生産することが確認された。次に、*Pseudomonas* sp. KN501 をこの培地中で培養し、得られた培養液から塩析を行なってキチナーゼを回収した。その後、陰イオン交換クロマトグラフィーと、疎水性クロマトグラフィーによってキチナーゼを精製した。回収した分画を SDS-PAGE に流したところ、キチナーゼと推定されるバンドが確認された。この分画を β-キチンと反応させたところ TLC において$(GlcNAc)_2$の生産が確認できた。

Pseudomonas, Chitinase, Enzyme Purification

講演番号：4C16a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ C 校舎 16 会場

構造一体型キチナーゼ *Serratia marcescens* キチナーゼ B の結晶性キチン分解機構の解明とフレキシブル型キチナーゼとの比較解析

Studies on mechanism of crystalline chitin hydrolysis by unified-type chitinase, *Serratia marcescens* chitinase B and comparative analysis with flexible-type chitinase

○杉本 華幸[1,2]、中村 啓太[2]、西野 裕史[1]、藤沼 晶子[2]、橋詰 義夫[2]、丸屋 良輔[2]、五十嵐 圭日子[3]、鮫島 正浩[3]、渡辺 大輝[4]、内橋 貴之[4]、安藤 敏夫[4]、鈴木 一史[1,2]、渡邉 剛志[1,2]（[1]新潟大・農・応生化、[2]新潟大院・自然科学、[3]東大院・農生科、[4]金沢大院・自然科学）

○Hayuki SUGIMOTO[1,2], Keita NAKAMURA[2], Yuji NISHINO[1], Akiko FUJINUMA[2], Yoshio HASHIZUME[2], Ryosuke MARUYA[2], Kiyohiko IGARASHI[3], Masahiro SAMEJIMA[3], Hiroki WATANABE[4], Takayuki UCHIHASHI[4], Toshio ANDO[4], Kazushi SUZUKI[1,2], Takeshi WATANABE[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Facul. Agric., Niigata Univ., [2]Grad. Sch. Sci. & Tech., Niigata Univ., [3]Grad. Sch. Agri. & Life Sci., Univ. of Tokyo, [4]Grad. Sch. Nat. Sci. & Tech., Kanazawa Univ.)

結晶性キチン分解活性の高いキチナーゼは、糖質加水分解酵素ファミリー18 に属する一部のキチナーゼである。これらの酵素は、触媒および基質結合ドメインを含む複数のドメインから構成される。各ドメインが近接してリジッドな構造をとる構造一体型と、ドメイン間のフレキシビリティーが高いフレキシブル型に分類できる。これらのキチナーゼは、触媒部位が深いクレフトになっていることや、複数の芳香族アミノ酸残基が触媒クレフトに向かって分子表面上に並んでいるという特徴をもち、キチンをプロセッシブに(連続的に)分解する。*Serratia marcescens* キチナーゼ B(SmChiB)は N 末端側に触媒ドメイン、C 末端側にキチン結合に重要なドメインをもつ構造一体型酵素で、分子表面には 4 つの芳香族アミノ酸残基が並んでいる。本研究では、SmChiB による結晶性キチン分解機構の詳細を明らかにするため、これらの芳香族アミノ酸残基が基質結合や分解におよぼす影響を生化学的解析および高速原子間力顕微鏡観察により調べた。また、SmChiB の分解特性についてフレキシブル型酵素である *Bacillus circulans* キチナーゼ A1 と比較解析した。BcChiA1 は、触媒、基質結合ドメインの間に FnIII ドメインが 2 つ挿入されている。

SmChiB の分子表面には、4 つの芳香族アミノ酸残基が触媒ドメイン側から Y240、W252、W479、Y481(YWWY)の順に並んでいる。Y を W に、もしくは W を Y に置換した 6 種類の変異型 SmChiB を用いて実験を行った。Y を W に置換した場合、野生型酵素に比べて、基質との結合力が増大した。他方、W を Y に置換すると基質との結合力が減少した。結晶性キチン(α-およびβ-キチン)の分解では、Y240 を W に置換した変異型酵素の活性は著しく低下したが、Y481 を W に置換した場合は活性の低下は見られなかった。高速原子間力顕微鏡により結晶性基質上での酵素分子の動態を観測したところ、野生型はキチン鎖上を移動しプロセッシブに分解していたが、Y240W はキチン鎖上を移動する様子がほとんど観察されなかった。これらの結果から、4 つの芳香族アミノ酸残基は基質結合および分解に重要であることがわかった。特に、触媒クレフトに一番近い Y240 が重要であり、この残基はキチン鎖を結晶表面から引き剥がし、クレフト内部に導くのに重要であると考えられた。また、SmChiB とフレキシブル型酵素 BcChiA1 の結晶性キチン(α-およびβ-キチン)に対する分解活性を比較すると、SmChiB はβ-キチンに対する分解活性が比較的高かったが、BcChiA1 はα-キチンに対する分解活性が顕著に高かった。これらの結果から、両酵素の分解特性は異なることが分かり、構造一体型とフレキシブル型酵素では結晶性キチン分解機構の一部に、分解特性を特徴づける違いがあると考えられた。

chitinase, crystalline chitin hydrolysis, high-speed atomic force microscopy

講演番号：4C16a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ C 校舎 16 会場

真正細菌および古細菌におけるイノシトールリン脂質の新規生合成経路の普遍性

Universality of novel biosynthetic pathway of inositol-phospholipid in Bacteria and Achaea

○森井 宏幸[1]、小川 みどり[2]、福田 和正[2]、谷口 初美[2] ([1]産業医大・化学、[2]産業医大・微生物)
○ Hiroyuki MORII[1], Midori OGAWA[2], Kazumasa FUKUDA[2], Hatsumi TANIGUCHI[2] ([1]Dept.Chem.UOEH, [2]Dept.Microbiol.UOEH)

我々は、古細菌において、イノシトールリン脂質の新規生合成経路を見いだし、抗酸菌も同様の生合成経路である事を明らかにした。真核生物では、イノシトールと CDP-ジアシルグリセロール(CDP-DAG)からホスファチジルイノシトール(PI)が生合成される。これに対して、古細菌と抗酸菌では、最初に、イノシトール１リン酸と CDP-アーキオール(CDP-ArOH)(または CDP-DAG)から、中間体のアーキチジルイノシトールリン酸(AIP)(またはホスファチジルイノシトールリン酸(PIP))ができ、これが脱リン酸化されてアーキチジルイノシトール(またはPI)が生成する。イノシトールリン脂質は、古細菌には広く分布し、真正細菌では放線菌類縁の菌に含まれている。しかし、これまでにイノシトールリン脂質の新規生合成経路を確認したのは、古細菌では *Methanothermobacter* と *Pyrococcus* の２属と、真正細菌では *Mycobacterium* の１属の合計３属だけである。

この新規生合成経路が、真正細菌と古細菌において普遍的に存在する事を示すために、PIP(AIP)合成酵素の真正細菌と古細菌における分布を、人工合成遺伝子を利用して調べた。真正細菌は、*Propionibacterium acnes*、*Corynebacterium glutamicum*、*Rhodococcus equi* の３種、古細菌は *Sulfolobus solfataricus* の１種、コントロールとして真核生物の *Saccharomyces cerevisiae* と *Homo sapiens* の２種について、それぞれの PIP 合成酵素、AIP 合成酵素、PI 合成酵素とホモロガスなタンパク質の遺伝子を pET21a に挿入したプラスミドベクターを構築し、大腸菌に導入した。それぞれの酵素の遺伝子を発現させた組み換え体を緩衝液に懸濁し、超音波で破砕した。菌体の破片と未破壊菌は低速遠心により取り除いた。残りのホモジネートから、超遠心により膜画分を分画し、緩衝液に懸濁して酵素として用いた。AIP 合成酵素活性と PIP 合成酵素活性は、[^{14}C]イノシトール１リン酸と CDP-ArOH(または CDP-DAG)を反応させ、[^{14}C]ラベルの脂質画分への取り込みを測定した。PI 合成酵素活性は、[^{3}H]イノシトールと CDP-DAG(または CDP-ArOH)を反応させ、[^{3}H]ラベルの脂質画分への取り込みを測定した。

真正細菌 *P. acnes*、*C. glutamicum*、*R. equi* の３種、古細菌 *S. solfataricus* の１種の目的遺伝子を導入した組換え体については、それぞれすべて PIP(AIP)合成酵素活性を確認し、イノシトールは取り込まれなかった。*S. cerevisiae* と *H. sapiens* の２種については、PI 合成酵素活性を確認したが、イノシトール１リン酸は取り込まれなかった。同様の方法で真正細菌１種(*Streptomyces avermitilis*)と古細菌２種(*Aeropyrum permix*、*Methanosarcina barkeri*)についても調べている。

inositol, phospholipid, phosphatidylinositol

講演番号：4C16a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ C 校舎 16 会場

Lactobacillus plantarum AKU 1009a 由来新規エノン還元酵素の結晶構造解析

Crystal structure of novel enoate reductase from *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a

○侯 峰[1]、宮川 拓也[1]、岸野 重信[2]、小川 順[2]、田之倉 優[1] ([1]東大院農生科、[2]京大院農)
○Feng Hou[1], Takuya Miyakawa[1], Shigenobu Kishino[2], Jun Ogawa[2], Masaru Tanokura[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Kyoto Univ.)

生体内には多様な脂肪酸が存在し、生体膜形成、タンパク質の機能調節、核内受容体を介した転写調節など、様々な役割を演じている。このため、脂肪酸の代謝と調節は生体にとって極めて重要である。これまでに、脂肪酸の不飽和化、水酸化、伸長、脂肪酸メディエーターへの変換など、様々な脂肪酸の代謝経路が知られている。近年、新たな脂肪酸代謝経路として飽和化経路が *Lactobacillus* 属乳酸菌 *L. plantarum* AKU 1009a において発見され、リノール酸から飽和脂肪酸を生成できることが明らかにされた。さらに、この代謝経路で飽和化反応を触媒する酵素として 10-oxo-11(*E*)-octadecenoic acid 還元酵素 (CLA-ER) が同定され、不飽和脂肪酸のエノン部分の C=C 結合を飽和化するためにエノン還元反応を触媒することが明らかになった。

CLA-ER は、NADH oxidase/flavin reductase superfamily に属しており、このファミリーにおいてエノン還元反応を触媒する酵素はこれまで報告されていない。そこで本研究では、新規エノン還元酵素 CLA-ER の反応機構と基質特異性の構造基盤を解明するために X 線結晶構造解析を行い、CLA-ER と補酵素 FMN の複合体構造、さらに基質 10-oxo-11(*E*)-octadecenoic acid または生成物 10-oxo-octadecenoic acid が結合した構造をそれぞれ 2.10, 2.35, 2.15 Å 分解能で決定した。CLA-ER は NADH oxidase/flavin reductase superfamily に特有のドメインスワッピングによる二量体構造を形成し、プロトマー間に 2 分子の FMN を結合していた。基質または生成物を結合した構造では、α5 ヘリックスと α6 ヘリックスからなるキャップ構造が、非結合状態の構造と比べて約 45º 傾き、長鎖脂肪酸の形によく合う結合ポケットを形成することが明らかになった。触媒部位には CLA-ER に特徴的な Cys51 が存在し、Cys51 の主鎖アミノ基と FMN の C2'位水酸基により、基質のカルボニル基の空間配置が規定されていた。また、キャップ構造の閉じた状態への変化に伴い、Trp126 が 180º 回転して C=C 結合付近の空間を占めることにより、二重結合とフラビン環が平行に配置できるようになることが示された。さらに、Tyr101 は 8.4 Å 移動して触媒部位に唯一存在する親水性残基の Cys51 と水素結合を形成し、基質への H^+の供与に関わることが示唆された。以上の構造的知見は、FMN と Cys51 から H^-と H^+が供与されて反応が進行することを結論づけるものであり、本研究は CLA-ER の長鎖脂肪酸に対する基質特異性の構造基盤を解明し、NADH oxidase/flavin reductase superfamily において新規なエノン還元反応機構を明らかにした。

Enoate Reductase, Fatty acid, Crystal Structure

講演番号：4C16a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ C 校舎 16 会場

ホスホエタノールアミンシチジリル基転移酵素 ECT の基質認識機構の X 線結晶構造解析
X-ray crystal structural analysis on the substrate binding mechanism of a phosphoethanolamine cytidylyltransferase ECT

○王 世鵬[1]、大塚 淳[1]、福田 良一[2]、永田 宏次[1]、太田 明徳[2]、田之倉 優[1]（[1]東大院農生科・応生化、[2]東大院農生科・応生工）
○Shipeng Wang[1], Jun Ohtsuka[1], Ryouichi Fukuda[2], Koji Nagata[1], Akinori Ohta[2], Masaru Tanokura[1]（[1]Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Biotechnol., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo）

【目的】

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来ホスホエタノールアミンシチジリルトランスフェラーゼ ECT は、真核生物におけるホスファチジルエタノールアミンの主要生合成経路である CDP-Etn 経路の二段階目の反応を担い、この経路を制御する鍵酵素である。ECT が触媒する二段階目の反応は CTP と O-phosphoethanolamine（P-Etn)を基質とし、シチジル基の転移反応によって CDP-Etn とピロリン酸（PPi)を生成する。基質の結合は CTP が先で P-Etn が後、また反応産物の解離は PPi が先で CDP-Etn が後の ordered bi bi 機構で進行する。それゆえ、ECT は反応の進行において、ECT・CTP 複合体、ECT・CTP・P-Etn 複合体、ECT・CDP-Etn・PPi 複合体および ECT・CDP-Etn 複合体という 4 状態を経ることが想定される。本研究では、ECT の基質認識機構およびシチジル基の転移反応における電子伝達機構を解明することを目的とし、P-Etn のアナログ 2-aminoethyl hydrogensulfate（S-Etn）を用いた共結晶化、X 線結晶構造解析、構造に基づく部位特異的変異体の作製、活性測定を行った。

【方法・結果】

ECT・CTP・S-Etn・Mg^{2+}複合体の X 線結晶構造解析を行い、分子置換法によって 1.8 Å 分解能で立体構造を決定した。反応に必須である二価金属イオン Mg^{2+}は CTP の α、β、γ リン酸基、そして 3 つの水分子との間に六配位結合を形成していることが明らかとなった。ECT・CTP・S-Etn・Mg^{2+}複合体結晶構造に基づいて、本来の基質である P-Etn を含む ECT・CTP・P-Etn・Mg^{2+}複合体における基質の認識機構を推定することができた。基質認識に関わるアミノ酸残基を同定し、部位特異的変異体を作製し、活性測定によって検証した。変異体活性測定の結果、His46、His101、Tyr115 は基質 P-Etn の認識に関わり、Thr136 が基質 CTP のβリン酸基を認識することが示唆された。また、His23 がシチジル基の転移反応における電子伝達に関わることが推定され、ECT の反応触媒機構を提唱することができた。

phosphoethanolamine cytidylyltransferase, ECT, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：4C16a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ C 校舎 16 会場

油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 由来 phospholipid:diacylglycerol acyltransferase ホモログの機能解析

Functional analysis of phospholipid:diacylglycerol acyltransferase homolog from *Mortierella alpina* 1S-4

○落合 美佐[1]、櫻谷 英治[2]、安藤 晃規[2,3]、小川 順[2]（[1]サントリービジネスエキスパート（株）、[2]京大院農・応用生命、[3]京大・生理化学ユニット）

○Misa OCHIAI[1], Eiji SAKURADANI[2], Akinori ANDO[2,3], Jun OGAWA[2] ([1]SUNTOTY business expert Ltd., [2]Kyoto Univ., [3]Kyoto Univ.)

【目的】脂質生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 は、アラキドン酸含有トリアシルグリセロール（TG）を菌体内に蓄積する。*M. alpina* のΔ5 脂肪酸不飽和化酵素は、リン脂質を構成するジホモ-γ-リノレン酸（DGLA）に作用しアラキドン酸を生成すると考えられている。そのため、*M. alpina* では、リン脂質を構成するアラキドン酸が TG に移行する経路が存在すると考えられる。TG は、ジアシルグリセロール（DG）にアシル基が転移されることにより生成される。DG にアシル基を転移する酵素には、アシル CoA をアシルドナーとする acyl-CoA:diacylglycerolacyltransferase と、リン脂質をアシルドナーとする Phospholipid:diacylglycerolacyltransferase(PDAT)の２つのタイプが知られている。そこで、*M. alpina* 1S-4 から PDAT ホモログを単離し機能解析を行った。

【方法と結果】*M. alpina* のゲノム情報から PDAT ホモログ（*MaLRO1*）を見出し、cDNA を単離した。推定アミノ酸配列は、*Yarrowia lipolytica* 由来の LRO1（XP_504038)と 31.7％、*Saccharomyces cerevisiae* 由来の LRO1 と 28.9％の同一性を示した。

S. cerevisiae でジアシルグリセロールアシル基転移活性を担っている *LRO1* と *DGA1* を欠失させた *Δlro1 Δdga1* 株では TG がほとんど生成しないが、*Δlro1 Δdga1* 株で、*MaLRO1* を高発現させたところ TG の生成量が増加したこのことから、MaLRO1 タンパク質はジアシルグリセロールアシル基転移活性を有することが示唆された。

一方、*S. cerevisiae* に *M. alpina* 1S-4 由来のΔ12 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子、Δ6 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子、GLELO 脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子、Δ5 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を導入し、アラキドン酸を生産できるようにした株（ARA3-1 株）を作成した。ARA3-1 株で *MaLRO1* を高発現させ、酵母菌体内の TG とリン脂質の脂肪酸組成を調べた。*MaLRO1* を高発現させた株では、TG 中のアラキドン酸および DGLA 比率がコントロール株に比べて上昇したことから、MaLRO1 タンパク質はアラキドン酸や DGLA に特異性が高く、これを用いることで DGLA や ARA を高含有する TG を効率よく生成することができる可能性が示唆された。

Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase, *Mortierella alpina*, arachidonic acid

講演番号：4C16a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ C 校舎 16 会場

電極表面の電場による酵素の変形

Electric field effect on enzymes at the surface of the electrode

○北隅 優希[1,3]、白井 理[1]、山本 雅博[2,3]、加納 健司[1,3]（[1]京大院農、[2]甲南大理工、[3]CREST）
○Yuki Kitazumi[1,3], Osamu Shirai[1], Masahiro Yamamoto[2,3], Kenji Kano[1,3] ([1]Kyoto Univ., [2]Konan Univ., [3]CREST)

1.諸言

酵素を電極上に固定化した酵素修飾電極は、酵素の持つ高い基質特異性と高い触媒活性を電気化学デバイスに付与することを意味することから、その関連研究が積極的に進められている。しかしながら、吸着した酵素の特性に電極表面の電場がどのように影響するかについてはほとんど検討されていない。実用的な電解質溶液中では、電気二重層と呼ばれる電極から溶媒数分子程度の距離の間に 10×10^6 V m^{-1} 以上の強い電場が存在することが知られている。電気二重層により電極表面に固定化された酵素は、電場による強いひずみを受けることが予想される。電極表面における電場が酵素に及ぼす影響を明らかとするために、電極表面に吸着した酵素の形態を原子間力顕微鏡(AFM)により観察し、外部から電位を制御したときの電極上の酵素の観測結果について報告する。

2．実験

天然マイカの劈開面上に Au(111)単結晶面を真空蒸着および加熱処理により作成し、これを電極として用いた。pH 5 のクエン酸・リン酸緩衝液 (イオン強度 0.3 M)に *E. coli* 由来のマルチ銅オキシダーゼ(CueO)を溶解し、そこに Au(111)電極を浸漬することで、電極表面に CueO を吸着させた。緩衝液中でコンタクトモードの AFM により CueO 修飾電極を観察した。また、Ag|AgCl|KCl (sat.)電極を参照電極として、酵素修飾電極の電位を制御した後に電極表面の AFM 観察を実施した。

3．結果及び考察

AFM を用いた観察によると、電極表面に吸着した直後の CueO は高さが 5 nm の半球状に見えた。その後に+800 mV の電位を一時間印加した後で観察したところ、CueO は高さ 2 nm の円盤状になった。AFM により観察される CueO の形状の変化は、電極表面に吸着した CueO がつぶれたことを反映していると考えられる。電位印加をやめ開回路にしてもつぶれた CueO が膨らむ様子は観察されなかった。以上の観察より、電気二重層の電場は酵素を変形させることが明らかになった。今回の実験条件では電極表面の電気二重層の厚さが酵素の大きさと比べて薄いことから、吸着した酵素は電極側からつぶれてゆくと考えられる。

electrical double layer, enzyme modified electrode

講演番号：4C16a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:12～ C 校舎 16 会場

アルブチン・ゲンチジン酸縮合体アグリコンの物理化学的性質

Physicochemical properties of aglycone of arubutin condensed with gentisate

○木曽 太郎、桐生 高明、村上 洋、中野 博文（阪市工研）
○Taro KISO,Takaaki Kiryu,Hiromi Murakami,Hirofumi Nakano (OMTRI)

【目的】ヒドロキノンの重合体は、水素や電子の授受に与ることが出来るため、酸化還元反応の触媒やリチウム電池の蓄電体としての利用が可能である。従来から有機合成により、あるいは電気化学的に合成されているが、演者らはラッカーゼやペルオキシダーゼを用いた酵素合成について検討してきた。これまでに、ヒドロキノン配糖体（アルブチン）に過酸化水素とペルオキシダーゼを作用させることで、アルブチンのポリマーおよびオリゴマーが得られることや、重合反応のメカニズムについて報告した。本研究では、ペルオキシダーゼの酸化反応を利用して、フェノール性配糖体とゲンチジン酸との共重合体である新規配糖体を合成した。この新規配糖体について、機器分析による構造解析を行った。ゲンチジン酸は MALDI-TOF/MS 測定時のマトリックスに使用されるため、合成した新規配糖体アグリコンを用いて糖類の MALDI-TOF/MS 測定が可能であるか検討した。
【方法と結果】アルブチンとゲンチジン酸ナトリウムをモル比 1:2 で混合し、西洋わさび由来ペルオキシダーゼを添加した。この混合液に小量の過酸化水素を少しずつ加え、酸性条件下で放置することにより、黄色沈殿を得た。機器分析による構造解析の結果、黄色沈殿物は、アルブチンとゲンチジン酸がモル比 1:1 で、芳香環が直接結合した新規な構造を有する共重合体であった。この配糖体を DMF に溶解し、塩酸酸性下で加熱することによりグルコシル基を脱離させ、アグリコンを得た。このアグリコンはクマリン様の構造を含んでいるため、蛍光スペクトルを測定した。その結果、420nm 付近と 320nm 付近の 2 つの波長領域で励起が起こり、450nm 付近に発光の極大が認められた。また、ゲンチジン酸が MALDI-TOF/MS 分析において糖類に対するマトリックスとして利用されていることから、本アグリコンには MALDI-TOF/MS マトリクスとしての利用可能性が示唆された。新規配糖体アグリコンをマトリックスとしてマルトペンタオースと混合し、MALDI-TOF/MS 分析を行った。その結果、レーザーのエネルギーや試料濃度は高くする必要があるが、マルトペンタオースのシグナルが得られ、その分子量測定が可能であった。

peroxidase, oxidative condensation, MALDI-TOF

講演番号：4C16a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:24～ C 校舎 16 会場

小麦粉生地タンパク質のジスルフィド結合形成に対する小麦粉内在 PDI-Ero1 の作用について

Effet of wheat endogenous PDI-Ero1 on formation of the disulfide bond in dough

○西堀 史也[1]、岡 大貴[2]、野口 治子[3]、内野 昌孝[3]、野口 智弘[2]、高野 克己[3]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・食加技セ、[3]東京農大応生・化学)
○Fumiya NISHIBORI[1], Daiki OKA[2], Haruko NOGUCHI[3], Masataka UCHINO[3], Tomohiro NOGUCHI[2], Katsumi TAKANO[3] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch., [2]Dept.Appl.Biol.chem.,FPC, [3]Dept.Appl.Biol.Chem.,Fac.Biosci.,Tokyo Univ.Agr.)

【目的】

小麦粉生地混捏時のグルテン形成には、様々なタンパク質分子間(内)の結合や相互作用が関与し、特にジスルフィド（SS）結合の形成が重要とされている。このため、製パンにおいて生地改良材としてアスコルビン酸（AsA）が用いられているが、AsA は小麦生地中でデヒドロ AsA(DAsA)に酸化され、グルテンの SS 結合形成を促進すると言われているが、その詳細は不明な点が多い。我々は、SS 結合形成を触媒するプロテインジスルフィドイソメラーゼ（PDI）および PDI の酸化再生に関与するエンドプラズミックレティキュラムオキシドレダクターゼ１（Ero1）に着目し、生地物性および製パン性に対する両酵素の影響について検討を行ってきた。これら酵素系を介し AsA および DAsA が SS 形成に関与する可能性について検証するため、AsA および DAsA の小麦粉生地における SS 結合形成に及ぼす影響について検討を行った。

【方法】

PDI および Ero1 は、小麦遺伝情報を基に大腸菌を用いた大量発現系にて発現取得した。PDI-Ero1 による SS 結合形成量の測定は、還元変性オボムコイド(redOM)を基質とし、NBD-Cl 法にて SH 基量の減少量より SS 結合形成量を算出した。強力粉（カメリア；日清製粉）に水および、AsA 123ppm または DAsA を加え生地を調製後、0.1M 酢酸溶液にてタンパク質を抽出し、対角線電気泳動（1D:SS 非還元、2D:SS 還元）に供し、分子間・分子内 SS 結合形成の解析を行った。

【結果】

AsA によるタンパク質への SS 結合形成について検討するため、redOM に AsA または DAsA のみを作用させたところ、SS 結合の形成はほとんどみられなかったが、redOM に PDI-Ero1 と DAsA を作用させたところ、 SS 結合の形成が確認された。次に AsA または DAsA を添加し調製した生地より抽出したタンパク質を対角線電気泳動に供したところ、無添加生地に比べ対角線の上部ではグリアジンが、下部ではグルテニンのバンドが強く検出された。また、AsA 添加に比べ DAsA 添加において対角線の上部のバンドが顕著に強く検出された。これらのことから小麦生地タンパク質にも DAsA が PDI-Ero1 SS 結合形成系に作用することで特にグリアジンの分子内に SS 結合を形成させることが示唆された。

dough, disulfide bond, ascorbic acid

講演番号：4A11a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ A 校舎 11 会場

刺身用冷凍魚肉に最適な解凍方法の検討

Evaluation of thawing methods of frozen fishes for sashimi

○小南 友里、中野 早紀、渡辺 学、鈴木 徹（東京海洋大学大学院）
○Yuri KOMINAMI,Saki NAKANO,Manabu WATANABE,Tou SUZUKI（Tokyo University of Marine Science and Technology）

【目的】
冷凍食品の品質管理において、凍結過程及び保管過程は重要視される傾向にあるが、解凍過程については軽視されることが多かった。実際には、凍結及び保管が適切になされていたとしても不適切な解凍によって品質は劣化し得る。とくに、刺身用冷凍魚肉については不適切な解凍方法によって品質が著しく変化し、商品価値が下がり易い。そこで、本研究では刺身用冷凍魚肉の最適な解凍方法について検討を行った。

【方法】
試料魚には B1 カツオ（一本釣りされた後にすぐさまブライン浸漬によって急速凍結された冷凍カツオ）を採用した。また、カツオ肉の品質指標の１つとして K 値を使用した。まず、本研究室で開発したシミュレーションプログラム[*1]によって５℃の空気解凍、１５℃の流水解凍、氷水解凍の各解凍プロセスにおける解凍中の K 値の変化についてシミュレーションを行った。シミュレーションでは氷水解凍が最適であるという結果が得られた。この結果について、商業的有用性を検証するために実際に B１カツオのドレスを用いて氷水解凍試験を行い、ATP 関連化合物の消長を調べて K 値を算出した。解凍試験では、解凍開始０時間後、４時間後、８時間後での変化を測定した。

【結果】
実際の B1 カツオ氷水解凍試験の結果、シミュレーション結果と同様に解凍の進行に伴う緩やかな K 値の上昇が見られた。また、実測によって氷水解凍では肉中の IMP 濃度が高い状態を維持できることがわかった。さらに、B1 カツオは肉中の ATP 濃度が高く解凍硬直による肉の縮れが起こり易いことが知られているが、氷水解凍時には肉の縮れは見られなかった。以上の結果から、B1 カツオの生食に供する場合の解凍には氷水解凍が非常に適しているといえる。

＊1　村上 菜摘，渡辺 学，鈴木 徹，日本冷凍空調学会論文集 26(2)，185-191，2009

fish, freezing, K value

講演番号：4A11a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ A 校舎 11 会場

小麦澱粉の糊化・老化に及ぼすヒドロキシプロピル化タピオカ澱粉添加の影響

Effects of hydroxypropyl tapioca starch on gelatinization and retrogradation of wheat starch

○鳥井 昭良[1]、松宮 健太郎[2]、林 由佳子[2]、入江 謙太朗[3]、松村 康生[2]（[1]京大・農、[2]京大院・農、[3]（株）日清製粉グループ本社・基礎研究所）
○ Akira TORII[1], Kentaro MATSUMIYA[2], Yukako HAYASHI[2], Kentaro IRIE[3], Yasuki MATSUMURA[2] ([1]Fac. of Agric., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [3]Research Center for Basic Science, Nisshin Seifun Group Inc.)

【目的】近年食生活の多様化に伴い化工澱粉の重要性が高まっており、冷凍食品を始めとした様々な食品に添加されている。中でもヒドロキシプロピル化タピオカ澱粉（以下 HP タピオカ澱粉）は高い保水性と粘度安定性、老化耐性、凍結・解凍安定性などをもつことから汎用性が高く、麺類や菓子類などの小麦粉製品に添加されることも多い。したがって本研究では小麦粉の主要な構成成分である小麦澱粉に HP タピオカ澱粉を添加した場合に、澱粉間にどのような相互作用が生じるのか糊化・老化挙動の変化に着目して明らかにすることを目的とした。また、比較のために非化工のタピオカ澱粉を添加した場合についても検討を行った。
【方法】小麦澱粉、HP タピオカ澱粉、非化工タピオカ澱粉をそれぞれ単独、あるいは小麦澱粉と各タピオカ澱粉を混合したものに水を加えて加熱し、デンプンゲルを作成した。それらを 4℃で 1 ヶ月間保存したものの微細構造をクライオ SEM で観察して糊化直後のゲルと比較することにより、保存によるそれぞれの澱粉ゲルの構造変化を検討した。また、同様に保存した澱粉ゲルを凍結乾燥しミルで粉末状に破砕したものについて X 線回折測定を行い、糊化前の澱粉の回折強度曲線と比較することにより、保存中の澱粉の再結晶化の程度を調べた。さらに DSC を用いて各種澱粉及び混合澱粉の糊化挙動、保存後（1 週間及び 1 ヶ月後）の再糊化挙動、老化度の評価を行った。
【結果】クライオ SEM により 4℃で保存した澱粉ゲルの微細構造を観察した結果、小麦澱粉に非化工タピオカ澱粉を加えたものでは糊化直後に見られた微細な繊維が途切れるとともに、糊化した澱粉が大きく収縮して空隙を生じていたのに対し、HP タピオカ澱粉を加えたものでは部分的に収縮しているものの、糊化直後の微細なネットワーク構造が維持されていた。DSC 測定において、保存 1 週間後では HP タピオカ澱粉添加と非化工タピオカ澱粉添加の間で再糊化エンタルピーに差が見られなかったが、保存 1 ヶ月後では HP 澱粉を添加したものの方が再糊化エンタルピーが小さく、老化が抑制されていた。また、保存した混合澱粉について X 線回折測定を行った結果、どちらにおいても同様な回折強度曲線を示したが、それらの曲線は、小麦澱粉を単独で糊化後、老化させたものと、よく似ていた。また、非化工澱粉、HP タピオカ澱粉単独では、糊化後、4℃に保存しても明確なピークが観察されなかった。以上の X 線回折の結果から、小麦澱粉と各タピオカ澱粉を混合して糊化・老化させても、結晶化するのは小麦澱粉のみであることが示唆された。これらのことより、小麦澱粉に HP 及び非化工タピオカ澱粉を添加した場合、両者の間には強い相互作用が起こらないことが示唆された。

wheat starch, hydroxypropyl tapioca starch, retrogradation

講演番号：4A11a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ A 校舎 11 会場

TLC を用いたビタミン E の簡易目視定量法

Simple determination of vitamin E by using TLC plate

○赤坂 和昭、細矢 理奈（尚絅学院大）
○Kazuaki Akasaka,Rina Hosoya (Shokei Gakuin Univ.)

【目的】 3,6-dihydroxyxanthan はほとんど無色であるが、その酸化により生成する 6- hydroxy-3-fluorone は黄色を呈し、かつ光増感性を示すため、光照射下で自己触媒的に 3,6-dihydroxyxanthan の酸化反応を促進する。この反応では誘導期の後、一気に発色が進むこと、および誘導期は抗酸化成分により濃度依存的に延長されることを利用し、ビタミンＣを、TLC プレート上で分離後、目視計測する簡易定量法を報告した（１）。本研究では、同様の方法により、脂溶性の抗酸化ビタミンである、ビタミンＥ（VE）の定量に応用し、油脂の酸化劣化の指標としての可能性について検討した。

【方法】 シリカゲルＴＬＣプレートに試料油脂のイソオクタン／酢酸エチル溶液（1:1、 酸化防止剤として約 1mg/ml のアスコルビルジパルミトテートを含む）2μｌをスポットし、クロロホルム／イソオクタン（10 : 5）で展開した。減圧乾燥後、3,6-dihydroxyxanthan 溶液（10%グリセロール・エタノール：オレイン酸：オクタン酸メチル：酢酸：水＝ 20 : 1 : 2 : 2 : 3）を均一に噴霧し、冷風で表面を軽く乾燥させた後、シャーレ（175 mm φ）の中に入れて、蛍光灯照射（約 3000Lux）下で、ビデオカメラで撮影を行った。撮影後、ビデオの再生により各成分のスポットが黄色く発色するまでの時間を計測し、別途標品を用いて作成した検量線を用い、各トコフェロール量を算出した。

【結果】 VE の分離、及び検出について検討した結果、各トコフェロールの Rf 値はα0.63、β0.34、γ0.34、δ0.20 となり、βとγ-トコフェロールの分離は達成できなかったが、β-トコフェロールの分布は限られているため、γ-トコフェロールを標品とし、β＋γとして求めた。光照射開始後、周りの部分はすぐに黄色く発色したが、各 VE は白く抜けたスポットとして観察され、その後発色しにより消失した。スポット消失時間と各トコフェロール濃度の関係は直線とはならなかったが、いずれも 6.3～188μｇ/ml の範囲において多項式で近似することができた（R^2>0.95）。5 連における測定値の相対標準偏差は 7.5%以内であった。

市販の油並びにフライ調理に用いた油を試料とし、本法とＨＰＬＣ法による各トコフェロールの定量値を比較した結果、いずれについても良好な相関性が認められた（R^2>0.91）。また、揚げ油について食用油テスタ(極性成分測定)による TPM 値と VE 量の間には良好な、負の相関性が認められ、揚げ油劣化の簡易評価法としての応用の可能性も示唆された。

（１）赤坂、日本分析化学会第 61 年会（金沢）、ｐ203（2012）

vitamin E, simple determination, thin-layer chromatography

講演番号：4A11a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ A 校舎 11 会場

NMR に基づくコーヒー生豆の品種・産地の鑑別法

NMR-based metabolomics for the classification of green coffee beans according to variety and origin

○魏 菲菲[1,2]、降旗 一夫[1]、甲田 政則[1]、胡 芳宇[1]、宮川 拓也[1]、田之倉 優[1]([1]東大院農生科、[2]学振)
○Feifei WEI[1,2], Kazuo Furihata[1], Masanori Koda[1], Fangyu Hu[1], Takuya Miyakawa[1], Masaru Tanokura[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]JSPS)

【背景と目的】

コーヒーの品質に大きく関わるコーヒー生豆の品種および産地の識別は、コーヒーの品質管理にとって非常に重要な課題である。核磁気共鳴法（NMR）は簡単な前処理と穏やかな環境での測定が可能であるため、成分の変質、損失を最小限に抑える事ができる。本研究では、NMR を用いてコーヒー生豆の化学組成に基づく品種・産地の非破壊鑑別法を確立することを目的とした。また、コーヒー生豆の品種・産地の識別に重要なマーカー物質の同定することも目指した。

【方法】

アラビカとロブスタの 2 品種について、コロンビア、インドネシア等の合計 6 産地のコーヒー生豆を重水で抽出し、成分混合状態のままで 1 次元及び 2 次元 NMR スペクトルを測定し、観測されたシグナルの帰属を行った。さらに、多変量解析のソフトウェア SIMCA-P を用いて統計モデルを構築し、loading plot や S-plot によってコーヒー生豆の品種および産地の鑑別に重要なパラメータを解析し、帰属情報と合わせて生豆の品種・産地の区別に重要なマーカー物質を同定した。

【結果】

コーヒー生豆抽出物の 1 次元および 2 次元の NMR スペクトルを測定し、観測されたシグナルのほぼ全てを帰属することができた。これにより、生豆成分であるカフェイン、クロロゲン酸類、トリゴネリン、ショ糖、アミノ酸、キナ酸などの 16 種類の化合物が NMR で観測できることが確認できた。また、NMR スペクトルの主成分分析により、すべての生豆試料はアラビカとロブスタの品種によって区別することができた。各品種に特徴的な成分を確認するための判別分析と帰属情報から、アラビカ品種のコーヒー生豆にはショ糖、トリゴネリンなどの成分がより多く、ロブスタ品種の生豆にはクロロゲン酸、カフェイン、コリンが多いことが明らかになった。さらに、コーヒー生豆の原産地を区別するためにアラビカ品種の 4 産地の生豆サンプルの NMR スペクトルを主成分分析し、第 3 主成分までの展開により原産地ごとに識別することができた。ロブスタ品種 2 産地の生豆の主成分分析および判別分析では、産地を区別することができ、帰属の情報から各産地の生豆の特徴成分を同定することに成功した。

これらの結果から、NMR はコーヒー豆の品種、原産地、偽和の有無の識別に有効な分析手法と考えられる。

green coffee bean, NMR, origin

講演番号：4A11a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ A 校舎 11 会場

食肉由来家畜飼料添加物の硫酸化によるヒトでの代謝

Studies on the metabolism of feed additives through sulfation in human

○黒木 勝久[1]、榊原 陽一[1]、LIU Ming-Cheh[2]、水光 正仁[1] ([1]宮崎大農応生科、[2]トレド大薬)
○Katsuhisa KUROGI[1], Yoichi SAKAKIBARA[1], Ming Cheh LIU[2], Masahito SUIKO[1] ([1]Univ. Miyazaki, [2]Univ. Toledo)

【目的】海外から輸入される豚肉や牛肉には、様々な家畜飼料添加物が残留している可能性がある。特に、ラクトパミン、サルブタモール、クレンブテロールは、肉質改善を目的として、頻繁に使用される家畜飼料添加物である。これらの家畜飼料添加物が過剰に残留した際には、人体に悪影響を及ぼす可能性があり、実際に、海外では、中毒事件が発生している。これらの家畜飼料添加物は、抗ぜんそく薬等に使用される交感神経β2作動薬の一種である。そこで、本研究では、ヒトにおけるβ2 作動薬の主な代謝経路である硫酸化が、上述の 3 つの家畜飼料添加物の代謝を担っているのかを解析した。
【方法】肝細胞における家畜飼料添加物の硫酸化を、放射性同位体 ^{35}S とヒト肝細胞株 HepG2 を用いて解析した。次に、その硫酸化の臓器特異性を検討するため、ヒト由来の肺、肝臓、小腸、腎臓の 4 つの臓器のサイトゾルを用いて、硫酸化活性測定を行った。最後に、家畜飼料添加物の硫酸化を担う硫酸転移酵素の同定を行うため、11 種類の精製リコンビナント酵素を用いた硫酸化活性測定と、その硫酸化の諸性質を酵素学的に解析した。
【結果】HepG2 細胞を用いた代謝実験により、3 つの家畜飼料添加物の内、ラクトパミンとサルブタモールが硫酸化によって代謝される事が判明した。クレンブテロールに関しては、その硫酸化は確認されなかった。次に、臓器サンプルを用いてラクトパミンとサルブタモールに対する硫酸化活性測定を行ったところ、肝臓と小腸、とくに、小腸のサイトゾルが強い硫酸化活性を示した。さらに、リコンビナント硫酸転移酵素を用いた活性測定により、２つの家畜飼料添加物の硫酸化を担う硫酸転移酵素 SULT1A3 が同定され、その酵素による家畜飼料添加物硫酸化の反応速度解析を行ったところ、ラクトパミンは、サルブタモールよりも 10 倍以上高い親和性を示した。さらに、本酵素は、ドーパミンなどのカテコールアミン神経伝達物質の硫酸化を担う重要な酵素である事から、ラクトパミンとサルブタモールによる SULT1A3 の活性阻害試験を行ったところ、両化合物とも阻害作用を示したが、ラクトパミンの方が 30 倍以上も低い IC_{50} 値を示した。以上の結果から、家畜飼料添加物として用いられる 3 つの化合物の中で、クレンブテロールは硫酸化による代謝を受けないが、ラクトパミンとサルブタモールは、腸管を通して体内に吸収される際に、硫酸化による代謝を受けることが明らかとなった。とくに、ラクトパミンは、硫酸転移酵素の基質としてだけでなく、阻害剤としての作用も有しており、腸管におけるカテコールアミン代謝への影響を与える事が考えられた。

Sulfation, Sulfotransferase, Feed additives

講演番号：4A11a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ A 校舎 11 会場

大豆クラス２食物アレルゲン Glym4 の精製、特性解析及びモノクローナル抗体作製

Purification, characterization and monoclonal antibody production of soybean allergen Glym4

○末森 祐輔、木下 恵利、矢野 えりか、崎川 貴文、財満 信宏、森山 達哉、河村 幸雄 (近畿大院農)
○ Yuusuke SUEMORI,Eri KINOSHITA,Erika YANO,Takafumi SAKIKAWA,Nobuhiro ZAIMA,Tatsuya MORIYAMA,Yukio KAWAMURA (Kinki Univ.)

【目的】近年、ある種の食品を摂取した際に発症するアレルギー症状（主に OAS）が花粉症患者に増加傾向を示している。このような新たな食物アレルギーは花粉抗原と植物性食品中の抗原に対するそれらの抗体の交差反応性が発症基盤となっており、「クラス２食物アレルギー」と呼ばれる。そのような反応は、シラカバ・ハンノキ属による花粉症と、バラ科、セリ科植物性食品との交差反応が有名であるが、大豆とも交差反応する。その原因抗原として、大豆の Glym4,Glym3 などのアレルゲンがある。これまでに、大豆よりこれらのアレルゲンをクローニングし、発現、抗体作製を行い、様々な変動解析を行っている。しかし、得られた抗体は native な抗原との反応性が弱いため、ELISA 系への適用が困難であった。そこで本研究では、大豆種子より native な Glym4 を精製し、その諸性質を解析するとともに、得られた native Glym4 を用いて、マウスモノクローナル抗体、ウサギポリクローナル抗体、及び T7 ファージ抗体の作製を行い、臨床的なアレルゲン性を反映しうる native な Glym4 の定量に使用しうるサンドイッチ ELISA 系の構築を試みる。
【方法と結果】大豆種子からタンパク質を抽出し、7S や 11S などの貯蔵タンパク質を沈殿除去して得られたホエイ画分を各種クロマトグラフィー（陰イオン交換、ハイドロキシアパタイト吸着クロマト、疎水クロマト、ゲル濾過 HPLC）に順次供し、リコンビナント Gly m 4 に対して作製した抗体に対する反応性（イムノブロット）を指標に native Gly m 4 の精製を行った。大豆種子 40g から 2.74mg の精製標品が得られた。得られた native な Gly m 4 を用いて、IgE 反応性を IgE-ELISA にて確認したところ、リコンビナントと比べて native な Glym4 の方がより反応性が高かった。また、本分子の RNase 活性の有無を検討したところ、活性を示すことが示唆された。現在、アレルゲンとしての熱安定性などの特性解析を行っている。Gly m 4 を抗原とし、マウスに免疫し、常法に従いモノクローナル抗体の作製を進めている。現在少なくとも３つのハイブリドーマが得られ、リコンビナントのみならず精製 native Glym4 や大豆抽出液中の Glym4 にも反応する抗体を産生していることが確認できた。また、免疫マウス脾臓より単離した RNA から逆転写反応によって cDNA を得、イムノグロブリンの V_H 鎖、V_L 鎖を PCR にて増幅し、リンカーを介して結合後、T7 ファージベクターアームにクローニングした。こうして得られたファージからバイオパンニングを経て native Glym4 に対して反応しうるファージ抗体の単離を試みている。これらの得られた抗体を組み合わせ、臨床的なアレルゲン性を評価しうる native Glym4 定量サンドイッチ ELISA の構築を行う。

soybean, allergen, Glym4

講演番号：4A11a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ A 校舎 11 会場

抗菌ペプチドを利用した微生物検出法における検出用プローブの菌体結合量解析
Analysis of the detection probe binding to microbes in the sandwich detection method using antimicrobial peptides

○阿部 千春[1]、越山 竜行[1]、坂井 ちひろ[1]、中住 太一[1]、冨澤 聡[1]、北條 江里[2]、大槻 隆司[2]、米北 太郎[2]、森下 直樹[2]、菊川 峰志[1]、熊木 康裕[1]、神谷 昌克[1]、出村 誠[1]、河野 敬一[1]、松本 貴之[2]、森松 文毅[2]、相沢 智康[1] ([1]北大・院生命科学、[2]日本ハム・中研)
○Chiharu ABE[1], Tatsuyuki KOSHIYAMA[1], Chihiro SAKAI[1], Taichi NAKAZUMI[1], Satoshi TOMISAWA[1], Eri HOJO[2], Ryuji OHTSUKI[2], Taro YONEKITA[2], Naoki MORISHITA[2], Takashi KIKUKAWA[1], Yasuhiro KUMAKI[1], Masakatsu KAMIYA[1], Makoto DEMURA[1], Keiichi KAWANO[1], Takashi MATSUMOTO[2], Fumiki MORIMATSU[2], Tomoyasu AIZAWA[1] ([1]Grad. Sch. Life Sci., Hokkaido Univ., [2]R&D Center, Nippon Meat Packers Inc.)

【目的】抗体による微生物検出法としてELISA法やイムノクロマト法が広く用いられているが、抗体の性能により検出感度や特異性が左右されるなどの問題がある。そこで我々は、現在広く用いられている捕捉抗体と検出抗体を用いたサンドイッチELISA法をベースとして、捕捉抗体の特異性を活用しながら検出抗体に代えてビオチン標識した抗菌ペプチドを検出用プローブとして用いる新しい高感度検出技術の検討を進めている。
現在までの検討で、検出用プローブとして抗菌ペプチドであるcecropin P1(CP1)を用い、従来の捕捉抗体-検出抗体を用いたサンドイッチELISAと同等以上の感度でサルモネラ菌を検出できる系の構築に成功している。そこで本研究では、各種プローブの菌体への結合状態に関する解析を進め、さらなる高感度化を目指した検討を行った。
【方法】サンドイッチ検出法のプローブであるビオチン標識した検出抗体およびCP1について、懸濁液中の菌体に対する結合量を、HRP標識streptavidinを用いたWestern blot法により比較した。
また、サンドイッチ検出法の系において、マイクロプレート上の固相化抗体に捕捉された菌体に対して結合している検出抗体およびCP1に対しても、その結合量の評価を行い、サンドイッチ検出法での結果との比較を行った。
【結果】CP1と抗体を用いたプローブのサルモネラ菌に対する結合量をWestern blot法によって比較した結果、抗体と比較してCP1がより大量に菌体に対して結合可能であることが明らかとなった。また、マイクロプレートを用いたサンドイッチ検出法の系においても、プローブとして用いる検出抗体とCP1の分子数が同じ条件下では、CP1を用いた検出系が著しく高い検出効率を示すことが明らかになった。この理由としては、抗体と比較してCP1の分子量が著しく低く菌体との結合に有利であること、部位選択的なビオチン標識が可能なため結合の効率が良いことなどが考えられる。しかし、CP1を用いたプローブでは、濃度依存的に菌体に対する結合量が増加するにも関わらず、サンドイッチ検出法での検出感度が上昇しない現象が見られた。この結果は、菌体表面へのプローブの多量の結合により、検出に用いたstreptavidinの立体障害が検出の障害となっている可能性を示唆している。
現在、検出感度の向上のために、各種のCP1変異体を作製し、プローブの改良を検討中である。

antimicrobial peptides, ELISA, cecropin

講演番号：4A11a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ A 校舎 11 会場

抗菌ペプチドを用いたラテラルフローによる腸管出血性大腸菌、カンピロバクター及びサルモネラ検出法の開発

Development of lateral flow assay using antimicrobial peptide for the detection of enterohemorrhagic *E. coli*, *Campylobacter* and *Salmonella*

○北條 江里[1]、大槻 隆司[1]、米北 太郎[1]、森下 直樹[1]、松本 貴之[1]、相沢 智康[2]、森松 文毅[1]([1]日本ハム・中研、[2]北大院生命・生命融合)
○Eri HOJO[1], Ryuji Ohtsuki[1], Taro Yonekita[1], Naoki Morishita[1], Takashi Matsumoto[1], Tomoyasu Aizawa[2], Fumiki Morimatsu[1] ([1]R&D Ctr., Nippon Meat Packers, [2]Grad. Sch. Life Sci., Hokkaido Univ.)

【目的】腸管出血性大腸菌（EHEC)、カンピロバクターおよびサルモネラは、食中毒の主要な原因菌である。中でも血清型O157に代表されるEHEC感染は、重度の下痢や溶血性尿毒症症候群を引き起こし、特に幼児や高齢者では感染すると死に至ることもある深刻な感染症の 1 つである。また、サルモネラ食中毒は世界的に最も多い食中毒であり、患者数は年間1億3000万人にのぼるといわれているが、中でも近年感染力の強い*Salmonella* Enteritidisの鶏肉や鶏卵を介した食中毒が増加し問題となっている。さらにカンピロバクター食中毒の発生件数は、欧米諸国と同様に近年増加傾向にあり対策が急務である。よってこれらの菌を迅速に検出・同定することは、食中毒予防や患者の重症化を防ぐ上で極めて重要である。我々は抗菌ペプチドを検出分子として用いたラテラルフロー検出法により、1本のストリップでEHEC O157、O26、O111、*Campylobacter jejuni*、*S.* Enteritidis を識別して検出可能な系を開発したので報告する。
【方法】メンブレン上に5種類の補足抗体（抗O157、抗O26、抗O111、抗カンピロバクター、抗サルモネラ抗体）を3 mm間隔で塗布した。検出用プローブには抗菌ペプチド（Cecropin P1等）を金コロイド標識して使用した。抗菌ペプチド―抗体サンドイッチ法をベースとしたストリップを作製し試験に用いた。
【結果】本方法により1本のストリップで、テストラインの出現位置の違いからEHEC O157、O26、O111、*C. jejuni*、*S.* Enteritidisを識別して検出可能であった。従来からの抗体サンドイッチによる方法では、5菌種を検出する為には捕捉抗体とは別に5種の検出抗体が必要であったが、本方法では1種類の抗菌ペプチドプローブのみで5菌種全てが検出可能であった。検出デバイス開発においては優良抗体の作製に多大な時間やコストを要することが問題となっていたが、抗菌ペプチドをプローブとして用いることでこの問題を抑えられる可能性が示唆された。

antimicrobial peptides, lateral flow assay, cecropin

講演番号：4A11a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ A 校舎 11 会場

抗菌ペプチド「ナイシン」およびエタノールを感作した乳酸菌の菌体内残存物質網羅（メタボローム）解析

Metabolome analysis of intracellular substances of a lactic acid bacterium treated with “nisin A” and ethanol

○川井 泰、郭 暁艶、大島 悟、木ノ内 智之、水谷 陽、鈴木 はるか、西村 順子、北澤 春樹、齋藤 忠夫（東北大院農）
○ Yasushi KAWAI,Xiaoyan Guo,Satoru Oshima,Tomoyuki Kinouchi,Akira Mizutani,Haruka Suzuki,Junko Nishimura,Haruki Kitazawa,Tadao Saito (Tohoku Univ.)

【目的】「ナイシン」（ナイシン A）は、酪農用乳酸菌（*Lactococcus lactis*）により生産される抗菌ペプチド（バクテリオシン、lantibiotic）で、我が国では 2009 年 3 月 2 日付けで食品添加物に指定された。1920 年代に発見されたナイシンは、グラム陽性細菌に対して幅広い抗菌効果を有することから、半世紀以上に渡り食品保存剤として幅広く使用されている。しかしながら、ナイシンの大きな欠点として、中性 pH 域では溶解性の低下から、抗菌効果が大幅に低減することが知られている。多数の食品は弱酸性から中性 pH 域であるため、ナイシンの添加量増大は、低コスト化や耐性菌の出現防止に向けた克服すべき課題である。そこで本研究では、中性 pH 域における効果的なナイシンの利用性としてエタノールに着目し、相乗効果と熱安定性を調べると共に、それらの抗菌作用（効果）の解明に向けた菌体内残存物質の消長についてメタボローム解析による検証を試みた。
【方法】MRS 培地で培養した指標菌*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM1002^{T}（2.1×10^{8}CFU/mL）に対して、4 試験区｛対照区−0.85% NaCl溶液（37℃、2 時間）、比較群 1−ナイシン（200IU=0.2mg/mL）添加 0.85% NaCl溶液（37℃、2 時間）、比較群 2−20% エタノール（37℃、10 分）、比較群 3−ナイシン（0.2mg/mL）添加 20% エタノール（37℃、10 分）｝の生菌数測定、熱安定性性試験（比較群 1 と 3 の溶液）、および菌体内残存物質の網羅的解析（メタボローム）を行った。
【結果】*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM1002^{T} の生菌数は対照区で変化は無かったものの、比較群 1 で 98%の減少率（3.3×10^{6}CFU/mL）、比較群 2 で 91%の減少率（1.9×10^{7}CFU/mL）であった。また、比較群 3 で菌数は、僅か 10 分後で未検出となり、ナイシンとエタノールの強力な相乗効果が観察された。95℃・1 時間の加熱試験では、比較群 1 溶液中のナイシン活性は 128 倍低下したが、20%エタノール中では活性が維持され、極度に安定であることが明らかになった。メタボローム解析では、低分子型バクテリオシンの特徴的な抗菌作用「標的菌の細胞膜に孔を形成して、イオンや ATP 等の物質を流出させ、エネルギー枯渇により、標的菌を死に至らしめる」に加えて、「ナイシンは、細胞内に乳酸などの有機酸を止める・蓄積することで抗菌効果を高める」ことが明らかになった。また、ナイシンとエタノールが一部の類似した菌体内物質の流出（消失）を引き起こすことが示唆され、さらにナイシン添加エタノールでは、各種有機酸が菌体内で顕著に増加している傾向が認められた。これらの成果は、日本発の技術であるメタボローム解析を利用した初めての例であり、バクテリオシンをはじめ、各種抗菌物質の作用機構を探る上で今後の有用な解析手法になるものと考えられた。

nisin, bacteriocin, metabolome

講演番号：4A11a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ A 校舎 11 会場

米飯保存時の黄色ブドウ球菌エンテロトキシン A 産生に対する培養温度の影響

Effect of storage temperature on the production of staphylococcal enterotoxin A in cooked rice

○筒浦 さとみ、村田 容常（お茶大院）
○Satomi Tsutsuura,Masatsune Murata (Ochanomizu Univ.)

【目的】黄色ブドウ球菌は健常人の手指にも存在する常在菌で、食品中で増殖し、エンテロトキシン A（SEA）を産生する。日本では、手作業により作られることの多い仕出し弁当やにぎりめし、和菓子等で黄色ブドウ球菌食中毒が多く見られる。しかし、米飯や和菓子に菌を添加し、SEA を経時的に定量した報告はほとんどない。本研究では、異なる温度（20℃、37℃）で米飯を保存した時の黄色ブドウ球菌の増殖と SEA 産生を経時的に調べた。

【方法】1 g の精白米に 1.4 mL の水を加え、30 分間浸漬後、炊飯した。室温で 30 分間放冷後、37℃で 1 時間保温して実験に用いた。複数の黄色ブドウ球菌 SEA 産生株を、初発菌数 10^6 CFU/ test tube で米飯に添加した。この米飯を 20℃、37℃で 2-10 日間保存した。SEA は、BSA（1 mg/mL）溶液で 2 回抽出し、SDS-PAGE 後、Western blot し、市販の抗 SEA ウサギ抗体を用いた化学発光法により定量した。SEA を 0.1-50 ng/test tube になるよう米飯に添加したものを検量線とした。米飯中での Western Blot の検出限界は 0.5 ng/test tube（0.21 ng/test tube）程度であった。菌数はマンニット食塩寒天培地を用い、測定した。

【結果】菌添加米飯を 37℃で保存した場合は最大で 2~138 ng/test tube（0.8~58 ng/g 米飯）程度、20℃で保存した場合は最大で 6~70 ng/test tube（2.5~29 ng/g 米飯）程度の SEA が検出された。液体培地中 [1]と同様に、米飯中での最大 SEA 産生量は菌株によって大きく異なった。全体的な傾向としては 37℃に比べ、20℃では最大 SEA 産生量が減少した。また、各温度で SEA 産生の多い菌株については、菌数と SEA 量を経時的に測定した。C-271 株を 37℃培養した時、菌数は 10^6 CFU/test tube から 10^9 CFU/test tube 程度まで増加し、本菌株は 4 時間目から 7 ng/test tube（2.9 ng/g 米飯）程度の SEA を産生し始めた。一方、本菌株は 20℃では 16 時間から SEA を産生し始め、温度が下がると SEA の検出時間は遅くなった。以上の結果より、食中毒発症に必要な最小 SEA 摂取量は 20~100 ng/ヒトとの報告もあることから、菌の付着量と菌株の種類によっては、37℃で 4 時間、20℃で 16 時間保存した米飯には食中毒を起こすのに十分量の SEA が含まれる可能性があると考えられた。

[1] Tsutsuura Sら, Temperature dependence on production of staphylococcal enterotoxin A by *Staphylococcus aureus., Biosci. Biotechnol. Biochem.* （in press）

Staphylococcus aureus, enterotoxin A, cooked rice

講演番号：4A11a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:12～ A 校舎 11 会場

食中毒菌の毒素産生および活性を抑制する植物食品の探索

Screening of plant extracts for inhibitory effects on the production and biological activity of bacterial toxins

○青木 菜摘[1]、島村 裕子[1]、田中 隆[2]、村田 容常[3]、増田 修一[1]([1]静岡県大・食品栄養、[2]長崎大院・医歯薬、[3]お茶大院・人文創科)
○Natsumi Aoki[1], Yuko Shimamura[1], Takashi Tanaka[2], Yoshitsune Murata[3], Syuuiti Masuda[1]([1]Univ. of Shizuoka, [2]Nagasaki Univ., [3]Otyanomizu Univ.)

【目的】近年、我が国の衛生環境は、かなり改善されているが、黄色ブドウ球菌や腸管出血性大腸菌 O-157、O-111 等による食中毒事故の発生が社会問題となっている。これまでに黄色ブドウ球菌の汚染防止策として、緑茶に含まれるカテキン類の抗菌成分としての利用が報告されている。しかし、抗菌成分はその濫用により生態系に大きな影響を及ぼし、有益菌である表皮ブドウ球菌まで殺菌してしまうという問題点があることから、殺菌作用を示さず毒素の活性のみを阻害する方法が求められている。本研究では、黄色ブドウ球菌の毒素産生抑制及び毒素活性阻害成分を各種植物食品や植物食品由来のポリフェノール類から探索し、その活性物質を分離・同定することを目的として研究を行った。
【方法】全ての実験において、*Staphylococcus aureus* C-29 (staphylococcal enterotoxin A; SEA 産生、ヒト分離株) を試験に供した。SEA 産生抑制物質のスクリーニングには、植物食品 84 試料 (野菜 n=67、茶など飲料 n=17) の熱水またはエタノール抽出物を用いた。また、茶や果実に含まれているポリフェノール類 (n=22) についても検討を行った。植物食品の熱水およびエタノール粗抽出液 (終濃度: 0.5～10.0. mg/mL)、ポリフェノール類 (終濃度 : 0.05～0.5 mg/mL) 各々20 μL を培養液 (終濃度: 10^3~10^4 CFU/mL) 180 μL と混合し、37 °C で 24 時間培養後、その上清をウエスタンブロット解析に用いた。SEA のバンドの消失が認められた試料に関して、SEA 分子との結合親和性を調べるために SEA (1 μg/mL) と各植物食品抽出液 (終濃度: 0.5～10.0 mg/mL) またはポリフェノール類 (終濃度 : 0.2～0.5 mg/mL) を混合し、37 °C で 24 時間インキュベートし、その上清をウエスタンブロット解析に用いた。
【結果】84 試料の植物食品と 22 試料のポリフェノール類の C-29 株の SEA 産生に対する影響を調べたところ、すべての植物食品とポリフェノール類において SEA 産生抑制効果は示さなかった。しかしながら、SEA 分子と植物食品またはポリフェノール類の結合親和性について、ウエスタンブロット解析を用い調べたところ、ワサビ葉抽出物、黒茶抽出物、リンゴポリフェノール、パーシモンタンニン (oligomer)、タンニン酸 (polygalloyl glucose)、カスタラジン及びメチル化カテキン ((-)-epigallocatechin-3-(3”-O-methyl)gallate) で処理した SEA に対する抗-SEA 抗体の結合は、用量依存的に阻害され、これらの活性物質は SEA の分子量の変化や変性を引き起こさなかった。これらの結果より、活性物質は、SEA 分子と反応し、抗体サイトのコンフォメーションを変化させているか、または直接抗体に対する結合部位をブロックしている可能性が示唆された。

Staphylococcus aureus, polyphenol, enterotoxin

講演番号：4A11a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:24～ A 校舎 11 会場

食肉中の食中毒菌の分布とその制御に関する研究

Distribution of food poisoning bacteria in meat and their microbial control

○新家 桃香[1]、島村 裕子[1]、青野 博志[2]、青野 盈瓠[3]、篠田 和代[3]、佐藤 勝浩[4]、村田 容常[5]、増田 修一[1] ([1]静岡県大院・薬食生命科学、[2]アオノフレッシュミート(株)、[3]アオノミート(株)、[4](株)ガイア、[5]お茶大院・人文創科)

○ Momoka SHINKE[1], Yuko SHIMAMURA[1], Hiroshi AONO[2], Mitsuhisa AONO[3], Kazuyo SHINODA[3], Katsuhiro SATO[4], Masatsune MURATA[5], Shuichi MASUDA[1] ([1]University of Shizuoka, [2]Aono fresh meat Co., [3]Aono meat Co., [4]Gaea Co., [5]Ochanomizu Univ.)

【目的】食肉の安全性を確保し、チルドパックされた食肉のシェルフライフを延長するためには、微生物制御が不可欠である。食肉の食中毒菌における汚染において、食中毒菌が単に表面に付着しているだけでなく、食肉内部にまで侵入した場合、洗浄や表面における加熱では、除去・除菌できない可能性がある。そのため、食肉内部への食中毒菌の侵入に影響を与える因子について明らかにすることは、汚染防御を考える上で重要である。影響する因子としては、食中毒菌の濃度、菌株の種類、食肉の種類や鮮度、温度などが考えられるが、これらに関する知見は少ない。本研究では種類や部位の異なる食肉に各種食中毒菌を付着させ、食肉内部における食中毒菌の分布について調べた。また、食中毒菌に汚染された食肉を殺菌する手法として、アルカリ性電解水、酸性電解水併用処理を用い、殺菌効果についても検討した。

【方法】牛レバー、鶏もも肉を縦 3 cm、横 3 cm、高さ 6 cm にカットし、上部表面（表面積 9 cm^2）に *Staphylococcus aureus* FDA209P を浸み込ませたペーパーディスク（10^5～10^6 CFU/ 100 μL）を置き、室温で 1 時間放置した。1 時間後、①上部表面、②上部表面から 1 cm、③上部表面から 1～2 cm、④上部表面から 2 cm～4 cm、⑤上部表面から 4cm～6cm に切り分け、各々の部位の菌数を測定した。電解水による殺菌実験については、*S. aureus* FDA209P を 10^4～10^5 CFU/g になるように表面に菌を接種した牛レバー、鶏もも肉 10 g を 100 mL のアルカリ性電解水（pH 11.5）に 3 分間浸漬して表面の有機物等を除去し、100 mL の酸性電解水（pH 2.5）で中和後、さらに 100 mL の酸性電解水（pH 2.5）に 3 分間浸漬して殺菌処理を行い、菌数を測定した。

【結果】上部表面が汚染された食肉内部における *S. aureus* の分布について調べたところ、薄皮のある牛レバーでは、菌は薄皮表面にとどまったが、薄皮のない牛レバー及び鶏もも肉では、菌は 1 時間で上部表面から 1 cm 以上の内部にまで達した。アルカリ性電解水、酸性電解水併用処理を用いた殺菌実験では、牛レバー、鶏もも肉ともに 10^1～10^2CFU/g オーダーの菌数の減少が認められ、表面に付着している菌に関しては、殺菌できていることを確認した。しかし、食肉の切断面から内部に侵入した菌に対し電解水を用いて殺菌処理をしても減少させることが困難であり、切断面での食中毒菌等の汚染の場合、洗浄殺菌は難しいことが示唆された。現在、*Listeria monocytogenes* JCM7679、*Escherichia coli* JCM2449 及び *Salmonella enteritidis* NBRC3313 についても同様の実験を行い、菌株による違いについて検討している。

Staphylococcus aureus, Meat, Electrolyzed water

講演番号：4A11a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:36～ A 校舎 11 会場

白菜浅漬けに混入した大腸菌 O157 の生存性

Fate of *E. coli* O157 contaminated into lightly fermented Chinese cabbage

○稲津 康弘、大畑 由起子、川崎 晋（農研機構　食総研）
○Yasuhiro Inatsu,Yukiko Ohhata,Kawasaki Susumu (National Food Research Institute, NARO)

2012 年 8 月に札幌市等で白菜浅漬けを原因食材とする腸管出血性大腸菌 O157 による食中毒事件が発生し、169 名が発症、8 名が死亡した。これまでもわが国では和風キムチあるいはキュウリ浅漬け等による類似の食中毒事件が発生しており、この種の食品中における食中毒菌の挙動については、ある程度検討がなされている。しかし低菌数レベルの大腸菌 O157 が混入した場合の増殖・死滅特性に関する知見は少ないことから、本研究では国内各地で市販される白菜浅漬けを用いて、大腸菌 O157 の接種試験を行うとともに、収集検体の衛生検査を行った。

関東、中部、関西および九州で販売されていた製造所の異なる白菜浅漬け 20 検体を収集した。それぞれ消費期限終了日の 7 日以上前に、5 株の大腸菌 O157 の混合液を接種し、10℃、7 日間保存の前後に平板希釈法および MPN 法を用いて生菌数を測定した。これにあわせて、「食品衛生検査指針」等に準拠して、未接種検体中の糞便系大腸菌、大腸菌、大腸菌 O157/026/0111 および腸球菌の定性試験を行った。分離された大腸菌群および腸球菌の同定には Api20 および Api Strep（日本ビオメトリュー）を使用した。

未接種の収集検体から大腸菌 O157/026/0111 は検出されなかったが、それぞれ 1 検体から *E. coli* と *Cronobacter Sakazakii* が検出された。糞便系大腸菌および腸球菌陽性率はいずれも 25%であり、前者には耐熱性の *Citrobacter*、*Enterobacter* および *Klebsiella* が含まれた。3.5 log CFU/g および 2.5 log CFU/g 前後の接種量では、キトサン等の食品添加物を使用したものを含む全ての検体で、保存の前後にほとんど生菌数の変化は見られず、1.5 log MPN/g 前後のごく少ない接種量においてもこの傾向は同様であった。

厚生労働省が 2012 年 9-10 月に実施した浅漬製造施設（5,476 施設）に対する立入り調査の結果、81%の施設が殺菌を行っている形跡がみられず、また 70%が十分な施設の衛生管理を行っていないことが判明している。本研究の結果からも明らかなように、一度混入した大腸菌 O157 は適正に冷蔵保存を行った場合、消費期限内に死滅することが期待できない。それゆえ、原料野菜の生産段階および加工段階において適正な衛生管理を行うとともに、商品購入後の交差汚染発生の防止を図ることが、浅漬け類に起因する食中毒の発生を防止するために必須とされる。また浅漬け類に使用される日持ち向上剤は（過剰発酵の抑制等には有用であるものの）、消費期限内の低温貯蔵中に大腸菌を死滅させるまでの効果がないことが確認された。

Escherichia coli O157, lightly fermented vegetables, foodborne outbreak

講演番号：4A11a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:48～ A 校舎 11 会場

イオン半導体由来の抗酸化作用を基盤とする安全・安心な食品加工工程の構築

Constructions of Food Processing Process Based on Antioxidative Effect Derived from the Ionic Semiconductor

○田村 健治[1]、苅野 仁[2] ([1]首都大産技高専品川、[2]（有）イオン化学)
○Kenji Tamura[1], Hitoshi Karino[2] ([1]Tokyo Metro. Coll. Ind. Tech., [2]Ion-Kagaku, Ltd.)

イオン半導体は、消費電力が著しく小さいこと、人畜無害であることなどをはじめとする各種の環境負荷が非常に小さい環境適合型の装置である。各種溶媒あるいは雰囲気に対してイオン半導体を作用させることにより、安全・簡便な方法で非常に強力な還元作用、すなわち抗酸化作用を与えることが可能となることを明らかとしてきた。イオン半導体および関連技術を導入することにより発現されるこれらの強力な抗酸化作用は、①各種二次電池用バッテリー活性強化剤、②各種二次電池の再生技術を基盤とするエネルギー貯蔵システム、③食品揚げ加工工程における食用油劣化防止システム、④食品の鮮度保持および熟成促進を実現する冷凍・解凍システム、⑤熱交換特性の向上に基づく空調あるいは冷凍庫・冷蔵庫などの熱交換機における消費電力削減システムなどの開発に応用・利用され、それぞれ実用段階まで開発されつつあり、いずれも大きな環境負荷低減効果が認められている。本報では、イオン半導体および関連技術を基盤として開発を進めて来た上述のうち、食品加工工程に関する③および④について報告する。それぞれの概要は以下の通りである。

③食品揚げ加工工程における食用油劣化防止システムの概要

食用油劣化反応（熱酸化・熱分解・熱重合・熱加水分解）の抑制：

抗酸化作用（食用油・揚げ種）AV 値・COV 値・残存ビタミン E 測定による効果確認

調理加工寿命延長：新油使用量および廃油廃棄量の削減による環境保全に貢献

食用油由来の揮発性物質生成阻止：

作業環境改善（作業従事者・近隣住民に対する健康被害撲滅・悪臭防止などの対策）

④食品の鮮度保持および熟成促進を実現する冷凍・解凍システムの概要

冷凍・解凍工程における庫内雰囲気の抗酸化作用：

鮮度保持（劣化反応の防止）・熟成促進（選択的熟成反応を促進・他の劣化反応を抑制）

前処理用ミストの機能：

抗酸化作用を有す本半導体処理水への安全な非残留性殺菌剤（安定化次亜塩素酸水）添加

本システムの効果：ドリップ生成抑制効果、変色（冷凍焼け）・型くずれ防止、凍結前の鮮度・品質保持、食肉などの熟成促進、雑菌などの繁殖抑制

the Ionic Semiconductor, antioxidative effect, food processing process

講演番号：4A12a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ A 校舎 12 会場

新ショウガとひねショウガの多面的成分組成の比較
Comparative analysis of constituents between immature and mature ginger rhizomes
○飯島 陽子[1]、櫻井 望[2]、鈴木 秀幸[2]、柴田 大輔[2] ([1]神奈川工科大応用バイオ、[2]かずさＤＮＡ研産業基盤)
○Yoko IIJIMA[1], Nozomu SAKURAI[2], Hideyuki SUZUKI[2], Daisuke SHIBATA[2] ([1]Kanagawa Institute of Technology, [2]Kazusa DNA Research Institute)

【目的】ショウガの根茎は世界的にポピュラーな香辛料素材であるが、日本では新ショウガとひねショウガが別々に市場で売られている。新ショウガは未熟な根茎で収穫直後のものであり、組織が柔らかく、みずみずしい食感が特徴であり、漬物などに利用されている。一方、ひねショウガは収穫後貯蔵された成熟した根茎であり、硬く繊維質が多いのが特徴であり、すりおろして薬味として使用される。新ショウガとひねショウガでは色や香りの違いが知られているが、組成成分の違いについての詳細についてはよく分かっていない。そこで本研究では、糖やアミノ酸などの中心代謝物や、特にショウガの特徴であるジンゲロールを主とするフェノール化合物群と香気成分、色素成分（適応代謝物群）を質量分析計によりスクリーニングし、新ショウガとひねショウガの比較、各ショウガの特徴成分について調べた。
【方法】漬物などの食用におもに用いられる大ショウガ（高知県産）の根茎について、年度および栽培地の異なる条件で新ショウガとひねショウガをサンプルとした。中心代謝成分は、メトキシム化およびTMS誘導体化したのちGC-MSにより分析を行い、66種の成分を検出した。フェノール化合物群はメタノールにより抽出し、LC-MS（positive mode）で分析を行い、LC-MS^nデータの比較と過去の文献との比較から、gingerol類、diarylheptanoid類として138種を検出し、その後の解析に用いた。香気成分は、MTBEにより抽出し、GC-MSで分析を行い、モノテルペノイド、セスキテルペノイドを中心に74種を検出した。
【結果】主成分分析により、いずれの成分群においても新ショウガとひねショウガ間で判別が可能であった。中心代謝物群では、新ショウガの方がグルコースなどの糖類が多い傾向を示し、一部のアミノ酸では、ひねショウガの方が顕著に多い傾向を示した。フェノール化合物群では、gingerolについては大きな差は見られなかったが、ひねショウガのほうがshogaol類が多い傾向を示した。また、両者の色素の違いに関与するフェノール化合物群として、赤色色素であるcyanidin rutinosideがひねショウガで減少した。黄色色素に関与する成分としてcurcumin、demethoxycurcuminのほかにgingerdione類縁体のピークが検出され（現在構造確認中）、この成分の増加がひねショウガでみられた。香気成分では、新ショウガにおいて、geranyl acetate、citronellyl acetate、bornyl acetateなどのアセチル化物が存在し、新ショウガとひねショウガの香気特性を判別していることが示唆された。

Ginger, Volatiles, Phenolics

講演番号：4A12a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ A 校舎 12 会場

塩味受容体 hENaC 発現細胞系による化合物ライブラリーを用いた塩味増強剤の探索
Searching a chemical library to find out saltiness enhancers and confirming the effect by use of a salt taste receptor hENaC-expressing cell line

○松田 龍星[1]、笠原 洋一[1,2]、櫻井 敬展[2]、石丸 喜朗[1]、三坂 巧[1]、阿部 啓子[1,3]、朝倉 富子[1]([1]東大院農生科・応生化、[2]日清食品 HD・食総研、[3]神奈川科学技術アカデミー)
○Ryusei Matsuda[1], Yoichi Kasahara[1,2], Takanobu Sakurai[2], Yoshiro Ishimaru[1], Takumi Misaka[1], Keiko Abe[1,3], Tomiko Asakura[1] ([1]University of Tokyo, [2]Nissin Foods Holdings, [3]Kanagawa Academy of Science and Technology)

【目的】上皮ナトリウムチャネルは、マウスにおいて、食塩水に対しての嗜好性に深く関わっており、塩味の受容体として働いているということがJayaram, C et al.(2010)によって明らかにされた。このことから、我々はヒト上皮ナトリウムチャネル(以下hENaC)もまたマウスENaCと同様に塩味受容体として働いており、hENaCを活性化することによって、塩味を増強することが出来ると考えた。そこで、塩味増強剤の探索を目的として、hENaC活性化剤のスクリーニングを実施することにした。
【方法】効率的な物質のスクリーニングを行うために、ハイスループットな系として、培養細胞を利用した系を構築し、この系を一次スクリーニングに用いた。二次スクリーニングの系としてアフリカツメガエル卵母細胞による電気生理学的手法を用いることで、効率よくhENaC活性化剤のスクリーニングを行うこととした。以下にその方法を示す。
・一次スクリーニング系　hENaCα,β,γの三つのサブユニットを、一過的に発現させたHEK293T細胞に、膜電位感受性色素(FLIPR Membrane Potential Assay Kit, Molecular Device製)を負荷した。hENaCを介したナトリウムイオンの流入量に変化が起こると、培養細胞の膜電位変化が引き起こされる。この変化を、膜電位感受性色素の蛍光強度の変化値として観測した。活性評価は、hENaC 活性化剤であるS3969添加時の値を 1 としたときの相対値として示した。
・二次スクリーニング系　hENaCα,β,γの三つのサブユニットを、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた。ここにサンプル溶液を添加し、そのときに細胞膜を通過する電流の変化値を、二電極膜電位固定法によって測定した。測定値のばらつきを補正するため、ENaC阻害剤であるアミロライドによる電流の変化値を 1 としてサンプル添加による電位値の変化を表した。
　なお、スクリーニングに供する化合物は、東京大学創薬オープンイノベーションセンターの保有する化合物ライブラリーから提供を受けたものを使用した。
【結果】化合物ライブラリーのうち構造の類似性が低い化合物を集めたライブラリー(コアライブラリー)に属する 4800 の化合物を一次スクリーニング系に供したところ、S3969 添加時の計測値を 1 とした相対応答値が 0.18 を超えた化合物として 512 の化合物が選び出された。これらの化合物を、さらに、二次スクリーニング系を使用して検討した。

ENaC, salt taste, chemical library

講演番号：4A12a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ A 校舎 12 会場

苦味抑制物質あるいはエマルション形成が STC-1 細胞の苦味応答に及ぼす影響

Effect of masking agents or emulsion on response in STC-1 cell by bitter compound

○古屋 進之介、江草 愛、西村 敏英（日獣大　応生）
○SHINNOSUKE FURUYA,AI EGUSA,TOSHIHIDE NISIMURA (Nippon Veterinary and Life Science Univ.)

【目的】我々はこれまでの研究で、キサンタンガムやβ-シクロデキストリンの苦味抑制効果が、苦味レセプターT2Rを有するSTC-1細胞で客観的に評価できることを明らかにしてきた。本研究では、γ-シクロデキストリンを用いて、苦味抑制物質の構造の違いによる細胞応答への影響を比較した。また、エマルションを用いた場合での苦味抑制効果についても検討を行い、官能評価との相関を確認した。

【方法】5mM カフェイン溶液に対し、β-あるいはγ-シクロデキストリンを各々終濃度で 0.1%若しくは 0.5%となるように調製した。また、エマルションの調製には、大豆油とカフェイン溶液(終濃度 5mM あるいは 10mM)に 4 種類の乳化剤(終濃度 1%)を用い、O/W 型エマルションを調製した。官能評価には、訓練されたパネリストを用い、各溶液の苦味強度を 2 点識別法で評価した。また、解析には 2 項分布の片側検定を用いた。細胞の応答には、カルシウムイメージング法を用い、蛍光カルシウム指示薬 fluo-8 を導入した STC-1 細胞に、5mM、10mM カフェイン水溶液、各シクロデキストリン水溶液、あるいは 5mM、10mM カフェインのエマルション溶液を添加した場合の細胞応答について、共焦点顕微鏡(LSM710)を用いて 5 秒毎に測定した。細胞の応答は蛍光強度の変化量【ΔF/F=（F-F0）/F0】として算出した。

【結果】苦味溶液にβ-あるいはγ-シクロデキストリンを添加すると、いずれにおいても、官能評価において苦味が有意に抑制された。細胞応答においても、シクロデキストリン添加によってカルシウムの放出量が抑制された。特に、0.5%γ-シクロデキストリンの苦味抑制効果は、0.5%β-シクロデキストリンの場合よりも高い抑制効果を示した。前者は、後者よりグルコースが 1 分子多いため、空間的に苦味物質を包接しやすいと考えられており、この違いを STC-1 細胞が認識していると推察された。

5mM、10mM カフェインのエマルション溶液の苦味強度は、5mM、10mM カフェイン水溶液に比べて有意に弱くなった。細胞応答においても、5mM、10mM カフェインのエマルション溶液では、水溶液に比べて、STC-1 細胞のカルシウム放出量が抑制された。5mM カフェイン溶液での抑制割合は、10mM の場合よりも高かった。

以上の結果から、苦味抑制物質による STC-1 細胞の苦味物質の応答変化は、官能検査による苦味抑制現象とよく相関していることから、STC-1 細胞よる苦味の評価が可能であると推察された。

STC-1 cell, bitter taste, emulsion

講演番号：4A12a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ A 校舎 12 会場

呈味を有さない酵母エキスが基本五味に与える影響

Effect of the tasteless yeast extract on five basic tastes.

○安松 良恵[1]、大野 勇司[2]、古屋 進之助[2]、江草 愛[2]、阿孫 健一[1]、池田 咲子[1]、山下 裕隆[1]、西村 敏英[2] ([1]興人ライフサイエンス株式会社、[2]日獣大・応生)
○Yoshie YASUMATSU[1], Yuji OHNO[2], Shinnosuke FURUYA[2], Ai EGUSA[2], Kenichi ASON[1], Sakiko IKEDA[1], Hirotaka YAMASHITA[1], Toshihide NISHIMURA[2] ([1]KOHJIN Life Sciences Co.,Ltd., [2]NIPPON VETERINARY AND LIFE SCIENCE UNIVERSITY)

【目的】

古来より酵母は、その多彩な機能から私たちの生活に深く浸透し、医薬品から飲食品分野に至るまで幅広く利用されてきた。呈味性酵母エキスは、5’-IMPや5’-GMP、グルタミン酸ナトリウムなど既知のうま味成分を含み、調味料として広く使用されている。しかし、うま味成分以外の呈味効果に関しては、あまり検討されていない。

本研究では、*Candida utilis*由来のRNAと食物繊維を主成分とし、それ自身が呈味を持たない酵母エキスを用いて、飲食品の味覚において重要な要素である基本五味（甘味、酸味、塩味、苦味、うま味）に与える影響について評価を行った。さらに、苦味については、官能評価に加え、味細胞モデルであるSTC-1細胞を利用した評価も行った。

【方法および結果】

① 乾燥酵母エキスに含まれる成分を分析した結果、主要成分は、タンパク質、RNA、食物繊維であることが判明した。既知の基本味を呈する成分は、いずれも認知閾値よりも低い値を示した。

②酵母エキスの基本五味に対する官能評価方法は、各濃度の溶液（5 % スクロース、0.2 % グルタミン酸ナトリウム、0.02 % 酒石酸、0.001 % キニーネ、0.097 % カフェイン、0.8 % NaCl）に酵母エキスを終濃度で 0.1 %となるよう添加し、十分に訓練された官能パネルを用いて 2 点比較法にて実施した。味の評価は、酵母エキス添加区と無添加区において最大値、先味、後味、全体の呈味強度の 4 項目で強く感じる方を選択し、2 項分布の片側検定で有意差を判定した。その結果、酵母エキスの添加により、甘味では後味と全体の呈味強度で有意に増強され *($p<0.01$, $p<0.05$)*、うま味では先味と後味で増強傾向が認められた。一方、酸味は最大値と先味で有意に抑制され(*$p<0.001$*)、苦味も最大値と先味の抑制傾向が認められた。塩味に関しては、添加効果が認められなかった。

③STC-1 細胞による苦味の評価には、カルシウムイメージング法を用いた。蛍光カルシウム指示薬 fluo8 を導入した STC-1 細胞に、苦味溶液(0.1 % カフェイン溶液あるいは 0.1 % キニーネ溶液)と酵母エキス(終濃度 0.1 %)を添加した場合の細胞応答について、共焦点顕微鏡(LSM710)を用いて 5 秒毎に測定した。細胞の応答は蛍光強度の変化量【$\Delta F/F=(F-F_0)/F_0$】として算出した。その結果、酵母エキスの添加によって、苦味に対する応答が抑制された。また、時間経過と共に抑制度合いは小さくなっており、苦味における官能評価の結果と相関することが明らかとなった。

yeast extract, taste modifier, STC-1

講演番号：4A12a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ A 校舎 12 会場

酵母エキス成分の分画物添加が基本味溶液に及ぼす影響

Effect of compounds fractionated from the tasteless yeast extract on basic tastes

○大野 勇司[1]、江草 愛[1]、安松 良恵[2]、阿孫 健一[2]、池田 咲子[2]、山下 裕隆[2]、西村 敏英[1]([1]日獣大　応生、[2]興人ライフサイエンス（株））
○Yuji ONO[1], Ai EGUSA[1], Yoshie YASUMATSU[2], Kenichi ASON[2], Sakiko IKEDA[2], Hirotaka YAMASHITA[2], Toshihide NISHIMURA[1] ([1]Nippon Veterinary and Life Science Univ., [2]KOHJIN Life Sciences)

【目的】我々はこれまでの研究で、酵母エキスを終濃度で 0.1%となるように基本味溶液に添加すると甘味、うま味については増強効果を、酸味、苦味については抑制効果を示すことを確認してきた。今回は甘味の増強と、酸味及び苦味の抑制に寄与している物質を解明するために、酵母エキス成分の分子量分画を行って、各分画物の添加による基本味への影響を官能評価法で検討した。また、酵母エキスの主要な構成成分である RNA と食物繊維を単離し、各成分の添加が基本味にどのような影響を与えるのかについても検討した。
【方法】酵母エキスを分子量 10000 で分画する限外ろ過膜を使い、分子量 10000 以上（高分子画分）と分子量 10000 以下（低分子画分）に分画した。官能評価における両画分の添加量は、分画後の重量比 3：1（高分子画分：低分子画分）に合わせて、終濃度で高分子画分では 0.075%、低分子画分では 0.025%と決定した。5%スクロース溶液（甘味）、0.02%酒石酸溶液（酸味）、あるいは 0.001%カフェイン（苦味）を用いて、両画分の添加効果を評価した。また、RNA と食物繊維についても、酵母エキス中の組成比に準じて、終濃度で各々0.026%、0.03%となるように添加した。官能評価には訓練されたパネリストを用い、①最大値、②先味、③後味、④全体の呈味強度（全体強度）の 4 項目において味を強く感じる方を選択させた。また、解析には 2 項分布の片側検定を用いた。
【結果】甘味溶液への高分子画分の添加は、甘味の最大値、後味、全体強度を有意に増強した。酸味溶液あるいは苦味溶液に添加した場合には、両味の最大値、先味、全体強度を有意に抑制した。一方、低分子画分を各基本味溶液に添加した場合、甘味と苦味については呈味強度に影響を与えなかった。酸味溶液に添加した場合には、酸味の最大値と先味を抑制した。
　次に、呈味性への影響が大きかった高分子画分中の寄与因子を検討した。高分子画分に存在する RNA を各溶液に添加した結果、甘味の先味に有意な増強効果が認められた。また、酸味と苦味の最大値、先味および全体強度が有意に抑制された。また、高分子画分の主要構成成分である食物繊維を各溶液に添加した場合、酸味の先味と全体強度並びに苦味の先味も有意に抑制された。しかし、甘味に対する増強効果は認められなかった。
　以上の結果から、酵母エキスによる甘味の増強効果には、RNA が寄与していること、また、酸味と苦味の抑制効果には、RNA および食物繊維が寄与していることが推察された。

yeast extract, taste modifier, RNA

講演番号：4A12a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ A 校舎 12 会場

米麹による食肉加工

Meat processing by rice *koji*.

○飛塚 幸喜、城 祥子、安食 雄介、野内 義之（山形工技セ）
○Koki TOBITSUKA,Sachiko SHIRO,Yusuke AJIKI,Yoshiyuki NOUCHI (Yamagata R.I.T.)

【目 的】

日本では古くから、塩辛、魚醤油、鰹節など水産物を原料とした多種多様な発酵食品が食されている。その一方で、畜産物を原料とした発酵食品は乳を原料としたもの（ヨーグルト、チーズなど）を除き極めて少ない。そこで我々は、新たな畜産発酵食品開発に向けた基礎的データの採取を目的に、牛および豚肉を米麹で処理した際の呈味成分の変化等について検討し、熟成後の遊離アミノ酸が最大で約 9 倍、ペプチドが 2 倍以上に増加することを明らかにしてきた。

本研究では、米麹処理による肉呈味成分の増加が味に与える影響や熟成中の微生物数の変化を調べる目的で、米麹を添加したソーセージを試作しこれの官能評価および微生物検査を行った。また米麹処理によるガンマアミノ酪酸生成の可能性について検討を行った。

【方 法】

原料重量に対して約 10 %量の米麹粉末を添加してソーセージを調製した。これを熟成させた後に湯煮して官能評価した。またソーセージの微生物数（一般生菌、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌）を測定した。

牛または豚ひき肉に米麹粉末を添加して 20℃で 2 から 24 時間保持した後に、ガンマアミノ酪酸含量を定量した。

【結 果】

米麹粉末を添加、熟成させて調製したソーセージと米麹を添加せずに調製したソーセージを官能検査（男性 10 名、女性 7 名のパネル）したところ、約 7 割（12 名）が米麹添加ソーセージのうま味が強いと評価した。畜肉を米麹で処理することにより、うま味が増強されることが明らかとなった。一方、タンパク質をプロテアーゼ等の酵素で分解すると苦味を呈するペプチドやアミノ酸が生成することが多いが、前述の官能検査では、約 9 割（15 名）が「苦味を感じない」と評価しており、米麹による畜肉処理では苦味の生成はあまり問題にならないと考えられた。

牛または豚ひき肉に米麹粉末を添加、熟成させた後にガンマアミノ酪酸含量を定量したところ、経時的に増加する傾向が見られた。

koji, meat, *umami*

講演番号：4A12a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ A 校舎 12 会場

乳酸菌を用いた発酵浅漬けの製造

Application of lactic acid bacteria in pickled cucumber.

○寺田 創、西野 智彦（東京工科大院バイオ）
○Hajime TERADA,Tomohiko NISHINO (Tokyo university of technology)

［背景・目的］

浅漬けは短期間の漬け込みで手軽に製造できる漬け物であり、微生物による発酵の関与が少ないとされる。浅漬けは塩分濃度が２．０～２．５％と低塩分であることから高塩分で長期間漬け込む漬け物と比べて好まれて食されているが、漬け物では珍しい食中毒事例がこれまでに報告されている。昨年７月には北海道で白菜の浅漬けにおける腸管出血性大腸菌Ｏ１５７の集団食中毒が発生している。浅漬けの雑菌汚染対策には塩素による消毒が推奨されているが、乳酸菌接種による雑菌汚染抑制の試みはあまり見られない。本研究は浅漬けの漬け込み時にスターターとして乳酸菌を接種することで雑菌汚染抑制の可能性について検証する。

［実験方法］

きゅうりを輪切りにしたモデル浅漬けの漬け工程（塩分濃度２％）時に、漬け物から分離される報告例が多い乳酸菌（*Lactobacillus plantarum* JCM1149, *Leuconostoc mesenteroides* JCM6124）を接種して２０℃で保存し、２４時間ごとに乳酸菌数、ｐＨ、滴定酸度の測定を行うことで増殖性状を調べた。また、乳酸菌と同時に大腸菌を接種することで模擬汚染状態とし、乳酸菌の有無が大腸菌数に与える影響について検討した。上記の菌株では大腸菌の抑制が不十分であったため、市販の漬け物を分離源として浅漬け製造に適した乳酸菌の探索を行った。

［結果・考察］

モデル浅漬けに接種した乳酸菌の増殖は、*L. plantarum* に比べて *Leuc. mesenteroides* の方が早かった。これを反映して *Leuc. mesenteroides* の方が大腸菌の増殖を抑制する効果が高かった。しかし、大腸菌の抑制は不十分であった。そこで市販の漬け物を分離源として浅漬け製造に適した乳酸菌を探索した結果、だいこんキムチ、トマトの水キムチから漬け液中におけるｐＨ低下が早い菌株が数株分離された。現在、これら候補菌株の増殖性状と大腸菌の増殖抑制を確認するとともに１６Ｓ ｒＲＮＡ遺伝子の塩基配列を用いて菌種の推定を行っている。

lactic acid bacteria, pickles, food poisoning

講演番号：4A12a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ A 校舎 12 会場

冷凍すり身（イトヨリダイ）のゲル形成能低下を引き起こすプロテアーゼについて

Effect of protease on gel property of snapper surimi paste

○若宮 英倫子[1]、野口 治子[2]、内野 昌孝[2]、高野 克己[2] ([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・化学)
○ Eriko WAKAMIYA[1], Haruko NOGUCHI[2], Masataka UCHINO[2], Katsumi TAKANO[2] ([1]Agrichem., Agr., Grad. Sch., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Biosci., Tokyo Univ. Agr.)

【目的】
近年、魚肉すり身の価格は原材料の漁獲量減少に伴い、高騰している。このため、比較的安価な原料として、イトヨリダイなどが利用されてきている。しかし、このような魚種を使用して水産練り製品を製造すると、製品の弾力が悪くなり、特に加熱工程での温度条件によってはゲルが崩壊する。このゲルの品質劣化の原因を見出すことを目的とし、すり身中に含まれているプロテアーゼに着目して検討を行った。

【方法】
試料にはインド産イトヨリダイ KA 級のすり身を用いた。すり身に界面活性剤を含む緩衝液を加えて抽出した後、40%飽和硫安塩析し、その上澄液に対し 80%飽和硫安塩析を行った。得られた沈殿を緩衝液にて溶解し、透析したものを粗酵素溶液とした。粗酵素溶液をアフィニティクロマトグラフィ(Benzamidine Sepharose 6B)に供し、溶出液を 1ml ずつ分取した。各フラクションについて、プロテアーゼ活性はＦＴＣカゼインを基質とした測定法で、タンパク質量の測定は 280nm における吸光度を測定した。そこで得られたピークを回収し、脱塩と濃縮を行った後、Zymography と SDS-PAGE に供した。

【結果】
粗酵素溶液をアフィニティクロマトグラフィに供し、吸着画分にプロテアーゼ活性を確認した。活性画分を回収して Zymography に供したところ、数箇所に活性バンドを確認した。さらに、各種プロテアーゼ阻害剤を添加して反応を行ったところ、Kunitz 型トリプシンインヒビターと Bowman Birk 型トリプシンインヒビターにて Zymography の活性バンドが薄くなった。これらのことから、供試すり身のゲル形成を阻害する要因の一つは、すり身中のトリプシン様プロテアーゼであることが示唆された。

Frozen surimi, Protease, Trypsin inhibitor

講演番号：4A12a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ A 校舎 12 会場

豆腐形成における凝固剤濃度が沈殿に与える影響と凝固剤種の違い
Effect of the coagulant concentration and different coagulants on the precipitate formation
○有井 康博[1]、鳥居 絵美[1]、岡村 麻衣[1]、竹中 康之[2]([1]武庫川女子大生活環境、[2]神戸松蔭女子大生活)
○Yasuhiro ARII[1], Emi Torii[1], Mai Okamura[1], Yasuyuki Takenaka[2] ([1]Mukogawa Women's University, [2]Kobe Shoin Women's University)

【目的】豆腐は日本の伝統食品である。その加工は加熱した豆乳に凝固剤を添加し、タンパク質を凝固させることを利用している。豆腐形成に用いられる金属イオンは主としてマグネシウムイオンおよびカルシウムイオンであり、その塩化物塩あるいは硫酸塩が凝固剤として用いられる。凝固剤の違いは、豆腐の食感や味に影響を及ぼすことが知られているが、これら凝固剤の差異が豆腐形成に及ぼす影響は詳細には不明である。過去の様々な研究では、凝固剤の濃度と豆腐形成の関係を調べる方法として、凝固剤添加後の上清タンパク質濃度の残量を追跡することが主として行われている。しかしながら、この方法では凝固剤濃度依存的な沈殿の物理的変化を見逃すこととなる。本研究では、沈殿湿重量を追跡することで、凝固剤濃度依存的な沈殿形成を評価し、これまで見逃しがちであった凝固剤濃度と豆腐の物理的変化の関係性および凝固剤種による沈殿形成の違いを明らかにすることを目的とした。
【方法】市販無調整豆乳（メイラク）および凝固剤として塩化マグネシウム、硫酸マグネシウムあるいは塩化カルシウムを用いた。硫酸カルシウムは水に溶けにくいため、今回は対照から除外した。80℃に温めた豆乳に豆乳容量の 1/9 量の凝固剤を添加した後、よく混合した。この際、凝固剤の最終濃度が 0-20 mM となるように添加した。混合液を 80℃で 60 分間保温した後、15 分間氷上に静置した。その後 4℃、4,100×*g* で 10 分間遠心し、上清と沈殿に分けた。沈殿を湿重量測定、沈殿観察、水分含量測定に用いた。塩化マグネシウムにより生じた沈殿のうち、湿重量および沈殿の様子に大きな差があった沈殿を様々な可溶化液で再溶解し、その溶解度を調べた。いずれも独立した 3 回の実験の平均値を用いた。
【結果と考察】塩化マグネシウム濃度依存的湿重量変化を調べた結果、5 mM 以上で湿重量が増加し、7 mM で豆乳成分の約 60%が沈殿した。その後、10 mM までは一定量の湿重量で生じたが、11 mM で約 50%に減少し、その後は一定となった。沈殿の外観は 7-10 mM では滑らかな沈殿（SP）、11 mM 以上では目の粗い沈殿（RP）であった。次に、硫酸マグネシウムおよび塩化カルシウムを様々な濃度で添加し、凝固剤濃度依存的湿重量変化、沈殿の外観、水分含量を調べた。その結果、沈殿の外観および水分含量が異なる二種類の沈殿 SP および RP が、塩化マグネシウムの使用時と同様に低濃度の凝固剤添加および高濃度の凝固剤添加によって生じることが分った。しかしながら、凝固剤の種類によって SP および RP の形成における凝固剤濃度に差が生じた。これらの結果は絹ごし豆腐、木綿豆腐の形成機構の差異を解明するきっかけとなると考えている。本研究は科学研究費（23700894）の助成で実施されている。

silken tofu, regular tofu, coagulant

講演番号：4A12a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ A 校舎 12 会場

蚕サナギおよびイナゴ蛋白質の栄養特性

Nutritional characterization of protein from Silkworm pupae and Rice hopper

○友竹 浩之、片桐 充昭、柴本 むつ美（飯田女子短期大学）
○Hiroyuki Tomotake,Mistuaki Katagiri,Mustumi Shibamoto (Iida Women's Junior College)

【目的】長野県の伊那、木曽、佐久地域には、古くから昆虫を食べる文化（昆虫食文化）が根付いている。具体的には、イナゴ、蚕のサナギ、ザザムシなどが挙げられるが、これらはかつて山間地域におけるタンパク質源として欠かせないものだった。しかしながら、食資源としての昆虫の栄養機能、生理活性機能に関する研究は国内ではほとんどなく、昆虫食は伝統食品、嗜好食品、趣味としてのイメージが強い。本研究では、イナゴおよび蚕サナギのタンパク質の栄養特性について調べることを目的とした。
【方法】イナゴは長野県内の稲作地より採取し、100℃で間接的に加熱処理した。蚕サナギは長野県内の食品メーカーより入手した。各サンプルは凍結乾燥後、粉末化した。アミノ酸分析の加水分解、条件は 6N 塩酸、110℃、22 時間とした。メチオニン、シスチンの分析には、過ギ酸化の後、加水分解した。トリプトファンの分析には、アルカリ加水分解を行った。SDS-PAGE は、Laemmli の方法に従って行った。タンパク質の消化実験のため、pH を調整した溶液中でサンプルをペプシンおよびパンクレアチンと反応させた。その後、TNBS 法にて、遊離のアミノ基の量を測定した。
【結果】蚕サナギタンパク質はバリン、メチオニン、フェニルアラニンなどの必須アミノ酸を多く含んでおり、2007 年 FAO/WHO/UNU 報告のアミノ酸必要量を満たしていた。一方、イナゴタンパク質はリジンや含硫アミノ酸の含量が少なかった。SDS-PAGE の結果、蚕サナギは 80kDa 付近と 32kDa 付近に濃いバンドが見られた。また、イナゴは 30kDa 前後と 17kDa 前後に細かいバンドが見られた。
試験管内でのタンパク質消化実験の結果、蚕サナギおよびイナゴタンパク質は、経時的に加水分解されることがわかった。

Silkworm pupae, Rice hopper, protein

講演番号：4A12a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ A 校舎 12 会場

核酸染色試薬によるアルデヒド修飾タンパク質の認識

Aldehyde modified protein recognized by DNA intercalator

○宮下 宙士、近澤 未歩、大瀧 菜月、柴田 貴広、河合 慶親、内田 浩二（名大院生命農）
○Hiroaki Miyashita,Miho Chikazawa,Natsuki Otaki,Takahiro Shibata,Yoshichika Kawai,Koji Uchida (Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya. Univ.)

【背景・目的】生体膜を構成するリノール酸やアラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸は、脂質過酸化反応により、4-oxo-2-nonenal (ONE) などの反応性短鎖アルデヒド類を生成する。これらの化合物は、タンパク質を修飾し、自己免疫応答を誘導することが示唆されている。当研究室では、これまでに自己免疫疾患のひとつである全身性エリテマトーデス（SLE）患者血清において、DNA のみならずアルデヒド修飾タンパク質に対する抗体価の上昇が見られることを報告している。さらに、SLE モデルマウスである MRL / lpr マウスが産生する自己抗体の一部が、ONE 修飾タンパク質も認識する二重交差性抗体であることを見出してきた（Toyoda et al., JBC, 2007; Otaki et al., JBC, 2010)。そこで、本研究では、自己抗体が修飾タンパク質との交差性を有することから、修飾タンパク質が核酸と類似した構造を有しているという仮説のもと、核酸染色試薬である臭化エチジウム（EtBr）及び SYBR Green I (SG) による検出を試みた。
【方法・結果】ONE 1 mM とウシ血清アルブミン 1 mg/ml を 24 時間インキュベートし、ONE 修飾タンパク質を作成した。修飾タンパク質を電気泳動後、核酸染色試薬である EtBr あるいは SG で染色したところ、ONE 修飾タンパク質に著しい蛍光が見られ、ONE 濃度依存的に蛍光強度が増すことが確認された。また、修飾タンパク質の加熱及び還元アルキル化処理による蛍光強度に変化がないことが確認された。様々なアルデヒド修飾タンパク質に対して、詳細な検討を行ったところ、γ–ケトアルデヒド全般がタンパク質との反応により、核酸染色試薬によって認識されることが明らかとなった。そこで、γ–ケトアルデヒドの最小単位である 1,4-butanedial (BA) を用いて、さらに詳細な検討を行った。その結果、BA 修飾タンパク質は核酸染色試薬により認識されるだけでなく、自己抗体との交差性を有することを確認した。現在、BA による修飾構造の解明など修飾タンパク質の核酸染色試薬による認識機構の解析を行っている。

DNA intercalator, γ-ketoaldehyde, autoantibody

講演番号：4A12a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:12～ A 校舎 12 会場

グリセルアルデヒド修飾アルブミンのグリケーション部位とアミノ酸配列の解析

Amino Acid Sequence of Glyceraldehyde-modified albumin

○臼井 照幸[1,2]、山岸 理[2]、渡辺 寛人[2]、早瀬 文孝[2]([1]昭和学院短大ヘルスケア栄養、[2]明治大農)
○ Teruyuki USUI[1,2], Satoshi YAMAGISHI[2], Hirohito WATANABE[2], Fumitaka HAYASE[2] ([1]Showagakuin Junior College, [2]Meiji Univ.)

【目的】メイラード反応によって、タンパク質のリシン残基およびアルギニン残基はカルボニル化合物による修飾を受ける。タンパク質の修飾には、付加型の修飾と架橋型の修飾がある。また分子内架橋及び分子間架橋が想定される。また、修飾部位のアミノ酸は、グリケーション後期段階生成物として、新奇アミノ酸配列となる。我々はグリセルアルデヒドにより修飾されたリゾチーム、シトクロム C、リボヌクレアーゼ A のアミノ酸配列について報告している[1]。グリセルアルデヒドは代謝物、あるいは糖の分解物として生成するが、グリセルアルデヒドによるタンパク質の修飾は、タンパク質の機能異常や、受容体を介した細胞応答の誘発などを引き起こすことが考えられるが未解明である。これまでに、我々はグリセルアルデヒド修飾アルブミンにおいて細胞毒性を示す化学構造を見出しており、タンパク質における存在部位とアミノ酸配列について解析を進めている。今回、グリセルアルデヒドで修飾した牛血清アルブミン(BSA)のグリケーション部位とアミノ酸配列について報告する。
【方法】グリセルアデヒド（10mM）と BSA（5mg/ml）を 0.2M リン酸緩衝液（pH 7.4）に溶解し、37 ℃で所定時間（0-240h）インキュベートし 、継時的に採取した。透析により脱塩および未反応のグリセルアルデヒドの除去を行い、SDS-PAGE を実施した後、ゲルを切り出し、トリプシン消化した。トリプシン消化ペプチドを LC-MS/MS(LTQL Orbitrap)により分析した。
【結果】グリセルアルデヒドにより修飾した BSA のアミノ酸配列を分析した結果、特定の部位のアミノ酸残基が早期に修飾され、ピリジニウムである GLAP を生じることが明らかとなった。また、同様に特定の部位のアルギニン残基からはイミダゾリノンである MG-H1 を生じた。その後、K136、K273、K275、K504、K535、K537、R427 などが修飾された。さらに続いて、K221、K224、K294、K312、K350、K413、K465、K471、K556、R335、R336、R347、R444 などが修飾されることが明らかとなった。早期に修飾される部位は、溶媒露出度の高いものも多く、タンパク質の比較的外側に位置するアミノ酸であると考えられる。また、時間をおいてから修飾される部位は、早期の修飾によってタンパク質の立体構造が変化し、通常の状態では修飾されにくい部位のアミノ酸が露出し、修飾されたものと推察した。
[1]山岸理、臼井照幸、増田喜恵、渡辺寛人、早瀬文孝、日本農芸化学会 2012 年度大会講演要旨集

glycation, Maillard reaction, glyceraldehyde

講演番号：4A12a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:24～ A 校舎 12 会場

LC-MS/MS による過酸化脂質-DNA 付加体の網羅解析及び検出系の確立
Analysis of lipid peroxidation-induced DNA adducts by LC-MS/MS
河合 慶親[1]、○額 惠理香[2]、柴田 貴広[1]、内田 浩二[1] ([1]名大院農、[2]名大農)
Yoshichika KAWAI[1], ○Erika NUKA[2], Takahiro SHIBATA[1], Kouji UCHIDA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Nagoya Univ.)

【目的】生体膜を構成しているリノール酸（LA）やアラキドン酸（AA）などの多価不飽和脂肪酸は、脂質過酸化反応によりアルデヒド類など反応性の高い多くの分解産物を生成し、DNA と付加体を生成することが示唆されているが、付加体構造や疾病との関係については不明な点が多い。そこで本研究では、生体膜を構成する脂肪酸の中でも二重結合が多く、多様な分解産物が生成すると考えられる AA に注目し、AA 酸化物と 2'-deoxyguanosine （dG）との反応で生じる付加体について LC-MS/MS を用いた網羅的解析法により新たな付加体の同定を試みるとともに、主要な付加体については生体内からの検出・定量法の確立を試みることとした。
【方法と結果】AA を Fe^{2+}-アスコルビン酸存在下で dG と 3 日間反応させた反応液を、既知のアルデヒド-dG 付加体のうちで最小の分子量である 1,N^2-etheno-dG の *m/z*292 から *m/z*500 までの分子イオンピークについて、それぞれデオキシリボースが脱離したフラグメント (-116) の MRM 解析を行った。その結果、付加体と考えられる 101 種類のピークが検出され、そのうち 15 種類は既知の付加体であった。最も主要な付加体として検出された 4-oxo-2-nonenal 由来 heptanone-1,N^2-etheno-dG（ONE-dG）と、エポキシ化アルデヒド由来 1,N^2-etheno-dG について、[$^{15}N_5$]dG から安定同位体標品を作製し、安定同位体希釈法による DNA 中の付加体定量を行うこととした。方法として酵素消化した DNA 試料に、安定同位体を添加し、固相抽出による未反応塩基の除去を行った後、LC-MS/MS 解析を行った。その結果、仔ウシ胸腺 DNA 中から ONE-dG と 1,N^2-etheno-dG のピークが検出され、酸化 AA 修飾による有意な増加が確認された。また、未同定付加体のうち主要に検出された *m/z*410 のピークは、溶出時間の異なる複数のピークが確認され、これらは AA と同じω6 系の LA を同様に酸化条件下で dG と反応させても検出されたことから、AA のメチル基末端を含む部分構造から生成することが示唆された。また、分子量からこれらの付加体を生成する部分構造は炭素数 8 であることが想定されたため、炭素数 8 のアルデヒドである trans-2-octenal と dG を 3 日間反応させ LC-MS/MS 解析したところ、これらの一部と一致するピークが確認されたことから、trans-2-octenal 由来のアルデヒド類が付加体生成を引き起こすことが示唆された。現在、trans-2-octenal と dG との反応から生じる付加体構造について検討中である。

lipid peroxidation, DNA adducts, LC-MS/MS

講演番号：4A15a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ A 校舎 15 会場

カルノシンによる腸管における CREB の活性化とその機能性

Carnosine regulates the activity and function of CREB in the intestine

○藤井 薫[1]、門岡 桂史[2]、松本 貴之[3]、森松 文毅[3]、片倉 喜範[1,2,4] ([1]九大院・シス生、[2]九大院・生資環、[3]日ハム中研、[4]九大院・農院)
○ Kaoru Fujii[1], Keishi Kadooka[2], Takashi Matsumoto[3], Fumiki Morimatsu[3], Yoshinori Katakura[1,2,4] ([1]Kyushu Univ., [2]Kyushu Univ., [3]Nippon Meat Packers Inc., [4]Kyushu Univ.)

【目的】我々は、脳と腸との間の相互作用、すなわち脳腸相関の食品による活性化の可能性を追求することを第一の目的として研究を行い、これまでに、食肉成分の一種であるカルノシンが、腸管上皮細胞からの神経栄養因子発現を増強することを見出している。そこで本研究では、カルノシンによる神経栄養因子発現の増強効果を検証するとともに、その機能性の分子基盤を明らかにすることを目的として研究を行った。

【方法】ヒト腸管上皮細胞のモデルとしてヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を用いた。また、食肉成分としてカルノシンを用い、これを様々な濃度で Caco-2 細胞に 3 日間添加し培養後、定量 RT-PCR 法により、神経栄養因子である BDNF の発現変化を追跡した。次に、食肉成分による BDNF 転写増強効果に対する CREB の関与を明らかにするために、CREB の活性及び転写活性化能をルシフェラーゼアッセイにより評価した。さらに、DNA マイクロアレイを用いることにより、カルノシンを添加した Caco-2 細胞において発現量の変化する DNA を網羅的に解析した。

【結果】カルノシンを添加した Caco-2 細胞において、BDNF の発現が増強していることが確かめられた。次に、カルノシンによる BDNF 発現増強効果に対する CREB の関与を明らかにするため、CREB の活性を pCRE-Luc レポーターコンストラクトを用いて検証した結果、カルノシンにより CREB が活性化していることが明らかとなった。さらに、カルノシンは BDNF や CREB 以外にも様々な遺伝子の発現を増強する効果があるのではないかと考え、カルノシンを添加した Caco-2 細胞に対し DNA マイクロアレイを実施して遺伝子の発現量変化を追跡した結果、数種類の CREB 関連遺伝子の発現が増加していることが判明した。以上の結果から、カルノシンは腸管上皮細胞において、CREB を初めとする様々な転写因子の活性化を引き起こし、その結果として BDNF の転写が増強されるものと考えられた。

carnosine, Caco-2, CREB

講演番号：4A15a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ A 校舎 15 会場

消化管内分泌細胞株において不飽和アルデヒドは TRPA1 を介して CCK 分泌を誘導する

Unsaturated aldehydes induce CCK secretion through TRPA1 in enteroendocrine cell line

○中島 進吾[1]、比良 徹[1]、西山 千草[2]、山下 貴俊[2]、今義 潤[2]、原 博[1]([1]北大院農、[2]株式会社 J-オイルミルズ 油脂開発研究所)
○Shingo NAKAJIMA[1], Tohru HIRA[1], Chigusa NISHIYAMA[2], Takatoshi YAMASHITA[2], Jun IMAGI[2], Hiroshi HARA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]J-Oil mils Inc.)

【背景】消化管ホルモン Cholecystokinin (CCK)は、上部消化管に散在する CCK 産生細胞より分泌され、胃排出遅延や膵酵素分泌促進など、消化・吸収を調節する役割を担っている。CCK 分泌の主要な刺激因子の一つとして、脂肪酸が知られているが、同じ脂肪族化合物ながらも、油の過熱や脂質酸化によって生じるアルデヒドの CCK 分泌活性については明らかにされていない。

本研究では、CCK 産生細胞株を用い、多様な脂肪族化合物による CCK 分泌活性を比較解析することで、CCK 分泌を強く誘導する脂肪族化合物の構造を明らかにし、その受容機構ならびに細胞内情報伝達経路について検討した。

【材料と方法】炭素鎖長（３～１３）および不飽和度の異なるアルデヒド、アルコール、脂肪酸を用いた。＜CCK 分泌試験＞マウス小腸由来 CCK 産生細胞株 STC-1 を、48-ウェルプレートで 48 時間培養した。HEPES ベースのバッファーで洗浄後、各種アルデヒドに 60 分間暴露し、上清中に放出された CCK を ELISA により定量した。＜細胞内 Ca^{2+}測定＞カバースリップ上に培養した STC-1 細胞に、蛍光 Ca^{2+}指示薬 Fura-2 を 20 分負荷したのち、二波長励起法により、各種アルデヒド暴露後の細胞内 Ca^{2+}濃度を測定した。

【結果と考察】各種脂肪族化合物の比較において、100 μM の二価不飽和アルデヒド(2,4-Decadienal)が強い CCK 分泌活性を示した。アルデヒドの炭素鎖長および不飽和度の違いについて検討したところ、飽和アルデヒドでは CCK 分泌は誘導されず、一価および二価不飽和アルデヒドが CCK 分泌を誘導した。官能基の影響について検討したところ、アルコールや脂肪酸では、炭素鎖長、不飽和度に関わらず、CCK 分泌は誘導されなかった。

不飽和アルデヒドによって細胞内 Ca^{2+}濃度上昇が誘導されたが、飽和アルデヒドやアルコール、脂肪酸では誘導されなかった。細胞外 Ca^{2+}を除去したところ、不飽和アルデヒドによる細胞内 Ca^{2+}濃度上昇が消失し、CCK 分泌も誘導されなかった。また、不飽和アルデヒドによる細胞内 Ca^{2+}濃度上昇および CCK 分泌は、Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)阻害剤により消失した。

以上より、不飽和アルデヒドは TRPA1 を活性化し、細胞外から Ca^{2+}を動員することで、CCK 分泌を誘導していることが明らかとなった。

Cholecystokinin, Aldehyde, TRPA1

講演番号：4A15a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ A 校舎 15 会場

GLP-1 の分泌を促進する食品因子の検討とその機序解明
Enhancement of glucagon-like peptide-1 secretion by food factors
○滝川 雅仁、栗本 雄太、津田 孝範（中部大応生）
○Masahito TAKIKAWA,Yuta KURIMOTO,Takanori TSUDA (Chubu Univ.)

【目的】Glucagon-like peptide-1（GLP-1）は、消化管下部の内分泌細胞である L 細胞で産生、分泌されて血中グルコース濃度に依存したインスリン分泌刺激作用や膵β細胞保護・増殖促進作用を有することが知られている。これまでに一部の糖質や脂肪酸、食品由来ペプチドが GLP-1 の分泌を促進することが報告されている。本研究では、GLP-1 の分泌促進に関与する食品因子を明らかにし、その機序を解明することを目的とした。

【方法】マウス大腸由来の GLP-1 産生細胞株を定法に従い培養した後、各種食品因子を投与し、培地中へ分泌される Total GLP-1 の濃度を ELISA により測定した。分泌を促進した成分については、さらに構造活性相関や分泌促進機構に関与する分子の挙動を検討した。

【結果】種々の食品因子の投与による GLP-1 の分泌促進作用を検討した結果、分泌促進作用を有する食品因子を明らかにした。分泌促進成分については、その構造と分泌促進作用には、ある程度の相関が認められた。現在、分泌促進機構についての検討を行うとともに、動物個体における作用の検証を進めている。

glucagon-like peptide-1, diabetes

講演番号：4A15a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ A 校舎 15 会場

米胚乳ペプチドはラットにおいて GLP-1 分泌を促進して血糖上昇を抑制する

Rice peptide stimulates GLP-1 secretion and suppresses the increase of plasma glucose in rats

○石川 結貴[1]、比良 徹[2]、藤井 幹夫[3]、門脇 基二[4]、原 博[2] ([1]北大農生機化、[2]北大院農応生科、[3]亀田製菓、[4]新潟大院自然研)
○ Yuki ISHIKAWA[1], Tohru HIRA[2], Mikio FUJI[3], Motoni KADOWAKI[4], Hiroshi HARA[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Univ., [3]KAMEDA SEIKA CO., LTD., [4]Niigata Univ.)

【目的】Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)は、下部消化管（主に回腸）に多く存在する消化管内分泌細胞 L cell から分泌される消化管ホルモンである。GLP-1 は GIP とともにインクレチンと呼ばれ、インスリン分泌促進作用、胃排出抑制作用、食欲抑制作用などを持つ。GLP-1 の分泌は消化管腔内のグルコース、脂肪酸などにより刺激されるが、食品タンパク質／ペプチドによる GLP-1 分泌については不明な点が多い。本研究では、米由来のタンパク質／ペプチドに GLP-1 分泌促進作用があるか、それによる血糖上昇抑制作用が見られるかを、培養細胞およびラットを用いて検討した。
【方法】＜酵素加水分解物の作成＞ 米由来タンパク質として米胚乳タンパク質（RPe）を用い、その加水分解物を調製した。パパインにより 55℃, 60 分間処理、またはペプシンにより 37℃で 30 分もしくは 60 分間処理後、中和し、凍結乾燥したものを使用した。
＜培養細胞での GLP-1 分泌活性評価＞ マウス大腸由来の GLP-1 産生細胞株（GLUTag）を用いて、種々の RPe 加水分解物による GLP-1 分泌活性を検討した。48well プレートにてサブコンフルエントまで GLUTag 細胞を培養し、Hepes バッファーに溶解した試料溶液中で 60 分インキュベートした。上清を回収し、GLP-1 濃度を ELISA にて測定した。
＜ラットでの血糖上昇抑制効果の検討＞ SD 系雄性ラット(6 週齢)を 25%カゼイン食(AIN-93G 準拠)にて馴化後、一晩絶食させ、各種試料の経口投与下で腹腔内糖負荷試験(IPGTT)を行った。また、RPe 加水分解物投与後の GLP-1 分泌応答を観察するため、投与 15 分後に麻酔下にて門脈より採血を行い、血漿中 GLP-1 濃度を測定した。
【結果】GLUTag 細胞において、RPe の各種酵素加水分解物により GLP-1 分泌が誘導され、その作用は陽性対照として用いたトウモロコシペプチドよりも強かった。
ラットにおいて、RPe を 2 g/kg BW で経口投与することにより、グルコース負荷後 15 分での血糖上昇がコントロール群と比較して有意に抑制された。一方で、小麦タンパク質、大豆タンパク質では、血糖上昇抑制は確認されなかった。また、RPe ペプシン分解物の経口投与（1 g/kg、2 g/kg）により、用量依存的な血糖上昇抑制が見られた。RPe ペプシン分解物投与 15 分後の門脈血を採取したところ、コントロール群と比較して有意に高い GLP-1 レベルが確認された。
以上の結果から、米胚乳タンパク質（RPe）由来のペプチドには、経口投与で血糖上昇を抑制する作用があり、それには GLP-1 分泌量の増加が関与していることが示唆された。

glucagon-like peptide-1 (GLP-1), rice protein, glucose tolerance

講演番号：4A15a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ A 校舎 15 会場

食用菊「モッテノホカ」成分による PC12 細胞の神経突起伸長作用は P38MAPK のリン酸化を抑制することにより増強する

Neurite outgrowth in PC12 cells by components from Dendranthema X grandiflorum cv. 'Mottenohoka' is enhanced by suppressing phosphorylation of p38MAPK

○仁科 淳良[1]、纐纈 守[2]、二ノ宮 真之[2]、木村 博一[3] ([1]米沢女子短期大学、[2]岐阜大学、[3]国立感染研)
○Atsuyoshi NISHINA[1], Mamoru KOKETSU[2], Masayuki NINOMIYA[2], Hirokazu KIMURA[3] ([1]Yonezawa Women's Junior College, [2]Gifu University, [3]National Institute of Infectious Diseases)

【目的】
認知症やストレス性の抑うつは神経細胞の死滅が原因の一つとなって引き起こされることが分かっている。一方、神経細胞中のマップキナーゼ（MAPK）が活性化されることにより、分化誘導や神経細胞死抑制が起こる。さらに海馬中の MAPK 活性化により抑うつが軽減できることが報告されている。我々は、山形県産農産物から種々の溶剤を用いて抽出物を調製し、各抽出物の PC12 細胞に対する作用を予備実験的に測定した。結果、山形県特産の食用菊「モッテノホカ」の極性画分が PC12 細胞の MAPK を活性化することが分かった。今回、モッテノホカ抽出物の、MAPK 活性化成分の化学構造の同定と活性成分が PC12 細胞の MAPK を活性化する機構について検討した経過を報告する。
【方法】
各種クロマトグラフィーを使用し、モッテノホカのメタノール抽出物から 3 種類の MAPK 活性化成分を単離し、MS、NMR 等により化学構造の同定を試みた。活性成分の作用測定には PC12 細胞を使用し、ウエスタンブロットと免疫染色により各種 MAPK のリン酸化を測定することにより各化合物の作用を比較した。
【結果】
活性を有する抽出物の主成分が luteolin と acacetin であることが分かった。精製した luteolin または acacetin で PC12 細胞を刺激することによりは ERK1/2、p46/54 JNK、p38MAPK のリン酸化が促進されるとともに、神経突起伸長の指標であるニューロフィラメント M（NFM）がわずかに増加した。陽性対照の NGF は PC12 細胞の ERK1/2、Akt、p46/54 JNK のリン酸化を促進するとともに NFM が顕著に増加した。しかし、NGF の p38MAPK に対する作用は認められなかった。luteolin または acacetin の ERK1/2 活性化が U0126 により抑制され K252a または EGF 受容体阻害剤で変化しなかったことから、luteolin と acacetin は、細胞膜上の Trk や EGF 受容体とは別の経路で古典的 MAPK 経路を活性化すると考えた。luteolin または acacetin で PC12 細胞を刺激し、2 日間培養後に神経突起伸長が認められたが、NGF で刺激後の神経突起伸長は、luteolin または acacetin と比較して顕著であった。SB203580（p38MAPK リン酸化阻害剤）で処理してから luteolin または acacetin で刺激することにより神経突起伸長が改善されるとともに p38MAPK 阻害剤未処理と比較して NFM が有意に増加したことから、本研究で用いた実験系では、p38MAPK のリン酸化の有無が神経突起伸長を左右している可能性がある。

MAP kinase, depression, neurite outgrowth

講演番号：4A15a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ A 校舎 15 会場

血管弛緩性ペプチド Trp-His（WH）は筋管細胞の AMP キナーゼを活性化する。

Trp-His（WH） activates AMPK in L6 myotubes.

○曽我 実[1]、大橋 彩加[1]、谷口 恵実[1]、滝川 雅仁[1]、松井 利郎[2]、津田 孝範[1] ([1]中部大・応生、[2]九大院・農)
○Minoru Soga[1], Ayaka Ohashi[1], Megumi Taniguchi[1], Mashahito Takikawa[1], Toshiro Matsui[2], Takanori Tsuda[1] ([1]Chubu Univ., [2]Kyushu Univ.)

【目的】Trp-His（WH）は、血管弛緩作用の他、抗動脈硬化作用が報告されている多機能性のジペプチドである。一方演者らは、アントシアニンやローヤルゼリーをはじめとする食品因子の細胞内エネルギー代謝を制御する AMP-activated protein kinase (AMPK)を介した糖尿病予防・抑制作用を明らかにしている。本研究では、WH の新たな機能性開発の点から AMPK の活性化とその作用機序の解明を目的とした。

【方法】ラット由来の筋芽細胞株 L6 を定法に従い培養・分化誘導し、筋管細胞を得た。これを骨格筋のモデルとして WH の投与による AMPK の活性化作用、細胞内への糖取り込みを測定した。さらに AMPK の活性化作用機序、WH の細胞内移行に関わるペプチドトランスポーターの関与を検討した。

【結果】WH の投与は AMPK を活性化させ、インスリン非依存的に細胞内への糖取り込みを有意に上昇させるが、これらの変化は AMPK 阻害剤処理により消失した。WH の投与は AMP/ATP 比を上昇させ、上流キナーゼ LKB1 のノックダウンにより WH の AMPK 活性化作用は消失した。一方 WH の AMPK 活性化作用には CaMKK 経路も関与することが示唆された。
現在さらに詳細な解析を行うとともに、WH の細胞内移行を担う可能性のある各種ペプチドトランスポーターの関与を検討中である。

AMP-activated protein kinase, dipeptide

講演番号：4A15a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ A 校舎 15 会場

フィタン酸によるヒストン脱アセチル化酵素活性化作用
Effect of phytanic acid on histone deacetylase activity
○長井 薫（山梨大院医工総合）
○Kaoru NAGAI (Univ. Yamanashi)

【目的】分枝脂肪酸であるフィタン酸は、クロロフィルの代謝中間体として知られ牛肉等に含まれている。フィタン酸の蓄積が病因とされている遺伝性疾患であるレフサム病は、小脳性運動失調や多発性神経炎等の神経系の異常を示す事が知られている。一方で近年、ヒストンの翻訳後修飾や DNA のメチル化等に依存し、遺伝子配列に依存しない遺伝子発現調節機構であるエピジェネティクスの神経系における重要性に注目が集まっている。ヒストン脱アセチル化酵素(Hdac)はエピジェネティクス転写調節に関与する酵素であり、この阻害剤が神経変性疾患の予防効果を有することが報告され注目を集めている。また、不飽和脂肪酸や低級脂肪酸類が Hdac 阻害剤として作用することが知られており、これらの神経系の細胞への作用についても研究が進められている。
　本研究の目的は、フィタン酸の Hdac 活性制御作用についての検討を行うことで、フィタン酸の中枢神経系内の細胞のエピジェネティクス状態および細胞機能に与える影響について明らかにすることである。
【方法】フィタン酸の Hdac 活性への作用については、蛍光合成基質を用いた酵素活性測定法により定量評価を行った。神経膠腫細胞系 C6 グリオーマ細胞の細胞内ヒストンアセチル化量への作用については、一定時間処理後の細胞内のアセチル化ヒストンに対する ELISA 法により解析を行った。Hdac 活性化作用の細胞における機能については、Hdac 阻害剤による C6 細胞への増殖抑制効果に対するフィタン酸の阻害作用から評価を行った。
【結果】酵素活性に対する影響を検討した結果、驚くべきことに不飽和脂肪酸や低級脂肪酸で見られる Hdac 阻害効果とは反対に、フィタン酸は Hdac 活性化作用を示した。また、細胞レベルにおいても、ヒストンのアセチル化量を有意に低下させる作用が認められた。さらに、Hdac 阻害剤による C6 細胞の増殖低下作用を抑制する作用が認められた。これら結果は、フィタン酸の摂取が体内におけるエピジェネティクス状態に影響する可能性があることを示唆している。

Phytanic acid, histone deacetylase, epigenetics

講演番号：4A15a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ A 校舎 15 会場

コムギ由来ペプチドの新しい機能性
Novel functions of wheat-derived dipeptide
○山本 裕佳子[1]、水重 貴文[1,2]、金本 龍平[1]、新村 由記[3]、大日向 耕作[1]（[1]京大院・農・食品生物、[2]京大・学際融合・生理化学研究ユニット、[3]日清ファルマ(株)）
○Yukako YAMAMOTO[1], Takafumi MIZUSHIGE[1,2], Ryuhei KANAMOTO[1], Yuki SHIMMURA[3], Kousaku OHINATA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Nisshin Pharma Inc.)

【目的】食品由来成分と神経系の相互作用の詳細は不明な点が多い。本研究では、コムギグルテンの酵素消化物中に見出された抗炎症ジペプチド pGlu-Leu（ピログルタミルロイシン；pEL）に着目し、その情動調節に及ぼす影響をマウス行動試験により検討した。
【方法】実験動物は 4 週齢の雄性 ddY マウスを用いた。サンプルを投与し 30 分後に行動試験を行った。抗うつ作用は強制水泳試験により、抗不安作用は高架式十字迷路試験により検討した。強制水泳試験では、25℃の水を入れた直径 10 cm の水槽にマウスを入れ、6 分間の無動時間を supermex（室町機械）を用いて測定した。無動時間が減少した場合に、抗うつ活性ありと判定した。高架式十字迷路試験には、壁のあるクローズドアームと壁のないオープンアームからなる高さ 50 cm の十字迷路を使用し、5 分間の行動を観察した。
【結果】強制水泳試験において pEL 投与（1－30 mg/kg, i.p.）により、用量依存的な無動時間の減少が認められた。したがって、pEL が抗うつ作用を示すことが明らかとなった。pEL の構成アミノ酸である pE 及び L の投与により無動時間は減少しなかったことから、pEL はジペプチドとして抗うつ作用を示していると考えられる。また、セロトニン 5-HT_{1A} 受容体アゴニストが抗うつ作用を示すことが知られているが、pEL による抗うつ作用は、セロトニン 5-HT_{1A} 受容体アンタゴニストにより阻害されなかったことから、5-HT_{1A} 受容体の活性化を介していないことが明らかとなった。さらに、高架式十字迷路試験を行ったところ、pEL の腹腔内投与によりオープンアームへの進入回数の割合が増加し、抗不安作用を示すことが明らかとなった。以上より、pEL は抗うつ作用と抗不安作用とを併せ持つことを見出した。

dipeptide, antidepressant-like activity, anxiolytic-like activity

講演番号：4A15a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ A 校舎 15 会場

食刺激が離乳期のマウス大脳皮質味覚野・体性感覚野へ及ぼす影響の解析

Influence of food stimulation in gustatory and somatosensory cortex of postnatal mouse

○伊藤 俊輔、青地 俊亮、藍澤 広行、三坂 巧（東大院農生化・応生化）
○Shunsuke Ito,Shunsuke Aoji,Hiroyuki Aizawa,Takumi Misaka (Dept.Appl.Biol.Chem, The Univ of Tokyo)

【目的】　食品摂食時の感覚は大脳皮質の味覚野や体性感覚野において認識されるが、食経験による大脳皮質の神経回路構築についての知見は少ない。我々はこれまで、離乳期のマウスが固形食を摂取することで、数日以内にシナプス関連タンパク質であるSNAP25発現量が大脳皮質味覚野・体性感覚野において増加する事、また、離乳期に新規の食刺激であるカプサイシンを摂取させることによりSNAP25タンパク質発現が増加するという知見を得ている(Kawakami et al., Neuroscience 2012)。これらの結果は、離乳期においてマウスが食刺激を受容し、脳神経回路の変化が起きたことのマーカーとしてSNAP25が有用であることを示唆している。
本研究では、大脳皮質の脳神経回路構築に離乳期の食事が果たす役割についての知見を得ることを目的に、離乳期の食事の種類を変化させることが、SNAP25タンパク質発現へ及ぼす影響を観察した。また先行研究においてSNAP25タンパク質の発現量が減少した8週齢のマウスに、離乳期においてSNAP25発現量を増加させるカプサイシンを摂取させることで、離乳期という特定の時期に食刺激を受容することが、大脳皮質味覚野・体性感覚野におけるSNAP25タンパク質発現へ及ぼす影響を観察した。
【方法】　実験に用いたC57BL/6Jマウスは生後18-19日において食餌を摂取し始める。この時期のマウスに異なる食事（1 固形食,2 流動食, 3 母乳のみ）を与え、これらのマウスの大脳皮質味覚野・体性感覚野を切り出したサンプルを用い、抗SNAP25抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した。次に、免疫組織染色法を用い、大脳皮質味覚野・体性感覚野におけるSNAP25タンパク質蓄積の差異を検討した。次にウェスタンブロッティング及び免疫組織染色法を用いた解析により、8週齢においてカプサイシン摂取がSNAP25タンパク質発現へ及ぼす影響を観察した。
【結果】　ウェスタンブロッティングの結果、SNAP25 タンパク質の発現量は、食事を摂取する以前の生後 17 日齢マウスと比較し、生後 21 日齢の固形食摂取マウスでは 1.4 倍、流動食摂取マウスでは 1.1 倍、母乳のみ摂取したマウスでは 0.7 倍となった。また免疫組織染色法による観察の結果、SNAP25 タンパク質蓄積部位は食事の差によって変化しなかった。また予備検討において 8 週齢マウスにカプサイシンを摂取させた結果、この時期のカプサイシン摂取は SNAP25 発現に及ぼす影響が小さい傾向が認められる。これらの結果は、離乳期という特定の時期の食事が SNAP25 発現量増加の一因であることを示唆している。

SNAP25, plasticity, taste

講演番号：4A15a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ A 校舎 15 会場

ブラジル産プロポリス抽出物による小胞体ストレスからの Neuro2a 細胞保護効果
Neuroprotective effect of Brazilian propolis extracts on endoplasmic reticulum stress induced cell death
○石合 忍[1]、田原 渉[2]、山本 悦子[2]、山本 倫大[2]、長井 薫[1] ([1]山梨大院、[2]日本自然食品（有））
○Shinobu ISHIAI[1], Wataru TAHARA[2], Etsuko YAMAMOTO[2], Rindai YAMAMOTO[2], Kaoru NAGAI[1] ([1]Yamanashi Univ., [2]Nihon Natural Foods Co., Ltd.)

【目的】プロポリスは、ミツバチが木や植物の新芽や樹脂から作る膠状物質であり、これまでに成分の同定に関する研究や多様な生理活性が報告されている。また、産地によりその含有成分や生理作用が異なることも知られている。近年、プロポリスの脳機能改善効果が報告されているが、神経細胞への直接的な作用については明らかになっていない。アルツハイマー病やパーキンソン病など多くの神経変性疾患は、小胞体ストレスによる神経細胞死が共通の機序であることが知られている。
　本研究の目的は、ブラジル産プロポリスによる小胞体ストレスに対する神経細胞保護効果を明らかにすることで、神経変性疾患予防食品としての可能性を検討することである。
【方法】ブラジル産プロポリス原塊から 80%エタノールによる成分抽出を行い、その抽出画分について神経保護効果の検討を行なった。神経細胞モデルとして Neuro2a 細胞を用い、ツニカマイシンまたはタプシガルギン添加による小胞体ストレス誘導からの細胞死抑制効果について、生細胞数の定量評価により解析を行なった。細胞保護機構として、カスパーゼの活性化や小胞体シャペロンの発現に注目し解析を行なった。
【結果】ブラジル産プロポリス抽出成分は、Neuro2a 細胞において小胞体ストレスからの細胞保護効果を有することを見出した。また、保護効果の作用機序として小胞体シャペロンの 1 つである 78 kDa glucose-regulated protein（Grp78）の発現誘導を介することが明らかとなった。本結果は、ブラジル産プロポリスが神経変性疾患予防作用を有する健康食品として利用できる可能性を示唆している。

propolis, neuroprotective effect, endoplasmic reticulum stress

講演番号：4A15a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ A 校舎 15 会場

抗酸化食品成分によるアルツハイマー病の予防に関する動物モデル研究

The Role of Antioxidants in Prevention of Alzheimer's Disease using Animal Models

○芝原 恵、田村 南、Bruno Herculano、久恒 辰博（東大院・新領域・先端生命）
○Megumi Shibahara,Minami Tamura,Bruno Herculano,Tatsuhiro Hisatsune (Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo)

【目的】アルツハイマー病（AD）の危険因子の一つに糖尿病があり、発症のリスクを倍増させることが知られている。当研究室ではこれまでに、高脂肪食（HFD）の給餌により AD モデルマウスの糖代謝を変化させた糖尿病併発型アルツハイマー病モデルマウスを用いた研究を行ってきた。このモデルマウスでは、文脈恐怖条件付け記憶行動試験の結果、空間記憶機能の障害が観察されており、その原因として脳血管あるいは脳組織内の活性酸素種の増加が推定された。そこで本研究では、AD モデルマウスに HFD を給餌した際に生じる記憶障害に対して、活性酸素除去作用を持つ高機能性食品成分を投与することで記憶障害が防御できるかどうかを明らかにすると共に、その防御作用のメカニズムを解明することを目的とした。
【手法】4 ヶ月齢の APPswe/PS1dE9 AD トランスジェニックマウスに２ヶ月間 HFD を給餌した。HFD 給餌開始２週間後から抗酸化食品成分であるカルノシン（0.1%）あるいは EGCG（0.5%）を飲水瓶より自由摂取させ、HFD 給餌期間終了後恐怖条件付け記憶課題により記憶機能を評価した。血液サンプルを採取し血中コレステロールあるいはインスリン濃度を測定した。その後、摘出した脳の切片を作製し、免疫組織化学染色により酸化ストレスマーカーおよび老人斑の検出を行った。
【結果】HFD 給餌を行ったトランスジェニックマウスにおいて、通常食を給餌した群と比較して有意な記憶障害が観察された。HFD 給餌と併せてカルノシンあるいは EGCG を投与した群では、通常食群と同程度の記憶能力が認められ、記憶能力の低下が改善されることが分かった。また、記憶能力が低下した HFD 給餌群では酸化ストレスマーカーの RAGE 発現量の増加および血管の拡張が観察された。なお、抗酸化物質投与群では血管の拡張は見られなかった。以上の結果を踏まえ、現在は脳血管に対する食品成分の保護作用を調べるため、インビトロ脳血管培養系などを用いて解析を進めている。

Alzheimer's Disease, high fat diet, antioxidant

講演番号：4A15a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:12～ A 校舎 15 会場

高機能食品素材の脳老化に対する予防・改善効果の評価に適した人体用 MRI 脳画像計測法の確立

Comprehensive MRI analysis which evaluates brain aging and its prevention by life-style improvement

○樋口 陽太[1]、大庭 彩香[1]、阿部 欣史[1]、陳 揚[1]、左達 秀敏[2]、中村 純二[2]、時光 一郎[2]、久恒 辰博[1] ([1]東大院・新領域・先端生命、[2]花王株式会社・ヒューマンヘルスケア研究センター)
○Yota HIGUCHI[1], Ayaka OHBA[1], Yoshifumi ABE[1], Yo CHIN[1], Hidetoshi SADACHI[2], Junji NAKAMURA[2], Ichiro TOKIMITSU[2], Tatsuhiro HISATSUNE[1] ([1]Dept. Integrated Biosciences, Univ. of Tokyo, [2]Human Health Care, Kao Corporation)

＜目的＞当研究室ではこれまでに動物モデル（マウス・ラット・サル等）を用いて、脳老化による記憶・認知機能の低下に関して、記憶の担当部位である海馬に焦点を当てた研究を行ってきた。そして、抗炎症作用を持つ栄養成分の投与により脳老化により生ずる認知機能低下が防御できることを見出してきた（J. Alzheimer Disease 2012 online)。ヒトにおいても、食習慣の改善により脳老化が予防できる可能性が高い。そこで、本研究では、将来的な介入試験の実施を念頭に入れて、核磁気共鳴画像法（Magnetic Resonance Imaging: MRI）を用いて脳老化を画像的に評価するための方法の確立を行った。
＜方法＞健康な右利きの成人男性ボランティア（20～74）を募集し、医療機関において、医師立会いの下、MRI撮影を行った。脳の加齢変化を捉えるためのMRI撮像法として、1）脳組織の構造的な変化（脳萎縮など）を捉える構造MRI(Structural MRI)、2）脳組織における軽微な炎症反応を捉えるために適した拡散MRI(Diffusion MRI)、 3）安静時における脳機能を便宜的に評価するRS-FMRI（Resting State-Functional MRI）を採用した。また、病的な変化の有無を確かめるため、ラクナ脳梗塞の描出に適したFlair画像と脳動脈瘤などの描出に適したMRA画像も取得した。脳画像解析においては、青年群（20～30 代)、中年群（40～50 代)、高齢者群（60 代以上）に分け、全世界的に汎用されているMRI解析ソフトSPM(Statistical Parametric Mapping)を用いて行った。特に、構造MRIデータの解析については、脳の各領域の体積変化をボクセル単位で自動解析するVBM（Voxel-Based Morphometry）ソフトウェアであるVSRAD（Voxel-based Specific Regional analysis system for Alzheimer's Disease）を用いて実施した。また、拡散MRIデータの画像解析には、DtiStudioを使用した。RS-FMRIは、SPMのエクステンションツールであるRESTを用いた。
＜結果＞最新の画像処理・統計計算手技を用いて、取得した脳 MRI 画像に関してグループ間解析を行った結果、すでに青年群(n=10)と中年群(n=10)の比較においても、統計学的に有意ないくつかの違い（年齢変化）が見出された。1）脳の各部位の体積変化に関して、中年群では青年群と比較して、大脳基底核の一部である左右のレンズ核（lentiform nucleus: 強化学習などに関与)、右側下頭頂小葉(inferior parietal lobule: ブルードマン 39 野と 40 野)、右側の中側頭回(middle temporal gyrus: 37 野)において灰白質体積が減少した。2）拡散 MRI 画像では、海馬の神経伝達を受け持つ脳弓（Fornix）ならびに大脳新皮質間の神経連絡を受け持つ脳梁の数箇所において加齢による変化を認めた。3）RS-FMRI 解析では、海馬と上側頭回・後頭回・中側頭回の機能的な結びつきが加齢により低下することを認めた。

MRI, Alzheimer's disease

講演番号：4A15a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:24～ A 校舎 15 会場

The main function of food intake is to reduce stress.

○Shuichi HASHIZUME[1,2] ([1]Idea-Creating Lab, [2]Toho Univ.)

The number of people suffering from stress is increasing worldwide, thereby resulting in a number of social problems. Therefore, it is desirable to find effective methods for controlling stress. In our previous studies, we reported the stress-reducing capacities of Tai Chi Quan (an ancient Chinese exercise that embodies the most profound concepts and principles of health and movement), stamping on an uneven floor mat[1)], aroma[2)] and ingestion of various foods and food ingredients, including a soft candy supplemented with cacao extract and whey protein, which had the highest stress-reducing capacity of 75.9%. Among all these approaches, food had the highest stress-reducing capacity.

A strong correlation was observed between sales figures of various food products and their stress-reducing capacities. The latter were measured by salivary chromogranin A levels, which are controlled by the involuntary sympathetic nervous system. These data indicate that we buy foods based on subconscious impulses and that products with higher stress-reducing capacities have higher sales figures than those with lower stress-reducing capacities. This study also indicated that hit products can be created by developing products with high stress-reducing capacities.

Food has primary (nutritional function), secondary (sensory function), and tertiary (physiological function) functions. The primary function is strongly associated with stress because malnutrition stresses the human body and its cells. The secondary function is also strongly associated with stress because likes and dislikes are considered to be connected with pleasure (low stress) and displeasure (high stress), respectively. The main and most important tertiary function is considered to be prevention of diseases, which are triggered and caused by stress. Stress is a keyword in each of these 3 functions, and we propose that the main function of ingesting food is to reduce stress. In future, various foods with high stress-reducing capacities, which are controlled by the involuntary sympathetic nervous system, will be developed to prevent many diseases.

1) Hashizume S., Kamada A., Kawano K., Kokubo H., Yamamoto M., Katsuragawa H. and Watanabe T.: Stamping on an uneven floor mat leads to stress reduction. *J. Intl. Soc. Life Info. Sci.*, 27(1): 73-77, 2009.
2) Hashizume S., Kawano K., Sato T., Kokubo H., Kamada A., Yamamoto M., Katsuragawa H. and Watanabe T.: Stress-reducing activity of aroma. *J. Intl. Soc. Life Info. Sci.*, 29(1): 76-81, 2011.

stress-reducing capacities, hit products, chromogranin A

講演番号：4A15a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:36～ A 校舎 15 会場

β-ユーデスモールの飲用による自律神経調節作用

β-Eudesmol ingestion modulates autonomic nerve activities.

○小原 一朗[1]、北尾 紗代子[1]、岡田 紘幸[1]、小山田 千秋[1]、高橋 千佳[1]、眞鍋 簡利[1]、形山 幹生[1]、永井 克也[2]([1]キリン株式会社 健康技術研究所、[2]株式会社 ANBAS)

○ Kazuaki OHARA[1], Sayoko KITAO[1], Hiroyuki OKADA[1], Chiaki OYAMADA[1], Chika TAKAHASHI[1], Fumitoshi MANABE[1], Mikio KATAYAMA[1], Katsuya NAGAI[2] ([1]Kirin Co., Ltd., Research Laboratories for Health Science and Food Technologies, [2]ANBAS Co.)

【目的】

ホップの芳香成分はビールの香味構築において重要な役割を果たしているが、その主要な成分の一つであるリナロールの「香り提示」には鎮静効果や自律神経調節作用などが知られている。一方で、ホップには香味上重要ではあるものの「香り提示」が難しい低揮発性芳香成分が含まれていることも多く、この様な成分の機能性評価では「飲用」時の評価を行うことが重要である。そこで、本研究ではホップの中でもヘルスブルッカー種に特徴的に含まれ、比較的揮発性の低いセスキテルペンの一種であるβ–ユーデスモールに着目し、その自律神経調節作用について「飲用」時の効果を中心に明らかとすることを目的とした。

【方法】

ウレタン麻酔下ラットに、β–ユーデスモールを経口胃内投与し、自律神経活動変化を電気生理的に測定した。また、ヒトボランティア試験（ダブルブラインドクロスオーバー試験）を行い、β–ユーデスモール飲用時の自律神経活動変化について唾液中交感神経活動マーカーにより評価した。

【結果】

β-ユーデスモールの胃内投与は、胃迷走神経（副交感神経）活動を有意に上昇させた一方、副腎交感神経の活動は有意に低下させた。これらは、ホップの代表的な芳香成分の一つで、過去に「香り提示」による副交感神経優位な自律神経調節効果が知られているリナロールの胃内投与よりも高い効果であった。このβ-ユーデスモールによる効果は、主に中枢に発現するヒスタミン H_3 受容体の阻害剤事前投与で完全に消失した。一方で、横隔膜下迷走神経切断では効果が完全には消失しなかったことから、消化管から中枢への迷走神経以外の情報伝達経路の関与が示唆された。またヒトボランティア試験では、単純計算ストレス負荷により、プラセボでは唾液中交感神経活動マーカーが有意に上昇したが、β-ユーデスモールの飲用ではその上昇が抑制された。

以上の結果から、ヘルスブルッカー種ホップに特徴的に含まれる低揮発性芳香成分であるβ-ユーデスモールの飲用が自律神経調節作用をもたらし、精神的ストレス負荷時の交感神経の興奮を抑制することを初めて明らかにした。

Autonomic nerve, β-Eudesmol, Hop

講演番号：4A16a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ A 校舎 16 会場

フラボノイドのコレステロール腸管吸収阻害機構の解析
Analyzing the Effects of Flavonoids on the inhibition of intestinal cholesterol transport
○猫橋 茉莉[1]、小川 真奈[2]、中澤 京子[1]、加藤 久典[1]、三坂 巧[1]、荻原 琢男[3]、阿部 啓子[1]、小林 彰子[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]東大農、[3]高崎健大・薬)
○ Mari NEKOHASHI[1], Mana OGAWA[2], Kyoko NAKAZAWA[1], Hisanori KATO[1], Takumi MISAKA[1], Takuo OGIHARA[3], Keiko ABE[1], Shoko KOBAYASHI[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Facl. Agri., Univ. Tokyo, [3]Dept. Pharm., Takasaki Univ. Heal. Welf.)

【目的】日本人のコレステロール摂取量および血中濃度は年々上昇しており、食事からの吸収抑制は高コレステロールに由来する疾患の予防につながる。消化管では、脂質のミセル化および小腸上皮に発現するコレステロールトランスポーター（NPC1L1 や ABCA1 等）が、コレステロール吸収を調節していると考えられているが、詳細については解明されていない。ポリフェノールには“フレンチパラドックス”が示唆するような動脈硬化を防ぐ疫学的知見があるが、そのメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、小腸においてコレステロール吸収を阻害するポリフェノールを網羅的にスクリーニングし、選抜したルテオリンおよびケルセチンのコレステロール腸管吸収阻害機構を *in vitro* および *in vivo* の系で明らかにしたので報告する。
【方法】小腸上皮のモデル細胞である Caco-2 細胞を用いて、[^{3}H]コレステロールの取り込み試験を行った。コレステロールは実際の消化管での存在形態をシミュレートしてホスファチジルコリンおよびタウロコール酸と共にミセル化させた。阻害効果をもつフラボノイドを Caco-2 細胞に添加しプレインキュベートした後、コレステロールミセルを添加しコレステロール取り込み量を測定した。また、NPC1L1 を介したコレステロール輸送に対する阻害機構を明らかにするため、ヒト腎臓由来 HEK293T 細胞に NPC1L1 を発現させ、同様にフラボノイドをプレインキュベートした後の[^{3}H]コレステロール取り込み量を測定した。さらに、7 週齢の雄 Wistar 系ラットを用いてこれらフラボノイドの血中コレステロール濃度に与える効果について検討した。ラットは普通食群、コレステロール食群およびコレステロール食 + フラボノイド胃内投与群に分け 10 日間飼育し、血中、肝臓、および糞中のコレステロールを測定した。
【結果および考察】スクリーニングで高いコレステロール取り込み阻害活性を示したルテオリンおよびケルセチンは、コレステロールのミセル形成阻害と Caco-2 の管腔側膜上への作用によりコレステロールの腸管吸収を阻害した。また、NPC1L1 強制発現 HEK293T 細胞において、ルテオリンとケルセチンによるコレステロール輸送阻害が確認された。ラットを用いた *in vivo* 試験において、ルテオリンおよびケルセチンはコレステロール摂餌によって増加した血中コレステロール濃度を数日間にわたり減少させた。以上の結果から、ルテオリンおよびケルセチンは小腸上皮におけるコレステロールの取り込みを抑制し、またラット生体内においても血中コレステロール濃度を減少させることが示された。

flavonoid, cholesterol, intestinal transport

講演番号：4A16a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ A 校舎 16 会場

フラボノイドの胆汁酸腸管再吸収阻害機構の解析
Analyzing the Effects of Flavonoids on the inhibition of intestinal bile acid transport
○小川 真奈[1]、猫橋 茉莉[2]、中澤 京子[2]、加藤 久典[2]、荻原 琢男[3]、阿部 啓子[2]、小林 彰子[2]([1]東大農、[2]東大院農生科・応生化、[3]高崎健大・薬)
○Mana Ogawa[1], Mari Nekohashi[2], Kyoko Nakazawa[2], Hisanori Kato[2], Takuo Ogihara[3], Keiko Abe[2], Shoko Kobayashi[2] ([1]Univ. Tokyo, [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo, [3]Dept. Pharm., Takasaki Univ. Heal. Welf.)

