ISSN 2186-7976

March 5, 2014
平成２６年３月５日発行

Annual Meeting of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 2014

大会講演要旨集

■２０１４年度(平成２６年度)大会[東京]■



京王プラザホテル（新宿）　　明治大学 生田キャンパス 中央校舎

公益社団法人日本農芸化学会

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

© Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

目次

授賞式、受賞者講演、受賞者----------3
一般講演番号の見方----------6
一般講演プログラム----------7
一般講演要旨----------83
大会シンポジウムプログラム----------2, 069
大会シンポジウム要旨----------2, 079
ランチョンシンポジウムプログラム----------2, 248
ランチョンシンポジウム要旨----------2, 249
ランチョンセミナープログラム----------2, 253
ランチョンセミナー広告要旨----------2, 256

日本農芸化学会
（2014 年度）学会賞等授賞式，受賞者講演，受賞者一覧

日　時：2014 年 3 月 27 日（木）10 時 30 分～17 時 30 分（受付 9 時 30 分～）
場　所：京王プラザホテル南館 5 階エミネンスホール（東京都新宿区西新宿 2–2–1）
進行予定：

（10:30）2014 年度学会賞等授賞式
　　1　授賞選考委員長報告
　　2　日本農芸化学会賞等授与
（10:55）第 11 回農芸化学研究企画賞表彰式
　　1　産学官学術交流委員長報告
　　2　農芸化学研究企画賞表彰
（11:00）特別表彰
（11:10）会長祝辞
（11:15）＊＊＊＊＊＊　休憩 15 分間　＊＊＊＊＊＊
（11:30）受賞者講演開始
（11:30）日本農芸化学会賞受賞者講演（2 件，各 25 分）
（12:20）＊＊＊＊＊＊　休憩 70 分間　＊＊＊＊＊＊
（13:30）日本農芸化学会功績賞受賞者講演（2 件，各 25 分）
（14:20）農芸化学技術賞受賞者講演（4 件，各 15 分）
（15:20）＊＊＊＊＊＊　休憩 10 分間　＊＊＊＊＊＊
（15:30）農芸化学奨励賞受賞者講演（10 件，各 12 分）
（17:30）終了予定
（18:00～20:00）懇親会：京王プラザホテル本館 5 階コンコードボールルーム

受賞者：

【日本農芸化学会賞】（2 件，50 音順）

加納　健司（京都大学大学院農学研究科）
「酸化還元酵素・電極共役系を基盤とした生物電気化学研究の展開」
宮澤　陽夫（東北大学大学院農学研究科）
「分析化学を基盤とした食品機能性研究の先導的展開」

【日本農芸化学会功績賞】（2 件，50 音順）

安達　修二（京都大学大学院農学研究科）
「食品製造における速度過程が関与する現象の工学的解析」
横田　明穂（奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科）
「植物機能高度活用のための分子基盤開発」

【農芸化学技術賞】（4 件，企業名 50 音順）

山本　直之・中村　康則（カルピス株式会社）
「乳由来血圧降下ペプチド素材の開発」
協和発酵バイオ株式会社（賛助会員枠）
「ジペプチド発酵技術の開発と工業化」
北林　雅夫[1]・小松原秀介[1]・今中　忠行[2]（[1]東洋紡株式会社・[2]立命館大学生命科学部）
「超好熱菌由来の新規 DNA ポリメラーゼの発見とその産業利用」
牧野　聖也・池上　秀二・狩野　　宏・伊藤　裕之（株式会社 明治）
「免疫調節多糖体を産生する乳酸菌を活用した機能性ヨーグルトの開発」

【農芸化学奨励賞】（10 件，50 音順）

石井　剛志（静岡県立大学食品栄養科学部）
「食品および酸化ストレス関連因子による生体タンパク質の翻訳後修飾に関する研究」

大坪　嘉行（東北大学大学院生命科学研究科）
「環境細菌の PCB 分解能を司る遺伝因子の解析と各種ゲノム解析ソフトウエアの開発」

柴田　貴広（名古屋大学大学院生命農学研究科）
「脂質メディエーターに関する化学生物学的研究」

鈴木　卓弥（広島大学大学院生物圏科学研究科）
「消化管のタイトジャンクション機能を制御する食品成分・生体内因子に関する基礎的研究」

都築　　毅（東北大学大学院農学研究科）
「天然由来機能性脂質の食品栄養学的特性に関する研究」

沼田　倫征（(独)産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門 ）
「tRNA 転写後修飾メカニズムの分子的基盤解明」

藤村　由紀（九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点）
「緑茶の機能性を捉える低分子ケミカルセンシングに関する研究」

古川　壮一（日本大学生物資源科学部）
「食品関連微生物が形成するバイオフィルムの制御と利用に関する研究」

丸山　如江（京都大学大学院農学研究科）
「構造生物学を基盤とした糖質の認識・輸送・分解機構に関する研究」

吉村　和也（中部大学応用生物学部）
「植物 Nudix hydrolase ファミリーの生理機能に関する研究」

【平成 26 年度日本農学賞受賞者（本会推薦)】

本会より推薦した下記の者が日本農学賞を受賞いたしました.

2014 年 4 月 5 日東京大学山上会館で開催される日本農学大会において，日本農学賞授賞式並びに受賞者講演が予定されています.

受賞者：林　英雄（大阪府立大学名誉教授）

受賞題目：環境保全型の高選択的生物制御物質に関する先駆的研究

【第 11 回農芸化学研究企画賞】

重点研究領域①　先導的生物活性物質研究と新技術開発

（1）革新的医薬医療を志向した生物活性物質の探索・合成・生産等の研究と新技術開発

（2）革新的農林水産物生産を志向した生物活性物質研究と新技術開発

高橋　俊二（(独)理化学研究所環境資源科学研究センター）
「放線菌二次代謝物の生産を増強する小分子バイオメディエーターの開発」

重点研究領域②　機能性食品素材および食品

松本　省吾（名古屋大学大学院生命農学研究科）
「生食用赤果肉リンゴ原因遺伝子の機能解析と育種の効率化」

重点研究領域③　グリーンバイオテクノロジー

（1）バイオマス資源の生産・供給・利用（有用物質生産プロセス等）に関わるテクノロジー

（2）省資源・省エネルギープロセスに関わるバイオテクノロジー

（3）環境浄化・資源循環に関わるバイオテクノロジー

河井　重幸（京都大学大学院農学研究科）
「巨大褐藻類を原料とする有用バルクケミカル発酵生産技術の開発」

【2013年（Vol.77）B.B.B. 論文賞（掲載順）】

pp.167～172 Akane Kubota, Kimitsune Ishizaki, Masashi Hosaka, and Takayuki Kohchi
Efficient *Agrobacterium*-Mediated Transformation of the Liverwort *Marchantia polymorpha* Using Regenerating Thalli

pp.534～543 Juliano de Oliveira Porciuncula, Takanori Furukawa, Kazuki Mori, Yosuke Shida, Hideki Hirakawa, Kosuke Tashiro, Satoru Kuhara, Satoshi Nakagawa, Yasushi Morikawa, and Wataru Ogasawara
Single Nucleotide Polymorphism Analysis of a *Trichoderma reesei* Hyper-Cellulolytic Mutant Developed in Japan

pp.802～809 Shigeki Kada, Atsushi Ishikawa, Yoshifumi Ohshima, and Ken-ichi Yoshida
Alkaline Serine Protease AprE Plays an Essential Role in Poly-γ-glutamate Production during Natto Fermentation

pp.966～970 Ancy Joseph, Shimpei Aikawa, Kengo Sasaki, Yota Tsuge, Fumio Matsuda, Tsutomu Tanaka, and Akihiko Kondo
Utilization of Lactic Acid Bacterial Genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in the Production of Lactic Acid

pp.1229～1235 Tomomi Ito-Nagahata, Chiaki Kurihara, Miki Hasebe, Akiko Ishii, Kaori Yamashita, Mari Iwabuchi, Mariko Sonoda, Kiyoshi Fukuhara, Rumi Sawada, Atsuko Matsuoka, and Yoko Fujiwara
Stilbene Analogs of Resveratrol Improve Insulin Resistance through Activation of AMPK

pp.1734～1738 Ryuto Maruyama, Yuki Kamoshida, Makoto Shimizu, Jun Inoue, and Ryuichiro Sato
ATF6α Stimulates Cholesterogenic Gene Expression and *de Novo* Cholesterol Synthesis

pp.1747～1752 Hao Fang, Masanori Toyofuku, Tatsunori Kiyokawa, Akihiro Ichihashi, Kazuhiro Tateda, and Nobuhiko Nomura
The Impact of Anaerobiosis on Strain-Dependent Phenotypic Variations in *Pseudomonas aeruginosa*

pp.1832～1840 Kotaro Ito, Yasuji Koyama, and Yoshiki Hanya
Identification of the Glutaminase Genes of *Aspergillus sojae* Involved in Glutamate Production during Soy Sauce Fermentation

pp.2175～2180 Shin-ichi Adachi, Yuki Endo, Takafumi Mizushige, Satoshi Tsuzuki, Shigenobu Matsumura, Kazuo Inoue, and Tohru Fushiki
Increased Levels of Extracellular Dopamine in the Nucleus Accumbens and Amygdala of Rats by Ingesting a Low Concentration of a Long-Chain Fatty Acid

【Most-Cited Paper Award】 被引用回数　19回

Vol.75, No.1, pp.100～106
Takeshi Ishii, Tatsuya Ichikawa, Kanako Minoda, Koji Kusaka, Sohei Ito, Yukiko Suzuki, Mitsugu Akagawa, Kazuki Mochizuki, Toshinao Goda, and Tsutomu Nakayama
Human Serum Albumin as an Antioxidant in the Oxidation of (−)-Epigallocatechin Gallate: Participation of Reversible Covalent Binding for Interaction and Stabilization

※ B.B.B. 論文賞の表彰式は行いません .

一般講演番号の見方

○ 講演番号の

最初の１桁の数字は講演発表日

２ ⟶ ３月２８日（金）
３ ⟶ ３月２９日（土）
４ ⟶ ３月３０日（日）

次のアルファベットは建物記号、その次の数字二桁は、会場番号

Ａ　　中央校舎
Ｂ　　第一校舎
Ｃ　　第二校舎５号館
Ｄ　　第二校舎Ａ館

（例：Ａ０８　→　中央校舎０８会場）

次の桁の小文字アルファベットは

ａ　は　午前の部
ｐ　は　午後の部

次の数字は、その会場での講演の順番

たとえば、**２Ａ０８ｐ０５**は、

３月２８日（金）、中央校舎０８会場、午後の部、５番目　の講演です。

○ 講演開始の時間は、次の通りです。

ａ［am］（午前）

０１．9：00	０２．9：11	０３．9：22	０４．9：33
０５．9：44	０６．9：55（PC 接続時間）	０７．10：05	０８．10：16
０９．10：27	１０．10：38	１１．10：49	１２．11：00（PC 接続時間）
１３．11：10	１４．11：21	１５．11：32	１６．11：43
１７．11：54			

ｐ［pm］（午後）

０１．14：00	０２．14：11	０３．14：22	０４．14：33
０５．14：44	０６．14：55（PC 接続時間）	０７．15：05	０８．15：16
０９．15：27	１０．15：38	１１．15：49	１２．16：00（PC 接続時間）
１３．16：10	１４．16：21	１５．16：32	１６．16：43
１７．16：54	１８．17：05（PC 接続時間）	１９．17：15	２０．17：26
２１．17：37	２２．17：48	２３．17：59	

一般講演発表プログラム

1. 講演時間は 1 題につき，11 分（発表 8 分，討論 2 分 30 秒，交代時間 30 秒）.
2. ◦は講演者（登壇者）を示す.
3. 座長は，大会プログラム集の 27～29 ページの座長一覧をご覧ください.
4. 講演番号 1 文字目（数字）は講演日（2: 3 月 28 日，3: 3 月 29 日，4: 3 月 30 日），2～4 文字目は講演会場（A01～D03），5 文字目（英字小文字 1 字）の a は午前，p は午後，6～7 文字目（数字 2 桁）は講演順番（01～23）.（例）「2A07p05」は，3 月 28 日，A07 会場，午後の部，5 番目の講演となります.

第 2 日（3 月 28 日）

講演番号
開始時間　　演　　題　　発表者氏名（所属）

A01 会場　午前の部（9:00～12:05）

環境—バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオリファイナリー—

a01～a05 発表者の接続時間 8:50～9:00

2A01a01　キシロース資化性向上に関わる *Saccharomyces cerevisiae HEX1* 遺伝子の特定
9:00　藤森一浩[1]，佐原健彦[1]，扇谷　悟[1]，鎌形洋一[1]，冨高正貴[2]，長島正明[2]，◦田口久貴[2]，赤松　隆[2]（[1]産総研・生物プロセス，[2]崇城大・生物生命）

2A01a02　高濃度キシロース資化を導く *Saccharomyces cerevisiae SXM1* 遺伝子の特定
9:11　藤森一浩[1]，佐原健彦[1]，扇谷　悟[1]，鎌形洋一[1]，冨高正貴[2]，長島正明[2]，◦田口久貴[2]，赤松　隆[2]（[1]産総研・生物プロセス，[2]崇城大・生物生命）

2A01a03　高濃度キシロース資化に関わる *Saccharomyces cerevisiae SXM2* 遺伝子の特定
9:22　◦藤森一浩[1]，佐原健彦[1]，扇谷　悟[1]，鎌形洋一[1]，冨高正貴[2]，長島正明[2]，田口久貴[2]，赤松　隆[2]（[1]産総研・生物プロセス，[2]崇城大・生物生命）

2A01a04　Megavariate analysis of inhibitory effects of fermentation inhibitors derived from lignocellulose hydrolysates on yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
9:33　◦Lahiru JAYAKODY[1,2]，Masafumi KADOWAKI[1]，Kenta HORIE[1]，Hayashi NOBUYUKI[1]，Hiroshi KITAGAKI[1,2]（[1]Saga Univ.，[2]Join Grad. Sch. of Agri., Kagoshima Univ.）

2A01a05　出芽酵母の Cyc8-Tup1 転写コリプレッサーへの自然変異がマンニトール資化能獲得と耐塩性に与える影響
9:44　中條萌絵子，村田幸作，◦河井重幸（京大院農）

a07～a11 発表者の接続時間 9:55～10:05

2A01a07　*Trichoderma reesei* beta-キシロシダーゼ（BXL I）の酵素化学的性質
10:05　◦岡田宏文[1]，山下景子[1]，藤川浩樹[1]，小松光子[1]，二階堂満[2]，戸谷一英[2]（[1]長岡技術科学大学 生物系，[2]一関高専 物化工）

2A01a08　中高圧下での β-グルコシダーゼ活性の変化と温度の影響について
10:16　◦林　秀太，栗原　聖，藤田智之（信州大院農）

2A01a09　ベタイン型代謝産物アナログの添加に伴う糖加水分解酵素の異常な収率向上効果
10:27　◦甲元一也，勢籏志郎（甲南大 FIRST）

2A01a10　バクテリア由来モノリグノール類変換酵素遺伝子の探索
10:38　◦上村直史[1]，荒木拓馬[1]，小林　巽[1]，菱山正二郎[2]，笠井大輔[1]，福田雅夫[1]，菊地　淳[3]，梶田真也[4]，政井英司[1]（[1]長岡技科大・生物，[2]森林総研，[3]理研 PSC，[4]東農工大院・BASE）

2A01a11　草本系バイオマス（稲わら）の高効率糖化酵素の探索と解析
10:49　◦小野田絵理，金子愛唯，三浦（鈴木）彩子，相澤朋子，野口　章，長谷川功（日大生資科）

a13～a17 発表者の接続時間 11:00～11:10

2A01a13　草本系バイオマス糖化分解ラッカーゼ様酵素を用いた直接糖化複合酵素系の構築
11:10　◦鈴木啓修，青山晃久，加藤祐太，永井和夫，倉根隆一郎（中部大）

2A01a14　稲わらを用いた白色腐朽菌ラッカーゼ生産反応の解析と応用
11:21　◦猪瀬　優，浅見和広，太田口和久（東工大院理工）

2A01a15　紙分解生成物を用いたトリコデルマ菌セルラーゼ生成反応の高活性化
11:32　◦浅見和広，一力啓晃，太田口和久（東工大院化工）

2A01a16　線虫補食で知られるオルビリア目のヘミセルラーゼ群の解析
11:43　◦島村麻美子[1]，西嶋桂子[1]，安宅花子[1]，金子　哲[2]，佐々木和美[1]，紙野　圭[1]（[1]（独）製品評価技術基盤機構，[2]独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構）

2A01a17　白色腐朽菌 Phlebia cf. lindtneri のバイオマス糖化酵素群の解析
11:54　島村麻美子，安　善榮，小口晃央，稲葉重樹，◦紙野　圭（製品評価技術基盤機構）

A01 会場　午後の部（14:00～17:59）

環境—バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオリファイナリー—

p01～p05 発表者の接続時間 13:50～14:00

2A01p01　グリセリン酸およびグルコシルグリセリン酸の細胞賦活作用および生体分子保護作用の評価
14:00　◦佐藤　俊，北本　大，羽部　浩（産総研環境化学）

2A01p02　微生物を用いた DL-グリセリン酸からの L-グリセリン酸の光学分割
14:11　佐藤　俊，森田友岳，北本　大，◦羽部　浩（産総研・環境化学）

2A01p03　長鎖脂肪酸を細胞内に蓄積する初めての細菌の発見～新規プラットフォーム微生物を用いた新しいバイオディーゼル生産戦略～
14:22　◦菅野　学[1]，片山泰樹[2]，森田直樹[1]，堀　知行[3]，成廣　隆[1]，三谷恭雄[1]，鎌形洋一[1]（[1]産総研・生物プロセス，[2]産総研・地圏資源環境，[3]産総研・環境管理技術）

2A01p04　ハロモナス菌を用いた木材糖化液からの 3-ヒドロキシ酪酸の生産技術開発
14:33　◦河田悦和[1]，川崎一則[1]，野尻昌信[2]（[1]産総研健康，[2]森林総研）

2A01p05　代謝予測に基づいた 3HP 高生産大腸菌の構築
14:44　◦徳山健斗[1]，大野　聡[1]，吉川勝徳[1]，古澤　力[1,2]，清水　浩[1]（[1]阪大院・情報・バイオ情報，[2]理研・QBiC）

p07～p11 発表者の接続時間 14:55～15:05

2A01p07　微生物を利用したキラル P(2-ヒドロキシ酪酸)の合成とポリマー解析
15:05　三宅政裕[1]，◦松本謙一郎[1]，寺井彩月[1]，加部泰三[2,3]，岩田忠久[2,3]，田口精一[1,3]（[1]北大院工，[2]東大院農，[3]CREST・JST）

2A01p08　植物バイオマス由来の単糖混合物を炭素源としたバイオポリエステルの生産
15:16　◦大井俊彦，佐々木勝平，松本謙一郎，田口精一（北大院工）

2A01p09　ゲノム変異導入法による微生物ポリマー高生産化宿主の創成

15:27 ○門屋亨介[1,2]，田口精一[1,2]（[1]北海道大院総合化学院，[2]CREST）

2A01p10　Purification and characterization of a polymer degrading enzyme from an isolated bacterium

15:38 ○Jian SUN, John NDUKO, Ken'ichiro MATSUMOTO, Toshihiko OOI, Seiichi TAGUCHI（Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.）

2A01p11　脂肪酸合成経路を介した糖からの共重合ポリエステルの生合成

15:49 ○外村彩夏[1]，岩崎美佳[1]，村田和歌子[2]，明智　聡[3]，福居俊昭[3]，柘植丈治[4]，田中賢二[5]，松崎弘美[2]（[1]熊本県大院環境共生，[2]熊本県大環境共生，[3]東工大院生命理工，[4]東工大院総理工，[5]近大産理工）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A01p13　微生物産生ポリエステル・ポリヒドロキシアルカン酸の分子量制御における細胞内エタノールの影響

16:10 ○廣江綾香，百武真奈美，白石雅也，柘植丈治（東工大院総理工）

2A01p14　*C. difficile* 由来ロイシン代謝遺伝子群を利用した P(3HB-*co*-3H4MV)生合成経路の構築

16:21 ○雑賀あずさ，渡辺世利子，柘植丈治（東工大院総理工）

2A01p15　ポリエステル重合酵素が示すエステル分解能に関与するアミノ酸の探索

16:32 ○百武真奈美[1]，水野康平[2]，柘植丈治[1]（[1]東工大院総理工，[2]北九州高専）

2A01p16　3-ヒドロキシプロピオン酸ユニット含有ポリヒドロキシアルカン酸の生合成を目指した *Ralstonia eutropha* の代謝改変

16:43 ○増田大輝[1]，向山正治[2]，堀川　洋[2]，折田和泉[1]，中村　聡[1]，福居俊昭[1]（[1]東工大院生命理工，[2]日本触媒）

2A01p17　Methylobacerium extorquens の包括的転写機構改変によるポリヒドロキシアルカン酸生産能の向上

16:54 ○鈴木裕貴，折田和泉，福居俊昭，中村　聡（東工大院生命理工）

p19〜p22 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A01p19　顆粒結合タンパク質の特性を利用した *Ralstonia eutropha* 共重合ポリエステル生合成能の改変

17:15 ○川島由依，折田和泉，中村　聡，福居俊昭（東工大院生命理工）

2A01p20　ポリ乳酸コポリマーステレオコンプレックスの生分解

17:26 ○中山敦好，川崎典起，山野尚子，上垣浩一（産総研関西）

2A01p21　生分解性ポリマーの生分解性制御

17:37 ○山野尚子，川崎典起，中山敦好（産総研）

2A01p22　生分解性の制御を目的として作製したポリマーコンポジットの抗菌活性

17:48 ○安藤　仁，中山敦好，山野尚子，上垣浩一（産総研）

A02 会場　午前の部（9:00〜11:54）

環境―環境保全，浄化技術工学，バイオレメディエーション―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A02a01　細胞性粘菌の化学生態学的解析

9:00 ○齊藤佑美子[1]，宮崎早紀[1]，Bartlem Derek[2]，齊藤玉緒[3]（[1]上智大院・理工，[2]北海道大・農，[3]上智大学・理工）

2A02a02　生物浄化法を用いた飲料水の硬度の低減化

9:11 ○宮平理恵[1]，黒田桃子[2]，浅川奈美樹[2]，小関正道[2]（[1]東京家政大学大学院人間生活学総合研究科健康栄養専攻，[2]東京家政大学家政学部栄養学科）

2A02a03　水棲生物と環境因子との関係を捉える為のデータマイニング

9:22 ○葭田征司[1]，赤間真樹子[2]，朝倉大河[1]，伊達康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3,4]（[1]横市院生命，[2]理研 CSRS，[3]理研 BMEP，[4]名大院生命農）

2A02a04　魚類多様性の潜在性を見据えた代謝プロファイル評価法の構築

9:33 ○朝倉大河[1]，坂田研二[2]，佐藤有穂[1]，伊達康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3,4]（[1]横市院生命医科，[2]理研 CSRS，[3]理研 BMEP，[4]名大院農）

2A02a05　対流と環境微生物による水質浄化

9:44 ○永野陽祐，吉田有汰，アディカリディネシュ，向　真樹，久保　幹（立命館大生命・生物工）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A02a07　熱帯・亜熱帯原生のヒ素高蓄積植物モエジマシダによる寒冷地におけるヒ素汚染土壌の植物修復

10:05 ○黄　毅[1]，大友俊介[1]，菅原一輝[2]，簡　梅芳[1]，宮内啓介[1]，北島信行[3]，井上千弘[2]，遠藤銀朗[1]（[1]東北学院大，[2]東北大学，[3](株)フジタ）

2A02a08　東北地方ヒ素汚染土壌に対するヒ素蓄積性シダ適用可能性の検討

10:16 ○菅原一輝[1]，黄　毅[2]，遠藤銀朗[2]，井上千弘[1]（[1]東北大院環境，[2]東北学院大）

2A02a09　亜ヒ酸酸化を指標にしたモエジマシダによるヒ素の吸収を触媒する微生物の探索

10:27 ○簡　梅芳，宮内啓介，黄　毅，遠藤銀朗（東北学院大学）

2A02a10　消石灰散布が土壌微生物に及ぼす影響

10:38 ○南　純一，濱崎洋輔，坂上吉一，森　美穂（近畿大農）

2A02a11　施肥による土壌微生物相変化に対する DGGE 解析の有効性検討

10:49 ○松本絵里乃，矢澤義昭，五十嵐由美子（日立製作所）

a13〜a16 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A02a13　MBR 高負荷運転における微生物群集構造変化の次世代シークエンサーによる解析

11:10 ○飯島孝行[1]，佐藤由也[1]，堀　知行[1]，尾形　敦[1]，柳下　宏[2]，羽部　浩[2]（[1]産総研・環境管理，[2]産総研・環境化学）

2A02a14　オミックス解析を活用した塩素化エチレン類のバイオレメディエーションによる環境影響の評価

11:21 ○木村信忠[1]，辻田知佳[1]，三浦隆匡[1,2]，山副敦司[2]，関口勇地[3]，野田尚宏[3]，松倉智子[3]，高畑　陽[4]，野尻秀昭[5]，福田雅夫[6]（[1]産総研・生物プロセス，[2]NITE，[3]産総研・バイオメディカル，[4]大成建設，[5]東大・生セ，[6]長岡技大・生物）

2A02a15　グリーストラップ浄化槽条件下での油脂含有排水高分解菌の探索

11:32 ○平野達也[1]，倉根隆一郎[1]，村瀬博宣[2]，西脇直秀[2]，稲川顕嗣[2]（[1]中部大学応用生物，[2]シーシーアイ株式会社）

2A02a16　腐植様物質添加による屎尿処理高効率化のための汚泥複合微生物相の解析

11:43 ○鬼頭昌久[1]，水野康弘[1]，倉根隆一郎[1]，橘　峰生[2]，植地俊仁[2]，安部　剛[2]（[1]中部大院応生，[2]クボタ環境サービス(株)）

A02 会場　午後の部（14:00〜16:54）

環境―環境保全，浄化技術工学，バイオレメディエーション，汚染物質―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A02p01　*S. cerevisiae* 胞子のキトサンビーズとしての応用

14:00 ○中西秀樹，ZHANG Hai-ni，高　暁冬（江南大学）

2A02p02　Debaryomyces hansenii による重金属の回収

14:11 ○山本智恵（大阪府大院）

2A02p03　耐塩性糸状菌を用いた環境浄化に関する研究(7)－重金属除去に関する検討－

14:22 ○大橋正俊，秦野聡嗣，向山夏女，佐藤綾乃，濱田奈保子（東京海洋大学）

2A02p04　コシアブラにおける放射性セシウムの分布
14:33　○武井利之[1]，伊藤正一[2]，熊田　淳[1]，村松康行[3]（[1]福島県林業研究センター，[2]福島県相双農林事務所･現福島県自然保護課，[3]学習院大学）

2A02p05　土壌改良剤中の常在菌による放射性セシウムの取り込み
14:44　○川端秀明[1]，張　鵬堯[1]，井戸田陽子[1]，矢野健太郎[1]，荒川　大[1]，松本朝子[2]，松本　明[2]，辻　　彰[3]，荻原琢男[1]（[1]高崎健康福祉大学薬学部，[2]有限会社ふくじゅ，[3]金沢大学薬学部）

p07～p11 発表者の接続時間 14:55～15:05

2A02p07　4 種の油分解菌による低温環境下での A 重油分解能力の調査と解析
15:05　○山田幸太[1]，櫻井琢磨[2]，杉山賢吾[2]，新谷政己[1]，金原和秀[1]（[1]静岡大院工，[2]静岡大工）

2A02p08　有機資材を用いた石油分解菌の長期維持によるバイオレメディエーションの効率化
15:16　○中辻貴広，アディカリディネシュ，向　真樹，久保　幹（立命館大生命・生物工）

2A02p09　*Rhodococcus* 属細菌におけるアルカンヒドロキシラーゼ遺伝子と長鎖シクロアルカン分解との関係解析
15:27　○川越大樹[1]，　久保田謙三[1]，　アディカリディネシュ[2]，向　真樹[2]，久保　幹[2]（[1]大和ハウス工業，[2]立命館大･生命･生工）

2A02p10　Pseudomonas resinovorans strain CA10 株由来メタ開裂酵素の解析
15:38　○柴崎夏美（芝浦工業大学大学院）

2A02p11　含塩素有機リン酸トリエステル分解菌の推定アルカリホスファターゼ遺伝子の同定と解析
15:49　○片沼拓士，恩田　穣，笠井大輔，福田雅夫，阿部勝正，高橋祥司，解良芳夫（長岡技大工）

p13～p16 発表者の接続時間 16:00～16:10

2A02p13　Bisphenol A 分解菌 *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株のゲノム配列の解析と AO1 組換え体による BPA 分解能調査
16:10　○木場　悟，石田　哲，松村吉信（関西大学）

2A02p14　ディルドリン微生物分解産物の合成化学的手法を用いた同定
16:21　○清田洋正[1]，　小竹正晃[2]，　高木和広[3]，　山崎健一[3]，榊原風太[3]，　伊藤虹児[3]，　片岡良太[4]，　近藤隆一郎[5]，　亀井一郎[6]（[1]岡山大院･環境生命，[2]東北大院農･生物産業創成，[3](独)農環研，[4]山梨大・生命環境，[5]九大院生資環・森林資源，[6]宮崎大農）

2A02p15　ウリ科植物における残留性有機汚染物質の体内輸送因子の機能・動態
16:32　○後藤純弥[1]，岩渕　彩[2]，乾　秀之[3]（[1]神戸大院農，[2]神戸大農，[3]神戸大遺伝子）

2A02p16　抗菌性薬剤トリクロサン分解菌の探索
16:43　○齋藤さや[1]，小森谷友絵[2]，坂本恵一[2]，神野英毅[2]（[1]日大生産工(院)，[2]日大生産工）

A03 会場　午前の部（9:22～11:54）

生体高分子・脂質—タンパク質—

a03～a05 発表者の接続時間 9:12～9:22

2A03a03　ルバーブ水抽出成分とヒアルロニダーゼ阻害活性
9:22　○森本正則[1]，　坂口裕太[1]，　国仙谷良男[2]，　藤木成忠[2]，播磨章一[2]，松田一彦[1]，駒井功一郎[1]（[1]近畿大応生化，[2]ハリマ漢方製薬）

2A03a04　Adenine nucleotide transporter ANT1 を膜上に配置したプロテオリポソームにおける内封ルシフェラーゼ活性の外部からの制御
9:33　○野澤　彰，戸澤　譲（愛媛大 PROS）

2A03a05　ヒト MDR1 の輸送基質導入ゲートの解析
9:44　○井上修一[1]，木村泰久[1]，木岡紀幸[1]，松尾道憲[1]，加藤博章[2]，植田和光[1,3]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大院薬，[3]京大・iCeMS）

a07～a11 発表者の接続時間 9:55～10:05

2A03a07　ABC トランスポーターの ATP 加水分解機構
10:05　○小池悠斗[1]，七谷　圭[2]，高橋　聡[3]，鎌形清人[3]，魚住信之[2]（[1]東北大工，[2]東北大院工，[3]東北大院理）

2A03a08　赤外自由電子レーザーを用いたタンパク質凝集体の光分解
10:16　○川崎平康[1]，遠藤　生[2]，藤岡　隼[2]，築山光一[1,2]（[1]東理大赤外自由電子レーザー研究セ，[2]東理大院総化）

2A03a09　好冷性 *Shewanella* 属細菌由来 cytochrome *c* の 1 アミノ酸置換による安定性の変化
10:27　○政成美沙[1]，若井　暁[2]，三本木至宏[1]（[1]広島大院生物圏，[2]神戸大自然）

2A03a10　好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* 由来シトクロム *c* ' の熱安定性と特殊な複合体形成
10:38　○藤井創太郎[1]，　政成美沙[1]，　若井　暁[2]，　山中　優[3]，三本木至宏[1]（[1]広大院生物圏，[2]神戸大自然，[3]奈良先端物質）

2A03a11　スギナ由来 GH18 キチナーゼ(EaChi-A)の触媒反応における LysM ドメインの機能
10:49　○北奥喜仁[1]，大沼貴之[1]，平良東紀[2]，深溝　慶[1]（[1]近畿大院農，[2]琉球大院農）

a13～a16 発表者の接続時間 11:00～11:10

2A03a13　有害金属に応答するシスエレメントと転写調節因子の結合親和性の解析，および金属センサーへの利用
11:10　○谷口正毅，　内藤多希，　シディキモハマド，　前田　勇（宇都宮大院農）

2A03a14　腸管上皮由来抗菌性レクチン RegIV の DNA 結合活性の解析
11:21　○坂本暁子，渡辺寛人（明治大院農）

2A03a15　C 型レクチン CEL-I の部位特異的変異導入による糖結合特異性変換とその立体構造解析
11:32　○森内裕美[1]，　海野英昭[1]，　郷田秀一郎[1]，　舘野浩章[2]，平林　淳[2]，畠山智充[1]（[1]長崎大院工，[2]産総研）

2A03a16　磁気力場を利用したタンパク質結晶の高品質化と結晶成長のリアルタイム観察
11:43　○中村　顕[1]，　大塚　淳[1]，　廣田憲之[2]，　和田　仁[1,2]，田之倉優[1,3]（[1]東大院農生科・応生化，[2]物材機構，[3]東大磁気力場研究連携ユニット）

A03 会場　午後の部（14:22～17:59）

生体高分子・脂質—タンパク質，多糖質—

p03～p05 発表者の接続時間 14:12～14:22

2A03p03　日本産ショウガの新規システインプロテアーゼの一次構造
14:22　○西山友貴[1]，荒木朋洋[2]（[1]東海大院農，[2]東海大農）

2A03p04　Expression and purification of cyto-insectotoxin(cit 1a)using silkworm larvae targeting for an antimicrobial therapeutic agent
14:33　○MD PANNA ALI[1]，　Katsuhiko Yoshimatsu[2]，Tomohiro Suzuki[2]，Tatsuya Kato[1,2]，Enoch Y. Park[1,2]（[1]Laboratory of Biotechnology, Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ.）

2A03p05　超好熱アーキア由来 S-layer タンパク質の機能解析
14:44　○郷田秀一郎，　山下謙一郎，　海野英昭，　畠山智充（長崎大院工）

p07～p11 発表者の接続時間 14:55～15:05

2A03p07　PEG 化タンパク質のイオン交換クロマトグラフィーに

よる分離
15:05 ○久保雄二，中村孝司（東ソー）

2A03p08　塩濃度耐性アニオン交換クロマトグラフィーによるタンパク質の分離
15:16 ○中村孝司，久保雄二（東ソー株式会社）

2A03p09　タンパク質蛍光標識技術を用いた S-ニトロシル化タンパク質の網羅的解析
15:27 ○芳村俊広[1,2]，黒木勝久[1,2]，水光正仁[1,2]，榊原陽一[1,2]（[1]宮崎大学農学部応用生物科学科，[2]宮崎大学大学院農学工学総合研究科）

2A03p10　ヘモグロビン A1c と結合するレクチンのスクリーニング
15:38 ○木村晃太[1]，小林夕香[2]，上野　泰[2]，吉宗一晃[1]（[1]日大生産応化，[2]J-オイルミルズ）

2A03p11　スギタケ由来の新規コアフコース特異的レクチン
15:49 ○小林夕香[1]，道羅英夫[2]，舘野浩章[3]，平林　淳[3]，河岸洋和[4,5]（[1]J-オイルミルズ，[2]静大グリーン研，[3]産総研，[4]静大・農，[5]静大院・創造）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A03p13　サナギタケ由来レクチンの精製と諸性質
16:10 ○竹島愛乃[1]，鈴木智大[2]，崔　宰熏[1]，道羅英夫[2]，加藤竜也[1,2]，朴　龍洙[1,2,3]，阿部伸一[4]，佐伯　潤[4]，小林夕香[5]，平井浩文[1,2]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大農・応生化，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造，[4]にちはら総研，[5]J-オイルミルズ）

2A03p14　スギヒラタケレクチン（PPL）の糖鎖構造解析
16:21 ○荒井勇人[1]，鈴木智大[2]，崔　宰熏[1]，道羅英夫[2]，平井浩文[1,2]，舘野浩章[3]，平林　淳[3]，小林夕香[4]，河岸洋和[1,2,5]（[1]静大農・応生化，[2]グリーン研，[3]産総研・糖鎖医工学，[4]J-オイルミルズ，[5]静大院・創造）

2A03p15　スギヒラタケ由来毒性物質の異種発現系の構築
16:32 ○亀澤哲弥[1]，竹島愛乃[1]，鈴木智大[2]，崔　宰熏[2]，平井浩文[2,3]，河岸洋和[2,3,4]（[1]静大農・応生化，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・農，[4]静大院・創造）

2A03p16　糸状性硫黄酸化細菌由来のマイクロチューブ形成多糖の構造解析
16:43 ○成塚理絵[1]，近藤敬子[2]，真嶋　司[2]，片平正人[2]，武田　穣[1]（[1]横国大院工，[2]京大エネ理工学研）

2A03p17　Pellicle of thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* strains: Characterization of polysaccharide and induction patterns
16:54 ○Buddhika Perumpuli, Taisuke Watanabe, Hirohide Toyama（Dept. Biosci. Biotech., Fac. Agr., Univ. the Ryukyus）

p19〜p22 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A03p19　未利用アナアオサ（*Ulva pertusa*）から分離したウルヴァンの化学構造
17:15 ○田幸正邦[1,2]，玉那覇真紀恵[1]，玉城善之[1]（[1]琉球大亜熱帯生資科，[2]琉球大産学官機構）

2A03p20　海藻類の非セルロース性中性多糖
17:26 ○PHAN VU THUY NHUNG，柴田千佳子，笠原　紳（宮城大学）

2A03p21　アルギン酸の酵素分解によるホモウロン酸ポリマーの調製
17:37 ○岡安祐佳[1]，下川知子[2]，吉田滋樹[1]（[1]筑波大学，[2]森林総合研究所）

2A03p22　三陸のイカ中骨を活用した機能性素材の開発
17:48 ○戸谷一英[1]，片ヶ瀬峻哉[1]，古関健一[1]，中川裕子[1]，長田光正[1]，渡邊　崇[1]，二階堂満[1]，甲野裕之[2]，伊藤良仁[3]，高橋　亨[3]，小浜恵子[3]，谷口隆雄[4]，成廣和枝[4]，山下和彦[4]，石村惣一[5]，伊藤典久[5]，田代勝男[5]（[1]一関高専・物化工，[2]苫小牧高専・物工，[3]岩手県工技センター・食品醸造，[4]ヤエガキ醗酵技研，[5]丸辰カマスイ）

A04 会場　午前の部（9:22〜12:05）

有機―天然物－生合成，代謝―

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

2A04a03　アロサミジン生合成遺伝子に関する研究
9:22 ○和田　響[1]，岡本　晋[2]，村岡聖子[1]，遠藤博寿[1]，長澤寛道[1]，作田庄平[1]（[1]東大院農，[2]食総研）

2A04a04　マクロラクタム抗生物質ヒタチマイシンのスターター部位構築に関わる酵素の機能解析
9:33 ○内野飛翔，沼倉真理緒，宮永顕正，江口　正，工藤史貴（東工大院理工）

2A04a05　ビセニスタチン生合成における ATP 依存性リガーゼ VinN の結晶構造解析
9:44 ○宮永顕正，篠原雄治，工藤史貴，江口　正（東工大院理工）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A04a07　放線菌由来新規 Pictet-Spengler 反応触媒酵素 McbB の構造機能解析
10:05 ○佐橋周作[1]，森　貴裕[1]，森田洋行[2]，阿部郁朗[1]（[1]東大院薬，[2]富山大和漢薬研）

2A04a08　Reveromycin A 生合成におけるサクシニル化酵素の機能解析
10:16 ○前島　希[1,2]，高橋俊二[1,3]，宮澤　岳[1,2]，野川俊彦[3]，清水　猛[1]，円谷陽一[2]，長田裕之[1,2,3]（[1]理研・抗生物質，[2]埼玉大院・理工学，[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）

2A04a09　butylmalonyl-CoA 生合成に関与する RevR の機能解析
10:27 ○宮澤　岳[1,2]，高橋俊二[1,3]，鈴木健裕[4]，堂前　直[2,4]，長田裕之[1,2,3]（[1]理研・抗生物質，[2]埼玉大・理工学，[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[4]理研 GRC）

2A04a10　Calyculin A 修飾酵素の機能解析
10:38 ○脇本行彦，江上蓉子，脇本敏幸，阿部郁朗（東大院薬）

2A04a11　海洋性粘液細菌のポリケチド抗生物質 haliangicin の生合成研究
10:49 ○孫　雨偉，宮野聖史，鈴木　彰，柘植尚志，小鹿　一（名大院・生命農）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A04a13　植物病原菌 *Bipolaris coicis* の生産する植物毒素 radicinin の生合成
11:10 ○西田直人[1]，北野生薫[2]，赤木靖典[2]，児玉基一朗[2]，石原　亨[2]，中島廣光[2]（[1]鳥取大院農，[2]鳥取大農）

2A04a14　放線菌 *Streptomyces rochei* の多重変異株が生産するアゾキシアルケン化合物の生合成機構
11:21 國武博文，木梨陽康，○荒川賢治（広大院・先端研）

2A04a15　*Streptomyces* sp. RI-77 由来フラノナフトキノン骨格を持つポリケタイド JBIR-76, 77 の生合成
11:32 ○曽根　薫[1]，佐藤龍太郎[1]，勝山陽平[1]，泉川美穂[3]，新家一男[2]，大西康夫[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]AIST，[3]JBIC）

2A04a16　微生物由来スチルベン合成酵素の機能解析と非天然型スチルベンアナログの創出
11:43 ○下村康一郎，森　貴裕，淡川孝義，阿部郁朗（東大院薬）

2A04a17　*Sarcophyton* 属ソフトコーラルの化学的および生物学的研究
11:54 ○戸村友彦[1]，荒武里衣[2]，山口勝司[3]，重信秀治[3]，田中淳一[2]，小鹿　一[1]（[1]名大院生命農，[2]琉球大理，[3]基生研）

A04 会場　午後の部（14:00〜18:10）

有機―天然物－生合成，代謝―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A04p01　放線菌由来新規セスキテルペン合成酵素遺伝子の解析
14:00 ○山田佑樹，小松　護，池田治生（北里大・生命研）

2A04p02　異種発現系を用いた新規 Teleocidin 類の生産
14:11 ○星野翔太郎[1]，張　驪騑[1]，淡川孝義[1]，伊藤卓也[2]，脇本敏幸[1]，阿部郁朗[1]（[1]東京大院薬，[2]徳島文理大院薬）

2A04p03　放線菌の生産するプレニルカルバゾール類縁体の生合成研究
14:22 ○小林正弥[1]，尾崎太郎[1]，新家一男[2]，西山　真[1]，葛山智久[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]産総研）

2A04p04　ヌクレオシド系抗生物質 A-94964 生合成におけるウリジン骨格形成機構
14:33 ○白石太郎，西山　真，葛山智久（東大・生物工学セ）

2A04p05　抗生物質ストレプトスリシン生合成機構の解明
14:44 ○丸山千登勢[1]，本山賢人[1]，馬場信行[1]，川畑球一[1]，泉川美穂[2]，増田裕一[3]，小松　護[4]，土井隆行[3]，新家一男[5]，池田治生[4]，濱野吉十[1]（[1]福井県大生物資源，[2]JBIC，[3]東北大院薬，[4]北里北里生命研，[5]産総研）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A04p07　放線菌由来 β-カルボリン化合物キタセタリン生合成遺伝子クラスターの同定
15:05 ○上田祥平[1]，木谷　茂[1]，アルーンスリアイヤダ[1]，池田治生[2]，仁平卓也[1]（[1]阪大工，[2]北里大）

2A04p08　ペプチドライゲースとリボソームとの協同によるペプチド新奇生合成機構の解明
15:16 ○野池基義[1]，雄谷洸一[2]，佐々木郁雄[1]，丸山千登勢[3]，石川　淳[4]，佐藤康治[1]，濱野吉十[3]，伊藤　肇[1]，大利　徹[1]（[1]北大院工，[2]北大院総合化学，[3]福井県立大学，[4]国立感染症研究所）

2A04p09　インドールジテルペンの生合成に関与するプレニル基転移酵素に関する研究－1
15:27 ○劉　成偉[1]，南　篤志[3]，野池基義[2]，戸嶋浩明[4]，及川英秋[3]，大利　徹[2]（[1]北大院総合化学，[2]北大院工，[3]北大院理，[4]茨城大農）

2A04p10　インドールジテルペンの生合成に関与するプレニル基転移酵素に関する研究－2
15:38 劉　成偉[2]，○藤盛道子[1]，南　篤志[3]，野池基義[1]，佐藤康治[1]，大栗博毅[3]，及川英秋[3]，大利　徹[1]（[1]北大院工，[2]北大院総合化学，[3]北大院理）

2A04p11　エルゴチオネインは *Streptomyces coelicolor* を酸化ストレスから守る
15:49 ○中嶋駿介[1]，佐藤康治[2]，簗島謙太郎[3]，松井智未[2]，大利　徹[2]（[1]北大院総合化学，[2]北大院工，[3]協和発酵バイオ）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A04p13　アミノ酸キャリアタンパク質を介して生合成される新規アミノ酸とその代謝産物の同定
16:10 ○長谷部文人[1]，富田武郎[1]，高ひかり[2]，藤村　務[2]，西山千春[3]，葛山智久[1]，西山　真[1]（[1]東大・生セ，[2]順天堂大・医・研究基盤センター，[3]順天堂大・医・アトピー疾患研究センター）

2A04p14　アミノ基結合型キャリアタンパク質を指標とした新規天然化合物の探索
16:21 ○松田研一[1]，長谷部文人[1]，富田武郎[1]，志波　優[2]，吉川博文[2]，新家一男[3]，葛山智久[1]，西山　真[1]（[1]東京大学，[2]東京農業大学，[3]産業技術総合研究所）

2A04p15　Jawsamycin 生合成経路およびシクロプロパン導入機構の解明
16:32 ○平塚知成，鈴木秀聡，仮屋　遼，清尾　崇，南　篤志，及川英秋（北大院理）

2A04p16　麹菌異種発現系を利用した，インドールジテルペン類の迅速な酵素合成
16:43 ○田上紘一[1]，南　篤志[2]，松本知之[1]，五味勝也[3]，大利　徹[4]，及川英秋[2]（[1]北大院総化，[2]北大院理，[3]東北大院農，[4]北大院工）

2A04p17　糸状菌ポリケタイド化合物の異種生産
16:54 ○藤居瑠璢[1]，南　篤志[1]，五味勝也[2]，藤井　勲[3]，及川英秋[1]（[1]北大院理，[2]東北大院農，[3]岩手医大薬）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A04p19　糸状菌メロテルペノイド anditomin の生合成機構解明
17:15 ○松田侑大，淡川孝義，阿部郁朗（東大院薬）

2A04p20　メロテルペノイド terretonin 生合成に関わる修飾酵素群の機能解析
17:26 ○岩渕大輝，松田侑大，淡川孝義，阿部郁朗（東大院薬）

2A04p21　糸状菌 *Aspergillus niger* 由来 PKS-NRPS 遺伝子クラスターの強制発現
17:37 ○淡川孝義，楊　小龍，脇本敏幸，阿部郁朗（東大院薬）

2A04p22　糸状菌 Fusarium sp. RK97-94 のルシラクタエン生合成遺伝子クラスターの解析
17:48 ○加藤　翔[1,2]，本山高幸[1]，林　敏明[1]，廣田　洋[1]，鎌倉高志[2]，長田裕之[1]（[1]理研・抗生物質，[2]東理大）

2A04p23　糸状菌 *Fusarium* sp. FN080326 株由来フサリセチン A 生合成遺伝子クラスターの解析
17:59 ○加藤直樹[1]，JANG Jun-Pil[2]，JANG Jae-Hyuk[2]，高橋俊二[1]，AHN Jong Seog[2]，長田裕之[1]（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]韓国生命工学研究院）

A05 会場　午前の部（9:11〜11:54）

有機―天然物，ケミカルバイオロジー，作用機構―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

2A05a02　昆虫類の化学コミュニケーションとヒト社会の科学コミュニケーション
9:11 ○笹川浩美[1,2,3]（[1]（公財）科学技術館，[2]（公財）国際科学振興財団，[3]（学）跡見学園）

2A05a03　バンウコンからの PPAR γ アンタゴニスト変換活性物質の同定及び推定結合様式の解析
9:22 ○宮前友策[1]，吉田光多郎[1]，大寺杏奈[1]，仲井奈緒美[1]，王　健一[2]，秋田　徹[3]，前嶋一宏[3]，増田誠司[1]，神戸大朋[1]，森　直樹[4]，入江一浩[4]，永尾雅哉[1]（[1]京大院生命，[2]京大農，[3]日本新薬，[4]京大院農）

2A05a04　PPAR γ アンタゴニスト変換活性物質による脂肪蓄積抑制機構の解析
9:33 ○大寺杏奈，宮前友策，大泉　宏，垣塚　彰，増田誠司，神戸大朋，永尾雅哉（京都大院生命）

2A05a05　抗線維化物質テトランドリンによるオートファジー経路制御機構の解明
9:44 ○西藤有希奈[1]，宮前友策[1]，仲井奈緒美[1]，Han Junkyu[2]，礒田博子[2]，増田誠司[1]，神戸大朋[1]，入江一浩[3]，永尾雅也[1]（[1]京大院・生命，[2]筑波大・生命環境，[3]京大院・農）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A05a07　プロシアニジン・オリゴマー構造－活性相関の可視化
10:05 ○春井宏太[1]，石原沙也加[1]，岡本修平[1]，土井翔馬[1]，奥谷浩平[2]，濱田義知[2]，中島範行[3]，齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電通大院・工，[2]大阪電通大・工，[3]富山県立大・工）

2A05a08　様々なプロシアニジン・オリゴマーの選択的合成研究と細胞増殖抑制活性
10:16 ○土井翔馬[1]，石原沙也加[1]，岡本修平[1]，岡本泰輔[1]，川崎　崇[2]，中嶋　範[3]，齊藤安貴子[1]（[1]大阪電通大院・工，[2]立命館大学・薬，[3]富山県大・工）

2A05a09　プロシアニジン・オリゴマーの細胞内シグナル伝達分

子への影響

10:27 ○岡本修平[1], 石原沙也加[1], 春井宏太[1], 土井翔馬[1], 岡本泰輔[1], 吉見旭人[2], 綾野義博[2], 野坂 祐[2], 齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電通大院・工, [2]大阪電通大・工）

2A05a10 脂肪鎖を導入した flavan-3-ol の HeLa S3 細胞増殖抑制活性

10:38 ○綾野義博[1], 森 一起[1], 東野雄祐[2], 石原沙也加[2], 岡本修平[2], 中島範行[3], 齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電気通信大・工, [2]大阪電気通信大院・工, [3]富山県立大・工）

2A05a11 プロアントシアニジン導入ビーズを用いた化学生物学研究

10:49 ○泉野麻友[1], 吉見旭人[2], 岡本修平[1], 石原沙也加[1], 田中龍太[2], 齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電気通信大院・工, [2]大阪電気通信大・工）

a13〜a16 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A05a13 Vialinin A の RBL-2H3 細胞における標的分子 USP5 酵素活性阻害を介した TNF-α 産生阻害メカニズムの解析

11:10 ○吉岡泰淳[1], 菅谷紘一[1], 高橋俊哉[2], 越野広雪[2], 矢島 新[3], 小野瀬淳一[1], 矢嶋俊介[4], 阿部尚樹[1]（[1]東農大・応生科・栄養, [2]理研・グローバル研究クラスタ, [3]東農大・応生科・醸造, [4]東農大・応生科・バイオサイエンス）

2A05a14 ツブイボタケ（*Thelephora vialis*）含有 vialinin A の KU-812 細胞中の生体内標的分子の探索

11:21 ○本橋寛子[1], 吉岡泰淳[1], 菅谷紘一[1], 高橋俊哉[2], 越野広雪[2], 矢島 新[3], 小野瀬淳一[1], 矢嶋俊介[4], 阿部尚樹[1]（[1]東農大・応生・栄養, [2]理研・グローバル研究クラスタ, [3]東農大・応生・醸造, [4]東農大・応生・バイオサイエンス）

2A05a15 ツブイボタケ（*Thelephora vialis*）含有 vialinin A の脱 SUMO 化酵素（SENP1）に対する阻害効果

11:32 ○牧内麻緒[1], 吉岡泰淳[1], 菅谷紘一[1], 矢島 新[2], 小野瀬淳一[1], 矢嶋俊介[3], 阿部尚樹[1]（[1]東農大・応生科・栄養, [2]東農大・応生科・醸造, [3]東農大・応生科・バイオサイエンス）

2A05a16 マクラギヤスデ防御物質の成長にともなう化学多形

11:43 ○桑原保正[1,2], 市来弥生[1,2], 森田將史[1,2], 浅野泰久[1,2]（[1]富山県大・生工科・生工研セ, [2]JST, ERATO）

A05 会場 午後の部（14:00〜18:10）

有機—天然物，ケミカルバイオロジー，作用機構—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A05p01 トランス・アネトールが薬剤排出および細胞内カルシウムイオン調節に与える影響

14:00 ○玉置裕之[1], 城野由衣[1], 荻田 亮[1,2], 田中俊雄[1], 藤田憲一[1]（[1]阪市大院, [2]健康研セ）

2A05p02 出芽酵母の偽菌糸形成に際しておこる微小管の配向異常への Bim1 および Kar9 タンパク質の関与の可能性

14:11 ○村田和加恵[1,2], 金原聡子[1], 北原 望[1], 荻田 亮[1,3], 藤田憲一[1], 田中俊雄[1]（[1]阪市大院理, [2]米子高専物質, [3]阪市大院研セ）

2A05p03 Aflatoxin production inhibitory activities of synthetic respiration inhibitors.

14:22 ○DIYAN FEBRI PRABOWO, Kurin Iimura, Keiko Takagi, Shohei Sakuda（The University of Tokyo）

2A05p04 *Fusarium graminearum* のトリコテセン生産を阻害する precocene II の標的タンパク質の同定

14:33 ○古川智宏, 坂本直子, 露木利枝, 鈴木道生, 長澤寛道, 作田庄平（東大院農生科・応生化）

2A05p05 キチナーゼ / キチナーゼ様タンパク質に着目したアロサミジン類の抗喘息作用の解析

14:44 ○桑田一平[1], 瀬口武史[2], 八村敏志[3], 井上博雅[4], 鈴木道生[1], 長澤寛道[1], 作田庄平[1]（[1]東大院・農生科, [2]プライムテック株式会社, [3]東大院・食の安全研究センター, [4]鹿児島大院・医歯）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A05p07 ブタ心臓からのミトコンドリア調製および新規 PET プローブのミトコンドリア内標的分子の同定

15:05 ○風見紗弥香[1], 西山新吾[2], 木村祐史[1], 伊藤博康[1], 塚田秀夫[2]（[1]浜松ホトニクス(株)筑波研, [2]浜松ホトニクス(株)中研 PET）

2A05p08 国内産琥珀に含まれる生物活性物質の比較による琥珀間の類似性の研究

15:16 ○清水栄作[1], 内田武史[2], 植田直見[3], 越野広雪[4], 木村賢一[1,2]（[1]岩手大農, [2]岩手大院農, [3]元興寺文化財研, [4]理研）

2A05p09 琥珀に含まれる生物活性物質の抗アレルギー作用について

15:27 ○小林 幹[1], 内田武史[1], 阿部友美[1], 新田久男[2], 東尾浩典[3], 上杉祥太[4], 木村賢一[1,4]（[1]岩手大院・農, [2]久慈琥珀(株), [3]岩手医大・共通教育セ・化学, [4]岩手大院・連合農）

2A05p10 種々の小分子化合物による UPR 関連遺伝子群発現挙動の解析

15:38 ○田代 悦, 新荘聡子, 溝谷優治, 井本正哉（慶應大理工）

2A05p11 漢方薬抽出物からのパーキンソン病治療薬シードの探索

15:49 ○藤巻貴宏[1], 斉木臣二[2], 田代 悦[1], 服部信孝[2], 井本正哉[1]（[1]慶大理工, [2]順天堂大医）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A05p13 転写因子 NF-κB の情報伝達経路に対する allantopyrone A の作用機序の解析

16:10 ○横井川純平[1], 森元今日子[1], 塩野義人[2], 上杉祥太[3], 木村賢一[3], 片岡孝夫[1]（[1]京都工芸繊維大応生, [2]山形大農, [3]岩手大院連合農）

2A05p14 細胞内タンパク質輸送に対する五環性トリテルペノイドの作用機序の解析

16:21 ○三津田智嗣, 横道公伸, 片岡孝夫（京工繊大院・応生）

2A05p15 アロステリックな Sirtuin 阻害剤の発見

16:32 ○伊藤昭博[1,2], 工藤紀雄[2], 竹本 操[2], 吉田 稔[1,2,3]（[1]理研 化学遺伝, [2]理研 CSRS, [3]科技機構 CREST）

2A05p16 FD-891 耐性酵母から精製したアクチンの特性

16:43 ○鏡大志郎[1], 竹内美穂[1], 工藤史貴[2], 江口 正[2], 片岡孝夫[3], 臼井健郎[1]（[1]筑波大院・生命環境, [2]東工大院・理工, [3]京工繊大院・応生）

2A05p17 化合物アレイを用いたトリコジエンシンターゼ阻害剤の探索

16:54 ○前田一行[1], 中嶋佑一[1], 河村達郎[2], 近藤恭光[2], 斎藤臣雄[2], 本山高幸[2], 長田裕之[2], 金丸京子[1], 小林哲夫[1], 木村 真[1]（[1]名大院・生命農, [2]理研 CSRS）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A05p19 放線菌由来抗がん性物質 collismycin A の作用標的同定

17:15 ○井上 尭[1,2], 川谷 誠[1], 室井 誠[1,3], 二村友史[1], 青野晴美[1], 浦本昌和[1], 本郷やよい[4], 越野広雪[4], 五十嵐康弘[5], 安藤直子[2], 長田裕之[1,3]（[1]理研・抗生物質, [2]東洋大院・工, [3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー, [4]理研 GRC・連携支援, [5]富山県立大・工）

2A05p20 ChemProteoBase による collismycin A の作用機作解析

17:26 ○室井 誠[1,2], 近藤久恵[2], 平田泰子[2], 井上 尭[1,3], 川谷 誠[1], 長田裕之[1,2]（[1]理研・抗生物質, [2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー, [3]東洋大院・工）

2A05p21 化合物アレイによる p38 γ および p38 δ MAP キナーゼ特異的阻害剤の探索

17:37 ○近藤恭光[1,2], 須藤龍彦[1], 本田香織[2], 林 輝雄[1], 長田裕之[1,2]（[1]理研・抗生物質, [2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）

2A05p22 がん細胞に ROS 産生を介した細胞死を誘導する α-chloroacetamide の作用機序と効果

17:48 ○河村達郎[1]，近藤恭光[1,2]，室井　誠[1,2]，川谷　誠[1]，長田裕之[1,2]（[1]理研・抗生物質，[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）

2A05p23　微生物培養ブロスからの抗マラリア活性化合物の探索

17:59 ○早瀬大貴[1]，宇賀田久美子[1,2]，LIM Chung Liang[1]，二村友史[1]，野川俊彦[1]，渡邉信元[1]，北　潔[3]，長田裕之[1]（[1]理研・抗生物質，[2]東京医科歯科大学，[3]東京大学）

A06 会場　午前の部（10:05〜12:05）

有機—天然物－単離構造決定，微生物—

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A06a07　ラン藻 *Moorea* 属から得られた新規 lyngbyatoxin A 誘導体の構造と活性

10:05 ○丹　智史[1]，内田　肇[1]，江　偉娜[1]，岩田恭江[1]，渡邊龍一[2]，鈴木敏之[2]，神尾道也[1]，永井宏史[1]（[1]東京海洋大，[2]水研セ中央水研）

2A06a08　食用ラン藻アシツキからのグラム陽性菌生育阻害物質の同定

10:16 ○米島洸佑[1]，奥　直也[1]，須河隆夫[2]，五十嵐康弘[1]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]富山生物学会）

2A06a09　食用ラン藻スイゼンジノリからの生理活性物質の探索

10:27 ○松本　京[1]，奥　直也[1]，丹生慶次郎[2]，五十嵐康弘[1]（[1]富山県大・生工研セ，[2]水前寺のり本舗 丹誠堂）

2A06a10　糸状菌 *Penicillium herquei* の生産する抗インフルエンザウイルス活性物質の構造および活性

10:38 ○千葉拓也[1]，浅見行弘[1,2]，須賀拓弥[1]，岩月正人[1,2]，野中健一[2]，増間碌郎[2]，永井隆之[1,2]，大村　智[2]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大学大学院感染制御科学府，[2]北里大生命科学研究所）

2A06a11　微生物二次代謝産物からの 赤痢アメーバ特異的含硫アミノ酸代謝経路阻害物質の探索

10:49 ○酒井一成[1]，森美穂子[1,4]，三橋祐也[3]，増間碌郎[1,4]，高橋洋子[1,4]，野崎智義[2]，塩見和朗[1,4]，大村　智[1,4]（[1]北里大学院感染制御科学府，[2]国立感染症研究所，[3]北里大学理，[4]北里大学生命研）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A06a13　微生物代謝産物からの MRSA に対するアルベカシン耐性克服物質の探索

11:10 ○須賀拓弥[1]，浅見行弘[1,2]，岩月正人[2]，山本　剛[2]，野中健一[2]，増間碌郎[2]，松井秀仁[2]，花木秀明[2]，岩本　晋[3]，小野寺秀幸[3]，大村　智[2]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大院感染制御，[2]北里大生命研，[3]協和発酵キリン創薬化学研）

2A06a14　病害虫ミトコンドリアに作用する天然物リガンドの探索

11:21 ○浅見行弘[1,2]，森美穂子[1,2]，須賀拓弥[2]，岩月正人[1,2]，中島琢自[3]，橋本祥平[4]，野中健一[1,2]，松本厚子[1,2]，弓削秀隆[4]，増間碌郎[1]，高橋洋子[1,2]，管原亮平[5]，塩月孝博[5]，山本武範[6]，篠原康雄[6]，一丸直哉[7]，村井正俊[7]，三芳秀人[7]，大村　智[1]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大生命研，[2]北里大院感染制御，[3]北里大感染制御研究機構，[4]北里大理，[5]農生資研，[6]徳島大疾患プロテオゲノム研究センター，[7]京大院農）

2A06a15　土壌分離放線菌 *Streptomyces* sp. 11A057 が生産する Indoleamine 2,3-dioxygenase 阻害物質の同定

11:32 ○植木雅志[1,2]，Oh Mijin[3]，Jang Jae-Hyuk[3]，Pham Dinh-Chuong[3]，廣田　洋[2]，Hwang Inkyu[3]，Ahn Jong Seog[3]，長田裕之[1,2]（[1]理研・抗生物質，[2]理研 GRC，[3]KRIBB, Chem. Biol.）

2A06a16　New Oxindole Derivatives Isolated from the Microbial Metabolite Fraction Library of Streptomyces sp. RK85-270

11:43 ○Jun-pil JANG[1,2]，Toshihiko NOGAWA[3]，Masakazu URAMOTO[1]，Akiko OKANO[3]，Yushi FUTAMURA[1]，Takeshi SHIMIZU[1]，Shunji TAKAHASHI[1,3]，Jae-Hyuk JANG[2]，Jong Seog AHN[2]，Hiroyuki OSADA[1,3]（[1]RIKEN，Antibiotics Lab.，[2]KRIBB, Korea，[3]RIKEN CSRS, Chemical Biology）

2A06a17　NPPlot（Natural Products Plot）を用いた新規微生物代謝産物の探索と単離

11:54 ○野川俊彦[1]，リムチュン・リャン[2,4]，浦本昌和[2]，岡野亜紀子[1]，本郷やよい[3]，中村健道[3]，越野広雪[3]，高橋俊二[1,2]，イブラヒムダーラ[4]，長田裕之[1,2]（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]理研・抗生物質，[3]理研 GRC，[4]マレーシア科学大学）

A06 会場　午後の部（14:00〜17:59）

有機—天然物－単離構造決定，微生物—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A06p01　フェアリーリング惹起物質の生合成経路に関する化学的研究

14:00 ○崔　宰熏[1]，河村友香子[2]，本橋令子[3]，鈴木智大[1]，大西利幸[1]，平井浩文[2]，浅川倫宏[4]，菅　敏幸[4]，河岸洋和[1,2,5]（[1]静大・グリーン研，[2]静大院農・応生化，[3]静大院農・共生バイオ，[4]静県大・薬，[5]静大院・創造）

2A06p02　イネにおけるフェアリーリング惹起物質 AOH の生合成経路に関する化学的研究

14:11 ○岩堀倫大[1]，崔　宰熏[2]，鈴木智大[2]，平井浩文[1]，浅川倫宏[3]，菅　敏幸[3]，河岸洋和[1,2,4]（[1]静大院農･応生化，[2]静大・グリーン研，[3]静県大・薬，[4]静大院・創造）

2A06p03　フェアリーリングの惹起物質のイネにおける二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析

14:22 ○山野博之[1]，崔　宰熏[2]，鈴木智大[2]，道羅英夫[2]，本橋令子[3]，平井浩文[1]，浅川倫宏[4]，管　敏幸[4]，河岸洋和[1,2,5]（[1]静大農応生化，[2]静大グリーン研，[3]静大院農共生バイオ，[4]静県大薬，[5]静大院創造）

2A06p04　コムラサキシメジにおける植物成長調節物質の生合成経路に関する化学的研究

14:33 ○圓山和希[1]，崔　宰熏[2]，鈴木智大[2]，平井浩文[1]，菅　敏幸[3]，浅川倫宏[3]，河岸洋和[1,2,4]（[1]静大院農･応生化，[2]静大・グリーン研，[3]静県大・薬，[4]静大院・創造）

2A06p05　ヤマブシタケ培養ろ液由来の生理活性物質の探索

14:44 ○徳永大輝[1]，呉　静[2]，崔　宰熏[2]，鈴木智大[2]，秋山佑介[1]，徳山真治[1]，平井浩文[1,2]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大院農・応生化，[2]静大院・グリーン研，[3]静大院・創造）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A06p07　サクラシメジが産生する機能性物質に関する化学的研究

15:05 ○森　千夏[1]，呉　静[2]，鈴木智大[2]，崔　宰熏[2]，平井浩文[1,2]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大農･応生化，[2]静大･グリーン研，[3]静大院・創造）

2A06p08　キシメジ（*Tricholoma flavovirens*）由来の機能性化合物の探索

15:16 ○邱　偉涛[1]，小堀　一[2]，平井浩文[1,3]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大院農・応生化，[2]静大院・創造，[3]静大院・グリーン研）

2A06p09　ナラタケ属（*Armillaria* sp.）菌糸体の産生する他感作用物質に関する化学的研究

15:27 ○小堀　一[1]，関谷　敦[2]，鈴木智大[3]，崔　宰熏[3]，平井浩文[3,4]，河岸洋和[1,3,4]（[1]静大院・創造，[2]森林総研，[3]静大・グリーン研，[4]静大農・応生化）

2A06p10　センボンナラタケ（*Armillaria* sp.）子実体が産生する他感作用物質の化学的解明

15:38 ○近田　梓[1]，小堀　一[2]，鈴木智大[3]，崔　宰熏[3]，平井浩文[1,3]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大農・応生化，[2]静大院・創造，[3]静大・グリーン研）

2A06p11　高等菌類の子実体形成物質の探索

15:49 ○呉　静[1,2]，森　千夏[3]，鈴木智大[1]，崔　宰熏[1]，平井浩文[1,4]，河岸洋和[1,4,5]（[1]静大・グリーン研，[2]日本学振，[3]静大農・応生化，[4]静大院農・応生化，[5]静大院・創造）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A06p13　青枯病菌が産生する ralfuranone 類の構造確定と病原力への寄与
16:10　○大西秀幸[1]，　甲斐建次[1]，　浅井郁哉[2]，　森　友花[2]，木場章範[2]，大西浩平[3]，曳地康史[2]，林　英雄[1]（[1]阪府大院・生命環境，[2]高知大・農，[3]高知大・総研セ）

2A06p14　Actinomycin 類による植物病原細菌 *Pseudomonas cichorii* のシデロフォア産生阻害
16:21　前中理沙，○甲斐建次，林　英雄（阪府大院・生命環境）

2A06p15　ナス科植物青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 由来の酵母に対する増殖促進活性物質の同定
16:32　○安住新吾[1]，　奥　直也[1]，　神田絢美[2]，　曳地康文[3]，五十嵐康弘[1]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]中央農業研究センター，[3]高知大農）

2A06p16　マメザヤタケ(*Xylaria polymorpha*)より単離したイソピマラン型ジテルペン類について
16:43　○塩野義人[1]，　松井紀嘉[1]，　小関卓也[1]，　村山哲也[1]，阿部友美[2]，木村賢一[2]（[1]山形大農，[2]岩手大院農）

2A06p17　新規オートファジー誘導物質(+)- エポジムノラクタムの構造と機能
16:54　新藤千波耶，三橋進也，重冨顕吾，○生方　信（北大院農）

p19〜p22 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A06p19　エリンギに含まれる抗腫瘍物質の単離・構造解析
17:15　○西村芳貴，西岡実穂，岩崎　崇，一柳　剛，石原　亨，會見忠則，河野　強（鳥取大農）

2A06p20　Neomacrophorin I, II, および III の単離構造決定
17:26　○橋本　勝[1]，　廣瀬あかね[1]，　殿内暁夫[1]，　根平達夫[2]，前多隼人[1]（[1]弘前大農生，[2]広島大総合）

2A06p21　Epoxyroussoeone および epoxyroussoedione の構造決定
17:37　○本村優奈[1]，　狩原恭平[1]，　田中和明[1]，　前多隼人[1]，根平達夫[2]，ウォーレンヒリー[3]，橋本　勝[1]（[1]弘前大学農学生命，[2]広島大学院総合科学，[3]ウェイブファンクション）

2A06p22　パイナップルセージ滲出物の化粧品原料としての機能性
17:48　○石田実希，　山本　葵，　竹森久美子，　米谷　俊，松田一彦，森本正則（近畿大院農）

A07 会場　午前の部（10:05〜12:05）

有機―合成，反応機構―

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A07a07　(+)-4'-deacetyl-griseusin A の合成研究
10:05　○佐古尚裕，渡邉秀典（東大院農生科・応生化）

2A07a08　Penifulvin A の両鏡像体の全合成
10:16　○深津裕一，渡邉秀典（東大院農生科）

2A07a09　Litseaone A の合成と構造改訂
10:27　○影治秀晃，石神　健，渡邉秀典（東大院・農生科）

2A07a10　三員環を有する生物活性物質の合成研究
10:38　○土井悠之介，坂口和彦，石神　健，渡邉秀典（東大院農生科・応生化）

2A07a11　立体化学の決定を目的とした GlabramycinB の合成研究
10:49　○山本将起，石神　健，渡邉秀典（東大院農生科）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A07a13　Pseudolaric acid B の 5 − 7 トランス縮環骨格の構築
11:10　○間瀬千晶，森　直紀，渡邉秀典（東大院農生科･応生化）

2A07a14　昆虫摂食阻害物質アザジラクチンの形式不斉合成
11:21　○森　直紀，渡邉秀典（東大院農生科・応生化）

2A07a15　4 つのジアステレオマーの合成と構造訂正
11:32　○徳田真樹[1]，　黒米雄次[2]，　加藤理恵子[2]，　野原由江[1]，服部恭尚[3]，真壁秀文[2]（[1]信州大農・応生科，[2]信州大院農，[3]京薬大・創薬化学）

2A07a16　Deacetylboronolide の合成研究
11:43　○黒米雄次[1]，徳田真樹[2]，服部恭尚[3]，真壁秀文[1]（[1]信大院農，[2]信大農応生，[3]京都薬科大）

2A07a17　パラジウム触媒による立体選択的環化反応を用いたピペリジンアルカロイド(+)-spectaline と *ent*-iso-6-spectaline の合成研究
11:54　○服部恭尚[1]，　葛山昌伴[1]，　古田善宏[1]，　大西康司[1]，櫻井春華[1]，　真壁秀文[2]，　廣田　満[2]，　小林数也[1]，　赤路健一[1]（[1]京都薬大薬，[2]信州大院農）

A07 会場　午後の部（14:00〜17:48）

有機―合成，反応機構―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A07p01　二置換アミノ酸残基を含むジペプチド誘導体の合成法
14:00　○松山恵介，児玉和也，山本憲一郎（長瀬産業株式会社）

2A07p02　温度感受性ペプチドへの応用を志向した側鎖アミド修飾型アミノ酸の合成
14:11　○出張裕子，藤田裕子，岡田洋平，金　承鶴，北野克和，千葉一裕（東農工大農）

2A07p03　磁性粒子を用いた効率的ペプチド液相合成法の開発
14:22　○谷口大輔，島田恒平，若松弘起，岡田洋平，北野克和，千葉一裕（東京農工大学）

2A07p04　Acm 化チオールの酸化的開裂を基軸としたペプチド誘導体の合成
14:33　○渋谷彩恵子，　高橋優士，　岡田洋平，　金　承鶴，北野克和，千葉一裕（東京農工大学）

2A07p05　疎水性可溶化担体を用いた液相コンジュゲート核酸合成
14:44　小路貴生，金　承鶴，○千葉一裕（東京農工大院農）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A07p07　ベンズアルデヒド誘導体の蛍光特性とその生体分子プローブとしての応用
15:05　○島田恒平，岡田洋平，金　承鶴，北野克和，千葉一裕（東京農工大院農）

2A07p08　過塩素酸リチウム - ニトロメタン系における電解付加環化反応
15:16　○山口勇将，岡田洋平，千葉一裕（東農工大院農）

2A07p09　スクアレンーホペン環化酵素による 10(15)位がエチル基に置換したスクアレン基質の環化反応
15:27　○佐々木勇輔[1]，　南野　舞[1]，　仲野千秋[2]，　星野　力[1,2]（[1]新潟大農，[2]新潟大院自）

2A07p10　β−アミリン合成酵素：基質の 23 位に位置するアルキル基のサイズが環化反応に及ぼす影響
15:38　○金子一輝[1]，　宮原悠里[2]，　花岡正樹[2]，　仲野千秋[1,2]，星野　力[1,2]（[1]新潟大農，[2]新潟大院自）

2A07p11　β - アミリン合成酵素：基質の 19 位に位置するアルキル基のサイズが環化反応に及ぼす影響
15:49　○高橋一成[1]，　山口雄生[1]，　千葉彬史[1]，　阿部奈緒美[1]，星野　力[1,2]（[1]新潟大院自，[2]新潟大農）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A07p13　神経成長因子増強活性を持つステロイド配糖体の合成研究
16:10　○谷田貴弘，原田翔太，小鹿　一（名大院生命農）

2A07p14　*gem*- ジブロモメチレンからケトンへの新規変換条件
16:21　○木村梨乃，澤山裕介，西川俊夫（名大院農生命農）

2A07p15　MTM エーテルの新しい脱保護法の開発
16:32　○橋本穂果，今津拓也，榊原　良，安立昌篤，西川俊夫（名大院生命農）

2A07p16　サキシトキシン骨格の新規構築法の開発
16:43　◦上野壮平，中崎敦夫，西川俊夫（名大院生命農）
2A07p17　Synthetic Study on Lycojapodine A
16:54　◦Wenyu Huang，Atsuo Nakazaki，Toshio Nishikawa（Nagoya Univ）

p19〜p21 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A07p19　インドールアルカロイド　セスペンドールの合成研究
17:15　◦樋口恵子，杉野公美，中崎敦夫，安立昌篤，西川俊夫（名大院生命農）
2A07p20　Phenacyl 基を Cys 残基保護基に用いた糖タンパク質 Evasin-1 の化学合成
17:26　◦木我崇廉[1]，片山秀和[2]，北條裕信[3]，中田宗宏[2]（[1]東海大院工・工業化学，[2]東海大工・生命化学，[3]阪大・蛋白研）
2A07p21　糖を付加したクルマエビのインスリン様造雄腺因子の化学合成
17:37　◦片山秀和[1]，窪田のぞみ[1]，大平　剛[2]，北條裕信[3]（[1]東海大工・生命化学，[2]神奈川大理・生物科学，[3]阪大・蛋白研）

A08 会場　午後の部（14:00〜18:10）

微生物―物質生産－醸造，発酵（一次代謝産物）―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A08p01　ブタノール生産性 Clostiridium 属細菌における至適発酵温度の改変
14:00　◦清　啓自，川嶋草平，門倉利守，中里厚実，中山俊一（東農大院農）
2A08p02　デンプン発酵性好熱乳酸生産細菌の分離と乳酸生産の最適化
14:11　◦田代幸寛[1]，ポウデルプラモド[1]，石橋侑子[1]，宮本浩邦[2]，酒井謙二[1]（[1]九大院・生資環，[2]日環科学）
2A08p03　トリメチルアミン分解能を持つ乳酸菌のスクリーニング
14:22　◦廣瀬弥生[1]，　金内　誠[1]，　畑中咲子[1]，　下山田真[1]，小泉武夫[2]（[1]宮城大学，[2]発酵文化推進機構）
2A08p04　米麹から単離した植物由来乳酸菌とその機能性・乳発酵適性
14:33　岩崎修一[2]，　◦横井健二[1]，　山川　崇[2]，　浅井　恵[2]，木元広実[3]，鈴木チセ[3]（[1]富山農総技セ食品研，[2]ホワイト食品（株），[3]農研機構・畜草研）
2A08p05　生もと系酒母に存在する *Lactobacillus sakei* の亜硝酸還元機能解析
14:44　◦渡邉亮太[1]，　池田優子[1]，　岩下和裕[2]，　徳岡昌文[1]，進藤　斉[1]，佐藤和夫[1]（[1]東農大院・農・醸造，[2]酒総研）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A08p07　好気条件で焼酎粕中のクエン酸を取込む大腸菌株の育株
15:05　◦宮地真由[1]，玉置尚徳[2]，鈴木秀之[1]（[1]京都工繊大院・応生，[2]鹿大・農・焼酎発酵セ）
2A08p08　次世代シークエンサーによる速醸もとを用いた清酒醸造過程の細菌叢解析
15:16　◦佐藤万里，三枝静江，細井知弘（東京都立食技セ）
2A08p09　次世代シークエンサーを用いたゲノムスケールでの酢酸菌分類の試み（第二報）
15:27　貝沼（岡本）章子[1]，松谷峰之介[2]，石川森夫[1]，◦矢吹　岳[1]，志波　優[3]，　鈴木治夫[4]，　吉川博文[3,5]，　松下一信[2]，　小泉幸道[1]（[1]東京農大・応生科醸造，[2]山口大・農，[3]東京農大・ゲノムセンター，[4]山口大・院・理工，[5]東京農大・応生科バイオ）
2A08p10　PCR-DGGE 法によるラオス・タイの伝統的水産発酵食品の微生物相解析
15:38　◦丸井淳一朗[1]，　Sayvisene BOULOM[2]，Wanchai PANTHAVEE[3]，　門馬真里[1]，　楠本憲一[4]，　中原和彦[1]，齋藤昌義[1]（[1]国際農研，[2]ラオス国立大・農，[3]カセサート大・食品研，[4]農研機構・食総研）
2A08p11　次世代シーケンサ MiSeq を用いた泡盛もろみの網羅的菌叢解析
15:49　◦塚原正俊[1]，　鼠尾まい子[1]，　渡久地政汰[1]，　東　春奈[1]，伊波朋哉[1]，大城彩音[1]，外山博英[2]（[1](株)バイオジェット，[2]琉大農）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A08p13　泡盛もろみ中の微生物の特性
16:10　◦宮平勝人，玉城康智（沖縄高専　生物資源工）
2A08p14　製造方法が多様な市販清酒のメタボローム解析
16:21　◦森雄太郎[1,2]，　豊浦利枝子[2]，　磯谷敦子[2]，　徳岡昌文[3]，織田　健[2]，岩下和裕[1,2]（[1]広大院先端，[2]酒総研，[3]東農大）
2A08p15　試験醸造による清酒メタボロームと製造法との関連解析
16:32　◦田村彰史[1,2]，　森雄太郎[1,2]，　織田　健[2]，　岩下和裕[1,2]（[1]広大院・先端研，[2]酒総研）
2A08p16　清酒粕や焼酎粕に含まれるポリアミン（プトレスシン，スペルミジン，スペルミン）含量の調査と解析
16:43　◦寺本拓生[1,2]，　森本朋子[2]，　上佐古大貴[1,2]，　佐藤龍一[1,2]，吉田聡子[2]，向井伸彦[2]，山田　修[2]，藤井　力[1,2]（[1]広島大院・生物圏，[2]酒総研）
2A08p17　清酒のフェノール酸レベルの変動要因について
16:54　◦鈴木伸和，伊藤俊彦，中山愛織，伊藤将哉，橋爪克己（秋田県立大学）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A08p19　清酒老香の主成分 Dimethyl trisulfide の生成に影響を与える製造条件の統計解析（2）
17:15　◦佐々木慧[1,2]，　西堀奈穂子[2]，　金井宗良[2]，　磯谷敦子[2]，山田　修[2]，後藤奈美[1,2]，藤井　力[1,2]（[1]広大院・生物圏，[2]酒総研）
2A08p20　山羊乳酒の開発と香気成分の特性評価
17:26　◦金城朱理[1]，武島浩太[2]，玉城康智[1]，田中　博[1]（[1]沖縄高専　生物資源，[2]沖縄高専　専攻科）
2A08p21　軟質性，高温登熟耐性を持った酒米選抜のためのスクリーニング方法の確立（第 1 報）
17:37　◦山崎梨沙[1]，　大土井律之[1]，　勝場善之助[2]，　出田　収[3]，船附稚子[3]，重宗明子[3]，中込弘二[3]（[1]広島県立総合技術研究所 食品工業技術センター，[2]広島県立総合技術研究所　農業技術センター，[3](独)農研機構 近畿中国四国農業研究センター）
2A08p22　ワイルドライスと有色米をもちいた醸造酒の特性
17:48　◦竹下良一，三枝敬明，寺本祐司（崇城大学）
2A08p23　オキアミを用いた発酵調味料の製造法
17:59　◦長田彩加，金内　誠，畑中咲子，下山田真，石田光晴（宮城大食産）

A09 会場　午前の部（9:11〜12:05）

微生物―細胞－分離，分類，生態―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

2A09a02　乳酸菌の分離と発酵特性の評価
9:11　◦武島浩太[1]，池松真也[2]，田中　博[2]（[1]沖縄高専・専攻科，[2]沖縄高専・生物資源）
2A09a03　富士五湖から乳酸菌の分離とプロバイオティクス利用に向けた基礎的研究
9:22　◦DO KIEU PHUONG，乙黒ミサ，岸本宗和，柳田藤寿（山梨大院ワイン研）
2A09a04　*Lactobacillus plantarum* におけるコロニー形態とバイオフィルム形成の関係性
9:33　◦河嶋伊都子[1]，　柿原健佑[1]，　尾花　望[1]，　久保田浩美[2]，清川達則[1]，小山二花[1]，細谷幸一[2]，湯井幸治[2]，野村暢彦[1]（[1]筑波大院生命環境，[2]花王株式会社安全科学研究所）
2A09a05　*Fructobacillus* 属乳酸菌の特徴と糖代謝
9:44　◦浅沼　開[1]，及川　容[1]，田中尚人[2]，梶川揚申[1]，遠藤明仁[3]，佐藤英一[1]，岡田早苗[1]（[1]東農大応生科・化学，[2]東農大・菌株，[3]東農大・生物産業学部）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A09a07　山廃もとの微生物フローラ〜ピロシークエンス法による菌叢変化の追跡〜

10:05　◦小柳　喬[1]，　中川　明[2]，　清原正志[2]，　松井　裕[2]，山本恵子[2]，　バルラフローリン[1]，　武　春美[3]，　勝山陽子[3]，辻　篤史[3]，　徳田耕二[4]，　中村静夫[3]，　南　博道[2]，　榎本俊樹[1]，片山高嶺[2]，熊谷英彦[2]（[1]石川県大・生資環・食品，[2]石川県大・資源研，[3]石川県・工試，[4]車多酒造(株)）

2A09a08　タイ及びラオス由来スターター中に含まれる微生物叢の解析

10:16　◦村越美穂[1]，米田英伸[1]，H-Kittikun Aran[3]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST，ERATO，[3]Prince of Songkla Univ.）

2A09a09　セルロース分解能を持つ新奇 *Streptomyces* 属細菌（*S abietis*）の分離

10:27　◦藤井克彦[1]，　里見正隆[2]，　福井洋平[2]，　松延　駿[1]，森福洋二[1]，榎田裕哉[1]（[1]山口大農，[2]水産総合研究センター）

2A09a10　キシロース資化性を有する新規インドネシア産酵母の分離と同定

10:38　◦小林隆一[1]，Atit Kanti[2]，川崎浩子[1]（[1]製品評価技術基盤機構・NBRC，[2]LIPI, Indonesia）

2A09a11　釜石市海岸に自生するマツより分離した新規酵母 *Wickerhamomyces kamaishiensis* sp. nov.

10:49　◦竹内史子[1]，　宮崎由美子[1]，　猪又幸江[2]，　笠井宏朗[2]，高橋幹男[1]，　鶴海泰久[1]，　川崎浩子[1]（[1]製品評価技術基盤機構・NBRC，[2]北里大・釜石研）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A09a13　地球深部探査船「ちきゅう」を用いた「下北八戸沖石炭層生命圏掘削調査」により採取された大深度堆積物試料からの圧力関連微生物の分離

11:10　◦加藤千明[1]，ファンジェイソン[2]，堀　知行[3]，諸野祐樹[1]，稲垣史生[1]（[1]海洋研究開発機構，[2]ハワイパシフィック大，[3]産業技術総合研究所）

2A09a14　化学合成生態系水槽中の微生物学的多様性と現場微生物の分離

11:21　◦吉成麻有[1]，根本　卓[2]，三宅裕志[1]，加藤千明[3]（[1]北里大院海洋生命科学，[2]新江ノ島水族館，[3]海洋研究開発機構）

2A09a15　佐鳴湖より見出された孔径 0.2 μm フィルターを通過可能な極小細菌の解析

11:32　◦福田洸平[1]，　石堂真輝[2]，　飯田健義[1]，　居波　渉[1]，川田善正[3]，金原和秀[1]，新谷政己[1]（[1]静大院工，[2]静大･工，[3]静大･電研）

2A09a16　モザンビークのダイズ根粒菌の系統解析

11:43　◦安藤康雄[1]，　伊藤　治[2]，　辻本泰弘[1]，　大矢徹治[1]，ボイナグイルヘルミノ[3]，　コリアールヘンリクエスビクトール[3]，飛田　哲[1]（[1]国際農林水産業研究センター，[2]国連大学，[3]モザンビーク農業研究所）

2A09a17　Feed-back isolation and identification of thermotolerant bacteria within mixed culture system

11:54　◦Pramod Poudel[1]，Yukihiro Tashiro[1]，Maiko Yadomi[1]，Hirokuni Miyamoto[2]，Kenji Sakai[1]（[1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.，[2]Japan Eco-science）

A09 会場　午後の部（14:00〜17:48）

微生物—細胞ー分離，分類，生態，複合微生物，共生微生物，難培養微生物—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A09p01　循環型汚水浄化槽内におけるアンモニア酸化細菌およびアンモニア酸化古細菌の動態解析

14:00　◦甲木幸絵[1]，　冨田　希[2]，　鈴木智順[1]（[1]東理大院応生物，[2]東理大応生）

2A09p02　循環型汚水浄化装置における細菌叢遷移とタンパク質の解析

14:11　◦有見芳樹[1]，山崎拓登[2]，鈴木智順[1]（[1]東理大院応生，[2]東理大応生）

2A09p03　循環型モデル浄化槽における細菌および真核微生物の有機物分解能と微生物叢の変動解析

14:22　◦高城茉那[1]，近藤仁美[2]，鈴木智順[1]（[1]東理大院理工，[2]東理大理工）

2A09p04　空中浮遊細菌の形態とその存在割合に関する調査

14:33　◦今野奈津子[1]，森下　航[2]，鈴木智順[1]（[1]東理大院理工，[2]東理大理工）

2A09p05　Study on bacterial population dynamics in association with biofumigant application

14:44　◦MD ROKUNUZZAMAN[1]，　Ayumi HayaKawa[2]，Shinzo Yamane[2]，　Sota Tanaka[2]，　Kouhei Ohnishi[3]（[1]The United Graduate School of Agricultural Sciences, Ehime University, [2]Faculty of Agriculture, Kochi University, [3]Research Institute of Molecular Genetics, Kochi University）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A09p07　テルルを代謝する新規海洋性微生物の獲得とその機能解析

15:05　◦堀池　巧[1,3]，　大塚　治[1]，　田中康寛[2]，　寺原　猛[3]，今田千秋[3]，山下光雄[1,2]（[1]芝浦工大　SIT 総研　レアメタルバイオリサーチセンター，[2]芝浦工大　応化，[3]東京海洋大院　海洋科学）

2A09p08　アニリン資化性糸状菌の分離

15:16　◦河合淳支[1,2]，村上周一郎[2,3]（[1]明治大学院農，[2]日本農芸化学会，[3]明治大学農農化）

2A09p09　MALDI-TOF-MS を用いた糸状菌類のタイピングにおける種間および種内変異の検討

15:27　◦濱田亮祐，堀沢　栄（高知工科大学）

2A09p10　逆転写と多制限酵素断片長多型を組合わせた食品由来大腸菌の迅速同定

15:38　◦細田晃文[1]，駒場　新[2]，岸本　満[2]，田村廣人[1]（[1]名城大農，[2]名芸大）

2A09p11　*Pseudozyma* 属酵母が植物体上で分泌する糖脂質マンノシルエリスリトールリピッドは，生息域の拡大に関与する

15:49　◦北本宏子[1]，　吉田重信[1]，　森田友岳[2]（[1](独)農環研，[2](独)産総研）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A09p13　*Sphingomonas* sp.GF9 株の生産する *Catellibacterium nectariphilum* AST4^{T}株生育因子の単離

16:10　◦三橋進也，　ブイヤンムハンマドナズルールイスラム，重冨顕吾，高井亮吾，鎌形洋一，生方　信（北大院農）

2A09p14　Thaumarchaeota 門古細菌が北方圏森林土壌の窒素循環に与える影響

16:21　◦礒田玲華[1]，　原新太郎[1]，　Tahvanainen Teemu[2]，橋床泰之[1]（[1]北大院農，[2]UEF）

2A09p15　長期無施肥水田で栽培したアフリカイネ×台中 65 号交雑後代系統イネの根面／根内共生細菌叢の DGGE 法による追跡と主要細菌として得た *Burkholderia kururiensis* の機能性

16:32　◦橋床泰之[1]，白　啓鈴[1]，前川雅彦[2]（[1]北海道大院農，[2]岡山大植物研）

2A09p16　環境条件が IncP-7 群プラスミド pCAR1 の接合伝達頻度・宿主域に及ぼす影響の解明

16:43　◦柳田晃輔[1]，　松井一泰[1]，　新谷政己[2]，　岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]（[1]東大生物工学セ，[2]静大・工）

2A09p17　プラスミド NAH7 の受容の可否に影響を及ぼす受容菌 Pseudomonas resinovorans ゲノム上の遺伝子の解析

16:54　◦李　美英[1]，　高橋裕里香[1]，　松井一泰[1]，　新谷政己[2]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]静大院・工）

p19〜p21 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A09p19　*Methylobacterium* sp.121 株の運動性に影響を与える因子の探索
17:15　◦若林　佑[1], 清水　哲[2], 中村　顕[2], 伊藤政博[1]（[1]東洋大・生命, [2]筑波大・生命環境系）

2A09p20　フェナントレン分解コンソーシアムにおける非分解優占種細菌の役割
17:26　◦小川なつみ,　加藤広海,　遠藤　諒,　大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝（東北大院生命科学）

2A09p21　1 細胞ゲノム解析で明らかにするシロアリ腸内原生生物細胞表面共生菌 Rs-N74 の機能
17:37　◦雪　真弘[1],　桑原宏和[2],　新谷政己[3,4],　本郷裕一[2], 大熊盛也[1,4]（[1]理研 CSRS, [2]東工大院生命理工, [3]静岡大工, [4]理研 BRC-JCM）

A10 会場　午前の部（9:11〜11:54）

微生物―物質生産－微生物変換，微生物酵素反応―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

2A10a02　枯草菌細胞壁合成に関与する酵素を用いたペプチド合成の基質特異性
9:11　◦荘　葉[1],　橋本義輝[1],　安部智子[2],　葛　寅[1], 熊野匠人[1], 小林達彦[1]（[1]筑波大院・生命環境, [2]東電大・理工）

2A10a03　枯草菌ゲノム縮小株によるケミカル代替素材の生産
9:22　◦増田健太[1],　森本拓也[1],　戸谷吉博[2],　平沢　敬[2,3], オヌマチュムサク[4],　石川　周[4],　影山　泰[1],　清水　浩[2], 小笠原直毅[4], 尾崎克也[1]（[1]花王・生科研, [2]阪大院・情報・バイオ情報, [3]東工大院生命理工・生物プロセス, [4]奈良先端大院・バイオ）

2A10a04　定常期の枯草菌によるジピコリン酸生産における ^{13}C 代謝フラックス解析
9:33　◦戸谷吉博[1],　平沢　敬[1,2],　増田健太[3],　森本拓也[3], 影山　泰[3], 尾崎克也[3], 小笠原直毅[4], 清水　浩[1]（[1]阪大院･情報･バイオ情報, [2]東工大院・生命理工・生物プロセス, [3]花王・生科研, [4]奈良先端大院・バイオ）

2A10a05　*Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 による食後高血糖改善成分 1- デオキシノジリマイシンの高生産培養
9:44　◦小野瀬晋司[1],　仲川清隆[1],　山岸賢治[2],　木村俊之[3], 池田亮一[4], 樋口央紀[5], 宮澤陽夫[1]（[1]東北大院農, [2]東北農研セ, [3]中央農研セ, [4]旭松食品, [5]機能性植物研）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A10a07　T7 ポリメラーゼ /T7 プロモーターを用いた構成的高発現システムによる芳香族化合物の生産
10:05　◦駒　大輔, 山中勇人, 森芳邦彦, 大本貴士（阪市工研）

2A10a08　代謝改変大腸菌による *p*- アミノ安息香酸の生産
10:16　駒　大輔[1],　◦山中勇人[1],　森芳邦彦[1],　酒井清文[1], 増田敬哉[2], 佐藤嘉弘[2], 樋田幸三[2], 大本貴士[1]（[1]阪市工研, [2]帝人）

2A10a09　2,4- ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の特性解析
10:27　◦吉田拓矢[1], 満倉浩一[2], 吉田豊和[2]（[1]岐阜大工・生命工, [2]岐阜大工・化生工）

2A10a10　*Streptomyces* sp. GF3585 由来（*R*）- 選択的イミン還元酵素の特性解析
10:38　◦新妻貴明[1],　満倉浩一[2],　小田高広[1],　長澤　透[1], 吉田豊和[2]（[1]岐阜大工・生命工, [2]岐阜大工・化生工）

2A10a11　*Microbacterium* sp. H8 由来（*S*）- 選択的ハイドロラーゼの特性解析
10:49　◦満倉浩一[1],　林　秀樹[2],　高間　健[2],　長澤　透[2], 吉田豊和[1]（[1]岐阜大工・化生工, [2]岐阜大工・生命工）

a13〜a16 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A10a13　耐熱性ニトリルヒドラターゼのスクリーニング
11:10　◦朴木佳那[1], 安川和志[2], 浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ, [2]JST, ERATO）

2A10a14　アミノ酸酸化酵素のストレッカー反応への利用
11:21　◦安川和志[1,2], 浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ, [2]JST, ERATO）

2A10a15　アミノ酸水酸化酵素を用いた L-*threo*-3- ヒドロキシアスパラギン酸の効率的生産
11:32　◦中野雅至[1], 原良太郎[2], 木野邦器[1,2]（[1]早大理工・応化, [2]早大・理工研）

2A10a16　酵素反応を利用した *trans*-3- ヒドロキシ -L- プロリン合成法の開発
11:43　◦山縣　海[1], 北辻早希[1], 原良太郎[2], 木野邦器[1,2]（[1]早大理工・応化, [2]早大・理工研）

A10 会場　午後の部（14:00〜18:10）

微生物―物質生産－微生物変換，微生物酵素反応―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A10p01　*Leuconostoc mesenteroides* NBRC 100496 が生産する不溶性グルカン
14:00　若林安希[1], ◦矢野成和[1], 立木　隆[2], 若山　守[2]（[1]山形大学院理工, [2]立命館大学生命）

2A10p02　DFAIII 生産酵素の探索と生産条件の検討
14:11　◦佐野直也, 上田　誠（小山高専物質工）

2A10p03　*Gluconobacter* 属酢酸菌によるズルシトールの酸化反応
14:22　◦成田裕香, 片岡尚也, 薬師寿治, 足立収生, 松下一信（山口大・農・生物機能）

2A10p04　メチロトローフ酢酸菌 *Acidomonas methanolica* におけるジヒドロキシアセトン生産
14:33　◦阿野嘉孝[1], 大久保慎二[1], 丸山雅史[1], 三井亮司[2]（[1]愛媛大・農, [2]岡山理大・理）

2A10p05　*Gluconobacter oxydans* NBRC 3293 由来 2- ケトグルコン酸脱水素酵素遺伝子の同定およびその活用
14:44　◦片岡尚也, 松谷峰之介, 松下一信, 薬師寿治（山口大・農・生物機能）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A10p07　酢酸菌のウロン酸酸化に寄与する PQQ 酵素
15:05　◦玉井秀樹, 丸山雅史, 阿野嘉孝（愛媛大・農）

2A10p08　*Eggerthella* sp. YY7918 株でのダイゼイン - エクオール変換に関する酵素の解析
15:16　◦川田結花[1],　横山慎一郎[2],　野村　泉[1],　服部正平[3], 大島健志朗[3], 鈴木　徹[1]（[1]岐阜大・連農, [2]岐阜県産業技術センター, [3]東大・院・新領域）

2A10p09　核酸医薬合成中間体となるヌクレオシド誘導体の合成に有用な微生物酵素の探索
15:27　◦松谷成裕[1],　堀之内伸行[1],　日比　慎[2],　斯　大勇[1], 高橋里美[2], 小川　順[1]（[1]京大院農　応用生命, [2]京大院農　産業微生物）

2A10p10　ポリグルタミン酸型葉酸の消化管吸収促進に有用な微生物の探索
15:38　◦岸田奈弓[1],　岸野重信[1],　青木雄大[2],　鈴木重徳[2], 小川　順[1]（[1]京大院農･応用生命, [2]カゴメ株式会社研究開発本部）

2A10p11　新規環状アミノ酸水酸化酵素の探索と機能解析
15:49　◦森　亮輔[1],　日比　慎[2],　三宅良磨[3,4],　川端　潤[3,4], 高橋里美[2], 小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命, [2]京大院農・産業微生物, [3]三菱化学科学技術研究センター, [4]エーピーアイコーポレーション）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A10p13　アミノ酸水酸化反応に有用な α-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼの補基質供給系の開発
16:10　日比　慎[2]，　○富田弥生[1]，　矢島紘子[2]，　高橋里美[2]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大院農・産業微生物）

2A10p14　Screening of 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid producing lactic acid bacteria for probiotics
16:21　○Nu Anh Thu LE[1]，Shigenobu KISHINO[1]，Yoshie UCHIBORI[2]，Yasunori YONEJIMA[2]，Jun OGAWA[1]（[1]Division of Applied Life Sciences, Graduate school of Agriculture, Kyoto University, [2]Research and Development Department, Nitto Pharmaceutical Industries, Ltd.）

2A10p15　*Lactobacillus plantarum* AKU 1009a 由来脂肪酸水和脱水酵素の諸性質解明
16:32　○竹内道樹[1]，　田辺香緒里[1]，　平田晶子[1]，　朴　時範[2]，岸野重信[1]，小川　順[1,3]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大院農・産業微生物，[3]京大・生理化学ユニット）

2A10p16　油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 由来グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼホモログの機能解析
16:43　○落合美佐[1]，櫻谷英治[2]，安藤晃規[3]，小川　順[2]（[1]サントリー SIC，[2]京大院農・応生，[3]京大・生理化学ユニット）

2A10p17　分裂酵母 *S. pombe* でのリパーゼの活用によるリシノール酸の分泌生産
16:54　○植村　浩[1]，矢澤　彌[1]，熊谷博道[2]（[1]産総研・生物プロセス，[2]旭硝子）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A10p19　固定化リパーゼを用いたネルボン酸セラミドの酵素合成
17:15　○梅本宏樹[1]，　倉田淳志[1]，　濱口翔平[2]，　塚原　智[2]，石黒　隆[2]，岸本憲明[1]（[1]近畿大院農，[2]ミヨシ油脂(株)食品油脂研究所）

2A10p20　薬物代謝酵素発現酵母を用いたヒト医薬品代謝物の製造
17:26　○西川美宇[1,2]，　生城真一[1]，　安田佳織[1,2]，　榊　利之[1]（[1]富山県立大生物工，[2]TOPU バイオ研）

2A10p21　酵母 *Trichosporon moniliiforme* の細胞反応による安息香酸からの *p*-ヒドロキシ安息香酸の高収量生産
17:37　○安藤拓也，吉野周平，小林慶一，桐村光太郎（早大理工・応化）

2A10p22　糸状菌胞子を用いた新規な界面微生物変換プロセス
17:48　○城戸良介，杉谷彩香，小田　忍，大箸信一（金沢工大ゲノム研）

2A10p23　*Aspergillus niger* の固体培養によるオリーブ葉二次代謝産物の微生物変換
17:59　○三宅聡子，仁戸田照彦，神崎　浩（岡山大院環境生命）

A11 会場　午後の部（14:00〜17:48）

微生物—遺伝子ー構造，機能—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A11p01　IncP-9 群 NAH7 の oriT の同定と接合伝達宿主域に関する研究
14:00　○岸田康平，井上　慧，宮崎　亮，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大院生命）

2A11p02　プラスミド上及び宿主染色体にコードされる MvaT ホモログ群の改変 ChIP-chip 解析
14:11　○高橋裕里香[1]，　尹　忠銖[1,2]，　鈴木千穂[1]，　新谷政己[3]，山根久和[4]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1,2]（[1]東大・生物工学セ，[2]東大院農生科・アグリバイオ，[3]静大院・工，[4]帝京大・バイオ）

2A11p03　プラスミドと宿主染色体にコードされる MvaT ホモログのヘテロ二量体形成機構の解析
14:22　○川妻孝平[1]，　鈴木千穂[1]，　藤本　瑞[2]，　岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]農生資研）

2A11p04　*Sphingobium* sp. SYK-6 株におけるアセトバニロン代謝酵素遺伝子の単離と解析
14:33　○樋口雄大[1]，　菖蒲田透[1]，　上村直史[1]，　原　啓文[2]，笠井大輔[1]，片山義博[3]，福田雅夫[1]，政井英司[1]（[1]長岡技科大・生物，[2]Malaysia-Japan Int'l. Inst. Tech.，[3]日大・生資科）

2A11p05　*Sphingobium* sp. SYK-6 株のリグニン由来芳香族化合物取り込み遺伝子
14:44　○森　光佑[1]，　上村直史[1]，　原　啓文[2]，　笠井大輔[1]，福田雅夫[1]，政井英司[1]（[1]長岡技科大・生物，[2]Malaysia-Japan Int'l. Inst. Tech.）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A11p07　耐熱性ザイモモナス菌の耐熱性遺伝子の解析
15:05　○櫻田朋子[1]，時山亜美奈[1]，CHAROESUK KANNIKAR[2]，久野圭佑[2]，村田正之[2]，高坂智之[1]，山田　守[1,2]（[1]山口大農生機，[2]山口大院医）

2A11p08　*Z. mobilis* における耐熱化機構解明のための高温適応株の単離と解析
15:16　○山下舞子[1]，　松谷峰之介[2]，　高坂智之[2]，　山田　守[1,2]（[1]山口大院医，[2]山口大農）

2A11p09　大腸菌生育限界温度適応株の取得とその解析
15:27　○加藤薫平（山口大学）

2A11p10　メタゲノム手法は培養法を凌駕するのか：遺伝子資源取得に際しての手法間の比較
15:38　○末永　光，水田志織，宮崎健太郎，矢追克郎（産総研・生物プロセス）

2A11p11　真核生物の環状染色体維持に必要な遺伝子の探索
15:49　○上野　勝，田中大樹（広大院先端物質）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A11p13　超好熱菌キチン代謝遺伝子群の発現調節に関与する機能未知タンパク質の解析
16:10　○野村宜成[1]，　坂本香織[1]，　秋山貴志[1]，　折田和泉[1]，中村　聡[1]，今中忠行[2]，福居俊昭[1]（[1]東工大生命理工，[2]立命館大生命）

2A11p14　新規ランダム変異法による超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* 温度感受性株の単離とその解析
16:21　○二石涼平[1]，　足立恭子[1]，　野原健太[1]，　折田和泉[1]，中村　聡[1]，今中忠行[2]，福居俊昭[1]（[1]東工大院生命理工，[2]立命館大生命）

2A11p15　好熱性アーキア *Caldiarchaeum subterraneum* がもつユビキチン様遺伝子の機能解析
16:32　○金井　保[1]，　藤本理夏子[1]，　徳原将弘[1]，　布浦拓郎[2]，橘高瑞奈[1]，　高木善弘[2]，　高見英人[2]，　高井　研[2]，　跡見晴幸[1]（[1]京大院工，[2]海洋科技セ）

2A11p16　*Haloarcula japonica* の C_{50} カロテノイド生合成機構の解析：*c0507* / *c0506* / *c0505* 遺伝子クラスターの役割
16:43　○楊　影[1]，　八波利恵[1]，　安藤　藍[1]，　三横伸弘[1]，高市真一[2]，福居俊昭[1]，中村　聡[1]（[1]東京工業大学，[2]日本医科大学）

2A11p17　水素資化性メタン生成菌の凝集に関与する遺伝子の検討
16:54　○高坂智之[1]，　澄川佳奈[2]，　馬屋原範聡[2]，　山田　守[1,2]（[1]山口大農，[2]山口大院医）

p19〜p21 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A11p19　大腸菌における CsrB RNA の分解過程の解析
17:15　伊藤　学[2]，岡山明裕[2]，阿部葉月[2]，高橋優介[2]，杉本華幸[1,2]，渡邉剛志[1,2]，○鈴木一史[1,2]（[1]新潟大・農・応生化，[2]新潟大院・自然科学）

2A11p20　大腸菌のアラニン排出輸送体 AlaE は能動輸送活性を有する
17:26　○金　世怜，堀　初弘，安藤太助，磯貝恵美子，米山　裕（東北大院農）

2A11p21　高級アルコールによるリパーゼ・PHB 生産誘導を促進する分泌タンパク質 EliA の機能解析

17:37 ○赤沼元気[1]，　多勢真大[1]，　鈴木優美[1]，　渡辺　智[2]，志波　優[3]，吉川博文[2]，牛尾一利[4]，石塚盛雄[1]（[1]中央大・理工，[2]東農大・応生科，[3]東農大・NGRC，[4]新居浜高専・生応化）

A12 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―細胞－情報伝達，細胞応答，ストレス―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A12a01　プラスミド保持に伴うバイオフィルム表現型の変化に関与する新規遺伝因子の探索
9:00 ○李昇ウク[1]，　高橋裕里香[1]，　大浦　啓[2]，　野村暢彦[2]，岡田憲典[1]，山根久和[3]，野尻秀昭[1]（[1]東大生物工学セ，[2]筑波大院生命環境，[3]帝京大・バイオ）

2A12a02　共焦点反射顕微鏡法を用いた逆浸透膜上バイオフィルムの画像解析手法の確立および応用
9:11 ○長田啓司，稲葉知大，上田考摂，豊福雅典，野村暢彦（筑波大学院生命環境）

2A12a03　緑膿菌の生産する細胞間コミュニケーションシグナル物質は異種細菌のバイオフィルム形成を抑制する
9:22 ○森永花菜，稲葉知大，大浦　啓，豊福雅典，内山裕夫，野村暢彦（筑波大学院生命環境）

2A12a04　温度に応答した *Clostridium perfringens* のバイオフィルム形態変化に関与する遺伝子の探索
9:33 ○山根由子[1]，尾花　望[2]，中村幸治[2]，野村暢彦[2]（[1]筑波大生命環境，[2]筑波大院生命環境）

2A12a05　*Paenibacillus* 属細菌のバイオフィルム形成及び芽胞形成
9:44 ○横山佳奈[1]，　尾花　望[2]，　久保田浩美[3]，　細谷幸一[3]，湯井幸治[3]，野村暢彦[2]（[1]筑波大学　生命環境学群　生物資源学類，[2]筑波大学　生命環境系，[3]花王株式会社　安全性科学研究所）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A12a07　蛍光菌 Pf0-1 株におけるプリン核酸生合成とバイオフィルム形成の関係
10:05 ○吉岡資郎（分子研）

2A12a08　シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 の塩ストレスによるバイオフィルム形成誘導メカニズムの解析
10:16 ○牧野恒平[1]，　冨永　昴[1]，　堀籠智子[1]，　七谷　圭[1]，茅森俊介[1]，佐伯千香[1]，鈴木石根[2]，魚住信之[2]（[1]東北大・院工・バイオ工学，[2]筑波大・生命環境）

2A12a09　スペルミジン及びプトレッシンインポーター PlaP が大腸菌のバイオフィルム形成に与える影響
10:27 ○掛川苑美，鈴木秀之（京都工繊大院応生）

2A12a10　歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のポーリンがオートインデューサーの不活化に関与する
10:38 ○阿座上弘行[1]，Mansur Jasin[1]，野杁由一郎[2]，加藤昭夫[1]（[1]山口大農，[2]阪大院歯）

2A12a11　キシラン添加による *Lactobacillus brevis* の凝集作用への細胞表層電位の影響
10:49 ○齋藤勝一，小林　功，中村敏英（農研機構・食総研）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A12a13　緑膿菌の運動性を制御する新規転写因子の機能解析
11:10 ○上田考摂[1]，　大浦　啓[1]，　李昇ウク[2]，　野尻秀昭[2]，田代陽介[3]，　豊福雅典[1]，　中島敏明[1]，　内山裕夫[1]，　野村暢彦[1]（[1]筑波大院生命環境，[2]東大院生物工学セ，[3]静岡大院工学）

2A12a14　細胞内シグナル物質 c-di-GMP が細胞間コミュニケーションに与える影響
11:21 ○伊藤聡志，柿原健佑，豊福雅典，中島敏明，内山裕夫，野村暢彦（筑波大院生命環境）

2A12a15　ストレス応答を介した緑膿菌の新奇メンブランベシクル形成機構
11:32 ○黒沢正治，豊福雅典，野村暢彦（筑波大院生命環境）

2A12a16　メンブランベシクルによる微生物細胞間シグナル物質の伝達
11:43 ○豊福雅典[1]，橋本庸平[2]，稲葉英樹[2]，野村暢彦[1]（[1]筑波大院生命環境，[2]住友重機械工業）

2A12a17　好熱性 *Thermaerobacter* 属細菌由来アシル化ホモセリンラクトン分解遺伝子の機能解析
11:54 ○諸星知広，富永良昭，池田　宰（宇都宮大院工）

A12 会場　午後の部（14:11〜17:48）

微生物―細胞－情報伝達，細胞応答，ストレス―

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

2A12p02　コネクター因子 SafA によるセンサー PhoQ の活性化機構
14:11 ○吉谷亘平[1]，　江口陽子[1]，　石井英治[2]，　内海龍太郎[1]（[1]近畿大院農，[2]京都大ウイルス研）

2A12p03　サルモネラ菌の TCS と PTS をつなぐコネクター RcsG
14:22 ○加藤明宣，深見知可，萩原　慧，内海龍太郎（近畿大院農）

2A12p04　インドールによる大腸菌酸耐性システムの発現抑制機構の解析
14:33 ○安彦弦太，堀川晃菜，和地正明（東工大院生命理工）

2A12p05　Transplantation of *Escherichia coli* acid tolerance systems into *Corynebacterium glutamicum*
14:44 ○Young il Jo[1,2]，Masaaki WACHI[1]（[1]Tokyo Tech，[2]Daesang corp.）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A12p07　抗菌性界面活性剤処理した *Staphylococcus aureus* 細胞における活性酸素ストレスとその応答の解析
15:05 ○守茂山礼乃[1]，太田美也子[1]，松村吉信[1,2]（[1]関西大化学生命工，[2]関西大学 ORDIST）

2A12p08　乳酸菌 *Enterococcus gilvus* におけるカロテノイド生産とストレス応答
15:16 ○萩　達朗，小林美穂，野村　将（農研機構・畜草研）

2A12p09　乳酸菌の長寿遺伝子 Sirtuin homologue とストレス応答
15:27 ○新　穂高[1]，　田中尚人[2]，　志波　優[3]，　吉川博文[3]，岡田早苗[2]，遠藤明仁[1]，宮地竜郎[1]，中川純一[1]（[1]東農業大院・生産，[2]東農業大・菌株，[3]東農業大・ゲノム解析セ）

2A12p10　大腸菌は D-Ala 飢餓ストレス感知後，未知シグナル伝達系を活性化し細胞死に至る
15:38 ○梅宮真知，佐藤一樹，大内寿一，堀　初弘，安藤太助，磯貝恵美子，米山　裕（東北大院農）

2A12p11　*Pseudomonas putida* における熱ショック応答と凝集タンパク質の再生
15:49 ○伊藤史浩[1]，福森文康[2]（[1]東洋大院･生命，[2]東洋大･食環）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A12p13　絶対嫌気性細菌 Clostridium 属細菌の O2 存在下における生育停止機構に関する研究
16:10 ○小野寺央，岡田拓也，工藤貴靖，鈴木一平，新村洋一，川崎信治（東農大）

2A12p14　anammox 菌の持つ酸素耐性関連遺伝子の比較
16:21 ○西山　孝[1]，　竹之内良太[1]，　藤　英博[2]，　服部正平[3]，古川憲治[4]，藤井隆夫[1]（[1]崇城大・応生命，[2]九大・生体防医研，[3]東大院・新領域，[4]熊大院・自然科学）

2A12p15　緑膿菌の多剤排出ポンプを利用した新規スクリーニング系で見いだしたリード化合物の性状評価
16:32 ○潮田兼一，佐藤一樹，秋葉敬斉，安藤太助，磯貝恵美子，米山　裕（東北大農）

2A12p16　枯草菌の脱アセチル化酵素は低温への適応に必須である
16:43 ○田村　克，古園さおり（東大・生物工学セ）

2A12p17　超好熱菌の長鎖・分岐型ポリアミンの翻訳促進効果
16:54　○井上貴央[1]，　岡田和真[1]，　秀瀬涼太[1]，　今中忠行[2]，藤原伸介[1]（[1]関西学院大院理工，[2]立命館大生命科学）

p19〜p21 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A12p19　根粒菌シグマ因子 RpoH1 の制御を受ける遺伝子が鉄イオウタンパク質生合成に果たす役割
17:15　佐々木祥平，南澤　究，○三井久幸（東北大院生命科）
2A12p20　好熱菌 *Meiothermus ruber* H328 株が生産するケラチン分解性プロテアーゼ巨大分子複合体の膜小胞における局在性の研究
17:26　○山岡昂太[1]，　片岡真亜知[1]，　俣野明日香[1]，　佐生　愛[1]，増村威宏[1]，川崎一則[2]，茂里　康[2]，渡部邦彦[1]（[1]京都府大院，[2]産総研・健康工学）
2A12p21　二成分情報伝達系を介した腸管出血性大腸菌 O157 のホスホマイシン耐性と炭素源獲得の可逆的制御
17:37　倉林久美子[1]，　平川裕子[3]，　谷本弘一[3]，　富田治芳[2,3]，○平川秀忠[1]（[1]群馬大学先端科学ユニット，[2]群馬大学医，[3]群馬大学薬剤耐性菌実験施設）

A13 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―遺伝子ー発現制御，トランスクリプトーム―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2A13a01　*Bifidobacterium. longum* NCC2705 株における二成分制御系遺伝子の系統的破壊株コレクション
9:00　○和泉絢子[1]，　桝谷尚慶[1]，　滝口裕加[1]，　山中祐二[1]，坂口広大[2]，野村　泉[2]，鈴木　徹[2]（[1]岐阜大応用生物，[2]岐阜大連合農学研究科）
2A13a02　*Alcarigenes denitrificans* A41 株内で安息香酸はビフェニル分解遺伝子群の発現を抑制する
9:11　○金井拓也，前田理久（明治大院農）
2A13a03　細菌における転写後制御による環境適応機構
9:22　○藤本めぐみ，徳元　舶，前田理久（明治大院農）
2A13a04　*Acidvorax*.sp KKS102 のカタボライト調節機構に関わる二成分制御系遺伝子 *bphPQ* の解析
9:33　○佐藤　旦，小沼かおり，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大院生命）
2A13a05　土壌細菌 *Burkholderia multivorans* における Fur 依存的な鉄恒常性維持に関与する *hemP* 遺伝子の解析
9:44　○佐藤拓哉，木村明音，湯原悟志，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大院生命）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A13a07　細胞外電子伝達系シトクロム遺伝子の転写活性化因子の同定
10:05　○笠井拓哉，高妻篤史，渡邉一哉（東薬大院生命）
2A13a08　連鎖球菌における莢膜多糖生産を制御するメカニズムの解析
10:16　○松本裕子，前田康太郎，小谷拡太郎，三宅克英（石川県大資源研）
2A13a09　プラスミド pCAR1 にコードされる 3 種の核様体タンパク質がもつ転写制御能の網羅的解析
10:27　○廣谷龍輔[1]，　鈴木千穂[1]，　高橋裕里香[1]，　武田俊春[1]，尹　忠鉄[1,2]，新谷政己[3]，岡田憲典[1]，山根久和[4]，野尻秀昭[1,2]（[1]東大・生物工学セ，[2]東大院農生科・アグリバイオ，[3]静大院・工，[4]帝京大・バイオ）
2A13a10　プラスミド pCAR1 にコードされる核様体タンパク質が接合伝達に与える影響の解明
10:38　○松井一泰[1]，　廣谷龍輔[1]，　武田俊春[1]，　尹　忠鉄[1,2]，新谷政己[3]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1,2]（[1]東大・生物工学セ，[2]東大院農生科・アグリバイオ，[3]静大・工）
2A13a11　プラスミド pCAR1 にコードされる核様体タンパク質の転写様式と相互作用の解析
10:49　○鈴木千穂[1]，　高橋裕里香[1]，　新谷政己[2]，　岡田憲典[1]，山根久和[3]，野尻秀昭[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]静大院・工，[3]帝京大・バイオ）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A13a13　プラスミドを保持した宿主における LysR ファミリー転写制御因子 MexT の機能解析
11:10　○能登　優，高橋裕里香，岡田憲典，野尻秀昭（東大・生物工学セ）
2A13a14　緑膿菌ゲノムでの薬剤耐性調節遺伝子 *mexT* の出現
11:21　○上手麻希，横田優子，大政健史，間世田英明（徳島大院 STS）
2A13a15　緑膿菌 MexEF-OprN 薬剤排出ポンプの一過的な発現調節機構
11:32　○市瀬裕樹，上手麻希，大政健史，間世田英明（徳島大 STS）
2A13a16　緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* における *cbb*$_3$型シトクロム *c* 酸化酵素イソサブユニットの発現制御機構
11:43　○平井猛博，長村達也，石井正治，新井博之（東大院・農生科・応生工）
2A13a17　緑膿菌セラミダーゼの発現制御に関わる新規転写因子 SplR の解析
11:54　○沖野　望，伊東　信（九大院農）

A13 会場　午後の部（14:00〜17:59）

微生物―遺伝子ー発現制御，トランスクリプトーム―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A13p01　大腸菌非メバロン酸経路の人工オペロン化
14:00　○柘植謙爾[1]，　富樫　貴[1]，　長谷部雅子[1]，　冨田　勝[1,2]，板谷光泰[1,2]（[1]慶應大先端生命研，[2]慶應大環境情報）
2A13p02　大腸菌を宿主とした難発現タンパク質大量発現システムの検討
14:11　○今中洋行[1]，　三木駿也[1]，　安保紘高[2]，　原　啓文[3]，山副敦司[4]，細山　哲[4]，土金恵子[4]，今村維克[1]（[1]岡山大院・自然，[2]岡山大・工，[3]マレーシア工科大，[4]NITE-NBRC）
2A13p03　放線菌を宿主とした構成型分泌発現ベクターの構築
14:22　○齋藤結希，松本雅子，橋本義輝，熊野匠人，小林達彦（筑波大院　生命環境系）
2A13p04　*Rhodococcus* 由来ニトリルヒドラターゼ遺伝子プロモーターを利用した *Rhodococcus* 属放線菌における構成型発現ベクターの構築
14:33　○松本雅子，橋本義輝，劉　　瑞，熊野匠人，小林達彦（筑波大院　生命環境系）
2A13p05　*Rhodococcus* sp. strain YH3-3 における“アルドキシム - ニトリル経路”の遺伝子発現解析
14:44　○田部井陽介[1]，山口拓也[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A13p07　サナギタケの感染過程におけるトランスクリプトーム解析
15:05　○鈴木智大[1]，　道羅英夫[1]，　崔　宰熏[1]，　加藤竜也[1,2]，朴　龍洙[1,2,4]，阿部伸一[3]，佐伯　潤[3]，平井浩文[1,2]，河岸洋和[1,2,4]（[1]静大･グリーン研，[2]静大農･応生化，[3]にちはら総研，[4]静大院･創造）
2A13p08　Omics 手法を用いた *Lactobacillus lindneri* のビール混濁能の解析
15:16　○藤井敏雄，多田節三（キリン基盤技術研究所）
2A13p09　好熱性化学独立栄養性細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 における硫黄化合物酸化代謝に関する研究
15:27　○石崎　優[1]，　佐藤由也[3]，　三本木至宏[2]，　新井博之[1]，

石井正治[1]（[1]東大院農，[2]広島大農，[3]産総研・環境管理）

2A13p10　高度好熱菌 *Thermus thermophilus* のセロビオース代謝オペロンの転写解析

15:38　◦黒澤智砂，星野貴行，中村　顕（筑波大学大学院）

2A13p11　枯草菌でのラムノース異化に関わる *yuxG-yulBCDE* オペロンにコードされる各タンパク質の機能解析

15:49　◦広岡和丈，藤田泰太郎（福山大生命工・生物工）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A13p13　植物病原菌 *Burkholderia plantarii* におけるトロポロン産生制御系の解析

16:10　吉岡誠訓[1]，◦三輪瞬平[1]，紀平絵梨[1]，仲曽根薫[2]，五十嵐雅之[3]，波多野和樹[3]，吉川博文[4,5]，兼崎　友[5]，江口陽子[1]，内海龍太郎[1]（[1]近大院農バイオ，[2]近大工，[3]微化研，[4]東京農大応生化バイオ，[5]東京農大ゲノム解析セ）

2A13p14　Glu/Asp ABC トランスポーター mRNA によって引き起こされる GcvB レギュロンの脱抑制

16:21　◦宮腰昌利，フォーゲルヨーク（ヴュルツブルク大）

2A13p15　Glycine cleavage system 構成遺伝子群の転写を活性化するグリシンリボスイッチはグリシン存在下での *Streptomyces griseus* の生育に必須である

16:32　◦手塚武揚，大西康夫（東大院農生科・応生工）

2A13p16　*Streptomyce griseus* の黄色色素生産を制御する機能未知タンパク質 *SGR1728* に関する解析

16:43　◦平松秀基[1]，手塚武揚[2]，中村一成[2]，志波　優[3]，吉川博文[4]，大西康夫[2]（[1]東大農・生命化学工学，[2]東大院農生科・応生工，[3]東農大・ゲノム解析セ，[4]東農大応生科・バイオ）

2A13p17　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の二成分制御系レスポンスレギュレーター TcrA のターゲット遺伝子探索

16:54　◦毛利佳弘，手塚武揚，大西康夫（東大院農生科・応生工）

p19〜p22 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A13p19　*Bacillus megaterium* QM B1551 株の光誘導性カロテノイド生産機構の解明

17:15　◦見世　光，萩原健太，平田直哉，上田賢志，高野英晃（日大生資科・生命セ）

2A13p20　グラム陰性細菌が有する新規な光応答転写調節タンパク質の探索とその解析

17:26　◦角　　悟，上田賢志，高野英晃（日大生資科生命セ）

2A13p21　*Corynebacterium glutamicum* から見出した新規な光応答性転写調節タンパク質の解析

17:37　松木哲郎，伊藤優佑，渡邉恵利花，上田賢志，◦高野英晃（日大生資科・生命セ）

2A13p22　*Cyanidioschyzon merolae* の光応答転写制御における二成分制御系の役割

17:48　◦安藤洸幸[1]，小倉駿佑[1]，佐藤大地[1]，藤井　岳[2]，今村壮輔[2]，田中　寛[2]，五十嵐雅之[3]，内海龍太郎[4]，華岡光正[1]（[1]千葉大院園芸，[2]東工大資源研，[3]微化研，[4]近畿大農）

A14 会場　午前の部（10:16〜12:05）

微生物—物質生産－発酵（二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質）—

a08〜a11 発表者の接続時間 10:06〜10:16

2A14a08　*Streptomyces blastmyceticus* 由来 indole prenyltransferase（TcnD）の機能解析

10:16　◦多田智美，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大院・生環科）

2A14a09　Analysis of RevU interaction to carboline compounds

10:27　◦Suresh PANTHEE[1]，Shunji TAKAHASHI[1,2]，Teruo HAYASHI[2]，Takeshi SHIMIZU[2]，Jun ISHIKAWA[3]，Seiji MATSUOKA[4]，Tetsuo ONUKI[4]，Hiroyuki OSADA[1,2]（[1]RIKEN CSRS, Chemical Biology, [2]RIKEN, Antibiotics Lab., [3]Nat. Inst. Inf. Dis., [4]RIKEN CSRS, SCEUD2P）

2A14a10　Verticilactam 遺伝子クラスターに存在する生合成遺伝子群の機能解析

10:38　◦寺井淳高[1,2]，高橋俊二[3]，野川俊彦[3]，橋本絢子[4]，新家一男[5]，池田治生[6]，川崎　寿[2]，長田裕之[1,3]（[1]理研・抗生物質，[2]東電大院工，[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[4]バイオ産業情報化コンソーシアム，[5]産業技術総合研究所，[6]北里大生命研）

2A14a11　放線菌における線状プラスミドを用いた二次代謝産物生合成遺伝子群の接合伝達

10:49　◦小松　護[1]，小曽根郁子[2]，橋本絢子[2]，新家一男[3]，池田治生[1]（[1]北里大・北里生命研，[2]JBIC，[3]産総研）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A14a13　リンコマイシンによる *Streptomyces* 属放線菌の潜在的抗生物質生産能の活性化

11:10　◦今井　優[1]，佐藤誠造[2]，田中幸徳[3]，越智幸三[3]，保坂　毅[1]（[1]信州大院・総合工，[2]日本水産・中研，[3]広工大・生命）

2A14a14　複合培養において死細胞は放線菌の二次代謝を誘導しない

11:21　◦浅水俊平，尾崎太郎，尾仲宏康（東大院農）

2A14a15　放線菌の複合培養法による新規テトラヒドロキノリン類の単離とその生合成

11:32　◦尾崎太郎[1]，森夕希子[2]，杉山龍介[3]，西村慎一[3]，浅水俊平[1]，掛谷秀昭[3]，尾仲宏康[1]（[1]東大院農，[2]富山県大工，[3]京大院薬）

2A14a16　代謝改変シアノバクテリアを用いたリモネンの光合成的生産

11:43　◦清田浩史[1,2]，奥田由紀子[3]，伊藤美千穂[4]，平井優美[2]，池内昌彦[1,3,5]（[1]東大院理，[2]理研 CSRS，[3]東大院総合文化，[4]京大院薬，[5]CREST）

2A14a17　シアノバクテリアにおけるイソプレノイド生産を目指した DXS 過剰発現および炭素 局在解析

11:54　◦工藤　海[1]，河野祐介[1,2]，堀田真吾[1]，関根　翠[1]，渡邉敬文[1]，伊原正喜[1,3]（[1]信州大学農，[2]奈良先端大，[3]さきがけ）

A14 会場　午後の部（14:22〜17:48）

微生物—物質生産－発酵（二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質）—

p03〜p05 発表者の接続時間 14:12〜14:22

2A14p03　多成分バクテリオシンの分泌を担うトランスポーターの基質認識機構の解明

14:22　◦須志田浩稔[1]，石橋直樹[1]，善藤威史[1]，中山二郎[1]，園元謙二[1,2]（[1]九大院・農，[2]九大・バイオアーク）

2A14p04　*Lactobacillus salivarius* AC21 の 2 分子ペプチドバクテリオシン salivacin K21 の異種発現と機能解析

14:33　◦梶原春香[1]，Nitisinprasert Sunee[2]，善藤威史[3]，中山二郎[3]，園元謙二[3]，松崎弘美[4]（[1]熊本県大院環境共生，[2]カセサート大学，[3]九大院農，[4]熊本県大環境共生）

2A14p05　たくあん漬けから分離した乳酸球菌 *Lactococcus lactis* PJR24 が生産するバクテリオシンの精製と構造解析

14:44　◦木村宏和[1]，木村香織[1]，松崎弘美[2]（[1]尚絅大生活科学，[2]熊本県大環境共生）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A14p07　乳製品由来プロピオン酸菌が生産する新奇バクテリオシンの探索

15:05　◦高屋朋彰，栗原英人（小山高専物質）

2A14p08　*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA4408L が発酵豆乳中に産生する粘性物質の解析

15:16　◦伊藤千浩[1]，塩見直希[1]，田中尚人[2]，梶川揚申[1]，佐藤英一[1]，岡田早苗[1]（[1]東農大応生科・化学，[2]東農大・菌株）

2A14p09　*Lactobacillus helveticus* 及び *Lactobacillus casei* 混合培養による血圧上昇抑制作用等機能性を有する乳製品乳酸菌飲料

15:27　◦上野義栄[1]，川嶋敬三[2]（[1]京都府中小企業技術セ，[2]クロレラ食品ハック）

2A14p10　腸内細菌のコラボレーションによる新しいポリアミン生合成経路

15:38　◦北田雄祐，村松幸治，松本光晴（協同乳業株式会社）

2A14p11　酢酸菌 *Gluconacetobacter europaeus* 分岐鎖アミノ酸生合成における転写調節因子 *Ge*-Lrp の機能解析

15:49　◦石井友理[1]，赤坂直紀[2]，秀瀬涼太[1]，佐古田久雄[2]，藤原伸介[1]（[1]関西学院大理工生命科学，[2]マルカン酢株式会社）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A14p13　代謝改変酢酸菌を利用したコバエ誘引素材の開発

16:10　◦赤坂直紀[1]，石井友理[2]，秀瀬涼太[2]，佐古田久雄[1]，藤原伸介[2]（[1]マルカン酢株式会社，[2]関西学院大理工生命科学）

2A14p14　低栄養性細菌を用いた微生物農薬候補株の探索

16:21　◦大池達矢，松川哲也，岡南政宏，梶山慎一郎，阿野貴司（近大院生物理工）

2A14p15　*Jatropha curcas* 種子採油残渣を用いた微生物農薬の培養

16:32　◦石田結子，大池達矢，松川哲也，岡南政宏，梶山慎一郎，阿野貴司（近大院生物理工）

2A14p16　アラキドン酸を生産する新規の PKS 遺伝子クラスターの同定

16:43　永野　愛，◦氏原哲朗，田畑和彦（協和発酵バイオ）

2A14p17　モルヒネの生成中間体であるサルタリジンの微生物生産

16:54　◦中川　明[1]，松村栄太郎[1]，小柳　喬[2]，片山高嶺[3]，山本憲二[1]，熊谷英彦[1]，佐藤文彦[4]，南　博道[1]（[1]石川県大資源研，[2]石川県大食品，[3]石川県大共生研，[4]京大院生命）

p19〜p21 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2A14p19　チロシンハイドロキシラーゼを用いたベンジルイソキノリンアルカロイドの微生物生産

17:15　◦松村栄太郎[1]，中川　明[1]，片山高嶺[1]，山本憲二[1]，熊谷英彦[1]，佐藤文彦[2]，南　博道[1]（[1]石川県立大・資源研，[2]京大院・生命）

2A14p20　油脂(triacylglycerol)を分泌する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 変異株の解析

17:26　◦藤井洋紀，松崎浩明，秦野琢之（福山大・生命工・生物工）

2A14p21　分裂酵母でのコエンザイム Q10 の高生産

17:37　◦森山大輔[1]，戒能智宏[2]，鷲田元久[1]，難波弘憲[1]，川向　誠[2]（[1]株式会社カネカ・QOL 事業部，[2]島根大・生物資源・生命工）

A15 会場　午前の部（10:05〜11:54）

微生物—遺伝子ーゲノム解析，メタゲノム，プロテオーム，バイオインフォマティクス—

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2A15a07　FinishChecker: 完全決定したつもりのゲノム配列のチェック機能

10:05　◦大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大院生命科）

2A15a08　有機塩素系殺虫剤 gamma-hexachlorocyclohexane 分解能を有するスフィンゴモナッド細菌群の挿入配列に関する研究

10:16　◦荷川取佑記[1,2]，大畑智史[1]，田端理朗[1]，大坪嘉行[1,2]，永田裕二[1,2]，津田雅孝[1]（[1]東北大学院生命科，[2]日本農芸化学会）

2A15a09　芳香族化合物汚染化土壌メタゲノムから培養非依存的手法により取得したフェノール分解関与遺伝子群の機能解析

10:27　◦永山浩史，菅原智詞，遠藤　諒，加藤広海，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大院生命）

2A15a10　次世代シーケンサーを用いた下面ビール酵母のゲノム解析

10:38　◦児玉由紀子[1]，奥野未来[2]，伊藤武彦[2]（[1]サントリー SIC，[2]東工大生命理工）

2A15a11　single nucleotide variation(SNV)を考慮したラガービール酵母のゲノム再解析

10:49　◦奥野未来[1]，児玉由紀子[2]，伊藤武彦[1]（[1]東工大生命理工，[2]サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社・研究部）

a13〜a16 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2A15a13　カビアレルゲンデータベースの構築

11:10　◦大波純一[1]，渡辺麻衣子[2]，山田　修[3]，水谷　治[3]，高橋　徹[4]，川上裕司[5]，橋本一浩[5]，清水公徳[6]，髙橋治男[2,6]，横山耕治[6]，鎌田洋一[7]（[1]科学技術振興機構，[2]国立医薬品食品衛生研究所，[3]酒類総合研究所，[4]岐阜セラツク製造所，[5]エフシージー総合研究所，[6]千葉大真菌医学研究センター，[7]岩手大農

2A15a14　*Aspergillus* 属の比較ゲノム解析

11:21　◦佐藤敦史[1]，松島健一朗[1]，半谷吉識[1]，小山泰二[1]，伊藤武彦[2]，服部正平[3]，光山統泰[4]（[1]キッコーマン，[2]東工大院生命理工，[3]東大院新領域，[4]産総研生命情報工セ）

2A15a15　担子菌 *Coprinopsis cinerea* のプロテオーム解析による子実体形成機構に関する研究

11:32　◦相島奈央[1]，山田知佳[1]，村口　元[2]，吉田　誠[3]，志水元亨[1]，加藤雅士[1]（[1]名城大農，[2]秋田県立大生物資源，[3]農工大農）

2A15a16　養菌性キクイムシと共生する新規 *Fusarium* 属糸状菌が生産するセルロース分解酵素の機能解析

11:43　◦竹浦賢吾[1]，田中大助[1]，濱本　光[1]，中野将志[1]，梶村　恒[2]，志水元亨[1]，加藤雅士[1]（[1]名城大院農，[2]名古屋大院農）

A15 会場　午後の部（14:00〜16:54）

微生物—遺伝子ーゲノム解析，メタゲノム，プロテオーム，バイオインフォマティクス—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2A15p01　DNA メチル化系の認識配列変換によるエピゲノム多様化：PacBio マシンによる全メチローム解読からの証拠

14:00　古田芳一[1,2]，南波宏枝[1]，柴田朋子[3]，西山智明[4]，重信秀治[3,5]，鈴木　穣[1]，菅野純夫[1]，長谷部光泰[3,5]，◦小林一三[1,2]（[1]東大・新領域・メディカルゲノム，[2]東大・医科研，[3]基生研，[4]金沢大学・学際科学実験センター，[5]総研大・生命科学・基礎生物学）

2A15p02　最確数・制限酵素断片長多型解析法の水系の微生物群集解析への利用と DGGE 法による検証

14:11　◦渡辺克二（福工大工）

2A15p03　高い発電能力を有する新規 *Geobacter sulfurreducens* の比較ゲノム解析

14:22　◦河野好裕[1]，小椋義俊[2]，井上謙吾[1]（[1]宮崎大 IR 推進機構，[2]宮崎大フロンティア科学実験総合センター）

2A15p04　放線菌ゲノムデータベースのリファレンス情報拡張とその利用

14:33　◦藤澤貴智[1]，望月孝子[1]，谷澤靖洋[1]，桧原直子[1]，山田佐知子[1]，照井敬子[1]，石井英治[1]，加藤香奈[1]，鐘ヶ江弘美[2]，神沼英里[1]，岡本　忍[2]，黒川　顕[3]，中村保一[1]（[1]遺伝研，[2]ライフサイエンス統合データベースセンター，[3]東工大院・生命理工）

2A15p05　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢開裂時に翻訳されるタンパク質及び胞子嚢構成成分のプロテオーム解析

14:44　手塚武揚[2]，◦安田理沙[1]，大西康夫[2]（[1]東大農・生命化学工学，[2]東大院農生科・応生工）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2A15p07　高度好熱菌 *Thermus thermophilus* における短鎖アシル化修飾による酵素調節機構の解析

15:05 ○吉田彩子[1]，　山本寛之[1]，　西山　真[1]，　吉田　稔[2]，古園さおり[1]（[1]東大生物工学セ，[2]理研 CSRS）

2A15p08　短鎖アシル化修飾による代謝フラックス制御機構の探索

15:16 田村　克[1]，吉田　稔[2]，○古園さおり[1]（[1]東大生物工学セ，[2]理研 CSRS）

2A15p09　*Ralstonia* sp. NT-80 において高級アルコール添加に応答して発現するタンパク質群のプロテオーム解析

15:27 ○大塚　拓[1]，　永倉茉莉[1]，　吉澤梨絵[1]，　赤沼元気[1]，志波　優[2]，渡辺　智[3]，吉川博文[3]，牛尾一利[4]，石塚盛雄[1]（[1]中大理工，[2]東農大 NGRC，[3]東農大応生科，[4]新居浜高専生物応化）

2A15p10　根粒形成過程におけるミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* の時系列プロテオーム解析

15:38 ○南部真実，立上陽平，森坂裕信，黒田浩一，植田充美（京大院農・応用生命）

2A15p11　BLSOM を利用した腸内細菌叢の比較メタゲノム解析

15:49 ○齋藤禎一，村上勝彦，今西　規（産業技術総合研究所）

p13〜p16 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2A15p13　酸性河川より分離された未分類の鉄酸化細菌 GJ-E10 株のゲノム構造

16:10 ○福島　淳，　東條ふゆみ，　小林弥生，　浅野亮樹，志村洋一郎，岡野邦宏，宮田直幸（秋田県大）

2A15p14　難消化性オリゴ糖 DFAIII および *Ruminococcus productus* AHU1760 の共投与が及ぼす腸内環境への影響

16:21 ○鳶　諒介，藤井早苗，高野七海，北川　航，曾根輝雄，田中みち子，浅野行蔵（北大農）

2A15p15　A non-cellulosomal mannanase 26E contains CBM59 in *Clostridium cellulovorans*

16:32 ○Kousuke YAMAMOTO[1], Yutaka TAMARU[1,2,3]（[1]Grad. Bioresour., Mie Univ., [2]Mie Univ. LSRC, [3]Mie Univ. ITII）

2A15p16　パッチクランプ法による大腸菌呼吸鎖の末端酸化酵素の H^+-pump の機能解析

16:43 ○宇野正晃[1]，　駒澤光祐[1]，　杉村しおり[1]，　黒田照夫[2]，川崎　寿[1]，矢部　勇[1]（[1]東京電機大学・工，[2]岡山大学・薬）

B02 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―食品工学－物性，分析―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2B02a01　加熱方式の違いが煮物調理の部域差に与える影響

9:00 ○藤本祐子[1]，千葉浩子[2]，大川　諒[1]，都甲　潔[2]（[1]大阪ガス（株），[2]九州大学）

2B02a02　各種加工タピオカ澱粉 / 卵白共存ゲルの「もちもち」食感と破壊力学特性の解析

9:11 ○井之上明弘，中村　卓（明治大院農）

2B02a03　食品タンパク質の加熱誘導ゲル形成性に及ぼす卵白オボムコイド添加の影響―卵白リゾチーム及び米 γ- グロブリンを例に―

9:22 ○太田尚子，丸山奈実，加藤つばさ，和田静香，木村陽子（日大短大）

2B02a04　凍結融解による卵黄の状態変化

9:33 ○堀井美歌，松宮健太郎，林由佳子，松村康生（京大院農）

2B02a05　大豆タンパクとサイリウムガム混合ゲルの物性に関する研究

9:44 ○安藤為明[1]，田中克幸[1]，畠中芳郎[2]，山内朝夫[2]（[1]奥野製薬工業株式会社，[2]地方独立行政法人　大阪市立工業研究所）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2B02a07　グリアジン水和物のレオロジー特性に対する食塩の影響

10:05 ○東野ゆうき，松宮　葵，小谷正男，松村康生，裏出令子（京大院農・農学）

2B02a08　水和グリアジンが形成するナノ集合体と食塩との関係

10:16 ○松宮　葵[1]，　佐藤信浩[2]，　大場洋次郎[2]，　杉山正明[2]，東野ゆうき[1]，裏出令子[1]（[1]京大院農・農学，[2]京大・原子炉）

2B02a09　シクロデキストリンの包接能を利用したコエンザイム Q10 のナノミセル形成

10:27 ○上梶友記子[1,2]，　大西麻由[2]，　中田大介[2]，　寺尾啓二[2]，PARTANEN Riitta[3]，吉井英文[1]（[1]愛媛連大農，[2]シクロケムバイオ，[3]VTT）

2B02a10　クチクラ膜の強度に及ぼすクタンの役割

10:38 ○東　順一[1]，　椿俊太郎[2]，　金山裕亮[3]，　米森敬三[4]，宇山　浩[1]（[1]阪大院工，[2]高知大総研セ，[3]サンアクティス，[4]京大院農）

2B02a11　トウモロコシ果皮の水分吸着特性

10:49 ○吉田有希[1]，宇山　浩[2]，東　順一[2]，本田与一[1]（[1]京大院農，[2]阪大院工）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2B02a13　粘度 B 係数と部分モル比容から求めた水和パラメータ h と分子間相互作用

11:10 ○佐藤之紀[1]，　關藤祐加[1]，　花垣　恵[1]，　岩切恵梨奈[1]，平澤毬子[1]，宮脇長人[2]（[1]県立広島大生命環，[2]石川県大生資環）

2B02a14　超音波パルスドップラー法による水の嚥下量が食道での流動性に及ぼす影響の解析

11:21 ○神山かおる，高　智紅（(独)農研機構・食総研）

2B02a15　ヒトのぜん動運動を備えた胃消化シミュレーターによる固形食品の消化動態の観測

11:32 ○神津博幸[1,2]，　小林　功[2]，　中田友輝[1]，　中嶋光敏[1,2]，ネヴェスマルコス[1,2]，植村邦彦[2]，佐藤誠吾[1]，市川創作[1]（[1]筑波大院生環科，[2]農研機構食品総合研究所）

2B02a16　ぜん動運動を備えた胃消化シミュレーターを用いた米飯の消化特性の観測

11:43 王　　政[1,2]，　市川創作[3]，　神津博幸[1,3]，　中嶋光敏[1,2,3]，NEVES Marcos A.[1,2,3]，植村邦彦[1,2]，○小林　功[1,2]（[1]農研機構食総研，[2]筑波大北アフリカ研究センター，[3]筑波大生命環境）

2B02a17　食品の塩蔵工程中における塩分濃度非破壊測定法の開発

11:54 ○名古匡志，築舘亜由美，秋山美展，石川匡子（秋田県立大学院生物資源）

B02 会場　午後の部（14:00〜17:05）

食品―食品工学－製造工学―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2B02p01　生姜プロテアーゼを用いた新規コラーゲンペプチドの生成

14:00 ○多賀祐喜，楠畑　雅，鈴木　哲，林田　治，小山洋一，服部俊治（株式会社ニッピ）

2B02p02　Stability of astaxanthin during the treatment of Isada krill in subcritical water

14:11 ○Intira Koomyart[1]，　Hironori Nagamizu[1]，Takashi Kobayashi[1]，　Hirokazu Shiga[2]，　Hidefumi Yoshii[2]，Shuji Adachi[1]（[1]Div. Food Sci. Agric., Kyoto Univ., [2]Dep. Appl. Biol. Sci., Kagawa Univ.）

2B02p03　エビアレルゲンタンパクの多糖類による化学修飾と抗体反応性に及ぼす影響

14:22 関美紗希，小磯茉奈，○佐々木萌，菰田俊一（宮城大食産業）

2B02p04　講演取消

2B02p05　ジメチルホルムアミドを用いた噴霧乾燥粉末中の油脂の包括率の測定

14:44 ○足立早映[1]，四日洋和[1]，安達修二[2]，吉井英文[1]（[1]香大農，[2]京大院農）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2B02p07　Multiple case study analysis of Solid-Liquid equilibrium of organic molecules in Ethanol/Water system

15:05 ◦Ilyes Dammak[1], Marcos Neves[1,2], Hiroshi Nabetani[3], Sami Sayadi[4], Mitsutoshi Nakajima[1,2,3]（[1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Alliance for Research on North Africa, University of Tsukuba, [3]National Food Research Institute, NARO, Tsukuba, [4]Centr of Biotechnology of Sfax, Tunisia）

2B02p08 Preparation of monodisperse aqueous liquid microspheres containing high-concentration of L-ascorbic acid by microchannel emulsification

15:16 ◦Nauman KHALID[1,2], Isao KOBAYASHI[1], Marcos. A NEVES[3], Kunihiko UEMURA[1], Mitsutoshi NAKAJIMA[1,3], Hiroshi NABETANI[1,2]（[1]Food Engineering Division, National Food Research Institute, NARO, [2]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, [3]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba）

2B02p09 Formulation and characterization of triglycerides O/W emulsions stabilized by oleuropein using microchannel emulsification

15:27 ◦Safa SOUILEM[1,2,3], Isao KOBAYASHI[2], Marcos. A NEVES[1,2], Sami SAYADI[3], Mitsutoshi NAKAJIMA[1,2]（[1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Food Engineering Division, National Food Research Institute, NARO, [3]Center of Biotechnology of Sfax, Tunisia）

2B02p10 Application of beta-lactoglobulin as the emulsifier for producing limonene droplets using microchannel emulsification technique

15:38 ◦Nanik PURWANTI[1,2], Marcos. A NEVES[1,3], Kunihiko UEMURA[1], Mitsutoshi NAKAJIMA[1,3], Isao KOBAYASHI[1]（[1]Food Engineering Division, National Food Research Institute, NARO, [2]Biosystem Division, Department of Mechanical and Biosystem Engineering, [3]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba）

2B02p11 固体脂を用いた短鎖脂肪酸内包 W/O エマルションの作製と物理的安 定性評価

15:49 ◦山中洋平[1,2]，小林　功[2]，マルコスネヴェス[1,2]，植村邦彦[2]，中嶋光敏[1,2]（[1]筑波大学生命環境系，[2]農研機構食総研）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2B02p13 金属製非対称貫通孔型マイクロチャネルアレイを用いた単分散 O/W エマルションの作製特性

16:10 ◦張　晏如[1]，小林　功[2]，和田芳弘[3]，Neves Marcos A.[1]，植村邦彦[2]，中嶋光敏[1]（[1]筑波大院生命環境，[2]農研機構食総研，[3]イーピーテック）

2B02p14 プロペラファンを用いた食品冷却の最適条件化の検討

16:21 ◦鈴木　翔，鈴木　徹，渡辺　学（海洋大院）

2B02p15 界面前進凍結濃縮法における収率改善のための氷結晶部分融解装置の試作

16:32 ◦宮脇長人[1]，グナチラカミヒリ[1]，道善倫子[1]，北野　滋[2]（[1]石川県大生資環，[2]明和工業）

2B02p16 界面前進凍結濃縮によるリンゴ果汁を用いたリンゴワインの製造と品質評価

16:43 ◦石崎佳奈[1]，グナチラカミヒリ[4]，笹木哲也[2]，松田　章[2]，三輪章志[1]，北野　滋[3]，小柳　喬[4]，宮脇長人[4]（[1]石川農総研，[2]石川工試，[3]明和工業(株)，[4]石川県大生資環）

2B02p17 共焦点レーザー顕微鏡を用いた乳化油噴霧乾燥粉末の表面油特性評価

16:54 ◦四日洋和[1]，フランソワレノン[3]，安達修二[2]，吉井英文[1]（[1]香大農，[2]京大院農，[3]アグロスップ　ディジョン）

B03 会場　午前の部（9:22〜11:54）

食品—食品化学－糖質，脂質—

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

2B03a03 食品加熱により生ずる 5-hydroxymethyl-furanal（5-HMF）に関する研究

9:22 ◦新藤一敏，斉藤麻由美，山村真弓（日女大・家政・食物）

2B03a04 イヌリンオリゴ糖の分析・分取法の確立と構成成分 GF4〜GF10 の単離

9:33 ◦松本恵実, 牧岡富広, 中塚進一（長良サイエンス株式会社）

2B03a05 連結 NH2 カラムによる糖質の分析とハチミツへの応用

9:44 ◦寺川美加[1]，伊藤新次[2]，榎本俊樹[1]（[1]石川県立大院生資，[2]ハニーテックラボラトリー株式会社）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2B03a07 収穫時期が異なる加賀レンコンから分離した澱粉の性質について

10:05 ◦山崎徹也[1]，本多裕司[1]，川嶋ふみ[1]，岡崎正規[1]，三輪章志[2]（[1]石川県大・生資環，[2]石川県農総研）

2B03a08 日本で栽培されたモチ米から精製した胚乳澱粉の構造および物性

10:16 ◦中浦嘉子[1]，廣瀬美佳[2]，小山善幸[2]，松下　景[3]，後藤明俊[4]，松葉修一[5]，梶　亮太[6]，出田　収[7]，片岡知守[8]，松木順子[2]，山本和貴[2]，井ノ内直良[1]（[1]福山大生命工，[2]農研機構・食総研，[3]農研機構・中央農研，[4]農研機構・作物研，[5]農研機構・北農研，[6]農研機構・東北農研，[7]農研機構・近中四農研，[8]農研機構・九州研）

2B03a09 食味の異なる米飯から調製した組織切片の澱粉の解析

10:27 ◦辻井良政[1], 川原真由美[2], 高野克己[2]（[1]アルファー食品(株), [2]東京農大応生・化学）

2B03a10 蒸米食味形成に関わる蒸煮中の胚乳細胞壁の変化

10:38 ◦渡邊　香[1]，辻井良政[3]，高野克己[2]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・化学，[3]アルファー食品株式会社）

2B03a11 Aspergillus niger 休止菌体を利用したエチル -α- グルコシドの生産性向上について

10:49 ◦兼重知尚[1]，戸倉慶大[1]，内野昌孝[2]，高野克己[2]，中西載慶[3]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・化学，[3]東京農大短大・醸造）

a13〜a16 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2B03a13 Aspergillus oryzae RIB 40 形質転換体を用いた機能性糖エチルグルコシド生産性について

11:10 ◦内野昌孝[1]，兼重知尚[2]，阿部有希子[2]，戸倉慶大[2]，中西載慶[3]，高野克己[1]（[1]東京農大応生・化学，[2]東京農大院・農，[3]東京農大短大・醸造）

2B03a14 神経応答解析を用いた糖アルコールの味質評価

11:21 ◦伊藤友紀[1,2]，十川詩帆[2]，安松啓子[1]，小関宏明[2]，二ノ宮裕三[1]（[1]九州大院口腔機能解析学，[2]三菱商事フードテック株式会社）

2B03a15 脂肪酸が苦味を抑制する作用機序の解明-脂肪酸は苦味物質の立体構造を変化させる-

11:32 ◦大木伽耶子[1]，山下治之[1]，井深章子[2]，石丸喜朗[1]，阿部啓子[1]，朝倉富子[1]（[1]東大院農，[2]山形大院理）

2B03a16 燕麦の脂質特性

11:43 ◦遠藤泰志，ソ　イ，津久井隆行（東京工科大応生）

B03 会場　午後の部（14:11〜18:10）

食品―食品化学－タンパク質，アミノ酸―

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

2B03p02　米アルブミンの物理化学的特性の評価
14:11 ○中嶋夏子，金子智博，稲　成信，赤尾　真，熊谷日登美（日大・生資・生化）

2B03p03　粒子径制御技術を用いた乳製品向け抗酸化製剤の開発
14:22 ○門脇章夫[1]，　檜山真一郎[1]，　山本幸弘[2]，　原　節子[2]，大久保泰宏[1]（[1]太陽化学株式会社，[2]成蹊大理工）

2B03p04　金属イオンは豆腐形成におけるタンパク質会合開始因子である
14:33 ○有井康博[1]，　岡村麻衣[1]，　鳥居絵美[1]，　西澤果穂[1]，竹中康之[2]（[1]武庫女大，[2]神戸松蔭大）

2B03p05　ε-ポリリシンとの複合体化による β-コングリシニンの機能改変
14:44 ○橋本健史，好田　正，服部　誠（東京農工大院農）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2B03p07　小麦登熟過程における PDI および Ero1 の発現量解析
15:05 ○徳本　脩[1]，　塩野弘二[2]，　岡　大貴[2]，　野口治子[3]，内野昌孝[3]，野口智弘[2]，高野克己[3]（[1]東京農業大院・農・農化，[2]東京農大・応生・食加技セ，[3]東京農大・応生・化学）

2B03p08　小麦粉生地中のジルフィド結合形成に対する PDI-Ero1 の影響
15:16 ○西堀史也[1]，　塩野弘二[2]，　岡　大貴[2]，　野口智弘[2]，高野克己[3]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・食加技セ，[3]東京農大応生・化学）

2B03p09　PDI，Ero1 を用いた国内産パン用小麦粉の製パン向上効果について
15:27 ○塩野弘二[1]，　西堀史也[2]，　岡　大貴[1]，　野口智弘[1]，高野克己[3]（[1]東京農大応生・食加技セ，[2]東京農大院農・農化，[3]東京農大応生・化学）

2B03p10　製パン性に対する小麦粉タンパク質酸可溶性画分の ω-グリアジンの効果について
15:38 ○岡　大貴[1]，　大原慎太郎[2]，　野口智弘[1]，　高野克己[3]（[1]東京農大応生・食加技セ，[2]東京農大院農・農化，[3]東京農大応生・化学）

2B03p11　小麦粉生地形成に対するアスコルビン酸の作用と PDI-Ero1 の関係について
15:49 ○野口智弘[1]，　西堀史也[2]，　塩野弘二[1]，　岡　大貴[1]，高野克己[3]（[1]東京農大・応生・食加技セ，[2]東京農大院・農・農化，[3]東京農大・応生・化学）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2B03p13　緑豆由来の不凍活性を有するタンパク質の構造と機能
16:10 ○田中里佳[1]，　中地　学[1]，　荒井直樹[2]，　片倉啓雄[1]，河原秀久[1]（[1]関西大化生工，[2]カネカ）

2B03p14　グアー起泡性アルブミン溶液の表面張力
16:21 ○徐　知華[1]，土居幸雄[2]（[1]京女大院家政，[2]龍谷大経済）

2B03p15　オボアルブミンの加熱凝集に対する N 末端ペプチドの役割
16:32 河内悠希[1]，　亀山里菜[1]，　半田明弘[2]，　○高橋延行[3]，田中直毅[1]（[1]京都工繊大生体分子工学，[2]キューピー(株)研究開発本部，[3]京都大学大学院農学研究科）

2B03p16　食用ペポカボチャ種子タンパク質のペプシン消化性
16:43 法村美幸[1]，　○吉田訓子[1]，　江原　清[2]，　嘉見大助[3]，園山　慶[4]，知地英征[1]，中河原俊治[1]（[1]藤女子大食物栄養，[2](地独)道総研・上川農試，[3](独)農研機構・北農研セ，[4]北大院農）

2B03p17　ダッタンソバ由来ルチン分解酵素のキャラクタリゼーションとその応用
ダッタンソバ由来ルチン分解酵素のキャラクタリゼーションとその応用
16:54 ○秦千比呂[1]，　片山　茂[1,2]，　大野史晃[2]，　岩本珠佳[2]，中村宗一郎[1,2]（[1]信州大院農，[2]信州大農）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2B03p19　デンプン粒表層タンパク質が生デンプン分解性に与える影響
17:15 ○芳原章太[1]，　岡　大貴[2]，　野口治子[3]，　野口智弘[2]，高野克己[3]（[1]東京農大学院農・農化，[2]東京農大応生・食加技セ，[3]東京農大応生・化学）

2B03p20　ヨーグルトカードの凝固性に及ぼす κ－CN の影響について
17:26 ○大原慎太郎[1]，岡　大貴[2]，野口智弘[2]，高野克己[3]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・食化技セ，[3]東京農大応生・化学）

2B03p21　大豆多糖との複合体化による β-ラクトグロブリンの機能改変
17:37 ○稲田直己，林　麻衣，好田　正，服部　誠（農工大院農）

2B03p22　Comparison of the digestibility of rice allergenic proteins by in vitro digestion
17:48 ○Gang-hua LANG，Yukari KAGIYA，Kazumi KITTA（National Food Research Institute）

2B03p23　ラクトフェリンによる *Acanthamoeba* sp. AA014 臨床分離株の生残性およびシスト形成に及ぼす影響
17:59 ○鈴木智恵[1]，　野町美弥[2]，　今安正樹[2]，　佐々木香る[3]，冨田信一[1]（[1]玉川大院農，[2]株式会社メニコン，[3]星ヶ丘厚生年金病院）

B04 会場　午前の部（9:11〜12:05）

食品―食品機能・栄養－酸化，抗酸化，老化―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

2B04a02　年産別収穫米の炊飯水蒸気中に含まれる香気成分と生理活性
9:11 ○村上結城[1]，　藤田明子[2]，　川上晃司[2]，　立花伸哉[3]，岡田芳治[1]，野村正人[1]（[1]近畿大・院，[2](株)サタケ，[3]甲南化工(株)）

2B04a03　かまぼこ加工残渣を発酵させて開発を試みた新たな魚醤のイン・ビトロ系における抗酸化性
9:22 ○原田和樹，福田　翼，和田律子，武智美佳，谷口成紀，前田俊道（水大校・食科）

2B04a04　マガキ由来の抗酸化物質における培養肝細胞保護作用
9:33 ○布田博敏[1]，　渡邉　貢[2]，　上甲紗愛[1]，　神　繁樹[1]，川西範明[1]，　吉田　繁[1]，　惠　淑萍[1]，　武田晴治[1]，　櫻井俊宏[1]，Rojeet Shrestha[1]，　池川繁男[1]，　三木恵美子[2]，　渡邉孝之[2]，千葉仁志[1]（[1]北海道大学大学院　保健科学研究院，[2]渡辺オイスター研究所）

2B04a05　豚筋肉タンパク質加水分解物の抗酸化作用
9:44 ○井上　航，江草(雑賀)愛，西村敏英（日獣大　応生）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2B04a07　D-キシロース－グリシン系メイラード反応により生成するピロロピロール化合物の抗酸化性
10:05 ○高井良輔，岩井美由紀，渡辺寛人，早瀬文孝（明治大農）

2B04a08　N-アセチルシステインと各種抗酸化物の相乗効果
10:16 ○小浜友紀子[1]，　山内良子[2]，　山元涼子[3]，　松井利郎[4]，石川洋哉[1,2]（[1]福岡女子大学院人間環境，[2]福岡女子大学国際文理，[3]熊本県立大学環境共生，[4]九州大学院農）

2B04a09　カルノシンによる腸管におけるミトコンドリア生合成の亢進
10:27 ○藤井　薫[1]，松本貴之[2]，森松文毅[2]，片倉喜範[1,3]（[1]九大院シス生，[2]日ハム中研，[3]九大院農院）

2B04a10　ミトコンドリア機能不全による組織障害に対するりんごポリフェノールの保護作用
10:38 ○増田　功[1,2]，　小池正人[1]，　渡辺憲史[1]，　小澤裕介[1]，

澤田陽子[2]，　杉本　篤[2]，　福田和郎[2]，　森光圭司[3]，　岩東清茂[3]，横手幸太郎[1]，清水孝彦[1]（[1]千葉大学大学院医学研究院，[2]アサヒグループホールディングス株式会社，[3]アサヒフードアンドヘルスケア株式会社）

2B04a11　システイン存在下でのポリフェノールによるメトミオグロビンの還元オキシ化

10:49　◦稲井美由紀[1]，　三浦ゆか理[1]，　本田沙理[1]，　増田晃子[2]，増田俊哉[1]（[1]徳島大院・総合，[2]四国大・生活）

a13～a17 発表者の接続時間 11:00～11:10

2B04a13　C3G ならびにその熱分解物である PCA の生体抗酸化性

11:10　◦近藤(比江森)美樹[1,2]，永易あゆ子[2]，中川咲良[1]（[1]徳島文理大人間・食栄，[2]岡山県大保福・栄養）

2B04a14　クルクミン封入ナノ粒子の調製と生物学的利用能向上

11:21　◦張替敬裕[1]，　宮澤大樹[1]，　庄司　求[1]，　仲川清隆[1]，藤井智幸[2]，宮澤陽夫[1,3]（[1]東北大院農・機能分子解析，[2]東北大院農・テラヘルツ，[3]東北大未来科学技術共同研究セ）

2B04a15　いも類・野菜類のフライ加工食品を組み合わせた活性酸素消去相乗効果の検討

11:32　◦石原克之[1]，　松橋　南[2]，　久保美沙子[1]，　中田民枝[1]，佐久間塁[1]，古賀秀徳[1]，秋山美展[2]（[1]カルビー(株)，[2]秋田県大・生物資源）

2B04a16　凍結粉砕微粉により抽出したコーヒーの抗酸化特性

11:43　◦内田健太郎[1]，　冨田晴雄[1]，　竹森利和[1]，　藤原裕史[2]（[1]大阪ガス株式会社，[2]株式会社リキッドガス）

2B04a17　ヒトカテコール -O- メチル基転移酵素発現酵母を用いたメチル化フラボノイドの調製

11:54　◦生城真一，藤森成美，西川美宇，安田佳織，鎌倉昌樹，榊　利之（富山県大・工・生物工学）

B04 会場　午後の部（14:11～17:59）

食品―食品機能・栄養－酸化，抗酸化，老化―

p02～p05 発表者の接続時間 14:01～14:11

2B04p02　紫外線照射ヘアレスマウスにおけるウシ初乳乳清蛋白質濃縮物投与の皮膚への影響

14:11　◦大久保俊平[1]，　松本剛弥[1]，　村田麻衣[1,2]，　野村義宏[1]（[1]東農工大農・硬蛋研，[2]森永乳業株・食基研）

2B04p03　経口投与コラーゲンモデルペプチドの皮膚移行およびヘアレスマウス皮膚水分量向上効果

14:22　◦神保希望[1]，　陳　　怡[1]，　大久保俊平[1]，　金澤怜子[1]，高島　正[2]，　細谷祥一[2]，　杉原富人[3]，　小泉聖子[3]，　片岡　綾[3]，渡部睦人[1]，千葉一裕[1]，野村義宏[1]（[1]農工大農，[2]吉田機械興業株式会社，[3]新田ゼラチン株式会社・ペプチド事業部）

2B04p04　光老化モデル動物に対するラクトフェリン投与の皮膚保護効果

14:33　◦村田麻衣[1,2]，　佐藤拓海[1]，　若林裕之[1]，　山内恒治[1]，阿部文明[1]，野村義宏[2]（[1]森永乳業株・食基研，[2]東農工大農・硬蛋研）

2B04p05　コラーゲンペプチドおよびビタミン C は SOD1 欠損マウスの加齢様皮膚萎縮を相加的に改善する

14:44　◦澁谷修一[1]，　小澤裕介[1]，　戸田年彦[1]，　渡辺憲史[1]，遠目塚千紗[2]，小倉孝之[2]，小山洋一[2]，清水孝彦[1]（[1]千葉大院医 先進加齢医学，[2](株)ニッピ　バイオマトリックス研）

p07～p11 発表者の接続時間 14:55～15:05

2B04p07　皮膚の光老化に対するリンゴポリフェノールの作用

15:05　◦武智貴之[1]，　土江久美子[1]，　小山摂司[1]，　上村克己[1]，正木　仁[2]（[1]ちふれ化粧品，[2]東京工科大）

2B04p08　レスベラトロールは皮膚老化様症状を改善する

15:16　◦渡辺憲史，小澤祐介，澁谷修一，小林慶司，横手幸太郎，清水孝彦（千葉大学大学院・医学研究院）

2B04p09　植物中に含まれる配糖体に対する *Lactobacillus paracasei* A221 株の影響

15:27　◦位上健太郎，下条洋輔，野渕　翠，小坂邦男，伊藤久富，宮崎寿次（長瀬産業(株)）

2B04p10　*Lactobacillus paracasei* A221 株が「ケール」の表皮バリア増強作用に与える影響

15:38　◦下条洋輔，位上健太郎，野渕　翠，小坂邦男，伊藤久富，宮崎寿次（長瀬産業(株)）

2B04p11　金時草の血管新生抑制作用

15:49　◦吉城由美子，吉田沙織，田中美由紀，仲山　薫（石川県大食）

p13～p17 発表者の接続時間 16:00～16:10

2B04p13　A β，ApoAII 及び stefin B を標的としたクロロゲン酸及びその代謝産物の抗アミロイド効果

16:10　◦福本高大[1]，　片山　茂[1,2]，　山内　陸[2]，　中林昌基[2]，中村宗一郎[1,2]（[1]信州大院農，[2]信州大農）

2B04p14　老化促進マウス SAMP8 における大豆ペプチドの認知機能保護効果

16:21　◦今井理恵[1]，　片山　茂[1]，　杉山　遥[1]，　前渕元宏[2]，中村宗一郎[1]（[1]信州大農院，[2]不二製油）

2B04p15　Melanogenesis-inducing effect of cirsimaritin through increase in microphthalmia-associated transcription factor and tyrosinase expression

16:32　◦Hyo Jung KIM[1]，　Yin Dong[1]，　Ik Soo Lee[3]，Toshiaki Teruya[4]，　Takayuki Yenazawa[5]，　Kazuo Nagai[1]，Je-Tae Woo[1,2]，　Jin Sook Kim[3]，　Byung-Yoon Cha[1]（[1]Chubu University, [2]Erina Co., Inc., [3]Herbal Medicine Research Division, TKM-Based Herbal Drug Research Group, 1672 Yuseongdae-ro, Daejeon, Republic of Korea, [4]Ryukyu University, [5]Tokyo University）

2B04p16　ミッドカインを指標とした亜熱帯性農産物抽出液の抗腫瘍活性の解析

16:43　◦伊波幸紀[1]，藏屋英介[2]，池松真也[3]（[1]沖縄高専　専攻科，[2]沖縄高専 技術室，[3]沖縄高専 生物資源）

2B04p17　ヒト神経芽細胞腫株 SK-N-SH の 6-OHDA および過酸化水素による細胞死に保護効果を示す物質の検討

16:54　◦中路昌志，小川智弘，藤原宜弘，山田康枝（近畿大院工）

p19～p22 発表者の接続時間 17:05～17:15

2B04p19　希少糖からのカロリー制限模倣物質の探索　－線虫寿命試験法の改良－

17:15　◦佐藤正資[1]，　砂古口博文[1]，　新谷知也[2]，　大隈一裕[2]，何森　健[3]（[1]香川大・農，[2]松谷化学工業，[3]香川大・希少糖研究センター）

2B04p20　日本食が生体寿命に与える影響

17:26　◦都築　毅[1]，　本間太郎[1]，　北野泰奈[1]，　畠山雄有[1]，鄂　　爽[1]，　山本和史[1]，　治部祐里[2]，　川上祐生[2]（[1]東北大院農，[2]岡山県大保福）

2B04p21　各種食品素材の寿命延長効果スクリーニング

17:37　◦高橋千尋，西村太輔，林田　茂，松永政司（NPO 法人遺伝子栄養学研究所）

2B04p22　大麦若葉エキス投与によるヒト繊維芽細胞遺伝子発現量変化

17:48　◦西村太輔，高橋千尋，林田　茂，松永政司（NPO 法人遺伝子栄養学研究所）

B05 会場　午前の部（9:11～12:05）

食品―食品機能・栄養－脂質代謝―

a02～a05 発表者の接続時間 9:01～9:11

2B05a02　L- システインによる LDL 受容体上方制御は，新規 TGF-α シグナル伝達経路によって媒介される

9:11　◦田中裕真，島田昌也，長岡　利（岐阜大応生）

2B05a03　エピガロカテキンガレートによる LDL 受容体活性化及び PCSK9 減少の分子機構
9:22　○北村幸平，三島周平，島田昌也，長岡　利（岐阜大応生）
2B05a04　ラクトスタチンは ABCA1 発現低下を介してコレステロール吸収を抑制する
9:33　○小室あゆ美[1]，　山本達記[1]，　上田　浩[2]，　島田昌也[1]，長岡　利[1]（[1]岐阜大応生・応用生命，[2]岐阜大工・生命工）
2B05a05　LDL 受容体遺伝子発現を上昇させる食品成分の探索と作用機構解析
9:44　○落合彩紗，　宮田慎吾，　Shimizu Makoto，　井上　順，佐藤隆一郎（東大院農生科）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2B05a07　シナモン熱水抽出物は脂肪細胞での ACSL1 発現量を抑制して抗糖尿病作用を示す
10:05　○沈　　燕[1]，小林克也[1]，細野(深尾)友美[2]，大嶋みづき[1]，定村祐加子[1]，高西真貴子[1]，原田彩絵子[1]，細野　崇[1]，関泰一郎[1]（[1]日大生資科生命化，[2]お茶大生環研セ SHOKUIKU）
2B05a08　カルコンである cardamonin と flavokawain B は ERK の活性化を介して脂肪細胞分化を抑制する
10:16　○張　天順[1]，山本憲郎[2]，芦田　均[1]（[1]神戸大院農，[2]ハウスウェルネスフーズ）
2B05a09　ヒト肝細胞 HepG2 における短鎖脂肪酸の抗インスリン抵抗性作用の解明
10:27　○石井　恵，前田歩海，赤川　貢（大阪府立大院生命環境科学）
2B05a10　エミューオイルが 3T3-L1 脂肪細胞の脂質代謝に及ぼす影響
10:38　○永田もも子，　加藤由麻，　妙田貴生，　藤森　嶺，戸枝一喜，桜井智野風，西澤　信（東農大・生物・食香）
2B05a11　培養筋細胞におけるロスマリン酸の脂肪酸代謝促進作用
10:49　○阿部大吾，齋藤　武，野方洋一（農研機構　近中四農研）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2B05a13　食餌脂肪酸の腸内細菌代謝物摂取は肥満に伴う代謝異常症を改善する
11:10　○古薗智也[1]，　山國加成衣[1]，　金　英一[1]，　キムミンジ[1]，西村　哲[1]，　滝野晃將[1]，　後藤　剛[1,2]，　北村苗穂子[3]，　朴　時範[3]，岸野重信[3]，小川　順[2,3]，高橋信之[1,2]，河田照雄[1,2]（[1]京大院農・食品生物，[2]京大　生理化学研究ユニット，[3]京大院農･応用生命）
2B05a14　食事共役リノール酸による卵巣摘出雌性ラットにおける肥満予防効果の検証
11:21　小山庸子，小栗幹也，高橋　彩，○長田恭一（明治大･農･農化）
2B05a15　腹部大動脈瘤発症に及ぼす n-3 系高度不飽和脂肪酸の影響評価
11:32　○久後裕菜[1]，　毛利陽平[1]，　柳本賢一[2]，　韓　　力[2]，財満信宏[1]，森山達哉[1]（[1]近畿大農，[2]日本水産株式会社生活機能科学研究所）
2B05a16　エイコサペンタエン酸 8 位および 9 位炭素への水酸基導入はペルオキシソーム増殖因子活性化受容体に対するリガンド活性を増強する
11:43　○山田秀俊[1]，　菊地明香[1]，　箱崎真友佳[1]，　高橋秀行[1]，木村賢一[2]（[1]岩手生物工学研究センター，[2]岩手大学）
2B05a17　低脂肪高炭水化物食と等カロリーの高脂肪低炭水化物食がエネルギーおよび脂質代謝に与える影響-SD ラット -7% vs 21% ラード食-
11:54　小川望美，○井上奈穂，池田郁男（東北大院農）

B05 会場　午後の部（14:00〜18:10）

食品―食品機能・栄養－脂質代謝―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2B05p01　高イソフラボン大豆の摂取がラットの脂質代謝に及ぼす影響
14:00　○高橋陽子，渡辺　純，石川(高野)祐子（農研機構食総研）
2B05p02　Flavan 3-ols 単回投与のエネルギー代謝亢進メカニズムの解明
14:11　○松村優介，　見米克之，　神尾直哉，　工藤直人，越阪部奈緒美（芝浦工業大学）
2B05p03　コレステロールを給餌したラットに対する Oligonol の脂質代謝調節作用
14:22　○日野原顯[1]，　鈴木ひかる[1]，　林　洪太[1]，　長田恭一[1]，北舘健太郎[2]（[1]明治大院農，[2]アミノアップ化学）
2B05p04　コレステロール酸化物(COP)がラットの代謝に与える影響
14:33　○多田篤生[1]，小川真奈[2]，加藤久典[2]，小林彰子[2]（[1]東大農，[2]東大院農生科・応生化）
2B05p05　胆汁を介さない小腸からのコレステロール排泄に影響する因子
14:44　村田みのり，　荒井達也，　船山明日和，　井上奈穂，○池田郁男（東北大学院農）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2B05p07　ガーリックオイルの抗肥満効果に関する研究
15:05　○香川祐輝[1]，　久宮彩乃[1]，　秋葉知奈[2]，　山口花梨[2]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]（[1]日本大院生資科，[2]日本大生資科）
2B05p08　黒豆種皮成分の脂肪細胞小型化による糖尿病改善効果の解析
15:16　○松川隼也[1]，稲熊哲也[1]，HAN Junkyu[1,2]，長谷川季男[3]，永尾雅哉[3]，礒田博子[1,2]（[1]筑波大院生命環境，[2]筑波大北アフリカ研究センター，[3]京都大院生命科学）
2B05p09　ジネンジョによる脂質代謝改善作用の解析
15:27　○竹内若子[1]，辻原命子[1]，升井洋至[2]，草野由理[1]（[1]名女大，食栄，[2]武庫川女大，食栄）
2B05p10　KK-Ay マウスにおける山薬および有効成分ジオスゲニンの血中トリグリセライド低下作用
15:38　○三好規之，佐々木香，三浦進司，大島寛史（静岡県立大学）
2B05p11　高脂肪食誘導肥満マウスにおけるシークワーサーエキスの抗肥満効果
15:49　○車　炳允[1]，　浅井みどり[1]，　照屋俊明[1,3]，　米澤貴之[1,4]，金　孝靜[1]，永井和夫[1]，禹　済泰[1,2]（[1]中部大学　生物機能開発研究所，[2]中部大学　応用生物学部，[3]琉球大学　教育学部，[4]東京大学　大学院工学系研究科）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2B05p13　Theaflavin のマウスエネルギー代謝への影響
16:10　○工藤直人[1]，　新井泰範[1]，　神尾直哉[1]，　渡辺悠人[1]，石井剛志[2]，中山　勉[3]，越阪部奈緒美[1]（[1]芝浦工業大学，[2]静岡県立大学，[3]日本獣医生命科学大学）
2B05p14　アポ E 欠損マウスに対するヘスペリジン配糖体の抗動脈硬化作用
16:21　○東口文治[1]，　菅澤典子[2]，　中山泰介[2]，　樫谷悠也[2]，木下　肇[2]，　宅見央子[1]，　栗飯原賢一[3]，　黒部裕嗣[2]，　北川哲也[2]（[1]江崎グリコ・健康科学研究所，[2]徳島大院・心臓血管外科，[3]徳島大院・生体情報内科学）
2B05p15　抗肥満・血糖低下効果を有する TGR5 アゴニスト活性成分の探索
16:32　○碇　菜穂[1]，Shimizu Makoto[1]，中村明朗[2]，井上　順[1]，佐藤隆一郎[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]長谷川香料(株)・技術研）
2B05p16　キサントフモールによる SREBP 活性抑制効果と作用

機構解析

16:43 ○宮田慎吾，井上　順，SHIMIZU Makoto，佐藤隆一郎（東大院農）

2B05p17　VLDL 分泌に関与する MTP 遺伝子の転写を抑制するフラボノイドの機能解析

16:54 李　　娟，○井上　順，CHOI Jung-Min，SHIMIZU Makoto，佐藤隆一郎（東大院農生科）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2B05p19　酒粕摂取によるマウスの NASH 予防効果

17:15 ○大浦　新[1]，　村上直之[1]，　入江元子[1]，　守田麻由子[2]，堤　浩子[1]，内藤裕二[2]，秦　洋二[1]（[1]月桂冠総研，[2]京都府立医大・消化器内科）

2B05p20　米油の血漿コレステロール上昇抑制作用に関する研究

17:26 ○木村ふみ子[1]，　周　秀瑩[1]，　仲川清隆[1]，　宮澤陽夫[1,2]，橋本博之[3]，築野卓夫[3]（[1]東北大学院・農・機能分子解析，[2]東北大未来化学技術共同研究センター，[3]築野食品工業株式会社）

2B05p21　β クリプトキサンチンは糖・脂質代謝異常を改善する

17:37 ○村上弘樹[1]，　高橋信之[1,2]，　古薗智也[1]，　大山夏奈[1]，千田真里[1]，杉浦　実[3]，後藤　剛[1,2]，河田照雄[1,2]（[1]京大院農・食品生物，[2]京大　生理化学研究ユニット，[3]農研機構　果樹研究所カンキツ研究領域）

2B05p22　フコキサンチン含有海藻脂質の機能性および消化吸収性評価

17:48 ○菅野翔伍[1]，庭野吉己[2]，前多隼人[1]（[1]弘前大院農，[2]東北大院歯）

2B05p23　NAFLD モデルである *Fxr* 欠損マウスの肝脂質代謝に対するフコキサンチン投与の影響

17:59 ○木下佑一，田島惟李，杉浦義正，宮田昌明（水大校・院）

B06 会場　午前の部（9:33〜11:54）

食品―食品機能・栄養－免疫，炎症，アレルギー―

a04〜a05 発表者の接続時間 9:23〜9:33

2B06a04　抗原提示能を指標とした抗原感作性評価法の構築

9:33 ○小俣洋奈[1]，片山　茂[1]，穐山　浩[2]，中村宗一郎[1]（[1]信州大農，[2]国立衛研）

2B06a05　樹状細胞の TGF-β 産生を指標とした免疫調節物質の探索

9:44 ○大野史晃[1]，　片山　茂[1,2]，　丹治典子[1]，　小俣洋奈[1]，中村宗一郎[1,2]（[1]信州大農，[2]信州大院農）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2B06a07　AGEs 結合タンパク質の同定

10:05 ○近澤未歩，柴田貴広，内田浩二（名大院生命農・応用分子生命科）

2B06a08　陰性荷電タンパク質の自己免疫原性

10:16 ○伊藤美香，近澤未歩，柴田貴広，内田浩二（名大院農）

2B06a09　自然抗体によるカテキン - タンパク質複合体の認識

10:27 近澤未歩[1]，　○畑佐行紀[2]，　柴田貴広[1]，　赤川　貢[4]，立花宏文[3]，内田浩二[1]（[1]名古屋大院農，[2]名古屋大農，[3]九州大農，[4]大阪府立大生命環境科学）

2B06a10　ピロール化タンパク質の機能特性

10:38 宮下宙士[1]，　○日沖裕介[1]，　近澤未歩[1]，　柴田貴広[1]，松見紀佳[2]，内田浩二[1]（[1]名大院生命農・応用分子生命科，[2]北陸先端科学技術大学院大学）

2B06a11　次世代シーケンサーを用いたアナジー化 T 細胞で発現が変動する遺伝子の網羅的解析

10:49 ○吉岡雄介[1]，　古崎利紀[2]，　石井一夫[2]，　服部　誠[1]，好田　正[1]（[1]東農工大院・応生化，[2]東農工大・農学系ゲノム科学人材育成プログラム）

a13〜a16 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2B06a13　α－ディフェンシン 5 遺伝子の転写調節エレメントの同定

11:10 ○小早川哲朗，　高橋恭子，　栗原健太，　杉　由高，細野　朗，上野川修一（日大生資科）

2B06a14　パイエル板樹状細胞において TLR2 は TLR9 応答を選択的に抑制する

11:21 ○上滝隆太郎[1,2]，　輪島隼一[1,2]，　塩河亜弥[1,2]，　八村敏志[1,2]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大院農生化・食の安全研セ）

2B06a15　腸管関連リンパ組織の細胞フェノタイプの発現は腸管部位ごとに異なる特徴をもつ

11:32 ○於　鉄崢[1]，　鈴木　誠[1]，　八村敏志[2]，　高橋宣聖[3]，高橋恭子[1]，上野川修一[1]，細野　朗[1]（[1]日大生資科　食品生命，[2]東大院農生科・食の安全研セ，[3]感染研・免疫）

2B06a16　経口免疫寛容において誘導される $CD62L^{high/int}CD44^{int}$ および $CD62L^{low}CD44^{high}$ T 細胞の機能解析

11:43 ○芝原恭子[1,2]，　田邊康祐[1]，　塩河亜弥[1,2]，　佐藤隆一郎[1]，八村敏志[1,2]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大院農生科・食の安全研セ）

B06 会場　午後の部（14:22〜17:59）

食品―食品機能・栄養－免疫，炎症，アレルギー―

p03〜p05 発表者の接続時間 14:12〜14:22

2B06p03　ピンクペッパーによるマクロファージの炎症抑制機構

14:22 ○松崎義明，平井　静，江頭祐嘉合（千葉大院・園芸・応生化）

2B06p04　ウメ酢ポリフェノールのマクロファージにおける抗炎症作用の解析

14:33 ○小佐田翔平[1]，　森尾大智[1]，　武本淳史[1]，　堀西朝子[1]，三谷隆彦[2]，永井宏平[1]（[1]近大生物理工，[2](財)わかやま産業振興財団）

2B06p05　卵黄ペプチドの抗炎症効果に関する検討

14:44 ○中村紀夫[1]，　宇野賀津子[2]，　原田清佑[1]，　丸　勇史[1]，金　武祚[1]，吉川敏一[3]（[1]株式会社ファーマフーズ，[2]財団法人ルイ・パストゥール医学研究センター，[3]京都府立医科大学）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2B06p07　腸内細菌のリノール酸代謝産物 10-Hydroxy-cis-12-octadecenoic acid はマウス腸管上皮細胞における TNFR2 発現を抑制し腸炎を緩和する

15:05 宮本潤基[1]，　水呉太一[1]，　PARK Si-Bum[2]，　岸野重信[2]，小川　順[2]，鈴木卓弥[1]，○田辺創一[1]（[1]広島大院生物圏，[2]京都大院農）

2B06p08　腸内細菌のリノール酸代謝産物 10-Hydroxy-cis-12-octadecenoic acid は GPR40 シグナルを介して Caco-2 細胞における腸管上皮バリアの損傷を回復する

15:16 ○宮本潤基[1]，　畑堀　翔[1]，　PARK Si-Bum[2]，　岸野重信[2]，小川　順[2]，鈴木卓弥[1]，田辺創一[1]（[1]広島大院生物圏，[2]京都大院農）

2B06p09　デキストラン硫酸ナトリウムで誘発したヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 の細胞傷害に対するローヤルゼリータンパク質の影響

15:27 ○松浦遼太郎[1]，　村松和香[2]，　上妻由章[1,2]，　米倉政実[1,2]（[1]茨城大院農，[2]茨城大学農）

2B06p10　乳由来スフィンゴミエリン濃縮物の抗炎症作用及びその機構解析

15:38 ○副島理人[1]，　酒井史彦[2]，　門岡幸男[2]，　古崎利紀[1]，石井一夫[1]，矢ヶ崎一三[1]，三浦　豊[1]（[1]東京農工大学・大学院農学研究院，[2]雪印メグミルク株式会社・ミルクサイエンス研究所）

2B06p11　薬剤誘発耳介浮腫モデルマウスにおける低分子化ヒアルロン酸経口摂取の影響

15:49 ○周　敬棠[1]，羽鳥由信[2]，真鍋祐樹[3]，菅原達也[3]（[1]京都大学，[2]日本新薬・食開研，[3]京都大学院・農）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2B06p13　ヤマブシタケのマクロファージおよび脂肪細胞に対する抗炎症作用とその有効成分の探索
16:10　○森光一郎[1]，　平澤典保[2]，　菊地晴久[2]，　大島吉輝[2]，大内謙二[1]（[1]ホクト(株)，[2]東北大院薬）

2B06p14　小麦アルキルレゾルシノールは脂肪細胞の慢性炎症を予防する
16:21　○福田真人[1]，　菊池洋介[1]，　福留真一[1]，　渡辺　純[2]，石川祐子[2]（[1]日清製粉グループ本社，[2](独)農研機構・食総研）

2B06p15　ケルセチンが西洋型食で誘導される脂肪組織の免疫システム活性化に及ぼす影響
16:32　○山内優輝[1,2]，　高橋弓子[1]，　大池秀明[1]，　一法師克成[1]，小堀真珠子[1]（[1](独)農研機構　食品総合研究所，[2]日本製粉）

2B06p16　フェルラ酸によるアセトアミノフェン肝障害の抑制機序
16:43　○山田大貴（千葉大院園）

2B06p17　ガーリック由来香気成分 diallyl trisulfide による肝臓虚血再灌流障害抑制効果
16:54　○日吉滉平[1]，　長須賀美紀[2]，　渡辺師成[1]，　細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]（[1]日本大院生資科，[2]日本大生資科）

p19〜p22 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2B06p19　プロバイオティクスの炎症抑制作用を媒介するエキソソーム
17:15　青木(吉田)綾子[2]，大角有里沙[1]，鶴田剛司[1]，○園山　慶[1]（[1]北大院農，[2]農研機構・畜草研）

2B06p20　植物ホルモン様ペプチド leginsulin の動物細胞に対する機能性解析
17:26　○坂野太研，伴野　勧，大島寛史，三好規之（静岡県大院薬食生命）

2B06p21　腸管上皮細胞からの TGF-β 1 産生誘導を伴う *Lactobacillus plantarum* 22A-3 の腸管炎症抑制効果
17:37　○ランウボンジャルカン[1]，　橋本堂史[1]，　林多恵子[2]，西谷洋輔[2]，水野雅史[1]（[1]神戸大院農，[2]丸善製薬・研究開発本部）

2B06p22　皮膚機能を改善するパイナップル果実由来グルコシルセラミドによる小腸の IL-23 mRNA 発現の亢進
17:48　○桑田崇志[1]，　野嶋　潤[2]，　大戸信明[2]，　桑原浩誠[2]，橋本堂史[1]，水野雅史[1]（[1]神戸大院農，[2]丸善製薬株式会社）

B07 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―食品機能・栄養－その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2B07a01　プチヴェールの機能解析
9:00　○小瀬木一真[1]，　糟谷亮介[1]，　山田千佳子[1]，　松田　幹[2]，和泉秀彦[1]（[1]名古屋学芸大院，[2]名大院・生命農）

2B07a02　柿へた由来成分の機能性解析(第 2 報)
9:11　○折居千賀（公益財団法人　東洋食品研究所）

2B07a03　タマネギ外皮抽出物の *Staphylococcus aureus* に対する抗菌効果に関する研究
9:22　○黄　　達[1]，　橋本堂史[1]，　藍原祥子[1]，　金沢和樹[1,2]，水野雅史[1]（[1]神戸大院農，[2]吉備国際大地域創成農）

2B07a04　ガーリック由来香気成分 diallyl trisulfide による白血病細胞のアポトーシス誘導機構とその分子標的の解明
9:33　○渡辺師成，　今井孝俊，　日吉滉平，　細野　崇，　関泰一郎（日本大院生資科）

2B07a05　ヒトの肌状態に対するイチジク発酵液の効果
9:44　○福島沙帆子[1]，　吉村麻奈未[1]，　井口隆文[2]，　渡辺敏郎[2]，高岡素子[1]（[1]神戸女学院大学，[2]ヤエガキ発酵技研(株)）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2B07a07　小麦ふすまはメチル水銀の尿中排泄を促し，組織中水銀濃度を減少する
10:05　○永野匡昭[1]，藤村成剛[1]，岩崎一弘[2]，稲葉一穂[2]（[1]国立水俣病総合研究センター，[2]国立環境研究所）

2B07a08　サツマイモ茎葉中のカフェオイルキナ酸類分析法の単一試験室での妥当性確認
10:16　○佐々木一憲，沖　智之，小林　透，甲斐由美，奥野成倫（農研機構・九州沖縄農研）

2B07a09　クローブ抽出物に含まれるテストステロン 5 α - リダクターゼ阻害物質の探索
10:27　○上西雄大，加藤英介，川端　潤（北大院農）

2B07a10　サケ白子由来血糖値上昇抑制ペプチドの開発
10:38　○鎌田　彰[1]，　稲橋佑起[2]，　小西達也[1]，　広瀬あかり[1]，高橋義宣[1]（[1]マルハニチロ，[2]北里大北里生命科学研）

2B07a11　血管内皮細胞おける黒大豆の抗糖化作用
10:49　○吉田　泉，原田哲平，渡辺章夫，三嶋　隆，藤田和弘，渡井正俊（日本食品分析センター）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2B07a13　トマト果実における oxo-octadecadienoic acids 及び脂肪酸のプロファイル解析
11:10　○鎌苅浩介[1]，　高橋春弥[1]，　鈴木秀幸[2]，　後藤　剛[1,3]，高橋信之[1,3]，　柴田大輔[2]，　河田照雄[1,3]（[1]京大院農・食品生物，[2](財)かずさ DNA 研，[3]京大生理化学研究ユニット）

2B07a14　新規カシス抽出物の肥満・糖尿病における作用機構の解析
11:21　○上野有紀[1]，　濱田　愛[1]，　田中麻奈未[1]，　近藤晴香[1]，有田麻里絵[1]，　瀧本陽介[2]，　大澤俊彦[1]（[1]愛知学院大心身科学，[2]株)ヘルスケアシステムズ）

2B07a15　蓮芯に含まれる筋細胞の糖取り込み促進活性成分の探索
11:32　○加藤英介[1]，　木村太郎[1]，　稲垣洋介[2]，　藤田裕之[2]，川端　潤[1]（[1]北大院農，[2]日本サプリメント(株)）

2B07a16　マカ由来のインスリン様活性物質の探索
11:43　○片山紳司，町川　司，加藤英介，川端　潤（北大院農）

2B07a17　レモングラスからのインスリン様活性物質探索
11:54　○町川　司，加藤英介，川端　潤（北大院農）

B07 会場　午後の部（14:11〜17:59）

食品―食品機能・栄養－その他―

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

2B07p02　自然薯ムカゴのマウス肝臓遺伝子発現に対する影響
14:11　○篠崎文夏[1]，亀井飛鳥[1]，渡部由貴[1]，荒井綜一[1,2]，阿部啓子[1,3]（[1]KAST，[2]東農大総研，[3]東大院農生科・応生化）

2B07p03　DNA マイクロアレイによる杜仲葉の食品機能性評価
14:22　○常岡　誉，中谷祥恵，熊谷祐哉，中野弘香，清水　純，古旗賢二，和田政裕（城西大薬）

2B07p04　茶に含まれるカテキン関連物質のレニン抑制活性
14:33　○八巻幸二，李　風娟，亀山眞由美，高橋陽子（食品総合研究所）

2B07p05　カルコン類によるアリール炭化水素受容体の形質転換抑制効果について
14:44　○賀　　超，張　天順，芦田　均（神戸大院農）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2B07p07　食品ポリフェノールによる代謝ストレスの緩和に関わるエピゲノム調節領域の解析
15:05　○原田尚志[1]，　姚　瑞卿[1]，　牛尼翔太[1]，　岡田由紀[1]，三坂　巧[1]，　伊藤隆司[2]，　三浦史仁[2]，　安岡顕人[3]，　白髭克彦[1]，阿部啓子[1,3]，中井雄治[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大院理学系研究科，[3]KAST）

2B07p08　食品由来のファイトケミカルによるタンパク質変性作用の評価

15:16 ○今林健登, 中畑恵利奈, 大西康太, 田中遼平, 五十嵐洋子, 入江一浩, 村上 明（京大院農）

2B07p09 タンパク質変性作用に着目したクルクミンの脂肪分解機構の解明

15:27 ○バレンティンシンディ, 入江一浩, 村上 明（京大院農）

2B07p10 線虫におけるクルクミンの熱耐性賦与作用に対する加齢の影響

15:38 ○村川 慧（京大院農）

2B07p11 セサミンと CYP2C9 代謝型医薬品の相互作用

15:49 ○上野千来, 安田佳織, 西川美宇, 鎌倉昌樹, 生城真一, 榊 利之（富山県立大学・工・生物工学）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2B07p13 骨粗鬆症モデルマウスの骨代謝および equol 産生能に及ぼす大豆イソフラボン・セロオリゴ糖併用摂取の影響

16:10 ○藤井駿吾[1], 井上博文[1], 勝間田真一[1], 鈴木和春[1], 吉川裕治[2], 町田 誠[2], 上原万里子[1]（[1]東農大院農, [2]日本製紙(株)）

2B07p14 3-Hydroxytyrosol は破骨細胞分化を抑制する活性本体である。

16:21 ○井上博文[1], 小林謙一[2], 鈴木 司[2], 山本祐司[2], 勝間田真一[1], 鈴木和春[1], 上原万里子[1]（[1]東京農大・栄養, [2]東京農大・化学）

2B07p15 Sulforaphane は HO-1 の発現上昇を介して HMGB1 分泌を抑制し破骨細胞分化を阻害する。

16:32 ○高木智弘, 井上博文, 勝間田真一, 鈴木和春, 上原万里子（東農大院 食品栄養）

2B07p16 スルフォラファンの変形性関節症予防効果とその作用機構

16:43 ○柴田紗知[1], 石飛博之[2], 味八木茂[2], 松原主典[1]（[1]広島大院教育, [2]広島大病院）

2B07p17 ホモシステインおよびベタインの摂取が骨・関節組織に及ぼす影響

16:54 ○勝呂祐美[1], 中谷祥恵[1], 千葉大成[2], 古旗賢二[1], 和田政裕[1]（[1]城西大薬, [2]神奈川工科大応用バイオ科学）

p19〜p22 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2B07p19 小腸上皮様細胞表面のヘパラン硫酸糖鎖にペクチンが与える影響の解明

17:15 ○西田光貴[1], 村田一馬[2], 森雄一郎[4], 山元宏貴[4], 伊神孝生[4], 北口公司[2,3], 金丸義敬[1,2,3], 矢部富雄[1,2,3]（[1]岐阜大院・連農・生物資源, [2]岐阜大院・応生科・資源生命, [3]岐阜大・応生科・応用生命, [4]三基商事(株)）

2B07p20 DNA マイクロアレイ解析による腸管細胞に対するカルノシンの機能推測

17:26 ○門岡桂史[1], 松本貴之[2], 森松文毅[2], 片倉喜範[1]（[1]九大院農院, [2]日ハム中研）

2B07p21 アロエステロール(R)含有 AVGP の光老化モデルにおける皮膚弾力性低下予防効果

17:37 ○齊藤万里江, 田中美順, 三澤江里子, 姚 瑞卿, 山内恒治, 阿部文明（森永乳業・食基研）

2B07p22 共培養系においてセラミドが皮膚細胞へ及ぼす影響

17:48 ○赤木 裕[1], レヴランフォン[1], 薩 秀夫[1], 戸塚 護[1], 千田和広[2], 清水 誠[3]（[1]東大院農・応生化, [2]東大院農・応動科, [3]東大院農・食の安全研究センター）

C01 会場 午前の部（10:27〜11:43）

新技術—先端バイオ計測，アレイ—

a09〜a11 発表者の接続時間 10:17〜10:27

2C01a09 BetI 変異体と T7RNA ポリメラーゼを用いたコリン誘導系の開発

10:27 荒澤悠輔, ○池 紘平, 宮口明恵, 冨永将大, 河合(野間)繁子, 斎藤恭一, 梅野太輔（千葉大院・工・共生応化）

2C01a10 安定運転と弱毒化を指向した Autogene の進化工学

10:38 ○佐伯和哉, 池 紘平, 宮口明恵, 冨永将大, 河合(野間)繁子, 斎藤恭一, 梅野太輔（千葉大院・工・共生応化）

2C01a11 生理的濃度における非標識，迅速な生理活性成分評価のための *in vivo*-like セルベースアッセイの開発− 1 時間以内で評価−

10:49 ○小名俊博[1,2], 柴田純子[2]（[1]九大院農, [2]オーケーラボ Cell BET）

a13〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2C01a13 微生物細胞の転移温度を決定づける主な要因は含水率である

11:10 ○中西弘一[1], 藤田康弘[2], 出内桂二[2], 桑名利津子[3], 高松宏治[3]（[1]ナノ・マイクロバイオ研, [2]キリン飲料技研, [3]摂南大薬）

2C01a14 ウサギモノクローナル抗体の効率的取得法の開発

11:21 ○加藤晃代[1,2], 橋村 大[2], 山本広晃[2], 兒島孝明[2], 中野秀雄[2]（[1](公財)科技財団, [2]名大院生命農）

2C01a15 水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出法：糸状菌への適用

11:32 ○塚谷忠之[1], 末永 光[1], 志賀匡宣[2], 松本 清[3]（[1]福工技セ・生物食品研, [2](株)同仁化学研, [3]崇城大・生物生命）

C01 会場 午後の部（14:00〜18:10）

新技術—コンビバイオ工学等，分析法，解析法—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2C01p01 プローブ修飾ナノ粒子を用いたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の電気化学的 DNA バイオセンシング

14:00 ○渡邊和也[1], 桑田典明[2], 里村武範[2,3], 坂元博昭[1], 末信一朗[1,2,3]（[1]福井大院・工・繊維, [2]福井大院・工・生物応化, [3]福井大・生命セ）

2C01p02 L- ヒドロキシプロリンのバイオセンシングシステムの構築

14:11 ○小泉 岳[1], 渡邊和也[1], 坂元博昭[1,3], 渡辺誠也[4], 里村武範[2,3], 末信一朗[1,2,3]（[1]福井大院・工・繊維先端, [2]福井大院・工・生物応化, [3]福井大・生命セ, [4]愛媛大）

2C01p03 検出系一体型アプタマーアレイ技術の開発とパツリンアプタマーへの応用

14:22 ○冨田康之[1], 森田悠治[1], 秋吉妙子[1], 菅 裕明[2], 藤原大介[1]（[1]キリン・基盤研, [2]東大院理・化学専攻）

2C01p04 fNIRS を用いたビールの香り提示時の脳機能計測

14:33 ○小島英敏[1], 渕本 潤[1], 丸山弘明[1], 荒木茂樹[1], 執行達朗[1], 坂井信之[2]（[1]サッポロビール・価値創造フロンティア研究所, [2]東北大院文）

2C01p05 混ぜるだけで導入可能な細胞内温度計測用の新規蛍光性温度センサーの開発

14:44 ○辻 俊一[1], 吉田 聡[2], 吉田有人[1], 内山聖一[3]（[1]キリン・基盤研, [2]キリン・酒類研, [3]東大院・薬）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2C01p07 Fabricating Small-Scale Structures for Various Biomedical Applications via an Inexpensive and Easy-to-Handle Approach

15:05 Chung-Yao Yang, ○Yu-Tsyr Huang, J. Andrew Yeh, Chao-Min Cheng（Institute of Nanoengineering and Microsystems, National Tsing Hua University）

2C01p08 Food Safety Monitoring via Cotton-based Diagnostic Devices

15:16 ○Shang-Chi Lin, Ting-Chu Lin, Fan-Gang Tseng, Chao-Min Cheng（National Tsing-Hua University）

2C01p09 Portable Diagnostic Devices for Monitoring Food Safety through a Combination of Using Paper and

String

15:27 ○Kuan-Hung Chen, Hsi-Kai Wang, Jhih-yan Cheng, Chao-Min Cheng（National Tsing-Hua University）

2C01p10 Using Hydrophobic and Hydrophilic Leaves as a Template to Prepare the Polymeric Substrate

15:38 ○Shu-Ting Fan, Jyun-Yu Lin, Chao-Min Cheng（Institute of NanoEngineering and MicroSystems, National Tsing-Hua University）

2C01p11 In Situ Examination of Tea Drinks by Using Smartphone via a Combination of Paper-Based Device and Fluorescence Image Recording System

15:49 ○Shih-Jie Lo[1], Ting-Lan Wang[1], Jung-Chun Kao[2], Da-Jeng Yao[1], Chao-Min Cheng[1]（[1]Institute of Nanoengineering and Microsystems, National Tsing Hua University, [2]Department of Computer Science, National Tsing Hua University）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2C01p13 Lignocellulosic-based Diagnostic Device

16:10 ○Chen-Meng Kuan, Ting-Yu Chen, Chao-Min Cheng（Institute of Nanoengineering and Microsystems, National Tsing Hua University）

2C01p14 質量分析イメージングによる傷害ストレス条件下でのトマト果実代謝物分布の可視化

16:21 ○中村純也[1]，三浦大典[2]，藤村由紀[2]，割石博之[2,3]（[1]九大院生資環，[2]九大レドックスナビ，[3]九大基教）

2C01p15 ラジカル補足剤 DBNBS を利用した抗酸化活性評価

16:32 ○浜崎武記[1]， 中西 恵[1,2]， 中道 昇[1]， 樺山 繁[3]，石井嘉時[4]，照屋輝一郎[1,2]，白畑實隆[1,2]（[1]九大院農，[2]九大院システム生，[3](株)日本トリム，[4](株)日田天領水）

2C01p16 安定同位体標識された幼木の多次元核磁気共鳴法による代謝流束およびバイオマス解析

16:43 大石梨紗[3]， ○小松功典[1,2]， 篠阿弥宇[2]， 菊地 淳[1,2,3,4,5]（[1]横市大院生命医，[2]理研 CSRS，[3]横市大院生命ナノ，[4]理研 BMEP，[5]名大院生命農）

2C01p17 シグナル帰属の困難な海藻混合物への新規多次元 NMR 解析法の構築

16:54 ○伊藤研悟[1]， 小松功典[1]， 坂田研二[2]， 伊達康博[1,2]，菊地 淳[1,2,3,4]（[1]横市院生命医，[2]理研 CSRS，[3]理研 BMEP，[4]名大院生命農）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2C01p19 小型表面プラズモン共鳴センサーによるがんワクチン適格性判定

17:15 ○奥村史朗[1]， 川内 強[2]， 岩倉宗弘[3]， 小松誠和[4]，久原 哲[5]，伊東恭悟[4]（[1]福岡県工技セ，[2]久留米リサーチパーク，[3]九州計測器，[4]久留米大医，[5]九大院農）

2C01p20 ポテンショメトリッククーロメトリ法の開発

17:26 聶 其華[1]， ○北隅優希[1]， 白井 理[1]， 山本雅博[2]，加納健司[1]（[1]京大院農，[2]甲南大理工）

2C01p21 チャネル形成剤 - アンホテリシン B- によるイオンおよびグルコースの 脂質二分子膜透過とコレステロールの役割

17:37 ○白井 理，籠橋宏樹，北隅優希，加納健司（京大院農）

2C01p22 リアルタイム PCR による食品などの遺伝子解析方法の検討

17:48 ○坂口大介，原 宏佳，渋井達郎（日本獣医生命科学大院応 食品バイオテクノロジー教室）

2C01p23 環境中の亜リン酸動態モニタリングのための簡便な亜リン酸検出法の開発

17:59 ○作田敦士[1]，廣田隆一[2]，池田 丈[2]，黒田章夫[2]（[1]広島大工，[2]広島大院先端物質・分子生命）

C02 会場 午前の部（9:22〜12:05）

動物―生理・栄養，生体機能，生体制御―

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

2C02a03 アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド高含有醤油の開発とその降圧効果

9:22 ○仲原丈晴，杉本勝俊，山口仁美，内田理一郎（キッコーマン(株)）

2C02a04 ガーリック由来香気成分 diallyl trisulfide による血小板凝集の抑制とそのメカニズムについて

9:33 ○佐藤明日香，細野 崇，関泰一郎（日本大院生資科）

2C02a05 第 1 相薬物代謝酵素シトクロム P450 2E1 の発現の特徴と diallyl trisulfide による抑制メカニズム

9:44 ○荒木彩花，久宮彩乃，秋葉知奈，山口花梨，細野 崇，関泰一郎（日本大生資科生命）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2C02a07 LPS 誘導性炎症反応に対するアスコルビン酸の防御効果

10:05 ○徳田優希[1]， 川出野絵[1]， 辻野祥伍[1]， 小林美里[1]，村井篤嗣[1]，伊藤浩行[2]，堀尾文彦[1]（[1]名大院生命農・応用分子生命科，[2]近畿大・生物理工）

2C02a08 茶抽出物の骨粗鬆症改善効果について

10:16 ○橋本尚央子，松田智子，西尾昌洋，梅川逸人（三重大院生物資源）

2C02a09 重合度の異なる β-1,3- グルカンの気管支喘息モデルマウスに対する影響

10:27 ○中川奈美，西尾昌洋，松井亜衣，磯野直人，梅川逸人（三重大院生物資源）

2C02a10 アカメガシワ葉粉末及びその抽出成分の摂取によるラット皮膚への影響

10:38 ○周 洲[1]， 中村麻里[1]， 原 早織[1]， 平野夏子[1]，山根拓実[1]， 服部一夫[1]， 田畑光正[2]， 勝部拓矢[2]， 大石祐一[1]（[1]東農大・応生科，[2]島根県産業技術）

2C02a11 骨細胞におけるミトコドリア抗酸化酵素 Sod2 の骨リモデリング制御機構

10:49 ○清水孝彦[1]， 小林慶司[1,2]， 野尻英俊[2]， 渡辺憲史[1]，小澤裕介[1]，金子和夫[2]，横手幸太郎[1]（[1]千葉大院医，[2]順天堂大院医）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2C02a13 骨における *Mab21l1* 遺伝子の機能解析

11:10 ○吉満 和，小島拓哉，高橋直樹（東大院農生科応生化）

2C02a14 マウス脂肪組織における *Mab21l1* 遺伝子の機能解析

11:21 ○小栗 晶，小島拓哉，高橋直樹（東大院農）

2C02a15 転写因子 Bcl11b の脂肪細胞分化における機能の解析

11:32 ○塚本大介， 井原悠介， Shimizu Makoto， 井上 順，佐藤隆一郎（東大院農生科）

2C02a16 アンドロゲンによる形態的性差を生み出す分子メカニズムの解明

11:43 ○鈴木堅太郎[1]， 沼田朋和[1]， 松下祥子[1]， 鈴木裕子[1]，横山智哉子[1]，高橋 智[2]，山田 源[1]（[1]和歌山県立医大先端研，[2]筑波大医学医療系解剖発生）

2C02a17 ムスクの香りを感知する受容体と脳領域の決定

11:54 ○白須未香[1,2]， 吉川敬一[1]， 高井佳基[1]， 中嶋 藍[3]，竹内春樹[3]，坂野 仁[3]，東原和成[1,2]（[1]東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻，[2]JST ERATO 東原化学感覚シグナルプロジェクト，[3]福井大学医学部医学科高次脳機能領域）

C02 会場　午後の部（14:00〜17:59）

動物—生理・栄養，生体機能，生体制御—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2C02p01　肥満白色脂肪組織の慢性炎症像を可視化する非侵襲イメージングモデルマウスの作出
14:00　○真田洋平[1]，　山本岳史[1]，　金井すみれ[2]，　中村美奈子[2]，加藤範久[1]，Fons A.J. van de Loo[3]，矢中規之[1]（[1]広島大院 生物圏，[2]広島大　生物生産，[3]Radboud University Nijmegen Medical Centre）

2C02p02　摂食パターンは脂肪の分布を変化させ体重増加に影響を与える
14:11　○大路拓巳[1]，　香川祐輝[1]，　久宮彩乃[1]，　秋葉知奈[2]，伊藤友香[2]，長須賀美紀[2]，中野絵里香[2]，新國美由[2]，船戸里香[2]，矢口真実[2]，山口花梨[2]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]（[1]日本大院　生資科，[2]日本大　生資科）

2C02p03　摂食タイミング異常による肝臓時計異常と脂質代謝異常
14:22　○小田裕昭[1]，　片岡裕太郎[1]，　小林　悟[1]，　望月　聡[2]（[1]名古屋大院生命農，[2]大分大教育）

2C02p04　肥満に伴う脂肪組織炎症が白色脂肪細胞における UCP1 発現誘導に与える影響
14:33　○新田貴大[1]，　坂本智弥[1]，　丸野晃嗣[1]，　後藤　剛[1,2]，高橋信之[1,2]，河田照雄[1,2]（[1]京大院農・食品生物，[2]京大　生理化学研究ユニット）

2C02p05　ob/ob マウス糞便に含まれる起炎症性分子の探索
14:44　○真田峻佑，大島寛史，三好規之（静県大院薬食生命）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2C02p07　五加の実がマウス脂質代謝に及ぼす影響
15:05　○齋藤哲男，西田美也子，永塚貴弘，西田浩志（新潟薬科大学）

2C02p08　胎児・乳児期における過剰栄養状態は成長後の生体内脂質過酸化を亢進させる
15:16　○伊藤隼哉[1]，　加藤俊治[1]，　木村ふみ子[1]，　仲川清隆[1]，宮澤陽夫[1,2]（[1]東北大院農，[2]東北大学未来科学技術共同研究セ）

2C02p09　高脂肪食摂取により変動する表皮タンパク質のプロテオーム解析
15:27　○梅澤　悠，大高万実，黒木　鷹，山根拓実，服部一夫，大石祐一（東農大・応生科）

2C02p10　UVB 照射がヘアレスマウスの肝臓 TGF β 1 と PAI-1 遺伝子発現に及ぼす影響
15:38　○松居　翔，上杉康之，長野真帆，山根拓実，服部一夫，大石祐一（東農大・応生科）

2C02p11　非アルコール性脂肪肝に及ぼす BCG 菌投与の影響
15:49　○稲福征志，屋　宏典（琉球大熱生研）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2C02p13　経口摂取したロイシンの骨格筋同化シグナルへ及ぼす PGC-1 α の影響
16:10　○吉村亮二[1]，　佐藤沙耶[1]，　南貴美子[1]，　只石　幹[2]，三浦進司[3]，亀井康富[1]（[1]京府大院生環，[2]国立健康栄養研，[3]静岡県大食栄）

2C02p14　1 日の低タンパク質食摂取が成長期のラット肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響
16:21　○尾崎　依[1]，　斉藤憲司[2]，　中澤京子[2]，　伯野史彦[3]，高橋伸一郎[3]，加藤久典[2]，竹中麻子[1]（[1]明治大農・農化，[2]東大・総括寄付講座「食と生命」，[3]東大・院・農生科）

2C02p15　タンパク質低栄養による肝臓脂質蓄積機構
16:32　○竹之内柚貴乃[1]，　大谷りら[2]，　蟹沢壮平[1]，　小幡祐子[1]，関亜理砂[1]，加藤久典[2]，竹中麻子[1]（[1]明治大学農，[2]東大・総括プロジェクト機構）

2C02p16　リポポリサッカライド投与は低タンパク質食による肝臓脂質蓄積を抑制する
16:43　○小幡祐子，　蟹沢壮平，　関亜理砂，　竹之内柚貴乃，竹中麻子（明治大農）

2C02p17　アミノ酸欠乏培地で培養した肝細胞ではインスリン受容体基質（IRS）-2 量が増加し脂肪蓄積が起こる
16:54　○森　友美[1]，　亀井宏泰[1]，　赤西成美[1]，　尾添淳文[1]，伯野史彦[1]，　千田和広[1]，　加藤久典[2]，　豊島由香[3]，　竹中麻子[4]，高橋伸一郎[1]（[1]東大・院・農生科，[2]東大・総括プロジェクト機構，[3]日本医大・老研，[4]明治大・農）

p19〜p22 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2C02p19　乳児期における栄養状態が成長後の健康状態に与える影響
17:15　○本間太郎，畠山雄有，北野泰奈，鄂　　爽，山本和史，都築　毅（東北大院・農）

2C02p20　脂質の種類と量がインスリン抵抗性に及ぼす影響について
17:26　○佐藤友宏[1]，　江口　輝[1]，　佐藤明日香[1]，　船戸里香[2]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]（[1]日本大院生資科，[2]日本大生資科）

2C02p21　プテロスチルベンの抗糖尿病作用解析
17:37　○古橋慶亮，三浦　豊，矢ヶ崎一三（東京農工大院農）

2C02p22　短梗五加葉抽出物による脂肪細胞分化および骨格筋細胞の AMPK 活性化作用
17:48　○西田美也子，　平山匡男，　金崎桃子，　伊藤大貴，永塚貴弘，小西徹也，佐藤眞治，西田浩志（新潟薬大・応生科）

C03 会場　午前の部（10:27〜11:54）

動物—遺伝子・タンパク質－発現制御—

a09〜a11 発表者の接続時間 10:17〜10:27

2C03a09　トキシコゲノミクスデータベースを用いた肝臓肥大の遺伝子発現制御ネットワークの構築
10:27　○古川竜矢，荒木啓充，久原　哲（九州大院農）

2C03a10　カロリー制限を施したラットの DNA マイクロアレイデータを用いた発現変動遺伝子の同定方法の検討
10:38　○山本祐生[1]，権　娟大[2]，宮崎　智[2]（[1]東京理科大院・薬，[2]東京理科大・薬）

2C03a11　低タンパク質食摂取は mTORC1 経路を介して IGFBP-1 mRNA 量を増加させる
10:49　○日野美佳，竹内香菜恵，竹中麻子（明治大農）

a13〜a16 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2C03a13　MIG12 による ACC ポリマー化亢進機構の解明
11:10　○和泉彬子，池内江美奈，宮田慎吾，Shimizu Makoto，井上　順，佐藤隆一郎（東大院農生科）

2C03a14　ストレス刺激により発現上昇する FGF21 の機能解析
11:21　○丸山竜人[1]，　SHIMIZU Makoto[1]，　井上　順[1]，伊藤信行[2]，佐藤隆一郎[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]京大院・薬）

2C03a15　様々なストレス刺激における FGF19 の発現調節
11:32　○森本ひとみ，清水　誠，井上　順，佐藤隆一郎（東大院農）

2C03a16　SREBP-2 はヒト消化管由来細胞で FGF19 の FXR 依存的な転写を負に調節する
11:43　○宮田昌明[1,2]，畑　竜也[1]，山添　康[1]，吉成浩一[1]（[1]東北大院薬，[2]水大校）

C03 会場　午後の部（14:00〜17:59）

動物—遺伝子・タンパク質－発現制御—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2C03p01　SUMO 化によるパーキンソン病関連転写因子 PARIS（ZNF746）の転写抑制活性の調節

14:00 ◦西田　有，山田芳司（三重大・生命科学研究支援センター）

2C03p02　記憶形成能力に対する前脳領域におけるレチノイン酸情報伝達系の役割の解析

14:11 ◦海老原てい[1]，　篠沢貴寛[1]，　野本真順[1]，　武田陽平[1]，内田周作[1]，喜田　聡[1,2]（[1]東京農大院，[2]科学技術振興機構 CREST）

2C03p03　社会的認知記憶に基づく新規性認識メカニズムの組織学的解析

14:22 ◦谷水俊之[1]，　門間和音[1]，　岡野絵美子[1]，　張　　悦[1,2]，福島穂高[1,2]，喜田　聡[1,2]（[1]東農大院農，[2]科学技術振興機構）

2C03p04　前脳領域 BMAL1 による記憶想起のサーカディアン制御

14:33 ◦長谷川俊介[1,2]，　細田浩司[1]，　張　　悦[1,2]，　太田美穂[1]，岡田辰太郎[1]，谷水俊之[1]，Frankland Paul[3]，Josselyn Sheena[3]，喜田　聡[1,2]（[1]東農大応生科バイオ，[2]科学技術振興機構 CREST，[3]トロント大学）

2C03p05　転写因子 CREB の恒常的活性化は学習速度を向上させる

14:44 ◦芹田龍郎[1]，　福島穂高[1,2]，　喜田　聡[1,2]（[1]東京農大院，[2]JST・CREST）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2C03p07　カルシニューリンを起点とした想起後の受動回避記憶強化

15:05 ◦福島穂高[1,2]，　張　　悦[1,2]，　石川理絵[1]，　金　　亮[1]，喜田　聡[1,2]（[1]東京農大・応生科・バイオ，[2]JST, CREST）

2C03p08　NMDA 受容体阻害剤メマンチンによる海馬依存性記憶の破壊

15:16 ◦石川理絵[1]，　Paul W. Frankland[2]，　喜田　聡[1,3]（[1]東農大院・農・バイオ，[2]University of Toronto，[3]CREST,JST）

2C03p09　恐怖記憶固定化に対するヒストン修飾の役割の解析

15:27 ◦天野翔次郎[1]，喜田　聡[1,2]（[1]東農大院・農・バイオ，[2]CREST, JST）

2C03p10　海馬におけるポリ ADP リボシル化による恐怖記憶の制御

15:38 ◦稲葉洋芳[1]，塚越昭紀[1]，喜田　聡[1,2]（[1]東京農大院・農・バイオ，[2]JST・CREST）

2C03p11　ビタミン B1 欠乏は海馬依存的学習・記憶形成の障害を誘導する

15:49 ◦岸本拓也[1]，　大石　諭[1]，　永田　幹[1]，　長谷川俊介[1,2]，喜田　聡[1,2]（[1]東農大院農，[2]科学技術振興機構・CREST）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2C03p13　マウスとヒト組織における哺乳類キチナーゼ mRNA レベルの解析

16:10 ◦大野美紗[1]，　富樫勇斗[1]，　津田京子[1]，　大川一明[1]，釜谷美則[2]，坂口政吉[1]，菅原康里[1]，小山文隆[1]（[1]工学院大学工学部応用化学科，[2]工学院大学工学部環境エネルギー化学科）

2C03p14　転写因子 ATF5 による嗅覚受容体の発現調節

16:21 ◦金子将人，　雨宮ゆう子，　中野春男，　梅村真理子，高橋　滋，高橋勇二（東薬大生命・環境応用動物）

2C03p15　プロリン異性化酵素 Pin1 による P 糖タンパク質の発現制御機構の解析

16:32 ◦川邉庸介，坂場義正，内田隆史（東北大院農）

2C03p16　GATA2 によるマスト細胞の ST2 遺伝子発現制御機構

16:43 ◦笠倉和巳[1]，　八代拓也[1]，　奥村　康[2]，　西山千春[1]（[1]東京理科大学 生物工，[2]順天堂大学 医 免疫学）

2C03p17　樹状細胞における OX40L 発現制御機構の解析

16:54 ◦八代拓也[1]，奥村　康[2]，西山千春[1,2]（[1]東京理科大基礎工，[2]順大医）

p19〜p22 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2C03p19　骨格筋 LPL 発現調節における AMPK の役割

17:15 ◦佐々木崇[1]，　中田理恵子[2]，　井上裕康[2]，　清水　誠[1]，井上　順[1]，佐藤隆一郎[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]奈良女大院・人文科・食栄）

2C03p20　ゼブラフィッシュを用いた Chondromodulin-I の軟骨特異的な転写制御機構の解析

17:26 ◦山下　寛[1]，宿南知佐[1,2]，開　祐司[1]（[1]京都大・再生研，[2]広島大・医歯薬保健研究院）

2C03p21　受動的 DNA 脱メチル化に伴う DNA 損傷誘導機構の解明

17:37 ◦奥村克純，栗谷健志，生野彰宏，吉村　健，来馬啓介，伊藤　克（三重大院生物資源）

2C03p22　5- ブロモデオキシウリジンによる老化応答遺伝子のヌクレオソーム構造の変化

17:48 ◦末松佑理，山上義巳，三木健輔，藤井道彦，鮎沢　大（横浜市大生命ナノ）

C04 会場　午前の部（9:11〜12:05）

植物—遺伝子ー構造解析，ゲノム，遺伝，変異遺伝子ー機能，発現制御—

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

2C04a02　次世代シークエンサーを用いた，マーカーフリー米型経口ワクチン MucoRice-CTB の複数系統および野生型の変異解析および比較

9:11 ◦鹿島光司[1,2]，　目島未央[1]，　黒田昌治[3]，　竹山夏実[1]，黒河志保[1]，福山賀子[1]，清野　宏[1]，幸　義和[1]（[1]東大医科研，[2]朝日工業社，[3]中央農研北陸セ）

2C04a03　ウンシュウミカンのトランスクリプトーム解析

9:22 ◦永野幸生，三村高史，松本亮司（佐賀大）

2C04a04　ナショナルバイオリソースプロジェクト「トマト」における Micro-Tom を基盤としたトマトリソースの整備

9:33 ◦四方雅仁[1]，　星川　健[1]，　有泉　亨[1]，　福田直也[1]，久保康隆[2]，金山喜則[3]，青木　考[4]，江面　浩[1]（[1]筑波大生命環境，[2]岡山大院自然科学，[3]東北大院農学，[4]大阪府立大院生命環境科学）

2C04a05　紫外線照射で生じる植物ゲノムの突然変異の検出及び解析

9:44 ◦中村宗久[1]，　長谷部航[1]，　牧野耕三[1]，　布柴達男[2]，平津圭一郎[1]（[1]防衛大，[2]国基大）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2C04a07　発芽期大豆種子からクローニングされた糖転移酵素遺伝子の特徴付け

10:05 ◦河上茉奈実[1]，　市村悠子[1]，　御園久代[1]，　佐藤光朗[2]，小島俊雄[2]，高原英成[2]，白岩雅和[1]（[1]茨城大院農・食品生化，[2]茨城大院農・分子生化）

2C04a08　ジャガイモ塊茎を形成するストロンの原基である地中腋芽における *RanGTPase1* 遺伝子 の発現解析

10:16 加藤　彰[1]，　福井由記[1]，　蘆田弘樹[1]，　明石欣也[1]，梶川昌孝[1]，重岡　成[2]，◦横田明穂[1]（[1]奈良先端大バイオ，[2]近畿大農）

2C04a09　ジャガイモ・ストロン分化時に発現する遺伝子の網羅的な解析

10:27 ◦加藤　彰[1]，重岡　成[2]，横田明穂[1]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]近畿大・農）

2C04a10　イネにおけるサクラネチン生合成酵素遺伝子のジャスモン酸依存的な発現制御機構の解明

10:38 ◦小川哲史[1]，　清水崇史[1]，　山根久和[1,2]，　野尻秀昭[1]，岡田憲典[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]帝京大・バイオ）

2C04a11　イネの免疫反応に関与する *PR* 遺伝子の発現制御に関与する新規転写因子の同定

10:49 ◦宇野雄太[1]，　平井洋行[1]，　四井翔太[1]，　寺沢勇治[1]，堀家史哉[2]，久保健一[3]，仲下英雄[4]，蔡　晃植[1]（[1]長浜バイオ大・院バイオ，[2]長浜バイオ大学・バイオ，[3]奈良先端科学技術大学大学院，[4]東農大・応生化）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2C04a13　シロイヌナズナ熱ショック転写因子 HsfA2 の Ca^{2+} シグナリングによる発現制御機構の解明
11:10 ○中村朋美[1]，野坂亮太[1]，小林宏太[1]，田部記章[2]，薮田行哲[3]，丸田隆典[4]，田茂井政宏[1,2]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]鳥取大・農・生資環，[4]島根大・生資科・生命工）

2C04a14　モモ黄肉種に存在するカロテノイド代謝酵素 *CCD4* の変異
11:21 深松陽介[1]，田村隆行[2]，日原誠介[2]，○小田賢司[1]（[1]岡山生物研，[2]岡山県農総センター農業研）

2C04a15　緑藻 *Euglena gracilis* における *trans*-2-エノイル-CoA レダクターゼの同定と機能解析
11:32 ○冨山拓矢[1]，玉木　峻[1,3]，山口由貴[1,3]，羅　軍[1,3]，吉田勇太[1]，丸田隆典[1,3]，澤　嘉弘[1]，重岡　成[2,3]，石川孝博[1,3]（[1]島根大・生物資源・生命工，[2]近畿大・農・バイオ，[3]JST・CREST）

2C04a16　ヒメツリガネゴケのアスコルビン酸生合成調節に関わる *VTC3* 遺伝子の発現解析
11:43 ○袖山　翼[1]，原井健司[1]，丸田隆典[1]，澤　嘉弘[1]，重岡　成[2]，石川孝博[1]（[1]島根大・生資科・生命工，[2]近畿大・農・バイオ）

2C04a17　ズッキーニにおけるダイオキシン類の取り込みに係わる遺伝子の機能解析
11:54 ○乾　秀之[1,2]，廣田又士[2]，後藤純弥[2]，吉原亮平[1]，兒玉典子[2]，松井智美[2]，山崎清志[2]，殷　熙洙[3]（[1]神戸大遺伝子，[2]神戸大院農，[3]農環研）

C04 会場　午後の部（14:00〜17:59）

植物—植物ホルモン，成長調節物質—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2C04p01　イネにおけるモミラクトン輸送体遺伝子の探索
14:00 ○千葉光浩[1]，菅野裕理[2]，岡田憲典[3]，長谷川守文[4]，三橋　渉[1]，瀬尾光範[2]，豊増知伸[1]（[1]山形大農，[2]理研 CSRC，[3]東大生物工学セ，[4]茨城大農）

2C04p02　植物病害抵抗性の抑制化合物の構造展開
14:11 ○栗本哲哉，姜　凱，徐　銀卿，中村英光，浅見忠男（東大院・農生科）

2C04p03　新奇エチレン様活性物質の構造活性相関及び生理作用解析
14:22 ○堅固山裕子[1,2]，北畑信隆[3]，安藤卓也[1,2]，浅見忠男[1,2]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]科学技術振興機構・CREST，[3]東理大・理・応用生物科学科）

2C04p04　雌雄異花植物テンナンショウの性転換に関わる化学物質の探索
14:33 井上智宏[1]，池田修也[2]，渡辺修治[3]，○大西利幸[2,4]（[1]静大農，[2]静大院農，[3]静大院工，[4]静大グリーン研）

2C04p05　部位特異的に作用するジベレリン受容体阻害剤の選抜と機能解析
14:44 ○尹　禎敏，安藤卓也，福井康祐，大谷征史，Park Seung-Hyun，中嶋正敏，浅見忠男（東大院・農生科・応生化）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2C04p07　側枝形成における植物ホルモンを介した糖シグナリングの関与
15:05 ○大鳥久美[1,2]，福井祥太[1]，Daniel Padilla-Chacon[1,2]，田部記章[1,2]，田茂井政宏[1,2]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大・農・バイオ，[2]JST・CREST）

2C04p08　Characterization of physiological roles of PYR/RCAR/PYL in *Arabidopsis*
15:16 ○Kai JIANG，Eun-kyung Seo，Hidemitsu Nakamura，Tadao Asami（The Univ. of Tokyo）

2C04p09　イネの ABA 受容体 OsPYL の機能解析
15:27 ○地頭広貴[1]，竹内　純[2]，大西利幸[1,3]，轟　泰司[1,3]（[1]静大院農，[2]静大院創造，[3]静大グリーン研）

2C04p10　高等植物における ABA 信号伝達因子の細胞周期制御系への関与について
15:38 ○二村美恵，阿部央樹，高橋伸明，豊増知伸，三橋　渉（山形大学農）

2C04p11　PYL アンタゴニスト PAO4 の生化学的機能解析
15:49 ○竹内　純[1]，岡本昌憲[2]，大西利幸[3]，轟　泰司[1,3,4]（[1]静大院創造，[2]鳥取大乾燥地研究センター，[3]静大院農，[4]静大グリーン研）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2C04p13　新規ストリゴラクトンミミックの合成と活性評価
16:10 ○加藤雄太[1]，福井康祐[1,2]，太田　鋼[1]，中村英光[1,2]，浅見忠男[1,2]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]JST CREST）

2C04p14　デブラノン類はストリゴラクトンの複数の作用を個別にミミックできる
16:21 ○福井康祐[1,2]，加藤雄太[1]，山上大智[1,2]，中村英光[1,2]，浅見忠男[1,2]（[1]東大院農生科応生化，[2]JST-CREST）

2C04p15　タルウマゴヤシが生産するストリゴラクトン medicaol の生合成経路解析
16:32 ○徳永珠美[1]，謝　肖男[2]，米山弘一[2]，秋山康紀[1]（[1]阪府大院・生命環境，[2]宇都宮大・雑草科学）

2C04p16　ソルガムにおける 5-deoxystrigol から sorgomol への変換反応
16:43 ○上野琴巳[1]，本並宜子[1]，中嶌　瞳[1]，水谷正治[1]，滝川浩郷[1,2]，杉本幸裕[1,2]（[1]神戸大院農，[2]JST/JICA, SATREPS）

2C04p17　Isolation and structural determination of novel germination stimulant produced by maize
16:54 ○PICHIT KHETKAM[1,2]，Takaya Kisugi[1]，Xiaonan Xie[1]，Kaori Yoneyama[1]，Takahito Nomura[1]，Koichi Yoneyama[1]（[1]Weed Sci. Center, Utsunomiya Univ.，[2]United Grad. School of Agric. Sci., Tokyo Univ. of Agric. and Technol.）

p19〜p22 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2C04p19　植物におけるインドール-3-酢酸生合成機構の解析
17:15 ○増口　潔，神谷勇治，榊原　均，笠原博幸（理研・環境資源科学研究センター）

2C04p20　オーキシン代謝における C24 エチルステロールの生理機能解明
17:26 ○中本雅俊，太田大策（大府大院生命環境）

2C04p21　昆虫におけるインドール酢酸生合成
17:37 ○鈴木宏佳[1]，横倉淳平[1]，伊藤つかさ[1]，永田晋治[2]，浅見忠男[3]，鈴木義人[1]（[1]茨城大農，[2]東大院新領域，[3]東大院農生科）

2C04p22　IAA 生合成阻害剤を用いたオーキシン関連変異体の探索
17:48 ○安藤卓也[1,2,7]，中村英光[1,7]，近藤陽一[4]，松井　南[4]，長田裕之[2,3]，仲野雄司[2,5,7]，嶋田幸久[6]，浅見忠男[1,7]（[1]東大院・応生化，[2]理研・抗生物質，[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[4]理研 CSRS・合成ゲノミクス，[5]理研 CSRS・機能開発，[6]横浜市大・木原生物学研究所，[7]科学技術振興機構・CREST）

C05 会場　午前の部（9:00〜12:05）

植物—植物工学－育種，物質生産，形質転換—

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

2C05a01　ショ糖による翻訳制御を受けるトマト bZIP 型転写因子遺伝子の特徴づけ

9:00 ○田中　俊[1]，井澤　翔[1]，ベルベリッヒトーマス[2]，草野友延[1]（[1]東北大院生命，[2]BiK-F）

2C05a02　スクロース誘導性プロモーターを用いた *Nicotiana plumbaginifolia* 毛状根における GUS の高発現

9:11 ○本間洋平，山川　隆（東大院農）

2C05a03　サツマイモ由来 Rubisco small subunit プロモーターの単離と発現解析

9:22 ○田部記章[1,2]，豊田雄介[1]，大鳥久美[1,2]，Padilla-Chacon Daniel[1,2]，田茂井政宏[1,2]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大・農・バイオ，[2]JST, CREST）

2C05a04　バイオディーゼル燃料植物ヤトロファの遺伝子導入系の最適化

9:33 ○七里吉彦，木戸真史，明石欣也（鳥取大農）

2C05a05　植物の形質転換に有用な特性を持つリゾビウム属細菌作出法の改良

9:44 ○山本真司，鈴木克周（広島大院理）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2C05a07　複数遺伝子の発現が可能な植物形質転換用リサイクルベクターシステムの開発

10:05 芝原健太[1]，○田中優史[1]，木村哲哉[2]，中川　強[1]（[1]島根大・総科センター・遺伝子，[2]三重大院・生物資源）

2C05a08　Development of Dual Site R4 Gateway Binary Vector System Driven by Any Desired Promoter for Plant Transformation

10:16 ○Mostafa ABOULELA，Tsuyoshi NAKAGAWA（Shimane University）

2C05a09　保存野菜からの PCR 用 DNA の最簡便抽出・検出法 "10-sec Prep"

10:27 ○望月峰子[1]，清水正則[2]，小林裕和[1]（[1]静岡県大・院薬食生命・食品栄養科学，[2]常葉大・健康プロデュース）

2C05a10　米型経口コレラワクチン Marker Free MucoRice-CTB のイネゲノム導入部位と導入配列について

10:38 ○目島未央[1,2]，鹿島光司[2]，黒田昌治[3]，竹山夏実[2]，黒河志保[2]，福山賀子[2]，清野　宏[2]，三ツ井敏明[1]，幸　義和[2]（[1]新潟大院・自然科学，[2]東大・医科研，[3]中央農研・北陸セ）

2C05a11　作物の多系統少量種子生産に適したグロースチャンバーでの簡便省力水耕栽培法

10:49 ○黒田昌治[1]，池永幸子[2]（[1]農研機構中央農研，[2]農研機構東北農研）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2C05a13　日本在来藍のインディカン生産に対するストレスホルモンおよび紫外線の影響

11:10 ○高田雄輔[1]，松川哲也[1,2]，堀端　章[1,2]，梶山慎一郎[1,2]（[1]近大生物理工，[2]近大院生物理工）

2C05a14　イネ種子プロテインボディタイプ I（PB-I）におけるプロラミン蓄積機構の解析

11:21 ○佐生　愛[1]，重光隆成[1]，森田重人[1,2]，佐藤　茂[1,2]，増村威宏[1,2]（[1]京都府大院・生命環境，[2]京都農技セ・生資セ）

2C05a15　Production of Human Glucocerebrosidase in Nicotiana benthamiana Plants

11:32 ○Juthamard LIMKUL[1]，Ryo MISAKI[1]，Ko KATO[2]，Kazuhito FUJIYAMA[1]（[1]Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.，[2]Grad. Sch. Biological Sciences, Nara Inst. Science Technol.）

2C05a16　植物細胞に対するオリゴアルギニンと *p* VEC の透過性の比較

11:43 ○橋野友里恵，宮下正弘，宮川　恒（京都大院農）

2C05a17　イネの SPK に対する RNAi 遺伝子の誘導的発現抑制による貯蔵デンプン生合成のスイッチング制御の試み

11:54 ○山本祐子，阿部孝太，竹田　遥，竹本佳奈子，草野博彰，島田浩章（東京理科大生物工）

C05 会場　午後の部（14:11〜17:37）

植物―植物栄養，光合成，オルガネラ，膜輸送―

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

2C05p02　ホウ酸トランスポーター BOR1 の極性局在の意義

14:11 ○笠井光治，藤原　徹（東大院農）

2C05p03　*AtMRS2-4* is a transporter required for the maintenance of Mg concentration in *Arabidopsis*

14:22 ○Koshiro ODA[1]，Takehiro KAMIYA[1]，Shuji SHIGENOBU[2]，Katsushi YAMAGUCHI[2]，Toru FUJIWARA[1]（[1]Univ. of Tokyo，[2]NIBB）

2C05p04　*Oryza sativa*（イネ）における窒素，リン欠乏感受性変異体 HCA7 の解析

14:33 ○吉永良平，大森良弘，藤原　徹（東大院農）

2C05p05　イネ培養細胞におけるムギネ酸類生合成酵素の局在解析

14:44 ○古賀悠介，長坂征治（東洋大院　生命科）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2C05p07　イネにおけるムギネ酸顆粒の研究

15:05 ○野副朋子[1]，長坂征治[1]，バシルクーラム[1]，高橋美智子[1]，小林高範[2]，中西啓仁[1]，西澤直子[2]（[1]東大院農，[2]石川県立大生物資源）

2C05p08　ダイズ 11S グロブリンの種子貯蔵液胞への輸送解析

15:16 ○丸山伸之[1]，奥田英子[1]，寺川輝彦[2]，石本政男[3]（[1]京大院農，[2]北興化学，[3]農生資研）

2C05p09　葉緑体蛋白質輸送における膜透過中間体の形成

15:27 ○秋田　充，ポハレマノジ，山本祐希，米永貴洋，今井綾奈（愛媛大農）

2C05p10　シロイヌナズナ葉緑体アスコルビン酸取込み機構の解明

15:38 ○竹内　崇[1]，丸田隆典[1]，澤　嘉弘[1]，重岡　成[2]，石川孝博[1]（[1]島根大・生資科・生命工，[2]近畿大・農・バイオ）

2C05p11　シアノバクテリアにおける酸素依存型代替的電子伝達系の役割と種間差

15:49 ○釋啓一郎，林　良祐，嶋川銀河，三宅親弘（神戸大院農）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2C05p13　ランソウにおける活性カルボニル解毒機構

16:10 ○嶋川銀河[1]，鈴木麻由実[1]，山本　宏[2]，三宅親弘[1]（[1]神戸大院農，[2]京都大院理）

2C05p14　*Synechococcus elongatus* PCC7942 における RuBisCO 発現量によるカルボキシソーム形成制御

16:21 ○蘆田弘樹[1,2,3]，向川佳子[1]，横田明穂[1]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]神戸大院・人間発達環境学，[3]JST・さきがけ）

2C05p15　植物葉緑体のプリンヌクレオチド生合成制御における ppGpp の役割

16:32 ○野村勇太[1]，泉　厚志[3]，福永芳規[1]，楠見健介[2]，射場　厚[2]，中平洋一[3]，野澤　彰[3]，戸澤　譲[3]（[1]愛媛大院・理工，[2]九州大院・理，[3]愛媛大・PROS）

2C05p16　日本東海地方における社寺林の研究

16:43 ○高村　仁（高村生命科学研究所）

2C05p17　Analysis of nitrogen fixing bacteria in agricultural soil

16:54 ○Chalee KONGWICHIAN，Masaki MUKAI，Dinesh ADHIKARI，Motoki KUBO（Ritsumeikan Univ.）

p19〜p20 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2C05p19　土壌環境中における環境バクテリアとリン循環の関係解析

17:15 ○ADHIKARI Dinesh，仲林　聡，向　真樹，久保　幹（立命館大生命）

2C05p20　土壌肥沃度指標（SOFIX）を基盤とした実圃場における

バレイショ栽培

17:26 ○向　真樹，アディカリディネシュ，久保　幹（立命館大生命）

D01 会場　午前の部（9:22〜11:54）

酵素—酸化還元酵素—

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

2D01a03　補酵素非依存型酵素を利用したバニリン合成プロセスの開発

9:22 ○古屋俊樹，三浦美沙，木野邦器（早大理工・応化）

2D01a04　耐熱性向上型フルクトシルペプチドオキシダーゼの開発

9:33 ○鉞　陽介[1]，　一柳　敦[1]，　中津　亨[2]，　加藤博章[2]，五味恵子[1]（[1]キッコーマン研究開発本部，[2]京大院薬）

2D01a05　HbA1c 由来糖化ヘキサペプチドに作用するフルクトシルペプチドオキシダーゼの開発

9:44 ○一柳　敦[1]，　鉞　陽介[1]，　渡辺文太[2]，　中津　亨[3]，加藤博章[3]，五味恵子[1]（[1]キッコーマン研究開発本部，[2]京大化研，[3]京大院薬）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2D01a07　連続グルコース計測への応用を目指した真菌由来 FAD グルコース脱水素酵素の改良

10:05 ○坂井元気[1]，森　一茂[2]，小嶋勝博[2]，フェリステファノ[1]，早出広司[1,2]（[1]東京農工大院工，[2]有限会社アルティザイム・インターナショナル）

2D01a08　植物由来鉄電子移動系を用いた不斉酸化触媒（SanCat-S/-R）の開発

10:16 ○永岡宏行（サンヨー食品開発）

2D01a09　ヒト由来 CYP2R1 発現酵母を用いたビタミン D 25 位水酸化体の生成

10:27 ○安田佳織[1,2]，　遠藤真理子[1]，　生城真一[1]，　鎌倉昌樹[1]，太田美穂[3]，榊　利之[1]（[1]富山県大工，[2](株)TOPU バイオ研究所，[3]相愛大人間）

2D01a10　anammox 菌 KSU-1 株由来ヘテロ 2 量体シトクロム *c*（NaxLS）の軸配位子置換とそのヒドラジン合成反応への影響

10:38 ○大久保寛幹[1]，　市川智美[1]，　平　大輔[1]，　古川憲治[2]，藤井隆夫[1]（[1]崇城大応生命，[2]熊大院自然科学）

2D01a11　anammox 菌 KSU-1 株で発現している 2 種類の可溶性シトクロム *c* の同定と大腸菌発現

10:49 ○平　大輔[1]，野元美樹[1]，古川憲治[2]，藤井隆夫[1]（[1]崇城大応生命，[2]熊大院自然）

a13〜a16 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2D01a13　ギ酸 / 二酸化炭素対の可逆反応系に対する生物電気化学的アプローチ

11:10 ○阪井研人[1]，　河井翔太[1]，　高木一好[2]，　北隅優希[1]，白井　理[1,3]，加納健司[1,3]（[1]京都大院農，[2]立命館大理工，[3]CREST）

2D01a14　酸化還元酵素－電極界面電子移動の解明のためのアプローチ

11:21 ○河井翔太[1]，　北隅優希[1]，　白井　理[1]，　薬師寿治[2]，松下一信[2]，加納健司[1]（[1]京大院農，[2]山口大院農）

2D01a15　タンパク質バイオマスを原料とした酵素燃料電池用素子の開発

11:32 ○里村武範[1,2]，　川上竜巳[3]，　坂元博昭[1]，　櫻庭春彦[4]，大島敏久[5]，末信一朗[1,2]（[1]福井大院工，[2]福井大生命セ，[3]徳島大院総合，[4]香川大農，[5]大阪工大工）

2D01a16　分子内ケトンを持つ新規な酸化糖の酸化発酵を触媒する膜酵素

11:43 ○足立収生[1]，アワーズロケA.[2]，赤壁善彦[1]，阿野嘉孝[3]，品川恵美子[4]，片岡尚也[1]，薬師寿治[1]，松下一信[1]（[1]山口大学・農，[2]CINDEFI, UNLP，[3]愛媛大学・農，[4]宇部高専）

D01 会場　午後の部（14:00〜17:59）

酵素—酸化還元酵素—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2D01p01　グラム陰性菌由来 D 型乳酸脱水素酵素の機能 - 構造解析

14:00 ○古川那由太[1]，　戸川美里[1]，　宮永顕正[2]，　中島将博[1]，田口速男[1]（[1]東理大院理工，[2]東工大院理工）

2D01p02　好酸好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来の非リン酸化型グリセルアルデヒド -3- リン酸脱水素酵素におけるアロステリック制御にともなう構造変化

14:11 伊藤史晃，　三宅将之，　中村周吾，　清水謙多郎，伏信進矢，○若木高善（東京大学・院農生科・応生工）

2D01p03　*Tetragenococcus halophilus* 由来 D 型マンデル酸脱水素酵素ホモログの酵素学的性質

14:22 ○森田一弘[1]，　古川那由太[1]，　宮永顕正[2]，　中島将博[1]，田口速男[1]（[1]東京理科大院理工，[2]東京工業大院理工）

2D01p04　ヤスデにおけるマンデロニトリル酸化酵素の精製と諸性質の検討

14:33 ○市来弥生[1,2]，　森田將史[1,2]，　石田裕幸[1,2]，ダダシプールモハンマド[1,2]，山口拓也[1,2]，桑原保正[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大・生工研セ，[2]JST, ERATO）

2D01p05　Crystal structure of pyridoxine 4-oxidase from *Mesorhizobium loti*

14:44 ○ANDREW MUGO[1]，Jun Kobayashi[2]，Bunzo Mikami[2]，Taiji Yamasaki[1]，　Yu Yoshikane[1]，　Toshiharu Yagi[1]，Kouhei Ohnishi[1]（[1]Kochi Univ., [2]Kyoto Univ.）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2D01p07　高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の耐熱化イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の圧力耐性について

15:05 ○濱島裕輝[1,2]，　永江峰幸[3]，　赤沼哲史[4]，　山岸明彦[4]，今井竹夫[1]，渡邉信久[3,5]，牧野　龍[1]，山田康之[1]，加藤千明[2]（[1]立教大院生命，[2]海洋研究開発機構，[3]名大院工学，[4]東京薬科大生命，[5]名大シンクロトロン）

2D01p08　過酸化物分解酵素系　NADH oxidase（Nox）-AhpC（Prx）の複合体形成（第 5 報）

15:16 望月大地[1]，　新井俊晃[1]，　○原　敬太[1]，　有坂文雄[2]，松本　崇[3]，中川純一[4]，佐藤純一[1]，川崎信治[1]，新村洋一[1]（[1]東農大応生科・バイオ，[2]東工大生命理工・分子生命科学，[3]リガク，[4]東農大生物産業・食香）

2D01p09　金属還元細菌 *Geobacter sulfurreducens* のマルチヘムセレンタンパク質の複合体解析

15:27 杉山　慧[1]，　○嶌本奈々[1]，　谷　泰史[1,2]，　斎藤茂樹[1,2]，田島寛隆[1,2]，三原久明[1]（[1]立命館大・生命科学・生物工，[2]立命館大・R-GIRO）

2D01p10　メタン生成アーキアの膜脂質生合成に関わるフェレドキシンの特性評価

15:38 ○廣瀬加奈，磯部圭祐，吉村　徹，邊見　久（名大院生命農・応用分子生命科）

2D01p11　大腸菌ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼの嫌気下での精製と機能解析

15:49 ○吉岡博史[1]，　石田哲夫[2]，　谷　泰史[1,3]，　三原久明[1]（[1]立命館大・生命科学・生物工，[2]滋賀医大・生化学，[3]立命館大・R-GIRO）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2D01p13　新規フェノールオキシダーゼの立体構造が示唆するタイプ 3 銅蛋白質の機能分化について

16:10 ○増田太郎[1]，百次恭佑[2]，平田　孝[2]，三上文三[3]（[1]京大院農・農学，[2]京大院農・応用生物，[3]京大院農・応用生命）

2D01p14　グリコール酸酸化活性を有する *Ochrobactrum* sp. AIU 033 由来アルコール酸化酵素の諸性質解明

16:21 ○山田美和[1], 東山貴紀[1], 岸野重信[2], 片岡道彦[3], 小川 順[2], 清水 昌[4], 礒部公安[1]（[1]岩手大・農, [2]京大院農・応用生命, [3]阪府大院・生命環境, [4]京都学園大・バイオ環境）

2D01p15 深海脱窒細菌 *Pseudomonas* sp. strain MT-1 の亜硝酸塩還元酵素に対する電子供与体

16:32 ○榛村 惟[1], 古川千真[1], 荒木琢磨[1], 掘越弘毅[2], 加藤千明[2], 為我井秀行[1]（[1]日本大文理, [2]海洋研究開発機構）

2D01p16 メチロトローフ細菌 *Methylobacterium extorquens* AM1 の希土類に対する メタノールデヒドロゲナーゼの応答機構

16:43 ○三井亮司[1], 峰松由季[1], 桑原朋代[1], 中川智行[2], 谷 明生[3], 田中三男[1]（[1]岡山理大理, [2]岐阜大応生科, [3]岡山大資植研）

2D01p17 脱窒菌 *Pseudomonas stutzeri* 由来ケルセチナーゼ遺伝子の *Brevibacillus* を宿主とする異種発現

16:54 ○片岡邦重, ウィディアトニングラムタリサ, 牛山大地, 櫻井 武（金沢大院・自然科学）

p19〜p22 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2D01p19 Carbazole 1,9a-dioxygenase における核間二水酸化反応の機構解明

17:15 ○松澤 淳[1], 梅田隆志[1], 藤本 瑞[2], 岡田憲典[1], 野尻秀昭[1]（[1]東大生物工学セ, [2]農生資研）

2D01p20 カルバゾール分解酵素群の相互間作用解析

17:26 ○井上慎也, 岩田健一（芝浦工業大学大学院 理工学研究科 システム理工学専攻）

2D01p21 2 サブユニット型芳香環メタ開裂酵素 FlnD1D2 の発現系の構築と機能解析

17:37 ○小竹立朗[1], 松澤 淳[2], 宮本皓司[3], 岡田憲典[2], 野尻秀昭[2], 岩田健一[1]（[1]芝工大シ生, [2]東大生物工学セ, [3]帝京大・バイオ）

2D01p22 多環芳香族炭化水素分解に関わる初発酸化酵素 NidAB,A3B3 の基質特異性

17:48 ○土田健人[1], 都築周作[1], 吉村武朗[1], 後藤純雄[2], 峯木 茂[1]（[1]東理大院・応生科, [2]麻布大・環境科）

D02 会場 午前の部（9:11〜12:05）

酵素—糖質代謝関連酵素—

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

2D02a02 希少糖生産酵素 *Acinetobacter* sp. 由来 L-リボースイソメラーゼの X 線結晶構造解析

9:11 ○吉田裕美[1], 吉原明秀[2], 寺岡美沙[1], 何森 健[2], 神鳥成弘[1]（[1]香川大総合生命研究セ, [2]香川大希少糖研究セ）

2D02a03 Production of 1,5-anhydro-D-fructose by α-glucosidases belonging to glycoside hydrolase families 13 and 31

9:22 ○Janjira Maneesan, Hideyuki Matsuura, Takayoshi Tagami, Momoko Kobayashi, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Atsuo Kimura（Hokkaido Univ.）

2D02a04 Aspargine 694 in Aspergillus niger α-glucosidase is related to its specificity

9:33 ○Min MA, Megumi SATO, Masayuki OKUYAMA, Haruhide MORI, Atsuo KIMURA（Hokkaido Univ.）

2D02a05 *Halomonas* sp. H11 株由来 α-グルコシダーゼ D274G 変異酵素の一価カチオンによる活性化機構の解析

9:44 ○城戸悠輔[1], 佐分利亘[1], 小島晃代[2], 松井博和[1], 森 春英[1]（[1]北大院農, [2]日本食品化工）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

2D02a07 *Caulobacter* グルコアミラーゼの発現と諸性質の解析

10:05 ○坂口政吉[1], 松嶋裕大[1], 南雲利之[1], 清野淳一[1], 宮川 聡[1], 本田翔太郎[1], 菅原康里[1], 小山文隆[1], 川喜田正夫[1,2]（[1]工学院工, [2]東京都医学研）

2D02a08 *Bacillus subtilis* FP-133 由来耐塩性アミラーゼの特性解析

10:16 ○竹中慎治, 宮武彩香, 田中耕生, 吉田健一（神戸大院農）

2D02a09 *Streptomyces corchorusii* 由来細胞表層結合型アミラーゼの触媒ドメイン間の相互作用

10:27 ○久保江里果, 谷 修治, 炭谷順一, 川口剛司（阪府大院・生環科）

2D02a10 *Kitasatospora* sp. MK-1785 株由来マルトトリオース生成アミラーゼの部位特異的変異による転移活性の向上

10:38 ○掃部正浩[1], 西村重徳[1], 谷 修治[1], 炭谷順一[1], 多田俊治[2], 川口剛司[1]（[1]阪府大院・生環科, [2]阪府大院・理）

2D02a11 複合基質を用いた効率的配糖化反応における糖転移メカニズム解明 のためのプロセッシブ機構モデル

10:49 ○伊藤 博, 小林厚志, 正田晋一郎（東北大院工）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

2D02a13 *Arthrobacter globiformis* T-6 由来イソマルトデキストラナーゼとパノースとの複合体の立体構造解析

11:10 ○岡沢唯香, 宮崎剛亜, 西河 淳, 殿塚隆史（東京農工大院農）

2D02a14 *Gluconobacter oxydans* 由来 dextran dextrinase の直鎖イソマルトメガロ糖の効率的な合成に関わる領域の解析

11:21 ○熊谷祐也, Lang Weeranuch, 貞廣樹里, 奥山正幸, 森 春英, 木村淳夫（北大院農）

2D02a15 澱粉様貯蔵多糖を蓄積するシアノバクテリア由来グリコーゲン合成酵素の機能解析

11:32 ○鈴木龍一郎, 種市良祐, 藤田直子, 鈴木英治（秋田県立大生物資源）

2D02a16 化学修飾によるコムギ β-アミラーゼの熱安定性および酵素活性の向上

11:43 Tadessa DABA, ○兒島憲二, 井上國世（京大院・農）

2D02a17 X 線結晶構造解析によるダイズ β-アミラーゼの反応機構の解明

11:54 ○三上文三[1], 姜 有那[1], 安達基泰[2], 河村和広[1], 水谷公彦[1], 高橋延行[1]（[1]京大院農, [2]日本原子力機構）

D02 会場 午後の部（14:00〜18:10）

酵素—糖質代謝関連酵素—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

2D02p01 ランダム変異導入による *Microbacterium saccharophilum* K-1 株由来 β-フルクトフラノシダーゼの耐熱化

14:00 ○伊藤哲也[1], 大田ゆかり[2], 嶋根康弘[2], 岸野恵理子[1], 藤田孝輝[1], 三國克彦[1], 西河 淳[3], 殿塚隆史[3], 秦田勇二[2]（[1]塩水港精糖株式会社, [2]海洋研究開発機構, [3]東京農工大・院農）

2D02p02 *Microbacterium saccharophilum* K-1 由来 β-フルクトフラノシダーゼ耐熱化酵素の立体構造解析

14:11 ○盛まりな[1], 横井 岳[1], 佐藤祥名[1], 宮崎剛亜[1], 大田ゆかり[2], 嶋根康弘[2], 秦田勇二[2], 藤田孝輝[3], 伊藤哲也[3], 西河 淳[1], 殿塚隆史[1]（[1]東京農工大・院農, [2]海洋研究開発機構, [3]塩水港精糖株式会社）

2D02p03 MD・FMO 計算による *Microbacterium saccharophilum* K-1 株由来 β-フルクトフラノシダーゼの耐熱化

14:22 ○嶋根康弘[1], 殿塚隆史[2], 臼井けい子[1], 伊藤哲也[3], 岩沢美佐子[1], 西 真郎[1], 大田ゆかり[1], 森 楢[1], 三國克彦[3], 秦田勇二[1]（[1]海洋研究開発機構, [2]東京農工大・院農, [3]塩水港精糖株式会社）

2D02p04 β-キチンナノファイバーを用いた簡便なキチナーゼ活性測定法の開発

14:33 ○西平知世[1], 宮野有紗実[2], 大沼貴之[1], 成廣和枝[3], 山下和彦[3], 後藤 猛[4], 高橋砂織[5]（[1]近畿大院・農・バイオ, [2]近畿大・農・バイオ, [3]ヤエガキ醗酵技研(株), [4]秋田大院工, [5]秋田総食研）

2D02p05 *Streptomyces griseus* 由来の AA10, SgCBP V の諸

性質と機能解析

14:44 ○千葉大介，畠山彩乃，戸谷一英，中川裕子（一関高専・物化工）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

2D02p07 *Streptomyces griseus* 由来の AA10 family のキチン酵素分解促進効果

15:05 ○中川裕子[1]，工藤まどか[1]，竹林 晃[1]，戸谷一英[1]，大塚未来[2]，渡邉剛志[2,3]，Eijsink Vincent[4]，Vaaje-Kolstad Gustav[4]（[1]一関高専・物化工，[2]新潟大院・自然科学，[3]新潟大・農・応生化，[4]Norwegian Univ. Life Sci. Chem. Biotech. Food Sci.）

2D02p08 キチン分解細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* が保有するキチン分解酵素 ChiJ,ChiK の解析

15:16 ○中野 萌，兪 佳怡，野川優洋，田口悟郎，下坂 誠（信州大繊）

2D02p09 キチン分解細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* における遺伝子操作系の開発

15:27 ○園田紀恵，兪 佳怡，野川優洋，田口悟郎，下坂 誠（信州大繊維）

2D02p10 Paenibacillus 属細菌由来キチン分解酵素 ChiW の N 末端領域の解析

15:38 ○伊藤貴文[1]，日ビ隆雄[1]，高宮杏奈[1]，鈴木史子[1]，杉本郁美[1]，藤井 豊[2]，武藤 明[3]，木元 久[1]（[1]福井県大・生物資源，[2]福井大・医，[3]福井工大・工）

2D02p11 ユーグレナ由来キチナーゼのクローニング，発現および酵素化学的諸性質

15:49 ○具志堅央，菅田瑚紅，伊藤 進，平良東紀（琉大農）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

2D02p13 ガジュマル(*Ficus microcarpa*)乳液由来キチナーゼ-B のクローニング，発現および抗真菌活性

16:10 ○平良東紀，平安名一，西江史人，伊藤 進（琉大農）

2D02p14 ソテツ由来クラス V キチナーゼの結晶構造解析およびアロサミジン結合性

16:21 ○梅本尚之[1]，神田有華[1]，大沼貴之[1]，平良東紀[2]，沼田倫征[3]，作田庄平[4]，深溝 慶[1]（[1]近畿大院農・バイオ，[2]琉球大，[3]産総研，[4]東京大）

2D02p15 ループ 3 欠損型ファミリー 19 キチナーゼの構造と機能

16:32 ○大沼貴之[1]，高木丈二[1]，近藤香織[1]，沼田倫征[2]，梅本尚之[1]，深溝 慶[1]（[1]近畿大農，[2]産総研）

2D02p16 *Serratia marcescens* 2170 由来 CBP21 のファミリー 19 キチナーゼによるキチン分解への効果

16:43 高橋亮大[1]，森山拓実[1]，猪又義広[1]，杉本華幸[1,2]，中川裕子[3]，鈴木一史[1,2]，戸谷一英[3]，○渡邉剛志[1,2]（[1]新潟大院・自然科学，[2]新潟大農・応生化，[3]一関高専・物化工）

2D02p17 *Gongronella butleri* の生産する exo-chitobiohydrolase の切断特異性

16:54 ○西山安江，川野明日香，古田椋子，関 清彦，光富 勝（佐賀大農）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

2D02p19 *Serratia marcescens* 2170 のキチン分解利用機構 − *chiPQ-ctb* オペロンの機能−

17:15 ○三浦拓馬[1]，今井裕也[1]，小川知佐奈[1]，杉本華幸[1,2]，鈴木一史[1,2]，渡邉剛志[1,2]（[1]新潟大院・自然科学，[2]新潟大・農・応生化）

2D02p20 small RNA を介した *Serratia marcescens* キチン分解利用系制御への NagC 及び ChbR の関与

17:26 鈴木一史[1,2]，○小川知佐奈[1]，南 晴香[2]，杉本華幸[1,2]，渡邉剛志[1,2]（[1]新潟大院・自然科学，[2]新潟大・農・応生化）

2D02p21 2 種の Shewanella 属由来キチンオリゴ糖脱アセチル化酵素の酵素化学的性質の解明

17:37 ○白石晴香[1]，上原理絵[1]，平野貴子[2]，加藤 達[2]，袴田 航[1,2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科）

2D02p22 沖縄県の土壌より単離した微生物が生産するキトサナーゼ

17:48 ○佐久本太一（沖縄高専生物資源）

2D02p23 *Paenibacillus* sp. IK-5 キトサナーゼのキトサン結合モジュール : キトサン結合に関わるアミノ酸残基

17:59 ○新家粧子[1]，尾井宏美[2]，大沼貴之[1]，木元 久[3]，草桶秀夫[4]，深溝 慶[1]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]福井県大・生，[4]福井工大・工）

講演番号
開始時間　　演　　題　　発表者氏名（所属）

A01 会場　午前の部（9:11〜11:54）

環境—バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオリファイナリー—

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3A01a02　高収率・高生産型ホモブタノール生産菌を目指したクロストリジウム属微生物の育種
9:11 ○向山正治[1]，中ノ庄正弘[1]，市毛栄太[1]，土橋幸生[1]，中山俊一[2]（[1]株式会社日本触媒，[2]東京農業大学）

3A01a03　デザインドバイオマスによるバイオプロセスの開発〜ブタノール発酵でのセロビオースによるカーボンカタボライト抑制の回避とその機構の解明〜
9:22 ○野口拓也[1]，田代幸寛[1]，酒井謙二[1]，園元謙二[1,2]（[1]九大院・農，[2]九大・バイオアーク）

3A01a04　オールパーム樹液からのバイオブタノール生産
9:33 ○荒井隆益[1]，オスマンスレイマン[2]，ロキアハシム[2]，クナスンダリバラクリシャン[2]，カーマシュデシュ[2]，ウチタラボンルングノック[1]，森　隆[1]，小杉昭彦[1]（[1]国際農研，[2]マレーシア理科大）

3A01a05　シリカライト膜によるバイオブタノールの高選択的浸透気化分離
9:44 ○池上　徹[1]，根岸秀之[1]，中山俊一[2]，小林元太[3]，榊　啓二[1]（[1]産総研・環境化学，[2]東農大・応生科，[3]佐賀大・農）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A01a07　*Saccharophagus degradans* 由来アルギン酸分解酵素群の基質特異性の解析
10:05 ○横井貴大[1,2]，高木俊幸[1,2]，柴田敏行[2,3,4]，森坂裕信[1,2]，黒田浩一[1,2]，植田充美[1,2]（[1]京大院農・応用生命，[2]JST, CREST，[3]三重大院・生資・生物圏生命，[4]三重大・新産業）

3A01a08　アルギン酸からのエタノール生産を目指した酵母の合成生物学的育種
10:16 ○高木俊幸[1,2]，横井貴大[1,2]，森坂裕信[1,2]，黒田浩一[1,2]，植田充美[1,2]（[1]京大院農・応用生命，[2]JST, CREST）

3A01a09　統合型リグノセルロース系エタノール生産プロセスに資するセルラーゼ表層提示酵母の開発
10:27 ○猪熊健太郎[1]，番場崇弘[2]，蓮沼誠久[1,3]，近藤昭彦[1,2]（[1]高機能遺伝子デザイン技術研究組合，[2]神戸大院・工・応化，[3]神戸大・自）

3A01a10　染色体多重組込みによるキシロース資化性サッカロマイセス酵母のエタノール収率向上
10:38 ○小西　仁，福田　明，牟田口梢栄，上村　毅，雨宮正臣（JX 日鉱日石エネルギー(株)中央技術研）

3A01a11　線虫と出芽酵母を用いた遺伝子組み換え体の有効利用法の開発
10:49 ○水野貴之，大岩嵩裕，前田淳史，文谷政憲（徳島文理大理工）

a13〜a16 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A01a13　エタノール発酵接合菌を用いたアルカリ - 酸処理ペーパースラッジからの効率的バイオエタノール生産
11:10 ○高野真希，星野一宏（富山大院理工）

3A01a14　微生物によるバイオディーゼル廃グリセロールからのエタノール生産
11:21 ○瀬田幸平[1]，鈴木敏弘[1]，茂野俊也[2]，野村暢彦[1]，中島敏明[1]（[1]筑波大院生命環境，[2]つくば環微研）

3A01a15　人工進化実験による *Synechocystis* sp. PCC 6803 へのイソブタノール耐性の賦与
11:32 ○松迫卓也，仲嶋　翼，吉川勝徳，清水　浩（阪大院情報バイオ情報）

3A01a16　微細藻類を用いたエタノール生産における malic enzyme の影響
11:43 ○吉川勝徳[1,2]，平沢　敬[2,3]，清水　浩[1,2]（[1]阪大・院情報・バイオ情報，[2]Crest, JST，[3]東工大・院生命理工・生物プロセス）

A01 会場　午後の部（14:00〜17:59）

環境—バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオリファイナリー—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A01p01　竹バイオマスのバイオリファイナリーの研究
14:00 ○新井一斗[1]，石川貴大[1]，西澤正平[1]，椎葉　究[1]，平木　純[2]（[1]東京電機大学，[2]JNC 株式会社）

3A01p02　竹バイオマス中のオリゴ糖成分のコレステロール上昇抑制作用と腸内細菌への影響
14:11 ○堀内美穂，小笠原真実，椎葉　究（東電大理工学部）

3A01p03　超音波霧化技術による木質バイオマスの有効利用
14:22 ○北村　唯[1]，菅野　匠[2]，袴田淑篤[1]，工藤　孝[1]，米山雄二[3]，野口正孝[4]，川島徳道[5]，斉木　博[1]，石河睦生[2]，下村美文[1]（[1]東京工科大学，[2]桐蔭横浜大学，[3]文化学園大学，[4]神戸芸術工科大学，[5]環太平洋大学）

3A01p04　$Ca(OH)_2$ 前処理稲わらの CO_2 加圧糖化リアクターによる酵素糖化技術の開発
14:33 ○池　正和，尹　旻洙，趙　鋭，城間　力，徳安　健（農研機構・食総研）

3A01p05　単一海藻給餌に対するサザエ腸内微生物フローラの適応
14:44 ○伊藤通浩[1,2]，渡邊幸太郎[3]，モリテツシ[1,2]，丸山　徹[3]，丹羽健太郎[4]，緑川直子[1,2]，張　成年[4]，竹山春子[1,3]（[1]早稲田大 ASMeW，[2]JST-CREST，[3]早稲田大院先進理工，[4]水産総合研究セ）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A01p07　白色腐朽菌を用いた木質バイオリファイナリーに関する研究　—酢酸発酵能改善について—
15:05 ○隅谷友紀[1]，平井浩文[1,2]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大院・農，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造）

3A01p08　高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株におけるリグニン分解誘導物質の探索
15:16 ○橋爪勇樹[1]，王　剣橋[2]，平井浩文[3,4]，河岸洋和[2,3,4]（[1]静大・農，[2]静大院・創造，[3]静大院・農，[4]静大・グリーン研）

3A01p09　新規な *Euglena gracilis* 株の従属栄養培養
15:27 赤司　昭[1]，○竹崎　潤[1]，濱田武志[1]，出村幹英[2]，米澤夏岐[2]，河地正伸[3]，渡邉　信[2]（[1](株)神鋼環境ソリューション，[2]筑波大院・生命環境系，[3]国立環境研究所）

3A01p10　嫌気処理および暗黒処理が *Euglena gracilis* の極性脂質に及ぼす影響
15:38 ○小川拓水[1]，古橋　剛[2]，西尾和樹[1]，岡澤敦司[1]，太田大策[1]（[1]阪府大院生命環境，[2]理研 CSRS）

3A01p11　沖縄工業高等専門学校周辺環境から単離される微細藻類が産生する脂質成分の分析
15:49 ○長崎泰真[1]，池松真也[2]（[1]沖縄高専　専攻科，[2]沖縄高専生資工）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3A01p13　コウキクサ由来細菌による水生植物の成長促進
16:10 ○尾島拓也[1]，山賀文子[1]，菅原雅之[1,2]，森川正章[1,2]（[1]北大院環境，[2]JST-ALCA）

3A01p14　おから分解菌のスクリーニング法開発
16:21 ○袴田　航[1,2]，小笠原駿[2]，平野貴子[2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科・生命化）

3A01p15　草食性甲殻類消化管からのバイオマス分解細菌の単離

16:32 ○三宅克英[1]，　裏　佳織[1]，　柳井清治[2]，　北原隆志[2]，山岸明日翔[2]（[1]石川県大資源研，[2]石川県大環境）

3A01p16　廃棄物系バイオマスの高温可溶化メタン発酵に適した好熱性細菌の探索

16:43 ○薬師寺佑佳（熊本県立大学）

3A01p17　放射性物質汚染バイオマスの嫌気消化によるエネルギー回収

16:54 ○中島田豊[1]，　久保　希[1]，　仁木大輔[1]，　中村雅哉[2]，大塚祐一郎[2]，金原和秀[3]，佐々木健[4]，加藤純一[1]（[1]広島大院先端，[2]森林総研，[3]静岡大工，[4]広島国際学院大工）

p19〜p22 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3A01p19　同時糖化発酵による希硫酸前処理バイオマスからのフェニル乳酸生産

17:15 ○川口秀夫[1]，　寺村　浩[1]，　中村聡子[1]，　荻野千秋[1]，老沼研一[2]，　高谷直樹[2]，　平野　恒[3]，　佐塚隆志[3]，　北野英己[3]，近藤昭彦[1]（[1]神戸大院・工，[2]筑波大・生命環境，[3]名大・生物機能セ）

3A01p20　*Schizophyllum commune* を用いた糖化発酵同時進行によるセルロース系バイオマスからの L- リンゴ酸の直接生産

17:26 ○長根江里，高野真希，星野一宏（富山大院理工）

3A01p21　キシロース資化の新規代謝経路設計による L- グルタミン酸発酵法の開発

17:37 ○山田和輝，山本洋子，西尾陽介，原　吉彦，安枝　寿（味の素(株)）

3A01p22　リグニン類化合物からバイオ生産されるベンゼン環構造を含まない新規有機蛍光物質

17:48 ○松藤　寛[1]，　濱口　峻[2]，　川村以杏[2]，　砂入道夫[2]，岩淵範之[2]（[1]日大生資科食品生命，[2]日大生資科応用生物）

A02 会場　午前の部（9:11〜12:05）

糖鎖工学—構造，機能—

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3A02a02　担子菌 *Flammulina velutipes* の産生するエンド -β-*N*- アセチルグルコサミニダーゼ FV のプロセシング酵素の遺伝子クローニング

9:11 高橋剛生，海住宜広，○伊藤和央（阪市大院・理）

3A02a03　植物エンドグリコシダーゼの部位特異的変異導入による酵素活性制御

9:22 前田　恵[2]，○瀬尾和子[1]，岡本尚子[2]，木村吉伸[2]（[1]岡山大学農学部，[2]岡山大学大学院環境生命科学研究科）

3A02a04　トマト実生中における ENGase と PNGase の発現解析及び遊離糖鎖の分布解析

9:33 前田　恵[2]，○松丸千紘[1]，木村吉伸[2]（[1]岡山大学農学部，[2]岡山大学大学院環境生命科学研究科）

3A02a05　淡水性藻類に発現される *N*- グリカンの構造解析：ルイス a エピトープ含有糖鎖のスクリーニング

9:44 前田　恵[2]，○谷　美里[1]，木村吉伸[2]（[1]岡山大学農学部，[2]岡山大学大学院環境生命科学研究科）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A02a07　Structural Analysis of the *N*-glycans of Selected Basidiomycetous Yeasts in the Subphylum Agaricomycotina (Phylum Basidiomycota)

10:05 ○Ronilo Jose Flores[1]，　Takao Ohashi[1]，Hiroko Kawasaki[2]，Kazuhito Fujiyama[1]（[1]International Center for Biotechnology, Osaka University, Japan, [2]NITE Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japan）

3A02a08　FGF を用いたヘパラン硫酸糖鎖の構造変化検出法の開発

10:16 ○小堺健生[1]，　西田光貴[2]，　北口公司[3]，　金丸義敬[3]，矢部富雄[3]（[1]岐阜大院・応生科・応用生命，[2]岐阜大院・連農・生物資源，[3]岐阜大・応生科・応用生命）

3A02a09　魚類コンドロイチン硫酸の含有量と組成分析

10:27 ○中谷なつみ，　水田結貴，　中田有美，　山本麻伊，大下加奈恵，問田椋介，田村純一（鳥取大地域環境）

3A02a10　ウォンバットミルクオリゴ糖の構造解析

10:38 ○平山賢太郎[1]，　メッサーマイケル[2]，　福田健二[1]，斉藤忠夫[3]，浦島　匡[1]（[1]帯広畜産大学，[2]シドニー大学，[3]東北大農）

3A02a11　6 位にグリコシド結合を持つ糖鎖の NMR による配座解析

10:49 ○鵜澤　洵[1]，　加藤雅樹[1]，　関　宏子[2]，　桝飛雄真[2]，山口芳樹[1]（[1]理研　糖鎖構造，[2]千葉大　共用機器センター）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A02a13　合成糖鎖を用いた UGGT2 の基質特異性解析

11:10 ○武田陽一[1]，　瀬古　玲[1]，　八須匡和[1]，　大黒周作[1]，和泉雅之[2]，小泉晶彦[1]，藤川紘樹[1]，梶原康宏[1,2]，伊藤幸成[1,3]（[1]JST, ERATO，[2]阪大院理，[3]理研 細胞制御化学）

3A02a14　IgG_1抗体の *N*- 結合型糖鎖付加コンセンサス配列の改変による抗体諸性質への影響

11:21 ○高島　晶，八須和子，天野純子（野口研・糖鎖生物）

3A02a15　Identification of the Protein Glycosylation Operon from *Campylobacter jejuni* JCM 2013

11:32 ○Akkaraphol SRICHAISUPAKIT，　Takao OHASHI，Kazuhito FUJIYAMA（International Center for Biotechnology, Osaka University）

3A02a16　マウスシグレック F に結合する内因性糖タンパク質の同定

11:43 ○加藤紀彦[1]，　際本拓未[2]，　エヴァンスクリストファー[3]，ブルメットメアリー[4]，ハドソンシェリー[4]，ズウゾウ[5]，ボクナーブルース[6]，ティーマイヤーマイケル[7]（[1]石川県立大，[2]筑波大，[3]コロラド大，[4]ジョンズホプキンス大，[5]イェール大，[6]ノースウェスタン大，[7]ジョージア大）

3A02a17　ブタ精漿由来新規レクチン WGA16 の精子表面への結合機構の解明

11:54 ○北島　健[1,2]，ガレノエステル[1,2]，金川真由美[3]，土山智之[1,2]，堀　和紀[1,2]，　金澤　尊[1,2]，　千葉　満[4]，　安江　博[5]，　池田明美[3]，山口芳樹[3]，　佐藤ちひろ[1,2]（[1]名大生物機能セ，[2]名大生命農学，[3]理研糖鎖構造，[4]弘前大医，[5]農業生物資源研家畜ゲノム）

A02 会場　午後の部（14:00〜18:10）

糖鎖工学—合成，生合成—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A02p01　高濃度条件下での分子間カップリング反応によるジカルバグルコビオースの合成

14:00 ○館田尚家，宮崎達雄，鰺坂勝美（新潟薬大院・応用生命科学）

3A02p02　ウミシダ由来の糖リン脂質 CJP- シリーズの合成研究

14:11 ○武田　陽[1]，　水野孝星[1]，　玉井秀樹[1,2]，　植木章晴[1,2]，今村彰宏[1]，安藤弘宗[1,2]，石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMs）

3A02p03　ガングリオシド SJG-2 に特異なシアル酸配列の合成研究

14:22 ○坂本紘一[1]，　中島慎也[1,2]，　玉井秀樹[1,2]，　今村彰宏[1]，安藤弘宗[1,2]，石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS）

3A02p04　神経突起伸展活性をもつガングリオシド LLG-3 の構造活性相関研究 2

14:33 ○山岸愛実[1]，矢部(細田)律子[1,2]，玉井秀樹[1,2]，小西美紅[1,2]，今村彰宏[1]，　矢部富雄[1]，　安藤弘宗[1,2]，　石田秀治[1]，　木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS）

3A02p05　II 型 ABO 抗原糖鎖の化学合成

14:44 ○原　　温[1]，　今村彰宏[1]，　安藤弘宗[1,2]，　石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A02p07　ビオチンリンカーに結合したケラタン硫酸オリゴ糖の合成
15:05　○武田尚子[1,2]，田村純一[1,3]（[1]鳥取大院工，[2]学振特研 DC，[3]鳥取大地域環境）
3A02p08　ビオチン化コンドロイチン硫酸 D 型オリゴ糖の化学合成
15:16　○松下健也[1]，田村純一[1,2]（[1]鳥取大院工，[2]鳥取大地域環境）
3A02p09　ナマコ由来フコシルコンドロイチン硫酸繰返し三糖の合成
15:27　○田村純一[1,2]，　田中晴奈[2]，　中村　歩[2]，　武田尚子[1,3]（[1]鳥取大院工，[2]鳥取大地域環境，[3]学振特研 DC）
3A02p10　分子内アグリコン転移反応を利用した，Extensin 親水性モチーフの合成研究
15:38　○石渡明弘[1]，Kaeothip Sophon[2]，武田陽一[2]，伊藤幸成[1,2]（[1]理研，[2]ERATO, JST）
3A02p11　4- メチルベンジル基を保護基とする O- 結合型糖アミノ酸の合成と応用
15:49　○朝比奈雄也[1,2]，　武居俊樹[3]，　藤本梨菜[1]，　瀬戸茉莉絵[1]，田中洋成[1]，中原義昭[1]，北條裕信[1,4]（[1]東海大工生命，[2]東海大糖鎖研，[3]東海大理化学，[4]大阪大蛋白研）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3A02p13　分子内グリコシド結合生成反応を利用する Kdo2 糖の合成研究
16:10　○田坂瑞葵，門脇拓哉，蟻　瑞欽，一柳　剛（鳥取大農）
3A02p14　3-Deoxy-GlcNAc の合成
16:21　○狐塚哲也，岩山祐己，稲津敏行（東海大工）
3A02p15　凍結反応を用いた糖鎖へのアミノ酸導入反応の検討
16:32　○藤川紘樹[1]，　松尾一郎[2]，　小泉晶彦[1]，　八須匡和[1]，迫野昌文[1]，高谷万紀[1]，武田陽一[1]，瀬古　玲[1]，伊藤幸成[1,3]（[1]JST, ERATO，[2]群馬大院工，[3]理研）
3A02p16　チオサリチル酸誘導体を脱離基にもつ各種糖供与体の反応挙動
16:43　○田村真奈美，櫻井理沙，小林真己，西田芳弘，土肥博史（千葉大院融合）
3A02p17　チオサリチル酸メチルを脱離基に持つシアリルドナーに関する研究
16:54　○若杉裕樹，田山和哉，駒井亮太，池田理絵，木村智文，西田芳弘，土肥博史（千葉大院融合）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3A02p19　環状シリル系保護基を用いた立体選択的グリコシル化の検討
17:15　○八神なほ子[1]，　小西美紅[1,2]，　玉井秀樹[1,2]，　植木章晴[1,2]，安藤弘宗[1,2]，石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS）
3A02p20　グリコシド化反応において環状保護基の存在が与える影響
17:26　○酒井静雄[1]，今村彰宏[1]，安藤弘宗[1,2]，石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS）
3A02p21　シュウダミン酸糖供与体の合成研究
17:37　○岩井一晃[1]，　鈴木達哉[1,2]，　植木章晴[1,2]，　玉井秀樹[1,2]，今村彰宏[1]，安藤弘宗[1,2]，石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS）
3A02p22　新規セレノグリコシド合成法の開発とセレン多置換糖鎖合成への応用
17:48　○鈴木達哉[1,2]，　林知衣香[1]，　河村奈緒子[1,2]，　安藤弘宗[1,2]，今村彰宏[1]，石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大･応用生物，[2]京都大･iCeMS）
3A02p23　セレノフコースの合成とフコース認識レクチン AOL との共結晶立体構造解析
17:59　○島袋隼平[1]，　牧尾尚能[2]，　鈴木達哉[1,3]，　安藤弘宗[1,3]，山田悠介[2]，　石田秀治[1]，　若槻壮市[2,4,5]，　加藤龍一[2]，　木曽　真[3]（[1]岐阜大・応用生物，[2]高エネ機構・放射光，[3]京都大・iCeMS，[4]スタンフォード大・医，[5]SLAC 国立加速器研究所）

A03 会場　午前の部（9:22〜11:43）

生体高分子・脂質—脂質—

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

3A03a03　低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 のエイコサペンタエン酸生合成酵素の局在性解析
9:22　○小倉隆太郎，趙　賢南，川本　純，栗原達夫（京大化研）
3A03a04　Subcellular localization of 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase responsible for the synthesis of EPA-containing phospholipids in *Shewanella livingstonensis* Ac10
9:33　○Hyun-Nam CHO，Wataru KASAI，Jun KAWAMOTO，Nobuyoshi ESAKI，Tatsuo KURIHARA（Institute for Chemical Research, Kyoto University）
3A03a05　エイコサペンタエン酸による低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の細胞分裂タンパク質の制御
9:44　○岩野友里子，永久由利絵，川本　純，江崎信芳，栗原達夫（京都大学）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A03a07　低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の低温誘導性外膜タンパク質の機能解析
10:05　○浅井　梓，杉浦美和，水谷彩乃，川本　純，江崎信芳，栗原達夫（京大化研）
3A03a08　ω- エチニル型エイコサペンタエン酸の合成法の確立
10:16　○徳永智久，渡辺文太，川本　純，栗原達夫（京大化研）
3A03a09　ω- エチニル型脂肪酸を用いた血管内皮細胞における不飽和脂肪酸修飾タンパク質の同定法開発
10:27　○山浦貴之[1]，　佐藤　翔[2]，　川本　純[1]，　江崎信芳[1]，佐藤　智[3]，栗原達夫[1]（[1]京大化研，[2]京都大学，[3]京大 LTM センター）
3A03a10　卵黄及びミルク由来のスフィンゴミエリン構成成分の単離
10:38　牧岡富広，○石野暢好，松本恵実，中塚進一（長良サイエンス）
3A03a11　原始腹足類の精巣から見いだされたユニークなコレステロール前駆体
10:49　○川島英城（岩県大宮短大部）

a13〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A03a13　脂肪滴サイズによる脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸鎖の違い
11:10　○有澤琴子，市　育代，安川由希子，吉田好海，藤原葉子（お茶大院ライフ）
3A03a14　スフィンゴ脂質並びにその代謝物が消化管に与える影響
11:21　○榮田拓起[1]，　坪谷朗行[1]，　古田土麗[1]，　大西正男[2]，木下幹朗[1]，間　和彦[3]，高崎一人[4]，原口浩幸[4]（[1]帯広畜大食品，[2]藤女子大人間生活，[3]日本製粉中研，[4]ファスマック研究開発部）
3A03a15　心筋梗塞自然発症モデルウサギのリポプロテイン脂質プロファイリング
11:32　○竹田浩章[1]，　小池智也[2]，　山田貴之[1]，　和泉自泰[1]，塩見雅志[2]，吉田　優[2]，福崎英一郎[1]，馬場健史[1]（[1]大阪大院工，[2]神戸大院医）

A04 会場　午前の部（9:00〜12:05）

有機—天然物－生合成，代謝—

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A04a01　キャンディン系抗真菌化合物アクレアシンの生合成に

関わるオキシゲナーゼ遺伝子の同定
9:00 ○荒井裕太郎[1], 星野泰隆[2], 清野優花[1], 佐藤浩之[1], 石川　淳[1,2]（[1]東邦大院理, [2]国立感染研）

3A04a02　麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来タイプ III 型ポリケタイド合成酵素 CsyB による 3-acetyl-6-alkyl-α-pyrone の生成
9:11 ○橋元　誠[1],　高圓　宰[1],　高橋宏明[1],　須田千尋[1], 北本勝ひこ[2], 藤井　勲[1]（[1]岩手医科大薬, [2]東大院・農生科・応生工）

3A04a03　ヒカゲノカズラ由来新規トリテルペン合成酵素の遺伝子クローニング
9:22 ○荒木健志, 荒谷　博, 久城哲夫（明治大院農）

3A04a04　*Herpetosiphon aurantiacus* 由来の新規ジテルペン生合成遺伝子群の機能解析
9:33 仲野千秋[1], ○大嶋美咲[2], 佐藤　努[1,2], 星野　力[1,2]（[1]新潟大院自, [2]新潟大農）

3A04a05　Methylococcus capsulatus スクアレン合成酵素～特に NADPH 結合サイトの特定～
9:44 ○大竹佳奈[1], 渋谷　智[1], 星野　力[1,2]（[1]新潟大院自, [2]新潟大農）

a07～a11 発表者の接続時間 9:55～10:05

3A04a07　イネ由来のパルケオール合成酵素 Y257 残基の役割について
10:05 ○鈴木明日香[1],　相川侑子[2],　伊藤遼介[1],　星野　力[1,2]（[1]新潟大院自, [2]新潟大農）

3A04a08　ミドリサンゴ β-アミリン合成酵素の Y259 及び W257 の機能解析
10:16 ○仲田知佳[1],　天利佳奈子[2],　伊藤遼介[1],　星野　力[1,2]（[1]新潟大院自, [2]新潟大農）

3A04a09　β-アミリン合成酵素の F474 残基の機能解析～嵩高さの重要性～
10:27 ○伊藤遼介[1],　増川友夏里[1],　仲田知佳[1],　天利佳奈子[2], 仲野千秋[1], 星野　力[1,2]（[1]新潟大院自, [2]新潟大農）

3A04a10　スクアレンの両末端環化：オノセロイド合成酵素の初めての同定および龍涎香主成分 ambrein の酵素合成
10:38 ○上田大次郎, 星野　力, 佐藤　努（新潟大院自然・農）

3A04a11　イネのフィトアレキシンであるサクラネチンのいもち病菌による代謝
10:49 ○濱名一穂, 戸嶋浩明, 長谷川守文（茨城大農）

a13～a17 発表者の接続時間 11:00～11:10

3A04a13　ジャポニカ種およびインディカ種のイネにおけるファイファイトアレキシン, サクラネチンの蓄積
11:10 ○西口沙也加[1],　吉本理子[1],　中島廣光[1],　寺石政義[2], 森　直樹[2], 奥本　裕[2], 石原　亨[1]（[1]鳥取大農, [2]京大院農農）

3A04a14　ムラサキ培養細胞におけるナフトキノン骨格生成：3''-ヒドロキシゲラニルハイドロキノン中のアルコール性水酸基の酸化
11:21 ○塚原美香[1],　町田典子[1],　矢崎一史[2],　和田昭盛[3], 山野由美子[3], 山本浩文[1]（[1]東洋大院生命, [2]京大生存圏研, [3]神戸薬大）

3A04a15　脂肪酸合成経路の遮断による一次代謝産物の生産能の強化
11:32 ○大石奈穂美,　山梨智也,　曽根祐輔,　田辺友紀, 山本　聡, 金　承榮, 鮒　信学（静県大院食栄）

3A04a16　Acetyl-CoA carboxylase の発現によるクルクミンの微生物生産
11:43 ○曽根祐輔,　山梨智也,　大石奈穂美,　天野結香子, 金　承榮, 鮒　信学（静県大院食栄）

3A04a17　Microbial bioconversion of an active natural compound, curcumin
11:54 ○Azam Hassaninasab, Yoshiteru Hashimoto, Michihiko Kobayashi（Institute of Applied Biochemistry and Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba）

A04 会場　午後の部（14:00～18:10）

有機―天然物－生合成，代謝，その他―

p01～p05 発表者の接続時間 13:50～14:00

3A04p01　*Aspergillus wentii* による(+)-(1 *S*)- および (−)-(1 *R*)-camphorquinone の生物変換
14:00 ○宇佐見享嗣，本岡良太，宮澤三雄（近畿大理工）

3A04p02　生体触媒としてハスモンヨトウ(*Spodoptera litura*)を用いた(-)-myrtenal の生物変換
14:11 ○本岡良太，宇佐見享嗣，宮澤三雄（近畿大理工）

3A04p03　Real-time observation of microbial metabolism by dynamic nuclear polarization NMR(DNP-NMR)
14:22 ○Dana Ulanova,　Keiko Kumagai,　Mai Akakabe, Masashi Tsuda（Kochi Univ.）

3A04p04　麻痺性貝毒の生合成中間体の定量及び未知中間体について
14:33 ○土屋成輝[1],　長由扶子[1],　吉岡廉平[1],　此木敬一[1], 長澤和夫[2], 大島泰克[3], 山下まり[1]（[1]東北大院農, [2]東京農工大院工, [3]東北大院生命科学）

3A04p05　致死性海藻食中毒原因物質ポリカバノシド A の起源生物の推定
14:44 ○前田高輔[1], 田谷有妃[1], 大水絵理[1], Mirriam A. Cayme[2], 長由扶子[1], 此木敬一[1], Sherwood Hall[3], 福代康夫[4], 安元　健[5], 山下まり[1]（[1]東北大学院農, [2]フィリピン NFRDI, [3]アメリカ FDA, [4]東大アジアセ, [5]日本食品分析セ）

p07～p11 発表者の接続時間 14:55～15:05

3A04p07　10-hemiketal 型テトロドトキシン類縁体の構造決定と生合成経路の考察
15:05 ○工藤雄大[1],　山下瑶子[1],　此木敬一[1],　長由扶子[1], 安元　健[2], 山下まり[1]（[1]東北大・院農, [2]日本食品分析セ）

3A04p08　メタゲノムからの 新規 Baeyer-Villiger monooxygenase のスクリーニング
15:16 山下瑶子, ○山下まり, 工藤雄大, 長由扶子, 此木敬一（東北大学院農）

3A04p09　昆虫食害で誘導されるオオイタドリ由来フェニルアセトニトリルの生合成中間体
15:27 ○野下浩二, 阿部　誠, 田母神繁（秋田県大・生資科）

3A04p10　ハスモンヨトウ幼虫の腸管内容物抽出液によりダイズ葉で誘導される二次代謝物
15:38 ○中田　隆[1],　村上真一郎[1],　網干貴子[1],　吉永直子[1], 石原　亨[2], 寺石政義[1], SCHMELZ Eric[3], 小野　肇[1], 西田律夫[1], 奥本　裕[1],　森　直樹[1]（[1]京大院農,　[2]鳥取大農,　[3] USDA ARS, CMAVE）

3A04p11　ハスモンヨトウ腸管内に誘導される β-alanine と iridoid 代謝
15:49 ○志野真実子[1],　内藤裕彬[1],　齊藤　準[2],　網干貴子[1], 吉永直子[1], 小野　肇[1], 西田律夫[1], 森　直樹[1]（[1]京大院農・応用生命, [2]京工繊大工科）

p13～p17 発表者の接続時間 16:00～16:10

3A04p13　鱗翅目幼虫，キイロショウジョウバエ，コオロギにおける FACs パターンおよび生合成
16:10 ○森田沙代，吉永直子，網干貴子，小野　肇，西田律夫，森　直樹（京大院農・応用生命）

3A04p14　淡水性甲殻類スジエビ(*Palaemon paucidens*)における FACs の同定
16:21 ○森田智也，森田沙代，吉永直子，網干貴子，小野　肇，西田律夫，森　直樹（京大院農・応用生命）

3A04p15　ホタル生体への安定同位体標識化合物のインジェクションと LC/MS を用いたホタルルシフェリンの生合成に関する研究
16:32 ○蟹江秀星[1],　大場裕一[1],　吉田尚生[1],　小鹿　一[1],

井上　敏[2]（[1]名古屋大院生命農，[2]JNC 株式会社横浜研究所）

3A04p16　コナダニ *Sancassania* sp.“sasagawa”における脂肪族ギ酸エステルの生合成

16:43　◦清水伸泰[1]，坂田大介[1]，宮崎帆波[1]，桑原保正[2]（[1]京都学園大バイオ環境，[2]富山県大工・生工研セ，JST，ERATO）

3A04p17　アクリドン類の合成および前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制活性

16:54　◦岸本真帆[1]，　川井　悟[1]，　常盤野哲生[2]，　吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大資料）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3A04p19　ハロゲン原子を導入したフラボノイド類の合成と出芽酵母遺伝子破壊株増殖阻害に関する研究

17:15　◦金子綾希[1]，川井　悟[1]，吉澤結子[2]，田島知子[1]（[1]東電大院理工，[2]秋田県大生資科）

3A04p20　セミカルバゾン類の合成とそのシステインプロテアーゼ阻害活性

17:26　◦樋口佳遥[1]，　川井　悟[1]，　常盤野哲生[2]，　吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資科）

3A04p21　ピラノクマリン類の合成および前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する影響

17:37　◦田中祐希[1]，川井　悟[1]，吉澤結子[2]（[1]東京電機大学理工学部，[2]秋田県立大学資料）

3A04p22　翻訳後修飾によりトリプトファンがイソプレニル化された新規ペプチドの探索

17:48　◦宇佐美翔平，林　峻輔，中村優太，岡田正弘（中部大院応生）

3A04p23　クルクミン類縁体による α - アミラーゼ阻害活性評価

17:59　◦近藤あずさ[1]，　増田温子[1]，　米本龍太[2]，　加藤英介[2]，川端　潤[2]，柳瀬笑子[1]（[1]岐阜大応生，[2]北大院農）

A05 会場　午前の部（10:05〜12:05）

有機—天然物，ケミカルバイオロジー，作用機構—

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A05a07　Hydrogen-Deuterium Exchange of Cross-Linkable α-Amino Acid Derivatives in Deuterated Triflic Acid

10:05　◦Lei Wang[1]，Yuta Murai[2]，Takuma Yoshida[1]，Masashi Okamoto[1]，Yasuko Sakihama[1]，Yasuyuki Hashidoko[1]，Makoto Hashimoto[1]（[1]Division of Applied Science, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, [2]Faculty of Advanced Life Science, Frontier Research Center for Post-Genome Science and Technology, Hokkaido University）

3A05a08　発光タンパク質（フォラシン）の発光基質誘導体の合成とその発光活性

10:16　◦松岡絢香[1]，　南郷成子[1]，　古市卓也[2]，　久世雅樹[1]，滝川浩郷[1]（[1]神戸大院農，[2]岐阜女子大家政）

3A05a09　体外受精におけるフラバン二量体処理マウス精子の効果

10:27　◦荒舘　忠[1]，　谷井一郎[1]，　小宮　顕[2]（[1]富山大医生物，[2]富山大医腎泌尿器）

3A05a10　新規 RNA 5'- トリホスファターゼ阻害物質 MI481-42F6 A,B,C および D に関する研究

10:38　◦梅北まや[1]，　五十嵐雅之[1]，　澤　竜一[1]，　山崎　学[1]，林　千草[1]，　波多野和樹[1]，　藤原俊伸[1]，　水本清久[2]，　野本明男[1]（[1]微化研，[2]北里大）

3A05a11　新規ヒスチジンキナーゼ阻害剤 Waldiomycin の作用機構

10:49　◦犬飼洋一[1]，　江口陽子[1]，　栃尾尚哉[2]，　木川隆則[2]，岡島俊英[3]，五十嵐雅之[4]，梅北まや[4]，内海龍太郎[1]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]理研横浜，[3]阪大・産研，[4]微化研）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A05a13　香気性の植物抽出物の細菌の増殖に与える影響の解析

11:10　◦朝井　計，小穴秋弓，今泉　優，長谷川登志夫（埼玉大学院理工）

3A05a14　Hsp90 を活性化する天然小分子化合物

11:21　◦仲本　準，天谷洋介（埼玉大院理工）

3A05a15　bZIP 型転写因子の 14-3-3 結合に関する生化学的研究

11:32　◦藤岡　興[1]，　千葉光浩[2]，　深澤壽太郎[2]，　三橋　渉[1]，加藤修雄[3]，豊増知伸[1]（[1]山形大農，[2]広島大院理，[3]大阪大産研）

3A05a16　T7 ファージディスプレイ法によるリダイフェン G 標的タンパク質の探索

11:43　◦池田健太郎[1]，　紙透伸治[1]，　草柳友恵[1]，　九十田千子[1]，渡邊千尋[2]，植竹祥子[2]，椎名　勇[2]，菅原二三男[1]（[1]東理大院理工，[2]東理大理）

3A05a17　単極紡錘体を誘導するピレノシン A の作用機構解析

11:54　◦紙透伸治[1]，　明畠佑典[1]，　九十田千子[1]，　東　恒仁[1]，知念拓実[2]，　竹本健二[1]，　志村聡美[1]，　松永朋子[1]，　佐原弘益[3]，臼井健郎[2]，松永幸大[1]，菅原二三男[1]（[1]東理大理工，[2]筑波大院生命環境，[3]麻布大獣医）

A05 会場　午後の部（14:00〜18:10）

有機—天然物，ケミカルバイオロジー，作用機構—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A05p01　ミトコンドリア NADH- ユビキノン酸化還元酵素（複合体 -I）の部位特異的化学修飾

14:00　◦桝谷貴洋，村井正俊，三芳秀人（京大院農　応用生命）

3A05p02　キナゾリンのミトコンドリア ADP/ATP 輸送体における結合部位の同定

14:11　◦浅野　周，村井正俊，三芳秀人（京都大　農）

3A05p03　ユビキノン結合性タンパク質 Coq10 におけるキノン結合部位の同定

14:22　◦松延広平[1]，村井正俊[1]，川向　誠[2]，三芳秀人[1]（[1]京大院農，[2]島根大生物資源科学）

3A05p04　シトクロム *c*- カルジオリピン複合体のペルオキシダーゼ活性誘導の分子機構

14:33　◦三木祐子，安部真人，三芳秀人（京都大院農）

3A05p05　リン脂質カルジオリピンのシトクロム *c* に対する結合部位の同定

14:44　◦小坂亜弓，田邊有貴恵，安部真人，三芳秀人（京大院農）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A05p07　合成ノビレチンの経口投与によるラットの真皮への影響

15:05　◦倉本純子[1]，　井上隆之[1]，　元矢知志[1]，　野村正人[2]，大谷　浩[1]（[1]島根大医，[2]近畿大学工）

3A05p08　*Senna occidentalis* 抽出物は線維芽細胞の増殖に影響を与える

15:16　◦元矢知志[1]，野村正人[2]，大谷　浩[1]（[1]島根大医，[2]近畿大工）

3A05p09　Camptothecin 耐性癌細胞に対する植物アルカロイド nitidine の有効性の検証

15:27　◦平良直幸[1]，岩崎公典[2]，稲福征志[2]，屋　宏典[2]（[1]鹿児島大院連合農，[2]琉球大学農）

3A05p10　オニヒトデ由来の神経突起伸長活性物質に関する研究

15:38　◦原田翔太，山田理紗，小鹿　一（名大院生命農）

3A05p11　フラノース型 D- アロース中鎖脂肪酸エステルのヒト白血病 MOLT-4F 細胞増殖抑制活性

15:49　◦小橋克哉，柳田　亮，芦田能基，山足陽和，川浪康弘（香川大農）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3A05p13　イチイ *Taxus cuspidata* 由来 α, β チューブリンの発現とタキソール結合性の評価
16:10　◦工藤佑馬，長由扶子，山下まり，此木敬一（東北大院農）

3A05p14　ホタテ貝中で進行する下痢性貝毒オカダ酸のアシル化反応
16:21　◦此木敬一，古用幸愛，小野田竜也，長由扶子，山下まり（東北大院農）

3A05p15　ヒト培養細胞中に見られる β-アロシダーゼ活性に関する研究：光アフィニティーラベル法による標的タンパク質の同定
16:32　◦三浦一輝[1]，荒瀧幸和実[2]，袴田　航[1,2]，平野貴子[2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用，[2]日大生資科・生命化）

3A05p16　フェニルプロパン酸骨格を有する SARS 3CL protease 阻害剤の合成と構造活性相関研究
16:43　◦若林雅貴[1]，高沼大樹[1]，似内郁美[1]，赤路健一[2]，今野博行[1]（[1]山形大院理工，[2]京都薬大）

3A05p17　アミロイド β 凝集阻害剤を指向したクルクミン誘導体の構造活性相関研究
16:54　遠藤　仁，伊勢里美，中館眞美子，◦今野博行（山形大院理工）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3A05p19　糖結合性天然物・pradimicin A の二量体構造
17:15　◦中川　優[1]，橋爪大輔[1]，土井崇嗣[2]，竹腰清乃理[2]，五十嵐康弘[3]，伊藤幸成[1]（[1]理研，[2]京大院理，[3]富山県大）

3A05p20　アミロイド β ダイマーの合成と活性評価
17:26　◦鈴木天志[1]，村上一馬[1]，佐藤瑞穂[1]，岩崎真実[2]，久米利明[2]，入江一浩[1]（[1]京都大学大学院農学研究科，[2]京都大学大学院薬学研究科）

3A05p21　非カテコール型フラボノイドによるアミロイド β 42 凝集抑制機構
17:37　◦佐藤瑞穂[1]，村上一馬[1]，赤木謙一[2]，入江一浩[1]（[1]京都大院農，[2]医薬基盤研）

3A05p22　伝統生薬チョウトウコウに含まれるアミロイド β 凝集抑制物質
17:48　◦村上一馬，井戸恭平，佐藤瑞穂，山口加乃子，入江一浩（京大院農）

3A05p23　Debromoaplysiatoxin の 4 位不斉メチル基の生物活性における役割
17:59　◦菊森将之[1]，徳田春邦[2]，鈴木信孝[2]，村上　明[1]，入江一浩[1]（[1]京大院農，[2]金沢大院医）

A06 会場　午前の部（10:05〜12:05）

有機—天然物－単離構造決定，微生物—

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A06a07　放線菌の生産する DPPH ラジカル捕捉物質 12T061A の単離と化学構造
10:05　◦菰田俊一[1]，佐伯奈央子[1]，越野広雪[2]，清田洋正[3]（[1]宮城大食産業，[2]理研，[3]岡山大院・環境生命）

3A06a08　放線菌の生産する DPPH ラジカル捕捉物質 13T030A の単離と化学構造
10:16　佐伯奈央子[1]，◦杉浦　舞[1]，越野広雪[2]，清田洋正[3]，菰田俊一[1]（[1]宮城大食産業，[2]理研，[3]岡山大院・環境生命）

3A06a09　タイ植物由来 *Microbispora* 属放線菌 GMKU363 が生産する新規ポリケタイドの絶対配置の決定と生物活性
10:27　◦秋山浩文[1]，奥　直也[1]，Indanada Chantra[2]，Thamchaipente Arinthip[2]，及川　勉[3]，五十嵐康弘[1]（[1]富山県立大・生工研セ，[2]タイ Kasetsart 大・理，[3]神奈川県立保健福祉大・保）

3A06a10　Production of phthoxazolin, a lipophilic triene compound, is triggered by disruption of an autoregulator receptor homologue in *Streptomyces avermitilis*
10:38　◦Dian Anggraini Suroto[1]，Shigeru Kitani[1]，Kiyoko Miyamoto[1]，Haruo Ikeda[2]，Takuya Nihira[1]（[1]International Center for Biotechnology,Osaka Univ.，[2]Kitasato Institute for Life Sciences,Kitasato Univ.）

3A06a11　放線菌の生産する環状デプシペプチドによるクオラムセンシング阻害活性
10:49　◦庄島あかね[1]，松藤貴久[1]，Desouky Said Elsayed[1]，大久保謙一[1]，五十嵐康弘[2]，園元謙二[1,3]，中山二郎[1]（[1]九大院農，[2]富山県大・生工研，[3]九大バイオアーク）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A06a13　*Hamigera* 属糸状菌が生産するクオラムセンシング阻害物質に関する研究
11:10　◦門嶋泰斗[1]，郷田史也[1]，花房知朗[1]，松藤貴久[2]，中山二郎[2]，五十嵐康弘[1]（[1]富山県立大・生工研セ，[2]九大院・農）

3A06a14　ジャガイモ疫病菌 *Phytophthora* のファイトアレキシン誘導性エリシターの探索
11:21　◦天廣志保，松田健太郎，村田　涼，川北一人，小鹿　一（名大院生命農）

3A06a15　海洋性粘液細菌のゲノムデータに基づく新規二次代謝産物の探索
11:32　◦佐藤潤一[1]，孫　雨偉[1]，不藤亮介[2]，飯塚　俊[3]，小鹿　一[1]（[1]名大院生命農，[2]バイオインダストリー協会，[3]味の素(株)イノベーション研究所）

3A06a16　*Chloroflexi* 門好熱性細菌 *Thermosporothrix* の二次代謝能の解析
11:43　◦山田　和，山本和樹，奥　直也，五十嵐康弘（富山県大・生工研セ）

3A06a17　Lycopene cyclase 高発現酵母（改変 *Xanthophyllomces dendrorhous*）が生産する新規カロテノイド 3-hydroxy-7',8'-dihydro echinenone
11:54　◦大澤絢子[1]，位寄かのこ[1]，Gerhard Sandmann[2]，新藤一敏[1]（[1]日女大家政・食物，[2]フランクフルト大学）

A06 会場　午後の部（14:00〜17:48）

有機—天然物－単離構造決定，動物，植物—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A06p01　アコヤガイ貝殻靭帯部から見出された PfTIMP の構造・機能解析
14:00　◦鈴木道生[1]，小暮敏博[2]，前山　薫[3]，服部文弘[3]，作田庄平[1]，長澤寛道[1]（[1]東大院農，[2]東大院理，[3]御木本製薬）

3A06p02　アコヤガイ貝殻稜柱層カルサイト結晶内の小角粒界の形成機構
14:11　◦近都浩之[1]，奥村大河[2]，小暮敏博[2]，作田庄平[3]，鈴木道生[3]（[1]東大農，[2]東大院理，[3]東大院農）

3A06p03　軟体動物の貝殻形態形成に関与するキチナーゼの解析
14:22　◦米澤　舞[1]，小暮敏博[2]，作田庄平[1]，鈴木道生[1]（[1]東大院農，[2]東大院理）

3A06p04　イボタガ(カイコガ上科イボタガ科)の性フェロモンの同定と野外誘引試験
14:33　◦熊野谿明子[1]，中　秀司[2]，鐘ヶ江明子[1]，宮地崇司[1]，安藤　哲[1]（[1]東京農工大院 BASE，[2]鳥取大学）

3A06p05　アワダチソウグンバイ *Corythucha marmorata* 成虫分泌物の性フェロモン活性
14:44　◦渡邊綺咲，清水伸泰（京都学園大バイオ環境）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A06p07　Reexamination of the Female Sex Pheromone of the Sweetpotato Vine Bore Moth: Identification of Tricosatriene and Its Field Evaluation
15:05　◦Qi YAN[1]，Le Van Vang[2]，Tetsu Ando[1]（[1]BASE，Tokyo University of Agriculture and Technology，[2]Department of

Plant Protection, Can Tho University）

3A06p08　ヒロヘリアオイラガ幼虫分泌液由来の発疹誘起物質
15:16　○野呂真奈美，　平川祥成，　水谷祐輔，　西尾昌洋，今井邦雄，勝崎裕隆（三重大院生資）

3A06p09　スクミリンゴガイ卵塊の化学防御機構に関する研究
15:27　○安部洋生，奥　直也，五十嵐康弘（富山県大･生工研セ）

3A06p10　シロカイメンタケに含まれる炎症抑制物質
15:38　○野村瑞樹，廣田　満（信州大院農）

3A06p11　エノキに含まれるオオムラサキの産卵刺激物質
15:49　○和田篤史，中出　彩，小野　肇，吉永直子，森　直樹，西田律夫（京大院農・応用生命）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3A06p13　花粉に含まれる蛍光物質の化学生態学
16:10　○森信之介[1]，大石雅典[1]，(故)福井宏至[2]，(故)後藤勝実[3]，月岡淳子[3]，佐久間正幸[1]，平井伸博[1]（[1]京都大院農，[2]香川大名誉教授，[3]京都薬科大附属薬用植物園

3A06p14　紫外線照射イネ葉からの新規ファイトカサン類縁体の同定
16:21　井上靖乃[1]，堀江清孝[2]，戸嶋浩明[1,2]，○長谷川守文[1,2]（[1]茨城大農，[2]東京農工大院連農）

3A06p15　ストリゴラクトン分子の起源-カロテノイド光酸化仮説-
16:32　○寺本　匡[1]，　米山弘一[2]，　秋山康紀[3]，　山口信次郎[4]，眞岡孝至[5]，平井伸博[1]（[1]京都大院農，[2]宇都宮大雑草科学研セ，[3]大阪府大院生命環境，[4]東北大院生命科学，[5]生産開発研）

3A06p16　シモクレン(*Magnolia liliiflora*)花被に含まれる生理活性物質
16:43　○上石和樹[1]，　佐久間裕貴[1]，　板垣和幸[1]，　武山佳代[1]，塩野義人[1]，貫名　学[1]，木村賢一[2]，村山哲也[1]（[1]山形大院農，[2]岩手大院農）

3A06p17　気孔分化を調節する stomagen の普遍性に関する研究
16:54　○西澤美智[1]，　村上一馬[2]，　入江一浩[2]，　坂神洋次[1]，近藤竜彦[1]（[1]名大院生命農，[2]京大院農）

p19〜p21 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3A06p19　植物由来カフェ酸誘導体の肝細胞増殖因子産生促進活性
17:15　○繁森英幸[1]，　栗栖真奈美[1]，　中曽根理絵[1]，　宮前友策[1]，松浦大輔[2]，金谷裕敏[2]，谷野伸吾[2]（[1]筑波大院生命環境，[2](株)バスクリン）

3A06p20　Studies on Antitrypanosomal Activity of Myanmar Medicinal Plants
17:26　○NYUNT KHINESWE[1]，　Ahmed ELKHATEEB[2]，Ken KATAKURA[1]，Hideyuki MATSUURA[1]（[1]Hokkaido Univ.，[2]National Research center, Egypt）

3A06p21　馬鈴薯を原料とした機能性食品ポテインからのトリプシンインヒビターの同定
17:37　○矢高圭祐[1]，　友澤　寛[2]，　鍔田仁人[2]，　山口和也[2]，中村浩蔵[1]（[1]信州大院農，[2](株)東洋新薬）

A07 会場　午前の部（9:22〜12:05）

有機―合成，反応機構―

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

3A07a03　ホコリタケに含有されるグルタミン酸誘導体 lycoperdic acid の合成
9:22　○石内隆太郎，勝田　亮，矢島　新，額田恭郎（東農大院応生）

3A07a04　キノコから単離された ganomycin I と fornicin A の合成と生物活性
9:33　○浦尾翔太，矢島　新，勝田　亮，額田恭郎（東農大院農）

3A07a05　ヨードベンゼンを触媒とした酸化的環化反応による 1*H*-インダゾールの簡便合成
9:44　○柏　充裕，谷森紳治（大阪府大院生命環境）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A07a07　*N,N,N′*-Trimethylethylenediamine を用いるポリアセトキシベンズアルデヒドのオルト脱アセチル化反応
10:05　○福士幸治（北大院農）

3A07a08　リポシドマイシンの合成研究 2: ジアゼパノン環の環化反応の検討
10:16　○中島範行，　濱田昌弘，　岸本崇生，　古野　愛，富崎裕紀子，清田太一（富山県大工）

3A07a09　DNA ポリメラーゼ Y ファミリー阻害剤 ペニシリオール類の合成研究
10:27　○遠藤正伍[1]，　黒澤　敦[1]，　志村聡美[1]，　竹内倫文[1]，鈴木孝洋[2]，紙透伸治[1]，小林　進[2]，菅原二三男[1]（[1]東理大院理工，[2]東理大薬）

3A07a10　抗ウイルス活性を有する新規環状デプシペプチド MA026 の合成研究と標的分子の探索
10:38　○志村聡美[1]，　中嶋　翔[1,2]，　藤井俊孝[1]，　池田健太郎[1]，イザギレ - カルボネルヘスス[1]，　石間正浩[1]，　竹内倫文[1]，紙透伸治[1]，　鈴木孝洋[3]，　倉持幸司[4]，　渡士幸一[1,2]，　小林　進[3]，菅原二三男[1]（[1]東理大院理工，[2]国立感染症研究所　ウイルス第2部，[3]東理大薬，[4]京府大院生命環境）

3A07a11　Berkeleyamide D の短段階合成と VCD 励起子キラリティー法による絶対立体配置の決定
10:49　小森健太[1]，　谷口　透[2]，　水谷将馬[1]，　門出健次[2]，○倉持幸司[1]，椿　一典[1]（[1]京府大院生命環境，[2]北大院先端生命）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A07a13　弱い分子間相互作用の集積を駆動力とした立体選択的光二量化反応の発見：光応答性分子としての可能性
11:10　○太田元博[1]，　笹森貴裕[2]，　水品善之[3,4]，　時任宣博[2]，倉持幸司[1]，椿　一典[1]（[1]京府大院生命環境，[2]京大化研，[3]神戸学院大栄養，[4]神戸学院大 LSC）

3A07a14　Callipeltin B の合成研究：環化部位の探索
11:21　○菊池真理，今野博行（山形大院理工）

3A07a15　Homophymine A の全合成を目指した立体選択的異常アミノ酸の合成と環状部構築へアプローチ
11:32　○東海林由憲, 武田　祥, 菊池真理, 今野博行（山大院理工）

3A07a16　ヒト γ - グルタミルトランスペプチダーゼの強力な反応機構依存的カーバメート阻害剤の開発
11:43　○李　春杰[1]，　尾崎文音[1]，　渡辺文太[1]，　肥塚崇男[2]，平竹　潤[1]（[1]京都大院農，[2]山口大農）

3A07a17　Fmoc- アルギニン誘導体―ジメチルチオホスフィン酸混合酸無水物のラクタム化の抑制
11:54　○赤司里奈，岩山祐己，稲津敏行（東海大工）

A07 会場　午後の部（14:00〜18:10）

有機―合成，反応機構―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A07p01　topsentolide C_2および A_2の合成研究
14:00　○十和田諒，倉科友輔，桑原重文（東北大院農）

3A07p02　Terpendole E の合成研究
14:11　○寺西貴昭，桑原重文（東北大院農）

3A07p03　lipoamicoumacin B の全合成研究
14:22　○鈴木智美，永沢友裕，桑原重文（東北大院農）

3A07p04　抗腫瘍物質マオエクリスタル V の合成研究
14:33　○佐藤恵里子[1]，　小竹正晃[1]，　佐々木郁香[1]，　浅尾洋樹[1]，島崎泰治[1]，山田てい子[1]，桑原重文[1]，清田洋正[2]（[1]東北大院農・生物産業創成，[2]岡山大院・環境生命）

3A07p05　分子内反応を用いた 4-6 縮合型(+)-catechin 2 量体 procyanidin B6 の立体選択的合成
14:44　○東野雄祐[1]，　森　一起[2]，　岡本泰輔[1]，　中島範行[3]，齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電通大院･工，[2]大阪電通大･工，[3]富山県大･工）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A07p07　Epigallocatechin 2 量体の合成と構造 - 活性相関研究
15:05　°高野翔太[1]，　岡本泰輔[2]，　法島太一[1]，　岡本修平[2]，石原沙也加[2]，土井翔馬[2]，石田匡彦[1]，中島範行[3]，齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電通大・工，[2]大阪電通大院・工，[3]富山県大・工）

3A07p08　有機合成 procyanidin oligomer 2~6 量体の SARS-コロナウイルス増殖阻害活性，および，ガン細胞増殖抑制活性
15:16　°濱田義知[1]，　岡本泰輔[2]，　吉仲由之[3]，　石原沙也加[2]，岡本修平[2]，伊藤孝太郎[1]，中島範行[4]，齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電気通信大・工，[2]大阪電気通信大院・工，[3]東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・ウイルス制御，[4]富山県立大・工）

3A07p09　ウーロンテアニン類の生成機構の証明
15:27　°廣瀬紗弓，柳瀬笑子（岐阜大院応生）

3A07p10　天然フラボノイド ugonin 類縁体の選択的合成法の開発
15:38　°田中寛知[1]，　長谷川啓[2]，　森由希恵[2]，　川井　悟[3]，吉澤結子[2]，常盤野哲生[2]（[1]秋田県立大院生資科，[2]秋田県立大生資科，[3]東京電機大理工）

3A07p11　C_2 対称キラルサルファイトを用いる光学活性スルホキシドの合成
15:49　°林　光輝，濱本博三，塩入孝之，松儀真人（名城大農）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3A07p13　分子内 CH/π 相互作用を利用する高活性型メタセシス触媒の開発
16:10　°犬飼紗絵，小林佑基，塩入考之，濱本博三，松儀真人（名城大農）

3A07p14　ライトフルオラスサレンマンガン錯体の合成と triphenylethylene の不斉エポキシ化反応
16:21　°浅井直輝，小林佑基，塩入孝之，濱本博三，松儀真人（名城大農）

3A07p15　ライトフルオラス Fmoc 試薬を活用した Tenuecyclamide A 全立体異性体のスプリット型簡易合成
16:32　°杉山祐也，江口文崇，高橋広明，濱本博三，塩入孝之，松儀真人（名城大農）

3A07p16　Ugi 反応を用いた海洋天然物の合成研究
16:43　°市川善康，齋藤健太，三村利香（高知大学理学部）

3A07p17　位置選択的変換を鍵段階とする，希少フラボノイド類の合成研究
16:54　°須貝　威，松内佑輔，花屋賢悟，庄司　満，木内文之（慶應大薬）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3A07p19　Hostasolid A の合成研究
17:15　°山本　駿，久世雅樹，滝川浩郷（神戸大院農）

3A07p20　抗菌活性物質 aurachin 類およびそのアナログ化合物の合成研究
17:26　°榎本　賢，北川　航，安武義晃，清水弘樹（産業技術総合研究所生物プロセス研究部門）

3A07p21　塩基除去修復酵素の活性評価を目的とした脂質酸化物による DNA 付加体とそのアミダイト体の合成研究
17:37　°松島芳隆[1]，　記野　順[1]，　後藤正憲[2]，　新村和也[2]，椙村春彦[2]（[1]浜松医科大学・化学，[2]浜松医科大学・腫瘍病理学）

3A07p22　カルバモイル基を有するスフィンゴ糖脂質の合成と免疫賦活活性
17:48　°田代卓哉[1]，　重浦智邦[2]，　渡会浩志[2]，　小山裕雄[1]，谷口　克[2]，森　謙治[1]（[1]理研創薬，[2]理研 IMS）

3A07p23　ミヤコシン A の全立体異性体の合成と HPLC 分析による天然ミヤコシン A の絶対立体配置決定
17:59　°森　謙治[1,2]，赤坂和昭[3]，松永茂樹[4]（[1]東洋合成工業(株)，[2]理研，[3]尚絅学院大，[4]東大院農生科）

A08 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物—物質生産－醸造，発酵（一次代謝産物）—

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A08a01　大腸菌の高圧二酸化炭素処理ストレス応答機構の解明
9:00　°田上　峻，古川壮一，森永　康（日大院・生資科）

3A08a02　*Leuconostoc* 属乳酸菌と出芽酵母の複合バイオフィルム形成と共凝集
9:11　°山岸明日香，平山　悟，古川壮一，森永　康（日大院・生資科）

3A08a03　酵母との複合バイオフィルム形成能を有する乳酸菌のゲノムシーケンス及びポストゲノム解析
9:22　°平山　悟，古川壮一，森永　康（日大院・生資科）

3A08a04　りんご未熟果搾汁残渣を利用した麹菌の液体培養による α - アミラーゼ生産における無機塩の効果
9:33　°井澤弘美[1]，佐藤　勉[2]，藤田修三[1]（[1]青森県立保健大健康科学，[2]秋田今野商店）

3A08a05　固体培養中に培養基質水分を低下させた時の酵素生産への影響
9:44　°伊藤一成[1]，五味勝也[2]，狩山昌弘[3]，三宅剛史[1]（[1]岡山県工技セ，[2]東北大院農，[3]フジワラテクノアート）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A08a07　回転ドラム型製麹機が麹菌の生理と物質生産に及ぼす影響
10:05　°横田林太郎[1]，　徳岡昌文[1]，　岩下和裕[2]，　進藤　斉[1]，佐藤和夫[1]（[1]東京農大・農・醸造，[2]酒総研）

3A08a08　味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株由来酸性ホスファターゼ(AphC)の酵素学的特性
10:16　°安田(吉野)庄子[1]，中村恵美[1]，小野奈津子[1]，長谷川摂[1]，和久　豊[2]，杉本達哉[3]，楠本憲一[4]，北本則行[1]（[1]あいち産科技総セ・食工技セ，[2](株)ビオック，[3]ナカモ(株)，[4]農研機構・食総研）

3A08a09　米グルテリンから見た麹菌 PepA の醸造機能の再検討
10:27　°濱田雄太郎[1,2]，　垣内慎吾[1,2]，　北村洋朗[1,2]，　磯谷敦子[1,2]，織田　健[2]，岩下和裕[1,2]（[1]広大院・先端研，[2]酒総研）

3A08a10　*A. flavus-A.oryzae* 菌株群のゲノムワイドな系統解析
10:38　大田　民[1]，織田　健[1]，後藤奈美[1]，°岩下和裕[1,2]（[1]酒総研，[2]広大先端）

3A08a11　黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* のペクチンメチルエステラーゼ遺伝子破壊株の機能解析(第 2 報)
10:49　°水谷　治，柿薗ダララット，高橋　徹，山田　修（酒総研）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A08a13　白麹菌 *Aspergillus kawachii* のクエン酸高生産に関わる遺伝子の探索
11:10　田代智史[1]，　°二神泰基[2]，　森　一樹[2]，　和田正太郎[3]，田代康介[2]，　久原　哲[2]，　梶原康博[3]，　高下秀春[3]，　竹川　薫[2]，後藤正利[2]（[1]九大院生資環，[2]九大院農，[3]三和酒類）

3A08a14　沖縄自然界からの泡盛黒麹菌の単離と酒造好適株の選抜
11:21　仲間加奈，坂元理奈，金城悠希菜，°渡邉泰祐，外山博英（琉球大農・亜熱生資）

3A08a15　花から分離した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の清酒醸造特性解析
11:32　°小野奈津子[1]，安田(吉野)庄子[1]，三井　俊[1]，船越吾郎[1]，加藤雅士[2]，北本則行[1]（[1]あいち産科技総セ･食工技セ，[2]名城大･農）

3A08a16　思川桜からの酒造用酵母の分離
11:43　°荻野目あづさ[1]，三川　隆[2]，上田　誠[1]（[1]小山高専物質工学科，[2]三菱化学メディエンス）

3A08a17　酵母識別 DNA マーカーを有する尿素非生産性清酒酵母の単離
11:54　°栗林　喬[1]，　田村博康[2]，　安澤義彦[2]，　平田　大[3]，渡邊健一[1]（[1]新潟県醸造試験場，[2]朝日酒造，[3]広島大・先端研）

A08 会場　午後の部（14:00〜18:10）

微生物―物質生産－醸造，発酵（一次代謝産物）―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A08p01　ピルビン酸低減清酒酵母のミトコンドリア代謝・活性解析
14:00　アグリミゲンナロ[3]，　メナマリア[3]，　泉　知輝[1]，ピサノイザベラ[3]，　ゲルミナリオルクレジア[3]，　福崎久誌[1]，パルミエリルイジ[3]，ブランクラース[2]，◦北垣浩志[1]（[1]佐賀大学農，[2]アーヘン工科大学，[3]バリ大学）

3A08p02　ミトコンドリアの自食作用（ミトファジー）阻害による酵母の発酵力増強
14:11　◦城間祥大[1]，　ジャヤコディラヒル[1,2]，　堀江健太[1]，岡本浩二[3]，北垣浩志[1,2]（[1]佐賀大，[2]鹿児島大院連合農，[3]阪大院生命機能）

3A08p03　オートファジー欠損清酒酵母の醸造特性解析
14:22　◦佐田尚隆，山内隆寛，浅井拓也，明石貴裕（白鶴酒造(株)）

3A08p04　清酒もろみから分離したリンゴ酸高生産清酒酵母のゲノム解析
14:33　◦大場孝宏[1]，　吉瀬友紀[2]，　泉本英次[2]，　渡辺大輔[3,4]，赤尾　健[3]（[1]福岡工技セ生物食品研，[2]久留米高専生化，[3]酒総研，[4]現　奈良先端大バイオ）

3A08p05　高リンゴ酸生産・低酢酸生産性変異株の細胞内代謝物プロファイル
14:44　◦中山俊一[1]，　小杉慎吾[1]，　清　啓自[1]，　満生慎二[2]，門倉利守[1]，中里厚実[1]（[1]東農大・応生・醸造，[2]九産大・工・物質生命化学）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A08p07　二種類の糖の同時資化が酵母にもたらす増殖阻害
15:05　◦畠中治代[1,2]，　光永　均[2]，　大村文彦[1]，　石黒正路[3]，馬場健史[2]，福崎英一郎[2]（[1]サントリー SIC，[2]大阪大院・生命先端工，[3]新潟薬科大・応生命）

3A08p08　休止期移行欠損株における下面発酵ビール酵母の発酵性
15:16　◦大室　繭[1]，　加藤　拓[1]，　山岸裕美[1]，　相澤正幸[1]，周　　延[2]，渡辺大輔[2,3]，赤尾　健[2]，後藤奈美[2]（[1]アサヒビール(株)，[2](独)酒総研，[3]現・奈良先端大）

3A08p09　ビールの泡持ちを低下させる液胞プロテアーゼ PrA と関連するタンパク質の解析
15:27　◦佐伯　圭[1]，　陶山明子[2]，　竹川　薫[2]，　佐藤雅英[1]，執行達朗[1]（[1]サッポロビール・価値創造フロンティア研究所，[2]九大院・生資環・生命機能）

3A08p10　海水からの発酵性酵母の分離と分離株のワイン醸造学的性質
15:38　◦小森光紗[1]，　乙黒美彩[1]，　岸本宗和[1]，　佐野憲悟[2]，佐野邦夫[2]，柳田藤寿[1]（[1]山梨大･ワイン研，[2]伊豆食文化公園(株)）

3A08p11　ワインアロマを作る酵母の解析
15:49　◦小野大洋，池原作務，曽　少豊，藤森　嶺，妙田貴生，西澤　信，遠藤明仁，宮地竜郎，中川純一（東京農業大院生物産業）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3A08p13　酵母菌株間での dimethyl sulphoxide reductase の違い
16:10　◦菅井竹彦，金内　誠，畑中咲子，下山田真（宮城大食産）

3A08p14　誘導物質非存在下で β - グルコシダーゼを分泌する新種酵母 Ogataea　neopini
16:21　◦齋藤聡志（トヨタ自動車　バイオ・緑化）

3A08p15　機能性アミノ酸に着目したストレス耐性パン酵母の育種と製パン特性の解析
16:32　橋田恵介，渡辺大輔，◦高木博史（奈良先端大バイオ）

3A08p16　ED 経路導入による酵母中央代謝系路の拡張
16:43　◦森田啓介[1]，　梶畠秀一[1]，　石井　純[2]，　松田史生[1]，清水　浩[1]（[1]阪大院・情報・バイオ情報，[2]神大・研究環）

3A08p17　代謝シミュレーションにもとづく酵母イソブタノール生産能の向上
16:54　◦松田史生[1,2]，　石井　純[3]，　近藤貴志[4]，　伊田賢吾[5]，手塚裕紀[5]，近藤昭彦[2,5]（[1]阪大院情報，[2]理研 CSRS，[3]神戸大自然科学，[4]横国大環境情報，[5]神戸大院工）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3A08p19　産業用バイオエタノール酵母由来の *HAA1* 遺伝子過剰発現株と糖蜜を用いたバイオエタノール生産
17:15　◦稲葉拓哉[1,2]，　渡辺大輔[3,4]，　吉山洋子[2]，　田中晃一[2]，小川　順[1]，高木博史[3]，下飯　仁[4]，島　　純[2]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大・微生物科学，[3]奈良先端大・バイオ，[4]酒類総合研究所）

3A08p20　油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 由来 Δ *lig4* 株を用いた分子育種株の構築
17:26　◦菊川寛史[1]，　櫻谷英治[1]，　安藤晃規[1,2]，　落合美佐[3]，清水　昌[1,4]，小川　順[1,2]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大・生理化学ユニット，[3]サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社，[4]京都学園大・バイオ環境）

3A08p21　油糧微生物 *Mortierella alpina* におけるオレイン酸およびリノール酸生産性の向上
17:37　◦阪本鷹行[1]，櫻谷英治[1]，安藤晃規[2]，島　　純[3]，小川　順[1,2]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大生理化学，[3]京大微生物科学）

3A08p22　油糧性糸状菌 *Mortierella alpina* S14 株における RNAi 法を用いた Δ 12 不飽和化酵素発現抑制によるエイコサジエン酸（EDA）の生産
17:48　◦奥田知生[1]，　安藤晃規[1,2]，　根来宏明[1]，　櫻谷英治[1]，島　　純[3]，小川　順[1,2]（[1]京大院農･応用生命，[2]京大･生理化学，[3]京大・微生物科学）

3A08p23　油糧微生物 *Mortierella alpina* への外来 Δ 17 不飽和化酵素遺伝子導入による常温 EPA 生産
17:59　◦村椿達哉[1]，　安藤晃規[2]，　根来宏明[1]，　菊川寛史[1]，櫻谷英治[1]，島　　純[3]，小川　順[1]（[1]京大院農･応用生命，[2]京大･生理化学，[3]京大・微生物科学）

A09 会場　午前の部（9:11〜11:54）

微生物―細胞－複合微生物，共生微生物，難培養微生物―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3A09a02　植物内生細菌による宿主植物の重金属蓄積及び耐性能獲得メカニズムの解析
9:11　◦市橋明大，大嶋俊介，長田賢志，山路恵子，野村暢彦（筑波大・院・生命環境）

3A09a03　外生菌根菌の生育に対するフラボノイド類の効果
9:22　◦足立亜衣，加瀬谷泰介（(公財)東洋食品研究所）

3A09a04　高温性堆肥における経時的・空間的温度変化に伴う菌叢変化
9:33　◦栗冠真紀子，福丸琢人，東　俊之，千葉悠佳，木村哲也，栗冠和郎（三重大院生資）

3A09a05　還元的酢酸生成菌と酢酸還元菌の共培養系
9:44　◦阿藤　真，石井正治，五十嵐泰夫（東大院農生・応生工）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A09a07　木材チップ分解性メタン生成微生物群集の構築とその特性
10:05　◦白鳥初美[1]，石井匡志[2]，上田賢志[1]（[1]日大生物資科・生命セ，[2]アゴラ造園株式会社）

3A09a08　花に生息する嫌気性菌に関する研究
10:16　◦上野一輝，　菅原麻美，　黒沢佳奈，　篠奈津実，青木由加里，板橋貴智，新村洋一，川崎信治（東農大バイオ）

3A09a09　トマトネコブセンチュウ防除に有効な放線菌の探索

10:27 ○猶塚陽介，石神洸太，徳山真治（静大院農）

3A09a10　カメムシ共生細菌 *Burkholderia* sp. SFA1 株の農薬分解および耐性機構

10:38 ○佐藤由也[1]，　小池英明[2]，　竹下和貴[2]，　伊藤英臣[2]，菊池義智[2]，堀　知行[1]（[1]産総研・環境管理，[2]産総研・生物プロセス）

3A09a11　次世代シークエンサーの適用による RNA-SIP の高感度化

10:49 ○青柳　智[1]，　佐藤由也[1]，　伊藤英臣[2]，　花田　智[2]，菊池義智[2]，堀　知行[1]（[1]産総研・環境管理，[2]産総研・生物プロ）

a13〜a16 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A09a13　固体培地での生育能の低下した大腸菌変異株の分析

11:10 ○納庄一樹，三井智玄，池端祐仁，小川哲弘，日高真誠，正木春彦（東大院農）

3A09a14　大腸菌の VBNC 化を緩和する遺伝子のスクリーニング

11:21 ○高丸玲子，　森本亜希子，　西尾優宏，　小川哲弘，日高真誠，正木春彦（東大院農）

3A09a15　アジア人の腸内フローラに見られる 2 つのエンテロタイプと地域特異性

11:32 ○東佳那子[1]，　JIAHUI Jiang[1]，　渡辺幸一[2]，DEMBEREL Shirchin[8]，　NITISINPRASERT Sunee[3]，PARK Yongha[9]，　ENDANG S. Rahayu[4]，　REN Fa-Zheng[5]，Tsai Ying-Chieh[6]，　園元謙二[1]，　LEE Yuan-Kun[7]，　中山二郎[1]（[1]九大院農，[2]ヤクルト中央研究所，[3]カセサート大学，[4]ガジャ・マダ大学，[5]中国農業大学，[6]国立陽明大学，[7]シンガポール国立大学，[8]モンゴル州立農業大学，[9]ヨンナム大学）

3A09a16　コール酸長期摂取ラットにおける糞便中胆汁酸組成の変化と腸内細菌叢との関係

11:43 ○馬場菜那子[1]，　萩尾真人[1]，　李　慈英[1]，　吹谷　智[1]，小椋義俊[2,3]，　清水英寿[1]，　大岡唯祐[2]，　林　哲也[2,3]，　石塚　敏[1]，横田　篤[1]（[1]北大院農，[2]宮崎大医，[3]宮崎大フロンティア）

A09 会場　午後の部（14:00〜18:10）

微生物—細胞－栄養，生育，増殖—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A09p01　*Lactobacillus gasseri* を用いた発酵大豆製品製造への新たなアプローチ

14:00 ○荒川健佑[1]，　松永佳奈子[1]，　滝廣宗平[1]，　川井　泰[2]，増田哲也[2]，宮本　拓[1]（[1]岡山大院環境生命，[2]日大生資科）

3A09p02　*Moorella thermoacetica* 芽胞の発芽と発芽誘起剤

14:11 ○青山好男（(公財)東洋食品研）

3A09p03　超好熱菌の分岐鎖ポリアミン合成酵素の役割

14:22 ○岡田和真[1]，秀瀬涼太[1]，今中忠行[2]，藤原伸介[1]（[1]関西学院大学，[2]立命館大学）

3A09p04　安定性の異なる *trpC* 遺伝子の置換が超好熱菌の生育に及ぼす影響

14:33 ○三浦歌織[1]，　藤原綾子[1]，　秀瀬涼太[1]，　今中忠行[2]，藤原伸介[1]（[1]関西学院大理工生命科学，[2]立命館大院生命生工）

3A09p05　好アルカリ性細菌 Bacillus pseudofirmus OF4 株由来の機能未同定低分子量タンパク質 BpOF4_01690 の機能解析

14:44 ○高橋哲亮，伊藤政博（東洋大院・生命科学）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A09p07　平板法によって評価した大腸菌の無傷および加熱損傷細胞の生存性における酸化ストレスの関与

15:05 ○西谷巧太，坂元　仁，土戸哲明（関西大化生工）

3A09p08　枯草菌胞子のコア内の酸性 pH および発現タンパク質に対するジピコリン酸の役割

15:16 ○前田伸彦[1]，坂元　仁[1]，古田雅一[2]，土戸哲明[1]（[1]関西大学，[2]大阪府大）

3A09p09　枯草菌の抗酸化遺伝子多重欠損株を用いた“ストレス感受性 / 抵抗性マトリックス解析”

15:27 ○御厨真幸，坂元　仁，土戸哲明（関西大化生工）

3A09p10　枯草菌における新規緊縮応答制御機構の解析

15:38 ○高田　啓[1]，　清水　翔[1]，　大竹俊平[1]，　志波　優[2]，斉藤菜摘[3]，福永芳規[4]，戸澤　譲[4]，吉川博文[1,2]（[1]東京農大・応生科・バイオ，[2]東京農大・ゲノム解析セ，[3]慶応大・先端生命研，[4]愛媛大・無細胞セ）

3A09p11　レーザー計測技術を用いた大腸菌コロニー形成過程の 3 次元リアルタイム解析

15:49 ○津留美紀子，出口　茂（海洋機構）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3A09p13　腸内細菌による鉄還元

16:10 ○櫻井友樹[1]，鈴木義規[2]，斎木　博[2]（[1]東京工科大学大学院，[2]東京工科大学）

3A09p14　大腸菌における鉄還元酵素の探索

16:21 佐藤純一[1]，　○湯本小百合[1]，　中元翔太[1]，　石井達也[1]，武田晃治[2]，　吉村悦郎[3]，　中川純一[4]，　西田雄三[5]，　阿部　晃[6]，川崎信治[1]，新村洋一[1]（[1]東農大応生科・バイオ，[2]東農大・教職，[3]東大院農生科・応生科，[4]東農大生物産業・食香，[5]金沢医大，[6]札幌医大・眼科）

3A09p15　*Amphibacillus xylanus* における遊離フラビン関与の好気代謝と微生物界における遊離フラビンの分布

16:32 木俣真弥[1]，　望月大地[1]，　○富塚　駿[1]，　新井俊晃[1]，藤田信之[2]，　阿部　晃[3]，　中川純一[4]，　佐藤純一[1]，　川崎信治[1]，新村洋一[1]（[1]東農大応生科･バイオ，[2]NITE，[3]札幌医大医･眼科，[4]東農大生物生産・食香）

3A09p16　プラスミドの負荷軽減化における宿主由来転写制御因子の影響

16:43 ○久保　彩[1]，　能登　優[1]，　高瀬識之[1]，　高橋裕里香[1]，松本貴嗣[2]，　吉川博文[2]，　土金恵子[3]，　細山　哲[3]，　藤田信之[3]，岡田憲典[1]，山根久和[4]，野尻秀昭[1]（[1]東大･生物工学セ，[2]東農大･生物資源ゲノム解析セ，[3]NITE，[4]帝京大・バイオ）

3A09p17　細菌群集中で優占化するプラスミド保持株の解析

16:54 ○杉山大介，高橋裕里香，岡田憲典，野尻秀昭（東大・生物工学セ）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3A09p19　*Methylobacterium* 属細菌の植物上での窒素代謝

17:15 ○多賀寛樹[1]，　井口博之[1,2]，　由里本博也[1]，　阪井康能[1,2]（[1]京大院農・応用生命，[2]JST・ALCA）

3A09p20　植物共生メタノール資化性細菌の時計遺伝子ホモログの機能解析

17:26 ○井口博之[1,3]，　多賀寛樹[1]，　藤澤健斗[1]，　由里本博也[1]，小山時隆[2]，阪井康能[1,3]（[1]京大院農･応用生命，[2]京大院理･植物，[3]JST・ALCA）

3A09p21　緑膿菌のカイコへの病原力を低下させる自発的突然変異の解析

17:37 ○森　栄揮[1]，飯山和弘[2]，石井正治[1]，新井博之[1]（[1]東大院･応生工，[2]九大院・農）

3A09p22　好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 のガス消費

17:48 ○山口依里香，新井博之，石井正治（東大院・農生科・応生工）

3A09p23　*Shewanella livingstonensis* Ac10 の金属呼吸における外膜タンパク質 PhoE の機能

17:59 ○丸山沙織，川本　純，樽井　淳，王　　玉，江崎信芳，栗原達夫（京大化研）

A10 会場　午前の部（9:22〜12:05）

微生物―物質生産－微生物変換，微生物酵素反応―

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

3A10a03　セルロース系バイオマスからの物質生産を可能にしたスーパー麹菌の開発
9:22　◦若井　暁[1]，　浅井菜々実[1]，　山田亮祐[1]，　荻野千秋[2]，堤　浩子[3]，秦　洋二[3]，近藤昭彦[2]（[1]神戸大･自然，[2]神戸大院･工，[3]月桂冠・総研）

3A10a04　機能性スクリーニングによる有機養液栽培根圏微生物群からの新規セルロース分解酵素の探索と同定
9:33　◦山口滋生（慶應大院理工）

3A10a05　バクテリアセルロース生産に用いる微細藻類の処理方法の検討
9:44　◦松野良亮[1]，　平戸祐喜[1]，　重　雅俊[1]，　旗谷　惇[1]，谷川　実[1]，西村克史[2]（[1]日大理工，[2]日大短大船橋）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A10a07　担子菌を用いたメラニン脱色機構の解析
10:05　◦沼田大志[1]，　南　正彦[2]，　齋藤洋太郎[2]，　中沢威人[1]，小池謙造[3]，本田与一[1]（[1]京大院農，[2]京大生存研，[3]花王株式会社　ビューティケア研究センター）

3A10a08　深海環境よりリグニン代謝微生物を探索
10:16　◦佐藤玲央奈[1,2]，　大田ゆかり[2]，　丸山　正[2]，　秦田勇二[2]（[1]横浜市立大院生命ナノ，[2]海洋研究開発機構）

3A10a09　*Pseudomonas* sp. YL 株由来ハロ酸脱ハロゲン化酵素（L-DEX YL）の立体選択性の機構解析
10:27　◦出来弘幸，村瀬泰明，中村　卓（長浜バイオ大バイオサイエンス）

3A10a10　ハロ酸デハロゲナーゼスーパーファミリーに属するフルオロ酢酸デハロゲナーゼの炭素－フッ素結合切断機構解析
10:38　◦新川雄也，福井拓海，中村　卓（長浜バイオ大院）

3A10a11　ロドコッカス属細菌によるフッ素化合物の代謝
10:49　◦岩井伯隆，矢野憲一，渡辺洋介，北爪智哉，和地正明（東工大院・生命理工・生物プロセス）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A10a13　細菌におけるセレン微粒子生成に関わるタンパク質の同定
11:10　大内田竜大[1]，　◦田島寛隆[1,4]，　山本紘資[1]，　斎藤茂樹[1,4]，谷　泰史[1,4]，　峯元高志[3]，　PRAKASH N. Tejo[2]，　三原久明[1]（[1]立命館大・生命科学，[2]Dept. Biotech. Environ. Sci.・Thapar Univ.，[3]立命館大・理工，[4]立命館大・R-GIRO）

3A10a14　*Cellulomonas* sp. D3a 株におけるテルル酸還元に関わる遺伝子の同定
11:21　◦名田イサナ[1]，　田島寛隆[1,3]，　斎藤茂樹[1,3]，　谷　泰史[1,3]，PRAKASH N. Tejo[2]，三原久明[1]（[1]立命館大・生命科学，[2]Dept. Biotech. Environ. Sci.・Thapar Univ.，[3]立命館大・R-GIRO）

3A10a15　新規ポリエチレンテレフタレート代謝酵素群の同定と機能解析
11:32　◦吉田昭介[1]，捧　開維[1]，小田耕平[2]，宮本憲二[1]（[1]慶應大理工，[2]京都工繊大応生）

3A10a16　ベルベリン分解菌 BD3100 株の単離と解析
11:43　◦武田　尚[1]，　石川和樹[1]，　若菜大悟[1]，　佐藤文彦[2]，細江智夫[1]（[1]星薬大，[2]京大院・生命）

3A10a17　ビフェニルジオキシゲナーゼサブタイプ複合型の細菌触媒によるポリ塩化ビフェニル類の分解
11:54　◦西山亜紀[1]，　高塚由美子[2]，　片倉苑香[2]，　大場好弘[2]，原富次郎[2]（[1]山形大工，[2]山形大院理工）

A10 会場　午後の部（14:00〜18:10）

微生物―細胞－構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A10p01　出芽酵母細胞壁成分 β-1,6- グルカン合成関連タンパク質 Kre9 の解析
14:00　◦林田光弘，野田陽一，依田幸司（東大院･農生科･応生工）

3A10p02　出芽酵母小胞体からの膜タンパク質の選択的輸送機構の解析
14:11　◦藤井聖也，野田陽一，依田幸司（東大院･農生科･応生工）

3A10p03　分裂酵母ロンボイドプロテアーゼの役割と切断機構の解析
14:22　東　玲那[1]，　渋谷大介[1]，　竹川　薫[2]，　田淵光昭[1]，◦田中直孝[1]（[1]香川大・農・応用生物，[2]九大院・農・生物機能）

3A10p04　ジスフェリンドメインのみからなる出芽酵母 Spo73 の機能解析
14:33　◦奥村祐哉[1]，　中村　毅[1]，　井上一朗[1]，　田中貴之[1]，須田恭之[2]，舘川宏之[1]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]理研・光量子工学研究領域・ライブセル分子イメージング）

3A10p05　出芽酵母の胞子形成に必須な PP1 ターゲティングサブユニットの解析
14:44　◦沼尻祐未，井上一朗，舘川宏之（東大院農生科･応生化）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A10p07　花粉アレルゲンと相同性をもつ分裂酵母胞子壁タンパク質 Isp3 の解析
15:05　◦福西加奈[1]，　宮首佳奈[1]，　畠中内子[1]，　大鶴なつみ[1]，平田愛子[2]，下田　親[1]，中村太郎[1]（[1]大阪市大院理，[2]東大院新領域）

3A10p08　出芽酵母を用いたホスファチジルエタノールアミンのオルガネラ間輸送に関する解析
15:16　◦水池　彩[1]，　小林新吾[1]，　堀内裕之[1]，　太田明徳[2]，福田良一[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]中部大・応生・応生化）

3A10p09　酵母を用いた小胞体からミトコンドリアへのステロールの輸送に関する解析
15:27　◦田　スチ[1]，堀内裕之[1]，太田明徳[2]，福田良一[1]（[1]東大院･農生科・応生工，[2]中部大・応生・応生化）

3A10p10　出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた脂肪滴オートファジー分解の誘導機構解析
15:38　◦近藤健史，前田佑一郎，奥　公秀，阪井康能（京大院農･応用生命）

3A10p11　出芽酵母液胞内プロテアーゼ Atg15 の脂肪滴動態における役割り
15:49　◦前田佑一郎，奥　公秀，阪井康能（京大院農）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3A10p13　メタノール資化性酵母の窒素源変化に伴うオートファジーの役割
16:10　◦白石晃將，奥　公秀，由里本博也，阪井康能（京大院農･応用生命）

3A10p14　酵母液胞アミノ酸トランスポーター Avt4 の N 末端親水性領域に存在する保存配列の機能
16:21　◦佐藤有美香[1]，　石本晶也[1]，　本藤加奈[1]，　河田美幸[1,2]，関藤孝之[1]，柿沼喜己[1,2]（[1]愛媛大農，[2]愛媛大 INCS）

3A10p15　リジン添加による出芽酵母生育阻害に伴う細胞内アミノ酸組成の変化とその分子機構
16:32　◦村尾奈美[1]，山口翔吾[1]，河田美幸[1,2]，関藤孝之[1]，柿沼喜己[1,2]（[1]愛媛大農，[2]愛媛大 INCS）

3A10p16　出芽酵母胞子形成過程における液胞アミノ酸リサイクルの役割について
16:43　◦山中敦詞[1]，　刀根潤一[1]，　杉本直子[1]，　河田美幸[1,2]，関藤孝之[1]，柿沼喜己[1,2]（[1]愛媛大農，[2]愛媛大 INCS）

3A10p17　Identification of vacuolar amino acid transporter from *Fusarium oxysporum*

16:54　◦Siriporn LUNPROM[1], Pongsanat PONGCHAROEN[1], Miyuki KAWADA-KAWANO[2], Takayuki SEKITO[1], Koichi AKIYAMA[2], Yoshimi KAKINUMA[1,2]（[1]Ehime Univ. Agriculture, [2]Ehime Univ. INCS）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3A10p19　ハンセヌラ酵母モリブデン輸送体の探索

17:15　◦中西洋一，川嶋輝美，前田道子，鵜飼杏奈，前島正義（名大院生命農）

3A10p20　麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー関連ステロール - グルコシルトランスフェラーゼ様遺伝子 *Aoatg26* の解析

17:26　◦菊間隆志, 田所隆之, 北本勝ひこ（東大院農生科･応生工）

3A10p21　麹菌　*A. oryzae* におけるオートファジー関連膜タンパク質 AoAtg9 の機能解析

17:37　◦藤木耕平, 菊間隆志, 北本勝ひこ（東大院農生科･応生工）

3A10p22　AoLAH regulates position, movement and function of Woronin body in *Aspergillus oryzae*

17:48　◦PEI HAN, FENG JIE JIN, JUN-ICHI MARUYAMA, KATSUHIKO KITAMOTO（Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo）

3A10p23　麹菌 *A. oryzae* における 2 つの acyl-CoA binding protein の局在及び機能解析

17:59　◦川口航平, 菊間隆志, 北本勝ひこ（東大院農生科･応生工）

A11 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―遺伝子－構造，機能―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A11a01　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のセリンタイプカルボキシペプチダーゼ遺伝子におけるイントロン残存性の解析

9:00　◦石田　健，久保島恵，森田寛人，前田　浩，岡本綾子，竹内道雄，山形洋平（東京農工大院・応生化）

3A11a02　*Aspergillus oryzae* における 331-25 sense RNA, 331-25 antisense RNA の機能解析

9:11　◦辻井　雅，竹内道雄，山形洋平（東農工大・応生科）

3A11a03　*Aspergillus oryzae* のハイドロフォービン HypA の局在機構の解析

9:22　◦早川芙佑華，山川　結，石田千絵，千代　優，水野佑香，中島春紫（明治大農）

3A11a04　*Aspergillus oryzae* の機能性ペプチド融合ハイドロフォービン(HypB)による細胞表層工学システムの構築

9:33　◦大橋信太郎，中間　聖，藍　悠子，石倉幹大，中島春紫（明治大農）

3A11a05　麹菌のアミノ酸トランスポーター遺伝子の機能解析

9:44　◦宮西史則，寺瀬　裕，浜中大夢，金子明裕，佐野元昭，尾関健二，大箸信一（金沢工大・ゲノム研）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A11a07　麹菌 *A. oryzae* における *Aoste23* の機能解析

10:05　◦三谷隆宏，川口航平，菊間隆志，丸山潤一，北本勝ひこ（東大院農生科・応生工）

3A11a08　糸状菌の環境センサー，HysA を介した活性酸素種(ROS)の発生制御

10:16　◦林　早紀，小島憲介，松井哲児，木村　真，金丸京子，小林哲夫（名古屋大院生命農）

3A11a09　糸状菌 *Aspergillus nidulans* の WASP オルソログの機能解析

10:27　◦テイ　ロ，星　浩臣，堀内裕之（東大院農生科）

3A11a10　*Aspergillus nidulans* の GfsA は *O*- グリカンの Gal *f* を合成する糖転移酵素である

10:38　◦岡　拓二[1]，二神泰基[2]，浴野圭輔[1]，竹川　薫[2]，後藤正利[2]，野村善幸[1]（[1]崇城大生物生命，[2]九大農）

3A11a11　イネいもち病菌の非病原性タンパク質 AVR-Pia の相互作用の解析

10:49　◦樋口裕也[1]，佐藤佑樹[1]，尾瀬農之[2]，曾根輝雄[1]（[1]北大院農，[2]北大院薬）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A11a13　宿主グルタチオン代謝を制御する病原菌エフェクターの酵母システムによる機能解析

11:10　藤原祥子，田中直孝，◦田淵光昭（香川大農）

3A11a14　分裂酵母の SPB 構成因子 Cdc31 の G1-S 期における機能解析

11:21　◦中林　修，山下　茂（東邦大・医・生化）

3A11a15　耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* における高効率遺伝子破壊法の開発

11:32　◦奥林裕也[1]，星田尚司[2]，赤田倫治[2]（[1]山口大工，[2]山口大院医）

3A11a16　*Debaryomyces hansenii* のフェノール代謝系遺伝子 -catechol 1,2-dioxygenase（C12O）遺伝子の解析

11:43　◦柴田光治[1]，前田剛志[2]，能木裕一[3]，浜本牧子[1,2]（[1]明治大院農，[2]明治大，[3]独立行政法人海洋研究開発機構）

3A11a17　線虫遺伝子 R13A5.9 のシナプスにおける役割

11:54　◦米沢大地[1,2]，辻　俊佑[1]，坂田和実[1]，小栗栖太郎[1]（[1]岩手大学，[2]日本農芸化学会）

A11 会場　午後の部（14:00〜18:10）

微生物―遺伝子－構造，機能―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A11p01　有胞子細菌の胞子形成期における遺伝子再構築の多様性

14:00　◦津田嵩平[1], 吉成　輝[1], 安部公博[2], 佐藤　勉[1,2]（[1]法政大・生命科学部，[2]法政大・マイクロナノテクセンター）

3A11p02　枯草菌における SP β プロファージを介した遺伝子再編成と胞子の成熟化

14:11　◦安部公博[1]，岩本敬人[2]，稲井貴志[2]，佐藤　勉[1,2,3]（[1]法政大・マイクロ・ナノテクセンター，[2]法政大・生命科学部，[3]法政大院・理工学部）

3A11p03　枯草菌 SP β による遺伝子再編成の調節機構

14:22　◦河野裕太[1]，新井健司[2]，中村　甫[2]，丸山祐輝[2]，安部公博[3]，佐藤　勉[1,2,3]（[1]法政大院・理工学部，[2]法政大・生命科学部，[3]法政大・マイクロ・ナノテクセンター）

3A11p04　枯草菌の不稔感染遺伝子 *nonA* が SP10 ファージ増殖に与える影響

14:33　◦山本達也[1]，尾花　望[1]，イーリーメン[2]，朝井　計[3]，野村暢彦[1]，中村幸治[1]（[1]筑波大院生命環境，[2]東大生物工学セ，[3]埼玉大院理工）

3A11p05　Thermus thermophilus HB27 株の toxin-antitoxin system の解析

14:44　◦FAN Yuqi[1], 星野貴行[2], 中村　顕[2]（[1]筑波大院生命環境，[2]筑波大生命環境）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A11p07　好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 における DNA 修復系遺伝子の発現変化

15:05　◦鈴木宏和，小林淳平，古川　恵（九大院農）

3A11p08　好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 の高変異性株を利用した耐熱化指向性の酵素遺伝子変異

15:16　◦和田圭介，小林淳平，古川　恵，土居克実，鈴木宏和（九大院農）

3A11p09　好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 で機能するクロラムフェニコール耐性プラスミドの創出

15:27 ○小林淳平，古川　恵，鈴木宏和（九大院農）

3A11p10　中性環境における好アルカリ性細菌と好中性細菌の Na^+駆動型べん毛モーター固定子 MotPS のイオン流入制御機構の解析

15:38 ○高橋優嘉[1,2]，野口有希奈[1]，伊藤政博[1,2]（[1]東洋大院・生命科学，[2]東洋大・バイオナノ）

3A11p11　PGA 合成関連遺伝子 *pgsE* が γ-ポリグルタミン酸（PGA）生産に与える影響 － PGA 生産菌の由来による *pgsE* の機能比較－

15:49 ○猪井崇弘[1]，　信田晃佑[1]，　荻田　亮[1,2]，　田中俊雄[1]，藤田憲一[1]（[1]阪市大院・理，[2]阪市大・健康研セ）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3A11p13　放線菌 *Streptomyces* における *afsS* 遺伝子座の機能解析

16:10 ○辛　利弥，大西康夫（東大院農生科・応生工）

3A11p14　セルラーゼ高分泌性放線菌 *Streptomyces argenteolus* M178 株由来のセルラーゼ遺伝子群の解析

16:21 ○春日　和[1]，　日景真紀[1]，　安達紗由香[1]，　友常久実子[1]，志村洋一郎[1]，　小林正之[1]，　石川　淳[2]，　池田治生[3]，　小嶋郁夫[1]（[1]秋田県大，[2]国立感染研，[3]北里大・北里生命研）

3A11p15　セルラーゼ高分泌放線菌 *Streptomyces thermocarboxydus* C42 のゲノム解読より見出された推定セルラーゼ遺伝子群の発現解析および発現タンパク質によるセルロース分解

16:32 ○友常久実子[1]，　春日　和[1]，　佐藤梓織[1]，　小林正之[1]，志村洋一郎[1]，石川　淳[2]，池田治生[3]，小嶋郁夫[1]（[1]秋田 県 大，[2]国立感染研，[3]北里大・北里生命研）

3A11p16　The *tpg-tap* gene pair of the linear plasmid functions to maintain the linear chromosome in *Streptomyces rochei* 7434AN4

16:43 ○Yosi NINDITA[1]，　Zhisheng CAO[1]，　Yuh SHIWA[2]，Hirofumi YOSHIKAWA[2]，Kenji ARAKAWA[1]，Haruyasu KINASHI[1]（[1]Hiroshima Univ., [2]Tokyo Univ. Agri.）

3A11p17　*Streptomyces rochei* 7434AN4 株の線状染色体の塩基配列解析

16:54 ○稲田晋宣[1]，　曹　志生[2]，　ニンディタヨシ[2]，　片岡憂祐[2]，田上道平[3]，　レジャヴァアレキサンダー[3]，　志波　優[4]，　吉川博文[4]，石川　淳[5]，　木梨陽康[2]，　荒川賢治[2]（[1]広島大・自然科学セ，[2]広島大院・先端研，[3]理研・OSC，[4]東農大・応生科，[5]国立感染研）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3A11p19　肺炎連鎖球菌における過酸化水素耐性機構の解析

17:15 ○山本裕司，伊東　諒，鈴木亜也菜，向井孝夫（北里大学獣医）

3A11p20　*Lactobacillus reuteri* における Elongation factor Tu のシグナル配列非依存的な分泌機構に関する研究

17:26 ○西山啓太，　南條早由利，　遠藤紗耶，　小菅晴香，山本裕司，向井孝夫（北里大獣医）

3A11p21　*Lactobacillus reuteri* DSM 20016^T 腸管付着因子 MapA とムチンの相互作用解析

17:37 ○本橋健太，梶川揚申，佐藤英一，岡田早苗（東農大院）

3A11p22　マウス腸管粘膜における *Lactobacillus reuteri* DSM 20016^T の付着

17:48 ○永倉洋憲，梶川揚申，佐藤英一，岡田早苗（東農大応生科・化学）

3A11p23　*Lactococcus lactis* 由来新規 m5C MTase による大腸菌ゲノム DNA のメチル化割合の変更

17:59 ○小林美穂，　萩　達朗，　鈴木チセ，　木元－新良広実，守谷直子，野村　将（畜草研）

A12 会場　午前の部（10:16〜12:05）

微生物―細胞－情報伝達，細胞応答，ストレス―

a08〜a11 発表者の接続時間 10:06〜10:16

3A12a08　大腸菌を用いた，金属イオン存在下での酸化による fALS SOD1 異常化の評価

10:16 ○黒川洋一，桜田真一，松井義隆（福井県大生物資源）

3A12a09　Chlamydomonas reinhardtii 実験系におけるタイプ B トリコテセン系マイコトキシンの毒性評価

10:27 ○鈴木忠宏，岩橋由美子（農研機構 食総研）

3A12a10　過酷な生育環境に生息する微細藻類の探索とストレス耐性機構の解析

10:38 ○高橋妙華，牛奥佳澄，岡田和隆，長嶋雄大，峰村　拓，川崎信治（東農大　バイオ）

3A12a11　真夏のアスファルトから単離した真核微細藻類が生産するアスタキサンチンを水溶化するタンパク質の発見と機能特性

10:49 ○川崎信治，水口佳祐，牛奥佳澄，高橋妙華，佐藤　大，河野哲也，清水宏文（東農大　バイオ）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A12a13　シックハウスシンドローム原因物質が酵母細胞に及ぼす影響の解析

11:10 ○河合孝朗，芳本奈々，井澤真吾（京都工繊大院　工芸科学）

3A12a14　出芽酵母での局所麻酔薬や抗精神病薬の作用・毒性の機構とその緩和法

11:21 ○上園幸史[1]，　荒木智之[2]，　東江昭夫[3]，　野口　航[1]，寺島一郎[1]（[1]東大院理，[2]埼玉医大医，[3]千葉大真菌セ）

3A12a15　*Candida albicans* における植物ディフェンシン AFP1 の作用機序解析

11:32 ○小黒芳史，山崎晴丈，高木正道，高久洋暁（新潟薬大応生科）

3A12a16　酵母に見出した Tah18 タンパク質依存的な NO 生成の制御機構

11:43 ○吉川雄樹，川原寛弘，西村　明，那須野亮，高木博史（奈良先端科学技術大学院大学）

3A12a17　酵母における銅代謝関連転写因子 Mac1 を介した NO による高温ストレス耐性機構の解析

11:54 ○相徳珠帆，那須野亮，高木博史（奈良先端大バイオ）

A12 会場　午後の部（14:00〜18:10）

微生物―細胞－情報伝達，細胞応答，ストレス―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A12p01　*HKR1* の発現調節による *Saccharomyces cerevisiae* の HM-1 キラー・トキシン耐性機構

14:00 ○武藤紘子，笠原　紳（宮城大食産業）

3A12p02　分裂酵母プロテインキナーゼ A によるスピンドルチェックポイント制御機構

14:11 酒井智健，山家雅之，川向　誠，○松尾安浩（島根大・生物資源・生命工）

3A12p03　分裂酵母の有性生殖を亢進させる *sam* 変異株と $CaCl_2$ 感受性の関連性

14:22 ○伊藤有紀，川向　誠（島根大院生物資源）

3A12p04　出芽酵母 SCZ 遺伝子が関与する寿命制御機構の解析

14:33 ○山名一綱，小川貴史，椿山諒平，平田　大，水沼正樹（広島大学院）

3A12p05　出芽酵母 Δ *zds1* 株の Ca^{2+} 感受性を抑圧する多コピーサプレッサーの寿命への影響

14:44 ○上野史記，小山哲也，平田　大，水沼正樹（広島大院）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A12p07　酵母を指標とした微高圧炭酸ガスストレス応答の解析
15:05　○貝沼瑞生[1]，　牛　力源[1]，　野村一樹[1]，　岩橋　均[1]，松岡寛之[2]，河内哲史[2]，鈴木良尚[2]，田村勝弘[2]（[1]岐阜大応生，[2]徳島大ソシオ）

3A12p08　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* への圧力感受性付与における Proline 代謝の影響
15:16　○野村一樹[1]，岩橋　均[1]，井口晃徳[2]，重松　亨[2]（[1]岐阜大院連農，[2]新潟薬大応生科）

3A12p09　酵母のストレス耐性に関与するプロリン合成酵素 γ-グルタミルキナーゼの機能解析
15:27　○立橋祐樹，高木博史（奈良先端大・バイオ）

3A12p10　出芽酵母の酢酸耐性は Haa1 依存的な細胞内グリセロールの蓄積により増強される
15:38　○田中晃一[1]，小川　順[2]，島　純[1]（[1]京大・微生物科学，[2]京大院・農・応用生命）

3A12p11　出芽酵母のアセトアルデヒドストレス耐性におけるグルタチオンおよびその分解経路の役割
15:49　○佐藤優太，早川享志，中川智行（岐阜大院応生）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3A12p13　リボソーム生合成調節蛋白質 Rrs1 および Ebp は核膜において分泌経路遮断時のシグナル伝達に機能する
16:10　○矢吹友佳理，水田啓子（広島大院）

3A12p14　出芽酵母 RNase T2 を介したストレス応答機構の解析
16:21　○陣内　凱，　島日佳理，　大石早希子，　大本哲也，小川哲弘，日高真誠，正木春彦（東大院農生科・応生工）

3A12p15　酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 の改変による異常タンパク質分解能の向上
16:32　WIJAYANTI Indah，○渡辺大輔，WATCHARAWIPAS Akaraphol，高木博史（奈良先端大バイオ）

3A12p16　麹菌マルトースパーミアーゼ分解におけるユビキチン化マシナリーの作用機構
16:43　○松浦優佳，田中瑞己，平本哲也，新谷尚弘，五味勝也（東北大院農）

3A12p17　麹菌 *Aspergillus oryzae* の高温誘導性遺伝子の機能に関する研究
16:54　○江嵜　豪[1]，伊藤香苗[2]，前橋健二[1]，柏木　豊[1]（[1]東農大院農，[2]東農大応生）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3A12p19　糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるプロテインキナーゼ C の sterigmatocystin 合成制御に関わる機能の解析
17:15　○片山琢也，堀内裕之（東大院）

3A12p20　糸状菌 PKC に対する選択的阻害剤の開発に向けた酵母スクリーニング系の構築
17:26　○庄司郁央[1]，　中山真由美[2]，　吉見　啓[2]，　藤岡智則[3]，河合　清[3]，堀内裕之[4]，梅山秀明[5]，阿部敬悦[1,2]（[1]東北大院農，[2]東北大・未来研，[3]クミアイ化学工業，[4]東大院・農生科，[5]中央大理工）

3A12p21　糸状菌 *Cryphonectria parasitica* の低分子量 GTP 結合タンパク質
17:37　○望月翔子[1]，　山内優輝[1]，　高橋拓也[1]，　鈴木信弘[2]，笠原　紳[1]（[1]宮城大・食産業，[2]岡山大・植物研）

3A12p22　出芽酵母および糸状菌における植物-真菌融合ヒスチジンキナーゼの機能相補とエチレン応答
17:48　○中山真由美[1,2]，　古川健太郎[3]，　吉見　啓[2]，　阿部敬悦[1,2]（[1]東北大・未来研，[2]東北大・院農・生物産業創成，[3]Univ. of Gothenburg, Dept. of Chemistry and Molecular Biology）

3A12p23　*Fusarium asiaticum* の窒素代謝におけるアグマチン添加の影響
17:59　○岩橋由美子，鈴木忠宏（(独)農研機構）

A13 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―遺伝子ー発現制御，トランスクリプトーム―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3A13a01　コリネ型細菌におけるアラビノース応答性転写因子 AraR の制御機構の解明
9:00　○久下貴之[1]，寺本陽彦[2]，乾　将行[2]，湯川英明[1,2]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE）

3A13a02　コリネ型細菌 ArnR による硝酸還元酵素およびフラボヘモグロビン遺伝子の NO 応答制御機構
9:11　○西村　拓，寺本陽彦，乾　将行，湯川英明（RITE）

3A13a03　イソブタノールストレスが及ぼすコリネ型細菌のトリプトファン生合成遺伝子の発現への影響
9:22　○辻本敏博[1]，豊田晃一[2]，寺本陽彦[2]，乾　将行[2]，湯川英明[1,2]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE）

3A13a04　コリネ型細菌の ECF シグマ因子 SigH のレギュロンの同定
9:33　○豊田晃一，寺本陽彦，乾　将行，湯川英明（地球環境産業技術研究機構）

3A13a05　コリネ型細菌における転写因子 OxyR によるレドックス応答制御機構
9:44　○寺本陽彦，乾　将行，湯川英明（RITE）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A13a07　コリネ型細菌における転写因子 GntR1 の標的遺伝子探索と発現解析
10:05　○田中裕也，伊藤輝二，寺本陽彦，乾　将行，湯川英明（RITE）

3A13a08　コリネ型細菌 Riboflavin transporter 遺伝子の FMN-riboswitch による RNA 分解を介した発現制御
10:16　○竹本訓彦，田中裕也，乾　将行，湯川英明（RITE）

3A13a09　コリネ型細菌における RNaseJ 遺伝子の発現制御解析
10:27　○濱本　渚[1]，田中裕也[2]，竹本訓彦[2]，乾　将行[2]，湯川英明[1,2]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE）

3A13a10　コリネ型細菌におけるキナ酸・シキミ酸代謝経路のコリスミ酸による発現制御
10:38　○久保田健，田中裕也，竹本訓彦，渡邉　彰，平賀和三，乾　将行，湯川英明（RITE）

3A13a11　大腸菌における全 tRNA 遺伝子オペロンの発現プロファイルの解析　-Fis の関与 -
10:49　○秋元隼風[1]，吉川　慎[1]，石浜　明[2]，前田理久[1]（[1]明治大農，[2]法政大ナノ）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A13a13　大腸菌 GadE によるゲノム発現制御メカニズムの解明
11:10　○山中　幸[1]，　志波　優[3]，　山本健太郎[1]，　川岸郁朗[1,2]，吉川博文[3,4]，石浜　明[1,2]，山本兼由[1,2]（[1]法政大・生命科学，[2]法政大・マイクロナノセンター，[3]東京農大・ゲノム解析セ，[4]東京農大・バイオ）

3A13a14　ビフィズス菌との相互作用で誘導される大腸菌遺伝子(群)の同定と発現制御
11:21　○小島渓晃[1]，森田英利[3]，石浜　明[2]，山本兼由[1,2]（[1]法政大・生命科学，[2]マイクロナノセンター，[3]麻布大・獣医）

3A13a15　システイン代謝遺伝子転写因子 YdcN の包括転写因子としての機能
11:32　○中野雅博[1,2]，　多田麻里永[2]，　石浜　明[1,2]，　山本兼由[1,2]（[1]法政大マイクロナノ研究セ，[2]法政大生命）

3A13a16　大腸菌システイン合成遺伝子群を制御する CysB-Cbl カスケード
11:43　○山本兼由[1,2]，　山田佳代子[1]，　岩田紀子[1]，　小澤貴博[1]，富山あや乃[1]，　千野拓馬[1]，　石井絵里[1]，　鈴木孝太[1]，　尾崎友紀[1]，石浜　明[1]（[1]法政大・生命科学，[2]法政大・マイクロナノセンター）

3A13a17　大腸菌の L-アラニン排出輸送体 AlaE(YgaW)の発現制御解析
11:54　◦伊原航平，佐藤一樹，堀　初弘，安藤太助，磯貝恵美子，米山　裕（東北大院農）

A13 会場　午後の部（14:00〜18:10）

微生物—遺伝子ー発現制御，トランスクリプトーム—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A13p01　酵母メタノール誘導性遺伝子発現に重要な Wsc ファミリータンパク質の機能解析
14:00　◦大澤　晋，由里本博也，阪井康能（京都大院農・応用生命科学）
3A13p02　酵母メタノール誘導性遺伝子発現に必要な転写因子 CbHap3p の C 末端領域の解析
14:11　◦小田沙織，由里本博也，阪井康能（京大院農･応用生命）
3A13p03　出芽酵母のクロマチンリモデリング因子 RSC によるオートファジー調節因子の転写制御
14:22　◦余　斐斐，今村優子，土屋英子（広島大学・先端物質科学研究科・分子生命機能科学）
3A13p04　出芽酵母のタンパク質発現量を 2 倍以上高める DIT1 ターミネーター
14:33　◦松山　崇[1]，伊藤洋一郎[1]，山西　守[1]，池内暁紀[1]，今村千絵[1]，徳弘健郎[1]，北川孝雄[2]（[1](株)豊田中央研究所，[2]山口大学）
3A13p05　Saccharomyces cerevisiae におけるイントロン配列を利用したタンパク質の高発現
14:44　◦近藤真樹[1]，小林隆文[2]，星田尚司[2]，赤田倫治[2]（[1]山口大工，[2]山口大院医系）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A13p07　Aspergillus nidulans の Sirtuin A 阻害剤の探索
15:05　◦張本修平，高谷直樹，老沼研一，伊藤英里子（筑波大生命環境）
3A13p08　麹菌における自己切断型 Cre/*loxP* 選択マーカーリサイクリングカセットを利用した多重遺伝子導入・破壊システム
15:16　◦張　斯来[1]，伴　暁彦[1]，江原直樹[1]，水谷　治[2]，田中瑞己[1]，新谷尚弘[1]，五味勝也[1]（[1]東北院農，[2]酒総研）
3A13p09　麹菌アレスチン様タンパク質 CreD の翻訳後修飾の解析とカーボンカタボライト脱抑制への関与
15:27　◦田中瑞己，平本哲也，新谷尚弘，五味勝也（東北大院農）
3A13p10　麹菌の固体培養特異的遺伝子発現制御に関わる転写因子の探索
15:38　◦吉村　緑，田中瑞己，新谷尚弘，五味勝也（東北大農）
3A13p11　糸状菌の鉄恒常性に関わる転写因子 HapX の機能解析
15:49　◦金子優平，中村隼人，祖父江衣純，志水元享，加藤雅士（名城大学院農）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3A13p13　麹菌 *Aspergillus oryzae* ADAM は，分生子表層構造構築と細胞壁ストレス応答に関与する
16:10　◦小林拓嗣，前田　浩，竹内道雄，山形洋平（東京農工大院・応生化）
3A13p14　*Aspergillus oryzae* の菌体内金属プロテアーゼ saccharolysin homolog の機能解析
16:21　◦石川雄一朗，前田　浩，竹内道雄，山形洋平（農工大院･応生化）
3A13p15　醤油麹菌 *Aspergillus sojae* における *manR-xlnR* 二重強制発現株の解析
16:32　◦小川真弘，吉村太郎，松島健一朗，小山泰二（キッコーマン株式会社）
3A13p16　*Aspergillus nidulans* 転写因子 ManS が制御する多糖分解酵素遺伝子の同定
16:43　◦渡邉亜也子，金丸京子，木村　真，小林哲夫（名大院生命農）
3A13p17　*Aspergillus oryzae* 転写因子 XlnR/AraR の DNA 結合をめぐる競合
16:54　◦石川香南，金丸京子，木村　真，小林哲夫（名大院生命農）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3A13p19　*Trichoderma reesei* における pH 依存的セルラーゼ･ヘミセルラーゼ生産制御機構の解析
17:15　◦平沢大樹，塩屋幸樹，志田洋介，小笠原渉（長岡技科大生物）
3A13p20　糸状菌 *Trichoderma reesei* のアスパラギン酸プロテアーゼの発現誘導機構の解析
17:26　◦塩屋幸樹，雪　真弘，佐藤春菜，志田洋介，小笠原渉（長岡技科大 生物）
3A13p21　*Aspergillus aculeatus* セルロース誘導初期の遺伝子発現を制御する因子の同定と機能解析
17:37　◦遊亀翔太，國武絵美，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大院・生環科）
3A13p22　*Aspergillus aculeatus* セロビオース応答因子 ClbR とそのパラログ因子 ClbR2　の作用機序解析
17:48　◦川村彩乃，國武絵美，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大院　生環科）
3A13p23　糸状菌 cellobiose response regulator(ClbR)パラログの機能解析
17:59　◦藤原麻友美，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大院･生環科）

A14 会場　午前の部（9:22〜11:54）

微生物—物質生産ー発酵(二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質)—

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

3A14a03　新規二次代謝制御因子 *Aospt3* の機能解析
9:22　◦廣瀬雅人[1,2]，河内護之[1,2]，織田　健[2]，岩下和裕[1,2]（[1]広大院先端研，[2]酒総研）
3A14a04　糸状菌の情報伝達系攪乱による二次代謝活性化及び生産誘導される化合物の解析
9:33　◦本山高幸[1]，尹　忠鉄[1]，二村友史[1]，廣田　洋[1]，長田裕之[1,2]（[1]理研・抗生物質，[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）
3A14a05　ポリエン系抗生物質と相乗的に働く新規抗真菌剤の探索
9:44　◦吉岡麻里子[1]，木下　浩[1]，中村美有希[1]，井原史雄[2]，仁平卓也[1]（[1]阪大・生物工学国際交流セ，[2]農研機構・果樹研）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3A14a07　Search for anti-Rhodotorula compounds showing synergistic effects with antifungal polyene
10:05　◦Sarach WONGSUNTORNPOJ[1], Hiroshi KINOSHITA[1], Mariko YOSHIOKA[1], Fumio IHARA[2], Takuya NIHIRA[1]（[1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]Nat. Inst. Fruit Tree Sci.）
3A14a08　ハイグロマイシン B の活用による紅麹菌の潜在的二次代謝能活性化
10:16　◦水上智也[1]，越智幸三[2]，保坂　毅[3]（[1]信州大院・農，[2]広工大・生命，[3]信州大・農）
3A14a09　Water-soluble adipogenesis inhibition activity produced by genus *Monascus*
10:27　◦Indika WANNINAIKA, Hirohide TOYAMA, Schinjiro TACHIBANA（Dept. Biosci. Biotech., Fac. Agr., Univ. the Ryukyus）
3A14a10　麹菌が産生する鉄キレート環状ペプチド　デフェリフェリクリシンの大量生産技術の開発 - 培地成分の Dfcy 生成への影響について -
10:38　◦村上直之[1]，戸所健彦[1]，中川拓哉[1]，福田克治[1]，

松村憲吾[1]，　入江元子[1]，　小林由佳[2]，　堤　浩子[1]，　大石真也[2]，藤井信孝[2]，秦　洋二[1]（[1]月桂冠総研，[2]京大院薬）

3A14a11　糸状菌が産生する有用芳香族化合物の探索と構造解析

10:49　◦茂本亮輔，老沼研一，高谷直樹（筑波大生命環境）

a13〜a16 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3A14a13　液 - 液界面培養法を基幹とする抗生物質生産カビの高感度スクリーニング法

11:10　◦小田　忍，岡南雅教，榊原雄介，大箸信一（金沢工大ゲノム研）

3A14a14　新規天然型トリコテセンの同定と毒性評価

11:21　◦鎌田賢太朗[1]，　田中　彰[1]，　多久島遼[1]，　相川俊一[2]，吉田泰彦[1]，安藤直子[1]（[1]東洋大・工研，[2]東洋大・バイオナノセンター）

3A14a15　トリコテセン C-4 位アセチル化酵素 TRI7 の発現と性状解析

11:32　◦田中　彰，杉山智樹，吉田泰彦，安藤直子（東洋大院・工研）

3A14a16　麹菌でアフィディコリンを異種高生産させるための生合成酵素の細胞内局在解析

11:43　◦伴　暁彦[1]，　田中瑞己[1]，　藤居瑠彌[2]，　南　篤志[2]，及川英秋[2]，新谷尚弘[1]，五味勝也[1]（[1]東北大院農，[2]北大院理）

A14 会場　午後の部（14:22〜17:59）

微生物―物質生産－酵素，タンパク質―

p03〜p05 発表者の接続時間 14:12〜14:22

3A14p03　細胞性粘菌の予定柄細胞分化誘導に関するポリケタイド合成酵素の働き

14:22　◦佐藤有紀江[1]，齊藤玉緒[2]（[1]上智大院理工，[2]上智大理工）

3A14p04　細胞性粘菌の発生初期における新規ハイブリッド型ポリケタイド酵素 SteelyA の役割

14:33　◦成田隆明[1]，Pauline schaap[2]，齊藤玉緒[3]（[1]上智大院理工，[2]ダンディー大，[3]上智大理工）

3A14p05　*Dictyostelium monochasioides* の *stlA* 遺伝子のクローニングと機能解析

14:44　◦小西智子[1]，齋藤玉緒[2]（[1]上智大学院･理工，[2]上智大学･理工）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A14p07　細胞性粘菌における *Dictyosterol* の進化的保存性の解明

15:05　◦深澤汐香[1]，齊藤玉緒[2]，品川知則[1]，森田直樹[3]（[1]上智大学院・理工，[2]上智大学・理工，[3]産業技術総合研究所生物プロセス研究部門分子生物工学研究グループ）

3A14p08　脂質エンジニアリングを目指したタイ王国産高脂質生産酵母における簡易形質転換系の開発

15:16　金沢孟紀[1]，◦大橋貴生[1]，リムトンサビトリー[2]，藤山和仁[1]（[1]大阪大学生物工学国際交流センター，[2]カセサート大学理学部）

3A14p09　合成生物学的手法を用いた酵母で効率的な分泌を示す人工分泌シグナルの創出

15:27　◦鎗水　透，星田尚司，赤田倫治（山口大院医系）

3A14p10　部位特異的非天然アミノ酸導入を利用した翻訳スイッチの性能に影響する因子

15:38　◦加藤祐輔，皆葉正臣（農業生物資源研）

3A14p11　1.5%（w/v）微結晶セルロース含有寒天培地を透明化するトリコデルマ株の構築

15:49　◦外山英男（南九大食）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3A14p13　酵素複合体を導入したシアノバクテリアによるエチレン生産

16:10　◦神藤定生[1]，　早稲田葵[2]，　増井　寛[2]，　細田晃文[2]，田村廣人[2]（[1]名城大理工，[2]名城大農）

3A14p14　*Lactobacillus plantarum* における表層タンパク質の機能解析

16:21　◦小山二花[1]，　柿原健佑[1]，　尾花　望[2]，　久保田浩美[3]，清川達則[1]，　河嶋伊都子[1]，　細谷幸一[3]，　湯井幸治[3]，　野村暢彦[1,2]（[1]筑波大学大学院生命環境科学研究科，[2]筑波大学生命環境系，[3]花王株式会社安全性科学研究所）

3A14p15　ファージ尾部状バクテリオシンを利用したファージ宿主細胞認識の研究

16:32　◦樋口大祐[1]，　鈴木敦斗[1]，　木村啓太郎[2]，　阿部直樹[1]，金子　淳[1]（[1]東北大院農，[2]食総研）

3A14p16　*Aspergillus fumigatus* TH7-1 株由来キシラナーゼ遺伝子の発現パターンの解析

16:43　◦榎本洋平[1]，　高橋　結[1]，　若井嘉人[2]，　古田正美[2]，村上周一郎[3]（[1]明治大院農，[2]鳥羽水族館，[3]明治大農）

3A14p17　黄麹菌 *Aspergillus oryzae pepO* 遺伝子欠損株の菌体外エンド型プロテアーゼについて

16:54　◦上野絢子，前田　浩，山形洋平，竹内道雄（農工大院・応生化）

p19〜p22 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3A14p19　麹菌 *Aspergillus oryzae* のエラスターゼインヒビター様タンパク質の単離

17:15　◦山下伸雄[1]，　奥村欣由[2]，　打矢恵一[2]，　小川賢二[3]，鶴田宏樹[4]，明石貴裕[1]，二改俊章[2]（[1]白鶴酒造研究開発，[2]名城大薬，[3]東名古屋病院臨床研究部，[4]神戸大学連携創造本部）

3A14p20　*Bacillus thuringiensis* A324 株由来抗菌タンパク質の解析

17:26　◦浴野圭輔[1]，　齋藤浩之[2]，　岡　拓二[1]，　三田光章[3]，野村善幸[1]，新　隆志[1]，水城英一[2]（[1]崇城大・応微工，[2]福岡工技セ・生食研，[3]中村産業開発(株)）

3A14p21　高度好塩菌由来 nucleoside diphosphate kinase の構造形成と塩の役割について

17:37　◦石橋松二郎，内野真奈美，徳永正雄（鹿児島大学農学部）

3A14p22　大腸菌発現系における植物酵素ヒドロキシニトリルリアーゼの可溶性変異体の探索と解析

17:48　◦川原寛弘[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST，ERATO）

A15 会場　午後の部（14:00〜18:10）

微生物―代謝－代謝調節，発酵生理，メタボローム―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3A15p01　Mangromicin 類の質量分析と新規類縁体の検出

14:00　神谷義之[1]，◦中島琢自[2]，谷口貴子[3]，岩月正人[4]，高橋洋子[1,4]，谷口寿章[3]，大村　智[4]（[1]北里大感染制御科学府，[2]北里大感染制御研究機構，[3]徳島大疾患酵素学研究センター，[4]北里大生命研）

3A15p02　放線菌による 3,4-AHBA 合成とキシロース代謝

14:11　◦中村聡子[1]，　川口秀夫[1]，　荻野千秋[1]，　菅井佳宣[2]，勝山陽平[2]，大西康夫[2]，近藤昭彦[1]（[1]神戸大院工，[2]東京大院農）

3A15p03　有機塩素系殺虫剤分解能を有するスフィンゴモナッド細菌株の有機炭素源非添加無機寒天培地での生育を司る機構に関する研究

14:22　◦永田裕二，平野　丈，宇井博紀，大坪嘉行，津田雅孝（東北大学院生命科）

3A15p04　超好熱・好酸性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* におけるアミノ酸生合成経路の調節機構の解析

14:33　◦秋山　渚，富田武郎，葛山智久，西山　真（東大・生物工学セ）

3A15p05　大腸菌は D- アラニン排出システムをもつのか？

14:44　◦勝部　哲，佐藤一樹，安藤太助，磯貝恵美子，米山　裕（東北大院農）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3A15p07　*ura4* 遺伝子破壊株の細胞溶解時代謝物の検討
15:05　◦西野耕平，松尾祐児，川向　誠（島根大学　生物資源生命工）

3A15p08　分泌型マルターゼ Agl1 の Atf1/Pcr1 による制御
15:16　加藤太陽[2]，吉良新太郎[1]，◦川向　誠[1]（[1]島根大生資生命工，[2]島根大医生化）

3A15p09　*Gluconacetobacter xylinus* NBRC 3288 の高温適応育種にともなう酢酸発酵能の向上
15:27　◦伊藤光平，松谷峰之介，藥師寿治，松下一信（山口大・農・生物機能）

3A15p10　*Gluconobacter* 属酢酸菌のジヒドロキシアセトン代謝に関わるリン酸化酵素
15:38　◦河尻恵理佳[1]，　小東　陽[2]，　松谷峰之介[1]，　後藤　勝[2]，薬師寿治[1]，足立収生[1]，松下一信[1]（[1]山口大農，[2]東邦大理）

3A15p11　酢酸菌 *Acetobacter* 属菌の熱耐性に関与する Na^+/H^+ アンチポーターの解析
15:49　◦辰野真木[1]，　ソエンポールビッチャイ[2]，　岡田隆宏[1]，薬師寿治[1]，松下一信[1]（[1]山口大・農・生物機能，[2]コンケン大学）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3A15p13　乳酸菌 *Enterococcus faecalis* W11 株のフマル酸非依存性の嫌気性グリセロール代謝
16:10　◦土肥裕希（岡山理大　工）

3A15p14　連鎖球菌による宿主細胞外マトリクス(グリコサミノグリカン)の代謝機構
16:21　◦橋本　渉[1]，　丸山如江[1]，　高瀬隆一[1]，　中道優介[1]，三上文三[1]，村田幸作[2]（[1]京大院農，[2]摂南大理工）

3A15p15　海洋性好酸性硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* SH 株の硫黄代謝
16:32　◦金尾忠芳[1]，梶谷泰之[2]，上村一雄[1]（[1]岡山大院環境生命，[2]岡山大農）

3A15p16　*A. ferrooxidans* 由来 cytochrome oxidase による還元型無機硫黄化合物からの亜硫酸の生成
16:43　◦杉尾　剛[1]，　杉尾理恵[1]，　根岸敦規[2]，　井川秀樹[3]，竹内文章[4]（[1]杉尾化学合成独立栄養細菌研究所，[2]安藤ハザマ・先端技研，[3]日本ヒューム・技研，[4]岡大・環境管理セ）

3A15p17　ビフィズス菌の逆流硫黄経路の同定と活性染色法による C-S リアーゼの解析
16:54　◦鈴木　梓，和田　大，吹谷　智，横田　篤（北大院農）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3A15p19　排出系を欠損した *Lactobacillus plantarum* VL103 の代謝解析
17:15　◦今井祐斗，梶川揚申，佐藤英一，岡田早苗（東農大応生科・化学）

3A15p20　アーキア型 phosphoribulokinase の機能解析
17:26　◦河野卓成[1,2]，　遠藤千夏子[1]，　木津奈津子[3]，　木村浩之[4]，溝端栄一[3]，　井上　豪[3]，　松村浩由[3]，　横田明穂[1]，　蘆田弘樹[1,5,6]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]JSPS　特別研究員　DC，[3]阪大院・工，[4]静岡大院・理，[5]JST- さきがけ，[6]神戸大院・発達科学）

3A15p21　サクラ周辺環境より単離された *Pseudomonas* sp. のクマリンの代謝
17:37　◦田村　駿，島崎真実，今井政裕，米山恵介，岡田貴博，清水文一（東洋大生命）

3A15p22　海洋性アルケン資化性菌によるエポキシアルカン代謝について
17:48　◦古松星来[1]，矢澤友規[2]，鈴木敏弘[3,4]，布施博之[2]（[1]芝工大院・シ理工・シ理工，[2]芝工大・シ理工・生命，[3]芝工大院・地域環境，[4]筑波大・生命環境）

3A15p23　沖縄からの酢酸菌のスクリーニングとピロロキノリンキノン生産条件の検討
17:59　◦又吉智尋（琉球大院農）

B02 会場　午前の部（9:22〜11:43）

食品―食品工学－保蔵，安全性―

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

3B02a03　高温気流によるそば粉の加熱殺菌処理
9:22　◦森川卓哉[1]，　盛内成貴[2]，　伊藤綾香[2]，　三浦　靖[1,2]，廣瀬宏一[3]，船崎健一[3]，齋藤和良[4]，川端　實[5]（[1]岩手大三陸水産研究センター，[2]岩手大農，[3]岩手大工，[4](株)平岩鉄工所，[5](株)川喜）

3B02a04　ヤーコンの加熱・凍結処理における物性および構造変化
9:33　春田直樹，◦石田信昭（石川県立大学）

3B02a05　魚肉の鮮度低下が凍結時の氷結晶形態に及ぼす影響
9:44　◦小南友里，渡辺　学，鈴木　徹（東京海洋大学）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B02a07　小麦デンプン発酵過程の微生物叢とアミラーゼ生産菌の探索
10:05　◦野口治子，内野昌孝，高野克己（東京農大応生・化学）

3B02a08　どぶろくの醸造に対する柿渋の作用
10:16　◦馬路泰藏[1]，馬路明子[2]，酒向嘉彦[3]（[1]修文大学健康栄養，[2]床下からみた白川郷事務局，[3]松井屋酒造場）

3B02a09　石川県産発酵食品からの抗菌物質生産乳酸菌の分離および抗菌物質の性質決定
10:27　◦辻　篤史[1]，井上智実[1]，道畠俊英[1]，小柳　喬[2]（[1]石川工試，[2]石川県大・生資環）

3B02a10　食中毒菌の毒素産生および活性に対するカテキン類の抑制効果
10:38　◦杉山由華[1]，　島村裕子[1]，　浅川倫宏[2]，　菅　敏幸[2]，増田修一[1]（[1]静岡県立大学　食品栄養科学部，[2]静岡県立大学　薬学部）

3B02a11　*E.coli* O157 :H7 の生育に対する各種食品添加物の影響
10:49　◦河村沙也加[1]，内野昌孝[2]，高野克己[2]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・化学）

a13〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3B02a13　高圧処理したミミズに含まれる各種酵素活性及び生菌数変化について
11:10　◦赤澤真一[1]，　徳山遥香[1]，　横山圭佑[1]，　渡邉俊則[2]，脇本真之介[2]，金子信博[3]（[1]長岡高専物質工，[2]ワキ製薬，[3]横国大環境情報）

3B02a14　中高圧処理による枯草菌の発芽誘導
11:21　◦山本和貴，森松和也，鐘　　雷，木村啓太郎，稲岡隆史（農研機構食総研）

3B02a15　ブリ胃廃棄物を用いたチャンジャ様発酵食品
11:32　◦福田　翼，吉山　慧，犬塚由真，古下　学，芝　恒男，原田和樹（水大校食品）

B02 会場　午後の部（15:05〜18:10）

食品―食品工学－加工学―

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3B02p07　デキストランとの多糖修飾による蕎麦全タンパク質の分子表面機能特性の改善
15:05　◦平林正大[1]，　片山　茂[1,2]，　山口大樹[1]，　内堀友貴[1]，Ntshepisa Lebetwa[2]，田澤　茂[2]，中村宗一郎[1,2]（[1]信州大農，[2]信州大院農）

3B02p08　界面活性を有する米粉由来糖質素材の開発と加工食品への利用効果
15:16　◦三輪章志[1]，　石崎佳奈[1]，　深山敏明[1]，　三國克彦[2]，三浦　靖[3]，鈴木大介[4]，野田　實[5]，小林昭一[3]（[1]石川農林総研，[2]塩水港精糖，[3]岩手大農，[4]敷島製パン，[5]スギヨ）

3B02p09　餅硬化性が異なる糯米品種の澱粉物理化学的特性
15:27　○佐々木朋子[1]，神山かおる[1]，岡本和之[2]（[1]農研機構・食総研，[2]茨城農総セ・生工研）
3B02p10　講演取消
3B02p11　小麦粉の品質との関係解明を目指したコムギプロテインジスルフィドイソメラーゼの同定および特性解析
15:49　○木村静香[1]，　北尾悠樹[1]，　増田太郎[1]，　長澤幸一[2]，伊藤美環子[2]，田引　正[2]，裏出令子[1]（[1]京大院農・農学，[2]農研機構・北農研）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3B02p13　米粉特性がパン製造加工特性に与える影響
16:10　○奥西智哉[1]，　岡留博司[1]，　松木順子[1]，　鈴木啓太郎[2]，宮下香苗[1]（[1]農研機構・食総研，[2]農研機構・作物研）
3B02p14　T2-MR 画像による米粉パンの評価および製粉方法の違いが及ぼす影響
16:21　○関山恭代[1]，　堀金明美[1]，　宮下香苗[1]，　小野裕嗣[1]，奥西智哉[1]，藤井智幸[2]（[1]農研機構・食総研，[2]東北大院農）
3B02p15　アルギン酸エステル添加による製パン性改良効果について
16:32　○田原　彩[1]，宮島千尋[2]，笠原文善[2]，瀬口正晴[1]（[1]神女大・家政，[2]株式会社キミカ）
3B02p16　多糖類(キサンタンガム，グアガム，タマリンドシードガム)添加による冷凍ドウ劣化パンの改良について
16:43　○瀬口正晴，森元直美，田原　彩（神戸女子大）
3B02p17　中高圧処理した加工米の物性評価
16:54　○藤井華蓮，甲田万紀子，藤田智之（信州大院農）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3B02p19　菌体内プロテアーゼを利用する高圧食品加工
17:15　○大山結香[1]，　上野茂昭[1]，　藤井智幸[1]，　伊藤淑恵[2]，毛利　哲[2]，　齋藤静香[3]，　井戸川詩織[3]，　岩元　靖[3]，　塚田義弘[3]（[1]東北大院農，[2]宮城県産業技術総合センター，[3]太子食品工業株式会社）
3B02p20　無塩みそ風調味料の製造方法について
17:26　○中原達雄[1]，川野隆史[2]（[1]丸善製薬，[2]ますやみそ）
3B02p21　二枚貝の中高圧開脱殻における溶出物質
17:37　○森松和也，小田真知子，バウム博美，山本和貴（農研機構食総研）
3B02p22　かき玉形成への剪断の影響とオボムチンの関与
17:48　○伊與田哲也[1]，　中村　卓[1]，　星野　貴[2]，　滝田裕二[2]，山口祐輝[2]，五十部誠一郎[3]（[1]明治大院農・農化，[2](株)フロンティアエンジニアリング，[3](独)農研機構・食総研）
3B02p23　生姜ミルクプリンの作成条件に関する研究
17:59　○山田徳広（帝塚山大現代生活食物栄養）

B03 会場　午前の部（10:05〜12:05）

食品―食品化学－タンパク質，アミノ酸―

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B03a07　ピリドキサミン由来メイラード反応生成物の化学構造
10:05　○能見祐理，大塚　譲（お茶大・生環研セ）
3B03a08　3-deoxyosone 修飾 ribonuclease A の解析
10:16　○石渡まどか[1]，臼井照幸[2]，渡辺寛人[1]，早瀬文孝[1]（[1]明治大農，[2]昭和学院短大・ヘルスケア栄養）
3B03a09　グリセルアルデヒド修飾タンパク質における酵素活性低下機構の解析
10:27　○長谷川俊樹[1]，　臼井照幸[1,2]，　渡辺寛人[1]，　早瀬文孝[1]（[1]明治大農，[2]昭和学院短大・ヘルスケア栄養）
3B03a10　ピロロキノリンキノンによるメイラード反応抑制作用の解析
10:38　○大関菖平，早瀬文孝，渡辺寛人（明治大院農）
3B03a11　酸化修飾タンパク質のアダクトーム解析
10:49　○柴田貴広[1,2]，　清水和真[1]，　内田浩二[1]（[1]名大院生命農，[2]JST, さきがけ）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3B03a13　米胚乳タンパク質の血清尿酸値低下効果
11:10　○細島康宏[1,2]，　青池郁夫[3]，　近藤葉月[4]，　藤井幹夫[4]，久保田真敏[1]，　門脇基二[1]，　斎藤亮彦[5]（[1]新潟大学自然科学系(農学部)，[2]新潟大学医歯学総合病院　腎・膠原病内科，[3]向陽メディカルクリニック，[4]亀田製菓株式会社，[5]新潟大学機能分子医学講座）
3B03a14　発酵食品に含まれる蛋白質酵素分解物の RBL-2H3 細胞に対する脱顆粒抑制作用
11:21　○曽根田祐太[1]，　下田博司[3]，　小野瀬淳一[2]，　柏木　豊[1]，前橋健二[1]（[1]東農大院醸造，[2]東農大応生栄養，[3]オリザ油化株式会社）
3B03a15　運動時の脂肪燃焼効果が高いアミノ酸の探索
11:32　○上田啓輔[1]，　山口　真[1]，　高井祥子[1]，　藤田　聡[2]，山地健人[1]，伊藤裕之[1]（[1]株式会社明治，[2]立命館大学）
3B03a16　高血圧自然発症ラットにおける発酵キョウバクの血圧上昇抑制作用
11:43　○小山正浩[1]，石田竜也[2]，猪狩直樹[3]，加藤　智[3]，中村浩蔵[1,2]（[1]信州大農，[2]信州大院農，[3]大和薬品(株)）
3B03a17　発酵キョウバク由来降圧ペプチドの生体内 ACE 活性に与える影響
11:54　○石田竜也[1]，小山正浩[2]，服部成治[1]，中村浩蔵[1,2]（[1]信州大院農，[2]信州大農）

B03 会場　午後の部（15:05〜18:10）

食品―食品工学－物性，分析，その他―

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3B03p07　S-1-Propenyl-L-cysteine sulfoxide を高含有するタマネギエキスの製造
15:05　○稲川裕人，片柳悠紀，新村由紀，原田昌卓，池本裕之，福富竜太，八幡信広（日清ファルマ(株)）
3B03p08　イオン性多糖類を用いた胃内浮遊性炭酸飲料の設計
15:16　○堂本隆史，坂田　茜，深見麻里江，武井拓人（大正製薬株式会社セルフメディケーション開発研究所）
3B03p09　茶生葉酵素を利用したテアフラビン類高含有飲料の開発
15:27　○淺沼俊倫[1]，　高木啓詞[1]，　袴田雅俊[1]，　上野千恵[1]，上村慎子[1]，　油上　保[1]，　杉山直人[1]，　望月一男[1]，　笹野直紀[2]，太田和宏宣[2]，片岡良充[2]（[1]静岡県工業技術研究所，[2]静岡ジェイエイフーズ株式会社）
3B03p10　茶葉ポリフェノールオキシダーゼ活性の簡易的測定方法の構築と評価
15:38　○袴田雅俊，高木啓詞，淺沼俊倫，望月一男（静岡県工業技術研究所）
3B03p11　テアフラビン類高含有紅茶葉の製造方法の開発
15:49　○高木啓詞，袴田雅俊，淺沼俊倫，望月一男（静岡県工業技術研究所）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3B03p13　LC/MS 及び多変量解析を用いた緑茶成分の分析
16:10　○岡田明子，清水　博，則武智哉（(株)UBE 科学分析センター）
3B03p14　亜臨界水抽出による茶の味および香りに関する化学的研究
16:21　○宮下知也（静大院農）
3B03p15　ドライエイジング処理が牛肉の香気に及ぼす影響
16:32　○池ヶ谷篤[1]，　油上　保[1]，　渡瀬隆也[1]，　青野博志[2]，篠田和代[2]（[1]静岡県工業技術研究所，[2]アオノフレッシュミート株式会社）
3B03p16　スパゲティの香気成分に及ぼす乾燥温度・乾燥時間の

影響について
16:43 岩瀬翔太郎，杉山健二郎，°山田昌治（工学院大学院工）
3B03p17 赤ワインタンニンのタンパク質結合性による分画
16:54 °奥田 徹，近田有哉法，井上絵梨，斉藤史恵，久本雅嗣（山梨大院ワイン研）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3B03p19 甲州種ワイン醸造におけるヒドロキシシンナム酸エチルエステルの生成と呈味に与える影響
17:15 °斉藤史恵，林 周美，久本雅嗣，奥田 徹（梨大・ワイン研）
3B03p20 イチゴジャムのペクチン濃度がフレーバーリリースに及ぼす影響
17:26 °黒飛知香[1]， 干野隆芳[1]， 風見由香利[2]， 神山かおる[2]，早川文代[2]（[1]アヲハタ(株)，[2](独)農研機構・食総研）
3B03p21 液状食品モデルにおける各種増粘剤の香気放散挙動に与える影響
17:37 °吉田 遼[1]， 松宮健太郎[1]， 林 和寛[2]， 松村康生[1]（[1]京都大院農，[2]味の素(株)食品研）
3B03p22 自己駆動型クーロメトリーを用いた NADH の定量とその応用
17:48 °川嶋浩平，北村 誠，三木功次郎（奈良工業高専）
3B03p23 LC-Orbitrap MS によるトウモロコシ中のカビ毒配糖体(マスクドマイコトキシン)の検出(第 3 報)
17:59 °松尾洋輔[1]， 高原健太郎[2]， 佐合由紀[1]， 長嶋 等[1]，中川博之[1]（[1](独)農研機構・食総研，[2](株)サーモフィッシャーサイエンティフィック）

B04 会場 午前の部（9:22〜11:54）

食品—食品機能・栄養－酸化，抗酸化，老化－たんぱく質・アミノ酸代謝—

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

3B04a03 高濃度カルシウム含有天然水の機能評価
9:22 °白畑實隆[1,2]， 濱崎武記[1]， 金城智也[2]， 中道 昇[1]，飛矢和司[3]，冬木久善[4]（[1]九大院農，[2]九大院シス生，[3](有)明日香，[4](株)青葉）
3B04a04 過酸化リン脂質異性体の精密定量による生体酸化ストレスの評価
9:33 °加藤俊治[1]， 仲川清隆[1]， 浅井 明[2]， 及川眞一[2]，永島和幸[3]，宮澤陽夫[1,4]（[1]東北大・院・農・機能分子解析，[2]日医大・内分泌代謝，[3]心研・附属病院，[4]東北大未来科学技術共同センター）
3B04a05 LC-MS/MS によるヒト血漿アラキドン酸型 PCOOH の定量
9:44 °水落俊介[1]， 加藤俊治[1]， 宮澤大樹[1]， 仲川清隆[1]，浅井 明[2]，及川眞一[2]，永島和幸[3]，宮澤陽夫[1,4]（[1]東北大院農・機能分子解析，[2]日医大・内分泌代謝，[3]心研，[4]東北大未来科学技術共同研究センター）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B04a07 DNA 損傷に対するアーユルヴェーダハーブの防御効果
10:05 °高氏裕貴[1]， 森野香子[1]， 三木健輔[1]， 山内正剛[2]，HOSSAIN Mohammad N[1]，藤井道彦[1]，鮎沢 大[1]（[1]横浜市大院・生命ナノシステム，[2]放医研・防護研究センター）
3B04a08 線虫の脂肪蓄積を抑制するアーユルヴェーダハーブの探索
10:16 °武田あすか，三木健輔，藤井道彦，鮎沢 大（横浜市大院生命ナノシステム）
3B04a09 ケルセチンの長期および過剰摂取が正常マウスに及ぼす影響
10:27 °高橋弓子， 秋元由香里， 大池秀明， 一法師克成，小堀真珠子（農研機構 食品総合研究所）
3B04a10 焙煎コーヒー豆中のキサンチンオキシダーゼ(XO)阻害能を有するクロロゲン酸ラクトン
10:38 °本田沙理，三浦ゆか理，稲井美由紀，増田俊哉（徳島大院・総合）
3B04a11 フラボノイドとシステイン類との酸化的成分間反応物との構造と機能—XO 阻害活性の増強について—
10:49 °三浦ゆか理，本田沙理，稲井美由紀，増田俊哉（徳島大院・総合）

a13〜a16 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3B04a13 TNF-α による筋タンパク質合成抑制に対する 1-デオキシノジリマイシンの改善作用
11:10 °藤谷直輝[1]，羽鳥由信[2]，平田 孝[1,3]，菅原達也[1]（[1]京大院・農，[2]日本新薬・食開研，[3]四條畷学園大・リハビリテーション学部）
3B04a14 高分岐鎖アミノ酸食によるラット脳におけるキヌレン酸産生制御
11:21 °福渡 努，丸山明子，東山沙織，佐野光枝，柴田克己（滋賀県大人間文化）
3B04a15 筋特異的分岐鎖アミノ酸代謝亢進マウスの解析
11:32 °北浦靖之，石川卓弥，伊丹雄也，加藤里奈，犬飼彩美，門田吉弘，下村吉治（名古屋大院生命農）
3B04a16 安定同位体を用いた腸内常在菌によるアルギニンからのプトレッシン産生の証明
11:43 °中村篤央，松本光晴（協同乳業株式会社）

B04 会場 午後の部（14:22〜18:10）

食品—食品化学－色素，香料—

p03〜p05 発表者の接続時間 14:12〜14:22

3B04p03 長野県の伝統野菜「八町きゅうり」の香気特性
14:22 °小木曽加奈[1]，金子昌二[2]，中澤弥子[1]（[1]長野県短大生活科学，[2]長野県工技センター）
3B04p04 施肥条件の異なるミズナにおける官能評価と香気成分の関連性解析
14:33 °福田朋彦[1,2]， 岡崎圭毅[3]， 渡邊彩乃[4,5]， 信濃卓郎[2,3,6]，岡 紀邦[2,3]（[1]ホクレン農総研，[2]北大院農，[3]農研機構 北海道農研，[4]北大農，[5]農林水産消費安全技術セ，[6]農研機構 東北農研）
3B04p05 二条裸麦「ビューファイバー」搗精粉の加水処理による香気成分の変化
14:44 °神山紀子，一ノ瀬靖則，金子成延，柳沢貴司，小前幸三（農研機構作物研）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3B04p07 リンゴ‘ふじ’の栽培法に関連した香味物質の特徴
15:05 °田中福代[1]， 岡崎圭毅[2]， 宮澤利男[3]， 伊藤 伝[4]（[1](独)農研機構・中央農研，[2](独)農研機構・北農研，[3]小川香料株式会社，[4](独)農研機構・果樹研）
3B04p08 チャ生葉低温保管による香気成分 indole の蓄積
15:16 °勝野 剛[1,2]， 友村美穂[3]， 中村順行[1,4]， 渡辺修治[2]（[1]静岡県農林技研茶研センター，[2]静岡大創造院，[3]静岡大院農，[4]静岡県立大）
3B04p09 包括的二次元 GC-TOFMS を用いたワカメの香気物質の網羅的解析
15:27 °山下哲郎，加藤恭子，小枝まどか，中野晴日，小野久弥，宮崎雅雄（岩手大農）
3B04p10 乾燥ワカメの主要香気成分の同定
15:38 °寄元祥平，高山志穂，赤壁善彦（山口大農）
3B04p11 調味液のコクに寄与する香気成分の解析
15:49 °加藤祥恵，宮下泰明，渡辺寛人，早瀬文孝（明治大農）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3B04p13　D-キシロース−グリシン系メイラード反応で生成する青色色素の生成機構について
16:10　◦伊藤恵介，渡辺寛人，早瀬文孝（明治大農）

3B04p14　メイラード反応により生成する色素のピロロピロール構造特異的抗体の作製
16:21　◦青木真洋[1]，臼井照幸[2]，渡辺寛人[1]，早瀬文孝[1]（[1]明治大院農，[2]昭和学院短大・ヘルスケア栄養）

3B04p15　キシロース−リジン系メイラード反応により形成される主要反応生成物の同定
16:32　◦見上葉子[1]，山田眞二[2]，村田容常[1]（[1]お茶大院・ライフ，[2]お茶大院・理学）

3B04p16　メラノイジンの分解菌の検索と分解物の性質
16:43　◦本間清一[1]，　松井芳光[2]，　中西康博[2]，　山本祐司[2]，能見祐理[1]，大塚　譲[1]（[1]お茶大，[2]東農大）

3B04p17　クロロフィルの光退色に及ぼす溶媒の影響
16:54　◦安田みどり[1]，織田恵輔[2]，上田敏久[2]，田端正明[3]（[1]西九大健福，[2]佐賀大農，[3]佐賀大院工）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3B04p19　着色系“松館しぼりダイコン”交配種のアントシアニン分析
17:15　◦畠山研人[1]，　椿　信一[2]，　大木梓織[3]，　櫻井健二[3]，常盤野哲生[3]，吉澤結子[3]（[1]秋田県立大院生資科，[2]秋田県農業試験場，[3]秋田県立大生資科）

3B04p20　紅イモ（*Ipomoea batatas*）に含まれるアントシアニンの固定化酵素による構造の改変
17:26　◦山田恭正，河合　梢，前田美樹（同志社女大食栄）

3B04p21　既存添加物「クチナシ赤色素」の製造法に関する研究
17:37　◦森本麻紀[1]，伊藤裕才[2]，杉本直樹[2]，穐山　浩[2]（[1]東京理科大薬，[2]国立医薬品食品衛生研究所）

3B04p22　キサントフィル酸化的代謝産物によるマウス 3T3-L1 脂肪前駆細胞の分化誘導抑制効果
17:48　◦小竹英一，長尾昭彦，長谷　恵，小林みゆき（独立行政法人　農業・食品産業技術総合研究機構　食品総合研究所）

3B04p23　ヒト血漿中に検出されるキサントフィルの酸化的代謝産物
17:59　◦長尾昭彦, 小竹-奈良英一, 小林みゆき（農研機構食総研）

B05 会場　午前の部（9:22〜11:54）

食品—食品機能・栄養−糖質代謝—

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

3B05a03　ChREBP β の組織における発現分布と機能の解析
9:22　◦井上聖哉，井上　順，Shimizu Makoto，佐藤隆一郎（東大院農）

3B05a04　N-アセチルスクロサミンの諸性質と腸内細菌による資化性
9:33　◦篠崎佑子[1]，豊田葉月[2]，平野貴子[2]，袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用，[2]日大生資科・生命化）

3B05a05　高アミロース米及び超硬質米の食味及び機能性改善
9:44　◦大坪研一[1]，　中村澄子[1]，　笹原茂樹[2]，　松下　景[2]，長岡一朗[2]，山口誠之[2]（[1]新潟大院自然，[2]農研機構）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B05a07　栗渋皮ポリフェノールの膵アミラーゼ阻害機構の解析
10:05　◦辻田隆広，高久武司（愛媛大総合科学）

3B05a08　脂肪酸添加による馬鈴薯澱粉の難消化性付与
10:16　◦秋山美展[1]，　松橋　南[1]，　小原　幸[1]，　納谷美日子[1]，石川匡子[1]，石原克之[2]，佐久間塁[2]，古賀秀徳[2]（[1]秋田県大・生物資源，[2]カルビー(株)）

3B05a09　リグニンスルホン酸による脂肪細胞分化促進作用と α-グルコシダーゼ活性阻害作用
10:27　◦川南　諭, 阿部貴大, 高橋浩司, 長谷川靖（室蘭工大院工）

3B05a10　蚕サナギの 1-デオキシノジリマイシン含量および糖質分解酵素阻害作用
10:38　◦友竹浩之，片桐充昭（飯田女子短期大学）

3B05a11　ナツメに含まれる糖取り込み誘導活性成分の同定
10:49　◦成瀬翔真[1]，　北村賢治[1]，　上前知之[1]，　高橋正和[1]，大東　肇[1]，入江一浩[2]，川畑球一[1]（[1]福井県大院・生物資源，[2]京大院農・食生科）

a13〜a16 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3B05a13　田七人参由来ダンマラン系トリテルペンと習慣的な走行運動の併用で血糖値上昇が効果的に抑制され，骨格筋重量が増加する
11:10　◦岩本　拓[1]，　高村裕介[1]，　北村久美子[1]，　野村　充[1]，村越倫明[1]，眞鍋康子[2]，藤井宣晴[2]（[1]ライオン(株)，[2]首都大学東京院）

3B05a14　新種玉ねぎ「さらさらゴールド」による血糖値上昇抑制作用
11:21　◦荒尾紗代[1]，庭野吉己[2]，塚田　愛[3]，前多隼人[1]（[1]弘前大学農学生命，[2]東北大学大学院歯学研究科，[3](株)ハーバー研究所）

3B05a15　高脂肪高ショ糖食摂食マウスモデルにおけるメチル化 EGCG のインスリン抵抗性改善作用
11:32　◦日高詩織[1]，　熊添基文[1]，　篠田有希[2]，　山口　航[2]，豊田　唯[2]，山本(前田)万里[3]，山田耕路[1]，立花宏文[1,4]（[1]九大院農院・生機科，[2]アサヒ飲料，[3]農研機構食総研，[4]九大食品機能デザイン）

3B05a16　コーヒーの STZ 誘発性糖尿病発症抑制効果と膵 β 細胞へ与える影響の解析
11:43　◦浜名芳輝[1]，　小林美里[1]，　倉田貴生[1]，　井上孝司[2]，坂井田和裕[2]，村井篤嗣[1]，堀尾文彦[1]（[1]名大院農，[2]ポッカサッポロ中研）

B05 会場　午後の部（14:11〜18:10）

食品—食品機能・栄養−消化，吸収，循環—

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

3B05p02　ラット体内リグナン分布の検討及び愛媛県東温市住民の血中リグナン濃度調査
14:11　◦岸田太郎[1]，　斉藤　功[2]，　江口依里[2]，　丸山広達[2]，梶原秀平[1]，　松木　翠[1]，　西脇　寿[1]，　山内　聡[1]，　谷川　武[2]（[1]愛媛大農，[2]愛媛大院医）

3B05p03　ルテオリン(パプリカ葉フラボノイド)の体内吸収動態評価
14:22　◦近藤桃子[1]，　庄子真樹[2]，　仲川清隆[1]，　津志田藤二郎[3]，宮澤陽夫[1,4]（[1]東北大院農　機能分子解析学分野，[2]宮城県産業技術総合センター，[3]宮城大学　食産業学部，[4]東北大未来科学技術共同センター）

3B05p04　半永久胸管リンパカニュレーションを施したラットにおける食事ステロイドのリンパ吸収及びリンパ液中サイトカイン濃度に対するエゼチミブの影響
14:33　◦城内文吾，　古川裕美子，　河内明日香，　中村有理，佐藤匡央（九大院農）

3B05p05　フラボノイドが胆汁酸およびコレステロール腸管吸収トランスポーター発現に与える影響
14:44　◦小川真奈[1]，高田龍平[2]，阿部啓子[1]，小林彰子[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大病院薬）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3B05p07　小腸刷子細胞の分化制御と機能の解明
15:05　◦吉岡美紗子[1]，　石丸喜朗[1]，　朝倉富子[1]，　阿部啓子[1,2]（[1]東大農生科・応生化，[2]KAST）

3B05p08　腸管上皮グルコーストランスポーター SGLT1 を制御

する食品因子の探索及び解析

15:16 ○柴田諒祐[1]，　山本憲朗[2]，　戸塚　護[1]，　清水　誠[1]，薩　秀夫[1]（[1]東大院農生科，[2]ハウスウェルネスフーズ）

3B05p09　ゲニステインによる腸管上皮における解毒代謝酵素の制御解析

15:27 ○大前佑介, 戸塚　護, 清水　誠, 薩　秀夫（東大院農生科）

3B05p10　リゾホスファチジルイノシトールが腸管上皮における炎症メディエーター発現に及ぼす影響

15:38 ○宮崎　悠, 戸塚　護, 清水　誠, 薩　秀夫（東大院農生科）

3B05p11　炭素安定同位体比を用いた食餌性グルコシルセラミドの皮膚セラミド生合成へ寄与の推定

15:49 ○原口浩幸[1,2]，　山田桂大[2]，　宮下留美子[1]，　間　和彦[1]，大西正男[3]，木下幹朗[4]，菅原達也[5]，吉田尚弘[2]（[1]日本製粉中央研究所，[2]東工大院総理工，[3]藤女子大人間生活学部，[4]帯広畜大食品科学研究部門，[5]京大院農学研究科）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3B05p13　ユリネのエタノール抽出物および抽出残渣物が高脂肪食摂取ラットの腸内環境に及ぼす影響

16:10 ○岡崎由佳子[1]，　山口さより[2]，　平　敏夫[2]，　福田絵里[1]，知地英征[1]，加藤範久[3]（[1]藤女子大人間生活，[2]コスモ・バイオ(株)，[3]広島大院・生物圏科学）

3B05p14　便通状態が尿中・血中栄養素並びに尿中酸化ストレスマーカーに与える影響

16:21 ○小林　晃[1]，信田幸大[1]，菅沼大行[1]，青江誠一郎[2]（[1]カゴメ株式会社，[2]大妻女子大学）

3B05p15　プロトン共役型オリゴペプチド輸送体を介した食品ペプチド素材の生体吸収性解析

16:32 ○伊藤圭祐[1]，　VU THI TUYET LAN[1]，　木村美香[1]，本山貴康[2]，河合　駿[3]，加藤竜司[3]，河原崎泰昌[1]（[1]静県大院・薬食，[2]不二製油・基盤研，[3]名大院・創薬）

3B05p16　プロトン共役型オリゴペプチド輸送体によるジ・トリペプチドおよび医薬品認識メカニズムの解明

16:43 ○VU THI TUYET LAN[1]，　伊藤圭祐[1]，　石黒正路[2]，本山貴康[3]，河合　駿[4]，加藤竜司[4]，河原崎泰昌[1]（[1]静県大院・薬食，[2]新潟薬大・応生科，[3]不二製油・基盤研，[4]名大院・創薬）

3B05p17　食用地衣のレニン及びキマーゼ阻害活性

16:54 ○韮澤　悟[1]，程　永強[2]，山本好和[3]，高橋砂織[4]（[1]国際農研，[2]中国農大食品科学，[3]秋田県大生物資源，[4]秋田県総食研）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3B05p19　納豆菌を用いた発酵マコンブの血圧上昇抑制作用

17:15 ○橋口慧理[1]，三沢　宏[2]，矢澤一良[3]，濱田(佐藤)奈保子[1]（[1]東京海洋大院・食品流通，[2]日本・バイオ株式会社，[3]東京海洋大・ヘルスフード科学プロジェクト）

3B05p20　自然発症高血圧ラットにおける米糀の血圧上昇抑制効果と抗肥満効果

17:26 ○佐藤優太郎，櫻井美仁，佐藤眞治（新潟薬大）

3B05p21　低分子量化酸性多糖類の食後血糖上昇抑制作用

17:37 ○本三保子[1]，　内田菜穂子[1]，　鬘谷　要[1]，　田中克幸[2]，岩崎一泰[2]，室田明彦[3]（[1]和洋女子大生活，[2]奥野製薬工業，[3]明治大理工）

3B05p22　絶食条件下におけるシイタケ抽出物の血中エタノール濃度上昇抑制作用

17:48 ○吉岡沙織[1]，　廣中　聡[1]，　鵜飼愛梨[1]，　増田秀樹[2]，松井謡子[2]，西村　修[2]，作田圭亮[2]，赤尾　真[1]，熊谷日登美[1]（[1]日大・生資・生化，[2]小川香料(株)）

3B05p23　ケルセチン硫酸抱合体の合成と抗炎症作用の解析

17:59 ○黒川健治[1]，　生城真一[2]，　榊　利之[2]，　寺尾純二[3]，大西康太[1]，河合慶親[1]（[1]名大院生命農，[2]富山県大・工，[3]徳島大院・HBS 研）

B06 会場　午前の部（9:11〜12:05）

食品―食品機能・栄養－免疫，炎症，アレルギー―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3B06a02　Immune enhancement and Antiviral activity of herbal medicines, Phellodendron amurense Ruprecht & Angelica tenuissima Nakai

9:11 ○Myun Soo KIM[1,2]，Prasanna Weeratunga[2]，Ki Jong YU[1]，Hongik KIM[1]，Jong-Soo LEE[2]（[1]R&D Division, Vitabio.，[2]College of veterinary medicine, Chungnam National University）

3B06a03　ウーロン茶ポリフェノール Chafuroside B の皮膚表皮細胞における紫外線防御作用（UVB による DNA 損傷および皮膚免疫抑制因子生成に対する改善作用について）

9:22 ○長谷川達也[1]，　島田正一郎[1]，　石田均司[2]，　中島優哉[1]（[1]資生堂リサーチセンター，[2]静岡県立大学）

3B06a04　緑茶カテキンにより誘導される食作用活性の増強は Transient Receptor Potential Melastatin 2(TRPM2)阻害剤によって抑制される

9:33 ○物部真奈美[1]，江間かおり[1]，徳田佳子[1]，山本(前田)万里[2]，堀江秀樹[1]（[1](独)農研機構野菜茶業研究所，[2](独)農研機構食品総合研究所）

3B06a05　自然免疫応答を用いた新規食品機能性評価法で判明した茶類の機能性

9:44 ○數村公子[1]，　山本(前田)万里[2]，　里園　浩[1]，　呉　暁紅[3]，土屋広司[1]，小池　隆[4]，岡崎茂俊[5]，大澤俊彦[6]（[1]浜松ホトニクス・中研，[2]農研機構・食総研，[3]ヘルスケアシステムズ，[4]浜松ホトニクス・電子管，[5]浜松医大・MPRC，[6]愛知学院大・心身）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B06a07　ナチュラルキラー細胞を活性化する食品成分の探索

10:05 ○齋藤　武，阿部大吾，野方洋一（農研機構・近中四農研）

3B06a08　マウス自己免疫病発症に対するアスタキサンチンの効果

10:16 ○茶山和敏[1]，中岡千種[1]，山下栄次[2]（[1]静岡大院農，[2]アスタリール）

3B06a09　Oral administration of kaempferol induces IL-10-producing regulatory B cell population and inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis

10:27 ○Chenhao YEH，Junya HORIUCHI，Hideo SATSU，Makoto SHIMIZU，Mamoru TOTSUKA（Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo）

3B06a10　植物由来食品因子エリオジクチオールおよびモリンのマウス制御性 T 細胞分化誘導機能

10:38 ○松本優樹，薩　秀夫，清水　誠，戸塚　護（東大院農）

3B06a11　*Lactococcus lactis* C59 株とナリンゲニンの同時経口投与による経口免疫寛容誘導の強化

10:49 ○西田実紗[1]，青木ー吉田綾子[2]，鈴木チセ[2]，薩　秀夫[1]，清水　誠[1]，戸塚　護[1]（[1]東大院農生・応生化，[2](独)農研機構・畜草研）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3B06a13　*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC により産生された菌体外多糖のアレルギーモデルマウスに対する効果

11:10 ○後藤弥生[1]，　鈴木志保[2]，　戸田登志也[1]，　山田勝重[1]，北村進一[3]（[1]フジッコ株式会社，[2]有限会社 IPE，[3]大阪府大院・生命環境）

3B06a14　乳酸菌由来 GAPDH による IgE 産生の抑制

11:21 ○岩元　彬[1]，　井上愛子[2]，　井上祐一[3]，　山田耕路[1]，立花宏文[1]，川原浩治[3]（[1]九大院農院・生機科，[2]キューリン・検査部，[3]北九州高専・物化工）

3B06a15　ロタウイルス感染マウスモデルにおける *Lactococcus lactis* JCM5805 株摂取の効果

11:32 ○城内健太[1,2]，　杉村　哲[2]，　大塩木乃実[2]，　藤原大介[2]

([1]小岩井乳業(株)技術開発センター，[2]キリン(株)基盤技術研究所)

3B06a16　乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* MCC1849 による IgA 産生促進作用と感染防御作用

11:43　◦新井　聡[1]，　岩淵紀介[1]，　田中智弘[1]，　小田巻俊孝[1]，清水(肖)金忠[1]，八村敏志[2]，阿部文明[1]（[1]森永乳業・食基研，[2]東大院農生科・食の安全研セ）

3B06a17　エンドウマメより単離された乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 株の免疫賦活能の解析

11:54　◦松崎千秋[1]，　山元優花[1]，　松本健司[2]，　古賀博則[2]，片山高嶺[1]，加藤紀彦[1]，山本憲二[1]，久　景子[3]（[1]石川県大・資源研，[2]石川県大・生資環，[3]日東薬品工業(株)）

B06 会場　午後の部（14:22〜17:59）

食品—食品機能・栄養－免疫，炎症，アレルギー—

p03〜p05 発表者の接続時間 14:12〜14:22

3B06p03　食品因子の抗アレルギー効果を評価する新規評価法の有効性

14:22　◦横山友紀，橋本堂史，水野雅史（神戸大院農）

3B06p04　授乳期の抗原摂取が仔の免疫応答に及ぼす影響の解析

14:33　◦阿部麻里奈[1]，渡辺　純[1]，後藤真生[2]，石川(高野)祐子[2]（[1]筑波大院生環，[2]農研機構　食総研）

3B06p05　エビアレルギー発症リスクと調理または鮮度との関係

14:44　◦臼井将勝[1]，西大杏里[1]，五十嵐真璃亜[1]，高場穂那実[1]，安本信哉[2]，近藤昌和[2]，宮崎泰幸[1]，花岡研一[1]（[1]水大校食品科学，[2]水大校生物生産）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3B06p07　赤シソからの新規 I 型アレルギー抑制因子の単離・同定

15:05　◦亀井力哉[1]，　河本正次[1]，　荒川賢治[1]，　平川規子[2]，馬場堅治[2]，小埜和久[1,3]（[1]広島大院先端，[2]三島食品株式会社研究所，[3]広島工大生命）

3B06p08　ホウレンソウ由来フラボノイドの抗アレルギー作用の評価

15:16　◦森下雄太[1]，　小川晃太朗[1]，　熊石朱純[1]，　澤谷一樹[2]，武藤徳男[1]（[1]県広大院生命，[2]県広大生環）

3B06p09　ノビレチンの抗アレルギー作用に関する研究

15:27　◦安永　翔[1]，　大西紗与[1]，　西　甲介[1]，　門田　歩[2]，菅原卓也[1]（[1]愛媛大・農，[2]伊方サービス(株)）

3B06p10　褐藻類アカモク由来クロロフィル c2 の脱顆粒抑制作用に関する研究

15:38　◦石田萌子[1]，　吉岡久史[2]，　鎌田　彰[2]，　小西達也[2]，高橋　潤[3]，　織田浩司[2]，　玉井忠和[2]，　豊原治彦[3]，　菅原卓也[1]（[1]愛媛大学・農，[2](株)マルハニチロ，[3]京都大院・農）

3B06p11　スフィンゴミエリンの蓄積を介したシフォナキサンチンの脱顆粒抑制作用

15:49　◦真鍋祐樹[1]，平田　孝[1,2]，菅原達也[1]（[1]京大院農，[2]四条畷学園大）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3B06p13　茶葉成分ストリクチニンは IL-4 受容体 a に結合するとともに IgE 産生経路を阻害する

16:10　◦金　允喜[1]，　藤村由紀[2]，　二宮　悠[1]，　中山和子[1]，山田耕路[1]，立花宏文[1,2,3,4]（[1]九州大院農，[2]九大レドックスナビ，[3]九大バイオアーク，[4]九大食品機能デザイン）

3B06p14　マンゴーエタノール抽出物の IgE 産生抑制活性に関する研究

16:21　◦佐々木智子[1]，　近藤倫世[1]，　西　甲介[1]，　玉元武司[2]，菅原卓也[1]（[1]愛媛大・農，[2]オキナワ宮古市場）

3B06p15　じゃがいも皮抽出物の経口投与によるマウスパイエル板細胞のサイトカイン産生への影響

16:32　◦須藤麻里[1]，　加藤　卓[2]，　入澤　恵[2]，　市澤　恵[1]，石原克之[1]，　平林真一[1]，　古賀秀徳[1]，　佐久間塁[1]，　伏谷眞二[2]，高野文英[2]（[1]カルビー(株)，[2]日薬大薬学）

3B06p16　褐藻サガラメ由来フロロタンニンの免疫調節作用

16:43　◦杉浦義正，田中竜介，松下映夫，宮田昌明（水大校　食品科学）

3B06p17　マウス好塩基球の IgG 依存性活性化マーカーの同定

16:54　◦松原　毅，岩本　洋，中里友紀，難波和美，武田安弘（森永乳業栄養科学研究所）

p19〜p22 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3B06p19　アトピー性皮膚炎の増悪化予防に寄与する北海道産果実由来脂肪酸の微生物選択的な抗菌活性

17:15　◦永尾寿浩[1]，　川上誠治[2]，　遠藤正弘[3]，　板野　勝[2]，田中重光[1]，　倉田淳志[4]，　田中小百合[4]，　岸本憲明[4]，　中野博文[1]（[1]阪市工研，[2]ジェミニ，[3]遠藤組，[4]近畿大院農）

3B06p20　TCR トランスジェニックマウスを用いた食物アレルギーモデルにおける Th2 型皮膚炎の解析

17:26　◦平出恵利華[1,2]，　足立(中嶋)はるよ[2]，　北村紀子[3]，上滝隆太郎[1,2]，武山　純[1,2]，佐伯真弓[3]，西村友枝[3]，神沼　修[3]，廣井隆親[3]，八村敏志[1,2]（[1]東大院農生科･応生化，[2]東大院農生科･食の安全研セ，[3]東京都医学総合研・花粉症プロ）

3B06p21　高圧下酵素処理した低アレルゲン化 β-ラクトグロブリンで誘導されるアナフィラキシーの評価

17:37　◦藤原麻美，楯岡　潤，勝俣雅之，東　徳洋，山田　潔（宇都宮大農）

3B06p22　接触過敏症モデル動物実験系における大豆の効果

17:48　◦長野隆男[1]，烏烏日娜[1]，米元博子[2]，津村和伸[2]（[1]川崎医福大臨床栄養，[2]不二製油）

B07 会場　午前の部（9:11〜11:54）

食品—食品機能・栄養－その他—

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3B07a02　*Nostoc* 属の示す抗変異原性に対する消化液処理による影響

9:11　◦小原章裕[1]，　川村磨史[1]，　山口裕司[2]，　竹中裕行[2]，湊健一郎[1]（[1]名城大農，[2]マイクロアルジェ—コーポレーション）

3B07a03　ラクトフェリン＋ラクトパーオキシダーゼ含有粉末組成物の抗菌作用および口臭抑制作用

9:22　◦新光一郎，中野　学，若林裕之，山内恒治，阿部文明（森永乳業食基研）

3B07a04　ラクトパーオキシダーゼ(LPO)システムによる揮発性硫黄化合物産生抑制作用機構

9:33　◦中野　学[1]，　新光一郎[1]，　若林裕之[1]，　山内恒治[1]，阿部文明[1]，朝岡あかね[2]，川津正俊[2]，弘中祥司[3]（[1]森永乳業食基研，[2]クリニコ，[3]昭和大・歯）

3B07a05　乳酸菌と酵母で発酵した発酵乳の香りが自律神経と行動に与える影響

9:44　◦川口恭輔[1]，小谷　恵[1]，水野征一[1]，永井克也[2]（[1]カルピス株式会社　発酵応用研究所，[2]株式会社 ANBAS）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B07a07　高脂肪高ショ糖給餌ラットにおける米穀由来バイオエタノール発酵残渣の抗肥満効果

10:05　◦櫻井美仁[1]，内海竜也[2]，佐藤眞治[1]（[1]新潟薬大応生・食品分析，[2]JA 全農・資源開発）

3B07a08　麹菌エキス末のヒトにおける抗血栓効果

10:16　◦菅美奈子[1]，　山下裕輔[1]，　武島一仁[1]，　丸　勇史[1]，脇本真之介[2]，脇本吉清[2]，金　武祚[1]（[1]株式会社ファーマフーズ，[2]ワキ製薬株式会社）

3B07a09　*Lactobacillus gasseri* CP2305 株の経口投与が自律神経活動および HPA 軸での遺伝子発現に及ぼす影響

10:27　澤田大輔[1]，◦藤原　茂[2]，永井克也[3]，桑野由紀[4]，六反一仁[4]（[1]カルピス(株)商開セ，[2]アルピス(株)発酵研，[3](株)ANBAS，[4]徳

島大ストレス制御医学）

3B07a10　ヒト常在ビフィズス菌と非常在ビフィズス菌の母乳に対する親和性の違いについて

10:38　°南　淳一，　小田巻俊孝，　橋倉那波，　清水(肖)金忠，阿部文明（森永乳業株式会社）

3B07a11　ヒト常在ビフィズス菌または非常在ビフィズス菌による無菌マウスに対する影響

10:49　°菅原宏祐，　小田巻俊孝，　橋倉那波，　田中智弘，南　淳一，清水(肖)金忠，阿部文明（森永乳業株式会社　食品基盤研究所）

a13〜a16 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3B07a13　発酵青バナナ末の開発

11:10　°井上侑紀[1]，　堀江健二[1]，　渡部和哉[1]，　青笹正義[1]，丸　勇史[1]，加藤　敬[2]，山田　敬[2]，金　武祚[1]（[1](株)ファーマフーズ，[2](株)ドール）

3B07a14　発酵青バナナ末が培養筋細胞ミトコンドリアに与える影響

11:21　°堀江健二[1]，　井上侑紀[1]，　坂下真耶[1]，　薩　日娜[1]，渡部和哉[1]，　青笹正義[1]，　山下裕輔[1]，　丸　勇史[1]，　加藤　敬[2]，山田　敬[2]，金　武祚[1]（[1](株)ファーマフーズ，[2](株)ドール）

3B07a15　紅麹抽出物による骨石灰化の効果

11:32　°安里雪乃，池尻真美，宮里梨恵，比嘉由美子，橘信二郎（琉大農・亜熱生資）

3B07a16　マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 の石灰化に及ぼす PQQ 長期曝露の影響

11:43　°比嘉由美子，橘信二郎（琉大農・亜熱生資）

B07 会場　午後の部（14:11〜17:59）

食品—食品機能・栄養－その他—

p02〜p05 発表者の接続時間 14:01〜14:11

3B07p02　朴葉熱水抽出物中に存在するロタウイルス感染抑制成分の解析

14:11　°河原岳志[1]，　友野拓真[1]，　濱渦康範[1]，　田中勝巳[2]，保井久子[2]（[1]信州大院農，[2]木曽町地域資源研）

3B07p03　マクロファージ分化に対する多糖およびその他食品成分の影響

14:22　°湊健一郎，安藤　恵，小原章裕（名城大院農）

3B07p04　GLP-1 の分泌を促す食品因子の解明とその機序

14:33　°加藤正樹，谷　翼，津田孝範（中部大・応生）

3B07p05　血管弛緩性ペプチド Trp-His(WH)の AMP キナーゼ活性化作用とそのメカニズム

14:44　°曽我　実[1]，　大橋彩加[1]，　谷口恵実[1]，　滝川雅仁[1]，松井利郎[2]，津田孝範[1]（[1]中部大・応生，[2]九大院・農）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3B07p07　骨格筋の分化を促進する活性物質探索法の確立

15:05　°木村駿介，木村太郎，加藤英介，川端　潤（北大院農）

3B07p08　肝臓水解物の肉体疲労改善効果

15:16　°山田耕太郎[1]，　中川西修[2]，　根本　亙[2]，　櫻井英知[1]，只野　武[2,3]，丹野孝一[2]（[1]ゼリア新薬工業株式会社　コンシューマーヘルスケア製品開発部，[2]東北薬科大学　薬理学教室，[3]金沢大学医薬保健学総合研究科環境健康科学）

3B07p09　ココア摂取による体表温の上昇に寄与する成分の検討

15:27　°森　紀之[1]，　岡村実咲[1]，　中山由子[1]，　亀井優徳[2]，灘本知憲[1]（[1]滋賀県大人間文化，[2]森永製菓株式会社）

3B07p10　ココア飲用による計算能力向上効果について：カカオ類の日常摂取頻度の影響

15:38　°西村雅明[1]，佐藤広康[2]，亀井優徳[1]（[1]森永製菓株式会社，[2]四天王寺大学）

3B07p11　mRNA-Seq 法を用いた味蕾特異的発現遺伝子の網羅的解析

15:49　°角田俊介[1]，　石丸喜朗[1]，　吉澤真人[1]，　吉岡美紗子[1]，朝倉富子[1]，阿部啓子[1,2]（[1]東大院農生科・応生化，[2]KAST）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3B07p13　レポーターアッセイを用いた客観的味評価系の開発

16:10　°鈴川　縁，三坂　巧（東大院農生科・応生化）

3B07p14　メダカにおける味覚関連遺伝子群の発現様式

16:21　°家木誉史，池永直弥，吉田晃子，岡田晋治，三坂　巧（東大院農生科・応生化）

3B07p15　メダカ味覚受容体 T1R1 の転写制御配列の取得

16:32　池永直弥，°吉田晃子，家木誉史，岡田晋治，三坂　巧（東大院農生科・応生化）

3B07p16　マウス有郭乳頭における味蕾マーカーとしての *Ulex europaeus* agglutinin-1 の有用性

16:43　°吉本靖東[1,2]，岡田晋治[1]，山上圭吾[2]，三坂　巧[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]ミツカン・中研）

3B07p17　ヒト甘味受容体に作用する新規天然化合物の探索と機能評価

16:54　°寺田育生，三坂　巧（東大院農生科・応生化）

p19〜p22 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3B07p19　ヒト甘味受容体を活性調節するフレーバー化合物の探索

17:15　°野尻健介[1,2]，　藤原　聡[1]，　山本直人[1]，　中北智哉[2]，三坂　巧[2]（[1]長谷川香料(株)，[2]東大院農生科・応生化）

3B07p20　旨味受容体 T1R1/T1R3 の L-Glu 活性を決定する因子の同定

17:26　°戸田安香，中北智哉，岡田晋治，成川真隆，石丸喜朗，三坂　巧（東大院農生科・応生化）

3B07p21　レタス苦味成分のヒト苦味受容体発現細胞を用いた評価

17:37　°柳澤琢也[1,2]，　木村義治[1]，　久能昌朗[1]，　高宮　満[1]，三坂　巧[2]（[1]キユーピー(株)，[2]東大院農生科・応生化）

3B07p22　ポリフェノールに応答する苦味受容体の同定

17:48　°成川真隆，三坂　巧（東京大院農生科）

C01 会場　午前の部（9:22〜11:54）

新技術—分析法，解析法，その他—

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

3C01a03　Influenza virus sensing system via PL enhancement monitoring using AuCNT and CdTe quantum dot

9:22　°Jaewook LEE[1]，　Rahin Ahmed Syed[2]，　Sangjin Oh[3]，Enoch Y. Park[1,2]（[1]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [2]Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [3]Department of Cogno-Mechatronics Engineering, Pusan National University）

3C01a04　卵白アルブミン，β-ラクトグロブリン，およびトロポミオシンのアレルゲン高感度測定

9:33　°大岡尚貴，斎木　博，鈴木義規（東京工科大学院）

3C01a05　抗原抗体反応を用いた抗生物質の新規測定法の開発

9:44　°福田裕之，齋木　博，鈴木義規（東京工科大学大学院）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3C01a07　酸処理を用いた SDS-PAGE によるプロテアーゼ含有試料の簡便な純度分析方法

10:05　°藤田智大[1]，小川　俊[2]，吉川　潤[2]，塩田一磨[1]（[1]合同酒精(株)酵素医薬品工場，[2]合同酒精(株)酵素医薬品研究所）

3C01a08　中性子捕捉反応を利用した植物組織におけるホウ素の *in situ* 可視化法

10:16　°木野内忠稔[1]，小林　優[2]（[1]京大・原子炉，[2]京大院・農）

3C01a09　化学発光を利用した HPLC ポストカラム法による Fe(III)キレーターの分析

10:27 ○有賀智子，井村祐己，吉村悦郎（東大院農生科･応生化）

3C01a10　C4D 検出器を利用した植物水耕液の簡易分析

10:38 ○東　良太[1]，　林　俊弘[1]，　吉野将紀[2]，　岡部勝美[2]，安保　充[1]（[1]明治大農・農化，[2]明治大・黒川農場）

3C01a11　ヒト同一個体異種試料および摂食情報の統合解析技術構築

10:49 ○三澤拓真[1]，伊達康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3,4]（[1]横市院生命医，[2]理研 CSRS，[3]理研 BMRP，[4]名大院生命農）

a13～a16 発表者の接続時間 11:00～11:10

3C01a13　オートクレーブを用いた PCR 鋳型活性の除去

11:10 ○陶山哲志，川原崎守（産総研）

3C01a14　RNA 干渉酵素を用いた RNA 切断技術の開発

11:21 ○宮本龍樹[1]，関口勇地[2]，常田　聡[1]，野田尚宏[2]（[1]早大院先進理工，[2]産総研バイオメディカル）

3C01a15　STH クロマト PAS を利用した色素生産用サツマイモ品種判別法の開発

11:32 ○高崎一人[1]，　田中　勝[2]，　峯岸恭孝[3]，　川瀬三雄[4]，門田有希[5]，田原　誠[5]，布藤　聡[1]（[1]株式会社ファスマック，[2]農研機構九州沖縄セ，[3]株式会社ニッポンジーン，[4]東北大学院医工学，[5]岡山大院環境生命科学）

3C01a16　応用生命科学分野における「産学協同 PBL 講座」初年次教育実施の試み

11:43 ○高橋勇二[1]，井上英史[1]，平山恭子[2]（[1]東京薬科大生命科学部，[2](株)ベネッセコーポレーション　大学事業部　FSP 研究会事務局）

C02 会場　午前の部（9:00～12:05）

動物―生理・栄養，生体機能，生体制御，細胞工学－細胞培養，細胞培養，物質生産―

a01～a05 発表者の接続時間 8:50～9:00

3C02a01　ネコの尿臭識別能力と尿臭の個体差を作り出す揮発性化合物の探索

9:00 ○中野晴日，加藤恭子，山下哲郎，宮崎雅雄（岩手大学）

3C02a02　ネコの嗅覚コミュニケーションに重要なマーキング臭と体臭の有意な違い

9:11 ○宮崎雅雄，北條　涉，西村貴志，山下哲郎（岩手大農）

3C02a03　オオカミ尿中の恐怖誘発性物質の同定と副嗅球への影響

9:22 ○長田和実[1]，柏柳　誠[2]（[1]北海道医療大学，[2]旭川医科大学）

3C02a04　マウス鋤鼻細胞の増殖とアポトーシスに関与する転写因子 ATF5

9:33 ○鈴木誠人，飯田吉剛，青木満里恵，笹川　洋，中野春男，梅村真理子，高橋　滋，高橋勇二（東薬大生命・環境応用動物）

3C02a05　マウスペプチド性フェロモン ESP1 と ESP22 が活性化する鋤鼻神経回路の解析

9:44 ○小坂田拓哉[1]，　フェレーロデイヴィット[2]，　堀尾奈央[1]，リバーレスステファン[2]，東原和成[1]（[1]東大院農，[2]ハーバード大院医）

a07～a11 発表者の接続時間 9:55～10:05

3C02a07　Intracranial Self-Stimulation（ICSS）を用いた新規中枢性疲労測定法の確立

10:05 ○井樋聡美，上野聡子，永吉宏充，井上和生，伏木　亨（京大院農）

3C02a08　持久運動時の中枢性エネルギー代謝調節における脳内 Thrombospondin-1 の関与

10:16 ○藤谷美菜，山田裕之，井上和生，伏木　亨（京都大院農）

3C02a09　Capsaicin 受容体（TRPV1）活性に作用する物質の検討

10:27 ○佐藤崇弘[1]，青島　均[2]，伊豆英恵[3]，山田康江[1]（[1]近畿大院工，[2]山口大院，[3]酒類総合研究所）

3C02a10　ラット小腸に発現する CRBPII の MS/MS 解析

10:38 ○伊藤景子，川端博秋（明治大農）

3C02a11　トランスポーターの網羅的比較定量プロテオミクス技術の確立とショ糖摂取による小腸上皮トランスポーター発現変動解析への適用

10:49 西山　俊，○奥田　傑，高藤和輝，ウォンタイプリンティップ，五十棲規嘉，永森收志，金井好克（大阪大院医）

a13～a17 発表者の接続時間 11:00～11:10

3C02a13　血清のプロテオーム解析による黒毛和種牛の脂肪交雑度を診断するバイオマーカーの探索

11:10 ○赤尾大樹[1]，　池上春香[1]，　松橋珠子[2]，　武本淳史[3]，永井宏平[1]，　樋口智香[3]，　守田昂太郎[3]，　小林直彦[4]，　松本和也[1]（[1]近畿大学生物理工学部，[2]岐阜県畜産研究所，[3]近畿大学大学院生物理工学専攻，[4]岐阜県家畜保健衛生所）

3C02a14　バイオ医薬品製造向け細胞株育種研究開発の統合管理：CHO ゲノム精査と解析

11:21 Thomas Hartsch[2]，Ludwig Macko[2]，Sebastien Ribrioux[2]，Julia Retey[2]，下広英樹[1]，森脇香織[1]，○新城雅子[1]（[1]ジーンデータ株式会社，[2]Genedata AG）

3C02a15　ROCK 阻害剤による ES 細胞および iPS 細胞の分化促進効果

11:32 ○上芝原佑[1]，川口英夫[1]，清水範夫[2]（[1]東洋大院生命科学，[2]東洋大バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター）

3C02a16　絹由来タンパク質セリシン加水分解物の高純度化と細胞培養への応用

11:43 ○寺田　聡[1]，　福本　健[1]，　山内莉奈佳[1]，　奥本光軌[1]，佐々木真宏[2]，高橋　潤[2]，山田英幸[2]（[1]福井大院工，[2]セーレン株式会社）

3C02a17　ラット神経細胞に発現させたアミロイド β タンパク質凝集体の免疫染色

11:54 ○板倉　暁[1]，　落石知世[2]，　清水武則[1]，　小森谷友絵[1]，神野英毅[1]，吉宗一晃[1]（[1]日本大学生産工学部，[2]独立行政法人産業技術総合研究所）

C02 会場　午後の部（14:11～17:48）

動物―遺伝子・タンパク質－構造，機能，その他―

p02～p05 発表者の接続時間 14:01～14:11

3C02p02　遺伝子欠損細胞を用いたヒストンバリアント H2A.Z の機能解析

14:11 ○奥　裕之[1]，　日下部将之[2]，　松田　涼[2]，　北村大志[2]，堀　哲也[3]，深川竜郎[3]，原田昌彦[1,2]（[1]東北大学･農，[2]東北大学院･農，[3]国立遺伝研）

3C02p03　高分子非コード RNA, *ANRIL* の作用機序と細胞機能の解明

14:22 ○苗村円佳，神武洋二郎（近大院産理工）

3C02p04　細胞分化における核内アクチンの機能解析

14:33 ○山本浩志[1]，山崎祥他[4]，十川久美子[2,3]，徳永万喜洋[2,3]，原田昌彦[1,4]（[1]東北大農，[2]東工大院生命理工，[3]理研免疫センター，[4]東北大院農）

3C02p05　転写およびアクチンダイナミクス制御におけるアクチンファミリー Arp5, Arp8 の機能解析

14:44 ○村上寛和[1]，　高橋裕一朗[2]，　山崎祥也[2]，　西嶋　仁[3]，柴原慶一[3]，原田昌彦[1,2]（[1]東北大･農･分子生物，[2]東北大院･農･分子生物，[3]国立遺伝研）

p07～p11 発表者の接続時間 14:55～15:05

3C02p07　がん細胞における p27 機能抑圧因子の探索

15:05 ○荒井拓也，浅野祐一，吉川博文，千葉櫻拓（東京農大･応生科･バイオ）

3C02p08　酵母 split-ubiquitin システムを用いたヒトドリコールキナーゼ hDOLK の物理的相互作用の解析

15:16 ○高橋哲夫，樋口洋子，山田直人，傳能康成（東海大工生命化学）

3C02p09　HDL 産生における ABCA1 のダイマー化の生理的意義の解析

15:27　◦石神正登[1]，　永田　紅[2]，　笠井倫志[3]，　永岩耕太[1]，提坂友梨奈[1]，楠見明弘[2,3]，植田和光[1,2]（[1]京大院農，[2]京大 iCeMS，[3]京大再生研）

3C02p10　ヒト Intelectin（Lactoferrin receptor）の哺乳動物細胞における発現検討

15:38　◦関　航平，中　侑希，大島裕太，渋谷昌孝，横山竜也，佐藤　淳（東京工科大院バイオニクス専攻）

3C02p11　ウシ乳に含まれるリポカリンタンパク質のリガンド特性解析

15:49　◦福田健二[1]，古川奈那[2]，土井山爽太[2]，浦島　匡[1]（[1]帯畜大院畜産衛生，[2]帯畜大食品）

p13〜p16 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3C02p13　ニワトリ中期〜後期胚の中脳視蓋における TGF β スーパーファミリーの発現解析

16:10　◦太田知希[1]，小野寺望[2]，荒木功人[1,2]（[1]岩手大院工，[2]岩手大院連合農）

3C02p14　組換えタンパク質を利用したニワトリ卵膜マトリックス形成機構の解析

16:21　◦佐藤喬洋，福島英晃，氏田　稔，奥村裕紀（名城大院農）

3C02p15　ニワトリ IFITM がもつ抗ウイルス活性の機能解析

16:32　◦木溪俊介，奥嵜雄也，金岡英徳，西島謙一，飯島信司（名大院・工）

3C02p16　クロマグロのグルコース代謝におけるアイソザイムの進化的関係の探索

16:43　◦岩塚美由紀[1]，　森　一樹[1]，　田代康介[1]，　中村洋路[2]，藤原篤志[2]，小林敬典[2]，乙竹　充[2]，久原　哲[1]（[1]九州大学，[2]中央水研）

p19〜p21 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3C02p19　大腸菌ペリプラズム空間に発現したマウス酸性哺乳類キチナーゼの性質

17:15　◦大川一明，　樫村明徳，　石川晃太朗，　貴田雄太，岩渕　志，松嶋裕大，坂口政吉，菅原康里，小山文隆（工学院大学工学部応用化学科）

3C02p20　プロリン異性化酵素 Pin1 による神経細胞内 CaMKII の活性と安定性制御

17:26　◦金井研太，内田隆史（東北大院農）

3C02p21　Growth arrest specific protein b（Gas7b）によるリン酸化 Tau 量の調節機構

17:37　◦乗田理恵[1]，　清水泰希[1]，　秋山弘匡[2]，　広瀬恵子[3]，後藤愛那[1]，日高將文[1]，内田隆史[1]（[1]東北大学農，[2]東京理科大学，[3]産業技術総合研究所）

C03 会場　午前の部（9:11〜12:05）

動物―細胞－細胞機能，細胞骨格，オルガネラ，輸送―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3C03a02　Ras 活性化因子 RasGRP1 はリサイクリングエンドソームで Ras と共局在する

9:11　糸川和貴，◦三崎　亮，藤山和仁（大阪大・生物工学国際交流センター）

3C03a03　哺乳動物細胞小胞体に局在する ERdj5（JPDI）の生理的基質候補タンパク質の網羅的解析

9:22　◦門倉　広[1,2]，　斉藤美知子[2]，　都留秋雄[2]，　稲葉謙次[1]，河野憲二[2]（[1]東北大多元研，[2]奈良先端大バイオ）

3C03a04　小胞体関連分解を担うジスルフィド還元酵素がグルタチオンにより還元される機構

9:33　◦寶関　淳[1,2]，山本章嗣[3]，阪井康能[1,2]，永田和宏[4]（[1]京大・生理化学，[2]京大院農，[3]長浜バイオ大バイオサイエンス，[4]京産大総合生命）

3C03a05　炎症応答における細胞膜コレステロールの関与

9:44　◦中島史恵，柴田貴広，内田浩二（名大院生命農・応用分子生命科）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3C03a07　GDE5 の遮断による脂肪細胞分化の抑制は，clonal expansion の阻害による

10:05　中村啓司[2]，　◦武田崇登[1]，　吉澤郁美[2]，　加藤範久[2]，JEFF M. SANDS[3]，矢中規之[2]（[1]広島大生物生産，[2]広島大院生物圏科学，[3]Emory Univsity School of Medicine）

3C03a08　マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞分化における PLSCR3 の役割

10:16　◦猪川　亮，犬塚達俊，高原照直，柴田秀樹，牧　正敏（名大院生命農）

3C03a09　Apolipoprotein A-I 周囲環境変化に着目した新規 HDL 形成測定法の開発

10:27　◦長尾耕治郎，大村理紗，斎藤博幸（徳島大院 HBS）

3C03a10　アミノ酸置換導入による ABCA1 の基質認識部位の解析

10:38　◦伊藤晋平[1]，長尾耕治郎[3]，木村泰久[1]，植田和光[1,2]（[1]京大院農，[2]京大 iCeMS，[3]徳島大ヘルスバイオサイエンス研究部）

3C03a11　ABCG1 と ABCG4 による脂質ラフトを介した細胞機能の制御

10:49　◦伊藤志帆[1]，佐野　修[1]，松尾道憲[1]，植田和光[1,2]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大 iCeMs）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3C03a13　ABCB4 によるホスファチジルコリン排出はスフィンゴミエリンに依存する

11:10　◦趙　　禹[1,2]，　石神正登[1]，　長尾耕次郎[3]，　花田健太郎[4]，松尾道憲[1]，木岡道憲[1]，植田和光[1,2]（[1]京大院農，[2]京大 iCeMS，[3]徳島大薬，[4]感染研）

3C03a14　結合能と接着斑増強効果を指標としたビネキシンファミリー（Srobs）タンパク質の機能の比較解析

11:21　◦喜多真弘，市川尚文，瀬崎拓人，松尾道憲，植田和光，木岡紀幸（京都大学院農学研究科）

3C03a15　ビネキシン α の N 末端側領域は細胞外マトリクスの硬さの感知に必要である

11:32　◦市川尚文[1]，　山下　寛[1]，　木村泰久[1]，　植田和光[1,2]，木岡紀幸[1]（[1]京大院農，[2]京大 iCeMS）

3C03a16　脂肪細胞分化の「細胞外マトリクスの硬さ」依存性に接着斑タンパク質ビンキュリンが必要である

11:43　◦黒田美都[1]，和田洋樹[1]，植田和光[1,2]，木岡紀幸[1]（[1]京大院・農・応用生命，[2]京大・iCeMS）

3C03a17　接着斑タンパク質ビンキュリンによる細胞外基質の硬さ感知には，ビンキュリンの脂質ラフト局在化が必要である

11:54　◦長里彩花[1]，山下　寛[1]，市川尚文[1]，松尾道憲[1]，植田和光[1,2]，木岡紀幸[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大・iCeMS）

C03 会場　午後の部（15:05〜18:10）

動物―細胞－情報伝達，細胞応答―

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3C03p07　glabridin は PP2C を活性化し，破骨細胞分化を阻害する

15:05　◦秋山智美[1]，　寶地美妃[1]，　青山友果[1]，　車　炳允[2]，禹　済泰[1,2]，大西素子[1]（[1]中部大応生，[2]生物機能開発研究所）

3C03p08　カルシウム依存性リン脂質結合タンパク質アネキシン A11 と EF-hand タンパク質の相互作用解析

15:16　◦佐藤あかね，　京　卓志，　加村悟史，　高原照直，牧　正敏，柴田秀樹（名大院・生命農・応用分子生命科）

3C03p09　アネキシン A11 のリン脂質結合特性の解析

15:27　◦加村悟史，　京　卓志，　佐藤あかね，　高原照直，牧　正敏，柴田秀樹（名大院・生命農）

3C03p10　カルシウム動態に応じた機能未知タンパク質 MISSL の ALG-2 結合と細胞内局在解析

15:38 ○井上国子，　高原照直，　佐々木桂奈江，　柴田秀樹，牧　正敏（名大院・生命農）

3C03p11　ALG-2 結合モチーフ 2 型の精査と新規 ALG-2 相互作用因子の探索

15:49 ○小島亨介，　高橋　健，　伊藤　優，　佐々木桂奈江，川崎真依，張　　維，高原照直，柴田秀樹，牧　正敏（名古屋大院農・応用分子生命科）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3C03p13　糖化タンパク質 AGEs は腸管上皮細胞における抗ウイルス因子の発現を抑制する

16:10 ○布野絢子，早瀬文孝，渡辺寛人（明治大院農）

3C03p14　糖化タンパク質受容体 RAGE の細胞接着分子としての機能解析

16:21 ○石川かれん，早瀬文孝，渡辺寛人（明治大院農）

3C03p15　膵 β 細胞におけるグルココルチコイド誘導性アポトーシスに対するアンドロゲンの抑制メカニズム

16:32 ○原田直樹[1]，中野長久[2]，乾　　博[3]，山地亮一[1]（[1]大阪府大・生命環境・応用生命，[2]大阪女子短大，[3]大阪府大・栄養）

3C03p16　PC12 細胞におけるグルコース枯渇依存的な Sortilin 発現制御

16:43 ○川島健一，　藤野耕太郎，　小倉友里奈，　宮西伸光，根建　拓（東洋大院生命）

3C03p17　犬の骨格筋培養細胞におけるインスリンによる糖取り込みと細胞内代謝産物の変動

16:54 ○野澤聡司，佐藤稲子，関根　舞，片山欣哉，田崎弘之（日獣大・獣医）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3C03p19　低酸素により惹起されるアンドロゲン受容体の選択的分解亢進について

17:15 ○三谷塁一[1,2]，　南　真人[2]，　原田直樹[2]，　中野長久[3]，乾　　博[4]，芦田　均[5]，山地亮一[2]（[1]神大・自然科学，[2]大阪府大院・生命環境，[3]大阪女子短大，[4]大阪府大・栄養，[5]神大院・農）

3C03p20　cGMP ホスホジエステラーゼ 6 の発現におけるシャペロンタンパク質の影響

17:26 ○尾谷優磨，田端勇人，嶺岸卓徳，奥田祐介，岡崎修治，赤沼元気，石塚盛雄（中央大院理工応化）

3C03p21　cGMP-dependent protein kinase II と小胞輸送制御因子 Rab11B との相互作用の解析

17:37 ○伊藤千尋[1]，小出(吉田)静代[2]，Reger Albert[3]，辻　明彦[2]，Kim Choel[3]，湯浅恵造[2]（[1]徳島大工，[2]徳島大院 STS，[3]Baylor College of Medicine）

3C03p22　脱ユビキチン化酵素 USP19 の骨格筋量における性差への関与

17:48 ○小川真弘[1]，　原田直樹[1]，　中野長久[2]，　乾　　博[3]，山地亮一[1]（[1]大阪府大院生命環境，[2]大阪女子短大，[3]大阪府大総リハ栄養）

3C03p23　紫外線 DNA 損傷の修復機構における SUMO E3 結合酵素の機能解析

17:59 ○金岡英徳[1]，　柘植麻亜沙[1]，　増田裕介[1]，　伊藤弘樹[1]，三宅克英[2]，飯島信司[1]（[1]名大院工，[2]石川県大資源研）

C04 会場　午前の部（9:11〜12:05）

植物—植物ホルモン，成長調節物質—

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3C04a02　シロイヌナズナの光応答におけるストリゴラクトン誘導性転写因子の機能解析

9:11 ○永井優子[1]，　中村英光[1]，　長江未有[1]，　増口　潔[2]，山上あゆみ[3]，光田展隆[4]，高木　優[5]，中野雄司[3]，浅見忠男[1]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]理研 PSC，[3]理研・抗生物質研究室，[4]産総研・生物プロセス，[5]埼玉大・環境）

3C04a03　ストリゴラクトンシグナル因子 D14 と DELLA タンパク質の相互作用の解析

9:22 ○吉澤真人[1]，　中村英光[1]，　PARK Seung-Hyun[1]，伊藤晋作[1]，　福井康祐[1]，　伊藤瑛海[2]，　上田貴志[2]，　宮川拓也[1]，田之倉優[1]，浅見忠男[1]（[1]東大院・農生化，[2]東大院・理）

3C04a04　ブラシノステロイド生合成阻害剤 Brz 耐性を示す低緑化変異体 *bpg4* の FOX ラインからの単離と機能解析

9:33 ○阿部　晋[1,2,7]，　山上あゆみ[1,7]，　市川尚斉[4]，　松井　南[4]，久城哲夫[2]，長田裕之[1,3]，浅見忠男[6,7]，中野雄司[1,5,7]（[1]理研・抗生物質，[2]明治大院・農芸化学，[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[4]理研 CSRS・合成ゲノミクス，[5]理研 CSRS・機能開発，[6]東大院・農化生，[7]JST CREST）

3C04a05　ブラシノステロイド不活性化に関わるシトクロム P450 酵素 CYP72C1 の機能解明

9:44 ○佐原瑞穂[1]，　渡辺文太[2]，　横田孝雄[3]，　渡辺修治[4,5]，水谷正治[6]，大西利幸[1,7]（[1]静大院農，[2]京大化研，[3]帝京大バイオ，[4]静大院工，[5]静大院創造，[6]神戸大院農，[7]静大グリーン研）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3C04a07　発芽大豆根における DDMP グループサポニンの活性酸素種代謝制御による根伸長メカニズム

10:05 ○永井華澄，　八木絵美，　小牧香里，　石川佳奈子，伊藤　慧，佐々木由香里，白岩雅和（茨城大農）

3C04a08　A グループサポニンの大豆種子発芽における生理機能の解明

10:16 ○松本　剣，白岩雅和（茨城大農）

3C04a09　殺菌剤イソプロチオランの植物成長調節活性の解析

10:27 ○草島美幸，　宮嵜　樹，　宮下範大，　前原恭兵，與多垣内雄也，仲下英雄（東農大生応）

3C04a10　ヒメツリガネゴケにおける 12- オキソファイトジエン酸還元酵素の機能解析

10:38 ○高橋知寛，松浦英幸，高橋公咲（北大院農）

3C04a11　Cloning and Characterization of Allene Oxide Cyclase, SmAOC, in the Model Lycophyte *Selaginella moellendorffii*

10:49 ○Putri Pratiwi，Tomohiro Takahashi，Matsuura Hideyuki，Kosaku Takahashi（Hokkaido Univ.）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3C04a13　ヒメツリガネゴケ原糸体の分化誘導に関わるジベレリン様新奇成長制御物質の探索

11:10 ○PARK Seung-Hyun[1]，　大谷征史[1]，　川出　洋[2]，林謙一郎[3]，浅見忠男[1]，中嶋正敏[1]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]東京農工大・農，[3]岡山理大・生物化学）

3C04a14　ヒメツリガネゴケ原糸体の青色光への忌避反応にジベレリン様新奇成長制御物質が関与する

11:21 ○宮崎　翔[1,2]，　豊島　輝[1]，　夏目雅裕[1]，　中嶋正敏[3]，川出　洋[1]（[1]東京農工大院・農，[2]日本学術振興会特別研究員 PD，[3]東大院・農生科・応生化）

3C04a15　ジャスモン酸 - アミノ酸結合体に対する CYP94B3 の活性

11:32 ○天野就基[1]，　北岡直樹[1]，　川出　洋[2]，　松原卓也[1]，鍋田憲助[1]，高橋公咲[1]，松浦英幸[1]（[1]北大院農，[2]東農工大）

3C04a16　ジャスモン酸生合成遺伝子 *DAD1* 及びそのホモログの傷害誘導性発現制御機構

11:43 RUDUS Izabela[1,2]，寺井はる霞[1]，○石黒澄衛[1]（[1]名大院生命農，[2]Szczecin Univ.）

3C04a17　ジャスモン酸処理によるイネにおける IAA およびその類縁体の変化

11:54 ○藤岡敬大，宮下正弘，宮川　恒（京都大院農）

C04 会場　午後の部（14:00〜18:10）

植物―タンパク質，酵素－機能，調節，その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3C04p01　米のとぎ汁発酵液中のトマトかいよう病菌増殖抑制化合物について
14:00 ○中田達矢[1]，　プリエトラファエル[2]，　高瀬尚文[2]，川口　章[3]，關谷次郎[2]（[1]京都学園大院バイオ環境，[2]京都学園大バイオ環境，[3]岡山農林水産総合センター）

3C04p02　活性酸素種生成を指標とした植物免疫制御剤の選抜
14:11 ○北畑信隆[1]，　八木智華子[1]，　吉川岳史[1]，　助川夏雄[1]，来須孝光[2]，浅見忠男[3]，朽津和幸[1]（[1]東京理科大，[2]東京工科大，[3]東大院）

3C04p03　円石藻 *Pleurochrysis carterae* に対する Ca，P の生育と石灰化への影響
14:22 ○田村綾子[1]，　村松英直[2]，　坂田昂也[2]，　高野あゆみ[2]，長坂征治[1]（[1]東洋大院生命，[2]東洋大生命）

3C04p04　バラ科果樹果実のメタボローム解析
14:33 ○及川　彰[1,2]，　大塚貴生[2]，　中林　亮[2]，　竹林裕美子[2]，五十鈴川寛司[3]，村山秀樹[1]，斉藤和季[2,4]，白武勝裕[5]（[1]山形大農，[2]理研 CSRS，[3]山形県農総研セ，[4]千葉大院薬，[5]名古屋大院生命農）

3C04p05　巨大胚変異系統米における遺伝子発現プロファイル解析
14:44 ○坂見綾佳，　田代康介，　榎本亜紀子，　阪田光和，吉村　淳，佐藤匡央，熊丸敏博，佐藤　光，久原　哲（九州大院農）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3C04p07　イネ胚乳における澱粉生合成関連酵素の相互作用の解析
15:05 ○阿部奈津子[1]，　クロフツ尚子[1]，　中村保典[1]，Ian J. TETLOW[2]，Michael J. EMES[2]，藤田直子[1]（[1]秋田県大・生物資源，[2]Univ. of Guelph）

3C04p08　高アミロース二重変異体米の解析
15:16 ○藤田直子，　淺井裕貴，　阿部奈津子，　追留那緒子，クロフツ尚子，中村保典（秋田県大生物資源科学）

3C04p09　イネ植物体における新規ビタミン E 合成酵素の探索
15:27 ○阿部　伎[1]，　木村映一[2]，　木村俊之[3]，　村田和優[4]，吉田泰二[2]，仲川清隆[1]，宮澤陽夫[1]（[1]東北大院農・機能分子解析学分野，[2]東北農研セ，[3]中央農研セ，[4]富山農総技セ）

3C04p10　ウメ（*Prunus mume* Sieb. Et Zucc）のアミグダリン生合成に関わる P450 の同定と性状解析
15:38 ○山口拓也[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大・生工科・生工研セ，[2]JST, ERATO）

3C04p11　フェニルアセトアルドキシム変換に関与するシロイヌナズナ由来シトクロム P450 の探索
15:49 ○三木佑太[1,2]，岡崎誠司[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3C04p13　プロテインジスルフィドイソメラーゼファミリー GmPDIM のダイズ Ero1 による活性化と構造との関係
16:10 ○小石原克典，　松崎元紀，　三田竜太，　奥田　綾，成尾由理香，増田太郎，裏出令子（京大院農・農学）

3C04p14　二種類のダイズ PDI ファミリーと Ero1 の連携による効率的なタンパク質フォールディング
16:21 ○松崎元紀，　小石原克典，　奥田　綾，　三田竜太，増田太郎，裏出令子（京大院農・農学）

3C04p15　ダイズジスルフィド結合形成酵素 QSOX と PDI ファミリーを用いた *in vitro* 酸化的フォールディング系
16:32 ○奥田　綾，　松崎元紀，　三田竜太，　東野ゆうき，増田太郎，裏出令子（京大院農・農学）

3C04p16　紅藻スサビノリにおけるフィコエリスリン結合タンパク質の探索
16:43 ○吉村　航，井村祐己，吉村悦郎（東大院農生科・応生化）

3C04p17　ガジュマル由来 *cis*-prenyltransferase のクローニング及び機能解析
16:54 ○増田有紗[1]，中村武志[2]，大谷典正[2]（[1]山形大院理工，[2]山形大学）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3C04p19　Partial purification and characterization of novel monoterpene dehydogenase from plant
17:15 ○NIK ABDUL GHANI NIK RASHIDA, MAIZOM HASSAN（Inst.of Systems Biology, National Univ. of Malaysia）

3C04p20　Purification and characterization of farnesal dehydogenase from plant
17:26 ○KAMARULZAMAN AHMAD FARIS, MAIZOM HASSAN（INSTITUTE OF SYSTEMS BIOLOGY, UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA）

3C04p21　Substrate specificity of farnesol dehydrogenase from plant
17:37 ○NOR AIN SHAHAJAR AHMAD SOHDI, MAIZOM HASSAN（INSTITUTE OF SYSTEMS BIOLOGY, UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA）

3C04p22　NAD kinase overexpression promotes the biosynthesis of nitrogen-rich amino acids under elevated CO_2
17:48 ○Yayoi ONDA[1]，Atsuko MIYAGI[2]，Kentaro TAKAHARA[3]，Hirofumi UCHIMIYA[2]，Maki KAWAI-YAMADA[2]（[1]Yamagata Univ.，[2]Saitama Univ.，[3]Tokyo Univ.）

3C04p23　ウリ科植物の根における脂溶性物質結合タンパク質の局在性
17:59 ○吉原亮平[1]，　後藤純弥[2]，　岩渕　彩[3]，　池田健一[2]，井上加奈子[2]，乾　秀之[1,2]（[1]神戸大遺伝子，[2]神戸大院農，[3]神戸大農）

C05 会場　午前の部（9:00〜12:05）

植物―一次代謝，二次代謝―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3C05a01　ダイジョ（*Dioscorea alata L.*）の葉における色素変異
9:00 ○飯島　健[1]，上村昴大[1]，バビルパチャキル[2]，川原玲香[4]，野口治子[1]，内野昌孝[1]，児玉浩明[3]，高野克己[1]（[1]東京農大応生・化学，[2]独立行政法人 国際農林水産業研究センター，[3]千葉大学，[4]東京農業大学生物資源ゲノム解析センター）

3C05a02　除虫菊の分化状態とピレスリン生合成
9:11 ○阪森宏治[1]，　安達元希[2]，　古谷章悟[1]，　畑中顯和[3]，松田一彦[1]（[1]近畿大院・農・応生化，[2]近畿大・農・応生化，[3]山口大学）

3C05a03　遺伝子組換えアスタキサンチン高産生レタスのメタボローム解析
9:22 ○佐々木貴子[1]，　小川拓水[1]，　岡澤敦司[1]，　三沢典彦[2]，太田大策[1]（[1]阪府大院　生命環境，[2]石川県大　生資研）

3C05a04　培養地衣菌の二次代謝に対するガンマ線照射の影響
9:33 ○小林優維[1]，　古田雅一[2]，　原光二郎[1]，　小峰正史[1]，山本好和[1]（[1]秋田県立大学大学院，[2]大阪府立大学）

3C05a05　Arabidopsis Response regulator 14 の転写活性化機構の解析
9:44 ○高林佑輔[1]，　萬年一斗[1]，　橋川博一[1]，　高橋征司[1]，本橋令子[2]，古山種俊[3]，中山　亨[1]（[1]東北大院工，[2]静岡大院農，[3]東北大多元研）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3C05a07　微生物を用いた sanguinarine 生合成経路の再構築
10:05 ○堀健太郎，岡野峻祐，佐藤文彦（京大院・生命）

3C05a08　ハナビシソウ形質転換培養細胞を用いた CjbHLH1 ホモログ，EcbHLH1 の機能解析

10:16 ◦山田泰之，本村幸也，佐藤文彦（京大院生命科学）

3C05a09　ソバ由来の *C* 配糖化酵素遺伝子を発現させた大腸菌によるフラボノイド *C* 配糖体の生産

10:27 ◦伊藤崇充，臼井栞理，古謝詠喜，藤本俊介，水藤史明，長友仁寿，田口悟朗（信州大・繊維）

3C05a10　トウガラシ果実由来のバニリルアルコール，バニリン酸産生菌の単離

10:38 ◦久原崇史，丸山将明，土佐菜摘，古旗賢二，中谷祥恵，和田政裕（城西大院薬）

3C05a11　シロイヌナズナにおけるフェノール性異物の配糖化およびその排出現象の解析

10:49 ◦渡邉貴史，丸山佳紀，田口悟朗（信州大・繊維）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3C05a13　シロイヌナズナ GDP-D-Mannose 加水分解酵素(At-NUDX9)の機能解析

11:10 ◦田中裕之[1]，吉村和也[2]，小川貴久[3]，田部記章[3]，丸田隆典[4]，田茂井政宏[1,3]，重岡　成[1,3]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]中部大・応生・食栄，[3]近畿大・農・バイオ，[4]島根大・生資科・生命工）

3C05a14　ジャガイモの有毒ソラニン生合成に関わる新規ジオキシゲナーゼの機能解析

11:21 ◦中安　大[1]，梅基直行[2]，大山　清[3,4]，渡辺文太[5]，村中俊哉[4,6]，斉藤和季[4,7]，杉本幸裕[1]，水谷正治[1]（[1]神戸大院・農，[2]キリン・基盤研，[3]東工大院・理工，[4]理研 CSRS，[5]京大・化研，[6]大阪大院・工，[7]千葉大院・薬）

3C05a15　ソバ(Fagopyrum esculentum)のルチン合成に関わるラムノシル化酵素の機能解析とその応用

11:32 ◦丸山佳紀，古謝詠喜，田口悟朗（信州大繊維）

3C05a16　フラノクマリン生合成初発反応を担うクマリン特異的プレニル基転移酵素の解析

11:43 ◦棟方涼介[1]，KARAMAT Fazeelat[2]，OLRY Alexandre[2]，肥塚崇男[3]，杉山暁史[1]，PARIS Cedric[2]，HEHN Alain[2]，BOURGAUD Frederic[2]，矢崎一史[1]（[1]京大・生存研，[2]ナンシー大学，[3]山口大・農）

3C05a17　マメ科植物が生産するダイズシストセンチュウ孵化促進物質の探索

11:54 ◦野中詩織[1]，町田教暢[1]，近藤竜彦[2]，佐々木康幸[1]，浅見忠男[3]，矢嶋俊介[1]，伊藤晋作[1]（[1]東農大・応生科・バイオ，[2]名大院・生命農学，[3]東大院・農生科・応生化）

C05 会場　午後の部（14:00〜18:10）

植物—環境応答，ストレス応答，生物間相互作用—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3C05p01　植物の耐塩性に関与する機能未知タンパク質 Gm-TDF-5 のユビキチン - プロテアソームによる制御

14:00 ◦木村　愛，佐藤光朗，高原英成，小島俊雄（茨城大･農･生化）

3C05p02　塩ストレス条件下で栽培したトマト果実で発現する遺伝子の網羅的解析

14:11 ◦緑川景子[1]，牧野孝宏[1]，田村倫子[2]，星　雅子[1]，石丸喜朗[1]，阿部啓子[1,3]，朝倉富子[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東農大応生科・栄養，[3]神奈川科学技術アカデミー）

3C05p03　タバコから単離した TRI1 は，ナミハダニ，アザミウマ，ハスモンヨトウに対する抵抗性を誘導し，植物の防御遺伝子の発現を高める

14:22 ◦田島直人[1]，村田未果[1]，望月　淳[2]，光原一朗[1]，瀬尾茂美[1]（[1]生物研・植物科学研究領域，[2]農環研・生物多様性研究領域）

3C05p04　シロイヌナズナエコタイプに見られたヒ酸反応性の差異と新規ヒ酸反応性決定遺伝子の座乗領域の同定

14:33 ◦木幡　光[1]，井上雅貴[1]，國廣俊太[1]，松田大樹[1]，藤井伸治[1]，高橋秀幸[1]，ユセフィアンショハブ[2]，草野友延[1]（[1]東北大院生命，[2]秋田県立大）

3C05p05　ヘム存在下におけるデハイドリンの酵素活性発現に関する研究

14:44 ◦天野翔乃[1]，原　正和[2]（[1]静岡大農，[2]静岡大グリーン科技研）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3C05p07　光酸化的ストレス条件下におけるデヒドロアスコルビン酸還元酵素アイソザイムによる細胞内レドックス状態の制御機構

15:05 ◦畑中理佐[1]，野志昌弘[2]，田茂井政宏[1,2]，丸田隆典[3]，石川孝博[3]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大院農バイオ，[2]近畿大農バイオ，[3]島根大生資科生命工）

3C05p08　シロイヌナズナにおけるペルオキシソーム型モノデヒドロアスコルビン酸還元酵素アイソザイムの生理機能

15:16 ◦高橋隆樹[1]，畑中理佐[2]，野志昌弘[3]，田茂井政宏[2,3]，丸田隆典[1]，澤　嘉弘[1]，石川孝博[1]，重岡　成[2,3]（[1]島根大･生資科･生命工，[2]近畿大院・農・バイオ，[3]近畿大・農・バイオ）

3C05p09　VTC2 によるアスコルビン酸生合成制御の組織特異性

15:27 近藤真美[1]，大北由佳[1]，丸田隆典[2]，石川孝博[2]，重岡　成[3]，◦吉村和也[1]（[1]中部大・応生・食栄，[2]島根大・生資科・生命工，[3]近畿大・農・バイオ）

3C05p10　細胞内 NADH レベルの変化を介したストレス応答制御

15:38 ◦村本亘平[1]，高田梨沙[2]，小川貴央[2]，重岡　成[2]，吉村和也[1]（[1]中部大院・応生，[2]近畿大・農・バイオ）

3C05p11　葉緑体由来の酸化的シグナリングに関与する転写因子ネットワークの解明

15:49 ◦丸田隆典[1]，野志昌弘[2]，問田英里[3]，岡本　泰[3]，大和　開[1]，田茂井政宏[2,3]，高木　優[4,5]，澤　嘉弘[1]，石川孝博[1]，重岡　成[2,3]（[1]島根大・生資科・生命工，[2]近畿大・農・バイオ，[3]近畿大院・農・バイオ，[4]産総研・生物プロセス，[5]埼玉大・環境科学）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3C05p13　シロイヌナズナ HsfA1d の酸化還元が熱ショックエレメントの結合に及ぼす影響 の解析

16:10 ◦小林宏太[1]，野坂亮太[1]，中村朋美[1]，田部記章[2]，薮田行哲[3]，田茂井政宏[1,2]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]鳥取大・農・生資環）

3C05p14　シロイヌナズナキチン受容体の細胞内動態の解析

16:21 ◦安川大喜[1]，松波絵里香[1]，地阪光生[1]，長屋　敦[1]，横田一成[1]，中川　強[2]，西村浩二[2]（[1]島根大・生資，[2]島根大・総科セ・遺伝子）

3C05p15　植物の耐熱性を向上させるアルカロイドに関する研究

16:32 ◦原　正和[1]，栗田郁也[2]（[1]静岡大　グリーン科技研，[2]静岡大　農学部）

3C05p16　テルペン類の植物耐熱性向上に関する研究

16:43 ◦角田佳紀[1]，原　正和[2]（[1]静岡大院農，[2]静岡大グリーン科技研）

3C05p17　シロイヌナズナにおけるポリアミン酸化酵素 5 の生理的役割

16:54 ◦Kim Dong Wook[1]，新津　勝[2]，ベルベリッヒトーマス[3]，草野友延[1]（[1]東北大院生命，[2]城西大薬，[3]BiK-F）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3C05p19　苔類ゼニゴケを用いた祖先的な赤色光シグナル伝達機構の解析

17:15 ◦井上佳祐[1]，西浜竜一[1]，石崎公庸[2]，河内孝之[1]（[1]京大院生命，[2]神戸大院理）

3C05p20　UV-C で誘導されるオオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子の機能解析

17:26 ◦田中小百合[1]，木原　誠[2]，杉本　学[1]（[1]岡山大学･植物研，[2]サッポロビール・バイオ研究開発部）

3C05p21　被覆栽培したチャの被覆解除時に引き起こされるストレスに対する応答

17:37 ○佐野　智[1]，　竹本哲行[2]，　荻原　彬[1]，　鈴木健吾[1]，増村威宏[1,3]，　佐藤　茂[1,3]，　高野和文[1]，　三村　裕[2]，　森田重人[1,3]（[1]京都府大院生命環境，[2]京都農技セ　農林セ茶研，[3]京都農技セ生資セ）

3C05p22　Response of antioxidative enzymes and lipid peroxidation of *Kandelia obovata* seedlings to long-term salinity

17:48 ○MD. DAUD HOSSAIN，Naoyuki Taira，hironori Iwasaki，Masashi Inafuku，Hirosuke Oku（Ryukyu Univ）

3C05p23　孔辺細胞アブシジン酸シグナル伝達におけるグルタチオンの役割

17:59 ○宗正晋太郎[1]，　室山大地[1]，　長橋大樹[2]，　中村宜督[1]，森　　泉[3]，村田芳行[1]（[1]岡山大院環境生命，[2]岡山大農，[3]岡山大IPSR）

D01 会場　午前の部（9:00〜12:05）

酵素—タンパク質・ペプチド代謝関連酵素，その他—

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3D01a01　Pseudomonas aeruginosa PAO1 株由来 γ-glutamyltranspeptidase の機能解析

9:00 ○若山　守[1]，　野々村祐輝[1]，　高木一好[1]，　矢野成和[2]，梅川碧里[1]（[1]立命館大学生命科学，[2]山形大学院理工）

3D01a02　*Actinomadura* sp. RD001933 株由来新規プロテアーゼの発現と自己分解抑制

9:11 ○後藤あずさ，杉森大助（福島大理工）

3D01a03　親水性イオン液体 [BMIM][Cl] 耐性 *Bacillus* sp. CMW1 由来のプロテアーゼ

9:22 ○古中康平[1]，　池田泰之[1]，　貝田英彰[1]，　倉田淳志[1]，広瀬　侑[2]，岸本憲明[1]（[1]近畿大農，[2]豊橋技科大・EIIRIS）

3D01a04　既存プロリダーゼとは異なる Gly-Pro 分解性システインペプチダーゼの生化学的解析と結晶化

9:33 ○河野良輔[1]，坂本琢馬[1]，中野博明[2]，渡部邦彦[1]（[1]京府大院・生命環境・応用生命，[2]兵庫医療大学・薬）

3D01a05　超好熱菌由来 D 型アミノ酸特異的ペプチダーゼの機能解析

9:44 ○張　榮維，濱口昌宏，小川哲弘，日高真誠，正木春彦（東大院・農生科・応生工）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3D01a07　ナンキョクオキアミ由来新規フィブリン分解酵素の精製及び諸性質

10:05 ○湯原駿介（東京農大院醸造）

3D01a08　味噌中のレニン・アンギオテンシン関連酵素類の阻害活性について

10:16 ○高橋砂織，　佐々木康子，　佐藤　愛，　小笠原博信，渡辺隆幸（秋田県総食研）

3D01a09　Function of C-terminal domain of Pholiota nameko pro-tyrosinase

10:27 ○Lai Lai Moe, Saya Maekawa, Yasuko Konishi（Grad. Sch. Bioresources and Environmental Sci., Ishikawa Pref. Univ.）

3D01a10　新規芳香族ポリマー 4CDP 分解機構の解析

10:38 ○老沼研一，佐々木太洋，高谷直樹（筑波大院生命環境）

3D01a11　*Aspergillus oryzae* のタイプ D に属するフェルラ酸エステラーゼ様遺伝子の機能解析

10:49 ○大塚基広，渡邊裕也，小関卓也，塩野義人（山形大農）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3D01a13　植物の香気成分の評価とアルコールアシルトランスフェラーゼの解析

11:10 ○吉川千晶[1]，亀谷将史[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

3D01a14　ゼブラフィッシュグルタチオン転移酵素の同定とその諸性質検討

11:21 ○黒木勝久[1]，　榊原陽一[1]，　Liu Ming-Cheh[2]，　水光正仁[1]（[1]宮崎大・農・応生，[2]トレド大・薬）

3D01a15　好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 の酸化ストレス防御酵素 Bacterioferritin comigratory protein の反応機構解析

11:32 ○加藤真美[1]，佐藤由也[2]，新井博之[1]，石井正治[1]（[1]東大院・農生科，[2]産総研・環境管理）

3D01a16　微生物による第 4 級アンモニウム化合物の分解（第 13 報）：γ-ブチロベタイニル CoA 合成酵素の精製と諸性質の検討

11:43 ○藤光洋志[1]，松本　彬[2]，有馬二朗[2]，森　信寛[2]（[1]鳥取大院連農，[2]鳥取大農）

3D01a17　第一原理計算および MD シミュレーションを用いた植物由来ヒドロキシニトリルリアーゼのマルチスケールシミュレーション

11:54 岡崎誠司[1,2]，　中野祥吾[1,2]，　○常盤広明[1,3,4]，　浅野泰久[1,2]（[1]JST,ERATO，[2]富山県大工・生工研セ，[3]立教大理，[4]立教大未来分子研究セ）

D01 会場　午後の部（14:00〜17:59）

酵素—脂質代謝関連酵素，アミノ酸代謝関連酵素—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3D01p01　芳香族アミノ酸誘導体による可溶性エポキシドハイドロラーゼ阻害

14:00 ○片岡将樹（東農工大院農）

3D01p02　脂肪酸による可溶性エポキシドハイドロラーゼ阻害

14:11 ○多田祥太郎（東農工大農）

3D01p03　リゾプラズマローゲンを特異的に加水分解する新規ホスホリパーゼ D

14:22 ○松本優作[1]，　杉森大助[1]，　酒瀬川信一[2]，　松本英之[2]（[1]福島大院理工，[2]旭化成ファーマ）

3D01p04　カテキン類によるジアシルグリセロールキナーゼ α 活性化機構の解明

14:33 ○林　大輝[1]，　芦田　均[2]，　上田修司[1]，　山之上稔[1]，白井康仁[1]（[1]神戸大院・農・生命機能・動物資源，[2]神戸大院・農・生命機能・開発）