【目的】食後胆管を通じて腸管に排出される胆汁酸の 95%は、腸管から再吸収されて肝臓へと戻った後、再び腸管へ分泌される（腸肝循環）。肝臓で生合成される胆汁酸はコレステロールを原料とすることから、腸管からの胆汁酸の再吸収抑制はコレステロールからの胆汁酸への変換を促進し、その結果、血中コレステロールの低下をもたらす。本研究では、このメカニズムによる日常的に摂取する食品中成分の血中コレステロール低下作用を期待し、胆汁酸吸収抑制作用を有するポリフェノールをスクリーニングし、その詳細な抑制メカニズムを *in vitro* および *in vivo* の系で明らかにしたので報告する。
【方法】小腸上皮のモデルとしてヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を、胆汁酸として[^{3}H]タウロコール酸を用いた。Caco-2 細胞に[^{3}H]タウロコール酸を添加し、一定時間インキュベート後、液体シンチレーションカウンターで Caco-2 細胞に取り込まれたタウロコール酸の量を測定した。また、時間依存性、濃度依存性、およびナトリウム依存性を検討し、Caco-2 細胞における胆汁酸取込み機構を速度論的に解析した。さらに、Caco-2 細胞を様々なポリフェノールでプレインキュベートした後、そのポリフェノール共存下で同様の取り込み試験を行い、胆汁酸再吸収阻害成分をスクリーニングした。有意に胆汁酸取り込みを阻害したものについて、*in vivo* で評価した。すなわち、7 週齢 Wistar 系雄ラットを、普通食群、コレステロール食群およびコレステロール食＋ポリフェノール投与群に分けて 10 日間飼育し、血清、肝臓、および糞におけるコレステロール濃度に関わるパラメータを測定した。
【結果・考察】速度論的解析において、Caco-2 細胞における胆汁酸取り込みは、Eadie-Hofstee Plot により二相性を示したことから、腸管における胆汁酸の取り込みは少なくとも２つの能動輸送が関与し、またその大部分は Na^+依存型の apical sodium-dependent bile acid transporter(ASBT)によるものと考えられた。食品中に含まれる代表的なポリフェノール 36 種類を用いて胆汁酸取り込み阻害スクリーニングを行った結果、11 種のポリフェノールが有意に胆汁酸の取り込みを阻害した。このうち最も高い効果を示したケルセチンを選択し、ラットを用いて血中コレステロール低下作用を解析したところ、ケルセチンはコレステロール食で上昇した血清コレステロールを減少させた。以上より、ケルセチンは小腸上皮で胆汁酸の取り込みを阻害することにより、生体内でコレステロールを下げる可能性が示唆された。現在、血清・糞・肝臓中のその他のパラメータについて解析を続けている。

bile acid, flavonoid, intestinal permeability

講演番号：4A16a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ A 校舎 16 会場

ローヤルゼリーに含まれる 10-hydroxy-*trans*-2-decenoic acid の吸収と代謝に関する基礎的研究

Basic study for the absorption and metabolism of 10-hydroxy-*trans*-2-decenoic acid of royal jelly in rats

○成田 幸夫、加藤 健司、太田 象三、市原 賢二 (アピ（株）長良川リサーチセンター)
○Yukio Narita,Kenji Kato,Shozo Ohta,Kenji Ichihara (Nagaragawa Research Center, API Co., Ltd)

【目的】10-Hydroxy-*trans*-2-decenoic acid（10HDA）は、ローヤルゼリー（RJ）に含まれる脂肪酸であり、動物試験において高脂血症改善作用や抗うつ様作用が報告されている。吸収された 10HDA が体内でどのような代謝を受けるかは、機能性の作用メカニズムを検討するうえで重要な因子である。しかしながら、10HDA の吸収や代謝に関する報告はほとんどない。そこで、本研究ではラットを用いて 10HDA の吸収と代謝に関する基礎的な検討を行った。
【方法】実験には RJ から単離・精製した 10HDA を用いた。一晩絶食したラットに 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁した 10HDA（対照群には溶媒のみ）を経口投与し、経時的に血液および尿を採取した。採血は頚静脈および門脈から行い、尿は代謝ケージを用いて採取した。採取した試料は除タンパク処理を行い、遠心後の上清をフィルター濾過して UPLC 分析に供した。
【結果および考察】UPLC 分析において、10HDA 経口投与後にラットから採取した血漿中および尿中に 10HDA に由来すると思われる代謝物のピークが認められた。この代謝物をラットの尿から単離・精製し、NMR を用いて構造解析を行なったところ、2-decene-1, 10-dioic acid（2DDA）と同定された。次に、10HDA を 5mg、15mg および 50mg/kg の用量で経口投与し、2DDA の血漿中濃度および尿中排泄量を測定した。その結果、血漿中 2DDA 濃度および尿中 2DDA 排泄量は、ともに 10HDA の投与量に依存して増加した。一方、未変化体の 10HDA の血漿中濃度は、2DDA と比較して著しく低く、10HDA は吸収された後、速やかに 2DDA に代謝されると推察された。そこで、肝臓で代謝を受ける前の 10HDA 濃度を調べるため、門脈血中の 10HDA 濃度を測定した。門脈血中の 10HDA 濃度は、頚静脈血中の濃度と比較して顕著に高く、小腸粘膜から吸収された 10HDA は門脈を経て、主に肝臓で 2DDA に代謝されることが示唆された。なお、投与後 30 分までの門脈血中の 10HDA と 2DDA の血中濃度－時間曲線下面積（AUC）を比較したところ、吸収された 10HDA の半分以上が 2DDA に代謝されることが示唆された。以上の結果より、経口投与された 10HDA は直ちに小腸より吸収されて門脈に入り、主に肝臓で速やかに 2DDA に代謝されることが示唆された。また、2DDA の血漿中濃度および尿中排泄量は、10HDA 投与量に依存した変化を示し、2DDA が 10HDA を経口摂取した際の吸収の指標として利用できる可能性が示された。さらに、10HDA を含む RJ（凍結乾燥品）をラットに経口投与した場合も、2DDA の血漿中濃度および尿中排泄量は、RJ の投与量に依存した変化を示すことを確認した。

royal jelly, 10-hydroxy-*trans*-2-decenoic acid, metabolism

講演番号：4A16a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ A 校舎 16 会場

多継代 Caco-2 のトランスクリプトミクスによる形質変化解析

Transcriptomics of the functional change of Caco-2 cells at high passage numbers

○鈴木 千尋[1]、勝山 真多[2]、中井 雄治[2]、阿部 啓子[2]、小林 彰子[2] ([1]東大農、[2]東大院農生科・応生化)
○ CHIHIRO SUZUKI[1], SHINTA KATSUYAMA[2], YUJI NAKAI[2], KEIKO ABE[2], SHOKO KOBAYASHI[2] ([1]Univ. Tokyo, [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo)

【目的】我々の研究室ではヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を用いて食品栄養成分の吸収機構を解析しているが、Caco-2 細胞の継代を重ねるにつれて、被験化合物の透過性が増減する現象が見られた。このことから、Caco-2 細胞は継代数が上昇することにより様々な食品栄養成分の吸収・排出に関わる因子が変動し、これらを詳細に検討することが食品栄養成分の吸収機構の解明に繋がるのではないかと考えた。本研究では Caco-2 細胞の多継代による形質変化に着目し、継代数が異なる Caco-2 細胞の遺伝子発現を網羅的に比較することにより、Caco-2 細胞における食品栄養成分の吸収に関わる因子を解明することを目的とした。
【方法】Caco-2 細胞の、それぞれ多継代群（high passage 群、以下 HP 群）と継代数の少ない群（low passage 群、以下 LP 群）から total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行った。遺伝子発現解析には GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 アレイを使用した。遺伝子発現プロファイルについて qFARMS による正規化後、ウェブツール（DAVID や QuickGO）でのアノテーション解析等によるマッピングやパスウェイ解析を行い、特にトランスポーター、輸送、および薬物代謝に関わる遺伝子の発現変動を中心に抽出した。有意に変動した食品栄養成分の吸収に関与する遺伝子群について、実際の吸収性を HP 群および LP 群で比較した。グルコースの取り込み試験には[^{3}H]デオキシグルコースを、フラボノイドの吸収性試験にはヘスペレチンを主に用いて、それぞれ液体シンチレーションカウンターおよびクーロメトリック ECD により化合物濃度を測定した。
【結果・考察】DNA マイクロアレイの結果、HP 群では LP 群に比べグルコーストランスポーターの発現が高かったのに対し、グルコースの取り込み試験における取り込み速度には有意差がなかった。一方、DNA マイクロアレイでは HP 群は TCA サイクルおよび電子伝達系といった酸化的 ATP 産生経路に関わる遺伝子の発現が低下しており、ATP 合成能が低下していることが示唆されたため、細胞内の ATP を定量した。細胞内 ATP 量は LP 群に比べて HP 群で有意に低く、DNA マイクロアレイの結果を支持していた。Caco-2 はヒト結腸癌由来の細胞である。癌細胞の特徴として、好気条件下であっても酸化的リン酸化ではなく解糖系を優先する Warburg 効果が知られている。以上の結果から、継代を重ねた Caco-2 は癌細胞としての特徴を強く表すことが示唆された。一方、フラボノイドの透過性は HP 群で有意に低かったことから、現在、さらに DNA マイクロアレイの結果を解析し、グルコースおよびフラボノイドの腸管吸収に関わる因子を探っている。

Caco-2, transcriptomics, transporter

講演番号：4A16a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ A 校舎 16 会場

ラットにおける肝臓脂肪蓄積に及ぼす MFGM の抑制効果
Inhibitory effect of MFGM on the accummulation of fat in the rat liver.
○小田垣 成美[1]、瀧口 ひとみ[1]、内田 健治[2]、山田 潔[1]、東 徳洋[1] ([1]宇都宮大農、[2]よつ葉乳業株式会社)
○Narumi Odagaki[1], Hitomi Takiguchi[1], Kenji Uchida[2], Kiyoshi Yamada[1], Norihiro Azuma[1] ([1]Utsunomiya Univ., [2]Yotsuba milk products CO.,LTD)

【目的】乳脂肪球皮膜（MFGM）は、脂肪球が乳汁中に分泌される際に細胞質由来の膜に包み込まれ、更に乳腺上皮細胞の細胞膜に包み込まれた二重膜構造を成しており、バター製造時の副産物であるバターミルク画分中に排除される。バターは他の脂肪源に比べて高コレステロール血症を引き起こしやすいことが知られているが、バターから MFGM を排除する前のクリームはコレステロール値を上げないという報告がある。また、われわれは MFGM が *In vitro* において、脂肪細胞の脂肪滴形成抑制効果を示唆するデータを得ている。本研究では乳脂肪を安定なエマルションにして乳中に分散させている MFGM の脂肪球形成との関わりに着目し、MFGM の経口摂取による血清コレステロール値、脂肪蓄積の抑制効果を検討することにより、メタボリックシンドローム抑制効果の可能性を探ることを目的としている。
【方法】4 週齢の Wistar 系雄ラットを市販の飼育飼料（CE-2）で 10 日間馴化させ、高コレステロール食（HC 群）、高コレステロール＋MFGM 食（MFGM 群）を 14 日間自由摂取させた。実験食の組成は 1%コレステロール・0.25%コール酸ナトリウム添加食を基本食とし（HC 群）、5.5%の MFGM の添加分は脂質成分と蛋白質成分から差し引いた（MFGM 群）。実験食の投与期間中の 8 日目に採血を、最終日に採血と肝臓摘出を行った。血液を遠心分離した後、血清中の総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸の測定を行った。さらに、摘出した肝臓を用いて凍結切片の Oil Red O 染色による脂肪蓄積の観察と、Folch 法による脂質抽出を行った。
【結果】
肝臓凍結切片の Oil Red O 染色の結果、HC 群では赤く染色された脂肪滴の蓄積が顕著であったのに対して、MFGM 群では脂肪滴の蓄積抑制が観察された。さらに MFGM 群の脂肪滴の大きさは HC 群に比べて小さくなる傾向もみられた。また肝臓から抽出した全脂質量は HC 群が MFGM 群の約 2.5 倍であった。血清中の HDL コレステロール濃度の測定結果には大きな変化は認められなかったが、総コレステロール、LDL コレステロール、トリグリセリドの濃度は HC 群に比べ MFGM 群で抑制される傾向にあった。これらの結果から MFGM の経口摂取による脂質、コレステロールの吸収抑制への効果が期待される。

MFGM, Cholesterol, Fatty Liver

講演番号：4A16a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ A 校舎 16 会場

AV シャント血栓モデルを用いた麹エキス末の抗血栓効果

Antithrombosis effect of koji extract using Arteriovenous shunt thrombosis model

○菅 美奈子[1]、山下 裕輔[1]、武島 一仁[1]、丸 勇史[1]、脇本 真之介[2]、脇本 吉清[2]、金 武祚[1]([1]株式会社ファーマフーズ、[2]ワキ製薬株式会社)
○MINAKO SUGA[1], YUSUKE YAMASHITA[1], KAZUHITO TAKESHIMA[1], ISAHUMI MARU[1], SHINNOSUKE WAKIMOTO[2], YOSHIKIYO WAKIMOTO[2], MUJYO KIM[1] ([1]PHARMA FOODS INTERNATIONAL CO.,LTD, [2]WAKI PHARMACEUTICAL CO.,LTD)

【目的】

血管内の血液が凝固し塊を形成し、線溶作用とのバランスが崩れると、血栓になり、これにより血管を塞がれると虚血、梗塞がおこる。我々は、抗血栓効果を有する機能性食品素材の開発を目的とし、これまでに種々の食品成分からのスクリーニングを実施してきた。その中で、麹は *in vitro* 試験にて、高い抗血栓効果を有することを見出した。今回は、数種の種麹から高活性の菌株をスクリーニングすると共に、麹エキス末を作製し、その抗血栓効果を抗血栓モデルであるラット AV シャント試験により検証したので報告する。

【方法】

市販の 23 種の種麹の水抽出物を作製し、2 つの方法の *in vitro* 活性測定法を用いて種麹のスクリーニングを行なった。方法①：フィブリンプレートに対する溶解活性を溶解窓の直径（mm）により評価した。方法②：線溶酵素であるプラスミンの活性を合成基質を用いて評価した。続いて、最も活性の高い種麹エキス末を作製し、*in vivo* 試験のサンプルとした。*In vivo* 試験は、SD ラット（雄、8 w）を用いて、麹エキス末（10 mg/kg、50 mg/kg）及び水（コントロール）を各群 10 匹に 7 日間経口投与した。最終投与 1 時間後に麻酔下で、絹糸を留置したポリエチレンチューブを頚動静脈（AV）に挿入しシャントを作製した。シャント作製後、20 分間血液を循環させ、絹糸に付着したフィブリン血栓の湿重量を測定した。あらかじめ計測していた絹糸の重量と血栓湿重量の差を血栓重量とし、各検体投与における血栓重量の比較を行い、抗血栓効果を評価した。

【結果】

In vitro 試験より、複数種の種麹から抗血栓効果の高い種麹を 1 種選定した。さらに、この種麹由来の麹エキス末投与における AV シャント試験の結果、コントロール群の血栓重量が 89.3 mg であるのに対し、麹エキス末 10 mg/kg および 50 mg/kg 投与群でそれぞれ、61.7 mg、46.4 mg であった。コントロール群の血栓重量を 100 %として表すと、麹エキス末 10 mg/kg および 50 mg/kg 投与群でそれぞれ 69 %、52 %と麹エキス末を投与した濃度依存的に有意な血栓重量低下効果が確認された。

以上の結果より、麹エキス末は新たな抗血栓素材として有用な機能性食品素材であることが確認された。今後は、麹エキス末中の活性成分の同定と作用機序の解明を行なう。

Aspergillus Oryazae, Antithrombosis, fibrinolytic

講演番号：4A16a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ A 校舎 16 会場

Val-Pro-Pro、Ile-Pro-Pro 摂取が皮膚血流に与える影響

Effect of Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro on skin blood flow

○鈴木 千尋[1]、野中 敦子[1]、中村 哲平[1]、大木 浩司[1]、池谷 敏郎[2]、北風 政史[3]([1]カルピス（株)、発酵応用研究所、[2]池谷医院、[3]国立循環器病センター)
○Chihiro SUZUKI[1], Atsuko NONAKA[1], Teppei NAKAMURA[1], Kohji OHKI[1], Toshiro IKETANI[2], Masafumi KITAKAZE[3] ([1]Microbiology & Fermentation Laboratory, Calpis Co., Ltd.,, [2]Iketani Clinic, [3]National Cerebral and Cardiovascular Center)

【背景と目的】

カゼイン由来トリペプチド Val-Pro-Pro（VPP)、Ile-Pro-Pro（IPP）はアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性を有し、血圧低下作用を示すことが報告されている。また近年、VPP、IPP は血管内皮機能改善作用、血管拡張作用を示すことが明らかとなっており、これらの作用に伴い血流を増加させる可能性が考えられる。そこで、本研究では VPP、IPP の摂取が皮膚血流量に与える影響とそのメカニズムについて検討することを目的とした。

【方法と結果】

試験 1：ヘアレスマウス（8～15 週齢、♀）に VPP、IPP を単回経口投与し、レーザードップラー血流測定装置（アドバンス社製；ALF21RD）を用いて背部の皮膚血流量を測定した。その結果、対照群と比較して皮膚血流量に有意な増加が認められた。

試験 2：メカニズムを検討するため、血管拡張物質である一酸化窒素（NO）およびプロスタサイクリンの阻害剤との併用試験を行った。NO 合成酵素阻害剤（L-NAME：50mg/kg 体重）またはプロスタサイクリン合成酵素阻害剤（インドメタシン：5mg/kg 体重）を皮下投与した後に VPP、IPP を経口投与し、皮膚血流量を測定した。その結果、L-NAME の併用により VPP、IPP 投与による皮膚血流量の増加は阻害されたが、インドメタシンでは阻害されなかった。

試験 3：ヘアレスマウスに VPP、IPP を投与し、1 時間後に採血を行いマウス血中 NOx（NO_2+NO_3）濃度を測定した。その結果、VPP、IPP の用量依存的に有意な血中 NOx 濃度の上昇が認められた。

【考察】

VPP、IPP 摂取によりヘアレスマウスの皮膚血流量は有意に増加した。またこの作用は NO 合成酵素阻害剤で阻害され、さらに VPP、IPP 摂取により血中 NOx 濃度が有意に上昇することから、VPP、IPP は血中 NO 産生を介して、皮膚血流量を増加させる可能性が示唆された。

peptide, skin blood flow, nitric oxide(NO)

講演番号：4A16a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ A 校舎 16 会場

ザクロ抽出物のヒトリコンビナントマルターゼ阻害活性

Inhibitory effect of pomegranate extracts on recombinant human maltase

○川上 賀代子[1]、李 鵬[2]、裏地 美杉[1]、畑中 唯史[1]、伊東 秀之[2]([1]岡山生物研、[2]岡山大院医歯薬)
○Kayoko KAWAKAMI[1], Peng LI[2], Misugi URAJI[1], Tadashi HATANAKA[1], Hideyuki ITO[2] ([1]RIBS Okayama, [2]Okayama Univ.)

【目的】ザクロ（*Punica granatum* ）は Punicalin や Punicalagin などのエラジタンニンを多く含み、抗酸化作用、抗肥満作用、抗炎症作用など様々な機能性が報告されている。また、ザクロ花抽出物では血糖値上昇抑制作用が報告されているが、ザクロ果実に関する研究報告はない。従来、糖類水解酵素の阻害活性測定にはラット小腸由来の酵素が用いられることが多いが、本研究室ではメタノール資化性酵母を用いてヒトリコンビナントマルターゼを作製し、阻害活性評価の実験系を確立した。そこで本研究では、ザクロ果実の糖類水解酵素阻害活性を、ヒトリコンビナント酵素により評価し、さらに、その活性成分の同定を試みた。
【方法】ヒトリコンビナントマルターゼは、ヒト小腸マルターゼグルコアミラーゼの N 末端ドメインの遺伝子をメタノール資化性酵母用分泌型発現ベクター（pPICZα）に挿入し、*Pichia pastris* KM71H に形質転換して作製した。この酵母を培養して得られた培養上清を硫安沈殿後、透析して酵素の精製を行った。阻害活性の評価はマルトースを基質とし、37℃、30 min 反応を行い、遊離したグルコースをグルコース CⅡテストワコーで測定した。比較のため、ラット小腸アセトンパウダーから粗酵素を調製し、基質にマルトース、スクロースを用いて阻害活性の評価も行った。様々な産地のザクロを果皮と果肉に分け、70%アセトンで抽出、減圧濃縮した。果肉抽出物は Bond-Elut C18 を用いて糖類の除去を行った。活性の最も強かったザクロ抽出物は Diaion HP20 カラムに供し、0、10、30、50、100%メタノールで分画して、活性成分の同定を試みた。
【結果】今回作製したヒトリコンビナントマルターゼのマルトースに対する Km 及び Vmax は、7.2 mM、31.3 nmol/min/mg であった。この酵素を用いて様々な産地のザクロ抽出物の阻害活性を測定した結果、果皮より果肉のほうが阻害活性が強く、中でもイラン産の果肉抽出物が最も阻害活性が強いことが分かった。ラット小腸由来の酵素と比較すると、阻害強度に違いがあることが分かった。活性成分の同定のため、果肉抽出物を Diaion HP20 カラムで分画した結果、30%メタノール溶出画分に強い阻害活性がみられた。さらに分画を進めた結果、エラジタンニン 2 量体の Oenothein B が得られ、その阻害活性（IC_{50}）は 125 μM であり、acarbose と同等（IC_{50}＝112 μM）であった。また、その阻害様式は非拮抗阻害であることが示唆された。以上の結果から、ザクロの果肉抽出物は食後の血糖値上昇を穏やかにするための食品として有望であることが示唆された。

pomegranate, recombinant human maltase, ellagitannin

講演番号：4A16a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ A 校舎 16 会場

ウニ加工品並びにウニ魚醤のイン・ビトロ系における抗酸化性

Antioxidant activities on the processing product and fish sauce made from sea urchin gonad measured by using H-ORAC and L-ORAC methods

○原田 和樹[1]、福田 翼[1]、和田 律子[1]、平岡 亮人[1]、横山 駿[1]、島田 和子[2]、木梨 直子[3]、高村 仁知[3]（[1]水大校・食科、[2]山口県大・看護栄養、[3]奈良女大院・人間文化）
○Kazuki Harada[1], Tsubasa Fukuda[1], Ritsuko Wada[1], Ryoto Hiraoka[1], Shun Yokoyama[1], Kazuko Shimada[2], Naoko Kinashi[3], Hitoshi Takamura[3] ([1]National Fisheries Univ., [2]Yamaguchi Prefectural Univ., [3]Nara Women's Univ.)

【目的】本大会などにて、既に、我々が開発して商品化された、フグから作った「ふく魚醤」、クジラから作った発酵調味料の「くじら醤油」が持つ抗酸化性や、次世代食品機能性評価法で調べた抗炎症作用について報告してきた。今回は、ウニの生殖巣を加工して熟成させたアルコール漬瓶詰めウニ塩辛や、発酵させて作ったウニ魚醤について調べたイン・ビトロ系での抗酸化性を報告する。
【方法】試料は、市販品のアルコール漬瓶詰めウニ塩辛や、既に商品化された市販品のウニ魚醤を凍結乾燥して用いた。抗酸化性は、米国起源のH-ORAC (Hydrophobic Oxygen Radical Absorbance Capacity)法とL (Lipophillic)-ORAC法の合算値を用いて調べ、T (Total)-ORAC値が示すペルオキシラジカル消去活性で評価した。なお、L-ORAC法における試料抽出はヘキサンで行い、試料乾固は真空遠心機で行い、再溶解はアセトンで行った。トロロックスや試料に含まれる親油性物質の溶解には、定法に従って、メチル化βシクロデキストリンを用いた。単位は、μmolトロロックス当量（TE）／100 gである（以下、単位省略）。
【結果】ウニ加工品でA社のアルコール漬瓶詰め粒ウニ塩辛は、[1,976±176 (H-ORAC)] ＋[717±40 (L-ORAC)] = 2,693 (T-ORAC) であり、湿重量100 g当たりに換算すると1,349であった。B社の同塩辛は、[5,012±656 (H-ORAC)] ＋ [862±69 (L-ORAC)] = 5,874 (T-ORAC) であり、湿重量100 g当たりに換算すると3,027であった。同じ製品でも会社によって、大きな開きがあったが、全体のL-ORAC値が占める割合は、15から27%であった。先行研究により[1)]、主な脂溶性抗酸化成分はαトコフェロールである事が判明している。一方、ウニ魚醤に関しては、[13,490±732 (H-ORAC)] + [15±14 (L-ORAC)] = 13,504 (T-ORAC) であり、湿重量100 g当たりに換算すると4,293であった。ウニ魚醤は、脂分を除いて製造されるため、L-ORAC値が低く出たが、発酵過程を経ているために、H-ORAC値に大きな増大が認められ、T-ORAC値の上昇に寄与した。結果的に、ウニ魚醤は、アルコール漬瓶詰め粒ウニ塩辛の1.4から3.2倍の高いT-ORAC値を示した。
本研究は、山口県うに協同組合のサポート、並びに、JSPS科研費23500949の助成を受けたことを付記する。
1) 島田和子ら: うに塩辛の熟成貯蔵中におけるカロテノイドの消長について. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, **37**, 702-708, 1990.

antioxidant activity, processed sea urchin gonad, ORAC

講演番号：4A16a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ A 校舎 16 会場

ヒト微量アミン関連受容体から見た発酵食品由来芳香族アミンの食品機能性
Functionality of aromatic amines in fermented foods through human trace amine-associated receptors
○村上 由佳、高濱 佑成、森村 茂、太田 広人（熊大・院・自然科学）
○Yuka MURAKAMI,Yusei TAKAHAMA,Shigeru MORIMURA,Hiroto OHTA (Grad. Sci. Tech., Kumamoto Univ.)

【目的】

チラミン（TA）やフェネチルアミン（PEA）などの芳香族アミンが発酵食品中に多く含まれることはよく知られている。近年、TA や PEA に応答する hTAAR1 を含むヒト微量アミン関連受容体（hTAARs）が発見された。そこで、我々は、これらアミン類の新しい食品機能性の可能性を検証するために、hTAARs の生理機能と組織局在性について調べてきた。今回、消化器官を中心とするヒト臓器における hTAARs サブタイプの発現パターンを調べた。また、GPCR の主要シグナル伝達分子 cAMP をモニターするためのレポーターアッセイの一種 CRE-SEAP アッセイ系を構築し、hTAARs の機能解析を行ったので報告する。

【方法】

5 種類のヒト臓器（心臓, 腎臓, 胃, 小腸, 大腸）cDNA をそれぞれ鋳型とする PCR を行い、各臓器における hTAARs サブタイプ 6 種類（hTAAR1, 2, 5, 6, 8, 9）の発現パターンを調べた。次に、CRE-SEAP アッセイによる hTAARs の機能解析を行った。それぞれの hTAARs サブタイプ遺伝子を組み込んだ発現ベクターpcDNA3 をレポーターベクターpCRE-SEAP とともに HEK-293 細胞にコトランスフェクションし、TA 及び PEA に対する各受容体の応答を発光量で評価した。その際、膜発現が困難とされている hTAARs の N 末端にβ_2-アドレナリン受容体 N 末端の 9 アミノ酸を付加したキメラ受容体も作製して機能実験を行った。

【結果および考察】

各臓器における hTAARs サブタイプの発現パターンを調べた結果、hTAARs サブタイプが幅広く発現していることが分かった。特に hTAAR1 に関しては今回調べたすべての組織で発現が確認できた。大腸と胃においては hTAAR1 と hTAAR 9 のみが発現していた。培養細胞に発現させた hTAARs に対して、TA と PEA をリガンドとする CRE-SEAP アッセイを実施した結果、以前から hTAAR1 に関してはこれら 2 つのアミンに応答することが知られていたが、今回我々もキメラ受容体に対して僅かにアゴニストの応答が確認でき、同様の機能を証明することができた。他のサブタイプについても調べたが、TA と PEA に対する目立った応答はなかった。発酵食品由来及び腸内細菌によって生産された芳香族アミンが消化器官で発現する hTAAR1 に受容されることで細胞内 cAMP の亢進が起こり、それによって何らかの生理調節が行われていることが示唆された。

trace-amine associated receptors, food functionality, fermented foods

講演番号：4A16a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ A 校舎 16 会場

消化管で機能する亜鉛トランスポーターを標的にした亜鉛吸収促進因子の探索

Searching for food factors enhancing Zinc absorption

○橋本 彩子[1]、木津 久美子[2]、宮前 友策[1]、増田 誠司[1]、永尾 雅哉[1]、成田 宏史[2]、神戸 大朋[1] ([1]京大院・生命、[2]京女大・家政・食物栄養)
○Ayako Hashimoto[1], Kumiko Kizu[2], Yusaku Miyamae[1], Seiji Masuda[1], Masaya Nagao[1], Hiroshi Narita[2], Taiho Kambe[1] ([1]Grad Sch. Biostudies, Kyoto Univ., [2]Dept. of Food and Nutr., Kyoto Women' s Univ.)

【目的】亜鉛は、タンパク質の構造因子、酵素の補因子、シグナル調節因子として機能する必須微量元素である。そのため、亜鉛が不足すると、味覚障害や皮膚炎、生殖機能や免疫機能の低下など種々の症状を引き起こす。これまで我が国では、亜鉛欠乏はそれほど大きな問題として捉えられることがなかったが、近年、高齢者を中心に潜在的な亜鉛欠乏者が非常に多く存在することを示す疫学調査が相次いで報告され、対処すべき栄養問題となっている。従って、日常の食生活を通して亜鉛を充足させることが重要となるが、消化管での亜鉛吸収効率は 30%程度と低い。亜鉛吸収向上のためには、亜鉛吸収効率を改善することが肝要である。消化管での亜鉛吸収には、先天性亜鉛欠乏症（腸性肢端皮膚炎）の原因遺伝子である、亜鉛トランスポーターZIP4 が必須の役割を果たしている。ZIP4 の発現量は、体内亜鉛レベルに応じて制御されており、その発現量の増加は、細胞内への亜鉛取り込み量の増加に結びつく。本研究では、亜鉛吸収効率を改善させる食品の創成に向けて、ZIP4 の発現を増加させる食品因子の探索を行った。
【方法】食品因子による ZIP4 の発現変動の評価は、小腸上皮細胞と同様に亜鉛欠乏状態に応答して細胞表面の ZIP4 発現が増大する Hepa 細胞を用いて、培養液に種々の食品抽出物を添加し、Western blot により評価した。細胞内の亜鉛量の変動は、細胞内亜鉛量のマーカーであるメタロチオネイン（MT）の mRNA の発現変化を real-time PCR 法により評価するとともに、MT プロモーターを利用したレポーターアッセイにて詳細に検討した。また、見出したサンプルが、ZIP4 の mRNA、タンパク質の発現レベルに及ぼす影響については、real-time PCR 法、並びに細胞表面ビオチン化アッセイにより検討した。
【結果】幾つかの大豆抽出画分の中に、細胞表面の ZIP4 発現を増加させる活性を見出した。この活性と比例して、細胞内の MT の発現も増加していた。大豆抽出画分による細胞表面の ZIP4 発現の増加は、ZIP4 の mRNA 量の増加による効果ではなく、細胞膜表面からの分解を抑制した結果であった。その効果は、クラスリンや脂質ラフトを介したエンドサイトーシスにはほとんど影響を与えず、ZIP4 特異的なエンドサイトーシスの阻害による結果であると考えられた。従って、見出した大豆抽出画分には ZIP4 の発現量を増加させ、細胞内亜鉛量を増大させる因子が含まれると示唆された。消化管からの亜鉛吸収の本体である ZIP4 の発現量を増加させる活性を有する食品因子は、これまで全く報告されておらず、亜鉛栄養改善効果を持つ食品の創成に向けた極めて重要な成果であると考える。

zinc, transporter, ZIP4

講演番号：4A16a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:12～ A 校舎 16 会場

亜鉛トランスポーターZIP4 の発現を促進する大豆由来成分の単離・同定

Isolation and determination of a soybean extract-derived factor with ZIP4 expression-promoting activity

○高橋 正和[1]、大倉 克摩[1]、橋本 彩子[2]、永尾 雅哉[2]、神戸 大朋[2]、入江 一浩[3]、大東 肇[1]([1]福井県大・生物資源、[2]京大院生命・統合生命、[3]京大院農・食生科)
○Masakazu TAKAHASHI[1], Katsuma OHKURA[1], Ayako HASHIMOTO[2], Masaya NAGAO[2], Taiho KAMBE[2], Kazuhiro IRIE[3], Hajime OHIGASHI[1] ([1]Dept. of Biosci., Fukui Pref. Univ., [2]Grad Sch. Biostudies, Kyoto Univ., [3]Grad Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】亜鉛は、タンパク質の構造因子や酵素の補因子、細胞内シグナル因子などの機能を持つ微量必須金属元素であり、その欠乏症には味覚機能障害や免疫機能低下・皮膚疾患などが知られる。これら欠乏症の予防には食事からの亜鉛摂取が最も重要であるが、亜鉛の経腸吸収効率は低い。よって経腸吸収効率向上は、亜鉛欠乏症の予防・改善に役立つと期待される。ZIP4 は小腸上皮細胞の頂端側細胞膜に発現し、亜鉛吸収に必須な役割を果たしている。そこで亜鉛吸収効率の改善に役立つ食品成分を探索する戦略として、ZIP4 に注目し、ZIP4 発現促進活性を示す食品因子の探索を行った。その結果、これまでに調べた食素材の中で、特に強い ZIP4 発現促進活性を示した大豆抽出物に注目し、活性化合物を単離・同定した。

【方法】活性の確認には、ZIP4 発現細胞株である Hepa 細胞を用いた。この細胞は小腸上皮細胞と同様に、亜鉛欠乏条件下で ZIP4 の細胞膜発現量が増大する。そこで Hepa 細胞をサンプル存在下で 24 時間培養処理した後、細胞破砕物を調製し、Western 解析によって ZIP4 発現促進活性を判定した。

大豆抽出物を溶媒分画したのち、粗抽出物の ZIP4 発現誘導活性を上記アッセイ系で確認した。さらにこれを YMC-GEL ODS-A による逆相中圧カラムクロマトグラフィーや逆相 HPLC によって分画した。最終的に単離した活性成分は、各種機器分析に供して構造決定した。

【結果】大豆粗抽出物 4 g を精製に供し、逆相中圧クロマトや分取 HPLC をへて 3 種類の化合物 S-1、S-2、S-3 をそれぞれ約 100、61、64 mg ずつ単離した。これらを NMR や LC-MS/MS などの各種機器分析に供した結果、互いに類似した構造を持つ関連化合物と判明した。S-1 の活性を調べたところ、濃度依存的に明瞭な活性を示し、終濃度 0.003～0.01%（w/v）で十分な ZIP4 発現促進活性を示した。一方、S-2 と S-3 では、S-1 は対照的に ZIP 発現促進活性が認められないことが判明した。このことから、S-1 の活性には S-2 や S-3 とは異なる特有構造が関与していることが考えられた。

soybean, zinc transporter, ZIP4

講演番号：4A16a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:24～ A 校舎 16 会場

マウス小腸上皮における味覚関連遺伝子群の発現解析

Expression analysis of taste-related genes in murine intestinal epithelia

○吉岡 美紗子[1]、石丸 喜朗[1]、朝倉 富子[1]、阿部 啓子[1,2] ([1]東大院農生科・応生化、[2]KAST)
○Misako Yoshioka[1], Yoshiro Ishimaru[1], Tomiko Asakura[1], Keiko Abe[1,2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]KAST)

【目的】甘味、苦味、うま味受容体（T1Rs、T2Rs）や、下流シグナル伝達因子群（Gα-gustducin、Phospholipase C-β2(PLC-β2)、Transient receptor potential melastatin 5(TRPM5)）は、味蕾だけではなく、消化管（胃、小腸）においても発現している。小腸上皮には吸収上皮細胞、杯細胞、パネート細胞、内分泌細胞という 4 種類の主要な細胞の他、刷子細胞などが存在する。しかし、上述した味覚関連遺伝子が発現する細胞の種類とその機能は、内分泌細胞（L 細胞など）を除いて、依然として未解明のままである。本研究では、マウス小腸において各味覚関連遺伝子が発現する細胞を同定することを目的とした。
【方法・結果】まず、マウス小腸（十二指腸、空腸、回腸）の凍結切片を作製し、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、味覚受容体と下流シグナル伝達因子の mRNA 発現解析を行った。味覚受容体は、*T1r3*、*T2r5*、下流シグナル伝達因子は、*gustducin*、*Plc-β2*、及び *Trpm5* を用いた。その結果、*Trpm5* は十二指腸、空腸、回腸のいずれにおいても、一部の細胞にシグナルが観察された。次に、免疫染色法を用いて、タンパク発現解析を行った。TRPM5、gustducin、PLC-β2 は、小腸の上部から下部に至る全ての部位で、一部の細胞にシグナルが観察された。さらに、L 細胞から分泌されるインクレチン Glucagon-like peptide 1 (GLP-1)、刷子細胞のマーカー分子である Doublecortin-like kinase 1 (DCLK1)、中間径フィラメント構成タンパク質 Cytokeratin 18 (CK18) を用いて、二重免疫染色や発現細胞の形態比較を行い、各味覚関連遺伝子が発現する細胞の種類を調べた。TRPM5 発現細胞は、DCLK1 発現細胞と形態が類似していること、及び CK18 発現細胞に含まれることから、TRPM5 が主に刷子細胞に発現していることが示された。また、gustducin 陽性細胞の一部は L 細胞である一方で、TRPM5 と PLC-β2 は L 細胞に発現しないことが判明した。以上の実験結果から、マウス小腸において、味覚シグナル伝達因子は、それぞれ多様な発現パターンを示すことが分かった。

brush cell, small intestine, taste signaling molecules

講演番号：4A22a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ A 校舎 22 会場

Lactobacillus paracasei K71 の経口摂取による腸管 IgA レベル亢進と形質細胞様樹状細胞の APRIL 発現増大

Enhanced mucosal IgA level by orally administrated *Lactobacillus paracasei* K71 is associated with an increase in APRIL expression in plasmacytoid dendritic cells

○寺平 拓也[1]、五十嵐 晶[1]、熊谷 武久[2]、藤井 幹夫[2]、城 斗志夫[3]、原 崇[3]([1]新潟大院自然科学、[2]亀田製菓、[3]新潟大農)

○Takuya TERADAIRA[1], Akira IGARASHI[1], Takehisa KUMAGAI[2], Mikio FUJII[2], Toshio JOH[3], Takashi HARA[3] ([1]Grad. Sch. Sci. & Technol., Niigata Univ., [2]Kameda Seika Co., Ltd., [3]Fac. Agric., Niigata Univ.)

【目的】*Lactobacillus paracasei* K71（K71 株）は酒粕より分離された乳酸菌であり、動物実験およびヒト試験を通じて Th1 応答誘導作用[1)]、抗アレルギー作用[2)]が確認された。さらに、K71 株を経口摂取したマウスの糞中 IgA レベルが亢進する現象を見出した。最近、腸管における B 細胞の IgA 産生が形質細胞様樹状細胞の発現する BAFF 及び APRIL により T 細胞非依存的に誘導されることが報告された。本研究では、K71 株の腸管 IgA レベル亢進のメカニズム解明へ向け、パイエル板と腸間膜リンパ節における T 細胞のサイトカイン産生と樹状細胞の BAFF 及び APRIL 発現を中心に検討した。

【方法】BALB/c マウス（♀、6 週齢）を対照群と K71 株投与群に分け、コンベンショナルな環境で飼育した。K71 株は滅菌処理後に凍結乾燥粉末（2×10^{11} cfu/g）とし、経口投与（1 mg/mouse/day）した。飼育開始から 1 週間毎に糞便を採取し、糞中の総 IgA 量を ELISA 法により測定した。6 週間飼育後、パイエル板細胞、腸間膜リンパ節細胞を採取し、T 細胞を活性化する目的で抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体を添加して 3 日間培養後、培養上清中のサイトカインを ELISA 法により測定した。また、パイエル板、腸間膜リンパ節における $CD19^+$B 細胞の IgA 発現、$CD11c^+$樹状細胞の BAFF、APRIL 発現について FACS 解析により検討した。

【結果】糞中の総 IgA レベルは K71 株投与により亢進し、飼育開始 2 週目以降、有意差が認められた。また、K71 株投与により IgA を発現する $CD19^+$B 細胞が腸間膜リンパ節細胞において増加し、パイエル板細胞では対照群マウスと同程度であった。サイトカイン産生応答を調べた結果、K71 株投与により IFN-γ/IL-4 比が増大する傾向が認められ、Th1 偏向誘導作用が示唆された。一方、IgA クラススイッチおよび産生に関わるサイトカインでは、IL-5 と TGF-βの産生量に K71 株投与による変化は認められず、IL-6 は K71 株投与により腸間膜リンパ節細胞において減少した。樹状細胞の BAFF、APRIL 発現レベルを検討した結果、K71 株投与によりパイエル板では顕著な変化は認められなかったが、腸間膜リンパ節では増大する傾向が認められた。特に、K71 株投与群マウスの腸間膜リンパ節における $CD11^+CD45R^+$樹状細胞（形質細胞様樹状細胞）では、APRIL の発現が有意に増加していた。以上の結果から、乳酸菌の経口摂取による腸管 IgA レベル亢進には T 細胞非依存的経路が関与し、それには腸間膜リンパ節の形質細胞様樹状細胞が重要であると推察される。

1) T. Kumagai et al. : Food Sci. Technol. Res. (in printing)

2) M. Moroi et al. : J. Dermatol., 38, 131 (2011)

Lactobacillus paracasei K71, IgA, APRIL

講演番号：4A22a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ A 校舎 22 会場

乳児ラット壊死性腸炎モデルにおけるヒトミルクオリゴ糖 Lacto-*N*-biose の影響

Effect of human milk oligosaccharides Lacto-*N*-biose on neonate rat necrotizing enterocolitis model.

○清水 金忠[1]、佐藤 拓海[1]、和泉 裕久[2]、岩淵 紀介[1]、小田巻 俊孝[1]、西本 完[3]、阿部 文明[1]、北岡 本光[3] ([1]森永乳業・食基研、[2]森永乳業・栄科研、[3](独)食品総合研究所)
○Xiao Jin-zhong[1], Takumi Satoh[1], Hirohisa Izumi[2], Noriyuki Iwabuchi[1], Toshitaka Odamaki[1], Mamoru Nishimoto[3], Fumiaki Abe[1], Motomitsu Kitaoka[3] ([1]Food Science and Technology Institute, Morinaga milk industry co., LTD, [2]Nutritional Science Laboratory, Morinaga milk industry co., LTD, [3]National Food Research Institute)

【背景・目的】
我が国における低出生体重児の出生率は増加傾向にある。低出生体重児は成人になった際の肥満発症リスクが高いなどの他、乳児期における感染症のリスクや致死にも至る壊死性腸炎(NEC: Necrotizing enterocolitis)の罹患リスクが上昇するとされている。ヒトミルクオリゴ糖の構成単位である Lacto-N-biose(LNB; Galβ1-3GlcNAc)はビフィズス菌の増殖促進因子として知られている。我々はこれまでに乳児腸内菌叢の多くを占めるビフィズス菌種が LNB を利用できる事を報告してきた。本研究では乳児ラット NEC モデルにおける LNB の効果を検討した。
【方法】
妊娠ラットには SD ラット♀10 週齢を用い、自然分娩で生まれる妊娠 21 日の前日である妊娠 20 目に帝王切開により分娩したものを早産児ラットとした。得られた早産児ラットはラットの母乳に近い組成の人工乳(Pet-Ag 社 Esbilac canine milk(犬用) 75ml に Abbott 社 Similac 60/40(ヒト用)を 15g 混合したもの)を 150 μl×3 回/日で投与し 96 時間(4 日)育仔した。また人工乳投与前に低酸素(5% O_2)に 10 分間×3 回/日で曝す事で NEC を誘導した。NEC を誘導した早産児ラットに対して LNB を 0.3 mM、3 mM 含有人工乳を投与し NEC への影響を評価した。
【結果】
対照群と比較して小腸下部組織切片の観察結果では組織状態に大きな差は観察されなかったが、LNB の投与により mRNA 発現レベルで小腸下部の NEC により誘導される炎症性サイトカイン IL-1β を抑制した他、炎症トリガーにもなる TLR4 の発現抑制が確認された。さらに NEC 誘導により発現上昇する腸管バリアに関連する ZO-1、β-catenin の発現抑制も観察された。以上の結果より LNB の投与は炎症抑制に働き、腸管バリア維持に関与しているものと考えられる。

necrotizing enterocolitis, prebiotics, HMOs

講演番号：4A22a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ A 校舎 22 会場

パン酵母由来β-グルカン（BBG）のマクロファージにおける抗炎症作用
β-Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* Reduces Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in Macrophages
○保田 倫子[1]、許 小娟[2]、水野 雅史[2]、芦田 均[2] ([1]神戸大院・自然科学、[2]神戸大院・農)
○Michiko YASUDA[1], Xiaojuan Xu[2], Masashi Mizuno[2], Hitoshi Ashida[2] ([1]Kobe Univ. Adv. Sci. Tech., [2]Kobe Univ. Agrobiosci.)

【目的】β-グルカンはキノコ類や酵母の細胞壁に含まれる多糖類で、免疫賦活作用や抗腫瘍作用など様々な生理機能を有することから、健康食品や医薬品として注目を浴びている。一方、炎症反応に対する抑制作用を示した知見は少ない。そこで、本研究ではパン酵母由来のβ-グルカン（BBG）の新たな機能を見出すことを目的とし、マウス RAW264.7Mφ における BBG の炎症抑制作用について検討を行った。

【方法】RAW264.7Mφ において炎症剤であるリポ多糖（LPS）刺激により誘導される一酸化窒素（NO）産生に対する BBG の効果を検討した。次に、LPS により活性化される MAPKs（ERK1/2）および NFκB（p65）について調べた。さらに、一般的にβ-グルカンのレセプターとして知られる TLR2 の関与について、中和抗体を用いた試験を行い、TLR2 リガンド Pam3CSK 誘導性の NO 産生に対する BBG の作用についても検討した。

【結果および考察】BBG は LPS により誘導される NO 産生を濃度依存的に抑制し、200 μg/ml では 70%の阻害作用を示した。なお、BBG 単独処理では NO 産生の誘導効果は見られなかった。BBG は NO 合成酵素である iNOS の発現を顕著に低下させるとともに ERK1/2 のリン酸化を抑制したが、炎症関連遺伝子などの転写因子である NFκB の活性化および p65 の核内移行についてはむしろ促進作用を示した。TLR2 中和抗体により BBG による NO 産生抑制効果は阻害されず、一方で、TLR2 中和抗体により LPS による NO 産生自体が低下した。一般的に LPS は TLR4 を介して NO を産生することが知られているが、今回用いた LPS による NO 産生には、TLR4 のみならず TLR2 も介していることが考えられた。さらに、TLR2 中和抗体によって、LPS による ERK1/2 のリン酸化は抑制され、p65 の核内移行量についてはむしろ増加し、BBG の効果と TLR2 中和抗体による作用との間に共通点が見られた。そこで、TLR2 リガンドである Pam3CSK により誘導される NO 産生に対する BBG の効果を調べたところ、BBG はこれに対して抑制作用を示した。

【結論】BBG は LPS により誘導される NO 産生を抑制することが明らかとなった。また、今回用いた LPS による NO 産生に対して、BBG は TLR4 および TLR2 経路のどちらもに作用することで抑制効果を示すことが示唆された。BBG の新たな機能として、炎症反応に対する抑制作用が大いに期待できる。

glucan, inflammation, macrophage

講演番号：4A22a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ A 校舎 22 会場

ヒトマクロファージ様細胞における緑茶の幼葉由来水溶性高分子によるインターフェロンα産生誘導とその作用機序

Water-soluble high molecule from immature green tea (*Camellia sinensis* L.) leaves promotes Interferon-alpha production in human macrophage-like cells

○物部 真奈美、荻野 暁子、江間 かおり、徳田 佳子、山本（前田） 万里（農研機構・野茶研）
○Manami MONOBE,Akiko OGINO,Kaori EMA,Yoshiko TOKUDA,Mari MAEDA-YAMAMOTO (NARO Vegetable Tea Science)

【目的】緑茶（*Camellia sinensis* L.）は様々な健康効果を有する機能性食品として注目されており，その健康機能の１つとして以前から免疫調節能が報告されている。緑茶抽出液中に多く含まれる水溶性高分子やカテキン類は免疫調節機能を有する主要な成分として知られており，カテキン類については比較的よく調べられているが，水溶性高分子についてはほとんど調べられていない。以前我々は，緑茶幼葉由来水溶性高分子（iTPS）がマクロファージ様細胞の貪食能を活性化することを発見し，その作用機序として，iTPS中の１本鎖RNAがToll様レセプター7（TLR7）を介して活性を誘導していることを報告した。しかし，TLR7は細胞内のエンドソーム内にある内因性レセプターであり，高分子複合体であるiTPSがどのようにして内因性レセプターまで届くかなど不明点は多い。そこで，iTPSが貪作用の活性化以外に，TLR7の活性化により産生されるサイトカインとしてよく知られているI型インターフェロンであるインターフェロンα（IFN-α）を産生誘導可能かどうか，また，iTPSの細胞内取り込み経路など，iTPSによるマクロファージ様細胞の活性化メカニズムを調べたので報告する。

【方法】iTPSがマクロファージ様細胞内にIFN-α を産生誘導することが可能かどうか調べるため，THP-1細胞をカルシトリオール（活性型ビタミンD）で２日間刺激した後，培養液中にiTPSを添加し，８時間（最後２時間はブレフェルジンAを添加）後に細胞を回収してFITC標識IFN-α抗体で染色し，フローサイトメーターを用いて細胞内IFN-α を測定した。また，iTPSによるIFN-α の産生誘導がTLR7を介した反応であるかを調べるために，TLR7阻害剤（IRS661、クロロキン）を用いた。さらに，iTPSの細胞内への取り込み経路を探るために，iTPSによるIFN-α 産生が，食作用活性阻害剤であるサイトカラシンBにより阻害されるかどうかを調べた。

【結果】iTPS によりマクロファージ様細胞内に IFN-α が産生誘導されることを確認した。さらに，この IFN-α 産生誘導は Toll 様レセプター7 の活性阻害 DNA 配列である IRS661 によって阻害された。また，食作用活性阻害剤であるサイトカラシン B によって，iTPS による細胞内 IFN-α の産生が阻害されることから，iTPS はマクロファージ様細胞の食作用により細胞内に取り込まれ，ファゴソーム内の TLR7 と相互作用することにより，IFN-α を産生誘導する可能性が示唆された。

RNA, TLR7, IFN-alpha

講演番号：4A22a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ A 校舎 22 会場

ケルセチンによるビフィズス菌の抗炎症活性増強効果

Quercetin stimulates anti-inflammatory activity of *Bifidobacterium adolescentis*

○坂野 太研、川畑 球一、大東 肇（福井県大・生物資源）
○Taiken Sakano,Kyuichi Kawabata,Hajime Ohigashi (Dept. of Biosci., Fukui Pref. Univ.)

【目的】プロバイオティクスとポリフェノールは、腸管内で互いの生理機能に影響を及ぼし合っている可能性が考えられるが、そのような確たる知見はこれまでにほとんど得られていない。そこで本研究では、両者の機能的相互作用を解明するため、抗炎症活性を指標として、共培養上清における活性の変化を検討した。【方法】乳酸菌やビフィズス菌などのプロバイオティクス（10^8 cfu/mL）は、DMSO（終濃度 0.05 %）もしくはケルセチン（終濃度 25 μM）と DMEM 中にて嫌気条件下で共培養した。その上清をマウスマクロファージ RAW264 細胞に添加し、リポ多糖処理後 24 h における培地中の NO_2^- 量を Griess 法で測定することにより、一酸化窒素（nitric oxide, NO）産生量を算出した。培養上清中のケルセチンは酢酸エチルで分配抽出し、HPLC-PDA にて残存率を分析した。また、培養上清（500 μL）を分画分子量 3000 の遠心限外ろ過フィルターにて分画し、各画分を DMEM で 500 μL に fill-up して、NO 産生抑制活性評価に供した。【結果】ケルセチンは、培地に添加後すぐに細胞に処理した場合（培養 0 h）、NO 産生を 60 %抑制したが、3 h 単培養することで NO 産生抑制活性は大きく低下した（11 %抑制）。また、プロバイオティクスの 3 h 単培養上清は、いずれも NO 産生抑制活性を示さなかった。一方、プロバイオティクスとケルセチンを共培養した場合、興味深いことに *Bifidobacterium adolescentis* とケルセチンの共培養上清において強い NO 産生抑制活性（50 %抑制）が確認できた。この活性は、培養時間とケルセチン濃度に依存して上昇し、加熱処理した *B. adolescentis* との共培養では認められなかった。腸内細菌はフラボノイドをフェノール化合物に代謝することから、ケルセチン代謝物として知られる 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid および phloroglucinol〔1〕について NO 産生抑制活性を検討したが、低活性であった（26 %抑制）。培養上清中のケルセチンは、単培養（2 %）よりも *B. adolescentis* との共培養（23 %）でより多く残存していたことから、*B. adolescentis* のケルセチン代謝活性は低いことが示唆された。さらに、*B. adolescentis* の単培養上清は、菌体数の増加に伴い NO 産生抑制活性を発現したことから、*B. adolescentis* は自発的に NO 産生抑制活性成分を分泌し、ケルセチンがその産生もしくは分泌を促進することが強く示唆され、プロバイオティクスとフラボノイドの機能的相互作用を初めて見いだした。さらに、培養上清を分画して NO 産生抑制活性評価を行ったところ、3000 Da 以下の画分に活性を確認できたことから、活性成分の分子量は 3000 以下であると考えられた。

〔1〕Winter J. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:1203-8, 1989.

flavonoids, probiotics, anti-inflammatory activity

講演番号：4A22a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ A 校舎 22 会場

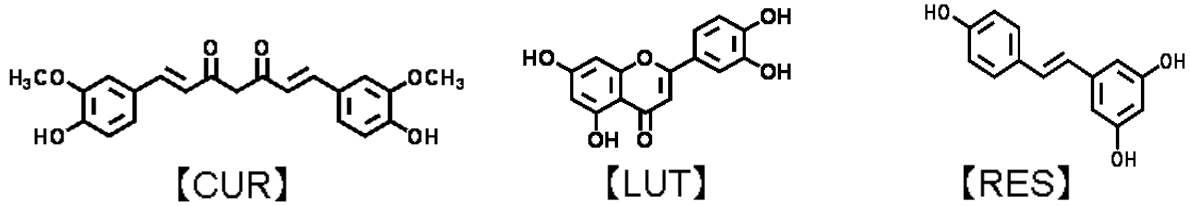
マクロファージの NO 産生における食由来化合物の相乗的抑制効果の解析
Synergistic inhibitory effect of dietary compounds on NO production in LPS-stimulated macrophages
○上前 知之、川畑 球一、高橋 正和、大東 肇（福井県大院・生物資源）
○Tomoyuki Uemae,Kyuichi Kawabata,Masakazu Takahashi,Hajime Ohigashi (Dept. of Biosci., Fukui Pref. Univ.)

【目的】マクロファージはリポ多糖（LPS）などの刺激によって一酸化窒素（NO）を産生するが、慢性炎症局所における NO 過剰産生は各種炎症性疾患の要因となる。これまで NO 産生抑制性食由来成分が各種報告されているが、食品は多様な化合物の混合系であり、それぞれの分子作用機序も異なる。本研究では、食由来 NO 産生抑制成分について、相乗的効果を示す組合せを探索し、作用機序などについて検討することとした。

【方法】RAW264 細胞株を LPS で刺激し、24 時間後の培養上清に含まれる亜硝酸イオン濃度を Griess 法で調べ、NO 産生量を求めた。本アッセイ系に 2 種類の食由来化合物を、濃度を変えながら単独あるいは同時添加して NO 産生抑制活性を測定し、各化合物の単独投与によって得られる用量作用曲線にもとづき、相乗効果を検討した。また iNOS などの各種炎症誘発性タンパク質の発現を Western 解析により調べた。

【結果】フラボノイドを含む代表的な NO 産生抑制性食由来成分を用いて、組合せの効果を調べた。多くのフラボノイドとクルクミン（CUR）の間には相乗効果は認められなかったが、CUR とルテオリン（LUT）の間で相乗的効果が認められた。すなわち、LUT 3 μM は 12%の NO 産生抑制活性を示すが、CUR 3 μM を同時に添加すると、その抑制率は 67%へと増強された。これは LUT 単独では 13 μM の濃度における活性であった。一方、CUR 3□ μM 単独では、20%の産生抑制活性を示し、これは LUT4 μM での作用に匹敵した。したがって、CUR の同時添加によって LUT の作用は 7□ μM 相当から 13 μM 相当へと増強されたことが示され、相乗的効果と考えられた。同様の相乗的効果はレスベラトロール（RES）と CUR の間でも認められた。

Western 解析から、CUR と LUT、および CUR と RES の間には、LPS による iNOS タンパク質発現誘導において、相乗的抑制効果と思われる活性が認められた。



図．CUR , LUT , RES の構造

synergistic effect, dietary compounds, nitric oxide

講演番号：4A22a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ A 校舎 22 会場

コラーゲン誘導関節炎マウスにおける水溶性の非変性 II 型コラーゲンの効果

Effects of water-soluble undenatured type II collagen in collagen-induced arthritis mice

○吉成 織恵[1,2]、塩島 由晃[1]、森山 浩義[1,2]、篠崎 淳一[2]、中根 孝久[2]、増田 和夫[2] ([1]株式会社龍泉堂、[2]昭和薬科大学)
○Orie YOSHINARI[1,2], Yoshiaki SHIOJIMA[1], Hiroyoshi MORIYAMA[1,2], Junichi SHINOZAKI[2], Takahisa NAKANE[2], Kazuo MASUDA[2] ([1]Ryusendo Co., Ltd., [2]Showa Pharmaceutical University)

【目的】慢性関節リウマチ（RA）は関節滑膜内の継続的炎症と軟骨や骨へのパンヌスの浸食を特徴とし、世界人口の 0.5-1%が罹患している深刻な自己免疫疾患である。RA でよく用いられる動物モデルは、II 型コラーゲン（C II）により誘発される関節炎（CIA）である。以前から C II の経口投与は、経口免疫寛容により CIA の動物や臨床研究において症状を改善することが報告されていた。しかしその詳細なメカニズムについて報告されていない。本研究では、水溶性であり非変性 C II（Water Soluble-C II）の経口投与が CIA マウスに及ぼす影響についてメカニズムを解明することを目的とした。
【方法】Water Soluble-C II は、トリ軟骨からペプシン処理抽出し、凍結乾燥により粉末とした。8 週令の DBA1/J マウスを正常群（n=7）と実験群（n=25）の 2 群に分け、実験群マウスにはウシ II 型コラーゲンとフロイント完全アジュバンドの混合液を免疫した（0 日目）。さらに 21 日目に実験群に同量を追加免疫し、39 日目に実験群を 3 群に分けた。対照群（n=8）には生理食塩水を、グルコサミン群（n=8）にはグルコサミン塩酸塩（300mg/kg/day）、コラーゲン群（n=9）には Water Soluble-C II（1mg/kg/day　非変性 II 型コラーゲン換算）を胃内ゾンデで与え、飼育最終日に麻酔下解剖後、血液、脾臓、後肢を採取し各分析に用いた。
【結果】コラーゲン群の関節炎指数は、対照群およびグルコサミン群と比較して有意に低下した。後肢の組織学的分析においてもコラーゲン群は、パンヌスの侵入がなく、軟骨の破壊が抑制された。さらに血清 IL-6 濃度は対照群と比較して有意に低下し、血清 IL-2 濃度は上昇した。また Water Soluble-C II の経口投与は脾臓中の CD4+CD25+ T 細胞を増加させ、Fox p3、TGF-β1、CD25 の遺伝子発現量も増加させた。
【結論】 これらの結果から、Water Soluble-C II の経口摂取は CD4+CD25+ Treg 細胞の増加により CIA を軽減させたと推察される。

Undenatured Type II collagen, Collagen-induced arthritis, CD4+CD25+ Treg

講演番号：4A22a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ A 校舎 22 会場

オリーブ油搾り粕を有効利用したロコモシティブシンドローム（関節炎）対応食品素材の開発

The beneficial effect of olive oil residues on the locomotive syndrome（joint inflammation）

○福光 聡[1]、安本 秀幸[2]、間 和彦[1]、落合 潔[1] ([1]日本製粉・中研、[2]東洋オリーブ)
○Satoshi FUKUMITSU[1], Hideyuki YASUMOTO[2], Kazuhiko AIDA[1], Kiyoshi OCHIAI[1] ([1]Nippon Flour Mills Co., Ltd., [2]TOYO OLIVE CO., LTD.)

【目的】

日本は超高齢社会に突入しており、健康体で生活できる「健康寿命」が重要視されている。最近では、筋肉量、骨量、関節などの老化により運動機能が低下し、要介護や寝たきりのリスクの高い状態を「ロコモティブシンドローム（運動器症候群）」と呼ぶ。古くから地中海沿岸食は炎症疾患の発症リスクを低減すると言われ、近年、オリーブの摂取とこれら疾病予防との関連性が明らかになってきている。私達は、オリーブ油搾り粕にこれまで利用されていない炎症抑制成分マスリン酸を見出し、それを利用した機能性食品素材の製造方法を開発した。本研究では、関節炎モデルマウスを用い、マスリン酸の経口摂取による浮腫及び関節炎への影響を検討した。

【方法】

国産及び海外産オリーブ油搾り粕を 70%メタノールで抽出し、薄層クロマトグラフ分析（TLC）及び HPLC 分析に供した。また、国産オリーブ油搾り粕について、果実の熟度の違いによるマスリン酸含量を比較するため、経時的にサンプリングしたオリーブ果実を 70%メタノールで抽出し、HPLC 分析に供した。さらに、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、オリーブ油搾り粕からマスリン酸を含量 90%以上に精製し、関節炎モデルマウスへの摂取試験に用いた。

5 週齢、雄、DBA1/J マウスを用い、関節の主成分である II 型コラーゲンの関節炎惹起エピトープを認識する抗体カクテルを腹腔内投与し、さらに 3 日後に LPS を腹腔内投与して関節炎を促進させた。マスリン酸は、コラーゲン抗体投与の 1 週間前から計 2 週間、1 日 1 回、用量 100 mg/kg body weight で経口投与した。

【結果】

TLC 及び HPLC 分析からオリーブ油搾り粕には、国産、海外産共に安定してマスリン酸が含まれていた。また、オリーブ果実の熟度の違いによるマスリン酸含量を比較したところ、熟度が増すほどマスリン酸含量は低下傾向を示したが、グリーンオリーブの状態であれば比較的含有量は安定していることが示された。

関節炎モデルマウスを用いたマスリン酸（100mg/kg）摂取試験において、マスリン酸摂取による炎症スコアの低下、及び病理組織学的検査から後足膝関節の滑膜組織の炎症抑制が認められた。さらに、膝関節から total RNA を回収し、炎症因子の遺伝子発現を比較したところ、マスリン酸の摂取により *TNF-α*、*IL-1*、*IFN-γ* mRNA レベルが有意に低下した。以上の結果から、私達はオリーブ油搾り粕からこれまで利用されていなかった有用成分マスリン酸を見出すことに成功し、マスリン酸のロコモティブシンドロームへの有効性を示した。

Olive, Maslinic acid, Locomotive syndrome

講演番号：4A22a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ A 校舎 22 会場

紫外線惹起による皮膚炎症に対するキノコ由来スフィンゴ脂質の抑制効果

Suppression of sphingolipids in the mushroom on UVB induced inflammation in HaCaT keratinocytes

○都築 毅[1]、後藤 智生[2]、阿部 敬悦[1]([1]東北大院・農、[2]岐阜セラツク)
○ Tsuyoshi TSUDUKI[1], Tomoo GOTO[2], Keietsu ABE[1] ([1]Tohoku Univ., [2]GIFUSHELLAC MFG.CO.,Ltd.)

【目的】 成層圏に存在するわずか3ｍｍ程度のオゾン層は、太陽光に含まれる有害な紫外線（UV）の大部分を吸収して、地球上の生物を守っている。このオゾン層が近年フロンなどの人工的化学物質によって破壊されることが明らかとなっている。オゾン層の破壊によって今まで地表に届かなかったUVが降り注ぐようになり、ヒトでは皮膚がん、白内障、免疫能の低下が、植物では成長阻害、色素形成不全などの障害が増加することが実験及び疫学的研究により明らかにされている。我々はこのような背景のもとに、皮膚障害とその予防法に関する研究を行っており、食品による予防法の確立を試みている。

近年、グルコシルセラミドをはじめとするスフィンゴ脂質の生理活性に注目が集まっている。我々は、キノコ類の非可食部の有効利用を目指し、この非可食部より効率よくスフィンゴ脂質を抽出した。そこで我々は、この非可食部より抽出されたスフィンゴ脂質に有益な生理機能を期待し、皮膚の炎症に対する効果を検討した。本研究では、培養細胞試験により、紫外線惹起による皮膚炎症に対するキノコ由来スフィンゴ脂質の抑制効果とその作用機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】 ヒト表皮角化細胞であるHaCaT細胞に紫外線B 波（UV-B）を照射後、キノコ由来スフィンゴ脂質とともに培養した。炎症性サイトカインであるPGE_2産生量をELISA 法で調べ、PGE_2産生酵素であるCOX-2などの遺伝子とタンパクの発現量をリアルタイムRT-PCRやウエスタンブロッティングで評価した。また、ストレス応答タンパクのリン酸化を調べた。

【結果】 HaCaT 細胞への UV-B 照射により PGE_2 産生が亢進し、これがキノコ由来スフィンゴ脂質により抑制されたため、本モデルでスフィンゴ脂質の皮膚炎症抑制効果の検討が可能であると判断した。そこで種々の炎症促進関連分子（IL-1 β , IL-6, MCP-1, COX-2）への影響を調べ、HaCaT 細胞への UV-B 照射で誘導されるこれらの炎症促進関連分子（とくに COX-2）の遺伝子発現が、キノコ由来スフィンゴ脂質により抑制されることを見出した。この COX-2 への影響を支持する知見として、COX-2 タンパクやストレス応答タンパク（JNK, p38, ERK）のリン酸化がキノコ由来スフィンゴ脂質により抑制されることがわかった。

【結語】キノコ由来スフィンゴ脂質は MAPK シグナルの抑制（COX-2 の発現低下）を介して、皮膚炎症抑制効果を発揮する可能性が考えられた。

sphingolipid, HaCaT, UVB

講演番号：4A22a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ A 校舎 22 会場

TCR トランスジェニックマウスを用いた食物アレルギー性皮膚炎モデルの解析
Analysis of a food allergic skin inflammation model using TCR transgenic mice
○平出 恵利華[1,2]、足立 (中嶋) はるよ[2]、北村 紀子[3]、上滝 隆太郎[1,2]、武山 純[1,2]、佐伯 真弓[3]、西村 友枝[3]、神沼 修[3]、廣井 隆親[3]、八村 敏志[1,2] ([1]東大院農生科・応生化、[2]東大院農生科・食の安全研セ、[3]東京都医学総合研・花粉症プロ)
○Erika HIRAIDE[1,2], Haruyo NAKAJIMA-ADACHI[2], Noriko KITAMURA[3], Ryutaro KOTAKI[1,2], Jun TAKEYAMA[1,2], Mayumi SAEKI[3], Tomoe NISHIMURA[3], Osamu KAMINUMA[3], Takachika HIROI[3], Satoshi HACHIMURA[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [2]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [3]Pollen Allergy Proj., Tokyo Metropol. Inst. Med. Sci.)

[目的] OVA23-3 マウスは卵白アルブミン(OVA)の 323-339 残基に特異的な T 細胞抗原レセプター(TCR)を発現するトランスジェニックマウスである。この OVA23-3 マウスは卵白含有飼料 (EW) の自由摂取のみで、Th2 サイトカインの産生、体重減少、IgE 抗体価の上昇、および腸炎症が誘導される有用な食物アレルギーモデルである。食物アレルギーの臨床症状では皮膚炎が最も多いとされるため、我々は OVA23-3 マウスが卵白食の投与に伴い皮膚炎も発症するモデルであるかを検討してきた。今回はさらに皮膚組織の解析を進めた。
[方法] OVA23-3マウスにEWまたは標準食であるCE-2を1週間与えた後、OVAまたはPBSを浸み込ませた脱脂綿をマウスの背中の皮膚に48時間接触させた。その後、接触部位を摘出し、サイトカインmRNAの測定、HEおよびギムザ染色による組織解析、フローサイトメトリーによるCD4$^+$T細胞の解析を行った。また、皮膚の所属リンパ節中のCD4$^+$T細胞の解析を行った。
[結果] EWを摂取させOVAを皮膚接触させたEW/OVA群では、皮膚組織中のTh2サイトカインと好酸球ペルオキシダーゼのmRNA発現が他群に比べ高かった。組織解析では、OVAの皮膚接触群(EW/OVAおよびCE-2/OVA)で細胞の浸潤が認められた。EW/OVA群ではCE-2/OVA群より細胞浸潤が促進されており、特に好酸球の浸潤が顕著であった。皮膚組織中のCD4$^+$T細胞の解析では、EW/OVA群でCD4$^+$T細胞の割合が他群よりも高かった。また所属リンパ節では、EWを摂取した群 (EW/OVAまたはEW/PBS) 間の比較でも、CE-2を摂取した群 (CE-2/OVAまたはCE-2/PBS) 間の比較でも、OVAを皮膚接触した群 (EW/OVAおよびCE-2/OVA) で集積したCD4$^+$T細胞の数が多かった。しかし、短期間のOVA皮膚接触のみ (CE2/OVA群) では、皮膚組織中のCD4$^+$T細胞と好酸球の浸潤度合はEW/OVA群より低く、卵白食摂取がEW/OVA群においてこれらの細胞による皮膚炎症を促進したと考えられる。従って、OVA23-3マウスは卵白食摂取に伴い、Th2型の食物アレルギー性皮膚炎を起こし、皮膚炎モデルとしても有用であることが示された。

food allergy, skin inflammation

講演番号：4A22a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ A 校舎 22 会場

フキ葉抽出物（*Petasites japonicus*）のカドミウム腎臓障害緩和作用

Japanese butterbur leaf (*Petasites japonicus*) alleviates cadmium renal injury in rats

○吉城 由美子、開田 環美、今井 楓 (石川県大)
○Yumiko Yoshiki,Tamami Kaida,Fu Imai (Ishikawa Pref. Univ.)

[目的]

カドミウム（Cd）はヒトでの半減期が 10～30 年と非常に長く、体内吸収されることで蓄積毒となる有害金属の一つである。近年、体内吸収された Cd の約 50%が腎臓に、約 15%が肝臓に蓄積することが報告され、糸球体や近位尿細管への蓄積を介した重篤な腎臓障害の発症が懸念されている。

日本原産であるフキ（*Petasites japonicas*）は独特の香りと苦みがあり、葉柄が常食されるが、葉は苦味が強いため廃棄されることも多い。しかしながら、葉にはフキノール酸やフキノンなどのポリフェノールが多く含まれており、有害金属の排泄促進作用が期待される。そこで、本研究では Cd 障害の一つである腎症に着目し、フキ葉抽出物の腎臓障害緩和作用について検討した。

[方法]

試料としてフキ葉の 70%エタノール抽出物を用い、Crlj:WI(Wister)ラット（雄、6 週齢）による動物実験を行った。1 週間の予備飼育後、コントロール群（Co 群）と Cd 摂取群(Cd 群)に分け、Cd 群には Cd 摂取量が 1.2 mg/kg/day となるように飲み水に加えて摂取させた。さらに各群を 2 群に分け、それぞれにコントロール食（CF-II,オリエンタル酵母)、フキ食（16.7 mg/day/匹）を与え 8 週間飼育した（Co, Cd, CoF, CdF 群)。体重は隔日測定し、尿は実験食前、実験食開始 4 週目、解剖前日に採取し、クレアチニン、糖、タンパク量を測定した。解剖後、血清分析、腎組織の観察（HE 染色）を行った。また、腎臓のカタラーゼ、腎臓と肝臓の MT1、MT2 の mRNA 発現量を RT-PCR で測定した。

[結果]

血液、尿を用いて腎機能評価に関するスクリーニング検査を行った結果、Cd 群ではクレアチンクリアランスの減少や血清カリウム濃度の増加がみられ、Cd 投与による腎機能の低下が確認できた。さらに尿糖値、血糖値の増加も見られ、糖尿病の発症も示唆された。

腎臓重量は各群で差がなかったが、HE 染色による組織観察では Cd 投与による糸球体の萎縮（Co 群：6160±842 μm^2、Cd 群：5126±949 μm^2、$p<0.05$）など腎障害に基づくいくつかの所見を観察できた。これら所見はフキ食（CdF 群：5560±519 μm^2）によって改善される傾向にあった。また、腎臓の有害金属排泄作用に関与する MT1 と MT2 の mRNA 発現量にも違いがみられ、Cd 群と比較し CdF 群で有意に増加した。

kidney, cadmium, butterbur

講演番号：4A22a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:12～ A 校舎 22 会場

米ぬか由来アラビノキシラン加水分解物(HRB)によるマウスの LPS/D-ガラクトサミン肝障害の抑制機序

Protective effect of a modified arabinoxylan from rice bran on LPS/D-galactosamine liver injury in mice

○花木 麻里子[1]、平井 静[1]、朱 霞[2]、猪狩 直樹[2]、江頭 祐嘉合[1]([1]千葉大院・園芸応生化、[2]大和薬品)
○Mariko HANAKI[1], Shizuka HIRAI[1], Xia ZHU[2], Naoki IGARI[2], Yukari EGASHIRA[1] ([1]Chiba Univ., [2]Daiwa Pharmaceutical Co.ltd.)

【目的】HRB(Hydrolysis Rice Bran)は米ぬかから抽出した難消化性多糖類を、シイタケより抽出した複数のグリコシダーゼで加水分解した物質である。加水分解条件が異なる MGN-3 は免疫賦活作用が数多く報告されている。一方、HPB は抗炎症作用が報告されているが、肝障害に対する影響に関しては十分な研究が行われていない。そこで、本研究では、LPS/D-ガラクトサミンによる実験的肝障害モデルを用いて、HRB が肝障害に及ぼす影響およびそのメカニズムを検討した。
【方法】実験には、6 週齢の ddy 系雄マウスを用いた。予備飼育の 5 日後に、標準食群(AIN-93G)、および、HRB 添加食群に群分けした。本飼育 6 日目に 16 時間の絶食を開始し、本飼育 7 日目に、LPS と D-ガラクトサミンを腹腔内に注射して肝障害を誘導した。その後すぐに再摂食させ、薬剤投与から 6 時間後に解剖を行い、血清のトランスアミナーゼ(AST,ALT)活性を測定した。また、炎症性サイトカイン IL-18,IL-6,TNF-α について、血清中濃度を ELISA 法で、肝臓中 IL-18 mRNA の発現量を real-time RT-PCR を用いて測定した。さらに、核内転写因子 NF-κB を制御する肝臓中 I-κB 発現量を、ウエスタンブロッティング法により測定した。
【結果・考察】HRB の混餌投与により、LPS/D-ガラクトサミン誘導性肝障害による血清トランスアミナーゼ(AST)活性の上昇が有意に抑制された。また、HRB 投与群の血清中 IL-18 濃度が対照群と比較して有意に減少し、血清中 IL-6、TNF-α 濃度、および肝臓中 IL-18 mRNA 発現量は減少する傾向が認められた。さらに HRB 投与群では、LPS/D-ガラクトサミンによる肝臓中 I-κB の分解が抑制される傾向が認められた。これらの結果から、LPS/D-ガラクトサミン誘導性肝障害において、HRB は、I-κB の分解を抑制することで IL-18 等のサイトカインの産生を抑制し、肝機能障害を軽減させる可能性があることが示唆された。

rice bran, liver injury, IL-18

講演番号：4B11a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ B 校舎 11 会場

13C 安定同位体希釈に基づく新規代謝ターンオーバー解析システムの提案

Suggestion of a novel metabolic turnover analysis system based on 13C stable isotope dilution.

○傳寶 雄大[1]、中山 泰宗[1]、原田 和生[2]、馬場 健史[1]、福崎 英一郎[1] ([1]大阪大院工、[2]大阪大院薬)
○Yudai DEMPO[1], Yasumune NAKAYAMA[1], Kazuo HARADA[2], Takeshi BAMBA[1], Eiichiro FUKUSAKI[1] ([1]Grad.Sch.Eng.,Osaka Univ., [2]Grad.Sch.Pharm.Sci.,Osaka Univ.)

メタボロミクスは，表現系の解析や生体内における代謝の機構を理解するための非常に強力なツールである．一般的なメタボロミクス技術に基づくスナップショット解析では，生体内に存在する各代謝物の絶対的または相対的な量に関する静的な情報を取得することが可能である一方，得られた情報のみでは代謝の変化に関する解釈が難しいというのが現状である．近年，より詳細な代謝動態の情報を得るため，安定同位体を用いた様々なアプリケーションが開発されてきた．こうした代謝回転を観測するアプローチの一つに代謝ターンオーバー解析という手法が存在する．これは，細胞内に取り込まれた安定同位体標識炭素源から派生する細胞内代謝物の標識率を観測し，その時系列的変化を質量分析計で検出して追跡するというものである．分析化学をベースとした本手法は標識源の制約がなく，また未知の代謝経路や想定外の調節機構を許容し，その存在を推測できる可能性を有している．しかしながら，得られる代謝動態情報量は，観測することのできる代謝物数に強く依存しており，これはしばしば分析装置の検出可能な代謝物数によって制限される．そこで本報告では，検出可能な代謝物の適用範囲の拡大を目的とし，複数分析装置を用いた分析手法及びそれぞれの装置から得られたデータを統合するシステムの構築と，そのワークフローの提案を行う．

サンプルは，^{13}C 標識実験時の経時サンプリングで得られた細胞の抽出物を用い，各代謝物の代謝動態の変化を代謝ターンオーバー解析で観測した．GC 分析は，MTBSTFA により誘導体化処理を行い，LC 分析は，TBA をイオンペア試薬として用いて分析を行った．また，検出器はその選択性と定量性の観点から，両システムにおいて三連四重極型質量分析計を用いた．また，我々は GC と LC という異なる分析システムから得たデータを統合するため，すべての代謝物の天然存在同位体分布を数学的処理にて補正し，対象とする全代謝物のアイソトポマー比の経時変化を算出後，図に示した．結果として，代謝経路上における，解析範囲の拡張を目的とした本システムが *in vivo* における ^{13}C - 代謝ターンオーバー解析に適応可能であることが確認された．

metabolomics, metabolic turnover analysis, isotopomer

講演番号：4B11a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ B 校舎 11 会場

In vitro 代謝経路による酵素エフェクター同定手法
In vitro metabolic pathway reveals the action of enzyme effectors
○斎藤 菜摘、曽我 朋義、冨田 勝（慶大・先端生命研）
○Natsumi SAITO,Tomoyoshi SOGA,Masaru TOMITA (Inst. Avd. Biosci., Keio Univ.)

[目的] 代謝経路の調節において、代謝フィードバックやアロステリック制御など酵素活性レベルの調節は一般的に知られる。特に、バクテリアなど単細胞生物では酵素レベルの調節への依存度が高いことが知られ、代謝調節のメカニズムを理解するために重要な要素となる。しかし、タンパク質の量的変化を伴わない酵素活性の調節をシステマティックに解析することや酵素活性化分子や阻害分子のような細胞内の代謝調節物質（酵素エフェクター）を見つけ出すことは難しい。我々は、酵素エフェクターを探索し、その作用を同定できる *in vitro* 代謝解析手法を考案した。
[方法] 低分子を除いた大腸菌由来の細胞抽出物、および代謝経路 1 段階目の反応基質と経路内補因子を混合することで、試験管内で連続的な酵素反応を活性化可能な *in vitro* 代謝経路を構築した。狙った代謝経路が活性化していることは、メタボローム解析手法で代謝物質を定量解析することで確認した。このように構築した *in vitro* 代謝経路にエフェクターを与え、それが酵素活性に影響した場合、*in vitro* 経路内の代謝物質濃度が変化するはずである。これを通常に活性化している代謝経路と比較することで、投与したエフェクター候補の作用を同定することが可能である。
[結果] 以上の実験デザインに基づき、解糖系、ペントースリン酸経路、アミノ酸合成経路を試験管内で活性化することに成功した。最初に、代謝フィードバック制御が知られる大腸菌のセリン合成経路を対象として解析を行い、*in vitro* セリン合成経路においてセリンによる酵素阻害効果を示すことができた。次に、解糖系、およびペントースリン酸経路に対する酵素エフェクターの探索に適応した。候補物質には、代謝物質標準品を混合したカクテルを用いた。スクリーニングの結果、isocitrate の添加がペントースリン酸経路の酵素活性に影響することを見いだした。続く解析により、isocitrate による酵素阻害効果は、*in vitro* 経路内で isocitrate が代謝されて産生した NADPH によることが明らかとなった。ペントースリン酸経路の酵素に対する NADPH の阻害作用は様々な生物種で報告されている既知のものであったが、*in vitro* 代謝経路を用いた探索方法が未知の酵素エフェクターを同定できる手法であることを示唆した。

metabolome, enzyme, allosteric regulation

講演番号：4B11a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ B 校舎 11 会場

マイクロ波照射が大腸菌のグルコース代謝に与える効果

The effect of microwave irradiation on glucose metabolism in *Escherichia coli*.

○佐成 巧、麻生 祐司、小原 仁実（京都工繊大院・工芸科学）
○Takumi SANARI,Yuji ASO,Hitomi OHARA (Kyoto Inst. Tech.)

［緒言］従来の汎用マイクロ波（MW）照射装置は温度を保ちながら一定出力の MW を連続照射することができない。また、一定出力の MW を連続照射したときの微生物の代謝物変化を解析した研究例はない。そこで本研究では、微生物の至適生育温度を保ちながら一定出力の MW を連続照射することのできる新たな MW 照射装置の開発を行い、これを用いて MW 照射が *Escherichia coli* K-12 株のグルコース代謝に与える効果を解析した。

[方法] （MW 照射装置の開発）反応の場となる試験管を覆うホウ珪酸ガラス製ジャケットを作製し、MW を吸収しない冷媒を循環させた。試験管内の液温は冷媒により調節し、光ファイバー温度計で温度測定した。

（MW 照射がグルコース代謝に与える効果の解析）*E. coli* K-12 株を LB 培地に接種し、37°C で振とう培養した。対数増殖期に達した菌体を洗菌後、1%グルコース-50 mM リン酸緩衝液に懸濁し 37℃で 1h インキュベーションした。これを再び洗菌し同緩衝液に懸濁することで休止菌体液とした。開発した MW 照射装置を用いて一定出力（20、40、80W）で MW を連続照射しながら 37°C で休止菌体液を 12 h インキュベーションした。経時的に休止菌体液を分取し、SEM による形態観察、生菌数の測定、残存グルコース濃度の測定、HPLC 及び GC-MS 分析による代謝物の解析を行った。

[結果と考察] SEM 観察から、MW 照射した場合では不均一な細胞形態が観察された。一方、MW 照射と未照射の両者間において、生菌数と残存グルコース濃度の測定結果に優位な差はなかった。HPLC 及び GC-MS 分析の結果、MW 照射強度の増加に伴い乳酸生産量は減少した。この結果から、大腸菌への MW 照射は乳酸生産に関連する酵素活性や遺伝子の発現に効果を与え、グルコース代謝に変化をもたらすと考えられる。

Metabolism, Microwave irradiation, *Escherichia coli*

講演番号：4B11a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ B 校舎 11 会場

ターゲットメタボロミクスに基づく *Clostridium cellulovorans* の代謝経路の解明
Target metabolomics demonstrated carbon metabolism of *Clostridium cellulovorans*
○篠原 昌宏[1]、森坂 裕信[1]、松井 一真[1]、高嶋 和也[2]、黒田 浩一[1]、三宅 英雄[2]、田丸 浩[2]、植田 充美[1] ([1]京大院農・応用生命、[2]三重大院・生資)
○Masahiro SHINOHARA[1], Hironobu MORISAKA[1], Kazuma MATSUI[1], Kazuya TAKASHIMA[2], Kouichi KURODA[1], Hideo MIYAKE[2], Yutaka TAMARU[2], Mitsuyoshi UEDA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric, Kyoto Univ., [2]Dept. Life. Sci., Mie Univ. Grad. Sch. Bioresour)

【背景と目的】バイオマス分解に関与するタンパク質複合体セルロソームを形成する *Clostridium* 属細菌は数種報告されている。それぞれの種に関する研究の多くは、セルロソームそのものに注目しているが、今後、セルロソーム生産菌を利用してバイオ燃料などの有用物質生産につなげる場合には、その基礎的な生態、中でも一次代謝の重要経路を理解することが必要である。*Clostridium* 属細菌において、単糖を出発物質とした代謝経路の流れを分子生物学的手法によって明らかにした研究は少なく、また、*C. acetobutylicum* を対象とした報告[1]においても、観測された代謝経路に関与している酵素遺伝子の全てがゲノム上で予測されているわけではなかった。そこで、本研究では、*Clostridium* 属セルロソーム生産菌の中でも、多様なバイオマスを分解するセルロソームを形成し、応用利用が期待される中温完全嫌気性菌 *C. cellulovorans* の代謝経路を、分子生物学的手法により明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】ゲノム解析の結果[2]より、多くの酵素がアノテーションされている TCA 回路に着目した。そこで、定常期に達した *C. cellulovorans* を、安定同位体ラベルした炭素源を含む培地に植え次ぎ、ラベル化炭素の代謝物への取り込みを検討した。定めた時間ごとに細胞内代謝物を抽出し、誘導体化後、GC/MS を用いたターゲットメタボロミクス解析を行なった。その結果、TCA 回路中間体であるターゲット分子種への安定同位体ラベル化炭素の取り込みが観察された。加えて、転写レベルの解析を行い、TCA 回路の流れに関して検討した。その結果、*C. cellulovorans* の TCA 回路に関して新たな知見が得られたので、解析結果をまとめて報告する[3]。
[1] D. Amador-Noguez, et. al. (2010) *J. Bacteriol.*, 192, 4452-4461
[2] Y. Tamaru, et. al. (2010) *J. Bacteriol.*, 192, 901-902
[3] M. Shinohara, et. al. submitted.

metabolomics, TCA cycle, *Clostridium cellulovorans*

講演番号：4B11a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ B 校舎 11 会場

枯草菌ゲノム縮小株を用いた組換えタンパク質生産における転写、代謝フラックス解析

Transcriptome and ^{13}C-Metabolic flux analysis for recombinant protein production by *Bacillus subtilis* reduced genome strain

○戸谷 吉博[1]、河崎 優樹[1]、平沢 敬[1]、増田 健太[2]、森本 拓也[2]、ONUMA Chumsakul[3]、石川 周[3]、大島 拓[3]、影山 泰[2]、尾崎 克也[2]、小笠原 直毅[3]、清水 浩[1]（[1]阪大院・情報・バイオ情報、[2]花王・生科研、[3]奈良先端大院・情報）

○ Yoshihiro TOYA[1], Yuki KAWASAKI[1], Takashi HIRASAWA[1], Kenta MASUDA[2], Takuya MORIMOTO[2], Chumsakul ONUMA[3], Shu ISHIKAWA[3], Taku OSHIMA[3], Yasushi KAGEYAMA[2], Katsuya OZAKI[2], Naotake OGASAWARA[3], Hiroshi SHIMIZU[1] ([1]Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]Biol. Sci. Lab., Kao Corp., [3]Grad. Sch. Infom. Sci., NAIST)

【目的】グラム陽性菌のモデル生物である枯草菌は、高いタンパク質分泌能力を持つことから有用物質生産の宿主細胞として注目されている。近年、目的物質の生産に不要なゲノム領域を大規模に削除することで、組換えタンパク質の生産性が向上することが報告されている（Morimoto *et al.*, 2008 *DNA Res.* 15:73-81）。本研究では、セルラーゼの生産性向上を目的とした合理的な代謝の改変を行うため、セルラーゼ生産時と非生産時における転写・代謝レベルにおける違いを調査した。

【方法】セルラーゼ合成遺伝子を導入した枯草菌野生株およびゲノム縮小株を、合成培地を用いて好気条件下で回分培養し、対数増殖期における細胞の遺伝子発現を GeneChip 解析によって測定した。また、^{13}C 標識したグルコースを用いて培養し、菌体を構成するタンパク質に由来するアミノ酸の ^{13}C 濃縮度をガスクロマトグラフ質量分析計によって測定することで、中枢代謝経路のフラックス分布を求めた。

【結果・考察】グルコースを単一炭素源とした培養ではセルラーゼは生産されず、生産にはグルタミン酸が必要であることが分かった。そこでグルタミン酸を加えた場合と加えなかった場合について遺伝子発現とフラックス分布を比較した結果、グルタミン酸を加えた培養において、TCA 回路やホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ、リンゴ酸酵素のフラックスが増加することが明らかになった。グルタミン酸添加時に糖新生反応が活性化することは、遺伝子発現においても確認された。また、野生株とゲノム縮小株の代謝フラックス分布の比較からも、より多くセルラーゼを生産するゲノム縮小株において TCA 回路のフラックスが増加することが分かった。これらの結果より、セルラーゼ生産には TCA 回路のフラックスを強化することが重要であり、それに伴う ATP 生産量の増加や、炭素原子の供給が生産性向上に寄与することが示唆された。

Bacillus subtilis, ^{13}C-Metabolic flux analysis, Recombinant protein production

講演番号：4B11a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ B 校舎 11 会場

Metabolomics-based approach for strain improvement of 1-propanol producing *Escherichia coli*

○SASTIAPRAMA PUTRI[1], NAOKI KAWASE[1], SHINGO NOGUCHI[2], CLAIRE SHEN[3], JAMES LIAO[3], TAKESHI BAMBA[1], EIICHIRO FUKUSAKI[1] ([1]Dept. of Adv. Sci. and Biotech, Grad. Sch. of Eng., Osaka Univ., [2]Dept. of Biotech., Sch. of Eng., Osaka Univ., [3]Dept. of Chem. and Biomolecular Eng., UCLA)

Depletion of fossil fuels results in a pressing need to produce chemicals and fuel from renewable resources. Several promising biofuels have been produced in non-native hosts. In particular, longer-chain alcohols are of interest because of their high energy densities and low hygroscopicities, which are desirable traits for fuel storage and distribution. One attractive higher alcohol is 1-propanol, an important industrial chemical that has been used as paint, cleaner and cosmetics. It can be esterified to yield diesel fuels and be dehydrated to yield propylene, which at present is derived from petroleum for making polypropylene. Previously, *Escherichia coli* strains capable of producing 1-propanol from glucose have been constructed. 1-propanol production was achieved via 2-ketobutyrate from two pathways, native threonine pathway and non-native citramalate pathway from *Methanococcus jannaschii*. The strain possessing two pathways resulted in a high titer of 1-propanol, reaching 2.5 g/L/day. Here, we demonstrate that comprehensive metabolomics analysis by ion pair LC/MS and GC/MS and multivariate analysis by Principal Component Analysis (PCA) and Orthogonal Projection to Latent Structures-Discriminant Analysis (OPLS-DA) were successful to validate strain construction and reveal unprecedented accumulation of by-products as well as bottlenecks in the pathway, which opens up new possibilities to engineer strains with higher productivity.

Keywords : metabolomics, biofuel, 1-propanol, *Escherichia coli*

metabolomics, biofuel, *Escherichia coli*

講演番号：4B11a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:12～ B 校舎 11 会場

質量分析器を用いた代謝プロファイリングによる 1−プロパノール生産延長を目的とした主要因子の探索

Investigation of the key factors for prolonged production of 1-propanol by mass spectrometry based metabolic profiling

○野口 真悟[1]、プトリ サスティアプラマ[2]、川瀬 直樹[2]、シェン クレア[3]、リャオ ジェイムズ[3]、馬場 健史[2]、福崎 英一郎[2]([1]阪大工・応用自然、[2]阪大院工・生命先端、[3]UCLA)
○Shingo NOGUCHI[1], SastiaPrama PUTRI[2], Naoki KAWASE[2], Claire SHEN[3], James LIAO[3], Takeshi BAMBA[2], Eiichiro FUKUSAKI[2] ([1]Dept. of Biotech., Sch. of Eng., Osaka Univ., [2]Dept. of Adv. Sci. and Biotech., Grad. Sch. of Eng., Osaka Univ., [3]Dept. of Chem and Biomol. Eng., UCLA)

本研究は，塗料や洗剤，化粧品のような様々な工業製品において多目的有機溶剤として利用されている 1 - プロパノールの微生物生産技術開発に関わる. 1 - プロパノールは代謝改変遺伝子組み換え大腸菌により，スレオニン経路あるいはシトラマル酸経路由来の 2 - ケトブタン酸を経由した生産が報告されている．[1]［2］これまでは生化学，生理学的な知見や化学量論に基づいた手法により高生産性菌株構築が行われてきたが，実用化にはさらなる生産性向上が求められる．当該問題解決のために我々は，生産における重要な因子解明へのメタボロミクスの応用を検討している．メタボロミクス技術は生産経路に直接関係する代謝物や，同様に直接には関係しない代謝物を網羅的に解析することが可能であるため，代謝工学において非常に有効な手法であると言える．さらにメタボロームデータを説明変数に設定することで生理的な特徴を定量的に扱うことも可能となる．つまり，1 - プロパノール生産に対して負に貢献する代謝物の蓄積や，高生産に寄与する重要な代謝物を発見することが期待できる.

本研究で，我々は質量分析器を用いて代謝プロファイリングを行い，組み換え大腸菌における問題代謝箇所を調査することを目的とした．まず大腸菌の 1 - プロパノール生産期間を延長するために pH 調整と基質供給による培養条件の最適化を試み，それによって生じた代謝物変化を観察した．その結果生産期間は延長し，8 g/L 以上の 1 - プロパノール蓄積量が観測された．さらに培養条件ごとのメタボローム情報を比較することで，生産期間の延長に寄与する因子の探索を行った．生産期間に影響する因子の特定は，さらなる生産期間の延長と生産量の増加を可能にすると考えられる．本研究では，生産過程の最適化のための体系的な標的探索におけるメタボロミクスの有用性を示す.

［1］C.R. Shen, J.C. Liao, *Metab. Eng*. **10**, 312-320 (2008)
［2］Shota A, J.C. Liao, *Appl. Environ. Microbiol*. **74**, 7802-7808 (2008)

metabolomics, biofuel, *Escherichia coli*

講演番号：4B11a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:24～ B 校舎 11 会場

アルコール脱水素酵素阻害剤による酵母中心炭素代謝制御

Regulation of yeast central metabolism by alcohol dehydrogenase inhibitor

○松田 史生[1,2,3]、白井 智量[3]、近藤 昭彦[3,4]（[1]神戸大自然科学、[2]大阪大情報科学、[3]理研 BMEP、[4]神戸大院工）
○Fumio Matsuda[1,2,3], Tomokazu Shirai[3], Akihiko Kondo[3,4] ([1]Kobe Univ., [2]Osaka Univ., [3]RIKEN BMEP, [4]Kobe Univ.)

【目的】これまで中心代謝経路の各反応ステップを阻害するさまざまな薬剤が報告されているが、薬剤の処理が微生物中心代謝全体に与える影響には不明な点が多い。そこで本研究では、出芽酵母にアルコール脱水素酵素阻害剤を処理し、中心代謝経路に生じる変化を代謝プロファイル分析法を用いて解析した。
【方法】出芽酵母実験室株(*Saccharomyces cerevisiae*, YPH499 株)を 96 穴ウェルプレート中、YPD 培地中で培養し(30℃、200 rpm)、濁度の上昇から増殖速度を検定した。生育阻害活性の見られた代謝阻害剤について、500 mL の YPD 培地中で浸とう培養を行い、代謝物プロファイルの経時的な比較を行った。酵母菌体はフィルターでろ集後、クロロホルム―メタノール―水法をもちいて、代謝物を抽出した。代謝物プロファイル分析は、糖リン酸、α ケト酸、補酵素については液体クロマトグラフィー―タンデム四重極型質量分析計の MRM モードで行い、(LC-MS/MS, Agilent 6460)、有機酸、アミノ酸、糖については、GC-MS を用いたメタボローム分析法に従って実施した。
【結果】複数のアルコール脱水素酵素について、96 穴プレートを用いたアッセイ法で培養開始 18 時間後の生育阻害活性を調べたところ、ピラゾールに活性が認められた。50%生育阻止濃度 pIC50 は 1.4 ± 0.1 M だった。ついでフラスコスケールで培養を行い、培養開始 16 時間後に 5 g/L のピラゾールを投与し、0, 2, 4, 7, 24 時間後に菌体および培養液を回収して、代謝成分の分析を行った。ピラゾール処理区では菌体生育速度が 82%阻害され、エタノール収率も 0.34 g/g glucose から 0.10 g/g glucose まで減少した。一方、グリセロール収率は、0.03 g/g glucose から 0.26 g/g glucose まで増加した。菌体内代謝産物のプロファイル分析の結果、ピラゾール処理区では、NADH/NAD^+比の増加し、酸化還元バランスに変化が起きていた。また、フルクトース-1,6-ビスリン酸も顕著に蓄積していたことから、アルコール脱水素酵素の阻害が酵母中心炭素代謝に様々な影響を及ぼしていることが明らかとなった。本研究は NEDO「先導的産業技術創出事業（若手研究グラント）」の一環で行われたものである。

metabolic inhibitor, metabolic profiling analysis, Saccharomyces cerevisiae

講演番号：4B11a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:36～ B 校舎 11 会場

出芽酵母によるコハク酸生産におけるメタボロミクスを活用した代謝評価とその生産性の向上
Improving succinic acid production by *Saccharomyces cerevisiae* based on evaluation with metabolomics

○平沢 敬、伊東 佑真、清水 浩（阪大院情報・バイオ情報）
○Takashi hirasawa,Yuma Ito,Hiroshi Shimizu (Dept. of Bioinfo. Eng., Grad. Sch. of Info. Sci. and Technol., Osaka Univ.)

【目的】微生物細胞を宿主とした有用化学品生産において、その生産性向上のためには、細胞内の代謝状態を把握しその細胞を評価することが必要となる。そのような代謝状態の把握・評価のために、細胞内の代謝物質を一斉に分析するメタボロミクスは有効な手段となると考えられる。本研究では、高いエタノール生産性のみならず高い酸耐性を示すという特徴を持つ出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主に、有機酸であるコハク酸を生産するような組換え株を構築し、構築した組換え株の代謝状態をメタボローム解析により評価した。また、メタボローム解析の結果をもとに、コハク酸の生産性向上に向けた代謝改変を行った。コハク酸は、TCA サイクルの中間代謝物質であり、また高分子ポリマー生産のための原料となるため、バイオプロセスによる有用物質生産におけるターゲット物質として注目されている。
【方法および結果】*S. cerevisiae* のコハク酸デヒドロゲナーゼのサブユニットをコードする *SDH1* と *SDH2* を破壊することで、TCA サイクルを経由して酸化的にコハク酸を生産することを可能にする組換え株を構築した。坂口フラスコを用いた振とう培養において、*SDH1* と *SDH2* を破壊することで、野生株と比べてコハク酸の生産が増加していることを確認した。さらにアルコールデヒドロゲナーゼをコードする *ADH1*・*ADH2*・*ADH3*・*ADH4*・*ADH5* の遺伝子を破壊することでエタノール生産が低下し（Ida et al. J. Biosci. Bioeng. 2012)、さらに生産性が増加したことが確認された。これら構築した組換え株について、対数増殖期の細胞内代謝物質含量をキャピラリー電気泳動-質量分析計を用いて測定し、代謝状態を評価した。その結果、*SDH1* と *SDH2* を破壊することで、野生型株より高いコハク酸の細胞内蓄積が見られた。そこで、分裂酵母のリンゴ酸トランスポーターをコードする *mae1* 遺伝子を発現させたところ、培養上清中のコハク酸濃度のさらなる上昇と細胞内のコハク酸含量の低下が確認された。メタボロミクスは微生物育種のための戦略を導き出す有効なツールとなると期待される。

Saccharomyces cerevisiae, succinic acid, metabolomics

講演番号：4B11a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:48～ B 校舎 11 会場

ノンターゲットアプローチによる GC/MS 代謝ターンオーバー解析

Non-targeted approach for GC/MS based metabolic turnover analysis

○中山 泰宗[1]、津川 裕司[1,2]、玉田 佳大[1]、馬場 健史[1]、福崎 英一郎[1] ([1]阪大院工、[2]理研 PSC.)
○ Yasumune NAKAYAMA[1], Hiroshi TSUGAWA[1,2], Yoshihiro TAMADA[1], Takeshi BAMBA[1], Eiichiro FUKUSAKI[1] ([1]Osaka univ., [2]Riken PSC.)

代謝マップには多くの分岐経路・回路・逆反応が存在し，それらが細胞内外の状態に応じで高度に制御されている．そのためときとして代謝物蓄積量は十分な情報ではない．そのためにこれまでに種々の代謝動態解析法が開発され利用されてきた。中でも flux distribution analysis や metabolic flux analysis は洗練された理論構築が成されており，代謝工学やシステムバイオロジーをはじめとして様々な分野で利用されている．これらの方法は代謝マップをベースとした生物への数学的アプローチであり理論的大枠は完成されている．一方で代謝状態を立式するために代謝マップの既定が必要となり，定義された代謝経路から外れる代謝を対象とすることが難しい．
一方で分析化学をベースとする metabolic turnover analysis (MTA)は，原理的に観測可能なピークすべてを対象として解析することができる．しかし MTA は得られるデータが膨大であるにもかかわらず，解析手法が確立されていないのが現状である．また得られた未知ピークについても，統一された有用な解析手法が提案されていない．そこで本報告では標識率の経時変化によるターンオーバー解析と多変量解析を組み合わせることで，代謝変動と関連する代謝物を効率良くマイニングする手法を構築した．さらに本手法を既存のピークアノテーション法と組み合わせることで，代謝変動と関連がある未知ピークのアノテーションまでを行うワークフロー提案をする．

対象としては *Saccharomyces cerevisiae* X2180 株及び BY4742 株を用い，アミノ酸の添加による代謝動態の変化を MTA により観測した．標識源には $^{13}C_6$-Glucose を用い，10 点の経時サンプリングを行った．親水性代謝物を Bligh and Dyer 法にて抽出をし，methoxyamine と MSTFA により誘導体化の後，GC/MS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Kyoto) によりスキャン分析を行った．データは MetAlign, AIoutput によりピーク同定を行った．さらに CG/MS solution (Shimadzu, Kyoto) により各代謝物のマススペクトルを取得し，MTA を行った．得られたデータは主成分分析に供し，代謝動態の可視化を行った．更にグルコースと各代謝物の PCA 上の距離を算出し，各サンプル間での距離を比較することでターンオーバーの変化が著しい代謝物の選択を行った．未知ピークに対しても同様の解析を行い，ターンオーバーの変動が大きいピークの選択を行った．得られた未知ピークは NIST, Golm, Mass bank 等のの GC/MS ライブラリに供し，アノテーションを行った．結果として，複数摂動関連の代謝物及び未同定ピークを選択することができ，未同定ピークに関してはアノテーションを行うことができた．

metabolomics, metabolic turnover analysis, metabolic dynamics

講演番号：4B13a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ B 校舎 13 会場

麹菌 *A. oryzae* におけるエンドサイトーシス関連タンパク質 AipB, AipC, AipD の解析

Analysis of endocytosis-related proteins AipB, AipC, and AipD in *A. oryzae*

○松尾 賢人、樋口 裕次郎、菊間 隆志、有岡 学、北本 勝ひこ（東大院農生科・応生工）
○Kento MATSUO,Yujiro HIGUCHI,Takashi KIKUMA,Manabu ARIOKA,Katsuhiko KITAMOTO
(Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】　菌糸先端において、エンドサイトーシスが活発に行われている部位に局在するAoAbp1 をbaitとしたyeast two-hybridスクリーニングにより、4 つの遺伝子*aipA*～*D*（AoAbp1 interacting protein）が見出された。これらの遺伝子は*Aspergillus*属糸状菌において広く保存されており、このうちAipB、AipC、AipDの機能解析を行うことで、*A. oryzae*におけるエンドサイトーシス機構のさらなる理解を目指した。これらのタンパク質はすべてAoAbp1 の全長およびSH3 ドメインと相互作用しており、自身の配列中のプロリンリッチ領域がこの結合に寄与していると考えられた。また、EGFP融合タンパク質の顕微鏡観察で、菌糸先端や細胞膜上においてAoAbp1-mDsRedとの共局在が観察されたことから、エンドサイトーシスに何らかの形で関与していると考えられた。

【方法と結果】　*aipB* は class I myosin 重鎖をコードしており、*A. nidulans* における *myoA* や出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の *MYO3*/*MYO5* など、他の近縁種においても高い相同性でホモログが存在していた。*aipB* 破壊株は取得できなかったため、*thiA* 条件発現プロモーター制御下で *aipB* の発現を抑制したところ、コロニー周縁部の形態異常および分生子の発芽率の低下が観察された。これらは *A. nidulans* での知見と一致しており、AipB が myosin I としてエンドサイトーシスに機能することが強く示唆された。

*aipC*は*S. cerevisiae*の*APP1*（actin patch protein）のホモログである一方、*aipD*は*S. cerevisiae*にはホモログは存在せず、*Aspergillus*属糸状菌に特異的な遺伝子であった。通常の培養条件では、*aipC*、*aipD*の破壊株ともにその生育や蛍光色素FM4-64 のエンドサイトーシスに異常は見られなかったが、*aipC*破壊株において、特に低温条件で分生子数が有意に減少すること、アゾール系抗真菌剤であるミコナゾールやイトラコナゾールに耐性を示すことが分かった。さらに我々は、FM4-64 を用いない観察法として、細胞膜上に存在する膜区画であるMCC（membrane compartment of Can1p）の構成因子、アルギニンパーミアーゼAoCan1 に着目し、過剰量のアルギニンの添加によって誘導される選択的なエンドサイトーシスを解析する系を確立した。*aipC*破壊株、*aipD*破壊株においてAoCan1-EGFPの取込みを観察したところ、両破壊株でエンドサイトーシスに遅延が生じることから、AipCとAipDがエンドサイトーシスに関与することが明らかとなった。また、出芽酵母とは異なり、AoCan1-EGFPは主に菌糸基部の細胞膜上に偏って局在していたことから、高度に極性化した細胞において菌糸の先端と基部で異なるエンドサイトーシスの機構が存在することが示唆された。

Aspergillus oryzae, endocytosis, *CAN1*

講演番号：4B13a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ B 校舎 13 会場

Identification and functional analysis of ER cargo receptors for secreted proteins in *Aspergillus oryzae*

○Huy Dung HOANG,Jun-ichi MARUYAMA,Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

[Purpose]

Aspergillus oryzae is a filamentous fungus extensively used in traditional Japanese fermentation. Due to its ability to secrete a large amount of proteins into the medium, *A. oryzae* has been industrially used for the production of enzymes and heterologous proteins. However, detailed knowledge of *A. oryzae* secretory pathway is insufficient at present, restricting the advance in improving the strain. In the secretory pathway, newly-synthesized proteins are translocated into the ER, completely folded, and then packaged into the transport vesicles for delivery to the Golgi apparatus. Packaging of secreted proteins into the transport vesicles is selective, and a number of the ER membrane proteins called cargo receptors are responsible for efficiently recruiting a set of secreted proteins into the transport vesicles. To shed light on the excellent protein secretion ability of *A. oryzae*, we investigate the role of ER cargo receptors in its secretory pathway.

[Methods and Results]

A search for putative ER cargo receptors on the *A. oryzae* genome database yielded three promising candidates; AO090038000244 (AoErv29) as a putative transmembrane protein homologous to yeast Erv29p, AO090102000145 (AoEmp47) and AO090026000428 (AoVIP36) as predicted transmembrane lectin-proteins homologous to yeast Emp47p and mammalian VIP36, respectively.

For studying the subcellular localization, we expressed their mDsRed fused constructs together with the ER marker calnexin-EGFP[1)]. AoErv29 and AoEmp47 showed colocalization with the ER, while AoVIP36 did not overlap with the ER but appeared as small dots near it. We generated disruptants of the three cargo receptor genes and analyzed their secretion of α-amylase, the most abundantly secreted protein in *A. oryzae*. Disruption of the *Aovip36* gene resulted in decreased α-amylase secretion, raising a possibility that AoVIP36 is a main cargo receptor for α-amylase. Further researches to determine a set of secreted proteins paired with each cargo receptor are being conducted.

1) Kimura *et al.* (2010) *Fungal Genet. Biol.* 47, 1044-1054.

Aspergillus oryzae, cargo receptor, secretion

講演番号：4B13a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ B 校舎 13 会場

麹菌 *A. oryzae* における特殊分泌タンパク質 Acyl-CoA binding protein (AoAcb1)の機能解析

Analysis of unconventional secreted protein Acyl-CoA binding protein (AoAcb1) in *Aspergillus oryzae*

○川口 航平、田所 隆之、菊間 隆志、北本 勝ひこ（東大院農生科・応生工）
○Kouhei KAWAGUCHI,Takayuki TADOKORO,Takashi KIKUMA,Katsuhiko KITAMOTO (The Univ. of Tokyo)

（目的）

近年多くの真核生物において、通常の分泌経路とは異なる様々な経路でのタンパク質の細胞外への分泌が報告されている。その一つとして、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* や *Pichia pastoris* において、小胞体 - ゴルジ体を経由する分泌経路とは異なった経路での Acyl-CoA-binding protein(Acb1)の輸送、さらには細胞外への分泌が報告されている。Acb1 はシグナル配列を持たないタンパク質であり、栄養飢餓条件で細胞外へ分泌される。その機構にはオートファジー関連タンパク質や多胞体タンパク質、細胞膜 SNARE タンパク質など多くのタンパク質が必要とされる。酵母ではこの特殊分泌経路の研究が行われているが、糸状菌ではこのような経路は発見されていない。そこで、糸状菌における特殊分泌経路を発見することを目的として本研究を行った。

（方法と結果）

S. cerevisiae の Acb1 とのホモロジー検索により見出した遺伝子 *Aoacb1* は 365 アミノ酸をコードしており、*S. cerevisiae* の 87 アミノ酸と比べて大きいが、Acyl CoA binding protein モチーフが保存されている。AoAcb1-EGFP 発現プラスミドを導入した株を取得し、蛍光顕微鏡観察で細胞内での動態を観察したところ、AoAcb1 は栄養培地、窒素源枯渇培地の両培地で、細胞内で活発に細胞先端、あるいは基部方向へと直線的に移動していることがわかった。同一直線状を逆方向へ移動する、停止しているドット状構造が移動を開始して再び停止するというような観察結果も得られた。またオートファゴソーム膜形成に重要な役割を果たす AoAtg8 との共局在を観察したところ、窒素源枯渇培地において AoAtg8 の一部が AoAcb1 と共局在していることがわかった。さらに *Aoatg8* 遺伝子破壊株での AoAcb1-EGFP の局在観察を行ったところ、破壊株では野生株よりも大きな AoAcb1 のドット状の構造が見られた。そのドット状構造は野生株の AoAcb1 のものと比べて移動速度が小さかった。これらの結果から AoAcb1 の輸送に AoAtg8 が関与していることが示唆された。現在、オートファジー関連タンパク質以外のタンパク質と AoAcb1 の共局在観察を行うとともに、他のオートファジー遺伝子破壊株における AoAcb1-EGFP の局在解析により、AoAcb1 輸送にオートファジー経路が必要なのか、あるいは AoAtg8 のみが必要なのかどうかを検討している。同時に *Aoacb1* 破壊株の形態観察を行い、*A. oryzae* における AoAcb1 の生理的機能の解析を進めている。

Aspergillus oryzae, unconventional secretion, autophagy

講演番号：4B13a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ B 校舎 13 会場

麹菌 *A. oryzae* の菌核形成抑制因子 EcdR の欠損による有性生殖促進効果の検討

Analysis of promotion effects of deleting a sclerotial formation repressor EcdR in sexual reproduction of *Aspergillus oryzae*

○田中 勇気[1]、矢萩 大貴[1]、金 鋒杰[1]、小山 泰二[2]、丸山 潤一[1]、北本 勝ひこ[1]（[1]東大院農生科・応生工、[2]野田産研）
○Yuuki TANAKA[1], Daiki YAHAGI[1], Feng Jie JIN[1], Yasuji KOYAMA[2], Jun-ichi MARUYAMA[1], Katsuhiko KITAMOTO[1]（[1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Noda Ins. Sci. Res.）

【目的】

麹菌 *Aspergillus oryzae* において有性世代は発見されていないが、株によって異なる接合型遺伝子 *MAT1-1* あるいは *MAT1-2* をもつことから、ヘテロタリックな有性生殖を行う可能性が示唆されている [1)]。*A. oryzae* で有性生殖が可能になれば、優良な形質をもつ菌株の育種に役立つと期待される。菌核は菌糸が分岐、融合、接着を繰り返して形成する耐久構造であり、他の糸状菌で菌核内に有性胞子が形成されることが報告されている。しかし、*A. oryzae* では菌核形成能力が低下していることから、有性生殖を行うにはその形成能力を向上させることが必要である。我々の最近の研究において、菌核形成を正に制御する転写因子 SclR[2)] を過剰発現した結果、2 つの株が菌糸融合して形成する菌核の増加が見られた [3)]。今回は、菌核形成を負に制御する転写因子をコードする *ecdR* 遺伝子 [4)]の破壊を行い、*A. oryzae* の有性生殖の促進効果を検討することを目的とした。

【方法と結果】

菌糸融合および有性生殖の有無を明確に判別するため、異なる栄養要求性および異なる蛍光色で細胞質を可視化した株を作製した。最初に、*A. oryzae* のウリジン・ウラシル要求性(Δ*pyrG*)をもつ MAT1-1 型株、MAT1-2 型株において *pyrG* マーカーにより *ecdR* 遺伝子を破壊した結果、分生子の形成が著しく阻害され、菌核の形成能力が顕著に向上することを確認した。*ecdR* 遺伝子破壊株よりプロトプラストを調製し、5-FOA 培地に植菌することで、*pyrG* マーカーが脱落してウリジン・ウラシル要求性に戻った株を取得した。次に、EGFP もしくは mDsRed を発現するためのプラスミドを第 6 染色体の *AosC* 遺伝子座に導入することで、細胞質を緑色、赤色蛍光それぞれで標識した。さらに、*pyrG* マーカーにより *adeB* 遺伝子を破壊することにより、アデニン要求性(Δ*adeB*)をもつ株を作製した。

以上のように作製した株を用い、*ecdR* 遺伝子破壊による有性生殖の促進効果を検討するとともに、以前作製した *sclR* 遺伝子過剰発現株との比較を行う予定である。

1) Wada *et al.* (2012) *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2819-2829.
2) Jin *et al.* (2011) *Eukaryot. Cell* 10, 945-955.
3) 和田龍太ら、2012 年度日本農芸化学会大会講演要旨集
4) Jin *et al.* (2011) *Fungal Genet. Biol.* 48, 1108-1115.

Aspergillus oryzae, sexual cycle, hyphal fusion

講演番号：4B13a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ B 校舎 13 会場

麹菌 *A. oryzae* における菌糸融合の分子機構の解析
Molecular analysis of hyphal fusion mechanism in *Aspergillus oryzae*
○塚崎 和佳子、川畑 絢平、丸山 潤一、北本 勝ひこ（東大院農生科・応生工）
○ Wakako TSUKASAKI,Junpei KAWABATA,Jun-ichi MARUYAMA,Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】

麹菌 *Aspergillus oryzae* は産業上有用な微生物であるが、有性世代が発見されていないため、複数の優れた形質を併せもつ株を交配育種することが不可能である。このような育種のためにはまず異なる 2 株を菌糸融合させる必要があり、それを効率的に行うには菌糸融合の分子機構を解明することが重要である。しかし、*A. oryzae* の菌糸融合については約 50 年前の坂口謹一郎らの報告 [1)]以降、ほとんど研究が行われてこなかった。我々は最近、*A. oryzae* において寒天培地での対峙培養、液体培地での混合培養のそれぞれで菌糸融合が起こることを確認した [2)]。本発表では、寒天培地での混合培養で *A. oryzae* の菌糸融合能を評価する方法を確立するとともに、菌糸融合の分子機構の解析を行ったので、それを報告する。

【方法と結果】

A. oryzae において、ウリジン・ウラシル要求性(Δ*pyrG*)とアデニン要求性(Δ*adeB*)の 2 種類の株を作製し、両者の分生子を等量ずつ混合して、ウリジン・ウラシル、アデニンを含む寒天培地にスポットした。数日間培養ののち形成した分生子を回収し、最少培地に塗布したところ、複数のコロニーの生育が観察された。ゲノム DNA に対する PCR 解析を行った結果、これらのコロニーは互いの栄養要求性が相補された菌糸融合体に由来するものであることを確認した。以上のことから、寒天培地での混合培養において *A. oryzae* が菌糸融合を行うことが明らかになった。また、栄養培地よりも最少培地において、菌糸融合の頻度が高くなる傾向が見られた。

さらに、*Neurospora crassa* などで *so* 遺伝子が菌糸融合に関与することが報告されていることから、*A. oryzae* の相同遺伝子 *Aoso* [3)]の菌糸融合での役割を調べた。その結果、*Aoso* 遺伝子破壊株では異なる栄養要求性が相補された菌糸融合体が観察されなかったことから、*A. oryzae* において AoSO が菌糸融合に関与することが示された。現在、菌糸融合への関与が予想される MAP キナーゼ AoFus3 についても解析を行うとともに、AoSO および AoFus3 と相互作用する新規タンパク質についても菌糸融合での機能を解析する予定である。

1) Ishitani and Sakaguchi (1956) *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2, 345-400.
2) 和田龍太ら、2012 年度日本農芸化学会大会講演要旨集
3) Maruyama *et al.* (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 868-873.

Aspergillus oryzae, hyphal fusion, sexual cycle

講演番号：4B13a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ B 校舎 13 会場

麹菌 *A. oryzae* における菌糸損傷に対する細胞修復と再生長の分子機構の解析
Molecular analysis of cell repair and regrowth upon hyphal wounding in *Aspergillus oryzae*
○川畑 絢平、佐伯 圭、丸山 潤一、北本 勝ひこ（東大院農生科・応生工）
○ Junpei KAWABATA,Kei SAEKI,Jun-ichi MARUYAMA,Katsuhiko KITAMOTO（Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo）

【目的】麹菌 *A. oryzae* が属するチャワンタケ亜門（真正子嚢菌綱）の糸状菌において、菌糸は隔壁によって多数の細胞に区切られている。そして、隔壁にあいている穴である隔壁孔を介して隣接する細胞どうしで細胞間連絡を行っているが、この性質はある細胞が損傷した際に隣接する細胞に溶菌が伝播する危険を伴う。我々は以前、*A. oryzae* において寒天培地上のコロニーに水を添加して溶菌を誘導する低浸透圧ショック実験法を確立し、Woronin body というオルガネラが隔壁孔をふさいで溶菌の伝播を防ぐこと [1]、同様の機能に AoSO タンパク質が隔壁孔に凝集することにより関与すること [2]を明らかにした。しかし、この実験方法では低浸透圧によるストレスが過大であるため再生長の効率が悪く、溶菌前後の変化を経時的に追跡することが困難であった。また、これまでに糸状菌全般において溶菌時の細胞修復と再生長における分子機構は解明されていない部分が多い。そこで本発表では、細胞に過度の負担をかけずに溶菌して、細胞修復と再生長までの過程を解析する新たな実験系を確立し、その分子機構の解明を試みたので報告する。
【方法と結果】寒天培地上に生育させた *A. oryzae* の菌糸をパルスレーザーにより切断し、溶菌した細胞に隣接する細胞を観察した。その結果、野生株において隣接する細胞の約 8 割が新たな菌糸先端を形成し、再生長することがわかった。*Aoso* 遺伝子破壊株を用いて同様の実験を行ったところ、再生長を行う菌糸の割合が野生株に比べて低下した。AoSO の局在変化を溶菌前後で経時的に調べた結果、菌糸切断直後から数秒という短い時間で隔壁孔に凝集する様子が観察された。以上の結果から、AoSO は溶菌後の初期段階で細胞修復に働くことで再生長に関わっている可能性が考えられた。

さらに、AoSO 部分欠失体を発現する株を用いて、パルスレーザーによる溶菌実験を行った。AoSO の C 末側領域（556-1195 アミノ酸）を *Aoso* 破壊株で発現した場合では、再生長において野生型と同等の機能を示したが、隔壁孔への凝集にかかる時間は AoSO 全長と比べて遅れるという結果が得られた。また、AoSO の C 末端約 50 アミノ酸を除いた領域（1-1146 アミノ酸）を同様に発現したところ、再生長の機能は *Aoso* 破壊株と同程度に低下したままであり、隔壁孔への凝集を示す菌糸の割合が減少した。現在，AoSO と相互作用すると考えられるタンパク質の機能解析により、細胞修復や再生長における AoSO の作用機構を明らかにすることを試みている。

1) Maruyama *et al.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 1081-1088.
2) Maruyama *et al.* (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 868-873.

Aspergillus oryzae, septal pore, regrowth

講演番号：4B13a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ B 校舎 13 会場

麹菌 *A. oryzae* の AoFus3 MAP キナーゼとその相互作用タンパク質の機能的関係の解析
Analysis of the functional relationship between AoFus3 MAP kinase and its interacting proteins in *Aspergillus oryzae*

○矢萩 大貴[1]、丸山 潤一[1]、金 鋒杰[1]、BAYRAM Ozgur[2]、VALERIUS Oliver[2]、BRAUS Gerhard H.[2]、北本 勝ひこ[1] ([1]東大院農生科・応生工、[2]ゲッティンゲン大学)
○Daiki YAHAGI[1], Jun-ichi MARUYAMA[1], Feng Jie JIN[1], Ozgur BAYRAM[2], Oliver VALERIUS[2], Gerhard BRAUS[2], Katsuhiko KITAMOTO[1] ([1]Dept. of Biotechnol.,The Univ. of Tokyo, [2]Georg-August-Universitat Gottingen)

【目的】

多細胞生物である麹菌は、菌糸の隔壁にあいた小さな穴である隔壁孔を介して、隣接する細胞どうしが細胞間連絡を行っている。この細胞間連絡は菌糸損傷時に溶菌が隣接する細胞に伝播する危険を伴うが、Woronin body というオルガネラが隔壁孔をふさぎ溶菌の伝播を防ぐことが知られている[1)]。しかし、溶菌の伝播を防ぐ機能における Woronin body 以外の因子の関与については、あまり解析が進んでいない。我々は以前、麹菌の MAP キナーゼ AoFus3 が菌糸先端と隔壁孔に局在し、溶菌の伝播を防ぐ機能に関与することを見いだした[2)]。さらに、AoFus3 と相互作用する新規タンパク質 FipA と FipB (Fus3-interacting protein)を同定し[3)]、これらが隔壁孔に局在して溶菌の伝播を防ぐ機能に関与することを示した。本発表では、AoFus3 と FipA、FipB との機能的関係を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】

fipA および *fipB* の単独破壊株において、*Aofus3* を破壊することで 2 重破壊株を作製した。それらの生育と溶菌の伝播を防ぐ機能を解析・比較したところ、AoFus3 の機能的上位性が示唆された。また、各遺伝子破壊株でそれぞれのタンパク質の局在を観察し、局在における上位性の解析を行った。その結果、AoFus3 が菌糸先端の FipB の局在に影響を与えていることが明らかになった。さらに、溶菌の伝播を防いだ後の再生長における機能を検討するために、パルスレーザーで菌糸を切断し、溶菌した細胞に隣接する細胞が新たな菌糸生長を行う能力を解析した。その結果、*Aofus3* 破壊株と *fipB* 破壊株において、溶菌後に再生長する菌糸の割合が野生株と比べて低下した。

一方で、酵母ツーハイブリッド解析により、Rho-GAP ドメインをもつ FipB が Rho GTPase のひとつ AoCdc42 の活性化型変異体と結合することを見いだした。*fipB* 遺伝子破壊株では、野生株には見られなかった AoCdc42 の隔壁孔への局在が観察されたことから、FipB が AoCdc42 の RhoGAP として機能していることが強く示唆された。現在、AoFus3 と FipB を介した AoCdc42 との関係を解析している。

1) Maruyama *et al.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*331, 1081-1088.
2) 佐々木ら、2011 年度日本農芸化学会大会講演要旨集 p. 116.
3) 丸山ら、2011 年度日本農芸化学会大会講演要旨集 p. 116.

MAP kinase, RhoGAP, Cdc42

講演番号：4B13a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ B 校舎 13 会場

Functional analysis of Woronin body-tethering protein leashin in *Aspergillus oryzae*

○PEI HAN,JUN-ICHI MARUYAMA,KATSUHIKO KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

[Purpose]

Septal pores in the Pezizomycotina allow intercellular communication between adjacent cells, which, however, includes the risk of uncontrolled cytoplasmic bleeding when hyphae are wounded. Woronin body is a Pezizomycotina-specific organelle observed in the vicinity of septum, and plugs the septal pore in response to cellular wounding. Previously, we characterized AoHex1 as the major protein of Woronin body in *Aspergillus oryzae*[1], and investigated the Woronin body differentiation from the peroxisome[2]. Recently, we discovered that Woronin bodies reversibly plug the septal pore in intact hyphae, resulting in hyphal heterogeneity by restricting the intercellular communication[3]. However, how Woronin bodies localize in the vicinity of septum is not known. Recently, the leashin (LAH) protein was identified to tether Woronin bodies to the cell cortex in *Neurospora crassa*[4], which exceptionally does not recruit the organelle in the vicinity of septum. In this study we attempt to elucidate the mechanism for tethering Woronin bodies at the septum in *A. oryzae*.

[Methods and Results]

We predicted *Aolah* gene encoding a single polypeptide of 5,727 amino acids, which is homologous to the *N. crassa lah* gene expressed into two distinct proteins[4]. AoLAH-EGFP expressed from the endogenous locus was observed as Woronin body-like dots along the hyphae and closely associated with the septal pore. To visualize the Woronin body localization, N-terminal conserved region of AoLAH (AoLAH[1-2039]) was expressed as EGFP fusion protein, since the region was hypothesized to be associated with the Woronin body via binding to the WSC (Woronin body-sorting complex) protein[5]. AoLAH[1-2039]-EGFP was localized as Woronin body-like dots in both sides of septum, and there was a certain distance from the septal pore, which is typical for Woronin body localization in the vicinity of septum. In *Aowsc* disruptant the fluorescence dispersed to the cytoplasm, confirming the recruitment of AoLAH[1-2039] to the Woronin body by AoWSC protein. In *Aolah* disruptant, AoLAH[1-2039]-EGFP was not localized around the septum, indicating that AoLAH is required for tethering Woronin body at the septum.

1) Maruyama *et al.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 1081-1088.
2) Escano *et al.* (2009) *Eukaryot. Cell* 8, 296-305. 3) Bleichrodt *et al.* (2012) *Mol. Microbiol.* in press.
4) Ng *et al.* (2009) *PLoS Genet.* 5, e1000521. 5) Liu *et al.* (2008) *J. Cell Biol.* 180, 325-339.

Aspergillus oryzae, Woronin body, septum

講演番号：4B13a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ B 校舎 13 会場

ホスファチジルエタノールアミンの細胞内輸送に関する因子の出芽酵母を用いた解析
A factor Implicated with the Intracellular Transport of Phosphatidylethanolamine in *Saccharomyces cerevisiae*

小林 新吾[1]、○水池 彩[1]、福田 良一[1]、堀内 裕之[1]、太田 明徳[2]([1]東大院・農生科・応生工、[2]東農大・応生科・バイオ)
Shingo KOBAYASHI[1], ○Aya MIZUIKE[1], Ryouichi FUKUDA[1], Hiroyuki Horiuchi[1], Akinori Ohta[2] ([1]Univ. Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Agric)

生体膜の主要構成成分の一つであるホスファチジルエタノールアミン(PtdEtn)は、ミトコンドリアの機能に重要な役割を担っている。出芽酵母において、ミトコンドリアの PtdEtn は、Psd1p により小胞体から運び込まれたホスファチジルセリンを脱炭酸して合成される。この Psd1p を欠失するとミトコンドリア内 PtdEtn 量が欠乏し呼吸機能欠損が生じるため、*PSD1* の破壊株はグリセロールや乳酸などの非発酵性炭素源を資化することができない。出芽酵母は、外部から供給したエタノールアミンをもとに小胞体膜上でケネディ経路を介して PtdEtn を合成できるが、*PSD1* 破壊株の非発酵性炭素源資化能欠損は外部からのエタノールアミンの供給によって抑圧されることから、出芽酵母には他のオルガネラで作られた PtdEtn をミトコンドリアに輸送する機構が存在すると考えられる。しかしながら、その輸送機構についてはほとんど解明されていない。

我々は、ミトコンドリアへの PtdEtn の輸送に関わるタンパク質を同定することを目的として、*psd1*Δ株の乳酸資化能欠損を抑圧できる遺伝子を単離、解析してきた。今回、得られた候補遺伝子産物が細胞内で脂質と結合しているか調べるため、本遺伝子に IgG 結合ドメインを連結して発現させ、遺伝子産物を細胞破砕液より精製した。精製タンパク質から抽出した脂質画分を質量分析装置により解析したところ、本遺伝子産物が PtdEtn やホスファチジルコリンと結合していることが明らかとなった。さらに、抑圧能を失った変異遺伝子についても同様の実験を行なったところ、これらリン脂質との結合がおおきく低下していたことから、本遺伝子産物とリン脂質との結合が呼吸能欠損の抑圧に重要であることが示唆された。

phosphatidylethanolamine, *Saccharomyces cerevisiae*, transport

講演番号：4B13a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ B 校舎 13 会場

酵母における異常タンパク質発現によるオートファジーの誘導とその分解について

Induction of autophagic degradation by the expression of misfold proteins in yeast

○樋口 健吾、興梠 祐樹、加藤 昭夫、阿座上 弘行（山口大農）
○Kengo HIGUCHI,Yuki KOHROGI,Akio KATO,Hiroyuki AZAKAMI (Yamaguchi Univ.)

【目的】生物にはタンパク質のフォールディング状態を監視し、正しく構造形成されなかったものは分解する品質管理機構が備わっている。哺乳動物において小胞体内でミスフォールドしたタンパク質が分解除去される仕組みとして 2 通りの分解機構が知られている。ユビキチン・プロテアソーム（UPS）系とオートファジー・リソソーム（ALS）系である。そこで、種々の構造安定性を示す変異型鶏卵白リゾチームを酵母で発現させ、不安定型リゾチームが分解される機構について調べた。

【方法および結果】*Pichia pastoris* で種々の変異型リゾチームを発現させ、その分泌に対するオートファジー阻害剤ウォルトマンニンの効果を調べた。その結果、安定型リゾチームの分泌はウォルトマンニンの有無に関わらず変化しなかったが、ジスルフィド結合欠損させた不安定型リゾチーム（C76A/G49N）や、αヘリックスを不安定化したリゾチーム（K13D/R21T）、アミロイド変異を導入した不安定型リゾチーム(D66H/G49N)の分泌はオートファジーの阻害により増加した。このことから、不安定型リゾチームの分解には ALS 系も関与することが示唆された。また、オートファジー阻害による分泌量の増加は、凝集性のアミロイド変異体において顕著であったことから、UPS 系で処理しきれないミスフォールドタンパク質を ALS 系で処理している可能性が示唆された。

また、種々の変異型リゾチームを発現させた *P. pastoris* において、オートファジー誘導の指標である Atg8 の発現とリゾチームの発現を蛍光免疫顕微鏡観察により調べた。その結果、安定型リゾチームの発現ではオートファジーの誘導は見られなかったが、不安定型リゾチームの発現によりオートファジーの誘導が観察された。その誘導は凝集性のアミロイド変異リゾチームを発現させたときに顕著に見られた。また、オートファジー阻害剤の添加時に不安定型リゾチームの蛍光が強まったことから、酵母でも UPS 経路をバックアップするタンパク質品質管理機構として ALS 経路が機能し得ることが示唆された。

autophagy, yeast, lysozyme

講演番号：4B13a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ B 校舎 13 会場

出芽酵母のクロマチンリモデリング因子 RSC によるオートファジー制御機構の解明
Regulatory mechanisms of RSC chromatin-remodeling complex for autophagy in budding yeast
○余 斐斐、今村 優子、湯川 格史、土屋 英子（広島大院先端研・分子生命）
○Feifei Yu,Yuko Imamura,Masashi Yukawa,Eiko Tsuchiya (Hiroshima Univ.)

【目的】
真核生物の染色体DNAは、ヒストン八量体にDNAが巻き付いたヌクレオソームコアを形成しており、このヌクレオソームコアが数珠状に繋がり、折りたたまれることで高度なクロマチン構造を形成している。出芽酵母のATP依存性クロマチンリモデリング因子RSC(Remodel Structure of Chromatin)複合体は、転写制御、DNA複製、染色体分配などに重要であり、Rsc1とRsc2を含む複合体が二種類存在している。しかし、これら二種の複合体がどのように使い分けられているかについてはよく分かっていない。当研究室では、RSCの中心因子である*NPS1*の温度感受性変異株である*nps1-105*株との合成致死を示す候補株の網羅的解析によって、RSCがミトコンドリア機能とオートファジー制御に関連することを見出している。そこで、本研究ではRSCによるタンパク質分解系であるオートファジー制御機構を明らかにすることを目的としている。

【方法及び結果】
RSC の構成因子である *rsc1* 欠損株又は *rsc2* 欠損株において、オートファジーの指標となる GFP-Atg8 融合タンパク質を発現させ、GFP-Atg8 の分解を調べた。*rsc1* 欠損株では野生株と比較して Atg8 の発現量が低下し、オートファジー誘導時の分解量も減少していた。一方、*rsc2* 欠損株では Atg8 の発現量が増加し、分解も促進していた。このことから、Rsc1 を含む複合体と Rsc2 を含む複合体とで、オートファジーに対する制御機構が異なることが明らかになった。
さらに、ミトコンドリアを選択的に分解するマイトファジーに対する影響を調べるために、非発酵性培地から栄養飢餓培地に移行することにより、異常なミトコンドリアの蓄積を観察した。マイトファジー欠損株では、異常なミトコンドリアの蓄積により活性酸素が蓄積し、ミトコンドリア DNA の欠失を引き起こす。*rsc1* 欠損株又は *rsc2* 欠損株の両方でミトコンドリアの欠損株が増加し、活性酸素の蓄積も見られた。現在、これら二種の RSC 複合体のオートファジー/マイトファジーにおける機能についてさらに解析中である。

RSC, autophagy, mitophagy

講演番号：4B13a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:12～ B 校舎 13 会場

エタノールによる出芽酵母の小胞体ストレス応答

endoplasmic reticulum-stress response of budding yeast cells upon ethanol stress

○宮川 賢一、河野 憲二、木俣 行雄（奈良先端大・バイオ）
○KENICHI MIYAGAWA,KENJI KHONO,YUKIO KIMATA (Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* によるエタノール発酵生産において、産物であるエタノールが酵母細胞にダメージを与えることは大きな問題である。本研究では、エタノールストレスへの酵母細胞の適応を理解する一環として、小胞体ストレス応答の寄与を検討した。

小胞体は分泌蛋白質の折り畳みや膜脂質の生合成を行うオルガネラであり、小胞体の機能不全は小胞体ストレスと総称される。小胞体膜貫通蛋白質である Ire1 は RNase として機能し、その活性は小胞体ストレスに応じて発揮され、*HAC1* mRNA をスプライシングにより成熟させる。成熟型 *HAC1* mRNA は転写因子へと翻訳され、小胞体で機能する蛋白質の発現が転写レベルで上昇し、小胞体ストレスは緩和へと向かう。これが酵母における小胞体ストレス応答である。では、エタノールは小胞体ストレスになるのだろうか？

我々は、S288C 由来実験室酵母株を用い、培地へのエタノール添加に応じた小胞体ストレス応答の惹起、すなわち Ire1 の活性化を、*HAC1* mRNA スプライシング効率により評価した。まず、エタノールを終濃度８％にて培地に添加したところ、一過的に *HAC1* mRNA のスプライシングが認められた。Ire1 は、変性蛋白質との直接的相互作用（小胞体内腔での蛋白質折り畳み不全の場合）、及び未解明のメカニズム（膜脂質の代謝不全の場合）により活性化することが知られている。変性蛋白質との会合能を欠く Ire1 変異体はエタノール添加により活性化しなかったことから、エタノールストレスは小胞体での蛋白質折り畳み状態に異常を生じさせ、それが小胞体ストレスになると考えられる。

しかし、その小胞体ストレスは弱いと考えられ、８％エタノールによる小胞体ストレス応答は速やかに減弱した。また、活性が減弱しない Ire1 変異体を有する細胞は、野生型細胞に比して、エタノール存在下での増殖が遅かった。すなわち、８％エタノールによる小胞体ストレス応答は、速やかに抑制されるべき不要な現象なのかもしれない。一方、培地中のエタノール濃度を１６％に上昇させると、Ire1 は活性化し続けた。そこで私たちは、この条件では小胞体にどのようなダメージが生じているのか、そして、その状態への適応のため小胞体ストレス応答システムがどのように働いているのかを明らかにすべく、研究を進めている。

endoplasmic reticulum, yeast, ethanol

講演番号：4B13a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:24～ B 校舎 13 会場

分裂酵母カルモジュリンによる胞子細胞膜形成開始の分子メカニズム

Molecular dissection of Calmodulin in fission yeast spore cell membrane formation

○石橋 尚実、今田 一姫、板谷 有希子、中村 太郎 (阪市大)
○Naomi Ishibashi,Kazuki Imada,Akiko Itadani,Taro Nakamura (Osaka City Univ.)

【目的】カルモジュリンは真核生物間で高く保存されたCa2+結合タンパク質で、細胞内のさまざまなプロセスに関わることが知られている。我々は分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*カルモジュリンオルソログCam1が、胞子細胞膜形成の開始に関わることを明らかにした。しかしながら、Cam1がどのようなタンパク質と相互作用して、膜形成開始を制御しているかはわかっていない。本研究の目的はこのCam1による胞子細胞膜形成開始の分子メカニズムを明らかにすることである。
【方法・結果】i)胞子細胞膜はスピンドル極体（SPB）より始まるが、この時期にSPBは構造的に大きな変化が見られる（構造変換)。Cam1はこの時期にSPBに局在する。そこで、SPBに局在する胞子形成関連タンパク質Spo2,Spo15との関連を調べた。cam1変異株では、Spo2, Spo15がSPBに局在できなかった。したがって、Cam1は胞子形成に必要なタンパク質をSPBに局在させることにより、胞子膜形成開始を制御している可能性が示唆された。Spo15はSPB上でSpo2より核側に存在し、Spo2のSPB局在に必要である。そこで、Spo15の欠失変異を作製し、相互作用を調べたところ、Spo15はN末端側でSpo2と結合することがわかった。しかしながら、Cam1とSpo15の直接的な結合は見られなかった。
ii) Cam1がどのようなタンパク質を介してSpo15のSPB局在を制御しているか調べるためにCam1、Spo15をbaitにして酵母ツーハイブリッド法を用いて相互因子の取得をこころみた。その結果、それぞれに相互作用する複数の候補因子を取得した。現在、これらの因子についてさらなる解析をすすめている。

yeast, Calmodulin, sporulation

講演番号：4B13a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:36～ B 校舎 13 会場

分裂酵母シンタキシン 1 の胞子形成特異的なエンドサイトーシスの分子メカニズム
Molecular mechanism of sporulation-specific endocytosis of the fission yeast syntaxin 1
○山崎 百合子、寺口 絵理香、中村 太郎（大阪市大院理）
○Yuriko Yamasaki,Erika Teraguchi,Taro Nakamura (Osaka city Univ.)

【目的】分裂酵母の胞子形成は細胞の中に新しい細胞（胞子）が作られるユニークな現象である。この現象に伴い、哺乳類の SNARE タンパク質シンタキシン 1 の分裂酵母オルソログ（Psy1）は、エンドサイトーシスによりダイナミックに細胞の中へ取り込まれ、将来の胞子細胞膜（FSM）へ局在変化する。これは FSM 形成に必須のステップであり、本研究ではこの分子メカニズムの解明をめざしている。酵母では、タンパク質のユビキチン化がエンドサイトーシスのトリガーとなること、さらにユビキチンリガーゼ（E3）の足場としてアレスチン様タンパク質が介在することが報告されている。そこで、Psy1 のエンドサイトーシスについて、①ユビキチン化 ②アレスチン様タンパク質 Mug170 に焦点をあて、解析を行った。
【結果】①ユビキチン活性化酵素（E1）の変異株では、Psy1 のエンドサイトーシスが部分的に阻害された。ユビキチン化はリジン残基がターゲットとなるため、Psy1 のリジン残基に変異を導入した株を取得したところ、エンドサイトーシスに欠損がみられた。このことから Psy1 のエンドサイトーシスにユビキチン化が必要であることが示唆された。一方、分裂酵母にはエンドサイトーシスに関与すると予想される E3 が 7 種類あるが、いずれの変異株においても Psy1 のエンドサイトーシスは正常であったことから、複数の E3 がこの系に関わることが考えられた。②Mug170 欠損株では Psy1 のエンドサイトーシスが阻害された。さらに、通常 Mug170 が発現していない栄養増殖時の細胞で Mug170 を強制発現させると、Psy1 のエンドサイトーシスが観察された。以上のことから、胞子形成特異的に発現する Mug170 を介して、Psy1 がユビキチン化を受け、取り込まれている可能性が考えられた。

endocytosis, ubiquitination, SNARE

講演番号：4B13a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:48～ B 校舎 13 会場

分裂酵母の胞子形成の開始に必要な Rab-GEF カスケードの解析

Role of the Rab-GEF cascade essential for the initiation of spore plasma membrane formation in fission yeast

○今田 一姫、中村 太郎（阪市大院理・生物地球）
○Kazuki Imada,Taro Nakamura (Osaka City Univ.)

分裂酵母の胞子形成は、将来の胞子細胞膜である前胞子膜が母細胞中に新生され、減数分裂によって生じた核を包み込み、新たな細胞を形成するという、非常に興味深い現象である。我々はこれまでに、胞子形成欠損株(*spo* 変異株)のスクリーニングと表現型の解析により、エキソサイトーシス経路における Rab カスケードが前胞子膜形成の開始に重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。エキソサイトーシス経路における Rab カスケードには、Ypt3(哺乳類 Rab11/出芽酵母 Ypt31/Ypt32)とその下流の Rab GTPase である Ypt2(哺乳類 Rab8/出芽酵母 Sec4)が存在し、Ypt2 のグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)である Sec2 がカスケードを仲介していると考えられている。加えて、分裂酵母では減数分裂特異的なスピンドル極体(SPB)構成因子である Spo13 が Ypt2 の GEF として機能しうることが報告されている。

そこで我々は、胞子形成時における Sec2 と Spo13 の機能制御メカニズムの解析を試みた。胞子形成時における発現量を調べた結果、Spo13-HA は前胞子膜形成開始時に発現がみられるのに対し、Sec2-GFP は発現が非常に弱かった。また、Yeast two hybrid 法により、Sec2 が胞子形成に必要な SPB 構成因子である Spo7 と強く結合することが分かった。さらに、Yeast three hybrid 法により、Sec2 と GTP 結合型 Ypt3 との結合が、Spo7 により阻害される可能性が示唆された。一方、Spo13 を栄養増殖時に強制発現させたところ、GFP-Ypt2 が異常な局在を示した。以上の結果から、胞子形成時において、Sec2 は発現、機能ともに抑制されており、胞子形成特異的な Spo13 の発現によって、Ypt3 から Ypt2 への Rab カスケードが進行し、前胞子膜形成の開始が誘導される可能性が考えられる。

fission yeast, Rab GTPase, sporulation

講演番号：4B14a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ B 校舎 14 会場

Genome analyses for hyper glucose tolerance of acetic acid bacteria, *Tanticharoenia sakaeratensis* and *Asaia bogorensis*.

Hiromi Hadano[1], Norie Higashiura[1], Hideki Hirakawa[2], So Takebe[1], Kazunobu Matsushita[3], ○Yoshinao AZUMA[1] ([1]BOST, Kinki University, [2]Kazusa DNA Research Institute, [3]Yamaguchi University)

Acetic acid bacteria (AAB), forming a divergent phylogenetic group within alpha-proteobacteria, inhabit niches where sugars are accumulated, e.g. fruits, flowers and soil nearby. *T. sakaeratensis* and *A. bogorensis* are able to grow in media with glucose up to 30%. To acquire new enzymes and metabolic systems practicable in high sugar concentration and to achieve a model system to comprehend environmental responses of AAB, we have been performing comparative genome, transcriptome and proteome analyses using *T. sakaeratensis* and *A. bogorensis*. First, we have determined draft genome DNA sequences of *T. sakaeratensis* and *A. bogorensis* as well as 12 other AAB using a next generation sequencer. Homologous gene analysis among more than 20 AAB genomic DNA sequences including *T. sakaeratensis*, *A. bogorensis* and other AAG genomic DNA sequences revealed that 41 gene groups were specific to only *T. sakaeratensis* and *A. bogorensis*. Comparative transcriptome and proteome analyses illustrated that *T. sakaeratensis* and *A. bogorensis* showed different gene and protein profiles between high and low glucose concentration environments. Both of *T. sakaeratensis* and *A. bogorensis* commonly presented higher expression of cytochrome d ubiquinol oxidase operon under high a glucose concentration condition than a low one. In addition, *T. sakaeratensis* and *A. bogorensis* showed accumulation of pyruvate decarboxylase and DNA starvation/stationary phase protection protein under a high glucose concentration, respectively, based on both of comparative transcriptome and proteome analyses. We will present our recent data for the metabolic and gene regulations by the stress of high glucose concentration.

acetic acid bacteria, transcriptome, genome

講演番号：4B14a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ B 校舎 14 会場

環境メタトランスクリプトーム解析により検出した土壌微生物由来のバイオマス糖化関連酵素のクローニングと機能評価

Isolation and characterization of lignocellulolytic enzymes from forest soil eukaryotic community revealed by metatranscriptomic analysis

○木村 信忠、三浦 隆匡、高崎 一人、菅野 学、鎌形 洋一 (産総研生物プロセス)
○ Nobutada KIMURA,Takamasa Miura,Kazuto Takasaki,Manabu Kanno,Yoichi Kamagata (AIST)

【背景と目的】環境中でセルロース等の木質が分解する過程では、細菌などの原核生物以外に糸状菌など真核生物が精力的に活動している。しかし、真核生物の遺伝子はタンパク質のアミノ酸配列をコードする領域（エクソン）が非コード領域（イントロン）によって分断された複雑な構造をとっているため、真核生物の遺伝子を DNA レベルで検出・捕捉することは非常に難しい。一方、木質が分解する過程において真核生物由来のバイオマス糖化に係わる遺伝子の転写物質(mRNA)が大量に合成されることが予想される。そこで、腐植質土壌を対象とした環境メタトランスクリプトーム解析を行い、遺伝情報からバイオマス糖化関連遺伝子を網羅的に探索し、遺伝子のクローニングと発現酵素の機能評価を行った。
【方法と結果】まず、結晶性セルロースであるアビセルを添加して集積した森林土壌から RNA を抽出し、真核生物由来の mRNA のみを鋳型にした cDNA ライブラリーの構築を行った。次に、次世代シーケンサー（Roche 454 FLX）を利用した cDNA 塩基配列の解読作業を行い、土壌サンプルから糖質加水分解酵素をコードすることが推定される 129 種類の遺伝子情報(断片)を検出した。
そのうち、FX003685 遺伝子がコードする推定アミノ酸配列は、*Neosartorya fischeri* のゲノム情報に存在する Extracellular cellulase にアミノ酸レベルで 79%の相同性を示しており、さらに、モチーフ検索の結果から、糖化促進因子であるエクスパンシン特有の保存配列が見出された。そこで、大腸菌による FX003685 遺伝子の異種発現系を構築し、遺伝情報から推定される分子量と一致する約 34 kDaのタンパク質の発現を確認した。次に、酵素の活性評価を行った結果、FX003685 から発現したタンパク質にセルラーゼ活性は検出されなかったが、1%アビセルを基質とした溶液中において、FX003685 から発現するタンパク質は、糖化を 1.8 倍程度促進することを確認した。以上の結果は、環境メタトランスクリプトーム解析により取得した遺伝情報に基づいて、環境中に存在する真核生物由来の未知遺伝子資源にアクセスが可能であることを示した。

metatranscriptome, lignocellulolytic enzyme

講演番号：4B14a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ B 校舎 14 会場

バイオマス分解のための *Clostridium cellulovorans* の定量的セクレトーム解析
Quantitative secretome analysis of *Clostridium cellulovorans*for biomass degradation
○松井 一真[1]、江坂 康平[1]、森坂 裕信[1]、三宅 英雄[2]、田丸 浩[2]、植田 充美[1] ([1]京大院・農・応用生命、[2]三重大院・生資)
○ Kazuma Matsui[1], Kohei Esaka[1], Hironobu Morisaka[1], Hideo Miyake[2], Yutaka Tamaru[2], Mituyoshi Ueda[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric, Kyoto Univ., [2]Dept. Life. Sci., Mie Univ. Grad. Sch. Bioresour.)

[目的]
中温完全嫌気性菌である *Clostridium cellulovorans* は、菌体外に酵素複合体セルロソームを形成し、分泌酵素群と共に、非常に効率良くセルロース質ソフトバイオマスを完全分解する。セルロソームは、足場タンパクに多数の酵素を集積することで複合体を形成し、基質に応じて構成酵素の最適な組み合わせをとることで効率的な分解を実現しており、その機構は非常に興味深い。そこで、我々が世界に先駆けて明らかにした *C. cellulovorans* の全ゲノム配列完全解析の結果[1)]を元に、種々の基質の下での定量的セクレトーム解析を行うことで、分解基質によるセルロソーマルタンパク質を含むセクレトームの量的変化を網羅的に明らかにすることを試みた。

[方法及び結果]
セロビオース、キシラン、ペクチン、リン酸膨潤セルロース及び大型藻類のクロメを基質として *C. cellulovorans* を 2 週間培養し、嫌気条件下での生育曲線を得た。その後、培養上清の濃縮、トリプシン消化を行い、抽出したタンパク質由来のペプチドを安定同位体ラベル化した。その後、ラベル化ペプチドを、モノリスカラム(300 cm)を用いた nano-flow HPLC によって分離し、MS/MS により網羅的に同定・定量した。その結果、これまでに報告した基質変化に応じたセルロソーム構成酵素プロファイルの変化[2)]に加えて、分解基質によるセルロソーマルタンパク質を含むセクレトームの量的変化を網羅的に明らかにすることに成功したので、結果をまとめて報告する[3)]。

[Reference]
⑴ Y. Tamaru *et al*., *J. Bacteriol*., 192, 901-902 (2010)
⑵ H. Morisaka *et al., AMB Express*, 2:37 (2012)
⑶ K. Matsui *et al.*, submitted

Quantitative proteomics, Cellulosome, *Clostridium cellulovorans*

講演番号：4B14a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ B 校舎 14 会場

キシラン利用菌 *Amphibacillus xylanus* の網羅的手法を用いた代謝経路の解析

Comprehensive analyses of metabolic pathway in *Amphibacillus xylanus* , xylan utilizing bacterium.