3D01p05　核内受容体コファクターによる骨格筋アミノ酸代謝制御

14:44 ○畑澤幸乃[1,2]，　只石　幹[3]，　長池祐太[4]，　守田昭仁[4]，小川佳宏[1]，　江崎　治[5]，　北浦靖之[6]，　下村吉治[6]，　亀井康富[2]，三浦進司[4]（[1]東京医科歯科大学，[2]京都府立大学，[3]国立健康栄養研究所，[4]静岡県立大学，[5]昭和女子大学，[6]名古屋大学）

p07〜p10 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3D01p07　*Syncephalastrum racemosum* 由来新規アミンオキシダーゼのキャラクタリゼーションと異種組換え発現

15:05 ○杉森大助[1]，　長南圭介[1]，　酒瀬川信一[2]，　松本英之[2]（[1]福島大理工，[2]旭化成ファーマ）

3D01p08　ポリフェノールによるプロリン異性化酵素（Pin1, Cyp, FKBP）の活性制御

15:16 ○小坂啓太，生地紘子，日高將文，内田隆史（東北大院農）

3D01p09　高基質特異性 L-グルタミン酸オキシダーゼより作製した L-アルギニンオキシダーゼの特異な性質

15:27 ○中井隆一郎[1]，　田村　隆[1]，　今田勝巳[2]，　日下部均[3]，稲垣賢二[1]（[1]岡山大院環境生命，[2]大阪大院理，[3](株)エンザイムセンサ）

3D01p10　アミノアシル-tRNA 合成酵素の ATP トリリン酸部位とピロリン酸認識におけるクラス間差異に関する洞察

15:38 ○滝田禎亮，大山創平，和田　工，平井伸博，井上國世（京大院農）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3D01p13　細胞性粘菌における D-セリン代謝酵素欠損の影響
16:10 ○伊藤智和[1]，濱内菜月[1]，邊見　久[1]，齊藤玉緒[2]，吉村　徹[1]（[1]名大院生命農，[2]上智大理工）

3D01p14　好熱性細菌 *Rhodothermus marinus* 由来色素依存性 D- フェニルアラニン脱水素酵素の性質の解明と基質特異性の解析
16:21 ○廣田湧也[1]，石倉　優[1]，里村武範[1,2]，櫻庭春彦[3]，大島敏久[4]，末信一朗[1,2]（[1]福井大院・工・生物応化，[2]福井大・生命セ，[3]香川大・農・応生，[4]大阪工大・工・生命工）

3D01p15　酵母 D-アスパラギン酸オキシダーゼにおける His56 の機能解析
16:32 ○島田　梢[1]，野沢駿友[1]，後藤　勝[2]，阿部勝正[1]，高橋祥司[1]，解良芳夫[1]（[1]長岡技科大工，[2]東邦大学）

3D01p16　好熱菌 *Rubrobacter xylanophilus* D-アミノ酸オキシダーゼの諸特性解析
16:43 ○古川原諒，高橋祥司，田所南海帆，斎藤弥生，小林見江子，大前圭史，阿部勝正，解良芳夫（長岡技大工）

3D01p17　紫外線照射によりアポ化した D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを用いた高感度 PLP 測定
16:54 ○太田寛毅[1]，吉村　徹[2]，吉宗一晃[1]（[1]日大生産工，[2]名大院農）

p19〜p22 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3D01p19　Characterization of glycine oxidase involved in the biosynthesis of the thiazole moiety of thiamine in *Pseudomonas putida* KT2440
17:15 ○Yohannes Equar Messelle[1]，Yasushi Tani[1,2]，Hisaaki Mihara[1]（[1]Dept. Biotechnol., Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]R-GIRO, Ritsumeikan Univ.）

3D01p20　4-メチル-5-(β-ヒドロキシエチル)チアゾールキナーゼ ThiM の酵素学的特性の解析
17:26 ○谷　泰史[1,2]，木村圭佑[1]，斎藤茂樹[1,2]，三原久明[1]（[1]立命館大・生命科学・生物工，[2]立命館大・R-GIRO）

3D01p21　酵母における *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 依存的な新規アルギニン合成系の分子機構の解析
17:37 ○関口春菜，那須野亮，西村　明，高木博史（奈良先端科学技術大学院大学）

3D01p22　立体構造に基づく酵母の抗酸化酵素 Mpr1 の機能向上を目指した分子設計
17:48 平瀬冴華，○那須野亮，高木博史（奈良先端大バイオ）

D02 会場　午前の部（9:11〜12:05）

酵素—糖質代謝関連酵素—

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3D02a02　実験室で容易に調製可能な新規糖ドナー：DMT グリコシド
9:11 ○正田晋一郎，小林厚志，野口真人（東北大院工）

3D02a03　起源の異なる β-グルコシダーゼの加水分解活性と糖転移活性の比較研究
9:22 ○寺坂美紀，早川有美，仁戸田照彦，神崎　浩（岡山大院環境生命）

3D02a04　*Listeria innocua* 由来 β-グルコシダーゼの機能と構造解析
9:33 ○吉田龍太[1]，中島将博[1]，宮永顕正[2]，阿部紘一[1]，豊泉大幸[1]，北岡本光[3]，田口速男[1]（[1]東理大院理工，[2]東工大，[3]農研機構・食総研）

3D02a05　特徴的な基質特異性を持つ麹菌由来新規 β-グルコシダーゼ(BglH)の酵素学的諸性質
9:44 ○渡部　昭，鈴木　萌，氏家成隆，五味勝也（東北大院農）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3D02a07　*Trichoderma reesei* 由来の β-グルコシダーゼの基質特異性
10:05 ○平沢　巽[1]，鈴木尊久[2]，岡田宏文[2]，尾形　慎[3]，村田健臣[4]，戸谷一英[1]（[1]一関高専・物化工，[2]長岡技科大・生物，[3]福島高専・物工，[4]静岡大農・応生化）

3D02a08　β-グルコシダーゼを含有する *Clostridium thermocellum* セルロソームの試験管内再構成
10:16 ○平野勝紹[1]，古内正紀[1]，鈴木優也[1]，二瓶　哲[1]，春木　満[1]，平野展孝[1,2]（[1]日大・工・生命応化，[2]JST・PRESTO）

3D02a09　1,2-β-オリゴグルカンホスホリラーゼを用いた新規の直鎖状 β-1,2-グルカンの大量合成
10:27 ○阿部紘一[1]，中島将博[1]，北岡本光[2]，田口速男[1]（[1]東理大院理工，[2]食総研）

3D02a10　*Talaromyces funiculosus* 由来 β-1,2-グルカン分解酵素の精製と機能解析
10:38 ○田中信清[1]，阿部鉱一[1]，中島将博[1]，北岡本光[2]，田口速男[1]（[1]東理大，[2]食総研）

3D02a11　*Fervidobacterium pennivorans* 由来の耐熱性 β-1,3-グルカンホスホリラーゼの機能解析
10:49 ○磯野直人，伊藤翔子（三重大院生資）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3D02a13　きのこ類 β-グルカナーゼによる昆布ラミナリン分解物の免疫賦活機能
11:10 ○金野尚武[1,2]，渡辺千尋[1]，山田秀俊[2]，高橋秀行[2]，坂本裕一[2]，羽生直人[1]（[1]宇都宮大農，[2]岩手生物工学研究センター）

3D02a14　担子菌 *Coprinopsis cinerea* の子実体形成過程において発現する糖質関連酵素遺伝子の網羅的解析
11:21 ○梅澤　究[1]，村口　元[2]，古崎利紀[1]，石井一夫[1]，吉田　誠[1]（[1]東京農工大農，[2]秋田県立大生資科）

3D02a15　糖質加水分解酵素ファミリー 6 セルラーゼのプロセッシビティを中心とした機能解析
11:32 ○内山　拓[1]，金子　哲[2]，内橋貴之[3]，中村彰彦[1]，五十嵐圭日子[1]，安藤敏夫[3]，鮫島正浩[1]（[1]東大院農生科，[2]食総研，[3]金沢大理工）

3D02a16　セロビオン酸ホスホリラーゼの発見
11:43 ○仁平高則[1]，斉藤由華[1]，西本　完[2]，北岡本光[2]，五十嵐圭日子[3]，伏信進矢[4]，中井博之[1]，大坪研一[1]（[1]新潟大院・自然科，[2]農研機構・食総研，[3]東大院・農生科・生材科，[4]東大院・農生科・応生工）

3D02a17　Saccharophagus degradans 由来セロビオン酸ホスホリラ-ゼの X 線結晶構造解析
11:54 ○南ヨンウ[1]，仁平高則[2]，北岡本光[3]，中井博之[2]，荒川孝俊[1]，伏信進失[1]（[1]東大・農生科，[2]新潟大・農，[3]農研機構・食総研）

D02 会場　午後の部（14:00〜18:10）

酵素—糖質代謝関連酵素—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3D02p01　アルカリ性嫌気下で生産される *Amphibacillus xylanus* の xylan 分解酵素(第 3 報)
14:00 西田俊介[1]，○川村友亮[1]，浅石真由[1]，望月大地[1]，藤田信之[2]，佐藤純一[1]，川崎信治[1]，新村洋一[1]（[1]東農大応生科・バイオ，[2]NITE）

3D02p02　放線菌 *Streptomyces turgidiscabies* 由来グルクロノキシラン特異的 GH30 キシラナーゼの特性解析
14:11 ○前原智子[1]，紙野　圭[2]，金子　哲[1]（[1](独)食品総合研究所，[2](独)製品評価技術基盤機構）

3D02p03　キシログルカナーゼ XEG74 のエンド-プロセッシブ活性に重要なアミノ酸の特定

14:22 ○松沢智彦，矢追克郎（産総研 生物プロセス）

3D02p04　メタゲノム由来 GH43 酵素について

14:33 ○矢追克郎，松沢智彦（産総研生物プロセス）

3D02p05　放線菌由来フェルラ酸エステラーゼの探索

14:44 裏地美杉[1]，原園幸一[2]，川上賀代子[1]，○畑中唯史[1]（[1]岡山生物研，[2]ナガセケムテックス）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3D02p07　*Clostridium cellulovorans* が生産するセルロソーム形成マンナナーゼの酵素学的諸性質と新規骨格タンパク質 CbpB との相互作用解析

15:05 ○石川　岳[1]，　中島大地[1]，　原　浩美[1]，　柴田敏行[1]，田中礼士[1]，　黒田浩一[2]，　植田充美[2]，　田丸　浩[1,3]，　三宅英雄[1,3]（[1]三重大院・生資・生物圏生命，[2]京大院・農・応用生命，[3]三重大・生命支セ）

3D02p08　Characterization of a thermophilic 4-*O*-*β*-D-mannosyl-D-glucose phospholylase from *Rhodothermus marinus*

15:16 ○Nongluck Jaito[1]，　Wataru Saburi[1]，　Rei Odaka[1]，Yusuke Kido[1]，　Ken Hamura[1]，　Mamoru Nishimoto[2]，Motomitsu Kitaoka[2]，　Hirokazu Matsui[1]，　Haruhide Mori[1]（[1]Hokkaido Univ., [2]NARO）

3D02p09　アクセプタ結合部位を改変した *Ruminococcus albus* 由来マンノシドホスホリラーゼの基質特異性と反応特性の解析

15:27 ○尾高　伶[1]，　佐分利亘[1]，　福士江里[1]，　西本　完[2]，北岡本光[2]，松井博和[1]，森　春英[1]（[1]北大農，[2]食総研）

3D02p10　新規エンド型ペクチン分解酵素の探索

15:38 ○長見　篤，小川晃範，奥田光美，小澤忠弘，佐伯勝久，尾崎克也（花王・生科研）

3D02p11　新奇 ulvan 分解酵素の探索

15:49 ○高橋　亮[1]，大西浩平[2]（[1]高知大院農，[2]高知大総研セ）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3D02p13　*Thalassomonas agarivorans* 由来 *α* アガラーゼの結晶化及び機能解析

16:10 ○高木瑛実子[1,2]，　大田ゆかり[2]，　嶋根康弘[2]，　湯川清孝[1,2]，増田美希[1,2]，　柳田早智[1,2]，　弓田　涼[1,2]，　殿塚隆史[3]，　秦田勇二[1,2]（[1]横浜市大院生命ナノ，[2]海洋研究開発機構，[3]東京農工大院農）

3D02p14　植物細胞壁多糖ラムノガラクツロナン I の主鎖の生合成に関与するラムノース転移酵素の生化学的解析

16:21 ○上原洋平[1]，　田村峻佑[1]，　加藤大詞[1]，　牧　祐介[2]，湯浅大史[1]，石水　毅[1]（[1]立命館大生命，[2]阪大院理）

3D02p15　*Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1 が産生する酸性 *β*-ガラクトシダーゼ

16:32 ○千葉瀬里奈[1]，　磯部公安[1]，　山下美穂[1]，　高橋直己[1]，小山貴史[2]（[1]岩手大農，[2]天野エンザイム）

3D02p16　*Bifidobacterium longum* における *β*-アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群の転写解析

16:43 ○藤田清貴，吉嶺良平，下川倫子，北原兼文（鹿児島大農）

3D02p17　ビフィズス菌由来 GH127 *β*-L-アラビノフラノシダーゼの新規な活性中心

16:54 ○伊藤　佑[1]，　齋川　匡[1]，　Seonah Kim[5]，　藤田清貴[2]，石渡明弘[3]，　Sophon Kaeothip[4]，　荒川孝俊[1]，　若木高善[1]，Gregg T. Beckham[5]，伊藤幸成[3,4]，伏信進矢[1]（[1]東大院農，[2]鹿児島大農，[3]理研，[4]ERATO, JST，[5]National Renewal Energy Laboratory）

p19〜p23 発表者の接続時間 17:05〜17:15

3D02p19　Purification and Characterization of plant *β*-Galactosidase that hydrolyzes *β* 1-3 Gal residue in complex type N-glycans

17:15 ○Md. Ziaur RAHMAN，Megumi Maeda，Yoshinobu Kimura（Okayama University）

3D02p20　深海底泥由来 *Bacillus* sp. F8 の chondroitin sulfate 分解酵素

17:26 ○倉田淳志[1]，　西村みどり[1]，　小林　徹[2]，　岸本憲明[1]（[1]近畿大農，[2]独立行政法人海洋研究開発機構）

3D02p21　グース型リゾチームの触媒部位周辺に存在する Asp 残基の機能について

17:37 ○川口裕也[1]，米田一成[2]，荒木朋洋[2]（[1]東海大院農，[2]東海大農）

3D02p22　糖タンパク質品質管理機構関連酵素に対する 5-チオグルコース置換型基質の効果

17:48 ○迫野昌文[1]，　瀬古　玲[1]，　武田陽一[1]，　八須匡和[1]，小泉晶彦[1]，藤川紘樹[1]，瀬戸秀春[2]，伊藤幸成[1,2]（[1]JST, ERATO, [2]理研）

3D02p23　超好熱性微生物由来の無機ピロリン酸依存性ホスホフルクトキナーゼの結晶構造解析とリン酸供与体の認識機構

17:59 ○宋　賢珍，日高将文，荒川隆俊，伏信進矢，若木高善（東京大学）

D03 会場　午前の部（10:05〜11:54）

生物化学工学—酵素工学・生物反応工学—

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3D03a07　各種 aminoacyl-tRNA synthetase のアミノ酸定量への応用

10:05 ○亀谷将史[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

3D03a08　A new hydroxynitrile lyase: purification, characterization and recombinant expression

10:16 ○M. Dadashipour-Lakmehsari[1,2]，　Yuko Ishida[1,2]，Yasuhisa Asano[1,2]（[1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO）

3D03a09　異種宿主による活性型酵素の発現

10:27 ○伊奈隆年[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

3D03a10　酵母細胞表層工学によるセルラーゼの集積と共役・相乗効果の解析

10:38 ○BAE Jungu，黒田浩一，植田充美（京大院農）

3D03a11　*Clostridium cellulovorans* を基にしたセルロソームの酵母細胞表層工学による構築の試み

10:49 ○石高彰人[1]，　BAE Jungu[1]，　三宅英雄[2]，　田丸　浩[2]，黒田浩一[1]，植田充美[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]三重大院・生資）

a13〜a16 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3D03a13　機能物質探索ツールとしての D-アミノペプチダーゼ：反応の効率化と生成物の網羅的解析

11:10 ○恒原由佳[1]，　磯田佳孝[2]，　田村　丹[3]，　森　信寛[1]，有馬二朗[1]（[1]鳥取大農，[2]鳥取大院連農，[3]鳥取大院）

3D03a14　グラム陽性細菌に対して抗菌活性を有する酵素合成 D-ホモジペプチド：D-Trp-D-Trp

11:21 ○磯田佳孝[1]，霜村典宏[2]，森　信寛[2]，有馬二朗[2]（[1]鳥取大連農，[2]鳥取大農）

3D03a15　カイコ幼虫後部絹糸腺由来無細胞タンパク質合成系における翻訳促進配列の機能解析

11:32 ○佐事　武[1]，尾山　廣[2]，伊東昌章[3]（[1]沖縄高専　専攻科，[2]摂南大学　理工　生命科学，[3]沖縄高専　生資工）

3D03a16　パパインによるオリゴチロシンペプチドの合成

11:43 ○三橋　純，奈良井朝子，中山　勉（日獣大応生）

D03 会場　午後の部（14:00〜16:54）

生物化学工学—ペプチド・タンパク質工学，その他—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00

3D03p01　FRET を用いた硝酸センサータンパク質の開発

14:00 ○後藤愛那[1]，　日高將文[1]，　岡部恵美子[1]，　金井研太[1]，

小坂啓太[1]，板倉　学[2]，クリスチーナサンチェス[2]，南澤　究[2]，内田隆史[1]（[1]東北大院農，[2]東北大院生命）

3D03p02　FRET 法を用いた Pin1 構造変化の可視化

14:11　◦岡部恵美子，日高將文，内田隆史（東北大院農）

3D03p03　ナノ粒子局在表面プラズモン共鳴によるインフルエンザウイルスの検出

14:22　◦高橋直人[1]，アハメッドラヒン[1,2]，加藤竜也[1,3]，朴　龍洙[1,2,3]（[1]静岡大院農，[2]静大　創科技院，[3]静大　グリーン科学技術研）

3D03p04　がん細胞特異的一本鎖抗体を提示したがん細胞追跡用ウイルス様粒子によるがん細胞のイメージング

14:33　◦油井　恵[1]，デオピピンクマール[2]，加藤竜也[1]，上田　宏[3]，朴　龍洙[2]（[1]静岡大院農，[2]静岡大グリーン科技研，[3]東工大資化研）

3D03p05　タンパク質を提示したマグネタイト粒子の作製と細菌回収への応用

14:44　◦梅田憲義，池田　丈，椎原史裕，廣田隆一，黒田章夫（広島大学先端研）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:55〜15:05

3D03p07　新規細胞膜透過ペプチド「ポリヒスチジン」の発見

15:05　◦岩崎　崇，綿谷佳久，小竹彩香，河野　強（鳥取大農）

3D03p08　新規細胞膜透過ペプチド「ポリヒスチジン」の分子機構の解析

15:16　◦綿谷佳久，小竹彩香，河野　強，岩崎　崇（鳥取大農）

3D03p09　非天然アミノ酸 D-Nle を含有するジペプチド誘導体の腫瘍細胞に対する細胞毒性

15:27　◦田村　丹[1]，岩崎　崇[2]，森　信寛[2]，有馬二朗[2]（[1]鳥取大院農，[2]鳥取大農）

3D03p10　エリンギ由来セリンペプチダーゼ：特定の残基の酸化と変異が基質特異性を変える

15:38　◦東海彰太[1]，森　信寛[2]，有馬二朗[2]（[1]鳥取大院農，[2]鳥取大農）

3D03p11　米タンパク質由来ペプチドの抗菌・抗炎症・創傷治癒作用の解析とその機構の解明

15:49　◦谷口正之，田嶋幸司，松嶋健太，高橋清志，中道俊一，落合秋人，田中孝明（新潟大自然研）

p13〜p16 発表者の接続時間 16:00〜16:10

3D03p13　こんにゃく飛粉を用いた機能性ペプチドの開発

16:10　◦田中雅幸，高屋朋彰（小山高専物質）

3D03p14　主鎖骨格にアゾール環を含むペプチド合成法の開発

16:21　◦加藤保治，後藤佑樹，菅　裕明（東大院理）

3D03p15　赤血球中に含まれる A β 凝集体の検出

16:32　◦細見恵里，小森谷友絵，神野英毅，吉宗一晃（日大生産工）

3D03p16　硫酸イオン塩架橋による Bacillus sp.TB-90 ウリカーゼの耐熱化

16:43　◦林　祐太[1]，伊藤貴文[1]，西矢芳昭[2]，深田はるみ[3]，日ビ隆雄[1]（[1]福井県立大生物資源，[2]摂南大理，[3]大阪府立生命環境）

講演番号
開始時間　　演　　題　　発表者氏名（所属）

A01 会場　午前の部（9:11〜12:05）

環境—バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオリファイナリー—

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

4A01a02　*Clostridium thermocellum* によるリグノセルロースからの直接グルコース生産法
9:11　○小杉昭彦[1,2,3]，Prawitwong Panida[1]，Waeonukul Rattiya[4]，Ratanakhanokchai Khanok[4]，Deng Lan[1]，森　隆[1]（[1]国際農研センター，[2]筑波大院　生命環境，[3]鳥取大院　生物資源，[4]King Mongkut's University）
4A01a03　ソフトバイオマス分解を目指した *Clostridium cellulovorans* のエキソプロテオーム解析
9:22　○江坂康平[1]，松井一真[1]，森坂裕信[1,2]，黒田浩一[1]，三宅英雄[3]，田丸　浩[3]，植田充美[1,2]（[1]京大院・農・応用生命，[2]京都バイオ計測センター，[3]三重大院・生資）
4A01a04　*Clostridium cellulovorans* の基質認識の解析
9:33　○油屋駿介[1]，江坂康平[1]，森坂裕信[1,2]，黒田浩一[1]，植田充美[1,2]（[1]京大院・農・応用生命，[2]京都バイオ計測センター）
4A01a05　*Clostridium paraputrificum* による水素ガス生産向上のための培養条件の検討と代謝関連遺伝子の発現解析
9:44　中西有斗[1]，大石琢馬[1]，黒岩千智[1]，大島健志朗[2]，服部正平[2]，粟冠真紀子[1]，○木村哲哉[1]，粟冠和郎[1]（[1]三重大院生資，[2]東大院新領域）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4A01a07　バイオ電池構築のための超好熱性古細菌 *Pyrobaculum aerophilum* 由来 multicopper oxidase を用いたバイオカソード
10:05　○末信一朗[1]，内井俊貴[1]，坂元博昭[1]，里村武範[1]，櫻庭春彦[2]，大島敏久[3]（[1]福井大院工，[2]香川大農，[3]大阪工大）
4A01a08　バイオ燃料電池のための *Pyrobaculum aerophilum* 由来 PQQ 依存型グルコース脱水素酵素配向固定化によるバイオアノードの構築
10:16　○向當綾子[1]，坂元博昭[1]，里村武範[2,3]，末信一朗[1,2,3]（[1]福井大学院・工・繊維，[2]福井大学院・工・生物応用化，[3]福井大学・生命セ）
4A01a09　微生物燃料電池による霞ヶ浦湖底堆積物のバイオマスエネルギーとしての利用
10:27　○返町洋祐[1]，丹羽晋太郎[1,2]，星野貴行[1]（[1]筑波大生命環境，[2]茨城水試）
4A01a10　非白金水素エネルギー変換系につなげるヒドロゲナーゼの電気化学的アプローチ
10:38　○宋　慶盛[1]，河井翔太[1]，北隅優希[1]，白井　理[1,2]，西原宏史[3]，加納健司[1,2]（[1]京大院農，[2]Crest，[3]茨城大農）
4A01a11　アルカリ性条件下における微生物燃料電池の構築
10:49　○江邉正平[1]，大池達矢[1]，岡南政宏[1,2]，阿野貴司[1,2]（[1]近大院生物理工，[2]近大生物理工）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4A01a13　電流生成条件下における *Shewanella oneidensis* 変異株の糖代謝産物の同定
11:10　○中川　元，高妻篤史，渡邉一哉（東薬大院生命）
4A01a14　通電型固定床式メタン発酵の植物工場由来農業廃棄物への適用
11:21　○平野伸一，松本伯夫，大村直也（電中研）
4A01a15　電気培養によるグリセロール廃液からのエタノール生産の促進
11:32　○椎葉千慧[1]，平野伸一[3]，松本伯夫[3]，大村直也[3]，安藤昭一[2]（[1]千葉大院・園芸，[2]千葉大，[3]電中研）
4A01a16　電気培養を用いた水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株への還元力の供給とその影響
11:43　○松本伯夫[1]，平野伸一[1]，石井正治[2]（[1]電中研，[2]東大院農生科・応生工）
4A01a17　*Corynebacterium glutamicum* 増殖時の電気培養下での乳酸生成
11:54　○佐々木建吾[1]，柘植陽太[1]，佐々木大介[2]，近藤昭彦[2]（[1]神戸大・自科，[2]神戸大院・工）

A02 会場　午前の部（9:11〜12:05）

糖鎖工学—合成，生合成，その他—

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

4A02a02　タンパク質と各種還元糖のアミノカルボニル反応に対するホウ酸塩の影響
9:11　○小林厚志，酒井謙介，吉田尚生，正田晋一郎（東北大院工）
4A02a03　糖-タンパク質間相互作用を基盤とする Organic framework の創成研究
9:22　○中川　篤，蟹江　治（東海大糖鎖研）
4A02a04　生物多様性損失因子に由来する海藻多糖ソフトマテリアルの開発
9:33　○菅野憲一[1]，藤田雄大[2]（[1]近大産理工，[2]近大院産理工）
4A02a05　ナイセリア属細菌の産生する部分糖鎖コンジュゲートの合成
9:44　○岸本勝也，石井一之，山崎良平（鳥取大学・農）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4A02a07　DDS を指向したシアリルルイス X 修飾リポソームの合成と機能評価
10:05　○植木章晴[1,2]，ウンガヨハン[3]，樋口ゆり子[3]，川上　茂[3]，安藤弘宗[1,2]，石田秀治[1]，山下富義[3]，橋田　充[2,3]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS，[3]京都大・薬）
4A02a08　ITC 滴定実験による LacNAc 含有糖鎖クラスターとデイゴマメレクチンとの相互作用解析
10:16　○安本佳成[1]，尾形　慎[2]，田見祐一[1]，中馬康志[1]，碓氷泰市[1,3]，朴　龍洙[1,3]（[1]静岡大農・応生化，[2]福島高専・物質工，[3]静大院・創科技）
4A02a09　癌や精神疾患に関わるポリシアル酸構造に特異的な一本鎖抗体の作製と特異性評価
10:27　○羽根正弥[1,2,3]，長江雅倫[4]，池田明美[4]，山口芳樹[4]，北島　健[1,2,3]，佐藤ちひろ[1,2,3]（[1]名大・生物機能セ，[2]名大院・生命農学，[3]リーディング大学院プログラム・IGER，[4]理研・糖鎖構造）
4A02a10　Characterization of medaka fish CMP-Sia synthetase (CSS) mutants detected in the TILLING library
10:38　○di wu[1,2,3]，Akiko Fujita[1]，Yuko Yasukawa[1,3]，Yoshihito Taniguchi[4]，Yasuhiro Kamei[5]（[1]Biosci. Biotech. Center，[2]Program for Leading Graduate Schools IGER，[3]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.，[4]Sch. Med., Keio Univ.，[5]Dept Appl. Life Sci., Nat. Inst. Basic Biol.）
4A02a11　シアル酸を過剰発現した細胞株の樹立とその応用
10:49　○柿沼俊光[1]，上宮　悠[1]，鈴木佑典[2]，峯　利喜[2]，山本　岳[2]，櫛　泰典[1]（[1]日本大・院・理工，[2]日本たばこ・植物イノベーション）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4A02a13　耐熱グルコシダーゼ HT1 酵素反応におけるマイクロ波効果の研究
11:10　○長島　生[1]，作田智美[1]，杉山順一[2]，佐々木正秀[1]，清水弘樹[1]（[1]産総研生物プロセス，[2]産総研ナノシステム）

4A02a14　ゴルジマンノシダーゼの糖蛋白質に対する作用の解析
11:21　○相川順一[1]，武田陽一[2]，松尾一郎[3]，伊藤幸成[1,2]（[1]理研，[2]JST ERATO，[3]群馬大院工）

4A02a15　新規 endo-α-mannosidase 探索に向けたアフィニティーゲルの作成
11:32　○笠原佑太[1]，岩本将吾[1]，亀井健一[1]，武田陽一[2]，瀬古　玲[2]，伊藤幸成[2,3]，松尾一郎[1]（[1]群馬大院理工，[2]ERATO-JST，[3]理研・細胞制御化学）

4A02a16　Endo-M の N-型糖鎖コア構造認識に関する研究
11:43　○石井希実[1]，岩本将吾[1]，熊田純一[2]，松崎祐二[2]，松尾一郎[1]（[1]群馬大院理工，[2]東京化成）

4A02a17　変異酵素 Endo-M N175H の酵素学的解析と効率的な糖転移反応の検討
11:54　○坂口広大，加藤紀彦，山本憲二（石川県大・生資工研）

A03 会場　午前の部（9:00〜12:05）

環境—資源変換，資源再生利用—

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4A03a01　卵殻膜の機能を活用した燃料電池の開発
9:00　○谷藤尚貴，西尾幸祐，井田健太郎，大江ひかる，小西那奈，小林周平，田原早央莉，可知佳晃（米子高専）

4A03a02　生乳からのグリセロール資化性菌の分離と解析
9:11　○布川玲奈[1]，松井　徹[2]，上田　誠[1]，高屋朋彰[1]（[1]小山高専物質，[2]琉大熱生研）

4A03a03　幌延深部地下環境における腐植物質分解能を示す嫌気性微生物の探索
9:22　○上野晃生[1]，清水　了[1]，玉村修司[1]，奥山英登志[2]，長沼　毅[3]，金子勝比古[1,4]（[1]幌延地圏環境研究所，[2]北大院・地球環境，[3]広島大院・生物圏科学，[4]北大院・工）

4A03a04　クロム・銅・ヒ素(CCA)系保存剤で処理された木材に結合するペプチドの探索
9:33　○太田原統[1]，中澤　光[2]，梅津光央[2]，吉田　誠[1]（[1]東京農工大農，[2]東北大院工）

4A03a05　アーミング酵母によるレアアース回収のためのテーラーメードスクリーニング法の開発
9:44　○橋本　遥，戎谷一輝，黒田浩一，植田充美（京大院農・応用生命）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4A03a07　水生植物オオカナダモ(*Egeria densa*)の Mn 蓄積性
10:05　○浅山拓馬，白木望美，井上翔太，奥田絵里奈，長谷川博，原田英美子（滋賀県大環境）

4A03a08　*Pseudomonas stutzeri* NT-I 株のジメチルジセレニド合成能の特徴
10:16　○大塚　治[1]，成田尚宣[1]，黒田真史[2]，池　道彦[2]，山下光雄[1]（[1]芝浦工大 SIT 総研　レアメタルバイオリサーチセンター，[2]大阪大院・工・環エネ）

4A03a09　好酸性鉄酸化菌を利用した廃電子基板からの有用金属回収
10:27　○東條ふゆみ[1]，渡邊陽祐[1]，宮田直幸[1]，梁　瑞録[1]，谷　幸則[2]，福島　淳[1]（[1]秋田県大，[2]静岡県大）

4A03a10　核酸によるレアアース回収
10:38　○近藤和博[1]，高橋嘉夫[2]（[1](株)アイシン・コスモス研究所，[2]広島大院理）

4A03a11　非鉄金属にキレート作用を示すシデロフォアのスクリーニングと希少金属回収への利用
10:49　○篠崎由紀子[1,2]，平舘俊太郎[1]，牧野知之[1]，中島(神戸)敏明[3]，北本宏子[1]（[1]農環研，[2]JSPS-RPD，[3]筑波大院・生命環境）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4A03a13　土壌化技術を利用した無機肥料の製造と有機質肥料活用型養液栽培
11:10　○篠原　信[1]，岩井　喬[2]，藤原和樹[1]，河邑ちひろ[1]，小川　順[3]，安藤晃規[3]，加藤康夫[4]，宮本憲二[5]，高野雅夫[2]，浅川　晋[6]（[1]農研機構，[2]名古屋大，[3]京都大農，[4]富山県大，[5]慶應大理，[6]名大院・生命農）

4A03a14　有機質肥料活用型養液栽培における根圏微生物群が *Fusarium oxysporum f. sp. lactucae* に及ぼす影響
11:21　○藤原和樹[1]，染谷信孝[1]，飯田祐一郎[1]，安藤晃規[2]，大西　純[1]，小川　順[2]，加藤康夫[3]，宮本憲二[4]，高野雅夫[5]，寺見文宏[1]，篠原　信[1]（[1]農研機構，[2]京大・生理化学・京大院農・応用生命，[3]富山県大工・生工研セ，[4]慶大・理工，[5]名大院・環境）

4A03a15　有機質肥料活用型養液栽培における硝化関連微生物群集の動態解析
11:32　○宇佐美晶子[1]，安藤晃規[1,2]，犬飼龍矢[1]，溝渕久恭[1]，池本成美[1]，島　純[3]，篠原　亘[5]，吉田昭介[5]，宮本憲二[5]，加藤康夫[6]，藤原和樹[7]，浅川　晋[4]，篠原　信[7]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大・生理化学，[3]京大・微生物科学，[4]名大院・生命農，[5]慶大・理工，[6]富山県立大工・生工研セ，[7]農研機構）

4A03a16　次世代シーケンサーによる有機養液栽培における根圏微生物叢の経時変化解析
11:43　○篠原　亘[1]，吉田昭介[1]，安藤晃規[2,3]，小川　順[2,3]，加藤康夫[4]，浅川　晋[5]，篠原　信[6]，宮本憲二[1]（[1]慶大・理工，[2]京大院農・応用生命，[3]京大・生理化学，[4]富山県立大工・生工研セ，[5]名大院・生命農，[6]農研機構）

4A03a17　有機質肥料活用型養液栽培法を用いた水稲根圏微生物群集解析の試み
11:54　赤木美咲[2]，米田恒明[2]，服部亜紀[2]，篠原　信[3]，木村眞人[4]，○浅川　晋[1]（[1]名古屋大院生命農，[2]名古屋大農，[3]農研機構・野茶研，[4]農林水産消費安全技術センター）

A04 会場　午前の部（9:22〜12:05）

有機—その他—

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

4A04a03　エピロドデンドリン酸化体の化学合成と生理活性評価
9:22　○岩舘丈央[1]，二瓶賢一[1,2]（[1]東農工大院連農，[2]宇都宮大農）

4A04a04　ツバキ科ビベンジル配糖体の化学合成と生理活性評価
9:33　○大出知里[1]，小太刀悠佳[1]，島田　亙[2]，井筒ゆき子[2]，二瓶賢一[1]（[1]宇都宮大農，[2]コスモステクニカルセンター）

4A04a05　オオヨモギ精油の鎮静作用に関する研究
9:44　○國廣建斗[1]，後藤広太郎[1]，田島範明[2]，妙田貴夫[1]，藤森　嶺[1]，戸枝一喜[1]，西澤　信[1]（[1]東農大・生物・食香，[2]株式会社アルビオン）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4A04a07　アオノリ香気特性および香気成分の品種間・産地間差異の解析
10:05　○山本正芳[1,2]，Baldermann Susanne[3]，渡辺修治[1]（[1]静大・創造科技院，[2]焼津水産化学工業(株)，[3]ライプニッツ研究所・植物・食品化学）

4A04a08　和種ハッカ「ほくと」精油の香気成分分析
10:16　○松村卓磨，妙田貴生，戸枝一喜，西澤　信，久保田紀久枝，藤森　嶺（東農大・生物・食香）

4A04a09　MS/MS 分析によるペプチド中の Leu/Ile の判別における N 末端修飾の効果
10:27　○北中淳史，宮下正弘，宮川　恒（京都大院農）

4A04a10　熱帯牧草 *Brachiaria humidicola* の根から分泌される硝化抑制物質ブラキアラクトンの GC-MS-SIM による定量
10:38　○吉橋　忠，中原和彦，スバラオグントゥール（国際農研）

4A04a11　酵素タンパク質の鏡像体選択性に関する大規模量子化学計算
10:49　○矢城陽一朗[1,2]，木村崇知[3]，亀澤　誠[3]，直島好伸[1,2]（[1]岡山理大自然科学研，[2]岡山理大院総合情報，[3]甲南化工）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4A04a13　フィシフォリジオンとその類縁体の培養細胞に対する毒性評価ならびに作用機序の解明
11:10　◦藤原敏美，西脇　寿，岩本洋幸，西　甲介，菅原卓也，山内　聡，首藤義博（愛媛大農）

4A04a14　アミノ酸由来イソニトリル化合物の合成と付着阻害活性に関する構造－活性相関の考察
11:21　◦福田拓也[1]，小南喜郁[1]，野方靖行[2]，吉村えり奈[3]，千葉一裕[1]，北野克和[1]（[1]東農工大農，[2]電中研，[3]セレス）

4A04a15　黒ゴマ抗酸化成分 anthrasesamone F の種子成熟度別含量変化
11:32　◦古本敏夫，西本潔司（香川大農）

4A04a16　染色用紅花加工品“紅餅”における加工処理条件と品質の関係
11:43　◦勝見直行，遠藤昌幸（山形県農業総合研究センター）

4A04a17　Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase の蛍光基質としての N^6-isopentenyl-ethenoadenine 類の合成及び基質特異性の解析
11:54　◦竹井昭登，設楽研司，大久保駿，飯野誠之，杉山民二（明治大院農）

A06 会場　午前の部（9:22〜12:05）

有機—天然物－単離構造決定，植物—

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

4A06a03　ヤマノイモ属トゲトコロに蓄積するステロイドサポニンの単離精製および定量解析
9:22　◦李ヒョン宰[1]，渡辺文太[2]，中安　大[1]，山村理恵[1]，岡田実佳[1]，杉本幸裕[1]，水谷正治[1]（[1]神戸大院・農・生命機能科学，[2]京都大学・化学研究所）

4A06a04　赤米の種皮および芒の成分
9:33　◦我如古菜月，伊東秀之（岡山県大保福）

4A06a05　大豆もやし種皮中のイソフラボン類縁体の分析
9:44　◦大島綾華[1]，中田光彦[2]，柳瀬笑子[1]（[1]岐阜大院応生，[2](株)サラダコスモ）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4A06a07　パッションフルーツ種子中における新規スチルベン型化合物の単離
10:05　山本諭志，◦中塚宏志，松本恵実，中塚進一（長良サイエンス）

4A06a08　パッションフルーツ種子中スチルベノイドを利用した天然微量成分の合成
10:16　◦山本諭志，松本恵実，中塚進一（長良サイエンス）

4A06a09　ワサビ葉の成分分析および機能性評価
10:27　◦吉田周平[1]，細谷孝博[1]，増田英樹[2]，熊澤茂則[1]（[1]静岡県大院食品栄養，[2](株)田丸屋本店）

4A06a10　Camu-camu 種子に含まれる縮合型タンニンとその機能性
10:38　◦金嶋　泰，妙田貴生，戸枝一喜，藤森　嶺，西澤　信（東農大・生物・食香）

4A06a11　静岡県産温室メロン葉の成分研究
10:49　◦増田友香[1]，細谷孝博[1]，大場聖司[2]，熊澤茂則[1]（[1]静岡県大院薬食・食栄，[2]静岡県農林技術研）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4A06a13　ぶどう山椒に含まれるアポトーシス誘導活性物質の探索とその作用機構
11:10　◦古川和樹[1]，原田悠希[1]，奥野祥治[1]，河野良平[2]，野村幸子[2]，宇都宮洋才[2]（[1]和歌山高専，[2]和歌山県医大）

4A06a14　梅種子由来新規リグナン 2',9-epoxylyoniresinol の絶対立体構造の決定と全合成
11:21　◦須戸雅弘[1]，奥野祥治[1]，河野良平[2]，野村幸子[2]，宮澤三雄[3]，宇都宮洋才[2]（[1]和歌山高専，[2]和歌山県医大，[3]近畿大理工）

4A06a15　シラカンバ外樹皮からの AGEs 形成阻害物質の探索
11:32　◦岡田直己，重冨顕吾，三橋進也，生方　信（北海道大学院農）

4A06a16　ヤナギ科カワヤナギ由来の生薬抽出物の HL-60 増殖抑制活性
11:43　◦小山愛美[1]，常盤野哲生[2]，川井　悟[3]，吉澤結子[2]（[1]秋田県立大院生資科，[2]秋田県立大生資科，[3]東京電機大理工）

4A06a17　ザクロの新規ネオリグナンの構造
11:54　◦金田麻央[1]，李　鵬[2]，我如古菜月[1]，長友暁史[3]，西田典永[3]，伊東秀之[1,2]（[1]岡山県大院保福，[2]岡山大院医歯薬，[3]森下仁丹株式会社）

A07 会場　午前の部（9:22〜12:05）

有機—医薬，農薬，その他—

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

4A07a03　ジュンサイ成分による HIV-1 逆転写酵素活性の阻害
9:22　◦久好哲郎[1]，篠村まゆ[2]，小西　篤[2]，田中潤司[3]，下田博司[3]，畠　恵司[4]，高橋砂織[4]，保川　清[2]（[1]京大・農，[2]京大院・農，[3]オリザ油化(株)，[4]秋田県総食研）

4A07a04　新規アシルプルンバギンの合成と抗がん・抗炎症・抗アレルギー活性
9:33　◦栗山磯子[1]，河村　萌[2]，椿　一典[2]，倉持幸司[2]，吉田弘美[1]，水品善之[1,3]（[1]神戸学院大・栄養，[2]京府大院・生命環境，[3]神戸学院大・LSC）

4A07a05　インドール誘導体の小胞体グルコシダーゼ阻害剤活性に関する研究
9:44　◦荒井詩織[1]，袴田　航[1,2]，平野貴子[1]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大生資科・生命化，[2]日大院 生資科）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4A07a07　ヒドロキシアミンの骨格筋細胞に対する糖取り込み促進作用とその作用機構解析
10:05　◦木村太郎，加藤英介，町川　司，木村駿介，片山紳司，川端　潤（北大院農）

4A07a08　山椒種子中のセロトニン関連配糖体および類縁体のチロシナーゼ阻害活性評価
10:16　吉田拓弥，◦小川和樹，柳瀬笑子（岐阜大学）

4A07a09　構造生物学的アプローチによるヒドロキシルアミン酸化還元酵素を標的とした硝化抑制剤の開発
10:27　◦西ヶ谷有輝[1,2]，熊谷美穂[3]，土屋　渉[2]，藤本　瑞[2]，鮫島玲子[4]，藤原健智[3]，山崎俊正[2]（[1]東大院新領域，[2]生物研，[3]静岡大理，[4]静岡大農）

4A07a10　Gallic acid 誘導体の植物病原菌に対する構造活性相関
10:38　◦谷澤　悟，中川泰伯，矢嶋俊介，佐々木康幸，伊藤晋作（東農大・応生科・バイオ）

4A07a11　ニコチン性アセチルコリン受容体の多型によって生じるネオニコチノイド感受性変化の分子機構
10:49　◦伊原　誠[1]，島津直弥[1]，宇都宮麻衣[1]，赤松美紀[2]，David B. SATTELLE[3]，松田一彦[1]（[1]近畿大農，[2]京都大院農，[3]Univ. College London）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4A07a13　（1245/36）1-Hydroxy-2,3,4,5,6-pentachlorocyclohexane：γ-BHC 1-OH 類縁体のラセミ体光学分割とその鏡像異性体の活性
11:10　◦田中啓司[1]，永崎果鈴[2]，松田一彦[2]，森本正則[2]，尾添嘉久[3]，栗原紀夫[4]（[1]近畿大農・名古屋大エコトピア科研，[2]近畿大農，[3]島根大生物資源科学，[4]京都大）

4A07a14　ナミテントウとニジュウヤホシテントウの脱皮ホルモン受容体(EcR/USP)に対する脱皮ホルモン類の結合親和性評価と受容体に対する結合様式の予測

11:21　°中川好秋[1]，　森下知奈[2]，　水口智江可[3]，　横井大洋[1]，瀧本征佑[1]，細田晃文[2]，赤松美紀[1]，田村廣人[2]（[1]京大院農，[2]名城大院農，[3]名古屋大院農）

4A07a15　ブタン型リグナンの 2 つのベンゼン環上の置換基が抗かび活性に与える影響

11:32　°中崎翔子[1]，西脇　寿[1]，秋山浩一[2]，山内　聡[1]（[1]愛媛大農，[2]愛媛大総科支セ）

4A07a16　Induction of apoptosis by 1,7-seco-2,7'-cycloligнane and structure-cytotoxic activity relationship of (-)-dihydroguaiaretic acid

11:43　°Tuti Wukirsari，Hisashi Nishiwaki，Kosuke Nishi，Takuya Sugahara，Satoshi Yamauchi（Ehime Univrsity, Faculty of Agriculture）

4A07a17　抗がん活性を有する新規ナフトキノンの単離と構造決定

11:54　°竹本健二[1]，紙透伸治[1]，水品善之[2]，菅原二三男[1]（[1]東理大理工・応生，[2]神戸学院大・栄養）

A08 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―物質生産－醸造，発酵(一次代謝産物)―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4A08a01　*Acetobacter* 属酢酸菌に至適化した新規シャトルベクターの開発

9:00　貝沼(岡本)章子，　°山我幹太，　石川森夫，　永山広輝，海野祥子，小泉幸道（東農大応生科・醸造）

4A08a02　伝統的壺造り純米黒酢醸造における酢酸菌の生態生理学的研究

9:11　°菅原圭悟[1]，　橋口和典[2]，　菱田直人[2]，　長野正信[2]，新井博之[1]，五十嵐泰夫[1]，石井正治[1]（[1]東大院農生科・応生工，[2]坂元醸造株式会社）

4A08a03　混合または従属培養条件下でトリグリセリド類を高蓄積する緑藻株の探索

9:22　°加藤康夫[1,2]，　藤城迪子[2]，　伊藤純平[2]，　野村泰治[1,2]，荻田信二郎[1,2]（[1]富山県立大工･生工研セ，[2]富山県立大工･生物工）

4A08a04　大腸菌におけるプトレッシン生産法の開発

9:33　°古道紗斗里，鈴木秀之（京都工繊大院応生）

4A08a05　組換え大腸菌を用いたグリセロールを出発基質とする 1- プロパノール発酵生産に関する研究

9:44　°松原　充，浦野信行，藤居実咲，會野宏志，片岡道彦（阪府大院生環科・応生科）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4A08a07　代謝工学に基づいた大腸菌によるイタコン酸生産

10:05　°麻生祐司，岡本脩佑，陳　泰駿，平塚　賢，田中康智，小原仁実（京都工繊大院・工芸科学）

4A08a08　シアノバクテリアを用いた二酸化炭素からのイタコン酸生産

10:16　°陳　泰駿，岡本脩佑，麻生祐司，小原仁実（京都工繊大院・工芸科学）

4A08a09　*Corynebacterium glutamicum* の脂肪酸生産に関わる変異の解析

10:27　°村松哲広[1]，　見村晃紀[1]，　大下政一[1]，　三橋　敏[2]，竹野誠記[1]，池田正人[1]（[1]信州大農・応生科，[2]協和発酵バイオ）

4A08a10　*Corynebacterium glutamicum* のオレイン酸非依存性ビオチン要求株の育種

10:38　°白野裕隆[1]，　宮本　綾[1]，　北野由子[1]，　三橋　敏[2]，竹野誠記[1]，池田正人[1]（[1]信州大農・応生科，[2]協和発酵バイオ）

4A08a11　*Corynebacterium glutamicum* のビオチン要求性解除

10:49　°宮本　綾[1]，　武藤　葦[1]，　田島　明[1]，　白倉大輔[1]，三橋　敏[2]，竹野誠記[1]，池田正人[1]（[1]信州大農・応生科，[2]協和発酵バイオ）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4A08a13　コリネ型細菌を用いた糖を原料とする GABA の生産

11:10　°岡井直子[1]，　高橋千尋[2]，　畑田一樹[2]，　荻野千秋[2]，近藤昭彦[2]（[1]神戸大自，[2]神戸大院工・応化）

4A08a14　*Corynebacterium glutamicum* における短鎖アシル化修飾の網羅的解析

11:21　°水野裕太[1,2]，久保翔世[1,3]，吉田　稔[4]，古園さおり[1]（[1]東大･生物工学セ，[2]協和発酵バイオ，[3]東電大院・工，[4]理研 CSRS）

4A08a15　*Corynebacterium glutamicum* の 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体における短鎖アシル化修飾の役割

11:32　°久保翔世[1,2]，水野裕太[1,3]，川崎　寿[2]，古園さおり[1]（[1]東大･生物工学セ，[2]東電大院・工，[3]協和発酵バイオ）

4A08a16　汎用型物質排出担体としての *Corynebacterium glutamicum* 由来圧力依存性チャネルの有用性

11:43　°橋本賢一[1]，　小西智之[2]，　李　双春[2]，　三井岳志[2]，矢部　勇[1]，中松　亘[2]，川崎　寿[2]（[1]東電大工・環境化，[2]東電大院工・物質工）

4A08a17　Pantoea ananatis における新規 L-グルタミン酸排出輸送体の同定

11:54　°原　吉彦[1]，泉井　裕[1]，伊藤久生[1]，中松　亘[2]（[1]味の素，[2]東京電機大学）

A09 会場　午前の部（9:22〜12:05）

微生物―細胞－栄養，生育，増殖―

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

4A09a03　*Aspergillus nidulans* が有する adenosine deaminase-related growth factor 様遺伝子の解析

9:22　°西川良平[1]，　伊藤靖夫[2]，　稲冨　聡[3]，　田口悟朗[1]，下坂　誠[1]（[1]信州大・繊維・応生系，[2]信州大・全学教育機構，[3]ホクトきのこ総合研）

4A09a04　表面の分子修飾による真菌の接着制御

9:33　°西村麻里江[1]，　中野美紀[2]，　三宅晃司[2]（[1](独)生物研，[2](独)産総研）

4A09a05　eIF5A による発現制御を受けるタンパク質の網羅的探索

9:44　°近藤直子[1,2]，　白井温子[1,6]，　松山晃久[1,3]，　夏目　徹[4]，浜本牧子[5]，吉田　稔[1,2,3]（[1]理研　化学遺伝，[2]東京大院農，[3]理研 CSRS，[4]産総研 創薬分子，[5]明治大院農，[6]理研 細胞記憶）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4A09a07　大腸菌のシステイン代謝に関わる新規 CysB レギュロン yciW 遺伝子の機能解析

10:05　°玉越　愛，河野祐介，大津厳生，高木博史（奈良先端大バイオ）

4A09a08　アミノ酸を単一炭素源として利用する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の解析

10:16　°西田郁久，大津厳生，渡辺大輔，高木博史（奈良先端大バイオ）

4A09a09　メチロトローフ酵母 *Pichia methanolica* の様々な炭素源による生育特性と AOD アイソザイムの発現誘導

10:27　°若山敬嗣，早川享志，中川智行（岐阜大応生）

4A09a10　ジペプチドによる細胞増殖阻害

10:38　°北村憲司（広島大・自然科学研セ）

4A09a11　出芽酵母において染色体からのセントロメア DNA の切り出し誘導時に出現する生存細胞の解析

10:49　°宮本昭弘, 柳本敏彰, 秦野琢之, 松崎浩明（福山大生命工）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4A09a13　グリコーゲン欠乏が出芽酵母の増殖と経時寿命に及ぼす影響

11:10　°山内雪菜，井澤真吾（京都工繊大工芸科学）

4A09a14　出芽酵母の *SSG1-1* 長寿変異株における遺伝子発現の解析

11:21　○小川貴史[1]，　椿山諒平[1]，　金井宗良[2]，　藤井　力[2]，平田　大[1]，水沼正樹[1]（[1]広島大院・先端研・分子生命，[2]酒総研）

4A09a15　高温・高圧ストレス下における酵母トリプトファン輸送体 Tat1 の安定性に関する解析

11:32　○望月貴博[1]，持田和範[1]，上村聡志[1]，阿部文快[1,2]（[1]青山学院大理工，[2]海洋研究開発機構）

4A09a16　出芽酵母のペプチド輸送体 Ptr2 の発現と機能解析

11:43　○河合　建[1]，上村聡志[1]，阿部文快[1,2]（[1]青山学院大院理工，[2]海洋研究開発機構）

4A09a17　出芽酵母のロイシン輸送体 Bap2 における機能部位の同定

11:54　宇佐美佑紀，望月貴博，上村聡志，○阿部文快（青山学院大・理工）

A10 会場　午前の部（9:22〜12:05）

微生物―細胞－構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子―

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

4A10a03　*Corynebacterium glutamicum* の細胞表層形成に関与する遺伝子の解析

9:22　○北原裕己[1]，　松田吉彦[2]，　和地正明[1]（[1]東工大院生命理工，[2]味の素(株)イノベーション研究所）

4A10a04　*Lactobacillus plantarum* の免疫調節作用に関わる因子の探索

9:33　○長井遼太[1]，　浜村南実[1]，　福井雄一郎[2]，　菅沼大行[2]，梶川揚申[1]，田中尚人[3]，佐藤英一[1]，岡田早苗[1]（[1]東農大応生科・化学，[2]カゴメ（株），[3]東農大・菌株）

4A10a05　乳酸菌における細胞壁テイコ酸の分布

9:44　○佐々木織江[1]，　梶川揚申[1]，　田中尚人[2]，　佐藤英一[1]，岡田早苗[1]（[1]東農大応生科・化学，[2]東農大・菌株）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4A10a07　New Insight Into the Surface of Living *Rhodobacter sphaeroides* Using the High-Speed Atomic Force Microscope

10:05　○Zachery Oestreicher[1]，Taoka Azuma[1,2]，Yoshihiro Fukumori[1,2]（[1]Kanazawa Univ. Sch. of Sci. and Tech., Fac. of Nat. Sys.，[2]Kanazawa Univ. Sch. of Sci. and Tech. Bio-AFM FSC）

4A10a08　生細胞タイムラプスイメージングによる原核細胞オルガネラ「マグネトソーム」の細胞内動態観察

10:16　○上杉知佳[1]，田岡　東[2,3]，森井　香[1]，福森義宏[2,3]（[1]金沢大院自然科学，[2]金沢大理工自然システム，[3]金沢大理工バイオ AFM）

4A10a09　*Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株が低栄養生育時に形成するオリゴボディーの機能解析

10:27　○藤好拓也[1]，　永井里奈[4]，　岩野　恵[1]，　西田倫希[2]，田口英次[2]，吉田信行[3]，高木博史[1]（[1]奈良先端大･バイオ，[2]阪大･超高圧電顕セ，[3]静大・工，[4]理研・生命システム・細胞場構造）

4A10a10　*Sphingomonas* 属細菌 A1 株の側べん毛関連および非関連遺伝子群による極単べん毛の形成

10:38　○丸山如江[1]，小林将大[1]，村田幸作[2]，橋本　渉[1]（[1]京大院・農，[2]摂南大・理工）

4A10a11　エノキタケ子実体由来接着タンパク質の抽出とその機能

10:49　○楮畑智代[1]，　泉　沙織[1]，　吉見慎太郎[1]，　小出芳栄[2]，片倉啓雄[1]，河原秀久[1]（[1]関西大化生工，[2]有限会社　一栄）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4A10a13　麹菌 *A. oryzae* における Ime2p 相同タンパク質の高発現による菌核内部での有性生殖器官形成の促進

11:10　○田中勇気，金　鋒杰，丸山潤一，北本勝ひこ（東大院農生科・応生工）

4A10a14　麹菌 *Aspergillus oryzae* の菌糸融合に培地成分が与える影響の解析

11:21　○塚崎和佳子，丸山潤一，北本勝ひこ（東大院農生科・応生工）

4A10a15　BiFC 法による麹菌 *Aspergillus oryzae* の菌糸融合の解析

11:32　○岡部知弥[1]，　塚崎和佳子[1]，　金　鋒杰[1]，　藤井郁雄[2]，丸山潤一[1]，北本勝ひこ[1]（[1]東大院農生科･応生工，[2]阪府大院･理）

4A10a16　Adjusting the cargo receptor composition of ER-Golgi secretoty pathway for enhancing heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*

11:43　○Huy Dung HOANG，　Jun-ichi MARUYAMA，Katsuhiko KITAMOTO（Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo）

4A10a17　麹菌の *PHO36* ホモログ破壊株を用いた植物由来オスモチンの生産

11:54　○伊藤大修[1]，　丸山潤一[1]，　永田宏次[2]，　田之倉優[2]，北本勝ひこ[1]（[1]東大院農生科・応生工，[2]東大院農生科・応生化）

A11 会場　午前の部（10:16〜12:05）

微生物―遺伝子－構造，機能，その他―

a08〜a11 発表者の接続時間 10:06〜10:16

4A11a08　アルコール依存症患者の糞便から分離した腸内細菌のアセトアルデヒド代謝

10:16　○下山武文[1]，　桑原明香[1]，　山口晴彦[1]，　大島健志朗[2]，服部正平[2]，　横山　顕[3]，　水上　健[3]，　堤　絵梨[4]，　諏訪芳秀[4]，戸塚ゆ加里[5]，中山　亨[1]（[1]東北大院工，[2]東大院新領域，[3]久里浜医療セ，[4]サントリー研究セ，[5]国立がん研究セ）

4A11a09　アルコール依存症患者の糞便中のアセトアルデヒド代謝と網羅的な腸内細菌叢解析

10:27　○中山　亨[1]，　桑原明香[1]，　斉藤祐太[1]，　下山武文[1]，須田　亙[2]，　大島健志朗[2]，　服部正平[2]，　森田英利[3]，　横山　顕[4]，水上　健[4]，堤　絵梨[5]，諏訪芳秀[5]（[1]東北大院工，[2]東大院新領域，[3]麻布大，[4]久里浜医療セ，[5]サントリー研究セ）

4A11a10　アセトアルデヒド蓄積微生物によるバイオフィルム形成と酸化ストレス応答

10:38　○鶴谷篤生[1]，　菅　将吾[1]，　斎藤祐太[1]，　坪　嵩久[1]，天間ナツキ[1]，　稲井　真[1]，　高橋征司[1]，　下山武文[1]，　横山　顕[2]，水上　健[2]，中山　亨[1]（[1]東北大院工，[2]久里浜医療センター）

4A11a11　水平伝播を利用したクローニングシステム（CMM）の汎用性

10:49　○金子真也[1]，板谷光泰[2]（[1]東工大・生命理工，[2]慶応大・先端生命研）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4A11a13　Bacillus cereus 細菌芽胞を標的とした DNA アプタマーの構築

11:10　○海谷慎一[1,2]，　梅影　創[1]，　菊池　洋[1]（[1]豊橋技科大，[2](公財)科技財団）

4A11a14　黄色ブドウ球菌の 2 成分性膜孔形成血球崩壊毒素 S 型成分の細胞特異性に関与する領域の解析（2）

11:21　○竹下珠由[1]，　長崎由依[1]，　神尾好是[2]，　田中良和[3]，金子　淳[1]（[1]東北大院農，[2]尚絅学院大健康栄養学，[3]北大院先端生命科学）

4A11a15　アカマツ菌根圏土壌の抗菌活性物質

11:32　○西野勝俊[1]，　城美沙緒[1]，　大泉一也[1]，　藤田　徹[2]，山田明義[3]，　田中千尋[1]，　笹森貴裕[4]，　時任宣博[4]，　平井伸博[1]（[1]京大院農，[2]京都府農水技セ，[3]信州大農，[4]京大化研）

4A11a16　麹菌が産生する hydrophobin RolA と固体表面間の相互作用に関する研究

11:43　○田中拓未[1]，　田邊弘毅[1]，　高橋　徹[2]，　冨樫貴成[3]，有田稔彦[4]，阿部敬悦[1,2]（[1]東北大院農，[2]東北大・未来研，[3]山形大理，[4]東北大・多元研）

4A11a17　世界のパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の多様性（2）

11:54 ○長野宏子[1]，村山美穂[2]，井上英治[2]，鈴木　徹[1]（[1]岐阜大連農，[2]京都大理学）

A14 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物—物質生産－酵素，タンパク質—

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4A14a01　ヒト腸内細菌 *Prevotella copri* のキシラナーゼ 10B の特性解析
9:00 ○田中芳貴[1]，今井裕也[2]，小林海渡[2]，林　秀謙[1,2]（[1]前工大院工，[2]前工大工）

4A14a02　ヒト腸内細菌 *Prevotella copri* のキシラナーゼ 10B 由来の新規 CBM の機能解析
9:11 ○小林海渡[1]，今井裕也[1]，田中芳貴[2]，松尾一郎[3]，林　秀謙[1]（[1]前工大工，[2]前工大院工，[3]群馬大理工）

4A14a03　*Variovorax* sp. 由来，及び *Burkholderia* sp. 由来組換え β-Phe アミノアシラーゼの性質解析
9:22 ○山崎　穣，竹澤俊大，加藤雄己，橋本賢一，川崎　寿，夏目　亮，中松　亘（東電大院工）

4A14a04　立体選択的に α - トリフルオロメチル乳酸アミドを加水分解する微生物酵素の精製と遺伝子クローニング，大腸菌による大量発現
9:33 ○渡部俊介[1]，冨宿賢一[1]，西井哲郎[3]，石井章央[3]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO，[3]セントラル硝子）

4A14a05　麹菌の凝乳酵素の機能解析
9:44 ○田久陽子，岡本綾子，前田　浩，山形洋平，竹内道雄（東京農工大院・応生化）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4A14a07　麹菌ペプスタチン非感受性プロテアーゼの機能解析
10:05 ○竹内真理衣，岡本綾子，阿保春花，前田　浩，山形洋平，竹内道雄（東京農工大院・応生化）

4A14a08　*Listeria* 属由来キチナーゼの発現と性質の解析
10:16 ○本田翔太郎，菅原康里，小山文隆，坂口政吉（工学院大学　工学部　応用化学科）

4A14a09　変異導入による超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 由来の PH0459 のデハロゲナーゼ活性またホスファターゼ活性強化
10:27 ○殷　梓蘭，中村　卓（長浜バイオ大）

4A14a10　*Aspergillus oryzae* KB 株によるフルクトース転移酵素の生産条件
10:38 ○倉掛昌裕，兼国将一，古賀雅紀，芝田美幸，廣津紗弥（福山大 生命工学）

4A14a11　大腸菌でのプラスミド改変よるセルラーゼ発現への効果
10:49 ○岸川昭太郎[1,2]，渡部　暁[3]，木川隆則[3,4,5]，大熊盛也[1,2]，村田武英[1]，小幡裕一[1,2]（[1]理研バイオリソースセンター，[2]理研バイオマス工学研究プログラム，[3]理研生命システム研究センター，[4]理研イノベーション推進センター，[5]東京工業大学）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4A14a13　γ グルタミル基転移反応によるペプチドの呈味性の改善
11:10 ○田村友規，鈴木秀之（京都工芸繊維大学工芸科学部）

4A14a14　スチレンモノオキシゲナーゼ発現 *Kocuria rhizophila* DC2201 を用いた立体選択的エポキシド生産システム
11:21 ○大内卓也[1]，今江龍太[1]，戸田　弘[1,2]，伊藤伸哉[1,2]（[1]富山県大・生物工，[2]富山県大・生工研セ）

4A14a15　シークワァーサー由来フラボノイド O-メチルトランスフェラーゼのクローニングおよび機能解析
11:32 伊藤伸哉[1,2]，○戸田　弘[1,2]，岩田知沙[2]（[1]富山県大・生工研セ，[2]富県大工・生物工）

4A14a16　PCR 法により取得したメタゲノム由来新規短鎖アルコール脱水素酵素遺伝子とその翻訳産物の諸性質
11:43 ○黒川純司，狩谷理美，礒谷健太郎，伊藤伸哉（富山県大・工・生物工）

4A14a17　好熱性 enoate reductase の探索と特性解析および疎水性細菌を発現宿主とした脂溶性キラル化合物生産への応用
11:54 ○本田孝祐，辻　直人，岡野憲司，大竹久夫（阪大院工）

A15 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物—代謝－代謝調節，発酵生理，メタボローム—

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4A15a01　システイン合成に利用できる新規硫黄同化経路の同定と機能解析
9:00 ○高橋砂予，大津巌生，高木博史（奈良先端大）

4A15a02　硫黄中間代謝産物の動態解析による大腸菌のチオ硫酸硫黄転移酵素 GlpE の機能解析
9:11 ○河野祐介，大津巌生，高木博史（奈良先端大・バイオ）

4A15a03　超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株における TCA バイパス経路の解析
9:22 ○矢野嵩典[1]，吉田信行[2]，高木博史[1]（[1]奈良先端大･バイオ，[2]静大・工）

4A15a04　*Methylobacterium extorquens* のメタノール生育におけるレアアース要求性とその役割
9:33 ○日比野歩美[1]，三井亮司[2]，谷　明生[3]，田代晋也[1]，早川享志[1]，中川智行[1]（[1]岐阜大院応生，[2]岡山理大理，[3]岡山大資植研）

4A15a05　*Pichia pastoris* フルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼアイソザイムの機能とメタノール代謝における役割
9:44 ○福岳寛隆，早川享志，中川智行（岐阜大院応生）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4A15a07　*Streptomyces coelicolor* A3(2)M145 における窒素酸化物によって制御される遺伝子群の解析
10:05 ○小川翔大，草間慎一朗，杉浦　遼，田瀬有紀，伊藤晋作，矢嶋俊介，祥雲弘文，佐々木康幸（東農大・応生・バイオ）

4A15a08　放線菌の新規窒素代謝系における生産物調節因子の解明
10:16 ○信田啓介，小口　悠，棚橋月子，矢嶋俊介，伊藤晋作，祥雲弘文，佐々木康幸（東農大・応生・バイオ）

4A15a09　放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)M145 における内在的 NO の生理的意義の解明
10:27 ○平田卓也，田瀬有紀，小林卓矢，小口　悠，伊藤晋作，矢嶋俊介，祥雲弘文，佐々木康幸（東農大・応生・バイオ）

4A15a10　*Streptomyces coelicolor* A3(2)M145 における SoxR の機能解析
10:38 ○田瀬有紀，小林卓矢，杉浦　遼，草間慎一朗，矢嶋俊介，伊藤晋作，祥雲弘文，佐々木康幸（東農大・応生・バイオ）

4A15a11　*Streptomyces coelicolor* A3(2)M145 における窒素酸化物受容タンパクの機能解析
10:49 ○草間慎一朗，杉浦　遼，田瀬有紀，小川翔大，矢嶋俊介，伊藤晋作，祥雲弘文，佐々木康幸（東農大・応生・バイオ）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4A15a13　*n*-アルカン資化性酵母 *Yarrowia lipolytica* における 12 種のシトクロム P450ALK の機能解析
11:10 ○岩間　亮[1]，小林　哲[1]，堀内裕之[1]，太田明徳[2]，福田良一[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]中部大・応生・応化）

4A15a14　ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ活性型変異体を発現させた脂質蓄積性出芽酵母の解析
11:21 ○神坂　泰，木村和義，植村　浩，山岡正和（産総研生物プロセス）

4A15a15　*Aspergillus terreus* のイタコン酸生産におけるシス・アコニット酸デカルボキシラーゼの重要性
11:32 ○篠田　優[1]，山田智士[2]，朴　龍洙[3]，荒井基夫[1]，金政　真[1]（[1]中部大･環境生科，[2]中部大院･応生，[3]静岡大･グリーン科技研）

4A15a16　クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* におけるシアン非感受性呼吸系酵素遺伝子(*aox1*)の高発現によるクエン酸生産量の向上

11:43　◦田中　珠，服部貴澄，小林慶一，桐村光太郎（早大理工・応化）

4A15a17　発酵熱の生成機構に関する研究

11:54　◦西村佳祐[1]，　伊藤智和[1]，　高橋克忠[2]，　羽田亜紀[2]，邊見　久[1]，吉村　徹[1]（[1]名大院生命農，[2]けいはんな文化学術協会微生物計測システム研究所）

B04 会場　午前の部（9:11〜11:43）

食品―食品化学－その他―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

4B04a02　プロテアーゼ処理をした 100% 米粉パンの香気成分

9:11　◦小西康子[1]，本多千咲[1]，笹木哲也[2]（[1]石川県大食品，[2]石川工試）

4B04a03　にがり成分が食塩の呈味性に及ぼす影響

9:22　◦遠藤由香，石川匡子（秋田県立大学院生物資源）

4B04a04　マウスを利用した香辛料抽出物による塩味増強評価

9:33　◦安室憲一[1]，　河合崇行[2]，　日下部裕子[2]，　足立謙次[1]，安部　忍[1]，濱口　隆[1]（[1]小川香料(株)，[2]農研機構　食品総合研究所）

4B04a05　半脱脂米糠麹による酵素生産と糖化液の特徴

9:44　◦鬼島直子[1,2]，　勝見直行[1]，　遠藤修二郎[3]，　川瀬　蓮[4]，小関卓也[5]（[1]山形県農業総合研究センター，[2]宮城大学大学院食産業，[3]三和油脂株式会社，[4]サンブラン株式会社，[5]山形大学農）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4B04a07　梅酢由来ポリフェノール調製物(UP)の構成化合物の解明

10:05　◦堀西朝子[1]，　葛巻里紗[1]，　部屋雄一[1]，　多中良栄[2]，三宅靖仁[2]，　高垣昌史[2]，　森　　一[2]，　岸田邦博[1]，　尾崎嘉彦[1]（[1]近畿大・生物理工，[2]和歌山県工技セ）

4B04a08　*Rosa gallica* の花弁に含まれるヒスチジン脱炭酸酵素阻害成分の探索

10:16　◦秋本　梢[1]，　渡邉裕香[2]，　新田陽子[2]，　植野洋志[1]，小林慧子[1]，菊崎泰枝[1]（[1]奈良女子大院，[2]岡山県立大保健福祉）

4B04a09　マヌカ蜂蜜に特有な Leptosin の質量分析による検出定量と認証評価

10:27　◦加藤陽二[1]，　藤中里衣[1]，　石坂朱里[1]，　北元憲利[1]，瀧本陽介[2]（[1]兵庫県大環境人間，[2](株)ヘルスケアシステムズ）

4B04a10　ワインに含まれるレスベラトロール誘導体の検出

10:38　吉田知夏[1]，　來住明宣[2]，　松川泰治[2,3]，　茶山和敏[3]，◦細谷孝博[1]，熊澤茂則[1]（[1]静岡県大食栄，[2]ユーハ味覚糖，[3]静岡大自然科学）

4B04a11　セネガル産プロポリスに含まれる成分と生理活性に関する研究

10:49　乾沙王里[1]，細谷孝博[1]，吉積一真[2]，佐藤　一[3]，◦熊澤茂則[1]（[1]静県大院食栄，[2](株)ファンケル，[3]ブルカー・バイオスピン(株)）

a13〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4B04a13　枯草菌における EGCg と相互作用する菌体表層タンパク質の解析

11:10　◦島谷佳奈果[1]，　中山素一[1]，　小澤忠弘[1]，　富山大輔[1]，湯井幸治[1]，野中　愛[2]，香月真央[2]，宮本敬久[3]（[1]花王(株)・安全性科学研，[2]九大・生資環，[3]九大院・農）

4B04a14　水気耕栽培の食品学的利用に関する研究

11:21　◦後藤英子（実践女子大学）

4B04a15　各種清酒の水素・酸素安定同位体比

11:32　◦橋口知一，伊豆英恵，橋本知子，藤田晃子，藤井　力（酒類研）

B05 会場　午前の部（9:11〜12:05）

食品―食品機能・栄養－神経，内分泌―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

4B05a02　ローズマリー(*Rosmarinus officinalis*)精油成分の神経分化促進作用による抗ストレス作用

9:11　◦池谷亜有美[1]，HAN Junkyu[1,3]，NEFFATI Mohamed[2]，礒田博子[1,3]（[1]筑波大院生命環境，[2]チュニジア国立乾燥地研究所，[3]北アフリカ研究センター）

4B05a03　大豆由来の新規ペプチドは経口投与により迷走神経を介して抗不安作用を示す

9:22　◦太田愛美[1]，水重貴文[1]，金本龍平[1]，鈴木秀幸[2]，柴田大輔[2]，大日向耕作[1]（[1]京都大院農，[2]公益財団法人かずさ DNA 研究所）

4B05a04　牛乳由来ペプチド Tyr-Leu-Gly の海馬神経新生作用および抗うつ作用

9:33　◦内田朋希[1]，　水重貴文[1,2]，　金本龍平[1]，　大日向耕作[1]（[1]京大院農，[2]京大学際融合生理化学）

4B05a05　海馬神経新生を誘導する抗うつジペプチド Tyr-Leu の標的受容体同定

9:44　◦水重貴文[1,2]，石田祐己[2]，金本龍平[2]，大日向耕作[2]（[1]京大学際融合，[2]京大院農食品生物）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4B05a07　柑橘系香気成分を含む飲料が自律神経活動や気分状態におよぼす影響

10:05　◦山崎英恵[1]，高田浩平[2]，豊嶋麻里[2]，伏木　亨[2]（[1]龍谷大，[2]京都大院農）

4B05a08　脂質と糖質の嗜好性における opioid の寄与の違い

10:16　◦坂本和洋，岡橋達也，岡藤洋子，松村成暢，都築　巧，井上和生，伏木　亨（京都大院農）

4B05a09　認知症モデルマウスを用いた脳老化に対するカルノシンの予防・改善作用の解明

10:27　◦金子　順，芝原　恵，久恒辰博（東大院新領域）

4B05a10　中高齢者の脳老化予防に対する高機能食品成分の作用を検証する心理機能検査法の確立

10:38　◦貴田潤平，樋口陽太，芝原　恵，藤永梨沙，金子　順，久恒辰博（東京大学）

4B05a11　Accumulation of flavonoids quercetin and luteolin in SH-SY5Y cells and their effects on Monoamine oxidase-A

10:49　◦Yauhen Bandaruk，Rie Mukai，Junji Terao（University of Tokushima）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4B05a13　フィタン酸によるヒストン脱アセチル化酵素活性化を介した Neuro2a 細胞に対する毒性作用

11:10　◦長井　薫（山梨大院医工総合）

4B05a14　ポリフェノール類によるヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)活性制御と神経機能調節

11:21　◦名取貴光[1,2]，長井　薫[2]（[1]山梨学院大・健・管理栄養，[2]山梨大院・医・環境遺伝医学）

4B05a15　離乳期マウスの大脳皮質味覚野・体性感覚野におけるカプサイシン応答領域の解析

11:32　◦匂坂美輝，成川真隆，三坂　巧（東大院農生科･応生化）

4B05a16　trans,trans-2,4- デカジエナールの経口投与によるラット胃排出遅延作用

11:43　◦矢萩明日香[1]，　比良　徹[2]，　西山千草[3]，　山下貴稔[3]，今義　潤[3]，原　　博[2]（[1]北海道大･農･生機化，[2]北海道大･院農･応生科，[3](株)J-オイルミルズ　油脂開発研究所）

4B05a17　米糠・胚乳ペプチドはラットにおいて GLP-1 分泌を促進し，血中 GLP-1 の Active／Total 比を高める

11:54　◦石川結貴[1]，　比良　徹[1]，　原田幸和[2]，　橋本博之[2]，

藤井幹夫[3]，門脇基二[4]，原　博[1]（[1]北大院農応生科，[2]築野食品工業株式会社　基礎研究部，[3]亀田製菓株式会社　お米研究所，[4]新潟大院・自然研）

B06 会場　午前の部（10:05〜12:05）

食品—食品機能・栄養－癌—

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4B06a07　食品中機能性分子の組合せによる相乗的抗腫瘍活性の可能性
10:05　◦岩崎公典，屋　宏典（琉大熱生研）

4B06a08　キクイモ塊茎に含まれる前立腺ガン細胞増殖抑制成分の探索
10:16　◦柴田祥平，竹花駿平，白岩雅和（茨城大院農・食品生化）

4B06a09　ヒト乳腺細胞および乳がん細胞におけるカテコールアミンによる β-シグナリングによおぼす quercetine-3-O-glucuronide の影響
10:27　◦山崎隼輔[1]，三好規之[2]，保田倫子[2]，下位香代子[1,2]（[1]静岡県立大院生活健康，[2]静岡県立大院薬食生命）

4B06a10　中枢神経系癌細胞の細胞周期タンパク質に対するグリチルレチン酸の影響
10:38　伊藤大輔[1]，川瀬裕太[1]，清水涼平[1]，田中大樹[1]，上家勝芳[2]，木立由美[2]，野下俊朗[3]，梅津博紀[4]，猟山一雄[2]，◦山口秀明[1]（[1]名城大薬，[2]青森大薬，[3]県立広島大生命環境，[4]岐阜聖徳学園短大生活）

4B06a11　サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツの抽出物による HL-60 細胞のアポトーシス誘導
10:49　◦章　超[1,3]，坂尾こず枝[2]，小野友愛[2]，高瀬良和[3]，岩井謙一[3]，侯　徳興[1,2]（[1]鹿大・連合農，[2]鹿大，[3]霧島酒造）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4B06a13　トコトリエノールによる癌細胞増殖抑制とフェルラ酸の相乗効果
11:10　◦永塚貴弘[1]，舘脇直人[1]，西田浩志[1]，仲川清隆[2]，宮澤陽夫[2]（[1]新潟薬大応生化，[2]東北大院農機能分子解析）

4B06a14　ホウレン草糖脂質 MGDG と抗がん剤ゲムシタビンのヒト膵臓がん細胞増殖抑制活性と抗腫瘍活性の相乗効果
11:21　◦水品善之[1,2]，赤坂浩亮[3]，吉田賢史[3]，高山いずみ[3]，吉田弘美[1]，佐々木良平[3]（[1]神戸学院大・栄養，[2]神戸学院大・LSC，[3]神戸大院・医）

4B06a15　67-k Da Laminin Receptor は 慢性リンパ性白血病患者における EGCG の感受性を規定する因子である
11:32　◦熊添基文[1]，塚本俊太郎[1]，Shanafelt Tait[2]，Kay Neil[2]，山田耕路[1]，立花宏文[1,3]（[1]九大院農院・生機科，[2]メイヨークリニック，[3]九大食品機能デザイン）

4B06a16　ルテオリンによる AhR-Nrf2 経路を介した薬物代謝系調節能の解明
11:43　◦木村有希，姜　嵩岩，芦田　均（神戸大院農）

4B06a17　白金ナノ粒子及び分子状水素の併用処理によるガン細胞のアポトーシス誘導機構
11:54　◦中西　恵[1]，村田みさと[1]，福永有紗[1]，濱崎武記[3]，樺山　繁[4]，照屋輝一郎[2]，白畑實隆[2]（[1]九大院シス生，[2]九大院生資環，[3]九大院農院生機科，[4]日本トリム）

B07 会場　午前の部（9:22〜11:43）

食品—食品機能・栄養－ビタミン，ミネラル—

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

4B07a03　ビタミン B_{12} 欠乏による酸化ストレスが線虫(*Caenorhabditis elegans*)の記憶・学習能に及ぼす影響
9:22　◦美藤友博，薮田行哲，河野　強，渡辺文雄（鳥取大院連合農学）

4B07a04　α-トコフェロールが α-トコフェロール輸送タンパク質(α-TTP)の細胞内局在に与える影響
9:33　◦依包智行，佐藤道夫，竹中麻子（明治大院農）

4B07a05　細胞外マトリクスが α-トコフェロール輸送タンパク質遺伝子発現に及ぼす影響
9:44　◦江口　岳[1]，尾崎　依[1]，小田裕昭[2]，竹中麻子[1]（[1]明治大院農，[2]名古屋大院・生命農学研究科）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4B07a07　トコトリエノールがビタミン E 欠乏による不安行動におよぼす影響
10:05　◦内山　智，中間未祈子，原田健史，竹中麻子（明治大農）

4B07a08　ビタミン K 欠乏食による KK-A^y マウスのインスリン分泌能・感受性の変化
10:16　◦白川　仁，平原啓甫，後藤知子，駒井三千夫（東北大院農）

4B07a09　海藻アカモクの食用加工によるミネラル含量への影響
10:27　◦村上　香，岡　聡子，江島　潤，小田涼太（広島工業大学）

4B07a10　共役アッセイ法を用いたヒト肺由来セレノリン酸合成酵素の機能解析
10:38　◦鎌田早帆，奥河内貴大，稲垣賢二，田村　隆（岡山大院・環境生命）

4B07a11　四物湯(漢方薬)による造血促進効果
10:49　◦陳　風霞，大塚紗恵，芋岡佑里奈，パズリジャンイスカンダル，篠田粧子（首都大院人）

a13〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4B07a13　亜鉛欠乏予防に向けた食品由来の亜鉛吸収促進因子の探索
11:10　◦橋本彩子[1]，木津久美子[2]，宮前友策[1]，増田誠司[1]，永尾雅哉[1]，成田宏史[3]，神戸大朋[1]（[1]京大院生命・統合生命，[2]大阪成蹊短大・総合生活，[3]京女大・家政・食物栄養）

4B07a14　亜鉛トランスポーター ZIP4 発現促進活性を示す大豆サポニン分子の機能評価
11:21　◦岡本亘弘[1]，桑室慶考[1]，大倉克摩[1]，橋本彩子[2]，永尾雅哉[2]，神戸大朋[2]，入江一浩[3]，高橋正和[1]（[1]福井県大院生物資源，[2]京大院生命・統合生命，[3]京大院農・食生科）

4B07a15　新規ナノ化食品の吸収性向上に関する研究
11:32　◦丸　勇史[1]，樽井一也[1]，山下裕輔[1]，木村信之[2]，加賀美和宏[2]，金　武祚[1]（[1]ファーマフーズ，[2]アクティバスファーマ）

C02 会場　午前の部（9:11〜12:05）

動物—無脊椎動物－生理，細胞，遺伝子，タンパク質—

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

4C02a02　線虫 *Caenorhabiditis elegans* の休眠打破物質の単離と受容体の探索
9:11　◦河野　強，大道由香里，竹歳悠希，岩崎　崇，一柳　剛（鳥取大農）

4C02a03　ブドウ抽出物 ANOX-R5 が線虫 *C.elegans* に与える影響の検討
9:22　◦高橋航大[1]，真野　貴[2]，笹川　昇[1]（[1]東海大工，[2]日本薬品株式会社）

4C02a04　ケナガコナダニからの Δ 12-desaturase 遺伝子同定
9:33　◦網干貴子，櫻谷英治，田中晃一，島　純，小川　順，西田律夫，天野　洋，桑原保正，森　直樹（京大院農）

4C02a05　フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* の脂肪酸不飽和化酵素 delta 9-および delta 12-desaturase のクローニングと酵素活性測定
9:44　◦小沼貴裕[1]，網干貴子[2]，吉永直子[2]，森　直樹[2]，長澤寛道[1]，永田晋治[3]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]京大院農・応生科，[3]東大院・新領域・先端生命科学）

a07〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4C02a07　フタホシコオロギにおける摂食行動を制御する神経ペプチドの網羅的変動解析
10:05　◦塚本悠介，永田晋治（東大院・新領域・先端生命）
4C02a08　フタホシコオロギの選好性摂食行動の自動計測システム作成
10:16　◦永田晋治（東大院新領域）
4C02a09　ボンビコール産生メカニズムに関与するリパーゼの解析
10:27　◦大西　敦[1,2]，松本正吾[2]（[1]帝京平成大薬，[2]理研分子昆虫）
4C02a10　カイコガ性フェロモン生合成活性化神経ペプチド受容体のホモロジーモデリングおよびリガンドとのドッキングシミュレーション
10:38　◦永田宏次[1]，河合岳志[1]，郭　琳君[1]，劉　徳生[1]，鈴木達也[1]，片山幸江[1]，早川　江[1]，李載みん[2]，永峰俊弘[2]，Hull J. Joe[3]，松本正吾[2]，長澤寛道[1]，田之倉優[1]（[1]東大院農生科，[2]理研，[3]米農務省）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4C02a13　リフォールディングによるヨトウガ PTTH の作製とその活性
11:10　◦星川珠莉，伊賀正年，齋藤一樹，片岡宏誌（東大・新領域・先端生命）
4C02a14　クマムシの乾眠誘導機構の解析
11:21　◦近藤小雪，久保健雄，國枝武和（東京大学）
4C02a15　軟体動物におけるレチノイン酸シグナルおよび幹細胞関連遺伝子の組織再生への関与
11:32　◦中間　翼，渡邊弘明，中野春男，梅村真理子，高橋　滋，高橋勇二（東京薬科大学　生命科学部　環境応用動物学研究室）
4C02a16　小笠原海溝に生息する超深海性ヨコエビの消化酵素
11:43　◦小林英城，荒井　渉，高見英人（海洋機構）
4C02a17　重イオンビーム照射によるキイロショウジョウバエ変異系統の樹立系構築
11:54　◦常泉和秀，阿部知子（理化学研究所　仁科加速器研究センター　生物照射チーム）

C03 会場　午前の部（9:11〜12:05）

動物—細胞－情報伝達，細胞応答—

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

4C03a02　PCTK3 は cyclin A 及び PKA によって活性調節を受け，アクチン動態を制御する
9:11　◦松田真弥，小湊恭平，小出静代，宮本賢治，辻　明彦，湯浅恵造（徳島大・STS）
4C03a03　高温ストレス下における細胞周期制御機構の解析
9:22　◦遠藤里佳子，針谷香澄，吉川博文，千葉櫻拓（東農大・応生科・バイオ）
4C03a04　歯胚発生における Lgr4 の機能解析
9:33　◦山上友希子，大山一徳，毛利泰彰，西森克彦（東北大院農）
4C03a05　アーユルヴェーダハーブのヒト毛乳頭細胞における遺伝子発現への効果
9:44　◦米倉佑香[1]，Mohammad N Hossain[1]，三木健輔[1]，山下律郎[2]，藤井道彦[1]，鮎沢　大[1]（[1]横浜市大院生命ナノ，[2]㈱SLH BCL カンパニー）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4C03a07　粘膜型マスト細胞分化における Notch シグナルと IL-3 シグナルの協調作用
10:05　◦中野信浩[1]，西山千春[1,2]，奥村　康[1]，小川秀興[1]（[1]順天堂大・医，[2]東京理科大・基礎工）
4C03a08　ニワトリ胚中脳視蓋発生の間の層および細胞特異的マーカーの発現解析
10:16　◦中田　洸[1]，小野寺望[2]，荒木功人[1,2]（[1]岩手大院工，[2]岩手大院連合農）
4C03a09　ニワトリ網膜内 peptidylarginine deiminase type I ならびに type III の機能解析
10:27　◦清水　明[1]，井尻怜果[3]，本田智則[3]，小島俊雄[1,3]，高坂哲也[2]，高原英成[1,3]（[1]東京農工大院連合農学，[2]静岡大農，[3]茨城大農）
4C03a10　分泌型ホスホリパーゼ A2 は神経栄養因子からのシグナルを増強する
10:38　◦畢　純，オハンチメグ，北本勝ひこ，有岡　学（東大院農生科・応生工）
4C03a11　シアル酸認識レクチン Siglec によるマクロファージの活性制御
10:49　◦樋口廣士，庄司　徹，西島謙一，飯島信司（名大院工）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4C03a13　TSLP による KU812F 細胞の好塩基球機能亢進
11:10　◦原　崇，伊藤達城，城斗志夫（新潟大農）
4C03a14　食道扁平上皮がん細胞に対する UCN-01 の放射線感受性増強活性
11:21　◦小泉幸央，岳　発貴，小代田宗一，杉山俊博（秋田大院医）
4C03a15　旋回振とうによる流体刺激が MG-63 骨肉腫細胞株に引き起こす力学応答の特性について
11:32　◦深田　尚，杉本憲治（大阪府大院生命環境）
4C03a16　Regulatory effect of terpene compounds on melanogenesis signal transduction pathways in B16 murine melanoma cells
11:43　◦Myra VILLAREAL，Junkyu HAN，Hideyuki SHIGEMORI，Hiroko ISODA（University of Tsukuba）
4C03a17　メラノサイトの機能に影響を及ぼすアーユルヴェーダハーブの探索
11:54　◦十文字浩美[1]，三木健輔[1]，モハマドナジールホサイン[1]，山下律朗[2]，藤井道彦[1]，鮎沢　大[1]（[1]横浜市大･生命ナノ，[2]㈱SLH BCL カンパニー）

C04 会場　午前の部（9:00〜12:05）

植物—タンパク質，酵素－機能，調節—

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4C04a01　抗菌性蛋白質 AFP1 のイネ植物体表面処理によるイネいもち病菌の感染抑制効果の検証
9:00　◦提箸祥幸[1]，芦澤武人[2]，高久洋暁[3]，矢頭　治[2]（[1]農研機構･北農研，[2]農研機構・中央農研，[3]新潟薬大・応生科）
4C04a02　ダイズにおけるイソフラボン主骨格生合成酵素群のタンパク質相互作用解析
9:11　◦和氣駿之[1]，本橋令子[2]，高橋征司[1]，中山　亨[1]（[1]東北大院工，[2]静岡大農）
4C04a03　ダイズにおけるイソフラボン　7-O-グルコシルトランスフェラーゼ相同遺伝子の包括的機能解析
9:22　◦船木亜由太，和氣駿之，高橋征司，中山　亨（東北大院工）
4C04a04　短鎖シス型プレニルトランスフェラーゼの基質認識機構
9:33　◦沓川　諒，末永美樹，高橋征司，中山　亨（東北大院工）
4C04a05　ヤセウツボ発芽種子で発現する糖加水分解酵素の機能解析
9:44　◦東久保諒[1]，ギリモグレゴリー[1]，若林孝俊[1]，水谷正治[2]，杉本幸裕[2,3]，關　光[1]，村中俊哉[1]，岡澤敦司[3,4]（[1]阪大院・工・生命先端，[2]神大院・農・生命機能科，[3]JST/JICA・SATREPS，[4]阪府大院・生命環境・応生科）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4C04a07　トマトにおけるアスコルビン酸生合成酵素ガラクツロン酸レダクターゼの生理機能と発現調節

10:05 ○末川麻里奈，藤川愉吉，江坂宗春（広島大院生物圏）

4C04a08　シロイヌナズナのペルオキシソーム輸送におけるカタラーゼのヘム結合領域の機能解析

10:16 ○遠藤聡至[1]，藤川愉吉[1]，真野昌二[2]，林　誠[3]，西村幹夫[2]，江坂宗春[1]（[1]広大院生物圏，[2]基生研高次細胞機構，[3]長浜バイオ大バイオサイエンス）

4C04a09　アセロラのアスコルビン酸生合成酵素 GDP-D- マンノースピロホスホリラーゼ遺伝子のプロモーター解析

10:27 ○近藤隆之，藤川愉吉，江坂宗春（広島大院生物圏）

4C04a10　NPP1 は高温・高 CO_2 環境下における成長およびデンプン蓄積を負に制御する

10:38 ○金古堅太郎[1]，猪俣拓也[2]，増井貴広[2]，伊藤紀美子[2]，ハビアポズエタ-ロメロ[3]，三ツ井敏明[1,2]（[1]新潟大農・応生化，[2]新潟大院・自然科学，[3]バイオ研・CSIC&UPNA）

4C04a11　シロイヌナズナシグナルペプチドペプチダーゼ（AtSPP）の基質探索の為のリポーターアッセイ系の構築

10:49 ○星　雅子[1]，前田達哉[2]，石丸喜朗[1]，阿部啓子[1,3]，朝倉富子[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東京大学 分子細胞生物学研究所，[3]神奈川科学技術アカデミー）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4C04a13　シロイヌナズナのセリン生合成を担うリン酸化経路とその制御

11:10 ○岡村英治，平井優美（理研 CSRS）

4C04a14　CP12-GAPDH-PRK 複合体形成によるカルビン回路調節機構の解明

11:21 ○松村浩由[1]，清水伸隆[2]，木津奈都子[1]，吉田将康[1]，荒武将弘[1]，溝端栄一[1]，田茂井政宏[3]，和田野晃[4]，重岡　成[3]，井上　豪[1]（[1]阪大院工，[2]高エネ機構物構研，[3]近畿大農，[4]阪府大院生環科）

4C04a15　低温ストレスに応答するイネ由来熱ショックタンパク質 Hsp70 の X 線結晶構造解析

11:32 ○落合秋人，菅井　寛，原田　計，田中孝明，谷口正之（新潟大院自然研）

4C04a16　ジベレリン生合成・代謝酵素の X 線結晶構造解析

11:43 ○竹原清日[1]，三上文三[2]，樫尾　徹[1]，松岡　信[1]，上口(田中)美弥子[1]（[1]名大・生物機能開発利用研究センター，[2]京大院農・応用生命）

4C04a17　ストリゴラクトン受容体 D14 の DELLA 相互作用に関わる構造基盤の解析

11:54 ○宮川拓也[1]，薛　友林[1]，中村英光[1]，侯　峰[1]，秦　慧民[1]，福井康祐[1]，石　玄[1]，伊藤瑛海[2]，伊藤晋作[1]，PARK Seung-Hyun[1]，宮内裕美子[1]，浅野敦子[1]，戸塚直哉[1]，上田貴志[2]，浅見忠男[1,3]，田之倉優[1]（[1]東大院農生科，[2]東大院理，[3]JST・CREST）

C05 会場　午前の部（9:00〜12:05）

植物—情報伝達，細胞応答，分化—

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4C05a01　イネの免疫反応を誘導するエフェクタータンパク質 IPPT の同定と機能解析

9:00 ○柳生暁輝[1]，近藤真千子[2]，宮田千加[1]，蔡　晃植[1,2]（[1]長浜バイオ大院バイオサイエンス，[2]長浜バイオ大バイオサイエンス）

4C05a02　イネの PAS ドメインを有する MAP3K の機能について

9:11 ○高岡翔平[1]，深山　浩[1]，松岡大介[1]，南森隆司[1,2]（[1]神戸大院・農，[2]神戸大・遺伝子実験センター）

4C05a03　高等植物細胞周期停止因子の分解にオートファジーは関与するのか？

9:22 ○関　史恵，大熊康仁，高橋伸明，豊増知伸，三橋　渉（山形大学農学部）

4C05a04　シロイヌナズナ T87 培養細胞の葉緑体分化に際した転写制御の解析

9:33 ○木山貴史，江波和彦，上原浩一，華岡光正（千葉大院園芸）

4C05a05　気孔閉口シグナル伝達因子としてのカルボニル化合物

9:44 ○村田芳行[1]，Islam Md. Moshiul[1]，松島大貴[1]，叶　文秀[1]，宗正晋太郎[1]，中村宜督[1]，真野純一[2]（[1]岡大院環境生命，[2]山口大院農）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4C05a07　AM 菌共生シグナルによる共生関連遺伝子発現誘導における植物ホルモンの関与

10:05 ○秋山康紀，河原千春（阪府大院・生命環境）

4C05a08　イネは EF-Tu タンパク質の N 末端ペプチドである elf18 とは異なる領域を認識して免疫反応を誘導する。

10:16 ○稲垣宏明，古川岳人，高井亮太，平井洋行，蔡　晃植（長浜バイオ大院バイオ）

4C05a09　高等植物・エンドファイト共培養液中の生理活性因子に関する研究

10:27 ○西垣舞穂，小川拓水，岡澤敦司，太田大策（大阪府大院・生命環境）

4C05a10　植物免疫活性化ペプチド PIP-1 の分解と防御応答誘導の関係

10:38 ○金　容賢，宮下正弘，宮川　恒（京都大院農）

4C05a11　植物免疫活性化ペプチド PIP-1 の環状化による分解耐性の向上

10:49 ○眞重るり，安西友里恵，宮下正弘，宮川　恒（京都大院農）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4C05a13　イネ *OsREX1-S* 遺伝子は植物細胞の DNA 修復能を高め，カドミウム及び紫外線耐性を向上させる

11:10 ○國廣俊太[1]，木幡　光[1]，近藤陽一[2]，高橋真哉[2]，松井　南[2]，ベルベリッヒトーマス[3]，ユセフィアンショハブ[4]，日出間純[1]，草野友延[1]（[1]東北大院生命，[2]理研，[3]BiK-F，[4]秋田県立大）

4C05a14　イネにおけるジテルペン型ファイトアレキシン生産を負に制御する bZIP 型転写因子の機能解析

11:21 ○宮本皓司[1,3]，西澤洋子[2]，南　栄一[2]，野尻秀昭[3]，山根久和[1,3]，岡田憲典[3]（[1]帝京大バイオ，[2]農生資研，[3]東大生物工学セ）

4C05a15　イネの転写因子 DPF によるジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の転写活性化に関わるシス因子の解析

11:32 ○山村千紘[1,2]，水谷恵美[1,2]，福島説子[1]，前田　哲[1]，松下　茜[1]，鎌倉高志[2]，岡田憲典[3]，山根久和[3,4]，高辻博志[1]，森　昌樹[1]（[1]農業生物資源研，[2]東理大・理工，[3]東大・生物生産工学研究センター，[4]帝京大・バイオサイエンス）

4C05a16　イネのジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の発現を制御する転写因子 DPF の機能解析

11:43 ○堤　涼[1]，宮本皓司[1,2]，山根久和[1,2]，野尻秀昭[1]，森　昌樹[3]，岡田憲典[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]帝京大・バイオ，[3]農生資研）

4C05a17　蘚類ハイゴケにおけるモミラクトン A 合成酵素遺伝子の単離と機能解析

11:54 ○藤原　薫[1,3]，宮崎　翔[2]，宮本皓司[1,4]，竹村哲雄[3]，山根久和[1,4]，野尻秀昭[1]，野崎　浩[5]，林謙一郎[5]，川出　洋[2]，岡田憲典[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]東京農工大院・農，[3]東京理科大・理，[4]帝京大・バイオ，[5]岡山理科大・理）

D01 会場　午前の部（10:05〜11:54）

酵素—アミノ酸代謝関連酵素—

a07〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4D01a07　超好熱アーキア *Pyrobaculum calidifontis* 由来 NAD(P)依存性 L-セリン 3-脱水素酵素の機能・構造解析

10:05 ○米田一成[1]，櫻庭春彦[2]，荒木朋洋[1]，大島敏久[3]（[1]東海大・農・バイオ，[2]香川大・農・応用生物科学，[3]大阪工大・工・生命）

4D01a08　進化分子工学による L-リジン ε-酸化酵素の異種発現；

抗生物質耐性マーカーとの融合による発現型変異酵素のスクリーニング

10:16 ○松井大亮[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

4D01a09 *Marinomonas mediterranea* 由来 L- リシン ε- 酸化酵素におけるシステイントリプトフィルキノン補酵素の存在の結晶学的証明

10:27 ○岡崎誠司[1,2]，中野祥吾[1,2]，松井大亮[1,2]，赤地周作[3]，稲垣賢二[2,3]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO，[3]岡山大院環境生命）

4D01a10 *Burkholderia* sp. AIU 395 由来のデカルボキシラーゼ活性とオキシダーゼ活性を有する酵素の性質

10:38 ○菅原麻美[1]，松井大亮[2,3]，山田美和[1]，浅野泰久[2,3]，礒部公安[1]（[1]岩手大・農，[2]富山県大工・生工研セ，[3]JST ERATO）

a13〜a16 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4D01a13 *Aeropyrum pernix* K1 由来 *O*-Phosphoserine sulfhydrylase における F225 の役割

11:10 ○武田瑛美[1]，中村　卓[1]，石川一彦[2]（[1]長浜バイオ，[2]産総研）

4D01a14 放線菌由来 L-メチオニン脱炭酸酵素の大腸菌発現系の構築と精製

11:21 ○岡田　茜[1]，広瀬　侑[2]，田村　隆[1]，稲垣賢二[1]（[1]岡山大院環境生命，[2]豊技大 EIIRIS）

4D01a15 超好熱アーキア Thermococcus litoralis DSM 5473 のアスパラギナーゼホモログ遺伝子のクローニングとその遺伝子産物の酵素科学的性質の解明

11:32 ○山崎　遼[1]，老川典夫[2]（[1]関西大学理工学研究科，[2]化学生命工学部）

4D01a16 *Brevibacillus brevis* の機能未知 MocR ファミリータンパク質に関する研究

11:43 ○竹中　崇[1]，伊藤智和[2]，邊見　久[2]，吉村　徹[2]（[1]名大農，[2]名大院生命農）

D02 会場　午前の部（9:22〜11:54）

酵素—核酸代謝関連酵素，その他—

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

4D02a03 Retrosynthesis of 2'-deoxyribonucleosides in live Escherichia coli compensates the ribonucleotide reductase inactivation

9:22 ○Dayong SI[1]，Nobuyuki Horinouchi[1]，Makoto Hibi[2]，Anthony M. Poole[3]，Jun Ogawa[1]（[1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.，[2]Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.，[3]Canterbury Univ.）

4D02a04 リボヌクレアーゼ P タンパク質 Pop5 の RRM 非標準構造の機能解析

9:33 ○杤山紘輔，濱崎真人，中島　崇，角田佳充，木村　誠（九大院生資環）

4D02a05 シロイヌナズナ由来 RNase P 様タンパク質（PRORP1）PPR ドメインの基質認識機構の解析

9:44 ○今井崇喜[1]，中村崇裕[2]，中山　郁[1]，前田　卓[1]，中島　崇[2]，角田佳充[2]，木村　誠[2]（[1]九大院・生資環，[2]九大院・農）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4D02a07 最小ドメイン型 ppGpp 加水分解酵素 SAH の同定およびその機能構造解析

10:05 ○泉　厚志[1]，野村勇太[2]，福永芳規[2]，野澤　彰[3]，戸澤　譲[3]（[1]愛媛大・VBL，[2]愛媛大・理工，[3]愛媛大・PROS）

4D02a08 DNA 認識ドメインへの変異導入による制限酵素 EcoT38I の機能改変

10:16 ○日置貴大，中村啓悟，喜多恵子（京大院農）

4D02a09 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* におけるヌクレオシド代謝の解明

10:27 ○青野　陸[1]，佐藤喬章[1,3]，今中忠行[2,3]，跡見晴幸[1,3]（[1]京大院工，[2]立命館大，[3]JST CREST）

4D02a10 有機リン系神経剤を分解する Organophosphorus hydrolase の固定化

10:38 ○中山公介[1]，大森　毅[2]，瀬戸康雄[2]，有路沙織[1]，石川暁志[1]，川原一芳[1]（[1]関東学院大・工・物質生命，[2]科警研）

4D02a11 *Burkholderia* sp. a13 株が生産する新規フィチン酸分解酵素の解析

10:49 ○グラミニオエドワード，高谷直樹，中村　顕，星野貴行（筑波大生命環境）

a13〜a16 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4D02a13 部位特異的変異導入による HIV-1 逆転写酵素の熱安定性の向上

11:10 ○西村耕作[1]，篠村まゆ[1]，小西　篤[1]，横川貫太[2]，久好哲郎[2]，保川　清[1]（[1]京大院・農，[2]京大・農）

4D02a14 Val433 への変異導入による MMLV 逆転写酵素の耐熱化

11:21 ○小西　篤[1]，馬　暁晨[1]，横山高広[2]，保川　清[1]（[1]京大院・農，[2]京大・農）

4D02a15 ピペロナール代謝酵素の大量発現と諸性質の解析

11:32 ○土居志織，富田千晶，橋本義輝，小林達彦（筑波大院生命環境）

4D02a16 好冷細菌 *Pseudoalteromonas sp.* AS-131 及び大腸菌由来グルコキナーゼの酵素反応における構造変化のトリプトファン蛍光分析

11:43 ○湧川盛洋，佐藤奈々，本島浩之，渡邉啓一（佐賀大農）

D03 会場　午前の部（9:11〜12:05）

生物化学工学—培養工学ー微生物・動植物細胞，生物材料工学，生体医用工学—

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

4D03a02 エレクトロポレーション法による様々な生物種への遺伝子導入

9:11 ○山上義巳[1]，早川　清[2]，早川靖彦[2]，三木健輔[1]，藤井道彦[1]，鮎沢　大[1]（[1]横浜市大・生命ナノシステム，[2]ネッパジーン(株)）

4D03a03 大腸菌を用いた組換えタンパク質の細胞外発現

9:22 ○柳原芳充[1]，草野美紀[1]，松尾健太郎[1]，上垣真理[1]，古我怜恵[1]，鈴木涼介[1]，森　浩禎[2]，進藤康裕[1]（[1]三洋化成工業株式会社，[2]奈良先端科学技術大学院大学）

4D03a04 オカラと廃食用油を用いた好気高温固体発酵システムへの油脂分解能を有する微生物群の添加効果

9:33 ○岩瀬徳康[1]，山田千早[1]，西田茂雄[2]，松岡真生[1]，須田　亙[3]，服部正平[3]，祥雲弘文[1]，若木高善[1]，伏信進矢[1]（[1]東大院農生科，[2]環清技研エンジニアリング，[3]東大院新領域）

4D03a05 白色腐朽菌 Phanerochaete sordida YK-624 株による木質バイオマス減容化プロセスの開発

9:44 菖蒲貴弘[1]，富成宏典[2]，平井浩文[3]，新谷政己[1]，○金原和秀[1]（[1]静岡大院工，[2]静岡大工，[3]静岡大院農）

a07〜a11 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4D03a07 アスタキサンチン培養スケールアップのための培養基本特性解析

10:05 ○永井秀忠[1]，高橋季之[1]，森弘敏夫[1]，矢田哲久[1]，東　光利[1]，佐藤　博[1]，武部英日[2]（[1]JX 日鉱日石エネルギー(株)，[2]株式会社エーアイソリューションズ）

4D03a08 ゼアキサンチン培養におけるスケールアップのための条件検討

10:16 ○高橋季之[1]，永井秀忠[1]，東　光利[1]，矢田哲久[1]，佐藤　博[1]，武部英日[2]（[1]JX 日鉱日石エネルギー(株)　中央技術研究所，[2](株)エーアイ・ソリューション）

4D03a09 酸化物半導体ナノ素材合成のための新規なタンパク質の構築

10:27 ○井之上一平[1]，　石河泰明[2]，　山下一郎[2]，　浦岡行治[2,3]，安枝　寿[1]（[1]味の素(株)イノベーション研，[2]奈良先端大・物質創成，[3]科学技術振興機構，CREST）

4D03a10　チオレドキシン高含有酵母抽出物によるメラニン合成抑制効果

10:38 ○伊井野貴史，山下裕輔，丸　勇史，金　武祚（(株)ファーマフーズ）

4D03a11　抗スギ，ヒノキ花粉鶏卵抗体(IgY)を用いたヒトにおける花粉症症状緩和効果

10:49 ○山下裕輔，山津敦史，丸　勇史，金　武祚（株式会社ファーマフーズ）

a13〜a17 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4D03a13　*Human papillomavirus* L1 タンパク質の発現と磁気微粒子を用いたタンパク質精製

11:10 ○吉松勝彦[1]，　油井　恵[2]，　アメドラヒン[3]，　加藤竜也[1]，朴　龍洙[1]（[1]静岡大グリーン科技研，[2]静岡大院農，[3]静岡大院創造科技研）

4D03a14　Chimeric virus like particles(VLPs)made using capsid(gag-577 and M1)proteins from Rous Sarcoma Virus and Influenza virus.

11:21 ○Vipin Kumar Deo[1]，Tatsuya Kato[1,2]，Mizuho Harada[2]，Enoch Y Park[1,2]（[1]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [2]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University）

4D03a15　Metal enhanced fluorescence based Influenza A (H1N1)virus detection on nanoporous gold leaf

11:32 ○SYED Rahin AHMED[1,2]，Md Ashraf Hossain[2]，Dongyun Lee[3]，Tetsuro Suzuki[4]，Jaebeom Lee[3]，Enoch Y. Park[1,5]（[1]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [2]Department of Nano Fusion Technology, Pusan National University, [3]Department of Cogno-Mechatronics Engineering, Pusan National University, [4]Department of Infectious Diseases, Hamamatsu University School of Medicine, [5]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University）

4D03a16　Silver Nanoparticle assisted Macromolecule drug for internalization into mycobacterial smegmatis

11:43 ○FANGFANG SUN，Enoch Y. Park（Shizuoka University）

4D03a17　C 型肝炎ウイルスコアタンパク質と細胞内抗体の発現と機能解析

11:54 山本　英[1]，　デオビピンクマール[2]，　○加藤竜也[1,2]，鈴木哲朗[3]，朴　龍洙[1,2,4]（[1]静大農・応生化，[2]静大・グリーン研，[3]浜医大・感染症学，[4]静大・創科技院）

講演番号：2A01a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ A 校舎 01 会場

キシロース資化性向上に関わる *Saccharomyces cerevisiae HEX1* 遺伝子の特定

Identification and characterization of the *HEX1* mutation of *Saccharomyces cerevisiae*, leading to high efficiency xylose assimilation

藤森 一浩[1]、佐原 健彦[1]、扇谷 悟[1]、鎌形 洋一[1]、冨高 正貴[2]、長島 正明[2]、田口 久貴[2]、○赤松 隆[2] ([1]産総研・生物プロセス、[2]崇城大・生物生命)

Kazuhiro Fujimori[1], Takehiko Sahara[1], Satoru Ohgiya[1], Yoichi Kamagata[1], Masataka Tomitaka[2], Masaaki Nagashima[2], Hisataka Taguchi[2], ○Takashi Akamatsu[2] ([1]BPRI, AIST, [2]Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

【目的】酵母染色体の 1 カ所に *XYL1 XYL2 XKS1* を挿入組換えしたキシロース資化性菌から，キシロース最少培地で最少の世代時間が 2.5 時間と早い増殖を示す Hex$^+$突然変異体を分離している。遺伝解析を行い，これら突然変異体が持つ変異遺伝子を 3 個の遺伝子 *HEX1, HEX2, hex3* に分類している。このうち優性遺伝子変異 *HEX1–22* を特定する。

【方法と結果】次世代シーケンサー5500xl SOLiD™ システムで野生型株と Hex$^+$変異体の塩基配列を比較し，変異部位を解析したところ，*HEX1–22* の候補として *CDC19* と *MTC4* が，*HEX1–29* の候補として *CDC19, FDH1, DLT1* あるいは *YDL073W, ILV5, POL5* のフランキング領域が考えられた。*HEX1* 遺伝子は遺伝解析から酵母 I 番染色体のセントロメアに隣接するので，*HEX1* は *CDC19* であると推定した。そこで，*CDC19* 近傍のゲノム塩基配列を解析し，その情報をもとに *kanMX* を *CDC19* 遺伝子変異近傍にそれぞれ組換えた。組換え体の増殖試験を行い，*kanMX* の挿入が Hex$^+$表現型に影響しないことを確認した。次に *CDC19* 内の変異点 *kanMX* 領域を含む DNA を PCR 法で増幅し，増幅 DNA が野生型の Hex$^-$受容菌を Hex$^+$に換えるかどうかを解析した。その結果，G418 耐性転換体の約 30%は，それぞれ Hex$^+$を示すことを見出した。また，Hex$^+$形質転換体は，期待通り *CDC19* 遺伝子内に変異を持つことを認めた。このようにして *HEX1* 遺伝子を特定した。

Saccharomyces cerevisiae, high efficeincy of xylose assimilation, *HEX1*

講演番号：2A01a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ A 校舎 01 会場

高濃度キシロース資化を導く *Saccharomyces cerevisiae SXM1* 遺伝子の特定

Identification and characterization of the *SXM1* mutation leading to high concentration of xylose assimilation in a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

藤森 一浩[1]、佐原 健彦[1]、扇谷 悟[1]、鎌形 洋一[1]、冨高 正貴[2]、長島 正明[2]、○田口 久貴[2]、赤松 隆[2] ([1]産総研・生物プロセス、[2]崇城大・生物生命)
Kazuhiro Fujimori[1], Takehiko Sahara[1], Satoru Ohgiya[1], Yoichi Kamagata[1], Masataka Tomitaka[2], Masaaki Nagashima[2], ○Hisataka Taguchi[2], Takashi Akamatsu[2] ([1]BPRI, AIST, [2]Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

【目的】酵母染色体の 1 カ所に *XYL1 XYL2 XKS1* を挿入組換えし，かつ高効率キシロース資化する Hex$^+$株から，高濃度のキシロース培地で増殖できる Sxm$^+$突然変異体を 2 株分離している。このうち一株の変異体が持つ *SXM1* 遺伝子変異を特定し，その特徴づけを行う。
【方法と結果】次世代シーケンサー5500xl SOLiD™ システムで野生型株と Sxm$^+$突然変異体の塩基配列を比較し，*SXM1* 遺伝子変異を解析したところ，候補遺伝子または突然変異点として *TIP20, MTH1* と *HXT4* のフランキング領域が考えられた。その内，遺伝子の機能から *SXM1* は，*MTH1* であると推定した。*MTH1* 近傍の塩基配列を解析し，その情報をもとに *kanMX* を *MTH1* 遺伝子変異近傍に組換えた。*kanMX* の挿入が Sxm$^+$表現型に影響しないことを，組換え体の増殖試験で確認した。次に *MTH1* 遺伝子内の変異点と *kanMX* 領域を含む DNA を PCR 法で増幅し，増幅 DNA が野生型の Sxm$^-$受容菌を Sxm$^+$に換えるかどうかを調べた。その結果，G418 耐性形質転換体の約 30%は，顕著な増殖を示すことが分かった。また，Sxm$^+$形質転換体は，期待通り *MTH1* 遺伝子内に変異を持つことを確認した。このようにして *SXM1* は，*MTH1* であると特定した。*SXM1* 遺伝子変異を持つプラスミドを構築し野生型株に移した。高濃度キシロース培地で増殖試験を行うと増殖したので，変異は野生型対立アレルに対し優性であると結論した。そこで，この遺伝子変異を *SXM1−32* と名づけた。また，この *SXM1−32* 単独変異は，低濃度キシロース培地での増殖が早くなる Hex$^+$性も示すことが分かった。高濃度キシロース培地での増殖の早さは，分離した突然変異体，*SXM1−32 HEX1−22* 二重変異体，*SXM1−32* 単独変異体の順であり，明らかに *SXM1−32* と *HEX1−22* で相乗効果が見られた。75 g/L グルコースと 35 g/L キシロースを含む酵母エキス・ペプトン培地 pH 4.5 温度 32.5℃で発酵試験を行ったところ，グルコースは 6 時間強で消費し，キシロースは 24 時間で 16 g/L まで減少した。消費糖当たりのエタノール収率は 80%であり，38.5 g/L のエタノールを生産した。

Saccharomyces cerevisiae, high concentration of xylose assimilation, *SXM1*

講演番号：2A01a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ A 校舎 01 会場

高濃度キシロース資化に関わる *Saccharomyces cerevisiae SXM2* 遺伝子の特定

Identification and characterization of the *SXM2* mutation leading to high concentration of xylose assimilation in a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

○藤森 一浩[1]、佐原 健彦[1]、扇谷 悟[1]、鎌形 洋一[1]、冨高 正貴[2]、長島 正明[2]、田口 久貴[2]、赤松 隆[2] ([1]産総研・生物プロセス、[2]崇城大・生物生命)

○ Kazuhiro FUJIMORI[1], Takehiko Sahara[1], Satoru Ohgiya[1], Yoichi Kamagata[1], Masataka Tomitaka[2], Masaaki Nagashima[2], Hisataka Taguchi[2], Takashi Akamatsu[2] ([1]BPRI, AIST, [2]Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

【目的】酵母染色体の 1 カ所に *XYL1*，*XYL2*，*XKS1* を挿入組換えし，かつ高効率キシロース資化を導く Hex$^+$株から，さらに自然突然変異導入により高濃度のキシロース培地で増殖できる Sxm$^+$突然変異体を 2 株分離している。そこで、変異体 *SXM2* の原因遺伝子変異を特定し，発酵性能及び糖代謝の特徴づけを行った。

【方法と結果】次世代シーケンサー5500xl SOLiD™ システムで野生型株と Sxm$^+$突然変異体の全ゲノム塩基配列を比較し，関連株間の遺伝的背景を考慮した絞り込みによって *SXM2* 遺伝子変異を解析したところ，アミノ酸置換を伴う一塩基置換を持つ候補遺伝子として *ACO2, GRR1, SPB1, COS111, TMA64* の 5 遺伝子及び遺伝子変異が挙げられた。この中で，最も有力な候補として *SXM1* 遺伝子と類似の機能を持つ *SXM2* が，*GRR1* であると推定した。そこで、親株である NAM34-4C ゲノム中の *GRR1* 近傍の塩基配列から特異的プライマーを設計し、*GRR1* 遺伝子変異を含むフランキング領域 2 kb を PCR 増幅により取得した。また，酵母の I 染色体上にある *ADE1* 領域を PCR 増幅により取得した。この二つの DNA 断片を *ade1Δ1* Sxm$^-$株に加え，相同組換えにより Ade$^+$形質転換体を得た。その転換体の中から任意に 100 株選び，高濃度キシロース培地で増殖試験を行ったところ，2 株が Hex$^+$を示した。この 2 株の *GRR1* 周辺領域の塩基配列を解析すると，*GRR1* 遺伝子内に期待された通りの変異を持つことを確認した。使用した 2 種類の DNA 断片により Ade$^+$ Sxm$^+$二重形質転換体が出現することから，*SXM2* をもたらす原因遺伝子は，*GRR1* であると特定した。この *GRR1* 遺伝子変異株と野生型株を掛け合わせ，二倍体を作製し増殖試験を行ったところ，Sxm$^+$/wt 二倍体は高濃度キシロース培地では増殖しなかった。すなわち，*SXM2* 遺伝子変異は野生型対立アレルに対し劣性であることが分かった。そこで，この遺伝子変異を *sxm2–33* と名づけた。また，この *sxm2–33* 単独変異の低濃度キシロース培地での増殖は遅かったが、グルコースとキシロース共存下で発酵試験を行ったところ，この変異体はグルコースが存在する時に顕著なキシロースの消費を示すという特異な特徴を示すことが明らかになった。

Next-generation sequencing, Comparative whole genome analysis, *GRR1*

講演番号：2A01a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ A 校舎 01 会場

Megavariate analysis of inhibitory effects of fermentation inhibitors derived from lignocellulose hydrolysates on yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

○ Lahiru JAYAKODY[1,2], Masafumi KADOWAKI[1], Kenta HORIE[1], Hayashi NOBUYUKI[1], Hiroshi KITAGAKI[1,2] ([1]Saga Univ., [2]Join Grad. Sch. of Agri., Kagoshima Univ.)

Complex inhibitory effect of inhibitors in cellulose hydrolysate hampers the growth and fermentation of industrial workhorse *Saccharomyces cerevisiae.* Last few decades most of the former studies in this field are focused on single inhibitory compounds present in hydrolsate and developed strains. However, most of the resultant strains are not fully recovered growth or ethanol production in actual hydrolyasate due to complexity of inhibitors in actual hydrolysate. Therefore, we used novel approaches to develop the tolerant strain to complex inhibitory stress of actual lignocelluloses hydrolysate. First, we adopted PLS modeling of growth to dissect the fermentation inhibitory effect of major inhibitors present in lignocelluloses hydrolysis, and confirmed that glycolaldehyde, which we identified as an inhibitory compound[1], is the most toxic compound in HCWT-lignocellulose hydrolysate. Second, we developed the strain, which is capable to reduce glycolaldehyde through introducing oxidoreductases [2, 3]. Third, by comprehensive genomic analysis and PCA analysis of combinational inhibitory effect of HCWT-treated cellulose hydrolysate, we identified sumolysation as a novel target to develope tolerant strains. Indeed, overexpression of genes in SUMO-dependent ubiquitylation pathway such as *SMT3, SLX5, SLX8* significantly improved the tolerance of yeast strain to the combination of hot-compressed water-treated cellulose hydrolysate. To the best of our knowledge, this is the first successful utilization of sumolysation pathway for conferring inhibitor tolerance to yeast cells. In sum, our comprehensive genomic and megavariate analysis established a novel platform to engineer a yeast strain tolerant to complex inhibitory effects of lignocelluloses hydrolysate, which benefits to overcome the critical barrier for commercialization of lignocellulosic ethanol production.

1. Jayakody et al., *Biotechnol. Let*., 33, 285-289 (2011)
2. Jayakody et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 94, 273-283 (2012)
3. Jayakody et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* 97, 6589-6600 (2013)

glycolaldehyde, bioethanol, sumolysation

講演番号：2A01a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ A 校舎 01 会場

出芽酵母の Cyc8-Tup1 転写コリプレッサーへの自然変異がマンニトール資化能獲得と耐塩性に与える影響

Effect of natural mutations in *TUP1* and *CYC8*, genes for Cyc8-Tup1 transcriptional corepressor, on the acquisition of an ability to utilize mannitol and the salt-tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*

中條 萌絵子、村田 幸作、○河井 重幸（京大院農）
Moeko CHUJO, Kousaku MURATA, ○Shigeyuki KAWAI (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景】国土面積は狭隘だが広大な排他的経済水域に恵まれた我が国にとって、海洋バイオマスからの有用物質 (エタノールなど) 生産法の確立は重要である。特に藻体が巨大な褐藻類は有望な海洋バイオマスである。しかし、高いエタノール生産能などの優れた特性を示す出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、海洋バイオマス (褐藻類) の主成分の一つマンニトールを資化できないという問題があった。当分野では、出芽酵母をマンニトール含有培地に塗布することにより、出芽酵母がマンニトール資化能とフロキュレーション (Flo) 能を自然に獲得することを見出し [1]、かかる能力の獲得が Cyc8-Tup1 転写コリプレッサー成分 Tup1 への一塩基変異に起因することを明らかにしている。本研究では、より優れたマンニトールからのエタノール生産能を示す出芽酵母の取得、ならびに本獲得機序のさらなる解明を目指して、他のマンニトール資化能獲得出芽酵母株 (Mtl+株) の取得およびそれらの解析を進めた。

【結果】マンニトール含有培地から新たに単離した Mtl+株は、*TUP1* に変異を有するグループと有さないグループに分けられた。後者に属する株は Flo 能を示さない傾向にあった。後者に属する株の *CYC8* 遺伝子配列を調べたところ、2 株 (MK4010 株、MK4437 株) 以外の株においては、*CYC8* 遺伝子に変異が見出された。*CYC8* 遺伝子の欠損株が Mtl+株であることも確認した。相補実験の結果も併せて、*CYC8* 遺伝子への自然変異により出芽酵母がマンニトール資化能を獲得することが明らかとなった。*CYC8* 遺伝子に変異を有する Mtl+株のうち、MK4416 株は *TUP1* 遺伝子に変異を有する Mtl+株よりも耐塩 (NaCl) 性が高く、塩存在下でのマンニトールからのエタノール生産能も高かった。すなわち、塩の混入が避けられない海洋バイオマスからのエタノール生産系において、*CYC8* に変異を有する MK4416 株のような Mtl+株の方がより優れていると考えられた。今後、かかる Mtl+株へのアルギン酸 (褐藻類の主成分) 資化能の導入により、出芽酵母を用いた海洋バイオマス (褐藻類) からの有用物質生産系の確立が期待される。一方、*TUP1* と *CYC8* の両方に変異を有さない Mtl+株 (MK4010 株、MK4437 株) は固体培地での継体培養中にマンニトール資化能を喪失するという表現型を示した。かかる表現型の原因を明らかにするため、両株のゲノム DNA を次世代シーケンサーで解析した。本研究は、最先端・次世代研究開発支援プログラムの助成により行われた。

1) **日本農芸化学会 2012 年度大会　プログラム集, p. 107.**

Saccharomyces cerevisiae, ethanol, mannitol

講演番号：2A01a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ A 校舎 01 会場

Trichoderma reesei beta-キシロシダーゼ(BXL I)の酵素化学的性質
Characterization of *Trichoderma reesei* beta-xylosidase (BXL I)
○岡田 宏文[1]、山下 景子[1]、藤川 浩樹[1]、小松 光子[1]、二階堂 満[2]、戸谷 一英[2] ([1]長岡技術科学大学　生物系、[2]一関高専　物化工)
○Hirofumi OKADA[1], Keiko YAMASHITA[1], Hiroki FUJIKAWA[1], Mitsuko KOMATSU[1], Mitsuru NIKAIDOU[2], Kazuhide TOTANI[2] ([1]Nagaoka Univ. Technol., [2]Ichinoseki College Technol.)

【目的】糸状菌 *Trichoderma reesei* が生産分泌するキシラン分解酵素のうち、キシラン主鎖を非還元末端からキシロース単位で切断するβ-キシロシダーゼ(BXL)は BXL I 一種であることが知られている。BXL I は GH ファミリー3 に属しており、アミノ酸配列より推定される分子量は 85,300 である。BXL I 遺伝子破壊株(Δbxl1)のアビセル+キシラン培養上清の *p*-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside(*p*NPβXyl)分解活性はほとんど見られなかったことから、培養上清中の *p*NPβXyl 分解活性は BXL I が担っていることが明らかになった。また、この培養上清を用いてバイオマスの糖化を行ったところ、野生株と比較して、生成キシロース量の減少が見られた。このことから BXL I は糖化において重要な役割を担っていることが推察された。本研究では、酵母 *Pichia pastoris* を宿主とした BXL I の発現と酵素学的性質、およびバイオマス糖化における役割の解明を目指した。
【方法・結果】*P. pastoris* 発現ベクターである pPICZC のマルチクローニングサイト内の EcoR I から SnaB I の間に、シグナル配列を含む *bxl1* 遺伝子を挿入し *P. pastoris* X-33 の形質転換を行った。得られた形質転換体を 24 時間ごとにメタノールを添加し、培養したところ、5 日目の培養上清で 1.9U/mL-broth の *p*NPβXyl 分解活性が見られた(発現量 36 mg/L-broth)。この培養上清を用いて硫安分画と疎水性カラムクロマトグラフィーを行い、精製酵素を取得した。精製酵素の SDS-PAGE を行ったところ、分子量が 102,000 のほぼ単一のバンドが見られた。アミノ酸配列より推定される分子量が 85,300 であることから精製酵素は糖付加されていると考えられた。そこで精製酵素の GPF 処理を行った結果、分子量は 90,000 であり、10,000 糖付加されていることが明らかになった。精製酵素の酵素化学的性質を調べた結果、至適 pH は 5.0 であり、比活性は *p*NPβXyl を基質とした際に 53 U/mg であった。基質特異性は、*p*NPβXyl 分解活性 100%に対し、*p*NPαAra、*p*NPβGlc 分解活性は、それぞれ 12%と 1%であった。一方、*p*NPβMan と *o*NPβGal 分解活性は検出限界以下であった。pH 安定性を調査した結果、30℃で 30 分保温した際、pH4.0 と 5.0 で 80%の活性を維持した。また、温度安定性を調査した結果、pH5.0 で 2 時間保温した際、0-40℃で 70%の活性を維持した。組換え BXL I を野生株のアビセル+キシラン培養上清に添加し、バイオマスの糖化を行った結果、キシロース生成量に変化は見られなかった。現在、Δbxl1 培養上清を用いた種々のキシラン基質の糖化や組換え BXL I と他のキシラン分解酵素を組み合わせた糖化の生成物の解析を行い、BXL I のバイオマス分解における役割の解明を行っている。

Trichoderma reesei, beta-xylosidase, biomass

講演番号：2A01a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ A 校舎 01 会場

中高圧下でのβ-グルコシダーゼ活性の変化と温度の影響について

Evaluation of β-glucosidase activity at various temperatures under high-hydrostatic pressure

○林 秀太、栗原 聖、藤田 智之（信州大院農）
○Shuta HAYASHI, Sho KURIHARA, Tomoyuki FUJITA (Shinshu Univ.)

【目的】近年、高圧処理技術の利用が注目されており、食品加工や生物制御などに利用されている。加圧時の酵素活性の変化についても報告がなされているものの、その多くは数百 MPa の超高圧下におけるもので、100 MPa 程度の中高圧下での活性の変化についてはいまだ明らかにされていない。昨年度の本大会において、セルラーゼ Celluclast 1.5L を用いた反応で、酵素中のβ-グルコシダーゼ活性の昂進が示唆されることを報告した[1)]。本研究では *p*NPG を基質に用いて Celluclast 1.5L 及び emulsin の中高圧下でのβ-グルコシダーゼ活性の変化について調査した。

【方法】酵素はセルラーゼ Celluclast 1.5L 及び emulsin (Almond 由来β-グルコシダーゼ) を用いた。基質には 4-nitrophenyl β-D-glucopyranoside (*p*NPG) を用いた。チャック付き袋に 0.1 M 酢酸緩衝液 1.0 ml、1 mg/ml の基質 0.5 ml、酵素 0.5 ml を添加し、シーラーで密封後、常圧 (0.1 MPa) または中高圧 (100 MPa) 下、25~70℃にて反応を行った。反応終了後、0.2 M 炭酸ナトリウム水溶液を 2.0 ml 加え、吸光度 (400 nm) を測定した。

【結果】Celluclast 1.5L 中のβ-グルコシダーゼ活性を測定したところ、すべての温度条件で常圧下に比べて加圧下では活性が上昇した。特に、60℃以上の反応において、加圧下では常圧下より活性を長時間維持する傾向が認められた。また、加圧下での反応 3 時間後の *p*NP 生成量で比較したところ、65℃で 191% (常圧: 100%) となり最大となった。以上の結果から、Celluclast 1.5L の圧力感受性はβ-グルコシダーゼ活性の昂進であることが示された。一方、Almond 由来β-グルコシダーゼ活性を測定したところ、Celluclast 1.5L の場合とは異なり、加圧下では常圧下に比べて活性は著しく低下した。このように、β-グルコシダーゼの起源の違いによって、圧力感受性が異なることが示された。今後は pH 変化等の化学的要因と中高圧処理の併用効果について調査していく予定である。

1) 日本農芸化学会 2013 年度大会講演要旨集, 2C12p11 (2013)

glucosidase, high-hydrostatic pressure, enzyme activity

講演番号：2A01a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ A 校舎 01 会場

ベタイン型代謝産物アナログの添加に伴う糖加水分解酵素の異常な収率向上効果
Unusual increase in the yield of glucosidases-mediated hydrolysis in the presence of betaine-type metabolite analogs
○甲元 一也、勢籏 志郎（甲南大 FIRST）
○Kazuya KOUMOTO, Shiro SEHATA (FIRST, Konan Univ.)

【研究背景】
化石資源の枯渇に直面した昨今、自然界で大量に生産されているが使用されていないバイオマス資源の活用が模索されている。バイオマスを活用するには、その主成分であるセルロースを高効率で糖化、発酵させ、エタノールを製造する技術の開発が不可欠となる。とりわけ、バイオマスからグルコースを作る糖化は幅広く検討されており、セルラーゼを活用する酵素糖化法は注目を集めている。しかし、セルラーゼ特有の低反応性や低収率がその実用化の大きな障壁となっている。セルラーゼに含まれる糖化酵素（セロビオヒドラーゼ、βグルコシダーゼ等）は、生成物によるフィードバック阻害がかかりやすく、反応収率を向上するには、生成したグルコースを透析によって取り除くなど、大掛かりな装置の開発が必要であった。講演者らのグループでは、細胞由来の代謝産物アナログが、酵素の安定性や活性を向上させることを見いだし、報告してきた。その中で、代謝産物アナログ添加に伴って糖加水分解酵素の反応収率の大幅に向上する現象を今回、新たに見いだした。
【実験結果】
これまでの報告によって、グリシンベタインを基体とした代謝産物アナログを基質や反応機構の異なる種々の酵素反応溶液に添加すると、酵素の反応速度、熱安定性、耐塩性、基質特異性などが上昇することが明らかとなっている（*Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3128）。先行研究の結果を受け、α-グルコシダーゼを用いて基質特異性が向上する点に着目し、阻害剤や生成物による阻害効果の抑制を検討していたところ、アナログ非存在下では 11%であった収率がアナログを添加すると 95%にまで上昇した。グルコースによる阻害定数（K_i）の変化を調べたところ、8.23 mM（[*N,N,N*-トリ-*n*-ブチルグリシネート]=0 mM）から 16.4 mM（100 mM）へと阻害定数が上昇し、アナログが生成物阻害の抑制にも関わることが明らかとなった。また、バイオマスの分解において重要なβ-グルコシダーゼにおいても大きな収率向上効果が確認され、例えば、Almond 由来のβ-グルコシダーゼでは反応収率が 17%から 87%に、*Agrobacterium sp.* 由来のβ-グルコシダーゼでは 4%から 96%に、T. maritina 由来のβ-グルコシダーゼでは 13%から 96%にそれぞれ上昇した。大掛かりな装置も必要とせず、生成物阻害を受けやすい糖加水分解酵素の収率がこれほど大きく上昇することは大変興味深い知見と言える。本講演では、これら代謝産物アナログによる加水分解酵素の収率向上効果、ならびに、そのメカニズムについて紹介する。

glucosidases, cellular metabolites, enzyme activation

講演番号：2A01a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ A 校舎 01 会場

バクテリア由来モノリグノール類変換酵素遺伝子の探索

Genome Mining for Monolignol Derivatives Conversion Enzyme Encoding Sequences

○上村 直史[1]、荒木 拓馬[1]、小林 巽[1]、菱山 正二郎[2]、笠井 大輔[1]、福田 雅夫[1]、菊地 淳[3]、梶田 真也[4]、政井 英司[1]([1]長岡技科大・生物、[2]森林総研、[3]理研 PSC、[4]東農工大院・BASE)
○ Naofumi KAMIMURA[1], Takuma ARAKI[1], Yuduru KOBAYASHI[1], Shojiro HISHIYAMA[2], Daisuke KASAI[1], Masao FUKUDA[1], Jun KIKUCHI[3], Shinya KAJITA[4], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]FFPRI, [3]RIKEN PSC, [4]Tokyo Univ. Agric. Tech.)

【目的】木質バイオマスからバイオ燃料や化学工業原料を生産する上で、リグニンを除去するための前処理工程に多量の薬品やエネルギーを必要とする。当研究グループは、環境試料やゲノムデータベースから有用なモノリグノール類変換酵素遺伝子を探索・解析し、それらを植物に導入することでリグニン生合成を調節して易分解性リグニンを創出することを最終目的としている。本研究では、高分子リグニンの前駆体であるモノリグノール生合成中間体を Cβや 4 位 OH 基のラジカル生成を阻害する構造に変換する酵素として、coniferyl aldehyde (CALD)の Cα-Cβ二重結合を還元する *Arabidopsis thaliana* の alkenal double bond reductase (DBR, At5g16970)と、caffeoyl-CoA や hydroxycinnamic acid 類の 4 位 OH 基をメチル化する *Synechocystis* の *O*-methyltransferase (OMT, slr0095)に着目し、既知の両酵素よりも優れた変換活性を有する遺伝子をゲノムデータベースから得ることを目的とした。

【方法】NCBI ゲノムデータベースから BLAST プログラムにより At5g16970 及び slr0095 に相同性を示すバクテリア由来の遺伝子を探索・選定した。大腸菌での発現にコドンを最適化した遺伝子を合成し、pET-16b に導入した。His-tag 融合酵素 (ht-DBR 及び ht-OMT)を大腸菌で生産させ、精製酵素を用いて CALD 及び caffeic acid に対する変換活性を調べた。各基質の変換は HPLC 分析により評価した。ht-DBR の至適 pH と至適温度は、それぞれ pH 5.0～9.0 および 20°C～70°C の範囲で調べた。CALD 濃度 10 μM～1 mM の範囲で CALD 変換活性を測定し、K_m と V_{max} を算出した。

【結果】バクテリアゲノムデータベースから、At5g16970 と 41～46%の相同性を示すα、β、γ、δ、εプロテオバクテリア及びグラム陽性菌由来の 6 つの機能未知遺伝子と、slr0095 と 47～55%の相同性を示すシアノバクテリア及びγ、δプロテオバクテリア由来の 7 つの機能未知遺伝子を選定した。各 ht-DBR 及び ht-OMT を大腸菌で生産させ、精製した。精製 ht-DBR を用いた CALD 変換実験の結果、*Parvibaculum lavamentivorans* の DBR (Plav)が At5g16970 と同等の変換活性を有することが示唆された。Plav と At5g16970 の酵素学的諸性質を調べた結果、両酵素は共に NADPH を要求し、至適 pH は pH 7.0 (Plav) と pH 6.25 (At5g16970)、至適温度は 40°C (Plav)と 60°C (At5g16970)であった。Plav の 30°C における CALD 変換の K_m と V_{max} は、それぞれ 430 ± 31 mM 及び 1.3 ± 0.05 U/mg であり、V_{max}/K_m は At5g16970 の文献値 (Youn et al., 2006, *J. Biol. Chem.*)よりも 4 倍高かった。一方、精製 ht-OMT を *S*-adenosyl-L-methionine をメチル基ドナーとして用いて caffeic acid と反応させた結果、slr0095 を含む 4 つの OMT が 4 位 OH 基をメチル化できることが示され、*Pseudomonas* sp. GM41 株の OMT が最も高い変換活性を有することが示唆された。

【謝辞】本研究は JST-ALCA (先端的低炭素化技術開発)の助成を受けて行われたものである。

lignin engineering, alkenal double bond reductase, *O*-methyltransferase

講演番号：2A01a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ A 校舎 01 会場

草本系バイオマス（稲わら）の高効率糖化酵素の探索と解析

Screening and characterization of high efficiency saccharification enzyme herbaceous biomass (rice straw).

○小野田 絵理、金子 愛唯、三浦(鈴木) 彩子、相澤 朋子、野口 章、長谷川 功（日大生資科）
○Eri ONODA, Ayu KANEKO, Ayako MIURA(SUZUKI), Tomoko AIZAWA, Akira NOGUCHI, Isao HASEGAWA (Nihon Univ.)

近年、国連の FAO/WHO 合同による食品の安全規格を制定する Codex 委員会では、農作物中の重金属含量を厳しく規制する方向で検討が進められており、日本では、2011 年に精米中に含有されるカドミウム（Cd）の上限値が Codex 委員会で決定した Codex 国際基準値である 0.4 mg/ kg を適用することになった。一方、野菜・果樹など他の農作物中の Cd 含量についても Codex 国際基準値が提示されており、今後、国内の野菜類に対する上限値が提示される可能性もある。

そのため、わが国で流通している農産物がこの国際基準値を越えないようにするための低 Cd 吸収性品種の開発や、農耕地の Cd を除去して農作物中の Cd 濃度を低下させるための研究が鋭意行われている。その中で、植物の養分吸収能を活用した低濃度の汚染物質の広範囲での浄化方法、すなわちファイトレメディエーションが注目され、Cd に対しては既に日本各地で Cd 高吸収性イネを用いた実証試験が進められている。

ファイトレメディエーションの実用化には、収穫後に発生する膨大な量の稲わら等の草本系バイオマスの処理が重要となる。現在は焼却する方法が採られているが、エネルギーに変換利用することが有効であると考えられ、なかでもエタノール（バイオエタノール）化技術が最も注目されている。しかし、稲わらは、木材と比べてリグニン含量が少ない一方で、セルロース、ヘミセルロース、高含量のケイ素を主とする無機成分を多く含む複雑な組成の基質であり、そのような草本系バイオマスを利用したバイオエタノール生産に実用的な糖化酵素は見つかっていないのが現状である。

そこで本研究では、イネを含むイネ科植物を主食にしている昆虫の腸内酵素に着目し、昆虫腸内容物や糞を粗酵素として用い、稲わらおよびセルロース分解能を評価した。その結果、イネを主食としているイナゴの腸内容物は、稲わら分解活性が特に高いことを明らかにした。次に、イナゴの腸内容物を粗酵素とし、稲わら分解活性に与える条件を検討した結果、pH 7.0、50℃の条件が至適条件であった。また、ザイモグラフィーや LC/MS/MS 分析を行った結果、イナゴ自体に由来する稲わらを分解するセルラーゼとともに、イナゴ腸内に共生する微生物由来と思われるヘミセルラーゼが多く検出された。そこで、PCR-DGGE 法を用いてイナゴ腸内容物の微生物群集構造を解析した結果、酵素と同様に、腸内微生物叢にも共通性があることを明らかにした。さらに、稲わらを基質としたイナゴ腸内微生物の集積培養法により高いヘミセルラーゼ活性をもつ多くの微生物を単離、その特徴を解析したので報告する。

saccharification enzyme, herbaceous biomass, rice straw

講演番号：2A01a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ A 校舎 01 会場

草本系バイオマス糖化分解ラッカーゼ様酵素を用いた直接糖化複合酵素系の構築

Construction of enzyme-consortium system with laccase-like enzyme for directly saccharifying herbal biomass

○鈴木 啓修、青山 晃久、加藤 祐太、永井 和夫、倉根 隆一郎（中部大）
○Yoshinobu SUZUKI, Akihisa Aoyama, Yuta Kato, Kazuo Nagai, Ryuichiro Kurane (Chubu Univ.)

【目的】地球温暖化問題から、二酸化炭素排出量削減のためバイオエタノールが注目されている。第一世代バイオエタノールはトウモロコシなどの食糧デンプンを原料として生産されている。このため食糧との競合が起こり、飢餓に苦しんでいる発展途上国での食糧問題や作物の価格上昇等深刻な問題も引き起こされている。そこで非食部分である稲わらなどの草本系、間伐材などの木質系バイオマスのセルロースバイオマス資源に注目が注がれている。しかしながら、それらのセルロースバイオマス資源をバイオエタノール生産に繋げるには脱リグニンの工程が必要となってくる。当研究では生物（酵素）的脱リグニンを目指して、リグニンを分解する酵素の一つであるラッカーゼに注目し、ラッカーゼ様酵素を生産する微生物 KS1025A2-4 株を取得した。これと、本研究室の青山らが取得のアルカリ処理等前処理なしで粉砕処理のみを施した稲わらを基質とした場合、高い分解率を示す酵素を生産する糸状菌（SA57-2 株）を複合することで稲わらの直接糖化率が向上することを目指した直接糖化複合（微生物）酵素系の構築を目的とした。

【方法】粉砕稲わらを基質として、SA５７－２株が生産する酵素を基質に対して１％になるよう調整し、KS1025A2-4 株より調整したラッカーゼ様酵素と Ｈ２Ｏ２をいれ、４５℃、２５０ｓｐｍ、９６時間反応させた。その後、遠心上清を３， ５－Dinitrosalicylic acid（DNS）にて還元糖分析を行った。

【結果】DNS にて還元糖分析を行った結果、SA５７－２株の生産する酵素のみで反応させたものよりも、ラッカーゼ様酵素を混合添加した糖化複合酵素系の方が約１０％糖化率の上昇を確認した。この結果、草本系バイオマス（粉砕稲わら）を直接糖化可能な複合酵素系を構築した。また、他のラッカーゼ酵素が阻害される L－システイン及び、ジチオスレイトールにおいて本株が生産するラッカーゼ様酵素は阻害を受けないことも確認できた。

Laccase-like, enzyme-consortium, herbal biomass

講演番号：2A01a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ A 校舎 01 会場

稲わらを用いた白色腐朽菌ラッカーゼ生産反応の解析と応用

Production of laccase by white-rot fungi using rice straw

○猪瀬 優、浅見 和広、太田口 和久（東工大院理工）
○Yu INOSE, Kazuhiro ASAMI, Kazuhisa OHTAGUCHI (Tokyo Tech)

【目的】

白色腐朽菌が分泌する酵素の一種であるラッカーゼは，ダイオキシン類，PCB 類などの難分解性物質を生分解する活性を発現することから生物学的汚染修復技術に利用されている．本研究では，農業廃棄物である稲わらは，ラッカーゼ誘発物質であるリグニンを含み，多糖類セルロース，ヘミセルロースを主成分とすることから，これをラッカーゼ生産用培地成分とすることの可能性を探ることとした．実験では，稲わらを用いた白色腐朽菌の培養を行い，稲わらのサイズや植菌量，培養形態(固体培養/液体培養)の違いが菌体のラッカーゼ生産に及ぼす影響を検討した．

【方法・結果】

液体培地で 3 日間前培養した後の白色腐朽菌 *Trametes hirsuta* を，固体培地または液体培地で培養し，ラッカーゼ活性，プロテアーゼ活性，たんぱく質量，還元糖濃度，グルコース濃度，呼吸活性(固体培養)，乾燥菌体量（液体培養），培地 pH の経時変化を観察し，考察を加えた．30℃で 1 分間に 1 μmol の 2,6-Dimethoxyphenol を分解するラッカーゼの活性を 1 Unit と定義した．

前培養後に，破砕した稲わらと，糖を含まない栄養培地から成る固体培地上で固体培養したところ，培養 3 日目にラッカーゼ活性のピーク(1.90 $U \cdot (g\text{-rice straw})^{-1}$)を観察した．培地中のグルコース濃度を観察したところ，培養 4 日目までにグルコース濃度が減少しそれ以降増えないことから，白色腐朽菌の稲わら分解による糖生産は起こらず，菌体は稲わら表面のグルコースを消費していることが示唆された．また，培養後期のプロテアーゼ活性が高いことから，培地中の窒素源枯渇によるタンパク質分解が起こり，ラッカーゼ失活が引き起こされると考える．

また，白色腐朽菌の稲わら分解による糖生産が起こっていないことから，稲わらを水に浸して成分を抽出した稲わら抽出液を用いて菌体の液体培養を行ったところ，植菌後 1 日以内にすべての糖消費が観察され，培養 1 日目にして固体培養 3 日目とほぼ同等のラッカーゼ活性(1.72 $U \cdot (g\text{-rice straw})^{-1}$)が示された．さらに，培養 5 日目に固体培養の最大活性を超える活性ピーク(2.17 $U \cdot (g\text{-rice straw})^{-1}$)を観察した．以上の結果から液体培養に着目し，稲わら抽出液の有用性及び液体培養における更なる効率的なラッカーゼ生産条件の模索を行った結果も報告予定である．

laccase, rice straw, white-rot fungi

講演番号：2A01a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ A 校舎 01 会場

紙分解生成物を用いたトリコデルマ菌セルラーゼ生成反応の高活性化

High activation of Trichoderma cellulase production reaction using the paper degradation products

○浅見 和広、一力 啓晃、太田口 和久（東工大院化工）
○Kazuhiro ASAMI, Hiroaki ICHIRIKI, Kazuhisa OHTAGUCHI (Tokyo Tech.)

【目的】

本研究ではバイオマスエタノール生産原料の植物資源およびセルラーゼ生産に用いる炭素源として廃棄紙に注目した。これは日本で年間 1400 万トン発生しており、製紙工程で脱リグニン処理されていることから利用しやすいバイオマスである。これをセルラーゼ生産にも用いると想定し、濾紙をモデル物質として用いた。セルラーゼ生成高活性化のためにこれを予め硫酸で分解した生成物を用いて菌体を培養したときのセルラーゼ生成反応を解析した。

【方法・結果】

T.reesei を三角フラスコ内の 200mL 液体マンデル培地で振とう培養し、所定の時間にサンプリングをして菌体量、残存セルロース濃度、酵素生成量を測定した。菌体を育てる炭素源には、2%硫酸で所定の時間反応し、よく水洗した濾紙を用いた。

硫酸による紙分解生成物を用いて菌体を培養したところ、分解時間とともにセルラーゼ生成量（FPU 活性）が上昇し、処理時間 180min で最大値を示した。また Endo-グルカナーゼが生成されると他の種類のセルラーゼ生成が促され、生成量を上昇させることがわかった。これは Endo-グルカナーゼがセルロースのβ-グリコシド結合をランダムに切断し分解物を生成するためだと考えられる。また硫酸処理時間を増加させると Endo-グルカナーゼ生成と菌体の増殖が早期に起こることが確認された。

一方硫酸処理に伴い炭素源に用いるセルロース繊維の容積が減少した。ここで繊維容積の異なるセルロースを炭素源にして菌体を培養したところ、繊維容積の減少に伴いセルラーゼ生成量が増加する傾向が確認された。また長時間硫酸処理されたセルロース繊維は培養中に分裂し、容積が小さくなることも確認された。繊維容積の小さいセルロース、また硫酸処理され分解されたセルロースによりセルラーゼ生成反応を高活性化できることが確認された。

bioethanol, waste paper, cellulase production

講演番号：2A01a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ A 校舎 01 会場

線虫補食で知られるオルビリア目のヘミセルラーゼ群の解析
Hemicellulase for lignocellulosic biomass saccharification in nematophagous fungi, Orbiliales
○島村 麻美子[1]、西嶋 桂子[1]、安宅 花子[1]、金子 哲[2]、佐々木 和美[1]、紙野 圭[1] ([1]（独）製品評価技術基盤機構、[2]独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構)
○Mamiko SHIMAMURA[1], Keiko NISHIJIMA[1], Hanako ATAKU[1], Satoshi KANEKO[2], Kazumi SASAKI[1], Kei KAMINO[1] ([1]NITE, [2]NARO)

糸状菌酵素の多様性とその利用は新たな局面を迎えると思われる。リグノセルロース系バイオマスの変換・利用促進の波にのって、糸状菌類の多様性に関する底上げが進んでおり、多岐にわたる新たな展開を予感させる。当機構では、バイオマスエネルギー先導技術開発／酵素糖化・効率的発酵に資する基盤研究（NEDO）への参画を機に、保有および新たに国内外より単離した多様な糸状菌からのバイオマス糖化に関する情報収集を進めている。バイオマス糖化は、リグノセルロース系バイオマスの変換・利用の鍵を握るプロセスである。分類の偏りを排して選んだ菌株プールの汎用的なスクリーニングの過程で、線虫補食菌として古くより知られるオルビリア目に属する菌株の多くがセルラーゼ活性を有することを見いだし、すでに報告した【2011 年度および 2013 年度本学会大会】。同時に、それらの菌株のいずれもが比較的高いヘミセルラーゼ活性を有することも見いだしていた。バイオマスの変換・利用ではセルロースの糖化はもちろん重要であるが、その効率は、化学構造的に多様なヘミセルロース成分の効率的な除去に大きく依存する。本研究では、リグノセルロース分解においては全く注目されてこなかったオルビリア目菌株のヘミセルラーゼ群について報告する。
結晶性セルロースにより酵素発現誘導を行った *Gamsylella* sp. 株培養上清の疎水カラムクロマト分離画分の LC-MS/MASCOT 解析で、GH10、GH67、GH62 のそれぞれに相同なタンパク質の存在が確認された。これら精製タンパク質の解析について報告する予定である。

Orbiliales, Hemicellulase, saccharification

講演番号：2A01a17
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ A 校舎 01 会場

白色腐朽菌 Phlebia cf. lindtneri のバイオマス糖化酵素群の解析

Enzymes for lignocellulosic biomass saccharification in white-rot Phlebia cf. lindtneri

島村 麻美子、安 善榮、小口 晃央、稲葉 重樹、○紙野 圭 (製品評価技術基盤機構)
Mamiko SHIMAMURA, Son-yon ANN, Akio OGUCHI, Shigeki INABA, ○Kei KAMINO (Natl. Inst. Tech. Eval.)

糸状菌酵素の多様性とその利用は新たな局面を迎えると思われる。リグノセルロース系バイオマスの変換・利用促進の波にのって、糸状菌類の多様性に関する底上げが進んでおり、多岐にわたる新たな展開を予感させる。当機構では、バイオマスエネルギー先導技術開発／酵素糖化・効率的発酵に資する基盤研究（NEDO）への参画を機に、保有および新たに国内外より単離した多様な糸状菌からのバイオマス糖化に関する情報収集を進めている。バイオマス糖化は、リグノセルロース系バイオマスの変換・利用の鍵を握るプロセスである。
分類の偏りを排して選んだ菌株プールの汎用的なスクリーニングでは、２割以上の糸状菌が酵素系分泌のポテンシャルを有していた【2011 年度本学会大会】。しかし、それらの酵素の有用性を見積もることは容易ではない。その原因は基質、酵素（系）、菌株のそれぞれに存在するが、菌株について見れば、生育の遅い株、酵素産生能の低い株、酵素誘導の不安定な株、多糖や着色成分を多量に生産する株等は、公平な比較評価が容易ではない。自然界における酵素（系）の働く環境を想像すると、バイオリアクターのように懸濁された環境ではなく、菌体の足下でじんわりと分解が進むような場合が一般的であり、菌体外に多量に酵素系をまき散らすような株は稀であると考えるべきかもしれない。すなわち、それら研究のし難い株の酵素の能力は見過ごされてきた可能性が高い。そこで、それら多様な糸状菌株のリグノセルロース分解時に優位に発現する遺伝子情報を網羅的かつ効率的に取得するため、Suppression Subtractive Hybridization(SSH)法を用いた酵素遺伝子情報の収集を進めている。ここでは、白色腐朽菌 *Phlebia* cf. *lindtneri* のそれら情報と、昨年度本学会大会で報告した興味深い活性を示す精製 GH7-CBH のさらなる解析などについて報告する。

Saccharification, rot, SSH

講演番号：2A01p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ A 校舎 01 会場

グリセリン酸およびグルコシルグリセリン酸の細胞賦活作用および生体分子保護作用の評価

Evaluation of glyceric acid and glucosylglyceric acid as cell proliferation inducers and biomlecular protectants

○佐藤 俊、北本 大、羽部 浩（産総研環境化学）
○Shun SATO, Dai KITAMOTO, Hiroshi HABE (AIST)

D-グリセリン酸（GA）は、タバコの葉や果物等の植物に微量含まれる天然の有機酸であり、ラットにおいて肝臓のエタノール代謝を促進する作用等の生物活性が報告されている。我々は、植物油脂等のエステル交換反応で副生するグリセリンを原料に用いた GA の微生物発酵生産技術の開発、さらに GA およびその誘導体の産業利用に向けた各種機能性評価を行ってきた。その結果、GA 自身にはエタノール損傷した胃細胞を賦活化する作用や、GA のアシル誘導体には優れた界面活性剤としての機能を見出している。本研究では、GA 誘導体として配糖体の一種であるα-グルコシルグリセリン酸（GGA）を調整し、GA やその誘導体のさらなる用途開拓を目的として細胞賦活作用および生体分子保護作用を調べ、これらの生物活性化合物としての新たな機能を見出したので報告する。

GGA は、シュクロースと GA カルシウム塩を原料に、シュクロースホスホリラーゼを触媒に用いて既報のとおり調整した。GA および GGA の細胞賦活作用はヒト皮膚線維芽細胞に対して試験した。培養 24 時間後の生細胞数を水溶性ホルマザン色素により評価し、無添加条件に対する相対活性を調べた。また、GA および GGA の添加によりヒト皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲン生産量への変化を調べた。さらに、これら化合物の DNA およびタンパク質の変性条件下における保護効果を調べるため、DNA 保護ではプラスミド DNA をヒドロキシラジカル存在下 GA および GGA を系中に添加し、DNA 分子鎖の分解を電気泳動で評価した。タンパク質保護では、2%卵白溶液を 70℃で加熱し熱変性による濁度変化を調べ、GA および GGA 存在下での濁度変化を無添加条件と比較した。

GA および GGA のヒト線維芽細胞に対する賦活作用では、0.078-7.8 mM GA 存在下では無添加条件に比べて最大で 45%生細胞数が増加し、GGA 存在下では賦活作用は見られなかった。一方、同細胞による I 型コラーゲンの生産量は、GA 添加条件では変化せず、34 mM GGA 添加条件下で 1.4 倍に増加した。また、DNA の酸化的損傷および卵白溶液の熱変性に対して、GA および GGA 添加により当該分子の変性が阻害され、同濃度のグルコースやシュクロース等の糖類に比べて変性に対する高い阻害効果を示した。これらの結果は、GA および GGA の生物活性化合物としての新たな機能を示しており、特にヒト皮膚細胞に対する賦活作用やコラーゲン産生促進作用から、新しいスキンケア素材として応用できる可能性が考えられる。

glyceric acid, glucosylglyceric acid, cell proliferation

講演番号：2A01p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ A 校舎 01 会場

微生物を用いた DL-グリセリン酸からの L-グリセリン酸の光学分割

Microbial resolution of DL-glyceric acid for L-glyceric acid production

佐藤 俊、森田 友岳、北本 大、○羽部 浩（産総研・環境化学）
Shun SATO, Tomotake MORITA, Dai KITAMOTO, ○Hiroshi HABE (AIST)

【目的】グリセリン酸（GA）は、植物などから見出される有機酸の一つであるが、その構造は D 体であり、D-GA は、エタノールの代謝促進効果や肝機能の改善効果など、生物活性を示すことも報告されている。D-GA の製造法としては、酢酸菌によるグリセリンの酸化発酵法が知られており、菌株を選ぶことにより D-GA のみを選択的に生産することができる[1)]。一方で、L-GA は、希少糖である L-ヘキソース合成における出発原料となることが近年報告され、医薬品等の高付加価値化学品原料としての利用が期待されるが、その効率的な製造法は確立されていない。比較的安価な GA 製造法と考えられる、アクリル酸やグリセリンの化学触媒による酸化反応では、ラセミ体の GA（DL-GA）が生成するため、微生物を利用して DL-GA から D 体を簡単に取り除くことができれば、L-GA を安価で簡便に得ることができる。しかしながら、これまで DL-GA の微生物代謝に関する報告はないため、DL-GA のうち D-GA のみを選択的に分解する微生物の探索を行った。

【方法と結果】土壌等の環境サンプルを 5%（w/v）の DL-GA を唯一の炭素源とする合成培地[0.5%（w/v）硫酸アンモニウム、0.1%（w/v）リン酸二水素カリウム、0.2%（w/v）リン酸水素二カリウム、0.05%（w/v）硫酸マグネシウム 7 水和物]5 mL の入った試験管に適量加え、30℃で好気的に 5～7 日間培養した。得られた培養液を新しい同培地に植え継ぎ、30℃で好気的に 5～7 日間培養し、微生物の増殖が見られたサンプルについて、YPD 寒天培地[0.5%（w/v）グルコース、0.5%（w/v）ポリペプトン、0.5%（w/v）酵母エキス、0.1%（w/v）硫酸マグネシウム 7 水和物]に塗布し、単一コロニーを形成させた。単離した約 20 株の GA 資化菌の中から、5%（w/v）DL-GA の培地で良好な生育を示す 2 株（3R 株、72P 株）を選抜し、16S rRNA 解析による同定を行った結果、それぞれ *Serratia* 属および *Pseudomonas* 属細菌であることが明らかとなった。

同定した 2 菌株を、それぞれ YPD 培地 5 mL の入った試験管で 30℃、200 rpm にて 24 時間前培養し、その 1.5 mL を 10%（w/v）DL-GA を含む合成培地 100 mL の入ったフラスコに接種後、30℃、200 rpm にて好気的に培養した。経時的に培養液を採取し、液体クロマトグラフィーにより培養液中に残存している D-および L-グリセリン酸濃度を測定した。その結果、これら 2 株は 72 時間で 10%（w/v）DL-GA のうち D-GA のみを資化した。培養液から陰イオン交換樹脂等を用いて、残った L-GA 回収した。回収した L-GA の光学純度を確認したところ、99%ee 以上であり、本法の有用性が示された。

1）Habe et al., Appl. Environ. Microbiol., **75**: 7760-7766.

microbial resolution, glyceric acid

講演番号：2A01p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 01 会場

長鎖脂肪酸を細胞内に蓄積する初めての細菌の発見 ～新規プラットフォーム微生物を用いた新しいバイオディーゼル生産戦略～

A bacterium that intrinsically accumulates long-chain free fatty acids in its cytoplasm ~New strategy for biodiesel production~

○菅野 学[1]、片山 泰樹[2]、森田 直樹[1]、堀 知行[3]、成廣 隆[1]、三谷 恭雄[1]、鎌形 洋一[1] ([1]産総研・生物プロセス、[2]産総研・地圏資源環境、[3]産総研・環境管理技術)
○ Manabu KANNO[1], Taiki KATAYAMA[2], Naoki MORITA[1], Tomoyuki HORI[3], Takashi NARIHIRO[1], Yasuo MITANI[1], Yoichi KAMAGATA[1] ([1]Bioproduction Research Institute, AIST, [2]Institute for Geo-Resources and Environment, AIST, [3]Institute for Environmental Management Technology, AIST)

従来のバイオディーゼル生産は、トリアシルグリセロール（TAG）を出発物質とするため、副産物グリセロールの精製・除去が必要であった。近年になって、遊離脂肪酸を出発物質とした、グリセロールを生じないバイオディーゼル製造方法が大きな注目を集めている。TAG やワックスエステル（WE）等の中性脂質や、ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）等のポリエステルは、炭素源及びエネルギー貯蔵物質として細胞内に蓄積されることが知られる。一方、遊離脂肪酸を細胞内に高濃度に蓄積する生物は知られていない。これは、遊離脂肪酸の細胞毒性によると考えられている。我々は、高温メタン発酵槽から分離した絶対嫌気性細菌 GK12 株[1]が、長鎖の遊離脂肪酸を細胞内に蓄積することを発見した[2]。GK12 株は、*Firmicutes* 門 *Erysipelotrichaceae* 科に帰属する乳酸発酵細菌で、透過型電子顕微鏡により細胞内に顆粒を蓄積することが観察された。脂質分析の結果、この顆粒は炭素数 14 から 20 の飽和脂肪酸であり、一般的に細菌が蓄積する TAG や WE、PHA は検出されなかった。GK12 株は回分培養で菌体乾燥重量当たり 25%もの長鎖脂肪酸を 1 日以内に蓄積した。有機溶媒への曝露やヒートショック等のストレスによって蓄積量は顕著に増加した。蓄積する長鎖脂肪酸の組成は細胞膜の脂肪酸組成と同一であること、どちらもストレスによって同じような鎖長の変化を示すこと、ストレスによる鎖長の変化の度合いと蓄積量に正の相関が認められたことから、長鎖脂肪酸の蓄積は膜流動性の維持というストレス応答に必要な脂肪酸の新規合成と関連することが強く示唆された。実際、ストレス条件下では脂肪酸合成に関与する遺伝子群の発現が顕著に増加した。一方で，長鎖脂肪酸を分解する β 酸化を担う遺伝子の顕著な発現増加は認められなかった。嫌気的な乳酸発酵では律速となるであろう β 酸化に必要な NAD^+の再生を脂肪酸の新規合成が補足していると考えられた。すなわち、GK12 株における長鎖脂肪酸の蓄積は、ストレス応答ならびに細胞内のレドックスバランス維持の結果として生じると推察された。蓄積した長鎖脂肪酸は飢餓条件下で有意に減少しなかったことから、従来の貯蔵脂質のような炭素源及びエネルギー貯蔵源としての役割は持たないと考えられた。この GK12 株による脂肪酸蓄積機構と、バイオディーゼル生産プラットフォームとして近年開発されている組換え大腸菌の脂肪酸生産様式が似ていることは非常に興味深い。組換え大腸菌とは異なり、GK12 株では蓄積した長鎖脂肪酸は細胞毒性を示さなかった。遺伝子組換えを伴わずに長鎖脂肪酸を高濃度に毒性なく蓄積する GK12 株の特徴は、効率的なバイオ燃料生産に貢献するものと期待される。

[1] Kanno *et al*., Appl. Environ. Microbiol. 2013. 79:6998-7005.　[2] Katayama *et al*., AEM 2013. in press.

stress response, lipid metabolism, biodiesel production

講演番号：2A01p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 01 会場

ハロモナス菌を用いた木材糖化液からの 3-ヒドロキシ酪酸の生産技術開発
Efficient secretion of (R)-3-hydroxybutyric acid from *Halomonas* sp. KM-1 with saccharified wood under microaerobic conditions

○河田 悦和[1]、川崎 一則[1]、野尻 昌信[2] ([1]産総研健康、[2]森林総研)
○Yoshikazu Kawata[1], Kazunori Kawasaki[1], Masanobu Nojiri[2] ([1]AIST, [2]FFPRI)

【目的】国内外で、非可食の木材・草本等を原料として、バイオエタノールの生産、研究が進んでいる一方で、C5糖の利活用が課題となっている。我々のハロモナスKM-1株は、このC5糖キシロース、アラビノースをC6糖グルコースと同速度で利用し、菌体内にバイオプラスチックPHBを蓄積し、微好機条件にすると培地に3-ヒドロキシ酪酸を分泌する。本研究では木材を糖化したサンプルを用いて、3-ヒドロキシ酪酸の高生産を目的に実験を実施した。
【方法】国内の杉、海外のユーカリなどの木材糖化液、コントロールとしてグルコースを炭素源に、*Halomonas* sp.KM-1を好気条件で培養し、バイオプラスチックPHBを蓄積した。その後、供気条件を、微好気条件に変更し、培養を継続した。菌体内のPHB量、培地中の3-ヒドロキシ酪酸の量をそれぞれGC等で分析した。同時に、微好気条件での菌体の状況を確認するために、電子顕微鏡による観察、GC-MSにおるメタボローム解析を行った。
【結果】グルコースを用いた場合、好気条件 60 時間培養で、60 g/L 以上の PHB を菌体内に蓄積した。これを微好気条件に移し、24 時間後には、著量の 3-ヒドロキシ酪酸を培地に分泌した。さらに、木材糖化液を用いて、好気条件で培養したところ、20 g/L 以上の PHB を菌体内に蓄積し、微好機条件にした場合そのほとんどを分解し、3-ヒドロキシ酪酸を培地に分泌した。好気条件、微好気条件の菌体を、電子顕微鏡にて観察した結果、双方とも菌体の溶菌は見られず、好気条件の際に蓄積された PHB 顆粒が、微好気条件では、サイズが減少していることを確認した。また、好気条件、微好気条件で、それぞれの菌体内、培養液の代謝物について、バイオプラスチック PHB の蓄積や 3-ヒドロキシ酪酸の分泌に関連する代謝物について、解析を進めている。

Halomonas, hydroxybutyric acid, saccharified wood

講演番号：2A01p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 01 会場

代謝予測に基づいた 3HP 高生産大腸菌の構築

Construction of 3-hydroxypropionic acid high producible strain of *Escherichia coli* based on metabolic prediction

○徳山 健斗[1]、大野 聡[1]、吉川 勝徳[1]、古澤 力[1,2]、清水 浩[1]([1]阪大院・情報・バイオ情報、[2]理研・QBiC)
○Kento TOKUYAMA[1], Satoshi OHNO[1], Katsunori YOSHIKAWA[1], Chikara FURUSAWA[1,2], Hiroshi SHIMIZU[1] ([1]Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]QBiC RIKEN)

【目的】3-ヒドロキシプロピオン酸（3HP）は、生分解性ポリエステルやアクリル酸などの前駆体となる広い汎用性のある有用物質である。微生物による 3HP 生産においては、基質として安価なグリセロールを利用でき、3HP はグリセロールから少ない代謝反応数で生産可能であるなど、グリセロールを基質とした 3HP 生産は有用な生産プロセスである。近年、目的物質の生産性の向上に向け、細胞内の代謝反応が記述されたゲノムスケール代謝モデルと Flux Balance Analysis（FBA）を用いた代謝予測に基づく合理的な代謝設計が広く行われている。FBA は、代謝ネットワークを静的モデルとして捉え、細胞の増殖速度が最大となる代謝状態を予測する。本手法を用いた遺伝子破壊シミュレーションにより、増殖連動型で目的物質の生産性を向上させる遺伝子破壊候補を予測できる。しかし、FBA では代謝反応を化学量論的にのみ考慮して簡略的に計算しているため、予測結果に基づき構築した株は、予測された目的物質の生産性の高い理想的な代謝状態に及ばない場合がある。そこで本研究では、代謝予測に基づき 3HP 生産株を構築するとともに、実験結果と予測結果との差異を解析し、更なる遺伝子改変や培養条件の最適化を行うことで生産性向上を目指した。

【結果】本研究では、大腸菌 MG1655 株を 3HP 生産の宿主として用いた。大腸菌は元来 3HP を生産する代謝経路を持たないため、*Klebsiella pneumoniae* の *dhaB* と *gdrB*、大腸菌の *aldH* を過剰発現することで、グリセロールを基質とした 3HP 生産株を構築した。グリセロールを基質とした M9 合成培地にて好気条件下で培養を行った結果、3HP 生産収率は 0.05 mol/mol-glycerol になった。次に、大腸菌の全ての代謝反応が記述されたゲノムスケール代謝モデルに対して FBA を用いて、3HP 生産性を向上させる遺伝子の破壊候補を探索した結果、*tpiA* と *zwf* の 2 重遺伝子破壊により 3HP 生産収率の増加が予測された。実際に 3HP 生産株に対し、*tpiA* と *zwf* の 2 重遺伝子破壊株を構築したところ 3HP 生産収率は 0.20 mol/mol-glycerol に増加した。ここで、2 重遺伝子破壊株の培養結果では、主な副生産物として 1,3PPD が 0.38 mol/mol-glycerol と多量に生産されていたが、代謝予測結果では、1,3PPD は生産されないと予測された。そこで、代謝予測結果に実際の細胞の状態を近づけることで生産性の向上につながると考え、1,3PPD の生合成経路に関わる *yqhD* をさらに破壊した 3 重遺伝子破壊株を構築した。その結果、3HP 生産収率は 0.34 mol/mol-glycerol に増加した。

3-Hydroxypropionic acid, *Escherichia coli*, Glycerol

講演番号：2A01p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 01 会場

微生物を利用したキラル P(2-ヒドロキシ酪酸)の合成とポリマー解析

Biosynthesis of isotactic P(2-hydroxybutyrate) and polymer analysis

三宅 政裕[1]、○松本 謙一郎[1]、寺井 彩月[1]、加部 泰三[2,3]、岩田 忠久[2,3]、田口 精一[1,3]([1]北大院工、[2]東大院農、[3]CREST・JST)
Masahiro MIYAKE[1], ○Ken'ichiro MATSUMOTO[1], Satsuki TERAI[1], Taizo KABE[2,3], Tadahisa IWATA[2,3], Seiichi TAGUCHI[1,3] ([1]Hokudai, [2]Tokyo Univ., [3]CREST-JST)

分子中に不斉炭素が１つ存在すると、２種類の鏡像異性体が存在し、その物理化学的性質は、同一となる。しかし、不斉炭素を含む分子が重合されて高分子となると、無数の立体異性体が生まれ、且つ、すべてのモノマーが同一の立体配置をとるポリマー（isotactic）と、異なる立体配置のモノマーがランダムに重合されたポリマー(atactic)とは、物理化学的性質が異なる。例えば、isotactic ポリ乳酸は、結晶性で硬いフィルムにできるのに対し、atactic ポリ乳酸は、非晶質で成型できない。したがって、高分子合成に置いて、モノマーの立体配置を制御することは非常に重要である。

我々は、微生物が合成するポリエステルの生合成を改変し、様々な非天然型のポリマーの合成に取り組んでいる。微生物ポリエステル重合酵素は、元々厳密な立体認識能を有し、モノマーが不斉炭素を有する場合は例外なく R 体だけが重合され、これはモノマー構造を非天然に拡張した場合でも同様である。本研究では、ポリ乳酸と類似の構造を有するポリ(2-ヒドロキシ酪酸)[P(2HB)]に着目した。P(2HB)は、モノマー内に不斉炭素を有するので、本ポリマーをフィルムに加工できるような材料とするためには isotactic P(2HB)を合成する必要がある。キラル 2HB を化学的に重合させることにより、isotactic P(2HB)を合成することはできるが(Tsuji et al., Biomacromolecules 2010)、キラル 2HB が大変高価なため、合成できるポリマー量は限られていた。そこで我々は、微生物ポリエステル合成系を用いて、ラセミ 2HB を原料として、isotactic P(2HB)を合成することを検討した。

モノマー供給に必要な CoA 転移酵素と重合酵素を発現する組換え大腸菌を、ラセミ 2HB を添加した培地で振とう培養し、得られた菌体からポリマーを抽出した。その結果、得られたポリマーは、少なくとも 99.2%以上の光学純度で R 体から構成される事が分かった。さらに、このポリマーは透明なフィルムに加工でき、ポリ乳酸とは異なり軟質な物性を示した。この結果より、微生物合成が isotactic P(2HB)を作る有用な方法であることが示された。次に、スケールアップのため、ジャーファーメンターを用いて同じ組換え株を培養したところ、2HB に加え、14mol%の乳酸が含まれた共重合体が合成された。これは、培養が嫌気的になり乳酸の合成が促進され、乳酸が 2HB と同様の CoA 化を経て重合酵素に取り込まれたためと推定された。そこで、通気条件をより嫌気的にして培養を行ったところ、乳酸分率を 50mol%程度まで上昇させることが出来た。これらの共重合体を等温結晶化させて広角 X 線回折に供したところ、P(2HB)、ポリ乳酸とは異なる回折を示した。これは、２種類のユニットが共結晶化し、ホモポリマーの結晶とは異なる構造をとったためと考えられた。

chiral polymer, poly(lactic acid), polyhydroxyalkanoate

講演番号：2A01p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 01 会場

植物バイオマス由来の単糖混合物を炭素源としたバイオポリエステルの生産
Biopolyester productions from plant biomass-derived sugars
○大井 俊彦、佐々木 勝平、松本 謙一郎、田口 精一（北大院工）
○Toshihiko OOI, Shouhei Sasaki, Kenichiro Matsumoto, Seiichi Taguchi (Hokkaido Univ.)

【目　的】
微生物が合成可能なポリヒドロキシブタン酸[P(3HB)]に代表されるバイオポリエステルは、石油由来のプラスチックに代わる環境低負荷型の高分子材料として注目されている。代表的なバイオポリエステルである P(3HB)は硬質で柔軟性が乏しい物性を示すが、第二モノマー成分をポリマー分子中に導入した共重合ポリエステルは、軟質となり柔軟性の付与が可能になるため広範囲な用途に利用可能となる。これらの共重合ポリエステルは、再生可能な植物バイオマス由来の糖や脂肪酸から生合成される。非可食性の植物バイオマスには五炭糖と六炭糖からなる多糖類が混在しており、これらを糖化することでグルコースとキシロースを主成分とした単糖混合物を得られる。本研究では、実バイオマスからポリマー生産までの一貫プロセスの開発を目的に、非可食植物バイオマスから調製したホロセルロースおよびクラフトパルプを酵素糖化して得た単糖混合物を炭素源として、組換え大腸菌を用いた P(3HB)ホモポリマーおよびコポリマーの生産について検討した。

【方法および結果】
非可食性の植物バイオマスとして、草本系植物の稲ワラおよびススキ、ならびに木質系植物由来のユーカリ由来クラフトパルプを選択した。稲ワラおよびススキは微粉末化した後、亜塩素酸およびアルカリを用いて脱リグニン処理しホロセルロースを調製した。得られたホロセルロースおよびクラフトパルプは市販のセルラーゼ剤により 50℃で酵素糖化を進めたところ、約 24 時間で分解が飽和した。糖化液中にはいずれの材料を用いた場合でも、単糖としてグルコースおよびキシロースの組成比がほぼ同様の単糖混合物として得られた。その後、糖化物は熱処理により酵素を失活させた。単糖混合物をサンプルとしたポリマー生産には、最終の糖濃度が 2%(w/v)となるように単糖混合物を添加した LB 培地を用いて培養した。また同時に、純粋なグルコースとキシロースの混合物を、酵素糖化した単糖混合物と同組成になるように培地に添加してポリマー生産量のコントロールとして用いた。その結果、今回検討した非可食植物バイオマスから調製した単糖混合物を炭素源とした場合、コントロールと比較して P(3HB)ホモポリマーおよびコポリマーの生産量にほとんど違いは見られなかった。以上のことから、植物バイオマス由来の単糖混合物は、ポリマー生産の炭素源として十分に利用可能であることが分かった。

Biopolymer pruduction, Biomass, Polyester

講演番号：2A01p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 01 会場

ゲノム変異導入法による微生物ポリマー高生産化宿主の創成

Genetic evolution of bacterial host by transposon mutagenesis for efficiently producing bioplastic

○門屋 亨介[1,2]、田口 精一[1,2] ([1]北海道大院総合化学院、[2]CREST)
○Ryosuke KADOYA[1,2], Seiichi TAGUCHI[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]CREST)

微生物生合成バイオポリエステルであるポリ乳酸は、生分解性などの機能性を有しているバイオプラスチックである。再生可能なバイオマス資源から合成が可能なため、石油系プラスチックの代替材料としてポリ乳酸を使用することに工業的な注目が集まっている。従来、微生物細胞内で生合成するポリ乳酸の生産性を向上させるためには、その合成酵素遺伝子群に対して優良型変異の導入や、プロモーターの改良による細胞内発現量増加、または培養法の検討などさまざまなアプローチが試みられてきた。

本実験では、これまでとは異なるアプローチとして、宿主大腸菌の変異体ライブラリーを用いて、ポリマー生産性が向上した菌株の新規創製を試みた。はじめに、ポリマー生合成関連遺伝子群を持った宿主大腸菌にトランスポゾン（Tn5）を導入し、変異体ライブラリーを作成した。その変異体ライブラリーをポリマーを特異的に染色可能なナイルレッドプレート上で培養し、呈色反応を用いた一次スクリーニングを行なった。続いて強い呈色反応を示した菌株を液体培地で培養後、HPLC を用いた二次スクリーニングを行ない、ポリマー生産性の向上した株を幾つか得ることに成功した。その高生産化細胞を顕微鏡観察し細胞長及び細胞幅を計測した結果、全ての変異株で細胞幅が大幅に上昇しており「細胞体積が増大」する特徴を示した（volume-increased strain: VIS と命名）。これら VIS 株は、細胞体積が著しく上昇した結果、細胞内に今まで以上のポリマーを蓄積することができたと予想された。

Bioplastic, Bacterial host, Genetic evolution

講演番号：2A01p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 01 会場

Purification and characterization of a polymer degrading enzyme from an isolated bacterium

○Jian SUN, John NDUKO, Ken'ichiro MATSUMOTO, Toshihiko OOI, Seiichi TAGUCHI (Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

[Purpose]

P[(*R*)-lactate(LA)-*co*-(*R*)-3-hydroxybutyrate(3HB)] is an unusual microbial polyester produced in engineered *Escherichia coli* expressing lactate-polymerizing polyhydroxyalkanoate synthase. P(LA-*co*-3HB) is thought to be a potent biobased material because of its semitransparency and flexibility. The aim of this study was to investigate the biodegradability of this new biopolyester. To date, P(3HB) has been proved to be degraded by a variety of microorganisms possessing P(3HB) depolymerases, while P[(*R*)-LA] (PDLA) is hardly biodegraded. Therefore, biodegradability of the copolymer incorporating LA and 3HB was an interesting subject.

[Methods and results]

We attempted to isolate P(LA-*co*-3HB)-degrading microorganisms from soil/water in Hokudai campus. The strains, which grew on a P(LA-co-3HB)-containing agar plate and generated halo, were chosen as candidates. Eventually, we isolated one strain, the supernatant of which exhibited significant P(LA-*co*-3HB)-degrading activity. The culture supernatant degraded P(LA-*co*-3HB) and P(3HB) but not PDLA. A potential depolymerase in the culture supernatant was purified to be homogeneous using ammonium sulfate precipitation and isoelectric electrophoresis. The N-terminal amino acid sequence of the purified enzyme exhibited homology to those of Type II extracellular PHA depolymerases. As a comparison, the substrate specificity of a well-characterized PHB depolymerase from *Alcaligenes feacalis* was tested, revealing that the depolymerase from *A. feacalis* did not degrade P(LA-*co*-3HB) and PDLA. This fact indicated that the newly isolated depolymerase possessed unique substrate specificity. Moreover, the results of this study suggested that P(LA-*co*-3HB) is a biodegradable polymer in the environment.

polyhydroxyalkanoates, biodegradation, enzyme

講演番号：2A01p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 01 会場

脂肪酸合成経路を介した糖からの共重合ポリエステルの生合成
Biosynthesis of copolymers from sugar through fatty acid synthesis pathway

○外村 彩夏[1]、岩崎 美佳[1]、村田 和歌子[2]、明智 聡[3]、福居 俊昭[3]、柘植 丈治[4]、田中 賢二[5]、松崎 弘美[2] ([1]熊本県大院環境共生、[2]熊本県大環境共生、[3]東工大院生命理工、[4]東工大院総理工、[5]近大産理工)
○Ayaka HOKAMURA[1], Mika IWASAKI[1], Wakako MURATA[2], Satoshi AKECHI[3], Toshiaki FUKUI[3], Takeharu TSUGE[4], Kenji TANAKA[5], Hiromi MATSUSAKI[2] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech., [4]Dept. Innov. Eng. Mat., Tokyo Inst. Technol., [5]Dept. Biol. & Environ. Chemistry, Kinki Univ.)

【目的】多くの微生物が菌体内に合成・蓄積するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、生分解性を有し、環境調和型プラスチックとして期待されている。化学合成独立栄養細菌 *Ralstonia eutropha* は、糖や炭酸ガスを炭素源として､炭素数 4 の 3-ヒドロキシブタン酸（3HB）からなる P(3HB)ホモポリマーを合成するが、これは堅くて脆く、実用性に乏しい。当研究室では、*Pseudomonas* sp. 61-3 の低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子（*phaC1*）および脂肪酸合成経路からの中鎖長 3-ヒドロキシアルカン酸（3HA）ユニットを供給する 3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ遺伝子（*phaG*）を導入したさまざまな *R. eutropha* の組換え株を作製し、脂肪酸合成経路を介した物性の優れた P(3HB-*co*-3HA)共重合ポリエステルの生合成を試みてきた。近年、PhaG 酵素は、3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ活性よりもチオエステラーゼ活性が高いことが報告された[1)]。また、これまで PHA 非生産菌の大腸菌を宿主として、糖を唯一の炭素源とした P(3HB-*co*-3HA)共重合ポリエステルの生合成に関する報告例はない。そこで、本研究では、PHA 重合酵素遺伝子とともにモノマー供給系に関わる酵素遺伝子を導入した大腸菌および *R. eutropha* の組換え株を作製し、糖を炭素源として脂肪酸合成経路を介して 3HB 分率の高い P(3HB-*co*-3HA)共重合ポリエステルを合成することを目的とした。
【方法および結果】*Pseudomonas* sp. 61-3 の *phaC1* および *phaG* 遺伝子、*R. eutropha* の 3-ヒドロキシブタン酸（3HB）ユニット供給系酵素遺伝子 *phbAB* が *R. eutropha* の PHA 生合成遺伝子の native promoter によって発現するように設計したプラスミド pJScK-C1GAB を構築した。さらには、*Pseudomonas aeruginosa* PAO あるいは *P. putida* NBRC100650 の推定 3-ヒドロキシアシル CoA（3HA-CoA）リガーゼ遺伝子を pBBR1MCS-3 ベクターに導入したプラスミドを構築し、これらの各プラスミドとともに pJScK-C1GAB を導入した大腸菌の組換え株を作製した。これらの株を糖を炭素源として培養した結果、*P. aeruginosa* PAO の推定 3HA-CoA リガーゼ遺伝子を導入した組換え株で、中鎖長 3HA ユニットが取り込まれた共重合ポリエステルが約 20 wt%合成された。この組換え株の乾燥菌体よりポリエステルを抽出し、GC/MS および NMR 解析を行った結果、このポリエステルは炭素数 8～14 の中鎖長 3HA ユニットが 5.4 mol%導入された P(3HB-*co*-3HA)であった。*R. eutropha* の組換え株については現在検討中である。

1) Wang *et al*., *Appl*. *Environ*. *Microbiol*.（2012）

polyhydroxyalkanoate, PHA, biodegradable plastics

講演番号：2A01p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 01 会場

微生物産生ポリエステル・ポリヒドロキシアルカン酸の分子量制御における細胞内エタノールの影響
Effect of endogenous ethanol on molecular weight regulation of bacterial polyester : polyhydroxyalkanoate

○廣江 綾香、百武 真奈美、白石 雅也、柘植 丈治（東工大院総理工）
○Ayaka HIROE, Manami HYAKUTAKE, Masaya SHIRAISHI, Takeharu TSUGE (Tokyo Tech.)

【背景・目的】ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、糖や植物油など再生可能な資源から微生物によって合成されるポリエステルであり、低環境負荷型のプラスチック材料として広く研究が進められている。PHA の幅広い用途への応用に向けた課題のひとつに、ポリマーの長さ（分子量）の制御が挙げられる。PHA は基本となるモノマーユニットが連なった鎖状の分子であり、この鎖の長さ（分子量）によって材料強度が変化する。長いポリマーであるほど高強度材料としての加工が可能であり、これはポリマー鎖同士がより強固に絡まり合うためである。本研究では、微生物体内における PHA の分子量制御を考えるにあたり、同じく細胞内で合成されるエタノールに着目し、連鎖移動剤（ポリマー伸長を停止させる化合物）としての役割を検証した。なお、全ての検証は、遺伝子組換え大腸菌を宿主として行った。【実験】PHA 鎖末端へのエタノールの取込みの有無は、NMR による末端構造解析より評価した。NMR 解析用のポリマーは、標識(1-^{13}C)エタノールを 10 g/L 添加し培養した組換え大腸菌より抽出・精製した。宿主生産エタノールの連鎖移動剤効果については、温度・培地量・攪拌速度等を変化させた種々の培養条件にて、エタノール生産レベル及び PHA 分子量との関連より評価した。エタノール生産レベルは、培養上清中濃度を酵素法にて、PHA 分子量はゲル浸透クロマトグラフィーにより測定した。さらに、エタノール生産の抑制効果についても検証行うため、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子(*adhE*)欠損株を用い、野性株との分子量の比較を行った。最終的に組換え大腸菌 5 株の培養データから、各株における連鎖移動回数とエタノールレベルの関連ついて検証を行った。【結果・考察】NMR 解析より、ほぼ全て(90%)の PHA 鎖末端に標識(1-^{13}C)エタノールが取込まれ、付加されていることが明らかとなった。また、宿主生産エタノールレベルは、培養条件により様々に変化し、生産量が増大するにつれ、PHA の分子量が減少する傾向が明確に示された。*adhE* 欠損株では、培養上清中にエタノールはほぼ検出されず(0.03 g/L)、PHA 分子量は野生株と比較し 77%増加した。さらに、分子量に影響を与える PHA 重合酵素の発現量を加味し、組換え大腸菌 5 株における連鎖移動回数を算出したところ、その回数は宿主生産エタノールレベルと高い正の相関関係(R^2=0.8687)を示した。これらの結果は、組換え大腸菌の PHA 生産において、エタノールが主要な連鎖移動剤として働くことを示している。*In vivo* における PHA 連鎖移動剤について言及した報告は本研究が初めてであり、PHA の分子量制御を考える上で、重要な指針の一つになると考えている。

Polyhydroxyalkanoate, Molecular weight regulation, Ethanol

講演番号：2A01p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 01 会場

C. difficile 由来ロイシン代謝遺伝子群を利用した P(3HB-*co*-3H4MV)生合成経路の構築

Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate-*co*-3-Hydroxy-4-Methylvalerate) by Recombinant *Escherichia coli* Expressing Leucine Metabolism-Related Genes Derived from *Clostridium difficile*

○雑賀 あずさ、渡辺 世利子、柘植 丈治（東工大院総理工）
○Azusa SAIKA, Yoriko WATANABE, Takeharu TSUGE (Tokyo Tech)

【目的】

側鎖分岐型ユニット 3-ヒドロキシ-4-メチル吉草酸 (3H4MV)を含む 3-ヒドロキシブタン酸 (3HB)ベースのポリヒドロキシアルカン酸 (PHA)共重合体は, 3H4MV の分率に応じて柔軟な性質を示す[1)]。しかし，現在のところ柔軟性の付与に必要な 3H4MV 分率 10 mol%を実現するには，3H4MV に構造の類似した脂肪酸を前駆体として添加する必要がある。脂肪酸前駆体は高価，かつ菌体の増殖を阻害することから，脂肪酸前駆体を必要としない 3H4MV 共重合体合成法の確立が必要となった。

【方法】

分岐アミノ酸のひとつ，ロイシンは炭素骨格が 3H4MV と一致しており，このことから，宿主体内で合成されたロイシンを前駆体に 3H4MV モノマーの供給経路を構築できるのではないかと考えた。一方，偏性嫌気性グラム陽性細菌 *Clostridium difficile* は，ロイシン代謝の過程で 3H4MV の前駆体である 4M2PE-CoA を生成する[2)]。この 4M2PE-CoA を水和して得られた 3H4MV-CoA と，別経路で供給される 3HB-CoA を PHA 重合酵素で重合すると，P(3HB-*co*-3H4MV)となる。本実験では，*C. difficile* 由来ロイシン代謝遺伝子群，および PHA 合成関連遺伝子群を導入した大腸菌を宿主に，ロイシンおよびロイシンの供給源である糖質から P(3HB-*co*-3H4MV)を生合成することを試みた。

【結果と考察】

PHA 生合成の宿主にレアコドン対応大腸菌 *E. coli* BL21 codonplus (DE3)-RIL を用い，*C. difficile* 由来ロイシン代謝遺伝子群(*ldhA*, *hadAIBC*)の活性を確認したところ，一部酵素が好気培養下では活性を持たないことがわかった。そこで, *ldhA, hadAIBC* および PHA 合成関連遺伝子群[*phaP*(D4N)*C*(NSDG)J_{Ac}, $phaAB_{Re}$]を導入した組換え *E. coli* BL21 codonplus (DE3)-RIL をグルコース 20 g/L およびロイシン 1 g/L を添加した条件で微好気培養したところ，12.2 mol%の 3H4MV 分率を示す共重合体の合成に成功し，構築した経路が正しく機能していることが示唆された。GC-MS，NMR 分析の結果，この共重合体は 3HB と 3H4MV からなる 2 元共重合体であった。また，PHA 生合成の宿主を，ロイシン過剰合成大腸菌 *E. coli* NS1391[3)]に変更したところ，グルコース単一炭素源下でも 3.0 mol%の 3H4MV を含む共重合体の生合成が確認され，大腸菌を宿主とした P(3HB-*co*-3H4MV)の生合成に始めて成功した。

1) Tanadchangsaeng et al., (2009) Biomacromolecules, 10: 2866, 2) Kim et al. (2006) Appl Environ Microbiol, 72: 6062
3) Ptitsyn et al., US Patent WO 2008/010565 A2

Polyhydroxyalkanoate, 3H4MV unit, *Clostridium difficile*

講演番号：2A01p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 01 会場

ポリエステル重合酵素が示すエステル分解能に関与するアミノ酸の探索

Study on catalytic residue for alcoholysis activity by $PhaRC_{YB4}$

○百武 真奈美[1]、水野 康平[2]、柘植 丈治[1] ([1]東工大院総理工、[2]北九州高専)
○MANAMI HYAKUTAKE[1], KOUHEI MIZUNO[2], TAKEHARU TSUGE[1] ([1]Dept. Innov. Eng. Mater., Tokyo Inst. Technol., [2]Kitakyushu Natl. Coll. Technol.)

【目的】 環境調和型材料として利用が期待されるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、微生物がエネルギー貯蔵物質として細胞内に蓄積するバイオポリエステルである。PHA 合成細菌は PHA の重合を触媒する重合酵素を有しており、その酵素特性から 4 つのクラスに分類されている。

なかでもクラス IV に属する *Bacillus cereus* YB-4 由来の PHA 重合酵素 $PhaC_{YB4}$ は PHA 重合能以外にもアルコーリシス能を有することがわかっている。アルコーリシス活性は他の重合酵素においては確認されておらず、この反応によりアルコールがポリマー鎖末端に導入されることから、新たな PHA 末端修飾法として応用が期待される。しかしながら、$PhaC_{YB4}$ にはセリンを活性中心とした一般的なリパーゼ様分解配列は存在しておらず、アルコーリシスを触媒する残基は不明である。したがって本研究ではアルコーリシスに関わるアミノ酸残基の特定を目的とした。

【方法】 本研究では一部のアミノ酸を置換した変異型 $PhaC_{YB4}$ を作成し、その PHA 分解能を調査することで関与するアミノ酸残基の特定を試みた。PHA 分解能の有無については、変異型酵素を PHA に作用させ PHA 分子量が低下するか調査することによって判断した。具体的には $PhaC_{YB4}$ への点変異導入を行い、Cys^{151}、Asp^{306}、His^{335} それぞれを置換した変異型酵素を構築した。これと野生型 *Delftia acidovorans* 由来重合酵素 $PhaC_{Da}$ および *Ralstonia eutropha* 由来モノマー供給酵素 PhaAB を導入した遺伝子組換え大腸菌(*E. coli* JM109)を構築し、グルコースを炭素源として培養し PHA 生産を行った。同様に、変異型 $PhaC_{YB4}$ と PhaAB のみを導入した大腸菌でも PHA 生産を試みた。大腸菌内に蓄積された PHA の含有率はガスクロマトグラフィーにより測定し、分子量はゲル浸透クロマトグラフィーにより決定した。

【結果】 変異型 $PhaC_{YB4}$ と PhaAB を発現する大腸菌株内においては PHA 生産が確認されず、本変異型酵素が PHA 重合能を欠失していることがわかった。変異型 $PhaC_{YB4}$ と $PhaC_{Da}$ を共発現する大腸菌では、合成された PHA はいずれも数平均分子量(M_n)が 1000×10^3 程度であった。これは $PhaC_{Da}$ のみを発現する場合に合成される PHA の M_n と近く、ここから変異型 $PhaC_{YB4}$ が PHA の分子量に影響を与えないことがわかった。一方野生型 $PhaC_{YB4}$ を共発現させた場合には分子量低下が確認されていることから、変異型 $PhaC_{YB4}$ はアルコーリシス能を欠失していることが示唆された。これらの結果から、$PhaC_{YB4}$ におけるアルコーリシス能には、PHA 重合反応に関わるアミノ酸残基(Cys^{151}、Asp^{306}、His^{335})が重要な役割を担うことが示唆された。

Catalytic residue, Alcoholysis reaction, PHA synthase

講演番号：2A01p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 01 会場

3-ヒドロキシプロピオン酸ユニット含有ポリヒドロキシアルカン酸の生合成を目指した *Ralstonia eutropha* の代謝改変

Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for biosynthesis of 3-hydroxypropionate-containing polyhydroxyalkanoates

○増田 大輝[1]、向山 正治[2]、堀川 洋[2]、折田 和泉[1]、中村 聡[1]、福居 俊昭[1]([1]東工大院生命理工、[2]日本触媒)
○Taiki MASUDA[1], Masaharu MUKOYAMA[2], Hiroshi HORIKAWA[2], Izumi ORITA[1], Satoshi NAKAMURA[1], Toshiaki FUKUI[1] ([1]Tokyo Tech., [2]Nippon Shokubai)

【目的】ポリ（3-ヒドロキシブタン酸）［P(3HB)］に代表される微生物産生ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、バイオベースかつ生分解性の環境低負荷型プラスチック素材として期待されている。ポリ（3-ヒドロキシブタン酸-*co*-3-ヒドロキシプロピオン酸）［P(3HB-*co*-3HP)］共重合体は 3HP モノマー分率の増加に伴って融点・結晶化度が低下し柔軟性が向上されるが、その微生物生産には 3HP などの高価な前駆体を添加する必要があった。当研究室ではこれまでに、緑色非硫黄細菌 *Chloroflexus aurantiucus* 由来マロニル-CoA レダクターゼ（Mcr）およびプロピニル-CoA 合成酵素中のアシル-CoA シンテターゼドメイン（Acs）を P(3HB)生産菌 *Ralstonia eutropha* JMP134 株にベクター導入することで、マロニル-CoA から 3HP-CoA を生合成する「MCR 経路」を構築し、糖質のみから最大約 2 mol%の 3HP ユニットを含む P(3HB-*co*-3HP)の生合成を行なった。本研究では、この知見を元に 3HP 分率増加を目指した代謝改変を行なうことを目的とした。
【方法と結果】Mcr によりマロニル-CoA から生成した 3HP を 3HP-CoA に変換する酵素として、Acs に加えて *R. eutropha* H16 株由来プロピオニル-CoA シンテターゼ PrpE、*Clostoridium propionicum* 由来プロピオン酸 CoA-トランスフェラーゼ Pct を用いたところ、それぞれの菌体内活性と 3HP 分率に相関がなかったことから、Mcr にマロニル-CoA を供給するアセチル-CoA カルボキシラーゼ（ACC）に着目した。まずアミノ酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* 由来 ACC の２つの遺伝子 *accBC* および *dtsR1* を構成的プロモーター下流に配置したベクターを用いて、MCR 経路を構築した *R. eutropha* JMP134 形質転換体に導入したが 3HP 分率の増加には至らず、ACC 活性の増加も認められなかった。そこでストレプトアビジン-HRP によるビオチン化タンパク質の検出を行ったところ、*R. eutropha* JMP134 由来株では ACC 発現ベクターの導入による変化はなかったが、*R. eutropha* H16 由来株では AccBC と推測されるビオチン化タンパク質の発現を確認した。この結果から、宿主を遺伝子操作や代謝に関する知見がより豊富な *R. eutropha* H16 株に変更し、MCR 経路のベクター改良や相同組換えによる染色体への外来遺伝子導入などを進めている。また、我々は最近、グリセロール資化能の高い *R. eutropha* H16 組換え株を作製するとともに、H16 株のグリセロール代謝に関する知見を得た。そこで肺炎桿菌 *Klebsiella pneumoniae* に由来する補酵素 B_{12} 依存型ジオールデヒドラターゼ（DD）と CoA 依存型プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ PduP によってグリセロールから 3HP-CoA を生合成する「DD 経路」を *R. eutropha* H16 由来株に構築することも検討中である。

Polyhydroxyalkanoate, 3-hydroxypropionate, *Ralstonia eutropha*

講演番号：2A01p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ A 校舎 01 会場

Methylobacerium extorquens の包括的転写機構改変によるポリヒドロキシアルカン酸生産能の向上
Improvement of polyhydroxyalkanoate productivity of Methylobacterium extorquens by global transcription machinery engineering

○鈴木 裕貴、折田 和泉、福居 俊昭、中村 聡（東工大院生命理工）
○Hirotaka SUZUKI, Izumi ORITA, Toshiaki FUKUI, Satoshi NAKAMURA (Tokyo Tech.)

【目的】持続可能資源として注目されるメタノールを単一炭素源として生育可能なメチロトローフの中には、メタノールを原料にしてバイオベース生分解性プラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸（PHA）を生合成するものが知られているが、その PHA 蓄積率は *Ralstonia eutropha* といった代表的な PHA 生産菌と比べると低い。我々はこれまでにモデルメチロトローフである *Methylobacterium extorquens* AM1 の代謝改変によって PHA 蓄積率が野生株の 3 倍以上である株を取得しているが、応用利用には未だ十分とはいえない。本研究では、σ^{70} をコードする *rpoD* 遺伝子へのランダムな変異導入による網羅的転写バランス改変とその後の表現型スクリーニングを基盤とした包括的転写機構改変を本菌に適用し、メタノールを単一炭素源として PHA 生産能が向上した株を取得することを目的とした。

【方法と結果】*M. extorquens* AM1 染色体上の *rpoD* とその上流 200 bp の領域をプラスミドベクター pCM80 に挿入した。挿入 *rpoD* 領域を鋳型としたエラープローン PCR 増幅により、ランダム変異が導入された *rpoD* 断片を得た。得られた増幅断片をメガプライマーとして用いてベクター部分を PCR 合成し、*Dpn*I 処理によって鋳型プラスミドを除去した。この反応液で *M. extorquens* AM1 由来株を形質転換することで変異ライブラリーを作製した。メタノールを単一炭素源とする Nile Red 含有寒天培地上でライブラリーを培養し、各コロニーの蛍光強度を比較することで PHA 蓄積量に基づいたスクリーニングを行った。約 20,000 のコロニーから蛍光強度の高い株を約 30 株程度選抜し、Nile Red 含有固形培地に植え継いだ。このなかから、特に蛍光強度の強い株を 10 株選抜し、0.5%メタノールを含む液体培地で培養した。遠心分離および凍結乾燥した菌体についてメタノリシス処理し、ガスクロマトグラフィーにより PHA 蓄積率を測定した。その結果、コントロール株と比較すると乾燥菌体重量あたりの PHA 蓄積量が平均で約 7%増加していた。今後、さらなるスクリーニングを進めるとともに、得られた変異株について、トランスクリプトーム解析またはプロテオーム解析を行うことで PHA 蓄積率の向上に寄与した遺伝子を特定する予定である。

Methylobacterium extorquens, methanol, polyhydoroxyalkanoate

講演番号：2A01p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ A 校舎 01 会場

顆粒結合タンパク質の特性を利用した *Ralstonia eutropha* 共重合ポリエステル生合成能の改変

Modification of copolyester biosynthesis ability of *Ralstonia eutropha* by functions of granule-associated protein

○川島 由依、折田 和泉、中村 聡、福居 俊昭 (東工大院生命理工)
○Yui KAWASHIMA, Izumi ORITA, Satoshi NAKAMURA, Tosiaki Fukui (Tokyo Tech.)

【目的】ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は種々の微生物が菌体内に蓄積する熱可塑性ポリエステルであり、生分解性を示すこと、かつ糖や植物油等の再生可能バイオマス資源から生産可能であることから、石油を原料とする難分解性プラスチックに代わる環境調和型高分子材料としての実用化が期待されている。土壌細菌 *Aeromonas caviae* が植物油から生合成するポリ((*R*)-3-ヒドロキシブタン酸-*co*-(*R*)-3-ヒドロキシヘキサン酸) [P(3HB-*co*-3HHx)]は柔軟性に優れ、実用化に適した PHA であるが、*A. caviae* による生産効率は低い。そこで我々はこれまでに P(3HB)生産菌 *Ralstonia eutropha* への *A. caviae* 由来 PHA シンターゼ変異体遺伝子（$phaC_{NSDG}$）の導入、および P(3HB)生合成経路・脂肪酸β-酸化経路の改変により、大豆油から P(3HB-*co*-10mol% 3HHx)を生産する組換え株を作製した。一方、PHA 生産菌において両親媒性の PHA 顆粒結合タンパク質 PhaP は PHA 顆粒の疎水性表面に結合することで PHA 顆粒を細胞内に安定に維持すると考えられているが、近年、PhaP は PHA シンターゼ PhaC と相互作用してその重合特性に影響を及ぼすことが示唆されている。本研究では *R. eutropha* 改変株の高い PHA 生産効率を維持しつつ 3HHx 分率をさらに向上させることを目的として、PhaP に着目した改変を行った。

【方法と結果】 PhaP-PhaC 間相互作用が PhaC による重合反応に及ぼす影響、および PhaP・PhaC の由来に依存する相互作用特異性の可能性に着目し、$phaC_{NSDG}$ を導入した数種の *R. eutropha* P(3HB-*co*-3HHx)生合成株を宿主として、$phaP1_{Re}$ を PHA シンターゼと同じ由来の $phaP_{Ac}$ に置換した株を作製した。その結果、興味深いことにいずれの株においても大豆油を炭素源として生合成された PHA 中の 3HHx 分率が向上することを見出した。特に、PHA 蓄積期に特異的かつ強力に発現する $phaP1_{Re}$ の下流に(*R*)-ヒドラターゼ遺伝子 $phaJ_{Ac}$ を挿入した株では、$phaP1_{Re}$ から $phaP_{Ac}$ への置換によって PHA 生産量が 4%増加しつつ、3HHx 分率が 43%増加した。これらの結果から $PhaC_{NSDG}$ は同じ微生物種由来の $PhaP_{Ac}$ と何らかの相互作用をすることで 3HHx-CoA 取り込み能が変化した可能性が考えられた。現在、*phaP* 置換による PHA 顆粒結合タンパク質の変化、および顆粒表面の PHA シンターゼの重合特性におよぼす影響について検討を加えている。

polyhydroxyalkanoate, *Ralstonia eutropha*, granule-associated protein

講演番号：2A01p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ A 校舎 01 会場

ポリ乳酸コポリマーステレオコンプレックスの生分解
Biodegradation of Stereocomplex with PLA copolymers
○中山 敦好、川崎 典起、山野 尚子、上垣 浩一（産総研関西）
○Atsuyoshi NAKAYAMA, Norioki KAWASAKI, Naoko YAMANO, Kouichi UEGAKI (AIST)

【目的】循環型社会の構築に向けた方策の一つとしてバイオマスの活用が検討されており、ポリ乳酸はバイオマス由来のポリマーとして研究され、普及が図られている。ポリ乳酸の一つの形態としてポリ L-乳酸とポリ D-乳酸とからなるステレオコンプレックス(Sc)は 225℃の融点を持つ高融点高強度材料として注目されている。しかしながら、その強固な結晶構造のため、柔軟性に乏しく、難生分解性である。我々は以前、乳酸系コポリエステルの Sc 化とその物性の改善と非晶部の生分解について報告した。本発表では、ポリ乳酸より優れた加水分解性、生分解性を示す乳酸系コポリエステルをベースにした Sc の生分解性について報告する。
【方法】コポリエステルはラクチドと 7 員環までのラクトン類及びグリコリドとの開環共重合により合成した。Sc は L 体、D 体のポリマーのクロロホルム溶液を混合、溶媒キャスト法にてフィルムとして得た。Sc 生成の確認は DSC による熱分析で行った。生分解性の評価は熱水中での加水分解試験、プロテネース K による酵素分解、コンポスト試験により行った。
【結果】Sc 形成はコポリマー中の乳酸成分が 80%以上で確認された。また、コモノマーはε-カプロラクトンのような長鎖のものよりもメチレン鎖数の少ないグリコリドの方で形成が容易であった。熱分析から、得られたフィルム中には元のコポリマーやポリ乳酸の融点に加えて、より高い温度に Sc の融点が新たに出現し、Sc の形成が確認された。その融点は元のコポリマーの融点と強い相関があり、コポリマーとホモポリ乳酸の組合せの場合、ホモポリ乳酸とコポリマーの融点の差がそのまま Sc の融点低下と一致した。コポリマー同士の組合せでは Sc 化の際の融点低下はホモポリマーの場合ほど大きくはなかった。オートクレーブ中での加圧下 121℃での加水分解試験(1h×2 回)では、コポリマーの分解率は高いものでは 20%近くになるのに対し、Sc 化により加水分解性は大きく低下した。プロテネース K での酵素試験ではその差はさらに顕著となった。コンポストによる生分解性も同様の傾向を示し、元のコポリマーでは乳酸含率 90%のものでは 3 週間の試験で残存重量は 30%以下となるのに対し、Sc 化により生分解性は低下し、L 含率が低いものほど分解は速くなった。分解試験後の残存ポリマーの熱分析から、Sc、元ポリマーの両方の融解熱が大きくなり、Sc でその程度は大きいことから、分解は主としてアモルファス部分、ついで元ポリマーの結晶部分で進行したと考えられる。そこで作成した Sc フィルムを熱処理し、結晶化度を大きくした試料での生分解試験も行ったので、その結果についても合わせ報告する。

Poly lactic acid, Stereocomplex, Biodegradation

講演番号：2A01p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ A 校舎 01 会場

生分解性ポリマーの生分解性制御

Control of biodegradation of biodegradable polymer

○山野 尚子、川崎 典起、中山 敦好 (産総研)
○Naoko Yamano, Norioki Kawasaki, Atsuyoshi Nakayama (AIST)

【目的】生分解性ポリマーの生分解性は用途によっては環境低負荷材料として長所になるが、一方長期安定性を求められる用途では実用化を阻む要因となる。ポリアミド４はナイロンの１種である高性能プラスチックであり、バイオマス由来のγ-アミノ酪酸を原料として生産可能なバイオベースポリマー[1)] と同時に生分解という性質を持つ [2)]。我々はポリアミド４の生分解性の制御について検討し、ステアリン酸などの長鎖脂肪酸を末端に付加することにより生分解性を抑制する技術を本大会において報告してきた。本報告では、長鎖脂肪酸であるステアロイル基を持つ種々のポリアミド４を合成し生分解性への影響を調べると共に、フェニル基やポリエチレングリコール(PEG)等長鎖脂肪酸以外の官能基の効果について検討した。
【方法】ポリアミド４は 2-ピロリドンを原料として開環重合により合成した。長鎖脂肪酸、フェニル基、PEG を持つポリアミド４は開始剤にそれぞれの酸塩化物を用いることにより導入した。合成したポリマーの生分解性は活性汚泥を用いて評価した。JIS K6950 に記載されている無機培地に各種ポリマー粉末を分散させ、微生物源としては標準活性汚泥(化学物質評価研究機構)を使用し、BOD 測定装置（タイテック, BOD tester 200F）を用いて JIS K6950 に準拠した方法にて生分解に伴う酸素消費量を測定することにより生分解試験を行った。疎水性は接触角を測定することにより評価した。トリフルオロエタノールに溶解したポリマー（濃度 5mg/ml)、0.05mL をスピンコーター（ミカサ、MS-A100）を用いてスライドガラス上にコーティングし、接触角計（協和界面科学, DMe-200）を用いて測定した。
【結果】末端にステアロイル基を持つポリマーは生分解を抑制されたが、長鎖メチレン鎖がポリマーの中央部分に位置する場合は生分解を受けた。分子量を制御しステアロイル基の比率の異なるポリマーを合成したがその効果は認められず、生分解抑制効果はそれぞれのポリマーの接触角から求めた疎水度と相関を持っていた。またフェニル基や PEG を付加したポリアミド４では生分解を抑制する効果は見られなかった。より疎水性が高い官能基を持つポリマーを合成しその効果を検討すると共に、ポリマー表面の組成分析を行った。

1) Yamano *et al*, J.Polym.Environ.,21,528(2013)
2) Yamano *et al*, J.Polym.Environ.,16,141(2008)

biodegradable polymer, polyamide, biodegradability

講演番号：2A01p22
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ A 校舎 01 会場

生分解性の制御を目的として作製したポリマーコンポジットの抗菌活性

Antimicrobial activity of polymer composites developed for the control of biodegradation

○安藤 仁、中山 敦好、山野 尚子、上垣 浩一（産総研）
○Hitoshi ANDO, Atsuyoshi NAKAYAMA, Naoko YAMANO, Kouichi UEGAKI (AIST)

【目的】生分解性ポリマーを汎用用途向けのポリマーとして利用するためには、生分解性を制御し、安定性を高めることが求められる。ポリマーの生分解は、主に微生物による作用を受けるため、これら微生物の生育を抑えることで生分解性を制御できる。しかし、単にポリマーに高い抗菌性を付与するだけでは非分解になると考えられるため、このバランスが重要となる。また、ポリマーを無機、有機系材料とコンポジット化することにより、高性能なポリマー複合材料を作製することが可能となる。今回我々は、生分解性ポリマーに抗菌性を付与し、生分解性を制御することを目的に様々な抗菌剤とのコンポジット化について検討した。

【方法】コポリマーはε-カプロラクトンとL-ラクチドの組成比を 90/5 とし、開始剤にテトラフェニルスズを用いて開環重合により合成した。コンポジット化するナノ微粒子には、可視光応答型の酸化チタンを用いた。合成したコポリマーと酸化チタンを混合し、溶媒キャスト法によりコンポジットフィルムを作製した。コンポジットフィルムの *Escherichia coli* に対する蛍光灯照射下(4000 lux、4 h)での抗菌活性を JIS R1702 に準じたフィルム密着法で評価した。

【結果】コンポジットフィルムの蛍光灯照射下における抗菌活性を評価した結果、コンポジットフィルムは暗所下においても抗菌活性を示した。しかし、蛍光灯照射下では、暗所よりも高い抗菌活性を示し、0.5%（w/w）酸化チタン含有コンポジットフィルムでは、*E. coli* は完全に死滅していた。また、酸化チタン含有率が 5%に増加すると、照射、非照射に関わらず *E. coli* は完全に死滅した。これらの結果から、生分解性ポリマーに酸化チタンをコンポジット化することで抗菌性が付与され、さらに光照射によって抗菌性が強化し、生分解性が抑えられるため、生分解性制御への応用が期待できる。このほか、金属微粒子や酵素とのコンポジット化したポリマーの抗菌性や生分解性についても合わせて報告する。

biodegradation, composite, antimicrobial

講演番号：2A02a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ A 校舎 02 会場

細胞性粘菌の化学生態学的解析

Chemical and ecological analysis of slime mold

○齊藤 佑美子[1]、宮崎 早紀[1]、Bartlem Derek[2]、齊藤 玉緒[3] ([1]上智大院・理工、[2]北海道大・農、[3]上智大学・理工)
○Yumiko Saito[1], Saki Miyazaki[1], Derek Bartlem[2], Tamao Saito[3] ([1]Graduate School of Science and Technology, Sophia Univ., [2]Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., [3]Faculty of Science and Technology, Sophia Univ.)

【目的】土壌微生物の細胞性粘菌と線虫は、生息域が同じで餌を共有するなど相互に密接に関係している。そこで、社会的に影響が大きい植物寄生性線虫 *Meloidogyne hapla* に注目し、細胞性粘菌とどのような相互関係があるのかを調べた。本研究では、細胞性粘菌が *M. hapla* に与える影響の定量的解析法を確立するとともに、農薬への応用を視野に入れ、細胞性粘菌・線虫・植物の 3 種の相互関係を検討した。

【方法】まず、細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* を直接発生させた培地と Filter 上で発生させてそれを取り除いた培地にそれぞれ *M. hapla* を播種して挙動を解析した。その結果、Filter を通過した *D. discoideum* の分泌物が *M. hapla* に影響を与えていることが判明したため、粘菌分泌物を回収して *M. hapla* の挙動と植物感染への影響を検討した。挙動解析では、プレートの端に分泌物を浸み込ませた Filter をのせ、中央に *M. hapla* を播種した。24 時間後に *M. hapla* の歩いた跡を画像解析ソフトで定量化し、分泌物側とその反対側のどちらに多く線虫が移動したか比較した。植物感染実験では、培地上に植物(ミヤコグサ *Lotus japonics*)を 3 つ等間隔に並べ、一番端の植物の隣に分泌物を浸み込ませた Filter を置いた。そして、それぞれ植物の根の先端から 1 cm の所に *M. hapla* を播種した。48 時間後に植物に感染した *M. hapla* の数をカウントし、それぞれの植物に感染した線虫の総数に対する各植物に感染した線虫の数の割合を算出した。また、分泌物が植物の成長に与える影響を検証するため、根の隣に分泌物を浸み込ませた Filter を置いた場合の植物の根の伸長速度を観測した。

【結果】挙動解析では、*M. hapla* が粘菌分泌物の反対側の領域に多く動いていた。つまり、分泌物は *M. hapla* の忌避行動を引き起こすということが示された。植物感染実験では、*M. hapala* は分泌物から離れた植物に集中して感染するという結果が得られた。このことから、細胞性粘菌の分泌物は線虫が近くの植物に感染するのを抑制することが出来ると考えられる。分泌物が植物に与える影響の検証では、分泌物を隣に置いた場合に植物の根の成長阻害が見られた。しかし、この植物を新しい培地に移すと正常に根が伸長したため、分泌物は植物を枯らせてしまうわけではないことも判明した。今後は、分泌物中に含まれる *M. hapla* に影響を与えている化学物質の同定を進めていきたい。

Dictyostelium discoideum, *Meloidogyne hapla*, chemical ecology

講演番号：2A02a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ A 校舎 02 会場

生物浄化法を用いた飲料水の硬度の低減化

Reduction of drinking water hardness with biological filtration

○宮平 理恵[1]、黒田 桃子[2]、浅川 奈美樹[2]、小関 正道[2]（[1]東京家政大学大学院人間生活学総合研究科健康栄養専攻、[2]東京家政大学家政学部栄養学科）
○Rie MIYAHIRA[1], Momoko KURODA[2], Namiki ASAKAWA[2], Masamichi KOSEKI[2] ([1]Graduate School of Tokyo Kasei University, [2]Tokyo Kasei University)

【目的】硬度は飲料水の味に大きく関与し、食品製造においても大きく影響を与える。そのため、硬度が高い地域の浄水場では硬度を下げるためにろ過の前に薬品処理を行っている。本研究では硬度の高い水を良質な飲料水及び食品製造用水に変えるため、薬品を使わず、安全、簡単、安価な方法である生物浄化法により硬度を低減化する方法を検討した。
【方法】ろ過材中に藻類を中心とした生物膜を形成させる生物浄化法というろ過方法を使用した。本実験では 2ℓペットボトルを用いて、中に小石を詰めた小型のろ過層を 3 本連結して 1 セットとした装置を作成した。ろ過層の一つには粒径約 13 ㎜の軽石を 1.5ℓ、残り 2 本には粒径約 5 ㎜の小石を 1.5ℓろ過材として用いた。ろ過層に井戸水を 1 ヶ月程度通水して藻類が充分に生成した後、硬度の高い試料水をろ過した。ろ過前後の試料水中の硬度は 0.01M-EDTA 標準溶液を用いたキレート滴定法により測定した。
【結果】硬度 310 ㎎/ℓ程度のミネラルウォーターを試料水として用いたところ、1 回のろ過で 12%、1 日間のろ過で 43%、3 日間のろ過で 63%、5 日間のろ過で 67%、7 日間のろ過で 70%、9 日間のろ過で 74%硬度が減少した。減少した硬度の量はミネラルウォーターの一時硬度量と同量であったため、永久硬度成分である硫酸カルシウムと塩化カルシウムを用い、それぞれ硬度がミネラルウォーターと同じ 310 ㎎/ℓになるように調製した水溶液をろ過層でろ過したところ、減少はほとんど見られなかった。このことから藻類による生物浄化法により、一時硬度成分のみが除去できることがわかった。

biological filtration, water hardness, drinking water

講演番号：2A02a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ A 校舎 02 会場

水棲生物と環境因子との関係を捉える為のデータマイニング
Data mining for capturing relationship between probe organisms and environmental factors
○葭田 征司[1]、赤間 真樹子[2]、朝倉 大河[1]、伊達 康博[1,2]、菊地 淳[1,2,3,4] ([1]横市院生命、[2]理研 CSRS、[3]理研 BMEP、[4]名大院生命農)
○Seiji Yoshida[1], Makiko Akama[2], Taiga Asakura[1], Yasuhiro Date[1,2], Jun kikuchi[1,2,3,4] ([1]Grad. Sch. NanoBioSci., Yokohama City Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]RIKEN BMEP, [4]Grad. Sch. Bioagr., Nagoya Univ.)

河口環境は、地質や川等の陸圏由来および内湾や沿岸域等の海洋圏由来の両面からミネラル群等が流入し、潮汐作用を受けながら豊富な栄養場を形成している。これら豊富なミネラル源・栄養源等に支えられ、河口環境は多種多様な生態系を形成しており、その生態系から人は生存基盤としての生態系サービスを享受している。こういった豊富なミネラル源・栄養源等の環境要因は、水棲生物の新陳代謝、組織および骨格形成、成長促進等に影響を与え、生体成分の変動を齎す為、その環境要因と魚類との関係性を明らかにすることは、生態系サービスの維持に役立ち、さらには養殖技術の発展へと繋がると著者らは考えている。本研究では、このような環境要因と魚類の代謝変動との関係性を評価することのできるプロファイリング技術の確立を目的としており、NMR メタボローム解析に加え ICP イオノーム解析を用いて、プローブ魚類を対象とした魚類各器官における代謝物およびミネラルプロファイリング技術の構築を推進してきた。本研究では、親水性代謝物だけでなく疎水性代謝物を評価する為に水溶媒に加えメタノール溶媒を用いて代謝物の抽出を行い、それぞれの溶媒に対してＣＰＭＧ（Ｃａｒｒ　Ｐｕｒｃｅｌｌ　Ｍｅｉｂｏｏｍ　Ｇｉｌｌ）法、ＷＡＴＥＲＧＡＴＥ（ｗａｔｅｒ　ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｂｙ　ｇｒａｄｉｅｎｔ　ｔａｉｌｏｒｅｄ　ｅｘｃｉｔａｔｉｏｎ）法、２Ｄ　ＪＲＥＳ（ｔｗｏ－ｄｉｍｅｎｓｉｏｎａｌ　Ｊ－ｒｅｓｏｌｖｅｄ）NMR法の三種類のＮＭＲパルスシーケンスプログラムによる計測方法を用いて評価した。これらの計測手法を用いて統合的に評価することにより、オーバーラップ領域における高分解能化を実現するとともに、より多くの代謝物情報を取得することに成功した。また、環境応答を調べることに最適と考えられる魚類の筋肉部を用い、東北地方および関東近郊の河川に生息するマハゼを対象として、季節変動も考慮した河川間の違いについて解析を行ったところ、同一時期における代謝プロファイルは河川毎に異なる傾向を示し、また平均体長も有意な差異を示したことから、河川環境の違いがマハゼの成長過程および代謝プロファイルと関係している可能性が示唆された。さらに鶴見川での季節変動を評価した結果、季節変動に応じて変動する代謝物プロファイルを捉えることが可能であった。本会ではさらに、各河川由来のマハゼおよび環境水のミネラルプロファイルから生育環境や季節、体長等の変動を踏まえた統合的な解析による最新の知見について議論したい。

Environmental metabolomics, Mineral profiling, Fish metabolism

講演番号：2A02a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ A 校舎 02 会場

魚類多様性の潜在性を見据えた代謝プロファイル評価法の構築

Investigating of metabolic profiling technique for the potential of fish diversity

○朝倉 大河[1]、坂田 研二[2]、佐藤 有穂[1]、伊達 康博[1,2]、菊地 淳[1,2,3,4]（[1]横市院生命医科、[2]理研 CSRS、[3]理研 BMEP、[4]名大院農）
○Taiga Asakura[1], Kenji Sakata[2], Yuho Sato[1], Yasuhiro Date[1,2], Jun Kikuchi[1,2,3,4] ([1]YCU, [2]RIKEN CSRS, [3]RIKEN BMEP, [4]Nagoya Univ.)

【目的】日本沿岸は世界三大漁場の一つとも呼ばれ、市場に出回らないが美味な魚類資源が多様に存在する。しかし多様性豊かな魚類に完全養殖できる種は少なく、まず蓄養等の段階を経て、その潜在性を惹き出していく必要がある。こうした蓄養も含めた養殖過程では自然界から人口環境へと変化するため、餌等の変化に応じた魚類品質の変化が生じ、その内的変動を非侵襲的なサンプリングで評価できることが望まれる。本研究ではその一端として、NMR メタボロミクスを主軸とした魚類代謝プロファイリング技術の構築と餌料に対する応答、および種の多様性について以下のように評価した。
【方法】本研究では魚類糞便・腸内環境についての解析と評価を行うため、マハタ（*Epinephelus septemfasciatus*）・シロメバル（*Sebastes cheni*）・マハゼ（*Acanthogobius flavimanus*）等の多種多様な魚類を天然環境から採集し、人工海水水槽にて種ごとに飼育し、適時餌料を換えつつ、定期的に糞便のサンプリングを行った。採集後の糞便は凍結乾燥しオートミルによる破砕後、MeOD 溶媒を用いて抽出し、700MHz の NMR 装置を用いて ^{1}H-NMR 計測した。これらの多検体スペクトルデータを bin 化処理により数値化した後、フリーソフトウエア R を用いて相関解析・主成分分析（PCA）等の多変量解析により評価した。代謝物のアノテーションには statistical total correlation spectroscopy (STOCSY) および当研究室で開発した SpinAssign プログラムを用いた。また、次世代シーケンサーを用いた腸内微生物叢の解析も行い、同様に多変量解析により評価した。
【結果】計 21 種の魚類に対して 1~12 週間の飼育で得られた糞便を採集し、種の多様性および摂食物による応答について評価した。その結果、餌料変化の影響が最も大きく、次いで種の違いを反映した。このことから、魚類の糞便プロファイルは餌料の変化による代謝動態と種の多様性の特徴を捉えることが出来る非侵襲的なプロファイリング技術としての有用性が示唆された。また、飼育環境下において同一種内での餌料の違いに基づく変動を上記のプロファイリング法によって評価した結果、餌料の変化により糞便プロファイルは一時的に大きく変動し、一定期間後には元のパターンに帰結する傾向が得られた。以上のことから、生育環境・食餌の違い、および種による違いが糞便の代謝プロファイリングに影響をもたらすこと示唆された。魚類糞便には生理状態や健康状態の情報が反映されており、これらの情報を利用した養殖魚類の非侵襲的な検査技術確立のため、上記のプロファイルと関係すると考えられる腸内細菌叢の餌料・種の多様性に対する変動について統合的な評価も行っており、本会ではこれらの検討で得られた最新の知見についても合わせて報告したい。

aquafarming, intestinal　environment, NMR

講演番号：2A02a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ A 校舎 02 会場

対流と環境微生物による水質浄化

Water purification by water flow and environmental bacteria

○永野 陽祐、吉田 有汰、アディカリ ディネシュ、向 真樹、久保 幹（立命館大生命・生物工）
○ Yosuke NAGANO, Yuta YOSHIDA, Adhikari DINESH, Masaki MUKAI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【目的】

水の流出入が少ない止水域の水質汚染の主原因である有機態窒素や有機体炭素は底土に生息する環境微生物により分解される。これらの汚染物質の分解は、原因物質と微生物が接触することが必須である。しかし、止水域では、微生物による分解量を汚染物質の蓄積が上回るため、汚染物質が徐々に増加していき、COD の上昇や底土へのヘドロ層の堆積などを引き起こしている。特にヘドロ層の堆積はそのような止水域の物質循環のさらなる悪化を引き起こすことにつながる。

本研究では、水質浄化における対流と環境微生物の役割を明らかにするため、研究室規模の循環型水処理システムを作製した。その後、各種環境水を用いた浄化実験を行い、対流と環境微生物を解析した。その結果、カラム内の担体や流水速度が浄化に及ぼす影響の重要性が確認できたため、自然の循環機能に倣った水質の浄化方法の構築を目指した。

【方法・結果】

本実験は種々の環境水（200L）、水を循環させるポンプ、微生物を保持するためのカラムを備えた装置を用いて行った。カラム内には微生物吸着担体を充填し、ポンプによる対流を行わせた。タンク内の水の COD,TC,TN の継時的測定を行った。また、担体中から eDNA 抽出を行い、担体 1 g 中の微生物保持数を測定し、抽出した eDNA を用いて PCR-DGGE を行うことでその担体中の菌叢の解析を行った。

効率の良い水浄化が確認された 22 回転/day 付近の流速で対流を行わせると 2 週間の浄化で、COD の初期値がそれぞれ 13ppm、10ppm、5ppm の場合、10ppm、5ppm、3ppm にまで減少し、全体で平均 25%(14%-39%)減少する浄化が認められた。対流だけの場合(カラムなし)及び対流を行わなかった場合は、COD の減少は認められなかった。このため、COD の減少にはカラムが必須であると分かった。また、対流を行ったカラム内の担体 1g 中の微生物数は 2.13×10^{9}cells /g であり、これは一般的な土壌環境中に存在する細菌数と同レベルであった。これらの結果から、対流と環境微生物が水質浄化に重要な役割を果たしていることが確認された。

water purification, COD, environmental bacteria

講演番号：2A02a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ A 校舎 02 会場

熱帯・亜熱帯原生のヒ素高蓄積植物モエジマシダによる寒冷地におけるヒ素汚染土壌の植物修復

Phytoremediation of arsenic contaminated soil in the Temperate Zone using a subtropical-to-tropical arsenic-hyperaccumulator fern,*Pteris vittata*

○黄 毅[1]、大友 俊介[1]、菅原 一輝[2]、簡 梅芳[1]、宮内 啓介[1]、北島 信行[3]、井上 千弘[2]、遠藤 銀朗[1] ([1]東北学院大、[2]東北大学、[3](株)フジタ)

○Yi HUANG[1], SHUNSUKE OTOMO[1], KAZUKI SUGAWARA[2], MEI-FANG CHIEN[1], KEISUKE MIYAUCHI[1], NOBUYUKI KITAJIMA[3], CHIHIRO INOUE[2], GINRO ENDO[1] ([1]Tohoku-gakuin Univ, [2]Tohoku Univ, [3]Fujita Corp)

【目的】東北地方は亜寒帯に属し、過去における鉱山開発または地熱利用等により土壌のヒ素汚染が多数確認されている、さらに 2011 東日本大震災津波によりヒ素多く含まれる海底堆積物が海岸沿いに押し上げられ、土壌のヒ素汚染を拡大してしまった現状である。本研究は、津波等によりヒ素汚染が発生した宮城県沿岸域土壌に熱帯・亜熱帯原産のヒ素高蓄積植物のモエジマシダを適用した場合、ヒ素汚染土壌修復が有効になしえるかどうかを実証することを目的として行った。

【方法】ヒ素汚染圃場 2 箇所を選定し、2012 年と 2013 年の二年間には寒冷期を避け、5 月にモエジマシタを植付け、11 月に刈り取った。土壌と植物を毎月採取し熱硝酸等による分解後および土壌水溶出後のヒ素を ICP-MS を用いて分析した。また、シダの乾燥重量等の変化を経時的に測定しバイオマス当りのヒ素吸収量等を評価した。

【結果・考察】2 年間のモエジマシダの栽培により土壌中ヒ素濃度の低減が確認でき、地上部の羽片のヒ素除去量が最大 107 mg/m^2 であることが分かり、熱帯・亜熱帯原産のモエジマシダは宮城県沿岸域においてもヒ素汚染土壌の修復に有効であることが知られた。モエジマシダの羽片のヒ素濃度は 10 月までは増加したが、低温期の 11 月になると減少し、11 月のシダヒ素濃度は羽片よりも根茎において高くなることが確認され、ヒ素は羽片から根茎または根に転流したと考えられた。これらのことから、寒冷地では早い時点でのシダの刈り取りまたは根茎を含めた刈り取りによりヒ素を高濃度に含むバイオマスの回収が必要と考えられた。

arsenic, phytoremediation, *Pteris vittata*

講演番号：2A02a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ A 校舎 02 会場

東北地方ヒ素汚染土壌に対するヒ素蓄積性シダ適用可能性の検討
Evaluation of the applicability of phytoremediation with arsenic accumulating ferns to arsenic contaminated field in Tohoku district

○菅原 一輝[1]、黄 毅[2]、遠藤 銀朗[2]、井上 千弘[1] ([1]東北大院環境、[2]東北学院大)
○Kazuki SUGAWARA[1], Yi HUANG[2], Ginro ENDO[2], Chihiro INOUE[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Tohoku Gakuin Univ.)

2011 年 3 月に発生した東日本大震災は多くの被害をもたらした．その中の一つに，津波によって運ばれた海成堆積物由来の土壌汚染が挙げられる．既往の報告では津波浸水域の土壌 140 地点弱のヒ素濃度を測定したところ，その 3 分の 1 強に当たる 47 地点で土壌環境基準の超過が確認された[1]．ヒ素はガンや様々な健康被害の原因物質であるため，汚染された土壌のヒ素除染を早急に進める必要があるものの，その被害範囲はおよそ 400 km^2 と推定されているため従来の客土などの手法ではコスト面で除染が難しいと考えられ，これらの問題に対応出来る手法の開発が求められている．植物を用いた環境修復技法であるファイトレメディエーションは既存の手法に比べ低コスト・低環境負荷で，広範囲に渡る中・低濃度の汚染に対して効果的に適用が可能であると考えられており，その実用化が期待されている．*Pteris vittata*(モエジマシダ)を初めとする Pteris 属のシダは地上部にヒ素を高濃度で蓄積する種が存在するが，その多くが熱帯・亜熱帯原産であるため，東北地方で適用可能かどうかは未知数である．そのため，本研究では東北地方における津波由来ヒ素汚染土壌へのファイトレメディエーション適用可能性の検討を行うため，亜熱帯原産の *P.vittata* と東北地方にも自生している *Pteris cretica*, *Pteris multifida* のヒ素蓄積性シダ 3 種について実圃場で試験を行った．

実験は 2013 年 5 月から 12 月にかけて宮城県内 2 箇所の圃場(気仙沼市，仙台市)で行い，5 月に各種シダの苗を定植し，12 月に収穫した．それぞれの品種について収穫時のバイオマス量，シダ各部位のヒ素含有量などの評価を行った．また，コントロールとしてヒ素非蓄積性シダである *Nephrolepis exaltata* も一緒に定植した．12 月初旬の収穫時には *P.vittata* と *N.exaltata* は茶色く変色し立ち枯れしていたのに対し，*P.cretica* 及び *P.multifida* の 2 種はどちらも青々と繁茂している様子が確認された．11 月下旬の夜間の最低気温は-5℃を下回る日が数日あったため，亜熱帯性の *P.vittata* や *N.exaltata* では低温環境に対応出来ずに枯死してしまったと考えられる．しかしながら，*P.cretica* と *P.multifida* の 2 種は冬季でもさらに生育を続け，更なるバイオマスの増加が見込める．地上部のヒ素濃度はヒ素蓄積性シダ 3 種間では大きな差は見られなかったが，非蓄積性の *N.exaltata* よりも有意に高かった． 以上の結果より，東北地方におけるヒ素汚染土壌に対してヒ素蓄積性シダの適用が可能であると考えられ，東北地方で自生可能な種のものが植物体の収穫量の観点からより適している可能性が示唆された．

[1]土屋ら，地質学雑誌 118(7), 419-430, 2012

Phytoremediation, Arsenic, Fern

講演番号：2A02a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ A 校舎 02 会場

亜ヒ酸酸化を指標にしたモエジマシダによるヒ素の吸収を触媒する微生物の探索

Investigation of microbes that contribute to the absorption of arsenic by *Pteris vittata* using arsenite oxidation as an index

○簡 梅芳、宮内 啓介、黄 毅、遠藤 銀朗（東北学院大学）
○Meifang CHIEN, Keisuke MIYAUCHI, Yi HUANG, Ginro ENDO (Tohoku-Gakuin Univ.)

【目的】
ヒ素高蓄積植物のモエジマシダ（*Pteris vittata*）はヒ素汚染土壌の浄化に適用可能な植物の一つである。当研究室のこれまでの研究により、モエジマシダによるヒ素吸収に先立つヒ素形態の変化には、根圏中の微生物が大きく寄与していることが示唆された。本研究は、モエジマシダの根圏または根の内部に存在する微生物に着目し、それらの微生物の亜ヒ酸酸化活性および遺伝的特徴の解析を行った。
【実験方法】
ヒ素存在下でのモエジマシダの栽培実験を行い、シダ根圏試料の全 DNA に対して、微生物由来の亜ヒ酸酸化酵素遺伝子 *aroA* を標的とした PCR-tRFLP 解析を行った。根圏試料から亜ヒ酸・ヒ酸に対する耐性菌株を単離し、それらの単離菌株の亜ヒ酸酸化活性を調べた。また、各菌株の *aroA* 遺伝子の有無およびその遺伝子発現も調べた。
【結果と考察】
モエジマシダ根圏から得た DNA を鋳型とした *aroA* の tRFLP の解析結果から、特定の *aroA* 遺伝子を保有する微生物種がヒ素の酸化が進行した栽培前期において増加し、のちに減少したことが示された。根圏試料からは 37 株のヒ素耐性菌の単離に成功した。単離菌株に対する亜ヒ酸酸化活性の定性・定量試験を行った結果、亜ヒ酸酸化能を示した菌株が確認され、培地中に添加した亜ヒ酸は 5 日間以内にヒ酸に酸化されたことが確認できた。現在、単離菌株の培養実験におけるヒ素の形態変化と *aroA* 遺伝子発現について解析中である。

Pteris vittata, arsenite oxidation, *aroA*

講演番号：2A02a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ A 校舎 02 会場

消石灰散布が土壌微生物に及ぼす影響

Influence of lime hydrate sprinkled on the soil soil microorganism

○南 純一、濱崎 洋輔、坂上 吉一、森 美穂 (近畿大農)
○Junichi MINAMI, Yousuke HAMAZAKI, Yosikazu SAKAGAMI, Miho MORI (Kinki Univ.)

【背景・目的】 日本においては家畜伝染病が発生すると、家畜伝染病予防法により感染施設やその周辺域の消毒に大量の $Ca(OH)_2$（消石灰）が使用される。消石灰は水に溶解するとpH値が増加し、殺菌作用を示す。また、二酸化炭素と反応して炭酸カルシウムになることから環境への負荷も小さいと考えられてきた。しかし、利用実績がある一方、作業中に消石灰が目に入り失明した事故や、消石灰散布後に周辺の樹木が枯れたり、池の魚が死んだこと等が報告されている。その上、農林水産省が定める消石灰の散布基準（1 m^2 あたり 0.5～1.0 kg）には明確な科学的根拠が無いばかりか、上限値も存在しない。このような状況にあって、消石灰散布による生態系への影響を詳細に調査した研究例はほとんど認められない。そこで本研究では、土壌由来の細菌群を用いた消石灰の殺菌力試験と、実際に消石灰を屋外土壌に散布し、土壌の化学的変化と環境微生物に消石灰散布が及ぼす影響を調査した。

【材料と方法】

1. 消石灰の殺菌力試験　いくつかの一般細菌と土壌単離菌を用いて飽和消石灰溶液による殺菌力試験を行った。各菌液を 0～10 分間反応させ後、リン酸緩衝液で中和と希釈を行い、寒天培地上に塗抹した。一晩培養後、出現してきたコロニー数を計測した。また、土壌由来の細菌群を用いた殺菌力試験は、土壌 1 g を使用し、上記と同様の方法で評価した。

2. 野外消石灰散布実験　キャンパス内の野外土壌に0～1000 g/m^2の消石灰を単回散布あるいは複数回散布し、経時的に試料を採取した。表面土壌と深さ5 cm 土壌についてpH測定、平板培養法による生菌数測定、原子吸光光度計を用いた交換性陽イオン（Na, Mg, K, Ca）測定、および吸光光度法による可給態リン酸およびアンモニア態窒素の測定を行った。

【結果および考察】

1. 消石灰の殺菌力測定試験　一般細菌と土壌単離菌を用いた試験結果により、消石灰の殺菌力を *in vitro* で評価できる系を構築することができた。その系を用いて土壌由来の細菌群に対する消石灰の影響を評価した結果、未処理のものと比較して生菌数に顕著な違いは見られなかった。

2. 野外消石灰散布実験　単回、複数回散布ともに土壌の pH は、経過時間や消石灰濃度に依存した差異は認められなかったものの、消石灰散布土壌は未散布土壌と比較して 0.2～1 程度高い値を示した。生菌数測定の結果、消石灰散布と未散布の間では各土壌中に存在する生菌数に顕著な差異は認められず、濃度による違いも見られなかった。交換性陽イオン濃度の比較では未散布と比べて、Na, Mg, K に大きな変化は見られなかったが、Ca に関しては散布土壌で高い濃度が検出された。

lime hydrate, environment risk, soil bacteria

講演番号：2A02a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ A 校舎 02 会場

施肥による土壌微生物相変化に対するＤＧＧＥ解析の有効性検討

Feasibility Study of DGGE Analysis of Soil Microbial Community Responses to Fertilization

○松本 絵里乃、矢澤 義昭、五十嵐 由美子（日立製作所）
○Erino MATSUMOTO, Yoshiaki YAZAWA, Yumiko IGARASHI (Hitachi, Ltd.)

【緒言】

環境負荷を低減する持続可能型農業の実現に向け、有機肥料の利用拡大に寄与する技術を開発している。化学肥料は植物に栄養分を無機イオンの形で直接供給するが、有機肥料は有機物の分解が必要なため、これを利用するためには、微生物による有機物分解機能が不可欠である。この機能を最適化するためには、土壌中で共生関係にある多種多様な微生物を個ではなく、相として把握することが必要である。本研究では、施肥による土壌微生物相の変化を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）を用いて評価可能であるかを検証するために、有機肥料投与の時期を挟んで微生物相を時系列的に測定した。

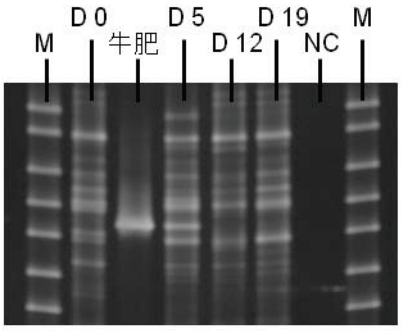
【実験】

解析土壌サンプルは普通畑土を耕起して施肥する前と施肥後（５日後、１２日後、１９日後）に採取し、DNA を抽出後、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて、糸状菌相（１８S　リボゾーム RNA）を増幅した。得られたサンプルを変性剤の濃度勾配があるゲルを用いて電気泳動し、得られたバンドパターンを解析した。

【結果と考察】

施肥前後の土壌の微生物相を解析・比較することで、施肥が土壌微生物相に与える影響を検討した（図）。土壌微生物相は施肥５日後では堆肥に由来するバンドと、これに加えて施肥前の土壌にも存在しなかった新たなバンドが出現した。施肥１２日後と１９日後の土壌微生物相では、堆肥中微生物に由来するバンドが消滅した。これらは、有機肥料の微生物と土壌の微生物が相互作用を及ぼしあったことを示し、施肥後時間が経過すると微生物は新たな相に移行して安定することを示唆している。

以上の結果より、土壌微生物相の変化を DGGE 測定によって計測可能であることを確認した。また、DGGE 測定は、肥料が土壌に及ぼす影響を評価する指標の一つになる可能性があると考えられた。



M : Marker, D 0 : 施肥前,
D 5 : 施肥5日後, D 12 : 施肥12日後, D 19 : 施肥19日後,
NC : ネガティブコントロール

図　施肥前後の微生物相比較

DGGE, Soil Microbial Community

講演番号：2A02a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ A 校舎 02 会場

MBR 高負荷運転における微生物群集構造変化の次世代シークエンサーによる解析

16S rRNA deep sequencing analysis to monitor the changes in microbial community structure during the operation of a membrane bioreactor

○飯島 孝行[1]、佐藤 由也[1]、堀 知行[1]、尾形 敦[1]、柳下 宏[2]、羽部 浩[2] ([1]産総研・環境管理、[2]産総研・環境化学)
○Takayuki IIJIMA[1], Yuya Sato[1], Tomoyuki Hori[1], Atsushi Ogata[1], Hiroshi Yanagishita[2], Hiroshi Habe[2] ([1]AIST EM Tech, [2]AIST IS Chem)

【背景･目的】　膜分離活性汚泥法(MBR: Membrane bioreactor)は、活性汚泥法と膜分離技術を組み合せた廃水処理技術である。一般的な活性汚泥法の最終沈殿池の代わりに膜で活性汚泥と処理水を固液分離できるため、従来法に比べ施設を小型化できる。さらに、汚泥を沈殿させる必要が無いため反応タンクの活性汚泥を高濃度に設定できる。これまで MBR について多くの研究がなされてきたが、リアクター内の微生物群集を分子生態学的に解析した例は少なく、高濃度の活性汚泥中でどのような微生物群集が形成され、各種廃水成分の分解にどの微生物が関与しているかなどの詳細は明らかになっていない。本研究では MBR の廃水処理効率を維持しながら廃水濃度を上げ、これによって生じる微生物群集構造の変化と処理水および系内の物理化学的パラメーターの変化との相関を明らかにすることを目的とした。
【実験方法】　パイロットスケール(約 230 L)の MBR (3 槽構造)を設計し運転を行った。運転条件として、高濃度人工下水(BOD 約 3000 mg/L)を 115 L/day でリアクターに流入させ、処理水の流出速度を 115 L/day に設定した。また各槽の活性汚泥濃度(MLSS)の偏りを防ぐ為に第 3 槽から第 1 槽に 115 L/day で汚泥を返送した。これらの条件下でリアクター内の MLSS が安定するまで 7 日間定常運転を行った後、廃水濃度を 2 倍へ上げ 14 日間高負荷運転を行った。計 21 日間、系内および処理水中のアンモニア濃度、TOC、COD、MLSS を 1 日毎に測定した。また微生物群集構造の変化を捉えるため、第 1 槽及び第 2 槽から活性汚泥を 1 日毎に採取し、全サンプルについて次世代シークエンサーを用いた微生物群集構造解析を行った。
【結果】　高負荷をかけることによって MLSS が 3000 mg/L から 10000 mg/L まで上昇した。これに伴い処理水の COD は 10 mg/L から 30 mg/L、TOC は 10 mg/L から 50 mg/L、アンモニア濃度は検出限界以下から 20 mM まで上昇し、系内の物理化学的パラメーターが大きく変化した。また、COD や TOC が顕著に上昇しないことから MBR の廃水処理能力は維持されていたと考えられる。次世代シークエンサーの解析結果からは、廃水濃度増加の前後で微生物群集構造が大きく変化していることが分かった。本発表では、各微生物種の存在量変化と処理水中または系内の成分変化との関係について詳細に議論する。

Membrane bioreactor, Wastewater treatment, 16S rRNA deep sequencing

講演番号：2A02a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ A 校舎 02 会場

オミックス解析を活用した塩素化エチレン類のバイオレメディエーションによる環境影響の評価
Assessment of a biostimulation site on remediation of chloroethenes by an omics approach

○木村 信忠[1]、辻田 知佳[1]、三浦 隆匡[1,2]、山副 敦司[2]、関口 勇地[3]、野田 尚宏[3]、松倉 智子[3]、高畑 陽[4]、野尻 秀昭[5]、福田 雅夫[6]([1]産総研・生物プロセス、[2]NITE、[3]産総研・バイオメディカル、[4]大成建設、[5]東大・生セ、[6]長岡技大・生物)
○Nobutada KIMURA[1], Chika Tsujita[1], Takamasa Miura[1,2], Atsushi Yamazoe[2], Yuji Sekiguchi[3], Naohiro Noda[3], Satoko Matsukura[3], Yo Takahata[4], Hideaki Nojiri[5], Masao Fukuda[6] ([1]BPRI, AIST, [2]NITE, [3]BMRI, AIST, [4]Taisei corp., [5]Univ. of Tokyo, [6]Nagaoka Univ. of Tech.)

【目的】 化学物質による土壌や地下水汚染を浄化する手段の一つとして、微生物を利用したバイオレメディエーション（Bioremediation）が利用されている。バイオレメディエーションを実施する際には、生態系への影響評価をモニタリングすることが推奨されており、モニタリング手法に関する研究開発が実施されている。そこで、我々は、近年、急速に発達している「オミックス解析」技術を活用したバイオレメディエーション現場の環境影響評価手法に関する研究開発を実施している。本報では、バイオレメディエーション手法の一種である「バイオスティミュレーション（Biostimulation)」による塩素化エチレン類汚染の修復現場を対象にして、オミックス解析手法を利用したバイオレメディエーション現場の環境影響評価を試みた。

【方法】 汚染サイトに栄養塩や有機物等の資材を注入する前から注入後に至る 6 ヶ月間、経時的に採取した地下水から全 DNA および全 RNA の抽出し、16S rRNA 遺伝子をターゲットにした次世代シーケンサーによるアンプリコンシーケンスを行い、DNA 塩基配列データに基づく微生物相解析と、16S rRNA 遺伝子の発現を指標にした「活性化している」微生物群の検出を行った。また、機能遺伝子を対象にしたメタトランスクリプトーム解析を実施し、浄化現場に生息する微生物群の挙動について検討を行った。

【結果と考察】 有機資材注入井戸と観測井戸において、16S rRNA 遺伝子に基づいた微生物相解析の結果から、多様性解析を実施したところ、時間の経過と共に、多様性が変化していることが分かった。また、注入口からの距離に応じて、距離が通り観測井戸は微生物の多様性が注入前に戻るが顕著に確認できた。以上の結果は、16S rRNA 遺伝子の RNA を指標にした解析においても観察された。また、DNA レベルで解析した微生物相に関するメタゲノム解析や、機能遺伝子を対象にしたメタトランスクリプトーム解析に関するデータを加え、統合的なオミックス解析を行い、現場において活性化している遺伝子群を検出し、浄化の進捗との関連性について検討した。

以上の結果から、本研究では、オミックス解析技術を利用することで、バイオレメディエーションによる環境修復の過程で変遷する微生物相を解析すると共に、現場において活性化している微生物群や機能遺伝子を遺伝子発現に基づいて解析することができた。また、汚染物質の分解に寄与する微生物の消長を捉えることができ、遺伝子の発現量解析のデータと組み合わせることで、微生物の挙動をより詳細に把握できることを示した。

Bioremediation, PCE, Metagenomics

講演番号：2A02a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ A 校舎 02 会場

グリーストラップ浄化槽条件下での油脂含有排水高分解菌の探索

Isolation of microorganism(s) copable of degrading fat-containg wastewater under the condition of grease-trap treatment facility

○平野 達也[1]、倉根 隆一郎[1]、村瀬 博宣[2]、西脇 直秀[2]、稲川 顕嗣[2]([1]中部大学応用生物、[2]シーシーアイ株式会社)
○ Tatsuya HIRANO[1], Ryuuichiro KURANE[1], Hironobu MURASE[2], Naohide NISHIWAKI[2], Akitsugu INAGAWA[2] ([1]Chubu Univ, [2]CCI Corporation)

【目的】厨房や食品工場等から排出される廃水には，多量の油（動植物性油）が混入しており，排出先の下水道の管路閉塞や浄化槽の水質悪化等の問題が起きている。
一般的に，多量の油が混入すると予想されている廃水経路にはグリーストラップや加圧浮上装置等の油を除去する施設（除害施設）の設置が義務付けられている。グリーストラップに溜まった油脂をそのままにしておくと、スカムが発生し、スカムが浮上して排水中の油脂の収集効率が低下したり排水口へ逆流、悪臭の原因、害虫発生の原因となる。分離された油泥は産業廃棄物として焼却処分されるため CO_2 の大量発生や環境汚染などの原因となる。
グリーストラップ等の小型の除害設備では計画値を大幅に超える油の流入などの管理不良等の問題、不定期清掃、さらに清掃業者にメンテナンスを依頼するとコスト増の問題がある。このような問題を少なくするために、近年微生物製剤を利用して廃水処理効率を高効率に管理する傾向が見られる。しかしながら、未だ不十分な状態である。
我々は微生物製剤にリパーゼを添加した現行で最も利用されている市販製剤よりも油脂の分解率の高くコスト削減可能な持続性のある油脂高分解微生物のスクリーニングを行い、微生物製剤の開発を行うことを目的として研究を開始した。
【方法】分離源として土壌やグリーストラップの廃液を用いた。炭素源として分解が難しいとされている固形油脂の牛脂濃度（１％，ｗ/ｖ）を唯一炭素源としてグリーストラップと同程度の ph4.5 の無機塩液体培地に加え集積培養を行った。
単離を行い、候補菌を用いて反応 20 時間後ノルマルヘキサン抽出法と薄層クロマトグラフィーを行うことで油脂分解率の評価、微生物株の絞り込みを行った。
【結果】現行最汎用市販製剤よりも油脂の分解率の高い菌株をいくつか取得した。これら候補菌株はグリーストラップと同じような条件下（ph4～5、反応時間 20 時間）にて高分解性を示した。現在これらの高分解候補微生物については同定中である。

degrading, fat-containg wastewater, grease-trap treatment facility

講演番号：2A02a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ A 校舎 02 会場

腐植様物質添加による屎尿処理高効率化のための汚泥複合微生物相の解析

Microflora analysis of human-waste high-efficient treatment sludge by adding humic-like substance

○鬼頭 昌久[1]、水野 康弘[1]、倉根 隆一郎[1]、橘 峰生[2]、植地 俊仁[2]、安部 剛[2] ([1]中部大院応生、[2]クボタ環境サービス(株))
○Masahisa KITO[1], Yasuhiro Mizuno[1], Ryuichiro Kurane[1], Mineo Tachibana[2], Toshihito Uechi[2], Tsuyoshi Abe[2] ([1]Chubu Univ., [2]Kubota Environmental Service Co., Ltd.)

【目的】生物学的屎尿処理法である活性汚泥法は、従来型エンジニアリングアプローチでは既に円熟の域に達しており、今後屎尿処理の高効率化を図る上ではバイオからのアプローチを加えることが必要不可欠である。そのような問題がある中で 2011 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災による大津波の被災地である東北地方沿岸部では、下水道施設の壊滅的被害を受け、仮設住宅の建設により山間部用の屎尿処理施設である K 屎尿処理場に負担が集中し長期化していることから、屎尿処理の更なる高効率化が求められている。現在同施設で腐植様物質添加による活性汚泥中の微生物相の最適化を行い長期間高負荷条件下にて高効率処理運転をしている。また、比較施設として T 屎尿処理場においても同様な試験を実施している。本研究では、K 屎尿処理場及び T 屎尿処理場での腐植様物質添加による誘導効果、活性汚泥中の微生物、活性汚泥中の菌叢の変化を調べ、高効率化を可能にする基礎データを明らかにすることを目的とした。

【方法】K 屎尿処理場及び T 屎尿処理場にて腐植様物質による微生物相の誘導を行い PCR－DGGE 法により微生物相の変化を解析した。また、同活性汚泥中の酵素活性の変動を調べるためα－アミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼの酵素活性を測定し、更に活性汚泥中に含まれる微生物の中で、各種酵素活性が高いといわれている *Bacillus sp.* に注目し、コロニーカウントを行い *Bacillus sp.* 生菌数の変動並びに抗真菌活性を調べた。同時に活性汚泥を用いた生物学的脱臭による臭気減少、放流水水質の変化を調べ腐植様物質添加による屎尿処理への影響を調べた。

【結果】腐植様物質添加による菌相の変動を PCR-DGGE 法を用いて解析した結果、K 屎尿処理場ではリアクター設置により菌叢の変化が確認され、さらに 1 年経過後でも菌叢が維持されているのが確認できた。T 処理場汚泥の酵素活性を測定した結果、添加によりリパーゼ活性に約 2 倍の活性値(IU/g-ss)の増加が見られた。また、K 屎尿処理場より分離した *Bacillus sp.* は糸状菌に対して抗真菌活性を示しており、汚泥の沈降性向上に寄与していると考えられた。放流水 BOD, COD を測定したがいずれも変化はなく環境基準値を下回っていた。

microflora, human-waste, humic-like substance

講演番号：2A02p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ A 校舎 02 会場

S. cerevisiae 胞子のキトサンビーズとしての応用
Applied uses of *S. cerevisiae* spores as chitosan beads
○中西 秀樹、ZHANG Hai-ni、高 暁冬（江南大学）
○Hideki NAKANISHI, Hai-ni ZHANG, Xiao-Dong GAO (Jiangnan Univ.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の胞子は、二倍体の栄養増殖細胞を栄養飢餓、特に窒素源を枯渇させた条件下に移すことで得ることができる。本研究では、*S. cerevisiae* の胞子壁には栄養増殖時の細胞壁には存在しないキトサンが含まれていることに注目し、この胞子をキトサンビーズとして利用することを試みた。胞子壁は四層（内側からマンナン、グルカン、キトサン、ジチロシン層）から成っており、キトサン層はジチロシン層によって覆われている。しかしながら、ジチロシン合成に必要な遺伝子の一つである、*DIT1* 遺伝子を破壊することによってジチロシン層の形成を阻害することが可能である。これによりキトサン層が露出された胞子、つまり、キトサンビーズを作成できる。

キトサンは一般的にキチンを脱アセチル化して得られるグルコサミンポリマーであり、主な特徴の一つとして重金属や負電荷を持つ物質に対する吸着作用があげられる。そこでまず、胞子の吸着作用について検討を行った。酵母の栄養増殖細胞については生物吸着剤としての研究が以前に行われており、重金属に対しても吸着能を有することが報告されている。しかし今回、銅、鉛、カドミウムなどの重金属について、胞子と栄養増殖細胞の吸着能を比べた結果、前者のほうが単位重量当たりより多くの重金属を吸着できることがわかった。さらに、*DIT1* 遺伝子を破壊した（*dit1*Δ）胞子は野生型よりも効率的に重金属を除去できることを見いだした。キトサン層を持たない変異株の胞子では銅の吸着量が栄養増殖細胞と同程度まで低下した。よって、胞子、そしてそのキトサン層には重金属に対する吸着能があることがわかった。また、重金属以外にも胞子が負電荷を持つ物質である胆汁酸を吸着できることも見いだしている。

さらに我々は、キトサンのアミノ基が化学反応性に富む性質を利用して、胞子を利用した酵素の固定化を試みた。グルタルアルデヒドで活性化した胞子または栄養増殖細胞とα-ガラクトシダーゼを撹拌した後、細胞に吸着した酵素活性を測定した結果、栄養増殖細胞や野生型胞子と比べて著しく高い活性が *dit1*Δ 胞子から検出された。よって、*dit1*Δ 胞子は酵素固定のための担体としても利用できる。総じて、これらの結果は *S. cerevisiae* の胞子、特に *dit1*Δ胞子が化学的な処理を用いずに作成できるキトサンビーズとして様々な目的に利用できることを示している。

yeast, spore, chitosan

講演番号：2A02p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ A 校舎 02 会場

Debaryomyces hansenii による重金属の回収

Recovery of heavy metals by Debaryomyces hansenii.

○山本 智恵（大阪府大院）
○Chie Yamamoto (Osakafu Univ.)

東日本大震災によって引き起こされた原発事故をきっかけに「除染」ということの難しさが改めて取り立てられている。

また、私たちの生活は様々な物質の特性を活かすことで成り立っている。その中でも、レアメタルは、その特異的な性質と稀少性から重宝され、その獲得・備蓄はもはや国家戦略のひとつにまでになっている。

こういった背景から、私たち、そして未来を生きる子どもたちが、安心・安全な生活をおくるためには、重金属を簡単に除去し、再利用する方法の発見は必要不可欠であろう。本研究では、酵母のもつ「回収能」を利用し、生活排水や工業排水から重金属を回収・除去することで、生活環境を浄化することを目的としている。

生物毒性が高いカドミウムに耐性をもち、それを蓄積することのできる酵母を食品中から単離することに私たちは成功した。カドミウム耐性酵母 *Debaryomyceshansenii* は、細胞にカドミウムを蓄積することが判明した。そこで、更なるカドミウム回収量の向上を目指し、*D.hansenii* のカドミウム最大吸収条件の検討を行った。

D.hansenii はナトリウムイオンを高濃度で細胞内に取り込むことが分かっている。そのためナトリウムイオンとの競合実験を行った。結果、カドミウムの回収量はナトリウムイオンの影響を受けて低下することが明らかになった。カドミウムの回収に適したpHや生育フェイズを検討したところ、pH5.0、定常期の細胞で、水溶液中の 80%を越えるカドミウムを *D.hansenii* が回収することが判明した。

Debaryomyces hansenii, rare metal, bioremediation

講演番号：2A02p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 02 会場

耐塩性糸状菌を用いた環境浄化に関する研究（７）－重金属除去に関する検討－

Study on Bioremediation using Halotolerant Microorganism. -Study on removal for heavy metal-

○大橋 正俊、秦野 聡嗣、向山 夏女、佐藤 綾乃、濱田 奈保子（東京海洋大学）
○ Masatoshi OHASHI, Satoshi HATANO, Natsume MUKOUYAMA, Ayano SATO, Naoko HAMADA (Tokyo University of Marine Science and Technology)

【目的】
重金属は鉱工業で広く使われているが、重金属の中には人体や環境に悪影響を与えるものも存在し、工場や鉱山等の廃水に含まれる重金属による環境汚染は大きな社会問題となっている。このような問題を解決する方法として、処理コストが安く、廃棄物の量が少ない等のメリットがある微生物によるバイオレメデメディエーションが期待されている。当研究室では、奄美大島の湿地帯の流木から単離された耐塩性糸状菌 *Pestalotiopsis* sp.SN-3（以下 SN-3 菌）が各種染料、セルロース、有機スズ化合物、ノニルフェノール等の有機化合物を NaCl 存在下において分解することを報告してきた。本研究では耐塩性を有する SN-3 菌を用いた水圏環境を想定した培地での重金属の除去を目的とした。
【方法】
本研究では、有害金属として代表的な金属である鉛、銅、カドミウムを対象とした。それぞれの元素を終濃度 20 ppm となるように添加した本培養培地（人工海水にグルコース、NH_4NO_3、$NaHPO_4$、Bacto Yeast Extract を添加）に、PDB 培地で前培養した SN-3 菌を植菌し、回転振とう培養（暗所、好気条件、160rpm、27℃、1 日間）した。培養後、培地中の各重金属濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析法（ICP-AES）で測定し、除去率（%）を算出した。また除去能の向上を目的とし、SN-3 菌を固定化した。菌体を 3%アルギン酸ナトリウム水溶液に懸濁し、1%塩化カルシウム水溶液に滴下し、得られた固定化 SN-3 菌を用いて同様の実験を行なった。
【結果】
鉛、銅、カドミウムを単独で培地に添加した条件下で検討した結果、銅およびカドミウムはほとんど除去されなかった。一方、鉛については、SN-3 菌による除去が認められ、除去率は NaCl 濃度によって変化した。すなわち、 NaCl 濃度 0、1.5、3%を含むそれぞれの除去率は 33、63、39%であった。また銅、鉛、カドミウムを混合して同一培地に添加した場合には、銅およびカドミウムの除去率は NaCl 濃度に関わらず低かったが、鉛は NaCl 濃度 0、1.5、3%を含むそれぞれの除去率は 67、95、95%となった。アルギン酸カルシウムに固定化した SN-3 菌を人工海水培地で培養した結果、鉛は NaCl 濃度や他の重金属の存在に関わらず 90%以上の除去率が得られた。現在、除去メカニズムについて検討を進めている。

bioremediation, fungi, heavy metals

講演番号：2A02p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 02 会場

コシアブラにおける放射性セシウムの分布
Distribution of radiocesium within a single tree of *Acanthopanax sciadophylloides*
○武井 利之[1]、伊藤 正一[2]、熊田 淳[1]、村松 康行[3] ([1]福島県林業研究センター、[2]福島県相双農林事務所・現福島県自然保護課、[3]学習院大学)
○Toshiyuki Takei[1], Shoichi Ito[2], Atsushi Kumata[1], Yasuyuki Muramatsu[3] ([1]Fukushima Pref. Forestry Research Center, [2]Fukushima Pref. Sousou Agricultural and Forestry Office / present Fukushima Pref. Nature Conversation Division, [3]Gakusyuin Univ.)

［緒言］
平成 24 年 5 月 1 日に公表された福島県の農林水産物モニタリング検査により、事故後 1 年以上経過した後に新たに展開したコシアブラ可食部（新芽と葉柄）の ^{134}Cs 濃度と ^{137}Cs 濃度の合計値（放射性 Cs 濃度）が 390～920Bq/kg FW であったことが確認された[1)]。これは食品の規制値を上回る値である。そこで、コシアブラ可食部の放射性 Cs 汚染を防ぐ技術の開発が望まれるが、汚染経路を推定するための報告例等は無い。本研究ではコシアブラ可食部の放射性 Cs 汚染に関する基礎的知見を得ることを目的として、コシアブラの部位ごとの放射性 Cs 濃度を明らかにした。さらに、周辺樹種の葉及び枝先を測定し、コシアブラと比較検討した。

［実験方法］
東京電力福島第一原子力発電所から北北西方向に約 50Km、放射性 Cs 降下量[2)]300,000～600,000Bq/m^2、地上 1m の空間線量率 1.4 μSv/h の地点にて 19 年生のコシアブラ AS-1 を 2012 年 6 月に採取した。AS-1 は可食部、幹、枝及び根に分け、さらに材は高さ別に切断し、それぞれを外樹皮、内樹皮、辺材及び心材に分けた。土壌は AS-1 から 3m 以内の 3 カ所から採取した。また、AS-1 から 10 m 以内に生育していたコシアブラ、アオハダ、ミズナラ及びミズキの枝先を採取した。各試料は粉砕後 NaI(Tl)検出器を使用して放射性 Cs を測定した。

［結果及び考察］
AS-1 可食部の放射性 Cs 濃度は 2,990Bq/kg FW で、高い濃度の放射性 Cs が存在していた。幹外樹皮の放射性 Cs 濃度は約 28,000Bq/kg DW で、事故時のフォールアウトに由来する放射性 Cs が残留していると考えられた。幹の内樹皮、辺材及び心材の放射性 Cs 濃度はそれぞれ約 2,000、約 1,000 及び約 800Bq/kg DW であり、いずれも地際と頂端で高い傾向があった。枝の材の放射性 Cs 濃度は幹の材より高く、また、根の材の放射性 Cs 濃度も幹材と同様であり、樹木全体に放射性 Cs が分布していることがわかった。落葉層の放射性 Cs 濃度は約 10,000Bq/kg DW であり、土壌が深くなるに従い大きく減少した。さらに、コシアブラの葉及び葉柄の放射性 Cs 濃度は周辺に生育していたいずれの広葉樹のそれらより高い特徴があった。

1) 福島県, http://wwwcms.pref.fukushima.jp/download/1/mon240430mv.pdf
2) 文部科学省, http://radioactivity.nsr.go.jp/ja/contents/4000/3710/24/1305820_20110506.pdf

radiocesium, *Acanthopanax sciadophylloides*, leaf

講演番号：2A02p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 02 会場

土壌改良剤中の常在菌による放射性セシウムの取り込み

Uptake of radioactive cesium by bacteria in a soil conditioner.

○川端 秀明[1]、張 鵬尧[1]、井戸田 陽子[1]、矢野 健太郎[1]、荒川 大[1]、松本 朝子[2]、松本 明[2]、辻 彰[3]、荻原 琢男[1] ([1]高崎健康福祉大学薬学部、[2]有限会社ふくじゅ、[3]金沢大学薬学部)
○Hideaki Kawabata[1], Pengyao Zhang[1], Yoko Idota[1], Kentaro Yano[1], Hiroshi Arakawa[1], Yoriko Matumoto[2], Akira Matumoto[2], Akira Tsuji[3], Takuo Ogihara[1] ([1]Faculty of Pharmacy, Takasaki University of Health and Welfare, [2]Fukuju Co., Ltd., [3]Faculty of Pharmacy, Kanazawa University)

【目的】2011年3月に発生した東日本大地震に伴う原子力発電所の事故により，大量の放射性物質が環境中に放出され，それらは雨や自然沈降により今も土壌に堆積している．特にセシウム137（^{137}Cs）は約30年の半減期を有しているため，環境に対して長期に渡って甚大な影響を与えることが想定される．一方ある種の細菌は，その菌体内にセシウム（Cs）を取り込むことが知られている．そこで我々は，市販されている土壌改良剤から菌を分離し，Csの取り込みを検討したところ，ある種の土壌改良剤に含まれる菌がCsを効率的に取り込むことを見い出した．さらに，この取り込みには，細菌表面に発現しているカリウムトランスポーターが関与している可能性が示唆された．（日本農芸化学会2013年度，3B21p12）．本検討では，この菌が実際の土壌中においてもCsを取り込むかどうかを確認し，さらに被災地から採取した土壌中の^{137}Csも取り込むことができるのかを明らかにすることを目的とした．
【方法】高崎健康福祉大学薬学部附属薬草園より採取した土壌を乾熱滅菌し，この土壌に対して 10%（w/w）の土壌改良剤（松本常在菌 ™ を含む土壌改良剤, 有限会社ふくじゅ, 宮城県石巻市）と塩化セシウム（CsCl）および適量の水を混ぜ，4℃，25℃および 37℃の各温度条件下で穏やかに撹拌した．この土壌から単離した菌体内の Cs 量を，原子吸光光度計にて測定した．さらに，福島県双葉郡浪江町から採取した ^{137}Cs を含む乾燥土壌に，10%（w/w）の土壌改良剤と適量の水および養分（ぬか）を混ぜ，屋外に放置し，継時的に土壌中の ^{137}Cs の放射線量を測定した．
【結果･考察】滅菌土壌に土壌改良剤と CsCl および水を混ぜたとき，菌体内への Cs 取り込みは温度依存的に速くなる傾向が見られた．しかし，測定開始 30 分後では，Cs 取り込み量にはどの温度においても大きな差が認められなかった．さらに，福島県で採取した乾燥土壌に土壌改良剤と水および養分を加えた場合，土壌中の ^{137}Cs 残存率は試験開始後 30 日目に約 50%まで減少した．一方，水または土壌改良剤を加えない場合には，土壌中の ^{137}Cs の減少は認められなかった．以上の結果より，この土壌常在菌は実際の土壌中においても非放射性 Cs や ^{137}Cs をその菌体内に取り込むことが可能であり，数ヶ月で土壌から多くの ^{137}Cs を除去できる可能性が示唆された．なお，^{137}Cs を取り込んだ菌は，雨などによって地下下水道に流出する可能性がある．そこで，下水道処理の際に排出される汚泥焼却灰中の ^{137}Cs も，この方法を用いて回収可能であるか否かを検討中である．

bacteria in a soil conditioner, cesium, decontamination

講演番号：2A02p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 02 会場

4 種の油分解菌による低温環境下での A 重油分解能力の調査と解析

Analyze the A-fuel oil degradability of 4-oil degrading bacteria under low temperature condition

○山田 幸太[1]、櫻井 琢磨[2]、杉山 賢吾[2]、新谷 政己[1]、金原 和秀[1]([1]静岡大院工、[2]静岡大工)
○ Kota YAMADA[1], TAKUMA SAKURAI[2], KENGO SUGIYAMA[2], MASAKI SHINTANI[1], KAZUHIDE KIMBARA[1] ([1]Grad. School of Eng. Shizuoka Univ., [2]School of Eng. Shizuoka Univ.)

【目的】A 重油は、農業・漁業用に用いられている燃料油であり、その化学的組成は軽油と類似している。東日本大震災により、広大な土壌が A 重油に汚染された。従来こういった油汚染土壌は掘削除去による浄化が一般的であったが、コスト・エネルギー・源位置浄化が可能という観点から、分解微生物を汚染土壌に投入するバイオオーグメンテーションが注目を集めている。しかしバイオオーグメンテーションには、浄化期間を要することや確実性が低いという問題があり、実際の適用例は少ない。また東北での施工を想定すると、気温が低い条件でのバイオオーグメンテーションが想定される。一般的に低温環境下においては油の分解力は低下すると言われている。当研究室では微生物処理における上記の問題を解決するため、*Rhodococcus* と *Goldnia* に属する菌株 A～D の 4 種の油分解菌を複合的に用いたバイオオーグメンテーションを提案しており、本研究では培養温度を 15℃に設定し、油分解菌に及ぼす影響を調査した。
【方法】栄養培地である 1/3 に希釈した LB 培地にて前培養を行った 4 菌株を単独もしくは混合して、15 ml のキャップ付き試験管に添加した 6 ml の W 無機培地に 1%植菌した。唯一の炭素源となるように A 重油を 500 mg/l 加え、30℃と 15℃、120 rpm で振盪培養を行った。A 重油の分解は、等量のヘキサンによる全抽出後、GC-FID で分析を行って測定した。菌数測定は、サンプリングした 1 ml の培養液に SYBR® Green を添加して染色後、蛍光顕微鏡による直接計測により測定した。
【結果と考察】30℃の条件で単一菌株を用いた場合は、12 日間で、A；44%、B；54%、C；47%、D；43%の分解が確認できた。複合した場合は 92%であった。15℃においては 18 日間で、A；92%、B；63%、C；92%、D；14%であり、複合した場合は 85%の分解を確認した。30℃、15℃の両条件において、油分解菌を複合的に利用することにより、効果的に A 重油を分解できることが示唆された。菌株 A と C においてはともに 92%の分解を示し、30℃よりも 15℃で培養を行った方がより分解率が高い結果となった。30℃においては、単一菌株を用いた場合と複合した場合の両方で増殖を確認できた。最大到達菌数は単一菌株と複合した場合に差は確認できなかった。15℃においては細かな凝集体を形成したため、正確な菌数の測定はできなかった。15℃での培養において、A 重油の粘度は 30℃よりも高く、気相への拡散も少なくなる。小さな油滴に菌株 A と C が付着することで細かな凝集体となり、効率的に A 重油との接触できたことにより効果的な分解が行われたという可能性が考えられた。

A-fuel oil, Oil degrading bacteria, Low temperature

講演番号：2A02p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 02 会場

有機資材を用いた石油分解菌の長期維持によるバイオレメディエーションの効率化

Use of organic materials for long-term survival of oil degrading bacteria for effective bioremediation

○中辻 貴広、アディカリ ディネシュ、向 真樹、久保 幹（立命館大生命・生物工）
○Takahiro NAKATSUJI, DINESH Adhikari, Masaki MUKAI, Motoki KUBO (Ritsumeikan univ)

［目的］

これまでに様々な環境から長鎖シクロアルカン分解菌を分離・同定し、バイオレメディエーションシステムを構築してきた。しかし、無機塩で調整した環境土壌において分解菌は、一週間程度しか生存できないため、効率の良いバイオレメディエーションシステムの構築には、分解菌の長期維持が不可欠である。本研究では、石油分解菌の長期維持を目的とし、有機資材を用いたバイオレメディエーションの効率化を目指した。

［方法・結果］

土壌にベースオイル（ENEOS）を 5,000mg/kg-soil になるように添加することで石油汚染土壌を作製した。長鎖シクロアルカン分解菌である *Rhodococcus erythropolis* NDKK6 株を、1×10^8 cells/g-soil になるように菌液を添加して、バイオレメディエーションを行った。土壌中の総細菌数を slow-stirring method から得られた eDNA より算出した。NDKK6 株数は、alk-BR2 プライマーを用いたリアルタイム PCR 法から測定した。

また NDKK6 株の長期維持を行う為、各種有機物（堆肥）及び無機物に菌液を投入し生存率を見たところ、堆肥が効果的であることが明らかになった。

この結果より、石油汚染土壌に堆肥を用いて、全炭素量（TC）、全窒素（TN）を調整しバイオレメディエーションを行ったところ、TC≧20,000mg /kg-soil、及び TN≧2,000 mg/kg-soil の土壌において NDKK6 株数は一か月以上維持され、効率の良いバイオレメディエーションが行われた。

bioremediation, cycloalkane degradation bacteria, organic materials

講演番号：2A02p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 02 会場

Rhodococcus 属細菌におけるアルカンヒドロキシラーゼ遺伝子と長鎖シクロアルカン分解との関係解析

Analysis of the relationship between alkane hydroxylase gene and long chain-alkanes degrading Rhodococcus.sp

○川越 大樹[1]、久保田 謙三[1]、アディカリ ディネシュ[2]、向 真樹[2]、久保 幹[2]([1]大和ハウス工業、[2]立命館大・生命・生工)
○Taiki KAWAGOE[1], Kenzo KUBOTA[1], Dinesh ADHIKARI[2], Masaki MUKAI[2], Motoki KUBO[2]([1]Daiwa house industry co.,ltd., [2]Dept. Biotec., Fac.Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

【背景と目的】

炭化水素の生分解には、アルカンヒドロキシラーゼ遺伝子が関与している。これまでに、長鎖シクロアルカンを分解する *Rhodococcus* 属細菌を 11 菌株分離・同定した。これらの 11 菌株の遺伝的解析を行ったところ、すべて *R. erythropolis* であった。本研究では、これらの 11 種を含める各種 *Rhodococcus* 属細菌の、アルカンヒドロキシラーゼ遺伝子と、長鎖シクロアルカン分解能を解析することにより、*Rhodococcus* 属細菌における炭化水素分解の特徴を明らかにすることを目的にした。

【方法と結果】

11 種類の *Rhodococcus* 属細菌と、NBRC から取得した 14 菌株の全長を特異的なプライマーで増幅し、シーケンスを解析し、アルカンヒドロキシラーゼ遺伝子の種類の分類およびアルカンヒドロキシラーゼ遺伝子の有無を確認した。また、これらすべての菌株で長鎖シクロアルカンであるトリデシルシクロヘキサン(TDC)の分解能の解析を行った。

11 種の *R. erythropolis* は、すべてアルカンヒドロキシラーゼ遺伝子を有していた。また、これらのアルカンヒドロキシラーゼ遺伝子は既報（Fukuhara *et al.* 2013）の *alkB* R2 遺伝子を有していた。また、NBRC から取得した菌株については、*R. erythropolis* のみ *alkB* R2 を有していた。解析を行った 25 菌株は、*alkB* R2 遺伝子を有している菌株、*alk*B R2 以外のアルカンヒドロキシラーゼ遺伝子を持つ菌株、アルカンヒドロキシラーゼ遺伝子を持たない菌株の 3 種類の菌株に分類された。

これら 3 種類の菌株の長鎖シクロアルカンである TDC の分解能を計測したところ、*alkB* R2 遺伝子を有する *Rhodococcus* 属細菌である *R. erythropolis* では、平均 57.9%の分解率を示した。*alkB* R2 遺伝子以外のアルカンヒドロキシラーゼ遺伝子を有する *Rhodococcus* 属細菌 10 種類では、TDC では平均 53.9%の分解率を示した。また、アルカンヒドロキシラーゼ遺伝子を有さない細菌で同様の分解試験を行ったところ、TDC では平均 19.2%の分解率を示した。したがって、*alkB* R2 遺伝子を有する *Rhodococcus* 属細菌は、他の 2 種類の菌株よりも長鎖シクロアルカンである TDC に対して高い分解能を示した。

これらの 3 つのグループにおいて、それぞれの基質分解特性が異なったことから、*alkB* R2 遺伝子は長鎖シクロアルカン分解に重要な働きをしていることが示唆された。

Alkane hydroxylase gene, Cycloalkane, Rhodococcus

講演番号：2A02p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 02 会場

Pseudomonas resinovorans strain CA10 株由来メタ開裂酵素の解析
Analysis of a two-subunit extradiol dioxygenase derived from *Pseudomonas resinovorans* CA10
○柴崎 夏美（芝浦工業大学大学院）
○Natsumi SHIBAZAKI (Shibaura Institute of TechnologyUniv.)

[目的]Carbazole（CAR）はダイオキシン類と類似の平面骨格を持つ難分解性の含窒素芳香族化合物であり、発ガン性を示す環境汚染物質である。*Pseudomonas resinovorans* CA10 株は CAR を唯一の炭素限、窒素源として生育可能な細菌であり、CAR 分解に関与する主な酵素群は初発酸化酵素 CARDO（CarAaAcAd）、メタ開裂酵素 CarBaBb、加水分解酵素の CarC が存在し、これらの遺伝子やタンパク質について詳細に解析されている。ほとんどのメタ開裂酵素は単一のサブユニットで構成されるが、ダイオキシン類を強力に分解可能な細菌の持つメタ開裂酵素の一部は 2 種類のサブユニットで構成されている。活性中心はラージサブユニット CarBb に存在し、スモールサブユニット CarBa は構造の安定化に関与していると推測される。これらの遺伝子構造は *carBa*、*carBb* の順に並んでいるが *carBa* の終始コドン（TGA）と *carBb* の開始コドン（ATG）のアデニンが 1 塩基重複している。CAR 分解遺伝子群は同一クラスター上に存在するため、タンパク質発現に関与する mRNA も同一のものを利用する。翻訳の過程でそれぞれのタンパク質のフォールディングが形成されるが、2 種類のサブユニットの会合様式などは明らかになっていない。そこで、本研究ではサブユニットタンパク質の発現様式、会合様式のメカニズムを明らかとするためことを目的とし、サブユニット間にスペーサーDNA を挿入することによるタンパク質の発現、サブユニットの会合の影響を調べた。
[方法と結果] *carBa* と *carBb* の間にスペーサーDNA を挿入するためのカセット vector（pUCBaR3））を構築した。CraBa、CarBb それぞれが大腸菌内で最適に発現するためそれぞれの上流に SD 配列を付加し、スペーサーDNA 挿入のために *carBa* と *carBb* の間に MluI、Eco065、BglII の 3 種類の制限酵素で切断できるように設計した。スペーサーDNA は機能を持たない Junk DNA を挿入することとして､塩基配列が既に明らかとなっている OC9 株 16S rDNA の部分配列を用いて 250bp､500bp､1000bp の長さで設計した（pUCBaR250、pUCBaR500、pUCBaR1000）。それぞれのプラスミド DNA を *Escherichia coli* BL21(DE3)に形質転換しクローンを得た。形質転換したクローンの CarBa と CarBb の発現条件と活性確認を行った。

extradiol dioxygenase, meta- clevage enzyme

講演番号：2A02p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 02 会場

含塩素有機リン酸トリエステル分解菌の推定アルカリホスファターゼ遺伝子の同定と解析

Identification and characterization of putative alkaline phosphatase genes of a chlorinated organophosphate triesters - degrading bacterium

○片沼 拓士、恩田 穣、笠井 大輔、福田 雅夫、阿部 勝正、高橋 祥司、解良 芳夫 (長岡技大工)
○Hiroshi KATANUMA, Yutaka ONDA, Daisuke KASAI, Masao FUKUDA, Katsumasa ABE, Shouji TAKAHASHI, Yoshio KERA (Nagaoka Univ. of Tech.)

【背景】

含塩素有機リン酸トリエステルである tris(2-chloroethyl) phosphate(TCEP)および tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate(TDCPP)は，プラスチック製品の難燃剤や可塑剤として長年用いられてきた．その結果，河川，湖沼，地下水や飲料水など様々な環境中に検出されている．しかし，これら化学物質は物理化学的に安定であり微生物による分解を受け難い．また近年，発がん性や神経毒性が指摘されたことから，これら化学物質の環境汚染が及ぼす生態系への悪影響が懸念されている．我々は現在まで，微生物によるこれら化学物質の分解技術を開発するために，TCEP および TDCPP 分解能を有する *Sphingobium* sp. TCM1 株を見出し，これら化学物質の初発分解酵素ハロアルキル有機リン酸加水分解酵素(HAD)を単離した．TCM1 株によるこれら化学物質の分解代謝経路には HAD の他にジエステラーゼ，モノエステラーゼが関与し，これら酵素による分解が律速となっていると考えられた．そこで本研究では，TCM1 株による効率的な TCEP と TDCPP 分解を達成するため，本菌株のジエステラーゼとモノエステラーゼの解析を検討した．

【方法・結果】

まず，TCM1 株におけるアルカリホスファターゼ(APase)をコードする遺伝子を同定するために，本菌株のドラフトゲノム解析を行った．その結果，得られた配列データから APase とアノテーションされ，既知の APase と相同性を示す 4 つの遺伝子(CDS153691，CDS130194，CDS64595，CDS16155)を見出した．これら 4 つの遺伝子がコードするタンパク質はそれぞれ，PhoD ファミリー(CDS153691，CDS16155)，PhoK ファミリー(CDS130194)，PhoA ファミリー(CDS64595)に系統分類された．各々の遺伝子を挿入した大腸菌発現ベクターを構築し， *Escherichia coli* BL21(DE3)において発現させた．大腸菌を破砕，遠心して得られた上清画分と沈殿画分を SDS-PAGE により解析したところ，CDS130194 の発現産物は上清に見出されたが，その他の遺伝子産物の大部分は沈殿画分に観察された．上清画分の APase 活性を測定したところ，CDS130194 と CDS64595 では APase 活性が観察され，CDS130194 において非常に高い活性がみられた．これらの結果より，少なくとも CDS130194 および CDS64595 は APase をコードしていると考えられた． また，活性に及ぼす金属イオンの添加効果を解析したところ，CDS64595 では Zn^{2+}の添加によって活性が増加したが，逆に CDS130194 では Zn^{2+}の添加により活性が減少した．

alkaline phosphatase, chlorinated organophosphate triester, *Sphingobium* sp. TCM1

講演番号：2A02p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 02 会場

Bisphenol A 分解菌 *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株のゲノム配列の解析と AO1 組換え体による BPA 分解能調査

The genome structure of bisphenol-A degrading bacterium *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 and BPA removal by bisdAB-recombinant strain AO1.

○木場 悟、石田 哲、松村 吉信（関西大学）
○satoru KOBA, SATOSHI ISHIDA, YOSHINOBU MATSUMURA (Kansai Univ)

【目的】

ビスフェノール A（BPA）はポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料として大量に用いられる汎用性が高い合成化合物である。一方で BPA は内分泌攪乱化学物質として生体に悪影響を及ぼすとの研究報告もあり、カナダでは子供用の飲用ボトルへの使用禁止や工場からの排出規制が設けられている。このため、BPA の分解や無毒化処理技術の開発が重要となる。当研究室では BPA を完全分解する *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株を単離し、BPA 分解の初発反応に関わるシトクロム P450 モノオキシゲナーゼシステムの構造遺伝子（*bisdAB*）が、その細胞内に存在する少なくとも四種類のプラスミドの一つである pBAR1（約 70kb）にコードされていることを明らかにしている。さらに、AO1 株が BPA 以外のビスフェノール類化合物や様々なビフェニル類化合物なども分解でき、様々な合成化合物で汚染された環境の浄化や修復に活用できるものと予想される。しかし、AO1 株の BPA 分解能は不安定で、その一要因に pBAR1 の遺伝子構造の不安定性が予想されている。そこで、AO1 株の汚染物質浄化能を効果的に活用するためには、pBAR1 を含む AO1 株の遺伝子構造の不安定性を解消する必要がある。本研究では次世代シーケンサーによる AO1 株のゲノム DNA の塩基配列決定を試みた。また、AO1 株の BPA 分解能向上のため、*bisdAB* 組換えプラスミドを構築し、その組換え AO1 株の BPA 分解能を野生型 AO1 株と比較した。

【方法と結果】

AO1 株ゲノムの全塩基配列を解読するため、AO1 株から抽出した DNA をロシュ 454 ゲノムシークエンサーで解析した。得られた塩基配列断片を GS De novo Assembler でアセンブリした結果、100 bp 以上のコンティグを 92 個取得でき、最長のコンティグは約 436 kb、総塩基数は約 5 Mb となった。これまでの我々の研究で、pBAR1 の約 53 kb の配列を既に解読しており、この配列は今回の解析でも確認できたが、pBAR1 の未解析領域の塩基配列の解読にはいたらなかった。今回解読された pBAR1 配列は約 22 kb と約 30 kb のコンティグに分割されており、その間に存在する接合伝達に関与する遺伝子 *trbA*、*trbB* を含む約 600 bp の領域が確認されなかった。今後新たにプラスミドのみを単離して塩基配列を決定する予定である。さらに、AO1 株の BPA 分解能を高めるために、BPA 分解酵素遺伝子を保持するプラスミド DNA を pJN105 で作製し、AO1 株の形質転換体を得ている。この組換え体の BPA 分解能の調査も行う予定である。

genome structure, bioremediation, pollutant

講演番号：2A02p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 02 会場

ディルドリン微生物分解産物の合成化学的手法を用いた同定

Synthesis and dentification of the dieldrin biodegradation products

○清田 洋正[1]、小竹 正晃[2]、高木 和広[3]、山崎 健一[3]、榊原 風太[3]、伊藤 虹児[3]、片岡 良太[4]、近藤 隆一郎[5]、亀井 一郎[6] ([1]岡山大院・環境生命、[2]東北大院農・生物産業創成、[3](独)農環研、[4]山梨大・生命環境、[5]九大院生資環・森林資源、[6]宮崎大農)

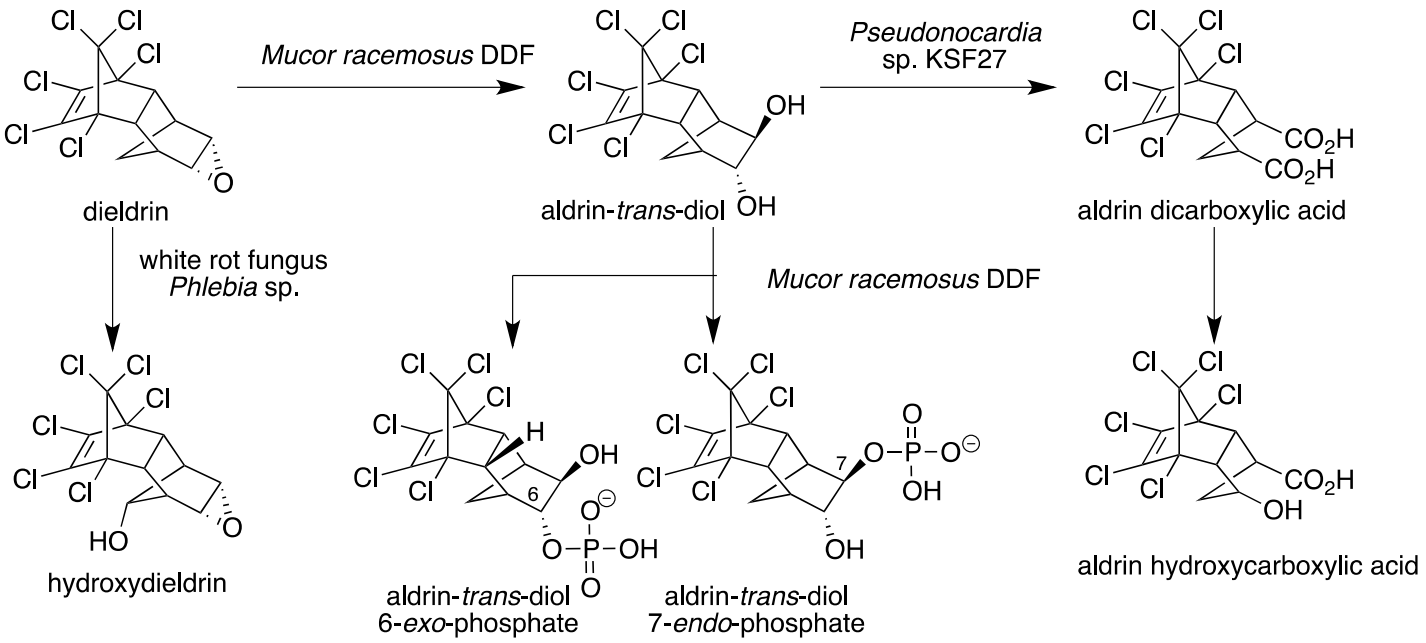
○Hiromasa Kiyota[1], Masaaki Kotake[2], Kazuhiro Takagi[3], Ken-ichi Yamazaki[3], Futa Sakakibara[3], Koji Ito[3], Ryota Kataoka[4], Ryuichiro Kondo[5], Ichiro Kamei[6] ([1]Okayama Univ., [2]Tohoku Univ., [3]National Inst. Agro-Environmental Sci., [4]Yamanashi Univ., [5]Kyushu Univ., [6]Miyazaki Univ.)

近年、農耕地土壌に広く低濃度で分布している POPs（残留性有機汚染物質）等難分解性の有機化合物の分解除去技術としてバイオレメディエーションが注目されている。我々は、ディルドリン等高度に塩素化された農薬を好気的に脱塩素分解する微生物の探索を行ってきた。分解菌による代謝産物の同定のために行った有機合成化学的手法について報告する。

１．エンドスルファン連用土壌から単離した糸状菌 *Mucor racemosus* DDF がディルドリンをアルドリン-*trans*-ジオールに加水分解、更にリン酸抱合することがわかった。微生物では初の例である[1]。

２．好気性菌 *Pseudonocardia* sp. strain KSF27 が、アルドリン-*trans*-ジオールを、アルドリンジカルボン酸を経て酸化的脱炭酸によりヒドロキシカルボン酸に変換することがわかった[2]。

３．*Phlebia* 属白色腐朽菌において、ディルドリンが 9-*syn*-ヒドロキシディルドリンに代謝されることがわかった[3]。



1) *Environ. Sci. Technol.* **44**, 6343 (2010). 2) *BBRC* **411**, 76 (2011). 3) *Chemosphere* **85**, 218 (2011).

bioremediation, dieldrin, organic synthesis

講演番号：2A02p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 02 会場

ウリ科植物における残留性有機汚染物質の体内輸送因子の機能・動態

Clarification of function and dynamic of transporting factors for persistent organic pollutants in *Cucurbita pepo*

○後藤 純弥[1]、岩渕 彩[2]、乾 秀之[3] ([1]神戸大院農、[2]神戸大農、[3]神戸大遺伝子)
○Junya GOTO[1], Aya IWABUCHI[2], Hideyuki INUI[3] ([1]Kobe Univ. Grad. Sch. Agric. Sci., [2]Kobe Univ. Fac. Agric., [3]Kobe Univ. Res. Ctr. Environ. Genomics)

【目的】

残留性有機汚染物質(POPs)は難分解性のために環境中に長期に渡って残留する。また、環境中に低濃度で残留していても、その高い脂溶性のために食物連鎖を介した生物濃縮により、上位捕食者に対して毒性を発現すると懸念されている。植物はその根系を利用し、広範囲の土壌から低濃度の化学物質を取り込むことができるため、土壌中の有害物質の除去に有用であると考えられているが、一般的に脂溶性が高い POPs は取り込みにくい。一方、ウリ科植物の *Cucurbita pepo* は POPs の一種、ディルドリンやエンドリン、ポリ塩化ビフェニル(PCBs)を他の植物種より効率よく取り込むことが報告されている。さらに POPs の取り込みには *C. pepo* 品種間でも差が見られ、*C. pepo* 品種の導管液の 17kDa タンパク質の存在量と PCB の地上部における蓄積量には有意な正の相関があることが明らかとなっているため、このタンパク質が POPs の体内移行に関わる可能性が示唆された。このタンパク質は Major latex-like protein (MLP)と類似性を示し、POPs 低蓄積品種である Patty green(PG)の根から *MLP-PG1* 遺伝子、POPs 高蓄積品種である Gold rush(GR)の根から *MLP-GR1* 遺伝子、*MLP-GR3* 遺伝子が取得された。本研究では、この 3 種類の MLP と PCB との結合特性や、導管液タンパク質と PCB との結合活性を明らかにし、*C. pepo* における PCB の体内輸送因子の機能・動態の解明を試みた。

【方法】

MLP に特異的に反応する抗体を作製し(抗 PG1/GR1 抗体、抗 GR3 抗体)、 PG と POPs 高蓄積品種である Magda(MG)の導管液や根のタンパク質をウエスタンブロット分析に供し MLP の存在を確認した。また 3 種類の *MLP* 遺伝子を組換え大腸菌で発現させ、組換えタンパク質を作製した。PCB 結合ビーズを作製し、PCB に結合活性を示す組換えタンパク質や導管液タンパク質を銀染色やウエスタンブロット分析で検出した。

【結果】

PG、MG の導管液を抗 PG1/GR1 抗体と抗 GR3 抗体とを用いてウエスタンブロット分析に供した結果、MG の導管液からバンドが検出された。PG の導管液からはバンドが検出されなかったため、品種ごとで根に存在する MLP の導管液への移行性が異なることが示唆された。また MG の導管液に含まれる 17kDa 付近の複数のタンパク質が PCB と結合活性を示した。ウエスタンブロット分析の結果、これらのタンパク質は抗 PG1/GR1 抗体と抗 GR3 抗体に反応することが明らかとなった。さらに組換え MLP と PCB との結合活性を評価したところ、MLP-GR3 のみ濃度依存的に PCB と結合した。以上の結果より POPs 高蓄積品種には PCB と結合活性を持つ MLP が存在し、PCB と結合した MLP が導管液に移行することで POPs の蓄積を促進すると推測された。

Cucubita pepo, phytoremediation

講演番号：2A02p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 02 会場

抗菌性薬剤トリクロサン分解菌の探索

Isolation of Triclosan Degrading Bacteria for Wastewater Treatment

○齋藤 さや[1]、小森谷 友絵[2]、坂本 恵一[2]、神野 英毅[2] ([1]日大生産工（院）、[2]日大生産工)
○Saya SAITO[1], Tomoe KOMORIYA[2], Keichi SAKAMOTO[2], Hideki KOHNO[2] ([1]Nihon Univ.(M), [2]Nihon Univ.)

トリクロサン(5-Chloro-2-(2、4-dichlorophenoxyl)phenol) は非イオン性の無色透明な化学物質である。トリクロサンはグラム陰性および陽性菌に対して抗菌性があり、歯磨き粉や薬用石鹸などのパーソナルケア製品に多く用いられている。生活排水中のトリクロサンは廃水処理により約 95%が分解除去されているが、9 ng/L 程度で検出されると報告されている。 トリクロサンは魚類の心筋や筋肉を収縮させる作用があり、環境ホルモンとして問題視されている。本研究は微生物による除去を目的とし、トリクロサン非感受性菌の単離、同定を行った。サンプルは廃水施設や一般環境中(新川、千葉用水総合管理所、千葉県八千代市八千代台北子供の森公園)から水サンプルおよび土壌サンプルを採集した。このサンプルを PAS 培地に入れ、30 °C、200 rpm で一週間培養した。その後、培養液 100 μL を PAS 寒天培地に撒いた。その後得られたコロニーを PAS 寒天培地に単離した。なお、PAS 寒天培地ではコロニーを形成するまでに時間がかかるほか、コロニーが無色透明で扱いづらかったため、得られた菌を一般寒天培地で培養した。これらの菌を DNA シーケンス解析により同定したところ *Stenotrophomonas*、*Burkholderia*、*Achromobacter* 属であることが分かった。

Burkholderia 属はグラム陰性菌で、中でも *Burkholderia cepacia* は病原性は低いが免疫力が低下した人に日和見感染を引き起こすほか、多剤耐性化しやすく、多くの抗菌剤に対して耐性があることが知られている。*Stenotrophomonas*、*Achromobacter* はグラム陰性桿菌であり、*Burkholderia* と同様に広域抗菌薬に対して耐性を持っていることが知られている。*Stenotrophomonas*、*Burkholderia*、*Achromobacter* はブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌と呼ばれており、抗菌性薬剤に耐性を持ちやすいことや湿潤環境に広く存在し、貧栄養状態でも増殖可能であることが特徴である。また、医療分野では感染防御能低下患者の呼吸器感染や手術部位感染などを起因し肺炎、敗血症、内心膜炎などに進展させることが知られている。

今後はこれらの菌のトリクロサン分解能の測定と、採集した微生物以外の菌の培養を予定している。なお、本実験からトリクロサン非感受性菌は湿潤環境に多く生息することが示唆できるため、サンプリングは沼地や田園などを予定している。

Triclosan, Microbes, Bioremediation

講演番号：2A03a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ A 校舎 03 会場

ルバーブ水抽出成分とヒアルロニダーゼ阻害活性

Constituents and hyaluronidase inhibition of rhubarb aqueous extract

○森本 正則[1]、坂口 裕太[1]、国仙谷 良男[2]、藤木 成忠[2]、播磨 章一[2]、松田 一彦[1]、駒井 功一郎[1] ([1]近畿大応生化、[2]ハリマ漢方製薬)
○Masanori MORIMOTO[1], Yuta SAKAGUCHI[1], Yoshio KOKUSENYA[2], Naritada FUJIKI[2], Shoichi HARIMA[2], Kazuhiko MATSUDA[1], Koichiro KOMAI[1] ([1]Kinki Univ., [2]Harima kanpo)

【目的】

ルバーブ（*Rheum rhabarbarum* L.）は、葉柄部分がジャムなどに加工され食用となるタデ科の栽培植物である。本種の葉柄部を熱水で抽出乾燥したものにウシ精巣由来ヒアルロニダーゼ阻害活性が認められたが、その阻害活性は、産地や抽出乾燥方法によって異なった。本研究では、この阻害活性がどの様な成分に由来するかを明らかにし、その活性を最大限に発揮できる抽出生産条件を確定することを目的とした。

【方法・結果】

ルバーブ水抽出物をエタノールで溶解して得られるエタノール可溶・不溶部それぞれのヒアルロニダーゼ阻害活性は、エタノール不溶部に認められた。これらヒアルロニダーゼ阻害活性のことなる抽出物をサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）で分析すると、阻害活性の高いサンプルでは、分子量 20kDa 以上の高分子量化合物が含まれることが判明した。さらに、得られたエタノール不溶物の主成分がペクチンと推察されたため、クロコウジカビ由来のエンド型ペクチナーゼを用いて限定的に加水分解を行ったところ、SEC 分析において高分子量化合物由来のピークが消失すると共にヒアルロニダーゼ阻害活性も消失した。このことからルバーブ水抽出物由来のヒアルロニダーゼ阻害活性は高分子ペクチンに由来すると考えられた。さらにエタノール不溶物を酸による完全加水分解によって構成糖も分析したので、その結果もあわせて報告する。

rhubarb, pectin, hyaluronidase inhibitor

講演番号：2A03a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ A 校舎 03 会場

Adenine nucleotide transporter ANT1 を膜上に配置したプロテオリポソームにおける内封ルシフェラーゼ活性の外部からの制御

Incorporation of adenosine nucleotide transporter, ANT1, into proteoliposomes facilitates ATP translocation and activation of encapsulated luciferase

○野澤 彰、戸澤 譲（愛媛大 PROS）
○Akira NOZAWA, Yuzuru TOZAWA (PROS, Ehime Univ.)

【目的】我々は、これまでにコムギ無細胞蛋白質合成系を用いて機能的膜輸送体蛋白質をリポソーム膜上に合成する技術を開発してきた。本研究では、この技術を利用して出芽酵母のミトコンドリアキャリア(MC)蛋白質の機能再構成系を構築するとともに、輸送活性に対する脂質組成の影響を調査した。さらに、機能型蛋白質として膜上に再構成した MC の中で Adenine Nucleotide Transporter 1(ANT1)を利用し、リポソーム内部に構築した代謝経路を外部から駆動・制御するシステムの構築を試みた。
【方法】MC 蛋白質の合成には、リポソーム添加条件下のコムギ無細翻訳系を用いた。翻訳と共役して MC が組込まれたリポソームを交換基質が内封されたリポソームと混合し、凍結融解および超音波処理により、交換基質封入型の MC プロテオリポソームを調製した。再構成 MC の基質輸送活性の解析は、RI 標識した輸送基質のプロテオリポソーム内への輸送量を液体シンチレーションカウンターにより測定することにより行った。ルシフェラーゼの活性はルシフェリン酸化反応による発光をルミノメーターにより測定した。
【結果】無細胞翻訳系により調製した 11 種の酵母 MC 蛋白質について、機能型蛋白質として再構成できることを確認した。また、MC 輸送活性に対するリポソーム脂質組成の影響を調べた結果、ミトコンドリア内膜に局在する MC はカルジオリピンを添加することにより輸送活性が上昇することが確認された。一方、ペルオキシソーム局在の ANT1 ではこのようなカルジオリピン効果が観察されなかった。これらの結果は、膜脂質組成が特定の MC 輸送活性に影響することを示している。次に、ATP と AMP との交換輸送活性を有することが確認された ANT1 を用い、リポソームに内封したルシフェラーゼへ ATP を供給するとともに反応後の AMP を膜外へ排出する疑似細胞型システムの構築を試みた。ANT1 を再構成したプロテオリポソームに AMP、ルシフェリン、Mg^{2+}およびルシフェラーゼを内封し、外部に ATP を添加すると、ルシフェラーゼ活性による発光が検出された。このとき、ANT1 阻害剤を添加した場合は、発光は検出されなかった。また、ATP の添加により発光が観察された ANT1 プロテオポソームに ANT1 阻害剤を添加すると、速やかに発光の消失が観察された。この結果は、リポソーム膜上に組込んだ輸送体蛋白質の基質選択的な輸送活性により、リポソーム内部の酵素機能の活性を外部から制御するシステムの構築が成功したことを意味している。

Mitochondrial carrier proteins, Wheat germ cell-free translation system, Liposomes

講演番号：2A03a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ A 校舎 03 会場

ヒト MDR1 の輸送基質導入ゲートの解析

The analysis of the substrates entry gates of human MDR1

○井上 修一[1]、木村 泰久[1]、木岡 紀幸[1]、松尾 道憲[1]、加藤 博章[2]、植田 和光[1,3] ([1]京大院農・応用生命、[2]京大院薬、[3]京大・iCeMS)
○ Shuichi Inoue[1], Yasuhisa Kimura[1], Noriyuki Kioka[1], Michinori Matsuo[1], Hiroaki Kato[2], Kazumitsu Ueda[1,3] ([1]Div Appl.Life Sci., Grad. Sch. of Agric, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch of Pharm. Sci. Kyoto Univ., [3]iCeMS, Kyoto Univ.)

【背景】MDR1(multidrug resistance 1)は細胞膜上の能動的な輸送体で、様々な疎水性化合物を細胞外へ排出し、生体を有害な化合物から保護している。一方で、MDR1 は投与薬物の体内動態に影響し癌の多剤耐性の原因となることから、基質認識機構の解明は医療や創薬においても重要である。MDR1 は ABC トランスポーターファミリーに属し、二つの膜貫通領域と二つのヌクレオチド結合領域を持つ。膜貫通領域はそれぞれ 6 つの膜貫通ヘリックス(Transmembrane helix：TM)から成り、基質の結合部位を形成する。最近、我々が取得した MDR1 のオーソログタンパク質の立体構造において、TM4 が柔軟に動く事で基質導入ゲートとして機能する可能性が示唆された。本研究では、ヒト MDR1 の TM4 と TM10 にα-ヘリックスを固定すると予想される変異を導入し、基質特異性の変化を解析した。【方法】C 末端に FLAG-tag を付加した MDR1 変異体を浮遊状態で培養可能な FreeStyle 293-F 細胞に発現させ、界面活性剤(0.8% DDM)で可溶化した後、FLAG-tag を用いて精製した。MDR1 の基質輸送は ATP 加水分解と共役しており、その ATP 加水分解活性は輸送基質によって強く促進される。この特徴を利用し、基質依存的な ATP 加水分解活性を酵素化学的に解析することで基質輸送能を評価した。【結果】オーソログタンパク質では TM4 上部の 3 つのアミノ酸残基にバリンを導入した変異体で TM4 の固定が確認された。そこで、ヒト MDR1 の TM4 および TM10 の上部にバリンを導入した変異体を作成した。TM10 バリン導入変異体の ATP 加水分解活性は野生型と大きく異なり、ベラパミル、ビンブラスチン、バリノマイシンなどで誘導されたものの、モネンシン、ローダミン B、ベルベリンなど他の多くの基質で誘導されなかった。TM4 バリン導入変異体では、野生型と同様に実験に用いた全ての薬剤において ATP 加水分解活性の促進が見られた。TM4 と TM10 の両側にバリンを導入した変異体においては、ベラパミル以外の基質による活性誘導が失われた。以上の結果から、TM10 と TM4 は共に基質導入ゲートを形成している事が示唆された。MDR1 は多くの薬剤を TM10 側から取り込み、ベラパミル、ビンブラスチン、バリノマイシンについては例外的に TM4、TM10 の両側から取り込むと考えられる。さらに詳細に基質ゲート機構を解析するため、TM10 と TM11 の間にイオン相互作用を導入した変異体(T945R)を作成した。T945R の ATP 加水分解活性はベラパミルで誘導されず、バリノマイシン、ビンブラスチン、ローダミン B による活性誘導も減少した。この結果からも TM10 が自由に動く事が基質取り込みに重要である事が示唆された。

ABC transporter, MDR1, p-gp

講演番号：2A03a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ A 校舎 03 会場

ABC トランスポーターの ATP 加水分解機構

Analysis of the conformational change in the ABC transporter

○小池 悠斗[1]、七谷 圭[2]、高橋 聡[3]、鎌形 清人[3]、魚住 信之[2] ([1]東北大工、[2]東北大院工、[3]東北大院理)
○ YUTO KOIKE[1], KEI NANATANI[2], SATORU TAKAHASHI[3], KIYOTO KAMAGATA[3], NOBUYUKI UOZUMI[2] ([1]Fac. Sch. of Eng., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. of Eng., Tohoku Univ., [3]Grad. Sch. of Sci., Tohoku Univ.)

ABC(ATP-binding cassette)トランスポーターは分子内に高度に保存された ATP 結合領域(NBD)を持ち，ATP の加水分解により生じるエネルギーを構造変化エネルギーに変換することで，生体膜を介して脂質やイオン，薬剤などの基質を濃度勾配に逆らって輸送する膜輸送体である．ABC トランスポーターの ATP 加水分解と構造変化のメカニズムについて，これまで生化学的解析あるいは結晶構造解析などにより議論されてきたが，その全容は未だ解明されていない．大腸菌フリッパーゼ MsbA は，哺乳類 ABC トランスポーターと類似の構造，機能を有しており，ヌクレオチドが結合した closed 型構造と，ヌクレオチド未結合の open 型構造が明らかになっている．そこで，本研究では FRET を用いて MsbA の構造変化を解析し，ABC トランスポーターの ATP 加水分解とコンフォメーション変化の相関の解明を目的とした．

はじめに，MsbA 内に存在する２つのシステイン残基をアラニンに置換し，MsbA の任意のアミノ酸残基をシステイン残基に置換した変異体発現コンストラクトを６種類作製した．作成したコンストラクトを大腸菌 C41(DE3)株に形質転換し､LB 培地を用いて 37℃で培養し, OD600 が 0.6 付近において、IPTG を添加し変異体の発現を誘導させた後, 20℃で培養を継続することで MsbA 変異体を高発現させた．その後，菌体を遠心により集菌し，フレンチプレスで破砕後，超遠心により膜画分を取得した．続いて，界面活性剤 n-dodecyl-β-D-maltoside (DDM)を用いて，膜画分から膜蛋白質を可溶化した．さらに，可溶化膜画分を Ni-NTA アフィニティーカラムに供し MsbA の精製を行った．SDS-PAGE により，精製 WT-MsbA，Cys-less-MsbA および各変異体の精製が確認できたため，MsbA による ATP 加水分解の過程で生じたリン酸を BIOMOL GREEN を用いて定量することにより ATPase 活性を測定した．その結果，全変異体が WT-MsbA と同様の活性を保持していることが確認できた．次に，導入したシステイン残基を蛍光分子である Alexa 532 で修飾し，高感度蛍光分光光度計を用いて ATP の結合と分解による蛍光強度の変化を観察した．今回用いた蛍光分光光度計は従来の分光器よりも少ないサンプルかつ高感度で測定を行なうことができる．観察の結果，6 変異体中 3 変異体において ATP 非存在下よりも ATP 存在下で蛍光強度の上昇が観察された．現在，この蛍光強度変化を引き起こす構造的メカニズムを解明するため各種変異体や，ATP と ATP アナログである ADP，ATPγS，ADP/Vi を用いて蛍光強度変化の観察を進めている．

ABC transporter, ATP hydrolysis, FRET

講演番号：2A03a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ A 校舎 03 会場

赤外自由電子レーザーを用いたタンパク質凝集体の光分解

Photo-dissociation of protein aggregates by using mid-IR free-electron laser

○川崎 平康[1]、遠藤 生[2]、藤岡 隼[2]、築山 光一[1,2] ([1]東理大赤外自由電子レーザー研究セ、[2]東理大院総化)
○Takayasu Kawasaki[1], Ikuru Endo[2], Jun Fujioka[2], Koichi Tsukiyama[1,2] ([1]Tokyo University of Science, IR FEL Research Center, [2]Tokyo University of Science, Grad. Sch. Chem. Sci. and Technol.)

[目的] 赤外自由電子レーザー(IR FEL)は、中赤外領域において波長可変かつ直線偏光性を有するパルス性の発振レーザーである。分子に対する IR FEL の照射により、多段階的に光子が吸収され、結合の分解や異性化反応等が引き起こされる（多光子吸収解離現象)。我々は、IR FEL の医科学分野への応用研究を積極的に推進しており、昨年度の大会において、アミロイドーシス疾患に関係するリゾチーム及びインスリンの各アミロイド線維に対する IR FEL の照射効果について報告した。今回、これらのタンパク質よりも分子サイズが小さい５残基ペプチド(DFNKF)から形成されるアミロイド線維並びに、アミロイド線維とは異質のタンパク質凝集体としてケラチンポリマーを照射対象とし、これらの凝集体の立体構造に与える IR FEL の効果について比較解析した。
[方法] 甲状腺ホルモンの一種カルシトニンの内部配列の５残基ペプチド(DFNKF)を 10 mM Tris 緩衝液(pH7.5, 含 10%DMSO)に溶解し(10mg/mL)、20 mM NaCl 共存下 37°C でアミロイド線維を形成させた。ケラチンポリマーについては、市販のケラチンを PBS(含 20%DMSO)に溶解し 0.5M NaCl 共存下凝集体を形成させた。各凝集体をスライドグラス上に添加し、様々な波数(1000-2000 cm^{-1})に調整した IR FEL を照射した後、FTIR 及び走査型電子顕微鏡観察(SEM)による解析を行った。FEL 照射方法 : 2856MHz の熱カソード高周波電子銃を電子源として用い、発振波長 5-10 ミクロンの中赤外領域において、350 ピコ秒間隔のミクロパルスから成るマクロパルス発振(2 マイクロ秒間隔、繰り返し速度:5Hz)により、8-10 mJ/macro-pulse のビームを試料に直接照射する方法にて実施した。
[結果及び考察] DFNKF のアミロイド線維の FTIR スペクトルでは、native の場合に比較してアミド I(6.08 ミクロン)のピークが増大した。このアミド I に調整した IR FEL を２時間照射すると、アミロイド線維由来のピーク強度が減少し、native ペプチドと類似のスペクトルに変化した。SEM 画像では、直径数十ナノメートルの細い絹糸のようなアミロイド線維が、IR FEL 照射により劇的に減少し、代わりに球状の塊が多く観察された。この結果は、リゾチームやインスリンで得られた結果と一致しており、アミロイド線維に対する IR FEL の分解効果を支持している。一方、ケラチンポリマーでは、アミロイド線維とは全く異なる岩状の凝集体が観察された。この凝集体に対して、アミド I、アミド II、及びアミド III の各振動領域の周波数で IR FEL を照射した結果、アミド II 及びアミド III で照射した場合に特に顕著な立体構造の変化が観察された。以上の結果から、IR FEL を用いてアミド主鎖の振動励起を誘起することにより、タンパク質凝集体の分解が促進されるものと考えられる。

amyloid, infrared free electron laser, aggregation

講演番号：2A03a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ A 校舎 03 会場

好冷性 *Shewanella* 属細菌由来 cytochrome *c* の 1 アミノ酸置換による安定性の変化
Changes in stability due to one amino acid substitution of cytochrome *c* from psychrophilic *Shewanella*

○政成 美沙[1]、若井 暁[2]、三本木 至宏[1] ([1]広島大院生物圏、[2]神戸大自然)
○Misa MASANARI[1], Satoshi WAKAI[2], Yoshihiro SAMBONGI[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Kobe Univ.)

【背景・目的】

我々はこれまでに，深海由来の *Shewanella violacea* と浅瀬由来の *Shewanella livingstonensis* の相同シトクロム *c* (以下それぞれ SV，SL)の熱安定性を比較してきた。その結果，SV は SL に比べて熱安定性が高かった。深海は高圧力環境であることから，深海由来の SV は圧力に適応し，その結果として浅瀬由来の SL よりも安定性が高くなった可能性がある。本研究の目的は，深海由来 *Shewanella* 属細菌が生産するシトクロム *c* の安定化機構をアミノ酸レベルで解明することである。

【方法・結果】

これまでの研究結果から，SV の Lys50 がヘムと水素結合を形成して SL よりも安定化していると考えている。そこで，SV および SL の 50 番目のアミノ酸 (SV は Lys，SL は Leu)を入れ替えた変異体(以下それぞれ SV-K50L，SL-L50K)の熱安定性および変性剤耐性を測定した。

熱安定性の測定には Differential scanning calorimetry (DSC)を使用した。SV-K50L の熱安定性は SV 野生体よりも下がっていた。一方，SL-L50K の熱安定性は SL 野生体とほぼ同じであった。熱力学的パラメータを算出した結果，熱変性に伴うエンタルピー変化およびエントロピー変化はいずれの変異体ともそれぞれの野生体より大きな値を示した。また，分光光度計を用いて GdnHCl に対する耐性も測定した。その結果，どちらの変異体もそれぞれの野生体より低い変性剤耐性を示した。

【考察】

SV-K50L の熱安定性は SV 野生体より下がったが，熱変性に伴うエンタルピー変化は上昇していたので，Leu への置換により新たな疎水性相互作用が生じた可能性がある。また，GdnHCl はイオン性の変性剤であるため疎水性相互作用に影響せず，変性剤耐性は野生体よりわずかに下がる程度に留まったと考えられる。

一方，深海由来と浅瀬由来のシトクロム *c* では 51 番目のアミノ酸にも違いがある。深海由来では Gly，浅瀬由来では Asn である。今回作製した SL-L50K 変異体では，Lys の隣に Asn が存在するため側鎖が立体障害を起こしている可能性がある。そのため，構造に歪みが生じ安定化できず，野生体と比べて熱安定性が同じであったり，変性剤耐性がほぼ変わらなかったりしたと考えられる。

今後は，SV-K50L および SL-L50K にそれぞれ 51 番目のアミノ酸も相互に入れ替えた二重変異体を作製し，その熱安定性および変性剤耐性を測定する予定である。

cytochrome *c*, growth pressure, *Shewanella*

講演番号：2A03a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ A 校舎 03 会場

好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* 由来シトクロム *c*′の熱安定性と特殊な複合体形成

Heat stability and unique oligomerization of cytochrome *c*′ from thermophile *Hydrogenophilus thermoluteolus*

○藤井 創太郎[1]、政成 美沙[1]、若井 暁[2]、山中 優[3]、三本木 至宏[1] ([1]広大院生物圏、[2]神戸大自然、[3]奈良先端物質)
○ Sotaro FUJII[1], Misa MASANARI[1], Satoshi WAKAI[2], Masaru YAMANAKA[3], Yoshihiro SAMBONGI[1] ([1]Hiroshima Univ, [2]Kobe Univ, [3]NAIST)

【目的】シトクロム *c*′は細菌から見出されるヘム蛋白質である。4 本のヘリックスが束になった筒状構造を持ち, その多くは 2 量体である。一酸化窒素や一酸化炭素に対する結合能があり, ガスセンサー蛋白質としての応用が期待される。応用する上では，安定性が高いほうが望ましい。当研究室では，生育至適温度 52ºC の好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* から新規シトクロム *c*′の精製に成功し，PHCP と名づけた。本研究の目的は，PHCP の熱安定性を調べることである。生育至適温度 25 ºC の常温菌 *Allochromatium vinosum* 由来シトクロム *c*′（AVCP）は PHCP とアミノ酸配列が 55%一致し，四次構造まで決定されている。AVCP と PHCP を比較することで，PHCP の熱安定性の違いに寄与するアミノ酸残基やその原因を特定することができる。
【方法・結果】CD（円偏光二色性）スペクトルによって，シトクロム*c*′の加熱に伴う二次構造変化から熱安定性を測定した。その結果，PHCPの変性中点温度（T_m）は87ºC，AVCPは52ºCであった。さらにDSC（示差走査熱量測定）によって，変性に伴う熱量変化から熱安定性を測定したところ，CD測定とほぼ同様の結果が得られた。DSCで得られた変性曲線から熱力学的パラメータを算出すると, PHCPの熱変性に伴うΔHはAVCPよりも大きく, 分子内部の相互作用が安定性に寄与する可能性を見出した。
AVCPのヘム周辺に位置するGly20およびVal76が，PCHPではより疎水性の高いAla20およびLeu76であることに着目した。AVCPの変異体G20AおよびV76Lを作製してその熱安定性を測定したところ，G20AのT_mは野生型より6ºC上昇した。しかしV76Lについては顕著な安定性の向上は見られなかった。また，ゲルろ過クロマトグラフィーおよびBlue-Native PAGEによってPHCPの分子量を推定した。その結果, PHCPは3量体を形成していることが分かり, これはシトクロム*c*′としては初めての知見である。
【考察】G20Aの熱安定性がAVCPより高いことから，PHCPはヘムとの疎水性相互作用を強くすることで安定化している。しかし，それだけではPHCPとAVCPの大きな熱安定性の差は説明できない。このことから，PHCPは3量体化することで分子内部の相互作用を増やし，高い安定性を獲得していると考えた。
【展望】現在，PHCPの結晶を用いてX線結晶構造解析を行っている。3量体の3D構造を解き，PHCPの安定化機構を解明する。また，PHCPは還元状態で一酸化窒素を結合すると，単量体に解離することが分かっている。もし単量体で熱安定性が落ちることを示すことができれば，蛋白質の複合体形成が熱安定性に寄与することを明らかにすることができる。

cytochrome *c*′, heat stabilty, oligomerization

講演番号：2A03a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ A 校舎 03 会場

スギナ由来 GH18 キチナーゼ（EaChi-A）の触媒反応における LysM ドメインの機能
A family GH18 chitinase containing LysM domain from Equisetum arvense: role of LysM domain in the enzymatic activity
○北奥 喜仁[1]、大沼 貴之[1]、平良 東紀[2]、深溝 慶[1] ([1]近畿大院農、[2]琉球大院農)
○Yoshihito KITAOKU[1], Takayuki OHNUMA[1], Toki TAIRA[2], Tamo FUKAMIZO[1] ([1]Kinki Univ., [2]Ryukyu Univ.)

目的

スギナ（*Equisetum arvense*）由来キチナーゼ（EaChi-A）は LysM ドメイン、PT リッチリンカー、および GH18 触媒ドメインから構成されるキチナーゼであり、植物由来 GH18 キチナーゼとしては珍しいマルチドメイン酵素である。本研究では酵素反応における各ドメインの機能を明らかにすることを目的として、各種基質に対する全長、触媒ドメインおよび LysM ドメインの分解活性と結合能を調べた。

方法

EaChi-A の全長と触媒ドメイン（EaChi-A Cat）のみからなるタンパク質を作製し、可溶性基質であるグリコールキチンとキチンオリゴ糖および不溶性基質であるキチンビーズに対する分解活性を調べた。また、それぞれのタンパク質の不活性変異体を作製し、キチンオリゴ糖に対する結合能を調べた。LysM ドメインはチオレドキシン融合タンパク質として発現させ、精製、TEV プロテアーゼによる消化後、LysM ドメインのみを単離した。キチンオリゴ糖に対する各タンパク質の結合力の評価は、CD による熱変性温度の上昇を指標として、また等温滴定熱量測定法（ITC）によって得られる熱力学的定数に基づいて行った。

結果

EaChi-A と EaChi-A Cat のグリコールキチンおよびキチンオリゴ糖分解活性を調べた結果、両者の分解速度に大きな違いがみられなかった。一方、不溶性基質であるキチンビーズに対して、EaChi-A は EaChi-A Cat よりも高い分解活性を示した。$(GlcNAc)_4$ と $(GlcNAc)_6$ の存在下で EaChi-A の熱変性中点温度（T_m）を調べた結果、非存在下での T_m よりもそれぞれ 4.9、10.3 ^{0}C 上昇することがわかった。同様の結果が EaChi-A Cat を用いた時にも得られた。以上のことから、LysM ドメインは、可溶性基質の分解には関与しないこと、また、不溶性基質に対する EaChi-A の吸着能を高めていることが示唆された。EaChi-A Cat のキチンオリゴ糖に対する結合力を ITC で調べた結果、$(GlcNAc)_{3\text{-}6}$ に対する結合定数がそれぞれ 9.80×10^2、6.50×10^3、4.51×10^4、1.97×10^5 M^{-1} であり、鎖長の伸長に伴って結合力が上昇することがわかった。また、結合はエンタルピー駆動型であること、不利なエントロピー変化を伴うことがわかった。現在 LysM ドメインの ITC 解析を行っている。

glycoside hydrolase, chitinase, LysM domain

講演番号：2A03a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ A 校舎 03 会場

有害金属に応答するシスエレメントと転写調節因子の結合親和性の解析、および金属センサーへの利用

Analysis of binding affinity between cis-elements and transcriptional regulators responsive to toxic metals

○谷口 正毅、内藤 多希、シディキ モハマド、前田 勇 (宇都宮大院農)
○Masaki TANIGUCHI, Taki NAITO, Mohammad SIDDIKI, Isamu MAEDA (Utsunomiya Univ.)

【目的】シスエレメントと転写制御因子で構成される転写スイッチは、環境の変化に応答して遺伝子の発現を制御する。カドミウム、ヒ素応答性の転写制御因子である CadC、ArsR は DNA に結合することで転写を抑制している。Cd (II)または As (III)が結合するとこれらの転写制御因子が DNA から解離し、抑制が解除されるため転写が開始する。一方、水銀応答性の転写制御因子である MerR も DNA に結合して転写を抑制するが、Hg (II)が結合すると MerR とそれが結合する DNA の立体構造が変化することで転写の抑制が解除され転写が開始する。本研究ではこれらの転写制御因子の DNA 結合親和性について比較し、MerR の水銀センサーへの利用を検討する。
【方法】結合の親和性の分析には蛍光測定および SPR を用いた。３つの転写制御因子 MerR、CadC、ArsR は緑色蛍光タンパク質（GFP）を融合させた組換えタンパク質として調製し、それぞれに対応するシスエレメントは基材上に固定するためにビオチン標識した。シスエレメント DNA をストレプトアビジンでコーティングされた基材上に固定化し、組換えタンパク質を含む溶液を反応させ、DNA とタンパク質からなる複合体を形成させた。反応液を除去した後、有害物質を含む緩衝液、または含まない緩衝液を加え反応させ遊離タンパク質を定量した。
【結果】CadC-GFP は 100 μg/L の Cd (II)を添加した場合、シスエレメントとの結合親和性は顕著に減少した。また、ArsR-GFP も 100 μg/L の As (III)を添加した場合、結合親和性は減少した。一方、MerR-GFP はHg(Ⅱ)を添加しても遊離タンパク質由来の有意な蛍光の増加は起こらなかった。しかし、SPR による分析ではシスエレメントからの MerR-GFP の解離がランニング緩衝液と比較して Hg (II) 10～10,000 μg/L の間で濃度依存的に増加した。この結果から、Cd (II)結合 CadC および As (III)結合 ArsR は DNA 結合親和性が低下し、基材から解離したため蛍光が増加したことが判る。一方、Hg (II)結合 MerR は DNA との結合を保ちながらシスエレメントの立体構造の変化を引き起こすが、この立体構造の変化は MerR のシスエレメントとの結合親和性に多少の変化を与えると考えられる。この結合親和性の変化をより的確に捉えることが出来れば遊離タンパク質の定量により Hg (II)の測定が可能である。

biosensor, toxic metal, transcriptional regulator

講演番号：2A03a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ A 校舎 03 会場

腸管上皮由来抗菌性レクチン RegIV の DNA 結合活性の解析
DNA-binding activity of RegIV an antimicrobial lectin secreted from intestinal epithelia
○坂本 暁子、渡辺 寛人（明治大院農）
○Akiko SAKAMOTO, Hirohito WATANABE (Meiji Univ.)

【目的】腸管上皮は感染防御においてさまざまな重要な機能を有するが、その 1 つが抗菌ペプチドなどの自然免疫因子の産生・分泌である。われわれは、腸管上皮細胞より分泌される抗菌性レクチン RegⅣについて解析を行い、これまでに RegⅣがマンナンや LPS などの糖鎖を認識して結合すること、さらに RegⅣがグラム陽性菌、グラム陰性菌、および真菌に対して幅広い抗菌活性を発揮することを明らかにしている。一方、RegⅣ mRNA は腸管上皮の内分泌細胞にも発現することから、RegⅣは抗菌機能に加え多様な機能を有することが推定されるが、その詳細は不明である。本研究では、RegⅣの生理機能の一端を明らかとすることを目的とし、DNA に対する RegⅣの結合能について解析を行った。
【方法および結果】大腸菌により His6 タグを付加したヒト RegⅣ組換えタンパク質を発現させ、これを精製して解析に用いた。はじめに Epoxy-activated Sepharose にマンナンをカップリングさせた樹脂を用いて結合性を解析したところ、組換え RegⅣがマンナンに結合することが確認された。さらに反応液にウシ胸腺由来 DNA を共存させたところ、RegⅣのマンナンへの結合は阻害された。この結合阻害作用は、DNase 処理により消失したことから、DNA 試料における夾雑糖鎖成分によるものではないことが示唆された。一方、Oligo-dT Sepharose 樹脂を用いて解析を行ったところ、RegⅣがこの樹脂に対する結合性を有すること、さらにこの結合がマンナンの共存により阻害されることが明らかとなった。
　以上のことから、RegⅣが DNA に対する結合活性を有することがはじめて示された。この事実は、腸管上皮より管腔側あるいは基底膜側に分泌された RegⅣの多様な機能を明らかにする上で重要な意味をもつものと考えられる。

lectin, intestinal epithelia, innate immunity

講演番号：2A03a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ A 校舎 03 会場

C 型レクチン CEL-I の部位特異的変異導入による糖結合特異性変換とその立体構造解析
Alteration of the carbohydrate-binding specificity of the C-type lectin CEL-I by site-directed mutagenesis
○森内 裕美[1]、海野 英昭[1]、郷田 秀一郎[1]、舘野 浩章[2]、平林 淳[2]、畠山 智充[1] ([1]長崎大院工、[2]産総研)
○Hiromi Moriuchi[1], Unno Hideaki[1], Shuichiro Goda[1], Hiroaki Tateno[2], Jun Hirabayashi[2], Tomomitsu Hatakeyama[1] ([1]Nagasaki Univ., [2]AIST)

【目的】海産無脊椎動物グミ（*Cucumaria echinata*）由来 C 型レクチンである CEL-I（32 kDa)は 2 つの糖認識サブユニットからなる C 型レクチンである。C 型レクチンの糖認識ドメイン(CRD)には QPD (Glu-Pro-Asp) 配列または EPN (Glu-Pro-Asn) 配列モチーフが存在しており，それぞれガラクトース特異性またはマンノース特異性に重要な寄与をしているものと考えられている。CEL-I は，GalNAc/Gal 特異性を示し，その糖結合部位には QPD 配列が存在しているが，これまでに，我々はこの QPD 配列を EPN 配列に置換した CEL-I の部位特異的変異体(EPN-CEL-I)が，マンノース特異性を示すことを明らにした。しかし，この EPN-CEL-I のマンノースに対する親和性は比較的弱く，糖結合部位に存在する別のアミノ酸の影響を考慮する必要があった。そこで今回，哺乳類血清に含まれるマンノース結合レクチン(mannose-binding lectin; MBL)の糖結合部位構造をもとに，EPN-CEL-I の Trp105 を His に置換した部位特異的変異体(EPNH-CEL-I)を作製し，その糖特異性の変化及び立体構造について検討を行った。
【方法・結果】EPNH-CEL-I 遺伝子を PCR によって作製し，pET-3a ベクターに挿入後，大腸菌 BL21(DE3)pLysS を用いて発現を行ったところ，目的タンパク質はインクルージョンボディとして得られたため，塩酸グアニジンを用いたリフォールディングを行った。得られた可溶性の EPNH-CEL-I は，円二色性（CD）スペクトルから天然型 CEL-I と同様の二次構造をもつことが確認された。EPNH-CEL-I は，マンノース固定化カラムに対する Ca^{2+}依存性の吸着及びマンノース糖鎖を末端に付加した PAMAM-dendrimer（Man-PD）に対する結合性を示したが，GalNAc 固定化カラムやガラクトース含有 PD などへの結合性は示さなかった。また，糖鎖アレイを用いた種々のオリゴ糖鎖との結合試験においても高マンノース型糖鎖への結合が認められた。さらに，等温滴定カロリメーター（ITC）によって，マンノースとの結合定数は 3.17×10^{3} M^{-1}（25℃）と算出された。これらのことから，EPN-CEL-I の Trp105 を His に置換することによって, ガラクトース特異性からマンノース特異性に変化したことが明らかになった。一方，EPNH-CEL-I/mannose 複合体の結晶を作製し，X 線回折測定を行ったところ，1.7Å以上の分解能で回折データが得られたため，天然型 CEL-I をサーチモデルとして分子置換法により構造解析を行った。その結果，EPNH-CEL-I 中の 1 個の Ca^{2+}にマンノースが配位結合によって結合しており，His105 との相互作用によって結合が安定化されていることが示唆された。

lectin, X-ray crystallographic analysis, protein engineering

講演番号：2A03a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ A 校舎 03 会場

磁気力場を利用したタンパク質結晶の高品質化と結晶成長のリアルタイム観察

Real-time observation of protein crystal growth in a magnetic field

○中村 顕[1]、大塚 淳[1]、廣田 憲之[2]、和田 仁[1,2]、田之倉 優[1,3]（[1]東大院農生科・応生化、[2]物材機構、[3]東大磁気力場研究連携ユニット）
○ Akira NAKAMURA[1], Jun OHTSUKA[1], Noriyuki HIROTA[2], Hitoshi WADA[1,2], Masaru TANOKURA[1,3] ([1]Univ. of Tokyo, [2]NIMS, [3]Coop. Unit of Magnetic Force Field Res., Univ. of Tokyo)

超伝導磁石が作り出す強い磁場と大きな磁場勾配により、水滴に作用する重力を相殺可能な鉛直上向きの磁気力を発生させることができ、これにより水の磁気浮揚が達成される。このような強い磁気力がはたらく環境を「磁気力場」と呼び、われわれは磁気力場をタンパク質結晶化に応用した研究を行なっている。2012 年度大会では、磁場外対照実験の結果と比較して、磁気力場を利用することで高品質なタンパク質結晶が得られることを報告した（Nakamura *et al.*, *Cryst. Growth Des.* **12**(3), 1141-1150, 2012）。また最近、蒸気拡散法によるタンパク質結晶化を磁気力場環境で実施すると、結晶化ドロップ中の対流が抑えられるという計算機シミュレーションの結果を報告している（Okada *et al.*, *IEEE Trans. Appl. Supercond.* **23**(3), 3700104, 2013）。本発表では、われわれが開発に成功した、磁気力場を用いて高品質なタンパク質結晶をさらに効率的に得るための『高効率・高品位タンパク質結晶生成システム』を紹介するとともに、本システムでのタンパク質結晶化の実施事例を報告する。

本システムの最大の特徴は、結晶化プレートを装置から取り出すことなく磁気力場中での結晶化ドロップの様子をリアルタイムに観察可能なデバイスを搭載している点にある。そのため、いつどのように結晶が生成したかを把握することができるとともに、結晶が十分に成長したことを確認した上で結晶化プレートを装置から取り出す最適なタイミングを知ることができる。

本システムを使用して、蛍光タンパク質および亜鉛プロテアーゼについて結晶化実験を実施し、結晶化の過程を観察装置によって記録した。また、得られた結晶について X 線回折強度データを取得することで、その品質を評価した。これらの結晶はいずれも結晶の *c* 軸が磁場の向きと平行になる磁場配向を示していた。また、本システム中で得られた結晶は対照実験で得られた結晶と比較して、最高分解能の向上などの高品質化の傾向が認められた。さらに、磁気力場中では、品質のバラつきが小さい均質な結晶が得られることが分かった。本結果より、均質で高品質な結晶が得られる磁気力場を利用したタンパク質結晶化法は、膜タンパク質や超分子質複合体などのいわゆる高難度タンパク質の結晶構造解析に貢献できると考えている。

本システムは、JST 研究成果展開事業 先端計測分析技術・機器開発プログラムの支援を受けて開発したものであり、現在、文部科学省先端研究基盤共用・プラットフォーム形成事業における共用対象装置として、産業界および産業界と連携した学術機関からの利用希望を受け付けている。

protein crystallization, high magnetic field, real-time observation

講演番号：2A03p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 03 会場

日本産ショウガの新規システインプロテアーゼの一次構造

Primary Structure of a new cysteine protease from ginger rhizome produced in Japan

○西山 友貴[1]、荒木 朋洋[2] ([1]東海大院農、[2]東海大農)
○Yuki Nishiyama[1], Tomohiro Araki[2] ([1]Grad. sch. of Agric. Tokai Univ., [2]Sch. of Agric. Tokai Univ.)

【目的】ショウガは，老化防止や免疫力の向上，殺菌作用，抗がん作用，鎮痛作用など多くの効能があるということが報告されている．また，日本産ショウガから種々の方法によってプロテアーゼが精製され，コラゲナーゼ活性を有することが報告されている．一方海外産ショウガからもシステインプロテアーゼが分離され，プロテアーゼ活性に加え,コラゲナーゼ活性および一次構造が報告されている．しかし日本産ショウガのシステインプロテアーゼは，一次構造および,切断特異性などの諸性質は明らかになっていない．そこで，試料に日本産ショウガを用いて，システインプロテアーゼの分離および精製を行い，一次構造解析を試みた.

【方法･結果】ショウガシステインプロテアーゼは，40% 硫安分画を行った.この上清画分は，DEAE トヨパール陰イオン交換クロマトグラフィーに供した． 20 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 と 0.25 M NaCl を含む同緩衝液のグラジエント溶出で分離を行った結果，3 つのピークがプロテアーゼ活性を有した.これらのピークは， SDS-PAGE を行った結果， 29 KDa 付近にバンドが存在した．これらのバンドはブロッティング後アミノ酸配列分析を行った．その結果，3 つのピークのうち 2 つピークがすでに報告されているシステインプロテアーゼの 2 種と同じ N 末端配列を示した．他の 1 つのピークはこれらとアミノ酸の置換が見出され，新たなプロテアーゼと考えられた．最も高収量で得られたシステインプロテアーゼ P2 画分は，ピリジルエチル化後トリプシン消化と Cm 化後 V8 プロテアーゼ消化を行った．P2 の消化物はそれぞれ逆相 HPLC によってペプチドを分離後，アミノ酸組成及び配列分析を行い一次構造を解析した．P2 から得られたペプチドについて,報告されているシステインプロテアーゼ GP Ⅱの配列と比較した結果，95 残基目(D→N)と 220 残基目(T→A)の 2 か所に置換が見いだされ,P2 は新規のシステインプロテアーゼであることが明らかとなった．また，アミノ酸の置換部位は触媒部位から離れた場所に存在したため，活性には影響しないと考えられた．一方，P2 は 2 ヶ所に N グリコシド糖鎖のコンセンサス配列を有したため,アミノ糖分析を行った結果 99 残基目と 156 残基目に糖鎖が確認された．この糖鎖はシステインプロテアーゼ GPⅡで報告されている 99 残基目と 156 残基目の糖鎖の位置と一致した.

ginger, cysteine protease, primary structure

講演番号：2A03p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 03 会場

Expression and purification of cyto-insectotoxin (cit 1a) using silkworm larvae targeting for an antimicrobial therapeutic agent

○MD PANNA ALI[1], Katsuhiko Yoshimatsu[2], Tomohiro Suzuki[2], Tatsuya Kato[1,2], Enoch Y. Park[1,2]
([1]Laboratory of Biotechnology, Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ.)

Recently, antimicrobial peptides (AMPs), both synthetic form and natural sources, have raised interest as potential substitute for antibiotics as resistant against conventional antibiotics. Cyto-insectotoxin (*cit1a*) is a 38 amino acid antimicrobial peptide isolated from spider venom of the central Asian spider, *Lachesana tarabaevi*. Natural cyto-insectotoxin is synthesized and shows effective therapeutic agent of *Chlamydia* infection as well as a broad spectrum of cytolytic activity. A synthetic gene cit1a fused with EGFP was expressed as an EGFP-cit1a fusion protein using a cysteine protease deleted *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV CP^-) bacmid in silkworm larva and pupa. The recombinant protein was purified effectively by using anti-FLAG protein purification gel. The antimicrobial effect of the purified protein was assayed using disk diffusion and broth microdilution methods. The minimum inhibitory concentration values (MICs) of EGFP-cit1a were also generated against several bacterial strains and showed similar antimicrobial activity to that of the synthetic cit1a reported earlier. This peptide showed the antibiotic activity towards Gram-positive and Gram-negative bacteria at micromolar concentration level. These results highlight that cit1a can be produced within very short time (as long as 10 days) using silkworm and the produced functional cit1a is expected for using as antimicrobial gene therapeutic agent.

Cyto-insectotoxin (cit1a), expression, purification,, antimicrobial effect,, bacteria.

講演番号：2A03p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 03 会場

超好熱アーキア由来 S-layer タンパク質の機能解析

Function of S-layer protein derived from hyperthermophilic archaea

○郷田 秀一郎、山下 謙一郎、海野 英昭、畠山 智充（長崎大院工）
○ Shuichiro GODA, Kenichiro YAMASHITA, Hideaki UNNO, Tomomitsu HATAKEYAMA (Nagasaki Univ.)

S-layer タンパク質は、細胞表面に存在し、自己集合性を持ち、細胞表面で格子を形成して細胞の安定化に大きく貢献している。そのアミノ酸配列は種間でほとんど保存されておらず、差が大きく見られている。生物の第 3 のドメインであるアーキアにおいては細胞壁の主要な成分であり、耐熱性に寄与していると考えられている。しかしながら、アーキア由来 S-layer タンパク質の構造、機能に関する報告は極めて限られたものとなっている。我々は超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* 由来タンパク質から糖結合性を示すものを探索したところ、グルコースに結合を示すタンパク質として S-layer タンパク質と機能が推定されているタンパク質を見出した。そこで、本研究では同タンパク質をリコンビナントタンパク質として生成し、その性質の解明を行った。

P. horikoshii を培養後、集菌し、超音波破砕することによって粗タンパク質溶液を調製した。糖結合性を示すタンパク質を精製するために、得られた粗タンパク質溶液はグルコースを固定化したカラムに通し、吸着画分はグルコースを含む溶液で溶出した。得られたタンパク質はプロテアーゼ処理し、質量分析計を用いてペプチドマスフィンガープリント法で解析したところ、S-layer タンパク質と機能がアノテーションされている ORFID PH1395.1 産物であった。そこで、大腸菌を宿主に用いた組換えタンパク質発現系の構築を行った。発現用ベクターには pET-3a、宿主となる大腸菌には BL21codon plus(DE3)RIPL を用いたところ、菌体粗抽出液の可溶性画分に生産がみられた。精製はアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより行った。得られたリコンビナント PH1395.1 産物の糖特異性を解明するため、等温滴定型熱量計を用いて、タンパク質に糖を滴下することによって相互作用に伴う熱量を測定した。その結果、PH1395.1 産物は N-acetylglucosamine に対してのみ結合を示し、グルコース、グルコサミン、N-アセチルムラミン酸、N-アセチルガラクトサミン、セロビオースには結合しなかった。このことは、グルコースを固定化したカラムで本タンパク質が吸着したことは樹脂自体に結合したものと考えられた。これらの結果、PH1395.1 は N-acetylglucosamine に糖特異性を示すことが明らかとなった。このことから、PH1395.1 産物をグラム陽性菌である *Micrococcus lysodeikticus* と混合したところ、菌凝集活性が見られた。X 線小角散乱及び動的光散乱測定から本タンパク質のサイズ及び分子量を求めたところ、同タンパク質は多量体を形成しており、その結果、菌凝集活性を示したと考えられた。

S-layer protein, Pyrococcus horikoshii

講演番号：2A03p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 03 会場

PEG 化タンパク質のイオン交換クロマトグラフィーによる分離

Separation of PEGylated protein by ion exchange chromatography

○久保 雄二、中村 孝司（東ソー）
○Yuji KUBO, Koji NAKAMURA (Tosoh)

近年、タンパク質の PEG（ポリエチレングリコール）修飾による新しい治療用タンパク質が開発され、次世代型バイオ医薬品として期待されている。PEG をバイオ医薬品（タンパク質、ペプチド、酵素、リン脂質など）に結合させることにより、バイオ医薬品の元来の機能に影響を与えることなく臨床的な特性を改善することが可能である。例えば抗原性（免疫原性）の調整、タンパク質の安定化にともなう血中半減期の延長、それに伴う薬剤投与量の低減、また受容体との結合力の調整などが可能となる。また、一方で医薬品タンパク質の PEG 化には、次の様な問題点がある。タンパク質を PEG 化する際、未反応 PEG、未反応タンパク質以外に、mono-, di-, tri-PEG 化タンパク質などの異性体が生成する。またタンパク質は、幾つかの異なる PEG 結合サイトを有しているため、PEG 化により構造異性体を生成する可能性があり、目的とする PEG 化タンパク質の精密精製が必要となる。本発表では、イオン交換クロマトグラフィー（IEC）を用いた PEG 化タンパク質の分離・精製例を報告する。特に高吸着型イオン交換クロマトグラフィー担体への PEG 化タンパク質の吸着挙動を調査し、pH や塩濃度を最適化することで、PEG 修飾後も高い吸着容量を維持できることを確認した。また、高吸着型イオン交換クロマトグラフィー担体の粒子サイズを小さくすることで、異性体等の分離能が改善されることを確認した。

pegylated protein, separation, ion exchange chromatography

講演番号：2A03p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 03 会場

塩濃度耐性アニオン交換クロマトグラフィーによるタンパク質の分離

Separation of proteins by Salt tolerant anion exchange chromatography

○中村 孝司、久保 雄二（東ソー株式会社）
○Koji NAKAMURA, Yuji KUBO (Tosoh Corporation)

タンパク質等の生体高分子の分離精製方法として種々の分離モードのクロマトグラフィーが利用されている。その中でもイオン交換クロマトグラフィーは、穏和な条件下で高分離能が得られることより、最も汎用されている技術である。しかしながら、試料中のイオン強度が高いと、タンパク質は充填剤に吸着されず素通り画分に溶出するため、試料中のイオン強度を下げる操作（脱塩または希釈）が必要となる。この欠点を解決すべく、我々は塩濃度耐性を有する新規アニオン交換体を開発した。ここでは本充填剤の基本的性質、溶離条件の検討およびタンパク質精製への応用について発表する。

Ion exchange chromatography, Salt tolerance

講演番号：2A03p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 03 会場

タンパク質蛍光標識技術を用いた S-ニトロシル化タンパク質の網羅的解析

Proteomic Analysis of S-Nitrosylated Proteins using Fluorescent Labeling Technique

○芳村 俊広[1,2]、黒木 勝久[1,2]、水光 正仁[1,2]、榊原 陽一[1,2] ([1]宮崎大学農学部応用生物科学科、[2]宮崎大学大学院農学工学総合研究科)
○ Toshihiro Yoshimura[1,2], Katsuhisa Kurogi[1,2], Masahito Suiko[1,2], Yoichi Sakakibara[1,2] ([1]Department of Biochemistry and Applied Biosciences, University of Miyazaki, Japan, [2]Interdisciplinary Graduate School of Agriculture and Engineering, University of Miyazaki, Japan)

【目的】一酸化窒素 (NO)はフリーラジカルの一種で一酸化窒素合成酵素 (NOS)によって産生される。NO は血圧制御やシナプス伝達、炎症反応など生物学的システムにおいて様々な効果を発現させることが知られる。近年、タンパク質のシステイン (Cys)残基に NO が付加する S-ニトロシル (SNO)化と呼ばれる翻訳後修飾がタンパク質の機能制御やシグナル伝達における新しいパラダイムとして注目されている。SNO 化はほぼ全てのタンパク質をターゲットにし、かつ可逆的な反応であるため多くのタンパク質機能の制御に関与すると考えられている。そのため、SNO 化によって制御されるタンパク質を明らかにすることは細胞プロセスを理解する上で必要不可欠である。SNO 化タンパク質の研究は”Biotin Switch 法”を用いて主に神経細胞や血管内皮細胞で多く報告されている。しかし、従来の研究は特定の SNO 化タンパク質に焦点を当てたものが多く、また膜タンパク質についての SNO 化タンパク質の知見も少ない。そこで、我々はタンパク質蛍光標識技術を用いたプロテオーム解析によって SNO 化タンパク質を網羅的に解析することで膜タンパク質における SNO 化タンパク質の機能や新規 SNO 化タンパク質の探索を行った。

【方法】本研究では蛍光色素として CyDye-Maleimide (Lumiprobe)を使用することから”CyDye Switch 法”を利用した。遊離 SH 基を N-Ethylmaleimide (NEM)で保護し、SNO 化部位を Sodium Ascorbate によって還元、新規に生成した遊離 SH 基を CyDye-Maleimide によって標識することで SNO 化タンパク質を特異的に標識した。細胞質画分と膜画分に分画した HepG2 をそれぞれ UTCD Buffer (7 M Urea, 2 M Thiourea, 2 % CHAPS, 2 % *n*-Dodecyl-*β*-D-Maltoside, 1 mM DTPA)で可溶化した。そのライゼートを NO donor である S-Nitrosoglutathione (GSNO)で 30 min, 暗所でインキュベートすることで HepG2 タンパク質を SNO 化した。その後、CyDye-Switch 法によって SNO 化部位に蛍光色素を標識し、二次元電気泳動によって分離、MALDI-TOF/MS (Bruker)を用いた PMF 法および Q-Exactive (Thermo)を用いた MS/MS 解析によって SNO 化タンパク質の同定とその修飾部位の解析を行った。

【結果・考察】HepG2 細胞の膜画分における SNO 化タンパク質を CyDye-Switch 法と二次元電気泳動を用いることで検出することができた。また、タンパク質の同定の結果、SNO 化が報告されているタンパク質を同定することができた。二次元電気泳動と CyDye-Switch 法を用いた SNO 化タンパク質の網羅的解析は SNO 化タンパク質の機能解析や新規 SNO 化タンパク質の探索に有効な手法であることが示唆された。

S-Nitrosylation, Membrane Proteins, CyDye-Switch Method

講演番号：2A03p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 03 会場

ヘモグロビン A1c と結合するレクチンのスクリーニング

Screening of hemoglobin A1c-binding lectin

○木村 晃太[1]、小林 夕香[2]、上野 泰[2]、吉宗 一晃[1] ([1]日大生産応化、[2]J-オイルミルズ)
○Kouta Kimura[1], Yuka Kobayashi[2], Yasushi Ueno[2], Kazuaki Yoshimune[1] ([1]Nihon Univ., [2]J-Oil Mills, Inc.)

【緒言】糖尿病患者は世界的に増加傾向にあり、国内でも 2025 年度に 1,500 万人に達すると予想されている。糖尿病は血糖値が高い状態になっている病気であるが、血糖値は食事の前後で大きな差がある。一方、ヘモグロビン A1c(HbA1c)濃度は血糖の過去 1 から 2 ヶ月の平均をあらわすとされるためその測定も重要となる。HbA1c はヘモグロビン(Hb)β 鎖の N 末端バリン残基に血中のグルコース 1 分子が非酵素的に結合し、アマドリ転位して生成した糖化ヘモグロビンである。現在 HbA1c を測定するために HPLC 法、ラテックス法、酵素法が知られている。HPLC 法は正確であるが、高価な装置を必要として多検体の処理には適していない。ラテックス法はラテックス上に HbA1c に対する抗体を吸着させその凝集速度を光学的に測定する方法で検査コストが安く広く利用されている。近年開発された酵素法は HbA1c を含む Hb を限定分解し生成する糖化ペプチドをフルクトシルペプチドオキシダーゼにより測定する方法である。レクチンは、動植物をはじめとして微生物など多くの生物中に存在し、糖に親和性を有するタンパク質の総称である。レクチンは単糖が結合したタンパク質とはほとんど結合しないと考えられているが、遊離の単糖存在下では糖タンパク質との結合が阻害される。本研究では、レクチンによる HbA1c の検出を目的として、様々なレクチンの中から HbA1c や Hb と特異的に結合するレクチンのスクリーニングを行った。
【方法】ヒト由来 Hb (SIGMA 社製)もしくは精製したヒト由来 HbA1c (BBI Solutions 社製)とレクチンとの親和性はビオチン標識レクチンを用いて確認した。Hb もしくは HbA1c を pH5.0-酢酸緩衝液中で 37℃、30 分間放置し変性させ、疎水性ウェルに固定化した。ブロッキング剤(1%BSA-PBS)を添加した後、ビオチン化レクチンを添加し、アビジン修飾した HRP の結合量を HRP 発色試薬により測定した。
【結果】ウェルあたり 2.5 μg 以下の Hb や HbA1c を固定した場合、ほとんどのレクチンで結合が確認できなかった。しかし Hb や HbA1c の添加量を増やすことによりレクチンとの反応性が確認された。このことはレクチンの糖鎖への親和性が抗体とタンパク質との親和性と比較して低いという、レクチンの性質と矛盾しない。Hb に結合するレクチンは DBA・LCA・UEA-I・Lotus・ECA・HHA・MPA・CGA であった。HbA1c と結合し、Hb と結合しないレクチンを 30 種のレクチンから選抜することができた。

hemoglobin A1c, lectin, diabetes

講演番号：2A03p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 03 会場

スギタケ由来の新規コアフコース特異的レクチン
A Novel Core Fucose-specific Lectin from the Mushroom *Pholiota squarrosa*
○小林 夕香[1]、道羅 英夫[2]、舘野 浩章[3]、平林 淳[3]、河岸 洋和[4,5] ([1]J-オイルミルズ、[2]静大グリーン研、[3]産総研、[4]静大・農、[5]静大院・創造)
○Yuka Kobayashi[1], Hideo Dohra[2], Hiroaki Tateno[3], Jun Hirabayashi[3], Hirokazu Kawagishi[4,5] ([1]J-oil mills, Inc, [2]Institute for Genetic Research and Biotechnology, Shizuoka Univ., [3]AIST, [4]Faculty of Agriculture, Shizuoka Univ., [5]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ.)

【目的】フコース 1-6 糖鎖は生物学的様々な機能と関わり合いがあり、肝細胞においてはαフェトプロテイン（AFP）のフコシル化の上昇の有無がバイオマーカーとしての役割を果たしている。本研究では、植物や菌類抽出液から新しいタンパク質を発見しその諸性質を明らかにするとともに、バイオマーカー研究に応用する。
【方法及び結果】キノコ（スギタケ）から、イオン交換クロマトグラフィーとアフィニティークロマトグラフィーで、新規フコース 1-6 特異的レクチンを精製し、スギタケレクチン(*Pholiota squarrosa* lectin)、PhoSL と命名した。電気泳動、MALDI-TOF MS 分析、N-末端アミノ酸配列分析の結果から、PhoSL はサブユニット分子量 4.5 kDa、等電点 pI 4.0 であり、N 末端アミノ酸配列は NH2-APVPVTKLVCDGDTYKCTAYLDFGDGRWVAQWDTNVFHTG-OH であった。レクチンの pH 安定性は pH 2.0 ～11.0 の間、温度安定性は 0～100° C の間で安定であった。フロンタルアフィニティークロマトグラフィー（FAC)による 134 種の糖鎖との糖結合性評価では、N 型糖鎖のコア 1-6 フコース糖にのみ結合し、1-2, 1-3, 1-4 のような他のフコース糖鎖には結合しなかった。さらに、PhoSL は腫瘍マーカーであるフコシル化 AFP にのみ結合し、フコシル化されていない AFP には結合しなかった。これらの結果から、PhoSL は、フコース 1-6 糖鎖の機能解明のための有用なツールとなりえ、さらに、腫瘍マーカーの評価にも使用できることから、臨床への応用も期待できる[1,2)]。

1) J. Biol. Chem., 2012 vol. 287, p33973-33982.
2) フコースα1-6 糖鎖特異的レクチン, 特許 第 4514163 号.

lectin, mushroom, fucose

講演番号：2A03p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 03 会場

サナギタケ由来レクチンの精製と諸性質

Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Cordyceps militaris*

○竹島 愛乃[1]、鈴木 智大[2]、崔 宰熏[1]、道羅 英夫[2]、加藤 竜也[1,2]、朴 龍洙[1,2,3]、阿部 伸一[4]、佐伯 潤[4]、小林 夕香[5]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2,3]([1]静大農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造、[4]にちはら総研、[5]J-オイルミルズ)
○ Yoshino TAKESHIMA[1], Tomohiro SUZUKI[2], Jae-Hoon CHOI[1], hideo DOHRA[2], Tatsuya KATO[1,2], EY PARK[1,2,3], Shinichi ABE[4], Jun-David SAEKI[4], Yuka KOBAYASHI[5], hirofumi HIRAI[1,2], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [3]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [4]Nichihara Research & Development Laboratories Inc., [5]J-Oil mills Inc.)

【目的】

冬虫夏草は昆虫などから生じるキノコの総称であり、世界的に約 400 種が確認されている。その 1 種 *Cordyceps militaris* はサナギタケと呼ばれ、栄養補助食品や漢方として広く利用されており、東アジアにおいては、中国医学で癌患者の治療薬として古くから用いられてきた。また、サナギタケが含有する化合物としては cordycepin や多糖類などが報告されている[1, 2]。本研究室でサナギタケの粗抽出液を赤血球凝集試験に供したところ、レクチン活性が確認された。更に粗抽出液を用いて赤血球凝集反応阻害試験に供した結果、asialo-BSM など数種の糖タンパク質に結合特異性が示された。そこで本研究では、サナギタケ由来レクチンを精製し、諸性質を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

サナギタケ子実体を 10 mM リン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)で 4℃、2 時間抽出し粗抽出液を得た。得られた粗抽出液を BSM-アミノトヨパールアフィニティークロマトグラフィーに供し、サナギタケレクチン(*Cordyceps militaris* lectin、CML)を得た。CML の pH 安定性及び温度安定性を試験した結果、CML のレクチン活性は、pH 2.0-10.0、50℃以下で安定であった。また CML の糖認識特異性を赤血球凝集反応阻害試験において調べた結果、単糖・オリゴ糖には結合しなかったが、糖タンパク質では asialo-BSM に最も強い結合特異性を示し、次いで asialo-fetuin に特異性を示した。現在更に詳細な諸性質を解析中である。

1) Cunningham, KG., et al., *Nature*, 166, 949 (1950).
2) Yu, R., et al., *Fitoterapia*, 75, 465 (2004).

lectin, mushroom, *Cordyceps militaris*

講演番号：2A03p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 03 会場

スギヒラタケレクチン（PPL）の糖鎖構造解析
Carbohydrate and oligosaccharides structure analysis of *Pleurocybella porrigens* lectin
○荒井 勇人[1]、鈴木 智大[2]、崔 宰熏[1]、道羅 英夫[2]、平井 浩文[1,2]、舘野 浩章[3]、平林 淳[3]、小林 夕香[4]、河岸 洋和[1,2,5]（[1]静大農・応生化、[2]グリーン研、[3]産総研・糖鎖医工学、[4]J-オイルミルズ、[5]静大院・創造）
○ Yuto ARAI[1], Tomohiro SUZUKI[2], Jae-Hoon CHOI[1], Hideo DOHRA[2], Hirofumi HIRAI[1,2], Hiroaki TATENO[3], Jun HIRABAYASHI[3], Yuka KOBAYASHI[4], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,5] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture, Shizuoka University, [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [3]Research Center for Medical Glycoscience, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, [4]J-Oil Mills, Inc., [5]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】
2004年、東北・北陸地方を中心に原因不明の急性脳症が発生し、患者数は59名に達し、17名の患者が亡くなった。そのうち59例中55名はスギヒラタケ（*Pleurocybella porrigens*）を摂取しており、51名が腎機能障害を持っていた。このことから、スギヒラタケが急性脳症の原因であることが予想されたが、未だその発症機構は不明である。我々は現在までに、スギヒラタケからレクチン(PPL)の単離・精製に成功し、そのアミノ酸配列およびcDNA塩基配列情報の取得に成功しており[1)]、PPLとスギヒラタケ致死性高分子を混合するとプロテアーゼ活性を示し、血液脳関門を破壊することを報告している[2)]。さらに、スギヒラタケエタノール可溶部よりミエリン鞘を構成するオリゴデンドロサイトに毒性を示すpleurocybellaziridineの単離にも成功している[3)]。本研究ではプロテアーゼ活性に糖鎖が関与しているかを明らかにするため、大腸菌、担子菌で発現させたrecombinant PPLとnativeのPPLを用いて詳細な解析を行った。

【方法および結果】
大腸菌で発現させたrPPLはスギヒラタケ致死性高分子と混合してもプロテアーゼ活性を示さなかったのに対し、担子菌で発現させたrPPLはスギヒラタケ致死性高分子を混合するとプロテアーゼ活性を示した。この結果から糖鎖が、プロテアーゼ活性に関与していることが示唆された。現在、MALDI-TOF-MS、LC-MS/MS、レクチンブロットを用いて糖鎖構造の詳細な解析を行っている。

1) Suzuki, T., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 702-709 (2009)
2) 鈴木ら、第 52 回天然有機化合物討論会講演要旨集、p. 655
3) Wakimoto, T., et al., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 50, 1168-1170 (2011)

Pleurocybella porrigens, lectin, oligosaccharides structure

講演番号：2A03p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 03 会場

スギヒラタケ由来毒性物質の異種発現系の構築
Heterologous expression of toxic principle(s) from *Pleurocybella porrigens*
○亀澤 哲弥[1]、竹島 愛乃[1]、鈴木 智大[2]、崔 宰熏[2]、平井 浩文[2,3]、河岸 洋和[2,3,4] ([1]静大農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・農、[4]静大院・創造)
○ Tetsuya KAMEZAWA[1], Yoshino TAKESHIMA[1], Tomohiro SUZUKI[2], Jae-Hoon CHOI[2], Hirofumi HIRAI[2,3], Hirokazu KAWAGISHI[2,3,4] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [3]Graduate School of Agriculture, Shizuoka University, [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】

スギヒラタケ(*Pleurocybella porrigens*)はキシメジ科スギヒラタケ属のキノコで、北陸、中部、東北地方を中心に食用とされてきたが、2004年9月以降、原因不明の急性脳症が相次いだ。この患者の59名中55名がスギヒラタケを摂取していたことから、スギヒラタケが急性脳症原因物質を含有していると推定した。我々はこれまでの研究において、スギヒラタケからレクチン(PPL)の単離・精製に成功し、そのアミノ酸配列およびcDNA塩基配列情報の取得に成功している[1)]。また、PPLとスギヒラタケ致死性高分子(B3)を混合するとプロテアーゼ活性を示し、血液脳関門を破壊することを報告している[2)]。しかしB3は不溶性なため一次構造が未だ不明であり、このB3遺伝子の獲得および一次構造を解明するため、酵母Two-Hybrid法を用いて取得した陽性クローン64株からプロテアーゼ活性を指標に陽性クローン5株を選抜した。そこで本研究では活性型rPPL及びrB3を取得するため、担子菌*P. sordida* YK-624株における異種発現系の構築を目的とした。

【方法】

(1)rPPL の *P. sordida* YK-624 株における異種発現

マンガンペルオキシダーゼ（MnP）遺伝子プロモーターと MnP 遺伝子（*mnp*）及び PPL の cDNA を連結し、融合タンパク質発現プラスミドを構築した。本プラスミドおよびマーカー(URA5)プラスミドを *P. sordida* YK-624 株由来ウラシル要求性変異株 UV-64 株に PEG 法を用いて導入し、複数の形質転換体を得た。現在、形質転換株の rPPL 産生能について検討中である。

(2)rB3 候補遺伝子の *P. sordida* YK-624 株における異種発現

P. sordida YK-624 株由来 GPD プロモーター･ターミネーター間にシグナルペプチドおよび His Tag を付加した B3 候補タンパク質の cDNA を挿入し、発現プラスミドを構築した。本プラスミドおよびマーカー(URA5)プラスミドを UV-64 株に PEG 法を用いて導入し、複数の形質転換体を得た。現在、形質転換株の rB3 産生能について検討中である。

1) Suzuki, T., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 13, 100-709 (2009)
2) 鈴木ら、第 52 回天然有機化合物討論会講演要旨集、p. 655 (2010)

mushroom, Heterologous expression, *Pleurocybella porrigens*

講演番号：2A03p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 03 会場

糸状性硫黄酸化細菌由来のマイクロチューブ形成多糖の構造解析

Structural determination of a microtube-forming polysaccharide secreted by a filamentous sulfur bacterium

○成塚 理絵[1]、近藤 敬子[2]、真嶋 司[2]、片平 正人[2]、武田 穣[1] ([1]横国大院工、[2]京大エネ理工学研)
○ Rie NARIZUKA[1], Keiko KONDO[2], Tsukasa MASHIMA[2], Masato KATAHIRA[2], Minoru TAKEDA[1] ([1]Yokohama Natl. Univ., [2]Kyoto Univ.)

【背景】*Thiothrix* 属は γ-プロテオバクテリア綱に属する糸状性の硫黄酸化細菌で、水圏に広く分布する。同属の基準種である *T. nivea* は細胞列を囲むマイクロチューブ状構造体（鞘）を形成する。鞘は基本となる高分子物質が自発的に会合することにより形成される超分子と捉えられる。したがって、鞘形成高分子の構造と機能が決定できれば、水中で形態形成する機能性高分子の設計が可能になると期待される。鞘形成高分子は β-1,4-グルコサミノグルカン（GG）を基本骨格とし、未同定のデオキシ糖（Sug-*d*）による修飾を受けていることがわかっている。しかし、Sug-*d* の構造および GG との結合様式は未解明である。本研究の目的は、*T. nivea* の鞘形成高分子に関するこれらの未解明の 2 点を明らかにすることである。

【方法・結果】*T. nivea* をリゾチーム・NaOH・SDS で処理し、残渣として鞘を得た。まず、Sug-*d* の GG に対する結合位置を解明するため、鞘を過ヨウ素酸酸化した後に加水分解して糖組成分析を行った。グルコース残基は 2 位ないし 3 位の OH 基が置換されていない限り一連の処理でで分解されるはずであるが、処理後でもグルコースが検出されたことから、Sug-*d*-(1→2 or 3)-Glc の結合が予想された。続いて鞘をギ酸酸性下で溶解させて NMR 測定を行ったところ、Sug-*d*-(1→3)-Glc の配列の存在が確かめられた。ただし、溶液の粘度が高くシグナルの分離が不十分だったため Sug-*d* の同定には至らなかった。そこで、遊離の Sug-*d* ないしその誘導体（Ethyl *p*-aminobenzoate (ABEE)による還元アミノ化）を精製することによって構造決定を試みることとした。鞘の加水分解物を還元アミノ化して RP-HPLC で Sug-*d*-ABEE を回収した。この誘導体の LC/MS 分析で予想された分子量は 313 であり、組成式は $C_{15}H_{23}NO_6$ だった。また NMR 測定では、メチル基（5 位）、メチレン基、4 級炭素の存在が示された。遊離の Sug-*d* は以下の手順で精製した。まず、鞘を緩やかな加水分解物に供して選択的に（GG を温存しながら）Sug-*d* を遊離させた。続いて分解物中から HILIC-HPLC を経て RP-HPLC で Sug-*d* の分取を行った。得られた Sug-*d* の LC/MS スペクトルから分子量 164 および組成式 $C_6H_{12}O_5$ が推定され、これらは ABEE 化物の LC/MS 分析での推定分子量および組成と合致した。^{1}H-NMR 測定も試みたが、重水置換の際に不溶化が起こり明瞭なシグナルは得られなかった。したがって、現時点で Sug-*d* は $C_6H_{12}O_5$ の組成式で表され、5 位にメチル基を持つほかメチレン基と 4 級炭素を有する奇異なデオキシ糖と推察される。そして、GG 骨格中のグルコース残基の 3 位にグリコシド結合することによって *T. nivea* の鞘形成高分子を成し、高分子間に適度な相互作用を与える働きを担っていると予想される。

Thiothrix, sheath, polysaccharide

講演番号：2A03p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ A 校舎 03 会場

Pellicle of thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* strains: Characterization of polysaccharide and induction patterns

○Buddhika Perumpuli, Taisuke Watanabe, Hirohide Toyama (Dept. Biosci. Biotech., Fac. Agr., Univ. the Ryukyus)

In order to keep high aerobic state, almost all *Acetobacter* species have ability to grow floating in static culture by producing a pellicle on the surface of culture medium. This pellicle is an aggregation of cells in the liquid-air interface in which cells are tightly associated with each other by extracellular matrix of polysaccharides on the cell surface. This is an important phenomenon in vinegar fermentation in static culture. In this study, we characterized the pellicle polysaccharides produced by thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* species (SL13E-2, SL13E-3, SL13E-4, and SKU1108), former three were isolated from Sri Lanka in the previous study, and performed their quantitative analyses of pellicle formation at different temperature levels with different ethanol concentrations to understand relationship between pellicle formation and stress tolerance. The monosaccharide composition of pellicle polysaccharides of *Acetobacter pasteurianus* strains found to be varied among strains. The pellicle polysaccharide of SL13E-2 composed of rhamnose and glucose in the ratio of 1:8 and that of SL13E-4 and mesophilic *A. pasteurianus* NBRC3191 consisted of rhamnose, glucose and xylose in the ratio of 1:5:2 and 1:4:2 respectively. On the other hand, the pellicle polysaccharides of SL13E-3 and SKU1108 strains were composed of rhamnose, glucose and galactose in the ratio of 2:2:1 and 1:5:2.5 respectively. The pellicle formation of thermotolerant SL13E-2, SL13E-3 and SL13E-4 were significantly induced by the addition of ethanol, while a poor induction was observed in SKU1108 strain. Induction ratio is not so much changed at the concentration from 1% to 4% ethanol. The size and sugar composition of the polysaccharides obtained from the cells induced by ethanol were unchanged from those of the uninduced cells, indicating that number of molecules of the same pellicle polysaccharides might increased in the presence of ethanol, and neither production of another type of polysaccharides nor elongation of polysaccharides occurred. On the other hand, addition of sugar sources, such as glucose, sucrose and fructose, showed a slight induction of pellicle formation in SKU1108 strain, not so much in other strains; especially at 40°C.

Capsular polysaccharide, Pellicle polysaccharide composition, Pellicle formation

講演番号：2A03p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ A 校舎 03 会場

未利用アナアオサ(*Ulva pertusa*)から分離したウルヴァンの化学構造

Chemical structure of ulvan isolated from unutilized *Ulva pertusa*

○田幸 正邦[1,2]、玉那覇 真紀恵[1]、玉城 善之[1] ([1]琉球大亜熱帯生資科、[2]琉球大産学官機構)
○Masakuni Tako[1,2], Makie Tamanaha[1], Yoshiyuki Tamashiro[1] ([1]Univ. Ryukyu, [2]Integr. Innov. Centr., Univ. Ryukyu)

目的

演者らは先に、沖縄県で養殖により生産されているオキナワモズク（褐藻）から初めてフコイダンを分離してその化学構造および諸機能特性を明らかにした[1-4]。また、物質特許と製法特許を取得した[5]。さらに、養殖ヒトエグサ（緑藻）からラムナン硫酸を分離してその化学構造を明らかにした[6]。ここでは、本県に広く自生し、未利用生物資源であるアナアオサ（*Ulva pertusa*, 緑藻）から分離したウルヴァンの化学構造について報告する。

方法

アナアオサは沖縄県豊見城市で採取（2005 年 4 月）したものを使用した。多糖の調製は常法に従って行った。全糖およびウロン酸含量はフェノール硫酸法およびカルバゾール硫酸法によった。中性糖、D-グルクロン酸および硫酸含量は陰イオン高速液体クロマトグラフ（DX-500、ダイオネックス）で定量した。メチル化は Ciucanu と Kerek の方法で行い、^{1}H-および ^{13}C-NMR スペクトルは JNM-α500（日本電子）を用いて測定した。

結果

精製ウルヴァンの収率は 8.5%（W/W、対乾燥藻体）であった。L-ラムノース、D-キシロース、D-グルコース、D-グルクロン酸および硫酸（量比 4.0:0.2:0.1:1.0:2.0）を同定した。また、^{1}H-および ^{13}C-NMR スペクトルの結果からα-L-イズロン酸を同定した。メチル化分析の結果（native および脱硫酸化物）から、ウルヴァンは主鎖がα-1,4-およびα-1,3-結合で、側鎖も存在した。メチル化および NMR(^{1}H および ^{13}C)分析の結果から、アナアオサから分離したウルヴァンは新規の化学構造を有するものであった。

文献

1）田幸、上原、川島、本郷：応用糖質科学、**43**, 143-148(1996).
2）Tako: *Botanica Marina*. 46, 461-465(2003).
3）Teruya, Konishi, Uechi, Tamaki and Tako: *Int. J. Biol. Macromol.*, **41**, 221-225(2007).
4）Teruya, Tatemoto、Konishi and Tako: *Glycoconjugate J.*, **38**, 1019-1026 (2009).
5）田幸：特許 3371124, 11 月 22 日(2002).
6）中村、山城、小西、花城、田幸：日食科工誌, **58**, 245-251(2011).

Ulva pertusa, Ulvan, Chemical structure

講演番号：2A03p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ A 校舎 03 会場

海藻類の非セルロース性中性多糖

Non-cellulosic neutral polysaccharides from seaweeds

○PHAN VU THUY NHUNG、柴田 千佳子、笠原 紳（宮城大学）
○VU THUY NHUNG PHAN, CHIKAKO SHIBATA, SHIN KASAHARA (Miyagi Univ.)

海藻類に含まれる多糖としては，アルギン酸やフコイダンをはじめとする酸性多糖と，セルロースやβ-1,3-グルカン等の中性多糖がよく知られている。特に非セルロース性の中性多糖であるβ-1,3-グルカンやβ-1,6-グルカンには，コンブの貯蔵多糖として有名なラミナリン（ラミナラン）のように古くから知られているものもある。本報告では，わが国で水産上特に重要な褐藻であるワカメ（*Undaria pinnatifida*）および東北地方三陸沿岸で珍重されている食用褐藻のマツモ（*Analipus japonicus*），紅藻のタオヤギソウ（*Chrysymenia wrightii*）を材料に，報告例の少ない非セルロース性中性多糖を主対象として分析を行った。β-1,3-グルカンやβ-1,6-グルカンについては，食品への添加や医薬品・医療用品の原料，加工素材としての需要が見込まれ，非食用部にも多く含まれるため，加工残渣の有効利用等の生物資源の高度利用・循環利用分野においても重要な対象であるといえる。

（方法）ワカメ，マツモ，タオヤギソウの乾燥品を粉砕した後，オートクレーブ処理により熱水可溶性成分を抽出し，次いで水酸化ナトリウム水溶液への可溶性成分（アルカリ可溶画分）と沈渣（アルカリ不溶画分）とに分画した。続いて塩化カルシウム添加による沈殿，エタノールによる沈殿操作を繰り返して分画を行い，各画分に含まれる糖を酸性糖，中性糖ごとに定量した。さらに各画分について構成糖分析を行い，構造的に純度が高いアルカリ可溶画分に関しては，箱守法を基本とするメチル化分析を行って結合様式を決定した。アノマー解析は，酵素分解と NMR 解析を併用して行った。

（結果）ワカメ，マツモ，タオヤギソウとも，アルカリ不溶性画分にはセルロースを中心とする結晶性高分子の多糖が含まれており，成分的には雑多で不均一な状態であると考えられた。一方，ワカメやマツモのアルカリ可溶性画分中にはβ-1,3-グルカンやβ-1,6-グルカンが比較的多く検出され，タオヤギソウの同画分中にはα-1,4-グルカンが認められ，紅藻類に広く含まれるとされる紅藻デンプンに相当する成分であると考えられた。また，陸上植物には見られない希少な糖も構成糖の一部として認められ，海藻類が重要な糖質資源であることが示された。

（参考） 1）持塚ら，日本農芸化学会 2009 年度大会（福岡）
2）中山ら，日本農芸化学会 2010 年度大会（東京）

seaweed, neutral polysaccharide, sugar composition

講演番号：2A03p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ A 校舎 03 会場

アルギン酸の酵素分解によるホモウロン酸ポリマーの調製

Preparation of homo-uronic acid polymer by using enzymatic digestion of alginic acid

○岡安 祐佳[1]、下川 知子[2]、吉田 滋樹[1] ([1]筑波大学、[2]森林総合研究所)
○ Yuka OKAYASU[1], Tomoko SHIMOKAWA[2], Shigeki YOSHIDA[1] ([1]University of Tsukuba, [2]FFPRI)

【目的】アルギン酸は食品や製紙、医薬などの様々な分野で工業的に利用されており、ゲルの形成は,アルギン酸分子内のホモウロン酸ポリマー部分、特にポリグロン酸[poly(GulA)]とカルシウムなどの二価イオンが架橋構造を形成することによることが知られている。しかし、アルギン酸の化学的分解によるホモウロン酸ポリマーの調製法はスケールアップが困難であるため、ホモウロン酸ポリマーの用途開発の支障となっている。そこで本研究では、*Streptomyces .violaceoruber* IFO 15732 から得られる菌外アルギン酸リアーゼのうち、ヘテロポリマー部分に特異的に作用する poly(ManA)/(GulA) specific lyase を精製し、同酵素を用いて酵素的分解によるアルギン酸からのホモウロン酸ポリマー調製法の確立を目的とした。
【方法及び結果】*S. violaceoruber* IFO 15732 をアルギン酸を炭素源として含む液体培地で 4 日間培養後、遠心分離により得られた上清を粗酵素液として使用した。この粗酵素液を DEAE-celluose、SP Sepharose FF カラムに供することでヘテロポリマー部分に特異的に作用する poly(ManA)/(GulA) specific lyase を精製した。酸分解法によって調製した poly(ManA)、poly(GulA)、poly(ManA)/(GulA)を基質として精製酵素の特異性を検討した結果、[poly(ManA)/(GulA)]を特異的に分解し、ホモポリマーpoly(ManA)、poly(GulA)に対してほとんど作用しなかった。次にこの poly(ManA)/(GulA) specific lyase を用いてアルギン酸からホモポリマーを調製するために、酵素分解条件の検討を行った。また、調製したポリマーの純度は NMR により分析した。その結果、終濃度として 1%アルギン酸、poly(ManA)/(GulA) specific lyase　0.155 units/ml の条件下で 8 時間分解した後、pH 処理により沈殿として得られた poly(GulA)の純度は 85%であり、酸分解法で調製した poly(GulA)とほぼ同じ純度であった。さらに、ゲル濾過による分子量分布の比較や同等の純度のポリマーが得られる最少酵素量などについて現在研究中である。

alginate lyase, Streptomyces .violaceoruber, alginic acid

講演番号：2A03p22
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ A 校舎 03 会場

三陸のイカ中骨を活用した機能性素材の開発

Development of functional materials utilizing squid pens in Sanriku.

○戸谷 一英[1]、片ヶ瀬 峻哉[1]、古関 健一[1]、中川 裕子[1]、長田 光正[1]、渡邊 崇[1]、二階堂 満[1]、甲野 裕之[2]、伊藤 良仁[3]、高橋 亨[3]、小浜 恵子[3]、谷口 隆雄[4]、成廣 和枝[4]、山下 和彦[4]、石村 惣一[5]、伊藤 典久[5]、田代 勝男[5]（[1]一関高専・物化工、[2]苫小牧高専・物工、[3]岩手県工技センター・食品醸造、[4]ヤエガキ醗酵技研、[5]丸辰カマスイ）

○Kazuhide TOTANI[1], Takaya KATAGASE[1], Kenichi KOSEKI[1], Yuko NAKAGAWA[1], Mitsumasa OSADA[1], Takashi WATANABE[1], Mitsuru NIKAIDO[1], Hiroyuki KONO[2], Yoshihito ITO[3], Toru TAKAHASHI[3], Keiko KOHAMA[3], Takao TANIGUCHI[4], Kazue NARIHIRO[4], Kazuhiko YAMASHITA[4], Soichi ISHIMURA[5], Norihisa ITO[5], Masao TASHIRO[5] ([1]Chem. Eng., Ichinoseki Natl. Coll. Tech., [2]Sci. Eng. Materi., Tomakomai Natl. Coll. Tech., [3]Iwate Industri. Res. Inst., [4]YAEGAKI Bio-industry, Inc., [5]Marutatsu Kamasui Co.,Ltd.)

【背景および目的】　イカは三陸の地域水産資源である。我々は震災復興の一環として廃棄物であるイカ中骨を高付加価値な機能性素材とするための取り組みを行っている。機能性素材として β-キチンナノファイバー（β-CNF）、*N*-アセチルグルコサミン（NAG）、キチン 2 糖（NAG2）、キチンオリゴ糖（NA-COS）を検討している。β-CNF は機能性食品、化粧品、再生医療などに利用が期待される。キチン 2 糖は NAG と同様の関節痛軽減と美肌効果が見込まれる。高重合度の NA-COS は免疫賦活や抗癌活性を有しており、研究用試薬にとどまらず新たな機能性市場の形成が期待される。本研究ではイカ中骨を β-CNF などの機能性素材に変換するための方法を検討した。

【材料および方法】　三陸や東南アジア産のイカ中骨から β-キチンや β-CNF を調製し物性を評価した。β-キチンはイカ中骨から脱灰と除タンパク質処理を経て精製した。精製 β-キチンに対し数種類の乾式粉砕を行った。粉砕物はウォータージェットによる湿式解繊処理（スギノマシン Star Burst）で 2～8w/v%濃度のナノファイバー（NF）に変換された。精製 β-キチン、β-キチン乾式粉砕物、および β-CNF は、タンパク質量、灰分量、粒度分布、結晶化度（XRD）、結晶子径、アセチル化度（元素分析、固体 NMR）、分子量、SEM、TEM、粘度、酵素分解性などを評価した。

【結果】　β-キチンはカッターミルや気流ミル単独では乾式粉砕が困難であり、媒体ボールミルが必要であった。転動ミルや NF 化により結晶性の低下が認められた。β-キチンはウォータージェットで低分子化の傾向が認められた。アセチル化度には大きな違いはなかった。三陸産 β-CNF の TEM および SEM 測定ではファイバー径は約 5 nm、長さは数 μm、結晶子径は約 5 nm であり、透明度も高く、ほぼ完全ナノ分散に近い状態であった。これに対し東南アジア産 β-CNF は十分に解繊されず、透明度も低かった。β-CNF の濃度が上昇すると粘度も上昇したが、三陸産は東南アジア産に比べ著しく粘度が高かった。β-キチンは未粉砕でもキチナーゼ（*Streptomyces* 属）およびキトビアーゼにより容易に酵素分解された。これに対し α-キチンは酵素分解のためにメカノケミカル粉砕が必須であり、この点は大きく異なっていた。β-キチンから前処理と酵素分解反応により NAG やキチン 2 糖を 100 g スケールで調製した。生成物はイオン交換樹脂と活性炭により不純物を除去し結晶化により精製した。β-キチンの塩酸分解等により重合度 3～6 の NA-COS の調製が可能であった。

本研究は JST 復興促進プログラム（マッチング促進タイプ 2 および復興 A-STEP 探索タイプ）で行われた。

squid pen, β-chitin, nanofiber

講演番号：2A04a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ A 校舎 04 会場

アロサミジン生合成遺伝子に関する研究
Studies on allosamidin biosynthetic genes
○和田 響[1]、岡本 晋[2]、村岡 聖子[1]、遠藤 博寿[1]、長澤 寛道[1]、作田 庄平[1] ([1]東大院農、[2]食総研)
○ Hibiki WADA[1], Susumu OKAMOTO[2], Seiko MURAOKA[1], Hirotoshi ENDO[1], Hiromichi NAGASAWA[1], Shohei SAKUDA[1] ([1]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, Univ. Tokyo, [2]NFRI)

【目的】
Streptomyces 属放線菌の二次代謝産物であるアロサミジンはキチナーゼの阻害物質として初めて見出された化合物である。アロサミジンはこれまで種々の生物におけるキチナーゼの生理的役割の解明に利用されてきており、近年では放線菌のキチナーゼ生産を促進する作用があることが明らかにされている。さらには、アロサミジンがマウスにおいて抗喘息作用を示すことが報告されるなど、その生理活性が注目されている。アロサミジンはユニークな擬似三糖構造を有していることからその生合成には多くの新規反応が含まれることが予想され、生合成研究が進められてきた。本研究では、アロサミジン生合成遺伝子クラスターをクローン化し、遺伝子破壊等を行い生合成遺伝子であることを確認することを目的として行った。
【方法】
アロサミジン生産菌 *Streptomyces* sp. AJ9463 株のゲノム配列を次世代シーケンサーで解析し、アロサミジン生合成遺伝子クラスターの一部と考えられる 25 kbp のゲノム領域を同定した。AJ9463 株から調製したゲノム DNA を用いてコスミドライブラリーを作製し、PCR スクリーニングにより陽性クローンを得た。遺伝子破壊株の作製は、コスミド上の目的遺伝子を PCR-targeting により破壊、それを放線菌に導入することにより行った。また、アロサミジン生産性の確認は、菌体メタノール抽出物を活性炭カラムで精製し、HPLC でのピークの確認と MS による検出を行った。
【結果および考察】
推定生合成遺伝子クラスターに含まれる異性化酵素をコードすると推定される遺伝子の破壊によりアロサミジン生産能が消失した。また、クラスター内に一遺伝子存在するメチル基転移酵素をコードすると推定される遺伝子の破壊により、ジメチル体であるアロサミジンおよびモノメチル体であるデメチルアロサミジンの生産能が消失し、メチル基を有さないジデメチルアロサミジンの生産が認められた。さらには、*Streptomyces lividans* を宿主とした異種発現において、アロサミジンの生産が確認された。これらの結果より、本遺伝子クラスターがアロサミジンの生合成に関与していることが証明された。現在、クラスター内に存在する他の生合成遺伝子の機能解析、および生合成中間体の同定を行っている。

allosamidin, biosynthesis, *Streptomyces*

講演番号：2A04a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ A 校舎 04 会場

マクロラクタム抗生物質ヒタチマイシンのスターター部位構築に関わる酵素の機能解析

Functional analysis of enzymes involved in the starter unit formation of macrolactam antibiotic hitachimycin

○内野 飛翔、沼倉 真理緒、宮永 顕正、江口 正、工藤 史貴（東工大院理工）
○Asuka Uchino, Mario Numakura, Akimasa Miyanaga, Tadashi Eguchi, Fumitaka Kudo (Tokyo Institute of Technology)

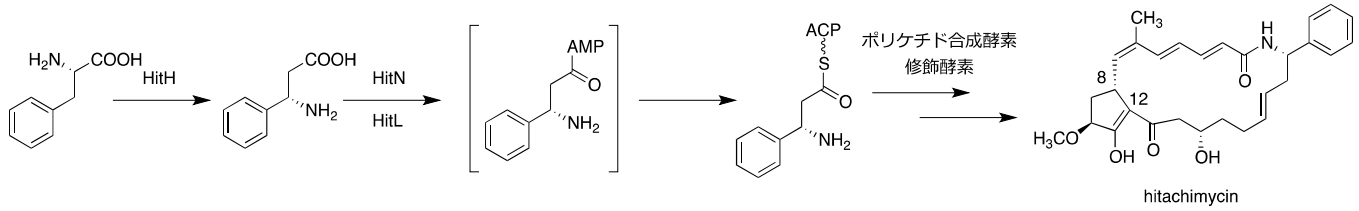
【目的】

ヒタチマイシンは、放線菌 *Streptomyces scabrisporus* が生産する抗腫瘍マクロラクタム抗生物質であり、β-フェニルアラニンをスターターとするポリケチド合成酵素（PKS）により基本骨格が生合成されると考えられており、その取り込み機構に興味が持たれた。また、大環状骨格炭素の C8 と C12 が縮環化した特徴的な化学構造の構築機構にも興味が持たれる。そこで本研究では、ヒタチマイシン生合成に関与すると考えられる遺伝子クラスターを特定し、その生合成機構の解明を目指した。

【方法・結果】

まず、ヒタチマイシン生産菌のドラフトゲノム解析を行い、約 11.4 Mb からなるゲノム DNA 配列情報を得た。次に、ヒタチマイシン生合成に関わると予想されるフェニルアラニンアミノムターゼ（PAM）遺伝子をプローブとして *in silico* にてスクリーニングした。その結果、PAM 遺伝子 *hitH*、二つのアデニル化酵素遺伝子 *hitN* と *hitM*、5 つの PKS 遺伝子等からなる 72 kb に渡る遺伝子クラスターを見出すことができた。この遺伝子クラスターには、類似のマクロラクタム骨格を有するクレミマイシン生合成遺伝子と相同性を有する遺伝子も存在することから、目的としているヒタチマイシン生合成遺伝子クラスターと予想された。

次に、この遺伝子クラスター中にコードされる *hitH* 遺伝子を大腸菌で発現させて *in vitro* にて酵素反応解析を行った。その結果、HitH は L-フェニルアラニンを選択的に認識し、(*S*)-β-フェニルアラニンを特異的に生成する酵素活性を有することが分かった。この立体化学はヒタチマイシンのものと一致している。また、アデニル化酵素 HitN がβ-フェニルアラニンを最もよく認識することも分かった。このことから、本研究で見いだした遺伝子クラスターがヒタチマイシン生合成に関与することが強く示唆された。



polyketide, biosynthesis, macrolactam

講演番号：2A04a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ A 校舎 04 会場

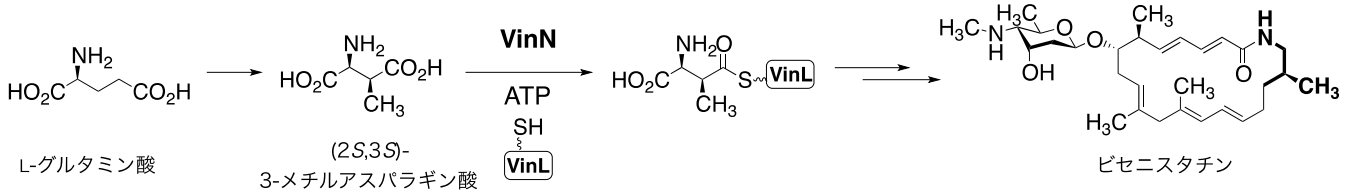
ビセニスタチン生合成における ATP 依存性リガーゼ VinN の結晶構造解析

Crystal structure of ATP-dependent ligase VinN involved in the biosynthesis of vicenistatin

○宮永 顕正、篠原 雄治、工藤 史貴、江口 正（東工大院理工）
○Akimasa MIYANAGA, Yuji SHINOHARA, Fumitaka KUDO, Tadashi EGUCHI (Tokyo Tech.)

[目的]　放線菌*Streptomyces halstedii* HC34が生産するビセニスタチンは、アミノ糖が20員環マクロラクタムに結合した特異な構造を有した化合物である。当研究グループでは、ビセニスタチン生合成における特異アミノ酸スターターユニットの構築機構に注目し、研究を進めてきた。その結果、そのスターターユニットの生合成において、ATP依存性リガーゼVinN が β-アミノ酸である3-メチルアスパラギン酸を選択的にアシルキャリアータンパク質であるVinL上にロードする反応を行うことが明らかになった。本研究では、VinNの特異な基質特異性に関与するアミノ酸残基の解明を行うことを目的とし、VinNのX線結晶構造解析と部位特異的変異導入による解析を行った。

[方法と結果]　まず、VinN全体 (Met1-Lys526) の結晶化を試みたが、結晶を得ることができなかった。そこで、基質結合に関係すると考えられるN末ドメイン (Met1-Arg426) のみの結晶化を行ったところ、結晶が得られたので、X線回折データを収集した。分子置換法にて位相決定を行い、分解能2.15 □にて構造決定した。その結果、VinNは他のATP依存性リガーゼと同様に、基質ポケットにはAsp230を有しており、3-メチルアスパラギン酸の2位アミノ基の認識に関わると考えられた。しかし、他のATP依存性リガーゼとは異なり、基質ポケットは比較的浅い構造をしていた。その底面にはLys330とArg331の側鎖により形成される正に荷電した領域を有していたことから、基質である3-メチルアスパラギン酸の1位カルボキシ基の認識に関係すると考えられた。そこで、R331A変異体を作製したところ、活性を失ったことから、この残基が基質の認識に重要な働きをしていることが示唆された。また、本研究では、VinNの基質特異性の改変を目指し、いくつかの変異体の解析も進めており、その結果も併せて報告する予定である。



polyketide, biosynthesis, crystal structure

講演番号：2A04a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ A 校舎 04 会場

放線菌由来新規 Pictet-Spengler 反応触媒酵素 McbB の構造機能解析

Structure-function analysis of novel Pictet-Spenglerase McbB

○佐橋 周作[1]、森 貴裕[1]、森田 洋行[2]、阿部 郁朗[1] ([1]東大院薬、[2]富山大和漢薬研)
○shusaku sahashi[1], takahiro mori[1], hiroyuki morita[2], ikuro abe[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Toyama Univ.)

【背景】

β-carboline alkaloid は、天然に広く存在する tricyclic pyrido[3,4-*b*]indole 環を有する化合物である。この化合物の多くは ”テトラヒドロ”β-carboline 骨格を有しており、この骨格は strictosidine 合成酵素が触媒する Pictet-Spengler 反応によって生合成されることが明らかになっている [1)]。また、β-carboline alkaloid には稀に薬用植物、海洋微生物、放線菌にて生産される、”不飽和”β-carboline 骨格を有する化合物が存在するが、本骨格の生合成に関連する酵素は未だ明らかにされていなかった。ところが最近、中国南海の深海層より発見された海洋放線菌 *Marinactinospora thermotolerans* から単離された”不飽和”β-carboline 骨格を有する化合物、marinacarboline A-D の生合成クラスターが同定され、大腸菌を用いた *in vivo* の実験から、marinacarboline の生合成クラスター中の酵素 McbB によって”不飽和”β-carboline 骨格(1-acetyl-3-carboxy-β-carboline) が合成されることが明らかになった [2)]。この McbB は strictosidine 合成酵素と同様に活性中心としてグルタミン酸残基を有しており、Pictet-Spengler 反応によりβ-carboline 骨格を形成していると予想されている。しかしながら、McbB を Blast search を用いてアミノ酸配列の相同性検索をした所、既に構造や機能が明らかになっているタンパク質との相同性が全く見られず、McbB は機能的、構造的に全く新しいタンパク質であることが予想される。そこで、本研究ではこの McbB の機能解析目的として、McbB の *in vitro* による活性評価とタンパク質の X 線構造解析を試みた。

【方法・結果】

大腸菌を用いて McbB を異種発現させ、原理の異なる複数のカラムを用いて高度精製を行った。精製したタンパク質を methylglyoxal と L-tryptophan を基質に酵素反応を行った結果、酵素反応特異的に 1-acetyl-3-carboxy-β-carboline の生産を確認することに成功した。また、McbB の結晶化についても着手したところ、PEG8000 を沈殿剤として用いた条件において良好な結晶を得た。この結晶について Photon Factory NW12A にて X 線回折強度の測定を行った結果、2.6 Å の分解能で反射を得ることに成功した。現在位相決定のため、selenomethionine 標識した McbB の作製と結晶化条件の最適化に取り組んでおり、結晶構造も合わせて報告する。

1) O’Connor, S. E. *et al.*. *Nat. Prod. Rep.,* **23**, 532 (2006).
2) Chen, Q. *et al.*. *Anqew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **38**, 10164 (2013).

β-carboline, Pictet-Spengler reaction

講演番号：2A04a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ A 校舎 04 会場

Reveromycin A 生合成におけるサクシニル化酵素の機能解析

Functional analysis of enzymes involved in succinylation for reveromycin A biosynthesis

○前島 希[1,2]、高橋 俊二[1,3]、宮澤 岳[1,2]、野川 俊彦[3]、清水 猛[1]、円谷 陽一[2]、長田 裕之[1,2,3] ([1]理研・抗生物質、[2]埼玉大院・理工学、[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)
○Nozomi MAESHIMA[1,2], Shunji TAKAHASHI[1,3], Takeshi MIYAZAWA[1,2], Toshihiko NOGAWA[3], Takeshi SHIMIZU[1], Yoichi TSUMURAYA[2], Hiroyuki OSADA[1,2,3] ([1]RIKEN, Antibiotics Lab., [2]Saitama Univ., [3]RIKEN CSRS, Chemical Biology)

【目的】Reveromycin A (RM-A) は放線菌 *Streptomyces reveromyceticus* が生産するポリケチド化合物である。これまでに、遺伝子破壊・相補解析に加えて、生化学解析を行うことにより post-PKS 代謝産物 (RM-A1a) は、ポリケチド鎖切断、スピロアセタール立体特異的環化 (RevG, RevJ) を経て RM-T を生成し、水酸化酵素 (RevI) により RM-T の C18 位が水酸化された RM-T1 を生成することを明らかにしている。RM-T1 からの RM-A の生成は、3 級水酸基のエステル化であり、合成化学的アプローチでは 1.5 GPa (15,000 気圧) という超高圧条件が必要な反応である。これまでに、遺伝子破壊株に蓄積する中間代謝産物の解析を進めた結果、最終生合成段階のサクシニル化には、*revK*, *revL* 及び *revM* 遺伝子が必要である事が判明している。*revK, revL* 遺伝子破壊株はともに RM-T の C18 位が水酸化された RM-T1 を蓄積し、*revM* 遺伝子破壊株では、RM-T1 に加えてヘミフマル化された RM-H を蓄積する。また、精製酵素 (RevK, RevL) を用いて反応を解析した結果、RM-T1 から RM-H への変換を確認している。以上の知見から、RM-H から RM-A への変換反応は Quinone oxidoreductase と機能アノテーションされる RevM が担うと考え、大腸菌を用いて異種発現・精製した RevM を用いて、NAD(P)H および RM-H 存在下、反応を検討したが RM-A への変換は検出出来なかった。そこで、本研究では、RevM 調製法及び RevK, RevL の反応条件を最適化することにより、サクシニル化反応の全貌を解析することを目的とした。
【方法および結果】大腸菌を用いた異種発現では、RevMの収率が低いため、pWHM3-P$_{TipA}$-*revM*を構築し*S. lividans* TK23を用いて異種発現を行った。菌体を培養後、超音波破砕、遠心分離を行い、上清をNi-NTAカラムを用いて精製したところ高収率で精製酵素を得た。精製したRevMを用いてRM-Hを基質として反応を検討したところ、大腸菌を用いて調製した酵素と同様にRM-Aまでの変換は検出できなかった。RM-A生合成において、RM-Hがシャント化合物である可能性を考慮し、RM-Aを生産できないPKS遺伝子破壊株にRM-Hを添加・培養後に酢酸エチル抽出を行い、変換産物をLC-MSで解析したところ、RM-A生産を確認できなかった。そこで、大腸菌 BL21(DE3)starを用いてRevK, RevL及び*S. lividans* TK23 を用いてRevMをそれぞれ異種発現し、Ni-NTAカラムを用いて精製した後に、フマル酸、ATP、Mg^{2+}、RM-T1、NAD(P)Hの存在下で酵素反応を検討した結果、RM-T1からRM-Aまで完全に変換できることが確認できた。RM-T1からのRM-Aの*in vitro*サクシニル化反応にはRevK, RevL, RevMのすべてが必要であることが判明した。

reveromycin A, succinylation, biosynthesis

講演番号：2A04a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ A 校舎 04 会場

butylmalonyl-CoA 生合成に関与する RevR の機能解析

Analysis of RevR involved in butylmalonyl-CoA biosynthesis

○宮澤 岳[1,2]、高橋 俊二[1,3]、鈴木 健裕[4]、堂前 直[2,4]、長田 裕之[1,2,3]（[1]理研・抗生物質、[2]埼玉大・理工学、[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[4]理研 GRC）
○Takeshi Miyazawa[1,2], Shunji Takahashi[1,3], Takehiro Suzuki[4], Naoshi Dohmae[2,4], Hiroyuki Osada[1,2,3] ([1]RIKEN, Antibiotics Lab., [2]Saitama Univ. Dep. Sci. and Eng., [3]RIKEN CSRS, Chemical Biology, [4]RIKEN GRC)

【目的】*Streptomyces reveromyceticus* は、アルキル側鎖長の異なる Reveromycin 類縁体(RM-A、RM-C、RM-D、RM-E) を生産する。これらの構造多様性は、ポリケチド合成酵素の acyltransferase4 ドメインが butylmalonyl-CoA、pentylmalonyl-CoA、isobutylmalonyl-CoA、hexylmalonyl-CoA のいずれかをポリケチド鎖へ選択的に取り込むことが一因と考えられる。これまでの研究で、2-アルキルマロニル CoA 生合成に関与すると考えられる遺伝子 *revR*、*revS*、*revT* を見出した。*revT* 遺伝子は carboxylase/reductase をコードし、RM 生合成に必須であり、*revS* 遺伝子は中鎖脂肪酸特異的 CoA ligase をコードし、遊離脂肪酸を活性化してアルキル側鎖形成に関与することを明らかにした。RevR は *S. coelicolor* A3(2) の FabH と低い相同性 (31%amino acid identity) を有し、脂肪酸生合成の初期段階に関与することが示唆されるが、その詳細な機能は不明である。そこで本研究では RevR 反応を生化学的に解析することによって、RM 類の多様化に関わる機構を考察することを目的とした。

【方法及び結果】*revR* 遺伝子破壊実験の結果、RM-A 生産量が選択的に減少するが、RM-C、D、E 生産には影響しないことが判明した。このことから、RevR が脂肪酸生合成系に RM-A のアルキル側鎖前駆体を積極的に供給することによって RM-A の生産を促進するシステムが存在すると考えた。そこで、pET28b-His8-*revR* を構築し、大腸菌 BL21(DE3)star を形質転換して組み換え酵素 RevR を精製した。次に RM 生産菌より脂肪酸生合成に関与する acyl carrier protein (ACP)、および *Bacillus subtilis* 168 由来の phosphopantetheinyl transferase を用いて holo-ACP の調製をおこなった。炭素鎖長 2-8 の acyl-CoA、holo-ACP、RevR を用いて酵素反応をおこない、MALDI-TOF/MS により反応産物を解析することにより反応効率を検証した。

butylmalonyl-CoA, fatty acid biosynthesis, claisen condensation

講演番号：2A04a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ A 校舎 04 会場

Calyculin A 修飾酵素の機能解析
Mechanistic Studies on Calyculin A Post PKS Modification

○脇本 行彦、江上 蓉子、脇本 敏幸、阿部 郁朗（東大院薬）
○Yukihiko WAKIMOTO, Yoko EGAMI, Toshiyuki WAKIMOTO, Ikuro ABE (The University of Tokyo)

海綿動物には強力な生物活性を示す二次代謝産物が数多く見出されている。それらは固着性動物である海綿類の化学防御物質として考えられている。一方で、二次代謝産物が有する細胞毒性や抗菌活性は海綿動物自身においても有害な可能性がある。そのような場合、化学防御には自己に対する毒性を回避する機構が必要となる。その機構の 1 つとして「Activated Chemical Defense」が挙げられる。ある種の高等植物、海藻類、海綿動物において見出されている機構であり、化学防御物質を低毒性な前駆体として貯蔵し、活性化酵素を別組織に局在させることで、外敵からの組織の浸食、破壊によって活性化酵素が前駆体に作用し、瞬時に毒性物質を産生することができる。我々は伊豆半島沿岸に生息する海綿 *Discodermia calyx* 由来の細胞毒性物質である calyculin A (**1**) においても同様の機構を見出した。本発表では前駆体の生合成に関わる修飾酵素について報告する。

我々は海綿メタゲノムライブラリーより calyculin A 推定生合成遺伝子クラスターを単離し、その上流に存在するリン酸基転移酵素 CalQ が calyculin A を二リン酸化体 phosphocalyculin A (**2**) へと変換することを明らかにした。同時に、液体窒素によって急速冷凍し、凍結乾燥した *D. calyx* 試料において二リン酸化体 **2** を主要代謝物として検出した。したがって calyculin 生合成の最終産物は二リン酸化体 **2** であることが示唆された。CalQ は抗生物質アミノグリコシドの水酸基をリン酸化し、不活性化体とするアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ(APHs)に配列相同性を示す。しかし APHs のいずれのファミリーにも属しておらずリン酸基の付加位置やその基質も異なることから、CalQ の詳細な機能解析は calyculin A 生合成経路の解明のみならず特異的リン酸基転移反応機構を解明する上で重要な知見となる。天然由来および半合成によって調整した種々の calyculin A 誘導体を基質に用いた酵素反応によって CalQ の基質特異性について検討したところ、CalQ は calyculin A の骨格を極めて厳密に認識することが明らかになった。この結果は、我々が単離した生合成遺伝子クラスターが calyculin A 生合成遺伝子であることを支持している。酵素反応の速度論解析についても併せて報告する。

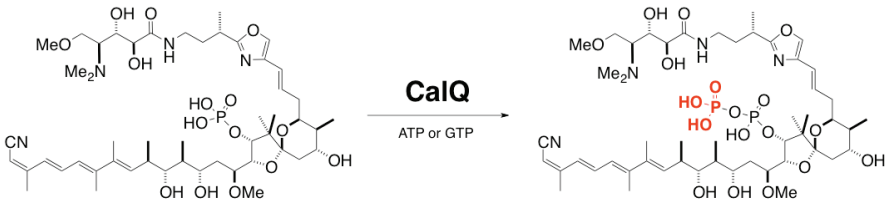


Figure. CalQ-catalyzed phosphorylation of calyculin A (**1**)

marine natural product, phosphotransferase, activated chemical defence

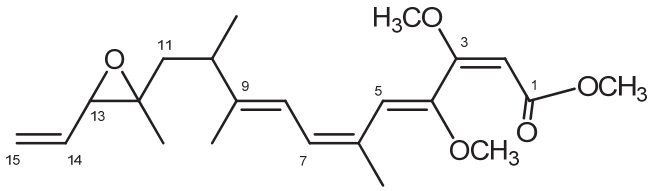
講演番号：2A04a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ A 校舎 04 会場

海洋性粘液細菌のポリケチド抗生物質 haliangicin の生合成研究

Biosynthetic study on a marine myxobacterial polyketide antibiotic haliangicin

○孫 雨偉、宮野 聖史、鈴木 彰、柘植 尚志、小鹿 一（名大院・生命農）
○Yuwei SUN, Seishi MIYANO, Akira SUZUKI, Takashi TSUGE, Makoto OJIKA (Nagoya Univ., Grad. Sch. Bioagric. Sci.)

【目的】粘液細菌は希少な難培養性微生物であり従来、注目されていなかったが、近年、培養条件が徐々に確立されるに伴って、数多くの新規性の高い抗生物質を生産できることが分かり、注目を集めつつある。Haliangicin は、最初の海洋性粘液細菌株 *Haliangium ochraceum* から発見された抗真菌性物質である。生産菌である粘液細菌はより希少で難培養性のため、我々は haliangicin の生合成遺伝子の異種発現による効率的な生産を目的として研究を行い、培養が比較的容易な粘液細菌 *Myxococcus xanthus* での異種発現に成功し（宮野ら、2009 年度大会）、得られた異種発現株を用いて安定同位体取り込み実験を行うことで haliangicin の生合成単位を明らかにしている（孫ら、2013 年度大会）。今回の研究では、haliangicin の生合成遺伝子クラスターがコードする幾つかの修飾酵素に着目し、その機能解析を試みた。



haliangicin

【方法・結果】Haliangicin の生合成遺伝子クラスター（Hli）を特定するため、我々は、ショットガンシーケンス及びゲノムウォーキングを用いて、Hli 全域をカバーできる二つのコスミドを解読した。遺伝子配列を解析した結果、全長約 63 kbp に及ぶ PKS 生合成遺伝子クラスターが見出され、この領域に 25 の ORF が存在することが分かった。塩基配列の相同性検索により、これらの ORF の中に、ポリケチド鎖伸長反応に直接関わる 5 つの PKS 遺伝子や数々の修飾酵素をコードする遺伝子（*HliD*、*HliE*、*HliR*、*HliU*）が見られた。

HliD はメチル転移酵素、HliU はエポキシダーゼであり、PKS より放出された haliangicin の前駆体を修飾する役割を担うと予測した。一方で、*HliR* は脱水素酵素をコードし、haliangicin の 14,15 位のオレフィンの形成に関与すると考えている。これらの遺伝子の機能を解明するため、haliangicin の生産能を有する異種発現株 *M. xanthus* c10-11C-c7-6E 株を用いて、遺伝子破壊実験を試みた。さらに酵素機能を証明するため、組み換え酵素を用いて、in vitro での解析を現在進めている。

haliangicin, myxobacteria, polyketide

講演番号：2A04a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ A 校舎 04 会場

植物病原菌 *Bipolaris coicis* の生産する植物毒素 radicinin の生合成
Biosynthesis of phytotoxin radicinin produced by phytopathogen *Bipolaris coicis*

○西田 直人[1]、北野 生薫[2]、赤木 靖典[2]、児玉 基一朗[2]、石原 亨[2]、中島 廣光[2] ([1]鳥取大院農、[2]鳥取大農)
○Naoto NISHIDA[1], Takashige KITANO[2], Yasunori AKAGI[2], Motoichiro KODAMA[2], Atsushi ISHIHARA[2], Hiromitsu NAKAJIMA[2] ([1]Grad. Sch. Agric., Tottori Univ., [2]Fac. Agric., Tottori Univ.)

【背景と目的】Radicinin は植物に葉枯れや根の生育阻害などを引き起こすポリケチド植物毒素である。1953 年に初めて単離されて以降、これまでにいくつかの植物病原菌からの単離例が知られている。Radicinin の生合成機構については、アセチル CoA を開始ユニット、マロニル CoA を伸長ユニットとしてポリケチド合成酵素 (PKS) により 2 本の異なるポリケチド鎖が合成され、それらが C-C 結合を介して結合、前駆体である deoxyradicinin を経て radicinin が生成されるという仮説が提唱されている。このような一つのポリケチドの生合成に二つの PKS が関与し、生成された 2 本のポリケチド鎖が他のポリケチドに見られるエーテル結合やエステル結合ではなく、C-C 結合で結合されるという点は、ポリケチド生合成においては例のないものと考えられた。そこで、われわれは radicinin の生合成機構を遺伝子レベル、酵素レベルで明らかにすることとした。本研究で用いた *Bipolaris coicis* は radicinin 生産菌の一つであり、ハトムギやジュズダマに葉枯病を引き起こす植物病原菌である。われわれは *B. coicis* H13-3 株が radicinin とその類縁体 3-*epi*-radicinin、3-*epi*-radicinol などを生産すること、それら代謝産物の示す植物毒性、deoxyradicinin から radicinin への無細胞系での変換についてすでに報告している。これまでに本菌のゲノム上に PKS をコードする 14 の遺伝子を見出しており、そのうち radicinin 生合成に関わる PKS 遺伝子の特定を行ってきている。
【方法と結果】次世代シーケンサーによる解析から明らかになった *B. coicis* のゲノム上の 14 の PKS 遺伝子について、各 PKS 遺伝子の KS ドメインに対し、相同組換えによる遺伝子破壊を行うことで破壊株を作出した。それらの破壊株における radicinin 生産量を LC-MS を用いて解析することで、生合成に関わる PKS 遺伝子の特定を行った。その結果、*pks8* 遺伝子の破壊株だけに、radicinin の生産が認められなかった。このことから、radicinin の生合成は一つの PKS だけで行われることが明らかになった。また、安定同位体標識酢酸ナトリウムの radicinin への取り込み実験の結果も radicinin が 1 本のポリケチド鎖から生合成されているということを強く支持した。次に、radicinin 生合成関連遺伝子がクラスターを構成しているかを調べるために、*pks8* 遺伝子の周辺領域に存在する 7 の遺伝子について同様の方法で破壊株を作出し、radicinin の生産量を調べた。その結果、radicinin 生産量が著しく低下した破壊株が得られたことから、遺伝子クラスターの存在が示唆された。現在、*pks8* 遺伝子及びその周辺領域の生合成関連遺伝子について、酵母、大腸菌を用いた異種発現系の構築を行っているところであり、この結果についても報告する予定である。

Radicinin, *Bipolaris coicis*, phytotoxin

講演番号：2A04a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ A 校舎 04 会場

放線菌 *Streptomyces rochei* の多重変異株が生産するアゾキシアルケン化合物の生合成機構
Biosynthesis of azoxyalkene compound produced by a multiple gene disruptant of *Streptomyces rochei*

國武 博文、木梨 陽康、○荒川 賢治（広大院・先端研）
Hirofumi KUNITAKE, Haruyasu KINASHI, ○Kenji ARAKAWA (Hiroshima Univ.)

【目的】 放線菌 *S. rochei* の保持するプラスミド pSLA2-L 上には 2 つのポリケチド抗生物質ランカサイジン（LC）およびランカマイシン（LM)生合成遺伝子がコードされており、さらにこれらの制御遺伝子（*srr* genes）や構造未知の type-II 型ポリケチド（*roc*, *orf62-orf70*), カロテノイド(*crt*, *orf104-orf110*) 生合成遺伝子群も本プラスミド上にコードされていた。我々はゲノムマイニングの一環として制御遺伝子に注目し、 *srrB*, *lkcF-KR1*, *lkmE* の三重破壊株を構築した。これは リプレッサー遺伝子 *srrB* 変異により二次代謝生産を向上させ、*lkcF-KR1* 変異により LC 生合成を遮断し、II 型チオエステラーゼ遺伝子 *lkmE* 変異により LM 生産を低下させた株である。すなわち、シグナル分子制御系の撹乱および主要抗生物質生合成遺伝子の欠失を組み合わせ、潜在的二次代謝の覚醒への適用を検討した。本株の代謝産物解析を行ったところ、通常生産していない化合物の蓄積が認められた。主生成物 KA57-A の UV 活性化合物の分子式は $C_{10}H_{20}N_2O_3$ であり、NMR 解析からアゾキシアルケン化合物であることが分かった。本研究では KA57-A の生合成機構に注目した。

【方法・結果】本化合物 KA57-A はアゾキシアルケンという特徴的な構造を有しており、アゾ結合の形成機構や生合成起源など興味深い点が多い。そこでまず取り込み実験を行ったところ、*cis*-1-ヘキセニル基 (C1'-C6') は脂肪酸由来であることが示唆された。一方、C2-C4 位はアラニン由来と考えられたが、[3-^{13}C]アラニンの C-4 位への取り込みが認められなかった。また、KA57-A の推定生合成遺伝子について、アゾキシアルケン骨格を有する抗生物質 valanimycin との生合成遺伝子比較を行い、KA57-A 生合成クラスターを絞り込んだ。*vlmH* (isobutylamine N-hydroxylase gene) ホモログの破壊株は KA57-A を生産せず、生合成への関与が示唆された。本発表では詳細について報告する。

biosynthesis, regulatory gene, secondary metabolite

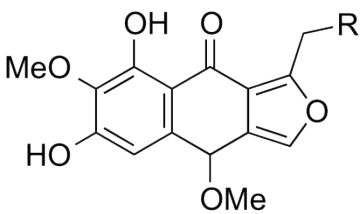
講演番号：2A04a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ A 校舎 04 会場

Streptomyces sp. RI-77 由来フラノナフトキノン骨格を持つポリケタイド JBIR-76, 77 の生合成
Biosynthesis of polyketides JBIR-76, 77 containing furanonaphthoquinone scaffold isolated from *Streptomyces* sp. RI-77

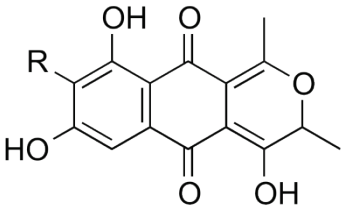
○曽根 薫[1]、佐藤 龍太郎[1]、勝山 陽平[1]、泉川 美穂[3]、新家 一男[2]、大西 康夫[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]AIST、[3]JBIC)
○Kaoru SONE[1], Ryutaro SATO[1], Yohei KATSUYAMA[1], Miho IZUMIKAWA[3], Kazuo SHIN-YA[2], Yasuo OHNISHI[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]AIST, [3]JBIC)

[背景]
放線菌 *Streptomyces* 属は、医薬品やその原料となる二次代謝産物のスクリーニング源として重要な微生物群である。放線菌が生産する二次代謝産物の多くは、多種多様な構造を持つことで知られるポリケタイドと呼ばれる化合物群に属している。ポリケタイドである JBIR-76 (**1**), JBIR-77 (**2**) は、放線菌 *Streptomyces* sp. RI-77 によって生産される二次代謝産物であり、微生物二次代謝産物としては珍しい特徴的なフラノナフトキノン構造を有している。本研究の目的は、これらの化合物の生合成経路を明らかにすることである。

[方法と結果]
Streptomyces sp. RI-77 のドラフトゲノムシーケンスデータを決定した。JBIR-76, 77 の生合成を担うと考えられる II 型ポリケタイド合成酵素遺伝子を含む生合成遺伝子クラスターを見出し、*fnq* 遺伝子群と命名した。次に、JBIR-76, 77 の生合成にとって特に重要と思われる 2 つの遺伝子 *fnqN*, *fnqQ* の破壊株を作製した。これらの遺伝子はそれぞれ ketosynthase と flavin-dependent monooxygenase をコードしている。得られた遺伝子破壊株が生産した低分子化合物を LC-MS で分析した結果、*fnqN*, *fnqQ* 破壊株はいずれも JBIR-76, 77 を生産していなかった。さらに *fnqQ* 破壊株は 350 nm に極大吸収を持つ芳香族化合物と思われる未知の化合物を複数生産することが分かった。*fnqQ* 破壊株を培養した 2 L の培養液よりこれらの未知の化合物を精製した。得られた化合物を ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, H-H COSY, HSQC, HMBC, HR-MS により解析した結果、これらの化合物の構造は **3**, **4** であることが明らかとなった。興味深いことに、これらの化合物は最終産物である JBIR-76, 77 よりも炭素を 2 つ多く持っていた。このことから、JBIR-76, 77 のフラノナフトキノン骨格の形成において炭素-炭素結合の切断が必要であり、この反応に FnqQ が関与していることが示唆された。現在、組換え FnqQ を用いて、*in vitro* で酵素アッセイを行っている。



R = OH: JBIR-76 (**1**)
R = H: JBIR-77 (**2**)



R = OMe: **3**
R = H: **4**

Streptomyces, biosynthesis, polyketide

講演番号：2A04a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ A 校舎 04 会場

微生物由来スチルベン合成酵素の機能解析と非天然型スチルベンアナログの創出

Functional analysis of bacterial stilbene synthase aiming for the production of unnatural stilbene analogues

○下村 康一郎、森 貴裕、淡川 孝義、阿部 郁朗（東大院薬）
○Koichiro Shimomura, Takahiro Mori, Takayoshi Awakawa, Ikuro Abe (The University of Tokyo)

【背景】Stilbene類は植物に広く分布する化合物群であり、植物ではcinnamoyl-CoAを開始基質としてⅢ型ポリケタイド合成酵素stilbene synthaseによる３回のmalonyl-CoAの縮合反応と環化反応を経て生合成される。一方、細菌由来のstilbeneはグラム陰性菌*Photorrhabdus luminescens* から単離される 2-isopropyl-5-[(*E*)-2-phenylvinyl]benzene-1,3-diol及び 2-ethyl-5-[(*E*)-2-phenylvinyl]benzene-1,3-diolのみしか報告が無く、その生合成経路は不明であった。過去の遺伝子破壊実験によりketosynthase様酵素であるStlDとflavodoxin様酵素であるStlCがその生合成に関わることが示され、この二つの酵素による２つのポリケタイド鎖のMichael付加反応とClaisen縮合を伴う1ステップの六員環形成反応、脱炭酸反応、芳香化反応にて生合成される経路が提唱された[1]。これは植物とは大きく異なる生合成経路であるため、極めて興味深い。しかしながらStlD、StlCの個々の酵素反応は不明であったため、本研究では両酵素の機能解析を行い基質特異性および触媒メカニズムを明らかにし、変異導入によって酵素反応を改変し、非天然型のstilbene骨格の創出を行うことを目的とした。

【実験・結果】 まず stilbene 合成に関わる二つのポリケタイド鎖のアナログを有機合成により調製した。5-methyl-3-oxohexanoyl-SNAC を isovaleryl chloride と meldrum's acid 間での求核アシル置換反応で得た化合物を toluene 中で *N*-acetyl cysteamine(NAC) と反応させることで取得し、5-phenyl-2,4-pentadienyl-SNAC を 5-phenyl-2,4-pentadienoic acid と NAC の WSCI を縮合剤として用いた縮合反応により得た。これらの基質を、大腸菌を宿主として発現し Ni アフィニティー精製して取得した StlD と共にインキュベートした。その結果、両アルキル鎖が縮合後、脱炭酸して生じる 2,5-dialkylcyclohexane-1,3-dione に対応する分子量のピークを酵素反応特異的に検出した。更に StlD の酵素反応生成物を基質とし、StlC を発現した大腸菌からの粗酵素抽出液を用いた酵素反応に供したところ、分子量が２減少し芳香化が進行したと考えられるピークが酵素反応特異的に検出された。これを、生産菌より単離した標品と保持時間及び MS を比較することにより、2-isopropyl-5-[(*E*)-2-phenylvinyl]benzene-1,3-diol と同定した。以上の結果により StlD のポリケタイド鎖の縮合、脱炭酸反応、StlC の芳香化反応を *in vitro* で再構築することに成功した。現在、StlD、StlC の基質特異性の検討および結晶化スクリーニングに着手している。

(1) Bacterial Biosynthesis of a Multipotent Stilbene Joyce, S. A., Brachmann, A. O., Glazer, I., Lango, L., Schwär, G., Clarke, D. J., Bode, H. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2008) **47**, 1942 –1945.

Bacterial stilbene, Photorhabdus luminescens, ketosynthase

講演番号：2A04a17
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ A 校舎 04 会場

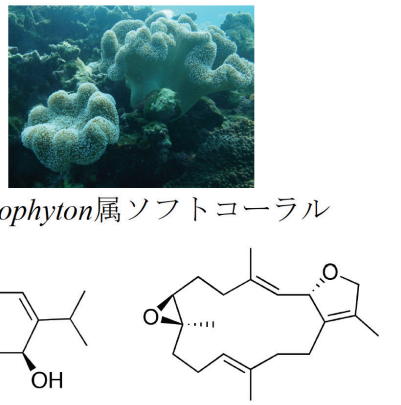
Sarcophyton 属ソフトコーラルの化学的および生物学的研究

Chemical and Biological Studies on *Sarcophyton* Soft Corals

○戸村 友彦[1]、荒武 里衣[2]、山口 勝司[3]、重信 秀治[3]、田中 淳一[2]、小鹿 一[1] ([1]名大院生命農、[2]琉球大理、[3]基生研)

○ Tomohiko TOMURA[1], Satoe ARATAKE[2], Katsushi YAMAGUCHI[3], Shuji SHIGENOBU[3], Junichi TANAKA[2], Makoto OJIKA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Ryukyu Univ., [3]NIBB)

[背景・目的] 近年、造礁サンゴのコユビミドリイシ（*Acropora digitifera*）の全ゲノムが解読され、サンゴの環境ストレス応答や褐虫藻との共生メカニズムの分子レベルでの解明が期待されている。しかし、サンゴの分子生物学的研究は主にハードコーラルに限られ、ソフトコーラルに関する研究報告は少ないのが現状である。ソフトコーラル類は新規生理活性物質の探索を目的として研究が行われ、特に *Sarcophyton* 属からは特徴的なセンブラン型ジテルペンが多く報告されている（図 1）。我々は、分子系統解析と化合物の関係を検討することで、種内での化学多様性を確認したが、多様性が生じる原因は不明であった。そこでソフトコーラルからジテルペン関連の生合成酵素を探索し、多様性が生じる原因を解明することを目的とした。



*Sarcophyton*属ソフトコーラル

sarcophytol-A　　2*S*,7*S*,8*S*-sarcophytoxide

図 1. 代表的なセンブラン型ジテルペン

[方法・結果] *Sarcophyton* 属ソフトコーラルの 1 種であるヒダベリウミキノコ（*S. trocheliophorum*）3 個体を沖縄本島水釜で採取し、各個体を生きている状態、液体窒素および RNAlater で保存した。各標本から mRNA を精製し、cDNA を合成した後、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq を行い、ライブラリーを作成した。得られた contig に対して BLASTX によるアノテーションを行った結果、種レベルでは *Nematostella vectensis* と *Hydra magnipapillata* が上位にヒットし、刺胞動物と相同性を示す配列が全体の 24%となった。また、得られたライブラリーにはジテルペン生合成に不可欠なメバロン酸経路に関係する酵素が全て含まれていた。ジテルペン環化酵素の共通モチーフとして DDXXD、NSE や DTE が知られている。このモチーフを手がかりとし、得られたライブラリーからジテルペン環化酵素を探索したところ、既存の環化酵素と相同性を示さない多くの候補を発見した。今後は、これらの候補の中から真の環化酵素を見つけ出し、活性試験を行う。

ソフトコーラルの次世代シーケンサーを用いた RNA-seq は未だ報告されておらず、本研究が世界で初めての試みである。今回作製したライブラリーが未だ研究が進んでいないソフトコーラルの理解に大いに貢献すると期待している。

soft coral, cembranoid diterpene, RNA-seq

講演番号：2A04p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ A 校舎 04 会場

放線菌由来新規セスキテルペン合成酵素遺伝子の解析

Analysis of genes encoding novel sesquiterpene synthase from actinobacteria

○山田 佑樹、小松 護、池田 治生 (北里大・生命研)
○Yuki YAMADA, Mamoru KOMATSU, Haruo IKEDA (Kitasato Univ.)

【目的】

テルペン化合物はこれまでに植物や糸状菌等の真核生物由来特有の代謝産物として考えられ、原核生物では極めて稀な代謝産物として理解されてきた。当研究室ではテルペン合成酵素のモチーフ配列およびそれらの配列間の距離等を統計学的に処理して検索する、いわゆる隠れマルコフモデル(HMM)をこの酵素群に適用する事によって、細菌のタンパク質データベースから効率良くテルペン合成酵素の候補を抽出する事に可能にした。そこで、本研究では日々加速度的に蓄積する細菌のゲノムデータに対して同様な解析を行ない、細菌由来の新規テルペン合成酵素を探索する事を目的とする。

【方法および結果】

NCBI データベースに対して新たに作製した HMM を用いて検索した結果、200 種以上もの細菌由来のテルペン合成酵素の候補が見出された。それら候補の大半は放線菌由来のものであったが、*Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 および *Mycobacterium marinum* M のゲノムからそれぞれ 17 種および 2 種ものテルペン合成酵素の候補を見出した。これらのアミノ酸配列に基づく系統解析より、SCLAV_p0985 および MMAR_3220 がそれぞれ新たなセスキテルペン骨格形成に関与する事が推測された。そこで、*sclav_p0985* および *mmar_3220* を *S. avermitilis* 大規模染色体 SUKA22(*Δsav71-1287 Δolm-cluster Δptl-cluster::ermE ΔgeoA Δsav7456-7491*)を宿主とした強制発現系に供し、生産される化合物を解析した。構成的強発現プロモーター(*rpsJp*)の下流に farnesyl pyrophosphate 合成酵素遺伝子(*ptlB*)を配置し、さらにその下流に各テルペン合成酵素遺伝子を共発現するように連結した。得られた形質転換体の菌体由来ヘキサン抽出物の GC-MS 解析を行なった結果、各形質転換体においてセスキテルペン化合物の生産が確認された。各代謝産物の構造解析を行なった結果、*sclav_p0985* の代謝産物は African-1-ene および African-2-ene であることが確認された。しかしながら、植物や珊瑚から既に単離された既知化合物と立体構造が異なる新規化合物であることが明らかになった。また *mmar_3220* の代謝産物は Germacradien-11-ol であることが明らかになった。これら化合物は既に植物や細菌から単離されたことが報告されているが、その生合成遺伝子は同定されておらず、本研究手法を用いることによって初めて見出すことができた。

terpene, streptomyces avermitilis

講演番号：2A04p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ A 校舎 04 会場

異種発現系を用いた新規 Teleocidin 類の生産

Heterologous expression system, the tool for production of novel teleocidins

○星野 翔太郎[1]、張 驪騑[1]、淡川 孝義[1]、伊藤 卓也[2]、脇本 敏幸[1]、阿部 郁朗[1] ([1]東京大院薬、[2]徳島文理大院薬)
○ Shoraro HOSHINO[1], Lihan ZHANG[1], Takayoshi AWAKAWA[1], Takuya ITO[2], Toshiyuki WAKIMOTO[1], Ikuro ABE[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Tokushima Bunri Univ.)

【背景】放線菌 *Streptmyces blastmyceticus* より単離されたインドールテルペノイドの一種である teleocidin B4 は、細胞内シグナル伝達に関与する酵素である PKC(Protein kinase C)の強力な活性化因子である。PKC 活性化因子の多くは発がんプロモーターとして作用するが、bryostatin 類のように抗がん作用を示すものも存在し、加えて PKC の活性化因子はがん以外にも抗 HIV 活性や抗アルツハイマー活性を示すことが知られており医薬品としての応用が期待される。また、teleocidin 類は 9 員環ラクタム構造やテルペノイド由来のシクロヘキセン構造といった特徴的な骨格を有するため、その生合成反応が注目される。本研究では、teleocidin 類の特異な生合成経路を解明し、物質生産系へと利用することを目的とした。
【方法・結果】teleocidin B4 は lyngbyatoxin A の geranyl 基がメチル化、環化されることによって生成すると予想できる。そこで、lyngbyatoxin A 生合成酵素遺伝子である *ltxABC* ホモログを *S. blastmyceticus* のゲノム情報より探索し、全てのホモログを含む遺伝子クラスターである *tld* クラスターを見出した。*Tld* クラスターを有する fosmid を改変し、放線菌へと導入可能なベクターへと変換した。これを、*Streptomyces lividans* TK21 株及び *Streptomyces avermitilis* SUKA22 株にそれぞれプロトプラスト-PEG 法及び接合伝達法によって導入し、代謝物の解析を行った。いずれの異種発現株からも lyngbyatoxin A 及びその生合成前駆体ペプチドである indolactam V、valindolmycin が検出された。さらに、*tld* クラスターを異種発現した *S. lividans* TK21 株及び *S. avermitilis* SUKA22 株の代謝物を詳細に検討した。結果 *S. lividans* TK21 株からは *N*-acetyl-tryptophanol、(±)-2-oxyindolactam、blastmycetin B、新規な valindolmycin アセチル化体が単離され、*S. avermitilis* SUKA22 株からは *N*-acetyl-tryptophanol、geranyl 基が酸化された新規 lyngbyatocin A 誘導体が単離された。これらの誘導体は *tld* クラスターの異種発現によって宿主に蓄積した lyngbyatoxin A 及びその前駆体が、宿主由来の代謝酵素によって変換を受けて生成したものであると予想された。このことは宿主の代謝経路は菌体によって多様性があり、複数の宿主を異種発現系に用いてそれらの代謝能力を利用することで、既知の天然物に対する多彩なアナログ分子を創出する有用な手法であることを示唆する。現在、*Streptomyces coelicolor* CH999 株など新たな宿主への異種発現を行うと共に、得られた新規化合物の生物活性の測定に着手している。

teleocidins, heterologous expression system, metabolism

講演番号：2A04p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 04 会場

放線菌の生産するプレニルカルバゾール類縁体の生合成研究

Studies on the biosynthesis of prenylated carbazoles produced by *Streptomyces*

○小林 正弥[1]、尾崎 太郎[1]、新家 一男[2]、西山 真[1]、葛山 智久[1]([1]東大・生物工学セ、[2]産総研)
○Masaya KOBAYASHI[1], Taro OZAKI[1], Kazuo SHIN-YA[2], Makoto NISHIYAMA[1], Tomohisa KUZUYAMA[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]AIST)

【目的】放線菌 *Streptomyces* sp. CS79 株の生産するカルキノスタチン A、および *Streptomyces* sp. FGK858 株の生産するラバンドキノシンは、特徴的なオルトキノン骨格にプレニル基が付加したカルバゾール類縁化合物である。これまでに、ピルビン酸や酢酸を用いたトレーサー実験の結果から、全ての炭素骨格の由来が推定されているが、その生合成遺伝子に関する報告はなく、特に、カルバゾール骨格にプレニル基を付加するプレニルトランスフェラーゼについては全く知見がない。本研究では、これらのプレニルカルバゾール生合成遺伝子の同定を目的とした。
【方法と結果】まず、これら 2 菌株のドラフトゲノム解析を行い、*in silico* スクリーニングによってプレニルカルバゾール生合成遺伝子の探索を試みた。プレニル基の供給に関与するメチルエリスリトールリン酸経路の酵素や IPP isomerase (IDI)を探索した結果、両菌株のゲノム配列から type 1 IDI と推定される ORF を 2 個ずつ見出した。そこで次に、これらの IDI 遺伝子の周辺の配列を詳細に解析したところ、両菌株にのみ共通に存在する特徴的な遺伝子クラスターを見出すことができた。これらの遺伝子クラスターをプレニルカルバゾール類縁体の生合成遺伝子と推定し、組換え酵素を用いた *in vitro* の機能解析を開始した。過去のトレーサー実験の結果から、カルバゾール骨格形成の初発の反応は L-トリプトファンに由来するインドールピルビン酸とピルビン酸の縮合反応と推定される。そこで、その縮合反応を触媒すると予想されるチアミン二リン酸依存型酵素 ORF2397 の組換え酵素を調製しその酵素活性を検討した。その結果、予想した反応産物と考えられる分子量 247 のβケト酸の生成が確認できた。次に、CS79 株のクラスター中に見出した機能未知酵素 ORF6903 について機能解析を行った。ORF6903 は、squalene/phytoene synthase と 30%の相同性を示すことから、プレニル二リン酸を基質とする反応を触媒すると予想した。そこで、ジメチルアリル二リン酸をプレニル基供与体とし、インドール類やカルバゾール類をプレニル基受容体として酵素反応を行ったところ、carbazole や 2-hydroxycarbazole にジメチルアリル基が付加した構造と考えられる反応産物の生成が確認できた。一方で、インドール類を用いた場合にはプレニル基付加反応を検出することはできなかった。以上の結果から、上記遺伝子クラスターがプレニルカルバゾール生合成に関与することが強く示唆された。また、カルバゾール骨格のプレニル基付加はまったく新しいタイプのプレニルトランスフェラーゼによって触媒されることが明らかになった。本発見は新たなプレニル化合物生産系の構築につながるものと期待される。

biosynthesis, carbazole, prenyltransferase

講演番号：2A04p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 04 会場

ヌクレオシド系抗生物質 A-94964 生合成におけるウリジン骨格形成機構

Biosynthesis of the uridine moiety of the nucleoside antibiotic A-94964

○白石 太郎、西山 真、葛山 智久（東大・生物工学セ）
○Taro SHIRAISHI, Makoto NISHIYAMA, Tomohisa KUZUYAMA (Biotechnol. Res. Ctr., Univ. Tokyo)

【目的】A-94964 は Translocase I の阻害活性スクリーニングにより、*Streptomyces* sp. SANK60404 株の培養液から発見された新規ヌクレオシド系抗生物質である [1,2]。A-94964 の構造は不飽和脂肪酸やアミノ糖、リン酸ジエステル、ウリジンが互いに結合したユニークなものとなっており、その生合成研究が新たな酵素の発見や新規有用生理活性物質の創製につながることが期待される。昨年度の当大会において、A-94964 の生合成遺伝子クラスターの最小単位の同定について報告した [3]。その生合成遺伝子クラスターの解析をさらに進めたところ、ヌクレオシド系抗生物質の生合成の初期反応に関与すると報告されているウリジン骨格形成遺伝子のホモログが存在しないことがわかった。この知見により、A-94964 は既存のヌクレオシド系抗生物質とは異なる初期反応経路で生合成されることが推測された。そこで、この新たなヌクレオシド化合物生合成機構を明らかにすることを本研究の目的とした。これによりヌクレオシド系抗生物質に新たな知見をもたらすことが期待される。

【方法・結果】A-94964 の構造から、その初発の反応はウリジンモノリン酸を基質とし、ユニークな 8 炭素からなるウロン酸を形成するものであると推測された。そこで、まずこのような化合物の生合成を明らかにするために、ウロン酸形成後の反応を担うと推測される *orf15* の破壊コスミドを作製しその形質転換株の培養抽出液を LC-MS により解析した。その結果、破壊コスミド導入株において、空ベクター導入株では検出されない 8 炭素からなるウリジルウロン酸（**1**）と推測されるシグナルが検出された。この結果から、A-94964 生合成遺伝子クラスター中の遺伝子産物により確かに **1** が形成されることがわかった。さらに、他の破壊コスミド導入株を解析した結果、*orf6* および *orf14* 破壊コスミド導入株において、**1** やその後の反応産物と予想される生合成中間体に由来するシグナルがすべて消失していた。以上の結果より Orf6 と Orf14 が A-94964 生合成における初発反応を担い、ユニークな 8 炭素からなるウロン酸を形成すると推測された。現在、orf15 破壊コスミド導入株で蓄積する化合物の単離と構造決定、および Orf6 と Orf14 の組換え酵素の作製と機能解析を行っており、ヌクレオシド化合物生合成におけるユニークな初発反応の同定を試みている。

【参考文献】

(1) R. Murakami, *et al*., J. Antibiot. 61(9): 537-544, 2008.
(2) Y. Funaki, *et al*., J. Antibiot. 61(9): 545-549, 2008.
(3) 白石太郎、西山真、葛山智久、日本農芸化学会 2013 年度大会　3C22a08

nucleoside antibiotics, polyketide, Streptomyces

講演番号：2A04p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 04 会場

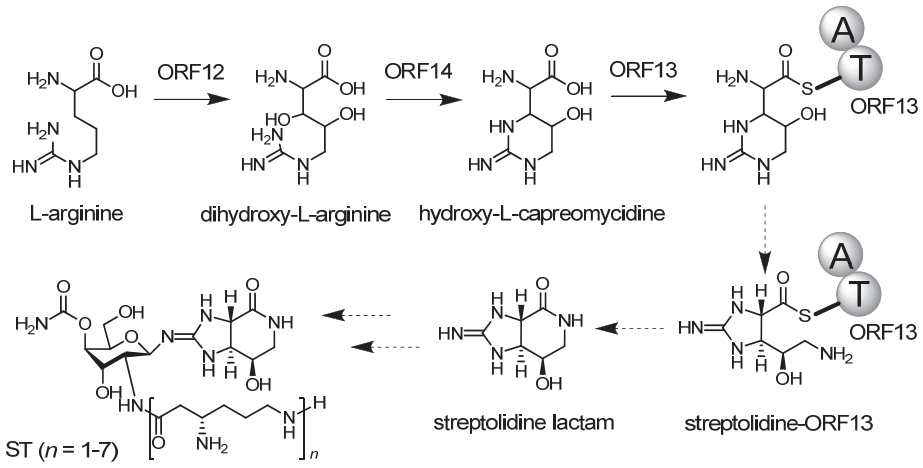
抗生物質ストレプトスリシン生合成機構の解明

Studies on the streptothricin biosyntheesis

○丸山 千登勢[1]、本山 賢人[1]、馬場 信行[1]、川畑 球一[1]、泉川 美穂[2]、増田 裕一[3]、小松 護[4]、土井 隆行[3]、新家 一男[5]、池田 治生[4]、濱野 吉十[1] ([1]福井県大生物資源、[2]JBIC、[3]東北大院薬、[4]北里北里生命研、[5]産総研)

○Chitose MARUYAMA[1], Kento MOTOYAMA[1], Nobuyuki BABA[1], Kyuichi KAWABATA[1], Miho IZUMIKAWA[2], Yuichi MASUDA[3], Mamoru KOMATSU[4], Takayuki DOI[3], Kazuo SHIN-YA[5], Haruo IKEDA[4], Yoshimitsu HAMANO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]JBIC, [3]Tohoku Univ., [4]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato Univ., [5]AIST)

【目的】放線菌によって生産される streptothricin（ST）は、強力な抗生物質であるが、原核・真核生物の両者に対して毒性を示すため臨床利用されていない。ST の streptolidine lactam 構造が開環した ST は、原核微生物特異的な抗菌活性を示すことから、この構造をターゲットとした生合成工学は新たな医薬品リード化合物の創製につながると考えられ、その生合成経路の解明は大変重要である。これまでには我々は、streptolidine lactam が L-arginine を出発物質として中間体 hydroxy-L-capreomycidine を経て生合成されることを見出しており、α-ケトグルタル酸依存性 L-arginine hydroxylase（ORF12）、PLP 依存性 aminotransferase（ORF14）、非リボソームペプチド合成酵素の A domain と T domain から成る ORF13 がその生合成に関与していることを明らかにしている。そこで、本研究では、生合成中間体の絶対立体配置の決定、および、streptolidine lactam の生合成に関わるその他生合成酵素の同定を行った。



【方法と結果】rORF12 は 3,4-dihydroxy-L-arginine を生成するが、その立体配置は不明のままであった。そこで、有機合成した標品と比較して本化合物の絶対立体配置を決定した。また、ST 生合成遺伝子群の各種遺伝子をλ-Red recombinase を利用して in-frame にて遺伝子破壊し、染色体組込み型ベクターを用いて異種放線菌 *Streptomyces avermitilis* SUKA17 株に導入した。得られた形質転換体の培養液を LCMS で分析したところ、ATP-grasp motif を有する amide ligase に相同性を示す ORF8 遺伝子の破壊株において、*m/z*=189 を示す新たな化合物ピークを検出した。本化合物を単離精製し rORF8 との反応を行ったところ、ATP 依存的に *m/z*=171 を示す化合物へと変換されたことから、これら化合物はそれぞれ、streptolidine（分子量 188）と streptolidine lactam（分子量 170）であることが示唆された。streptolidine は ORF13 に結合した状態で存在すると考えられていたことから、現在、これら化合物の構造決定を進めており、その結果についても報告する。

antibiotics, biosynthesis, NRPS

講演番号：2A04p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 04 会場

放線菌由来β-カルボリン化合物キタセタリン生合成遺伝子クラスターの同定

Identification of biosynthetic genes for a ß-carboline alkaloid kitasetaline from *Kitasatospora setae*

○上田 祥平[1]、木谷 茂[1]、アルーンスリ アイヤダ[1]、池田 治生[2]、仁平 卓也[1] ([1]阪大工、[2]北里大)
○Shohei UEDA[1], Shigeru KITANI[1], Aiyada Aroonsri[1], Haruo IKEDA[2], Takuya NIHIRA[1] ([1]Osaka Univ., [2]Kitasato Univ.)

【背景】

β-カルボリン化合物キタセタリンは、放線菌 *Kitasatospora setae* が生産する二次代謝産物として、オートレギュレーター受容体遺伝子破壊株において同定された化合物である。キタセタリンは、β-カルボリン骨格に加えて、*N*-アセチルシステイン残基を含む特徴的な化学構造を有する。多彩な生理活性を示すことで知られる β-カルボリン化合物の多くは高等植物に由来しており、微生物から同定されたβ-カルボリン化合物は極僅かである。また、植物 β-カルボリンの生合成経路はほぼ明らかであるが、微生物における β-カルボリンの生合成経路について、その分子情報が乏しいのが現状である。

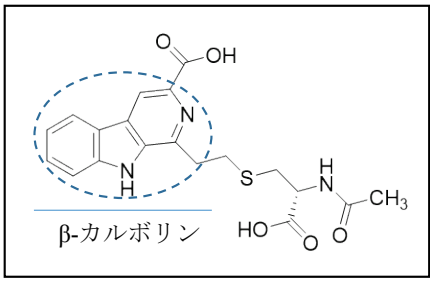


図1　キタセタリン

本研究では、異種発現最適化ホスト *Streptomyces avermitilis* SUKA22 株[(1)]を用いることにより、キタセタリン生合成遺伝子を同定することを目的とした。

【結果】

K. setae の BAC ライブラリーを *S. avermitilis* SUKA22 株に導入し、その生産物を解析している過程で、β-カルボリン骨格の UV スペクトラムを示すピークを与える BAC クローンを発見した。これらのピーク群の化合物を同定した結果、キタセタリンとその新規類縁体が含まれることが明らかとなった[(2)]。次に、BAC クローンよりキタセタリン生産を与える遺伝子群を異種発現解析により限定化したところ、３つの遺伝子（*kslA*/*B*/*C*）からなる１つのオペロンが β-カルボリン骨格生合成に必要であることが分かった。KslB は明瞭な機能ドメインを持たないが、オピンと総称される非タンパク態アミノ酸誘導体の生合成酵素と弱いながらも相同性を示すことから、KslB が β-カルボリン骨格生合成の鍵酵素となることが示唆された。

(1) ACS Synth Biol. 2:384-96. 2013.
(2) Appl Environ Microbiol. 78:8015-24. 2012.

β-carboline, *Kitasatospora setae*, biosynthetic genes

講演番号：2A04p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 04 会場

ペプチドライゲースとリボソームとの協同によるペプチド新奇生合成機構の解明

Peptide synthesis cooperatively achieved by peptide ligase and ribosomes

○野池 基義[1]、雄谷 洸一[2]、佐々木 郁雄[1]、丸山 千登勢[3]、石川 淳[4]、佐藤 康治[1]、濱野 吉十[3]、伊藤 肇[1]、大利 徹[1] ([1]北大院工、[2]北大院総合化学、[3]福井県立大学、[4]国立感染症研究所)
○Motoyoshi NOIKE[1], Koichi OOYA[2], Ikuo SASAKI[1], Chitose MARUYAMA[3], Jun ISHIKAWA[4], Yasuharu SATOH[1], Yoshimitsu HAMANO[3], Hajime ITO[1], Tohru DAIRI[1] ([1]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [3]Department of Bioscience, Fukui Prefectural University, [4]National Institute of Infectious Diseases)

【目的】放線菌が生産するペプチド系抗生物質、pheganomycin（PM、図 1）は、*C*-末のアミノ酸配列に多様性がある（NVKDR と NVKDGPT)。この多様性から判断すると、リボソーム関与の生合成とは考えにくく、また non-ribosomal peptide synthetase（NRPS）の場合も A-ドメインのアミノ酸の認識は比較的厳密であることから、どのような機構でこの *C*-末の多様性が導かれるか興味が持たれたことから、その生合成機構の解明を行った。

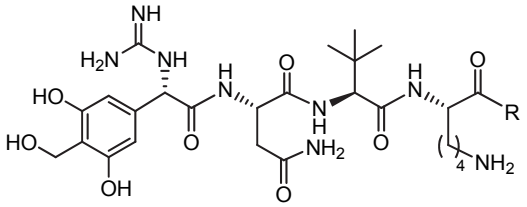


図1 Pheganomycin (R = DR or DGPT)の構造

【方法と結果】PM の *N*-末には 3,5-dihydroxyphenylglycine（DHPG）誘導体が存在することから、バンコマイシンで本骨格の生成に関与することが証明されている DpgA（Type III PKS）遺伝子をドラフトゲノム配列中に探索した結果、生合成遺伝子クラスターを見出した。本クラスターには DHPG の修飾に関与すると推定される酵素遺伝子群が存在したが、NVKDR と NVKDGPT を合成し得る巨大な NRPS は存在しなかった。そこで、クラスター内にペプチダーゼが存在したことも考慮し、ペプチド部分がリボソーム関与で合成される可能性を考え塩基配列を精査した結果、38 アミノ酸からなる遺伝子を見出した。このペプチドは NVKDR と NVKDGPT の両方の配列を含んでおり、*C*-末の多様性を良く説明できた。本遺伝子を欠失させた変異株では、PM の生産が消失したことから、NVKDR と NVKDGPT はリボソームにより供給されると結論づけた。しかし、DHPG とのペプチド結合を触媒する酵素に関しては候補遺伝子を見出せなかった。

そこで、既知のペプチド結合生成酵素は ATP を基質の活性化に用いる場合が多いことから、ATP 結合モチーフを持つ ORF を探索した。その結果、プレペプチド遺伝子の隣の遺伝子産物がモチーフを保持していたことから、本遺伝子の関与を検討した。組換え酵素を調製し、アミジノ化 DHPG と NVKD（または NVKDGPT）を ATP、Mg^{2+}存在下で反応させた結果、両基質がペプチド結合した化合物が生成した。したがって、PM はリボソームとペプチドライゲースという全く異なる機構が協調して生合成されること、その際、ペプチドを求核剤として利用することが判明した。本発表では、これらの結果の詳細について報告する。

peptide ligase, ribosome, peptide formation

講演番号：2A04p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 04 会場

インドールジテルペンの生合成に関与するプレニル基転移酵素に関する研究－1

Study on prenyltransferases responsible for indole diterpene biosynthesis－1

○劉 成偉[1]、南 篤志[3]、野池 基義[2]、戸嶋 浩明[4]、及川 英秋[3]、大利 徹[2] ([1]北大院総合化学、[2]北大院工、[3]北大院理、[4]茨城大農)

○Chengwei LIU[1], Atsushi MINAMI[3], Motoyoshi NOIKE[2], Hiroaki TOSHIMA[4], Hideaki Oikawa[3], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ., [4]College of Agriculture, Ibaraki Univ.)

【目的】インドールジテルペンの生合成研究は、Scott らにより paxilline 生産菌である糸状菌 *Penicillium paxilli* を用いて主に遺伝学的手法により進められてきた(1-3)。また、つい最近、我々は *Aspergillus oryzae* を用いた異種発現により、*paxG*, *paxC*, *paxM*, *paxB*, *paxP*, *paxQ* の 6 つの遺伝子が paxilline の生成に必要であることと、個々の遺伝子の機能も明らかにした(4)。しかし、初発反応を触媒し geranylgeranyl indole を生成する PaxC の真の基質や、クラスターに存在しプレニル転移酵素と相同性を有する *paxD* の機能は不明である。また *Aspergillus flavus* が生産し paxilline 類縁体である aflatrem の生合成遺伝子クラスターに存在し、プレニル転移酵素と相同性を有する *atmD* 遺伝子の機能も不明であることから、組換え酵素を用い解析を行った。

【結果】

（１）PaxC は、geranylgeranyl diphosphate を indole-3-glycerol phosphate (IGP) に付加する活性を有していた。また indole も基質となったが、速度定数解析から前者が真の基質と推定された(4)。さらに、PaxC は farnesyl diphosphate を IGP および indole に付加した(7)。

（２）PaxD は、dimethylallyl diphosphate（DMAPP）を paxilline の 21 位と 22 位に regular に di-プレニル化する活性を有していた(5)。基質特異性を検討した結果、paxilline の生合成中間体である paspaline も基質となったが、mono-プレニル化体のみが得られた(7)。

（３）AtmD の本来の基質と考えられる paspalinine が入手できなかったため、paxilline と DMAPP を用いて解析した結果、20 位と 21 位が reverse にプレニル化された化合物が生成した(7)。PaxD 同様に paspaline も基質となったが、驚いたことに 21 位が regular に mono-プレニル化されたものと、22 位が regular に mono-プレニル化されたものが生成した(7)。また、化学合成された各種化合物を基質に用いた場合、幾つかのインドール関連化合物をプレニル化した。以上まとめると、インドールジテルペン生合成に関与するプレニル転移酵素、特に AtmD は幅広い基質特異性と柔軟な regular/reverse 選択性を併せ持つことが解った。

【参考文献】(1)Mol. Microbiol. 2001, 39, 754-764. (2)FEBS Lett. 2006, 580, 1625-1630. (3)J. Biol. Chem. 2007, 282, 16829-16837. (4)J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 1260-1263. (5)Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013, in press. (6)Appl. Environ. Microbiol. 2009, 75, 7469-7481. (7)Appl. Environ. Microbiol. 2013, 79, 7298-7304.

indole diterpene prenyltransferase, aflatrem, paxilline

講演番号：2A04p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 04 会場

インドールジテルペンの生合成に関与するプレニル基転移酵素に関する研究－2

Study on prenyltransferases responsible for indole diterpene biosynthesis－2

劉 成偉[2]、○藤盛 道子[1]、南 篤志[3]、野池 基義[1]、佐藤 康治[1]、大栗 博毅[3]、及川 英秋[3]、大利 徹[1] ([1]北大院工、[2]北大院総合化学、[3]北大院理)

Chengwei LIU[2], ○Michiko FUJIMORI[1], Atsushi MINAMI[3], Motoyoshi NOIKE[1], Yasuharu SATOH[1], Hiroki OGURI[3], Hideaki OIKAWA[3], Tohru DAIRI[1] ([1]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)

【目的】先の演者が報告したように、インドールジテルペンの生合成に関与するプレニル転移酵素は幅広い基質特異性と柔軟な regular/reverse 選択性を併せ持つことが解った。そこで糸状菌に新たなプレニル転移酵素を探索した。また、化学合成した各種インドール関連化合物を基質に用い基質特性について更に詳細に検討を行った。

【結果】以前、我々が生合成機構の全体像を明らかにした(1)、ジテルペン配糖体であるフシコクシン生産菌 *Phomopsis amygdali* のドラフトゲノム中に paxilline 生合成に必須な *paxG*, *C*, *M*, *B*, *P*, *Q* の 6 つの遺伝子のオーソログを見出した。さらに周辺には、lolitrem の生合成に関与すると推定されている(2)、プレニル転移酵素遺伝子 *ltmE*,と P450 遺伝子 *ltmJ* と高い相同性を有するオーソログが存在した。これらが関与し生合成される化合物を同定するため、*P. amygdali* 培養液中にインドールジテルペン関連化合物を探索したが見出すことは出来なかった。そこで、培地・培養条件の検討、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤添加培養、クラスター近傍の転写因子の強制高発現、基質供給強化のためのフシコクシン非生産株の構築を行ったが、いずれの方法でも効果は認められなかった。そこで、*paxG*、 *paxC*、*ltmE* オーソログである *amyG*, *amyC*, *amyD* を麹菌内で強制発現させ cDNA を取得後、組換え酵素を用いて機能解析を行った。その結果、

（1）AmyG は、ゲラニルゲラニル 2 リン酸生合成活性を有していた。

（2）AmyC は、PaxC 同様、geranylgeranyl diphosphate を indole-3-glycerol phosphate (IGP) と indole に付加する活性を有していた。

（3）AmyD は、dimethylallyl diphosphate を paxilline の 20 位と 21 位に regular に di-プレニル化する活性を有していた(3)。

また、PaxD、AtmD、AmyD と化学合成された各種化合物を基質に用いて基質特異性を調べた結果、paxilline とは構造が異なる多くのインドール関連化合物がプレニル化されたことから、これら酵素の幅広い基質特異性が示された。

【参考文献】(1)PLoS ONE 7(8): e42090. (2)FEBS. Lett. 2012, 586, 2563-2569. (3)J. Biol. Chem. 2007, 282, 16829-16837. (4)J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 1260-1263. (5)Biosci. Biotech. Biochem. in press.

indole diterpene, prenyl transferase, substrate specificity

講演番号：2A04p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 04 会場

エルゴチオネインは *Streptomyces coelicolor* を酸化ストレスから守る

Ergothioneine protects *Streptomyces coelicolor* from various stresses.

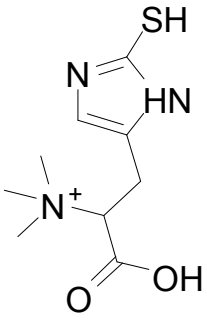
○中嶋 駿介[1]、佐藤 康治[2]、簗島 謙太郎[3]、松井 智未[2]、大利 徹[2] ([1]北大院総合化学、[2]北大院工、[3]協和発酵バイオ)

○Shunsuke NAKAJIMA[1], Yasuharu SATOH[2], Kentaro YANASHIMA[3], Tomomi MATSUI[2], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Kyowa Hakko Bio)

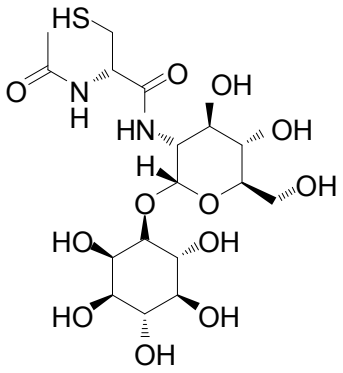
【目的】微生物における新規代謝経路の発見は、新規物質生産法の開発や抗生物質の新規ターゲットとしての価値がある。新規代謝経路の発見を目指し、*Streptomyces coelicolor* ゲノム上の機能未知遺伝子クラスターに注目し、その機能解析を行った。*S. coelicolor* は抗酸化剤としてグルタチオンを用いないことが知られており、ゲノム上に glutathione synthase オルソログが存在しない事実と合致する。しかし、グルタチオンの初発生合成反応を触媒する glutamate-cysteine ligase のオルソログ（SCO0910）が存在する。そこで SCO0910 遺伝子、およびクラスターを成すと考えられる SCO0911、SCO0912、SCO0913 の機能解析を試みた。

【方法と結果】SCO0910 の組換え酵素を調製し、in vitro assay を行った結果、予想通り glutamate-cysteine ligase 活性を検出できた。しかし、生成物である γ-glutamyl cysteine と組換え SCO0911、SCO0912、SCO0913 を反応させても生成物は認められなかった。本実験結果が得られたころ、*Mycobacterium smegmatis* のエルゴチオネイン(ERG) 生合成遺伝子を同定した報告がなされた（J. Am. Chem. Soc., 132:6632, 2010)。比較検討した結果、SCO0911、SCO0912、SCO0913 は、それらのオルソログであると推定された。そこで、SCO0910 遺伝子の破壊を行った結果、ERG 生産能が消失したことから、本クラスターは ERG 生合成に関与することが解った。

放線菌や *Mycobacterium* 属細菌は、抗酸化物質として大腸菌などが使うグルタチオンではなく、ERG とマイコチオール（MSH）を用いることが報告されている。そこで、どちらがより抗酸化作用があるのか調べるため、MSH 非生産株（MSH 生合成遺伝子欠損株）も構築し、各種酸化剤や抗生物質に対する感受性の違いを調べた。その結果、ERG 非生産株では、感受性が増大し、特に過酸化水素に対する感受性が増加した。以上の結果から、*S. coelicolor* では、抗酸化剤として ERG が重要であると示唆された。



ERG



MSH

Ergothioneine, Mycothiol, *Streptomyces coelicolor*

講演番号：2A04p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 04 会場

アミノ酸キャリアタンパク質を介して生合成される新規アミノ酸とその代謝産物の同定
Identification of a novel amino acid and metabolites biosynthesized using amino acid carrier protein.
○長谷部 文人[1]、富田 武郎[1]、高 ひかり[2]、藤村 務[2]、西山 千春[3]、葛山 智久[1]、西山 真[1]([1]東大・生セ、[2]順天堂大・医・研究基盤センター、[3]順天堂大・医・アトピー疾患研究センター)
○ Fumihito HASEBE[1], Takeo TOMITA[1], Hikari TAKA[2], Tsutomu FUJIMURA[2], Chiharu NISHIYAMA[3], Tomohisa KUZUYAMA[1], Makoto NISHIYAMA[1] ([1]Biotechnol. Res. Ctr.,Univ. Tokyo, [2]Division of Biochemical Analysis, Central Laboratory of Medical Sciences, Juntendo University School of Medicine, [3]Atopy (Allergy) Research Center, Juntendo University School of Medicine)

【目的】一般に細菌はジアミノピメリン酸を経てリジンを生合成することが知られているが、*Thermus thermophilus*は細菌でありながらα-アミノアジピン酸(AAA)を経由してリジンを生合成する。この生合成の後半(AAAからリジンへの変換)はアルギニン生合成におけるグルタミン酸からオルニチンへの変換に似ているものの、生合成中間体のα-アミノ基をLysWタンパク質のC末端のグルタミン酸残基で保護したのちに、酵素群LysXZYJKによる反応が進行することが我々のグループにより明らかになっている。一方、放線菌*Streptomyces sahachiroi* が生産する抗腫瘍化合物であるAzinomycin Bの生合成遺伝子クラスター中に*lysWXZYK*ホモログ遺伝子が存在し、これらがazabicyclic ring骨格を有するアミノ酸骨格の生合成に関わることが示唆されている。さらに最近多数の放線菌ゲノム上に類似クラスターが発見され、アミノ酸キャリアタンパク質を利用する新規なシステムが多くの二次代謝化合物の生合成に関わることが示唆された。本研究では、放線菌*Streptomyces* sp. SANK 60404（以下SANK 60404株）を用い、LysWホモログが関わる二次代謝産物の生合成についての研究を行った。これまでに、我々はSANK 60404株の有するLysWホモログが構造未知の化合物の生合成に関わることを明らかにし、この生合成に必要な遺伝子の同定と共に、大腸菌を用いた異種生産に成功している。今回はこの新規化合物の構造決定を行い、さらにこれを中間体として生合成される天然化合物の同定を試みた。

【方法と結果】大腸菌を用いて異種生産させた未知化合物を陽イオン交換カラムおよび逆相カラムを用いて精製し、これをNMRにより分析した。この結果、この未知化合物が(2,6)diamino-(5,7)dihydroxy-heptanoic acid(DADH)であり新規アミノ酸であることが明らかとなった。さらに有機修飾と新モッシャー法およびNMRデータを用いて、この化合物の絶対立体配置を決定し、(2*S*,6*S*)diamino-(5*R*,7)dihydroxy-heptanoic acidであることを明らかにした。SANK 60404株において、DADHを中間体として生合成される天然化合物を同定するために、野生株およびLysKホモログ破壊株を5日間培養した。培養濾液をLC-MSに供した結果、*lysK*ホモログ破壊株において、化合物<compound Y>の生産が消失することを見出した。この化合物の生産は*lysK*ホモログ破壊株の培養液にDADHを添加することにより回復したことから、compound Yは新規アミノ酸を生合成中間体とする天然化合物であると考えられる。本大会ではこの構造も発表する予定である。

Carrier protein, biosynthesis, secondary metabolite

講演番号：2A04p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 04 会場

アミノ基結合型キャリアタンパク質を指標とした新規天然化合物の探索

Screening of secondary metabolites biosynthesized with novel amino acid carrier protein system

○松田 研一[1]、長谷部 文人[1]、富田 武郎[1]、志波 優[2]、吉川 博文[2]、新家 一男[3]、葛山 智久[1]、西山 真[1] ([1]東京大学、[2]東京農業大学、[3]産業技術総合研究所)
○ Kenichi MATSUDA[1], Fumihito HASEBE[1], Takeo TOMITA[1], Yuh SHIWA[2], Hirofumi YOSHIKAWA[2], Kazuo SHIN-YA[3], Tomohisa KUZUYAMA[1], Makoto NISHIYAMA[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]AIST)

【目的】高度好熱菌 *Thermus thermophilus* はアミノ基結合型のアミノ酸キャリアタンパク質 LysW を介したユニークなアミノ酸変換システムによりリジンを生合成している。古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* においては類似のシステムによりリジン生合成だけでなくアルギニン生合成も行われており、同システムが多くの生物種に広く存在していることが明らかになりつつある。同システムは複数の放線菌のゲノム中にも見いだされており、中でも *Streptomyces* sp. SANK60404 において二次代謝産物の中間体となる新規アミノ酸 DADH ((2*S*,6*S*)diamino-(5*R*,7)dihydroxy-heptanoic acid)を生産していることが明らかにされた。本研究では同システムのキャリアタンパク質遺伝子ホモログを有する菌株の探索を通してその分布及び多様性を調べ、同ホモログを介したシステムにより生産される多様な天然化合物を探索した。

【方法と結果】*Streptomyces* sp. SANK60404 のアミノ酸キャリアタンパク質ホモログに対して設計したプライマーを用いて 846 株の放線菌ゲノムライブラリーの PCR スクリーニングを行った結果、24 株が同ホモログを有していることが示唆された。このうち 17 株のドラフトゲノムシークエンス解析を行い、同ホモログの周辺領域を解析した。その結果、全ての株において DADH の生産に必要な遺伝子(*lysWXYZK, transketolase* 及び *transaminase*)のホモログが共通して存在していた。しかしその一方、それ以外の周辺遺伝子は菌株間で多様であり、複数の NRPS や PKS が見出された。これらの結果からアミノ酸キャリアタンパク質を含む遺伝子クラスターは多様な構造を持つ二次代謝産物の生産に関わっていることが示唆され、またそれらの生合成には DADH が共通の中間体として用いられることが示唆された。このうち一株について予想生合成遺伝子を含む約 40 kb の領域をクローニングし、異種放線菌に導入したところ、この形質転換体は新規化合物 X を生産した。また、導入する遺伝子領域を約 70 kb に拡大したところ、この形質転換体では X の生産は消失し、同様な骨格を有すると推定される新たな化合物 Y を生産した。現在これらの化合物の化学分子構造の決定を行っている。

Carrier protein, Secondary metabolite, Actinomycetes

講演番号：2A04p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 04 会場

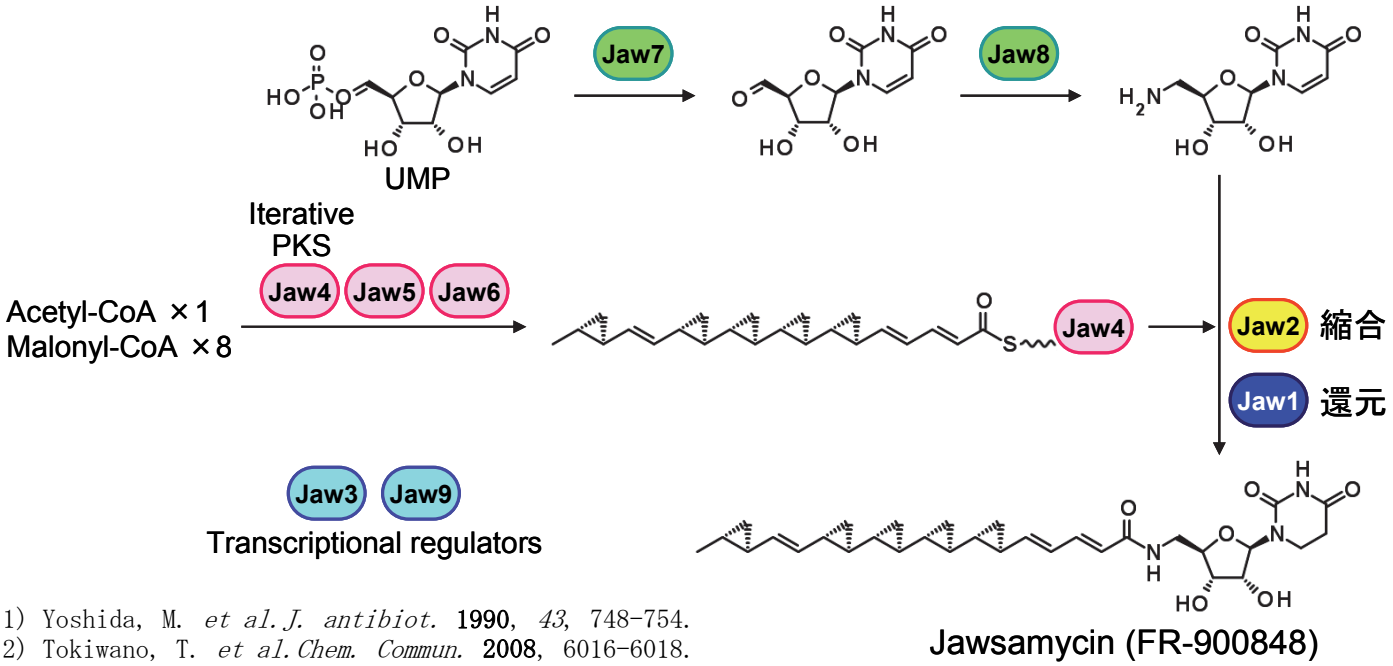
Jawsamycin 生合成経路およびシクロプロパン導入機構の解明

Studies of jawsamycin biosynthetic pathway and the cyclopropanation mechanism

○平塚 知成、鈴木 秀聡、仮屋 遼、清尾 崇、南 篤志、及川 英秋 (北大院理)
○Tomoshige HIRATSUKA, Hideaki Suzuki, Ryo Kariya, Takashi Seo, Atsushi Minami, Hideaki Oikawa (Hokkaido Univ.)

【目的】Jawsamycin (FR-900848) は 放線菌 *Streptoverticillium fervens* HP-891 により生産される抗真菌性二次代謝産物であり、その特徴的なポリシクロプロパン骨格の生合成機構に興味が持たれている．本研究では jawsamycin 生合成経路およびシクロプロパン導入機構の解明を目的とする．

【方法・結果】Jawsamycin の脂肪酸部は安定同位体の取り込み実験より、ポリケチド合成酵素(PKS)により構築されることが明らかになっている．そこで PKS および核酸修飾酵素遺伝子を含むクラスターを指標に *S. fervens* HP-891 のドラフトシークエンス解析を行い、jawsamycin 生合成遺伝子クラスター候補を選抜した．コロニーハイブリダイゼーション法を用いて生産菌ゲノムライブラリーより候補クラスターを含むコスミドを取得し、*Streptomyces lividans* TK23 を宿主とした異種発現を行った結果 jawsamycin の生産が確認された．次いで行った遺伝子破壊/相補実験により jawsamycin 生合成遺伝子クラスター(*jaw1* - *jaw9*)を確定した．さらに各遺伝子の機能解析を行うことで以下の jawsamycin 生合成経路を明らかにした．



1) Yoshida, M. *et al. J. antibiot.* **1990**, *43*, 748-754.
2) Tokiwano, T. *et al. Chem. Commun.* **2008**, 6016-6018.

natural product biosynthesis, polyketide, antibiotics

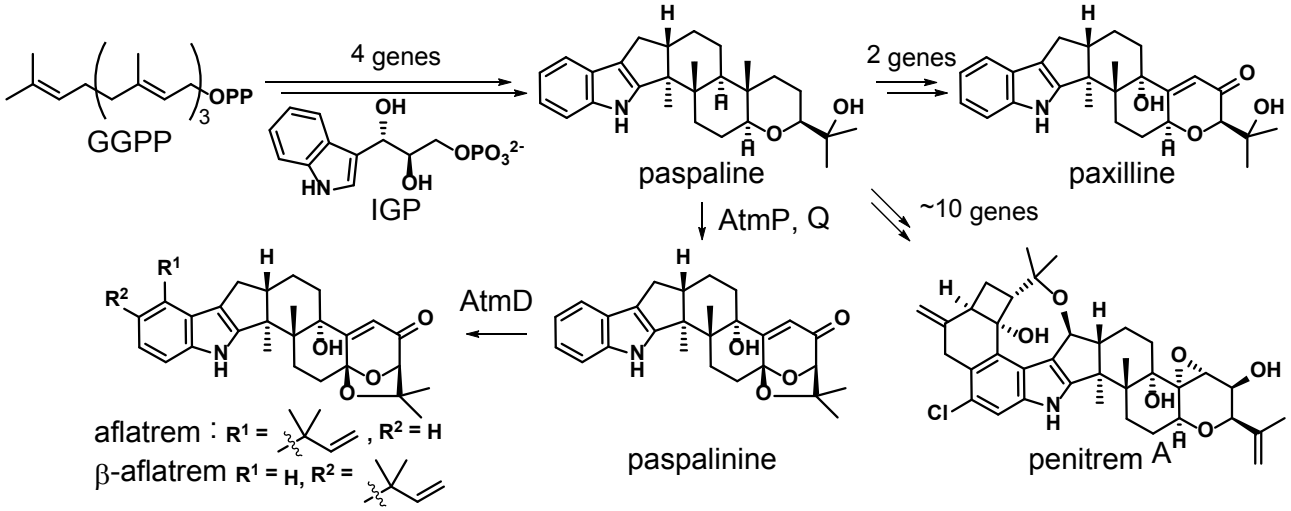
講演番号：2A04p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 04 会場

麹菌異種発現系を利用した、インドールジテルペン類の迅速な酵素合成
Biosynthetic study of indole-diterpenes

○田上 紘一[1]、南 篤志[2]、松本 知之[1]、五味 勝也[3]、大利 徹[4]、及川 英秋[2]（[1]北大院総化、[2]北大院理、[3]東北大院農、[4]北大院工）
○Koichi Tagami[1], Atsushi Minami[2], Tomoyuki Matsumoto[1], Katsuya Gomi[3], Tohru Dairi[4], Hideaki Oikawa[2]（[1]Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido Univ., [2]Graduate School of Science, Hokkaido Univ., [3]Graduate School of Agricultural Science Faculty of Agriculture, Tohoku Univ., [4]Graduate School of Engineering, Hokkaido Univ.）

【目的】paxilline に代表されるインドールジテルペンは、糸状菌が生産する代表的なマイコトキシンである。インドール基質に対してポリプレニル鎖 (C20) が導入された本化合物群は、環化様式や酸化等の修飾により多様性が創出される。我々は昨年度の本会で、麹菌 *Aspergillus oryzae* NSAR1 株を用いた異種発現系を利用し、paspaline の詳細な生合成機構の解明と paxilline の酵素的全合成を報告した。その際、２種の酸化酵素遺伝子 (*paxP, Q*) をそれぞれ同種のベクター (pUNA) に組み込んだプラスミドを構築し、同時に導入する手法を確立した。今回我々は同様の手法を用いることで、aflatrem, penitrem の迅速な生合成解析・酵素的全合成を試みた。

【方法・結果】本研究を始めるにあたり、まず４種の酵素によって生合成される、共通中間体 paspaline の迅速な酵素合成を試みた。２箇所の Promoter・Terminator 部を有するベクター (pUARA2) に生合成遺伝子を２種類ずつ組み込み (pUARA2-*paxG* /*C*, pUARA2-*paxM* /*B*)、麹菌へ同時に導入した。その結果、40 mg / kg の paspaline を生産する形質転換株の取得に成功した。さらに paspaline 生産株に対し、同様の手法を用いて、aflatrem 生合成に関与する３種の生合成遺伝子 (*atmP*, *Q*, *D*) を導入した。その結果、２種の酸化酵素遺伝子 (*atmP, Q*) を導入した株では中間体 paspalinine を、さらにプレニル基転移酵素遺伝子 (*atmD*) を導入した株では aflatrem, β-aflatrem をそれぞれ単離した。以上より、わずか２回の形質転換で天然物の酵素的全合成を達成した。現在本手法を応用し、paspaline から 10 個程度の酵素遺伝子を要する penitrem の生合成についても機能解析を進めている。



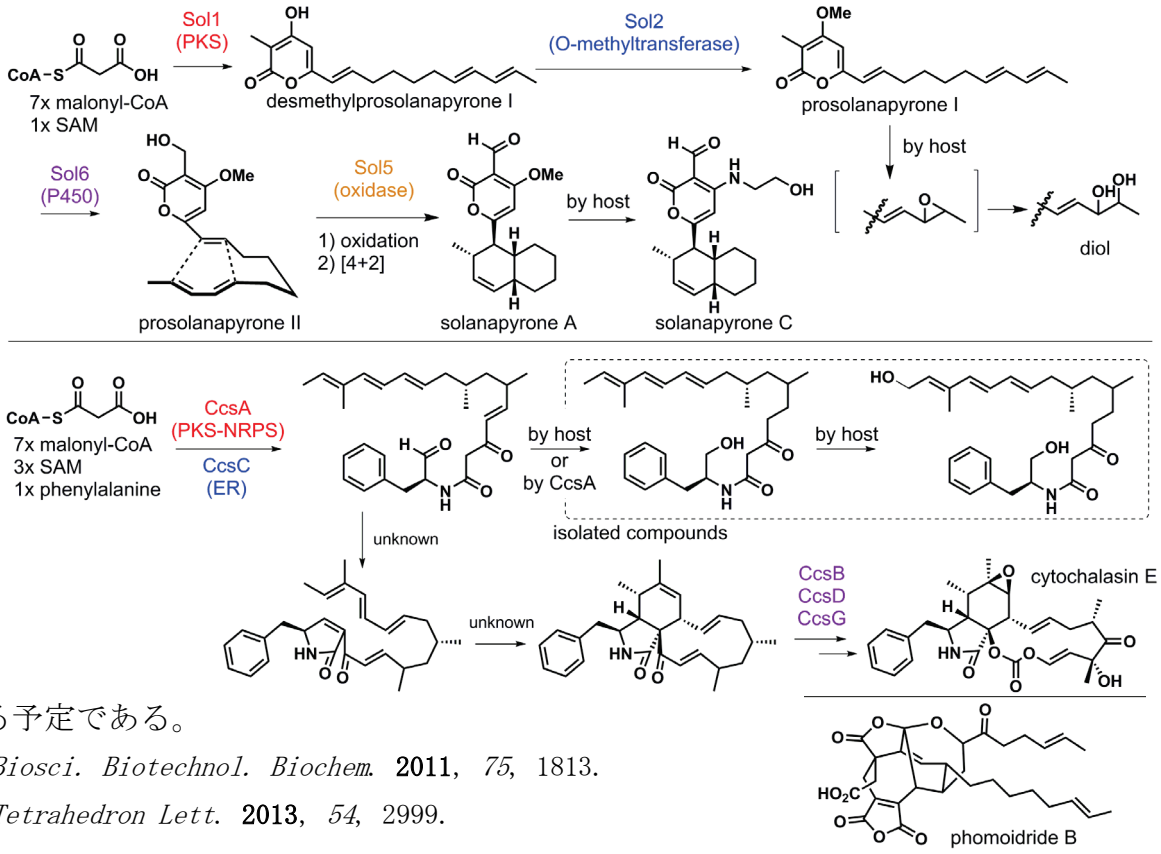
biosynthesis, Indole-diterpene, heterologous expression

講演番号：2A04p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ A 校舎 04 会場

糸状菌ポリケタイド化合物の異種生産
Heterologous production of bioactive fungal polyketides

○藤居 瑠彌[1]、南 篤志[1]、五味 勝也[2]、藤井 勲[3]、及川 英秋[1] ([1]北大院理、[2]東北大院農、[3]岩手医大薬)
○Ryuya FUJII[1], Atsushi MINAMI[1], Katsuya GOMI[2], Isao FUJII[3], Hideaki OIKAWA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Tohoku Univ., [3]Iwate Medical Univ.)

糸状菌の生産する天然物には、新規薬剤候補が多数存在する。その中でも糸状菌ポリケタイドは、繰返し型ポリケタイド合成酵素(PKS)のもつ修飾ドメインの制御により、多様な酸化度をもつ鎖状中間体を経由する。この制御機構は大変興味深い。我々はこれまで、麹菌異種発現系を用い、数種の天然物の酵素的全合成を達成してきた[1),2)]。本研究では、PKS の生合成機構を調査する第一段階として、ソラナピロン類(SP)およびサイトチャラシン E(CCL)、そしてフォモイドライド B(PHI)の酵素的合成に着手した。SP の場合、PKS のほか修飾酵素を含めた 4 種の遺伝子を順次導入し、天然物に加えて全ての生合成中間体を良好な収量で合成できた。次いで CCL についても検討し、PKS-NRPS と独立した 1,4-還元酵素(ER)ドメインを発現することで、予想するアシル鎖中間体の還元体を捕捉することに成功した。この過程で、宿主の酵素が鎖状中間体の末端に位置するオレフィン部を酸化した化合物の生成が問題になった。現在、これらの他に、PHI 生産菌のドラフトゲノムデータから推定した遺伝子クラスター情報を基に、各酵素遺伝子の機能解析を行っているので、その結果も報告する予定である。



1) Fujii R. *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75*, 1813.
2) Fujii R. *et al. Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2999.

biosynthesis, secondary metabolite, polyketide

講演番号：2A04p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ A 校舎 04 会場

糸状菌メロテルペノイド anditomin の生合成機構解明

Biosynthetic Studies on Fungal Meroterpenoid Anditomin

○松田 侑大、淡川 孝義、阿部 郁朗（東大院薬）
○Yudai MATSUDA, Takayoshi AWAKAWA, Ikuro ABE (Univ. of Tokyo)

【背景】

メロテルペノイドとは、テルペノイドの部分構造を有する化合物の総称であり、糸状菌からは構造多様性ならびに生物活性に富む多数のメロテルペノイドが報告されている。なかでも、3,5-dimethylorsellinic acid (DMOA) に由来するメロテルペノイドにはとりわけ大きな構造多様性が見られ、特異な分子構造を有する化合物も少なくない。DMOA 由来メロテルペノイドのひとつであり、*Aspergillus variecolor* の産生する anditomin は、ビシクロ[3.2.2]ノナン骨格を有する化合物であり、この特異な架橋構造は、分子内 Diels-Alder 反応を経て生合成されると予想されている。これまでに、種々の標識化合物を用いた生合成研究が行われてきた一方で、anditomin の生合成遺伝子は全く明らかになっていない。今回我々は、anditomin 生合成遺伝子の探索ならびにその機能解析による、Diels-Alder 反応を担う酵素（Diels-Alderase）の同定、ひいては生合成の全容解明を目指した。

【方法・結果】

まず、anditomin 生産菌のドラフトゲノムシーケンス解析により、13 遺伝子からなる推定生合成遺伝子クラスターを見出した。メロテルペノイドの生合成は一般に、ポリケタイド合成酵素やテルペン環化酵素などによる“基本骨格構築反応”と種々の酸化酵素などによる“修飾反応”の 2 つに大別される。推定生合成遺伝子群を精査したところ、5 つの遺伝子が基本骨格構築に寄与するものと予想された。そこで、これら 5 つの遺伝子を異種糸状菌 *Aspergillus oryzae* にて発現させたところ、導入遺伝子特異的に、順次新たな化合物が検出された。得られた新規代謝物を単離精製後、各種スペクトル解析により、構造決定を行ったところ、5 遺伝子導入時特異的に生成した化合物（化合物 **1**）が、当初の予想に反し、五環性の分子骨格を有することが明らかとなった。本化合物が anditomin 生合成の中間体であるか否かを検討するとともに、修飾酵素遺伝子群の機能を明らかにすべく、遺伝子クラスターのコードする 6 つの修飾酵素群の異種発現系を別途構築し、ここに化合物 **1** を投与した。その結果、化合物 **1** が新たな代謝物へと変換されることが判明し、現在、本化合物の構造決定を進めている。加えて、6 つの修飾酵素群のうちひとつだけを欠いた発現系もそれぞれ構築し、そこに化合物 **1** を投与後、代謝物を分析することで、各修飾酵素の機能解明を進めており、これらの結果についても合わせて報告したい。

fungal meroterpenoids, natural product biosynthesis, biosynthetic enzymes

講演番号：2A04p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ A 校舎 04 会場

メロテルペノイド terretonin 生合成に関わる修飾酵素群の機能解析
Functional analysis of the tailoring enzymes involved in the biosynthesis of a meroterpenoid terretonin
○岩渕 大輝、松田 侑大、淡川 孝義、阿部 郁朗（東大院薬）
○Taiki IWABUCHI, Yudai MATSUDA, Takayoshi AWAKAWA, Ikuro ABE (Univ. of Tokyo)

【背景】
Aspergillus terreus の生産する terretonin はポリケタイドと farnesyl 基由来のテルペノイドからなる特異なハイブリッド型化合物（メロテルペノイド）である。糸状菌由来メロテルペノイドの中には様々な生物活性を示すものが存在しており，たとえば pyripyropene A は acyl-CoA cholesterol acyltransferase（ACAT）阻害剤として，andrastin A は protein farnesyltransferase 阻害活性に加え抗癌剤 vincristine 耐性細胞の耐性克服活性も有する薬学的に興味深い化合物として知られている。Terretonin を含むこれら糸状菌由来メロテルペノイドの多くはしばしば共通の中間体である 3,5-dimethylorsellinic acid（DMOA）を経由して続く生合成過程でその構造多様性や生物活性に寄与する種々の修飾反応を受ける。すでに，terretonin 生合成遺伝子クラスターが *Aspergillus terreus* NIH2624 株のゲノムから同定されており，生合成経路については遺伝子破壊や生合成酵素の異種発現などによってその大部分が明らかにされている。しかし，terretonin 生合成における特徴的な反応である D 環の環拡大反応については，そのメカニズムが推定されているものの，反応に関与する酵素や反応機構はいまだ未解明である。また，terretonin 生合成への関与が判明している酵素群のうち，Trt6（P450），Trt7（non-heme iron-dependent dioxygenase），Trt14（hypothetical protein）の 3 つについては，その触媒機能が不明である。我々は，terretonin 生合成を異種糸状菌 *Aspergillus oryzae* にて再構築することにより，本環拡大反応のメカニズムならびに terretonin 生合成の全容解明を目指した。
【方法・結果】
今回我々は，遺伝子破壊実験により terretonin 生合成への関与が判明している酵素群のうち，Trt9（short chain dehydrogenase），Trt3（FAD-dependent monooxygenase）および Trt6 の発現系を構築した後，5 つの酵素群によって生合成される中間体 preterretonin A を投与した。その結果，生成が期待された生合成中間体 preterrenoid，terrenoid および Trt6 特異的産物と推定される化合物を検出した。LC-MS の結果から Trt6 は terrenoid を基質とした水酸基の付加によって環拡大反応に関与することが予想された。現在，これら化合物の構造決定を行うとともに，他の生合成関連酵素 Trt7，Trt14 を含む発現系を構築し，各酵素の機能解析を進めている。

meroterpenoid, *A.oryzae*, heterologous expression system

講演番号：2A04p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ A 校舎 04 会場

糸状菌 *Aspergillus niger* 由来 PKS-NRPS 遺伝子クラスターの強制発現

Expression of a PKS-NRPS gene cluster in *Aspergillus niger* by using a transcriptional activator

○淡川 孝義、楊 小龍、脇本 敏幸、阿部 郁朗（東大院薬）
○Takayoshi Awakawa, Xiao-Long Yang, Toshiyuki Wakimoto, Ikuro Abe (Tokyo Univ.)

【背景】糸状菌*Aspergillus niger*は９つのpolyketide synthase – non-ribosomal peptide synthase (PKS-NRPS)遺伝子を有するが、その全ての遺伝子クラスターの生成物は未同定である。よって、これら未知の生成物を同定することで、新規化合物、および生合成の知見が得られることが期待される。本研究では、そのうちの一つのPKS-NRPS遺伝子An11g00250 (*pynA*)を含む遺伝子クラスター(*pyn*クラスターと命名)に注目した。*Pyn*クラスターは正の転写因子である*pynR*遺伝子を含む。PynRはGAL4類似の転写因子であり、遺伝子クラスターに含まれる遺伝子全ての転写を誘導すると考えられた。また、*pyn*クラスターはflavin依存型酸化酵素 (PynB)、メチル基転移酵素(PynC)、P-450酵素(PynD)遺伝子を含むが、以上のPKS-NRPS遺伝子と修飾酵素遺伝子の組み合わせは生成物の報告例がなく、*pyn*クラスターは新規な化合物を生産することが期待された。本研究では、*pynR*を強制発現することによって*pyn*クラスターを活性化し、その生成物を取得することを目的として研究を行った。

【結果・考察】 *A. niger* ATCC 1015株にPEG-プロトプラスト法にて*pynR*上流に*gpdA* promoterを付加したベクターを導入し、グルコースを含む培地で形質転換体を培養して*pynR*を強制発現することで、*pyn*クラスターの生成物の検出を試みた。しかし、新たな生成物は得られず、RT-PCRの結果、グルコース存在下で*pynR*は転写されるものの、*pynA*は転写されないことが判明した。他の*Aspergillus*属の糸状菌において、二次代謝産物遺伝子はグルコース存在下、負の転写因子によって発現が抑制される例が報告されている。そこで同様に、*pyn*クラスターもグルコース存在下、転写が抑制されるのではないかと予想し、グルコース非存在化で転写誘導する*aga*プロモーターを*pynR*上流に挿入したベクターを構築し、再度*A. niger*へと導入して形質転換体を作製した。その結果、グルコースを含まない誘導培地でPynR発現株を培養することで、コントロールにはない、新たな化合物が生産されることが確認された。この化合物を大量調製し、NMR，MS分析に供することで、新規化合物pyranonigrin Eと同定した。また、RT-PCRによってPynR依存的に*pynABCD*が転写されていることを示し、これらのpyranonigirin E生合成への関与の可能性を示した。以上より、Pyranonigrin Eが、PynAによるpolyketide-peptide形成、PynBによる脱水素反応、PynCによるメチル基転移、PynDによる水酸化によって生合成される生合成経路を提唱した[1]。

1. Awakawa, T., Yang, X. L., Wakimoto, T., Abe, I. Pyranonigrin E: A PKS-NRPS hybrid metabolite from *Aspergillus niger* identified by genome mining. (2013) 14, 2095-2099.