○望月 大地[1]、新井 俊晃[1]、田中 尚人[2]、志波 優[3]、藤田 信之[4]、佐藤 純一[1]、川崎 信治[1]、新村 洋一[1] ([1]東農大バイオ、[2]東農大菌株、[3]東農大ゲノム解析セ、[4]NITE)
○Daichi MOCHIZUKI[1], Toshiaki ARAI[1], Naoto TANAKA[2], Yu SHIWA[3], Nobuyuki FUJITA[4], Junichi SATO[1], Shinji KAWASAKI[1], Youichi NIIMURA[1] ([1]Dept. Bio. Tokyo Univ. Agr., [2]NRIC Tokyo Univ. Agr., [3]Genome Res. Center Tokyo Univ. Agr., [4]NITE)

【背景・目的】我々は、酸素の供給（好気性菌）と除去（嫌気性菌）が不要なバイオマス利用を目指して、新規キシラン資化菌を分離し、新属新種 *Amphibacillus xylanus* と命名した[1)]。本菌は、呼吸鎖や heme -catalase, 各種 peroxidase を欠如するにもかかわらず、強力な酸素吸収能を有し、好気性と嫌気性の両条件下で同等の良好な生育を示した[1)]。このような性質は簡便な培養を可能とし、バイオマス利用の低コスト化が期待できることから、我々は本菌の代謝経路の解明を試みている。これまでに我々は代謝産物解析と酵素活性解析より NADH oxidase(Nox)-AhpC(Prx)を酸素代謝の中心とした代謝経路を推定した[2)]。本発表では、ゲノム解析データを基に基礎代謝遺伝子を同定し、同定した基礎代謝系遺伝子のノーザン解析と RNA-seq 解析、更に酸素代謝のキーエンザイムと推定される Nox-Prx に着目し、本酵素系の微生物界における分布と系統分類学的な解析[3)]を報告する。
【結果・考察】ゲノム解析より得られたデータを基に全遺伝子のアノテーションを行い、糖代謝を中心とする基礎代謝経路に関与する遺伝子群をゲノムレベルで同定した。結果、本菌は呼吸鎖、ヘム合成能、各種 peroxidase を欠如し、解糖系と嫌気、好気条件下に対応したピルビン酸代謝経路、部分的な TCA 回路を有することが明らかとなった。嫌気、好気条件下で培養した菌体を用いた推定代謝経路遺伝子のノーザン解析と、酸素添加 0, 5, 10, 30 分での経時的サンプリングにより得られた菌体における網羅的転写解析 (RNA-seq) を試みた。以上の結果は、我々が推定した代謝経路を支持した。Nox-Prx 系に解糖系 (GAPDH)と好気的ピルビン酸代謝 (PDH complex)から還元力(NADH)が供給され、Nox-Prx 系の酸素代謝活性はフラビン合成経路の誘導により活性化されることが推定される。この Nox-Prx 系は微生物界において広く分布することが報告されている。そこで一般微生物界を、好気性菌、呼吸鎖を有する通性嫌気性菌、呼吸鎖を欠如した酸素耐性菌、絶対嫌気性菌の 4 分類し、本酵素系の分布と、そのアミノ酸配列に基づいた系統分類学的な解析を試みた。結果、本酵素系は好気性菌から絶対嫌気性菌まで、広く存在することを見いだした。酸素代謝に関与する Nox アミノ酸配列に基づいた系統樹は、それを有するバクテリアの 16S rRNA に基づく系統樹と強い相関性を示した[3)]。

1) Niimura Y. et al. (1990) *IJSB*, vol.40 p.297-301
2) Nishiyama Y. et al. (2001) *J. bacteriol.,* vol.183 p2431-2438
3) Mochizuki D. et al. (2012) *Bulletin of BISMiS* vol.3 issue 1

Amphibacillus xylanus, Genome analysis, RNA-seq

講演番号：4B14a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ B 校舎 14 会場

適応育種により獲得した耐熱化エタノール発酵細菌のゲノム変異解析

Analysis of point mutation in genome of thermotolerant ethanol fermentative bacteria developed by adaptive evolution

○高坂 智之[1]、山下 舞子[2]、中島 康之[2]、松谷 峰之介[1]、村田 正之[2]、山田 守[1,2] ([1]山口大・農、[2]山口大院・医)
○ Tomoyuki KOSAKA[1], Maiko YAMASHITA[2], Yasuyuki NAKAJIMA[2], Minenosuke MATSUTANI[1], Masayuki MURATA[2], Mamoru YAMADA[1,2] ([1]Faculty of Agriculture, Yamaguchi Univ., [2]Graduate School of Medicine, Yamaguchi Univ.)

[概要] バイオマスを利用したバイオエタノールの世界的な生産量は年々増加しており、より安価なバイオエタノールの生産方法の開発が求められている。その方法の１つとして、高温発酵によるエタノール生産が挙げられる。高温発酵は、速度の向上、クーリングコストの削減、そして雑菌混入の予防等のメリットがある。我々は、タイで分離された比較的高い温度での生育が可能なエタノール発酵細菌 *Zymomonas mobilis* TISTR 548 を高温で継代培養を行う適応育種により、段階的に耐熱化した株 80M、130M そして 200M を獲得した。本研究では、耐熱化に関与する遺伝子を明らかにすることを目的に、得られた耐熱化株のゲノム変異解析を行った。
[結果] 親株である TISTR 548 と耐熱化株 80M、130M そして 200M は、41° C において、親株はほとんど生育出来ないが、80M より 130M、そして 130M より 200M の生育が良いことが示されている。親株及び耐熱化株のゲノム配列を次世代シーケンサーにより決定し、*de novo* アセンブリ及びマッピングにより変異箇所を予測した。予測されたすべての変異箇所をサンガー法により同定した所、80M では 6 箇所の変異が確認され、130M では新たに 6 箇所の変異が確認された。これらの変異の遺伝子への影響を解析した所、80M では 2 遺伝子が破壊されており、3 遺伝子はアミノ酸が置換されるかもしくは挿入されていることが明らかとなった。一方 130M では、4 遺伝子が破壊されており、1 遺伝子のアミノ酸が置換していることが明らかとなった。これまでの解析では 200M に特異的な変異を同定する事は出来ていないが、変異箇所の予測を再度試みたところ、新たに 7 箇所の 200M 特異的変異候補を見出した。現在これらの変異の同定を試みている。なお本研究は Asian Core Program (JSPS: 2008-2012)、 Asia-Africa Science and Technology Strategic Cooperation Promotion Program (MEXT-ARDA: 2010-2012)、そして ALCA (JST: 2011-) の各助成を受けて行われた研究成果の一部である。

thermotolerant, ethanol fermentative bacteria, mutation analysis

講演番号：4B14a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ B 校舎 14 会場

芳香族化合物複合汚染土壌における新規芳香族化合物分解酵素遺伝子の機能相補に基づく探索

Function-based screening of novel genes for degradation of aromatic compounds from soil artificially contaminated with aromatic compounds.

○永山 浩史、菅原 智詞、遠藤 諒、加藤 広海、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院生命）
○Hirofumi NAGAYAMA, Tomonori SUGAWARA, Ryo ENDO, Hiromi KATO, Yoshiyuki OHTSUBO, Yuji NAGATA, Masataka TSUDA (Tohoku Univ.)

【背景】従来の環境汚染物質分解細菌研究は、汚染物質を唯一の炭素源として単独で生育可能な細菌の詳細な解析が中心であったが、(i)環境中に棲息する細菌集団の大多数は実験室環境下では純粋培養困難であること、(ii)自然環境中において汚染物質は複数の細菌からなる集団により協調的に分解されている場合が多いこと、を考慮すると、純粋分離された分解細菌が実際の汚染環境で中心的な役割を果たしているとは必ずしも言えない。また、大多数の難培養性細菌集団の中には未開拓の新規反応特性を有する分解酵素遺伝子が多数存在している可能性もある。そこで、当研究室では難培養性細菌の存在も考慮したメタゲノム解析を実施し、新規環境汚染物質分解酵素遺伝子の探索を行なっている。
【方法】愛媛県農業試験場の土壌に 4 種の芳香族化合物(3-クロロ安息香酸、フェナントレン、ビフェニル、カルバゾール)を同時添加し、定量リアルタイム PCR でこれら物質の分解に関与する既知遺伝子が増加した時点を見計らいメタゲノム DNA ライブラリーを構築した。ナフタレン完全分解細菌株から当該化合物初発酸化を担うマルチコンポーネント酸素添加酵素遺伝子(*nahAaAbAcAd*)のうちのオキシゲナーゼ大サブユニット遺伝子(*nahAc*)とリダクターゼ遺伝子(*nahAa*)をそれぞれ破壊した誘導体株に上記ライブラリーを導入し、インドールを含む培地上で青色を示すクローンを選択した。一般的に芳香族化合物の初発酸化酵素はインドールを青色のインディゴに変換する活性を備えており、取得クローンは初発酸化酵素遺伝子の一部あるいは全セットを保持していると考えられる。
【結果と考察】リダクターゼ遺伝子破壊株から陽性クローンを 16 株取得した。各クローンが有するコスミドを制限酵素消化して電気泳動バンドパターンを比較した結果、お互いのバンドパターンは多様性があり、さらに *nahAa* をプローブに用いた解析ではシグナルが検出されなかった。一方、オキシゲナーゼ大サブユニット遺伝子破壊株を用いたスクリーニングでは、13 株の陽性クローンが得られ、同様に *nahAc* をプローブに用いたサザン解析ではシグナルが検出されなかった。しかしながら、各クローンが有するコスミドを制限酵素消化し電気泳動バンドパターンを比較した結果、お互いのバンドパターンは比較的類似していた。この結果は、NahA を構成する 4 つのコンポーネントのうち、フェレドキシンとリダクターゼの選択性は比較的低いのに対して、オキシゲナーゼ大小サブユニット間の選択性は高いために、*nahAc* 機能を相補する遺伝子は似た型の遺伝子しか取得できなかったことを示唆している。現在、取得クローンが有するコスミドの塩基配列および機能解析を進めている。

environmental bacteria, metagenome, biodegradation of environmental pollutants

講演番号：4B14a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ B 校舎 14 会場

フィニッシング支援ツール GenoFinisher と AceFileViewer

Development of computer tools for finishing draft genomic sequence: GenoFinisher and AceFileViewer

○大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院生命科）
○Yoshiyuki Ohtsubo,Yuji Nagata,Masataka Tsuda (Tohoku Univ.)

次世代シーケンサーを利用することで微生物のドラフトゲノム配列を得ることは非常に容易になりつつある。しかしながらゲノム配列の完全決定には、フィニッシングと呼ばれる一連の作業が必要である。本発表では Finishing を効率良く実施する目的で作成したソフトウエア GenoFinisher と AceFileViewer について紹介する。これらはどちらも MacOS10.6 以降で動作しグラフィカルユーザーインターフェースにより操作できる。

【GenoFinisher】GenoFinisher は Roche 社の 454 シーケンサーに付属のアッセンブラーである newbler を用いて得られたドラフト配列を出発点として Finishing を行うことを前提として作成したソフトウエアである。newbler の出力の中には、各コンティグのつながり方を記したデータが含まれている。GenoFinisher を使用することでコンティグ間の繋がりを表現したコンティググラフ容易に描画することができ、Finish に向けて解決すべき課題を把握することが容易となる。またリピートを境にコンティグのつながり方が不明になってしまっている箇所について、これらを自動抽出し、解決に必要な PCR についての総合情報を出力することができる。またスキャフォールドが得られている場合には、スキャフォールド内の各 gap についてどのコンティグが該当するかを探索する機能が有用である。

【AceFileViewer】ゲノム中に複数コピーある配列(リピート)がある場合、newbler はこれらからコンセンサス配列を作成して出力する。このとき、リピート間に多少の配列上の差異があったとしても、コンセンサス配列として 1 つの配列がコンティグ配列として出力される。すなわち、newbler が出力するリピートコンティグの配列には誤りが含まれる可能性があり、完全決定を行うためにはリピートのそれぞれのコピーについて配列を確定する必要がある(これをしない限り、リピートは完全に同一になってしまう)。AceFileViewer は、各コンティグがどのようなリードで構成されているかについて表示するソフトウエアであり、各種の条件に合致するリードを表示する機能などを有しており、リピートの各コピーにコンセンサス配列と異なる塩基があるかを判定し、必要に応じて修正可能なソフトウエアである。

両ソフトウエアは http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/gf/index.php よりダウンロード可能である。

Finishing, Newbler, 454

講演番号：4B14a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ B 校舎 14 会場

自然変異株のゲノム解析に基づいた放線菌 *Streptomyces griseus* の二次代謝に影響を与える遺伝子の探索

Search for genes involved in the regulation of secondary metabolism in *Streptomyces griseus* by genome sequencing of a spontaneous mutant

○中村 一成[1]、志波 優[2]、手塚 武揚[1]、吉川 博文[2,3]、大西 康夫[1] ([1]東大院農生科・応生工、[2]東農大・ゲノム解析セ、[3]東農大応生科・バイオ)
○Kazunari NAKAMURA[1], Yu SHIWA[2], Takeaki TEZUKA[1], Hirofumi YOSHIKAWA[2,3], Yasuo OHNISHI[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】*Streptomyces* 属放線菌は、多様な二次代謝産物生産能と胞子形成に至る形態分化能によって特徴付けられる。*Streptomyces griseus* は二次代謝産物としてストレプトマイシンだけでなく黄色色素グリキサゾンを生産するが、研究室において長年継代を重ねる中で、グリキサゾンを過剰に生産し形態分化能がやや低下した自然突然変異株（ADYP 株）が得られた。グリキサゾンの生産制御機構についてはこれまでの我々の研究によって解明されつつあるが[1,2)]、未だ不明な部分も多い。そこで、グリキサゾン生産の制御機構についてさらなる知見を得ることを目的に ADYP 株の変異点を解析した。

【方法・結果】Genome Analyzer を用いて野生株ゲノムのリシーケンスおよび ADYP 株ゲノムのシーケンスを行ったところ、ADYP 株において、12 ヶ所の変異候補が見出された。このうち ORF 内に存在しアミノ酸配列を変化させる変異候補は 8 ヶ所（7 遺伝子）であった。これらについてキャピラリーシーケンサーを用いて塩基配列を決定したところ、全ての変異が確認されたことから、ADYP 株の表現型の原因遺伝子候補をこの 7 つとした。次に、それぞれの変異点を野生型に戻した ADYP 株を作製し、その表現型の観察を行った。6 遺伝子については変異点を野生型に戻してもグリキサゾン生産能、形態分化能ともに ADYP 株と同様であったが、*SGR1728* 遺伝子上に生じていた 1 塩基挿入変異を野生型に戻した ADYP 株では、グリキサゾン生産能が著しく低下するとともに形態分化能が上昇し、ゲノム株と同様の表現型となった。この結果は ADYP 株の表現型が *SGR1728* 遺伝子上の変異によるものであることを強く示唆している。*SGR1728* 遺伝子は機能未知の膜タンパク質をコードしているが、ADYP 株では 1 塩基挿入変異によるフレームシフトのため、翻訳産物の C 末端側 3 分の 1 以降が異常なアミノ酸配列となる。*SGR1728* がどのようにしてグリキサゾン生産や形態分化に関わっているかについて大変興味がもたれる。現在、このタンパク質の機能を明らかにするため、発現解析や局在解析などを行っており、これらの結果も合わせて発表する予定である。

1) T. Higashi et al. (2007) *J. Bacterial.***189**, 3515-3524.
2) 中村ら、日本農芸化学会 2011 年度大会要旨 p. 255（講演番号 3C24a13）

Streptomyces, secondary metabolism, genome sequence

講演番号：4B14a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ B 校舎 14 会場

放線菌ゲノムアノテーションプラットフォームの構築とリファレンス情報の統合

Construction of a *Streptomyces* genome annotation platform and integration of the reference information

○藤澤 貴智[1]、照井 敬子[1]、桧原 直子[1]、山田 佐知子[1]、石井 英治[1,2]、加藤 香奈[1]、手塚 武揚[3]、大西 康夫[3]、神沼 英里[1]、岡本 忍[4]、黒川 顕[5]、中村 保一[1]（[1]遺伝研、[2]近畿大院・農、[3]東大院農生科・応生工、[4]ライフサイエンス統合データベースセンター、[5]東工大院・生命理工）
○Takatomo FUJISAWA[1], Keiko TERUI[1], Naoko HIBARA[1], Sachiko YAMADA[1], Eiji ISHII[1,2], Kana KATO[1], Takeaki TEZUKA[3], Yasuo OHNISHI[3], Eli KAMINUMA[1], Shinobu OKAMOTO[4], Ken KUROKAWA[5], Yasukazu NAKAMURA[1] ([1]NIG, ROIS, [2]Kinki Univ., [3]Univ. of Tokyo, [4]DBCLS, ROIS, [5]Tokyo Tech.)

微生物のゲノムやトランスクリプトームの配列が、新型シーケンサーの普及により従来に比較してさらに高速かつ大量に決定されるようになった。それらのオミックスデータを一定レベルの品質を保ちつつ低コストでアウトプットするためには、リファレンスとなるべきモデル微生物種群のゲノムアノテーションの信頼性および再利用性を増すことが急務であると言える。特に、我が国のライフサイエンスの得意分野である産業的に有用な微生物群のゲノムアノテーションの支援は重要な課題である。

我々は、ソーシャルブックマークシステムを利用した TogoAnnotation (http://togo.annotation.jp) を利用して、植物ならびに植物関連微生物ゲノム上への遺伝子に言及した論文情報の高速かつ高精度なマッピングを実施・公開し、有用性を実証した。また微生物を中心にゲノムアノテーションプラットフォームを提供する事で、ゲノム解析、コミュニティゲノムアノテーション、データベース公開、DDBJ への登録など専門知識が必要なゲノムアノテーションに対して継続的な支援を実施している。

本研究において、我々は放線菌の情報基盤整備を目的としてゲノムアノテーションプラットフォームを構築し、ゲノムデータベース（http://togo.microbedb.jp/streptomyces）を公開した。また、ストレプトマイシン生産菌である *Streptomyces griseus* NBRC 13350 株のゲノムアノテーションリファレンスとなる遺伝子および遺伝子グループに関する情報を手動によって文献から抽出した。2012 年 11 月 26 日現在、論文 111 報から 294 遺伝子 12668 件のアノテーションを集積し、データベースからの検索、参照を可能にした。また、セマンティックウェブ技術を用いたデータ統合を進めており、データ再利用性についての展望と併せて報告する。

Genome Annotation, Database, Streptomyces griseus NBRC 13350

講演番号：4B14a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ B 校舎 14 会場

微生物統合データベース　MicrobeDB.jp の開発

Development of a global microbial database MicrobeDB.jp

○山本 希[1]、森 宙史[1]、中村 保一[2]、内山 郁夫[3]、菅原 秀明[2]、黒川 顕[1]、MicrobeDB.jp プロジェクトチーム[1,2,3] ([1]東工大院・生命理工、[2]国立遺伝研、[3]基生研・ゲノム情報)
○Nozmoi YAMAMOTO[1], Hiroshi MORI[1], Yasukazu NAKAMURA[2], Ikuo UCHIYAMA[3], Hideaki SUGAWARA[2], Ken KUROKAWA[1], MicrobeDB.jp project team[1,2,3] ([1]Tokyo Inst. of Tech., [2]NIG, [3]NIBB)

数学的基盤が乏しいライフサイエンス研究において、知識の集積体であるデータベース（DB）は、知識の参照のみにとどまるものはなく、新たな研究分野を切り拓く上で欠くことのできない極めて重要な研究基盤である。ライフサイエンス研究の中でも、微生物を対象とした研究は歴史も古く、膨大かつ多岐にわたるデータや知識が蓄積されている。また、ゲノム科学の発展や新型シーケンサーの普及に伴い、ゲノムデータやメタゲノムデータといった、圧倒的な情報量をもつデータが算出されている。これらのデータを横断的かつ簡便に利用することが可能となれば、新たな仮説や研究分野の創出がより容易になるものと期待される。

これを実現するため、我々はゲノム情報を核とし、様々な微生物学上の知識を統合することで、幅広い分野における微生物学の発展に資することが可能な「微生物エンサイクロペディア」の構築を目標として研究開発を行っている。これらのデータの統合化は、微生物の体系的な理解を促進し、これまで行われてきた仮説検証型の研究に加えて、膨大なデータの中から新たな仮説を導くデータ駆動型の研究を強力に促進する。

database, gemone, metagenome

講演番号：4B14a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ B 校舎 14 会場

原始生態系の解明を目指した温泉微生物群集のメタゲノム解析

Metagenomic analysis of microbial communities in modern analogues of primitive ecosystem

○西山 依里[1]、吉野 弘二[1]、中村 仁美[1]、須田 好[1]、間渕 貴子[1]、河内 賢一[1]、森 宙史[1]、丸山 史人[2]、大森 聡一[3]、丸山 茂徳[1]、本郷 裕一[1]、黒川 顕[1] ([1]東工大院、[2]東京医科大院、[3]放送大院)
○Nishiyama Eri[1], Yshino Koji[1], Nakamura Hitomi[1], Suda Konomi[1], Mabuchi Takako[1], Kwachi Kenichi[1], Mori Hiroshi[1], Maruyama Fumito[2], Omori Soichi[3], Maruyama Shigenori[1], Hongoh Yuichi[1], Kurokawa Ken[1] ([1]TITECH, [2]TMDU, [3]OUJ)

細菌は光合成や窒素固定、アンモニア酸化、嫌気呼吸などの多様な代謝反応を行っており、現在の地球環境の物質循環に重要な役割を果たしている。また初期の生命は細菌であったと考えられていることから、原始地球においても細菌により構成される初期生態系は地球環境において重要な役割を担っていたと考えられる。しかしながら、地球史における地層や岩石から得られる地質情報は、変質などの影響により乏しく、原始生態系に関する手掛かりを得るには十分とはいえない。初期生態系に関する情報をより詳細に得るためには、原始地球と類似した現在の環境において、生態系を解析する事が有効な手段となる。原始生態系が形成された環境は、ribosomal RNA (rRNA) 遺伝子による分子系統解析結果や地球史研究の成果により、高温環境であったことが強く示唆されている。

そこで本研究では、陸上熱水環境である温泉に着目し、細菌の生態系 (群集構造、代謝機構) と物理化学因子 (溶存ガス、イオン) を合わせて解析することで、原始地球の生態系を明らかにすることを目的とした。

解析対象とした温泉は、形成年代が異なる母岩の影響を受けた 7 カ所の温泉（霧島、白馬、八丈島）とし、各温泉について化学分析を行った。その結果、白馬の温泉は地球初期に形成された蛇紋岩の影響を受けており、原始地球に近い環境であることが明らかとなった。続いて、各温泉試料から DNA を抽出し、細菌の 16S rRNA 遺伝子を特異的に増幅するユニバーサルプライマーにより PCR を行い、増幅配列を Roche 454 FLX にて取得し群集構造解析を行った。得られた配列から、温泉水中の細菌群集を門および属レベルで同定を試みたところ、全ての温泉において多様性が極めて低く、各温泉水の環境因子と対応した特異的な細菌群集構造が形成されていた。さらに、細菌群集全体の代謝経路を明らかにするために、白馬の温泉においてメタゲノム解析を行った。白馬の温泉における全菌数は非常に少ないため、DNA 抽出後、全ゲノム増幅を行った上で、Illumina GAIIx を用いてメタゲノム配列を取得した。まず、メタゲノム配列から相同性検索により 16S rDNA 遺伝子配列のみを抽出し、細菌群集構造解析を行った。その結果、化学合成独立栄養細菌 *Nitrospira* と Candidate Division OD1 の２種類の優先種から構成されている事が明らかとなった。このことは、原始地球環境と類似した白馬の温泉では、2 種類の優先種により安定した生態系が構築されている事を示唆している。現在、白馬の温泉における生態系を遺伝子レベルで明らかにするため、詳細なメタゲノム解析を行っている。

metagenome, hotspring, microbial community

講演番号：4B14a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:12～ B 校舎 14 会場

共通祖先系に最も近いバクテリアの潜在的代謝機能

Potential functionome of deeply branching bacteria

○高見 英人[1]、野口 英樹[2]、高木 善弘[1]、内山 郁夫[3]、豊田 敦[2]、西 真郎[1]、池 甲珠[1]、荒井 渉[1]、布浦 拓郎[1]、伊藤 武彦[4]、服部 正平[5]、高井 研[1] ([1]海洋機構、[2]遺伝研、[3]基生研、[4]東工大、[5]東大)
○Hideto Takami[1], Hideki Noguchi[2], Yoshihiro Takaki[1], Ikuo Uchiyama[3], Atsushi Toyoda[2], Shinro Nishi[1], Gab-Joo Chee[1], Wataru Arai[1], Takuro Nunoura[1], Takehiko Itoh[4], Masahira Hattori[5], Ken Takai[1] ([1]JAMSTEC, [2]Nat. Inst. Genetics, [3]Nat. Inst. Basic Biol., [4]Tokyo Inst. Tech., [5]Univ. Tokyo)

目的：初期生命誕生の可能性の高い場所の一つとして、深海などの熱水環境が有力と考えられ、初期生命は好熱菌であったとする説が普遍的ではないにしろ、一般的に受け入れられている。実際、16S rRNA 遺伝子をもとに作られたほとんどの進化系統樹において、バクテリアとアーキアの共通祖先系に近いバクテリアの多くは好熱菌である。一方、バクテリアとアーキアの共通祖先はアセチル CoA パスウェイをエネルギーと細胞を構成する炭素固定の基本代謝パスウェイとして用い、このパスウェイを経由して酢酸を生産することで、エネルギー獲得を行う生物がバクテリア、メタンを生産することでエネルギー獲得を行う生物がアーキアへと進化したという説が初期生命進化のシナリオとして提唱されている。しかし、既知微生物の中で、これまでアセチル CoA パスウェイを有する共通祖先系に近いバクテリアの存在が知られていないため、バクテリア側からこのシナリオを支持する知見はまだない。そこで本研究では、地下鉱山の熱水環境に繁茂する微生物マットに着目し、そのメタゲノム解析からアセチル CoA パスウェイを有する好熱菌の探索を目的とした。

方法：バイオマットから培養を介さずメタゲノムフォスミドライブラリーを作製し、その両端の配列をサンガー法によりシーケンスした。また、フォスミドライブラリーにある 16S rRNA 遺伝子をサザンハイブリにより検出し、生物種の特定を行った。一方、フォスミドライブラリーからランダムに約 150 クローンを選択し、サンガー法とパイロシーケンシング法によりシーケンスした。各クローン中に見いだされた遺伝子のコドン使用頻度の違いを利用したクラスタリングによって各クローンを分類した。次に、フォスミド両端配列から見いだされた遺伝子のコドン使用頻度の情報も利用して優先種と思われるバクテリアのゲノムの再構築を試みた。

結果と考察：選択されたフォスミドクローン中に Candidate division OP1 に属するバクテリアが優先種として存在することがわかったので、そのゲノム再構築を行ったところ、総塩基長が約 2Mb の 4 本のコンティグが形成された。アノテーションされた遺伝子の代謝系解析から、OP1 はアセチル CoA パスウェイを持つ好熱菌であることが示唆された。そこで、これまでゲノム解読が終了した原核生物に共通な 4 遺伝子を連結して系統解析を行ったところ、OP1 は既知のバクテリアの中で最も共通祖先系に近いバクテリアであることがわかった。また、アセチル CoA パスウェイに関与するコア遺伝子群を連結した系統解析からも、アセチル CoA パスウェイを持つバクテリアの中で最も共通祖先系に近いことが分かった。さらに、KEGG モジュールを用いた新しい方法による OP1 の潜在的代謝機能評価も行ったので報告する。

metagenome, deeply btanching bacteria, acetyl CoA-pathway

講演番号：4B14a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:24～ B 校舎 14 会場

高度好塩性アーキア *Haloarcula japonica* のリボソーム蛋白の精製と RFHR 2D 法による解析
Purification of ribosome and RFHR 2D analysis of extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*

○仲宗根 薫、池田 周平、佐藤 祐介、藤谷 創 (近畿大・工)
○Kaoru NAKASONE,Shuhei IKEDA,Yusuke SATO,Tsukuru FUJITANI (Kinki Univ.)

高度好塩性アーキア *Haloarcula japonica* は、塩田から分離された微生物である。本菌株は 20%の高塩濃度下において良好に増殖が観察され、外部から高濃度の塩(KCl)を細胞内に取り込む「Salt-In」戦略によって外部と内部の塩濃度差を減少させ浸透圧調節を行う。このアーキアのもつ蛋白質は、高塩濃度(2-3M)下において安定で機能性を有し、ほとんどが酸性蛋白質である。

一般的にリボソーム(rRNA とリボソーム蛋白から構成される)中のリボソーム蛋白は塩基性を示す。これはリボソーム蛋白が、酸性の性質を持つ rRNA と相互作用することに起因するが、高度好塩性アーキアのリボソーム蛋白は、このような一般性からは外れており酸性であることが、ゲノム解析の結果から明らかとなった。

本研究では、高度好塩性アーキアからリボソームの構造的基盤の知見を得るため、高度好塩性アーキアからリボソームの単離を試み、二次元電気泳動装置によりリボソーム蛋白の分離を行った。また同時に本菌株のゲノム情報から全リボソーム蛋白遺伝子のアノテーションを行い、pI のプロファイルのカタログ化も行った。リボソーム蛋白の二次元電気泳動による解析では、RFHR (Radical-Free & Highly Reducing)法を採用した。リボソームの単離においては 3M KCl を含む緩衝液を用い、超遠心分離の後、酢酸法により塩を完全に除去し、RFHR 法にサンプルをアプライしリボソーム蛋白の分離を試みた。泳動の結果、多くのスポットが観察され、リボソーム蛋白が単離されたと判断した。しかし、大腸菌と比較した場合、高度好塩性アーキアのリボソーム蛋白の泳動においては、分離法の技術的な改良が必要であることを強く示唆された。また同時に本菌株のゲノム情報から全リボソーム蛋白遺伝子のアノテーションを行い、pI プロファイルのカタログ化を行ったところ、殆どのリボソーム蛋白の pI は酸性で、この泳動パターンに矛盾しないことが明らかとなった。

extremely halophilic archaeon, ribosome, RFHR 2D analysis

講演番号：4B14a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:36～ B 校舎 14 会場

分裂酵母における経時老化マーカーの開発
Development of molecular markers for chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe*
○福島 玲奈[1,2]、松山 晃久[1,3]、吉田 稔[1,2,3] ([1]理研　化学遺伝、[2]埼玉大院理工、[3]理研　ケミカルゲノミクス)
○Reina FUKUSHIMA[1,2], Akihisa MATSUYAMA[1,3], Minoru YOSHIDA[1,2,3] ([1]RIKEN Chemical Genetics Laboratory, [2]Saitama Univ., [3]RIKEN Chemical Genomics Research Group)

単細胞生物である分裂酵母を用いた老化の研究では、単一の母細胞の分裂能で規定される複製寿命と、分裂を終えた細胞の生存能で表される経時寿命の二種類の寿命が定義されている。経時寿命は多細胞生物の皮膚や臓器等の分裂を終えた分化細胞の寿命の非常に良いモデルであるが、その制御メカニズムの全体像はまだほとんどわかっていない。細胞の生存能は静止期の休止細胞の細胞分裂を再開させる能力と定義されるため、経時寿命は細胞集団の生存率で計測する。しかし、この計測法は煩雑な操作を必要とするためにハイスループット化は難しく、大規模な実験には適していない。そこで本研究では将来のアンチエイジング薬などの開発に役立てられるよう、経時老化の度合いが視覚的かつ定量的に測定できる経時老化マーカーの開発を目指した。

当研究室では、約 5,000 種類に及ぶ分裂酵母の全遺伝子の 99%以上をクローニングし、それらの各 ORF の 3’末端に小分子のタグを融合して個々にゲノムに挿入した株コレクションが確立されている。この全遺伝子過剰発現株を利用し、経時老化に伴って細胞内のタンパク質レベルが顕著に変動するものをスクリーニングした。まず、約 5,000 種類の株を個々に培養し、細胞が分裂を停止して静止期に入った後も培養を続け、一定期間細胞を経時老化させた。この過程の途中で採取した細胞から全細胞抽出液を調製してメンブレンにスポットし、リバースアレイと呼ばれるプロテインアレイを作製した。そして、タグ特異的抗体を用いて各時点のシグナルを検出し、経時老化に伴って 4 倍以上レベルが変化するタンパク質を 118 種類同定した。

次に GO 解析の結果、経時老化につれてレベルが減少するタンパク質として翻訳関連因子が、レベルが上昇するタンパク質としてミトコンドリアの構築や翻訳の関連因子が有意に濃縮された。さらに、これらのマーカータンパク質候補に GFP 等の蛍光タンパク質を融合させ､染色体に挿入して可視化し、経時老化に伴う蛍光強度の変化が顕著なタンパク質を 68 種類同定した。

一方で、経時老化では、翻訳レベルだけでなく転写レベルで制御されている遺伝子も多数存在すると予想されることから、そのような遺伝子をスクリーニングするために DNA マイクロアレイを用いた転写解析も行っている。このような２つのスクリーニングから得られた候補タンパク質を元に、将来的には経時老化に伴って異なる変動パターンを示す２つのタンパク質を異なる蛍光タンパク質で標識することで、細胞の老化の度合いを即座に測定できる株の樹立を目指す。

chronological aging, fission yeast, proteome

講演番号：4B14a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:48～ B 校舎 14 会場

リバースプロテオミクスを用いた eIF5A におけるハイプシン化の機能解析
Functional analysis of eIF5A hypusination using reverse proteomics

○近藤 直子[1,2]、白井 温子[1,5]、夏目 徹[3]、浜本 牧子[2]、松山 晃久[1,4]、吉田 稔[1,4]([1]理研　化学遺伝、[2]明治大院農　微生物工学、[3]産総研　細胞システム制御解析、[4]理研　ケミカルゲノミクス、[5]理研　細胞記憶)
○ Naoko KONDO[1,2], Atsuko SHIRAI[1,5], Toru NATSUME[3], Makiko HAMAMOTO[2], Akihisa MATSUYAMA[1,4], Minoru YOSHIDA[1,4] ([1]RIKEN Chemical Genetics Lab., [2]Meiji Univ. Microbiology Lab., [3]AIST Biological Systems Control Team, [4]RIKEN Chemical Genomics Research Group, [5]RIKEN Cellular Memory Lab.)

eIF5A は元々翻訳開始因子として単離され、真核生物で広く保存されている必須タンパク質であるが、翻訳の開始には必要ないという研究結果等から、特定のタンパク質群のみの翻訳開始に関わる可能性が示唆されている。また、翻訳伸長等への関与も示唆されるなど、翻訳における役割については未だ不明な点が多い。非常にユニークな特徴として、ハイプシン化という翻訳後修飾を受ける唯一のタンパク質であることが知られている。ハイプシン化は eIF5A の活性に必須な修飾であり、DHS（deoxyhypusine synthase）と DOHH（deoxyhypusine hydroxylase）による二段階反応によって触媒される。

分裂酵母において、*dhs1*（*DHS*）遺伝子破壊株は致死となるのに対し、*mmd1*(*DOHH*)遺伝子破壊株は生育可能ながら顕著なミトコンドリアの局在異常を示す。このことから、eIF5A がミトコンドリア関連タンパク質の翻訳制御に関わる可能性が推測され、そのような直接の制御を受ける因子が見つかれば、そこから eIF5A の詳細な分子機能に迫れると期待できる。そこで、分裂酵母の全遺伝子発現ライブラリーを利用したリバースプロテオミクスにより、eIF5A のハイプシン化に依存した発現制御を受けるタンパク質の網羅的な探索を試みた。

我々の研究室で作製された分裂酵母の全遺伝子過剰発現株のコレクションでは、*nmt1* プロモーターの制御下にある各 ORF の 3’末端に $FLAG_2$-His_6 タグが付加され、染色体に挿入されている。まず、かけ合わせによって約 5,000 株の遺伝子過剰発現株全てに *mmd1* 遺伝子破壊を導入し、野生株と *mmd1* 遺伝子破壊株でそれぞれタンパク質を過剰発現させ、全細胞抽出液を調製した。次に、全細胞抽出液をメンブレンに直接ブロットして作製するリバースアレイと呼ばれるプロテインアレイに対し、タグ特異的抗体で各タンパク質を検出して、各タンパク質の発現レベルを野生株と *mmd1* 遺伝子破壊株の間で比較した。

GO 解析を行った結果、野生株と *mmd1* 遺伝子破壊株の間で発現レベルに差があったタンパク質はミトコンドリアに関連する項目について有意な濃縮が見られた。このことは、ミトコンドリアの制御に関わるタンパク質と eIF5A の機能との関連を強く示唆するものである。今後、スクリーニングで得られた候補タンパク質と eIF5A のハイプシン化との関係を詳細に解析することで、eIF5A におけるハイプシン化修飾の生理的意義を解明すると共に、翻訳における eIF5A の役割について明らかにしていきたい。

eIF5A, hypusination, reverse array

講演番号：4B21a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ B 校舎 21 会場

digital PCR による高精度環境微生物定量

Molecular quantification of environmental microbes using microfluidic digital PCR

○星野 辰彦、稲垣 史生 (海洋研究開発機構　高知コア研究所)
○Tatsuhiko HOSHINO,Fumio INAGAKI (Kochi institute for core sample research, JAMSTEC)

自然環境中の微生物の定量は real-time PCR により広く行なわれている。real-time PCR では、コピー数が既知の外部標準 DNA を用いて作製した検量線をもとにサンプル中の標的遺伝子のコピー数を算出する。つまり、外部標準と試料中の標的遺伝子の増幅効率が同じであるという仮定に基づいた定量法である。一方、自然環境中から DNA を抽出した場合にはフミン酸や多糖類などの物質が共抽出され PCR を阻害する事が知られている。このような物質を含むサンプルに対して real-time PCR を行なうと標的遺伝子数を過小評価することになる。

Digital PCR は、PCR を多数の微小反応液に分割して行い増幅が見られた反応の数から、ポワソン分布に基づく推定により標的遺伝子を絶対定量する手法である。この方法では、定量結果が増幅効率に依存せず反応の有無のみに依存するため、阻害物質の影響を受けずに標的遺伝子の定量が可能である事が期待される。

本研究では、まず阻害物質が digital PCR に及ぼす影響を評価した[1]。既知濃度のλDNA と 0-11.2 ng/µl のフミン酸を PCR mix に加え、SYBR Green I を使った real-time PCR と digital PCR による定量結果を比較した。real-time PCR による定量値はフミン酸濃度の上昇とともに減少し、6.6 ng/µl の濃度においては 1/4400 の過少評価となり、8.4 ng/µl 以上では定量が不可能であった。digital PCR においては 11.2 ng/µl のフミン酸濃度では全く増幅が起こらなかったが、9.3 ng/µl までは理論値と一致する一定の定量値が得られた。これらの結果から、digital PCR では反応が起こりさえすれば阻害の影響を受けない正確な定量値が得られることがわかった。次に、水田土壌中のアーキアの 16S rRNA gene の定量を行なった。水田土壌からは十分な量の DNA が抽出されたため、テンプレートの希釈により阻害の影響を軽減することが可能であり、real-time PCR による定量値と digital PCR による定量値はほぼ一致した。最後に海洋堆積物中のアーキアの定量を試みた。サンプルは、統合海洋掘削計画（IODP）第 307 次航海により Porcupine Seabight の海底下 125m から得られたコア試料を用いた。バイオマスが非常に小さいサンプルであったためテンプレートの希釈を行なうことはできず、抽出した DNA をそのまま反応に分析に使用した。その結果、real-time PCR では阻害の影響で実際の遺伝子数を過小評価していることが示唆された。上記の結果から、異なる自然環境中の遺伝子数を正確に比較するためには阻害の影響をほとんど受けない digital PCR が有効であることがわかった。

1) Hoshino and Inagaki, *Syst Appl Microbiol.*35. 390-395

quantification of DNA, microfluidcs, digital PCR

講演番号：4B21a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ B 校舎 21 会場

熱測定法と PCR-DGGE 法を用いた土壌微生物群集の多様性評価

Evaluation of diversity of soil microbial community using calorimetry and PCR-DGGE

石川 卓[1]、○小野 泰弘[1]、妹尾 啓史[2]、田中 晶善[1] ([1]三重大院・生資、[2]東大院農生科・応生化)
Takashi Ishikawa[1], ○Yasuhiro Ono[1], Keishi Senoo[2], Akiyoshi Tanaka[1] ([1]Dept. Life Sci., Grad. Sch. Biores., Mie Univ., [2]Grad. Sch. of Agric. Life Sci., Univ. of Tokyo)

【目的】我々は、微生物が炭素源を資化する際に生じる微小な熱を、多試料同時に感度よく測定できる等温熱量計を用いて、土壌微生物の機能的多様性を資化活性に基づいて評価する手法を開発した[1)]。本研究では、熱測定法から得られた土壌微生物群集の機能的多様性と、PCR-DGGE 法から得られた土壌微生物叢の種の多様性との比較を目的とした。
【方法】試料として、三重県内から採取した畑 4 種類（畑 1～4 とする）、果樹園 1 種類、水田 1 種類、海岸砂丘 1 種類、森林 3 種類（森林 1～3）、河川敷 3 種類（河川敷 1～3）の計 13 種類の土壌を用いた。乾燥重量として 10 g の各土壌をバイアルにとり、土壌水分量を最大容水量の 50 %に調整して約 10 日間、25℃で前培養した。各バイアルに糖やアミノ酸など 41 種類の炭素源（炭素原子 0.6 mmol 相当量）をそれぞれ加え、熱量計を用いて 25℃で約 150 時間連続的に測定し、資化に伴う発熱量の経時変化 $q(t)$を求めた。各土壌それぞれについて 41 炭素源の平均発熱速度が最大になる時間を求め、その平均時間における発熱量 $q(t_{\mathrm{mean}})$を用いて各土壌の機能的多様性評価を行った。多様性評価の指標として、シャノン指数を用いた。他方、各土壌からゲノム DNA を抽出し、PCR-DGGE 法による微生物菌叢解析を行った。一般細菌叢解析には 16S rRNA、糸状菌叢解析には 18S rRNA を対象とした解析を行った。DGGE ゲルからバンド数とバンド強度を画像解析ソフトにより自動検出し、シャノン指数を用いて土壌微生物叢の種の多様性の評価を行った。
【結果】機能的多様性については、シャノン指数の値が高い順に果樹園（3.61）、畑 3（3.58）、畑 4（3.57）、畑 1（3.51）、河川敷 2（3.49）、畑 2（3.45）、森林 1（3.43）、水田（3.42）、森林 2（3.25）、河川敷 3（3.24、）、森林 3（3.20）、河川敷 1（3.05）、海岸砂丘（2.93）であった。より多くの炭素源を資化でき、$q(t_{\mathrm{mean}})$が大きい土壌ほど機能的多様性が高くなった。耕作地土壌の方が非耕作地土壌よりも、機能的多様性が高くなる傾向が見られた。他方、PCR-DGGE 法による細菌叢の種の多様性では、シャノン指数の値が高い順に森林 1（3.57）、森林 2（3.54）、果樹園（3.39）であり、糸状菌叢では、値が高い順に森林 1（3.09）、河川敷 2（2.92）、森林 2（2.77）であった。土壌微生物叢の種の多様性が高くなると機能的多様性も高くなる傾向が見られたが、森林 1 や森林 2 では土壌微生物叢の種の多様性が高くても機能的多様性は低かった。これは、微生物種に富む土壌であっても、その微生物群集は一部の炭素源しか資化できないことを示唆している。

1）2012 年度　日本土壌微生物学会講演要旨集，P-33

calorimetry, soil microbial community, biodiversity

講演番号：4B21a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ B 校舎 21 会場

熱測定法を用いた土壌微生物の資化活性に基づく土壌試料の保存条件検討

Investigation of preservation conditions of soil samples using calorimetry

石川 卓[2]、○林 寛人[1]、妹尾 啓史[3]、田中 晶善[2] ([1]三重大・生資、[2]三重大院・生資、[3]東大院農生科・応生化)
Takashi ISHIKAWA[2], ○Hiroto HAYASHI[1], Keishi SENOO[3], Akiyoshi TANAKA[2] ([1]Dept. Life Sci., Facul. Biores., Mie Univ., [2]Dept. Life Sci., Grad. Sch. Biores., Mie Univ., [3]Grad. Sch of Agric. Life Sci., Univ. of Tokyo)

【目的】土壌試料を一定期間保存する方法の一つとして、乾燥させて冷蔵保存する方法が用いられるが、温度や期間などの保存条件が土壌微生物の群集構造や資化活性などに与える影響についての知見は乏しい。本研究では、微生物が炭素源を資化する際に発する熱（資化熱）を指標として土壌微生物の資化活性を経時的かつ定量的に評価する手法 [1,2] を用いて、保存条件が微生物の資化活性に及ぼす影響を調べ、土壌試料の適切な保存条件を設定するための基礎的知見を得ることを目的とした。
【方法】試料として三重大学附属農場の畑土壌（表層）を用いた。2 mm 以上の礫や植物体を除いた後、室内で乾燥させて風乾細土を得た。採取直後の土壌試料（乾燥重量として 10 g）を 18 個のステンレスシャーレそれぞれに入れ、水分量を最大容水量の 50%になるように調節した後、25℃で 10 日間前培養を行った。各シャーレに糖やアミノ酸など 18 種類の炭素源（炭素原子 0.6 mmol 相当）を 1 種類ずつ加え、25℃で約 160 時間、等温多試料熱量計を用いて資化熱を測定し、発熱速度の経時変化を得た。さらに、室温、冷蔵（4℃）、および冷凍（-30℃）で、2、5 および 8 か月保存した各土壌試料について上記と同様の測定を行い、採取直後の試料の結果と比較した。また DGGE によって各種土壌サンプルの菌叢解析（一般細菌および糸状菌）を行った。
【結果】採取直後の試料では、今回用いた 18 種類の炭素源いずれも単一の発熱ピークを示した。発熱速度が最大となる時間は、早いものではアラニンが 17 時間、プトレシン 21 時間、また遅いものでは、グルコースが 30 時間、フルクトースが 31 時間、マンニトールが 35 時間などであった。ラクトース、マンノース、リボース、キシロースなどでは有意の発熱が見られなかった。冷凍および冷蔵で 2～8 か月保存した土壌では、採取直後の結果とほぼ同一であった。これに対し、室温で 5 か月以上保存した試料では、上記のラクトースやキシロース等についても資化に伴う発熱が見られるようになったほか、グルコースやスクロース、フルクトース、マンニトールでは、10 時間前後に小さいながら新規の発熱ピークが見られた。また DGGE による菌叢解析では、8 か月保存後の各土壌サンプルと採取直後のサンプルでほとんど差が見られなかった。これらの結果から、室温では保存 2 か月でも資化活性に若干の差が出始めるが、冷蔵または冷凍保存では 8 か月の保存でもほとんど変化が見られないことがわかった。

1) 坂宮, 田中, 熱測定, **37**, 58-63 (2010)
2) Sakamiya *et al.*, 熱測定, **37**, 186-190 (2010)

calorimetry, preservation conditions of soil samples, soil microbial activity

講演番号：4B21a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ B 校舎 21 会場

水溶性天然ガス田生産水由来の新規酪酸酸化共生細菌の系統分類学的解析
Taxonomic characterization of a novel butyrate-oxidizing syntroph from gas-associated production water of a natural gas field in Japan.
○小栗 正大[1]、中村 浩平[2]、持丸 華子[3]、坂田 将[3]、高見澤 一裕[2] ([1]岐阜大院応生、[2]岐阜大応生、[3]産総研)
○ Masahiro OGURI[1], Kouhei NAKAMURA[2], Hanako MOCHIMARU[3], Susumu SAKATA[3], Kazuhiro TAKAMIZAWA[2] ([1]Gifu. Univ, [2]Gifu. Univ, [3]Aist)

【背景と目的】
嫌気環境における有機物分解には複数種の微生物が関わっている。その中でも水素資化性メタン生成アーキアは、有機物を分解して水素を供給する共生細菌と熱力学的法則に基づく共生関係を構築し、様々な有機物からメタン生成を行い、炭素循環の最終段階を担っている。新潟県内天然ガス田地下圏で水素資化性メタン生成アーキアと共生関係を構築し、酪酸を分解して水素を供給する *Syntrophomonadaceae* 科に属する新規の共生細菌の存在が示唆された。本研究ではその共生細菌の分離及び系統分類学的解析を行い、微生物学的諸性質を明らかにすることを目的とした。
【方法】
天然ガス田採掘井のセパレーターから採取した堆積物に、同天然ガス田生産水から分離された水素資化性メタン生成アーキア（*Methanothermobacter tenebrarum* RMAS）と酪酸を供して集積培養を行った。FISH 解析によって共生細菌の優占化を確認した後、限外希釈培養法による分離を試みたが、集積系内に僅かに生育する共生細菌以外の従属栄養細菌を除くことが困難だったため、ディープゲランガム法による共生細菌とメタン生成アーキアから成る“共生コロニー”の形成を経て、共生細菌 MAK 株を分離した。分離後、16S rRNA 遺伝子配列に基づく相同性解析、及び形態学的、生理学的、化学分類学的性状について解析を行った。
【結果】
MAK 株の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく既知細菌種との相同性解析の結果、最も近縁な *Thermosyntropha tengcongensis* L-60 と 92.6 %、*Thermosyntropha lipolytica* JW265 と 92.3 %、*Syntrophothermus lipocalidus* TGB-C1 と 90.5 %、*Syntrophomonas wolfei* subsp. *wolfei* Goettinge と 90.7 %の相同性を有していた。各種性状解析の結果、MAK 株は偏性嫌気性、グラム陰性の桿菌で、運動性を有し、37～60℃（至適温度：55℃）、及び 100 g/l 以下の NaCl 濃度で生育する（至適濃度：5 g/l 以下）ことが示された。呼吸鎖キノンは検出されず、G+C 含量は 45.0 mol %であった。また、水素資化性メタン生成アーキアとの共生培養条件下で胞子を形成した。16S rRNA 遺伝子配列に基づく相同性解析結果から、MAK 株は既知近縁種との相同性が低く、更にその表現形質は近縁種のものと異なることから、*Syntrophomonadaceae* 科に属する新属新種の細菌であると考えられ、現在より詳細な微生物学的諸性質について解析中である。

syntroph, methanogen, subsurface environment

講演番号：4B21a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ B 校舎 21 会場

高塩濃度下で機能する酵素の塩適応機構：活性の塩依存性とカチオンの役割

Salt-adaptation of halophilic enzyme: Salt dependent activity and roles of cations

○若井 暁[1,2]、安部 晶大[1]、城所 俊一[3]、仲宗根 薫[4]、正木 和夫[5]、三本木 至宏[1] ([1]広島大院・生物圏、[2]神戸大・自・研究環、[3]長岡技科大・生物、[4]近畿大・工、[5]酒類総研)
○ Satoshi WAKAI[1,2], Akihiro ABE[1], Shun-ichi KIDOKORO[3], Kaoru NAKASONE[4], Kazuo MASAKI[5], Yoshihiro SAMBONGI[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Kobe Univ., [3]Nagaoka Univ. Tech., [4]Kinki Univ., [5]NRIB)

地球上の水は、約 97%が海水として存在する。海水は塩を含んでいるため、産業上、特にバイオプロセスでの使用に制約を与える。産業に利用される多くの酵素が低塩で機能を示す酵素であり、海水濃度の塩存在下では効率的な働きが出来ない。すなわち、淡水の確保の問題と使用酵素の制約が発生するのである。産業で利用される酵素を塩存在下で効率的に機能させることができれば、この二つの問題を同時に解決出来る。本研究の目的は、酵素の耐塩性・好塩性を理解し、酵素工学を通して産業応用へと貢献することである。

本研究では、海水の塩濃度をはるかに超える約 20%(w/v) NaCl 存在下で良好に生育する高度好塩性菌 *Haloarcula japonica* を使用した。本菌は、細胞内に高濃度の塩を蓄積することで浸透圧に適応した結果、細胞内の酵素も高塩環境に曝される珍しい微生物である。我々は、本菌の持つ酵素の中で、ピロリン酸加水分解酵素（PPase）に注目した。好塩性を示さない大腸菌や酵母などが持つ PPase は、その構造や反応機構が明らかにされており、非好塩性酵素と好塩性酵素を比較することは好塩性への理解へと繋がる。

我々は、好塩性酵素の塩適応を理解するために、従来の生化学的な手法に加えて、熱力学的な視点での解析を導入した。本研究は、反応に伴う微小な熱変化を高精度で測定することが可能な等温滴定微量熱量計（ITC）を、高塩環境下での酵素反応の測定に初めて応用した例である。

従来からの生化学的な手法および ITC を用いた試験により、好塩性酵素による触媒反応について以下のことを明らかにした。(1) PPi 加水分解活性には、1 M 以上の NaCl および KCl を必要とすること、(2) 低塩濃度下でも加水分解が可能であるが、発熱量が減少し触媒効率も低下すること、(3)減少した発熱量と触媒効率の低下は Na^+濃度の上昇により回復すること。

これまで、好塩性酵素の塩要求性に対するカチオン（Na^+や K^+）の役割は、タンパク質表面に多く存在する酸性アミノ酸残基との相互作用で可溶性を上げることと考えられてきた。本研究は、カチオンが活性調節にも関与していることを初めて明らかにした。

halophilic, salt-adaptation, calorimetry

講演番号：4B21a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ B 校舎 21 会場

Thermus 属細菌及び大腸菌におけるシリカ誘導性遺伝子の発現解析
Analysis of silica inducible gene expression in *Thermus* and *E. coli*
○藤野 泰寛[1]、岩瀬 真[2]、大島 敏久[3]、土居 克実[3] ([1]九州大基幹教育院、[2]九大院生資環、[3]九大院農)
○ Yasuhiro FUJINO[1], Makoto Iwase[2], Toshihisa Ohshima[3], Katsumi Doi[3] ([1]Kyushu Univ., [2]Kyushu Univ., [3]Kyushu Univ.)

【背景/目的】地熱発電所では地熱熱水に含まれる過飽和シリカが発電設備に沈着するシリカスケール問題を抱えている。我々の研究グループでは、このシリカスケールの生成機構を調査する過程で、シリカスケールに高度好熱菌 *Thermus thermophilus* が優占的に存在することを見出し、当該菌が *in vitro* で過飽和シリカ溶液からのシリカ沈殿を促進することを明らかにした。また、過飽和シリカ添加時の培養において特異的に発現が誘導される Silica-induced protein(Sip)を見出した。Sip は *T. thermophilus* HB8 において鉄取込に関与する ABC transporter とアノテートされており、その発現誘導は過飽和シリカ添加から 1 時間以内に速やかに起こり、またその発現量も極めて多量である。このことから、Sip の発現を制御するシリカ誘導性プロモーターは新規なタンパク質発現システムに利用できると考えた。そこで *T. thermophilus* における過飽和シリカによる転写誘導メカニズムを明らかにするとともに、より取り扱いの容易な大腸菌における過飽和シリカ誘導性遺伝子の探索を行った。
【方法/結果】*T. thermophilus* HB8 を TM 培地で前培養し、回収した菌体をシリカ添加 TM 培地(SiO_2:600 ppm)及び鉄欠乏 TM 培地で 1 時間培養し、全 RNA を抽出した。これらのサンプルを DNA microarray に供したところ、シリカ添加・鉄欠乏条件下の両者で、*sip* の他にヘム鉄の取込に関与すると推定される遺伝子群の転写増大が確認された。また、定量的 RT-PCR の結果より、*sip* はシリカ添加時・鉄欠乏時において約 10 倍の転写増大が認められ、さらに鉄回復培地で転写量は通常培養時と同程度に抑えられた。このことから、シリカ誘導性のタンパク質発現は、過飽和シリカ添加により生じたコロイドシリカに鉄イオンが吸着し、細胞が利用可能な鉄濃度が減少することを引き金としていることが推察された。そこで大腸菌でも同様の現象が起こるのではないかと考え、大腸菌における鉄取込に関与する遺伝子群をターゲットとし、定量的 RT-PCR によって当該遺伝子の転写量変化を追跡した。大腸菌 DH5αを LB 培地、シリカ添加 LB 培地(SiO_2:600 ppm)、TM 培地、シリカ添加 TM 培地(SiO_2:600 ppm)で 6 時間培養したのち、全 RNA を抽出し、FhuA、FecA などの鉄 - シデロフォア複合体の輸送に関わる遺伝子群の転写量変化を測定した。その結果、FhuA は LB 培地での通常培養時と比較して、シリカ添加 LB 培地で約 7 倍、シリカ添加 TM 培地で約 20 倍の転写増大が認められた。TM 培地は LB 培地より培地成分の添加量が少ないため、シリカによる鉄欠乏がより顕著に現れるものと推察される。このように大腸菌においても過飽和シリカ応答性の遺伝子が確認されたため、今後シリカ添加による異種タンパク質発現システムの構築を目指していく予定である。

silica, expression, *Thermus*

講演番号：4B21a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ B 校舎 21 会場

海洋から分離された *Terrabacter* sp. OC11 株が有する carbazole 分解遺伝子の解析

Genetic Analysis on Carbazole Degradation Gene Sequence of *Terrabacter* sp. Srain

○大場 進太郎[1]、鈴木 敏弘[2,3]、前田 臨太郎[4]、大森 俊雄[5]、布施 博之[5]([1]芝工大院・シ理工・シ理工、[2]芝工大院・地域環境システム、[3]筑波大学・生命環境系、[4]芝工大・シ理工・応化、[5]芝工大・シ理工・生科)

○Shintaro OBA[1], Toshihiro SUZUKI[2,3], Rintaro MAEDA[4], Toshio OMORI[5], Hiroyuki FUSE[5] ([1]Grad. School of Engineering and Science, Shibaura Inst. Tech., [2]Grad. School of Regional Environment Systems, Shibaura Inst. Tech., [3]Life and Env. Sci., Tukuba Univ., [4]Grad. School of Applied Chemistry, Shibaura Inst. Tech., [5]Department of Biosci. and Eng. Shibaura Inst. Tech.)

【目的】難分解性の多環芳香環炭化水素の 1 つである carbazole (CAR) は原油中などに存在している。CAR は染料や工業用資源として用いられる一方で、毒性と変異原性を持つことも知られている。現在までに様々な CAR 分解細菌が環境から分離され、その菌株の特性と遺伝子について研究がされてきた。陸生環境ではグラム陰性細菌の *Pseudomonas resinovorans* CA10 や *Novosphingobium* sp. KA1 株、グラム陽性細菌の *Nocardioides aromaticivorans* IC177 [1)]の CAR 分解に関与する遺伝子群 (*car* genes)の解析が行われている。一方で海洋環境からは、グラム陰性細菌の OC6S 株や OC9 株が分離され陸生由来の細菌とは異なった特徴をもった *car* genes が分離されている。しかし、海洋環境から分離されたグラム陽性細菌の CAR 分解細菌についての報告はなく、海洋由来グラム陽性細菌の CAR 分解細菌が有する *car* genes に興味が持たれる。近年、我々の研究室では海洋由来でグラム陽性細菌の CAR 分解細菌である *Terrabacter* sp. OC11 株 [2)]を分離した。本研究では、この OC11 株が有する *car* genes を取得・解析し、その特色を明らかにすることを目的とした。

【方法】*car* genes の取得のため、既知の CAR 分解細菌の *car* genes を基にプライマーを作成し、このプライマー及び TaKaRa の LA PCR In vitro cloning Kit を用いた PCR を行った。取得した遺伝子の CAR 分解への関与を確かめる為、栄養培地で培養を繰り返すことによって CAR 分解能欠損変異株を取得し、野生株と変異株の PCR による *car* genes の増幅を比較した。また、OC11 株の発現を確かめるため CAR、あるいはサリチル酸ナトリウムで培養した細胞の *car* genes の転写解析を行った。

【結果】OC11 株の *car* genes と推定される ORF を含む遺伝子断片 5,336 bp を取得した。OC11 株の各 ORF はアミノ酸レベルで同じグラム陽性細菌の IC177 株と最も相同性が高かった。CAR 分解能欠損変異株の Total DNA を用いた PCR では、推定された *car* genes が検出されなかったため、この遺伝子群を *car* genes と同定した。転写解析では、CAR で培養された細胞でのみ *car* genes の検出が認められた。現在、*car* genes の機能をさらに明確にするとともに各酵素における基質特異性を調べるため、発現用ベクターを構築中である。

【参考文献】[1)]Inoue et. al., (2006) Appl Environ Microbiol 72:3321–3329.
[2)]Maeda et. al., (2009) Curr Microbiol. 59:154–159

Carbazole, Gram-positive, *Terrabacter*

講演番号：4B21a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ B 校舎 21 会場

カルバゾール代謝関連酵素の変異型作製による活性の比較

Comparison of the fusion and native enzymes concerning carbazole

○石部 貴映[1]、鈴木 敏弘[2,3]、布施 博之[4]、大森 俊雄[4] ([1]芝工大院シ工、[2]芝工大院地域環境システム、[3]筑波大生命環境系、[4]芝工大シ工生科)
○Takaaki ISHIBE[1], Toshihiro SUZUKI[2,3], Hiroyuki FUSE[4], Toshio OMORI[4] ([1]Shibaura Inst Tech. Grad. Sch. of Sys Sci., [2]Shibaura Inst Tech. Grad. sch. of Regi Envir Sys., [3]Tsukuba Univ. Life and Envi Sci., [4]Shibaura Inst Tech. Depa. of Biosci. Engi.)

【目的】我々はカルバゾール（CAR）代謝関連酵素の変異型を作製することで進化における以下の仮説を支持する。我々の保持する CA10 株は CAR を唯一の炭素源・窒素源として生育する。CA10 株の CAR 分解系酵素は初発酸化酵素（CarAa）・メタ開裂酵素(CarBaBb)・加水分解酵素(CarC)から成り、遺伝子 cluster を形成している。この遺伝子 cluster はプラスミド上に存在している。これらの酵素を構成している遺伝子には塩基が重複（overlap）している部位が存在する。CA10 株では CarBaBb 間において 1bp の重複、CarBbC 間で 11bp の重複が存在している。このような重複は他の CAR 分解系遺伝子を持つ菌株でも確認されている。我々が保有する菌株については CA10 株と同じ塩基数重複している株や 4,7,11bp などの塩基数の重複を確認している。そしてメタ開裂酵素 CarBaBb では重複している塩基数の違いこそあるが保有している全 14 株に重複が確認された。これらからメタ開裂酵素 CarBaBb は一つであったメタ開裂酵素遺伝子が進化して現在の状態になり、重複はその名残と仮説を立てた。この仮説を証明するために遺伝子改変を行い、二つの酵素遺伝子を fusion させた変異型の酵素を作成し、野生型の酵素と活性の有無や強さの比較を行った。

【方法】酵素をコードする遺伝子を puc119 ベクターに載せ、Inverse PCR を用い CarBa の終止コドンと CarBb の開始コドンに変異を起こした。大腸菌で発現させた。目的タンパク質の発現は SDS-PAGE により確認した。CarBa が約 10kDa、CarBb が約 30kDa なので約 40kDa の位置に確認された。活性は高密度菌体懸濁液や粗酵素抽出液で 2,3-ジヒドロキシビフェニルによる呈色反応で確認した。また、GC-MS による代謝産物の検出も行う。

【結果】メタ開裂酵素遺伝子重複部位は前（TGATG）から後（TGTATT）に変異した。また、変異型と野生型のメタ開裂酵素はどちらも大腸菌で一つのタンパクとして発現した。呈色反応において、野生型の方が変異型に比べ呈色反応が鋭敏であった。これは仮説を支持する結果であった。同じく加水分解酵素を加え変異させた酵素においても同様の結果が得られた。

Carbazole, *Pseudomonas resinovorans* ca10, meta-cleavage emzyme

講演番号：4B21a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ B 校舎 21 会場

Intracellular degradation of 3-hydroxyvalerate oligomers in a PHA-producing bacterium
○jing Lu[1,2], Akira Takahashi[1], Shunsaku Ueda[1] ([1]Faculty of Agriculture, Utsunomiya Univ., [2]United Graduate Sch. of Agricultural Sci., Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

Introduction:

3-Hydroxyalkanoate oligomer hydrolase (3HAOH) and 3HA dehydrogenase (3HADH) are included in intracellular polyhydroxyalkanoates (PHA) degradation. We already reported isolation of 3HAOH gene (*phaY*) of *Paracoccus denitrificans* and purification of the gene product. In this study, we will report 3HADH of *P. denitrificans* and degradation of 3-hydroxyvalerate (3HV) oligomers.

Methods:

P. denitrificans NBRC13301 (PD01) was used in this study. *P. denitrificans* PD1222 genome sequence is available in the NCBI data base. By referring to its nucleotide sequence, PCR was carried out against the PD01 strain DNA to isolate 3HADH gene. PCR product obtained was cloned in *E. coli* cells with pTAC-1 vector. 3HADH was expressed with pQE30 vector. Purification of the expressed 3HADH was carried out by Ni-NTA and G3000SW column chromatography. The substrate specificity of 3HADH was examined by the two-step reaction of 3HAOH and 3HADH.

Results:

3HADH gene cloning: A 0.8-kb DNA fragment of PD01 was obtained by PCR. Nucleotide sequence of the fragment was determined. A gene in this fragment was expressed with pTAC-1 vector in *E. coli* cells. A protein with predicted molecular size was produced. The protein catalyzed the dehydrogenation of 3-hydroxybutyrate. In order to overproduce the enzyme, it was expressed with pQE30 as a 6xHis-tagged protein.

3HADH purification and substrate specificity: His-tagged 3HAOH was purified as previously described. His-tagged 3HADH was purified by column chromatography to homogeneity in this study. Two-step reaction with these two enzymes was carried out by using 3HV oligomers as reaction substrates. Reaction mixture also contained NAD. In this reaction, 3HV oligomers were consumed and NAD was reduced. This result indicates that the two-step reaction should proceed also in PD01 cells. Therefore, these two enzymes are important for PHV degradation.

3-hydroxyvalerate, Paracoccus denitrificans, oligomer hydrolase

講演番号：4B21a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ B 校舎 21 会場

Pellicle of thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* strains: Sugar composition of polysaccharide and effect of carbon sources

○Buddhika Perumpuli,Taisuke Watanabe,Hirohide Toyama (Univ. Ryukyus)

Acetobacter species are well known to have an ability to grow floating on the surface of the medium by producing pellicle, which consists of cells and a self-produced matrix of cell-attached polysaccharide, not extracellular polysaccharide, and is important for traditional vinegar fermentation. We previously isolated three thermotolerant strains (SL13E-2, SL13E-3, and SL13E-4) from Sri Lankan coconut vinegar, and identified all strains as *A. pasteurianus*. Thus, characterization of pellicle polysaccharides of three stains and *A. pasteurianus* SKU1108, which was originally isolated from Thailand, was done. Bacterial cells obtained from shaking submerged-culture on Potato medium were disrupted by ultrasonication. After ultracentrifugation, the obtained supernatant was treated with DNase, and further with Proteinase K, and then dialyzed against 0.1 M NaCl containing 0.1 % SDS. Polysaccharides were precipitated by the addition of 2-propanol. The monosaccharide composition of the isolated polysaccharides was examined by both TLC and HPLC analyses after hydrolyzed with trifluoroacetic acid. As a result, the polysaccharides of SL13E-2 and SL13E-3 were composed of rhamnose and glucose in the ratio of 1：3 and 1：4 respectively, while that of SL13E-4 consisted of rhamnose, glucose and mannose in the ratio of 1：3：1. On the other hand, the polysaccharide of SKU1108 strain was composed of rhamnose, glucose and galactose in the ratio of 1：3：1. Sugar composition of the pellicle polysaccharides varied among *A. pasteurianus* strains. In static culture on Potato medium, all four strains gave better pellicle formation at 37°C than at 30°C or 40°C. The pellicle formation of SL13E-2, SL13E-3 and SL13E-4 were significantly induced by the addition of ethanol, while the SKU1108 strain showed induction by the addition of other sugar sources, such as glucose, sucrose and fructose, but not so much by ethanol. Induction patterns of pellicle formation also varied among strains of *A. pasteurianus*.

Acetobacter, pellicle, polysaccharide

講演番号：4B21a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ B 校舎 21 会場

キノヘモプロテイン・アルコール脱水素酵素 ADH-IIG 遺伝子プロモーターを利用した *Pseudomonas putida* 用異種タンパク質発現プラスミドの構築

Construction of a plasmid for protein expression in *Pseudomonas putida* using promoter for the gene of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase ADH-IIG

○外山 博英、宮城 雅一、新垣 萌美、大場 真奈、渡邉 泰祐（琉球大農）
○Hirohide TOYAMA,Masakazu Miyagi,Moemi Aragaki,Mana Ooba,Taisuke Watanabe (Univ. Ryukyus)

【目的】*Pseudomonas putida* HK5 は、種々のアルコールを炭素源とした場合に、3 つのピロロキノリンキノンを含有するキノプロテイン・アルコール脱水素酵素（ADH-I、ADH-IIB、ADH-IIG）をアルコールの種類に応じて誘導発現するが、有機酸などの別の炭素源や LB 培地のような栄養培地では発現しない。特に、ADH-IIG は 1,2-プロパンジオールやグリセロールで誘導発現されるが、別のアルコールでは発現が見られない。今回は *Pseudomonas* と *Escherichia coli* のシャトルベクターpUCP20T を基にして、ADH-IIG 遺伝子（*qgdA*）のプロモーター領域を導入したプラスミドを構築したので報告する。

【方法】pUCP20T の *lac* プロモーターの上流部分にある制限酵素 *Sap*I 部位で切断した場合の、切断末端部分約 15 塩基部分の配列を 5'位に、*P. putida* HK5 の *qgdA* プロモーターを含む領域の約 15 塩基部分の配列を 3'位に持つキメラプライマーを使って、*P. putida* HK5 のゲノム DNA を鋳型として PCR し、約 0.3 kb の DNA 断片を得た。この DNA 断片を、*Sap*I 切断した pUCP20T と In-Fusion PCR Cloning 法で結合させ pUCP20T-GA を得た。次に、pUCP20T-GA の *lac* プロモーター部分を含む領域を制限酵素 *Sap*I と *Eco*RI で切断除去し、合成オリゴヌクレオチドカセットを挿入して pUCP20T-GAdl を構築した。それぞれのクローニング部位にプロモーター領域を持たない β-ガラクトシダーゼ遺伝子を挿入し、pUCP20T-GA-gal と pUCP20Tdl-GA-gal を作製した。さらに、pUCP20Tdl-GA-gal を *Afl*II で切断した場合の、切断部分約 15 塩基部分の配列を 5'位に、プラスミドベクターpCM130 の転写終結配列 TrrnB を含む領域の約 15 塩基部分の配列を 3'位に持つキメラプライマーを作製し、pCM130 を鋳型として PCR し、約 0.5 kb の DNA 断片を得た。この DNA 断片を、*Afl*II で切断した pUCP20Tdl-GA-gal と In-Fusion PCR Cloning 法で結合させ pUCP20Tdl-Trrn-GA-gal を得た。得られたそれぞれのプラスミドを *P. putida* HK5 に形質転換した。無機塩培地に種々のアルコールを添加し誘導させた時の β-ガラクトシダーゼ活性を Miller 法で測定し、転写活性とした。

【結果】pUCP20T-GA-gal または pUCP20Tdl-GA-gal を有する菌株は、アルコールを添加していない非誘導条件でも転写活性が高かったが、1,2-プロパンジオールで 3 倍程度の誘導が確認できた。pUCP20Tdl-Trrn-GA-gal では前者 2 つに比べ非誘導条件での転写活性が抑えられ、1,2-プロパンジオールで約 7 倍の誘導が確認できた。

Pseudomonas putida, quinoprotein, alcohol dehydrogenase

講演番号：4B21a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:12～ B 校舎 21 会場

薬剤耐性 *Escherichia coli* が保有する耐性遺伝子及びプラスミド間における遺伝的特性

Localization of antimicrobial resistance genes on plasmids in *Escherichia coli* natural isolates

○山本 詩織、中野 源紀、田中 みち子、北川 航、曾根 輝雄、浅野 行蔵（北大院農）
○Shiori YAMAMOTO, Motoki NAKANO, Michiko TANAKA, Wataru KITAGAWA, Teruo SONE, Kozo ASANO (Hokkaido Univ.)

【目的】薬剤耐性菌は、抗生物質の使用によって増加し、食用動物や環境を介してヒトへの伝播リスクがある。抗生物質は、医療、畜産・水産現場において使用されており、中でも幼牛の飼育に多量の抗生物質が使用されている。先行研究では、肉牛糞便から *Escherichia coli* を分離し、耐性菌及び多剤耐性菌が高率で存在することを明らかにした。耐性遺伝子の種類は地区毎に異なった特徴があることも見出した。本研究では、耐性遺伝子がどの遺伝子上に乗っているかによって薬剤耐性の伝播・多剤耐性の獲得に影響を及ぼすと考え、分離菌の薬剤耐性の由来と遺伝的関係性の解析を行った。
【方法】肉牛糞便 291 検体から分離した *E. coli* 3,147 株のうち、耐性株は 1,397 株（44.4%）で、その内 52 株から、アルカリ抽出法及び S1-PFGE 法（パルスフィールドゲル電気泳動法）によりプラスミドを分離した。耐性遺伝子及び不和合性プラスミドの有無は、PCR によって調べた。それぞれの耐性遺伝子の存在位置をサザンブロットによって、染色体か、どのプラスミドかを特定した。
【結果】使用した耐性株 52 株は、1～数百 kbp のプラスミドを少なくとも 1 種類以上保有していた。また、50～150kbp の不和合性プラスミドが 8 種類検出され、約 85%が耐性遺伝子を保有していた。多剤耐性株は、複数の大きなプラスミドを保有しており、その中には不和合性プラスミドも含んでいた。多くのプラスミドは、耐性遺伝子を複数乗せている多剤耐性プラスミドであり、それぞれのプラスミドに乗っている耐性遺伝子の種類は異なっていた。9 剤耐性株と 11 剤耐性株を比較すると、11 剤耐性株のみから Inc A/C が検出され、保有する不和合性プラスミドの種類が異なっていた。プラスミドに乗っている耐性遺伝子の種類にも差異が見られ、9 剤耐性株ではゲンタマイシン耐性遺伝子である *aacC2* 遺伝子が存在したが、11 剤耐性株では *aacC2* 遺伝子ではなく *aac(3)-VIa* 遺伝子が存在した。9 剤以下に耐性を示した株から検出された *aacC2* 遺伝子は、ほとんどがプラスミド上に存在していた。しかし、*aac(3)-VIa* 遺伝子はプラスミド上で確認することができなかった。
【考察】多剤耐性株は複数の耐性遺伝子が乗っているプラスミドを保有していたが、プラスミドの種類や乗っている耐性遺伝子の種類が異なった。既に、薬剤耐性やプラスミドの祖先が共通していることが明らかになっていることから、多剤耐性獲得の派生経路は様々なファクターにより影響を受け、耐性菌毎に多剤耐性化や耐性伝播に違いが生じていると考えられる。従って、耐性遺伝子がどの遺伝子上に乗っているかによって、耐性遺伝子の伝播や薬剤耐性の蓄積に影響を及ぼす可能性も考えられる。これは、多剤耐性化及び耐性伝播に関係する遺伝因子の解明につながる。

Escherichia coli, resistance gene, plasmid

講演番号：4B21a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:24～ B 校舎 21 会場

アグロバクテリアの Ti プラスミドを簡便に交換する技術の確立

Establishment of method for exchange Ti plasmids between Agrobacterial strains.

○山本 真司、清川 一矢、鈴木 克周（広島大院理）
○Shinji YAMAMOTO,Kazuya KIYOKAWA,Katsunori SUZUKI (Hiroshima Univ.)

植物病原菌アグロバクテリアを用いた形質転換法の高効率化・適用可能な生物種の拡大を目的とした研究は現在まで多く行われてきたが、アグロバクテリア菌株自体に注目した研究は加工の困難さなどからあまり行われていない。我々は、様々な植物から単離され、その生理学的特性の多様さが明らかになる一方で形質転換への応用はほとんど行われてこなかった未利用アグロバクテリア病原株に着目した。現在、これらを簡便かつ容易に形質転換可能な菌株へ加工する技術を開発し、形質転換困難な生物種への応用を目指している。

アグロバクテリアの形質転換特性(遺伝子導入可能な植物種の範囲やその効率)は Ti プラスミドと染色体バックグラウンド、そしてその組み合わせによって予期せず大きく変わる。本研究では、多様な未利用病原株のもつ潜在的な形質転換特性を顕在化させ、その有用性を評価することを目標に、Ti プラスミドを容易に可動化し多様なアグロバクテリア病原株間で交換する技術の確立を目指した。本技術は、Ti プラスミドに転移起点(*ori*T)を含む小型可動化プラスミドを一旦融合させ、Ti プラスミド除去済みの別の菌株に接合で移したあと、融合させた小型可動化プラスミドを除去することによって Ti プラスミドの移動を行う。現段階では、試みた 6 種類の菌株全てで小型可動化プラスミドの融合によって Ti プラスミドの接合移動が可能になった。しかし、一旦融合した小型可動化プラスミドを除去し、再び元の Ti プラスミドに戻せたものは、6 株中 2 株にとどまっている。予備的な実験によって得られた、同一の染色体バックグラウンドを持つ 5 株の Ti プラスミド交換株は、保有する Ti プラスミドの種類によって異なる病原遺伝子(*vir*)誘導活性を示した。現在小型可動化プラスミドの改良と選抜方法を検討し、効率の良い Ti プラスミド移行系の確立を目指している。

Agrobacterium, Ti plasmid, Conjugal transfer

講演番号：4B22a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ B 校舎 22 会場

りんご未熟果でんぷんを糖化できる麹菌のスクリーニング

Screening of koji molds for saccharification of starch in dried unripe apple residue

○井澤 弘美、藤田 修三 (青森県立保健大栄養)
○Hiromi IZAWA,Shuzo FUJITA (Aomori Univ. of Health and Welfare)

りんご未熟果には多くのでんぷんが含まれているので、これを材料として麹を作ることは可能であろうと推察される。そこで、りんご未熟果を用いた製麹法開発の基礎資料を得るために、収穫後のりんご未熟果の含まれるでんぷんがどのくらいの期間保持できるかを確認した。りんご未熟果を室温で保存した場合、12 日目にはでんぷんが消失したが、4℃で保存した場合、14 日目でもでんぷんが保持されていた。加えて、りんご未熟果の搾汁残渣乾燥物では、でんぷんは室温で保存しても 7 ヶ月以上も保持されていた。よって、りんご未熟果を収穫した後は 1～2 週間以内に搾汁し、その残渣の乾燥物の状態で保管すれば、製麹原料を通年供給できることを見出した。次に市販種麹菌の中でどれが最もりんご未熟果でんぷんを糖化できるのかを調べるために、*Aspergillus oryzae*、*A. awamori* および *A. awamori ver. kawachi* をりんご未熟果搾汁残渣乾燥物の蒸煮物に接種し培養してαアミラーゼ活性を測定した。その結果、*A. oryzae* の活性が最も高かった。さらに、市販 *A. oryzae* の中でどの菌株がりんご未熟果で最も増殖できるかを調べるために、りんご未熟果搾汁残渣乾燥粉末を唯一の栄養源とした寒天平板培地を調製し、いくつかの市販 *A. oryzae* を接種し培養してそのコロニー径を測定した。その結果、*A. oryzae* AOK 139 の増殖能が最も高かった。この菌株は他の種麹菌と比較してセルラーゼ生産能が高いことが知られている。このことから、*A. oryzae* AOK 139 はセルラーゼを作り出すことによってりんご未熟果細胞を分解し、細胞内のでんぷんを増殖に利用しているのかもしれない。結論として、りんご未熟果を用いた製麹には、*A. oryzae* AOK 139 のようなセルラーゼ生産能が高い菌株が適していることが示唆された。

unripe apple, starch, koji mold

講演番号：4B22a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ B 校舎 22 会場

味噌用麹の酸性ホスファターゼ遺伝子発現解析
Transcriptional analysis of *Aspergillus oryzae* acid phosphatase genes in the *koji* culture for *miso* fermentation

○丸井 淳一朗[1,2]、多田 功生[2]、福岡 真里[1,2]、和久 豊[3]、白石 洋平[3]、北本 則行[4]、杉本 達哉[5]、鈴木 聡[2]、服部 領太[2]、楠本 憲一[2]([1]国際農研、[2]農研機構・食総研、[3]ビオック、[4]あいち産科技総セ・食工技セ、[5]ナカモ)
○Junichiro MARUI[1,2], Sawaki TADA[2], Mari FUKUOKA[1,2], Yutaka WAGU[3], Yohei SHIRAISHI[3], Noriyuki KITAMOTO[4], Tatsuya SUGIMOTO[5], Satoshi SUZUKI[2], Ryota HATTORI[2], Ken-Ichi KUSUMOTO[2] ([1]JIRCAS, [2]NARO, NFRI, [3]Bio'c, [4]Food Res. Center, ACIST, [5]Nakamo)

【目的】調味味噌（だし入り味噌）の製造では、イノシン酸などの核酸系旨味促進成分が味噌中の酸性ホスファターゼによって分解されることを防ぐため、加熱による味噌中の酵素の失活処理が行われているが、味噌の高温加熱処理には品質低下やコストの問題がある。味噌中の酸性ホスファターゼ活性は発酵スターターとして用いられる麹に由来すると考えられ、酸性ホスファターゼ活性の低い味噌用麹の開発により調味味噌の品質向上と製造コスト削減が可能となる。麹菌ゲノムからは 13 種類の酸性ホスファターゼ遺伝子が見出されている。それらの発現制御機構を明らかにすることで、複数の酸性ホスファターゼ遺伝子を協調的に抑制する製麹方法への応用が期待できる。今回、酸性ホスファターゼ活性の低い実用麹菌を選抜し、製麹時における麹菌の酸性ホスファターゼ遺伝子発現を解析するとともに、得られた知見に基づき米麹の酸性ホスファターゼ活性の低減を試みたので報告する。
【方法および結果】503 種類の実用麹菌株から、味噌の発酵に十分なプロテアーゼ、アミラーゼ活性を有しつつ、酸性ホスファターゼ活性が低い菌株として KBN8048 株を選抜した。本菌株で作製した米麹の酸性ホスファターゼおよびイノシン酸分解活性は豆麹の場合よりも高く、更なる低減の余地があると考えられた。麹菌の近縁種において、酸性ホスファターゼ遺伝子の転写量は酸性およびリン酸欠乏の環境において増加することが報告されている。KBN8048 株の米麹と豆麹を比較したところ、米麹は酸性でリン酸含量が低く、酸性ホスファターゼ遺伝子の誘導条件にあると考えられた。米麹、豆麹から抽出した RNA を使用した定量 RT-PCR の結果、麹菌の 13 種の酸性ホスファターゼ遺伝子は、転写レベルが米麹で高いもの（8 遺伝子）、豆麹で高いもの（5 遺伝子）の 2 種に分類でき、それぞれ R タイプ、S タイプとした。R タイプ遺伝子群は米麹の酸性ホスファターゼ活性低減のための標的となる。全ての R タイプ遺伝子のプロモーター上には、出芽酵母の酸性ホスファターゼ遺伝子の転写活性化因子 Pho4p の結合配列が存在した。Pho4p の支配下にある遺伝子の転写活性化は、環境中のリン酸に応じて解除される。KBN8048 株を用いた米麹の調製時にリン酸を添加したところ、R タイプ遺伝子の転写量が減少し酸性ホスファターゼ活性も低下したことから、核酸系旨味促進成分を含む調味味噌に適した米麹づくりに有効と考えられる。
本研究は「新たな農林水産政策を推進する実用新技術開発事業」の一環として実施した。

Aspergillus oryzae, acid phosphatase, miso

講演番号：4B22a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ B 校舎 22 会場

麹菌由来新規 4-methyl-2-oxopentanoic acid（MOA）レダクターゼの機能解析及び MOA レダクターゼ高発現株の作製　～新規吟醸酒用麹菌作製への試み～

Novel 4-methyl-2-oxopentanoic acid redactase belongs to 2-keto acid dehydrogenase family in Aspergillus oryzae

○竹浦 賢吾[1]、森 千明[2]、大穀 未来[2]、余野 圭司[2]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1]（[1]名城大院農、[2]名城大農）
○Kengo TAKEURA[1], Tiaki MORI[2], Miki DAIKOKU[2], Keiji YONO[2], Motoyuki SHIMIZU[1], Masasi KATO[1]（[1]Meijo Univ., [2]Meijo Univ.）

【目的】
清酒の代表的な香気成分として、カプロン酸エチルや酢酸イソアミルが知られている。これらは酵母単独でも生合成できるため、それらの生産能を強化した酵母の育種が盛んに行われている。一方、数多くある香気成分の中で清酒の香気増強に重要なロイシン酸エチルの生成機構については、お酒の原料である米の中に含まれるロイシンを麹菌 *Aspergillus oryzae* がロイシン酸へと変換し、さらに酵母が作用することでロイシン酸エチルが生合成されると報告されている。それぞれ単独では生合成されず麹菌と酵母が共に作用することで初めて生成すること、ロイシンからロイシン酸の変換には麹菌が寄与することも明らとなっている。しかし、麹菌のロイシン酸生合成経路については未知であり関与する酵素についての知見はない。そこで本研究ではロイシン酸の前駆体と考えられる 4-methyl-2-oxopentanoic acid (MOA) をロイシン酸に変換する酵素の探索を行った。将来的には、 MOA レダクターゼを高発現させた吟醸用麹菌を作製することで香味豊かな吟醸酒生産への展開も期待できる。
【方法・結果】
麹菌のゲノム情報から MOA レダクターゼが属すると考えられる 2-ケト酸デヒドロゲナーゼファミリーに属する 5 種の遺伝子を選別した。5 種の内、3 種は細菌類由来の 2-ケト酸デヒドロゲナーゼと、2 種はマウス由来のものと高い相同性を有していた。その遺伝子について大腸菌を宿主として組換え酵素を異種発現させ、精製を行った後、MOA 存在下における NAD(P)H の減少をモニターすることで MOA レダクターゼ活性の有無を調べた。その結果、5 種の内 1 種は NAD(P)H 存在下で MOA を基質とした。また GC-MS 分析から反応生成物はロイシン酸であることも確認した。真核生物において MOA レダクターゼの報告はなく、今回見出したものが初めてとなる。現在、この候補遺伝子を麹菌にセルフクローニングし、MOA レダクターゼを高発現させた新規麹菌の作製を試みている。

Aspergillus, 4-methyl-2-oxopentanoic acid　reductase, Ethyl -2-Hydroxy-4-methylvalerate

講演番号：4B22a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ B 校舎 22 会場

麹菌必須遺伝子の解析のためのプロモーターシャットオフシステムの開発
Development of promoter shutoff systems in *Aspergillus oryzae*
○寺戸 志保[1,2]、島原 朋子[2]、豊浦 利枝子[2]、河内 護之[1,2]、岩下 和裕[1,2] ([1]広島大院・先端研、[2]酒総研)
○ SHIHO TERADO[1,2], TOMOKO SHIMAHARA[2], RIEKO TOYOURA[2], MORIYUKI KAWAUCHI[1,2], KAZUHIRO IWASHITA[1,2] ([1]AdSM,Hiroshima Uni, [2]NRIB)

【目的】　麹菌の遺伝子機能の解析には、遺伝子の発現を ON/OFF を厳密に制御出来る事が必要とされる。これまで *amyB* プロモーター等いくつかの誘導型プロモーターの開発が成されているが、発現抑制時にも僅かに発現が見られるものや、誘導・抑制時に細胞内代謝の大幅な変化が見られる等、遺伝子機能解析に使用しにくい点がある。特にプロモーターシャットオフによる必須遺伝子の解析には、発現抑制時に転写がほぼ完全に抑えられる必要があり、このようなプロモーターは開発されていない。そこでグルコース同様に解糖系により代謝されると考えられるガラクトースとソルビトールに着目し、解析を行った。また、*Aspergillus* 属ではソルビトールを単一の C 源として資化できるが、その代謝機構等についてはほとんど研究されていなかった。そこで、ソルビトール誘導下での遺伝子発現につてマイクロアレイ解析を行い、誘導される遺伝子を抽出するとともに遺伝子破壊により機能解析を行った。そのプロモーターについて発現制御に使用可能かどうか検討を行った。
【方法・結果】　ソルビトールまたはガラクトースを誘導源として、グルコースを抑制条件としてマイクロアレイ解析した。その結果、ガラクトースに比べソルビトールを用いた場合の方が遺伝子全体への発現変動が少なく、かつグルコース環境下で発現が検出されず、ソルビトール下で発現が有意に 50 倍以上増加した遺伝子が 2 遺伝子（*SorA*, *SorB* ）見つかった。そこで、各プロモーターの下流に EGFP を連結したプラスミドを用いて、形質転換体を作成した。この獲得した形質転換体をグルコースまたはソルビトール存在下で培養し蛍光観察したところ、ソルビトール存在下でのみ EGFP の蛍光が観察された。さらに、ガラクトースなど様々な炭素源を用い培養を行い、抗 GFP ポリクロナール抗体による Western blot 解析を行ったところ、ソルビトールでのみ EGFP のシグナルが検出された。これらの結果から、*SorA*, *SorB* プロモーターはソルビトールでのみ誘導されることをタンパク質レベルで明らかにした。現在、ノーザン解析により EGFP の発現制御を mRNA で確認すると共に、本プロモーターシャットオフシステムの麹菌遺伝子の機能解析への利用について検討している。

Aspergillus oryzae, Promoter shutoff system, Sorbitol induction

講演番号：4B22a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ B 校舎 22 会場

麹菌の簡易系統判別法の開発と醸造特性予測への利用

Simple phylogenic classification method of Aspergillus oryzae strains and its application for characterization

○大田 民[1]、伊藤 岳[1,2]、岩下 和裕[1,2] ([1]独立行政法人酒類総合研究所、[2]広島大学先端物質科学研究所)
○TAMI OHTA[1], GAKU ITOH[1,2], KAZUHIRO IWASHITA[1,2] ([1]National Research Institute of Brewing, [2]The Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University,)

【背景】醸造産業では様々な麹菌株(*Aspergillus oryzae*)が使用されているが、これらの実用麹菌株については、ゲノム進化上の系統などが明らかとされていなかった。しかし、*Aspergillus oryzae* RIB40 のゲノムシーケンス解析が行われたことにより、ゲノム全体の情報を利用した系統解析を行うことが可能となった。そこで我々は、麹菌ゲノムアレイを利用した実用麹菌株のゲノム系統解析を行い、実用麹菌は大きく 9 系統、細かくは 13 系統に分類されることを明らかにした。またこれらの菌株を使用し米麹および清酒の作製を行ったところ、米麹の特性および清酒成分は麹菌のゲノム系統と相関が見られる事を明らかにしている。しかし今のところ麹菌の系統判別にはゲノムアレイを実施する必要があり時間とコストが必要である。そこで我々は、ゲノムアレイ解析、ゲノムシーケンス解析によって得られた情報を基に、PCR を利用して麹菌株系統を簡易に判別する方法を開発したので報告する。また系統判別の結果から、麹菌の醸造特性についても予想可能である事が明らかになったので報告する。
【実験方法と結果】麹菌ゲノムアレイ解析、シーケンス解析の結果から、各系統において特異的に欠失している遺伝子、あるいは配列に変化（小規模の欠失）が生じている遺伝子があることが明らかとなった。このような系統特異的な遺伝子を PCR により増幅し、バンドの有無、サイズの違いにより系統判別出来ると考えられる。そこで系統特異的な遺伝子の中から遺伝子を選抜し、500-700bp の断片を増幅出来るよう PCR プライマーを設計し、各系統から代表の株を 1 株ずつ選抜して PCR を行った。この結果、系統によってそれぞれ増幅パターンが違い、系統判別に使用可能であると考えられる最小の組合せ（8 つのプライマーセットによる PCR 増幅パターン）を選抜した。続いて、これらの株について、ゲノム DNA を精製せずにプレートの菌体および米麹から得られたライセートを用い PCR を行ったところ、同様の結果が得られた。さらにこれらのプライマーセットを使用し系統が明らかになっている 54 株について PCR を行った結果、すべての菌株が正しく分類された。続いて RIB 保存株の中からランダムに数株選抜し、ライセートを用いた PCR により簡易判別を行うと共に、ゲノムアレイによる系統分類を行ったところ、両方の結果が一致した。この結果を踏まえ、新規に分類された麹菌株を用いてパイロットスケールでの製麹を行い、醸造特性の指標となる各種酵素活性について評価したところ、同一系統の菌株との差が見られず、系統分類によって麹菌の醸造特性まで予想できることが明らかとなった。

Aspergillus oryzae, Phylogenic classification, Brewing characteristics

講演番号：4B22a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ B 校舎 22 会場

玄大麦を用いた液体麹における白麹菌 *Aspergillus kawachii* の遺伝子発現解析

Transcript Analysis of Submerged Culture Using Whole Barley in *Aspergillus kawachii*

○砂川 忠広[1]、舛田 晋[2]、内橋 康充[1]、結城 敏文[1]、安原 貴臣[3]、杉本 利和[4]、小路 博志[2]、福田 和郎[1] ([1]アサヒグループホールディングス・食の応用技研、[2]アサヒビール・醸造研、[3]アサヒグループホールディングス・R&D 推進、[4]ニッカウヰスキー・技術開発)

○Tadahiro SUNAGAWA[1], Susumu MASUDA[2], Yasumitsu UCHIHASHI[1], Toshifumi YUUKI[1], Takaomi YASUHARA[3], Toshikazu SUGIMOTO[4], Hiroshi SHOJI[2], Kazuro FUKUDA[1] ([1]Res. Lab. Appl. Technol. Food, Asahi Group Holdings, Ltd., [2]Res. Lab. Brew., Asahi Breweries, Ltd., [3]Dept. R&D Mgmt., Asahi Group Holdings, Ltd., [4]Dept. Technol. Dev., Nikka Whisky Distilling Co., Ltd.)

【目的】麹菌の液体培養では固体培養と比較して、酵素生産性が低下することが知られているが、我々は穀皮によりデンプン質が覆われた状態の大麦（玄大麦）を用いることを特徴とする麹菌の液体培養（液体麹）技術を開発し、実用規模の焼酎製造への利用に成功している。しかし、その酵素高生産機構は十分に解明されていない。今回、液体麹における酵素高生産機構を検証するため、遺伝子発現解析を行った。

【方法と結果】液体麹は、白麹菌 *Aspergillus kawachii* NBRC4308 を用いて、玄大麦 3%を含む培地でフラスコスケールによる培養を行った。対照とする低活性の液体培養は、ミルで粉砕した玄大麦 3%を含む培地で培養を行った。固体麹は、蒸煮処理した丸大麦を培地に用いて、シャーレによる培養を行った。遺伝子発現解析は、Agilent カスタムＤＮＡアレイを用いた。その結果、培養液遊離型および菌体トラップ型を合計した耐酸性αーアミラーゼおよびグルコアミラーゼ活性は、液体麹では低活性液体培養と比べて培養中期から大きく上昇しはじめ、培養後期にかけて最大値となり、活性上昇期と菌体増殖期は一致した。液体麹と固体麹では、同程度の麹重量あたりの活性値推移を示した。液体麹では低活性の液体培養、および固体麹と比べて、酵素遺伝子の発現は培養中期に顕著に高いレベルを示し、中心糖代謝遺伝子の発現は培養中期で低値を示した。一方、グルコース抑制制御を受ける遺伝子群については、培養中期で高値を示した。また、液体麹では培養初期において胞子形成等の分化に関わる遺伝子群の発現上昇、および培養中期においてタンパク翻訳後修飾に関わる遺伝子群の発現上昇が確認され、これらは固体麹と共通する発現パターンを示した。液体麹では、顕鏡観察により、培養初期に分生子柄形成等の形態変化が一部の菌糸体で確認された。これらの結果から、玄大麦を用いた液体麹培養では、基質制限によるグルコース抑制解除効果と、分化誘導およびタンパク修飾機構の誘導効果が認められ、固体麹と部分的な共通点を有することが明らかとなった。

Aspergillus kawachii, Submerged Cultivation, Whole Barley

講演番号：4B22a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ B 校舎 22 会場

麦麹の製造過程における白麹菌の DNA マイクロアレイ解析
Microarray analysis of white koji mold in a barley koji-making process
○二神 泰基[1]、森 一樹[1]、和田 正太郎[2]、梶原 康博[2]、高下 秀春[2]、大森 俊郎[2]、田代 康介[1]、久原 哲[1]、後藤 正利[1] ([1]九大院農、[2]三和酒類)
○ Taiki FUTAGAMI[1], Kazuki MORI[1], Shotaro WADA[2], Yasuhiro KAJIWARA[2], Hideharu TAKASHITA[2], Toshiro OMORI[2], Kosuke TASHIRO[1], Satoru KUHARA[1], Masatoshi GOTO[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Sanwa Shurui Co. Ltd.)

【目的】白麹菌（*Aspergillus kawachii*）は、焼酎の醸造に使用される麹菌である。その性質として、アミラーゼやグルコシダーゼなどに代表される糖質加水分解酵素を高分泌生産し、麹の原料である穀類に含まれる多糖類を単糖レベルに分解することが挙げられる。さらに、清酒・味噌・醤油などの製造に使用される黄麹菌とは異なり、クエン酸を高生産するという特徴をもつ。クエン酸の生産は、もろみの pH を低く保つことで雑菌の増殖を防ぐという意味をもち、これは焼酎が主に温暖な九州地方において生産されていることに関連している。本研究では、白麹菌の高クエン酸生産に関わる遺伝子を同定することを目的として、麦麹の製造過程における白麹菌の網羅的遺伝子発現解析を行った。
【方法・結果】麦焼酎の原料に使用される大麦および焼酎醸造用の白麹菌（樋口松之助商店）を用いて製麹を行った。製麹 25 時間後に 39.5℃から 30℃への温度を低下させた通常の条件（クエン酸生産誘導条件）と、39.5℃を維持した条件（クエン酸生産非誘導条件）において RNA を抽出し、マイクロアレイ解析（eArray, Agilent Technologies）により白麹菌の遺伝子発現を比較した。その結果、クエン酸生産誘導条件下において 2 倍以上発現量が高いものとして 296 遺伝子、低いものとして 250 遺伝子を同定した。クエン酸生産誘導条件下において発現量の高い遺伝子には、有機酸代謝に関わるものとして、cytoplasmic pyruvate carboxylase（AKAW_00804）や NADP/NAD-specific isocitrate dehydrogenase（AKAW_02496, AKAW_06629）などが含まれていた。また、DAVID（The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery）による解析の結果、クエン生産誘導条件下で発現量の低い遺伝子を特徴づける GO Term として protein folding、unfolded protein binding、heat shock protein binding などが挙げられた。これは、製麹過程において 39.5℃から 30℃に温度を低下することで高温ストレスから解除されたためであると考察した。現在、発現量に違いの見られた遺伝子の中からクエン酸の高生産に関わると予想された遺伝子の機能解析を進めている。

Aspergillus, shochu, koji

講演番号：4B22a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ B 校舎 22 会場

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* のペクチンメチルエステラーゼ A, B 遺伝子破壊株の機能解析

Characterization of the deletion mutants of pectin methylesterase A and B genes in *Aspergillus luchuensis*.

○水谷 治、柿薗 ダララット、高橋 徹、山田 修（酒総研）
○Osamu Mizutani,Dararat Kakizono,Toru Takahashi,Osamu Yamada (NRIB)

【目的】 焼酎製造では、官能的に必須な香気成分ばかりでなく、メタノールのような望まない成分も微量であるが生成することがある。特に原料に芋を用いて焼酎を製造した場合に、メタノールが含まれてしまうことが経験上知られている。焼酎のメタノール濃度において、わが国の食品衛生法では製品あたり 1 mg/cm^3 未満とされており、問題となっていないが、台湾の輸入基準では 100% エタノールあたり 1,000 mg/L 以下と設定されており、芋焼酎においては輸出ができない場合も想定され、解決しなければならない問題となっている。メタノールは、エタノールと近い性質から蒸留等の工程による除去は難しく、現状では醸造工程で生産させないことが最善の方策と考えられる。現在のところ、メタノールは原料である芋に含まれるペクチンを基質として焼酎麹菌が産生するペクチンメチルエステラーゼ (PME) の関与よって生成する見方が有力である (1)。本研究では、PME に焦点をあて、その低減方法について検討を行うことを目的とし、原因遺伝子の破壊株の造成を試みたので報告する。

【結果】 我々は前年度の大会で、*A. luchuensis* のゲノムデータベースより、*Aspergillus oryzae* の PME (PmeA) と相同性を示す遺伝子を見出し、*pmeA*, *pmeB*, *pmeC* と命名した。*A. luchuensis* の米麹中における、PME 候補遺伝子の発現解析を RT-PCR 等を用いて行った所、*pmeB* 遺伝子の発現が他の *pme* 遺伝子と比べて高い事が明らかとなった。また、これら遺伝子を *A. oryzae* を宿主として高発現させたところ、*pmeA*, *B* において、ペクチンを基質としてメタノールを生成する活性を有している事を報告した。そこで本大会では、PmeA, B が芋焼酎製造中におけるメタノール生成にどの程度影響を及ぼしているかを調べるために、*pmeA*, *pmeB* 各遺伝子の単独破壊株の造成を試みた。破壊用プラスミドの作製は、4 fragment を用いた In-Fusion 法にて行い、これらを用いて、*A. luchuensis ΔligD* 株 (2) の形質転換をアグロバクテリウム法にて行った。得られた形質転換体を、コロニー PCR、サザン解析により調べた所、それぞれ 2 株ずつ目的の位置のみで相同組換えが行われた株 (*ΔpmeA*, *ΔpmeB*) が得られた。続いて、これら破壊株の製麹を行い、メタノール生成活性調べた。その結果、*ΔpmeA* 株では 80%、*ΔpmeB* 株では 20%、親株と比較してメタノール生成活性が減少していた。

(1) 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告 (2007) No. 52 p. 85-88
(2) Takahashi et al., J. Biosci. Bioeng., (2011) Dec;112(6):529-534

Aspergillus luchuensis, pectin methylesterase, deletion mutants

講演番号：4B22a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ B 校舎 22 会場

Aspergillus oryzae KBN616株のキシリトール代謝関連遺伝子破壊株によるキシリトール生産と関連酵素活性の比較

Xylitol production and enzyme activity using xylitol metabolism-related gene disruptans of Aspergillus oryzae KBN616.

○矢田 ひかる[1]、マームド アシフ[1]、中村 浩平[1]、北本 則行[2]、鈴木 徹[3]、高見澤 一裕[1] ([1]岐阜大応生、[2]愛知産技研、[3]岐阜大院連農)
○hikaru yada[1], Asif Mahmud[1], kouhei nakamura[1], noriyuki kitamoto[2], tohr suzuki[3], kazuhiro takamizawa[1] ([1]Gifu Univ., [2]Aichi Ind. Tech. Inst., [3]Gifu Univ.)

【目的】キシリトールは五単糖の糖アルコールで、低カロリー非う蝕性を持つことから食品や医療分野で幅広く使用されている。我々は微生物によるキシリトールの生産方法を探求しており、本研究では高いキシラン分解能を持ち、古くから食品産業に利用され、安全性が確認されている *Aspergillus oryzae* を用いてバイオマスから単一菌株でのキシリトールの生産を検討している。*A. oryzae* は D-キシロースからキシリトールを経て、キシリトールデヒドロゲナーザ(XDH)により D-キシルロースへと変換する。キシリトールは中間代謝物であるため、蓄積することが難しい。そこで我々はキシロース代謝関連酵素である XDH および XDH のアイソザイムである L-アラビトールデヒドロゲナーゼ(LAD)に関連する遺伝子を破壊もしくは削除することでキシリトールの生産向上を試みている。現在までに *xdh*A 遺伝子削除株で親株と比較しキシリトール生産性が向上したことを明らかにした。本研究では *xdhA*、*ladA* およびそれらのホモログ遺伝子破壊株を用いてキシリトール生産実験を行った。その結果を報告する。
【方法】*A. oryzae* KBN616 およびその遺伝子変異株を用いて D-キシロースを炭素源とした培地で本培養を 10 日間行った。48 時間ごとに培養液と菌体のサンプリングを行い、培養液中の糖成分を HPLC で分析し、菌体は海砂で破砕し菌体内酵素液を抽出した。得られた粗酵素液の XR および XDH 活性を測定した。D-キシロース存在下での NADPH の酸化速度、またはキシリトール存在下での NAD^+ の還元速度をそれぞれ 340 nm における 15 分間の吸光度の変化で追跡し各々XR 活性、XDH 活性とした。1 分間での 1 μmol の D-キシロースの減少または D-キシリトールの増加を与える酵素量を 1U と定義した。タンパク質濃度は Qubit を用いて測定した。
【結果】親株である KBN616 株のキシリトール生産濃度は 4.17（g / l）、XR 活性は 0.62（U/ mg）、XDH 活性は 0.25（U/ mg）であった。これに対して、xdhA 破壊株のキシリトール最大生産濃度は 6.02（g / l）、XR 活性は 0.35（U/ mg）、XDH 活性は 0.18（U/ mg）でキシリトール生産濃度は 1.4 倍上昇した。また ladA のホモログ遺伝子破壊株である AO09009000575 株のキシリトール最大生産濃度は 9.02（g / l）で 2.2 倍上昇した。XDH および LAD を発現する遺伝子を破壊することによってキシリトール生産量は増加した。なお ladA およびホモログ遺伝子破壊株によるキシリトール生産および酵素活性については現在実験中である。

xylitol, xylitol dehydrogenase, Aspergillus oryzae

講演番号：4B22a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ B 校舎 22 会場

ビール用大麦麦芽のアスコルビン酸オキシダーゼについて
Characteristics of Ascorbate Oxidase in Barley Malt

○金内 誠[1]、Bamforth Charles[2] ([1]宮城大食産、[2]UC Davis)
○Makoto KANAUCHI[1], Charles BAMFORTH[2] ([1]Miyagi Univ., [2]UC Davis)

【目的】ビール醸造において、製造工程中の酸化は品質ばかりでなく、作業工程にも影響を及ぼすことが知られている。製造工程中に酸化を起こす要因の一つとして、ビール原料麦芽中に存在するチオールオキシダーゼやシュウ酸オキシダーゼなどの酸化酵素が挙げられる。チオールオキシダーゼは大麦タンパク質中のジスルフィド結合と過酸化水素を生成し、麦汁のろ過性の低下を引き起こし、シュウ酸オキシダーゼは、麦芽中のシュウ酸の消去と過酸化水素を生成する。さらに生成された過酸化水素は、脂質やポリフェノールを酸化し、製品ビールの香気の劣化や混濁などを引き起こす。これまで、麦芽中のチオールオキシダーゼやシュウ酸オキシダーゼを検討し、ビール醸造においてこれら酵素作用と生成される過酸化水素レベルとの関係を明らかにした。過酸化水素を消去する酵素としてペルオキシダーゼが知られる。そこで、大麦発芽中に生産されるアスコルビン酸ペルオキシダーゼに着目し、酵素化学的検討を行ってきた。ところが、アスコルビン酸は発芽中に生産されるが、酸化などにより容易にデヒドロアスコルビン酸へと変換される。これは麦芽中のアスコルビン酸オキシダーゼによる酵素的酸化が大きく関与すると考えられる。

本研究では製麦中のアスコルビン酸オキシダーゼの消長や酵素的性質について明らかにすることを目的とした。

【方法】大麦は Metcalfe 2008 年、カナダ産を用いた。これを、1%次亜塩素酸カルシウムで殺菌後、8 時間浸漬、16 時間エアーレスト、さらに 24 時間浸漬させ、その後、水切りし、16℃で、経時的に採取しながら、6 日間発芽させた。発芽させた大麦はただちに冷凍し、凍結乾燥した。これを粉砕後、2mM EDTA および NaCl を含むリン酸緩衝液（pH 7.0）にて抽出し、粗酵素液とした。アスコルビン酸オキシダーゼは、十分にエアレーションさせた 0.5mM アスコルビン酸溶液（リン酸緩衝液 pH 7.0 を含む）に粗酵素液を添加し、A265 にてその減少量を測定した。1Unit は、1 分間に 1mM のアスコルビン酸を酸化する酵素量とした。

【結果】発芽に伴い徐々に活性が上昇し、2 日目では、13.1U/g 麦芽、3 日目では、30.2U/g 麦芽と活性が最大になった。しかし、4 日目の活性は 20.5 U/g 麦芽、5 日目では 7.2 U/g 麦芽と徐々に減少した。本オキシダーゼは同じアスコルビン酸を基質とするアスコルビン酸ペルオキシダーゼと比べ、初期に生産されることが分かった。また、本酵素の活性の局在を検討したところ、胚芽に多く存在し、胚乳に多く存在しているアスコルビン酸ペルオキシダーゼとは異なった。

beer, ascorbate oxidase, barley malt

講演番号：4B22a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ B 校舎 22 会場

微細藻由来Δ6 不飽和化酵素遺伝子発現による脂質生産性糸状菌 *Mortierella alpina* の脂肪酸組成改変

Metabolic engineering of oleaginous fungus *Mortierella alpina* using the Δ6 desaturase gene from the microalga

浅岡 卓也[1]、○奥田 知生[1]、櫻谷 英治[1]、安藤 晃規[2]、小川 順[1]([1]京大院農・応用生命、[2]京大・生理化学)
Takuya ASAOKA[1], ○Tomoyo OKUDA[1], Eiji SAKURADANI[1], Akinori ANDO[2], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

【背景・目的】

糸状菌 *Mortierella alpina* はアラキドン酸をはじめとする種々の高度不飽和脂肪酸を菌体内に著量蓄積する。本菌における高度不飽和脂肪酸生合成経路には様々な脂肪酸不飽和化酵素及び伸長酵素が関わっており、これら脂肪酸生合成関連酵素遺伝子を過剰発現させることによって *M. alpina* の脂肪酸組成の改変が行なわれてきた。*M. alpina* などの脂質生産性微生物では一般的に、脂肪酸伸長酵素は Acyl-CoA を基質とし、不飽和化酵素はリン脂質を基質とすることがわかっているが、その一方で、微細藻 *Ostreococcus* 属より単離された Δ6 不飽和化酵素は Acyl-CoA を基質とすることが明らかになっている。そこで本研究では、*M. alpina* のアラキドン酸生産量の向上を目的とし、*M. alpina* における *Ostreococcus* 属由来 Acyl-CoA 依存性 Δ6 不飽和化酵素の発現実験を行なった。

【方法・結果】

Ostreococcus lucimarinus 由来 Δ6 不飽和化酵素遺伝子配列を *M. alpina* のコドン頻度に合わせて改変し、histone プロモーター制御下に挿入した発現ベクターを作成した。本発現ベクターをアグロバクテリウム法にて *M. alpina* ウラシル要求性株に導入した。得られた形質転換株を GY 培地(Glucose 2%、Yeast Extract 1%)にて 7 日間培養し、回収した菌体を乾燥させ、メチルエステル誘導体化処理を行なった後、ガスクロマトグラフによる定性・定量分析に供した。その結果、Acyl-CoA 依存性 Δ6 不飽和化酵素発現によるγ-リノレン酸生産量の増加および、最終産物であるアラキドン酸生産量の増加がみられた。

Moriterella alpina, polyunsaturated fatty acid, Δ6 desaturase

講演番号：4B22a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:12～ B 校舎 22 会場

油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 の caleosin 遺伝子の単離と過剰発現による脂質蓄積に及ぼす効果

Isolation of caleosin genes from oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4, and effect of overexpression of their genes for lipid accumulation

櫻谷 英治[1]、○三宅 貴士[1]、落合 美佐[2]、安藤 晃規[1,3]、小川 順[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]サントリービジネスエキスパート、[3]京大・生理化学ユニット）
Eiji SAKURADANI[1], ○Takashi MIYAKE[1], Misa OCHIAI[2], Akinori ANDO[1,3], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ., [2]Suntory Business Expert Ltd., [3]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

【目的】細胞内の脂質貯蔵体である油滴小胞は、トリアシルグリセロールなどの中性脂質をリン脂質から成る外膜で覆う構造をしており、その外膜上には caleosin などの油滴小胞特有のタンパク質が存在する。caleosin は油滴小胞の構造安定化に寄与すると推測される。これまでにシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）の caleosin が油滴小胞の肥大化を促進することが報告されている。そこで、アラキドン酸生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 株から caleosin をコードする遺伝子を単離し、過剰発現させることで脂質蓄積への影響を評価することとした。
【方法と結果】*M. alpina* 1S-4 のゲノム情報から 2 つの caleosin（Cal1 と Cal2）遺伝子の存在が示唆された。これらの遺伝子を単離し、推定アミノ酸配列を比較したところ互いに 61%の相同性を示した。また、Cal1 と Cal2 の推定アミノ酸配列は *A. thaliana* の caleosin とそれぞれ 45%、43%の相同性を示した。一方、野生株 *M. alpina* 1S-4 の 2 つの caleosin 遺伝子の転写量は脂質生合成に関わる酵素遺伝子の転写量に比べて低いことがわかった。そこで、caleosin と脂質蓄積の関係を考察するために、*cal1* あるいは *cal2* を過剰発現する *M. alpina* 1S-4 の形質転換体を作製し、それらの脂質生産性を評価した。

Mortierella, Caleosin, lipid

講演番号：4B22a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:24～ B 校舎 22 会場

Mortierella 属糸状菌によるエイコセン酸生産
Production of eicosenoic acid by *Mortierella* fungus
櫻谷 英治[1]、西馬場 由美[1]、○菊川 寛史[1]、安藤 晃規[2]、小川 順[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・生理化学ユニット）
Eiji Sakuradani[1], Yumi Nishibaba[1], ○Hiroshi Kikukawa[1], Akinori Ando[2], Jun Ogawa[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

【目的】エイコセン酸（C20:1Δ11）は植物油脂に比較的多く存在し、保湿効果があることから化粧品などへ応用される有用脂肪酸である。微生物にも微量存在するものの高蓄積するものはこれまで見いだされていなかった。そこで、我々はエイコセン酸を生産する微生物スクリーニングを行い、エイコセン酸の微生物生産を検討した。
【方法と結果】研究室保存菌をグルコースと酵母エキスを含む培地で培養し、得られた菌体の脂肪酸組成・脂肪酸量をガスクロマトグラフィーにより定性・定量分析した結果、総脂肪酸当たりエイコセン酸の占める割合が 5%以上の菌株を 27 株見いだした。このうち *Mortierella chlamydospora* FA73 株がエイコセン酸を最も多く蓄積することがわかった。さらに、TLC による脂質クラスの分画と各脂質画分中の脂肪酸組成の分析を行ったところ、エイコセン酸は 25%がトリアシルグリセロールに、24%が遊離脂肪酸画分に存在していることが確認された。

Mortierella, eicosenoic acid (C20:1Δ11)

講演番号：4B22a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:36～ B 校舎 22 会場

油糧微生物 *Mortierella chlamydospora* における脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子の機能解析
Functional analysis of a fatty acid elongase gene from oleaginous fungus *Mortierella chlamydospora*

櫻谷 英治[1]、○村椿 達哉[1]、西馬場 由美[1]、菊川 寛史[1]、安藤 晃規[1,2]、小川 順[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大・生理化学ユニット）
Eiji SAKURADANI[1], ○ tatsuya muratsubaki[1], Yumi NISHIBABA[1], Hiroshi KIKUKAWA[1], Akinori ANDO[1,2], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

【目的】我々は糸状菌 *Mortierella chlamydospora* FA73 がエイコセン酸（C20:1Δ11）を著量生産することを見いだした。これまでにアラキドン酸生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 のΔ9 鎖長延長酵素（Δ9EL）がオレイン酸（C18:1Δ9）をエイコセン酸に変換することを報告した。しかしながら酵母発現系を用いた機能解析では、その変換効率は数%にすぎなかった。そこでエイコセン酸生産性 *M.*のΔ9EL をコードする遺伝子を単離し、その機能を評価することとした。
【方法と結果】これまでに報告されているΔ9EL のアミノ酸配列の保存領域より degenerate primer を作製し、FA73 株のゲノムを鋳型とする PCR を行った結果、約 300 bp の*Δ9el* ホモログ遺伝子断片を取得した。この部分配列をもとに 5’ RACE 及び 3’ RACE を行い、FA73 株のもつ*Δ9el* ホモログ遺伝子の全長を取得した。その推定アミノ酸配列は、*M. alpina* 1S-4 のもつΔ9EL である MALCE1 と 88%、MALCE2 と 56%の相同性を示した。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた発現解析を行ったところ、本Δ9EL ホモログはパルミチン酸（C16:0）をステアリン酸（C18:0）に、パルミトオレイン酸（C16:1Δ9）をバクセン酸（C18:1Δ11）に、オレイン酸をエイコセン酸に鎖長延長することが明らかになった。

Mortierella, eicosenoic acid, fatty acid elongase

講演番号：4B22a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:48～ B 校舎 22 会場

シャグマアミガサダケの生産するヒドラジド化合物ギロミトリンの生合成に関する研究

Biosynthesis of gyromitrin, a hydrazide compound in *Gyromitra esculenta*

上坊 史晃[1]、○石黒 千絵[1]、出口 悠[1]、日比 慎[2]、高橋 里美[2]、小川 順[1] ([1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物)
Shiko Ueboh[1], ○Chie Ishikuro[1], Yu Deguchi[1], Makoto Hibi[2], Satomi Takahashi[2], Jun Ogawa[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】

窒素 - 窒素結合を持つ化合物は医薬・染料など様々な分野において有機合成中間体などとして使用されている。一方で天然中においても分子内に窒素 - 窒素結合を生合成する生物が見出されている。シャグマアミガサダケ(*Gyromitra esculenta*)は有毒成分としてギロミトリンというヒドラジン類化合物を生産することが知られている。しかし、ギロミトリンに関する窒素 - 窒素結合の生合成メカニズムは全く明らかにされていない。本研究ではシャグマアミガサダケの菌糸における培地組成の変化がギロミトリン生産へ与える影響を解析することで窒素 - 窒素結合の生合成経路の解明を試みた。

【手法】

まず初めにスクリーニングによりギロミトリン生産性の高い株の選択を行った。シャグマアミガサタケの子実体より単離した *Gyromitra* sp.を 29 株、*Gyromitra esculenta* を 8 株、*Gyromitra seculenta* を 3 株、*Gyromitra infula* を 3 株の計 43 株をギロミトリン生産用培地プレートにて培養した後、得た菌体からギロミトリンをエーテル抽出しガスクロマトグラフィー質量分析計を用いてそれぞれの株のギロミトリン生産量を比較した。次に選抜された株について、ギロミトリン生産用培地中の窒素源であるペプトンと酵母エキスの濃度変化によるギロミトリン生産の影響を調べた。さらに様々な含窒素化合物(アミンやアミド、核酸、ポリアミン、アミノ酸)、または金属など計 126 種類の化合物を培地に添加し、ギロミトリン生産への影響を調べた。

【結果】

スクリーニングの結果、再現性がよくギロミトリン生産性の高い菌株として *G. esculenta* CBS335.73 を選抜した。培地中のペプトンの濃度を 0%としたとき *G. esculenta* CBS335.73 株は、生育はするがギロミトリン生産は行わなかった。それに対して、酵母エキスの濃度を 0%としたとき *G. esculenta* CBS335.73 株は生育しなかった。そこから、酵母エキスは CBS335.73 株の生育に必要であり、ペプトンは生育には必要ないがギロミトリン生産には必要であると考えた。ペプトンの中には種々のアミノ酸が含まれていることから、ギロミトリン生産ではアミノ酸がギロミトリンの窒素源となっていることが示唆された。ギロミトリン生産用培地への化合物添加試験においても幾つかのアミノ酸添加でギロミトリン生産量が増大することが示された。

Gyromitrin, Hydrazide, Amino acid

講演番号：4B23a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ B 校舎 23 会場

出芽酵母の高親和性トリプトファン輸送体 Tat2 の機能における膜貫通領域の重要性

Transmembrane domains of the yeast high-affinity tryptophan permease Tat2 play a role in tryptophan import

○阿部 文快[1,2]、完田 奈緒子[1]、金子 麻緒[1] ([1]青山学院大理工、[2]海洋研究開発機構)
○Fumiyoshi ABE[1,2], Naoko KANDA[1], Mao KANEKO[1] ([1]Aoyama Gakuin Univ., [2]JAMSTEC)

【目的】出芽酵母におけるトリプトファン輸送は細胞のアキレス腱と呼ばれ、高水圧や低温、あるいは様々な薬剤に対し高感受性を示す。輸送体としてトリプトファンへの親和性の異なる Tat1 と Tat2 が知られているが、どちらも基質認識や透過機構に関する知見は乏しい。私たちはエラープローン PCR で *TAT2* 遺伝子にランダム変異を導入し、それらをスクリーニングすることで主要な役割を演じるアミノ酸残基の同定を行ってきた。初期の検討では 7 番目の膜貫通領域（TMD7）に重要性が見いだされた。その後、大腸菌ホモログであるアルギニン輸送体 AdiC の結晶構造との比較から、Tat2 の機能に関与するアミノ酸残基が複数の TMD で見つかってきたのでこれを報告する。

【方法】PrimeStar Max DNA ポリメラーゼを用いた部位特異的変異導入法により、高親和性トリプトファン輸送体 Tat2 の TMD1, 3, 6 および 7 にアミノ酸置換を導入した。*tat2* 破壊株は低トリプトファン培地で増殖できないため、これを指標に変異型 Tat2 の機能評価を行った。また ^{3}H-トリプトファンを用い、Tat2 に依存した取り込み活性を定量した。野生型と変異型 Tat2 の存在量については HA タグを用いたウエスタンブロッティングにより、細胞内局在については GFP 標識によって調べた。

【結果】エラープローン PCR で得られた Tat2 変異のうち、TMD7 の F324Y 置換は Tat2 のトリプトファン取り込み能を消失させた。TMD7 には他に 3 つのフェニルアラニン（F313, F314 および F315）が存在するが、Tat2 機能に重要なのは F324 と F315 であることがわかった。エラープローン PCR によるさらなる解析から、TMD3 の V168 の重要性が明らかとなった。興味深いことに、立体構造予測から Tat2 の V168 は、大腸菌のアルギニン輸送体 AdiC における基質認識と輸送に重要なアミノ酸残基の近傍に位置することがわかった。結晶構造からの類推で V168 近傍と思われる TMD1 と TMD6 内のアミノ酸残基の置換は、いずれも Tat2 機能を消失させることがわかった。以上の結果から、少なくとも TMD1, 3, 6 および 7 における複数のアミノ酸残基が、Tat2 によるトリプトファン取り込みに関与することが示唆された。変異型 Tat2 の存在量と細胞内局在を調べた結果とあわせて報告する。

Tryptophan permease Tat2, Transmembrane domain, Saccharomyces cerevisiae

講演番号：4B23a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ B 校舎 23 会場

出芽酵母の低親和性トリプトファン輸送体 Tat1 のユビキチン化による制御

Ubiquitin-mediated regulation of the yeast low-affinity tryptophan permease Tat1

○望月 貴博[1]、鈴木 麻葉[1]、上村 聡志[1]、阿部 文快[1,2] ([1]青山学院大理工、[2]海洋研究開発機構)
○Takahiro MOCHIZUKI[1], Asaha SUZUKI[1], Satoshi UEMURA[1], Fumiyoshi ABE[1,2] ([1]Aoyama Gakuin Univ., [2]JAMSTEC)

【目的】出芽酵母におけるトリプトファン取り込みは、トリプトファンに対する特異性の異なる2つの輸送体Tat1（低親和性型）とTat2（高親和性型）により担われ、いずれも様々なストレスに高い感受性を示す。25 MPa (~250 気圧) の圧力を酵母細胞に負荷すると、Tat1とTat2はともにRsp5ユビキチンリガーゼ依存的なユビキチン化が促進され液胞分解される。Tat2ではN末端の29番目と31番目のリジン残基へのユビキチン結合が分解の引き金となるが、Tat1についてはわかっていない。また最近、Rsp5とTat2を介在するアダプタータンパク質として、PPxYモチーフを有する複数のアレスチン様タンパク質が報告されている。しかしながらTat1のアダプタータンパク質については明らかではない。そこで本研究では、まずTat1に部位特異的変異導入を行いユビキチン化部位を特定する試みを行った。さらに、Tat1とRsp5を介するアダプタータンパク質の存在についての検討を行った。

【方法】Tat1 N末端側の細胞質ドメインには11個のリジン残基がある。PrimeStar Max DNAポリメラーゼを用いた変異導入法により、様々な組み合わせでそれらのリジン残基をアルギニンに置換したTat1プラスミドを構築した。変異型Tat1の分解についてはHAを標識としたウエスタンブロッティングで検証した。アダプタータンパク質の探索のため、PPxYモチーフを有するBul1やBul2、あるいはArtタンパク質の単独および多重欠損株に野生型Tat1発現プラスミドを導入し、Tat1の分解を調べた。

【結果】Tat1のウエスタンブロッティングを行ったところ、メインバンドの他に少なくとも2本の高分子量バンドが検出された。11個のリジン残基を全てアルギニンに置換したTat1$^{11K>R}$ではそれらの高分子量バンドが消失し、かつ高圧培養時の分解が抑制された。このことは、N末端の複数のリジン残基がユビキチン依存性分解に関与することを示唆する。そこで、様々な組み合わせでTat1にK>R変異を導入したところ、Tat2と同様に29番目と31番目のリジンを同時にアルギニン置換したときにのみTat1の分解抑制が見られた。よって、K29とK31いずれかのユビキチン化がTat1分解を引き起こすことが示唆された。一方、アダプタータンパク質については、Bul1とBul2の単独および2重欠損株、およびArtタンパク質の単独欠損株ではTat1の分解抑制は見られなかった。現在、9個のArtタンパク質の全欠損株におけるTat1の分解について検討を行っている。

Tryptophan permease Tat1, Ubiquitination, Saccharomyces cerevisiae

講演番号：4B23a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ B 校舎 23 会場

出芽酵母のロイシン輸送体 Bap2/Bap3 の機能解析
Functional analysis of yeast leucine permeases Bap2 and Bap3
○宇佐美 佑紀[1]、上村 聡志[1]、阿部 文快[1,2] ([1]青山学院大理工、[2]海洋研究開発機構)
○Yuki USAMI[1], Satoshi UEMURA[1], Fumiyoshi ABE[1,2] ([1]Aoyama Gakuin Univ., [2]JAMSTEC)

背景と目的】

20 種類のアミノ酸のうち、哺乳動物ではトリプトファン、ロイシン、イソロイシンなどの一部のアミノ酸は生体内で合成することができないため、食物から摂取しなければならない。そのため、これらアミノ酸を取り込む輸送体の機能は極めて重要である。当研究室では、これまでに出芽酵母をモデル生物として、高親和性トリプトファン輸送体(Tat2)の機能に重要なアミノ酸残基を多数明らかにしてきた。本研究では、Tat2 とアミノ酸レベルでの相同性が高いロイシン、イソロイシンなどの分岐アミノ酸を輸送する高親和性の Bap2 と低親和性の Bap3 に着目し、その輸送機構に重要なアミノ酸残基の同定を試みた。

【結果と考察】

まず、Bap2 と Bap3 のアミノ酸輸送活性を評価する実験系を構築した。ロイシン要求性の酵母(BY4741)の野生株と *bap2*Δ株及び *bap3*Δ株のロイシン濃度依存的な細胞増殖を比較するために、合成完全(SC)培地に含まれるロイシン濃度を 100 mg/L から 20 mg/L まで段階的に変えた。その結果、*bap3*Δ株はロイシン濃度を低下させても、野生型と同様の増殖を示したが、*bap2*Δ株はロイシン濃度を 50 mg/L まで低下させると、野生型と比較して顕著にその増殖能が低下した。さらに、3HA-Bap2 及び 3HA-Bap3 を *bap2*Δ株にそれぞれ発現させると、この増殖低下が回復することから、外因性の Bap2 や Bap3 の発現が *bap2*Δ株のロイシン取り込み活性の低下を相補することを確認した。つまり、この実験系を用いれば人為的に改変した Bap2 と Bap3 のロイシン輸送活性を評価することができる。

次に、Bap2 と Bap3 のアミノ酸輸送に必要なアミノ酸残基を同定するために、Bap2 と Bap3 のそれぞれに点変異を導入し、*bap2*Δ株に発現させた。変異導入箇所は、Bap2 と Bap3 の 5、6、7 番目の膜貫通領域に存在する 7 つのアミノ酸残基で、Bap2 については K242、 E305、Y336、I341、I343、V347 および F345、Bap3 については K237、E300、Y331、I336、I338、F340 および V342 である。これらは互いに相同的な部位にあり、Tat2 のトリプトファン輸送活性に必要なアミノ酸残基に相当する。 特に K、E、F、V は Tat2 でも保存されている。Bap2 に関して、野生型と変異体導入株を 50 mg/L ロイシン存在下で培養すると、E305D、Y336L、I343L 変異体を導入した酵母の増殖が顕著に低下し、必ずしも 3 者で保存されているアミノ酸の変異がロイシン輸送活性の低下を引き起こすわけではなかった。今後は Bap3 変異体のロイシン輸送活性を評価するとともに、Bap2 と Bap3 の変異体の安定性と細胞内局在を解析することで、ロイシン取り込み活性が低下する原因を明らかにしていく予定である。

Leucine permeases Bap2/Bap3, Transmembrane domain, Saccharomyces cerevisiae

講演番号：4B23a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ B 校舎 23 会場

出芽酵母における染色体からのセントロメア DNA の切り出しによる細胞死の誘導－生存細胞の生存原因の解析－

Cell death caused by excising centromeric DNA from a chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*

○宮本 昭弘、柳本 敏彰、秦野 琢之、松崎 浩明（福山大・生命工・生物工）
○Akihiro MIYAMOTO,TOSHIAKI YANAMOTO,TAKUSHI HATANO,HIROAKI MATSUZAKI (Fukuyama Univ., Fac. Life Sci. and Biotech., Dept. Biotech.)

近年、医薬品や酵素の製造および農業などにおいて多数の遺伝子組換え生物が利用されている。しかし、遺伝子組換え生物が野外で拡散した場合に環境へ及ぼす影響が危惧される。そこで、遺伝子組換え生物の拡散防止策の一つとして遺伝子組換え生物に条件致死性質や不稔性質を付与することが重要である。これらの付与は、部位特異的組換えを利用して特定の条件下や時期に染色体からセントロメア DNA を切り出し、細胞死を誘導することで可能であると考えた。そこで、出芽酵母 *S. cerevisiae* をモデル生物として pSR1 プラスミドの部位特異的組換えを利用したセントロメア DNA の切り出しにより細胞死を誘導することを検討している。

一倍体細胞において第 IV 番染色体上のセントロメア DNA の両側に組換え部位配列を挿入し、さらにレコンビナーゼ発現プラスミドを導入した株を作製した。レコンビナーゼ遺伝子は、*GAL1* プロモーターの制御下にあり、ガラクトース培地で培養することでセントロメア DNA が切り出される。切り出しの誘導で生存率が大きく低下し、細胞死を起こすことに成功した。また、第 V 番染色体からの切り出しによっても細胞死を起こすことができた。しかし、第 IV 番と第 V 番染色体の両方において、切り出しを誘導してもプレート上で僅かな数の生存コロニーが出現した。そこで、生存細胞の生存原因を解析することにした。第 IV 番染色体からの切り出しにおける生存細胞 5 株について染色体 DNA のパルスフィードゲル電気泳動解析およびセントロメア近傍 DNA の PCR 解析を行った。その結果、5 株のうち 4 株で切り出しが起きておらず、1 株でセントロメア DNA が切り出された後に、第 IV 番染色体上の他の部位に組み込まれた可能性が示唆された。さらに、シークエンシング解析から、切り出しが起きていなかった 4 株のうち、全てにおいて 2 個の組換え部位配列のうち片方が欠失していた。また、欠失した塩基配列は同じであった。

このような現象を抑制することで生存率をさらに低下させ、細胞死誘導の効率を改善することを検討している。

cell death, centromere, site-specific recombination

講演番号：4B23a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ B 校舎 23 会場

出芽酵母における染色体からのセントロメア DNA の切り出しによる細胞死の誘導－二 倍体細胞における細胞死の検討－
Cell death caused by the excision of centromeric DNA from a chromosome in *Saccharomyces cerevisiae* - Inducing cell death in diploid cell -
○柳本 敏彰、宮本 明弘、秦野 琢之、松崎 浩明（福山大・生命工・生物工）
○TOSHIAKI YANAMOTO,AKIHIRO MIYAMOTO,TAKUSHI HATANO,HIROAKI MATSUZAKI (Fukuyama Univ., Fac. Life Sci. and Biotech., Dept. Biotech.)

近年、多種多様な遺伝子組換え生物が開発されているが、遺伝子組換え生物が野外で拡散することにより環境へ及ぼす影響が懸念されている。遺伝子組換え生物の野外での拡散防止策として、遺伝子組換え生物に条件致死性質や不稔性質を付与することが効果的である。本研究では、部位特異的組換えを利用して特定の条件下や時期に染色体からセントロメア DNA を切り出し、細胞死を誘導することで条件致死性質や不稔性質を付与することを目指している。そこで、出芽酵母 *S. cerevisiae* をモデル生物として pSR1 プラスミドの部位特異的組換えを利用してセントロメア DNA を切り出し細胞死を誘導することを検討した。これまでに、一倍体細胞においてガラクトースによって第 IV 番染色体からのセントロメア DNA の切り出しが誘導される株を作製し、切り出しを誘導して細胞死を起こすことに成功している。今回は、二倍体細胞で細胞死の誘導を検討した。二倍体細胞において第 IV 番相同染色体の一方からセントロメア DNA を切り出しても生存率はあまり低下しなかったが、第 IV 番相同染色体の両方からセントロメア DNA を切り出すことによって生存率が大きく低下し、細胞死を誘導できた。また、第 V 番相同染色体からの切り出しによっても細胞死を起こすことができた。しかし、第 IV 番と第 V 番の両方で、二倍体細胞の生存率は一倍体細胞よりも高かった。複数の染色体から切り出すことで生存率をさらに低下できるかを、第 IV 番と第 V 番の相同染色体の両方から切り出すことで検討した。二倍体において、第 IV 番と第 V 番の両方からセントロメア DNA を切り出した結果、生存率は一倍体とほぼ同じまで低下し、複数の染色体から切り出すことが有効であることが分かった。また、セントロメア領域は部位特異的組換えの効率が低く、核内配置が特殊であることが示唆されている。*SSD1* が染色体の核内配置、特にセントロメアの核内配置に関与していることが示唆されており、*SSD1* 遺伝子の破壊によって *CEN5* 座-*HIS3* 座間の部位特異的組換えの効率が上昇することが分かっている。*SSD1* の破壊によって生存率をさらに低下できる可能性を検討している。今後、実用化に向けてさらに生存率を低下させることを目指す。

cell death, centromere, site-specific recombination

講演番号：4B23a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ B 校舎 23 会場

出芽酵母の長寿変異株における遺伝子発現の解析
Analysis of the transcriptional profile of long-lived mutants in budding yeast
○小川 貴史、水沼 正樹、椿山 諒平、平田 大（広島大院・先端研・分子生命）
○Takafumi OGAWA,Masaki MIZUNUMA,Ryouhei TSUBAKIYAMA,Dai HIRATA (Dep. of Mol. Biotech., Grad. Sch. of AdSM, Hiroshima Univ.)

あらゆる生物個体は有限の寿命を持っており、寿命制御機構の解明についてはこれまでに、酵母や線虫、ショウジョウバエ、マウスなどのモデル生物を用いて多くの研究がなされてきた。現在、寿命制御は、生物種を問わず共通のメカニズムがはたらくことが明らかになりつつある。我々は出芽酵母を用いて Ca^{2+}が寿命制御に関与することを見出し、Ca^{2+}感受性抑圧変異株（*scz1~14*)を用いて本制御機構の解析を行っている。

これまでの解析により、細胞周期進行に異常がある*Δzds1* 株の示す Ca^{2+}感受性を抑圧する変異として取得された *scz* 変異株のうち、増殖遅延が観察される *scz7* （*sah1-1*)変異株は、メチオニン代謝系酵素である必須遺伝子 *S*-アデノシルホモシステイン水解酵素 Sah1 に変異を持っており、著しく寿命が短いことを明らかにした。さらに、*sah1-1* 変異株では基質である *S*-アデノシルホモシステインのみならず、メチル基供与体として知られている前駆体 *S*-アデノシルメチオニンを蓄積することが観察された。さらに、*sah1-1* 変異株の緩慢な増殖を抑圧する変異株を取得することにより、新規長寿遺伝子の選抜が行われた。増殖が良好となった優性変異株を取得し、その寿命を測定したところ、野生株と比較して顕著に寿命が延長していたことから、目的の長寿変異株のスクリーニングに成功した（長寿変異株を *SSG1* と命名)。*SSG1* 単独変異株も野生株と比較して有意に寿命が延長した。また、興味深いことに *SSG1* 単独変異株においても *S*-アデノシルメチオニンや *S*-アデノシルホモシステインが野生株よりも蓄積することが明らかとなった。しかし両物質の寿命への影響は未だ明らかになっていない。

そこで、*S*-アデノシルメチオニンおよび *S*-アデノシルホモシステインによる寿命制御との関係に着目して、細胞増殖期における両物質の経時的変化や、マイクロアレイ解析により遺伝子発現レベルを調べ、長寿の原因を探索することにした。その結果、*SSG1* 変異株では野生株では見られなかった両物質の蓄積が対数増殖期において観察された。またマイクロアレイ法を用いた遺伝子発現の解析の結果、*SSG1* 変異株ではストレス耐性遺伝子が高発現していることが明らかとなった。以上のことから、対数増殖期における *S*-アデノシルメチオニン、*S*-アデノシルホモシステインの蓄積が転写レベルで長寿関連の遺伝子発現に影響を及ぼしていることが示唆された。現在、さらに、両物質の関与する寿命制御機構について解析を行っている。

yeast, life span, SAM

講演番号：4B23a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ B 校舎 23 会場

出芽酵母の液胞膜に局在する寿命制御に関わる Ssg1 の機能解析
functional analysis of vacuolar membrane protein Ssg1 which may involved in the regulation of lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*
○小山 哲也、水沼 正樹、椿山 諒平、平田 大（広島大院・先端研・分子生命）
○Tetsuya Koyama,Masaki Mizunuma,Ryohei Tubakiyama,Dai Hirata (Dep. of Mol. Biotech., Grad. Sch. of AdSM, Hiroshima Univ.)

寿命・老化研究は、酵母や線虫、ショウジョウバエ、マウスなどのモデル生物を用いて、世界中で活発に行われており、多くの寿命制御因子が同定されてきたが、その分子機構については不明な点も多い。我々は、これまでに Ca^{2+}シグナルの生理的機能を解析する過程で、Ca^{2+}シグナルが寿命制御に関与することを報告した。特に、出芽酵母*⊗zds1* 株が示す Ca^{2+}感受性を抑圧する *scz* 変異株のうち、*S*-アデノシルホモシステイン (SAH)水解酵素の変異株 *sah1-1* (*scz7*)変異株では、増殖遅延を示すこと、および寿命とテロメア長が著しく短縮することが観察されている。さらに、*sah1-1* 変異株の増殖遅延を抑圧する変異株は長寿変異株でもあることが期待され、スクリーニングを行った結果、実際に寿命延長変異株の取得に成功した。この抑圧変異を *ssg1* (**S**pontaneous **S**uppressor of **G**rowth-delay of the sah1-1)変異と命名した。そして、*ssg1* 変異の原因遺伝子を同定した結果、*ERC1* (**E**thionine **R**esistance **C**onferring)遺伝子内における変異であることがわかった。*ERC1* 遺伝子は過剰発現するとメチオニンの構造アナログであるエチオニンに耐性を付与することが報告されているが、Erc1 の詳細な機能については不明である。*sah1-1* 変異株が野生株と比較して寿命が短いのに対し、*sah1-1 ssg1* 二重変異株や *ssg1* 単独変異株では野生株より寿命が延長することが明らかとなっている。しかし、我々が使用している W303 株における *ERC1* 破壊株やその高発現株は *sah1-1* 変異株の増殖に対して何の影響も観察されなかった。以上のことから、*ssg1* 変異株は寿命制御に重要な機能を獲得したと予想されたため、Ssg1 の寿命制御における役割を明らかにすることを目的とした。

Ssg1 および Erc1 の N 末端に EGFP を融合させた株を構築し、YPD 培地で培養した対数増殖期初期から定常期に達するまでの細胞を用いて、それらの細胞内局在を観察した。その結果、Erc1 の明確な局在は観察されなかったが、Ssg1 は対数増殖期において液胞膜に局在し、定常期付近より液胞膜から消失することが観察された。また、EGFP-Erc1 と EGFP-Ssg1 についてそれらのタンパク量を Western 解析したところ、Erc1 に比べて Ssg1 のタンパク量が増加していることが明らかとなった。これまでの解析から、*ssg1* 変異株は S-アデノシルメチオニン (SAM)および SAH が高蓄積することも明らかとなっている。そこで、現在、Ssg1 が液胞膜における SAM および SAH のトランスポーターであると予想し、トランスポーター活性を測定するため、細胞分画を行い、条件検討中である。

yeast, lifespan, SAM

講演番号：4B23a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ B 校舎 23 会場

メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* の葉上での窒素代謝遺伝子群の発現制御

Regulatory expression of genes responsible for nitrogen metabolism in the methylotrophic yeast *Candida boidinii* on growing plant leaves

○白石 晃將、内田 大智、川口 甲介、由里本 博也、阪井 康能（京大院農・応用生命）
○ Kosuke SHIRAISHI,Daichi UCHIDA,Kosuke KAWAGUCHI,Hiroya YURIMOTO,Yasuyoshi SAKAI (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】植物からはメタノールやメタンなどの C1 化合物が放出されており、葉上にはこれらの C1 化合物を炭素源として利用する C1 微生物（メタノール資化性細菌やメタン資化性細菌）が普遍的に棲息していることが明らかとなってきた。我々はこれまでに、メタノール資化性酵母がシロイヌナズナ葉上で増殖すること、葉上のメタノール濃度が日周変動すること、葉上での増殖にはメタノール代謝とオートファジーが重要な役割を果たすことを明らかにした [1)]。しかし、葉上での本酵母の窒素代謝、すなわち酵母がどのような化合物を窒素源として利用しているかについては不明であった。本研究では、メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* の窒素代謝に関わる酵素として、メチルアミン代謝に関わるアミンオキシダーゼ（AMO）および硝酸代謝に関わる硝酸レダクターゼ（YNR）、をコードする遺伝子として *CbAMO1*、*CbYNR1* を同定し、葉上でのこれらの遺伝子発現制御と生理機能を調べた。
【結果】*CbAMO1*、*CbYNR1* それぞれのプロモーター支配下で蛍光タンパク質 Venus を発現する株を作成した。これら株をシロイヌナズナ葉上に接種し、4 時間後に顕微鏡観察を行ったところ、*CbYNR1* プロモーター支配下の Venus の発現を検出した。さらに、接種 3 日後に葉から回収した菌体の mRNA を抽出し、定量 RT-PCR を行ったところ、*CbYNR1* において葉上での発現が認められた。*CbYNR1* の発現量は明期に高く、暗期に低いことがわかり、明期においては暗期の約 2.6 倍の発現量が見られた。このことより、シロイヌナズナ葉上において窒素代謝に関わる遺伝子も日周制御を受けて、発現量が変動していることがわかった。

1) Kawaguchi et al., PLoS ONE 6, e25257 (2011).

methylotrophic yeast, nitrate reductase, nitrogen metabolism

講演番号：4B23a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ B 校舎 23 会場

酵母のペプチド利用制御における UBR 蛋白質のオリゴペプチド認識能の役割

The role of peptide recognition activity of UBR protein in oligopeptide utilization

○北村 憲司（広島大・自然科学研セ）
○Kenji KITAMURA (CGS, Hiroshima Univ.)

細胞はペプチドを栄養として利用する能力を有し、特に微生物にとって環境中のペプチドはアミノ酸供給源のみならず窒素や炭素源としても重要である。酵母はPTR及びOPTファミリーに属する特異的な輸送体を介してオリゴペプチドを細胞内に取込むが、オリゴペプチド輸送体の発現は細胞外のアミノ酸やペプチドの存在で変化する。分裂酵母*S. pombe*、出芽酵母*S. cerevisiae*ともに、オリゴペプチド輸送体遺伝子の転写にはUbrユビキチンリガーゼの機能が必須で、出芽酵母ではUbr1がペプチド輸送体の転写を抑制しているCup9をユビキチン化して分解する必要がある事が報告されているが、分裂酵母にはCup9の相同蛋白質がなく、Ubr蛋白質の基質はまだ見つかっていない。

Ubr1ユビキチンリガーゼは、N端に塩基性アミノ酸（type-1; R, K, H）又は長鎖疎水性/芳香族アミノ酸(type-2; L, I, F, W, Y）を有する蛋白質が非常に不安定化する現象の分子基盤であるN-end rule経路の必須因子として見いだされた。Ubr1類似ユビキチンリガーゼは、亜鉛が３個配位したZn finger構造のUBR boxや、細菌のClpSに相同なN-domain等の保存領域を有し、type-1アミノ酸をUBR boxで、type-2アミノ酸をN-domainで認識し、これら不安定化誘導アミノ酸をＮ端に持つ基質に結合してユビキチン化する。また、基質の結合とユビキチン化の効率はtype-1もしくはtype-2アミノ酸をＮ端に持つジペプチドにより影響を受ける事が示されている。出芽酵母ではtype-1, type-2基質のいずれか一方のみが特異的に認識できない*ubr*変異株が得られているが、分裂酵母ではペプチド輸送体発現に関わる基質がまだ不明なため、分裂酵母のUbr蛋白質の当該部位にアミノ酸置換を導入し、*in vivo*での効果とオリゴペプチド利用能への影響を調べた。

N-domainの変異株はtype-2アミノ酸をＮ端に持つモデル基質の分解のみが特異的に欠損し、type-1アミノ酸の認識やtype-1基質の分解は正常だったが、作製した２種のUBR box変異株はtype-1,type-2基質のいずれの分解もできず、UBR boxの重要性が示唆された。また、作製した全ての変異株でペプチド輸送体が発現しないためにオリゴペプチドを利用できず、Ubrユビキチンリガーゼの機能にはN-domain、UBR boxのいずれの領域の完全性も必須である事がわかった。ペプチド輸送体発現には、type-1アミノ酸の認識のみでは不十分でtype-２アミノ酸の認識能がより重要な意味を持つ事を示しており、type-2アミノ酸をＮ末に持つ仮想の基質蛋白質の分解か、type-2ジペプチドがUbrユビキチンリガーゼへ結合するかの、いずれかが必要と考えられる。

ubiquitin ligase, oligopeptide, *S. pombe*

講演番号：4B23a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ B 校舎 23 会場

分裂酵母のアミノ酸取り込みにおける適応現象の解析
Analysis of adaptive growth regulated by amino acid uptake in fission yeast
○孫 暁穎[1,2]、八代田 陽子[1,3]、高橋 秀和[1,3,4]、浜本 牧子[2]、吉田 稔[1,3,5]（[1]理研・化学遺伝学、[2]明治大院・農、[3]理研・ケミカルゲノミクス、[4]岡山大・公衆衛生、[5]科学技術振興機構・CREST）
○Xiaoying Sun[1,2], Yoko Yashiroda[1,3], Hidekazu Takahashi[1,3,4], Makiko Hamamoto[2], Minoru Yoshida[1,3,5] ([1]Chem. Genet. Lab., RIKEN ASI, [2]Grad. Sch. of Agri., Meiji Univ., [3]Chem. Genomics Res. Group, RIKEN ASI, [4]Dept. of Public Health, Okayama Univ., [5]CREST, JST)

すべての生物は様々な環境変化を認識し、その環境変化に適応することで生存している。単細胞真核生物である酵母には、アミノ酸のような栄養源の取り込みを制御することにより、周りの環境変化に迅速に適応する機構が備わっている。ただちに利用可能な窒素栄養素であるアンモニアが細胞外に存在するときは、アンモニアを優先して取り込むため透過酵素によるアミノ酸の取り込みが阻害される。したがって、アミノ酸を合成できない変異株は高濃度のアンモニアを含む培地では増殖できない。分岐鎖アミノ酸（Branched-chain amino acid; BCAA）アミノ基転移酵素は分裂酵母において BCAA（ロイシン、イソロイシン、バリン）を合成する唯一の経路の最終段階の反応を触媒する。我々は最近、分裂酵母において、BCAA アミノ基転移酵素をコードする *eca39*[+]遺伝子の破壊株（*eca39Δ* 株）は、アンモニアに次ぐ良好な窒素源であるグルタミン酸を含む培地上において、BCAA が含まれていても取り込みが阻害され、増殖不可能となることを示した。さらに、グルタミン酸を窒素源とする寒天培地上では、野生株の近傍において *eca39Δ* 株が増殖できるという驚くべき適応現象を見出した[1)]。この現象は、野生株から細胞外へ分泌された何らかの物質により、破壊株におけるアミノ酸の取り込み能が回復することで引き起こされたと考えられる。実際に、野生株の培養液上清を寒天培地に添加することにより、*eca39Δ* 株の増殖が確認されたことから、野生株から細胞外に「分泌ファクター」が分泌されていることが示唆される。そこで、この「分泌ファクター」或いは「分泌ファクター」の生成や分泌に関与する因子の同定を試みた。分裂酵母の遺伝子破壊株約 3,000 個について、*eca39Δ* 株の増殖を再開させることができない株をスクリーニングしたところ、12 個の遺伝子破壊株を単離した。また、野生株の培養液上清の分画実験を行ったので合わせて報告する。1) Takahashi, *et al.*, 2012, *J. Biol. Chem.*, 287: 38158

adaptive growth, amino acid uptake, fission yeast

講演番号：4B23a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ B 校舎 23 会場

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における塩基性アミノ酸の細胞毒性メカニズムの解析
Cytotoxic mechanisms of basic amino acids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*
○菊島 理恵、西村 明、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Rie Kikushima,Akira Nishimura,Hiroshi Takagi (Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】塩基性アミノ酸は生体に必須な物質であるが、一方でその過剰摂取が毒性を示すと知られている。例えば、ヒトの神経変性疾患 JNCL の発症メカニズムとして、塩基性アミノ酸の細胞内蓄積が示唆されている。また、ラットの場合、ヒスチジンの過剰摂取が体重減少を引き起こすと報告されている。しかしながら、塩基性アミノ酸の毒性機序についてはほとんど理解されていない。我々は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においても、塩基性アミノ酸、特にヒスチジンが毒性を示すことを見出している。このことから、*S. cerevisiae* がヒスチジンの毒性メカニズムを解析するモデル生物になり得ると考えている。そこで、*S. cerevisiae* に野生型ゲノムライブラリーを導入し、ヒスチジンの毒性を解除するマルチコピーサプレッサーをスクリーニングした。その結果、銅の取り込みに関与する *CTR1* 遺伝子を取得した。本研究では、*S. cerevisiae* におけるヒスチジンの毒性と銅代謝に関連があると考え、その詳細を解析した。
【方法・結果】*S. cerevisiae* において、外部環境の銅（II）は還元酵素 Fre1 により銅（I）に還元され、その後、銅（I）のトランスポーターCtr1/3 によって細胞内に運ばれる。銅（I）は細胞内に入ると速やかに、数種類の銅シャペロンによって捕捉され、各オルガネラの銅依存性タンパク質へ輸送される。この銅代謝の全体は転写因子 Mac1 によって転写レベルで制御されている。まず、Mac1 が恒常的に活性化し、銅の取り込み活性が高い $Mac1^{H294E}$ 発現株を用いて検討を行った。ヒスチジンの毒性を野生株と比較したところ、$Mac1^{H294E}$ 発現株はヒスチジンに対して耐性を示した。さらに、銅代謝のどの過程にヒスチジンが影響を及ぼすのかを検討するため、それぞれの遺伝子の過剰発現株および破壊株を作製した。各過剰発現株のヒスチジン毒性を検討した結果、*FRE1* と *CTR1/3* の過剰発現株はヒスチジンに対して耐性を示した。一方、各破壊株のヒスチジン毒性を検討したところ、*FRE1* を破壊した株において、ヒスチジンに対する感受性が顕著に表れた。これらの結果から、ヒスチジンの毒性と外部環境からの銅の取り込みの関連性が示唆された。そこで、培地中の銅含量がヒスチジンの毒性に及ぼす影響を検討したところ、ヒスチジンの毒性は銅含量の増加に伴って緩和された。以上の結果から、ヒスチジンが銅代謝に影響を及ぼす過程は、外部環境からの銅の取り込み段階であると考えられた。

yeast, basic amino acids toxicity, copper metabolism

講演番号：4B23a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:12～ B 校舎 23 会場

酵母チオレドキシンの細胞外への分泌

Secretion of yeast thioredoxin

池田 佳代、野村 亘、○井上 善晴（京大院・農・応生科）
Kayo IKEDA,Wataru NOMURA,○Yoshiharu INOUE (Div. of Appl. Life Sci. Grad. Sch. of Agric. Kyoto Univ.)

チオレドキン（TRX）は、大腸菌からヒトに至るまで、構造的にもよく保存された低分子量タンパク質である。TRX は元来、大腸菌においてリボヌクレオチドレダクターゼを還元する酵素として発見され、その後、抗酸化タンパク質としての機能があらゆる生物種で明らかにされている。

ヒトの TRX は、成人 T 細胞白血病由来因子（ATL-derived factor ; ADF）としてクローニングされた。ヒト TRX は細胞内で抗酸化タンパク質として機能するのみならず、細胞外に分泌され、IL-2 受容体の生産を誘導するなどサイトカイン様因子としても機能する。しかしながら、ヒト TRX には分泌タンパク質にみられるようなシグナル配列はなく、どのような機構により細胞外へ分泌されているかについては明らかになっていない。一方われわれは、酵母にエタノールや低 pH ストレス、あるいは低浸透圧ショックを与えると、細胞内 TRX が菌体外に漏えいすることを明らかにしている（*Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1672-1675）。さらに、酵母 TRX（Trx1、Trx2）の約 50%は膜画分に存在し、その一部は DRM（detergent-resistant membrane）画分、いわゆる脂質ラフトにも存在することを見いだした（*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 1393-1399, 2007）。しかしながら、酵母 TRX にもシグナル配列や、細胞膜に結合するような疎水性のドメインは存在しない。

今回われわれは、酵母においても TRX が細胞外に分泌されることを発見した。すなわち、酵母 TRX（Trx1 と Trx2）は対数生育期では分泌されないが、培養開始 48 時間以降では菌体外に分泌されていた。菌体外に観察される TRX は菌体の溶菌によるものでないことは、Cdc28 などの細胞質タンパク質が菌体外サンプル中には検出されないことから確認した。細胞外への TRX の分泌が post-diauxic shift 後に起こったことから、栄養源枯渇や培地 pH の低下の影響について検討したが、それらは TRX の分泌には影響を与えなかった。一方、TRX が DRM 画分にも局在したことから、DRM 画分に豊富に存在する脂質の一つであるエルゴステロールの合成に欠陥がある Erg6 欠損株の菌体外 TRX 量を検討したところ、野生株よりも約 2 倍の TRX の分泌が確認された。現在、DRM 画分に豊富に存在するもう一方の脂質成分であるスフィンゴリン脂質の合成系変異株や合成阻害剤を用いて、スフィンゴリン脂質代謝が TRX の分泌に及ぼす影響について検討を進めている。

thioredoxin, secretion, yeast

講演番号：4B23a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:24～ B 校舎 23 会場

cAMP/PKA は細胞周期制御因子 Whi3 のリン酸化制御を通して様々な生理機能に関わる

cAMP/PKA Regulates Multiple Aspects of Cellular Events by Phosphorylating Whi3 Cell-Cycle Regulator in Budding Yeast

○水沼 正樹、椿山 諒平、平田 大（広島大院先端研）
○Masaki Mizunuma,Ryohei Tsubakiyama,Dai Hirata (Hiroshima Univ. Grad. Sch. of ADSM)

細胞周期 G_1 期/Start は、細胞が細胞内外の環境の変化に応答して、有糸分裂開始あるいは分化へ向かうのか決定する極めて重要な時期である。出芽酵母 Whi3 は G_1 サイクリンの負の調節因子で Start や細胞分化の制御に関わっている。しかしながら、Whi3 の制御機構については不明な点が多い。我々は、Whi3 制御に携わる分子を同定し、その分子機構を明らかにし、その生理意義を明らかにすることを目的とした。

我々は、これまでに、Whi3 はリン酸化制御を受けることを見出した。まず、Whi3 をリン酸化する酵素をスクリーニングした。その結果、RAS/cAMP 依存タンパク質リン酸化酵素 PKA を見出した。実際、Whi3 には PKA のコンセンサス配列が存在した(568 番目のセリン)。*In vitro* によるキナーゼ解析の結果、Whi3 の 568 番目のセリン(Whi3-S568)が PKA による認識リン酸化部位であることが分かった。PKA は、グルコースなどの栄養源シグナルに応答し、細胞内 cAMP レベル濃度の上昇により活性化し、細胞の増殖・分化の制御に関わっている。PKA と Whi3 が関与するイベントが類似していることから、PKA による Whi3 制御の詳細なメカニズムに興味が持たれた。PKA による Whi3 リン酸化の生理意義を調べる目的で、568 番目のセリン残基をアスパラギン酸(D:リン酸化模倣)あるいはアラニン(A:非リン酸化模倣)に置換し、それら表現型を調べた。その結果、Whi3-S568D 株は細胞周期の進行が促進され、偽菌糸形成および胞子形成が阻害される結果となり、これらは *whi3* 破壊株と類似の表現型を示した。一方、Whi3-S568A 株は G_1 期進行の遅延が観察された。以上の結果から、PKA は Whi3 の機能を阻害することが示唆された。Whi3 は mRNA 結合タンパク質で特に G_1 サイクリン *CLN3* と結合することにより G_1 期停止する機能があることも報告されている。そこで Whi3-S568D や Whi3-S568A の *CLN3* mRNA との結合を *in vivo* で調べた。その結果、Whi3-S568D は *CLN3* mRNA との結合が弱まり、その逆に Whi3-S568A 株では *CLN3* mRNA との結合が強まる結果となった。S568 は Whi3 内の RNA 結合配列中に存在し、リン酸化は mRNA との結合を物理的に阻害することが予想された。以上、PKA により Whi3 はリン酸化を受けると *CLN3* mRNA との結合が弱まり、Whi3 の機能が阻害されることが分かった。

これらの結果から、PKA は Whi3 をリン酸化制御することにより細胞増殖・分化の切り替えを行う鍵分子で、長らく不明であった PKA による増殖制御の詳細が明らかになった。本知見は、他の生物種における細胞増殖・分化のスイッチ機構の理解に貢献しうると予想される。

cAMP/PKA, Whi3, Cell cycle

講演番号：4B23a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:36～ B 校舎 23 会場

アコニット酸イソメラーゼ遺伝子を高発現させた大腸菌による *trans*-アコニット酸生産

Production of *trans*-Aconitic Acid by Recombinant *Escherichia coli* Expressing Aconitate Isomerase Gene

○油原 かほり、濱地 達也、小林 慶一、本田 裕樹、桐村 光太郎（早稲田大学）
○Kahori YUHARA,Tatsuya HAMACHI,Keiichi KOBAYASHI,Yuki HONDA,Kohtaro KIRIMURA (Waseda Univ.)

【目的】*trans*-アコニット酸は機能性高分子原料としての用途があり、バイオプロセスによる生産が期待されている。アコニット酸イソメラーゼ（EC 5.3.3.7）は、植物や*Pseudomonas*属等の微生物に存在し、*cis*-アコニット酸と*trans*-アコニット酸の異性化反応を触媒する酵素である。本研究では、*Pseudomonas* sp. WU-0701由来のアコニット酸イソメラーゼ遺伝子を高発現させた大腸菌による*trans*-アコニット酸の生産を行った。

【方法および結果】*Pseudomonas* sp. WU-0701 よりアコニット酸イソメラーゼ遺伝子をクローニングし、大腸菌を宿主として高発現させることで、組換え酵素を活性のある可溶性タンパク質として取得した。取得した組換え酵素は、*cis*-アコニット酸を基質とする *in vitro* 反応により性質を検討した。最適反応 pH が 6.0、最適反応温度が 37℃で、*Pseudomonas* sp. WU-0701 由来のアコニット酸イソメラーゼと同一の性質を示した。さらに、クエン酸から *cis*-アコニット酸への脱水反応を触媒するアコニターゼ遺伝子をアコニット酸イソメラーゼ遺伝子と共発現させた大腸菌を作製した。作製した大腸菌を生体触媒として利用し、37℃、30 分間の反応で 100 mM のクエン酸を原料として 34.8 mM の *trans*-アコニット酸の生産に成功した。

aconitate isomerase, *Pseudomonas* sp., *trans*-aconitic acid

講演番号：4B23a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:48～ B 校舎 23 会場

Rhodococcus erythropolis N9T-4 株の低栄養生育における窒素源について

Effect of nitrogen sources on the oligotrophic growth of *Rhodococcus erythropolis* N9T-4

○稲葉 慧、吉田 信行、高木 博史（奈良先端大バイオ）
○Satoshi Inaba,Nobuyuki yoshida,Hiroshi Takagi (Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】備蓄原油から単離した超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythroplis* N9T-4 株は、炭素源無添加の無機塩固体培地で良好な生育を示す。本菌は生育に大気中の CO_2 を要求するが、既存の独立栄養性細菌には必須である光・金属などのエネルギー源の添加を全く必要としない。従って、本菌は新奇な低エネルギー型炭酸固定経路を有していると予想している。また最近では、本菌は CO も炭素源として利用できることを明らかにした。当研究室ではこれまでに、プロテオーム解析やメタボローム解析的手法により、主に本菌における炭素代謝の解析を精力的に行なってきたが、窒素代謝についてはほとんど検討されていない。そこで、本研究では N9T-4 株における窒素代謝を解析し、低栄養生育との関連性を考察することを目的とした。
【方法と結果】本菌を低栄養条件で生育させる際には $NaNO_3$ を窒素源とし、炭素源を含まない無機塩からなる培地（BM 培地）を用いている。本菌の低栄養生育における窒素源の影響を調べるため、精製寒天およびアガロースを支持体とした BM 固体培地の窒素源を様々に変えて培養を行った。その結果、一般的な微生物と同様に、硝酸塩よりアンモニウム塩を用いた方が生育は良好であった。また興味深いことに、窒素源を除いた培地を用いても生育が見られ、無機化合物であるシリカゲルを支持体とした培地においても同様に窒素源無添加条件下での生育が確認された。これら結果から、本菌は窒素源についても低栄養性であり、大気中より窒素源を得ていることが示唆された。
そこでまず、根粒菌などに見られる大気中の分子状窒素の固定を予想し、アセチレンガスを用いたニトロゲナーゼ活性の測定を行った。しかしながら、ニトロゲナーゼ活性は検出できず、本菌は分子状窒素の固定を行っていないことが示唆された。また、本菌のゲノムにもニトロゲナーゼに相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子は見出せなかった。次に、本菌を低栄養及び富栄養条件で生育させた際の遺伝子発現を調べるため、DNA マイクロアレイ解析を行った。菌体を BM 液体培地（低栄養条件）及び LB 培地（富栄養条件）で 30 分振とうした後、RNA を抽出したものをサンプルとして用いた。その結果、窒素代謝関連遺伝子としては低栄養条件下でアンモニウムトランスポーター(*amt*)遺伝子が富栄養条件下と比較して約 45 倍発現していた。さらに、パウチ袋を用いた密閉培養系では、窒素源無添加の BM 培地での生育が悪くなるが、アンモニア水を添加したろ紙を共存させて培養すると良好な生育を示した。これらの結果より、本菌は大気中の微量アンモニアを窒素源として利用可能であることが示唆された。現在、*amt* 遺伝子破壊株を作製し、その表現型の解析を試みている。

oligotroph, nitrogen source, *Rhodococcus erythropolis*

講演番号：4A37a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ A 校舎 37 会場

ESCRT システム関連因子 calpain-7 のエンドソーム成熟過程における役割

Roles for calpain-7, ESCRT-related factor, in endosomal maturation

○前本 佑樹[1]、木曽 里美[1]、小野 弥子[2]、柴田 秀樹[1]、牧 正敏[1]([1]名大院生命農、[2]都医学研)
○ Yuki MAEMOTO[1], Satomi KISO[1], Yasuko ONO[2], Hideki SHIBATA[1], Masatoshi MAKI[1]
([1]Nagoya Univ., [2]Tokyo Metro. Inst. Med. Sci.)

【目的・背景】

Calpain はカルシウム依存性システインプロテアーゼであり、基質を限定分解することによって、アポトーシス、細胞周期など様々な細胞内現象を調節することが報告されている。Calpain-7 の機能や生理的役割は不明であるが、構造的特徴として他の calpain と異なり、2 つの連続する MIT (Microtubule interacting and trafficking) ドメインをもつ。MIT ドメインは細胞表面レセプターなどの下方制御に関わる ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) 関連因子の一部にみられる相互作用ドメインである。

ESCRT 複合体はエンドサイトーシス経路において積荷分子の選別輸送を行う際の MVB (multivesicular body) 形成に関与する因子として同定された。MVB は ESCRT 複合体による内部小胞形成と中心体方向への移動を伴い、互いの融合を繰り返し、タンパク質分解の場であるリソソームへと成熟すると考えられている。

【方法・結果】

HeLa細胞のcalpain-7を発現抑制し、各種エンドソーム関連マーカーで免疫染色すると、発現抑制細胞ではコントロール細胞に比べ、MVBマーカーであるLBPAが示すシグナルが細胞辺縁部方向に拡散し、各シグナルが小さくなる様子が観察された。後期エンドソーム/リソソームマーカーのLAMP1も同様に細胞末端方向への分散がみられたが、一方、初期エンドソームマーカーのEEA1の局在に変化はなかった。

また ESCRT により選別され、リソソーム分解に供される典型的な積荷分子の EGFR の分解は calpain-7 の発現抑制により遅延し、発現抑制による分解の遅延は野生型 calpain-7 の入れ戻しでは回復するのに対し、プロテアーゼ不活性型変異体 (calpain-7^{C290S}) では回復しなかった。同様の傾向は calpain-7 のノックアウトマウスより得られた胎児線維芽細胞 (MEF 細胞) に calpain-7 を導入した細胞でも確認することができた。

以上の結果より、calpain-7 がエンドソームの成熟に影響を与えることで、EGFR の下方制御にも影響を及ぼすこと、並びにその下方制御に calpain-7 の活性が必要であることが明らかになった。現在、詳しい分子基盤については解析中である。

ESCRT, endosome, calpain

講演番号：4A37a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ A 校舎 37 会場

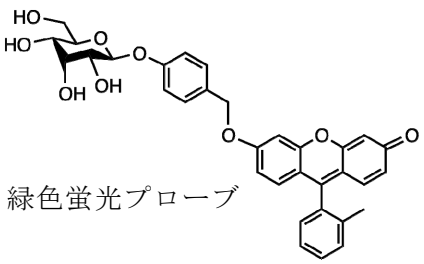
ゴルジ体に見られるβ-アロシダーゼ活性に関する研究

Research of β-allosidase activity in golgi body

○三浦 一輝[1]、大塚 紋[1]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[1]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大生資科・生命化、[2]日大院生資科)

○Kazuki Miura[1], Aya Otuka[1], Wataru Hakamata[1,2], Takako Hirano[1], Toshiyuki Nishio[1,2] ([1]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ., [2]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

【目的】タンパク質の翻訳後修飾は真核生物で普遍的に行われており、糖鎖を介したタンパク質の品質管理は真核生物において重要な役割を果たしている。また近年、これらの翻訳後修飾が様々な疾病と密接な関わりがあることが数多く報告されている。これまでに本研究室では、糖鎖プロセシング酵素である、小胞体に局在するα-グルコシダーゼ、ゴルジ体に局在するα-マンノシダーゼ、リソソームに局在するα-L-フコシダーゼを標的酵素として、キノンメチド開裂を利用したマルチカラー蛍光イメージングプローブの開発を行った。これらのプローブは、培養細胞においてそれぞれの標的であるオルガネラを特異的に染色した。そこで本研究では、新規な細胞内糖鎖プロセシング活性を見出すべく、*N*-結合型糖鎖プロセシング過程では存在しないβ-アロシダーゼ活性の検出を試みた。そこでマルチカラー（赤・青・緑）蛍光プローブ（右図：緑色蛍光プローブ）の分子設計と合成を行い、本活性が局在する細胞内小器官を特定することを目的とした。



緑色蛍光プローブ

【方法と結果】培養細胞中で酵素活性をイメージングするためには（1）フェノール性水酸基を有している、（2）励起条件下での pH 依存性が低い、（3）高い量子収率を有する、蛍光団が必要となる。これら 3 つの条件を満たす赤色蛍光団としてレゾルフィン、青色蛍光団としてトリフルオロメチルウンベリフェロン、緑色蛍光団として 2-メチル東京グリーンを選択した。それぞれの蛍光プローブは、4-ホルミルフェニル β-D-アロピラノシドを出発原料とし、水酸基をアセチル化後に水素化ホウ素ナトリウムによりアルデヒド基を還元し、ベンジルアルコールとした。次に光延反応によってベンジルアルコールとそれぞれの蛍光団を脱水縮合し、3 色の蛍光プローブの合成に成功した。これらの蛍光プローブを 3 種の培養細胞（HT1080：線維芽肉腫細胞、HeLa：子宮頸部癌細胞、SK-N-SH：神経芽細胞種）へ投与し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて染色部位の観察を行った。その結果、ゴルジ体を染色していることが示唆された。そこで市販のゴルジ体の特異的染色試薬 Golgi-ID Green を用い、染色部位の特定を行った。その結果、蛍光プローブが 3 種の培養細胞においてゴルジ体を特異的に蛍光染色したことから、β-アロシダーゼ活性がゴルジ体に存在することを確認した。さらに、染色部位の特定を行うためにゴルジ体分散作用を持つブレフェルジン A を用いて、本蛍光プローブの染色部位が分散するか否かの確認を行っている。

fluorescent probe, golgi body, allosidae

講演番号：4A37a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ A 校舎 37 会場

軟体動物のレチノイン酸カスケード遺伝子オーソログ cDNA の単離と組織再生過程における発現変動

Isolation of cDNA clones for retinoic acid-cascade gene orthologs and their expression patterns during tissue regeneration of *Thais clavigera*

○高橋 勇二、渡邊 弘明、伊東 翼、金子 浩子、官林 夕夏、宇田川 麻美、北田 翔也、梅村 真理子、中野 春男、高橋 滋（東京薬科大生命科学部）
○Yuji Takahashi, Hiroaki Watanabe, Tsubasa Ito, Hiroko Kaneko, Yuka Kanbayasi, Asami Udagawa, Yhouya Kitada, Mariko Umemura, Haruo Nakano, Shigeru Takahashi (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

【背景】２０１２年大会で、イボニシ（*Thais clavigera*）のペニスおよび触角の組織再生過程にレチノイン酸カスケードが関与することを示唆する結果を示した。しかし、イボニシにおけるレチノイン酸シグナル伝達に関わる遺伝子の存在については不明である。そこで、今回は、レチノイン酸カスケードに関わる遺伝子 cDNA の単離と、組織再生過程におけるレチノイン酸カスケード遺伝子の発現状態検討することを研究の目的にした。
【方法】茨城県ひたちなか市阿字ヶ浦海岸、および、神奈川県真鶴半島で採取したイボニシを麻酔し、ペニスおよび触角を切断し、その後、２週間の再生組織を経時的に採取した。組織から全 RNA を精製し、逆転写反応により cDNA を合成した。後生動物のレチノイン酸合成酵素(Aldh1a)あるいは分解酵素(Cyp26)の cDNA 配列をもとにデザインした縮重プライマーを用いて、イボニシレチノイン酸合成酵素および分解酵素 cDNA の単離を試みた。また、次世代シーケンサを用いた EST ライブラリーを構築し、これまで報告されている動物の配列との単離された配列に基づいて、イボニシ EST ライブラリーよりオルソローグ cDNA の単離を試みた。単離された cDNA 配列に基づいて 定量的 PCR 法を用いて RXR, Aldh1、Aldh2 の各 mRNA 量を測定した。
【結果と考察】脊椎動物の肝臓アルデヒド脱水素酵素の細胞質型およびミトコンドリア型に対応する Aldh1 および Aldh2、また、レチノイン酸分解酵素の Cyp26 に類似した配列を有する cDNA を単離した。これらの配列を系統樹解析し、それぞれが後生動物の遺伝子に対応するイボニシオーソローグ（tcAldh1, tcAldh2, tcCyp26）であることを確認した。ペニス再生の初期過程で tcRXRmRNA 量が一過性の有意な増加を示した。tcAldh1mRNA 量は tcRXRmRNA の変化に相応して、再生初期に有意な上昇を示した。しかし、tcAldh2mRNA は再生の初期に有意な増加を示さなかった。
　レチノイン酸の合成酵素は Aldh1 型に分類されており、今回イボニシより得た tcAldh1 および tcCyp26 が、それぞれ、レチノイン酸合成および分解酵素活性を有するかさらに検討を進める予定である。

Mollusc, Retinoids, Regeneration

講演番号：4A37a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ A 校舎 37 会場

超深海性ヨコエビが生産する新規セルラーゼの精製と性質
Purification and characterization of novel cellulase produced by deep-sea amphipod
○小林 英城、秦田 勇二、坪内 泰志、高見 英人 (海洋研究開発機構)
○Hideki KOBAYASHI,Yuji HATADA,Taishi TSUBOUCHI,Hideto TAKAMI (JAMSTEC)

目的）深海は地球の表面積の約半分を占め、多くの未知生物が存在していると考えられている。特に深度 7,000m を超える超深海領域では魚類の存在が確認されず、その生態系は全くわかっていない。一方、10,000 m 級無人探査機「かいこう」の探索により、深度 10,000m を超える世界最深部マリアナ海溝チャレンジャー海淵では、ヨコエビやナマコの存在が確認されている。しかし、細菌でさえもその増殖が困難になる超高静水圧・低温・貧栄養の極限環境に適応できる機構についてはわかっていない。そこで超深海生物の生態、特にその食性に注目し、チャレンジャー海淵から採取されたヨコエビ類の消化酵素を検討した結果、植物性多糖を分解する酵素を多数見いだした。その多糖分解酵素の中でも、特にセルラーゼは反応生産物がグルコースとセロビオースしか検出されず、新規セルラーゼと予想された。そこで、本研究ではカイコウオオソコエビセルラーゼを精製し、その性質を明らかにする事を目的とした。
方法）マリアナ海溝チャレンジャー海淵（深度約 10,800 m）より採取したカイコウオオソコエビを 10 個体破砕し、タンパク質溶液を抽出した。硫安分画後、２種類の陰イオン交換クロマトグラフィーにて、精製を行った。なお、酵素活性はカルボキシメチルセルロース（CMC）を基質として,生成するグルコースをグルコース CII キット（和光純薬）にて定量して、測定した。精製した酵素は常法に従い、酵素の諸性質を検討した。
結果と考察）
カイコウオオソコエビのセルラーゼは一種類であり、CMC からグルコースとセロビオースを 2:1 で生産する新規セルラーゼだった。SDS-PAGE の移動度から推定した分子量は 59 kDa だった。また、非還元末端から分解する exo 型の酵素だった。反応至適温度は２５−３５℃で、反応至適 pH は 5.6 だった。カイコウオオソコエビの生息環境は 4℃、1000 気圧だったことから、4℃で 1000 気圧の水圧を加圧して酵素活性を測定したところ、大気圧である 1 気圧の酵素活性の２倍程度まで上昇した。さらに、天然セルロースであるオガクズ（樫の木）を基質として反応させた場合でも、グルコースの生産が認められ、その生成速度は CMC の約 20%だった。カイコウオオソコエビは、サバなどの魚の切り身を食べる事から、滅多に落ちてこない魚類やクジラなどの大型ほ乳類の死骸を待っている間、流木などの植物片を食べて生きている事が明らかとなった。また、本セルラーゼのように陸上由来のいかなる生物とも異なる酵素を持っていることから、超深海独自の進化を遂げていると予想された。

cellulase, deep-sea, amphipod

講演番号：4A37a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ A 校舎 37 会場

線虫 *C. elegans* のインスリン様ペプチド INS-23 の機能解析

Functional analysis of INS-23, one of the insulin-like peptides, in *C. elegans*

○松川 隼也[1]、松永 洋平[2]、岩崎 崇[1,2]、河野 強[1,2] ([1]鳥取大農、[2]鳥取大院・連合農学)
○Toshiya MATSUKAWA[1], Yohei MATSUNAGA[2], Takashi IWASAKI[1,2], Tsuyoshi KAWANO[1,2]
([1]Faculty of Agric., Tottori Univ., [2]The United Grad.School of Agric. Sciences, Tottori Univ.)

【研究目的】線虫 *Caenorhabditis elegans* は生育環境の悪化に応答して幼虫休眠を行う。この幼虫休眠は insulin/IGF-1 シグナル伝達(IIS)経路ならびに TGF-βシグナル伝達経路によって制御される。また、IIS は成虫寿命を制御することも知られており、IIS による寿命制御は動物種に共通であると考えられている。現在、*C. elegans* では 40 種のインスリン様分子の存在が示唆されており、予想される S-S 結合様式から 3 種に分類される(Type-α，β，γ)。我々は Type-γ（哺乳動物のインスリン族ペプチドと同一の S-S 結合様式）に属するインスリン様ペプチド INS-17, INS-18 を同定し、その生理機能ならびに遺伝子発現パターンについて報告した[1,2)]。次いで、Type-αに属するインスリン様遺伝子に対して RNAi スクリーニングを行い、*ins-23* が幼虫休眠制御に関与する可能性を見出した。そこで本大会では、*ins-23* の生理機能ならびに発現パターン等について報告する。
【方法】*ins-23* 破壊株、復旧株および過剰発現株の幼虫休眠率ならびに成虫寿命を測定した。また、IIS のアンタゴニストとして機能する INS-18（休眠率上昇/寿命延長）との生理機能の比較を行った。次いで、INS-23 が IIS 依存的に幼虫休眠を制御するかを検証した（エピスタティック解析)。
【結果・考察】休眠誘導フェロモン存在下に於いて、*ins-23* 破壊株は有意な幼虫休眠率低下を示し、これは *ins-18* 破壊株の幼虫休眠率低下とほぼ同等であった。また、*ins-23* 復旧株は野生株と同等の幼虫休眠率を示し、過剰発現株は野生株よりも高い幼虫休眠率を示した。一方、*ins-23* 破壊株ならびに過剰発現株の成虫寿命の変動は認められなかった。以上の結果から、INS-23 は主に幼虫休眠を制御すると考えられる。さらに、エピスタティック解析を行い、INS-23 はアンタゴニストとして機能し、唯一のインスリン受容体様タンパク DAF-2 ならびに下流の転写因子 DAF-16（IIS 経路）を介して幼虫休眠を制御することを確認した。現在、*ins-23p*::VENUS ならびに *ins-18p*::mRFP を共発現する線虫を作出し、両者の発現パターンの比較を行っている。

1 Matsunaga Y. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., 423:478-483 (2012).
2 Matsunaga Y. et al. Biosci. Biotechnol. Biochem., 76:2168-2172 (2012).

C. elegans, insulin, diapause

講演番号：4A37a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ A 校舎 37 会場

カイコガ性フェロモン生合成活性化神経ペプチド受容体（PBANR）の点変異体を用いたリガンド認識残基の特定

Identification of some ligand recognition residues of the silkmoth pheromone biosynthesis-activating neuropeptide receptor (PBANR) by mutagenesis analysis

○河合 岳志[1]、郭 琳君[1]、永田 宏次[1]、松本 正吾[2]、長澤 寛道[1]、田之倉 優[1] ([1]東大院農生化・応生化、[2]理研・松本分子昆虫学)
○ Takeshi KAWAI[1], Linjun GUO[1], Kouji NAGATA[1], Shogo MATSUMOTO[2], Hiromichi NAGASAWA[1], Masaru TANOKURA[1] ([1]The University of Tokyo, [2]RIKEN Advanced Science Institute)

(背景・目的)　多くの蛾類昆虫において性フェロモンの生合成は、フェロモン生合成活性化神経ペプチド（PBAN）によって制御されている。PBAN は 33 または 34 アミノ酸残基のペプチドであり、その活性部位として C 末端の FXPRLamide モチーフが特定されている。また、カイコガ PBAN 受容体（PBANR）は、G タンパク共役型受容体（GPCR）であることが示されている。本研究では害虫防除の観点から、PBAN との相互作用に重要な PBANR のアミノ酸残基を変異体解析により特定し、それを基に PBAN アンタゴニストの設計に有用な知見を得ることを目的としている。
(方法)　PBAN の活性発現に重要な C 末端部のアミノ酸残基および PBANR の立体構造モデルから PBAN 認識に関与する可能性を有するアミノ酸残基を 1 個ずつアラニン残基に置換し C 末端に緑色蛍光タンパク（EGFP）を付加した PBANR-EGFP 変異体を Sf9 昆虫培養細胞に一過性発現させ、カイコガ PBAN の C 末端 10 残基をモデルとしたペプチド（$PBANC10_{R2K}$; SKTRYFSPRLamide）に対する応答性をカルシウム指示薬 Fura Red-AM と共焦点レーザ走査型顕微鏡を用いたカルシウムイメージング法により評価した。さらに、応答性が低下した PBANR-EGFP 変異体に関して、Rhodamine Red で蛍光標識した $PBANC10_{R2K}$（RR-$PBANC10_{R2K}$）との結合を同様に共焦点レーザ走査型顕微鏡により観察した。
(結果)　27 種類の PBANR-EGFP 変異体のカルシウムイメージングによる解析の結果、17 種類の変異体で野生型 PBANR-EGFP と比較し $PBANC10_{R2K}$ に対する応答性の低下が観察され、それらは膜貫通ヘリックス II, III, V, VI, VII 上に位置していた。これらリガンド応答性が低下した PBANR-EGFP 変異体は RR-$PBANC10_{R2K}$ との結合力も低下していた。また、すでに X 線結晶構造が解かれている A2a アデノシン受容体（A2aAR）やβ2 アドレナリン受容体（β2AR）とのアミノ酸配列比較から、今回特定された PBANR のリガンド認識残基は A2aAR やβ2AR のリガンド認識残基にほぼ対応する位置にあることが明らかとなった。

GPCR, peptide hormone, sex pheromone

講演番号：4A37a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ A 校舎 37 会場

抑制性グルタミン酸受容体の機能的発現量の決定に寄与するアミノ酸の同定

Identification of amino acids determining the membrane surface density of glutamate-gated chloride channels

○古谷 章悟[1]、山口 武則[1]、喜多 知[3]、布施 利紀[3]、中谷 有里[2]、三浦 由夏[2]、尾添 嘉久[3]、松田 一彦[1]([1]近畿大院農、[2]近畿大農、[3]鳥取大院農)
○ Shogo FURUTANI[1], Takenori YAMAGUCHI[1], Tomo KITA[3], Toshinori FUSE[3], Yuri NAKATANI[2], Yuka MIURA[2], Yoshihisa OZOE[3], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Kinki Univ., [2]Kinki Univ., [3]Tottori Univ.)

［目的］抑制性グルタミン酸受容体(GluCl)は、無脊椎動物特有のリガンド作動性塩素チャネルであり、マクロライド系化合物イベルメクチン(IVM)のターゲットとして知られている。われわれはこれまでに、カイコ神経系で GluCl 遺伝子の exon 3 と exon 9 での選択的スプライシングの違いにより数種の GluCl が発現し、バリアント間でグルタミン酸および IVM に対する応答強度に違いがあること見出している。本研究では、exon 3 の選択的スプライシングにより生成するバリアントに焦点を絞り、応答強度差をもたらす受容体の構造因子を同定することを目的とした。
[方法] カイコ GluCl(BmGluCl)は、pcDNA3.1(+)ベクターにクローニングした全長 cDNA を鋳型として合成した cRNA をインジェクションすることでアフリカツメガエル卵母細胞に発現させた。それぞれの BmGluCl バリアントのグルタミン酸および IVM に対する応答は、膜電位固定法により測定した。
[結果と考察] アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた BmGluCl バリアントのグルタミン酸および IVM に対する応答強度は exon 3?バリアントが最も小さく、exon 3c バリアントが最も大きかった。まず、exon 3 がコードするアミノ酸配列を block I と block II に分け、exon 3a と exon 3c バリアント間でアミノ酸を置換したキメラ GluCl を作製し、塩素チャネルの開口を誘起するリガンド（グルタミン酸と IVM）に対する応答を測定したところ、exon 3a バリアントの block II を exon 3c バリアントの対応する配列に置換するとリガンドに対する応答が有意に増大し、逆に exon 3c バリアントの block II のアミノ酸を exon 3a の対応する配列に置換すると応答は有意に減少した。Block II 領域において exon 3a バリアントと exon 3c バリアントのアミノ酸配列を比較すると、４つのアミノ酸が異なっていた。そこでこの４つのアミノ酸について、exon 3a のアミノ酸を一つずつ、あるいは複数個組み合わせて対応する exon 3c バリアントに置換し、それぞれの変異体のリガンドに対する応答を測定した。またその結果をもとにして、exon 3c バリアントのアミノ酸を exon 3a バリアントの対応するアミノ酸に置換し、それぞれの変異体のリガンドに対する応答を測定した。その結果、程度の差はあるものの、４つのアミノ酸それぞれが exon 3a と exon 3c バリアント間の応答強度の違いに寄与することが明らかとなった。この結果を説明するため、線虫 GluCl の結晶構造をもとにして、exon 3a および exon 3c バリアントのモデルを構築したところ、今回同定されたアミノ酸は、主に GluCl のサブユニット間の相互作用に影響することで膜での機能的受容体量を決定し、リガンドに対する応答強度の差もたらしたのはないかと推察された。

Glutamate-gated chloride channel, bombyx mori, Ivermectin

講演番号：4A37a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ A 校舎 37 会場

D2-like ドーパミン受容体アゴニストのブロモクリプチンはカイコの摂食行動を亢進する
The D2-like dopamine receptor agonist bromocriptine enhances feeding-related behaviors of the silkworm, *Bombyx mori*

○太田 広人[1]、朝岡 潔[2] ([1]熊大・院・自然科学、[2]農生資研)
○Hiroto OHTA[1], Kiyoshi ASAOKA[2] ([1]Grad. Sci. Tech., Kumamoto Univ., [2]NIAS)

【背景および目的】生体アミンの一種ドーパミン（DA）は、神経伝達物質・神経修飾物質・神経ホルモンとして機能し、昆虫の様々な行動を調節することが知られている。我々は、カイコの摂食行動における DA とその受容体の役割について薬理学的に調べてきた。これまでに、DA 受容体アンタゴニスト（フルペンチキソールとクロルプロマジン）に強い摂食抑制作用があること、さらに、それらの薬剤は 3 種類のカイコ DA 受容体（BmDopR1, 2, 3）のうち、D1-like（cAMP 亢進型）DA 受容体の BmDopR2 に対して高いアンタゴニスト活性を示すことが分かった。摂食行動に影響を及ぼす薬剤とその作用点に関する更なる調査を進めた結果、今回、麦角アルカロイド系 DA 受容体アゴニストのブロモクリプチン（Bro）に強力な摂食亢進作用があることを見出したので、その結果を報告する。
【方法】哺乳類 D2-like（cAMP 抑制型）DA 受容体の選択的アゴニストとして知られている Bro がカイコの D2-like DA 受容体である BmDopR3 にも選択的に作用するのかどうかを調べるために、HEK-293 細胞に BmDopR1, 2, 3 をそれぞれ安定的に発現させ、Bro のアゴニスト活性と受容体選択性を cAMP アッセイで調べた。摂食行動実験では、カイコ 5 齢幼虫に注射で Bro を投与し、摂食量、排糞数、大顎開閉回数、行動時間［摂食行動を FEEDING（人工飼料の摂食）・MOVING（頭部の動きや歩行などの運動）・RESTING（休息）の 3 状態それぞれの時間測定］を行った。
【結果および考察】3 種類のカイコ DA 受容体に対する Bro のアゴニスト活性を調べた結果、BmDopR1 と BmDopR2 にはほとんど活性を示さず、BmDopR3 に対してのみアゴニストとして作用していることが分かった。DA では 1 μM 付近で cAMP 抑制効果が認められたのに対して、Bro はそれよりも少なくとも 1 オーダー低い 0.1 μM でアゴニスト活性が認められた。以上の薬理学的実験から、Bro は BmDopR3 に選択的に作用する、DA よりも強力なアゴニストであることが分かった。Bro を 2 nmol/larva で注射し、その後 1 時間の摂食量を測定した結果、コントロールに対して 1.3 倍上昇した。排糞数は 0.2 nmol/larva で微増傾向が認められ、2 nmol/larva では 2.3 倍まで上昇した。大顎の開閉回数には大きな影響はなかった。摂食行動の 3 状態を 1 時間測定した結果、Bro を注射したカイコでは、RESTING がコントロールの 35 分から 17 分に大幅に減少し、FEEDING が 16 分から 24 分に上昇した。MOVING の時間も約 2 倍上昇していたが、これは餌の探索行動としてのロコモーション時間の増加に起因していると目視観察から予想された。以上をまとめると、Bro はカイコの D2-like DA 受容体である BmDopR3 にアゴニストとして選択的に作用し、摂食に関連する一連の行動（餌探索→摂食→排糞）すべてを亢進する化合物であることが分かった。

Bombyx mori, feeding behavior, dopamine receptor

講演番号：4A37a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ A 校舎 37 会場

カイコにおける神経ペプチド short neuropeptide F が中腸のプロテアーゼ活性に与える影響
Effects of short neuropeptide F on the midgut protease activity in the silkworm, *Bombyx mori*
○大原 彩子、永田 晋治、長澤 寛道（東大院・農生科・応生化）
○Ayako OHARA,Shinji NAGATA,Hiromichi NAGASAWA (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

【目的】short neuropeptide F(sNPF)は、哺乳類の摂食行動を調節している神経ペプチド neuropeptide Y（NPY）の C 末端のアミノ酸配列、およびその受容体の構造同士も類似している、昆虫の脳神経ペプチドである。これまでに、sNPF と NPY は機能的な関連性が示唆されているものの、昆虫の生体内での sNPF の生理機能および作用機構は明確には分かっていない。そこで本研究では、カイコ *Bombyx mori* における sNPFs（sNPF-1、-2、-3）の生理機能、特に摂食行動での sNPFs の役割を明らかにすることを目的としている。前回の本大会までに、カイコにおいて sNPF が摂食行動に関わること、カイコ sNPF 受容体（BNGR-A7、-A10、-A11）が摂食条件によって発現量が変動することを報告した。本大会では、カイコの中腸において、食餌中のタンパク質の消化に使われているプロテアーゼの活性に対し sNPFs が与える影響について調べたので、その結果を報告する。
【方法と結果】カイコの中腸から分泌されるタイプのプロテアーゼ活性を調べるため、通常摂食条件で飼育した 5 齢 2 日目幼虫から中腸を摘出し、PBS 中で 24 時間培養した。そして培養液中に分泌されたプロテアーゼ活性を測定した。方法は、まず、培養液をアルカリ条件下にてウシ血清アルブミン（BSA）と 3 時間反応させた後、トリクロロ酢酸を添加して未消化の BSA を沈殿させた。次に消化物のペプチド溶液の 280 nm における吸光度を測定することにより、中腸組織から分泌されたプロテアーゼの活性を評価した。化学合成した sNPF-1、-2、-3 を終濃度 10～100 nM となるように添加して中腸を培養したところ、いずれの sNPFs についても分泌されたプロテアーゼの活性は sNPFs の濃度依存的に上昇した。一方、sNPFs を添加した PBS 中で培養した後、中腸の膜画分に存在するプロテアーゼの活性を測定したところ、終濃度 10 pM～100 nM の sNPFs 存在下での培養では、sNPFs の濃度依存的に減少した。また、48 時間絶食させた場合、中腸から分泌したプロテアーゼの活性は sNPFs の濃度依存的に上昇したが、通常摂食のカイコの中腸を用いた場合よりも活性は低かった。カイコ sNPF 受容体の中腸での発現量が空腹条件において満腹条件よりも低いことを考慮すると、sNPF はその受容体を介して中腸でのタンパク質の消化に関与するプロテアーゼの活性を調節する機能を有する可能性が示唆された。

Bombyx mori, short neuropeptide F, protease

講演番号：4A37a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ A 校舎 37 会場

フタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)における脂質動員ホルモン(AKH, adipokinetic hormone)が制御する体液中の脂質および糖質レベルと摂食行動との関連性の解析
Relationship between hemolymph lipid and carbohydrate levels regulated by AKH (adipokinetic hormone) and feeding behavior in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*
○小沼 貴裕、永田 晋治、長澤 寛道（東京大院 農生科）
○Takahiro KONUMA,Shinji Nagata,Hiromichi Nagasawa (The University of Tokyo)

【目的】AKH (adipokinetic hormone、脂質動員ホルモン)は、昆虫において体内の栄養分の代謝や動員を制御するペプチドホルモンである。前回の本大会までに、直翅目昆虫であるフタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)の成虫の AKH 受容体(AKHR)を、RNA 干渉法によりノックダウンすると、①摂食周期が短縮する。②体液中の主要な脂質である 1,2-ジアシルグリセロール(1,2-DAG)レベル、および、昆虫の血糖であるトレハロースレベルが減少する。③これらのレベルは、或る標準値(basal level)をもち、摂食状態と相関して増減するということを報告した。そこで本大会では、体液中の脂質・糖質の量的レベルと摂食行動の関連性をさらに探索するために、体液中の脂質・糖質レベルの標準値と摂食量との相関関係を解析した。同時に、脂質・糖質の体液中への注射投与が摂食行動に与える影響についても解析した。
【方法・結果】先ず、通常個体に、体液中の脂質輸送複合体である、リポホリン、あるいはトレハロースを体液中に注射投与したところ、投与量依存的に体液中の脂質・糖質レベルがそれぞれ一過的に増加することを確認した。次に、脂質・糖質レベルを増加させた個体について摂食行動を解析したところ、摂食開始までの時間に遅延が見られた。この効果は、非代謝性の糖質である L-グルコースの投与では認められなかったことから、体液中の代謝性の脂質・糖質のレベルが増加することにより、摂食開始行動が抑制されると考えられた。一方、フタホシコオロギ成虫の集団では、体液中の脂質・糖質レベルの標準値に個体差が見られたため、それぞれのレベルと摂食量との相関関係を解析したところ、体液中の脂質レベルの標準値と摂食量には負の相関関係が認められたが、糖質レベルの標準値と摂食行動とは相関関係が認められなかった。この結果から、AKHR のノックダウン個体における摂食周期の短縮は、体液中の糖質レベルではなく、脂質レベルの標準値の減少に起因すると考えられた。そこで、AKHR のノックダウン個体の脂質・糖質レベルの標準値を、脂質・糖質の体液中への注射投与によって、通常個体のレベルまで一過的に増加させると、脂質レベルを増加させた場合にのみ、短縮していた摂食周期が通常個体程度まで戻った。以上の結果から、フタホシコオロギの摂食行動は、摂食に伴う体液中の脂質・糖質レベルが一過的に増加することによる摂食モチベーションの減少と、体液中の脂質レベルが減少することによる摂食モチベーションの増加によって規定されることが示唆された。

Adipokinetic hormone, Feeding behavior, *Gryllus bimaculatus*

講演番号：4A37a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ A 校舎 37 会場

フタホシコオロギにおける交尾後に惹起される摂食行動に関わる生体内因子の同定の試み
Characterization of a factor motivating feeding behavior after mating in the two spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*
○塚本 悠介、永田 晋治、長澤 寛道（東大院・農生科・応生化）
○Yusuke TSUKAMOTO,Shinji NAGATA,Hiromichi NAGASAWA (The Univ. of Tokyo)

【目的】
成虫期に摂食行動が見られる昆虫の成虫のメスでは、一般的に交尾後に摂食行動が惹起されることが知られている。しかし、その摂食モチベーションが上昇する現象を分子レベルで明らかにする研究は行われていない。そこで本研究では、フタホシコオロギ（*Gryllus bimaculatus*）の成虫のメスが交尾後において摂食モチベーションを上昇させるという現象を内分泌学的に明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】
まず、フタホシコオロギの成虫のメスにおいて交尾後に摂食量が増加するかを確認した。通常飼育している処女メスは羽化後４日目で摂食量のピークが見られたが、その後徐々に減少し、６日目以降はほぼ一定の食餌量となった。そこで、羽化後７～９日目の処女メスを交尾させ、交尾前後で摂食量を測定した。その結果、同一個体において交尾後は交尾前に比べ顕著に摂食量の増加が認められた。さらに、交尾後のメスは、処女メスと比較した場合においても顕著に摂食量が増加した。また、キイロショウジョウバエでは、成虫オスの精巣と付属腺で産生される Sex Peptide は、交尾後のメスの摂食モチベーションの上昇に関わるとされている。そこで、フタホシコオロギの成虫オスの精巣と付属腺を摘出し、60%アセトニトリル/0.1%TFA による抽出物を逆相カートリッジにて粗精製した。得られた粗精製物を成虫処女メスに注射し、摂食量の変化を測定した。その結果、オスの精巣と付属腺の粗精製物を注射した群は、PBS を注射した群と比較して、顕著に摂食量が増加した。現在、この交尾後のメスにおける摂食モチベーションを増加させるオスの精巣と付属腺由来の抽出物に含まれる因子を精製し、その構造を明らかにすることを試みている。

feeding behavior, Sex Peptide, *Gryllus bimaculatus*

講演番号：4A37a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:12～ A 校舎 37 会場

フタホシコオロギにおける餌に含まれる共食いを抑制する因子の同定の試み
Characterization of dietary inhibiting factors on cannibalisms in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*
○永田 晋治、長澤 寛道（東大院・農生科・応生化）
○Shinji NAGATA,Hiromichi NAGASAWA (the Univ. of Tokyo)

(目的)ほとんどの昆虫種は、餌が枯渇したり、縄張りを侵されたときに同種同士を食害するいわゆる「共食い」を起こす。このうち前者の栄養分要求性を満たすための共食い行動の分子メカニズムを明らかにするために、餌中に含まれる成分で共食いに関わる成分を明らかにし、その成分に関わる行動メカニズムを解明することを目的とした。

(方法・結果)フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* の成虫は、餌を枯渇させた状態で飼育すると、3 日目から餓死する個体が出現する。それとともに、瀕死状態の個体に対する共食いが見られ始める。この餓死や共食いは、餌を与えることで顕著に抑制された。次に、餌中のどの成分が共食いを抑制するかを検討した。先ず、通常飼育用の餌を、水およびアセトン抽出を行い、それらの残渣をそれぞれ凍結乾燥した餌を調製した。調製した餌を、フタホシコオロギの成虫にそれぞれを与え、経日的な生存数や共食い率を観測した。その結果、通常飼育用の餌を与えたコオロギは、供試 3 日目には共食いすることはなかったが、水抽出後の残渣を餌にした餌を与えたコオロギも同様に共食いすることはなかった。ところが、アセトン抽出残渣を餌として与えたコオロギでは、共食い率が 80%以上に達した。このことは、アセトン抽出物に共食いを抑制する成分が含まれていることを強く示唆する。現在、餌のアセトン抽出物に含まれる共食い抑制因子を明らかにすることを行っている。

auxotroph, cannibalism, *Gryllus bimaculatus*

講演番号：4A37a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:24～ A 校舎 37 会場

線虫 *C.elegans* の RNA 結合タンパク質である CeMBL 遺伝子の機能解析
Molecular functions of CeMBL splicing variants in *C.elegans*.
○鈴木 俊輔、笹川 昇（東海大工）
○Shunsuke Suzuki,Noboru Sasagawa (Tokai Univ)

【目的】CeMBLは、CCCH型のジンクフィンガーを持つRNA結合タンパク質である。ヒトオルソログであるMBNLとは 58%の相同性を有しており、MBNLは筋肉のインスリン受容体や心筋トロポニンTなどのスプライシング調節に関与していることが示唆されている。CeMBLには選択的スプライシングによって 6 種類の産物が発現することが判明している。その中のひとつにRNA結合ドメインを持たずにRNA結合能がない産物があるが、その存在意義は不明である。我々はこれまでにCeMBLを標的とするRNAiコンストラクトを構築し、それを用いたfeeding RNAiを行うことで、CeMBLのスプライシング産物特異的な機能の追究を行ってきた。これまでに、CeMBLのRNA結合ドメインを持つ産物をノックダウンさせると寿命が短くなるという表現型変化が観察されている。本発表ではこれまでの研究を更に進展させ、CeMBLの標的配列を新たに設定したRNAiを行い、CeMBLの選択的スプライシング産物の機能をより詳細に追究することを目的としている。
【方法】これまでにCeMBLの第 1 エキソンと第 2 エキソンをRNAiの標的としてきたが、今回はこれに加えてCeMBLの第 5 エキソンを標的としたRNAi実験を行うべく、この配列をfeeding RNAi用のプラスミドに挿入した。次にこのコンストラクトを大腸菌HT115 株に形質転換し、IPTG添加で発現誘導を行ったものを餌にしてfeeding法によるRNAi実験を行った。そしてその結果得られる表現型変化を注意深く観察するとともに、前回と同様の手法を用いて、CeMBLの第 5 エキソンをノックダウンした線虫の寿命を計測した。
【結果】CeMBLの第 5 エキソンを標的としたfeeding RNAiを行った結果、ノックダウンした線虫では第 1 エキソンや第 2 エキソンを標的としたRNAiのときと同様に寿命が短くなるという表現型変化が観察された。寿命変化の度合いは、第 1 エキソンや第 2 エキソンを標的とした場合と同程度であった。
【展望】ヒトオルソログであるMBNLは、インスリン受容体や心筋トロポニンTのスプライシングに作用しているとの報告がある。それを踏まえ、今回のCeMBLノックダウンを通じた寿命変化の分子機構を追究するため、現在はインスリン受容体オルソログのdaf-2 や心筋トロポニンTオルソログのmup-2 などの分子レベルでの挙動測定を試みている。具体的には、CeMBLをノックダウンさせた線虫からRNAを取り出した後にdaf-2 やmup-2 の発現量の定量的解析を進めている最中である。

C.elegans, CeMBL, RNAi

講演番号：4A37a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:36～ A 校舎 37 会場

ブドウ抽出物 ANOX-R5 による線虫 *C.elegans* の寿命への影響

Effects of grape extract (ANOX-R5) to a lifespan of *C.elegans*.

○高橋 航大[1]、鈴木 俊輔[1]、布藤 健[1]、真野 貴[2]、笹川 昇[1] ([1]東海大工、[2]日本薬品株式会社)
○Kodai Takahashi[1], Shunsuke Suzuki[1], Ken Futo[1], Takashi Mano[2], Noboru Sasagawa[1] ([1]Tokai Univ., [2]Nihon Pharmaceutical Co.,Ltd.)

【目的】レスベラトロールはブドウやイタドリなどに含まれる植物由来のポリフェノールの一種であり、抗酸化物質として知られている。線虫、マウス、酵母などのモデル生物を用いた実験では寿命延長作用や抗がん作用が見られるとされており、線虫*C.elegans* ではレスベラトロール標品を培地に添加することで、寿命延長の効果が報告されている。日本薬品㈱が販売している ANOX-R5 は赤ワイン由来のブドウ抽出物であり、t-レスベラトロールやプロアントシアニジンなどを含有する。本実験では、ブドウ抽出物 ANOX-R5 が線虫 *C.elegans* の寿命にどのような影響を与えるか調べることを目的とした。
【方法】線虫 *C.elegans* は N2 野生株を用いた。使用した全ての NGM プレートには、大腸菌 OP50 株を餌として塗布した。観察中の線虫が卵を産むと、そこから新たに生まれた子孫が寿命測定の妨害となるため、まず前段階として線虫を同調培養したのち、2-デオキシ-5-フルオロウリジン（FudR）によって不妊処理を施した。次に ANOX-R5 添加（終濃度 100μM、1mM および 5mM、レスベラトロール換算）の NGM プレートを各 5 枚から 10 枚作成し、各プレートに FudR 処理を施した線虫を 1 プレートあたり 10 匹ずつ移した後に、20℃恒温器で飼育した。寿命測定における生存確認は、シャーレの底面または壁面に指で振動を与え、それに反応するかどうかで判定した。
【結果】培地中に ANOX-R5 が含まれている場合、線虫の平均寿命が伸びる傾向にあることが判明した。統計解析の結果、ANOX-R5 未添加に比べ、ANOX-R5 添加下で生育した線虫の寿命変化は 5%有意水準で有意差が見られた。一方でレスベラトロール換算 5mM の条件では寿命計測以前に線虫が死んでしまうことが観察された。これらのことから、適正な濃度はレスベラトロール換算 100μM 前後にあり、あまりに高濃度の条件では効果が打ち消される可能性が示唆された。
【考察】今回の実験では、ブドウ抽出物 ANOX-R5 を添加した培地で線虫の寿命延長効果が認められた。一方で、レスベラトロール換算 5mM と高濃度の条件では、むしろ寿命延長効果が見られないことがあり、その理由としてブドウ抽出物中の他の成分による影響が考えられた。また今回はレスベラトロール標品を用いているわけではないので、ブドウ抽出物中のポリフェノールをはじめとした、レスベラトロール以外の成分が寿命延長効果に寄与した可能性も十分に考えられる。現在、ANOX-R5 添加下における遺伝子発現変化について、追究を進めているところである。

C.elegans, grape extract, life span

講演番号：4A41a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ A 校舎 41 会場

G タンパク質γサブユニット GNG11 の細胞老化における役割

The role of G protein gamma subunit GNG11 in cellular senescence

○工藤 生、伊藤 陽平、古賀 慎太郎、Mohammad N Hossain、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大（横浜市大・生命ナノシステム）
○Ikuru KUDO, Yohei Ito, Shintaro Koga, Hossain Mohammad N, Kensuke Miki, Michihiko Fujii, Dai Ayusawa (Grad. Sch. of Nanobioscience, Yokohama City Univ.)

ヒト組織を形成する正常体細胞は、培養系において一定回数の分裂を経ると増殖を停止する。この現象を細胞の継代老化と呼ぶ。細胞老化の特徴として、細胞の肥大化・扁平化等の形態的変異、老化マーカーと呼ばれる一群の遺伝子発現、老化特異的β-ガラクトシダーゼ活性の上昇、Mitogen-activated protein kinase (MAPK)の活性化などがあげられる。細胞老化は酸化ストレスや様々な薬剤処理、ガン遺伝子、DNA 障害やクロマチン構造の不安定化などによっても誘導されることが明らかになっている。

我々は、チミジン類似体である 5-ブロモデオキシウリジン (BrdU)が任意の細胞を顕著に老化誘導することを示した。また、細胞老化に伴い発現が変動する遺伝子をマクロアレイ解析によってスクリーニングし、多くの遺伝子を同定してきた。現在その内の一つである GNG11（G タンパク質γサブユニット 11）遺伝子に着目し、研究を行っている。GNG11 は三量体 G タンパク質のγサブユニットファミリーの 13 遺伝子のうちの 1 つであり、その発現は細胞が老化する際に転写レベルで顕著に誘導される。GNG11 は脳以外の全ての組織で発現していることが分かっているが、その機能は明らかになっていない。

最近、我々は GNG11 の過剰発現がヒト正常線維芽細胞（TIG-7）を老化誘導することを見出した。この時、ERK1/2 の活性化が確認された。さらに、GNG11 の過剰発現は、ある種の不死化細胞を特異的に老化誘導した。また、GNG11 は過酸化水素により迅速に発現誘導されるため、酸化ストレス応答にも関与していることが示唆されている。我々は GNG11 の機能を探るために、GNG11 認識抗体、蛍光タンパク質融合 GNG11 発現ベクターおよび RNAi 法を用いたノックダウンベクターを作製した。これらを用いて種々の細胞株での GNG11 の発現や細胞内局在を解析したので、その結果について報告する。

GNG11, senescence, MAPK

講演番号：4A41a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ A 校舎 41 会場

細胞老化に伴う核内及び核膜構造の変化

Sutructural changes of the nuclear envelope in senescent cells

○新井 留実、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大（横浜市大院生命ナノシステム）
○Rumi ARAI,Kensuke MIKI,Michihiko FUJII,Dai AYUSAWA (Yokohama City Univ.)

細胞老化の誘導方法と表現型は非常に多様である。当研究室では、核膨張および核膜の構造変化が老化細胞に共通の現象であることを見出した。核膜はヘテロクロマチンと結合し、核膜構造の維持と細胞老化特異的遺伝子の発現抑制において重要な役割を果たしている。我々は、細胞老化に伴う核膨張がこの結合を破壊すると考えている。本研究では、核膜とヘテロクロマチンの結合を仲介する複数のタンパク質が細胞老化に伴いどのように変化するか調べた。

老化誘導剤として過剰チミジンとブロモデオキシウリジン（BrdU）を使用した。過剰チミジンは DNA の複製遅延（細胞の不均衡増殖）を引き起こすことによって細胞老化を誘導する。一方、BrdU は直接 DNA に取り込まれ、クロマチン構造を変化させることで細胞老化を誘導する。この異なる二つの老化誘導法を用いて老化誘導させた細胞の核膜タンパク質について免疫染色を行い、老化細胞における核膜構造の変化を観察した。また、変化の見られた核膜タンパク質について過剰発現またはノックダウン法によって細胞老化への影響を調べた。

senescence, lamin B receptor, nuclear envelope

講演番号：4A41a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ A 校舎 41 会場

チェックポイントキナーゼ（chk1,2）の過剰チミジンによる細胞老化誘導における役割

Role of check point kinases in cellular senescence induced by excess thymidine.

○杉本 量平、野沢 愛実、米倉 隆造、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大 (横浜市立大学)
○Ryohei SUGIMOTO,Megumi NOZAWA,Ryuzo Yonekura,Kensuke MIKI,Michihiko FUJI,Dai AYUSAWA (Yokohama City Univ.)

ほ乳類の正常組織から採取した接触性の体細胞は、継代培養を続けるとほぼ一定の回数の細胞分裂回数ののちに増殖を停止し、肥大化・扁平化を呈す。この現象は、継代老化と呼ばれている。また活性酸素など様々なストレスを与えても同様の現象を示す。こうした現象の解明のために多くの研究がなされているが、その本体に関する研究は少ない。当研究室では､細胞老化は不均衡象増殖の一形態と考えている。すなわち、細胞老化の誘導は DNA 複製の遅延が例外なく必要である。細胞周期が遅延するためには、チェックポイント機構が正常に働く必要がある。修復が不完全であれば、細胞死が導かれる。すでに、阻害剤を用いた研究により、細胞老化の誘導に DNA チェックポイント機構の働きが必要であることが示唆されている。

本実験では、過剰チミジンや 5-ブロモデオキシウリジンで細胞老化を誘導した際に、阻害剤、ノックダウンベクターなどを用いて DNA 修復のシグナルを遮断することにより、細胞老化の誘導に DNA チェックポイント機構がどう関与するか調べた。

unbalance growth, senescence, check point kinase

講演番号：4A41a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ A 校舎 41 会場

細胞老化の不均衡増殖モデルの検証
Verification of Unbalanced growth model of cell senescence
○和田 卓巳、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大（横浜市大院ゲノムシステム）
○Takumi Wada,Kensuke Miki,Michihiko Fujii,Dai Ayusawa (Yokohama City Univ.)

哺乳類の正常組織から採取した接着性体細胞は、継代培養を続けるとほぼ一定の回数の分裂の後、増殖を停止し、肥大化、扁平化する。また、活性酸素や薬剤を処理しても正常細胞は同様な現象を示す。今までに報告されている様々な細胞老化系を調べると、DNA 複製の遅滞と形態変化が例外なく観察される。この現象は不均衡増殖によるものである。細胞不均衡増殖とは DNA 複製が遅延したとき、 RNA 合成やタンパク質合成が正常に起こり、細胞が肥大化する現象である。本実験では、不均衡増殖が起こっている細胞に薬剤を加えることで、不均衡増殖からの回復が可能であるかを調べた。

老化誘導剤として過剰チミジン(EdT)を用いて、強制的に DNA 複製を阻害することで不均衡増殖を誘導させた。まず、不均衡増殖を抑制するためにタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド(CHX)を用い、高分子の不均衡の是正を示した。また、細胞増殖に関与する MAPK ファミリーの阻害剤、および長期培養中の酸化ストレスを防止するために抗酸化剤を使用した。これらの薬剤の最適濃度を検討し、増殖曲線や細胞形態から不均衡増殖からの回復が観察された。

unbalanced growth, cellular senescence, DNA replication

講演番号：4A41a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ A 校舎 41 会場

アーユルヴェーダハーブの放射線防護効果

Protective effect of ayurvedic herbs on radiation

○高氏 裕貴[1]、尾崎 洋子[1]、三木 健輔[1]、山内 正剛[2]、Mohammad N Hossain[1]、藤井 道彦[1]、鮎沢 大[1] ([1]横浜市大生命ナノ、[2]放医研防護センター)
○Yuki TAKAUJI[1], Yoko OZAKI[1], Kensuke MIKI[1], Masatake YAMAUCHI[2], Hossain Mohammad N[1], Michihiko FUJII[1], Dai AYUSAWA[1] ([1]Yokohama City Univ., [2]NIRS)

人類は有史以来、様々な形で放射線と関わってきた。現在では、人々は医療をはじめとする様々な分野でその恩恵を受けることができるようになったが、その反面、放射能汚染や放射線被曝による環境や健康へのリスクが重要な課題となっている。今日、原発問題によって放射線被曝に対する人々の関心は非常に高まっている。

我々はインド亜大陸５千年の歴史を持つ伝承医学アーユルヴェーダで用いられているハーブに着目した。アーユルヴェーダで用いられるハーブは１００００種類以上あり、それらを組み合わせて健康維持や病気治療を行なってきた。そこで本研究では、アーユルヴェーダハーブの放射線防護効果について検証した。我々は現地の専門大学と提携し、ハーブを輸入しハーブ抽出液を作成した。マウスにコントロール水またはハーブ混合抽出液を自然飲水させ、３週間飼育した。その後、X 線を全身照射し、照射後の生存率を観察した。その結果、特定のハーブの組み合わせが放射線防護効果を示すことを見出した。

herb, radiation, ayurveda

講演番号：4A41a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ A 校舎 41 会場

ヒト毛乳頭細胞におけるアーユルヴェーダハーブの生理作用

Effects of ayurvedic herbs on human dermal papilla cells

○米倉 佑香[1]、山口 葉子[2]、Mohammad N Hossain[2]、三木 健輔[2]、山下 律郎[3]、藤井 道彦[2]、鮎沢 大[2] ([1]横浜市大・国際総合、[2]横浜市大・生命ナノシステム、[3](株)SLH BCL カンパニー)
○Yuka Yonekura[1], Yoko Yamaguchi[2], Mohammad N Hossain[2], Kensuke Miki[2], Ritsuo Yamashita[3], Fujii Michihiko[2], Dai Ayusawa[2] ([1]Yokohama city Univ., [2]Yokohama city Univ., [3]SLH BCL COMPANY)

毛髪は毛根・毛球・毛包・毛母細胞などいくつかの組織から成り立っている。成長期の毛根の下部には球状をした毛球が存在し、その中は毛母細胞で満たされている。その毛母細胞に囲まれるようにして毛乳頭細胞が存在している。毛乳頭細胞は毛髪の成長に非常に重要な役割を持つ。毛細血管から養分を受け取り毛母細胞に受け渡したり、様々な細胞増殖因子を産生したりする。毛乳頭細胞が産生した細胞増殖因子が毛母細胞を刺激して細胞分裂を促進させ、毛母細胞が分裂し角化することで毛髪となる。

薄毛の原因は、様々な要因が絡み合っている。これまでに、男性ホルモンであるテストステロンを５αリラクターゼがジヒドロテストステロンに変換し、このジヒドロテストステロンが男性の脱毛を引き起こす原因になることが報告されている。他にも、細胞の成長を促進し休眠状態にある毛乳頭細胞を活性化するＩＧＦ１、血管新生を促進する作用を持つＶＥＧＦ－Ａ、休止期にある毛包を成長期に導くＨＧＦ、脱毛に関係するＴＧＦ－β、発毛抑制作用を持つＦＧＦ１８など様々な遺伝子が報告されている。そこで本研究では、インドの伝統医学であるアーユルヴェーダに習い、育毛効果があるとされているハーブを用いて毛乳頭細胞における様々なマーカーの発現量の変化を検証した。

アーユルヴェーダで育毛効果があるとされているハーブから抽出液を作製し、数種類の濃度の抽出液を毛乳頭細胞にそれぞれ添加した。培養後、毛乳頭細胞のＲＮＡを抽出し、育毛に関する様々なマーカーの発現量を比較した。

dermal papilla cell, herb, hair growth

講演番号：4A41a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ A 校舎 41 会場

加齢に伴う B 細胞機能変化における MAPKp38 の関与

Functions of MAPKp38 in aging-associated phenotypic changes of B cells

○藤木 司[1]、片倉 喜範[2]、岸原 健二[1] ([1]長国大薬、[2]九大院農院)
○Tsukasa FUJIKI[1], Yoshinori KATAKURA[2], Kenji KISHIHARA[1] ([1]Div. of Immunol., Fac. of Pharm., Nagasaki Int. Univ., [2]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

【目的】本研究では加齢に伴う免疫老化に関する機構解明を目指して、B 細胞の機能変化とストレス性因子の関与について検証を行った。ストレス性 MAPK として知られる p38 は細胞の分裂老化において重要な役割を果たしていると考えられており、本研究では加齢に伴う免疫機能低下に関わる B 細胞表現型と p38 の関与について検証を行った。

【方法】高齢者（65 歳）および若年者（22 歳）より採取した B 細胞を EB ウィルス（EBV）によって不死化した細胞株（EBV-B old、EBV-B young）を実験に供し、ELISA 法による IgM、IgG 抗体産生能および ELISPOT 法による特異的抗体産生を指標とした抗原感差能、PhosFlow assay による細胞内リン酸化タンパク質解析、フローサイトメーターによる B 細胞表面分子に関する解析を行った。

【結果・考察】EBV-B 細胞における抗体産生について検証したところ、IgM 抗体については EBV-B young で優位な産生がみられるのに対して、EBV-B old ではほとんど産生がみられなかった。一方、IgG 抗体産生については EBV-B young、old ともに観察されたが、EBV-B old ではより高い産生がみられた。また、ELISPOT 法では EBV-B old と比較して EBV-B young では特異的抗体産生を示すスポットが優位に観察された。これらは加齢に伴うナイーブ B 細胞の減少によるものと考えられ、免疫老化において初期免疫応答能および抗原感差能の低下を引き起こす一つの要因として考えられた。また、PhosFlow assay によるストレス性 MAPKp38 および炎症性シグナル因子 NF-kB の細胞内リン酸化状態について解析したところ、EBV-B old において p38、NF-kB 共に優位なリン酸化の亢進が観察された。さらに免疫応答における T-B 細胞間シグナル相互作用に重要であることが知られている細胞表面分子 CD27、CD40 および HLA-DR の発現について解析した。その結果、EBV-B old において CD27、CD40 および HLA-DR 発現はいずれも減少していることが明らかとなった。特に抗原提示分子として機能する MHC クラスⅡ分子である HLA-DR 発現の減少は、MAPK p38 特異的阻害剤である SB203580 処理により EBV-B young と同レベルにまで回復したことから、EBV-B old での HLA-DR 発現抑制は p38 依存的なものであることが示唆された。

p38, B cell, Aging

講演番号：4A41a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ A 校舎 41 会場

細胞を用いた炭酸刺激の評価
Evaluation of the stinging sensation of CO2 using cell-based assay.
○加藤 史佳[1]、指原 浩一[1]、加藤 直樹[1]、野場 重都[2]、佐見 学[1]、北川 泰[1] ([1]アサヒグループホールディングス、[2]アサヒビール)
○Fumika KATO[1], Koichi SASHIHARA[1], Naoki KATO[1], Shigekuni NOBA[2], Manabu SAMI[1], Yasushi KITAGAWA[1] ([1]Asahi Group HD, [2]Asahi Breweries)

【目的】
炭酸飲料を飲むときに感じる刺激感は炭酸ガスの濃度だけでは説明がつかないことが知られている。この現象のメカニズムを解明するためには、炭酸刺激とその受容体の関係を明らかにする必要がある。我々はイオンチャネルのひとつである Transient receptor potential ankyrin 1（TRPA1）に着目した。TRPA1 はワサビの辛味成分であるアリルイソチオシアネート、シナモンの主成分であるシンナムアルデヒドなどの刺激物質に加えて、炭酸刺激の受容体としても報告がある。これらのことから TRPA1 は、炭酸飲料を飲んだときに喉などで感じる独特の痛み刺激を受容していると考えられている。そこで演者らは、まずヒト細胞と TRPA1 を用いた炭酸刺激の評価系を構築したのでその結果を報告する。
【方法・結果】
HEK293T 細胞に Lipofectamine2000（Invitrogen 社）を用いて、ヒト発現ベクターに TRPA1 遺伝子を組み込んだプラスミドを細胞内に導入して作製した。炭酸刺激に対する細胞の応答は、カルシウムイメージング法を用いて細胞内の遊離 Ca2+濃度変化による蛍光強度の変化を捉え解析した。さらに、パッチクランプ法による細胞応答の解析も同様に行った。細胞を灌流条件下におき、炭酸を付与したバッファーを流したところ、細胞は炭酸濃度依存的に応答上昇を示した。また、TRPA1 特異的アンタゴニストである HC-030031 を炭酸と同時に流したところ、細胞の炭酸への応答は消失した。さらに、官能試験で炭酸刺激を増強する結果が得られた物質を添加したところ、細胞はこの炭酸刺激増強物質に対しても応答を示した。以上のことから、今回、炭酸刺激を受容する細胞評価系が構築できたものと考えられた。

TRPA1, stinging sensation of CO2, cell-based assay

講演番号：4A41a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ A 校舎 41 会場

骨肉腫細胞株 MG-63 の力学応答とアクチン結合タンパク質 FLNA の関連について

Involvement of actin-binding protein FLNA in shear stress response of osteosarcoma cell line MG-63

○深田 尚、杉本 憲治（大阪府大院生命環境）
○Takashi FUKADA,Kenji SUGIMOTO (Osaka Pref. Univ.)

骨組織は重力負荷や運動刺激などの力学的な刺激に応じて発達し、負荷が失われると萎縮する。また強い圧迫を受け続けると局所的に退縮し変形することがある。これらは骨組織が力学刺激を受容し、応答することを示している。硬組織である骨がどのようにして力学刺激を受容するのかには諸説あるが、有力な説の一つは骨のわずかな変形が骨細管内に圧力差を生じ、細管内の細胞外液の素早い流動として増幅され、細胞に知覚されるというものである。培養細胞系でこの過程を再現するには特別な装置内で培地を灌流する方法を用いることが多いが、通常の培養皿を旋回振とうして培地を流動させる簡便な方法を試みたところ、ヒト骨肉腫細胞株 MG-63 で流体刺激による MAP キナーゼ ERK の活性化を再現することができた。

この実験系を用いてアクチン結合タンパク質フィラミン A（FLNA）の力学応答への関わりを調べたところ、FLNA の発現抑制は流体刺激による ERK の活性化を抑制することが分かった。FLNA はアクチン繊維を網目状に架橋してアクチン皮層を形成する一方で、100 種類近いタンパク質と結合できる多機能な足場タンパク質でもある。これまで流体刺激に対する骨芽細胞の応答と FLNA の関わりを調べた報告はなかった。FLNA のこの役割について、FAK の活性化や FLNA のリン酸化との関連などを報告したい。

mechanotransduction, filamin, osteoblast

講演番号：4A41a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ A 校舎 41 会場

TGF-β1 による表皮角化細胞のセラミド合成制御機構の解析
Analysis of regulation mechanism of ceramide synthesis by TGF-β1 in human keratinocytes
○村松 愛美[1]、加藤 なつき[1]、福田 愛美[1]、藤枝 亜里紗[1]、山根 拓実[1,2]、服部 一夫[1]、大石 祐一[1] ([1]東農大応生科・栄養、[2]東大院・医)
○ Aimi MURAMATSU[1], Natsuki KATO[1], Megumi FUKUDA[1], Arisa FUJIEDA[1], Takumi YAMANE[1,2], Kazuo HATTORI[1], Yuichi OISHI[1] ([1]Tokyo University of Agriculture, [2]University of Tokyo)

【目的】皮膚は、体内水分の蒸散抑制ならびに外部刺激からの身体保護などに関わる重要な器官であり、栄養条件による影響を受けやすいことが知られている。我々はこれまでに、高脂肪食条件下で、セラミド合成の律速酵素であるserine palmitoyltransferase (SPT) の減少を介して、皮膚中のセラミド量が低下することを報告した[1)]。また、表皮角化細胞において、TGF-β1を添加することによってSPTのmRNA量が増加することを報告した[2)]。しかし、TGF-β1がセラミド合成を制御するメカニズムは未だ明確になっていない。そこで本研究では、TGF-β1がどのようなシグナル経路でセラミド合成に影響を及ぼすかについて検討した。
【方法】正常ヒト表皮角化細胞は、増殖培地（HuMedia-KG2 (KURABO)）を用いて培養した。TGF-β1 (30 ng/ml) を添加し、0, 12, 24, 36, 48 h後に細胞からtotal RNAを抽出し、リアルタイムPCR法にてSPTのmRNA量を測定した。セラミド量の測定は、細胞をTGF-β1 (10, 30 ng/ml) を添加した分化培地にて9日間培養後、脂質を抽出し、TLC法を用いて行った。リン酸化Smad2/3の測定は、TGF-β1 (30 ng/ml) 添加後、0, 5, 10, 15, 30 min後に細胞からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティング法によって測定した。
【結果】TGF-β1の添加によって、SPTのmRNA量は経時的に増加し、12, 24, 36, 48 h で有意に増加した。この増加は、48 hで最も顕著であった。また、TGF-β1の添加によって、セラミド量は有意に増加した。次に、TGF-β1によりセラミド量が増加するメカニズムを検討するために、TGF-β1の下流シグナルとして知られているp38およびSmad2/3のインヒビターを添加し、SPTのmRNA量を測定した。その結果、p38のインヒビター添加によるSPTのmRNA量への影響は認められなかった。一方で、Smad2/3のインヒビター添加によって、添加濃度依存的にTGF-β1によるSPTのmRNA量の増加が抑制された。ウエスタンブロッティング法により、Smad2/3のリン酸化を確認したところ、TGF-β1添加後、5分後よりSmad3のリン酸化が認められた。一方で、Smad2のリン酸化レベルに変化は認められなかった。以上のことから、表皮角化細胞においてTGF-β1/Smad3シグナルがセラミドの合成を制御している可能性が示唆された。
1) Yamane T *et al.*, *Mol. Nutr. Food Res.* 2011, 55, S186-S192
2) 日本農芸化学会 2012 年度大会講演要旨集（p.2426）

TGF-β1, ceramide, keratinocytes

講演番号：4A41a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ A 校舎 41 会場

Ｃｒｅ依存性 Tert 遺伝子発現トランスジェニックマウスの解析

Generation of transgenic mice harboring Cre dependent activation system for Tert

○日出間 志寿、伊達 しおり、福田 真澄、西森 克彦（東北大院農）
○Shizu HIDEMA,Shiori DATE,Masumi FUKUDA,Katsuhiko NISHIMORI (Tohoku Univ.)

遺伝子改変マウスを解析する際、目的の組織から初代培養細胞を得て様々な分子生物学手法により分子メカニズムの検証が行われる。しかし各組織に分化した組織由来の初代培養細胞は維持や増殖、保存が難しく、細胞の収量を上げ実験の再現性をとることは困難である。そこで複数の組織から生体における機能を保持し継代数を重ねることが可能な初代培養細胞を得るシステムを開発することを目的とした。

ガン細胞や ES 細胞などの不死化細胞はテロメラーゼの逆転写酵素ユニットである TERT が高発現しており、遺伝子導入による発現誘導で正常細胞の長期培養を可能にする試みが行われている。我々は TERT の発現を発生時期や組織ごとに誘導することが可能なトランスジェニックマウス Cre 誘導型 TERT 発現 Tg マウス(loxP-Tert-Tg)の作製を行った。これによりマウス生体が TERT 高発現によりガン化などの影響をうけないように考慮した。構築したトランスジェニックベクターはマウス Tert cDNA の上流に loxP 配列に挟まれた停止配列を組みこみ、その下流に翻訳開始配列 IRES とハイグロマイシン耐性遺伝子を付加し薬剤スクリーニングが可能になるようにした。これにより *in vivo* では組織特異的 Cre recombinase 発現マウスと掛け合わせた場合 Cre recombinase を発現する組織のみ、*in vitro* では Cre recombinase を細胞内に導入した場合のみ TERT の発現が誘導される。初代培養細胞は Transfection 効率が非常に低いことが知られているので *in vitro* で Cre recombinase を誘導するために細胞透過性 Cre recombinase タンパク質(PTD-Cre)の導入を試みた。 PTD-Cre は大腸菌発現システムにより発現、精製を行った。PTD-Cre をレポーターマウス Rosa26 由来の初代培養細胞の培養プレートに添加し 100%の効率で loxP 配列が切り出されることを X-gal assay によって証明した。１１ラインの Tg マウスから薬剤耐性から有望な 1 ライン(loxP-Tert-Tg#4)を得た。このラインについて Real-Time PCR および TRAP アッセイにて Cre recombinase による TERT 発現誘導を確認した。現在行っている初代培養細胞の長期培養について報告する。

ES 細胞や iPS 細胞では TERT 活性が高いことが知られている。今回構築したシステムによって TERT 活性を高めた初代培養細胞でリプログラミングが起こるか否かを検討したのでこれについても報告する。

Hidema S., Tonomura Y., Date S, Nishimori K.,(2011) *Journal of Bioscience and Bioengineering,* 113(1),5-11,

Telomerase, Cre recombinase, Immortalization

講演番号：4A41a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:12～ A 校舎 41 会場

可欠アミノ酸代謝酵素の発現に与えるロイシンの特異的影響

Leucine has specific effect on the gene expression of dispensable amino acid metabolic enzymes

○吉村 亮二[1]、今村 渉[2]、加藤 久典[2]、水重 貴文[3,4]、大日向 耕作[4]、金本 龍平[1,4]([1]京府大院・生環、[2]東大・総括、[3]京大・学際融合・生理化学研究ユニット、[4]京大院・農・食品生物)
○ Ryoji Yoshimura[1], Wataru Imamura[2], Hisanori Kato[2], Takahumi Mizushige[3,4], Kousaku Ohinata[4], Ryuhei Kanamoto[1,4] ([1]Kyoto Prefectural Univ., [2]Tokyo Univ., [3]Kyoto Univ., [4]Kyoto Univ.)

【目的】Leu はタンパク質合成促進や分解抑制のシグナル分子となることが知られており、近年では、筋肉増強の効果を期待してサプリメントとしての Leu 摂取に注目が集まっている。しかしその一方で、低タンパク質食摂取時に Leu を多量に摂取すると摂食抑制や成長阻害が起こることも動物実験により分かっている。これまでに当研究室では、Leu を多量に摂取するとラット肝臓で Asn 合成酵素（AS）、Ser 合成の律速酵素である 3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素（PHGDH）遺伝子の発現が抑制され、Ser を異化する Ser 脱水酵素（SDH）遺伝子が誘導されていることを見出した。このことから我々は、可欠アミノ酸代謝酵素の遺伝子発現に Leu が影響を与えることで摂食抑制や成長阻害が引き起こされているのではないかと考え研究を行ってきた。しかし、Leu の多量摂取では、摂食量や摂取窒素量が変化し、酵素発現量の変動が真に Leu によるものかは明確ではない。そこで、本研究では可欠アミノ酸代謝酵素発現への摂食量、摂取窒素量の影響について検討した。
【方法】酵素遺伝子発現への摂食量の影響を評価するため、10 週齢の SD 系雄ラットに 6%カゼイン食、6%カゼイン＋8%Leu 食を自由摂食させる群、6%カゼイン食自由摂食群の摂食量の 90、70、50、30%の食餌を与える制限群を設け、1 週間飼育した。その後肝臓を採取し、RT-PCR 法、ウエスタンブロット法で酵素 mRNA とタンパク質量を、それぞれ測定した。次に、摂取窒素量の影響を評価するために、8%Leu 食と等窒素量の Ile、Val 食を用いて、自由摂食で 1 週間飼育し、上記の方法で酵素遺伝子の発現量を測定した。
【結果・考察】自由摂食群、90、70、50%制限食群において AS、PHGDH mRNA は高く発現しており、SDH mRNA の発現は抑制されていた。また、酵素タンパク質量も mRNA と同様の変化を示していた。一方、Leu 食群の摂取量は 50%制限食群と同等であったが、Leu 食群では AS、PHGDH は抑制されており、SDH は誘導されていた。このことから、Leu 摂取による可欠アミノ酸代謝酵素の遺伝子発現変動は摂取量の減少によるものではないことが明らかとなった。Leu 食と等窒素量である Ile、Val 食を与えた場合、摂食量は Leu 食群に比べ Ile、Val 食群で増加していた。しかし、AS、PHGDH mRNA 発現は Leu 食群のみで著しく抑制され、SDH mRNA は誘導されていた。この時、酵素タンパク質量も同様の傾向を示していた。このことから、Leu 食群で見られた酵素遺伝子の発現変動は摂取窒素量の増加ではなく、Leu による影響であることが明らかとなった。

leucine, dispensable amino acid metabolism, gene expression

講演番号：4A41a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:24～ A 校舎 41 会場

AIN-76 と 93G を給餌したマウスにおける体重増加、白色脂肪重量の差異について

The effect of AIN-76 and 93G diet on the growth of rats.

○渡辺 智之[1]、福住 真吾[2]、増尾 森也[2]、久宮 彩乃[2]、香川 祐輝[1]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日大院・応生科、[2]日大・生命化)
○Tomoyuki Watanabe[1], Singo Fukuzumi[2], Sinya Masuo[2], Ayano Kugu[2], Yuki Kagawa[1], Takashi Hosono[1,2], Taiichiro Seki[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ.)

【背景･目的】ラット、マウスを用いた栄養試験において American Institute of Nutrition(AIN) 配合飼料が広く利用されている。AIN 飼料 は 1976 年に発表された AIN-76, AIN-76 の有する諸問題を改善するために改良された AIN-93G があるが、両者をラットに給餌すると血中脂質濃度が大きく異なること、マウスに給餌すると体重増加率、血中脂質濃度が異なることが報告されている。本研究では、これらの差異が両者のどのような成分に起因するのかを明らかにすることを目的として基礎的な検討を行った。
【方法】4 週齢雄性 C57BL/６J マウス（日本 SLC）を 22℃、明期 8 時から 20 時の環境で飼育した。滅菌蒸留水と CRF-1（オリエンタル酵母工業）を自由に摂取させて 1 週間予備飼育後、各群の体重の平均が同じになるように群分けをし、個別ケージにて試験食を給餌した。試験期間中の摂餌量は毎日測定し、体重は 2 日に 1 度測定した。本研究では、AIN-76 と AIN-93G の組成の差異に着目して、それぞれの飼料に含まれる大豆油とコーン油を相互に置換した脂質置換群、ビタミン MIX を相互に置換したビタミン置換群、糖質を相互に置換した糖質置換群、AIN-76 の糖質の 50%占めるスクロースで AIN-93G の糖質を置換したスクロース群、ミネラル MIX を相互に置換したミネラル置換群、AIN-93G のみに含まれる微量ミネラルを AIN-76 に添加したミネラル添加群を設定し､各々のカロリーは同一となるように調製した。実験終了時に血液、肝臓を回収し、体重、白色脂肪組織重量を測定した。血漿中トリグリセライド濃度、コレステロール濃度は市販のキットにより、脂質代謝関連因子の mRNA 発現量はリアルタイム PCR により測定した。
【結果】AIN-76 給餌群の実験終了時の体重、白色脂肪重量、摂取飼料 1g 当たりの体重増加量、血漿中トリグリセライド濃度は AIN-93G 給餌群より高い傾向を示した。同様に AIN-76 処方の糖質を含む試験群で体重、白色脂肪重量、摂取飼料 1g 当たりの体重増加量、血漿中トリグリセライド濃度が増加する傾向を示した。さらに、AIN-76 処方の糖質を含む群では、脂質合成に関与する carbohydrate response element binding protein（ChREBP）, fatty acid synthase（FAS）, sterol regulatory element-binding proteins（SREBP1-c） の mRNA 発現量が増加する傾向を示した。
【結語】 等カロリーの飼料を摂取する場合、体重増加、白色脂肪重量は飼料中の糖質の種類に依存することが示唆された。

AIN diet, adipose tissue, rat growth

講演番号：4A44a01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ A 校舎 44 会場

植物生育における活性炭吸着作用の役割

Influence of activated carbon on plant growth

○老野 克紀 (神奈川工科大学)
○Katsuki Oino (Kanagawa Institute of Technology)

[目的]植物栽培において肥料として用いられている活性炭は、含有している無機塩類による栄養補給や土壌 pH の調節や、物質を物理的吸着して土壌汚染による生育阻害効果を回復する等の効果を有していることが報告されている。本研究室ではこれまでに活性炭添加時の植物生育を評価し、無添加時に比べ全長が約 1.7 倍に生育が向上することを確認している。この生育向上効果が活性炭の吸着能力と関係していると考え、本研究では植物生育に用いた活性炭から吸着物質の抽出・分離を行い、植物生育における影響を評価することを目的とした。
[原理及び実験] 評価に使用する植物として生育速度の速いカイワレダイコンを使用し、シャーレ上にて純水 20 mL を加えて 1 週間栽培を行い、活性炭(1 g)の有無による生育差を評価した。活性炭吸着物質の抽出には、カイワレダイコン採取後の活性炭を回収、純水で洗浄後、アセトン 200 mL を用いて抽出を行った。アセトンを減圧蒸留後、DMSO 200 μL に溶解させて抽出溶液とし、純水 20 mL に加えて 0.12 mg/mL としたものをカイワレダイコンの栽培に使用し、生育に及ぼす影響を評価した。また、アセトン抽出物を 10%メタノール(ギ酸 0.06%)に溶解させたもの(10 mg/mL)を HPLC を用いて分画し、当該分画サンプルのカイワレダイコンの栽培に使用することにより活性物質の単離も試みた。
[結果及び考察] 植物の生育に用いた後の活性炭からの吸着物質を抽出後、当該抽出物によるカイワレダイコンの生育評価を行った結果、抽出溶液を添加することにより、コントロールに比べ全長が約 0.7 倍に減少していることが確認され、抽出溶液がカイワレダイコンの生育を阻害するということが示された。また、抽出溶液に活性炭を加えた場合には生育阻害が見られず、コントロールと比較して全長が約 1.4 倍生長したため、活性炭は生育阻害物質を吸着することによって生育を向上させる効果があることが示唆された。活性炭に吸着したと思われる物質は栽培環境の点から植物由来成分である可能性が非常に高いため、植物が代謝した老廃物、または自身の成育をコントロールする物質である可能性が考えられる。

Activated carbon, Plant growth, Growth control

講演番号：4A44a02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:12～ A 校舎 44 会場

イネディフェンシン由来ペプチドのヒト日和見感染菌 *Candida albicans* に対する抗菌活性評価とアミノ酸置換効果の検証

Synthetic peptides derived from rice defensin and its amino acid substitution peptides exhibit antifungal activity against *Candida albicans*.

○提箸 祥幸[1]、高久 洋暁[2]、矢頭 治[3] ([1]農研機構・北農研、[2]新潟薬大・応生科、[3]農研機構・中央農研)
○Yoshiyuki SAGEHASHI[1], Hiroaki TAKAKU[2], Osamu YATOU[3] ([1]NARCH, [2]NUPALS, [3]NARC)

ディフェンシンは抗菌性蛋白質として多くの生物種に存在することが報告されている。ディフェンシンは植物において主に病原菌に対する防御機構の重要な役割を担っており、様々な植物から多くのディフェンシン蛋白質及びその遺伝子が取得されている。我々はイネのディフェンシン蛋白質に注目し、蛋白質レベルでの解析を行うことで、植物由来の抗菌性成分としての特性と利用可能性を調査することを目的として研究を行ってきた。これまでに、イネのディフェンシン蛋白質のひとつである OsAFP1 (Oryza sativa antifungal peptide-1)が、イネいもち病菌をはじめとする複数のイネの病原糸状菌に対して強い抗菌活性を有し、加えてヒト日和見感染菌の*Candida albicans*にも抗菌活性を示すこと明らかにしている。さらに、我々はOsAFP1を10アミノ酸程度のペプチドに縮小しても、イネいもち病菌に対して抗菌活性を有することを昨年度の大会で報告している。今大会ではイネディフェンシン蛋白質の幅広い分野での実用化を目指し、イネディフェンシン由来ペプチドの*C. albicans*に対する効果を調査するとともに、より汎用性の高い抗菌性物質とすることを目的にペプチドにアミノ酸置換等による改変を行いその効果を検証した。

イネディフェンシンOsAFP1の成熟領域49アミノ酸全領域を含むように8つの10アミノ酸程度のペプチドを合成し、これらを用いて*C. albicans*に対する抗菌活性を測定した。その結果、イネいもち病菌に対する結果と同様にOsAFP1分子内のN末端およびC末端近傍の2つの領域で作製したペプチドが*C. albicans*に対する抗菌活性を有していた。最も抗菌活性強度の高かったペプチドOsAFP1(1-10)のアミノ酸置換を行った複数の改変型OsAFP1(1-10)を作製し、*C. albicans*に対する抗菌活性を測定した。改変型OsAFP1(1-10)ペプチドは*C. albicans*に対し最大で2倍の抗菌活性増強効果が確認された。

defensin peptide, antifungal activity, *Candida albicans*

講演番号：4A44a03
講演日時、会場：3 月 27 日 09:24～ A 校舎 44 会場

4 クマル酸：CoA リガーゼ阻害剤の合成と阻害活性の評価
Synthesis and evaluation of 4-coumarate:CoA ligase inhibitors
○平竹 潤、切替 宏彰、肥塚 崇男、渡辺 文太 (京大化研)
○ Jun HIRATAKE,Hiroaki KIRIKAE,Takao KOEDUKA,Bunta WATANABE (Institute for Chemical Research, Kyoto Univ.)

【目的】 4-クマル酸：CoA リガーゼ（4CL）は、ATP を用いてケイ皮酸誘導体の CoA エステル合成を触媒する合成酵素の一種であり、植物が特定の環境下に適応するため進化させた特化代謝産物、特にリグナンやクマリン、フラボノイドなどの生合成における鍵酵素の一つとして重要な生理的役割を担っている。そこで、我々は、フェニルプロパノイド生合成の人為的な制御・調節を目指し、4CL に対する選択的阻害剤の設計・合成を行い、それらの酵素阻害活性を評価した。

【阻害剤の合成と設計】 4CL が触媒する CoA チオエステル合成反応は、ケイ皮酸誘導体のアシルアデニル酸（acyl-AMP）中間体を経て進行する。そこで、中間体の AMP の 5’-リン酸基をスルファミド基で置換したアデノシン誘導体に、基質であるケイ皮酸およびその誘導体に対応した構造を結合させた一連の中間体アナログ阻害剤、*N*-アシルスルファミド類 **1**-**4** を設計・合成した (Fig. 1)。

【*in vitro* 酵素阻害実験】 合成した阻害剤を用いて組換え酵素 4CL に対する *in vitro* 酵素阻害試験を行った。その結果、阻害剤 **2** が 4CL に対して高い酵素阻害活性を示した（シロイヌナズナ At4CL1 に対して、IC_{50} = 0.26 ± 0.02 μM）。ケイ皮酸誘導体の代わりに C8 直鎖のアシル基をもつ *N*-オクタノイルスルファミド、およびアシル基のないスルファミドアデノシンには、全く阻害活性がなかった。一方、フェノール性水酸基を持たない阻害剤 **1** は阻害剤 **2** に比べて阻害活性が大きく低下した（At4CL1 に対して、IC_{50} = 25.1 ± 2.8 μM）。このことから、4CL は阻害剤のケイ皮酸部分を強く認識し、とりわけ、クマロイル基の *p*-位のフェノール性水酸基を特に強く認識していることが明らかになった。また、フェルラ酸、シナピン酸に対して基質特異性の高いダイズ Gm4CL1 に対しては、阻害剤 **3**、**4** が高い阻害活性を示し（それぞれ、IC_{50} = 0.18 ± 0.03 μM、0.10 ± 0.01 μM）、酵素の基質特異性に応じて選択的に酵素を阻害できることがわかった。現在、細胞透過性にすぐれた誘導体の合成と、植物体を使った *in vivo* 投与実験を行い、阻害剤が特化代謝産物生合成に与える影響を評価している。

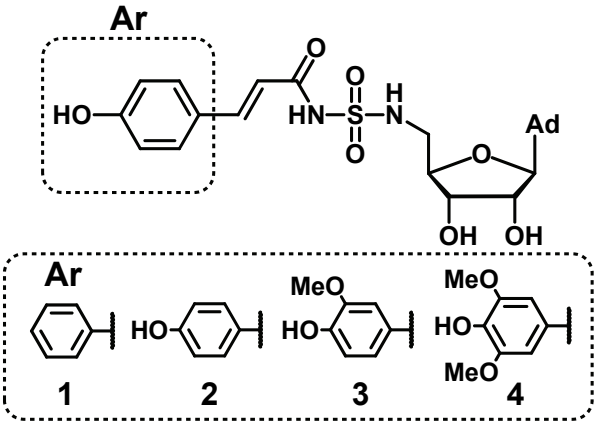


Figure 1. 合成した 4CL 阻害剤

4-coumarate:CoA ligase, phenylpropanoid biosynthesis, enzyme inhibitor

講演番号：4A44a04
講演日時、会場：3 月 27 日 09:36～ A 校舎 44 会場

シロイヌナズナの配糖化酵素 UGT71C1 のリグナン生合成への関与

Involvement of glycosyltransferase UGT71C1 in lignan biosynthesis in Arabidopsis

○楠瀬 達也[1]、畑 直樹[1,2]、小埜 栄一郎[3]、佐竹 炎[4]、關 光[1]、村中 俊哉[1]、岡澤 敦司[1,2] ([1]阪大院・工・生命先端、[2]阪府大院・生命環境・応用生命、[3]サントリー、[4]サントリー生有研)
○Tatsuya KUSUNOSE[1], Naoki HATA[1,2], Eiichiro ONO[3], Honoo SATAKE[4], Hikaru SEKI[1], Toshiya MURANAKA[1], Atsushi OKAZAWA[1,2] ([1]Osaka Univ., [2]Osaka Pref. Univ., [3]Suntory Ltd., [4]SUNBOR)

【背景および目的】主要なリグナン類は維管束植物中で，フェニルプロパノイドの一つであるコニフェニルアルコールがβ位で二量体化することによって生成される．リグナン類には抗ガン作用や抗酸化作用などを示すものが知られており，人に有用な天然物質として注目されている．しかし，リグナン類の代謝経路は複雑で，未だ不明な部分が多いため，代謝工学による有用リグナン類の大量生産には至っていない. 近年, モデル植物であるシロイヌナズナからリグナン類が検出され, 当研究グループよってそのプロファイリング法が確立されたことにより [1)]，シロイヌナズナをリグナン代謝工学のモデル植物として利用することが可能となった．植物中でリグナン類は主に配糖体として存在していることが知られているため，配糖体化の抑制はリグナン類の代謝経路の改変に有用であると考えられる．シロイヌナズナのゲノムには 14 グループ，約 120 種類の UDP-グリコシルトランスフェラーゼが存在することが知られている．これまでに，リグナン類の配糖化酵素としてゴマ由来の UGT71A9 およびレンギョウ由来の UGT71A18 が明らかになっている. シロイヌナズナにおいてはこれらと同様にグループ E に含まれる UGT71C1 がリグナン類の配糖化酵素である可能性があるものの，その機能は未だ不明である．本研究では，*UGT71C1* の遺伝子破壊株のリグナン類のプロファイリングとリコンビナントタンパク質の機能解析を行うことで，この酵素のリグナン類の代謝経路への関与を明らかにすることを目的とする．
【結果および考察】リグナン類のプロファイリングによって *UGT71C1* の遺伝子破壊株においてピノレジノールグルコシドの含量が減少していることが確認された．これにより UGT71C1 がピノレジノールの配糖化に関わっていることが示唆された. また, *UGT71C1* を大腸菌で発現させたところ, 得られたリコンビナントタンパク質がピノレジノールおよびラリシレジノールの配糖化を触媒することが確認された．この結果より，UGT71C1 が植物中でピノレジノール及びラリシレジノールを配糖化しているということが強く示唆された．今後は遺伝子破壊株への *UGT71C1* の導入による相補性試験ならびに UGT71C2-UGT71C5 の各酵素についての機能解析を行う予定である．

[1)] A. Okazawa, *et al.*, (2011) Simultaneous quantification of lignans in *Arabidopsis thaliana* by highly sensitive capillary liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometory. *Plant Biotechnol.* 28, 287-293.

lignan, glycosyltransferase, Arabidopsis

講演番号：4A44a05
講演日時、会場：3 月 27 日 09:48～ A 校舎 44 会場

N-末端ドメインが関与する植物型フェリチンの鉄放出機構

The processing of the extension peptide accelerates the iron release from plant ferritin

○増田 太郎[1]、杉原 格[2]、森本 晋一郎[2]、三上 文三[3]、豊原 治彦[2]([1]京大院農・農学、[2]京大院農・応用生物、[3]京大院農・応用生命)
○Taro MASUDA[1], Itaru Sugihara[2], Shin-ichiro Morimoto[2], Bunzo Mikami[3], Haruhiko Toyohara[2]
([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Kyoto Univ.)

【背景・目的】フェリチンはほぼ全ての生物種において、鉄代謝に主要な役割を演じる鉄貯蔵蛋白質である。演者らは植物由来のフェリチンとして初となるダイズフェリチンの立体構造解析に成功し、植物フェリチンの詳細な 24 量体構造と多量の鉄を集積する分子機構を明らかにした。本研究では、高等植物型フェリチンと類似の一次構造を持つ緑藻（アナアオサ、*Ulva pertusa*）由来フェリチン(UpFer)をモデルとして、生理条件でのフェリチンの存在様式と、in vitro での鉄貯蔵、放出機構について検討した。
【方法】高等植物型の一次構造を有する緑藻アナアオサ由来のフェリチン(UpFer)について、cDNA を単離し、組換え型蛋白質を調製、結晶化を行った。得られた結晶について分解能 2.4Åまでの回折強度データを収集し、構造決定を行った。また、天然型の他に、植物フェリチンに特異的な N-末端ドメインを欠く変異型 UpFer も調製し、鉄貯蔵と鉄放出活性について検討した。
【結果・考察】UpFer 結晶は、空間群 *I*432 に属し、非対称単位中に一つのサブユニットを含んでいた。植物フェリチンに特有の N-末端ドメインは 24 量体表面に位置し、この N-末端ドメインと隣接サブユニットとの間に相互作用が認められた。両者の相互作用がフェリチン 24 量体構造の安定化に寄与していると考え、全長の UpFer と N-末端ドメインを欠く変異型 UpFer との間で、熱安定性を比較した。その結果、N-末端ドメインを欠く変異体では、UpFer 全長と比較して熱安定性の低下が認められた。このことから、我々は、N-末端ドメインの切断がフェリチン 24 量体構造の不安定化を誘起し、フェリチン 24 量体内に蓄えられた鉄の放出につながるとの仮説を立て、天然型 UpFer と N-末端ドメインを欠く変異体との間で、内部に蓄えられた鉄の放出速度を比較した。その結果、N-末端ドメインを欠く変異体では、天然型と比較して、鉄の放出速度が大幅に増大していることが明らかになった。また、両者の間で、鉄の取り込み活性については大きな差が見られなかった。更に、アナアオサ生体内での UpFer の存在様式を明らかにするため、UpFer 特異的抗体を用いたイムノブロットを行ったところ、全長の UpFer と、部分的に切断を受けたバンドが検出された。このバンドは N-末端ドメイン領域が切断を受けた結果生じたものであると推察された。以上の結果から、植物型フェリチンに特有の N-末端ドメインは、これまで不明であったフェリチンからの鉄放出機構に関与すると考えられる。この N-末端ドメインの切断は、植物における鉄欠乏、過剰といった鉄ステータスにより制御される可能性が考えられ、現在、切断が起こる条件と切断の制御機構について検討中である。

ferritin, iron, algae

講演番号：4A44a06
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ A 校舎 44 会場

ジベレリン生合成酵素の構造解析への試み
In the study of the structure analysis of the gibberellin biosynthetic enzyme
○竹原 清日[1]、森中 洋一[1]、加藤 博章[2]、松岡 信[1]、上口（田中） 美弥子[1] ([1]名大生物機能開発利用研究センター、[2]京大院薬・構造生物)
○ Sayaka Takehara[1], Yoichi Morinaka[1], Hiroaki Kato[2], Makoto Matsuoka[1], Miyako Ueguchi-Tanaka[1] ([1]Biosci. and Biotec. Center, Nagoya Univ., [2]Dept. of Struct. Biol., Grad. Sch. of Pharm. Sci., Kyoto Univ.)

【背景】植物ホルモンのひとつであるジベレリン（GA）は、草丈の伸長促進や発芽促進、花芽形成促進などさまざまな生理作用をもつ。 ジベレリン生合成経路の後半段階においては GA20-oxidase (GA20ox)および GA3-oxidase (GA3ox)が、代謝経路では GA2-oxidase (GA2ox)が働いており、いずれも 2-オキソグルタル酸要求性酸化酵素（2ODDs）に属する酵素である。 一方、GA3ox の阻害剤としてプロヘキサジオンが知られている。 様々な濃度に対する植物の反応性の違いから、プロヘキサジオンは GA3ox 以外の 2ODDs に対しても阻害するが、その阻害の程度は酵素によって異なることが推察されている。 そこで我々は、2ODDs の構造を解明し、阻害剤や基質との結合部位を明らかにすることにより、新たな阻害剤や、進化型の酵素を作ることを目標に 2ODDs の結晶化を試みた。 また、これら酸化酵素の機能解析も合わせて行った。【方法】GA2ox および GA3ox は大腸菌系で発現させ、Trp 蛍光、CD などにより性質を検討した。 両酵素活性は、安定同位体の基質を用い GCMS により測定を行った。 また、反応(生成)物質である GA_4 を加え、20℃で蒸気拡散法により結晶化を行なった。【結果】両酵素は GST タグを付加して発現させ、GA_4 を加えて精製する事で結晶化に十分量のサンプルを得ることに成功した。 GA2ox については、0.1 M リン酸ナトリウム（pH 6.5）、12 % PEG8000 の条件下において立方状の結晶が得られ、分解能は 20 Å であった。 一方、GA3ox は凝集しやすく安定性に欠けるため、不安定な N 末端の除去、リガンド等の添加などの検討を行い、現在結晶化の初期条件を探索中である。 また、酵素活性測定によりプロヘキサジオンの阻害機作を検討したところ、2-オキソグルタル酸と拮抗的に働いて 2ODDs を阻害していることが示唆され、その中でも GA3ox を最も強く阻害することが明らかとなった。 本研究は、最先端・次世代研究開発支援プログラムにより助成された。

gibberellin biosynthesis, plant hormone, dioxygenase

講演番号：4A44a07
講演日時、会場：3 月 27 日 10:12～ A 校舎 44 会場

抗真菌タンパク質 Gnk2 のマンノース結合構造の X 線結晶解析

X-ray crystallographic analysis of the mannose-bound structure of antifungal protein Gnk2

○宮川 拓也[1]、澤野 頼子[1]、秦野 賢一[2]、田之倉 優[1] ([1]東大院農生科、[2]群馬大工)
○Takuya Miyakawa[1], Yoriko Sawano[1], Ken-ichi Hatano[2], Masaru Tanokura[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Gunma Univ.)

【目的】植物は病原菌の感染や環境ストレスに応答した様々な生体防御機構を備えている。近年、この防御応答に関与する因子として SSRA（Salt Stress Response/Antifungal）ドメインスーパーファミリー[1)] に属する複数のタンパク質が同定されている。我々はこれまでに SSRA タンパク質の 1 つである Gnk2 が抗真菌活性をもつことを明らかにし、その立体構造から Gnk2 が SSRA タンパク質の機能ドメインであることを示してきた[2)]。さらに、Gnk2 がグループ III レクチンと同様の認識パターンでマンノース等の単糖と相互作用することを NMR により解析し、Gnk2 のマンノース認識と抗真菌活性の相関を示す知見を得ている。本研究では、Gnk2 のマンノース結合状態の立体構造を解析し、糖認識機構を明らかにすることを目的とした。
【方法】Gnk2 の発現には、大腸菌のペリプラズムにおいてジスルフィド結合の適切な形成を促進する 4 種類の Dsb タンパク質との共発現系を利用した。大腸菌のペリプラズムに大量発現した Gnk2 を浸透圧ショックにより抽出し、イオン交換クロマトグラフィー及びゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。この精製タンパク質に対して終濃度 5−10%の D-マンノース（単糖）または α1,2-マンノビオース（二糖）を混合し、蒸気拡散法による結晶化スクリーニングを行った。取得した結晶について Photon Factory AR-NE3 ビームラインで X 線回折実験を行い、Gnk2 とマンノースの複合体構造を解析した。
【結果】5% D-マンノース添加条件で得られた結晶から分解能 2.6 Å の X 線回折データを取得し、Gnk2 単体の結晶構造を用いて分子置換法により構造を決定した。非対称単位中の 4 分子のうち 2 分子においてマンノースの電子密度が観察され、マンノースの結合モデルを構築することができた。マンノースは NMR を用いた相互作用解析で示唆された領域に結合しており、Asn11, Arg93, Glu104 の 3 残基による 5 配位の水素結合で認識されていることが明らかになった。さらに、この複合体構造から Gnk2 の糖選択性に関する知見が得られた。

1）Marchler-Bauer et al. Nucleic Acids Res. 39, 225-229 (2011)
2）Miyakawa et al. Proteins 77, 247-251 (2009)

antifungal protein, lectin, X-ray crystallography

講演番号：4A44a08
講演日時、会場：3 月 27 日 10:24～ A 校舎 44 会場

シロイヌナズナにおけるアスコルビン酸再生系の包括的な機能解析

Functional analysis of ascorbate recycling enzymes in *Arabidopsis* plants

○野志 昌弘[1]、畑中 理佐[1]、田茂井 政宏[1,2]、高橋 隆樹[3]、丸田 隆典[3]、澤 嘉弘[3]、石川 孝博[3]、重岡 成[1,2] ([1]近畿大・農・バイオ、[2]近畿大院・農・バイオ、[3]島根大・生資科・生命工)
○Masahiro NOSHI[1], Risa HATANAKA[1], Masahiro TAMOI[1,2], Ryuki TAKAHASHI[3], Takanori MARUTA[3], Yoshihiro SAWA[3], Takahiro ISHIKAWA[3], Shigeru SHIGEOKA[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [3]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ.)

【緒論】高等植物において、アスコルビン酸（AsA）は最も豊富に存在する水溶性抗酸化剤であり、レドックス緩衝剤としてストレスおよびホルモン応答に関与している。そのため、酸化型 AsA（モノデヒドロ AsA：MDA およびデヒドロ AsA：DHA）の再生系が重要である。シロイヌナズナには局在などの異なる MDA 還元酵素（MDAR1～5）および DHA 還元酵素（DHAR1～5）が存在するが、個々の酵素の生理機能には不明な点が多く残されている。このような状況の中、我々はシロイヌナズナにおける AsA 再生系の全体像を明らかにすることを目的に、今回各々の AsA 再還元酵素の欠損株ラインの包括的なストレス感受性試験を試み、これまでの報告と併せて、オルガネラ型 DHAR および MDAR の生理機能について考察した。
【結果・考察】欠損株ラインのストレス感受性試験により、DHAR1 および DHAR5 はパラコート処理や強光などの光酸化的ストレスに対して必須であることが明らかになった。DHAR1 は葉緑体に局在することが知られており、DHAR5 はペルオキシソームや葉緑体、液胞などの複数のオルガネラに局在することが示唆されている。強光下において、DHAR5 欠損株では AsA/総 AsA 比の有意な低下が認められた。興味深いことに、DHAR5 欠損株では強光下での酸化型グルタチオンの増加が著しく抑制されていた。よって、DHAR5 は各オルガネラの AsA およびグルタチオンのレドックス制御因子として重要であることが示唆された。また、MDAR 欠損株ラインでは、MDAR4 欠損株のみが強光に対して高感受性を示した。MDAR4 は MDAR3 とともにペルオキシソームに局在することが報告されている。独立栄養条件において MDAR3 欠損株はシードリング（実生）致死の表現型を示したが、MDAR4 欠損株は野生株と同様の生育を示した。また、MDAR3 欠損株の強光感受性は野生株と同程度であった。そこで、野生株、MADR3 および MDAR4 欠損株のシードリング段階における総 MDAR 活性を調べた。その結果、MDAR3 および MDAR4 欠損株ではそれぞれシードリング初期および後期で著しい総 MDAR 活性の低下が認められた。したがって、シードリング生育段階における発現制御により MDAR3 および MDAR4 は機能分化していることが示唆された。現在、各欠損株ラインにおける AsA のレドックス状態を調べている。

Ascorbate, Ascorbate recycling enzyme, Oxidative stress

講演番号：4A44a09
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ A 校舎 44 会場

シロイヌナズナ GDP-D-Mannose 加水分解酵素（AtNUDX9）の同定と機能解析

Identification and functional analysis of Arabidopsis GDP-D-Mannose pyrophosphohydrolase

○田中 裕之[1]、塩谷 知子[2]、丸田 隆典[3]、田茂井 政宏[1,2]、吉村 和也[4]、重岡 成[1,2]([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]島根大・生資科・生命工、[4]中部大・応生・食栄)
○Hiroyuki TANAKA[1], Chikako ENYA[2], Takanori MARUTA[3], Masahiro TAMOI[1,2], Kazuya YOSHIMURA[4], Shigeru SHIGEOKA[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [4]Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ.)

高等植物において、アスコルビン酸（AsA：ビタミン C）は最も主要なレドックス緩衝剤であり、酸化的ストレス防御・シグナリングをはじめとした種々の生理応答の根幹を担っている。AsA は主に多糖から GDP-D-mannose（GDP-D-Man）を代謝中間体とする D-Man/L-Galactose 経路を介して生合成される。一方、GDP-D-Man はタンパク質のグリコシル化や細胞壁合成のための糖ドナーとしても必須であるため、細胞内 GDP-D-Man レベルの制御はそれらの経路への炭素分配を決定する上で重要であると考えられる。興味深いことに最近、大腸菌においてヌクレオシド-2 リン酸由来の化合物に対して加水分解活性を有する Nudix hydrolase（NUDX）ファミリーから、GDP-D-Man 特異的活性（GDP-D-Man + H2O → GMP + mannose-１リン酸）を示す Orf1.9（wcaH）および Orf191（yffH）が同定された。そこで本研究では、植物の GDP-D-Man 特異的 NUDX の同定、およびその AsA 生合成への関与を明らかにすることを目的とした。高等植物において、GDP-D-Man は細胞質で合成される。そこで、シロイヌナズナに存在する 28 種類の NUDX（AtNUDX1-27 および AtDCP2）から、細胞質局在型 AtNUDX（AtNUDX1-11 および25)のリコンビナント酵素を用いてGDP-D-Manに対する加水分解活性を検討した。その結果、AtNUDX9 のみが GDP-D-Man に対して活性（Vmax: 1.6 ±0.15 μmol/min/mg protein、Km: 376±24 μM）を示した。他の NUDX と同様に、本酵素は触媒反応に 2 価のカチオン（Mg2+）を要求した。また、H2O2 や AsA の添加は本酵素の活性にほとんど影響しなかった。AtNUDX9 の発現は、細胞内 AsA レベルと同様に、光照射下で徐々に増加した。したがって、AtNUDX9 は光に応答して AsA 生合成を負に調節していると考えられた。4 週齢のシロイヌナズナから調製した粗酵素を超遠心分離後、Q Sepharose カラムクロマトグラフィーにより分画したところ、複数の GDP-D-Man 加水分解活性のピークが得られた。現在、各ピークの精製を進めるとともに、AtNUDX9 の過剰発現株や遺伝子破壊株を用いた解析を行っている。

GDP-D-Mannose, ascorbic acid, arabidopsis

講演番号：4A44a10
講演日時、会場：3 月 27 日 10:48～ A 校舎 44 会場

シロイヌナズナにおける CYP94B2 の機能解析
Functional analysis of *Arabidopsis* CYP94B2

○天野 就基[1]、北岡 直樹[1]、川出 洋[2]、谷口 沙希[1]、佐分利 亘[1]、松井 博和[1]、松浦 英幸[1]([1]北大院農、[2]東農工大応生科)
○ Naruki AMANO[1], Naoki KITAOKA[1], Hiroshi KAWAIDE[2], Saki TANIGUCHI[1], Wataru SABURI[1], Hirokazu MATSUI[1], Hideyuki MATSUURA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Tokyo Univ. Agric. Technol.)

【目的】ジャスモン酸(JA)は、傷害や病害に対する応答や老化と離層形成、バレイショの塊茎誘導など多種多様な生理活性を有する植物ホルモンで、その応答は様々な機構によって巧妙に制御されている。JA の代謝については、12 位の水酸化やカルボキシ化、11 位の水酸化など数多くの報告があるが、活性型 JA である(+)-7-*iso*-jasmonoyl-L-isoleucine(JA-Ile)の不活性化機構については報告が少ない。植物ホルモンの活性はその生合成と代謝量のバランスによって調節されているため、不活性化機構の解明は重要である。当研究室の研究により、シロイヌナズナにおいてシトクローム P450 に属する酵素の一つである CYP94B3 が JA-Ile の 12 位を水酸化する酵素であり、本酵素反応が JA シグナルの不活性化機構の 1 つであることが示された。シトクローム P450 は生物界に広く分布する一群のヘムタンパク質で、モノオキシゲナーゼ様式の酸素添加活性を持つことが知られている。我々は、CYP94B3 と類縁の酵素である CYP94B2 も JA-Ile の 12 位または 11 位の水酸化を触媒する酵素と予想し、CYP94B2 の機能解析を目的として研究を行った。

【方法】播種後 5 週間栽培したシロイヌナズナの葉部を傷害処理し、調製した mRNA から cDNA を合成して *CYP94B2* をクローニングした。得られた *CYP94B2* を pPICZ-A ベクターに導入してピキア酵母を形質転換した。なお、ピキア酵母には予めシロイヌナズナの P450 レダクターゼ遺伝子(*ATR1*)を導入したものを用いた。得られた形質転換体を JA-Ile を含む培地で 5 日間培養し、その代謝産物を UPLC TOF MS 及び UPLC MS/MS によって分析した。標品として 12-OH-JA-Ile 及び、今回新たに合成した 11-OH-JA-Ile を用いた。

【結果】11-OH-JA-Ile は、 α,β-不飽和ケトンのシス・トランス異性化反応(Scheme 1)を中間反応として用いることで合成できた。UPLC TOF MS 及び UPLC MS/MS において、標品との co-injection の結果より、CYP94B2 は JA-Ile の 12 位を水酸化する酵素であることが明らかとなった。現在、傷害後の *CYP94B2* の発現解析や、*cyp94b2* 変異株における 12-OH-JA-Ile や JA-Ile の内生量の定量、CYP94B2 の基質特異性の評価を行っている。

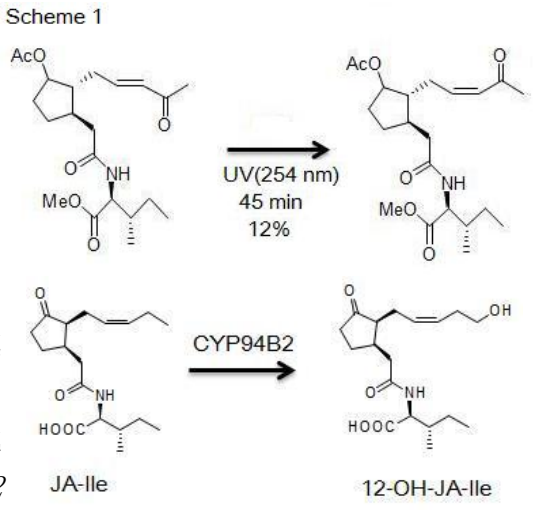


Fig.1 CYP94B2によるJA-Ileの代謝

Jasmonyl isoleucine, Cyt P450, *Arabidopsis thaliana*

講演番号：4A44a11
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ A 校舎 44 会場

イソキノリンアルカロイド生合成の発現制御に関わる CjWRKY1 の機能解析

Functional analysis of CjWRKY1 in isoquinoline alkaloid biosynthesis

○山田 泰之、島田 友恵、吉本 忠司、小倉 康平、加藤 伸彦、小山 知嗣、佐藤 文彦（京大院生命科学)
○ Yasuyuki YAMADA,Tomoe SHIMADA,Tadashi YOSHIMOTO,Kouhei OGURA,Nobuhiko KATO,Tomotsugu KOYAMA,Fumihiko SATO (Kyoto Univ.)

キンポウゲ科のオウレン(*Coptis japonica*)が産生するイソキノリンアルカロイド、ベルベリンの生合成系において、生合成酵素遺伝子の包括的な発現制御に 2 種類の転写因子 CjWRKY1、CjbHLH1 が関わることが、オウレンプロトプラストを用いた解析から明らかとなっている（Kato et al., 2007; Yamada et al., 2011)。特に、CjWRKY1 はアルカロイド生合成系ではじめて単離された WRKY 型の転写因子であり、ベルベリン生合成系の転写活性化因子として機能していることが明らかとなっている。今回我々は、CjWRKY1 によるベルベリン生合成酵素遺伝子の発現制御機構を明らかにするために、より詳細な機能解析を行った。生合成酵素遺伝子プロモーターの下流に *Luciferase* 遺伝子を組み込んだコンストラクトを用いた一過的ルシフェラーゼアッセイやゲルシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降等の解析の結果、CjWRKY1 がベルベリン生合成酵素遺伝子プロモーターに結合し転写を誘導していることが示唆された。また、*CjWRKY1* の発現量は生合成酵素遺伝子や *CjbHLH1* の発現量と同様に、メチルジャスモン酸(MeJA)処理によって一過的に上昇したことから、CjWRKY1 は CjbHLH1 とともにジャスモン酸シグナル伝達系において機能することが示唆された。しかし、一方の転写因子の発現量を、オウレンプロトプラストを用いた一過的 RNAi 法によって抑制しても、もう一方の発現量には変化が見られなかったことから、両転写因子は少なくとも転写レベルにおいて独立に機能していることが示唆された。

isoquinolione alkaloid biosynthesis, WRKY, transcription factor

講演番号：4A44a12
講演日時、会場：3 月 27 日 11:12～ A 校舎 44 会場

sanguinarine 生合成経路における protopine 6-hydroxylase の反応特性

Characterization of protopine 6-hydroxylase in sanguinarine biosynthesis

○堀 健太郎、竹村 知也、佐藤 文彦 (京大院生命科学)
○Kentaro Hori,Tomoya Takemura,Fumihiko Sato (Kyoto Univ.)

ベンゾフェナンスリジンアルカロイドの一つ sanguinarine は、protopine を介して、ベンジルイソキノリンアルカロイド生合成の共通中間体である *(S)*-reticuline から合成される。*(S)*-reticuline から sanguinarine までの合成は、7 段階の反応を必要とし、そのうち 4 つの反応がシトクロム P450 によるものである。すなわち、cheilantifoline synthase (CYP719A5)、stylopine synthase (CYP719A2/A3)、*N*-methylstylopine hydroxylase (MSH)、protopine 6-hydroxylase (P6H) が関与している。今回、我々は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で発現させた 組換え CYP82N2v2 (P6H) および CYP82N2v2-like の酵素特性について報告する。組換え酵母のミクロソーム画分で発現させたこれらの酵素は、protopine を基質として dihydrosanguinarine を生成する活性を示した。一方、CYP82N2v2 もしくは CYP82N2v2-klike を発現させた酵母菌体を用いた反応では、*in vitro* の反応とは異なる反応産物が見られた。すなわち、protopine を基質として dihydrosanguinarine の他に sanguinarine、並びに m/z350 を示す物質が検出された。この m/z350 を示す物質の同定と、*in vivo* と *in vitro* での P6H および P6H-like の反応性の違いについて解析している結果を報告する。

cytochrome P450, benzophenanthridine alkaloid, Eschscholzia californica

講演番号：4A44a13
講演日時、会場：3 月 27 日 11:24～ A 校舎 44 会場

シロイヌナズナのポリアミン酸化酵素は全て逆変換反応を触媒する
All of the polyamine oxidases in Arabidopsis catalyze back-conversion reaction
○Kim Dong Wook[1]、村山 千尋[1]、新津 勝[2]、神尾 好是[1]、Berberich Thomas[3]、草野 友延[1] ([1]東北大院生命、[2]城西大薬、[3]BiK-F)
○Dong Wook Kim[1], Chihiro Murayama[1], Masaru Niitsu[2], Yoshiyuki Kamio[1], Thomas Berberich[3], Tomonobu Kusano[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Josai Univ., [3]BiK-F)

シロイヌナズナゲノムには、5 種類のポリアミン酸化酵素(Polyamine oxidase, PAO と略)をコードする遺伝子が存在し、*AtPAO1*～*AtPAO5* と名付けられている。これまでの研究により、*AtPAO1*～*AtPAO4* までは大腸菌で産生された組換え酵素を用いて酵素として大筋の特徴づけがなされてきた(Moschou et al. 2008; Kamada-Nobusada et al. 2008; Takahashi et al. 2010; Fincato et al. 2011,2012)。これら 4 種の AtPAO は基質特異性に違いはあるものの、いずれも生合成反応の逆変換反応を触媒することが判明している。今回、*AtPAO5* の遺伝子産物を大腸菌で産生させることに成功したので報告する。

宿主大腸菌を Rosetta2 として、エターノール処理および熱ショック処理後に IPTG での誘導をすることにより目的タンパク質の可溶化を促進できた。Ni カラムからのイミダゾールによるステップワイズな溶出により、AtPAO5 を分子量 58 kDa のほぼ均一なタンパク質として精製できた。透析後、精製標品は 380 と 460nm 付近に明瞭な極大吸収を持つことから FAD を補酵素として含むことが強く示唆された。スペルミンを基質として反応を行うと pH6.5～10 の範囲に活性が見られ、その至適 pH は 7.5 であった。一方、サーモスペルミンを基質とすると、スペルミンを基質にしたときよりも相対活性は低いものの pH5.5～10 の範囲に活性が見られ至適 pH は 6.5 であった。そこで両 pH での基質特異性を検討したところ、pH7.5 ではスペルミン>ノルスペルミン>N1-アセチルスペルミン=サーモスペルミンの順の活性を示し、スペルミジン、ノルスペルミジンそしてプトレシンにはほとんど活性が見られなかった。pH6.5 ではサーモスペルミン>N1-アセチルスペルミン>ノルスペルミン>スペルミンの順であり、スペルミジン、ノルスペルミジンそしてプトレシンに対しては活性が見られなかった。次に、スペルミンとサーモスペルミンの反応産物を HPLC で解析したところ、いずれの場合も反応時間依存的に、酵素量依存的にスペルミジンのみが検出された。このことは、AtPAO5 も逆変換反応を触媒することが示された。上記の結果から、シロイヌナズナの PAOs は AtPAO5 を含め全て逆変換反応を行うと結論できる。

polyamine, polyamine oxidase, *Arabidopsis thaliana*

講演番号：4A44a14
講演日時、会場：3 月 27 日 11:36～ A 校舎 44 会場

ヤセウツボ発芽種子で発現する糖加水分解酵素の機能解析
Functional analysis of glycosyl hydrolase specifically expressed in *O. minor* germinating seeds
○東久保 諒[1]、Gregory Guirimand[1]、若林 孝俊[1]、水谷 正治[3]、杉本 幸裕[3]、關 光[1]、村中 俊哉[1]、岡澤 敦司[1,2] ([1]阪大院・工・生命先端、[2]阪府大院・生命環境・応用生命、[3]神大院・農・植物機能)
○ Ryo HIGASHIKUBO[1], Gregory Guirimand[1], Takatoshi WAKABAYASHI[1], Masaharu MIZUTANI[3], Yukihiro SUGIMOTO[3], Hikaru SEKI[1], Toshiya MURANAKA[1], Atsushi OKAZAWA[1,2] ([1]Osaka Univ., [2]Osaka Prefecture Univ., [3]Kobe Univ.)

【背景】ハマウツボ科のヤセウツボ (*Orobanche minor*) は，マメ科植物など広範囲の双子葉植物の根に寄生する全寄生植物である．これらの根寄生植物は特有の生活環を持っており，コンディショニングと呼ばれる吸水期間を経た後に，ストリゴラクトンなどの発芽刺激物質を感受して初めて発芽する．ハマウツボ科の根寄生植物によって，アフリカをはじめとする乾燥地での農業は甚大な被害を受けており，その防除技術の確立が望まれている．これまでハマウツボ科の根寄生植物の制御のために様々な研究が行われてきたが，未だ完全な防除技術は確立されていない．我々はハマウツボ科の根寄生植物に特異的な発芽過程における代謝に注目し，防除標的の探索を行っており，これまでに，ヤセウツボ種子中の糖加水分解活性が発芽の進行とともに上昇することを明らかにした．一方，トマトやシロイヌナズナなどにおいて，糖加水分解酵素 (GH) が発芽に関与することが知られている．これらのことから，ヤセウツボの発芽においても GH が関与することが予想された．ヤセウツボの EST データベースを検索したところ，ヤセウツボ発芽種子で特異的に発現する GH 相同遺伝子断片の配列が得られた．その配列はトマトの発芽種子において細胞壁中のガラクトマンナンの分解に関与すると考えられているβ-マンノシダーゼと高い配列相同性を示したことから，この遺伝子がヤセウツボの種子発芽にも関与していると予想した．そこで本研究では，ヤセウツボ発芽種子で特異的に発現する GH 相同遺伝子のクローニングとその機能解析を行った．
【結果】ヤセウツボの種子，吸器，茎，花から total RNA を抽出し，EST データベースから得られたヤセウツボ発芽種子由来の GH 相同遺伝子断片の配列を用いて，GH 相同遺伝子のクローニングと発現解析を行った．配列解析の結果，この GH 相同遺伝子は GH1 ファミリーに属していることが明らかになった．また，遺伝子発現解析の結果から，この遺伝子は種子発芽過程の初期に強く発現していることが明らかになった．このことは，この遺伝子がヤセウツボの種子発芽に関与しているという我々の仮説を支持した．次に，クローニングした GH 相同遺伝子を大腸菌で発現させたところ，精製した組換え酵素はβ-マンノシダーゼ活性を示した．一方，グルコシダーゼ，ならびにガラクシダーゼ活性は検出されなかった．また，GFP 融合タンパク質の局在解析により，当該酵素が細胞壁に局在することが示された．これらのことから，ヤセウツボ発芽種子由来の GH 相同遺伝子は細胞壁に局在するβ-マンノシダーゼをコードしていることが明らかになった．

β-mannosidase, *Orobanche minor*, Glycosyl hydrolase family 1

講演番号：4A44a15
講演日時、会場：3 月 27 日 11:48～ A 校舎 44 会場

シロイヌナズナシグナルペプチドペプチダーゼ（AtSPP）の発現系の構築及び酵素活性の解析
Construction of expression system of Arabidopsis signal peptide peptidase and analysis of its proteolytic activity
○星 雅子[1]、阿部 啓子[1,2]、朝倉 富子[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]神奈川科学技術アカデミー)
○masako HOSHI[1], keiko ABE[1,2], tomiko ASAKURA[1] ([1]Tokyo Univ., [2]KAST)

［目的］シグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)は複数回膜貫通型のアスパラギンプロテアーゼに属し、その機能の 1 つはシグナル配列から派生したシグナルペプチドを切断することである。今までに MHCclass Ⅰ分子、hepatitis C virus polyprotein が SPP に切断された後、切り出されたペプチドが重要な役割を担う生物活性を有することが報告されている。我々は植物内に初めて SPP を見出し、オルガネラにおいては小胞体に局在し、組織においては多くの器官で発現が見られるが特に花や根において強い発現が見られることを示した。また、茎頂や根端といった生長組織に発現が認められることも確認している。さらに、AtSPP ノックアウト株は致死となることから、AtSPP が生存に必須であることが示唆されている。本研究では他の種では既に重要な生物活性を有することが報告されている SPP の植物における機能解析を行う事を目的とし、膜内プロテアーゼとして活性があるかどうかを humanSPP の基質であるプレプロラクチンの合成ペプチドを用いて *in vitro assay* により調べた。

[方法]シロイヌナズナの根由来の細胞である Deep Cell あるいは酵母による発現たんぱく質を超遠心法によりミクロゾーム画分を取得した後、界面活性剤 *n*-dodecyl-*β*-maltoside：DDM（２％）で可溶化し膜画分とした。その膜画分と Myc タグを付けた合成プレプロラクチンとを 37℃反応で反応させ、反応産物をトリスートリシンー８MUrea ゲルにて電気泳動した。泳動後の切断断片は抗 myc 抗体を用いてウエスタンブロッティングにより検出した。
[結果] Deep Cell の DDM 可溶化膜画分による基質切断断片の位置は humanSPP のものと同じであった。さらにアスパラギンプロテアーゼ阻害剤である L-685,458 や SPP 特異的阻害剤である(Z-LL)2-ketone により酵素反応が阻害されたことから Deep Cell の DDM 可溶化膜画分には SPP の活性があることが判明した。しかし、膜画分には他のプロテアーゼも存在することからさらに酵母に GFP 融合たんぱく質として発現させ活性を調べた。その結果 GFP 融合たんぱく質は酵母の膜画分に局在することが確認された。AtSPP 発現たんぱく質は同じように合成基質を切断し(Z-LL)2-ketone により酵素反応が阻害されたことから、AtSPP には膜内アスパラギン酸プロテアーゼとしての酵素活性が存在することが示唆された。

signal peptide peptidase, Arabidopsis, aspartic protease

震災復興関連シンポジウムプログラム

3 月 27 日（水）9:50〜16:30

4SY01　東日本大震災からの復旧・復興に向けた農芸化学および関連分野の取り組み

第 1 部　農地・家畜の汚染と現状に向けた技術

3 月 27 日（水）9:50〜12:00　M26 会場（マルチメディア教育研究棟 2F）

世話人：内田隆史（東北大院農），南條正己（東北大院農）

座　長：内田隆史（東北大院農）

9:50　はじめに……°磯貝恵美子（東北大院農）

9:55　4SY01–A1　福島第一原子力発電所事故によって生じたウシの体内における放射性物質の動態
……°福田智一（東北大院農）

10:25　4SY01–A2　農地土壌に対する津波と放射性物質の影響……°南條正巳（東北大院農）

10:55　4SY01–A3　福島における放射性セシウムの土壌中の挙動と稲への移行……°塩沢　昌（東京大院農）

11:25　4SY01–A4　高分子膜を活用した持続的農業……°森　有一（メビオール株式会社）

11:55　おわりに……°内田隆史（東北大院農）

第 2 部　震災復興に向けた環境バイオテクノロジー分野の取り組みと展望

共　催　環境バイオテクノロジー学会

3 月 27 日（水）13:30〜16:30　M26 会場（マルチメディア教育研究棟 2F）

世話人：福田雅夫（長岡技科大生物），永田裕二（東北大院生命科学），宮内啓介（東北学院大工）

座　長：福田雅夫（長岡技科大生物），加藤純一（広島大院先端物質科学），遠藤銀朗（東北学院大工），永田裕二（東北大院生命科学），宮内啓介（東北学院大工）

13:30　はじめに……°福田雅夫（長岡技科大生物）

13:35　4SY01–P1　被災地調査からの報告と震災復興に向けた課題……°西村　修（東北大院工）

14:00　4SY01–P2　油分解細菌群によるバイオオーグメンテーション……°今中忠行，高松邦明（立命館大生命科学）

14:25　4SY01–P3　津波による土壌のヒ素汚染とその修復への取り組み
……°宮内啓介[1]，簡　梅芳[1]，黄　毅[1]，大友俊介[1]，和泉卓也[1]，井上千弘[2]，北島信行[3]，遠藤銀朗[1]（[1]東北学院大工，[2]東北大院環境，[3](株)フジタ）

14:50　4SY01–P4　放射性物質で汚染された植物バイオマスの減容化総合処理システムの開発
……°金原和秀[1]，大塚祐一郎[2]，中村雅哉[2]，佐々木健[3]，中島田豊[4]，加藤純一[4]（[1]静大工，[2]森林総研，[3]広島国際学院大，[4]広大院先端）

15:15　4SY01–P5　食・農・村の復興支援プロジェクトと菜の花プロジェクト……°中井　裕（東北大院農）

15:40　4SY01–P6　大震災復興に向けての被災地住民の高効率し尿および浄化槽汚泥処理システム
……°倉根隆一郎[1]，水野康弘[1]，鬼頭昌久[1]，紺野充弘[2]，橘　峰生[3]，植地俊仁[3]，安部　剛[3]（[1]中部大院応生，[2]釜石大槌地区行政事務組合，[3]クボタ環境サービス(株)）

16:05　総合討論

16:25　おわりに……°遠藤銀朗（東北大院工）

シンポジウムプログラム

3 月 27 日（水）13 : 30〜16 : 30

4SY02　食の安全と健康を担う乳酸菌発酵生産物の機能と応用

3 月 27 日（水）13 : 30〜16 : 10　A11 会場（講義棟 A1F）
世話人：瀧井幸男（京都学園大バイオ環境），早川　潔（(株)ファーマフーズ），高橋砂織（秋田県総食研セ）
座　長：早川　潔（(株)ファーマフーズ），高橋砂織（秋田県総食研セ），瀧井幸男（京都学園大バイオ環境）

13 : 30　　はじめに……°瀧井幸男（京都学園大バイオ環境）
13 : 40　4SY02–1　食の安全と健康を担う乳酸菌……°瀧井幸男（京都学園大バイオ環境）
14 : 10　4SY02–2　人工胃液耐性を有する乳酸菌の抗菌活性……°水田容子（京都学園大学バイオ環境学部）
14 : 40　4SY02–3　漬物由来乳酸菌による GABA 生産と乳酸菌飲料の開発……°上野義栄（京都府中小企業技術セ）
15 : 10　4SY02–4　乳酸菌発酵 GABA の抗ストレス効果と応用……°堀江健二（株式会社ファーマフーズ開発部）
15 : 40　4SY02–5　抗アレルギー作用を有する ***Lactobacillus acidophilus*** **L–92** 株の機能
……°弘田辰彦（カルピス（株)発酵研）

4SY03　細胞骨格とシグナル伝達の理解からがんに迫る

3 月 27 日（水）13 : 30〜16 : 30　A12 会場（講義棟 A1F）
世話人：原田昌彦（東北大院農），木村賢一（岩手大農），片方陽太郎（元弘前大農生科）
座　長：原田昌彦（東北大院農），木村賢一（岩手大農），片方陽太郎（元弘前大農生科）

13 : 30　　はじめに……°原田昌彦（東北大院農）
13 : 35　4SY03–1　細胞骨格および細胞核におけるアクチンファミリーの機能とがん細胞の特徴
……°原田昌彦（東北大院農）
14 : 03　4SY03–2　ケラチノサイトの分化とケラチンの時差的発現調節
……°片方陽太郎[1]，山崎祥他[2]（[1]弘前大院農生，[2]東北大院農）
14 : 31　4SY03–3　微小管ダイナミクスが関わる細胞内シグナル伝達……°臼井健郎（筑波大　生命環境）
14 : 59　4SY03–4　山菜由来の抗がん物質のケミカルバイオロジー……°木村賢一（岩手大農）
15 : 27　4SY03–5　がん細胞と微小環境との相互作用の薬理学的制御……°上原至雅，奥　裕介，西谷直之（岩手医大薬）
15 : 55　4SY03–6　肝がん幹細胞の特性と発現制御による肝がん克服の基礎研究
……°杉山俊博，王　静舒，小代田宗一（秋田大院医）
16 : 23　　おわりに……°木村賢一（岩手大農）

4SY04　高温発酵技術の構築と展望（Development of high-temperature fermentation technology and its prospect）

3月27日（水）13:30～16:10　B11会場（講義棟B1F）
世話人：山田　守（山口大院医），松下一信（山口大農），酒井謙二（九大院農）
座　長：山田　守（山口大院医），松下一信（山口大農），酒井謙二（九大院農）

13:30　**Introduction** ……○Mamoru Yamada（Fac. Agric., and Grad. Sch. Med., Yamaguchi Univ.）

13:40　4SY04–1　**Development of bioethanol production technology at high temperature by thermotolerant yeasts**……○Savitree Limtong[1], Wichien Yongmanitchai[1], Teera Yimyoo[1], Podchamarn Pimpakan[1], Noppon Lertwattanasakul[1], Tomoyuki Kosaka[2], Mamoru Yamada[2,3]（[1]Fac. of Sci., Kasetsart Univ., [2]Fac. of Agr., Yamaguchi Univ., [3]Gra. Sch. of Med., Yamaguchi Univ.）

14:00　4SY04–2　**Potential for simultaneous saccharification and fermentation by the yeast *Kluyveromyces marxianus* that has outstanding abilities in high-temperature fermentation and secretory production**……○Hisashi Hoshida（Yamaguchi Univ.）

14:20　4SY04–3　**Development of commercial rice vinegar production using thermotolerant acetic acid bacteria by fermentation process without cooling system**……○Gunjana Theeragool[1], Wichien Yongmanitchai[1], Wilawan Sintuprapa[2], Kazunobu Matsushita[3]（[1]Fac. of Sci., Kasetsart Univ., [2]Fac. of Agro-ind., Kasetsart Univ., [3]Fac. of Agri., Yamaguchi Univ.）

14:40　4SY04–4　**Development of high temperature L–lactic acid fermentation to recycle total waste biomass**……○Kenji Sakai[1], Yukihiro Tashiro[1], Vichien Kitpreechavanish[2], Vichai Leelavatcharamas[3], Xuan Vo-Tong[4]（[1]Kyushu Univ., [2]Kasetsart Univ., [3]KhonKaen Univ., [4]TanTao Univ.）

15:00　4SY04–5　**Development of biohydrogen production process from sago starch under extreme thermophlilic condition**……○Kanthima Phummala[1], Tsuyoshi Imai[1], Rafiani Hasyim[1], Sompong O-Thong[2], Poonsuk Prasertsan[3], Alissara Reungsang[4], Prapaipid Chairattanamanokorn[5]（[1]Gra. Sch. Eng., Yamaguchi Univ., [2]Fac. Sci., Thaksin Univ., [3]Fac. Agro Ind.,Prince of Songkla Univ., [4]Fac. Tech., Khon Kean Univ., [5]Fac. Sci., Kasetsart Univ.）

15:20　4SY04–6　**Process development for thermophilic fermentation of hydrogen and methane from palm oil mill effluent with hythane gas engine testing**……○Poonsuk Prasertsan[1], Sompong O-Thong[2], Thanansak Theppaya[1], Kittinan Maliwan[1], Tsuyoshi Imai[3], Takaya Higuchi[3], Suteera Prasertsan[1]（[1]Prince of Songkla Univ., [2]Thaksin univ., [3]Yamaguchi Univ.）

15:40　4SY04–7　**Optimizing the hydrogen and methane productions from sugarcane juice as the feeding processes in hythane production**……○Alissara Reungsang[1], Sompong O-Thong[2], Mullika Boonmee[1], Tsuyoshi Imai[3], Takaya Higuchi[3]（[1]Khon Kaen Univ., [2]Thaksin univ., [3]Yamaguchi Univ.）

16:00　**Concluding remarks**……○Kazunobu Matsushita（Fac. Agric., Yamaguchi Univ.）

4SY05　神秘の生理活性物質ポリアミン研究の新展開

3 月 27 日（水）13:30～16:10　A15 会場（講義棟 A1F）
世話人：草野友延（東北大院生命科学），鈴木秀之（京都工繊大工芸科学）
座　長：神尾好是（東北大院生命科学），鈴木秀之（京都工繊大工芸科学），草野友延（東北大院生命科学）

13:30　はじめに……°草野友延（東北大院生命科学）
13:35　4SY05–1　大腸菌及び動物細胞におけるポリアミンによる翻訳の効率化機構
……°柏木敬子[1]，五十嵐一衛[2,3]（[1]千葉科学大薬，[2]千葉大院薬，[3]アミンファーマ研究所）
14:00　4SY05–2　好熱菌分岐鎖ポリアミンの生合成、および高温下での翻訳の効率化……°藤原伸介（関西学院大）
14:25　4SY05–3　動物細胞におけるポリアミン恒常性の維持機構–アンチザイムを中心に
……°村井法之（慈恵医大分子生物）
14:50　4SY05–4　細菌細胞壁結合ポリアミンの膜安定化機構と合成制御……°神尾好是（東北大学院生命）
15:15　4SY05–5　細菌のポリアミントランスポーターとその生理的役割
……°鈴木秀之，栗原　新，掛川苑美（京都工繊大工科）
15:40　4SY05–6　植物のパラコート輸送はポリアミントランスポーターによってなされる
……°藤田美紀[1]，篠崎一雄[1]，井内　聖[2]，小林正智[2]
（[1]理研植物科学セ，[2]理研バイオリソースセ）
16:05　おわりに……°鈴木秀之（京都工繊大工科）

4SY06　グリーンポリマー関連酵素における分子機能創出の方法と応用

協　賛　公益社団法人高分子学会，関西バイオポリマー研究会
3 月 27 日（水）13:30～16:40　A16 会場（講義棟 A1F）
世話人：河合富佐子（京都工繊大ナノ・デバイス研セ），田之倉優（東大院農生科），村田幸作（京大院農）
座　長：田之倉優（東大院農生科），根来誠司（兵庫県立大院工），松本謙一郎（北大院工）

13:30　はじめに……°河合富佐子（京都工繊大ナノ・デバイス研セ）
13:35　4SY06–1　リン酸化酵素の先祖返り　～化石ポリマー（ポリリン酸）利用能の産業への応用～
……°河井重幸，中道優介，吉岡　彩，村田幸作（京大院農）
14:05　4SY06–2　結晶性セルロースとキチンを分解する酵素：プロセッシブな加水分解の分子機構とドメイン構造における戦略……°五十嵐圭日子（東大院農生科）
14:35　4SY06–3　耐熱性放線菌由来の万能型ポリエステル分解酵素の構築を目指して
……°河合富佐子（京都工繊大ナノ・デバイス研セ）
15:05　4SY06–4　タンパク質立体構造に基づく酵素の高機能化と人工酵素創出への途
……°田之倉優，宮川拓也（東大院農生科）
15:35　4SY06–5　微生物ポリエステル合成系酵素の機能改変と多元ポリ乳酸の創製
……°松本謙一郎[1]，田口精一[1,2]（[1]北大院工，[2]CREST–JST）
16:05　4SY06–6　ナイロン加水分解酵素の分子設計と生分解性ポリアミド開発への展望
……°根来誠司（兵庫県立大院工）
16:35　おわりに……°田之倉優（東大院農生科）

4SY07　バクテリア・コード：バクテリアの基本 OS とは何か？

3 月 27 日（水）13:30～16:20　A22 会場（講義棟 A2F）
世話人：田中　寛（東工大資源研），和地正明（東工大院生命理工）
座　長：高谷直樹（筑波大生命環境），古園さおり（東大生物工学セ）

13:30　はじめに……°田中　寛（東工大資源研）
13:40　4SY07–1　ストレプトミセス属放線菌のエネルギー代謝と分化の連携
……藤本正浩，高野英晃，°上田賢志（日大生資科）
14:10　4SY07–2　コリネ型細菌の代謝，増殖，細胞分裂……°和地正明（東工大院生命理工）
14:40　4SY07–3　大腸菌における硫黄源の選択的利用機構とシステイン代謝との共役
……°大津巌生，高木博史（奈良先端大バイオ）
15:10　4SY07–4　ゲノムにおける塩基置換の偏り……°西田洋巳（東京大院農）
15:40　4SY07–5　バクテリアの枠組みとは何だろうか……°田中　寛，島田友裕（東工大資源研）
16:10　おわりに……°和地正明（東工大院生命理工）

4SY08　先端テクノロジーが切り拓く食品の機能性評価戦略の新展開

3 月 27 日（水）13:30〜16:30　A20 会場（講義棟 A2F）
世話人：立花宏文（九大院農），榊原陽一（宮崎大農）
座　長：中山　勉（静県大食品栄養），榊原陽一（宮崎大農），馬場健史（阪大院工），内田浩二（名大院生命農学），福崎英一郎（阪大院工），水光正仁（宮崎大農）

13:30　4SY08–1　食品因子感知システムに基づいた食品の機能性評価……°立花宏文（九大院農）
13:50　4SY08–2　超臨界流体テクノロジーのフードメタボロミクスへの応用……°馬場健史（阪大院・工・生命先端）
14:20　4SY08–3　組織内微小領域における機能性食品因子の時空間分解可視化
……°藤村由紀[1]，三浦大典[1]，割石博之[1,2,3]，立花宏文[1,3]
（[1]九大レドックスナビ，[2]九大基教，[3]九大院農）
14:50　4SY08–4　プロテオミクスを基盤とした食品機能性評価……°榊原陽一（宮崎大農）
15:20　4SY08–5　食品機能解析研究とバイオインフォマティクス……°門田幸二（東大院農学生命）
15:50　4SY08–6　レドックス制御を基盤にした食品の機能性評価……°内田浩二（名大院生命農学）

4SY09　ポリフェノールのケミカルバイオロジー最先端

3 月 27 日（水）13:30〜16:55　A25 会場（講義棟 A2F）
世話人：吉田久美（名大院情報科学），上田　実（東北大院理）
座　長：吉田久美（名大院情報科学），上田　実（東北大院理）

13:30　はじめに……°吉田久美（名大院情報科学）
13:35　4SY09–1　効率的カテキンプローブ合成を基盤とする動態解析……°菅　敏幸（静岡県大薬）
14:05　4SY09–2　フラボンおよびオーロン類の多様性指向型位置選択的合成法の開発……°吉田将人（東北大院薬）
14:35　4SY09–3　生物機能解明を目指したアントシアニンの汎用的合成法の開拓
……°尾山公一[1]，近藤忠雄[2]，吉田久美[2]（[1]名大物国セ，[2]名大情報科学）
15:05　休　憩
15:20　4SY09–4　緑茶カテキン **EGCG** のケミカルバイオロジー……°立花宏文（九大院農）
15:50　4SY09–5　^{11}**C**–標識フラボノイド **PET** プローブの合成戦略……°土居久志（理研分子イメージング）
16:20　4SY09–6　ポリフェノールによるアミロイドβの凝集抑制機構
……°入江一浩，佐藤瑞穂，村上一馬（京大院農）
16:50　おわりに……°上田　実（東北大院理）

4SY10　糖鎖修飾技術を基盤とした機能素材創出の新潮流

3 月 27 日（水）13:30〜16:30　C11 会場（講義棟 C1F）
世話人：千葉靖典（産総研生物プロセス），松尾一郎（群馬大院工），清水弘樹（産総研生物プロセス）
座　長：千葉靖典（産総研生物プロセス），松尾一郎（群馬大院工），清水弘樹（産総研生物プロセス）

13:30　はじめに……°千葉靖典（産総研生物プロセス）
13:35　4SY10–1　マイクロ波および酵素を活用した糖鎖生産技術開発研究……°清水弘樹（産総研生物プロセス）
14:05　4SY10–2　糖を分子デバイスの蝶番様部品として活用する……°湯浅英哉（東工大院生命理工）
14:40　4SY10–3　均一な糖タンパク質合成を行うグライコシンターゼの利用研究
……°石田秀樹，羽生正人，熊田純一，石丸　剛，松崎祐二（東京化成工業株式会社）
15:15　4SY10–4　植物二次代謝産物の生合成に関与するグリコシルトランスフェラーゼ
……長友仁寿，伊藤崇充，古謝詠喜，°田口悟朗（信州大繊維）
15:50　4SY10–5　糖鎖修飾リポソームの合成と活用……°石田秀治（岐阜大応生）
16:25　おわりに……°松尾一郎（群馬大院工）

4SY11　微生物の種・系統とはいったい何なのか？ ～爆発するゲノム情報から考える～

3 月 27 日（水）13:30～16:30　B12 会場（講義棟 B1F）
世話人：吉川博文（東京農大応生科），小林一三（東大院新領域創成科），津田雅孝（東北大院生命科学）
座　長：小林一三（東大院新領域創成科学），津田雅孝（東北大院生命科学），吉川博文（東京農大応生科）

13:30　はじめに……°吉川博文（東京農大応生科バイオ）
13:35　4SY11–1　プロローグ……°大島泰郎（共和化工・環境微生物研）
13:45　4SY11–2　生物種固有の GC 含量を持つ進化的背景を探るためのゲノム変異解析
……°吉川博文[1]，明石基洋[1]，志波　優[2]（[1]東京農大応生科バイオ，[2]東京農大ゲノム解析セ）
14:10　4SY11–3　**Resource partitioning and sympatric speciation in ocean bacteria**
……°Eric J. Alm[1,2]（[1]MIT Biological Engineering, [2]Broad Institute）
15:10　4SY11–4　環境メタゲノム解析における微生物種……°津田雅孝（東北大・院生命）
15:35　4SY11–5　系統間の遺伝情報フローとそのバリアー……°小林一三（東大新領域・医科研）
16:00　4SY11–6　ゲノム合成手法によるバクテリア新種のデザイン……°板谷光泰（慶應大学先端生命研）
16:25　総合討論……小林一三[1]，津田雅孝[2]（[1]東大新領域・医科研，[2]東北大院生命科学）

4SY12　MS 解析による農学と医学の融合研究

3 月 27 日（水）13:30～16:40　B13 会場（講義棟 B1F）
世話人：河村幸雄（近畿大院農），瀬藤光利（浜松医大解剖），仲川清隆（東北大院農）
座　長：河村幸雄（近畿大院農），菅原達也（京大院農），仲川清隆（東北大院農）

13:00　はじめに……°河村幸雄（近大院農）
13:05　4SY12–1　**IMS オーバービュー**……°瀬藤光利（浜松医大解剖）
14:10　4SY12–2　**IMS による農作物の機能成分の組織局在解析**……°井上菜穂子（首都大人間健康科学）
14:45　休　憩
14:55　4SY12–3　**IMS による組織内代謝変動の可視化–食品成分動態解析と病理解析への応用**
……°財満信宏，河村幸雄（近大院農）
15:30　4SY12–4　栄養生理作用解明のための食品と生体成分の **LC–MS/MS** 分析
……°仲川清隆，宮澤陽夫（東北大院農）
16:05　4SY12–5　**LC–MS を用いた海洋天然物研究**……°山下まり（東北大院農）
16:40　おわりに……°仲川清隆（東北大院農）

4SY13　微生物・代謝・酵素のユニークかつ重要な機能の解明と応用への展望

3 月 27 日（水）13:30～16:30　C12 会場（講義棟 C1F）
世話人：小林達彦（筑波大・生命環境），西山　真（東大・生物工学セ）
座　長：小林達彦（筑波大・生命環境），西山　真（東大・生物工学セ），中山　亨（東北大・工）

13:30　はじめに……°小林達彦（筑波大・生命環境）
13:35　4SY13–1　酵素のユニークな特性を利用したタンデム型遺伝子増幅技術の開発
……°小林達彦，橋本義輝（筑波大・生命環境）
13:59　4SY13–2　ペプチド化合物の新規生合成マシナリー……°大利　徹（北大院工）
14:23　4SY13–3　アーキアのリジン・アルギニン・ロイシン生合成酵素の構造・機能・進化
……°西山　真（東大生物工学セ）
14:47　4SY13–4　アーキアゲノム上に存在する重複遺伝子の機能解析
……°跡見晴幸[1,3]，粟野知嗣[1]，Anja Wilming[1]，横大路裕介[1]，
青野　陸[1]，佐藤喬章[1,3]，金井　保[1,3]，今中忠行[2,3]
（[1]京大院工，[2]立命館大生命科学，[3]JST, CREST）
15:11　4SY13–5　フラボノイドアグリコンの合成・修飾・脱修飾を介する植物の環境応答制御
……°中山　亨（東北大院工）
15:35　4SY13–6　細菌における高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の生合成と機能……°栗原達夫，川本　純（京大化研）
15:59　4SY13–7　ビジュアル系マイクロバイオロジーの展開：付着から脱離までのバイオフィルム時空間解析
……°野村暢彦[1]，八幡　穣[1,2]（[1]筑波大・生命環境系，[2]マサチューセッツ工科大）
16:23　おわりに……°西山　真（東大生物工学セ）