PKS-NRPS, filamentous fungi, transcriptional factor

講演番号：2A04p22
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ A 校舎 04 会場

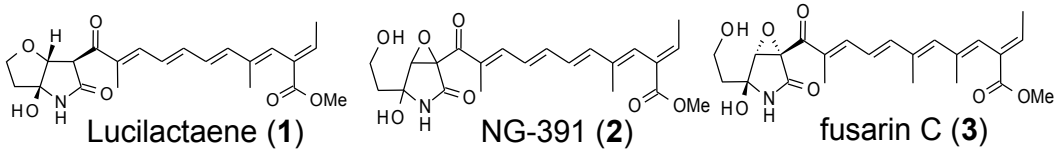
糸状菌 Fusarium sp. RK97-94 のルシラクタエン生合成遺伝子クラスターの解析

Functional Analysis of Lucilactaene Biosynthesis Gene Cluster of Producing Fungus Fusarium sp. RK97-94

○加藤 翔[1,2]、本山 高幸[1]、林 敏明[1]、廣田 洋[1]、鎌倉 高志[2]、長田 裕之[1]([1]理研・抗生物質、[2]東理大)
○Sho Kato[1,2], Takayuki Motoyama[1], Toshiaki Hayashi[1], Hiroshi Hirota[1], Takashi Kamakura[2], Hiroyuki Osada[1] ([1]RIKEN, Antibiotics Lab., [2]Tokyo Univ. Sci)

【目的】ルシラクタエン(**1**)は糸状菌 *Fusarium* sp. RK97-94 が生産する低分子化合物であり、がん抑制遺伝子 p53 不活化細胞で細胞周期阻害活性を示す。そのため、抗がん剤のリード化合物として注目され、生合成経路の解明が必要とされている。ルシラクタエン(**1**)生産菌は同時に類縁体 NG-391(**2**)を主要代謝物として生産し、その構造は Fusarin C(**3**)に酷似している。我々はルシラクタエン(**1**)と NG-391(**2**)の生合成に必須な PKS-NRPS 融合酵素遺伝子をクローニングし、その近傍に推定ルシラクタエン(**1**)生合成遺伝子クラスターが存在することを明らかにしている。遺伝子クラスター内にはメチル基転移酵素(Luc1)、P450(Luc2)、脱水素酵素(Luc3)、トランスポーター(Luc4)、PKS-NRPS 融合酵素(Luc5)、エステル分解酵素(Luc6)、翻訳伸長因子(Luc7)、プロテアーゼ(Luc8)をコードすると予想される遺伝子群が存在することを明らかにしている。前年度本大会において Luc1 と Luc4 の機能を解析し、ルシラクタエン(**1**)生合成経路を推定していたが、今回は Luc2, 3, 6, 7, 8 の機能を解析しルシラクタエン(**1**)生合成経路全体を推定した。

【方法と結果】*luc2, 3, 6, 7, 8* 破壊株を作製し、ルシラクタエン(**1**)生産培地で培養し代謝物を解析した。*luc2*、*luc3* 破壊株ではルシラクタエン(**1**)と NG-391(**2**)の生産性は共に確認されず、類縁体と推定される微少な生産ピークは確認されたが構造解析までは至らなかった。*luc6* 破壊株ではルシラクタエン(**1**)と NG-391(**2**)の生産能を完全に失い、代謝中間体は確認されなかった。*luc7* 破壊株ではルシラクタエン(**1**)と NG-391(**2**)の生産性が著しく上昇したが、一方で *luc8* 破壊株ではルシラクタエン(**1**)と NG-391(**2**)の生産性は大幅に低下した。以上よりルシラクタエン(**1**)の生合成に必須である遺伝子は *luc1*、*2*、*3*、*5*、*6* であり、*luc7* はルシラクタエン(**1**)の生合成全体を負に制御し、*luc8* は正に制御していることが示唆された。Luc5 と 6 が基本骨格形成、Luc2 と 3 がカルボン酸形成、Luc1 がカルボン酸のメチル化に関与していると推定している。Fusarin C 生合成に必要なのは *luc1*、*2*、*5*、*6* のオルソログであり、生合成経路の違いが示唆された。また、各遺伝子破壊株において各遺伝子の発現量を解析したところ、遺伝子のサイレンシングが起きている株が確認され、その可能性が示唆された。

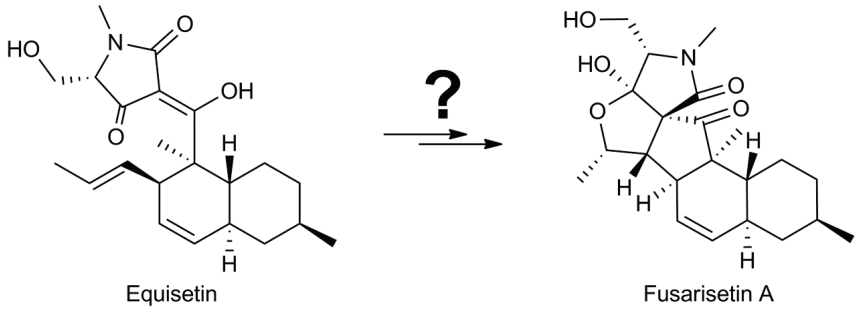


secondary metabolism, mycotoxin, silencing

講演番号：2A04p23
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ A 校舎 04 会場

糸状菌 *Fusarium* sp. FN080326 株由来フサリセチン A 生合成遺伝子クラスターの解析
Analysis of fusarisetin A biosynthetic gene cluster of *Fusarium* sp. FN080326
○加藤 直樹[1]、JANG Jun-Pil[2]、JANG Jae-Hyuk[2]、高橋 俊二[1]、AHN Jong Seog[2]、長田 裕之[1]([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]韓国生命工学研究院)
○Naoki KATO[1], Jun-Pil JANG[2], Jae-Hyuk JANG[2], Shunji TAKAHASHI[1], Jong Seog AHN[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]RIKEN CSRS, Chemical Biology, [2]KRIBB)

【目的】糸状菌 PKS-NRPS ハイブリッド酵素に由来する代謝産物は複雑かつユニークな化学構造を有しており，様々な生理活性を持った化合物が多数知られている．ほぼ同一のドメイン構成を有するハイブリッド酵素から放出される多様な構造の生合成中間体の多くは、修飾酵素の作用によりさらに複雑な構造に変換される．フサリセチン A(1)はがん細胞の形態形成を阻害する物質として *Fusarium* sp. FN080326 株より単離された代謝物であり，ユニークな五環性の新規炭素骨格を有する。PKS-NRPS ハイブリッド酵素に由来するテトラミン酸化合物であるエキセチン（2）は *Fusarium* 属糸状菌の代謝物として知られており、1 と共通する基本骨格を有していることから、2 が 1 の生合成中間体と予想されている。本研究では類縁体創製と活性化合物の高生産を目的に，フサリセチン生合成遺伝子クラスターの同定と、テトラミン酸化合物 2 からより複雑な環構造を有する化合物 1 への変換反応に関わる酵素遺伝子の機能解析を行ったので報告する。
【方法と結果】生産菌 FN080326 株のドラフトゲノム解析を行い，二次代謝関連遺伝子を探索した．その結果，他の糸状菌同様，多数の PKS ならびに NRPS 遺伝子が見いだされたが，PKS-NRPS ハイブリッド酵素遺伝子はゲノム中に 1 遺伝子のみであった．その周辺にはデカリン構造形成に関わるエノイルレダクターゼドメインタンパク質，メチル基転移酵素，C6 型転写活性化因子，シトクロム P450 遺伝子等，1 の生合成への関与が予想される遺伝子が存在しており，本遺伝子クラスターをフサリセチン生合成遺伝子（*fsa*）クラスターの候補として解析を進めることとした．*fsa* クラスターに唯一含まれるシトクロム P450 遺伝子 *fsa9* が 2 から 1 への変換を担う酵素遺伝子の有力候補であり，現在，遺伝学的アプローチにより本遺伝子の生合成への関与を検証するとともに，異宿主発現系を用いて機能解析を行っている．



Equisetin　　Fusarisetin A

secondary metabolite, *Fusarium*, cytochrome P450

講演番号：2A05a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ A 校舎 05 会場

昆虫類の化学コミュニケーションとヒト社会の科学コミュニケーション

Insect chemical communication and human science communcation.

○笹川 浩美[1,2,3] ([1](公財)科学技術館、[2](公財)国際科学振興財団、[3](学)跡見学園)
○Hiromi SASAGAWA[1,2,3] ([1]JSF, [2]FAIS, [3]Atomi-gakuen)

科学コミュニケーションプログラム「光の実験室～震災復興の光と光る生き物たち」を、企画提案し、実験＆トークショーを被災地(岩手県)で実施した。

ヒトは、科学と科学技術を使うことで便利な生活を手に入れ、今もなお進歩・発展を続けている。ヒトは動物の 1 種であり、言語によるコミュニケーションは必要不可欠である。ヒト社会で今必要なことの一つに「科学コミュニケーション(SC)」があげられる。SC は、新しい情報を正確に受け止め、正しく理解することで、自分の考えや行動するときの判断に役立つ。科学や科学技術 などの研究者や技術者による研究成果は、国民の理解を得る必要性が近年出てきた。一方、国民は、より良い生活を手に入れるため、科学や科学技術に対する正確な知識と理解、すなわち各人の科学リテラシーを向上させる必要が出てきた。特に東日本大震災後の日本では、必須である。研究者・技術者と国民とをつなぐ架け橋には、双方型の科学コミュニケーションが有効である。科学コミュニケーションには、豊富な正しい知識とヒトの創造力が必要である。動物社会の化学コミュニケーションに関する研究成果は、ヒト社会の科学コミュニケーション(SC)に応用することで、科学と科学技術を文化に発展させることが可能である。ここでは、光を操る生き物たちを題材にして、双方向型の科学コミュニケーションプログラムを立ち上げた。作成した SCP は、2014 年 6～8 月に岩手県立博物館で開催された震災復興支援プログラムの 1 つとして開催された。

「生物の環境適応～光を操る生き物とヒトの科学技術が共存できる地球環境とは？～」.【目的】国民の科学リテラシー向上を目指す目的で,一般と研究者を繋ぐ,研究者による双方向型の科学コミュニケーション(SC)プログラム(SCP)を,農芸化学の視点から開発し,博物で実施した. 【方法・結果】本SCPの対象は幼児～成人, 研究成果や科学技術を活用し, 実物の提示や発光実験を行い, 約30分間の直接対話型・体験型に開発した. 会場は, 大型スクリーン・明暗制御可能な階段教室(講堂)を使用した. 実験・解説の後, 参加者は,特別展を鑑賞し, 終了時はアンケート調査に答えた. 実施は4回, 参加者は160名. 扱った項目は,発光・LED・電球・発光生物・光を操る生物種・宇宙からみた地球の夜・生物多様性・科学技術・ケミカルライト・蛍光・GFP化学コミュニケーション等. 暗闇の体験はプログラムから削除した。「生物種の知恵をヒトは科学技術へ活用. ヒトを含め光を操る種と科学技術が共存を考える」SCは成功し、 SCPは完成した。【謝辞】藤井千春博士・池谷治義氏・菅野治虫氏・大場裕一博士・提髪玲子博士・小林直樹博士・代島慶一氏・豊田倫子女史ら、各位へ御礼申し上げる.

chemical communication, science communication, social behavior

講演番号：2A05a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ A 校舎 05 会場

バンウコンからの PPARγアンタゴニスト変換活性物質の同定及び推定結合様式の解析

Identification of a PPARγ antagonist-converting substance from *Kaempferia galanga*

○宮前 友策[1]、吉田 光多郎[1]、大寺 杏奈[1]、仲井 奈緒美[1]、王 健一[2]、秋田 徹[3]、前嶋 一宏[3]、増田 誠司[1]、神戸 大朋[1]、森 直樹[4]、入江 一浩[4]、永尾 雅哉[1]([1]京大院生命、[2]京大農、[3]日本新薬、[4]京大院農)

○YUSAKU MIYAMAE[1], KOTARO YOSHIDA[1], ANNA OHTERA[1], NAOMI NAKAI[1], JIAN-YI WANG[2], TOHRU AKITA[3], KAZUHIRO MAEJIMA[3], SEIJI MASUDA[1], TAIHO KAMBE[1], NAOKI MORI[4], KAZUHIRO IRIE[4], MASAYA NAGAO[1] ([1]Kyoto Univ. Biol., [2]Kyoto Univ., [3]Nippon Shinyaku, [4]Kyoto Univ. Agric.)

【目的】核内受容体 PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) γ は生体内において脂質、糖代謝、炎症などに関与する重要な因子である。その合成リガンドであるチアゾリジン誘導体は、抗糖尿病薬として臨床で用いられてきたが、体重増加、浮腫、心疾患などの副作用の問題で処方中止になりつつある。演者らはこれらに代わる新規リガンドを天然物より探索する過程で、バンウコン（*Kaempferia galanga*）根茎のメタノール抽出物に、「PPARγ のアンタゴニストである GW9662 の活性をアゴニスト様の活性に変換する作用（以下 PPARγ アンタゴニスト変換活性）」があることを見出した。本研究ではバンウコン根茎メタノール抽出物からの PPARγ アンタゴニスト変換活性物質の単離、同定、並びにドッキングスタディによる推定結合部位の予測を行った。

【方法及び結果】PPARγアンタゴニスト変換活性は、ヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞に Gal4 DNA 結合ドメイン/PPARγ リガンド結合ドメインキメラ分子と、Gal4 の標的配列を上流に接続したルシフェラーゼレポーターを用いたアッセイ系において、PPARγ アンタゴニストである GW9662 存在下でルシフェラーゼ活性が増加することを指標として評価した。バンウコンの乾燥体 2 kg のメタノール抽出物を二層分配し、酢酸エチル及び水層を得た。このうち、PPARγアンタゴニスト変換活性が見られた酢酸エチル層を種々のクロマトグラフィーを用いて分画した結果、活性物質として *p*-methoxy cinnamic acid ethyl ester (pMCAEE)を同定した。pMCAEE は、単独でのアゴニスト活性は弱いが、GW9662 を共処理することで濃度依存的にアゴニスト活性が増加した。また、本化合物は、GW9662 以外の他のアンタゴニストに対しては変換活性を示さなかったことから、本現象には GW9662 による PPARγ-LBD (ligand-binding domain)の Cys285 への共有結合が重要であることが示唆された。詳細な結合様式を解析するため、Molegro Virtual Docker（MVD）を用いて推定結合様式を予測した。PDB に登録されている hPPARγ-LBD と GW9662 の複合体結晶構造データ (PDB code: 3B0R)に、pMCAEE をドッキングさせた結果、pMCAEE はチアゾリジンなどの従来のアゴニストが結合する AF-2 ポケットではなく、Ω-ループ近傍のサブポケットに結合することが予測された。また、pMCAEE のメトキシ基の酸素原子と PPARγ-LBD の Ser342 との間に水素結合の存在が予測されたため、pMCAEE のメトキシ基がヒドロキシル基に置き換わったクマル酸エチルの変換活性を検討したところ、pMCAEE よりも強い活性を示した。さらに、同様にΩ-ループに結合することが知られるルテオリンでも、GW9662 に対するアンタゴニスト変換活性が見られ、MVD により pMCAEE と類似の結合様式が予測された。

PPARγ, GW9662, molecular docking study

講演番号：2A05a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ A 校舎 05 会場

PPARγアンタゴニスト変換活性物質による脂肪蓄積抑制機構の解析

Inhibitory effect of a PPARγ antagonist-converting substance on lipid accumulation in 3T3-L1 cells

○大寺 杏奈、宮前 友策、大泉 宏、垣塚 彰、増田 誠司、神戸 大朋、永尾 雅哉（京都大院生命）
○Anna OHTERA, Yusaku MIYAMAE, Hiroshi OHIZUMI, Akira KAKIDUKA, Seiji MASUDA, Taiho KAMBE, Masaya NAGAO (Kyoto Univ.)

【目的】核内受容体 PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) γは生体内において脂質代謝、糖代謝に関与する重要な転写因子である。演者らは、新たな PPARγリガンドを天然由来成分より探索する過程で、*Kaempferia galanga* L.の抽出物から不可逆的な PPARγアンタゴニストである GW9662 の活性をアゴニスト様に変換するユニークな生理活性を有する化合物である桂皮酸誘導体 *p*-methoxy cinnamic acid ethyl ester (pMCAEE) を同定した。またドッキングスタディから、両化合物がチアゾリジンなどの従来のアゴニストが結合する AF-2 領域ではなく、Ωループ近傍のポケットに結合することを示唆する結果を得た。これらの解析により、両化合物共処理による外因性 PPARγの活性化は明らかとなったが、内在性 PPARγへの影響は明らかにされていない。そこで本研究では、内在性 PPARγが脂肪細胞分化の主要制御因子であることに着目し、両化合物による脂肪細胞分化および脂質代謝に対する影響について解析することとした。
【方法及び結果】マウス由来線維芽細胞株 3T3-L1 を脂肪細胞に分化誘導後、サンプル投与し、脂肪滴を Oil Red O 法によって染色した。その結果、チアゾリジン誘導体では脂肪細胞への分化促進並びに脂肪蓄積が見られた一方で、GW9662 と pMCAEE 共処理下では興味深いことに脂肪の蓄積が顕著に抑制されていた。GW9662 及び pMCAEE 単独の処理ではこのような活性は見られなかった。この現象が細胞内のエネルギー代謝亢進に起因するかを検証するため、フラックスアナライザーを用いた解析を行った。その結果、両化合物を共処理した細胞内において基礎呼吸量が増加する傾向が観察された。近年、PPARγを含む種々の核内受容体活性化により、細胞内エネルギー代謝、及び脂肪燃焼が促進されることが報告されている。そこで、他のエネルギー代謝に関わる核内受容体に対する影響の有無をレポーターアッセイ系によって検討したところ、両化合物は PPARα及び PPARγに対してアゴニスト活性を示した。よって両化合物による脂肪蓄積抑制活性が、どちらの PPAR サブタイプに起因するかを検証するため、PPARα及びγをノックダウン（KD）した細胞を用いてこれらの現象が緩和されるか検討した。その結果、両化合物による脂肪蓄積の抑制が、PPARα KD では部分的に緩和された一方で、PPARγKD でより強く緩和される傾向が得られた。以上の結果は、GW9662 および pMCAEE は PPARγに作用し、エネルギー消費を亢進させ、脂肪蓄積を抑制することを示唆する。PPARγ制御下の各遺伝子の発現変動については現在解析中である。

PPARγ, lipid metabolism, 3T3-L1 cells

講演番号：2A05a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ A 校舎 05 会場

抗線維化物質テトランドリンによるオートファジー経路制御機構の解明

Tetrandrine, an anti-fibrotic substance, regulates autophagic pathway in hepatic stellate cells

○西藤 有希奈[1]、宮前 友策[1]、仲井 奈緒美[1]、Han Junkyu[2]、礒田 博子[2]、増田 誠司[1]、神戸 大朋[1]、入江 一浩[3]、永尾 雅也[1] ([1]京大院・生命、[2]筑波大・生命環境、[3]京大院・農)
○Yukina NISHITO[1], Yusaku MIYAMAE[1], Naomi NAKAI[1], Junkyu Han[2], Hiroko ISODA[2], Seiji MASUDA[1], Taiho KAMBE[1], Kazuhiro IRIE[3], Masaya NAGAO[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Tsukuba Univ., [3]Kyoto Univ)

【目的】肝線維化の進行に中心的な役割を果たす肝星細胞は、通常静止期にあり、ビタミンAを含む脂肪滴を貯蔵しているが、炎症時には活性化されて平滑筋型αアクチンが発現しコラーゲンを産生する。演者らはこれまでに、肝線維化の抑制を目的として、静止期に特徴的な脂肪蓄積を誘導する化合物の探索を行ってきた。その過程で、ツヅラフジ科植物に含まれるイソキノリンアルカロイドであるテトランドリン(図1)に、ラット由来肝星細胞株HSC-T6細胞においてオートファジー制御を介して脂肪滴を蓄積させる作用を有することを見出した[1]。本研究では、テトランドリンによる脂肪滴蓄積機構の解明を目的とし、オートファジー経路制御機構の解析を行った。

【方法および結果】これまでの解析から、テトランドリン刺激により、オートファジーのマーカーであるLC3-Ⅱタンパク質が増加することが明らかになっている。このLC3-Ⅱの増加がオートファジー経路の誘導によるものなのか、阻害により蓄積されたものなのかを明らかにするため、リソソームの阻害剤であるE64d及びPepstatin Aの共処理によりLC3-Ⅱタンパク質存在量が変動するか、抗LC3抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検討した。その結果、テトランドリン単独処理と、E64d及びPepstatin A共処理でLC3-Ⅱタンパク質存在量に変化は見られなかった。また、オートファジーにより選択的に分解されるp62タンパク質が、テトランドリン刺激により増加した。次に、LC3をEGFP及びmRFP蛍光タンパク質と融合させたmRFP-GFP tandem fluorescent-tagged LC3 (tfLC3)を安定発現するHSC-T6細胞を樹立し、テトランドリン処理時のmRFP並びにEGFPの局在を蛍光観察した。その結果、既存のオートファジー阻害剤であるBafilomycin A1と同様、テトランドリン刺激により、mRFP及びEGFPの蛍光の増加並びに共局在が観察された。さらに、オートファゴソームとリソソームの融合に関わるsyntaxin 17(Stx17)をノックダウンしたHSC-T6細胞において、テトランドリンによる脂肪滴蓄積並びにLC3-Ⅱ増加活性のフェノタイプが再現された。以上の結果は、テトランドリンが、オートファゴソームとリソソームの融合を阻害することにより脂肪滴蓄積並びにLC3-Ⅱタンパク質を蓄積させていることを強く示唆している。

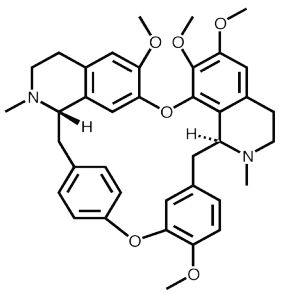


図１．テトランドリンの構造

1)宮前ら、日本農芸化学会　2012年大会

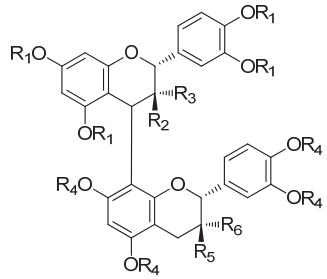
Tetrandrine, autophagy, hepatic stellate cell

講演番号：2A05a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ A 校舎 05 会場

プロシアニジン・オリゴマー構造－活性相関の可視化
Visualization Study of structure-activity relationships of procyanidin oligomers.
○春井 宏太[1]、石原 沙也加[1]、岡本 修平[1]、土井 翔馬[1]、奥谷 浩平[2]、濱田 義知[2]、中島 範行[3]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大院・工、[2]大阪電通大・工、[3]富山県立大・工)
○kota HARUI[1], Sayaka ISHIHARA[1], Syuhei OKAMOTO[1], Syoma DOI[1], Kohei OKUTANI[2], Yoshitomo HAMADA[2], Noriyuki NAKAJIMA[3], Akiko SAITOU[1,2] ([1]OECU,ASE, [2]OECU, [3]TPU)

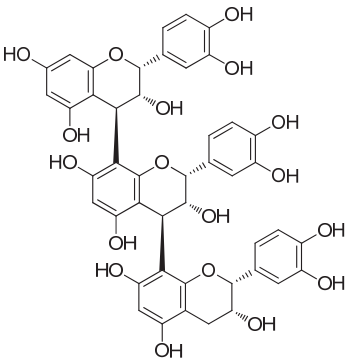
【目的】

Proanthocyanidin(PAs) は、お茶やカカオの嗜好品、ブドウ等の果物類、スギ等の樹皮など、多くの植物に含まれ、オリゴマー構造をもった高機能性ポリフェノール化合物である。これらは、極めて強い抗酸化活性・動脈硬化抑制活性・抗腫瘍活性・抗炎症作用・発ガン抑制作用等、様々な生物活性を示す。しかし、天然からは複雑な類縁体化合物として得られ純粋に単離することが難しく、詳細な構造-活性相関研究や活性発現機構についてはほとんど解明されていない。



1: $R_1 = R_2 = R_4 = R_6 = H$, $R_3 = R_5$ = gallate
2: $R_1 = R_4$= Ac, $R_3 = R_5$ = OAc, $R_2 = R_6 = H$
3: $R_1 = R_2 = R_6 = H$, $R_3 = R_5$ = OAc, R_4 = Ac
4: $R_1 = R_3 = R_6 = H$, $R_2 = R_5$ = OAc, R_4 = Ac

我々は、オリゴマーのどの部分が活性を発揮するのか、また、どのような修飾がある場合活性が高まるのかに注目して合成研究、および、構造-活性相関研究(SAR)を進めている。これまでの我々のヒト培養細胞を用いた細胞増殖抑制活性において、細胞種によって PAs に対する感受性が異なることが確認されている。本発表では、PAs を添加したのちの細胞の様子や化合物の構造や細胞種による感受性の違いを可視化する検討を行ったので報告する。



5

【方法と結果】

1~5 の化合物を 96 well plate に生育させた細胞に対して添加した。添加からの経過時間ごとに死細胞染色試薬、生細胞染色試薬を加えて蛍光顕微鏡で観察し、さらに蛍光マイクロプレートリーダーにより数値化した。用いた細胞はガン細胞として、ヒト子宮頸ガン細胞 HeLa S3、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549、正常細胞としてヒト胎児肺由来二倍体繊維芽細胞 WI-38 を用いた。その結果、天然に存在し強いガン細胞増殖抑制活性を持つ **1** および **5** は、正常細胞である WI-38 への影響は弱く、ガン細胞に対しては時間経過に従い細胞死へ誘導することが確認できた。また、脂溶性を上げた非天然化合物は天然型と異なる機構で細胞死を誘導することが示唆された。

proanthocyanidin, procyanidin oligomers, visualization

講演番号：2A05a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ A 校舎 05 会場

様々なプロシアニジン・オリゴマーの選択的合成研究と細胞増殖抑制活性

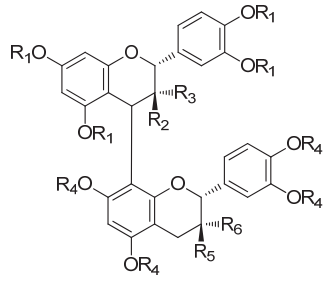
Selective synthesis of various procyanidin oligomers and their inhibitory activity of cell proliferation

○土井 翔馬[1]、石原 沙也加[1]、岡本 修平[1]、岡本 泰輔[1]、川崎 崇[2]、中嶋 範[3]、齊藤 安貴子[1]([1]大阪電通大院・工、[2]立命館大学・薬、[3]富山県大・工)

○ Syoma DOI[1], Sayaka ISHIHARA[1], Syuhei OKAMOTO[1], Taisuke OKAMOTO[1], Takashi KAWASAKI[2], Noriyuki NAKAJIMA[3], Akiko SAITO[1] ([1]OECU,ASE, [2]Ritsumeikan Univ, [3]TPU)

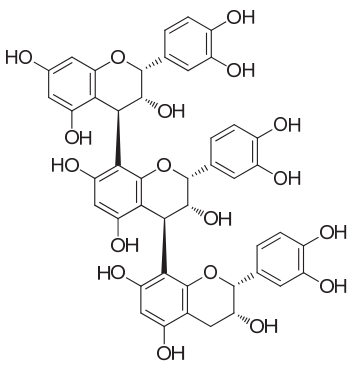
【目的】

Proanthocyanidin(PAs) は、お茶やカカオの嗜好品、ブドウ等の果物類、スギ等の樹皮など、多くの植物に含まれ、オリゴマー構造をもった高機能性ポリフェノール化合物である。これらは、極めて強い抗酸化活性・動脈硬化抑制活性・抗腫瘍活性・抗炎症作用・発ガン抑制作用等、様々な生物活性を示す。しかし、天然からは複雑な類縁体化合物として得られ純粋に単離することが難しく、詳細な構造-活性相関研究や活性発現機構についてはほとんど解明されていない。



1: $R_1 = R_2 = R_4 = R_6 = H$, $R_3 = R_5$ = gallate
2: $R_1 = R_4$= Ac, $R_3 = R_5$ = OAc, $R_2 = R_6 = H$
3: $R_1 = R_2 = R_6 = H$, $R_3 = R_5$ = OAc, R_4 = Ac
4: $R_1 = R_3 = R_6 = H$, $R_2 = R_5$ = OAc, R_4 = Ac

我々は、オリゴマーのどの部分が活性を発揮するのか、また、どのような修飾がある場合活性が高まるのかに注目して合成研究、および、構造-活性相関研究(SAR)を進めている。本発表では、SAR を行うための選択的合成研究、及び、合成した procyanidin oligomer を用いたヒト培養細胞を用いた細胞増殖抑制活性、及び、抗菌活性試験について報告する。



5

【方法と結果】

1~5 の化合物を、ヒト子宮頸ガン細胞 HeLa S3、ヒト肺胞基底上皮腺ガン細胞 A549、ヒト白血病細胞 HL-60、ヒト肝臓ガン細胞 HepG2、ヒト胎児肺由来二倍体繊維芽細胞 WI-38 に与え、それぞれに対する細胞増殖抑制活性を測定した。その結果、天然に存在する **1** および **5** は、強いガン細胞増殖抑制活性を持つ事が確認できた。一方で、正常細胞である WI-38 への影響は弱い事も確認された。一方で、下半分がアセチル化された 2 量体 **2**、**3** を上下のユニットの保護基を変えて縮合することによって合成し活性測定を行ったところ、脂溶性が高い化合物 **3** が非常に強い細胞増殖抑制活性を示すことが確認された。本発表では上記細胞増殖抑制活性に加え、インキュベーション・リーダー（サイニクス社）を用いた抗菌活性試験、および、化合物 **2**、**3** の合成法の詳細をまとめて発表する。

procyanidin oligomers, synthesis, inhibitory activity of cell proliferation

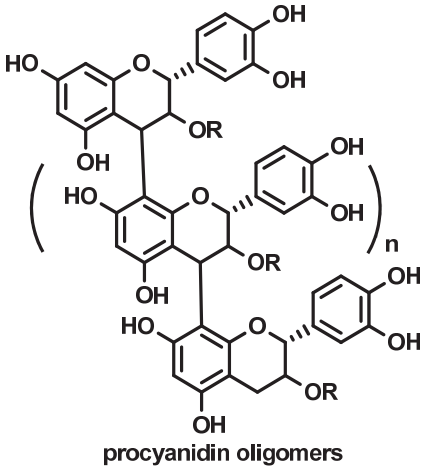
講演番号：2A05a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ A 校舎 05 会場

プロシアニジン・オリゴマーの細胞内シグナル伝達分子への影響

Effects on intracellular signaling molecules　by procyanidin oligomers

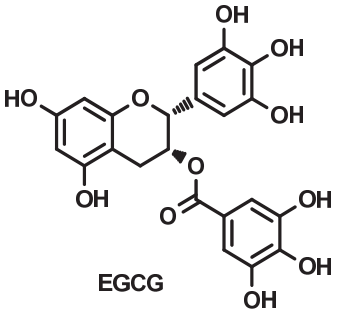
○岡本 修平[1]、石原 沙也加[1]、春井 宏太[1]、土井 翔馬[1]、岡本 泰輔[1]、吉見 旭人[2]、綾野 義博[2]、野坂 祐[2]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大院・工、[2]大阪電通大・工)
○Syuhei OKAMOTO[1], Sayaka ISHIHARA[1], Kota HARUI[1], Syoma DOI[1], Taisuke OKAMOTO[1], Akito YOSIMI[2], Yoshihiro AYANO[2], Yu NOSAKA[2], AKIKO SAITO[1,2] ([1]OECU,ASE, [2]OECU)

【目的】



procyanidin oligomers

Proanthocyanidin(PAs)は、お茶やカカオなどの嗜好品、大豆や小麦、古代米などの穀物、ブドウやリンゴ、柿などの果物類、さらには、スギなどの樹木の樹皮などにも含まれるポリフェノール化合物である。PAs は、flavan-3-ol 類が縮合しオリゴマー化した構造を基本骨格に、様々な修飾や変換を受けて実に多くの類縁体を持ち、多くの報告は混合物での活性測定のものである。PAs は非常に強い抗酸化活性をはじめとして、抗腫瘍活性、発がん抑制活性等、様々な生物活性を持つことが確認されている。しかし、前述のように天然からは混合物として得られるため単離することが難しく、網羅的な構造-活性相関研究が不可能であった。そこで我々は、様々な化合物を純粋に合成する方法を開発し、系統的な構造-活性相関研究(SAR)を進めている。本発表では、これまでに合成した天然型、及び、非天然型の procyanidin オリゴマーから、ヒト子宮頸ガン細胞 HeLa S3 に対して強い細胞増殖抑制活性を持つ化合物を選び、それらの細胞内シグナル伝達分子に対する影響を比較したので報告する。



EGCG

【方法と結果】

お茶カテキンである EGCG は、そのガン細胞選択的増殖阻害活性について詳細な検討がなされており、様々な細胞内シグナル伝達分子の阻害活性が報告されている。一方で我々が合成している procyanidin オリゴマーの中で、3 量体よりも長いオリゴマー、ガロイル基を複数持つオリゴマー、下のユニットがアセチル化されている 2 量体の一種は、EGCG よりもはるかに高い HeLa S3 細胞増殖抑制活性を持つ事が確認された。これらの化合物が EGCG と同様な活性発現機構を有するのか、細胞内シグナル伝達分子に対する影響を比較した。昨年度の本大会でガロイル基を複数持つオリゴマーが p38MAPK 等の細胞内存在量を減少させることを見出し報告したが、その後の検討により、ガロイル基を持たない 3 量体は強い細胞増殖抑制活性を持つが、細胞内シグナル伝達分子の減少は全く観察されなかった。本報告では、それらの検討の詳細を報告する。

Proanthocyanidin, p38MAPK, intracellular signaling

講演番号：2A05a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ A 校舎 05 会場

脂肪鎖を導入した flavan-3-ol の HeLa S3 細胞増殖抑制活性

Inhibitory activity of HeLa S3 cells proliferation by flavan-3-ol fatty acid ester

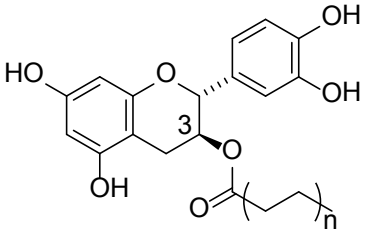
○綾野 義博[1]、森 一起[1]、東野 雄祐[2]、石原 沙也加[2]、岡本 修平[2]、中島 範行[3]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電気通信大・工、[2]大阪電気通信大院・工、[3]富山県立大・工)
○ Yoshihiro AYANO[1], Kazuki MORI[1], Yusuke HIGASHINO[2], Sayaka ISHIHARA[2], Syuhei OKAMOTO[2], Noriyuki NAKAJIMA[3], Akiko SAITO[1,2] ([1]OECU, [2]OECU・ASE, [3]TPU)

【目的】

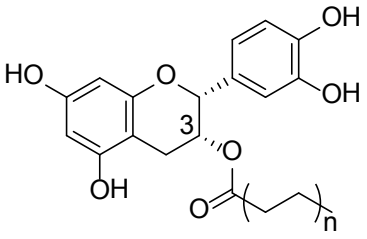
Flavan-3-ol類は、いわゆる「カテキン類」と呼ばれ、様々な食品中に含まれるため日々大量に摂取している化合物群である。我々は、flavan-3-olがオリゴマー構造をとったポリフェノール化合物、proanthocyanidin (PAs)の様々な生物活性、及び、その作用機構に興味を持ち、食機能性を明らかにするために研究を進めている。我々はPAsの化合物ライブラリーを構築するために様々な新規合成法の開発を行っているが、その過程でflavan-3-olの5位を位置選択的に修飾する簡単な手法を見出した。この5位選択的な修飾法を利用することで新たな機能をflavan-3-olに導入することが可能である。本研究では、3位と5位に脂肪鎖を導入し、その活性がどのように変化するのか検討を行ったので報告する。

【方法と結果】

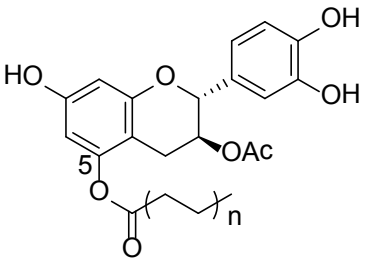
3位と5位に脂肪鎖を導入した化合物を用いてHeLa　S3細胞に対する増殖抑制活性試験を行った。その結果3位に脂肪鎖を導入した化合物のうち、C10、C12が非常に高い活性を示した。一方で、5位にC10、C12の脂肪鎖を導入した場合、3位に導入した化合物と比較して、細胞増殖抑制活性が低い事が確認された。脂肪鎖を3位に導入したflavan-3-olは正常細胞に対しても強い増殖抑制活性を示す。5位を脂肪鎖で修飾することで正常細胞に影響の少なく、かつ、脂溶性の高いPAsオリゴマーの開発が可能になると考えている。



3-C8: n = 3
3-C10: n = 4
3-C12: n = 5
3-C14: n = 6
3-C16: n = 7



3-EC8: n = 3
3-EC10: n = 4
3-EC12: n = 5
3-EC14: n = 6



5-C12: n = 5
5-C14: n = 6

falavan-3-ols, inhibitory activity of cell proliferation, structure-activity relationships

講演番号：2A05a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ A 校舎 05 会場

プロアントシアニジン導入ビーズを用いた化学生物学研究

Chemical biology studies using proanthocyanidin beads

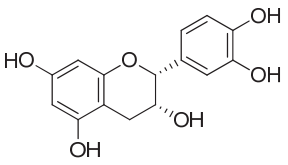
○泉野 麻友[1]、吉見 旭人[2]、岡本 修平[1]、石原 沙也加[1]、田中 龍太[2]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電気通信大院 ・工、[2]大阪電気通信大 ・工)
○Mayu IZUNO[1], Akito YOSHIMI[2], Syuhei OKAMOTO[1], Sayaka ISHIHARA[1], Ryuta TANAKA[2], Akiko SAITO[1,2] ([1]OECU ・ASE, [2]OECU)

【目的】

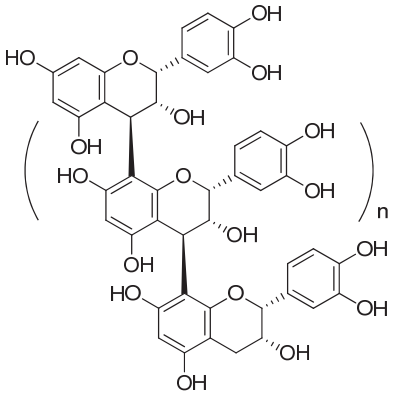
プロアントシアニジンは、お茶やカカオなどの嗜好品、大豆や小麦、古代米などの穀物、ブドウやリンゴ、柿などの果物類、さらには、スギなどの樹木の樹皮などにも含まれるポリフェノール化合物であり、様々な生物活性を持つことが知られている。これらの化合物は、flavan-3-ol 類が縮合しオリゴマー化した構造を基本骨格に、様々な修飾や変換を受けて実に多くの類縁体を持つため、天然からは複雑な混合物として得られ、純粋に単離することが困難である。そこで我々は、様々な化合物を純粋に合成する方法の開発、および、構造-活性相関研究を行っている。これまで、プロアントシアニジンのタンパク質への物理的な結合について、多数のフェノール性水酸基が非特異的にタンパク質と結合するといわれてきた。しかし我々の研究における様々な立体を持つ化合物の合成やアナログ合成を通じ、構造によってタンパク質との結合様式が異なる可能性が示唆されている。本発表では、理化学研究所・長田抗生物質研究室で開発された光親和型アフィニティービーズ法[1)]を改良し、少量のプロアントシアニジンをビーズ上に固定化して、タンパク質との相互作用の検出を試みたので報告する。

【方法と結果】

(-)-epicatechin (**1**)、epicatechin oligomer を光親和型ビーズに固定化し、リコンビナントのヒト DNA polymerase α との結合を検出できるか検討を行った。これまでに、**1** は DNA polymerase α に対する阻害活性は非常に低く、一方で **3** は高い阻害活性を持つことがわかっている。**1**, **3** をそれぞれ導入したビーズにおいて、**3** のビーズにのみ、DNA polymerase α が結合した。現在、**2**、**4**、および、その他のオリゴマーについても同様な実験を進め、物理的な相互作用と活性の相関が得られるか検討を進めている。



(-)-epicatechin (**1**)



epicatechin oligomer
n = 0: procyanidin B2 (**2**)
n = 1: procyanidin C1 (**3**)
n = 2: epicatechin tetramer (**4**)

1) N. Kanoh et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 3559-3562, 2005.

photoaffinity beads, procyanidins, small-molecule-protein interaction

講演番号：2A05a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ A 校舎 05 会場

Vialinin A の RBL-2H3 細胞における標的分子 USP5 酵素活性阻害を介した TNF-α産生阻害メカニズムの解析

Elucidation of inhibitory mechanism of vialinin A against TNF-alpha production through inhibition of USP5 enzymatic activity in RBL-2H3 cells.

○吉岡 泰淳[1]、菅谷 紘一[1]、高橋 俊哉[2]、越野 広雪[2]、矢島 新[3]、小野瀬 淳一[1]、矢嶋 俊介[4]、阿部 尚樹[1] ([1]東農大・応生科・栄養、[2]理研・グローバル研究クラスタ、[3]東農大・応生科・醸造、[4]東農大・応生科・バイオサイエンス)
○Yasukiyo Yoshioka[1], Kouichi Sugaya[1], Shunya Takahashi[2], Hiroyuki Koshino[2], Arata Yajima[3], Jun-ichi Onose[1], Shunsuke Yajima[4], Naoki Abe[1] ([1]Dept. of Nutri. Sci. Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo Univ. of Agri., [2]RIKEN GRC, [3]Dept. of Ferment. Sci. Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo Univ. of Agri., [4]Dept. of Bioscience Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo Univ. of Agri.)

【目的】これまでの研究から、抗炎症効果が知られている中国産食用茸ツブイボタケ（*Thelephora vialis*）含有 vialinin A が、抗原刺激 RBL-2H3 細胞において強力な炎症性サイトカイン TNF-α放出阻害活性を有することを見いだし、biotin 標識分子プローブを用いた標的分子探索研究から、その細胞内標的分子を ubiquitin-specific peptidase 5/isopeptidase T (USP5 / isoT, EC 3.1.2.15) と同定、さらに、vialinin A は USP5 酵素活性を阻害することも明らかにした。本研究では、USP5 発現制御により USP5 と TNF-α産生との関連性を明らかにすることで、vialinin A による TNF-α産生抑制のメカニズムを解明することを目的とした。

【方法・結果】Vialinin A が標的分子 USP5 の酵素活性阻害活性を有することから、細胞内における USP5 発現制御により TNF-α産生が影響を受けるかを確認するため、RNA 干渉の技法による検討を行った。USP5 を含む複数の deubiquitinating enzyme (DUB)それぞれの siRNA をトランスフェクトした細胞を用いて PCR 及び Westernblot により転写レベル及びタンパク質レベルでの目的 DUB の発現減少を確認後、それぞれの細胞からの細胞外への TNF-α放出量を検討した結果、USP5 の発現の減少が認められた細胞にのみ有意な減少が認められた。加えて、TNF-α産生量及び mRNA 発現量にも有意な減少が認められた。一方、TNF-α は NF-κB シグナルを介する転写誘導により産生されることから、NF-κB と複合体を形成し、自身がポリユビキチン化されることにより分解され、NF-κB シグナルを活性化させる IκB の細胞質内安定性について検討を行った。検討の結果、USP5 発現の減少している細胞での IκB 分解は抑制されることが観察され、さらに vialinin A 処理においても同様な IκB の分解の抑制が確認された。

【結論】Vialinin A 標的分子である USP5 は、RBL-2H3 細胞における TNF-α産生において重要な鍵分子の一つであることが強く示唆された。一方、vialinin A は、IκB の分解を抑制することにより TNF-α産生を抑制することが示唆されたことから、vialinin A の USP5 酵素活性阻害を介した TNF-α産生抑制を想定し、詳細な検討を行っている。

Vialinin A, USP5, TNF-alpha

講演番号：2A05a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ A 校舎 05 会場

ツブイボタケ（*Thelephora vialis*）含有 vialinin A の KU-812 細胞中の生体内標的分子の探索
Study on target biomolecules of vialinin A, isolated from *Thelephora vialis*, in KU-812 cells
○本橋 寛子[1]、吉岡 泰淳[1]、菅谷 紘一[1]、高橋 俊哉[2]、越野 広雪[2]、矢島 新[3]、小野瀬 淳一[1]、矢嶋 俊介[4]、阿部 尚樹[1]（[1]東農大・応生・栄養、[2]理研・グローバル研究クラスタ、[3]東農大・応生・醸造、[4]東農大・応生・バイオサイエンス）
○Hiroko Motohashi[1], Yasukiyo Yoshioka[1], Kouichi Sugaya[1], Shunya Takahashi[2], Hiroyuki Koshino[2], Arata Yajima[3], Jun-ichi Onose[1], Shunsuke Yajima[4], Naoki Abe[1] ([1]Dept. of Nutri. Sci., Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo Univ. of Agri., [2]RIKEN GRC, [3]Dept. of Ferment. Sci., Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo Univ. of Agri., [4]Dept. of Bioscience., Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo Univ. of Agri.)

【目的】
ツブイボタケ（*Thelephora vialis*）より、新規生理活性物質 vialinin A を単離・構造決定し、抗体刺激したラット好塩基球系 RBL-2H3 細胞において強力な TNF-α放出阻害活性を有することを見いだし、ファーマコフォアを保持した新規活性アナログ DMT を合成し、この物質がさらに強い阻害活性を有することを明らかにした。さらに、DMT をリード化合物としたビオチン標識化分子プローブを誘導し、これを用いてその標的タンパク質として脱ユビキチン化酵素の一つである Ubiquitin-specific peptidase 5 (USP5) を同定、その誘導阻害と TNF-α産生阻害活性との間に強い関連があることも見いだした。本研究では、抗体刺激ヒト好塩基球系 KU-812 細胞における vialinin 類の TNF-α放出に与える影響を評価するとともに、KU-812 細胞における vialinin A 標的分子を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】
KU-812 細胞を用い、カルシウムイオノフォア A23187 と PKC 活性化剤 PMA による非免疫的刺激及び IgE 感作による免疫的刺激による TNF-α放出に対する vialinin 類と DMT の影響を ELISA 法により検討したところ、vialinin 類、DMT 共に RBL-2H3 細胞の場合と同様、免疫的刺激による TNF-α放出に対してのみ強力な阻害活性を示した。そこで、DMT ビオチン標識化分子プローブを調製、これで処理した KU-812 細胞の細胞質抽出液を、アフィニティークロマトに供し、標的分子の同定を試みた。その結果、約 100 kDa と 50 kDa 付近に特異的なバンドが検出され、これらを MALDI-TOFMS に供し、ペプチドマスフィンガープリント法により解析を行った結果、約 100 kDa の分子については RBL-2H3 細胞において標的分子と同定した脱ユビキチン化酵素の一種である USP5 であると同定した。
【結論】
Vialinin A が、KU-812 細胞においても TNF-α の放出を強力に阻害することを明らかにした。また、RBL-2H3 細胞と同様、KU-812 細胞においても脱ユビキチン化酵素の一種である USP5 が vialinin A の標的分子の一つであることが強く示唆された。現在、KU-812 細胞中の標的分子として新たに検出された 50 kDa 付近の分子について解析を行っている。

Vialinin A, USP5, KU-812

講演番号：2A05a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ A 校舎 05 会場

ツブイボタケ（*Thelephora vialis*）含有 vialinin A の脱 SUMO 化酵素（SENP1）に対する阻害効果
Inhibitory effect of vialinin A, isolated from *Thelephora vialis*, against SUMO-specific protease 1 (SENP1) activity.

○牧内 麻緒[1]、吉岡 泰淳[1]、菅谷 紘一[1]、矢島 新[2]、小野瀬 淳一[1]、矢嶋 俊介[3]、阿部 尚樹[1]([1]東農大・応生科・栄養、[2]東農大・応生科・醸造、[3]東農大・応生科・バイオサイエンス)
○ Mao Makiuchi[1], Yasukiyo Yoshioka[1], Kouichi Sugaya[1], Arata Yajima[2], Jun-ichi Onose[1], Shunsuke Yajima[3], Naoki Abe[1] ([1]Dept. of Nutri. Sci., Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo Univ. of Agri., [2]Dept. of Ferment. Sci., Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo Univ. of Agri., [3]Dept. of Bioscience, Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo Univ. of Agri.)

【目的】

中国産食用茸であるツブイボタケ（*Thelephora vialis*)含有 vialinin A がヒト好塩基球系 KU-812 細胞に対して TNF-α の放出抑制活性を有することを明らかにしてきた。Vialinin A は RBL-2H3 細胞において TNF-α の産生と放出を 2 段階で阻害することが示唆されており、そのうち産生阻害については分子プローブを用いた標的分子の探索により見出した vialinin A 標的分子 USP5 の酵素活性阻害が関与することが強く示唆されている。しかし放出阻害の作用機序はまだ明らかとなっていない。近年、分泌小胞からの分泌顆粒を含むタンパク質エキソサイトーシスに関与する分子が SUMO 化/脱 SUMO 化により制御されることが報告されている [1)]。そこで本研究では、TNF-α 放出制御も SUMO 化/脱 SUMO 化によって行われる可能性があることから、脱 SUMO 化を制御する主要な酵素である SENP1 に対する vialinin A の酵素阻害活性を検討することとした。

【方法・結果】

SENP1 阻害活性は、蛍光基質 SUMO1-AMC を用い SENP1 酵素活性を測定することにより評価した。市販されているヒト SENP1 触媒ドメイン（cSENP1）に対する vialinin A の効果を検討したところ、低濃度で阻害活性を示すことが認められた。そこで細胞内における完全長の SENP1 に対する効果を検討するため、ヒト組み換え体完全長 SENP1（SENP1)の作製を試みた。KU-812 細胞の SENP1 遺伝子を pET6xHN-N ベクターに挿入し、*Escherichia coli* BL21（DE3）に形質転換して導入し、大腸菌を培養、タンパク質を発現誘導後、アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、SENP1 を得た。SENP1 に対して vialinin A は cSENP1 と同程度の低濃度で阻害活性を示した。

【結論】

TNF-α の放出は SUMO 化/脱 SUMO 化を介するエキソサイトーシスに関連している可能性が予想されることから、大腸菌で産生させた完全長の脱 SUMO 化酵素 SENP1 に対する vialinin A の阻害効果を検討したところ、cSENP1 と低濃度の阻害活性が認められた。現在、SENP1 に対する他のツブイボタケ含有 *p*-テルフェニル化合物との構造活性相関の検討を行っている。

1) Xiao-Qing D., et al., *Diabetes*, **60**, 838-847 (2011)

Vialinin A, SUMO, SENP1

講演番号：2A05a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ A 校舎 05 会場

マクラギヤスデ防御物質の成長にともなう化学多形

Chemical polymorphism of defense secretions along with growth in the millipede *Niponia nodulosa* [Polydesmida: Cryptodesmidae]

○桑原 保正[1,2]、市来 弥生[1,2]、森田 將史[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大・生工科・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Yasumasa Kuwahara[1,2], Yayoi Ichiki[1,2], Masashi Morita[1,2], Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., Biotech. Res. Center & Dept. Biotech., [2]JST, ERATO)

【目的】

オビヤスデ目シロハダヤスデ科のマクラギヤスデ *Niponia nodulosa* は、成虫でも体長 15 mm 程度の小型種、庭先の落葉の下や畑にごく一般的に見つかる。成虫は褐色、若虫は白色で、動きが遅く、名前通り枕木を並べたような形態である。オビヤスデ目に一般的な防御物質成分とされる青酸化合物（PD 化合物と略称）が見つからず、これまでに微生物産生揮発性有機化合物（MVOC と略称）である 1-octen-3-ol と geosmin が同定され、警報フェロモン機能をかねている事が判っている。野外から集めたヤスデをヘキサン抽出し、GC/MS 分析したところ、発育段階により分泌物の組成が顕著に異なり、MVOC 以外に PD 化合物の存在に気付いた。そこで、全発育段階［若虫期(1～7齢)と成虫］について、防御物質の組成を GC/MS 分析で調べた。

【方法と結果・考察】

マクラギヤスデの棲息する腐植質から、若虫(3-7齢)と成虫を採集した。採集できなかった若虫(1-2齢)は、雌成虫から産卵・孵化させ腐植質を与えて飼育し、調達した。各個体は胴体節数と脚数から齢を特定し、体重測定後、個体ごとに規定量のヘキサンで 3 分間浸漬し、直ちに GC/MS 分析（Agilent 5975C Inert XL EI/CI MSD with triple-Axis Detector at 75 eV coupled with 7890A GC-system with HP-5 capillary column (30 m x 0.25 mm; 膜厚 0.25 μm), He 流量 1 ml/min, 昇温 60°C(3 min)-10°C/min-290°C）した。

若虫期(1-4齢)は MVOC 5 成分（1-octen-3-ol, 2-methyl-2-bornene, *E*-2-octen-1-ol, 2-methyl-isobornenol, geosmin）と PD 化合物 5 成分（benzaldehyde, benzoyl cyanide, benzoic acid, mandelonitrile, mandelonitrile benzoate）の混合物で構成されていた。一方、若虫期(5-7齢)と成虫には PD 化合物がなく、MVOC 5 成分のみを検出できた。成分の雌雄差を 6 齢以上で調べたが、各齢ともに相違は無かった。

成虫と若虫で防御物質組成の異なる例は不完全変態の半翅目昆虫（カメムシ類）で知られているが、若虫期の途中で成分変化する例はない。PD 化合物はフェニルアラニンから生合成される。MVOC を食物由来とすると、本種は防御物質素材としてアミノ酸という高コスト素材から食物由来の低コスト素材へとシフトさせたと思われる。

chemical polymorphism, defense secretion, *Niponia nodulosa*

講演番号：2A05p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ A 校舎 05 会場

トランス・アネトールが薬剤排出および細胞内カルシウムイオン調節に与える影響

Effect of *trans*-anethole on drug efflux and regulation of intracellular calcium ions

○玉置 裕之[1]、城野 由衣[1]、荻田 亮[1,2]、田中 俊雄[1]、藤田 憲一[1]([1]阪市大院、[2]健康研セ)
○Hiroyuki Tamaki[1], Yui Jono[1], Akira Ogita[1,2], Toshio Tanaka[1], Ken-ichi Fujita[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]Res. Cntr. for Urban Health and Sports. Osaka City Univ.)

トランス・アネトール（アネトール）は、セリ科植物から抽出される独特の芳香を放つフェニルプロパノイドであり、香辛料として食品に幅広く添加されている。本物質は弱い抗菌活性を示すが、他の薬剤と併用することで相乗的な抗真菌作用を発揮することがすでに報告されている。

本研究ではアネトールとモデル薬剤であるドデカノールを併用した際に見られる相乗的な抗真菌作用発現メカニズムを、出芽酵母の薬剤耐性に関わる多剤耐性薬剤排出ポンプ、ABC トランスポーター群と、細胞質 Ca^{2+}濃度調節遺伝子群に絞って解析した。

ドデカノール処理により排出ポンプの一つである *PDR5* の発現が増大したが、アネトールとの併用によりその過剰発現は強く抑制された。また、*PDR5* の転写因子とされる *PDR3* においてもアネトールとの併用によりその発現が抑制された。ドデカノールは細胞質における Ca^{2+}濃度を一過的に上昇させたが、アネトールを共存させた場合、その上昇が維持されることが判った。Ca^{2+}濃度の上昇には、細胞質の Ca^{2+}濃度を低下させるゴルジ体 Ca^{2+}-ATPase *PMR1* の抑制が関わっている可能性が、遺伝子欠損株を用いた実験から示唆された。以上の結果より、相乗的な抗真菌作用には少なくとも薬剤排出の抑制および Ca^{2+}濃度の調節不全が関与していると推察された。

trans-anethole, multi efflux pumps, calcium ions

講演番号：2A05p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ A 校舎 05 会場

出芽酵母の偽菌糸形成に際しておこる微小管の配向異常への Bim1 および Kar9 タンパク質の関与の可能性

Possibility of involvement of Bim1 and Kar9 in disturbance of microtubule-orientation during pseudohyphal formation of budding yeast.

○村田 和加惠[1,2]、金原 聡子[1]、北原 望[1]、荻田 亮[1,3]、藤田 憲一[1]、田中 俊雄[1] ([1]阪市大院理、[2]米子高専物質、[3]阪市大院研セ)
○ Wakae MURATA[1,2], Satoko KINPARA[1], Nozomi KITAHARA[1], Akira OGITA[1,3], Ken-ichi FUJITA[1], Toshio TANAKA[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]Yonago Natl. Coll. Technol., [3]Res. Center. Urban Health Sports, Osaka City Univ.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、イソアミルアルコール（IAA）の存在下で偽菌糸を形成する。酵母体から偽菌糸への形態変化にはダイナミックな細胞骨格の変動が関与している可能性が高いと考え、研究を進めている。

これまでの研究で、IAA 誘導偽菌糸において、アクチンの細胞内レベルには変化が見られず、微小管の構成分子である α-および β-tubulin においてその相対レベルが低下することがすでに明らかにされている。今回、IAA 処理による偽菌糸形成誘導の際におこる微小管およびアクチンの局在変化について検討を行った。IAA で4時間処理した偽菌糸細胞においては、無処理細胞と比較して出芽端におけるアクチンパッチの凝集が減少しているのに対し、処理時間が長くなると、無処理細胞と差がほとんどなくなるという結果が得られた。次いで、微小管の挙動を調べるため、tub1-GFP 株を用いてタイムラプス観察を行った。正常な個体では細胞の伸長方向に微小管が伸長していくのに対して、偽菌糸形成個体では、微小管は出芽方向と直角方向への配向した後、時間をかけて配向を正常な出芽方向に戻しながら伸長していった。これらのことから、微小管の配向を決めるアクチンとの相互作用に何らかの異常があるのではないかと考え、出芽酵母においてアクチンと微小管をつなぐタンパク質である Bim1 と Kar9 に着目した。Bim1 および Kar9 タンパク質の構成遺伝子である、*BIM1* と *KAR9* がそれぞれ欠損した株を用いて、IAA 処理を施し、形態観察を行った。その結果、⊿*BIM1* と⊿*KAR9* の両株において偽菌糸形成が抑制された。この結果から、これらのタンパク質が偽菌糸形成に関与している可能性が示唆された。

偽菌糸形成にはアクチン凝集の異常に加えて、微小管が、アクチンを何らかの機構で認識できず、その結果、微小管の配向が異常になったまま細胞が伸張することによって偽菌糸が形成されるという可能性が示唆された。

Saccharomyces cerevisiae, pseudohyphal form, tubulin

講演番号：2A05p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 05 会場

Aflatoxin production inhibitory activities of synthetic respiration inhibitors.
○DIYAN FEBRI PRABOWO, Kurin Iimura, Keiko Takagi, Shohei Sakuda (The University of Tokyo)

Aflatoxins are toxic and carcinogenic secondary metabolites produced primarily by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. Aflatoxins frequently contaminate agricultural commodities, and thus pose not only health hazards but also economic impact. To protect agricultural commodities from aflatoxin contamination, specific inhibitors of aflatoxin production may be useful. During our screening with a natural product library (RIKEN NPDepo), a natural respiration inhibitor was found to inhibit aflatoxins production of *A. paraciticus*. Since aflatoxin production inhibitory activity of any respiration inhibitors has not been reported, we planned to examine aflatoxin production inhibitory activity of respiration inhibitors. In this study, we report the effects of commercially available synthetic miticides and fungicides on aflatoxin production of *A. parasiticus*.

A. parasiticus NRRL 2999 were used as a producer of aflatoxins. Aflatoxins B_1 and G_1 are the main aflatoxins produced by the strain. One milliliter of PD liquid medium in a well of a 24-well microplate was inoculated with a spore suspension of the strain and was incubated statically for 3 days at 27.5°C. The culture broth of each well was centrifuged to obtain the mycelia and culture filtrate. The dry weight of mycelia was subjected for fungal growth analysis. The culture filtrate was subjected to HPLC analysis for determination of aflatoxin amount. Among 16 compounds tested, pyridaben and pyribencarb (inhibitors of complex I and complex III, respectively) inhibited aflatoxin production of *A. paraciticus* without inhibiting fungal growth with the strongest activity. IC_{50} values of pyridaben and pyribencarb for inhibition of aflatoxins B_1 and G_1 of *A. parasiticus* were 0.01 and 0.09, and 0.02 and 0.07 μM, respectively. The results suggested that respiration inhibitors are useful for aflatoxin control.

謝辞
本研究は生物系特定産業技術研究支援センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業「ケミカルバイオロジーを基盤とした革新的な農薬等の探索研究」として行われているものです。

aflatoxin, synthetic respiration inhibitor, pyridaben

講演番号：2A05p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 05 会場

Fusarium graminearum のトリコテセン生産を阻害する precocene II の標的タンパク質の同定
Identification of the target protein of precocene II that inhibits trichothecene production of *Fusarium graminearum*
○古川 智宏、坂本 直子、露木 利枝、鈴木 道生、長澤 寛道、作田 庄平（東大院農生科・応生化）
○Tomohiro FURUKAWA, Naoko SAKAMOTO, Rie TSUYUKI, Michiwo SUZUKI, Hiromichi NAGASAWA, Shohei SAKUDA (The Univ. of Tokyo)

【目的】　マイコトキシンとはカビの生産する有毒二次代謝産物の総称であり、カビが感染した農作物中に生産される。その中でも、*Fusarium graminearum* により生産されるトリコテセンの一種、デオキシニバレノール(DON)による小麦等の汚染は世界中の穀倉地帯で見られ、毒性、汚染量の両面から深刻な問題となっている。殺菌剤の繰り返しの施用は耐性菌の蔓延を招く懸念があるため、DON 生産の特異的抑制物質の利用が汚染防除に有効であると考えられる。当研究室では DON 生産阻害物質のスクリーニングを行い、活性物質として precocene II を同定した。precocene II は抗幼若ホルモン活性物質として知られているが、その標的分子は不明である。precocene II は *F. graminearum* の生育は阻害せず、DON 生産だけを IC_{50} 1.2 μM の低濃度で阻害した。このような特異的阻害物質の作用機序を解明することは、DON 生産の分子機構の解明に重要であり、有用な薬剤の開発に貢献できると考えられる。そこで本研究では、precocene II の標的タンパク質の同定を試みた。

【方法および結果】　DON 生産培地で培養した *F. graminearum* の菌体を細胞壁分解酵素で処理してプロトプラストとし、界面活性剤により菌体内タンパク質を抽出した。precocene II のフォトアフィニティープローブを用いて precocene II 結合タンパク質の検出を行ったところ、29 kDa 付近に precocene II 特異的に結合すると考えられるタンパク質のバンドが確認された。precocene II 固定化磁気ビーズによりこのタンパク質の精製を行い、トリプシン消化後 LC/MS/MS による解析に供した結果、ミトコンドリア外膜に存在しミトコンドリア内外の物質輸送を担うチャネルタンパク質である voltage dependent anion-selective channel (VDAC)と同定された。ATP や NADH などの透過性は VDAC の状態により変化するため、precocene II は VDAC に結合しミトコンドリア内外の物質輸送に影響を与えている可能性が考えられる。そこで、*F. graminearum* のミトコンドリアを単離し、NADH のミトコンドリア内外の輸送に対する precocene II の影響を調べたところ、precocene II は NADH の輸送速度を減少させた。このことより precocene II は、VDAC に結合することで膜の透過性に影響を与えていることが強く示唆された。

謝辞
本研究は農林水産省委託プロジェクト研究「カビ毒の動態解明と産生低減技術の開発(カビ毒動態)」として行われているものである。

Fusarium graminearum, precocene II, target identification

講演番号：2A05p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 05 会場

キチナーゼ/キチナーゼ様タンパク質に着目したアロサミジン類の抗喘息作用の解析

Analysis of the mode of action for anti-asthmatic activity of allosamidins concerning chitinases/ chitinase-like proteins

○桑田 一平[1]、瀬口 武史[2]、八村 敏志[3]、井上 博雅[4]、鈴木 道生[1]、長澤 寛道[1]、作田 庄平[1]([1]東大院・農生科、[2]プライムテック株式会社、[3]東大院・食の安全研究センター、[4]鹿児島大院・医歯)
○Ippei KUWATA[1], Takeshi SEGUCHI[2], Satoshi HACHIMURA[3], Hiromasa INOUE[4], Michio SUZUKI[1], Hiromichi NAGASAWA[1], Shohei SAKUDA[1] ([1]The Univ. of Tokyo-Agricultural and Life Science, [2]Primetech Co., [3]The Univ. of Tokyo-Research Center for Food Safety, [4]Kagoshima Univ.)

【背景と目的】

放線菌の生産するキチナーゼ阻害物質アロサミジン(allo)は、喘息モデルマウスを用いた実験で抗喘息作用を示すことが明らかとなっており、さらにデメチルアロサミジン(dmallo)は allo よりも約 10 倍強い抗喘息作用を示す。我々は、この allo と dmallo の抗喘息活性の違いを手がかりにアロサミジン類の抗喘息作用での作用機構を解明し、新たな抗喘息薬の開発につなげることを目的に研究を行っている。アロサミジン類の標的分子は不明であるが、アロサミジン類がキチンミミックとしてキチナーゼに結合することから、標的分子はマウスの持つキチナーゼ、あるいはキチナーゼ活性は持たないがキチンオリゴ糖との結合能を有するキチナーゼ様タンパク質であると考えられる。マウスの持つキチナーゼ/キチナーゼ様タンパク質のうち喘息発症との関与の可能性が報告されているものは、acidic mammalian chitinase (AMCase)、breast regression protein 39 (BRP-39)、Ym1、Ym2 であり、本研究ではそれらタンパク質の組換え体を用いてアロサミジン類の抗喘息作用の解析を行った。

【方法と結果】

キチナーゼ/キチナーゼ様タンパク質の中でアロサミジン類の主要な標的分子を探索するため、アロサミジン類とキチナーゼ/キチナーゼ様タンパク質との結合能の定量を行い、allo と dmallo の間で結合能に差のある分子の同定を試みている。各タンパク質は N 末端にマルトース結合タンパク質(MBP)を付加した MBP-AMCase、MBP-BRP-39、MBP-Ym1、MBP-Ym2 として調製し、アロサミジンはビオチン化プローブとして調製した。ビオチン化試薬は、アロサミジンとビオチン間のスペーサーの長さを変化させたものを使用した。現在、それらを用いて生体分子間相互作用解析装置 Octet によって結合能の定量を行っている。

また、AMCase、BRP-39 は細胞に対して抗アポトーシス活性を持つことが知られている。そこで現在、その活性をアロサミジン類が阻害するかどうかをマウスの脾細胞、フローサイトメーターを用いて調べている。

Allosamidin, asthma, chitinase

講演番号：2A05p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 05 会場

ブタ心臓からのミトコンドリア調製および新規 PET プローブのミトコンドリア内標的分子の同定
Preparation of mitochondria from porcine heart, and identification of the target in mitochondria for the novel PET probes

○風見 紗弥香[1]、西山 新吾[2]、木村 祐史[1]、伊藤 博康[1]、塚田 秀夫[2] ([1]浜松ホトニクス（株）筑波研、[2]浜松ホトニクス（株）中研 PET)
○Sayaka KAZAMI[1], Shingo NISHIYAMA[2], Yuji KIMURA[1], Hiroyasu ITOH[1], Hideo TSUKADA[2] ([1]HAMAMATSU PHOTONICS K.K. Tsukuba Reseach Lab., [2]HAMAMATSU PHOTONICS K.K. Central Reseach Lab. PET Center)

【背景・目的】 [^{18}F]BMS-747158-02 ([^{18}F]BMS)は心臓を可視化する既存の PET (positron emission tomography) プローブであり、ミトコンドリアに蓄積する性質を有する(*J. Nucl. Cardiol.*, **14**, 782-788, (2007))。我々は[^{18}F]BMS がミトコンドリア割合の高い脳の可視化プローブとして利用可能であることを見出し(*Synapse*, **66**, 909-917, (2012))、脳への特異性を高めた誘導体[^{18}F]BCPP-EF, [^{11}C]BCPP-EM を新たに開発した。ラットを用いた解析からこれらの化合物は *in vivo* において脳および心臓へ蓄積すること、*in vitro* においてミトコンドリア呼吸鎖複合体 I (MC-1)の特異的阻害剤である Rotenone と競合すること、を報告した(*J. Label. Compd. Radiopharm.*, **56**, 553-561, (2013))。しかし、これらの化合物が MC-1 に対してどのように作用するか、他のミトコンドリア呼吸鎖複合体群へ影響するかについては不明であった。そこで、呼吸鎖複合体群を含むミトコンドリア内膜の反転膜小胞 SMP (sub-mitochondrial particle)を調製し、BMS, BCPP-EF, BCPP-EM による影響を検討した。

【方法・結果】 既存の調製法(*Methods cell biol.*, **80**, 3-44, (2007))を改変し、ブタ心臓からミトコンドリアおよび SMP を調製した。温度上昇および pH 変化に注意し、ブタ心臓をミンサー、ブレンダー、ホモジナイザーを用いて細かく破砕した後、遠心分離によりミトコンドリア画分を得た。次に、フレンチプレスによりミトコンドリアを破砕し、遠心分離により SMP を得た。

SMP に存在する呼吸鎖複合体は基質反応部位が外側を向いており、NADH, Succinate, ATP により複合体 I, II, V (MC-1,-2,-5)をそれぞれ特異的に駆動することが可能である。駆動後に起こる電子伝達により Buffer 中のプロトンが SMP 内へ輸送されるが、プロトン濃度に応じて消光する性質を有する蛍光試薬 ACMA (9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine)を組み合わせることで、プロトン輸送活性をモニタリングすることが可能である(*J. Biol. Chem.*, **277**, 13281-13285, (2002))。

調製した SMP はいずれの駆動剤においても ACMA の蛍光が消光し、脱共役剤である FCCP (carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone)の添加により蛍光が回復したことから、プロトン輸送活性を保持していることが明らかとなった。続いて BMS, BCPP-EF, BCPP-EM による影響を検討した結果、MC-1 駆動によるプロトン輸送活性を低濃度で阻害すること、MC-2,-5 駆動によるプロトン輸送活性は高濃度においても阻害しないこと、が明らかとなった。よって、ブタ心臓からプロトン輸送活性測定が可能な SMP を取得できること、BMS, BCPP-EF, BCPP-EM が MC-1 特異的に作用し、その活性を低濃度で阻害することを明らかにした。

mitochondrial complex 1, inhibitor, PET

講演番号：2A05p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 05 会場

国内産琥珀に含まれる生物活性物質の比較による琥珀間の類似性の研究

Study on the similarity by the comparison of biological compounds isolated from the domestic ambers

○清水 栄作[1]、内田 武史[2]、植田 直見[3]、越野 広雪[4]、木村 賢一[1,2]（[1]岩手大農、[2]岩手大院農、[3]元興寺文化財研、[4]理研）
○Eisaku Shimizu[1], Takeshi Uchida[2], Naomi Ueda[3], Hiroyuki Koshino[4], Ken-ichi Kimura[1,2] ([1]Fac. of Agri, Iwate Univ., [2]Grad. Sch. of Agri, Iwate Univ., [3]Gangoji Inst., [4]RIKEN.)

【目的】琥珀は太古の樹脂の化石であり、主に装飾品として利用されている。我々は、琥珀を植物の天然資源と捉え、Ca^{2+}超感受性の遺伝子変異酵母 YNS17 株（*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ 株）を用いたスクリーニングにより、久慈産琥珀（約 8500 万年前）から Ca^{2+}シグナル伝達を阻害する 3 種の新規物質 kujigamberol（15,20-dinor-5,7,9-labdatrien-18-ol）、neokujigamberol A（13-methyl-8,11,13-podocarpatrien-19-ol）、並びに neokujigamberol B（15,20-dinor-5,7,9-labdatrien-13-ol）を見いだした[1-3]。そこで、日本国内の他の産地であるいわき（中生代白亜紀後期）、銚子（約 1 億 1000 万年前）、宇部（約 3000 万年前）、並びに瑞浪（1500~1600 万年前）の琥珀において同様の活性の有無を調べた後、活性が認められた琥珀から活性物質の単離精製を進め、久慈産琥珀から単離された kujigamberol などと比較し、新たな生物活性物質の探索と共に琥珀の類似性について考察することを目的とした。

【方法・結果】遺伝子変異酵母 YNS17 株と 0.3 M $CaCl_2$ を懸濁した YPD 培地に、各メタノール抽出物サンプル 1.0 mg/ml を 1/2 ずつ希釈して 5 µl 滴下し、高濃度の Ca^{2+}存在下で細胞周期が G2/M で停止する性質の回復活性（生育円活性）を調べた。その結果、久慈産といわき産の琥珀に 0.15 µg/spot でも活性が認められ、一方で銚子産と瑞浪産の琥珀はそれより弱く、宇部産の琥珀には活性が認められなかった。そこで、80% MeOH、ODS カラムの条件で HPLC の分析を行ったところ、いわき産琥珀のパターンは久慈産琥珀に似ていた。そこで、活性を指標にいわき産琥珀（18.22 g）のメタノール抽出物を酢酸エチル抽出、シリカゲル TLC（ヘキサン：酢酸エチル=3：1）、逆相 HPLC（85% MeOH）を用いて活性物質の単離精製を行い、最終的に 1.0 mg の単一物質が得られた。各種機器分析を行った結果、HR-EI-MS の結果より分子式 $C_{18}H_{28}O$（分子量 260）を示し、NMR における全ての ^{1}H、^{13}C のケミカルシフト値、HPLC の保持時間、シリカゲル TLC の Rf 値、並びに UV が全て kujigamberol の結果と一致した[1)]。さらに、YNS17 株に対する生育活性も kujigamberol と一致したことから、いわき産琥珀にも kujigamberol が含まれることが明らかとなり、久慈産琥珀といわき産琥珀が同じ起源の琥珀である可能性が生物活性物質の面からも示唆された。

1）Kimura, K., *et al.*, Fitoterapia., **83**, 907（2012）
2）Ye, Y.. Q., *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett. **22**, 4259（2012）.
3）内田武史ら、2013 年度日本農芸化学会、2C21a14（2013）

yeast Ca^{2+}-signal transduction, kujigamberol, amber

講演番号：2A05p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 05 会場

琥珀に含まれる生物活性物質の抗アレルギー作用について
Anti-allergic effect of biological active compounds isolated from ambers
○小林 幹[1]、内田 武史[1]、阿部 友美[1]、新田 久男[2]、東尾 浩典[3]、上杉 祥太[4]、木村 賢一[1,4] ([1]岩手大院・農、[2]久慈琥珀（株）、[3]岩手医大・共通教育セ・化学、[4]岩手大院・連合農)
○Miki Kobayashi[1], Takeshi Uchida[1], Tomomi Abe[1], Hisao Shinden[2], Hironori Higashio[3], Syota Uesugi[4], Ken-ichi Kimura[1,4] ([1]Grad. Sch. of Agri., Iwate Univ., [2]Kuji Kohaku Co. Ltd., [3]Center Lib. Arts & Sci., Iwate Med. Univ., [4]Uni.Grad. Sch. Of Agri.Sci., Iwate Univ.)

【目的】琥珀は主に中生代から新生代の植物の樹脂が地中に埋没し、それが化石化したものである。装飾品以外に医療や美容の分野で利用されているが、その生物活性物質に関する報告はこれまでなかった。我々は、琥珀を植物由来の天然資源として捉え、世界中の琥珀（岩手県久慈産琥珀、ロシア産琥珀、ドミニカ産琥珀）から Ca^{2+}超感受性の遺伝子変異酵母 YNS17 株（*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ）を用いたスクリーニングにより、Ca^{2+}シグナル伝達阻害物質を取得してきた。これまで久慈産琥珀から 3 種、ロシア産琥珀から 3 種、ドミニカ産琥珀から 3 種の物質を取得しているが、いずれも異なる物質であり、琥珀が含む生物活性物質は産地、生成年代、起源樹によって多様性があることが示唆されてきた。そこで本研究では、琥珀の生物活性のうち Ca^{2+}シグナル伝達阻害が関わる抗アレルギー作用に注目し、世界の琥珀の抗アレルギー作用を比較検討することとした。
【方法・結果】久慈産琥珀由来の新規な Ca^{2+} シグナル伝達阻害物質である 15,20-dinor-5,7,9-labdatrien-18-ol (kujigamberol)と久慈産琥珀メタノール抽出物を、モルモット遅発型鼻炎モデルに対し、惹起 30 分前および 1 時間後に左右にそれぞれ 20 µl ずつ点鼻投与した。惹起した 10 分後および 5 時間後に鼻腔抵抗を測定したところ、10 分後の溶媒対照群に対する抑制率は kujigamberol 1.0 mg/ml で 47%、0.1 mg/ml で 42% 、並びに久慈産琥珀メタノール抽出物 1 mg/ml で 63%を示し、さらに kujigamberol 1.0 mg/ml は 5 時間後でも 66%の 抑制活性を示した。また、ヒスタミン誘発マウス掻痒モデルに対し、kujigamberol 10 mg/kg、及び久慈産琥珀メタノール抽出物 10 mg/kg を腹腔内投与し、30 分後にヒスタミン皮内投与による掻痒行動を惹起した。その結果、kujigamberol は溶媒対照群に対し掻痒行動を 34%抑制し、久慈産琥珀メタノール抽出物も有意ではないが抑制傾向を示した。久慈産琥珀の抗アレルギー作用が動物レベルで確認されたことから、久慈産琥珀、ロシア産琥珀、ドミニカ産琥珀、並びに新たに入手したメキシコ産琥珀のメタノール抽出物 100 µg/ml と、それぞれの主な Ca^{2+}シグナル伝達阻害物質である kujigamberol 、dehydroabietic acid、3-cleroden-15-oic acid 25µM をマスト細胞（RBL-2H3 細胞）に供し、抗 DNP-IgE・DNP-BSA 誘導脱顆粒抑制作用（β-hexosaminidase 放出抑制作用）を測定した。その結果、予想に反し動物レベルで抗アレルギー作用を示した久慈産琥珀抽出物および kujigamberol に脱顆粒抑制作用はなく、ドミニカ産琥珀抽出物、メキシコ産琥珀抽出物、並びにその活性物質の一つの 3-cleroden-15-oic acid に抑制作用が認められた。

Anti-allergic effect, Amber, Kujigamberol

講演番号：2A05p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 05 会場

種々の小分子化合物による UPR 関連遺伝子群発現挙動の解析

Comparative analysis of the expression patterns of UPR-target genes caused by UPR-inducing compounds

○田代 悦、新荘 聡子、溝谷 優治、井本 正哉（慶應大理工）
○Etsu TASHIRO, Satoko SHINJO, Yuji MIZOTANI, Masaya IMOTO (Dept. Biosci. & Bioinfo., Keio Univ.)

小胞体の恒常性維持機構 UPR（Unfolded Protein Response）は，小胞体膜上に局在する３つのセンサータンパク質（ATF6, IRE1, PERK）が小胞体内に蓄積した不良タンパク質を認識することで活性化し，様々な UPR 関連遺伝子群の発現によって制御されている．これまでに，糖鎖修飾阻害剤 tunicamycin や小胞体 Ca^{2+} ATPase 阻害剤 thapsigargin など作用点の異なる様々な小分子化合物が UPR を誘導することが報告されているが，これら作用点が異なる化合物による UPR 関連遺伝子の発現挙動の違いについて解析した例はなかった．

そこで我々は，作用点が異なる UPR 誘導剤 7 種（2-deoxyglucose, brefeldin A, DTT, eeyarestatin I, monensin, thapsigargin, tunicamycin）による UPR 関連遺伝子 9 種（ATF4, CHOP, EDEM, ERdj4, GADD34, GRP78, GRP94, PDI, $p58^{IPK}$）の mRNA 量を Real-Time RT-PCR により化合物添加２４時間後まで経時的発現挙動を測定した．その結果，それぞれの化合物による 9 種の UPR 関連遺伝子の発現プロファイルはそれぞれ特徴的なパターンを示し，またその発現プロファイルの類似度をピアソン相関係数を用いて計算すると，それぞれの化合物の濃度を変えた時の発現プロファイル同士が最も類似していることがわかった．このことから，UPR 関連遺伝子発現プロファイルの違いは化合物の濃度よりも化合物の作用点の違いに依存していることが示唆された．さらに，化合物毎の遺伝子発現プロファイルを階層的クラスタリングにより比較解析した結果，７種の UPR 誘導剤による UPR 関連遺伝子の発現プロファイルは大きく３つに分類された（グループ A ; 2-deoxyglucose, DTT, thapsigargin, tunicamycin : グループ B ; eyarestatin I : グループ C ; brefeldin A, monensin）．UPR 関連遺伝子の発現は３つのストレスセンサーの活性で制御されているため，次にグループ A，B，C それぞれに属する化合物群による３つのストレスセンサーの活性を検討したところ，グループ A に属する化合物は３つのストレスセンサーいずれも活性化させていたのに対し，グループ B に属する化合物は PERK と ATF6 を，さらにグループ C に属する化合物は PERK のみを活性化させていた．以上の結果より，ストレスセンサーの活性と UPR 関連遺伝子の発現が化合物の作用点の違いによって少なくとも３パターン存在することが示唆された．

ER stress, UPR, Expression profile

講演番号：2A05p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 05 会場

漢方薬抽出物からのパーキンソン病治療薬シードの探索

A screening of neuroprotective seeds for Parkinson's disease from extraction of herbal medicines

○藤巻 貴宏[1]、斉木 臣二[2]、田代 悦[1]、服部 信孝[2]、井本 正哉[1] ([1]慶大理工、[2]順天堂大医)
○Takahiro Fujimaki[1], Shinji Saiki[2], Etsu Tashiro[1], Nobutaka Hattori[2], Masaya Imoto[1] ([1]Keio Univ., [2]Juntendo Univ.)

パーキンソン病(PD)は脳内伝達物質であるドーパミンが減少することで振戦、固縮、無動といった運動障害を引き起こす神経変性疾患であるが、発症メカニズムが不明であり、治療法は対症療法しか存在せず完治治療には至っていない。そこで我々は漢方薬から新たなパーキンソン病治療薬シードの探索を行った。ラット副腎髄質由来褐色細胞腫 PC12D 細胞に神経毒ロテノンにより細胞死を誘導する PD モデルを用いて、日本の臨床で使用されている 128 種類の漢方薬サンプルの中からその細胞死を抑制するサンプルの探索を行った。その結果、「調胃承気湯（ちょういじょうきとう)」および「大黄甘草湯（だいおうかんぞうとう)」に細胞死抑制効果があることを見出した。さらに「調胃承気湯」および「大黄甘草湯」の共通生薬成分である甘草に強い活性があることを確認し、甘草単体からの活性成分の単離精製を試みた。甘草（粉末）を 90%エタノールおよび酢酸エチルにより抽出後、PD モデルを用いた細胞死抑制活性を指標に、各種クロマトグラフィーを用いて活性成分の単離精製を行った。その結果licopyranocoumarin(LPC)及びglycyrurol(GCR)を取得した。LPC と GCR は PC12D 細胞において、分化した神経細胞特異的に毒性を示す MPP^+で誘導される細胞死を濃度依存的に回復させた。次に我々は PD の原因とされるミトコンドリア機能障害と酸化ストレスに対する LPC と GCR の影響を検証した。LPC と GCR は MPP^+が誘導するミトコンドリア膜電位の消失を細胞死抑制濃度で回復させた。また、MPP^+により上昇してくる細胞内の ROS 産生を有意に阻害し、ROS 産生により活性化する JNK のリン酸化を抑制した。JNK の阻害剤である SP600125 も MPP^+が誘導する細胞死とミトコンドリア膜電位消失を抑制したことから、LPC と GCR は ROS 産生を減少させることで、JNK 経路を介して細胞死を抑制していることが示唆された。

Parkinson's disease, traditional chinese herbal medicines, reactive oxygen species

講演番号：2A05p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 05 会場

転写因子 NF-κB の情報伝達経路に対する allantopyrone A の作用機序の解析

Mechanism of action of allantopyrone A for signaling pathway of NF-κB

○横井川 純平[1]、森元 今日子[1]、塩野 義人[2]、上杉 祥太[3]、木村 賢一[3]、片岡 孝夫[1] ([1]京都工芸繊維大応生、[2]山形大農、[3]岩手大院連合農)
○Junpei YOKOIGAWA[1], Kyouko MORIMOTO[1], Yoshihito SHIONO[2], Shota UESUGI[3], Ken-ichi KIMURA[3], Takao KATAOKA[1] ([1]Dept. Appl. Biol. , Kyoto Inst. Tech., [2]Fac. of Agri. , Yamagata Univ., [3]Uni. Grad. Sch. of Agri. Sci. , Iwate Univ.)

【目的】TNF-α や IL-1α に代表される炎症性サイトカインは、転写因子 nuclear factor-κB（NF-κB) を活性化し、炎症反応や免疫反応などの重要な生体防御反応を担っている。NF-κB シグナル伝達経路においては、アダプタータンパク質のレセプタへの結合、TGF-β-activated kinase 1 (TAK1)複合体の活性化、inhibitor of NF-κB (IκB) kinase 複合体の活性化、IκB のリン酸化と分解が起こり、遊離した NF-κB サブユニットが核内へ移行し標的遺伝子を活性化する。Allantopyrone A は植物内生糸状菌 *Allantophomopsis lycopodina* KS-97 より単離されたα-ピロン代謝産物であり、α,β-不飽和カルボニル基を持つ。α,β-不飽和カルボニル基は求電子性であることから求核試薬に対する反応性を有し、Michael 付加反応によりシステインチオール基と反応することが知られている。我々はこれまでにα-メチレン γ-ラクトン構造やα-ブロモケトン構造を持つオイデスマン誘導体が NF-κB シグナル伝達経路における複数のステップを阻害することを報告した。本研究では、NF-κB シグナル伝達経路に対する allantopyrone A の作用機序について検討した。

【方法】ヒト肺がん腫 A549 細胞を allantopyrone A で前処理した後、炎症性サイトカインである TNF-α もしくは IL-1αの存在下で培養した。細胞表面の intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)の発現量を Cell ELISA 法、NF-κB の転写活性をルシフェラーゼレポーターアッセイ、IκBαの分解および NF-κB の核移行をウェスタンブロッティングによって検討した。また、HEK293T 細胞に過剰発現させた IκB キナーゼβを用いた *in vitro* キナーゼアッセイを行った。

【結果】Allantopyrone A は TNF-α もしくは IL-1α によって 誘導される ICAM-1 の発現をほぼ同程度の濃度で阻害した。さらに NF-κB レポーターアッセイを行ったところ、allantopyrone A は ICAM-1 の発現を阻害したのと同じ濃度で NF-κB の転写活性を阻害することが明らかになった。そこで NF-κB シグナル伝達経路に対する allantopyrone A の影響を検討したところ、allantopyrone A は TNF-αによって誘導される NF-κB サブユニットの核移行、および IκBαの分解を阻害することが観察された。一方、IκB キナーゼβを用いた *in vitro* キナーゼアッセイを行ったところ、allantopyrone A は IκB キナーゼβによる IκBαのリン酸化を阻害しないことを見出した。以上の結果から、allantopyrone A は TNF-αによって誘導される NF-κB シグナル伝達経路において IκB キナーゼよりも上流のステップを阻害していることが示唆された。

Allantopyrone A, NF-κB, IκB kinase

講演番号：2A05p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 05 会場

細胞内タンパク質輸送に対する五環性トリテルペノイドの作用機序の解析

Mechanism of action of pentacyclic triterpenoids on intracellular protein transport

○三津田 智嗣、横道 公伸、片岡 孝夫（京工繊大院・応生）
○Satoshi MITSUDA, Tomonobu YOKOMICHI, Takao KATAOKA (Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. Tech.)

【目的】五環性トリテルペノイドは多くの植物に含まれており、近年抗腫瘍活性や抗炎症活性などの多くの生物活性を有することが報告されている。我々は、五環性トリテルペノイドのひとつであるウルソール酸 (ursolic acid)が、炎症性サイトカインである interleukin-1α (IL-α)によって誘導される細胞接着因子 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)の細胞表面での発現を抑制することを見出し、その作用機序を解析してきた。これまでに、その作用機序の一つとして、ウルソール酸が小胞体からゴルジ体への ICAM-1 輸送を阻害し、高マンノース型糖鎖をもつ ICAM-1 を小胞体に蓄積させることを発見した。今回、我々は、細胞内タンパク質輸送に対するウルソール酸、並びにその構造類縁体であるオレアノール酸 (oleanolic acid)とベツリン酸 (betulinic acid)の影響を検討した。
【方法】ヒト肺がん腫由来 A549 細胞をトリテルペノイドで前処理した後、IL-1α存在下で培養した。細胞表面の ICAM-1 発現に対する影響を Cell ELISA 法で測定した。細胞内の ICAM-1 の発現量や分子量に対する影響をウェスタンブロッティングによって検討した。またエンドグリコシダーゼ H (Endo H)を用いて、トリテルペノイドが ICAM-1 の糖鎖修飾に与える影響を調べた。さらにα-グルコシダーゼ活性に対するトリテルペノイドの影響を測定した。
【結果】IL-1αによって誘導される細胞表面の ICAM-1 発現に対し、オレアノール酸とベツリン酸は阻害活性を示さず、ウルソール酸のみが顕著な阻害活性を示した。一方、ウルソールとベツリン酸は ICAM-1 の低分子量化を誘導したが、オレアノール酸で処理した細胞では、ICAM-1 の分子量に顕著な変化は見られなかった。次に、ICAM-1 の糖鎖修飾に対する影響を Endo H を用いて検討したところ、ウルソール酸で処理した ICAM-1 では Endo H 感受性、ベツリン酸で処理した ICAM-1 では部分的な Endo H 感受性、オレアノール酸で処理した ICAM-1 は Endo H 耐性であった。さらに種々の糖鎖修飾阻害剤と比較したところ、ベツリン酸はα-グルコシダーゼ阻害剤であるカスタノスペルミンと類似していることが明らかになった。そこで、α-グルコシダーゼ活性に対する影響を測定したところ、ウルソール酸とベツリン酸はα-グルコシダーゼ阻害活性を示したが、オレアノール酸は阻害活性を示さなかった。以上の結果から、ウルソール酸は細胞内タンパク質輸送を阻害する作用とα-グルコシダーゼ阻害活性を持つこと、ベツリン酸はα-グルコシダーゼ阻害活性のみを持つこと、オレアノール酸はいずれの阻害活性を持たないが明らかとなり、五環性トリテルペノイドにおいてはわずかな構造の違いが大きな生物活性の違いを生みだすことが示唆された。

Pentacyclic triterpenoids, Protein transport, Glycosylation

講演番号：2A05p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 05 会場

アロステリックな Sirtuin 阻害剤の発見

Discovery of allosteric Sirtuin inhibitors

○伊藤 昭博[1,2]、工藤 紀雄[2]、竹本 操[2]、吉田 稔[1,2,3]（[1]理研　化学遺伝、[2]理研 CSRS、[3]科技機構 CREST）
○Akihiro ITO[1,2], Norio KUDO[2], Misao TAKEMOTO[2], Minoru YOSHIDA[1,2,3] ([1]Chem. Genet., RIKEN, [2]RIKEN CSRS, [3]CREST, JST)

NAD 依存的な脱アセチル化酵素である Sirtuin はエネルギー代謝などを制御し、老化、寿命および癌などの疾患に密接に関与することが知られている。ヒトにおいて Sirtuin は 7 種類のアイソフォーム（SIRT1-7）が存在し、細胞内局在、酵素活性、基質特異性等が異なる。SIRT3 はミトコンドリアに局在する主要な脱アセチル化酵素であり、ミトコンドリア内の酵素の活性を制御することによりエネルギー代謝を調節することが知られている。我々は SIRT3 阻害剤を同定するために、様々な化合物ライブラリーからスクリーニングを行ったところ、SIRT3 の脱アセチル化酵素阻害活性を有する複数の化合物を取得に成功した。得られた化合物の SIRT3 阻害機構を明らかにするために、共結晶構造解析を行った。その結果、化合物は基質結合ポケットと離れた位置に存在する 301 番目のアルギニン付近に結合することを見出した。アポ酵素の構造と superimpose 解析を行ったところ、化合物の結合により NAD 結合ポケットに覆い被さるように構造変化を引き起こしていることが示され、NAD 結合ポケットが閉じた状態になっていることが示唆された。実際、等温滴定カロリメトリーを用いて化合物存在下における SIRT3 と NAD の KD 値を算出したところ、化合物は SIRT3 と NAD の結合親和性を低下させることを見出した。本発表では、新しいアロステリックな Sirtuin 阻害機構について報告したい。

Allosteric inhibitor, Metabolism, Sirtuin

講演番号：2A05p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 05 会場

FD-891 耐性酵母から精製したアクチンの特性

Properties of yeast actin purified from FD-891-resistant yeast

○鏡 大志郎[1]、竹内 美穂[1]、工藤 史貴[2]、江口 正[2]、片岡 孝夫[3]、臼井 健郎[1]([1]筑波大院・生命環境、[2]東工大院・理工、[3]京工繊大院・応生)
○ Daijiro KAGAMI[1], Miho TAKEUCHI[1], Fumitaka KUDO[2], Tadashi EGUCHI[2], Takao KATAOKA[3], Takeo USUI[1] ([1]Univ. Tsukuba, [2]Tokyo Inst. Technol., [3]Kyoto Inst. Technol.)

【目的】FD-891 は抗がん活性を指標に放線菌 *Streptomyces graminofaciens* A-8890 培養上清から単離・構造決定された 16 員環マクロライドである[1,2]。これまで本物質が動物細胞の細胞周期進行を G2/M 期で停止させてアポトーシスを誘導すること[3]、また F-アクチンを安定化する一方、F-アクチンと F-アクチン結合タンパク質の結合を阻害し、細胞に特徴的な一つの大きなアクチン凝集体を形成する“タンパク質-タンパク質相互作用阻害剤”であることを報告してきた[4]。さらに FD-891 のアクチン結合部位を明らかにするため、*in silico* 結合モデルを元にアクチンに変異を導入し、変異アクチンのみを発現する酵母を作成したところ、他のアクチン作用薬への感受性は変わらず、FD-891 特異的に耐性を示す変異アクチン発現酵母の作出に成功した[4]。このことから結合モデルがある程度信頼できると考えられるが、FD-891 耐性酵母が発現する変異アクチンがどのようにして FD-891 の作用に対して耐性を与えているかは不明のままである。そこで酵母の野生型及び耐性変異型アクチンを精製し、*in vitro* 系を用いて耐性変異型の FD-891 耐性機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

【方法・結果】野生型酵母アクチン、または FD-891 耐性変異型酵母アクチンのみを発現する酵母より、DNase I カラムを用いてそれぞれの酵母アクチンを精製した。精製した酵母アクチンは、ATP 存在下、塩を加えることにより重合したことから、通常の重合能を持つと考えられる。そこでこれらの酵母アクチンに対し FD-891 の作用を検討した。まず FD-891 によるアクチンの重合促進・安定化を検討したところ、野生型酵母アクチンでは重合の促進が見られたが、耐性変異型酵母アクチンでは重合が促進されなかった。次に、重合した野生型及び耐性変異型酵母アクチンと、ヒト由来 F-アクチン結合タンパク質の結合に対する FD-891 のタンパク質－タンパク質相互作用阻害活性を検討したところ、FD-891 は野生型酵母アクチンと F-アクチン結合タンパク質の結合を阻害したが、耐性変異型酵母アクチンと F-アクチン結合タンパク質との結合は阻害しなかった。現在、これらの精製アクチンと FD-891 との結合についても検討しており、合わせて報告する予定である。

1) *J. Antibiot.*, **47**, 1226-1233 (1994)、2) *J. Antibiot.*, **57**, 156-157 (2004)、
3) *J. Antibiot.*, **62**, 507-512 (2009)、4) 日本農芸化学会 2012 年度大会 4SY09-3

actin, FD-891, protein-protein interaction

講演番号：2A05p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ A 校舎 05 会場

化合物アレイを用いたトリコジエンシンターゼ阻害剤の探索

Screening of inhibitors against trichodiene synthase, by the chemical array approach

○前田 一行[1]、中嶋 佑一[1]、河村 達郎[2]、近藤 恭光[2]、斎藤 臣雄[2]、本山 高幸[2]、長田 裕之[2]、金丸 京子[1]、小林 哲夫[1]、木村 真[1] ([1]名大院・生命農、[2]理研 CSRS)
○Kazuyuki Maeda[1], Yuichi Nakajima[1], Tatsuro Kawamura[2], Yasumitsu Kondoh[2], Tamio Saito[2], Takayuki Motoyama[2], Hiroyuki Osada[2], Kyoko Kanamaru[1], Tetsuo Kobayashi[1], Makoto Kimura[1] ([1]Nagoya Univ., [2]RIKEN CSRS)

【目的】*Fusarium graminearum* や *Fusarium asiaticum* 等のムギ類赤かび病菌はトリコテセンと総称されるマイコトキシン（かび毒）を産生する。トリコテセンは汚染穀類の生物毒性や宿主植物における病徴の進展への関与が指摘されている。そのためトリコテセンの産生制御剤を開発することができれば、食の安全性の確保に寄与するばかりでなく、画期的な病害防除手法への展開も期待できると考えられる。我々は、トリコテセン生合成の初発酵素であり、生合成に必要不可欠な TRI5（trichodiene synthase）に着目し、同タンパク質と結合能を有する化合物について、理化学研究所天然化合物バンクの化合物を対象に化合物アレイによるスクリーニングを実施し、ヒット化合物について活性を評価した。
【方法】毒素産生時の *F. asiaticum* MAFF111233 株の培養菌体から total RNA を抽出し、*Tri5* 遺伝子の cDNA を増幅した。*Tri5*_cDNA を挿入した pCold®II ベクターを Rosetta2 株に導入・発現誘導し、菌体破砕液より His-TRI5 タンパク質を精製した。精製した His-TRI5 タンパク質を化合物アレイ解析に供し、結合化合物のスクリーニングを行なった。アレイ解析で得られた結合化合物の候補（以下、ヒット化合物）とその類縁体を用いて、培養菌体の YS_60（0.1% Yeast extract, 6% sucrose）培地における毒素産生と精製 TRI5 タンパク質に対する酵素活性を指標として阻害活性を評価した。
【結果と考察】化合物アレイによるスクリーニングの結果、32 種類のヒット化合物が得られた。これらの化合物はいずれも 10 μg/ml の処理濃度で毒素産生を抑制しなかったが、うち 1 化合物は 100 μg/ml の処理濃度で TRI5 の酵素活性を 85.4%阻害した。同化合物の類縁体 21 化合物を 10 μg/ml の処理濃度で培養菌体に処理したところ、3 化合物は再現性良く毒素産生の抑制を示した。これらの化合物はトリコテセン生合成遺伝子もしくは遺伝子産物に干渉しているものと考えられる。これらの化合物のトリコテセン生合成遺伝子の発現レベルへの影響や TRI5 の酵素活性に対する影響を検証し、報告する予定である。

謝辞
本研究は生物系特定産業技術研究支援センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業「ケミカルバイオロジーを基盤とした革新的な農薬等の探索研究」として行われているものである。

chemical array, trichothecene, trichodiene synthase

講演番号：2A05p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ A 校舎 05 会場

放線菌由来抗がん性物質 collismycin A の作用標的同定

Identification of a target for collismycin A, a cytotoxic microbial product

○井上 尭[1,2]、川谷 誠[1]、室井 誠[1,3]、二村 友史[1]、青野 晴美[1]、浦本 昌和[1]、本郷 やよい[4]、越野 広雪[4]、五十嵐 康弘[5]、安藤 直子[2]、長田 裕之[1,3]（[1]理研・抗生物質、[2]東洋大院・工、[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[4]理研 GRC・連携支援、[5]富山県立大・工）

○Gyo Inoue[1,2], Makoto Kawatani[1], Makoto Muroi[1,3], Yushi Futamura[1], Harumi Aono[1], Masakazu Uramoto[1], Yayoi Hongo[4], Hiroyuki Koshino[4], Yasuhiro Igarashi[5], Naoko Ando[2], Hiroyuki Osada[1,3] ([1]RIKEN, Antibiotics Lab., [2]Toyo Univ., [3]RIKEN CSRS, Chemical Biology, [4]RIKEN GRC, Collaboration Promotion, [5]Toyama Prefectural Univ.)

【目的】放線菌などの微生物は抗生剤や抗がん剤といった有用物質をしばしば生産する。しかし、医薬やバイオプローブとして開発していくには、そのような生理活性化合物の作用標的・作用機作を明らかにすることが不可欠である。放線菌二次代謝産物である collismycin A（CMA）は、抗菌作用やがん細胞増殖阻害作用を示すことが知られているが、そのメカニズムは不明である。本研究では、CMA の作用標的の解明を試みた。

【方法】由来の異なる 10 種類のヒトがん細胞を CMA で 72 時間処理後、WST-8 試験により増殖阻害活性を評価した。HeLa 細胞あるいは HL-60 細胞を CMA で処理後、フローサイトメトリーを用いて細胞周期への影響を解析した。また、細胞周期関連タンパク質の発現変動はウェスタン・ブロッティングにより解析した。細胞内 ATP 量はルシフェラーゼ発光法により測定し、細胞内活性酸素種（ROS）の生成量は ROS 感受性蛍光プローブ carboxy-H2DCF-DA を用いて、フローサイトメトリーにて測定した。CMA-Fe(II)錯体および CMA-Fe(III)錯体の定性分析は HPLC あるいは HR-ESI-MS を用いて行った。

【結果】CMA はさまざまなヒトがん細胞の増殖を IC_{50} 値 100～400 nM と比較的低濃度で阻害し、cyclin D1 タンパク質の速やかな発現低下を伴いながら細胞周期を G1 期で停止させた。また、細胞増殖に関わる ATP の細胞内含量および ROS の細胞内生成量を調べたところ、CMA 処理細胞では ATP、ROS レベルともに低下していた。特に、内在性 ROS レベルについては処理後 1 時間で顕著に低下し、その効果はポジティブコントロールとして用いた抗酸化物質の N-アセチル-L-システイン（NAC）と同等かそれ以上であった。このことから、CMA に強い抗酸化作用があることがわかった。これらの生物活性と化学構造の知見から、CMA は鉄キレーターとして作用する可能性が考えられた。実際、CMA は Fe(II)あるいは Fe(III)と組成比 2：1 の錯体を形成した。また、培地中に鉄イオンを過剰量添加しておくと、CMA の増殖阻害活性が完全に失われた。このような効果は、亜鉛イオンやマグネシウムイオンなどの他の金属イオンの添加では観察されなかった。以上より、CMA は鉄キレーターとして作用することで抗がん活性を示すことが強く示唆された。

cancer, iron, chelator

講演番号：2A05p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ A 校舎 05 会場

ChemProteoBase による collismycin A の作用機作解析

Proteomic analysis of the effect of collismycin A by ChemProteoBase

○室井 誠[1,2]、近藤 久恵[2]、平田 泰子[2]、井上 尭[1,3]、川谷 誠[1]、長田 裕之[1,2] ([1]理研・抗生物質、[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[3]東洋大院・工)
○Makoto Muroi[1,2], Hisae Kondo[2], Yasuko Hirata[2], Gyo Inoue[1,3], Makoto Kawatani[1], Hiroyuki Osada[1,2] ([1]RIKEN, Antibiotics Lab., [2]RIKEN CSRS, Chemical Biology, [3]Toyo Univ.)

【目的】薬剤に応答して変化するプロテオームは、薬剤作用を解析する上で有用な情報を与える。我々は２次元電気泳動をベースとしたプロテオーム解析手法である蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析システム（2-D DIGE）を用いて、薬剤作用解析システムChemProteoBaseを構築した。本システムでは、薬剤処理HeLa細胞のプロテオーム解析を行い再現性の高い296スポットの定量を行い、データベース化した既知薬剤処理細胞の定量結果と多変量解析を用いて比較するシステムである。本解析システムでは、スポットの同定情報がなくても薬剤間の比較が可能であることが利点であるが、プロテオームの変化のパターン比較だけでは、新たな作用標的を予測することは難しい。しかし、発現量の顕著な変化の認められたスポットの同定情報を加える事によって、薬剤によって影響を及ぼすパスウェイの抽出や特定の代謝系に着目した作用解析が可能になることが期待される。そこで、現システムを改変し、スポット同定情報を用いた解析手法を組み込んだ。本システムを用いてがん細胞増殖阻害作用物質Collismycin Aの作用を解析した。
【方法】プロテオーム解析を行う時の濃度決定をする為に、薬剤でHeLa細胞を48時間処理後、WST-8を用いて細胞数を測定した。細胞の増殖をほぼ完全に阻害する5 μMの濃度でプロテオーム解析を行なった。コントロール並びに18時間薬剤処理を行なったHeLa細胞から調製したライゼートを蛍光標識後、２次元電気泳動を行ない2-D DIGEのシステムを用いてスポット定量を行なった。296スポットの定量データを用いて、データベースの化合物とクラスター解析を行なった。296スポットのうち、256スポットを同定してChemProteoBaseに取り込み、顕著に変化したスポットをUniprotのデータと関連付けるシステムを作成し、Collismycin Aの作用を解析した。
【結果】Collismycin Aと鉄キレーターDp44mT とChemProteoBaseによる比較を行ったところ、高い類似性を示した。Collismycin A処理HeLa細胞では、Dp44mT処理HeLa細胞と同様に、解糖系関連のタンパク質スポットの顕著な増加が認められる他、コラーゲンの修飾に関するタンパク質スポットの顕著な増加も認められた。Collismycin Aは解糖系やがん細胞の転移に関する細胞外マトリックスの合成に作用していることが示唆された。本解析手法を用いる事によって、メタボリズムなどに及ぼす薬剤の作用情報が迅速に得られることが期待される。

ChemProteoBase, proteomic profiling, metabolome

講演番号：2A05p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ A 校舎 05 会場

化合物アレイによる p38γおよび p38δMAP キナーゼ特異的阻害剤の探索

Screening of an inhibitor for p38γ and p38δ using chemical array

○近藤 恭光[1,2]、須藤 龍彦[1]、本田 香織[2]、林 輝雄[1]、長田 裕之[1,2]([1]理研・抗生物質、[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)
○Yasumitsu KONDOH[1,2], Tatsuhiko SUDO[1], Kaori HONDA[2], Teruo HAYASHI[1], Hiroyuki OSADA[1,2] ([1]RIKEN, Antibiotics Lab., [2]RIKEN CSRS, Chemical Biology)

【目的】化合物アレイによるスクリーニングは、タンパク質に結合する小分子化合物をハイスループットに探索するための有用な手法である。我々が開発した化合物アレイは、ポリエチレングリコール(PEG)鎖の先端にジアジリン基を有するリンカーをスライドガラスに導入し、紫外線照射により化合物をリンカーに固定化する。この化合物アレイ上の化合物とタンパク質との相互作用を検出することにより結合化合物をハイスループットに探索できる。この方法により、これまでに多くのタンパク質の結合化合物を探索し、その中からそのタンパク質の阻害剤を見いだしてきた。しかし、p38αMAPキナーゼとその阻害剤であるSB203580(SB)との相互作用は化合物アレイ上で感度よく検出されないという問題があった。この問題を解決するために、化合物アレイのリンカーおよびタンパク質処理方法の改良を行い、さらに、改良した化合物アレイシステムを用いて、p38γおよびp38δMAPキナーゼ特異的阻害剤の探索を行う。
【方法と結果】p38α-SB 間の相互作用を検出するにはリンカーの PEG 鎖だけでは長さが不十分であると考え、PEG 鎖の根元にプロリンロッドを連結させた長鎖リンカーを合成して化合物アレイに導入した。その結果、p38α と SB との相互作用によるシグナル強度が飛躍的に上昇した。また、p38αの処理によるタンパク質の非特異的吸着を抑制するために、MPC ポリマーをタンパク質溶液に添加し、非特異的吸着を抑制して、S/B 比を劇的に向上させた。次に、改良した化合物アレイシステムを用いて、特異的阻害剤が未報告の p38γおよびp38δの特異的阻害剤の探索を試みることにした。そのために、スクリーニングに p38α野性型とゲートキーパーアミノ酸を Thr から Met に変異させた p38α106M 変異型を用いることとした。SB の p38 アイソフォームに対する選択性は、このアミノ酸の違いが大きく関与しており、Thr である p38α/βは SB に対して感受性であるのに対して、Met である p38γ/p38δは非感受性である。そのため、このアミノ酸を Met に置換した p38αT106M を用いることで、この 1 アミノ酸の違いを認識して結合する化合物をより絞り込んで探索することが可能であると考えた。そこで、p38α と p38αT106M の両方で化合物アレイスクリーニングを行い、p38αT106M のみに結合する化合物を探索したところ、27,000 化合物の中から 4 化合物を見いだした。その 4 化合物の中から、SU-002 が p38αのキナーゼ活性は阻害せず、p38αT106M のキナーゼ活性を阻害することが見いだされた。この SU-002 は、期待通りに p38γおよびp38δのキナーゼ活性を阻害した。

chemical array, p38 MAP kinase, inhibitor

講演番号：2A05p22
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ A 校舎 05 会場

がん細胞に ROS 産生を介した細胞死を誘導するα-chloroacetamide の作用機序と効果

Study on the mechanism of action and effect of an α-chloroacetamide that induces cell death via ROS generation

○河村 達郎[1]、近藤 恭光[1,2]、室井 誠[1,2]、川谷 誠[1]、長田 裕之[1,2] ([1]理研・抗生物質、[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)

○Tatsuro KAWAMURA[1], Yasumitsu KONDOH[1,2], Makoto MUROI[1,2], Makoto KAWATANI[1], Hiroyuki OSADA[1,2] ([1]RIKEN, Antibiotics Lab., [2]RIKEN CSRS, Chemical Biology)

【目的】生理活性物質の作用機序の解明は、生命現象の理解につながる重要なプロセスである。我々は、抗がん物質を探索する過程で、がん細胞に短時間で細胞死を誘導するα-chloroacetamide (NPD926)を見出した。本研究は、NPD926 の作用機序の解明と効果の検証を目的とした。

【結果】①作用機序の解明：NPD926 は活性酸素種(ROS)産生を介した細胞死を誘導すること、また、NPD926 の結合タンパク質として glutathione *S*-transferase (GST)の複数のアイソザイムを同定したことを昨年の本大会にて報告した。GST は細胞内外に由来する様々な基質に glutathione (GSH)を結合させ、細胞の解毒などの機能を担う酵素である。その後、LC-MS を用いた解析により、NPD926 は *in vitro* および細胞レベルで GST の基質となり、GSH と共有結合して GSH 抱合体を形成することを見出した。さらに、NPD926 は細胞内の GSH の濃度の低下を誘導することを明らかにした。これらの結果から、「NPD926 が GST の基質として細胞内の主要な還元物質である GSH と結合し、GSH を枯渇させ、その結果として ROS 産生を介した細胞死を誘導する」という作用機序が示唆された。②効果の検証：がん遺伝子である *K-ras* が活性化した細胞は恒常的に ROS レベルが上昇しており、そのため ROS inducer に対する感受性が高いことが知られている。実際に、活性型 *K-ras* により形質転換した NIH3T3 細胞は親株と比べて細胞内 ROS レベルが高く、NPD926 に対して高い感受性を示した。先行研究と同様にこれらの結果は、ヒトで高頻度に認められる *K-ras* 遺伝子に活性型変異を有するがんに対し、ROS inducer が有効であることを示唆している。

reactive oxygen species, glutathione, glutathione *S*-transferase

講演番号：2A05p23
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ A 校舎 05 会場

微生物培養ブロスからの抗マラリア活性化合物の探索

Screening for microbial metabolites inhibiting the growth of *Plasmodium falciparum*

○早瀬 大貴[1]、宇賀田 久美子[1,2]、LIM Chung Liang[1]、二村 友史[1]、野川 俊彦[1]、渡邉 信元[1]、北 潔[3]、長田 裕之[1] ([1]理研・抗生物質、[2]東京医科歯科大学、[3]東京大学)

○Hiroki HAYASE[1], Kumiko UGATA[1,2], Chung Liang LIM[1], Yushi FUTAMURA[1], Toshihiko NOGAWA[1], Nobumoto WATANABE[1], Kiyoshi KITA[3], Hiroyuki OSADA[1] ([1]RIKEN, Antibiotics Lab., [2]TMDU, [3]The Univ. of Tokyo)

背景

マラリアは熱帯地方を中心に年間数億人が罹患し、約 80 万人が死亡する感染症であり、今もなお甚大な被害をもたらしている。マラリアはワクチンの開発が進んでいるが、化学療法が一般的である。しかし既存の抗マラリア薬に対する耐性マラリア原虫が出現しており、新規な薬剤の開発が急務である。

微生物培養ブロスは構造の多様性に富んだ二次代謝産物の宝庫であり、微生物培養ブロスからはこれまでにも医薬品のシード化合物となるような生理活性化合物が数多く単離同定されてきた。我々の研究室でもホ乳類細胞の増殖を指標としたスクリーニングから数多くの生物機能調節物質の同定に成功してきた。

生理活性化合物を探索する上で、微生物培養ブロスはなおも魅力的な探索源であるが、近年になって新規な天然化合物の報告が減少傾向にあり、これまでの探索方法を改良する必要がある。ブロスからの活性化合物の探索では生物活性を指標とした探索法が一般的であり、本研究以前に微生物培養ブロスからの抗マラリア活性化合物の探索研究が報告されている。新規な活性化合物を得るためには、既知の活性化合物は速やかに選別することが必要である。

一方で、活性を指標にしたスクリーニングでは、微量にしか存在しない化合物は同定されない可能性がある。我々は、微生物代謝産物のスペクトルデータや HPLC の保持時間を網羅的に収集したデータベース(NPPlot)を構築し、微生物ブロスに含まれる既知化合物を速やかに同定し、新規な構造を有する化合物を迅速に選抜することに成功している。これを利用すれば、新規な化合物を探索して抗マラリア活性を評価することで、新規な抗マラリア活性化合物を得ることができる。

目的

迅速に新規な抗マラリア活性化合物を探索する。

方法・結果

1)微生物培養ブロス（ca. 3000）について、ヒト細胞、各種細菌、マラリア原虫に対する活性を比較して、マラリア原虫に対して高い活性を示すブロスから、抗マラリア活性化合物を探索した。そして活性プロファイルから既知の活性化合物は速やかに選別し、新規な化合物を探索した。

2.)NPPlot を利用して新規な化合物を迅速に同定し、抗マラリア活性を評価した。

本発表では 1)微生物培養ブロスからの抗マラリア活性化合物の同定と 2)NPPlot を利用して得た新規な化合物の抗マラリア活性について報告する。

malaria, screening

講演番号：2A06a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ A 校舎 06 会場

ラン藻 *Moorea* 属から得られた新規 lyngbyatoxin A 誘導体の構造と活性

Two new lyngbyatoxin A derivatives from the cyanobacteria *Moorea* sp.

○丹 智史[1]、内田 肇[1]、江 偉娜[1]、岩田 恭江[1]、渡邊 龍一[2]、鈴木 敏之[2]、神尾 道也[1]、永井 宏史[1] ([1]東京海洋大、[2]水研セ中央水研)
○Satoshi TAN[1], Hajime UCHIDA[1], Weina JIANG[1], Yasue IWATA[1], Ryuichi WATANABE[2], Toshiyuki SUZUKI[2], Michiya KAMIO[1], Hiroshi NAGAI[1] ([1]Tokyo Kaiyo Univ., [2]NRI Fish. Res.)

【目的】

数年前に沖縄県では毒性をもつラン藻 *Moorea*（旧名 *Lyngbya*）属が大発生し、海水浴場の一部閉鎖などに追い込まれた。本ラン藻は、各種有毒成分を生産することで知られるが、なかでも lyngbyatoxin A は最も強い毒性を示す生産物の一つであり、発癌プロモーター作用や皮膚への炎症作用を惹起することで知られる。また、この lyngbyatoxin A は放線菌 *Streptomyces* sp.が生産する有毒物質 teleocidin A-1 と同一化合物である。ハワイ産の *Moorea* sp.抽出物を精査したところ、主成分である lyngbyatoxin A の二つの類縁体の存在が示された。そこで、これら化合物の構造決定ならびに毒性を明らかにすることを目的に研究を行った。

【方法および結果】

ハワイ産 *Moorea* sp.を有機溶媒で抽出し、抽出物を得た。その後、液-液分配を行い、酢酸エチル層を得た。今までの研究において、酢酸エチル層に可溶な化合物群から多くの有毒成分が見出されてきたため、酢酸エチル層を逆相 HPLC に供し、50%、70%、90%、100%MeOH で順次溶出した。その中で、70%MeOH 溶出画分についてさらに逆相 HPLC に供し精製を繰り返すことで化合物の単離を行った。単離した化合物について ESI-MS、各種 1 次元ならびに 2 次元 NMR、CD、UV、旋光度などを測定し、構造決定を試みた。また、甲殻類致死活性試験を行い、化合物が持つ毒性の評価を行った。

精製操作の結果、2 つの lyngbyatoxin A (teleocidin A-1)類縁化合物 A および B の単離に成功した。ESI-MS と NMR の測定結果からこれら化合物の平面構造を決定した。化合物 A は 2-oxo-3-hydroxy-teleocidin A-1 (分子式 C27H39N3O4)、化合物 B は 2-oxo-3-hydroxy-13*N*-desmethyl-teleocidin A-1 (分子式 C26H37N3O4)と同一の平面構造を有することが判明した。さらに NMR、CD、旋光度の測定結果から、3、9、12、19 位の 4 つの不斉炭素の立体配置を推定し、これらの絶対立体構造を推定した。本研究は、ラン藻から 2-oxo-indolactam V 骨格を有する lyngbyatoxin 関連化合物群を見出した初めての例である。甲殻類致死活性試験結果から、これら化合物の毒性は lyngbyatoxin A と比較すると非常に弱いことが判明した。本発表では、これら新規化合物の構造決定の詳細と生物活性について報告する。

Cyanobacteria, Lyngbyatoxin A, Structure

講演番号：2A06a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ A 校舎 06 会場

食用ラン藻アシツキからのグラム陽性菌生育阻害物質の同定

Antibacterial n-1 fatty acid from the cyanobacterium *Nostoc verrucosum*

○米島 洸佑[1]、奥 直也[1]、須河 隆夫[2]、五十嵐 康弘[1] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]富山生物学会)
○Kohsuke YONEJIMA[1], Naoya OKU[1], Takao SUGAWA[2], Yasuhiro IGARASHI[1] ([1]Biotech Res Center Toyama Pref Univ, [2]Toyama biological society)

【背景】好気的光合成細菌であるラン藻の一部には寒天質の海藻様群体を形成するものがおり、それらは世界各地で食されている。アシツキ (*N. verrucosum*) もその一つであり、万葉時代から食されていたことが大伴家持の短歌からも窺える。本種はかつて、北陸地方から中国地方にかけての清流に分布していたが、河川開発などの影響により近年では群生地が激減している。当研究室ではこれまで、様々な微生物分類群の化学成分検索を行ってきたが、その一環としてアシツキに着目した。なお、*Nostoc* 属ラン藻からは多様な構造・活性を持つ生物活性物質が多く単離されており、有用な創薬資源の一つであるが、本種について成分調査の報告はない。また、食経験があることから、その成分は人体への高い安全性が期待できる。
【方法と結果】富山県南砺市利賀村の自生地にて試料を約 5.2 kg 採集した。藻体の EtOH 抽出物を溶媒分画にて *n*-hexane、90% MeOH, BuOH, H_2O の 4 フラクションを調製し、これらの 9 種の検定菌に対する増殖阻害活性を調べたところ、90% MeOH と BuOH 画分にグラム陽性菌に対する活性がみられた。このうち 90% MeOH 画分を各種クロマトグラフィーにて精製し活性物質 8.7 mg を得た。NMR および MS スペクトル分析にて構造解析を行った結果、(9*Z*,12*Z*)-9,12,15-hexadecatrienoic acid であることが判明した。本物質は GC 分析にてニシン油や、ナタネ油、およびイチョウの葉や根より検出されているが、幾何異性等の厳密な同定はなされていなかった。また、今回初めて詳細な構造決定がなされ、本物質が抗菌活性を有することを示した。本物質の *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus* に対する最小発育阻止濃度はそれぞれ 64, 256, 256 μg/mL であった。

Ashituki, *Nostoc verrucosum*, n-1 fatty acid

講演番号：2A06a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ A 校舎 06 会場

食用ラン藻スイゼンジノリからの生理活性物質の探索
Isolation, Structure, and Bioactivity a New Fungicidal Macrolide from an Edible Cyanobacterium *Aphanothece sacrum*

○松本 京[1]、奥 直也[1]、丹生 慶次郎[2]、五十嵐 康弘[1]（[1]富山県大・生工研セ、[2]水前寺のり本舗 丹誠堂）
○Miyako MATSUMOTO[1], Naoya OKU[1], Keijiro TANSEI[2], Yasuhiro IGARASHI[1]（[1]Biotech Res Center Toyama Pref Univ., [2]Suizenjinori Hompo Tanseido.）

【目的】スイゼンジノリ（*Aphanothece sacrum*）は、福岡県黄金川のみに生息する希少食用ラン藻である。スイゼンジノリと類似の寒天状群体を形成する食用ラン藻として、ネンジュモ（*Nostoc commune*）、中国産の髪菜（*N. flagelliforme*）、アシツキ（*N. verrucosum*）等が知られており、これらの属する *Nostoc* 属は数多くの二次代謝産物を生産することが知られている。しかし、*Aphanothece* 属は過去にシュードビタミン B_{12} と高分子多糖 sacran が発見されているのみであまり研究が進められていない。そこで、食用ラン藻からの生理活性物質探索研究の一環としてスイゼンジノリからの物質探索を試みた。
【方法及び結果】藻体 500 g をエタノールで抽出後、溶媒分画を行い、ヘキサン層、90 %メタノール層、ブタノール層、水層の 4 画分を得た。これらをカビ 2 株、酵母 2 株、グラム陽性菌 4 株、グラム陰性菌 1 株からなる 9 種の検定菌に対する生育阻害試験に供したところ、全ての画分がいずれかの株に対し生育阻害活性を示した。このうち、カビに対して強い活性の見られたヘキサン層と 90 %メタノール層を、最も感受性の高い黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* に対する抗菌活性を指標にシリカゲルカラムクロマトグラフィー、Sephadex LH-20 ゲルろ過クロマトグラフィー、シリカゲル HPLC により順次精製した結果、ヘキサン層からは 1.5 mg（収率 0.0003 %）、90 %メタノール層からは 6.0 mg（収率 0.0012 %）の同一物質を得た。NMR 及び MS スペクトル解析の結果、本物質は新規 14 員環マクロライドであることが判明し、sacrolide A と命名した。本物質の二箇所の不斉中心は、化学誘導及びキラル異方性分析にてその絶対立体配置を決定した。また、本物質は 3Y1 ラット繊維芽細胞に対して IC_{50} 4.5 μM の細胞毒性を示した。

sacrolide, *Aphanothece sacrum*, Edible Cyanobacterium

講演番号：2A06a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ A 校舎 06 会場

糸状菌 *Penicillium herquei* の生産する抗インフルエンザウイルス活性物質の構造および活性
Structures and biological activities of an anti-influenza virus substance produced by fungi

○千葉 拓也[1]、浅見 行弘[1,2]、須賀 拓弥[1]、岩月 正人[1,2]、野中 健一[2]、増間 碌郎[2]、永井 隆之[1,2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2] ([1]北里大学大学院感染制御科学府、[2]北里大生命科学研究所)
○Takuya Chiba[1], Yukihiro Asami[1,2], Takuya Suga[1], Masato Iwatuki[1,2], Kenichi Nonaka[2], Rokuro Masuma[2], Takayuki Nagai[1,2], Satoshi Omura[2], Kazuro Shiomi[1,2] ([1]Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University, [2]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University)

【背景と目的】インフルエンザウイルスは変異を繰り返しながら毎年のように世界中で流行し、またそれに加えて数十年に一度、数百万～数千万人の死者を出す世界規模の大流行を引き起こしている。現在利用可能な抗インフルエンザウイルス薬は 2 つの作用点に対する 5 種（日本認可は 4 種)のみである。しかし既に耐性種も出現しており、投与法やウイルス亜型に対するスペクトル、副作用などの問題点もあることから、大流行時の備えとして充分とは言い難い。そのため新型や薬剤耐性のウイルスに対応するため、作用点や構造の異なる薬剤を複数持つことが重要であり、新しい薬剤が求められている。そこで、本研究では微生物代謝産物を探索源として、新しい作用機構、化学構造を持つ新規抗インフルエンザウイルス活性物質の探索を目指している。

【方法】本アッセイは、一般的に抗インフルエンザウイルス活性を評価する手法である *in vitro* アッセイ系を用いている。[1)] 概略としては、インフルエンザ感受性細胞である MDCK 細胞（イヌ腎臓上皮細胞由来の培養細胞)にインフルエンザウイルス（A/PR/8/34 型)とサンプルを添加し、ウイルス感染による細胞の生死をクリスタルバイオレット染色法により判定した。

【結果と考察】微生物の産生する抗インフルエンザ活性物質を探索した結果、糸状菌 *Penicillium herquei* FKI-7215 株の培養液中より、herquline A を単離した（Fig. 1)。[2)] Herquline A は、A/H1N1 型インフルエンザウイルスの MDCK 細胞に対する感染を、50 μg/ml で 50%阻害（IC_{50})し、細胞毒性との選択性は 60 倍（MDCK 細胞毒性 IC_{50} 3,000 μg/ml)と高い値を示した。これは、既存薬であるアマンタジンの IC_{50} 76 μg/ml と比較すると同等の値であった。また、herquline A は、いずれも A/H3N2 型や B 型のインフルエンザウイルスに対しては、効果を示さなかった。これは、現在用いられているノイラミニダーゼ阻害剤やM2チャネル阻害剤とは異なる抗ウイルススペクトルであり、既存薬とは異なる作用機構が予想される。したがって、本化合物は既存薬に耐性なインフルエンザウイルスにも有効である可能性が考えられる。

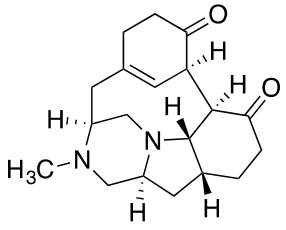


Fig.1 Herquline Aの構造

【参考文献】
1. Fukami, A. *et al.*, *J. Antibiot.*, 2000, **53**, 1215-1218.
2. Ōmura, S. *et al.*, *J. Antibiot.*, 1979, **32**, 786-790.

Influenza virus, Microbial metabolites, Fungi

講演番号：2A06a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ A 校舎 06 会場

微生物二次代謝産物からの 赤痢アメーバ特異的含硫アミノ酸代謝経路阻害物質の探索

Search for inhibitors against *Entamoeba histolytica* specific biosynthetic pathway of sulfur-containing amino acids produced by microorganisms

○酒井 一成[1]、森 美穂子[1,4]、三橋 祐也[3]、増間 碌郎[1,4]、高橋 洋子[1,4]、野崎 智義[2]、塩見 和朗[1,4]、大村 智[1,4] ([1]北里大学院感染制御科学府、[2]国立感染症研究所、[3]北里大学理、[4]北里大学生命研)
○ Kazunari SAKAI[1], Mihoko MORI[1,4], Yuya MITUHSHI[3], Rokurou MASUMA[1,4], Yoko TAKAHASHI[1,4], Tomoyoshi NOZAKI[2], Kazurou SHIOMI[1,4], Satoshi OOMURA[1,4] ([1]Grad. Sch. Infect. Control Sci., Kitasato Univ., [2]Dept. Parasitol., NIID, [3]Sch Sci., Kitasato Univ., [4]Kitasato Inst. Life Sci., Kitasato Univ.)

【背景と目的】赤痢アメーバ症は赤痢アメーバ原虫（*Entamoeba histolytica*）が水・食物から経口感染し大腸に寄生することにより起こる下痢症であり、熱帯～亜熱帯の開発途上国で感染者が多く見られる。近年、日本では男性同性愛者に感染が拡大しており、年間 1,000 件を超える報告がある。治療に用いられる抗菌・抗原虫薬であるメトロニダゾールは、シストには効かないことや耐性原虫の出現、催奇形性等の問題があり、作用機構の異なる新薬の開発が望まれている。我々は赤痢アメーバ原虫特異的な含硫アミノ酸代謝経路（Fig. 1）に着目し、本経路上のセリン-アセチル転移酵素（SAT1, 2, 3）またはシステイン合成酵素（CS1, 2, 3）を阻害する物質は宿主であるヒトに害を及ぼさない抗原虫薬になると考えた。そこでこれまでに多数の有用な生理活性物質が見出されている微生物二次代謝産物を探索源とし、SAT、CS を阻害する物質の探索研究を進めている。

【方法】微生物培養液を 96 穴プレートに入れ、そこに大腸菌で発現させた酵素（SAT1, 3、CS1, 3）と基質を加え Fig. 1 に示す酵素反応を行った。生成したシステインを酸ニンヒドリン試薬と反応させ 550 nm の吸光度を測定することで検出し、サンプルの酵素阻害活性を調べた。また、阻害活性を示したサンプルがシステイン検出系自体を阻害していないかを確認するために、サンプルにシステイン溶液を加えて呈色反応の阻害を調べた。

【結果と考察】放線菌培養液及び糸状菌培養液 3,152 サンプルをスクリーニングした。その結果、糸状菌 FKI-7082 株培養液に CS1 阻害活性を見いだした。培養液を各種クロマトグラフィーで精製した結果、CS1 阻害活性物質として exophillic acid[1)]（CS1 に対する IC_{50}=19.0 μM）を単離した。

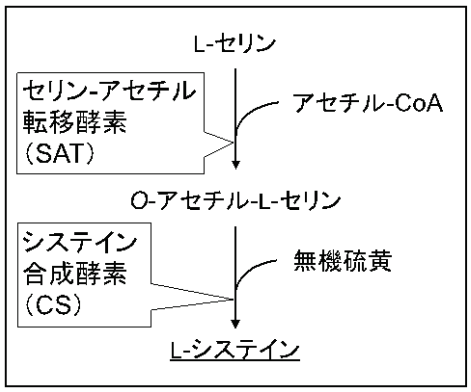


Fig. 1　赤痢アメーバ原虫
特異的含硫アミノ酸代謝系

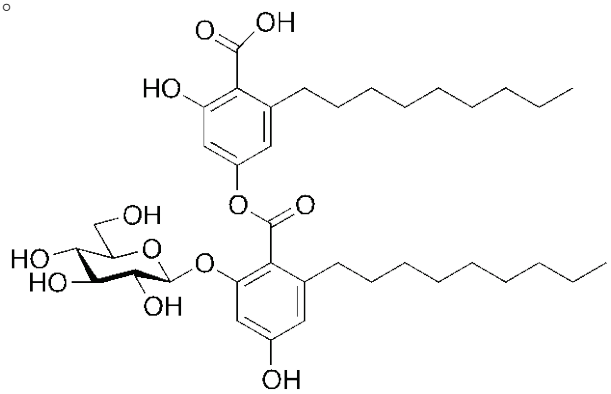


Fig. 2　Exophillic acid [1)]
・HIV-1 Integrase 阻害活性物質 [1)]

1）Ondeyka, J. G. *et al., J. Antibiot.*, 2003, **56**, 1018-1023.

Entamoeba histolytica, isolation, natural products

講演番号：2A06a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ A 校舎 06 会場

微生物代謝産物からの MRSA に対するアルベカシン耐性克服物質の探索

Search for circumventors of arbekacin resistance in MRSA

○須賀 拓弥[1]、浅見 行弘[1,2]、岩月 正人[2]、山本 剛[2]、野中 健一[2]、増間 碌郎[2]、松井 秀仁[2]、花木 秀明[2]、岩本 晋[3]、小野寺 秀幸[3]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2]（[1]北里大院感染制御、[2]北里大生命研、[3]協和発酵キリン創薬化学研）

○Takuya SUGA[1], Yukihiro ASAMI[1,2], Masato IWATSUKI[2], Tsuyoshi YAMAMOTO[2], Kenichi NONAKA[2], Rokuro MASUMA[2], Hidehito MATSUI[2], Hideaki HANAKI[2], Susumu IWAMOTO[3], Hideyuki ONODERA[3], Satoshi OMURA[2], Kazuro SHIOMI[1,2] ([1]Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University, [2]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University, [3]Medicinal Chemistry Research Laboratories, Kyowa Hakko Kirin)

【目的】

アミノグリコシド系抗生物質アルベカシン（ABK）は、薬剤耐性菌にも有効であるため MRSA に対して用いられてきたが、ABK 耐性 MRSA も出現しており、使用範囲が限定されるようになってきた。MRSA の主な ABK 耐性機構は、修飾酵素である二機能酵素による ABK のアセチル化およびリン酸化と考えられている。この二機能酵素を阻害することができれば、ABK 耐性を克服できることが期待される。そこで、微生物代謝産物からの MRSA に対する ABK 耐性克服活性物質の探索を行った。

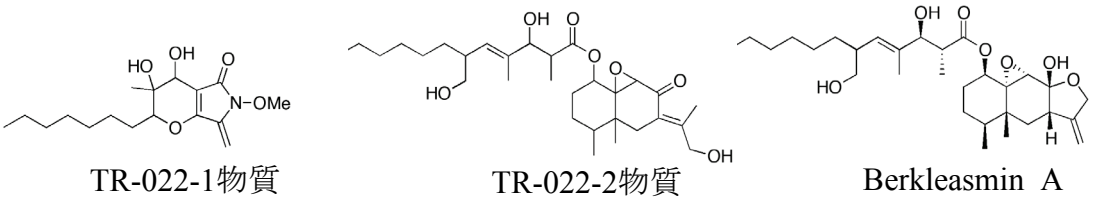
【方法】

活性評価はペーパーディスク法により行い、試験菌として ABK 耐性 MRSA を用いた。菌の増殖に影響を与えない濃度の ABK を含有した寒天培地と ABK 非含有寒天培地にそれぞれペーパーディスクを置いて培養し、両寒天培地で阻止円径に有意な差が認められるものを選択した。[a)]

単離した活性物質については二機能酵素阻害活性を評価した。大腸菌により発現させたリコンビナント二機能酵素を用いて酵素反応を行い、反応液を TLC にて展開しニンヒドリンで呈色させ、基質が残存しているか確認した。

【結果】

糸状菌ならびに放線菌の培養液7,000サンプルをスクリーニングした結果、14株の微生物培養液にABK含有培地と非含有培地で有意な差が認められた。特に活性の強かった*Paraphaeosphaeria* sp. TR-022株を培養し、各種カラムクロマトグラフィーにより精製を行った結果、既知化合物berkleasmin A [b)]と新規化合物TR-022-1およびTR-022-2物質を活性物質として単離した（Fig. 1）。ABK含有非含有培地において、berkleasmin Aをペーパーディスク上で評価した。ABK非含有培地では30 μgで11 mmの阻止円径を示すのに対し、ABK含有培地では0.3 μgで同一の阻止円径を示した。このことから、berkleasmin AはABKの活性を100倍高めることが分かった。また、新規物質2種にも有意な選択性が確認された。



TR-022-1物質　　TR-022-2物質　　Berkleasmin A

Fig.1　TR-022株から取得した活性物質の構造

a) T. Suga *et al. J. Antibiot.*; **65**, 527(2012).
b) M. Isaka *et al. Tetrahedron*; **65**, 8808(2009).

MRSA, cricumventor, Arbekacin

講演番号：2A06a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ A 校舎 06 会場

病害虫ミトコンドリアに作用する天然物リガンドの探索

Exploration of natural ligand for affecting the mitochondria of agricultural pest

○浅見 行弘[1,2]、森 美穂子[1,2]、須賀 拓弥[2]、岩月 正人[1,2]、中島 琢自[3]、橋本 祥平[4]、野中 健一[1,2]、松本 厚子[1,2]、弓削 秀隆[4]、増間 碌郎[1]、高橋 洋子[1,2]、管原 亮平[5]、塩月 孝博[5]、山本 武範[6]、篠原 康雄[6]、一丸 直哉[7]、村井 正俊[7]、三芳 秀人[7]、大村 智[1]、塩見 和朗[1,2] ([1]北里大生命研、[2]北里大院感染制御、[3]北里大感染制御研究機構、[4]北里大理、[5]農生資研、[6]徳島大疾患プロテオゲノム研究センター、[7]京大院農)

○ Yukihiro ASAMI[1,2], Mihoko MORI[1,2], Takuya SUGA[2], Masato IWATSUKI[1,2], Takuji NAKASHIMA[3], Shohei HASHIMOTO[4], Kenichi NONAKA[1,2], Atsuko MATSUMOTO[1,2], Hidetaka YUGE[4], Rokuro MASUMA[1], Yoko TAKAHASHI[1,2], Ryohei SUGAHARA[5], Takahiro SHIOTSUKI[5], Takenori YAMAMOTO[6], Yasuo SHINOHARA[6], Naoya ICHIMARU[7], Masatoshi MURAI[7], Hideto MIYOSHI[7], Satoshi OMURA[1], Kazuro SHIOMI[1,2] ([1]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato Univ., [2]Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato Univ., [3]Research Organization for Infection Control Sciences, Kitasato Univ., [4]Department of Chemistry, School of Science, Kitasato Univ., [5]Insect Growth Regulation Research Unit, National Institute of Agrobiological Sciences, [6]Institute for Genome Research, University of Tokushima, [7]Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ.)

【背景】

ATP はミトコンドリアにおいて産生され、生命維持に必須の生物界共通のエネルギー源である。そのため、選択毒性の問題から、ミトコンドリアを標的とする殺病害虫剤の実用化は難しいと考えられてきた。しかし、近年ミトコンドリア電子伝達系複合体Ⅰを阻害する fenpyroximate, fenazaquin, pyrimidifen 等といった高性能の殺ダニ剤や、複合体Ⅲを標的とするキノコより単離・構造決定された strobilurin A 由来の殺ダニ剤も上市され、安全性の面からも十分に実用化できることが証明されつつある[1)]。また、複合体Ⅰを標的部位とする殺ダニ剤は、ダニ以外の害虫にも有効であることから、化学構造次第では新たな活性や特性を持った殺病害虫剤のシード化合物としての創製が期待できると考えられ、ミトコンドリアの ATP 産生に作用点を狙った研究がなされている。

【目的】

そこで本研究では、殺病害虫剤のターゲットとなる標的分子をミトコンドリア内膜に局在する ADP/ATP 輸送体（AAC）とした。病害虫の生命維持に必須な ATP 輸送を担う AAC の機能を選択的に阻害することができれば、新しいタイプの殺病害虫剤のリード化合物になると期待できる。以上のことを踏まえ、殺病害虫剤開発の出発点であるリード化合物となりうる天然物リガンドを微生物二次代謝産物から単離・精製および構造解析して、その天然物リガンドの生物活性を評価することを目的とした。

【方法および結果】

病害虫（エンドウヒゲナガアブラムシ、コクヌストモドキ）およびヒトの AAC をミトコンドリア内膜で機能発現させた組み換え出芽酵母を用いた。これら出芽酵母株を用いて、病害虫の AAC 機能を選択的に阻害し阻止円を形成させる微生物培養液サンプルをペーパーディスク法により選抜し、活性物質の精製を行った。7,730 サンプルの糸状菌および放線菌の微生物培養液から、優先的に病害虫 AAC 発現株に阻止円を形成する微生物培養液を見出した。活性物質を取得するために、*Aspergillus* sp. FKI-6682 株を培養後、各種クロマトグラフィーおよび、各種機器分析の測定から、新規 ascosteroside 類縁体として FKI-6682A（15 mg）を単離・構造決定した。

なお本研究は生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業の支援を受けて行った。

1) 山本出監修 農薬開発の動向生物制御化学への展開 CMC 出版 (2003) pp.99-101.

Agricultural pest, Mitochondria, ADP/ATP carrier protein

講演番号：2A06a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ A 校舎 06 会場

土壌分離放線菌 *Streptomyces* sp. 11A057 が生産する Indoleamine 2,3-dioxygenase 阻害物質の同定

Identification of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors from *Streptomyces* sp. 11A057.

○植木 雅志[1,2]、Oh Mijin[3]、Jang Jae-Hyuk[3]、Pham Dinh-Chuong[3]、廣田 洋[2]、Hwang Inkyu[3]、Ahn Jong Seog[3]、長田 裕之[1,2]（[1]理研・抗生物質、[2]理研 GRC、[3]KRIBB, Chem. Biol.）
○Masashi Ueki[1,2], Mijin Oh[3], Jae-Hyuk Jang[3], Dinh-Chuong Pham[3], Hiroshi Hirota[2], Inkyu Hwang[3], Jong Seog Ahn[3], Hiroyuki Osada[1,2] ([1]Antibiotics Lab, RIKEN, [2]RIKEN GRC, [3]Chem. Biol., KRIBB)

【目的】Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)は、Tryptophan 代謝の最初の鍵酵素で、Kynurenine を生成する。通常の細胞では、IDO の発現はほとんどないが、IFN-γや TNF-αによって発現が誘導され、Kynurenine の生成（もしくは細胞内の Tryptophan 量の減少）により様々な生理作用が現れる[1)]。その中には、MHC class-I の発現抑制や免疫抑制因子の発現誘導などが含まれ、がん細胞が免疫系の surveillance から逃れることができる要因の一つとなっている[2)]。1-Methyltryptophan といった阻害剤によって IDO 活性を抑制すると、T 細胞によってがん細胞の増殖を抑制できることから、IDO は抗がん剤のターゲットの一つとして注目されている。そこで我々は、微生物代謝産物より IDO 阻害物質の探索を行い、土壌分離放線菌 *Streptomyces* sp. 11A057 株が生産する IDO 阻害物質を同定したので、これまでに得られた知見を報告する。
【方法及び結果】ヒト由来 IDO1 を His タグ付加して大腸菌で発現させ、Ni-NTA を用いて調製した。この酵素を用いて、微生物培養抽出液中に阻害活性を探索したところ、数株に阻害活性を見出し、そのうち最も阻害活性が強かった、韓国 Boseong の緑茶栽培地の土壌から分離された放線菌 11A057 株から活性物質の精製を行った。16L 培養液をアセトン抽出後、酢酸エチルで抽出を行い、これをシリカゲルカラムに負荷した。活性画分をさらに逆相カラムを用いた HPLC で分取を行い、代謝産物 **1** を 2.9 mg、代謝産物 **2** を 6.3 mg、代謝産物 **3** を 3.2 mg 得た。各種機器分析の結果、**1** は分子量 270 の Nybomycin[3)]類縁体、**2** は分子量 284 で **1** にメチル基が付加した構造であることを明らかにした。3 は、Deoxynybomycin[4)]と同定した。代謝産物 **1** は、ヒト IDO1 に対して IC_{50} = 20 nM と強力な阻害活性を示した。**2** の阻害活性は **1** より弱かったが、**3** は 1 μM 以下の濃度では阻害活性を示さなかった。

【文献】

1) J. Godin-Ethier, *et al*. *Clin. Cancer Res.* **17**, 6985-6991 (2011)
2) C. Uyttenhove, *et al*. *Nat. Med*. **9**, 1269-1274 (2003)
3) K. L. Rinehart, and H. B. Renfroe. *J. Am. Chem. Soc*. **83**, 3729-3731 (1961)
4) H. Naganawa, *et al. J. Antibiotics.* **23**, 365-366 (1970)

indoleamine 2,3-dioxygenase, deoxynybomycin, Streptomyces

講演番号：2A06a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ A 校舎 06 会場

New Oxindole Derivatives Isolated from the Microbial Metabolite Fraction Library of Streptomyces sp. RK85-270

○ Jun-pil JANG[1,2], Toshihiko NOGAWA[3], Masakazu URAMOTO[1], Akiko OKANO[3], Yushi FUTAMURA[1], Takeshi SHIMIZU[1], Shunji TAKAHASHI[1,3], Jae-Hyuk JANG[2], Jong Seog AHN[2], Hiroyuki OSADA[1,3] ([1]RIKEN, Antibiotics Lab., [2]KRIBB, Korea, [3]RIKEN CSRS, Chemical Biology)

[Purpose]

Secondary metabolites from microorganisms are major source of antibiotics, antitumor drugs, immune suppressants and other medicines. The bioassay-guided approach has an advantage for selecting active fraction from extract or microbial metabolites. However, in this method we miss valuable active compounds because small abundance, co-existing material might also inhibit the bioassay system. More importantly, microbial metabolites include structurally unique compounds which might show strong biological activity in other assay systems. To obtain such valuable metabolites, efficiently we have constructed the microbial metabolite fraction library with a spectral database, named NPPlot (Natural Products Plot) on the basis of photodiode array (PDA) detector attached LC/MS analysis and screened possibly new metabolites by the combination of the fraction library and spectral database, NPPlot.

[Method]

A 30 L of culture broth of *Streptomyces* sp. RK85-270 was filtered and partitioned with same volume of ethyl acetate twice. Ethyl acetate layer was concentrated to afford 37.2 g of a crude extract. A part of the extract (28.7 g) was subjected to a silica gel MPLC with $CHCl_3$/MeOH stepwise gradient system to afford 8 fractions. The fractions were separated by C_{18}-HPLC to construct a fraction library. Each fraction in the library was analyzed by PDA-LC/MS to obtain UV and mass spectra of each compounds within the fraction to generate a spectral database.

[Results]

In our continuing search for structurally unique metabolites based on the fraction library and spectral database, we found new compounds in the library of RK85-270. The related fractions were purified by C_{18}-HPLC to afford three oxindole derivatives, RK-270A (**1**), B (**2**), and C (**3**). The structures of **1**, **2**, and **3** were elucidated by spectroscopic method including extensive 1D, 2D NMR techniques. Compound **1** showed moderate cytotoxicity against the HeLa, HL-60, tsFT210, and tsNRK cells with IC_{50} values of 6.6, 5.5, 10.9, and 15.3 μg/mL, respectively, while **1** also showed moderate antifungal activity against *Magnaporthe oryzae* with an IC_{50} value of 8.7 μg/mL.

Oxindole, Microbial metabolites, Fraction library

講演番号：2A06a17
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ A 校舎 06 会場

NPPlot（Natural Products Plot）を用いた新規微生物代謝産物の探索と単離
Isolation of novel microbial metabolites based on NPPlot screening

○野川 俊彦[1]、リム チュン・リャン[2,4]、浦本 昌和[2]、岡野 亜紀子[1]、本郷 やよい[3]、中村 健道[3]、越野 広雪[3]、高橋 俊二[1,2]、イブラヒム ダーラ[4]、長田 裕之[1,2] ([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]理研・抗生物質、[3]理研 GRC、[4]マレーシア科学大学)
○Toshihiko NOGAWA[1], CHUNG LIANG LIM[2,4], MASAKAZU URAMOTO[2], AKIKO OKANO[1], YAYOI HONGO[3], TAKEMICHI NAKAMURA[3], HIROYUKI KOSHINO[3], SHUNJI TAKAHASHI[1,2], DARAH IBRAHIM[4], HIROYUKI OSADA[1,2] ([1]RIKEN CSRS, Chemical Biology, [2]RIKEN, Antibiotics Lab., [3]RIKEN GRC, [4]USM, Malaysia)

【目的】放線菌をはじめとする微生物は、多様な構造と活性を有する二次代謝産物を生産することで知られている。それら有用代謝産物を効果的に探索するために、我々の研究室では粗精製物から構成されるフラクションライブラリーとその PDA（Photodiode-Array）-LC/MS 分析結果を利用したオリジナルのスペクトルデータベース NPPlot（Natural Products Plot）を作製、構築してきた。NPPlot は、化合物の物理化学的性質を二次元上の分布として表したものであり菌体ごとに特有の分布を示す。我々はこれを用いることで効率的に新規代謝産物を探索できることを示してきた。今回、５種の放線菌より作成した NPPlot を比較することで菌株特有の化合物群の探索を行うこととした。
【方法】放線菌の 30 L 培養液より酢酸エチル可溶性抽出物を調製した。抽出物をシリカゲル中圧クロマトグラフィー、逆相 HPLC により連続的に分画することでフラクションライブラリーを作製した。各フラクションを PDA-LC/MS により分析し、含有成分の UV およびマススペクトルデータを収集した。UV クロマトグラム上のピークの保持時間と対応する *m/z* の値をそれぞれ横軸および縦軸に取り各化合物を二次元プロットすることで NPPlot を作成した。同様に５種の放線菌についてフラクションライブラリーおよび NPPlot を作製し、特徴的な分布を示す菌株特有の化合物群探索を行った。
【結果】５種の NPPlot の比較より *Streptomyces* sp. RK88-1355 に特有の分布を示す分子量 1000 程度の化合物群を見出した。それらの UV スペクトルはどれも 218、230, 298 および 356 nm 付近に最大吸収を示し、3-ヒドロキシキナルジン酸に由来するクロモフォアを有することがわかった。また分子量が 1000 程度であることからこれら化合物が quinomycin 類であることが推定された。その中のいくつかは、分子量が一致する quinomycin 類の報告がなかったことからこれら化合物の単離・構造決定を行うこととした。目的化合物を含むフラクションを逆相 HPLC により精製し、化合物 **1**、**2** および **3** を単離した。それらの構造を NMR や MS による分光学的手法をもとに検討し、化合物 **1** および **2** を分子内にスルホキシドを有する新規 quinomycin 類縁体と決定した。化合物 **3** は、スペクトルデータの比較より既知 quinomycin、UK-63,598 と同定した。3-ヒドロキシキナルジン酸を有する quinomycin 類の中でスルホキシドを有する天然物が単離されたことは初めてのことである。このようにフラクションライブラリーに NPPlot を組み合わせて用いることにより、効率的に菌株特有の新規化合物群を見出すことができることがわかった。また、化合物 **1** および **2** は HeLa および HL-60 細胞に対して強い細胞毒性を示した。

NPPlot, Fraction library, microbial metabolite

講演番号：2A06p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ A 校舎 06 会場

フェアリーリング惹起物質の生合成経路に関する化学的研究
Chemical studies on biosynthetic pathway of fairy-ring causing substances

○崔 宰熏[1]、河村 友香子[2]、本橋 令子[3]、鈴木 智大[1]、大西 利幸[1]、平井 浩文[2]、浅川 倫宏[4]、菅 敏幸[4]、河岸 洋和[1,2,5] ([1]静大・グリーン研、[2]静大院農・応生化、[3]静大院農・共生バイオ、[4]静県大・薬、[5]静大院・創造)
○Jae-Hoon CHOI[1], Yukako KAWAMURA[2], Reiko MOTOHASHI[3], Tomohiro SUZUKI[1], Toshiyuki OHNISHI[1], Hirofumi HIRAI[2], Tomohiro ASAKAWA[4], Toshiyuki KAN[4], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,5] ([1]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [2]Department of Applied Biochemistry, Graduate School of Agriculture, Shizuoka University, [3]Department of Symbiosis and Bioscience, Graduate School of Agriculture, Shizuoka University, [4]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [5]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】

我々はフェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジの培養濾液から植物成長調節活性を有する2-azahypoxanthine (AHX) を単離し、報告している[1)]。2012年度大会においてAHXが植物内で内生されていることを報告した[2)]。また、AHXは化学合成法が既に知られており、5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) を前駆体として合成される。AICAは植物が産生していることが知られていることから、我々は化学合成と同様の経路で植物体内においてAICAからAHXが生合成されていると考え，その経路が存在している可能性を示した[3)]。本研究では，このAICAからAHXへの生合成経路を証明することを目的とした。

【方法・結果】

発芽させ、2週間培養したイネを地上部と根に分け、根において緩衝液で抽出を行い、30%の濃度で硫安沈澱を行った。得られた画分を粗酵素液として透析後、これらに^{13}Cラベルしたを添加することで活性を確認した。その結果、30%硫安沈澱上清画分に、^{13}Cラベル化されたAHXの生成がLC-MS/MS分析で確認できた。精製された活性画分から生合成経路に関わる酵素を精製,同定するために、疎水カラムを用いた分画を行った。現在疎水性カラム以降の精製方法の検討を行っている。

1) J-H Choi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) 崔ら、2012 年度農芸化学会大会講演要旨集
3) 崔ら、2013 年度農芸化学会大会講演要旨集

fairy-ring, biosynthetic pathway, plant growth regulator

講演番号：2A06p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ A 校舎 06 会場

イネにおけるフェアリーリング惹起物質 AOH の生合成経路に関する化学的研究

Chemical studies on biosynthetic pathway of fairy-ring causing substance, AOH, in rice

○岩堀 倫大[1]、崔 宰熏[2]、鈴木 智大[2]、平井 浩文[1]、浅川 倫宏[3]、菅 敏幸[3]、河岸 洋和[1,2,4] ([1]静大院農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]静県大・薬、[4]静大院・創造)

○Tomohiro Iwahori[1], Jae-Hoon Choi[2], Tomohiro Suzuki[2], Hirofumi Hirai[1], Tomohiro Asakawa[3], Tosiyuki Kan[3], Hirokazu Kawagishi[1,2,4] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [3]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】

我々はフェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジの培養濾液から植物成長調節活性を有する2-azahypoxanthine (AHX) を単離し、報告している[1)]。前大会においてAHXが植物内で内生されていることを報告した[2)]。また、AHXは化学合成法が既に知られており、5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) を前駆体として合成される。さらに、AHXをイネ科等の植物に投与すると、2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) に代謝され、このAOHもまた植物成長調節作用を有することが確認されている。AOHは市販のキサンチンオキシダーゼの酵素反応によってAHXから合成が可能であるが、植物体内の代謝ではAHXからAOH変換のみを酵素が存在する可能性が示唆されている[3)]。本研究では、AOH合成酵素の単離、精製を目的とした。

【方法・結果】

発芽させ、2週間培養したイネの根を緩衝液で抽出し、30%, 70%の濃度で順次硫安沈澱を行った。それぞれの画分を粗酵素液として透析後、これらに^{13}Cラベルした AHXを添加することでそのAHX変換活性を確認した。その結果、LC-MS/MS分析により、30%硫安沈澱画分によって^{13}Cラベル化AOHの生成が確認できた。さらに、硫安沈澱以降の精製を各種クロマトグラフィーにより行い、目的物質の精製を試みた。

1) J-H Choi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) 崔ら、2012 年農芸化学会大会講演要旨集
3) 崔ら、2013 年農芸化学会大会講演要旨集

fairy-ring, biosynthetic pathway, rice

講演番号：2A06p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 06 会場

フェアリーリングの惹起物質のイネにおける二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析
Proteomics of fairy-ring causing substances in rice using two dimensional electrophoresis
○山野 博之[1]、崔 宰熏[2]、鈴木 智大[2]、道羅 英夫[2]、本橋 令子[3]、平井 浩文[1]、浅川 倫宏[4]、管 敏幸[4]、河岸 洋和[1,2,5] ([1]静大農応生化、[2]静大グリーン研、[3]静大院農共生バイオ、[4]静県大薬、[5]静大院創造)
○Hiroyuki YAMANO[1], Jae-Hoon Choi[2], Tomohiro Suzuki[2], Hideo Dohra[2], Reiko Motohashi[3], Hirofumi Hirai[1], Tomohiro Asakawa[4], Toshiyuki Kan[4], Hirokazu Kawagishi[1,2,5] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [3]Department of Symbiosis and Bioscience, Graduate School of Agriculture, Shizuoka University, [4]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [5]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】
我々は以前、フェアリーリングの惹起物質としてコムラサキシメジの培養濾液から植物成長調節活性を有する 2-azahypoxanthine(AHX)及び imidazole-4-carboxamide(ICA)を単離した[1,2]。また，AHX を植物に処理することにより 2-aza-8-oxohypoxanthine(AOH)に代謝されることを発見し、この AOH も植物成長調節活性を有していた[3]。本研究では、これら活性物質を処理したイネにおけるタンパク質発現を，無処理のそれと比較するため，二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析を行った。このタンパク質発現量解析によって，成長調節活性のメカニズムを解明することを目的とした。
【方法・結果】
発芽後、AHX,AOH,ICA 処理を二週間行ったイネを地下部と地上部に分け、TCA/acetone 沈殿,メタノールクロロホルム沈殿を行ってタンパク質抽出を行った。抽出したタンパク質を 2-D DIGE 法による二次元電気泳動に供し、タンパク質発現量解析を行った。発現量差異があったスポットの切り出しを行った。現在切り出したスポットを LC-MS/MS に供して mascot 解析を行い、タンパク質の同定・アノテーションを行っている。

1) J-H Choi *et al.*, *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) J-H Choi *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 58, 9956-9959 (2010)
3) 崔ら、平成22年度日本農芸化学会大会講演要旨集

fairy-ring, two dimensional electrophoresis, Proteomics

講演番号：2A06p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 06 会場

コムラサキシメジにおける植物成長調節物質の生合成経路に関する化学的研究

Chemical studies on the biosynthetic pathway of plant growth regulators in *Lepista sordida*

○圓山 和希[1]、崔 宰熏[2]、鈴木 智大[2]、平井 浩文[1]、菅 敏幸[3]、浅川 倫宏[3]、河岸 洋和[1,2,4] ([1]静大院農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]静県大・薬、[4]静大院・創造)
○Waki Maruyama[1], Jae-Hoon Choi[2], Tomohiro Suzuki[2], Hirofumi Hirai[1], Toshiyuki Kan[3], Tomohiro Asakawa[3], Hirokazu Kawagishi[1,2,4] ([1]Department of Applied Biochemistry, Graduate School of Agriculture, Shizuoka University, [2]Reserch Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [3]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】
フェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジ培養ろ液から単離された2-azahypoxanthine (AHX)およびimidazole-4-carboxamide(ICA)は、植物成長調節物質としての活性を有することが示され[1,2]、さまざまな植物に内生することが明らかとなった。前大会では、AHXおよびICA産生量が増加したArgの^{13}C,^{15}Nラベル化体を添加してコムラサキシメジを培養し、この培養ろ液より分取したAHXおよびICAをMSに供したところ^{15}N-AHXおよび^{15}N-ICAが検出され、AHXおよびICAの生合成においてArgが窒素源として関与していることを報告した[3]。また、コムラサキシメジのタンパク質抽出液にAHX合成酵素の存在が示唆されたことを報告した。今回も引き続きこれら化合物の生合成経路の解明を目的とした。

【方法および結果】
guanido-^{13}C Argおよび1,2-^{13}C Glyを培地に添加して同様の実験を行いNMRに供したところ、AHXおよびICAがラベル化され、これらアミノ酸の取り込みが確認された。また、AHX合成酵素の精製は各種クロマトグラフィーを検討し、活性画分のペプチドマスフィンガー分析によりタンパクの同定を試みた。さらに二次元電気泳動によりAHX・ICA産生量を増加させるArg添加条件におけるタンパク発現の差異を見るべく実験を行っている。

1) J-H Choi *et al.*, *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) J-H Choi *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 58, 9956-9959 (2010)
3) 圓山ら、平成23年度日本農芸化学会大会講演要旨集

Lepista sordida, plant growth-regulation, biosynthetic pathway

講演番号：2A06p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 06 会場

ヤマブシタケ培養ろ液由来の生理活性物質の探索

Search for biologically functional compounds from culture broth of *Hericium erinaceus*

○徳永 大輝[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[2]、鈴木 智大[2]、秋山 佑介[1]、徳山 真治[1]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大院農・応生化、[2]静大院・グリーン研、[3]静大院・創造)
○Taiki TOKUNAGA[1], Jing WU[2], Jae-Hoon CHOI[2], Tomohiro SUZUKI[2], Yusuke AKIYAMA[1], Shinji TOKUYAMA[1], Hirofumi HIRAI[1,2], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】

ヤマブシタケ（*Hericium erinaceus*）はサンゴハリタケ科サンゴハリタケ属の可食性のキノコである。広く北半球温帯以北に分布しており、夏の終わりから秋にかけて広葉樹の立木や枯木などに生える。過去に当研究室は、認知症の予防や治療への有効性が指摘されている神経成長因子の合成を促す物質として、ヘリセノン類およびエリナシン類を、それぞれヤマブシタケ子実体および菌糸体から発見したが[1-6]、この培養ろ液に関する研究はあまり行われていない。そこで本研究では、ヤマブシタケ培養ろ液に由来する生理活性物質の探索を試みた。

【方法および結果】

ヤマブシタケ培養ろ液を減圧濃縮後、ヘキサンおよび酢酸エチルで液 - 液分配を行った。得られたヘキサン可溶部および酢酸エチル可溶部をそれぞれフラッシュクロマトグラフィー、HPLC等を用いて分画し、化合物の単離・精製を試みた。その結果、酢酸エチル可溶部から新規化合物を含む数種の化合物の単離に成功した。これらの化合物の構造はMS、IRおよび各種NMRスペクトルにより決定した。これらの化合物を各種活性試験に供し、生理活性について検討する予定である。

1) Kawagishi H, et al : Tetrahedron Lett. 32, 4561-4364, 1991
2) Kawagishi H, et al : Phytochemistry 32, 175-178, 1993
3) Kawagishi H, et al : Tetrahedron Lett. 35, 1569-1572, 1994
4) Kawagishi H, et al : Heterocycl. Commun. 2, 51-54, 1996
5) Kawagishi H, et al : Tetrahedron Lett. 37, 7399-7402, 1997
6) Lee EW, et al : Biosci. Biotechnol. Biochem. 64, 2402-2405, 2000

Hericium erinaceus, mushroom, structural determination

講演番号：2A06p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 06 会場

サクラシメジが産生する機能性物質に関する化学的研究

Chemical studies on biologically functional compounds produced by *Hygrophorus russula*

○森 千夏[1]、呉 静[2]、鈴木 智大[2]、崔 宰熏[2]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2,3]（[1]静大農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造）

○ Chinatsu MORI[1], Wu JING[2], Tomohiro SUZUKI[2], Jae-Hoon CHOI[2], Hirofumi HIRAI[1,2], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】

サクラシメジ（*Hygrophorus russula*）はヌメリガサ科ヌメリガサ属のキノコであり、グアテマラ、ロシア、ブータンなどさまざまな国でよく発生する可食性のキノコである。日本では秋にコナラ、ミズナラ、ブナ、カシなどの広葉樹の林の地上に群生する。以前に我々はサクラシメジ子実体からマンノースα1-6結合を特異的に認識するレクチンを報告している。[1)] しかし，このキノコの低分子物質に関する研究はほとんどされていない。そこでサクラシメジ子実体抽出物を抗菌活性試験に供したところ、活性がみられた。本研究では、サクラシメジ子実体から抗菌活性物質などの各種生物活性物質の単離、精製、および構造決定を目的とした。

【方法】

サクラシメジ子実体をエタノール、アセトンで順次抽出し、抽出液を減圧濃縮後、ヘキサン、酢酸エチル、エタノール、水で順次抽出し、得られた各可溶部を抗菌活性試験に供した。抗菌活性が確認された酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーによって分画した。

【結果】

酢酸エチル可溶部より、新規化合物を含む数種の物質を単離した。これらの化合物の構造はMS、IRおよび各種NMRスペクトルにより決定した。各化合物は各種生物活性試験に供しているところである。さらに各種活性試験で活性が確認された画分から、活性物質の探索を進めている。

1) Suzuki, T. *et al.* Glycobiology, **22**(5), 616-629 (2012)

Hygrophorus russula, mushroom, structural determination

講演番号：2A06p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 06 会場

キシメジ（*Tricholoma flavovirens*）由来の機能性化合物の探索

Search for functional compounds from *Tricholoma flavovirens*

○邱 偉涛[1]、小堀 一[2]、平井 浩文[1,3]、河岸 洋和[1,2,3]（[1]静大院農・応生化、[2]静大院・創造、[3]静大院・グリーン研）

○Weitao QIU[1], Hajime KOBORI[2], Hirofumi HIRAI[1,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [3]RIGST., Shizuoka Univ.)

【目的】キシメジ（*Tricholoma flavovirens*）は、ハラタケ目キシメジ科キシメジ属のキノコである。秋にマツなどの針葉樹林やコナラ、ミズナラなどのナラ類の広葉樹林内の地上に発生し、北半球一帯に広く分布している[1)]。古くから可食性のキノコとして利用されてきたが、化学的研究はほとんど報告されていない。昨年度の本大会において、キシメジ子実体由来のレタスに対する成長調節活性物質および出芽酵母に対するアンチエイジング活性物質について発表した[2)]。本研究では、このキノコから更なる機能性化合物の探索を目的とした。

【方法・結果】キシメジ子実体をエタノール、アセトンにより順次抽出を行った。抽出を減圧濃縮後、ヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部、ブタノール可溶部及び水可溶部にそれぞれ分画した。このうち、ヘキサン可溶部および酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーに供し、化合物の単離・精製を試みた。その結果、複数の化合物の単離に成功した。現在、それらの化合物を分裂酵母に対するアンチエイジング等のバイオアッセイに供し、その活性を評価している。

1）今関六也ら、日本のきのこ、山と渓谷社、p. 79
2）邱偉涛ら、平成 25 年度日本農芸化学会大会講演要旨集

Tricholoma flavovirens, fruiting body, novel functional compound

講演番号：2A06p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 06 会場

ナラタケ属（*Armillaria* sp.）菌糸体の産生する他感作用物質に関する化学的研究

Chemical studies on allelopathic compounds from mycelia of *Armillaria* sp.

○小堀 一[1]、関谷 敦[2]、鈴木 智大[3]、崔 宰熏[3]、平井 浩文[3,4]、河岸 洋和[1,3,4]（[1]静大院・創造、[2]森林総研、[3]静大・グリーン研、[4]静大農・応生化）

○Hajime KOBORI[1], Atsushi SEKIYA[2], Tomohiro SUZUKI[3], Jae-Hoon CHOI[3], Hirofumi HIRAI[3,4], Hirokazu KAWAGISHI[1,3,4] ([1]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [2]Forestry and Forest Products Research Institute, [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [4]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University)

【目的】

タマバリタケ科ナラタケ属に属する一連のキノコは生きている植物に対する寄生性、病原性が非常に強く、その寄生による病害は「ナラタケ病」と呼ばれている。また、ナラタケ属のキノコは他の菌類に対する影響も強く、イッポンシメジ科イッポンシメジ属のキノコであるタマウラベニタケ（*Entoloma abortivum*）は近傍にナラタケの菌糸があると球状の奇形を生じることが知られている[1)]。我々は現在までに、ナラタケ属のキノコであるナラタケ488菌株および543菌株培養ろ液からレタスの根や胚軸に対して植物成長調節活性を有する複数の化合物の単離を報告している[2,3)]。本研究では、これら化合物の他の菌類に対する活性を検討し、また、活性物質の更なる探索を目的とした。

【方法・結果】

ナラタケ属543菌株を約3週間液体培養することで得られた培養液を濾過し、菌体および培養ろ液に分け、培養ろ液を分液ロートを用いて液–液分配することによって、*n*–ヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部、*n*–ブタノール可溶部および水可溶部に順次分画した。それらのうち*n*–ヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部から数種類の既知化合物および新規化合物の単離に成功した。また、それらの化合物のうち収量の多いものをペーパーディスクに投与し、様々なキノコの菌糸体に対する成長調節活性試験に供したところ、一部のキノコの菌糸体の生育を調節する活性が観察された。

1）今関　六也ら、日本のきのこ、山と渓谷社、p. 282
2）小堀　一ら、平成 25 年度日本農芸化学会大会講演要旨集
3）H. Kobori *et al.*, *Tetrahedron lett.*, **54**, p 5481-5483 (2013)

Armillaria sp., culture broth, mycelial growth

講演番号：2A06p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 06 会場

センボンナラタケ（*Armillaria* sp.）子実体が産生する他感作用物質の化学的解明
Chemical studies on allelopathic compounds from fruiting bodies of *Armillaria* sp.

○近田 梓[1]、小堀 一[2]、鈴木 智大[3]、崔 宰熏[3]、平井 浩文[1,3]、河岸 洋和[1,2,3]（[1]静大農・応生化、[2]静大院・創造、[3]静大・グリーン研）
○Azusa KONDA[1], Hajime KOBORI[2], Tomohiro SUZUKI[3], Jae-Hoon CHOI[3], Hirofumi HIRAI[1,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】

我々は以前、「ナラタケ病」と呼ばれる植物病害や他の菌類の奇形子実体誘導の原因となるタマバリタケ科ナラタケ属に属する一連のキノコから、レタスの根や胚軸に対して植物成長調節活性を有する複数の化合物の単離を報告している[1-3]。しかし、これまでの活性物質の報告はいずれもナラタケ属のキノコの菌糸体培養ろ液由来のもののみであり、ナラタケ属のキノコの子実体由来の植物成長調節物質および奇形子実体誘導物質の報告はされていない。そこで本研究では、ナラタケ属に属するキノコであるセンボンナラタケ（*Armillaria* sp.）子実体から他の植物や菌類に対して影響を与える化合物の探索を目的とした。

【方法・結果】

センボンナラタケ子実体（7.5 kg）をエタノール、アセトンで順次抽出し、抽出液を減圧濃縮後、各溶媒で液-液分配することにより*n*-ヘキサン可溶部（46.1 g）、酢酸エチル可溶部（10.3 g）、*n*-ブタノール可溶部（18.3 g）、水可溶部（252.0 g）にそれぞれ分画した。それらのうち、レタスに対する植物成長調節活性試験の結果を指標に、*n*-ヘキサン可溶部および酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーに供した結果、数種類の化合物の単離に成功した。現在、それらの化合物をレタスや他の菌類に対する成長調節活性試験に供し、その影響を観察している。

1）今関　六也ら、日本のきのこ、山と渓谷社、p. 282
2）小堀　一ら、平成 25 年度日本農芸化学会大会講演要旨集
3）H. Kobori *et al.*, *Tetrahedron lett.*, **54**, p 5481-5483 (2013)

Armillaria sp., fruiting body, plant growth regulation

講演番号：2A06p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 06 会場

高等菌類の子実体形成物質の探索

Search for fruiting body-inducing compound(s) in higher fungi

○呉 静[1,2]、森 千夏[3]、鈴木 智大[1]、崔 宰熏[1]、平井 浩文[1,4]、河岸 洋和[1,4,5]（[1]静大・グリーン研、[2]日本学振、[3]静大農・応生化、[4]静大院農・応生化、[5]静大院・創造）
○Jing Wu[1,2], Chinatsu Mori[3], Tomohiro Suzuki[1], Jae-Hoon Choi[1], Hirofumi Hirai[1,4], Hirokazu Kawagishi[1,4,5] ([1]RIGST, Shizuoka Univ., [2]JSPS, [3]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [4]Grad. Sch. of Agric., Shizuoka Univ., [5]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】多くの生物種は、特有のホルモンを有している。しかし、高等菌類であるキノコにおけるホルモンは全く明らかにされていない。キノコ（子実体）を形成する高等菌類は、胞子から菌糸、菌糸から子実体、そして子実体から胞子という生活環を持っている。本研究では、特に菌糸から子実体を発生させる子実体形成物質（発茸ホルモン）の発見を目的とした。
【方法】植物や動物にはステロイドホルモンが存在する。キノコは一般にステロイドを多く産生している。このことから、我々は、キノコにもステロイドホルモンが存在するという仮説をもっている。その候補としてサケツバタケから単離された前例の無いステロイド骨格化合物strophasterol A-D[1,2)]や茶樹茸から単離されたステロイドchaxine A-E[3,4)]を考えた。そこでこれらの化合物がキノコ中に共通に存在するか否かをLC-MS/MSを用いて検討することにした。さらに、ヤマブシタケやエノキタケ菌糸体等を用いて、これらの化合物の菌糸成長、子実体形成に及ぼす影響を検討した。
【結果】Strophasterol A溶液（10 μM, 10 mL）を、ヤマブシタケ菌糸体が蔓延したポットに注いだところ、2週間後にstrophasterol Aに子実体形成誘導活性が確認された。また、エノキタケに対して、ペーパーディスク上に0.5 mg、0.05 mgのstrophasterol Aを添加したところ、1週間後に菌糸体の成長阻害活性が見られ、3ヶ月後に子実体の形成が確認された。さらに、LC-MS/MSを用いて分類学的には異なった30種のキノコにstrophasterol A-Dが、42種のキノコにchaxine B-Eが存在することが明らかになった。

1) Wu, J. *et al.*, **Angew. Chem., Int. Ed.,** 51, 10820-10822 (2012)
2) Wu, J. et al., **Biosci. Biotechnol. Biochem.,** 77, 1779-1781 (2013)
3) Kawagishi, H. *et al.*, **Heterocycles**, 69, 253-258 (2006)
4) Choi, J-H. *et al.,* **Tetrahedron**, 65, 9850–9853 (2009)

fruiting body-inducing compound, strophasterol, chaxine

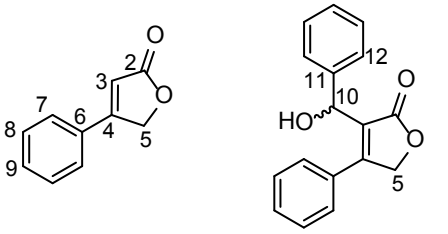
講演番号：2A06p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 06 会場

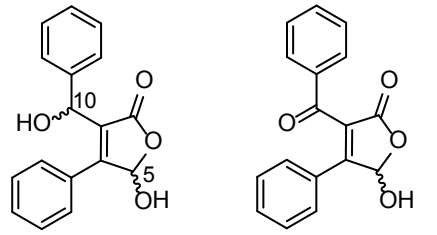
青枯病菌が産生する ralfuranone 類の構造確定と病原力への寄与

Identification and characterization of ralfuranones in the plant pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*

○大西 秀幸[1]、甲斐 建次[1]、浅井 郁哉[2]、森 友花[2]、木場 章範[2]、大西 浩平[3]、曳地 康史[2]、林 英雄[1] ([1]阪府大院・生命環境、[2]高知大・農、[3]高知大・総研セ)
○ Hideyuki OHNISHI[1], Kenji KAI[1], Fumiya ASAI[2], Yuka MORI[2], Akinori KIBA[2], Kouhei OHNISHI[3], Yasufumi HIKICHI[2], Hideo HAYASHI[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]Kochi Univ., [3]SRC, Kochi Univ.)

【目的】青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* はナス科を中心とした 200 種以上の植物に萎凋を引き起こす。本菌は根の傷口などから宿主に侵入し、細胞間隙でのコロニー化後、維管束に侵入する。導管に侵入した青枯病菌は爆発的に増殖し、大量の細胞外多糖（EPS）を産生する。その結果、導管の通水能が低下し、感染植物は萎凋症状を呈する。EPS をはじめとした病原力因子は、グローバルレギュレーターPhcA によって発現調節されている。なお PhcA の活性は、PhcS/R の二成分情報伝達系が認識するクオラムセンシング分子によって調節されている。*R. solanacearum* OE1-1 株において *phcA* 遺伝子欠損により消失する二次代謝物として ralfuranone A と B に加え、新規類縁体である ralfuranone J と K を昨年度の本大会で発表した。今回、それらの化学構造を全合成により確定するとともに、ralfuranone 生合成酵素遺伝子欠損株（Δ*ralA*）を作製し、ralfuranone 類の病原力発現への寄与を調べたので報告する。





【方法と結果】Ralfuranone 類の全合成は次のような方法で行った。A は、分子内環化でフラノン環を構築する既報の合成経路により合成した。B は、10 位ケト体の合成方法が既に報告されていたため、その 10 位をルーシェ還元して全合成した。J および K は、一段階前である 10 位メチレン型化合物の合成方法が既に報告されていたため、最後に *N*-hydroxyphthalimide 触媒下で 10 位を酸素酸化することで全合成した。合成品と天然物の NMR データが完全に一致したため、天然 ralfuranone 類の化学構造を確定した。HPLC を用いて定量実験を行った結果、ralfuranone 類は対数増殖期後期から多く産生され始めることが分かった。また、Δ*ralA* は野生株と比べて、病原力に関与する swimming motility の増加および固着能とバイオフィルム形成能の低下が確認され、宿主であるトマトとタバコへの接種実験では病原力が著しく低下することが判明した。以上のことから、ralfuranone 類は病原力に関与する重要な二次代謝物であることが明らかになった。現在 *ralA* 相補株を作製し、宿主植物に対する青枯病菌の病原力の解析を進めている。

Ralstonia solanacearum, quorum sensing, secondary metabolites

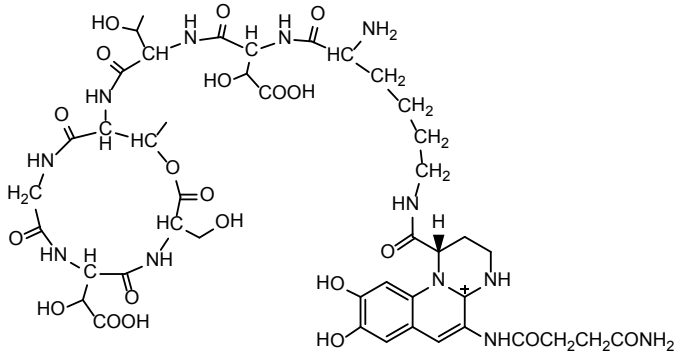
講演番号：2A06p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 06 会場

Actinomycin 類による植物病原細菌 *Pseudomonas cichorii* のシデロフォア産生阻害

Actinomycins inhibit the production of pyoverdine siderophores in the plant pathogen *Pseudomonas cichorii*

前中 理沙、○甲斐 建次、林 英雄（阪府大院・生命環境）
Risa MAENAKA, ○Kenji KAI, Hideo HAYASHI (Osaka Prefecture Univ.)

【目的】細菌は環境中の微量な鉄を獲得するため、シデロフォアと呼ばれる Fe^{3+}と親和性の高い化合物を産生・分泌し、Fe^{3+}–シデロフォア複合体として細胞内に取り込む。*Pseudomonas* 属細菌のシデロフォアは主に pyoverdine であり、種や株によって構成アミノ酸の種類や数が異なる。緑膿菌 *P. aeruginosa* や植物病原菌 *P. syringae* では pyoverdine がそれらの病原力の制御に重要であることが報告されている。我々は、多犯性植物病原菌 *P. cichorii* がナスに対して示す病原力にも pyoverdine が関与していることを、2013 年度大会にて報告した。Pyoverdine の産生阻害剤は本菌の防除に有効なだけでなく、pyoverdine を産生する *Pseudomonas* 属細菌の病原力を制御する薬剤となり得る。そこで今回、*P. cichorii* SPC9018 における pyoverdine 産生阻害剤の探索を行い、*Streptomyces* sp. RM-32 株の産生する actinomycin 類が阻害活性を示すことを見出したので報告する。



P. cichorii SPC9018 が産生する pyoverdine

【方法と結果】土壌分離放線菌 49 株の培養液 10 ml を酢酸エチルでそれぞれ抽出し、これらを含む鉄欠乏培地で *P. cichorii* SPC9018 を 20℃で 24 時間培養した。本菌の生育を阻害せず、かつ pyoverdine に特徴的な 405 nm の吸収を減少させる抽出物を探索したところ、*Streptomyces* sp. RM-32 株に活性が見出された。この培養抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーと HPLC によって精製し、440 nm 付近に極大吸収を持つ 2 種の化合物を単離した。NMR と LC/MS によって構造解析を行ったところ、活性物質はグラム陽性細菌に有効な抗生物質として知られる actinomycin X_2 と D であることが分かった。Pyoverdine 特有の蛍光（Ex 280 nm、Em 490 nm）を指標にして、actinomycin X_2 と D が示す pyoverdine 産生阻害の IC_{50} 値を算出したところ、それぞれ 17.6 μM と 29.6 μM であった。さらに、シデロフォア活性を評価する CAS アッセイにより pyoverdine 産生阻害を調べた場合も、actinomycin 類は蛍光測定と同程度の IC_{50} 値を示した。また、actinomycin 類を処理した培養上清を HPLC で分析し、濃度依存的に pyoverdine 産生量を減少させることを確認した。現在、actinomycin 類が他の *Pseudomonas* 属細菌に対して pyoverdine 産生阻害活性を示すかどうかを調べている。

actinomycin, siderophore, pyoverdine

講演番号：2A06p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 06 会場

ナス科植物青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 由来の酵母に対する増殖促進活性物質の同定

Identification of a growth-promoting substance for *Saccharomyces cerevisiae* produced by bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*

○安住 新吾[1]、奥 直也[1]、神田 絢美[2]、曳地 康文[3]、五十嵐 康弘[1]([1]富山県大工・生工研セ、[2]中央農業研究センター、[3]高知大農)
○Shingo AZUMI[1], Naoya OKU[1], Ayami KANDA[2], Yasufumi HIKICHI[3], Yasuhiro IGARASHI[1]
([1]Toyama Pref. Univ., [2]Nat Agric Food Res Cen, [3]Kochi Univ.)

【目的】抗生物質探索のためのペーパーディスク試験において、検定菌の増殖を促進する現象がしばしば観察される。有用微生物の培養に本現象を再現できれば、バイオプロセスの生産性向上に寄与できる。ナス科植物青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* を対象にスクリーニングを行ったところ、SUPP1541 株の培養抽出物がグラム陽性菌の *Micrococcus luteus*、酵母 *Candida albicans* および *Saccharomyces cerevisiae* の 3 種の微生物に対して増殖促進活性を示すことを見出したため、活性物質の同定を試みた。
【方法及び結果】本菌株の培養液 10L をブタノール抽出し、*S. cerevisiae* に対する増殖促進活性と HPLC-フォトダイオードアレイ分析における UV 吸収を指標に、溶媒分画と各種クロマトグラフィーにて精製をし、活性物質を単離した。しかし、本物質の NMR スペクトルには、色素団を形成するような低磁場シグナルが観測されずペンチル基のみが部分構造として得られた。また、活性物質は不安定であり、一部が非活性物質に変換することが LC-MS 分析により確認された。この非活性物質の NMR スペクトルは明瞭な低磁場シグナルを有しており、色素団の存在と矛盾しなかった。詳細な NMR および MS スペクトル解析の結果、非活性物質は *Pseudomonas* 属細菌から単離された強力なマイコプラズマ生育阻害物質の micacocidin C ($C_{27}H_{36}N_3O_4S_3Fe$)と判明した。同物質は Fe^{3+}を配位したシデロフォアであり、Zn^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}をキレートした類縁体も報告されていることから、活性物質は配位金属の交換した類縁体と予想された。MS データと NMR で得られた部分構造から、活性物質は micacocidin B($C_{27}H_{37}N_3O_4S_3Cu$)と同定した。なお、LC-MS 分析により、他のフラクション中に Ni^{2+}、Co^{2+}を配位した類縁体も検出した。活性物質の増殖促進効果は、等モルの硫酸銅(Ⅱ)のみで再現され、硫酸鉄(Ⅱ)、硫酸亜鉛(Ⅱ)は活性を示さなかったことから、本活性の本体が micacocidin C 中の Cu^{2+}であることが示唆された。

Micacocidin, *Ralstonia solanacearum*, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：2A06p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 06 会場

マメザヤタケ（*Xylaria polymorpha*）より単離したイソピマラン型ジテルペン類について

Isopimarane Diterpenoids from Fruiting Bodies of *Xylaria polymorpha*

○塩野 義人[1]、松井 紀嘉[1]、小関 卓也[1]、村山 哲也[1]、阿部 友美[2]、木村 賢一[2]（[1]山形大農、[2]岩手大院農）
○ Yoshihito SHIONO[1], NORIKA MATSUI[1], TAKUYA KOSEKI[1], TETSUYA MURAYAMA[1], TOMOMI ABE[2], KEN-ICHI KIMURA[2] ([1]Yamagata Univ., [2]Iwate Univ.)

我々のグループは、糸状菌類の生産する生理活性物質を探索しており、近年、子嚢菌 *Xylaria* 属の人工培養した子実体より、細胞毒性を有するピマラン型ジテルペン類を明らかにしてきた。本発表では、マメザヤタケ (*Xylaria polymorpha*) の人工子実体抽出物より、数種の新規なイソピマラン型ジテルペン類を明らかにしたので、それらの化学構造と生理活性について、報告する。

【方法と結果】野外で採取したマメザヤタケの内部より分離した菌糸を用いて、玄米を主とした培地 (1.0 kg) に接種し、４週間、静置培養した。形成された子実体をメタノールで抽出し、得られた抽出物 (4.0 g) を各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、三種の化合物 **1** (25 mg) と **2** (17 mg)、**3** (10 mg) を得た。それぞれの化合物について、NMR を中心に化学構造を解析した結果、**1** は、ベンゾフラノンとシクロヘキセン環がスピロ炭素を介して結合した構造を部分骨格に有する新規なイソピマラン型ジテルペン類の誘導体であった。一方、**2** と **3** は既知のマイロシン D と マイロシン D のラクトンが開環した新しい類縁物質であった。また、これらの化合物の生理活性について調べたところ、**1** は、カルシウムイオンシグナルが高活性化した遺伝子変異酵母において、6.0 ~ 1.56 μg/spot でカルシウムイオンシグナル伝達阻害活性を示した。

Xylaria polymorpha, isopimarane diterpenoid, Ca^{2+} signaling

講演番号：2A06p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ A 校舎 06 会場

新規オートファジー誘導物質(+)-エポジムノラクタムの構造と機能

Structure and function of (+)-epogymnolactam, novel autophagy inducer

新藤 千波耶、三橋 進也、重冨 顕吾、○生方 信 (北大院農)
Chihaya SHINDO, Shinya MITSUHASHI, Kengo SHIGETOMI, ○Makoto UBUKATA (Hokkaido Univ.)

【背景と目的】これまでに、我々は北海道で採取・分離した 37 菌株のキノコ培養菌糸体の酢酸エチル抽出物を用いてメラノーマ細胞に対する抗腫瘍物質の探索を行い、ニカワウロコタケ培養菌糸体からヒルスタノール A を単離し、その生物学的性質の解明と不明であった絶対配置の決定を行った（*J. Antibiot.*, **64**, 693-696 (2011)）。本物質はオートファジー誘導活性を示すことが報告されていた（*Chinese J. Cancer*, **29**, 655-660 (2010)）。そこで、新たなオートファジー誘導活性物質の発見を目指し、より有望なスクリーニングソースを構築した。

新たに北海道で採取・分離した菌株の ITS 領域の DNA 解析及び子実体の形態観察を行い 28 菌株の種推定を行い、種の多様性に富むスクリーニングソースとした。うち安定して培養可能な 27 菌株のキノコ培養菌糸体の酢酸エチル抽出物からオートファジー誘導活性物質の探索を行った。その結果、モリノカレバタケの一種(*Gymnopus* sp.)の抽出物が再現性良く、かつ強いオートファジー誘導活性を示すことを見いだした。我々は、モリノカレバタケの属名 *Gymnopus* と重メタノール中で優勢である互変異性体の構造にちなみ、本物質を (+)-epogymnolactam [(+)-エポジムノラクタム]と命名した。本大会では、(+)-エポジムノラクタムの単離・構造決定の詳細、及び動物細胞に対するオートファジー誘導活性、並びに互変異性に関する考察について報告する。

【方法と結果】NIH3T3 細胞を DMSO に溶解した被検サンプルで処理し、LC3-II の量をウェスタンブロットで検出することによりオートファジー誘導活性を評価した。活性を示した *Gymnopus* sp. の大量培養により得られた 2.98g の粗抽出物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、HPLC にて順次精製することにより、二つの活性画分 I(3.5mg)及び II(1.2mg)を得た。I と II は HPLC 上で平衡混合物として存在する同一物質であることが示唆された。得られた活性物質は質量分析の結果、$C_8H_{12}NO_3$ の分子式を持ち、^{1}H NMR、^{13}C NMR、COSY、NOESY 及び HMBC 解析により、エポキシ、アミド並びにケトンを分子内に持ち、三種類の互変異性体として存在する新規物質であることが判った。本化合物は正の旋光度（$[\alpha]^{20}_D$ + 47.8（*c* 0.175, MeOH)）を示し、類似した基本骨格を持つ(+)-セルレニンの旋光度との比較により、その絶対配置を決定した。現在、(+)-エポジムノラクタムの全合成研究と、オートファジー誘導活性並びに細胞死誘導活性の評価を検討中であり、三種類の互変異性体の存在状態に関しても計算化学と機器分析の手法を組み合わせて解析を行っている。

autophagy, (+)-epogymnolactam, inducer

講演番号：2A06p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ A 校舎 06 会場

エリンギに含まれる抗腫瘍物質の単離・構造解析

Isolation and structural analysis of anti-tumor compounds from Pleurotus eryngii

○西村 芳貴、西岡 実穂、岩崎 崇、一柳 剛、石原 享、會見 忠則、河野 強（鳥取大農）
○ Yoshitaka NISHIMURA, Miho NISHIOKA, Takashi IWASAKI, Tsuyoshi ICHIYANAGI, Atsushi ISHIHARA, Tadanori AIMI, Tsuyoshi KAWANO (Tottori Univ.)

【研究目的】

現在の化学療法によるガン治療は、ガン患者に有効な治療効果をもたらす一方で、その副作用によりガン患者を苦しめることが大きな問題となっている。このことから、副作用の少ない効果的な新規抗ガン剤の開発が求められているが、そのためにはまず、抗ガン剤の基本骨格となるリード化合物の開発が必要不可欠となる。そこで本研究では、リード化合物の探索資源として、未開発の生物資源であり様々な生理活性物質を産生することが期待されるキノコに注目した。まず、種々のキノコの粗抽出物を調製し、哺乳類の正常細胞株(1 種類)とガン細胞株(7 種類)に対する *in vitro* バイオアッセイ(WST アッセイ)を行った。その結果、エリンギ(*Pleurotus eryngii*)粗抽出物に、正常細胞株には細胞毒性を示さず、T リンパ性白血病細胞株である Jurkat に対して選択的な細胞毒性を示す物質の存在を確認したため、エリンギに着目して抗ガン剤リード化合物の探索を試みた。本大会では、活性物質の単離・構造解析ならびに選択的細胞毒性等について報告する。

【方法・結果】

エリンギ子実体 76kg を 80%アセトンで抽出し、減圧濃縮後、Diaion HP-20 による一次処理を行い、各種クロマトグラフィーを用いて活性物質の精製を進めた。逆相 HPLC を用いた最終精製により、化合物 1（1.6mg）と化合物 2（1.4mg）を得た。詳細な NMR 解析により、両化合物ともステロイド骨格を有することが明らかとなった。化合物 1 はエポキサイドを有する新規化合物であると推定した。また、化合物 2 はステロイド環にパーオキサイドを有する既知物質であった。現在、毒性評価の検証ならびに作用機序の解析を行っている。

Pleurotus eryngii, steroidal compound, anti-tumor activity

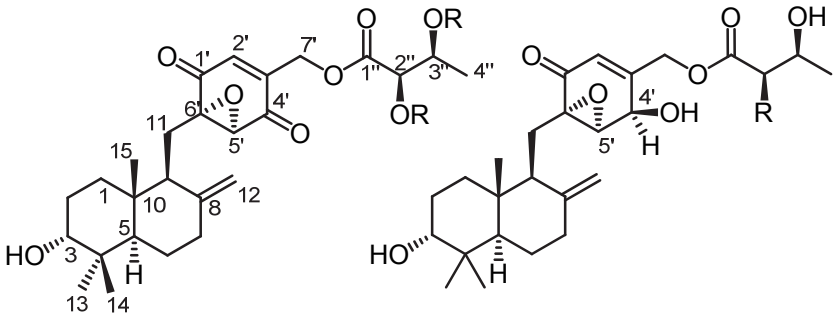
講演番号：2A06p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ A 校舎 06 会場

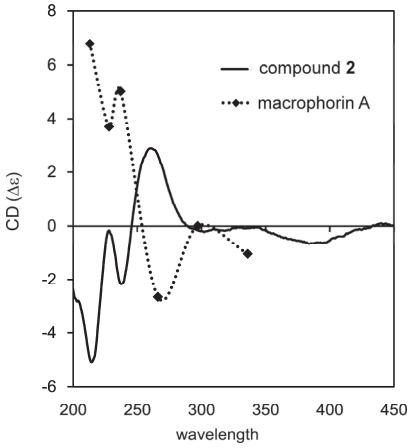
Neomacrophorin I, II, および III の単離構造決定
Isolation and structural elucidation of Neomacrophorin I, II, and III

○橋本 勝[1]、廣瀬 あかね[1]、殿内 暁夫[1]、根平 達夫[2]、前多 隼人[1] ([1]弘前大農生、[2]広島大総合)
○ Masaru HASHIMOTO[1], Akane Hirose[1], kio Tonouchi[1], Tastuo Nehira[2], Hayato Maeta[1] ([1]Hirosaki Univ., [2]Hiroshima Univ.)

我々は、白神山地微生物は多様で新規有用物質性の可能性が期待される。スクリーニングの結果、弘前大学白神自然観察園の土壌から単離した *Trichoderma* sp. 1212-03 に強い抗菌活性を見出し、その培養液から新規化合物 **1-3** を見出した。

1 の分子式は ESITOFMS の精密質量から $C_{26}H_{36}O_8$ と決定した。平面及び相対構造は NMR スペクトルの解析により、3 位にアクシアル水酸基を有するドリマン誘導体であると決定した。本構造は 4'-oxomacrophorin A[1] と類似しているが、NOE 実験によりエポキシキノン部はジアステレオマーとなっていることが示唆され、円二色性スペクトルの解析からこれを確認した。側鎖ジヒドロキシブタン酸部分は、メチル基の ^{13}C NMR の化学シフト(19.5 ppm)からトレオ配置であると決定した。またその絶対配置は対応するジベンゾアート **1a** に誘導した後、負のコットン効果を観測し、励起子キラリティー法によって(2"*R*,3"*S*)-配置を決定した。　**2** は、そのスペクトル解析により、**1** の還元体であることが判明した。^{1}H NMR スペクトルにおいて 4'位、5'位間の結合定数は(0.8Hz)からその立体配置を決定することはできなかったが円二色性スペクトルを macrophorin A のそれと比較することによってトランス体である決定した。**3** は 3-ヒドロキシブタン酸エステルを有するが、その絶対配置はメタノール分解の後、キラル GCMS によって(S)-配置であると決定した。大会ではこれらの生物活性についても言及する。





1) M. Ishibashi, and T. Sassa *et. al, J. Nat. Prod.*, **64**, 1234-1237 (2001).

ECD, NMR, Structural determination

講演番号：2A06p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ A 校舎 06 会場

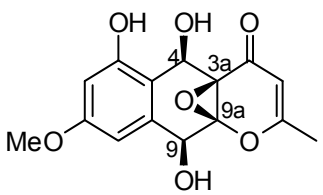
Epoxyroussoeone および epoxyroussoedione の構造決定

Structural Elucidation of Epoxyroussoeone and epoxyroussoedione

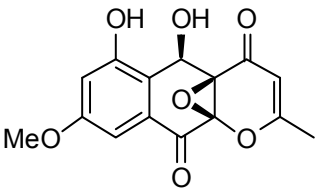
○本村 優奈[1]、狩原 恭平[1]、田中 和明[1]、前多 隼人[1]、根平 達夫[2]、ウォーレン ヒリー[3]、橋本 勝[1] ([1]弘前大学農学生命、[2]広島大学院総合科学、[3]ウェイブファンクション)
○Yuna Hommura[1], Kyohei Karihara[1], Tanaka Kazuaki[1], Hayato Maeda[1], Tatsuo Nehira[2], Warren Hehre[3], Masaru Hashimoto[1] ([1]Hirosaki Univ., [2]Hiroshima Univ., [3]Wavefunction, Inc.)

本研究室ではこれまで草本タケ *Sasa veitchii.*から単離した子嚢菌 *Roussoella hysterioides* KT1651 の培養液から、新規ジテルペン roussoellol 類を単離構造決定し、昨年の本大会で発表した。培養液成分を精査した所 epoxyroussoeone (**1**), epoxyroussoedione (**2**)を単離した。まず **1** の解析から行った。これら分子には骨格部分に水素原子の結合が少なく、NOESY や HMBC 法などによる解析では、候補構造 **X**、あるいは **Y** のいずれかを決定することができなかった。そこでのこれらの可能なすべての立体異性体について DFT/EDF2/6-31G*による理論化学シフトを計算し、実測値との比較を行った。その結果、候補構造 **Y** は全ての異性体とも計算値と大きなずれを示し、候補構造 **X** がすべての異性体が計算精度内でよい一致を示した。NOE スペクトルを測定しなおしたところ、4 位及び、9 位水素間に NOE を観測し、分子モデリングと組み合わせて、**1** の構造を推定した。

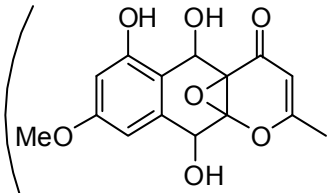
Epoxyroussoedione (**2**)は、NMR スペクトル解析により、**1** の 9 位ケト体であると推定した。ケト基の位置は、4 位水素とフェノール性水酸基との間に NOE を観測して確認した。先と同様な化学シフト理論化学シフトの計算結果もこれを支持した。さらに円二色性スペクトルを測定したところ、α,β 不飽和エポキシケトン部の R 帯(n→π*遷移)に帰属される波長 326 nm に正のコットン効果を観測した。これを Snatzke による逆オクタント則[1]に従って解析し(3a*S*,9a*R*)-配置と決定した。**2** の水酸基の絶対配置は、その生合成を考慮して、(4R)-配置と推定しているが、実験的解析は現在検討中である。これらはいずれも顕著な抗菌活性は示さなかったが、ヒト結腸腺がん細胞（COLO201）に対してそれぞれ IC_{50} = 6.1 μg/ml, 12.2 μg/ml と強い細胞増殖抑制効果を示した。



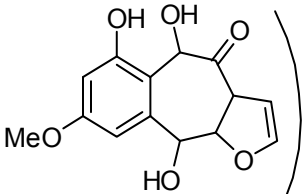
epoxyroussoeone (**1**)



epoxyroussoedione (**2**)



候補構造 X



候補構造 Y

1) G. Snatzke, *Tetrahedron*, **21**, 413-419 (1965)

Epoxyroussoeone, isolation and structural determination, chemical shift calculation

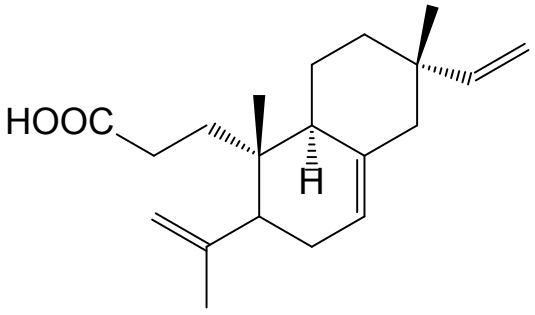
講演番号：2A06p22
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ A 校舎 06 会場

パイナップルセージ滲出物の化粧品原料としての機能性

Evaluation of pineapple sage leaf exudate for cosmetic use

○石田 実希、山本 葵、竹森 久美子、米谷 俊、松田 一彦、森本 正則（近畿大院農）
○ Miki ISHIDA, Aoi YAMAMOTO, Kumiko TAKEMORI, Takashi KOMETANI, Kazuhiko MATSUDA, Masanori MORIMOTO (Kinki Univ.)

【目的】
シソ科のマンネンロウ（ローズマリー, *Rosmarinus officinalis* L.）については抗酸化活性を示す carnosic acid などの有効成分が見出されているのに対して、同じ科に属する園芸植物であるパイナップルセージ（*Salvia elegans* Vahl.）については有効利用に関する知見は乏しく、現在では観賞目的でしか利用されていない。そこで本研究では、本種の滲出物中のテルペン類の化粧品原料としての機能性評価を目的とした。
【方法・結果】
本種の葉の表面には腺毛が多数観察された。その腺毛に含まれる滲出物を塩化メチレンで洗浄することで得た。その滲出物をフラッシュカラムクロマトグラフィーによって精製し、滲出物中の主成分がセコイソピマラン型ジテルペンカルボン酸の 3, 4-secoisopimara-4(18), 7, 15-triene-3-oic acid とウルサン型トリテルペンカルボン酸の ursolic acid であると同定した。これら化合物の美白、抗酸化活性を評価するために、チロシナーゼ阻害活性試験および SOD 様活性試験をそれぞれ行ったところ、いずれの試験でも活性は認められなかった。本種の生産するセコイソピマランカルボン酸については近縁種より単離報告があり、鎮痙作用を示すことが報告されている [1)]。そこで Wister 系雄性ラット胸部大動脈由来の血管標本を用いて本化合物の血管弛緩活性を評価したところ、有意な活性が認められた。さらに本化合物の血管弛緩活性における必須構造を明らかにするために対応するアルコール、メチルエステル、末端メチレンの還元体をそれぞれ調製し、それらの血管弛緩活性を測定したところ、カルボキシル基を持つ化合物にのみ活性が認められた。これらのことから、3, 4-secoisopimara-4(18), 7, 15-triene-3-oic acid を含むパイナップルセージ滲出物成分には血管弛緩活性に基づく血流改善効果が期待される。



3, 4-Secoisopimara-4(18), 7, 15-triene-3-oic acid

1) Giovanni R. *et. al.* : A new diterpenoid with antispasmodic activity from *Salvia cinnabarina*., *Planta Medica*, **67**, 153-155（2001）

Salvia elegans, diterpene, antispasmodic activity

講演番号：2A07a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ A 校舎 07 会場

(+)-4'-deacetyl-griseusin A の合成研究

Synthetic study of (+)-4'-deacetyl-griseusin A

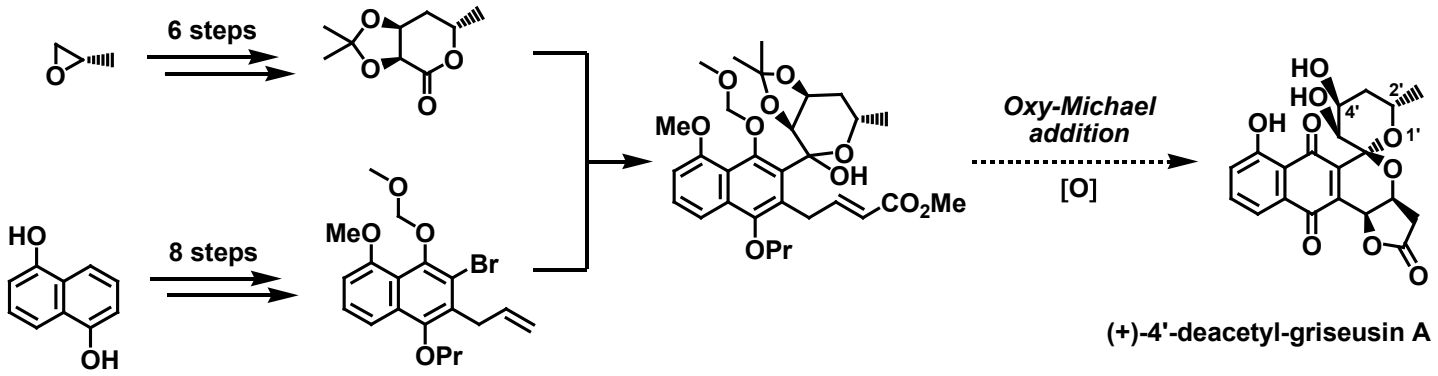
○佐古 尚裕、渡邉 秀典（東大院農生科・応生化）
○Takahiro SAKO, Hidenori WATANABE (The Univ. of Tokyo)

（目的）

(+)-4'-deacetyl-griseusin A は 2011 年に *Streptomyces* sp. IFM 11307 から単離及び構造決定された、Tumor-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand（TRAIL）耐性克服活性を有するピラノナフトキノンである。本化合物は新しい分子標的治療におけるリード化合物となることが期待され、詳細な活性試験及び構造活性相関研究が要求されている。このため我々は効率的な本化合物の合成経路を確立し、種々の創薬研究に寄与することを目的とし合成研究に着手した。

（方法・結果）

我々は(+)-4'-deacetyl-griseusin A の合成を光学活性なプロピレンオキシドを唯一の不斉源として本化合物中に含まれる全ての立体化学を構築するという、画期的な戦略により行うことを計画した。(*S*)-乳酸エチルから導いた光学活性な(*S*)-プロピレンオキシドから、3 つの不斉点を有するバレロラクトンを調製した。続いて 1,5-ナフタレンジオールから得た臭化物より調製したリチウム試薬をこのバレロラクトンに対し求核付加させた後に、アクリル酸メチルとのクロスメタセシス反応に付すことにより(+)-4'-deacetyl-griseusin A に存在する全炭素を有する重要中間体の合成に成功した。今後、この中間体に対し鍵反応である分子内 Oxy-Michael 付加反応及びベンジル位の酸化により(+)-4'-deacetyl-griseusin A の全合成を行う予定である。



(+)-4'-deacetyl-griseusin A, pyranonaphthoquinone, TRAIL resistance-overcoming activity

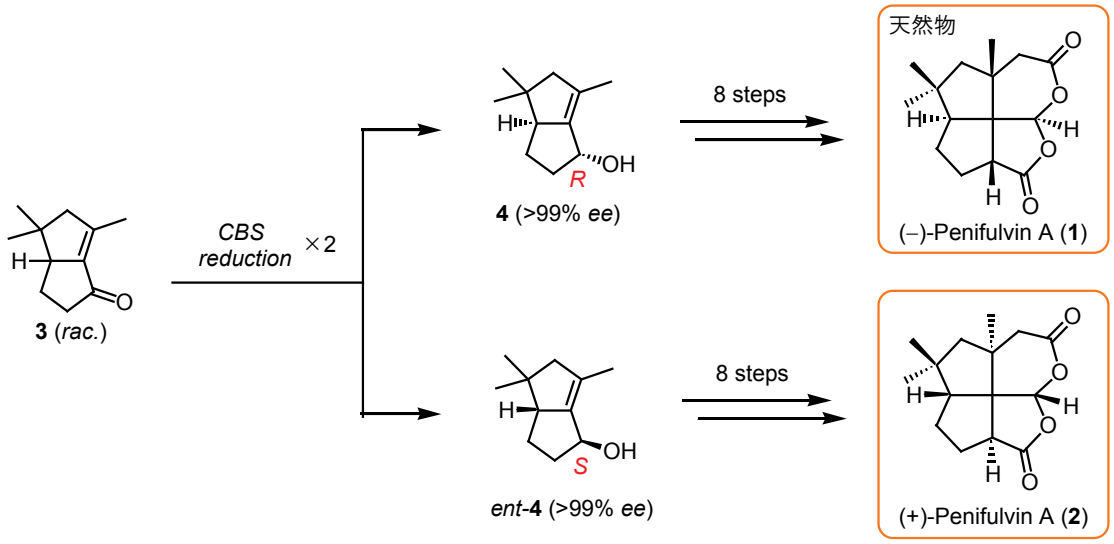
講演番号：2A07a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ A 校舎 07 会場

Penifulvin A の両鏡像体の全合成

Total synthesis of both enantiomeric isomers of Penifulvin A

○深津 裕一、渡邉 秀典（東大院農生科）
○Yuichi FUKATSU, Hidenori WATANABE (Univ. of Tokyo)

Penifulvin A (**1**)は、2006 年に Glore らによって *Penicillium griseofulvum* (NRRL 35584)の培養菌体から単離・構造決定されたセスキテルペンである。**1** はトウモロコシなど 80 種以上の農作物を食害するヨトウガの一種であるツマジロクサヨトウ(*Spodoptera frugiperda*)の幼虫に対して成長抑制活性を示すが、詳細な生理活性発現機構は未だに分かっていない。また **1** は一つの炭素原子が四つの環に共有されたジオキサ[5.5.5.6]フェネストラン骨格という、ユニークな構造を有しており合成化学的に興味深い化合物である。**1** の初の不斉全合成は 2009 年に Mulzer らによってなされ、天然物は図に示したような絶対立体配置を有していることが報告されている。我々は、本化合物の新規な骨格の構築法の確立と生理活性発現機構の解明のための試料供給を目指して合成研究に着手し、本化合物のラセミ体合成を達成し、2013 年度の農芸化学会年会にて発表を行った。今回、我々は本化合物の両鏡像体の全合成を達成したので報告する。



Total synthesis, antiincectan activity, dioxa[5.5.5.6]fenestrane skeleton

講演番号：2A07a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ A 校舎 07 会場

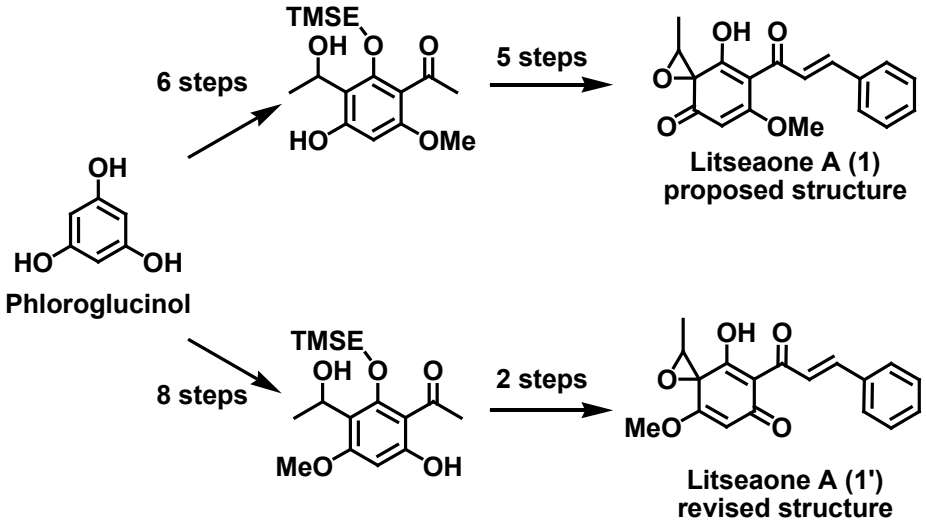
Litseaone A の合成と構造改訂

Synthesis and structural revision of Litseaone A

○影治 秀晃、石神 健、渡邉 秀典（東大院・農生科）
○Hideaki KAGEJI, Ken ISHIGAMI, Hidenori WATANABE (Univ. of Tokyo)

Litseaone A（1）はハマビワ属の樹木より単離された骨髄性白血病細胞系に対する細胞毒性活性を有するフラボノイドの一種である。本化合物はその平面構造のみが決定されており、相対および絶対立体配置はともに決定されていない。我々は Litseaone A の立体化学の決定、および白血病治療研究の進歩へとつながることを目指し、本化合物の合成研究に着手した。

我々はフロログルシノールを出発原料とする 11 工程にて単離文献記載の Litseaone A の提唱構造を有する二つのジアステレオマーを合成した。しかしながら、合成した異性体の各種スペクトルデータはいずれも天然物のものとは一致しなかった。そこで我々は天然物 Litseaone A の各種スペクトルデータを再度詳細に検討し、天然物の真の構造は、提唱構造とはメチルエーテルとケトンの位置が異なる 1’のような化合物ではないかと推測した。先の合成と同様の 10 工程にて 1’の構造を持つ二つのジアステレオマーの合成を行った結果、片方のジアステレオマーのスペクトルデータが天然物のものと一致を示し、Litseaone A の真の構造は 1’に示したものであることが明らかとなった。



Total synthesis, Natural product, Flavonoid

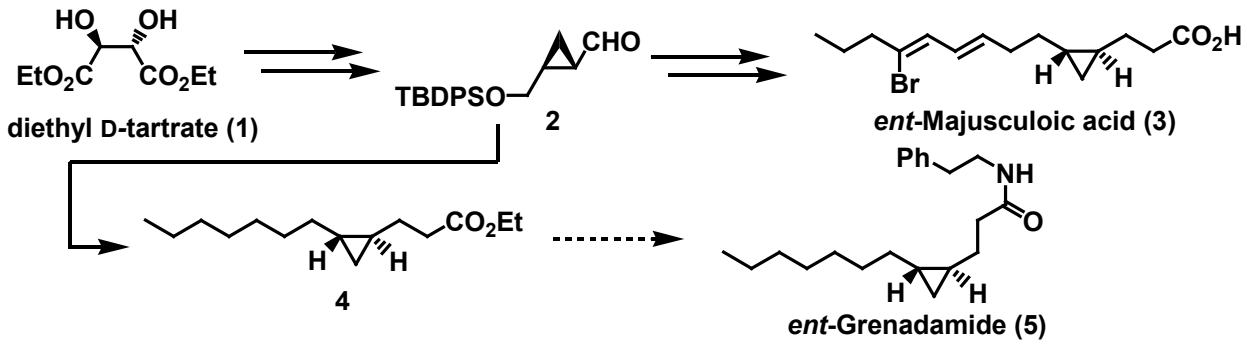
講演番号：2A07a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ A 校舎 07 会場

三員環を有する生物活性物質の合成研究

Synthesis of bioactive substances with cyclopropane ring

○土井 悠之介、坂口 和彦、石神 健、渡邉 秀典（東大院農生科・応生化）
○Yunosuke DOI, Kazuhiko SAKAGUCHI, Ken ISHIGAMI, Hidenori WATANABE (Univ. of Tokyo)

天然に存在する化合物の中には、三員環を有する化合物が多く存在し、またそれらの化合物の多くは生物に対して活性を持っていることが知られている。また天然に存在する三員環化合物の立体化学は単一のエナンチオマーであることがほとんどであり、応用研究を進めるためには高い光学純度で三員環を合成することが求められる。筆者らは汎用性の高いシクロプロパンキラルビルディングブロックの開発を行うことを目的に、Majusculoic acid と Grenadamide を合成ターゲットに置き、研究に取り組んだ。Majusculoic acid は 2005 年に Molinski らによってシアノバクテリア類より単離、構造決定された化合物である。本化合物はカンジダ症の主要な原因である *Candida albicans* に対する抗菌活性があり、抗真菌薬として期待されている。Majusculoic acid の構造はトランス置換のシクロプロパン環と共役臭化ジエンを有しているが、シクロプロパン環の絶対立体配置は決定されていない。Grenadamide は 1998 年に Gerwich らによってシアノバクテリア類より単離、相対立体化学の決定をされた化合物である。本化合物はカンナビノイド受容体阻害活性を持つことが明らかとなっており、また全合成による絶対立体配置の決定もなされている。筆者らはまず Majusculoic acid の全合成研究に取り組み、出発原料 diethyl-D-tartrate から 7 工程で得られる高光学純度のシクロプロパン環を有した化合物 **2** の合成を達成した。また、化合物 **2** から 7 工程の変換反応を行い Majusculoic acid の全合成を完了した。全合成した Majusculoic acid の遷光度は天然物と符号が異なったことから、Majusculoic acid の天然物のシクロプロパン環の絶対立体配置は(*R,R*)では無く、(*S,S*) であることを示唆することができた。続いて同じ手法を用いて合成した化合物 **2** から 3 工程で得られる化合物 **4** を合成することにより、grenadamide の形式全合成を達成した。この合成により筆者らが開発したシクロプロパンキラルビルディングブロックが汎用性の高い合成手法であることを証明した。



Majusculoic acid, Grenadamide, cyclopropane

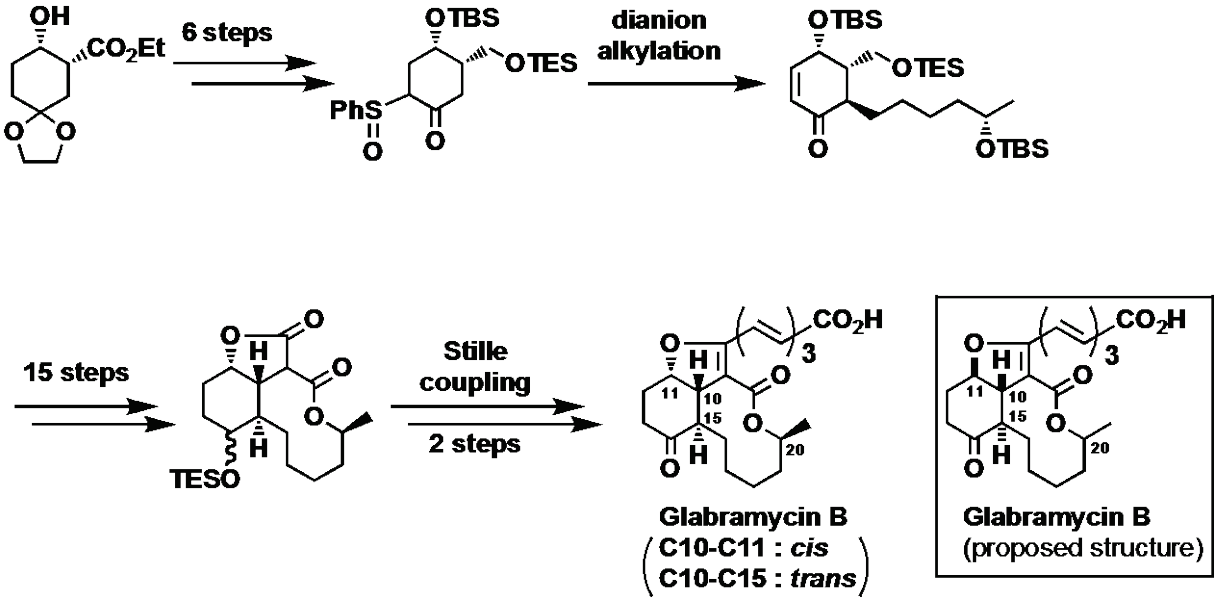
講演番号：2A07a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ A 校舎 07 会場

立体化学の決定を目的とした GlabramycinB の合成研究

Synthetic study of GlabramycinB for determination of stereochemistry

○山本 将起、石神 健、渡邉 秀典（東大院農生科）
○masaoki YAMAMOTO, ken ISIGAMI, hidenori WATANABE (Univ. of Tokyo)

（目的）Glabramycin B は 2009 年にカビ類 *Neosartorya glabra* の培養液から単離されたポリケチドである。本化合物はリボソームタンパク質 S4 を標的とするスクリーニングにより発見されたが、タンパク質合成を阻害するだけでなく RNA 合成も阻害するなど、その詳細な作用機序は未だ不明である。また立体化学についても ^{1}H-NMR における結合定数により部分的な相対立体配置が提唱されているのみでありその詳細については決定されていない。我々は、種々の類縁化合物とのスペクトルデータの比較により、提唱構造とは異なる立体化学を有する GlabramycinB の構造を独自に推定した。本推定構造の合成による Glabramycin B の詳細な立体化学の決定を目的として研究を開始した。
（方法・結果）パン酵母を用いた還元により得られる光学活性なヒドロキシエステルを出発原料とし、ジアニオンによる位置及び立体選択的なアルキル化、マクロラクトン化、クロスカップリング反応を用いて推定した立体化学を有する化合物の合成を行った。本化合物は精製が困難であるため完全な精製には未だ至っていないが、^{1}H-NMR スペクトルは天然物のものとよい一致を示した。現在、精製条件の検討を行っており、今後 Glabramycin B の絶対立体配置の決定を行う予定である。



Glabramycin, synthetic study, antibacterial

講演番号：2A07a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ A 校舎 07 会場

Pseudolaric acid B の 5－7 トランス縮環骨格の構築

Construction of 5-7 Transfused Framework of Pseudolaric acid B

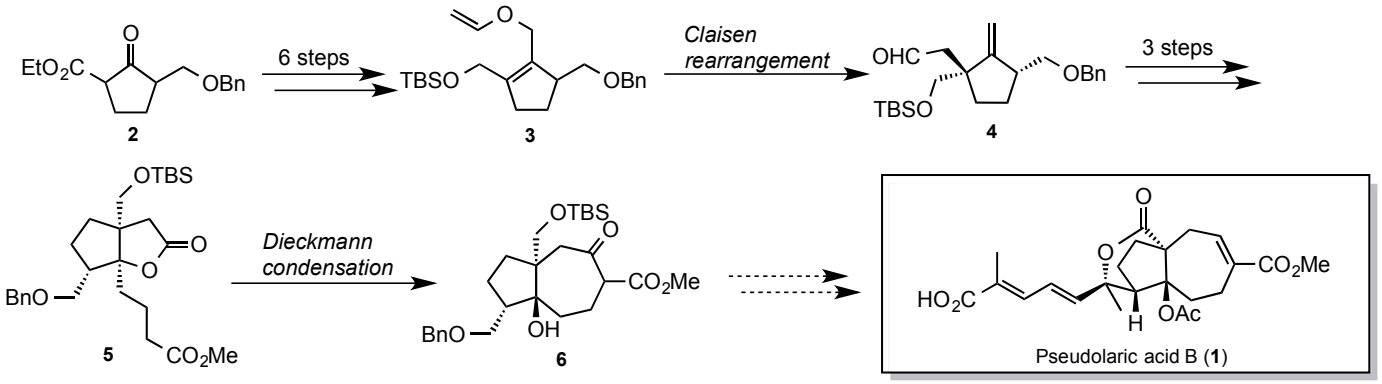
○間瀬 千晶、森 直紀、渡邉 秀典（東大院農生科・応生化）
○Chiaki MASE, Naoki MORI, Hidenori WATANABE (The Univ. of Tokyo)

［目的］

Pseudolaric acid B (**1**)は 1965 年にイヌカラマツの根皮より単離されたジテルペンであり、抗菌活性、抗腫瘍活性を有する。また近年、腫瘍細胞の血管新生阻害活性や、多重薬剤耐性腫瘍細胞に対する微小管重合阻害といった新しい生物活性も報告されており、抗癌剤としての応用も期待されている化合物である。構造的特徴としては、天然には珍しい 5 員環と 7 員環のトランス縮環構造、架橋ラクトン構造、さらに 4 級炭素を含む 4 つの連続不斉炭素を有している。現在までに数多くの合成研究がなされ、2007 年には Trost らにより不斉全合成が報告されているが、高価な不斉触媒や Rh 触媒の使用が問題点としてあげられる。そこで我々は、Pseudolaric acid B のさらなる効率的な合成を目指して研究を行うこととした。

［方法と結果］

1 の側鎖の導入と架橋ラクトンの構築は合成の最終段階で行うこととし、その前駆体として **6** を考えた。**6** の 5 員環–7 員環トランス縮環骨格の構築が本化合物の合成において最重要課題であり、**6** は **5** の Dieckmann 縮合によって導くことができると考えた。実際の合成としては、既知化合物 **2** より 6 工程で **3** へと導き、**3** の Claisen 転位によって **4** を得た。**4** をカルボン酸とした後にヨードラクトン化と、アクリル酸メチルとのラジカル反応を行うことで **5** を得た。現在までに、既知化合物 **2** より 11 工程で 5 員環–7 員環トランス縮環骨格を有する **6** を合成することに成功した。現在、**1** の全合成に向けて引き続き研究を行っている。



Pseudolaric acid B, diterpene, Dieckmann condensation

講演番号：2A07a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ A 校舎 07 会場

昆虫摂食阻害物質アザジラクチンの形式不斉合成

Formal Asymmetric Synthesis of Azadirachtin

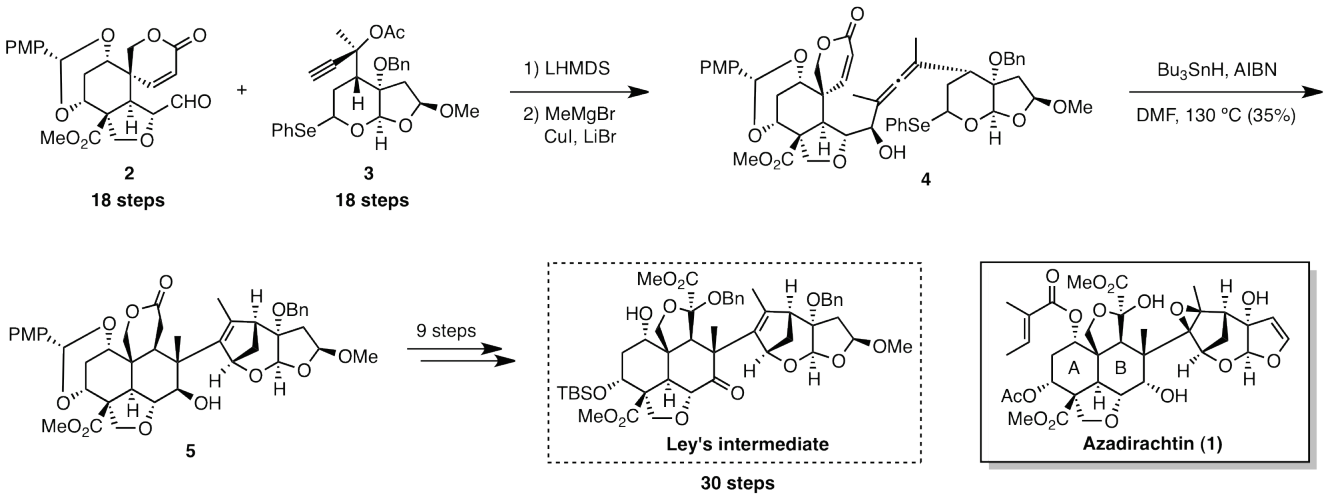
○森 直紀、渡邉 秀典（東大院農生科・応生化）
○Naoki MORI, Hidenori WATANABE (The Univ. of Tokyo)

［目的］

アザジラクチン(1)は 1968 年に Morgan らによって熱帯植物インドセンダンの種子から単離されたリモノイドであり、昆虫に対して強力な摂食阻害活性および成長・変態阻害活性を有する。本化合物はその高度に官能基化された複雑な構造ゆえ、現在においても合成の報告は Ley らによるリレー合成１例にとどまっている。そこで我々は、アザジラクチンの効率的な合成を目指して研究を行うこととした。

［方法と結果］

これまでに我々はアザジラクチンを左右ユニット(2 と 3)に分けて合成するという収束的なルートの開発を行ってきた。その結果、2 と 3 はいずれも既知化合物より 18 工程で光学活性体として合成することができ、鍵反応である 4 のタンデム型ラジカル環化反応によってアザジラクチンの全炭素骨格を有する 5 を得ることに成功した。さらにラクトン部の官能基変換など 9 工程を経て、Ley らの合成中間体へと導くことができた。これにより最長 30 工程でアザジラクチンの形式不斉合成（全合成には 39 工程）を達成することができた。本合成は世界で 2 例目となるアザジラクチンの合成であり、Ley らの合成（62 工程）と比べて非常に短工程で効率的である。



azadirachtin, antifeedant, formal synthesis

講演番号：2A07a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ A 校舎 07 会場

4 つのジアステレオマーの合成と構造訂正

Synthesis of four diastereomers and structural revision of tetradenolide

○徳田 真樹[1]、黒米 雄次[2]、加藤 理恵子[2]、野原 由江[1]、服部 恭尚[3]、真壁 秀文[2] ([1]信州大農・応生科、[2]信州大院農、[3]京薬大・創薬化学)
○Maki TOKUDA[1], Yuji KUROGOME[2], Rieko KATOH[2], Yukie NOHARA[1], Yasunao HATTORI[3], Hidefumi MAKABE[2] ([1]Shinshu Univ., [2]Shinshu Univ. Grad. School Agr., [3]Kyoto Pharm Univ.)

Tetradenolide (**1**) は分子内にα-ピロン環を有する化合物であり、1997 年に N. De Kimpe らによって東洋や南北回帰線間のアフリカに生育する低木 *Tetradenia riparia* の葉から単離・構造決定された。その生理活性作用として抗菌作用、殺虫作用、ファイトアレキシンが報告されている。[1]

Tetradenolide (**1**) には 8 つの立体異性体が存在するが、天然物の立体配置は決定していなかった (Figure1)。当研究室ではすでに **1a**, **1b**, **1c** の合成が完了しており、天然物のデータと比較した結果、その立体は天然物とは異なることが確認されている。そこで本研究では、残る **1d** の全合成を達成し天然物の相対立体配置を決定することを目的として合成を開始した。

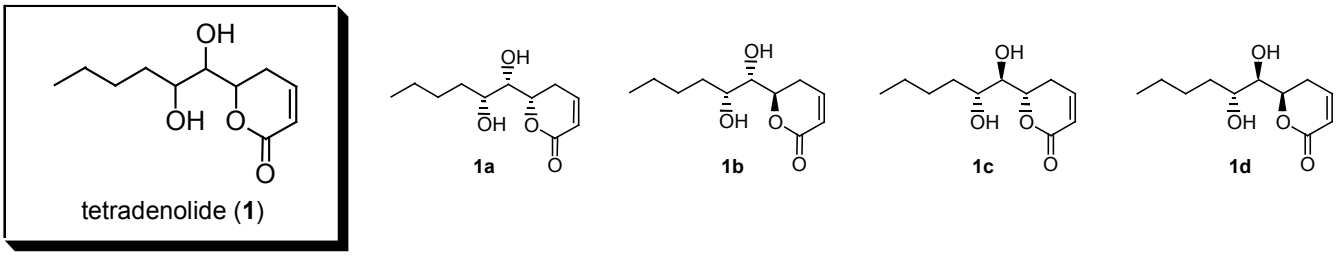


Figure1. Tetradenolide (**1**) の 4 つのジアステレオマー

1d は出発物質 3-butyne-1-ol と *n*-valeraldehyde の縮合を行った後、Sharpless 不斉ジヒドロキシ化反応に供し、L-Selectride による立体選択的還元、光延反応によるヒドロキシ基の立体反転、安藤試薬を用いた Z 選択的 Horner-Wadsworth-Emmons オレフィン化反応によるエステル基の導入、続く酸による環化反応を経て全合成を完了した。

合成した **1d** と天然物の各種データの比較を実施した結果、^{13}C-NMR のケミカルシフト、ならびに融点が一致しなかった。このため、**1d** の構造は天然物の立体配置とは異なっていた。そこで、文献検索を行ったところ、deacetylboronolide[2] の ^{13}C-NMR のケミカルシフトと、融点が天然物のデータとよく合致したため、天然物の tetradenolide (**1**)の構造は deacetylboronolide の可能性が高いことが示唆された。

[参考文献]

1. Van Puyvelde, L.; De Kimpe, N. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1157-1158.
2. Davies-Coleman, M. T.; Rivett, D. E. A. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 3047-3050.

total synthesis, natural product, structural revision

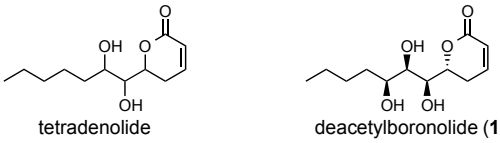
講演番号：2A07a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ A 校舎 07 会場

Deacetylboronolide の合成研究

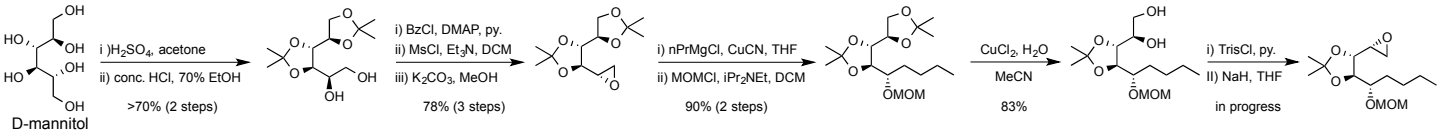
Synthetic studies on deacetylboronolide

○黒米 雄次[1]、徳田 真樹[2]、服部 恭尚[3]、真壁 秀文[1] ([1]信大院農、[2]信大農応生、[3]京都薬科大)
○ YUJI KUROGOME[1], MAKI TOKUDA[2], YASUNAO HATTORI[3], HIDEFUMI MAKABE[1]
([1]Shinshu Univ. Grad. Sch. Agr., [2]Shinshu Univ. Dept. of Biosci. Biotech., [3]Kyoto Pharm. Univ.)

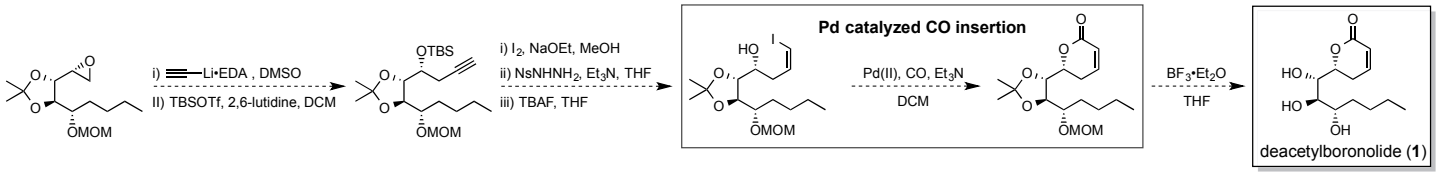
【目的】Tetaradenolide は N. De Kimpe らが *Tetradenia riparia* の葉から単離構造決定した化合物で、抗菌作用・殺虫作用を有しておりファイトアレキシンとして作用する [1]。不斉中心を三つ有しているが単離文献では相対立体配置が決定されておらず、比旋光度も不明である。本年度、当研究室では tetaradenolide のジアステレオマー4 種の合成を完了したが、^{13}C-NMR の値は天然物と一致しなかった。天然物のスペクトルデータを詳細に解析すると類縁化合物 deacetylboronolide (**1**)と酷似していたため、**1** を合成し、各種スペクトルデータを比較することにより構造を確認することにした。



【方法と結果】D-Mannitol のトリアセトニド保護体の一つのアセトニド保護を外し、1 級水酸基のみを Bz 基で保護した後、2 級水酸基に Ms 基を導入して塩基性条件下エポキシドを合成した。CuCN 存在下 *n*-PrMgCl を位置選択的にエポキシドに求核付加させ、水酸基を MOM 基で保護した。$CuCl_2$ による 1 級 2 級アセトニドの選択的脱保護を行い、1 級水酸基のみを Tris 基で保護した。炭酸カリウム・メタノール条件下でのエポキシ化を試みたが全く反応が進まなかったため、NaH を塩基として用いたところ高収率でエポキシドを得ることが出来た。



今後は、エポキシドへのリチウムアセチリドの求核付加と末端アセチレンのヨウ素化の後に、Ns ヒドラジドによる *Z* 選択的オレフィン化を行う。続いて 2 価パラジウムを用いた一酸化炭素とのアシルパラデーションによりα-ピロン骨格を形成し、合成を完了する予定である。



1) L. V. Puyvelde, N. De Kimpe, *Phytochemistry* 1998, *49*, 1157-1158.

total synthesis, natural product, asymmetric synthesis

講演番号：2A07a17
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ A 校舎 07 会場

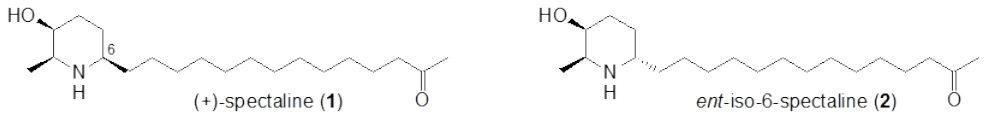
パラジウム触媒による立体選択的環化反応を用いたピペリジンアルカロイド(+)-spectaline と *ent*-iso-6-spectaline の合成研究

Synthetic studies on (+)-spectaline and *ent*-iso-6-spectaline via Pd(II) catalyzed cyclization

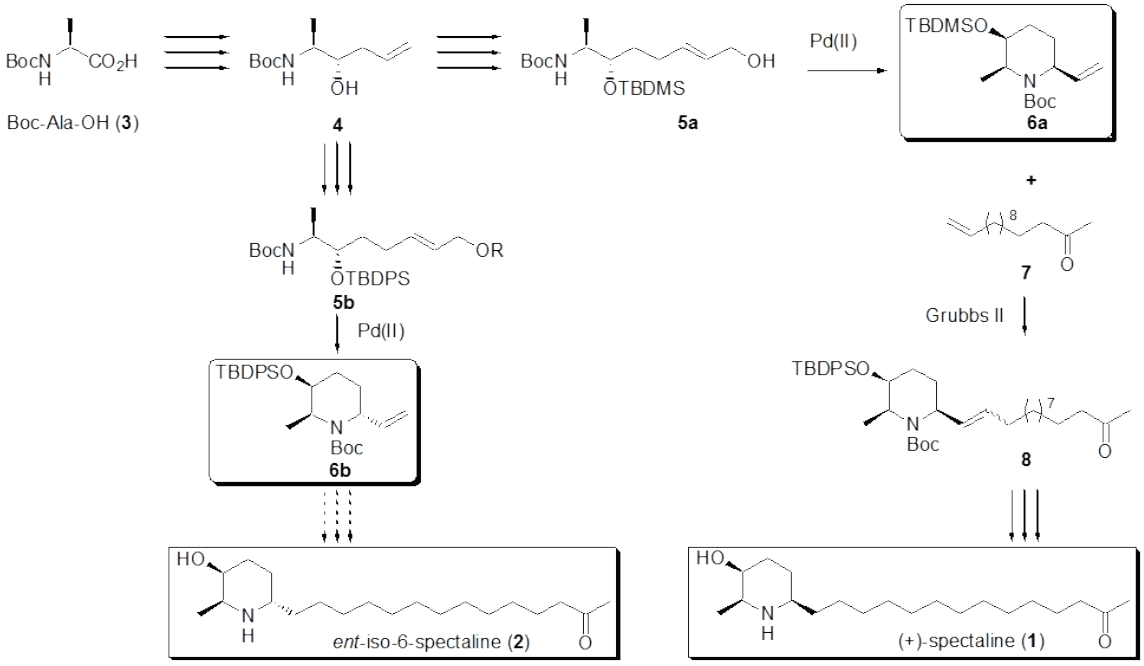
○服部 恭尚[1]、葛山 昌伴[1]、古田 善宏[1]、大西 康司[1]、櫻井 春華[1]、真壁 秀文[2]、廣田 満[2]、小林 数也[1]、赤路 健一[1] ([1]京都薬大薬、[2]信州大院農)

○Yasunao HATTORI[1], Masatomo Katsuyama[1], Yoshihiro Furuta[1], Kohji Ohnishi[1], Haruka Sakurai[1], Hidefumi Makabe[2], Mitsuru Hirota[2], Kazuya Kobayashi[1], Kenichi Akaji[1] ([1]Kyoto Pharmaceutical Univ., [2]Shinshu Univ.)

【目的】ピペリジンアルカロイドは天然に最も豊富に含まれているアルカロイドで、局所麻酔作用や抗アレルギー作用、抗菌作用など広範な活性が報告されている。今回、構造活性相関研究への展開を目的として、ピペリジン環 6 位の立体化学をパラジウム触媒による立体選択的環形成反応で制御可能な合成法の確立を行った。



【方法と結果】Boc-Ala-OH (**3**)を出発物質に、環化前駆体 **5a** と **5b** の合成を行い、Pd(II)触媒を用いた環化反応に供したところ望む立体化学を有する **6a** と **6b** を各々高選択的に得ることに成功した。[1] ピペリジン環 **6a** と別途合成した側鎖部分 **7** とのクロスメタセシス反応を行った後、2 工程で(+)-spectaline (**1**)の全合成を達成した。現在、*ent*-iso-6-spectaline (**2**)の合成を行っている。



1) Makabe, H.; Looi, K. K.; Hirota, M. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 27-29.

piperidine, natural product, stereoselective synthesis

講演番号：2A07p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ A 校舎 07 会場

二置換アミノ酸残基を含むジペプチド誘導体の合成法

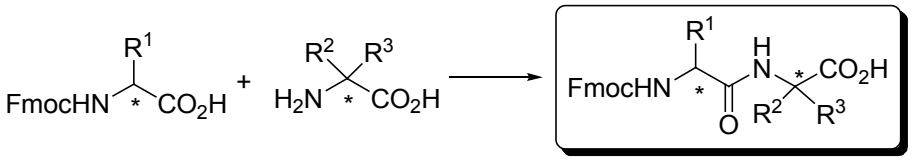
Synthetic Method of Dipeptide Derivatives with Quaternary Amino Acid Residue

○松山 恵介、児玉 和也、山本 憲一郎 (長瀬産業株式会社)
○Keisuke MATSUYAMA, Kazuya KODAMA, Kenichiro YAMAMOTO (NAGASE & CO., LTD.)