4SY14　澱粉生合成研究の最前線と変異体米澱粉の産業利用可能性

3 月 27 日（水）13:30～16:30　C15 会場（講義棟 C1F）
世話人：藤田直子（秋田県大生物資源），川越　靖（農業生物資源研），中村保典（秋田県大研究地域貢献）
座　長：藤田直子（秋田県大生物資源），川越　靖（農業生物資源研），中村保典（秋田県大研究地域貢献）

13:30　はじめに……°藤田直子（秋田県大生物資源）
13:40　4SY14–1　変異体米を用いた澱粉生合成メカニズムの解明……°藤田直子（秋田県大生物資源）
14:10　4SY14–2　イネ複粒型澱粉形成の分子機構……°川越　靖（農生資研・植）
14:40　4SY14–3　澱粉合成過程における酵素間相互作用……°中村保典（秋田県立大学）
15:10　4SY14–4　変異体米澱粉の物理化学特性……°髙橋　徹（秋田県総合食品研究センター）
15:40　4SY14–5　変異体米澱粉の食品産業利用可能性……°安東竜一，高田正保（日本食品化工株式会社）
16:10　総合討論，おわりに……°藤田直子（秋田県大生物資源）

4SY15　新規食品素材ピロロキノリンキノン（**PQQ**）の機能探索

3 月 27 日（水）13:30～16:30　B22 会場（講義棟 B2F）
世話人：浦野四郎（芝浦工大ライフサポートテクノロジー研セ），赤川　貢（大阪府大院生命環境）
座　長：浦野四郎（芝浦工大ライフサポートテクノロジー研セ），赤川　貢（大阪府大院生命環境）

13:30　シンポジウム趣旨説明……°赤川　貢（大阪府大院生命環境）
13:35　4SY15–1　**PQQ** の抗酸化作用の化学的な面からの評価……°向井和男（愛媛大理）
14:00　4SY15–2　**PQQ** の脊髄損傷治療への応用
……°福光秀文[1]，平川明弘[1,2]，古川昭栄[1]（[1]岐阜薬大薬，[2]岐阜大学医）
14:25　4SY15–3　**PQQ** の脳機能改善に及ぼす作用
……°金相　希，浦野四郎（芝浦工大ライフサポートテクノロジー研セ）
15:05　4SY15–4　**PQQ** のレドックスサイクリングを介した上皮細胞増殖促進作用
……°赤川　貢（大阪府大院生命環境）
15:30　4SY15–5　**PQQ** の骨代謝における作用と遺伝子発現解析……°橘信二郎，比嘉由美子（琉大農・亜熱生資）
16:00　パネルディスカッション

4SY16　食品におけるメイラード反応の最先端研究と将来展望

共　催　日本メイラード学会
3 月 27 日（水）13:30～16:30　B20 会場（講義棟 B2F）
世話人：早瀬文孝（明大農・農化），村田容常（お茶大院・人間文化創成科学）
座　長：早瀬文孝（明大農・農化），村田容常（お茶大院・人間文化創成科学），大塚　譲（お茶大院・人間文化創成科学）

13:30　はじめに……°早瀬文孝（明大農・農化）
13:35　4SY16–1　新たな低分子メイラード黄色色素……°村田容常（お茶大院・人間文化創成科学）
14:05　4SY16–2　メラノイジンの生成機構とメイラード反応制御因子
……°渡辺寛人[1]，早瀬文孝[2]（[1]明大農・生命科，[2]明大農・農化）
14:35　4SY16–3　味噌の鍵香気成分としてのヒドロキシエチルメチルフラノン（**HEMF**）の生成
……°大畑素子[1]，菅原悦子[2]（[1]北里大獣医，[2]岩手大教育）
15:05　4SY16–4　メイラード反応後期段階生成物の生体応答とその機構
……°永井竜児，白河潤一，大野礼一，諸石成美，永井 美芽（東海大農・バイオサイエンス）
15:35　4SY16–5　メイラード反応生成物の安全性　―アクリルアミドとフラン―……°吉田　充（農研機構・食総研）
16:05　総合討論……°村田容常（お茶大院・人間文化創成科学）

4SY17　糸状菌における次世代酵素生産技術―有用酵素生産を制御する転写制御マシナリーの解明とその応用―

共　催　生物系特定産業技術研究支援センター
3 月 27 日（水）13:30～16:30　B23 会場（講義棟 B2F）
世話人：小林哲夫（名大院生農），阿部敬悦（東北大院農），五味勝也（東北大院農）
座　長：阿部敬悦（東北大院農），川口剛司（阪府大院生環科），小山泰二（キッコーマン）

13:30　4SY17–1　***Aspergillus oryzae* の *β*–マンナン資化系を制御する転写制御因子 ManR の発見とその解析**
……°小川真弘（キッコーマン）

14:00　4SY17–2　***Aspergillus aculeatus* セロビオース応答制御因子 ClbR の機能解析とその応用**
……°谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大院・生環科）

14:30　4SY17–3　**麹菌のカーボンカタボライト抑制マシナリーの機能制御によるアミラーゼ生産向上**
……°五味勝也，田中瑞己，一瀬桜子，新谷尚弘（東北大院農・生物産業創成）

15:00　4SY17–4　**比較ゲノム解析を基にしたトリコデルマ・リーセイ日本型系統樹のセルラーゼ高生産化の解明と転写制御工学を用いた新たな系統樹進化**
……°小笠原渉[1]，志田洋介[1]，森　一樹[2]，久原　哲[2]（[1]長岡技科大 生物，[2]九大農）

15:30　4SY17–5　**麹菌によるバイオマス分解酵素の組換生産　～固体バイオマス上で生育する麹菌の育種を目指して～**
……°秦　洋二（月桂冠総合研究所）

16:00　4SY17–6　**バイオマス分解酵素遺伝子群の転写制御マシナリーの解明とその応用**……°小林哲夫（名大院生農）

4SY18　生命の根源物質アミノレブリン酸が拓く，健康・農業・医療への多様な応用の最前線

3 月 27 日（水）13:30～16:20　B14 会場（講義棟 B1F）
世話人：千葉櫻拓（東京農大応生科），田中　徹（SBI ファーマ(株)）
座　長：小倉俊一郎（東工大フロンティア研機），田中　徹（SBI ファーマ(株)），千葉櫻拓（東京農大応生科）

13:30　**はじめに**……°田中　徹（SBI ファーマ株式会社）

13:33　4SY18–1　**生命の根源物質 5–アミノレブリン酸（ALA）　―幅広い応用の可能性―**
……°田中　徹（SBI ファーマ株式会社）

13:45　4SY18–2　**アミノレブリン酸を骨格構造としたポルホビリノーゲン合成酵素阻害剤**
……°岩井伯隆（東工大院生命）

14:05　4SY18–3　**ALA の農業利用技術開発**……°渡辺圭太郎（コスモ石油株式会社）

14:25　4SY18–4　**癌特異的 ALA 誘導性 Protoporphyrin の蓄積：酵素，遺伝子発現および物質輸送からの検討**
……°竹谷　茂（京都工芸繊維大学応生）

14:45　4SY18–5　**5–アミノレブリン酸の育毛分野における可能性**……°松崎　貴（島根大生物資源）

15:05　4SY18–6　**栄養代謝における 5–アミノレブリン酸の生理作用**
……°木戸康博[1]，島村康弘[1]，松田学子[2]，堀ノ内泉[2]，土屋京子[3]，宮成節子[4]，小林ゆき子[1]，桑波田雅士[1]
（[1]京都府立大学，[2]BIT，[3]SBI ファーマ株式会社，[4]コスモ石油株式会社）

15:25　4SY18–7　**5–アミノレブリン酸を用いたがんのスクリーニングと好気代謝の亢進**
……°小倉俊一郎[1]，萩谷祐一郎[1]，杉山雄太[1]，井上啓史[2]，中島元夫[3]，田中　徹[3]
（[1]東工大院生命，[2]高知大医泌尿器，[3]SBI ファーマ）

15:45　4SY18–8　**5–アミノレブリン酸(ALA)による光力学技術を用いた対癌新戦略**
……°井上啓史[1]，福原秀雄[1]，執印太郎[1]，倉林　睦[2]，降幡睦夫[2]，渡邊裕修[3]，谷村正信[4]，小倉俊一郎[5]，石塚昌宏[6]，田中　徹[6]
（[1]高知大学医学部泌尿器科学，[2]高知大学医学部病理学，[3]独立行政法人国立病院機構 高知病院泌尿器科，[4]社会医療法人近森会 近森病院 泌尿器科，[5]東京工業大学 フロンティア研究機構生体代謝工学，[6]SBI ファーマ株式会社）

16:05　4SY18–9　**5–アミノレブリン酸による温熱条件下でのがん細胞死増強作用**
……°千葉櫻拓[1]，鳥谷部唯[1]，高橋　究[2]，川上茉利子[1]，芳賀葉月[1]，小倉俊一郎[3]，安部史紀[2]，中島元夫[2]，吉川博文[1]，田中　徹[2]
（[1]東京農大・応生科・バイオ，[2]SBI ファーマ(株)，[3]東工大・フロンティア研機）

16:17　**おわりに**……°千葉櫻拓（東京農大・応生科・バイオ）

4SY19 「第二世代バイオ燃料」研究の潮流と最先端オミクス解析の活用による新展開

3 月 27 日（水）13:30～16:45　B24 会場（講義棟 B2F）
世話人：高木博史（奈良先端大バイオ），新城雅子（ジーンデータ(株)）
座　長：新城雅子（ジーンデータ(株)），高木博史（奈良先端大バイオ），出村　拓（奈良先端大バイオ），高木　忍（ノボザイムズジャパン研究開発部門），乾　将行（RITE バイオ），早出広司（東京農工大院工，科技振興機構 CREST），蓮沼誠久（神戸大自，科技振興機構さきがけ）

13:30　はじめに……°新城雅子（ジーンデータ(株)）
13:35　4SY19–1　バイオエタノール生産に向けたオミクス解析の研究動向とストレス耐性酵母の育種
……°高木博史（奈良先端大バイオ）
14:00　4SY19–2　木質バイオマスの高生産に向けた早生樹木のゲノム育種
……°出村　拓[1,2]（[1]奈良先端大バイオ，[2]理研 BMEP）
14:25　4SY19–3　糸状菌のバイオマス変換用セルラーゼ開発におけるオミクスの利用
……°高木　忍（ノボザイムズジャパン研究開発部門）
14:50　4SY19–4　代謝工学を駆使したコリネ型細菌によるバイオ燃料生産……°乾　将行（RITE バイオ）
15:15　4SY19–5　シアノファクトリ™ ～海洋シアノバクテリアを用いるバイオ燃料関連化合物生産システムの提案～
……°早出広司[1,2]（[1]東京農工大院工，[2]科技振興機構 CREST）
15:40　4SY19–6　微細藻バイオリファイナリーに資する動的代謝プロファイリング解析
……°蓮沼誠久[1,2]（[1]神戸大自，[2]科技振興機構さきがけ）
16:05　4SY19–7　コンピュータ ソリューション **Genedata Selector™**：バイオ燃料研究開発における生産菌と生産プロセス最適化に向けた統合オミクス解析と可視化
……°新城雅子[1]，Hans-Peter Fischer[2]，Thomas Hartsch[2]，Ludwig Macko[2]，Sebastien Ribrioux[2]，Julia Retey[2]，Niko Bausch[2]，下広英樹[1]，森脇香織[1]
([1]ジーンデータ(株)，[2]Genedata AG)
16:30　総合討論，おわりに……°高木博史（奈良先端大バイオ）

4SY20　超活性天然物とケミカルバイオロジーへの応用

3 月 27 日（水）13:30～16:45　A37 会場（講義棟 A3F）
世話人：山下まり（東北大院農），桑原重文（東北大院農），此木敬一（東北大院農）
座　長：山下まり（東北大院農），橋本　勝（弘前大農生），岡田正弘（中部大応生），此木敬一（東北大院農），桑原重文（東北大院農）

13:30　4SY20–1　シガテラをとおして見る渦鞭毛藻の世界［大会実行委員会企画特別講演］
……°安元　健（日本食品分析センター）
14:10　4SY20–2　フェアリーリング(妖精の輪)の妖精の正体と農業への応用の可能性……°河岸洋和（静大院創造）
14:40　4SY20–3　記憶改善効果を示すステロイド配糖体の創製……°小鹿　一（名大院生命農）
15:10　4SY20–4　天然生物活性機構に携わる新奇な共役イミン反応性の検証と展開……°田中克典（理研基幹研）
15:40　4SY20–5　巨大複雑ポリエーテル天然物の全合成と機能解析……°佐々木誠（東北大院生命科学）
16:10　4SY20–6　ケミカルバイオロジーへの有機合成化学からのアプローチ……°渡邉秀典（東大院農）
16:40　おわりに……°桑原重文（東北大院農）

4SY21　アーキア研究から見える遺伝情報伝達系の保存性と多様性

3 月 27 日（水）13:30〜16:30　C16 会場（講義棟 C1F）
世話人：木村　誠（九大院農），石野良純（九大院農）
座　長：木村　誠（九大院農），石野良純（九大院農）

13:30　はじめに……°石野良純（九大院農）
13:35　4SY21–1　超好熱性アーキア **DNA** 複製因子に見られる多様性……°石野良純（九大院農）
14:03　4SY21–2　古細菌 **D**–ファミリー **DNA** ポリメラーゼのサブユニット **N**–末端領域に保存されるドメイン構造の重要性……°松井郁夫[1]，漆畑祐司[1]，松井えり子[1]，山崎和彦[1]，横山英志[2]
（[1]産総研バイオメディカル，[2]静岡県立大薬）
14:31　4SY21–3　超好熱性アーキアの環境適応に関わる転写調節因子の解析
……°金井　保[1,3]，武富尚吾[1]，小谷　徹[1]，釜下知之[1]，中之庄正弘[1]，今中忠行[2,3]，跡見晴幸[1,3]
（[1]京大院工，[2]立命館大生命科学，[3]科学技術振興機構，CREST）
14:59　4SY21–4　アーキアにおける **tRNA** 遺伝子の多様性と進化……°金井昭夫（慶應大先端生命研）
15:27　4SY21–5　超好熱性アーキアリボ核タンパク質酵素の活性化と耐熱性の分子基盤……°木村　誠（九大院農）
15:55　4SY21–6　超好熱性アーキアの反応系を用いて見えてきたリボソームの翻訳因子リクルート機構
……°内海利男[1]，鈴木隆寛[1]，本田貴嘉[1]，馬場健太朗[1]，田中　勲[2]，姚　閔[2]
（[1]新潟大理，[2]北大生命科学院）
16:23　まとめ……°木村　誠（九大院農）

4SY22　食スタイルの分子生物学ー不活動症候群（寝たきり），シフト・ワーカーは何をどのように食べたらよいのか

3 月 27 日（水）13:30〜16:35　B21 会場（講義棟 B2F）
世話人：小田裕昭（名大院生命農学），二川　健（徳島大院 HBS 研究部）
座　長：小田裕昭（名大院生命農学），二川　健（徳島大院 HBS 研究部）

13:30　はじめに……°小田裕昭（名古屋大院生命農学）
13:35　4SY22–1　**Unloading** による筋萎縮の治療に有効な栄養法の開発……°二川　健（徳島大院 HBS 研究部）
14:05　4SY22–2　食品因子による廃用性筋萎縮予防へのアプローチ……°寺尾純二（徳島大院 HBS 研究部）
14:35　4SY22–3　寝たきり状態によって引き起こされる代謝異常　―トランスクリプトーム，メタボロームによる網羅的解析―……°小田裕昭（名古屋大院生命農学）
15:00　4SY22–4　**Time of eating determines metabolic diseases**
……°Satchidananda Panda, Megumi Hatori, Christopher Vollmers（Salk Institute）
15:30　4SY22–5　時間栄養学視点での食習慣研究……°高瀬秀人（花王株式会社）
16:00　4SY22–6　乱れた体内時計を調節する食品因子の探索……°大池秀明，小堀真珠子（農研機構/食品総合研究所）
16:30　おわりに……°二川　健（徳島大院 HBS 研究部）

4SY23　グラム陰性細菌細胞表層構造の形成機構とバイオテクノロジー

3 月 27 日（水）13 : 30～16 : 30　C21 会場（講義棟 C2F）
世話人：成田新一郎（京大ウイルス研），西山賢一（岩手大寒冷バイオ）
座　長：成田新一郎（京大ウイルス研），西山賢一（岩手大寒冷バイオ）

13 : 30　4SY23–1　**大腸菌のタンパク質膜挿入に必須の糖脂質酵素（glycolipozyme）MPIase の構造と機能**
……°西山賢一（岩手大寒冷バイオ）

13 : 55　4SY23–2　**多彩な機能を有するリポ蛋白質の膜局在化を触媒する Lol 経路**……°徳田　元（盛岡大栄養科学）

14 : 20　4SY23–3　**体腔依存多糖取り込み ABC トランスポーターの構造機能相関とその応用**
……°橋本　渉，丸山如江，三上文三，村田幸作（京大院農）

14 : 45　4SY23–4　**大腸菌ペリプラズム空間での LPS の輸送は細胞質での ATP 加水分解エネルギーによって駆動される**……°奥田　傑，Daniel Kahne（ハーバード大）

15 : 00　4SY23–5　**大腸菌 β バレル型膜タンパク質の生合成に関わる BepA（YfgC）の機能解析**
……°成田新一郎[1]，鈴木健裕[2]，堂前　直[2]，秋山芳展[1]（[1]京大ウイルス研，[2]理研基幹研）

15 : 15　4SY23–6　**大腸菌のシグマ E 依存性プログラム死と長期定常期**
……°山田　守[1,2]，村田正之[1]，長光博史[1]，川口純平[1]，高坂智之[2]
（[1]山口大院医，[2]山口大農）

15 : 40　4SY23–7　**緑膿菌の多剤排出ポンプを構成するリポタンパク質の Tat 系を介する機能的発現**
……°米山　裕（東北大院農）

16 : 05　4SY23–8　***Corynebacterium glutamicum* を用いたタンパク質分泌生産系（CORYNEX®）の応用展開～細胞表層構造の改変による異種タンパク質分泌生産量の向上～**
……°松田吉彦[1]，和地正明[2]，菊池慶実[1]
（[1]味の素（株）イノベーション研究所，[2]東工大院生命理工）

16 : 25　**おわりに**……°成田新一郎（京大ウイルス研）

4SY24　プロバイオティクスの機能評価と新展開　―ヒトの健康と疾病予防を支える乳酸菌とビフィズス菌―

共　催　日本乳酸菌学会，日本酪農科学会
3 月 27 日（水）13 : 30～16 : 35　A41 会場（講義棟 A4F）
世話人：齋藤忠夫（東北大院農），横田　篤（北大院農）
座　長：横田　篤（北大院農），齋藤忠夫（東北大院農）

13 : 30　**はじめに**……°齋藤忠夫（東北大院農）

13 : 35　4SY24–1　**乳酸菌バクテリオシン（ナイシンとガセリシン）の機能特性と最新知見**
……°川井　泰，郭　暁艶，水谷　陽，鈴木はるか，齋藤忠夫（東北大院農）

14 : 00　4SY24–2　**1073R–1 乳酸菌が産生する多糖体の免疫賦活作用と感染防御効果**
……°牧野聖也[1]，池上秀二[1]，伊藤裕之[1]，永井隆之[2,3]，山田陽城[2,3]
（[1]（株）明治食機能研，[2]北里大生命研，[3]北里大院感染制御）

14 : 25　4SY24–3　**妊婦・乳幼児におけるビフィズス菌投与によるアレルギー発症予防効果　―和歌山県での試験結果―**
……°清水（肖）金忠[1]，榎本雅夫[2]（[1]森永乳業株式会社，[2]NPO 日本健康増進支援機構）

14 : 50　4SY24–4　***Lactobacillus gasseri* SBT2055 株（ガセリ菌 SP 株）の生理機能について**
……°瀬戸泰幸（雪印メグミルク（株）ミルクサイエンス研）

15 : 15　4SY24–5　**植物性食品由来，*L.brevis* KB290 のゲノム安定性，機能性，酵素活性における新知見**
……°矢嶋信浩（カゴメ株式会社総合研究所）

15 : 40　4SY24–6　**乳酸菌における血圧降下ペプチドの生産制御と生体作用の解析**
……°山本直之（カルピス株式会社　研究戦略部）

16 : 05　4SY24–7　**プロバイオティクス機能の分子機構解明に向けたビフィズス菌の遺伝子欠損導入系の開発**
……°吹谷　智，平山洋佑，横田　篤（北大院農・応生科）

16 : 30　**おわりに**……°横田　篤（北大院農・応生科）

4SY25　バイオミネラリゼーション研究の新展開：ゲノム研究から融合マテリアル研究まで

3 月 27 日（水）13:30～16:50　C22 会場（講義棟 C2F）
世話人：小川智久（東北大院生命），鈴木道生（東大院農学生命）
座　長：小川智久（東北大院生命），鈴木道生（東大院農学生命）

13:30　はじめに……°小川智久（東北大院生命）
13:35　4SY25–1　バイオミネラリゼーション：ゲノムの解読とその応用……°佐藤矩行（沖縄科学技術大学院大学）
14:15　4SY25–2　有機・無機ハイブリッド構造を持つ貝殻真珠層の形成に関与する基質タンパク質の機能と分子進化
……°鈴木 道生[1]，小暮 敏博[2]，長澤 寛道[1]（[1]東大院農，[2]東大院理）
14:40　4SY25–3　バイオミネラリゼーションでの結晶成長“その場”観察
……°塚本勝男[1]，荒木優希[1]，吉崎　泉[2]，山田啓文[3]，佐藤久夫[4]
（[1]東北大院理，[2]JAXA，[3]京大院工，[4]三菱マテリアル）
15:10　4SY25–4　マベ真珠バイオミネラリゼーションの分子機構と機能性材料への応用
……°小川智久（東北大院生命）
15:35　4SY25–5　バイオミネラリゼーションに倣いそれを超える機能材料構築へのアプローチ
……°加藤隆史（東大院工）
16:15　4SY25–6　磁性細菌における酸化鉄磁気微粒子の形態制御機構……°新垣篤史（農工大院工）
16:45　おわりに……°鈴木道生（東大院農）

4SY26　ものをつくり出す力ー有機化合物創製の新戦略とその活用・実践法

3 月 27 日（水）13:30～16:30　C25 会場（講義棟 C2F）
世話人：石神　健（東大院農学生命），矢島　新（東京農大応生科），田代卓哉（理研免疫・アレルギー総研セ）
座　長：石神　健（東大院農学生命），矢島　新（東京農大応生科），田代卓哉（理研免疫・アレルギー総研セ）

13:30　はじめに……°石神　健（東大院農生科応生工）
13:35　4SY26–1　マイクロフロー合成法を駆使する高効率天然物合成……°布施新一郎（東工大院理工）
14:10　4SY26–2　組換え微生物を利用した新規物質創製……°勝山陽平，大西康夫（東大院農生科応生工）
14:45　4SY26–3　二相溶液系による有機化合物創製 の新展開……°千葉一裕（東京農工大院農）
15:20　4SY26–4　**In silico** 合成経路開発　―量子化学計算に支援された合成経路開発―
……°堀　憲次，隅本倫徳，山本豪紀（山口大院理工）
15:55　4SY26–5　世界最大の海産物中毒と化学のインターフェイス……°平間正博（東北大院理）

4SY27　薬剤耐性とその克服へのアプローチ

3 月 27 日（水）13:30～16:30　C20 会場（講義棟 C2F）
世話人：内海龍太郎（近畿大農），五十嵐雅之（微化研）
座　長：内海龍太郎（近畿大農），五十嵐雅之（微化研），江口陽子（近畿大農）

13:30　はじめに……°内海龍太郎（近畿大院農）
13:35　4SY27–1　微生物由来の新しい抗感染症剤の開拓とその標的分子の解析 …小山信裕，°供田　洋（北里大院薬）
14:00　4SY27–2　“リバースアンチビオティックスの発見”，薬剤耐性克服への可能性
……°五十嵐雅之[1]，平松啓一[2]（[1]微化研，[2]順天堂）
14:25　4SY27–3　細菌情報伝達阻害型薬剤の開発……°内海龍太郎[1]，五十嵐雅之[2]（[1]近畿大院農，[2]微化研）
14:50　4SY27–4　細菌の病原性を標的とする多剤排出ポンプを利用した新規スクリーニング系の構築
……°米山　裕（東北大院農）
15:15　4SY27–5　サルモネラ菌の病原性制御と応用展開
……°加藤明宣[1]，Groisman, Eduardo[2]（[1]近畿大院農，[2]イェール大医，HHMI）
15:40　4SY27–6　**QseC inhibitors as anti-virulence drugs**
……°Vanessa Sperandio（UT Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA）

4SY28　イソプレノイドの酵素化学と生理機能

3 月 27 日（水）13:30〜16:30　C26 会場（講義棟 C2F）
世話人：川向　誠（島根大生資），邊見　久（名大院生命農学），岡田憲典（東大生物工学セ）
座　長：1–3 川向　誠（島根大生資），4–5 岡田憲典（東大生物工学セ），6–8 邊見　久（名大院生命農学）

13:30　はじめに……°川向　誠（島根大生資）
13:32　4SY28–1　細菌由来の新型および多機能性テルペン合成酵素の探索……°佐藤　努（新潟大院自然・農）
13:54　4SY28–2　タイプ 2 イソペンテニルニリン酸イソメラーゼにおけるフラビン補酵素の触媒機能
……°邊見　久（名大院生命農）
14:16　4SY28–3　放線菌由来ジテルペン環化酵素の反応機構と構造……°葛山智久（東大生物工学セ）
14:38　4SY28–4　プレニル鎖の伸長や修飾に関わる酵素の構造機能解析
……°藤橋雅宏，佐々木大輔，三木邦夫（京大院理）
15:00　4SY28–5　コエンザイム Q の生合成と多機能性……°川向　誠（島根大生資）
15:22　4SY28–6　メナキノン–4（MK–4）変換生成の意義とビタミン K 同族体の生理機能
……°駒井三千夫，白川　仁（東北大院農）
15:44　4SY28–7　コレステロール合成でのドリコイン酸の関与……°佐上　博（東北大多元研）
16:06　4SY28–8　植物における抗菌性イソプレノイドの生理と生産制御機構
……°岡田憲典[1]，宮本皓司[1]，山根久和[2]
（[1]東大生物工学セ，[2]帝京大学理工学部）
16:28　おわりに……°邊見　久（名大院生命農）

講演番号：4SY01-A1
講演日時、会場：3 月 27 日 9:55～ M 校舎 26 会場

福島第一原子力発電所事故によって生じたウシの体内における放射性物質の動態

Internal Distribution of Artificial Radionuclides in Abandoned Cattle in the Evacuation Zone of the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant

○福田 智一、被災動物線量評価グループ 被災動物線量評価グループ(東北大院農)
○TOMOKAZU FUKUDA,Research Group of Abandoned Animal Research Group of Abandoned Animal(Tohoku Univ.)

2011 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災によって東京電力福島第一原子力発電所事故が発生、環境中に大量の放射性物質が放出された。事故後に福島第一原子力発電所を中心に 20km の範囲で警戒区域が設定され、人の立ち入りが大きく制限された。その結果、警戒区域内で飼養されていたウシ、ブタなどの家畜類が畜舎から離れ、野生化するに至った。これらの家畜類の体内には警戒区域内で自由に活動し、体内に多くの放射性物質が蓄積していると考えられる。既にこれらの家畜類は食用に供することは出来ないが、我々はそれらの家畜類、特にウシにおいて体内の放射性物質の分布と動態を調べることで、放射性物質による内部被曝の基礎データになり得ると考えた。我々は放射性物質の体内における活性を検出するため、20km の警戒区域内に生息する離れウシの臓器における放射性物質の濃度を解析した。全ての採取された臓器において Cs-134 および Cs-137 が検出された。加えて Ag-110m の肝臓特異的、Te-129m の腎臓特異的な沈着が検出された。さらに回帰分析によって、血液中の Cs-137 の濃度は臓器中の Cs-137 と強い相関を示し、血液中の Cs-137 の濃度から臓器中の Cs-137 の濃度を推定できる可能性が示された。ウシの体内における Cs-137 の濃度は地理的条件および飼養条件によって大きく変動していた。我々の研究は福島第一原子力発電所事故によって生じた被災家畜の内部被曝の内部被曝の詳細を明らかにし、放射性物質の体内における動態の基礎データとなる。

Radionuclides, Abandoned Cattle, Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant

講演番号：4SY01-A2
講演日時、会場：3 月 27 日 10:25～ M 校舎 26 会場

農地土壌に対する津波と放射性物質の影響

Effects of tsunami and radioactive cesium on farmlands

○南條 正巳(東北大院農)
○Masami Nanzyo(Tohoku Univ.)

2011 年 3 月 11 日午後、大地震に続いて、大津波が東日本沿岸を襲った。さらにその大津波は東京電力福島第 1 原子力発電所（原発）の事故を引き起こし、大量の放射性物質が環境中に放出された。これら一連の大震災は農地にも大きな被害を与えた。ここでは農地土壌に対する津波と放射性物質の影響について検討状況を報告する。

津波の影響を受けた農地の大部分は水田であった。その津波の影響は土壌の侵食、津波の運んだ瓦礫や土砂の堆積、塩濃度の上昇、海水と農地土壌の間のイオン交換、乾燥時の沈殿生成などである。土壌の浸食は津波が道路や畦などの微高地を超えて落ちた所で強かった。特に海岸から 1 km 弱の所で海岸と平行する道路を津波が超えた所では水田の鋤床層の下まで土壌が抉られた。その他の農地では、耕起済みの場合、多くの作土が流された。これに対して、耕起前の水田では稲株が立っている所が多く、侵食は少なかった。これらの土壌の上に津波の運んだ砂と泥が堆積した。砂は海岸側で多く、泥は津波侵入域の中ほどで多かった。そして、砂が先に沈み、その上に泥が堆積する傾向であった。また、場所により大きく変化するが、瓦礫やゴミがこれらの上に散乱した。海水の土壌に対する主な化学的影響は塩濃度の上昇と交換性ナトリウムの増加である。乾燥時には、農地に滞留した海水が干上がり、表面に塩類が析出した。その塩類は主に塩化ナトリウムと石コウであった。排水がよい場所では降雨により次第に塩化ナトリウムは除去されたが、排水不良地域では除塩が遅れた。津波堆積物のイオウ濃度は石コウの沈殿に一部では硫化物の流入も加わったと見られ、元の土壌に比べて大きく増加した。硫化物は酸化すると酸性化が懸念されるが、津波堆積物の多くは除去されたため、その後の作物栽培に大きな影響は出にくいと考えられる。交換性ナトリウムは交換性イオン全体の半分以下であり、物理性悪化の度合いは大きくなかったが、真水による除塩過程では減少しにくい。

原発事故による放射性物質の汚染は東北中部から関東さらには東海地方の一部まで広がった。セシウムイオンは土壌のイオン交換基、特に雲母鉱物の楔形に風化した部位に強く保持されると見られ、土壌の表層付近に多く留まっている。作物への移行も土壌の濃度に比べれば極めて低いが、土壌による保持は完全な固定ではなく、一部は脱着しうる。また、土壌自身がかく乱、侵食されれば、土壌と一緒に放射性セシウムは移動する。作物への放射性セシウムの移行の度合いは作物の種類や特性によっても異なる。土壌中に交換性カリウムが少ないと、放射性セシウムが稲に多く移行する傾向が認められている。

tsunami, radioactive Cs, soil

講演番号：4SY01-A3
講演日時、会場：3 月 27 日 10:55～ M 校舎 26 会場

福島における放射性セシウムの土壌中の挙動と稲への移行

Migration of radio cesium in soil and its transfer to rice in Fukushima

○塩沢 昌(東京大院農)
○Sho Shiozawa(Univ. of Tokyo)

原発事故で土壌表面に降下した放射性セシウム（Cs）の水の浸透に伴うわずかな移動量を測定するために、土壌サンプリングによる放射能測定とともに、シンチレーションサーベイメータに側面にのみスリット窓をもつ鉛のコリメータを取り付け、土中に打ち込んだ塩ビパイプ内で水平方向からのみ入射するガンマ線強度の鉛直分布を測定し、この二時点のガンマ線強度分布の重心位置の差から Cs の平均移動距離を求める方法を開発して福島県でモニタリングを行ってきた。その結果明らかになったのは、2011 年 3 月に土壌表面に降下した Cs は、同年 6 月上～中旬までの 2～3 ヶ月間は降雨浸透によって予想外に速く移動した（1.5～3cm、水分子の移動距離との比が R=1/10～1/20）が、その後、移動速度が一桁低下している（R=1/100～1/300）という事実であり、Cs の粘土粒子への強い固定は現場において数ヶ月程度の時間を要するプロセスであったということである。Cs の土壌への固定は、当初の 2～3 ヶ月間は、まだ交換性陽イオンとして土粒子に弱く固定される割合が多く、水とともに移動しやすかったと同時に植物の根からも吸収されやすかったが、その後、粘土粒子（2:1 型層状珪酸塩）への強い固定が進んで植物から吸収されにくくなったと考えられる。

2011 年に、玄米 500bq/kg 越えの水田または移行係数が大きい（約 0.1 かそれ以上の）水田に共通する特徴は、(1) Cs 降下時に水田表面を有機物が覆っていたと考えられる（有機物の実体は、雑草（粘質土の水田）、落ち葉や（砂質土の山間水田）海洋性有機物（津波を受けた水田）起源の腐植物質など）；(2)近接水田と比較しても浸透量の非常に少ない排水不良田；である。浸透量が少ないことは用水量が少なく用水に解けて外部から供給されるカリウムが少ないこと、および還元状態のために有機物の分解が遅いことを意味する。雑草ポットに Cs-137 を撒布する実験により、雑草地上部に多量に Cs が直接付着し模擬の雨で流されないこと、これをすき込んで稲を栽培したポットは、土壌に Cs を注入したポットの稲の 2 倍の Cs を吸収した。はじめに土壌表面の有機物に多量に固定された Cs は、土粒子への強い固定が妨げられこれが遅れ、2011 年の夏に有機物の分解に伴ってイオン化して近接する根に吸収されたと考えられる。この有機物は既に分解が進んで Cs の粘土粒子への強い固定が進み、予想どおり、2012 年の稲への移行は大幅に減少した。

用水経由の水田への Cs 流入は、稲への移行に影響する量ではなく問題にならない。Cs は土壌や有機物に固定され、土壌被覆の土地（森や農地）からは流出しにくいことが大きな特徴である。

radiocesium, paddy field, transfer coefficient

講演番号：4SY01-A4
講演日時、会場：3 月 27 日 11:25～ M 校舎 26 会場

高分子膜を活用した持続的農業
Sustainable Agriculture using Polymeric Membrane

○森 有一(メビオール株式会社)
○Yuichi Mori(Mebiol Inc.)

我々は、土の代わりにハイドロゲルと膜の機能を併せ持つ“ハイドロメンブラン”と呼ばれるフィルム上で作物を栽培する技術（アイメック）を開発した。“ハイドロメンブラン”（フィルムと呼ぶ）は以下の特徴を有している。1）フィルムは養液のみを吸収し、菌、ウイルスなどを排除するために、作物は病気になり難く、農薬が大幅に削減され、安全性が担保される、2）フィルムは養液を内部に吸い込むものの、外部には放出しないために、作物は膨大な毛根をフィルム表面に強固に接着させ、糖分、アミノ酸などを大量に合成し、正浸透現象を利用し内部の養液を摂取する。したがって高栄養化する、3）農業のマニュアル化の最大のハードルは正体不明の土である。工業製品であるフィルムは均一性、再現性が高く、マニュアル化を可能にすると同時に、土、水などの天然資源と違って製造コストは生産量と共に大幅に低下する、などである。

“ハイドロメンブラン”を用いた栽培システムは大地と隔離する止水シートおよびフィルムの下と上から養液を供給するための点滴チューブから成っていて、簡便、安価、ポータブルである。システムの特徴を以下に記す。1）すでに述べたようにフィルムを介して作物に養液を供給することにより栄養価、安全性は高まるものの、生長は遅い、そこでフィルムの上からも養液を供給し生長を促進する。毛根が発達しているために少量の養液で効率よく生長する。2）止水シートによって大地と完全に隔離されているために供給された養液は外部に流亡せず、すべて作物に摂取され、水、肥料の大幅な削減になると同時に、肥料、農薬などによる土壌、地下水汚染も防げる。更に止水シートによって土壌汚染（有害微生物、残留農薬、塩分、ヘドロ、放射性物質など）が深刻な農地、あるいは農業ができない砂漠、コンクリート、ツンドラ地帯などでも安全、高品質の作物を安定して生産できる。

現在、アイメックによるトマト生産の施設数は 60 ヶ所を超え、総栽培面積は 100,000m2 超に急拡大している。この理由として、1）農業の全くの素人でも 1 年程度で高糖度トマトが生産できる、2）消費者の安全性、高栄養価志向が高まっている、などが考えられる。

アイメックは世界初の技術であり、世界 127 ヶ国に特許を出願中であり、既に 40 ヶ国以上で特許が成立している。アイメックは水不足、土壌劣化が深刻な地域に向いていて、ドバイの砂漠でアイメックトマトの栽培に成功し、Agricel社（http://www.agricel.co/）がドバイに設立され、中東、インドなどに展開中である。国内では、東日本大震災に被災した農地の復旧に本技術の活用が期待されている（http://tedxtokyo.com/ja/tedxtokyo-2011/program/dr-yuichi-mori/。

sustainable agriculture, Hydromembrane, Imec

講演番号：4SY01-P1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:35～ M 校舎 26 会場

被災地調査からの報告と震災復興に向けた課題
Earthquake and Tsunami Damage to Matsushima Bay and Some Issues towards Environment Rehabilitation beyond Disaster

○西村 修(東北大院工)
○Osamu Nishimura(Tohoku Univ.)

2011 年 3 月 11 日に発生した東北地方太平洋沖地震はマグニチュード 9.0 と日本観測史上における最大の巨大地震であり，沿岸域では発生した大津波により壊滅的な被害がもたらされた．宮城県沿岸域にある下水処理場も沿岸域を中心に停電や浸水，施設破損により稼働停止に陥り，震災後 1 年半以上経て未だ機能の完全復旧には至っていない．従前の放流水より水質が悪い状態が続いており，放流先の水質，底質および生態系影響が懸念されるところである．

東日本大震災による甚大な被害で宮城県は一時的に平成23年度の海域環境モニタリングの中止を余儀なくされた．これをふまえて，宮城県と東北大学が協力し松島湾の緊急調査を行った．湾奥の港橋，西浜では震災前に比べて COD が上昇し，震災前（平成 21 年度）の平均は 0.7mg/L であったのに対して，5 月では 4.2，3.6mg/L で環境基準を超過する値を検出した．また大腸菌群数，糞便性大腸菌群数も極めて高い値を示し，震災前（平成 21 年度）の港橋の大腸菌群数は平均 16,000MPN/100mL であったのに対して,5 月には 48,000MPN/100mL と 3 倍の値を記録した．しかし，7 月には 930，9 月には 1500MPN/100mL と低下した．なお，糞便性大腸菌群数は 5，7，9 月にかけて 4,900，600，204cfu/100mL と仙塩浄化センターの浄化機能回復にともない低減した．

底生動物は震災直後，港橋，西浜，桂島西において H11 年に調査された値よりも激減したが，松島海岸沖においては H11 年とほぼ同様に 100 個体以上が検出された．内訳としては，H11 年の調査においては環形動物が 8 割以上を示していたのに対し，震災後の港橋，西浜，桂島西では軟体動物の割合が約 5 割に上昇し，一方個体数に変化がなかった松島海岸沖では震災前と同様に環形動物が優占していた．

また藻場に関しては，震災前には湾の東部を中心に約 22 万m^2のアマモ場と，湾入り口から中央部にかけて 17 万m^2のガラ藻場が存在していたが，湾奥部の砂泥質の底質に広く分布していたアマモ場がほぼ壊滅的な被害を受けて消滅していることがわかった．また，岩礁や転石に付着して生育するガラ藻場の被害はアマモ場に比べれば軽微で，特にアカモクなどのホンダワラ類の藻場は，分布域に大きな差は認められず，震災以前より広く分布していた箇所も見られた．

以上のように，東日本大震災によって松島湾の水質，底質，生物・生態系は激変し，一部は回復し，一部は回復せず今日に至っている．現在仙塩浄化センターは 50%程度機能を回復し，平成 24 年 12 月には完全復旧（汚泥処理施設を除き）の予定である．これによって着実に水質改善が図られるものと思われるが，さらに陸域とあわせて激変した沿岸域の環境を速やかに修復し，有害化学物質や放射性物質汚染による二次的被害を防ぐためにバイオ・エコテクノロジーの活用が求められている．

Matsushima bay, water quality, seagrass bed

講演番号：4SY01-P2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ M 校舎 26 会場

油分解細菌群によるバイオオーグメンテーション

Bioaugmentation by oil-degrading bacteria

○今中 忠行、高松 邦明(立命館大生命科学)
○Tadayuki Imanaka,Kuniaki Takamatsu(Ritsumeikan Univ.)

バイオオーグメンテーションへの適用を視野に入れ，重油を基質としたスクリーニングを行い約 200 株の微生物を分離した．このうち重油培地での生育の良さ，および近縁種の安全性を考慮し，3 種類の微生物 No. 2 株，No. 5 株，No. 10 株を選抜した．16S rRNA 遺伝子解析により No. 2 株，No. 5 株，No. 10 株をそれぞれ *Novosphingobium* sp. No. 2，*Pseudomonas* sp. No. 5，*Rhodococcus* sp. No. 10 と同定した．さらに No. 2 株，No. 5 株および No. 10 株の特異的検出・定量方法を確立した．この方法は，実際の土壌にこれら 3 株を添加した場合でも他の微生物を誤って検出することなく，特異的に 3 株を検出することができた．実際の油汚染土壌を用いた実証実験を行ない，No. 2 株，No. 5 株および No. 10 株の油分分解能力を確認し，土壌微生物のモニタリングが可能であることを確かめた．No. 2 株，No. 5 株および No. 10 株の安全性に関する試験を行ない，「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」に適合した微生物であるとの確認を経済産業省および環境省から受けた．No. 2 株，No. 5 株および No. 10 株は実際のバイオオーグメンテーション工事にも適用され，浄化目標を達成した．

oil degrading bacteria, bioaugmentation, heavy oil degradation

講演番号：4SY01-P3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:25～ M 校舎 26 会場

津波による土壌のヒ素汚染とその修復への取り組み
Research of arsenic pollution in the coastal soil caused by the 2011 Tohoku earthquake tsunami and strategies for the remediation

○宮内 啓介[1]、簡 梅芳[1]、黄 毅[1]、大友 俊介[1]、和泉 卓也[1]、井上 千弘[2]、北島 信行[3]、遠藤 銀朗[1]([1]東北学院大工、[2]東北大院環境、[3]（株）フジタ)
○Keisuke Miyauchi[1], Mei-Fang Chien[1], Yi Huang[1], Shunsuke Otomo[1], Takuya Waizumi[1], Chihiro Inoue[2], Nobuyuki Kitajima[3], Ginro Endo[1]([1]Tohoku Gakuin Univ., [2]Tohoku Univ., [3]Fujita Co.)

ヒ素は地殻中に多く存在し、地下水の湧出などに伴って、自然的に環境中に放出される。また、鉱石の採掘などによって人為的にも環境に放出される。放出されたヒ素は河川によって、あるいは土砂として下流域に運搬されて、河川の沿岸や沖積域、および河口域の海底に堆積する。従って、これらの場所にはヒ素が比較的多く含まれていると考えられる。

2011 年 3 月 11 日に起きた東北地方太平洋沖地震によって引き起こされた津波によって、宮城県沿岸部には大量の海底堆積物が流れ込み、堆積した。上記の通り、この堆積物は長年にわたって河川によって海に運ばれて堆積したものであり、ヒ素等の有害無機化合物も含まれていると考えられた。被害面積は宮城県内の津波浸水農用地だけでも約 15,000 ヘクタールに及ぶため、有害無機化合物によって汚染されたと考えられる面積は、少なくとも数百ヘクタール、比較的軽度な汚染を含めれば数千ヘクタールにのぼると推定される。

本発表では、まず、宮城県沿岸部に打ち上げられた津波堆積物中のヒ素濃度調査の結果を報告する。多くの地点で、津波被災土壌のヒ素含有量が非被災土壌のそれを上回っていた。非津波被災域の全ての土壌サンプルにおいて、ヒ素に対する土壌環境基準（2003 年環境省告示第 19 号による公定法による測定値が 15 mg/kg-dw soil 以下）を超えるものはなかった。また、津波被災地域のサンプルにおいても、ほとんどの地点ではこの基準以下であった。

このような広域ヒ素汚染土壌を元のヒ素濃度にまで修復するには土木工学的な方法だけでは困難であり、その他の適用可能な手段として、植物を用いたファイトレメディエーションが考えられる。土壌中のヒ素汚染浄化に適応可能な植物の中でも、モエジマシダ（*Pteris vittata*）は地上部にヒ素を高濃度で蓄積することのできるハイパーアキュミュレーターとして知られており、乾燥重量に対して 2%ものヒ素を葉状体に蓄積する。我々は、モエジマシダを用いたファイトレメディエーションによって津波被災地域のヒ素汚染の浄化が可能かどうかを検証するために、被災地における現場実験を 2012 年 5 月から開始した。本発表では、現場実験の進め方と、1 年目の実験で得られたデータについて報告したい。

arsenic, phytoremediation, Pteris vittata

講演番号：4SY01-P4
講演日時、会場：3 月 27 日 14:50～ M 校舎 26 会場

放射性物質で汚染された植物バイオマスの減容化総合処理システムの開発

Development of a total treatment system for volume reduction of biomass which contaminated by radioactive materials

○金原 和秀[1]、大塚 祐一郎[2]、中村 雅哉[2]、佐々木 健[3]、中島田 豊[4]、加藤 純一[4]([1]静大工、[2]森林総研、[3]広島国際学院大、[4]広大院先端)

○ Kazuhide Kimbara[1], Yuichiro Otsuka[2], Masaya Nakamura[2], Ken Sasaki[3], Yutaka Nakashimada[4], Junichi Kato[4]([1]Shizuoka Univ., [2]Foresty Res. Inst., [3]Hiroshima Kokusai Gakuin Univ., [4]Hiroshima Univ.)

東日本大震災は、福島第一原子力発電所の事故を誘発し、膨大な量の放射性物質を環境に放出した。土壌汚染は深刻であり、放置された農地や空き地、山野で生育した雑草や、コメを中心とした汚染農作物、雑木、枯葉などのバイオマス量は膨大である。一方、植物を利用した土壌浄化であるファイトレメディエーションも計画されているが、そのバイオマス処理が問題である。当然ながら、こうした放射性物質汚染バイオマスは、土壌汚染が限りなくゼロになるまで毎年増加することが予測される。本研究は、環境工学、森林化学、廃水処理、生物工学の専門家が結集することにより、放射性物質で汚染したソフトバイオマス・ハードバイオマス（木質系バイオマス）を発酵変換してそのバイオマス量の大幅な軽減を図るとともに、汚染水の浄化も含む実施可能な総合処理システムを提案する。

バイオマスをメタン発酵や乳酸発酵により効率よく減容化するには、微粉化し生物との接触面積を増やす必要がある。そこで、森林総研が開発した木質バイオマスを未変性のまま抽出する技術である「湿式ミリング法」を応用し、ソフトバイオマス・ハードバイオマスを微粉化すると共に低分子糖類に分解する技術を開発する。微粉化糖化産物は、水分を含むため、固形分は乾式メタン発酵（広島大学)、液成分は UASB メタン発酵（静岡大学）により、バイオマスをエネルギーに変換すると同時に大幅な減容化を達成する。また、メタン発酵残渣にはリグニンが大量に含まれていると予想されるため、リグニンを分解する白色腐朽菌を用いた乳酸発酵によりバイオマスのさらなる減量化を行う（静岡大学)。メタン発酵および乳酸発酵からはそれぞれ放射性物質を含有する消化液が生じる。それらから放射性物質および BOD/COD を除去するため、広島国際学院大が開発中である光合成細菌を吸着材とする放射性物質吸着除去技術の適用を試みる。

本研究では、放射性セシウムの動態を解明することが大きな目的の一つである。バイオマスの微粉化と糖化液、メタン発酵で生じるメタンガス中、メタン発酵、乳酸発酵で生じる発酵残渣、消化液、消化液処理後の残渣、廃液中など、単位プロセスごとの産物を解析して放射性セシウムの動態を調査する必要がある。放射性セシウムの動態を明確にした後、福島の現地において、小規模なパイロットプラントを用いた実証試験を計画している（福島県西郷村と協議中)。本開発が成功すれば、放射性物質汚染バイオマス処理システム普及のブレークスルーになると確信している。

なお、本研究は文部科学省の「国家課題対応型研究開発推進事業『原子力基礎基盤戦略研究イニシアティブ』」の委託研究（代表研究者加藤純一、24 年度から 26 年度）として遂行中である。

radioactive material, biomass, treatment system

講演番号：4SY01-P5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:15～ M 校舎 26 会場

食・農・村の復興支援プロジェクトと菜の花プロジェクト
Agri-Reconstruction Project and Rapeseed Project

○中井 裕(東北大院農)
○Yutaka Nakai(Tohoku Univ.)

東北大学農学研究科では、2011 年 3 月 23 日に「食・農・村の復興支援プロジェクト」(ARP)を立ち上げた。53 人の教員が参加し、4 月 1 日には Web ページを立ちあげ、被災地に役立つ情報発信や、種々の現場での支援活動などを行って来た。http://www.agri.tohoku.ac.jp/agri-revival/

たとえば、「マガキ養殖復興支援プロジェクト」では、産官の調整役として働き、種苗の安全性の解析も担当して、壊滅的被害を受けたカキの種苗生産を短期間で回復させる成果を挙げた。また、「福島原発 20km 圏内に取り残されたウシの保護プロジェクト」では、動物福祉に配慮した家畜の保護活動を行っている。

中でももっとも大規模に行われているものが「東北大学菜の花プロジェクト」である。

農学研究科が保有する世界で唯一のアブラナ科作物の系統配付を実施しているジーンバンク（キャベツ・ハクサイ・ナタネなどの *Brassica* 属を中心としてその近縁の植物を含んで、58 属 177 種 758 系統を保有）から塩害に強い品種を選んで、津波による塩害で従来の作物の作付が出来なくなっている農地に、菜の花を育てるプロジェクトである。

5 研究室 8 名の教職員が中心となって、JST の「東日本大震災対応・緊急研究開発成果実装支援プログラム」に採択されて実施した。宮城県の被災農地を網羅するように 344 地点を選び、土壌解析を行った。また、温室内でアブラナ品種の耐塩性栽培試験を行って、69 系統から 7 系統を選抜した。仙台市および岩沼市の計 1.8ha で栽培実験を行い、2012 年 4 月には菜の花を摘み、食用として約 400kg を販売した。6 月から 7 月にかけて菜種の収穫を行い、専用コンバインを用いた 91a からは 3,500kg（385kg/10a）が収穫された。菜種からの搾油、菜種油を利用したキャンドル製作、食用油の販売、バイオディーゼル燃料（BDF）の製造などを現在実施中である。

今後は、放射性物質汚染地域をも対象として、バイオマスの地域内リサイクルシステムの構築、ナタネ油からのバイオディーゼル燃料生産等のエネルギーの地産地消システムを確立することを目指し、長期にわたって研究および支援活動を続けて行く予定である。

われわれは、農家を救いたいという思いで始めたプロジェクトであるが、大学と農家の連携の枠を越えて、県や市、企業など多くの人々を巻き込んで社会的な広がりを見せている。今後も、ARP 立ち上げ当初の「『人と人との繋がり、風土・歴史、環境・生態』を大切にして、新しい農林水産業とまちをつくる」という気持ちを大事にして、復興支援を続けて行きたい。

restoring farmlands, rapeseed, biomass recycling

講演番号：4SY01-P6
講演日時、会場：3 月 27 日 15:40～ M 校舎 26 会場

大震災復興に向けての被災地住民の高効率し尿および浄化槽汚泥処理システム
Novel biotreatment of human-waste, for restoration from Higashi-Nihon Earthquake

○倉根 隆一郎[1]、水野 康弘[1]、鬼頭 昌久[1]、紺野 充弘[2]、橘 峰生[3]、植地 俊仁[3]、安部 剛[3]([1]中部大院応生、[2]釜石大槌地区行政事務組合、[3]クボタ環境サービス（株））
○Ryuichiro Kurane[1], Yasuhiro MIzuno[1], Masahisa Kitou[1], Mituhiro Konno[2], Mineo Tachibana[3], Toshihito Ueti[3], Takeshi Abe[3]([1]Chubu Univ., [2]Kamaishi-Ozuti,Iwate, [3]KSK)

［目的］ 東日本大震災の大津波による大きな被害を受けた地方自治体において、大きな問題として被災住民の方々の生活排水（含むし尿）処理がある。屎尿処理施設（汚泥再生処理センター）はし尿および浄化槽汚泥の処理を担っている。被災地では復興の遅れ等により、仮設住宅での生活の長期化が懸念され、そこから発生する多量の浄化槽汚泥の安定的処理が懸案となっている。

し尿処理を担うのは微生物の集合体である活性汚泥であるにもかかわらず、これまでは外的要因を操作するエンジニアリング的側面からのアプローチによりなされてきたため、生物処理の主役たる活性汚泥はブラックボックスとして扱われてきた。従来型エンジニアリング的アプローチによる処理効率向上はほぼ限界に近いと考えられる。震災復興は予想以上に困難で、非常に多くの住民が仮設住宅生活を余議なくされている。この為、処理を請け負っている釜石・大槌汚泥再生処理センターでは設計能力以上の過酷な運転を強いられている。今後ともこの状態は相当の期間にわたり継続されるものと予想される。このような問題を抱える被災地施設において、活性汚泥が潜在的に持つパフォーマンスを最大限に引き出し活用するため、エンジニアリング的アプローチに加えてバイオ（微生物・遺伝子）的アプローチを行い、相互にフィードバック・クロスさせた高効率バイオ新処理法を開発し、被災地住民に貢献することを目的とした。

［方法］ 釜石・大槌地区行政事務組合（岩手県)、クボタ環境サービス（株）（施設の建設、維持管理請負会社）と中部大学の三者で、釜石・大槌汚泥再生処理センターでの実し尿処理施設を用い、クボタ ASB 法（土壌微生物活性化法）を導入し、中部大学にて実際の活性汚泥中の微生物学的・遺伝子学的（DGGE 法等）複合微生物系菌叢解析および酵素活性評価などを行った。

［結果］ 活性汚泥を ASB 法にて土壌微生物優先に活性化誘導した結果、誘導開始数週間後から菌叢の変化が認められた。誘導で変化した代表的な２菌株及び変化してない１菌株について塩基配列の結果より、前者の最近縁種は *Sphingobacterium* sp. と anaerobic bacterium であり、後者の最近縁種は腸内細菌群である CFB group bacterium であった。また、誘導によりプロテアーゼ活性が最大で２倍に活性化されていた。性状的に沈降性の向上と粘性低下等が見られた。実放流水の BOD, COD は変化なく環境基準値を下回っており、安定して放流できた。その後いくつかのプラント性能の改善が確認されており、し尿処理において複合微生物系菌叢誘導を引き起こすことにより、し尿処理の高効率化に向けての可能性が示された。

biotreatment, human-waste, Higashi-Nihon Earthquake

講演番号：4SY02-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:40～ A 校舎 11 会場

食の安全と健康を担う乳酸菌

lactic acid bacterai attributable to food safety and healthy way of life

○瀧井 幸男(京都学園大バイオ環境)
○Yukio Takii(Kyoto Gakuen Univ.)

我が国において長年、食の対象とされてきた発酵食品には多くの微生物フローラが存在する。そのうち乳酸菌グループには幅広い世代に健康増進効果を提示するものが知られている。その効果として、乳酸菌による免疫賦活効果・抗アレルギー作用あるいはその発酵生産物であるγ−アミノ酪酸（GABA）による腸内改善や降圧機能、抗菌性タンパク質（バクテリオシン）による食品汚染菌の増殖抑制（バイオプリザベーション）等があげられる。

食の安全に関わり食品産業的にも重要な乳酸菌は、資化炭素源、生育環境の pH 領域、共存酸素有無等の培養条件によって代謝に大きい変化を起こすため多様な機能を発現する一方、同属中にホモ型・ヘテロ発酵型が混在する複雑な系をもち分類学的研究の対象ともなっている。このような乳酸菌自体あるいは発酵生産物を生活習慣病発症リスクの低減に応用することを目的として、「食の安全と健康」を担う乳酸菌の特性と機能を精査し健康増進に資する知見を共有したい。

京漬物より得られた乳酸菌 NSB1 は顕著なγ-aminobutyric acid (GABA)生産性を示し、生理学的・分類学的諸性質から *L.keferii* (Kandler and Kunath 1983^{vp}) に帰属するとした。しかしいくつかの炭素源資化性において *L.keferii* よりも *L. buchneri* に近似する性質を示すことがわかった。すなわち arabinose, ribose, galactose を発酵し mannose, cellobiose を発酵せず、15℃で生育、アルギニンジヒドロラーゼ活性を示し *L. buchneri* の性状と一致するが、45℃、50℃で生育する点は *L. buchneri* とは大きく異なっていた。

詳細な 16S rDNA-Full 塩基配列解析を実施したところ、NSB1 は基準株 JCM1115 株に対し、99.8%の高い相同性を示した。さらに上位基準株 10 株の 16S rDNA 塩基配列に基づく簡易分子解析の結果、*L. buchneri* とクラスターを形成し、このクラスターは 93%という高いブートストラップ値で支持された。しかし primer 箇所を除く NSB1 と基準株の塩基配列間には 4 塩基の明確な相違点（G→A、C→T、C→T、T→C）が認められた。

以上の結果、菌株 NSB1 は *L. buchneri* に最も近縁な *Lactobacillus* sp. NCCB100334 として寄託した。

その他、GABA 含有漬物を継続的に摂取した便秘群女子学生の便通改善及び *L. brevis* subsp. *coagulans* 菌体摂取による若年女性の免疫活性賦活効果についても触れる。

lactobacillus keferii, γ-aminobutyric acid, 16S rDNA analysis

講演番号：4SY02-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:10～ A 校舎 11 会場

人工胃液耐性を有する乳酸菌の抗菌活性

Antibacterial activity of lactic acid bacteria resistant to digestive enzymes

○水田 容子(京都学園大学バイオ環境学部)
○Yoko Mizuta(Kyotogakuen Univ.)

安全性や健康に対する関心の高まりから、ヒトと環境に優しく保存性に優れた食品の開発が求められている。プロバイオテイクスは食品汚染菌に対する抗菌活性以外に必要な性質として、胆汁酸・胃酸・膵液等の消化液に対する耐性を有すること、すなわち生きたまま腸管に達して増殖可能であることがあげられる。一方、プレバイオティクスは消化管上部で分解・吸収されず、ビフィズス菌等の常在性腸内フローラのバランスを維持する特性を有する。

これらを同時に摂取できる「シンバイオテイクス」の開発を目的として、28 種の市販食品（漬物、納豆、味噌）から摩砕抽出液を得た。その段階的希釈液について指標菌の生育阻止円形成能をもとに抗菌活性のスクリーニングを行った結果、京漬け物“すぐき漬け”から顕著な抗菌作用を示す乳酸菌 MIBA4409 を取得した。

形態学的観察及び生理学的諸性質試験（桿菌、15℃での生育+、45℃での生育－、catalase－、glucose からのガス生成－、生成乳酸の光学異 DL、各糖類資化性など）の結果から乳酸菌とみなした MIBA4409 を *Lactobacillus plantarum* NRBC を含む既存の乳酸菌との 16SrRNA/DNA 相同性解析に供することにより *L. plantarum* に属する菌株と同定した。

4409 の培養上清を用いたペーパーデイスク法による阻止円判定の結果、指標菌 *Bacillus cereus* ATCC13061、*Vibrio parahaemolyticusATCC17802*、*Yersinia enterocolitica* ATCC9610 に強い抗菌活性を示すことが分かった。

MIBA4409 を MRS 液体培地で 30℃、24 時間培養することにより得られた培養液について、ペプシン（0.4%）を含む pH3.0-4.0 の条件下で 37℃、4 時間保温後の生菌数はペプシン無添加液対照と変わらなかった。同様に培養後の MIBA4409 を胆汁液最終濃度 0.1% ～ 1.0%の条件下で 37℃、16 時間保温した後の生菌数は、胆汁液無添加と同一のレベルを維持することがわかった。一方、培養上清中の抗菌活性は、熱処理（121℃、15 分）や proteinase K 処理（0.5U、37℃、3 時間）で失われなかった。さらに標品を変性剤（SDS）で熱処理後、抗菌物質は低分子（ペプチド）であることが示唆された。

bacteriocin, antibacterial, probiotics

講演番号：4SY02-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:40～ A 校舎 11 会場

漬物由来乳酸菌による GABA 生産と乳酸菌飲料の開発
GABA prodution by lactic acid bacteria from pickles and development of lactic fermenting beverage beverage
○上野 義栄(京都府中小企業技術セ)
○Yoshie Ueno(Kyoto Pref. Technology Center for Small and Medium Enterprises)

γ-アミノ酪酸 (GABA)は、生物界に広く分布している非たんぱく性アミノ酸である。生体内では抑制性の神経伝達物質であり、経口摂取することにより血圧上昇抑制作用やストレス低減作用が確認されている。その為、血圧上昇抑制効果が期待される機能性成分として、GABA が特定保健用食品に認められている。

GABA は、グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）により、L-グルタミン酸（L-Glu）からの脱炭酸反応により生産される。L-Glu を含む緑茶や玄米では、嫌気処理を行ったギャバロン茶や発芽玄米等が、内在 GAD の働きにより GABA を増加させた食品として商品化されている。

また、日本では乳酸菌や麹菌を利用した発酵食品である漬物や味噌、醤油等が古来より製造されており、これらの発酵食品の中には GABA が多く含まれているものが見られる。これらの GABA 含有発酵食品は、GABA 生産乳酸菌や麹菌の働きにより GABA が生産されている。京都においても、様々な発酵型漬物が製造されており、キムチ、スグキ、千枚漬け及び糠漬け等に GABA を含有するものが見つかった。

本講演では、漬物より分離した GABA 高生産乳酸菌による GABA 生産性の向上を目指した培養試験結果と、GABA 含有乳酸菌飲料の開発事例を紹介する。

GABA を高含有したキムチや千枚漬け等より、GABA 高生産性乳酸菌を分離した。キムチより分離した *Lactobacillus hilgardii* K-3 や千枚漬けより分離された *Lactobacillus senmaizukei* L13 は、L-Glu 存在下で増殖が旺盛になり、高濃度の L-Glu 存在化でも増殖した。

これら乳酸菌を使用して、GABA 生産を高効率で行う為の培養条件の検討を行った。GABA 生産乳酸菌の GABA 生産には、GAD による Glu から GABA への変換反応の補酵素であるピリドキサール-5'-リン酸の培地添加による報告もあるが、GAD の至適 pH である酸性条件での培養と、培地の炭素源を最適化することで、L-Glu から GABA への変換効率が向上した。*L. senmaizukei* L13 では、910 mM L-GluNa より 91%の変換率で、830 mM の GABA を生産することができた。

また、発酵乳からも GABA 生産乳酸菌 *Streptococcus thermophlus* を分離し、これら分離乳酸菌と保存菌を使用して乳酸菌飲料の開発を検討した。*S. thermophlus* の単独培養では GABA 生産性は低く、発酵乳生産に *S. thermophlus* と共に使用される *Lactobacillus bulgaricus* と混合培養したところ、GABA 生産性が向上した。

GABA, lactic acid bacteria, lactic fermenting beverage

講演番号：4SY02-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:10～ A 校舎 11 会場

乳酸菌発酵 GABA の抗ストレス効果と応用

The anti-stress effect of the lactic-acid-bacteria fermentation GABA, and application

○堀江 健二(株式会社ファーマフーズ開発部)
○KENJI HORIE(PHARMA FOODS INTERNATIONAL Co.,LTD)

近年発芽玄米や発酵乳製品などの流行により一般に広く知られる様になった機能性食品成分『ギャバ』は、γ－アミノ酪酸（γ－aminobutyric acid：以下『GABA』と記す）といい、自然界に多く存在するアミノ酸の一種である。野菜、果物を始め醗酵食品にいたるまで幅広く含まれており、我々の食生活の中で通常、摂取している食品成分の一つである。

GABA は抑制系の神経伝達物質として知られており、哺乳動物の脳中枢神経系および脊髄や網膜にも高い濃度で分布している事より、生理学的に見るとヒト体内で極めて重要な役割を果たしている生体内アミノ酸のひとつである。故に GABA の摂取によって直接的に様々な生理効果が期待できる。実際に血圧降下作用、精神安定作用等様々な報告があり、機能性食品素材として最も注目されている。

しかし、自然界の主な GABA 含量を比べてみると、話題となっている発芽玄米では 0.01～0.02%、チョコレートでは 0.005～0.02%、その他いずれの食品も低いレベルにあり、上記生理効果を期待するには十分な濃度とは言えない。

このように自然界の野菜や胚芽、穀物といった食物から高濃度の GABA を摂取する事は難しい。近年では、GABA 含量を積極的に高めたギャバロン茶（特殊発酵茶）や乳酸発酵食品等があり、これらの食品は明確に血圧降下作用などの生理効果を証明している。また、その一部については厚生労働省特定保健用食品として販売されている実績をもつ。しかし、その効果は血圧降下作用が中心であり、更なる高次生理効果の報告が望まれている。

弊社では京都府中小企業総合センターと共同で、GABA を高生産する乳酸菌（*Lactobacillus hilgardii* K-3 株）を用いた GABA 高含有食品素材『ファーマギャバ』の大量生産化の開発に成功した。乳酸菌発酵 GABA の摂取がもたらす高次生理機能として、新たにリラックス効果、抗ストレス効果並びに睡眠の質改善機能、更には中性脂肪減少効果、成長ホルモンに与える影響など多くの生理効果につき検証した。

本シンポジウムでは、我々が開発した GABA 高含有食品素材『ファーマギャバ』のリラックス並びに抗ストレス効果など交感神経に与える効果のエビデンスを中心に紹介する。また『ファーマギャバ』を用いた応用食品また応用食品を用いた効果についても紹介する。

GABA, anti stress

講演番号：4SY02-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:40～ A 校舎 11 会場

抗アレルギー作用を有する *Lactobacillus acidophilus* L-92 株の機能

Anti-allergic effects of *Lactobacillus acidophilus* L-92

○弘田 辰彦(カルピス(株)発酵研)
○Tatsuhiko Hirota(CALPIS Co., Ltd.)

アトピー性皮膚炎、花粉症等のアレルギー疾患を有する患者は、国民のおよそ 30%にのぼると言われており、重要な問題となっている。治療においては抗原の除去と回避、薬物療法が主流であるが、乳酸菌をはじめとする食品成分にも抗アレルギー作用を示すものが知られており、サプリメントや飲料など様々な形態で市販されている。それらの多くは副作用も少なく手軽に摂取できることから日常的なアレルギーのケアに非常に有用である。

アレルギーとは、特定の異物（抗原）に対して免疫反応が過剰に起こることをいうが、その免疫反応の鍵となるのがヘルパーT 細胞のサブセットである Th1 細胞と Th2 細胞のバランスである。そのバランスが崩れ Th2 細胞が優位になると、過剰な IgE 抗体が産生されアレルギー症状が引き起こされやすくなる。抗アレルギー作用を有する食品成分の中でとりわけ乳酸菌はこの Th1/Th2 バランスを改善する可能性が多くの研究で示されている。

Lactobacillus acidophilus L-92 株（以下、L-92 株）は OVA で感作したアレルギーモデルマウスを用いた実験で、比較として用いた他の乳酸菌株に比べ強い血中 IgE 抗体価の上昇抑制効果を示し、抗アレルギー効果を有する乳酸菌として選抜された。L-92 株は Th1/Th2 バランスの改善のほか、活性化 T 細胞へのアポトーシス誘導や制御性 T 細胞の誘導など、複数のメカニズムを介して抗アレルギー作用を示すことが明らかになっている。また L-92 株はヒトを対象とした試験で花粉症、通年性アレルギー性鼻炎、および小児のアトピー性皮膚炎といったアレルギー疾患の症状改善に有効であることが示されている。さらに最近では成人のアトピー性皮膚炎に対しても有効性が確認された。この効果は殺菌した菌体でも確認されていることから、乳酸菌を構成する成分によってもたらされていることが推察される。本シンポジウムでは、これまでに明らかになった L-92 株のヒトに対する抗アレルギー作用とそのメカニズムの一端について紹介する。

乳酸菌の抗アレルギー作用メカニズムは未だ不明な点が多く残されているが、今後より詳細な免疫調節機構が解明されることによって、アレルギー症状をもつ方々の QOL 向上や発症予防に乳酸菌がその一助となることを期待する。

Lactobacillus acidophilus L-92, allergy, atopic dermatitis

講演番号：4SY03-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:35～ A 校舎 12 会場

細胞骨格および細胞核におけるアクチンファミリーの機能とがん細胞の特徴

Actin family in cytoskeleton and cell nucleus and its contribution to cancer

○原田 昌彦(東北大院農)
○Masahiko Harata(Tohoku Univ.)

がん細胞では、細胞形態や細胞骨格に異常が観察され、さらに細胞核においても染色体の切断・転座や核内のクロマチン空間配置の異常、さらに遺伝子発現制御の異常が観察される。このような細胞質と細胞核におけるがん細胞の特徴に、アクチンファミリーが広く関与することが、最近の研究によって明らかになってきた。アクチンファミリーは、アクチンと、アクチンに進化的・構造的に関連性を有するアクチン関連タンパク質(actin-related protein, Arp)の両者で構成されている。Arp の存在は真核生物で保存されており、Arp1～Arp10 の 10 種のサブファミリーとして分類されている [1)]。アクチンと Arp との機能協調が、細胞質および細胞核における様々な機能の制御に関与することが見出されている。例えば細胞質においては、アクチンの重合によるアクチン骨格の形成が Arp2/3 複合体によって制御されている。がん細胞ではこの制御に異常が起こることによって、浸潤・転移が起こりやすくなっている。細胞質に比べて、細胞核におけるアクチンファミリーの機能解析は遅れているが、細胞核にも一定量のアクチンが存在するほか、Arp4～Arp9 については、そのほとんどが核内に存在している。興味深いことに、アクチンとこれらの核内 Arp が、異なった組み合わせで、核内のクロマチン構造の制御に関わるクロマチンリモデリング複合体やヒストン修飾複合体に含まれていることが明らかにされている [1)]。一例として、INO80 クロマチンリモデリング複合体には、アクチン、Arp4, Arp5, Arp8 が含まれる。これらの複合体は、転写制御に加えて、DNA 複製や DNA 損傷修復にも関与する [2)]。実際に、我々は Arp5 や Arp8 を欠損したヒト細胞でゲノム安定性が低下することを観察している。さらに、Arp6 はクロマチンの核内空間配置にも関与している [3, 4)]。これらの知見は、細胞質のみならず細胞核においても、アクチンファミリー機能の欠損や異常が、がん細胞の特徴形成に結びつくことを示している。また、このようなアクチンファミリーとがん細胞の多様な特徴との関連性は、細胞がん化の機構理解や治療におけるターゲットとしてのアクチンファミリーの重要性を示唆している。

References:
[1] Oma and Harata, *Nucleus* 2, 38-46 (2011), [2] Shimada *et al*., *Curr Biol* 18, 566-575 (2008), [3] Yoshida *et al.*, *PLoS Genet* 6, e1000910 (2010), [4] Ohfuchi *et al*., *J Cell Sci*, in press (2012)

actin family, cell nucleus, cancer

講演番号：4SY03-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:03～ A 校舎 12 会場

ケラチノサイトの分化とケラチンの時差的発現調節

Differentiation in keratinocytes and the keratin expression by difference in time

○片方 陽太郎[1]、山崎 祥他[2]([1]弘前大院農生、[2]東北大院農)
○Yohtaro Katagata[1], Shota Yamazaki[2]([1]Hirosaki Univ., [2]Tohoku Univ.)

ケラチノサイト（表皮の角化細胞）の最終分化の過程を演じているのは、３つの Key word で示すならば ケラチン(K)、角質被膜それに細胞間脂質である。さらに保湿因子が加わり角質層として皮膚の最外層に位置し、我々の身体を種々の外的刺激因子から防御している。ケラチンはこのケラチノサイトで約 60～70% を占め、細胞内空間構造の維持、細胞間の接着構造、細胞外からの情報伝達、それに分化に伴うケラチンの時差的推移（K5/K14 から K1/K10 への変化)など細胞生化学・生理学的に重要な機能を果たしている。

著者らはケラチンの細胞生化学的研究の中で、偶然にも熱ショックタンパク質(HSP) がケラチンと相互作用を持つことに遭遇した[1)]。HaCaT 細胞において HSP family の中で Hsp40 が Type I-K と強い親和性を示し、ケラチン特異的な分子シャペロンであると推定した。HSP といえばタンパク質のホールディング、品質管理それに細胞小器官への輸送などが代表的な機能として確立している。Hsp40 は RNAi によるノックダウン実験からケラチンの品質管理に関与し、それはユビキチン・プロテアソーム系を介して行われていることが推定された。さらにケラチノサイトの Ca^{2+}(9 mM)添加よる細胞分化誘導で Hsp40 のノックダウン は K14 および K10 の細胞内存在量に影響を及ぼし、Hsp40 がタンパク質レベルでケラチン量の調節に関与していることも確認した[2)]。この事実は Hsp40 がケラチノサイトにおける K5/K14 から K1/K10 への時差的発現にかかわる一つの因子であることを示している。ケラチン遺伝子の point mutation が病因であるケラチン病は、1990 年代の初めに遺伝学的、組織化学的および分子生物学的に実証されている（単純型表皮水疱症(Epidermolysis bullosa simplex; EBS)[3)]、魚鱗癬様紅皮症、掌蹠角化症など)。Hsp40 のノックダウンにより、細胞内でのケラチンの発現異常(K1/K10)やケラチンペアーの変化(K14)を認め、さらに変異した K14 遺伝子を HaCaT に導入し共焦点レーザー顕微鏡により細胞内挙動を観察した。その結果、EBS のケラチン凝集（臨床的所見）を推定させる結果が細胞核周辺でのみ認められ、その部位でのみ Hsp40 との共局在が認められなかった[2)]。

Hsp40 はケラチン特異的な分子シャペロンであり、ユビキチン・プロテアソーム経路を介してケラチンの細胞内存在量を調節し、ケラチノサイトの正常な分化に関与していることが明らかになり、EBS での解析からも推定された。このシンポジュウムではケラチノサイト研究のこれからについても紹介したい。

[1)] Katagata Y. & Hirayama T. *J Dermatol Sci,* **49**, 33-38 (2008) [2)] Yamazaki S. *et al. Int J Mol Med,* **29**, 165-168 (2012) [3)] Kitajima Y. *et al. Hum Cell,* **4**, 123-130 (1991)

Keratin, Keratinocyte, Hsp40

講演番号：4SY03-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:31～ A 校舎 12 会場

微小管ダイナミクスが関わる細胞内シグナル伝達

Functions of microtubule dynamics in cell signaling.

○臼井 健郎(筑波大　生命環境)
○Takeo Usui(Univ. Tsukuba)

微小管やアクチンなどの細胞骨格は、細胞内で絶えず重合・脱重合を繰り返す極めて動的な構造体であり、この動的不安定性が細胞内での機能、特に細胞運動や細胞分裂などに重要であることが知られている。我々はこの動的不安定性と細胞内機能発現との関連を、微小管やアクチンに直接、あるいは間接的に作用する様々なバイオプローブを用いて解析を行っている。

Glaziovianin A (AG1)はブラジル原産のマメ科植物の葉から細胞毒性を指標に単離・構造決定されたイソフラボノイドである。本物質の作用機構を解析したところ、紡錘体の多極化や染色体配向異常を引き起こして細胞周期進行を細胞分裂期で停止させる一方、間期の微小管ネットワークにはほとんど影響を与えないことを見出した。そこでさらに詳細に微小管に対する作用を検討したところ、AG1 はチューブリンの colchicine 結合部位近傍に結合し、*in vitro* においてチューブリン重合を遅らせるものの、最終重合度は変化させないといった colchicine や *vinca* alkaloids とは異なった既存の微小管重合阻害プロファイルを示すことが明らかとなった。そこで微小管ダイナミクスに対する影響を EB1-Venus や EGFP-tubulin 発現細胞を用いた time laps 観察により検討したところ、AG1 は微小管の伸長、および短縮速度を遅くし、カタストロフ頻度を低下させることで、重合・脱重合が止まった「pause」の状態にある微小管割合を劇的に増加させる「微小管ダイナミクス阻害剤」であることが明らかとなった。Vinblastine や paclitaxel など既存の多くの微小管作用薬も、低濃度処理により微小管ダイナミクスを阻害することが報告されているが、幅広い濃度域で微小管ダイナミクスを阻害する AG1 は、細胞内微小管ダイナミクスの機能を探る有用なバイオプローブであると考えられる。

本講演では AG1 が示すユニークな活性とともに、AG1 をバイオプローブとして用いた結果明らかとなった、微小管ダイナミクスが関わるシグナル伝達機構についての解析結果を紹介したい。

microtubule dynamics, glaziovianin A, cell signaling

講演番号：4SY03-4
講演日時、会場：3 月 27 日 14:59～ A 校舎 12 会場

山菜由来の抗がん物質のケミカルバイオロジー

Chemical biology for anti-tumor compounds derived from edible wild plants.

○木村 賢一(岩手大農)
○Ken-ichi Kimura(Iwate Univ.)

私たちは、DNA 損傷チェックポイントに関わる遺伝子変異酵母（*cdc2-1 rad9*Δ）株が、DNA 損傷に対して高感受性を示し、致死となる性質を救済して生育できる表現型を用いて、各種天然資源から抗がん候補物質を探索している [1]。その中で食材である山菜では、キク科のシドケ（モミジガサ）とボウナ（ヨブスマソウ）から 3,6-epidioxy-1,10-bisaboladiene（EDBD）を、またフキ・フキノトウから fukinone を見出した [2]。いずれも遺伝子変異酵母株に対して生育円活性を示し、ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対してもアポトーシス様の細胞毒性を示した。がん細胞パネルスクリーニング（JFCR39）において、EDBD は既存の抗がん剤とは異なるユニークな作用メカニズムが期待され、一方 fukinone は、チューブリンに作用する vinblastine 類似と判定されている。そこで本シンポジウムでは、HL60 細胞における EDBD の化学構造変化とその作用（ケミカルバイオロジー）について紹介する。

EDBD は、細胞内の Fe^{2+}により分子内のエンドパーオキサイド構造が開裂して生じる、不安定なラジカル中間体を経由して安定なジエポキシド体となることから（48 時間後に変換体は約 25%）、それぞれの化学構造が細胞に作用していると推定される [3]。それらはカスパーゼ 3/7、8、9 を活性化し、アポトーシスの内因性経路では p38 MAPK と JNK のリン酸化が起こり、外因性経路では DR4、5 の発現上昇が認められた。p38 MAPK の阻害剤の SB203580 により DNA 断片化が抑制されたことから、EDBD 誘導細胞死には p38 MAPK のリン酸化が関与していることが示唆されたが、JNK の阻害剤では阻害されなかった。さらに外因性経路では Bid の切断、ミトコンドリアからのシトクローム *c* の漏出、PARP の切断、並びに DFF45/CAD の切断が認められたことから、図 1 のメカニズムが考えられる。EDBD は、担癌マウス（ヒトメラノーマ Lox-IMVI）への単独投与（25 mg/kg）において、腫瘍増殖を抑制した。

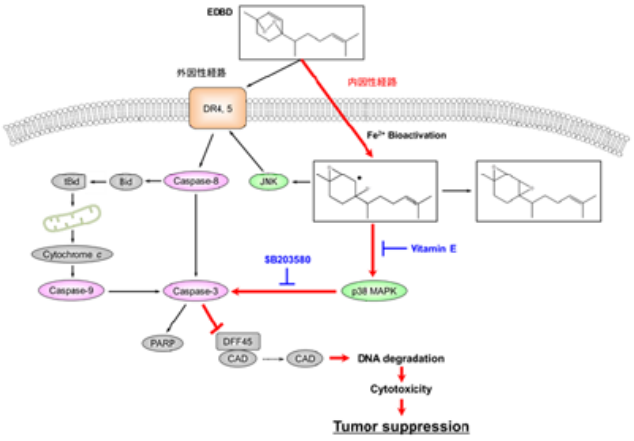


図 1. EDBD のアポトーシスメカニズム

1) Tsuchiya, E., *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem., **74**, 411 (2010), 2) Nishikawa, K., *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem., **72**, 2463 (2008), 3) Kimura, K., *et al.*, Bioorg. Med. Chem., **20**, 3887 (2012).

sesquiterpene endoperoxide, HL60 cells, apoptosis

講演番号：4SY03-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ A 校舎 12 会場

がん細胞と微小環境との相互作用の薬理学的制御

Pharmacological regulation of interactions between cancer cells and the tumor microenvironment

○上原 至雅、奥 裕介、西谷 直之(岩手医大薬)
○Yoshimasa Uehara,Yusuke Oku,Naoyuki Nishiya(Iwate Med. Univ.)

「足場非依存性増殖」や「接触阻害からの回避」は、がん細胞の微小環境への特異な適応と考えられる。我々は、がん細胞と微小環境との物理的相互作用である「細胞−基質間接着」と「細胞−細胞間接着」に着目し、がん細胞の増殖・生存シグナルを特異的に制御しうる化合物の探索を行っている。本シンポジウムでは、近年の成果について発表したい。

インテグリンなどを介した「細胞−基質間接着」シグナルの制御では、がん細胞の「足場非依存性増殖」を特異的に阻害する化合物として、U0126、hypothemycin、anicequol、NA22598 などを同定してきた。最近、がん細胞株を高密度培養することにより生じる「自発的浮遊細胞塊培養法」を用いることによって、CD133 陽性のがん幹細胞様集団を濃縮できることが明らかとなった。さらに、この細胞集団が種々の抗がん剤に対して耐性を示すことが確認された。現在、このがん幹細胞様集団の遺伝子発現プロファイリングを行い、その性質の分子基盤に関する情報を得るとともに、「造腫瘍性の評価」と「特異的阻害物質の探索」を行っている。

「細胞−細胞間接着」シグナルの一端を担うβ−カテニンは、核内への蓄積によりがん化、幹細胞の多能性維持、胚発生の体軸形成などを制御する。がん化と体軸形成シグナルの普遍性を利用したゼブラフィッシュ胚による探索系を用い、Wnt/beta-catenin シグナルを阻害する新規化合物として IMU14 とその誘導体を同定した。これらの化合物がβ−カテニン依存性大腸癌細胞の増殖を阻害することが明らかとなった。

このように、がん細胞のシグナル伝達の特異性を利用したアッセイ系から抗がん候補物質を同定し、作用機序の解析を通して新たながん分子標的薬を創製したいと考えている。

anchorage-independent growth, microenvironment, Wnt/beta-catenin signaling

講演番号：4SY03-6
講演日時、会場：3 月 27 日 15:55～ A 校舎 12 会場

肝がん幹細胞の特性と発現制御による肝がん克服の基礎研究

The characteristic of a liver cancer stem cell, and basic research of the liver cancer conquest by regulation of gene expression

○杉山 俊博、王 静舒、小代田 宗一(秋田大院医)
○Toshihiro Sugiyama,Jingshu Wang,Souichi Koyota(Akita Univ.)

近年がん幹細胞が発がんに大きく寄与していることが分かってきた。しかし、生体組織にわずかにしか存在しない幹細胞の特異的な検出および分離法、更に増殖能の維持と分化誘導機構さらに発がん機構はまだ十分に解明されていない。一部のがん細胞は、(1) 自らと全く同じ細胞を作り出す自己複製能と、(2) 多種類の細胞に分化しうる多分化能という、胚性幹細胞や体性幹細胞などの幹細胞に共通して見られる二つの特徴を持ち、がん組織中で自己複製により自分と同じ細胞を維持しながら、分化によって周辺の大多数のがん細胞を生み出すもとになっていると考えられている。これらの一部のがん細胞を「がん幹細胞」と呼び、がんがこの幹細胞様の細胞から発生・進行するという仮説（がん幹細胞仮説）が提唱されている。がん幹細胞は抗がん剤や放射線治療に抵抗性であり、抗がん剤や放射線治療によって腫瘍が縮小しても、死滅しているのは分化したがん細胞だけで、がん幹細胞は生き残ることが多いことが知られている。現行の抗がん剤治療のほとんどは、分化したがん細胞を標的として開発されており、がん幹細胞に対してはあまり効果が無い可能性がある。がん治療に対する抵抗性や再発・転移の原因となっているがん幹細胞をターゲットにしたがん治療の開発が求められているが、現時点ではまだ有効な治療法は見つかっていない。

肝臓の構成細胞である主な２つのタイプの細胞、肝実質細胞と胆管上皮細胞には増殖能があり、少なくとも健康な肝臓において、これらの２つの分化した細胞集団から細胞の損傷を補填することができる。しかし、肝臓に幹細胞が存在するかという問題は、古くから論争の的になっている。我々は、銅異常蓄積のために生後３−４か月において劇症肝炎を起こしたＬＥＣラット肝臓からコラーゲナーゼ灌流法を用いて「卵形細胞」を分離する方法を開発した。この細胞を肝臓に細胞移植したところ肝細胞に分化した。これらの結果、この卵形細胞は肝臓の幹細胞の一つであることが判明した。また、健常ラットより胆管上皮由来幹細胞（HSL 細胞）を分離し、星細胞と共培養すると肝細胞に分化転換した。

ヘリング周辺の胆管上皮に幹細胞が存在し、この幹細胞が「がん化・分化・再生」の中心的な役割を果たしていると思われる。がん幹細胞の発生、前がん前駆細胞の発生増殖過程の解明、肝臓の幹細胞の胆管、肝実質細胞の分化および再生は、肝炎、肝がんの発症と密接に関連しており、肝幹細胞の発現機構や制御機構が明らかになれば、肝がん克服のためにも大きな発展が期待される。

Cancer stem cell, hepatocarcinogenesis, anti-cancer

講演番号：4SY04-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:40～ B 校舎 11 会場

Development of bioethanol production technology at high temperature by thermotolerant yeasts

○Savitree Limtong[1], Wichien Yongmanitchai[1], Teera Yimyoo[1], Podchamarn Pimpakan[1], Noppon Lertwattanasakul[1], Tomoyuki Kosaka[2], Mamoru Yamada[2,3]([1]Fac. of Sci., Kasetsart Univ., [2]Fac. of Agr., Yamaguchi Univ., [3]Gra. Sch. of Med., Yamaguchi Univ.)

[Objective]

To develop a pilot-scale of bioethanol fermentation process from sugarcane juice at elevated temperature by a thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042.

[Results and Discussion]

1. Semi-pilot scale of ethanol fermentation in 100-L fermenter

Ethanol fermentation from sugarcane high test molasses (HTM, a modified sugarcane juice which is used for storage) in batch fermentation without aeration only low ethanol concentration (3.74 % w/v) was attained at 72 h due to low cell growth, 2.42 g dry cell weight (DCW)/L. In sigmoidal feeding fed-batch fermentation without aeration and under non-sterile condition with total fermentable hexose sugar (FHS) concentration of 18%. After 72 h, ethanol concentration was at 7.83 % w/v which significantly higher than that obtained from batch fermentation. The highest biomass was attained at 4.97 g DCW/L within 24 h after inoculation. Repeat-batch which was conducted as follows, the first step was fed-batch that the final FHS and medium volume were 18% and 80 L, respectively, after 24 h fermentation 60 L of fermenting medium was transferred to 5 L bottle and fermentation was continued in an incubator. Second batch was started by adding 60 L new fermentation medium (18% FHS) to the remaining fermenting medium in the fermenter and fermentation was performed for another 24 h and then 60 L of fermenting medium was transferred to the bottle and fermentation was continued. Third batch was performed same as for the second batch. The results showed that in the first fed-batch fermentation after 72 h 7.93 % w/v ethanol was attained but in the second batch ethanol production was slightly reduced to 7.36 % w/v and more reduction in the third batch (7.15% w/v). Therefore, only three batches could be continued.

2. Pilot scale of ethanol fermentation in 4,000-liter fermenter

Ethanol production from sugarcane HTM by batch fermentation in 4,000-L fermenter was slightly lower than that obtained in semi-pilot fermentation. Ethanol concentration reached maximum, 6.93 % w/v, at 72 h. Temperature at the beginning of fermentation was approximately 30 °C and rose gradually to 38 °C at 42 h. Final temperature at 72 h was 34 °C. Bacterial contamination was observed since 36 h. However, this final ethanol concentration was comparable to industrial production using molasses as raw material.

Kluyveromyces marxianus, Bioethanol, High temperature fermentation

講演番号：4SY04-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ B 校舎 11 会場

Potential for simultaneous saccharification and fermentation by the yeast *Kluyveromyces marxianus* that has outstanding abilities in high-temperature fermentation and secretory production

○Hisashi Hoshida(Yamaguchi Univ.)

Simultaneous saccharification and fermentation (SSF), in which enzymatic hydrolysis of raw materials and microbial fermentation occur simultaneously in a reactor, has several advantages in ethanol fermentation, such as lower inhibition of saccharification enzymes by the generated glucose, shorter fermentation time, and lower number of reactors required. However; SSF is not the major process adopted to ethanol fermentation even though starchy materials are used as raw materials. The main cause of this disparity is the difference of optimal temperatures between enzymes for starch hydrolysis and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol fermentation. The maximum fermentation temperature, at which *S. cerevisiae* can produce ethanol effectively is 35°C, but the optimal temperatures of sugar hydrolyzing enzymes are generally higher than 35°C. Microorganisms which can produce ethanol at higher fermentation temperatures will be able to make SSF effectively.

The *Kluyveromyces marxianus* is a thermotolerant ethanol-producing yeast and can produce ethanol at 45°C. Ethanol-producing ability at higher temperature is suitable to establish effective SSF process. Actually, in SSF by *K. marxianus* with soluble starch and a glucoamylase, fermentation speed was accelerated at 40°C and requisite amount of enzyme was decreased at 45°C compared to 30°C, while in the case of *S. cereviciae* fermentation speed was not changed at 40°C and fermentation was completely inhibited at 45°C.

To decrease the cost in SSF, secretory production of sugar hydrolyzing enzyme by the yeast itself is a favorable approach. *K. marxianus* is known to produce a native secretory inulinase abundantly. Furthermore, expression of a recombinant secretory luciferase with promoters of both yeasts was 10-18 folds higher in *K. marxianus* than in *S. cerevisiae*. These results indicate that *K. marxianus* is a better host for recombinant protein production.

The abilities of high-temperature ethanol fermentation and secretory protein production are suitable for constructing a recombinant strain used for SSF. Some strains expressing starch hydrolyzing enzymes were constructed and used for SSF. We will discuss potential of *K. marxianus* for high-temperature SSF.

Kluyveromyces marxianus, Simultaneous saccharification and fermentation, High-temperature ethanol fermentation

講演番号：4SY04-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:20～ B 校舎 11 会場

Development of Commercial Rice Vinegar Production using Thermotolerant Acetic Acid Bacteria by Fermentation Process without Cooling System

○ Gunjana Theeragool[1], Wichien Yongmanitchai[1], Wilawan Sintuprapa[2], Kazunobu Matsushita[3]([1]Fac. of Sci., Kasetsart Univ., [2]Fac. of Agro-ind., Kasetsart Univ., [3]Fac. of Agri., Yamaguchi Univ.)

[**Objective**]
To develop commercial rice vinegar production without cooling system in Thailand, we isolated thermo-adapted and ethanol-tolerant strain and investigated acetic acid fermentation from jasmine rice wine with the isolated strain.

[**Results and Discussion**]
We have successfully isolated thermal-adapted strain, TH-3, from thermotolerant acetic acid bacterium, *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 by gradually increasing the temperature of the repeated cultivations from 38.5°C to 40°C. This strain exhibited more thermotolerance than SKU1108 and also performed effective acetic acid fermentation under higher temperature. Moreover, an ethanol-adapted strain, 7E-13, was obtained from TH-3 strain by repeating the cultivations under high ethanol concentration (6 or 7%) at 37°C. The 7E-13 strain showed a little higher growth and acetic acid production in jasmine rice wine containing 6% ethanol at 37°C whereas SKU1108 strain could not grow in the same medium. Determination of growth characteristics implied that glycerol is a necessary substance, which may associate with the resistance against various stressors during fermentation process. Investigation of the bacterial genetic stability during vinegar fermentation was performed by analysis of plasmid profile, Southern hybridization pattern of alcohol dehydrogenase genes and ERIC-PCR. The results showed that the adapted strains possess the same plasmid profiles, same pattern of alcohol dehydrogenase genes and ERIC-PCR with SKU1108. Their thermotolerance and genetic stability are useful for industrial vinegar fermentation without cooling expense. Preliminary statistical analysis for scaling up of vinegar fermentation by Plackett-Burman Design indicated that temperature, ethanol concentration and aeration significantly affect yield of acetic acid production. Further analysis by Central Composite Designs (CCD) showed that the maximum yield of acetic acid (5.40%) was obtained from 100 ml-culture of jasmine rice wine containing 5.89% ethanol and supplemented with 0.5% YPGD after 5 d cultivation in 500 ml-Erlenmeyer flask at 37°C, 200 rpm. In addition, 4.44% acetic acid was obtained from 1 L of jasmine rice wine containing 5.89% ethanol and supplemented with 0.5% YPGD after 24 h cultivation in 2 L-jar fermentor at 37°C, 400 rpm and 0.75 vvm aeration rate. Further scale up to 100 L-fermentor is in progress.

[References]
1. Masud *et al*., 2011. J. Biosci. Bioeng. 112(5):422-431.
2. Masud *et al*., 2010. Int. J. Food Microbiol. 138: 39-49.
3. Kanchanarach *et al*., 2010. Biosci. Biotechnol. Biochem. 74(8): 1591-1597.
4. Kanchanarach *et al*., 2010. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85:741-751.

Rice vinegar, Acetic acid bacteria, Cooling cost reduction

講演番号：4SY04-4
講演日時、会場：3 月 27 日 14:40～ B 校舎 11 会場

Development of high temperature L-Lactic acid fermentation to recycle total waste biomass
○Kenji Sakai[1], Yukihiro Tashiro[1], Vichien Kitpreechavanish[2], Vichai Leelavatcharamas[3], Xuan Vo-Tong[4]([1]Kyushu Univ., [2]Kasetsart Univ., [3]KhonKaen Univ., [4]TanTao Univ.)

Unique production system of bioplastic, poly-L-lactic acid, from food waste have previously proposed that combines fermentation and chemical processes. Here we would like to introduce two novel strategies for improving the fermentation step.

First, a new concept of “meta-fermentation” system to achieve fermentation production of chemicals by a controlled-mixed culture would be introduced. The system has some advantages like efficient transformation of multiple substrates, no need of sterilization, degradation of thermolabile compounds, low facility cost and insusceptible to contamination. We optimized fermentation temperature specially emphasizing on the maximum productivity of L-lactic acid under anaerobic condition. Change in microbial community during the entire fermentation period at different temperatures was analyzed by DGGE and barcoded pyrosequencing.

Second, a new method for simultaneous production of optically-active L-lactic acid and a value-added fertilizer from food waste was developed by using KBKU27, which was isolated as a plant growth-promoting bacteria. KBKU27 also showed thermotolerance at 45°C, and produce certain amount of optically active L-lactic acid from food waste. The fermented residue was proved to be a kind of functional compost, rich in nitrogen with low C/N ratio.

thermotolerant bacteria, L-lactic acid, waste biomass

講演番号：4SY04-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:00～ B 校舎 11 会場

Development of Biohydrogen Production Process from Sago starch under Extreme Thermophlilic Condition

○ Kanthima Phummala[1], Tsuyoshi Imai[1], Rafiani Hasyim[1], Sompong O-Thong[2], Poonsuk Prasertsan[3], Alissara Reungsang[4], Prapaipid Chairattanamanokorn[5]([1]Gra. Sch. Eng., Yamaguchi Univ., [2]Fac. Sci., Thaksin Univ., [3]Fac. Agro Ind.,Prince of Songkla Univ., [4]Fac. Tech., Khon Kean Univ., [5]Fac. Sci., Kasetsart Univ.)

Hydrogen (H_2) is considered as future clean and secure energy carrier because it is sustainable, environmentally friendly alternate fuel that generates only water as by product in combustion process. Its production process via dark fermentation of waste results in clean effluent. Moderate- and extreme-thermophilic fermentation (55-70 °C) has been known for its benefits including the ability to use various types of carbon sources, acid tolerance, depress growth of contaminant bacteria, and fewer end-products.

This research was conducted in order to develop stable and efficient process of fermentative H_2 production using extreme-thermophilic H_2-producing bacteria, investigate the possibility of wastewater and biomass residues (especially from sago palm) as substrate, as well as to monitor and characterize the microbial compositions in the biohydrogen system using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) techniques.

H_2 production from sago starch using mixed culture enriched from a hot spring in southern Thailand (PGK) was also evaluated and compared with an anaerobic digested sewage sludge culture. The effects of repeated batch cultivations, the dependence of the initial pH values ranging from 5.0 to 8.0 and the initial sago starch concentrations ranging from 2.5 to 60 g/l as well as the utilization of 4 different starch types (gelatinized dry starch, non-gelatinized dry starch, gelatinized wet starch, and non-gelatinized wet starch) were examined in batch experiments at 60 °C. The result showed that the methane-free biogas evolved contained up to 55% H_2. Gelatinized dry starch at an initial pH of 6.5 and an initial starch concentration of 2.5 g/l gave the maximum H_2 yield of 422 ml-H_2/g-$starch_{added}$ (80% of the theoretical limit). Meanwhile, the H_2 yield from anaerobic digested sludge culture was quite comparable to the result from PGK culture with the maximum of 385 ml-H_2/g-$starch_{added}$ obtained at 60 °C condition with the H_2 content in biogas was up to 52%. PCR-DGGE profiles of 16S rRNA gene fragments from PGK cultures showed that the predominant H_2 producers were closely related to thermophilic anaerobic bacteria, including *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, *T. thermosulfurigenes*, and uncultured *Thermoanaerobacterium* sp., all of which probably produced H_2 with simultaneous generation of ethanol. The thermophilic bacilli capable of utilizing starch, including *Bacillus* sp., *Anoxybacillus* sp., *Bacillus lentus*, and *Geobacillus* sp., were also found. In anaerobic sludge culture, the genus of *Thermoanaerobacterium* including *T. thermosaccharolyticum* was also the dominant member.

Biohydrogen, Thermoplilic Condition, Mixed culture

講演番号：4SY04-6
講演日時、会場：3 月 27 日 15:20～ B 校舎 11 会場

Process development for thermophilic fermentation of hydrogen and methane from palm oil mill effluent with hythane gas engine testing

○Poonsuk Prasertsan[1], Sompong O-Thong[2], Thanansak Theppaya[1], Kittinan Maliwan[1], Tsuyoshi Imai[3], Takaya Higuchi[3], Suteera Prasertsan[1]([1]Prince of Songkla Univ., [2]Thaksin univ., [3]Yamaguchi Univ.)

[Objective]

To develop two-stage thermophilic fermentation of H_2 production from palm oil mill effluent (POME) followed by biogas (methane) production from H_2 effluent.

To find the optimum gas composition (H_2 and CH_4) for using the hythane as gas engine fuel.

[Results and Discussion]

Two-stage fermentation of POME for H_2 and CH_4 production under thermophilic condition was developed. In the first stage, preparation of raw POME for increasing the H_2 yields was investigated. Three start-up strategies (heat treatment, shock load, and bioaugmentation) for ASBR system were compared for H_2 production performance and study the microbial community structures by PCR-DCCE. Bioaugmentation of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2 showed stable H_2 production rate. Continuous operation by thermophilic mixed culture using ASBR at 2 d HRT resulted in higher H_2 production rate (7.2 L-H_2/L/d) and yield (3.6 L-H_2/L-POME) with COD removal rate of 38%. In the second stage, operating optimum condition for methane production using UASB reactor was achieved. The optimum HRT was found to be 7 days with the average yield of 28.9 L/L-H_2effluent and 65-75% CH_4 content.

For using the two gases as gas engine fuel, the engine had to be modified for gas fuel and equipped with research instrument. Seven gas compositions were tested to represent up to 60% of CO_2 removal from the actual biohythane. The varying parameters were “equivalent ratio” (determined from theoretical air-fuel ratio) while the results were obtained for exhaust temperature, torque, break horse power, specific fuel consumption, thermal efficiency and exhaust gas composition (HC, NO, CO, O_2, CO_2). Engine parts’ wear were determined thereafter. At present the 500-hour endurance test was being carried on. The engine is running at the optimum condition (determined from the previous tests) and performance-time dependence as well as wear will be obtained soon.

Biohythane, Palm oil mill effluent, Gas engine test

講演番号：4SY04-7
講演日時、会場：3月27日 15:40～ B校舎11会場

Optimizing the hydrogen and methane productions from sugarcane juice as the feeding processes in hythane production

○ Alissara Reungsang[1], Sompong O-Thong[2], Mullika Boonmee[1], Tsuyoshi Imai[3], Takaya Higuchi[3]([1]Khon Kaen Univ., [2]Thaksin univ., [3]Yamaguchi Univ.)

[Objective]

To develop the hythane (a mixture of hydrogen and methane gases) production process from sugarcane juice.

[Results and Discussion]

In order to achieve the goal, the whole project is divided into 4 different experiments. The first experiment focuses on the continuous hydrogen production from sugarcane juice by *Clostridium butyricum* in a 5-L continuous stirred tank reactor at 4 hr hydraulic retention time (HRT). Results revealed that a maximum hydrogen yield, specific hydrogen production potential, and maximum hydrogen production rate of 2.15 mol H_2/mol total sugar consumed, 6,512 mL H_2/L culture and 164.27 mL H_2/L.h, respectively, were achieved. In the second experiment, the key factors affecting the methane production from the effluent coming from the hydrogen production process by anaerobic mixed cultures was conducted. Investigated key factors include food/mass (F/M) ratio, nickle concentration, and cobalt concentration. We found that the optimum conditions for maximizing methane yield and COD removal efficiency were F/M ratio of 1.06 g-volatile solid (VS)/g-VS, nickel concentration of 0.53 mg/L and cobalt concentration of 0.06 mg/L. Under the optimum conditions, maximum methane yield and COD removal efficiency of 86 mL/g-VS and 92.99% were observed. The results obtained from the second experiment were used to operate the 25-L upflow anaerobic blanket sludge for continuously producing of methane from the effluent coming from the hydrogen production process. HRT of 4 days (or organic loading rate of 5.25 kg-COD/m^3d) gave the maximum methane yield, methane production rate and methane content of 0.89 L CH_4/g-COD, 3.31 L/L d, and 57.94%, respectively. Finally the hydrogen reactor and methane reactor will be combined. The efficiency of hythane at various percentages will be tested.

Biohydrogen, Methane, Hythane

講演番号：4SY05-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:35～ A 校舎 15 会場

大腸菌及び動物細胞におけるポリアミンによる翻訳の効率化機構

Polyamine stimulation of protein synthesis in *Escherichia coli* and mammalian cells

○柏木 敬子[1]、五十嵐 一衛[2,3]([1]千葉科学大薬、[2]千葉大院薬、[3]アミンファーマ研究所)
○Keiko Kashiwagi[1], Kazuei Igarashi[2,3]([1]Chiba Inst. Sci., [2]Chiba Univ., [3]Amine Pharma Res. Inst.)

多価カチオンであるポリアミン［プトレスシン（PUT）、スペルミジン（SPD）、スペルミン（SPM）］は細胞内で酸性物質と相互作用して存在する。大腸菌は PUT と SPD を含み、動物細胞では主として SPD と SPM を含んでおり、そのうち大部分が RNA と結合して存在している。従って、ポリアミンの生理作用は主として RNA との相互作用によりおこると考え、翻訳レベルにおけるポリアミンの機能解明を目指した。大腸菌ではポリアミンが 30S リボソーム亜粒子の会合を促進することにより、全体の蛋白質合成を促進する。さらに、細胞増殖や生存率上昇に重要な役割を果たす転写因子を中心とする特定蛋白質群を翻訳レベルで合成促進することを明らかにし、これら特定蛋白質群をコードする遺伝子群をポリアミンモジュロンと命名し、これまでに 17 種を同定した。ポリアミンモジュロンの mRNA はいずれも翻訳効率が悪く、1）翻訳開始に重要な Shine-Dalgarno（SD）配列が開始コドンより離れている場合、2）開始コドンが効率の悪い GUG や UUG である場合、及び 3) mRNA の open reading frame に終止コドンが存在する場合、ポリアミンによる合成促進をうけた。ポリアミンによる促進は翻訳効率の悪い mRNA 中の二本鎖を形成しない部分、即ち bulged-out 構造をポリアミンが特異的に安定化することによりおこることを明らかにした。この構造変化は Mg^{2+}や K^{+}によってはおこらず、ポリアミン特有であった。真核細胞では、ポリアミンモジュロンとして酵母で COX4、動物細胞で Hnrpl、Cct2、及び Pgam1 を同定した。ポリアミンは mRNA の 5'-非翻訳領域中にヘアピン構造並びに 18S rRNA と相補的な take-off 部位及び landing 部位を有する場合、40S リボソーム亜粒子がヘアピン構造を飛び越える ribosome shunting を促進することが明らかとなった。さらに最近、動物細胞の翻訳因子 mRNA の 5'-非翻訳領域中に 18S rRNA の 3'末端と相補的な eukaryotic Shine-Dalgarno（eSD）配列を見出し、eEF1A mRNA では eSD と開始コドンの距離が通常の mRNA より離れており、これらの mRNA からの蛋白質合成をポリアミンが促進することを見出した。従って、原核細胞から真核細胞に至るまで、ポリアミンによる翻訳効率化には共通性が認められ、ポリアミンは翻訳効率の悪い bulged-out 構造を含む mRNA からの蛋白質合成を効率化し、翻訳レベルでの遺伝子発現調節を行うことにより、細胞増殖促進や生存率上昇に貢献していると考えられる。

polyamine stimulation of protein synthesis, bulged-out nucleotides of RNA, eukaryotic Shine-Dalgarno sequence

講演番号：4SY05-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ A 校舎 15 会場

好熱菌分岐鎖ポリアミンの生合成、および高温下での翻訳の効率化
Biosynthesis pathway for branched chain polyamines in thermophilie and effect of branched chain polyamine on efficient translation
○藤原 伸介(関西学院大)
○Shinsuke Fujiwara(Kwansei-Gakuin Univ.)

好熱菌は長鎖・分岐型ポリアミンを合成するが、その生理的な意義や生合成経路は不明な点が多い。サーモスペルミンのように好熱菌特有のポリアミンと考えられていた分子は、植物でも見出されストレス応答に重要な役割を果たしている。本シンポジウムでは超好熱菌が持つ長鎖・分岐型ポリアミンの生合成経路の特徴に触れつつ、一連の遺伝学的・生化学的実験から考えられた長鎖・分岐型ポリアミンの機能について紹介したい。超好熱性アーキアである *Thermococcus kodakarensis* は 85℃を生育の至適温度とし、60℃～93℃の広範な温度でも生育し、生育温度の上昇に伴いスペルミジン[34]の割合が減少し、アミノプロピルスペルミン[3(3)43]の割合が増加する(1)。本菌はアルギニンから脱炭酸によりアグマチンを合成し、アグマチンから脱尿素によりアミノプロピルアグマチンが作られる。さらにアミノプロピル基の転移を受けてスペルミジンが合成される。この脱炭酸、脱尿素の順序は高等生物や他の多くの細菌で報告されているポリアミン合成と逆であり、このためプトレスシンは合成されない。同様な逆転現象は *Thermus thermophilus* でもみられる。特に *T. kodakarensis* においてはアグマチン合成を遮断すると致死的になる(2)。これはアグマチンが合成されないと、翻訳に必要なアグマチジンが供給されないためと考えられる(3)。このように超好熱菌においてポリアミン生合成経路はポリアミンを生産するためだけではなく、遺伝子翻訳と密接にかかわっている。なおアミノプロピルスペルミンの合成酵素は分子質量約 40k の分子として得られたが、本酵素はスペルミジン[34]からアミノプロピルスペルミジン[3(3)4]を合成した後、アミノプロピルスペルミン[3(3)43]の合成を触媒するユニークな性質を有した。このオルソログは好熱性のアーキアとバクテリアにのみ存在し、常温で生育する生き物には認められない。アミノプロピルスペルミンは高温での生育に関与していると考えられる。実際に *T. kodakarensis* の細胞質抽出液を用いて試験管内翻訳を試みると、アミノプロピルスペルミン[3(3)43]の添加により翻訳活性が促進されたが、スペルミジン[34]ではこの効果はみられなかった。これらの結果から長鎖・分岐型ポリアミンは翻訳の促進を行うことで高温での生育に寄与していると考えられる。

(1)N.Morimoto et al., J.Bacteriol., 192, 4991-5001, (2010)
(2)W.Fukuda et al., FEMS Microbiol. Lett., 287,113-120(2008)
(3)Y.Ikeuchi et al., Nat Chem Biol. 6, 277-282 (2010)

archaea, polyamine, Thermococcus

講演番号：4SY05-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:25～ A 校舎 15 会場

動物細胞におけるポリアミン恒常性の維持機構-アンチザイムを中心に-

Polyamine metabolism in animal cells -Focusing on antizyme-

○村井 法之(慈恵医大分子生物)
○Noriyuki Murai(Jikei Univ.)

動物細胞のポリアミンはプトレッシン、スペルミジン、スペルミンが主に存在している。これらは細胞増殖に必須であるが、細胞内のポリアミン濃度の顕著な上昇や低下は、細胞毒性やアポトーシスを引き起こすため、細胞内のポリアミン濃度は高度に調節されている。細胞内のポリアミン濃度の調節はアンチザイム(AZ)というタンパク質が行っている。哺乳動物細胞には AZ1, AZ2 および AZ3 の３つのアイソフォームが存在する。AZ1 と AZ2 の発現は普遍的であるが AZ3 は精巣特異的に発現している。いずれの AZ もポリアミンにより促進される翻訳フレームシフトというユニークな発現機構によって誘導され、ポリアミン合成の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素(ODC)に結合しその活性を阻害すると共に 26S プロテアソームによる ODC のユビキチン非依存的分解を促進する。これにより細胞内のポリアミン濃度はフィードバック調節される。

アンチザイムを介してユビキチン非依存的に 26S プロテアソームにより分解されるタンパク質は当初 ODC のみと考えられてきたが、近年 ODC 以外の標的が報告されている。我々も最近新たな相互作用分子を発見した。本発表では動物細胞のポリアミンの恒常性維持機構をアンチザイムの機能を中心に解説すると共にアンチザイムの新たな相互作用分子についても紹介する。

polyamine, antizyme

講演番号：4SY05-4
講演日時、会場：3 月 27 日 14:50～ A 校舎 15 会場

細菌細胞壁結合ポリアミンの膜安定化機構と合成制御

Molecular basis for the maintenance of envelope integrity in peptidoglycan-bound polyamine and the regulation of the biosynthesis of polyamine

○神尾 好是(東北大学院生命)
○Yoshiyuki Kamio(Tohoku Univ.)

カダベリン、プトレシン、スペルミジン、及びスペルミンに代表されるポリアミンは，すべての生体内に存在する脂肪族アミンである。 生体内でポリアミンは、遊離の形で存在して酸性生体成分とイオン的に相互作用し、核酸や蛋白質の合成促進、酵素活性の調節などの生理作用を発揮することが報告されてきた。ところが 1981 年以降、演者等により（１）反芻動物のルーメン内に生息する偏性嫌気性でグラム陰性［G(-)］細菌 *Selenomonas ruminantium* の細胞壁ペプチドグリカン(PG)の D-Glu 残基に共有結合して存在するカダベリン、（２）本共有結合を触媒する lipid intermediate:diamine transferase、（３）カダベリンの欠損時に起きる PG からの外膜の剥離、及びそれに誘発される細胞死、等が発見され 、生体高分子に共有結合して存在するポリアミンの新規生理機能の発見として注目を集めた。さらに、*S. ruminantium* は、一般の G(-) 菌に存在して表層構造の安定に必須なムレインリポ蛋白質を欠き、さらに遺伝子においては tol-pal gene cluster を欠くことから、本菌における PG 結合型カダベリンが関与する新規な表層膜安定機構の解明が期待された。 そして 2010 年、PG 結合型カダベリンが、本菌の外膜主要蛋白質 Mep45 のペリプラズムに露出した 46-アミノ酸残基から成る SLH ドメインを介した外膜-PG 間の強固なアンカーとなり、表層構造の安定に必須物質として存在することが証明された。 しかも結合型カダベリンをプトレシン等の他のポリアミンに変換した変異株は、野生株が元来持つ SDS(80μg/ml)や novobiocin (2μg/ml)の薬剤耐性及び高温(43℃)生育特異性を喪失した。一方、*S. ruminantium* におけるリジン脱炭酸酵素 (LDC)の研究で、「原核生物では存在しない」 とされていたアンチザイム(AZ)を介した ATP 依存性真核生物型 LDC 分解制御機構が発見された。しかも本菌において、真核生物で報告された AZ とは分子的実体が異なり、リボソーム 50S サブユニット L10 が AZ として機能していた。 本菌の L10 の構成アミノ酸配列には、既知の原核生物の L10 には存在しない２領域が存在し、両領域とも AZ 活性に必須であった。興味あることに、真核生物型オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) を有する超高熱性真正 G(-) 細菌 *Aquifex aeolicus* 及び *Thermotoga maritima* にも *S. ruminantium* L10 の上記２領域の存在が見出された。2012 年に L-10 を介した ATP 依存性 LDC 分解に関与する protease は ClpX-P と同定された。

peptidoglycan-bound polyamine, cell envelope integrity, regulation of polyamine biosynthesis

講演番号：4SY05-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:15～ A 校舎 15 会場

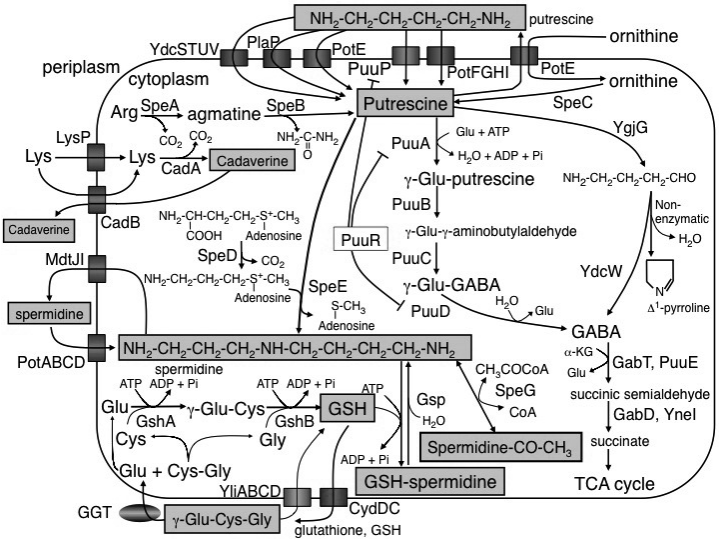
細菌のポリアミントランスポーターとその生理的役割

Bacterial polyamine transporters and their physiological fumctions

○鈴木 秀之、栗原 新、掛川 苑美(京都工繊大工科)
○Hideyuki Suzuki,Shin Kurihara,Sonomi Kakegawa(Kyoto Inst. Technol.)

ポリアミンは細胞の増殖に大きな影響を与えるため、その濃度は厳密に調節されている。ポリアミンの生合成や分解を調節することにより、その濃度が調節されるのはもちろんであるが、細胞にポリアミンを出し入れすることによっても調節されている。大腸菌を例にとると、ポリアミントランスポーターとしてあるいはポリアミントランスポーターであろうと報告されているものとして、下の図に黒四角で示したものがある。特にプトレッシンのトランスポーターは複数存在することから、大腸菌がこれらをどのように使い分けているか興味が持たれる。

PotE[1]はオルニチン/プトレッシンアンチポーター、CadB[2]はリジン/カダベリンアンチポーターであり、菌体外の pH が低くなったときに、pH を調整する役割を果たしていると考えられる。PotFGHI[3]はプトレッシンに対する *Km* 値が低く、菌体内のプトレッシン濃度管理に関与している可能性が高い。一方、Puu 代謝経路 [4]に属するプトレッシントランスポーターである PuuP[5]は、菌体外のプトレッシンを取り込み異化して C 源 N 源として利用するためのトランスポーターであると考えられる。PlaP (YeeF)[6]はプトレッシンに対する *Km* 値が PotFGHI の 100 倍もあり、菌体外のプトレッシン濃度が高濃度になったときに働くトランスポーターであると考えられる。軟寒天培地の表面を移動する surface motility は、このトランスポーターによるプトレッシンの菌体外からの取り込みによって引き起こされる。最近、演者らはスペルミジン依存的にバイオフィルムが形成されることを明らかにしたが、菌体外のプトレッシンを取り込み、菌体内でスペルミジンが作られることによってバイオフィルムが形成される場合のプトレッシン取り込みは、PlaP 依存的であることが明らかになりつつある。



参考文献

1. **PNSA** *89*: 4529-4533 (1992).
2. **Mol. Microbiol.** *51*: 1401-1412 (2004).
3. **J. Biol. Chem.** *265*: 20893-20897 (1990).
4. **J. Biol. Chem.** *280*: 4602-4608 (2005).
5. **J. Bacteriol.** *191*: 2776-2782 (2009).
6. **J. Biol. Chem.** *286*:10185-10192 (2011).

putrescine, transporter, Escherichia coli

講演番号：4SY05-6
講演日時、会場：3 月 27 日 15:40～ A 校舎 15 会場

植物のパラコート輸送はポリアミントランスポーターによってなされる
Transport of paraquat in plant is mediated by a polyamine transporter

○藤田 美紀[1]、篠崎 一雄[1]、井内 聖[2]、小林 正智[2]([1]理研植物科学セ、[2]理研バイオリソースセ)
○ Miki Fujita[1], Kazuo Shinozaki[1], Satoshi Iuchi[2], Masatomo Kobayashi[2]([1]RIKEN, PSC, [2]RIKEN,BRC)

Methyl viologen (MV)は、除草剤パラコートの主成分であり、生体内で活性酸素を発生させ、強い酸化ストレスを誘発する薬剤である。我々は、この MV に対する植物の応答を明らかとすることを目的とし、シロイヌナズナ野生型系統を用いて耐性比較を行った結果、強い MV 耐性を示す系統を見いだした。得られた MV 耐性系統について MV 以外の酸化ストレス誘導薬剤に対する応答を調べたところ、観察された耐性形質は MV 特異的であることが明らかとなった。

次に、MV 耐性に関わる遺伝子を特定するために、アソシエーション解析およびマッピング解析を行った。この結果、原因遺伝子として染色体 5 番の上腕に位置する遺伝子の特定に成功し、これを RMV1 (resistant to methyl viologen 1)と命名した。RMV1 は１２の膜貫通ドメインを有する輸送体タンパク質をコードしており、細胞膜に局在していた。RMV1 欠失変異体は MV 非感受性を示し、MV 吸収能が低下していたことから、RMV1 は MV トランスポーターであることが明らかになった。さらに、過剰発現体を用いた解析から、RMV1 タンパク質中の９番目の膜貫通ドメインに存在するアミノ酸変異がシロイヌナズナ野生型間の MV 取り込みおよび耐性の多様性を決定していることが明らかになった。

さらに、過去の研究により、植物に対する MV の毒性を外生ポリアミンが緩和することが報告されており、MV の吸収がポリアミンと競合する可能性が示唆されていたことから、我々は RMV1 の生理的基質がポリアミンであると予想した。そこで、RMV1 過剰発現体を用いた取り込み試験を行った結果、RMV1 がポリアミンの輸送に関わることを明らかにした。

以上の結果から、MV は、植物のポリアミントランスポーターを介して植物体内に取り込まれることが明らかとなり、同時に、これまでその分子メカニズムについてほとんど知見が得られていなかった植物のポリアミン輸送に関して、トランスポーターの分子実体を解明することができた。

paraquat, polyamine, transporter

講演番号：4SY06-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:35～ A 校舎 16 会場

リン酸化酵素の先祖返り ～化石ポリマー（ポリリン酸）利用能の産業への応用～

The reversion of kinase - Application of an ability of kinase to utilize a fossil polymer (inorganic polyphosphate) to industry -

○河井 重幸、中道 優介、吉岡 彩、村田 幸作(京大院農)
○Shigeyuki Kawai,Yusuke Nakamichi,Aya Yoshioka,Kousaku Murata(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

ポリリン酸は、リン酸分子がエステル結合により縮重合した鎖状あるいは環状のポリマーであり、その鎖長は数千にまで達する。当該エステル結合あたりのエネルギーが ATP のそれに匹敵するため、ポリリン酸は「生体エネルギーの塊」である。進化的には、ポリリン酸はそのシンプルな構造ゆえに原始地球環境下で生成し得たと考えられるため、ATP 生成前の「太古のエネルギー（化石ポリマー）」ではないかとの説も提唱されている。事実、系統樹上では「古い」生物とみなせるアーキアやグラム陽性細菌は、「先祖型酵素」とみなせるポリリン酸/ATP 依存リン酸化酵素（ポリリン酸と ATP の両方を利用できるキナーゼ）を有する。ポリリン酸/ATP-NAD キナーゼ（PA-NADK）は NAD^+をリン酸化して $NADP^+$を合成する。当分野では、PA-NADK とポリリン酸を用いた $NADP^+$の大量生産系が、ATP を用いた場合に比して経済面および生産物純度などの点において顕著に優れていることを明らかにしている[1) 2)]。従って、ポリリン酸を利用できるキナーゼを用いた、ポリリン酸を原料とした他の有用なリン酸化化合物の生産系が実用化されれば、産業界へのインパクトは大きいと期待される。しかし、問題はポリリン酸を利用できるキナーゼの種類が限られていることである（上記の NADK、グルコキナーゼ、ADP キナーゼ[ポリリン酸キナーゼ]、AMP キナーゼ、酢酸キナーゼ[後述]などしか知られていない)。そこで、タンパク質工学的手法で ATP 依存キナーゼにポリリン酸利用能を賦与する、すなわちキナーゼを「ATP 依存型からポリリン酸依存型へ先祖返り」させるべく、NADK をモデルとした構造機能相関研究を進めてきた。

最近、最も進化したバクテリアであるγ-プロテオバクテリアの NADK の構造に着目した結果、簡単なアミノ酸残基の置換により、γ-プロテオバクテリアの ATP 依存 NADK に強いポリリン酸利用能を賦与することに成功した。これは、確かに人為的に「ATP 依存キナーゼにポリリン酸利用能を賦与することができる」ことを初めて示した成果であり、今後の進展が期待される。他方、当分野では、アメーバ由来の酢酸キナーゼがポリリン酸を利用し得ることを見出した。本キナーゼの利用による、ポリリン酸と酢酸からのアセチルリン酸（ATP 再生系の優良基質）の生産も期待される。

1) Kawai *et al.* J. Biosci. Bioeng. 92:447-452 (2001)
2) 特許第 4088251 号

inorganic polyphosphate, NAD kinase, acetate kinase

講演番号：4SY06-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:05～ A 校舎 16 会場

結晶性セルロースとキチンを分解する酵素：プロセッシブな加水分解の分子機構とドメイン構造における戦略

Enzymes degrading crystalline cellulose and chitin: Molecular mechanisms and strategy of domain structure in processive hydrolases

○五十嵐 圭日子(東大院農)
○Kiyohiko IGARASHI(Univ. Tokyo)

プロセッシビティ（processivity）とは，酵素が基質から離れることなく触媒機能を連続的に続けることができることを意味する造語である。この定義のみから考えると，DNA やタンパク質など様々なポリマー関連酵素に用いることができる言葉であることは容易に想像できるが，演者らは特にセルラーゼやキチナーゼなどの結晶性構造多糖を加水分解する酵素（グリカナーゼ）におけるプロセッシビティの重要性に関してこれまで研究してきた。ポリマーに活性を持つ酵素の分類として一般的に用いられるエンド型（endo-type：ポリマー鎖にランダムに反応する）とエキソ型（exo-type：ポリマー鎖の端から反応する）という分類と比較したときに，プロセッシブとエキソ型の酵素を生化学的な解析で見極めることは非常に難しい。それは，一つの酵素分子が連続的に触媒反応をするプロセッシブと，反応毎に酵素分子が入れ替わるエキソ型を，古典的な生化学のみで見分けることはほぼ不可能なことが原因である。近年私たちは，高速原子間力顕微鏡を用いてセルラーゼの 1 分子観察を行い，結晶性セルロースを効率良く分解できるトリコデルマ属由来の糖質加水分解酵素（GH）ファミリー7 のセルラーゼ（TrCel7A）において，加水分解反応と酵素分子の基質表面での動きがリンクしていることを明らかにし，プロセッシブな酵素反応を直接証明することに成功した。その一方で，これまでプロセッシブな酵素であると考えられてきた GH ファミリー6 のセルラーゼ（TrCel6A）において，加水分解に連動した動きが観察されないことから，このような酵素はプロセッシビティ（processivity，反応の連続性）が低いかもしくはプロセッシブな酵素ではないことが推察された。一方，結晶性キチンを効率良く分解できる GH ファミリー18 に属するキチナーゼでは，セラチア属が生産するキチナーゼ A と B という 2 種類の酵素が知られているが，両酵素は互いにキチンの加水分解における方向性が異なることが，分解残渣の透過型電子顕微鏡像から推測されていた。これらの酵素による結晶性キチンの分解を高速原子間力顕微鏡によって観察すると，両酵素ともプロセッシブな挙動が観察されるとともに，両酵素の移動における異方性が観察された。このように結晶性多糖をプロセッシブに分解できる酵素とそうでない酵素のドメイン構造を比較してみると，プロセッシブな酵素では基質結合に関与するサブサイトの長さが生成物の結合に関与するサブサイトよりも長くなるように非対称にデザインされていた。さらに活性ドメイン自体にこのような非対称性が見られないキチナーゼの場合にも，キチン結合ドメインを活性ドメインの N 末端もしくは C 末端側にはいちすることでサブサイトを伸ばし，プロセッシブな酵素を作り上げるという結晶性多糖分解の分子戦略が垣間見られた。

processivity, cellulase, chitinase

講演番号：4SY06-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:35～ A 校舎 16 会場

耐熱性放線菌由来の万能型ポリエステル分解酵素の構築を目指して

Construction of a versatile polyesterase from thermophilic actinomycetes

○河合 富佐子(京工繊大)
○Fusako Kawai(Kyoto Inst. Technol.)

ポリエステルは汎用型プラスチックとしてあらゆる分野で用いられていると言って過言ではない。プラスチックのもたらす環境への負荷が 1990 年代初頭に世界的な社会問題となり、生分解性プラスチックの開発が進められた。生分解性プラスチックの主役はポリエステルタイプで、現在市場化されているものの大半を占める。ポリエステルの基本骨格はグリコールとジカルボン酸タイプの有機酸のエステル結合である。有機酸の種類により脂肪族および芳香族、さらに両者を合わせたタイプの脂肪族–芳香族ポリエステルに分類される。脂肪族ポリエステルは一般的に生分解性を有するが、耐熱性、硬度、耐久性などが低いため、用途が限定される。芳香族ポリエステルは PET ボトルで代表されるように耐熱性、硬度、耐久性などに優れるが、生分解性は実用的には皆無である。両者の特性を生かした形でデザインされたのが、脂肪族–芳香族ポリエステルである。グリコール、有機酸は共にバイオマスからの発酵生産が可能であるので、環境循環型素材ということができる。

ポリエステルの分解酵素はエステラーゼ、即ちリパーゼファミリーの酵素であるが、特にクチナーゼと通称されるグループがプラスチック分解に重要な役割を担っていることが知られている。クチナーゼがプラスチックを分解できるのは真性リパーゼにみられるリッドがなく、活性中心が大きく口を開けているために基質であるポリマーに接触しやすいためと考えられる。クチナーゼ研究は植物病原性カビの浸潤性と関わっていることからスタートしたが、後にポリエステル分解酵素（ポリエステラーゼ）がクチナーゼに分類されることが明らかになった。特にドイツの Deckwer らのグループは精力的に芳香環を含む難分解性ポリエステルの分解酵素に取り組み、 2005 年に耐熱性放線菌 *Thermobifida fusca* 由来のクチナーゼ遺伝子を初めてクローニングし、続いて様々な研究グループが同種由来の酵素遺伝子をクローニングした。演者らも堆肥由来の *T. alba* から tandem genes を得た。Database によると、相同遺伝子は広く放線菌に分布していると考えられる。特に *Thermobifida* 属の多くは相同性の高い tandem genes を保有していることから起源遺伝子の重複と属内の伝播が考えられる。演者らは tandem genes(*est1* & *est2*)のオペロン構造、誘導性を明らかにし、遺伝子改変による活性および耐熱性の増強に成功した。両者は 98%の相同性を有し、基質結合ループのアミノ酸配列が異なるだけであるが、活性や耐熱性は大きく異なる。Est2 は放線菌ポリエステラーゼとしては初めて結晶構造解析に成功したので、タンパク構造と活性/耐熱性の相関性を考察し、酵素の実用化への方策を探る。

Thermobifida alba, polyesterase, cutinase

講演番号：4SY06-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ A 校舎 16 会場

タンパク質立体構造に基づく酵素の高機能化と人工酵素創出への途

Structure-based improvement of enzymes and their adaptation to novel substrates

○田之倉 優、宮川 拓也(東大院農生科)
○Masaru Tanokura,Takuya Miyakawa(The University of Tokyo)

化学工業は、人々の生活を豊かにする多様な物質を生み出し、医薬品、農薬、化学薬品等の幅広い生産分野の基盤を担っているが、年間 7,500 万トンもの炭酸ガス（鉄鋼業に次いで 2 番目）を排出していることから、低環境負荷型の物質生産プロセスへの変革が求められている。酵素を産業用触媒として利用したバイオプロセスは、従来の化学プロセスと比較して炭酸ガスや環境汚染物質等の排出量を削減できることが示されており、クリーンな物質生産に向けて高いポテンシャルをもつ。また、化学触媒と比較して、酵素は反応特異性・立体特異性・位置選択性等に優れているため、光学活性体（キラル化合物）等の複雑な立体配置をもつ化合物の高効率な生産プロセスの構築において、その利用価値は極めて高い。実際、1 種類の酵素を利用したバイオプロセスが複数段階の反応からなる化学プロセスを代替した例が報告されており、酵素の利用により従来の物質生産プロセスを劇的に改善できることが期待される。

産業触媒として利用価値の高い酵素を開発するために、我々は、自然界からスクリーニングされた優れた性質をもつ酵素に対して、X 線結晶構造解析を適用してその性質を規定する構造基盤を明らかにすると同時に、その構造情報を基盤とした酵素の高機能化に取り組んできた。構造に基づく合理的デザインのみならず、定向進化アプローチや近年のデータ中心型デザインのいずれにおいても活性部位や反応機構に関する構造情報を正確に得ることの重要性は、酵素の活性や選択性を改変する目的において依然として変わらない。本講演では、キラル化合物の産業生産に有用な種々の酵素の基質特異性の改変・高機能化を例に挙げ、これらの酵素の構造解析により見出された新規かつ重要な酵素改変のホットスポットと酵素改変アプローチを紹介する。

（1）炭素二重結合不斉水素添加酵素（CYE）：CYE と補酵素 FMN 及び基質アナログとの複合体構造を決定し、基質選択性と触媒効率が活性部位近傍に存在する第 6 ループの開閉構造により規定されることを解明した。第 6 ループは、特に(4*S*)-フォレノールに対して立体障害を生じることが推定され、このループの改変により(4*S*)-フォレノールに対する活性が約 35 倍上昇した。

（2）アミノアルコール脱水素酵素（AADH）：触媒部位に直接触らない新たな高機能化アプローチとして、動的構造を利用した酵素改変を行った。AADH の触媒部位の周辺に配置するループの中で第 3 ループの運動性を高める変異導入を行い、AADH よりも約 10 倍高い活性をもつ変異酵素を取得した。

X-ray crystallography, protein engineering, chiral compounds

講演番号：4SY06-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:35～ A 校舎 16 会場

微生物ポリエステル合成系酵素の機能改変と多元ポリ乳酸の創製

Engineering of microbial polyester synthases for production of lactate-based polyesters

○松本 謙一郎[1]、田口 精一[1,2]([1]北大院工、[2]CREST-JST)
○Ken'ichiro MATSUMOTO[1], SEIICHI TAGUCHI[1,2]([1]Hokudai, [2]CREST-JST)

本講演では、「乳酸重合酵素」のモノマー基質に対する高い立体特異性と幅広い基質特異性を基盤にした、高光学純度かつ多様な乳酸ベースポリマー「多元ポリ乳酸」の創製について紹介する。

ポリ乳酸は、透明性に優れ、現在最も使用されているバイオマス由来プラスチックであり、石油由来プラスチックの代替材料として期待されている。ポリ乳酸は、L または D 体の乳酸から合成されるイソタクチックポリマーであり、現在は乳酸発酵と重金属触媒を用いる化学重合の複合プロセスにより合成されている。筆者らは、ある種の微生物がポリ乳酸と化学構造が類似したポリヒドロキシアルカン酸（PHA）を生合成することに着目し、乳酸ポリマーを細胞内で一気通貫に合成する新たなシステムの創製に取り組んだ。筆者らの研究グループは、天然および人工進化により活性を高めた変異体の機能スクリーニングを行い、一つの変異型酵素が、乳酸の CoA 体を重合するユニークな活性を持つ事を見出した。この乳酸重合酵素の発見がブレークスルーとなり、乳酸ポリマーの生合成系の構築に初めて成功した。次いで、本酵素をモノマー供給系酵素群とともに大腸菌およびコリネ菌で発現させる事により、糖質バイオマスを原料として、乳酸と 3-ヒドロキシ酪酸(3HB)との共重合体 P(LA-*co*-3HB)を合成する系を構築した。さらに、初代乳酸重合酵素に当グループで活性上昇効果を見出したアミノ酸置換変異を導入する事により、乳酸重合能の向上した第二世代乳酸重合酵素を作成した。これらの酵素改変と代謝工学・培養工学的手法を組み合わせることにより、P(3HB)からほぼ PLA ホモポリマーに近いポリマーまで、幅広い組成の P(LA-*co*-3HB)合成が可能になった。P(LA-*co*-3HB)は半透明のフィルムを作成することができ、加えて、硬質で剛直な PLA、P(3HB)の各ホモポリマーとは対照的に、ポリマー中の乳酸分率に依存した柔軟性と伸張性を示すことが分かった。さらに、乳酸重合酵素を含む PHA 合成酵素は、幅広い基質特異性を有するため、3HB 以外にも様々なモノマーユニットを取り込んだ共重合体「多元ポリ乳酸」が合成可能である。現在、様々な多元ポリ乳酸の合成方法の確立と、その物性解析を進めている。一方で、PHA 合成酵素は極めて厳密な立体特異性を有し、D 体のモノマーのみを重合する。そのため、得られるポリマーはほぼ完全なイソタクチックポリマーとなる。ポリ乳酸が優れた加工性を示すためには、99%以上の光学純度が望ましいとされているが、化学的合成系では、乳酸発酵から重合までの各過程で光学異性体が混入するため、その達成には多くの労力を要する。したがって、本乳酸ポリマー合成系は、酵素の立体特異性を利用した精密合成の好例と言えるだろう。

Matsumoto and Taguchi, Curr. Opin. Biotech. (2013) in press.

biobased plastic, polymerase, evolutionary engineering

講演番号：4SY06-6
講演日時、会場：3 月 27 日 16:05～ A 校舎 16 会場

ナイロン加水分解酵素の分子設計と生分解性ポリアミド開発への展望

Molecular design of nylon hydrolase and the prospects for the development of biodegradable polyamides

○根来 誠司(兵庫県立大院工)
○Seiji Negoro(Univ. of Hyogo)

6 ナイロン、66 ナイロンなどの合成ポリアミドは、強靭で、耐熱性、耐薬品性に優れ、繊維・プラスチックとして広く利用されている。ナイロンが示す難分解性の要因は、分子中に規則正しく存在するアミド結合が、分子間で強固な水素結合ネットワークを構築し、結晶性の高い領域を作り出しているためと考えられている。我々は、ナイロン工場廃液と活性汚泥を分離源として、6-アミノヘキサン酸オリゴマー（6 ナイロン工業副産物）を分解する微生物を取得し、分解酵素の特徴付けを行った。その結果、同オリゴマーは、NylA（環状２量体分解)、NylB（エキソ型分解)、NylC（エンド型分解）によりモノマーまで分解されることを明らかにした(Yasuhira *et al*, *Appl. Environ. Microbiol*. **73**, 7099-7102, 2007)。本演題では、特に、NylC の構造と特徴、同酵素の耐熱化とポリマー分解への応用、ガスクラスター二次イオン質量分析法(GC-SIMS)を用いたポリマー固相表面の分子量変化の解析、異種モノマー共重合による分解性の変化について紹介する。得られた知見から、酵素反応でモノマー化が可能なナイロンベースの「次世代生分解性プラスチック」開発への展望についても言及する。

ナイロン加水分解酵素の特徴と構造： NylC は N-terminal nucleophile(N-tn) amidohydrolase superfamily に属する。前駆体（36kDa）が Asn266/Thr267 間で自己分断されてα鎖（27kDa）とβ鎖（9kDa）を生じ、β鎖の N-末端 Thr267 が触媒基になる。Ｘ線結晶構造解析から、α鎖β鎖がヘテロ２量体を形成し、さらに、これらが４分子会合した（α β）$_4$構造を有することを明らかにした。さらに、サブユニット界面に位置する４箇所の変異導入により、熱変性温度（T_m 値）が、親型酵素（T_m＝52℃）から 36℃上昇した変異酵素（T_m＝88℃）の取得に成功した。

耐熱化 NylC を用いたナイロン分解： 耐熱化 NylC による 60℃の反応で、分解率は低いものの（モノマー換算で２％程度)、６ナイロン（微粉末）への酵素作用が確認できた（Negoro *et al*, *J. Biol. Chem.*, 287, 5079-5090, 2012）。また、同酵素は 66 ナイロンにも作用することを見いだした。GC-SIMS 分析から、酵素反応によるポリマー分子量の低下が確認できたが、20 量体以上のフラグメントは、切断後も水素結合によりポリマー会合体に付着しており、その後の分解を抑制していると推定した。すなわち、ポリマー分解性を高めるためには、ⅰ）高温反応が可能な耐熱性酵素、ⅱ）単位鎖長当たり多くのニックを与える高活性酵素の取得が必要であり、ポリマー側の要件として、ⅲ）一定間隔でポリマー分子間の水素結合を攪乱するモノマー分子の挿入が有効であると推定した。

異種モノマーを共重合させた 66 ナイロンの分解性： 上記の推定を検証するため、66 ナイロン合成反応において、アジピン酸とは炭素鎖長の異なるモノマー（コハク酸クロリドなど)、または、2 級アミン（*N,N'*-ジエチルヘキサメチレンジアミン）を 10%添加して界面重合させた。オリゴマー区分を洗浄・除去後、微粉末化し、同様に処理した 66 ナイロンと比較したところ、分解率が 66 ナイロンの 1.5 ～ 2 倍に上昇した。この結果は、分子間水素結合の抑制が分解性上昇に効果的であることを示す。反応温度、異種モノマーの種類と混合比率が分解性に及ぼす効果についても述べる。

nylon, hydrolase, biodegradation

講演番号：4SY07-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:40～ A 校舎 22 会場

ストレプトミセス属放線菌のエネルギー代謝と分化の連携

Connection between energy metabolism and development in Streptomyces

藤本 正浩、高野 英晃、○上田 賢志(日大生資科)
Masahiro Fujimoto,Hideaki Takano,○Kenji Ueda(Nihon Univ.)

ストレプトミセス属に代表される糸状性の放線菌は、カビに類似した複雑な形態分化を行う能力をもつバクテリアである。栄養細胞である基底菌糸を培地表面ならびに培地中に伸長させた後、栄養分の枯渇などのシグナルを受けて気中菌糸と呼ばれる新しい細胞を形成する。気中菌糸が伸長するとその先端部分には等間隔に隔壁形成がおこり、胞子鎖が成熟する。胞子が遊離して発芽すると再び栄養菌糸の増殖がはじまる。さらに放線菌群は、抗生物質などの多様な生理活性物質を二次代謝産物として生産する能力を有することでもよく知られている。放線菌にみられるこれらの特性は、バクテリアに共通して作動する基本 OS に相対峙した高次オプション機能として捉えることができる。

形態分化を開始できない放線菌の変異株の中には、同時に抗生物質の生産能を失うものが存在する。このことから、形態分化と二次代謝は共通の遺伝制御下にあると推測され、いくつかのモデルでは具体的な制御遺伝子が同定され詳しく調べられてきた。*Streptomyces griseus* の A-factor は、この菌の気中菌糸形成とストレプトマイシンなどの二次代謝産物の生産を同時に制御する微生物ホルモンであるが、その合成遺伝子 *afsA* は線状染色体の末端近くに位置し高い頻度で欠落することが知られている。これは、上記でいう所のオプション機能が遺伝的に不安定な（取り外し可能な）例と解釈できる。同様に、線状ゲノムを有する放線菌では二次代謝に関与する遺伝子群が末端に近い側に分布する傾向にあることが知られ、これらの高次機能が進化の過程で放線菌ゲノムに獲得されてきた経緯を反映していると考えられている。

放線菌の形態分化と二次代謝の遺伝制御はモデル株 *Streptomyces coelicolor* A3(2)について特に詳しく調べられ、*bld* カスケードと呼ばれる信号伝達がその中心的な役割を果たす主要制御系として同定されてきた。しかし、この制御システムがいかに環境シグナルを感知してそれを分化開始の決定に反映させているかについては理解が進んでいない。特に、エネルギー代謝がいかに分化に連携しているかについては殆ど調べられてこなかった。ここでは、講演者らが実施した呼吸系の網羅的破壊が分化の開始に抑制的に作用する現象と、細胞内 ATP レベルが信号としての役割を果たしている可能性について紹介する。バクテリアの基本 OS には、その存続（生存戦略）に関わる基盤システムが組み込まれているはずであり、それが細胞のエネルギー準位と何らかの形で連動していることは想像に難くない。そうしたシステムの具体的な形態は、高次オプション機能を備えるバクテリアをモデルとする検証を通じて明らかにできる可能性がある。

Streptomyces, ATP, development

講演番号：4SY07-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:10～ A 校舎 22 会場

コリネ型細菌の代謝、増殖、細胞分裂
Metabolism, growth and division of *Corynebacterium glutamicum*
○和地 正明(東工大院生命理工)
○Masaaki Wachi(Tokyo Inst. Technol.)

Corynebacterium glutamicum は、ミコール酸含有放線菌群に属する高 G+C 含量グラム陽性細菌で非対称の桿菌形態をしている。育種をおこなっていない野生型の *C. glutamicum* でも培養条件によって 80 g/L 程度のグルタミン酸を生産することができると言われている。しかし、普通に増殖しているときはまったくグルタミン酸を生産しない。本菌はビオチン要求性であり、ビオチン欠乏によりグルタミン酸の生産が誘導される。また、脂肪酸エステル系界面活性剤やペニシリンの添加といった処理によってもグルタミン酸生産を誘導することができる。これらの誘導処理がいずれも細胞表層構造の変化を誘起することから、当初はグルタミン酸が細胞膜から漏れ出てくると考えられた時期もあった。しかしその後の研究により、メカノセンシティブチャネル NCgl1221 が誘導処理によって引き起こされた膜張力の変化を感知して開口し、グルタミン酸を排出することが明らかとなった(1)。ビオチン制限やペニシリン添加などの誘導処理を施すと、細胞増殖が停止する。これにより細胞構成成分の合成をおこなう必要がなくなり、炭素源をもっぱらグルタミン酸合成に回すことができるようになっている。しかしながら、細胞増殖の停止と代謝フラックスの切り替えを引き起こす分子メカニズムは、いまだ解明されていない。我々は、この仕組みがグルタミン酸以外の物質生産にも応用できると考え、その解明をめざしている(2)。本菌はスナッピング分裂と呼ばれる特徴的な細胞分裂を行なうことでも知られており、分裂後の娘細胞対がＶ字型をとるのがその特徴である。また、大腸菌等の一般的な細菌に対して溶菌を誘導するペニシリンを処理しても、増殖は停止するが溶菌は誘起されない。さらに、グラム陽性細菌にも関わらず、リゾチーム処理をしても溶菌しない。このような特殊な細胞分裂様式と耐溶菌性にこの問題を解明する糸口があるのではないかと考えている。本発表では、*C. glutamicum* の増殖と細胞分裂に関する解析について紹介したい。

(1) Nakamura J, Hirano S, Ito H, Wachi M. (2007) Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. Appl Environ Microbiol. **273**:4491-4498.
(2) Kim J, Fukuda H, Hirasawa T, Nagahisa K, Nagai K, Wachi M, Shimizu H. (2010) Requirement of *de novo* synthesis of the OdhI protein in penicillin-induced glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol. **86**:911-920.

Corynebacterium glutamicum, growth, division

講演番号：4SY07-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:40～ A 校舎 22 会場

大腸菌における硫黄源の選択的利用機構とシステイン代謝との共役

Coupling between cysteine synthetic pathway and selective sulfur utilization mechanism on Escherichia coli

○大津 巌生、高木 博史(奈良先端大バイオ)
○Iwao OHTSU,Hiroshi TAKAGI(NAIST)

生物は、栄養を外界から取り込み、代謝して細胞構成成分を合成し、エネルギーを生産する。これは、生命の根本性質の一つである。カタボライトリプレッションやアンモニアリプレッションなど、同種の栄養源が培地中に複数存在する場合、より好ましい栄養素を優先的に利用する機構が多くの微生物において知られている。しかしながら、硫黄源に関する選択的な利用機構はほとんど知られていない。大腸菌は、硫酸塩とチオ硫酸塩という、２種類の無機硫黄源からシステインを合成できる。*cysK* 遺伝子がコードする*O*-アセチルセリンスルフヒドラーゼAにより*O*-アセチルセリン（OAS）と硫酸塩からシステインを生合成する硫酸経路と、*cysM* 遺伝子がコードする*O*-アセチルセリンスルヒドラーゼBによりOASとチオ硫酸塩から*S*-スルホシステインを経由するチオ硫酸経路が存在する。また、硫酸経路からシステインを合成するには、2分子のATPの消費を伴う一方、チオ硫酸経路はATP消費を伴わない。チオ硫酸経路にはエネルギー的な利点があるが、硫酸経路との使い分けや、代謝制御機構、生理的役割などに関しては不明な点が多い。

最近、我々はチオ硫酸経路を欠損している大腸菌が、培地中に硫酸塩とチオ硫酸塩が同時に存在すると生育できないことを見出した。チオ硫酸経路を遮断した*cysM* 遺伝子欠損株は、硫酸塩を硫黄源とした培地で良好に生育できる。しかしながら、ここにさらにチオ硫酸塩を添加するとほとんど生育できないことが判明した。このことは、チオ硫酸塩が硫酸塩の利用を抑制し、チオ硫酸経路優先的にシステインを合成する硫黄源の選択的利用機構を大腸菌が有していることを意味している。そこで、この現象を新規に「チオ硫酸リプレッション」（TSR）と名付け、その分子機構の解明を行っている。さらに、チオ硫酸経路からシステインを合成する際に生じる亜硫酸塩が硫酸経路に利用されること、またチオ硫酸塩で生育させた大腸菌は硫酸経路のホスホノアデニリル-硫酸（PAPS）レダクターゼCysHのシステイン残基がスルホ化されることを見出した。このことは、硫黄同化経路で生じる亜硫酸塩が、シグナル分子となり、外界の硫黄源であるチオ硫酸塩と硫酸塩の使い分けに働く可能性について紹介する。この硫黄源の選択的利用機構は、バクテリアに共通して機能する基本OSとしても捉えることができる。外界のチオ硫酸と硫酸の異なる2つの硫黄源をどのように大腸菌がセンシングしているのか、二つの異なる硫黄同化経路と異化（中央代謝）経路との共役機構を司る因子は存在するのか、それら代謝の変化が増殖の制御機構とどのように共役するのかについてその仕組みを明らかにして行きたい。

sulfur, cysteine, thiosulfate repression

講演番号：4SY07-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:10～ A 校舎 22 会場

ゲノムにおける塩基置換の偏り
Genomic DNA substitution bias

○西田 洋巳(東京大院農)
○Hiromi Nishida(Univ. Tokyo)

DNA の塩基置換は細胞内で生じているが、その意味（機能）についてはあまり意識されず、複製時におけるエラーとして認識されている。しかし、比較ゲノム学解析に基づき、バクテリアやアーキアにおいては AT に富む方向で塩基置換が生じていること[1,2]、ゲノムサイズの縮小が一般的に生じていること[3]、ゲノムサイズが大きいものは高 GC 含量であり、サイズの減少とともに GC 含量も減少すること[4-6]などのバイアスが報告されている。

真核細胞において DNA はヒストンと結合してヌクレオソームを形成し、バクテリアやアーキアの細胞では核様体タンパク質（NAP）がゲノム DNA の広い範囲に結合している。ヌクレオソームマップ解析より、DNA の塩基配列とヌクレオソーム形成の関係がわかりつつある。ヒストンは GC 含量が高い領域に結合する頻度が高く、イントロン領域に比べ GC 含量が高いエキソン領域のヌクレオソーム形成頻度が高い[7-10]。他方、ある種の NAP はゲノム DNA における GC 含量が低い領域に結合し、その領域からの遺伝子発現を抑制していることが示されている[11-13]。興味深いことに、それらの低 GC 含量の領域には外来性の DNA が位置していることが多い[11,12]。そこで、バクテリアにおけるクロモソーム DNA とその細胞を宿主とするプラスミド DNA の GC 含量を比較すると、8 割以上の宿主クロモソームとプラスミドのペアにおいて、クロモソーム DNA の GC 含量がプラスミドよりも高く（その差は 10%以内）、外来性の DNA の GC 含量がその他の領域よりも低い GC 含量となっていることを裏付けている[6]。すなわち、ゲノム DNA の塩基配列は DNA にグローバルに結合するタンパク質と共進化し、GC 含量の違いなどに反映していると考えられる[10,14]。本講演ではゲノム DNA の進化機構についての持論を述べる。

[1] Hildebrand et al., 2010, PLoS Genet, 6, e1001107. [2] Hershberg and Petrov, 2010, PLoS Genet, 6, e1001115. [3] Mira et al., 2001, Trends Genet, 17, 589-596. [4] Moran, 2002, Cell, 108, 583-586. [5] Bentley and Parkhill, 2004, Ann Rev Genet, 38, 771-791. [6] Nishida, 2012, Int J Evol Biol, 2012, 342482. [7] Schwartz et al., 2009, Nat Struct Mol Biol, 16, 990-995. [8] Tilgner et al., 2009, Nat Struct Mol Biol, 16, 996-1001. [9] Amit et al., 2012, Cell Rep, 1, 543-556. [10] Nishida, 2012, ISRN Mol Biol, 2012, 245706. [11] Navarre et al., 2006, Science, 313, 236-238. [12] Lucchini et al., 2006, PLoS Pathog, 2, e81. [13] Yun et al., 2010, J Bacteriol, 192, 4720-4731. [14] Nishida, 2013, Curr Issues Mol Biol, 15, 19-24.

genome evolution, substitution bias, DNA base composition

講演番号：4SY07-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:40～ A 校舎 22 会場

バクテリアの枠組みとは何だろうか
Elucidating the Bacteria-CoDe

○田中 寛、島田 友裕(東工大資源研)
○Kan TANAKA,Tomohiro SHIMADA(Tokyo Inst. Technol.)

全ての生命は細胞から成り立ち、細胞には原核細胞と真核細胞とがある。地球上における生命の生い立ちは今から 38 億年以上前と推定されるが、その際に生まれた細胞は原核細胞である。真核細胞がその後の原核細胞同士の相互作用や共生により進化したことを考えれば、原核細胞こそが細胞生命の起源であり、かつ基本ユニットであることを疑う余地はない。

原核細胞にはバクテリアとアーキアという極めて異なる２種の分類群が含まれるが、本シンポジウムではバクテリアを取り上げている。バクテリアには今回取り上げた生物種以外にも極めて大きな多様性がある。そして、バクテリアのもつ様々な代謝能力の利用や、病原性の克服を目的とした多くの研究の対象となってきた。しかし、バクテリアの研究がこれだけ盛んになされているにも拘らず、バクテリアとは何か？バクテリア細胞はどのようなソフトウエア（バクテリア・コード）に基づいて“生きて”いるのか？バクテリアとアーキアのシステムはどのように違うのか？といった根本的な問いかけに、まだ我々は答えることができていないのである。今回のシンポジウムでは、日頃からバクテリア研究に深く関わる研究者にお願いして、様々な観点からの“バクテリアの枠組み”についてお話いただいている。本演題では、大腸菌における増殖と代謝の関わりからバクテリア・コードについて考察してみたい。

Bacteria, Prokaryote, Software

講演番号：4SY08-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:30～ A 校舎 20 会場

食品因子感知システムに基づいた食品の機能性評価
Food functionality evaluation based on the food factor sensing system

○立花 宏文(九大院農)
○Hirofumi Tachibana(Kyushu Univ.)

我々は食品因子が生体内のセンサーに感知されることでその生体調節作用を発現するとのコンセプトに基づいた食品因子の感知システムの解明に取り組んでおり、食品因子感知システムを担う遺伝子の発現量がその食品因子の機能性発現に大きく影響することを緑茶カテキン EGCG や大豆イソフラボンを例として示してきた [1-4]。本講演では食品因子感知システム関連遺伝子をフォーカスした DNA チップ（食品感受性評価チップ）を用いた食品の機能性評価とこのほど健康寿命が日本一であることが公表された静岡県の西部に位置する掛川市在住の市民を対象とした食品因子感知システムに関する研究について紹介する。

食品機能としての食品因子感知システム調節作用

高脂肪高ショ糖食を摂取させたマウスの大腿四頭筋において複数の食品因子感知システム関連遺伝子の発現量が低下したが、緑茶抽出物の摂取はその低下を抑制した。また、ビタミンAはEGCGセンサーの発現量を増加させることでEGCGの機能性を増強することができる[2)]。

食品因子感知システムから探る健康寿命

静岡県掛川市に在住する住民を対象とした大規模な栄養疫学調査「掛川スタディ」が 2009 年に開始された。同市は国内有数の緑茶生産地として知られ、全国の人口 10 万人以上の都市における女性のがん死亡率（がん標準化死亡比）が最も低い地域（男性も二番目に低い）でもある。この研究では、緑茶摂取と動脈硬化関連因子およびその後の疾病罹患・死亡との関連を検討するとともに、肥満・高コレステロール血症、糖尿病等の動脈硬化の危険因子をもつ対象者に緑茶を一定期間飲用してもらった。我々は本調査において、食品因子の感知に関与する遺伝子の発現量と生活習慣や血清パラメーターとの関係や摂取する緑茶品種やその摂取形態の影響（抽出物、粉末、併せて摂取する食品）を食品感受性評価チップを用いて検討した。

1) **J. Biol. Chem.,** 283, 3050-3058 (2008)
2) **PLoS ONE**, 5, e11051 (2010)
3) **FEBS Lett.,** 586, 3441-3447 (2012)
4) **J. Clin. Invest**., in press (2013)

Food factors, Sensor, Sensing

講演番号：4SY08-2
講演日時、会場：3 月 27 日 13:50～ A 校舎 20 会場

超臨界流体テクノロジーのフードメタボロミクスへの応用

Application of supercritical fluid technology to food metabolomics

○馬場 健史(阪大院・工・生命先端)
○Takeshi Bamba(Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

メタボロミクスは，表現型として現れにくい生体内の変化を代謝物の変化として表現できることから，高解像度の表現型解析システムといえる．多成分の量比バランス（プロファイル）により形質を精密に表現するというメタボロミクスの手法は，生物の表現型の解析だけなく，食品の品質や機能など様々なものの形質の解析に有用であると考えられる．我々のグループでは，先駆けて食品の品質評価におけるメタボローム解析技術の適用を試み，マルチマーカープロファイリングをベースとしたフードメタボロミクスに取り組んできている．メタボロミクスにおいて一般的に用いられている GC/MS，LC/MS，NMR のほかに，超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）や FT-NIR などの新たな手法の適用についても試みている．その中でも SFC は疎水性の代謝物の分離において特筆すべきに有用性を示すことから，各種脂溶性代謝物の分析における SFC の適用技術の開発に積極的に取り組んでいる．

SFC は，温度や背圧を変化，すなわち，移動相の状態を変化させることにより GC や HPLC にない幅広い分離モードを選択できる特徴を有する．また，HPLC 用の各種カラムが使用でき，カラムや移動相に添加するモディファイヤーを選ぶことによって，幅広い化合物の分離に適用可能である．さらに，低粘性であるためカラム背圧が低いことを利用して，高速モードでの分離やカラム長を伸ばすことにより分離能を向上させることが可能ある．我々のグループでは，各種カラムにおける分離特性に関する知見の取得を行うとともに検出器として様々な質量分析計の接続を試み，メタボロミクスのコンセプトである多成分の一斉分析が可能なシステムの構築に取り組んでいる．さらに，我々のグループでは，変化しやすい成分をマイルドにかつ効率よく抽出できる超臨界流体抽出（SFE）のオンライン化についても積極的に取り組んでいる．抽出操作時に酸化を受けやすい成分を試料より抽出しそのままに分析できるオンライン SFE-SFC/MS は，食品中の抗酸化物質や酸化代謝物などの高精度のプロファイリングを可能にする画期的な手法として期待できる．また，SFE をオンライン化は，揮発成分のプロファイリングにおいてもメリットがある．通常，GC で分けて分析する必要がある揮発成分も同時に抽出・分析できることから，食品成分の総合的な評価，機能解析において威力を発揮する有用技術である．

本講演では，SFC や SFE を効果的に利用したリン脂質，トリグリセロール，カロテノイド類などの各種脂溶性成分のプロファイリング技術について紹介するとともに，フードメタボロミクスの有用な分析ツールとなりうる超臨界流体テクノロジーの可能性についても言及したい．

supercritical fluid chromatography, supercritical fluid extraction, metabolomics

講演番号：4SY08-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:20～ A 校舎 20 会場

組織内微小領域における機能性食品因子の時空間分解可視化

Spatio-temporally resolved visualization of functional food factors in tissue micro-regions

○藤村 由紀[1]、三浦 大典[1]、割石 博之[1,2,3]、立花 宏文[1,3](1 九大レドックスナビ、2 九大基教、3 九大院農)
○Yoshinori Fujimura[1], Daisuke Miura[1], Hiroyuki Wariishi[1,2,3], Hirofumi Tachibana[1,3]([1]ICMRN, Kyushu Univ., [2]Fac. of Arts & Sci., Kyushu Univ., [3]Fac. of Agric., Kyushu Univ.)

今日、機能性食品因子の多彩な生体調節作用に関する研究が活発に行われており、様々な分子メカニズムが *in vitro* の実験系にて提唱されてきたが、これらを *in vivo* にて直接証明することは多くの場合困難である。これは現状の食品機能性解析技術が、生体内における食品因子やその機能性発現に関わる一連の内在性因子の挙動を定量的に捉える能力（感度、精度、特異性、網羅性、時空間分解能等）を欠如していることに起因している。そのため、機能性食品因子の体内動態、すなわち、それら因子の作用標的部位における具体的な時空間分布（臓器および組織内微小領域分布）は依然として不明瞭な研究領域であり、いつ、どこで、どのような形で食品因子が生体内因子と直接相互作用しているかという詳細な分子動態情報を把握できる技術が、*in vivo* における食品因子の高精度な機能性発現メカニズムの理解に必要不可欠である。

食品因子の挙動を捉えるには適切な標識化が必要となるが、現状ではその標識の適用分子種に大きな制限があるとともに、標識化から解析までに要する労力や時間的・コスト的パフォーマンスも悪く、また、動態解析に必須な標的物質とその代謝物を区別して作用部位での時空間動態を同時追跡できない。これに対して、近年、組織切片上の様々な生体分子の分布を非標識で同時可視化する質量分析イメージング技術が注目を集めている。我々は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）法を用いた質量分析イメージングにより、病態に応じた一連の生体内低分子代謝物の時空間変動情報の同時可視化に世界に先駆けて成功した。本講演では、機能性食品因子の組織内微小領域における時空間分解可視化を目指した MALDI 質量分析イメージング(MALDI-MSI)の技術開発について紹介する。

我々はこれまでに詳細な追跡が困難であった代表的な機能性食品因子である緑茶カテキン Epigallocatein-3-*O*-gallate(EGCG)の組織内微小領域における二次元分布情報の可視化を試みた。EGCG のイオン化に最適なマトリックス(イオン化助剤)を見出すため、汎用マトリックスを含む 40 種類以上の化合物を MALDI-TOF-MS を用いて検証した結果、ある種の Naphthalene 誘導体が組織上の EGCG に対する高い検出能を示した。さらに、EGCG を経口投与したマウスの肝臓および腎臓の EGCG およびその代謝物の同時画像化にも世界で初めて成功した。このような非標識多分子イメージング法の開発により、実態が不明瞭な標的組織中の EGCG の詳細な作用機構の解明に寄与することが期待される。

Mass spectrometry imaging, MALDI, EGCG

講演番号：4SY08-4
講演日時、会場：3 月 27 日 14:50～ A 校舎 20 会場

プロテオミクスを基盤とした食品機能性評価
Proteomic Approach to The Actions of Various Food Factors
○榊原 陽一(宮崎大農)
○Yoichi Sakakibara(Univ. Miyazaki)

【目的】近年、食品に含まれる機能性成分が注目されており、様々な試験法により食品の抗酸化作用が評価されている。我々は、プロテオミクスを基盤として二次元電気泳動による分析を基盤とした食品の抗酸化ストレス作用評価法の確立を目的に研究を実施している。はじめに手軽にできる蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動法の確立を行った。次いでこの方法を発展し、食品成分の抗酸化ストレス活性を評価するため酸化傷害タンパク質特異的な二次元電気泳動によるプロテオーム解析技術を検討した。
【方法】蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動解析は、スクシンイミド活性エステルを有する IC3-OSu および IC5-OSu の２種類のインドシアニン化合物を用いてプレラベル法にてタンパク質のアミノ基を標識して実施した。酸化傷害タンパク質のプロテオーム解析には、同じ IC3 および IC5 のヒドラジド型蛍光色素を使用し、カルボニル化タンパク質が特異的に有するアルデヒドを特異的に標識することで実施した。二次元電気泳動後、蛍光スキャナによりゲルイメージを取得し、Progenesis による画像解析を行った。発現量が変化したマーカー候補タンパク質スポットは、MALDI-TOF 型質量分析装置を用いてペプチドマスフィンガープリント法により同定した。また、食品成分の系統的分析は、発現解析ソフト GeneSpring GX により分析した。
【結果】蛍光色素 IC3-OSu および IC5-OSu を用いた蛍光ディファレンシャル解析は、プロテオームの発現変化を内部標準法により適切にかつ手軽に定量解析できることが示された。同法を用いて、ヒト肝ガン由来細胞株である HepG2 細胞に種々の約 50 種の食品成分を作用し、タンパク質発現パターンをクラスター解析により系統的に分析した。これら結果から、プロテオーム解析は食品成分の機能性に関連するバイオマーカーの探索のみでなく、食品成分の構造・機能の相関などの解析が可能であることが示唆された。さらに、ヒドラジド型の蛍光色素を用いて、酸化傷害タンパク質を特異的に検出できるプロテオーム解析技術は、タンパク質の酸化傷害の程度を指標として、食品の抗酸化ストレス活性の評価に応用できることが示された。

proteomics, antioxidant, proteome

講演番号：4SY08-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:20～ A 校舎 20 会場

食品機能解析研究とバイオインフォマティクス

Bioinformatics guidelines for conducting transcriptome analysis in neutrigenomics

○門田 幸二(東大院農学生命)
○Koji Kadota(Univ. Tokyo)

一度に多数の遺伝子発現情報が得られるマイクロアレイ（DNA チップ）は、これまで高品質な食品の機能的デザインに直結する先端オミックス解析技術の一つとして重要な役割を担ってきた。この種の解析の最も基本的な実験デザインは「機能性食品 vs. 非機能性食品」のような二群間比較であり、得られた数値データをもとに発現変動遺伝子検出や発現変動に関連した同一機能をもつ遺伝子セットの同定（Gene Ontology 解析やパスウェイ解析に相当）などの基礎研究が行われている。

演者はこれまで、マイクロアレイや次世代シーケンサー（NGS）から得られる遺伝子発現データを効率的に解析するための方法の開発に取り組んできた。また、個別のデータ解析に関する各種相談や自身の経験を通じて得られたノウハウの普及についてもホームページなどを通じて行ってきた（http://www.iu.a.u-tokyo.ac.jp/~kadota/）。しかし現状では、シンポジウム企画趣旨である食品機能性評価をより正しく効率的に行うための基礎情報収集時に、私が話題提供可能な以下のような事柄を認識できていない（あるいは黙殺した）研究発表が少なからず見受けられる：

- このやり方では発現変動遺伝子数に関する議論はできません
- この実験デザインではこういうことは言えません
- 過去の研究結果と違うのは（おそらく間違っているのではなく）こういう理由からだと思います

本シンポジウムでは、バイオインフォマティクス側の「常識（推奨ガイドライン）」が、（機能性食品解析分野を含む）実データ解析において正しく反映されるべく、以下の話題に触れる予定である：

- technical replicates と biological replicates…
- 「統計的検出法」と「倍率変化に基づく方法」では発現変動解析結果がかなり違う
- 「x 倍以上発現が変化した遺伝子数は y 個であった」という結論は危険
- 「（サンプル間）クラスタリング」から発現変動解析結果のおおよその見当がつく
- 次世代シーケンサー（NGS）データ解析もマイクロアレイ解析と同じ枠組みで可能か？

bioinformatics, transcriptome, microarray

講演番号：4SY08-6
講演日時、会場：3 月 27 日 15:50～ A 校舎 20 会場

レドックス制御を基盤にした食品の機能性評価

Redox regulation-based functional evaluation of foods

○内田 浩二(名大院生命農学)
○Koji Uchida(Nagoya Univ.)

機能性食品成分の中にはタンパク質などの SH 基に対して選択的に作用するものがあり、この性質とがん予防や抗炎症作用などの生体防御機能との関連性が示唆されている。例えば、アブラナ科植物に広く含まれるイソチオシアネート化合物は、SH 基に対して選択的に作用することが知られる親電子化合物であるが、中でもスルフォラファンはブロッコリーに含まれる解毒酵素誘導物質として報告されて以来、食品に含まれる最も有名ながん予防成分の一つとなっている。また、内因性物質の中にも SH 基選択的な親電子化合物が知られている。これらの中には、プロスタグランジン D_2 の非代謝産物である 15-デオキシ-$\Delta^{12,14}$ プロスタグランジン J_2 (15d-PGJ_2) 、ω-3 多価不飽和酸化脂肪酸のオキソ誘導体、8-ニトロ-cGMP などが含まれ、解毒酵素誘導活性のほか、炎症の収束や抗腫瘍性など生体防御に関連した多数の報告がある。

本シンポジウムでは、様々な細胞内レドックスセンサーを取り上げ、食品素材から見いだされた機能性成分の作用メカニズムについて、特にそのセンサータンパク質への作用に関するケミカルバイオロジー研究について紹介したい。

redox regulation, electrophiles, protein thiols

講演番号：4SY09-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:35～ A 校舎 25 会場

効率的カテキンプローブ合成を基盤とする動態解析

Dynamic Imaging of EGCg Based on Efficient Synthesis of Probe Molecule

○菅 敏幸(静岡県大薬)
○Toshiyuki Kan(Univ. of Shizuoka)

静岡の特産品の「緑茶」を多く飲む人はガンや糖尿病になりにくいと言われ、その有効成分であるエピガロカテキンガレート (EGCg：**1**) は抗ガン作用や抗菌活性作用などの多彩な生理活性を有していることが知られている。そのため、カテキンの生理作用解明研究が盛んに行われてきたが、体内や細胞での詳細な動態解明の例は皆無であった。我々は、カテキンのプローブ分子を合成することにより生理的条件下での機能解明が可能になると考え、本研究に着手した。

筆者が静岡の赴任した 2005 年より当研究室では EGCg の合成研究を開始した。その過程で、A 環部に水酸基の無い DOEGCg (**2**) が **1** とほぼ同等の活性を有することを明らかにした。さらに、その結果を基にして種々のプローブユニットの導入が可能となる第一級アミンを有する側鎖を有する APDOEGCg (**3**) を合成した。プローブ前駆体 **3** はフェノール性水酸基を保護することなく、様々なプローブユニットの導入が可能であった。特に、蛍光発色団（Tokyo Green）と連結することで蛍光プローブ（**4**）を合成した。さらに、**4** をヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECS) にインキュベーションしたところ、 Figure 1 に示したように **4** が細胞の中に到達することも明らかとなった。

また、蛍光プローブによりカテキンの生細胞での動態解析が可能となったため、生体内での挙動解明を可能にするポジトロン断層（PET）プローブの合成に着手した。PET はがん診断にも使われる有効な方法であるが、^{11}C の半減期 20 分のため素早い合成が必須である。我々の花粉症に有効なメチル化 EGCg の合成を基にして、[^{11}C] 標識化カテキン（**5**）の迅速合成に成功した。さらに、浜松ホトニクスにて、Fig 2 に示したように EGCg の体内での動きをリアルタイムにて観測した。

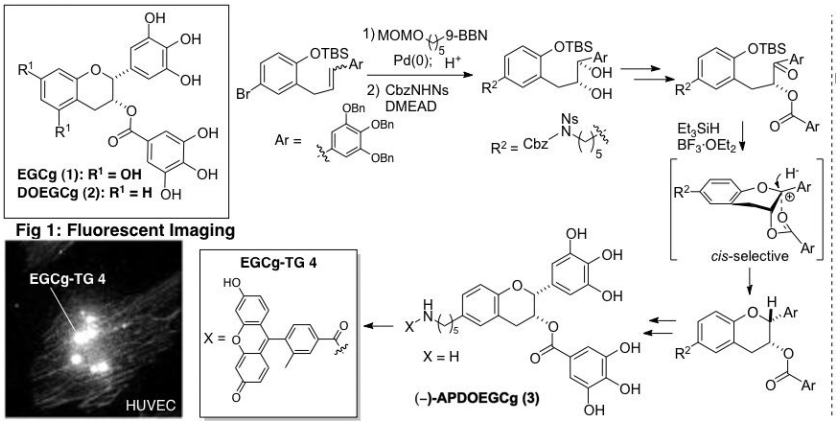


Fig 1: Fluorescent Imaging

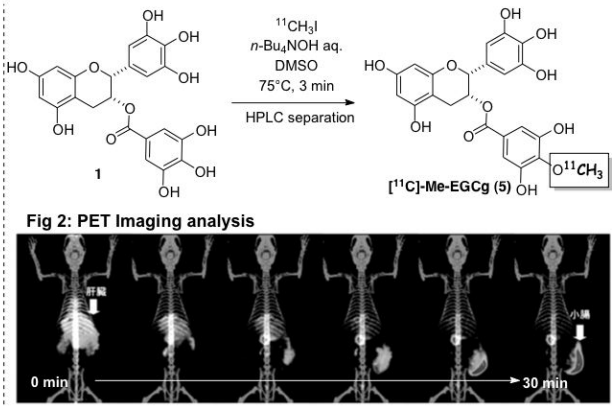


Fig 2: PET Imaging analysis

EGCg, fluorescein probe, PET

講演番号：4SY09-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:05～ A 校舎 25 会場

フラボンおよびオーロン類の多様性指向型位置選択的合成法の開発

Diversity-Oriented Synthesis of Flavones and Aurones via Regioselective Cyclization

○吉田 将人(東北大院薬)
○Masahito Yoshida(Tohoku Univ.)

フラボノイド類は天然から多く見いだされており，抗腫瘍作用や抗菌作用，抗酸化作用など多様な生物活性を有していることが知られている．また，我々が日常摂取しうる食物にも含まれていることからも毒性が低いことが予想され，フラボノイド類は医薬品としての応用も期待される化合物群と考えることができる．フラボノイド類は C_6–C_3–C_6 構造を基本骨格として有し，左右それぞれの芳香環上に様々な置換基が導入されている．これら置換基の影響により有為な生物活性を発現するが，天然から得られるフラボノイド類は, その多くがフェノール性水酸基やメトキシ基, プレニル基, グルコース等の糖で置換された化合物である．フラボノイド類における構造活性相関についての情報を得る，または強力な生物活性を有する新規化合物の探索を行う場合，置換基が限定される天然物のみでの探索研究には限りがある．したがって，有機合成化学によるフラボノイド類のライブラリー合成を基盤とした，より広範囲な化合物空間（ケミカルスペース）の構築が必要であると考えられる．そこで我々は，多様性指向型合成戦略に基づいた合成法を開発することにより，多種多様な天然型または非天然型フラボノイド類の高効率合成を達成できると考えた．

我々はフラボノイド類の中でも，特にフラボン骨格およびオーロン骨格を有する天然物に着目した．フラボン骨格およびオーロン骨格の合成法は現在までに様々な方法が報告されているが，サリチルアルデヒド誘導体とフェニルアセチレン誘導体から容易に調製可能なアルキノイルフェノールを用いた合成法が多様性指向型合成に適していると考えた．実際にアルキノイルフェノールからは 1 段階で対応するフラボンまたはオーロンへ導くことができるが，その際環化反応における位置選択性が問題となり，6 員環構造を有するフラボン類と 5 員環構造を有するオーロン類の混合物として得られることが知られている．我々はこの位置選択性の問題を解決し，アルキノイルフェノールから高収率および高選択的に望むフラボン類またはオーロン類を与える合成法を見いだすことに成功した．本発表では，その詳細について報告する．

References

1) Yoshida, M.; Fujino, Y.; Doi, T. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4526–4529.
2) Yoshida, M.; Fujino, Y.; Saito, K.; Doi, T. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 9993–9997.
3) Yoshida, M.; Saito, K.; Fujino, Y.; Doi, T. *Chem. Commum.* **2012**, *48*, 11796–11798.

Diversity-Oriented Synthesis, Flavonoid, Regioselective

講演番号：4SY09-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:35～ A 校舎 25 会場

生物機能解明を目指したアントシアニンの汎用的合成法の開拓

Development of versatile synthetic methods of anthocyanins for biofunctional studies

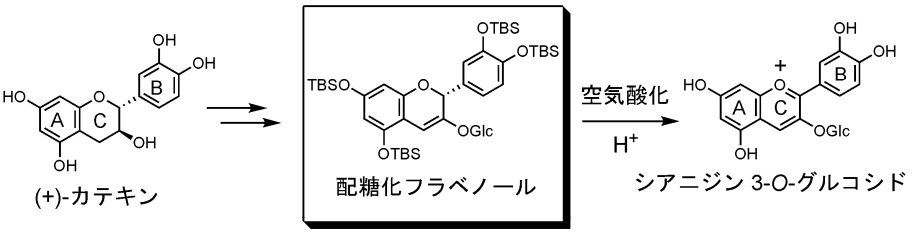
○尾山 公一[1]、近藤 忠雄[2]、吉田 久美[2]([1]名大物国セ、[2]名大情報科学)
○Kin-ichi Oyama[1], Tadao Kondo[2], Kumi Yoshida[2]([1]RCMS, Nagoya Univ., [2]IS, Nagoya Univ.)

アントシアニンは、梅干などに古来用いられてきたように安全な食品着色料である。さらに、近年、抗ガン、血糖値上昇抑制、視覚改善作用などの生理活性が広く知られるようになってきた。また、植物中では、3-デオキシアントシアニンがファイトアレキシンとして働くことが報告され、従来知られていなかった新しい生物機能が発見されている。これらの生物機能解明の研究には、非天然型を含む多様な構造を有する純粋なサンプルの供給が不可欠である。しかし、アントシアニンは、類縁体や他の共存成分と相互作用しやすく植物からの単離が非常に難しい。その上、中性条件下では不安定で容易に分解するなど取り扱いが難しく、天然からの大量供給は困難を極める。一方、合成研究は、1）フラボノール配糖体の金属還元による方法と 2）ロビンソンらによるアルドール縮合による方法が古くから知られているが、いずれも収率の基質依存性が大きく反応条件が厳しいため単純なアントシアニンの合成に限られていた。

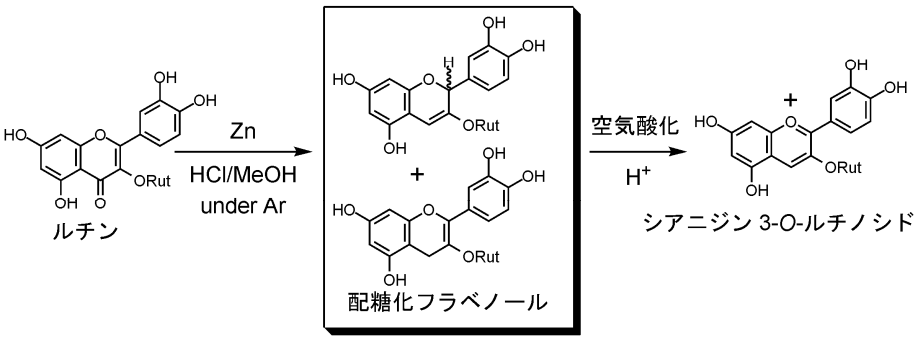
そこで我々は、基質依存性がなく温和な条件下で行えるアントシアニン合成法の開拓を目指し研究を行っている。そして、生合成中間体と酸化段階が同じフラベノール配糖体を鍵中間体とする新しいアントシアニンの合成法を確立し、シアニジン 3-グルコシドの全合成を達成した。また、本方法を応用することでナリンゲニンから 3-デオキシアントシアニンの合成にも成功した。さらに、フラボノール配糖体の金属還元において反応生成物を精査することで、この反応も中間体にフラベノール配糖体を経由することを明らかにした。

本講演では、フラベノール配糖体のアントシアニン生合成経路への関与の可能性についても議論する予定である。

I. 配糖化フラベノールを鍵中間体とするアントシアニンの合成



II. 配糖化フラボンのクレメンゼン還元によるアントシアニンの合成



anthocyanin, flavenol glycoside, air oxidation

講演番号：4SY09-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:20～ A 校舎 25 会場

緑茶カテキン EGCG のケミカルバイオロジー

Chemical biology of green tea polyphenol EGCG

○立花 宏文(九大院農)
○HIrofumi Tachibana(Kyushu Univ.)

食品の持つ生体調節機能を活用した健康志向が高まる中、機能性食品因子の標的となる生体分子を明らかにすることでその機能性発現の科学的根拠に資するとともに、新たな生命現象の解明やバイオマテリアルの創成に繋げていこうと取り組んでいる。本講演では、緑茶カテキン EGCG の機能性発現機構の解析から発見した新規のがん細胞特異的致死誘導経路ならびに腫瘍細胞を特異的に検出するための EGCG をベースにしたケミカルプローブの作成について紹介する。

緑茶カテキン受容体67LRを介した腫瘍特異的アポトーシス誘導経路

緑茶カテキンEGCGはその細胞膜上のセンサー分子である67LR (67kDa laminin receptor)と結合し[1]、抗腫瘍作用[2]や抗炎症作用を発揮する[3]。我々はEGCGが様々な腫瘍細胞において高発現している67LRを介してAkt/eNOS依存性のNO/cGMP産生を誘導し、PKCδ/酸性スフィンゴミエリナーゼ(aSMase)を活性化することで細胞死を誘導する経路を見出した[4), 5)]。さらに、種々のがん患者由来の腫瘍組織においてcGMP分解酵素PDE5が高発現しており、PDE5阻害剤を併用することでEGCGの細胞致死活性を顕著に増強できることをマウス腫瘍モデルにおいて明らかにした[5)]。一方、aSMaseの活性化によって生じるセラミド誘導性の脂質ラフトの崩壊が細胞致死活性に重要であること、また、セラミド分解促進因子であるスフィンゴシンキナーゼ1（SphK1）がミエローマで高発現しており、SphK1阻害剤がEGCG誘導性の67LR/aSMase/セラミド産生経路の活性化を維持することでEGCGの抗腫瘍活性を飛躍的に増強することを見出した。

蛍光標識化 EGCG による腫瘍細胞の可視化

各水酸基をメチルエーテル化した EGCG のがん細胞増殖抑作用ならびに 67LR に依存したシグナリング誘導能における活性評価から EGCG の活性発現に寄与度の低い水酸基を同定し、その箇所に蛍光色素を付加することで 67LR 陽性のがん細胞を特異的に検出できる EGCG 誘導体の作成に成功した。

1) **Nat. Struct. Mol. Biol.**, 11, 380-381 (2004)
2) **J. Biol. Chem.,** 283, 3050-3058 (2008)
3) **J. Immunol.**, 185, 33-45 (2010)
4) **Biochem. J.**, 443, 525-534 (2012)
5) **J. Clin. Invest**., in press (2013)

EGCG, PDE5, SphK1

講演番号：4SY09-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:50～ A 校舎 25 会場

^{11}C-標識フラボノイド PET プローブの合成戦略

Synthetic strategy for ^{11}C-labeled flavonoid PET probes

○土居 久志(理研分子イメージング)
○Hisashi Doi(RIKEN CMIS)

フラボノイド類が持つ多彩な生物活性の中でも、とくに、抗がん作用、抗ウイルス作用、抗炎症作用、さらに中枢神経保護・成長作用などは、創薬の観点からも大いに魅力的であり、事実、創薬のリード化合物ならびに薬剤候補化合物として活発な研究活動が進められている。一方、陽電子放射断層画像撮影法（PET）は、極微量の短寿命放射性化合物を使用して、小動物をはじめ、ヒト体内の化合物の集積や、その動態を高精度かつ定量的に画像化できる核医学の先端技術である。近年では、タンパク質や酵素のイメージングによるシグナル伝達系の解明や創薬ターゲットの適合性評価、薬物の体内動態イメージングによる代謝および薬物トランスポーターの評価、さらには疾患組織のイメージングによる病態診断や薬剤の投与用量の適合性評価などにも応用されている。まさに、従来の創薬プロセスを革新し、最新医療の有力手段の一つとして大きな期待が寄せられている。現在、私達は、薬剤候補化合物としてのフラボノイド誘導体の PET プローブ化を推進するとともに、PET 放射性条件下におけるフラボノイド基本骨格そのものの標識化研究を進めている。

「放射線環境下かつ時間制限下での有機合成化学」。PET プローブの化学合成の難しさを表現した一言である。PET で用いる陽電子放出核種として代表的なものに、^{11}C（半減期、20.4 分）^{13}N（半減期、9.96 分)、^{15}O（半減期、2.07 分)、^{18}F（半減期、109.7 分）などがある。これらの陽電子放出核種は主に生体構成元素の放射性同位体である。したがって、これらの核種を薬剤や生命機能の探索分子に効果的に導入する事ができれば、PET 法により生体の in vivo 分子情報の抽出が可能となる。しかしながら、短寿命 PET プローブの合成には通常とは異なった化学合成法が必要となる。例えば、^{11}C の半減期はわずか 20 分であるため、^{11}C 核種の導入は合成プロセスの最終段階で、かつ、わずか 5 分程度の反応時間で行う必要がある。さらに使用できる ^{11}C 核種は超微量（最大で数μg 程度（^{12}C の混入を含めた値））である。このような極限の有機化学においては、反応を加速させるために大過剰の基質を用いるか、あるいは、高活性触媒の使用が求められる。しかしながら、この方法が反応に常に有利になる訳ではない。私達はこれらの合成化学的制限を踏まえて、フラボノイドの PET プローブ化の実現を目指して、従来の化学反応の質的な改変を含め、短寿命放射性核種に適応した新たな化学反応の開発を行ってきた。本シンポジウムでは、現在、私達が取り組んでいるフラボノイドの ^{11}C-標識化に向けた合成戦略についてご報告させて頂きたい。

positron emission tomography, ^{11}C radionuclide, labeling chemistry

講演番号：4SY09-6
講演日時、会場：3 月 27 日 16:20～ A 校舎 25 会場

ポリフェノールによるアミロイドβの凝集抑制機構

Inhibitory mechanism of amyloid-beta aggregation by polyphenols

○入江 一浩、佐藤 瑞穂、村上 一馬(京大院農)
○Kazuhiro Irie,Mizuho Sato,Kazuma Murakami(Kyoto Univ.)

［**目的**］アルツハイマー病（AD）は、生活習慣病の一つと考えられていることから、食品による AD 予防が望まれている。AD の原因物質とされる 42 残基からなるアミロイドβタンパク (Aβ42) は、凝集することで神経細胞毒性を示す。これまで、ポリフェノールによる Aβ の凝集抑制が数多く報告されているが、凝集抑制に必要な構造因子ならびに Aβ における作用部位の同定などのメカニズム研究はほとんど行なわれていない。最近本研究グループは、マリアアザミ種子抽出物であるシリマリンが、AD モデルマウスの脳内における Aβ 凝集沈着および認知異常行動を改善することを明らかにした (1)。本研究は、シリマリンの活性本体を同定し、その凝集抑制機構を明らかにすることを目的とした。

［**方法および結果**］シリマリンに含まれる既知のポリフェノール 6 種を同定し、それらによる Aβ42 の凝集抑制活性を Th-T 法で調べた結果、タキシフォリンのみが強い活性を示した。一方、無酸素条件下あるいは酸化剤共存下での凝集抑制活性を精査した結果、タキシフォリンの B 環のカテコール構造が酸化されて *o*-キノン体になることが活性発現に必須であることが明らかになった。さらに、Aβ42 の塩基性アミノ酸残基 (5R, 16K, 28K) をそれぞれ nor-leucine 残基に置換した変異 Aβ42 に対する凝集抑制試験の結果から、本 *o*-キノン体が、Aβ42 の主として 16 番目のリシン残基と付加体を形成することにより、凝集を抑制していることが強く示唆された。

［**考察**］本発表者らは Aβ42 凝集体において、Q15～A21 ならびに V24～I32 領域が分子間βシート構造を取っていることを系統的なプロリン置換などによって明らかにしている (2)。本結果は、β シート形成領域に含まれるリシン残基が酸化型タキシフォリンと結合することにより、β シート構造を阻害して凝集抑制するという新しいメカニズムを示唆するものである。一方、カテコール構造を持たないクルクミンも Aβ42 の凝集を抑制するが、これは主としてクルクミンと Aβ42 の 19F 及び 20F の芳香環どうしの π-π スタッキングによるものであることが、固体 NMR 解析によって明らかになっている (3)。Kaempferol などのカテコール構造を持たないフラボノイドも Aβ42 の凝集を抑制したが、これらの化合物の平面性が高いことから、その機構はクルクミンに類似しているものと考えられる。

［**文献**］

(1) N. Murata *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2010**, *74*, 2299-2306.
(2) K. Murakami *et al., J. Am. Chem. Soc*. **2005**, *127*, 15168-15174.
(3) Y. Masuda *et al., Bioorg. Med. Chem*. **2011**, *19*, 5967-5974.

Alzheimer's disease, amyloid-beta, polyphenol

講演番号：4SY10-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:35～ C 校舎 11 会場

マイクロ波および酵素を活用した糖鎖生産技術開発研究

Carbohydrate syntheses using microwave and enzymes

○清水 弘樹(産総研生物プロセス)
○Hiroki Shimizu(AIST)

糖鎖は核酸や蛋白質に続く第三の生命情報分子として注目され、医薬分野における糖鎖利用の重要性はますます高まっている。糖鎖合成は数十年に渡って盛んに研究され、現在では合成できないオリゴ糖は無いと言っても過言ではないであろう。しかし化学合成では、保護基の選択的保護と脱保護、隣接基関与・アノマー効果等を利用した反応制御が要求され、その結果長い工程数が必要となり、調製時間が長くかかる。そのため、合成糖鎖の産業生産への展開は、未だ不十分で不満足な状態である。本講演では、糖鎖合成研究のさらなる発展と新展開を指向して、マイクロ波を利用したオリゴ糖のユニークな合成ルートの開拓研究と糖ペプチドの効率合成[1]、糖転移酵素反応における副反応の制御や非天然型糖鎖の合成研究などについて、掻い摘んで紹介する。

電子レンジに代表される様に、マイクロ波を照射すると物質は効率的に加熱されうる。1968 年以降、マイクロ波は化学反応の効率化にも利用され、加熱反応における短時間化と高収率について多数報告されている。我々は、反応を低温に保ちつつマイクロ波照射することで、加熱に依らないマイクロ波効果を得て、ルイスＸ３糖体合成におけるユニークな合成ルートを開拓した。すなわち、+10℃を必要とするグリコシル化反応を低温中でマイクロ波を利用することでより低温にて進行させ、−10～0℃で生じる副反応を抑えることに成功した。[2] また、糖ペプチド固相合成において、マイクロ波で加温することにより、より迅速かつ高収率で糖ペプチドを合成することに成功した。[3]

糖鎖合成の鍵は、位置選択的かつ立体選択的にグリコシド結合を形成させるところにある。そのため、前述の通り、化学合成法では長い工程数が必要となり、時間や収率のロスが不可避となっている。しかし糖転移酵素を利用すると、グリコシド結合を単工程で高い選択性でもって形成させることができ、糖鎖合成の簡素化が可能になる。一方で、酵素法による糖瀬合成では、基質や生成物の制限、合成スケール等の課題がある。我々は、酵素活性を向上や反応系へのシクロデキストリンの添加により、難溶性基質の合成スケールを向上させる研究について報告したが[4]、本講演では「天然型リコンビナント酵素を用いた非天然型糖鎖の合成」[5]や「添加物による副反応の制御」[6]について紹介する。

【参考文献等】 [1] 有機合成化学協会誌, 70, 250-264, 2012、[2] Tetrahedron, 64, 10091-10096, 2008、[3] Org. Lett., 7, 877-880, 2005; J. Org. Chem., 71, 3051-3063, 2006、[4] Tetrahedron Lett., 49, 3413-3418, 2008、[5]「SSEA 系新規糖鎖化合物」特願 2009-179705;「シアリルラクトサミン系、シアリルルイスＸ系のシアル酸とフコース含有新規糖鎖化合物」PCT/JP2010/067614、[6] Carbohydr. Res., 358, 31-36, 2012.

microwave, enzyme, carbohydrate synthesis

講演番号：4SY10-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:05～ C 校舎 11 会場

糖を分子デバイスの蝶番様部品として活用する

Development of carbohydrates into a hinge-like component of molecular devices

○湯浅 英哉(東工大院生命理工)
○Hideya Yuasa(TokyoTech)

自然界に存在する多くの糖は、椅子型 6 員環として存在している。ダイヤモンドの格子構造の一部と同じであり、美しいフォルムである。しかも、椅子型と逆椅子型の環フリップは、まるでトグルスイッチのように軽快である。糖は、アノマー効果の助けにより、シクロヘキサンより簡単に環フリップを起こす。このように独特な性質を自然界が利用しない訳はないと思い調査してきたが、そのような形跡は今のところ見つかっていない。それではこの良い性質を人工的に利用しようということで、能動的に環フリップを起こす分子部品として「蝶番糖」を考案し、種々の分子デバイスに応用してきた。これまで合成してきた分子デバイスとしては、亜鉛センサー、プロトンセンサー、光反応用テザー、金属イオン応答糖転移酵素阻害剤などがある。現在、この蝶番糖を用いて、シグナル応答性リポソームの開発を行っている。また、イノシトールの環フリップを利用したホウ酸センサーの開発にもとりくんでいる。本講演では、過去の応用例と現在の取り組みについて紹介する。

molecular device, chair conformation, hinge sugar

講演番号：4SY10-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:40～ C 校舎 11 会場

均一な糖タンパク質合成を行うグライコシンターゼの利用研究

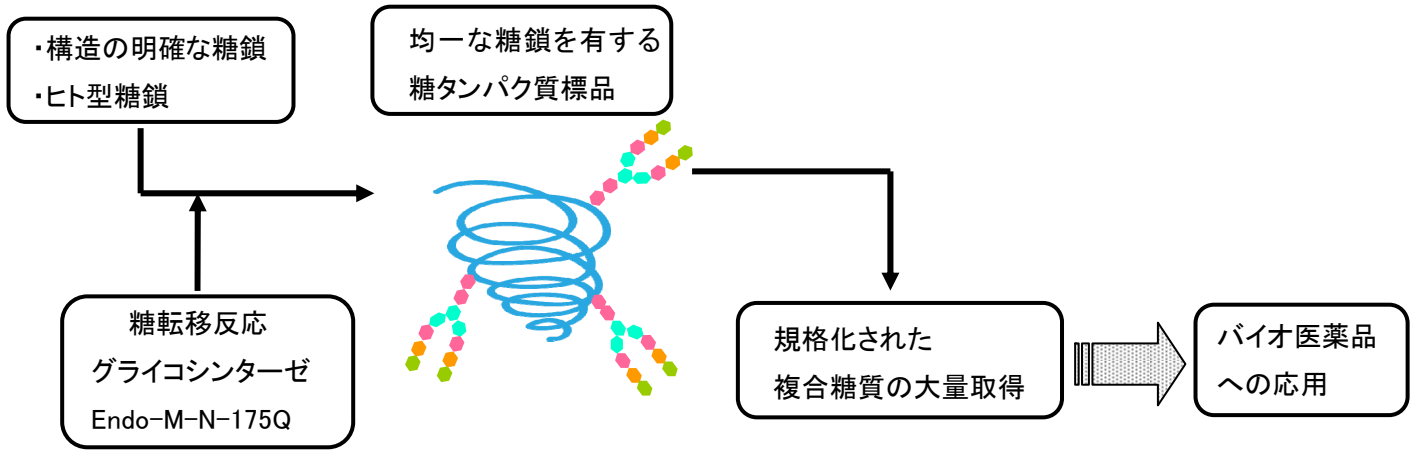
Application research of Glycosynthase for preparations of uniform glycoproteins

○石田 秀樹、羽生 正人、熊田 純一、石丸 剛、松崎 祐二(東京化成工業株式会社)
○ Hide-ki Ishida,Masato Habu,Junichi Kumada,Takeshi Ishimaru,Yuji Matsuzaki(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)

有力なバイオ医薬品が２０１５年前後に特許切れを迎えることから、バイオ後続品（バイオシミラー）の開発が注目されている。ところがバイオシミラーは製造に用いる遺伝子組み換え細胞が先発のバイオ医薬品とは異なるため、薬効は同等であっても化学的な「同一性」を確認することが難しいとされる。バイオシミラーの多くはタンパク質であり、少なからず糖鎖の修飾を受けているが、付加されている糖鎖は培養細胞の種類によって多様であり、均一な品質を持った製品の製造を難しくしている。そこで Endo 酵素による糖鎖の付け替えができれば、糖鎖構造の不均一性による規格化の障害を緩和することができると期待される。

弊社では山本・梅川 [1)] らによって開発された Endo-M の部分改変体であるグライコシンターゼ（Endo-M-N 175Q）を製品化した。この酵素は Endo-M の活性中心を部位特異的に変異させ、糖加水分解活性が抑制されている酵素である。本酵素は糖供与体としてオキサゾリン体を用いることにより糖鎖を高収率で付加させることができる。オキサゾリン体に誘導することにより本酵素の基質となるジシアリルオクタサッカリドも卵黄由来のシアリルグリコペプチド（SGP）から大量生産が可能となった。また天然からは大量に入手困難な糖鎖についても、化学合成により調製した糖鎖の酵素による転移反応も検討している。本酵素と糖鎖基質は糖鎖工学の有用なツールとしてバイオシミラーや改良型のバイオベターなどの糖タンパク合成への応用が期待される。

文献： 1）M. Umekawa *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta,* **2010**, *1800,* 1203-1209.



Endo-M, glycoprotein, Glycosynthase

講演番号：4SY10-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:15～ C 校舎 11 会場

植物二次代謝産物の生合成に関与するグリコシルトランスフェラーゼ
Glycosyltransferases for the biosynthesis of plant secondary metabolites
長友 仁寿、伊藤 崇充、古謝 詠喜、○田口 悟朗(信州大繊維)
Yoshihisa Nagatomo,Takamitsu Ito,Eiki Koja,○Goro Taguchi(Shinshu Univ.)

植物は種特異的に分化したさまざまな低分子の二次代謝産物を生産し、環境応答などに利用しているが、その多くは配糖化などの修飾を受けて蓄積されることが知られている。植物におけるこれらの配糖化の結合糖としてはグルコースが最も一般的であるが、ガラクトースやグルクロン酸、ラムノース、アラビノースなど、さまざまな糖が利用される。また、その結合様式は、糖受容基質の水酸基に糖が結合した *O*-配糖体が多いが、それ以外でも、カルボキシ配糖体、*N*-配糖体、*S*-配糖体、*C*-配糖体や、糖にさらに糖が結合した配糖体など、多岐にわたっている。一般に糖の結合により化合物の水溶性や安定性が高まるため、植物において、配糖化は不安定な化合物の安定化や生理活性物質の活性調節、物質の輸送・蓄積、有害物質の解毒などに関与すると考えられている。また、このような物性・生理活性の変化に加え、加水分解で元の化合物に戻すことが可能であることなどから、配糖化修飾は有用性が高く、応用面でも注目が集まっている。

これら配糖体の生成に関わる酵素が、グリコシルトランスフェラーゼ（UGT）である。UGT は糖転移酵素ファミリーGT1 β に属し、UDP 糖をドナーとして受容基質に糖分子を立体反転的に転移する。植物のゲノム中には多数の UGT 遺伝子（例えば、シロイヌナズナでは約 120）が存在して多重遺伝子族を形成しており、植物の多様な物質生成を支えていると考えられている。これらはアミノ酸配列の相同性からファミリーに分類されているが、例えば 1 アミノ酸の変異で UDP 糖の認識性が変化する例や、同じ UGT ファミリーの酵素で反応性が異なる例が知られるなど、配列から基質および生成物が推測できないことも多い。植物のゲノム解析の進展に伴って配糖化酵素の解析もこの十年で飛躍的に進展しているが、特にマイナーな配糖体の生成に関わる酵素についてはまだ情報が少なく、その生体内での役割の解明に加え、応用利用の観点からも、さらなる情報の蓄積が望まれている。

本シンポジウムでは、これら植物の低分子配糖体生合成に関わる UGT について概説するとともに、これらを利用した物質変換の試みや、我々が取り組んでいる *C*-配糖体生合成に関わる UGT や糖に糖を結合させる UGT などについての知見を紹介したい。

glycosyltrasferase, plant secondary metabolite, C-glucosylation

講演番号：4SY10-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:50～ C 校舎 11 会場

糖鎖修飾リポソームの合成と活用

Synthesis of glycan-modified liposome and its application

○石田 秀治(岐阜大応生)
○HIdeharu Ishida(Gifu Univ.)

薬物送達システム（DDS；drug delivery system）とは、１）目的とする部位（臓器や組織、細胞など）に、２）必要な量、３）必要な時間、薬物を送り込むことで、薬剤の治療効果の増強や副作用の軽減を目指すものである。その方法の一つに、リポソームをキャリア（運搬体）に用いる方法がある。リポソームは、1964 年に Bragham と Horne により見出され、１）サイズや性質の制御が容易、２）表面修飾が可能、３）低毒性かつ低抗原性、４）種々の溶質の保持が可能、５）大量調製や規格化が容易などと言った、キャリアとしての多くの利点を有している。
しかしながら、リポソームの実用化には大きな課題が残されている。それは、リポソームの構成成分として必須なガングリオシドの供給である。リポソームの調製には、膜の重量で約１５％を占めるガングリオシドが必要であり、これまで牛の脳などから複数のガングリオシド（GM3,GM2,GM1,GT1b,GQ1b など）からなる混合物が抽出されて用いられてきた。抽出ガングリオシドは希少であるだけでなく、ロットによって混合比が異なっており、リポソームの調製においてロット毎の最適化が必要だった。我々は、ガングリオシドを材料として用いることが可能な大量合成法を確立し、それを用いたガングリオシド含有リポソームの調製、ならびに物理化学的性質の評価や DDS への応用について検討した
従来、希少かつ高価であったガングリオシドを化学合成的に大量に供給する方法を確立し、それを「材料」に用いて均一、かつ高品質なリポソームを調製することに成功した。更に分子イメージングの手法でガンに対する十分な指向性を評価し、本リポソームが DDS へ応用できる十分な指向性を有することを見出した。現在、抗がん剤を内包させることで、実際の DDS への応用を検討している。

本研究は、岐阜大学応用生物科学部と片山化学工業株式会社との共同研究であり、山下泰治氏、平井正彦氏ならびに関係の皆様に感謝いたします。

DDS, liposome, ganglioside

講演番号：4SY11-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:35～ B 校舎 12 会場

プロローグ
Prologue
○大島 泰郎(共和化工・環境微生物研)
○Tairo Oshima(Inst. Environ. Microbiol.)

「種」は微生物を含め生物研究の基本概念である。しかし、動物と違って個体間の生殖可能性というよりどころを持たない原核生物では種の定義があいまいであった。古典的な形態に基づく分類も、形態的な変化に乏しい原核生物では多くの問題を含んでいた。たとえば、大腸菌は桿菌とされているが、一つあるいはごく少数の遺伝子破壊によって見かけ上球菌に近い形態の変異株は容易に得られる。その上、近年、ゲノム解析の技術が進み、ゲノム配列が短時間のうちに、また比較的安価に決定できるようになると、遺伝子の水平移動などゲノム情報がダイナミックに変化することがあきらかになってきた。このため原核生物の種をどう決めるかは、ますます混迷してきている。しかも、特許を思い浮かべたら分かるように、主の定義は基礎研究だけでなく、産業上も重要な問題である。この根源的な課題を取り上げた本シンポジウムの成果に大いに期待している。できることなら、本シンポジウムを契機として、討論をさらに深化させ、本シンポジウムの世話人、講演者などが国際的に原核生物の種の定義を提案してほしい。

definition of species, genome analyses

講演番号：4SY11-2
講演日時、会場：3 月 27 日 13:45～ B 校舎 12 会場

生物種固有の GC 含量を持つ進化的背景を探るためのゲノム変異解析

Mutational analysis to explore evolutionary aspect of species-specific GC content.

○吉川 博文[1]、明石 基洋[1]、志波 優[2]([1]東京農大応生科バイオ、[2]東京農大ゲノム解析セ)
○Hirofumi Yoshikawa[1], Motohiro Akashi[1], Yuh Shiwa[2]([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Tokyo Univ. of Agric.)

[目的]バクテリアにおいて「種」はゲノム配列の相同性によって分けられているが、概念的には、遺伝子発現とその産物の機能発現というレベルにおけるバリアーとして捉えられる。その表現型は基本的遺伝子発現機構や複製機構、代謝制御機構におけるバリアーである。ではこのバリアーの要因となっているものには何があるのだろうか。この「種」を特徴づけるシグナチャーは、根本的には塩基配列の中に秘められているはずである。さまざまなミニ配列のパターン解析からも進化の痕跡を辿ることができるが、GC 含量もシグナチャーの一つであろう。我々は、ある種の生物種が、固有の GC 含量を持つことの進化的背景を探るため、突然変異の方向性に焦点を当て、GC 含量を変動させる要因について解析してきた。そもそも変異の要因としては複製・校正装置と修復装置が考えられ、この両者に関する我々の考察を紹介する。
[方法・結果] 枯草菌においてはリーディング鎖の複製はPolCが行い、ラギング鎖の複製はDnaEが行う。PolCには校正機能が備わっているがDnaEにはない。両鎖ともDnaEで行う大腸菌にはDnaQという校正酵素があるが、枯草菌にはDnaQがなく、枯草菌のラギング鎖の校正は何が行っているのか謎であった。我々はDnaQのオルソログ配列が枯草菌DinGのN末端に保存されていることを見出し、まず、DinGの進化的位置づけを系統的に解析した。その結果、DinGはFirmicutesに保存されているとともに、Actinobacteriaにおいては大腸菌同様DnaE/DnaQのセットが保存されていることがわかった。生物種のGC含量と複製装置の分布を比較すると、DnaEがGC含量を高める方向に、またPolCはGC含量を低める方向に進化させる傾向が見える。
　次に枯草菌DinGがDnaEの校正酵素として機能している可能性をさまざまな変異株を構築して解析した。その結果、DinGの欠損株や活性部位の変異株でも、修復系mutSの欠失株ほど高頻度での変異は誘発されなかった。しかし野生株の自発的変異よりは有意に高く、校正機能を発揮している可能性を示唆した。さらに *ΔmutS* と *ΔdinG* の変異の方向性を調べたところ、*ΔmutS* ではGCを増加する方向に、*ΔdinG* はATを増加する方向の変異が顕著であった。一方、Actinobacteria はMutL/Sの修復系が欠損しており、このことが放線菌群が高GCであることの要因であると考えられた。

GC content, Proof reading, Mismatch repair

講演番号：4SY11-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:10～ B 校舎 12 会場

Resource partitioning and sympatric speciation in ocean bacteria
○Eric J. Alm[1,2]([1]MIT Biological Engineering, [2]Broad Institute)

How to define a species, and whether species even exist among bacteria are topics of vigorous debate among microbiologists. We have focused on the genus Vibrio, which can be efficiently isolated and cultured in the laboratory, as a model system to test and refine theories of bacterial evolution. In this talk, I will describe our recent efforts to understand the process of niche differentiation by sequencing many individual vibrios across different populations. I will present evidence that individual genes can sweep through bacterial populations independent of their genotypic background, and that the process of sympatric speciation surprisingly mimics that of sexual eukaryotes. These empirical results provide a framework for understanding and evaluating different concepts of bacterial species.

Genetic exchange, Population genomics, Ecological differentiation

講演番号：4SY11-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:10～ B 校舎 12 会場

環境メタゲノム解析における微生物種
Microbial Community Members in Environmental Metagenomics

○津田 雅孝(東北大・院生命)
○Masataka Tsuda(Tohoku Univ.)

自然環境棲息微生物のうち実験室で培養が可能な微生物は 1%未満であることから、自然環境で「どのような微生物がどのような生物機能を有し、どのようにその機能を発揮しているか」の本質は未知であり、また、自然環境要因変動に対して微生物が集団として適応・進化していく様式やその機構も不明である。このような状況は、汚染生態系における微生物やその集団による汚染物質分解に関しても該当する。

我々は、人工的汚染化閉鎖系土壌をモデル系として、メタゲノム解析と実際に分解能を示す各種分解菌株や分解酵素遺伝子群の取得・解析を同時平行的に実施することで、土壌汚染化に伴う棲息細菌集団と各種分解酵素遺伝子群等の変動様式を総合的に解析し、土壌細菌集団の環境汚染物質添加に対する適応様式の解明と本環境での微生物-環境相互関係や微生物間相互作用の包括的解明をめざしている。閉鎖系土壌に 4 種汚染物質を同時添加し、半年間にわたり経時的に、汚染物質残存量や既知の分解酵素遺伝子量を測定するとともに、汚染物質分解細菌株を分離した。そして、汚染物質添加直前土壌と添加後ならびに非添加後の 5 時点の土壌から調製したメタゲノム計 11 試料を用い、(1) 454 シーケンサーでの 16S rRNA 遺伝子解読と RDP データベース(DB)との照合による菌叢解析、(2) Illumina シーケンサーでの大規模塩基配列解読、を実施した。後者で得た計 11,000 万本程のリードに関しては、KEGG をはじめとする各種 DB に対して相同性検索と解析を行い、約 25%のリードについて遺伝子機能と由来微生物を推定できた。以上の解析を通じて、汚染土壌においては、時間経過に伴い、菌叢が著しく変動するとともに、汚染物質分解酵素遺伝子を含む多種多様の遺伝子の顕著な質的並びに量的変動が認められた。また、進化的に類縁関係が低い 2 つ以上の細菌が共同して汚染物質完全分解を行っている可能性も浮き彫りになった。

メタゲノム解析で決定した塩基配列の機能と由来微生物の可能な限りの正確なアサインメントは、照合する DB の質的並びに量的な正確性、そして、偏りのなさに大きく依存する。従って、これら条件を満たす統合 DB の作成とメタゲノム解析への利用が望まれる。

Metagenomics, Environmental bacteria, Bioremediation

講演番号：4SY11-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:35～ B 校舎 12 会場

系統間の遺伝情報フローとそのバリアー
Epigenetics-driven evolution

○小林 一三(東大新領域・医科研)
○Ichizo Kobayashi(Univ. Tokyo)

細菌は、ゲノム配列の特徴で区別される「系統群」である「種」に画然と分かれている。それらと外との遺伝情報のフローのバリアーは実在する。しかし、「この状態がどのようにして成立し、維持されるのか」、「この種分化が環境への適応進化とどう関係するのか」は、生命科学の未解決の重要問題の一つである。

メンバーゲノム間の相同組換えは、種内の遺伝情報フローに重要である。私たちは、ある種内の多数全ゲノム配列から全遺伝子の相同組換えの痕跡を数え上げ、種内のゲノムが密に結びつけられている様相を明らかにした。一般に、相同組換え装置は、DNA 配列の類似性によって「自己」「非自己」を区別し、「自己」配列間の結びつきを選択的に促進する。さらに、細菌の相同組み換え系は、特定の ID 配列を持つ「自己」ゲノム配列を修復維持し、それを持たない「非自己」ゲノム配列を破壊する。

「種」の問題には、エピジェネティックな「自己」と「非自己」の識別も重要である。制限修飾系は、特定の DNA 配列をメチル化する「修飾酵素」と、このメチル化を欠く「非自己」エピゲノム DNA を切断する「制限酵素」から成る。制限修飾系は、遺伝情報フローのバリアーになり、実際にゲノム配列の特徴を変化させる。また、それによるゲノム内の多数の箇所でのメチル化は、グローバルな遺伝子発現パターンに影響し、生物の形質を変える。制限修飾系自身の発現と活性とは、様々な環境要因によって制御される。そこには自分の持つ転写因子やスモール RNA が関与している。

制限修飾系は、それ自身ゲノム間を動きまわる。私たちは、DNA 配列を認識するドメイン配列が、「非相同遺伝子間を動く」場合、さらには「遺伝子内の複数のサイト間を移動する」場合（ドメイン移動、DoMo）を、ゲノム比較から発見した。制限修飾系によるゲノムのメチル化パターンは、これらの過程によって頻繁に変わっている。

これらから、「内外の因子による、DNA メチル化系の新しい配列特異性の出現が、ゲノム DNA のメチル化パターンとそれに伴うグローバルな遺伝子発現パターンを変換し、多様な形質を実現する。それらの一つ一つは、外の遺伝情報から隔離されている。多様なそれらからの選択こそが、適応進化をもたらす。」という「制限修飾系駆動の適応進化モデル」を提唱する。これは、「既にある多様なゲノム配列からの選択」という現代の適応進化モデルを乗り越える仮説である。私たちは、この仮説に基づいて、多様なメチロームからの人為選択による「エピゲノム育種」を目指している。

私たちの論文については、http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/ikobaya/

Restriction modification, Genome evolution, Epigenetics

講演番号：4SY11-6
講演日時、会場：3 月 27 日 16:00～ B 校舎 12 会場

ゲノム合成手法によるバクテリア新種のデザイン

Synthesis of designed genomes by a top-down genome synthesis method

○板谷 光泰(慶應大学先端生命研)
○Mitsuhiro Itaya(Inst.Adv. Biosci. Keio Univ.)

微生物ゲノムを大規模に設計して、研究、産業に有用な株を作製する技術に大きなブレイクがもたらされようとしている。ゲノムは遺伝子が数百あるいは数千つながった長鎖高分子で、分子量最大の生体分子である。ゲノムは溶液中では擦り切れやすく小さな DNA に断片化してしまい、損傷の無い巨大 DNA を細胞外に取り出して扱う技術は極めて限られていた。この状況は今世紀初頭に登場した画期的なゲノム DNA 合成法により、一変しゲノムを一から設計（デザイン）するという合成生物学の究極のテーマも視野に入っている（１）。
しかしながら、この「ゲノム合成生物学の興隆」時代に、全く新規なゲノムの全塩基配列を描くための設計図はどこにも無い。むしろ既存のゲノムを手本として、改変・交雑をトップダウン的な手法で操作する道筋が現実的であり、現時点では巨大 DNA 分子（＝ゲノム）の実験的な操作法を通じて検証中である（２－４）。このような大規模なゲノム改変は視点を変えると、微生物の種の本質を明らかにする実験的な手法でもある。本シンポでは、我々のグループが開発してきた新規ゲノムをトップダウン的に構築するシナリオ（５）と、関連する世界の趨勢を紹介し、種のアイデンティティの実験的な検証手法について議論したい。

[参考文献]
1)板谷‘合成生物学’, 浅島誠・他編、シリーズ現代生物科学入門 9、第 2 章「ゲノム構造の再編成」、pp35-65 岩波書店 (2010)。
2)板谷 :「化学合成、生物合成によるゲノム作製」実験医学、29, 140-145 (2011)。
3)板谷 :「微生物ゲノム工学におけるゲノム合成法のインパクト」バイオサイエンスとインダストリー、69, 196-199 (2011)。
4)柘植, 板谷: 「ゲノム再構築技術の応用と課題：汎用性、迅速性、コスト」第 1 章、pp1-9、合成生物学の隆起、シーエムシー出版 (2012)
5)板谷 :「ゲノム合成の実践とゲノム活用の将来」化学と生物, 50, 30-35 (2012)。

Genome syntheis, Bacteria species, Bacillus subtilis

講演番号：4SY12-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:05～ B 校舎 13 会場

IMS オーバービュー

Overview of imaging mass spectrometry

○瀬藤 光利(浜松医大解剖)
○Mitsutoshi Setou(Hamamatsu Univ Sch Med)

我々は分子イメージングとその応用を専門とし研究を行ってきた。代表的な応用例として、ニューロン樹状突起におけるモーター蛋白質群による分子輸送機構の解明(*Science* 2000、*Cell* 2000、*Nature* 2002、*Proc Natl Acad Sci* 2002)、神経終末端におけるユビキチンリガーゼによる神経伝達物質の放出制御機構の解明（*Cell* 2007)、ニューロン微小管におけるチューブリン翻訳後修飾の機能解明(*Proc Natl Acad Sci* 2007、2010、*Nat Neurosci* 2009)が挙げられる。これらの研究で生体組織・細胞内での分子局在を明らかにするために我々が最も多く用いてきたのは、対象分子に対し特異的に結合する抗体ないしは核酸鎖を用いた組織化学染色法と、対象分子の遺伝子配列に蛍光蛋白質配列を付加することによる蛍光蛋白質標識法であった。

上記の手法は蛋白質や核酸を対象とする研究全般に汎用されてきたが、脂質や代謝物の可視化にあたっては限界を抱えていた。抗体や脂質・代謝物に結合する化合物を用いた組織化学染色では、脂質の脂肪酸側鎖構造や代謝物の構造を識別できず、そもそも脂質や代謝物の抗原性の低さのために特異的抗体を作製できない場合が多い。また脂質や代謝物に対し遺伝子工学的に識別因子を付与することも難しい。そのため、生体内での脂質・代謝物分布を可視化するための新たな手法は長い間訴求されてきた。

この要請に応えることを目標の一つとして我々が進めてきたのが、質量顕微鏡法の開発と応用である（*Anal Chem* 2008、2009、2010 など)。質量顕微鏡法は、質量分析法の測定対象を二次元に拡張し分子分布の可視化を可能とするための手法である。本手法は前述の問題の解決に留まらず、従来のイメージング手法では一般的に難しかった分子網羅的な解析や未知分子の解析をも可能とするものである。我々は島津製作所、大阪大学、癌研究会、理化学研究所と共同して質量顕微鏡の開発にあたってきた。演者らのグループ、米国の Caprioli のグループ、欧州の Heeren のグループの三極が別々に水面下で質量顕微鏡開発を進め、結果的に 2000 年代終盤に三者が高空間分解能での質量顕微鏡法での解析をほぼ同時に達成することとなった。以来、質量顕微鏡に関連した技術開発と各分野への応用は、三極を起点として世界中の研究機関への広がりを見せている。

本発表では、技術的進歩を続ける質量顕微鏡法を利用した生体分子イメージングについて、最近の知見を含めて紹介したい。

Imaging mass spectrometry, Molecular imaging

講演番号：4SY12-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:10～ B 校舎 13 会場

IMS による農作物の機能成分の組織局在解析

Visualization of food nutrients in agricaltual products by imaging mass spectrometry

○井上 菜穂子(首都大人間健康科学)
○Naoko Goto-Inoue(Tokyo Metro. Univ.)

現在、タンパク質や代謝物の同定手法の一つとして質量分析法が広く用いられている。分析装置や解析手法の著しい発展により今や質量分析法の解析対象は多岐にわたり、今後の農学・生命化学研究において益々重要な役割を担うと考えられる。しかし一般的な質量分析は、生体試料から代謝物などの解析対象を抽出・分離・精製する必要がある。この手法では分子の空間的な情報を得ることができない。そこで従来の解析法に加えて、現在我々が取り組んでいるのが質量分析法を用いた局在可視化法である、イメージングマススペクトロメトリー（以下 IMS）である。生体組織や細胞の形態情報は顕微鏡観察によって得られるが、そのものが何で構成されているかを知ることはできない。IMS は顕微鏡で観察した場所を“その場”で質量分析することにより、形態情報と構成分子の情報を同時に得ることを目的としている。IMS の大きな利点は、ノンラベルで一度に多数の分子の解析が可能、という点である。この利点を生かすことによりこれまで抗体の作成が困難であった低分子代謝物の可視化が可能になったほか、新しい分子の発見も期待できる。

昨今、農作物中に含まれる機能性因子に注目が集まっており、その有効性を高めるための品種改良等が盛んに行われている。しかしこれらの機能性因子は低分子であり、農作物における局在情報はほとんど報告されていない。そこで現在、IMS の手法を用いて、これまで明らかとされなかった機能性因子の局所情報の解析、及び新しい機能性因子の発見を期待した、網羅的なメタボローム可視化を検討している。例えば同種の農作物において同機能性成分が含まれていても、局在が異なることによって生理活性に違いが生じる可能性もある。有効性の高い機能性因子の局在を明らかにすることは、生理機能への伝達メカニズムの解明に寄与する事ができるだけでなく、これらの情報を利用した品種改良や産地ブランドの創出に貢献できると考えている。我々はこれまで、米、ナス、食肉、ショウガなどの農作物を対象に、機能性栄養因子の局在可視化に成功しており、一度の分析で数 10 種以上の代謝物を一度に解析する事を可能とした。更に、特定の栄養因子が品種によって異なる局在を示している事を明らかにしてきた。本発表ではこれらの IMS を用いた農作物の機能成分局在解析のこれまでの研究成果について紹介する。

Imaging, Mass Spectrometry, Food nutrients

講演番号：4SY12-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:55～ B 校舎 13 会場

IMS による組織内代謝変動の可視化―食品成分動態解析と病理解析への応用

Visualization of metabolism by IMS - Application of IMS for neutrikinetics and pathological analysis

○財満 信宏、河村 幸雄(近大院農)
○Nobuhiro Zaima,Yukio Kawamura(Kinki Univ.)

生物組織における分子レベルの物質局在は，それらの生体内機能を示唆する重要な情報である。疾患の予防を目的とした機能性食品成分の研究を行う上で、摂取する機能性成分の体内動態や、疾患における代謝異常を理解することは重要な課題となる。我々は、この課題に取り組むための新たなアプローチとして、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法-イメージングマススペクトロメトリー（MALDI-IMS）を用いてきた。MALDI-IMS は組織切片上で二次元の質量分析を行うことにより、目的分子の位置情報を明らかにする手法であり、従来の手法では可視化が不可能であった多くの分子の可視化を可能にしている。近い将来、MALDI-IMS は、疾患の予防を目的とした農学と医学の融合研究において、LC-MS や GC-MS などと同様に MS 解析における重要な解析手法として定着すると期待される。

機能性食品成分の体内動態の解析において、対象となる機能性成分の可視化は有効な手段の一つであるが、多種多様な構造を有する機能性成分の体内動態を可視化できる汎用的な手法は確立されていない。機能性食品の研究における MALDI-IMS の大きな可能性は、摂取した機能性成分が組織の「どこ」に「どのような」代謝体で到達するのかという、体内動態の可視化ができるという点にある。MALDI-IMS による汎用的な食品成分動態解析手法は現時点では確立されてはいない。　我々は、現在、骨粗鬆症予防効果のあるポリフェノールのプエラリンやフェノール系抗酸化物質であるエラグ酸などを用いて体内動態の解析を試みており、有益な知見が得られつつある。

機能性食品成分のターゲットとなる疾患組織の解析に MALDI-IMS を応用した例は増加しつつある。疾患組織解析における MALDI-IMS の利点は、疾患組織病理を俯瞰的に観察できる点にある。これにより、病変部位と正常部位の比較解析だけでなく、疾患組織のノンターゲティングスクリーニングなどが可能になる。本発表では、我々がこれまでに行った、動脈硬化、動脈瘤、静脈瘤、肝臓癌、腎臓癌、乳癌、ミオパチー（筋肉疾患）、認知症などの疾患組織解析の中から見出されてきたデータをいくつか紹介したい。

疾患組織における代謝異常の解析と、疾患を予防する効果のある機能性食品成分の体内動態の解析を同じ方法論で行うことが可能な MALDI-IMS は、今後の機能性食品開発に大きく貢献できると考えられる。しかしながら、本分野への応用は始まったばかりであり、理想と現実の間にはまだ大きな開きもある。本発表では、MALDI-IMS の課題と今後の展望も議論したい。

imaging mass spectrometry, neutrikinetics, functional food factor

講演番号：4SY12-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:30～ B 校舎 13 会場

栄養生理作用解明のための食品と生体成分の LC-MS/MS 分析

Development of LC-MS/MS Methods for Food and Biological Constituents to Evaluate their Nutritional and Physiological Functions

○仲川 清隆、宮澤 陽夫(東北大院農)
○Kiyotaka Nakagawa,Teruo Miyazawa(Tohoku Univ.)

従来、分析が困難であった食品の機能性成分や疾病に深く関わる生体成分について、LC-MS/MS を中心とした分析技術を構築し、栄養生理作用解明などへの応用を図ってきた。本シンポジウムでは、以下の研究成果について紹介する。

1-デオキシノジリマイシン（DNJ）は、α-グルコシダーゼを阻害し、とくに糖尿病の予防・治療への活用が期待されている。しかし、DNJ は ODS カラムを通過するほど高極性で、分子内に検出に有利な官能基がなく、分析の困難さが本研究領域の足かせとなっていた。そこで、DNJ 分離を親水性相互作用クロマトグラフィーで達成し、ELSD さらには MS/MS で検出を可能にして、分析法を構築した。次いで、DNJ が桑に特徴的に含まれていることに着目し、高含有桑品種を見出し、DNJ 量を担保した桑食品を作出した。この食品の摂取は、血糖値が高めの方の食後高血糖を良好に改善できた。本結果を受けて、高血糖改善トクホへの展開が幾つかの企業により試みられている。将来の大量安定供給に向けては、枯草菌とその近縁種による DNJ 生産を確証し、DNJ 高生産菌を幾つか同定した。

癌などの血管新生病が増加し、問題となっている。そこで、抗血管新生活性を有する成分を探索し、不飽和ビタミン E であるトコトリエノール（T3）に活性を見出し、そのメカニズムを明らかにした。天然界で、T3 は米の糠部に特徴的に含まれている。そこで、T3 異性体の迅速スクリーニング法を構築し、数百種の在来品種の米糠 T3 量を調査して、高生産品種を特定した。育種を進め、T3 高生産品種の登録を近々に計画している。この研究過程で、なぜ米の糠部に T3 が分布しているのかに興味を抱き、T3 量や生合成酵素の遺伝子発現を評価して、ホモゲンチジン酸ゲラニルゲラニル転移酵素が重要であることを見出した。本知見をさらに T3 高生産品種の作成へとフィードバックしている。

認知症や動脈硬化などの疾病では、脂質過酸化との関係が古くから示唆されている。この証明には、生体内の過酸化脂質の定量が必須である。我々は、標準品を調製し、LC-MS/MS や HPLC-CL による定量を可能にした。これら分析法を用いて、アルツハイマー病患者の赤血球に過酸化リン脂質（ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド, PCOOH）の蓄積があり、キサントフィル（極性カロテノイド）は低値であることを見出した。この逆相関のメカニズムには血中に漏出してくるβアミロイドの関わりを示唆し、キサントフィルの補給は赤血球過酸化の防御に役立つことを示した。動脈硬化患者では、血漿で PCOOH が高く、酸化低密度リポタンパク質中の PCOOH が単球の内皮細胞への接着を亢進して、動脈硬化を悪化させる機構を示唆した。血漿 PCOOH の抑制にはカテキンが役立つことも認めた。

1-deoxynojirimycin, tocotrienol, lipid hydroperoxide

講演番号：4SY12-5
講演日時、会場：3 月 27 日 16:05～ B 校舎 13 会場

LC-MS を用いた海洋天然物研究

Studies on marine natural products using LC-MS

○山下 まり(東北大院農)
○Mari Yotsu-Yamashita(Tohoku Univ.)

LC-MS の普及は著しく、医学、薬学、農学分野で生体試料の微量分析に欠かせない装置となった。私共の海洋天然物領域においても、物質の同定、定量目的のみではなく、新規物質の探索にも日々活躍している。本シンポジウムでは、その中で得られた下記の結果を中心にご紹介する。

(1) プロスタグランジンの酸化代謝物の同定

Gracilaria 属（オゴノリ属）の紅藻は植物としては珍しく cyclooxygenase(COX)を有し、プロスタグランジン(PG)類を多量に含むことが知られている。我々は、動物にはない植物特有の PG をオゴノリ属の海藻より ESI-MS を用いて探索した結果、フィリピン産のカタオゴノリ *Gracilaria edulis* に未知の PG 類縁体が存在することを見いだした。そこで、その化合物を 0.1 mg 単離し、NMR で平面構造を決定した。本化合物は、その構造より PGH_2 が自発的に開裂して生じるレブグランジン(LG)D_2 の酸化物であると考えられ、oxidized LGD_2(ox-LGD_2)と名付けた[1)]。さらに、ox-LGD_2 の構造から、その還元型(ox-LGD_2H)の存在も示唆された。Ox-LGD_2H とその E_2 体の混合物は化学誘導にて PGH_2 から調製して標品とした。この標品を用いて、LC-MS/MS (MRM)でマウス組織に ox-LGD_2H と ox-LGE_2H、および ox-LGD_2 が存在することを明らかにした。本化合物は、生体内アミン類と反応性の高い LG 類の有害性を回避した代謝物と考えられた。

(2) 麻痺性貝毒生合成中間体の同定

サキシトキシン(STX, 1)とその類縁体は、麻痺性貝中毒の原因物質で、主に海産渦鞭毛藻や淡水産藍藻が生産し、食物連鎖により二枚貝に蓄積され、死亡率の高い食中毒を引き起こす。これまで、淡水産藍藻(*Anabaena circinalis*, *Lyngbya wollei*)および海産渦鞭毛藻(*Alexandrium fundyense*, *A. minutum*)のゲノム中に STX 生合成遺伝子クラスターや相同遺伝子が発見され、生合成経路が推定された。しかし、生合成中間体の化学的な同定は不十分であった。本シンポジウムでは、推定された生合成初期中間体の数種の化合物を合成してそれを標品とし、HILIC-UPLC-Q-TOF-MS を用いて、STX 類縁体を生産する藍藻および渦鞭毛藻（有毒及び無毒株）の培養藻体中にそれら生合成中間体が存在するのかどうかを調べた。

Ref 1) Kanai Y, Hiroki S, Koshino H, Konoki K, Cho Y, Cayme M, Fukuyo Y, Yotsu-Yamashita M., *J. Lipid Res.*, **52**, 2245-2254 (2011)

marine natural products, LC-MS, prostaglandins

講演番号：4SY13-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:35～ C 校舎 12 会場

酵素のユニークな特性を利用したタンデム型遺伝子増幅技術の開発

Gene amplification using unique enzyme characteristic

○小林 達彦、橋本 義輝(筑波大・生命環境)
○Michihiko Kobayashi,Yoshiteru Hashimoto(Univ. Tsukuba)

核酸の増幅技術は、遺伝子工学の分野において欠かすことができない。我々はこれまで遺伝子発現系の開発研究にも取り組み、アクリルアミドとニコチンアミドの工業生産に使用されている*Rhodococcus rhodochrous* J1 株が生成する２種のニトリル分解酵素系の遺伝子プロモーターと発現制御系を利用した３種の遺伝子発現系の開発に成功した（*PNAS*, 101, 14031 [2004], 他)。

現在、常温条件下においてDNAを増幅させる手法は、基礎・応用研究に用いられ、PCR法を代表とする高温条件下でのDNA増幅法にはない利点を有している。中でも最近、環状一本鎖DNA(circular single-stranded DNA：cssDNA)を鋳型としてその相補鎖をタンデムに配した鎖状一本鎖DNA(single-stranded DNA：ssDNA)を迅速かつ正確に合成するRCA(Rolling Circle Amplification)と呼ばれるDNA増幅法が注目されつつある。本反応で合成されるssDNAは「鋳型のcssDNAに相補的な配列が複数繰り返されたタンデムリピート」という特長を有する。この特異的複製が可能なのは、本反応を触媒するDNA polymeraseが、高い鎖置換活性・伸張反応能および高校正能といったユニークな機能を併せもつからである。本反応はこれ迄、一塩基多型の検出、シークエンス用鋳型の簡便な調製等に利用され、今後も幅広い分野の研究へ応用されるものと考えられる。

今回、RCA 反応を利用して、目的タンパク質を菌体内に著量生成させる新規な発現系の開発を試みた。[タンパク質をコードする遺伝子]を目的配列として直鎖状(タンデム)に整列する二本鎖 DNA を作製後、遺伝子プロモーター支配下に配置することで、プロモーター ＋ [タンパク質をコードする遺伝子]n を作製し、続いて、これを微生物に導入することによって、同じタンパク質をコードする遺伝子が（１本の mRNA 上に）n の数だけ転写され、目的タンパク質を大量生産し得ることが期待される。実際、この目的配列１ユニットをもつ発現プラスミドを鋳型として修飾プライマーを利用した PCR 法で目的断片を増幅後、環状化、RCA 反応を行い取得した repeat ssDNA を用いて相補鎖合成等の種々の反応を行い、目的断片１ユニットが１つから 5 つまで繰り返された二本鎖 DNA 断片を合成することに成功した。次に、1 ユニットから５ユニットまで各断片を、１コピーで複製するプラスミドの *lac* プロモーター下流に連結した５種類の発現プラスミドを構築し、大腸菌に導入した各形質転換体を解析した。その結果、目的タンパク質遺伝子のタンデムリピートの繰り返し数に応じた発現量の顕著な向上が確認された。本研究で確立した RCA 反応を利用してタンデムリピート二本鎖 DNA を作製する手法は、ライゲーション反応を利用した DNA 断片の連結とは異なり、今後、新規なタンデムリピート配列構築法として、さらなる応用が期待できる。

Gene, Expression, Protein

講演番号：4SY13-2
講演日時、会場：3 月 27 日 13:59～ C 校舎 12 会場

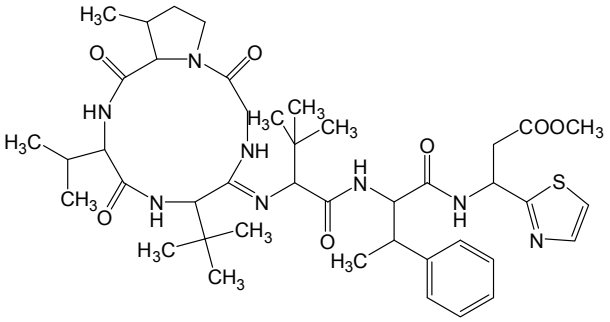
ペプチド化合物の新規生合成マシナリー

Unusual biosynthetic machinery of peptide antibiotics

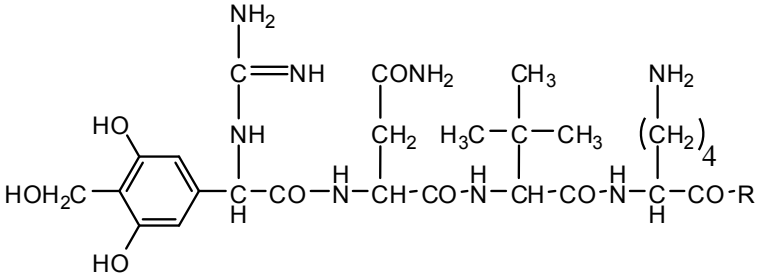
○大利 徹(北大院工)
○Tohru Dairi(Hokkaido Univ.)

ペプチド系抗生物質の生合成では、リボソーム関与の生合成に加え、Non-Ribosomal Peptide Synthase (NRPS) に代表されるリボソーム非関与の生合成機構も用いられる。前者では、乳酸菌が生産し、特徴的アミノ酸である lanthionine を含むランチビオテックに関する先駆的研究がある。放線菌では、内部にセリン・システイン残基由来のオキサゾール・チアゾール環を含有するもの、head-to-tail の環化、プレニル化、グリコシル化修飾される例もある。また最近、スポンジメタゲノムから polytheonamides の生合成遺伝子群が取得され、わずか 6 つの酵素がエピメリ化を含む 48 もの修飾反応を行うことが示され、新たな生合成機構として注目される。他方、後者の NRPS では、A-ドメインによるアデニル化、T-ドメインへのロード、C-ドメインでの縮合反応によりペプチド結合が生成後、エピメリ化、環化、メチル化などペプチド骨格の修飾や、ポリケチドやリピッドなど他の骨格との結合も良く知られている。さらに近年、ATP 依存のアミノ酸リガーゼ、tRNA 依存のアミノ酸転移酵素によるペプチド結合生成機構も報告されている。

このようにペプチド系抗生物質の生合成には多様性があり、polytheonamides に代表されるように、構造から、その生合成機構を推定することが難しい場合も多い。筆者らは、①ボトロマイシン（環化構造とチアゾール環を有する）と、②フェガノマイシン（非タンパク性のフェニルグリシンを含有、C-末アミノ酸の多様性）について、どちらの機構で生合成されるか検討を行った。本講演では、ドラフトゲノム解析で見出した生合成遺伝子クラスターと、それらの機能解析結果について紹介したい。



ボトロマイシンの構造



フェガノマイシンの構造（R ＝ DR or DGPT）

biosynthesis, peptide antibiotic, bottromycin

講演番号：4SY13-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:23～ C 校舎 12 会場

アーキアのリジン・アルギニン・ロイシン生合成酵素の構造・機能・進化

Structure, function, and evolution of lysine, arginine, and leucine biosynthetic enzymes in Archaea

○西山 真(東大生物工学セ)
○Makoto Nishiyama(BRC, The Univ. of Tokyo)

アルギニン生合成では、グルタミン酸の末端のカルボキシル基は、リン酸化の後、還元されセミアルデヒド基に変換されるが、セミアルデヒド基はグルタミン酸自身のアミノ基と容易に分子内環化してしまうため、アルギニン生合成の効率を落としてしまう。これを防ぐため、まず最初にグルタミン酸のアミノ基をアセチル基で保護することからアルギニン生合成反応が開始する。付加されたアセチル基はグルタミン酸の側鎖にアミノ基が導入された後、切り離される。こうして生成したオルニチンは、尿素サイクルでアルギニンに変換される。高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* のリジン生合成は、2-オキソグルタル酸を出発物質としてαアミノアジピン酸を経る。*T. thermophilus* のリジン生合成の後半にあたるαアミノアジピン酸からリジンへの変換は、アルギニン生合成におけるグルタミン酸からオルニチンまでの変換を担う酵素のホモログによって行われる。したがって、この生合成においてはαアミノアジピン酸のアミノ基の修飾が必要となる。リジン生合成では、アセチル基に代わって、強く負に帯電した低分子タンパク質 LysW がαアミノアジピン酸のアミノ基に結合することで、後半の反応がスタートする。一方で、負に帯電した LysW を受容するために、リジン生合成の後半部分に関わる酵素はどれも活性中心の近傍は正に帯電している。このように、LysW は、リジン生合成において単にαアミノアジピン酸のアミノ基を修飾保護するだけでなく、生合成酵素に高い親和性で認識され、反応が効率よく進行するためのキャリアタンパク質として機能すると考えられている。

我々は、*Sulfolobus* や *Thermococcus* などの超好熱性アーキアにおいても同様なシステムでリジンが生合成系されることに加えて、これらのアーキアではアルギニン生合成においてもグルタミン酸のアミノ基の保護にアセチル基ではなく LysW ホモログが使われることを見出している。これらのアーキアにおいては、一種類の LysW ホモログがリジンおよびアルギニンの両方の生合成のキャリアタンパク質として機能する。最近ようやく結晶構造解析をはじめとする物理化学的手法により、リジン、アルギニン生合成酵素による LysW ホモログ及び基質の認識・識別機構が明らかになってきた。一方、*T. thermophilus* で見出されたリジン生合成は、リジンだけでなく、アルギニン、ロイシン生合成系と共通の祖先をもつと考えられ、代謝・生合成系の進化を検証するための格好の材料といえる。我々は、これらの生合成に共通に用いられる酵素βdecarboxylating dehydrogenase に着目し、その進化過程を検証する研究を行っている。本シンポジウムでは、それらについての最新の結果を紹介し、酵素の構造と機能、進化について議論したいと考えている。

amino acid biosynthesis, evolution, carrier protein

講演番号：4SY13-4
講演日時、会場：3 月 27 日 14:47～ C 校舎 12 会場

アーキアゲノム上に存在する重複遺伝子の機能解析

Functional characterization of multiple homologous genes on archaeal genomes

○跡見 晴幸[1,3]、粟野 知嗣[1]、Anja Wilming[1]、横大路 裕介[1]、青野 陸[1]、佐藤 喬章[1,3]、金井 保[1,3]、今中 忠行[2,3]([1]京大院工、[2]立命館大生命科学、[3]JST, CREST)
○Haruyuki Atomi[1,3], Tomotsugu Awano[1], Wilming Anja[1], Yuusuke Yokooji[1], Riku Aono[1], Takaaki Sato[1,3], Tamotsu Kanai[1,3], Tadayuki Imanaka[2,3]([1]Kyoto Univ., [2]Ritsumeikan Univ., [3]JST, CREST)

アーキアは系統学的解析から真核生物や細菌とは区別される第３の生物界を構成し、特異な代謝機構や生命機能が数多く報告されている。我々はアーキアの代謝とその制御に興味を持ち研究を進めている。*Thermococcus kodakarensis* KOD1 は鹿児島県小宝島の硫気孔から分離された超好熱性アーキアである。本菌は絶対嫌気性・従属栄養性であり、多様な有機物を資化することができる。また既にゲノム解析が終了し、遺伝子操作系も確立されていることから *T. kodakarensis* は超好熱性アーキアのモデル生物の１つとして考えられている。

本菌の代謝機構を解析する際には我々はまずゲノム情報のみに基づいた代謝マップを作成し、それから予想される代謝機構と *T. kodakarensis* が実際に示す代謝能を比較しながら missing gene（あるべき遺伝子がゲノム上に見当たらない)、redundant gene（重複遺伝子)、lonely gene（機能上孤立している遺伝子）などに着目して研究を進めている。いままでは missing gene の探索を中心に進めてきたが、ここでは redundant gene の解析について紹介したい。ここで redundant gene（重複遺伝子）とは同一の機能を示すと推定される遺伝子がゲノム上に複数存在する場合の遺伝子をいう。例えば *T. kodakarensis* のゲノム上には NDP-forming acyl-CoA synthetase Large subunit と annotation されている遺伝子はゲノム上に５つ（TK0139, TK0665, TK0944, TK1880, TK2127）存在し、互いに 40%程度の identity を示す。また互いに 40%程度の identity を示す phosphoglucomutase と annotation されている遺伝子はゲノム上に３つ（TK1108, TK1777, TK2185)、相同性は比較的低いものの、ribokinase family sugar kinase 遺伝子も３つ（TK1843, TK2029, TK2285）存在する。これら重複遺伝子が同一の機能や生理的役割を果たすかどうかは個々の遺伝子産物の生化学的解析や遺伝子破壊株の作製と形質評価が必要となる。いままでの解析を通じてこれらの重複遺伝子の機能は全て互いに異なることが示唆されている。ここでは上記を含めた *T. kodakarensis* ゲノム上に存在する重複遺伝子の機能解析を中心に *T. kodakarensis* の代謝研究に関する成果を紹介する。

参考文献

Fukui, T. et al., Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes. Genome Res., 15, 352-363, 2005.

archaea, metabolism, genome

講演番号：4SY13-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:11～ C 校舎 12 会場

フラボノイドアグリコンの合成・修飾・脱修飾を介する植物の環境応答制御
Responses of plants to environmental stresses mediated by flavonoid aglycon synthesis, conjugation, and deconjugation
○中山 亨(東北大院工)
○Toru Nakayama(Tohoku Univ.)

ダイズのイソフラボン（ダイゼイン，ゲニステイン）は，そのアグリコン部分（3-フェニルクロモン骨格）が合成されたあと修飾（グルコシル化とマロニル化）を受け，マロニル化グルコース配糖体として液胞に蓄積する．一方，イソフラボンはダイズ根においてアグリコンの形で分泌され，根粒菌との共生関係の樹立や植物病原菌に対する抵抗性の獲得に重要な役割を演じる（1）．このイソフラボンの分泌はまた，窒素環境の変化によっても制御されることが知られている（2）．過去の研究で，細胞外に分泌されるアグリコンの少なくとも一部は液胞のイソフラボン配糖体プールに由来すること，また分泌の過程で根のアポプラストに局在する脱修飾酵素（イソフラボン配糖体特異的β-グルコシダーゼ，ICHG）が重要な役割を果たすことが示唆されている（3）．イソフラボン配糖体の液胞や細胞外への輸送プロセスについては現在も不明の点が多いが，イソフラボン代謝の酵素的プロセスについては，アグリコン合成，修飾，脱修飾の３ステップに分割して理解することができる．これらのうち，われわれは修飾と脱修飾の各ステップをつかさどる酵素遺伝子をそれぞれ同定し，機能解析を行った（4,5）．修飾ステップはイソフラボンの液胞内貯蔵に必須であり，脱修飾ステップはイソフラボン貯蔵プールをアグリコンに変換して細胞外に分泌するために必須であると考えられる．イソフラボンを介するダイズの環境応答は，イソフラボンの合成・貯蔵・分泌を通じて制御されることが示唆されるにもかかわらず，そのような制御における上述の三つの代謝ステップの調節の実態はほとんど明らかにされていない．

そこで本研究では，イソフラボンの生理作用発現の調節に関わる代謝ステップを同定することを目的として，各代謝ステップのキーエンザイム（アグリコン骨格合成，カルコン合成酵素 GmCHS と 2-ヒドロキシイソフラバノン合成酵素 GmIFS1；修飾，イソフラボン 7-*O*-グルコシルトランスフェラーゼ GmIF7GT；脱修飾，ICHG）について，ダイズ茎疫病菌 *Phytophthora sojae* の感染にともなう遺伝子発現レベルの変化を経時的に追跡・比較した．

【文献】（1）Yu O and Noel JP: Plant J. 54, 750-762 (2008)；（2）Cho MJ, Harher JE: Plant Physiol 95, 1106-1112 (1991)；（3）Graham TL: Plant Physiol 95, 594-603 (1991)；（4）Noguchi A et al. J Biol Chem 282, 23581-23590 (2007)；（5）Suzuki H et al. J Biol Chem 281, 30251-30259 (2006)

isoflavone, soybean, Phytophthora sojae

講演番号：4SY13-6
講演日時、会場：3 月 27 日 15:35～ C 校舎 12 会場

細菌における高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の生合成と機能

Biosynthesis and function of phospholipids with polyunsaturated fatty acyl chain in bacteria

○栗原 達夫、川本 純(京大化研)
○Tatsuo Kurihara,Jun Kawamoto(Kyoto Univ.)

エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などの高度不飽和脂肪酸は、リン脂質のアシル鎖として生体膜に存在し、特異な生理機能を発揮する。ヒトにおいては、抗炎症作用、抗腫瘍作用、心疾患発症リスク低減作用などをもつことが報告されており、その多機能性発現の機構に興味がもたれている。一方、EPA や DHA は種々の細菌においても重要な生理的役割を担っている。さまざまな海洋性低温菌が EPA や DHA を生産し、それらの脂肪酸が細菌の低温適応や高圧適応に関与することが示されている。我々はヒトなどの真核生物に比べて圧倒的に単純な膜系をもつ細菌を研究対象として、細胞膜における高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の機能解析を行っている。

EPA 生産性細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の EPA 生合成遺伝子を破壊すると低温での細胞分裂が阻害され、生育速度が著しく減少することを見いだした。細胞分裂に関与する ABC トランスポーターホモログ FtsEX を高発現することで生育速度が回復したことから、細胞膜における EPA 含有リン脂質と FtsEX の相互作用が示唆された。*sn*-1 位にオレオイル基、*sn*-2 位にエイコサペンタエニル基をもち、極性頭部に 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl (NBD) 基をもつ蛍光標識リン脂質を化学合成し、細胞に添加したところ、炭化水素鎖の構造依存的に、細胞分裂部位に局在することが観察された。*S. livingstonensis* Ac10 はグラム陰性細菌であり、内膜と外膜をもつため、これらのいずれにおいてプローブ分子が細胞分裂部位に局在するのか解析した。亜ジチオン酸ナトリウムを用いた NBD 基の蛍光消光実験や、リン脂質の ESI-MS 解析などの結果、添加したプローブ分子の *sn*-1 位のアシル鎖は外膜において脱離し、これにより生成したリゾリン脂質が内膜に到達して *sn*-1 位が再アシル化を受け、再アシル化により生成したリン脂質が内膜の細胞分裂部位に局在するものと推定された。EPA 含有リン脂質が内膜において細胞分裂関連タンパク質と相互作用してそれらの機能発現を介助する可能性や、細胞分裂部位における曲率の高い内膜の形成に関与する可能性が考えられた。

一方、細胞内における EPA の動態解析や EPA によって修飾されるタンパク質の同定に用いるツールとして、クリックケミストリーの手法で特異的に検出・同定が可能なプローブ分子（メチル末端にエチニル基を導入した EPA アナログ）を化学合成した。このプローブ分子が本菌において EPA の機能を代替できることを明らかにするとともに、このプローブ分子によって修飾されるタンパク質を見いだした。このような脂質修飾を受けたタンパク質は生体膜の特定のドメインに局在し、その場で機能を発現する可能性が考えられる。

phospholipid, polyunsaturated fatty acid, eicosapentaenoic acid

講演番号：4SY13-7
講演日時、会場：3 月 27 日 15:59～ C 校舎 12 会場

ビジュアル系マイクロバイオロジーの展開：付着から脱離までのバイオフィルム時空間解析
Development of biofilm analysis by a novel imaging COCRM
○野村 暢彦[1]、八幡 穣[1,2]([1]筑波大・生命環境系、[2]マサチューセッツ工科大)
○Nobuhiko Nomura[1], Yutaka Yawata[1,2]([1]Univ. of Tsukuba, [2]MIT)

（バイオフィルムとは）　細菌は単細胞生物として、互いにわれ関せずに生きていると長い間信じられてきた。しかしながら、その細菌も会話をし、集団生活をしていることが明らかになってきた。すなわち、言葉としてシグナル化合物を用いて、細菌間でコミュニケーションをしながら、バイオフィルムと呼ばれる組織化された集団で環境適応し生活していることがわかってきた。

バイオフィルムは各種醗酵のほか、水処理（活性汚泥）、バイオマスエネルギー、プラント配管腐食さらには感染症など正負の両面で様々な産業に関わっている。しかしそれらのバイオフィルム制御は、物理的アプローチや栄養素、pH、溶存酸素など工学的アプローチさらに医療では抗生物質などの化学療法が主で、これら既存の方法はすでに高度に至適化されており、改良では限界があることが現場の認識である。幅広い産業分野で、これまでのアプローチと異なる全く新しいバイオフィルムの制御技術が強く望まれている。

（バイオフィルム研究における技術的背景：なぜ困難なのか）　バイオフィルム研究において、そのバイオフィルムという集合体の立体構造さらにその経時的変化、そしてその中での微生物の相互作用と機能を知ること出来れば、バイオフィルムの理解そしてその制御への糸口が得られることが期待できる。しかし、バイオフィルムがどのように適応・変化してゆくのかという時空間的遷移を捉える研究がほとんどなされていない。すなわち、そのほとんどすべてが、「或る日の或る時刻」のスナップショットでしかない。その理由は技術的要因にある。バイオフィルムの立体構造の時空間的遷移を捉える手法としては、GFP が用いられている。しかし異なる蛍光色 GFP が必要な複合微生物バイオフィルムでは適用が困難なことにより、それらの研究の進展を大きく阻んでいた。（もちろん、染色法では経時的解析が出来ず問題外である。）

（新規バイオフィルム解析技術：COCRM 法）　我々は回折散乱光をシグナルとして対象を立体的に可視化し、取得した３次元画像より“１細胞からバイオフィルム立体構造およびその体積”も算出出来る共焦点顕微鏡解析技術 COCRM 法の開発に成功した。バイオフィルムの立体構造を生きたまま無処理(非破壊／非侵襲／非染色／非形質転換(GFP))で観察かつ定量を可能にするため、対象微生物が限定されず、さらに複合系微生物の経時観察・定量も可能にした。バイオフィルムがどのように適応・変化してゆくのかという付着から成熟そして脱離までの時空間的遷移を捉えるというこれまでにない新しいバイオフィルム研究の展開を紹介させて頂く。

Biofilm, Cell-cell communication, Quorum sensing

講演番号：4SY14-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:40～ C 校舎 15 会場

変異体米を用いた澱粉生合成メカニズムの解明

Starch biosynthesis mechanism in rice mutant lines.

○藤田 直子(秋田県大生物資源)
○Naoko Fujita(Akita Pref. Univ.)

植物が光合成産物として、主としてその貯蔵組織に大量に蓄積する「澱粉」は、地球上のほとんどの生物にとって重要な炭水化物源となっている。澱粉は、グルコースのα1,4 および 1,6 グルコシド結合のみからなるホモポリマーで、一見単純で退屈な分子のように思えるが、主成分であるアミロペクチンは地球上のあらゆる高分子の中で、DNA に次ぐ高分子量(10^{8-9})をもつ。その高次構造は植物が次世代のための栄養源として限られたスペースにできるだけ多くのグルコースを詰め込むためにとってきた戦略ともいえる。2000 年以降、いくつかの植物で澱粉生合成に関与する酵素のいずれかが欠損した変異体や遺伝子を導入した組換え植物が単離され、それらの解析から各酵素アイソザイムの機能が明らかになってきた。同時に、澱粉生合成に関与する遺伝子の発現量の制御によって澱粉の性質が改変できることが明らかになってきた。

我々のグループは、イネを材料に、さまざまな澱粉生合成関連酵素が欠損した変異体を解析してきた。その結果、イネの澱粉貯蔵器官である胚乳で主要な酵素活性が見られるアイソザイムの機能がかなりわかってきた。同時に、得られた変異体の胚乳澱粉は野生型とは全く異なる性質を示すため、これらを新規バイオマスとして食品を中心とした産業に利用することが期待される。高等植物は、澱粉生合成に関与する酵素に多数のアイソザイムをもっており、そのうちの一つを欠損させても、他のアイソザイムが欠損したアイソザイムの機能を部分的に相補するため、多くの変異体は野生型と遜色ない澱粉量を合成できることが明らかになってきた。一方、相補するアイソザイムは、元のアイソザイムと機能が同一ではないため、変異体の澱粉は野生型とは異なった性質を示すようである。

次に我々のグループが行ったのは、複数の酵素を同時に欠損させた二重変異体を作成することであった。二重変異体を作成する際に心配ごとの一つであった不稔や致死も、組み合わせる酵素によっては生じることがあったが、かなりの二重変異体では、澱粉蓄積量も親系統と比べて激しく低下はしておらず、むしろこれまでにないユニークな澱粉を蓄積するものが多数存在した。本発表では、これらのうち特にユニークな変異体（超高アミロース米および完全球体澱粉粒米）について紹介し、その解析から得られた澱粉の性質と、澱粉生合成メカニズムについてわかったことを述べる。

本研究はイノベーション創出基礎的研究推進事業（生研センター）によって実施された。

starch, mutant, rice

講演番号：4SY14-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:10～ C 校舎 15 会場

イネ複粒型澱粉形成の分子機構

Molecular mechanisms for the synthesis of compound-type starch granules in rice

○川越 靖(農生資研・植)
○Yasushi Kawagoe(NIAS)

イネの種子胚乳で合成される澱粉は、数個から数十個の多角形の澱粉粒がアミロプラスト内部に隙間なく配置され、全体として球形から楕円形となり、このような澱粉粒は複粒型澱粉と呼ばれる。これに対し、トウモロコシ、コムギ、オオムギでは、一個の球形やレンズ状の澱粉粒（単粒型澱粉）が合成される。形態が大きく異なる澱粉粒が合成される分子機構は不明である。我々は蛍光蛋白質を利用して共焦点レーザー顕微鏡で、イネ胚乳のアミロプラストの分裂様式と複粒型澱粉の形成を詳細に観察した。葉組織の葉緑体の分裂様式は２分裂であるのに対し、アミロプラストは多分裂であった。アミロプラストの内包膜、及び外包膜を蛍光蛋白質で可視化したところ、アミロプラストには内部構造があることが明らかになった。アミロプラストの分裂を阻害するとアミロプラストの内部構造にも異常が観察された。アミロプラストの内部で隣り合う澱粉粒の間の構造と、プラスチドの分裂過程で形成される隔壁(septum)との間には類似性が認められたので、澱粉粒の間の構造を septum-like structure (SLS)と呼ぶことにした(Yun and Kawagoe, 2010)。

本シンポジウムでは、多くの形質転換イネの観察に基づいて提案した複粒型澱粉合成の分子機構モデルを詳しく紹介したい(Kawagoe 2013)。このモデルでは、アミロプラストの最外層の包膜の内側に SLS が形成され、その結果生じたストロマ空間で澱粉粒の合成が新たに始まり、外側に向かって成長する。アミロプラストのストロマは SLS によって仕切られた空間であり、この仕切られた空間を充填するように澱粉粒は成長する。すなわち、SLS によって仕切られたストロマが鋳型となり、澱粉粒を「型にはめる」ことによって、イネに特徴的な多角形の澱粉粒が形成される。これに対し、複粒型澱粉合成メカニズムの第 2 のモデルとして、澱粉粒の間に SLS 又はその他の仕切りは無く、連続するストロマ空間で多数の澱粉粒が成長することを想定すると、隣接する澱粉粒の融合を阻害する他の要因が必要となる。蛍光蛋白質を利用した観察では、アミロプラスト内部のストロマが連続した空間であることを示唆する結果は得られていない。本シンポジウムでは、多くの形質転換イネの詳細な観察で明らかになったアミロプラストの内部構造を紹介し、複粒型澱粉形成の２つの分子機構モデルを対比しながら議論したい。

［参考文献］

Yun and Kawagoe (2010) Plant Cell Physiol. 51, 1469-1479.
Kawagoe (2013) J. Appl. Glycosci. 60 (in press)

starch synthesis, compound-type granule, amyloplast

講演番号：4SY14-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:40～ C 校舎 15 会場

澱粉合成過程における酵素間相互作用
Functional interaction between enzymes in starch biosynthesis in rice endosperm
○中村 保典(秋田県立大学)
○Yasunori Nakamura(Akita Prefectural Univ.)

澱粉はα-1,4-グルコシド結合（直鎖）とα-1,6-グルコシド結合（分岐鎖）から成るグルコースホモポリマーであるが、澱粉の構造はグリコーゲンと比べると複雑で、主成分のアミロペクチン分子は、クラスターと呼ばれる単位構造が多数タンデム状に結合し、全体として細管状をしているタンデム・クラスター構造を持つという特徴がある。アミロペクチンの直鎖と分岐鎖の形成を触媒する酵素はそれぞれスターチシンターゼ（starch synthase, SS）と枝作り酵素（starch branching enzyme, BE）である。アミロペクチン合成には他に、イソアミラーゼ（isoamylase, ISA）という分岐結合を加水分解する酵素が必須である。ISA はアミロペクチン合成時に、クリスタルラメラが形成される際に余分な分岐鎖を除去し、クラスター構造の形状をトリミングする働きがある。

変異体や形質転換体などを用いた *in vivo* 実験で推定された各酵素の機能に基づいて、アミロペクチンの独特の構造が SS, BE, ISA の各アイソザイム群の協同作用で形成されるモデルが提案されている。しかしながら、協同作用の制御メカニズムや酵素機能の証明は、精製酵素による *in vitro* 反応実験によってしか可能ではない。古典的な生化学実験に類するこの種の実験は、澱粉合成研究分野では上記の目的を達成するために必須であり、新規性が高く重要な知見を得るためには、従来とは一段と精度を上げた上で実施される必要がある。酵素間相互作用の解明研究にも本手法は欠かせない。ここでは、イネ精製酵素を用いた *in vitro* 反応実験によって最近明らかになった諸事実（下記 1-3）を紹介し、イネ高温登熟障害のメカニズム解明にもつながる本アプローチの重要性を概説する。

１．アイソザイム BEI, BEIIa, BEIIb の基本特性を決めた。①分岐グルカンを基質とした場合、BE の最低鎖長はグルコース重合度（DP）12 であり、転移鎖の最低鎖長は DP6 である。②転移鎖の鎖長選択性はアイソザイム間で大きく異なり、特に BEIIb は DP7 と 6 の鎖のみを合成するという顕著な鎖長選択性を示した。③直鎖グルカンを基質とした場合、最低鎖長は BEI では約 DP68 であるが、BEII は DP100 以上にならないと反応しない。直鎖と分岐鎖では BE の反応性が大きく異なる。

２．澱粉合成の初期過程は全く不明であるが、ホスホリラーゼ（Pho1）は BE と強い相互作用を持ちながら、プライマー非存在下で、初期グルカンを合成するとの新しい機能が推定された。

３．SS アイソザイム（SSI, SSIIa, SSIIIa）についても基本特性を決めた。また SSI-BE も、プライマー非存在下で、強いグルカン合成能を示すことがわかり、この相互作用も澱粉合成の初期過程に関わる可能性が示された。

starch biosynthesis, starch branching enzyme, phosphorylase

講演番号：4SY14-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:10～ C 校舎 15 会場

変異体米澱粉の物理化学特性
Physicochemical properties of novel starch isolated from rice mutant lines
○高橋 徹(秋田県総合食品研究センター)
○Toru Takahashi(Akita Research Institute of Food and Brewing)

澱粉生合成関連酵素は、生合成の最終産物である澱粉の構造や物性に大きな影響を与える [1)]．澱粉の特性は米の食味や加工特性に大きく影響するため，各酵素の作用機序の解明が重要な役割を担う．我々は，遺伝的背景が明確で，特定の澱粉生合成関連酵素が欠失した突然変異体米およびこれらを交配した二重変異体が生産する澱粉に着目した。本発表では，特に特徴のある変異体の組み合わせ（澱粉直鎖伸長酵素（SS）の一つである *SSIIIa* 変異体（*ΔSSIIIa*）を片親にして，澱粉枝作り酵素（BE）の *BEIIb* 変異体（*ΔBEIIb*）を交配した二重変異体（*ΔSSIIIa*/*ΔBEIIb*））を代表として、米澱粉の物理化学的特性を X 線回折（XRD），示差走査熱量分析（DSC），動的粘弾性測定によって詳細に調べた結果から、特定の酵素の欠損と物理化学特性、澱粉鎖の構造との関連について述べる．

内部標準物質（CaF_2）を加えた各澱粉の粉末 X 線回折から，相対結晶化度（RSC[2)]）の算出を試みた．*ΔSSIIIa* の結晶形は A 型，*ΔBEIIb* [3)]および *ΔSSIIIa*/Δ*BEIIb* はそれぞれ B 型を示し，これらの RSC は対照（日本晴）よりも低下したが，アミロース量の増加に伴うアミロペクチン量の相対的な減少に起因するためと考えられる．DSC の結果から，*ΔBEIIb* および *ΔSSIIIa*/*ΔBEIIb* の糊化ピーク温度は *ΔSSIIIa* および日本晴よりも有意に上昇した．アミロペクチン量で基準化した糊化エンタルピー（Δ*H*）は，日本晴と *ΔSSIIIa* 間，*ΔBEIIb* と *ΔSSIIIa*/*ΔBEIIb* 間でほぼ同値となり，後者が前者よりも大きいことから，アミロペクチンの二重らせん形成に寄与する鎖のうち，DP15～24 の鎖の顕著な増加が Δ*H* の増加にも影響を与えることが分かった。澱粉懸濁液の動的粘弾性測定から，貯蔵弾性率（*G′*）の立ち上がり温度およびピーク値は，DSC の結果を支持した．また，冷却時の *G′* は *ΔSSIIIa*/*ΔBEIIb* が顕著に大きく，*Δ SSIIIa* および *ΔBEIIb* の結果を加味すると，老化の初期段階において，アミロースの存在はもとより，長鎖のアミロペクチンの効果が色濃く，アイソザイム BEIIb は澱粉の糊化・老化に大きな影響を与える因子であると推察された．一方，アイソザイム SSIIIa の欠損は，アミロペクチン長鎖を減少させるため，粒内のクラスター構造も小さくなり，アミロペクチン鎖の広がり（粒の膨潤）を小さくすると考えられる．本研究から，各澱粉の物性が鎖長構造に裏打ちされていることを明らかにすることができ，澱粉生合成関連酵素（アイソザイム）の機能特性の解明への寄与や変異体米の選抜や産業利用時の指標となることが期待される．本研究はイノベーション創出基礎的研究推進事業（生研センター）の支援にて実施した．1) 藤田直子. 応用糖質科学, **1**, 58(2011). 2) Kodama, I., et al. *Jpn*. *J*. *Food Eng*. **12**,157(2011). 3) Kubo, et al., *J*. *Agric*. *Food Chem*., **58**, 4463(2010).

rheology, rice mutant lines, starch

講演番号：4SY14-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:40～ C 校舎 15 会場

変異体米澱粉の食品産業利用可能性

Availability of food applications of starches in rice mutant lines

○安東 竜一、高田 正保(日本食品化工株式会社)
○Ryuichi Ando,Masayasu Takada(Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.)

【目的】澱粉生合成メカニズムの解明を目的として、近年では、変異体米を作出して得られた澱粉を用い、酵素、澱粉構造及び物性の関係を明らかにする研究が行われている。これに伴い、ユニークな物性を有する変異体米澱粉の実用化が期待されているにもかかわらず、これら変異体米澱粉の実用化に向けた利用研究については、さほど多く行われていないのが現状である。変異体米澱粉を実用化する為には、物性の特徴を生かした用途開発が必要であるが、食品用途で広く普及している加工澱粉の代替が一つの可能性と考えられた。そこで、各種変異体米澱粉の食品への利用適性について、加工澱粉と比較して評価を行った。

【材料及び方法】本研究では、多数ある変異体系統の中から、比較的収量が高い系統を選択して用いた。ウルチ性変異体米澱粉には、野生型、スターチシンターゼの変異体（*△SSⅢa*）、スターチシンターゼの二重変異体（*△SSⅢa*／*△SSⅣb*）及びスターチシンターゼと枝作り酵素の二重変異体（*△SSⅢa*／*△BEⅡb*）を用いた。モチ性変異体米澱粉には、結合型スターチシンターゼの変異体（*△GBSSⅠ*）、スターチシンターゼと結合型スターチシンターゼの二重変異体（*△SSⅢa*／*△GBSSⅠ*、*△SSⅠ^{L}*／*△GBSSⅠ*）及び枝作り酵素と結合型スターチシンターゼの二重変異体（*△BEⅠ*／*△GBSSⅠ*）を用いた。これら米澱粉の性状（顕微鏡観察、粒径）及び糊化特性（8 %アミログラム）について分析を行った。さらに、ウルチ性変異体米澱粉についてはフライ衣、モチ性変異体米澱粉についてはタレ・ソースへの利用適性評価を行った。また、モチ性変異体米澱粉にアセチル化アジピン酸架橋を施して加工変異体米澱粉を作製し、これらを用いたタレ・ソースの利用適性評価も合わせて実施した。

【結果】変異体米澱粉の中では、二重変異体である*△SSⅢa*／*△SSⅣb* 及び*△SSⅢa*／*△BEⅡb* が最も糊化し難い性質を示した。特に*△SSⅢa*／*△BEⅡb* を用いることでクリスピー感のあるフライ衣が得られたものの、保存後の食感の劣化を抑制することができなかった。変異体米澱粉の中では、*△SSⅢa*／*△GBSSⅠ*の澱粉粒が最も微細であり、*△BEⅠ*／*△GBSSⅠ*が最も高いピーク粘度を示した。団子のタレによる利用評価では、*△SSⅢa*／*△GBSSⅠ*が保形性、口溶け、切れのバランスに優れて良好な利用適性を示したものの、酸性ソースでは澱粉粒の崩壊が促進され、保形性が大きく低下した。モチ性変異体米澱粉にアセチル化アジピン酸架橋を施したところ、澱粉粒の崩壊が適度に抑制され、タレ・ソース用途において、保形性と口溶けの両立を可能にすることができた。

本研究はイノベーション創出基礎的研究推進事業（生研センター）にて実施された。

rice mutant line, starch, food application

講演番号：4SY15-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:35～ B 校舎 22 会場

PQQ の抗酸化作用の化学的な面からの評価

Kinetic Study of Antioxidant Action of PQQ

○向井 和男(愛媛大理)
○Kazuo Mukai(Ehime Univ.)

[目的] Pyrroloquinolinequinone (PQQ) の重要な機能の一つとして、PQQ 還元型の、カテコール構造を有する、pyrroloquinolinequinol ($PQQH_2$) の抗酸化活性が挙げられる。しかしながら、その速度論的研究は行われていない。そこで我々は、$PQQH_2$ の aroxyl (ArO•) ラジカル消去速度 (k_s)[1]、α-tocopheroxyl (α-Toc•) ラジカル還元・再生速度 (k_r)、一重項酸素 ($^1O_2$) 消去速度 (k_Q)[2] の測定を行い、他の天然抗酸化剤との比較検討を行うことにより、$PQQH_2$ が高い活性を有する抗酸化剤であることを明らかにした。また、$PQQH_2$ と α-tocopherol (α-Toc) の共存下で、ラジカル消去速度に相乗効果が見られることを見出した。本シンポジウムではその詳細を報告する予定である。

[実験] DMSO およびミセル溶液中、25°C で、$PQQH_2$ を含む多くの天然抗酸化剤について、ArO• 消去速度 (k_s) と α-Toc• 再生速度 (k_r) を stopped-flow 分光光度計を用いて測定した。また、$PQQH_2$ と α-Toc の共存下で k_s を測定し、相乗効果を見出した。さらに、$^1O_2$ の発生剤として endoperoxide、UV-Vis probe として diphenylbenzofuran を用い、競争反応法により k_Q の測定を行った。

[結果と議論] DMSO 溶媒中における $PQQH_2$ の ArO• 消去速度 (k_s) は、ubiquinol-10 > α-Toc > $PQQH_2$ > EGCG > EGC > EC > caffeic acid、の順となり、カテキン類やコーヒー酸よりも速い速度を示すが、ubiquinol-10 や α-Toc に比べると遅い消去速度となった。一方、DMSO 中、$PQQH_2$ による α-Toc• の再生速度 (k_r) は、$PQQH_2$ > ubiquinol-10 > EGCG > EC > caffeic acid、の順になり、$PQQH_2$ が最も速い再生速度を示した。

DMSO 中、$PQQH_2$ と α-Toc の共存下で k_s の測定を行ったところ、単独の場合に比べ 1.3 倍速くなった。さらに、反応によって生じる α-Toc• の吸収が消滅した。このことは、$PQQH_2$ の共存により α-Toc• による酸化促進効果が抑制されることを示している。

$PQQH_2$ のミセル溶液中 (pH 7.4) における k_s は、$PQQH_2$ > Vit C >> cysteine > uric acid > glutathione、の順となり、Vit C より高い活性を示した。さらに、$PQQH_2$ の k_Q は、β-Car > $PQQH_2$ > α-Toc > uric acid > ubiquinol-10 > Vit C ~ EGC > EC となり、β-Car に次ぐ速い速度を示した。

以上、$PQQH_2$ は活性酸素・フリーラジカルに対して、高い抗酸化活性を示す。

文献 1) A. Ouchi, M. Nakano, S. Nagaoka, and K. Mukai, *J. Agric. Food Chem.*, 57, 450-456 (2009).
2) K. Mukai, A. Ouchi, and M. Nakano, *J. Agric. Food Chem.*, 59, 1705-1712 (2011).

pyrroloquinolinequinone, antioxidant activity, kinetic study

講演番号：4SY15-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ B 校舎 22 会場

PQQ の脊髄損傷治療への応用

Effect of PQQ on functional recovery after incomplete spinal cord injury

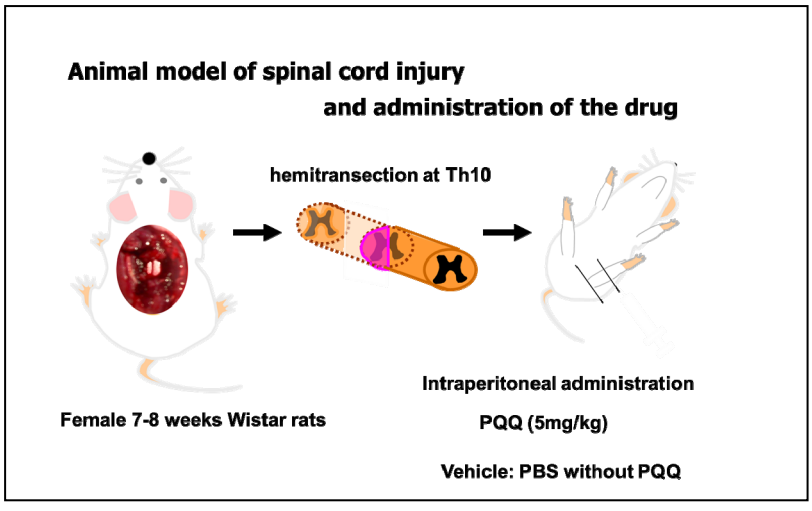
○福光 秀文[1]、平川 明弘[1,2]、古川 昭栄[1]([1]岐阜薬大薬、[2]岐阜大学医)
○Hidefumi Fukumitsu[1], Akihiro Hirakawa[1,2], Shoei Furukawa[1]([1]Gifu Pharmaceutical Univ., [2]Gifu Univ.)

脊髄は末梢組織と脳の運動、知覚情報の伝道路であり傷害されると、運動麻痺や知覚障害などの重篤な身体障害に陥る。近年、世界的に基礎研究が活発化し、成果も得られているが、いまだに抜本的治療法は開発されていない。

脊髄損傷部では、物理的損傷に続いて炎症反応が起こる。そのことを契機に、神経細胞に対して興奮毒性を示すグルタミン酸や一酸化窒素（NO）が蓄積することによって、損傷が拡大する。この 2 次的な損傷を抑制することが 1 つの治療標的となると考えられている。

PQQ は NMDA 型グルタミン酸受容体を酸化修飾し、NMDA あるいはグルタミン酸誘発性の細胞障害を抑制すること、脳虚血モデル動物に PQQ を投与しておくと、虚血による脳組織のダメージを軽減する作用があることが知られている。そこで、本研究では、脊髄損傷ラットの運動機能に対する PQQ の治療効果を検討した。

PQQ は脊髄半分切断モデルラットの損傷部において、誘導性 NO 産生酵素の mRNA 発現を誘導し、後肢の運動機能回復を促進した。損傷 7 日後の脊髄組織を比較したところ、対照群と比較して PQQ 投与群では、損傷領域の拡大が小さいこと、より多くの軸索再生が誘導されていることを明らかにした。



spinal cord injury, PQQ, locomotor function

講演番号：4SY15-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:25～ B 校舎 22 会場

PQQ の脳機能改善に及ぼす作用

Effect of pyrroloquonpline quinone on cognitive deficit

○金相 希、浦野 四郎(芝浦工業大ライフサポートテクノロジー研セ)
○Nozomi Kaneai,Shiro Urano(Shibaura Institute of Technology)

近年､新規食物栄養素としてピロロキノリンキノン(PQQ)が注目されている｡PQQ は 1964 年､Hauge JG らによりバクテリアのグルコース脱水素酵素の酸化還元補酵素として発見された。その後、PQQ 欠乏食を与えたマウスが、例えば、成育不良、毛並み悪化、繁殖能力の低下など種々の異常を呈することが報告され、ヒトや動物でも補酵素として利用しているものと考えられた。したがって、古くは水溶性ビタミンと考えられたこともある。しかし、欠乏症の研究やヒトの体内合成の有無の詳細が解明されていないことから、現在ではビタミン様物質として認識されている。PQQ はデヒドロゲナーゼ､アミンオキシダーゼなど酸化還元酵素の補酵素として機能し､キノンプロテインであることから、活性酸素種と効率的に反応し、強い抗酸化作用を示すことが予想されている。以前から脂質過酸化に対する PQQ の抗酸化活性を検討する試みが多く報告され、その後、神経系では、PQQ による腫瘍壊死因子(TNF-α)と malondialdehyde(MAD)の減少、神経成長因子(NGF)の生成の増加、N-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体の酸化損傷からの保護などがわかってきた｡酸化ストレスによる老化および疾患に対するビタミンの効果が明らかになっており、老化やアルツハイマー病などで観察される酸化ストレスに基づく認識能障害を、ビタミン E と同じように改善することが期待される。

従来我々は、酸化ストレスを負荷した若齢ラットおよび正常飼育した老齢ラットの学習能、記憶能の低下が PQQ 投与によって効率よく阻害されることを明らかにした。老齢ラットは長期慢性的に酸化ストレスが負荷されており、既に酸化損傷が蓄積されていることを考慮すれば、PQQ による認識機能改善が非抗酸化的に行われたものと考えられる。当然のことながら、認識機能の低下は神経伝達機能の低下に由来する。神経伝達機能はシナプス内 Ca^{2+}濃度の上昇、シナプス小胞とシナプス前膜の膜融合による神経伝達物質の放出が深く関係している。酸化ストレスや老化由来の NMDA 機能変化で、Ca^{2+}流入が異常に亢進すると、シナプス小胞の移送をコントロールする Synapsin-I タンパク質量が低下する。PQQ はこれを抑制し、神経伝達過程の膜融合に必須の SNARE タンパク質の低下も抑制することを見出した。したがって PQQ の神経保護効果は、ビタミン E(トコトリエノール)と同様に、抗酸化作用のみならず非抗酸化的作用により行われることが伺える。

このような神経細胞中の重要タンパク質の変化は、酸化ストレスが負荷されているアルツハイマー病を含む神経退行性疾患でも確認され、PQQ が抗酸化的および非抗酸化的にこれらの認識機能低下を予防できる可能性があるものと考えられる。今回はこれらの点について述べる。

Pyrroloquinoline quinone, Cognitive impairment, Oxidative stress

講演番号：4SY15-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ B 校舎 22 会場

PQQ のレドックスサイクリングを介した上皮細胞増殖促進作用

PQQ stimulates epithelial cell proliferation through redox cycling

○赤川 貢(大阪府大院生命環境)
○Mitsugu Akagawa(Osaka Prefecture Univ.)

ピロロキノリンキノン（PQQ）は、メタノール資化性細菌のメタノール脱水素酵素の酸化還元補酵素として 1979 年に同定された化合物であり、その後、原核生物においていくつかの PQQ 依存性脱水素酵素の存在が明らかになっている。PQQ は野菜や肉類などの食品にも含有され、PQQ の生合成能を持たないヒトの組織においても検出されるため、ヒトは食事から PQQ を摂取していると考えられている。1989 年に、Rucker らのグループによって PQQ 欠乏餌で飼育されたマウスが発育不良、皮膚の脆弱化、および繁殖能力の低下等の異常を呈することが報告され、哺乳類における PQQ の栄養学的な重要性が初めて示された。これらの症状は、微量の PQQ を与えることによって改善されることから、PQQ は哺乳類においても補酵素として機能するビタミンの一種ではないかと推測された。しかしながら、PQQ が哺乳類の酵素と結合して補酵素として機能するという実証はされておらず、未だビタミンとしては認定されていない。その栄養生理学的な側面に加えて、PQQ は抗酸化作用、線維芽細胞増殖促進作用、神経細胞保護作用、ミトコンドリア賦活作用などの生理作用を持つことが見出され、その薬理的効能も注目されている。このように PQQ は、ビタミンの候補物質として挙げられているだけではなく、我々の健康の維持および増進に貢献する有望な機能性食品因子であると考えられている。我々の研究グループは、PQQ が発揮する成長因子様の作用に着目し、その作用機序を分子レベルで解明することを目標として研究を進めている。本発表では、ヒト由来の培養上皮細胞を用いて PQQ の細胞増殖促進作用を検証し、さらにその作用機序の解析を行った研究結果について紹介する。

我々は、ヒト上皮由来細胞株 A431 細胞を用いて PQQ の細胞増殖促進作用の検証を行った。その結果、10 nM 以上の PQQ の存在によって A431 細胞の増殖が顕著に亢進されることが明らかになった。その作用機序を解析した結果、PQQ が protein tyrosine phosphatase 1B（PTP1B）を阻害することにより、リガンド非依存的に上皮成長因子受容体（EGFR）の活性化（チロシンリン酸化）を誘導し、細胞増殖が促進されるという機構を明らかにした。さらに、PQQ のレドックスサイクリングを介して発生した過酸化水素が PTP1B の活性中心のシステイン残基を酸化修飾することによって酵素活性を阻害することを明らかにした。PTP1B は、EGFR のみならずインスリン受容体などの受容体チロシンキナーゼファミリーを基質とすることから、PQQ が細胞増殖だけではなく広範な細胞応答を誘導する可能性が示唆された。

PQQ, redox cycling, epidermal growth factor receptor

講演番号：4SY15-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:30～ B 校舎 22 会場

PQQ の骨代謝における作用と遺伝子発現解析

Effects of PQQ on bone metabolism and gene expression

○橘 信二郎、比嘉 由美子(琉大農・亜熱生資)
○Shinjiro Tachibana,Yumiko Higa(Univ. of the Ryukyus)

ピロロキノリンキノン（PQQ）は、微生物で発見された酸化還元酵素の補酵素であり、ビタミン様の生理活性を有するバイオファクターとして注目されている。近年では、PQQ の抗酸化作用や神経細胞保護作用および記憶保持機能など興味深い生理機能が報告されている。Killgore らの実験では、PQQ 欠乏食給餌マウスに骨格異常（湾曲）の出現が認められている。この結果は、PQQ が骨代謝または骨形成過程に何らかの関与を及ぼしていることを示唆している。にもかかわらず、これまでに PQQ の骨代謝への影響については調べられていない。そこで、我々は PQQ の骨代謝への関与を想定し、マウス前駆骨芽細胞（MC3T3-E1）を用いた PQQ による骨形成に及ぼす影響と骨代謝バイオマーカーの遺伝子発現変動について検討を行った。

まず、前駆骨芽細胞に対する PQQ の毒性および細胞増殖に及ぼす影響について調べたところ、未分化細胞において 10^{-6}～10^{-4} M の PQQ 濃度下で有意な濃度依存的細胞毒性が認められた。また、前駆骨芽細胞の対数増殖期における PQQ の影響について調べたところ、10^{-4} M の PQQ 濃度下において有意な細胞増殖抑制が観察された。ヒト繊維芽細胞において、PQQ は細胞増殖を亢進することが報告されている。ところが、今回の我々の研究で用いた前駆骨芽細胞では、PQQ による有意な細胞増殖効果は確認されなかった。さらに、分化誘導後の骨芽細胞に対する PQQ の細胞毒性を調べた結果、10^{-4} M の PQQ 濃度においてのみ有意な細胞毒性が確認された。分化骨芽細胞の骨形成能を評価するため、石灰化染色（Alizarin red S、von Kossa）を行ったところ、Alizarin 染色および von Kossa 染色いずれも経時的な強度の増大を示したが、10^{-4} M の PQQ 濃度下において有意に低い染色強度が認められた。骨代謝バイオマーカーであるアルカリホスファターゼ（ALP）活性は、いずれの実験群においても経時的な比活性の増大を示したが、培養 35 日目において PQQ 添加群において対照群より有意に低い値を示した。骨形成関連バイオマーカーの遺伝子発現を RT-PCR にて確認したところ、オステオカルシン（OC）および I 型コラーゲン（Col1a1）の PQQ 濃度依存的な発現量の減少が確認された。RANK リガンド（RANKL）では、PQQ 濃度依存的な発現量の減少が確認されたものの、いずれの PQQ 添加群においても対照群の RANKL 発現量に比べて有意に高い発現量を示した。

以上の結果より、PQQ は骨形成を促進する効果は認められないと推測された。ところが、最近、PQQ は RANKL 誘導性の破骨細胞形成を阻害することが報告されており、現在、両細胞間のクロストークに及ぼす PQQ の影響について研究を行っている。

pyrroloquinoline quinone, osteoblast, osteogenesis

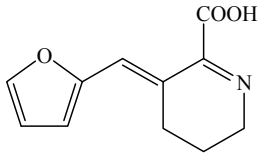
講演番号：4SY16-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:35～ B 校舎 20 会場

新たな低分子メイラード黄色色素

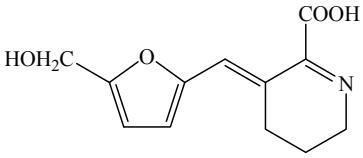
Novel Low-Molecular Weight Yellow Pigments Formed by the Maillard Reaction

○村田 容常(お茶大院人間文化創成科学)
○Masatsune Murata(Ochanomizu Univ.)

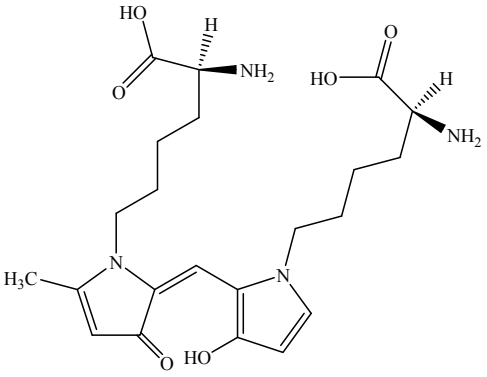
メイラード反応は、色・香りを通じて食品の嗜好性、品質に大きな影響を及ぼしている。食品は栄養素を十分含んでいても食べられなければ意味がない。加熱という人類しか行わない操作や様々な貯蔵法を通じてヒトは多くの食資源を手にしてきた。加熱操作や長期の貯蔵・熟成過程を経てきた食品は必ずメイラード反応を起こしている。加熱香気や褐変・着色である。ここでは、褐変・着色に注目する。主な褐変・着色反応は含窒素褐色物質であるメラノイジンの形成である。しかし、メラノイジンは、糖の分解産物がアミノ酸などを巻き込んで重合した高分子の不均一分子であり、構造を決定することは困難である。低分子色素としては、5 単糖系のメイラード反応産物として、脂溶性の赤色色素、水溶性の青色色素などが報告されているが、食品の色素という観点からは十分な検討はなされていない。我々は多くの食品系が弱酸性であることを考え、pH5 の酢酸緩衝液中で、フルフラールやキシロースとアミン酸との間でメイラード反応を起こさせ、形成される低分子色素を検索した。その結果、フルフラールやキシロースとリジンの反応系から一連の新規黄色色素（furpipate 類[1] と dilysyldipyrrolone 類[2]）を同定した。反応条件によっては、これらは反応溶液中の主要な色素となった。このことは反応系をコントロースすることでメラノイジンと低分子色素の量比などを変えることができ、色調や明度をコントロールできる可能性を示唆している。



Furpipate



Hydroxymethyl-furpipate



Dilysyldipyrrolone B

1) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1717-1723 (2007).*Food Sci. Technol. Res.*, **15**, 45-50 (2009).
2) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2065-2069 (2009).*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 221-226 (2011).

Maillard reaction, Browning, Yellow Pigment

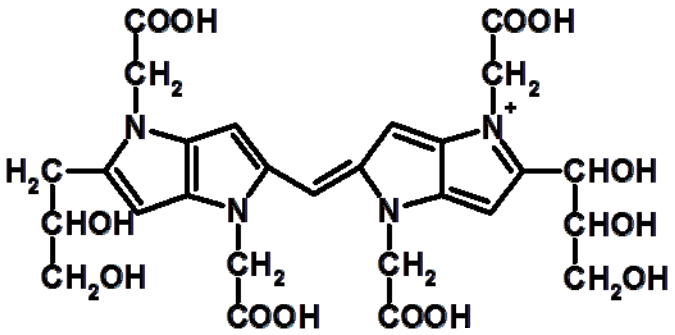
講演番号：4SY16-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:05～ B 校舎 20 会場

メラノイジンの生成機構とメイラード反応制御因子
Formation of melanoidin and regulation of Maillard reaction
○渡辺 寛人、早瀬 文孝(明大農)
○Hirohito Watanabe,Fumitaka Hayase(Meiji Univ.)

メイラード反応に起因する褐変の制御は、食品の製造・加工の現場において重要な課題である。しかしながらその複雑さゆえ、反応生成物および反応機構の解明は、反応の発見から百年を経た現在もなお十分とはいえない。メイラード反応で生成する褐色色素メラノイジンについては、その性質から直接的な機器分析を適用することは困難であり、メラノイジンの構造を解明する上で、前駆体となる分子の構造を解明することが有用であると考えられる。

われわれは、これまでにキシロースとグリシンのメイラード反応により生成する青色色素の構造を明らかにした。この反応系で生成する青色色素化合物群のうち主要生成物である Blue-M1 は、2 つのピロロピロール（pyrrolopyrrole）骨格がメチン架橋された長い共役系を有する（図）。精製した Blue-M1 を単独でインキュベートすると褐変することから、Blue-M1 はメラノイジンの前駆体であると考えられる。また同様の青色色素はキシロースとグリシン以外の糖、アミノ酸によっても生成することが明らかとなった。

一方、われわれはキシロースとグリシンの反応系において、ピロロピロール骨格を有する赤色色素や黄色色素を見出しており、これらがいずれもインキュベートにより褐変することを明らかにしている。これらの事実は、ピロロピロール骨格をもつ色素群がメラノイジンの前駆体となっており、メイラード反応による褐変において重要な役割をもつことを示している。このことから褐変の制御においては、これら色素化合物の生成機構および重合・高分子化の機構を解明することが重要であると考えられる。



Blue-M1

Maillard reaction, melanoidin, browning

講演番号：4SY16-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:35～ B 校舎 20 会場

味噌の鍵香気成分としてのヒドロキシエチルメチルフラノン（HEMF）の生成

Generation of HEMF [4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2*H*)-furanone as the key aroma component of Miso.

○大畑 素子[1]、菅原 悦子[2]([1]北里大獣医、[2]岩手大教育)
○Motoko Ohata[1], Etsuko Sugawara[2]([1]Kitasato Univ., [2]Iwate Univ.)

味噌は、日本古来より我々の食生活に欠かせない大豆発酵食品である。味噌の品質を評価する上でその香りは非常に重要な因子とされている。

HEMF［4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2*H*)-furanone］は甘いカラメル様の強烈な香りを有し、味噌に比較的高濃度で含まれる化合物である。全国味噌鑑評会における香りの項目での評価点と、機器分析によって算出された各香気成分の濃度との相関から、HEMF が味噌の香りの評価を最も高めていることが示され、HEMF は味噌の特有香気成分（鍵香気成分）として重要な化合物であることが判明した。味噌において、HEMF は酵母の関与によって生成されると考えられたが詳細は不明であり、その生成機構に関心が持たれた。

そこでまず、酵母添加と無添加の味噌を調製し、熟成に伴う HEMF 濃度と酵母菌数を比較した。酵母添加味噌では、熟成初期において酵母の菌数レベルが高いにも関わらず HEMF は検出されず、その後一定の期間を経過した後に濃度が増加することを確認した。一方、酵母無添加味噌では HEMF は検出されなかった。さらに、ペントースとアミノ酸によるメイラード反応生成物を含む酵母培養単純培地を用いて酵母を培養したところ、多量の HEMF 形成が確認された。したがって、我々は、味噌の熟成に伴って生成されるメイラード反応生成物が HEMF 形成における前駆物質であると推察した。

さらに我々は、酵母による HEMF 形成機構を検証するために、[U-^{13}C]-リボースと[U-^{13}C]-グリシンによるメイラード反応生成物を含む培地を用い、さらに酵母の栄養源として[U-^{13}C]-グルコースあるいは[6-^{13}C]-グルコース添加して酵母を培養し、生成された HEMF の炭素骨格を ^{13}C 原子の取り込みによって明らかにした。その結果、HEMF の五員環および側鎖メチル基はリボース由来であり、側鎖エチル基はグルコース由来であることが判明した。したがって HEMF は、酵母がグルコースを代謝することにより生じた炭素数 2 の物質と、ペントース由来の炭素数 5 のメイラード反応生成物が、酵母の菌体内で結合し形成されたと考えられた。

HEMF, Miso, yeast

講演番号：4SY16-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ B 校舎 20 会場

メイラード反応後期段階生成物の生体応答とその機構
Biological significance of AGEs of the Maillard reaction
○永井 竜児、白河 潤一、大野 礼一、諸石 成美、永井 美芽(東海大農)
○Ryoji Nagai,Jun-ichi Shirakawa,Rei-ichi Ohno,Narumi Moroishi,Mime Nagai(Tokai Univ)

最近、生活習慣病などの老化関連疾患の発症に関与する因子として AGEs(Advanced Glycation End products)の重要性が注目されている。AGEs の生成反応はフランス人の Louis Camille Maillard によって、アミノ酸と糖の加熱によって進行する褐変反応として見出されたことから、食品化学の分野では主にメイラード反応と呼ばれている。最近はより簡略化されて、蛋白に糖が結合する反応から「糖化」とも呼ばれている。AGEs 生成の経路は様々存在するが、食品と同様、生体内に存在する蛋白と糖との間でも本反応が進行し、褐色変化のみならず生体蛋白が変性する原因となる。つまり、われわれはグルコースをはじめとする糖質を消費し、生物万有のエネルギー源である ATP を絶えず生産しているが、メタボリックシンドローム等の糖質および脂質の代謝異常が進展すると AGEs 生成が促進し、生体蛋白が変性する反応が進展する。本反応はアマドリ転位物が生成するまでの前期反応と、その後 AGEs が生成する後期反応に分けられる。糖尿病の臨床マーカーとして世界的に測定されているヘモグロビン A1c(HbA1c)は、ヘモグロビン蛋白が糖化を受けた前期生成物（アマドリ転位物）である。その後、本反応がさらに進行すると AGEs へと変化し、蛋白の陰性荷電が増加し、重合体形成によって蛋白の変性がさらに促進する。HbA1c に対して AGEs はあまり臨床応用がなされていない。その理由として、AGEs は単一の構造ではなく、各 AGEs 構造によって安定性や測定法が異なり、簡便かつ信頼性の高い測定法が少ないことがあげられる。

また、近年ヒトの全遺伝子解析であるゲノムプロジェクトに続き、発現蛋白の網羅的解析であるプロテオミクスが盛んに行われるようになってきた。それに伴い、遺伝子や蛋白の発現レベルのみでは解明できない疾患の存在も明らかとなり、現在、老化関連疾患で“翻訳後修飾”という側面からも AGEs が改めて注目されている。AGEs 研究が最近活発になってきたもう一つの理由として、質量分析等の機器分析技術の進歩により、これまで測定が困難であった様々な AGEs 構造体が測定可能となり、信頼性の高い研究手法によって、AGEs と病態との関与が分子レベルで明らかとなってきたこともあげられる。今回、AGEs の生成経路、AGEs の生体に及ぼす作用、AGEs 生成阻害剤の効果について紹介したい。

AGEs, Lifestyle-related disease, Metabolic syndrome

講演番号：4SY16-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:35～ B 校舎 20 会場

メイラード反応生成物の安全性－アクリルアミドとフラン－
Safety of Maillard Reaction Products - Acrylamide and Furan -

○吉田 充(農研機構食総研)
○Mitsuru Yoshida(NFRI, NARO)

加熱調理は人類が火を使い始めて以来行われてきたことであり，加熱により食材を柔らかくして固いものや難消化性のものを食べられるようにしたり，殺菌により安全性を高めたり，保存性を向上させたりする作用があり，人類の生存にとってなくてはならない技術である。また，食欲をそそる好ましい香りや色を生じさせ，食の楽しみを増強させてくれる効果もある。しかし，加熱加工・調理時に食材の成分が反応を起こして有害物質を生成する場合があり，その例としてアクリルアミドとフランを取り上げ，そのリスクを考え，対策について紹介する。

アクリルアミドは，煮たりゆでたりの調理ではほとんど生成しないが，100℃を越える油で揚げたりオーブンで焼いたりした時に，アミノ酸の一種アスパラギンがフルクトースやグルコースなどの還元糖と反応して生じる。実験動物で発がん性，遺伝毒性，生殖・発生毒性が報告されており，体内で生じる反応性の高い酸化代謝物グリシダミドが毒性の原因であると考えられている。アクリルアミドは，主にフライドポテト，ポテトチップなどのバレイショ加工品，ビスケット，米菓，朝食シリアルなどの穀類加工品，コーヒー，麦茶，ほうじ茶などの焙煎飲料に含まれる。食品からのアクリルアミド摂取量は，一般人の平均で 0.001 mg/kg 体重/日と推定され，この量をラットにおける神経形態変化のNOAEL 0.2 mg/kg 体重/日，マウスにおけるハーダー腺腫誘発の BMDL 0.18 mg/kg 体重/日と比較すると，ヒトの健康への悪影響が懸念され，摂取を減らす努力が必要であると考えられている。このため，食品の品質と安全性に関する規格・基準を作成する国際的政府間組織コーデックス委員会では，2009 年に食品中のアクリルアミド低減のための実施規範を採択した。

フランは，食品中でアスコルビン酸の熱分解，糖の熱分解，糖とアミノ酸の反応，アミノ酸の熱分解，多価不飽和脂肪酸の酸化分解などにより生成し，その体内代謝物が毒性を示す。フランの沸点は 32℃と低いので，開放系での加熱により揮発するが，ベビーフードや缶詰，瓶詰めなどの密閉容器中では揮発せず蓄積しやすい。日本のトータルダイエットスタディでは，しょうゆ及びその加工品を中心とした調味料及び香辛料類と、缶コーヒーのような嗜好飲料類の二つの食品群が主なフランの摂取源と認められた。フランの摂取量は，国際的に平均 0.001 mg/kg 体重/日と推定されており，雌マウスにおける肝細胞腺腫及び肝細胞がん誘発の BMDL 0.96 mg/kg 体重/日を考慮するとヒトの健康への悪影響の懸念があり，アクリルアミドと同様に摂取低減のための実施規範作成に向けて，各国で低減法に関する研究を進め，情報を収集中である。

high temperature cooking, acrylamide, furan

講演番号：4SY17-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:30～ B 校舎 23 会場

Aspergillus oryzae のβ-マンナン資化系を制御する転写制御因子 ManR の発見とその解析
ManR, a $Zn(II)_2Cys_6$ transcriptional activator, controls ß-mannan utilization system in *Aspergillus oryzae*
○小川 真弘(キッコーマン)
○Masahiro Ogawa(Kikkoman Corporation)

β-マンナンはキシランと並び植物細胞壁に含まれる主要なヘミセルロース成分の一つであり、自然界に広く存在している多糖類の一つである。またβ-マンナンの中には、コンニャクグルコマンナンのように食品に含まれるもの、ローカストビーンガムのように食品添加物として使用されるものなど、我々の生活においても馴染みのある物質である。天然界においてβ-マンナンは、エンド-β-マンナナーゼ (マンナナーゼ) やβ-マンノシダーゼ、そしてα-ガラクトシダーゼといったマンナン分解系酵素群の作用により、単糖やオリゴ糖にまで分解される。これら酵素の中でもカビおよび細菌由来のマンナナーゼは、食品加工、畜産、生活用品（洗剤）など様々な分野において利用されている。マンナナーゼ遺伝子の転写制御因子は、原核生物である *Bacillus* 属においてその発現を負に制御するリプレッサーが見つかっているが、カビを含む真核生物ではいまだ発見されていなかった。また、これまでの *Aspergillus* 属糸状菌における転写制御因子の解析例では、デンプン分解系酵素群の転写活性化因子である AmyR のように、一つの正の制御因子が関連する酵素群の遺伝子を包括的に制御する事例がいくつか見出されている。そのためカビの場合、マンナナーゼの転写制御因子はマンナナーゼだけでなく、マンナン分解系酵素群の遺伝子発現を包括的に活性化する可能性も考えられた。このような転写活性化因子が得られれば、複数のマンナン分解系酵素群を効率的に生産する、バイオマス利用や食品産業等に利用価値のあるカビを育種できることが期待される。そこで我々は麹菌 *Aspergillus oryzae* の転写制御因子遺伝子破壊株ライブラリーを作製し、これをスクリーニングすることにより、マンナン分解系酵素群の転写制御因子 ManR を取得した。ManR は $Zn(II)_2Cys_6$ タイプの DNA 結合タンパク質であり、その DNA 結合部位はマンナナーゼのプロモーター領域に直接的に結合することをゲルシフトアッセイにより確認した。ManR により制御される遺伝子を同定するために、*manR* 破壊株の DNA マイクロアレイ解析を実施したところ、ManR はマンナン分解系酵素群の発現を包括的に制御し、いくつかのセルロース加水分解酵素遺伝子の発現についても制御することがわかった。さらに、TEF1 プロモーターを利用した *manR* の強制発現株を *A. oryzae* にて作製し、その酵素生産性を評価した。その結果、*manR* 強制発現株ではマンナナーゼ、α-ガラクトシダーゼ、そしてセルラーゼの生産量が、コントロールと比較して顕著に増加していた。このように、ひとつの転写活性化因子を強制発現させることにより、複数の酵素を同時に高生産する株を得ることが可能であるという結果は、今後の糸状菌の育種を行う上で、非常に有用な知見であると考えられる。

Aspergillus oryzae, transcriptional activator, ß-mannan utilization system

講演番号：4SY17-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ B 校舎 23 会場

Aspergillus aculeatus セロビオース応答制御因子 ClbR の機能解析とその応用
Functional analysis and application of cellobiose response regulator (ClbR) in *Aspergillus aculeatus*
○谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司(阪府大院・生環科)
○Shuji Tani,Jun-ichi Sumitani,Takashi Kawaguchi(Osaka Prefecture Univ.)

当研究室において土壌より単離された糸状菌 *Aspergillus aculeatus* no. F-50 株が分泌生産するセルロース系バイオマス分解酵素は，現在工業的に利用されている *Trichoderma reesei* 由来のセルラーゼ剤と協調的に基質に作用して効率よく単糖を生成する特長を有している．この特長は，*A. aculeatus* が異なる基質特異性を有す酵素を分泌生産していることに起因しており，演者らは，本菌が新たなセルロース系バイオマス分解酵素の供給源になると考えている．そこで，本菌において酵素大量生産系を構築し，得られた酵素を利活用することを目的として，まず，本菌におけるセルロース系バイオマス分解酵素遺伝子群の発現制御機構の解明を目指している．

A. aculeatus におけるセルロース系バイオマス分解酵素遺伝子群のセルロースによる誘導は，$Zn(II)_2Cys_6$ 型転写因子 XlnR 依存的，または非依存的な少なくとも 2 つの異なる経路により制御されている．演者らは，未同定の XlnR 非依存的なセルロース誘導経路を制御する因子を同定することを目的として，この経路制御下にあるセロビオヒドロラーゼ I 遺伝子（*cbhI*）の発現様式を指標としたポジティブスクリーニング系を構築し，T-DNA 挿入変異株ライブラリから制御因子遺伝子破壊株を探索した．これまでに約 6,000 株をスクリーニングした結果，*cbhI* のセロビオースやセルロースに応答した遺伝子発現を制御する新奇 $Zn(II)_2Cys_6$ 型転写因子様タンパク質を同定し，この因子を cellobiose response regulator (ClbR) と命名した．興味深いことに ClbR は，XlnR 依存的なセルロース誘導も制御していたことから，*clbR* 高発現により種々の酵素生産量が亢進されることが期待されたが，その効果は限定的であった．そこで，ClbR が他の制御因子と相互作用して協調的に遺伝子発現を制御していることを想定し、XlnR などの転写因子と ClbR の相互作用を Yeast Two-Hybrid 法を用いて解析したところ,XlnR やセルロース誘導を制御する転写因子 ManR ではなく,機能未同定の ClbR2 (ClbR パラログ）が相互作用因子として単離された．ClbR2 は，ClbR と制御している遺伝子が重複していることが遺伝学的解析により明らかになり，現在その作用機序に関して解析している．

Aspergillus におけるセルロース系バイオマス分解酵素遺伝子群の発現誘導は，多様な因子により制御されていることが明らかにされてきており，酵素生産を調節している制御因子の機能を利用した合理的な酵素高生産法を構築するには，制御機構の全貌を解明することが重要であると考えられる．

Aspergillus aculeatus, Cellobiose response regulator, Gene regulation

講演番号：4SY17-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:30～ B 校舎 23 会場

麹菌のカーボンカタボライト抑制マシナリーの機能制御によるアミラーゼ生産向上
Enhancement of amylolytic enzyme productivity by regulating the transcription machinery for carbon catabolite repression in *Aspergillus oryzae*
○五味 勝也、田中 瑞己、一瀬 桜子、新谷 尚弘(東北大院農・生物産業創成)
○Katsuya Gomi,Mizuki Tanaka,Sakurako Ichinose,Takahiro Shintani(Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

麹菌はα-アミラーゼをはじめとする多種類のアミラーゼ系酵素を高生産するだけでなく、強力なα-アミラーゼ遺伝子のプロモーターを利用した異種タンパク質の生産にも優れている。しかし、アミラーゼ系遺伝子群は誘導基質であるデンプンやマルトースの最終分解産物であるグルコースによるカタボライト抑制を受けることから、このグルコース抑制が解除された宿主株を育種することでアミラーゼや異種タンパク質のさらなる高生産が可能になると期待される。糸状菌におけるグルコース抑制は広域制御型転写因子 CreA によって制御されることが知られており、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* では CreA のユビキチン･脱ユビキチン化によりカタボライト抑制が制御されることが示唆されている。CreA は、グルコース非存在下では HECT ユビキチンリガーゼ HulA とそのアダプタータンパク質 CreD によりユビキチン化され不活性型として存在するが、グルコース存在下では脱ユビキチン化酵素複合体である CreB/CreC によって CreA が脱ユビキチン化され活性化すると考えられている。そこで、麹菌においてこれらのグルコース抑制に関わる転写制御マシナリーの機能解析を行うとともに、人為的制御によるアミラーゼなどの有用分解酵素生産性向上の可能性を検討した。

麹菌において *creA* 及び *creB* 破壊株を作製したところ、*creA* 破壊株では生育の悪化が観察されたが、*creB* 破壊株では生育への影響は観察されなかった。デンプンとグルコースが共存する培地におけるハロー形成能を比較すると、野生株ではハロー形成が見られないのに対し、*creA* 及び *creB* 破壊株では明瞭なハロー形成が観察された。同じ条件下においてα-アミラーゼ及びグルコアミラーゼの発現をノーザン解析により調べると、*creA* 及び *creB* 破壊株ではグルコース存在下でもこれらの遺伝子が強く発現しており、これらの破壊株ではグルコース抑制が解除されていることが示された。液体および固体培養における酵素生産量について調べたところ、興味深いことに液体培養では野生株と破壊株では大きな差は認められなかったが、小麦フスマを用いた固体培養では *creA* と *creB* 破壊株ともに野生株よりも生産量が顕著に上昇していた。以上のことから、グルコース抑制解除によりアミラーゼ系酵素の生産性が向上することが示された。また、リボスイッチを持つ *thiA* プロモーターを利用して *creA* の条件的発現抑制株を作製し、チアミン存在下で *creA* の発現を抑制したところ、生育は野生株とほとんど変わらないものの、α-アミラーゼ遺伝子の発現は *creA* 破壊株と同じように脱抑制された。一方、CreA のユビキチン化に関わる *creD* 破壊株と *hulA* 条件的発現抑制株ではアミラーゼ遺伝子のグルコース抑制に大きな影響は見られなかった。（本研究は生研センターの支援を受けて行われた。）

carbon catabolite repression, enzyme production, *Aspergillus oryzae*

講演番号：4SY17-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:00～ B 校舎 23 会場

比較ゲノム解析を基にしたトリコデルマ・リーセイ日本型系統樹のセルラーゼ高生産化の解明と転写制御工学を用いた新たな系統樹進化

Comparative Genenomics of a Trichoderma reesei Hyper-cellulolytic Mutant Developed in Japan and Development of a Next Generation Strain Based on Transcriptional Regulation Engineering

○小笠原 渉[1]、志田 洋介[1]、森 一樹[2]、久原 哲[2]([1]長岡技科大 生物、[2]九大農)
○Wataru Ogasawara[1], Yousuke Shida[1], Kazuki Mori[2], Satoru Kuhara[2]([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]Kyushu Univ.)