【目的】ペプチドはその多様な生理活性から、医薬として有望なターゲットである。しかしペプチドは体内では各種プロテアーゼにより速やかに分解されるため、投与後に狙った機能を発現するにはプロテアーゼの攻撃に耐える必要がある。我々は 2010 年に、α位に水素原子を持たない二置換アミノ酸残基を含むペプチドがプロテアーゼ耐性を示す例を報告した。[1)]今回、二置換アミノ酸残基のペプチドへの導入を支援すべく新たなビルディングブロックを開発した。

【方法】一般的な Fmoc 法ペプチド固相合成において二置換アミノ酸残基を導入すると、それ以降のペプチドの伸長が困難になる場合がある。これは二置換アミノ酸の次に導入されるべきアミノ酸残基が、反応位置周りの嵩高さのために接近しにくくなるためと考えられる。そこで二置換アミノ酸とその左隣のアミノ酸を比較的反応性の高い液相法で予め結合させたジペプチド誘導体を、ペプチド合成用試薬として開発する事とした。

【結果】側鎖に保護基を持たないアミノ酸残基のみからなる Fmoc 保護ジペプチドは、二置換アミノ酸 *t*-ブチルエステルと Fmoc 保護アミノ酸の縮合及び引き続いての脱 *t*-ブチルエステル化により容易に合成できた。一方酸性条件下で脱保護される保護基を側鎖に持つアミノ酸残基を導入したい場合、前記の方法が使用できない。そこで無保護の二置換アミノ酸を Fmoc 保護アミノ酸と縮合させる条件検討を行い、一工程で目的物を得る方法を見出した。本法は、様々な基質に適用可能であった。更に得られた Fmoc 保護ジペプチドを実際に Fmoc 法ペプチド固相合成に適用し、所望の二置換アミノ酸残基を含むペプチドが合成できる事も確認した。



1) Matsuyama, K.; Yamamoto, K.; Murakami, S.; Anzai, K. “Construction of an unnatural amino acid library through asymmetric alkylation of glycine or alanine ester Shiff-base utilizing Maruoka Catalyst®”, Presented at the 5th International Peptide Symposium, Kyoto, Japan, December 4-9, 2010; P2-204.

quaternary amino acid, dipeptide derivative, building block for solid phase peptide synthesis

講演番号：2A07p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ A 校舎 07 会場

温度感受性ペプチドへの応用を志向した側鎖アミド修飾型アミノ酸の合成

Synthesis of Side Chain Modified Amino Acids Intended to Apply Thermosenstive Peptides

○出張 裕子、藤田 裕子、岡田 洋平、金 承鶴、北野 克和、千葉 一裕（東農工大農）
○Yuko DEHARI, Yuko FUJITA, Yohei OKADA, Shokaku KIM, Yoshikazu KITANO, Kazuhiro CHIBA (Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)

【目的】「刺激応答性材料」は外部刺激や環境変化に応答して形や性質を変える機能性材料である。なかでも温度感受性材料は、DDS 材料や化粧品、組織培養培地などへの様々な応用が期待されている。その代表例である NIPAM は、その構造中のイソプロピルアミド基が熱特性に関与していると考えられている。近年、当研究室ではアミド結合を有する多様な低分子化合物を体系的に合成し、その熱特性を認めている[1]。これらは加温により均一水溶液から二相溶液へと相転移する。これはアミン部分の構造、分子の親水性、疎水性のバランスによると考えられる。一方、ペプチドは豊富なアミド結合と多様な側鎖構造を有するため、イソプロピルアミドやそれに類似したユニットの導入により、多様性のあるアミド結合オリゴマーを形成することが可能である。また、これらはその構造特異的な熱特性を示す可能性がある。そこで、当研究室で開発した可溶性タグを用いた効率的なペプチド合成技術により、新たな物性を持つ多様な機能性分子の探索を試みた。本研究ではアミノ酸の側鎖部分へイソプロピルアミド構造を導入し、新たな側鎖アミド修飾型アミノ酸の合成を検討した。

【方法】N 末端を Fmoc 基で、側鎖カルボキシ基を *t*Bu 基で保護したグルタミン酸を出発物質として、当研究室で発見された温度感受性低分子である *N*-isopropylpropionamide の部分構造を持つアミノ酸の合成を考えた。初めに、C 末端を保護した後、酸処理により *t*Bu 基を除去し、イソプロピルアミド化後、C 末端の保護基を外すことにより目的のユニットを得る(図 1)。

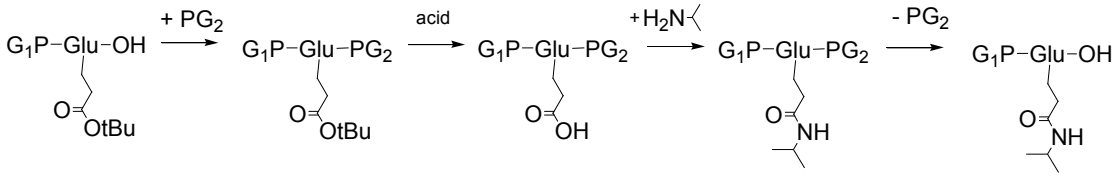


図 1　*N*-isopropylgultamic acid　合成戦略

【結果・考察】当初、保護基 PG_1 には Fmoc 基、PG_2 にベンジル基を用いて、側鎖アミド修飾型アミノ酸 Fmoc-Glu(NHiPr)-OH を合成しようと試みたが、合成途中で難溶解性に直面し、合成の継続が困難になったため、PG_2 に Trimetylsilylethyl 基を導入して、合成を行ったところ目的ユニットの合成に成功した。今後は可溶性タグを用いたペプチド合成法を用い、このユニットを連続的に、また多様なアミノ酸と組み合わせることで、新機能性物質を創成したい。

参考文献[1]M. KITSUNAI, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 3314-3317 (2008)

Peptide, Thremosenstive, Isopropylamide

講演番号：2A07p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 07 会場

磁性粒子を用いた効率的ペプチド液相合成法の開発

Development of efficient liquid-phase peptide synthesis　using magnetic particles

○谷口 大輔、島田 恒平、若松 弘起、岡田 洋平、北野 克和、千葉 一裕（東京農工大学）
○Daisuke TANIGUCHI, Kohei SHIMADA, Hiroki WAKAMATSU, Yohei OKADA, Yoshikazu KITANO, Kazuhiro CHIBA (Tokyo Univ.of Agric.and Technol)

[緒言]近年，中分子医薬のターゲットとしてペプチドが広く注目を集めている．代表的なペプチド合成法である固相法は，モニタリングの困難さや基質の制限がありながらも，分離精製の簡便さから迅速な自動合成やコンビナトリアル合成に用いられている．一方で液相法は分離精製が煩雑ではあるが，高い反応性を有し簡便なモニタリングが可能である．液相合成において簡便な分離精製が可能になれば，多様なペプチドを高効率で合成できると期待される．

液相反応後の分離精製過程において簡便な精製分離を助けるための補助剤の導入が必要である．特に磁性粒子はその広い表面積と可逆な凝集性，部位特異的な作用から，ペプチドの分離精製に応用できると考えられる．我々は磁性粒子をペプチド合成に導入することで簡便な分離精製法を開発することを目指した．

[方法および結果]まず，疎水性基を導入した磁性粒子と同じく疎水性基を有するベンジルアルコール誘導体である疎水性タグを用意した．疎水性タグはペプチド C 末端に導入しペプチド伸長は N 末端方向に行った．反応液中ではタグ付きペプチドや磁性粒子は分散し，伸長反応や脱保護反応は高収率で進行した(Figure 1 a)．続いて反応液に極性溶媒を加える事で疎水性基を有するタグと磁性粒子は凝集し，それらは外部からの磁力を受け磁石付近に集積した(Figure 1 b)．磁石によりペプチドが保持できるため，デカンテーション等による簡便な洗浄が可能となった(Figure 1 c)．洗浄されたタグ付きペプチドと磁性粒子は再び反応溶液中で分散し，次段階の反応を進めることができる(Figure1 d)[1]．本技術により，フィルターを用いた濾過が不要となりペプチドの効率的な液相合成が可能となった．

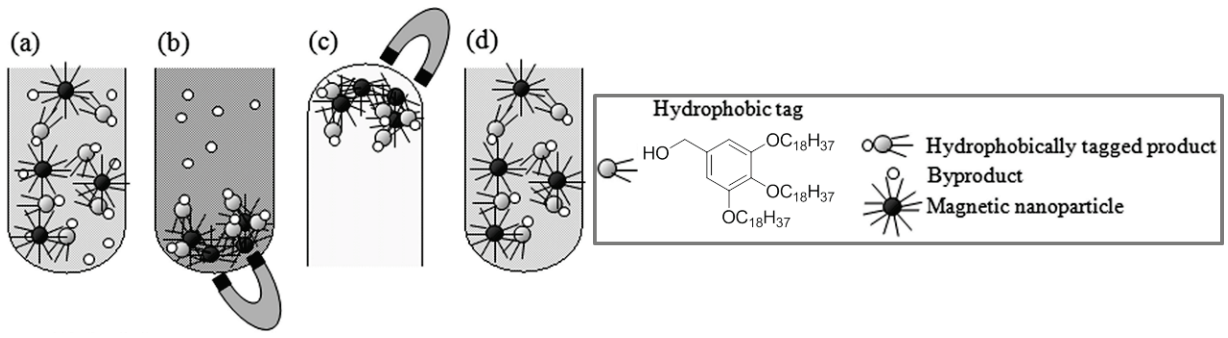


Figure 1

peptide synthesis, magnetic particles, solution-phase reaction

講演番号：2A07p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 07 会場

Acm 化チオールの酸化的開裂を基軸としたペプチド誘導体の合成

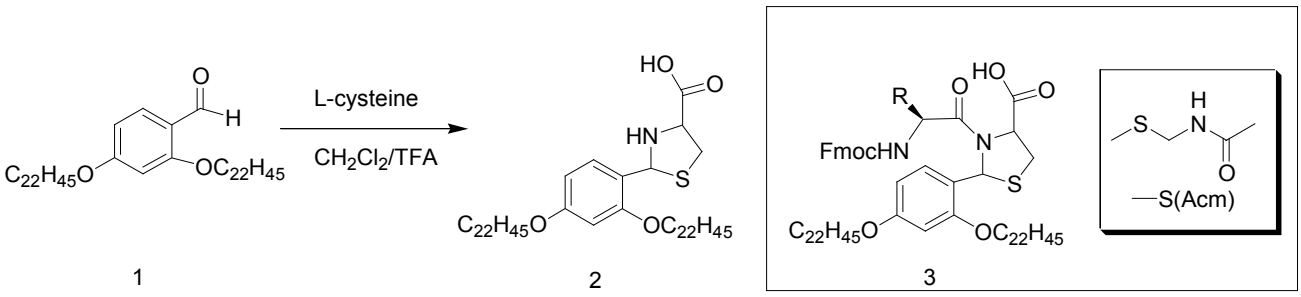
Synthesis of Peptide Analog based on Oxidative Cleavage of Acetoamidemethyl Protected Thiols

○渋谷 彩恵子、高橋 優士、岡田 洋平、金 承鶴、北野 克和、千葉 一裕（東京農工大学）
○Saeko SHIBUYA, Masahito TAKAHASHI, Yohei OKADA, Shokaku KIM, Yoshikazu KITANO, Kazuhiro CHIBA (Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)

ペプチド分子内のシステイン残基が持つチオール基は高い反応性を有しており，チオエステル形成やジスルフィド結合形成などの修飾を受けることでペプチドの生理活性の発現や安定性に寄与している．ペプチドの化学合成においては，その高い反応性からシステインチオールの保護は不可欠であり，チオール保護基に関する研究が盛んに行われている．チオール保護基の中でもアセトアミドメチル(Acm)基は高い酸耐性を持ちながら陽極酸化によって容易に脱保護が可能であり，有用なチオール保護基の一つである．一方，我々は疎水性のベンジルアルコール誘導体を可溶性のタグとして用いた液相ペプチド合成法を開発し，さまざまな配列のペプチド合成に取り組んできた．この合成法ではタグと結合したペプチドが各反応終了後に沈殿として高純度かつ定量的に回収できるため，カラムクロマトグラフィー等の分離・精製操作なしで数十段階に上る化学反応を実現することができる．しかし，本法ではペプチド伸長に伴いタグの疎水性効果が薄れてしまうため長鎖のペプチド合成は困難である．今回我々は，チオール保護基の Acm 基に注目し，ペプチドの伸長過程で可溶性タグを導入できるようなペプチド誘導体の合成を目指し，Acm 化チオールの酸化的開裂に関する研究を行った．

本研究ではまずアルデヒド基をもつベンジルアルコール誘導体 1 と L-システインを用いて，疎水性のタグとしての機能を有するアミノ酸誘導体 2 の合成を行った．反応はジクロロメタン／トリフルオロ酢酸混合溶媒中で行い，反応後は溶媒をアセトニトリルに置換することで化合物 2 を沈殿として得た．得られた化合物 2 を Fmoc アミノ酸との縮合反応に供することで分子内に Acm 様構造を持つペプチド誘導体 3 を合成することに成功した．さらに，化合物 3 を酸化反応に供することによってチオールを保護していた Acm 様構造の脱保護が観察された

本発表では Acm 化チオールのペプチド合成への応用を含め，詳細な実験条件等について報告する．



1　2　3

peptide synthesis, cysteine, oxidation

講演番号：2A07p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 07 会場

疎水性可溶化担体を用いた液相コンジュゲート核酸合成

Synthesis of Conjugated Oligonucleotides in Solution-Phase Using Alkyl Chain Soluble Support

小路 貴生、金 承鶴、○千葉 一裕（東京農工大院農）
Takao Shoji, Shokaku Kim, ○Kazuhiro CHIBA (Tokyo Univ. of Agri. and Technol.)

【目的】修飾核酸は医薬や診断薬への利用に留まらず，近年では分子コンピューターやナノツールの主要構造体として応用されるなど，多様な分野で新規機能の開発，展開が研究されている．種々の修飾核酸が報告される中，核酸と機能分子を共役的に結合させたコンジュゲート核酸が大きく注目されている．コンジュゲート核酸合成は，核酸の既存の性質・機能を改善するだけでなく，コンジュゲート分子全体として新規機能を発現させる事も可能であるという点から，重要な核酸修飾戦略となっている．これまでに，蛍光分子やペプチド，タンパク質，脂肪酸，金属複合体等，多様な分子をコンジュゲートさせた核酸が合成され，膜透過性や酵素耐性の改善，蛍光特性，触媒機能の付加が達成されている．一方，コンジュゲート核酸合成法として，樹脂上の核酸をコンジュゲートさせる固相法と，脱保護後の核酸を水溶液中でコンジュゲートさせる液相法が一般的に用いられている．しかし，これらの合成法は，不均一系の低い反応性や脱保護後の核酸と機能分子間の溶解性のギャップにより，コンジュゲート可能な分子が限定されるという課題を持つ．とりわけ，疎水性やカチオン性分子とのコンジュゲートにおいて，分子の凝集により反応効率が著しく低下する事が報告されている．
本研究では，疎水性可溶化担体を用いて保護核酸の均一反応系を構築し，多様な機能や極性を有する機能性分子を液相でコンジュゲートさせる新規合成プロセスを開発した．
【方法】長鎖アルキル基を有する可溶化担体上で，液相反応と生成物の選択的な分離を繰り返す事により，効率的にオリゴ DNA を合成し，さらに種々の機能分子と有機溶媒中でのコンジュゲートを試みた．オリゴ DNA は 5’末端をマレイミドで修飾し，機能分子はチオール基を持つものを用いて，チオールマレイミドマイケル付加によりコンジュゲートさせた．
【結果】条件検討の結果、担体上のオリゴ DNA と種々のチオール誘導体を高効率でコンジュゲートさせる事ができた．本反応ではコレステロールのような疎水性分子からシステインのような親水性分子まで，担体上のオリゴヌクレオチドと一様にコンジュゲート可能である事が明らかとなった．また，ポリプロリンのような疎水性ペプチドとのコンジュゲートも高効率で進行した．本システムはオリゴ DNA を担体で伸長すると共に，均一溶液系で多様な物質と効率よくコンジュゲートさせる事ができるため，従来の合成法と比べ，より多様な機能・極性を有する分子とのコンジュゲート体を高効率で得る事が可能となった．

Conjugated Oligonucleotide, Soluble Support, Solution-Phase Synthesis

講演番号：2A07p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 07 会場

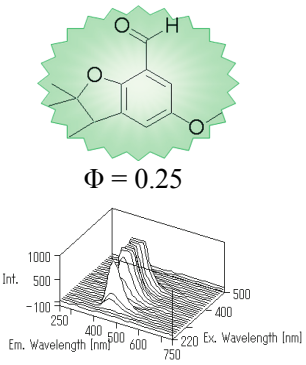
ベンズアルデヒド誘導体の蛍光特性とその生体分子プローブとしての応用

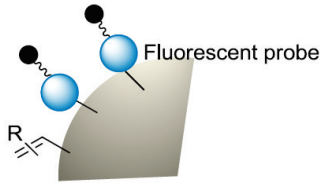
Fluorescent properties of benzaldehyde derivatives and their application as bio-molecular probes

○島田 恒平、岡田 洋平、金 承鶴、北野 克和、千葉 一裕（東京農工大院農）
○Kouhei Shimada, Yohei Okada, Shokaku Kim, Yoshikazu Kitano, Kazuhiro Chiba (Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)

蛍光プローブを用いたイメージングは化合物の高感度かつリアルタイムでの検出を可能とし，様々な分野で利用されている．蛍光分子自体に着目すると，近年ではクマリンやフルオレセインといった比較的低分子でありながら充分な蛍光性を有する化合物が数多く見出され，これらを基軸とした新たな有機センサーの開発が意欲的に行われている．

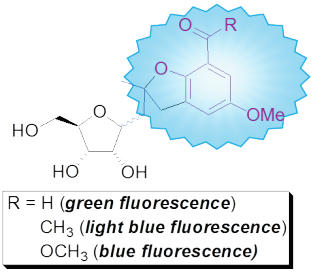
我々はこれまでに，低分子でありながら十分な蛍光特性を有するジヒドロベンゾフラン誘導体の蛍光プローブとしての可能性を探ってきた[Ref]（Fig. 1）．その中で，ジヒドロベンゾフラン誘導体の基本骨格であるベンズアルデヒド誘導体の蛍光特性に着目し，ベンズアルデヒド誘導体の蛍光特性に対する置換基効果について研究を行った．結果，最適な位置に置換基を有する蛍光ベンズアルデヒド誘導体が見出されてきた（Fig. 2）．



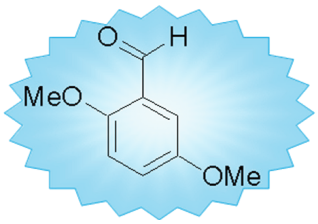


Electrochemically Active Crosslinking Reaction for Fluorescent Labeling of Aliphatic Alkenes

Figure 1



Fluorescent Nucleoside Analogues



2,5-dimethoxy-benzaldehyde

Figure 2

このようにして見出された基本単位である 2,5-dimethoxybenzaldehyde（Fig. 2）は，既存の蛍光分子よりも共役系部分が小さいため，蛍光プローブによる生体内分子動態観察の際にしばしば問題となる DNA 鎖へのインターカレート性の低い蛍光プローブとしての応用が期待される．また非常に安価であり，入手のハードルが低いという点も大きな魅力の一つである．さらに，こうした基本骨格の特性を調べることは，より優れた蛍光プローブ創出の足掛かりになることも期待される．

本発表では，当研究室におけるジヒドロベンゾフラン誘導体の蛍光プローブとしての応用への試みや，2,5-dimethoxybenzaldehyde を生体分子に対する蛍光プローブとして用いた際に見られた結果について報告する．

‣ ***Reference*** S.Kim et.al, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6284-6288

Fluorescent probe, Bio-molecule detection, Benzaldehyde derivatives

講演番号：2A07p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 07 会場

過塩素酸リチウム-ニトロメタン系における電解付加環化反応

Anodic cycloaddition reaction using lithium perchlorate-nitromethane system

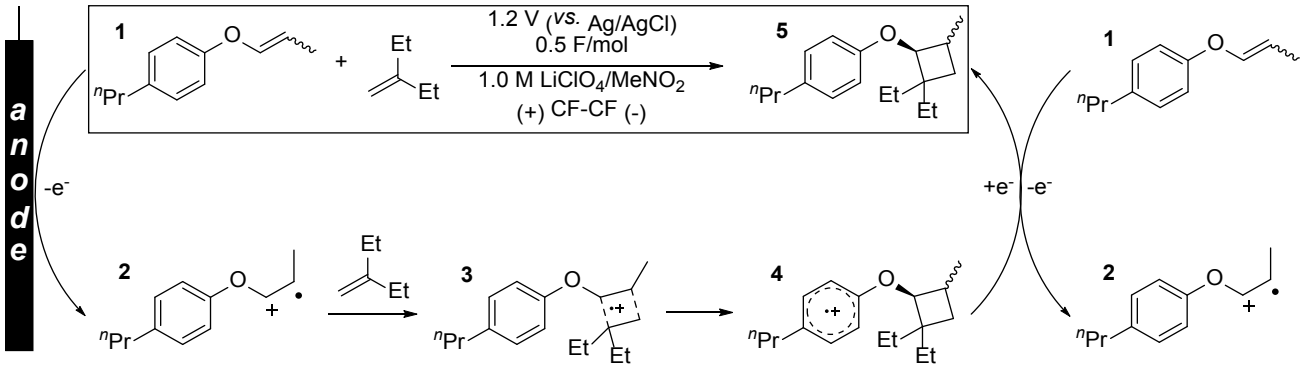
○山口 勇将、岡田 洋平、千葉 一裕（東農工大院農）
○Yusuke YAMAGUCHI, Yohei OKADA, Kazuhiro CHIBA (Tokyo Univ. of Agric. & Technol.)

有機電解反応はグリーンな反応であると同時に炭素骨格形成においても強力な手段である．特に，有機電解反応は天然物に見られるような複雑な炭素環骨格を構築することが可能であり，天然物全合成に応用されるとともにその有用性が示されてきた．

我々の研究室では有機電解反応のメディアとして過塩素酸リチウム–ニトロメタンを用いた反応を開発してきた．過塩素酸リチウム–ニトロメタン溶液は高いルイス酸性を示しカルボカチオンを安定化する特徴を有している．これらの特性をもった溶液中での電解反応により，ユーグロバールやジヒドロベンゾフラン，アザヌクレオシド誘導体など生体関連物質の簡便な合成が可能となった．

また，我々の研究室では過塩素酸リチウム–ニトロメタン系中で非活性化末端オレフィンが求核剤として機能し，電極上で発生したラジカルカチオン種にトラップされ[2 + 2]付加環化物を与えることを見出した．一例として，エノールエーテルと非活性化末端オレフィンによる[2 + 2]付加環化反応を挙げる(Scheme 1)[1].

本発表では過塩素酸リチウム–ニトロメタン系中におけるラジカチオンを経由する付加環化反応について，その電子移動特性や詳細な反応メカニズムなどについて報告する．



Scheme 1

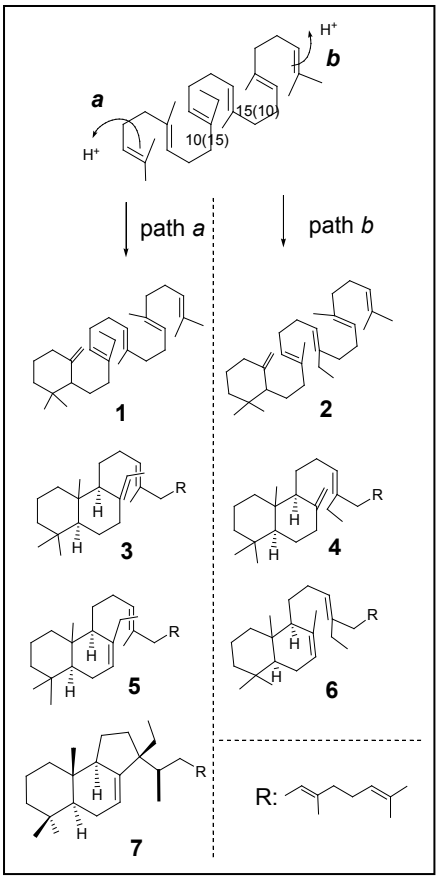
1)(a)Yamaguchi, Y.; Okada, Y.; Chiba, K. *J. Org. Chem.*, **2013**, *78*, 2626–2638.
(b)Okada, Y.; Yamaguchi, Y.; Chiba, K. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 243-246.

cycloaddition, radical cation, anodic oxidation

講演番号：2A07p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 07 会場

スクアレンーホペン環化酵素による 10（15）位がエチル基に置換したスクアレン基質の環化反応
On the polycyclization of 10(15)-ethylated squalene by squalene-hopene cyclase
○佐々木 勇輔[1]、南野 舞[1]、仲野 千秋[2]、星野 力[1,2]（[1]新潟大農、[2]新潟大院自）
○Yusuke SASAKI[1], Mai MINAMINO[1], Chiaki NAKANO[2], Tsutomu HOSHINO[1,2] ([1]Fac. Agri., Niigata Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

[目的]スクアレンーホペン環化酵素（SHC）によるノルスクアレン (NorSQ）との酵素反応について報告してきた[1-4]。今回は、10 位（15 位）の Me 基を Et 基に置換した基質アナログとの酵素反応の検討を行った。得られた知見について報告する。[方法・結果]スクアレンのエポキシ化、過ヨウ素酸処理により得られた C_{17}-アルデヒドを 2-bromobutyrate と $P(Phe)_3$ とでイリドを得て Wittig 反応により増炭させ、DIBAL 還元により C_{21}-OH 体とした。PBr_3 による Br 化後、BuLi/HMPTA によってゲラニルフェニルスルフォンとカップリング反応、$LiBEt_3H$ による脱硫処理により 10(15)-エチルスクアレン{10 (15)-EtSQ}を合成した。10(15)-EtSQ 40mg と SHC を用いて反応させ TLC・GC-MS により複数の酵素産物の生成を確認した。酵素産物を SiO_2 カラムにより精製し、溶出順に Fr. 1 (4.5 mg), Fr. 2 (7.9 mg), Fr. 3 (6.0 mg) と 3 画分に分離した。Fr. 1 と 2 を 5%-, 10%$AgNO_3/SiO_2$ カラムで分離し、HPLC により精製した。Fr. 1 から Product **7**（Fr. 1 全体の 67%）、Fr. 2 から Product 3~6 (**3**:**4**=4:1; **5**:**6**=1:1), Fr.3 から Product **1** と **2**(ca 1:1)を得た。なお、**1** と **2**；**3** と **4** 及び **5** と **6** は分離不可能のため、混合物のまま NMR 解析した。10 位(15 位)の置換基のサイズが基質の正確なフォールディングに大きな影響を及ぼし、環化反応が終結せず途中段階で停止した結果となった。10-EtSQ が 15-EtSQ よりも多く環化されていること (path *a*>*b*)、及び path *a* による Tricycle 体 **7** が多く生成したことにより、10 位置換基の結合サイトは Et 基を許容する空間的余裕をある程度持つが、15 位は空間的余裕がないことが示唆された。我々は 10-NorSQ との酵素反応により本来のフォールディングが崩れ 6/5+5/5+(6)骨格という異常環化産物が生成したと報告した。[1] 即ち、10 位が水素でも Et でも正常な folding が起きない。更に 15-NorSQ が環化に大きな影響を及ぼさないことも明らかにした。[1]即ち、15 位は水素置換では正常だが、Et では正常な folding が起きない。10 位の認識サイトは loosely packed であり、15 位は逆にかなりコンパクトであると考えられる。



1)T. Hoshino, et al., S. *Org. Lett*., **2002**, *4*, 2553-2556, 2) T. Hoshino et al, Chem. Commun.**1999**,731, 3).S. Nakano et al., OBC, **2004**, *2*, 1456. 4) S. Nakano et al. OBC, **2004**, 2, 2012.

Squalene, Hopene, Alicyclobacillus acidocaldarius

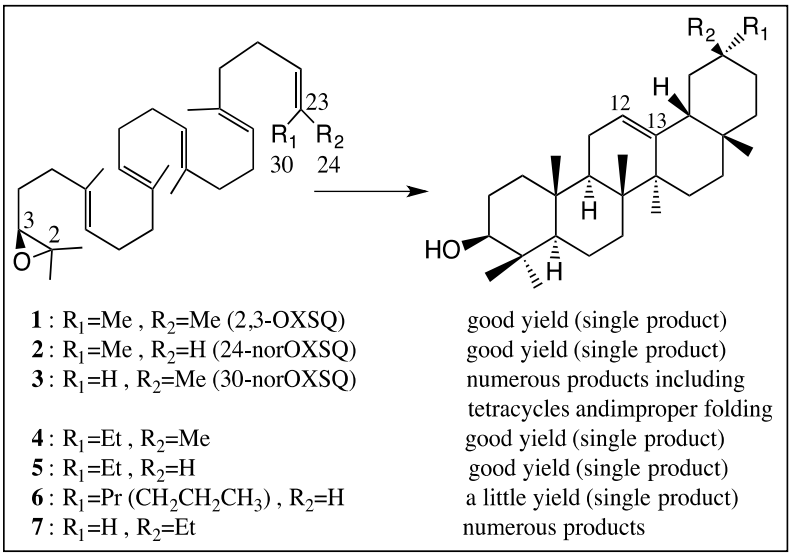
講演番号：2A07p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 07 会場

β－アミリン合成酵素：基質の 23 位に位置するアルキル基のサイズが環化反応に及ぼす影響
β－amyrin synthase：Effect of the steric size at 23-position of the substrate on the polycyclization pathway

○金子 一輝[1]、宮原 悠里[2]、花岡 正樹[2]、仲野 千秋[1,2]、星野 力[1,2]（[1]新潟大農、[2]新潟大院自）
○Ikki KANEKO[1], Yuri MIYAHARA[2], Masaki HANAOKA[2], Chiaki NAKANO[1,2], Tsutomu HOSHINO[1,2] ([1]Fac. agri., Niigata Univ, [2]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

【目的】オキシドスクアレン環化酵素（OSC）は鎖状の 2, 3–オキシドスクアレン **1** を基質として様々な環状トリテルペンを合成する酵素群であり、生物界に広く存在している。OSC の一種である β–アミリン合成酵素（β–AS）は、植物界に広く存在しているが、基質アナログに関する研究例は少ない。今回、23 位に種々の置換基を導入した基質アナログを合成し、β–AS との酵素反応で得た産物を同定して、末端メチル基のサイズの影響を調べた。我々は、既に基質 **2** と **3** の酵素反応を報告した。[1, 2)]

【方法】各種のアルキルブロマイドと $P(Phe)_3$ のイリドと、C27-アルデヒドとの Wittig 反応等によって基質アナログ **4**, **5**, **6** 及び **7** を合成した。酵素産物を GC-MS により確認し、SiO_2 カラムクロマトグラフィーや HPLC を用いて単離、精製を行い、NMR で構造決定した。



1: R_1=Me , R_2=Me (2,3-OXSQ)	good yield (single product)
2: R_1=Me , R_2=H (24-norOXSQ)	good yield (single product)
3: R_1=H , R_2=Me (30-norOXSQ)	numerous products including tetracycles andimproper folding
4: R_1=Et , R_2=Me	good yield (single product)
5: R_1=Et , R_2=H	good yield (single product)
6: R_1=Pr ($CH_2CH_2CH_3$) , R_2=H	a little yield (single product)
7: R_1=H , R_2=Et	numerous products

【結果と考察】 **4** と **5** から得られたメインプロダクトは、6/6/6/6/6-環系の 5 環性であり、β-アミリンと同一の骨格であった。これらの基質アナログは本来の基質 **1** と同じ *chair-chair-chair-boat-boat* folding で折りたたまれたことを示している。従って Z–配置を嵩高い Et 基に変換しても環化に大きな影響は及ぼさなかったと言える。しかしプロピル基を導入 **6** すると環化反応が大きく低下し、β–アミリン骨格はわずかしか生成しなかった。我々の **2**, **3** を用いた実験から、E-Me の欠損が環化に大きな影響を及ぼさないこと、また、 Z-Me がないと正常な環化が行われない、つまり酵素が厳密に Z-Me 基を認識しているということを報告してきた[1,2)]。**7** からは酵素産物を計 10 個確認し、やはり Z-Me 基の欠損によって正常な環化が行われないという結果が得られた。今回の研究により、β–AS は基質末端の Z-Me 基の欠損によって環化が正常に行われなくなる一方で、反応性が低くなるもののプロピル基まで許容して正常に環化させるという新しい知見が得られた。

１）宮原ら、農化要旨 2013、2C25a14：2)星野ら、天然有機化合物討論会 2013, p175-180.

substrate analog, 2,3-oxidosqualene, ß-amyrin

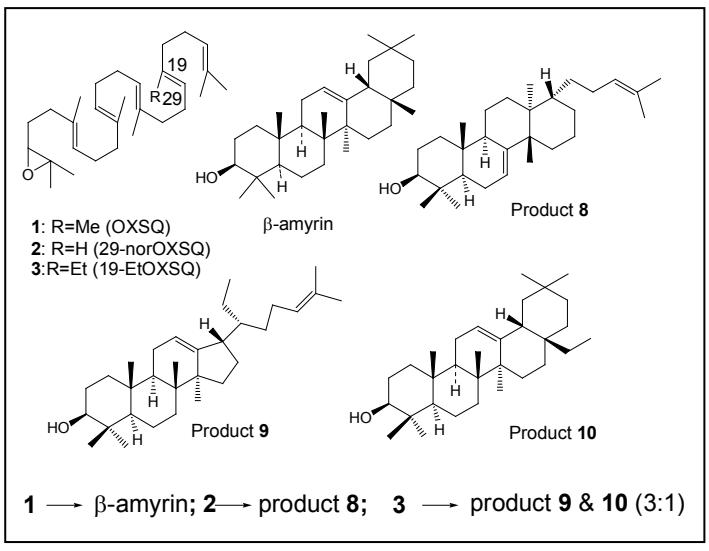
講演番号：2A07p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 07 会場

β-アミリン合成酵素：基質の 19 位に位置するアルキル基のサイズが環化反応に及ぼす影響
β-amyrin synthase: Effect of the steric size at 19-position of the substrate on the polycyclization pathway

○高橋 一成[1]、山口 雄生[1]、千葉 彬史[1]、阿部 奈緒美[1]、星野 力[1,2] ([1]新潟大院自、[2]新潟大農)
○Kazunari TAKAHASHI[1], Yuuki YAMAGUCHI[1], Akihumi CHIBA[1], Naomi ABE[1], Tsutomo HOSHINO[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agri., Niigata Univ.)

【目的】直鎖状分子 (3*S*)-2,3-oxidosqualene (OXSQ,**1**)を様々なトリテルペンへと環化する酵素群を oxidosqualene cyclase (OSC)といい、β-amyrin 合成酵素(βAS) については、触媒機構や基質認識について他の OSC に比べて進展してない。我々は、以前 27-norOXSQ や 28-norOXSQ を用いて、Me-27 や Me-28 の役割を報告した。[1、2)] 今回は、29-norOXSQ (**2**)や 19 位を Et に置換した 19-Et OXSQ(**3**) を合成して、βAS との反応で得られる産物を同定することにより Me-29 の役割を検討した。

【方法・結果】スクアレンを過酸でエポキシ化し、過ヨウ素酸処理をすることで、C_{22} アルデヒドを得た。ジエチルホスホノ酢酸エチルを用いた 2 個の増炭反応、DIBAL 還元、NBS によるブロモヒドリン化、PBr_3 によってブロマイド(**5**)を得た。3-methyl-2-butene-1-ol をブロム化後、フェニルスルホン体(**6**)を得た。また、同じく C_{22} アルデヒドと ethyl-2-bromobutanoate と$(C_6H_5)_3P$ とで得たイリドとでウィッティヒ反応、DIBAL 還元、ブロモヒドリン化、PBr_3 によってブロマイド(**7**)を合成した。t-BuOK で **5** と **6** 及び **6** と **7** をそれぞれカップリングし、$LiBEt_3H$ で脱フェニルスルホン化し、**2** と **3** を合成した。これらをβAS と酵素反応させ、得られたプロダクトを GC-MS、NMR を用いて同定した。基質 **2** から、**8**（71%)と微量のプロダクト（それぞれ約 8%）が複数個確認された。また、基質 **3** からは **9** と **10**（**9**:**10**= 3:1）が生成した。どちらの基質からも 4 環性で環化反応が停止した。E 環は、末端二重結合が空間的に近いD環の二級カチオンを攻撃することで形成されるが、19 位の立体サイズが変化したことで酵素が基質の末端二重結合を含む側鎖を正確にフォールディングできなくなったと考えられる。また、基質 **3** からはβ-amyrin 骨格を持つ product **10** が少量生成されていることから、29-Et 基の大きさをある程度許容できる空間的大きさがあるが、19 位置換基の大きさを正確に認識することで、正常なフォールデイングが獲得され、最終的な 5 環性のβ-amyrin 骨格へと導かれることを示唆している。



1）山口ら、農化、2011、p29.
2）星野ら、天然有機化合物討論会 2013、p175-180

β-amyrin, oxidosqualene, triterpene cyclase

講演番号：2A07p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 07 会場

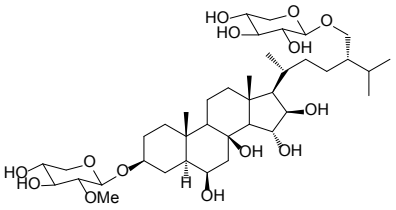
神経成長因子増強活性を持つステロイド配糖体の合成研究

Synthetic research on steroid glycosides showing nerve growth factor enhancing effect

○谷田 貴弘、原田 翔太、小鹿 一 (名大院生命農)
○Takahiro TANIDA, Shouta HARADA, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

【目的】

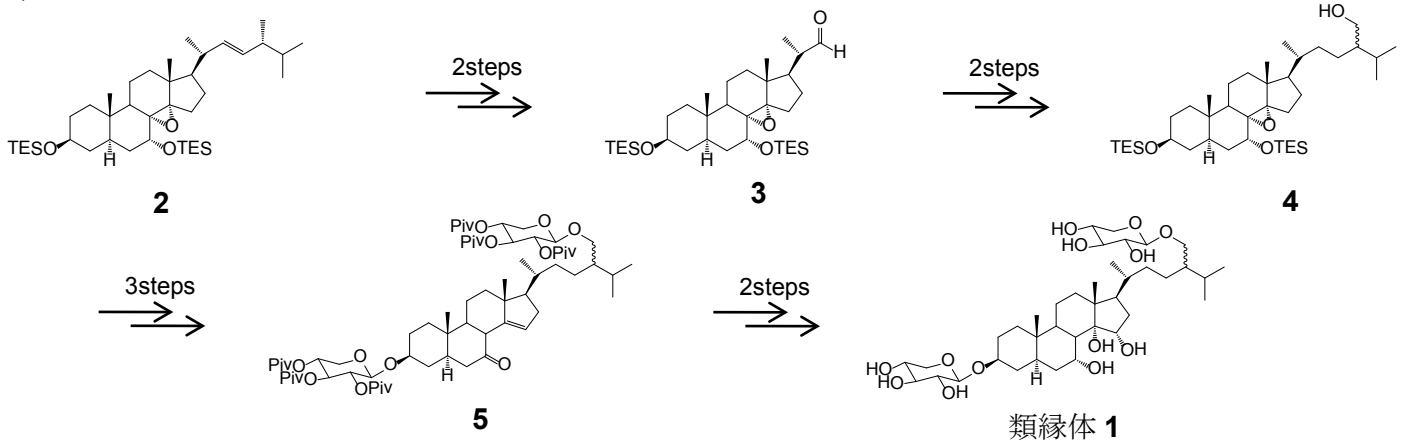
Acanthasteroside B3 は沖縄産オニヒトデから単離された化合物で, 神経細胞モデル PC12 細胞に対して神経成長因子 (NGF)増強活性を, 加齢マウスに対して記憶改善効果を示す. よって神経変性疾患治療薬のリードとして期待されるが, オニヒトデは有毒なトゲを持ち抽出作業に危険を伴うこと, また多数の類縁体を持ち, 精製が困難であることから大量供給することは難しい. そこで acanthasterodside B3 のような生理活性をもち, かつ構造を単純化したステロイド配糖体を有機合成で供給することを目的として研究を進めてきた. 今回は水溶性の向上を目指し設計された類縁体 **1** を合成し, NGF 増強活性を評価することを目的とする.



acanthasteroside B3

【方法・結果】

Ergosterol から合成されるシリルエーテル **2** を出発物質として, まず側鎖への水酸基導入を行うことにした. そこでまず, C-C 結合の切断を行い, アルデヒド **3** とし,水酸基をもつ側鎖を導入することでアルコール **4** を得た. 次にエポキシドの開環条件を検討した. まずプロトン酸を用いてエポキシドの開環を試みたが, 目的物は得られなかった. そこで酸をルイス酸に変更して開環条件を探すことにし, 結果として BF_3-Et_2O を用いるとエポキシドを開環できることが判明した. 次にその条件に従い, BF_3-Et_2O を用いて, エポキシドの開環を行いエノンに導いた後, グリコシル化を行うことでジグリコシド **5** とし, OsO_4 によるジオール化および DIBAL による還元・脱保護を行い, 類縁体 **1** の合成に成功した. 極微量の NGF 共存下, PC12 細胞に **1** を投与すると, 細胞は神経突起を伸長させたことから, 類縁体 **1** には acanthasteroside B3 と同様に NGF 増強活性があることが示された.



Acanthaster planci, steroid, nerve growth factor

講演番号：2A07p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 07 会場

gem-ジブロモメチレンからケトンへの新規変換条件

Novel condition of transformation of *gem*-dibromomethylene into ketone

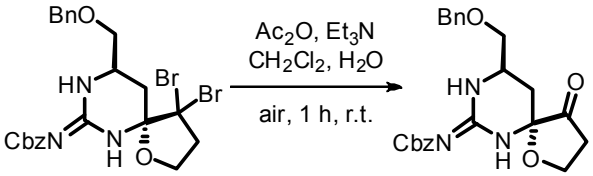
○木村 梨乃、澤山 裕介、西川 俊夫 (名大院農生命農)
○Rino KIMURA, Yusuke SAWAYAMA, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

【目的】

当研究室では、貝毒サキシトキシンの合成研究で、*gem*-ジブロモメチレンを含む中間体がアセチル化条件下(Ac_2O, Et_3N in CH_2Cl_2)において、エノールアセテートへ変換する新規反応を発見し、それを活用して、天然物デカルバモイルサキシトキシノールの全合成に利用した[1]。本研究では、この新反応の反応機構を明らかにすること、また変換率の向上を目的とした。

【結果】

より単純な基質 1 を上記の反応条件下で反応させたところ、エノールアセテートではなくケトンへ変換された。同基質で反応条件を詳細に検討した結果、さらに H_2O と O_2 が必要であることを見出した。また、この反応にはラジカル種が介在することも明らかにした。基質一般性についても発表する。



1 60%

(1) Y. Sawayama, T. Nishikawa. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7176.

gem-dibromomethylene, ketone, acetylation

講演番号：2A07p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 07 会場

MTM エーテルの新しい脱保護法の開発

A new deprotection method of MTM ether

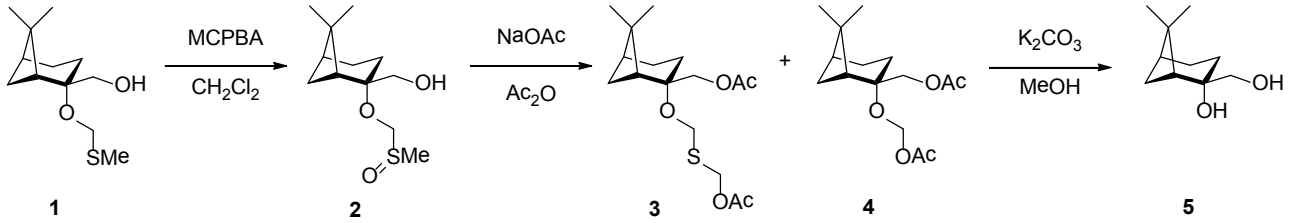
○橋本 穂果、今津 拓也、榊原 良、安立 昌篤、西川 俊夫 (名大院生命農)
○ Honoka HASHIMOTO, Takuya IMAZU, Ryo SAKAKIBARA, Masaatsu ADACHI, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

【目的】

当研究室では、ごく最近、矢毒カエル毒チリキトキシンの全合成を達成した[1]。この全合成研究で、水酸基の保護基として導入されたメチルチオメチル(MTM)基の脱保護は困難であったが、Pummerer 反応を利用した新しい脱保護法を開発することで脱保護に成功した。本研究では、この条件の官能基寛容性を確かめることを目的としている。

【方法と結果】

単純なモデル化合物として MTM エーテル **1** を選び、MCPBA によってスルホキシド **2** に酸化し、Pummerer 反応の条件で反応させた。生成物はチオアセタール **3** とアセトキシアセタール **4** の混合物であったが、両者をそのまま塩基性条件下で加水分解すると、ジオール **5** が得られた。様々な官能基を含む MTM エーテルを用いて検討した結果を報告する。



1) 安立昌篤、今津拓也、榊原　良、佐竹佳樹、磯部　稔、西川俊夫　第 55 回天然有機化合物討論会講演要旨集、p271.　2013 年

methylthiomethyl ether, Pummerer rearrangement, deprotection

講演番号：2A07p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 07 会場

サキシトキシン骨格の新規構築法の開発

A new synthetic route to the saxitoxin skeleton

○上野 壮平、中崎 敦夫、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Sohei UENO, Atsuo NAKAZAKI, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

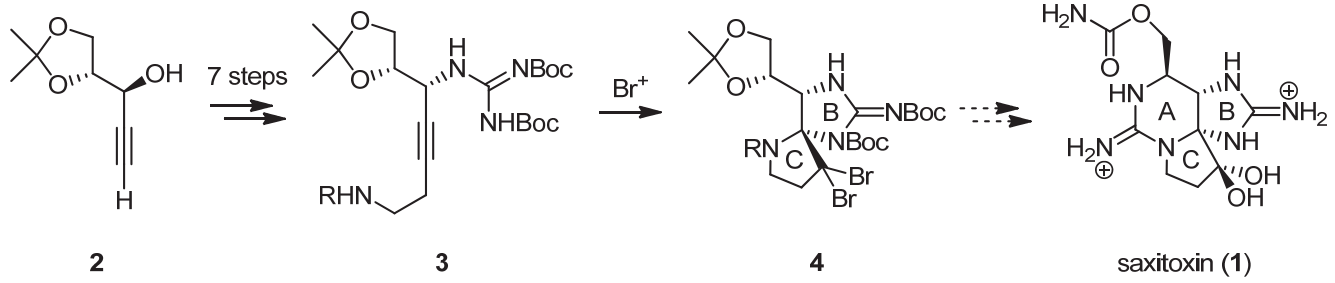
【目的】

麻痺性貝毒サキシトキシン**(1)**は、複雑な三環性骨格を有している環状グアニジンアルカロイドであり、多くの類縁体の単離も報告されている。また、**1** は電位依存性 Na^+チャネルに対して強力な阻害活性を示し、Na^+チャネルの機能解明のツールとして利用されている。我々は、サキシトキシン類の特異な構造と生理活性に興味を持ち、化学合成法の確立を目指して研究を開始した。

【方法・結果】

複雑な構造を持つサキシトキシン類の化学合成には、その特異な三環性骨格の効率的構築法の開発が必要不可欠である。そこで我々は、研究室で独自に開発したグアニジノアセチレンのカスケード型ブロモ環化反応を応用することで、その効率的合成が可能になると考えた。

既知のアセチレン **2** から 7 工程で合成した環化前駆体 **3** に対してカスケード型ブロモ環化反応を行ったところ、サキシトキシン骨格の BC 環に相当するスピロアミナール **4** を立体選択的に合成することに成功した。さらに、スピロアミナールから A 環の合成を検討したので報告する。



2 **3** **4** saxitoxin (**1**)

Natural product synthesis, sodium ion channel, saxitoxin

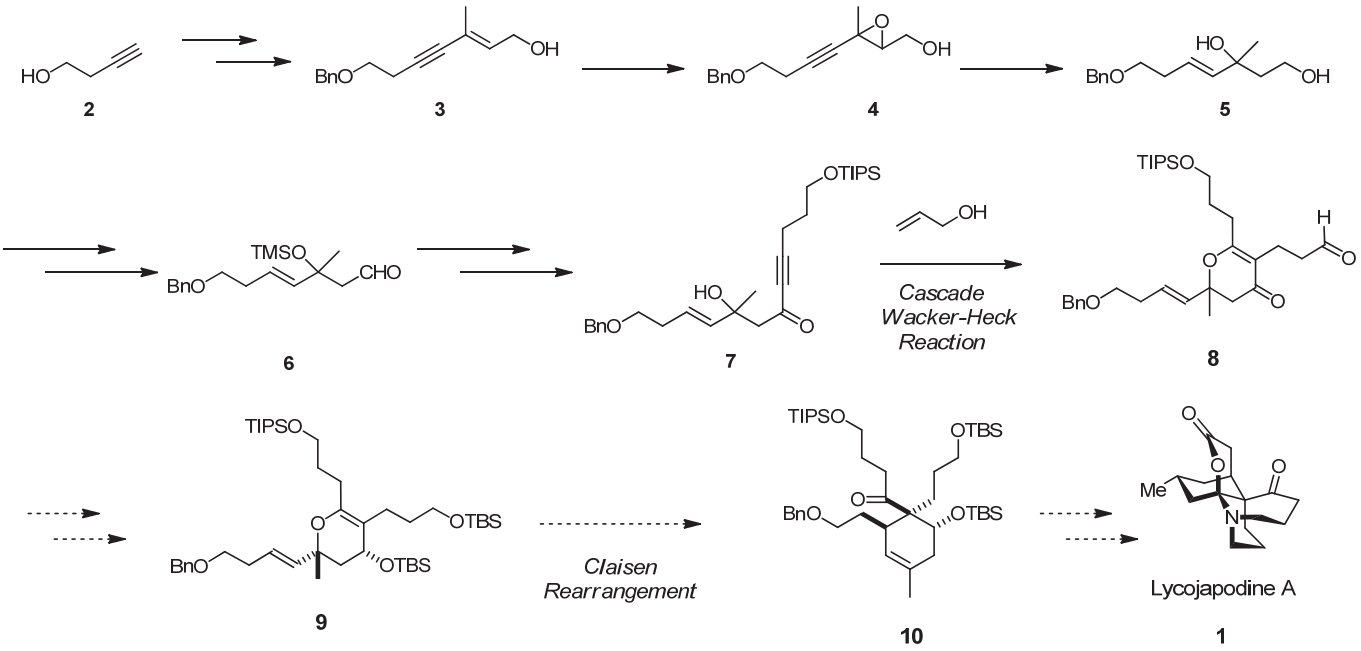
講演番号：2A07p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ A 校舎 07 会場

Synthetic Study on Lycojapodine A

○Wenyu Huang, Atsuo Nakazaki, Toshio Nishikawa (Nagoya Univ)

Lycojapodine A (**1**), a novel *Lycopodium* alkaloid with unprecedented 6/6/6/7 tetracyclic ring system, was isolated from the club moss *Lycopodium japonicum* by Zhao and co-workers in early 2009. [1] Lycojapodine A (**1**) inhibited activity on acetylcholinestrease and anti-HIV-1 activity. Due to the unique structure as well as its biological importance, we embarked on the synthesis of **1**.

In order to construct two contiguous stereogenic centers involving a quaternary carbon in **1** in a stereocontrolled manner, we decided to employ Claisen rearrangement of **9**, and its synthesis is shown in Scheme 1. Commercially available alcohol **2** was converted into compound **8** in several steps including the cascade Wacker-Heck reaction. Now we are concentrating on the synthesis of compound **9** which is the precursor of Claisen rearrangement.



Scheme 1. Synthesis of Precursor of Claisen Rearrangement.

Reference

1. Zhao, Q.-S. *et al. Org. Lett.* **2009**, *11*, 1397.

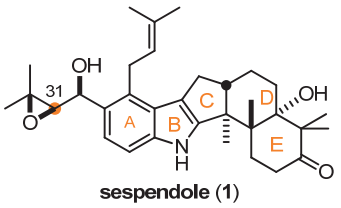
Natural Product Synthesis, Cascade Wacker-Heck Reaction, Claisen Rearrangement

講演番号：2A07p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ A 校舎 07 会場

インドールアルカロイド　セスペンドールの合成研究

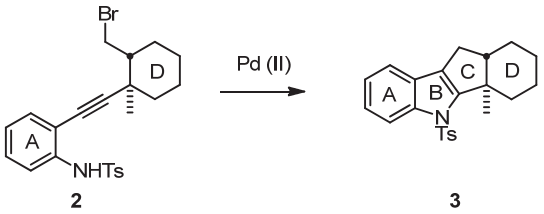
Synthetic studies on sespendole

○樋口 恵子、杉野 公美、中崎 敦夫、安立 昌篤、西川 俊夫（名大院生命農）
○Keiko HIGUCHI, Kumi SUGINO, Atsuo NAKAZAKI, Masaatsu ADACHI, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)



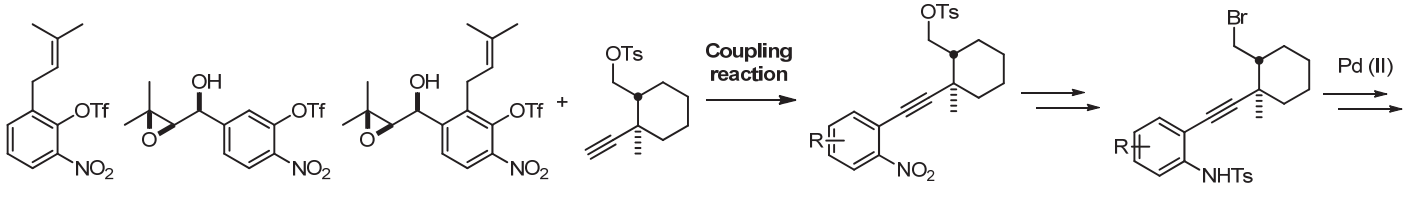
【背景と目的】セスペンドール(**1**)は、動脈硬化抑制作用を示すテルペンインドールアルカロイドである。[1),2)] 我々は既に、この化合物のテルペンセグメントおよび芳香族セグメントの立体選択的合成を報告し[3),4)]、分光学的手法を用いて決定することができないと報告されていたC-31位の立体配置を、合成化学的手法によって決定した。今回は、両セグメントの連結方法、およびBC環を一挙に構築する連続環化反応を開発したので報告する。

【方法と結果】まず、*o*-ヨードアニリンとアセチレン**7**のカップリング反応によってアルキン**2**を合成し、連続環化反応を検討した。2価パラジウム触媒を用いると、極めて温和な条件で望む連続環化反応が進行し、四環性生成物**3**を得た。次に、この連続環化反応の芳香環部分の基質一般性について検討した。



2 **3**

3つの芳香環セグメント、イソプレニル基**4**、エポキシアルコール**5**、セスペンドールと同じ側鎖**6**をアセチレン**7**とクロスカップリング反応で連結後、連続環化反応の前駆体を合成した。これらの前駆体は上記反応条件下、連続環化反応が進行し、芳香族部分が修飾された環化生成物を得た。



4 **5** **6** **7**

References
(1) Tomoda, H. *et al*. *J. Antibiot.* **2004**, *45*, 9. (2) Tomoda, H. *et al*. *J. Antibiot.* **2006**, *59*, 93. (3) Sugino, K.; Nakazaki, A.; Isobe, M.; Nishikawa, T. *Synlett* **2011**, 647. (4) Adachi, M.; Higuchi, K.; Thasana, N.; Yamada, H.; Nishikawa, T. *Org. Lett*. **2012**, *14*, 114.

sespendole, palladium, cascade reaction

講演番号：2A07p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ A 校舎 07 会場

Phenacyl 基を Cys 残基保護基に用いた糖タンパク質 Evasin-1 の化学合成
Chemical synthesis of glycoprotein, Evasin-1, using phenacyl group as a Cys protecting group
○木我 崇廉[1]、片山 秀和[2]、北條 裕信[3]、中田 宗宏[2]([1]東海大院工・工業化学、[2]東海大工・生命化学、[3]阪大・蛋白研)
○Takayuki Kiga[1], Hidekazu Katayama[2], Hojo Hironobu[3], Munehiro Nakata[2] ([1]Grad. Sch. Tokai Univ., [2]Tokai Univ., [3]Osaka Univ.)

【背景・目的】
固相合成法によるペプチド合成は、通常、鎖長が 40～50 アミノ酸残基までのペプチドに限られており、それよりも長鎖のペプチドの合成は、固相合成によって調製したペプチドセグメントを液相で縮合することによって達成される。ペプチドセグメント縮合法の一つであるチオエステル法は、C 末端にチオエステル基を有するペプチドと、もう一方のペプチドの N 末端アミノ基とを選択的に縮合する方法である。この方法では、位置選択的な縮合のために、Lys および Cys 残基側鎖に保護基が必要であり、従来より、Boc 基および Acm 基がその目的で使用されてきた。我々は、Lys 側鎖保護基としてアジド（N_3）基が有用であることを明らかにし、その方法を種々のペプチドや糖タンパク質の化学合成に応用してきた。一方、N_3 基の脱保護条件が Cys 側鎖の Acm 基と異なることから、縮合反応後に複数段階の脱保護反応が必要であるという問題点が残されていた。最近になって我々は、N_3 基の脱保護条件である亜鉛／酢酸による還元反応によって脱保護可能な Cys 残基側鎖保護基として phenacyl (Pac)基を見出し、いくつかのペプチドの合成に利用することによってその有用性を示してきた[1]。本研究では、Pac 基の糖タンパク質合成への有用性を示すことを目的として、クリイロコイタマダニ（*Rhipicephalus sanguineus*）の唾液由来糖タンパク質 Evasin-1 をモデル配列として合成することにした。
【方法・結果】
Evasin-1 は、5 個の Lys と 8 個の Cys を含む 94 アミノ酸残基からなるタンパク質であり、19、34、および 42 残基目の Asn に N 結合型糖鎖が付加していると考えられている。この配列をいくつかのセグメントに分割して、それぞれを常法による Fmoc 固相合成法によって合成し、チオエステル法によって縮合することにした。その際、Lys 部位には側鎖を N_3 基で保護した誘導体を、Cys 部位には Pac 基で保護した誘導体を、糖鎖付加部位の Asn には GlcNAc が結合した Asn 誘導体をそれぞれ用いることにした。セグメント縮合反応の重要な鍵中間体であるペプチドチオエステルの合成には、N-アルキルシステイン法を利用することとした。本発表では、3 カ所の N-結合型糖鎖付加部位に GlcNAc を結合した Evasin-1 の全合成について、その詳細を報告する。

[1] Katayama, H. and Hojo, H. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 4405-4413.

Evasin-1, Thioester method, Phenacyl group

講演番号：2A07p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ A 校舎 07 会場

糖を付加したクルマエビのインスリン様造雄腺因子の化学合成

Synthetic study on glycosylated insulin-like androgenic gland factor from the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*

○片山 秀和[1]、窪田 のぞみ[1]、大平 剛[2]、北條 裕信[3]([1]東海大工・生命化学、[2]神奈川大理・生物科学、[3]阪大・蛋白研)
○Hidekazu KATAYAMA[1], Nozomi KUBOTA[1], Tsuyoshi OHIRA[2], Hironobu HOJO[3] ([1]Tokai Univ., [2]Kanagawa Univ., [3]Osaka Univ.)

【目的】甲殻類の性は、オス特有の性ホルモンである造雄腺ホルモン（AGH）によって決定される。すなわち、生体内で AGH が機能すればオスに、AGH が存在しなければメスとなる。これまでに、オカダンゴムシ *Armadillidium vulgare* において AGH の構造が解析されており、インスリン様ヘテロ二量体糖ペプチドであることが明らかにされている。一方、クルマエビ *Marsupenaeus japonicus* の AGH の構造は明らかになっていない。最近になって、クルマエビの造雄腺で特異的に発現するインスリン様造雄腺因子（IAG）の遺伝子がクローニングされた。クルマエビ IAG は、オカダンゴムシ AGH と同様にインスリン様ヘテロ二量体の構造的特徴を有し、B 鎖内に 1 カ所の N-結合型糖鎖付加モチーフが存在することから、AGH と同様にインスリン様糖ペプチドであることが予想されている。IAG はクルマエビ AGH の候補分子と考えられているが、その直接的な証拠は未だ得られていない。IAG は生体内にごく微量しか存在しないことから、天然物を精製して機能解析に用いることは困難である。そこで、IAG の機能解析を目的として、IAG の化学合成を行うことにした。
【方法・結果】オカダンゴムシ AGH と他のインスリンファミリーのペプチドとでは、ジスルフィド結合架橋様式が異なることから、天然 IAG のジスルフィド結合架橋様式を推定することは困難である。そのため、双方のジスルフィド異性体を化学合成することとした。昨年度の本大会において、糖鎖を持たない IAG の化学合成について報告した。本発表では、B 鎖の N-結合型糖鎖付加モチーフ部位に GlcNAc を付加した IAG の両ジスルフィド異性体の合成について報告する。常法による Fmoc 固相合成法によって、IAG-A 鎖および IAG-B 鎖の合成を行った。その際、A 鎖に含まれる 4 つの Cys 残基側鎖保護基を使い分けることによって、両異性体の合成が可能となる部分的に保護された 2 種類の A 鎖を得た。これらを用いて、位置選択的に A 鎖内および A 鎖-B 鎖間のジスルフィド結合を順次架橋していくことによって、2 種類の IAG 異性体を得た。今後、これらの合成 IAG の生物活性について検討を行っていく予定である。

glycopeptide, insulin-like androgenic gland factor, *Marsupenaeus japonicus*

講演番号：2A08p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ A 校舎 08 会場

ブタノール生産性 Clostiridium 属細菌における至適発酵温度の改変

Improvement of optimum fermentation temperature in butanol producing Clostridia

○清 啓自、川嶋 草平、門倉 利守、中里 厚実、中山 俊一 (東農大院農)
○Keiji Kiyoshi, Sohei Kawashima, Toshimori Kadokura, Atsumi Nakazato, Shunichi Nakayama (Tokyo Univ. Agric.)

【背景】

我々はこれまでに高温性セルロース分解菌 *Clostridium thermocellum* NBRC103400 および中温性ブタノール生産菌 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4(以下 N1-4) の混合培養によるセルロースからのブタノール生産系の構築に成功した。しかし、高温性セルロース分解菌由来のセルラーゼ活性の至適温度は高温であるのに対し、本培養系は培養の大半を 30℃で行うためセルロース分解速度の遅さがブタノール生産性の低下要因の 1 つとなっている。一方で、N1-4 のブタノール生産量は培養温度上昇に伴い低下し、30℃ではグルコース 40 g/L から 10 g/L のブタノールを生産するのに対して 37℃では 3 g/L となる。混合培養においても 30℃で 5 g/L のブタノールを生産するのに対し、37℃では 2 g/L にブタノール生産量は減少する。そのため、混合培養系のブタノール生産性向上には、より高温でも N1-4 が高ブタノール生産を行う必要がある。そこで、本研究では N1-4 の温度上昇によるブタノール生産性低下の要因を解明し、混合培養系の培養温度上昇によるブタノール生産性向上を目的とした。

【方法・結果】

30℃および 37℃で 24 時間培養した N1-4 を、Propidium iodide を用いて死滅菌体率を確認したところ、30℃では 30%だったのに対して、37℃では 80%と多くが死滅していることが明らかとなった。そこで細胞の死滅が早期化する原因を明らかにするため、30℃および 37℃にて培養した N1-4 をメタボローム解析に供した。その結果、37℃では 30℃と比較して、解糖系上流の Dihydroxyacetone phosphate および Fructose-1,6-bisphosphate は培養時間の進行につれて蓄積してくのに対して、Glyceraldehyde-3-phosphate は常に検出されず、その下流の中間代謝物量も総じて減少する傾向にあった。また、代謝停滞の影響によりヌクレオチドや核酸、アミノ酸、ピリジンヌクレオチドなど菌体の生育や増殖の必須物質も減少していた。そこで、直接的に生育・増殖必須物質を補強するため、TYA 培地に核酸 100 mg/L を添加して 37℃で培養した結果、菌体量は培養 24 時間で添加無しでは OD_{600nm}=3.8 に対して核酸添加では OD_{600nm}=8.5 に上昇した。また、培養 48 時間でのブタノール生産量においても添加無しで 3.5 g/L であったのに対して、核酸添加により 7.8 g/L に上昇した。以上のことより、生育に必須の代謝物量を増強することで高温でも高ブタノール生産が可能であることが明らかとなった。

butanol, fermentation temperature, clostridium

講演番号：2A08p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ A 校舎 08 会場

デンプン発酵性好熱乳酸生産細菌の分離と乳酸生産の最適化

Isolation of thermophilic lactic acid producing bacteria from starch and optimization of direct lactic acid fermentation

○田代 幸寛[1]、ポウデル プラモド[1]、石橋 侑子[1]、宮本 浩邦[2]、酒井 謙二[1] ([1]九大院・生資環、[2]日環科学)
○Yukihiro TASHIRO[1], Pramod Poudel[1], Yuko Ishibashi[1], Hirokuni Miyamoto[2], Kenji Sakai[1] ([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]Japan Eco-science)

【背景・目的】

現在、光学活性乳酸（OPLA）は循環型プラスチックであるポリ乳酸の材料として注目を集めており、ラセミ体を生じる化学合成法よりも OPLA 生産微生物を用いる乳酸発酵法がその製造方法として優れている。一方、デンプンは一部食料と競合するものの、食品系廃棄物や非食用作物等のバイオマスに豊富に存在する乳酸発酵原料として利用可能である。これまでに、糖化処理を行わない、いわゆる直接発酵によりデンプン原料とした OPLA 生産の研究は乳酸菌や糸状菌で少ないながらも実施されているが、ほとんどの発酵温度は約 40°C 以下の中温である。これまでに、デンプンを原料とした直接高温 OPLA 発酵に関する報告はほとんどなく、高発酵速度、雑菌汚染の防止、冷却水コストの削減などの優れたメリットが期待できる。そこで本研究では、デンプン発酵性高温 OPLA 生産微生物の分離を試み、性状解析および発酵条件の検討を行った。

【方法・結果】

Marine-Animal-Resources (MAR) コンポスト (1) より、高温デンプン発酵性 MAR-7 株を分離した。性状解析を行った結果、MAR-7 株は最大増殖温度 62°C を示す好熱細菌であり、グラム陽性、胞子形成、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性桿菌であり、16S rRNA 遺伝子解析により *Bacillus* 属細菌と高い相同性を示した。また、MAR-07 株はグルコースやデンプン以外の六炭糖類（ガラクトース、セロビオースなど）を資化した。さらに、乳酸菌の使用培地と比較して、窒素源濃度が極めて小さい Mineral Salt 培地を使用可能であり、高光学純度で乳酸を生産できることが明らかとなった。

次に、可溶性デンプンを原料として間欠型 pH 制御による直接回分発酵で pH を検討した結果、最適 pH は中性付近であった。さらに、MAR-7 株と高い相同性を示す基準株と同発酵条件で比較した結果、乳酸生産濃度、乳酸収率、乳酸生産性、乳酸選択性のいずれにおいても MAR-7 株は優れた発酵特性を示した。今後、さらなる発酵条件の最適化を試みる予定である。

【参考文献】

(1) Niisawa et al, J Gen Appl Microbiol, 54, 149-158, 2008.

Optically pure lactic acid, Thermophilic bacteria, Direct starch fermentation

講演番号：2A08p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 08 会場

トリメチルアミン分解能を持つ乳酸菌のスクリーニング

Screening of Lactic Acid Bacteria Decomposing Trimethylamine

○廣瀬 弥生[1]、金内 誠[1]、畑中 咲子[1]、下山田 真[1]、小泉 武夫[2]([1]宮城大学、[2]発酵文化推進機構)
○YAYOI HIROSE[1], MKOTO KANAUCHI[1], SAKIKO HATANAKA[1], MAKOTO SHIMOYAMADA[1], TAKEO KOIZUMI[2] ([1]Miyagi Univ, [2]Ferment. Cult. Org.)

【目的】日本人一人あたりの魚介摂取量は年々減少しており、平成 21 年には畜肉類の摂取量に逆転された。この要因として、10 代から 20 代の若年層を中心とした「魚離れ」が考えられる。これは調理に手間がかかることと、特有の臭いが若年層から敬遠されるためと考えられる。ところで、この臭いの主成分は、トリメチルアミン(TMA)で、魚肉中に新鮮なものでも 1～3mg/100g 含有するといわれている。これまで安全性の高い微生物によって、TMA を分解し、魚臭を減少させた水産加工技術は検討されてきた。そこでは、乳酸菌の生産するバクテリオシンを利用することにより TMA の生成を抑制した魚醤油の製造が報告されている。また、塩干物の一種「くさや」からは TMA が検出されていないことも報告されている。これに注目し、くさや汁に生育する微生物から TMA 消去微生物を分離した報告もある。この中で、糸状菌の *Penicilliumu* 属が TMA を窒素源として分解することを報告しており、食品中で安全に利用されている乳酸菌類の報告はまだない。

そこで、本研究では、広く食品に用いられている乳酸菌により TMA を低減・資化性能を持つものをスクリーニングし、その性質を明らかにした。

【方法】食品や穀物等から分離した研究室保有乳酸菌株 178 株を供試菌株とし、GYP 培地(1.0% glucose、0.5% peptone、0.5% yeast extract)に 10mM TMA を添加し、30℃で、5 日間の培養を行った。この培養物の TMA の残存率を、トルエン・ピクリン酸を用いたピクレート法で測定し、残存率を算出した。対照は乳酸菌未接種の培地とした。さらにスクリーニング通過した株の TMA の分解の最適条件を検討するために、培養時間（0～5 日間)、培地条件（N 源；ペプトン量 0～1.0%)、温度（4～45℃）を検討した。最終選抜株の菌学的性質を明らかにし、定法に従い同定試験も行った。

【結果】研究室保有菌株178株を供試菌株とし、スクリーニングを行った結果、TMA 分解率20%以上は20株以上で、その中で50％以上を示した株は3株であった。そこで、TMA を50％以上分解する3株をスクリーニング通過株として、最適条件を検討した。その結果、3株とも37℃が最適培養条件であり、N 源としての Peptone 量が0.1%において分解能が高かった。また、これらの条件下で一番高い分解能を示したものは、H78株であった。この H78株は、GYP 培地(1.0% glucose、0．1％ peptone、0.5% yeast extract)で、10mM TMA を37℃、5日間培養において約90％分解することが明らかとなった。この乳酸菌の同定試験の結果、*Lactobacillus* 属であった。

trimethylamine, lactic acid bacteria, fishy odor

講演番号：2A08p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 08 会場

米麹から単離した植物由来乳酸菌とその機能性・乳発酵適性

Characterization of lactic acid bacteria isolated from rice-koji

岩崎 修一[2]、○横井 健二[1]、山川 崇[2]、浅井 恵[2]、木元 広実[3]、鈴木 チセ[3]([1]富山農総技セ食品研、[2]ホワイト食品(株)、[3]農研機構・畜草研)
Shu-ichi Iwasaki[2], ○Ken-ji Yokoi[1], Takashi Yamakawa[2], Megumi Asai[2], Hiromi Kimoto[3], Chise Suzuki[3] ([1]Toyama pref. Food Res. Inst., [2]White Food Industry Co. Ltd., [3]NILGS)

【背景及び目的】
植物由来乳酸菌が注目され、これを用いた乳酸菌飲料・発酵乳などが既に上市され好評を博している。しかし、植物由来乳酸菌は、乳製品の発酵に従来より使われてきた乳酸菌に比べ研究の歴史は浅く、新たな研究開発の余地は残されていると考えられる。そのため我々は、新たな菌、新たな機能を見出すために菌のスクリーニング、及びその性質の検討を重ねているが、今回有用性が期待される乳酸菌を見出したので報告する。
【方法及び結果】
米麹（４点）から、GYP 白亜寒天培地を用いて乳酸菌の単離を試み、生育した乳酸菌株を分離源、16S rDNA の RFLP 多型により分類して 6 菌株を単離保存した。これらを 16S rDNA 塩基配列解析により、*Lactococcus lactis* (3 菌株), *Leuconostoc citreum* (2 菌株), *Lactobacillus plantarum* (1 菌株)と同定した。10%脱脂粉乳-3%グルコース溶液（粉乳培地）を用い、酸度を指標に発酵性を評価したところ、 *Lc. lactis* が何れも高い酸度を示した。風味などから 1 菌株(*Lc. lactis* SIY8)を選び、諸性質を検討した。SIY8 株（熱死菌体）をマクロファージ様培養細胞(J774.1)に負荷し、IL-6, 12 産生量を測定したところ、陽性対照(*Lc. lactis* H61)に匹敵する誘導能を示した。SIY8 株は、数種の *Lactobacillus* 属乳業スターターに比べ、粉乳培地における発酵性は劣った。これらのスターターとの混合発酵について検討したところ、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (以下 LB)と混合発酵させた場合、酸度の上昇がそれぞれ単独の場合に比べ速い傾向が認められた。LB と *S. thermophilus*(以下 ST)は共生関係が知られているため、LB-SIY8 および LB-ST の組合わせで粉乳培地中で混合発酵させ、生菌数を各種培養条件(LB:改良 LBS,37℃嫌気; SIY8:GYP, 30℃好気; ST:LM17, 37℃好気)により分別計数して比較した。その結果、両組み合わせとも、LB 単独に比べ培養初期に LB の増殖が促進される傾向が認められた。さらに LB-SIY8 では LB-ST に比べ、発酵後半において LB の生菌数が約 10 倍多かった。これらの結果は、麹から単離した SIY8 株が健康機能性を有する可能性、および乳製品スターターとしての有益性を示唆した。

Fermented milk, Lactococcus lactis, Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus

講演番号：2A08p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 08 会場

生もと系酒母に存在する *Lactobacillus sakei* の亜硝酸還元機能解析

Functional analysis of nitrite reduction by *Lactobacillus sakei* in *kimoto*

○渡邉 亮太[1]、池田 優子[1]、岩下 和裕[2]、徳岡 昌文[1]、進藤 斉[1]、佐藤 和夫[1]([1]東農大院・農・醸造、[2]酒総研)
○Ryota WATANABE[1], Yuko IKEDA[1], Kazuhiro IWASHITA[2], Masafumi TOKUOKA[1], Hitoshi SHINDO[1], Kazuo SATO[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]National Research Institute of Brewing)

【目的】生もと系酒母において亜硝酸は野生酵母の増殖を抑制し、清酒酵母の生育環境を整える働きを持つ。生もと系酒母の亜硝酸は、硝酸還元菌である *Pseudomonas* 属の還元作用により硝酸塩から生成することが知られているが、亜硝酸の還元の詳細なメカニズムについてはよく分かっていない。これまでに本研究室において生もと系酒母の主要乳酸菌である *Lactobacillus sakei* が亜硝酸還元能を有することが見出されており、生もと系酒母中で生成された亜硝酸の消失反応には、乳酸菌が関与していることが示唆された[1)]。そこで、本研究では *L. sakei* の亜硝酸還元酵素の精製とアミノ酸配列の決定及び遺伝子のクローニングを行うこととした。
【方法・結果】グラム陽性菌における既知の亜硝酸還元酵素の塩基配列と相同性の高い遺伝子を *L. sakei* のゲノム配列より検索したところ、相同性の高い配列を見出すことができなかったことから、菌体からの酵素の抽出を行うためにまずジャーファメンターを用いて MRS 液体培地（30℃、pH6.0、100rpm）における *L. sakei* NRIC1071 の増殖と亜硝酸還元活性について調べた。Hulse らの方法により測定した亜硝酸還元活性は、培養開始 10 時間後の対数増殖期末期において最も高かった。対数増殖期末期の菌体から細胞破砕液を調製し、その硫安沈殿画分を Garcia らの方法を一部改変したメチレンブルーと亜硝酸を用いた活性染色に供したところ、亜硝酸還元活性を有するタンパク質が検出された。このタンパク質を Native-PAGE ゲルより抽出し、SDS-PAGE に供したところ分子量が約 50kDa と推定された。さらに MALDI TOF-MS 解析により内部アミノ酸配列を解析し、*L. sakei* のゲノムデータを参照したところ、本タンパク質は NAD 結合ドメインを持つ 450 アミノ酸からなる NADH peroxidase と推定された。データベース検索から、本遺伝子は *Lactobacillus* 属、*Enterococcus* 属、*Streptococcus* 属などに広く存在する遺伝子であることが分かった。現在、*L. sakei* のゲノム DNA を鋳型として PCR によりクローニングした本遺伝子の塩基配列を pET6×HN に導入し、His-tag を付加したタンパク質を大腸菌 BL21(DE3)で発現させることで亜硝酸還元活性を確認している。

1）池田優子ら：2011 年度日本醸造学会大会講演要旨集, p4

Lactobacillus sakei, nitrite reductase, *kimoto*

講演番号：2A08p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 08 会場

好気条件で焼酎粕中のクエン酸を取込む大腸菌株の育株

The development of E. coli strain which import citrate in shochu slops under aerobic condition

○宮地 真由[1]、玉置 尚徳[2]、鈴木 秀之[1] ([1]京都工繊大院・応生、[2]鹿大・農・焼酎発酵セ)
○Mayu MIYACHI[1], Hisanori TAMAKI[2], Hideyuki SUZUKI[1] ([1]Kyoto Institute of Technology, [2]Kagoshima Univ.)

本研究の目的は、食品製造残渣である甘藷焼酎粕に含まれるクエン酸を炭素源として生育する大腸菌株を育種することである。焼酎粕は、焼酎の製造工程で焼酎醪を蒸留した後に残る液体であり、産業廃棄物であるが、現在その処分法が問題になっている。焼酎粕は、焼酎製造で用いられる麹菌が生産したクエン酸や非発酵性のイソマルトオリゴ糖などを含むので、蒸留した後の状態で廃棄すると、環境中の BOD を上昇させてしまう可能性がある。脱水して飼料や肥料としての利用や、メタン発酵による熱、電気エネルギーとしての利用などが行われているが、不十分な状態である。また、約 95%が水分であるため、脱水の際には大量のエネルギーを要する。そこで、本研究では焼酎粕を大腸菌の培養基として利用することを考えた。

大腸菌は、好気条件下で細胞内にクエン酸を取込まないが、嫌気条件下ではグルコースやグリセロールなどの酸化補基質存在下でクエン酸を取込み、クエン酸→オキサロ酢酸→リンゴ酸→フマル酸→コハク酸という経路（コハク酸発酵）でコハク酸を生成することが知られている。大腸菌のコハク酸発酵においてクエン酸を取込むときにはたらく CitT というトランスポーターが知られている。大腸菌 CitT は、クエン酸を単一炭素源とするシトロバクター属の citrate carrier と 95%の相同性があり、クエン酸を取込み、おそらくコハク酸を排出するトランスポーターである。本研究では、*citT* 遺伝子を好気条件下で発現させて、クエン酸を取込み、炭素源として利用できる大腸菌株を育種した。

好気条件で発現させるためにプラスミドに *citT* 遺伝子をクローニングし、プロモーターを換えてクエン酸最少培地における培養実験で比較、検討した。プロモーターとして強発現の T5 プロモーター *T5p* と、*lac* リプレッサーのプロモーター *lacIp* を用いた結果、*lacIp* によって好気条件下で CitT が発現し、クエン酸を取込む大腸菌株 MM14 を育種できた。MM14 を甘藷焼酎粕培地で培養すると、生育に伴って培地に含まれるクエン酸量が減少し、ほとんど全てのクエン酸が取込まれることが分かった。

E. coli, citT, shochu slops

講演番号：2A08p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 08 会場

次世代シークエンサーによる速醸もとを用いた清酒醸造過程の細菌叢解析

Pyrosequencing-based investigation of bacterial flora of sake koji and mashes when applying 'sokujo-moto' brewing method

○佐藤 万里、三枝 静江、細井 知弘（東京都立食技セ）
○Mari SATO, Shizue SAEGUSA, Tomohiro HOSOI (Tokyo Metro. Food Tech. Res. Ctr.)

【目的】 清酒，焼酎，ワインなどの酒類製造時における酵母以外の微生物の存在は，製品の品質に影響を及ぼし得る。そのため，清酒造りでは，酒母の製造，寒造り，火入れなどが行われている。これまでに，培養法による生酛系酒母の菌叢の推移や，PCR-DGGE 法による生酛および速醸酛と，それらの酛を用いたもろみ中の乳酸菌の挙動等について報告がなされているが，次世代シークエンサーを用いた清酒醸造時の詳細な菌叢の解析例は皆無に等しい。そこで，本研究では，速醸系酒母を用いた清酒醸造時の酒母やもろみの性状を明らかにする目的で，東京都内３製造場の麹，酒母（速醸酛），もろみ，上槽後の清酒について，次世代シークエンサーを用いた細菌叢の解析と，pH 値，グルコース量の測定を行った。
【方法】 都内３製造場それぞれの麹，酒母（初期），もろみ（初期・中間・上槽前）について，GS Junior を用いた Pyrosequencing 法により網羅的な細菌叢解析を行った。各冷凍試料からゲノム DNA を抽出後（QIAamp DNA Stool，ビーズ破砕処理併用），16S rRNA 遺伝子の V7-V9 領域（position 968-1390）の PCR 増幅産物を調製して解析した。得られたリード（各試料につき約 5 万～13 万）の各配列について，Ribosomal Database Project にて相同性検索を行い，各試料における属レベルでの菌叢構成を解析した。また，酒母，もろみ，上槽後の清酒について，pH 値およびグルコース量（グルコース CⅡ-テストワコー）の変化を解析した。
【結果】 都内３製造場それぞれの麹，酒母（速醸酛），もろみについて，次世代シークエンサーを用いて網羅的な細菌叢解析を行ったところ，全試料において *Staphylococcus* 属，*Pseudomonas* 属，*Serratia* 属，*Acinetobacter* 属，*Escherichia/Shigella* 属細菌が共通して検出された。また，ほぼ全ての試料において *Staphylococcus* 属細菌が最優占種であったが，その検出比率の製造段階に依存した変化の様式は，各製造場ごとに特徴がみられた。*Leuconostoc* 属，*Lactobacillus* 属，*Streptococcus* 属，*Enterococcus* 属，*Atopostipes* 属などの乳酸菌のリード検出割合についても，製造場および製造段階に依存して差異が認められた。*Ferribacterium* 属細菌は，一製造場のもろみから特異的に多く検出され，設備や器具との関連が示唆された。また，各製造場における酒母の pH 値は 3.4～3.6，もろみの pH 値は 4.1～4.8 であり，もろみのグルコース濃度は発酵の経過に伴い低下した。

sake koji and mash microflora, next-generation pyrosequencing, 16S rRNA gene sequencing

講演番号：2A08p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 08 会場

次世代シークエンサーを用いたゲノムスケールでの酢酸菌分類の試み（第二報）

Taxonomic study of acetic acid bacteria on the basis of genome sequences analyzed by next-generation DNA sequencer (part2)

貝沼（岡本） 章子[1]、松谷 峰之介[2]、石川 森夫[1]、○矢吹 岳[1]、志波 優[3]、鈴木 治夫[4]、吉川 博文[3,5]、松下 一信[2]、小泉 幸道[1]([1]東京農大・応生科醸造、[2]山口大・農、[3]東京農大・ゲノムセンター、[4]山口大・院・理工、[5]東京農大・応生科バイオ)

Akiko Okamoto-Kainuma[1], Minenosuke Matsutani[2], Morio Ishikawa[1], ○Gaku Yabuki[1], Yuh Shiwa[3], Haruo Suzuki[4], Hirofumi Yoshikawa[3,5], Kazunobu Matsushita[2], Yukimichi Koizumi[1] ([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Biol. Chem., Yamaguchi Univ., [3]Genome Research Center, Tokyo Univ. Agric., [4]Grad. Sch. Sci. Eng., Yamaguchi Univ., [5]Dept. Biosci, Tokyo Univ. Agric.)

【目的】酢酸菌の分類体系は、16S rRNA 準拠の系統が表現型の相違を反映しない例があるため混乱しており、新規の手法による知見を加味して考える必要性が生じている。先に我々は、酢酸菌科の代表的な属・種についてゲノム解析を行い、その情報に基づく系統と 16S rRNA による系統や表現型との関連について比較し、両者の系統が大きく異なることを明らかにしている [1)]。そこで本研究では、より網羅的に酢酸菌におけるゲノムスケールでの系統解析を行い、16S rRNA による系統や各種表現型との比較検討を行って、本法の有効性について検証した。

【方法】酢酸菌各株、15 属・58 種のゲノムについて Illmina Genome analyzer Ⅱにより解析した。得られた 58 株のドラフトゲノム配列に公開済み 7 株のコンプリートゲノム配列を加えた 65 株の配列を対象として系統解析を行った。ゲノム準拠の系統は解析対象株間で共通に保存されているオルソログ遺伝子を抽出し、これらの遺伝子のアミノ酸配列のコンカテマーをアライメント後、塩基配列にバックトランスレーションして ML 法により解析した。16S rRNA 配列準拠の系統樹については定法により作成した。また、酢酸菌各属の表現型性状について 35 項目の試験を行った。

【結果】今回行った供試全 65 株についてコンカテマー配列より得られた系統は、既に報告した各属の基準種 16 株について系統とほぼ一致し、本法による属間のゲノム準拠の系統関係の信頼性が確認された。これらの系統と 16S rRNA 遺伝子準拠の系統は異なった様相を示し、特に *Acetobacter* 属および *Ameyamaea* 属について、両解析間では系統的位置に大きな差異が生じた。これらの属に関わる系統関係と表現型の関係においては、総じてゲノム準拠の系統の方が 16S rRNA 配列準拠の系統よりも良好な相関を示し、本法による系統解析が酢酸菌分類体系の混乱を解消するための有効な手段となり得ることが示唆された。

1）貝沼（岡本）章子ら 日本農芸化学会 2012 年度大会講演要旨集 2C20a06

acetic acid bacteria, next-generation sequencer, phylogenetic analysis

講演番号：2A08p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 08 会場

PCR-DGGE 法によるラオス・タイの伝統的水産発酵食品の微生物相解析
PCR-DGGE analysis of microbial communities in fermented fish products in Laos and Thailand
○丸井 淳一朗[1]、Sayvisene BOULOM[2]、Wanchai PANTHAVEE[3]、門馬 真里[1]、楠本 憲一[4]、中原 和彦[1]、齋藤 昌義[1] ([1]国際農研、[2]ラオス国立大・農、[3]カセサート大・食品研、[4]農研機構・食総研)
○Junichiro MARUI[1], Sayvisene BOULOM[2], Wanchai PANTHAVEE[3], Mari MOMMA[1], Ken-Ichi KUSUMOTO[4], Kazuhiko NAKAHARA[1], Masayoshi SAITO[1] ([1]JIRCAS, [2]NUoL FOA, [3]IFRPD, [4]NARO NFRI)

【目的】水産発酵食品は伝統的な保存食として東南アジア地域に広く普及している。中でも内陸国であるラオスや、タイ中部、北部、東北部などでは、様々な淡水魚が重要な食料資源となっている。これらの地域では、一般に知られている魚醤の他にも、淡水魚を用いたなれずし様の食品（ラオス名：パーソム、タイ名：プラソム）や、塩辛様のペースト調味料（ラオス名：パーデック、タイ名：プララー）などが盛んに生産され、日常的に食されている。これらの伝統的な水産発酵食品は地域の特産品ともなっており、農村地域の生計向上に資する貴重な収入源としても期待できる。好まれる味が地域ごとに異なることも興味深い。一般に、これらの様な熱帯地域の発酵食品に特徴的な酸味と保存性には乳酸菌の働きが重要と考えられるが、味や風味に地域性が見られることから、多様な微生物が発酵に関与すると思われる。本研究では、PCR-DGGE 法を用いた網羅的な解析により、ラオス・タイ地域に特徴的な水産発酵食品の製造に関与する微生物の多様性および発酵過程での挙動を解明し、品質の向上・生産の安定化に活用できる有用微生物を見出すことを目指している。
【方法及び結果】ラオス・ビエンチャンにおいて試作したパーソム（なれずし様食品）について、仕込み直後から４日後まで、１日ごとに発酵を停止させたサンプルから抽出した DNA をもとに nested-PCR により 16S rRNA 遺伝子 V3 領域を増幅し DGGE に供した。DGGE ゲルから精製した各 DNA バンドの塩基配列を用いたデータベース検索から各サンプルの微生物相を解析した。また、各サンプルの塩分濃度、pH、乳酸含量を測定し、微生物相との相関を検討した。その結果、仕込み 1 日後から４日後まで継続して検出される 3 種の乳酸菌が存在した。乳酸含量は仕込み 2 日後から増加し、pH の低下も見られたことから、これらの菌の働きはパーソム発酵において特に重要と考えられた。ラオス、タイで収集した１０種類のパーデック、プララーについても同様の解析を行ったところ、１５種類の乳酸菌を検出した。タイ北部で生産された 3 種のプララーからは *Lactobacillus* 属菌が主要な乳酸菌として検出されたのに対し、他の地域のプララー及びパーデックでは *Tetragenococcus* 属菌が主なものとして検出された。今回解析に用いたタイ北部産のプララーの塩分濃度は他よりも低く、特徴的な微生物相を決定する要因の一つとして考えられた。

fermented fish products, PCR-DGGE

講演番号：2A08p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 08 会場

次世代シーケンサ MiSeq を用いた泡盛もろみの網羅的菌叢解析

Effective analysis of bacterial flora in brewery mush of *Awamori* using MiSeq

○塚原 正俊[1]、鼠尾 まい子[1]、渡久地 政汰[1]、東 春奈[1]、伊波 朋哉[1]、大城 彩音[1]、外山 博英[2]（[1]（株）バイオジェット、[2]琉大農）

○Masatoshi TSUKAHARA[1], Maiko NEZUO[1], Shota TOGUCHI[1], Haruna AZUMA[1], Tomoya IHA[1], Ayane Oshiro[1], Hirohide TOYAMA[2] ([1]BioJet Co. Ltd., [2]Univ. Ryukyus)

【背景・目的】

泡盛は、約 600 年の歴史を有する日本最古の蒸留酒である。これまでに我々は、泡盛もろみ常在菌の一部が、泡盛の大きな付加価値の一つである古酒香の主成分「バニリン」濃度を上昇させる働きがあること、さらに本機序が新たな泡盛醸造技術として応用可能であることを報告した（2009 年日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部合同沖縄大会）。一方、清酒など他の酒類では、発酵中の菌叢変化やその酒質への影響、さらにはこれらのコントロールによる醸造技術が報告されている。しかしながら、泡盛醸造におけるもろみの菌叢解析は「腐造」対策としたものがほとんどで、酒質の安定化や向上などを目的とした研究報告は極めて少ない。そこで今回、現在の泡盛醸造の詳細を明らかにすると共に、今後の醸造技術の向上に資する基盤情報の取得を目的として、次世代シーケンサを用いた泡盛もろみの菌叢解析を行った。



酒造所での泡盛もろみ例

【方法・結果】

次世代シーケンサ MiSeq を用いて泡盛もろみの菌叢を効率的に解析しうる条件設定を検討した。泡盛もろみを試料として、16SrDNA を対象とした常法で菌叢解析を行うと、泡盛もろみを優占している黒麹菌および酵母ゲノムからのノイズが極めて高く、菌叢解析が困難であることが分かった。そこで、プライマーの選択、PCR 条件の検討、ノイズ低減の工夫など様々な試みを行ったところ、真核生物である黒麹菌および酵母ゲノムではほとんど増幅が見られず、原核生物のみの 16SrDNA を網羅的に取得しうる条件設定を見出した。本法は、発酵食品など優占微生物を含む試料の網羅的菌叢解析に応用しうる。さらに、本法を用いて、複数酒造所、あるいは異なる発酵日数の泡盛もろみを試料とした菌叢解析を行った。その結果、酒造所間でもろみ微生物の菌叢が大きく異なること、さらに発酵過程で菌叢が大きく変化することが明らかになるとともに、泡盛もろみ菌叢を属レベルで推定することができた。現在、これらの泡盛もろみの菌叢による泡盛の風味への関与を詳細に解析することで、泡盛醸造の安定化および品質向上に寄与する技術確立を目指している。

microorganism, liquor, NGS

講演番号：2A08p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 08 会場

泡盛もろみ中の微生物の特性

Characteristics of microorganisms in awamori mash

○宮平 勝人、玉城 康智（沖縄高専　生物資源工）
○Masato MIYAHIRA, Yasutomo TAMAKI (Okinawa National College of Technology)

【目的】沖縄県には多くの泡盛酒造所あり、各酒造所で個性的な泡盛が製造されている。近年では本物志向から古酒が注目されており、その芳醇な香りとまろやかな風味は男女を問わず人気を集めている。泡盛古酒の香り成分のひとつにバニリンがあり、バニラ様の甘い香りの物質で古酒独特の香り成分として知られている。バニリンは、原料米由来のフェルラ酸が泡盛もろみの酸や蒸留過程の熱により 4-ビニルグアヤコール（4-VG）へと変化して泡盛中に移行し、さらに泡盛中の 4-VG は熟成によりバニリンへと変化することが小関らによって報告されている [1)]。フェルラ酸を 4-VG に変換する酵母は知られているが、泡盛酵母はその活性をもたない。しかし、もろみ中には麹菌や酵母以外の微生物も存在することから、これら微生物も泡盛の酒質に影響を与えていると考えられる。本研究ではもろみ中の麹菌と酵母以外の微生物、特に酸生成菌に着目し、これら微生物が酒質に及ぼす影響についてフェルラ酸から 4-VG への変換能について検討を行った。

【方法】沖縄県の泡盛酒造所から毎日もろみを採取し、0.5%炭酸カルシウムを含む MRS 寒天培地で酸生成菌の分離を行った。分離した各株は、フェルラ酸から 4-VG への変換能確認のためフェルラ酸を添加した MRS 液体培地で 48 時間培養を行った。培養後、遠心分離し、その上清を 0.45μm シリンジフィルターでろ過したものを高速液体クロマトグラフィーを使用してフェルラ酸の変化を確認した。

【結果】泡盛もろみ発酵初日から 21 日間微生物の分離を行ったが、発酵の 3 日目まで酸生成菌が分離され、それ以降分離されなかった。今回サンプリングを行った酒造所から合計 148 株の酸生成菌を分離した。各株をフェルラ酸添加 MSR 液体培地で培養したところ、フェルラ酸変換能を有する 26 株を確認した。現在、この 26 株の 4-VG への変換能は確認できてはいないが、これらもろみ中の微生物が泡盛酒質に及ぼす影響が示唆された。

参考文献

1） 小関卓也、伊藤清、伊藤康郎、岩野君夫　農協　89 p. 408−441（1994）

awamori, acid-producing bacteria, ferulic acid

講演番号：2A08p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 08 会場

製造方法が多様な市販清酒のメタボローム解析
Metabolome analysis of commercial sake produced by different procedure.
○森 雄太郎[1,2]、豊浦 利枝子[2]、磯谷 敦子[2]、徳岡 昌文[3]、織田 健[2]、岩下 和裕[1,2]（[1]広大院先端、[2]酒総研、[3]東農大）
○ YUTARO Mori[1,2], Eriko Toyoura[2], ATSUKO Isogai[2], MASAHUMI Tokuoka[3], KEN Oda[2], KAZUHIRO Iwashita[1,2] ([1]Hiroshima Univ., [2]NRIB, [3]TUA)

【背景】清酒中には約 300 種類の成分が報告されている。これまでに我々は、精密質量分析(UPLC-QTOF MS)による醸造酒メタボライト分析法を開発し、市販酒分析により得られた清酒やワインのメタボライトと清酒では製法品質表示基準、ワインでは原料ぶどう品種に関連が見られる事を示している。そこで、本研究では原料米や各製造工程と清酒メタボライトとの関連性についてさらに解析を行った。
【方法】代謝物と製造工程との関連性を見出すために原料米を山田錦に統一し、広範な精米歩合、製造法による市販清酒 40 点について本方法により分析を行った。続いて、原料米品種、及び酒母工程の異なる清酒 30 点の分析を行った。全て 40 点または 30 点を 1 セットとし、3 回の分析を行った。検出されたピークのうちピーク強度が 500 以上のものを変数として抽出を行い、ピークのマッチングを行うと共にピークテーブルを作成した(ID 化)。本ピークテーブルの各ピーク情報を変数として多変量解析（主成分分析、クラスター分析、判別分析）を行った。判別分析についてはデータセットからステップワイズ法（F 値≧2）により変数抽出を行い、得られた変数により判別式を作成した。変数は F 値が大きいものから、交差検証法により 80%正答率が得られるまで徐々に増やしていった。交差検証法では、1 つの判別式を別のデータセット（本解析では 2 種類のデータセット）に適用して判別の正答率を検証し、各データセットでそれぞれ 1 つずつ判別式を作成した。
【結果】これまでに開発した分析法を用いて製法品質表示基準によって大まかにグループ化できることを報告したが、さらに検討する余地が残っていたため、新たにクラスター分析を行った。その結果、アルコール添加の有無で大まかにクラスター化された。主成分分析では精米歩合との関連がみられたが、クラスター解析ではアルコール添加の有無が見られた。また、精米歩合に対して PLS 解析を行ったところ、相関のある成分が見出された。次に、酒母工程及び山田錦、美山錦、五百万石といった原料米品種が異なる清酒 30 点について代謝物と製造工程の関連性を見出す指標作りとして判別分析を行った。交差検証法を用いて判別式の信頼性を確認しながら判別式を作成した結果、速醸酛のお酒と生酛のお酒を高い割合（≧80%）で判別することができた。同様に原料米についても判別分析を行った結果、山田錦、美山錦、五百万石の 3 種類を高い割合（≧80%）で判別することができた。以上の結果から、各製法の違いが清酒成分に影響する事を明らかとし、新たに製法と成分との関連を見出すことが可能であった。また、酒母の判別、原料米の判別で寄与が高かったピークのほとんどは成分同定を出来なかったが、これらの成分と官能評価への影響や製造方法との関連について興味がもたれる。

sake, metabolome, fermentation

講演番号：2A08p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 08 会場

試験醸造による清酒メタボロームと製造法との関連解析

Analysis of sake metabolite produced by pilot scale fermentation and its relationship

○田村 彰史[1,2]、森 雄太郎[1,2]、織田 健[2]、岩下 和裕[1,2]([1]広大院・先端研、[2]酒総研)
○Akifumi TAMURA[1,2], Yutaro MORI[1,2], Ken ODA[2], Kazuhiro IWASHITA[1,2] ([1]Hiroshima Univ, [2]NRIB)

【目的】清酒には多数の成分が含まれているが、これらの成分そのものは原料である米にはほとんど含まれておらず、製造工程を経て原料の成分が生成酒中の成分へと変化する。ゆえに清酒成分は原料、麹菌や酵母などの微生物、製造工程、貯蔵管理中の環境変化など様々な要因の影響を受けている。これらの要因と清酒の品質との関係については、古くから様々な研究はあるが、未だに不明なことも多い。これまでに当研究室では、精密質量分析（UPLC-QTOF　MS）による醸造酒メタボライト解析法を開発し、様々な市販酒類の分析を行ない、製造法等とメタボライトとの関連を解析している。本研究では、醸造工程と清酒メタボライトの関係を明らかにするために、小スケールでの試験醸造を行い、本方法を用いてメタボライトの解析を行った。
【方法と結果】まず、代謝物と製造工程との関係性を見るために総米 20kg スケールの試験醸造を行った。原料米を 70%精米日本晴、麹菌株を RIBOIS01 株に統一し、2 種類の酵母 K-701 株と K-1801 株、醸造アルコール添加の有無の 4 種類の条件に振り分けて行った。さらに上槽過程、貯蔵期間において経時的にサンプリングを行った。計 30 サンプル調整し、我々のグループで開発した醸造酒メタボライト解析法により 3 回分析を行った。得られたピーク情報を変数として多変量解析（主成分分析、判別分析）を行い、製造工程によるサンプル間の傾向とそれに関連する成分を確認した。その結果、PCA 解析においてサンプル間での酵母菌株、醸造アルコール添加の有無、火入れまでの時間経過等による違いが見られた。また、酵母の違いに関係している成分として、Ethyl caprylate 等、時間経過に関係している成分として Phenylalanine や Choline 等の複数の成分が確認できた。アルコール添加の有無については、判別分析により判別出来ると共に関連する成分が確認できた。
　続いて、これらの成分の変遷と製造工程との関係性を明らかにするため、もろみからの代謝成分の抽出方法を検討した。搾る直前のもろみをサンプルとし、抽出溶媒や抽出作業の異なる複数の抽出条件で試料を作成した。これらの試料について、醸造酒メタボライト解析法により 3 回分析を行い、そこから得られた成分のピーク強度を比較した。抽出条件の評価方法として、抽出の安定性も評価するためピーク数やピーク強度の変動を比較した。さらに生成酒までの変遷を評価する事を目的としている事から、本試験醸造で得られた清酒の成分との相関について解析した。その結果、超純水での抽出が最も適していることが確認された。今後はこれらの方法を用いてもろみの代謝成分の変遷を解析する予定である。

sake, fermentation, metabolite

講演番号：2A08p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 08 会場

清酒粕や焼酎粕に含まれるポリアミン（プトレスシン、スペルミジン、スペルミン）含量の調査と解析

polyamine content in sake cake and shochu distillation remnants.

○寺本 拓生[1,2]、森本 朋子[2]、上佐古 大貴[1,2]、佐藤 龍一[1,2]、吉田 聡子[2]、向井 伸彦[2]、山田 修[2]、藤井 力[1,2] ([1]広島大院・生物圏、[2]酒総研)
○Takumi TERAMOTO[1,2], Tomoko MORIMOTO[2], Daiki UESAKO[1,2], Ryuichi SATO[1,2], Satoko YOSHIDA[2], Nobuhiko MUKAI[2], Osamu YAMADA[2], Tsutomu FUJII[1,2] ([1]Hiroshima Univ., [2]National Research Institute of Brewing)

【目的】醸造副産物はさまざまな有用物質を含むことが知られているが、未だ十分な解析が進んでいない。ポリアミンは正常マウスの寿命の伸長が確認された物質で、清酒粕に高含有される SAM と代謝経路が近い。そこで新鮮な清酒粕 109 点と焼酎粕を現時点で 24 点収集し、ポリアミン含量を測定した。

【方法・結果】清酒粕および焼酎粕固形部は凍結乾燥後、ベンゾイル誘導体化法により処理し、プトレスシン、スペルミジン、スペルミン含量を HPLC により定量した。液部は凍結乾燥せず、誘導体化した。

清酒粕 109 点中のポリアミン含量は清酒粕湿重量 100 g あたりで平均 2.6 mg，最大 12.7 mg，最小 0.7 mg であった。成分別では，プトレスシンは平均 0.6mg，最大 7.6 mg，スペルミジンは平均 1.7 mg，最大 4.7 mg，スペルミンは平均 0.4 mg，最大 1.6 mg であり、スペルミジンの割合が比較的高いことが分かった。100 g あたり 12.7 mg の清酒粕は麹歩合 99.6%、かつウレア非生産性酵母により製造された清酒粕であった。成分としてはプトレスシンが高く、納豆の含量 11.7 mg/100 g とほぼ同程度であった。現在、高含有に寄与する条件について解析している。

焼酎粕 24 点中のポリアミン含量は、固形部では焼酎粕乾燥重量 100 g あたりで平均 9.2 mg，最大 42.2 mg，最小 2.2 mg であった。成分別では、プトレスシンは平均 7.9mg，最大 42.0 mg，スペルミジンは平均 0.9 mg，最大 4.0 mg，スペルミンは平均 0.4 mg，最大 2.3 mg であった。また、液部でのポリアミン含量の合計は 100 g あたりで平均 1.3 mg，最大 4.6 mg であった。成分別では、プトレスシンは平均 1.0 mg，最大 4.4 mg，スペルミジンは平均 0.1 mg，最大 0.7 mg，スペルミンは平均 0.1 mg，最大 0.3 mg であった。固形部、液部ともにプトレスシンの割合が比較的高かった。現在のところ、含量の高い焼酎粕には一部の泡盛粕、酒粕焼酎粕、一部の麦焼酎粕などがあった。含量が最大の焼酎粕は、固形部では乾燥大豆並み、液部ではウーロン茶の 4 倍以上含有していた。

〔本研究の一部は日本酒造組合中央会からの委託研究として行いました。〕

polyamine, sake cake, shochu distillation remnants

講演番号：2A08p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ A 校舎 08 会場

清酒のフェノール酸レベルの変動要因について
Factors of affecting on the level of phenolic acids in sake
○鈴木 伸和、伊藤 俊彦、中山 愛織、伊藤 将哉、橋爪 克己 (秋田県立大学)
○Nobukazu SUZUKI, Toshihiko ITO, Airi NAKAYAMA, Masaya ITO, Katsumi HASHIZUME (Akitakendai)

【目的】フェルラ酸は、抗酸化物質であるとともに強い苦味・渋味を呈し、活性炭素未処理成清酒には閾値を超えるレベルで存在する。米中にはフェルラ酸とともに *p*-クマル酸が存在する。これらフェノール酸は、醸造過程を経て清酒に移行すると考えられるが、移行過程の要因については未解明である。そこで、清酒のフェノール酸レベルに影響を及ぼす要因について検討した。
【実験材料及び方法】平成 19 年産の酒造好適米 5 品種（山田錦、五百万石、美山錦、雄町及び秋田酒こまち）の玄米及び精米歩合 75%、66%、60%、50%の精白米を用いた。米中のフェルラ酸及び *p*-クマル酸含有量の分析は、西澤ら(1)の方法に準じて行った。米麹は、*Aspergillus. oryzae* RIB128 株を使用し、清酒麹の標準的な経過によって製造した。消化液等のフェノール酸は HPLC により測定した。米麹の菌体量は、乾燥及び粉砕した米麹を、ヤタラーゼで消化し、生じた N-アセチルグルコサミンを Reissig 法により測定した。
【結果】①酒造好適米 5 品種の玄米及び精白米中のフェルラ酸及び *p*-クマル酸含有量を分析したところ、原料米の品種によって差が見られ、全ての品種で精白によるレベルの低下が見られた。②酒造好適米 5 品種の 75%及び 50%の精白米を米麹抽出酵素液で蒸米消化したところ、消化液のフェルラ酸及び *p*-クマル酸レベルは、精白米のフェルラ酸及び *p*-クマル酸含有量を反映したが、変動幅は小さかった。③酒造好適米 5 品種の 75%及び 50%の精白米を用いて製造した米麹の麹消化を行ったところ、消化液のフェルラ酸及び *p*-クマル酸レベルは、大きく変動した。④酒造好適米 5 品種の 75%及び 50%の精白米を用いて製造した米麹の麹菌菌体量及び各酵素活性（フェルロイルエステラーゼ活性、キシラナーゼ活性、α-アミラーゼ活性、及びグルコアミラーゼ活性）を分析したところ、消化液のフェルラ酸及び *p*-クマル酸レベルとフェルロイルエステラーゼ活性の間に高い相関がみられた。⑤精米歩合 60%山田錦精白米で製造した米麹に酵素剤ヘミセルラーゼ「アマノ」90 から調製したフェルロイルエステラーゼ及びキシラナーゼを添加して消化を行ったところ、フェルロイルエステラーゼの添加によって消化液のフェルラ酸及び *p*-クマル酸レベルは上昇し、キシラナーゼの添加によってさらに上昇した。

参考文献 (1)西澤ら：日本食品科学工学会誌、45、P499-503、1998

sake, ferulic acid, feruloyl esterase

講演番号：2A08p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ A 校舎 08 会場

清酒老香の主成分 Dimethyl trisulfide の生成に影響を与える製造条件の統計解析（２）

Statistical analysis of sake-preparation conditions and dimethyl trisulfide formation (2)

○佐々木 慧[1,2]、西堀 奈穂子[2]、金井 宗良[2]、磯谷 敦子[2]、山田 修[2]、後藤 奈美[1,2]、藤井 力[1,2] ([1]広大院・生物圏、[2]酒総研)
○Kei SASAKI[1,2], Nahoko NISHIBORI[2], Muneyoshi KANAI[2], Atsuko ISOGAI[2], Osamu YAMADA[2], Nami GOTO[1,2], Tsutomu FUJII[1,2] ([1]Hiroshima Univ., [2]National Resarch Institute of Brewing)

【目的】

清酒では貯蔵の過程で dimethyl trisulfide (DMTS)を主成分とする劣化臭(老香)が生じることが知られているが、その生成機構は未だ不明な点が残されている。そこで、DMTS の生成に影響を与える製造条件の検討を目的に、清酒製造場の協力のもと収集した清酒について、70℃1 週間の貯蔵（劣化処理）後に生じる DMTS 濃度（DMTS 生成ポテンシャル、以降 DMTS-pp）を目的変数とした統計解析を行った。昨年度の本大会では、重回帰分析の結果、もろみにおける毎日の温度の合計値（積算温度）と劣化処理後の 260 nm の吸光度の 2 つの変数で説明率 50%の重回帰式を報告した。今回は、変数を log 変換することでより予測精度の向上した重回帰式が得られた結果と、新たに行った partial least square regression(PLSR)解析の結果について報告する。

【方法・結果】

DMTS 濃度は GC/MS にて測定した。解析には清酒製造場から提供された清酒試料のうち、解析に用いた全ての情報がそろった 76 点を用いた。DMTS-pp をはじめ、多くの変数は正規分布を示さなかったが、log 変換後は正規分布を示した。そのため、解析には元から正規分布を示す変数と log 変換後に正規分布を示す変数〔log（変数）と記述〕を使用した。

log (DMTS-pp)を目的変数とし、製造条件や分析値を説明変数としてステップワイズ法による重回帰分析や、交差検証で成分数を決定した PLSR 解析を行った。この 2 つの統計解析の結果、もろみにおける平均品温、積算温度、含硫アミノ酸濃度、亜鉛濃度の変数が DMTS-pp に対して重要な変数として選択され、説明率は重回帰分析では 63.4%、PLSR 解析では 64.2%となった。これらの変数は、もろみの品温経過、酵母の死滅及び酵母内容物の漏出、含流アミノ酸濃度、原料米の分解等の要因が DMTS-pp に影響していることを示唆している。加えて、品温経過の寄与率が最も大きい可能性が示唆された。これは品温経過が酵母の硫黄取り込み、酵母の死滅、原料米の分解などの様々な要因に影響するためと考えられた。

一方で、全 19 の説明変数を投入した PLSR 解析でも DMTS-pp の説明率は 68.1%と 30%以上の説明できない DMTS-pp の変動が残されており、まだ別の要因が残されていることがわかった。

Sake, dimethyl trisulfide, statistic analysis

講演番号：2A08p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ A 校舎 08 会場

山羊乳酒の開発と香気成分の特性評価

Development of a Goat-milk spirit and its flavor Characteristics

○金城 朱理[1]、武島 浩太[2]、玉城 康智[1]、田中 博[1] ([1]沖縄高専　生物資源、[2]沖縄高専　専攻科)
○AKARI KINJO[1], Kouta TAKESHIMA[2], Yasutomo TAMAKI[1], Hiroshi TANAKA[1] ([1]Okinawa National College of Technology, Department of Bioresources Bioengineering, [2]Okinawa National College of Technology)

【目的】乳酒とは、モンゴルの伝統的なアルコール発酵乳飲料で、健康に寄与する機能性を持つ乳製品として注目されており、日本では既に牛乳酒が商品化されている。沖縄は山羊の飼育頭数が全国で一番多く、山羊肉を食す文化がある。そこで、沖縄の天然資源である山羊の新たな利用法の探索を目的とし、その乳の利用に着目した。本研究では、山羊乳酒の開発と、嗜好品としての香気成分の特性を明らかにすることを目的とした。

【方法】

１．原料乳およびスターター

市販の低温殺菌済み生乳を原料乳とした。

滅菌原料乳 5ml に乳酸菌 *L. bulgaricus* と *S. thermophilus* をそれぞれ別に植菌して 30℃で 24 時間培養し、これらを滅菌原料乳 40ml に接種し、30℃で 24 時間培養したものをスターターとした。

２．乳酒の作製

原料乳 1L にスターターを 50ml 接種し、42℃で山羊乳カゼインの等電点 pH4.2（比較対象とした牛乳は pH4.6）に到達するまで乳酸発酵を行った。原料乳に対してグルコース 60g と、水溶して活性化させたワイン用乾燥酵母 *S. cerevisiae* を 50mg 添加した。アルコール発酵は、振とう培養（1 日目：25℃、2~4 日目：20℃、5~7 日目：10℃）と静置培養（8~10 日目：4℃）を組み合わせて行った[1)]。

３．乳酒の評価

評価項目は、文献[1,2)]に沿い、pH、乳酸度、エタノール濃度とした。山羊乳のみで作製した乳酒の参考値として、牛乳酒の文献値[1,2)] pH4.8、乳酸度 1.0~1.5%(v/v)、エタノール濃度 3%(v/v)を用いた。香気成分は、牛および山羊の生乳・発酵乳・乳酒を GC/MS 法で比較分析した。

【結果】pH3.7、乳酸度 1.4%、エタノール濃度 3.5%の山羊乳酒が得られた。乳酸度は参考値と同値で、参考値と差のあった pH やエタノール濃度は、乳の成分組成（主にカゼイン）の差や酵母の代謝活性の影響によるものであると考え、牛乳酒の文献値をもとに、山羊乳酒が作製できたことを確認した。本発表では、牛および山羊の生乳・発酵乳・乳酒の香気成分を比較評価し、山羊乳酒の特性について考察する。

1)宮康夫、“乳酒の製造方法”、2000-60526 (2000.2.29)、2)石井智美，日本調理科学会誌，Vol.34 No.1 (2001)

flavor, milk spirit, Alcohol fermentation

講演番号：2A08p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ A 校舎 08 会場

軟質性，高温登熟耐性を持った酒米選抜のためのスクリーニング方法の確立（第 1 報）

Development of the method to select rice for Sake brewing, with high enzyme digestibility and resistance to stress by high ripening temperature

○山崎 梨沙[1]、大土井 律之[1]、勝場 善之助[2]、出田 収[3]、船附 稚子[3]、重宗 明子[3]、中込 弘二[3]([1]広島県立総合技術研究所 食品工業技術センター、[2]広島県立総合技術研究所 農業技術センター、[3]（独）農研機構 近畿中国四国農業研究センター)
○ Risa YAMASAKI[1], Ritsushi OODOI[1], Zennosuke KATSUBA[2], Osamu IDETA[3], Wakako FUNATSUKI[3], Akiko SHIGEMUNE[3], Kouji NAKAGOMI[3] ([1]Hiroshima Prefectural Technology Research Institute Food Technology Research Center, [2]Hiroshima Prefectural Technology Research Institute Agricultural Technology Research Center, [3]National Agriculture and Food Research Organization)

【背景と目的】近年，酒米生産において，登熟期に高温となる影響で白未熟粒等の発生による検査等級や蒸米消化性等酒造適性の低下が問題となっている。広島県では，高温登熟障害に強い多収性酒造好適米の開発に着手しており，収益性が高く良質な清酒製造を可能とするため，「①多収，②高温登熟耐性，③小～中程度の大きさの心白，④軟質性」の 4 指標の改善を目的に新品種の育種を実施している。これまでに，60 組み合わせの交配，世代促進を行って，本年 F_3 世代を確保している。従来は，育種後期に醸造試験で品種・系統の評価を行っており，一度に供試できる品種・系統数が少ないため，効率的に目的とする品種・系統を選抜することができなかった。本研究では，系統選抜初期（F_3～F_5 世代）において，育種の効率化を目的として，少量（数 g～数十 g）の玄米及び白米による「軟質性」の簡易スクリーニング方法及び「高温登熟耐性」米の選抜方法について検討を行った。
【方法と結果】平成 23～25 年に県内で栽培された酒米について，玄米水分を 13.8%に調湿した後にテストミルで精米歩合 70%まで搗精し，白米水分を 13.5%に調湿した後，酵素を用いた蒸米消化性試験，粉砕した試料のラピッドビスコアナライザー（RVA）による糊化粘度特性解析及びアミロース含有量の測定を行い，酵素を用いた蒸米消化性試験（米の軟質性）との相関について調べた。その結果，RVA での糊化温度，セットバック値において両者の相関が高く，スクリーニングに利用可能であることが示唆された。さらに，玄米粒や白米粒を用いたスクリーニング方法についても同様の検討を行った。それらの結果を基に，F_3～F_5 世代における軟質米のスクリーニング方法を確立した。今後，一部の F_3 世代の個体選抜試料について仮選抜を行い，スクリーニング方法の検証を行う予定である。
高温栽培米は，平成 24 年に，酒米 6 品種及び育成中の系統の交配親に用いた高温登熟耐性を有している粳米 3 品種をビニールハウス内の高温条件下で栽培した。一方，対照の普通栽培米は圃場で通常栽培を行った。上記と同様に，蒸米消化性及び粉砕した試料の示差走査熱量計（DSC），RVA による糊化温度を測定したところ，酒米及び高温登熟耐性を有している粳米ともに高温登熟による糊化温度の上昇，蒸米消化性の低下が見られ，その差異は品種により異なることがわかった。これらの知見を基に，今後，高温登熟耐性米のスクリーニング指標について確立，検証を行い育種に利用していく予定である。

rice for Sake brewing, RVA, Digestibility of steamed rice

講演番号：2A08p22
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ A 校舎 08 会場

ワイルドライスと有色米をもちいた醸造酒の特性

Characteristics of alcoholic beverages made from colored rice and wildrice

○竹下 良一、三枝 敬明、寺本 祐司 (崇城大学)
○Ryouichi TAKESHITA, Noriaki SAIGUSA, Yuji TERAMOTO (Sojo Univ.)

【目的】ワイルドライスおよび黒米、赤米、緑米をもちいて醸造酒を試醸し、品質ならびに抗酸化能について比較検討した。

【方法及び結果】各種玄米を発酵原料に、糖化剤としてスミチームを使用した。きょうかい 7 号酵母を含む 4 種類の酵母を使用し、蒸煮または無蒸煮アルコール発酵により醸造酒を試醸して、その品質を評価した。蒸煮発酵酒に比べ、無蒸煮発酵酒では玄米の種類に関わらず、総フェノール量が全て高かった。一方、最終 pH 値(4.5～5.0)、酸度(2.2～3.6ml)、アルコール濃度(13.4～17.5%)、残糖量(327～819μg/ml)には蒸煮・無蒸煮の発酵法の違いによる差異は認められなかったものの、玄米の種類による違いが認められた。そこで、抗酸化能を DPPH ラジカル消去能と β カロテン脂質過酸化阻止能により評価したところ、蒸煮、無蒸煮発酵酒に関わらずワイルドライスを原料にもちいた醸造酒がともに高い値を示した。

試醸した各種玄米酒の抗酸化物質が玄米のどの部位に存在するのかを調べるために、各種玄米を 90%以上精米したものをもちいて醸造酒を試醸し、抗酸化能値を比較した。その結果、ワイルドライスを除くすべての有色米の抗酸化能（DPPH ラジカル消去能）が 62～88%低下した。しかし、ワイルドライスでは 15～20%の低下であった。また、ワイルドライスをもちいた酒の抗酸化能は、使用酵母の種類や発酵温度による影響はなかった。

Wildrice, alcoholic beverage, antioxidative capacity

講演番号：2A08p23
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ A 校舎 08 会場

オキアミを用いた発酵調味料の製造法

The production of fermented seasoning from krill and their characteristics

○長田 彩加、金内 誠、畑中 咲子、下山田 真、石田 光晴（宮城大食産）
○Ayaka Nagata, Makoto Kanauchi, Sakiko Hatanaka, Makoto Shimoyamada, Mitsuharu Ishida (Miyagi Univ.)

【目的】ツノナシオキアミは東北地方で「いさだ」、「えさだ」などと呼ばれているオキアミ類オキアミ目の動物プランクトンの一種で、岩手県～茨城県の太平洋沿岸で水揚げされる水産物である。用途の多くは釣り餌や撒き餌として消費されるほか、乾燥後に加工用として主に「えびせん」などの材料に使われてきた。しかし、近年、えびの養殖のコストアップや国内の養殖えびの高騰などから、えび風味を持つオキアミの用途や加工品などが見直されている。特に、エスニックブームもあいまって「えび魚醤」やカピなどの天然調味料の使用量も増加している。

これまで、小泉らは魚介類の残渣に食塩、麹、プロテアーゼ、酵母、乳酸菌を添加し、短期間に魚臭の少ない魚醤を醸造する技術を確立した。しかし、分解や醸造条件などが魚種により異なり、検討が必要である。そこで本研究では、乾燥ツノナシオキアミを原料とし、麹プロテアーゼや市販プロテアーゼ製剤による分解条件や配合などを検討し、試醸した魚醤の性質を明らかにすることとした。

【方法】オキアミの成分分析（水分、タンパク質、灰分、脂肪、還元糖）は定法に従った。また、原料オキアミの分解条件を検討するために、原料オキアミと麹の混合物（1：0.5）に 5 倍加水し、6 種類の市販酵素剤を 0.1%ずつ添加した。45℃～55℃、24 時間インキュベートし、経時的にサンプリングし、そのろ液のホルモール窒素を分析した。オキアミ魚醤の小仕込みは、オキアミと麹の配合を変えて 6 区設定し、経時的に成分分析（ホルモール窒素、酸度Ⅰ・Ⅱ、アルコール、pH）を行った。また、アミノ酸分析はアミノ酸分析装置により測定した。精製したオキアミ魚醤は、官能評価により、香気、うま味、味のバランス等を検討した。

【結果】オキアミの成分は水分が 25.0%、タンパク質が 58.9%、灰分が 18.9%、脂肪が 5.87%、そして還元糖 4.66%であった。また、醤油の原料である大豆のタンパク質は約 35%であることより、本オキアミは魚醤の原料としては、十分なタンパク量を有していると考えられた。また、還元糖も約 5%存在し、アルコール発酵に適すものであることが示唆された。さらにこれに麹（醤油麹；小麦・大豆）を混合させたものに加水し、酵素剤の有無やその種類について検討した。その結果、スミチーム FP-G を添加し、55℃、24 時間分解させたものは、ホルモール窒素が高く、旨味が強いものであり分解条件として適していた。また、試醸したオキアミ魚醤のアミノ酸分析の結果、市販の醤油と同等のグルタミン酸を有していることがわかった。官能評価の結果、魚臭・生臭みなどの不快臭はなく、醤油より味わいが高かった一方で、色が濃いなどの指摘もあったが、総じて良好な香味であった。

krill, seasoning, protease

講演番号：2A09a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ A 校舎 09 会場

乳酸菌の分離と発酵特性の評価

Isolation of lactic acid bacteria and their fermentation characteristics

○武島 浩太[1]、池松 真也[2]、田中 博[2]([1]沖縄高専・専攻科、[2]沖縄高専・生物資源)
○Kota TAKESHIMA[1], Shinya IKEMATU[2], Hiroshi TANAKA[2] ([1]Okinawa National College of Technology, [2]Okinawa National College of Technology, Department of Bioresources Bioengineering)

【目的】

本研究では、沖縄県の食文化に深い関わりを持つ天然食素材（野菜、果物、島豆腐、海藻）などを加工度が低く、かつ保存性に富んだ一次加工食品素材に変換することを目的とし、その加工法に利用できる亜熱帯性乳酸菌の分離と発酵特性の評価を行った。

【方法】

1.乳酸菌の分離源

沖縄県（中部・北部地方）に生息する植物の葉、果実、花、及び石垣市で採取した海藻類を分離源とした。果実類、野菜類については沖縄県の市場で購入、及び地域住民からの提供を受けた。その他の植物資源については自生しているものを採取した。

2.乳酸菌の分離方法

0.85 % (w/v)滅菌生理食塩水(10 ml)に分離源を適量入れ混合撹拌し、1 % (w/w)炭酸カルシウムを含む MRS 寒天培地に(100 μl)塗布した。嫌気条件下で 37 ℃、24～72 時間の培養を行いコロニーの評価を行った。評価方法：1.ハローの有無、2.形状・色、3.カタラーゼテスト、4.グラム染色。
本発表ではハローを形成し、カタラーゼ陰性、グラム陽性を示す株を発酵特性評価の対象とした。

3.バクテリオシン様物質の産生能評価

分離した株を MRS 液体培地(10 ml)で 37℃、24 時間培養し、遠心分離 (3,000 rpm、10 min、4℃)、(0.45 μm)メンブレンフィルターろ過を行い培養上清とした。指標菌株(JCM1002)を混釈した MRS 寒天培地に試料注入ウェル（直径 6 mm）を作製し、培養上清(65μl)を添加後、嫌気条件下で 37℃、24 時間の培養を行った。指標菌株に対する生育阻止円の有無によりバクテリオシン様物質の産生能を評価した。

【結果】

156 の分離源からのべ 139 個のコロニーを確認した。そのうち発酵特性評価の対象として 44 株を分離することができた。(果実類から 13 株、花弁類から 6 株、葉類から 9 株、海藻類から 4 株、その他から 12 株)。現在までに 34 株についてバクテリオシン様物質の産生能評価を行い、産生株を確認した。本発表では、バクテリオシン様物質の産生能の評価結果、食餌モデル培地中での発酵特性の評価結果とともに、実際に食品加工に利用されている乳酸菌との特性比較について報告する。

Lactic Acid Bacteria, Fermentation characteristics, Bacteriocin

講演番号：2A09a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ A 校舎 09 会場

富士五湖から乳酸菌の分離とプロバイオティクス利用に向けた基礎的研究
Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Fuji Five Lakes
○DO KIEU PHUONG、乙黒 ミサ、岸本 宗和、柳田 藤寿（山梨大院ワイン研）
○KIEU PHUONG DO, MISA OTOGURO, MUNEKAZU KISHIMOTO, FUJITOSHI YANAGIDA (Enol.Vitic. Univ. Yamanashi)

［目的］乳酸菌は栄養要求性が非常に高く、自然環境中ではアミノ酸やビタミン、ミネラルなどの栄養成分が豊富な環境に棲息している。そのため従来の研究では、乳製品、発酵食品および植物などから多く分離されており、海水や湖といった水圏環境からの分離に関する研究は少ない。本研究では、山梨県特有の富士五湖から乳酸菌を分離し、水圏環境における乳酸菌の生態解明を目指すとともに、分離株のプロバイオティクスとしての有用性を調査することを目的とした。

[方法] 富士五湖（山中湖、河口湖、西湖、精進湖、本栖湖）より 2012 年（5 月、8 月、11 月、1 月）及び 2013 年（5 月、8 月）に採取した湖水から集積培養法により乳酸菌の分離を行なった。分離培地には MRS 及び GYP 液体培地を使用し、嫌気ジャーにて 30℃ で 2-3 日間培養後生育が認められたものを 0.75%生理食塩水にて 10^{-3} から 10^{-6} に希釈した。その後、各希釈液それぞれを寒天平板培地に途布し、30℃ で 3-5 日間嫌気培養した。形成した単一コロニーの形態観察、カタラーゼ反応及びグラム染色テストにより乳酸菌候補株を得た。McIlvaine 緩衝液を使用した耐酸性試験及び希釈豆乳発酵試験を行い、優良株 37 株を選抜した。これらの選抜株については 16S rDNA の PCR-RFLP 解析によるグルーピングと塩基配列解析を行い同定した。

[結果と考察] 富士五湖より四季を通して山中湖 6 ヶ所、河口湖 7 ヶ所、西湖 4 ヶ所、精進湖 3 ヶ所、本栖湖 4 ヶ所から合計 144 サンプルの湖水を採取し 152 菌株の乳酸菌候補株を分離した。分離株数は河口湖(64 株)が最も多く、次いで、山中湖（41 株）西湖(18 株)、本栖湖(18 株)、精進湖（11 株）の順であった。2012 年における季節毎の分離株数では秋（36 株）が最も多く、次いで、春（26 株)、夏（25 株)、冬（14 株）の順であった。湖水 10ml あたりの分離株数をみると河口湖が最も多く、精進湖が最も少なかった。各湖における乳酸菌の分離株数と COD の間には相関が認めたれた。分離株 152 株を用いた pH2.2 条件下での耐酸性試験において、10^3(cfu/ml)以上の生菌数があったものが 41 株あり、このうち希釈豆乳発酵試験において pH5.0 以下を示した菌株が 37 株であった。現在これらの選抜株について 16S rDNA の塩基配列による同定を進めている。

lactic acid bacteria, Isolation, characterization

講演番号：2A09a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ A 校舎 09 会場

Lactobacillus plantarum におけるコロニー形態とバイオフィルム形成の関係性
Colony morphology and biofilm formation in *Lactobacillus plantarum*
○河嶋 伊都子[1]、柿原 健佑[1]、尾花 望[1]、久保田 浩美[2]、清川 達則[1]、小山 二花[1]、細谷 幸一[2]、湯井 幸治[2]、野村 暢彦[1] ([1]筑波大院生命環境、[2]花王株式会社安全科学研究所)
○ Itsuko Kawashima[1], Kensuke Kakihara[1], Nozomu Obana[1], Hiromi Kubota[2], Tatsunori Kiyokawa[1], Nika Koyama[1], Koichi Hosoya[2], Koji Yui[2], Nobuhiko Nomura[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]Kao corp.)

【背景・目的】
近年、実環境中において微生物の多くは浮遊状態で個々に存在しているのではなく、集団で物質表面に付着したバイオフィルム状態で存在していることが明らかとなってきた。また、バイオフィルム中の微生物は、浮遊状態の時よりも高いストレス抵抗性を獲得していることが知られている。
食品分野において、実際にバイオフィルムを形成する微生物の１つに乳酸菌がある。乳酸菌はヨーグルトや漬物など発酵食品生産に用いられるなど、我々にとって有益な微生物である一方で、本来乳酸菌による発酵を行わない食品に混入し酸味や酸腐敗臭の原因となるなど、危害菌としての側面も併せ持っている。そして危害菌としての乳酸菌は、主に食品原料等にバイオフィルムを形成しているため、高い抵抗性を獲得しており、より制御が難しくなっていると考えられる。除去しにくいことが非常に大きな問題となっている。そのため食品製造工程においてはバイオフィルムの性質を考慮に入れた制御法が求められている。しかしながら、乳酸菌バイオフィルムに関する知見はあまり得られていないのが現状である。そこで本研究は、危害菌としての乳酸菌が形成するバイオフィルムに関する基礎的な知見を獲得し、将来的な乳酸菌バイオフィルムの制御法発展につなげることを最終目的としている。
【方法・結果】
はじめに *Lactobacillus plantarum* において、type strain の JCM1149 株では単一のコロニー形態しか観察されていないにも関わらず、環境中から単離してきた株には２種類のコロニーを形成する株が存在していることに着目した。２種類のコロニーは色や厚みが大きく異なり、それぞれを継代していくと、もう一方の形態のコロニーが出現してくることが確認された。そこで、この２種類のコロニーをそれぞれ MRS 培地で 24 時間培養させし、ガラス基質表面にバイオフィルムを形成させた。その結果、コロニー形態の違いによってバイオフィルムの形成量が大きく異なることが明らかとなった。また、この２種類のバイオフィルムの構造を走査型電子顕微鏡で観察したところ、細胞外物質の有無がコロニー形態の変化に関係していることが示唆された。以上の結果から *L. plantarum* においてはコロニー形態とバイオフィルム形成には関係性があることが明らかとなった。本研究により *L. plantarum* はコロニー形態に多様性を有しており、それに伴いバイオフィルム形態や形成量を制御することにより環境に応答している可能性が考えられた。このようなコロニー形態変化機構メカニズムの解析は乳酸菌バイオフィルムにおける新規の制御法確立のための重要な知見となると考えられる。

Lactobacillus plantarum , biofilm, colony morphology

講演番号：2A09a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ A 校舎 09 会場

Fructobacillus 属乳酸菌の特徴と糖代謝

Characteristics and Sugar Metabolism in the Genus *Fructobacillus*

○浅沼 開[1]、及川 容[1]、田中 尚人[2]、梶川 揚申[1]、遠藤 明仁[3]、佐藤 英一[1]、岡田 早苗[1]([1]東農大応生科・化学、[2]東農大・菌株、[3]東農大・生物産業学部)
○Kai ASANUMA[1], You OIKAWA[1], Naoto TANAKA[2], Akinobu KAJIKAWA[1], Akihito ENDO[3], EIICHI SATOH[1], Sanae OKADA[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem,Tokyo Univ. Agr., [2]NRIC, Tokyo Univ. Agr., [3]Dept. Bio-industry,Tokyo Univ. Agr.)

【目的】*Fructobacillus* 属乳酸菌は 2008 年に遠藤・岡田によって提唱された新属乳酸菌である。[1)] 本属乳酸菌の特徴として、ヘテロ発酵を行うにも関わらずエタノールを生産せず、生育にフルクトースや酸素などの細胞外因子を必須要求することが挙げられる。この特徴的な生育及び発酵形式に興味が持たれ、本属乳酸菌の糖代謝経路に関する研究を行った。

【方法・結果】*Fructobacillus* 属5種の基準株を供試菌株として用いた。また、*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NRIC 1541^{T}を比較対象として用いた。グルコースを基質とした培地に細胞外因子として酸素・フルクトース・ピルビン酸を加えた培地で培養し、HPLCを用いて代謝産物測定を行った。その結果、*Fructobacillus* 属においてピルビン酸添加GYPでは乳酸:酢酸＝3:1、フルクトース添加GYPでは乳酸:酢酸:マンニトール＝1:1:2、GYP好気条件では乳酸:酢酸＝1:1となった。このことから、*Fructobacillus* 属は過去に報告されたマンニトール発酵に類似した発酵形式[2)]を持っており、本来エタノール生産によって再生するNADを各細胞外因子を用いて再生していることが示唆された。この反応に関与すると考えられる酵素の酵素活性を測定したところ、各種酵素活性を保持していることが判明した。これらを踏まえ、代謝経路の予測を行うためにゲノム解析を行った。この結果、エタノール合成経路を保持していないことが明らかとなったことから、*Fructobacillus* 属の糖代謝においてNADの再生を細胞外因子に依存していることが強く示唆され、さらにグルコース1molから生産されるATPは通常のヘテロ発酵乳酸菌の2倍である2molのATPであることが予想された。そこで、予想代謝経路と実際の生育を比較するため、Y_{ATP}を用いた。Y_{ATP}を算出した結果、全ての株及び培養条件時においてY_{ATP}の基準とされる10.5付近の値を示した。このことから、*Fructobacillus* 属の代謝経路において生産されるATPは2molであることを強く裏付けた。以上のことから総合的に考察すると、*Fructobacillus* 属乳酸菌は菌体内のNADHを細胞外因子を用いてNADに再生し、エタノールを生産せず、ヘテロ発酵乳酸菌でありながらグルコース1molから2molのATPを生産する。従って本属乳酸菌はこれまでに報告の無い糖代謝経路に従うことを明らかにした。

1) *IJSEM*, 58(9), 2195-2205 (2008).
2) 乳酸菌の研究, 東京大学出版 (1965), p395.

Genus *Fructobacillus*, sugar metabolism

講演番号：2A09a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ A 校舎 09 会場

山廃もとの微生物フローラ～ピロシークエンス法による菌叢変化の追跡～
Pyrosequencing survey of the microbial diversity of Japanese sake starter "yamahai-moto"
○小柳 喬[1]、中川 明[2]、清原 正志[2]、松井 裕[2]、山本 恵子[2]、バルラ フローリン[1]、武 春美[3]、勝山 陽子[3]、辻 篤史[3]、徳田 耕二[4]、中村 静夫[3]、南 博道[2]、榎本 俊樹[1]、片山 高嶺[2]、熊谷 英彦[2]
([1]石川県大・生資環・食品、[2]石川県大・資源研、[3]石川県・工試、[4]車多酒造（株））
○Takashi KOYANAGI[1], Akira NAKAGAWA[2], Masashi KIYOHARA[2], Hiroshi MATSUI[2], Keiko YAMAMOTO[2], Florin BARLA[1], Harumi TAKE[3], Yoko KATSUYAMA[3], Atsushi TSUJI[3], Koji TOKUDA[4], Shizuo NAKAMURA[3], Hiromichi MINAMI[2], Toshiki ENOMOTO[1], Takane KATAYAMA[2], Hidehiko KUMAGAI[2] ([1]Dept. Food Sci., Ishikawa Pref. Univ., [2]Inst. Biores. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ., [3]Indus. Res. Inst. Ishikawa, [4]Shata Syuzo Co., Ltd.)

【目的】現在の我が国の日本酒は、その多くが乳酸添加を人工的に行う速醸法で仕込まれるが、自然に乳酸菌を繁殖させることにより乳酸の自然生成を促す「山廃もと」のような「生もと系」の仕込み法も未だ根付いている。これまで山廃もとにおける乳酸菌を中心とした菌叢報告は多数存在するが、大規模な解析母数が得られるピロシークエンス法を使用した報告はなかった。本研究では、石川県の酒造会社において製造されている山廃もとについて、ピロシークエンス法による経時的な発酵菌叢解析を行った。
【方法】山廃仕込みのもとから数日間隔でサンプルを採取し(仕込開始後 1～17 日、5 点)、DNA 抽出を行い 16S リボソーム RNA 遺伝子（16S rDNA）配列中の V1・V2 可変領域(約 350 bp)を PCR により増幅した。増幅断片を Genome Sequencer FLX System を用いたピロシークエンス解析に供し、得られたリード(約 10 万)について RDP classifier および BLAST による系統学的解析を行った。また、サンプル中に含まれる 16S rDNA 量を定量 PCR 法にて測定し、そのコピー数から総細菌数の変遷を追跡したほか、単離培養法による菌種同定結果とピロシークエンス解析にて得られたリード配列との比較も行った。
【結果】ピロシークエンス解析により得られたリード配列を系統学的に分類したところ、仕込み開始後 3 日目において最大 36 属の細菌の存在が確認された。仕込み期間中最も多く検出されたのは *Lactobacillus* 属乳酸菌であり、全期間中にわたって菌叢の 93 % 以上を占めていた。その他、少数の *Leuconostoc*（0～5.5 %）、*Tetragenococcus*（0.2～4.2 %）、および *Staphylococcus*（0.3～1.9 %）が検出された。種レベルの解析では、仕込み開始後 1～3 日目においては *L. acidipiscis* が *Lactobacillus* 属中 50 % あまりを占め、その後 6 日目において *L. sakei* が著しく増加（96 %まで上昇）し以後優勢を保った（75～90 %）。仕込み前期には、少数ながら *L. plantarum* の近縁種もみられた（11～12 %）。乳酸菌用完全栄養培地（MRS）を用いた単離培養法においても *L. sakei* が多数分離され、16S rDNA 配列を解析したところピロシークエンス法で得られた同菌種の塩基配列と 100 %一致していた。生もとの仕込み中において *L. sakei* が優勢となることは古くから知られているが、*L. acidipiscis* とダイナミックな入れ替わりがみられるなどの興味深い新知見が得られた。

fermented food, microbiota, pyrosequencing

講演番号：2A09a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ A 校舎 09 会場

タイ及びラオス由来スターター中に含まれる微生物叢の解析
The diversity of traditional starters from alcoholic fermentation in Thailand and Laos
○村越 美穂[1]、米田 英伸[1]、H-Kittikun Aran[3]、浅野 泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO、[3]Prince of Songkla Univ.）
○Miho MURAKOSHI[1], Hidenobu KOMEDA[1], Aran H-Kittikun[3], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO, [3]Prince of Songkla Univ.)

【目的】アジア各国で古くから酒の製造に使用されているスターターとしてタイの‘*loog pang*’、ベトナムの‘*banh men*’、中国の‘*chu*’などが挙げられる。このようなスターター中にはアミラーゼやエタノール生産菌が存在していると考えられ、微生物叢の解析によりエタノール生産に有用な微生物の発見につながることが期待できる。本研究ではタイ及びラオス由来のスターターの微生物叢を解析することを目的として、平面寒天培養法により各種微生物株を単離し、そのエタノール生産性を調べた。さらに培養法に依存しない方法として、スターターより直接 DNA を抽出し、微生物叢の解析を行った。
【方法と結果】まずタイ及びラオスより集めた 7 種類のスターターサンプルを、蒸米に加えてそれぞれのエタノール生産性を調べたところ 6 種類のサンプルでエタノールの生産が確認できた。これより、これらのスターター中にはアミラーゼ生産菌とエタノール生産菌が存在していると予測できる。次いで、これらスターターより種々の培地を用いて、各種微生物株を単離した。その結果 23 種の細菌、47 種の酵母、13 種の糸状菌が得られた。これらの菌株を各種糖源存在下で好気的及び嫌気的条件下で培養し、エタノール生産量を調べた。エタノール濃度の測定にはガスクロマトグラフィーを用いた。Ｄ－グルコース存在下では 2 種の細菌、36 種の酵母、13 種の糸状菌が 4g/L 以上のエタノール生産を示した。一方、Ｄ－キシロース、Ｌ－アラビノース存在下でエタノールの高い生産性を示す菌株は認められなかった。エタノール生産性の高い菌株について同定を行ったところ、糸状菌としては *Rhizopus microsporus*, *Mucor indicus*, *Mucor pilosus*, 酵母として *Meyerozyma caribbica* などであった。また、スターターより直接ＤＮＡを抽出後、最近に対しては 16SrRNA 配列、酵母や糸状菌に対しては D1/D2 領域を PCR により増幅し、微生物叢の解析を行った。その結果、43 種の細菌、3 種の酵母、47 種の糸状菌の存在を確認した。

alcohol fermentation starter, microbial diversity

講演番号：2A09a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ A 校舎 09 会場

セルロース分解能を持つ新奇 *Streptomyces* 属細菌（ *S abietis* ）の分離

Streptomyces abietis sp. nov., a cellulolytic bacterium isolated from forest soil

○藤井 克彦[1]、里見 正隆[2]、福井 洋平[2]、松延 駿[1]、森福 洋二[1]、榎田 裕哉[1] ([1]山口大農、[2]水産総合研究センター)

○ Katsuhiko FUJII[1], Masataka SATOMI[2], Youhei FUKUI[2], Shun MATSUNOBU[1], Youji MORIFUKU[1], Yuya Enokida[1] ([1]Yamaguchi Univ, [2]NRIFS)

【目的】

演者らはこれまでに様々な土壌からセルロース分解微生物の分離を行い、その微生物生態系について検討してきた。今回、北海道の森林土壌から得たセルロース分解細菌（A191, A192, A193 株）の 16S rDNA 部分配列（5’末端側 350 bp 程度）を解析したところ、これが *Streptomyces* 属の新種である可能性が考えられた。そこで本研究では、分離株の詳細な系統解析を行い、新種であるかどうかを判定した。

【方法】

北海道のトドマツ（Sakhalin fir）林の表層土壌を採集し、これを滅菌水に懸濁した。炭素源を抜いた無機塩寒天培地にこの土壌懸濁液を添加し、その上からろ紙を重層して 30℃静置培養を行った。1 週間培養後、ろ紙上面に出現したコロニーを滅菌爪楊枝でピックアップし、YM 寒天培地に画線することでセルロース分解微生物の純粋分離を行った。酵素活性（セルラーゼおよびキシラナーゼ）は Ghose（1987）の方法により測定した。

【結果】

本研究で試験する細菌株 A191, A192, A193 についても、上述のように、ろ紙上面に出現したコロニーを YM 寒天培地に画線し､出現したシングルコロニーから任意に 3 個を選抜して純粋分離された。これら 3 株の 16S rDNA 全長配列を比較したところ、塩基配列は完全に一致しており、3 株は同種であることが示された。また、BLAST 解析、G+C 含量、ならびに脂肪酸組成（属固有脂肪酸の有無）の解析結果から分離株は *Streptomyces* 属であることも明らかとなった。他方、近縁既知種（*S. alni* JCM 16122^T および *S. ferralitis* JCM14344^T）との 16S rDNA および *gyr*B 遺伝子相同性を検討したところ、前者は最高でも 97.9% 、後者は 95.0%であり、近縁種とは異なる種である可能性が示唆された。 そこでゲノム交雑実験を行ったところ、分離株と近縁種の DNA 交雑率は 70%を下回り、両者は別種である､すなわち分離株は *Streptomyces* 属の未報告種であると判断された｡そこで分離株を *Streptomyces abietis* (= NBRC 109094^T, DSM 42080^T) と命名、提案することにした。

培養上清の酵素活性を検討したところ、分離株ではエキソセルラーゼ（Avicelase）およびエンドセルラーゼ（CMCase）の酵素活性が認められたが､近縁ではいずれの活性も検出されなかった｡また、キシラナーゼ活性については分離株でも近縁種でも検出された。

Streptomyces, actinomycete, cellulolytic

講演番号：2A09a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ A 校舎 09 会場

キシロース資化性を有する新規インドネシア産酵母の分離と同定

Isolation and Identification of novel yeasts utilizing xylose isolated in Indonesia.

○小林 隆一[1]、Atit Kanti[2]、川崎 浩子[1] ([1]製品評価技術基盤機構・NBRC、[2]LIPI, Indonesia)
○Ryuichi KOBAYASHI[1], Atit KANTI[2], Hiroko KAWASAKI[1] ([1]NITE・NBRC, [2]LIPI, Indonesia)

【目的】木質系バイオマスからのエネルギー生産及び有用物質生産を念頭に、五単糖を資化する酵母の探索を行った。スマトラ島西部で朽木を中心として試料を採取し、酵母菌の分離・同定を試みた。本大会ではこれら酵母菌の分離と選抜、及び新規分類群について同定を行ったので報告する。
【方法及び結果】サンプリングサイト 5 ヶ所から 12 試料を採取し、キシロース及びキシランを基質として集積培養を行い、142 株の酵母を分離した。MALDI/TOF MS を用いたタンパク質パターン解析に供しグルーピングを行ったところ、34 グループに分類された。26S rRNA D1/D2 領域の塩基配列に基づく分子系統解析を行った結果、1 つのグループが Barnettozyma 属のクレードに属し、最も近縁な種 *Barnettozyma californica* var. *fukushimae* と 85.8%の相同性を有したことから、*Barnettozyma* 属の新種であると判断した。ITS 領域の解析もこれらを支持する結果となった。分類学的諸性質について調べたところ、細胞は楕円形で、多極出芽により増殖し、胞子形成は認められなかった。Glucose 及び D-xylose の発酵性はなかったが、キシロースを含む 14 種類の炭素源を資化し、G + C 含量は 40.1 (mol%)、主要ユビキノンは Q-7 であった。*Barnettozyma* 属の既知種とも表現型において差異が認められたことから、本酵母を *Barnettozyma* 属の新種として提案する。

本研究は地球規模課題対応国際科学技術協力事業(SATREPS)におけるインドネシア・LIPI との共同研究の下で実施されたものである。

novel yeast, *Barnettozyma*, xylose utilization

講演番号：2A09a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ A 校舎 09 会場

釜石市海岸に自生するマツより分離した新規酵母 *Wickerhamomyces kamaishiensis* sp. nov.

Wickerhamomyces kamaishiensis sp. nov., a novel yeast species isolated from pine in the coast of Kamaishi, Japan

○竹内 史子[1]、宮崎 由美子[1]、猪又 幸江[2]、笠井 宏朗[2]、高橋 幹男[1]、鶴海 泰久[1]、川崎 浩子[1] ([1]製品評価技術基盤機構・NBRC、[2]北里大・釜石研)
○ Fumiko TAKEUCHI[1], Yumiko MIYAZAKI[1], Yukie INOMATA[2], Hiroaki KASAI[2], Mikio TAKAHASHI[1], Yasuhisa TSURUMI[1], Hiroko KAWASAKI[1] ([1]NITE・NBRC, [2]Kitasato Univ. Kamaishi Research Lab.)

【目的】岩手県釜石市は東日本大震災で津波の被害を受けた。地域産業の復興と活性化のため、東日本大震災の津波に耐えて自生し続ける岩手県釜石市の花「ハマユリ」から微生物を分離し食品産業への展開を行う「釜石はまゆりプロジェクト」が発足した。本研究ではハマユリからの酵母株の分離の過程で見つかった新規酵母について、その分類学的性質を明らかにしたので報告する。

【方法及び結果】釜石市平田町佐須漁港ヘビ島（直径約 20 m、高さ約 5 m）に群生するハマユリ（*Crinum asiaticum* var. *japonicum*）の花弁、茎、根圏土壌及びハマユリとともに生息するマツより、6 種類の培地を用いて 25℃にて 272 株の酵母を分離した。MALDI/TOF MS を用いた簡易同定を行った結果、15 グループが認められ、そのうちマツの葉より分離されたグループについて D1/D2 領域に基づく分子系統解析を行ったところ、本グループの酵母は *Wickerhamomyces* クレードに属し、最も近縁の種 *Wickerhamomyces rabaulensis* と 95～96%の低い相同値を示したことから、新規分類群であることが示唆された。ITS 領域の解析からも同様の結果が得られた。本グループに属する 2 株について、詳細な同定試験を行った結果、ovoid 状の細胞で多極出芽により増殖し、子のうの中に 1~2 個の帽子状の子のう胞子を形成し、Glucose と Sucrose の潜在型発酵性が認められ、多種類の炭素源を資化するが、Methanol と Hexadecane は資化せず、窒素源として硝酸塩は資化しないことが認められた。ユビキノン系は Q-7、GC 含量は 44％（mol%）であった。生育温度は 35℃で良好、37℃で生育が抑えられ、40℃では全く生育できなかった。*Wickerhamomyces* 属既知種に対し、分子系統学的および生理生化学的に相違が見られたことから、本酵母を *Wickerhamomyces kamaishiensis* sp. nov.として提案する。

novel species of yeast, *Wickerhamomyces kamaishiensis* sp. nov.,, identification

講演番号：2A09a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ A 校舎 09 会場

地球深部探査船「ちきゅう」を用いた「下北八戸沖石炭層生命圏掘削調査」により採取された大深度堆積物試料からの圧力関連微生物の分離

Isolation of pressure related bacteria from the core samples obtained from the coalbed off Shimokita, Japan, during the IODP Expedition #337

○加藤 千明[1]、ファン ジェイソン[2]、堀 知行[3]、諸野 祐樹[1]、稲垣 史生[1] ([1]海洋研究開発機構、[2]ハワイパシフィック大、[3]産業技術総合研究所)
○Chiaki Kato[1], Jiasong Fang[2], Tomoyuki Hori[3], Yuki Morono[1], Fumio Inagaki[1] ([1]JAMSTEC, [2]HPU, [3]AIST)

[目的]
統合国際深海掘削計画（IODP）第 337 航海「下北八戸沖石炭層生命圏調査」により、地球深部探査船「ちきゅう」によって掘削採取された堆積物コア試料を用いて、同極限環境に生息する圧力関連微生物を分離し、その性質を解明する。
[方法]
下北八戸沖の掘削サイト C0020 (41°10.5983"N, 142°12.0328"E、水深 1180m) より、海底下 1498~2406m の環境から、約 2000 万年前に形成された石炭層（褐炭）をはじめとする、有機物に富む(TOC: ~60%)堆積物コア試料を採取した。得られた試料を船上ラボで直ちに嫌気状態に処理し、現場の圧力（35MPa）と現場温度（40～50℃）の状態で加圧集積培養を行った。本集積培養液から、好圧菌を含む圧力関連微生物の分離を試み、次世代シーケンサーおよび t-RFLP 法による集積培養サンプル中の微生物学的多様性解析を行った。
[結果]
加圧集積培養されたコア試料から、好圧菌の指標である 50MPa での良好な生育を示す 10 株の分離に成功した。本分離株の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統解析により、分離株が Firmicutes に属する *Virgibacillus* 属、*Bacillus* 属、*Staphylococcus* 属、*Robinsoniella* 属であることが示唆された。さらに、*Virgibacillus* 属に近縁な分離株は、嫌気条件下で 30MPa 付近に生育至適を持つ嫌気性好圧菌であることが明らかとなった。一方、次世代シーケンサーを用いて、加圧集積された微生物群集の多様性解析を行った結果、*Natronobacillus* 属、*Alkalibacillus* 属、*Marinilactibacillus* 属、*Anoxybacillus* 属などに近縁な微生物が優占種として検出され、50MPa で良好な生育を示した分離株は、集積系においては比較的希少種である可能性が示された。
[まとめ]
下北八戸沖の大深度掘削試料から、好圧菌を含むいくつかの圧力関連微生物の分離培養に成功した。これらの分離株は、Firmicutes のいくつかの系統に属し、高圧・嫌気条件下で良好な生育を示した。現在、その胞子形成能を含む生理・生化学的性状について研究を行っている。

Ocean Drilling Program, High pressure, Piezophile

講演番号：2A09a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ A 校舎 09 会場

化学合成生態系水槽中の微生物学的多様性と現場微生物の分離

Microbial diversity analyses and isolation studies of the chemosynthetic aqualium environment

○吉成 麻有[1]、根本 卓[2]、三宅 裕志[1]、加藤 千明[3] ([1]北里大院海洋生命科学、[2]新江ノ島水族館、[3]海洋研究開発機構)
○Mayu Yoshinari[1], Suguru Nemoto[2], Hiroshi Miyake[1], Chiaki Kato[3] ([1]Kitasato Univ., [2]Enoshima Aquarium, [3]JAMSTEC)

【目的】化学合成生態系では、無脊椎動物の多くが化学合成細菌を体内外に共生させ、それら共生菌から栄養を得て生きている。こうした生態系をより詳細に理解するためには、化学合成系生物を長期的に観察・実験を行うことが必要である。そこで、北里大学と JAMSTEC、新江ノ島水族館では生態系を再現した水槽を設置し、生物の長期飼育・観察実験に取り組んでいる。これらの再現水槽において、化学合成系生物と環境中の微生物との相互作用等を解明することは重要であり、微生物学的な観点からも水槽内の状態を把握することが求められる。そこで本研究において水槽中の様々な観測にあわせて水槽内の微生物相にも注目し、微生物学的多様性解析ならびに現場微生物の分離を行った。
【材料・方法】北里大学チューブワーム飼育水槽（以下、北里水槽）と新江ノ島水族館にある化学合成生態系再現シロウリガイ飼育水槽（CG 水槽）、また同チューブワーム飼育水槽（TW 水槽）の計３つの水槽を対象にサンプリングを行い、直接 DNA を抽出して微生物群集解析を行った。また、各サンプルからの微生物の分離を試みた。
【結果・考察】北里水槽と CG 水槽において、底泥サンプルの嫌気層において大量の嫌気的メタン酸化菌(ANME-3)グループの存在を確認した。一般的に深海底の湧水域においてその存在が主流となっている近縁の ANME-1 や ANME-2 グループは確認されなかったことから、これらの ANME-3 グループの存在は本水槽環境に特有な、嫌気的にメタンを酸化する微生物群集であると考えられる。また CG 水槽においては、硫酸還元菌(SRB)の存在も確認され、同時にγプロテオバクテリアに属する共生細菌に近縁なイオウ酸化細菌の存在が確認されたことから、これらがイオウ酸化に関わる細菌群となっていると考えられる。TW 水槽においては、水槽の底に入れられている小石とその上に存在している微生物マットのサンプルから、εプロテオバクテリアに属するイオウ酸化細菌 SOx の存在が確認された。またこの水槽ではチューブワームが飼育されていることから、小石上のサンプルからγプロテオバクテリアに属するチューブワーム共生細菌の存在も示唆された。これらのサンプルを用いた微生物分離培養実験では、難培養性のイオウ酸化菌や硫酸還元菌の分離が確認された。
日本近海のコールドシープで観察される微生物相と比較すると、一部に違いが見られるが、硫酸還元バクテリア(SRB)とコンソーシアムを構成する嫌気的メタン酸化アーキア(ANME)の両者の存在が確認されたことから、これらの水槽中である程度は天然環境が再現されていると考えられる。

chemosynthetic ecosystem, aquarium, microorganisms

講演番号：2A09a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ A 校舎 09 会場

佐鳴湖より見出された孔径 0.2μm フィルターを通過可能な極小細菌の解析

Characterization of ultramicrobacteria isolated from Lake Sanaru

○福田 洸平[1]、石堂 真輝[2]、飯田 健義[1]、居波 渉[1]、川田 善正[3]、金原 和秀[1]、新谷 政己[1] ([1]静大院工、[2]静大・工、[3]静大・電研)
○Kohei FUKUDA[1], Masaki ISHIDO[2], Takeyoshi IIDA[1], Wataru INAMI[1], Yoshimasa KAWATA[3], Kazuhide KIMBARA[1], Masaki SHINTANI[1] ([1]Grad. School of eng. Shizuoka Univ., [2]School of eng. Shizuoka Univ., [3]Research institute of electronics Shizuoka Univ.)

【目的】佐鳴湖は，高い化学的酸素要求量（COD）が問題となっている汽水湖である．水深が浅く，川で連結する浜名湖から海の潮汐によって水が逆流し，長期にわたり湖水が滞留している．従って，佐鳴湖には新奇の微生物を含む，様々な微生物が生息している可能性が高い．我々は，佐鳴湖から，一般的に濾過滅菌に用いられる孔径 0.2 μm のフィルターを通過し，コロニーを形成する細菌を複数種類発見した．このような細菌は ultramicrobacteria (UMB)とよばれ，氷河等の特殊な環境から発見されることが多い．本研究では，佐鳴湖に生息する，培養可能な極微小細菌について，その生理・生態について理解することを目的として実験を行った．

【方法】佐鳴湖で採取した湖水を，孔径 0.2 μm メンブレンフィルターで濾過した試料を，1/3 に希釈した LB（1/3LB）培地に塗布した．得られたコロニーについて単離操作を行った後，1/3LB 液体培地に懸濁して，再度濾過を行っても培地に生育することを確かめた．得られた菌体について 16S rRNA 遺伝配列を決定し，系統解析を行った．また，数種の UMB 候補株については，走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて菌体の大きさを視覚的に観察した．SEM 観察に供する試料の固定は，0.2 μm フィルターを通した菌体を集菌後，4%パラホルムアルデヒド PBS 溶液によって行い，エタノールにて脱水した．その後，金粒子で表面加工（およそ 10 nm）し，SEM 観察に供した．

【結果と考察】孔径 0.2μm メンブレンフィルターを通過可能な，7 株の菌体の単離に成功した．各菌株の 16S rRNA 遺伝子配列から，1 株（Ys 株と命名）は *Bacteroidetes* 門に属する菌株と推定された．他の 6 株については，4 株が *Hylemonella gracilis* ATCC 19624（相同性 99%）と，1 株が *Acidovorax caeni*R-24608 (相同性 99%)と，もう 1 株は最近，新種提案された *Imperialibacter roseus* P4 (相同性 99%)と相同性が高かった [1)]．このうち *H. gracilis* にはフィルターを通過する類縁株が存在することが報告されている [2)]．Y 株について系統分類したところ，類縁株のほとんどは未培養で，属種の同定されていない菌株であったため，本菌株が新種であると示唆された．さらに，Y 株について SEM で視覚的に観察した結果，0.2 μm よりも小さい球菌であると考えられた．現在 Y 株について脂肪酸分析等，さらに詳細な表現性状の解析を行っている．

(1) Wang et al., *Int J Syst Evol Microbiol*, (2013), 63(11): 4136-4140.
(2) Nakai et al., *Antarct Sci*, (2013), 25(2): 219-228.

Ultramicrobacteria, isolation, Bacteriodetes

講演番号：2A09a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ A 校舎 09 会場

モザンビークのダイズ根粒菌の系統解析

Phylogenetic analysis of soybean bradyrhizobia in Mozambique

○安藤 康雄[1]、伊藤 治[2]、辻本 泰弘[1]、大矢 徹治[1]、ボイナ グイルヘルミノ[3]、コリアール ヘンリクエス ビクトール[3]、飛田 哲[1]([1]国際農林水産業研究センター、[2]国連大学、[3]モザンビーク農業研究所)
○Yasuo ANDO[1], Osamu ITO[2], Yasuhiro TSUJIMOTO[1], Tetsuji OOYA[1], Guilhermino BOINA[3], Henriques Victor COLIAL[3], Satoshi TOBITA[1] ([1]JIRCAS, [2]United Nations Univ., [3]IIAM)

モザンビークは，南部アフリカ東側に位置し，熱帯性・亜熱帯性気候に属している。筆者らは，モザンビークの主要自給作物であるトウモロコシに新規換金作物であるダイズを組み合わせた間作技術の開発を目的として研究を実施し，ダイズの導入がトウモロコシの生産量を増加させることを明らかにした。しかし，モザンビークでのダイズ根粒菌に関する情報がほとんどなかったことから，どのようなダイズ根粒菌が分布しているのかを知るために，窒素固定遺伝子の一つである *nifD* 遺伝子の塩基配列を決定して解析を行い，その結果を 2013 年度の大会で報告した(安藤ら，日本農芸化学会大会 2013 年度大会講演要旨集 p.632)。今回は，新たなダイズ根粒菌サンプルを追加して，窒素固定遺伝子の一つである *nifD* 遺伝子，16S rRNA 遺伝子，16S-23S ITS 領域の塩基配列を決定し，系統解析を行った。

モザンビーク北部のナカラ回廊周辺の Lichinga(標高約 1,500m)，Mutuali(同 約 550m)，Mutequlesse(同 約 650m)，Ruace(同 約 700m)，Muriaze(同 400m)の5地域8ほ場で栽培のダイズ根から根粒を採取し洗浄後に，それを1個ずつFTAプラントセーバーカード上でつぶしてサンプルを染みこませたのち風乾して，乾燥状態のまま持ち帰った。上記カードから直径 2mm のディスク片を打ち抜き洗浄を行ったのち，PCR に供した。*nifD* 遺伝子では nifD-70F と nifD-904R を，16S rRNA 遺伝子では 1-F と 3-R を，ITS 領域では 16S-F と23S-Rをプライマーとして用いた(Risal ら，2010)。PCR 増幅産物のダイレクトシークエンスを行い，得られた部分塩基配列について BLAST 解析を行うとともに，系統樹を作成した。

モザンビークのダイズ根粒菌の *nifD* 遺伝子，16S rRNA，ITS 領域の塩基配列の多くは，*Bradyrhizobium elkanii* と相同性が高く，どの圃場でも検出された。これに対し，*B. japonicum* と *B. yuanmingense* と相同性の高い配列はわずかであった。さらに，未だ分類が明確にされていない *Bradyrhizobium* sp.と相同性が高いグループの配列が一部の圃場でみられ，これらの中には *Vigna* 属(ササゲなど)の根粒菌との関連性が推定されるものがあった。

soybean, Bradyrhizobium

講演番号：2A09a17
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ A 校舎 09 会場

Feed-back isolation and identification of thermotolerant bacteria within mixed culture system

○Pramod Poudel[1], Yukihiro Tashiro[1], Maiko Yadomi[1], Hirokuni Miyamoto[2], Kenji Sakai[1] ([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]Japan Eco-science)

Marine-animal-resources (MAR) compost has been produced under thermophilic temperatures (50-70°C), and used as a crop fertilizer in Japan (1). In addition, MAR compost was used as the seed of mixed culture for optically pure L-lactic acid (LA) production (2). Previous studies on bacterial structure community analysis by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) method revealed the existences of several strains (*Bacillus thermocloacae B. humi, B. ruris, B. coagulans*, *B. smithii*, and *Corynebacterium sphenisci*)in MAR composts or LA fermentation broth (1, 2). Although an isolation of these bacteria should be important to construct a simplified community for production of MAR compost and LA, it has been considered to be difficult to isolate some of them. The aim of this study was to isolate those strains and the other novel thermotolerant bacteria with 'feed-back isolation strategy' by designing isolation conditions obtained from the literatures and with rapid screening method by using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) technique.

Based on information from several literatures, we investigated specific growth parameters (media, temperature, pH etc) for the isolations from MAR compost and LA fermentation broth. The selected isolates were screened by MALDI-TOF-MS technique and were identified by their morphological, biochemical and genetic approaches. As the results, all the isolates exhibited gram-positive spore forming rod bacteria. Optimal growth temperature ranged between 45–50°C, indicating thermotolerance of the isolates. The results of colony level MALDI-TOF-MS screening showed good correspondence with 16S rRNA gene sequence results. The 16S rRNA gene sequence similarity score (>98%) of isolated strains resembled to *B. coagulans*, *B. humi*, *B. ruris*, *B. smithi*, *B. subtilis*, *Paenibacillus barengoltzii*. Therefore, we succeeded in isolations of several *Bacillus* strains detected by DGGE method previously. In addition to these bacteria, some isolates formed a different cluster in the phylogenetic tree showing low 16S rRNA gene sequence similarity score (<94%) with isolates in database. In addition, we proposed a novel *Bacillus* species by the analysis of DNA-DNA hybridization, cell wall peptidoglycan type, and fatty acid compositions (3).

(1) Niisawa et al, J Gen Appl Microbiol, 54, 149-158, 2008. (2) Tashiro et al, Bioresour Technol, 146, 672-681, 2013. (3) Poudel et al, Int J Syst Evol Microbiol, submitted.

MAR-compost, Feed-back isolation, thermotolerant *Bacillus*

講演番号：2A09p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ A 校舎 09 会場

循環型汚水浄化槽内におけるアンモニア酸化細菌およびアンモニア酸化古細菌の動態解析

Kinetic analyses of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in the lab-scale wastewater treatment system

○甲木 幸絵[1]、冨田 希[2]、鈴木 智順[1] ([1]東理大院応生物、[2]東理大応生)
○Sachie KATUKI[1], Nozomi TOMITA[2], Tomonori SUZUKI[1] ([1]Tokyo Univ of Sience.Department of Applied Biological Science, [2]Tokyo Univ of Science)

【目的】環境中のタンパク質の分解過程でアンモニアが生じる。このアンモニアは富栄養化を引き起こす要因の 1 つである。アンモニアの除去には、アンモニアの酸化を行う微生物であるアンモニア酸化細菌およびアンモニア酸化古細菌が関わっている。窒素循環の一部であるアンモニアの酸化を担っているこれらの微生物に関しては、その生態などについてまだ不明な点が多い。またアンモニア酸化細菌は偏性無機栄養生物であり、有機物存在下ではコロニーを形成しないことが分かっている。本研究では、有機物量の変化がこれらの微生物のアンモニア酸化能力にどのような影響をおよぼすのかを解明することを目的とした。
【方法】生物学的な有機物分解過程で生じるアンモニアの酸化過程を細菌叢と水質の両方の変化に基づいてモニタリングできる循環型汚水処理装置を構築した。この装置は好気層と嫌気層からなる処理槽で構成され、装置内を汚水が循環することで様々な分解反応が進む。また、処理槽の好気層と嫌気層には、微生物が定着する担体として立方体のスポンジキューブが充填されている。この装置を用い、生物学的な有機物分解過程で生じるアンモニアの酸化過程を細菌叢およびアンモニア態窒素量と亜硝酸態窒素量の両方の変化に基づいてモニタリングしている。アンモニア酸化細菌およびアンモニア酸化古細菌は好気性化学合成独立栄養微生物であるため、処理槽内の好気層からサンプリングを行った。処理槽内のアンモニア酸化の過程を観るため、0 から 120 時間で定期的にサンプルを採取した。通常濃度とその 5 倍量の有機物量の人工汚水を投入した際の比較を行った。
【結果】アンモニアおよび亜硝酸態窒素測定を行った結果、測定開始から 48 時間後までは、アンモニアの減少と亜硝酸の増加に関連がみられたが、60 時間以降はあまり関連がみられなかった。5 倍の有機物量を投入した際には、投入の 3 時間後に亜硝酸態窒素量が汚水投入初期の 1.8 倍に増加し、6 時間後にはその 1/4 まで減少した。また、通常時と比較してアンモニア態窒素および亜硝酸態窒素量に大きな変化は見られなかった。現在、有機物量を変化させた閉鎖系で培養を行い、アンモニアおよび亜硝酸、硝酸態窒素濃度を測定し、アンモニア酸化細菌およびアンモニア酸化古細菌に対する有機物量の影響をみているところであり、あわせて報告する予定である。

ammonia-oxidizing bacteria, ammonia-oxidizing archaea, wastewater treatment system

講演番号：2A09p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ A 校舎 09 会場

循環型汚水浄化装置における細菌叢遷移とタンパク質の解析

Dynamics of the bacterial community compositions and the analyses of the protein synthesis and the degradation in the lab-scale wastewater treatment system

○有見 芳樹[1]、山崎 拓登[2]、鈴木 智順[1] ([1]東理大院応生、[2]東理大応生)
○Yoshiki ARIMI[1], Takuto YAMASAKI[2], Tomonori SUZUKI[1] ([1]Tokyo Univ of Science Department of Applied Biological Science, [2]Tokyo Univ of Science)

【目的】水質浄化において窒素やリン、難分解性物質など特定の物質の分解機構は盛んに研究されているが、普遍的な微生物活動である易分解性有機物の分解に関わる細菌群の種類や除去機構は十分に解明されていない。本研究では、普遍的な有機物分解反応の解明を目的として、複合微生物系におけるタンパク質の代謝に着目した。具体的には、易分解性有機物の分解に関わる細菌群の種類とタンパク質の合成・分解を解析し、それらの関連を見ることである。
【方法】有機物分解過程を細菌叢、水質の両面でモニタリングが可能なラボスケールの循環型汚水浄化装置を構築した。これは好気層、嫌気層からなるスポンジ担体層と攪拌槽からなり、好気・嫌気的な逐次的反応系を持つ装置である。この装置に人工汚水を循環させ、装置内の担体に定着させた微生物群により有機物の分解を行っている。人工汚水を投入した時点から経過時間毎に細菌叢と水質の変化を追った。細菌群集構造解析のため、16S rDNA PCR-DGGE 法を行った。また代謝活性の高い細菌叢を解析するため、16S rRNA RT-PCR-DGGE 法を行った。さらにタンパク質分解反応の過程を解析するため、各種プロテアーゼ活性（Aminopeptidase、Trypsin、Chymotrypsin 型の計 3 種類）の測定、水質項目として TOC、COD、BOD、pH、タンパク質量、アンモニア態窒素量をそれぞれ測定した。
【結果】前任者の結果より、装置内には *Bacteroidetes* 門、*Alcaligenes* 属、*Firmicutes* 門に属する細菌が恒常的に定着しており、有機物分解に積極的に関与すると考えられるものが *Bacteroidetes* 門、*Firmicutes* 門に属する細菌であったことが確認されている。従来の装置は好気層、嫌気層からなる担体層と人工汚水を供給する攪拌槽で構成されていたが、攪拌槽で更なる有機物分解反応が起こり、好気、嫌気的な逐次的反応系を見る目的を果たしていないことが示唆されたので、一部改変し、攪拌槽を取り除いた新たな浄化装置を構築した。COD は従来のものと同様な挙動が見られ、再現性が得られた。今回、従来よりも水質測定項目を増やし、有機物分解過程の更なる優位性を確認すると共に、細菌叢の変化を追った。汚水処理中の COD と TOC は好気層、嫌気層それぞれ 3 h、6 h でピークに達し、その後は減少傾向が見られたが、BOD や他の測定項目は複数のピークが観察された。COD と TOC 計測により観察された総体的な有機物の減少と、他の項目で確認された挙動の違いから、有機物の分解過程は合成と分解による顕著なタンパク質の増減が繰り返されて進行すると考えられる。また、その各反応に伴い細菌叢の変化が見られると予想される。細菌叢の変化と代謝活性の高い細菌叢の変化については PCR-DGGE 法と RT-PCR-DGGE 法によって解析し、報告する予定である。

PCR-DGGE, waste water, protein degradation

講演番号：2A09p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 09 会場

循環型モデル浄化槽における細菌および真核微生物の有機物分解能と微生物叢の変動解析

Comparative analysis of organic matter degrading ability and microbial flora of bacteria and eukaryote in the lab-scale wastewater treatment system

○高城 茉那[1]、近藤 仁美[2]、鈴木 智順[1] ([1]東理大院理工、[2]東理大理工)
○ Mana TAKAGI[1], Hitomi KONDOU[2], Tomonori SUZUKI[1] ([1]Tokyo University of Science Department of Applied Biological Science, [2]Tokyo University of Science)

【目的】循環型モデル浄化槽では、細菌・真菌・原生生物など様々な生物が定着し、種々の代謝を行っている。本研究では、その中でも細菌と真核微生物に着目し、有機物分解に関与する微生物叢や、細菌と真核微生物との相互作用が有機物分解能にどのような影響を与えるかを解明することで、自然界における有機物分解のメカニズムについてより詳細に明らかにすることを目的としている。
【方法・結果】細菌や真核微生物などが混在する循環型モデル浄化槽のサンプルに加え、3 μm のメンブレンフィルターを用いて浄化槽サンプルから真核微生物を除去し、細菌のみにしたサンプル、浄化槽サンプルから純粋分離した真核微生物株を混合したサンプルの計 3 種類のサンプルを作製した。各サンプルを人工汚水 150 ml が入った坂口フラスコに接種後、振盪培養し、培養液の BOD、COD、pH、アンモニア態窒素量、微生物数の挙動を継時的に追う方法で、それぞれの有機物分解能を比較した。微生物の代謝活性は、rRNA を抽出し、RT-PCR-DGGE 法により解析した。その結果、BOD、COD の挙動から見る有機物分解能は、「細菌サンプル」＞「浄化槽サンプル」＞「真核微生物サンプル」の順に高かったため、有機物分解能は細菌のみの方が高いことが判明した。微生物数の計数結果からは、細菌サンプルの方が浄化槽サンプル内の細菌よりも多く増殖しており、浄化槽サンプル内の細菌は増殖が抑えられていることがわかった。このことと、浄化槽サンプル内には原生生物が存在していることから、浄化槽内で細菌は原生生物に捕食されている可能性が示された。16S rRNA 遺伝子の PCR 産物の DGGE バンドパターンから、細菌のみのサンプルも浄化槽サンプルも、時間経過に伴い細菌量が増加し、96 h が最も細菌量が多かった。それに対し、16S rRNA の RT-PCR 産物の DGGE バンドパターンから、細菌のみのサンプルも浄化槽サンプルも、12～96 h で高い代謝活性が見られたが、細菌のみのサンプルでは、特に 12, 24 h で最も代謝活性が高く、また浄化槽サンプルでは、24, 36 h で最も代謝活性が高かった。よって、細菌量が最も多い時に、代謝活性が高い状態になっているとは限らないことが示唆された。

Microbial ecology, Protozoan, RT-PCR-DGGE

講演番号：2A09p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 09 会場

空中浮遊細菌の形態とその存在割合に関する調査

Analyses on the morphology and the existence ratio of airborn bacteria

○今野 奈津子[1]、森下 航[2]、鈴木 智順[1] ([1]東理大院理工、[2]東理大理工)
○Natsuko KONNO[1], Wataru MORISHITA[2], Tomonori SUZUKI[1] ([1]Tokyo university of Graduate school of Science, [2]Tokyo university of Science)

【背景・目的】これまでの研究で、さまざまな環境における空中浮遊細菌叢が解明されつつあるが、それらが栄養細胞状態で存在するのか、芽胞状態で存在するのかについては、ほとんど明らかにされていない。しかも、芽胞状態の細菌は、物理的・化学的な耐性を持つため、通常の DNA 抽出法を用いた分子生物学的な検出方法では、その存在を検出できない。そこで本研究において、芽胞からの DNA 抽出法の検討を行った。さらに、空中浮遊細菌の細胞がどのような形態で、どのくらいの割合で存在しているのか、また、芽胞状態で浮遊している細菌にはどのような種類が存在しているのかを明らかにしようと試みた。
【方法】1．*Bacillus subtilis* IAM12118^T の芽胞 80 mg から塩化ベンジル法を基本として DNA を抽出した。芽胞の破砕方法は次の条件で検討を行った。(1)凍結融解 3 回、(2)ビーズビーティング、(3)超音波、(4)TiO_2 による光触媒効果。抽出・精製操作後のサンプルは、アガロースゲル電気泳動で DNA の状態を判定した。 2．エアーサンプラーを用いて、空気 3000 L 分の浮遊物をグリセリンシャーレに捕集した。捕集した浮遊サンプルはグリセリンと共に Saline EDTA (pH 8)に懸濁して等分した。各々に対して別々の DNA 抽出方法（凍結融解、ビーズビーティング、超音波、TiO_2 による光触媒効果）を施した。得られた DNA サンプルで PCR-DGGE を行い、バンドパターンを比較した。
【結果】1．塩化ベンジル法のみでは芽胞から DNA がほとんど抽出できなかった。また、(1)凍結融解を 3 回繰り返しても DNA 抽出効率はほとんど向上しなかった。(2)ビーズビーティング処理の結果、DNA 抽出効率は格段に向上したが、芽胞外に出た DNA がビーズビーティングで切断され、アガロースゲル電気泳動した結果、スメア状のバンドが観察された。そこで、ビーズビーティングの条件は検討を行い、その最適条件を報告する予定である。(3)超音波処理でも、スメア状ではあるものの DNA のバンドが確認できた。(4)粒子状の TiO_2 存在下で 2.0 mW/cm^2, 24 時間光照射したところ、10^7 cells/ml の芽胞から DNA の抽出ができた。 2．エアーサンプラーを用いて回収した空中浮遊細菌から、複数の方法で DNA 抽出し、PCR-DGGE を行ったところ、DNA 抽出方法によって各々のサンプル由来のバンドパターンが異なった。すなわち、DNA 抽出方法によって検出できる微生物種が異なることが示唆された。これらを比較解析することにより、芽胞状態で存在する空中浮遊細菌と、栄養状態で存在する空中浮遊細菌の種類と割合を明らかにしていくとともに、ヒートショック発芽を利用するなど、より安価で簡便な方法を模索していく。

spore, DNA extraction, airborn bacteria

講演番号：2A09p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 09 会場

Study on bacterial population dynamics in association with biofumigant application

○MD ROKUNUZZAMAN[1], Ayumi HayaKawa[2], Shinzo Yamane[2], Sota Tanaka[2], Kouhei Ohnishi[3]
([1]The United Graduate School of Agricultural Sciences, Ehime University, [2]Faculty of Agriculture, Kochi University, [3]Research Institute of Molecular Genetics, Kochi University)

Due to the adverse impacts, an effective fumigant methyl bromide has been banned in several countries, and alternative biofumigants have been searched. Little is known about the effect of biofumigation on microbial communities. A method using 16S rRNA partial sequence, such as PCR-DGGE method and high through-put next generation sequencing has been used for analyzing bacterial communities. In this study, we evaluated the bacterial communities after applying different soil disinfection materials by using these methods. Chemical fumigant chloropicrin, reductive treatment with wheat bran, chemical treatment with ethanol, and biofumigation with mustard green plant (*Brassica juncea*) was applied in isolated containers. Tomato seedlings were planted when disinfection treatment was completed. Soil DNA was periodically extracted throughout the study and partial fragments of the 16S rRNA gene were PCR amplified. Amplified fragments were separated on DGGE with 8% polyacrylamide and a range of 40%-70% denaturing agent. Next-generation sequencing was conducted using the 454 pyrosequencing titanium platform. Raw sequences were processed and analyzed using QIIME through OTUMAMi. Ribosomal Data Base Project (RDP) was used for classifying the sequences into phylum/class; clustering the sequences into operational taxonomic units (OTUs) and Chao I richness was estimated from OTUs. Based on DGGE profiles, no significant difference of bacterial communities on biofumigant treatment were observed from those of control soils without treatment, indicating that biofumigation is a very natural way to control the soil pests. Reductive disinfection with wheat bran also showed a little effect on bacteria communities. On the other hand, chloropicrin treatment greatly changed the bacterial communities. On the basis of analysis of organic carbon in soils, biomasses in the chloropicrin-treated soils were significantly lowered; showing not only structures but also numbers of bacteria was influenced by chloropicrin treatment. These results were supported by high through-put next-generation sequencing analysis. The Chao1 OUT richness estimate (maximum distance of 0.03; species level grouping) indicated that bacterial species in chloropicrin-treated soils was about one-half of those in other soils. Dominant species in chloropicrin-treated soils were also quite different from those in other soils. Abundant species in mustard green-treated soils were almost identical with those in control soils. We found tomato planting did not affect bacterial communities very much. Abundant bacterial species before and after planting tomato in most of soils did not change.

soil bacteria, biofumigant, mastardgreen plants

講演番号：2A09p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 09 会場

テルルを代謝する新規海洋性微生物の獲得とその機能解析

Isolation and characterization of novel marine microorganisms, which metabolize Tellurium

○堀池 巧[1,3]、大塚 治[1]、田中 康寛[2]、寺原 猛[3]、今田 千秋[3]、山下 光雄[1,2]([1]芝浦工大　SIT 総研レアメタルバイオリサーチセンター、[2]芝浦工大　応化、[3]東京海洋大院　海洋科学)
○Takumi HORIIKE[1,3], Osamu OOTSUKA[1], Yasuhiro TANAKA[2], Takeshi TERAHARA[3], Chiaki IMADA[3], Mitsuo YAMASHITA[1,2] ([1]RMBC, Res. Org. Adv. Eng. SIT, Shibaura Inst. Tech., [2]Appl. Chem., Eng., Shibaura Inst. Tech., [3]Tokyo Univ. of Marine Sci. Tech.)

【背景】レアメタルの一種であるテルル(Te)は、自動車や精密機器の鋼材料の快削性、強靭性、耐蝕性の向上や、太陽電池などの半導体材料に利用されており、その需要が増加している。Te は工業的に幅広い用途で使用されるが、生体に対する高い毒性を有しているため、水質汚濁防止法の要調査項目に指定されている。高い毒性や近年の使用量の増加から、排出される Te の潜在的な環境負荷は小さくないと考えられる。これらのことから、特殊な微生物の有する金属代謝機能を活用した廃水中の Te の除去・再資源化技術の確立を目指している。高濃度 Te を含む実際の廃水には、多種多様なマトリクスが含まれていることから、本研究では、実際の廃水に適応できる有用な Te 代謝微生物を網羅的に獲得し、それらの Te 代謝能を解析することとした。

【方法】Te 代謝微生物を、海洋環境試料からスクリーニングした。テルル酸を含む液体培地に環境試料を添加し、黒色を示す培養液を集積した。最終的には、テルル酸を含む寒天培地を用いて黒く呈色するコロニーを単離した。単離された菌株の 16SrDNA 部分領域の相同性検索により、菌種を同定した。Te 代謝能の解析は、誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-AES)を用いて培養液中の上清および沈殿物中の Te 濃度を定量分析することにより行った。電子顕微鏡-エネルギー分散型 X 線解析装置(SEM-EDX)により菌体および沈殿物の元素分析を行った。

【結果】海洋環境試料 34 地点からテルル酸を含む寒天培地上でコロニーが黒く呈色した 28 菌株を単離した。すべての菌株は、テルル酸を含む液体培地で培養すると溶存 Te を減少させて、黒色沈殿物を生成した。SEM-EDX により、この黒色沈殿物が高濃度に Te を含んでいた。これらの事から、単離した菌株はテルル酸を還元し、元素態テルルに変換できる能力を持つと思われる。16S rDNA 部分領域の相同性検索により、単離された微生物は、*Pseudoalteromonas* sp.や *Vibrio* sp.、*Sulfitobacter* sp.などに分類された。調べた限りにおいて、これらの菌種はテルル酸還元能の報告がない新規の細菌であった。

tellurate reduction, tellurium mineralization, marine microorganism

講演番号：2A09p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 09 会場

アニリン資化性糸状菌の分離
Isolation of aniline-assimilating filamentous fungus
○河合 淳支[1,2]、村上 周一郎[2,3]（[1]明治大学院農、[2]日本農芸化学会、[3]明治大学農農化）
○ATSUSHI KAWAI[1,2], SHUICHIRO MURAKAMI[2,3] ([1]Grad. Sch. Agric., Meiji Univ., [2]JSBBA, [3]Sch. Agric., Meiji Univ.)

【目的】アニリンは、有機合成の分野で合成の原料や中間体として利用されており、また環境汚染物質として報告されている含窒素芳香族化合物の 1 つである。これまでに、細菌におけるアニリンの代謝経路は、詳細に解析が進められてきたが、真菌によるアニリン代謝に関する報告は限られている。そこで本研究では、普遍的に存在し、かつ多様である糸状菌をターゲットとして、アニリンを資化できる糸状菌の分離を試みた。
【方法】①目的菌株の分離：0.05%アニリンを唯一の炭素源、および窒素源として含む液体培地に土壌懸濁液を加え、集積培養した。糸状菌の生育が認められたものについて、残存するアニリンをジアゾカップリング法により定量し、アニリンの減少が見られた試料を新しい培地に継代した。再度アニリンの減少が観察された試料から糸状菌を純粋分離し、その再現性を確認した。②分離菌株の同定：28S rRNA 遺伝子の解析、および形態学的観察により同定した。③代謝産物の分析：分離菌株を MY 培地（2.0% malt extract、0.3% yeast extract）に植菌し、30℃で 2 日間培養した。得られた菌体を生理食塩水で洗浄した後、アニリンを含む液体培地に加えて培養し、培養上清中に存在する代謝産物を TLC、および HPLC により分析した。
【結果】291 種の土壌サンプルを用いてスクリーニングを行った結果、培養 17 日目において、約 30%のアニリンが減少、培養 34 日目においては、41～66%の減少が確認できる 4 種の培養物を得ることができた。この 4 種の培養物から純粋分離を行った結果、8 種の糸状菌が得られた。分離菌株を用いてアニリン分解の再現性を調べたところ、11g6W 株は、培養開始 38 日目の培養上清において 53%のアニリンの減少が確認された。11g6W 株の 28S rRNA 遺伝子の部分塩基配列は、4 種の *Aspergillus* 属糸状菌と 99.8%の同一性を示した。また、本菌の形態観察から、*Aspergillus* 属様の分生子が確認され、この菌を *Aspergillus* sp.と同定した。TLC 分析により、11g6W 株の培養上清中には、アニリン（*Rf* 値：0.43）とは異なる 254 nm の紫外部吸収を示す化合物（*Rf* 値：0.97）を見出した。この物質の *Rf* 値が標品のアセトアニリドの *Rf* 値と一致したことから、この化合物がアセトアニリドである可能性が示唆された。また HPLC 分析により、培養開始 9 時間目からアセトアニリドの蓄積が確認され、128 時間後には、0.9 mM のアセトアニリドが蓄積した。さらに、培養経過に伴い、280 nm の紫外部吸収を示す、アセトアニリドとは異なるいくつかの化合物が観察された。現在、高速液体クロマトグラフ質量分析計を用いて、これらの化合物を分析しているところである。

aniline, acetanilide, *Aspergillus*

講演番号：2A09p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 09 会場

MALDI-TOF-MS を用いた糸状菌類のタイピングにおける種間および種内変異の検討
Detection of intra- and inter-specific diversity by MALDI-TOF-MS for fungal typing

○濱田 亮祐、堀沢 栄（高知工科大学）
○Ryosuke HAMADA, Sakae HORISAWA (Kochi Univ. Tech.)

糸状菌類の正確な同定は、微生物分解、医療関連、抗菌剤開発など様々な分野で必要とされる。しかしながら、現状では形態的特徴に頼るところが大きく、この方法では時間がかかる、誤同定が起こりやすいなどの問題がある。一方で、MALDI-TOF MS は従来法と比較すると、迅速かつ正確な結果が得られ低コストであることが特徴である。

MALDI-TOF MS の測定は約 2,000~20,000（Da）の分子量の範囲でリボソームタンパクを対象とする。リボソームタンパク質は菌体内での発現量が多く、塩基性タンパク質であるためイオン化されやすい。また分子量が 5,000~20,000（Da）程度であるため、数 Da 程度の誤差範囲で比較的正確に質量を求められる。取得されたマススペクトルパターンは、既にデータベース化されている菌株のマススペクトルパターンと比較することにより、どのような種・菌株と近縁であるかを解析し、同定するしくみである。

MALDI-TOF MS を用いたバクテリア同定法の研究報告は数多くあるが、糸状菌類、特に担子菌類を報告例はまだ少ない。本研究では、子のう類、担子菌にもその応用ができないかと考え、MALDI-TOF MS を用いて子のう類や担子菌類のマススペクトルを取得し、種間および種内での再現性を検討した。糸状菌類は強固な細胞壁を持つため、安定した測定結果を得るためには細胞壁を破砕しタンパク質抽出を行う必要がある。また分子量の小さいタンパク質に適したマトリクスを選択する必要がある。本研究では、タンパク質抽出方法およびマトリックスについて最適な条件を検討した。各菌種・菌株の MS スペクトルの種間・種内のパターンを検討し、種やグループ、あるいは株それぞれのプロファイルを試みた。

MALDI-TOF-MS, fungal typing, identification

講演番号：2A09p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 09 会場

逆転写と多制限酵素断片長多型を組合わせた食品由来大腸菌の迅速同定

Combination of reverse transcription and multienzyme restriction fragment length polymorphism analysis for rapid detection of Escherichia coli

○細田 晃文[1]、駒場 新[2]、岸本 満[2]、田村 廣人[1] ([1]名城大農、[2]名芸大)
○Akifumi HOSODA[1], Arata KOMABA[2], Michiru KISHIMOTO[2], Hiroto TAMURA[1] ([1]Meijo Univ., [2]NUAS)

現在，生鮮食品などを汚染する病原性微生物のモニタリングには，当該微生物に合わせた培地による培養法が用いられている。しかし，本法では培養に数日を要するため，時として解析結果を得る前に汚染した商品が出荷され，消費者へ渡ることが問題となる。このような問題を解決するために講演者らは，大腸菌 K-12 株および O157:H7（GTC14536）などの病原性大腸菌を接種（0 CFU/g および 1×10^1～10^4 CFU/g）したモデル食品サンプルからの RNA 抽出法と細菌同定システムの有効性を確認した。RNA 抽出の前に，37℃，16 時間 LB 培地で前培養した大腸菌の生理食塩水懸濁液（1×10^8 CFU/mL）を調製した。これを２分した後，１つは生細胞とし，もう１つはオートクレーブ滅菌（121℃，15 分）により死細胞とし，段階希釈後，モデル食品に接種した。マスティケーターによりモデル食品を破砕した後，懸濁液を回収し RNA 抽出を行った。RNA 抽出では，High Pure RNA isolation kit（Roche）を改変し，抽出濃度は分光光度計により測定した。各希釈サンプルから抽出した RNA（50～100 ng）を用いてランダム 6 mer をプライマーとして cDNA を合成した（High Capacity cDNA Reverse Transcription kit; Life Technologies）。得られた cDNA を鋳型として KAPA2G Fast PCR kit（KAPA Biosystems）を用いた PCR により標的遺伝子（16S rDNA）を増幅した。各希釈サンプル由来の PCR 産物は２種の制限酵素 *Hha*I および *Hae*III）による消化（37℃，15 分）およびマイクロチップ電気泳動（MultiNA MCE-202; Shimadzu）による RFLP 解析を行った。また，希釈率を確認するために SYBR Green 法による定量 PCR（StepOne plus™ Real-Time PCR system; Life Technologies）を行った。RNA 抽出の結果，生細胞および死細胞由来のサンプル全ておよび 0 CFU/g からも分光学的な数値が確認された。しかし，死細胞および 0 CFU/g 由来のサンプルから PCR 産物は得られなかった。また，生細胞由来の RNA 純度（A260/280）は，0.89～1.8 であった。本研究で用いたプライマーでの PCR 解析により，生細胞サンプルにおいてのみ 1×10^1 CFU/g まで病原性大腸菌を検出できることが明らかとなった。また，RFLP 解析から PCR により得られた DNA 断片は理論的な大腸菌の断片サイズと一致したことから，食品サンプル中の生きた大腸菌を標的として，逆転写－多制限酵素断片長多型（RT-MeRFLP）により同定可能であることが示唆された。また，本研究で行った RT-MeRFLP による大腸菌の検出・同定は，RNA 抽出から cDNA 合成，PCR および RFLP 解析までの所要時間は約 6.5 時間であり，低価格で迅速かつ信頼性を有する食品中の「生きた微生物」を同定する手法となり得ることが示された。

RNA extraction, cDNA, Multienzyme restriction fragment length polymorphism

講演番号：2A09p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 09 会場

Pseudozyma 属酵母が植物体上で分泌する糖脂質マンノシルエリスリトールリピッドは、生息域の拡大に関与する
Mannosylerythritol lipid secreted by phyllosphere yeast *Pseudozyma antarctica* plays a role for filamentous growth and propagation on plant surfaces
○北本 宏子[1]、吉田 重信[1]、森田 友岳[2] ([1](独)農環研、[2](独)産総研)
○Hiroko Kitamoto[1], Shigenobu Yoshida[1], Tomotake Morita[2] ([1]NIAES, [2]AIST)

葉面常在酵母 *Pseudozyma antarctica* は、油や糖質を炭素源に用いた液体培養中で、糖脂質(マンノシルエリスリトールリピッド, MEL) を著量分泌生産することが知られている。MEL は、固体表面の「ぬれ性」を高めるなどの優れた形質を有し、また最近、高機能な皮膚保湿剤としての特性が見出されたことから化粧品に実用化されている。一方、*P. antarctica* の植物体上での MEL 生産性や、その生態的役割は判っていない。そこで我々は、MEL の生態的役割を明らかにすることを目的として、葉の表面における細胞形態の観察と MEL 生合成を調べ、MEL が常在菌の葉面での生息域拡大に重要な役割を持つことを見出したので報告する。

本研究では、MEL を生産する *P. antarctica* T34 株と、MEL 合成に必須であるマンノース転移酵素遺伝子（*EMT1*）を破壊した MEL 非生産株（*⊿emt1* 株）を実験に用いた。既に、*⊿emt1* 株の細胞の伸張性が、MEL 生産用の液体培地中で抑制されることは明らかとなっている[1]。今回は、さらに固体表面上での細胞の状態を比較するため、各菌株をプラスチックフィルムやタマネギ表皮の疎水表面等に滴下し、接着している細胞の形態変化を経時的に観察した。その結果、T34 株の細胞は速やかに伸張するが、*⊿emt1* 株は伸張が遅れ、多くの細胞が酵母状の形態を維持することが分かった。また、ムギおよびイネ葉面上で T34 株細胞は、伸張しつつ成長し、葉の表面を覆うように生息域を広げることができるが、*⊿emt1* 株は、滴下した部位に留まっていた。*⊿emt1* 株を接種した後、MEL 溶液を滴下したところ、細胞が伸張し、菌塊が葉の表面に広がる現象が観察できた。以上の結果から、MEL は、*P. antarctica* の細胞の伸張と固体表面での生息域拡大に寄与していると考えられる。

次に、植物表面で *P. antarctica* が MEL を生産していることを明らかにするため、以下の実験を行った。まず、T34 株を懸濁した水溶液に切り葉を加えて静置し、MEL の生産量を調べた結果、MEL の生産量は増加し、静置後 4 日目が最大となった。一方、葉を加えない状態では MEL 生産量の変化は見られなかった。続いて、ポット栽培のムギの葉面に T34 株を接種後、RNA を抽出し、２つの MEL 生合成遺伝子（*EMT1* および *MMF1*）の発現量を、定量的 RT-PCR を用いて計測した。その結果、両遺伝子とも接種 4 日目以降に発現量が増加していた。したがって、葉の存在下で MEL 生合成遺伝子の発現が誘導され、MEL が生産されていると考えられる。これらの結果から、*P. antarctica* は植物表面でも MEL を生産していることが示唆された。

[1] Moria et al., Yeast 27, 905-917, 2010

Pseudozyma antarctica, mannosylerythritol lipid, plant surfaces

講演番号：2A09p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 09 会場

Sphingomonas sp.GF9 株の生産する *Catellibacterium nectariphilum* AST4^T 株生育因子の単離
Isolation of *Catellibacterium nectariphilum* growth factor from *Sphingomonas* sp. culture broth
○三橋 進也、ブイヤン ムハンマド ナズルール イスラム、重冨 顕吾、高井 亮吾、鎌形 洋一、生方 信（北大院農）
○Shinya MITSUHASHI, Mohammad Nazrul Islam BHUIYAN, Kengo SHIGETOMI, Ryogo TAKAI, Yoichi KAMAGATA, Makoto UBUKATA (Hokkaido Univ.)

これまで人類は膨大な労力を費やして微生物の探索と機能解析を行ってきた。しかし、顕微鏡等で確認できる細胞数から換算すると、環境場における少なくとも 90%以上の微生物が培養できていないと報告されている（参考文献 1：Dewi Puspita I. *et al.*, *Microbes Environ.*, 2012）。このような通常培養できない微生物の多くは、いかなる既存の人工培地でも生育しない、あるいは生育・代謝が完全に停止した休眠細胞であると考えられる。病原性細菌が休眠状態となった場合、抗生物質への抵抗性を示しながら宿主内で生残し、何らかの刺激で再び覚醒(病原性を発揮)することも知られている（参考文献 2：Oliver J.D., *FEMS Microbiol. Rev.* 2004）。よって、このような培養が困難な生態・状態の微生物（難培養性微生物）を培養可能とする技術の確立や詳細な生態の解明は基礎・応用微生物学の観点のみで無く公衆衛生の点からも極めて重要である。

以前より単独では培養不能な菌株が、他の菌株と複合培養すると生育できる事例は知られていた。また、そのような共生関係の多くは両者を半透膜で隔てても成立することから、一方が相手側に提供する何らかの低分子化合物がその機構に重要であると推測されている（参考文献 3：D'Onofrio A. *et al.*, *Chem. Biol.*, 2010）。*Sphingomonas* sp. GF9 株はこのような共生例の中でも特にユニークな特徴を有しており、異なる 3 種の微生物(AST4、ASTN45 および ASN212 株)に対し、それぞれ異なる生育因子を提供している事が示唆されている。そこで我々のグループは GF9 株が分泌する生理活性物質を単離・構造決定し、生育因子要求性株の遺伝子発現調節機構を解明することで、遺伝子レベルで難培養性微生物の普遍的な性質を明らかにし難培養性微生物の利用を目指した。

三角フラスコに比べジャーファーメンターでの培養の方が、生育因子の生産量が数倍多いことを確かめたのち、66 L の培養上清を調製した。次に、先行して比較的性状が扱いやすい生育因子 **A**（AST4 株に対する生育因子）の単離を試みた。菌体を遠心で除いた後、上清をブタノール処理し、次に水層を乾固してメタノールで処理した。メタノール可溶画分を HP-20 カラムクロマトに供し、活性画分を LH-20 カラムクロマトで分画した。これらの操作で AST4 株への生育促進活性は分割したり大きく失活したりすることなく単離できた。最後に ODS(C18)逆相 HPLC によって単一ピークにまで精製操作を進めたところ、比活性は 1.0 ng/mL までに上昇し、約 0.5 mg の量を得ることができた。生育因子 **A** は酸性物質と推測できるので HPLC の活性ピークの精密分子量を LC-ESI-MS（ネガティブ）を測定し、NMR を用いて構造解析を行った。

uncultivated bacteria, growth factor, symbiosis

講演番号：2A09p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 09 会場

Thaumarchaeota 門古細菌が北方圏森林土壌の窒素循環に与える影響

The effect of archeal phylum of Thaumarchaeota on nitrogen circulation in the boreal forest bed soil

○礒田 玲華[1]、原 新太郎[1]、Tahvanainen Teemu[2]、橋床 泰之[1] ([1]北大院農、[2]UEF)
○Reika Isoda[1], Shintaro Hara[1], Teemu Tahvanainen[2], Yasuyuki Hashidoko[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]UEF)

【背景】Thaumarchaeota 門古細菌は中温古細菌として，森林や農地土壌，海洋から検出されている．Thaumarchaeota 門古細菌には *amoA* 遺伝子を保持しているものが多数報告されており，土壌や海洋からは真正細菌由来の *amoA* 遺伝子に比べて古細菌 *amoA* 遺伝子が高い存在比で検出されていることから，これらの生態系では Thaumarchaeota が窒素循環に寄与している可能性が指摘されている．また，北方圏生態系は気候変動の影響を受けやすく，近年の温暖化の影響により植生のみならず生態系内の物質循環が大きく変動する可能性がある．本研究では，北方圏土壌生態系において古細菌が窒素循環に果たす役割の解明を目的とし，菌叢解析および培養試験を行った．
【方法】ヨーロッパトウヒが疎林を形成しているフィンランド森林限界線(Pallas, N68°02' E24°04')のツンドラ土壌，および比較として北海道苫小牧(N42°26' E141°47')の人工カラマツ林の林床土壌の A 層または B 層土壌をそれぞれ採取した。Winogradsky's 無機塩無窒素培地(10 mL,ジェランガム 0.3%含有)の混合炭素源を 0.02~2.0%の範囲で 7 区設定した培地に土壌 300 mg を接種した．培養物から DNA を抽出・回収し，古細菌 16S rRNA 遺伝子を標的とした変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE)による菌叢解析を行った．得られたバンド配列から培養物中の古細菌特異的なプライマーを設計し，該当古細菌 16S rRNA 遺伝子全長の解読を試みた．またこれら古細菌の集積培養を試みた．
【結果・考察】古細菌 16S rRNA 遺伝子配列を標的とした PCR-DGGE 解析によって，古細菌由来の 16S rRNA 遺伝子部分配列を多数取得した．これら部分配列の系統樹解析によって，配列の多くが主要な古細菌門である Crenarchaeota 門や Euryarchaeota 門とは異なるクラスターに属すことを確認した．DGGE により得られた部分配列を基に設計した特異的プライマーと古細菌用のユニバーサルプライマーで増幅した 16S rRNA 遺伝子全長配列 2 種を解読した結果，それらは Thaumaechaeota 門 "*Candidatus* Nitrosotalea devanaterrat" および "*Candidatus* Nitrososphaera gargensis"とそれぞれ 94%, 96%の相同性を示した．これら 2 種の Thaumarchaoeta 門古細菌は *amoA* 遺伝子並びにアンモニア酸化能を有するとの報告があることから，古細菌 *amoA* 特異的プライマーでの検出を試み，複数の強いバンドを得た．これら Thaumarchaeota 門古細菌が土壌中でアンモニア酸化に寄与している可能性を探り，独立栄養的に培養可能であるかを検証するため，無糖・炭酸アンモニウム塩培地で集積培養と純粋分離を試みている．Thaumarchaeota 門アンモニア酸化古細菌は北方圏の窒素循環解明の糸口となることが期待される．

Thaumarchaoeta, ammonia oxidizingarchaea, boreal forest

講演番号：2A09p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 09 会場

長期無施肥水田で栽培したアフリカイネ ×台中 65 号交雑後代系統イネの根面／根内共生細菌叢の DGGE 法による追跡と主要細菌として得た *Burkholderia kururiensis* の機能性

Tracking root-associating bacterial microbiota of a cross-hybrid paddy *Oryza longistaminata* × *O. sativa* T65 by DGGE, and functionality of *Burkholderia kururiensis* obtained as the major root symbiont

○橋床 泰之[1]、白 啓鈴[1]、前川 雅彦[2] ([1]北海道大院農、[2]岡山大植物研)
○Yasuyuki Hashidoko[1], Gyeryeong Bak[1], Masahiko Maekawa[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Okayama Univ.)

研究背景）本研究は，アフリカ原産の *Oryza longistaminata* と *O. sativa* subsp. *japonica* （しおかり，台中 65 号）を交雑させ，世代を重ねた交雑後代系統イネ(F9，LIA)の栄養獲得能力と根共生微生物との関連解明を目的としている。これらの交雑後代系統イネは，岡山大学資源植物科学研究所で 20 年以上無施肥管理・10 年以上収穫物地上部の持ち出しを継続している貧栄養土壌無施肥実験水田で栽培しても，農林 18 号などとは異なり，施肥水田で栽培したものと比較して遜色のないコメ収量を維持できる。この事実から，無施肥水田で栽培した交雑後代系統イネは，根面着生／根組織内生窒素固定細菌を貧栄養水田土壌での栄養獲得戦略に充てていると考えた。
方法）資源植物科学研究所実験水田でのイネ根圏微生物群集の菌相変化を追跡するため，*O. longistaminata* ×*O. sativa* 交雑後代イネについて，2013 年に生育ステージ毎にサンプリングを行い，根と土壌の微生物相遷移を 16S rRNA 遺伝子を標的とした変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）法で追跡した。交雑後代系統イネ LIA を，対照とした農林 18 号および交雑後代系統イネの母系品種である台中 65 号とともに，それぞれ苗移植後 1 週間（7 月上旬），幼穂形成期（8 月中旬），ならびに登熟期（9 月下旬）の根の混入していない土壌とイネ根を採取した。土壌 DNA は直ちに研究所内で Isoil®で抽出した。イネ根も同様に，1 mL TE buffer 中，スパティールで潰し，その液中分散物から DNA 抽出キット Isoplant II で DNA を回収した。これらをテンプレートに，PCR-DGGE 解析を行った。
結果及び考察）各生育ステージ，品種，施肥区／無施肥区における微生物群集の遷移を追跡し，分析で得られた主要な DNA バンドの塩基配列を解読したところ，出穂期から無施肥水田で生育したイネ根全ての微生物群集に特徴的なバンドが認められ，これはコメを 30%増収させるイネ根内共生窒素固定細菌としての報告がある *Burkholderia kururiensis* のものと同定された。無施肥水田では，*B. kururiensis* は登熟期まで主要細菌としてイネ根に留まった。施肥水田で栽培したイネでは，唯一，登熟期の交雑後代系統イネの一部から，強いシグナルとして *B. kururiensis* が検出された。Winogradsky’s 無機塩溶液のジェランガムソフトゲル培地で無施肥水田出穂期イネ根洗浄液を培養したところ，高い運動性を示す通性嫌気性細菌が LIA 根由来細菌の主要培養可能細菌相を占めていることが分かった。現在このソフトゲル培養物から，*B. kururiensis* の純粋分離を開始しており，窒素固定能検定と無菌モミへの接種試験も行う予定である。無施肥水田でのイネの窒素獲得に寄与する *B. kururiensis* と交雑後代系統イネとの相性が良い理由が解れば，持続型農業の発展に貢献できる。

Oryza longistaminata, *Burkholderia kururiensis*, free-living nitrogen-fixing bacteria

講演番号：2A09p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 09 会場

環境条件が IncP-7 群プラスミド pCAR1 の接合伝達頻度・宿主域に及ぼす影響の解明

Effects of environmental condition on conjugation frequency and host range of IncP-7 plasmid pCAR1

○柳田 晃輔[1]、松井 一泰[1]、新谷 政己[2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1]([1]東大生物工学セ、[2]静大・工)
○Kosuke YANAGIDA[1], Kazuhiro MATSUI[1], Masaki SHINTANI[2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Shizuoka Univ.)

【背景・目的】

細菌における遺伝子の水平伝播は、一般に可動性遺伝因子とよばれる遺伝因子によって担われ、このうち最も重要と考えられるのはプラスミドである。しかし、プラスミドの接合伝達能や宿主域に影響を与える環境要因については、未だ詳細な解析がなされていない。病院内での抗生物質耐性遺伝子の水平伝播による多剤耐性菌の出現抑制や、汚染サイトの土着細菌へ分解プラスミドを水平伝播させ、分解力を向上させるなど、医療や環境浄化への応用の観点からも、プラスミドの環境中での挙動について更なる知見が求められている。プラスミドの水平伝播現象の評価は接合伝達頻度を指標になされているが、過去の研究報告では、個々の接合方法や接合伝達頻度の計算などの条件が異なっており、結果を直接比較することが困難であった。そこで当研究室では、4 種類の特徴の異なるプラスミドを同じ方法で接合させ、接合伝達頻度を比べることで、各々のプラスミドの接合伝達に関わる因子の探索を行ってきた。本研究では、様々な環境条件を想定した接合条件を設定することで特異的な接合伝達現象の探索を行った。将来的にはその原因を遺伝子・タンパク質レベルで解明することを目標としている。

【方法・結果】

異なる不和合性(Inc) 群に属している 4 種のプラスミド[カルバゾール分解プラスミド pCAR1(IncP-7) 、薬剤耐性プラスミド pB10(IncP-1) 、薬剤耐性プラスミド R388(IncW) 、ナフタレン分解プラスミド NAH7(IncP-9)] をモデルプラスミドとし、供与菌・受容菌ともに *Pseudomonas putida* KT2440 株を用いた。LB 液体培地中で接合時間 3 時間の条件で、接合時の菌密度を変化(10^0, 10^1, 10^2, 10^3 希釈)させた際の接合伝達頻度(接合伝達体数/供与菌数)の比較を行った。接合伝達体数、供与菌数はそれぞれの抗生物質耐性を指標に、コロニー数(CFU / ml)より算出した。その結果、4 種類のプラスミドすべてにおいて、10^3 希釈の接合伝達頻度は 10^0 希釈と比べると約 1/100 に減少した。

実環境中において、同一の宿主に複数のプラスミドが保持されることがあり、各々のプラスミドの接合伝達に影響を与える可能性が考えられる。そこで、供与菌として *P. putida* KT2440(pCAR1, pB10) を、受容菌として *P. putida* KT2440 株、*Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株を用いて、プラスミドを単独・2 種類保持した場合の接合伝達頻度や宿主域の変化についても比較しているので、報告する予定である。

plasmid, conjugation frequency, host range

講演番号：2A09p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ A 校舎 09 会場

プラスミド NAH7 の受容の可否に影響を及ぼす受容菌 Pseudomonas resinovorans ゲノム上の遺伝子の解析

Analysis of Pseudomonas resinovorans genes determining the capability of receiving NAH7 plasmid in conjugation process

○李 美英[1]、高橋 裕里香[1]、松井 一泰[1]、新谷 政己[2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]静大院・工)
○meiying LI[1], Yurika Takahashi[1], Kazuhiro Matsui[1], Masaki Shintani[2], Kazunori Okada[1], Hideaki Nojiri[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Shizuoka Univ.)

当研究グループでは、プラスミドの接合伝達現象（受容菌域、接合伝達頻度、プラスミドの安定性など）に影響を与える種々の因子についての検討を行ってきた．特に接合伝達頻度は，プラスミドが細菌間をどの程度伝播するかを示す指標であり，プラスミドの拡散を“量的に”理解する上で重要である．昨年度本大会で発表したように，我々は 4 種類のモデルプラスミドの接合伝達頻度を供与菌と受容菌一種類ずつ混合して(1：1)、また供与菌一種と受容菌二種を混合して(1：2)評価している。具体的には、pCAR1 (IncP-7)，pB10 (IncP-1)，R388 (IncW)，NAH7 (IncP-9)をモデルプラスミドとし，*Pseudomonas putida* SM1443 株を供与菌として用いた。1:1 の実験では受容菌として *P. putida* KT2440RG 株と *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4RG 株のいずれかを用い、1:2 の実験では異なる蛍光マーカー遺伝子を持つ *P. putida* KT2440DsRed 株と *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4GFP 株を同量混合して受容菌として用いた。1:1 の実験では、接合時の培地成分（富栄養，貧栄養），温度（25, 30, 37 ℃），pH（5, 7, 9），接合時間（3, 6, 12, 24, 48 h）を変化させた際の各プラスミドの接合伝達頻度を評価し、1:2 の実験では pH（4, 5, 6, 7, 8, 9, 10）を変えた場合の頻度を評価した。

この実験の過程で、NAH7 の接合伝達頻度が、受容菌を CA10dm4RG 株にした場合、培地成分、温度、pH、接合時間の変化に関わらず著しく低下し、検出限界以下になることを見いだした。一方、興味深いことに、CA10dm4GFP（CA10dm4RG の染色体上に蛍光タンパク質が挿入されている）を受容菌として用いた場合、10^{-4} 以上の頻度で NAH7 の接合伝達が検出された。この結果は、ほぼ同等のゲノムを持つと予想される両菌で、受容菌としての能力が大きく変化していることを示しており、その原因に興味が持たれた。原因としては、両株の作製途中でゲノムに入った変異の違いが疑われたため、Miseq（Illumina 社）を用い CA10dm4RG 株と CA10dm4GFP 株の全塩基配列決定を行った。その結果、CA10dm4RG 株では、遺伝子間への IS 挿入を除くと、*rpoB* 内部と PCA10_55850 内部にそれぞれ 1 塩基置換が生じていた。また PCA10_21590-21620 の 4CDS が欠損しており、さらに PCA10_14960-21030 の 620CDS を含む領域が重複していた。一方で、CA10dm4GFP 株では *glmS* の下流に部位特異的に挿入された GFP カセットの他、*rpoB* 内部に 1 塩基置換が生じ, *ccoN2* 内部に IS が挿入されていることが判明した。確認されたこれらの変異点のいずれが原因かを探るため、現在、各変異を個別に導入した破壊株・及び高発現株を作製中である。

Plasmid, Conjugation frequency, NAH7

講演番号：2A09p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ A 校舎 09 会場

Methylobacterium sp.121 株の運動性に影響を与える因子の探索
Search of the factor affecting the kineticism of motility in *Methylobacterium* sp.121
○若林 佑[1]、清水 哲[2]、中村 顕[2]、伊藤 政博[1] ([1]東洋大・生命、[2]筑波大・生命環境系)
○Yuu Wakabayasi[1], Tetsu Shimizu[2], Akira Nakamura[2], Masahiro Ito[1] ([1]Toyo Univ., [2]Tukuba Univ.)

【背景・目的】
土壌などのような自然環境中では、多様な生物が様々な形で共存をしている。これまでの微生物学では、多くの場合、微生物を単離してから実験に扱ってきた。しかし、現在でも土壌中に含まれている微生物全体の 1%程度しか単離培養ができないと考えられている。近年、異種の細菌同士を共培養することで細菌同士が相互作用を行い、単一の細菌を培養したときには見られないような特徴が報告されている。このように、環境中の細菌は相互に影響し合っていると考えられている。しかし、報告されている細菌間の相互作用は生育や代謝産物に着目をしたものが主流である。
本研究では *Methylobacterium* sp. 121 株(以後 121 株と表記、運動性あり)の共培養時における運動性に着目をした。この 121 株は *Kaistia* sp. 32K 株(以後 32K 株と表記、運動性なし)と同一環境から単離された細菌である。これらの細菌を用いて共培養を行うと、121 株の顕微鏡下での運動性の向上が観察された。共培養による運動性の向上はこれまで注目されてこなかった現象である。このことから、細菌の運動においても細菌間相互作用の影響を受けている可能性が示唆された。そこで本研究では、共培養と 121 株の運動性向上の関係を明らかにすることを目的とした。
【方法】
細菌間相互作用による 121 株の運動性への影響を観察するために、121 株と 32K 株を培養槽がフィルターで仕切られた二層式浸透培養槽を用いて共培養を行い、121 株の遊泳速度を解析した。また、121 株の運動性を向上させる因子は 32K 株特異的なのかを調べるために他の細菌(大腸菌 W3110 株、枯草菌 151MA 株)を用いて 121 株と二層式浸透培養槽で共培養を行い、121 株の遊泳速度を解析した。
【結果・考察】
121 株は二層式浸透培養槽を用いて他の細菌と共培養を行うことで、単独培養時と比較して 2 倍程度の運動性の向上が観察された。その中でも 32K 株と共培養を行った際に運動性の向上が最も顕著に観察された。このことから、121 株は共培養を行うことでフィルターを通過できるような物質により運動性が向上している可能性が考えられた。そして、その物質は細菌の増殖過程に生産される代謝産物である可能性が考えられる。
今後は、32K 株の代謝産物より 121 株の運動性の向上に影響を与える因子の探索を行う予定である。

Methylobacterium, *Kaistia*, Symbiosis

講演番号：2A09p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ A 校舎 09 会場

フェナントレン分解コンソーシアムにおける非分解優占種細菌の役割
Phenanthrene-degrading microbial consortium: role of dominant bacterial strain unable to degrade phenanthrene
○小川 なつみ、加藤 広海、遠藤 諒、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院生命科学）
○Natsumi OGAWA, Hiromi KATO, Ryo ENDO, Yoshiyuki OHTSUBO, Yuji NAGATA, Masataka TSUDA (Tohoku Univ.)

多環芳香族炭化水素のフェナントレンは難分解性の環境汚染物質である。微生物のフェナントレン分解機構について、これまで純粋分離株を用いた研究報告例が数多くあるが、自然環境において微生物個々の代謝様式は他の微生物との関わりに大きく依存することから、フェナントレン分解時における微生物集団の応答を理解する必要がある。当研究室では汚染歴のない閉鎖系土壌サンプルに、4 種芳香族化合物（3-クロロ安息香酸、フェナントレン、ビフェニル、カルバゾール）を添加し、メタゲノム解析を行なった。菌叢解析の結果、汚染開始直後からフェナントレン分解時において *Burkholderia* 属細菌が優占していた。また、機能遺伝子の解析で、*Mycobacterium* 属細菌由来のフェナントレン初発酸化酵素遺伝子の増加に伴い、*Proteobacteria* の様々な代謝遺伝子が連動して増加するといった協調的代謝の可能性が示された。そこで本研究では、メタゲノム解析を実施した汚染土壌より、フェナントレン分解コンソーシアムを分離し、フェナントレン分解時における個々の微生物の役割を解明することを目的とした。上記汚染化土壌からフェナントレン分解能を有する集積培養系 Mix EPa4 を得た。Mix EPa4 から複数の細菌株を分離したところ、フェナントレン分解能を有する *Mycobacterium* 属細菌ならびにフェナントレン分解能を確認できない *Burkholderia, Dyella, Bordetella, Rastonia* 属細菌株を分離でき、16S rRNA 遺伝子を対象にした DGGE 解析では、Mix EPa4 は *B. carivensis* が優占していた。また、フェナントレン添加最小寒天培地を用いた生育試験の結果、*B. carivensis* の菌数に依存して *Mycobacterium* 属細菌の生育が促進された。*B. carivensis* と *Mycobacterium* 属細菌の各純粋液体培養、および二者の混合液体培養でのフェナントレン分解を定量化したところ、培養 4 日後の時点でそれぞれ 0%、30%、100%分解した。このことから、*B. carivensis* はフェナントレン分解能を有さないが、分解以外の要因で *Mycobacterium* 属細菌によるフェナントレン分解を促進していることが示唆された。本研究で分離した *Mycobacterium* 属細菌と *B. carivensis* は、メタゲノム解析でもフェナントレン分解時に増加していた系統と極めて近縁であり、フェナントレン分解に影響を与えるこの 2 種の微生物の混合培養系は、土壌環境でのフェナントレン分解の集団的応答を理解するモデルケースとして扱うことができよう。また、全ゲノム配列が決定されている *B. multivorans* においても *Mycobacterium* 属細菌のフェナントレン分解を促進していることが確認でき、遺伝学的アプローチからこの現象を探ることが可能である。さらに、この現象が他の *Burkholderia* 属細菌や異なる属に属する細菌についても起こる現象であるのかについては現在検討中である。

Microbial consortium, Biodegradation, Phenanthrene

講演番号：2A09p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ A 校舎 09 会場

1 細胞ゲノム解析で明らかにするシロアリ腸内原生生物細胞表面共生菌 Rs-N74 の機能

Single-cell genome sequencing of Rs-N74, an ectosymbiont of termite gut protist

○雪 真弘[1]、桑原 宏和[2]、新谷 政己[3,4]、本郷 裕一[2]、大熊 盛也[1,4]([1]理研 CSRS、[2]東工大院生命理工、[3]静岡大工、[4]理研 BRC-JCM)
○Masahiro YUKI[1], Hirokazu KUWAHARA[2], Masaki SHINTANI[3,4], Yuichi HONGOH[2], Moriya OHKUMA[1,4] ([1]RIKEN, CSRS, [2]Tokyo Inst. Tech, [3]Fac. Eng. Shizuoka Univ., [4]RIKEN, BRC-JCM)

【目的】シロアリの腸内には多様な原生生物（単細胞真核生物）と細菌が共生している。これら共生微生物の多くは難培養性であり、複雑な群集構造を形成しているため研究が遅れていた。近年、メタゲノム解析やメタ EST 解析など培養を介さない手法を用いて、腸内微生物群全体の解析が進められている。しかし、共生する個々の微生物種がシロアリ腸内においてどのような役割を担っているのかは、一部をのぞきほとんど解明されていない。本研究では、原生生物と細菌が混在した腸液から細菌のみを 1 細胞毎に分取する手法を確立し、細菌 1 細胞からゲノム解析を行うことにより、これまで解析されていなかった個々の細菌種の共生系における機能を解明することを目指した。
【方法】ヤマトシロアリの腸内細菌をセルソーターで 1 細胞毎に分離した。分離した細菌を Phi29 DNA ポリメラーゼで全ゲノム増幅し、これを鋳型に 16S rRNA 遺伝子を PCR によって増幅した。16S rRNA 遺伝子のシークエンス結果を Phred スコアで評価し、1 細胞から増幅された可能性が高いサンプルを選択した。得られた 1 細胞の全ゲノム増幅サンプルについて、ペアエンドとメイトペアライブラリーを作製し、Miseq により解析した。アッセブルは SPAdes で行い、得られたコンティグは Blast 解析、GC 含量、4 塩基頻度の主成分分析を行い選別した。ゲノムカバー率は、幅広い細菌で保存されている遺伝子の保有率から計算した。Blast、RAST、InterProScan を組み合わせてアノテーションを行った。
【結果】1 細胞から全ゲノム増幅したサンプルを 115 個得た。この中から木質分解性原生生物 *Dinenympha* の細胞表面に共生する Bacteroidales 目細菌 Rs-N74 のゲノム解析を行った。Rs-N74 はシロアリ腸内において数的優占種の一つだが、未培養で、機能は全く未知であった。アッセンブルの結果、コンティグ 445 本で合計約 3.5Mb であり、ゲノムカバー率は 66.2%と推定された。アノテーションの結果、糖質加水分解酵素のエンドグルカナーゼ(GH5, 9)、β-グルコシダーゼ(GH3)、キシラナーゼ(GH10)等の遺伝子を有していることが明らかになった。また、ガラクトシダーゼやアラビノフラノシダーゼ等のヘミセルロースの分解酵素遺伝子も多数有していた。さらに、複数の糖トランスポーターを有しており、分解産物である単糖を取り込みエネルギー源にしていると予測された。下等シロアリの腸内共生細菌が木質バイオマス分解に関与するかはこれまで不明であったが、今回の解析により Rs-N74 は宿主原生生物とともに木質分解に寄与していることが初めて示唆された。今回構築した手法を様々な微生物叢に応用することにより、これまで困難であった個々の細菌種の機能を 1 細胞レベルで解析することが可能になると期待できる。

Single-cell genome, Symbiosis, Termite

講演番号：2A10a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ A 校舎 10 会場

枯草菌細胞壁合成に関与する酵素を用いたペプチド合成の基質特異性

Substrate specificity of peptide synthetic reaction using microbial enzyme

○荘 葉[1]、橋本 義輝[1]、安部 智子[2]、葛 寅[1]、熊野 匠人[1]、小林 達彦[1] ([1]筑波大院・生命環境、[2]東電大・理工)
○ Ye ZHUANG[1], Yoshiteru HASHIMOTO[1], Tomoko ABE[2], Yin GE[1], Takuto KUMANO[1], Michihiko KOBAYASHI[1] ([1]Grad. School of Life and Environm. Sci., the Univ. of Tsukuba, [2]School of Sci. and Eng., Tokyo Denki Univ.)

【目的】

Pseudomonas chlororaphis B23 菌のニトリル代謝遺伝子クラスター下流に存在するアシル CoA 合成酵素 (AcsA) は、脂肪酸と CoA のチオエステル結合形成を触媒してアシル CoA を合成する。本酵素において、 CoA の代わりに、同じくチオール基を持つ化合物である L-システインを基質として反応させた場合、アミド結合を持った産物である *N*-アシル-L-システイン が合成され、本来のチオエステル結合 (-CO-S-) 形成だけでなく、アミド結合 (-CO-NH-) 形成をも触媒することを当研究室の先行研究で明らかにした。また、このアミド結合形成反応はアセチル CoA 合成酵素やルシフェラーゼにも見られ、アデニレート合成酵素スーパーファミリーに属する酵素が普遍的に持つ活性であると考えられた。

枯草菌などの一部のグラム陽性菌は、ペプチドグリカンとともに細胞壁を構成するテイコ酸に D-アラニンを結合する一連の反応に関わる *dlt* オペロンを持つ。本オペロン中の DltA は、D-アラニンをアシル側基質とし、キャリアタンパク質である DltC のホスホパンテテイン補欠分子族のチオール基に D-アラニンをチオエステル結合で付加する反応を触媒する。DltA も アデニレート合成酵素スーパーファミリーに属すことから、本酵素におけるアミド結合形成能を調べた。

【方法・結果】

大腸菌を宿主として大量に発現・精製した DltA を用いて D-アラニンと (DltC の代わりに) L-システインを基質として反応した結果、反応産物は D-アラニンと L-システインがアミド（ペプチド）結合した *N*-D-アラニル-L-システインであり、 DltA はペプチド形成能を持つことを実証した。 (D-アラニンの代わりに) 各種アミノ酸と L-システインを反応させたところ、いくつかの組合せにおいて反応が進行し、 HPLC による反応産物の分離および LC-MS/MS 分析を行った結果、反応産物をジペプチドと同定した。D-アラニンと (L-システインの代わりに) アミノ酸、ペプチド、 L-システイン誘導体を反応させた場合にも、いくつかの組合せにおいて反応が進行し、ジペプチド、オリゴペプチドなどが反応産物として得られた。

adenylate-forming superfamily, amide bond, thioester bond

講演番号：2A10a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ A 校舎 10 会場

枯草菌ゲノム縮小株によるケミカル代替素材の生産

Evaluation of bio-based chemical production by genome reduced strain of *Bacillus subtilis* as a platform cell factory.

○増田 健太[1]、森本 拓也[1]、戸谷 吉博[2]、平沢 敬[2,3]、オヌマ チュムサク[4]、石川 周[4]、影山 泰[1]、清水 浩[2]、小笠原 直毅[4]、尾崎 克也[1] ([1]花王・生科研、[2]阪大院・情報・バイオ情報、[3]東工大院生命理工・生物プロセス、[4]奈良先端大院・バイオ)

○Kenta MASUDA[1], Takuya MORIMOTO[1], Yoshihiro TOYA[2], Takashi HIRASAWA[2,3], Chumsakul ONUMA[4], Shu ISHIKAWA[4], Yasushi KAGEYAMA[1], Hiroshi SHIMIZU[2], Naotake OGASAWARA[4], Katsuya OZAKI[1] ([1]Biol. Sci. Res., Kao Corp., [2]Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [3]Dept. Bioeng., Tokyo Inst. Tech., [4]Grad. Sch. Bio. Sci., NAIST)

【目的】我々は、グラム陽性菌のモデル生物であり、優れたタンパク質分泌生産能をもつ枯草菌において、タンパク質生産に不要なゲノム領域を大規模に削除し、組換えタンパク質の生産性が大きく向上したゲノム縮小株（MGB874 株）を構築した。（Morimoto *et al.*, *DNA Res.* 15, 73-81 2008)。枯草菌ゲノム縮小株では、マルチコピープラスミドを用いたセルラーゼ生産系において、セルラーゼ合成遺伝子の転写レベルや細胞内グルタミン酸濃度が野生株と比較して向上することを示し（Manabe *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8370-8381 2011)、更に、ペントースリン酸経路や TCA 回路のフラックスの上昇を明らかにしてきた（戸谷ら、2013 年農芸化学会)。本研究では、ゲノム縮小株の多様な物質生産への展開を目的に、ポリアクリル酸の環境調和型代替素材として期待されるポリグルタミン酸（PGA）及び生分解性の高いキレート剤やバイオプラスチックの原料として利用可能と考えられるジピコリン酸（DPA）の生産評価と解析を行ったので報告する。

【方法･結果】枯草菌野生株およびゲノム縮小株にマルチコピープラスミドを用いた PGA 生産系をそれぞれ導入し、天然培地系おいて生産検討を行った。その結果、ゲノム縮小株は、野生株と比較して、約 1.9 倍と高い PGA 生産性を示すことを明らかにした。更に、DPA 生産系を導入して生産検討を行った結果、ゲノム縮小株では、野生株と比較して約 2.6 倍の高い DPA 生産性を示すことを確認した。また、合成培地系においてもそれぞれの物質の生産性向上を確認した。これらの結果から、ゲノム縮小株は高い組換えタンパク質生産能を有するだけでなく、様々な物質生産に優れたポテンシャルを有することが示唆された。今後、PGA 生産時などの合成遺伝子群の転写解析やグルタミン酸合成経路、中枢代謝経路の転写解析などを実施し、セルラーゼ高生産条件で得られた知見と併せ議論したいと考えている。

Bacillus subtilis, poly-gamma-glutamic acid, dipicolinic acid

講演番号：2A10a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ A 校舎 10 会場

定常期の枯草菌によるジピコリン酸生産における 13C 代謝フラックス解析

13C-Metabolic flux analysis of dipicolinate-producing Bacillus subtilis during stationary phase

○戸谷 吉博[1]、平沢 敬[1,2]、増田 健太[3]、森本 拓也[3]、影山 泰[3]、尾崎 克也[3]、小笠原 直毅[4]、清水 浩[1] ([1]阪大院・情報・バイオ情報、[2]東工大院・生命理工・生物プロセス、[3]花王・生科研、[4]奈良先端大院・バイオ)

○Yoshihiro TOYA[1], Takashi HIRASAWA[1,2], Kenta MASUDA[3], Takuya MORIMOTO[3], Yasushi KAGEYAMA[3], Katsuya OZAKI[3], Naotake OGASAWARA[4], Hiroshi SHIMIZU[1] ([1]Dept. of Bioinfo. Eng., Grad. Sch. of IST, Osaka Univ., [2]Dept. Bioeng., Tokyo Inst. Tech., [3]Bio. Sci. Lab., Kao corp., [4]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

【目的】枯草菌は、目的物質の生産に不要なゲノム領域を大規模に削除することで、生産性の向上や定常期における生産能の維持など、有用物質生産の宿主細胞として高い可能性を有している。ジピコリン酸（DPA）は、枯草菌の芽胞の主要な成分である一方、バイオプラスチックの原料として利用可能と考えられる有用物質である。我々は枯草菌の DPA 合成酵素遺伝子のプロモーターを強化した DPA 生産株を構築した。この株では DPA は主に定常期に生産されており、その収率や生産速度はゲノム縮小株において大きく向上することが示された。本研究では、DPA の生産性向上を目的とした合理的な代謝の改変を行うため、定常期における中枢代謝経路のフラックス分布を調査した。

【方法と結果】枯草菌ゲノム縮小株を元にした DPA 生産株をグルコースとグルタミン酸を炭素源として好気条件下で培養した。細胞増殖が停止した後、13C 標識したグルコースを培養液に添加し、細胞内遊離の代謝物質の 13C 濃縮度をガスクロマトグラフ質量分析計によって測定した。実測した代謝物質の 13C 濃縮度を説明し得る中枢代謝経路のフラックス分布を推定した。ゲノム縮小株を元にした DPA 生産株では、取り込まれたグルコースは殆どホスホグルコースイソメラーゼを経由して解糖系で代謝されており、その後アセトインとして排出されていた。また、DPA の合成速度とグルタミン酸の消費速度の関係が示唆された。今後、実測した DPA 高生産時の代謝フラックス分布に基づいた代謝デザインを実施し、DPA の更なる高生産に向けた遺伝子改変を行いたいと考えている。

Bacillus subtilis, 13C-metabolic flux analysis, Dipicolinate

講演番号：2A10a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ A 校舎 10 会場

Bacillus amyloliquefaciens DSM7 による食後高血糖改善成分 1-デオキシノジリマイシンの高生産培養

Production of the α-glycosidase inhibitor 1-deoxynojirimycin from *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7

○小野瀬 晋司[1]、仲川 清隆[1]、山岸 賢治[2]、木村 俊之[3]、池田 亮一[4]、樋口 央紀[5]、宮澤 陽夫[1] ([1]東北大院農、[2]東北農研セ、[3]中央農研セ、[4]旭松食品、[5]機能性植物研)

○Shinji ONOSE[1], Kiyotaka NAKAGAWA[1], Kenji YAMAGISHI[2], Toshiyuki KIMURA[3], Ryoichi IKEDA[4], Oki HIGUCHI[5], Teruo MIYAZAWA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Western Region Agricultural Research Center, [3]National Agriculture and Food Research Organization, [4]Asahimatsu Foods Co., [5]Biodynamic Plant Institute Co.)

【目的】アザ糖 1-デオキシノジリマイシン（DNJ）はα-グルコシダーゼ阻害作用を示し、糖尿病の予防と治療への応用が期待されている。DNJ の供給源には、DNJ を含有する桑葉がもっぱら用いられるが、DNJ 濃度が低く供給量は限られ、課題となっている。一方、ある種の放線菌や枯草菌でも DNJ 生産が報告されており、幾つかの菌株培養液にはα-GI 活性が認められ、その主体が DNJ によると推定されている[1)]。我々は、食品に展開できる醗酵食品由来の枯草菌が確かに DNJ を生産することを確認し、培養条件を変えることで DNJ 前駆体や DNJ 自体の生産性に影響することを明らかにした[2)]。本研究では、この高生産メカニズムを詳細に調べていくために、全ゲノムが解析されている *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 を用いて、DSM7 の DNJ 生産性にもっとも影響を与える培養条件を明らかにしようとした。さらに、最適条件下で DNJ 生産を試みた。

【方法と結果】炭素源（C 源：グルコース、ガラクトース、ラクトース、ソルビトール）の種類と濃度、窒素源（N 源：硫酸アンモニウム）の濃度を変えた種々の条件で DSM7 を 5 日間培養し、培養液の DNJ 量を LC-MS/MS で分析した。C 源としてラクトースを培地に加えると、DNJ の生産量が 10 倍以上増加することがわかった。さらに、C/N 比を 6.25（C 源：2.5%, N 源：0.4%）とした時に、生産量は最大で 1.2 g/L に達した。次に経時的な評価を行い、DNJ は培養 1～3 日に急激に生産されていることがわかった。以上の結果と、培地に含まれる糖（ラクトース）および ATP 濃度の推移から、DNJ 生産にはカタボライトリプレッションが関わることが示唆された。加えて、本条件下では、培地から DNJ 前駆体はほとんど検出されず、このことも DNJ 高生産の一因と考えられた。最適条件下で DNJ 生産を試み、培養液 4L をイオン交換樹脂に供し、DNJ を高濃度に含む粉末を数グラム得た。安価な DNJ 供給源としての活用が期待される。さらに本条件を活用して、安定同位体 ^{15}N でラベルした DNJ の作成も試みており、ラベル体は DNJ 効能発現機構や安全性担保に関する基礎研究に役立つと期待される。

1) Stein DC, et al., *Appl Environ Microbiol.*, 48, 280-284 (1984).
2) Onose S, et al., *Food Chem.*, 138, 516-523 (2013).

1-Deoxynojirimycin, Microbial production, Carbon source

講演番号：2A10a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ A 校舎 10 会場

T7 ポリメラーゼ/T7 プロモーターを用いた構成的高発現システムによる芳香族化合物の生産

Production of aromatic compounds by constitutive expression system with T7 polymerase/T7 promoter

○駒 大輔、山中 勇人、森芳 邦彦、大本 貴士（阪市工研）
○Daisuke KOMA, Hayato YAMANAKA, Kunihiko MORIYOSHI, Takashi OHMOTO (OMTRI)

【目的】

T7RNA ポリメラーゼ/T7 プロモーター(T7 発現系)を用いた遺伝子の高発現システムは世界中で広く利用されている。この発現のシステムは「遺伝子発現量が極めて高いこと」および「宿主本来の発現系への影響が小さいこと」から、大腸菌のみならず、さまざまな生物種にも適用されつつある。しかし、現行の T7 発現システムでは遺伝子発現の誘導に IPTG を必要とするため、実生産を考えた場合にはコスト的に問題がある。そこで本研究では、T7 発現系を実生産で利用可能にする手段の一つとして、T7 発現系を利用した構成的高発現システムを開発することを目指した。

【方法および結果】

T7 発現系を利用した構成的高発現株の作製は、大腸菌 BW25113 株の染色体 DNA を改良することで行った。大腸菌の染色体 DNA の改変には、Red 相同組み換え、FLP/FRT 部位特異的組み換え、および P1 形質導入を用いた。はじめに、モデルとして、β ガラクトシダーゼ遺伝子（*lacZ* 遺伝子）を構成的に高発現する菌株の作製を試みた。*lacZ* 欠失大腸菌である BW25113 株の染色体 DNA から、*lac* リプレッサー遺伝子を含む領域（*lacIYA*）を欠失させた。さらに構成性のプロモーターである *tyrR* 遺伝子のプロモーターに T7RNA ポリメラーゼ遺伝子を連結して、染色体に導入した。加えて、T7lac プロモーターに連結した *lacZ* 遺伝子を染色体に導入し、構成的に *lacZ* 遺伝子を発現する BWC4-L1 株を作製した。コントロールとして、BW25113(DE3)株の染色体 DNA に P_{T7lac}-*lacZ* を導入した AR-G70 株を作製した。両菌株の培養に伴う β ガラクトシダーゼ活性を 2-ニトロフェニル β-D-ガラクトピラノシド を基質に用いて測定したところ、AR-G70 株は IPTG を添加した場合に活性が大幅に上昇したのに対して、BWC4-L1 株の活性は IPTG に依存せず、常に高い活性を維持していた。菌体あたりの活性の最大値を比較すると、BWC4-L1 株の活性は AR-G70 株の 90%程度であり、本菌株が構成的に *lacZ* 遺伝子を高発現していることが示された。

現在、この発現系をこれまでに作製した芳香族化合物生産菌に対して適用することが可能であるかどうか検討している。IPTG により遺伝子発現が誘導されて、フェニルアラニンを高生産する菌株（AR-G91 株、*tyrR*::P_{T7lac}-*aroF*^{fbr}-*pheA* λDE3）またはフェニルエタノールを高生産する菌株（PAR-105 株、*tyrR*::P_{T7lac}-*aroF*^{fbr}-*pheA mtlA*::P_{T7lac}-*ipdC* (ab) *acs*::P_{T7lac}-*yahK feaB tyrA* λDE3）へ応用した結果を併せて報告する予定である。

Biorefinery, Expression, Choromosome

講演番号：2A10a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ A 校舎 10 会場

代謝改変大腸菌による *p*-アミノ安息香酸の生産

Production of *p*-aminobenzoic acid by metabolically engineered *Escherichia coli*

駒 大輔[1]、○山中 勇人[1]、森芳 邦彦[1]、酒井 清文[1]、増田 敬哉[2]、佐藤 嘉弘[2]、樋田 幸三[2]、大本 貴士[1] ([1]阪市工研、[2]帝人)
Daisuke Koma[1], ○Hayato Yamanaka[1], Kunihiko Moriyoshi[1], Kiyofumi Sakai[1], Takaya Masuda[2], Yoshihiro Sato[2], Kozo Toida[2], Takashi Ohmoto[1] ([1]OMTRI, [2]TEIJIN)

【目的】パラアミノ安息香酸（PABA）は芳香族ポリマー原料として利用できる可能性があるため、バイオマス原料より大量に PABA を生産する技術開発は、バイオリファイナリー社会の構築に貢献すると考えている。しかし、発酵法によって PABA を生産する場合、PABA は葉酸合成における中間代謝物であり、ごく微量しか生産できない。そこで、大腸菌を代謝工学的に改変し、グルコースを原料として PABA を高生産する菌株の作製を試みた。

【方法】Red 相同組換え、FLP/FRT 部位特異的組換え、および P1 形質導入[1)] を用いて大腸菌の染色体 DNA を改変することで PABA 生産菌を作製した。P_{T7lac}-*aroF*^{fbr} 遺伝子（シキミ酸経路の初発酵素遺伝子）を制御遺伝子である *tyrR* 部位に導入し、代謝の流れをシキミ酸経路へと導いた。次にシキミ酸経路上で代謝の分岐点となるコリスミ酸に着目した。コリスミ酸から 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸（4ADC）への変換を促進させるために、P_{T7lac}-*pabA* と P_{T7lac}-*pabB* 遺伝子を導入した。さらに、4ADC を効率よく PABA へと変換させるために、P_{T7lac}-*pabC* 遺伝子を導入した。P_{T7lac}-*pabA* と P_{T7lac}-*pabB* 遺伝子についてはコピー数を増加させた株や、外来生物種の相同遺伝子を導入した株を作製した。

グルコースを炭素源とした無機塩培地（M9M 培地）または M9M 培地に乾燥酵母エキスを添加した培地（M9M-Y 培地）を用いて菌株を培養し、培養液中の PABA 生産量を HPLC で測定した。

【結果】*aroF*^{fbr} 遺伝子の高発現株ではフェニルアラニンとチロシンが蓄積することが確認されたが、PABA の蓄積は見られなかった。*aroF*^{fbr} 遺伝子に加えて *pabA* または *pabB* 遺伝子を単独で高発現させた場合にも同様の結果が得られたが、両者を同時に高発現させた場合には PABA の蓄積が確認された。さらに *pabC* 遺伝子を高発現することで PABA の生産量は増加した。この段階で、PABA の生産量は 0.4 mM であった（収率 0.7%）。一方、副産物であるフェニルアラニンとチロシンは合計で 6.8 mM であった。副産物が生成する原因として、*pabA* および *pabB* の活性が不十分と考えられたため、これらのコピー数を増やしたところ、PABA の生産量は 0.9 mM に向上したが、副産物の生成量は依然として高かった。放線菌や酵母などの遺伝子は *pabA* と *pabB* がドメインを形成しており、PABA 生産に有利であると考えられたため、*Corynebacterium efficiens* の遺伝子を大腸菌の *pabA* および *pabB* の代わりに用いたところ、PABA 生産量は劇的に向上し、グルコースを逐次添加し培養した場合、生産量は 35 mM（収率 21%）となった。

[1)] Koma D, *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 815-829 (2012).

p-aminobenzoic acid, metabolic engineering, biorefinery

講演番号：2A10a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ A 校舎 10 会場

2,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の特性解析

Characterization of a 2,4-dihydroxybenzoic acid decarboxylase

○吉田 拓矢[1]、満倉 浩一[2]、吉田 豊和[2] ([1]岐阜大工・生命工、[2]岐阜大工・化生工)
○Takuya YOSHIDA[1], Koichi MITSUKURA[2], Toyokazu YOSHIDA[2] ([1]Dept. of Biomol. Sci., Gifu Univ., [2]Dept. of Chem. Biomol. Sci., Gifu Univ.)

【目的】我々はピロール、インドール、フェノールなどの芳香族化合物に位置選択的にカルボキシル基を導入する可逆的な脱炭酸酵素を見いだし、反応特性と酵素構造解析、芳香族カルボン酸合成への応用を検討してきた。2,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素は微生物に存在することが示唆されていたが、活性菌の分離さえ報告されておらず、反応特性や炭酸固定機能は明らかでない。そこで、高活性を示す微生物を土壌から分離し、休止菌体および精製酵素を用いて反応特性を検討した。

【方法・結果】2,4-ジヒドロキシ安息香酸を添加した培地で集積培養し、レゾルシノールの生成を指標として脱炭酸酵素の探索を進めた。栄養を制限した培地で静置培養することで、目的とする脱炭酸酵素活性を持つ微生物を得た。休止菌体を用い、炭酸水素カリウムを炭酸源とした炭酸固定反応を行うと、レゾルシノールへの位置選択的なカルボキシル化を触媒し、2,4-ジヒドロキシ安息香酸が生成した。培養条件を検討し、活性を高めた菌体から酵素精製を試みた。本酵素は熱安定性が高く、50℃で 30 分の処理後においても活性を維持していた。精製酵素のサブユニット分子量は約 25,000 であり、これまでに報告してきた可逆的な脱炭酸酵素と異なっていた。その他の酵素化学的諸性質についても報告する。

2,4-dihydroxybenzoic acid, decarboxylase, carboxylation

講演番号：2A10a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ A 校舎 10 会場

Streptomyces sp. GF3585 由来(*R*)-選択的イミン還元酵素の特性解析

Characterization of an (*R*)-selective imine reductase from *Streptomyces* sp. GF3585

○新妻 貴明[1]、満倉 浩一[2]、小田 高広[1]、長澤 透[1]、吉田 豊和[2] ([1]岐阜大工・生命工、[2]岐阜大工・化生工)
○Takaaki NIIZUMA[1], Koichi MITSUKURA[2], Takahiro ODA[1], Toru NAGASAWA[1], Toyokazu YOSHIDA[2] ([1]Dept. of Biomol. Sci., Gifu Univ., [2]Dept. of Chem. Biomol. Sci., Gifu Univ.)