非食料系バイオマスからの次世代バイオ燃料生産、化成品原料生産は世界的に脱石油化社会の本流となりつつある。そのため、欧米を中心とし精力的な研究がなされている。その中でセルロースからの糖生産は、コストなどの観点から酵素（セルラーゼ）による酵素糖化が中心となっている。糸状菌トリコデルマ・リーセイ（*Trichiderma reesei*）は、セルロース分解能力が高いことで知られる。また、液体培養で、菌体外タンパク質生産量を最大60～100（ｇタンパク質／L培養）も生産することから、この酵素糖化システムにおいて各国がトリコデルマ・リーセイの改良を進めている。特に世界２大酵素メーカー、NovozymesとGenencorは、このトリコデルマ・リーセイの改良を精力的に行っている。トリコデルマ・リーセイ研究の歴史において、日本は欧米と同じく、オイルショックの頃からの長い歴史を有し、日本独自の系統樹を保有している。この系統樹は、ひとつの野生株QM6aから、世界各国の系統樹が進化していることは、驚愕に値する。トリコデルマ・リーセイの系統樹は、近年の次世代シークエンサーによる比較ゲノム解析の最適なターゲットである。「日本が独自の系統樹を保有する」こと、「30年以上もの間、表現型をみつめた研究者の目と実験データを保有する（表現型ライブラリー）」こと、この２つが合わさることで比較ゲノム解析の大きなアドバンテージとなる。なぜならば、系統樹における比較ゲノム解析において1000以上のSNPが検出された時、「どの遺伝子をターゲットにするか？」という選択をしなければならない。表現型ライブラリーは、比較ゲノム解析において、相棒のように極めて重要な情報である。

日本型系統樹の表現型とは？我々は、まずは明確な表現型であるセルラーゼ高生産化に関与するSNPを見いだすことを第一の目的とした。その中で、セルラーゼ遺伝子発現制御機構について長年研究してきたこともあり、転写制御因子について注目をして解析を進めることにした。本シンポジウムでは、トリコデルマ・リーセイが、セルロースを認識後、どのようにしてセルラーゼを生産してくのかを日本型系統樹を用いてパズルを解くように研究の途中過程を紹介する。さらに、セルラーゼの発現量、比率をいかにしてコントロールするか、人工プロモーター作成と利用など、日本独自の転写制御工学による菌株開発について紹介する。

先人の長年の研究において得られた日本型系統樹と表現型ライブラリーを活用することで、バイオリファナリーへの安定的に安価な糖源を供給可能な次世代日本型系統樹を構築したいと考えている。

Trichoderma reesei, Cellulase, Comparative Genenomics

講演番号：4SY17-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:30～ B 校舎 23 会場

麹菌によるバイオマス分解酵素の組換生産　～固体バイオマス上で生育する麹菌の育種を目指して～

Recombinat prrotein production for cellulosic-baiomass degradation with Aspergillus oryzae

○秦 洋二(月桂冠総合研究所)
○Yoji Hata(Research Institute, Gekkeikan Co., Ltd.)

【はじめに】我々人類は様々な形で微生物を利用してきたが、カビを穀類などに生育させる「麹」（固体培養）は、その中でも最も巧妙な利用法の一つである。穀類にカビを生育させるとカビが産生する酵素により原料が分解され、食味を含めた新たな食品機能が生み出される。これは東アジア地域の独特の文化であり、これらの地域ではこの麹を用いて様々な伝統的醸造食品が生み出されている。特に我が国では、清酒、味醂などの酒類から醤油、味噌、米酢などの調味料まで、すべてこの麹の恩恵を受けている。一方近年のカビを含む糸状菌においても遺伝子解析が可能となり、さまざまな有用蛋白の遺伝子が単離され、その発現メカニズムが明らかとなっている。これらの遺伝子発現解析は実験室での液体培養での条件下に限られていたが、我々は固体培養にこの分子生物学的解析を応用することを試みた結果、固体培養特異的な遺伝子発現機構の発見やバイオマス分解への展開を見出したので紹介する。
【固体培養での遺伝子発現】固体培養の特徴は、高い酵素生産性である。培養工学の進歩とともに液体培養技術が発達する現在においても、醸造産業に重要な酵素は固体培養で生産される。これらの培養条件による生産性の違いを検討したところ、液体培養では発現せず、固体培養でのみ大量に発現する遺伝子が多数存在することを明らかにした。またこれらの遺伝子から生産される酵素は、固体状基質の分解に有利な特性を持つことも確認できた。
【固体培養とバイオマス分解】このような固体培養における酵素生産・遺伝子発現の研究は、バイオマスの有効利用の分野において最近注目されている。トウモロコシやサトウキビなどの食用作物以外のバイオマス資源からのエネルギーの生産が急務となっているが、これらのバイオマスを分解しエタノールに変換するには、水を加えて溶解する必要がある。もし固体状のバイオマスをそのまま分解できれば、反応装置の大幅なダウンサイジングと投入エネルギーの効率化が期待できる。固体培養に特異的に発現する遺伝子のプロモータ下流に麹菌の種々のセルロース分解酵素の遺伝子を連結し、固体バイオマスの分解を検討した。
【固体培養で生産される酵素の利用】固体培養で特異的に生産されるチロシナーゼ（MelB）は、麹や酒粕の品質を低下させる褐変現象に関与する酵素として単離されたが、本酵素は醸造分野以外にも利用できることが明らかとなっている。本酵素を用いて、白髪を染める染料を製造する方法を開発し、実用化することに成功した。

Aspergillus oryzae, solid-state culture, baiomass

講演番号：4SY17-6
講演日時、会場：3 月 27 日 16:00～ B 校舎 23 会場

バイオマス分解酵素遺伝子群の転写制御マシナリーの解明とその応用

Elucidation of regulatory machinery for production of biomass-degrading enzymes and its prospective application

○小林 哲夫(名大院生農)
○Tetsuo Kobayashi(Nagoya Univ.)

糸状菌由来のバイオマス分解酵素は食品や繊維の加工に、また飼料や洗剤への添加剤として関連産業で大量に使用されている。このような用途に供される酵素は低価格であることが必要であり、大量生産系が確立されないと製品とはなり得ない。このため、多重の突然変異導入や高発現プロモーターの利用により大量生産系が構築されてきた。一方、ここ十数年の間に植物性多糖分解酵素遺伝子の転写制御因子に関する知見が集積された。*Aspergillus* 属における AmyR、XlnR というそれぞれデンプン分解酵素、キシラン・セルロース分解酵素遺伝子の転写活性化因子の発見を契機として、*Trichoderma reesei*（*Hypocrea jecorina*)でも XlnR オルソログがキシラン・セルロース分解に主要な役割を持つことが示され、最近ではマンナン・セルロース分解に関わる転写活性化因子 ManR/ClrB が同定されている。ManR は *A. oryzae* で、ClrB は *A. nidulans* で同定されたが、両者はオルソログであるため ManR/ClrB と表記している。これらに加え、ManR/ClrB や XlnR の上流で機能すると考えられる ClrA/ClbR や、ManR/ClrB と協調的に働く McmA も見出され、セルロース、ヘミセルロース分解に関わる役者はほぼ出そろったと言える。この間、AmyR、XlnR については転写制御メカニズムも徐々に明らとなってきており、炭素源抑制を司る転写抑制因子 CreA の制御メカニズムも明らかになりつつある。

本講演では、以上の知見の集積が本シンポジウムのテーマである次世代酵素生産技術の開発につながるかという観点から、応用への基盤となるであろう我々の研究成果を最新のあるいは研究途上のものも含めて紹介する。アミラーゼ生産制御に関しては、AmyR の誘導物質依存的核移行とこれを制御すると思われる AmyR 複合体、核内での AmyR のリン酸化とそれに引き続く分解、推定リン酸化部位の変異の影響などについて、キシラナーゼ・セルラーゼに関しては XlnR 高発現による支配下酵素群の大量生産、XlnR の恒常的核局在と DNA 結合、誘導物質依存的な XlnR の可逆的リン酸化、XlnR とそのホモログである AraR との競合について、マンナナーゼ・セルラーゼに関しては、ManR/ClrB により制御される遺伝子、セルラーゼ遺伝子群の ManR/ClrB と McmA による協調制御、これら二種の転写因子の協調的 DNA 結合、また、*A. nidulans* 特異的ではあるが、ManR/ClrB とそのホモログである ManS によるマンナナーゼ生産制御などについて述べる予定である。また、このような基盤的情報を利用した応用展開への可能性について考察する。

biomass-degrading enzymes, gene regulation, transcription factors

講演番号：4SY18-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:33～ B 校舎 14 会場

生命の根源物質 5－アミノレブリン酸（ALA） － 幅広い応用の可能性 －
5-aminolevulinic acid (ALA) - The root of energy -

○田中 徹(SBI ファーマ株式会社)
○Tohru Tanaka(SBI Phamaceuticals Co., Ltd.)

5－アミノレブリン酸（ALA）は内在性のδ型アミノ酸でタンパク質を構成しないが、ヘムやクロロフィル VB12 など、テトラピロールの共通前駆体として重要な化合物である。テトラピロール化合物の代表格であるヘムは呼吸のクロロフィルは光合成の反応中心であり、ヘムやクロロフィルの生合成過程での律速段階が ALA 生合成であるため、ALA はエネルギーの元（The roots of energy）とも呼ばれている。有名なミラーの実験においても ALA の合成が確認されているため、生命誕生の少なくともエネルギー獲得系に関しては ALA と ALA から誘導されるテトラピロール化合物が生命誕生に深く関与したと考えている研究者も多く、その意味では「生命の根源物質」の一つであるとも言える。

今回のシンポジウムでは ALA に関する日本を代表する研究者に参集いただき、基礎から応用、医療の最先端まで ALA の応用の可能性についてご紹介いただく。岩井先生には ALA アナログを用いたヘム代謝系阻害剤に関する試みを紹介いただくが、これは、全く新規な抗生物質のターゲットであり、薬剤耐性に悩む医療現場に新しい光を示す事が期待されている。渡辺先生には農業生産だけでなく沙漠の緑化にも応用されている ALA の植物に対する効果についてご紹介いただく。竹谷先生にはがん細胞における ALA 投与時のプロトポルフィリン IX（PPIX）蓄積に関して分子レベルの研究の最先端をご紹介いただくが、大変ホットな状態にあるヘム代謝と鉄の関係にも言及いただけるものと楽しみにしている。松崎先生には、主として ALA を塗布した場合の育毛分野での ALA の応用についてご紹介いただき、木戸先生には栄養学的見地から経口投与時の ALA の効果を特に脂質代謝向上の観点からご紹介いただく。これらの効果は ALA 投与時のミトコンドリア活性向上が作用機序と推定されているが、小倉先生に電子伝達系活性の向上研究をご紹介いただく。ALA は正常細胞の好気呼吸は亢進するが、ワールブルグ効果により解糖系が亢進しているがん細胞ではヘム前駆体である PPIX を蓄積、排出する。小倉先生にはこの原理に基づくがんの簡易スクリーニング方に関してもご紹介いただく。井上先生にご紹介いただく ALA 投与時にがん細胞に蓄積する PPIX の蛍光を利用したがんの蛍光診断 PDD はその有用性の迫力に聴衆は驚くに違いない。本法は井上先生を中心に医師主導治験が進行中で医薬品として脚光を浴びる日も近い。ALA 投与時にがん細胞にのみ PPIX が蓄積すると言う性質を利用した千葉櫻先生の ALA の温熱増感効果（ALA-HTDT）は、侵襲性のきわめて低い温熱療法をがんの標準療法に引き上げるポテンシャルを有している。田中は ALA の基本的物性や活性を概説することで聴衆の先生方の理解を深めたい。本シンポジウムの聴衆から新たな ALA 応用のアイデアが生まれることを期待する。

5-aminolevulinic acid, mitochondria, photosynthesis

講演番号：4SY18-2
講演日時、会場：3 月 27 日 13:45～ B 校舎 14 会場

アミノレブリン酸を骨格構造としたポルホビリノーゲン合成酵素阻害剤

Porphobilinogen synthase inhibitor based on 5-aminolevulinic acid structure

○岩井 伯隆(東工大院生命)
○Noritaka Iwai(Tokyo Inst. Tech.)

5-アミノレブリン酸はヘムなどテトラピロール化合物の出発物質であることから、生体内の重要な役割を担う化合物であり、その有用性は健康・農業・医療など多岐の分野にわたり期待される。

では、5-アミノレブリン酸に関連する酵素にはどのような有用性があるのでろうか？例えば、疾病などの標的酵素として有用なのであろうか？その一つの答えとして、アラレマイシンという抗生物質が 2005 年に報告された。アラレマイシン（ALA-related antibiotic produced by *Streptomyces* sp.）は放線菌が生産する抗生物質で、その名の通り 5-アミノレブリン酸に類似した構造を持ち、ポルホビリノーゲン合成酵素を阻害することがその後の研究から明らかとなった。ポルホビリノーゲン合成酵素は 5-アミノレブリン酸を二分子縮合し、ピロール環を持つポルホビリノーゲンを合成する反応を触媒する。ヘムなどテトラピロール化合物を利用する生物、つまりほとんどの生物がこの酵素を保有している。しかし、ポルホビリノーゲン合成酵素には要求する補因子の違いや、マグネシウムイオンによるアロステリック効果の有無などから、幾つかのタイプに分けられることが知られている。ヒトをはじめとする動物類に対して、マラリア原虫を含む藻類や病院内の日和見感染症として問題視される緑膿菌類のポルホビリノーゲン合成酵素はそれぞれ異なるタイプに属する。

我々のグループではこの点に注目し、アラレマイシン構造を母核として病原微生物に対して特異性の高いポルホビリノーゲン合成酵素阻害剤の構築を検討した。アラレマイシン独特の構造部分にフッ素導入などを行うことにより、緑膿菌ポルホビリノーゲン合成酵素に対して高い阻害能（親和性）が期待できる化合物を設計した。化合物の合成方法には、アミノ酸派生物を出発物質とした合成方法を開発し、光学異性体を含む 14 種類のアラレマイシン類縁体を合成することに成功した。

一方、評価系として緑膿菌近縁種のポルホビリノーゲン合成酵素組換え発現系を構築し、精製タンパク質を用いた阻害剤評価系を構築した。微生物の酵素以外にヒトのポルホビリノーゲン合成酵素組換え発現系も構築することで、化合物の種特異性を評価できるようにした。

合成したアラレマイシン類縁体について、組換え酵素の評価系を用いて IC50 値を求めた結果、これらの中にはアラレマイシンに比べて 50～100 倍高い阻害能を示す化合物を見出すことができた。また、化合物の中には病原微生物の酵素とヒトの酵素に対して阻害濃度に大きな差を示す化合物も見いだせた。アミノレブリン酸を骨格構造としたポルホビリノーゲン合成酵素阻害剤の有用性と今後の課題について述べたい。

porphobilinogen synthase, Alaremycin

講演番号：4SY18-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:05～ B 校舎 14 会場

ALA の農業利用技術開発

Development of technology for agricultural utilization of aminolevulinic acid

○渡辺 圭太郎(コスモ石油株式会社)
○Keitaro Watanabe(Cosmo oil co., LTD.)

我々は、アミノレブリン酸（ALA）を植物に投与することにより、1991 年に光合成活性向上とそれに伴う農作物の収量・品質向上、1992 年に植物の外的ストレス耐性が向上することを発見した。その後、種々検討を重ね ALA の効果を安定化させた ALA 配合肥料を２００１年に開発、現在、国内およびヨーロッパを中心に実際の農業場面で使用されるに至っている。本発表では、ALA による植物生理作用およびフィールド試験結果を中心に、ALA の農業利用技術開発を紹介する。

１．ALA の生理作用

多量に投与された ALA は、クロロフィル、ヘム生合成の中間体であるプロトポルフィリン IX (PPIX) に変換され、PPIX による光増感作用により一重項酸素が発生する。このような ALA の作用から、除草剤としての利用研究が知られていた。当初、我々も ALA の除草剤研究を行ったが、その検討過程で 100ppm 以下という低濃度で ALA を投与したところ、植物の成長が促進される現象を発見した。水耕ポトスでは、0.01ppm の ALA 投与により明らかな緑色向上が確認された。また、コウシュンシバの光合成活性測定では、ALA 投与３日後に最大約４０％の光合成活性向上が確認され、活性向上は投与１４日後まで確認された。ALA はクロロフィルの前駆体であることから、急激な PPIX 蓄積を伴わない程度の ALA 投与はむしろ、クロロフィル含量を向上させ、光合成活性が向上したと考えられる。同時に、低濃度 ALA の投与は､植物が外的環境から受けるストレスに対し､耐性を高めることを明らかにした。ストレス耐性向上効果としては、耐塩性、耐冷性、耐暑性、耐陰性、耐アルカリ性の向上が確認されている。特に耐塩性向上は農業場面において世界的に重要な技術であり、これまでに生理学的検証として、ALA 投与により、①浸透圧向上により植物のナトリウム吸収を防ぐこと、②根の生理活性を維持すること、③ヘムを補酵素とする抗酸化物質活性向上により活性酸素種が低減すること、が分かっている。

２．ALA 配合肥料を用いたフィールド試験

我々は、ALA を効果発現促進剤として世界で初めての ALA 配合液体肥料を開発した。本肥料の開発にあたっては、クロロフィルの中心配位金属であるマグネシウム、ヘムの中心配位金属である鉄を最適な割合で配合することにより ALA の効果を安定化させることに苦心した。その後、本肥料を用いたフィールド試験を世界各地で実施し、収量および品質の向上に関する数多くの知見を得ている。

aminolevulinic acid, salt-stress tolerance, fertilizer

講演番号：4SY18-4
講演日時、会場：3 月 27 日 14:25～ B 校舎 14 会場

癌特異的 ALA 誘導性 Protoporphyrin の蓄積：酵素、遺伝子発現および物質輸送からの検討

Tumor-specific accumulation of protoporphyrin induced by ALA: Control by enzymes, gene expression and transporters

○竹谷 茂(京都工芸繊維大学応生)
○Shigeru Taketani(KIT, Biotec.)

5-Aminolevulinic acid (ALA)を癌患者に投与すると protoporphyrin が癌組織に特異的に蓄積するが、これを光照射して癌部位の特定や組織を破壊する光力学治療が広く用いられている (ALA-PDT)。我々は、癌細胞特異的な ALA-由来の protoporphyrin の蓄積の機構に関する研究を種々の角度から検討を加えてきた。第一にヘム合成の終末酵素の ferrochelatase の活性や量の低下と ALA の細胞への取り込みの増加が protoporphyrin の蓄積の大きな要因であることを明らかにした。さらに ferrochelatase の活性低下は一酸化窒素産生によって起こることや抗菌剤のキノロン化合物が protoporphyrin の蓄積を増加させることを見出した。一方、heme oxygenase (HO)によるヘム鉄の鉄イオンの再利用の変化が protoporphyrin の蓄積を増減させたので、癌化による鉄利用の多面的な影響が ALA 由来の protoporphyrin の蓄積をもたらすことが分かった。また、ミトコンドリアの鉄利用に関与する frataxin などの鉄輸送分子の発現量の変化に伴って、protoporphyrin の蓄積と光感受性の変化が認められた。特に、frataxin 高発現株を作製したところミトコンドリア機能の増加と protoporphyrin の低下が認められた。次に、癌化による p53 の変異と frataxin の発現レベルの減少との関係を調べたところ、p53 変異が frataxin の発現量の低下をもたらすと考えられた。そこで、マウス frataxin 遺伝子のプロモーター活性測定や CHIP assay を行って p53 応答配列を同定して p53 正常細胞での frataxin 高発現を明らかにした。また、p53 siRNA 処理した非癌細胞では p53 量の低下に伴う frataxin 発現の低下と protoporphyrin の増加が認められた。これらの結果は、p53 変異による frataxin 発現低下やミトコンドリア機能低下が癌細胞特異的な ALA-PDT を引き起こす要因であることを強く示唆した。また。ALA の取り込みと protoporphyrin 輸送に関与する分子機能について酵母ヘム要求株(Δhem1)を用いて検討したので、癌細胞での機能と合わせて考察を加える。

5-aminolevulinic acid, cancerous cells, protoporphyrin

講演番号：4SY18-5
講演日時、会場：3 月 27 日 14:45～ B 校舎 14 会場

5-アミノレブリン酸の育毛分野における可能性

Possible application of 5-aminolevulinic acid for hair growth

○松崎 貴(島根大生物資源)
○Takashi Matsuzaki(Shimane Univ.)

毛髪のトラブルには自己免疫疾患と考えられる円形脱毛症のような病理的な脱毛症と、年齢とともに発症する生理的脱毛症がある。一般に育毛剤は、男性ホルモン依存性の脱毛症(AGA)などの生理的脱毛症の改善を目的としたもので、こうした薄毛化現象は男性のみならず女性でも知られており、QOL の低下に悩んでいる方は日本だけで優に 1000 万人を超えると言われる。そこで効果的で使いやすい育毛剤が求められているが、その開発には毛周期の理解がとても大事である。

毛髪は成長期、退行期、休止期からなる周期的な再生プロセス(毛周期)にそって伸長・脱落を繰り返す。毛髪の長さは成長期の持続時間に、太さは毛乳頭の大きさと毛母細胞の数に、そして伸長速度は毛母細胞の増殖速度に依存すると考えられている。したがって、これらのプロセスで起こる様々な細胞間、あるいは細胞と細胞外環境との相互作用を改善することで、毛髪のトラブルを改善し、毛質を向上させることが可能なはずである。

しかしこれまでに知られている有力な育毛剤には、毛周期についてきちんと理解した上で戦略的に開発されたのではなく、偶然、育毛効果が発見されたものが少なくない。例えば、降圧剤のミノキシジルも前立腺肥大治療薬のフィナステリドも免疫抑制剤のシクロスポリンも、副作用として体毛の太毛化が起こったことから育毛剤への道が開けた。同様に病気がヒントになることもある。多毛症は体毛が剛毛化する病気で、家族性のものと後天的なものがある。多毛症には腫瘍などが原因で男性ホルモンが増加して女性が男性化する Hirsutism と、性にかかわらず多毛化する Hypertrichosis があり、上述の薬剤性多毛は後者に分類される。男性ホルモンが薄毛化も多毛化も引き起こすことは矛盾のようにも感じられるが、これは体の部位ごとにホルモン受容細胞の遺伝子の働き方が違うことによるものと考えられる。

また、体内にポルフィリンが過剰蓄積するため光過敏など様々な障害が引き起こされるポルフィリン症でも、Hypertrichosis が知られている。ポルフィリンの前駆体が 5-ALA であることから、我々は育毛における 5-ALA の効果に着目し、投与によって細胞の ATP 含量が増加することや、マウス頬髭の器官培養系において毛の伸長が早まることを見いだした。さらに、5-ALA を塗布することによりマウス皮膚での PTGS2、STAT3、TGFβ1、BMP2 および BMP4 遺伝子の発現量の有意な変動を認めた。

本発表では毛包再生や毛周期調節のメカニズムについて解説して、育毛のポイントを整理するとともに、5-ALA が毛包や毛周期に及ぼす効果を紹介することで、育毛剤としての可能性について考えてみたい。

hair growth, 5-aminolevulinic acid, gene expression

講演番号：4SY18-6
講演日時、会場：3 月 27 日 15:05～ B 校舎 14 会場

栄養代謝における 5-アミノレブリン酸の生理作用

Physiological action of 5-aminolevulinic acid on nutritional metabolism.

○木戸 康博[1]、島村 康弘[1]、松田 学子[2]、堀ノ内 泉[2]、土屋 京子[3]、宮成 節子[4]、小林 ゆき子[1]、桑波田 雅士[1]([1]京都府立大学、[2]BIT、[3]SBI ファーマ株式会社、[4]コスモ石油株式会社)
○Yasuhiro Kido[1], Yasuhiro Shimamura[1], Satoko Matsuda[2], Izumi Horinouchi[2], Kyouko Tsutiya[3], Setuko Miyanari[4], Yukiko Kobayashi[1], Masashi Kuwahata[1]([1]Kyoto Prefectural Univ., [2]Biomaterial in Tokyo Co., Ltd., [3]SBI Pharmaceuticals Co., Ltd., [4]COAMO OIL Co., Ltd.)

【背景】5-アミノレブリン酸(ALA)は、ヘムの前駆体として生体内に存在するアミノ酸である。ヒトにおいて、ALA は悪性腫瘍に対する治療法の一種である PDT(フォトダイナミックセラピー)に用いられてきた。しかし、動物における生理作用は十分に検討されていない。そこで、本研究では、ラットを用いて ALA の生理作用をエネルギー代謝に着目して検討した。
【方法】実験 1. 単回投与試験: 実験動物にはSD系雄性ラット(6 週齢)を用いた。ラットを 2 群に分け、活動期に絶食条件下で、対照群には蒸留水を、ALA群にはALAリン酸塩(1.5 mg/kg BW)を、経口ゾンデにより胃内に強制投与した。投与後、間接熱量計およびテレメトリー法を用いて、経時的に酸素消費量および深部体温を測定した。また、投与後ラットを経時的(60、120、240 分)に解剖し、下大静脈より採血した後、肩甲骨間の褐色脂肪組織(BAT)を摘出した。BAT中脱共役タンパク質(UCP)1 タンパク発現量は、ウェスタンブロット法により測定した。実験 2. 持続投与試験: 実験動物にはSD系雄性ラット(6 週齢)を用いた。ラットを 3 群に分け、対照群(C群)には 20%カゼイン食を、低用量群(2A群)、高用量群(20A群)には、ALAをそれぞれ 2mg%、20mg%添加した 20%カゼイン食を自由摂食させ、14 日間飼育した。24 時間の酸素消費量を測定した後解剖し、下大静脈より採血した後、BATおよび内臓周囲の白色脂肪組織(WAT) を摘出した。摘出したBATおよびWAT中のUCP1 タンパク発現量は、実験 1 と同様に測定した。
【結果】実験 1：ALA群において、投与後 90 分まで酸素消費量には変化が認められなかったが、深部体温は低下する傾向を示した。しかし、投与後 90 分以降、深部体温が上昇し始め、それに伴い酸素消費量も増加する傾向を示した。ALA群においてBAT中UCP1 タンパク発現量は投与後いずれの時間においても、増加した。実験 2 ： 解剖時体重および摂食量には、3 群間で差が認められなかった。BAT重量に有意な差は認められなかったものの、総内臓脂肪重量はALA投与量依存的に有意に減少した。解剖前日の 24 時間の酸素消費量は、ALA投与量依存的に高値となる傾向を示し、呼吸商はALA投与量依存的に低値となる傾向を示した。BATおよびWAT中のUCP1 タンパク発現量は、いずれもALA投与量依存的に有意に高値を示した。
【結論】栄養代謝における ALA の生理作用として、エネルギー代謝を亢進し、脂質代謝が促進される可能性が示唆された。また、この作用を持続させることにより、内臓脂肪型肥満の予防に有用であることが示唆された。

5-aminolevulinic acid, visceral fat accumulation, rats

講演番号：4SY18-7
講演日時、会場：3 月 27 日 15:25～ B 校舎 14 会場

5-アミノレブリン酸を用いたがんのスクリーニングと好気代謝の亢進

Tumor screening and the effect of aerobic metabolism using 5-aminolevulinic acid (ALA)

○小倉 俊一郎[1]、萩谷 祐一郎[1]、杉山 雄太[1]、井上 啓史[2]、中島 元夫[3]、田中 徹[3]([1]東工大院生命、[2]高知大医泌尿器、[3]SBI ファーマ)
○Shun-ichiro Ogura[1], Yuichiro Hagiya[1], Yuta Sugiyama[1], Keiji Inoue[2], Motowo Nakajima[3], Tohru Tanaka[3]([1]Tokyo Inst. Tech., [2]Kochi Med. Sch., [3]SBI Pharmaceuticals)

アミノレブリン酸を用いたがんのスクリーニング

がん患者にアミノレブリン酸（ALA）を投与することによって腫瘍特異的にポルフィリンが蓄積することが知られている。さらに腫瘍に蓄積したポルフィリンの一部は細胞外に排出されることが細胞レベルの実験から明らかとなっている。この排出されたポルフィリンは体液（血液・尿など）に混入すると考えられ、腫瘍マーカーとしての応用が期待できる。すなわち ALA 投与後のポルフィリン値はがん患者では高値であると考えられる。これはがんのスクリーニングに適していると言える。そこで担がんマウスに ALA を投与した後の血液・尿中のポルフィリン値を正常マウスのものと比較した。その結果、ALA 投与後の担がんマウス血液・尿中のポルフィリン値は数十倍高いことが分かり腫瘍マーカーとしての応用できる可能性が示唆された。現在、倫理審査委員会承認の基で臨床研究を進めている。

アミノレブリン酸を用いた好気代謝の亢進

シトクロム *c* オキシダーゼ（COX, 複合体 IV）はミトコンドリア電子伝達系の最終酵素であり、好気代謝において中心的な役割を担っている。さらに、がんや生活習慣病などでは COX 活性が低下することが知られており、その活性を向上させることは重要な意味を持つ。COX は活性中心としてヘムを持つヘムタンパク質である。そこで、本研究では ALA を用いて、COX に及ぼす影響を調べた。C57BL/6J マウスに ALA を 10 日間腹腔内連続投与（100 mg / kg / day）した後、肝臓・脳など各臓器を摘出した。さらに各臓器ホモジェネートから遠心分離によってミトコンドリア画分を抽出した。このミトコンドリア画分を用いて COX 活性を測定した。マウス肝臓組織において、ALA 投与群では COX タンパク質発現レベルの増加が認められ、COX 活性が著しく向上していることがわかった。このことから、ALA 投与により COX タンパク質量が増加し､その結果 COX 活性が向上すると考えられる｡以上のことより、ALA 投与によって肝臓におけるヘム合成が促進され、COX をはじめとするヘムタンパク質の発現を誘導し、好気代謝を亢進する可能性が示唆された。

5-Aminolevulinic acid, Tumor marker, Aerobic Metabolism

講演番号：4SY18-8
講演日時、会場：3 月 27 日 15:45～ B 校舎 14 会場

5-アミノレブリン酸（ALA）による光力学技術を用いた対癌新戦略

Novel strategy for cancer contral by using photodynamic technology mediated 5-aminolevulinic acid

○井上 啓史[1]、福原 秀雄[1]、執印 太郎[1]、倉林 睦[2]、降幡 睦夫[2]、渡邊 裕修[3]、谷村 正信[4]、小倉 俊一郎[5]、石塚 昌宏[6]、田中 徹[6]([1]高知大学医学部泌尿器科学、[2]高知大学医学部病理学、[3]独立行政法人国立病院機構 高知病院泌尿器科、[4] 医療法人近森会 近森病院 泌尿器科、[5] 東京工業大学 フロンティア研究機構生体代謝工学、[6]SBI ファーマ株式会社)

○ Keiji Inoue[1], Hideo Fukuhara[1], Taro Shuin[1], Atsushi kurabayashi[2], Mutsuo Furihata[2], Hisanobu Watanabe[3], Masanobu Tanimura[4], Shun-ichiro Ogura[5], Masahiro Ishizuka[6], Tohru Tanaka[6]([1]Department of Urology, Kochi Medical School, [2]Department of Pathology, Kochi Medical School, [3]Department of Urology, Kochi National Hospital, [4]Department of Urology, Chikamori Hospital, [5]Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, [6]SBI pharmaceuticals Co, Ltd.)

5-アミノレブリン酸(ALA)は、動植物に内在する天然アミノ酸で、血液中の血色素(ヘモグロビン)や光合成に関与する葉緑素(クロロフィル)の共通前駆物質である。この ALA は、体内投与後、ミトコンドリア内で光活性物質であるプロトポルフィリンⅨ(PpⅨ)に生合成され、その後ヘムやビリルビンに代謝される。癌細胞、特に尿路上皮癌では、この PpⅨが正常上皮と比較して過剰に集積する。この癌細胞に過剰集積する PpⅨは光活性を有するため、青色可視光(375-445nm)で励起すると、赤色蛍光(600-740nm)を発光する。このように ALA を光感受性物質として用いて癌細胞を赤色に蛍光発光させる蛍光ナビゲーションによる癌診断法が ALA による光力学診断(PDD)(ALA-PDD)である。ALA-PDD は高精度の癌診断法というだけでなく、外科的切除における補助診断として腫瘍範囲を的確に同定し、腫瘍残存率さらには腫瘍再発率を減少させることができる。2004 年高知大学で本邦初の臨床試験として導入され、現在は、第 3 項先進医療(高度医療)、さらに医師主導治験を実施中である。

また同様に、癌細胞に特異的に過剰集積した PpⅨに、特定波長の光、主に赤色の光(600-740nm)で低出力に励起し、癌細胞内で活性酸素を発生させ、傷害を与える治療法を光力学治療(PDT)(ALA-PDT)という。この ALA-PDT は、いまだ実験的試行の域を越えないが、低侵襲治療として今後の臨床導入が大いに期待されている。

さらに、癌組織で PpⅨが過剰集積した場合、飽和状態となった PpⅨ前駆体であるウロポルフィリンやコプロポルフィリンなどポルフィリン物質が尿中に過剰排泄されることが予想され、実際に担癌動物モデルの血液や尿で検証されている。ALA 投与後、尿中ポルフィリン物質の質量測定による癌診断法が ALA を用いた光力学スクリーニング(PDS)(ALA-PDS)である。この ALA-PDS は、放射性同位体を標識したブドウ糖誘導体の取り込みにより癌を同定する陽電子放射断層撮影(PET)の原理と同様に、癌共通のエネルギー産生における生物学的特性を根幹とするため、一個体における全ての癌腫の存在を検出しうる“総合的な癌スクリーニングシステム”として実用化が大いに期待できる。

本シンポジウムでは、ALAを用いた光力学技術であるALA-PDD、ALA-PDT、ALA-PDSを紹介し、医療導入の現状・展望について概説する。

5-aminolevulinic acid, photodynamic technology, cancer

講演番号：4SY18-9
講演日時、会場：3 月 27 日 16:05～ B 校舎 14 会場

5-アミノレブリン酸による温熱条件下でのがん細胞死増強作用

Enhancement of cancer cell death under the thermal stress by 5-aminolevulinic acid.

○千葉櫻 拓[1]、鳥谷部 唯[1]、高橋 究[2]、川上 茉利子[1]、芳賀 葉月[1]、小倉 俊一郎[3]、安部 史紀[2]、中島 元夫[2]、吉川 博文[1]、田中 徹[2]([1]東京農大・応生科・バイオ、[2](株)SBI ファーマ、[3]東工大・フロンティア研機)

○Taku Chibazakura[1], Yui Toriyabe[1], Kiwamu Takahashi[2], Mariko Kawakami[1], Hazuki Haga[1], Shun-ichiro Ogura[3], Fuminori Abe[2], Motowo Nakajima[2], Hirofumi Yoshikawa[1], Tohru Tanaka[2]([1]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [2]SBI Pharmaceuticals Co., Ltd., [3]Frontier Res. Center, Tokyo Inst. Tech.)

がんの温熱療法は、がん細胞が正常細胞に比べ温熱に感受性を示すことを利用した、副作用のほとんどない優れた治療法であり、放射線療法や化学療法と併用することによって、それらの治療効果を増強することから、併用増感療法として国内外で広く適用されている。しかしながら、温熱療法単独では比較的効果が弱いため、低侵襲性で副作用がなく患者に負担がかからないという温熱療法のメリットは十分活かされていないのが現状である。すなわち、温熱療法の可能性を広げるためには、その効率を増強し、かつ副作用の少ない増感処理あるいは増感剤の開発が必要である。一方、ポルフィリン代謝経路の共通前駆体である5-アミノレブリン酸（5-ALA）を投与すると、正常細胞ではヘムまで代謝されるのに対し、がん細胞ではヘムの前駆体であるプロトポルフィリンIX（PpIX）が細胞内に蓄積する。PpIXは光照射により活性酸素種（ROS）を生じ、細胞毒性を発揮することから、5-ALAは光線力学療法においてがん特異的細胞死を誘導する薬剤として期待されている。しかし光照射に依存しない5-ALAのがん治療への応用については未知であった。本研究では5―ALAの新規な臨床応用の検証とがん温熱療法の効率化を目的とし、光照射に依存しない5-ALAの温熱増感剤としての可能性を検証した。

種々のヒトがん細胞株および正常細胞株の培養系に5-ALAの添加と42℃、24時間の温熱処理を併用し、細胞死を検証した結果、肝臓がん由来HepG2、大腸がん由来Caco-2、胃がん由来Kato III等のがん細胞株においては、温熱条件下において5-ALA濃度依存的に細胞死が増加することが示された。一方、線維肉腫由来HT1080、骨肉腫由来U2-OS、乳がん由来MCF7等のがん細胞株、および正常細胞株では、温熱条件下での5-ALA依存的な細胞死の増強は見られなかった。また、5―ALAによる温熱細胞死増強効果の見られたがん細胞株と効果の見られなかったがん細胞株および正常細胞株を用いて、5-ALA添加による細胞内PpIXの蓄積量をHPLCにより測定した。その結果、5―ALAの温熱増感効果が見られるがん細胞株では5-ALA濃度依存的にPpIXの蓄積が見られたが、その他の細胞株では蓄積しなかった。さらに、5-ALA添加と温熱条件下でのROS生成量について、ROS検出蛍光試薬（APF）を用いて検証した結果、5―ALAの温熱増感効果が見られるがん細胞株では5-ALA添加と温熱処理の併用によりROS生成量が増加したが、その他の細胞株ではいずれの条件でも変化しなかった。

これらの結果から、5-ALAと温熱処理の併用により、ある種のがん細胞では特異的に細胞死を増強できることが示された。また、この増強効果には、細胞内PpIXの蓄積と活性酸素種生成量の増加が関与していることが示唆された。がん細胞間での5―ALAによる温熱増感効果の違いについて議論したい。

5-aminolevulinic acid, cancer, hyperthermia

講演番号：4SY19-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:35～ B 校舎 24 会場

バイオエタノール生産に向けたオミクス解析の研究動向とストレス耐性酵母の育種

Current status of omics analysis and breeding of stress-tolerant yeast for bioethanol production

○高木 博史(奈良先端大バイオ)
○Hiroshi Takagi(Nara Inst. Sci. Tech.)

現在、バイオエタノール生産に使用される酵母 *Saccharomyces cerevisiae* には、１）セルロース分解能の向上、２）キシロース資化能の付与、３）エタノール生産能の向上などの課題があり、１）２）の解決策として、強力なセルラーゼやキシロース資化に関わる酵素の機能改変、および酵母での発現に関する研究が盛んに行われている。３）については、高濃度のエタノール生産がコスト低減には有利であるが、濃厚な原料の仕込みは酵母にとって高浸透圧環境であり、原料の前処理で生成する化合物（フルフラール、バニリン、酢酸など）やエタノールが酵母の生育や発酵を阻害する。また、エネルギー節約の点では、高温でのエタノール発酵が望ましいが、高温も酵母の生育や発酵を阻害するため、エタノール生産性に限界がある。したがって、これらのストレス（高浸透圧、高濃度エタノール、高温、アルデヒド類・酸など）に強い耐性を有する酵母の育種が重要な課題である。近年、ゲノム情報を活用して産業酵母の有用機能（エタノール生産性、発酵能、耐久性、味・風味など）を向上させる研究が展開されている。特に、次世代型シーケンサーによって、様々なオミクス解析で迅速かつ膨大なデータを得ることが可能になり、育種への応用が期待されている。今回、バイオエタノールを含む産業酵母の育種について現状を整理した上で、マルチオミクスをどのように活用すべきか概説する。また、我々が行っている産業酵母の育種を目指した酵母のストレス耐性に関する研究例を紹介する。

最近、実験室酵母において、プロリンオキシダーゼ Put1 と *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 の遺伝子が高温処理などの酸化ストレスで誘導され、プロリンから *N*-アセチルグルタミン酸-γ-セミアルデヒドを介してアルギニン合成を亢進すること、およびアルギニンから Tah18 タンパク質依存的に一酸化窒素（NO）が生成し、細胞にストレス耐性を付与することを見出した。NO 合成系を強化したパン酵母では、親株に比べて高温乾燥後、冷凍後の生地発酵力が有意に向上し、産業酵母における NO の有用性を実証することができた。NO が関与するストレス耐性機構はバイオエタノール酵母の育種にも応用できる可能性がある。

転写因子 Msn2 は様々なストレスに応答し、抗酸化酵素、トレハロース合成系、熱ショックタンパク質など広範なストレス応答遺伝子の転写を活性化する。Msn2 を過剰発現させたバイオエタノール酵母は、親株に比べて酸化ストレスに耐性を示すとともに、フルフラール存在下で生育速度が向上しており、エタノール生産を開始するまでの時間を短縮できた。Msn2 の過剰発現はパン酵母においても、冷凍後の生地発酵力を著しく向上させることから、Msn2 の機能改変は有効な育種手法だと考えられる。

stress tolerance, bioethanol yeast, omics analysis

講演番号：4SY19-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ B 校舎 24 会場

木質バイオマスの高生産に向けた早生樹木のゲノム育種

Molecular breeding of fast-growing trees toward higher woody biomass production

○出村 拓[1,2]([1]奈良先端大バイオ、[2]理研 BMEP)
○Taku Demura[1,2]([1]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, [2]RIKEN BMEP)

第二世代のバイオ燃料の候補としてリグノセルロース由来のバイオエタノールなどが挙げられる。そして、バイオ燃料用のリグノセルロースの供給源としては、地上の植物バイオマスの中で最も賦存量が多い樹木由来の木質バイオマスが有力な候補となっている。樹木由来の木質バイオマスは、間伐材や建築用木材の端材などを木質チップに加工してストーブ用の燃料として利用するなど、すでに小規模では実用化されているが、今後の大規模な利用を考えた場合、これまでの樹木よりも「高生産」な樹種の選抜や新品種の育種が求められる。ここでは「高生産」の意味として、木質バイオマスの性質の改変によってリグノセルロース利用がより容易となったものも含むものとする。樹木研究の対象となるのは、成長が早いポプラである。ポプラは全ゲノムが解読されており、遺伝子組換えが可能で、中国や欧米では野性にあるいは植林によって広く生育している。これまでの研究から、モデル植物であるシロイヌナズナで明らかになった木質バイオマス（植物細胞壁）に生産に関する知見を、ほとんどそのままでポプラでの応用研究に適用できることが分かってきた。そこで、演者の研究室では、モデル植物シロイヌナズナでの基礎的な研究を進めると同時に、ポプラでの応用研究を行っている。シロイヌナズナにおいて、リグノセルロースを生産する木質細胞の分化制御機構を解析し、木質細胞分化のマスター制御因子群を発見した。そしてこれまでに、これらマスター制御因子を用いて、リグノセルロースの性質を改変することが可能となってきた。最近では、中国の南京林業大学の研究者と、遺伝子組換えポプラの中国での野外試験やゲノム育種（ゲノム情報を利用した育種）に向けた共同研究も始めている。ポプラでの研究に加えて、産業的にはユーカリが対象となる。ユーカリは世界各国の製紙企業が主要なパルプ材として利用しており、植林も盛んにおこなわれている。ユーカリについてはすでに、各植林地に適したユーカリ種の選抜・育種が進み、従来の選抜・育種ではこれ以上の高生産性を達成するのは難しい状況と言える。そこで期待されているのがゲノム育種である。残念ながら今のところ、ユーカリに関しては遺伝子組換え技術の利用が社会的に難しい状況であるが、将来に向けた取り組みとして、遺伝子組換えも念頭に置いた研究も進めている。本演題ではこれらの研究取り組みについてお話しするとともに、今後の展望について議論したい。

wood formation, master regulator, poplar

講演番号：4SY19-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:25～ B 校舎 24 会場

糸状菌のバイオマス変換用セルラーゼ開発におけるオミクスの利用

Application of Omics to the development of fungal cellulase for biomass conversion

○高木 忍(ノボザイムズジャパン研究開発部門)
○Shinobu Takagi(Novozymes Japan Ltd.)

世界の燃料用バイオエタノール生産量は２０１０年で前年比１７%増の８６００万KL と推定されているが、その原料の大部分はサトウキビあるいはトウモロコシ澱粉であり食糧との競合が問題視されている。そこで、非食糧原料であるリグノセルロース系バイオマスからのエタノール生産技術の開発が各国で進んできたが、近年ようやく工業化のめどが付き始めたところである。リグノセルロース系バイオマスのエタノール変換には、バイオマス糖化のための酵素が用いられる。ノボザイムズ社は糸状菌 *Trichoderma reesei* 由来のセルラーゼ製剤を基盤として、バイオマス糖化用酵素の開発を進めており、２０１２年２月には最新型のセルラーゼ製剤 Cellic CTec3 の発売を開始した。今回は本セルラーゼ製剤の開発に関連して、産業界で利用されているオミクスの例をいくつか紹介したい。

１）プロテオミクスによるバイオマス糖化促進因子の発見[1)]

Trichoderma reesei 由来のセルラーゼ製剤は複数のセルラーゼならびに関連酵素（エンドクルカナーゼ, CBH, β-グルコシダーゼ、各種ヘミセルラーゼ）を含む複合酵素製剤だが、バイオマス糖化活性の向上を図る目的で、他起源のセルラーゼ類をこれに組み合わせる実験を行った。その結果、いくつかの糸状菌が *T. reesei* 由来セルラーゼ製剤の糖化活性を著しく向上するタンパク質因子を持つことを発見した。これらの糸状菌のプロテオーム解析により、*T. reesei* 由来セルラーゼ製剤にないタンパク質因子の同定を行い、さらにこれらを精製抽出することにより糖化活性促進因子を同定することに成功した。

２）ゲノミクスによるセルラーゼ高生産菌の解析[2)]

Trichoderma reesei QM6a 株は、1944 年に米陸軍によって分離されたセルラーゼ生産菌であるが、その後、突然変異処理による育種により生産性が飛躍的に向上し、派生株は 30g/L 以上のタンパク質生産性をもつといわれている。これらセルラーゼ高生産株のゲノムの比較解析により、タンパク質の高生産性につながる菌の性質を探る試みが行われているので、簡単に紹介したい。

1) Cherry, J.R. et al. (2005) バイオサイエンスとインダストリー, Vol.63, 451-456
2) Le Corme, S. et al.(2009) PNAS, Vol.106, 16151-16156

omics, cellulase

講演番号：4SY19-4
講演日時、会場：3 月 27 日 14:50～ B 校舎 24 会場

代謝工学を駆使したコリネ型細菌によるバイオ燃料生産

Highly efficient production of biofuels by metabolically engineered corynebacteria.

○乾 将行(RITE バイオ)
○Masayuki Inui(RITE)

近年のバイオ燃料の生産急増は、食料・飼料作物の価格高騰を永続させる要因との指摘や栽培地拡大による環境破壊等、現状バイオ燃料の負の側面として強く認識されている。このような状況に対し、非可食資源である農産廃棄物やエネルギー作物（スイッチグラス等）由来のセルロース類を原料とするバイオ燃料製造は、食料との競合を回避・軽減し、さらに、LCA（Life Cycle Assessment）評価からも二酸化炭素（CO_2）排出削減に高い効果が示される等、クリーンな燃料として期待されている。

このような背景の下、RITE ではリグノセルロース系バイオマスを原料として、コリネ型細菌を用いたバイオ燃料製造技術開発を行ってきた。

コリネ型細菌は、1950 年代にグルタミン酸生産菌として日本で単離され、各国で各種アミノ酸、核酸等の工業生産に多用されてきた有用細菌である。我々は、このコリネ型細菌が還元条件下では、増殖は抑制されるものの代謝機能は維持され、糖類を代謝し有機酸を効率よく生成する現象を見出した。これを基に、高効率バイオプロセス“増殖非依存型バイオプロセス”の開発を進めている。これまでに非可食バイオマスを原料とするバイオリファイナリー工業化に必須の要素技術である「混合糖の完全同時利用」、「醗酵阻害物質への高度耐性」等は確立済みである。エタノール、ブタノール等のバイオ燃料の高効率生産法に加えて、乳酸、コハク酸、アミノ酸等の化学品生産への応用も報告し、さらに幅広い製品への展開を図っている。

現在、米国エネルギー省研究所 NREL とバイオ燃料製造に関する共同研究を行っており、NREL が有する非可食資源の糖化技術と RITE の増殖非依存型バイオプロセスを用いた有用物質生産技術の融合によるバイオ燃料製造の早期実用化を目指している。

本講演では、“増殖非依存型バイオプロセス”のバイオリファイナリーにおける優位性であるバイオマス由来混合糖の完全同時利用、醗酵阻害物質に対する耐性、及び Multi-omics 解析と代謝工学的改変によるバイオ燃料生産コリネ型細菌の育種現状について紹介する。

Corynebacterium glutamicum, biorefinery, biofuel

講演番号：4SY19-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:15～ B 校舎 24 会場

シアノファクトリ ™~海洋シアノバクテリアを用いるバイオ燃料関連化合物生産システムの提案～

The Cyanofactory™~ ~the innovative marine cyanobacterial bioprocess for biofuel relating compounds production~

○早出 広司(東京農工大院工)
○Koji Sode(Tokyo Univ. of Agric. & Technol.)

光合成により独立栄養細胞としてバイオ燃料関連化合物の生産が行えるシアノバクテリア（藍藻）は次世代のバイオ燃料生産の要として期待されてきた。特に海洋シアノバクテリアは、海洋水を培養に用いることができるという経済的な利点からも実用的見地が高く、その応用が期待されてきた。しかし、その一方で、シアノバクテリアを含めた藻類を用いるバイオ燃料の生産においては、バイオエネルギー化合物を効率的に生産する株の育種や検索とともに、ダウンストリームを含めたバイオプロセスの効率化を実現する革新的技術開発が今後の実用化の鍵を握っている。すなわち、藻体の培養における藻体密度、藻体を回収する方法とそのためのエネルギー、大量に利用する水の再利用、藻体からバイオ燃料関連化合物を回収するプロセス、さらにシアノバクテリアの増殖・生産のフェーズの制御や機能制御などを考慮したバイオプロセスを開発することが求められている。

我々の研究チームは、海洋シアノバクテリアの有する優れたバイオ燃料関連化合物生産能力に注目し、バイオ燃料関連化合物の生合成ならびにバイオプロセスを人工的に高度に制御し、かつ藻体からの当該化合物の回収プロセスまで一貫してデザインした「シアノファクトリ ™」を開発することを目的として研究を行っている。シアノファクトリは１）合成生物学のコンセプトに基づき、増殖・生産・凝集・溶解が外部刺激（光・浸透圧）によって制御できる合成情報伝達系が組み込まれた海洋合成シアノバクテリアホスト、２）バイオ燃料関連化合物を海洋シアノバクテリアホスト内にて生産するためのバイオ燃料生産合成オペロン、３）バイオ燃料関連化合物生産用の合成オペロンが導入された海洋合成シアノバクテリアホスト藻体から目的バイオ燃料関連化合物を効率的に抽出ためにデザインされたイオン液体、およびイオン液体を用いる抽出プロセス、から構成されるバイオ燃料関連化合物生産のためのバイオシステムである。「シアノファクトリ ™」を開発することにより、バイオ燃料の効率的な生産が可能になり、将来的には、化石燃料の使用が削減されることが期待される。また、化成品等の新規製造技術等へ繋がり、化学産業の石油依存度を大きく変える可能性がある。

cyanobacteria, synthetic biology, ionic liquid

講演番号：4SY19-6
講演日時、会場：3 月 27 日 15:40～ B 校舎 24 会場

微細藻バイオリファイナリーに資する動的代謝プロファイリング解析

Dynamic metabolic profiling conducive to microalgal biorefinery

○蓮沼 誠久[1,2]([1]神戸大自、[2]JST さきがけ)
○Tomohisa Hasunuma[1,2]([1]Kobe Univ., [2]PRESTO)

シアノバクテリアや微細藻類は光合成能力が高く，個体倍化速度が速いため第三世代バイオ燃料のフィードストックとして期待が高まっている。近年，CO_2 排出削減，環境への負荷低減の観点から，微生物を用いたバイオプロセスで液体燃料や汎用化学品を生産するバイオリファイナリーの構築が進められているが，微生物発酵への糖質の供給はバイオプロセス開発のボトルネックの一つになっており，その点，光エネルギーを利用して CO_2 を直接油脂や炭水化物，有用物質に変換できる微細藻類は増殖に必要な糖質の供給が不要であるだけでなく，光合成による CO_2 削減効果があるため，バイオ由来の化学製品を供給するための究極のバイオマス資源となる可能性を秘めている。

一方で，微細藻類を利用して効率的な物質生産を行うためには課題も多い。例えば化学工学的観点からは，微細藻の大規模培養技術，高密度大量培養方法や効率的な分離・回収方法の確立が必要であり，目的プロダクトの抽出方法の最適化も求められる。また，生物工学的観点からは，細胞の光利用効率の向上や物質代謝フローの最適化による目的プロダクトの生産能力の向上が求められる。微細藻類を次世代のフィードストックとして利用するためには，炭水化物（グリコーゲンやデンプン）や脂質等のエネルギー物質の生産能の増強と同時に高い細胞増殖能力が求められるが，これらを両立するためには微細藻の代謝制御メカニズムを把握し的確に制御することが必要になる。

我々はこの課題を解決するために，マルチオミクス技術を利用したシステムバイオロジー解析が強力なツールに成り得ると考え，遺伝子操作が容易でゲノム情報の取得が最も進んでいるシアノバクテリアに着目し，代謝プロファイリング技術を開発してきた。これまでに，質量分析計を用いてカルビン回路，解糖系，TCA 回路，アミノ酸生合成経路に関与する 150 種以上の代謝物の半定量システムを確立し，培養環境の変化に伴う中間代謝物蓄積量の変動を観測することに成功してきた。一方，目的物質を高生産するためには，代謝物の蓄積量だけではなく，反応速度論的な情報も重要となる。例えば，中間代謝物質の場合，蓄積量の増減だけではその代謝物が関わる経路が活性化したかどうかを判断することは難しい。つまり，代謝経路の活性化度を直接的に知るためには動的な代謝の流れ，すなわち代謝ターンオーバーを直接観測する必要がある。本講演では，主に，シアノバクテリアの主要貯蔵物質であるグリコーゲン生合成に焦点をあて，代謝プロファイリングと代謝ターンオーバー観測による生合成メカニズムの解析結果と微細藻バイオリファイナリーの構築に向けた今後の展望について発表したい。

Metabolic profiling, Cyanobacteria, Biorefinery

講演番号：4SY19-7
講演日時、会場：3 月 27 日 16:05～ B 校舎 24 会場

コンピュータ　ソリューション Genedata Selector™: バイオ燃料研究開発における生産菌と生産プロセス最適化に向けた統合オミクス解析と可視化

Computational solution Genedata Selector™: Integrated omics analyses and visualization for strain and process optimization towards biofuel R&D

○新城 雅子[1]、Hans-Peter Fischer[2]、Thomas Hartsch[2]、Ludwig Macko[2]、Sebastien Ribrioux[2]、Julia Retey[2]、Niko Bausch[2]、下広 英樹[1]、森脇 香織[1]([1]ジーンデータ株式会社、[2]Genedata AG)
○Masako Shinjoh[1], Hans-Peter Fischer[2], Thomas Hartsch[2], Ludwig Macko[2], Sebastien Ribrioux[2], Julia Retey[2], Niko Bausch[2], Hideki Shimohiro[1], Kaori Moriwaki[1]([1]Genedata KK, [2]Genedata AG)

持続可能なエネルギー資源の需要が、エタノールをはじめとする新規バイオ燃料発酵生産プロセス開発を加速している。バイオ燃料生産では、植物、藻類、カビ、酵母や細菌などの種々の生物が使用されている。　我々は、最適なバイオ燃料生産株を構築するための次世代シーケンシング（NGS）に基づく研究開発プロセスを支援する目的で、コンピューター ソリューションである Genedata Selector™　を開発してきた[1]。この革新的システムにより、数百のゲノムを同時に加工、解析し、対象生物の代謝や生産関連能力を検証することが可能となった。本 Selector™ は、パブリックおよび自社所有権のあるゲノムを取り込み、機能アノテーションを改良し、NGS 技術に基づく　ゲノムの *de novo* シーケンシングや、複雑な系統を持つ菌株群のリシーケンシング、トランスクリプトミクス、メタボロミクス、プロテオミクスを含むオミクス解析のデータ群の網羅的解析を支援してきている。

今回は、バイオ燃料発酵生産プロセス開発における Selector™の適用３例を紹介する：
【その１】「植物ゲノムなどのバイオ燃料生産原材料の機能的ゲノムアノテーションの改善と比較ゲノム」;【その２】「セルロース分解性カビ　*Trichoderma reesei* のラショナルデザインとメタボリックエンジニアリング」では、鍵酵素セロビオヒドロラーゼ(CBHI) 発現の改善とその酵素能力の検証；【その３】「バイオ燃料の原材料として C5C6 糖両方をエタノールに変換するフレキシブルな酵母構築のための代謝工学」においては、細菌やカビの Xyla（キシロース　イソメラーゼ)遺伝子クローン化によるエタノール生産

更に、Selector™は、メタゲノミクス　プロジェクト分野における新規菌株や酵素のスクリーニング研究および乾燥などの環境ストレスに強い改良型または新規バイオマス原料作物産生のための植物研究を支援している。

このように本 Selector™は、広い生物種に対し、マルチオミクスデータ解析を含む核酸配列、タンパク質機能、代謝パスウェイ、制御ネットワーク解析から特許までの完全な可視化と相互解析を可能にし、異なる研究グループ横断的にシステムバイオテクノロジーを用いる菌株および生産プロセス開発を支援するよう開発された。

1. Pacific Rim Summit on Industrial Biotechnology & Bioenergy 2012: Poster session: Biomass Production and Utilization, Thomas Hartsch *et al.*

biofuels, next generation sequencing, omics

講演番号：4SY20-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:30～ A 校舎 37 会場

シガテラをとおして見る渦鞭毛藻の世界

The world of dinoflagellates viewed through ciguatera

○安元 健(日本食品分析センター)
○Takeshi Yasumoto(Japan Food Research Laboratories)

「背景」　シガテラとは熱帯・亜熱帯域の魚類を原因とする食中毒の名称である。年間 3~6 万人の患者発生が推定され、自然毒による急性食中毒としては最大規模とされる。国内では琉球諸島で散発的しかし恒常的に発生し、九州以北でもまれに発生する。筆者は多くの共同研究者の協力を得て、原因毒の起源を海藻付着性の渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* と特定し、原因毒シガトキシン類（ciguatoxis　CTXs）の化学構も決定した。これを契機として、海洋生物毒の多くが渦鞭毛藻を起源とすることを明らかにしてきた。今回は、渦鞭毛藻毒一般について簡単に紹介し、シガテラ及び最近、脚光を浴びている Ostreocin (OST)、Ovatoxin（OST）類のパリトキシン同族体についての話題を提供する。

「毒の起源は海底の赤潮」　CTX s の起源である *G.toxicus* は海藻に付着生育し、増殖時には海底の赤潮と呼ぶにふさわしい密度に達する。渦鞭毛藻とは浮遊性で赤潮を形成するという従来の常識を覆した。また、OST や OVT などのパリトキシン同族体を生産する *Ostreopsis* 属やオカダ酸類を生産する *Prorocentrum　lima* も同様な生態を示し、底性種を対象とする化学、生態、分類の研究が重要な領域として開拓された。一方、プランクトンについても出現密度が低い下痢性貝毒原因種の発見などを行い、従来の概念を覆した。

「渦鞭毛藻の毒の多様性」　梯子状ポリエーテル化合物、マクロリド、鎖状ポリオール、環状イミンがあり、共通して多酸素化合物である。ペプチドは少ない。形態学的には同一とされる種でも生産する成分の構造は多様である。*Gambierdiscus* 属からは 13 個の環が連結する CTX に加えてさらに巨大な maitotoxin、gambieric acid, gambierol、gambiersulfate が決定された。これらの成分は、魚介類によってさらに、酸化、エステル化、開環などの反応で改変されるために成分は複雑化する。

「CTXs 組成の魚種特異性」　琉球列島の代表的シガテラ魚８種について LC-MS/MS 分析を行った。ハタとフエダイ類では、CTX1B-型の３成分を主体とし、各成分の比率は魚種特異的であり、過去 20 年間の変動はなかったと推定された。各魚種に特有の代謝酵素系が特有の毒組成を作りだすと推定された。一方、イシガキダイは他種と異なり、CTX4B/4A のように体内酸化を受けていない成分が主体であった。この種はウニやサザエを餌とするといわれる。過去に南鳥島でチョウセンサザエを原因とするシガテラが発生し、原因毒のクロマト挙動は CTX に類似した。当時の推定に合致する。また、ガンビエル諸島ではウニもシガテラの原因となると言われていた。

「地域特異性」　沖縄産イシガキダイが CTX4A/４B を主成分とするのに対して、宮崎産では骨格の異なる CTX3C とその酸化型の成分が主体であり、明らかな地域差があった。すなわち、奄美以南に分布する *G. toxicus* は CTX４A・４B を生産するが CTX３C は生産せず、宮崎沿岸ではその逆であると考えられる。近年の遺伝子解析研究は、日本沿岸の *G. toxicus* の多様性を報告している。しかし、多くの株に共通の CTX4A/4B 生合成遺伝子が存在するのか、あるいは、CTX4A/4B を生合成する 1 種類の株が広く分布するのか、明らかでない。また、魚の毒化や *G. toxicus* の生息が広く認められるにも拘わらず、CTX を生産する株が国内沿岸で発見されていない理由も不明であり、今後の検討が必要である。

「Ovatoxin」　地中海で発生したヒトの呼吸器障害は風で飛散した藻体もしくは OVT が原因と推定されて注目を呼んだ。その後、世界各地で多数の株が採集されて遺伝子解析がなされたが、OVT の生産性や対応する成分の構造解析は遅れている。微量試料で迅速解析が可能な方法として、陰陽両イオンモードを使用する LC-MS/MS を検討し、成功した。

Ciguatera, Dinoflatellates, Gambierdiscus

講演番号：4SY20-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:10～ A 校舎 37 会場

フェアリーリング（妖精の輪）の妖精の正体と農業への応用の可能性
Disclosure of the “fairy” of fairy-ring and possibility of its application to agriculture
○河岸 洋和(静大院創造)
○Hirokazu Kawagishi(Shizuoka Univ.)

公園，ゴルフ場，住宅街などで，芝が輪状に周囲より色濃く繁茂し，枯れた後にキノコが発生する現象を「フェアリーリング（妖精の輪)」という。西洋の伝説では，妖精が輪を作り，その中で踊ると伝えられている。1884 年の Nature に，1675 年に発表されたフェアリーリングに関する最初の科学的論文やそれに続く論文が紹介されて以来，その「妖精の正体（芝を繁茂させる原因)」は謎のままであった[1)]。これまでは，最も代謝が活発な先端の菌糸が枯れ草や土壌中の蛋白質を分解し，植物が利用しやすい形態（硝酸等）に窒素成分を変え，植物の成長が促された結果フェアリーリングが現れると説明されていた。しかし，私は，この定説に疑問を持ち，「成長促進は菌が特異的な植物成長調節物質を産生しているからではないか？」と考えた。そして，数十種あるフェアリーリング形成菌のうち，当然ながらこのコムラサキシメジを選び，実験を開始した。その結果，シバに対して成長促進調節活性を示す 2-アザヒポキサンチン（AHX）を得ることに成功した[2)]。また，さらなる実験で，AHX とは逆にシバの成長を抑制するイミダゾール-4-カルボキシアミド（ICA）を AHX の発見に 1 年遅れて得ることに成功した[3)]。これらの化合物は合成品として知られていたが，天然からは初めての発見であった。これらは，分類学上の科に無関係に試した調べた全ての植物（イネ，ジャガイモ，レタス，アスパラガス，チャ，トマト，シロイヌナズナ等）の成長を促進させた[4)]。

この研究のこれまでの経過，最新の結果，そして今後の応用展開について紹介する。

1) H. Evershed, Nature, 29, 384 (1884)。
2) J-H. Choi, et al., ChemBioChem, 11, 1373 (2010).
3) J-H. Choi, et al., J. Agric. Food Chem., 58, 9956 (2010).
4) 崔　宰熏，河岸洋和，化学と生物，49(5)，299-301 (2011).

disclosure, fairy, fairy-ring

講演番号：4SY20-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:40～ A 校舎 37 会場

記憶改善効果を示すステロイド配糖体の創製

Development of steroid glycosides that indicate memory-improving effect

○小鹿 一(名大院生命農)
○Makoto Ojika(Nagoya Univ.)

オニヒトデから発見したステロイド配糖体（acanthasteroside B3 および類縁体）はステロイド骨格両端にキシロースを結合した特異な構造をもち、神経成長因子（NGF）増強作用およびマウス記憶改善効果を示す。従って、神経変性疾患の治療薬への応用が期待できるが、(1)分子標的や作用機構、(2)天然からの安定供給、(3)体内動態、などの課題が残されている。本研究はこれら課題を解決し応用への道を拓くことを目的としている。

（１）作用機構の解析

神経成長因子（NGF）は受容体 TrkA に結合し、下流の MAP キナーゼ（ERK, p38）をリン酸化することで、神経モデルである PC12 細胞に突起伸長を誘導する。そこで acanthasteroside B3 による NGF 作用の増強が、このシグナル伝達経路の増強によるものかどうかを、ウェスタンブロットにより解析した。その結果、MAP キナーゼ ERK1/2 およびその上流の MEK のリン酸化が増強されることが分かった。現在、NGF 受容体 TrkA を含めた上流タンパク質の活性化を調べている。

２．活性類縁体の合成と記憶改善効果の確認

オニヒトデからのステロイド配糖体の供給は、材料入手の不安定性、含有する毒の危険性、煩雑な精製作業など困難が伴う。そこで応用化を視野に、構造活性相関に則した単純化類縁体の合成を行った。これまでに、コール酸から 16 段階（積算収率約 10%）の反応を経て類縁体１の合成に成功した。この類縁体１は、PC12 細胞に対し天然 acanthasteroside B3 とほぼ同等の NGF 増強効果を示した。さらに、加齢マウス、老化促進マウスの認知・記憶改善効果を行動実験（Y 迷路、新奇物体認知、自発的交代行動）により調べた結果、一定の効果が見られた。しかし水溶性が低いため、より吸収効率の高い（極性の高い）類縁体の設計・合成を進めている。

３．記憶改善ステロイド配糖体の体内動態

Acanthasteroside B3 を皮下投与したマウスから血液・脳組織を摘出し、各組織における含量を高感度 LC/MS により経時的に定量した。その結果、１時間で血中濃度が最大になり、脳組織へも移行していることが分かった。これは、この物質が血液脳関門を通過して脳内で作用していることを示唆する。上記の合成類縁体１でも同様の実験を行ったところ、血中への移行は観測されたが脳への移行は観測されなかった。これは低い水溶性に要因があると考えられるので、高水溶性類縁体の合成が期待される。

steroid glycoside, neurotrophic, memory improvement

講演番号：4SY20-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:10～ A 校舎 37 会場

天然生物活性機構に携わる新奇な共役イミン反応性の検証と展開

Exploring the new reactivity of natural unsaturated imines: Synthetic and biological evaluation

○田中 克典(理研基幹研)
○Katsunori Tanaka(RIKEN, ASI)

有機合成化学の分野では、様々な効率的結合形成反応が開発されているが、生体システムに有機反応の新しい反応性を学び、これを生体現象を理解するために積極的に利用する試みは非常に限られている。我々はこれまでに、生体内アミンに由来する不飽和イミンの『見過ごされてきた』そして『生体機能発現に密接に携わる』新奇な反応を幾つか見出すとともに、新規アルカロイド合成のための戦略として有機合成化学的に再開拓してきた。さらにこれら新奇反応を逆に利用して、生体分子の標識や複合化、あるいは自然界に存在する生理活性物質の新規探索戦略や生体寛容性機能性材料の創製に成功した。本発表では、以下に示した最新の２つのトピックについて紹介させていただきたい。

（1）ポリアミン誘導体の新規な反応性とその生物学的意義の追求

天然のポリアミン誘導体から得られる共役イミン誘導体が、新奇な[4+4]反応を速やかに起こして、特徴的なカゴ型分子骨格を形成することを初めて見出した。発表者らは計算化学を利用して、この反応が速やかに進行する理由を明らかにするとともに、自然界で存在する可能性があり、さらに顕著な活性が期待される新規アルカロイド類の合成を実現した。さらにある種のポリアミン誘導体は、連続的な[4+4]反応を起こしてヒドロゲル状のシート高分子を形成し、酸性物質や細胞との接着、あるいは特定分子の選択的細胞内導入に効果的な生体寛容性機能性材料となりうることを明らかにした。

さらにこれら有機合成化学的な成果と現象を基に、ポリアミンが様々な天然物に付加する理由や、タンパク質の新たな翻訳『後後』修飾を提起し、細胞内外や生体内での検証を行っている。

（2）タンパク質の翻訳後修飾に学ぶ新規反応開発

タンパク質構成アミノ酸側鎖が脂質酸化産物と反応して、翻訳後修飾に携わることは良く知られているが、これを有用な有機合成化学的手法として、積極的に活用する試みは非常に少ない。発表者らは、リジンやシステインと比較して反応性に劣るアルギニンが、ある種の共役アルデヒドと効率的に反応することにヒントを得て、これまでに合成法がほとんどない、しかし顕著な生理活性を示すことが知られている 2-アミノイミダゾール誘導体の合成に成功した。置換アミノイミダゾールの効率的なワンポット液相ライブラリー合成や天然物合成を行うと共に、逆にこの反応性を利用して、動物内での特定タンパク質（特定のアルギニン残基）に対する標識や多段階天然物合成を検討している。

unsaturated imine, polyamine, 2-aminoimidazole

講演番号：4SY20-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:40～ A 校舎 37 会場

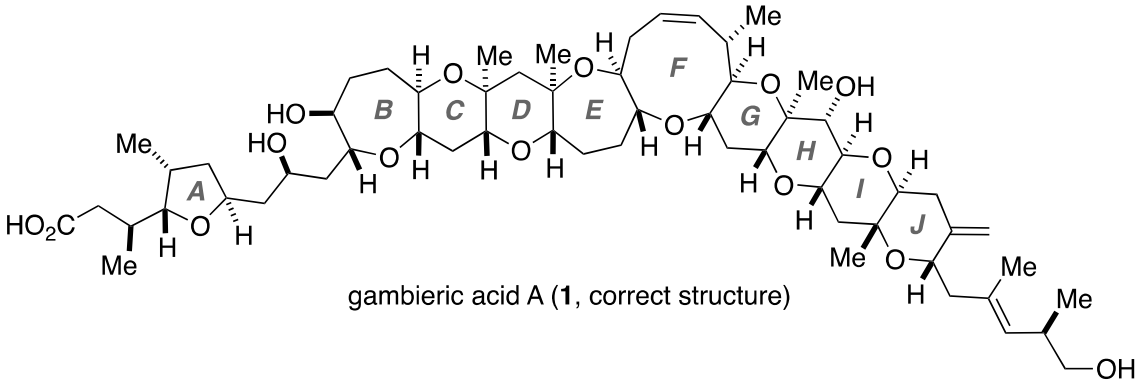
巨大複雑ポリエーテル天然物の全合成と機能解析

Total synthesis and biological evaluation of gambieric acid A, a complex polycyclic ether natural product

○佐々木 誠(東北大院生命科学)
○Makoto Sasaki(Tohoku Univ.)

赤潮毒ブレベトキシン類、食中毒シガテラ原因毒シガトキシン類やマイトトキシンに代表されるポリ環状エーテル天然物は、渦鞭毛藻が生産する二次代謝産物であり、複雑な分子構造と強力で多様な生物活性を有することから、これまで多くの研究者の興味を引いてきた。ガンビエル酸 A（**1**）およびその天然同族体は、永井・安元らのグループによりシガテラ原因渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* の培養液から単離・構造決定されたポリ環状エーテル天然物である。本天然物は、重篤な真菌感染症の治療薬として広く用いられている抗生物質アンフォテリシン B の約 2,000 倍にも匹敵する強力な抗真菌活性を示す一方で、シガトキシンなどとは異なりマウス致死毒性を示さない点で興味がもたれている。

ガンビエル酸 A の平面構造とポリ環状エーテル骨格の相対立体配置は二次元 NMR 解析により決定され、さらにその全立体構造は NOE 相関と $^{3}J_{H,H}$ 解析による立体配座解析および天然物の分解・誘導化実験、新 Mosher 法と PGME 法の適用、キラル蛍光 HPLC 分析を組み合わせることにより明らかにされた。一方で我々は、ガンビエル酸類の A/B 環部モデル化合物とその立体異性体を合成し、天然物と NMR データを比較することにより、天然物のポリ環状エーテル部分の絶対立体配置が提出構造式の逆であると推定した。今回、鈴木–宮浦カップリング反応を用いた高度に収束的な合成戦略に基づいたガンビエル酸 A の最初の全合成を達成するとともに、その全立体構造の決定に成功した。また、構造類縁体の生物活性評価により本天然物の構造活性相関に関する知見を得たので併せて紹介する。



gambieric acid A (**1**, correct structure)

polycyclic ether, Gambieric acid A, total synthesis

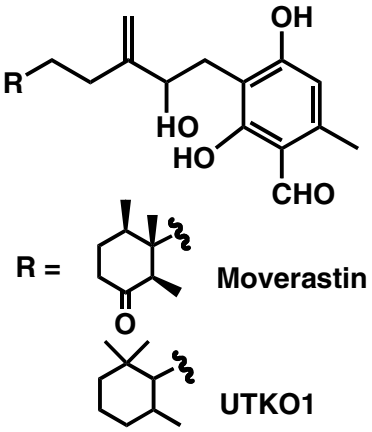
講演番号：4SY20-6
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ A 校舎 37 会場

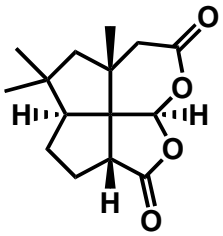
ケミカルバイオロジーへの有機合成化学からのアプローチ
Approach to Chemical Biology by Organic Synthesis

○渡邉 秀典(東大院農)
○Hidenori Watanabe(The Univ. of Tokyo)

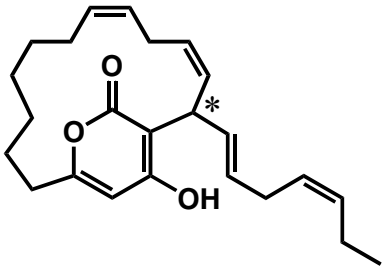
生物活性天然物の合成において、合成経路の短工程化とそれによる「実際に役に立てられる量と質を持ったものつくり」は、最重要課題であると言える。我々は合成対象化合物の構造的特徴に即したアプローチにより、なるべく迅速・簡便に合成することを目指した合成研究を展開している。一方、ケミカルバイオロジーやバイオロジーに携わる研究代表者との緊密で有機的な連携の下、類縁体や標識体合成をにらんだリアルタイムでの合成ルートのチューンアップを行うことで、作用機構の解明、さらに強力な生物活性を示す有用リガンド化合物の創製を同時進行的に行うことも重要である。

本シンポジウムでは、癌細胞遊走阻害物質である Moverastin[1] の類縁体であるが、より活性が強くかつ作用機構の異なる UTKO1 を見いだした経緯や、ハスモンヨトウに対して摂食阻害活性を有する Penifulvin A[2]、また抗 MRSA ならびに抗 VREF 活性を示す Neurymenolide A[3] などの合成研究について紹介したい。





Penifulvin A



Neurymenolide A

1. Takemoto, Y. et al. *Chemistry & Biology* **2005**, *12*, 1337-1347.
2. Stout, E. P. et al. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 225-228.
3. Shim, S. H. et al. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1225-1228.

UTKO1, Penifulvin A, Neurymenolide A

講演番号：4SY21-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:35～ C 校舎 16 会場

超好熱性アーキア DNA 複製因子に見られる多様性

Diversity of DNA replication mechanism in hyperthermophilic archara

○石野 良純(九大院農)
○Yoshizumi Ishino(Kyushu Univ.)

第三の生物であるアーキアの生命現象の分子機構を解析し、真正細菌や真核生物のものと比較することによって、生命現象の基本原理とその進化について詳細な理解が得られることが期待される。演者がアーキアの DNA 複製に興味を持ち、研究を開始した 1990 年頃は、アーキアの遺伝情報維持と伝達に関してはほとんど未知の状態であったが、1990 年代半ばからの全ゲノム配列解析の急速な進展によって、ゲノム中の遺伝子を網羅的に検索することができるようになった。その結果、アーキアの遺伝情報系に関わるタンパク質は真正細菌よりも我々ヒトを含む真核生物のものにより類似しているということがはっきりと見えてきた。演者らは DNA ポリメラーゼの研究から開始し、アーキア特有の DNA ポリメラーゼの発見もあったが、多くの複製関連タンパク質として真核生物で同定されたものと相同な配列を有するホモログの遺伝子をクローニングし、順次タンパク質を精製することによって、個々のタンパク質の生化学的機能を解析した。また、それらのタンパク質から複合体の構築を行って、機能構造解析を続けてきた。超好熱性アーキアのタンパク質は安定性に優れているため、高次複合体形成とその構造解析に特に適している。また最近では、*Thermococcus kodakarensis* で遺伝子操作実験系が確立されたことから、DNA 複製や修復に関して遺伝学的手法による機能解析も始めた。

本シンポジウムでは、DNA 複製開始から伸長現象に関わるタンパク質因子について、これまでに我々が解析してきた結果を基に、アーキアにおける各分子の保存性と多様性について紹介したい。*Pyrococcus furiosus* の Cdc6/Orc1 は *in vitro* において複製起点（*ori*）領域に特異的に結合し、二本鎖を開裂することができる。さらにヘリカーゼである MCM 複合体を複製起点に呼び込む機能も有する、MCM はそれ自身では弱いヘリカーゼ活性しか示さないが、GINS 複合体との相互作用によりヘリカーゼ活性が促進される。さらに、GINS には RecJ 様のタンパク質が安定に結合する。このタンパク質は真核生物の Cdc45 と配列上の相同性があり、真核生物における CMG 複合体との保存性が予想されるが、Cdc45 と異なり、この RecJ 様タンパク質は 5′-3′ exonuclease 活性を有する。このように、複製ヘリカーゼの本体はアーキアと真核生物で保存されていながら、異なる点もはっきり見える。また、複製ヘリカーゼの活性発現についてアーキアの中でも多様性が見られ、極めて興味深い。MCM はプライマーゼとも複合体を形成し、さらにプライマーゼは複製ポリメラーゼと予想される PolD と結合する。これらの知見を基に、我々はアーキア分子による試験管内 DNA 複製の再構成系の構築と、再構成レプリソームの構造解明を目指している。

Archaea, DNA replication, molecular diversity

講演番号：4SY21-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:03～ C 校舎 16 会場

古細菌 D-ファミリーDNA ポリメラーゼのサブユニット N-末端領域に保存されるドメイン構造の重要性

Functional roles of the N-terminal domains of the archaeal D-family DNA polymerase

○松井 郁夫[1]、漆畑 祐司[1]、松井 えり子[1]、山崎 和彦[1]、横山 英志[2]([1]産総研バイオメディカル、[2]静岡県立大薬)
○Ikuo Matsui[1], Yuji Urushibata[1], Eriko Matsui[1], Kazuhiko Yamasaki[1], Hideshi Yokoyama[2]([1]Natl. Inst. Adv. Indust. Sci. & Tech. (AIST), [2]School Pham. Sci., Univ. Shizuoka)

（緒言）ファミリーD の DNA ポリメラーゼ（PolD）は九州大学 石野良純教授が世界に先駆けて超好熱性古細菌より発見された新規 DNA ポリメラーゼです。PolD は我々ヒトを含む真核生物のゲノム複製を司る DNA ポリメラーゼの先祖であり、古細菌のゲノム複製の中心装置です。しかし、PolD はその機能的重要性にもかかわらず、触媒残基の種類や位置を含め、生化学的性質は全く不明でした。そこで我々は、PolD の大サブユニット（DP2）と小サブユニット（DP1）の共発現による大量発現系を構築し、Native 体が分子量 420kDa の 2:2 ヘテロテトラマー複合体であり、大サブユニット（DP2）の D1122 と D1124 残基が DNA 合成活性の触媒残基であることを発見しました。また、小サブユニット（DP1）は Mre11（真核生物の DNA 組み換え修復に必須な酵素）様の 3’-5’エキソヌクレアーゼであり、D363、H365、H454 が触媒残基であることを明らかにしました。さらに、DP2 と DP1 の N-末端と C-末端ドメインの欠失変異体を作成し、複合体形成メカニズムと活性制御機構を明らかにし、どの様にドメインが集合し、DNA ポリメラーゼの活性発現を制御するかを明らかにしました。その結果、DP2 の N-末端側ドメインが C-末端側ドメインとサブユニット内相互作用で環化する機構が明らかになりました。さらに、DP2 と DP1 の N-末端と C-末端が各々、逆転する形で寄り添い DP1 が 1 分子と DP2 が 1 分子結合し、基本構造となる 1:1 ヘテロダイマー複合体が形成されること解りました。
（方法と結果）本報告では、DP1(1-200)の分子機能制御における重要性に着目し、DP1(1-200)のアミノ酸配列上に酸性残基が多数集合した部位が数カ所存在し、局部的に自由度の高い構造であると予測し、この予測を基に、DNA 組換え法で、これら酸性クラスターを除去した欠失タンパク質を発現し、単離精製することに成功しました。また、この欠失タンパク質を用い、DP1(1-200）の部分構造を核磁気共鳴（NMR）法で明らかにした。さらに、DP2(1-300)の N-末端に存在する新規 DNA 結合ドメインの X 線結晶構造を決定しました。その N-末端 50 残基は電子密度が収束せず構造を決めることはできませんでした。興味深いことに、その未知領域は両親媒性 alpha-ヘリックスを構成すると予測され、疎水的表面で触媒反応中心と相互作用し、触媒ドメインの親水性を調整し、サブユニット内の自己環状化を司る極めて重要な機能を有することが明らかになりました。この N-末端 50 残基が構成する alpha-ヘリックスの両親媒性はメタン菌を含む主要な古細菌で必ず保存されていることも発見しました。よって、PolD の大小サブユニットからなる 2:2 ヘテロテトラマー構造は古細菌－真核生物型ゲノム複製装置の必須かつ未知な機能構造解明に貢献しました。

DNA replication, DNA polymerase, Hyperthermophilic archaea

講演番号：4SY21-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:31～ C 校舎 16 会場

超好熱性アーキアの環境適応に関わる転写調節因子の解析

Analysis of transcriptional regulators in hyperthermophilic archaea involved in environmental adaptation

○金井 保[1,3]、武富 尚吾[1]、小谷 徹[1]、釜下 知之[1]、中之庄 正弘[1]、今中 忠行[2,3]、跡見 晴幸[1,3]([1]京大院工、[2]立命館大生命科学、[3]科学技術振興機構, CREST)
○ Tamotsu Kanai[1,3], Shogo Takedomi[1], Toru Odani[1], Tomoyuki Kamashita[1], Masahiro Nakanosho[1], Tadayuki Imanaka[2,3], Haruyuki Atomi[1,3]([1]Kyoto Univ., [2]Ritsumeikan Univ., [3]JST, CREST)

アーキアの転写機構は、RNA polymerase などの基本転写因子が真核生物型である一方、転写調節に関わる因子にはバクテリア型が多く存在する。このようにアーキアの転写機構は、両ドメインの特徴を併せもつことから、転写メカニズムの分子進化を考える上において、大変興味深い研究対象である。本発表では、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における、環境変化への適応に関わる転写制御因子の解析結果を報告する。本菌は、全ゲノム配列と遺伝子組換系が利用可能であることから、アーキアや超好熱菌研究におけるモデル生物のひとつである。

T. kodakarensis の野生株は、解糖および糖新生の両培養条件下で良好に生育することから、外部環境に応答した解糖系・糖新生系酵素群の活性制御機構の存在が予想される。そこで両培養条件で生育させた菌体を用いて全ゲノム DNA Microarray 解析を行った結果、これらの制御が主に転写レベルで引き起こされていることが判明し、さらにこの制御を担う転写制御因子(Tgr)を同定した。遺伝子破壊や *in vitro* でのタンパク質機能解析の結果、Tgr は生育環境中の糖濃度を検知するセンサー機能を有し、さらにはプロモーター領域への結合や解離を通じて解糖系遺伝子群と糖新生系遺伝子群の転写を同時にかつ逆方向に制御する、多機能性転写制御因子であることが明らかとなった。Tgr により制御される遺伝子群(Tgr regulon)の総遺伝子数は 30 を超え、これまでにアーキアで見つかった regulon としては最大のものであった。

熱ショック応答は生物界に普遍的に見られる生命現象であるが、バクテリアや真核生物と比較してアーキアの熱ショック応答機構の詳細は明らかとなっていない。そこで *T. kodakarensis* の転写制御因子 Phr の遺伝子（TK2291）破壊株を作製し、その transcriptome 解析を行った。その結果、TK2291 破壊株では、通常生育温度においても prefoldin や small heat shock protein などの分子シャペロン遺伝子の転写量が上昇していたことから、Phr が細胞内において熱ショック応答を負に制御する転写抑制因子として機能することが明らかとなった。さらに Phr regulon 内には、上記の分子シャペロン遺伝子以外にも数多くの機能未知遺伝子が含まれており、これらの遺伝子がコードする機能未知タンパク質が新規な分子シャペロンであることが予想された。

archaea, transcriptional regulation, hyperthermophile

講演番号：4SY21-4
講演日時、会場：3 月 27 日 14:59～ C 校舎 16 会場

アーキアにおける tRNA 遺伝子の多様性と進化
Variety and evolution of the archaeal tRNA genes

○金井 昭夫(慶應大先端生命研)
○Akio Kanai(IAB, Keio University)

tRNA は古典的な non-coding RNA の一種であり、ゲノムに書き込まれた塩基配列の情報をアミノ酸配列（タンパク質）に書き換えるために要となる分子である。近年、我々は，主にアーキアの完全長ゲノムを用いて、その短い 100 塩基程度の遺伝子に複数のイントロンが介在した tRNA や、split tRNA と呼ばれ 2-3 の独立した遺伝子に分けられた「分断型の tRNA」を見いだしてきた。本発表では、まず、このように多様な tRNA 遺伝子が如何に進化して来たのかについて、アーキアの系統樹上で具体的な例を用いて論じたい。

一方、分断型の tRNA は前駆体 tRNA（Pre-tRNA）の形でゲノム上にコードされているので、機能的な、成熟型の tRNA になるためには RNA のプロセシングを正確に遂行する必要がある。ここで、tRNA のイントロンを切り取る酵素である tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼに着目してみると、本酵素の分子タイプと tRNA の多様化には、アーキアの系統樹上で高い相関があることが分かる。最近、我々の研究グループは米カルフォルニア大学との共同研究を通して、新しいタイプの tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼ（ε2 タイプと命名）を、メタゲノム解析から再構成した ARMAN-2 と総称される極小のアーキアゲノム中に見出し、その組換え体酵素の性状解析を行なった。この例もまた、アーキア tRNA の多様化に伴う、tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼの共進化を示唆するものであった。分断された tRNA 分子を研究することで、極めて初期の生命体において如何に遺伝暗号が成立したかという問題にも迫れる可能性があり、この点についても議論出来ればと考えている。

tRNA, archaea, intron

講演番号：4SY21-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ C 校舎 16 会場

超好熱性アーキアリボ核タンパク質酵素の活性化と耐熱性の分子基盤

Structural basis for the activation and thermostability of the archaeal ribonucleoprotein enzyme

○木村 誠(九大院農)
○Makoto Kimura(Kyushu Univ.)

触媒活性を持つ RNA（リボザイム）や RNA 干渉の発見により、低分子 RNA が前駆体 RNA のプロセシングや mRNA の分解反応等、遺伝子の発現調節において重要な役割を担っていることが明らかになってきた。これらの機能性 RNA は、通常 RNA 分子のみでは活性を示さず、タンパク質と複合体（リボ核タンパク質複合体）を形成することにより機能している。従って、機能性 RNA の作用機構を理解するためには、リボ核タンパク質複合体を構成するタンパク質と RNA の相互作用機構を詳細に理解することが重要である。

リボヌクレアーゼ P （RNase P）は前駆体 tRNA の 5’末端プロセシング反応や様々な前駆体 non-codingRNA のプロセシングを触媒する酵素で、その機能は細菌からヒトまでよく保存されている。しかし、そのサブユニット構成や酵素化学的性質は、進化系統ドメイン間（真正細菌、古細菌、真核生物）で異なっている。大腸菌を代表とする真正細菌の RNase P は、触媒活性を持つ１分子の RNA と１分子のタンパク質からなり、高 Mg^{2+}濃度では RNA のみで触媒活性を持つことから、リボザイム発見の端緒となった分子である。一方、アーキアと真核生物の RNase P は、１分子の RNA とアーキアでは４～５種のタンパク質、真核生物では９～１０種のタンパク質から構成され、いずれも RNA のみでは触媒活性を示さず、タンパク質との相互作用により、その触媒活性が活性化される。このような性質から、アーキアおよび真核生物の RNase P は機能性 RNA がどのようにタンパク質により活性化されるかを研究する上で最適なモデル酵素と考えられている。

我々は超好熱アーキア（*Pyrococcus horikoshii*）RNase P が、触媒活性を持つ RNA（*Pho*pRNA）と５種のタンパク質（*Pho*Pop5, *Pho*Rpp21, *Pho*Rpp29, *Pho*Rpp30, *Pho*Rpp38）から構成され、*Pho*Rpp38 を除く４種のタンパク質と *Pho*pRNA からなる再構成酵素（R-4P）が 55℃で最大酵素活性を示すのに対し、５種のタンパク質と *Pho*pRNA を含む再構成酵素（R-5P）は 70℃で最大酵素活性を示すことを明らかにした。さらに、構成タンパク質の結晶構造を決定するとともに、*Pho*pRNA の三次構造モデルを RNase P RNA の塩基配列比較と既知の細菌 RNase P RNA の構造情報に基づき作製した。また、タンパク質 *Pho*Pop5 と *Pho*Rpp30 および *Pho*Rpp21 と *Pho*Rpp29 が複合体を形成し、それぞれ *Pho*pRNA の機能ドメインである C ドメインと S ドメインを活性化していること、一方 *Pho*Rpp38 は *Pho*pRNA の２つのステムループ構造に特異的に結合し、RNase P の最適温度の上昇に関与していることを示唆した。

本シンポジウムでは、超好熱古細菌の RNase P に関する我々の研究成果を紹介する。

archaea, ribonuclease P, ribozyme

講演番号：4SY21-6
講演日時、会場：3 月 27 日 15:55～ C 校舎 16 会場

超好熱性アーキアの反応系を用いて見えてきたリボソームの翻訳因子リクルート機構

Mechanism of the recruitment of translation factors to the ribosome: evidence from studies with hyperthermophilic archaeal proteins

○内海 利男[1]、鈴木 隆寛[1]、本田 貴嘉[1]、馬場 健太朗[1]、田中 勲[2]、姚 閔[2]([1]新潟大理、[2]北大生命科学院)
○Toshio Uchiumi[1], Takahiro Suzuki[1], Takayoshi Honda[1], Kentaro Baba[1], Isao Tanaka[2], Min Yao[2]([1]Niigata Univ., [2]Hokkaido Univ.)

タンパク質生合成のペプチド鎖伸長反応は mRNA の遺伝情報に従い 1 秒間に数個～20 個のアミノ酸が正確に連結する反応であり、主に二つの翻訳伸長因子（真核では eEF-1αと eEF-2）とリボソーム間の交互の相互作用によって進行する。リボソームと翻訳因子間のこの効率的な交互相互作用の仕組みを解明することはリボソーム研究に残された極めて重要な課題の一つである。リボソームタンパク質成分の中で、柔軟な“stalk”と呼ばれるタンパク質は翻訳因子のリクルートに機能することが示唆されてきたが、真核生物の stalk タンパク質を用いた生化学的解析ではその結合性は検出することができなかった。我々は超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* からのタンパク質を用いてこの問題に取り組み、stalk タンパク質（P1）の特徴的な 7 量体複合体構造 P0(P1-P1)(P1-P1)(P1-P1)を結晶構造で解明したばかりでなく、stalk 二量体と古細菌翻訳因子（aEF-1α, aEF-2, aIF5B）間の明確な結合性をそれぞれ検出することができた。ゲルシフト法を用いた結合実験により、古細菌伸長因子 aEF-1αと aEF-2 は共に GTP 結合型/GDP 結合型の区別なく stalk と結合した。stalk への変異導入により、その因子結合部位は stalk の C 末端部位で、保存された疎水性アミノ酸の一群が重要であることが明らかにされた。stalk の C 末端のアミノ酸配列は古細菌と真核生物間に高度に保存されており、stalk・翻訳因子間相互作用に関して真核生物と古細菌で共通の分子機構が存在することが示唆された。超好熱性古細菌の翻訳因子は構造解析にはしばしば利用されているものの、本研究のような常温における機能解析の例は少ない。我々は生化学的手法を用いて古細菌翻訳因子から翻訳機構に関する新たな知見を得ることを目的として、古細菌翻訳因子を用いたペプチド鎖伸長反応系の構築を試みた。古細菌リボソームを用いた反応系は高温条件下が必須で実験条件の設定に限界があるため、我々は大腸菌リボソームの stalk 複合体を古細菌の相同体と置換したハイブリッドリボソームを構築し、これにより古細菌 aEF-1α/aEF-2 に依存したペプチド鎖合成活性を 37℃において検出することに成功した。この系によるペプチド鎖伸長活性は aEF-1α・GDP を GTP 結合型に交換する伸長因子である aEF-1βを添加することにより約 4 倍の活性の促進が見られ、ヌクレオチド交換も 37℃において検出された。さらに aEF-1βは、aEF-1αとリボソーム stalk である P1 二量体との結合を解離させることが新たに判明し、aEF-1α上の GDP→GTP 交換反応の調節に stalk タンパク質 P1 が関与する可能性が新たに示された。これら古細菌の stalk 複合体とペプチド鎖伸長因子を用いた研究知見より、リボソーム上に複数コピー存在する P1 により、効率的なペプチド鎖伸長反応を可能とする仕組みを考察する。

ribosomal protein, translation factor, ribosome

講演番号：4SY22-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:35～ B 校舎 21 会場

Unloading による筋萎縮の治療に有効な栄養法の開発

Nutritional Approach for preventing unloading-mediated muscle atrophy

○二川 健(徳島大院生体栄養)
○Takeshi Nikawa(Tokushima Univ.)

無重力や寝たきりなど Unloading 環境は、生体にさまざまな影響をあたえる。なかでも、骨格筋や骨の萎縮は著しく、運動器に急激な老化が進行したような状態を示す。そこで、私達は宇宙フライトや尾部懸垂による骨格筋や骨の萎縮のメカニズムの解明が、加齢などによる運動機能の低下の原因究明にもつながると考えた。Unloading 環境では蛋白質のユビキチン化が促進されるので、Unloading 環境に暴露したラットの腓腹筋や大腿骨の遺伝子を網羅的に解析し、そのユビキチン化の原因遺伝子を探索した。その結果、増殖因子のレセプターやその関連蛋白を特異的にユビキチン化させるユビキチンリガーゼ Cbl-b (Casitus B-ligeage lymphoma-b)の発現が宇宙フライトにより増大していることを発見した。Cbl-b は、インスリン受容体基質蛋白質 (IRS-1)をユビキチン化し分解へと導くユビキチンリガーゼとして働き、骨格筋や骨芽細胞におけるインスリン様増殖因子のシグナル伝達を負に調整していた。また、Cbl-b ノックアウトマウスでは Unloading による筋萎縮や骨萎縮がほとんどおこらなかった。これらの所見より、Cbl-b が筋細胞や骨芽細胞の増殖因子受容体シグナル系を負に調節し、運動器の萎縮を引き起こす重要な遺伝子の一つであることがわかった。この分子をターゲットにして、そのユビキチン化を阻害できる栄養素材を開発中である(2 件の特許を取得済み)。さらに、この分子の発現調節機構を解明することにより、骨格筋が Unloading ストレスをどのように感知しているかについても明らかになりつつある。本講演では、無重力による筋萎縮のメカニズム解明を目指した宇宙実験の紹介も交えながら、治療や予防が難しい(リハビリテーション以外に治療法のない)Unloading による運動器の萎縮に対する新しい治療法の可能性について、皆様と議論したいと考えている。

unloading, muscle atrophy, ubiquitin-dependent proteolysis

講演番号：4SY22-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:05～ B 校舎 21 会場

食品因子による廃用性筋萎縮予防へのアプローチ

Approach to the prevention of disuse musctle atrophy by food factors

○寺尾 純二(徳島大院 HBS 研究部)
○Junji Terao(Univ. Tokushima)

我が国は超高齢社会に移行したが、高齢者の大きな健康問題として筋力低下による「寝たきり」がある。骨折等で不動状態になると機械的負荷の低下により急激に骨格筋の萎縮が起こり、筋力が低下する。これは「廃用性筋委縮」とよばれる現象であり、筋細胞内のタンパク質分解系が亢進するために起こる。廃用性筋萎縮を抑える有効な薬剤は開発されておらず、食品摂取により廃用性筋萎縮を予防することができれば、「寝たきり」防止の大きな手段となり、社会への貢献が高い。われわれは、平成 20 年度に採択された農研機構生研センター・イノベーション基礎研究創出事業「筋肉老化を防ぐ抗ユビキチン化ペプチドおよびフラボノイドの開発」において、食品素材から抗筋萎縮作用を有する成分を探索し、ヒトでの有効性評価を行うプロジェクトを開始した(1)。まず食品成分による抗筋萎縮の作用点として筋タンパク質合成を伝達する IGF-1 シグナルに着目し、IGF-1 シグナルを減弱させるユビキチンリガーゼである Cbl-b と IRS との結合を阻害する抗ユビキチン化ペプチドに相当するアミノ酸配列を食品タンパク質から探索した。その結果、ダイズグリシニンが抗筋萎縮効果を有することを坐骨神経切除マウスへの経口摂取による筋萎縮モデル実験で確認した(2)。一方、骨格筋の筋萎縮にはミトコンドリア機能障害に基づく酸化ストレスの関与が示唆されている。そこでわれわれはフラボノイドに着目し、代表的な抗酸化フラボノイドであるケルセチンをマウスへ筋肉注射することにより尾懸垂による後肢骨格筋の筋量低下が抑制されることを明らかにした(2)。ケルセチンは重力低下で亢進する酸化ストレスを抑えることにより、筋タンパク質分解に働くユビキチンリガーゼの発現を抑制することが示唆された。しかし、フラボノイドの生体利用性は低いため、食品成分として経口摂取した場合の効果には疑問がもたれた。そこで、筋肉組織により蓄積しやすいフラボノイドとして疎水性のプレニル基が結合したプレニルフラボノイドを想定し、ホップに存在する 8-プレニルナリンゲニン(8-prenylnaringenin：8-PN)の経口摂取を検討した。その結果、坐骨神経切除マウスにおいて経口摂取した 8-PN は筋肉に蓄積して筋量低下を抑えることが示された(3)。食餌由来のフラボノイドも筋萎縮低下に有効であることを示す結果を得たことから、現在は入院中の高齢者を対象として、ダイズタンパクおよび植物フラボノイド含有食材のヒト臨床試験を進行中である。今後の研究成果から日常摂取する食品による「寝たきり」予防の可能性が明らかになり、応用開発に向けた試みが進むことが期待される。(1) http://www.naro.affrc.go.jp/brain/inv_up/theme/2008/023748.html (2)山下ら.化学と生物 50:357-362:2012
(3) Mukai et al. *J Nat Prod* 73:1708-1710:2010. (3) Mukai et al. *PLoS ONE* 7:e45048:2012.

disuse muscle atrophy, ubiquitin ligase, food factor

講演番号：4SY22-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:35～ B 校舎 21 会場

寝たきり状態によって引き起こされる代謝異常　－トランスクリプトーム、メタボロームによる網羅的解析－

Confined condition, "Netakiri", itself induced liver injury and abnormality of lipid metabolism in rats

○小田 裕昭(名古屋大院生命農学)
○Hiroaki Oda(Nagoya Univ.)

現代社会は、様々な原因から身体活動が抑制されている人が増加しており、これは不活動症候群と呼ばれ、生活習慣病などにつながる可能性が指摘されている。不活動は、活動によるエネルギーを使用しないだけであると考えられてきたが、不活動それ自身が不健康を導いていることが、震災後改めてクローズアップされてきた。また超高齢化社会となり、さらに活動が制限された状態である寝たきりや長期のベッドレストなどは、特に廃用性症候群と呼ばれる。臨床現場では、寝たきりとなる原因に注目するため、寝たきりそれ自身の影響はほとんど検討されてこなかった。一部外部に現れる症状は、原因とは別に検討されてきた。例えば筋萎縮などである。しかし、寝たきり状態の動物実験モデルが存在しないため、不活動によって体の中で何が起きているかなど生化学的・分子生物学的研究は全くされてきていない。私たちは、ラットをボールマンケージに簡易拘束することにより、寝たきり状態に近い現象を引き起こすことに成功し、寝たきり動物モデルを初めて考案した。この寝たきりモデルラットにおいてコレステロール代謝異常と肝機能障害が起こることを報告してきた。不活動それ自身が、代謝に与える影響を網羅的に調べる目的で、寝たきりモデルラットにおける脂質代謝異常、肝機能悪化のメカニズムに注目して、トランスクリプトーム、メタボローム研究を行った。

Wistar 系雄ラットに高コレステロール食を与え、高コレステロール血症を発症させ、その後半数のラットをボールマンケージに移し、42 日間飼育した。実験期間終了後、血清、肝臓を採取し、肝臓からは RNA を抽出し、アフィメトリクス社のマイクアレー解析を行った。またリアルタイム qRT-PCR 法により RNA の定量解析を行った。また、肝臓サンプルを用いて CE-MS 法によりメタボローム解析を行った。肝機能のマーカーとして血清 ALT、AST を測定した。VLDL の放出速度は、チロキサポールの静脈注射によって測定した。さらに、寝たきり状態からの復帰を促進する食品成分の探索を行う目的で、食餌タンパク質として、カゼイン、大豆たんぱく質、卵白タンパク質を用いて、検討を行った。

寝たきり群では、血清コレステロール濃度が増加し、血清 ALT、AST 活性が増加した。血清コレステロール濃度の増加は、肝臓からの VLDL 放出速度の増加によることが分かった。肝臓メタボローム解析から、寝たきり群では、解糖系の代謝物の減少が見られた。アミノ酸濃度の変動はみられないものの尿素生成が亢進しているようであった。胆汁酸代謝にも変動が見られた。特に、寝たきりモデルラットでは、含硫アミノ酸代謝の変動が起きており、コレステロール代謝の異常と関連していることが示唆された。トランスクリプトーム解析から、肝細胞の増殖、アポトーシスに関連する遺伝子の変動が見られ、含硫アミノ酸代謝を変動させた遺伝子を特定できた。寝たきり群では肝臓特異的転写因子の遺伝子発現の変動が見られた。これらの結果は、寝たきりモデルにおいては、肝臓の遺伝子発現異常を介して、アミノ酸、糖質の代謝変動が引き起こされ、そのために肝機能ならびに脂質代謝の異常が生じたことを示している。さらに、卵白タンパク質は、寝たきり状態によって引き起こされるコレステロール代謝を改善し、大豆たんぱく質はコレステロール代謝ならびに肝機能も改善した。これらの結果は、食餌の内容により寝たきりからの復帰を促進する食品成分の開発もできることを示している。

inactive syndrome, cholesterol, liver injury

講演番号：4SY22-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:00～ B 校舎 21 会場

Time of eating determines metabolic diseases

○Satchidananda Panda,Megumi Hatori,Christopher Vollmers(Salk Institute)

Disruption of the circadian clock has a profound effect on energy homeostasis and has emerged as a critical contributing factor in the incidence of obesity, diabetes, and metabolic pathologies. While diet-induced obesity has been attributed to increased caloric intake from fat, animals fed high fat diet *ad libitum* also exhibit a disrupted daily feeding rhythm and the relevance of such feeding disruption to obesity and metabolic disease is unknown. Mice fed a high fat diet under a time-restricted feeding regimen, when compared to mice fed a high fat diet *ad libitum*, consume isocaloric amounts of food, yet are protected against obesity, insulin- and leptin- resistance, hepatic steatosis, and inflammation, and show normal metabolic parameters as well as improved motor function. Time-restricted feeding regimen improved CREB, mTOR and AMPK pathway function, oscillations of the hepatic circadian clock and target genes' expression. Consequent changes in catabolic and anabolic pathways led to reduced gluconeogesis and lipogenesis, improvements in glycolysis, β-oxidation, bile acid production, and energy expenditure. Thus, a time-restricted feeding regimen is a potential non-pharmacological strategy for combating obesity and its associated metabolic diseases.

circadian rhythm, time-restricted feeding, obesity

講演番号：4SY22-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:30～ B 校舎 21 会場

時間栄養学視点での食習慣研究

Study for the dietary habits from chrono-nutrition aspects

○高瀬 秀人(花王株式会社)
○Hideto Takase(Kao Corp.)

現代日本の肥満の増加は著しく、特に成人男性では BMI 25kg/m^2 以上の割合は 30 年前から 10%近く増加し、成人男性の 3 人にひとりは肥満である。基本的に肥満はエネルギー摂取とエネルギー消費の差分が体脂肪として蓄積されることにより生じるが、エネルギー摂取は近年むしろ減少傾向であり、エネルギー消費に大きな寄与を持つ身体活動も歩行数はやや減少傾向であるものの、1 回 30 分以上の運動を週 2 回以上、1 年以上続けている運動習慣者の割合は変らないかシニア層を中心に増加している[1)]。このような状況においてもなお肥満が増加する理由として、食事の質的な変化（脂質エネルギー比の増加、食物繊維不足など）とともに、食事の「時間」の要因が注目されてきた。NHK が 1960 年から 5 年ごとに実施している生活時間調査でも夕食時間が特異的に遅くなる傾向が顕著に認められる[2)]。

食事の時間と肥満の関係は主として動物を用いたモデル実験で検証され、ヒトの肥満との関係は、調査・疫学研究レベルで数多く報告されているが、その基盤となるヒトのエネルギー代謝に及ぼす影響は、実験系の困難さもあって必ずしも多くはない。我々はこれまで、ヒトの食習慣の実態と肥満・内臓脂肪蓄積の関係を調査してきた[3)]。そこから見出された肥満に関連すると考えられる食事パターンをモデル化し、ヒトのエネルギー代謝を長時間にわたって測定することができるヒューマンカロリメーターを用いてさまざまな食事の時間要因や質的要因がエネルギー消費、基質利用性、血中成分および食欲等に及ぼす影響を評価してきた。それらの検討から、主として夕食時間の遅れ、広い意味で食事の「時間」と言える欠食や間食、各食事ごとの栄養バランスの違いなどがエネルギー消費の低下や基質代謝の変化、食欲の亢進などを通じて肥満や代謝異常に繋がる可能性を見出しており、それらの結果について紹介し議論したい。

一方、ヒトの食習慣の実態を調査すると、食事の時間的な乱れはそれ単独で生じておらず、同時に量的・質的な変化を伴っていることが多い。端的には、夕食の時間が遅いヒトの食事は早いヒトとは量も質も異なる傾向がある。この背景には栄養学的説明以外に、社会環境や個人の生活環境が影響すると考えられるため、時間栄養学のエビデンスをヒトの食習慣研究と結びつけ、食習慣の改善につなげるためには今一歩の工夫が必要と考えられる。

1) 平成 22 年国民健康・栄養調査報告 厚生労働省
2) 2010 年国民生活時間調査報告書 NHK 放送文化研究所
3) Kondo T, Takase H, Yamaguchi T, et. al., Obes Res Clin Pract (2012) in press.

dietary habit, late diner, energy metabolism

講演番号：4SY22-6
講演日時、会場：3 月 27 日 16:00～ B 校舎 21 会場

乱れた体内時計を調節する食品因子の探索

Screening for food factors regulating circadian clocks

○大池 秀明、小堀 真珠子(農研機構/食品総合研究所)
○Hideaki Oike,Masuko Kobori(NARO/NFRI)

体内時計は、エネルギー代謝や睡眠、成長、免疫など、生命現象の基礎的なリズムを支配する重要な機能である。古くから、体内時計の調節に光が重要であることは知られていたが、近年の研究から、食事、温度、香り、音など、様々な刺激が時計の調節に影響を与えていることが明らかになってきた。その中でも、食事情報が体内時計に与える影響は大きく、例えば、夜行性動物であるマウスの飼育環境を、昼間にしか食餌摂取できない条件に移行すると、全身に存在するほぼすべての体内時計は 1 週間ほどで昼行性のリズムに反転することが知られている。つまり、全身の多くの組織は、食事リズムを最優先させ、いわゆる「腹時計」とも言える時刻情報をもとに代謝や各種生理機能を調節している。われわれはこれまで、食事内容が体内時計に与える影響に着眼して研究を進め、いくつかの食品成分がマウスの体内時計を変化させることを明らかにした。まず、マウスに高食塩食（4% NaCl）を自由に摂取させると、1 ヶ月後には、ほぼ全身の末梢体内時計が 3 時間程度前進した状態になることを見出した[1]。この現象は、小腸におけるナトリウム依存性グルコース共輸送体の発現が上昇し、糖の吸収が亢進することで、食事（朝食）情報による体内時計の時刻合わせ信号が増強された結果であると示唆されている。また、マウスにコーヒーやカフェイン溶液を飲用させると、中枢時計の制御下にある自発活動リズムが伸長することを見出した[2]。カフェインによる時計伸長作用は、培養細胞や培養組織片レベルでも観察されることから、ホルモンや睡眠妨害の影響ではなく、時計の分子回路に直接働きかけている可能性が考えられる。さらに、肝臓の時計は、食事情報への応答が非常に早く、１回の朝食遅延にも反応することを明らかにした[3]。つまり、朝食を抜くことで、その日の肝臓時計は数時間後退することを意味しており、エネルギー代謝や薬物代謝など、肝機能のリズムも変化していることが予想される。また、食事による肝臓時計の即時応答には、糖とアミノ酸の混合栄養が必要であり、朝食による肝臓時計の時刻合わせには、炭水化物とタンパク質の両方の摂取が望ましいと解釈できる。今後は、食品による効率的な体内時計制御を元に、体内リズムを整え、生体が本来持っている能力を効率的に引き出すという、健康科学研究への発展が見込まれる。最近では、細胞や組織レベルで体内時計リズムを解析する手法も増えており、古典的な動物個体の行動試験を行わずとも、時計に影響する食品成分の探索が可能になっている。シンポジウムでは、食品成分による体内時計調節能の研究手法を紹介しながら、時間栄養学を活かした新たな機能性食品開発への応用を提案する。
[1] Oike et al., BBRC (2010) [2] Oike et al., BBRC (2011) [3] Oike et al., PLoS One (2011)

circadian clocks, mouse, food

講演番号：4SY23-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:30～ C 校舎 21 会場

大腸菌のタンパク質膜挿入に必須の糖脂質酵素（glycolipozyme）MPIase の構造と機能
Structure and function of MPIase, a glycolipozyme essential for membrane protein integration in *E. coli*
○西山 賢一(岩手大寒冷バイオ)
○Ken-ichi Nishiyama(CRC, Iwate Univ)

大腸菌の内膜タンパク質や分泌タンパク質は、細胞質で生合成された後、それぞれ内膜に挿入したり、膜透過してペリプラズムや外膜に輸送される。これらのタンパク質膜輸送は大腸菌細胞表層構造の形成に極めて重要な役割を果たしている。我々は、タンパク質膜挿入やタンパク質膜透過の詳細な分子機構を明らかにするため、これらの反応に関与する因子を同定・精製し、試験管内で再構成することを試みてきた。タンパク質膜透過チャネル SecYEG はタンパク質膜挿入・膜透過の両方に必要であるが、タンパク質膜挿入反応には膜内在性因子として SecYEG だけでは不十分であった。大腸菌の内膜から膜挿入因子を検索したところ、SDS-PAGE 上で約 7 kDa の因子を同定し、MPIase（*M*embrane *P*rotein *I*ntegr*ase*）と名付けた（1)。MPIase と SecYEG が共存させると膜挿入活性が検出された。このとき、タンパク質膜透過活性も著しく促進された。一方、一連の膜タンパク質は SecYEG に依存せずに膜挿入すると考えられてきた。これらの膜挿入についても MPIase に依存して膜挿入することが判明した。MPIase の構造を決定したところ、MPIase は従来報告されている膜挿入因子とは異なり、タンパク質性の因子ではなく糖脂質であり、3 種のアミノ糖からなるユニットの繰り返しによる糖鎖がピロリン酸を介してジアシルグリセロールに連結されていた。MPIase の糖鎖は、大腸菌外膜因子 ECA (enterobacterial common antigen)の糖鎖と類似していた。しかし、ECA には MPIase のような膜挿入活性は検出されなかった。糖鎖の繰り返しは ECA で 18～55 なのに対し、MPIase は 9～11 であったため、糖鎖長が膜挿入活性に重要であると考えられる。MPIase の構造機能関連をさらに調べるため、MPIase をピロリン酸フォスファターゼ（PP）処理すると、脂質部分を除去した可溶性の糖鎖（PP-MPIase）が得られた。PP-MPIase はもとの MPIase よりも高い膜挿入活性を示した。PP-MPIase は新生膜タンパク質と水溶性の複合体を形成し、膜タンパク質を膜挿入可能な構造に保っていた。その後、タンパク質合成に共役しない膜挿入反応が進行した。すなわち、MPIase はそのシャペロン様機能により膜タンパク質と相互作用した後、積極的に膜挿入反応を触媒することが明らかになった。抗 MPIase 抗体を膜挿入反応液に添加すると、反転膜小胞への膜挿入も阻害され、MPIase は *in vivo* の膜挿入にも関与することが強く示唆された。以上のことから、膜挿入反応に必須の糖脂質 MPIase は糖脂質酵素（Glycolipozyme）であるというコンセプトを提案する（2)。

1. Nishiyama et al. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**, 733-736.
2. Nishiyama et al. (2012) *Nat. Commun.* in press.

protein integration, MPIase, ECA

講演番号：4SY23-2
講演日時、会場：3 月 27 日 13:55～ C 校舎 21 会場

多彩な機能を有するリポ蛋白質の膜局在化を触媒する Lol 経路

The Lol pathway mediates the membrane localization of lipoproteins possessing diverse functions.

○徳田 元(盛岡大栄養科学)
○Hajime Tokuda(Morioka Univ.)

グラム陰性細菌の外膜は、リン脂質、リポ多糖、βバレル型蛋白質、リポ蛋白質を主要な構成成分とする生体膜である。大部分の細菌にとって外膜は生育に必須である。外膜の主要構成成分はいずれも疎水的であり、これらが親水的なペリプラズム空間をどうやって通過し、どの様な機構で運ばれて外膜を形成するかが大変重要な研究課題として近年盛んに研究されている。４種類の構成成分の中で、最も早く輸送機構の全体像が明らかになったのは、リポ蛋白質を選別して輸送する Lol システムである（１）。リポ蛋白質輸送の機能単位は、内膜の ABC トランスポーターLolCDE 複合体、ペリプラズムの輸送体 LolA、外膜の受容体 LolB の 3 種である。前駆体として合成されたリポ蛋白質は、内膜のペリプラズム側に運ばれた後、3 種の修飾酵素によってアミノ末端に保存された Cys 残基がトリアシル化され成熟体となる。リポ蛋白質は、その後内膜に留まるものと外膜に運ばれるものに選別される。大腸菌では、内膜に留まるリポ蛋白質は少数である。これらのリポ蛋白質の２番目のアミノ酸残基は Asp である。この Asp は、LolCDE の認識を回避するシグナルとして働き、その結果リポ蛋白質は内膜に残留する。その他のアミノ酸が２番目にあるリポ蛋白質は、LolCDE の作用で内膜のペリプラズム側から遊離する。内膜から遊離したリポ蛋白質は LolA と複合体を形成する。LolA には疎水性のキャビティがあり、ここにアシル基が結合する。この複合体は親水性であり、ペリプラズム空間を通過し、外膜に運ばれる。外膜の LolB にも疎水性キャビティがあり、LolA から LolB にリポ蛋白質が受け渡され、外膜に定着する。LolB 自身もリポ蛋白質であるが、アシル基を持たない変異体でも活性がある。LolA と LolB の結晶構造はよく似ており、開口部分に蓋のある不完全なβバレル型である。膜サブユニット LolC と LolE のペリプラズム領域も、同様な構造をしている可能性が示唆されている。すなわち、リポ蛋白質は似たような構造を次々経由して、外膜にまで運ばれると考えられる。LolA から LolB にリポ蛋白質が受け渡される駆動力は、リポ蛋白質との親和性である。リポ蛋白質輸送に欠陥が生じると、Cpx２成分制御系を活性化すること、また Rcs ストレス応答システムを活性化して、LolA の発現を促進することが最近の研究によって明らかになった（２）。

1. Okuda & Tokuda, Annu. Rev. Microbiol. **65,** 239-259 (2011).
2. Tao et al. J. Bacteriol. **194,** 3643-3650 (2012).

lipoprotein, lol pathway, outer membrane

講演番号：4SY23-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:20～ C 校舎 21 会場

体腔依存多糖取り込み ABC トランスポーターの構造機能相関とその応用

Structure/function relationship and application of pit-dependent ABC transporter involved in polysaccharide import

○橋本 渉、丸山 如江、三上 文三、村田 幸作(京大院農)
○Wataru Hashimoto,Yukie Maruyama,Bunzo Mikami,Kousaku Murata(Kyoto Univ.)

細菌から植物、動物に至る幅広い生物の細胞膜に局在する ATP 結合カセット（ABC）トランスポーターは、ATP 加水分解エネルギーを用いて物質の膜内外への輸送（取り込み或いは排出）を行う分子装置である。取り込みに関わる ABC トランスポーターの立体構造と機能との相関を明らかにする研究が実施されているが、その多くは低分子物質（オリゴ糖、ビタミン、金属など）の輸送に限定されている。本講演では、細菌に見出された多糖アルギン酸取り込み ABC トランスポーターに焦点を当て、その構造機能相関と応用について紹介する。

（１）体腔形成細菌　アルギン酸資化性細菌として土壌より分離された *Sphingomonas* 属細菌 A1 株は、細胞表層に多数の襞状分子をもち、細胞外にアルギン酸が存在すると、襞状分子の再編により大きな孔「体腔」を形成する。膜構造の陥入により形成される体腔は、開閉自在の分子器官であり、アルギン酸を濃縮する機能を示す。

（２）多糖取り込み機構　A1 株はペリプラズム局在性のアルギン酸結合タンパク質（AlgQ1 と AlgQ2）と細胞内膜に局在する ABC トランスポーター（AlgM1-AlgM2/AlgS-AlgS）の作用により、体腔に濃縮したアルギン酸を細胞質内に直接取り込む。つまり、体腔と ABC トランスポーターから成る「超チャネル」により多糖が高分子のまま取り込まれる。X 線結晶構造解析により、結合タンパク質 AlgQ2 と相互作用した ABC トランスポーターの立体構造を決定した。この構造は、高分子基質を取り込む ABC トランスポーターの最初の例である。AlgM1-AlgM2 は、ペリプラズムでアルギン酸オリゴ糖を捕捉した AlgQ2 と閉じた構造で接触しているのに対し、細胞質側の AlgS-AlgS との結合面では開いた形状を示す。そのため、このモデルでは ABC インポーターは全体構造として Inward-facing 構造をとる。AlgQ2 は主に AlgM2 サブユニットと相互作用するが、AlgQ2 と AlgM1 との界面にはアルギン酸結合部位に繋がるトンネル構造が形成される。この特徴的なトンネル構造により、本トランスポーターが、オリゴ糖のみならず、高分子アルギン酸を輸送できることが示唆された。

（３）スーパー細菌の育種　*Sphingomonas* 属細菌 RW1 株は、ダイオキシン分解能を有する。A1 株の「超チャネル」をダイオキシン分解菌である RW１株へ分子移植し、ダイオキシン分解能の強化を図った。RW1 株は、導入された「超チャネル」遺伝子を構成的に発現し、その細胞表層に体腔を形成した。この「超チャネル」移植株は、液体培地中でダイオキシン類縁体を野生株の 2 倍の速さで分解するのみならず、土壌に混入したダイオキシン類縁体も効率よく分解した。

ABC transporter, alginate, *Sphingomonas*

講演番号：4SY23-4
講演日時、会場：3 月 27 日 14:45～ C 校舎 21 会場

大腸菌ペリプラズム空間での LPS の輸送は細胞質での ATP 加水分解エネルギーによって駆動される
Cytoplasmic ATP hydrolysis powers transport of lipopolysaccharide across the periplasm in E. coli

○奥田 傑、カーン ダニエル(ハーバード大)
○Suguru Okuda,Daniel Kahne(CCB, Harvard Univ.)

グラム陰性細菌の外膜は内側がリン脂質、外側がリポ多糖（LPS）からなる非対称な脂質二重層である。この外側のLPS層によって、グラム陰性細菌は過酷な環境や多くの抗生物質存在下で生存する事が可能である。LPSの生合成機構が詳細に研究されている一方、この疎水的な分子がいかにして親水的なペリプラズム空間を経由して内膜から細胞表層へと輸送されるのかは、生育に必須な7つのLpt (Lipoposysaccharide transport) 因子が関与しているということ以外は明らかではない。ABC (ATP binding cassette) トランスポーターLptBFGは内膜蛋白質LptCと、外膜β-バレル蛋白質LptDはリポ蛋白質LptEとそれぞれ複合体を形成している。ペリプラズム蛋白質LptAはN末端側がLptCと、C末端側がLptDのN末端のペリプラズム領域と相互作用して蛋白質の橋を形成し、内膜上のLptBFGC複合体と外膜上のLptDE複合体を繋いでいる。あらゆるLpt蛋白質の欠損株でLPSが内膜のペリプラズム側に蓄積することが報告されているが、これまでにLPSがLpt蛋白質に蓄積した輸送中間体は検出されたことがなく、LPSの輸送過程を観察することは困難であった。そこでまずはLpt蛋白質がin vivoでLPSと相互作用するのか、またそれはどの部位かを同定するため、光架橋性の非天然アミノ酸*p*BPA (*p*-benzoylphenylalanine) を立体構造が明らかになっているLptCとLptAの任意の部位に導入し、それぞれ23種類、14種類の変異体を作製した。LptCとLptAは共に良く似たβ-ゼリーロール構造をとっており、UV照射依存的にLPSとin vivoで架橋された変異体の側鎖はいずれもゼリーロール構造の内側を向いていることから、LPSはゼリーロール構造で形成される橋の内側を渡って内膜から外膜へと輸送されることが示唆された。また各Lpt因子の発現量を調節することによって、LPSはLptBFG、LptBFGC依存的にそれぞれLptCまたはLptAに蓄積することが示された。次にLPS輸送に必要な因子を調べるため、in vivoでLPSと架橋された変異体を用いてin vitroでの解析を試みた。その結果、LPSの内膜からLptCへの輸送にはLptBFGとATP、また内膜からLptAへの輸送にはLptBFGCとATPが必要なことが明らかになった。LptCに蓄積したLPSはATPaseの阻害剤であるバナジン酸存在下ではLptAへと輸送されず、LPSの内膜から細胞表層への輸送には少なくとも２つの段階 (内膜からLptC, LptCからLptA) でATPの加水分解エネルギーが必要であることが示唆された。またLpt蛋白質のLPS結合サイトは常にLPSで満たされていることもin vitroの実験により示唆され、LPSは細胞質におけるATP加水分解エネルギーを利用し、ペリプラズム空間に存在するLpt蛋白質の橋の上を互いに押し合いながら、内膜から細胞表層へと濃度勾配に逆らって輸送されると考えられる。

Gram-negative bacteria, Lipopolysaccharide, Lpt

講演番号：4SY23-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:00～ C 校舎 21 会場

大腸菌 β バレル型膜タンパク質の生合成に関わる BepA (YfgC)の機能解析

BepA (YfgC), a novel protease homolog involved in biogenesis of an essential β-barrel membrane protein in *Escherichia coli*

○成田 新一郎[1]、鈴木 健裕[2]、堂前 直[2]、秋山 芳展[1]([1]京大ウイルス研、[2]理研基幹研)
○Shin-ichiro Narita[1], Takehiro Suzuki[2], Naoshi Dohmae[2], Yoshinori Akiyama[1]([1]Kyoto Univ., [2]RIKEN)

大腸菌をはじめとするグラム陰性細菌は、細胞を取り囲む細胞質膜の外側にもう一つの膜構造、外膜を持っている。外膜は有害な物質の侵入を排除するなど、グラム陰性細菌の生育に極めて重要な役割を果たしている。外膜はリン脂質、リポ多糖、リポタンパク質、および β バレル型の外膜タンパク質の 4 つの必須構成因子からなる。外膜が選択的透過性を備えた透過障壁としての機能を発揮するためには、外膜構成因子の生合成機構とともに、これらの因子の状態をモニターし、変化に対応する品質管理・ストレス応答機構が重要である。σ^E 応答機構は大腸菌における主要な表層ストレス応答機構である。外膜タンパク質のミスフォールディングが起こると、転写因子 σ^E が活性化され、外膜機能の維持に必要な遺伝子群の転写が誘導される。*bepA* (*yfgC*)は σ^E によって制御される遺伝子で、ペリプラズムのメタロプロテアーゼをコードすると推定されている。*bepA* 欠失株が様々な薬剤に対して高感受性を示すことから、BepA は外膜機能の維持に関与していると考えられているが、その機能はよくわかっていない。

BepA のプロテアーゼ活性部位と推定される HExxH モチーフに変異を導入したところ、*bepA* 欠失株の薬剤感受性を相補する能力が失われたことから、BepA はプロテアーゼ活性を持ち、そのことが BepA 機能に重要であることが示唆された。また、BepA がリポ多糖の輸送に関わる外膜タンパク質 LptD の生合成に関わることを見出し、LptD が成熟過程で分子内ジスルフィド結合の異性化を経ること、BepA がその過程を促進することを明らかにした。LptD のジスルフィド結合異性化は、BepA プロテアーゼ活性部位変異体の発現によっても部分的に促進されたことから、BepA はプロテアーゼ活性とは独立したシャペロン様活性を持つものと推測される。さらに BepA は外膜タンパク質の生合成に関与する BAM 複合体と遺伝学的および物理的に相互作用することもわかった。これらの結果から、BepA は外膜タンパク質のアセンブリーを促進することによって外膜機能の維持に働くと考えられる。

bacterial cell surface, protease, extracytoplasmic stress responses

講演番号：4SY23-6
講演日時、会場：3 月 27 日 15:15～ C 校舎 21 会場

大腸菌のシグマ E 依存性プログラム死と長期定常期

Sigma E-dependent programmed cell death and long-term stationary phase in *Escherichia coli*

○山田 守[1,2]、村田 正之[1]、長光 博史[1]、川口 純平[1]、高坂 智之[2]([1]山口大院医、[2]山口大農)
○Mamoru Yamada[1,2], Masayuki Murata[1], Hiroshi Nagamitsu[1], Junpei Kawaguchi[1], Tomoyuki Kosaka[2]([1]Yamaguchi Univ. Grad. Sch. Med., [2]Yamaguchi Univ. Fac. Agri.)

大腸菌は、外部ストレスに対して外膜タンパク質 Omp の構造変化を介してシグマ E 制御遺伝子群を発現させて対処している。外部ストレスによる比較的弱い障害に対してはシグマ E 制御下の修復機構が働くが、強い障害に対しては Omp の発現を下げて溶菌を引き起こすことが示唆されてきた(1, 2)。このようにシグマ E 系は外部ストレスに対して重要な役割を担っているが、細胞内に蓄積する酸化ストレスなどの内部ストレスに対しても働いている(3, 4)。それらに加えて、シグマ E 系は死滅期から長期定常期においても重要な役割を果たしているようである。

RNA ポリメラーゼのシグマ因子の１つであるシグマ E は、通常、抗シグマ E 因子である RseA および RseB と結合して不活性型で存在する。熱などの外部ストレスに曝されると Omp の C 末端配列が DegS と結合し、これによって DegS は活性型プロテアーゼとなり、活性型 DegS は RseP とともに RseA を切断する。この一連の反応によって、シグマ E は活性型となって関連遺伝子群を発現する。

大腸菌を至適条件で培養すると定常期初期に活性酸素種が蓄積し、その後生きているがコロニーをつくれない細胞や死細胞が蓄積する (2,4)。その時期に溶菌が観察されるが、抗シグマ因子によって抑制されることからシグマ E 依存性の溶菌であると考えられる(2)。また、この時期に活性型シグマ E を増加させると溶菌が亢進する(1)。シグマ E による溶菌カスケードは最終的に Omp の発現抑制に至るが、これが溶菌の原因と考えられる(1)。この溶菌カスケードに欠失があると死滅期後の長期定常期が不安定となる。

1. M. Murata *et al*: A novel pathway directed by sigma E, which causes cell lysis, in *Escherichia coli*. *Genes Cells*, 17:234-247 (2012)
2. R. Noor *et al*: Dissection of sigma E-dependent cell lysis in *Escherichia coli*: Roles of RpoE regulators RseA, RseB and periplasmic folding catalyst PpiD. *Genes Cells,* 14: 885-99 (2009)
3. M. Murata *et al*: Molecular strategy for survival at a critical high temperature in *Eschierichia coli*. *PloS ONE*, 6(6): e20063 (2011)
4. R. Noor *et al*: Oxidative stress as a trigger for growth phase-specific sigma E-dependent cell lysis in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.,* 17: 177-187 (2009)

Sigma E, Programmed cell death, Long-term stationary phase

講演番号：4SY23-7
講演日時、会場：3 月 27 日 15:40～ C 校舎 21 会場

緑膿菌の多剤排出ポンプを構成するリポタンパク質の Tat 系を介する機能的発現

Functional expression of lipoprotein components of the xenobiotic extrusion pump, MexAB-OprM, via the Tat pathway in *Pseudomonas aeruginosa*

○米山 裕(東北大院農)
○Hiroshi Yoneyama(Tohoku Univ.)

リン脂質二重層からなる細胞膜は脂溶性の低分子を除き、各種溶質に対し透過障壁として機能するため、基質特異的な膜輸送体を介して栄養素あるいは代謝産物の細胞内外への輸送を行うことによって細胞内の恒常性を維持している。この物質輸送は疎水性のαヘリックスからなる膜貫通領域をもつ膜タンパク質に担われている。グラム陰性菌は、細胞膜(内膜)に加えリン脂質とリポ多糖を主成分とする外膜を有しており、βバレル構造からなる物質透過孔(ポーリン)を介して低分子化合物を透過させることによって細胞内の恒常性の維持に寄与している。これらの膜タンパク質は N 末端側にシグナル配列を有しており、普遍的なタンパク質分泌システムである Sec 系を介して内膜に組み込まれるか、あるいは内膜を透過しさらに外膜に組み込まれる。

近年、この外膜タンパク質のバイオジェネシスに関与するシステムとして、ペリプラズム内のシャペロンと共同して外膜タンパク質の外膜アセンブリーに関与する BAM 複合体が見いだされた。また、多くのグラム陰性細菌が有する外膜リポタンパク質はそれに特異的な Lol システムによってペリプラズム内を移動し外膜に移送されることが明らかとなっている。これらの内膜および外膜タンパク質はフォールディング前の状態すなわちスレディングした状態で翻訳後あるいは翻訳に共役して Sec 系を介して輸送される。一方、植物で最近見いだされたプロトン濃度勾配を利用する新規なタンパク質輸送系である Tat (Twin-arginine translocation)系は、Sec 系とは異なりフォールディングしたタンパク質を基質として認識し輸送する。また、Tat 系の基質となるタンパク質はシグナル配列内に保存された Arg-Arg (Twin-arginine)モチーフを有していることが知られている。

興味あることに、緑膿菌の病原因子の一つであるホスホリパーゼ C の分泌など多くの病原細菌の病原性に Tat 系が関与することが最近明らかとなってきた。また、Tat 系は動物細胞には存在せず多くの細菌に保存されていることから新規抗生物質の標的として関心がもたれている。そこで、我々はこの Tat 系を標的とした新規スクリーニング系を構築するために、緑膿菌の多剤排出ポンプである MexAB-OprM の内膜サブユニット MexA と外膜サブユニットであるリポタンパク質 OprM をレポーターとし、本来 Sec 系の基質である両タンパク質を Tat 系を介して内膜をトランスロケートする組換え体を構築した。本システムは Tat 系の生物学的機能を MexAB-OprM ポンプの機能すなわち組換え体の薬剤感受性の変化として捉えることができる簡便なスクリーニング系であることが明らかになると同時に、膜タンパク質のバイオジェネシスを解析するツールとなり得るものと考えられた。

Pseudomonas aeruginosa, Tat pathway, multidrug efflux pump

講演番号：4SY23-8
講演日時、会場：3 月 27 日 16:05～ C 校舎 21 会場

Corynebacterium glutamicum を用いたタンパク質分泌生産系(CORYNEX^{R})の応用展開～細胞表層構造の改変による異種タンパク質分泌生産量の向上～

Development of the CORYNEX^{R}: a novel protein secretion system using *Corynebacterium glutamicum* -Improvement of heterologous protein secretion by modification of the cell surface structure-

○松田 吉彦[1]、和地 正明[2]、菊池 慶実[1]([1]味の素(株)イノベーション研究所、[2]東工大院生命理工)
○Yoshihiko Matsuda[1], Masaaki Wachi[2], Yoshimi Kikuchi[1]([1]Ajinomoto Co., Inc., [2]Tokyo Institute of Technology)

Corynebacterium glutamicum はミコール酸含有放線菌群に属し、グラム陽性細菌ではあるがペプチドグリカン層の外側にミコール酸を主成分とする脂質膜を有している。これまでに、グルタミン酸をはじめとする多くのアミノ酸の工業的生産菌として 50 年にわたり利用されており、そのため、アミノ酸の生産性を向上させる目的から、数多くの基礎的研究がなされてきており、全ゲノム配列も既に決定されている。しかしながら、アミノ酸の重合体であるタンパク質の生産に関する研究はほとんど報告されていなかった。そこで我々は、*C. glutamicum* を用いた新しいタンパク質分泌系の開発を行ってきた。*C. glutamicum* のタンパク質分泌系の特徴としては、分泌している宿主由来タンパク質がほとんど無く発現させた異種タンパク質が高純度で蓄積する点、菌体外プロテアーゼ活性がほとんど無く分泌させたタンパク質が分解されない点、複雑なジスルフィド結合を有するタンパク質に関しても正常な構造を有する活性体での分泌発現が可能である点を挙げている。またこの系の汎用性を高める手段として、これまでの General secretion pathway(Sec 系)とは異なる新しいタンパク質分泌経路である Twin-arginine translocation pathway(Tat 系) を利用することを行った。その結果、従来の Sec 系では分泌発現が困難であったタンパク質の高分泌発現に成功している。

我々はこの新しいタンパク質分泌生産系を用い、Corynex®と名付けたタンパク質受託発現サービスを、主として日米欧の製薬企業を顧客として開始している。その結果、これまでの大腸菌をはじめとする既存のタンパク質生産系において発現させることが困難であったタンパク質に関し、それらを効率よく発現させる事に成功している。さらに近年は、拡大成長を続ける抗体医薬市場において、低分子抗体の一種である Fab(H 鎖断片と L 鎖からなるヘテロ二量体)が次世代抗体の重要な分子骨格として着目されており、高効率な Fab 発現系に対する顧客ニーズが高い。そこで我々は、新規の Fab 発現系として Corynex® による Fab 生産検討を開始したが、既存の宿主・ベクター系では Fab 生産量はごく微量であった。そこで、Fab 生産性向上を主眼として種々の取り組みを検討した結果、細胞表層の構築に関与する遺伝子を欠損することで Fab 生産量が顕著に向上することを見出した。即ち、*C. glutamicum* による Fab 分泌発現においては、細胞表層の透過段階が律速の一因となっていると考えられた。本発見により、ヘテロ二量体の Fab に関して H 鎖-L 鎖の会合状態での高分泌発現に成功している。

本シンポジウムでは、これら Corynex®の技術概要および細胞表層関連遺伝子の欠損による Fab 生産量向上に関して発表し、異種タンパク質生産における細胞表層構造の重要性について議論したい。

CORYNEX^{R}, *Corynebacterium glutamicum*, protein secretion

講演番号：4SY24-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:35～ A 校舎 41 会場

乳酸菌バクテリオシン（ナイシンとガセリシン）の機能特性と最新知見
Function properties of LAB bacteriocins (nisin and gassericins) and the latest topics

○川井 泰、郭 暁艶、水谷 陽、鈴木 はるか、齋藤 忠夫(東北大院農)
○Yasushi Kawai,Xiaoyan Guo,Akira Mizutani,Haruka Suzuki,Tadao Saito(Tohoku Univ.)

ヒト腸管から高頻度で検出されるプロバイオティック乳酸菌 *Lactobacillus gasseri*（ガセリ菌）には、バクテリオシン（抗菌ペプチド）を生産する株が多数存在する。これらバクテリオシンは、高い熱・pH 安定性と、乳酸菌やリステリア菌、バチルス菌、黄色ブドウ球菌などのグラム陽性食中毒・病原性細菌に対する抗菌効果を示し、食品保存剤としての応用が期待される。本シンポジウムでは、当研究室で見出した2種のガセリシンの構造決定、生合成機構、機能特性および食品への応用研究と共に、現在研究を進めている「ナイシン」の最新知見について紹介する。

ヒト乳児便由来の*L. gasseri* LA39株が生産する「ガセリシンA」は、N -末端と C -末端がペプチド結合した特徴的な環状構造を有している。環状ペプチドは、微生物からアカゲザルまでの広い生物種から 100 種類以上見出されているが、最も単純な原核生物における環状化機構や生物学的意義は詳しく解明されていないものが多い。ここではガセリシンA 生合成遺伝子クラスターの部分欠損あるいはガセリシンA 構造遺伝子への変異導入による生合成機構解明の進捗状況を併せて報告する。

ヒト乳児便由来の*L. gasseri* LA158株が生産する「ガセリシンT」は、相補的な二成分 GatA/GatX から構成される class IIb バクテリオシンである。最近、GatA および GatX に存在する、ヘリックス間相互作用や構造の安定化に関わるとされる複数の GxxxG モチーフがガセリシンT の抗菌活性に重要な役割を担っていることを明らかにした。また、GatA と GatX は単独でも抗菌的に作用し、かつ GatA と GatX の作用順序は抗菌作用に関係なく、GatA と GatX は別々に膜に作用出来ると共に、膜への挿入後に複合体となる可能性が高いと推定された。

ナイシンは、酪農用乳酸菌（*Lactococcus lactis*）により生産される、我が国を含む世界 50 ヵ国を超える国々で食品保存剤として使用されている唯一のバクテリオシン（lantibiotics）である。しかしながら、中性 pH 域では溶解性の低下から、抗菌効果が大幅に低減する欠点が知られている。当研究室では最近、中性 pH 域における効果的なナイシンの利用性としてエタノールに着目し、その高い相乗効果と熱安定性を見出した。また、ナイシンを感作した指標菌体のメタボローム解析により、低分子型バクテリオシンの特徴的な抗菌作用「標的菌の細胞膜に孔を形成し、低分子物質の流出から標的菌を死に至らしめる」に加えて、「ナイシンは、細胞内に乳酸などの有機酸を留め蓄積させることで抗菌効果を高めている」ことを明らかにした。以上、これら知見はバクテリオシン研究の益々の発展と、生合成および作用機構の解明に関わるブレイクスルーに繋がるものと期待される。

bacteriocin, nisin, peptide

講演番号：4SY24-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ A 校舎 41 会場

1073R-1 乳酸菌が産生する多糖体の免疫賦活作用と感染防御効果

Protective effects of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 against infections

○牧野 聖也[1]、池上 秀二[1]、伊藤 裕之[1]、永井 隆之[2,3]、山田 陽城[2,3]([1]（株）明治食機能研、[2]北里大生命研、[3]北里大院感染制御)
○Seiya Makino[1], Shuji Ikegami[1], Hiroyuki Itoh[1], Takayuki Nagai[2,3], Haruki Yamada[2,3]([1]Meiji Co., Ltd., [2]Kitasato Institute for Life Sciences, [3]Kitasato Univ.)

1073R-1 乳酸菌（*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1）はブルガリア国のヨーグルトから分離されたブルガリア菌であり、EPS（exopolysaccharide）を大量に産生することからその培養物は高い粘性を示すという特徴を持っている。そして、本 EPS については *in vitro* における B 細胞のマイトジェン活性やマクロファージ活性化作用といった免疫賦活作用が報告されている。本研究では 1073R-1 乳酸菌を含めた当社保有のブルガリア菌の中からインターフェロン(IFN)-γ産生誘導活性を発揮する EPS を大量に産生する菌株を選抜し、本株が産生する EPS と本株で発酵したヨーグルトのナチュラルキラー(NK)活性上昇効果と感染防御効果について検討した。

まず、当社が保有する 139 株のブルガリア菌の中から EPS 産生量が多い菌株を選抜し、産生 EPS のマウス脾臓細胞に対する IFN-γ産生誘導活性を評価した。その結果、1073R-1 乳酸菌が産生する EPS は 139 株の中で最も量が多く、IFN-γ産生誘導活性を発揮することが明らかとなった。また、本 EPS を 3 週間経口投与したマウスは脾臓細胞の NK 活性が上昇し、1073R-1 乳酸菌で発酵したヨーグルトについても同様の効果が確認された。そこで、これらの EPS、ヨーグルトを予め経口投与したマウスにインフルエンザウイルスを感染させたところ、マウスの生存日数が有意に延長した。したがって、これらの EPS、ヨーグルトは抗インフルエンザ活性を発揮することが明らかとなった。

次に、本ヨーグルトの摂取がヒトの免疫力に与える影響を明らかにすることを目的に健常高齢者を対象とした長期摂取試験を行った。試験は山形県舟形町、佐賀県有田町の２つの地域で実施し、それぞれ NK 活性の動きや風邪症候群への罹患状況について評価を行った。その結果、ヨーグルト摂取群では、摂取前に NK 活性が低かった被験者で摂取期間終了後の NK 活性が有意に上昇した。また、２つの試験を統合して解析した結果、ヨーグルト摂取群では牛乳摂取群に比べて風邪症候群に対する罹患リスクが有意に低下した。

今回、1073R-1 乳酸菌が産生する EPS、1073R-1 乳酸菌で発酵したヨーグルトについてマウスでの NK 活性上昇効果、抗インフルエンザ活性が明らかとなった。また、健常高齢者を対象とした試験では 1073R-1 乳酸菌で発酵したヨーグルトの摂取によって、低下した NK 活性が上昇し、風邪症候群に対する罹患リスクが低下した。これまでヨーグルトの健康効果といえば整腸作用が中心であったが、産生物質の免疫賦活作用を指標として発酵に使用する乳酸菌を選ぶことで、免疫力の向上、さらには感染防御効果を発揮する機能性ヨーグルトを開発できる可能性が明らかとなった。

immunostimulatory effect, exopolysaccharide, infection

講演番号:4SY24-3
講演日時、会場:3 月 27 日 14:25～ A 校舎 41 会場

妊婦・乳幼児におけるビフィズス菌投与によるアレルギー発症予防効果 --和歌山県での試験結果--

Primary Prevention of Allergic Diseases in Infants by Administration of Bifidobacteria to Prenatal Mothers and Infants, a Study Performed in Wakayama Prefecture

○肖 金忠(森永乳業)
○Jin-zhong Xiao(Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

近年、先進諸国における各種のアレルギー疾患の増加は著しく、特に我が国のスギ花粉症の増加は社会問題として認知されている。アレルギー疾患の成立には、遺伝的要因、環境要因が複雑に絡み合っていると考えられるが、先進国における清潔志向、少子化、予防接種の普及、抗生物質の乱用などによる微生物との接触機会の減少も原因の 1 つとして考えられている(hygiene hypothesis:衛生仮説)。演者らは和歌山県「紀の国森づくり基金活用事業」の一環として、平成 19 年～23 年わたり和歌山県における乳幼児の各種アレルギー疾患の有病率とその背景因子との関連の調査を行ったところ、乳幼児のアレルギー疾患の有病率には性差・家族のアレルギー歴・ペット飼育などの背景因子との関連性がみとめられたことや、乳幼児の乳酸菌製品摂取がアレルギー疾患の発症率の低下に寄与する結果が得られた。そこで、ビフィズス菌摂取によるアレルギー発症の予防効果を検証するために、妊婦及び乳児にビフィズス菌を投与する試験を実施した。

和歌山県御坊市、美浜町、日高町、由良町、日高川町、印南町に在住し、国保日高総合病院で出産を予定している妊婦を対象に、本人の意向に従ってビフィズス菌摂取群(B 群)と非摂取群(N 群)に分けた。B 群では妊婦には出産予定日の約 4 週間前から分娩までビフィズス菌粉末(*Bifidobacterium longum* BB536 と *B. br*eve M-16V、各 50 億/包)を 1 日 2 包、生まれた乳児には 6 ヶ月齢になるまで同粉末を 1 日 1 包摂取させた。両群とも定期健診時に各種アレルギー疾患の有無を医師の診察および母親のアンケートにより調査した。また、妊婦に対してビフィズス菌摂取前および分娩時、乳幼児に対しては各定期健診時に糞便サンプルを採取し、次世代シーケンサーにより菌叢の解析を実施した。

計 160 名の母子ペア(B 群 139 名、N 群 41 名)が試験に参加した。被験者の背景因子については家族のアレルギー歴が B 群において有意に高かった以外では群間に違いが見られなかった。乳幼児について、診察結果では、10 ヶ月及び 1 歳 6 ヶ月時の湿疹・アトピー性皮膚炎の有病率は N 群に比べて B 群が有意に低かった。母親へのアンケート調査においてもほぼ同様な結果であった。実施した 64 母子ペアの菌叢解析の結果では、母親では N 群に比べて B 群の分娩時における Proteobacteria の占有率が有意に低かった。4 ヶ月時および 10 ヶ月に湿疹・アトピー性皮膚炎を発症した乳幼児において、非発症グループに比べて 4 ヶ月時における Actinobacteria の占有率が有意に低く、Proteobacteria の占有率が高い傾向にあった。また、母親分娩時と乳児の 4 ヶ月時における Proteobacteria の占有率に有意な正の相関が見られた。

以上から、妊婦及び乳児へのビフィズス菌投与による乳幼児のアレルギー発症の初期予防に対する効果、ならびにその作用には妊婦および乳児の菌叢に対する影響が関与していることが示唆された。今後、全員が 3 歳になるまで観察を継続する予定である。本研究は和歌山県「紀の国森づくり基金活用事業」の助成によった。

参考文献

1. 榎本ら:アレルギー 55: 1394-1399, 2006.
2. Kalliomaki M, et al: Lancet 357: 1076-1079, 2001.
3. Xiao JZ, et al.: J Investig Allergol Clin Immuno l16: 86-93, 2006.
4. Xiao JZ, et al.: Clin Exp Allergy 36: 1425-1435, 2006.
5. 服部ら:アレルギー52(1):20-30, 2003.

Bifidobacterium, Allergy, Probiotics

講演番号：4SY24-4
講演日時、会場：3 月 27 日 14:50～ A 校舎 41 会場

Lactobacillus gasseri SBT2055 株（ガセリ菌 SP 株）の生理機能について

Health Benefits of *Lactobacillus gasseri* SBT2055

○瀬戸 泰幸(雪印メグミルク（株）ミルクサイエンス研)
○Yasuyuki Seto(Megmilk Snow Brand Co., Ltd.)

Lactobacillus gasseri はヒト腸管内の常在菌として高頻度に分離され、*Lactobacillus* 属細菌では *L. reuteri* や *L. salivarius* とともにヒト腸内の最優勢菌種とされる[1)]。そこで、我々はプロバイオティクスとして *L. gasseri* に着目し、当社保有株の中から SBT2055 株（ガセリ菌 SP 株）を選抜して研究を進めてきた。本発表では *L. gasseri* SBT2055 株の特長と最近の研究成果について報告する。

SBT2055 株は人工消化液試験で高い生残率を示し、腸管細胞 caco-2 への接着性も有する。そこで、8 名の被験者に 1×10^{11} 個の SBT2055 株を 1 日 1 回、7 日間摂取してもらい、経時的に糞便中の菌数を測定し、SBT2055 株の実際の腸管での滞留性を評価した。その結果、SBT2055 株は 8 名中 4 名の被験者で 90 日後も糞便中から検出された[2)]。摂取した菌がこのような長期間検出される例は少なく、本結果は SBT2055 株の高いプロバイオティクス適性を示すものと考える。

近年、我々は *L. gasseri* SBT2055 株の新しい機能として、内臓脂肪の蓄積抑制作用を見出した。4 週齢の SD ラットに対し、SBT2055 株の脱脂乳培養物を含む飼料を 4 週間投与したところ、対照飼料と比較して腸間膜白色脂肪細胞サイズの有意な減少が認められた[3)]。そこで BMI 値が高めの被験者 87 名を、SBT2055 株含有発酵乳を摂取する群（G 群）と含有しない発酵乳を摂取する群（N 群）の 2 群に分け、二重盲検並行群間比較試験を実施した。各発酵乳を 12 週間摂取後、CT により内臓脂肪の占める面積を測定した結果、G 群では摂取前と比べ内臓脂肪で平均 4.6%、皮下脂肪で平均 3.3%減少した。また、N 群に対しても有意な減少を示していた。したがって、*L. gasseri* SBT2055 株はヒトに対しても内臓脂肪の蓄積抑制効果があることが明らかとなった[4)]。メカニズムの解明が今後の課題であるが、脂質の体内吸収の抑制や、近年肥満との関連が指摘されている慢性炎症状態の抑制といった観点から現在解析を進めている。今後のメカニズムの検討を通じ、*L. gasseri* SBT2055 株のより詳細な機能性を明らかにしていきたい。

（参考文献）

1) Reuter G, *Curr Issues Intest Microbiol.* **2**, 43-53(2001)
2) Fujiwara S et al., *J Appl Microbiol.* **90**, 343-52(2001)
3) Sato M et al., *Br J Nutr.* **99**, 1013-7(2008)
4) Kadooka Y et al., *Eur J Clin Nutr.* **64**, 636-43(2010)

Lactobacillus gasseri SBT2055, intestinal adhesion, abdominal adiposity

講演番号：4SY24-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:15～ A 校舎 41 会場

植物性食品由来、*L.brevis*KB290 のゲノム安定性、機能性、酵素活性における新知見

New aspects of genomic stability, functionality and enzyme activity in the plant derived lactic acid bacteria, *L.brevis*KB290.