【目的】これまでに我々は、 2-メチル-1-ピロリン (2-MPN) に対する立体選択性を指標にして、*Streptomyces* sp. GF3587 の(*R*)-イミン還元酵素(RIR)と *Streptomyces* sp. GF3546 の(*S*)-イミン還元酵素(SIR)を選抜し、それら酵素の特徴解析と遺伝子発現を報告した。GF3587 の RIR は、基質特異性が極めて高い一方、GF3546 の SIR は、RIR より基質特異性が広いという特徴を示した。そこで、基質特異性の広い RIR を得るために、2-MPN に対して(*R*)-選択性を示す菌株を 1-メチル-3,4-ジヒドロイソキノリンを用いて還元活性を調査したところ、*Streptomyces* sp. GF3585 が対応するアミンを生成した。そこで本研究では、GF3585 のイミン還元酵素を精製し特性解析を行った。
【方法・結果】無細胞抽出液から、GF3585 のイミン還元酵素を電気泳動的に単一に精製した。本酵素のサブユニット分子量は、SDS-PAGE から 39,000、HPLC ゲルろ過から 100,000 と算出された。基質特異性の検討から、本酵素の立体選択性は極めて高いことが判明した。生成したアミンの絶対立体配置を調べたところ、2-MPN と 1-ピロリン-2-カルボン酸を用いた場合は C=N に対して、どちらも *si* 面から還元されるが、1-メチル-3,4-ジヒドロイソキノリンでは、*re* 面から還元していることが分かった。N 末端アミノ酸の相同性解析において、本酵素と高い相同性を示す酵素は無かったことから、新規のイミン還元酵素であることが示唆された。

Streptomyces, imine reductase, (*R*)-selectivity

講演番号：2A10a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ A 校舎 10 会場

Microbacterium sp. H8 由来(*S*)-選択的ハイドロラーゼの特性解析
Chracterizaiton of a (*S*)-selective hydrolase from *Microbacterium* sp. H8
○満倉 浩一[1]、林 秀樹[2]、高間 健[2]、長澤 透[2]、吉田 豊和[1] ([1]岐阜大工・化生工、[2]岐阜大工・生命工)
○Koichi Mitsukura[1], Hideki Hayashi[2], Ken Takama[2], Toru Nagasawa[2], Toyokazu Yoshida[1] ([1]Dept. of Chem. Biomol. Sci., Gifu Univ., [2]Dept. of Biomol. Sci., Gifu Univ.)

【目的】キラル環状アミンは、医薬品合成中間体としての用途が期待されており、これまでに様々な化学合成法および酵素合成法が報告されてきた。当研究室では、効率的なキラル環状アミンの合成法として、イミン不斉還元に着目し、イミン還元酵素の探索、精製、特徴解析、遺伝子発現を報告してきた。一方、光学活性環状アミンの合成ルートを想定すると、ハイドロラーゼを利用した合成が有利であることも考えられる。これまでにリパーゼを利用した光学活性ピペラジンの合成法が報告されているが、立体選択性が低いという問題があった。そこで我々は、ラセミ体の 1,4-ジアセチル-2-メチルピペラジン(*rac* DAMPZ)を単一炭素源として用いて、土壌からエナンチオ選択的なハイドロラーゼの取得を試み、高い(*S*)-選択性を示す *Microbacterium* 属由来ハイドロラーゼを見出した。本研究では、菌体による光学活性ピペラジンの合成、(*S*)-選択的ハイドロラーゼの精製と特徴解析を行った。
【方法・結果】微生物を培養後、休止菌体を調製し、300 mM DAMPZ を作用させたところ、変換率 52.7%、99% ee 以上で(*S*)-1-アセチル-2-メチルピペラジンの合成を達成した。無細胞抽出液から、硫安分画、各種カラムクロマトグラフィーによって(*S*)-選択的ハイドロラーゼを電気泳動的に単一に精製した。本酵素のサブユニット分子量は SDS-PAGE から 38,000、分子量は HPLC ゲルろ過から 66,000 と算出されたことから、本酵素は、ホモダイマーであると推定した。本酵素は、*N*-アシル環状アミンだけでなく、短鎖のエステル類にも作用した。N 末端アミノ酸の相同性解析において、本酵素と高い相同性を示す酵素は無かったことから、新規のハイドロラーゼであることが示唆された。

chiral cyclic amine, hydrolase, (*S*)-selectiviy

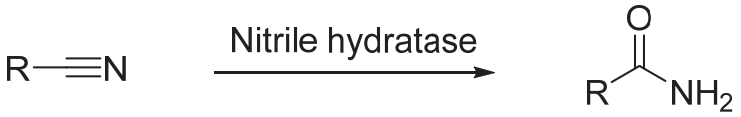
講演番号：2A10a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ A 校舎 10 会場

耐熱性ニトリルヒドラターゼのスクリーニング

Screening of thermostable nitrile hydratase

○朴木 佳那[1]、安川 和志[2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Kana Hounoki[1], Kazuyuki Yasukawa[2], Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO)

【目的】ニトリルヒドラターゼ (NHase)は、ニトリル化合物を水和しアミド化合物へ変換する酵素である。アクリルアミドはアクリロニトリルを基質として生産され、紙力増強剤、高分子凝集剤、石油回収剤などとして利用される重要な化成品である。NHase を用いたアクリルアミド生産は、酵素法を用いた工業生産の初めての成功例であるが問題点として、高温、高濃度になるとアクリロニトリルやアクリルアミドにより阻害され反応が進まなくなる点が挙げられる。そのため、0～5ºC の低温で酵素反応を行う必要があり、冷却時にエネルーギが必要となる。そこで、本研究では、上記の問題点を解決するため、常温や高温で反応が効率よく進む耐熱性 NHase を持つ微生物の探索を目的とし研究を行った。



【実験方法】耐熱性 NHase を生産する微生物の探索には土壌、池の水、味噌などを分離源とし集積培養法を用いた。分離基質として、ニトリル化合物、アルドキシム化合物を用い、pH 4.0、7.0、10.0 に調製した培地を用いて、抗生物質存在下または非存在下で、30~70ºC で培養を行った。得られた菌株のうち、酵素活性が強くアクリルアミド生産が有望だと思われる菌株を用いて、15 種類のニトリル化合物、アミド化合物または尿素を単一窒素源とし、NHase の誘導剤としての検討を行った。

【結果】ブチロニトリルを単一窒素源、グリセロールを単一炭素源として添加した培地で集積培養を行った結果、耐熱性 NHase 生産菌 315 菌株を富山県立大学の土壌より単離した。また、バレロニトリルを基質とした場合、スクリーニングの分離基質であるブチロニトリル添加時に比べ約 6 倍の NHase 活性を示した。

nitrile hydratase, thermostable, biotransformation

講演番号：2A10a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ A 校舎 10 会場

アミノ酸酸化酵素のストレッカー反応への利用

Amino acid oxidase-catalyzed Strecker reaction

○安川 和志[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Kazuyuki YASUKAWA[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO)

［目的］
ストレッカー反応は、アルデヒドまたはケトン、アンモニアおよびシアンの三成分の縮合反応によりアミノニトリルを合成する反応である。アミノニトリルは、医薬、農薬、有機材料の有機合成化学における重要な合成中間体であり、近年では、不斉有機触媒の研究が盛んに行われている。一方、酵素がストレッカー反応を触媒する報告は未だ無い。酵素法は、水中で温和な条件下で反応が進むことから環境調和型のものづくりであるグリーンケミストリーに最も適していると考えられる。本研究の目的は、ストレッカー反応を触媒する酵素の探索である。
［方法］
ストレッカー反応は、以下に挙げる大きく二つの反応段階からなる。i)アルデヒドへのアンモニアの付加によるイミンの生成そして ii)イミンに対してシアン化物イオンが求核反応を起こしアミノニトリルができる段階である。我々は、上記 ii)の反応段階に着目し、中間体にイミンを経由する酵素反応ならば、反応系内にシアン化物イオンがあることで反応中間体イミンに求核付加しアミノニトリルが生成するであろうと推測した。スクリーニング方法は、反応中間体にイミンを経由する酵素を様々な pH およびシアン濃度で反応させアミノニトリルの生成を HPLC で検出した。
［結果］
反応中間体にイミンを経由する酵素よりスクリーニングを行った結果、*Crotalus atrox*由来L-アミノ酸オキシダーゼおよびブタ腎臓由来D-アミノ酸オキシダーゼ(pkDAO)において反応系内にシアンが存在する時、それぞれの基質であるアミノ酸のシアン付加物の生成が見られた。我々は、2013年度農芸化学大会で*R*立体選択的にアミン化合物に作用する変異型pkDAOについて報告している[1]。変異型pkDAOも同様に、シアン存在下でα−メチルベンジルアミンを基質としたとき2-アミノ-2-フェニルプロピオニトリルの生成を触媒することを確認した。

［1］安川 和志、浅野 泰久, 日本農芸化学会2013年度大会講演要旨集, 3A11a07

amino acid oxidase, strecker reaction, amineoxidase

講演番号：2A10a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ A 校舎 10 会場

アミノ酸水酸化酵素を用いた L-*threo*-3-ヒドロキシアスパラギン酸の効率的生産

Efficient Production of L-*threo*-3-Hydroxyaspartate Using Amino Acid Hydroxylase

○中野 雅至[1]、原 良太郎[2]、木野 邦器[1,2] ([1]早大理工・応化、[2]早大・理工研)
○Masashi NAKANO[1], Ryotaro HARA[2], Kuniki KINO[1,2] ([1]Dept. Appl. Chem., Fac. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]RISE, Waseda Univ.)

【目的】

L-*threo*-3-ヒドロキシアスパラギン酸 (L-THA) は医薬中間体や機能性ポリマー原料として有用である。しかし、既存の合成法では選択的な合成が困難であるため、高い位置・立体選択的合成が期待される微生物変換プロセスに着目した。我々は既に、*Streptomyces coelicolor* A3(2)由来アスパラギン水酸化酵素[1] (AsnO)と大腸菌由来アスパラギナーゼによる合成プロセスを開発している[2]。本プロセスは、*asnO* 遺伝子発現大腸菌を触媒とする菌体反応系であり、L-アスパラギンを基質とし、L-*threo*-3-ヒドロキシアスパラギンを反応中間体としてワンポットで L-THA が合成可能である。本研究では、高収率・高得量での L-THA 生産の実現を目指し、宿主やベクター及び本反応プロセスの詳細条件を検討した。

【方法及び結果】

asnO 遺伝子を pUC18 ベクター系で高発現させた組換え大腸菌を用いた場合、L-アスパラギンからの L-THA 生産収率は 0.08%と低かった。この要因は、宿主大腸菌に由来するアスパラギナーゼによる L-アスパラギンの過剰な分解と、AsnO 活性の低さにあると考えた。そこで、試験管スケールで数種類の宿主及びベクターを用い、L-THA 生産に最適な組み合わせを検討した。さらに、L-THA の実用的生産を目指し、詳細な反応条件とスケールアップを検討した。

アスパラギナーゼによる L-アスパラギンの分解を抑制するため、大腸菌内に 2 種類存在するアスパラギナーゼをそれぞれ欠損させた株を宿主とし、L-THA 収率への影響を比較した。その結果、アスパラギナーゼ I の遺伝子欠損株を用いた場合に L-THA 収率が最大となった。また、*asnO* 遺伝子の発現強化による水酸化反応の促進を期待し、T7 プロモーターを有する pET-21a(+)ベクターを用いて *asnO* 遺伝子を高発現させたところ、L-THA の収率は大幅に向上した。

上記を踏まえ、反応プロセスの詳細条件を検討した。その結果、ジャーファーメンターを利用することで収率が 94%まで向上した。これは、水酸化反応に必要な O_2 の供給が強化されたためと考えられる。また、L-アスパラギン濃度 100 mM までは収率 90%以上を維持したが、高濃度においては収率の低下が確認された。高濃度基質での収率低下の原因を解析中であり、本プロセスでの高濃度基質への適用と、さらなる高得量の実現に向けて検討中である。

1) M. Strieker, F. Kopp, C. Mahlert, L. O. Essen, M. A. Marahiel, *ACS Chem. Biol.* 2007, **2**, 187-196.
2) 原良太郎, 木野邦器, 日本生物工学会 2011 年度大会講演要旨集 p41, 1Ep08.

L-*threo*-3-Hydroxyaspartate, asparagine hydroxylase, asparaginase

講演番号：2A10a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ A 校舎 10 会場

酵素反応を利用した *trans*-3-ヒドロキシ-L-プロリン合成法の開発

Development of Synthesis for *trans*-3-Hydroxy-L-Proline Using Enzyme Reactions

○山縣 海[1]、北辻 早希[1]、原 良太郎[2]、木野 邦器[1,2] ([1]早大理工・応化、[2]早大・理工研)
○Kai YAMAGATA[1], Saki KITATSUJI[1], Ryotaro HARA[2], Kuniki KINO[1,2] ([1]Dept. Appl. Chem., Fac. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]RISE, Waseda Univ.)

【目的】

ヒドロキシ-L-プロリン (Hyp) には 4 種類の異性体が存在し、いずれも医薬中間体として有用である。*cis*-3-, *cis*-4-, *trans*-4-Hyp は L-プロリンを直接水酸化して合成する酵素法がそれぞれ確立されているが、*trans*-3-Hyp では該当する水酸化酵素が見出されていない。そこで、L-アルギニンを出発基質として、酵素的な水酸化反応、グアニジノ基の加水分解反応、環化反応を組み合わせる新たな合成戦略を考案した。本研究では、本戦略に基づく *trans*-3-Hyp の酵素的合成プロセスの開発を検討した。

【方法および結果】

trans-3-Hyp 合成法の検討において、根粒菌 *Agrobacterium* sp.などの微生物におけるアルギニン代謝経路に着目した。当該経路では、L-アルギニンはアルギナーゼによるグアニジノ基の加水分解反応により L-オルニチンに変換され、さらにシクロデアミナーゼの環化反応により L-プロリンに変換される[1)]。当該経路におけるアルギナーゼおよびシクロデアミナーゼがヒドロキシアミノ酸に対して基質特異性を有するか不明であったが、基質として認識することが可能であれば(2*S*,3*S*)-3-ヒドロキシアルギニンから *trans*-3-Hyp が合成可能であると予測した。放線菌 *Streptomyces* sp. NBRC 13098 由来アルギニン 3-水酸化酵素遺伝子[2)]、根粒菌 *Mesorhizobioum loti* MAFF303099 由来アルギナーゼ遺伝子およびシクロデアミナーゼ遺伝子を His-tag 融合タンパク質として大腸菌で発現させ、Ni^{2+}アフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーにより精製酵素を調製した。L-アルギニンを出発基質として、順次酵素反応を実施し、HPLC によって生成物を確認した。

まず、L-アルギニンを基質とした水酸化反応を実施した。当該反応は 2-オキソグルタル酸依存的に進行し、反応条件の最適化により L-アルギニンから(2*S*,3*S*)-3-ヒドロキシアルギニンへ完全変換した。次に、これにアルギナーゼを作用させると、(2*S*,3*S*)-3-ヒドロキシオルニチンと考えられる化合物へ完全変換し、最後にシクロデアミナーゼによる環化反応を行うことで *trans*-3-Hyp の合成を確認した。

以上、*Mesorhizobioum loti* MAFF 303099 由来アルギナーゼおよびシクロデアミナーゼにおいてヒドロキシアミノ酸に対する新規な基質特異性を見出し、これら酵素に L-アルギニン水酸化酵素を加えた 3 段階の酵素反応を組み合わせることで、L-アルギニンからの *trans*-3-Hyp 合成に成功した。

1) Notker S, *et al*., *Eur. J. Biochem*., **167**, 81-87(1987)
2) Xihou Y, *et al*., *ChemBioChem*., **5**, 1274-1277(2004)

trans-3-Hydroxy-L-Proline, Arginine Hydroxylase, Ornithine Cyclodeaminase

講演番号：2A10p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ A 校舎 10 会場

Leuconostoc mesenteroides NBRC 100496　が生産する不溶性グルカン
Production of insoluble glucan by *Leuconostoc mesenteroides* NBRC 100496
若林 安希[1]、○矢野 成和[1]、立木 隆[2]、若山 守[2] ([1]山形大学院理工、[2]立命館大学生命)
Aki WAKABAYASHI[1], ○ Shigekazu YANO[1], Takashi TACHIKI[2], Mamoru WAKAYAMA[2]
([1]Yamagata Univ., [2]Ritsumeikan Univ.)

【目的】乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* は、スクロースを基質としてデキストランを合成する。一方、*L. mesenteroides* NBRC 100496 は、デキストランだけでなく不溶性グルカンも生成する。この不溶性グルカンは、α-1,6-グルコシド結合だけでなく、α-1,3-グルコシド結合も有している。デキストランは、様々な分野で産業利用されているが、不溶性グルカンの利用例はほとんどない。

我々は、これまでに、*Bacillus circulans* KA-304 が、グリコシダーゼファミリー87 型α-1,3-グルカナーゼ (Agl-KA) を生産すること、大腸菌宿主ベクター系で容易に発現することを報告した(1)。Agl-KA は、グルコースのα-1,3-結合からなるムタンを加水分解し、さらに、*L. mesenteroides* が生成する不溶性グルカンにも活性を示すことを見出した。Agl-KA は、基質に対して endo 型に作用する酵素であることから、不溶性グルカンからオリゴ糖が調製できると考えられる。

本報では、発酵原料として古くから利用されており廃糖蜜を原料とした不溶性グルカンの生産法を検討したので、その結果を報告する。

【方法と結果】乳酸菌培養に用いられる MRS 培地の炭素源を 4%スクロースに変更したスクロース改変 MRS 培地、炭素源を 5%廃糖蜜に変更した廃糖蜜改変 MRS 培地を用いて、*L. mesenteroides* NBRC 100496 の培養を行った。その結果、培地 100 ml 当たり、スクロース改変 MRS 培地では 0.5 g が得られ、廃糖蜜改変 MRS 培地では 0.27 g 得られた。

得た不溶性グルカン中にα-1,3-結合、あるいはα-1,6-結合が含まれているかを確認するために、Agl-KA と市販デキストラナーゼを用いて加水分解反応を行った。その結果、スクロース改変 MRS 培地から得た不溶性グルカン(1%)と廃糖蜜改変 MRS 培地から得た不溶性グルカン(1%)は、ともに Agl-KA とデキストラナーゼで分解された。両グルカンともに、デキストラナーゼを作用させたほうが、遊離還元糖量が多かったことより、α-1,6-結合の含有量が多いと考えられる。本研究では、さらに、廃糖蜜を炭素源とし、様々な培養条件を検討したので、その結果を報告する。

(1) Yano, S., Biosci. Biotechnol. Biochem., 67, 1976-82 (2003).

Leuconostoc mesenteroides, Insoluble glucan

講演番号：2A10p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ A 校舎 10 会場

DFAIII 生産酵素の探索と生産条件の検討

Isoration of DFAIII-forming enzyme and investigation of the reaction conditions

○佐野 直也、上田 誠（小山高専物質工）
○Naoya SANO, Makoto UEDA (Oyama National College of Technology)

【目的】DFAⅢ(di-D-fructofuranose-1,2’:2,3’-dianhydride)は、2 分子のフルクトースが分子内で脱水環化したオリゴ糖であり、カルシウムの吸収を助ける効能があるとされ、健康補助食品等として商品化されている。また、フルクタンの一種であり、ゴボウなどのキク科の植物の貯蔵多糖類であるイヌリンを原料とした酵素反応による DFAⅢの合成検討に関する研究も盛んに行われている [1)]。本研究では微生物が産する DFAⅢ合成酵素を取得し諸性質解明の後、DFAⅢの合理的な生産法の検討（スクロースからのイヌリン合成酵素と組み合わせたワンポット合成反応 [2)]や固定化酵素など）を行うことを目的とした。

【方法】土壌を生理食塩水に懸濁させ、イヌリンを唯一の炭素源とする寒天培地に塗布した。数日後、寒天培地上に生育したコロニーを単離した。次に、単離した微生物の DFAⅢ生成能を確認するため、イヌリン液体培養液で数日間培養を行い、遠心分離で菌体を分離した上清中に生産された糖を TLC で確認し、DFAⅢを産する微生物を選別した。続いて得られた DFAⅢ生産菌のフラスコ培養を行い、培養上清から粗酵素液を調整し、種々の実験に供した。スクリーニングにより取得した微生物の同定は、16S rDNA の塩基配列解析により行った。

【結果】これまでにイヌリン資化菌を 186 株取得し、イヌリン液体培地で培養し活性確認を行ったところ、菌体外に本酵素活性を有する細菌 9 株が得られた。これら 9 株の中から酵素生産性および生成酵素の耐熱性等を指標に優良株を選定し、OTCC－1 を選択した。OTCC-1 由来の DFAⅢ生成酵素の至適温度は 50℃、また、60℃まで安定であり 70℃を超えると急激に失活した。16SrDNA の塩基配列解析により OTCC-1 は *Arthrobacter* sp.と同定した。ワンポット反応や酵素の固定化検討などの製法の合理化検討についても報告する。

1) Makoto UEDA, Reiko SASHIDA, Yuuki MORIMOTO, and Haruyuki OHKISHI
J. Biosci. Biotech. Biochem., **58**(3), 574-575(1994)
2)Hua Hang, Ming Miao, Yungao Li, Bo Jiang, Wanmeng Mu, Tao Zhang
J. Carbohydrate Polymers, **92,** 1608-1611(2013)

Inulin, DFA, *Arthrobacter*

講演番号：2A10p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 10 会場

Gluconobacter 属酢酸菌によるズルシトールの酸化反応
Oxidation of dulcitol with the resting *Gluconobacter* cells
○成田 裕香、片岡 尚也、薬師 寿治、足立 収生、松下 一信（山口大・農・生物機能）
○ Yuka NARITA, Naoya KATAOKA, Toshiharu YAKUSHI, Osao ADACHI, Kazunobu MATSUSHITA (Yamaguchi Univ.)

酢酸菌は膜表面上で様々な糖類および糖アルコールを酸化し、その酸化生成物を培地中へ蓄積する独特の性質をもつ。糖アルコールであるズルシトール（ガラクチトール）の 2 位の炭素を酸化させるとタガトースへと変わる。タガトースは自然界に微量ながら存在するケトースであり、スクロースと同程度の甘味をもつ一方で、その半分ほどのカロリーしかもたない。このことから、低カロリーの甘味料として注目されており、その利用価値は高い。また、ズルシトールからのタガトース生産を行う酢酸菌酵素は未だ報告されていないので、この新規酢酸菌酵素に着目し、実験を行った。

タガトース生産能を高めることを目的に、既報に従って *Gluconobacter* 属酢酸菌をズルシトール含有培地で培養・適応させた。ズルシトールへ適応変異させた菌株から休止菌体を作製し、ズルシトールを加え 48 時間反応させた。

培地中のズルシトール濃度が高くなるように継代培養を行って適応させた 6 つの酢酸菌株（*Gluconobacter oxydans* 621H, *G. oxydans* IFO 3293, *Acetobacter pasturianus* IFO 3283-01, *G. frateurii* CHM43, *Frateuria aurantia* LMG 1588, *Gluconacetobacter xylinus* IFO 3288）について、ケトース生産能を調査した。最も安定的かつ高いケトース生産性を示したのは CHM43 株であった。この菌株を用いて、ズルシトールから生産されるケトースの同定を試みた。この菌株は、ズルシトールからタガトースとガラクトースを生産することが明らかとなった。ガラクトースは、ズルシトールの 1 位の炭素を酸化して生じるアルドースである。現在、当該反応を触媒する酵素の同定を進めている。

Gluconobacter, oxidative fermentation, ketose

講演番号：2A10p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 10 会場

メチロトローフ酢酸菌 *Acidomonas methanolica* におけるジヒドロキシアセトン生産
Dihydroxyacetone production by methylotrophic acetic acid bacterium, *Acidomonas methanolica*
○阿野 嘉孝[1]、大久保 慎二[1]、丸山 雅史[1]、三井 亮司[2] ([1]愛媛大・農、[2]岡山理大・理)
○Yoshitaka ANO[1], Shinji OKUBO[1], Masafumi MARUYAMA[1], Ryoji MITSUI[2] ([1]Fac. of Agr., Ehime Univ., [2]Fac. of Sci., Okayama Univ. of Sci.)

【目的】*Acidomonas methanolica* は、酢酸菌に分類されながらメタノールを単一炭素源として生育できるユニークな細菌であり、最近の研究によりメチロトローフと酢酸菌の数々の特徴を併せもつことが分かってきた。本菌はグリセロールを炭素源にして生育させると酢酸菌様の性質を示すが、グリセロールの酸化能については異なる報告があり不明瞭なまま残されている。酢酸菌がグリセロールを酸化してジヒドロキシアセトン（DHA）を生成する反応は DHA 発酵として知られていて工業的に重要である。この反応では細胞膜に局在するキノプロテイン・グリセロール脱水素酵素（GLDH）が呼吸鎖とリンクして機能していることが知られていたが、近年、酢酸菌の主要な細胞膜酵素であるキノヘモプロテイン・アルコール脱水素酵素（ADH）が非生理学的な高濃度のグリセロールが存在する環境下でグリセリン酸（GA）を生成することが明らかにされ、酢酸菌のグリセロール代謝は更なる広がりを見せるようになってきた。そこで本研究では、*Ac. methanolica* のグリセロール酸化能を非生理学的濃度も含めた範囲で再調査することにより、本菌の DHA 生成能の有無を明らかにすることを目的とした。
【方法】グリセロールとメタノールを炭素源とする培地で生育した *Ac. methanolica* MB58 の菌体より細胞膜画分を調製し、フェリシアン化カリウムを人工電子受容体とするアッセイ系でグリセロールの酸化活性の有無を調査した。また、グリセロール酸化に伴う酸素消費をクラーク型酸素電極により測定し呼吸鎖との関連を調査した。休止菌体反応による酸化生成物は TLC によって定性分析した。
【結果と考察】細胞膜画分を用いたアッセイ系において終濃度 100 mM のグリセロールを基質とする反応系ではわずかな活性しか示さなかったが、終濃度 1 M の高濃度基質を用いた反応系では顕著なグリセロール酸化活性を示すことが分かった。この反応は酸素消費を伴う活性であり呼吸鎖阻害剤であるアザイドの阻害を受けたことから呼吸鎖にリンクした反応であることが明らかとなった。TLC により休止菌体反応による生成物の定性を行ったところ、100 mM 基質の反応系では TLC の検出限界以下であったが、1 M 基質の反応系では DHA と GA を生成していることが確認できた。以上のことから、*Ac. methanolica* は高濃度のグリセロール存在下でのみ、顕著な DHA 生成能を示すことが明らかとなった。

methylotrophs, acetic acid bacteria, oxidative fermentation

講演番号：2A10p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 10 会場

Gluconobacter oxydans NBRC 3293 由来 2-ケトグルコン酸脱水素酵素遺伝子の同定およびその活用
Identification of 2-ketogluconate dehydrogenase genes in *Gluconobacter oxydans* NBRC 3293 and its application

○片岡 尚也、松谷 峰之介、松下 一信、藥師 寿治（山口大・農・生物機能）
○Naoya KATAOKA, Minenosuke MATSUTANI, Kazunobu MATSUSHITA, Toshiharu YAKUSHI (Yamaguchi Univ.)

【背景・目的】*Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Acetobacter* 属に代表される酢酸菌は, ペリプラズム領域に存在する, FAD や PQQ 等を補欠分子族とする膜結合型酵素を持つ。これらの酵素は, 呼吸鎖と連動することで糖類やアルコール類を特異的に酸化する。本反応は酸化発酵と呼ばれ, 酢酸菌の持つ特徴の一つとして知られており, 産業的にはビタミン C や食酢製造の場で利用されている。グルコースからのグルコン酸・ケトグルコン酸発酵に関与する酵素および遺伝子に関しては, 数多くの報告例が存在している。しかしながら, 特定の酢酸菌のみが保有する 2-ケトグルコン酸 (2-KGA) を 2,5-ジケトグルコン酸 (2,5-DKGA) へ酸化する酵素である 2-ケトグルコン酸脱水素酵素 (2KGDH) 遺伝子は未だ同定されていない。そこで本研究では, 比較ゲノム解析に基づいた 2-KGDH 遺伝子の同定を試みたので報告する。
【方法・結果】これまでの研究により, *Gluconobacter oxydans* NBRC 3293 由来の 2-KGDH が精製および解析されており, 2-KGDH は FAD を補欠分子族とする膜結合型フラボプロテイン・シトクロム *c* 複合体であることが明らかとなっている。そこでまず, *G. oxydans* NBRC 3293 および同種である *G. oxydans* NBRC 3244 のドラフトゲノム配列を取得するとともに, 近縁種の既知のゲノム配列を加え, FAD 結合部を持つフラボプロテインサブユニットを標的とした分子系統解析を行った。その結果, 膜結合型フラボプロテインは, グルコン酸脱水素酵素 (GADH), ソルビトール脱水素酵素 (SLDH) および未同定グループの 3 ないし 5 つのクレードに分かれることが明らかになった。加えて, 2KGDH を保有する *G. oxydans* NBRC 3293 には, 計 6 つの膜結合型フラボプロテインが存在しており, その内の 3 つが GADH, 1 つが SLDH, 他の 2 つが未同定グループのクレードに分布することが示された。そこで, 機能未知である未同定グループの 2 つと GADH に分類される 1 つの遺伝子を同種である *G. oxydans* NBRC 12528 Δ*adhA* で高発現させた。得られた組換え体を用いて活性を評価したところ, 未同定グループに分類された 1 つを高発現させると高い 2KGDH 活性を示した。さらに, 組換え体から本酵素を精製し既報の結果と比較したところ, 性質が一致したことから, 本遺伝子が 2KGDH をコードする遺伝子と結論づけた。現在, 2,5-DKGA の前駆体である 2-KGA を高生産する異種酢酸菌 *Gluconobacter japonicus* NBRC 3271 Δ*sldA* で 2KGDH 遺伝子を高発現させることで, 2,5-DKGA の高生産を試みている。

Gluconobacter oxydans, flavoprotein, comparative genome analysis

講演番号：2A10p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 10 会場

酢酸菌のウロン酸酸化に寄与する PQQ 酵素

Quinoprotein involved in uronate oxidation in acetic acid bacteria

○玉井 秀樹、丸山 雅史、阿野 嘉孝 (愛媛大・農)
○Hideki TAMAI, Masafumi MARUYAMA, Yoshitaka ANO (Fac. of Agr., Ehime Univ.)

【目的】酢酸菌は自然界では花や腐敗した果実に生息し、そこに多量に含まれる糖や糖アルコールを酸化発酵的に変換していることが知られている。ここには、ピロロキノリンキノン（PQQ）や FAD を補欠分子族とする多数の細胞膜酵素群が呼吸鎖とリンクして機能しており、本菌の生育に重要な働きをしている。一方、ウロン酸は花や果実などに含まれるペクチンなどの複合多糖の構成糖であり、これらの腐敗過程において酢酸菌の生育環境に多量に生成してくると考えられているが、酢酸菌のウロン酸に対する酸化発酵能については課題として残されていた。そこで本研究では、酢酸菌のウロン酸に対する酸化発酵能を調査し、その機構を明らかにすることを目的とした。
【方法】さまざまな酢酸菌から細胞膜画分を調製し、D-グルクロン酸（GluUA）および D-ガラクツロン酸（GalUA）をウロン酸基質としフェリシアン化カリウムを人工電子受容体としたアッセイで、ウロン酸酸化活性の有無を調査した。活性が確認できた *Gluconobacter oxydans* NBRC12528 の細胞膜画分を用いて GluUA および GalUA に対する酸化活性の諸性質を比較調査した。
【結果と考察】ウロン酸酸化活性の調査の結果、多くの酢酸菌が細胞膜画分にウロン酸酸化活性を有していることが明らかとなった。そこで遺伝子解析が容易な *G. oxydans* NBRC12528 を用いて調査を進めた。本菌の細胞膜画分を調製し緩衝液中でウロン酸と直接反応させると、ウロン酸の減少とアルダル酸の生産が確認できたことから、ウロン酸は細胞膜酵素よりアルダル酸に酸化されることが明らかになった。EDTA 処理および PQQ、$CaCl_2$ 添加処理による細胞膜画分のウロン酸酸化活性への影響を調べると、他の PQQ 酵素と同様の挙動を示すことが確認できたことから、酢酸菌のウロン酸酸化には PQQ 酵素が寄与すると推測された。しかし、GluUA と GalUA を基質とした場合では EDTA 処理による影響と活性の pH パターンが異なり、異なる酵素が反応を触媒していることが推測できた。GalUA 酸化活性と EDTA 処理による影響が類似したキノプロテイン・グルコース脱水素酵素（GDH）の活性を比較すると、異なる pH パターンを示したことから、GalUA 酸化には GDH は関与していないと推測できた。一方、GluUA 酸化活性と EDTA 処理による影響が類似したキノヘモプロテイン・アルコール脱水素酵素（ADH）の活性を比較すると、野生株の ADH 活性と GluUA 酸化活性の pH パターンは酷似し、ADH 破壊株で GluUA 酸化活性が完全に消失した。また ADH の精製酵素はエタノールに対して 30.4%の GluUA 酸化活性を有していた。以上のことから酢酸菌の GluUA 酸化には ADH が寄与していると結論した。

acetic acid bacteria, oxidative fermentation, uronate

講演番号：2A10p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 10 会場

Eggerthella sp. YY7918 株でのダイゼイン-エクオール変換に関する酵素の解析
Analysis of enzymes for daidzein-to-equol conversion system in *Eggerthella* sp. YY7918
○川田 結花[1]、横山 慎一郎[2]、野村 泉[1]、服部 正平[3]、大島 健志朗[3]、鈴木 徹[1] ([1]岐阜大・連農、[2]岐阜県産業技術センター、[3]東大・院・新領域)
○Yuika KAWADA[1], Shin-ichiro YOKOYAMA[2], Izumi NOMURA[1], Masahira HATTORI[3], Kenshiro OHSHIMA[3], Tohru SUZUKI[1] ([1]Gifu Univ., [2]Gifu Pref., [3]Tokyo Univ.)

エクオールとは特定の腸内細菌により大豆イソフラボンであるダイゼインを前駆体として生産される代謝物で、その構造は女性ホルモンのエストラジオールに類似していることから、エストロゲンレセプターへの結合活性を示す。エクオールはエストラジオールに対し、ダイゼインの約100倍の結合活性を示すため更年期の女性ホルモンの減少に起因する各種症状に効果を示すとして注目されている。エクオール産生菌の有無には個人差があるため腸内細菌叢の違いがエストロゲン活性に大きく影響する可能性があると考えられている。

エクオール産生のメカニズムについては、エクオール産生能を有する腸内細菌の酵素、ダイゼインレダクターゼ、ジヒドロダイゼインレダクターゼ、テトラヒドロダイゼインレダクターゼの触媒する3段階の還元反応によってダイゼインからエクオールへ代謝されることが明らかにされている。エクオール代謝の酵素学的特性を明らかにすることで、人為的なエクオール生合成の調節が可能となる。

我々はこれまでに、成人の糞便よりエクオール産生能を持つ*Eggerthella* sp.YY7918株を単離し、全ゲノム配列の解析を行ってきた。このゲノム情報をもとに既報の*Lactococcus garvieae*由来のエクオール産生に関する遺伝子群、L-DZNR、L-DHDR及びL-THDRと翻訳レベルで99%の相同性を示す3つのORF（*E1*、*E2*、*E3*）をエクオール生産に関わる遺伝子群の候補とした。各遺伝子をクローニングし作製した大腸菌組換え体において*E1*、*E2*、*E3*全ての遺伝子の酵素活性を確認した。さらに中間代謝物を有機化学的に合成し、各段階の反応を定量的に解析する試みを行った。その結果、大腸菌組換え体および組換え酵素において、YY7918株における、NADPHを補酵素としたダイゼインからエクオールへの3段階の酵素反応を明らかにし、中間代謝物質の産生を定量的に分析できることを確認した。

equol, daidzein, isoflavone

講演番号：2A10p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 10 会場

核酸医薬合成中間体となるヌクレオシド誘導体の合成に有用な微生物酵素の探索

Screening of microbial enzymes for the synthesis of nucleoside acid drug intermediates

○松谷 成裕[1]、堀之内 伸行[1]、日比 慎[2]、斯 大勇[1]、高橋 里美[2]、小川 順[1]([1]京大院農　応用生命、[2]京大院農　産業微生物)

○Narihiro Matsutani[1], Nobuyuki Horinouchi[1], Makoto Hibi[2], Dayong Si[1], Satomi Takahashi[2], Jun Ogawa[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】核酸医薬は、低分子医薬や抗体医薬に続く次世代の医薬品として期待されている。その合成原料として、高いヌクレアーゼ耐性をもつリボース誘導体が使用されている。なかでも、ピリミジンヌクレオシド誘導体については効率的合成法が開発されてきているが、プリンヌクレオシド誘導体に関しては多段階反応が必要となるため化学合成が困難とされている。そこで、バイオプロセスを活用するピリミジン誘導体からのプリンヌクレオシド誘導体への変換法の開発が望まれている。本研究では、2'-methoxy-Uridine（2'-OMe-UR）から Adenine への糖転移による 2'-methoxy-Adenosine（2'-OMe-AR）の生産に関し、高活性微生物を探索するとともに、反応に関与する酵素の単離精製および機能解析を目的とした。

【方法と結果】研究室保存菌約 1000 株を対象に、2'-OMe-UR と Adenine から 2'-OMe-AR を生成する菌株の探索を行った。その結果、*Lactobacillus buchneri* LBK78 において目的の活性をを見いだした。本反応に関与する酵素を単離・精製し、アミノ酸配列を決定したところ、*Lactobacillus buchneri* NRRL-30929 株由来の nucleoside hydrolase と高い相同性を示した。次に、本酵素をコードする遺伝子を *E. coli* Rosseta2 に導入した形質転換体を得た。本菌株の無細胞抽出液より、硫安分画・陰イオン交換クロマトグラフィ・ゲルろ過クロマトグラフィを経て精製酵素を得た。精製酵素の 2'-OMe-UR 糖転移反応の解析を進めたところ、反応最適条件は 50℃、pH 7.0 であることが明らかになった。この条件で 60 mM 2'-OMe-UR、30 mM Adenine から約 0.3 mM の 2'-OMe-AR 生産を確認した。さらに解析を進めると、2'-OMe-UR 濃度を上げることで 2'-OMe-AR 生産が向上することを見いだした。現在、さらなる高収率化を目指して詳細な反応解析を進めている。

nucleoside acid drug, nucleoside hydrolase, Lactobacillus buchneri

講演番号：2A10p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 10 会場

ポリグルタミン酸型葉酸の消化管吸収促進に有用な微生物の探索

Screening of microorganisms useful for enhancing gastrointestinal absorption of pteroylpolyglutamate

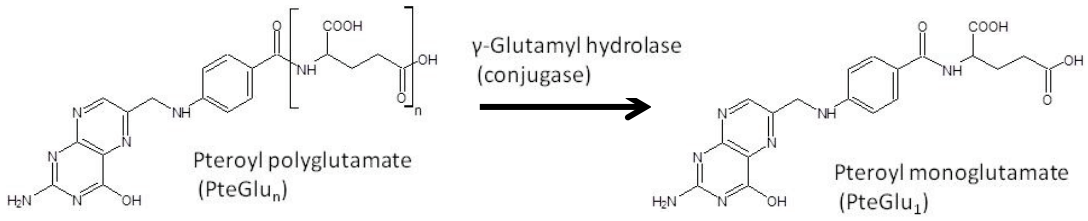
○岸田 奈弓[1]、岸野 重信[1]、青木 雄大[2]、鈴木 重徳[2]、小川 順[1]([1]京大院農・応用生命、[2]カゴメ株式会社研究開発本部)
○Nayumi KISHIDA[1], Shigenobu KISHINO[1], Yudai AOKI[2], Shigenori SUZUKI[2], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Research and Development Division, Kagome CO., LTD.)

【目的】

葉酸（プテロイルグルタミン酸）は、プテリジンにパラアミノ安息香酸とグルタミン酸が結合した構造を持ち、水溶性ビタミンに分類される生理活性物質である。葉酸が不足すると、アミノ酸代謝障害が起こるとともに、核酸合成が滞るため細胞分裂に支障をきたし、赤血球障害や悪性貧血などの症状が現れる。また、葉酸貯蔵機能に限界があること、成長期に多量に消費されること、摂取量が多くないことなどから、葉酸は欠乏症がおこりやすいビタミンの一つである。

葉酸は、食品中ではその多くが側鎖にグルタミン酸が 3~7 個結合したポリグルタミン酸型葉酸として存在しているが、ポリグルタミン酸型葉酸はモノグルタミン酸型葉酸に比べて小腸での吸収率が低いため、小腸においてγ-グルタミルヒドロラーゼ（コンジュガーゼ）によりモノグルタミン酸型葉酸へと変換されて体内へ吸収される。したがって、消化管におけるポリグルタミン酸型葉酸からモノグルタミン酸型葉酸への変換を促進することができれば、葉酸の吸収が高まり、葉酸欠乏症を予防できると考えられる。

本研究では、ポリグルタミン酸型葉酸のひとつであるトリグルタミン酸型葉酸をモノグルタミン酸型葉酸へと変換する微生物の探索を行った。



【方法・結果】

異なるグルタミン酸残基数の葉酸を分離定量できる HPLC の分析系を構築し、この分析系を用いて、トリグルタミン酸型葉酸をモノグルタミン酸型葉酸へと変換するコンジュガーゼ活性を有する微生物の探索を行った。ポリグルタミン酸部分の加水分解を期待し、ポリ-γ-グルタミン酸資化性菌を対象とした探索、さらには誘導条件や様々な反応条件を検討した結果、ポリ-γ-グルタミン酸資化性菌として土壌より単離した 2 株の微生物においてコンジュガーゼ活性を認めた。

pteroylpolyglutamate, conjugase (γ-glutamyl hydrolase), probiotics

講演番号：2A10p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 10 会場

新規環状アミノ酸水酸化酵素の探索と機能解析
Screening and characterization of novel cyclic amino acid hydroxylases
○森 亮輔[1]、日比 慎[2]、三宅 良磨[3,4]、川端 潤[3,4]、高橋 里美[2]、小川 順[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物、[3]三菱化学科学技術研究センター、[4]エーピーアイコーポレーション）
○ Ryosuke MORI[1], Makoto HIBI[2], Ryoma MIYAKE[3,4], Hiroshi KAWABATA[3,4], Satomi TAKAHASHI[2], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Mitsubishi Chemical Group Science and Technology Research Center, [4]API Corporation)

【目的】水酸化酵素の一種であるα-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ（DO）は、アミノ酸などの親水性の基質に対して水酸基を立体選択的に導入することができる。我々も DO の一種である L-isoleucine hydroxylase を用いた(2*S*,3*R*,4*S*)-4-hydroxyisoleucine の実用レベルでの生産を実現しており、DO の産業用酵素としての有用性を示してきた。本発表では、DO の応用範囲の拡大に向けた DO ライブラリーの構築に関して、医薬品の合成中間体やキラルビルディングブロックとして重要な光学活性水酸化環状アミノ酸の生産に有用な新規環状アミノ酸水酸化酵素について報告する。
【方法と結果】環状アミノ酸類を単一炭素源または単一窒素源とする最少培地を用いて集積培養を行い、土壌サンプルより環状アミノ酸水酸化活性を持つ糸状菌を単離した。この糸状菌の無細胞抽出液を用いて反応条件を検討した結果、水酸化反応はα-ケトグルタル酸依存的であり、EDTA 添加で水酸化活性が低下するという DO 触媒反応と同様の性質を示した。続いて、酵素精製及びアミノ酸配列解析を行い、環状アミノ酸水酸化酵素の遺伝子を同定した。同定した遺伝子は多くの DO に共通する鉄結合モチーフである HX(D/E)$X_{n>40}$H という配列を含んでいたが、既知の DO とアミノ酸配列が大きく異なっており、新規性が高いと考えられた。本酵素遺伝子を *E. coli* JM109 で発現させ、環状アミノ酸の一種である L-プロリンと反応させたところ *trans*-4-L-ヒドロキシプロリンの生成が確認できた。現在、さらなる基質特異性の評価等、詳細な酵素学的解析を行っている。

hydroxylase, 2-ketoglutarate dependent dioxygenase

講演番号：2A10p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 10 会場

アミノ酸水酸化反応に有用なα-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼの補基質供給系の開発

Development of cosubstrate-supplying system for α-ketoglutarate-dependent dioxygenases useful for amino acid hydroxylation

日比 慎[2]、○富田 弥生[1]、矢島 紘子[2]、高橋 里美[2]、小川 順[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物）
Makoto HIBI[2], ○Yayoi TOMITA[1], Hiroko YAJIMA[2], Satomi TAKAHASHI[2], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】水酸化アミノ酸は医薬品や健康食品への応用が期待される有用な機能性アミノ酸である。しかし、多くの水酸化アミノ酸は分子内に複数の不斉炭素原子を有するため、有機化学的手法による合成が困難である。一方で酵素法による合成は高い立体選択性、位置選択性が期待でき、あわせて環境負荷が小さいという利点を備えている。水酸化酵素の一種であるα-ケトグルタル酸（αKG）依存性ジオキシゲナーゼは、水酸化アミノ酸の酵素合成に有用なツールである。これらのジオキシゲナーゼは、非ヘム鉄を活性中心にもち、補基質として O_2 とαKGを要求する。αKGが比較的高価であることから、ジオキシゲナーゼを用いた酵素法による水酸化アミノ酸生産をスケールアップする際、コスト面での課題があった。そこで、本研究では安価な原料からαKGを生成する補基質供給系と、αKG依存性ジオキシゲナーゼ反応を組み合わせたシステムを構築することで、安価で高収率な水酸化アミノ酸生産法の開発を目指した。
【方法】*Streptomyces hygroscopicus* 由来のグルタミン酸オキシダーゼ（Gox）遺伝子を大腸菌に導入し、グルタミン酸をαKGへと変換する活性を持つGox発現株を構築した。以前本研究室で構築したαKG依存性ジオキシゲナーゼ発現株にGox発現株を組み合わせることで、グルタミン酸を添加した反応系における水酸化アミノ酸生産を検討した。
【結果】Gox を用いた補基質供給系において、グルタミン酸が αKG に変換される際に生成する過酸化水素が、αKG依存性ジオキシゲナーゼ活性を阻害することが判明した。そこで、Goxによる補基質供給系、αKG依存性ジオキシゲナーゼ、カタラーゼを組み合わせた複合酵素システムを構築した。本システムでは、αKGを直接添加する反応系と比較して遜色のない水酸化アミノ酸生産が認められた。

α-ketoglutarate-dependent dioxygenase, L-glutamate oxidase, hydroxylation

講演番号：2A10p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 10 会場

Screening of 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid producing lactic acid bacteria for probiotics

○Nu Anh Thu LE[1], Shigenobu KISHINO[1], Yoshie UCHIBORI[2], Yasunori YONEJIMA[2], Jun OGAWA[1] ([1]Division of Applied Life Sciences, Graduate school of Agriculture, Kyoto University, [2]Research and Development Department, Nitto Pharmaceutical Industries, Ltd.)

Introduction

Hydroxy fatty acids such as ricinoleic acid (12-hydroxy-*cis*-9-octadecenoic acid) are widely used in chemical, food, and cosmetic industries as materials for polymers, lubricants, emulsifiers, and stabilizers. They have antibiotic, anti-inflammatory, and anticancer activities and therefore can be applied for medical purposes. In our previous studies, we found that 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA), which was produced by *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a as an intermediate of linoleic acid metabolism[1)], had ability to recover the intestinal epithelial barrier impairment in Caco-2 cells[2)]. These situations led us to screen lactic acid bacteria, which is one of the most important microorganisms for food and industrial purposes, for producing 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid.

Methods and Results

Through the screening of about 500 strains of lactic acid bacteria, one strain was selected as a potential strain for HYA production. After the optimization of cultivation conditions (such as temperature, inducer, and cultivation time) and reaction conditions (such as buffer, pH and substrate), the strain produced about 0.73 mg/ml HYA from 1 mg/ml linoleic acid (the conversion yield is 73%). The cells in the stationary growth phase (OD_{610} ~ 0.9-1.2) showed significant activity of HYA production from linoleic acid.

References

1. S. Kishino, et al, PNAS, (2013),110, 19808-19810
2. J. Miyamoto, et al, Annual Meeting of Japan Society for Biosciences, Biotechnology, and Agrochemistry, (2013), 2A22a15

Hydroxy fatty acid, lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*

講演番号：2A10p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 10 会場

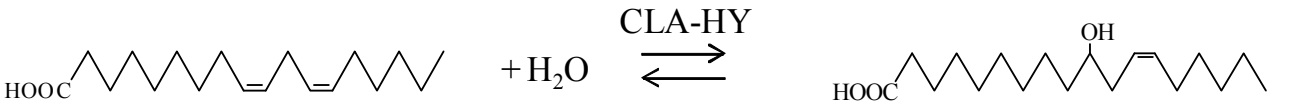
Lactobacillus plantarum AKU 1009a 由来脂肪酸水和脱水酵素の諸性質解明
Analysis of fatty acid hydratase/dehydratase from *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a

○竹内 道樹[1]、田辺 香緒里[1]、平田 晶子[1]、朴 時範[2]、岸野 重信[1]、小川 順[1,3]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物、[3]京大・生理化学ユニット）
○Michiki TAKEUCHI[1], Kaori TANABE[1], Akiko HIRATA[1], Si-Bum PARK[2], Shigenobu KISHINO[1], Jun OGAWA[1,3] ([1]Div. Appl. Life Sci., Kyoto Univ., [2]Lab. Ind. Microbiol., Kyoto Univ., [3]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

【目的】

近年、様々な機能性脂肪酸が、栄養学的・薬理学的見地から注目を集めており、機能性脂肪酸の微生物生産に関する研究も盛んに行なわれている。機能性脂肪酸の一つである共役リノール酸（CLA）は共役した二重結合を有するリノール酸（*cis*-9, *cis*-12-octadecadienoic acid）の異性体であり、その中でも *cis*-9, *trans*-11 および *trans*-10, *cis*-12 異性体において、体脂肪の減少・抗がん作用・動脈硬化予防作用など有益な生理活性が見いだされている。

本研究室では、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a によるリノール酸の不飽和脂肪酸飽和化代謝を明らかにすることにより、CLA 生産ならびに脂肪酸分子内の炭素 - 炭素二重結合の飽和化に関与する酵素（水和脱水酵素（CLA-HY）、酸化還元酵素（CLA-DH）、異性化酵素（CLA-DC）、エノン還元酵素（CLA-ER））を見いだしている[1)]。本研究では、本菌の不飽和脂肪酸飽和化代謝の初発反応を触媒する CLA-HY について諸性質の解明を試みた。



Linoleic acid　　10-Hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid

【方法・結果】

L. plantarum AKU 1009a 由来 CLA-HY を His-tag 融合タンパク質として大量発現する形質転換大腸菌を作成した。形質転換大腸菌を、LB 培地を用いて培養し、対数増殖期初期に IPTG（終濃度 1 mM）を添加することにより、導入タンパク質の誘導を行った。得られた菌体を超音波破砕することにより cell-free-extracts を作成し、アフィニティークロマトグラフィーにより CLA-HY の精製を行った。本酵素の水和活性および脱水活性について検討したところ、いずれも FAD を補酵素として要求し、NADH の添加により活性が上昇することが判明した。また、水和反応の基質は、Δ9 位にシス型二重結合を有する炭素数 18 の脂肪酸であり、脱水反応の基質は、10 位に水酸基を有する炭素数 18 の脂肪酸であった。さらに、水和反応および脱水反応において、反応 pH、反応温度、塩濃度が酵素活性に与える影響や、酵素の pH 安定性、温度安定性を検討するなど、本酵素の諸性質を解明した。

1) Kishino *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 637-640 (2013)

hydroxy fatty acid, hydratase/dehydratase, lactic acid bacteria

講演番号：2A10p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 10 会場

油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 由来グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼホモログの機能解析

Characterization of glycerol-3-phosphate acyltransferase homologs from oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4

○落合 美佐[1]、櫻谷 英治[2]、安藤 晃規[3]、小川 順[2]（[1]サントリーSIC、[2]京大院農・応生、[3]京大・生理化学ユニット）
○ Misa OCHIAI[1], Eiji SAKURADANI[2], Akinori ANDO[3], Jun OGAWA[2] ([1]SUNTORY SIC, [2]Graduate School of Agriculture Kyoto Univ., [3]Kyoto Univ.)

【目的】脂質生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 は、アラキドン酸含有トリアシルグリセロール（TG）を菌体内に蓄積し、最適条件下では乾燥菌体あたりの TG は 50-60%に達する。*M. alpina* の油脂蓄積機構を解明する手がかりとして、貯蔵脂質である TG の生合成経路に関わる遺伝子をクローン化し機能解析を行う。TG やリン脂質の生合成では、グリセロール-3-リン酸がアシル化され、リゾホスファチジン酸が生じる。この反応を担うのが、グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ（GPAT）である。*M. alpina* 1S-4 から *GPAT* ホモログを単離し機能解析を行った。
【方法と結果】*M. alpina* 1S-4 株のゲノム情報から 5 つの *GPAT* ホモログ（*MaGPAT1-5*）を見出し、それらの cDNA をクローン化した。*MaGPAT1* と *MaGPAT3* は相同性が高く、アミノ酸配列の identity は 83.7%であり、*Saccharomyces cerevisiae* で GPAT 活性を担う遺伝子として同定されている 2 つの遺伝子 *GPT2* と *SCT1* との identity は 30%程度であった。*S. cerevisiae* ではこれら 2 つを同時に欠失させた *Δgpt2, Δsct1* 株は致死であることが知られている。そこで、*M. alpina* 由来の *GPAT* ホモログが *S. cerevisiae* の *Δgpt2, Δsct1* 欠失を相補できるかどうかを調べた。その結果、*MaGPAT1* または *MaGPAT3* を発現させた酵母では *Δgpt2, Δsct1* 欠失であっても生育することができ、これらが GPAT 活性を有することが示唆された。さらに、*MaGPAT1* や *MaGPAT3* を高発現させると菌体あたりの総脂肪酸量が顕著に増加し、総脂肪酸に占める飽和脂肪酸の比率が高くなった。
一方、*Δgpt2, Δsct1* 欠失を相補できなかった 3 つの *GPAT* ホモログのうち、*MaGPAT4* は酵母で構成的に高発現させると生育を阻害したが、ガラクトース誘導型プロモーターで発現させ、ガラクトース含有培地で培養すると、コントロール株に比べて酵母の菌体内の総脂肪酸量が顕著に増加しており、総脂肪酸に占めるパルミチン酸の比率が高まっていた。また、*MaGPAT2* を酵母で高発現させると、菌体内の総脂肪酸量はコントロール株と変わらないものの、脂肪酸組成ではパルミチン酸の比率が低くなり、オレイン酸の比率が高くなった。*MaGPAT2* をアラキドン酸を作るよう育種した酵母で高発現させたところ、総脂肪酸に占めるジホモ-γ - リノレン酸やアラキドン酸の比率がコントロール株と比べて高くなった。

glycerol-3-phosphate acyltransferase, *Mortierella alpina*

講演番号：2A10p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ A 校舎 10 会場

分裂酵母 *S. pombe* でのリパーゼの活用によるリシノール酸の分泌生産
Secretory production of ricinoleic acid in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* by utilizing lipase

○植村 浩[1]、矢澤 彌[1]、熊谷 博道[2] ([1]産総研・生物プロセス、[2]旭硝子)
○Hiroshi UEMURA[1], Hisashi Yazawa[1], Hisomichi Kumagai[2] ([1]AIST, Bioproduction Research Inst., [2]Asahi Glass Co. Ltd.)

【目的】
リシノール酸はオレイン酸の 12 位に OH 基を持つ特殊な脂肪酸で、石油化学製品の代替材料として注目されている。我々はオレイン酸含量の高い分裂酵母にオレイン酸に OH 基を付加する Δ12-hydroxylase 遺伝子（*FAH12*）を導入し、酵母の全脂肪酸の５０％を超えるリシノール酸の合成に成功している。しかしリシノール酸生産が宿主に毒性を示しリシノール酸生産株の増殖が阻害されるなど解決すべき点が残されていた。そこで今回、宿主にリシノール酸耐性能力を付与することを目的として更なる解析を行った。

【方法及び結果】
宿主の増殖阻害の改善を目的に、分裂酵母 c DNA ライブラリーをスクリーニングし、増速阻害を解除する遺伝子としてフォスフォリパーゼ A2 をコードする *plg7* を見いだした。*plg7* を導入した株ではリシノール酸生産量は減少せずに、増殖はリシノール酸非生産株に近いレベルまで回復した。脂質の解析から Plg7p を高発現した株ではリン脂質内のリシノール酸量がコントロール株に比べて減少し遊離のリシノール酸量が増加しており、Plg7p のフォスフォリパーゼ活性によりリシノール酸がリン脂質から除去され、生体膜の機能阻害が解除されて増殖が回復している事が示唆された。更に、FAH12 の活性は低温で強くなるが、低温でリシノール酸生産量を増加させた条件下で *plg7* を高発現させると培養上清が白濁した。この白濁現象は培養 1 日目から観察され、その濁度は日毎に増加したが、上清中には溶菌した細胞は観察されなかった。脂質及び脂肪酸組成の解析から、遊離型のリシノール酸が高効率で細胞外へ分泌される事が示された。*plg7* を高発現させていない場合に比べて全体のリシノール酸生産量も上がり、定常期ではその約半分量のリシノール酸の分泌が確認され、リシノール酸を遊離脂肪酸として細胞外へ分泌生産できる可能性が示された。本研究の一部は野田産研の助成及び NEDO プロジェクトの一環として行われた。

yeast, ricinoleic acid, secretion

講演番号：2A10p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ A 校舎 10 会場

固定化リパーゼを用いたネルボン酸セラミドの酵素合成

Enzymatic synthesis of nervonic ceramide with immobilized lipase

○梅本 宏樹[1]、倉田 淳志[1]、濱口 翔平[2]、塚原 智[2]、石黒 隆[2]、岸本 憲明[1] ([1]近畿大院農、[2]ミヨシ油脂（株）食品油脂研究所)
○ Hiroki UMEMOTO[1], Atsushi KURATA[1], Shohei HAMAGUCHI[2], Satoshi TSUKAHARA[2], Takashi ISHIGURO[2], Noriaki KISHIMOTO[1] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kinki Univ., [2]Miyoshi oil and fat Co., Ltd.)

【目的】ネルボン酸（*cis*-15-Tetracosenoic acid、$C_{24:1}$）は、生体内ではスフィンゴ脂質に含まれる極長鎖一価不飽和脂肪酸である。ネルボン酸は強い DNA ポリメラーゼ阻害活性を持つが、生体内では脂肪酸として代謝されるので抗ガン剤としての利用は難しいと考えられている。一方、スフィンゴ脂質の一種であるセラミドはセカンドメッセンジャーとして働き、ガン細胞のアポトーシスに関与することが知られている。セラミドによる代謝変化には結合する脂肪酸の種類が密接に関与し、ネルボン酸が結合したセラミドはマントル細胞リンパ腫 Rec-1 などのいくつかの細胞にアポトーシスを誘導することが分かっている。我々は先の農芸化学会 2013 年度大会で、*Mortierella* 属糸状菌によるネルボン酸の発酵生産を報告した。今回、発酵生産したネルボン酸からリパーゼを用いてセラミドの酵素合成法を確立したので報告する。
【方法・結果】ヒトセラミドを構成するスフィンゴイド塩基 D-*erythro*-sphingosine とネルボン酸メチルエステルを 2-メチル-2-ブタノールに溶解し、*Candida antarctica* 由来の固定化リパーゼ Novozym 435 を触媒に 65℃で 24 時間酵素反応を行った。生成物をセミ分取 HPLC で精製した後、構造解析（ESI-MS、NMR、旋光度測定）に供し、ネルボン酸を側鎖に持つセラミド（N-Nervonyl-D-*erythro*-sphingosine）と決定した。次にセラミド合成の反応条件を最適化するために、リパーゼと反応溶媒を検討した。8 種類の固定化リパーゼを触媒に酵素合成した結果、Novozym 435 を用いたとき、最も高い変換率 17.4 mol%が得られた。次に、Novozym 435 を触媒に 10 種類の反応溶媒中で反応させた結果、*n*－ヘキサンを用いたとき最も変換率が高く、53.2 mol%に達した。さらにこの反応の基質特異性を調べるために、基質のネルボン酸メチルエステルを 4 種類の長鎖脂肪酸メチルエステル（$C_{18:1}$、$C_{20:1}$、$C_{22:1}$、$C_{24:0}$）に変えて酵素反応したところ、いずれの脂肪酸でも変換率 60～76 mol%で、対応するセラミドが合成できた。合成できたセラミドは、ファインケミカルとして化粧品や医薬品用途への応用が期待できる。

Ceramide, Nervonic acid, Lipase

講演番号：2A10p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ A 校舎 10 会場

薬物代謝酵素発現酵母を用いたヒト医薬品代謝物の製造

Whole cell-dependent synthesis of human drug metabolites using genetically engineered yeast cells.

○西川 美宇[1,2]、生城 真一[1]、安田 佳織[1,2]、榊 利之[1]([1]富山県立大生物工、[2]TOPU バイオ研)
○Miyu Nishikawa[1,2], Shin-ichi Ikushiro[1], Kaori Yasuda[1,2], Toshiyuki Sakaki[1] ([1]Dep. of Biotech., Toyama.Pref.Univ., [2]TOPUBIO RESEARCH Co., Ltd.)

【背景・目的】 2008 年に米国食品医薬品局から提出された「代謝物の安全性評価に関するガイダンス」により、医薬品開発においては親化合物だけでなくその代謝物についても安全性評価が必要になってきた。また、医薬品においては親化合物よりも代謝物が生理活性を示すことが往々にしてあり、機能性評価における代謝物の需要も高まっている。しかし、大量の代謝物を従来法で合成するのは概して困難であり、代謝物の簡便な調製法の確立が望まれている。我々は医薬品開発への寄与を目指したヒト医薬品代謝物製造法の確立を目的とし、出芽酵母発現系を用いて代表的な第 I 相薬物代謝酵素である P450、および第 II 相薬物代謝酵素である UDP-グルクロン酸転移酵素（UGT)、硫酸基転移酵素（SULT）発現株を構築した。
【方法】 酵母発現用ベクターを用いてヒトおよび哺乳類由来 P450、UGT、SULT 遺伝子を出芽酵母 AH22 株に導入し、薬物代謝酵素発現酵母株を構築した。また、ヒト由来 P450・UGT 同時発現株および P450・SULT 同時発現株を構築した。酵母菌体懸濁液にモデル化合物である 7-エトキシクマリンおよび 7-ヒドロキシクマリンを添加し、代謝活性を評価した。また、既存医薬品を含む様々な化合物の代謝分析および代謝物製造を行った。
【結果】 これまでに 19 種類の P450 発現株、35 種類の UGT 発現株、5 種類の SULT 発現株を構築し、数種類の化合物において、1L の反応系で数百ミリグラムの代謝物製造が可能となった。複数の代謝経路を持つ化合物においては、最適分子種の選択により特異的な代謝物製造が可能であった。また、ヒト以外の哺乳類由来 UGT 分子種発現株を用いることにより、複数の医薬品のアシルグルクロン酸抱合体を効率良く製造することに成功した。また、種々のフラボノイドからのグルクロン酸及び硫酸抱合体の合成に成功した。さらに、P450・UGT および P450・SULT 同時発現株の構築により、ヒト体内での連続的な薬物代謝反応を再現した。多種多様な発現系を有する本システムは、医薬品候補化合物の代謝予測や効率的な代謝物製造に有用であると考えられる。

Drug metabolite, Yeast expression system

講演番号：2A10p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ A 校舎 10 会場

酵母 *Trichosporon moniliiforme* の細胞反応による安息香酸からの *p*-ヒドロキシ安息香酸の高収量生産

High-Yield Bioproduction of *p*-Hydroxybenzoic Acid from Benzoic Acid by Whole Cell Reactions of *Trichosporon moniliiforme*

○安藤 拓也、吉野 周平、小林 慶一、桐村 光太郎（早大理工・応化）
○Takuya ANDO, Shuhei YOSHINO, Keiichi KOBAYASHI, Kohtaro KIRIMURA (Dept. Appl. Chem., Fac. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】*p*-ヒドロキシ安息香酸 (PHBA) は、防腐剤 (パラベン) の原料や液晶高分子材料のモノマーとして有用な化合物で、安息香酸 (BA) の *p*-位を水酸化することで生産できる。現在の PHBA の製造プロセスではフェノールを原料とした Kolbe-Schmitt 反応が利用されているが、副生成物の分離プロセスが必要で高温高圧条件を要することが課題となっている。本研究では、生体触媒を利用した PHBA 生産の代替プロセスを構築するため、benzoate-*p*-hydroxylase 活性を有する酵母 *Trichosporon moniliiforme* WU-0401[1, 2]の変異株を作製し、当該菌株の細胞を生体触媒として利用した PHBA の高収量生産について検討した。

【方法および結果】酵母 *T. moniliiforme* WU-0401 を、炭素源として 5 mM の BA を含む YM 培地で 2 日間培養した後、4 mM の BA と 0.5 g/L の yeast extract を含む改変 SA 培地[1]で 18 時間培養し、反応に使用する細胞を調製した。反応液中の BA や PHBA などの化合物は、HPLC を用いて定量した。10 mM の BA を基質とした反応を行い、WU-0401 の細胞を利用して位置選択的に BA の *p*-位水酸化反応が可能なことを確認した。しかし、1 時間の反応で 0.21 mM の PHBA が生産されたが、収量は低かった。そこで、WU-0401 に対して UV 照射により変異誘起処理を行い、PHBA の分解活性が低下した変異株 WU-0401-M1 を誘導した。WU-0401-M1 株の細胞を利用した場合、10 時間毎に反応液に 20 mM の BA を逐次添加する 30°C、40 時間の反応で、86 mM の BA から 47 mM (6.5 g/L) の PHBA が生産された (モル変換効率 55%) 。さらに、反応温度を 10°C とした場合、PHBA の生産量が増大し、40 時間の反応で 81 mM の BA から 75 mM (10 g/L) の PHBA が生産された (モル変換効率 93%) 。そこで、10°C において BA を連続添加した条件下で 132 時間の反応を行い、168 mM (23.2 g/L)の PHBA の生産を可能にした (モル変換効率 93%) 。以上より、酵母 *T. moniliiforme* WU-0401-M1 の細胞を生体触媒として利用することによって、PHBA の高収量生産に成功した。

[1] Y. Iwasaki, et al., Biodegradation., **21**, 557–564 (2010).
[2] S. Ienaga, et al., Bull. Chem. Soc. Jpn., **86**, 628-634 (2013).

Benzoic acid, *p*-Hydroxybenzoic acid, *Trichosporon moniliiforme*

講演番号：2A10p22
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ A 校舎 10 会場

糸状菌胞子を用いた新規な界面微生物変換プロセス
Novel interfacial bioconversion systems with fungal spores

○城戸 良介、杉谷 彩香、小田 忍、大箸 信一（金沢工大ゲノム研）
○Ryosuke Kido, Ayaka Sugitani, Shinobu Oda, Shinichi Ohashi (Kanazawa Inst. Technol.)

【目的】

医薬品原料の多くは水に対する溶解性が低い一方、疎水性有機溶媒に対する溶解性も高くはない。従って、Log *P* が 1.5 ~ 4.0 程度の中極性有機溶媒を生体触媒に利用できれば、それの適用範囲は大きく拡大することが期待できる。しかしながら、これらの中極性有機溶媒の多くは強い微生物毒性を発揮することが知られており、基質・生成物の溶解性と微生物毒性とのジレンマが、常に大きな障壁となる。一方、糸状菌胞子は栄養細胞に比べて強い有機溶媒耐性を示すうえに、水層中で様々な微生物変換反応を触媒することが報告されている。そこで本研究では、エネルギー源を添加した水層と中極性 ~ 疎水性有機溶媒との界面に糸状菌胞子を位置させて、有機層中の基質を微生物変換する新規なシステムを開発することを目的とした。

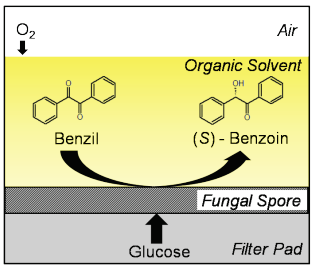
【方法・結果】

PDA 平板の中央にカビマット切片(13 株)を植菌し、ただちに有機溶媒 (13 種; log *P* 1.76 ~ 6.80)を重層し静置培養した。非重層系のコロニーが内壁に到達するまで培養し、溶媒を完全に除去した後にコロニー径をデジタルノギスで計測した(1st stage)。さらに表面を hexane 洗浄後、所定時間培養し、同様にコロニー径を計測した(2nd stage)。

1st stage では増殖が認められなかった株の多くが、2nd stage では log *P* = 1.76 の *tert*-butyl acetate でも旺盛に増殖した。以上の結果より、中極性溶媒を生体触媒に利用できる可能性が確認されたため、次に糸状菌胞子を用いた新規システムの開発を試みた。

Glucose を含む *Aspergillus sojae* NBRC 32074 の胞子懸濁液を濾過板もしくはセルロースビーズに吸着させ、1.0%の benzil/有機溶媒を添加して不斉還元を行わせた [1]。その結果、(*S*)-benzoin の生産が確認され、本不斉還元の反応条件の最適化についても検討した。

New bioconversion system



1) Oda, S., and Isshiki, K., Biosci. Biotechnol. Biochem., **72**, 1364 (2008).

Fungal spore, Interfacial reduction, Solvent-tolerance

講演番号：2A10p23
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ A 校舎 10 会場

Aspergillus niger の固体培養によるオリーブ葉二次代謝産物の微生物変換
Microbial conversion of olive secondary metabolites by solid-state culture of *Aspergillus niger*
○三宅 聡子、仁戸田 照彦、神崎 浩 (岡山大院環境生命)
○Satoko Miyake, Teruhiko Nitoda, Hiroshi Kanzaki (Okayama Univ.)

【目的】二次代謝産物の中には抗生物質のように既に利用されているものもあるが，ユニークな構造を有しているにもかかわらず応用されていないものも多く存在する。それらの中には微生物変換によるわずかな構造変換により高機能化される例も知られている。そこで，我々はオリーブ葉由来二次代謝産物の高機能化を目的とした微生物変換を試み，オリーブ葉抽出物のパン酵母処理で，oleuropein aglycon のアルデヒド型（化合物 A）から抗酸化活性の高い新規物質（化合物 B）への変換に成功し，その化合物の化粧品素材としての開発を進めている。パン酵母を用いた構造変換による高機能化が達成されたため，本研究ではさらに別の食品発酵微生物での二次代謝産物の高機能化を目指して研究を進めることにした。その際に，菌株として黒麹菌 *Aspergillus niger* を用い，さらに培養法として麹の生産に使われている固体培養法を用いた。固体培養は，生産される酵素の種類が豊富で，酵素発現量が高い事が知られているため微生物変換に適していると考え，本実験の微生物変換に用いた。
【方法・結果】φ9 cm シャーレ中の小麦ふすま培地に，*A. niger* を寒天培地ごと植菌して 28°C で培養した。培養 4 日目にオリーブ葉抽出物を添加したところ，培養物抽出物の HPLC クロマトグラム上に生成物と思われる新たなピークが添加 1 時間後から検出され，生成量が増加していった。この生成物（SM-1）をシリカゲルカラムクロマトグラフィー，分取 HPLC により単離・精製し，NMR，MS，UV，旋光度測定に供して構造解析を行った。質量分析結果から SM-1 の分子量は 286 であることが分かった。また，^{1}H-NMR スペクトルにおいて，δ6.2～7.4 付近にメタカップリング 2 組，オルトカップリング 1 組が見られた。これらの機器分析結果，及びオリーブ葉には oleuropein 以外にフラボノイド配糖体が含まれていることなどを総合的に考え文献検索を行ったところ,SM-1 がフラボノイド luteolin である可能性が示唆された。そこで，SM-1 の各種機器分析データを標品と比較した結果，SM-1 を luteolin と同定した。続いて，オリーブ葉に含まれている luteolin 7-*O*-glucoside が今回の微生物変換の反応基質である可能性が考えられたため，*A. niger* 固体培養粗酵素液で luteolin 7-*O*-glucoside を処理したところ，添加した luteolin 7-*O*-glucoside がほぼ全量加水分解され luteolin が生成した。また,HPLC 分析から luteolin 7-*O*-glucoside はオリーブ葉抽出物中に存在し，*A. niger* 固体培養物に添加することにより消失することが分かった。以上のことから，*A. niger* の微生物変換において，luteolin 7-*O*-glucoside が β-グルコシダーゼにより加水分解されて luteolin が生成したと判明した。

Aspergillus niger, bioconversion, solid-state culture

講演番号：2A11p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ A 校舎 11 会場

IncP-9 群 NAH 7 の oriT の同定と接合伝達宿主域に関する研究

Identification of oriT and analysis of host-range in IncP-9 plasmid NAH7

○岸田 康平、井上 慧、宮崎 亮、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院生命）
○Kohei Kishida, Kei Inoue, Ryo Miyazaki, Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata, Masataka Tsuda (Tohoku Univ.)

自己伝達性プラスミドは接合を介して他菌株に伝達し、その結果生じる表現型の変化は細菌の環境適応能やゲノムの再編成に大きく寄与している。現在まで F や Ti プラスミド等のモデルプラスミドにおける 1 本鎖 DNA 生成過程や細胞間の架け橋となる接合対の構造形成という分子機構の概略が解明されてきている。だが、供与菌と受容菌の組み合わせで宿主域、接合伝達頻度が大きく異なる原因や新たな宿主での適応過程などのプラスミド宿主域に関する知見は乏しい。

IncP-9 群ナフタレン分解プラスミド NAH7 は *Pseudomonas putida* G7 由来の自己伝達性プラスミドである。NAH7 の *mpf* (mating pair formation) オペロン、*dtr* (DNA transfer and replication) オペロン、*traDEF* オペロンは接合伝達に関与する遺伝子群として推定されていた。これらのうち、広宿主域性プラスミドに広く保存されている *traDEF* オペロンはその具体的機能は不明なものの、伝達頻度や宿主域に直接関与していることが明らかとなっていた。野生型 NAH7 は同属間のみならず、*P. putida* から大腸菌、大腸菌から *P. putida* にも伝達可能であるが、*traDEF* オペロンを欠失した NAH7 誘導体は、同属間や *P. putida* から大腸菌には伝達可能であったが、大腸菌から *P. putida* には接合伝達が不可能であった。このことから *traDEF* オペロンは特定の供与菌-受容菌の組み合わせの接合を促進する機能を有することが推定されていた。

本研究では、*oriT* プラスミドを用いた NAH7 が複製維持できない菌株への接合伝達挙動や *traDEF* オペロンの接合伝達宿主域に対する働きを明らかにするための解析を行なった。*oriT* はプラスミド上にあれば、同じ宿主細胞内の他レプリコンから接合伝達機構を借りて、接合伝達できるという性質を持つ。この性質を利用して、供与菌に推定 *oriT* 領域を含むプラスミドと NAH7 を保持させ、受容菌に *oriT* プラスミドが接合伝達をするかどうかを指標に *oriT* を同定した。さらに、NAH7Δ*oriT* を作製し、推定した領域のみに *oriT* があることを明らかにした。次に、複製・維持能が広宿主域性であるベクターに *oriT* をクローニングし、供与菌にこの *oriT* プラスミドと NAH7 を保持させた。受容菌として、NAH7 が複製・維持できない α、β-proteobacteria を用いて接合伝達試験を行い、*oriT* プラスミドが接合伝達できるかどうかで NAH7 の接合伝達能を評価した。さらに、*traDEF* オペロンを欠失した NAH7 誘導体を用いてその影響を検討した。以上の実験系では供与菌が NAH7 を複製維持可能な菌に限られるので、全ての接合伝達関連遺伝子群を広宿主域ベクターにクローニングしたプラスミドを作製し、供与菌の違いによる宿主域変化の検討も試みている。

plasmid, conjugation, host range

講演番号：2A11p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ A 校舎 11 会場

プラスミド上及び宿主染色体にコードされる MvaT ホモログ群の改変 ChIP-chip 解析
Modified ChIP-chip analyses of cooperative transcriptional regulation by MvaT homologs encoded on plasmid pCAR1 and host *Pseudomonas* chromosome

○高橋 裕里香[1]、尹 忠鉄[1,2]、鈴木 千穂[1]、新谷 政己[3]、山根 久和[4]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1,2] ([1]東大・生物工学セ、[2]東大院農生科・アグリバイオ、[3]静大院・工、[4]帝京大・バイオ)
○Yurika TAKAHASHI[1], Choong-Soo YUN[1,2], Chiho SUZUKI[1], Masaki SHINTANI[3], Hisakazu YAMANE[4], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]Uviv. Tokyo, [2]Univ. Tokyo, [3]Shizuoka Univ., [4]Teikyo Univ.)

【背景・目的】*Pseudomonas* 属細菌における核様体タンパク質の一種である MvaT ホモログ群は H-NS の機能的ホモログ（大腸菌の *hns* 破壊株の表現型を相補できるがアミノ酸配列の保存性はない）であり、C 末端側に DNA 結合ドメインを、N 末端側に二量体／多量体化ドメインを有する。*P. putida* KT2440(pCAR1)株では、染色体上にコードされる TurA, TurB と pCAR1 上にコードされる Pmr が互いに結合する主要な MvaT ホモログであり、各 MvaT ホモログいずれを破壊しても染色体上・プラスミド上双方で数百の遺伝子が転写変動するが、転写変動する遺伝子は一部共通するものの大部分は異なっていることがトランスクリプトーム解析から示されている。本研究ではこのレギュロンが異なる原因を明らかにし、プラスミド由来・宿主由来の MvaT ホモログによる協調的転写制御機構を解明することを目的として、3 種の MvaT ホモログの結合位置の網羅的同定と結合配列の解析を行った。
【方法・結果】対数増殖期の *P. putida* KT2440(pCAR1)株をホルムアルデヒド処理して DNA 結合タンパク質を DNA と架橋した後に超音波破砕し、各 MvaT ホモログと共にアフィニティー精製された DNA 断片をタイリングアレイによってそれぞれ検出した。プローブ 1 本ずつの *p*-value（この値が小さいほどその領域がアフィニティー精製によって濃縮されたことを表す）を配列上に可視化したところ、3 者の結合領域はほとんど同一であり、染色体・プラスミド両ゲノム由来の MvaT ホモログが双方の DNA 上でヘテロ多量体を形成していることが示された。3 種の MvaT ホモログのうちいずれか 1 種類以上でしきい値（p-value < 10^{-15}）を超えた領域を共通結合領域とすると、染色体上 284 箇所、pCAR1 上 24 箇所が同定された。各共通結合領域での 3 種の MvaT ホモログの *p*-value の値にばらつきが見られたこと、及び大部分の結合領域では Pmr や TurA の *p*-value よりも TurB の *p*-value が小さい値を示したことから、ヘテロ多量体中の 3 種の MvaT ホモログの比は結合領域によって変化しうるが、TurB の割合は他の 2 種に比べて全体的に低いことが示唆された。また、結合領域内の genome signature［n 連塩基(n≧2)の出現頻度］を調べたところ、TTT や AAAA のような A か T が連続する塩基が特異的に濃縮されていた。各共通結合領域での MvaT ホモログ間のタンパク質比（*p*-value 比で近似）と genome signature の相関を調べたところ、ATA や TATAT のような A と T が交互に繰り返される配列が増加すると、ヘテロ多量体中の Pmr の割合が増加し、反対に TurB の割合が減少していくことが示唆された。以上のことから、3 種の MvaT ホモログのレギュロンの違いは結合位置の違いによるものではなく、結合領域ごとにヘテロ多量体の組成が異なることによるものだと考えられる。

H-NS, plasmid, *Pseudomonas*

講演番号：2A11p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 11 会場

プラスミドと宿主染色体にコードされる MvaT ホモログのヘテロ二量体形成機構の解析
Hetero-dimerization manners of MvaT homologs encoded on the plasmid and host chromosome
○川妻 孝平[1]、鈴木 千穂[1]、藤本 瑞[2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]農生資研)
○Kohei Kawazuma[1], Chiho SUZUKI[1], Zui FUJIMOTO[2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]NIAS)

【目的】細菌の遺伝子転写制御には核様体タンパク質 (nucleoid-associated proteins; NAPs) が重要な役割を果たすが、NAPs は染色体だけではなく可動性遺伝因子であるプラスミドにもコードされている。宿主細菌が NAPs をコードするプラスミドを保持すると、既に宿主細菌内で形成されていた NAPs の転写制御ネットワークに新たな NAPs が加わることになり、プラスミド・宿主染色体由来の NAPs が協調的に両ゲノムの転写を制御するようになると考えられる。当研究室で研究が進められてきたプラスミド pCAR1 にコードされる Pmr と、モデル宿主 *Pseudomonas putida* KT2440 株の染色体にコードされる TurA、TurB の 3 つの MvaT ホモログ（NAPs の一種で、腸内細菌の H-NS の機能的ホモログ）は、C 末端側の DNA 結合ドメインで標的遺伝子配列に結合した後、N 末端側の二量体／多量体化ドメインにより DNA 上で多量体化することで遺伝子の転写制御を行うと予想される。この時、基本となる構造は二量体であり、H-NS ではホモ二量体や自身のホモログとヘテロ二量体を形成することが知られている。一方 Pmr のホモログではホモ二量体の形成は示されていたものの、ヘテロ二量体の形成の可否は不明であった。そこで本研究では Pmr、TurA、TurB のヘテロ二量体形成について解析した。
【方法と結果】Pmr では二量体／多量体化ドメイン (Pmr_nt$_{61}$) が過去に同定されていたため、まず TurA、TurB の同ドメインをタンパク質間クロスリンク法により探索したところ、Pmr と同様に N 末端側 61 残基が二量体／多量体化ドメインであることが明らかとなった（以下 TurA_nt$_{61}$, TurB_nt$_{61}$）。これらと同ドメインを含む異なる長さのタンパク質とを混合し、同様な方法でホモ・ヘテロ二量体の検出を行ったところ、いずれの組み合わせでもヘテロ二量体は観察されたが、Pmr-TurB 間と TurA-TurB 間ではヘテロ二量体の形成率に差が見られた。この原因を調べるため、結晶構造解析への使用を目的として、ホモ二量体で安定する TurB_nt$_{61}$ アラニン置換体の作製を試みた。以前の研究から、Pmr_nt$_{61}$ では N 末端側から 6, 8, 15, 18, 20, 27, 49 番目の残基を各々アラニンで置換した場合にホモ多量体形成能が低下することが明らかとなっていた。そこで TurB_nt$_{61}$ でもこれら 7 残基のアラニン置換体を作製し、タンパク質間クロスリンク法により各アラニン置換体のホモ多量体形成能を調べたところ、N 末端側から 8 番目のアルギニン残基をアラニン残基に置換した TurB_nt$_{61}$-R8A でホモ多量体の割合が顕著に減少し、代わりにホモ二量体の割合が増加した。これらの結果から、TurB_nt$_{61}$-R8A を用いて結晶化条件のスクリーニングを行ったところ、複数の条件でタンパク質に由来すると思われる結晶が形成された。現在はこれらの条件を基に、再現性の確認と結晶化条件の最適化を進めている。

H-NS, plasmid, Pseudomonas

講演番号：2A11p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 11 会場

Sphingobium sp. SYK-6 株におけるアセトバニロン代謝酵素遺伝子の単離と解析
Identification and characterization of the acetovanillone catabolism genes in *Sphingobium* sp. strain SYK-6

○樋口 雄大[1]、菖蒲田 透[1]、上村 直史[1]、原 啓文[2]、笠井 大輔[1]、片山 義博[3]、福田 雅夫[1]、政井 英司[1] ([1]長岡技科大・生物、[2]Malaysia-Japan Int'l. Inst. Tech.、[3]日大・生資科)
○ Yudai HIGUCHI[1], Toru SHOBUDA[1], Naofumi KAMIMURA[1], Hirofumi HARA[2], Daisuke KASAI[1], Yoshihiro KATAYAMA[3], Masao FUKUDA[1], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]Malaysia-Japan Int'l. Inst. Tech., [3]Nihon Univ.)

【目的】*Sphingobium* sp. SYK-6 株は、様々なリグニン由来の二量体および単量体化合物を唯一の炭素源、エネルギー源として生育する。リグニンの分子間結合の内、β-aryl ether はリグニン中の約 50-70%を占める主要な結合であることから、本結合の開裂とその後の分解はリグニン分解できわめて重要と考えられる。SYK-6 株において、β-aryl ether のモデル化合物である guaiacylglycerol-β-guaiacyl ether (GGE) は Cα位の酸化後、グルタチオン *S*-トランスフェラーゼによるエーテル開裂を受けて β-hydroxypropiovanillone (HPV) に変換される。HPV は Cγ位の酸化を受けて vanilloyl acetaldehyde、vanilloyl acetic acid を経由して代謝されるが、酵素非依存的な反応により vanilloyl acetic acid から acetovanillone (AV) が生成することが示唆されている。本研究では AV 代謝に関わる酵素遺伝子の単離と解析を行い、AV の代謝経路を明らかにすることを目的とした。
【方法】3 mM GGE または 2 mM AV を含む無機塩培地で SYK-6 株を培養し、HPLC と LC-MS 分析によって代謝中間体を同定した。5 mM の AV 存在下、非存在下で培養した SYK-6 株の休止細胞を用いて 1 mM AV 分解実験を行い、HPLC により基質の分解をモニターした。AV の存在下または非存在下で培養した SYK-6 株から全 RNA を単離し、逆転写反応により合成した cDNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析で見出された SYK-6 株の AV 分解遺伝子の候補を相同組換えによって破壊し、各破壊株の 3 mM AV での生育能を調べた。
【結果】SYK-6 株による GGE の分解産物として AV が検出され、GGE の代謝中に AV が生成することが確認された。AV の代謝経路を推定するために、AV での培養時における代謝中間体を同定した。その結果、興味深いことに vanilloyl acetic acid の生成が観察された。この結果は、AV の側鎖がカルボシキル化を受けて再度 vanilloyl acetic acid に変換されて代謝されることを示唆するものと考えられた。AV 変換活性が SYK-6 株を AV で培養した際に誘導されることから、DNA マイクロアレイ解析によって AV 培養時に特異的に誘導される遺伝子を同定した。その結果、*Aromatoleum aromaticum* EbN1 株の *p*-hydroxyacetophenone 代謝に関与するビオチン要求性カルボキシラーゼと推定されている *xccA*、*xccC*、*xccB* と相同性を示すものを含む 6 つの遺伝子 (*acvABCDEF* と命名)が顕著に誘導されていることが示された。SYK-6 株の各遺伝子の破壊株を作製し、AV での生育能を調べた結果、すべての遺伝子破壊株で AV 生育能の欠損が見られた。以上の結果から、AV のカルボキシル化に *acvABCDEF* が関与することが強く示唆された。

lignin, β-aryl ether, acetovanillone

講演番号：2A11p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 11 会場

Sphingobium sp. SYK-6 株のリグニン由来芳香族化合物取り込み遺伝子
Identification of the genes involved in the uptake of lignin-derived aromatic compounds
○森 光佑[1]、上村 直史[1]、原 啓文[2]、笠井 大輔[1]、福田 雅夫[1]、政井 英司[1] ([1]長岡技科大・生物、[2]Malaysia-Japan Int'l. Inst. Tech.)
○Kosuke MORI[1], Naofumi KAMIMURA[1], Hirofumi HARA[2], Daisuke KASAI[1], Masao FUKUDA[1], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]Malaysia-Japan Int'l. Inst. Tech.)

【目的】*Sphingobium* sp. SYK-6 株は、リグニン由来のさまざまな二量体芳香族化合物を代謝するための多様かつ特異性の高い酵素系を有しており、これらの酵素系はリグニンの有用物質変換に有用である。現在までに SYK-6 株の多様なリグニン代謝系酵素遺伝子が明らかにされてきたが、本株によるリグニン由来芳香族化合物の細胞内への取り込みに関する知見は得られていない。そこで本研究では、SYK-6 株に存在する major facilitator superfamily (MFS)トランスポーター遺伝子の中からリグニン由来芳香族化合物の取り込みに関与する遺伝子を同定することを目的とした。
【方法】5,5′-デヒドロジバニリン酸 (DDVA)、フェルラ酸 (FA)、バニリン酸 (VA)、シリンガ酸 (SA)およびプロトカテク酸 (PCA)の取り込みに関与するトランスポーター遺伝子を推定するために、各基質の存在下または非存在下で培養した SYK-6 株から全 RNA を単離し、得られた cDNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行い、各基質で誘導される MFS トランスポーター様遺伝子を調べた。SYK-6 株のトランスポーター候補遺伝子を相同組換えによって破壊し、各遺伝子破壊株を 5 mM の基質を含む液体培地で培養することで生育能を測定した。*ddvK* 破壊株および *pcaK* 破壊株については、pJB866 に各遺伝子をクローン化したプラスミドを導入した相補株を作製し、生育能を評価した。
【結果】DNA マイクロアレイ解析によって、DDVA、FA、VA、SA または PCA との培養時に誘導される 5 個の MFS トランスポーター様遺伝子を見出した。また、*Corynebacterium glutamicum* RES167 株の *vanK* および *Pseudomonas putida* PRS2000 株の *pcaK* とアミノ酸配列レベルで約 30%の同一性を示す 2 個の MFS トランスポーター様遺伝子を候補に加えた。これら 7 個の遺伝子について SYK-6 株の破壊株を作製し、各破壊株の DDVA、FA、VA、SA、PCA を炭素源とした時の生育能を調べた。その結果、*ddvK* と命名した遺伝子の破壊株において DDVA の生育能の欠損が見られた。また、*pcaK* と命名した遺伝子の破壊株で PCA での生育に顕著な遅延が観察された。一方、他の破壊株では、いずれの基質においても野生株との生育能に差異は観察されなかった。*ddvK* 破壊株と *pcaK* 破壊株にそれぞれ *ddvK* と *pcaK* を相補した株は SYK-6 株と同等の生育能を示したことから、*ddvK* は DDVA での生育に必須であり、*pcaK* は PCA での正常な生育に必要であることが明らかとなった。*ddvK* と *pcaK* の推定アミノ酸配列は、*P. putida* PRS2000 株の *pcaK*、*Acinetobacter* sp. ADP1 株の *vanK* と *benK*、*C. glutamicum* RES167 株の *pcaK*、*vanK*、*benK*、*genK* の配列と 22~33%の同一性を示した。以上の結果から、*ddvK* と *pcaK* がそれぞれ DDVA と PCA の MFS トランスポーターをコードすることが示唆された。

lignin, transporter, major facilitator super family

講演番号：2A11p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 11 会場

耐熱性ザイモモナス菌の耐熱性遺伝子の解析

Analysis of thermotolerant genes in thermotolerant *Zymomonas mobilis*

○櫻田 朋子[1]、時山 亜美奈[1]、CHAROESUK KANNIKAR[2]、久野 圭佑[2]、村田 正之[2]、高坂 智之[1]、山田 守[1,2] ([1]山口大農生機、[2]山口大院医)

○ TOMOKO SAKURADA[1], AMINA TOKIYAMA[1], KANNIKAR CHAROESUK[2], KEISUKE HISANO[2], MASAYUKI MURATA[2], TOMOYUKI KOSAKA[1], MAMORU YAMADA[1,2] ([1]Yamaguchi Univ. Fac. Argi., [2]Yamaguchi Univ. Grad. Med.)

［目的］

地球温暖化の進行とともにバイオエタノールが注目され、その生産量と使用量は年々増加している。一般にエタノール生産には酵母が用いられているが、その生育温度は 30℃前後であるため、発酵熱による温度上昇を抑制するための温度制御が効率的な生産に不可欠である。耐熱性微生物を用いた高温発酵は、そのような温度管理を容易にし、冷却コストの削減や発酵操作の簡素化などによって安価なエタノール生産を可能にすると期待される。発酵性細菌である *Zymomonas mobilis* は通性嫌気性グラム陰性菌で、エントナー・ドウドロフ経路により一般的な酵母よりも優れたエタノール生産能をもっており、さらにタイで単離された TISTR548 株は、39℃で生育してエタノール発酵を行うことから高温高速発酵が可能である。本研究では、この耐熱性を示す TISTR548 株の生育限界温度における生存機構の解明を目的とし、トランスポゾン挿入破壊ライブラリーを作製し、高温感受性株のスクリーニングによる耐熱性遺伝子の同定を試みた。また、同定された耐熱性遺伝子群について機能分類を行い、大腸菌の耐熱性遺伝子群(1)と比較した。さらに、高温ストレス以外のストレスとの関連性についても検討した。

［方法・結果］

Z. mobilis TISTR548 を親株としてトランスポゾン挿入による破壊株ライブラリーを作製し、それを用いて 3 段階のスクリーニングによって生育限界温度感受性株を 67 株取得した。それぞれの感受性株の原因遺伝子を TAIL-PCR と DNA シークエンスによって特定し、これまで 28 個の耐熱性遺伝子を同定した。これらの遺伝子を、データベース解析等によって分類したところ、大腸菌の耐熱性遺伝子と同様に、9 つのグループ（エネルギー代謝、膜の安定化、DNA 修復、tRNA 修飾、蛋白品質管理、翻訳制御、細胞分裂、転写調節、その他）に分類されることが分かった。さらに、耐熱性とその他の環境ストレス耐性との関連性の有無を調べるために、生育限界温度感受性株についてエタノールストレスを含む他のストレスに対する感受性について検討した。

(1) Murata et al., *PLoS ONE*, 6(6): e20063 (2011)

Zymomonas mobilis, thermotolerance, thermotolerant genes

講演番号：2A11p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 11 会場

Z. mobilis における耐熱化機構解明のための高温適応株の単離と解析
Isolation and characterization of high-temperature-adapted mutants to clarify thermotolerant mechanisms in *Zymomonas mobilis*

○山下 舞子[1]、松谷 峰之介[2]、高坂 智之[2]、山田 守[1,2] ([1]山口大院医、[2]山口大農)
○Maiko YAMASHITA[1], Minenosuke MATSUTANI[2], Tomoyuki KOSAKA[2], Mamoru YAMADA[1,2] ([1]Grad. Sch. Med. Yamaguchi Univ., [2]Yamaguchi Univ.)

[概要]

省エネ化や低コスト化の観点から高温発酵が注目されているが、バイオエタノール生産においても 40 ºC 程度の発酵技術開発が進められている。高温発酵には、高温で安定的に生育する耐熱性株が不可欠であるが、そのような菌株を開発するためには、耐熱化メカニズムの理解が重要である。我々はこれまで、比較的耐熱性をもつエタノール発酵性細菌 *Zymomonas mobilis* TISTR548 の耐熱化を実施し、耐熱性株のさらなる耐熱化に成功するとともにその遺伝的背景を明らかにしてきた。しかしながら、高温発酵を一般的な技術にするためには微生物の普遍的な耐熱化機構を解明する必要があり、そのための種々のデータ蓄積が不可欠である。本研究では、比較的耐熱性の低い高エタノール生産株を研究対象として、耐熱化株の育種並びにその遺伝的背景の解明を目的とする。

[方法・結果]

TISTR548 よりも耐熱性が低く全ゲノムが決定されている *Z. mobilis* ZM4 を親株として用いた。まず、生育限界温度の決定方法を検討し、この方法によって ZM4 の生育限界温度を 37 ºC と決定した。続いて、独立した ZM4 の 4 サンプルを 36 ºC から 38 ºC まで段階的に生育温度を上昇させ、その間菌株の植継を 80 回実施することで耐熱化株を 4 株取得した。これらの菌株はすべて、30 ºC で植え継いだ後もそれぞれの獲得した耐熱性を保持していたことから、変異が起こっていると推定した。また、これらは 39 ºC 及び 40 ºC において親株よりも良好な生育を示し、生育限界温度が 2 ºC 程度高温側にシフトしていた。さらに、生理学的な解析により、株間において過酸化水素に対する耐性に違いがあることが明らかとなった。現在、これら耐熱化株のゲノム解析による変異遺伝子の解析を進めている。なお本研究は ALCA (JST: 2011-) の助成を受けて行われた研究成果の一部である。

Zymomonas mobilis, themotolerance, adaptive evolution

講演番号：2A11p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 11 会場

大腸菌生育限界温度適応株の取得とその解析

Acquisition and gene analysis of thermotolerant mutants adapted to a critical high temperature in Escherichia coli

○加藤 薫平（山口大学）
○Kunpei KATO (Yamaguchi Univ)

[目的]

生物は高温側と低温側にそれぞれ生育限界温度をもっている。我々は常温菌としては比較的耐熱性を有する大腸菌について、高温側の生育限界温度に必要な遺伝子（耐熱性遺伝子）を解析し、一般的な熱ショック応答とは異なる分子機構が存在することを明らかにしてきた(1)。その耐熱性遺伝子群は、エネルギー代謝、膜の安定化、DNA 修復、tRNA 修飾、蛋白品質管理、翻訳制御、細胞分裂、転写調節といった機能に分類される。また、耐熱性遺伝子変異株の多くが酸化ストレス感受性であった。本研究では、高温側の生育限界温度での生存機構を理解するために、限界温度での適応育種を行うことにより耐熱化した変異株を取得･解析することで、さらなる耐熱化が可能かどうか、あるいはそれに必要な分子機構があるかどうかを検討した。

[方法、結果]

大腸菌 W3110 株を親株として 45°C で 22 回､46°C で 13 回､46.5°C で 13 回継代培養し､Im2A､Im4A の 2 株、更に 47°C で Im2A を 12 回、Im4A を 7 回植え継ぐことで Im2B、Im4B の 2 株、計 4 株の高温適応株を得た。これらの株は、30 °C で植え継いだ後もそれぞれの獲得した耐熱性を保持していたことから、変異が起こっていると推定した。これら高温適応株は、コロニーのサイズが親株よりも小さく、菌体の長さも短く、さらに 37°C では親株よりも生育が遅いという表現型を示した。これらの株のゲノム解析を次世代シーケンサーにより実施し、変異遺伝子の分析を試みたところ、Im2A には 2 つ、Im2B には 5 つ、Im4B には 5 つの遺伝子にアミノ酸置換を引き起こす SNP が予測された。このうち、いくつかの重要と思われる遺伝子についてはサンガー法により変異を確認した。高温適応株の表現型や遺伝子変異に基づいて、高温側の生育限界温度での生存機構について考察する。

(1) Murata et al., *PLoS ONE*, 6(6): e20063 (2011)

Escherichia coli, critical high temperature, thermo-adapted strain

講演番号：2A11p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 11 会場

メタゲノム手法は培養法を凌駕するのか：遺伝子資源取得に際しての手法間の比較
Culture-dependent and -independent (metagenomic) approaches to the screening for microbial degradation genes of aromatic compounds (extradiol dioxygenase)
○末永 光、水田 志織、宮崎 健太郎、矢追 克郎（産総研・生物プロセス）
○Hikaru SUENAGA, Shiori MIZUTA, Kentaro MIYAZAKI, Katsuro YAOI (AIST)

【目的】
メタゲノム手法による微生物遺伝子資源の探索の出発点は、環境中の微生物の大部分は培養できないという、培養に依存した従来のスクリーニング法の限界が指摘されてきたことによる。以降、新出のメタゲノム手法のほうが優れているようであるという共通の認識はあるが、明確な根拠は提示されていない。そこで本研究においては、環境中からの遺伝子資源取得という目的において、メタゲノム手法は微生物培養法を本当に凌駕するのか（しないのか)、について比較実験に基づいた検証を行うものである。

【方法・結果】
今回標的とする酵素は、微生物による芳香環分解における鍵酵素である Extradiol dioxygenase（EDO）である。我々は、すでにメタゲノム手法により 43 の EDO 遺伝子の同定に成功しており、その半数以上が、既存の EDO ファミリーには属さない新規な酵素群であることを報告し、メタゲノム手法の有用性を示すことができた（1, 2)。そこで本研究においては、一転して、微生物培養法に基づいて EDO を遺伝子し、比較解析を行った。
メタゲノムスクリーニングを行った同一の環境試料から、フェノールを唯一の炭素源として生育する 88 の分解菌を単離した。次に、16S rDNA による系統解析により優占種となる 4 株を選別し、それぞれのゲノムから EDO 遺伝子のクローニングに成功した。このうち、3 つのクローンについては、メタゲノム手法で取得された本環境由来の EDO、および他の環境で単離された分解菌由来の既存の EDO アミノ酸配列と高い相同性を示した。しかしながら、ひとつの遺伝子は、これらとは系統学的に全く異なるグループに属する、希少な EDO 遺伝子であることが明らかとなった。さらに、それぞれの手法に用いた EDO 遺伝子プールについて 16S rDNA による系統解析を行った結果、異なる微生物構成相であることが示された。本発表では、これらの結果に基づき、メタゲノム法・培養法それぞれの手法のメリット・デメリットについて報告する。

(1) Suenaga et al. Environmental Microbiology (2007) 9, 2289-2297.
(2) Suenaga et al. ISME J. (2009) 3, 1335-1348.

metagenomics, functional screening, microbial community

講演番号：2A11p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 11 会場

真核生物の環状染色体維持に必要な遺伝子の探索

Identification of genes required for the maintenance of circular chromosomes

○上野 勝、田中 大樹（広大院先端物質）
○Masaru UENO, Daiki TANAKA (Hiroshima Univ.)

ヒトの染色体は線状であるが、まれに環状染色体が存在する。特にある種のがん細胞では、高い頻度で環状染色体が見つかっている。このことから、環状染色体を持った細胞を特異的に殺す薬剤は環状染色体を持ったがん細胞だけを特異的に殺す副作用の少ない抗がん剤となることが期待できる。しかし環状染色体の維持にどのような遺伝子が関係するかどうかは、ほとんどわかっていない。

分裂酵母はヒトと同じ真核生物で、染色体維持に関係する蛋白質の多くは進化的に保存されている。さらに遺伝学的解析が容易に行えるなどのメリットがあることから優れたモデル生物として広く実験に用いられている。Pot1 は分裂酵母の一本鎖テロメア DNA に特異的に結合し、テロメアの保護を担っている。pot1 が欠損した染色体では、急激にテロメアの削り込みが促進され、相同配列を用いた末端融合によって染色体の環状化が引き起こされる。分裂酵母において、pot1 欠損株では３本の染色体が全て環状化したものが生育する。そこで、当研究室では、分裂酵母 pot1 破壊株を用いて、環状染色体の維持に関係する遺伝子の探索とその機能解析を行っている。これまでに DNA 修復に関係しているヘリケース Rqh1 の遺伝子破壊と pot1 破壊は、合成致死になることが報告されているが、その原因はわかっていなかった。我々はこの pot1 rqh1 二重破壊株の合成致死の原因を調べた結果、ヘリケース Rqh1 が環状染色体の維持に必要であることを発見し、報告している（南部ら、Mol. Cell. Biol. 2013. p1175）。

本研究では、rqh1 以外に環状染色体の維持に必要な遺伝子の探索を試みた。その結果、分裂酵母 pot1 rad9 二重変異株が合成致死になることを発見した。rad9 は分裂酵母及びヒト細胞における 9-1-1 複合体の構成遺伝子であり、DSB に結合し、DNA ダメージチェックポイントの初期段階に関与している。そこで本研究では、この合成致死の機構を解明することを目的とした。pot1 rad9 二重変異株の合成致死の原因は２つ考えられる。第一に、rad9 が欠損すると末端融合が起こらなくなるため。第二に、Rad9 が環状染色体の維持に必要であるためである。まず、第一の可能性を検証するために、rad9 が破壊された状態で pot1 の機能を低下させて、染色体の環状化が起こるかどうかを調べた。その結果、rad9 が破壊された状態で pot1 の機能を低下させても、染色体の環状化が起こることを発見した。このことから、pot1 rad9 二重変異株の合成致死の原因として、rad9 が欠損すると末端融合が起こらなくなるためではないことがわかった。現在は、第二の可能性である Rad9 が環状染色体の維持に必要であるという可能性を検証している。

yeast, anti-cancer drug, DNA repair

講演番号：2A11p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 11 会場

超好熱菌キチン代謝遺伝子群の発現調節に関与する機能未知タンパク質の解析
Analyses of function-unknown proteins involved in expression regulation of genes for chitin metabolism in hyperthermophilic archaeon

○野村 宜成[1]、坂本 香織[1]、秋山 貴志[1]、折田 和泉[1]、中村 聡[1]、今中 忠行[2]、福居 俊昭[1]([1]東工大生命理工、[2]立命館大生命)
○ Yoshinari NOMURA[1], Kaori SAKAMOTO[1], Takashi AKIYAMA[1], Izumi ORITA[1], Satoshi NAKAMURA[1], Tadayuki IMANAKA[2], Toshiaki FUKUI[1] ([1]Tokyo Tech, [2]Ritsumeikan Univ.)

【目的】超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* のキチン分解代謝に関与する遺伝子群は約 13kbp の領域にクラスターを形成しており、その発現はキチンが細胞外キチナーゼで分解されて生じた $GlcNAc_2$ によって誘導される。我々はこれまでに、クラスター内の機能未知遺伝子 *tk1762* および *tk1763* がトランス因子として当該クラスターをはじめ、染色体上に点在する様々な遺伝子の発現制御に関与することを見いだした。TK1763 は PIN ドメイン単体からなる PIN タンパク質であるが、細菌・始原菌・真核生物由来のいくつかの PIN タンパク質は DNase や RNase として機能することが示されている。このことから TK1762-TK1763 が関わる発現制御にも TK1763 が有する核酸分解活性が関与する可能性が考えられるが、その詳細は明らかになっていない。TK1762-TK1763 の機能解析は多くの生物種に共通する発現制御機構の理解につながる可能性がある。本研究ではクラスター中に存在し ABC トランスポーターをコードする *dppABCDE* 領域の転写、および TK1762-TK1763 タンパク質複合体の形成を検討した。

【方法および結果】*T. kodakarensis* KUW1 株（親株）および *tk1762-tk1763* 破壊株からトータル RNA を抽出し、*dpp* 領域（約 6.9 kb)をプローブとしたノーザン解析を行った。親株では培地中へのキチンオリゴマーの添加によりシグナルは強度が増加するとともに、やや高分子量側にシフトした。*tk1762-tk1763* 破壊株ではキチンオリゴマーの添加の有無に関わらず、やや高分子量側に強いシグナルが検出された。これらの結果は TK1762-TK1763 による mRNA 分解とキチンオリゴマーによる分解抑制の可能性とは矛盾しないが、転写量の増加とは区別が困難なため、今後は短い領域をプローブとした解析を行う。

大腸菌により TK1762 および TK1763 の組換え型タンパク質を生産し、熱処理で粗精製した。これらを混合してネイティブ PAGE を行ったところ、複合体の形成が見られ、その量比は TK1762:TK1763=1:1 と見積もられた。また *T. kodakarensis* KUW1 株の無細胞抽出液をネイティブ PAGE で展開して TK1762 抗体、TK1763 抗体を用いたウエスタン解析を行った。その結果、いずれの抗体を用いても同じ移動度の高分子量タンパク質が検出され、組換え型タンパク質の混合で見られたものと同じ TK1762-TK1763 複合体と推測された。また、その複合体の細胞内存在量は培地に添加したキチンオリゴマーの濃度増加に応じて増加する傾向が見られた。これらの結果より、キチンオリゴマーの添加による TK1762 と TK1763 の発現量増加と複合体形成がキチン代謝クラスターの発現に関与することが示唆された。

Thermococcus kodakarensis, chitin metabolism, transcriptional regulation

講演番号：2A11p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 11 会場

新規ランダム変異法による超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* 温度感受性株の単離とその解析
Isolation by novel random mutagenesis and analyses of thermosensitive mutants of hyperthermophile *Thermococcus kodakarensis*

○二石 涼平[1]、足立 恭子[1]、野原 健太[1]、折田 和泉[1]、中村 聡[1]、今中 忠行[2]、福居 俊昭[1]([1]東工大院生命理工、[2]立命館大生命)
○ Ryohei FUTATSUISHI[1], Kyoko ADACHI[1], Kenta NOHARA[1], Izumi ORITA[1], Satoshi NAKAMURA[1], Tadayuki IMANAKA[2], Toshiaki FUKUI[1] ([1]Tokyo Tech, [2]Ritsumeikan Univ.)

【目的】90℃以上でも生育可能な超好熱菌がどのような機構によって高温耐性を実現しているのかは多くの研究者の興味を引いてきた。また全生物共通祖先が超好熱菌であったとの仮説に従うと、現存の常温生物は超好熱菌の低温適応進化により生じたことが考えられ、超好熱菌が至適生育温度より低い温度で生育するために必要な遺伝子群は進化の観点からも興味深い。特定の表現型に関与する遺伝子の同定には変異株の解析が有効である。絶対嫌気性超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* はゲノム解析が完了し、かつ遺伝子操作系が確立されていることから、超好熱菌研究における有用なモデル生物である。我々は *T. kodakarensis* の遺伝子操作系の応用の１つとして、相同性組換えを基盤とするランダム変異法の確立に成功し、2012 年度の本大会で報告した。本研究ではこのランダム変異法を用いた高温（90℃以上）または低温（70℃以下）感受性変異株のスクリーニング系を構築し、いくつかの高温感受性変異株を取得した。

【方法と結果】ランダム変異の宿主には、アグマチン要求性相補を指標とした選抜を行うための *pdaD*（*tk0149*）破壊と形質転換効率向上のための推定制限系遺伝子 *tk2239* 破壊を導入したΔ*pdaD*Δ2239 株を用いた。*In vitro* トランスポゾン転移で作製したランダム変異 DNA ライブラリーを用いて *T. kodakarenis* Δ*pdaD*Δ2239 株を形質転換し、人工海水栄養豊富固体培地で培養した。モノコロニーとして単離した株をピルビン酸含有栄養豊富培地を分注した 96 穴プレートへ植菌し、嫌気的に 85℃で一晩培養した。その後、レプリケーターを用いて培養プレートを複製し、各プレートをそれぞれ 65℃、85℃、93℃で嫌気培養した。各ウェルの生育を OD_{600} で比較し、温度感受性の指標とした。

これまでに約 1000 クローンの解析を行い、高温での生育能が欠失または低下した高温感受性変異株を 18 株取得した。この 1.8%という高い出現率は高温耐性が多数の遺伝子機能の集積によるものであることを示唆している。一方で、低温感受性を示す変異株はこれまで得られておらず、低温耐性に重要な遺伝子は少数であることが考えられた。今後、解析クローン数を増やすとともにスクリーニング系の改善を行う。得られた高温感受性株における変異部位を同定したところ、超好熱性への関与が報告されているリバースジャイレースや tRNA 修飾酵素の遺伝子が同定され、本スクリーニング系の有用性が示された。また、ABC トランスポーター関連遺伝子など、これまで高温耐性との関係が報告されていない遺伝子の変異株も多数単離した。現在、これら単離遺伝子の機能について検討している。

Thermococcus kodakarensis, random mutagenesis, thermosensitivity

講演番号：2A11p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 11 会場

好熱性アーキア *Caldiarchaeum subterraneum* がもつユビキチン様遺伝子の機能解析
Functional analysis of ubiquitin-like genes identified from the thermophilic archaeon, *Caldiarchaeum subterraneum*

○金井 保[1]、藤本 理夏子[1]、徳原 将弘[1]、布浦 拓郎[2]、橘高 瑞奈[1]、高木 善弘[2]、高見 英人[2]、高井 研[2]、跡見 晴幸[1] ([1]京大院工、[2]海洋科技セ)
○Tamotsu KANAI[1], Rikako FUJIMOTO[1], Masahiro TOKKUHARA[1], Takurou NUNOURA[2], Mizuna KITTAKA[1], Yoshihiro TAKAKI[2], Hideto TAKAMI[2], Ken TAKAI[2], Haruyuki ATOMI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]JAMSTEC)

ユビキチン (Ub) は真核生物に普遍的に存在し、標的タンパク質と選択的に結合することで細胞周期の制御など細胞内の様々な生命現象に関与する。国内地下熱水孔サンプルのメタゲノム解析により明らかにされた、未培養好熱性アーキア *Caldiarchaeum subterraneum* のゲノム上には、原核生物には例のない真核生物型 Ub 様遺伝子 (Ubl) が存在する。通常、Ub 化反応は、活性化酵素 E1、結合酵素 E2、Ub リガーゼ E3 との段階的な反応により進行するが、本菌の Ubl 遺伝子は、E1 様遺伝子および、原核生物では例がない E2 様遺伝子、RING 型 E3 様遺伝子と共に、原核生物特有のオペロン構造 (C1474-C1478) を形成する。またオペロンの反対側には、脱 Ub 化酵素 DUB の相同遺伝子 (C1473) も存在している。従って本菌の Ubl システムは、これまで真核生物が起源であると考えらえてきた Ub システムの発生と進化を理解する上で、大変興味深い存在である。本研究では本 Ubl システムの機能の検証を目的として、これらの因子を用いた *in vitro* でのタンパク質修飾反応系の再構築を行った。

まず本菌の Ubl、成熟型 Ubl (mUbl)、E1、E2 の各組換えタンパク質を調製し、これらを ATP 存在下で混合して複合体形成反応を行った。その結果、1) mUbl-E1 複合体の形成、および 2) 本複合体からの mUbl 受渡しによる mUbl-E2 複合体の形成、が確認された。また、mUbl、E1、E2 の各部位特異的変異体を作製して解析した結果、 mUbl の C 末端の di-glycine motif ($Gly^{77}Gly^{78}$)、E1 の Cys^{184}、E2 の Cys^{93} が、これらの複合体形成に必須であることが判明した。

続いて本菌の E3 タンパク質(C1477)を大腸菌内で大量発現させたが、発現タンパク質は不溶化した。そこで、C1477 が下流にある機能未知遺伝子 (C1478) と共に機能している可能性を考えて、両タンパク質の共発現を試みたところ、E3 タンパク質の一部は可溶性画分に存在し、70℃での熱処理（10 分）に対しても安定であった。そこで、この熱処理後の可溶性画分を E3 画分とし、これを mUbl・E1・E2 と共に混合し、さらに基質タンパク質としてパン酵母の細胞抽出液を添加して Ubl 化反応を行った。この反応後の溶液について、抗 Ubl 抗体を用いた Western blot 解析を行った。その結果、E3 画分の添加・非添加により、Ub 化バンドのパターンに変化が見られたことから、本菌において、C1477 と C1478 が複合体として存在し、実際に E3 としての機能している可能性が示された。

以上の生化学的解析により、本菌の Ubl システムが、真核生物型 Ub システムと類似した機構で反応する、タンパク質修飾システムであることが予想された。

ubiquitin, archaea, thermophile

講演番号：2A11p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 11 会場

Haloarcula japonica の C_{50} カロテノイド生合成機構の解析：*c0507*/*c0506*/*c0505* 遺伝子クラスターの役割

Roles of the *c0507*/*c0506*/*c0505* gene cluster in C_{50} carotenoid biosynthesis of *Haloarcula japonica*

○楊 影[1]、八波 利恵[1]、安藤 藍[1]、三横 伸弘[1]、高市 真一[2]、福居 俊昭[1]、中村 聡[1]([1]東京工業大学、[2]日本医科大学)

○Ying YANG[1], Rie Yatsunami[1], Ai Ando[1], Nobuhiro Miyoko[1], Shinichi Takaichi[2], Toshiaki Fukui[1], Satoshi Nakamura[1] ([1]Tokyo Institute of Technology, [2]Nippon Medical School)

【目的】植物や細菌が生産するカロテノイドは、8 つのイソプレン（C_5）単位が結合した C_{40} の構造をもつ。一方で、ある種の高度好塩性古細菌は C_{50} のカロテノイドを生産する。しかしながら、高度好塩性古細菌のカロテノイド生合成系の全貌は未だ明らかになっていない。最近になり、高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* の全ゲノム配列が明らかにされた。また *Ha. japonica* が生産するカロテノイド種も同定され、中間体であるリコペン（C_{40}）、イソペンテニルデヒドロロドプシン（IDR、C_{45}）、ビスアンヒドロバクテリオルベリン（BABR、C_{50}）とモノアンヒドロバクテリオルベリン（MABR、C_{50}）および最終産物であるバクテリオルベリン（BR、C_{50}）が検出された。本研究では、高度好塩性古細菌 *Ha. japonica* のカロテノイド生合成系の解明を目的とし、リコペンから BR までのカロテノイド生合成遺伝子の特定を試みた。

【結果】*Ha. japonica* の全ゲノム配列のアノテーションの結果、デサチュラーゼ（CrtI）をコードする遺伝子と相同な遺伝子ホモログ *c0507* が見出された。また、*c0507* 遺伝子のすぐ下流に存在する *c0506* および *c0505* 遺伝子がそれぞれリコペン伸長酵素（CrtEb）およびヒドラターゼ（CruF）をコードする遺伝子のホモログであることがわかった。これら 3 つの遺伝子はクラスターを形成し、共転写されていたことから、本菌のカロテノイドの生合成に関与していると予想された。

各遺伝子の単独破壊株を構築し、それらが生産するカロテノイド種の分析を行った。野生株のコロニーが BR 由来の赤色を呈するのに対し、*c0506* 遺伝子破壊株のコロニーは黄色となった。カロテノイド種分析の結果、*c0506* 遺伝子破壊株においては、野生株で見られた C_{50} カロテノイド種が検出されず、C_{40} カロテノイドであるリコペンが蓄積されていることがわかった。*c0507* 遺伝子破壊株のコロニーも黄色となり、*c0507* 遺伝子破壊株が生産する主要カロテノイドは共役二重結合数 11 のジヒドロイソペンテニルデヒドロロドプシン（DH-IDR、C_{45}）およびテトラヒドロビスアンヒドロバクテリオルベリン（TH-BABR、C_{50}）であった。*c0505* 遺伝子破壊株のコロニーは野生株と同じ赤色であるが、生産するカロテノイドは BABR であることがわかった。

【結論】リコペンから BABR までの反応において、*c0506* 遺伝子はイソプレン（C_5）および水酸基を付加する酵素に関わっていると考えられた。また、*c0507* 遺伝子は中間体の不飽和化に関与していることが示唆された。さらに、*c0505* 遺伝子は BABR から BR までの水酸化反応に関与していることが明らかとなった。

carotenoid biosynthesis, extremely halophilic archaeon, genome

講演番号：2A11p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ A 校舎 11 会場

水素資化性メタン生成菌の凝集に関与する遺伝子の検討

Genes related to aggregation in a thermophilic and hydrogenotrophic methanogen

○高坂 智之[1]、澄川 佳奈[2]、馬屋原 範聡[2]、山田 守[1,2] ([1]山口大農、[2]山口大院医)
○ Tomoyuki KOSAKA[1], Kana SUMIKAWA[2], Noriaki MAYAHARA[2], Mamoru YAMADA[1,2] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Grad. Sch. Med. Yamaguchi Univ.)

【目的】メタン発酵槽内でしばしば観察される凝集により菌体の安定化や中間代謝物分解の促進が果たされている。中間代謝物である揮発性脂肪酸は、揮発性脂肪酸を分解し水素と二酸化炭素もしくはギ酸を生産する発酵性細菌と生成された水素及びギ酸を資化する水素資化性メタン生成菌が近接することにより分解が促進される。この機構に水素資化性メタン生成菌の凝集が関与しているが、この凝集形成のメカニズムや関与する遺伝子はほとんど明らかとなっていない。我々は凝集性を示す高温性水素資化性メタン生成菌 *Methanothermobacter* sp. CaT2 を分離し、この株の細胞表層には糖の層が形成されていることを明らかにした。また、ゲノム配列を決定後、比較ゲノム解析により凝集に関連する7個の遺伝子を予測した。本研究では、凝集関連候補遺伝子の転写解析を行うと共に、CaT2 株の凝集性低下変異株を取得し、その菌株の生理学的解析とゲノム解析による遺伝的変異解析を試みることで、凝集能に関与する遺伝子の同定を試みた。
【方法・結果】水素と二酸化炭素を基質として培養した CaT2 株より total RNA を抽出後 realtime RT-PCR により、凝集関連候補遺伝子の転写量を測定したところ、1 つの glycosyltransferase 遺伝子および 2 つの adhesin 遺伝子がメタン生成経路の遺伝子と同等の転写量を示すことが明らかとなった。一方、CaT2 株を EMS 処理及びフィルター処理を組み合わせることで凝集性の低下した菌体を集積し、その後コロニー化することで、凝集性の低下した変異株を 3 株得た。沈降速度による比較及び顕微鏡観察により、取得した 3 つの変異株の凝集性が親株に比べて明確に低下していることが示された。現在、この 3 株の凝集性低下変異株をゲノム配列決定による変異箇所の同定を試みており、この結果を基に凝集に関与する遺伝子について考察する。

Aggregation, Hydrogenotrophic methanogen, Genome

講演番号：2A11p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ A 校舎 11 会場

大腸菌における CsrB RNA の分解過程の解析

Analysis of the degradation process of CsrB RNA in *Escherichia coli*

伊藤 学[2]、岡山 明裕[2]、阿部 葉月[2]、高橋 優介[2]、杉本 華幸[1,2]、渡邉 剛志[1,2]、○鈴木 一史[1,2] ([1]新潟大・農・応生化、[2]新潟大院・自然科学)
Manabu ITO[2], Akihiro OKAYAMA[2], Hazuki ABE[2], Yusuke TAKAHASHI[2], Hayuki SUGIMOTO[1,2], Takeshi WATANABE[1,2], ○Kazushi SUZUKI[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Facul. Agric., Niigata Univ., [2]Grad. Sch. Sci. & Tech., Niigata Univ.)

Csr (carbon storage regulator)システムは多くの真正細菌に存在し、細菌のバイオフィルム形成、運動性、解糖系、病原性等、様々な遺伝子の発現調節に関わるグローバルな制御システムである。大腸菌 Csr システムは２つのタンパク質と２つの small RNA から構成されている。活性の中心となる RNA 結合タンパク質 CsrA は、*glgCAP*, *pgaABCD* や *flhDC* など、ターゲットとなる mRNA の 5′UTR に結合し、翻訳や mRNA 安定性を変化させることで遺伝子の発現を調節している。２つの small RNA・CsrB 及び CsrC は複数の CsrA 結合部位を含むステムループ構造からなり、CsrA を捕捉することで細胞内での CsrA の働きを阻害する。GGDEF-EAL ドメインタンパク質である CsrD は、これら CsrB/C RNA の Degradosome 依存的な分解を調節することで CsrA の細胞内での働きを制御している。CsrD は一般的な GGDEF-EAL ドメインタンパク質とは異なり、c-di-GMP の合成分解には関与せず、そのメカニズムは明らかになっていない。CsrB/C RNA とその安定性を調節する CsrD は、細胞内での CsrA の働きを微妙にコントロールできる重要な因子であると考えられる。

今回、CsrB/C RNA 安定性調節のメカニズム解明の端緒として、CsrB RNA の分解過程を解析した。CsrB RNA の分解は、エンドリボヌクレアーゼ RNase E、3′-5′エキソリボヌクレアーゼ PNPase、さらには Degradosome に依存しており、PNPase 欠損株である *pnpΔ683* において複数の CsrB 分解中間産物の蓄積が確認されている。プライマーエクステンション法と、3′-RACE 法による解析の結果、これらの分解産物の 5′末端は野生型 CsrB RNA と一致したが、3′末端は異なり 9 つの領域に分類された。主要な分解中間産物の 3′末端は CsrB RNA の 5′末端から 250 塩基付近だった。これらは主に RNase E によって分解された後、PNPase による分解を受けずに蓄積した分解中間産物であると考えられた。3′-RACE 法によって明らかとなった CsrB RNA 分解中間産物の 3′末端領域を欠損させた複数の変異体 CsrB RNA を解析するため、*csrB* 遺伝子に欠失を導入したプラスミドを作製した。それらのプラスミドを *csrB* 変異株に導入してバイオフィルム形成に与える影響を調べた。その結果、ターミネーター直前の一本鎖領域を欠失した変異型 CsrB RNA がバイオフィルム形成量を大幅に増加させた。ノーザンブロット解析の結果、この変異型 CsrB RNA は極端に安定化したことから、ターミネーター直前の一本鎖領域が CsrB RNA の分解に最も重要であると考えられた。

small RNA, Csr system, PNPase

講演番号：2A11p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ A 校舎 11 会場

大腸菌のアラニン排出輸送体 AlaE は能動輸送活性を有する

L-alanine exporter of *Escherichia coli*, AlaE, has an active transport activity

○金 世怜、堀 初弘、安藤 太助、磯貝 恵美子、米山 裕 (東北大院農)
○Seryoung Kim, Hatsuhiro Hori, Tasuke Ando, Emiko Isogai, Hiroshi Yoneyama (Tohoku Univ.)

【目的】 我々は先に L-アラニン（L-Ala）排出能を欠損した大腸菌変異株を分離し、この変異株の L-Ala 排出能を相補するクローンをスクリーニングすることによって、新規遺伝子 *ygaW* が本菌の L-Ala 排出輸送体をコードすることを初めて明らかにし *alaE* と命名した。本研究では AlaE の構造と機能の詳細を解析する第一歩として、AlaE 過剰産生株とその宿主である AlaE 欠損株の反転膜小胞を作製し AlaE の排出輸送活性を解析した。

【方法】 Intact cell を用いた[^{3}H]L-Ala の取り込み実験ではインポーターとエキスポーターの活性を区別することが難しい。そこで我々は、フレンチプレスを用いて AlaE 過剰産生株（Δ*alaE*/ｐAlaE）と AlaE 欠損変異株（Δ*alaE*）の反転膜小胞を製作し、様々の条件で[^{3}H]L-Ala の小胞内への取り込み活性を測定した。

【結果および考察】 *ΔalaE* 由来の反転膜小胞内への[^{3}H]L-Ala 取り込みはエネルギー源（NADH)の有無にかかわらず認められなかったが、AlaE 過剰産生株由来の反転膜小胞では NADH 非存在下で L-Ala 濃度依存的に[^{3}H]L-Ala の蓄積が認められた。また、エネルギー源として 2.5 mM NADH を加えると、この[^{3}H]L-Ala の蓄積は上昇したことから、AlaE はエネルギー依存的な L-Ala 輸送活性をもつことが明らかとなった。この条件は反転膜小胞外の L-Ala 濃度が小胞内より高いため、AlaE が能動輸送能を有するのか不明である。そこで、200 mM の L-Ala を小胞内にローディングした反転膜小胞を作製し、[^{3}H]L-Ala の小胞内への輸送活性を評価した。反転膜小胞内外の L-Ala 濃度を同じ 200 mM に設定して、小胞内への[^{3}H]L-Ala 取り込みを調べた結果、AlaE 過剰産生株由来の反転膜小胞は NADH 存在下で[^{3}H]L-Ala を蓄積した。さらに、反転膜小胞外に[^{3}H]L-Ala（0.34μM）のみを添加し小胞内への蓄積を検討した結果、NADH 非存在下では蓄積が認められなかったが、NADH 存在下では蓄積が認められた。以上の結果より、AlaE はエネルギー依存的な L-Ala 排出活性を有することが明らかとなった。

L-alanine, Exporter, *Escherichia coli*

講演番号：2A11p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ A 校舎 11 会場

高級アルコールによるリパーゼ・PHB 生産誘導を促進する分泌タンパク質 EliA の機能解析
EliA is a promoting factor for the induction of lipase and PHB by stearyl alcohol in *Ralstonia* sp. NT80.
○赤沼 元気[1]、多勢 真大[1]、鈴木 優美[1]、渡辺 智[2]、志波 優[3]、吉川 博文[2]、牛尾 一利[4]、石塚 盛雄[1] ([1]中央大・理工、[2]東農大・応生科、[3]東農大・NGRC、[4]新居浜高専・生応化)
○Genki AKANUMA[1], Masahiro TASE[1], Yumi SUZUKI[1], Satoru WATANABE[2], Yuh SHIWA[3], Hirofumi YOSHIKAWA[2], Kazutoshi USHIO[4], Morio ISHIZUKA[1] ([1]Fac. of Sci. and Engn., Chuo Univ., [2]Dept. of Biosci., Tokyo Univ. of Agric., [3]NGRC, Tokyo Univ. of Agri., [4]Dept. of Ind. Chem., Niihama Nat. Col. of Tech)

一般的に、微生物が生産するリパーゼは油や脂肪酸、界面活性剤などによって発現誘導されるが、我々はこれまでに *Ralstonia* sp. NT80 が分泌するリパーゼ（LipA）がステアリルアルコール等の高級アルコールによって顕著に生産誘導されることを見出している。その高い生産性と耐熱性から産業利用も期待されるが、その誘導機構は不明だった。そこで、高級アルコール添加に対する細胞の応答機構を調査し、リパーゼ等の発現誘導に関わる因子の同定と機能解析を試みた。

ステアリルアルコールによるリパーゼ発現時には分子量約 14 kDa の分泌タンパク質（EliA; effector protein of lipase induction）も多量に発現していた。このタンパク質をコードする遺伝子の破壊株では、ステアリルアルコールによる誘導時において、培養上清におけるリパーゼ活性、LipA タンパク質量、*lipA* 転写量ともに著しく低下した。また、透過型電子顕微鏡観察等から、野生株ではステアリルアルコール添加時にポリヒドロキシ酪酸（PHB）も多量に生産されていることが明らかになったが、*eliA* 破壊株では PHB 生産はほとんど観察されなかった。一方、野生株では難溶性ステアリルアルコールの乳化に伴う培地の白濁が培養時間とともに解消されるのに対し、*eliA* 破壊株では 72 時間の培養後も白濁が残存していた。ガスクロマトグラフィーにより培養上清に残存するステアリルアルコールを定量すると、72 時間後の破壊株の培養上清には野生株のおよそ 8 倍のステアリルアルコールが検出された。*eliA* 遺伝子破壊株に見られるこれらの異常は、遺伝子相補によって完全に回復した。このような観察結果に加え、精製 EliA が高い界面活性作用を有していること、水溶性の誘導剤である polyoxyethylene (20) oleyl ether を用いた場合には *eliA* 破壊の影響は観察されなかったことから、EliA は細胞による難溶性高級アルコールの認識、分解に関与し、結果としてリパーゼ・PHB 生産誘導を促進していると考えられる。

Lipase, PHB, Ralstonia

講演番号：2A12a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ A 校舎 12 会場

プラスミド保持に伴うバイオフィルム表現型の変化に関与する新規遺伝因子の探索

Searching of novel genetic elements involved in biofilm phenotypic change due to plasmid maintenance

○李 昇ウク[1]、高橋 裕里香[1]、大浦 啓[2]、野村 暢彦[2]、岡田 憲典[1]、山根 久和[3]、野尻 秀昭[1]([1]東大生物工学セ、[2]筑波大院生命環境、[3]帝京大・バイオ)
○ Seunguk LEE[1], Yurika TAKAHASHI[1], Hiromu OURA[2], Nobuhiko NOMURA[2], Kazunori OKADA[1], Hisakazu YAMANE[3], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Univ. of Tsukuba, [3]Teikyo Univ)

【背景と目的】バイオフィルム中での宿主細菌の振る舞いにプラスミドが与える影響を解析することは、実環境中でのプラスミドの挙動を知る基盤情報となるが、報告例は非常に少ない。そこで、カルバゾール分解プラスミド pCAR1 と 3 種の *Pseudomonas* 属細菌 (*P. putida* KT2440 株、*P. aeruginosa* PAO1 株、*P. fluorescens* Pf0-1 株) を用いて、宿主細菌が pCAR1 を保持することで、形成するバイオフィルムの構造に差異が見られるかどうかを解析した。pCAR1 保持株と非保持株の形成するバイオフィルムを共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、KT2440 株特異的に保持株が形成するバイオフィルムはフラットになり、繊維状化した菌体が多く認められた。また、pCAR1 上には 3 種の核様体タンパク質（Pmr, Phu, Pnd）がコードされているため、繊維状化へのそれらの関与を各単独・二重破壊株を用いて評価した。その結果、Δ*pmr*/Δ*phu* と Δ*pmr*/Δ*pnd* の 2 組の二重破壊株で繊維状化が亢進した。昨年度本大会において、上記の繊維状化の原因を探るため、pCAR1 保持や NAPs 遺伝子の破壊がバイオフィルム形成時のトランスクリプトームに及ぼす影響を高密度タイリングアレイで解析した。園結果、繊維状化の原因遺伝子、あるいは繊維状化を亢進する遺伝子と考えられ 32 個の遺伝子の取得に成功した。本年度は、上記の繊維状化の原因を探るため、抽出された遺伝子について高発現株を作製し、これらがバイオフィルム形成に及ぼす影響を解析した。

【結果】繊維状化しない宿主である KT2440 株と繊維状化する KT2440(pCAR1)株細胞内で、選抜された 32 遺伝子を pBBad18k ベクター（アラビノース添加により挿入遺伝子が高発現）から高発現させ、各 32 過剰発現体において導入遺伝子の発現がバイオフィルムへ及ぼす影響を共焦点レーザー顕微鏡にて評価した。KT2440 株を用いた過剰発現株では、ほとんどの株ではバイオフィルムの形状に差が見られなかったが、PP_2193（TonB-dependent siderophore receptor）を高発現させた株で菌体が伸びる現象が観察された。また、KT2440(pCAR1) 株を用いた過剰発現株では、32 株中、PP_0308（membrane dipeptidase）や PP_0309（hypothetical protein）を高発現させた株で繊維状化の亢進が観察された。PP_2193 は鉄欠乏の時に転写されると考える遺伝子であり、菌体の繊維状化への変化することによる細胞中の鉄欠乏が起きる可能性が示唆された。一方、PP_0309 や PP_0308 遺伝子についでは生理機能の詳細な解析は不明である。このような結果から、菌体が pCAR1 を保持することで繊維状する原因は、プラスミド保持により複数の遺伝子が転写誘導されることによる協調的影響であることが示唆された。

biofilm, plasmid, nucleoid-associated proteins

講演番号：2A12a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ A 校舎 12 会場

共焦点反射顕微鏡法を用いた逆浸透膜上バイオフィルムの画像解析手法の確立および応用

Establishment and application of the image analysis technique for biofilm on reverse osmosis membrane by confocal reflection microscopy

○長田 啓司、稲葉 知大、上田 考摂、豊福 雅典、野村 暢彦（筑波大学院生命環境）
○ Keiji NAGATA, Tomohiro INABA, Kousetsu UEDA, Masanori TOYOFUKU, Nobuhiko NOMURA (Tsukuba Univ.)

【背景】逆浸透膜（RO 膜）は水の再生利用、汚染水の処理に利用される濾過膜である。RO 膜はナノメートルオーダーの細孔からなり、細菌や塩類を透過させない構造となっているため、純水の製造、排水処理、化学薬品の濃縮など、産業上幅広く利用されている。近年、RO 膜の産業利用において、膜の目詰まりによって濾過機能が低下するファウリングが問題視されている。そのうち、膜表面の微生物膜（バイオフィルム）及び微生物由来の物質による膜の目詰まりをバイオファウリングと呼ぶ。従来、バイオファウリングによって濾過機能が低下した膜の洗浄はアルカリ処理により行われてきたが、この膜洗浄法では膜の劣化・洗浄後の濾過機能が回復しないことなどが問題として挙げられている。よって現在、RO 膜の産業利用において、膜の劣化を抑えつつ濾過機能の低下を防ぐ効率的な膜の洗浄法が求められている。膜の洗浄効果の評価を行う上で膜上バイオフィルムの挙動を解析することは非常に重要であると考えられる。その一方で、膜表面と膜上バイオフィルムを同時に観察する有効な膜観察手法が確立していないのが現状である。そこで我々は、膜上バイオフィルムの観察に共焦点反射顕微鏡法を用いることとした。共焦点反射顕微鏡法では照明光を反射した際の反射光をシグナルとして検出するため、膜表面とバイオフィルムの構造を無処理で同時かつ迅速に検出することが可能になった。さらに、本研究ではバイオファウリングの主要因として考えられる膜上バイオフィルムに対する種々の薬剤の影響評価をモデルケースとし、共焦点顕微鏡法による画像解析を用いた新しい膜観察手法と汚染膜の効率的かつ新しい洗浄法を示すことを目的とした。

【結果・考察】まず、共焦点反射顕微鏡法による RO 膜表面の観察を行った。その結果、RO 膜からの反射光をシグナルとして検出し、画像を取得することによって膜表面の凹凸などの微細な構造を可視化することに成功した。次に、バイオファウリングを引き起こした RO 膜の膜上バイオフィルムに対する種々の薬剤の影響評価をモデルケースとし、共焦点反射顕微鏡法による RO 膜と膜上バイオフィルムの同時観察を行った。種々の薬剤を用いて汚染 RO 膜の洗浄を行い、画像解析を行った結果、一部の薬剤による膜上バイオフィルムの除去効果が示された。さらに、異なるサイトから取得した汚染 RO 膜に対しても薬剤によるバイオフィルムの除去効果が見られたことから、今回用いた薬剤が汚染 RO 膜の洗浄に普遍的な効果を持つことが示唆された。これらの結果より、いくつかの薬剤による膜上バイオフィルムの除去効果が示され、それと共に共焦点反射顕微鏡法による新しい膜観察手法が有効であることを確認した。

confocal reflection microscopy, reverse osmosis membrane, biofilm

講演番号：2A12a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ A 校舎 12 会場

緑膿菌の生産する細胞間コミュニケーションシグナル物質は異種細菌のバイオフィルム形成を抑制する

A quorum sensing molecule of *Pseudomonas aeruginosa* inhibits biofilm development of *Streptococcus mutans*

○森永 花菜、稲葉 知大、大浦 啓、豊福 雅典、内山 裕夫、野村 暢彦（筑波大学院生命環境）
○ Kana MORINAGA, Tomohiro INABA, Hiromu OURA, Masanori TOYOFUKU, Hiroo UCHIYAMA, Nobuhiko NOMURA (Tsukuba Univ.)

微生物はシグナルを介した細胞間コミュニュケーション（クォーラムセンシング, QS）を行なうことで、遺伝子制御を行なっている。多くの病原菌では QS シグナルによって毒素の生産が抑制されていることが知られており、日和見感染細菌である *Pseudomonas aeruginosa* においても、種々の毒素の生産がシグナルによって制御されている。しかし、近年そのシグナルは別種の細菌に対しても生育や遺伝子発現の制御をすることが明らかとなってきた。特に *P. aeruginosa* の産生する *Pseudomonas* quinolone signal (PQS)はいくつかの細菌の生育や運動性を抑制することが知られている。しかしながら、PQS が異種の細菌へ及ぼす影響に関しては不明な点が多い。

今回我々は、PQS が異種の細菌に与える影響を解析したところ、口腔細菌として広く知られ、う蝕原生細菌である *Streptococcus mutans* のバイオフィルム形成を抑制することを明らかにした。

２つの細菌の相互作用を調べるために、*P. aeruginosa* と *S. mutans* の共培養を行なったところ、バイオフィルムを形成させると、単培養に比べて、バイオフィルム形成量は著しく減少した。*P. aeruginosa* において、QS によって多くの毒素の生産が制御されているため、緑膿菌の QS mutant を使用し、同様に共培養実験を行なった。すると、緑膿菌の PQS 非生産株と共培養して形成させた *S. mutans* のバイオフィルムの量は、野生株との共培養で形成したバイオフィルムの量と比較して著しい減少は見られなかった。さらに、PQS を添加した際に *S. mutans* のバイオフィルム形成量が減少することを観察することができた。一方で、PQS は *S. mutans* の生育には影響を与えなかった。

以上のことから、*P. aeruginosa* が *S. mutans* の生育は抑制しないがバイオフィルム形成を抑制していることが明らかとなった。これらのことから、異種菌で産生されるシグナルが、バイオフィルム形成にも影響を及ぼすことが示された。*P. aeruginosa* の産生するシグナルが、*S. mutans* 以外の細菌にも作用するのか引き続き解析を行なっていく。

PQS, biofilm, quorum sensing

講演番号：2A12a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ A 校舎 12 会場

温度に応答した *Clostridium perfringens* のバイオフィルム形態変化に関与する遺伝子の探索
Identification of genes involved in temperature-dependent biofilm morphological change in *Clostridium perfringens*

○山根 由子[1]、尾花 望[2]、中村 幸治[2]、野村 暢彦[2] ([1]筑波大生命環境、[2]筑波大院生命環境)
○ YUKO YAMANE[1], NOZOMU OBANA[2], KOUJI NAKAMURA[2], NOBUHIKO NOMURA[2] ([1]College of Agrobiological Resource Sciences, University of Tsukuba, [2]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

多くの細菌は実環境中においてバイオフィルムとよばれる集合構造体を形成して存在している。バイオフィルム中の細菌は酸素や抗生物質などといった環境ストレスへの高い耐性を有しており、実環境中での細菌の挙動や感染症の拡大との関連が考えられる。ウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)はグラム陽性偏性嫌気性の桿菌であり、食中毒やガス壊疽を引き起こす原因となることが知られている。近年、ウェルシュ菌はバイオフィルムを形成することにより様々なストレス耐性を持つことが報告された。本研究室ではウェルシュ菌が温度により異なる形状のバイオフィルムを形成することを明らかとした。哺乳動物の体内の温度である 37℃条件では既に報告されているような菌体密度の高い、基質底面に付着するバイオフィルムを形成する(付着型バイオフィルム)。一方で、環境中の温度である 25℃条件では細胞外マトリクスに富んだ菌体密度の低い非付着型の膜状バイオフィルムを基質底面に形成した(ペリクル型バイオフィルム)。温度による劇的なバイオフィルムの形態変化の例は少なく、また、温度変化は宿主の体内か環境中なのかを認識するシグナルの一つであると考えられる。すなわちバイオフィルム形態変化と病原性には深い関係が示唆される。そこで、本研究ではバイオフィルム形態変化に関与する遺伝子を同定することとした。遺伝子の探索方法として、トランスポゾンによるゲノム上の遺伝子のランダム破壊法を用いた。作成した遺伝子破壊株ライブラリーより、25℃条件でペリクル型バイオフィルム形成不全株を選別したところ、いくつかの株では細胞外タンパク質をコードする遺伝子や細胞外タンパク質分泌に関与する遺伝子にトランスポゾンが導入されていた。また、ペリクル型バイオフィルムを proteinase K で処理するとバイオフィルム構造が脆弱になることから、分泌型細胞外タンパクがバイオフィルムの重要な構成成分であることが考えられる。現在は上記のペリクル型バイオフィルム形成関連遺伝子の詳細な解析を進めている。

Clostridium perfringens, Biofilm, temperature

講演番号：2A12a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ A 校舎 12 会場

Paenibacillus 属細菌のバイオフィルム形成及び芽胞形成
Biofilm and Spore Formation of *Paenibacillus* Species

○横山 佳奈[1]、尾花 望[2]、久保田 浩美[3]、細谷 幸一[3]、湯井 幸治[3]、野村 暢彦[2]([1]筑波大学　生命環境学群　生物資源学類、[2]筑波大学　生命環境系、[3]花王株式会社　安全性科学研究所)
○Kana YOKOYAMA[1], Nozomu OBANA[2], Hiromi KUBOTA[3], Kouichi HOSOYA[3], Koji YUI[3], Nobuhiko NOMURA[2] ([1]Colledge of Agrobiological resource sciences, University of Tsukuba, [2]Graduate School of Life and Environment Sciences, University of Tsukuba, [3]Kao Corporation)

【背景・目的】
Paenibacillus 属はグラム陽性の好気性または通性嫌気性の桿菌である。また、本属細菌はバイオフィルムや芽胞を形成し、それらの高い耐久性ゆえ、様々な極限環境に適応できる。さらに、*Paenibacillus* 属が形成する芽胞は殺菌剤に対しても生存可能であることから、完全に除去することが難しく、本属細菌は食品腐敗や製品劣化の原因となりうる。近年、*Bacillus* 属などにおいてバイオフィルムが芽胞形成に適した環境であることが報告されており、バイオフィルムと芽胞の形成には密接な関連性が認められている。一方で、*Paenibacillus* 属細菌のバイオフィルムや芽胞形成に関する知見は少なく、それらの制御につながる新規知見が求められている。そこで本研究では、*Paenibacillus* 属においてのバイオフィルム形成や芽胞形成およびこれらの関連性を解析するとともに、それらの制御につながる基礎的知見を得るということを目的とした。
【方法・結果】
初めに、腐敗食品や原料などから分離されてきた *Paenibacillus* 属の 6 種 13 株を用い、96 穴プレートにてそれぞれバイオフィルムを形成させ、クリスタルバイオレット染色により定量した。その結果、培地によってバイオフィルム形成能が異なることが分かったが、中でも 2×SGG 培地で培養した際に *P. glucanolyticus* と *P. polymyxa* において顕著なバイオフィルム形成が見られた。同様の培地で 24 穴プレートにて培養し、そのバイオフィルム形態を観察すると *P. glucanolyticus* は気液界面に、*P. polymyxa* は底面部にバイオフィルムを形成することが分かった。また、バイオフィルムを形成した株に関して芽胞の形成能と、その局在を調べるため、バイオフィルムとそれ以外の浮遊部分を分離した後、それぞれの芽胞形成効率を検証した。その結果、いずれの株においてもバイオフィルム中により多くの芽胞を形成することが分かった。しかしながら、バイオフィルムを形成しない振とう培養液中においては、芽胞の形成効率が格段に下がった。以上のことから、いくつかの *Paenibacillus* 属ではバイオフィルム形状に関わらず、芽胞をバイオフィルム中で効率よく形成しており、本属細菌においてもバイオフィルムと芽胞の形成に関連性が認められ、バイオフィルム形成の制御の重要性が示唆された。

Paenibacillus species, biofilm formation, spore formation

講演番号：2A12a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ A 校舎 12 会場

蛍光菌 Pf0-1 株におけるプリン核酸生合成とバイオフィルム形成の関係
Relationship between purine nucleotide biosynthesis and biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1
○吉岡 資郎（分子研）
○Shiro YOSHIOKA (Institute for Molecular Science)

蛍光菌(*Pseudomonas fluorescens*) Pf0-1 株は、バイオフィルム形成のモデルとして研究されているバクテリアの一つである。本菌のバイオフィルム形成に影響を及ぼす遺伝子を同定するためトランスポゾン変異体の解析を行ったところ、ホスホリボシルピロリン酸(PRPP)からイノシン一リン酸(IMP)に至る *de novo* プリン核酸生合成経路に含まれるいくつかの遺伝子(purF や purL 等)の欠損によってバイオフィルム形成量が WT の 1/3 程度まで減少する事を見出した。この結果は、核酸生合成経路の遮断によってバイオフィルム形成の阻害が可能であることを示唆しており、大変興味深いものと考えられた。そこで本研究では、IMP から GMP および AMP に至るまでの経路も検討に加え、*de novo* プリン核酸生合成経路が蛍光菌 Pf0-1 株のバイオフィルム形成に与えるに影響をついてより詳細に調べた。

ポリ塩化ビニル製９６ウェルプレートを用いて K10T-1 培地中における single-crossover 変異体のバイオフィルムアッセイを行ったところ、同じ反応を行うと考えられる purN と purT の欠損はいずれもバイオフィルム形成に大きな影響を与えなかった。また、IMP から AMP または GMP に至る puA、purB、guaA や guaB の欠損もバイオフィルム形成量にはあまり影響が無かった。一方で、PRPP から IMP までの経路に存在する８つの遺伝子（purB を除く purC、purD、purE、purF、purH、purK、purL および purM）の欠損はバイオフィルム形成量を大きく減少させた。これら８つの遺伝子について clean deletion mutants を作製し、600nm における培養液の吸光度変化を追跡したところ、時間に伴う吸光度の増加が観察されなかった。これらの変異体では培養液中で菌が増殖していないと考えられたので、培養液の上澄みについて発光に基づく ATP の定量を行ったところ、WT に比べ 1/20 程度である事が分かった。つまり、各変異体は K10T-1 培養液中では WT のように増殖できないと結論づけられた。一方、９６ウェルプレートの壁面に形成されたバイオフィルムを綿棒で掻き取った後、バイオフィルム由来の細胞について ATP の定量を行ったところ、各変異体の ATP 量は WT の 1/10 程度まで減少していた。この ATP 量の減少はバイオフィルム形成量の減少（WT の 1/3～1/2 程度）よりもさらに大きいものであった。以上の結果から、K10T-1 培地中における８つの変異体は WT のように増殖する事はできないものの、その一部はバイオフィルムを形成し、WT に比べて低い代謝活性（細胞内 ATP 濃度）の状態で生存を続けているものと考えられる。

biofilm, purine nucleotide biosynthesis

講演番号：2A12a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ A 校舎 12 会場

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 の塩ストレスによるバイオフィルム形成誘導メカニズムの解析

Mechanism of biofilm formation by *Synechocystis* sp. PCC6803 under salt stress

○牧野 恒平[1]、冨永 昴[1]、堀籠 智子[1]、七谷 圭[1]、茅森 俊介[1]、佐伯 千香[1]、鈴木 石根[2]、魚住 信之[2] ([1]東北大・院工・バイオ工学、[2]筑波大・生命環境)

○Kohei Makino[1], Akira Tominaga[1], Tomoko Horigome[1], Kei Nanatani[1], Syunsuke Kayamori[1], Chika Saeki[1], Iwane Suzuki[2], Nobuyuki Uozumi[2] ([1]Grad. Sch. of Eng., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. of Life and Env., Tsukuba Univ.)

ラン藻 *Synechocystis* は比較的高い塩濃度でも生育し，昼間は光合成を行うなど変化の大きな環境で生育できることから，多様な環境適応機構を有していることが推定される．私たちは，これまでに *Synechocystis* sp. PCC6803 を塩ストレス環境に移すとバイオフィルムを形成することを報告してきた．バイオフィルムは細胞外多糖類（exopolysaccharide; EPS）を基本成分として，タンパク質，核酸などからなり，細菌，真菌，藻類，原生生物など様々な微生物が形成し，薬剤抵抗性，乾燥耐性の獲得に関与することが知られている．しかしながら，*Synechocystis* sp. PCC6803 のバイオフィルム形成に関する知見は乏しく，形成メカニズムに関する研究はほとんどなされていない．本研究では，*Synechocystis* が塩ストレスを感知し，バイオフィルムを形成するまでのメカニズムを明らかにするため，二成分系シグナル伝達因子，および細胞内セカンドメッセンジャー生合成酵素に焦点を当て，バイオフィルム形成誘導への関与を検討した．バイオフィルム形成を誘起する物質として，ポリアミンやセカンドメッセンジャーの c-di-GMP が知られている．ポリアミンは，細胞分裂や DNA の複製，各種ストレス適応などにおいて重要な役割を果たす塩基性の低分子であり，様々な生物の細胞内に存在する．そこで，本研究ではポリアミンがバイオフィルム形成にどのようにかかわっているのかを明らかにするために，ポリアミン生合成系の一部の酵素をコードする遺伝子に関する検討を行った．また，c-di-GMP は GGDEF ドメインをもつ蛋白質の diguanylate cyclase (DGC)活性によって合成される．細胞内の c-di-GMP 濃度が高まるとそれが引き金となり，浮遊して動いていた個々の細胞が動きを止め，凝集して，バイオフィルム形成を開始するといった固着的な挙動にシフトすることが推測されている．緑膿菌など一部の細菌においては，c-di-GMP がバイオフィルム形成やキイロタマホコリカビの胞子形成などに必要なシグナルであることが報告されている．ラン藻においても，GGDEF ドメインを有するタンパク質が存在することなどから，c-di-GMP とバイオフィルム形成の相関関係の可能性が推測される．本研究では，*Synechocystis* sp. PCC6803 の GGDEF ドメインを持つタンパク質をコードする遺伝子を欠損した株を作製して，その変異株のバイオフィルム形成を検討した．バイオフィルム形成と c-di-GMP の関係を明らかにすることにより，環境ストレス耐性生物の獲得や薬剤耐性菌への対処に関する基盤的メカニズムの解明の一端をはかる．

cyanobacteria, biofilm, salt stress

講演番号：2A12a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ A 校舎 12 会場

スペルミジン及びプトレッシンインポーターPlaP が大腸菌のバイオフィルム形成に与える影響
Effects of Spermidine and Putrescine Importer PlaP on Biofilm Formation in *Escherichia coli*.
○掛川 苑美、鈴木 秀之（京都工繊大院応生）
○Sonomi KAKEGAWA, Hideyuki SUZUKI (Kyoto Institute of Technology)

【背景･目的】
バイオフィルムとは、細菌などの微生物が固体表面に付着して、菌体外に生産した多糖によって囲まれた構造をとる。菌体が多糖等の基質に覆われているため、バイオフィルムの中の細菌は、免疫機構や抗菌薬が効きにくく、難治性の感染症を引き起こすことが問題となっている。ポリアミンとは、アミノ酸の一種であるアルギニンやオルニチンから合成され、ウイルスからヒトに至るまで生物界に広く存在し、細胞増殖に重要な物質である。本研究では、大腸菌をモデル生物として用い、バイオフィルム形成に与えるポリアミンの影響について調べている。

【結果】
･バイオフィルム形成に重要なポリアミン
大腸菌のポリアミンとして、プトレッシン(Put)、カダベリン(Cad)、スペルミジン(Spd)が挙げられる。これら３つのポリアミンをそれぞれ添加した M9 galactose 培地にポリアミン合成遺伝子欠損株を植菌し、バイオフィルム形成量を比較したところ、Spd を添加した場合にのみバイオフィルム形成量が著しく上昇した。このことから、Spd がバイオフィルム形成を促進していると考えられた。大腸菌の野生株と、Spd をアセチルスペルミジンへと変換する酵素（SpeG）を欠損した菌株でバイオフィルム形成量を比較すると、Δ*speG* 株では菌体内のスペルミジン濃度が高くなり、バイオフィルム形成量も高くなった。

･バイオフィルム形成に重要なポリアミンインポーター
プトレッシンインポーター（YdcSTUV, PotE, PuuP, PlaP, PotFGHI）のうち、１つだけを欠損した菌株を用い､培地に Put を加えた場合､加えていない場合でバイオフィルム形成量を比較したところ、*plaP* が欠損した菌株のみ、培地に Put を加えてもバイオフィルム形成量は高くならなかった。逆に Put のインポーターのうち４つを欠損し、１つだけ残した菌株を用いて、培地に Put を加えた場合と加えていない場合でバイオフィルム形成実験を行った結果、*plaP* のみを残した菌株では、Put を加えるとバイオフィルム形成量が高くなった。このため、PlaP はバイオフィルム形成に重要であると考えられる。しかし、菌体内 Spd 濃度は *plaP* を欠損した菌株と欠損していない菌株で大差はなかった。PlaP がバイオフィルム形成を促進するメカニズム、Spd がバイオフィルム形成を促進するメカニズムは独立していると考えられる。今後それぞれのメカニズムについて解明していく予定である。

Biofilm, Polyamine, *Escherichia coli*

講演番号：2A12a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ A 校舎 12 会場

歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のポーリンがオートインデューサーの不活化に関与する
Porin is involved in the inactivation of autoinducer in periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens*

○阿座上 弘行[1]、Mansur Jasin[1]、野杁 由一郎[2]、加藤 昭夫[1] ([1]山口大農、[2]阪大院歯)
○Hiroyuki AZAKAMI[1], Jasin Mansur[1], Yuichiro Noiri[2], Akio Kato[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Osaka Univ.)

【目的】歯周病関連細菌の一つである *Eikenella corrodens* は、対数増殖期の中期から後期にかけてオートインデューサー２(AI-2)を産生し、これによりバイオフィルムの形成に影響を及ぼす。しかし、定常期に入ると、AI-2 活性は劇的に減少することから、AI-2 の分解または不活化酵素の存在が示唆された。本研究では、*E. corrodens* の培養上清から AI-2 を不活化する酵素を精製し、その同定を試みたので、報告する。
【結果】*E. corrodens* を定常期まで培養後、培養上清を硫安分画することにより、AI-2 不活化活性を有する画分（30%画分）を得た。この画分は、*E. corrodens* の培養上清から精製した AI-2 のみならず、AI-2 のセンサー株である *Vibrio harveyi* BB170 に対して AI-2 活性を示すメチルヒドロキシフラノン（MHF）も同様に不活化した。このことから、*E. corrodens* が AI-2 と MHF は 30%画分によって同じメカニズムで不活化されることが示唆された。

30%画分とインキュベートした MHF を薄層クロマトグラフィーで解析したところ、MHF のスポットの消失が観察された。また、30%画分とインキュベートした MHF を逆相 HPLC で解析したところ、MHF のピークがシフトしていた。これらの結果から、この画分には AI-2 を別の形に変換することで分解または不活化する酵素が含まれることが示唆された。

次に、30%画分をさらに DEAE-Toyopearl や Q-Sepharose によるイオン交換クロマトグラフィーで精製を行った。精製したタンパク質を SDS-PAGE で解析したところ、約 40kDa の単一なバンドが確認された。このタンパク質の N 末端アミノ酸シークエンスを決定したところ、外膜ポーリン（PorA）のものと一致した。そこで、*porA* 遺伝子の欠損株を作成したが、この株の培養上清からは AI-2 不活化活性は見られなかった。これらの結果から、*E. corrodens* においてポーリンが AI-2 を不活化する可能性が示唆された。

以上の結果から、*E. corrodens* はポーリンを介して AI-2 を別の化合物に変換し、二段階の（１段階目は *V. harveyi* が感知できる AI によって、２段階目は感知できない変換型 AI によって）クオラムセンシングを行っている可能性が示唆された。

Eikenella corrodens, autoinducer, porin

講演番号：2A12a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ A 校舎 12 会場

キシラン添加による *Lactobacillus brevis* の凝集作用への細胞表層電位の影響
Effect of cell-surface potential on aggregation of *Lactobacillus brevis* mediated by xylan.
○齋藤 勝一、小林 功、中村 敏英（農研機構・食総研）
○Katsuichi Saito, Isao Kobayashi, Toshihide Nakamura (NARO-NFRI)

【目的】近年植物に由来する乳酸菌の食品利用が活発に行われている。一方、乳酸菌と植物との相互作用など植物に由来する乳酸菌の機能の詳細は未だ明らかになっていない。そこで植物由来乳酸菌の機能特性の解明に向け、これまでに付着・凝集作用を有する乳酸菌と植物成分の探索を行ったところ、*Lactobacillus brevis* がキシランの添加により特異的に凝集することを見出した（日本農芸化学会 2012 年度大会)。また、本作用はレクチン等の特異的レセプターによるものではなく、*Lb. brevis* の最表層に存在する細胞表層タンパク質（Slp）に起因することが示唆された（日本乳酸菌学会 2013 年度大会)。今回は、本作用の更なる機構解明に向け *Lb. brevis* の細胞表層電位（ゼータ電位）に着目した検討を行った。

【方法】乳酸菌として(独)製品評価技術基盤機構・生物遺伝資源部門(NBRC) 保有の *Lb. brevis* 7 株を用いた。各菌株を MRS 培地で 30℃、24 時間静置培養後、菌体を生理食塩水で洗浄し以降の実験に供した。キシランによる凝集作用は、洗浄菌体に 1%キシラン水溶液を添加し 30℃で 2 時間保温後、上層液の OD_{600} を測定し、菌体の沈降度により評価を行った。細胞表層電位は、洗浄菌体を 10 mM リン酸緩衝液（pH6.8）に懸濁し、ゼータ電位測定装置（ZEECOM ZC-2000）を用いて測定を行った。また、塩化リチウムにより Slp を除去した菌体の凝集作用及びゼータ電位を測定し、凝集作用に及ぼす Slp と細胞表層電位の影響について解析を行った。

【結果】キシラン添加による *Lb. brevis* の凝集作用は菌株により差違があり、凝集作用が強い菌株（*Lb. brevis* NBRC 3960、13109、13110)、弱い菌株（NBRC 3345、12005、12006)、作用が見られない菌株（NBRC 107147）に大別された。これら菌株のゼータ電位を測定したところ、全ての菌株が負の電荷を有していたが、それら電位の強弱と凝集作用の強弱に相関は見られなかった。Slp を完全に除去した菌体においても Slp 除去前の菌株と同程度の電位が確認でき、キシランによる凝集作用も見られた。一方、Slp を部分的に除去した菌体では、ゼータ電位の絶対値が増加し電荷が減少するとともに、凝集作用の低下・消滅が確認できた。このことから Slp の状態が細胞表層電位に影響し、その結果生じる電荷とキシランとの静電的な作用により凝集作用を生じていることが示唆された。

Lactobacillus brevis, xylan, cell-surface potential

講演番号：2A12a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ A 校舎 12 会場

緑膿菌の運動性を制御する新規転写因子の機能解析

Functional analysis of novel transcriptional regulator that controls the motility of *Pseudomonas aeruginosa*

○上田 考摂[1]、大浦 啓[1]、李 昇ウク[2]、野尻 秀昭[2]、田代 陽介[3]、豊福 雅典[1]、中島 敏明[1]、内山 裕夫[1]、野村 暢彦[1] ([1]筑波大院生命環境、[2]東大院生物工学セ、[3]静岡大院工学)

○Kosetsu Ueda[1], Hiromu Oura[1], Seung Uk Lee[2], Hedeaki Nojiri[2], Yosuke Tashiro[3], Masanori Toyofuku[1], Toshiaki Nakajima[1], Hiroo Uchiyama[1], Nobuhiko Nomura[1] ([1]Univ of Tsukuba, [2]The Univ of Tokyo, [3]Shizuoka Univ)

【背景・目的】緑膿菌は環境中に広く存在している一方、免疫力の低下した患者や高齢者に日和見感染を引き起こす病原菌である。緑膿菌は多様な運動性により高い環境適応能力を有している。緑膿菌は、Swimming、Twitching、Swarming といった 3 種の運動性を持ち、それらの運動性を環境に応じて使い分ける。Swarming は、微生物間情報伝達や栄養塩によって高度に制御された集団行動であるが、Swarming がどのように制御されているかは完全にはわかっていない。Swarming 細胞は浮遊細胞と比較して抗生物質への耐性や毒素生産関連遺伝子の転写が上昇することが報告されている。Swarming は緑膿菌における一運動性という位置付けのみならず、周囲の環境に応じてそのパターンが変化し、さらに複数の遺伝子が関与する非常に複雑な運動性と言える。当研究室の先行研究により、ナフタレン誘導体(ナフタレン分解産物とそのアナログ)が緑膿菌の運動性の 3 つの運動性の中で Swarming をのみを抑制することを発見した。石油中のコールタールの成分として知られるナフタレンは環境中に幅広く存在している。ナフタレンは分解菌により分解され様々な中間物質を生じるが、このような分解産物が細菌に与える影響についての報告は少ない。そこで本研究では、ナフタレン誘導体が緑膿菌の Swarming を抑制するメカニズムを明らかにする事を目的とした。

【方法・結果】ナフタレン誘導体による Swarming 抑制に関わる遺伝子を明らかにするためにマイクロアレイを行った結果、ナフタレン誘導体添加時に発現が低下した 2 つの新規転写因子を同定した。これらの転写因子の破壊株を作成し、Swarming motility assay を行った。それぞれの転写因子のシングルミュータントでは部分的に Swarming が抑制された一方で、これらの転写因子のダブルミュータントでは Swarming が顕著に抑制された。走査型電子顕微鏡(SEM)を用いた観察により、ダブルミュータントの鞭毛の構造は WT と比べ異なっている事が分かった。さらにこの時、ダブルミュータントは WT では見られなかった凝集体を形成していた。ダブルミュータント同様、WT にナフタレン誘導体を加えても鞭毛の構造の変化、凝集体の形成が観察された。これらの結果からナフタレン誘導体がこれらの転写因子を介して緑膿菌の Swarming motility を抑制している事が示唆された。

Pseudomonas aeruginosa, motility, transcriptional regulator

講演番号：2A12a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ A 校舎 12 会場

細胞内シグナル物質 c-di-GMP が細胞間コミュニケーションに与える影響
The effect of the intracellular signaling molecule c-di-GMP on cell-to-cell communication
○伊藤 聡志、柿原 健佑、豊福 雅典、中島 敏明、内山 裕夫、野村 暢彦 (筑波大院生命環境)
○Satoshi Ito, Kensuke Kakihara, Masanori Toyofuku, Toshiaki Nakajima, Hiroo Uchiyama, Nobuhiko Nomura (Grad. Sch. of Life and Env. Sci., Univ. of Tsukuba)

【背景・目的】実環境中の多くの微生物は浮遊状態ではなく、固体表面に付着したバイオフィルム状態という細胞をマトリックスで覆われた集団の状態で存在している。また、バイオフィルム中では浮遊状態の細胞と同様に、シグナル物質を介した細胞間コミュニケーションが行われており、多くの遺伝子発現制御が行われている。当研究室の先行研究では緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* において、浮遊状態の細胞とバイオフィルム状態の細胞で細胞間コミュニケーションによる遺伝子発現制御が異なるということを明らかになった。本研究ではバイオフィルムと浮遊状態の細胞間コミュニケーションの差異において、細胞内シグナル物質である c-di-GMP というバイオフィルム形成因子に着目して解析を進めた。
【方法・結果】当研究室の先行研究では、浮遊状態の細胞においてシグナル物質の一つである *Pseudomonas* quinolone signal(PQS)が脱窒遺伝子 (*nir*) の発現に影響を与えないことが明らかになっていた。しかしながら、バイオフィルム状態の細胞では PQS が *nir* の発現を促進するという現象が観察された。本研究ではこの現象のメカニズムを解析する上でバイオフィルム状態の細胞で蓄積することが明らかになっている c-di-GMP に着目した。c-di-GMP を過剰に生産する株を作成し、親株と比較して、PQS が制御する遺伝子群の変化の有無を解析した。Real-time PCR による遺伝子発現量定量の結果、c-di-GMP を過剰生産する株では親株と比較して、PQS が制御する遺伝子群が変化することが示された。この結果から、浮遊状態の細胞とバイオフィルム状態の細胞では PQS 制御下にある遺伝子群が変化する可能性が示唆された。今後は c-di-GMP が仲介する細胞間コミュニケーションの遺伝子発現制御の詳細メカニズムを解析する予定である。

c-di-GMP, cell-to-cell communication, Pseudomonas quinolone signal

講演番号：2A12a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ A 校舎 12 会場

ストレス応答を介した緑膿菌の新奇メンブランベシクル形成機構
The membrane vesicle formation mechanism via stress response in *Pseudomonas aeruginosa*
○黒沢 正治、豊福 雅典、野村 暢彦 (筑波大院生命環境)
○Masaharu KUROSAWA, Masanori TOYOFUKU, Nobuhiko NOMURA (Tsukuba Univ.)

微生物は様々な物質を介して細胞間で相互作用を及ぼし合っていることがわかってきている。この細胞間相互作用において重要な役割を担う構造物として、メンブランベシクル(MV)と呼ばれる微生物が生産する nm オーダーの膜小胞体が近年注目されている。MV は主にグラム陰性細菌でその生産が確認されている外膜由来の小胞体で、タンパクやシグナル物質、核酸などを包括していることから、物質輸送のキャリアーや遺伝子の水平伝播など細胞間相互作用における様々な機能が見込まれる。しかしながら、その詳細な形成メカニズムや機能に関する知見は未だ乏しく、MV に関する新たな知見を得ることは細胞間相互作用を深く理解する上で重要であると考えられる。本研究は MV の細胞間相互作用における役割を明らかにすることを目的とし、MV 生産のモデル微生物である緑膿菌を用いて MV 形成メカニズムの解析を行った。緑膿菌の MV 形成において、これまでに提唱されているメカニズムに基づくと緑膿菌は嫌気条件下では MV を生産しないことが予想されていた。しかし、当研究室の先行研究において緑膿菌は嫌気条件下でも MV を生産していることが明らかとなり、ストレス応答の一つである SOS レスポンスを介した新奇な MV 形成メカニズムの存在が示された。本研究では新奇 MV 形成メカニズムの詳細な解析を行った。その結果、SOS レスポンスによってその生産が制御されているファージ様タンパク（バクテリオシン）の分泌（溶菌）システムが MV 形成に関与していることが示唆された。本発表では、緑膿菌のストレス応答を介した新奇な MV 形成メカニズムの詳細とそのメカニズムから推測される MV の細胞間相互作用における役割について考察し、発表を行う。

membrane vesicle, SOS response, pyocin production

講演番号：2A12a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ A 校舎 12 会場

メンブランベシクルによる微生物細胞間シグナル物質の伝達
Membrane vesicles as a carrier of long-chain-AHLs in bacteria
○豊福 雅典[1]、橋本 庸平[2]、稲葉 英樹[2]、野村 暢彦[1] ([1]筑波大院生命環境、[2]住友重機械工業)
○ Masanori TOYOFUKU[1], Yohei HASHIMOTO[2], Hideki INABA[2], Nobuhiko NOMURA[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]Sumitomo Heavy Indust.)

微生物は細胞外にシグナル物質を生産してお互いにコミュニケーションをとることが明らかとなっている。その中でもアシル化ホモセリンラクトン(AHL)はグラム陰性細菌の中で最もよく保存されているシグナル物質として知られている。AHL には様々なアシル鎖のものが存在し、アシル鎖の長さが AHL 受容体との特異性、すなわち種特異性を決定する。水に溶けにくい長鎖 AHL の存在は知られていたが、疎水性が高いことから、どのように環境中に分泌され、細胞に伝達されるのか疑問であった。一方で、グラム陰性細菌は細胞外膜から成るメンブランベシクル(MV)を生産することが明らかとなっている。MV はこれまでに、緑膿菌が生産するキノロン系のシグナル物質を運搬することが報告されているが、AHL との関係については分かっていない。

本研究ではグラム陰性細菌で最も生産されている AHL が MV に含まれていることを見いだした。活性汚泥より単離したパラコッカッス属細菌において、長鎖 AHL(C16-HSL)がメンブランベシクルに含まれることが明らかとなった。微生物間コミュニケーションにおいて、生産されたシグナル物質がどのように相手まで伝わるかは非常に重要な問題であり、本研究は MV が水に溶けにくいシグナル物質を効率的に伝達する役割を担っている可能性を示す。

Cell-cell communication, Membrane vesicle, AHL

講演番号：2A12a17
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ A 校舎 12 会場

好熱性 *Thermaerobacter* 属細菌由来アシル化ホモセリンラクトン分解遺伝子の機能解析
A thermostable of *N*-acylhomoserine lactonase from the thermophilic genus *Thermaerobacter*
○諸星 知広、富永 良昭、池田 宰（宇都宮大院工）
○Tomohiro MOROHOSHI, Yoshiaki TOMINAGA, Tsukasa IKEDA (Utsunomiya Univ.)

【目的】多くのグラム陰性病原性細菌は、アシル化ホモセリンラクトン（AHL）を介した細胞間情報伝達機構 Quorum Sensing（QS）により自身の病原性発現を制御しており、AHL を生産できない変異株は病原性が極度に低下することから、QS 阻害技術は新しい病原性抑制技術として注目されている。近年、AHL 分解酵素を発現する細菌の存在が明らかになり、AHL 分解酵素により病原菌の AHL を分解することで、病原性の抑制が可能となる。本研究では、既知の AHL 分解酵素の遺伝子情報に基づいて新たな熱安定型 AHL 分解酵素の取得を試みた。
【実験方法及び結果】本研究に先駆けて、ジャガイモ葉から単離した AHL 分解細菌 *Solibacillus silvestris* から metallo-β-lactamase superfamily に属する *ahlS* のクローニングに成功し、AhlS は AHL のラクトン環を加水分解する AHL ラクトナーゼとして機能することを明らかにしている。AhlS を含む既知の metallo-β-lactamase superfamily に属する AHL ラクトナーゼの系統解析を行ったところ、いくつかのサブファミリーに分類できる可能性が示唆された。その中でも、AhlS サブファミリーのアミノ酸配列を基にデータベース検索を行ったところ、海洋性好熱細菌 *Thermaerobacter marianensis* JCM 10246 株のゲノム上に *ahlS* 相同性遺伝子が存在することが明らかになり、この遺伝子を *aiiT* と命名した。さらに、PCR を用いて近縁種のゲノムからも *aiiT* 相同性遺伝子のクローニングを行ったところ、*T. composti* JCM 15650 株および *T. nagasakiensis* JCM 11223 株からも *aiiT* 相同遺伝子のクローニングに成功した。AhlS と AiiT の AHL 分解活性を詳細に解析するために、マルトース結合タンパク質との融合タンパク質として発現、精製を行った。まず、AiiT と AhlS の至適温度を調べたところ、AhlS が 50℃付近であったのに対し、AiiT は 70℃付近と高く、80℃でも最大活性の 90%程度を維持していた。また、AhlS と AiiT の熱安定性を調べるために、あらかじめ各温度で 10 分間プレインキュベートした後の酵素の残存活性を調べたところ、AhlS は 60℃のプレインキュベートで酵素活性がほぼ失われてしまったのに対し、AiiT は 80℃のプレインキュベートでも 50%程度の酵素活性を維持したことから、AiiT は従来の酵素と比較して熱安定性が高いことが明らかとなった。

quorum sensing, acylhomoseine lactone, Thermaerobacter

講演番号：2A12p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ A 校舎 12 会場

コネクター因子 SafA によるセンサーPhoQ の活性化機構

Activation mechanism of sensor PhoQ by the connector SafA in *E.coli*

○吉谷 亘平[1]、江口 陽子[1]、石井 英治[2]、内海 龍太郎[1] ([1]近畿大院農、[2]京都大ウイルス研)
○kohei yoshitani[1], yoko eguchi[1], eiji ishii[2], ryutaro utsumi[1] ([1]Kinki Univ., [2]Kyoto Univ.)

大腸菌の膜タンパク質 SafA は、酸耐性に関与する細菌２成分情報伝達システム EvgS/EvgA と PhoQ/PhoP をつなぐコネクター分子として働き、細菌情報伝達ネットワークに重要な働きをしている。SafA は、一回膜貫通型タンパク質で、ペリプラズム領域に位置する PhoQ のセンサードメイン（SD）と相互作用を起こすことにより、PhoQ/PhoP の情報伝達を活性化する。現在, SafA と PhoQ の相互作用に重要なアミノ酸残基は完全には理解されていない。先の研究から PhoQ-SD 中の D179 と K186 が SafA の PhoQ 活性化に重要であることが示唆されている。しかし、PhoQ-SD と SafA の詳細な結合メカニズムは解明されていないため PhoQ-SD の変異体を用い、SafA による PhoQ 活性化の分子機構解明を行った。

PhoQ-SD 立体構造上で D179, K186 が近接していることから D179, K186 を中心とした領域が SafA と PhoQ の相互作用に重要であると予想した。2 つのアミノ酸が電荷をもつアミノ酸であるため SafA と PhoQ-SD の結合に静電的な作用が関与していると考え、PhoQ D179 を正の電荷をもつ Arg、負の電荷をもつ Glu、電荷をもたない Ala、Leu に置換し、SafA の活性化能を測定したところ、D179R, D179A, D179 L において活性化能が低下した。しかし、野生型と同じ電荷をもつ変異体 D179E において SafA による活性化能が低下しなかったことから、SafA による活性化には、PhoQ の 179 番目に負の電荷をもつことが重要であり、PhoQ D179 が SafA の正の電荷をもつアミノ酸残基と静電的に引き合い、結合していることが示唆された。そこで、SafA のアラニン置換変異体で最も活性化能が低下した SafA R53 と、PhoQ D179 の電荷を入れ替えた変異体 PhoQ D179R-SafA R53D を作製し、変異体の活性化能を測定したところ、SafA が作用したことによると思われる活性の低下がみられた。この変異体は、電荷的な引き合いが保持されているもののアミノ酸残基の側鎖が置換されたことにより SafA の異常な結合を引き起こし、PhoQ の活性を抑制したと考えられる。さらに、PhoQ-SD D179, K186 の周辺アミノ酸残基が D179, K186 と同様に SafA による活性化に影響をもつ残基が存在すると考え、アラニン置換変異体を用いたレポーターアッセイを行った。その結果、アミノ酸配列、PhoQ-SD 立体構造上で隣接しているアミノ酸を含むアラニン置換変異体において SafA による PhoQ の活性化は野生型と同様な値を示した。これらの結果から、PhoQ D179, K186 は、周辺アミノ酸の電荷や側鎖のサイズに依存せず、SafA と PhoQ-SD の結合に関与していることが示唆され、2 つのアミノ酸のもつ電荷が重要な役割をもっていることが考えられる。

protein interaction, two component regulatory system, protein complex

講演番号：2A12p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 12 会場

サルモネラ菌の TCS と PTS をつなぐコネクターRcsG

RcsG, a connector of PTS to TCS in *Salmonella enterica*

○加藤 明宣、深見 知可、萩原 慧、内海 龍太郎（近畿大院農）
○Akinori KATO, Tomoka FUKAMI, Kei HAGIHARA, Ryutaro UTSUMI (Kinki Univ.)

細菌の環境応答機構として二成分制御系（TCS）が知られる。サルモネラ菌の病原性調節ネットワークの解析から、複数のTCS間を繋ぐ情報伝達機構の存在が明らかとなって来た。その一つとして、コネクターと呼ばれる、それぞれに特徴的なアミノ酸配列を有するスモールタンパクを介した機構が知られる。我々は、コネクター因子を介する機構の更なる解明のため、新たなコネクター候補の探索を行っている。本研究では、莢膜多糖合成遺伝子群の調節に関わるRcsC/RcsD/RcsB系を活性化するRcsGの分子機構解明を目的とした。

RcsC/RcsD/RcsB 系は、ヒスチジンホスホトランスフェラーゼ (HPt) ドメインを単独のリン酸基転移部位として保持する RcsD が、ヒスチジンキナーゼ RcsC とレスポンスレギュレーターRcsB の間でリン酸リレーを中継する変則的な TCS を形成している。RcsG の過剰発現によって、莢膜多糖合成関連遺伝子 *cps* (*wzc*)が活性化されたが、*rcsB*、*rcsC*、*rcsD* をそれぞれ欠損させた株では *wzc* は活性化されなかった。RcsG の標的を調べるために bacterial two-hybrid system (BACTH) による解析を行ったところ RcsD と RcsG 間で相互作用が検出された。しかし、RcsD のリン酸化部位を変異させると相互作用が失われた。一方、*rcsG* は糖取込みに関わるホスホトランスフェラーゼシステム (PTS) の転写調節因子 *rcsH* や PTS レギュレタリードメイン (PRD) *rcsI* 等、他のスモールタンパク質をコードする遺伝子等とクラスターを形成している。*rcsG* オペロンが構成的に発現される *rcsJ**変異株において、*rcsG* オペロンの転写は *rcsH* だけではなく、PTS の Enzyme I と HPr をそれぞれコードする *ptsI*、*ptsH* に依存的に上昇した。*rcsJ**変異株において、*rcsG* や *rcsH* だけではなく、*ptsI*、*ptsH* に依存的に *wzc* 発現が活性化されることが示された。

two-component system, connector, network

講演番号：2A12p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 12 会場

インドールによる大腸菌酸耐性システムの発現抑制機構の解析
Repression of acid resistance system by indole in *Escherichia coli*
○安彦 弦太、堀川 晃菜、和地 正明（東工大院生命理工）
○Genta ABIKO, Akina HORIKAWA, Masaaki WACHI (Tokyo Tech.)

[はじめに]

これまでの研究により大腸菌 *Escherichia coli* の外膜を貫通するチャネルタンパク質をコードする *tolC* 遺伝子の欠損株が、酸感受性を示すことが見出された(1)。TolC タンパク質は内膜のポンプタンパク質と複合体を形成し、抗生物質や界面活性剤などの外来物質や、インドールやポルフィリンなどの代謝物を能動的に排出する。TolC 依存的排出システムは特に薬剤耐性の観点で注目されていたが、酸耐性機構への寄与により TolC が経口感染にも重要な因子であることが示唆されている。

tolC 変異株では、大腸菌の酸耐性システムの一つである Gad システムの酸性条件での発現誘導が阻害される。Gad システムは、グルタミン酸脱炭酸酵素 GadA/B とグルタミン酸:GABA アンチポーターGadC より構成される。Gad システムは細胞外のグルタミン酸をとりこんで脱炭酸し GABA に変換して細胞外に GABA を排出し、H^+を消費することで細胞内 pH を上昇させる。解析の結果、*tolC* 変異株では TolC 依存的排出システムの基質であるインドールが細胞内に蓄積し、インドールが Gad システムの発現誘導を抑制することが示唆された。本研究では細胞内インドールによる Gad システム発現誘導の抑制メカニズムの解明を試みた。

[結果と考察]

tolC 変異株では Gad システムのセントラルアクチベーターである GadE が転写レベルで抑制されていることが明らかになった。GadE の発現調節は複雑であり、制御因子として 20 種以上のタンパク質と 4 種の sRNA が見出されている。現在、インドールによる GadE の発現抑制のメカニズムの解明を行っている。

[参考文献]

(1) Deininger KN, Horikawa A, Kitko RD, Tatsumi R, Rosner JL, Wachi M, Slonczewski JL.(2011)
A requirement of TolC and MDR efflux pumps for acid adaptation and GadAB induction in *Escherichia coli*. PLoS One,6,e18960

Acid resistance, *tolC*, Indole

講演番号：2A12p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 12 会場

Transplantation of *Escherichia coli* acid tolerance systems into *Corynebacterium glutamicum*
○Young il Jo[1,2], Masaaki WACHI[1] ([1]Tokyo Tech, [2]Daesang corp.)

Corynebacterium glutamicum, an important industrial bacterium in producing amino acids, has a low ability in acid tolerance. On the other hand, *Escherichia coli* has acid resistance systems allowing survival under extreme acidic conditions. Among the systems, Gad system, which contains GadA or GadB (glutamate decarboxylase) and GadC (glutamate : γ-aminobutyric acid antiporter), is known enabling bacteria survival at pH 2.5. The introduction of gad operon (*gadB-gadC*) from *E. coli* into *C. glutamicum* results in consumption of glutamate and production of γ-aminobutyric acid in acidic pH, which did not happen in non-recombinant, suggesting GadB and GadC work well in *C. glutamicum*. By the adding of 5~10 mM glutamate, the survival rate of the recombinant strain in pH 4.5 medium increased about 8-fold compared to the non-recombinant strain. Hereby, it was found that the expression of heterologous acid tolerance system in *C. glutamicum* could be possible and it suggests potential of applying other heterologous acid tolerance systems to *C. glutamicum*.

acid tolerance, *Corynebacterium glutamicum*, transplantation

講演番号：2A12p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 12 会場

抗菌性界面活性剤処理した *Staphylococcus aureus* 細胞における活性酸素ストレスとその応答の解析
Analyses of the reactive oxygen stress and its response in *Staphylococcus aureus* cells treated with an antibacterial surfactant

○守茂山 礼乃[1]、太田 美也子[1]、松村 吉信[1,2]（[1]関西大化学生命工、[2]関西大学 ORDIST）
○ayano SUMOYAMA[1], miyako OTA[1], YOSHINOBU MATSUMURA[1,2] ([1]Kansai Univ., [2]Kansai Univ. ORDIST)

近年、抗菌剤の乱用による薬剤耐性菌の出現が懸念されており、その耐性機構の解明が課題となっている。当研究室では、臭化セチルトリメチルアンモニウム（CTAB）に耐性を示す自然突然変異株を大腸菌で取得し、その親株との比較解析を行ってきた。これより、スーパーオキシドストレス応答能の強化につながる染色体変異がその耐性能向上に関与し、さらに、野生株ではCTAB処理によって発生する細胞内活性酸素種が過剰となることも明らかにしている。一方、グラム陽性菌である*Staphylococcus aureus*をCTAB処理して細胞内活性酸素の発生を調査した結果、過剰なスーパーオキシドの発生は認められず、微量の過酸化水素の発生のみが観察された。また、活性酸素消去酵素であるカタラーゼやスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）の細胞内タンパク質量の変化を調査したところ、カタラーゼタンパク質量は大きく変化しないが、SODタンパク質量は増加していた。そこで本研究では、CTAB処理した*S. aureus*における活性酸素消去酵素活性の変動と活性酸素消去酵素以外の細胞内タンパク質量の変動を調査し、CTAB処理で生じている細胞ストレスを解析することを目的とした。

供試菌には *S. aureus* Mu50 株を使用し、対数増殖期中期に 5～20 μM CTAB を培養液に添加後 30 分培養して CTAB 処理した。CTAB 処理細胞より抽出した細胞内タンパク質を、カタラーゼ活性は過酸化水素量を 240 nm における吸光度変化で評価し、SOD 活性はニトロブルーテトラゾリウム（NBT）還元法で測定した。その結果、カタラーゼ活性および SOD 活性ともに、低濃度 CTAB 処理では未処理と比較して有意な活性の上昇が観察されたが、CTAB 処理濃度の上昇に伴い活性の低下が観察された。CTAB による活性酸素消去酵素活性の低下は大腸菌細胞でも観察されており、Mu50 株でも活性酸素処理能力の低下による活性酸素ストレスが生じている可能性が高いと予想された。また、CTAB 未処理細胞より抽出した細胞内タンパク質に直接 CTAB 処理した場合のカタラーゼ活性と SOD 活性を測定したが、カタラーゼ活性および SOD 活性に変動は認められず、CTAB がこれら活性酸素消去酵素に直接作用して活性を阻害するものではないことも確認された。さらに、活性酸素消去酵素以外のタンパク質について、2D-PAGE 法と PDQuest を用いてそれらタンパク質量の変動を評価し、MALDI-TOF-MS によってタンパク質同定を行っている。これらの結果および、細胞内で生じている酸化障害の程度を評価し、CTAB 処理によって生じるストレスを明らかにする予定である。

Staphylococcus aureus, cetyltrimethylammonium bromide(CTAB), reactive oxygen stress

講演番号：2A12p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 12 会場

乳酸菌 *Enterococcus gilvus* におけるカロテノイド生産とストレス応答

Relationship between carotenoid production and stress response in *Enterococcus gilvus*

○萩 達朗、小林 美穂、野村 将（農研機構・畜草研）
○Tatsuro HAGI, Miho KOBAYASHI, Masaru NOMURA (NILGS)

【目的】光合成生物や一部の微生物が生産するカロテノイドは抗酸化作用を有し、宿主の酸化ストレス耐性に関与している。乳酸菌について、その一部はカロテノイドを生産することが知られているが、乳酸菌における酸化ストレスとカロテノイドとの関係は未解明な部分が多い。我々はこれまでに、カロテノイド生産乳酸菌 *Enterococcus gilvus* を牛乳から分離し、カロテノイド生合成遺伝子の単離および機能解析を行い、カロテノイドは乳酸菌の酸化ストレス耐性を向上することを明らかにしてきた[1)]。本大会では、乳酸菌のストレス応答とカロテノイドとの関係を明らかにするため、酸化ストレスが乳酸菌のカロテノイド生産に与える影響について検討したので報告する。

【方法】前培養した *E. gilvus* を、200 mL の M17 培地（0.5%グルコース含有）を含む 500 mL 三角フラスコに接種し、好気条件（振とう：酸化ストレス条件）および嫌気条件（静置：非ストレス条件）にて、30℃で培養した。2 時間毎に培養液のサンプリングを行い、各培養条件における生育特性（増殖度・乳酸生成量）を調べるとともに、菌体量あたりのカロテノイド量を測定した。さらに、逆転写定量 PCR でカロテノイド生合成遺伝子（*crtN* と *crtM*）の発現量を調べた。また、各条件で培養した菌体について、16 および 32 mM 過酸化水素水処理後の生残率を測定し、各培養条件が酸化ストレス耐性に与える影響について検討した。

【結果】*E. gilvus* を好気培養することで、嫌気培養時に比べて増殖度と乳酸生成量は若干低下した。一方、好気培養時の菌体に含まれるカロテノイド量は、嫌気培養時に比べて最大 22 倍（4 時間培養後）となり、著しく増加した。次に、各培養条件におけるカロテノイド生合成遺伝子の発現量を比較した結果、好気培養時の *crtN* 遺伝子の発現量は嫌気培養時に比べて、培養期間を通して 2.7～5.9 倍、*crtM* 遺伝子では 2.6～5.7 倍であり、好気培養によってカロテノイド生合成遺伝子の発現が誘導されることが明らかとなった。また、16 および 32 mM 過酸化水素水処理後の生残率は、好気培養した *E. gilvus* の方が嫌気培養時に比べ、それぞれ 62 倍、72 倍と高く、カロテノイド生産量の増加が *E. gilvus* の酸化ストレス耐性の向上に関与することが示唆された。

1) Hagi et al., 2013. *J. Appl. Microbiol.*, 114(6):1763-1771.

lactic acid bacteria, carotenoid, stress response

講演番号：2A12p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 12 会場

乳酸菌の長寿遺伝子 Sirtuin homologue とストレス応答

The longevity gene sirtuin homologue of lactic acid bacteria and stress response

○新 穂高[1]、田中 尚人[2]、志波 優[3]、吉川 博文[3]、岡田 早苗[2]、遠藤 明仁[1]、宮地 竜郎[1]、中川 純一[1] ([1]東農業大院・生産、[2]東農業大・菌株、[3]東農業大・ゲノム解析セ)

○Hotaka Atarashi[1], Naoto Tanaka[2], Yuu Shiha[3], Hirohumi Yoshikawa[3], Sanae Okada[2], Akihito Endou[1], Tatsuro Miyazi[1], Junichi Nakagawa[1] ([1]Tokyo Univ. Agr., [2]NRIC, Tokyo Univ. Agr, [3]Genome Res. Center, Tokyo Univ. of Agr.,)

【目的】我々は乳酸菌の環境ストレス耐性に関わる遺伝子制御機構を解析するアプローチとして、ヒトなど真核生物で「長寿遺伝子」とされている Sirtuin に着目した。Sirtuin は環境ストレスやカロリー制限などに対して応答反応を引き起こすヒストン脱アセチル化酵素である。乳酸菌にはその祖先と考えられるホモログがあるが、ヒストンを持たない原核生物における役割は不明である。そこで、*Lactobacillus paracasei* 菌をモデルとして、本遺伝子と乳酸菌にとってストレスになる腸管での胆汁酸に対する耐性との関連を中心に Sirtuin homologue タンパク質の発現制御を解析し、乳酸菌の環境ストレス応答とそれに関わる遺伝子発現制御の関係を解明することを目的とした。

【方法】実験には 3 株の *L. paracasei* 株、即ち、NRIC 0644 株、サトウキビワイン由来 NRIC 1917 株、コンポスト由来 NRIC 1981 株を用いた。これら 3 株の全ゲノムを東京農業大学生物資源ゲノム解析センターの次世代シーケンサーを用いて解析し、その後サイクルシーケンス法にて Sirtuin homologue の遺伝子配列を決定した。これらの Sirtuin homologue 遺伝子をクローニングし、大腸菌発現系を用いて組換えタンパク質を生産、アフィニティー精製し、酵素活性を測定した。更に Sirtuin の賦活剤であるレスベラトロールおよび阻害剤であるスラミンを作用させ、乳酸菌 Sirtuin homologue の酵素活性および胆汁酸の主成分であるコール酸耐性能への影響を観察した。次に、組換えタンパク質に対する抗体を作製し、コール酸及び飢餓ストレス等の環境ストレス存在下における発現量の変動をウエスタンブロットにて解析した。

【結果および考察】全ゲノム解析から、3 株全てが Sirtuin homologue を保有しており、NRIC 1981 株においては *Lactobacillus rhamnosus* に類似する Sirtuin homologue 配列も見出され、2 つの Sirtuin homologue を保有していることが示された。精製された組換え *L. casei* 型 Sirtuin homologue タンパク質は脱アセチル化活性を有し、レスベラトロールで賦活化され、スラミンで阻害された。更にレスベラトロール処理された菌株はコール酸耐性能が上昇し、スラミン処理した菌株はコール酸耐性能が減少した。また、乳酸菌の Sirtuin homologue タンパク質の発現量はコール酸ストレス、温度ストレス、酸素ストレス及び培地の炭素源濃度を減少させた飢餓ストレス下において発現量の増加および減少のタイミングが変化した。これらの事は,コール酸や飢餓等の環境ストレスに対し、乳酸菌の Sirtuin homologue が何らかの関与をしていることを示唆している。今後は脱アセチル化酵素としての乳酸菌 Sirtuin homologue のターゲット分子や環境ストレスに応答する遺伝子の更なる解析が必要である。

Sirtuin, Lactobacillus paracasei, Resveratrol

講演番号：2A12p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 12 会場

大腸菌は D-Ala 飢餓ストレス感知後、未知シグナル伝達系を活性化し細胞死に至る
D-alanine starvation leads to death of Escherichia coli via the activation of an unknown signal transduction pathway
○梅宮 真知、佐藤 一樹、大内 寿一、堀 初弘、安藤 太助、磯貝 恵美子、米山 裕 (東北大院農)
○Machi UMEMIYA, Kazuki SATO, Toshikazu OUCHI, Hatsuhiro HORI, Tasuke ANDO, Emiko ISOGAI, Hiroshi YONEYAMA (Tohoku Univ.)

【目的】大腸菌がもつ 2 つのアラニンラセマーゼ(Alr、DadX)を欠損した二重変異株 MB2795(Δ*alr* Δ*dadX*)は D-アラニン(D-Ala)要求性を示す。我々はアラニンの代謝研究をする過程で、D-Ala を含まない L 液体培地でこの D-Ala 要求株を培養すると急激な細胞死を起こすことを偶然見いだした。そこで、この D-Ala 飢餓ストレスによる細胞死の原因を探る目的で本研究を行った。
【方法】D-Ala 添加 L 培地で前培養した MB2795 を、D-Ala を含まない L 培地あるいは最少培地に約 10^8 cells/ml 接種し 37℃にて振盪培養を行い、経時的に残存生菌数を D-Ala 添加 L 平板にて計測した。また、浸透圧溶菌の影響を調べるために 2% NaCl あるいは 10% sucrose を両培地に添加し、同様に残存生菌数を評価した。さらに、D-Ala 飢餓ストレスを与えた後に起こる細胞死の原因の一端を探るため、タンパク質合成阻害剤であるクロラムフェニコールの細胞死に与える影響を評価した。また、D-Ala 飢餓ストレス時に起こる細胞死に与える他のアミノ酸(L-Met,L-Tyr)の飢餓ストレスの影響を調べるために、これらの L-アミノ酸欠乏条件を設定し残存生菌数を評価した。
【結果と考察】D-Ala を含まない液体培地に MB2795 を接種培養後、経時的に残存生菌数を測定した結果、L 培地では培養開始 6 時間後に生菌数が約 10^4 cells/ml まで低下し、最少培地では培養開始 9 時間後に生菌数が約 10^6 cells/ml に低下した。この細胞死の原因が D-Ala 欠乏による細胞壁合成阻害に起因する浸透圧溶菌である可能性を調べるために、各培地に 2% NaCl と 10% sucrose を添加し、残存生菌数を計測した結果、最少培地では細胞死の抑制が認められたが、L 培地では抑制効果が認められなかった。さらに、D-Ala を含まない各培地にタンパク質合成阻害剤のクロラムフェニコールを添加したところ、いずれの培地でも濃度依存的に細胞死が抑制された。これは遺伝情報の発現を抑制したことによって、D-Ala 飢餓ストレス後に起こる細胞死が抑制されたことを意味している。また、D-Ala 飢餓ストレスによる細胞死に与える L-アミノ酸飢餓ストレスの影響を調べるために、D-Ala・L-Tyr 要求株あるいは D-Ala・L-Met 要求株を用いて、L-Tyr あるいは L-Met を含有しない最少培地での生菌数を評価した。その結果、D-Ala 飢餓ストレスによる細胞死が、これらの L-アミノ酸の飢餓ストレスを同時に与えることによって抑制されたことから、D-Ala 飢餓ストレス感知後に作動する細胞死に至るカスケードが、これらの L-アミノ酸飢餓ストレスによって遮断された可能性が示唆された。以上のことより、大腸菌は D-Ala 飢餓ストレス感知後、遺伝情報の発現が関与する細胞死の機構をもつと考えられる。

E.coli, stress response, cell death

講演番号：2A12p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 12 会場

Pseudomonas putida における熱ショック応答と凝集タンパク質の再生

Heat shock response and disaggregation of protein aggregates in *Pseudomonas putida*

○伊藤 史浩[1]、福森 文康[2] ([1]東洋大院・生命、[2]東洋大・食環)
○Fumihiro ITO[1], Fumiyasu FUKUMORI[2] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ., [2]Faculty of Food Life Sciences, Toyo Univ.)

【目的】細胞中のタンパク質は、種々のストレスにより変性して誤った立体構造となり、それらは本来タンパク質内部にあるべき疎水性領域が露出した状態となるため、他の変性タンパク質と互いに凝集する傾向にある。特定のタンパク質の凝集体は、ヒトでは神経疾患をもたらし、微生物にとっても生育に悪影響を与える可能性がある。原核生物においては、分子シャペロンである ClpB が異なる機能をもつ分子シャペロンの DnaK および DnaJ とともに凝集タンパク質の脱凝集化と可溶化を担うことが、主に *Escherichia coli* を用いた研究により明らかになっている。我々は、分子シャペロンおよびプロテアーゼ遺伝子破壊株を用いて、*Pseudomonas putida* の熱ショック応答（hsr）および凝集タンパク質の蓄積と再生について解析したので報告する。

【方法・結果】*P. putida* KT2442 株（KT 株）を通常の培養温度である 30℃から 42℃に移した場合、ClpB, DnaK, HtpG, GroEL といったヒートショックタンパク質（HSP）の顕著な増加が熱ショック応答として観察された。一方、45℃では他の HSP の顕著な増加は見られなかったが、ClpB の増加が確認された。hsr を制御するσ因子であるσ^{32}の量をウエスタンブロット法により測定したところ、45℃処理時においてもσ^{32}は 42℃の場合と同程度存在することが確認された。しかしながら、前述の HSP をコードする遺伝子の発現量は、42℃と 45℃で大きな差はみられなかった。このことは、45℃においてはほとんどのタンパク質の合成が停止し、ClpB の翻訳が他のタンパク質に優先されて起きることを示唆している。42℃と 45℃では、熱ショック応答のシャットオフについても差異がみられ、42℃ではσ^{32}量の経時的な減少が認められたが、45℃では 30 分処理後もσ^{32}量は大きく変化しなかった。これは、45℃では DnaK の顕著な増加が見られないことから、DnaK とプロテアーゼによるσ^{32}の分解機構が正常に機能していないことによると考えられた。また、σ^{32}量と HSP 遺伝子の転写量は、生育可能な温度である 33℃、35℃、37℃へシフトしても温度に依存して増加し、僅かな温度変化を感知する機構が KT 株の hsr に備わっているものと考えられる。一方、*clpB* 破壊株は KT 株と同様の hsr を示すが、45℃での処理によりコロニー形成能が低下することが明らかとなっている。今回 KT 株と *clpB* 破壊株において、熱処理後および、熱処理後常温に戻して培養した場合の不溶性タンパク質を検出したところ、*clpB* 破壊株においては、KT 株では再生される様々な不溶性タンパク質が不溶化したままであることが明らかとなった。その中に、タンパク質合成に関わるタンパク質が含まれることから、*clpB* 破壊株はコロニー形成能を消失すると考えられた。

heat shock response, molecular chaperone, *Pseudomonas putida*

講演番号：2A12p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 12 会場

絶対嫌気性細菌 Clostridium 属細菌の O2 存在下における生育停止機構に関する研究

Study of grwth arrest mechanism of Clostridium under O2

○小野寺 央、岡田 拓也、工藤 貴靖、鈴木 一平、新村 洋一、川崎 信治（東農大）
○Akira ONODERA, Takuya OKADA, Takayasu KUDOH, Ippei SUZUKI, Yoichi NIIMURA, Shinji KAWASAKI (TUA)

【目的】絶対嫌気性菌は、エネルギー産業や有用物質生産の分野において、古くから利用されてきたが、一般的に絶対嫌気性菌は 0_2 存在下で生育が阻害される。0_2 による生育阻害の原因としては DNA 損傷等を引き起こす活性酸素種を分解する酵素である SOD や catalase を欠如する事が推定されていた。当研究グループにおいて絶対嫌気性菌である *Clostridium* 属細菌を用いて 0_2 による生育阻害の原因解明を目的として研究を行った結果、自身が消費可能な 0_2 量であれば 0_2 を消費し、嫌気条件とほぼ同等に生育を行う事が明らかになった。またその後の研究で *Clostridium acetobutylicum* は 0_2 や活性酸素種を同時に、かつ高速に水へと還元無毒化する新規な複合酵素系を有する事が明らかになった [1)]。しかし、自身が消費可能な 0_2 量を超えると生育を停止する原因は未だ不明である。そこで本研究では 0_2 による生育停止機構の解明を目的として研究を行った。

【方法・結果】*Clostridium acetobutylicum* を 0_2 濃度 0～5％で液体培養を行ったところ、3％ 0_2 と 5％ 0_2 大気下で異なる生育挙動が観察された。3 ％と 5 ％ 0_2 下で 0_2 毒性防御系酵素の発現を解析したところ、発現の挙動が異なっていた。また Live/Dead 染色法による生存率の比較や平板培養法による生残性試験を行い、3 ％ 0_2 下と 5 ％ 0_2 下での生育挙動の違いを解析している。

1) Kawasaki S et al. AEM 75:1021-1029(2009)

Clostridium, oxidative stress, anaerobe

講演番号：2A12p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 12 会場

anammox 菌の持つ酸素耐性関連遺伝子の比較

Comparison of antioxidant genes of anammox bacteria

○西山 孝[1]、竹之内 良太[1]、藤 英博[2]、服部 正平[3]、古川 憲治[4]、藤井 隆夫[1] ([1]崇城大・応生命、[2]九大・生体防医研、[3]東大院・新領域、[4]熊大院・自然科学)
○Takashi NISHIYAMA[1], Ryota TAKENOUCHI[1], Hidehiro TOH[2], Masahira HATTORI[3], Kenji FURUKAWA[4], Takao FUJII[1] ([1]Dept. Appl. Life Sci., Sojo Univ., [2]Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ., [3]Grad. Sch. Frontier Sci., Univ. Tokyo, [4]Grad. Sch. Sci. Rech., Kumamoto Univ.)

【背景・目的】嫌気性アンモニア酸化（anammox）は Planctomycetes 門の嫌気性の anammox 菌によって触媒される反応で、アンモニアと亜硝酸は酸化還元により窒素ガスへ変換、脱窒する。anammox を利用したアンモニア含有排水の処理は従来法に比べ低コストで、温暖化ガスが産生されない特徴を持つため、排水処理分野で大きな注目を集めている。

また、anammox は、海洋における脱窒の 3～5 割を担っており、自然界での窒素循環に大きな役割を果たしている。自然界では anammox 菌は好気/嫌気の境界領域に生息してきた。水系の下層の嫌気領域にあるアンモニアは、上層でアンモニアから好気的に変換された亜硝酸と好気/嫌気の境界領域で共存する。そのため、好気/嫌気の境界領域は anammox 菌の生育適地である。一方、そこでは逆に嫌気性菌の anammox 菌に好ましくない酸素にさらされる可能性があると推定される。

我々は anammox 菌 KSU-1 株で酸素耐性機構を調べ、多くの酸素耐性関連遺伝子を同定し、その機構を推定してきた。今回、この酸素耐性機構が anammox 菌に普遍的に存在するのか、ゲノム遺伝子が明らかになっている anammox 菌株で比較することを目的とした。

【方法・結果】我々が既に KSU-1 株で同定した酸素耐性関連遺伝子について、同じ淡水性の *Candidatus* Kuenenia stuttgartiensis、*Ca.* Brocadia fulgida、*Ca.* Brocadia anammoxidans と海洋性の *Ca.* Scalindua sp.の各ゲノムに対し検索を行った。KSU-1 株で見いだした、細胞内コンパートメントの anammoxosome 移送シグナルを持つ 2 つの酸素耐性遺伝子、superoxide dismutase（SOD）、cytochrome *c* peroxidase（CCP）遺伝子は淡水性の各菌も全て保持していた。anammoxosome は anammox の行われる“器官”で、スーパーオキシドや過酸化水素が anammox 反応に影響するため、これら活性酸素種を除去する系が必須で、SOD と過酸化水素を水に還元する CCP が選択されてきたと思われた。また、細胞質で発現する酸素耐性関連遺伝子群も属に多少の差が見られるものの、それらの多くが保存されていた。特に type A flavoprotein、superoxide reductase、rubrerythrin は海洋性の *Ca.* Scalindua sp.にも共通して存在していた。これらは嫌気性菌の *Clostridium acetobutylicum* の酸素耐性機構を構成する酵素にそれぞれ相同性を示し、anammox 菌には *C. acetobutylicum* に代表される嫌気性菌の酸素耐性機構が共通して存在することを示唆した。一方、海洋性の *Ca.* Scalindua sp.には SOD と peroxiredoxin が存在せず、淡水性と海洋性の anammox 菌間で酸素耐性関連遺伝子に違いがあった。海洋性 anammox 菌に anammoxosome 内で SOD の代わりをする別の酵素があるのか、今のところ不明のため今後調べる必要がある。

anammox, antioxidant gene

講演番号：2A12p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 12 会場

緑膿菌の多剤排出ポンプを利用した新規スクリーニング系で見いだしたリード化合物の性状評価
Characterization of a lead compound identified by the novel screening system that uses xenobiotic extrusion pump, MexAB-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*.
○潮田 兼一、佐藤 一樹、秋葉 敬斉、安藤 太助、磯貝 恵美子、米山 裕（東北大農）
○Kenichi USHIODA, Kazuki SATO, Keiji AKIBA, Tasuke ANDO, Emiko ISOGAI, Hiroshi YONEYAMA (Tohoku Univ.)

【目的】緑膿菌は代表的な日和見感染症起因菌であり院内感染の原因となりうる。特に多剤耐性緑膿菌は各種抗菌剤への強力かつ幅広い抵抗性を有するため、薬剤による緑膿菌感染者の治療が困難になっている。これら多剤耐性菌の出現は公衆衛生上大きな問題であり、それに対処するためには新規抗菌剤の開発が必須である。病原細菌が感染する宿主体内は鉄枯渇環境であり、感染成立のために細菌は鉄を積極的に取り込む必要がある。そこで当研究室では緑膿菌の重要な病原因子の一つであるこの鉄獲得系に着目し、鉄獲得時に活性化するシグナル伝達系を標的とした新規スクリーニング系を構築してきた。そして、約 9,000 種の化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを行った結果、1 つのヒット化合物を見いだした。この評価株に加え緑膿菌野生株を用いた 2 次スクリーニングを行った結果、本ヒット化合物はレポーターとして用いた本菌の多剤排出ポンプ MexAB-OprM に対する阻害活性を有することが示唆された。そこで本研究では、本ヒット化合物と各種薬剤との併用効果を詳細に検討し、ヒット化合物のターゲットを明らかにすることを目的とした。
【方法】チェッカーボード法により各種緑膿菌(MexAB-OprM 過剰発現株 nalB-1、野生株 PAO4290、スクリーニング株 PAM01)に対する本ヒット化合物と各種薬剤(アズトレオナム、クロラムフェニコール、ゲンタミシン、イミペネム)との併用効果を評価した。また、本菌の MexAB-OprM 以外の薬剤排出ポンプである MexXY-OprM に対する阻害効果を調べるために MexXY-OprM 過剰発現株 AM104 および AM107 を用いて、本ヒット化合物とゲンタミシンとの併用効果を調べた。
【結果】本スクリーニング系は鉄欠乏条件下で活性化するシグナル伝達系を標的とした新規スクリーニング系であるが、本菌の多剤排出ポンプの機能をレポーターとしたシステムであるので、MexAB-OprM 阻害剤も評価の対象となりうる。野生株と nalB-1 株において、鉄過剰および鉄欠乏条件下でチェッカーボード法により評価した結果、両菌株とも本ヒット化合物と薬剤との併用効果が認められた。また AM104 および AM107 を指標菌とした場合、併用効果はほとんど見られなかった。以上より、本ヒット化合物は MexAB-OprM ポンプ阻害剤であることが明らかとなった。

Pseudomonas aeruginosa, extrusion pump inhibitor, screening

講演番号：2A12p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 12 会場

枯草菌の脱アセチル化酵素は低温への適応に必須である

Protein deacetylases are necessary for cold adaptation in *Bacillus subtilis*

○田村 克、古園 さおり（東大・生物工学セ）
○Masaru TAMURA, Saori KOSONO (UTokyo)

生物には、様々な環境変化に応じてタンパク質の機能や遺伝子の発現を制御するシステムが備わっている。環境変化に迅速に対応する機構として翻訳後修飾が知られているが、アセチル化が温度変化への適応に関わる機構は未だ知られていない。Cold shock(低温ショック)による遺伝子発現誘導現象は大腸菌で 1987 年に発見され研究が進められてきた。これまでの研究から、低温への適応には(i)膜の流動性を介した 2 成分制御系(枯草菌では DesK と DesR)、(ii)RNA ヘリカーゼや Cold-shock protein による mRNA の分解促進、(iii)リボソームを介した選択的翻訳、などが機能していることが明らかにされている。本研究は、「低温」という 1 つの環境変化に注目し、アセチル化および脱アセチル化が低温への適応を司る新規のメカニズムを解明することを目的としている。

枯草菌が持つ2つの脱アセチル化酵素（Lysine deacetylase; KDAC）であるAcuC（non-sirtuin型）およびSrtN（sirtuin型）について変異株を作製し、15-20˚Cでの低温適応実験に供試したところ、*acuC*単独欠損株と*acuCsrtN*二重欠損株において低温への適応能力が著しく低下することが固体培地および液体培地の両方で観察された。この結果は、枯草菌の低温適応にはKDACが必要であることを示している。液体培地において37˚Cから18˚CへのCold shockを行うと、*acuC*欠損株ではWild Typeと比較して成長曲線に著しい生育ラグ（acclimation phase）が観察された。以上の結果は、低温への適応に関して枯草菌の2つのKDACが異なる機能を有し、AcuCが正常な低温適応に必須のタンパク質であり、特に低温順化初期（acclimation phase）の細胞機能を司ることが示された。Acclimation phaseは正常なタンパク質合成が停止し、余剰なmRNAの分解等、低温適応に必須の遺伝子発現調節が行われる期間であり、AcuCがこれらのいずれか、もしくは新規のシステムを制御することで、細胞の低温環境への適応を司っていることが示唆される。現在、網羅的プロテオーム解析から枯草菌の低温適応に関わることが既知のタンパク質にアセチル化が見いだされており、これらのアセチル化の機能について解析を進めている。

Protein acylation, *Bacillus subtilis*, Cold adaptation

講演番号：2A12p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ A 校舎 12 会場

超好熱菌の長鎖・分岐型ポリアミンの翻訳促進効果
Enhancing effect of long and branched chain polyamine on cell-free gene translation
○井上 貴央[1]、岡田 和真[1]、秀瀬 涼太[1]、今中 忠行[2]、藤原 伸介[1] ([1]関西学院大院理工、[2]立命館大生命科学)
○Takahiro Inoue[1], Kazuma Okada[1], Ryota Hidese[1], Tadayuki Imanaka[2], Shinsuke Fujiwara[1] ([1]Kwansei Gakuin Univ., [2]Ritsumeikan Univ.)

【研究目的】ポリアミンは核酸の安定化や細胞増殖・分化等、様々な生命現象に関与している低分子の塩基性物質である。好熱菌では一般的なポリアミンの他にも、長鎖または分岐型の特殊なポリアミンが発見されている。これら特殊なポリアミンは核酸の安定化能が高いという報告があり、長鎖・分岐型ポリアミンは好熱菌の高温環境への適応機構に関与していると考えられている。そこで本研究では、好熱菌のもつ長鎖・分岐型ポリアミンが高温下での無細胞翻訳系に与える影響を調べ、好熱菌の高温環境適応における、それらポリアミンが果たす生理学的機能を明らかにすることを目的とする。

【実験方法及び結果】*Thermococcus kodakarensis* から S30 画分を抽出し、そこに、種々のポリアミンを添加し、無細胞翻訳系を用いて高温下の翻訳活性を測定した。その結果、直鎖型のポリアミンにおいては、鎖長が長くなるにつれて高温下での翻訳活性は上昇し、カルドペンタミン(3333)で最も高い活性を示したが、カルドヘキサミン(33333)では、カルドペンタミンより低い活性を示した。また、アミノプロピルスペルミジン（3(3)4）など構造が T 字型のもの、ビスアミノプロピルスペルミジン（3(3)(3)4）のように構造が十字型のポリアミンについても検討したところ、分岐していくにつれて高い活性を示した。以上のことより、ポリアミンの塩基度が高いほど、また分岐度が高いほど核酸を安定化していると考えられる。カルドペンタミン（3333）やビスアミノプロピルスペルミジン(3(3)(3)4)は tRNA のループ部分に包埋されるのに適した分子サイズを有しており、特に tRNA のアンチコドンループを安定化していることが予想された。ポリアミンは塩基度だけでなく、その構造も重要な役割を果たすと考えられる。
さらに、長鎖・分岐型ポリアミンのもつ高温下での核酸安定化能の一般性を調べるために、*E. coli* の無細胞翻訳系を用いて、種々のポリアミンを添加し高温下の翻訳活性を測定した。その結果、長鎖・分岐型ポリアミンを添加すると、従来の至適温度よりも高い温度でも翻訳活性が認められた。このことからこれらポリアミンは大腸菌においても高温での反応に寄与していると考えられる。
T. kodakarensis では分岐型ポリアミンの合成に必須なアミノプロピル基転移酵素として *TK1691* が同定されている。そこでこの *TK1691* 遺伝子の破壊株を作出し、高発現ベクターに *TK1691* を組み込むことで *TK1691* 高発現株を作出した。現在、それぞれの株の生育特性及び、高温下における翻訳活性を測定しており、これら知見を含め、分岐型ポリアミンの意義について考察する。

archea, polyamine, cell-free translation

講演番号：2A12p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ A 校舎 12 会場

根粒菌シグマ因子 RpoH1 の制御を受ける遺伝子が鉄イオウタンパク質生合成に果たす役割

Search for a key target of RpoH1, the sigma factor essential for effective symbiosis, in *Sinorhizobium meliloti*

佐々木 祥平、南澤 究、○三井 久幸（東北大院生命科）
Shohei Sasaki, Kiwamu Minamisawa, ○Hisayuki Mitsui (Tohoku Univ.)

根粒菌 *Sinorhizobium meliloti* はアルファルファ（マメ科）に根粒形成を誘導し、その細胞内で窒素固定を営むα-プロテオバクテリアである。我々は、*S. meliloti* が *E. coli* のヒートショックシグマ因子 σ^{32} の相同因子を 2 つ有し（RpoH1、RpoH2）、そのうち RpoH1 は多くのヒートショックタンパク質の発現誘導と共生窒素固定の両方で必須の役割を果たすことを示した。更に、ヒートショック（培養温度を 25°C から 37°C に上昇）に伴う発現誘導が RpoH1 に依存する遺伝子の網羅的同定を行ってきた。本研究は、RpoH1 レギュロンの中から共生窒素固定に重要な遺伝子を探索し、その機能を明らかにすることを目的とした。

ヒートショック 10 分間の *S. meliloti* 野生株での発現強度と比べて、同条件の *rpoH1* 変異株でのそれの減少の倍率が大きい上位 40 遺伝子（≥3）の破壊をそれぞれ行い、得られた変異株を植物接種に供した。その結果、主要なシャペロン（*clpB*、*groESL5*、*ibpA* 等）・プロテアーゼ（*hslVU* 等）の変異株は野生株と同様の共生窒素固定能を示した。他方、126 アミノ酸からなる機能不明タンパク質をコードする SMc00302 遺伝子について、その変異株が共生窒素固定能欠損となることを見出した。当遺伝子は *S. meliloti* ゲノム上で *sufBCDS* 相同遺伝子と *sufA* 相同遺伝子の間に位置しており、上流（*sufS* 内部）に RpoH1 プロモーターコンセンサス類似配列が存在する。5′ RACE 解析により、転写開始点がその直下にあり、その転写は *rpoH1rpoH2* 変異株で消失するという結果を得、SMc00302 が RpoH1 の制御下にあることが確認された。*suf* 遺伝子群は、鉄イオウ（Fe/S）クラスター形成マシナリーをコードしており、原核細胞・真核細胞両方に広く保存されている。他方 SMc00302 は、*E. coli* PaaD、ヒト FAM96B、シロイヌナズナ HCF101 等に存在する DUF59 様配列を有し、やはり Fe/S タンパク質生合成への関与が予想される。当遺伝子の変異株は、野生株と比べて鉄キレーターdipyridyl への感受性が高まり、また、最小培地での増殖速度が低下していた。更に、Fe/S 酵素である 6-ホスホグルコン酸デヒドラターゼの活性が顕著に低下する一方、非 Fe/S 酵素への影響は最小限であることが判明した。以上より、SMc00302 は少なくとも一部の Fe/S タンパク質の生合成ないし活性に重要な役割を有し、それを通じて共生窒素固定に必須の役割を果たしていると判断した。現在、SMc00302 変異株の最小培地での生育阻害のサプレッサーの解析を進めており、当遺伝子を含む Fe/S クラスター代謝の制御ネットワークの解明が期待される。

rhizobium, sigma factor, iron-sulfur cluster

講演番号：2A12p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ A 校舎 12 会場

好熱菌 *Meiothermus ruber* H328 株が生産するケラチン分解性プロテアーゼ巨大分子複合体の膜小胞における局在性の研究

Study of localization of a macro molecular complex of keratinolytic proteases in membrane vesicles produced by a thermophilic bacterium,*Meiothermus ruber* H328

○山岡 昂太[1]、片岡 真亜知[1]、俣野 明日香[1]、佐生 愛[1]、増村 威宏[1]、川崎 一則[2]、茂里 康[2]、渡部 邦彦[1] ([1]京都府大院、[2]産総研・健康工学)
○Akito YAMAOKA[1], Maati KATAOKA[1], Asuka MATANO[1], Ai SASOU[1], Takehiro MASUMURA[1], Kazunori KAWASAKI[2], Yasushi SHIGERI[2], Kunihiko WATANABE[1] ([1]Kyouto Pref. Univ., [2]AIST)

【背景・目的】好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株はトリ羽毛ケラチンを強力に分解する。本菌株が生産するケラチン分解性プロテアーゼは、複数のタンパク質から構成されるウイルス大の巨大分子複合体を形成する。他方で電子顕微鏡解析から、細胞表層から放出される膜小胞にこの巨大分子複合体が含まれることを突きとめている。そこで、膜小胞におけるケラチン分解性プロテアーゼの局在性を明らかにすることを目的に、免疫電顕を用いた解析を進めているので報告する。
【方法】ケラチン分解性プロテアーゼ巨大分子複合体および膜小胞の調製は、羽毛含有 YS 培地 55℃、72 h 培養で得られる培養上清から行った。限外濾過濃縮（排除分子量 5 x 10^5）、ゲル濾過クロマトグラフィー（分画分子量 1 x 10^8）によりウイルス大の Peak 1 画分とそれより小さい Peak 2 画分に分け、さらに Peak 1 画分をショ糖密度勾配超遠心にかけ、活性および無活性画分を得てサンプルとした。MALDI-TOF/MS 解析と H328 株ゲノム情報から、ケラチン分解性プロテアーゼとして機能し得るセリンプロテアーゼ（Protein B）を同定し、それに対するウサギ抗体を作成し、金コロイド標識二次抗体と共に免疫電顕解析に用いた。
【結果・考察】まず Protein B 抗体を用いた Western blot 解析では、限外濾過濃縮、Peak 1、Peak 2 および超遠心活性画分のいずれでも存在することを示すことが出来た。次に Peak 2、超遠心活性および無活性画分に対するネガティブ染色による電顕解析では、超遠心活性および無活性画分についてϕ100 nm 以上の膜小胞と、膜小胞とは異なるϕ10 nm サイズの粒子が観察されたのに対し、Peak 2 画分についてはϕ10 nm の粒子のみが確認できた。そこで、Protein B 抗体を用いたこれらの画分に対する免疫電顕解析から、超遠心活性画分にある膜小胞上に Protein B が存在することが確認できた。しかしϕ10 nm の粒子に対しては、明確なシグナルが検出されておらず検討を進めている。
　また、培地への羽毛の添加の有無に対し、ネガティブ染色法を用いて電子顕微鏡で観察したところ、羽毛添加に関わらずϕ100 nm 以上の膜小胞が確認できたが、添加時に膜小胞の産生率がおよそ 6 倍増加していることが判った。
　これらのことから、羽毛を分解するために、H328 株内で Protein B を含む様々なタンパク質を膜小胞として放出していることが考えられる。

membrane vesicle, keratinolytic protease, TEM

講演番号：2A12p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ A 校舎 12 会場

二成分情報伝達系を介した腸管出血性大腸菌 O157 のホスホマイシン耐性と炭素源獲得の可逆的制御
The reversible control of fosfomycin resistance and carbon substrates uptake in EHEC O157 by two-component signal transduction system

倉林 久美子[1]、平川 裕子[3]、谷本 弘一[3]、富田 治芳[2,3]、○平川 秀忠[1]（[1]群馬大学先端科学ユニット、[2]群馬大学医、[3]群馬大学薬剤耐性菌実験施設）
Kumiko KURABAYASHI[1], Yuko HIRAKAWA[3], Koichi TANIMOTO[3], Haruyoshi TOMITA[2,3], ○Hidetada HIRAKAWA[1] ([1]Gunma Univ. ASRLD Unit, [2]Gunma Univ. Grad. Medicine, [3]Gunma Univ. Lab. Drug resistance)

ホスホマイシンは放線菌が産生する抗生物質であり、グラム陰性、陽性問わず広範囲な抗菌スペクトルを持ち、他の抗生物質と交叉耐性を持たないことが知られている。近年、これまで感染症の治療薬として中心的に用いられてきたβ-ラクタム剤やキノロン剤に対する耐性菌の広がりが問題となっていることから、ホスホマイシンの有用性が再検討されている。

私たちは、大腸菌群の環境適応と薬剤耐性との関係を調べていた過程で、二成分情報伝達系の CpxAR が腸管出血性大腸菌 O157 のホスホマイシン耐性制御に関与していることを発見した。センサー蛋白質をコードする *cpxA* 遺伝子の変異､インドール添加によって CpxAR 系を活性化させると、O157 はホスホマイシンに対する抵抗性が増大した。ホスホマイシンはグリセロール３リン酸とグルコース６リン酸輸送体によって細胞内に取り込まれるが、CpxAR 活性化株ではこれらの輸送体の発現レベルが大きく低下しており、そのためホスホマイシン取り込み能が低下していた。しかし、この株は、グルコース６リン酸とグリセロール３リン酸自体の取り込み能力も低下しているため、炭素源を上記の化合物とした最小培地では生育が遅延した。親株と CpxAR 活性化株をホスホマイシン非存在下の培地中で競培養を行ったところ、CpxAR 活性化株は親株によって駆逐された。これは、ホスホマイシン耐性株はグルコース６リン酸とグリセロール３リン酸の取り込み能が低下したことによって、生物学的適応度(Biological fitness)が感受性株より減少していることを意味している。すなわち、ホスホマイシン抵抗性と Biological fitness との間に代償関係が成立している。さらに、私たちは低濃度のホスホマイシン添加が CpxAR 系を一過的に活性化させることも発見した。

以上の結果から、CpxAR 系は、自然環境中において放線菌が産生するホスホマイシンに対する自然抵抗性因子であると同時に、ホスホマイシン耐性と炭素源取り込みに依存した Biological fitness を可逆的に制御するシステムであることが示された。これは、O157 にとって、ホスホマイシン耐性化に伴う、Biological fitness 低下のリスクを最小限に抑える新たな薬剤耐性獲得戦略であると考えられる。

Drug resistance, Two-component signal transduction system, Environmental response and adaptation

講演番号：2A13a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ A 校舎 13 会場

Bifidobacterium. longum NCC2705 株における二成分制御系遺伝子の系統的破壊株コレクション
Knockout gene collection of Two-Component System in *Bifidobacterium. longum* NCC2705
○和泉 絢子[1]、桝谷 尚慶[1]、滝口 裕加[1]、山中 祐二[1]、坂口 広大[2]、野村 泉[2]、鈴木 徹[2]([1]岐阜大応用生物、[2]岐阜大連合農学研究科)
○ Ayako IZUMI[1], Hisayoshi MASUTANI[1], Yuka TAKIGUCHI[1], Yuji YAMANAKA[1], Kouta SAKAGUCHI[2], Izumi NOMURA[2], Tohru SUZUKI[2] ([1]Gifu Univ., [2]Gifu United Grad. School agricultural Sci.)

【目的】ビフィズス菌は、私たちヒトの大腸に存在する共生細菌である。便秘や下痢を防ぎ、免疫賦活活性、アレルギー症状の緩和作用があることが報告されている。しかし、本菌がなぜこのような働きを有しているかのメカニズムは解明されていない。従って、これらのビフィズス菌が有する様々な機能や性質を遺伝子破壊法という逆遺伝学的アプローチにより解明することが必要である。二成分制御系(Two-Component regulatory System; TCS)は、His-Asp リン酸リレー情報伝達系とも呼ばれ、浸透圧・金属イオン・栄養など様々な外的環境の変化を感知し、その変化に適応し生存していくために必要なシステムである。この系は、環境変化を感知する膜貫通型タンパク質のヒスチジンキナーゼ(HK)と環境に適応するために遺伝子の発現調節を行うレスポンスレギュレーター(RR)から成り立っている。ビフィズス菌における TCS 遺伝子は、様々な生理学的役割を裏付けている可能性がある。また、RR の破壊により mRNA 発現に影響を受ける遺伝子を調べることで、RR によって制御を受けている遺伝子を同定できると考える。これらの理由により、私たちは二成分制御系の RR 遺伝子を破壊対象とした。
【方法】当研究室はこれまでに、37℃で複製できるが 42℃では複製できない温度感受性複製開始点をもつプラスミド pKO403 を作製し、簡便かつ比較的高い効率で相同組換えによる遺伝子破壊株を得ることを可能にしてきた。破壊方法は、温度感受性プラスミドに染色体上の相同領域である標的遺伝子の上流配列と下流配列それぞれ約 1 kb の間にスペクチノマイシン耐性遺伝子を組み込んだ後、ビフィズス菌 *B. longum*NCC2705 株へエレクトロポレーションした。42℃で培養することにより、プラスミドと染色体上で 2 回相同組換えを起こし、スペクチノマイシン耐性遺伝子をポジティブセレクションマーカーとして標的遺伝子と置き換え、プラスミドを取り除くことで破壊株の取得を試みた。破壊の確認は、PCR 増幅断片のシークエンス解読とサザンハイブリダイゼーションを用いて行った。
【結果】NCC2705 株にコードされている 9 つの TCS 遺伝子 RR の破壊に着手した。9 つの遺伝子の内、現在までに 3 つの遺伝子(BL0030, BL0986,BL1000)については破壊の確認ができたが、残り 6 つについては確認中である。6 つの遺伝子破壊候補株の中には、形質転換を起こすとコロニーの変形や液体培地中においてフロッグの形成、コロニーの生育が悪くなることが観察された。そのため、これらはビフィズス菌が生育するために必須または非常に重要な遺伝子であることが考えられた。今後、遺伝子発現を On/Off できる系を導入し、これらの遺伝子が生育に必須であるか否かを確認したい。

Bifidobacterium. longum , Gene Knockout, Two-Component System

講演番号：2A13a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ A 校舎 13 会場

Alcarigenes denitrificans A41 株内で安息香酸はビフェニル分解遺伝子群の発現を抑制する

Benzoate represses expression of biphenyl degradation gene cluster in *Alcarigenes denitrificans* strain A41

○金井 拓也、前田 理久（明治大院農）
○Takuya KANAI, Michihisa MAEDA (Meiji Univ.)

Alcarigenes denitrificans A41 株は、PCB/ビフェニル分解遺伝子群（*bph* 遺伝子群）を染色体中のゲノミックアイランド上に保持する。*bph* 遺伝子群は最上流に存在するプロモーターから一つの転写単位で転写され、ゲノム上離れた場所にある二成分制御系が発現の活性化を行い、*bph* 遺伝子群のプロモーター上流にコードされている BphS が発現の抑制を行っている。

bph 遺伝子群のプロモーターを制御する二成分制御系は C4 ジカルボン酸輸送タンパク質遺伝子である *dctPQM* を制御する DctS/DctR と高い相同性を示す。これまでに安息香酸が *dctP* の発現を抑制し、C4 ジカルボン酸よる安息香酸の代謝を優先させるという報告が既にされている。そこで、*Alcarigenes denitrificans* A41 株の *bph* 遺伝子群の発現の安息香酸による影響を解析した。安息香酸に加え、二成分制御系のシグナルと考えられているコハク酸、BphS の転写抑制を解除するビフェニルを用いて、*bph* 遺伝子群の転写活性を解析した。

ビフェニルとコハク酸では、添加後転写活性が大きく上昇したが、安息香酸添加後では、増殖相を通して転写活性は低かった。*bphS* 欠損株内においても同様に結果を示した。ビフェニルあるいはコハク酸および安息香酸を同時に添加した場合は、添加直後は転写活性が上昇し、添加後 4 時間以降は転写活性が低下した。

以上の結果より、A41 株の *bph* 遺伝子群の転写は安息香酸により抑制されること、それが BphS とは独立した制御系であることが示された。また、安息香酸による転写の抑制は、コハク酸やビフェニルによる活性化よりも優先されることが示された。安息香酸による *bph* 遺伝子群の転写の抑制は、二成分制御系に続き、宿主ゲノムの因子が外来性遺伝子を制御するという現象の新たなモデルとなることを示唆する。現在、この分子機構について解析を進めているところである。

biphenyl degradation, carboxylic acids metabolism, regulatory system

講演番号：2A13a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ A 校舎 13 会場

細菌における転写後制御による環境適応機構

Adaptation to environmental changes via posttranscriptional regulation in bacteria

○藤本 めぐみ、徳元 舶、前田 理久 (明治大院農)
○Megumi FUJIMOTO, Wataru TOKUMOTO, Michihisa MAEDA (Meiji Univ.)

環境汚染物質 PCB を分解する *Alcaligenes denitrificans* A41 株は、PCB/ビフェニル分解を担う *bph* 遺伝子群を上流から *bphE*, *bphG*, *bphF*, *bphA1*, *bphA2*, *bphA3*, *bphB*, *bphC*, *bphD*, *bphA4* の順でクロモソーム上に保持している。これまでに、*bph* 遺伝子群は *bphE* 上流に存在する P_E プロモーターから一つの転写単位(*bph* mRNA)として転写され、転写後に *bphF-bphA1* 間および *bphB* 遺伝子内領域の少なくとも 2 か所で RNase E による切断を受け、別々の RNA セグメントへと分断されることが明らかとなっている。また、切断された各 RNA セグメント間で安定性が異なっており、*bph* 遺伝子群の各遺伝子産物の量的制御が転写後調節によって行われていることが示唆されている。

当研究室では、転写後調節の詳細な分子機構を解明し、この機構を保持するバクテリアにとっての意義を明らかにすることを目的として研究を行っている。この目的に対して RNase E による切断を受けない株を構築するために *bphF-bphA1* 間領域に存在する *orf4* を完全に欠損させた *orf4* null 株の構築を行い、この株の解析を行った。

A41 野生株と *orf4* null 株をビフェニル単一炭素源で培養したところ、*orf4* null 株は野生株よりも良好な生育が見られ、最終的な培養液の濁度でも *orf4* null 株の方が野生株より高くなった。また、RNA レベル、タンパク質レベルへの影響をノーザンブロット、ウェスタンブロットによって解析したところ、*orf4* null 株において *bphA1* 領域を含む mRNA の切断パターンが変化し、BphA1 タンパク質の発現量も著しく減少した。しかしながら、BphA1 タンパク質で確認されたような切断領域の欠損による著しい影響は BphE タンパク質や BphC タンパク質では見られなかった。これらの結果から、RNase E による切断が BphA1 など特定の遺伝子に強くはたらくことでビフェニル分解経路を制御していることが示唆された。そこで、切断領域の欠損によるビフェニル分解能への影響をビフェニル濃度の異なる培地を用いて生育を解析したところ、すべての培地において対数増殖期までは野生株、*orf4* null 株ともに同様な生育を示したが、最終濁度では *orf4* null 株の方が高かった。これらのことから、RNase E による転写後制御は低濃度ビフェニル条件下での生育を有利にしていることが示唆された。

Posttranscriptional regulation, Biphenyl, PCB

講演番号：2A13a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ A 校舎 13 会場

Acidvorax.sp KKS102 のカタボライト調節機構に関わる二成分制御系遺伝子 *bphPQ* の解析

Analysis of two-component system genes *bphPQ* for catabolite control from *Acidvorax* sp. KKS102

○佐藤 旦、小沼 かおり、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院生命）
○Akira SATO, Kaori ONUMA, Yoshiyuki OHTSUBO, Yuji NAGATA, Masataka TSUDA (Tohoku Univ.)

β-proteobacteria の *Acidvorax* sp. KKS102 株は、PCB/biphenyl 分解能を有する。分解に関与する *bph* 遺伝子群はオペロンを形成しており、*bph* オペロン上流に位置する pE プロモーターはカタボライト調節を受ける。本研究では、KKS102 株のカタボライト調節機構の全容解明を目指した解析を行ってきた。
先行研究により抑制炭素源として、酢酸と C４または C５のジカルボン酸であるコハク酸、フマル酸、リンゴ酸、グルタミン酸が同定されている。また本株のカタボライト調節に関与する遺伝子として、二成分制御系因子をコードする *bphPQ* が見いだされ、各々、二成分制御系因子である histidine kinase および response regulator をコードすると推察された。
これまでの二成分制御系の知見をふまえると、(1)抑制炭素源の非存在下では BphP が BphQ をリン酸化し、リン酸化 BphQ が pE プロモーターを活性化するが、(2)抑制炭素源存在下では、BphP による BphQ のリン酸化が阻害され、pE プロモーターが活性化されない、というのが本株のカタボライト調節機構と推察される。しかし、抑制炭素源の存在が感知される分子機構が不明であること、*bphP* 遺伝子破壊株でカタボライト調節が観察されること、精製 BphP による精製 BphQ のリン酸化が検出できていないことなど、KKS102 株のカタボライト調節の分子機構の詳細は不明である。
BphP 機能については、リン酸化ではなく、脱リン酸化によって BphQ の機能を抑制する因子であることも考えられた。すなわち KKS102 株には何らかの BphQ 活性化因子が存在しており、BphP は BphQ の抑制因子として機能している可能性が考えられた。*Pseudomonas putida* KT2440 株を宿主とした解析では、pE プロモーターの活性化に、*bphQ* と *bphP* の両方が必要であった。また BphP リン酸化に関係すると推測されるアミノ酸配列モチーフは BphP の C 末端側ドメイン(BphPc)に存在するが、KKS102 株で BphPc を発現させたところ、コハク酸存在下であっても pE プロモーターは高い活性を示した。これらのことから、BphP は BphQ の活性化能を有することが明らかとなり、また BphP の N 末端側ドメインが C 末端側のリン酸化活性を抑制することが示唆された。
また *bphPQ* 転写量を定量 RT-PCR で解析したところ、対数期ではコハク酸の有無によらず大きな転写レベルの差は見いだされなかった一方で、静止期ではコハク酸の有無により転写量に大きな差が見られた。この結果は、pE プロモーターのカタボライト調節に BphPQ の発現量が関与していることを強く示唆している。
以上、KKS102 株のカタボライト調節への BphPQ の関与を解明するための重要な知見が得られた。

two-component system, catabolite control, ß-proteobacteria

講演番号：2A13a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ A 校舎 13 会場

土壌細菌 *Burkholderia multivorans* における Fur 依存的な鉄恒常性維持に関与する *hemP* 遺伝子の解析

Analysis of the *hemP* gene involved in the Fur-dependent iron homeostasis in *Burkholderia multivorans*

○佐藤 拓哉、木村 明音、湯原 悟志、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院生命）
○Takuya SATO, Akane KIMURA, Satoshi YUHARA, Yoshiyuki OHTSUBO, Yuji NAGATA, Masataka TSUDA (Tohoku univ.)

【背景・目的】鉄は生物にとって必須元素であるが、過剰な鉄の取込みは細胞に有害なヒドロキシラジカルを始めとする活性酸素種の誘発に繋がるため、細胞内の鉄イオン量を一定に保つことは生存に必須である。細菌では、鉄応答発現制御因子 Ferric uptake regulator (Fur)が高濃度鉄存在下で活性化し、鉄獲得に関わる遺伝子の発現を抑制することで、鉄恒常性維持の中心的な役割を担っていると考えられているが、Fur により発現制御される遺伝子は多様であり、未解明な鉄恒常性維持機構の存在が強く示唆される。我々は、物質代謝能に優れた土壌細菌 *Burkholderia multivorans* ATCC17616 株を対象として、Fur が関与する新規な鉄恒常性維持機構の解明を目的とした研究を進めている。これまでの研究で、*fur* 欠損株(Δ*fur* 株)がコハク酸やクエン酸などの炭素源の資化能を失うことを指標とし、これら炭素源資化能を回復した Δ*fur* サプレッサー変異株 8 株を取得した。このうち 3 株では制御遺伝子 *oxyR* に変異が存在し、Δ*fur* 株では OxyR によって転写抑制されているカタラーゼ遺伝子 *katG* が高発現することが表現型の回復につながったと結論した。一方、他の 5 株全てにおいては、*oxyR* に変異はなく、hemin uptake protein をコードするとアノテイトされているが、実際の機能は未知である *hemP* 遺伝子に変異が見られた。そこで本研究では、*hemP* の機能解明を目的として研究を行った。

【方法・結果および考察】まず、Fur が *hemP* の発現制御に関与しているか検討した。Δ*fur* 株における *hemP* の転写量を定量 PCR により測定したところ、野生株と比較して 800 倍以上の転写量の増加が観察された。次に、野生株において鉄濃度条件を変えて *hemP* の転写量を検討した。その結果、*hemP* の転写量は、LB 培地で培養した際と比較して、鉄高濃度条件では約 1/100 に減少し、鉄制限条件では約 100 倍増加していた。一方、次世代シーケンサー（Illumina 社 MiSeq）を用いて、本株の遺伝子の転写開始点の網羅的な解析を実施したところ、*hemP* の転写開始点が明らかになり、本転写開始点の数塩基上流には推定 Fur 結合配列が存在していた。以上の結果から、Fur が *hemP* 発現を直接制御しており、Fur 機能の欠損による *hemP* の高発現が細胞内鉄濃度の上昇をもたらすという可能性が考えられる。すなわち、機能未知の HemP による新規の鉄恒常性維持機構の存在が示唆された。現在、*hemP* 破壊株および *fur* と *hemP* の二重破壊株を作製し、各種表現型について、野生株や Δ*fur* 株と比較検討すると共に、HemP の精製と機能解析を進めている。

Ferric uptake regulator (Fur), Hemin uptake protein (*hemP*), Bacterial iron homeostasis

講演番号：2A13a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ A 校舎 13 会場

細胞外電子伝達系シトクロム遺伝子の転写活性化因子の同定

Identification of transcriptional activator for outer-membrane cytochrome genes involved in extracellular electron transfer

○笠井 拓哉、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大院生命）
○Takuya KASAI, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. of Pharmacy and Life Sciences)

【背景・目的】*Shewanella oneidensis* MR-1 株は微生物燃料電池 (microbial fuel cells; 以下 MFC) におけるモデル電流生産細菌として知られており、その電流生産メカニズムについて世界的に研究が進められている。MR-1 株は細胞外膜に局在する導電性シトクロムタンパク質等 (OmcA, MtrA, MtrB, MtrC) から構成される細胞外電子伝達経路 (Mtr 経路) を有しており、本経路を介して細胞内の基質代謝により放出された電子を細胞外の電極に伝達することによって電流を生産することが明らかとなっている。Mtr タンパク質の生成量を制御・維持することは、MFC の電流生産量を向上させ、またその電流生産活性を持続させるうえで非常に重要であると考えられる。しかし Mtr タンパク質をコードする遺伝子 (*omcA, mtrC, mtrA, mtrB*) の発現制御メカニズムは未だに解明されていない。これまでに我々は *omcA* から *mtrB* までの遺伝子領域がポリシストロニックに転写されること、また *omcA* と *mtrC* の上流にはそれぞれ転写活性化領域が存在することを明らかにした（図）。本研究では *mtr* 遺伝子群の発現制御機構の解明のため、*mtr* 遺伝子群のプロモーター領域に結合する転写制御因子について詳細な解析をおこなった。

【方法・結果】*omcA* 上流の転写活性化領域には CRP (cAMP receptor protein) 結合サイトに類似した配列が見出された。そこで CRP の精製タンパク質と *omcA* 転写活性化領域との相互作用をゲルシフトアッセイによって解析したところ、CRP が cAMP 依存的に *omcA* 上流域に結合することが明らかとなった。また、*crp* 欠損変異株における *omcA* の発現量を *lacZ* レポーターアッセイによって解析した結果、*crp* 欠損株では *omcA* の発現量が著しく減少した。以上の結果より、CRP は *omcA* 上流域に直接的に結合し、転写を活性化していることが明らかとなった。*mtr* 遺伝子群の発現量は嫌気条件下で増加することが示されているが，CRP には好気・嫌気の認識に関与する redox-sensing domain が含まれていないため、どのような認識機構で発現制御が行われているのかに興味が持たれる。現在 CRP が *mtrC* 上流域からの転写に関与しているかどうかを明らかにするため、*crp* 欠損株における各 *mtr* 遺伝子の発現量をレポーターアッセイおよび定量的 RT-PCR によって解析している。

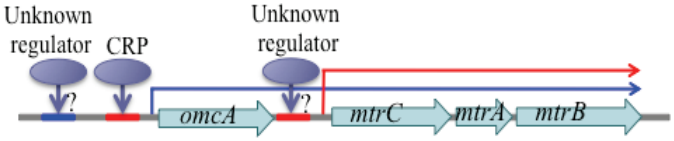


図　　予想される *mtr* 遺伝子群の発現メカニズム

Shewanella oneidensis, extracellular electron transfer, transcriptional regulation

講演番号：2A13a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ A 校舎 13 会場

連鎖球菌における莢膜多糖生産を制御するメカニズムの解析
Regulatory mechanism of the capsule biosynthesis genes in Streptococci
○松本 裕子、前田 康太郎、小谷 拡太郎、三宅 克英（石川県大資源研）
○Yuko MATSUMOTO, Kotaro MAEDA, Kotaro ODANI, Katsuhide MIYAKE (Res. Inst. Biores. Biotech. Ishikawa Pref. Univ.)