○矢嶋 信浩(カゴメ株式会社総合研究所)
○Nobuhiro Yajima(Research Intitute, Kagome Co., Ltd.)

Lactobacillus brevis KB290 は京漬物「すぐき」より分離された植物性食品由来の乳酸菌である。本菌の形態学的特徴の一つとして細胞外多糖を形成し、消化液に強い耐性を示すことが知られている。ヒトにおける機能的な特徴として、便通の改善や腸内菌叢の改善などの整腸作用、そして経口摂取による細胞傷害活性の上昇やインターフェロン-α産生能の亢進などの免疫賦活作用が報告されている。本シンポジウムでは、ゲノム解析から得られた本菌のゲノム安定性や細胞および動物実験から得られた免疫調節機能、酵素活性など *L. brevis* KB290 に関する新知見を紹介する。

ゲノム解析とゲノム安定性：次世代シークエンサーを用いてゲノム解析を行った。本菌は 9 種類（pKB290-1～9）のプラスミド（42～6 kb）を安定的に保有しており、それらには他乳酸菌で報告されている遺伝子と比較して、KB290 に特徴的な遺伝子がコードされていた。また、約 2.3MB の染色体のゲノムも安定的維持されていることが示唆された。

免疫調節機能：マウスを用いて KB290 の細胞傷害活性上昇メカニズムの解明を試みた。KB290 を混餌投与したマウス脾臓における細胞傷害活性は、対照群に比べ有意に高値であった。KB290 群の脾臓における経時的な遺伝子発現変化を網羅的に解析し、Gene Ontology 解析、KEGG PATHWAY 解析を行ったところ、細胞傷害活性に関与すると考えられる“positive regulation of T cell mediated cytotoxicity”および“Natural killer cell mediated cytotoxicity”カテゴリーにおいて発現亢進した遺伝子の割合が有意に多かった。さらに、MHC class I の構成タンパク質の多くの遺伝子の発現が亢進しており、また、NK 細胞活性化シグナル伝達に関わる遺伝子の多くも発現が亢進していた。今後は、細胞レベルで詳細な解析を行う予定である。

また、日本において深刻な問題となりつつある腸管炎症に対する KB290 の効果も検討している。ヒト樹状細胞モデルを用いた検討では、KB290 とレチノイン酸（ビタミン A の代謝体）の併用が腸管炎症に効果的であることが示唆されている。今後は、大腸炎モデル動物に対する効果も確認していく予定である。

ラクトース資化性酵素の特性：*L. brevis* は、ラクトースを資化できないと考えられてきた。API 50CHL を用いて糖資化性を調べた結果、ラクトースは培養 1、2、7 日ですべて陰性であり、KB290 もラクトースを資化しないと判定された。しかし、実際にラクトースを糖源とする培地を用いて KB290 を培養すると、非常に緩慢ながらも生育することが判明した。本菌株では、D-グルコースによるβ-ガラクトシダーゼの発現抑制（カタボライト抑制）が認められなかった。遺伝子解析の結果、リン酸化酵素である 6-phoshofructokinase の構造遺伝子が欠損しており、カタボライト抑制に必要なフルクトース-1,6-ビスリン酸を作れないことが示唆された。このためにβ-ガラクトシダーゼを構成的に発現していると推測された。また、本酵素の推定分子量は 72 kDa および 37 kDa であり、ヘテロダイマーであることが示唆された。ラクトース資化が緩慢である理由として、細胞膜上のラクトース輸送体（パーミアーゼなど）の阻害が生じている可能性が高く、主に植物基質中に生息する *L. brevis* にとって、ラクトース資化の速度は、選択優位性をもたらさなかったと考えられた。

L. brevis　KB290, genome, function

講演番号：4SY24-6
講演日時、会場：3月27日 15:40～ A校舎41会場

乳酸菌における血圧降下ペプチドの生産制御と生体作用の解析

Regulatory release of anti-hypertensive peptide in lactobacilli and its in vivo mode of action

○山本 直之(カルピス株式会社 研究戦略部)
○Naoyuki Yamamoto(Research and Development Planning Department, Calpis Co., Ltd.)

過去に多くの血圧降下ペプチドが食品蛋白質の酵素分解物や発酵食品から単離され報告されてきた。我々の研究においては、乳酸菌の中で*Lactobacillus helveticus* は蛋白質分解作用が最も強く、その発酵乳において特に血圧降下作用が強く、VPP（Val-Pro-Pro）とIPP（Ile-Pro-Pro）がその有効成分があることを明らかにしてきた。一方、これらの有効成分を強化すべく乳酸菌の育種・改良を進めてきたが、発酵に従い発酵乳内に生産・蓄積されたペプチドやアミノ酸が蛋白質分解系遺伝子群の発現に抑制的に影響を与えることが示され、発酵乳内のペプチドの生産が抑制されることが明らかとなった。今後の乳酸菌発酵乳に関連した機能性ペプチドの産生強化における乳酸菌の育種改良に向けて、蛋白質分解系遺伝子群の制御システムに関しての解析を進め、関与成分とその制御遺伝子に関する新規システムの存在を明らかにした。これらの*L. helveticus* のアミノ酸濃度に応答する新規遺伝子発現制御システムに関してまとめて紹介する。

一方、血圧降下ペプチドの多くは生体内での血圧調節に重要な役割を果すアンジオテンシン変換酵素(ACE:Angiotensin I-Converting Enzyme)の阻害ペプチドとして、開発・実用化が進められてきた。しかし、多くのACE阻害ペプチドは医薬品との作用の違いや生体内での作用メカニズムなど不明な点が多い。そこで、今回VPPとIPPを用いた動態試験を実施してペプチドの組織移行性や局在性を評価し、さらに組織における血圧関連遺伝子群の発現解析を実施した。以上の動態試験結果をもとに両ペプチドの生体におけるACE阻害作用の可能性について考察したい。

proteolytic system, anti-hypertensive peptide, pharmacokinetic study

講演番号：4SY24-7
講演日時、会場：3 月 27 日 16:05～ A 校舎 41 会場

プロバイオティクス機能の分子機構解明に向けたビフィズス菌の遺伝子欠損導入系の開発
Development of a markerless gene deletion system in *Bifidobacterium longum* for elucidation of molecular mechanisms of probiotic functions.
○吹谷 智、平山 洋佑、横田 篤(北大院農・応生科)
○Satoru Fukiya,Yosuke Hirayama,Atsushi Yokota(Hokkaido Univ.)

ビフィズス菌はヒトの健康に有用な効果を示すプロバイオティクスとして広く知られている．しかしながら，ビフィズス菌が示すプロバイオティクス機能の分子機構については，不明な部分が多い．その原因の一つとして，ビフィズス菌の遺伝子機能を調べるために必要な遺伝子操作系の開発が，他の細菌種と比べて遅れていることが挙げられる．

我々はこの状況を鑑みて，ビフィズス菌の遺伝子操作系の開発を進めている．本発表では，直接的な遺伝子機能解析に必須の技術である遺伝子欠損導入系として，我々が最近確立した二重相同組換え法によるビフィズス菌の標的遺伝子欠損技術と，その遺伝子機能解析への応用について紹介する．

技術開発の要点として，我々はプラスミドの複製機構を利用して，二回目の相同組換えの効率化を図った．まず遺伝子欠損導入用ベクターとして，ビフィズス菌のプラスミド複製に必要なタンパク質 RepA の遺伝子が欠失したプラスミド pBS423-Δ*repA* を作成した．標的遺伝子の相同領域を pBS423-Δ*repA* に組み込み，*Bifidobacterium longum* 105-A に導入すると，一回目の相同組換えにより pBS423-Δ*repA* がゲノム上の標的遺伝子領域に組み込まれたベクター挿入株を得ることができる．

次にこの株に，pBS423-*ΔrepA* と不和合性であり，RepA を産生できるプラスミドである pTBR101-CM を導入する．この導入により，細胞内に RepA が供給され，染色体上の pBS423-Δ*repA* の複製が誘起される．この複製が染色体の複製と干渉し，生育阻害を起こすので，これを回避するために pBS423-Δ*repA* の染色体からの切り出し，つまり二回目の相同組換えが効率的に起こると予測した．

実際にプレバイオティクスとして知られているラフィノースの資化に関与する α-ガラクシダーゼの推定遺伝子 *aga* を標的として，遺伝子欠損導入を試みた．その結果，pTBR101-CM を導入することにより，二回目の相同組換え体の出現頻度は 99.9%となり，導入しなかった場合の 960 倍に上昇した．この出現頻度の上昇により，最終的に 4 株の Δ*aga* 株を取得することができた．Δ*aga* 株はラフィノースおよびメリビオースの資化性が失われており，α-ガラクシダーゼ活性も検出されなかった．一方，プラスミドを用いて Δ*aga* 株に *aga* を相補した株では，検出された表現型が野生株並みに回復した．

このように，プラスミドの複製機構を利用して，ビフィズス菌に遺伝子欠損を導入する手法を確立することができた．本手法では，外来配列が残らないマーカーレス欠損を導入できるため，多重変異株の構築も可能である．本手法を活用することにより，ビフィズス菌のプロバイオティクス機能について，その分子機構の解明が大きく進展することが期待される．

Bifidobacterium, probiotics, gene deletion system

講演番号：4SY25-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:35～ C 校舎 22 会場

バイオミネラリゼーション：ゲノムの解読とその応用
Biomineralization: Genome decoding and its application
○佐藤 矩行(沖縄科学技術大学院大学)
○Nori Satoh(Okinawa Inst. Sci. Tech. Grad. Univ.)

ゲノムはある生物の遺伝情報の 1 セットであり、かつ全遺伝情報である。従って、ゲノムの解読は、個々の遺伝子を取り扱ってきたこれまでの研究とは幾分趣を異にし、まず全遺伝子情報を手に入れ、そこから研究を展開していこうという目的をもって進められる。次世代シーケンサーなどの技術開発により、ゲノム解読はこれまでよりも飛躍的に早くかつ安価に行えるようになってきたとはいえ、それでも例えば仮に 500 Mb 近い動物のゲノムを新規に読み上げようとすれば、それなりの費用と長時間にわたる多数の研究者の努力が必要になる。私達沖縄科学技術大学院大学マリンゲノミクス研究グループの遠い将来の夢は、全動物門のゲノムを解読し、それを全ての研究分野に役立てることである（実際すでに多くの動物のゲノムは解読されており、残っているのはいわゆる触手冠動物を中心にした 10 門程度である)。

そのような目的および個々の研究目的もあって、我々は 2011 年にサンゴの一種コユビミドリイシのゲノムを解読した。サンゴは刺胞動物の中で炭酸カルシュウムの骨格を作り出すという特殊な能力を備えており、そのゲノムにはバイオミネラリゼーションに関わる多くの遺伝子が含まれている。我々はまた 2002 年にアコヤガイのドラフトゲノム解読をした。アコヤガイゲノム情報は現在多くの研究者に使われ、バイオミネラリゼーションに関わる遺伝子の同定が進みだしている。

また最近になって我々は（東大・遠藤一佳研との共同研究)、碗足動物シャミセンガイのゲノム解読を進めている。もしデータが得られれば、シャミセンガイにおけるバイオミネラリゼーション関連遺伝子についても述べてみたい。

genome, biomineralization, genes

講演番号：4SY25-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:15～ C 校舎 22 会場

有機・無機ハイブリッド構造を持つ貝殻真珠層の形成に関与する基質タンパク質の機能と分子進化
Molecular evolution and functional analyses of matrix proteins in the nacreous layer consisting of the organic-inorganic hybrid microstructure.

○鈴木 道生[1]、小暮 敏博[2]、長澤 寛道[1]([1] 東大院農、[2] 東大院理)
○Michio Suzuki[1], Toshihiro Kogure[2], Hiromichi Nagasawa[1]([1]Univ. Tokyo, [2]Univ. Tokyo)

真珠は真珠層と呼ばれる微細構造を有する貝殻を持つ貝類によって形成される宝石である。真珠層の構造を電子顕微鏡で観察すると、レンガが積み重なったような構造をしている。この構造はレンガに対応する炭酸カルシウム（アラゴナイト）結晶と、モルタルのようにその間に挟まった有機薄膜によって形成されている。このような有機-無機のハイブリッド構造から真珠層が構成されることで、非常に強い強度と剛性を持ち、また真珠光沢のような美しい模様を描き出す。このような精密な構造を軟体動物がどのように作り出すのか、その分子メカニズムは多くの人が注目するところである。

私達は近年、二枚貝であるアコヤガイ（*Pinctada fucata*）の貝殻真珠層の形成に重要な役割を果たすと考えられている酸性の基質タンパク質である Pif の構造と機能を明らかにした[1]。Pif は Pif 97 と Pif 80 という 2 つのタンパク質から構成され、Pif 97 はタンパク質間相互作用に働く VWA domain と chitin-binding domain を有し、Pif 80 はアスパラギン酸に富みアラゴナイト結晶結合活性を有していた。

これまで、多くの種類の貝類の貝殻から基質タンパク質が同定されているが、系統関係の遠い種間で共通に存在するタンパク質はほとんど判明しておらず、種を超えて共通に存在する石灰化に重要な因子は不明のままであった。そこで、もし Pif が真珠層のアラゴナイト結晶形成に重要な因子であるならば、多くの貝類に保存されていると考え、その探索を行った。まずは近縁種である *Pinctada margaritifera*, *Pinctada maxima*, *Pteria penguin* からホモロジークローニングにより Pif の相同分子を同定した。しかし、系統関係が離れたムラサキイガイ、*Mytilus galloprovincialis* からはホモロジークローニングにより配列を得ることはできなかった。そこで、炭酸カルシウム結晶結合活性を指標に探索したタンパク質のアミノ酸配列を決定したところ、Pif と同様のドメイン構造を持つことが判明した[2]。さらに全ゲノムが明らかにされている巻貝、*Lottia gigantea* のデータベースより Pif 関連タンパク質を明らかにした。これらの配列の比較の結果、Pif 97 に相当するタンパク質の VWA domain や chitin-binding domain が保存されていた一方で、Pif 80 に相当するタンパク質の配列は大きく異なっていた。しかし、詳細な配列解析を行った結果、Pif 80 に相当するタンパク質の一部の配列が laminin G ドメイン由来であることが明らかになった。これらの結果は、全ての Pif 分子が共通の祖先分子から進化し、貝類の貝殻石灰化にとって基本となる重要な因子であることを示唆している[3]。

[1] Suzuki et al. (2009) Science 325, 1388-1390. [2] Suzuki et al. (2011) ChemBioChem 12, 2478-2487.
[3] Suzuki et al. Mar. Biotechnol. in press, DOI 10.1007/s10126-012-9471-2.

aragonite, nacre, Pif

講演番号：4SY25-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:40～ C 校舎 22 会場

バイオミネラリゼーションでの結晶成長”その場”観察

In-Situ Observation of Crystal Growth in Biomineralization

○塚本 勝男[1]、吉崎 泉[2]、山田 啓文[3]、荒木 優希[1]、佐藤 久夫[4]([1]東北大院理、[2]JAXA、[3]京大院工、[4]三菱マテリアル)
○Katsuo Tsukamoto[1], Izumi Yoshizaki[2], Hirofumi Yamada[3], Yuki Araki[1], Hisao Satoh[4]([1]Tohoku Univ., [2]JAXA, [3]Kyoto Univ., [4]Mitsubishi Materials)

バイオミネラリゼーションと言われる結晶化は殆どが水溶液からの核形成とそれに続く結晶成長課程である。私たちは水溶液からの結晶の成長メカニズムを理解するために、成長過程を分子レベルで光学的に“その場”観察・測定を行う手法を開発してきた。例えば、動的光散乱法、位相シフト干渉法などがあげられる。それらを、溶液からの結晶の結晶化に適用することで、結晶化における準安定相と安定相の違いなどを明らかにしてきた。

一方、タンパク質やアミノ酸の結晶化、その無機塩に及ぼす影響などを、結晶形態や速度の点でも明らかにしてきた。これらの研究は、実験室レベルの研究にだけでなく、宇宙ステーションなどの無重力環境での“その場”観察にも発展させており、現在、宇宙環境での対流の無いときの結晶成長速度の測定を精力的に行っている。これらの結果はかなりショッキングである。例えば、対流を抑えると結晶成長速度は遅くなると考えがちである。しかし、実際には２倍程度速くなることも明らかになっている。また、無重力で速度の変動に影響する対流を抑えても、別の理由で結晶成長速度が振動するなど新しい結果が得られている。

これらの実験と解析は、無機塩とタンパクやアミノ酸などの有機分子との相互作用に関する新しい情報をもたらした。しかし、結晶成長過程における、これらの相互作用を直接的に見るために、結晶界面近傍の原子レベルでの“その場”観察をスタートしている。これは、周波数変調原子間力顕微鏡（FM-AFM）という従来の AFM より数１０倍感度が良い観察装置である。そのお陰で、例えば、方解石の表面での原子位置やペプチドの吸着状態、あるいは、界面近傍の水和の構造までを、結晶の成長中に見ることが出来るようになったのは新しい。

これらの新しい手法を用いることで得られたバイオミネラリゼーションやその応用分野での最新情報を報告したい。

crystal growth, biomineral, interface

講演番号：4SY25-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:10～ C 校舎 22 会場

マベ真珠バイオミネラリゼーションの分子機構と機能性材料への応用

Molecular mechanism of biomineralization of Pteria penguin nacre and its application for functional materials

○小川 智久(東北大院生命)
○Tomohisa Ogawa(Tohoku Univ.)

生物が創り出す硬組織であるバイオミネラルは、たとえば真珠貝の外殻の稜柱層カルサイトと内殻の真珠層アラゴナイトの２種の炭酸カルシウム相を見事に作り分けている例にみられるように、その構造や結晶系を厳密に制御するシステムが存在する。そのバイオミネラルのもつ巧妙な構造・機能を明らかにし、特徴を利用することで新規の機能性ナノ材料を創り出すことが期待できる。

これまで我々は真珠貝であるマベガイ（*Pteria penguin*）の外套膜分泌液より，真珠バイオミネラリゼーションに基質タンパク質として関わるジャッカリン様レクチンとそのホモローグ（PPL2A, PPL2B, PPL3, PPL4），およびアラゴナイト結晶配向性に関わる26kDaADPリボシルトランスフェラーゼ様タンパク質（ART26P-1およびART26P-2）を単離し，それらの一次構造を明らかにした。また，これらタンパク質のD型幼生におけるノックダウン実験およびin vitroでの炭酸カルシウム結晶実験より，PPL2A, PPL2BとPPL4，および26kDaADPリボシルトランスフェラーゼ様タンパク質が真珠アラゴナイト形成に重要であることが判明した。しかしながら，これらのタンパク質がどのように機能して，真珠アラゴナイト結晶形成を制御しているのか，そのメカニズムは不明であった。

最近我々は，真珠アラゴナイトマトリックスタンパク質のプロテオーム解析により，ジャッカリン様レクチンおよび26kDaADPリボシルトランスフェラーゼ様タンパク質の多くが，リン酸化されていることが判明した。また，PPL2Aのアラゴナイト様結晶形成促進作用が，PPL2Aの特異糖であるトレハロースによってさらに増加することがわかり，マベガイ真珠マトリックスタンパク質は，糖鎖との相互作用あるいはリン酸化により，そのバイオミネラリゼーション機能が制御されていることが示唆された。

本シンポジウムでは，マベガイ真珠形成に関わる２種のマトリックスタンパク質を中心に真珠バイオミネラリゼーションの分子機構について紹介し，さらにタンパク質のリン酸化を利用した新規機能性材料創製の取り組みについても，その一端を紹介したい。

biomineralization, protein, pearl shell

講演番号：4SY25-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:35～ C 校舎 22 会場

バイオミネラリゼーションに倣いそれを超える機能材料構築へのアプローチ
Development of New Functional Materials Inspired by Biomineralization
○加藤 隆史(東大院工)
○Takashi Kato(The Univ. of Tokyo)

今後の機能性材料の開発においては、分子レベルの構造制御と高機能化、製造時における低エネルギー消費などが大きな課題である。ここで良い手本となるのが、貝殻真珠層や骨に代表されるバイオミネラルである。生体は、精緻な構造を有するバイオミネラルを、温和な条件の下、モルホロジー・サイズ・多形・結晶軸などを制御しながら形成している。本講演では、結晶化を制御する有機分子と無機化合物の自己組織化を利用することにより、バイオミネラルに倣いそれを超える機能性ハイブリッド材料を構築するアプローチについてのべる[1]。バイオミネラルの精緻な階層構造は、タンパク質や多糖などの生体高分子が自己組織化能力を利用して無機結晶の結晶成長を制御することにより形成される。我々は貝殻真珠層の形成機構に学び、不溶性高分子と水溶性高分子、および無機イオンの協同的な相互作用を利用した薄膜状の炭酸カルシウム結晶の形成を報告してきた[1-4]。結晶成長マトリクス高分子の主鎖構造や官能基を変化させる事により、薄膜結晶の多形やモルホロジー・結晶軸の配向を制御することができた[2]。たとえば、プルランなどの多糖やポリビニルアルコール誘導体から形成されるヒドロゲルを結晶成長基板として用いると、周期構造を持つ無機結晶の薄膜を形成した[3]。さらに、刺激応答性高分子による結晶成長制御に着目し、側鎖に光応答性置換基を有するマトリクスを合成した[4]。炭酸カルシウムの薄膜結晶を成長させると、光照射・非照射によりモルホロジーの異なる薄膜が得られた。このように、バイオミネラルに倣う人工系では、天然のバイオミネラルでは用いられない素材からハイブリッド構造を構築することができ、新しい機能材料への展開が期待される。

参考文献

[1] 加藤隆史, 高分子, **60**, 685 (2011); T. Kato, et al., *MRS Bulletin* **35**, 127 (2010); 加藤隆史監修, バイオミネラリゼーションとそれに倣う新機能材料の創製, シーエムシー出版, 2007; T. Kato, *Adv. Mater.* **12**, 1543 (2000).
[2] H. Kumagai, T. Nishimura, H. Nagasawa, T. Kato, et al., *Faraday Discuss*. **159**, 483 (2012).
[3] A. Sugawara, T. Kato, et al., *Angew. Chem. Int. Ed*. **42**, 5299 (2003); T. Sakamoto, T. Kato, et al., *Cryst. Growth Des*. **9**, 622 (2009).
[4] T. Sakamoto, T. Nishimura, T. Kato, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 5856 (2011).

Biomineralization, Calcium Carbonate, Organic/Inorganic Hybrids

講演番号：4SY25-6
講演日時、会場：3 月 27 日 16:15～ C 校舎 22 会場

磁性細菌における酸化鉄磁気微粒子の形態制御機構

Morphology control mechanism of iron oxide particles in magnetotactic bacteria

○新垣 篤史(農工大院工)
○Atsushi Arakaki(Tokyo Univ. Agric. Technol.)

磁性細菌は、水環境中に見られる細菌の一つで、細胞の中に形成した小胞内に鉄イオンを取り込み、これを結晶化することで酸化鉄磁気微粒子を合成する能力を持つ。磁気微粒子の形態やサイズは細菌種によって大きく異なり、化学合成法では作ることの難しい伸長した多面体や弾丸状などの複雑な形態を持つ磁気微粒子も見られる。磁気微粒子の磁気特性は形態やサイズに大きく依存することから、この合成機構を理解し利用することで、産業分野で求められる多様な形態の磁気微粒子の合成が可能になると期待される。

これまで我々は、分子生物学的な手法を用いて磁性細菌の合成する磁気微粒子の形成機構の解析を行ってきた。特に、磁気微粒子の表面に局在するタンパク質の解析を行う中で、粒子表面に局在し、磁気微粒子の合成に直接関与すると考えられる約 5～13 kDa の 4 つの新規タンパク質を分離した[1)]。これらのタンパク質は、N 末端部にグリシンとロイシンの繰り返し配列を含む疎水性の領域と、C 末端部には酸性アミノ酸に富んだ親水性の共通領域を有する。*in vitro* における磁気微粒子合成の結果から、Mms6 タンパク質はこのような特徴的な領域を介して酸化鉄結晶と相互作用し、形態の制御に関与していることが考えられた[2, 3)]。そこで相同性組換え法を用いて 4 つのタンパク質をコードする遺伝子を欠損させた遺伝子組換え株を作製し、細胞内でのタンパク質の機能解析を行った。電子顕微鏡による解析の結果、野生株の磁気微粒子は、粒径約 40 nm の球形を示し、(100)と(111)面から構成される切頂八面体の構造を有するのに対し、*mms6* 遺伝子欠損株の磁気微粒子は伸長した多面体を示した。また *mms6* 遺伝子欠損株の磁気微粒子には(110)面が高い頻度で観察され、一般的にはあまり見られない(210), (211), (311)面などの結晶面の存在が確認された[4)]。同様に、他の遺伝子欠損株においても磁気微粒子の形態やサイズに変化が見られた。よって、これら 4 つのタンパク質は、主に結晶の成長過程において機能し、酸化鉄表面の特定結晶面と相互作用することで粒子の形態制御に関与していることが考えられた。今後、遺伝子組換えによってタンパク質の発現を制御することで、多様な形態、サイズを持つ磁気微粒子材料の開発に繋がることが期待される。

1) A. Arakaki et al., *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 8745.
2) Y. Amemiya et al., *Biomaterials* **2007**, *28*, 5381.
3) A. Arakaki et al., *J. Colloid Int. Sci.* **2010**, *343*, 65.
4) M. Tanaka et al., *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 6386.

Bacteria, Iron oxide

講演番号：4SY26-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:35～ C 校舎 25 会場

マイクロフロー合成法を駆使する高効率天然物合成

Efficient Natural Product Synthesis Assisted by Microflow Reactors

○布施 新一郎(東工大院理工)
○Shinichiro Fuse(Tokyo Institute of Technology)

微小な流路を反応場とするマイクロフローリアクターを利用して通常のフラスコを用いた場合では実現し得ない反応成績を得ることが可能である。演者は、1)光反応において、マイクロフローリアクターが薄い反応場を持つため光の減衰を抑え、副反応を抑制しつつ効率的に反応を進行させられる点、2)瞬間的な混合操作を実現できるため、反応時間を秒単位以下で厳密に制御することが可能である点、3)常に少量の化合物をリアクター内で取り扱うため、爆発物・毒物を扱う際の危険性を低減できる点といったマイクロフローリアクターの利点に着目してビタミン D_3 やその類縁体、ペプチドの効率合成に利用したので報告する。

プロビタミンD_3類の光および熱反応によるビタミンD_3類の変換は工業法でも利用されているビタミンD_3類の重要な合成手法である。演者らは図 1 に示す光反応マイクロフローリアクターと光・熱同時反応マイクロフローリアクターを組み合わせることにより副反応を抑制しつつ目的物を収率良く得ることに成功した。[1)]

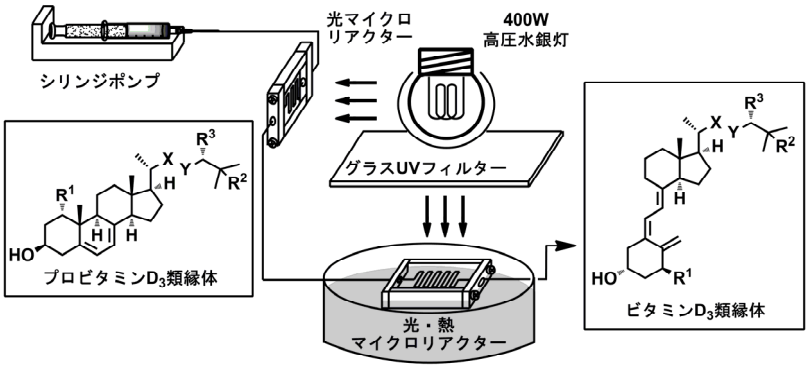


図 1

ペプチドをエピメリ化させることなく効率的に合成する手法は極めて重要である。演者らは、図 2 に示すように、猛毒のホスゲンを 1 つ目のマイクロミキサー内で塩基とトリホスゲンを混合することにより必要最小量発生させ、即時カルボン酸の酸塩化物化に利用し、2 つ目のマイクロミキサー内で求核剤と反応させて [2)]ペプチドを高収率で得る条件を確立した。本手法では、反応性の低いアミノ酸を求核剤とし、エピメリ化しやすいアミノ酸をカルボン酸として用いても、目的物を高収率で得られる。

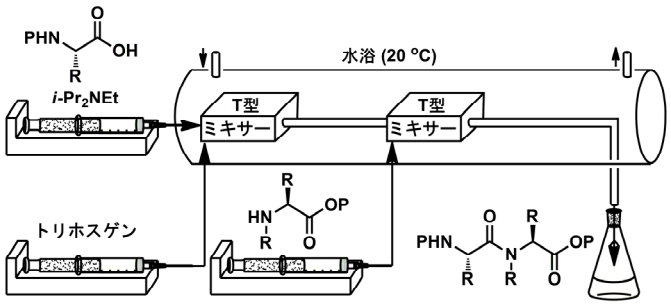


図 2

参考文献：1) a) S. Fuse, Y. Mifune, N. Tanabe, T. Takahashi *Org. Biomol. Chem*, 2012, *10*, 5205. b) S. Fuse, N. Tanabe, M. Yoshida, H. Yoshida, T. Doi, T. Takahashi *Chem. Commun.*, 2010, *46*, 8722. 2) S. Fuse, N. Tanabe, T. Takahashi *Chem. Commun.*, 2011, *47*, 12661.

microflow, vitamin D, peptide

講演番号：4SY26-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:10～ C 校舎 25 会場

組換え微生物を利用した新規物質創製

Production of novel metabolites exploiting genetically engineered microorganisms.

○勝山 陽平、大西 康夫(東大院農生科応生工)
○Yohei Katsuyama,Yasuo Ohnishi(The University of Tokyo)

フレミングによりペニシリンが発見され、それがフローリーらにより実用化されて以来、多くの医薬品あるいはリード化合物が天然物より発見されてきた。有機化学的に合成された医薬品の中にも、天然物の構造を参考に創製されたものも多い。天然物を用いた医薬品開発と有機合成化合物ライブラリーを用いた医薬品開発のどちらが優れているかは一概には言えないが、構造多様性や光学活性中心の立体選択性などにおいて、天然物は有機合成化合物ライブラリーより優れた性質を持っていると考えられる。このような天然物の長所をより有効に利用するために、多くの科学者が遺伝子組換え技術を用いて生合成経路をエンジニアリングし新規化合物を生産することを試みている。このようなエンジニアリング技術はコンビナトリアル生合成と呼ばれている。変異導入による酵素の基質特異性改変や precursor directed biosynthesis 法を利用した物質生産はコンビナトリアル生合成という言葉が誕生する以前から使われているが、現在ではコンビナトリアル生合成の手法の 1 つとして用いられている。近年のゲノム解析技術の進歩、酵素の反応機構に関する知見や X 線結晶構造解析によるタンパク質構造情報の蓄積、DNA 組換え酵素を利用した遺伝子改変技術や DNA 合成技術の発展はコンビナトリアル生合成の研究を後押ししており、様々な新規手法の開発へと結びついている。precursor directed biosynthesis を発展させた mutasynthesis による天然物類縁体の生産や酵素のドメインスワッピングを利用した新規物質創製はその好例である。また、触媒反応が解明された複数の酵素の遺伝子を利用することで、微生物細胞内に人工的な生合成経路をデザインすることも可能となってきている。このようにデザインされた生合成経路は mutasynthesis 法などの他の手法と組み合わせることで、より多様な構造の化合物の生産を実現することができる。これらの技術はまだ実施例が少なく、今後も様々な研究を続けることがコンビナトリアル生合成の発展には重要である。また、様々な活性を持つ酵素をより多く発見し、生合成遺伝子ライブラリーを拡充することも必要不可欠である。本発表ではこれらの手法を用いて実際にどのように物質生産が行われているかについて実例を交えつつ概説し、組換え微生物を利用した物質生産の今後の展望について考察する。

combinatorial biosynthesis, genetic engineering, polyketide

講演番号：4SY26-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:45～ C 校舎 25 会場

二相溶液系による有機化合物創製 の新展開

Development of Organic Syntheses in Biphasic Solutions

○千葉 一裕(東京農工大院農)
○Kazuhiro Chiba(Tokyo Univ. Agric. & Technol.)

【緒言】合成目標とする化学物質を，より簡便な操作で高収率，高効率で得ることは化学反応プロセスにおける大きな課題の一つである．そのためには，エネルギーや溶媒，試薬の使用量を大幅に削減するとともに，溶媒や試薬の再生や反応毎の分離精製操作の簡易化，反応プロセスのモニター方法など多岐にわたる技術が必要となる．本講演では，有機二相溶液反応系とそれに関連する要素技術である疎水性（可用性）タグを用いた合成法を活用し，有機電解合成反応や多段階合成反応を効率的に実現することを目指したこれまでの研究成果を紹介する．

【方法と結果】過塩素酸リチウムを溶解したニトロメタン溶液が Diels–Alder 反応などを著しく促進すること，またこの溶液を用いた電解法によって通常の有機合成反応では実現が困難な多様な分子間炭素-炭素結合形成反応が効率的に進行することを見出してきた．有機電解反応では電極電子移動によって多くの有機反応を制御できるため，陽極および陰極をそれぞれ酸化剤または還元剤と見なして多様な化学反応系を構築できる．その一方で，通常は一定量の支持電解質を溶媒中に溶解させなければならないため，生成物と支持電解質との相互分離が必要となる．このような煩雑な操作性を克服すること，さらには支持電解質溶液の再利用を実現するためには，さらなる効率的なシステムの構築が必要となる．演者らはこれまで，シクロアルカン類と多くの極性有機溶媒とを組み合わせた混合溶液が冷却状態では二相に分離する一方で，加温によって均一になる現象を活用し，多くの夾雑物が混在する化学反応系から生成物を選択的に分離する特性を利用し，効率的な化学プロセスの実現に向けた検討を広く行った．シクロアルカン類と支持電解質を溶解した多くの極性有機溶媒も同様の性質を示すため，予め疎水性のタグに結合した基質の反応と分離を温度の変化で制御する有用な溶液系となる．この溶液系では，疎水性タグに結合した基質や生成物を，様々な極性有機溶媒中に均一に溶解することができる一方で，わずかに温度を変化させることによって，相分離したシクロアルカン相に効率的に生成物を回収することができる．

このように，疎水性タグと有機二相溶液系を活用することによって，連続的な有機電解合成反応，フロー電解合成反応に新たな道を開いた．また，疎水性タグにアミノ酸を逐次結合させる手法は，有機二相反応系を用いることによって多段階反応を効率的に進めることを可能にした．さらに，疎水性タグの特性を利用した生成物の選択的な沈殿分離を迅速に進める方法によって，多様なペプチド等の高純度，高効率大量合成を実現することに成功した．

peptide, organic synthesis, electrochemistry

講演番号：4SY26-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:20～ C 校舎 25 会場

In silico 合成経路開発 －量子化学計算に支援された合成経路開発－

In silico synthesis route development assisted by quantum chemical calculations

○堀 憲次、隅本 倫徳、山本 豪紀(山口大院理工)
○Kenji Hori,Michinori Sumimoto,Hidetoshi Yamamoto(Yamaguchi Univ.)

合成化学に導入された IT 技術は，主に合成反応のデータベース構築，それに基づいた合成経路創出などの情報化学的手法に限られる。これらの分野では，コンピュータの演算速度や磁気ディスクの容量が限られた時代においてもこの技術は有用であった。コンピュータを用いた合成経路設計は、ノーベル賞学者である Corey により創出され、その後ドイツの Gasteiger，アメリカの Jorgensen，日本では東京大学の船津らの努力により目覚ましい発展を遂げている。21 世紀に入ってからは，コンピュータの演算速度の増加，磁気ディスク容量の拡大とアクセス速度の増加，格納データの飛躍的な増加と相まって，合成経路設計は実用的なレベルに達しっている。ただし、創出された合成経路の実用性の有無は、実験により確かめて初めて判明するとこれまで考えられてきた。

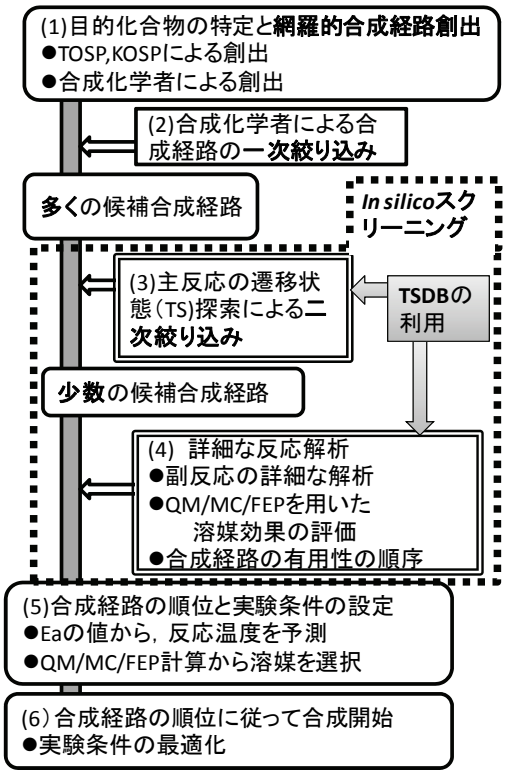


Fig.1. Typical procedure of *in silico* synthesis development

我々は，有機合成化学に IT 技術を用いた *in silico* 合成経路開発法（図 1）の導入を 2000 年ころより提唱し，それに関する研究を行って来た。その中心的なテーマは，合成経路設計システム（SRDS）により創出された新規合成経路の可能性を実験開始前に理論的に予測する（*in silico* スクリーニングと呼ばれる）ことであった。この目的を達成するために，理論計算を用いた反応解析の時間短縮に有用な遷移状態データベース（TSDB）の構築，合成経路の有用性の指標となる合成収率を予測する方法や溶媒効果を理論的評価にする方法の開発等を行ってきた。これらの研究により，合成経路開発に利用できるとは思われてこなかった理論計算は，目的化合物の合成経路開発を支援し，その開発時間短縮に役立つレベルに達したものと考えている。本研究では，*in silico* 合成経路開発法の実際とそれに関連する研究を示すとともに，有機合成を行うときに発揮されるその有用性と今後の展望について述べる。

sythesis route devekopment, quantum chemistry, in silico screening

講演番号：4SY26-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:55～ C 校舎 25 会場

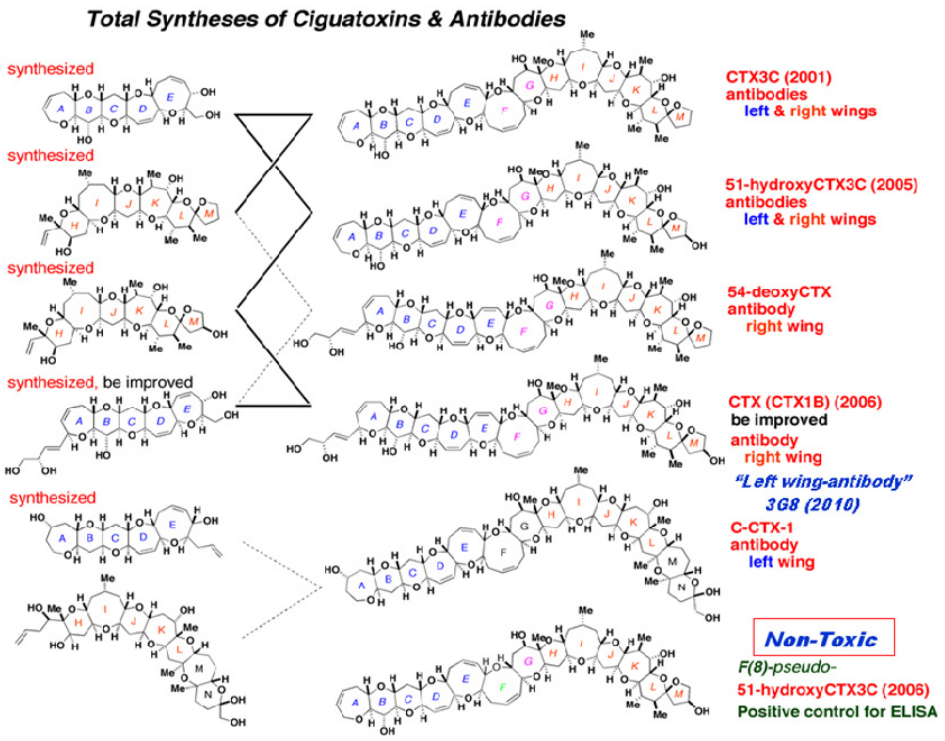
世界最大の海産物中毒と化学のインターフェイス
The Interface between Ciguatera Seafood Poisoning and Organic Synthesis

○平間 正博(東北大院理)
○Masahiro Hirama(Tohoku Univ.)

私の場合、天然物の構造と生物活性に惚れて始めた全合成が殆どである。天然物がなければ始まらない。様々な生物現象を司る、あるいは生理活性を有する天然分子を発見・構造決定する研究は、諸科学が進歩するために必須である。新規天然物探索研究が評価され、発展することを願っている。

私は以前、「超天然物」を提案した。趣旨は、「生体高分子との相互作用を視野に入れながら全合成を展開して行こう」ということであった。シガトキシンの全合成を基盤にして、他分野の研究者との共同研究によって、抗シガトキシン抗体作製、抗体–シガトキシン複合体の結晶構造・分子認識機構解明、毒魚検定イムノアッセイ法、中毒治療法開発、電気生理学的特性解析、シガトキシン–Na イオンチャネル複合体の単粒子電顕構造解析へと発展させたいと願って来た。

「始めに天然物ありき」であり、「全合成を基盤にして総合科学へ」である。基礎科学と応用分野の両面での展開を図った成果について紹介したい。本研究は、研究室内外の多くの共同研究者の努力の賜物である。共同研究者に深甚の謝意を表したい。



Ciguatera, Ciguatoxin, Synthesis

講演番号：4SY27-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:35～ C 校舎 20 会場

微生物由来の新しい抗感染症剤の開拓とその標的分子の解析

Discovery of new anti-infectious agents and study of mechanism of action

小山 信裕、○供田 洋(北里大院薬)
Nobuhiro Koyama,○Hiroshi Tomoda(Kitasato Univ.)

近年、薬剤耐性菌や多剤耐性菌が世界規模で蔓延している状況から、耐性菌に有効な新しい抗生物質の開拓が強く求められている。このような中、演者らのグループでは、院内感染の原因菌として問題となっているメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）に焦点を当て、ほとんど効かなくなったβ-lactam 薬 imipenem の抗菌活性を増強させる物質を微生物資源より検索するという新しいアプローチから研究を進めてきた。この研究の過程において、真菌 *Aspergillus* sp. FKI-2136 株が生産する四環性 quinone 基本構造を持つ stemphone 類 [1] 及び放線菌 *Streptomyces* sp. K04-0144 株が生産する labdan 型 diterpene 基本構造を持つ cyslabdan [2] と糖化リン脂質 nosokophic acid [3] を発見した。これら化合物は、それ自身は抗 MRSA 活性を示さないが、imipenem の抗 MRSA 活性を約 500-1000 倍まで増強し、さらに他の carbapenem 類の活性も強く増強する。一方、作用機序の異なる他の抗生物質（vancomycin, streptomycin, tetracycline や ciplofloxacin）に対しては増強活性を示さないという興味深い特徴をもつ。

演者らのグループでは、これら化合物の imipenem の抗 MRSA 活性の増強機構について詳細に研究し、化合物に親和性を示すタンパク質を MRSA のタンパク抽出液の中より検索するというケミカルバイオロジー的なアプローチより、cyslabdan の標的分子が細胞壁 peptidoglycan の生合成に関わる aminoacyl 転移酵素 FemA であることを明らかにした [4]。実際、酵素化学的な研究より、cyslabdan は、FemA による monoglycyl lipid II から triglycyl lipid II への変換反応を濃度依存的に阻害し、一方、その関連酵素である FemX や FemB による lipid II や triglycyl lipid II への glycine 付加反応には影響しないことを見出した。さらに、HPLC による peptidoglycan の組成解析から、cyslabdan を処理した MRSA の細胞壁には、monoglycyl lipid II が蓄積していることが明らかとなった。以上の知見をもとに、cyslabdan は、FemA の機能を阻害することで、imipenem との共存下で MRSA 細胞壁 peptidoglycan の生合成を阻害し、imipenem の活性を増強させたと推測している。最近になり、FemA は、MRSA において PBP2’ によるβ-lactam 薬の耐性度を決定する重要な因子であることが報告されている [5]。Cyslabdan は、FemA 阻害剤として初めて発見した化合物であり、MRSA 細胞壁の生合成のみならず、MRSA の耐性機構を解析するためのツールとして応用されることを期待したい。

【参考文献】1) *J Antibiot* **58**:695-703 (2005). 2) *J Antibiot* **61**:1-6 (2008). 3) *Bioorg Med Chem Lett,* in press. 4) *PLoS One* **7**(11): e48981 (2012). 5) *Future Microbiol* **7**: 1315-1329 (2012).

anti-infectious agents, MRSA, mechanism of action

講演番号：4SY27-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ C 校舎 20 会場

"リバースアンチビオティックスの発見"、薬剤耐性克服への可能性
“Reverse antibiotics, a novel class of antibiotics in nature” a hint of overcoming the drug resistance infections
○五十嵐 雅之[1]、平松 啓一[2]([1]微化研、[2]順天堂)
○Masayuki Igarashi[1], Keiichi Hiramatsu[2]([1]Institute of Microbial Chemistry, [2]Juntendo Univ.)

抗生物質(antibiotics)は「微生物によってつくられ、微生物の発育を阻害する物質」と1941年ワックスマンにより定義されている。現在、抗生物質は、人の健康のみならず動物薬や農薬等へと多岐に渡り用いられており欠かす事の出来ない物となっている。しかし、抗生物質の汎用は常に耐性菌出現のリスクを伴っている。米国感染症学会では、問題となっている医療関連感染の主要な多剤耐性菌6種の（***E****nterococcus faecium,* ***S****taphylococcus aureus,* ***K****lebsiella pneumoniae,* ***A****cinetobacter baumannii,* ***P****seudomonas aeruginosa,* ***E****nterobacter* species）の頭文字を用いESKAPEと称し注意を喚起し、これらの耐性菌に有効な抗生物質の早期開発を強く要望している。これら“superbug”の出現は、抗生物質の汎用と新規抗生物質開発の遅延停滞によりもたらされた結果である。ESKAPEの一翼である、*S. aureus* の多剤耐性菌であるMRSAは、1961年に英国で出現して以来現在では、ほとんど全ての抗生物質に耐性を獲得した、最もありふれた高度耐性医療関連感染菌である。

我々は、高度に耐性化した MRSA に着目し従来と全く異なるコンセプトで、薬剤耐性菌に対する新規抗生物質の探索を行なった。即ち、高度耐性化した MRSA 対してのみ有効な抗生物質は、MRSA の耐性化の何らか過程により、結果として従来不感受性であったものが感受性となると考え、MRSA に特異的に抗菌力を示す化合物を放線菌 2 次代謝物より探索を開始した。その結果、土壌より分離した一放線菌の生産物より MRSA に特異的に抗菌活性を示す化合物を得る事ができた。構造解析の結果活性物質は、Nybomycin および Deoxynybomycin である事が判明した。これらの化合物の作用機構を解析したところ、フルオロキノロンに耐性化した MRSA に対し有効である事が判明した。さらに、詳細な解析から、キノロン耐性化決定領域が変異により Nybomycin 感受性ジャイレースとなること、Nybomycin はキノロン感受性ジャイレースにほとんど阻害を示さないこと、また、Nybomycin に耐性を獲得した MRSA は、高頻度でキノロン感受性ジャイレースに復帰することが判明し、本化合物は耐性菌に対し作用する特異的な抗生物質である事が明らかとなった。我々は、これらの現象が、新しい抗生物質像の一つと考え、“リバースアンチビオティックス”と呼ぶ事とした。本シンポジウムでは、この″リバースアンチビオティックス″の発見と展望に付いて発表する。

drug resistance infections, MRSA, reverse antibiotics

講演番号：4SY27-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:25～ C 校舎 20 会場

細菌情報伝達阻害型薬剤の開発
Development of antibiotics targeting bacterial sensor kinases
○内海 龍太郎[1]、五十嵐 雅之[2]([1]近畿大院農、[2]微化研)
○Ryutaro Utsumi[1], Masayuki Igarashi[2]([1]Kinki Univ, [2]Microbial Chem. Res. Center)

病原性細菌細胞膜には多くのヒスチジンキナーゼ（HK）活性を示すリン酸化酵素が存在し、細菌細胞の増殖、病原性の発現、クオラムセンシング、バイオフィルム形成にも関与している情報伝達（二成分情報伝達系、TCS）に主要な働きをしている。特に、WalK(HK)/WalR(RR) TCS は、*Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Listeria monocytogenes, Streptococcus mutans, Streptococcus pyogenes, Staphylococcus epidermidis* 等のグラム陽性細菌において、増殖に必須な働きをしていることが知られている。WalK はヒト細胞にはなく、その阻害薬は既存薬と異なる作用で病原菌に働くので、MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）や VRE（バンコマイシン耐性腸球菌）を含む多剤耐性細菌等に有効に働く新規な抗菌剤として注目されている(1)。

WalK 阻害型薬剤を開発するために、放線菌抽出物を用いて、WalK の HK（自己リン酸化）阻害活性を指標にしたスクリーニングが行われた。その結果、３種の新規な化合物が WalK（HK）阻害剤として見出され、それぞれ、Walkmycin, Signermycin, Waldiomycin と命名された。これらの阻害剤はいずれも、MRSA や VRE の WalK に対して阻害活性(IC50, 5.7-37 μM)を示すとともに、それらの最小生育阻止濃度（MIC、0.39-3.13 μg/ml)を示し、新規抗生物質として同定された(2,3)。Walkmycin, Signermycin, Waldiomycin の WalK 阻害作用を明らかにするために、WalK 細胞質内領域に含まれる２種のドメイン（ATP 結合ドメイン、２量体化ドメイン）に対する作用が調べられた。WalK の自己リン酸化には、ホモ２量体化形成が必要である。クロスリンカー存在下で、WalK の 2 量体形成が促進されるが、Walkmycin, Signermycin, Waldiomycin 存在下では、WalK の 2 量体形成が阻害された。一方、WalK に対するこれらの HK 阻害剤の IC50 に対する ATP の影響はなかった。Walkmycin, Signermycin, Waldiomycin は WalK の２量体化ドメインに作用する新規な HK 阻害剤であることが示唆された。

このように、本研究で開発された細菌情報伝達阻害型薬剤は、細菌情報伝達システムを阻害し、その標的となる遺伝子発現を制御することで、病原菌の病原性の抑制ならびに増殖阻害（死滅）させることが可能であり、既知抗生物質に耐性な病原菌にも有効に作用する。

1) Curr Opin Microbiol 13:232-239, 2010; 2) Antimicrob Agents Chemother 56:3657-3663, 2012; 3) Antimicrob Agents Chemother 55:1475-1484, 2011;

本研究は主として生研センター異分野支援事業（平成 18-22 年）においてなされた。

histidine kinase inhibitors, two-component signal transduction, drug-resistant bacteria

講演番号：4SY27-4
講演日時、会場：3 月 27 日 14:50～ C 校舎 20 会場

細菌の病原性を標的とする多剤排出ポンプを利用した新規スクリーニン グ系の構築
Novel screening systems for the development of anti-virulence agents by using multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*
○米山 裕(東北大院農)
○Hiroshi Yoneyama(Tohoku Univ.)

人類の歴史を医学的観点から捉えると感染症との戦いであったと言っても過言ではない。ペニシリンの発見以降、各種抗生物質が開発され重篤な細菌感染症を制御することができるようになり、人々の生活に計り知れない貢献をしてきた。しかし、これらの抗生物質を過剰に使用し続けた結果、多剤耐性結核菌の再来、「最後の切り札」とも言われるバンコマイシンに耐性を示すメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の出現、最近では、各種抗生物質に自然耐性能を有する日和見感染症起因菌である緑膿菌やアシネトバクターなどの高度多剤耐性菌による集団院内感染が発生し公衆衛生上の大きな問題となっている。これらの細菌感染症の脅威に対抗するためには新規抗生物質の開発が必須であり、その研究開発に対する社会的要請も大きい。

既存の抗生物質は、細菌の生存に必須な代謝過程を標的とする伝統的なスクリーニングによって見いだされてきたものであり、臨床現場で使用されている薬剤の標的を分類すると 4 つの代謝経路(細胞壁合成、タンパク質合成、核酸合成、葉酸合成)が主にその標的となっている。1995 年に *Heamophilus influenzae* のゲノムが解読されて以降、多くの医学的に重要な細菌ゲノムが解読され、既存の抗生物質の標的とは異なる細菌の生存に必須な機能の探索研究がバイオインフォマティクスを用いてなされた。そして、その情報に基づくハイスループットスクリーニング系による大規模な評価が海外の製薬メーカーによってなされてきたが、未だこの手法からは有望な化合物は見出されていない。仮にこれらの試みから実用化される新規抗生物質が登場したとしても、その化合物は細菌の生存に必須な機能を標的としているため、細菌にとって強力な選択圧として作用する結果、いずれ耐性菌が出現することは避けられない。

一方、病原細菌が感染を成立させるためには、宿主に接触・定着した後、宿主の表面あるいは体内で増殖することが必須であり、この感染成立のために病原細菌は各種病原因子を必要とする。これらの病原因子は細菌の生存自体には必ずしも必要ではないので、各種病原因子の阻害剤に対する耐性菌の出現頻度は既存の抗生物質に比べ低いと考えられることから、細菌の病原因子は新規標的として魅力的である。我々は、これらの病原因子の中でも最近見いだされた新しいタンパク質分泌システムであるTat (Twin-arginine translocation)経路と、細菌の鉄取り込み系に関するシグナル伝達経路に注目し、それぞれのシステムの生物学的機能を簡便に評価することができる生菌を用いたスクリーニング系の構築を試みたので紹介する。

Pseudomonas aeruginosa, anti-virulence agents, screening system

講演番号：4SY27-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:15～ C 校舎 20 会場

サルモネラ菌の病原性制御と応用展開
Salmonella virulence regulatory network: defense mechanisms and future prospects

○加藤 明宣[1]、Groisman Eduardo[2]([1]近畿大院農、[2]イェール大医、HHMI)
○Akinori Kato[1], Eduardo Groisman[2]([1]Kinki Univ., [2]Yale Univ., HHMI)

近年、多剤耐性菌の出現は新たな抗菌薬の開発の必要性を提起している。更に、多剤耐性やバイオフィルム形成、病原性発現性制御に関わる調節機構解明の重要性が増している。サルモネラ菌（*Salmonella typhimurium*）はマウスに対しヒトのtyphoid feverに相当する全身感染を引き起こすことから、マウスを用いたサルモネラ感染モデルでの病原性発現機構の解明が進展してきた。二成分調節系のPhoP/PhoQは、サルモネラ菌と宿主との攻防において中心的な役割を担う。例えば、腸管上皮内への侵入やファゴソーム内で生存・複製する際に必要なエフェクターを分泌する病原性遺伝子群の調節だけでなく、宿主等が産生する抗菌ペプチドや抗菌剤に対する抵抗性（magainin 2、melittin、mastoparan、ポリミキシンB等）を付与するリポ多糖（LPS）修飾遺伝子群を調節する。本講演では、まず、このディフェンス調節機構についての基礎的知見について紹介する。

グラム陰性菌の外膜は LPS に覆われ、その修飾は抗菌剤抵抗性や宿主自然免疫からの回避等に重要である。サルモネラ菌において、PmrA/PmrB 系は細胞外 Fe^{3+}に応答し、LPS 修飾遺伝子群を制御する主要調節機構である。PmrA/PmrB 系においては、センサーPmrB が細胞外 Fe^{3+}を感知すると、レギュレーターPmrA をリン酸化し、PmrA 依存的 LPS 修飾遺伝子群を活性化する。一方、低 Mg^{2+}シグナルも PmrA/PmrB 系を活性化する。低 Mg^{2+}を感知する PhoP/PhoQ 系が 85 aa から成るコネクターPmrD を発現させ、これがリン酸化型 PmrA (PmrA-P)と結合し、PmrB による脱リン酸化から保護する分子機構がこれまでに解明された。また最近、LPS 修飾状態と PmrA/PmrB 系間の相互フィードバック調節機構が明らかとなった。*pmrB* センサー遺伝子の下流にコードされる膜局在ペプチドの PmrR が見出された。PmrR は、1)リピッド A の 1 位をピロリン酸（1-PP）で修飾する膜酵素 LpxT と相互作用しその活性を抑制し、2)細胞表層のマイナス(-)電荷を減じることで Fe^{3+}結合性を低下、3)センサーPmrB を刺激する Fe^{3+}の量を減少させることで更に PmrA 活性化遺伝子の mRNA レベルを低下させた。これらのことから、この相互フィードバック調節機構においてはリピッド A の 1-PP と Fe^{3+}の結合性変化が基軸となっていることも初めて示された。

サルモネラ菌を含む種々の病原細菌において、特定の二成分制御系を欠失、或は、構成的に活性化した変異株では、病原性が極端に減弱する。二成分制御系に特異的に作用するペプチド（スモールタンパク質）因子等を細胞外から添加させ、細菌の病原性制御に利用する可能性についても議論する。

Salmonella, virulence regulatory network, two-component system

講演番号：4SY27-6
講演日時、会場：3 月 27 日 15:40～ C 校舎 20 会場

QseC inhibitors as anti-virulence drugs

○Vanessa Sperandio(UT Southwestern Medical Center,Dallas, TX, USA)

Many bacterial pathogens exploit cell-to-cell signaling between the microbial flora and the host as a means to gage and recognize the host environment. This inter-kingdom signaling is predicated upon hormonal communication, and utilizes the host epinephrine and/or norepinephrine (NE) stress hormones and a bacterial aromatic hormone-like signal named autoinducer-3 (AI-3). This communication relies on a conserved membrane sensor, QseC, to sense and respond to these signals to initiate a complex signaling cascade to promote expression of virulence factors. Of note this signaling cascade is widespread in bacteria. We have also shown that inhibition of this signaling pathway, specifically the QseC sensor, by small molecules constitutes a novel and exciting approach to develop therapeutic strategies to hamper bacterial infections. Because QseC is clearly essential for the activation of the virulence in many bacterial pathogens, and mammals do not harbor HKs, inhibitors of bacterial HKs are attractive potential novel therapeutics due to their selective toxicity. We have screened UT Southwestern's 150,000 small molecule chemical library and, from the initial hits, developed a remarkably potent small molecule antagonist to QseC (lead compound LED209). This compound is highly selective for the bacterial QseC receptor, not acting in mammalian adrenergic receptors, and is non-toxic to mammalian cells. LED209 (at a concentration of only 5pM) effectively blocks QseC recognition of epinephrine and norepinephrine, successfully blocks virulence gene expression and pathogenesis in EHEC, *S. typhimurium* and *F. tularensis in vitro* and *in vivo* (during animal infections), but do not interfere with pathogen growth, which leads to a milder evolutionary pressure towards development of drug resistance. This is a novel approach to antimicrobial drug development, QseC antagonists confuse or obfuscate signaling between bacteria and the host, and unlike antibiotics, do not kill or hinder bacterial growth. Hence, QseC antagonists should be viewed as blockers of pathogenicity (anti-virulence drugs) rather than as antimicrobials. There is an imminent need for development of novel treatments for infectious diseases, given that one of the biggest challenges to medicine in the foreseeable future is the emergence of microbial antibiotic resistance. The rapid mutation rate of bacteria allows them to develop resistance to virtually all known antibiotics. This threat to humans and their food sources is immediate, global and potentially catastrophic.

QseC, virulence, enterohemorrhagic E. coli(EHEC)

講演番号：4SY28-1
講演日時、会場：3 月 27 日 13:32～ C 校舎 26 会場

細菌由来の新型および多機能性テルペン合成酵素の探索

Search for new and multifunctional terpene synthases from bacteria

○佐藤 努(新潟大院自然・農)
○Tsutomu Sato(Niigata Univ.)

以前から、イソプレノイドの生合成に関与する酵素の中から、多くの新規性の高い酵素が発見されてきている。例えば、メバロン酸経路と全く異なる MEP 経路の発見[1]や、*E* 型プレニル鎖伸長酵素と一次構造のみならず三次構造も全く異なる *Z* 型プレニル鎖伸長酵素の発見[2]などがあげられる。一方、テルペン骨格の多様性を生み出すテルペン合成酵素は、1990 年代から数多くの遺伝子が同定され、詳細な触媒機構の解析や酵素改変による非天然型テルペンの創出などが成されてきた。また、最近バクテリアから発見されたテルペン合成酵素のように、新規性の高いテルペン合成酵素の発見は、ゲノムマイニングによって数多くのテルペン合成酵素の発見を導くことが明らかになってきている[3]。

その様な背景の中、2011 年、我々は今まで知られていたテルペン合成酵素の一次構造と類似性をもたないテルペン合成酵素（テトラプレニル-β-クルクメン合成酵素：TS）を枯草菌のセスクアテルペン（我々が提案した C_{35} テルペンの分類名）の生合成研究から発見した[4]。TS ホモログは、様々な細菌に存在しているが、既に、好アルカリ性 *Bacillu* 属の TS ホモログの解析から、新規三機能性セスタテルペン（C_{25}）/トリテルペン（C_{30}）/セスクアテルペン（C_{35}）合成酵素を見出した[5]。また、TS の変異によって、生成物が変わることも見出した[5]。さらに、TS は既知のテルペン合成酵素の活性部位モチーフをもっていないため、新しい触媒機構が存在しているものと考えられる。したがって、従来のテルペン合成酵素の研究で進展したように、ゲノムマイニングによる新規テルペン合成酵素の探索、詳細な触媒機構の解析、そして酵素改変による非天然型テルペンの創出などが今後進められるものと期待している。

一方、我々は酵素の多機能性についても注目して研究を進めてきている。2008 年、開始のアリル性基質によって C_{35} と C_{50} に生成物を生体内で作り分ける二機能性 *Z* 型プレニル鎖伸長酵素を発見した[6]。さらに、2011 年、C_{30} と C_{35} のイソプレノイドを環化して各々２環と４環を形成する二機能性テルペン合成酵素（TC）を発見した[7]。TC は C_{30} の環化生成物をさらに基質として取り込んで反応する能力があることもすでに見出されている[5]。今後、イソプレノイド生合成酵素の多機能性に着目することで、新規テルペンの発見が成されるものと期待している。

1) T. Kuzuyama, H. Seto, *Nat. Prod. Rep.*, **20**, 171 (2003). 2) M. Fujihashi *et al.*, *PNAS*, **98**, 4337 (2001). 3) D.E. Cane , H. Ikeda, *Acc. Chem. Res.*, **45**, 463 (2012).4) *JACS*, **133**, 9734 (2011). 5) 本大会一般講演.6) *ChemBioChem*, **11**, 1874 (2010). 7) *JACS*, **133**, 17540 (2011).

isoprenoid, terpene, biosynthesis

講演番号：4SY28-2
講演日時、会場：3 月 27 日 13:54～ C 校舎 26 会場

タイプ２イソペンテニル二リン酸イソメラーゼにおけるフラビン補酵素の触媒機能
Catalytic function of the flavin cofactor in type 2 isopentenyl diphosphate isomerase
○邊見 久(名大院生命農)
○Hisashi HEMMI(Nagoya Univ.)

タイプ２イソペンテニル二リン酸イソメラーゼ(IDI-2)は、黄色ブドウ球菌や腸球菌などの一部のバクテリアや大部分のアーキアにおいて、イソプレノイド生合成に必須なイソペンテニル二リン酸(IPP)とジメチルアリル二リン酸(DMAPP)の間の異性化反応を触媒する酵素である。単純な異性化反応を触媒するにも関わらず、同酵素は酸化還元補酵素として知られる FMN と NADPH を活性に要求し、その反応機構に興味が持たれていた。近年、反応機構依存的に FMN と共有結合を形成して IDI-2 活性を不可逆的に阻害する基質アナログを用いた研究や、基質-酵素複合体の X 線結晶構造解析の結果などにより、同酵素は非酸化還元的に異性化反応を触媒しており、その中で還元型 FMN が一般酸塩基触媒として働いていることが示された。この予想外のフラビン補酵素の機能は IDI-2 で初めて見出されたものである。我々は、その詳細な分子機構を解明すべく、上述した基質アナログの一種である 3-oxiranyl-but-3-en-1-yl diphosphate (oIPP)、もしくは 3-vinyl-but-3-en-1-yl diphosphate (vIPP)を、結晶状態の好熱性アーキア *Sulfolobus shibatae* 由来 IDI-2 と反応させ、活性部位において還元型 FMN とのアダクト化合物を形成させた後に、その結晶を用いて X 線結晶構造解析を行った。得られた結晶構造は、基質アナログとの共有結合形成が FMN の C4a 位で起きることを示唆しており、さらにその化学構造は、酵素から単離したアダクト化合物のスペクトル解析によっても支持された。また同時に我々は、活性状態における基質-酵素複合体の、以前に得られたデータに比べて高解像度の構造解析にも成功した。以上のデータを総合することで、我々は IDI-2 の反応における還元型 FMN の分子機構を以下のように提案している。まず、中性還元型 FMN の互変異性体である、双性イオン種 5,5-dihydroFMN の N5 窒素が一般酸として働き、プロトンを IPP の 4 位に供与する。これにより生じるカルボカチオン中間体は、同じくプロトン供与の結果生じるアニオン性還元型 FMN のごく近傍に位置している。続いて、アニオン性還元型 FMN の N5 窒素が一般塩基として働き、中間体の２位よりプロトンを引き抜くことで DMAPP が生じ、5,5-dihydroFMN が再生される。同機構において還元型 FMN は、酸塩基触媒として働くだけではなく、中間体の安定化という機能も担っていると推察される。

isoprenoid, isopentenyl diphosphate isomerase, flavin mononucleotide

講演番号：4SY28-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:16～ C 校舎 26 会場

放線菌由来ジテルペン環化酵素の反応機構と構造

Reaction mechanism and structure of *Streptomyces* diterpene cyclase

○葛山 智久(東大生物工学セ)
○Tomohisa Kuzuyama(Univ. Tokyo)

テルペンとは、炭素数5個のイソプレンを基本構成単位とした化合物で、メバロン酸経路やメチルエリスリトールリン酸経路によって供給されるイソペンテニルジリン酸とジメチルアリルジリン酸の縮合反応により生合成される化合物群である。テルペンに官能基などが付加した誘導体はテルペノイド、また、それらを総称してイソプレノイドと呼ばれ、一次代謝産物のみならず、二次代謝産物として抗菌活性、抗腫瘍活性などの生物活性を持つ誘導体が多数報告されている。テルペンには、テルペン環化酵素が触媒する環化反応によって、構造中に様々な環構造をもった環状テルペンが数多く見られ、この環状構造の違いにより、テルペンの構造多様性が生み出されている。テルペンの環化反応は、反応性の高いカルボカチオンが形成されて開始する。このカルボカチオンの形成反応は大きく分けて2通りあり、ひとつは末端のジリン酸が Mg^{2+}などの二価の金属イオンを触媒としてイオン化されて脱離することにより形成する反応で、もうひとつは構造中のエポキシドや末端の炭素−炭素二重結合がプロトン化されて形成する反応である。前者のジリン酸基の脱離によるイオン化が初発反応である環化様式をType A、後者のプロトン化が初発反応である環化様式をType Bと分類されている。しかしながら、これまでに反応機構の詳細が報告されたジテルペン環化酵素として、taxadiene を生成する植物由来の taxadiene synthase や、fusicoccadien を生成する真菌由来の PaFS などの報告例があるものの、バクテリア由来のジテルペン環化反応機構の詳細については限定的である。本発表では、放線菌 *Streptomyces melanosporofaciens* MI614-43F2 が生産するジテルペン cyclooctatin 生合成における鍵酵素 CotB2 が触媒する炭素−炭素間の組換えを含む複雑な環化反応機構について、最新のデータを示しながら紹介する。また、X 線結晶構造解析によって得られた CotB2 の構造についても紹介する。

isoprenoid, biosynthesis, reaction mechanism

講演番号：4SY28-4
講演日時、会場：3 月 27 日 14:38～ C 校舎 26 会場

プレニル鎖の伸長や修飾に関わる酵素の構造機能解析

Structure and function analyses of enzymes regarding elongation and modification of prenyl chains

○藤橋 雅宏、佐々木 大輔、三木 邦夫(京大院理)
○Masahiro Fujihashi,Daisuke Sasaki,Kunio Miki(Kyoto Univ.)

イソプレノイドは、抗菌、薬理、香料、色素、ホルモンなど、多様な利用価値をもつ化合物群であり、これまでに 50,000 種以上の化合物が同定されている。本報告では、イソプレノイド合成に関わる様々な酵素のうちの二つの酵素、ヘテロ二量体型 *trans* プレニル鎖伸長酵素と、伸長されたプレニル鎖の二重結合還元反応を触媒するゲラニルゲラニル基還元酵素の、構造と機能の関係について述べる。

<ヘテロ二量体型プレニル鎖伸長酵素>

これまでに様々な鎖長の *trans* プレニル鎖の伸長反応を触媒する酵素の解析がなされているが、ほとんどの酵素は同一のサブユニットで構成されるホモ二量体を単位として機能している。これに対し、我々が解析した *M. luteus* 由来 Hexaprenyl pyrophosphate synthase (HexPPs) は、A と B の異なる二つのサブユニットの組み合わせで機能する。

解析した HexPPs の全体構造は、ホモ二量体型酵素と同様にα-helix のバンドル構造をしていたが、基質を認識するポケットはホモ二量体型酵素とは異なる特徴を持っていた。ホモ二量体型酵素では二つのサブユニットそれぞれの中央に基質認識クレフトが存在するのに対し、HexPPs ではヘテロ二量体の界面にクレフトが存在し、伸長反応触媒部位は B サブユニットに位置するクレフト入り口付近に、クレフトの底部は A サブユニットに位置していた。HexPPs は B サブユニットでイソプレン単位の縮合反応を触媒し、A と B 両サブユニットの協調で生成物の鎖長を制御していると考えられる。

<ゲラニルゲラニル基還元酵素>

ゲラニルゲラニル基還元酵素(GGR)は、古細菌の膜脂質前駆体中の二重結合を還元する FAD 酵素である。我々は GGR の反応触媒機構を明らかにするために、*S. acidocaldarius* 由来 GGR (Sa-GGR)を対象に、結晶構造解析と部位特異的変異解析を行った。

解析した Sa-GGR の中央部には、FAD のイソアロキサジン環に接触した大きなキャビティーが存在していた。基質の一つゲラニルゲラニル二リン酸は、このキャビティーに結合した。キャビティー周辺には、GGR で広く保存された YxWxFPx$_{7\text{-}8}$GxG モチーフやシステイン残基が存在する。部位特異的変異解析の結果、YxWxFPx$_{7\text{-}8}$GxG モチーフは基質を還元に適した位置で保持する役割を持ち、システイン残基はイソアロキサジン環の還元反応に関わると考えられる。

crystal structure, prenyltransferase, geranylgeranyl reductase

講演番号：4SY28-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:00～ C 校舎 26 会場

コエンザイム Q の生合成と多機能性

Biosynthesis and various roles of coenzyme Q

○川向 誠(島根大生資)
○Kawamukai Makoto(Shimane Univ.)

コエンザイム Q（ユビキノン）はイソプレノイドキノンの一種で、広く生物界に分布している。コエンザイム Q の種類は生物種で異なっており、出芽酵母では CoQ６、大腸菌では CoQ８、ラットやイネでは CoQ９、分裂酵母やヒトでは CoQ10 が存在する。このイソプレン単位 10 のものがコエンザイム Q10 として市販されている。

コエンザイム Q の生合成経路は、まだ完全には解明されていない。最近の研究により、実際は、複数の経路が存在することが、明らかになってきた。これまで、イソプレノイド鎖がヒドロキ安息香酸（PHB）に縮合する反応が合成の初発であると考えられてきたが、PHB 以外に、パラアミノ安息香酸(pABA)が初発の基質となっていることが明らかになってきている。pABA との縮合反応後には、少なくとも脱アミノ化反応を必要とするので、これまで予想された以上の酵素が関与していると考えられる。遺伝学的には、９種の遺伝子がコエンザイムQの合成に関わることが判明しているが、その中には酵素複合体の形成を調節するキナーゼが含まれている。生物種によって生合成酵素の違いもある。例えば、分裂酵母のコエンザイムQの側鎖合成に関わる酵素はヒトと同様の構成をなしており、大腸菌や出芽酵母との違いを示している。遺伝病との関連において特にヒトのコエンザイムQ合成系遺伝子の解析が重要になる。ヒトの相同性の高い遺伝子を検索して、それらの遺伝子を分裂酵母内で発現させるとほとんど相補的に働くことがわかった。そのことは酵母での解析を進めていくことがヒトを含めたコエンザイムQ生合成のアウトラインをつかむのに適していることを意味している。

コエンザイムQは、電子伝達系の成分としてエネルギー産生に関わる他、抗酸化物質としての役割が重要であるが、それらの役割以外にも機能がある。分裂酵母での解析により、コエンザイムQが硫化物の酸化反応やウラシル５リン酸の合成に関わることが、遺伝学的な解析により判明した。このように、コエンザイムQは、いわゆる補酵素として、複数の酵素反応に関わることを見いだした。

[1] M. Kawamukai. Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q10 by yeasts and other organisms. Biotechnol. Appl. Biochem. 53:217-226 (2009)

[2] T. Cui, T. Kaino, M. Kawamukai. A subunit of decaprenyl diphosphate synthase stabilizes octaprenyl diphosphate synthase in *Escherichia coli* by forming a high-molecular weight complex. FEBS Lett 584, 652-656 (2010)

coenzyme Q, fission yeast, isoprenoid

講演番号：4SY28-6
講演日時、会場：3 月 27 日 15:22～ C 校舎 26 会場

メナキノン-４（MK-4）変換生成の意義とビタミン K 同族体の生理機能

Menaquinone-4 (MK-4) formation from vitamin K analogues and its physiolocgical significance

○駒井 三千夫、白川 仁(東北大院農)
○Michio Komai,Hitoshi Shirakawa(Tohoku Univ.)

納豆や緑色野菜に含まれるビタミン K（VK）の主な機能は、プロトロンビンやその他の血液凝固因子タンパク質のグルタミン酸（Glu）残基を Gla（γ-カルボキシ-グルタミン酸）化して活性化させ、血液凝固を可能にさせることである（中には逆の作用をもつ Gla タンパク質もある)。すべての VK 同族体（VK_1、VK_2、など）に、γ-グルタミルカルボキシラーゼ（GGCX）を介した Gla 化能がある。すなわち、血液凝固に必須な凝固因子や、骨形成に必須なオステオカルシン（bone Gla protein [BGP]）などの Gla タンパク質の完成に必須な補因子としての作用である。さらに近年、VK にはこれ以外にも多くの重要な生理機能が多くあることが示されてきた。すなわち、VK_2 の 1 種である MK-4（メナキノン-4）の Gla タンパク質によらない特有の生理機能である。以下に箇条書きする。

（１）破骨細胞のアポトーシスの誘導、及び破骨細胞の分化促進因子 (RANKL) の発現抑制による骨吸収の抑制（＝骨形成の促進)。これは、既に抗骨粗鬆症薬として使用されている。
（２）培養白血病細胞の apoptosis 誘導作用（＝発癌抑制への関与）
（３）動脈硬化抑制作用
（４）核内の受容体（SXR or PXR）との結合能
（５）炎症性サイトカインの分泌修飾を介した抗炎症作用
（６）ステロイドホルモン生合成系への直接的関与（精巣、脳？）と性機能への影響（すなわち、MK-4 不足は精巣でテストステロン（男性ホルモン）産生の低下を誘導する)。

上記（５）と（６）は、当研究室の成果である（白川、駒井、ほか)。これらを総じて考えると、MK-4 は組織内活性型 VK とも言える。

1992 年以後 MK-4 の新規な生理機能に関する新しい知見が続々発表されてきた。そして、組織内に存在する内因性酵素による VK1（フィロキノン）の MK-4 への生体内変換が指摘されてきた(無菌マウス・ラット＝Komai ら: 1992、無菌ラット＝Suttie ら: 1998 及び Vermeer ら: 1998、細胞培養系＝岡野ら: 2007 年、2010 年)。また、2010 年に MK-4 変換酵素として UbiA プレニルトランスフェラーゼ（UBIAD1）が同定されたと報告された(Nature 誌)。しかし、これは 3 位に側鎖のない VK3 へのゲラニルゲラニル基の付加反応のみであると判断された。すなわち、3 位にフィチル基を有する VK1 からの変換活性が VK3 からの場合の千分の 1 程度しかなく、VK1 からの変換が証明されたとは言えない。当教室でも、ヒト由来培養細胞にて MK-4 変換系を確立し、UBIAD1 に着目して VK1 から MK-4 への変換機構について検討したが、全く同じような結果となった。つまり、VK1 から MK-4 への変換酵素はなお未解明のままであり、今後の検討を要する。

植物での光合成における電子伝達系ではフィロキノン（VK1）が、細菌の電子伝達系ではメナキノン-n（MK-n＝MK 類＝VK2）が不可欠であることが知られている。しかし、ホ乳類の各臓器（脳、精巣、その他多数の臓器）における MK-4 の比較的高濃度の存在に関する生理的意義はまだ解明されていない。この命題の解明のためにも、VK1 から MK-4 への変換酵素が解明される必要がある。

上述のように、MK-4 には VK1 にはない働きのあることが次々と報告されてきた。ただし、VK1（緑色植物に存在）や MK-7（納豆に多く存在）を摂取しても、生体内で MK-4 に変換されることを我々は以前の実験で確かめてきた。このため、MK-4 以外の VK 同族体も間接的に MK-4 作用につながるため、MK-4 機能の発現には有効といえる。

vitamin K analogue, menaquinone-4 (MK-4), vitamin K1

講演番号：4SY28-7
講演日時、会場：3 月 27 日 15:44～ C 校舎 26 会場

コレステロール合成でのドリコイン酸の関与

Effects of Dolichoic Acid on Cholesterol Synthesis

○佐上 博(東北大多元研)
○hiroshi sagami(Tohoku Univ. IMRAM)

我々はメバロン酸（MVA）代謝系の中でのイソプレノイド鎖延長生合成に関して研究を行ってきた。特に炭素鎖 C20 の全トランスゲラニルゲラニル化合物と炭素鎖の長いトランス-シス混合ポリプレニル化合物の合成に焦点を当ててきたが，現在それらの化合物からの異化代謝系に関して研究を行っている。 2002 年，ラット胸腺細胞での代謝物として R-2,3-ジヒドロゲラニルゲラノイン酸(R-2,3-diGGA）を同定したが，新奇ではなく，レフサム病患者の代謝異常で多量に検出される３種の分岐脂肪酸（フィタン酸，2,3-diGGA，そして 15,16-デヒドロフィタン酸）の一つという既知の化合物であった。炭素鎖 C20 の GGA は非環式レチノイドとしてレチノイン酸同様の作用が明らかにされていた事から，αイソプレン二重結合飽和の R-2,3-diGGA が機能分子であるのかどうか調べてみた。R-2,3-diGGA は GGA と異なり HL-60 細胞において好中球への分化を誘導しなかったが脂肪滴形成を誘導した。３位のキラル炭素に関する S-2,3-diGGA は R-2,3-diGGA と同様脂肪滴形成を誘導したが R-2,3-diGGA とは異なり更に異常な細胞形態を誘導した。MVA の添加により形態の異常は見られなかった。これらのことから R-2,3-diGGA の立体構造ではなく S-2,3-diGGA の立体構造に類似する化合物を探索してみた。S-3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA に類似構造がありまた MVA 代謝系の HMGCoA 還元酵素の特異的阻害剤スタチンにも共通すると思われる構造があることから， MVA 代謝系の律速酵素の HMGCoA 還元酵素に S-2,3-diGGA が作用し阻害の結果異常な細胞形態の誘導が起きたのではないかと予想してみた。また S-2,3-diGGA は生体内代謝物としては検出されていないことから、もしも同様な作用をもつ生体内化合物があるなら３位のキラル炭素に関して S のドリコイン酸（Dol-A）ではないかとも予想してみた。これらの予想のもと，トリ肝臓ドリコール（Dol）から Dol-A を調製しその HL-60 細胞に対する効果を調べてみた。細胞レベルで S-2,3-diGGA と同様の作用を示したことを受け，マウス個体に対しての影響も調べてみた。マウスに対して Dol-A は，体重の減少を伴った血中コレステロール濃度の上昇と肝臓の白色化を誘導した。Dol-A はウシ甲状腺に Dol とのエステル体として存在（1984 年）し，またヒト大脳に存在，特に黒質の神経メラニンに局在（2007 年）する。本シンポジウムではイソプレノイド化合物としてはまだ新奇な Dol-A に関して最近の研究結果を示すと共にコレステロールホメオスタシスに対する内在性 Dol-A が関与する可能性について議論する。

Cholesterol, Dolichol, Lipid droplet

講演番号：4SY28-8
講演日時、会場：3 月 27 日 16:06～ C 校舎 26 会場

植物における抗菌性イソプレノイドの生理と生産制御機構

The biosynthesis of anti-fungal isoprenoid and the mechanisms regulating it in plants.

○岡田 憲典[1]、宮本 皓司[1]、山根 久和[2]([1]東京大学生物生産工学研究センター、[2]帝京大学理工学部)
○Kazunori Okada[1], Koji Miyamoto[1], Hisakazu Yamane[2]([1]BRC, The Univ. of Tokyo, [2]Teikyo Univ.)

植物は病原菌などの感染を認識すると、抗菌性化合物であるファイトアレキシンの生産を含む様々な抵抗性反応を誘導する。イネにおけるファイトアレキシンとしては、ジテルペン型イソプレノイド化合物のモミラクトン類およびファイトカサン類とフラボノイド型のサクラネチンが知られている。これらのファイトアレキシンはいもち病菌感染などの生物的ストレスのほか、UV 照射や重金属処理、病害抵抗性に関与する植物ホルモンのジャスモン酸（JA）処理など、非生物的ストレスによっても生産誘導を受ける。一方、健全なイネ植物体では生産されないとされてきたファイトアレキシンであるが、最近の研究から通常の生育条件下においても根圏への分泌や特定の生育段階の花芽における生産などが認められている。根圏へのファイトアレキシンの分泌はアレロパシー物質としても知られるモミラクトンの作用により、周辺植物の生育を妨げるイネの生育戦略の 1 つと考えられる。花芽で生産されるファイトアレキシンも、最終的にはモミに蓄積することでアレロケミカルとしてイネの芽生え期の生育を有利にするものとも考えられるが、イネの開花期に高蓄積するファイトアレキシンの生理的な意味については明らかになっていない。また、イネとは進化的に大きく離れたコケ植物（蘚類）のハイゴケ *Hypnum plumaeforme* が、イネと同様にモミラクトンを生産することも報告されており、植物の生き残り戦略として、特定の環境に適応するための specialized metabolite（適応代謝産物）であるモミラクトンを、イネとハイゴケが共に生合成しアレロケミカルとして利用してきたことは極めて興味深い。一方で、イネにおけるジテルペン型ファイトアレキシンの組織特異的あるいはストレス誘導的な生産制御メカニズムに関しては未解明の部分が多く、我々はその生産制御機構に興味を持ち研究を進めている。イネのジテルペン型ファイトアレキシンは、メチルエリスリトールリン酸(MEP)経路由来のゲラニルゲラニル 2 リン酸を共通の前駆体として、ジテルペン環化酵素による環化反応および P450 などによる酸化反応を経て生合成される。興味深いことに、モミラクトン生合成酵素遺伝子群は 4 番染色体上において、ファイトカサン生合成酵素遺伝子群は 2 番染色体上において、それぞれ遺伝子クラスターを形成している。また、キチンエリシター応答性 bZIP 型転写因子 OsTGAP1 が上流の MEP 経路遺伝子と共にモミラクトン・ファイトカサン生合成酵素遺伝子群の発現制御に関与することを見いだした。本発表では、最近の我々の研究結果からこれまでに明らかにされたイネのジテルペン型ファイトアレキシンの生合成とその制御機構について、転写因子の機能解析を中心に紹介する。

Phytoalexins, Gene cluster, Transcription factor

ランチョンシンポジウム

本大会でのランチョンシンポジウムのチケットは，東北大学川内北キャンパス A 食堂〈川内の杜ダイニング〉で当日の朝 8:30 より配布します．チケットを受け取り，開始 5 分前までに会場にお越しください．空席がある場合は，チケットがなくても入場できます．

3LS01　JABEE ランチョンシンポジウム「大学・大学院での教育改革と人材養成」

3 月 26 日(火) 12:20〜13:40　B20 会場（講義棟 B 棟　2 階）
世話人：江坂宗春（広島大院生物圏科学，JABEE 対応委員会委員長），佐藤隆一郎（東大院農生，日本農芸化学会理事，JABEE 対応委員），小関卓也（山形大農，JABEE 対応委員）
座　長：江坂宗春（広島大院生物圏科学，JABEE 対応委員会委員長），小関卓也（山形大農，JABEE 対応委員），稲垣　穣（三重大院生物資源，JABEE 対応委員），大島敏久（九大院農，JABEE 対応委員）

12:20〜12:30　3LS01–1　はじめに　―JABEE と教育改革―……°江坂宗春（広島大院生物圏科学）
12:30〜12:50　3LS01–2　東北大学工学部化学・バイオ工学科の「一体教育」と JABEE　―伝統と改革―……°中山　亨（東北大院工）
12:50〜13:10　3LS01–3　リーディング大学院「グリーン自然科学国際教育研究プログラム」　―研究科の垣根を越えたリーダー育成―……°北島　健（名大院生命農学）
13:10〜13:30　3LS01–4　若手研究者キャリア支援プログラム　―岡山大学の取組から―……°稲垣賢二（岡山大院環境生命）
13:30〜13:40　おわりに……°佐藤隆一郎（東大院農生）

4LS02　ランチョンシンポジウム

3 月 27 日(水) 12:30〜13:20　B21 会場（講義棟 B 棟　2 階）
世話人・座長：五味勝也（東北大院農）

12:30〜12:55　4LS02–1　21 世紀の微生物によるモノづくり研究を俯瞰する……°穴澤秀治（(一財)バイオインダストリー協会）
12:55〜13:20　4LS02–2　日本は微生物資源をどのように確保するのか……°安藤勝彦（NITE・バイオテクノロジーセンター）

4LS03　ランチョンシンポジウム

3 月 27 日(水) 12:30〜13:20　B23 会場（講義棟 B 棟　2 階）
世話人・座長：此木敬一（東北大院農）

12:30〜13:20　4LS03–1　化学の力で生命現象の解明に挑む……°長田裕之（理研基幹研，ケミカルバイオロジー）

4LS04　ランチョンシンポジウム

3 月 27 日(水) 12:30〜13:20　B20 会場（講義棟 B 棟　2 階）
世話人・座長：宮澤陽夫（東北大院農）

12:30〜13:20　4LS04–1　食物アレルゲンの話：アレルゲン性低減化に向けてのヨーロッパでの研究について……°戸田雅子（ドイツ連邦共和国・ポール・エーリッヒ研究所）

講演番号：3LS01-1
講演日時、会場：3 月 26 日 12:20～ B 校舎 20 会場

JABEE と教育改革
JABEE and Educational Reform

○江坂 宗春(広島大院生)
○Muneharu Esaka(Hiroshima Univ.)

JABEE（日本技術者教育認定機構 Japan Accreditation Board for Engineering Education）は、技術者教育プログラムの 審査・認定を行う非政府団体である（JABEEの詳細は、http://www.jabee.org/を参照）。JABEEは、1999年に設立されており、今年15年目となる。その間、2005年には、ワシントンアコードへの加盟が認められ、国際的にも認知された技術者教育認定機関になった。

JABEE修了生は、ワシントンアコード加盟国のプログラム修了生と同じ技術者教育を受けた者として認められるとともに、技術士の第一次試験が免除され、登録を行えば、すぐに技術士補となれる。実務経験（通常4年間）を経た後、第二次試験に合格すれば、正式に技術士になることができる。

最近、JABEEは、新規に受審するプログラムが頭打ちで、JABEE自体が大きな壁に突き当たっている。「農学一般関連分野」では、昨年度までの３年間、新規プログラムがなく、中間、継続、変更時審査のみであった。しかし、今年度、農芸化学関係の新規プログラムがJABEEを受審した。

2012 年度、国際的整合性や審査方法の改善の観点から、JABEEの認定基準が大幅に改定された（http://www.jabee.org/OpenHomePage/kijun/kaitei2012_110609.pdf）。

日本農芸化学会は、「農学一般関連分野」に属しているが、農芸化学領域が含まれるJABEE認定プログラムは5プログラムのみである。しかし、生物工学および生物工学関連分野でも6プログラムが認定されており、広い意味では、11プログラムが農芸化学系のJABEEプログラムと考えられる。

日本農芸化学会では、JABEE対応委員会を組織し、JABEE対応の活動を行うとともに、以下のようなJABEE・教育シンポジウムを全国大会時に開催している。

・2007年度　「日本農芸化学会とJABEE」
・2008年度　「農芸化学における魅力ある大学教育とJABEE」
・2009年度　「農芸化学分野の大学院における技術者、研究者養成教育の改革」
・2010年度　「農芸化学における教育改革と分野別質保証」
・2011年度　「JABEEとキャリア教育」（東日本大震災で大会は中止）
・2012年度　「農芸化学における人材育成」

近年、大学・大学院における人材育成の重要性が指摘され、多くの大学・大学院で教育改革が進んでいる。このような背景から、今回「大学・大学院での教育改革と人材養成」と題したシンポジウムを開催することになった。

JABEE, educational reform, human resource development

講演番号：3LS01-2
講演日時、会場：3 月 26 日 12:30～ B 校舎 20 会場

東北大学工学部化学・バイオ工学科の「一体教育」と JABEE －伝統と改革－

A unique bioengineering program in Tohoku University

○中山 亨(東北大院工)
○Toru Nakayama(Tohoku Univ.)

【はじめに】 本講演では，東北大学工学部化学・バイオ工学科における生物工学教育の取り組みと特徴について紹介する．東北大学工学部の各学科では，学部 1 年次から大学院までの一貫教育を想定したカリキュラム編成がなされている．化学・バイオ工学科には応用化学・化学工学・バイオ工学の 3 コースが設置されている．

【一体教育】 本学科の教育プログラムの最大の特徴は，学科創設（1917 年）以来の伝統を踏襲した「一体教育」であり，本学科の生物工学教育もその特色が強く打ち出されたものとなっている．一体教育とは，3 年次終了まで学科の3 コース（応用化学，化学工学，バイオ工学）のカリキュラム（講義科目，実験，演習）を区別せず融合しながら実施する教育プログラムである．このプログラムにより，学生は履修の過程で幅広い領域のなかから自分の適性に合った専門分野を見極めることが可能となっている．この教育プログラムにおいてバイオ系講義科目は６つの学科専門科目からなり，それらの履修を通じて一冊の生化学の教科書（ホートン）をベースにして応用的側面も学べるように設計されている．さらに一体教育による応用化学・化学工学系科目の履修によって，生物工学教育が総合的に達成されている．学生は4年次に修了コースならびに卒業研修を実施する研究室を決定し，コースの専門性に特化した教育を受けながら総合的な能力を身につけていく．生物工学系の教育・研究はバイオ工学・化学工学両コースの研究室に広がっている．

本学科の一体教育は，「化学」に関するあらゆることを広く学べることを特徴とし，このことを反映して本学科の生物工学教育も「化学」に深く根差したものとなっている．当学科のバイオ工学コースの卒業生は，有機化学はもちろんのこと，無機化学，固体化学，量子化学や熱力学などを含む物理化学，移動現象論やプロセス工学などの化学工学の諸分野について，おもな領域をひととおりマスターした人材である．このように本学科の教育は，化学・バイオ技術に関わるきわめて広範な産業分野に柔軟に対応できるものとなっており，事実，本学科の卒業生の柔軟な対応能力は産業界できわめて高い評価を受けている．

【JABEEへの取り組み】 化学・バイオ工学科では教育プログラムの継続的改善を目的として早くからJABEE認定に取り組み，2002 年には「化学および化学関連分野」のJABEE 認定を取得した．2007 年には「化学および化学関連分野」（応用化学コースと化学工学コース）および「生物工学および生物工学関連分野」（バイオ工学コース）のJABEE 認定を取得した．本学科の教育プログラムでは，卒業要件がJABEE の基準をすべて満足するように設計されており，卒業生全員がJABEE修了生として認定される．

Tohoku University, JABEE, chemistry-oriented education of biotechnology

講演番号：3LS01-3
講演日時、会場：3 月 26 日 12:50～ B 校舎 20 会場

リーディング大学院「グリーン自然科学国際教育研究プログラム」 －研究科の垣根を越えたリーダー育成－

Program for Leading Graduate Schools: Integrative Graduate Education and Research Program in Green Natural Sciences

○北島 健(名大院生命農学)
○Ken Kitajima(Nagoya Univ.)

リーディング大学院は、我が国の将来を率いる実力あるリーダー人材の育成と大学院教育改革を目標として、文部科学省が設定したプログラムである。本プログラムでは、グリーン自然科学研究、すなわち人類が直面する環境やエネルギー問題を恒久的に解決し、持続可能な社会の発展を実現させる研究領域において、その目標を達成しようとしている。この領域における優れた人材育成と研究進展の必要性は、奇しくも未曾有の東日本大震災の大禍によって強く再認識させられたところである。本プログラムの背景として、名古屋大学が、分子生物学を基盤としたシステム生命科学や分子触媒を基軸とした物質創製の国際的研究拠点として活躍してきた実績と、分子科学研究所や基礎生物学研究所をはじめとする我が国屈指の研究所の連携協力関係を基に、きわめて高い水準の研究教育が可能であることが挙げられる。具体的には、生命農学、工学、理学の関連専攻が協力して、基礎から応用に至る４つの包括的研究展開「ナノ・エネルギー」、「グリーン物質変換」、「バイオマス」、「システムバイオ」において、最先端プロジェクトを実行しつつ、新しい教育システムを構築している。その教育システムの特色は、大学と産官学研究所の連携を実現すること、国際機関への人材輩出を目指すこと、単純選抜でなく切磋琢磨によって真に力量ある人材育成をすること、女子大学院生の特別育成支援によるリーダー育成を実施することにある。とくに、優れたアカデミア研究者だけでなく、シーズを産業に育てる企業研究者、国際社会で活躍するコーディネーター・メンターを育成することを目標にしている点が、これまでの大学院にはない特徴となっている。院生に対しては、研究成果、企業・研究所での研究経験、自立的独創的研究能力、国際教育企画能力、海外留学の５本柱の目標を設定し、それぞれの達成に対して授与されるStarを集めて、5 Starの獲得を目指すよう推奨している。本シンポジウムでは、このような構想のもとで、どのような取り組みを行っているのか、その具体的な制度設計とともに、実際に教育・研究上で起こりつつある様々な変化を紹介する。

Program for Leading Graduate Schools, Interdisciplinary Course with Environmental Focus, Nagoya University

講演番号：3LS01-4
講演日時、会場：3 月 26 日 13:10～ B 校舎 20 会場

若手研究者キャリア支援プログラム -岡山大学の取組から-

Okayama University Career Support Program for Young Scientist

○稲垣 賢二(岡山大院環境生命)
○Kenji Inagaki(Okayama University)

岡山大学若手研究者キャリア支援センターは，ポストドクターと大学院博士後期課程学生のキャリア支援を行っている。近年文部科学省は，ポストドクターがアカデミックポジション以外の分野でも活躍できるようキャリアパスの多様化を促進するため，ポストドクター・キャリア開発事業を実施している。岡山大学は 2011 年度にこの事業に採択され，2015 年度までの 5 年間，科学技術人材育成費補助金を受け，ポスドク・博士後期課程学生等の若手研究者で，企業等への就職希望者に対して，多様なキャリアパス人材として育成する若手研究者キャリア支援プログラムを実施している。そして，大学院の各専攻における研究教育に加えて，多様なインターンシップやキャリア教育を実施することにより，産業界などの実社会のニーズを踏まえた発想や国際的な幅広い視野などを身に付けさせ，大学院博士課程で培った専門知識・スキルを，多彩な分野で発揮・活躍できる**博士人財**を創出していくことを目指している。

【若手研究者キャリア支援センターとキャリア支援プログラム】

本センターでは，キャリア教育・就職支援に関する業務と，長期インターンシップを柱に，講義・セミナー，講演会・企業との交流会，コーディネーター面談などで構成するポストドクター・キャリア開発事業を行っている（１．キャリア教育･就職支援等業務　①キャリア教育の研究開発及び実施，②就職支援事業，③進路・就職相談，④インターンシップ，⑤学内及び学外就職関連機関等との連携・調整，⑥企業等の情報の収集及び提供，⑦進路・就職に関する調査・分析及び統計，⑧その他キャリア形成及び就職支援　２．ポストドクター・キャリア支援事業（ドクター・キャリアサポート・プログラム）　①講義・セミナーの実施，②講演会・企業との交流会の開催，③長期インターンシップ派遣，④コーディネーター面談)。

【キャリア支援の状況と成果】2012 年 11 月 1 日現在，プログラム登録者数 98 名，養成者数 76 名となっており，農芸化学関連分野の人材も多数プログラムに登録している。プログラム登録者からは，これまで行った講義や各種セミナー，企業との交流会などに対して評価する声が寄せられており，本センターの事業が浸透しつつある。協賛・連携企業はバイオ・食品関連企業を含めて現在 47 社であるが，賛同企業も今後さらに増える見通しである。長期インターンシップには，これまで 4 名を派遣している。今後の課題としては，登録者，協賛・連携企業，インターンシップ派遣者を増加させるとともに，インターンシップを契機にできるだけ多くの**博士人財**が実際の採用に至ることである。

post doctor, career support, internship

講演番号：4LS02-1
講演日時、会場：3 月 27 日 12:30～ B 校舎 21 会場

21世紀の微生物によるモノづくり研究を俯瞰する
Perspective of Microbiological Production in 21st Century

○穴澤 秀治(一般財団法人　バイオインダストリー協会)
○Hideharu Anazawa(Japan Bioindustry Association)

人類の健康で豊かな生活を支える食品や医薬品，化成品などは，農林水産業や医薬品産業，化学工業などの知的集約型のモノづくり技術の上に成立している。地球規模の人口増加，食糧需給，新興感染症，環境汚染，エネルギー資源など人類共通の課題からは，バイオテクノロジーの活用によるソフトな物質製造技術に期待が寄せられている。

広範なバイオテクノロジーの分野の中でも微生物機能を活用した製造技術は，米国においてはバイオリファイナリーとして，欧州ではホワイトバイオケミカルス構想において取り組みが進行しているが、これらは化学工学の基盤の上に発酵生産技術が展開されているものである。ここは、もともと我が国が秀でていると考えられてきたはずである。このことを本質的に支えているのが，有用微生物機能探索技術，微生物菌株の変異等遺伝学的改良技術，酵素や微生物を用いた反応系の構築技術等の水準の高さである。

しかしながら近年, 米国において大量, 均一で安価な糖質を基盤とする燃料用エタノールやコモディティーケミカルスという安価な発酵生産物質の工業的生産が現実のものとなり，「日本のバイオ産業はすでに米国に追い抜かれた」という見解が，行政の一部には流れている。それはエネルギー，プラスチックという人類に普遍的に必要とされ，急速に膨らんでいる世界のニーズに，日本企業，アカデミアの貢献が少ないからである。

詳細に見ると，それは安価で良質な糖源を大量に有しているという米国やブラジルの農業の優位性に立脚しているのが現実であり，微生物の探索，改良，反応系の構築という発酵技術開発の本質において追い越されたわけではないことが分かる。

そこで，我が国においても，将来の日本の産業構造をしっかりと見据えた上で，重要と思われる具体的課題を設定し，欧米の物まねで“合成生物学”などの言葉に踊らされることなく，その解決に最も適した微生物機能を探索・育種・開発することを軸とし，その微生物機能が最大限に発揮される場を提供しうる周辺技術（画期的なスクリーニング技術，各種オミクス解析技術，それらを統合したシステムズバイオロジー，それに立脚した物質生産菌株の育種技術など）を，今後も継続的に発展，成熟させる必要がある。

わが国にふさわしい研究の方位性はどこにあるのかを考えたい。

その三つの解として、

①発酵生産菌として圧倒的な生産性（石油化学工業レベル）を示す菌株・酵素の育種、②設計どおりに生産能を発揮できる菌株の造成、③多様な有機物を資化・発酵できる宿主細胞の造成、をここに示しておく。

Microbiology, Fermentation, Enzyme

講演番号：4LS02-2
講演日時、会場：3 月 27 日 12:55～ B 校舎 21 会場

日本は微生物資源をどのように確保するのか
How to secure microbial resources in Japan

○安藤 勝彦(NITE・バイオテクノロジーセンター)
○Katsuhiko Ando(Biological Resource Center, NITE (NBRC))

多種多様な微生物資源を日本国内で確保・整備しその利用を促進させることは、バイオ産業の発展に寄与するであろうし、この事に反対する人はいないであろう。それでは、どのようにして日本国内に多種多様な微生物資源を確保するのか？この場合、日本国内に棲息する日本産微生物資源と海外に棲息する海外産微生物資源に大別して考えるのが良いであろう。

１．日本産微生物資源：現在、地球上において菌類の約 10 万種が知られている。日本においては約 1 万 3 千種が記録されており、この事は日本が菌類のメガダイバース国家であることを示している。他方、保存されている菌類は 2 割にも満たないと思われる。また、細菌においては日本でいったいどのぐらいの種が見つかっているのかさえ分かっていない。この事から、少なくとも日本で記録された微生物は全て日本国内においてその培養株を保存することが微生物学者の義務ではなかろうか。また、そのためには何らかの制度を作り、日本の微生物資源は日本国内において確実に確保・整備することが重要である。間違っても、日本で発見された微生物が日本国内で保存されることなく海外で保存されているというような事があってはならないのである。

２．海外産微生物資源：日本では記録がない海外の微生物資源を日本国内に整備することも微生物資源の多様性の確保からは重要である。1993年に発効した生物多様性条約は、生物遺伝資源を扱う研究者にとっては研究の足かせになっているという話を耳にする。さらに、近い将来発効するであろう名古屋議定書やそれに伴う各批准国の国内法は、その状況をさらに悪化させるのではないかと心配する声も聞く。確かに名古屋議定書にはわずか一株の微生物資源であっても、海外の微生物資源を利用するためにはその国の国内法に則った方法で入手し、基本的にはその国の政府の許可を得るように求めている。しかしながら、全ての生物遺伝資源に対してこのような手続きを義務化しても、その運用面で多大なる労力と時間を必要とするのではなかろうか。ひいては研究開発の停滞を招きかねない。これについては、微生物資源を保存提供する微生物保存機関をうまく利用することが重要である。例えば、微生物の国境を越える移動についても名古屋議定書に沿った仕組みを作り出すために、世界の微生物保存機関の間の移動を基本とした新しいルールを作り、その中で日本の海外微生物資源確保の道を作り上げて行くべきではないだろうか。その事により、研究者は「提供国政府からの入手許可の取得」「相互に合意する条件の設定」「利益配分の設定」などの煩わしい仕事から解放され、研究に集中できるであろう。

多種多様な微生物資源を確保した国のバイオ産業の成功は、持たない国よりも格段にその可能性は高いであろう。我々は生物遺伝資源は国家財産と認識し、近い将来起こるであろう生物遺伝資源外交の切り札にもなり得ることを認識し、微生物資源確保に向けての制度設計を考えるべきである。

microbial resource center, CBD, Nagoya protocol

講演番号：4LS03-1
講演日時、会場：3 月 27 日 12:30～ B 校舎 23 会場

化学の力で生命現象の解明に挑む

Chemical Biology; it challenges elucidation of the mystery of living organisms via chemical approach.

○長田 裕之(理研基幹研、ケミカルバイオロジー)
○Hiroyuki Osada(Chem Biol, RIKEN ASI)

我が国の農芸化学者は「化学的手法で農学にかかわる事象を解き明かす」ことを目標にして、歴史的には、オリザニンやジベレリンの発見など、世界に冠たる研究成果を上げてきた。現在、我々の研究グループは、「化学的手法で生命現象を解き明かす」ケミカルバイオロジー研究を行っているが、農芸化学の目標と類似点が多い。本ランチョンセミナーでは、我々の研究を例に取り、ケミカルバイオロジー研究の現状と今後の可能性について紹介したい。

2004 年に、米国保健衛生研究所（NIH）がロードマップの一つに、化合物ライブラリーの重要性を挙げて以来、ケミカルバイオロジーおよびケミカルゲノミクスに関する研究所（センター）が世界中で設立された。主として、新設されたセンターの目的は創薬に偏っており、「化学的手法で生命現象を解き明かす」という基礎研究を行っている施設は少ない。NIH のケミカルゲノミクスセンターは、創設後わずか 7 年余で改組され、創薬研究を加速する National Center for Advancing Translational Sciences（NCATS)に編入されている。

理研のケミカルバイオロジー研究領域も、設立後 5 年で改組され、一部は、2012 年 4 月から環境資源科学研究センターに組み込まれることになっている。これまでは、医薬農薬の出口を見据えつつ、生命現象の解明に寄与するバイオプローブの開発をメインテーマとしてきたが、今後は、さらに天然資源の有効活用、環境研究へ貢献することが期待されている。本セミナーでは、以下の研究例を紹介する。（１）天然物（主として微生物二次代謝産物）の中から新規化合物を見出すための HPLC/MS/UV データベース NPPlot（Curr Opin Chem Biol 12:101-109, 2012)、（２）動物細胞の形態変化で化合物の作用標的を予測する MorphoBase（Chem Biol in press)、（３）化合物添加によって変動するタンパク質発現で、化合物の標的分子を予測する ProteoBase（Chem Biol 17: 460-470, 2010)、（４）数千種類の化合物をチップに固定化して、目的タンパク質のリガンドを探索する化合物アレイ法（Nature Chem Biol 6: 667-673, 2010)。

Chemical Biology, Database, Drug Discovery

講演番号：4LS04-1
講演日時、会場：3 月 27 日 12:30～ B 校舎 20 会場

食物アレルゲンの話：アレルゲン性低減化に向けてのヨーロッパでの研究について
Advanced research to reduce the allergenic properties of food allergens in Europe

○戸田 雅子(ドイツ連邦共和国・ポール・エーリッヒ研究所)
○Masako Toda(Paul-Ehrlich-Institut, German Federal Agency for Vaccines and Biomedicines)

ヨーロッパは多様な気候と食習慣を持つ国々の集合体であり、食物アレルギー発症の原因や頻度は国や地域によって異なる。例えば、シラカバ花粉による感作が多い北西部では、花粉症患者が新鮮な果物、野菜、ナッツ類などを摂取した際に起こる口腔アレルギー症候群（Oral allergy syndrome）の発生が増加して大きな問題となっている。この食物アレルギーはシラカバ花粉主要アレルゲンBet v 1 と相同性の高い PR-100 protein family に属する食物アレルゲンによって起こり、比較的マイルドな症状が主に口腔組織に発症するのが特徴である。一方、野菜や果物を多く摂取する南欧では、植物起源の脂質輸送タンパク Lipid Transfer Protein (LTP)やアクチン結合性タンパク Profilin などが原因アレルゲンとなる場合が多い。特に LTP は熱処理や消化酵素に対する耐性が高く、経口感作により重篤な症状を伴うアレルギーを発症させることが明らかになっている。

２００５年､食物アレルギーの発生率を把握し､また食物アレルゲンの分子特性を解析して in vitro の診断法を改善することを目的としたヨーロッパ多国間共同プロジェクト EuroPrevall が開始された。さらに FAST（Food Allergy Specific Immuno Therapy）プロジェクトでは、食物アレルギーのアレルゲン特異的免疫療法の開発が行われている。アレルゲン特異的免疫療法とはアレルゲン抽出物やアレルゲンタンパクを患者に定期的に皮下注射や舌下投与することで、アレルギー反応を起こりにくくする治療方法である。この免疫療法の問題点の一つとして、治療用アレルゲンが投与の際にアレルギー副反応を起こすリスクが挙げられる。FAST では LTP をターゲットアレルゲンの一つとしており、アレルゲンタンパクの構造改変を行うことでアレルゲン性を低減化させ、これを免疫療法に用いることを検討している。

本シンポジウムでは、ヨーロッパでの食物アレルギー研究の動向について、特に低アレルゲン性食品や治療用アレルゲンの開発を目的としたアレルゲン性低減化のストラテジー確立について、我々の知見を含めて紹介する。

Food allergy, Food allergen

ランチョンセミナー　プログラム

本大会でのランチョンセミナーのチケットは，東北大学川内北キャンパス A 食堂〈川内の杜ダイニング〉で当日の朝配布します（25 日は 8:15，26 日と 27 日は 8:30）．チケットを受け取り，開始 5 分前までに会場にお越しください．空席がある場合は，チケットがなくても入場できます．

3 月 25 日(月) 12:30〜13:20

LS 1　株式会社ブルボン／三井製糖株式会社　　A20 会場（講義棟 A2F）

司会　　峰尾 茂（株式会社ブルボン 健康科学研究所研究推進室室長）

「スローカロリー」を世界が注目！
－「イソマルチュロース」の特徴と食産業への活用－

家森 幸男（武庫川女子大学 国際健康開発所所長）
宮坂 清昭（三井製糖株式会社 開発生産本部商品開発部商品開発課）

LS 2　株式会社島津製作所　　C20 会場（講義棟 C2F）

座長　　奥村　毅（株式会社島津製作所 分析計測事業部グローバルマーケティング部）

京都バイオ計測プロジェクト・分析技術基盤構築のための産学公連携拠点の取り組み

山本 佳宏（京都市産業技術研究所 加工技術グループ バイオチーム）

LS 3　三菱ガス化学株式会社　　B11 会場（講義棟 B1F）

座長　　外山 博英（琉球大学農学部 教授）

新規食品素材ピロロキノリンキノン（PQQ）

ロバート・ラッカー〈Robert Rucker〉
（カリフォルニア大学デービス校 名誉教授〈University of California, Department of Nutrition〉）

LS 4　ブルカー・ダルトニクス株式会社　　B13 会場（講義棟 B1F）

司会　　志村 信之（ブルカー・ダルトニクス株式会社 営業本部）

精密質量分析装置による metabolome 解析と天然物構造解析

細田 晴夫（ブルカー・ダルトニクス株式会社 営業本部 アプリケーション）

MALDI TOF MS による微生物の迅速同定

松山 由美子（ブルカー・ダルトニクス株式会社 営業本部 アプリケーション）

LS 5　タカラバイオ株式会社　　B21 会場（講義棟 B2F）

座長　　北川 正成（タカラバイオ株式会社 ドラゴンジェノミクスセンター長）

PCR による遺伝子クローニング成功への道

上森 隆司（タカラバイオ株式会社ドラゴンジェノミクスセンター 副センター長）

LS 6　株式会社伊藤園　　B23 会場（講義棟 B2F）

座長　　提坂 裕子（株式会社伊藤園 中央研究所）

清涼飲料の口腔・咽頭における嚥下特性

森髙 初惠（昭和女子大学大学院 生活機構研究科 教授）

3月26日(火) 12:30〜13:20

LS 7　株式会社明治　　M26会場（マルチメディア教育研究棟 M206）

座長　　齋藤 忠夫（東北大学大学院農学研究科 教授）

腸内細菌およびプロバイオティクスの免疫調節作用
〜発酵食品の未来〜　　上野川 修一（東京大学名誉教授）

LS 8　味の素株式会社　　A20会場（講義棟 A2F）

司会　　鬼頭 守和（味の素株式会社 研究開発企画部）

だしのおいしさの秘密と健康への寄与
かつおだしの嗜好性のメカニズム　　近藤 高史（味の素株式会社 イノベーション研究所）
かつおだしは攻撃行動を低下させる　　西条 寿夫（富山大学大学院医薬薬学研究部(医学)システム情動科学）

LS 9　エッペンドルフ株式会社　　C20会場（講義棟 C2F）

座長　　野村 俊一郎（エッペンドルフ株式会社 マーケティング部）

DASGIP Small Scale Bioreactors-The Vital Instrument for Screening and Process Development
Joerg Schwinde（Bioprocess Manager, Eppendorf APHQ）

LS 10　ベックマン・コールター株式会社　　B11会場（講義棟 B1F）

座長　　小林 俊博（ベックマン・コールター株式会社 ライフサイエンス
テクニカルマーケティング統括部門）

超遠心分析法のタンパク質機能・構造生物学における貢献
新井 悦郎（ベックマン・コールター株式会社 ライフサイエンス
テクニカルマーケティング統括部門）

LS 11　株式会社エービー・サイエックス　　B13会場（講義棟 B1F）

司会　　岡本 尚一（株式会社エービー・サイエックス 事業戦略推進本部）

ストリゴラクトンの機能と作用機構：植物ホルモン研究における LC-MS/MS の利用
山口 信次郎（東北大学大学院生命科学研究科）

LS 12　ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社　　B23会場（講義棟 B2F）

司会　　田中 政道（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）

シークエンスキャプチャーと GS FLX による
非モデル作物の SNP マーカー開発　　福岡 浩之（独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
野菜茶業研究所　野菜育種・ゲノム研究領域）

3 月 27 日(水) 12:30〜13:20

LS 13　アサヒフードアンドヘルスケア株式会社　　B11 会場（講義棟 B1F）

司会　　高橋 朋子（アサヒグループホールディングス株式会社 食の基盤技術研究所）

抗酸化食品で寿命は延びるのか？　　白澤 卓二（順天堂大学大学院 医学研究科 加齢制御医学講座 教授）

りんごポリフェノールの寿命延長研究のご紹介　　砂川 忠広（アサヒグループホールディングス株式会社 食の応用技術研究所 主任研究員）

LS 14　発芽と健康機能研究会　　B13 会場（講義棟 B1F）

座長　　下山田 真（宮城大学 食産業学部）

栄養学から見た発芽食のすすめ　〜発芽ご飯紹介〜　　関口 絢子（有限会社ファーレ）

発芽食品の過去・現在・未来　　茅原 紘（信州大学）

長寿社会実現に向けた発芽食品の可能性を考える　　津志田 藤二郎（宮城大学 食産業学部）

ランチョンセミナーLS1
-日本農芸化学会2013年度大会-

「スローカロリー」を世界が注目！
-「イソマルチュロース」の特徴と食産業への活用-



日時：2013年3月25日(月)
12:30～13:20

会場：東北大学川内北キャンパス
A20会場(講義棟A200)

豊かな食生活の代償として肥満などの生活習慣病が世界中で蔓延しつつあります。世界60を超える地域での調査研究を基にして、健康長寿の栄養条件として「スローカロリー」の可能性について述べていただきます。
そして消化吸収がスローな糖質「イソマルチュロース（パラチノース®）」に関する加工特性や機能性について取り上げ、食産業への活用事例について紹介いたします。

演者1　家森 幸男先生(武庫川女子大学国際健康開発研究所)

演者2　宮坂 清昭(三井製糖株式会社開発生産本部商品開発部)

【司会】　峰尾 茂(株式会社ブルボン健康科学研究所)

武庫川女子大学 スローカロリーランチ付き 森真理管理栄養士監修

ランチョンセミナーへの参加には整理券(無料)が必要です。
整理券配布場所：A食堂〈川内の杜ダイニング〉　当日8:15～(定員300名)

※整理券は12時25分を過ぎると無効になります。午前のプログラムは12時5分に終了予定です。整理券をお持ちの方は、セッション5分前の12時25分までにご来場ください。12時25分までにご来場されない場合には、整理券は無効となり、整理券をお持ちでないセミナー参加者にご提供いたしますことをご了承ください。

ブルボン
本社：〒945-8611 新潟県柏崎市松波4丁目2番14号
TEL(0257)23-2333　FAX(0257)22-2005
http://www.bourbon.co.jp/

三井製糖
本社：〒103-8423 東京都中央区日本橋箱崎町36番2号
TEL(03)3663-3111　FAX(03)3664-6778
http://www.mitsui-sugar.co.jp/

SHIMADZU
Excellence in Science

日本農芸化学会2013年度大会

ランチョンセミナーのご案内

京都バイオ計測プロジェクト・分析技術基盤構築のための産学公連携拠点の取り組み

日時　2013年3月25日（月）12:30～13:20

会場　東北大学川内北キャンパス　講義棟C200

演者　山本佳宏 先生　（京都市産業技術研究所　加工技術グループ　バイオチーム）

京都市バイオシティ構想の一部として、研究・開発の基盤となる計測技術を高度化することで大学、企業の研究開発を促進し、また、開発した分析技術を製品化し、市場に普及させることを目的として、京都バイオ計測プロジェクトは活動を行ってきた。現在では、開発した分析技術を応用し、菓子、飲料、清酒、試薬キット、分析用カラム、センサー、計測装置等が開発され、市販製品として市場に展開されつつある。本セミナーではプロジェクトの取り組みを紹介しながら、開発された分析技術がどのように産業に波及しているのかを紹介する。

司会　奥村　毅　（株式会社 島津製作所）

お問合せ

（株）島津製作所　分析計測事業部　グローバルマーケティング部
〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原1　TEL：075-823-1352

日本農芸化学会 2013 年度大会

ランチョンセミナー　LS3

新規食品素材ピロロキノリンキノン（PQQ）

日時：3 月 25 日(月）12:30～13:20

場所：東北大学　川内北キャンパス　B11 会場（講義棟 B101）

演者：Robert B. Rucker　名誉教授

（カリフォルニア大学　デービス校　栄養学部）

マウスでの PQQ 欠乏症の Science 誌での発表(1989 年)を始め、PQQ 研究を長年続けてきたこの分野のスペシャリスト。講演は英語で行います。

座長：外山博英　教授

（琉球大学　農学部亜熱帯生物資源科学科　発酵･生命科学分野）

ピロロキノリンキノン（PQQ）は 1979 年に第 3 番目の補酵素として微生物で発見されました。微量ですが、日常摂取している飲食物や体内にも存在します。微生物での機能・構造研究に加えて、マウスでの欠乏症や、新規ビタミンの可能性の報告があり、細胞や動物レベルでの生理的機能についても興味が集まってきています。米国で脳機能改善を訴求する健康食品素材として、また、国内では化粧品原料として使用され始め、産業的な応用面も開拓されつつあります。強力な抗酸化作用に加えて、神経保護作用やミトコンドリア新生などの作用が報告され、様々な機能を持っている低分子キノン化合物として益々の注目を浴びています。この PQQ の焦点をあて、これまでの知見を概観するとともに、新たな機能探索の最新情報を提供いたします。

シンポジウム　4SY15　新規食品素材ピロロキノリンキノン（PQQ）の機能探索（3 月 27 日（水）13：30～16：30、B202 会場（講義棟 B 棟 2 階 B202）も開催いたしますので、合わせてご参加ください。

三菱ガス化学株式会社

〒100-8324　東京都千代田区丸の内 2-5-2　TEL　03-3283-4772　FAX　03-3283-5184

関連 Web サイト　http://biopqq.com/

Bruker Daltonics

日本農芸化学会2013年度大会

ブルカー・ダルトニクス株式会社

ランチョンセミナー　LS4 B13 会場（講義棟B103）
日時：3月25日（月）　12：30～13：20



●演題1
「精密質量分析装置によるmetabolome解析と天然物構造解析」

多変量解析ソフト　ProfileAnalysis

メタボローム分野における質量分析装置の膨大なデータから特徴ある成分を抽出するためには多次元の変量の比較を行う必要があります。

弊社ProfileAnalysis はPrincipal Component Analysis(主成分解析)という手法を用いて膨大な質量分析装置のデータよりその特徴ある成分を簡便に抽出することが可能です。

質量分析装置への固体試料直接導入　DirectProbe

質量分析のイオン化はElectroSprayIonization、あるいはAtmosphere pressure chemical ionization などの手法が汎用的にもちいられています。しかしいずれの手法も液体試料を前提としたイオン化になります。

今回弊社で紹介するのは溶媒に易溶性の試料だけでなく、溶媒難溶性の試料を固体試料そのまま測定可能なDirectProbeを紹介いたします。

さらにその一つのアプリケーションとして薄層クロマトグラフを用いた分離、そのスポット成分をDirectProbeにより測定、組成解析までのフローを合わせてご紹介いたします。

上記アプリケーションのほか弊社 質量分析装置最新機種　micrOTOFQIII, maXis impactに関してもデータも交えながらご紹介いたします。

●演題2
「MALDI TOF MSによる微生物の迅速同定」

近年、新しい微生物同定法として質量分析装置を用いた技術が広く注目を集めており、さまざまな分野でその導入が加速度的に進んでいます。この手法はMALDI TOF MSを用いた微生物の主にリボゾームタンパク質のプロファイルから、パターンマッチングにより菌種を特定するというもので、従来法と比較して極めて迅速に、かつ正確な結果を得ることができ、さらには低コストを実現した手法であるということが主な特徴になっています。

現在一般細菌を中心に2000菌種（4500株）以上が登録されたライブラリを提供していますが、真菌など従来法で同定が困難とされてきた菌種に関しても前処理法を含めライブラリを充実させており、より広い微生物で利用可能なシステムになっています。さらには同定のみならずタイピングや毒性株の検出、薬剤感受性などのアプリケーションも次々に発表されております。

今回はMALDI TOF MSを用いた微生物同定システム　MALDIバイオタイパーについて基本原理から最新アプリケーションを中心にご紹介します。

MASS SPECTROMETRY

Innovation with Integrity

詳しくは、www.bruker.jpをご訪問ください。

ブルカー・ダルトニクス株式会社
●営業本部・テクニカルサポートセンター
〒221-0022横浜市神奈川区守屋町3-9
TEL: 045-440-0471　FAX: 045-453-1827
●大阪営業所
〒532-0004 大阪市淀川区西宮原1-8-29 テラサキ第2ビル2F
TEL: 06-6396-8211　FAX: 06-6396-1118

TaKaRa

日本農芸化学会2013年度大会
ランチョンセミナー

PCRによる遺伝子クローニング成功への道

日　時:　2013年　3月25日(月)12:30　～　13:20

会　場:　東北大学　川内北キャンパス　B21会場（講義棟B201）

座　長:　北川　正成

（タカラバイオ株式会社　執行役員　バイオ研究所長）

演　者:　上森　隆司

（タカラバイオ株式会社　ドラゴンジェノミクスセンター　副センター長）

目的のDNAを任意のベクターに載せるクローニング操作は、遺伝子工学実験における基礎技術のひとつであり、様々な手法が存在します。その中でもPCRを用いた各種の方法は、自由度が高く、簡便であることから近年多用されています。

一方、PCR テクノロジーの発展は目ざましく、それぞれに特長を持った多くの種類の酵素が存在しています。これらの中から、その性質を理解した上で、自身の用途、目的に応じた最適の酵素を選択することが、実験の結果を左右すると言っても過言ではありません。

今回のセミナーでは、タカラバイオの最新のPCR 酵素や Clontech の In-Fusion クローニングシステムを中心に、PCR クローニングを成功させる近道をご紹介します。

In-Fusion クローニングシステムは、1ステップの反応で、短時間に効率よくPCR 断片を任意のベクターにクローニングでき、余分な配列が付加されず、しかも定方向クローニングを行うことができる優れた方法です。

タカラバイオ株式会社

東日本支店　TEL　03-3271-8553　FAX　03-3271-7282　受託窓口　TEL　077-543-6116
西日本支店　TEL　077-565-6969　FAX　077-565-6995　ウェブサイト　http://www.takara-bio.co.jp
TaKaRaテクニカルサポートライン　TEL 077-543-6116　FAX　077-543-1977

日本農芸化学会2013年度大会
ランチョンセミナー LS6
株式会社伊藤園

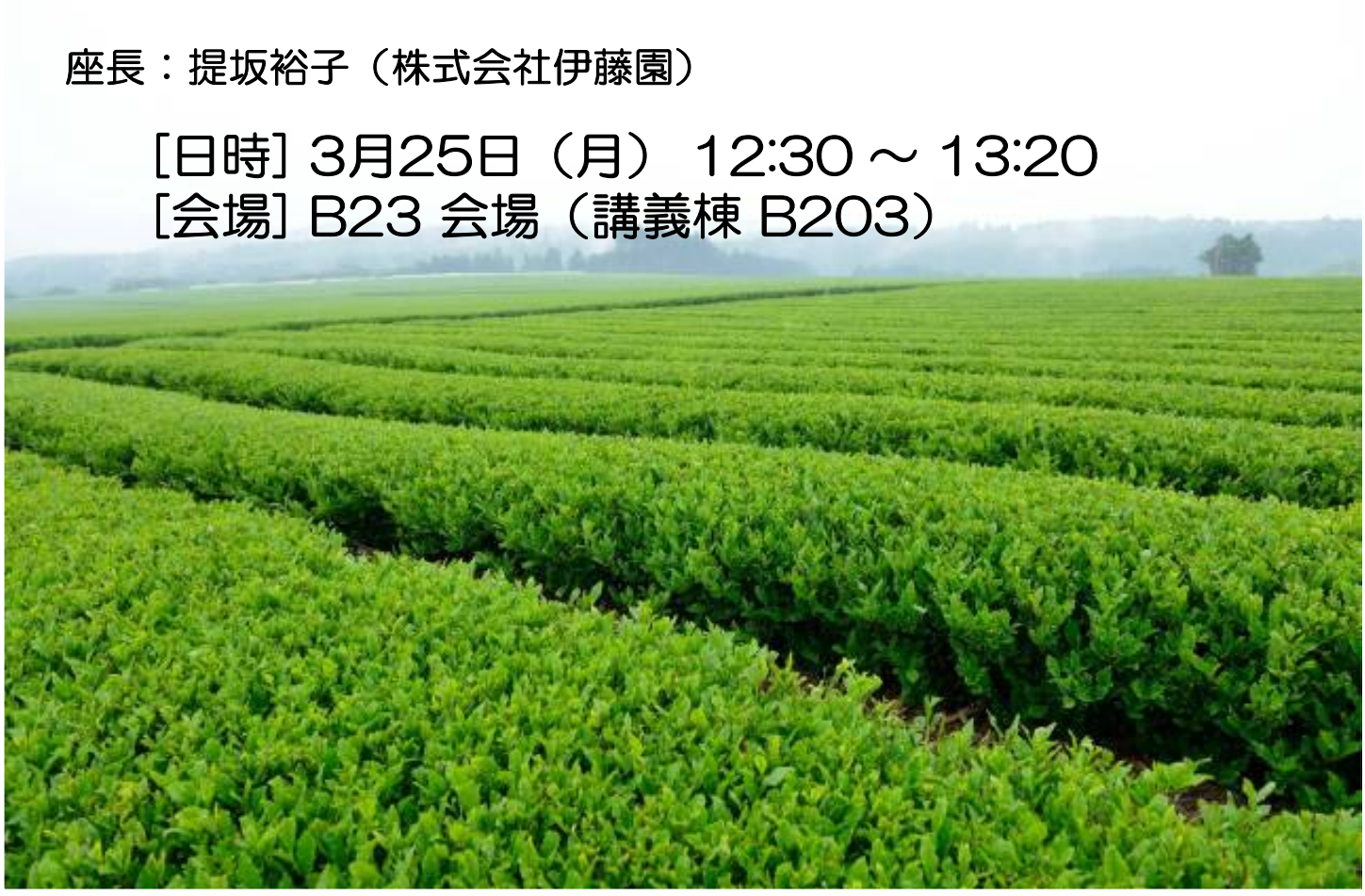
清涼飲料の口腔・咽頭における嚥下特性

森髙初恵　先生（昭和女子大学大学院　生活機構研究科）

　食塊のまとまりやすさ、粘性率や硬さなどの物理的性質は、食塊の口腔から食道への移送に影響を与えるため、嚥下機能低下者が安全に食塊を嚥下するためには極めて重要である。
　飲料の配合割合や素材を変化させることにより、食塊のレオロジー特性やテクスチャー特性は変化する。
　本講演では、清涼飲料水の口腔・咽頭における嚥下特性について具体例を挙げながら紹介する。

座長：提坂裕子（株式会社伊藤園）

[日時] 3月25日（月） 12:30 ～ 13:20
[会場] B23 会場（講義棟 B203）



明日をもっとおいしく
meiji

LS-7 日本農芸化学会2013年度大会
株式会社 明治 ランチョンセミナー

腸内細菌およびプロバイオティクスの免疫調節作用 ～発酵食品の未来～

2013年3月26日（火） 12:30-13:20
M26会場（マルチメディア教育研究棟M206）

座長：齋藤忠夫先生
（東北大学大学院農学研究科　教授）

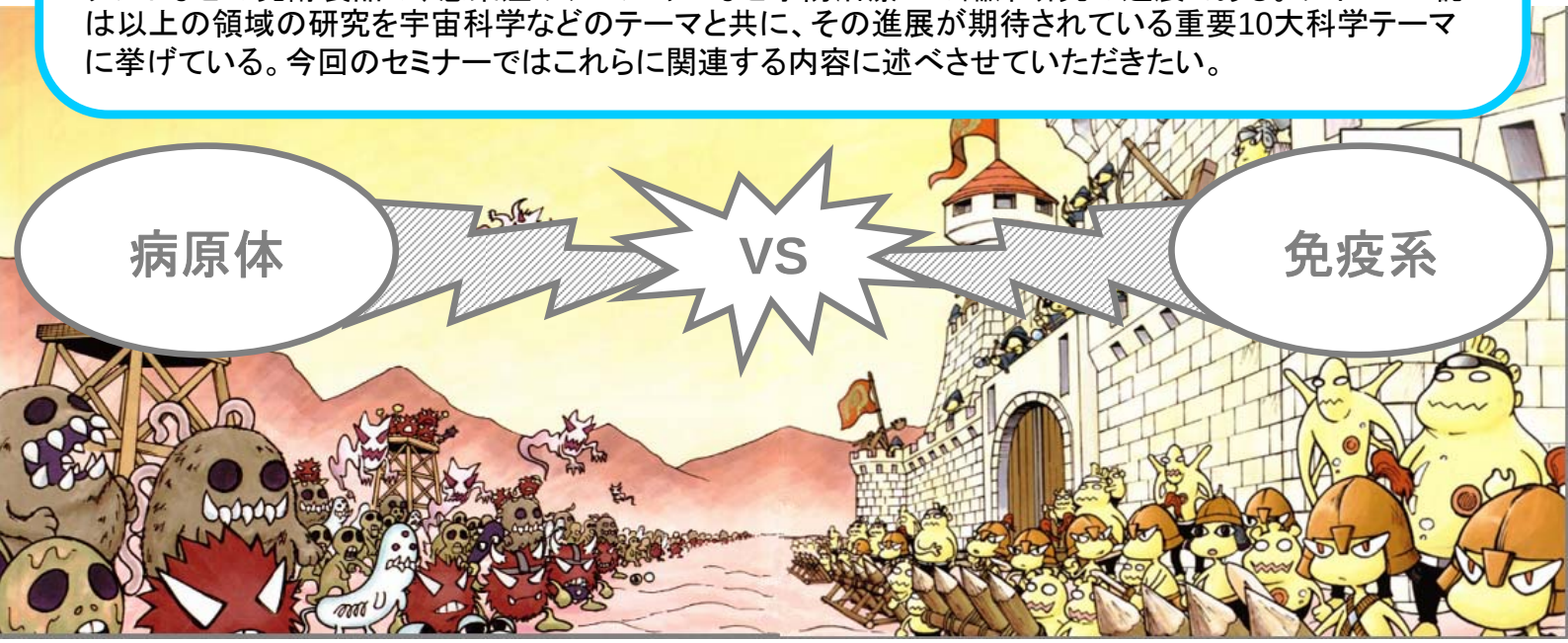




講演者：上野川修一先生
（東京大学名誉教授）

東京大学農学部卒業　農学博士
東京大学農学部助手、助教授を経て、2003年まで東京大学大学院農学生命科学研究科教授、現在東京大学名誉教授、また、2012年まで日本大学生物資源科学部教授。
この間、日本農芸化学会会長を務める。
専門分野は、食品免疫学、腸内細菌学、食品機能学、食品アレルギー学。
現在、財団法人日本ビフィズス菌センター（腸内細菌学会）理事長、日本食品免疫学会会長、一般財団法人糧食研究会会長
受賞：紫綬褒章、国際酪農連盟賞、日本農芸化学会賞

腸内細菌の研究は17世紀のレーウェン・フックに始まり、19世紀の乳酸菌研究のパスツール、そしてヨーグルト、腸内細菌と健康長寿の研究のメチニコフへと長い歴史をもつ。
そして、長い時を経て現在この領域の研究は急激な進展期に入った。すなわち腸内細菌や有益な細菌であるプロバイオティクスと免疫系との相互作用、そして、その破綻と病気（感染症、アレルギー、自己免疫疾患など）の発症との関連が明らかにされた。その推進役を果たしたのは最近の①腸内細菌群のメタゲノム解析、②免疫系における細菌の認識機構の解明（トル受容体の研究）、③プロバイオティクスやヨーグルトなどの発酵製品の、感染症やアレルギーなど予防治療への臨床研究の進展である。サイエンス誌は以上の領域の研究を宇宙科学などのテーマと共に、その進展が期待されている重要10大科学テーマに挙げている。今回のセミナーではこれらに関連する内容に述べさせていただきたい。



日本農芸化学会 2013 年度大会
LS8：味の素株式会社　ランチョンセミナー
2013 年 3 月 26 日（火）12:30-13:20
A20 会場（講義棟 A200）



だしのおいしさの秘密と健康への寄与

１　かつおだしの嗜好性のメカニズム

演者：味の素株式会社 イノベーション研究所
近藤　高史

だしは日本料理の味付けの基本です。油、バター、ソースに頼らず、かつお節や昆布などの乾物を使ってだしを引き食材の下味にするという調理方法は、日本で独自に発達した優れた調理方法です。しかし海外の方々から、だしは生臭い磯臭いと不快に感じ敬遠される傾向にあります。ではなぜこのように評価が分かれるのでしょうか？だしには不思議なことが多く、何か特別な秘密が隠されているに違いありません。それを解き明かす鍵として、摂取経験／学習や健康効果などが考えられます。本セミナーでは、「かつおだし」を例にして、だしの嗜好性とその裏側に隠れている本質（健康効果）を生理科学的に解明しようと試みる最新の研究成果について紹介します。

２　かつおだしは攻撃行動を低下させる

演者：富山大学大学院医学薬学研究部（医学）システム情動科学
教授　西条　寿夫

消化管と脳は、迷走神経や液性因子により相互に影響を及ぼしています。また近年、うま味物質や様々な栄養素が情動行動の中枢である大脳辺縁系などの脳機能を変化させることが報告され、食物の向精神作用が注目されています。そこで私達は、マウスの攻撃行動をモデルに、かつおだしが情動行動に及ぼす影響ついて調べました。その結果、かつおだしを摂取しているマウスでは、他マウスへの攻撃行動が低下し、うつ状態になりにくいことなどが分かりました。本セミナーでは、これら行動実験やニューロン活動を記録した研究から、かつおだしの情動／社会行動改善効果について紹介します。

おいしさ、そして、いのちへ。
Eat Well, Live Well.
AJINOMOTO®

eppendorf

日本農芸化学会 2013 年度大会ランチョンセミナー：LS9



DASGIP Small Scale Bioreactors

The Vital Instrument for Screening and Process Development

日 時 : 3 月 26 日 (火) / 12:30 - 13:20

会 場 : C20 会場（講義棟 C200）

講演者名 : Joerg Schwinde (Bioprocess Manager, Eppendorf APHQ)

DASGIP has been an industry-leading supplier of benchtop bioreactor solution for biotech, pharma and chemical industries as well as academia and research institutions since 1991.

Our Parallel Bioreactor Systems for cultivation of microbial, plant, animal and human cells utilize industry standard benchtop glass and single-use bioreactors.

DASGIP’ s best-in-class configurable control systems and state-of-the-art bioprocess analyzers deliver unparalleled functionality coupled with user-friendly design for optimal bioprocessing.

SCRUM

国内販売店：株式会社スクラム

〒130-0021 東京都墨田区緑 1 丁目 8 番 9 号 A&Y ビル 3F

BECKMAN COULTER

日本農芸化学会 2013 年度大会

ランチョンセミナー【LS10】

■ 日時　2013年3月26日（火）　12:30 ～ 13:20

■ 会場　B11 会場（東北大学 川内北キャンパス 講義棟 B101）

超遠心分析法の タンパク質機能・構造生物学における貢献

演者　ベックマン・コールター株式会社
ライフサイエンス　テクニカルマーケティング統括部門
新井悦郎

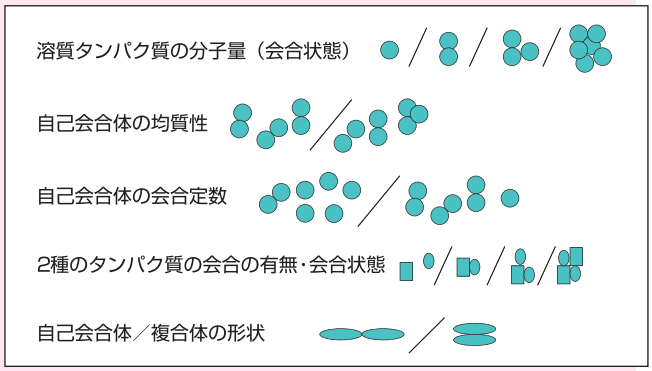
機能･構造生物学において重要な、タンパク質の自己会合や他の分子とのインタラクションを解析できる、超遠心分析法をご存じでしょうか。

超遠心分析法の利点

① 試料を担体に固定せず、溶液中に溶質として存在したままで解析します。分子内すべての相互作用部位が活性状態のままの Native 状態で解析できます。
② 分析中の濃度変化（希釈など）が少なく、濃度依存性の高い系の解析に優れます。
③ 数百万程度までの幅広い分子量が求められます。
④ 分子形状推定ができるとともに、形状によらない正確な分子量も求められます。

超遠心分析法で分かること

右図に示しました。これらの情報は結晶解析・NMR 解析の背景情報としても有用です。



セミナーでは、

分析用超遠心システム「ProteomeLab XL-A/I」（ベックマン･コールター）による超遠心分析について、その分析原理と、応用例（製薬業界における生物製剤応用、タンパク質機能・構造生物学における応用など）を紹介します。



分析用超遠心システム
ProteomeLab™ XL-I

ベックマン･コールター株式会社
お客様専用 0120-566-730　☎ 03-6745-4704　FAX 03-5530-2460
e-mail bckkcas@beckman.com　URL http://www.beckmancoulter.co.jp

日本農芸化学会2013年度大会

Annual Meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry 2013

株式会社 エービー・サイエックス

会期 2013年 **3月26日（火）12:30 ～ 13:20**

会場 **東北大学** 川内北キャンパス：講義棟 **B103**

＜ 演題 ＞ **ストリゴラクトンの機能と作用機構：植物ホルモン研究におけるLC-MS/MSの利用**

＜ 演者 ＞ **山口 信次郎 先生**

東北大学大学院生命科学研究科

「植物ホルモン」は、植物の成長や分化に微量で多大な影響を与える活性分子群である。私たちの研究室では、植物ホルモンの生合成や応答性に欠陥をもつ突然変異体を化学生物学的視点から解析し、それらのホルモンがどのように作られ、どのように働くのかを明らかにするための研究を行なっている。植物ホルモンの研究において、植物体に含まれるホルモンの定性・定量分析は重要な技術である。一般に、植物ホルモン類の内生量は極めて微量であり、グラム新鮮重量あたり1ナノグラムに満たない場合も多い。また、化学的性質が類似した類縁体が共存する場合もある。したがって、植物ホルモン類の定性・定量分析には、高感度かつ選択性の高い分析法が必要である。これを実現するため、私たちはLC-MS/MSを利用している。特に、検出しているピークが真に目的物質であることを確証するには、質量分解能に優れた四重極–飛行時間型（Q-Tof）質量分析計の利用が有効である。

私たちは以前に、テルペノイド化合物の一種である「ストリゴラクトン」が、植物の枝分かれを制御する新しいホルモンとして働くことを明らかにした。本セミナーでは、主にストリゴラクトンを対象とした研究において、LC-MS/MSがどのように利用されているのかを紹介したい。ストリゴラクトンは1960年代に、根寄生植物の種子発芽を誘導する物質として根の滲出液中から最初に発見された。その後、ストリゴラクトンは植物の栄養吸収を助けるアーバスキュラー菌根菌との共生に関与する化学シグナルであることが示された。すなわち、ストリゴラクトンは植物のホルモンとして自身の生長・分化を制御するだけでなく、アレロケミカルとして根から分泌され、根圏において寄生および共生に関与する。イネの枝分かれ（分げつ）が異常に多くなる*dwarf (d)*変異体等の解析から、ストリゴラクトン生合成や応答に関わる重要な遺伝子が明らかになっている。これらの機能解析を通じて、ストリゴラクトンの生合成や作用機構に関する重要な知見を得たいと考えている。

株式会社 エービー・サイエックス
本社：〒140-0001 東京都品川区北品川4-7-35
TEL：0120（318）551 FAX：0120（318）040 www.absciex.com

是非弊社展示ブースにもお立ち寄りください。

本製品は研究用にのみ使用できます。診断目的およびその手続き上での使用はできません。
The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX ™ is being used under license.
© 2013 K.K. AB SCIEX. All rights reserved.

日本農芸化学会　2013年度大会

ランチョンセミナー LS12

■ 日時：2013年3月26日（火）
12:30~13:20

■ 会場：東北大学川内北キャンパス
講義棟B203（B23会場）

シークエンスキャプチャーとGS FLXによる非モデル作物のSNPマーカー開発

講 演

福岡　浩之 先生

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
野菜茶業研究所　野菜育種・ゲノム研究領域

■ 司会：田中　政道
ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
AS事業部　マーケティング部

ナス（Solanum melongena L.）は日本をはじめアジア、南欧、中近東諸国では重要な野菜であるが、同じナス属に属し全ゲノム配列の解読が報告されているバレイショおよびトマトに比べゲノム情報リソースの蓄積は遅れている。このような非モデル作物における網羅的なDNAマーカー開発を目的に、ゲノム濃縮とNGSを併用した手法を試みた。
ナスの様々な組織に由来するcDNAをロシュGS-FLXを用いて高速解読したところ、得られた約50万リードのEST配列は総塩基数約24Mb、43,236種の独立配列にアセンブルされた。この配列に基づき、シーケンスキャプチャー法のためのオリゴプローブを設計したところ、42,957配列（99.4%）について計701,553個のプローブが設計できた。ゲノム断片に含まれる反復配列同士のハイブリダイズに因る濃縮配列のバイアスを避けるため、設計したプローブによるCGHを行い、その結果に基づき著しく高いシグナルを示す129,362プローブ（18.5%）を排除し、42,275配列（97.8%）についてゲノム濃縮を行った。
得られた濃縮産物から、51,720コンティグ、平均長1,536bpの配列情報が得られた。
192の暫定SNPサイトについてサンガー法による配列確認を行い、その結果に基づいてリードの重複度、塩基のq値、マイナーアリルの出現数などの指標を設定し、4,453の確からしいSNPsを選抜した。これらのSNPsの由来遺伝子はそのトマトにおける相同遺伝子がゲノム上のほぼ全域にわたって分布していることから、ナスゲノム上においてもゲノム全体をカバーしうることが示唆された。このうち、1,536個のSNPについてF2分離集団を用いたマッピングを行った結果、これらの座乗位置は想定通りナスゲノム全体に均等に分布し、高密度なSNPマーカー連鎖地図を構築することができた。
以上の結果は、シーケンスキャプチャー法とGS-FLXの併用によって、ゲノム情報が網羅的に整備されていない非モデル作物においても、極めて効率的に多数のSNPマーカー開発やマーカー連鎖地図構築が可能であることを示している。

ランチョンセミナーへのご参加には
整理券（無料）が必要です。

整理券発券デスク：A食堂（川内の杜ダイニング内）
当日の8:30より配布。但し、整理券がなくなり次第終了となります。

■ 共催：日本農芸化学会 2013年度大会　ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

お問い合わせ
ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
AS事業部（研究用試薬・機器）
本社：〒105-0014 東京都港区芝2丁目6番1号
TEL.03-5443-5287　FAX.03-5443-7098
E-mail：tokyo.as-support@roche.com
URL：http://www.roche-biochem.jp

日本農芸化学会 2013 年度大会
ランチョンセミナー

アサヒフードアンドヘルスケア株式会社

【特別セミナー】
抗酸化食品で寿命は延びるのか？
白澤　卓二　先生

（順天堂大学大学院　医学研究科　加齢制御医学講座教授）

最近の老化研究の進展を紹介し、抗酸化食品によるアンチエイジングの可能性について分かりやすく解説します。

【講演】
りんごポリフェノールの寿命延長研究のご紹介
砂川　忠広

（アサヒグループホールディングス株式会社　食の応用技術研究所）

りんごは抗酸化作用を有するプロシアニジンを主成分としたポリフェノールを多く含んでいます。りんごポリフェノール（AP）の抗酸化作用を検証するために、心筋特異的 Mn - SOD 欠損マウス（拡張型心筋症モデルマウス）に AP を飲水投与したところ、心臓重量増加と心臓組織の繊維化が抑えられるとともに寿命も延伸しました。
また、このマウスから単離調製した心室筋細胞において、AP の摂取は活性酸素の生成を抑制することが明らかになりました。

日時：3 月 27 日（水）12：30～13：20
会場：東北大学川内北キャンパス講義棟 B101

Asahi アサヒ フードアンドヘルスケア株式会社

発芽と健康機能研究会

発芽の力。

私たちは、発芽がもたらす健康を研究しています。

ランチョンセミナー
日本農芸化学会 2013 年度大会

3 月 27 日（水）12：30 ～ 13：20
LS14 発芽と健康機能研究会 B13 会場（講義棟 B103）

講演 1 栄養学から見た発芽食のすすめ ～発芽ご飯紹介～
管理栄養士 関口絢子 氏

演題 2 発芽食品の過去・現在・未来
信州大学 茅原 紘 氏

演題 3 長寿社会実現に向けた発芽食品の可能性を考える
宮城大学 食産業学部 津志田藤二郎 氏

座長・司会　宮城大学 食産業学部 下山田 真 氏

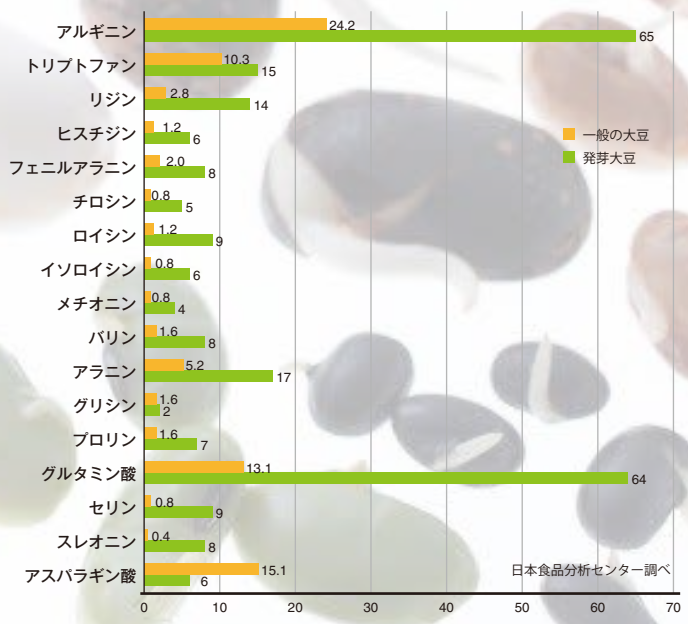
講演内容

食品機能性研究の目的は、全ての人が寿命の続く限り健康な生涯を全うできる食生活の構築に貢献することです。我々人間の寿命を 100 歳と仮定した場合、理想的な年齢構成における高齢化率は 35% に達します。最も長く生きたフランスのカルマン女史のように、全員が 122 歳まで生きることのできる社会では、高齢化率が 47.5% に至ります。日本は今、超高齢社会であると言われていますが、そのネーミングにはやや重苦しい衰退した雰囲気が漂います。理想的な長寿社会では、高齢者がいることは当然のことであり、「高齢化」をことさら強調することなく、社会の各階層がそれぞれの役割を持ち、必要とされながら寿命を全うできる社会システムの構築と新たな呼び名が求められているように感じます。この長寿社会の実現に貢献する食品開発を目指す食品機能性研究は、1986 年に我が国で台頭し、それが世界に波及し、これまでに様々な研究成果を上げてきましたが、ここでは発芽食品に焦点を当ててその可能性を考えていきます。

発芽は主に植物の種子が活動を開始し芽を出す過程を意味していますが、この外界への出陣に当たり様々な生理的変化が生じ、それを可能とする栄養素など必要な物質がその過程で生まれ利用されているものと考えられます。ここでは、生命の最初の躍動とも言えるこの発芽過程で生じる GABA やその他の物質に焦点を当て機能性食品開発の観点から私見を述べたいと思います。

食はヒトの健康維持に欠かすことができません。また、ヒトは自らが口にした食べ物でしかカラダを作ることができません。時代の風とともに「食とアンチエイジング」に高い関心が寄せられるようになりました。その一方で、現代病や心身の不調が問題視されています。厚生労働省の国民健康運動のプロジェクトである「健康日本２１」では、豆類の摂取量を１日１００ｇ以上という目標があります。この度は、発芽した大豆などを使用した体に優しいお弁当をお作りしました。植物の生命力が生み出す新機能成分、栄養的な付加価値が得られる食事として、お召し上がり頂ければ光栄です。不足しがちな栄養素が補えるよう副菜のバランスも考えて取り合わせています。どうぞお楽しみ下さい。

発芽大豆と一般大豆の遊離アミノ酸含有量の比較（mg/100g 発芽大豆）



事 務 局　宮城大学 食産業学部 フードビジネス学科
〒982-0215　仙台市太白区旗立２－２－１
TEL 022-245-1378／FAX 022-245-1534
E-mail kanauchi@myu.ac.jp（金内まで）

協賛企業　株式会社ニチレイフーズ　株式会社だいずデイズ
株式会社はくばく　株式会社シードライフテック

本書の内容の一部または全部を無断で複写複製(コピー)及び転載することは、法律で認められた場合を除き、権利の侵害となりますので、あらかじめ本会あて許諾を求めてください。
Copyright © 2013 by Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

日 本 農 芸 化 学 会 2013 年 度 大 会 講 演 要 旨 集 (オンライン)
Proceedings (online) of the Annual Meeting 2013 Sendai of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry
2013 年 3 月 5 日公開 Published online 5 March 2013 ISSN 2186-7976

発行者 公益社団法人日本農芸化学会 JSBBA http://www.jsbba.or.jp/
PUBLISHER 113-0032 東京都文京区弥生 2-4-16 学会センタービル 2 階 Phone 03-3811-8789

データ作成者 株式会社ダイナコム DYNACOM http://www.dynacom.co.jp/
ASSISTS 261-7125 千葉県千葉市美浜区中瀬 2-6-1WBG マリブイースト 25 階 Phone 043-213-8131
小宮山印刷工業株式会社 COMOIYAMA PRINTING http://www.kopas.co.jp/
162-0808 東京都新宿区天神町 78 Phone 03-3368-3023