菌体外莢膜多糖はバイオフィルムの主成分として細菌を外部環境から保護する働きを有している。我々は、これまで溶血性連鎖球菌 *Streptococcus agalactiae* や口腔連鎖球菌 *S. anginosus* の莢膜多糖に着目し、これらの菌株から莢膜多糖合成（*cps*）遺伝子群をクローン化し、その解析を行ってきた。連鎖球菌の莢膜多糖遺伝子群は多くの菌株で報告されてきており、その構造の特徴も明らかになっているが、遺伝子群を調節し、莢膜多糖の生産を制御するメカニズムは不明な点が多い。今回は上記 *S. anginosus* を材料として、*cps* 遺伝子群を制御する調節遺伝子と環境因子の検索を試みた。*cps* 遺伝子群近傍下流に存在する二成分制御系因子（*orfO*、*orfP*、*orfQ*、*orfR*）において欠損変異株と強制発現株を取得し、その莢膜多糖生産量の変化を ELISA を用いて解析した。その結果、*orfP,Q,R* の欠損株においては莢膜の発現量が減少しており、強制発現株においては増加していたため、これらは外的環境からの刺激を受けて、*cps* cluster の発現を調節し、莢膜多糖の発現に関与している遺伝子の可能性が高いと考えられる。OrfP は膜結合型レセプターであるため、今後はその標的の検索が重要である。一方、OrfO に関しては脱リン酸化酵素であると予想されるが、その活性については現在検討中である。

莢膜多糖生産量に影響する環境因子については、CO_2 とクオラムセンシング因子に着目して検討した結果、CO_2 が増殖や莢膜多糖生産を促していることがわかった。次に $NaHCO_3$ について調べたところ、増殖にだけ効果が見られたため、莢膜多糖生産には溶存した CO_2 そのものが重要であると考えられる。CO_2 の存在が酸素分圧の低下を招いている可能性があるため、不飽和脂肪酸を添加し培養を行ったところ、増殖は促されたが、莢膜多糖生産量への影響はみられなかった。そのため、増殖には酸素の量が影響しており、増殖と莢膜多糖の発現とでは別々の経路が関与していると考えられる。

今後は CO_2 がどのように影響を及ぼしているのか探索していく方針である。また、上記の CO_2 や OrfP,Q,R といった因子が独立して莢膜多糖生産に関与するのか、あるいはお互い関連して調節しているのかといった点も研究していきたいと考えている。また、*S. anginosus* のメカニズムの普遍性を調べるために、他の細菌での解析も重要である。

capsular polysaccharide, biofilm, carbon dioxide

講演番号：2A13a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ A 校舎 13 会場

プラスミド pCAR1 にコードされる 3 種の核様体タンパク質がもつ転写制御能の網羅的解析
Transcriptome alteration by disruption of the genes encoding nucleoid-associated proteins on the plasmid pCAR1

○廣谷 龍輔[1]、鈴木 千穂[1]、高橋 裕里香[1]、武田 俊春[1]、尹 忠鉄[1,2]、新谷 政己[3]、岡田 憲典[1]、山根 久和[4]、野尻 秀昭[1,2] ([1]東大・生物工学セ、[2]東大院農生科・アグリバイオ、[3]静大院・工、[4]帝京大・バイオ)
○ Ryusuke HIROTANI[1], Chiho SUZUKI[1], Yurika TAKAHASHI[1], Toshiharu Takeda[1], Choomg-Soo YUN[1,2], Masaki SHINTANI[3], Kazunori OKADA[1], Hisakazu YAMANE[4], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Univ. of Tokyo Agri., [3]Shizuoka Univ., [4]Teikyo Univ.)

【目的】宿主細菌がプラスミドを保持すると、プラスミド上の遺伝子が宿主染色体由来の因子によって制御されるだけでなく、プラスミド由来の因子も宿主染色体上の遺伝子を制御する。近年この作用の鍵因子として核様体タンパク質 (NAPs) の重要性が指摘されている。NAPs は DNA に結合し核様体という高次構造を形成するという特徴から、多数の遺伝子を制御する global regulator として知られるが、宿主染色体のみならず一部のプラスミドにもコードされている。当研究室で研究が進められている IncP-7 群カルバゾール分解プラスミド pCAR1 (*Pseudomonas* 属細菌を主な宿主とする) にも 3 種の NAPs [MvaT ホモログ(Pmr)、HU ホモログ(Phu)、NdpA ホモログ(Pnd)] がコードされていた。これまでに *P. putida* KT2440 (pCAR1)株をモデル宿主として 3 種の単独破壊株 (Δ*pmr*, Δ*pnd*, Δ*phu*) 及び 3 種の二重破壊株 (Δ*pmr*Δ*pnd*, Δ*pmr*Δ*phu*, Δ*pnd*Δ*phu*) の表現型を調べたところ、Δ*pmr*Δ*pnd* 及び Δ*pmr*Δ*phu* では pCAR1 が脱落しやすいことが明らかとなっていた。本研究では、上述の破壊株のトランスクリプトーム解析により各 NAPs の機能の解明を試みた。
【方法・結果・考察】野生型株及び 5 種の破壊株 (Δ*pmr*, Δ*pnd*, Δ*phu*, Δ*pmr*Δ*pnd*, Δ*pmr*Δ*phu*) を、コハク酸を唯一の炭素源とする培地で培養し、対数増殖期中期のトランスクリプトームデータを高密度タイリングアレイによって取得した。得られたデータの中で野生型株と各破壊株を比較し、2 倍以上転写誘導または転写抑制された遺伝子を選抜した。Δ*pmr* では転写変動した全 226 遺伝子の内 224 遺伝子が転写誘導されており、Pmr は転写抑制能を有すると考えられた。またΔ*pnd* では転写変動した 174 遺伝子すべてが抑制されていること、Δ*phu* では転写変動した 46 遺伝子の内 34 遺伝子が抑制されていることから Pnd, Phu は転写誘導能を有すると考えられた。一方、二重破壊株では転写変動した遺伝子のほとんどが誘導されており、その内容は単独破壊株で転写変動した遺伝子の単純な和にはなっていなかったことから、Pmr, Pnd, Phu は協調的に細胞の機能を調節していると考えられた。続いて pCAR1 の脱落の原因遺伝子探索のため、Δ*pmr*Δ*pnd* 及びΔ*pmr*Δ*phu* で特異的に転写変動した遺伝子の選抜も行った。その結果、pCAR1 上で相同組換えに関わると予想される *recT* が 2 つの二重破壊株で共通して転写誘導されていることが明らかとなった。しかし RecT を過剰発現した KT2440(pCAR1)株では pCAR1 の脱落は見られなかったことから、二重破壊株の表現型は複数の要因が重なった結果と考えられた。

nucleoid-associated proteins, plasmid, *Pseudomonas*

講演番号：2A13a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ A 校舎 13 会場

プラスミド pCAR1 にコードされる核様体タンパク質が接合伝達に与える影響の解明
Effect of the nucleoid-associated proteins encoded on the plasmid pCAR1 in conjugation
○松井 一泰[1]、廣谷 龍輔[1]、武田 俊春[1]、尹 忠鉄[1,2]、新谷 政己[3]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1,2] ([1]東大・生物工学セ、[2]東大院農生科・アグリバイオ、[3]静大・工)
○Kazuhiro MATSUI[1], Ryusuke HIROTANI[1], Toshiharu TAKEDA[1], CHoong-Soo Yun[1,2], Masaki SHINTANI[3], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]Univ. Tokyo, [2]Univ. Tokyo Agri, [3]Shizuoka Univ.)

【背景と目的】

Pseudomonas 属細菌に由来するカルバゾール分解プラスミド pCAR1 は，不和合性（Inc）P-7 群に属する自己伝達性プラスミドである. また, pCAR1 上には HU ホモログ Phu, MvaT ホモログ Pmr, NdpA ホモログ Pnd の 3 種類の核様体タンパク質 (NAPs, nucleoid-associated proteins) がコードされている．これまでに詳細な研究がなされている IncF や IncHI プラスミドにおいて，NAPs が接合伝達の制御に関わっていることが知られており，pCAR1 においてもこれら 3 種類の NAPs が接合伝達の制御に関わっている可能性が考えられる．そこで本研究では，*phu*, *pmr*, *pnd* を単独，あるいは複数破壊した際の接合伝達頻度や接合関連遺伝子の転写変動を調べた．

【結果】

NAPs を単独で破壊した pCAR1 を保持する *Pseudomonas putida* KT2440 株を供与菌，プラスミドを保持しない *P. putida* KT2440 株を受容菌として液体培地中で接合実験を行い，抗生物質耐性を指標として接合伝達頻度（接合伝達体の CFU／供与菌の CFU）を評価した．その結果，NAPs を破壊していないコントロールとして用いた pCAR1pmrHis（9.1×10^{-4} ～1.1×10^{-3}）と比較して, pCAR1Δ*phu*（2.0×10^{-5}）において接合伝達頻度が 1/10 程に低下したものの，他の単独破壊株では大きな変化は見られなかった．これに対し，NAPs を二重破壊した pCAR1 の接合伝達頻度を測定したところ，pCAR1Δ*phu*Δ*pnd* では pCAR1pmrHis と比較して接合伝達頻度に変化が見られなかったのに対して（5.2×10^{-4}），pCAR1Δ*phu*Δ*pmr*，及び pCAR1Δ*pmr*Δ*pnd* は検出限界以下（それぞれ$<4.0\times10^{-7}$, $<4.1\times10^{-7}$）と大きく減少した．また，この接合伝達頻度の減少は，pCAR1 上の ORF98-ORF99 遺伝子間領域に *pmr* の推定プロモーター配列からターミネーター配列までを含む 0.57 kb の遺伝子断片を挿入することで *pmr* を相補しても回復しなかった（それぞれ$<6.7\times10^{-7}$, $<2.2\times10^{-6}$）．なお，各供与菌の間で CFU に大きな違いは見られず，接合実験中にプラスミドが脱落していないことも確認されている．

コハク酸培養時の NAPs 遺伝子単独破壊株、二重破壊株のトランスクリプトーム解析では，pCAR1 上の多くの接合関連遺伝子の転写量が pCAR1Δ*pmr*，pCAR1Δ*phu*Δ*pmr*，pCAR1Δ*pmr*Δ*pnd* のいずれの場合においても増加しており，各破壊株における接合伝達頻度の評価とは合致しないものであった．

今後は，相補した *pmr* の転写量の確認を行うとともに，接合条件下でのトランスクリプトーム解析を行う必要があると考えられる．

plasmid, conjugation, nucleoid-associated proteins

講演番号：2A13a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ A 校舎 13 会場

プラスミド pCAR1 にコードされる核様体タンパク質の転写様式と相互作用の解析
Transcriptional regulation and protein-protein interaction of the nucleoid-associated proteins encoded on the plasmid pCAR1

○鈴木 千穂[1]、高橋 裕里香[1]、新谷 政己[2]、岡田 憲典[1]、山根 久和[3]、野尻 秀昭[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]静大院・工、[3]帝京大・バイオ)
○Chiho SUZUKI[1], Yurika TAKAHASHI[1], Masaki SHINTANI[2], Kazunori OKADA[1], Hisakazu YAMANE[3], Hideaki NOJIRI[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Shizuoka Univ., [3]Teikyo Univ.)

【背景と目的】一般に細菌の DNA は種々の核様体タンパク質 (nucleoid-associated proteins; NAPs) によって小さく折り畳まれており, NAPs は DNA 構造を変化させることで数多くの遺伝子の転写制御を行う. NAPs は細菌の染色体だけではなく, 可動性遺伝因子であるプラスミドにもコードされている. 宿主細菌が NAPs をコードするプラスミドを保持すると，既に宿主細菌内で形成されていた NAPs の転写制御ネットワークに新たな NAPs が加わることになり，プラスミド・宿主染色体由来の NAPs が協調的に両ゲノムの転写を制御するようになると考えられる．当研究室で研究が進められてきたプラスミド pCAR1 (*Pseudomonas* 属細菌を主な宿主とする) には MvaT ホモログ Pmr, NdpA ホモログ Pnd, HU ホモログ Phu, の 3 種類の NAPs がコードされており，*P. putida* KT2440 株を宿主としてこれら遺伝子の破壊株を作製したところ，*pmr*/*pnd* 及び *pmr*/*phu* の 2 つの二重破壊株では pCAR1 の安定性や接合伝達頻度が顕著に低下することが明らかとなった．一方，Pmr についてはこれまでに宿主染色体由来の MvaT ホモログも含めた解析が進められてきたものの，Pnd と Phu については解析が進んでおらず，上述の表現型が生じる分子機構は不明であった．本研究では，3 つの NAPs の協調的機能が生じる分子機構解明の足がかりとして，転写様式とタンパク質間相互作用の解析を行った.

【結果と考察】まず *pnd* と *phu* の転写開始点を 5'-RACE 法により決定したところ，*pnd* は開始コドン上流 254 及び 224 塩基から，*phu* は開始コドン上流 788, 714, 122, 51 塩基からσ^{70} 依存的に転写が開始することが示唆された. 過去の研究から *pmr* も開始コドン上流 69 塩基からσ^{70} 依存的に転写が開始することが示唆されているが，*pmr*, *pnd*, *phu* の転写量を *P. putida* KT2440(pCAR1)株の生育段階ごとに qRT-PCR 法で定量したところ，いずれの遺伝子も定常期に比べて対数増殖期での転写量が多くσ^{70} 制御下にあることと矛盾しなかった．またいずれの生育段階においても *pnd* の転写量は *pmr*, *phu* の転写量の約 10 分の 1 と見積もられた．KT2440 株染色体上には 3 つの HU ホモログと 1 つの NdpA ホモログがコードされているが，過去のトランスクリプトーム解析の結果では Pnd, Phu の存在はこれらの転写量に影響を与えておらず，Pnd, Phu の機能は染色体由来ホモログとは重複しない可能性が示唆された. 一方, His-tag 融合 Pmr, Pnd, Phu と FLAG-tag 融合 Pmr, Pnd を用いたプルダウンアッセイでは, Pmr 同士，Pnd 同士のホモ多量体は検出されたものの，いずれの組み合わせでもヘテロ多量体は検出されなかった. 以上より Pmr, Pnd, Phu の協調的機能は 3 種の NAPs が協調して形成する DNA のトポロジーに由来するものであり，この過程にタンパク質間の直接的な相互作用は関与しないことが示唆された.

nucleoid-associated proteins, plasmid, *Pseudomonas*

講演番号：2A13a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ A 校舎 13 会場

プラスミドを保持した宿主における LysR ファミリー転写制御因子 MexT の機能解析

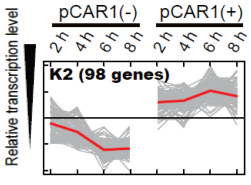
Function of LysR-type transcriptional regulator MexT in IncP-7 plasmid harboring Pseudomonas putida KT2440

○能登 優、高橋 裕里香、岡田 憲典、野尻 秀昭（東大・生物工学セ）
○SUGURU NOTO, YURIKA TAKAHASHI, KAZUNORI OKADA, HIDEAKI NOJIRI (Univ. Tokyo)

【目的】プラスミドは宿主間を伝播し多剤耐性や特殊な代謝能等を与えると共に、宿主染色体の転写様式や細胞内環境の変化を引き起こすため、経験的に宿主への負荷になり得る。本研究では、カルバゾール分解プラスミド pCAR1 保持時の *Pseudomonas putida* KT2440 株における応答に関して LysR ファミリー転写制御因子である MexT が重要な役割を果たしていると予想し、その機能解析を目的とした。
【方法・結果】当研究室では 3 種の *Pseudomonas* 属細菌を用いて pCAR1 保持株・非保持株の競合培養実験[1)] やトランスクリプトーム比較解析[2)] 等が行われ、3 宿主で pCAR1 保持が生育負荷になる事、その度合いは各宿主で異なり、pCAR1 保持時に転写変動した遺伝子数に相関がある事等が分かっていた。

上記の結果を受け、pCAR1 による負荷が最も大きい KT2440 株において“pCAR1 保持に伴い転写量が恒常的に増加した遺伝子群”（以降 K2 クラスターと呼ぶ）に着目すると、多剤排出ポンプ *mexEF-oprN* が含まれていた。*mexEF-oprN* は *Pseudomonas aeruginosa* において解析が進んでおり、LysR ファミリー転写制御因子 *mexT* により正の制御を受ける事が報告されている[3)]。*mexT* 相同遺伝子は KT2440 株にも存在するため、KT2440 株では MexT が *mexEF-oprN* だけでなく、pCAR1 保持により転写変動する遺伝子群の転写制御を担う可能性が考えられた。そこで、KT2440 株染色体上の各遺伝子上流に関し、*P. aeruginosa* における MexT の推定コンセンサス配列[4)] を探したところ、検出された遺伝子の多くが K2 クラスターに含まれることが示唆された（図 1）。以上の結果より、KT2440(pCAR1)株において MexT が制御する遺伝子群に興味が持たれたため、*mexT* を KT2440 株の染色体上から除去した株（以後 Δ*mexT* 株と呼ぶ）を相同組み換えにより作製した。本大会では、Δ*mexT* 株を用いたマイクロアレイ解析により特定した MexT のレギュロンと pCAR1 保持により転写変動した遺伝子群との関係、また *mexT* 除去による生育などの表現型への影響などについても発表する。

１）能登ら、日本農芸化学会 2013 年度大会 3B23a13 ２）高橋ら、日本農芸化学会 2013 年度大会 2B13p16 ３） Köhler *et al.*, 1999. J. Bacteriol. **181**:6300-6305. ４） Tian *et al.*, 2009. Nucleic Acids Res. **37(22)**:7546-59.



Locus tag	Gene name	Product name
PP_2647		major facilitator family transporter
PP_2958		glutaredoxin
PP_3425	*mexE*	RND family efflux transporter MFP subunit
PP_3770		hypothetical protein
PP_4858		hypothetical protein

図 1: （左）K2 クラスターの転写プロファイル
（右）推定 MexT コンセンサス配列を持つ K2 クラスターの遺伝子

Pseudomonas, plasmid, LysR-type transcriptional regulator

講演番号：2A13a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ A 校舎 13 会場

緑膿菌ゲノムでの薬剤耐性調節遺伝子 *mexT* の出現

Emergence of a regulator gene, *mexT*, for *mexEF-oprN* operon in genome of *Pseudomonas aeruginosa*

○上手 麻希、横田 優子、大政 健史、間世田 英明（徳島大院 STS）
○Maki Uwate, Yuko Yokota, Takeshi Omasa, Hideaki Maseda (The Univ. Tokushima Grad.)

緑膿菌の多剤耐性変異株である NfxC 変異株は、薬剤を効率的に排出する RND 型薬剤排出ポンプ MexEF-OprN の発現の亢進と、特に緑膿菌制御に非常に有効であるカルバペネム剤の細胞への透過孔である OprD ポーリンの発現の抑制が認められ、様々な抗生物質に耐性を示すことから、臨床現場で非常に問題視されている。この MexEF-OprN 薬剤排出ポンプの発現と OprD ポーリンの発現抑制は、その調節遺伝子 *mexT* によりコントロールされているが、非常に興味深いことに、*mexT* 遺伝子自体は通常野生株のゲノム中には存在していない。*mexEF-oprN* オペロンの上流領域に存在する重なり合ったダイレクトリピートで、特異的に 8 bp が欠失することで、フレームシフトが生じ、ゲノム編集の結果、ゲノム中に *mexT* が出現し、耐性化を促す。しかし、本耐性化の主原因である *mexT* 遺伝子の出現に関わる因子については、全く明らかにされていなかった。そこで、今回この欠失現象に関与する因子の同定と解析を試みたので報告する。

まず、8 bp の欠失が生じる *mexT* 遺伝子領域と発現した MexT が直接的に制御している *mexEF* オペロンを挿入したアッセイベクターを構築し、欠失現象が大腸菌でも生じるか否かを確認した。その結果、本プラスミドを有する大腸菌では、4.5×10^{-5} の高頻度で 8 bp が欠失し、緑膿菌同様様々な薬剤に耐性を示した。この様に、本現象及びそのキー因子が緑膿菌だけでなく大腸菌にも存在することが初めて明らかとなった。次に、大腸菌の一遺伝子欠失コレクションである Keio mutants 3909 株それぞれに上記のアッセイベクターを一つずつ導入し、耐性獲得株の出現の有無により、耐性関与遺伝子のスクリーニングを試みた。その結果、耐性株の出現率が元株の 1/10 以下に低下した株を約 200 株取得した。さらに関与遺伝子を絞り込むため、*mexT* 遺伝子の 8 bp が欠失する領域をクロラムフェニコール耐性遺伝子の開始コドン直下に融合させ、欠失により初めてクロラムフェニコール耐性を示す新たなアッセイベクターを構築した。これを先程取得した約 200 の候補株それぞれに導入し、再度アッセイを試みた。その結果、約 10 株において、クロラムフェニコール耐性株の出現の著しい低下が認められ、これらの変異遺伝子が本欠失に強く関わっているものと考えられた。その中には、様々な生物種に幅広く存在する因子も含まれていたことから、大腸菌や緑膿菌だけでなく、その他の生物種でも本現象が生じる可能性が示唆された。現在、これらの遺伝子が緑膿菌での欠失に関わっているか否かについて検討を加えている。

antibiotic resistance, efflux pump

講演番号：2A13a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ A 校舎 13 会場

緑膿菌 MexEF-OprN 薬剤排出ポンプの一過的な発現調節機構
Expression mechanisms of a multi-drug efflux pump, MexEF-OprN of *Pseudomonas aeruginosa*
○市瀬 裕樹、上手 麻希、大政 健史、間世田 英明（徳島大 STS）
○Yu-ki ICHISE, Maki UWATE, Takeshi OMASA, Hideaki MASEDA (The Univ. Tokushima Grad.)

緑膿菌は元来多剤耐性を示すばかりか、抗生物質への暴露によって容易に高度に多剤耐性化する。実際、臨床分離株である緑膿菌 8380 株を、クロラムフェニコールやキノロン剤、さらにはカルバペネム剤に暴露すると、10^{-7} 程度の効率で MexEF-OprN 薬剤排出ポンプが新たに発現した高度耐性株が出現する。この耐性化の原因を解析したところ、耐性株ではどれも、MexEF-OprN 薬剤排出ポンプを正に制御している *mexT* 遺伝子産物のその制御遺伝子 *mexS* に変異があることが認められた。さらに相補実験の結果から、その変異は全て *mexS* の機能を破壊する変異であることが確認された。このように、8380 株では *mexS* の変異により高度に多剤耐性化することが示された。面白いことに、8380 株を薬剤を含むスクリーニング培地上で *mexS* 変異株の出現後さらに長く培養を続けると、新たに多くの耐性株が出現してくることを見出した。しかも解析の結果、この耐性株の *mexS* 遺伝子には変異が認められず、先に解析した高度耐性株とは異なった耐性機構を有する耐性株であることが示唆された。抗生物質への細菌を暴露した場合に、どのような機構で耐性化が進んでいくのかに関して解析した例は少なく、その機構には興味が持たれる。そこで、今回、暴露後にあとから新たに出現してくる耐性株の出現機構について、解析を加えたので報告する。

まず、あとから出現してきた耐性株をランダムに 50 株程度分離し、その薬剤感受性を測定した。その結果、全ての株で親株と比べ著しい薬剤耐性を示し、その耐性度は、ほぼ先の MexS 変異株同様の値を示した。さらに、MexE 抗体を用いて MexEF-OprN タンパク質の発現を確認したところ、親株では全く MexE の発現が確認されないのに対し、MexS 変異株に比べるとその発現量は低いものの、明らかな発現が確認された。このことから、本株の耐性がやはり MexEF-OprN 薬剤排出ポンプの発現にあることが示された。興味深いことに、これらの株を薬剤非存在下で培養すると、速やかに薬剤感受性および MexE の発現量が親株レベルまで戻った。このことから、本株の耐性が MexEF-OprN の一過的な発現にあることが示唆された。続いて、本株の MexEF-OprN の発現機構の詳細を明らかにすべく、*mexS* および *mexT* 両遺伝子の転写量、およびそれぞれの遺伝子産物の発現量を測定した。その結果、両制御因子の転写量・発現量はともに親株と同レベルであった。このことから、両制御因子の量の変化が MexEF-OprN の発現を導いている訳ではないことが示された。もしかすると、MexS や MexT の活性に関わる因子の増減が本株での一過的な MexEF-OprN の発現および耐性に関わっているのかもしれない。現在、その因子の取得および同定に向けた検討を進めているところである。

Antibiotic, Resistance, Efflux pump

講演番号：2A13a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ A 校舎 13 会場

緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* における *cbb*$_3$型シトクロム *c* 酸化酵素イソサブユニットの発現制御機構

Regulatory mechanism of isosubunits of the *cbb*$_3$-type cytochrome *c* oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*

○平井 猛博、長村 達也、石井 正治、新井 博之（東大院・農生科・応生工）
○Takehiro Hirai, Tatsuya Osamura, Masaharu Ishii, Hiroyuki Arai (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

【目的】緑膿菌の *cbb*$_3$型シトクロム *c* 酸化酵素はそれぞれ *ccoN1O1Q1P1* と *ccoN2O2Q2P2* の遺伝子群にコードされる Cbb3-1 と Cbb3-2 の 2 種類が知られてきた。恒常的な発現を示す *ccoN1O1Q1P1* は酸化還元状態を感知するとされるレギュレーターRoxSR によって制御され、低酸素及び定常期において誘導される *ccoN2O2Q2P2* は RoxSR 及び低酸素応答のレギュレーターANR によって制御されている。近年、緑膿菌のゲノム中にはさらに *ccoN3Q3* と *ccoN4Q4* の 2 種類の *ccoNQ*-like な遺伝子群が存在し、それらによってコードされる CcoN3 及び CcoN4 が CcoO1P1 または CcoO2P2 と共に活性型の複合体を形成し、好気呼吸を担い得ることが明らかとなってきた。トランスクリプトーム解析の結果、*ccoN3Q3* は嫌気脱窒条件で、*ccoN4Q4* は定常期及びシアン存在条件での誘導が見られたが、それらの条件で働く既知の呼吸酵素関連レギュレーターによる制御は受けていなかった。そこで、本研究では *ccoN3Q3* と *ccoN4Q4* の転写誘導を引き起こす因子及びそれらを感知するレギュレーターに関する詳細な知見を得ることを目的とした。

【方法・結果】*ccoN3Q3* は嫌気脱窒条件で誘導される。そこで、様々な脱窒関連物質（NO_3^-、NO_2^-、NO）存在下での *ccoN3* の転写活性を *lacZ* アッセイ法によって調べたところ、好気条件においても *ccoN3* は NO_2^-存在下において非常に高い転写活性を示した。また、緑膿菌のゲノム上で *ccoN3Q3* の近傍に存在する LysR タイプのレギュレーターをコードする遺伝子 *nirY* の破壊株では NO_2^-存在下における *ccoN3* の転写活性が失われ、*nirY* の相補によって転写活性の回復が見られたことから、NirY は新規の NO_2^-応答性アクチベーターであることが示された。

ccoN4Q4 は定常期及びシアン存在下において誘導される。緑膿菌は定常期において自らシアンを生産することで、他の菌に対して優位性を保つことが知られている。そこで、緑膿菌のシアン生合成系の遺伝子 *hcnB* の破壊株における *ccoN4* の転写活性を *lacZ* アッセイ法によって調べたところ、*hcnB* 破壊株では定常期における *ccoN4* の転写活性が失われ、KCN 添加によって回復したことから、定常期における *ccoN4Q4* の誘導は緑膿菌自身が生産するシアンによるものであることが示された。また、*ccoN4Q4* の近傍には、KCN 存在下で *ccoN4Q4* と共に転写誘導される GntR タイプのレギュレーターをコードする遺伝子 PA4132 が存在した。PA4132 破壊株では KCN 存在下での *ccoN4* の転写活性が失われ、PA4132 の相補によって回復したことから、PA4132 は新規のシアン応答性アクチベーターをコードしていることが示された。

Pseudomonas aeruginosa, cytochrome *c* oxidase, cyanide responsive regulator

講演番号：2A13a17
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ A 校舎 13 会場

緑膿菌セラミダーゼの発現制御に関わる新規転写因子 SplR の解析

Analysis of a novel transcriptional regulator, SplR, which induces *Pseudomonas* ceramidase expression.

○沖野 望、伊東 信 (九大院農)
○Nozomu OKINO, Makoto ITO (Kyushu Univ.)

セラミダーゼはセラミドを脂肪酸とスフィンゴシンに加水分解する酵素である。私たちはこれまでに、緑膿菌セラミダーゼがスフィンゴ脂質により発現誘導され、スフィンゴミエリナーゼ活性を持つ溶血性ホスホリパーゼ C (PlcH) が引き起こす溶血反応を増強することを明らかにしている (Okino, N. and Ito, M. (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 6021-6030)。今回、緑膿菌セラミダーゼがスフィンゴ脂質によって発現誘導されるメカニズムについて報告する。まず、緑膿菌セラミダーゼ遺伝子を大腸菌由来β-ガラクトシダーゼ遺伝子に置換した変異株 (AN17-BGT) を作製した。次に、AN17-BGT 株のトランスポゾン導入変異体ライブラリーを作製し、スフィンゴミエリン存在下でのβ-ガラクトシダーゼ活性の消失を指標にして、スクリーニングを行った。その結果、機能未知の転写制御因子がスフィンゴミエリンによるセラミダーゼ誘導に関与することを見出し、スフィンゴ脂質応答性転写制御因子 (Sphingolipid responsive regulator, SplR) と名付けた。

SplR の生理機能を解析するために、新たに SplR 欠損株を作製し、スフィンゴミエリンを含む PY 培地で培養して、培養上清中のセラミダーゼ活性と溶血活性を測定した結果、SplR 欠損株ではセラミダーゼ活性が消失し、溶血活性も抑制されていた。また、SplR 欠損株の増殖を野生株と比較したところ、PY 培地での増殖に変化はなかったが、スフィンゴミエリンを唯一の炭素原とする培地では、野生株に比べて増殖が抑制されていた。次に、SplR を介した緑膿菌セラミダーゼの発現機構を詳細に明らかにするために、セラミダーゼ遺伝子のプロモーター解析を行った。その結果、5’非翻訳領域の-100 から-200 領域の間にプロモーター活性 (SplR の結合部位) があることが判明した。さらに、本プロモーター領域を含むDNA断片を用いたゲルシフトアッセイにより、SplRはスフィンゴシンの存在下で、プロモーター領域に結合することが明らかになった。一方、SplR を活性化する脂質を探索するために、AN17-BGT 株を各種スフィンゴ脂質を含む培地で培養して、β-ガラクトシダーゼ活性を測定したところ、スフィンゴミエリンやセラミドに比較して、スフィンゴシンに強いセラミダーゼ誘導能があることが分かった。スフィンゴミエリンは緑膿菌が生産する PlcH の働きによって速やかにセラミドに分解されるので、本実験結果から、SplR の活性化にはスフィンゴミエリンよりも、その分解産物であるセラミドやスフィンゴシンが重要であることが示唆された。以上の結果は、緑膿菌が感染した際に、宿主由来の生体膜脂質やその分解産物によって、SplR を介した遺伝子発現が起こり、緑膿菌の溶血活性が増強されることを示唆しており、緑膿菌の病原性における SplR の機能に興味が持たれる。

Pseudomonas aeruginosa, ceramidase, sphingolipid

講演番号：2A13p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ A 校舎 13 会場

大腸菌非メバロン酸経路の人工オペロン化
Construction of an artificial nonmevalonate operon of Escherichia coli
○柘植 謙爾 [1]、富樫 貴 [1]、長谷部 雅子 [1]、冨田 勝 [1,2]、板谷 光泰 [1,2] ([1]慶應大先端生命研、[2]慶應大環境情報)
○ Kenji TSUGE[1], Takashi TOGASHI[1], Masako HASEBE[1], Masaru TOMITA[1,2], Mitsuhiro ITAYA[1,2] ([1]Inst. Adv. Biosci. Keio Univ., [2]Env. Info. Study Keio Univ.)

様々な DNA 断片を繋げてゲノムデザインを行う、ボトムアップ型ゲノムデザインにおいては、代謝経路などの一連の遺伝子群の発現制御をどのように行うかということが問題となる。我々は、それぞれの代謝経路の遺伝子群を、人工オペロンにまとめ、これらを積み上げることにより新規ゲノムをデザインすることを考えている。そこで、この方法理論検証の一環として、大腸菌の解糖系に関わる一連の遺伝子群を人工オペロンに集積することを行った。解糖系の各遺伝子断片を枯草菌のプラスミド形質転換系を利用した遺伝子集積法の OGAB によりポリシストロニックな人工オペロンの形に集積した。これをプラスミドの形で大腸菌に導入することで、本来大腸菌が持つ解糖系の遺伝子回路を相補できるかどうかを検証してきた。その結果、人工オペロン内の遺伝子配列に留意すると大腸菌が本来持つ解糖系の遺伝子回路を完全に欠損させても増殖速度に影響なく生育させることが可能であることを示した。人工オペロン内の遺伝子配列は、増殖している野生型の大腸菌の解糖系の各遺伝子の発現量を参考に発現量の多い順から唯一のプロモーターに近くなるように配置した“野生型 mRNA 量順”が最も良かった。この原因は、ポリシストロニックなオペロン内では、プロモーターに近い遺伝子ほど良く発現し遠ざかるにつれその発現量が減少することに起因しているものと考えられた。そこで、本知見がより一般的であるかどうかを検証するために、大腸菌の非メバロン酸経路にについて同様の実験を試みた。非メバロン酸経路の 9 個の遺伝子群について、野生型大腸菌中での発現量を測定し、この値を元に 9 個の遺伝子を発現量の順番に連結した、野生型 mRNA 量順非メバロン酸オペロンプラスミドを OGAB 法により構築した。このプラスミドを大腸菌に導入した状態で、大腸菌ゲノム中の非メバロン酸遺伝子について 1 つずつ遺伝子の除去を試みた。その結果、2 個の遺伝子についてゲノムからの完全な除去が出来ず、このオペロンプラスミドでは相補出来ていないことが判明した。そこで、ゲノム中のこの 2 遺伝子についてそれぞれ様々な破壊方法を試みたところ、1 遺伝子については ORF 内部の一部分が必須であることを見出し、その部分にゲノム中で下流に存在する必須遺伝子のプロモーターが存在していることが判明した。もう一方の遺伝子では、人工オペロン内の遺伝子発現が期待した量に到達せず、発現量が不足していることが判明した。そこで、発現量を増大させるように人工オペロン内の遺伝子順序を若干変更したところ、全ての非メバロン酸経路の遺伝子をゲノム中から除去することに成功した。この結果により、オペロン構築原理の一般性をある程度示すことができたと考えている。

Genome design, artificial operon, OGAB

講演番号：2A13p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ A 校舎 13 会場

大腸菌を宿主とした難発現タンパク質大量発現システムの検討

Investigation of recombinant protein overproduction system in Escherichia coli

○今中 洋行[1]、三木 駿也[1]、安保 紘高[2]、原 啓文[3]、山副 敦司[4]、細山 哲[4]、土金 恵子[4]、今村 維克[1] ([1]岡山大院・自然、[2]岡山大・工、[3]マレーシア工科大、[4]NITE-NBRC)
○Hiroyuki IMANAKA[1], Syunya MIKI[1], Hirotaka ABO[2], Hirofumi HARA[3], Atsushi YAMAZOE[4], Akira HOSOYAMA[4], Keiko TSUCHIKANE[4], Koreyoshi IMAMURA[1] ([1]Grad. Sch. of Nat. Sci. & Tech.,Okayama Univ., [2]Fac. Of Eng., Okayama Univ., [3]Uni. Tech. Malaysia, [4]NITE-NBRC)

大腸菌は最も汎用されている組換えタンパク質発現用宿主の一つであり、活性タンパク質収量の向上に向けたアプローチも多様になされているが、最適な発現システムの整備はいまだ不十分である。そこで、本研究では大腸菌における組換えタンパク質発現を規定する因子を探索すべく、野生型配列の組換え体発現が困難な放線菌 *Streptomyces mobaraensis* 由来 ε -リジンアシラーゼ遺伝子（*Sm-ela*）をモデルとし、コドン及び培養条件に着目した様々な発現実験を行った。その結果、 5’末端付近の 1 レアコドン改変、あるいは全長にわたるコドン最適化が有用であることがわかった。また、*Sm*-ELA 活性体発現に最適な培地組成を見出した。最適培地では 1 レアコドン改変あるいはコドン最適化により野生型配列の場合と比べ、いずれも 100 倍以上の活性向上がみられた。さらに、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行い、1 レアコドン改変配列発現時における呼吸鎖関連遺伝子の転写抑制や、コドン最適化配列発現時にのみ転写が誘導される熱ショックタンパク質遺伝子などが見出された。

Escherichia coli, protein expression, transcriptome

講演番号：2A13p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 13 会場

放線菌を宿主とした構成型分泌発現ベクターの構築

Constraction of constitutive secretory expression plasmid for Actinomycetes

○齋藤 結希、松本 雅子、橋本 義輝、熊野 匠人、小林 達彦（筑波大院　生命環境系）
○Yuki SAITOH, Masako MATSUMOTO, Yoshiteru HASHIMOTO, Takuto KUMANO, Michihiko KOBAYASHI (The Univ. of Tsukuba)

Streptomyces 属放線菌は、各種有用物質・酵素タンパク質等の生産菌として工業的に広く利用されており、今日の応用微生物学上、極めて重要な菌群となっている。本属放線菌での有用物質生産の重要性を鑑みて、我々はニトリル分解性放線菌 *Rhodococcus rhodochrous* J1 株の有する強力なタンパク質発現機構[1, 2]を基に *Streptomyces* 属放線菌で機能する誘導型[3]および構成型高発現系を構築した。本研究では、先行研究で開発した高発現系に目的タンパク質を分泌させる能力を付与した分泌型高発現系の開発を目的とした。

全ゲノム配列が決定されている *Streptomyces* 属放線菌から 20 個のシグナルペプチドを選択した。それぞれのシグナルペプチドとレポーター遺伝子を in frame で連結し、先行研究で構築した構成型発現ベクターpHSA81 のニトリルヒドラターゼ遺伝子プロモーター下に配置したプラスミドを作成した。本プラスミドで、*Streptomyces lividans* TK24 株を形質転換し、各々の形質転換体を液体培養後、その培養上清を用いてレポータータンパク質が示す酵素活性の測定を行うとともに、培養上清中に分泌されたレポータータンパク質を SDS-PAGE で調べた。その結果をもとに、分泌能が高いシグナル配列を選抜し、pHSA81 のマルチクローニングサイト上流にこれらのシグナル配列を各々導入した構成型の分泌高発現ベクターを数種類構築した。

【文献】

(1) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10572 (1994)
(2) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **93**, 4267 (1996)
(3) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14031 (2004)

Streptomyces, signal peptide, expression vector

講演番号：2A13p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 13 会場

Rhodococcus 由来ニトリルヒドラターゼ遺伝子プロモーターを利用した *Rhodococcus* 属放線菌における構成型発現ベクターの構築

Construction of an expression plasmid for *Rhodococcus* using a *Rhodococcus* promoter

○松本 雅子、橋本 義輝、劉 瑞、熊野 匠人、小林 達彦（筑波大院　生命環境系）
○Masako MATSUMOTO, Yoshiteru HASHIMOTO, Rui LIU, Takuto KUMANO, Michihiko KOBAYASHI (The Univ. of Tsukuba)

放線菌の一種である *Rhodococcus* 属は難分解性化合物を分解する能力が高く、環境浄化や有用物質生産に利用される実用菌を含んでいる。また、有機溶媒耐性と強い酸化還元能を有する為、特殊なバイオプロセス環境下の次世代宿主の候補として期待されている。我々はこれまでに、*Rhodococcus* 属で機能する構成型発現系を開発するため *Rhodococcus erythropolis* PR4 株から構成型プロモーターの探索を行い、それらを利用した複数の構成型発現ベクターの構築に成功している。今回は、*R. erythropolis* PR4 とは異なる *Rhodococcus* に由来するニトリルヒドラターゼ（NHase）遺伝子プロモーターを利用し、*Rhodococcus* 属放線菌で機能する新規構成型発現系を開発することを目的とした。

NHase 遺伝子クラスター中の調節タンパク質遺伝子およびプロモーター領域を含む断片内に存在する幾つかの制限酵素サイトを破壊した構成型改変プロモーターを作成した。一方、*Rhodococcus-E. coli* シャトルベクター内の幾つかの制限酵素サイトを破壊し、構成型改変プロモーターとさらにその下流にマルチクローニングサイト（MCS）を配置した構成型発現ベクターの構築に新たに成功した。現在、レポーター遺伝子を本ベクターに組込み、数種類の *Rhodococcus* 属放線菌の形質転換を行い、レポータータンパク質の発現を確認することで、本プラスミドの機能性を検証している。

Rhodococcus, promoter, plasmid

講演番号：2A13p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 13 会場

Rhodococcus sp. strain YH3-3 における“アルドキシム-ニトリル経路” の遺伝子発現解析
Transcriptional analysis of genes involved in “aldoxime-nitrile pathway” in *Rhodococcus* sp. strain YH3-3

○田部井 陽介[1]、山口 拓也[1,2]、浅野 泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO）
○Yosuke TABEI[1], Takuya YAMAGUCHI[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ, [2]JST, ERATO)

【背景と目的】本研究で用いた *Rhodococcus* sp. strain YH3-3（以下 YH3-3 と略す）は、*E*-ピリジン-3-アルドキシム（PyOx）資化菌として分離された株であり、PyOx を 3-シアノピリジン（CyPy）へと変換する脱水酵素（アルドキシムデヒドラターゼ： Oxd）を有する[1)]。さらに、CyPy は、ニトリルヒドラターゼ（NHase）およびアミダーゼ（Ami）の作用により、ニコチンアミド（NAm）を経て、ニコチン酸へと代謝される（“アルドキシム-ニトリル経路”）。本菌株は各種アルドキシムからニトリルの合成が可能であり[2)]、その有用性が示されているものの、その遺伝子レベルでの制御に関しては未知な部分が多い。今回、この“アルドキシム-ニトリル経路” 関連遺伝子群の転写レベルでの解析を行ったので報告する。
【方法と結果】全ゲノム塩基配列を決定するために、YH3-3 のゲノム由来 DNA ライブラリーを調製し、Illumina Hiseq2000 によりシークエンス解析を行った。得られたリードからソフトウェア SOAP de novo を用いてアッセンブルを、さらに形成されたスカフォールドから glimmer3.0 を用いて遺伝子の予測を行った。その結果、ゲノムサイズは約 7.3 Mbp、GC 含量 62.2%、ORF は約 7300 あることが推定された。さらに“アルドキシム-ニトリル経路”関連遺伝子に関しては、2 つの遺伝子クラスターの存在が見出された。1 つは Fe 型 NHase を有し（以下 Fe 型クラスターと略す)、もう 1 つは Co 型 NHase をコードする遺伝子を有する（以下 Co 型クラスターと略す）ものであった。
そこで、種々の条件下で YH3-3 を培養し、これら“アルドキシム-ニトリル経路”関連遺伝子群の発現量を、RT-PCR により解析した。当研究室の先行研究の知見をもとに“アルドキシム-ニトリル経路”の誘導剤として PyOx および NAm を用いた。遺伝子発現解析の結果、Fe(II)存在下では Fe 型、Co 型両クラスターともに発現誘導されるのに対し、Co 存在下では、Fe 型クラスターの *oxd* および *ami* の発現は抑制されていた。このことから、*oxd* および *ami* の発現誘導には誘導剤の添加とともに Fe(II)要求性があることが明らかとなった。また、窒素源が豊富な条件下では、Fe 型、Co 型両クラスターともに発現の抑制が認められた。そこで、窒素源として種々のアミノ酸を用い、発現解析を行ったところ、アラニン、アルギニン、システインに発現抑制効果が認められた。

[1)]Y Kato, R Ooi and Y Asano, *Arch. Microbiol.*, 1998, 170:85-90
[2)]Y Kato, R Ooi and Y Asano, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 1999, 6:249-256

aldoxime-nitrile pathway, transcription, *Rhodococcus*

講演番号：2A13p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 13 会場

サナギタケの感染過程におけるトランスクリプトーム解析
Transcriptome analysis on the infection process of the mushroom *Cordyceps militaris*.
○鈴木 智大[1]、道羅 英夫[1]、崔 宰熏[1]、加藤 竜也[1,2]、朴 龍洙[1,2,4]、阿部 伸一[3]、佐伯 潤[3]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2,4]([1]静大・グリーン研、[2]静大農・応生化、[3]にちはら総研、[4]静大院・創造)
○ Tomohiro SUZUKI[1], Hideo DOHRA[1], Jae-Hoon CHOI[1], Tatsuya KATO[1,2], EY PARK[1,2,4], Shinichi ABE[3], Jun-David SAEKI[3], Hirofumi HIRAI[1,2], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,4] ([1]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [2]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [3]Nichihara Research & Development Laboratories Inc., [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】
冬虫夏草は昆虫などから生じるキノコの総称で、節足動物の病原体として世界的に約 400 種以上が確認されている。冬虫夏草 *Cordyceps militaris*(サナギタケ)は鱗翅目昆虫の蛹の病原体で、北半球の大部分で発生する[1)]。しかし、感染から寄生そして子実体形成における詳細なメカニズムは未だ不明であり、これらを解明することはこの種の菌の生産及び栽培にも有用な情報となることが期待される。
そこで本研究ではサナギタケの感染過程において発現する遺伝子を網羅的に解析するため、サナギタケ菌体をカイコ（*Bombyx mori*）の蛹に接種した後の遺伝子発現を次世代シーケンサーを用いて解析することを目的とした。

【方法及び結果】
シーケンス解析には Illumina 社の MiSeq を用いた。液体培養した菌糸体及びサナギタケ菌子体をカイコ蛹に接種した後、それぞれ 3 日目から 11 日目の検体から total RNA を抽出した。その後、それぞれライブラリーの作成を行った。得られたライブラリーは両末端 300 bp の Paired-end でシーケンスを行った。
取得したリード配列をTrinity、Oasesを用いた*de novo*アセンブルに供した。次いで得られたアセンブルデータをリファレンスとしてリードのマッピングおよびRPKM値の算出により、発現解析を行った。現在、サナギタケの菌糸体やカイコ蛹への感染過程において発現量に変化が見られた遺伝子をBlast解析、Gene Ontology やKEGGを用いた機能解析に供し詳細に解析中である。

1) Sung, GH., et al., Studies in Mycology, 57, 5 (2007).

Transcriptome analysis, *Cordyceps militaris*, mushroom

講演番号：2A13p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 13 会場

Omics 手法を用いた *Lactobacillus lindneri* のビール混濁能の解析
Omics approach to the beer-spoilage ability of *Lactobacillus lindneri*
○藤井 敏雄、多田 節三 (キリン基盤技術研究所)
○Toshio FUJII, Setsuzo TADA (Kirin co.ltd.)

【背景と目的】*Lactobacillus lindneri* は *Lactobacillus brevis* と並ぶ代表的なビール混濁乳酸菌種である。*L. brevis* 等、他の乳酸菌のビール混濁能は株特異性が高く、主として plasmid に依存しているのに対し、*L. lindenri* では検出されるほぼすべての株がビール混濁能を有しており、またビール工場以外の環境で検出されることがほとんどない。すなわち、*L. lindneri* は他の乳酸菌と異なる環境適応機構を持っていると考えられるが、その遺伝学的背景は十分解析されていない。たとえば、*L. brevis* において混濁能と関連が深い *horC*、*hgtA*、*hitA* のうち、*L. lindenri* では、*hgtA*、*hit*A は存在せず、*horC* もごく一部の株でのみ検出されている。そこで我々は omics 手法を用いて、包括的な遺伝子解析を行い、本菌種のビール混濁機構の解明を試みた。
【方法】*L. lindenri* DSM20692 株より全 DNA を抽出し、平均インサート長 800bp、4kb、40kb のライブラリーを作成し、ABI3730xl および 454 により塩基配列を決定した。PGA ソフトウエアを用いて、アセンブルした結果、スーパーコンティグ数は 41 となった。仮想ゲノム配列から、Glimmer (version 2) と Critica を併用して遺伝子領域を予測し、マイクロアレイを作成した。嫌気培養槽を用いてビールおよび MRS 培地で DSM20692 株、およびその派生株で *horC* 欠失株を培養したものから RNA を抽出し、トランスクリプトームの比較解析を行った。
【結果】スーパーコンティグの大きさが最大でも 0.8Mbp であったため、*L. brevis* ATCC 367 株のゲノム配列を比較参照配列として、コンティグを整列化させ、仮想ゲノム配列を作成した。*L. brevis* ATCC 367 株と *L. brevis* では大きな逆位構造が認められた。Glimmer と Critica を用いた遺伝子領域予測結果では 2,280 個の遺伝子を予測することができた。遺伝子発現解析の結果、DSM 20692 株ではビール中のほうがホップ添加により *horC* が強く誘導され、hop 耐性に重要であることが確認された。いっぽう、DSM 20692 株由来の *horC* 欠損株では、Ni,Co, oligopeptide trasnporter や shikimate pathway の遺伝子が強く誘導されていた。これらの遺伝子に相同性のある遺伝子は、ホップ耐性能のない他の乳酸菌でも報告されている。*L. lindneri* においてはこれらの遺伝子が特異的な進化をとげることにより、ビール環境への適応性を高めていることが推察される。

Lactobacillus lindneri, beer, genome

講演番号：2A13p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 13 会場

好熱性化学独立栄養性細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 における硫黄化合物酸化代謝に関する研究

Study on Sulfur-compounds Energy Metabolism in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6

○石崎 優[1]、佐藤 由也[3]、三本木 至宏[2]、新井 博之[1]、石井 正治[1] ([1]東大院農、[2]広島大農、[3]産総研・環境管理)

○ Masaru ISHIZAKI[1], YUYA SATO[3], YOSHIHIRO SANBONGI[2], HIROYUKI ARAI[1], MASAHARU ISHII[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Hiroshima Univ., [3]AIST EMTech)

Hydrogenobacter thermophilus TK-6 は伊豆の温泉から単離された好熱性化学独立栄養性細菌である。本菌は水素もしくはチオ硫酸をエネルギー源とした生育が可能であることが知られている。チオ硫酸酸化代謝に関しては、各種硫黄代謝関連遺伝子破壊株の生育試験より Heterodisulfide reductase (Hdr), Sox system, Sulfur reductase (Sre), ATPase/Rhodanese fusion protein (HT0621;Rhd1)が寄与していることを発表してきた。また、チオ硫酸酸化条件でのトランスクリプトーム解析からは、Hdr や Sox 遺伝子の発現量は変動しない一方、遺伝子の有無が生育速度に影響を与えない Sulfite:cytochrome c oxidoreductase (Sor)などの発現量が上昇しているなど、興味深い傾向が確認されていた。本発表では、さらに複数の条件で行ったトランスクリプトーム解析の結果を中心に、本菌の硫黄化合物酸化代謝の全容解明にむけて得られた知見を報告する。

本菌をテトラチオン酸を唯一のエネルギー源として培養したところ、pH の急激な低下に伴い、濁度の増加は小さいものの有意な生育が確認された。水素とテトラチオン酸が共存する条件での培養においても同様の pH 低下が見られることから、水素存在下においても硫黄酸化代謝は機能していると判断した。そこで、水素＋チオ硫酸、水素＋テトラチオン酸条件、さらに *soxB* 破壊株(Δ*soxB*)の水素＋チオ硫酸条件でのトランスクリプトーム解析を行った。

水素＋チオ硫酸条件では Hdr 遺伝子の有意な発現上昇など、チオ硫酸のみで生育させた条件の結果と異なる発現挙動を示す遺伝子が確認された。これらの挙動変化は、前回の報告が対数増殖後期のチオ硫酸分解が進行した段階でのサンプル由来であったことに起因していると考えられる。Δ*soxB* の水素＋チオ硫酸条件では、*sox*YZAX の発現上昇も見受けられ、Sox や Hdr といった鍵酵素がチオ硫酸での発現制御を受けていることが強く示唆された。水素＋テトラチオン酸条件では各硫黄代謝系遺伝子の発現挙動が水素＋チオ硫酸条件と概ね合致しており、テトラチオン酸酸化の一部にチオ硫酸酸化機構が用いられている可能性が示唆された。一方、特定の遺伝子セット(HT1783-1784: hypothetical protein)において水素＋テトラチオン酸条件特異な高い発現上昇が見受けられ、この遺伝子産物がテトラチオン酸酸化に強く寄与することが示唆された。

今回の発表では上記の内容に加え、本菌の有する硫黄代謝関連遺伝子に関する生理学的・生化学的な知見も合わせて報告する予定である。

Tetrathionate, Energy metabolism, Thiosulfate

講演番号：2A13p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 13 会場

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* のセロビオース代謝オペロンの転写解析
Transcriptional analysis of a cellobiose utilization operon in *Thermus thermophilus*
○黒澤 智砂、星野 貴行、中村 顕（筑波大学大学院）
○CHISA KUROSAWA, HOSHINO TAKAYUKI, NAKAMURA AKIRA (Tsukuba Univ.)

【目的】

Thermus thermophilus HB27 株は至適生育温度を 70～75 ℃ に有する高度好熱菌で、全ゲノム配列が明らかにされ、また簡便な操作で遺伝子組換えが可能なため、高度好熱菌のモデル生物として様々な研究がなされている。同株の推定β−glycosidase 遺伝子 *TTP0042* は、レポーター遺伝子として広く利用されているが、その生理機能については未解明のままである。同遺伝子の上流には、3 つの糖取り込みに関与する遺伝子(*TTP0039-TTP0041*)及び LacI family の転写調節遺伝子 *TTP0038* が存在している。

我々は、同株で利用可能な誘導発現系の開発を最終目標として研究を行っており、推定転写因子 TTP0038 による遺伝子発現調節に着目して解析を行った。今回同遺伝子がセロビオース代謝に関わる下流遺伝子 *TTP0042* の発現を調節することを明らかにしたので報告する。

【方法及び結果】

RT-PCR により *TTP0038-TTP0042* の転写単位を解析し、これらがオペロンとして転写されることを明らかにした。また上流遺伝子（*TTP0037*）は約 200 bp 離れており、異なる転写単位であることを明らかにした。この結果より *TTP0038-TTP0042* オペロンのプロモーターが *TTP0037-TTP0038* 遺伝子間に存在し、TTP0038 がその転写調節に関与することが推定された。

また、*T. thermophilus* の培養液中にセロビオースを添加すると TTP0042 の活性が誘導され、同時に *TTP0042* および *TTP0038* の転写量が増加した。このことから、TTP0042 はセロビオースを基質とするβ-glycosidase であり、セロビオースによって発現が誘導されることが明らかになった。

最後に TTP0038 の組換えタンパク質を用いて、*TTP0037-TTP0038* 遺伝子間領域をプローブとした EMSA を行ったところ、TTP0038 は同領域に結合し、セロビオース存在下で解離することを明らかにした。このことから、TTP0038 は *TTP0038~TTP0042* オペロンのリプレッサーとして機能し、セロビオースがリガンドとして機能することが明らかになった。

以上の結果から、TTP0038 はセロビオース資化に関わるオペロン *TTP0038-TTP0042* の発現調節を担う転写調節因子であることが示唆された。現在 *TTP0038-TTP0042* のプロモーターおよび TTP0038 結合領域の同定を行っており、これらの結果についても合わせて報告する予定である。

Thermus thermophilus, cellibiose

講演番号：2A13p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 13 会場

枯草菌でのラムノース異化に関わる *yuxG-yulBCDE* オペロンにコードされる各タンパク質の機能解析

Functional analysis of proteins encoded in the *yuxG-yulBCDE* operon, which is involved in rhamnose metabolism in *Bacillus subtilis*

○広岡 和丈、藤田 泰太郎（福山大生命工・生物工）
○Kazutake HIROOKA, Yasutaro FUJITA (Fukuyama Univ.)

【目的】土壌細菌である枯草菌は植物根圏にも普遍的に存在し、根から浸潤する糖などの種々の有機化合物を栄養源として利用している。我々は、枯草菌ゲノムからラムノース異化に関わる酵素群とその発現制御を担う転写因子をコードする *yuxG-yulBCDE* オペロンを見出し、その制御機構を解析している。YulB は DeoR ファミリーに属する転写因子であり、DNase I フットプリント解析によりオペロン上流の 2 つの不完全なダイレクトリピートを含む領域に結合することが示された。この結合様式を明らかにするために、YulB タンパク質の四次構造の決定を試みた。また、他の DeoR ファミリー転写因子の特性から類推すると、ラムノース代謝中間体でリン酸基を有するラムヌロース-1-リン酸が直接のエフェクターとして作用し、YulB の DNA 結合を解除してオペロンの発現を脱抑制することが予想された。ラムノースのラムヌロースへの異性化は YulE によって行われ、YulC はラムヌロースのリン酸化を行うと考えられる。YulB の DNA 結合に対する効果の検証に用いるラムヌロース-1-リン酸を調製することを目的に、YulE および YulC タンパク質を調製し、それぞれの酵素活性の測定を試みた。
【方法・結果】*yulB* 遺伝子断片を pColdIV ベクターに組み込んだプラスミドを構築し、これを用いて大腸菌 BL21 株を形質転換した。得られた形質転換体を LB 培地を用いて 37℃ で培養後、15℃ に冷却して IPTG を添加することで目的タンパク質の発現を誘導した。菌体を超音波破砕して粗タンパク質抽出液を調製し、これを硫安沈殿に供し、30-50%飽和沈殿画分を回収して透析後、DEAE 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供した。その結果、比較的高収率で精製 YulB タンパク質を得ることができた。現在ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて、溶液中の YulB タンパク質の分子量を算出し、四次構造の決定を行っている。また、*yulE* および *yulC* 遺伝子断片をそれぞれ pColdI ベクターに組み込み、N 末側に His タグを付加した状態で各タンパク質を発現させるプラスミドを構築した。これらをそれぞれ用いて大腸菌 BL21 株を形質転換し、上述の方法に従って目的タンパク質の発現誘導を行った。菌体から粗タンパク質抽出液を調製し、SDS-PAGE に供した結果、目的タンパク質の明確なバンドを確認することができた。現在各タンパク質のアフィニティカラムクロマトグラフィーによる精製とそれらの酵素活性測定を行っている。

rhamnose metabolism, *Bacillus subtilis*, transcriptional regulation

講演番号：2A13p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 13 会場

植物病原菌 *Burkholderia plantarii* におけるトロポロン産生制御系の解析
Control mechanism of tropolon production in *Burkholderia plantarii*
吉岡 誠訓[1]、○三輪 瞬平[1]、紀平 絵梨[1]、仲曽根 薫[2]、五十嵐 雅之[3]、波多野 和樹[3]、吉川 博文[4,5]、兼崎 友[5]、江口 陽子[1]、内海 龍太郎[1]([1]近大院農バイオ、[2]近大工、[3]微化研、[4]東京農大応生化バイオ、[5]東京農大ゲノム解析セ)
Akinori YOSHIOKA[1], ○ Shunpei MIWA[1], Eri KIHIRA[1], Kaoru NAKASONE[2], Masayuki IGARASHI[3], Masaki HATANO[3], Hirofumi YOSHIKAWA[4,5], Yu KANESAKI[5], Yoko EGUCHI[1], Ryutaro UTSUMI[1] ([1]Dept.of Biosci.,Grad.Sch.of Agric., Kinki Univ., [2]Dept. of Biotechnol and Chem.,Faculty of Engeneering.Kinki Univ., [3]Inst. Microb. Chem.(BIKAKEN), [4]Tokyo Univ. of Agriculture, [5]Tokyo Univ. of Agriculture Genomu research center)

イネ苗立枯病は、イネ苗立枯細菌病菌 *Burkholderia plantarii* によって生産されるトロポロンが主病原因子と考えられている。トロポロンは三価の鉄とキレート化し赤褐色のトロポロン第二鉄錯塩を形成する。これによって、イネの生育に必要な鉄が不足し枯死へとつながると考えられる。本研究では、トロポロン生合成や制御に関する遺伝子を探索した。現在までの研究で *B. plantariin* には二成分制御系(TCS)に関わる 55 個の HK（ヒスチジンキナーゼ）と 75 個の RR（レスポンスレギュレーター）が存在し、この中の HK3, RR1, RR2 がトロポロン生産に関与することが明らかにされている。また野生株（WT）の培養液にトロポロンを添加するとトロポロン産生が誘導される。さらに WT において長期間培養し菌量が増加することでトロポロン産生量が増加することから quorum sensing (QS) による制御が示唆された。本研究において、TCS と QS 関与のトロポロン生産制御ネットワークの分子機構の解明を目的にした。

全ゲノム情報から QS に関与する遺伝子を探索したところ、*luxR*、*luxI* と相同性の高い遺伝子が 12 個見出されたのでこれらの破壊株を作成し、トロポロン産生量の変化を測定した。その結果 *luxR* と相同性の高い csgD(QS2) 遺伝子破壊株において顕著にトロポロン産生能が低下した。また HK3/RR1/RR2 破壊株と比べて QS2 破壊株ではトロポロン添加によるトロポロン産生が見られなかった。さらに QS2 破壊株では長期間の培養によって菌量が増加してもトロポロンは産生されなかった。従って QS2 は HK3/RR1/RR2 と異なりトロポロン産生に直接関与していると考えられた。続いてトロポロン生合成に関与する遺伝子群を網羅的に解析するために、HK3/RR1/RR2 遺伝子破壊株と WT における RNA-seq を行った。WT と HK3RR1/RR2 破壊株で発現量を比較し WT に比べ発現量が 5 分の 1 以下になった遺伝子群の中に転写調節因子(*lysR*)、生合成(*paaD*)、排出ポンプ(*emrK*)などに関与する遺伝子群が見つかった、これらの遺伝子を破壊しトロポロン産生量を測定したところ lysR、paaD、emrK 破壊株において WT に比べ明確な発現量の低下が確認された。さらに、LysR は HK3/RR1/RR2 破壊株とも、QS2 破壊株とも異なるトロポロン産生の挙動を示した。以上の結果から、トロポロン産生には、HK3/RR1/RR2 と QS2、LysR の 3 種類の制御による、複雑なネットワークの遺伝子発現制御系が関与していることが示唆された。

Burkholderia plantarii, Troplone, two component system

講演番号：2A13p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 13 会場

Glu/Asp ABC トランスポーターmRNA によって引き起こされる GcvB レギュロンの脱抑制
Derepression of GcvB regulon by Glu/Asp ABC transporter mRNA

○宮腰 昌利、フォーゲル ヨーク (ヴュルツブルク大)
○Masatoshi MIYAKOSHI, Joerg Vogel (Univ. Wuerzburg)

原核生物では50-250塩基からなるsmall RNAがRNA結合タンパク質Hfqを介して複数のターゲットmRNAと短くて不完全な塩基対を形成し、主に翻訳阻害およびRNA分解を引き起こす。Hfq依存性small RNAは現在のところ腸内細菌では約200種類同定されており、迅速な環境応答と複雑な遺伝子発現ネットワークを実現している。腸内細菌のグリシン誘導性small RNA GcvBはアミノ酸輸送タンパク質や代謝酵素をコードする約20種類のmRNAの負の転写後制御因子である。その標的の一つであるグルタミン酸/アスパラギン酸ABCトランスポーターをコードする*gltIJKL* mRNAは、その遺伝子間領域からプロセッシングされたRNA断片をGcvBと2カ所で短い塩基対を形成させることでRNase EによるGcvBの分解を促進することが明らかになった。一つのmRNAがsmall RNAの能動的な分解を介してその他の複数のmRNAを脱抑制し、結果的にグルタミン酸/アスパラギン酸だけでなくその他のアミノ酸輸送、代謝系の誘導を引き起こす。

small RNA, RNase E, Hfq

講演番号：2A13p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 13 会場

Glycine cleavage system 構成遺伝子群の転写を活性化するグリシンリボスイッチはグリシン存在下での *Streptomyces griseus* の生育に必須である

Glycine riboswitches activate the glycine cleavage system essential for glycine detoxification in *Streptomyces griseus*

○手塚 武揚、大西 康夫（東大院農生科・応生工）
○Takeaki TEZUKA, Yasuo OHNISHI (Univ. of Tokyo)

【背景】GcvP、GcvT、GcvH、GcvLの4タンパク質で構成されるglycine cleavage (GCV) systemはグリシンの酸化的分解反応を触媒する一次代謝の重要な反応経路である。我々は過去の研究において、*Streptomyces griseus*の*gcvP*および*gcvTH*オペロンの上流領域に*Streptomyces*属放線菌で高度に保存された配列を見いだした。RNA塩基配列データベースRfamで検索したところ、これらの保存配列はグリシンリボスイッチに高い相同性を示したことから、*gcvP*および*gcvTH*の発現制御を担うリボスイッチ領域であると予想された。本研究では、これらの保存領域がGCV system構成遺伝子群の発現制御にどのような役割を果たしているか解析を行った。
【方法・結果】*gcvP* および *gcvTH* の転写開始点を高解像度 S1 nuclease mapping 法により決定したところ、ORF 上流の保存配列は *gcvP* および *gcvTH* の 5’-非翻訳領域に含まれることが判明した。グリシンリボスイッチはグリシンが直接結合することで下流遺伝子への転写の伸張を促進することが報告されているため、グリシンを培地に添加した条件で *gcvP* および *gcvTH* の ORF 領域の転写産物量を RT-PCR 法で解析したところ、グリシンを添加していない場合と比較して顕著な転写産物量の増加が見られた。*gcvTH* の 5’-UTR の上流に恒常的に転写が開始されるリボソーム RNA オペロンのプロモーターを、下流にネオマイシン耐性遺伝子 *aph*II の ORF を連結してレポーターアッセイ系を構築したところ、培地へのグリシンの添加によって *aph*II の転写産物量は 2.5 倍に上昇した。また、グリシンリボスイッチ領域の 3’-末端付近の 40 bp を欠失させた変異型コンストラクトでは、グリシンの添加の有無にかかわらず *aph*II の転写産物量が上昇していたことから、この領域に転写ターミネーターが存在し、グリシンが結合することでこのターミネーターの形成が阻害されることが強く示唆された。また、これら 5’-非翻訳領域の保存配列を鋳型として調製した RNA は *in vitro* でグリシンと直接結合した。したがって、これら 2 つの保存配列がグリシンリボスイッチとして機能し、グリシン存在下で GCV system 構成遺伝子群の転写を活性化していることが示された。2 つのグリシンリボスイッチのいずれか一方、または両方をゲノム上から欠失させた変異株を作製したところ、これらの株では予想通りグリシン存在下で欠失領域下流の遺伝子の転写産物量に変化は見られなかった。また、これらの変異株の増殖曲線を作製したところ、グルコースを炭素源とする最少培地では野生株と同様に生育した一方、グルコースに加えて終濃度 1%のグリシンを添加した培地では、野生株はグリシンを添加していない培地とほぼ同様の増殖が見られたのに対して、変異株はいずれもほとんど生育できなかった。以上の結果から、グリシンは *S. griseus* の生育を阻害すること、野生株は GCV system を利用してグリシンを分解していることが強く示唆された。2 つのグリシンリボスイッチは GCV system の発現を担っているため、グリシン存在下での *S. griseus* の生育に必須な制御領域であると考えられた。

riboswitch, glycine cleavage system, *Streptomyces griseus*

講演番号：2A13p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 13 会場

Streptomyce griseus の黄色色素生産を制御する機能未知タンパク質 *SGR1728* に関する解析
Analysis of *SGR1728* involved in the yellow pigment production in *Streptomyces griseus*
○平松 秀基[1]、手塚 武揚[2]、中村 一成[2]、志波 優[3]、吉川 博文[4]、大西 康夫[2] ([1]東大農・生命化学工学、[2]東大院農生科・応生工、[3]東農大・ゲノム解析セ、[4]東農大応生科・バイオ)
○Hideki HIRAMATSU[1], Takeaki TEZUKA[2], Kazunari NAKAMURA[2], Yu SHIWA[3], Hirofumi YOSHIAWA[4], Yasuo OHNISHI[2] ([1]Facul. Agric., Univ. Tokyo, [2]Grad. of Agric. and Life Science, Univ. Tokyo, [3]Genome Research Center, Tokyo Univ. of Agric., [4]Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】*Streptomyces griseus* は黄色色素グリキサゾンを生産するが、継代培養を重ねる中でグリキサゾンを過剰に生産する自然突然変異株（ADYP 株）が得られた。次世代シーケンサーを用いて ADYP 株のゲノムシーケンス解析を行ったところ、親株（野生株）と比較して 7 遺伝子にアミノ酸配列の変化を引き起こす変異点が発見された。このうち *SGR1728* 遺伝子上に生じていた 1 塩基挿入変異を野生型に戻したところ、過剰生産されていたグリキサゾンの生産量が顕著に低下し野生株と同レベルになったことから、ADYP 株で見られた表現型の変化は *SGR1728* 遺伝子に生じた変異が原因であることが強く示唆された [1)]。*SGR1728* 遺伝子産物は 3 回膜貫通型の膜タンパク質であると予想されているが、グリキサゾン生産にどのようにして関与しているかは未知である。そこで、本研究では遺伝子 *SGR1728* に関する解析を行った。　【方法・結果】野生株を親株として *SGR1728* 遺伝子のインフレーム欠失株を作製したところ、この破壊株はグリキサゾンを過剰生産することが確認された。*SGR1728* 遺伝子の相補によりグリキサゾン生産が野生株と同レベルに抑制されたことから、*SGR1728* 遺伝子の変異によりグリキサゾンの過剰生産が引き起こされることが明らかになった。*SGR1728* 破壊株ではストレプトマイシンの生産量に野生株との差異は見られなかった。RT-PCR による転写解析を行ったところ、SGR1728 遺伝子から微量の転写産物が検出され、転写単位はモノシストロンであった。*SGR1728* 遺伝子産物は *Streptomyces* 属放線菌において高度に保存されているが、N 末端側の約 50 残基の領域に配列の多様性が見られる。この領域が *SGR1728* 遺伝子産物の機能に重要であると予想し、この領域を欠損させた変異型遺伝子を *SGR1728* 破壊株に導入したところ野生型遺伝子と同様にグリキサゾン生産を抑制したことから、この領域は *SGR1728* 遺伝子産物の機能に必須ではないことが判明した。グリキサゾンは経路特異的転写活性化因子 GriR が生合成遺伝子群 *griCDEFG* 及び *griJIH* オペロンの転写を活性化することで生産が開始される。*SGR1728* 遺伝子がどの段階でグリキサゾンの生産に関与するか明らかにするため、野生株と *SGR1728* 破壊株で S1 マッピング法による転写解析を行ったところ、両株でほぼ同レベルの *griR* の転写が検出されたが、*griCDEFG* オペロンの転写量は *SGR1728* 破壊株において野生株より増加し、*griJIH* オペロンの転写は *SGR1728* 破壊株においてのみ検出された。これらのことから、*SGR1728* 遺伝子産物は *griR* の翻訳から *griCDEFG* 及び *griJIH* オペロンの転写活性化までのいずれかの段階を阻害することでグリキサゾンの生産を抑制していると考えられた。

1)　中村ら、日本農芸化学会 2013 年度大会要旨（講演番号:4B14a08）

secondary metabolism, regulation, transcription analaysis

講演番号：2A13p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ A 校舎 13 会場

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の二成分制御系レスポンスレギュレーターTcrA のターゲット遺伝子探索

Target genes of the global regulator TcrA involved in sporangium development in *Actinoplanes missouriensis*

○毛利 佳弘、手塚 武揚、大西 康夫（東大院農生科・応生工）
○Yoshihiro MOURI, Takeaki Tezuka, Yasuo Ohnishi (Tokyo Univ.)

【目的】希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は栄養豊富な環境下では基底菌糸を形成し、栄養飢餓状態に陥ると多数の運動性胞子を内包する胞子嚢を形成する。この胞子嚢は水および何らかのシグナルを感知すると開裂し、運動性胞子を放出する。放出された胞子は多数のべん毛を持ち、走化性を示す。我々はこれまでに、*A. missouriensis* べん毛遺伝子クラスターの近傍に存在する二成分制御系レスポンスレギュレーターTcrA をコードする遺伝子について解析を進めており、TcrA が胞子嚢内部における胞子の休眠・覚醒を制御していること、べん毛遺伝子クラスターの転写を活性化していることを示唆してきた [1)]。また、べん毛遺伝子クラスター中のある転写単位のプロモーター上流に TcrA が強く結合することを見出し、11 bp の繰り返し配列からなる結合配列を同定した [2)]。TcrA がゲノム全体でどのような遺伝子を制御しているのかを明らかにするため、TcrA のターゲット遺伝子の網羅的な探索を行った。

【方法・結果】*A. missouriensis* ゲノムの遺伝子間領域を対象とした *in silico* 解析により、34 個の遺伝子の上流に、上述した TcrA 結合配列と 80%以上の相同性がある配列を見出した。このうち 6 つをプローブとしてゲルシフトアッセイを行ったところ、3 つの遺伝子の上流領域で TcrA の結合が観察された。この 3 つの遺伝子の転写量を定量 RT-PCR により調べたところ、*tcrA* の欠損により転写が減少した遺伝子が 1 つ、増大した遺伝子が 2 つであった。また、胞子形成培地で 6 日間培養した野生株および *tcrA* 破壊株から RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。その結果、野生株と比較して *tcrA* 破壊株で 4 倍以上発現量が減少しているものが 262 遺伝子、8.5 倍以上発現量が増大しているものが 26 遺伝子有意に同定された（p-value < 0.05）。このことから、TcrA がグローバルに機能する転写制御因子であることが明らかになった。*tcrA* 破壊株で発現量が顕著に減少している遺伝子の中にはべん毛遺伝子クラスター内の遺伝子が多く含まれており、TcrA がべん毛遺伝子クラスターの転写を活性化するというこれまでの結果と矛盾しない。一方、上述した上流領域に TcrA の結合が確認された 3 つの遺伝子についても定量 RT-PCR の結果と同様の傾向の変化が RNA-seq 解析でも観察されたが、有意に変化が見られたのは 1 つ（*tcrA* 破壊株で発現量が減少していた遺伝子）だけであった。今後、TcrA に直接制御される遺伝子を決定するため、TcrA の ChIP-seq 解析を行う計画である。

1）日本農芸化学会 2010 年度大会講演要旨集 2ARa01
2）日本農芸化学会 2013 年度大会講演要旨集 2B13a11

Actinoplanes, response regulator, RNA-seq

講演番号：2A13p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ A 校舎 13 会場

Bacillus megaterium QM B1551 株の光誘導性カロテノイド生産機構の解明
Light-sensitive AdoB12-photoreceptor of *Bacillus megaterium* QM B1551
○見世 光、萩原 健太、平田 直哉、上田 賢志、高野 英晃（日大生資科・生命セ）
○Kou MISE, Kenta HAGIWARA, Naoya HIRATA, Kenji UEDA, Hideaki TAKANO (Nihon Univ.)

[目的]

LitR/CarH ファミリーはアデノシル B_{12}（$AdoB_{12}$）を光受容分子として利用する MerR 型転写調節タンパク質であり、グラム陽性・陰性を問わず広範なバクテリアゲノムに保存されている。LitR のリプレッサー機能は、光受容に伴って起こる $AdoB_{12}$ の光分解によって活性型から不活性型に変わり、標的遺伝子であるカロテノイド(*crt*)合成遺伝子の発現が誘導されることがグラム陰性細菌 *T. thermophilus* の LitR の解析により明らかになっている。我々は新たにグラム陽性細菌 *Bacillus megaterium* QM B1551 株の *litR* ホモログ(*BMQ_4356*)の遺伝生化学的な解析を行い、本菌においても光誘導性 Crt 生産の中心的な転写調節タンパク質であることを明らかにしてきた。本研究では、*In vitro* mRNA 合成系（*In vitro* ランオフ転写アッセイ）を用いて、*B. megaterium* の LitR が有する光依存的なリプレッサー機能の証明を目的とした。

[結果]

In vitro mRNA 合成系は、市販の大腸菌 RNA ポリメラーゼコア酵素(E)、*B. megaterium* 由来の組み換え蛋白質 σ^A、$AdoB_{12}$-LitR 複合体を用いて行った。RNA ポリメラーゼホロ酵素($E\sigma^A$)は単独で *litR* プロモーターと *crt* プロモーターからの mRNA を合成する活性を有していた。次に、$AdoB_{12}$-LitR のリプレッサー機能を調べるために、両プロモーターを鋳型として $E\sigma^A$ による転写が行われる条件下に $AdoB_{12}$-LitR を添加した。その結果、双方のプロモーターの転写は $AdoB_{12}$-LitR の添加によって顕著に抑制された。一方、明条件下における同アッセイでは $AdoB_{12}$-LitR による転写抑制は見られず、$E\sigma^A$ 単独と同様の転写が確認された。また、DNaseI フットプリント法で予想された LitR 結合コンセンサス配列に変異を導入した *litR* プロモーターを用いて同アッセイを行ったところ、$AdoB_{12}$-LitR による転写抑制は見られなかった。続いて、光の波長を調べたところ、$AdoB_{12}$-LitR による転写抑制は 660nm では見られたのに対して、365~530nm では正常な転写が確認された。これらの転写抑制が見られた波長は $AdoB_{12}$ の吸収波長とよく一致していた。以上の結果より、$AdoB_{12}$-LitR 複合体は光依存的なリプレッサーとして機能することが明らかとなった。また、*B. megaterium* の光応答制御系は、*T. thermophilus* に比べてシンプルであることが明らかになった。

Bacillus megaterium, LitR, Vitamin B12

講演番号：2A13p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ A 校舎 13 会場

グラム陰性細菌が有する新規な光応答転写調節タンパク質の探索とその解析

Exploration of a novel photo-responsive transcriptional regulator in Gram-negative bacteria.

○角 悟、上田 賢志、高野 英晃（日大生資科生命セ）
○Saotru SUMI, Kenji UEDA, Hideaki TAKANO (Nihon Univ.)

[目的]我々が放線菌において見出した LitR は、光アンテナ分子の役割をするビタミン B_{12}(VB_{12})との相互作用を介してカロテノイド生産の光誘導に直接関与する転写調節蛋白質である。LitR に類似の MerR 型転写調節蛋白質は、グラム陽性・陰性を問わず多様なバクテリアのゲノムに分布している。そのうち、多様な芳香族化合物を分解するグラム陰性細菌 *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株において BMULJ_05678 にコードされる遺伝子は、リガンド結合領域と予測される部位に VB_{12} 結合ドメインを有していない。このことは、本蛋白質が VB_{12} とは異なる光アンテナ分子を要求する可能性を示唆している。そこで本研究は、*B. multivorans* が保持する新たな光センシング機構の解明を目的とした。

[方法・結果] *B. multivorans* の野生株および BMULJ_05678 破壊株における明・暗条件下の転写レベルを半定量 RT-PCR を用いて解析した。野生株では、BMULJ_05678 とその周辺遺伝子(上流に 3 個、下流に 19 個の遺伝子)の転写レベルは暗条件下に比べて明条件下で顕著に高いことが明らかとなった。一方、BMULJ_05678 破壊株における上述の遺伝子の転写は明・暗条件下ともに高いレベルを示した。このことから、BMULJ_05678 産物は光依存的に自身と周辺遺伝子の転写を制御するリプレッサーとして働き、その転写抑制能は光依存的に解除されることが推測された。

次に、大腸菌を異種宿主として利用した BMULJ_05678 産物の機能解析を行った。すなわち、*B. multivorans* の長鎖ゲノム DNA 断片を含むコスミドクローンライブラリーを作製し、光誘導性遺伝子群を保持したコスミドベクター導入大腸菌株を選定し、その株を用いて上記と同様な転写解析を行った。その結果、*B. multivorans* 野生株と同様の結果が得られた。さらに、大腸菌を宿主とした BMULJ_05678 産物の組換え蛋白質を大量発現し、精製した。得られた BMULJ_05678 産物は、VB_{12} との相互作用を示さなかった。一方、その吸光スペクトルを測定したところ、350 nm 付近に極大吸収が観察された。これは、既知の光アンテナ分子には見られない特徴であり、新しいタイプのアンテナ分子が本蛋白質に配位していること、ならびにそれが大腸菌においても合成されている分子であることが予想される。

LitR, photo-sensing, Burkholderia multivorans

講演番号：2A13p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ A 校舎 13 会場

Corynebacterium glutamicum から見出した新規な光応答性転写調節タンパク質の解析
Analysis of a novel light-inducible transcriptional regulator in *Corynebacterium glutamicum*
松木 哲郎、伊藤 優佑、渡邉 恵利花、上田 賢志、○高野 英晃（日大生資科・生命セ）
Tetsurou MATSUKI, Yusuke ITOU, Erika WATANABE, Kenji UEDA, ○Hideaki TAKANO (Nihon Univ.)

【目的】MerR 型転写調節蛋白質 LitR/CarH ファミリーはビタミン B_{12} を光アンテナ分子として利用する新しいタイプの光センサーである。広範な一般細菌における LitR/CarH のホモログの分布は光センシング機能が光合成能力を有さない細菌群にも広く備わっていることを示唆している。そこで、我々が独自に進めた微生物の表現型に基づいたおよびゲノム情報を利用した探索により、アミノ酸生産菌 *C. glutamicum* のカロテノイド（Crt）生産が光によって顕著に促進されることを見出した。*C. glutamicum* が生産する主要な Crt は C_{50} テルペン Decaprenoxanthin とその配糖体であることが知られているが、その生産に対する光の影響は報告されていない。本研究は既知の光センサーを有さない *C. glutamicum* が示す Crt 生産の光誘導機構の解明を目的とした。
【結果】バクテリアにおける遺伝子の発現は隣接する転写調節蛋白質によって制御される場合が多いことから、*C. glutamicum* の *crt* 合成オペロンの上流領域にコードされている MarR(multiple antibiotic resistance regulator)型転写調節蛋白質 *NCgl1601* に着目した。本遺伝子の機能を調べるために作製した *NCgl1601* 破壊株は明・暗の両条件下において同程度の Crt 生産を示し、光依存的な Crt 生産能を失っていた。一方、野生型 *NCgl1601* が導入された破壊株は、野生株と同様に光依存的な Crt 生産を示した。セミ定量 RT-PCR 法により転写レベルを調べたところ、野生株における *crt* オペロンの転写は光によって顕著に促進された。一方、*NCgl1601* 破壊株においては明・暗の両条件下においてほぼ同程度の転写量であった。これら遺伝破壊実験および転写解析の結果より、NCgl1601 の機能は *crt* オペロンの発現を抑制するリプレッサーであり、その抑制機能が光によって解除されることで *crt* 発現の誘導が起こると予想された。そこで、大腸菌を宿主として発現させた組み換え蛋白質を用いたゲルシフトアッセイにより、NCgl1601 蛋白質の *crt* オペロンのプロモーター領域に対する結合を調べた。NCgl1601 蛋白質は *crt* プロモーターに対して特異的な結合を示したが、光依存的な DNA 結合活性は確認されなかった。このことから、光依存的な蛋白質活性にはリガンドとして働く未同定の光アンテナ分子が必要であると予想された。本研究において *C. glutamicum* より見出した *NCgl1601* のホモログは、類縁菌である *Arthrobacter* 属や *Mycobacterium* 属細菌ゲノムにおいても *crt* 合成オペロンに隣接してコードされていた。一部の放線菌における *NCgl1601* ホモログを含む *crt* クラスターの高い保存性は、NCgl1601 が光センサーとして機能することを強く示唆している。

Corynebacterium glutamicum, Photoreceptor, MarR

講演番号：2A13p22
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ A 校舎 13 会場

Cyanidioschyzon merolae の光応答転写制御における二成分制御系の役割
Role of the two-component system for light-dependent transcriptional regulation in *Cyanidioschyzon merolae*

○安藤 洸幸[1]、小倉 駿佑[1]、佐藤 大地[1]、藤井 岳[2]、今村 壮輔[2]、田中 寛[2]、五十嵐 雅之[3]、内海 龍太郎[4]、華岡 光正[1]（[1]千葉大院園芸、[2]東工大資源研、[3]微化研、[4]近畿大農）
○Hiroyuki ANDO[1], Syunsuke OGURA[1], Daichi SATOH[1], Gaku FUJII[2], Sousuke IMAMURA[2], Kan TANAKA[2], Masayuki IGARASHI[3], Ryutaro UTSUMI[4], Mitsumasa HANAOKA[1] ([1]Chiba Univ., [2]Tokyo Inst. Tech., [3]Inst. Microbial Chem., [4]Kinki Univ.)

【背景と目的】光合成微生物の一種である単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae*（シゾン）は、高温・強酸性という極限環境下でも生育できる利点を持つことから、バイオ燃料生産など応用面での利用も注目されつつある。シゾンは、その生存が光合成に完全に依存する光独立栄養生物であることから、光に対する応答機構は極めて重要であると考えられるが、その詳細については未だ不明な点が多い。これまでのゲノム解析や細胞構造に関する研究から、シゾンには多くの原始的な特徴が残されていることが示されてきた。光環境の認識に関わる光受容体についても同様で、シゾンには一般的な植物が持っているフィトクロムなどの典型的な光受容体が存在しない一方で、葉緑体の起源となったシアノバクテリアの光センサーであるヒスチジンキナーゼ型の光受容体（CmHIK）が今なお残されており、葉緑体ゲノムにコードされたレスポンスレギュレーターYcf27 と共に二成分制御系を構成している。我々はこれまでに、この二成分制御系が光に自律応答した葉緑体遺伝子の転写制御に関与することを示してきたが、CmHIK の光環境応答における役割の全体像は明らかとなっていない。そこで本研究では、CmHIK による光応答機構、遺伝子発現制御機構の詳細をさらに解明することを目的として、CmHIK の光受容体としての機能解析と CmHIK を介した光シグナル伝達、特にプラスチドシグナルを介した光による核遺伝子の転写調節システムの解析を行った。
【方法と結果】CmHIK タンパク質の N 末端側領域には、植物やシアノバクテリアの光受容体に広く見られる GAF ドメインが保存されている。そのため、一般的な光受容体と同様に、このドメインにビリン型の発色団が結合することで光を認識していると予想された。そこで、シゾンと類似した色素組成を持つシアノバクテリアの系を用いて、CmHIK の GAF ドメインのみを発現・精製したところ、少なくともビリン型の発色団は結合していないことが示された。現在 CmHIK 全長を発現するシゾン形質転換株を用いて同様に検討を進めている。一方で、CmHIK は暗条件下で活性化され、葉緑体の光合成遺伝子の *psbA* と *psbD* の転写を抑制することが示されている。葉緑体に存在する HIK が光に依存した核遺伝子の転写制御にも関わっているかを検討するため、ヒスチジンキナーゼ阻害剤である Signermycin B を暗条件下で加えて CmHIK を不活性化させた際の葉緑体および核遺伝子の発現変化を調べた。その結果、上述の葉緑体遺伝子だけでなく、核遺伝子である *CMK296C* の転写も暗条件にも関わらず誘導された。このことから、CmHIK が葉緑体で受容した光情報により、未知のプラスチドシグナル伝達機構を介して核遺伝子の発現をもコントロールしている可能性が示唆された。

Two-component system, Transcriptional regulation, Light response

講演番号：2A14a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ A 校舎 14 会場

Streptomyces blastmyceticus 由来 indole prenyltransferase (TcnD) の機能解析

Characterization of indole prenyltransferase (TcnD) from *Streptomyces blastmyceticus*

○多田 智美、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司 (阪府大院・生環科)
○Tomomi TADA, Shuji TANI, Jun-ichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI (Osaka Pref Univ)

［背景・目的］放線菌 *S. blastmyceticus* はインドールアルカロイドの一種である (－)-indolactam V (IL-V) と、IL-V のインドール環 6, 7 位に多彩なモノテルペン鎖を持つ teleocidin 類縁体を産生する。当研究室においてクローニングされた本菌の teleocidin 生合成遺伝子群の中に、IL-V にモノテルペン鎖を付加すると考えられる prenyltransferase (PT) をコードすると推定される遺伝子 *tcnD* が存在している。PT は炭素数 5 のイソプレン単位から構成されるプレニル基の転移反応を触媒する。既知の PT の中でも芳香族化合物にプレニル基を付加する芳香族 PT は二次代謝産物生合成にみられ、植物、カビ、放線菌において知られている。プレニル基修飾を受けた二次代謝産物は様々な生理活性を有するものも多く、プレニル化することで前駆体への生理活性の付与または増強が見込まれる。この TcnD は既知の芳香族 PT とアミノ酸配列相同性が低く、ユニークな基質特異性を有していることが予想され、プレニル化化合物合成ツールとしての応用が期待される。また TcnD のように炭素数 10 のプレニル基を転移するものは報告が少ない。そこで、本研究では TcnD を大腸菌において発現させ、その発現産物の基質特異性を調べることを目的とした。

［方法・結果］*tcnD* を His-tag 融合タンパクとして大腸菌で発現させることを試みた。その際、使用するプロモーターと宿主の組合せ、His-tag を付加する位置や培養温度を変えて、TcnD が可溶性タンパクとして生産される条件を検討した。その結果、どの組合せにおいても発現産物の多くは不溶性タンパクとして発現していたが、*trc* プロモーター制御下に N 末端側に His-tag が付加されるよう構築した発現プラスミドを用いて *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3)-RP 株を形質転換し、20℃ で培養することで、最も可溶性タンパクとして発現される割合が高いことが分かった。電気泳動的に均一に精製した TcnD を用いて基質と考えられる IL-V と geranyl pyrophosphate 存在下で反応させ、TLC を用いて反応生成物を解析したところ、IL-V にゲラニル基が付加した反応生成物と考えられるスポットが検出された。現在、TcnD の諸性質を検討している。

Prenyltransferase, *Streptomyces*, Teleocidin

講演番号：2A14a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ A 校舎 14 会場

Analysis of RevU interaction to carboline compounds

○ Suresh PANTHEE[1], Shunji TAKAHASHI[1,2], Teruo HAYASHI[2], Takeshi SHIMIZU[2], Jun ISHIKAWA[3], Seiji MATSUOKA[4], Tetsuo ONUKI[4], Hiroyuki OSADA[1,2] ([1]RIKEN CSRS, Chemical Biology, [2]RIKEN, Antibiotics Lab., [3]Nat. Inst. Inf. Dis., [4]RIKEN CSRS, SCEUD2P)

Objective: Production of secondary metabolites (SMs) from *Streptomyces* can be induced by various signaling molecules that are produced by the strain on which it shows activity and not produced by themselves. The former group are categorized as autoregulators and we define the latter group as biomediators, molecules that can regulate SMs when added externally to broth. We have found that reveromycins (RMs) produced by *Streptomyces reveromyceticus* were induced by a beta carboline compound NPD2639. As a result of deep structure activity relationships study, we designed a better synthetic signal, referred to as **B**iomediator that induces **R**everomycin-**1** (BR-1). BR-1 induced the expression of RM biosynthetic gene cluster and bound to RevU, a Large ATP binding Regulators of the LuxR (LAL) family regulator. In this research, we determined the affinity constants of biomediators against RevU using surface plasmon resonance.

Methods and Results: Histidine tagged RevU in buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH7.5) and 500 mM NaCl was immobilized to NTA sensor chips in a Biacore T200. Various concentrations of BR-1 were applied to reveal a weak interaction between BR-1 and RevU. Equilibrium affinity constant (K_D) was used to quantify biomediator-RevU interactions. It was found that the K_D had a correlation with the amount of RMs induced after biomediator treatment. BR-1 showed a K_D of 1.34 μM which is a concentration comparable with the lowest effective concentration of 0.35 μM required to show its biomediator activity. On the other hand, a tetrahydro derivative of BR-1, which did not enhance the production of RMs, did not bind to RevU in concentration up to 87 μM.

This work was supported in part by the Program for Promotion of Basic and Applied Researches for Innovations in Bio-oriented Industry.

biomediator, *Streptomyces*, secondary metabolism

講演番号：2A14a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ A 校舎 14 会場

Verticilactam 遺伝子クラスターに存在する生合成遺伝子群の機能解析

Functional analysis of biosynthetic genes involved in verticilactam gene cluster

○寺井 淳高[1,2]、高橋 俊二[3]、野川 俊彦[3]、橋本 絢子[4]、新家 一男[5]、池田 治生[6]、川崎 寿[2]、長田 裕之[1,3] ([1]理研・抗生物質、[2]東電大院工、[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[4]バイオ産業情報化コンソーシアム、[5]産業技術総合研究所、[6]北里大生命研)
○Atsutaka TERAI[1,2], Shunji TAKAHASHI[3], Toshihiko NOGAWA[3], Junko HASHIMOTO[4], Kazuo SHIN-YA[5], Haruo IKEDA[6], Hisashi KAWASAKI[2], Hiroyuki OSADA[1,3] ([1]RIKEN, Antibiotics Lab., [2]Tokyo Denki Univ., [3]RIKEN CSRS, Chemical Biology, [4]JBIC, [5]AIST, [6]Kitasato Univ.)

【目的】

独自に構築した Natural Products Plot (NPPlot) データベースを駆使することにより新規二次代謝産物の効率的な取得を進めている。この手法により放線菌 *Streptomyces spiroverticillatus* JC-8444 から β-keto-amide を含む 16 員環マクロラクタム骨格を有する新規ポリケチド化合物 verticilactam (VL) を見出した [1)]。しかしながら、本菌株から生物活性評価を行うために十分量の VL を取得することは困難であるため、本研究では、異種発現による VL 生産性の改善及び生合成機構の解明を目的とした。

【方法・結果および考察】

第一に *S. spiroverticillatus* JC-8444 より BAC ベクターを構築し、vicenistatin のスターターユニットの生合成遺伝子群 [2)]と相同性の高い遺伝子群および、10 モジュール 49 ドメインから構成されるポリケチド合成酵素 (PKS)を含むクローンを取得した。次に、主要な生合成遺伝子群を欠損し生合成前駆体供給が最適化された SUKA17 株 [3)]に導入を行った。BAC クローンを大腸菌 GM2929 に導入し、非メチル化ベクターを調製した後に、プロトプラスト法により SUKA17 株に導入した。得られた形質転換株を様々な培地で培養、酢酸エチル抽出後に LC/MS 解析を行ったところ、VL 生産を確認した。さらに、生合成遺伝子クラスター近傍に存在する転写制御因子(*SSP_1550*)の恒常発現により 3-4 倍の生産性改善に成功した。また、フラン環形成機構を明らかにするために、λ-Red 法を用いて P450 遺伝子(*SSP_1543*)の破壊を行った。

【文献】

1) Nogawa T. *et al*, *Org. Lett.* 12, 4564-4567 (2010)
2) Shinohara Y. *et al*. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 18134–18137 (2011)
3) Komatsu M. *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 2646–2651 (2010)

heterologous expression, biosynthetic gene cluster, secondary metabolite

講演番号：2A14a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ A 校舎 14 会場

放線菌における線状プラスミドを用いた二次代謝産物生合成遺伝子群の接合伝達

Introduction of gene cluster for secondary metabolite biosynthesis using liner plasmid by interspecific mating in Streptomycetes

○小松 護[1]、小曽根 郁子[2]、橋本 絢子[2]、新家 一男[3]、池田 治生[1]([1]北里大・北里生命研、[2]JBIC、[3]産総研)

○Mamoru KOMATSU[1], Ikuko KOZONE[2], Junko HASHIMOTO[2], Kazuo SHINYA[3], Haruo IKEDA[1] ([1]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato Univ., [2]JBIC, [3]AIST)

我々はこれまで、avermectin の工業生産菌である放線菌 *Streptomyces avermitilis* の大規模欠失体（SUKA）を宿主とした異種微生物由来の二次代謝産物生産について報告してきた[1-2]。I 型ポリケチド合成酵素や非リボソーム型ペプチド合成酵素によって骨格を生成するラクトン型ポリケチドやペプチド化合物の生合成遺伝子群は 100 kb にもおよび、そのような化合物の異種生産を達成するためには宿主に対する効率的な遺伝子導入方法が必須であり、かつそれが安定的に保持されることが重要である。我々は前年度大会において、*S. avermitilis* 由来の接合伝達性線状プラスミド(SAP1)を運び屋として、二次代謝産物生合成遺伝子群を *S. avermitilis* SUKA 株に導入する方法について報告した。*S. avermitilis* や *S. coelicolor* A3(2)などの放線菌は一般的に大腸菌で調製した DNA(Dam Dcm による修飾された)を制限する。一方、*S. lividans* 1326 株は一般の *Streptomyces* の菌株と比べ Dam Dcm で修飾された DNA の制限は低いため、通常の大腸菌で調製した 100 kb 以上の BAC クローンによって形質転換することが可能である。我々は、アクチノファージφC31 のアタッチメントサイト(*attB*)を導入した SAP1 を構築し、*S. lividans* へ導入した。*int-attP* を保持する BAC クローンを形質転換法により導入し、部位特異的組換えにより SAP1 上へ組込んだ後、得られた *S. lividans* 形質転換体を供与菌として *S. avermitilis* SUKA 株へ接合伝達させることに成功した。本発表では、更に 5 種のアクチノファージ由来の *attB* を導入した SAP1 ベクターを新たに構築したので報告する。

S. avermitilis ならびに *S. venezuelae* 由来の 5 種のアクチノファージ(φC31、R4、TG1、φK38-1、φBT1)の *attB* をタンデムに連結した人工 DNA を合成した後、viomycin 耐性遺伝子(*vph*)と連結し、相同的組換えによりそれぞれ SAP1 上へ導入した。*S. lividans* の染色体上から内在性の *attB* を全て欠失した変異株を作製した後、構築した SAP1 ベクターを導入した。各アクチノファージ由来の部位特異的組込み型プラスミドを導入した結果、得られた *S. lividans* の形質転換体において、SAP1 上に導入した各 *attB* サイトにそれらプラスミドが部位特異的に組込まれたことが確認できた。I 型ポリケチド合成酵素遺伝子を含む二次代謝産物生合成遺伝子群を保持する 100 kb～200 kb の数種の BAC クローンにおいても、SAP1 上の *attB* に部位特異的に導入することができた。得られた *S. lividans* 形質転換体を供与菌として、*S. avermitilis* SUKA 株へ接合伝達した結果、接合体からは BAC クローンが導入された SAP1 を検出した。また、これらの接合体からは、良好な二次代謝産物の生産を観察することができた。

1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**:2646-2651 (2010).
2. *ACS Synthetic Biology*. **2**:384-396 (2013)

liner plasmid, secondary metabolism, Streptomyces

講演番号：2A14a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ A 校舎 14 会場

リンコマイシンによる *Streptomyces* 属放線菌の潜在的抗生物質生産能の活性化

Activation of the potential to produce antibiotics in *Streptomyces* spp. by exposure to subinhibitory concentrations of lincomycin

○今井 優[1]、佐藤 誠造[2]、田中 幸徳[3]、越智 幸三[3]、保坂 毅[1]([1]信州大院・総合工、[2]日本水産・中研、[3]広工大・生命)
○Yu IMAI[1], Seizo SATO[2], Yukinori TANAKA[3], Kozo OCHI[3], Takeshi HOSAKA[1] ([1]Interdisc. Grad. Sch. Sci. and Technol. Shinshu Univ., [2]Nippon Suisan Kaisha, Ltd., [3]Fac. Life Sci. Hiroshima Inst. Technol.)

【背景】

枯草菌や大腸菌では，亜致死濃度のリボソーム攻撃性抗生物質（クロラムフェニコールやピューロマイシンなど）の存在下で，リボソームタンパク質やアミノ酸代謝などに関わる遺伝子の発現が変化する。今回我々は，放線菌においても同じような現象が起こることを明らかにした。具体的には，*Streptomyces* 属放線菌を最小生育阻止濃度（MIC）以下のリンコマイシン（LIN）に曝すと，二次代謝産物生合成遺伝子の発現が上昇し，抗生物質の生産量が劇的に増加することを見出した。本発表では，その成果を報告する。

【結果・考察】

供試菌として，放線菌基準株 *Streptomyces coelicolor* A3(2) とその近縁種である *Streptomyces lividans* の 2 菌株を使用した。

S. coelicolor A3(2) を MIC（20 μg/ml）の 1/2 量の LIN を含む MR5 液体培地で培養したところ，非添加時の約 20 倍まで青色抗生物質アクチノロージン（ACT）の生産量が上昇した。LIN 添加による ACT 生産性の向上は，*S. lividans* においても確認できた。一方，*S. lividans* は，MIC（40 μg/ml）の 1/8～1/2 量の LIN を含む MR5 寒天培地で培養すると，非添加時では認められない抗菌物質を著量生産した。質量分析と抗菌活性試験により，それら抗菌物質のいくつかは calcium-dependent antibiotics（CDA）の類縁体であることも明らかになった。

今回の検討で，MIC 以下の LIN には，*S. coelicolor* A3(2) と *S. lividans* の潜在的な抗生物質生産力を引き出す作用があることを証明できた。この現象の仕組みを解析するために，先ず，LIN 存在下での *S. coelicolor* A3(2) における抗生物質生合成遺伝子の発現変化を調べた。その結果，予想どおりに経路特異的調節遺伝子 *act*II-ORF4 が LIN 存在下で高発現することを確認できた。加えて，興味深いことに，LIN 添加により ACT 生産の増加が起こる条件下では，定常期における *S. coelicolor* A3(2) の乾燥菌体重量が増加することも見出した。この現象は，LIN による抗生物質生産活性化機構を解明するうえでの重要な鍵であると考え，現在，その課題達成に向けて生化学・分子生物学的な面から種々の解析を行っている。

antibiotic production, lincomycin, *Streptomyces*

講演番号：2A14a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ A 校舎 14 会場

複合培養において死細胞は放線菌の二次代謝を誘導しない

Dead cells do not induce *Streptomyces* secondary metabolism in combined culture

○浅水 俊平、尾崎 太郎、尾仲 宏康（東大院農）
○Shumpei ASAMIZU, Taro OZAKI, Hiroyasu ONAKA (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】我々は、潜在的な二次代謝経路活性化法である複合培養法、ミコール酸を細胞壁成分に含む細菌と放線菌を共培養することにより二次代謝産物の誘導生産を行う培養法に注目している。（Onaka H. *et al.,* AEM, 77(2): 400-406, 2011）複合培養法を用いることにより純粋培養では生産しない新規生物活性物質、アルキベマイシン及び 5-alkyl-THQ の発見に成功している。複合培養での二次代謝活性化は、自然生育環境の一部分を実験室に模倣することで、放線菌に本来備わっている環境シグナルへの応答機構が発揮されたが故と考えられるが、その機構は全くわかっていない。本発表では誘導する側のミコール酸含有細菌が、細胞の見かけ上の形態を保ちながら生理機能を停止した状態の死細胞であった場合、放線菌に対する二次代謝誘導が起こるのかどうかを検討することによって、複合培養時の誘導機構について形態学的な解析を行ったので報告する。

【方法・結果】これまでに、*Corynebacterieae* 亜目に属する多くのミコール酸含有細菌が *Streptomyces lividans* TK23 の色素性抗生物質、undecylprodigiosin 及び actinorhodin の生産を誘導することが明らかになっている。この誘導現象は、ミコール酸含有細菌を培養した、培養上清ろ過液、ブタノール抽出物、オートクレーブ処理液では起こらず、同様に二層式フラスコを用いて、透析膜（MWCO8000）もしくはセルロース混合エステル膜（0.1 μm）によって、両培養液を遮断しても起こらない。更にミコール酸そのものや *Corynebacterium glutamicum* のミコール酸欠損変異株でも起こらない。以上のことから、本現象は特異的な低分子化合物の介在によるものではなく、ミコール酸含有細菌と放線菌が接触により相互作用する環境が必要であることが示唆されていた。今回我々は、ホルムアルデヒドを用いて、ミコール酸含有細菌（*Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 など）の細胞の見かけ上の形態が保たれている状態の死細胞を調整し複合培養を行った。その結果、死細胞は *S. lividans* TK23 の色素生産を寒天培地上では誘導しないこと、死細胞を添加した液体培地においても *S. lividans* TK23 の色素生産は誘導されないことを定量的に示した。以上のことから、放線菌の二次代謝活性化はミコール酸含有細菌の細胞表層形態を認識することにより起こる現象ではなく、ミコール酸含有細菌の生体反応を接触によって直接感知し、その応答によって起こることが示唆された。

Streptomyces, secondary metabolism, combined culture

講演番号：2A14a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ A 校舎 14 会場

放線菌の複合培養法による新規テトラヒドロキノリン類の単離とその生合成

Studies on new tetrahydroquinolines identified from a combined culture of actinomycete strain

○尾崎 太郎[1]、森 夕希子[2]、杉山 龍介[3]、西村 慎一[3]、浅水 俊平[1]、掛谷 秀昭[3]、尾仲 宏康[1]([1]東大院農、[2]富山県大工、[3]京大院薬)
○ Taro OZAKI[1], Yukiko MORI[2], Ryosuke SUGIYAMA[3], Shinichi NISHIMURA[3], Shumpei ASAMIZU[1], Hideaki KAKEYA[3], Hiroyasu ONAKA[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Toyama Pref. Univ., [3]Kyoto Univ.)

【目的】近年のゲノム解析の進展により、多くの放線菌ゲノムが解読されてきた。結果として多くの放線菌がそのゲノム上に数十もの二次代謝産物生合成遺伝子群を有することが明らかにされたが、一方でその多くは実験室における培養条件では生産が見られない休眠遺伝子であり、生産物の同定には至っていないのが現状である。それら休眠遺伝子の中には新規化合物の生合成に関与するものが数多く存在すると期待されるため、その活性化手法が近年注目を集めている。我々は、放線菌において休眠遺伝子を覚醒させる手法としてミコール酸含有細菌との複合培養法を開発し、これまでに報告してきた（尾仲ら、2013 年農芸化学会大会)。分裂酵母の脂質認識化合物の単離を目的として放線菌の複合培養サンプルからスクリーニングを行ったので、本大会ではその結果について発表する。また、その生合成遺伝子の同定にも至ったため、合わせて報告する。
【方法と結果】分裂酵母変異株を用いて、脂質認識化合物のスクリーニングを行ったところ、目的の活性を *Streptomyces* sp. HEK616 株とミコール酸含有細菌である *Tsukamurella pulmonis* の複合培養液抽出物に見出すことができた。そこで、培養液から濾取した菌体を有機溶媒で抽出後、活性成分を精製し、淡黄色の油状物質を得た。構造解析の結果、本化合物が 1, 2, 3, 4-テトラヒドロキノリンとアルキル鎖からなる新規骨格を有することが明らかとなった。この 5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (5aTHQ) のアルキル鎖長には多様性があり、様々な鎖長の化合物が生産されるため、その生合成機構に興味が持たれた。また、本化合物は HEK616 株の純粋培養液からは検出されず、複合培養時に初めて検出される化合物であるため、その生産調節機構の解明は放線菌二次代謝産物生産の活性化に重要な知見を与えると期待される。5aTHQ の構造をもとに HEK616 株の 5aTHQ 生合成遺伝子をドラフトゲノム情報から探索したところ、ポリケチド合成酵素やアミノ基転移酵素などをコードする 9 つの ORF から構成される全長約 11 kb の推定生合成遺伝子クラスターを見出すことができた。その機能を評価するため、本遺伝子クラスターをクローニングし、異種放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 に導入した。形質転換体が 5aTHQ 類を生産したことから、本遺伝子クラスターが目的の生合成遺伝子群であることが確かめられた。

combined culture, Streptomyces, biosynthesis

講演番号：2A14a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ A 校舎 14 会場

代謝改変シアノバクテリアを用いたリモネンの光合成的生産

Photosynthetic production of limonene by metabolic engineering of cyanobacteria

○清田 浩史[1,2]、奥田 由紀子[3]、伊藤 美千穂[4]、平井 優美[2]、池内 昌彦[1,3,5]（[1]東大院理、[2]理研 CSRS、[3]東大院総合文化、[4]京大院薬、[5]CREST）
○Hiroshi KIYOTA[1,2], Yukiko OKUDA[3], Michiho ITO[4], Masami HIRAI[2], Masahiko IKEUCHI[1,3,5]
([1]Sci., Univ. Tokyo, [2]RIKEN CSRS, [3]Arts and Sci., Univ. Tokyo, [4]Kyoto Univ., [5]CREST)

イソプレノイドは二次代謝産物の主要なグループの 1 つであり、炭素数 5 のイソプレンが複数連なった構造を持つ。多様な物性、用途を持ち、香料・医薬品原料・色素・燃料・材料として工業的に幅広く使われている。私たちは生育の速いシアノバクテリアを用いて、光合成による二酸化炭素からの直接的イソプレノイド生産について研究している。そのモデルとして植物のリモネン合成酵素遺伝子をゲノム中に導入した *Synechocystis* sp. PCC 6803 を作製し（図 1）、ガスストリッピング法を用いた回収系を構築し、リモネンの連続的な生産を確認している（図 2）。今回、この株を元に、リモネンシンターゼの基質であるゲラニルピロリン酸を供給する内在非メバロン酸経路の発現強化株や外来メバロン酸経路導入株を作製したところ、生産速度が約 1.5 倍に向上した。上流経路の強化のみによっては劇的な生産増が起こらなかったので、リモネン合成酵素の基質供給の強化だけでなく、ゲノム中に複数コピーを導入することでのリモネン合成酵素自身の発現強化も試みている。また、栄養や光などの培養条件についても検討した。これらを通じて、シアノバクテリアにおけるイソプレノイド生合成の律速段階について議論したい。

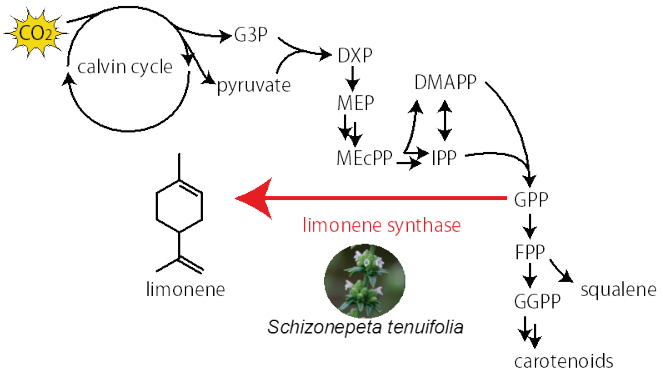


図 1. リモネン生合成経路
G3P: glyceraldehyde-3-phosphate DXP: 1-deoxyxylulose-5-phosphate MEP: methylerythritol-4-phosphate MEcPP: 2-methylerythritol 2,4-cyclodiphosphate IPP:isopentenyl pyrophosphate DMAPP: dimethylallyl pyrophosphate GPP:geranyl pyrophosphate FPP: farnesyl pyrophosphate GGPP: geranylgeranyl pyrophosphate

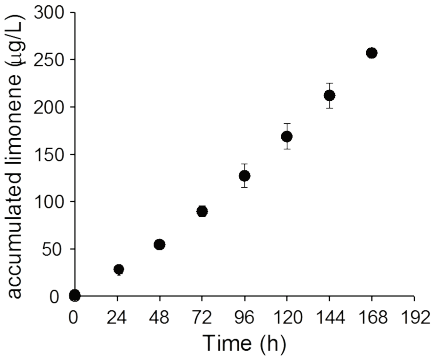


図 2. リモネンの生産

metabolic engineering, cyanobacteria, isoprenoid

講演番号：2A14a17
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ A 校舎 14 会場

シアノバクテリアにおけるイソプレノイド生産を目指した DXS 過剰発現および炭素 局在解析
Prerequisite for highly efficient isoprenoid production by cyanobacteria discovered through the over-expression of DXS and carbon allocation analysis
○工藤 海[1]、河野 祐介[1,2]、堀田 真吾[1]、関根 翠[1]、渡邉 敬文[1]、伊原 正喜[1,3] ([1]信州大学農、[2]奈良先端大、[3]さきがけ)
○Kai Kudoh[1], Yusuke Kawano[1,2], Shingo Hotta[1], Midori Sekine[1], Takafumi Watanabe[1], Masaki Ihara[1,3] ([1]Shinshu Univ., [2]NAIST, [3]JST)

＜背景＞シアノバクテリアは酸素発生型光合成を行う唯一の細菌群であり、光合成利用物質生産ホストとして近年注目を浴びている。今回我々は、同菌体における生産物質としてイソプレノイドに焦点を当てた。イソプレノイドはイソプレンを構成単位とした化合物群であり、生理活性物質、エネルギー物質など様々な有用物質が存在している。しかし、これらイソプレノイドは天然での存在量が少なく、合成も困難であるため、遺伝子工学による生合成向上が求められている。生合成においてすべてのイソプレノイドはイソペンテニル二リン酸（IPP）とジメチルアリル二リン酸（DMAPP）を原料として生産される。そして、この IPP と DMAPP はシアノバクテリアにおいて非メバロン酸経路（MEP 経路）によって生産される。よって、イソプレノイド生合成増加にはこの経路の強化が不可欠である。しかし、大腸菌において MEP 経路の律速段階である 1-デオキシキシルロース-5-リン酸合成酵素（DXS）の過剰発現が試みられたが、イソプレノイド収量の増加はわずか 2 倍程度であることが報告されている。その原因として、MEP 経路の出発物質であるグリセルアルデヒド 3 リン酸（G3P）及びピルビン酸の多くが糖や脂肪酸合成などに消費されていることが考えられるが、その詳細は明らかにされていない。
＜目的＞ 本研究では、太陽光エネルギーを利用したイソプレノイド生産を目的とし、シアノバクテリア内に人工的な高効率合成系の構築を目指している。そこでまず、シアノバクテリにおいても DXS 過剰発現を行い、イソプレノイド合成量並びに、その他代謝物質、細胞形態の変化を調査することで、細胞内における炭素の流れを明らかにし、今後の代謝改変の設計指針を得ることとした。
＜結果＞作製した過剰発現株の DXS 発現量は、野生型と比較して、mRNA レベルにおいて最大約 4 倍、蛋白質レベルにおいて最大約 1.5 倍であることが明らかとなった。イソプレノイド増加の指標であるカロテノイド類の約 1.5 倍の増加を確認した。また、成分分析の結果、炭素は糖および蛋白質に特に多く局在していることが判明し、それぞれカロテノイドの 26 倍および 35 倍であった。また、糖の主成分は細胞壁などの不溶性糖であり、蛋白質の主成分はフィコビリ蛋白質であることが判明した。
＜結論＞今回の測定結果から、シアノバクテリアにおける DXS 過剰発現はイソプレノイドを増加させることが判明した。しかし、炭素は主に細胞壁やフィコビリ蛋白質に多く存在しており、更なるイソプレノイド生産増加にはこれら細胞構成物への炭素供給を制限する必要があるという結論に至った。

cyanobacteria, isoprenoid, mep pathway

講演番号：2A14p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 14 会場

多成分バクテリオシンの分泌を担うトランスポーターの基質認識機構の解明

Elucidation of the recognition mechanism of a transporter for multiple bacteriocins

○須志田 浩稔[1]、石橋 直樹[1]、善藤 威史[1]、中山 二郎[1]、園元 謙二[1,2] ([1]九大院・農、[2]九大・バイオアーク)
○ Hirotoshi SUSHIDA[1], Naoki ISHIBASHI[1], Takeshi ZENDO[1], Jiro NAKAYAMA[1], Kenji SONOMOTO[1,2] ([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Bio-Arch, Kyushu Univ.)

【目的】バクテリオシンは、細菌により生産される抗菌性ペプチドであり、中でも乳酸菌が生産するバクテリオシンは、低濃度で抗菌活性を示し、低 pH や熱に安定であるといった優れた特性を有することから、バイオプリザベーションへの応用が期待されている。タイの発酵魚から単離された乳酸菌、*Enterococcus faecium* NKR-5-3（NKR-5-3 株）は、enterocin NKR-5-3A、B、C、D、Z（Ent53A、B、C、D、Z）という 5 種のバクテリオシンを生産する[1)]。Ent53B を除く 4 種の生合成に関与する遺伝子はクラスターを形成し、本クラスターに唯一存在する ABC トランスポーター遺伝子（*ent53T*）は、それら 4 種（Ent53A、C、D、Z）の分泌を担うと考えられている。また、多くのバクテリオシンは菌体外分泌の際に N 末端のリーダーペプチドが切断されて活性型のバクテリオシンとなることから、リーダーペプチドはトランスポーターによる基質認識機構に重要と考えられている。一般にバクテリオシンの分泌には、それぞれに専用のトランスポーターが必要で、Ent53T のように種々のバクテリオシンを同時に分泌するものはきわめて珍しく、基質認識などの詳細な分泌機構に興味が持たれる。本研究では、Ent53T の分泌機構の解明を目標とし、特にリーダーペプチドが分泌に及ぼす影響について検討した。
【方法・結果】*Lactococcus lactis* NZ9000 株を宿主として *ent53C*、*ent53T* 及び Ent53C の自己耐性遺伝子である $ent53I_C$ を導入した Ent53C 発現株を構築し、Ent53C 前駆体の 18 残基からなるリーダーペプチドを点変異させ、Ent53T による分泌能を Ent53C の抗菌活性試験により定量的に評価した。その結果、リーダーペプチドの切断部位から数えて 13 残基目のリジン、あるいは 14 残基目のグルタミン酸をアラニンに置換した場合に Ent53C の分泌量が顕著に減少した。次に、リーダーペプチドの N 末端側から、開始メチオニンを除いた 3、6、9、10 残基を欠損した変異株では、Ent53C の分泌は確認されたものの、欠損残基数が増加するにつれて Ent53C の分泌量が減少した。一方で、12 及び 15 残基までを欠損させた場合では Ent53C の分泌は観察されなかった。また、Ent53C 前駆体のリーダーペプチドを、Ent53T により分泌される他 3 種のバクテリオシン（Ent53A、D、Z)、及び他の菌株によって生産される全く構造の異なる 6 種のバクテリオシンの各リーダーペプチドに交換したところ、すべての変異株において Ent53C の分泌が確認された。以上の結果から、Ent53T は、リーダーペプチドの配列や長さに対して非常に寛容な基質認識機構を有することが明らかとなり、この特性によって、NKR-5-3 株は構造の異なる種々のバクテリオシンを分泌することが可能であると推察された。

1) Ishibashi et al., 2012, Biosci. Biotechnol. Biochem.

bacteriocin, transporter, leader peptide

講演番号：2A14p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 14 会場

Lactobacillus salivarius AC21 の 2 分子ペプチドバクテリオシン salivacin K21 の異種発現と機能解析

Heterologous expression and functional analysis of a two-peptide bacteriocin, salivacin K21 produced by *Lactobacillus salivarius* AC21

○梶原 春香[1]、Nitisinprasert Sunee[2]、善藤 威史[3]、中山 二郎[3]、園元 謙二[3]、松崎 弘美[4] ([1]熊本県大院環境共生、[2]カセサート大学、[3]九大院農、[4]熊本県大環境共生)
○Haruka Kajiwara[1], Sunee Nitisinprasert[2], Takeshi Zendo[3], Jiro Nakayama[3], Kenji Sonomoto[3], Hiromi Matsusaki[4] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto., [2]Fac. Agro-Industry., Kasetsart Univ., [3]Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ., [4]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto.)

【目的】鶏腸管から分離した耐熱性乳酸菌 *Lactobacillus salivarius* AC21 は 2 分子ペプチドからなるバクテリオシン salivacin K21（salivacin K21α および salivacin K21β）を生産する。この salivacin K21 は広い pH 領域で安定で、ヒトの消化酵素で分解され、*Bacillus* 属や *Listeria* 属などの低温性食中毒細菌に対して抗菌活性を示すことから、多様な食品への食品保存料としての利用が期待できる。Salivacin K21 の実用化のためにも、2 つのペプチドのそれぞれの抗菌活性や両ペプチドの相互作用を調べる必要がある。しかしながら、AC21 野生株から α ペプチドを精製することには成功しているが、β ペプチドは抗菌活性がない（あるいは低い）ためか、精製には至っていない。そこで本研究では、salivacin K21 の α ペプチドと β ペプチドをそれぞれ His-tag チオレドキシン融合タンパク質として大腸菌で発現させ、salivacin K21 の α および β ペプチドを精製し、機能解析を行うことを目的とした。
【方法および結果】Salivacin K21 の成熟 α ペプチドおよび β ペプチドの DNA 領域に相当する塩基配列を pET-32b ベクターに挿入したプラスミド pET32b-msalAα および pET32b-msalAβ をそれぞれ構築した。これらを *Escherichia coli* BL21(DE3)に導入し、大量培養による誘導発現を行った。培養後、遠心分離により菌体ペレットを回収し、超音波破砕後、上清（可溶性画分）を回収した。これらの上清についてアフィニティークロマトグラフィーを行い His-tag チオレドキシン融合タンパク質を精製した。精製後、エンテロキナーゼで消化することで、活性型の α ペプチドおよび β ペプチドが遊離された。α ペプチドは強い抗菌活性を、β ペプチドは弱い抗菌活性を示した。また、α ペプチドと β ペプチドを混合したものは非常に強い抗菌活性を示し、抗菌活性の相乗効果が確認された。次に、逆相 HPLC による分析を行った結果、α ペプチドと β ペプチドの保持時間はほぼ等しいことがわかった。以上より、AC21 野生株から salivacin K21 を構成するそれぞれのペプチドを分離・精製することは困難であるが、大腸菌による異種発現系を用いることで、α ペプチドおよび β ペプチドをそれぞれ精製することができた。現在、大腸菌の異種発現系により精製した各ペプチドが AC21 株本来のものと同一であることを確認しているところである。

bacteriocin, *Lactobacillus salivarius*, lactic acid bacteria

講演番号：2A14p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 14 会場

たくあん漬けから分離した乳酸球菌 *Lactococcus lactis* PJR24 が生産するバクテリオシンの精製と構造解析

Purification and structural analysis of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* PJR24 isolated from pickled Japanese radish

○木村 宏和[1]、木村 香織[1]、松崎 弘美[2]([1]尚絅大生活科学、[2]熊本県大環境共生)
○Hirokazu KIMURA[1], Kaori KIMURA[1], Hiromi MATSUSAKI[2] ([1]Shokei Univ., [2]Pref. Univ. Kumamoto)

【目的】ある種の乳酸菌が生産する抗菌物質、バクテリオシンは食中毒細菌を含むグラム陽性菌に対して抗菌作用を示すために、安全な食品保存料として利用が期待されているが、バクテリオシンの食品の置かれている環境（pH や温度など）への適応性、標的細菌のみに抗菌作用を示す高い選択性・特異性が重要となる。そこで、様々な抗菌スペクトルや性質を示すバクテリオシンの探索は必要不可欠である。本研究では、発酵食品のたくあん漬けからバクテリオシン生産乳酸菌を分離し、生産するバクテリオシンの精製と構造解析について検討した。
【方法と結果】たくあん漬けから、バクテリオシン生産乳酸菌 4 株を分離した。それら分離したバクテリオシン生産乳酸菌の培養液上清の抗菌スペクトル、ナイシン遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR による塩基配列解析の結果、分離した菌株のうち 3 株は、ナイシン Z 生産菌であること、１株(PJR24 株)は、ナイシとは異なるバクテリオシン生産菌であることが明らかになった。16S rRNA 遺伝子の配列解析および生理学的手法を用いた解析により PJR24 株を *Lactococcus lactis* と同定した。PJR24 株の培養液上清より、70%飽和硫酸アンモニウム分画、透析で粗精製したバクテリオシンの pH、熱安定性について検討したところ、比較的広い pH 領域で安定であったが、110℃、10 分のオートクレーブ処理により検討したすべての pH 領域において失活したため、熱感受性であることが明らかとなった。次に、PJR24 株が生産するバクテリオシンの構造を明らかにするために、PJR24 株の培養液上清を、70%飽和硫酸アンモニウム分画、透析、DEAE sepharose を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー、Octyl sepharose を用いた疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し、本バクテリオシンの精製を行った。精製したバクテリオシンの Tricine-SDS-PAGE 分析およびゲルバイオアッセイ（重層法）を行ったところ、本バクテリオシンは単一のバンドとして検出され、その分子量は約 8.0 kDa と推定された。また、精製したバクテリオシンを逆相 HPLC で分析したところ、単一のピークとして検出された。現在、精製したバクテリオシンのアミノ酸配列分析および質量分析を行っている。

bacteriocin, lactic acid bacteria

講演番号：2A14p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 14 会場

乳製品由来プロピオン酸菌が生産する新奇バクテリオシンの探索

Research of a new bacteriocin isolated from dairy propionibacteria.

○高屋 朋彰、栗原 英人（小山高専物質）
○Tomoaki KOUYA, Eito KURIHARA (Oyama NCT.)

【背景・目的】微生物が生産する抗菌タンパク質（バクテリオシン）は非常に多くの種類が発見・報告されており，1．主にグラム陽性細菌に作用する，2．主に近縁の菌種を選択的に殺菌する，3．宿主に対して毒性が低い，4．環境中で容易に分解されて耐性菌の発生を生じにくい，などの特徴を有していることから，耐性菌の出現と蔓延が危惧されている従来の抗生物質に変わる抗菌成分として，近年盛んに研究が行われている．本研究では，病原微生物の増殖を阻害する乳製品由来プロピオン酸菌（*Propionibacterium* 属）を検索し，見出した抗菌物質（新奇バクテリオシン）の精製・機能性評価を目的とした．具体的には，日和見感染菌などの病原微生物に対するプロピオン酸菌の抗菌性評価，見出した新奇バクテリオシンの各種クロマトグラフィー（イオン交換クロマトグラフィー・ゲル濾過クロマトグラフィー）による精製を試みた．

【方法】複数の乳製品由来プロピオン酸菌を検定菌， 日和見感染菌を被検菌として， Agar spot 法による抗菌性の評価を行った．抗菌性を示した検定菌は， 初期基質濃度が 30g/L となるように調整した YE 培地（pH6．5）に初期濁度（O．D．660）≒0．1 となるように接種して， 回分培養を行った．定常期に達した培養液を遠心分離（20，000×g， 20 min）することにより， バクテリオシンを含む培養上清を回収した．得られた培養上清を 80%硫安沈殿， 限外ろ過（透析）， 陰イオン交換クロマトグラフィー（Hi Trap Q FF， GE ヘルスケア）， およびゲル濾過クロマトグラフィー（HiLoad 16/600 Superdex 75 pg， GE ヘルスケア）により， 培養上清中のバクテリオシンを濃縮・精製した．

培養上清中の有機酸濃度は Shim-Pack SCR-102H カラム（島津製作所）と電気伝導度検出器（島津製作所）を備えた HPLC により測定した．培養上清および精製したバクテリオシンの抗菌活性評価は Disk diffusion 法を用いて評価した．

【結果】Agar spot 法を用いた抗菌性評価によって，複数の乳製品由来プロピオン酸菌が日和見感染菌 *Propionibacteirum acnes* JCM 6425^{T}および *Propionibacterium acnes* JCM 6473 に対して抗菌性を有することが明らかとなった．見出した菌株の回分培養上清から 80%硫安沈殿によってタンパク質成分を回収し，陰イオン交換クロマトグラフィーを用いたステップワイズ法による粗精製を行った．その結果，0.5 M NaCl で溶出した画分が *P. acnes* JCM 6473 に対して抗菌性を示した．限外ろ過膜を用いた脱塩・濃縮の結果，見出したバクテリオシンの分子量は 3,000 以上であることが明らかとなった．現在，見出したバクテリオシンの精製・同定に取り組んでいる．

bacteriocin, purification, dairy propionibacteria

講演番号：2A14p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 14 会場

Lactobacillus delbrueckii subsp. *delbrueckii* TUA4408L が発酵豆乳中に産生する粘性物質の解析
Analysis of viscous material in soy milk fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA4408L

○伊藤 千浩[1]、塩見 直希[1]、田中 尚人[2]、梶川 揚申[1]、佐藤 英一[1]、岡田 早苗[1] ([1]東農大応生科・化学、[2]東農大・菌株)
○Chihiro ITO[1], Naoki SHIOMI[1], Naoto TANAKA[2], Akinobu KAJIKAWA[1], Eiichi SATO[1], Sanae OKADA[1] ([1]Dept. of .Appl. Biol. Chem., Tokyo Univ. Agr., [2]NRIC, Tokyo Univ. Agr.)

【目的】微生物は発酵食品において様々な物質を産生し、味・香り・形・物性等に関与することが知られている。その一例として、長野県の伝統的な発酵食品である「すんき漬け」より分離された *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA4408L は菌体外粘性多糖(Extracellular polysaccharide:EPS)を産生し発酵豆乳に粘性と曳糸性を付与することが報告されている。一般に乳酸菌の産生する菌体外多糖は、バイオフィルムの骨格として菌体保護の役割を果たしている。応用利用の面で EPS は、免疫調節作用や食品に程よい粘性を付与する効果や離水防止効果があると知られている。中でも粘度付与については食感特性を研究するうえで注目されている。粘性を付与する際の構造特徴としては分子量の大きさ、構成単糖、分枝の有無など様々あり、これらの要因が食品成分と網目構造を形成することで生じる。

これまでの吉田ら[1)]の研究で TUA4408L を MRS 培地で培養した際に産生する EPS の構造や EPS が豆乳成分と網目状の構造を形成し粘度を付与することが報告された。しかし、培地中の炭素源により EPS の構造に差が生じる報告もあるため、sucrose を主な糖源とする豆乳中で産生される EPS についてはさらなる検討が必要である。

そこで、本研究は *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA4408L の発酵豆乳中で産生する EPS の構造や諸性質ついて明らかにすることを目的とする。

【方法・結果】TUA4408L を用いて吉田らの方法を参考に発酵豆乳を作製したところ、粘性付与の再現性が乏しかった為、乳酸菌の物質生産培養法として用いられる Hop-Step-Jump(HSJ)培養法を行い安定した粘性発酵豆乳を取得した。さらに、発酵豆乳中から粗 EPS を抽出し、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いた分画を行った。その結果、中性多糖(NPS)、酸性多糖(APS)が得られ、APS を多く産生することが明らかとなった。また、HPLC による分子量測定の結果 APS は 2000kDa 以上の、NPS は 30kDa 程度の分子量を有することを確認した。続いて、分画された EPS の構成糖について確認した。その結果、過去の研究で報告のあった MRS 培地中で産生する多糖と差が見られたため、TUA4408L は培地中の構成糖により EPS の構成を変化させる事が明らかとなった。

1)吉田ら，日本農芸化学会 2012 年度大会, 2B18a04

Extracellular polysaccharide, Lactobacillus delbrueckii, fermented soy milk

講演番号：2A14p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 14 会場

Lactobacillus helveticus 及び *Lactobacillus casei* 混合培養による血圧上昇抑制作用等機能性を有する乳製品乳酸菌飲料

Lactic fermenting beverage by *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus casei* mixed culture

○上野 義栄[1]、川嶋 敬三[2] ([1]京都府中小企業技術セ、[2]クロレラ食品ハック)
○Yoshie Ueno[1], Keizou Kawashima[2] ([1]Kyotofuchusyokigyogijyutuse, [2]Chlorella syokuhin hak)

【目的】

Lactobacillus helveticus は、アンジテンシン変換酵素(ACE)阻害活性を有する血圧降下ペプチドを生成することが知られているが、酸に弱いため、酸性の乳酸菌飲料中では数日で菌が減少していく。その為、これまでは乳酸菌数が規格基準になっている乳酸菌飲料に使用すること難しかった。特に乳製品乳酸菌飲料は、生菌数の規格基準が 10^7/ml 以上と乳酸菌飲料の中でも厳しい基準となっている。本研究では、*Lactobacillus casei* 431 の単独培養後の *L. helveticus* B02 との混合培養により、生菌数を維持しながら、ACE 阻害活性等の機能性を有する乳製品乳酸菌飲料を製造するための乳酸菌培養法について検討した。

【方法】

スキムミルク培地で *L. casei* 431 を単独培養後、*L. helveticus* B02 を接種し、混合培養を行った。更に液糖等を加えてホモジナイズし、乳製品乳酸菌飲料を製造した。乳酸菌数は、GYP 寒天培地を用いた希釈平板培養法で測定し、ACE 阻害活性の測定は、ACE 阻害活性測定キット（同仁化学研究所）により行った。また、SHR ラットを用いた血圧上昇抑制試験、RAW264 細胞を用いた NO 産生誘導試験及び P388 白血病細胞増殖抑制試験を実施した。

【結果】

1) *L. casei* 431 を 24 時間単独培養後 *L. helveticus* B02 を接種し、48 時間混合培養を行い製造した乳製品乳酸菌飲料は、生菌数を 4 週間 10^7/ml 以上保持したが、72 時間混合培養を行い製造した乳製品乳酸菌飲料は、生菌数を 4 週間 10^7/ml 以上保持することは出来なかった。

2) *L. casei* 431 を 24 時間単独培養後、*L. helveticus* B02 を接種し、1～3 日間培養したところ、培養日数に応じて ACE 阻害活性が増加した。

3) 乳酸菌培養液を高血圧自然発症ラットに強制単回投与したところ、投与後 4 時間後に収縮期及び拡張期の血圧が対照群に比べて有意に低かった($P<0.01$)

4) RAW264 細胞 NO 産生誘導試験により、NO 産生誘導効果が見られた。また、P388 白血病細胞増殖抑制試験により、増殖抑制効果が見られた。

本研究は、平成 24 年度ものづくり中小企業・小規模事業者試作開発等支援補助金により実施した。

lactic acid bacteria, lactic fermenting beverage, ACE inhibitor peptide

講演番号：2A14p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 14 会場

腸内細菌のコラボレーションによる新しいポリアミン生合成経路

Novel polyamine biosynthesis pathway through the collaboration by intestinal bacteria

○北田 雄祐、村松 幸治、松本 光晴（協同乳業株式会社）
○Yusuke Kitada, Koji Muramatsu, Mitsuharu Matsumoto (Kyodo Milk industry CO.,LTD.)

[背景・目的]

腸内細菌が産生するポリアミン（PA）は宿主の健康に強く関係していることから、PA 産生に関与する菌種や産生経路の解明は重要なテーマであり、注目されている。現在、腸内細菌の PA 生合成系の研究は個々の菌種を対象に行われているが、PA 生合成経路が特定されているのは一部の病原菌に限られており、また菌体外（腸管腔内）への PA 放出メカニズム、及びその生理的意義（なぜ放出するのか）はそれらの菌種においても解明されていない。

我々は、ヒト腸管内で最も多く存在している PA であるプトレッシン（Put）が、前駆体であるアルギニン（Arg）投与により濃度依存的に誘導されることを *in vivo* 試験で確認してきた。また、予備的試験にて、単独菌株より混合培養の方が Put を産生することを見出し、腸管内では個々の細菌ではなく、複数の細菌がコラボレーションすることによって Put を生合成し、放出していると仮説を立てた。本研究は Arg から Put を菌体外へ産生する細菌の組み合わせを発見し、複数菌種による新しい PA 生合成、及び放出経路の可能性を探索することを目的とした。

[方法]

大腸内の常在菌の一部である *Bateroides* 属（4 種類）、*Parabacteroides*（2 種類）、*Alistipes putredinis*、*Eubaterium rectal*、*Blautia hansenii*、*Ruminococcus bromii*、*Enterococcus faecalis* 、*Clostridium leptum*、*Streptococcus thermophilus*、*Escherichia coli* の中から 2 種類の細菌を選び、Arg（5 mM）含有培地において共培養を行った。培養開始から 24 時間後の培養液中 Put 濃度を UPLC にて測定し、Put 濃度が増加する細菌の組み合わせを探した。目的の組み合わせを確定後は、培養液 pH を変化させ、同様の方法を用いて菌体外の Put 濃度を測定することで、Put 産生メカニズムの特性を調べた。

[結果]

E. coli と *En. faecalis* の組み合わせが培養液中で最も Put 濃度が増加することを見出した。この Put 産生量は各々の単菌培養時と比べて上昇していることが確認された。培養開始時の培養液が pH7.5 の条件では共培養時においても Put を菌体外へ放出せず、培養液が pH6.0 の条件では菌体外へ Put を放出した。これらの結果により、腸内細菌のコラボレーションによる新しい PA 生合成経路が確認され、この PA 産生メカニズムでは PA 濃度が pH に依存していることが示唆された。

polyamine, intestinal bacteria, coculture

講演番号：2A14p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 14 会場

酢酸菌 *Gluconacetobacter europaeus* 分岐鎖アミノ酸生合成における転写調節因子 *Ge*-Lrp の機能解析

Regulation of branched-chain amino acids biosynthesis by transcriptional regulator *Ge*-Lrp in *Gluconacetobacter europaeus*.

○石井 友理[1]、赤坂 直紀[2]、秀瀬 涼太[1]、佐古田 久雄[2]、藤原 伸介[1]（[1]関西学院大理工生命科学、[2]マルカン酢株式会社）
○Yuri Ishii[1], Naoki Akasaka[2], Ryota Hidese[1], Hisao Sakoda[2], Shinsuke Fujiwara[1]（[1]Kwansei Gakuin Univ., [2]Marukan Vinegar Co. Ltd.）

酢酸菌 *Gluconacetobacter europaeus* は高いエタノール酸化能、及びエタノール・酢酸耐性を有し、食酢工業生産に広く用いられている。一方、食酢以外の物質生産菌としての可能性も検討されており、これまでに分岐鎖アミノ酸(BCAA)を生産する変異株(ABAr1-56株)が単離されている[1)]。BCAAの中でもロイシンはインスリンシグナル伝達系の促進及び糖新生の抑制効果や、脂肪燃焼作用を有しているため、機能性アミノ酸として注目されている。従って、食酢製造とBCAA生産を両立させる事で、高機能食酢の開発が期待される。一般にバクテリアの BCAA 生合成系は最終産物によるフィードバック制御機構(酵素活性阻害及び転写減衰)により制御されており、必要十分量のBCAA が合成される。大腸菌では、外界の栄養状態に応答し、アミノ酸代謝系を含む多数の遺伝子発現を包括的に制御する転写因子Leucine responsive regulatory protein (Lrp)がBCAA生合成における律速酵素アセトヒドロキシ酸シンターゼ(AHAS)をコードする*ilvIH*遺伝子の発現を促進する一方で、富栄養状態を示すシグナルリガンドとして、ロイシンがLrp C末端領域に結合する事でLrp高次構造に変化が生じ、その転写促進効果が減衰する事が知られている[2)]。一方、リガンド結合能を欠損した変異型Lrpを有する大腸菌では、*ilvIH*遺伝子の発現が恒常的となる事が知られている[3)]。米酢より単離された*Ga. europaeus* KGMA0119株(野生株)及びABAr1-56株の比較ゲノム解析の結果、大腸菌*lrp*のオルソログと考えられる遺伝子(*Ge-lrp*)中においてナンセンス変異が検出された事から、同変異株における*Ge*-Lrp C末端領域の欠損が予測され、更に同変異とBCAA生産能の相関が示唆された。これらを踏まえ、先行研究において確立された遺伝子破壊法[4)]により、2種の*Ge-lrp*破壊株(Δ*Ge-lrp*, *Ge-lrp*完全欠損株; Δ*Ge-lrp2*, ABAr1-56株と同位置にストップコドンを導入した株)を作出した。生育特性解析の結果、Δ*Ge-lrp2*株は野生株とほぼ同様の生育を示した。一方で、Δ*Ge-lrp*株では比増殖速度及び最終菌体収量の著しい低下が見られ、それらはBCAAの添加で部分的に解消された。また、薄層クロマトグラフィーによる解析の結果、Δ*Ge-lrp2*株はABAr1-56株とほぼ同等のBCAA生産性を示した。更に定量PCRの結果、Δ*Ge-lrp2*株における*ilvIH*遺伝子の発現亢進も認められた事から、BCAA生合成系は*Ge*-Lrp制御下にある事が示唆された。現在、他のBCAA生合成遺伝子の発現解析を行っている。

【引用文献】(1) 赤坂ら, 生物工学会誌, 90, 374 (2012). (2) Cho et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 105, 19462 (2008). (3) Platko et al, J. Bacteriol., 175, 1110 (1993). (4) Akasaka et al, Appl. Environ. Microbiol., 79, 7334 (2013).

acetic acid bacteria, branched-chain amino acids, Lrp

講演番号：2A14p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 14 会場

代謝改変酢酸菌を利用したコバエ誘引素材の開発

Effective fly-trapping device using metabolically-engineered acetic acid bacteria

○赤坂 直紀[1]、石井 友理[2]、秀瀬 涼太[2]、佐古田 久雄[1]、藤原 伸介[2] ([1]マルカン酢株式会社、[2]関西学院大理工生命科学)
○Naoki Akasaka[1], Yuri Ishii[2], Ryota Hidese[2], Hisao Sakoda[1], Shinsuke Fujiwara[2] ([1]Marukan Vinegar Co. Ltd., [2]Kwansei Gakuin Univ.)

住宅地に発生するハエ等の飛翔昆虫は不衛生指標の一つとなっており、市場には様々な捕虫器・捕虫剤が流通している。それらの原材料として種々の化学物質が使用される一方で、近年の「安全・安心」を求める消費者動向に応じる形で、天然由来の物質を主原料とした生活雑貨も多数販売される様になった。その一例として、黒酢やバルサミコ酢等、食酢を主原料としたコバエ(ショウジョウバエ)誘引装置が挙げられる。食酢に含まれる様々な揮発性成分のうち、バター・チーズ様の臭気を有するアセトインがショウジョウバエの誘引に効果的である事が知られている [1)]。食酢生産酢酸菌 *Gluconacetobacter europaeus* KGMA0119 株の代謝解析から、同菌におけるアセトイン経路が明らかにされた [2)]。同代謝経路は、分岐鎖アミノ酸(BCAA)生合成経路と、中間代謝物 α-アセト乳酸(α-AL)を共有している [3, 4)]。この α-AL が両代謝経路の分岐点であり、脱炭酸酵素により脱炭酸されるとアセトインが生じ、BCAA 生合成経路酵素の一つであるアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ(*ilvC* がコード)が作用すると、新たな BCAA 生合成経路中間代謝物が生じる。*ilvC* 遺伝子破壊による炭素フラックスの改変は、α-AL からアセトインへの転換を促進することが推測される。そこで遺伝子破壊を行い、誘引作用の高い素材を生産する酢酸菌の開発を試みた。我々は既に大腸菌 leucine responsive regulatory protein (Lrp)[5)]遺伝子の、*Ga. europaeus* におけるオルソログ *Ge-lrp* の機能欠損により、BCAA 生合成経路遺伝子の一つ *ilvIH* の発現が亢進する事を明らかにしている。IlvIH はアセトイン前駆体 α-AL の合成酵素であるため、*Ge-lrp* 機能欠損株も *ilvC* 破壊株と同様に、誘引剤生産性の向上が期待される。これらを踏まえ、KGMA0119 株を宿主に、*ilvC* 破壊株および *Ge-lrp* 機能欠損株(Δ*Ge-lrp2* 株)を作出したところ、両株は野生株と比較して著量のアセトインを培養液中に蓄積した。これら酢酸菌培養液を用いてショウジョウバエの誘引実験を行ったところ、両変異株は高い誘引作用を示した。更に、培養液を高速液体クロマトグラフィーにより詳細に解析したところ、最も高い誘引効果を示した Δ*Ge-lrp2* 株の培養液からのみ、極微量の低炭素鎖有機酸が検出された。これらの結果から、アセトイン及び同有機酸の共存、更に、その量比がショウジョウバエ誘引において極めて重要である事が示唆された。

【引用文献】(1) 特開 2001-233709. (2) Akasaka et al, Appl. Environ. Microbiol., 79, 7334 (2013). (3) 佐古田ら, 日本醸造協会誌 (印刷中). (4) 赤坂ら, 生物工学会誌, 90, 374 (2012). (5) Cho et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 105, 19462 (2008).

acetic acid bacteria, fly trapping device, acetoin

講演番号：2A14p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 14 会場

低栄養性細菌を用いた微生物農薬候補株の探索

Screening of microbial formulation candidates from oligotrophic bacteria

○大池 達矢、松川 哲也、岡南 政宏、梶山 慎一郎、阿野 貴司（近大院生物理工）
○Tatsuya OIKE, Tetsuya MATSUKAWA, Masahiro OKANAMI, Shin'ichiro KAJIYAMA, Takashi ANO (Grad. Sch. BOST, Kinki Univ.)

【目的】

近年、植物病原微生物から作物を守る生物防除剤として微生物農薬が注目されている。通常、微生物農薬に利用される有用微生物は、高栄養培地や特別な物質生産培地を用いて培養が行われる。しかしながら、土壌等では、このような高栄養件下であることは稀であるため、期待した増殖や物質生産が行われない可能性が挙げられる。そこで我々は、微生物農薬候補株の単離源として低栄養性細菌に着目した。

低栄養性細菌とは、極端に炭素源が低い培養条件下で生育可能な細菌を指し、このような微生物は、廃棄物のバイオコンバージョン（生物変換）において低コスト生産の可能性を有しており、商業的にも期待されている。本研究では、低栄養性細菌を用いた微生物農薬の開発を目指し、低栄養性細菌の探索と抗菌活性試験、およびその物質生産について研究を行った。

【方法】

最少ミネラル液体培地（炭素量：100 μg/mL）を使用し、土壌、植物、水源等より低栄養性細菌のスクリーニングを行った。得られた微生物は、さらに植物病原菌である *Rhizoctonia solani* に対する抑制活性を試験し、強い抑制を示す細菌を単離した。また、抗菌活性物質を培養液より有機溶媒抽出と各種クロマトグラフィーによって精製した。

【結果】

和歌山県紀の川市の土壌から単離した KS 株と、腐敗した *Jatropha curcas* 種子仁から単離した de 株の 2 種が、低栄養性培地で増殖を示し、*R. solani* だけで無く *Fusarium* や *Colletotrichum*、*Bipolaris* などの代表的な植物病原菌に対しても抑制活性を示した。また、KS 株については、*Bacillus subtilis* に対する抗菌活性も検出された。さらに 16S rDNA 系統解析と形態観察の結果から、KS 株は *Burkhorderia contaminans*、de 株は *Pseudomonas protegens* と推定された。現在、この 2 種の細菌が生産する抗菌活性物質について構造解析を行っている。

oligotrophic bacteria, microbial formulation, *Jatropha curcas*

講演番号：2A14p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 14 会場

Jatropha curcas 種子採油残渣を用いた微生物農薬の培養
Cultivation of biocontrol agent by using seed cake of *Jatropha curcas*.
○石田 結子、大池 達矢、松川 哲也、岡南 政宏、梶山 慎一郎、阿野 貴司 (近大院生物理工)
○Yuko ISHIDA, Tatsuya OIKE, Tetsuya MATSUKAMA, Masahiro OKANAMI, Shin'ichiro KAJIYAMA, Takashi ANO (Grad. Sch. BOST,Kinki Univ.)

【目的】

Jatropha curcas は貧栄養土壌でも成長が早く干ばつや病害に強い低木であり、その種子には約 60 %の油脂が含まれるためバイオディーゼル燃料としての利用が期待される。しかし、燃料としての利用が進むにつれて大量に産出される種子搾油残渣の処理問題を解決する必要がある。

そこで我々は抗菌性リポペプチドである iturin A を生産する微生物農薬候補株 *Bacillus subtilis* RB14 の生育培地としてジャトロファ残渣を用いた液体培養を試みたところ、菌数の増加と iturin A の生産が行われることを示した [1)]。

今回、我々はジャトロファ残渣の量を増やし固体発酵培地において *B. subtilis* RB14 を培養することを試みた。固体発酵培養は静置で行われるため省エネルギー条件下で発酵を行う事が可能である。このことから低コストでの残渣の大量処理が期待できる。本研究ではジャトロファ残渣を使用した固体発酵における *B. subtilis* RB14 の生育と iturinA の生産を目的とした。

【方法】

ヘキサン等の有機溶媒処理により油脂の除去を行ったジャトロファ種子残渣に蒸留水の添加量を変化させることにより含水率の異なる培地を作製した。*B. subtilis* RB14 を 24℃、5 日間培養し、培養後の生菌数、胞子数、iturin A 生産量を測定することにより蒸留水の最適添加量を決定した。また最適条件下における菌数、iturin A 生産量等の経時変化を測定した。

【結果】

ジャトロファ種子残渣を用いた固体発酵において *B. subtilis* RB14 は液体培養と同程度の良好な生育を示した。また胞子数も生菌数と同程度の値が得られたことから、ジャトロファ残渣培地において *B. subtilis* RB14 の胞子形成が阻害されないことが示された。次に抗菌活性物質 iturin A を抽出後 HPLC 測定を行ったところ、iturin A 同族体の各ピークが検出された。メタノール抽出により iturin A 粗抽出物を得たところ植物病原菌に対して顕著な抑制効果が認められた。このことから微生物農薬としての有効利用が期待された。

1)吉川ら、2012 年度　日本農芸化学会大会講演要旨集 p1043

biocontrol agent, *Bacillus subtilis* RB14, *Jatropha curcas*

講演番号：2A14p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 14 会場

アラキドン酸を生産する新規の PKS 遺伝子クラスターの同定

Identification of a novel arachidonic acid producing polyketide synthase gene cluster from marine bacterium *Aureispira marina*

永野 愛、○氏原 哲朗、田畑 和彦（協和発酵バイオ）
Megumi Nagano, ○Tetsuro Ujihara, Kazuhiko Tabata (KYOWA HAKKO BIO)

【目的】

多価不飽和脂肪酸の生合成経路は、鎖伸長酵素と不飽和化酵素の組み合わせによる好気経路と、アセチルCoAとマロニルCoAから中間体を経ずに多価不飽和脂肪酸をポリケタイド合成酵素(PKS)で一気に生産するPKS経路が知られている。多価不飽和脂肪酸の微生物による発酵生産を考えた時、PKS経路は酸素を利用しないため高密度培養に適しており、中間体も蓄積しないため利用価値が高いと考えられる。しかしながら、これまでに知られている多価不飽和脂肪酸合成PKSはDHA, EPAのものに限られており、アラキドン酸を生産するPKSは知られていなかった。そこで、PKS経路でのアラキドン酸生産を目指してアラキドン酸生産PKS遺伝子探索を行った。

【方法及び結果】

我々は、既知の種々の生物の脂肪酸組成を調査し、炭素鎖18の中間体を蓄積することなくアラキドン酸を生産する生物として海洋性細菌*Aureispira marina*に着目した[1]。本細菌のドラフトゲノム配列を新たに決定し、配列を調べることにより、新規のPUFA-PKSを見出すことができた。本PKSは４つのORFからなり、周辺にはPKSの活性化に必要なホスホパンテテニルトランスフェラーゼ(PPTase)も存在した。本PKSを構成する４つのORFとPPTase遺伝子を３つのベクターに分けてクローニングし、β酸化を遮断するために*fadE*を欠損させた大腸菌で発現させたところ、実際にアラキドン酸の生産を確認することができた。また、予想されたように炭素鎖18の脂肪酸の増加は見られなかった。本研究により有用脂質の一つであるアラキドン酸を生産するPUFA-PKSが初めて同定され、本遺伝子を利用することにより、アラキドン酸をPUFA-PKS経路により効率的に生産する可能性が開けたといえる。

[1] Hosoya S *et al., Int. J. Syst. Evol. Microbiol.,*56, 2931-2935 (2006)

Arachidonic acid, Polyketide synthase, Polyunsaturated fatty acid

講演番号：2A14p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ A 校舎 14 会場

モルヒネの生成中間体であるサルタリジンの微生物生産

Microbial production of salutaridine, an intermediate of morphine

○中川 明[1]、松村 栄太郎[1]、小柳 喬[2]、片山 高嶺[3]、山本 憲二[1]、熊谷 英彦[1]、佐藤 文彦[4]、南 博道[1] ([1]石川県大資源研、[2]石川県大食品、[3]石川県大共生研、[4]京大院生命)
○Akira NAKAGAWA[1], Eitaro MATSUMURA[1], TAKASHI KOYANAGI[2], Takane KATAYAMA[3], Kenji YAMAMOTO[1], Hidehiko KUMAGAI[1], Fumihiko SATO[4], Hiromichi MINAMI[1] ([1]Ishikawa pref. Univ., [2]Food, Ishikawa pref. Univ., [3]Symb., Ishikawa pref. Univ., [4]Kyoto Univ.)

モルヒネを始めとするモルヒナンアルカロイドは、強い鎮痛作用があり、ガンやリウマチに伴う強い痛みの処方に用いられている．しかし、これらの医薬品は、植物からの抽出物を原料に製造されるため、薬価が比較的高く、患者の QOL 向上には安価な生産方法が望まれている．微生物による植物の二次代謝産物生産は、時間的、空間的なコストが植物からの抽出に比べ安く、昨今、合成生物学分野において注目を集めている．

植物において、モルヒネは 2 分子のチロシンから 17 段階の反応を経て生成され、そのうちサルタリジンは、チロシンから 9 段階目の中間代謝産物である．本研究室では、大腸菌を用いて、7 段階目の中間代謝産物である(*S*)-レチクリンをグルコースから生産することに成功している．植物では(*S*)-レチクリンを(*R*)-レチクリンに 2 段階で転換することが知られているが、それを触媒する酵素遺伝子はまだ同定されていない．サルタリジンやモルヒネは(*R*)-レチクリンからしか生成されないため、(*R*)-レチクリンの生産が必須である．

レチクリンはテトラハイドロパパベロリン(THP)から 3 つのメチル基転移酵素により、6 位の酸素原子→窒素原子→4'位の酸素原子の順にメチル化され生成されるが、様々な検討から、メチル基転移酵素の反応順を窒素原子→4'位の酸素原子→6 位の酸素原子にすると(*R,S*)-レチクリンを生成できることを見出した．すなわち、THP からレチクリンを生成する経路を 2 菌体に分けて構築することにより、酵素の反応順を変え、ラセミックなレチクリンの生産に成功した．

(*R*)-レチクリンは P450 酵素であるサルタリジン合成酵素(SalS)によってサルタリジンに転換されるが、一般に大腸菌での P450 酵素の機能的な発現は難しいとされている．主に、酵素の N 末コドンの最適化やペリプラズム移行シグナルの付加等の改変により実現されるが、本研究では植物由来の P450 酵素において数少ない成功例の一つである CYP71P にならい、SalS の N 末の膜貫通ドメインを削除することによって、機能的な発現に成功した．上記の(*R,S*)-レチクリン生産系に N 末を削除した SalS を組み込むことによって、2mM のドーパミンからおよそ 20μM のサルタリジンの生産に成功した．

microbial production, alkaloid, morphine

講演番号：2A14p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ A 校舎 14 会場

チロシンハイドロキシラーゼを用いたベンジルイソキノリンアルカロイドの微生物生産
Production of benzylisoquinoline alkaloids using a tyrosine hydroxylase in *Escherichia coli*
○松村 栄太郎[1]、中川 明[1]、片山 高嶺[1]、山本 憲二[1]、熊谷 英彦[1]、佐藤 文彦[2]、南 博道[1]([1]石川県立大・資源研、[2]京大院・生命)
○ Eitaro MATSUMURA[1], Akira NAKAGAWA[1], Takane KATAYAMA[1], Kenji YAMAMOTO[1], Hidehiko KUMAGAI[1], Fumihiko SATO[2], Hiromichi MINAMI[1] ([1]Ishikawa Prefectural Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】アルカロイドは、テルペノイドやフラボノイドとならぶ主要な植物二次代謝産物であり、さまざまな生理活性を有する化合物が見いだされている。その中でも benzylisoquinoline alkaloid (BIA)は、モルヒネやコデインなどの少量で顕著な生理活性を示す化合物が含まれることから、新たな生理活性を有する化合物群として注目されている。しかし、BIA は化学合成が困難であり、現状では植物体から抽出することにより得ているため、短期間に安定した供給を可能にする生産系の開発が望まれている。我々は、これまでに、ほとんどの BIA の中間体である(*S*)-reticuline を組換え大腸菌を用いて発酵生産できる系を確立した[1)]。大腸菌での BIA の生産においては、野生株では生産しない L-DOPA を生成させるために、L-tyrosine の 3 位を水酸化する酵素が必要である。これまでの生産系においては、L-tyrosine を水酸化するために tyrosinase を用いていたが、同酵素は反応性が高く、基質特異性が広いことから、副生成物としてメラニンが生成されやすく、(*S*)-reticuline の収量に影響があると考えられた。そこで、本研究では、哺乳類などにおいて特異的に L-tyrosine の 3 位を水酸化する tyrosine hydroxylase を大腸菌において利用できる系を開発し、生産効率の優れた(*S*)-reticuline 生合成系の構築を目指した。
【方法】これまでの(*S*)-reticuline を生産する組換え大腸菌をベースとして、tyrosinase 遺伝子に換えて、ヒト由来およびショウジョウバエ由来の tyrosine hydroxylase(TH)遺伝子を導入した。さらに、TH 活性には、補酵素として tetrahydrobiopterin (BH_4)を必要とすることから、BH_4の生合成に関わる *Bacillus subtillis* 由来 GTP cyclohydrolase I、ラット由来 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase、ラット由来 sepiapterin reductase の 3 つの遺伝子を導入した。作製した菌株を 3% D-glucose を含む Terrific Broth を用いて培養し、培養液中に含まれる(*S*)-reticuline を LC-MS により分析した。
【結果と考察】各 TH 遺伝子を有する菌株をフラスコで培養したところ、ショウジョウバエ由来の TH を用いた場合に、tyrosinase 遺伝子を用いた場合の 1.2 倍となる 39.5 mg/L の(*S*)-reticuline を生成した。さらに、代謝経路を最適化することにより、最大で 125 mg/L の(*S*)-reticuline を生産した。また、ジャーファーメンターを用いた系においては、最大で 498 mg/L の(*S*)-reticuline を生産することができた。
1) Nakagawa et. al. Nat. Commun. 2:326 (2011)

alkaloid, tyrosine hydroxylase, microbial production

講演番号：2A14p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ A 校舎 14 会場

油脂（triacylglycerol）を分泌する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 変異株の解析

Characterization of triacylglycerol-secreting mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*

○藤井 洋紀、松崎 浩明、秦野 琢之（福山大・生命工・生物工）
○Hiroki FUJII, Hiroaki MATSUZAKI, Takushi HATANO (Fukuyama Univ.)

【目的】油脂生産微生物のほとんどは、産物油脂を細胞内に蓄積する。我々は、油脂を細胞外へ分泌生産する微生物の育種実験を行ってきた。産物油脂を細胞外に排出させることにより、生産能の強化と抽出コストの削減を目指している。これまで 2 種の酵母（*Trichosporon* sp.および *Saccharomyces cerevisiae*）の triacylglcerol（TG）分泌変異株を材料として、TG の細胞外排出機構の解析を行ってきた。今回は *S. cerevisiae* で得られた知見について報告する。

【方法･結果】*S. cerevisiae* の STG1 変異株は、TG を菌体外に漏出する。STG1 株の TG 分泌（$Halo^{+}$）形質は 1 遺伝子変異に由来し、野生型遺伝子により相補される。また細胞凝集性が強く、遺伝子クローニングの障壁ともなってきた。変異遺伝子を特定するため、Yeast-Knock-Out collection（YKO、約 4800 株）より TG 分泌の表現型を示す株をスクリーニングした。得られた候補株について、STG1 株との交配試験並びに菌体外 TG の検出を行った。その結果、*SPC72* 遺伝子が TG 分泌抑制に関与していることが強く示唆された。親株（YP1）の *SPC72* を破壊した（YP1/*SPC72Δ*）ところ、菌体外に TG が検出されるようになった。一方 *spc72* 株は、細胞内油滴（Lipid droplet）の形態・配位に異常を生じ、また油滴タンパクの分子種にも変動が起こっていることが明らかとなった。Spc72p は 622 アミノ酸で構成され coiled-coil 構造を有し、SPB の outer-plaque に局在する。その機能として、細胞質微小管や星状体微小管の形成・安定に関わることが示されている。変異遺伝子 *spc72* の塩基配列を親株のそれと比較した結果、ORF の上流 414 塩基から下流 218 塩基までに変異点は存在しなかった。RT-PCR を行い発現の有無や強弱を確認したが、どちらの株でも発現しており、有意差は認められなかった。なぜこのような結果になったか、その原因を解析するとともに、改めて相補試験を行い、他の候補遺伝子の関係についても検討している。

triacylglycerol, secretion, *Saccharomyces serevisiae*

講演番号：2A14p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ A 校舎 14 会場

分裂酵母でのコエンザイム Q10 の高生産

High production of Coenzyme Q10 in fission yeast

○森山 大輔[1]、戒能 智宏[2]、鷲田 元久[1]、難波 弘憲[1]、川向 誠[2] ([1]株式会社カネカ・QOL 事業部、[2]島根大・生物資源・生命工)
○Daisuke MORIYAMA[1], Tomohiro KAINO[2], Motohisa WASHIDA[1], Hirokazu NANBA[1], Makoto KAWAMUKAI[2] ([1]QOL division, Kaneka Corporation, [2]Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University)

【目的】コエンザイム Q（CoQ）はミトコンドリアにおける好気性呼吸に関与する電子伝達系の構成成分であり、ATP 依存型のエネルギー生産において重要な役割を果たしている。また、CoQ_{10} はヒトが生合成できる唯一の脂溶性抗酸化物質であるが、その量は加齢とともに減少することが知られている。そのため、外部から CoQ_{10} を補給することは重要であると考えられており、その需要は年々増加している。そこで本研究では、元々CoQ_{10} を生合成する分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を宿主株として、CoQ_{10} の高生産化を目指した。

【方法・結果】分裂酵母では少なくとも１０種の遺伝子（*dps1*, *dlp1*, *ppt1*, *coq3-9*）が CoQ 生合成に関与していることが知られており、これまでの研究から分裂酵母でこれらの CoQ 生合成遺伝子を単独増強しても CoQ 生産性があまり変化しないことが分かっている（細野ら、2011 年度日本農芸化学会大会）。その原因の一つとして、CoQ 生合成酵素が複合体を形成しているため遺伝子を一つだけ高発現させても効果が現れないことが考えられる。そこで、一連の CoQ 生合成遺伝子を同時に増強することで CoQ 生産性を向上させることができるのではないかと考え検討を行っているが、これまでに行った８種までの遺伝子同時増強では CoQ 生産性が大きく向上した株は得られていない。
また、CoQ 前駆体供給の強化を考えた CoQ 生合成経路の上流遺伝子の増強検討も行っている。CoQ のイソプレノイド側鎖の生合成経路であるメバロン酸経路の律速酵素として知られている HMG-CoA reductase について、遺伝子増強株を取得し評価を行ったところ、*coq* 遺伝子群増強の結果を上回る CoQ 生産性の向上が認められた。このことから上流経路の強化が CoQ 高生産の１つのポイントである可能性も考えて、他の CoQ 生合成経路上流遺伝子の遺伝子増強を行っている。

coenzyme Q10, fission yeast

講演番号：2A15a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ A 校舎 15 会場

FinishChecker: 完全決定したつもりのゲノム配列のチェック機能
FinishChecker: a computational tool to veryfy finished genomic sequences
○大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝 (東北大院生命科)
○Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata, Masataka Tsuda (Tohoku Univ.)

次世代シーケンサーの登場によって微生物のドラフトゲノム配列、特に細菌のゲノム配列のドラフト配列を得ることは非常に容易となった。我々はこれまでに 3 つのソフトウエア GenoFinihser、AceFileViewer、および ShortReadManager を開発してきた。リードデータの質やゲノム配列にも左右されるが、これらを活用することで Finishing の手間を大幅に簡略化することが可能であり、場合によってはドラフトゲノム配列を完全に in silico の解析によって(追加の実験無しに)Finish することも可能である。これらソフトウエアを利用した Finishing においては、コンティグの張り合わせ、リピート配列の確定などの多くの過程は人為的ミスが起こりにくいように半自動化されている。しかしながら、Finishing における煩雑・複雑なデータの処理の最中には、コピーペーストにおけるミスなど人為的ミスが起こる可能性があり、結果として Finish したと思われる配列(prefinish 配列と呼ぶ)に間違いがある可能性を捨てきることができない。そこで 2 つの方法で prefinish 配列をチェック可能なツール、FinishChecker を作成し GenoFinisher のツールとして使用可能にした。2 つの方法のうち 1 つは、k-mer を利用した方法、もう 1 つはペアとなる 2 つのリードのマッピングによる方法である。前者では prefinish 配列を k-mer(例えば 21mer)で切り刻んで作成した全レパートリーから、アッセンブルに使用したリードに登場する k-mer を取り除き、残った k-mer から作業ミスを発見する(残った k-mer はリードには存在しなかったのに prefinish 配列には存在している k-mer であり、人為的ミスに由来することが考えられる)。後者ではペアとなる 2 つのリードのセットを prefinish 配列にマッピングする。このとき向きあるいは末端間距離が異常なペアが局所的に集中していればその部分に何らかのミスがあることが示唆される。また prefinish 配列全体についての末端間距離分布と、prefinish 配列上の各部分を通過するペアの末端間距離分布が、同じ母集団に由来するとの帰無仮説を t 検定で棄却可能な p 値を算出し、prefinish 配列上にプロットする。この手法により末端間距離分布が異常な部分を知ることができ、ミスの発見に役立てることができる。
以上、FinishChecker は prefinish 配列をチェック可能なツールであり人為的ミスの発見に有用である。

Finishing, Draft genome, NGS

講演番号：2A15a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ A 校舎 15 会場

有機塩素系殺虫剤 gamma-hexachlorocyclohexane 分解能を有するスフィンゴモナッド細菌群の挿入配列に関する研究

Insertion sequences of sphingomonad strains capable to degrade an organochlorine pesticide, gamma-hexachlorocyclohexane

○荷川取 佑記[1,2]、大畑 智史[1]、田端 理朗[1]、大坪 嘉行[1,2]、永田 裕二[1,2]、津田 雅孝[1] ([1]東北大学院生命科、[2]日本農芸化学会)
○Yuki NIKAWADORI[1,2], Satoshi OHHATA[1], Michiro TABATA[1], Yoshiyuki OHTSUBO[1,2], Yuji NAGATA[1,2], Masataka TSUDA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]JSBBA)

【背景・目的】α-Proteobacteria に属するスフィンゴモナッド細菌群は、環境中に広く棲息し、人為起源のものを含む高度難分解性の多様な物質分解能を持つ様々な株が知られている。しかし、多くの場合、各株は特定の物質の分解能に特化したスペシャリストであり、本細菌群は可塑性に富んだ柔軟なゲノム構造を有していると考えられる。そして、我々は、人工の有機塩素系殺虫剤で難分解性の γ-hexachlorocyclohexane (HCH)分解能を有するスフィンゴモナッド株である *Sphingobium japonicum* UT26 株の HCH 分解代謝経路の全貌を解明すると共に、本株の全ゲノム配列を完全決定し、本株がゲノム構造的にも HCH 分解のスペシャリストであり、HCH 分解に特異的な *lin* 遺伝子群の獲得には、本株が 13 コピー有する挿入配列 IS*6100* やスフィンゴモナッド細菌群に特徴的な複数のプラスミドなどの可動性遺伝因子が重要な役割を果たしていることを強く示唆する結果を得ている。さらに、(i) UT26 株ゲノムに IS*6100* の転移に伴う染色体とプラスミド間の DNA 交換の痕跡が見出されること、(ii) UT26 株内で IS*6100* を含む複数の挿入配列が実際に転移することを明らかにした。本研究では、我々が新たに全ゲノム配列を完全決定した 3 株の HCH 分解細菌、*Sphingomonas* sp. MM-1 株、*Sphingobium* sp. TKS 株、*Sphingobium* sp. MI1205 株が有する挿入配列について解析を行った。

【方法・結果および考察】完全決定した 3 株のゲノムには、UT26 株のものとほぼ同一の HCH 分解に特異的な *lin* 遺伝子群が染色体及び複数のプラスミドに散在し、かつ近傍には IS*6100* が見出された。MM-1 株、TKS 株、MI1205 株で各々15, 29, 24 コピー存在する IS*6100* の隣接配列の解析から、IS*6100* の転移に伴うレプリコンの融合と解離や、レプリコン間の DNA の交換の痕跡が見出された。従って、これら 3 株においても、UT26 株と同様に、IS*6100* が HCH 分解遺伝子の獲得と、それに伴うゲノム再編成に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。一方、これら株内で実際に転移する挿入配列を明らかにするために、スクロース存在下で自殺遺伝子として働く *sacB* 遺伝子を利用した IS entrapment 法を実施した。3 株とも、*sacB* 遺伝子を有するプラスミド pGEN500 の導入によりスクロース感受性を示すが、通常の培養条件下で一定の割合で耐性株が出現した。耐性株が保持する pGEN500 の中には *sacB* 遺伝子内に内在性の IS が転移されたと推定されるものが見出された。現在、転移した挿入配列の特定と転移頻度に関する解析を進めている。

organochlorine pesticide, sphingomonad, insertion sequence

講演番号：2A15a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ A 校舎 15 会場

芳香族化合物汚染化土壌メタゲノムから培養非依存的手法により取得したフェノール分解関与遺伝子群の機能解析

Functional analysis of genes for phenol degradation isolated by using cultivation-independent approach from metagenome of a soil artificially polluted with aromatic compounds

○永山 浩史、菅原 智詞、遠藤 諒、加藤 広海、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院生命）
○Hirofumi Nagayama, Tomonori Sugawara, Ryo Endo, Kato Hiromi, Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata, Masataka Tsuda (Tohoku Univ.)

【背景】従来の環境汚染物質分解微生物の研究の多くは、集積培養と純粋分離の過程を経て取得した当該物質を唯一の炭素源・エネルギー源として利用可能な微生物を対象として行われてきた。しかし、実際の環境では、常法では培養できない微生物を含む複数の微生物が協調的に環境汚染物質の分解に関与している可能性が極めて高い。すなわち、従来の古典的手法により実験室環境で純粋培養可能な分解細菌が、実際の汚染環境中での汚染物質分解に中心的な役割を果たしているとは限らず、培養非依存的手法を用いることで、新規性の高い分解酵素遺伝子が取得できる可能性がある。
【方法】本研究では、天然の汚染環境では特定の分解遺伝子が高度に濃縮されている場合が多いというこれまでの知見を踏まえ、愛媛県農業試験場の非汚染土壌に 4 種の芳香族化合物（3-クロロ安息香酸、フェナントレン、ビフェニル、カルバゾール）を同時添加した汚染化土壌を用いた。定量リアルタイム PCR でこれら物質の分解に関与する既知遺伝子が増加した時点を見計らいメタゲノム DNA を調製し、ライブラリーを構築した。本ライブラリーをナフタレン完全分解細菌株のナフタレン初発酸化を担うマルチコンポーネント酸素添加酵素遺伝子(*nahAaAbAcAd*)のうちのオキシゲナーゼ大サブユニット遺伝子(*nahAc*)とリダクターゼ遺伝子(*nahAa*)のいずれかを破壊した誘導体株に導入し、インドールを含む培地上で青色を示すクローンを選択した。一般的に芳香族化合物の初発酸化酵素はインドールを青色のインディゴに変換する活性を備えており、取得クローンは初発酸化酵素遺伝子の一部あるいは全セットを保持していると考えられる。
【結果と考察】リダクターゼ遺伝子破壊株を宿主として陽性クローンを 16 株取得した。これらクローンが保持するコスミドのうち、10 クローンが有するコスミドは、オキシゲナーゼ遺伝子破壊株にもインディゴ生成能を付与することができた。すなわち、これら 10 コスミドは初発酸化酵素遺伝子を構成するリダクターゼ遺伝子のみではなく、少なくともオキシゲナーゼ遺伝子も保持していると考えられた。当該コスミドに対して、*in vitro* トランスポゾン挿入突然変異導入法を用いてインディゴ生成能を担う領域の同定を行った結果、10 コスミドのうち 2 コスミドにおいて、*Cupriavidus nector* JMP134 株のフェノール分解に関与する遺伝子群と高い相同性を有する遺伝子群がインディゴ生成能を担うことが明らかになった。さらに、これら遺伝子群が実際にフェノール分解に関与することを GC/MS 分析で確認した。現在、本フェノール分解遺伝子群のさらなる詳細な解析を行っている。

metagenome, aromatic compound, functional screening

講演番号：2A15a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ A 校舎 15 会場

次世代シーケンサーを用いた下面ビール酵母のゲノム解析

Whole genome analysis of a lager brewing yeast using next generation sequencing technology

○児玉 由紀子[1]、奥野 未来[2]、伊藤 武彦[2]([1]サントリーSIC、[2]東工大生命理工)
○ Yukiko KODAMA[1], Miki OKUNO[2], Takehiko ITOH[2] ([1]Suntory SIC, [2]Tokyo Institute of Technology)

ラガービール酵母（*Saccharomyces pastorianus*）は *S. cerevisiae (S. c)*と *S. eubayanus (S. b)* からなる自然交雑体である[1)]。ラガービール酵母のドラフトゲノム(約 22.4 Mbp)は既に決定されている[2)]が、その複雑な構造ゆえに未だ不明な点も多い。

この交雑体について、より詳細なゲノム情報を得るため、ラガービール酵母 Weihenstephan 34/70（W34/70）とその 2 倍体胞子クローンについて Illumina 社次世代シークエンサを用いた再解析を試みた。

まず、4 倍体ゲノムを有する W34/70 とその 2 倍体胞子クローンについてビール酵母アレイを用いた Array CGH(Comparative Genomic Hybridization)を行い、各染色体構造を推定するとともに、シーケンスリードのアセンブルから *S. c* タイプと *S. b* タイプ、ミトコンドリアゲノムのドラフトゲノムを決定し、カバレッジから各染色体の倍数性の決定を行なった。さらに、ドラフトゲノムにリードをマッピングし、1 塩基多型；Single Nucleotide Variation (SNV)の解析を行なった。

その結果、ラガービール酵母は染色体ごとに倍数性が異なること、新たな *S. c* タイプと *S. b* タイプ染色体間の乗り換え部位が存在することが明らかとなった。　また、*S. c* タイプゲノムには *S. b* タイプゲノムより多くの SNV が見つかり、*S. c* タイプのゲノムは高ヘテロ接合性であることが明らかとなった。さらに染色体上で SNV の位置をプロットしたところ、*S. c* タイプゲノムの SNV はセントロメア付近に集中していた。

以上の結果から明らかになったラガービール酵母の複雑なゲノム構造が、どのように形成されてきたのか、またどのように維持されているのか、今後も解析を進めていきたい。

1) Libkind D et. al. (2011) Proc Natl Acad Sci U S A. 108(35):14539-44
2) Nakao Y et. al. (2009) DNA Res. 16(2):115-29

genome, lager brewing yeast, Single Nucleotide Variation

講演番号：2A15a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ A 校舎 15 会場

single nucleotide variation (SNV)を考慮したラガービール酵母のゲノム再解析

Genome re-analysis of lager beer yeast in consideration of single nucleotide variation (SNV)

○奥野 未来[1]、児玉 由紀子[2]、伊藤 武彦[1] ([1]東工大生命理工、[2]サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社・ 研究部)
○Miki Okuno[1], Yukiko Kodama[2], Takehiko Itoh[1] ([1]Tokyo Tech, [2]Suntory SIC)

ラガービール酵母（*Saccharomyces pastorianus*）は *S. cerevisiae (S. c)*と *S. eubayanus (S. b)* からなる異質倍数体ゲノムであり、*S. c* タイプのゲノムは高ヘテロ接合性であることが分かっている。ドラフトゲノム(約 22.4 Mbp)はすでに決定されているが、サンガー法による低カバレッジのデータに基づくものであり、single nucleotide variation (SNV) や各相同染色体での遺伝子変異の解析はされていない。しかし、実際には染色体は倍数体であるため遺伝子の冗長性によって選択圧を逃れており、遺伝子の偽遺伝子化や多様化が見られると考えられる。そこで、本研究では異質倍数体ゲノムの構造変異やゲノム進化の新しい知見を得るために、Illumina 社製次世代シーケンサを用いたラガービール酵母ゲノム再解析とその祖先種と考えられているエールビール酵母と *S. eubayanus* との比較解析を行なった。

はじめに、シーケンスリードをアセンブルし、配列と S288c との相同性を基に *S. c* タイプと *S. b* タイプ、ミトコンドリアゲノムのドラフトゲノムを決定し、カバレッジから各染色体の倍数体の推定を行なった。次に、ドラフトゲノムにリードをマッピングし、SNV の解析を行なった。その結果、ラガービール酵母の *S. c* タイプと *S. b* タイプでそれぞれ約 12,000 個と約 1,500 個の SNV が見つかった。さらに、染色体上での SNV の特定と遺伝子のアノテーションを同時に行なうことで、相同染色体間でアミノ酸変異を伴う SNV やフレームシフト、未成熟終止コドンなどの遺伝子変異をもたらす SNV が見つかった。

祖先種との比較では、エールビール酵母は SNV が 38,000 以上あり、ラガービール酵母よりも高ヘテロ接合性ゲノムであることが分かり、ラガービール酵母はハイブリッド後に loss of heterozygosity (LOH) が起きたことが示唆された。ラガービール酵母の *S. c* タイプとエールビール酵母、S288c を含めた *S. c* の亜種 7 株との系統関係と *S. b* タイプと *S. eubayanus*、*S. bayanus* の系統関係を株間と株内の SNV から明らかにした。

本研究により、ラガービール酵母のハイブリット後の構造変異や遺伝子変異が明らかになり、異質倍数体ゲノムの適応について理解が深められると考えられる。

lager beer yeast, alloploid, single nucleotide variation (SNV)

講演番号：2A15a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ A 校舎 15 会場

カビアレルゲンデータベースの構築

Development of Fungus Allergen Database

○大波 純一[1]、渡辺 麻衣子[2]、山田 修[3]、水谷 治[3]、高橋 徹[4]、川上 裕司[5]、橋本 一浩[5]、清水 公徳[6]、髙橋 治男[2,6]、横山 耕治[6]、鎌田 洋一[7] ([1]科学技術振興機構、[2]国立医薬品食品衛生研究所、[3]酒類総合研究所、[4]岐阜セラツク製造所、[5]エフシージー総合研究所、[6]千葉大真菌医学研究センター、[7]岩手大農)

○ Jun-ichi ONAMI[1], Maiko WATANABE[2], Osamu YAMADA[3], Osamu MIZUTANI[3], Toru TAKAHASHI[4], Yuji KAWAKAMI[5], Kazuhiro HASHIMOTO[5], Kiminori SHIMIZU[6], Haruo TAKAHASHI[2,6], Koji YOKOYAMA[6], Yoichi KAMATA[7] ([1]JST, [2]NIHS, [3]NRIB, [4]Gifu Shellac Mfg. Co., Ltd., [5]FCG Research Institute, Inc., [6]Chiba Univ., [7]Iwate Univ.)

カビ（真菌）の産生物質の中には、アレルギー性疾患を引き起こす物質が存在することが知られている。このため、発酵・醸造産業など大量の真菌の暴露を受ける業務従事者の健康と、カビ由来物質の関係性が注目されている。そこで、千葉大学真菌医学研究センターでは、2013 年度の共同利用課題の一つとして、「病原性を有する *Aspergillus niger* 及び醸造黒麹菌のアレルゲン遺伝子の検索」と題し、アレルゲン物質をコードする遺伝子の網羅的な探索を実施している。これまでに解読されていた 4 株の *Aspergillus* 属菌（*A. niger* ATCC 1015、*A. niger* CBS 513.88、*A. luchuensis* RIB 2604、*A. kawachii* NBRC 4308）の全ゲノム塩基配列に対し、アレルゲン遺伝子の公開データベース（IUIS allergen nomenclature）の登録配列の相同性検索を行い、麹菌ゲノムに含まれるアレルゲン遺伝子の探索を行った。この検索結果を e-value によって、ランク 1：e-value が 0、ランク 2： 0 より大きく e-10 未満、ランク 3： e-10 以上 1 未満、ランク 4： 1 以上 10 未満、の 4 段階にランク付けした。さらに IUIS allergen nomenclature に登録されているアレルゲン性の根拠となる情報についても、ランク 1：組換えまたは精製アレルゲンで IgE 抗体の結合が確認されているとともに、皮膚テスト等臨床試験で有用性が確認されたもの、ランク 2：組換えまたは精製アレルゲンで IgE(一部 IgG)抗体の結合が確認されたもの、ランク 3：粗抽出物で臨床試験陽性またはウエスタンブロット上で IgE 抗体の結合が確認されたもの、ランク 4：データがなく根拠不在、以上の 4 段階のランクで評価を行い、情報の整理を行った。その上で検索・並び替え・ダウンロード機能を追加し、「カビアレルゲンデータベース」（URL: http://fungusallergen.org/）としてサイトの公開を開始した。利用者は本データベースからアレルゲン遺伝子と相同性が高い真菌ゲノム情報に容易にアクセスすることができ、2 種類のランク付け評価から、情報の精度を検証することができる。今後はこの情報を活用した実験研究の実施や、関連情報のデータベースへの追加を行い、カビアレルゲンの詳細な解明のための情報基盤構築を継続する。

fungus, allergen, database

講演番号：2A15a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ A 校舎 15 会場

Aspergillus 属の比較ゲノム解析
Comparative genomic analysis of *Aspergillus* species
○佐藤 敦史[1]、松島 健一朗[1]、半谷 吉識[1]、小山 泰二[1]、伊藤 武彦[2]、服部 正平[3]、光山 統泰[4] ([1]キッコーマン、[2]東工大院生命理工、[3]東大院新領域、[4]産総研生命情報工セ)
○Atsushi Sato[1], Kenichiro Matsushima[1], Yoshiki Hanya[1], Yasuji Koyama[1], Takehiko Itoh[2], Masahira Hattori[3], Toutai Mituyama[4] ([1]Kikkoman Corp., [2]Tokyo Institute of Tech., [3]Tokyo Univ., [4]CBRC)

【背景】

Aspergillus sojae は、しょうゆ製造につかわれている麹菌である。*A. sojae* は、形態学的、生理学的に麹菌 *A. oryzae* やアフラトキシン生産菌である *A. flavus*、*A. parasiticus* と同じ *A. flavus* group に属すると考えられているが、*A. sojae* の進化的起源は未だ不明である。我々は既に *A. sojae* NBRC4239 のゲノムシークエンスを実施している。今回、新たにシークエンスを追加して詳細な解析をおこなうと共に、*A. sojae* の進化的起源の知見を得るべく 9 種 13 株の *Aspergillus* 属糸状菌の比較ゲノム解析を実施した。

【結果】

追加シークエンスの結果、*A. sojae* NBRC4239 のゲノムサイズは 39.4 Mb、総遺伝子数は約 13,000 個であった。*A. oryzae* RIB40 と染色体構造を比較した結果、2 番染色体と 6 番染色体に約 1 Mb の転座があった。*A. oryzae* RIB40 と *A. flavus* NRRL3357 の比較ゲノムでも、同様の転座が報告されていることから、この転座は *A. oryzae* RIB40 に特異的な現象と思われた。9 種 13 株のゲノムを 1 kb ごとに分割し、それぞれのゲノムに対し BLAST でアライメントした。E-value が 1.0×10^{-75} 以下を相同領域、1.0×10^{-75} 以上を非相同領域とし、さらに相同領域に含まれるミスマッチ数をカウントした。*A. oryzae* と *A. flavus* の比較では、約 95 %が相同領域で、含まれる平均ミスマッチ数は 11～15 であったが、*A. oryzae* と *A. sojae* の比較では約 85 %が相同領域で、含まれる平均ミスマッチ数は 68～69 であった。*A. fumigatus* の種内比較では、約 97 %が相同領域で、含まれる平均ミスマッチ数は 11、*A. niger* の種内比較では、約 96 %が相同領域で、含まれる平均ミスマッチ数は 18 であった。これらの結果は、*A. oryzae* と *A. flavus* の違いが同種レベルであるのに対し、*A. oryzae* / *A. flavus* と *A. sojae* の違いはそれよりも離れていることを示している。また、9 種 13 株の *Aspergillus* 属糸状菌を ortholog 遺伝子で系統解析した結果、種間で高度に保存されている遺伝子のみ用いると *A. sojae* は *A. oryzae* / *A. flavus* と極めて近い種になるが、全ての ortholog 遺伝子を用いると *A. sojae* は *A. oryzae* / *A. flavus* から離れ、独立した clade を形成した。これらの結果は、*A. sojae* が *A. oryzae* / *A. flavus* との共通先祖から早い時期に分岐し、*A. oryzae* / *A. flavus* とは異なる進化を遂げてきたことを示唆している。

Aspergillus comparative genomics, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus* section Flavi

講演番号：2A15a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ A 校舎 15 会場

担子菌 *Coprinopsis cinerea* のプロテオーム解析による子実体形成機構に関する研究
Proteome analysis at the different developmental stages of *Coprinopsis cinerea*
○相島 奈央[1]、山田 知佳[1]、村口 元[2]、吉田 誠[3]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1] ([1]名城大農、[2]秋田県立大生物資源、[3]農工大農)
○Nao AISHIMA[1], Chika YAMADA[1], Hajime MURAGUCHI[2], Makoto YOSHIDA[3], Motoyuki SHIMIZU[1], Masashi KATO[1] ([1]Meijo Univ., [2]Akita Prefectural Univ., [3]Tokyo Univ. of Agriculture and Tech.)

【目的】　担子菌は、光照射や温度などの環境変化に応じて菌糸体から子実体への形態変化をする。このため、細胞分化および形態形成機構を解明する上で、担子菌は極めて興味深いターゲットとなると考えられた。しかしながら、担子菌の子実体形成機構についてはほとんど明らかになっていない。担子菌 *Coprinopsis cinerea* は、ゲノムプロジェクトが完了しており、短期間で子実体が形成されることから、担子菌類のモデル生物として用いられている。本研究では、プロテオーム解析法を利用することで、*C. cinerea* の子実体特異的に発現するタンパク質を探索し、それらが子実体形成にどのような役割を果たしているのかを明らかにすることを目的とした。

【実験および結果】　*C. cinerea* を Yeast Malt Glucose 培地に接種後、3 日間暗所下にて培養した。既報に従い、4 日目からは 12 時間の明暗サイクルで培養することで子実体形成を誘導した。形成した子実体と菌糸体からタンパク質を抽出し、二次元電気泳動を行ったところ、それぞれ 300 を超えるスポットが検出された。ゲル上に検出されたスポットを切り出し、トリプシン処理した。MALDI-TOF/TOF-MS にて解析することで得られた質量スペクトルから、MASCOT サーチを行い菌糸体と子実体で発現するタンパク質を同定した。現在、同定された 200 を超えるスポットのうち菌糸体に特異的に発現するものが 18 種、子実体に特異的に発現するものが 11 種同定されている。この中には、子実体に特異的に発現することが既に報告されているセプチンやガレクチンも含まれていた。菌糸体と子実体形成におけるいくつかのステージで RNA-seq 解析を行ったところ、子実体初期に特異的に発現していたレクチンやガレクチン等のタンパク質は、特に子実体初期と成長した子実体の柄の部分で強く発現し、傘の部分ではほとんど発現していなかった。このことから、それらは子実体の形成と伸長に関与していると考えられた。子実体形成初期では菌糸体に比べ、レクチン類、キチンの分解およびキチンの構成単位であるグルコサミンなどのアミノ糖代謝に関与するタンパク質の発現が誘導された。実際、グルコサミン含量を定量したところ子実体では菌糸体より 1.8 倍多かったことから、菌糸体から子実体への形態変化に伴い、細胞壁がリモデリングされていることが示唆された。

現在、子実体に特異的に発現したレクチンや機能未知タンパク質をコードする遺伝子の高発現株やノックダウン株を作製し、それらが子実体形成に与える影響を解析している。

Coprinopsis cinerea, proteome analysis, fruiting body formation

講演番号：2A15a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ A 校舎 15 会場

養菌性キクイムシと共生する新規 *Fusarium* 属糸状菌が生産するセルロース分解酵素の機能解析
Purification and characterization of cellulase from symbiotic fungus *Fusarium* sp. with the ambrosia beetle.

○竹浦 賢吾[1]、田中 大助[1]、濱本 光[1]、中野 将志[1]、梶村 恒[2]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1]([1]名城大院農、[2]名古屋大院農)
○Kengo TAKEURA[1], Daisuke TANAKA[1], Hikaru HAMAMOTO[1], Masasi NAKANO[1], Hisashi KAJIMURA[2], Motoyuki SHIMIZU[1], Masasi KATO[1] ([1]Meijo Univ., [2]Nagoya Univ.)

【目的】

キクイムシ類は、甲虫類ゾウムシ上科に属する昆虫である。養菌性キクイムシと呼ばれるグループはマイカンギアと呼ばれる器官をもち、そこに共生菌を保有している。養菌性キクイムシは樹木に穿孔して坑道を形成する際、保有している菌類を坑道壁面に接種し、その後、生育した菌類を摂取するという生活様式をもつことが知られている。また、樹木に坑道を形成するだけでなく、持ち込む菌により、木材質の低下や樹木の枯死を引き起こす。養菌性キクイムシが保有している菌類及び坑道内の菌は、木質を炭素源として生育していることから、セルロースを分解して栄養源としていることが示唆されている。本研究では、イチジクに寄生する養菌性キクイムシであるアイノキクイムシ（ *Euwarllacea interjectus* ）が保有するセルロース分解菌の単離を行い、さらに、その菌のセルロース分解機構を解明することを目的とする。

【方法・結果】

人工飼育した *E. interjectus* の抗道内壁より試料を採取し、セルロースを単一の炭素源とした培地で集積培養することでセルロースを資化できる菌をスクリーニングした。単離した菌の 18S rDNA の塩基配列を決定し、BLAST 解析を行ったところ、*Fusarium solani* と 98%の同一性を示す新規の *Fusarium* 属糸状菌が見出された。この菌をセルロースを含む最少培地で培養後、培養濾液中のセルラーゼ活性を測定したところ、培養 4 日目で高いセルラーゼ活性が検出された。グルコース及びセルロースのみを炭素源とした培地でこの *Fusarium* 属糸状菌を培養し、細胞外に分泌されたタンパク質をプロテオーム解析にて比較したところ、セルロース培地で多数のタンパク質が特異的に発現していることが明らかとなった。また、セルロース培地で誘導的に発現したタンパク質について、MALDI-TOF/TOF-MS 及び Mascot search を用いた解析を行った。さらに、セルロース培地で *Fusarium* 属糸状菌を培養し、得られた培養濾液から各種カラムを用いてセルラーゼを精製後、その機能を解析した。

ambrosia beetle, secretome, cellulase

講演番号：2A15p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ A 校舎 15 会場

DNA メチル化系の認識配列変換によるエピゲノム多様化 : PacBio マシンによる全メチローム解読からの証拠
Epigenome diversification through changes in DNA sequence specificity of DNA methyltransferases
古田 芳一[1,2]、南波 宏枝[1]、柴田 朋子[3]、西山 智明[4]、重信 秀治[3,5]、鈴木 穣[1]、菅野 純夫[1]、長谷部 光泰[3,5]、○小林 一三[1,2] ([1]東大・新領域・メディカルゲノム、[2]東大・医科研、[3]基生研、[4]金沢大学・学際科学実験センター、[5]総研大・生命科学・基礎生物学)
YOSHIKAZU FURUTA[1,2], HIROE NAMBA[1], TOMOKO SHIBATA[3], TOMOAKI NISHIYAMA[4], SHUJI SHIGENOBU[3,5], YUTAKA SUZUKI[1], SUMIO SUGANO[1], MITSUYASU HASEBE[3,5], ○ICHIZO KOBAYASHI[1,2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]IMSUT, [3]NIBB, [4]Kanazawa Univ., [5]SOKENDAI)

DNA のメチル化によるエピジェネティックな修飾は、細菌の様々な 活動で重要な役割を果たしている。なかでもピロリ菌はメチル化酵素遺伝子の数が多く、種類も多様であり、株ごとに異なるエピゲノム状態を持っていることが推測される。私達は、「DNA メチル化系の変化が、多様なメチロームとそれらにともなう多様な遺伝子発現パターンと形質を実現し、それらメチローム（エピゲノム）状態が自然選択の単位となる」という、「エピジェネティクス駆動進化」仮説を提唱している。

本研究では、その検証を目的として、ごく近縁な株を含むピロリ菌 5 株について、PacBio 社の第三世代シークエンサーの一分子リアルタイムシーケンシング技術によって、ゲノム全域でメチル化塩基を一塩基の分解能で検出した。

株によってメチル化の程度とパターンは大きく異なっていた。いずれの株でも RNA ポリメラーゼ遺伝子など高メチル化が保存されている領域が見出され、新たな遺伝子発現制御機構が示唆された。逆に、トランスポゾン TnPZ ではメチル化が低かった。

メチル化塩基の周辺配列をモチーフ検索することで、メチル化モチーフを数多く検出した。それらと対応させて、多くのメチル化配列認識遺伝子の認識配列を明らかにした。私たちが提案した「遺伝子内の複数サイト間での標的 DNA 配列認識ドメインの移動(DoMo)」による認識配列変換のしくみが、機能していることを示した。さらに、トランスクリプトーム解析（RNA-seq）で、配列特異性遺伝子の欠損によって顕著に発現が変化した遺伝子が存在した。

これらの結果は、「エピジェネティクス駆動進化」仮説を支持し、それを応用した「エピゲノムエンジニアリング」による育種への道を開く。

（科研費および生研センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業による支援を受けた。）

epigenome, methylation, methyltransferase

講演番号：2A15p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ A 校舎 15 会場

最確数・制限酵素断片長多型解析法の水系の微生物群集解析への利用と DGGE 法による検証

Application of newly developed MPN/MERFLP method to microbial community analysis in aqueous samples and certification by DGGE

○渡辺 克二（福工大工）
○Katsuji Watanabe (FIT)

【目的】これまでに最確数・制限酵素断片長多型解析法が、抗生物質多剤耐性菌群等の細菌群集の同定・定量に有効であることを見いだしてきた。多様な属に跨る細菌群集の実態を簡便に把握できる手法の開発を目的とし、ここではﾏｲｸﾛﾁｯﾌﾟ電気泳動装置(MCE-202 MultiNA;島津製作所)で得たデータから、この方法で効率的に水系の微生物相の同定・定量を行うための条件検討を行った。

【方法】連続運転している好気的な蓄舎排水処理施設から採取した試料を段階的に希釈し肉汁培地(DNB)、乳糖ﾌﾞｲﾖﾝ培地(LB培地)で培養し、短期間に増殖してくる細菌に由来する16S rDNAの制限酵素断片長多型解析法により属名を推定した。推定された菌群を各希釈段階毎に集計し最確数法で計数し、試料に含まれる微生物群集の分類・定量を行った。

また解析方法をより簡略化できるかどうかを検討する目的で、同試料から培養せずに直接DNAを抽出後、段階的な希釈液を作成しPCRで増幅される16S rDNAを同様に解析し、培養を介して得た結果との比較を行った。

さらに、本法による同定・定量結果を検証するため、本法で解析した試料をDGGE法で解析し結果を比較した。

【結果】肉汁培地(DNB 培養７日)では10^{-6}希釈の５本の内１本の16S rDNA切断パターンは*Bacillus licheniformis*（X68416）と最も類縁性が近かった。１本は*Clostridium limasum*（M59096)と最も近かった。また、乳糖ﾌﾞｲﾖﾝ培地(LB培地 培養４日）では10^{-5}希釈のLB培養液５本の内２本と10^{-7}のLB培養液１本の16S rDNA 切断ﾊﾟﾀｰﾝは *Enterococcus avium*（AF133535), *E.saccharolyticus*（U30931), *E.casseliflavus*(Y18161)と一致した。また10^{-7}希釈のLB培養液５本の内２本（②、④）の16S rDNA切断ﾊﾟﾀｰﾝの類縁性は *E.gallinarum*（Y18160), *E.faecalis*（Y18293)と最も近かった。

よって試験した活性汚泥には*Entrococcus*属細菌が5.6x10^{7}MPN/mL以上存在していた。この内6.8x10^{6}MPN/mLは*E. avium, E.saccharolyticus, E.casseliflavus*であることが判明した。

今後培養を介しない方法による解析結果との比較、またDGGE法により本法の解析結果の検証を行ってゆく予定である。

microbial community analysis, mpn/merflp, dgge

講演番号：2A15p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ A 校舎 15 会場

高い発電能力を有する新規 *Geobacter sulfurreducens* の比較ゲノム解析

Comparative genome analysis of novel *Geobacter sulfurreducens* strains with high current-production capability

○河野 好裕[1]、小椋 義俊[2]、井上 謙吾[1] ([1]宮崎大 IR 推進機構、[2]宮崎大フロンティア科学実験総合センター)
○ Yoshihiro KAWANO[1], Yoshitoshi OGURA[2], Kengo INOUE[1] ([1]Interdisciplinary Research Organization, Univ. of Miyazaki, [2]Division of Bioenvironmental Science, Frontier Science Research Center, Univ. of Miyazaki)

【目的】微生物燃料電池（MFC）は微生物が有機物代謝で生じる還元力を電気エネルギーとして取り出す装置である。*Geobacter sulfurreducens* PCA 株は純粋培養系の MFC で高い発電能力を持つが，*G. sulfurreducens* KN400 株は PCA 株よりもさらに約 8 倍の電力密度の電流生成が可能である。PCA 株と KN400 株のゲノム比較解析がなされた結果，SNPs が 27270 個あり，高い発電に必要な遺伝的要因を明確化することは困難であったことが報告された[Butler *et al.*, BMC Genomics, 2012]。昨年度本大会にて、我々の研究グループは自然界から KN400 株と同等もしくはそれ以上の電流生成能力を有する 8 株（YM18, YM35, YM40, YM44, YM64, YM75, YM82, YM90 株）と PCA 株と同等の電流生成能力を持つ株を 1 株（YM87 株）分離したことを報告した。本研究ではそれら新規分離株と PCA 株，KN400 株とのゲノムを比較することで，MFC で高い電流生成能力を発揮するために必要な遺伝的要因を絞り込むことを目的とした。
【方法と結果】YM18 株については 454 シーケンシングシステム（ロシュ）と Miseq（illumina），他の 8 株（YM35, YM40, YM44, YM64, YM75, YM82, YM87, YM90 株）については Miseq のみを用いて解析を行った。ゲノム全長は全株で約 3.7 Mbp であった。また、新規分離株 9 株についてその推定 ORF のアミノ酸配列を調べたところ、全ての株において PCA 株の全 3467 遺伝子のうち 90%以上の遺伝子と 80%以上の相同性を有する ORF を持つことが明らかとなった。現在、YM18 株については完全ゲノム配列の決定を試みており、他の 8 株についても得られているドラフトゲノムの詳細な解析を進めている。発表では、より詳細な比較ゲノム解析の結果や発電に関わる遺伝子について報告する予定である。

microbial fuel cell, *Geobacter*, comparative genome analysis

講演番号：2A15p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ A 校舎 15 会場

放線菌ゲノムデータベースのリファレンス情報拡張とその利用

Updating of curated genomic database in Streptomyces and the use cases

○藤澤 貴智[1]、望月 孝子[1]、谷澤 靖洋[1]、桧原 直子[1]、山田 佐知子[1]、照井 敬子[1]、石井 英治[1]、加藤 香奈[1]、鐘ヶ江 弘美[2]、神沼 英里[1]、岡本 忍[2]、黒川 顕[3]、中村 保一[1] ([1]遺伝研、[2]ライフサイエンス統合データベースセンター、[3]東工大院・生命理工)

○Takatomo FUJISAWA[1], Takako Mochizuki[1], Yasuhiro Tanizawa[1], Naoko Hibara[1], Sachiko Yamada[1], Keiko Terui[1], Eiji Ishii[1], Kana Kato[1], Hiromi Kanegae[2], Eli Kaminuma[1], Shinobu Okamoto[2], Ken Kurokawa[3], Yasukazu Nakamura[1] ([1]NIG, ROIS, [2]DBCLS, ROIS, [3]Tokyo Tech.)

微生物のゲノムやトランスクリプトームの配列が、新型シーケンサーの普及により従来に比較してさらに高速かつ大量に決定されるようになった。それらのオミックスデータを一定レベルの品質保ちつつ低コストでアウトプットするためには、リファレンスとなるべきモデル微生物種群のゲノムアノテーションの信頼性および再利用性を増すことは重要な課題である。我々は、昨年度の本学会において放線菌の情報基盤整備を目的としてゲノムアノテーションプラットフォームを構築し、ゲノムデータベース（http://togo.microbedb.jp/streptomyces）の公開と *Streptomyces griseus* NBRC 13350 株の文献キュレーションによる情報集積について報告した。

本研究において、放線菌ゲノムリファレンスとして重要な *Streptomyces coelicolor* A3(2)および国内で *Streptomyces avermitilis* MA-4680 について手動による文献キュレーションの対象を拡張した。2013 年 11 月現在、論文 351 報から放線菌 1,807 遺伝子について 37,708 件のアノテーションを実施した。我々は、整備したリファレンスゲノム情報を用いて、DAN 多型注釈データベース DNApod（http://tga.nig.ac.jp/dnapod/）による DDBJ Sequence Read Archive（DRA）データとのゲノム塩基配列レベルでの大規模比較解析ワークフローによる整備を進めており、放線菌 DNA 多型解析情報を構築した。また、リファレンスゲノム情報の活用例として、非公開ゲノムアノテーション支援のためのウェブサービス Genome Refine（http://genome.annotation.jp/genomerefine/）についても紹介する。

Genome Annotation, Database, Streptomyces griseus NBRC 13350

講演番号：2A15p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ A 校舎 15 会場

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢開裂時に翻訳されるタンパク質及び胞子嚢構成成分のプロテオーム解析

Analyses of Proteins Translated during Sporangia Dehiscence and Components of Sporangia of *Actinoplanes missouriensis*

手塚 武揚[2]、○安田 理沙[1]、大西 康夫[2]([1]東大農・生命化学工学、[2]東大院農生科・応生工)
Takeaki TEZUKA[2], ○Risa YASUDA[1], Yasuo OHNISHI[2] ([1]The University of Tokyo, Faculty of Agriculture, [2]The University of Tokyo, Department of Biotechnology)

【背景・目的】*A. missouriensis* は多数の運動性胞子を内包した胞子嚢を基底菌糸上に形成する。胞子嚢をヒスチジン溶液に懸濁すると胞子嚢の外壁が破れ、内部の運動性胞子が次々に放出され泳ぎだすが、その分子機構に関しては大部分が未知である。また、休眠胞子は spore sheath と呼ばれる薄い皮に包まれており、泳ぎだす際にこれを脱ぎ去ることが分かっているが、その分子実体は不明である。胞子嚢が開裂し胞子が泳ぎだす分子メカニズムの解明を目的として、本研究では転写や翻訳の阻害剤などが胞子嚢の開裂を阻害するか解析を行った。また、胞子嚢は休眠胞子の物理的な保護や乾燥耐性などに寄与していると予想されるが、その構成成分の多くは未知である。そこで開裂させた胞子嚢および未開裂の胞子嚢のプロテオーム解析により胞子嚢外皮、マトリックス、spore sheath 等を構成するタンパク質の同定を試みた。
【結果】ヒスチジン溶液に翻訳阻害剤、転写阻害剤、プロテアーゼ阻害剤を加えた場合、胞子嚢を懸濁しても胞子が泳ぎださないことが判明した。このとき、翻訳阻害剤を加えた場合は胞子嚢の様子に全く変化は見られなかった一方、転写阻害剤を加えた場合は胞子嚢の開裂が途中まで進むが胞子は泳ぎださないことが判明した。プロテアーゼ阻害剤を加えた場合も翻訳阻害剤と同様に胞子嚢の開裂が全く進行しなかった。このことから休眠胞子嚢内には何らかの mRNA が蓄積している可能性があり、これが翻訳されることが胞子嚢の開裂の第一ステップに必須であることが示唆された。次にこれらの抗生物質を用いて未開裂の胞子嚢、開裂させた胞子嚢、開裂を途中まで進めた胞子嚢からタンパク質を抽出・精製して二次元電気泳動に供した。転写阻害剤を入れた条件と翻訳阻害剤を入れた条件で発現しているタンパク質を比較することで、蓄積した mRNA から胞子嚢の開裂時に翻訳されたタンパク質と推測されるスポットを 16 個見出した。また、開裂させた胞子嚢と未開裂の胞子嚢の比較プロテオーム解析から、マトリクス由来と思われるタンパク質を新規に 1 つ同定した。さらに胞子嚢形成培地上で 1、3、6、40 日間培養して形成させた菌糸および成熟段階の異なる胞子嚢から RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行ったところ、このタンパク質をコードする遺伝子は胞子嚢形成初期である生育 3 日目に最も強く転写されていることが分かった。

Actinomycete, sporangia, proteome analysis

講演番号：2A15p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ A 校舎 15 会場

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* における短鎖アシル化修飾による酵素調節機構の解析
Analyses of enzyme regulation by post-translational acylation in *Thermus thermophilus*
○吉田 彩子[1]、山本 寛之[1]、西山 真[1]、吉田 稔[2]、古園 さおり[1] ([1]東大生物工学セ、[2]理研 CSRS)
○Ayako YOSHIDA[1], Hiroyuki YAMAMOTO[1], Makoto NISHIYAMA[1], Minoru YOSHIDA[2], Saori KOSONO[1] ([1]UTokyo, [2]RIKEN)

【目的】プロテオミクス技術の発展により、タンパク質のアセチル化をはじめとする短鎖アシル化修飾がバクテリアにも広く存在することが明らかになりつつある。このタンパク質（脱）アシル化修飾を担う KAT（lysine acetyltransferase）と KDAC（lysine deacetylase）はそれぞれ、acyl-CoA や NAD^+を利用することから、アシル化修飾が細胞内の栄養状態に応じた代謝制御に関わることが示唆されている。しかしながら、各酵素のアシル化修飾による調節機構が結晶構造をベースとして原子レベルで解明された例はない。そこで我々は、アシル化修飾という新規な酵素活性調節機構を詳細に明らかにするために、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* を対象に、アセチル化およびスクシニル化修飾を受けるタンパク質を網羅的に同定し、その中から酵素の活性調節という点で興味深いタンパク質について、アシル化修飾の役割を構造的に明らかにすることを目的とした。
【結果】*T. thermophilus* HB27 を対象に LC-MS/MS を用いたショットガンプロテオミクスを行ったところ、211 のアセチル化タンパク質と 161 のスクシニル化タンパク質が同定された。アシル化修飾が見いだされたタンパク質の半数近くが代謝関連酵素であり、その中でもアミノ酸代謝関連酵素が約半数を占め、糖代謝関連酵素も多数存在していた。我々はアミノ酸代謝関連酵素のうちロイシン生合成の初発酵素である 2-isopropylmalate synthase（IPMS）に着目した。IPMS をコードする *TTC0849* 遺伝子が位置する分岐鎖アミノ酸生合成遺伝子クラスター内には、KAT に共通する GNAT モチーフを持つタンパク質をコードする *TTC0848* が存在する。このことから、TTC0848 が KAT として機能し、分岐鎖アミノ酸の生合成の制御に関わる可能性が考えられた。また、IPMS は最終産物であるロイシンによってフィードバック阻害を受けることが知られている。*Mycobacterium tubercolosis* 由来の IPMS の結晶構造解析などから、ロイシンが結合する制御ドメインと触媒ドメインとの間に位置するリンカードメインが、ロイシン結合シグナルを触媒ドメインに伝えるのに重要な役割を持つことが示唆されている。今回、このリンカードメインに相当する部位に 2 か所のアシル化修飾部位を見いだしており、これらの残基におけるアシル化修飾が酵素活性やロイシンによる阻害に何らかの影響を持つことが予想された。現在、これらのリジン残基のアセチル化・スクシニル化・非修飾体を模倣した KQ、KE、KR 変異体の解析を行っており、そちらの結果と合わせて、IPMS のアシル化修飾による活性調節機構について発表する予定である。

protein acylation, *Thermus thermophilus*, 2-isopropylmalate synthase

講演番号：2A15p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ A 校舎 15 会場

短鎖アシル化修飾による代謝フラックス制御機構の探索

Regulation of metabolic flux by protein acylation in Bacillus subtilis

田村 克[1]、吉田 稔[2]、○古園 さおり[1] ([1]東大生物工学セ、[2]理研 CSRS)
Masaru TAMURA[1], Minoru YOSHIDA[2], ○Saori KOSONO[1] ([1]UTokyo, [2]RIKEN)

【目的】アセチル化に代表されるタンパク質の短鎖アシル化修飾は、KAT（アシル化酵素）と KDAC（脱アシル化酵素）によって可逆的に制御され、その反応にアシル CoA や NAD+などの代謝産物を利用することから代謝や栄養シグナルに応答したタンパク質の機能調節に関わると考えられている。細胞内のアシル CoA 量は栄養や代謝の状態によって変化する。これに応じてアシル化修飾のパターンは変化すると予想され、さらにアシル化修飾による代謝酵素調節が代謝フラックスを変えていくといった制御メカニズムがあるのではないかと考えている。本研究では、代謝フラックス変化に関わるアシル化修飾の同定を目的として、枯草菌を対象に糖代謝フラックスの違いが明確な MM グルコース条件と MM クエン酸条件で、SILAC を用いた定量アセチローム及びスクシニローム解析を行った。
【結果】枯草菌ライゼートを用いたウェスタン解析から、MM グルコース条件と MM クエン酸条件ではアセチル化とスクシニル化修飾パターンに著しい違いが観察された。次に、片方の培地条件にのみ安定同位体リジン（lysine-13C6）を添加して枯草菌（168 trpC2 lysA-）を培養し、各条件の対数期の菌体（OD660~0.5）より調製したライゼートを 1：1 で混合し、トリプシン消化と抗体によるアセチル化ペプチドの濃縮、LC-MS/MS 分析によるアセチル化部位の網羅的同定と定量解析を行った。その結果、グルコース条件では解糖系と酢酸生成、アミノ酸合成、核酸合成、シデロフォア合成などに関連する代謝酵素群のアセチル化レベルがクエン酸条件よりも高い傾向が見られた。一方、クエン酸条件では主に TCA とアミノ酸分解代謝酵素群のアセチル化が相対的に上昇していた。基質となるアセチル CoA が少ないと考えられるクエン酸条件で一連の代謝酵素群のアセチル化が上昇していた結果は、特定の酵素だけを選択的にアセチル化するための制御の存在が伺える。また、ある代謝経路内の酵素群のアセチル化が協調的に変動する傾向が見えており、アセチル化修飾が各酵素の協調的な調節を介して代謝フラックスを制御する可能性が示唆された。本発表では、スクシニル化修飾についての解析結果も併せて、アシル化修飾による代謝フラックス制御の可能性について議論したい。

protein acylation, *Bacillus subtilis*, SILAC

講演番号：2A15p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ A 校舎 15 会場

Ralstonia sp. NT-80 において高級アルコール添加に応答して発現するタンパク質群のプロテオーム解析

Proteomic analysis for the proteins induced by stearyl alcohol in *Ralstonia* sp. NT-80

○大塚 拓[1]、永倉 茉莉[1]、吉澤 梨絵[1]、赤沼 元気[1]、志波 優[2]、渡辺 智[3]、吉川 博文[3]、牛尾 一利[4]、石塚 盛雄[1] ([1]中大理工、[2]東農大 NGRC、[3]東農大応生科、[4]新居浜高専生物応化)

○Taku OTSUKA[1], Mari NAGAKURA[1], Rie YOSHIZAWA[1], Genki AKANUMA[1], Yu SHIWA[2], Satoru WATANABE[3], Hirofumi YOSHIKAWA[3], Kazutoshi USHIO[4], Morio ISHIZUKA[1] ([1]Chuo Univ., [2]NGRC, Tokyo Univ. of Agri., [3]Dept. of Biosci. Tokyo Univ. of Agri., [4]Niihama Nat. Col. of Tech.)

我々はこれまでに、*Ralstonia* sp. NT-80 (NT-80)が分泌するリパーゼの生産において、stearyl alcohol などの高級アルコールや polyoxyethylene 20 (POE20) oleyl ether などの長い炭素鎖を有する界面活性剤が極めて有効な誘導剤であることを見出している。その誘導効率は、一般的な誘導剤であるオリーブ油等と比較すると約 8 - 17 倍にも及ぶ。しかしながら、これらの誘導剤によるリパーゼ発現誘導機構の詳細は解明されていない。そこで本研究では、高級アルコールや長い炭素鎖を有する界面活性剤を培地に添加した際の細胞の反応をプロテオーム解析によって把握するとともに、リパーゼ生産誘導に関与するタンパク質を探索することを目的とした。

細胞質タンパク質についてはこれまでに 46 種類のタンパク質が同定され、これらのうち 8 種のタンパク質が stearyl alcohol 添加時に特異的に観察されており、その中にはストレス応答に関するタンパク質や stearyl alcohol 代謝への関与が予想される酵素などが含まれていた。一方、膜タンパク質についてはこれまでに 47 種類のタンパク質が同定されており、その中には ABC トランスポーターや porin などの膜輸送に関わるタンパク質が多く含まれていた。また、菌体外タンパク質についてはこれまでに46種のタンパク質が同定されており、その中には、タイプVI分泌システムエフェクター(Hcp)やプリンヌクレオシドの取り込みに関するタンパク質、機能未知のペリプラズムタンパク質などが含まれていた。

一方、stearyl alcohol 添加時には分子量約 14 kDa の界面活性作用を有するタンパク質(EliA; effector protein of lipase induction)が特異的に同定され、このタンパク質をコードする遺伝子の破壊株ではリパーゼの発現誘導が低下する事が見出されている。そこで、EliA のリパーゼ発現誘導への作用機構を解明する一助として、野生株と *eliA* 破壊株における菌体外タンパク質の比較プロテオーム解析を試みた。その結果、*eliA* 破壊株では野生株と比較して、タイプVI分泌システムエフェクター(Hcp)やIV型線毛、フラジェリンなどの感染に関与するタンパク質の発現量低下が観察された。

Ralstonia, Proteome, Fatty alcohol

講演番号：2A15p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ A 校舎 15 会場

根粒形成過程におけるミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* の時系列プロテオーム解析
Behavior of *Mesorhizobium loti* during nodule development with quantitative proteome analysis
○南部 真実、立上 陽平、森坂 裕信、黒田 浩一、植田 充美（京大院農・応用生命）
○Mami Nambu, Yohei Tatsukami, Hironobu Morisaka, Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景・目的】共生窒素固定細菌であるミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* は宿主であるミヤコグサ *Lotus japonicus* と特異的に共生し、窒素固定を行う。根粒菌は単生では窒素固定を行わないが、宿主植物に感染後、植物細胞の形態学的変化に伴い、バクテロイドと呼ばれる共生に特異的な形態に分化して窒素固定活性を発現することが知られている。我々は、単生、及び、共生下における *M. loti* の定性プロテオーム解析を行い、各条件下でタンパク質プロファイルが変化することを報告してきた[1]。しかし、さらなる根粒菌の窒素固定メカニズムの解明のためには、タンパク質の定量的な変動を時系列で測定する必要があると考えた。そこで、本研究では、根粒菌が植物との共生関係を築く過程において、根粒菌のタンパク質の変動を捉えるために、共生下の *M.loti* において、時系列に沿ってプロテオーム解析を行った。
【方法・結果】共生状態における時系列に沿ったタンパク質変動を把握するために、3 週間水耕栽培した *L. japonicus* に *M. loti* を接種し、その 2, 3, 4 週間後に採取した根粒からバクテロイドを単離した。また、比較対象として *M. loti* を液体培地で対数増殖期まで培養し、単生状態のモデルとした。得られた試料からタンパク質試料を調製し、独自に開発したロングモノリスカラムと LC-MS/MS を組み合わせた系[2]により、網羅的なタンパク質の比較解析を行ったので、まとめて報告する。
[1] Tatsukami Y. *et al*., *BMC Microbiol.*, 13, 180 (2013)
[2] Morisaka H. *et al*., *AMB Express*, 2, 37 (2012)

symbiosis, nitrogen fixation, *Mesorhizobium loti*

講演番号：2A15p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ A 校舎 15 会場

BLSOM を利用した腸内細菌叢の比較メタゲノム解析

Comparative metagenomic analysis of human gut microbiome using BLSOM

○齋藤 禎一、村上 勝彦、今西 規（産業技術総合研究所）
○ Yoshimoto SAITOH, Katsuhiko MURAKAMI, Tadashi IMANISHI (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

Batch-Learning SOM（BLSOM）法[1)]は、教師なしニューラルネットワークの一手法であり、ゲノム配列中の連続塩基の出現頻度をベクトル化し、自己組織化マップ法によって 2 次元のマップ(BLSOM マップ)に投影する。BLSOM 法はハイスループットなデータを高速で解析し、ゲノムの特徴をマップ上で視覚的に抽出することができる。本研究では 2007 年に公開された成人および乳幼児の腸内細菌メタゲノム [2)] を用いて BLSOM 法を用いた比較解析を実施した。その結果、BLSOM マップ上に成人由来のメタゲノム配列が集中する領域、さらには乳幼児由来のメタゲノム配列群が集中する領域が見出された。成人メタゲノム配列の集中した領域にプロットされた配列群を解析したところ、その多くは Bacteroideles 目および Clostridiales 目所属細菌の配列と推定された。一方で乳幼児メタゲノム配列の集中した領域からは、*Bifidobacterium* 属、*Enterococcus* 属菌や *Enterobacteriacea* 科所属細菌などと推測される配列が多く認められた。本研究と同一のメタゲノムデータセットを異なる手法(相同性検索)で解析した先行研究(Kurokawa et.al 2007)においても同様の傾向が既に示されている。また、BLSOM によって Map 上に現れた領域には、微生物の様々な機能遺伝子もプロットされていた。従って、BLSOM は環境の特徴となる微生物群の代謝なども推定できる可能性が考えられた。

次に、本研究では 2010 年に公開された健常者および Crohn 病罹患者の腸内細菌メタゲノム [3)]を用いて、BLSOM 法による比較解析を行った。解析の結果、BLSOM マップ上に健常者および Crohn 病罹患者に特徴的な領域が認められた。これら領域にプロットされた配列群を解析した結果、健常者に特徴的な領域には Bacteroideles および Clostridiales 目所属細菌の配列が多く含まれていた。一方で Crohn 病罹患者の領域には、*Bifidobacterium* 属および、*Streptococcus* 属、*Veillonella* 属菌などを由来とする配列がプロットされており、これらがの Crohn 病罹患者の腸内細菌叢を特徴づける微生物群であると考えられた。また、興味深いことに、Crohn 病罹患者に特徴的な微生物群の中には、前述の乳幼児と共通な分類群が認められた。このことから、両者の腸内環境には類似点のあることが推定された。

1) Abe et al. 2003. Genome Res. 13: 693-702.
2) Kurokawa et al. 2007 DNA Research 14 169-181
3) Fraser-Liggett Claire 2010 Metagenomic Analysis of the Structure and Function of the Human Gut Microbiota in Crohn's Disease. Available from Nature Precedings.

metagenome, self-organizing Map, human gut microbiome

講演番号：2A15p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ A 校舎 15 会場

酸性河川より分離された未分類の鉄酸化細菌 GJ-E10 株のゲノム構造

Genome Analysis of the Unclassified Iron-Oxidizing bacterium GJ-E10 Isolated from Acid River

○福島 淳、東條 ふゆみ、小林 弥生、浅野 亮樹、志村 洋一郎、岡野 邦宏、宮田 直幸（秋田県大）
○Jun FUKUSHIMA, Fuyumi TOJYO, Yayoi KOBAYASHI, Ryoki ASANO, Yoichirou SHIMURA, Kunihiro OKANO, Naoyuki MIYATA (Akita Prefectural Univ.)

鉱山酸性排水や硫酸土壌、温泉などの硫酸酸性環境には一般的に好酸性鉄酸化細菌が存在している。II 価鉄の生物的酸化は環境での鉄の移動性に関与している。このような鉄酸化細菌では Proteobacteria（Acidithiobacillia 綱)に属する *Acidithiobacillus ferrooxidans* がよく研究され、金属の生物精錬等に使用されている。またこの反応はプリント基板などの産業廃棄物からの金属回収にも応用されようとしている。現在まで鉄酸化細菌は Nitrospira、Firmicutes、Actinobacteria や Proteobacteria に属するものが知られ、非常に多様な分類群に存在している。しかし実際に種として報告されているものは *A. ferrooxidans* 以外に *A. ferrivorans*、*Acidiferrobacter thiooxydans*、*Thiobacillus prosperu*、 *Ferrovum myxofaciens* などと少数であるため、新規の鉄酸化細菌の探索を行った。その結果、秋田県仙北市玉川上流の堆積物から全く新しい Betaproteobacteria に属すると考えられる鉄酸化細菌 GJ-E10 株を集積培養により分離した。この GJ-E10 株は酸性環境（pH 2.2–3.5）で生育できる独立栄養菌である。16S rRNA 遺伝子配列の解析から、Burkholderiales 目に含まれる可能性は高いが、既存の科には分類できないと考えられた。我々はこの菌のゲノム構造の解析を試みた。GJ-E10 よりゲノム DNA を抽出して、ロシュ社 GS Junior での 8 kb メイトペアーライブラリー解析２回と、イルミナ社 HiSeq 1000 でペアエンド解析を行った。それら両方のデータを Newbler ver. 2.7 でアッセンブルしてコンティグとスキャフォールドを作成した。その結果 91 のコンティグから 12 のスキャフォールドを得、ゲノムサイズはトータルで 3.3 Mb であった。リボソーム RNA オペロンはゲノム当たり 1 コピーであった。ORF を予測し、アノテーションを行ったところ、窒素固定遺伝子クラスタのほぼ全体がゲノム中に 1 コピー存在すると考えられた。他にも Hydrogenase 遺伝子クラスタ、鞭毛遺伝子クラスタ、Rhodanese 、RubisCO 遺伝子等が検出された。

なお、本研究は平成 25 年度環境研究総合推進費補助金（3K133012、代表宮田直幸）の助成を受けて行った。

genome, iron-oxidizing bacterium, Betaproteobacteria

講演番号：2A15p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ A 校舎 15 会場

難消化性オリゴ糖 DFAIII および *Ruminococcus productus* AHU1760 の共投与が及ぼす腸内環境への影響

Influence on intestinal environment by co-administration of DFAIII and *Ruminococcus productus* AHU1760

○鳶 諒介、藤井 早苗、高野 七海、北川 航、曾根 輝雄、田中 みち子、浅野 行蔵（北大農）
○Ryosuke GAN, Sanae FUJI, Nanami TAKANO, Wataru KITAGAWA, Teruo SONE, Michiko TANAKA, Kozo ASANO (Hokkaido Univ.)

【目的】　近年，腸内細菌叢と脂質代謝・肥満・生活習慣病が密接に関係していることを示唆する多くの報告がなされている．難消化性オリゴ糖 DFAIII は腸内で特定の細菌により資化され，生成された有機酸により腸内の pH を低下させ，宿主の細菌叢を改善させるプレバイオティクスの効果を有している．本研究では DFAIII の資化性菌として *Ruminococcus productus* AHU1760 をヒトから単離し，DFAIII と共投与することで腸内への影響を評価した．さらに，既知のシンバイオティクス素材であるフラクトオリゴ糖(FOS)+*Bifidobacterium breve* JCM1192^{T} との比較により，高脂肪条件下における本シンバイオティクスの効果の評価を試みた．

【方法】　5 週齢の SD 系雄性ラット 36 匹を，対照群，DFAIII+*R. productus* AHU1760 共投与群(DFAIII 群)，FOS+*B. breve* JCM1192^{T} 共投与群(FOS 群)，さらにそれぞれに対し標準食の 5 倍のコーン油を含む高脂肪食を与えた高脂肪食投与群(HF 群，HF+DFAIII 群，HF+FOS 群)の 6 群に分け，30 日間の試験飼育を行った．得られた盲腸内容物，糞便を用いて，盲腸内容物量，有機酸，腸内 pH の測定及び，16S rRNA 遺伝子の V3 領域に基づく DGGE 法と V3-V5 領域に基づくパイロシークエンス法により腸内細菌叢の解析を行った．

【結果及び考察】　DFAIII と *R. productus* AHU1760 の共投与は，総有機酸量の増加と腸内 pH の低下を招き，盛んな腸内発酵が示された．高脂肪食を与えた場合では，FOS 群では腸内発酵の減少がみられた一方，DFAIII 群では依然として盲腸内容物量と有機酸量が多く，腸内 pH の低下が確認された．さらに菌叢解析より，DFAIII の投与によって高脂肪食と標準食との間での腸内細菌叢の変化が小さいことも確認された．以上のことより，DFAIII と *R. productus* AHU1760 の共投与は高脂肪食ストレスにも強い耐性を持つ細菌叢を形成した結果，腸内環境の改善が期待されると考えられた．

DFAIII, *Ruminococcus productus*, synbiotics

講演番号：2A15p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ A 校舎 15 会場

A non-cellulosomal mannanase 26E contains CBM59 in *Clostridium cellulovorans*

○Kousuke YAMAMOTO[1], Yutaka TAMARU[1,2,3] ([1]Grad. Bioresour., Mie Univ., [2]Mie Univ. LSRC, [3]Mie Univ. ITII)

【Background】Increase of carbon dioxide in the air due to the fossil fuel usage has caused global environmental change. The development of technologies related biorefinery is expected to solve the issue. The biorefinery process involves pretreatment of biomass, saccharification, fermentation, purification and conversion. However, since cellulosic biomass has a complicated structure that consists of various polysaccharides, it is very difficult to degrade their structure. *Clostridium cellulovorans*, which is anaerobic mesophile and produces a multiple enzyme complex called the cellulosome for efficient degradation of various polysaccharides. Genome sequence analysis revealed that this organism has the genes encoding 17 cellulosomal cellulases, 10 cellulosomal hemicellulases and 63 non-cellulosomal enzymes related to degrade polysaccharides such as not only cellulases and hemicellulases, but also pectinaes. In addition, the expression pattern of polysaccharolytic enzymes was changed to be suitable for degradation of each carbon sources. Therefore, polysaccharolytic enzymes dependent on the substrates would be elicited by functional proteome analysis of the proteins produced by *C. cellulovorans* under its growing on each carbon sources. Our aim is identification of enzymes, which contribute to degrade plant-biomass. In this study, the method of identifying enzymes to contribute to degrade Locust bean gum (LBG) was demonstrated.

【Methods and Results】*C. cellulovorans* was cultivated into locust bean gum (LBG) that is composed of galactomannan. Functional proteome analysis was performed with the proteins of culture supernatant produced by *C. cellulovorans*. The purified proteins were separated by each fractions containing ether binding to crystalline-cellulose or not. Proteins obtained from each fraction were further separated by SDS-PAGE and were stained with Coomassie brilliant blue. Moreover, the separated proteins were detected with mannanase activity. Among the bound proteins to crystalline cellulose, the proteins having the enzymatic activity for LBG were cut out and identified by mass spectrometry. As a result, four protein bands were classified into glycoside hydrolase family 26. One of identified enzyme Man26E contains a carbohydrate-binding module (CBM) family 59, which binds to xylan, mannan and Avicel. The expression patterns of the proteins from *C. cellulovorans* were quite different, although mannose and galactose are same as a hexose. Interestingly, Man26E was only expressed in LBG.

Clostridium cellulovorans, mannanase, proteomics

講演番号：2A15p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ A 校舎 15 会場

パッチクランプ法による大腸菌呼吸鎖の末端酸化酵素の H^+-pump の機能解析

Patch clamp studies on H^+-pump of terminal oxidase of *E.coli*

○宇野 正晃[1]、駒澤 光祐[1]、杉村 しおり[1]、黒田 照夫[2]、川崎 寿[1]、矢部 勇[1]([1]東京電機大学・工、[2]岡山大学・薬)
○Masaaki UNO[1], Kousuke KOMAZAWA[1], Shiori SUGIMURA[1], Teruo KURODA[2], Hisashi KAWASAKI[1], Isamu YABE[1] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Okayama Univ.)

パッチクランプ(PC)法は、細胞膜上に存在するイオン輸送系の活性を電流値として直接測定し、しかも、その駆動力を外部から制御でき、輸送系を機能評価する上で優れものである。これまで、大腸菌呼吸鎖にPC法を適用し、好気的条件下では、NADH dHⅠ、NADH dhⅡ、さらに末端酸化酵素として、Cyt *bo*、Cyt *bd*Ⅰが主要素として機能していることを選択的電子受容体・供与体、及び阻害剤、遺伝子破壊株等によって確認してきた。さらに、Succinate dehydrogenase (SDH)、 Cyt *bd*Ⅱを含めた呼吸鎖複合体の全体をシステムとして機能評価する上で、各構成要素のV-I curveの測定が必須である。そこで、我々は、各構成要素を露わにした遺伝子破壊株を作成し、さらに、PC法のWhole-cell recordingモードで、S/N比を１０倍程度向上させフルスケール1pA程度でも測定可能な装置上の改良も行っている。

本発表では、Cyt *bd*Ⅰ、Cyt *bd*Ⅱ二重遺伝子破壊株を作成し、Cyt *bo*単独のユビキノール誘導電流を求め、そのV-I curveの逆転電位135mV近傍、及び、膜内外に負荷したΔpH=2.5(pHin=7.4、pHout=4.9)より、pmfとして285mV近傍を測定した。F-type ATPaseのH^+/ATPの量論比=4 (2008, Graber)とすると、ATP合成に使用可能な自由エネルギーは-4*F* pmf=-110kJ/molとなり、その値はATP合成標準自由エネルギー=38kJ/molを十分に賄うことができる。さらに、Cyt *bo*、Cyt *bd*Ⅱ二重遺伝子破壊株も作成し、Cyt *bdI*単独のユビキノール誘導電流を求め、Cyt *bo*のベクトル的＋スカラー的H^+輸送、Cyt *bdI*のスカラー的H^+輸送の両者を比較検討し、それらのH^+輸送機構の解明を目指す。
今後、さらに、NADH dHⅠ(2013, Sazanoz)、SDH (2003, Iwata)、Cyt *bo* (2000, Wickstrom)などの構造解析結果、及び好気的条件下でのCyt *bd*ⅡのH^+カップリングの存在 (2011, Gennis) などの知見も踏まえて、他の呼吸鎖構成要素に対しても検討を行う。

Patch clamp, Respiratory chain, Giant cell

講演番号：2B02a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ B 校舎 02 会場

加熱方式の違いが煮物調理の部域差に与える影響

Effects of different heating systems on regional difference in simmer cooking

○藤本 祐子[1]、千葉 浩子[2]、大川 諒[1]、都甲 潔[2]([1]大阪ガス(株)、[2]九州大学)
○Yuko FUJIMOTO[1], Hiroko CHIBA[2], Ryo OKAWA[1], Kiyoshi TOKO[2] ([1]Osaka Gas Co., Ltd., [2]Kyushu University)

【目的】業務用では大量に調理したものを商品として提供するので、味や色等の均一性・再現性が求められる。大根煮物の大量調理において加熱方式の違いが、おいしさ・色・硬さ・味に影響を与え、鍋肌加熱が局部加熱に比べ有意に数値が高いことは既報※1で報告した。本稿では加熱方式により、これらおいしさ等の部域差にどのような影響を与えるかを定量的に把握することを試みた。

【方法】《調理試験方法》既報同様、鍋肌加熱(ガス調理器,以下「鍋肌」)・局部加熱(ＩＨ調理器,以下「局部」)を用い、調理条件も同等とした。各鍋に大根サンプルを外 12,中 8,内の合計 25 個を同心円状に配置し、それを 3 段重ねた 75 個を調理した。部域差は再現性の高さから外と中で比較した。《評価方法》官能評価分析（N=44）と、３種の物理化学分析（色;色差分析・硬さ;テクスチャー分析・味;味覚センサー分析）を併用し、分析を行った。

【結果】《官能評価》おいしさ・外観のよさ・色の濃さ・硬さ・味の染み・コクの項目で鍋肌加熱は局部加熱に比べ部域差が小さい（表 1)。《色差分析》赤色味(a 値）において局部は部域差があるが、鍋肌は部域差が見られなかった(表 1)。《テクスチャー分析》局部･外はその他に比べ破断応力が大きく、局部には部域差が見られた。(図 1)《味覚センサー分析》塩味・コク・うま味の全てで、鍋肌・局部共に部域差は見られなかった(表 1)。

表 1 官能評価と色差・味覚センサー分析結果

	項目	鍋肌加熱 外	鍋肌加熱 中	鍋肌加熱 判定	局部加熱 外	局部加熱 中	局部加熱 判定
官能評価	おいしさ	4.82	3.71	*	2.86	4.06	**
	外観のよさ	4.70	4.91	N.S.	2.89	4.09	**
	食感のよさ	4.20	3.97	N.S.	3.82	3.88	N.S.
	味覚のよさ	4.73	3.76	*	2.84	3.97	*
	色の濃さ	5.07	5.68	N.S.	2.70	4.74	**
	硬　さ	2.20	1.68	N.S.	4.20	2.85	*
	味の染み	4.91	5.24	N.S.	3.11	4.56	**
	塩　味	3.32	3.68	N.S.	2.64	3.18	N.S.
	うま味	4.77	4.09	N.S.	3.59	4.24	N.S.
	コク	4.45	4.06	N.S.	2.64	4.18	*
色差分析(赤色味)		-0.74	-0.6	N.S.	-1.31	-0.58	*
味覚	塩味	19.14	19.28	N.S.	19.18	18.84	N.S.
	うま味	11.63	11.70	N.S.	11.77	11.76	N.S.
	コク	4.23	4.45	N.S.	3.97	4.22	N.S.

有意差判定　**:p＜0.01、*:0.01≦p＜0.05、N.S:　p≧0.05

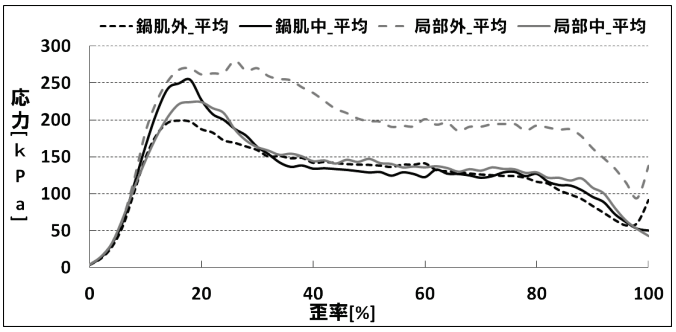


図 1 テクスチャー分析結果

【考察】同じ加熱方式の外・中での部域差を分析した結果、色・硬さでは、局部に部域差があるという点で官能評価と物理化学分析結果が一致した。味は官能評価で局部のコクに部域差があったが、味覚センサーでの部域差は無かった。これは、伊藤ら※2の報告の通り、色の濃さによる視覚に味が影響を受けたと考えられる。

※1 藤本他,日本味と匂学会大会予稿集（2013）p.106
※2 伊藤ら,日本味と匂学会誌（1997）Vol.4 No.3 pp.511-514

sensory evaluation, taste sensing system, regional difference

講演番号：2B02a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ B 校舎 02 会場

各種加工タピオカ澱粉/卵白共存ゲルの「もちもち」食感と破壊力学特性の解析

Analysis for "mochi-mochi" texture and fracture mechanical properties of co-gels with modified tapioca starch/egg white protein

○井之上 明弘、中村 卓 (明治大院農)
○Akihiro INOUE, Takashi NAKAMURA (Meiji Univ.)

【目的】
食品のおいしさを決定する重要な要因として食感がある。食感は咀嚼による食品構造の破壊過程において、力学特性と構造状態の変化が認知されることにより表現される。食品構造を形成する主要な成分として澱粉が挙げられる。中でもタピオカ澱粉は食品の食感改良の目的で用いられており、例えばドーナツやうどんなどの食品に特徴的な「もちもち」とした食感を付加させることが知られている。しかし、なぜ「もちもち」とした食感が発現するのかは明らかになっていない。これまでの研究では、馬鈴薯澱粉、タピオカ架橋澱粉を比較対象とし、タピオカ澱粉の伸びる性質とタンパク質界面での相互作用が重要であることを明らかにした。本研究では、各種加工タピオカ澱粉を卵白に混合したゲルを食品モデルとして、タピオカ澱粉の「もちもち感」について、破壊力学特性と官能評価の関係を検討した。
【方法】
卵白と澱粉を混合した懸濁液を、95℃で 10 分間加熱後、25℃で 30 分間常温に戻しゲルを作製した。ゲル作製には未加工のタピオカ澱粉とタピオカ加工澱粉（アセチル化澱粉、リン酸架橋澱粉、ヒドロキシプロピル化リン酸架橋澱粉）を用いた。ゲルについて、クリープメータにて破断強度試験、10 回繰り返し圧縮試験を行った。ゲルの「もちもち感」について、7 段階尺度の採点法を用いて官能評価を行った。物性測定で得られた波形から 9 項目の物性パラメータを抽出し、官能評価の結果と合わせて主成分分析を行った。
【結果】
官能評価の結果より、アセチル化澱粉を添加したゲルで最も「もちもち感」を強く感じた。破断強度試験の結果、加工澱粉は全て未加工澱粉より高荷重で破断し、アセチル化澱粉が最も高歪率高荷重で破断した。また 10 回繰り返し圧縮試験の結果、ゲルの壊れ方に違いが見られた。未加工澱粉は繰り返し圧縮による応力低下が大きいのに対し、加工澱粉では応力低下が抑えられ、アセチル化澱粉で最も小さかった。主成分分析より、官能評価の「もちもち感」と破壊力学特性の破断荷重、破断歪率、10 回圧縮後の比率といったパラメータとの間に相関が見られた。以上より、第一咀嚼後半の噛み応えや、複数回圧縮した時の噛み応えの持続を知覚することにより、人間は「もちもち」という食感を認知していると考えられる。

modified tapioca starch, gel, texture

講演番号：2B02a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ B 校舎 02 会場

食品タンパク質の加熱誘導ゲル形成性に及ぼす卵白オボムコイド添加の影響―卵白リゾチーム及び米γ-グロブリンを例に―

Effects of Ovomucoid on the formation of heat-induced food protein gel -Lysozyme and rice globulin-

○太田 尚子、丸山 奈実、加藤 つばさ、和田 静香、木村 陽子（日大短大）
○Naoko OHTA, Nami MARUYAMA, Tsubasa KATO, Shizuka WADA, Yoko KIMURA (Nihon Univ.)

私たちはこれまで、種々の食品タンパク質に対する乳カゼイン添加の影響を調べ、カゼインタンパク質がそれ自身熱安定性が高く単独では加熱による相転移現象は観察されないが、共存するタンパク質に影響を与え、混合タンパク質系では共同的に働くことを示唆してきた。今回は、起源を異にする 2 種類の食品タンパク質（卵白リゾチーム及び米γ-グロブリン）を用いて、乳カゼイン同様熱安定性の高い卵白オボムコイド（OM）添加の影響を調べた。

実験材料は、米γ-グロブリンは米胚芽より森田らの方法に準じて調製し、他の試料については試薬標品を用いた。卵白リゾチーム及び米γ-グロブリンそれぞれのタンパク質のゲル化示適条件で、異なる比率での OM 存在下でトータルタンパク質濃度 10%にて加熱誘導ゲル形成過程及び形成したゲルの構造を調べた。即ち、リゾチームに関しては 0.2M、一方、米γ-グロブリンについては 0.6M の食塩存在下、pH はそれぞれ 6 付近と 7 付近とした。解析方法には、動的粘弾性測定、超音波分光分析、走査型電子顕微鏡観察（SEM）及びフーリエ変換赤外分光分析（FT-IR）を用いた。

その結果、OM 単独では熱安定性が高いが、OM の添加は共存するいずれのタンパク質に対してもその物性に影響を与えた。また、両タンパク質間でその変化量に差が認められた。即ち、リゾチームの場合には、等量混合系で無添加に比べて複素弾性率が約 20%に、超音波減衰は約 70%に減少し、SEM による粒径はおよそ 1/20 に小さくなった。一方、米γ-グロブリンの場合には、動的粘弾性測定では OM 添加により相転移が早まる傾向が観察された。また、米γ-グロブリン系の SEM 像では OM 添加量の増加につれてリゾチームの場合とは逆にむしろ徐々に凝集体の粒径が大きくなった。以上の種々の結果を通して、米γ-グロブリンの場合には OM 添加の影響がリゾチームの場合に比べて小さいと結論付けられた。そこで、上述の卵白リゾチームと米γ-グロブリンに及ぼす OM の効果の違いが何に起因しているのかを考察する一助として、FT-IR によるタンパク質二次構造解析をこれら２つの系で比較した。即ち、リゾチーム又は米γ-グロブリンを用いた OM 混合タンパク質ゲルのアミド I’領域のスペクトルを、加熱処理した各単独タンパク質系のスペクトルの合成スペクトルと比較した。その結果、リゾチーム/ OM 混合系の方が、米γ-グロブリン/ OM 混合系に比べ、単独タンパク質スペクトルの合成スペクトル（各スペクトルの和）からのずれ（二次構造変化）が大きい事がわかった。この事から、リゾチーム/ OM 混合系においてよりタンパク質分子間相互作用が起こり易く、この事が両タンパク質間における OM 添加効果の違いに起因しているのではないかと示唆された。

food protein gel, ultrasound spectroscopy, FT-IR

講演番号：2B02a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ B 校舎 02 会場

凍結融解による卵黄の状態変化

Changes in physicochemical properties of egg yolk by freeze-thaw treatments

○堀井 美歌、松宮 健太郎、林 由佳子、松村 康生（京大院農）
○Mika HORII, Kentaro MATSUMIYA, Yukako HAYASHI, Yasuki MATSUMURA (Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ.)

【目的】卵黄（EY）は幅広い加工食品に用いられ、品質保持期限の延長を目的としてしばしば冷凍される。EY を凍結融解（FT）すると、流動性に変化が表れ、ゲル状を呈するということ、また、この変化は NaCl を添加することで抑制されるといわれている。分光蛍光法は、タンパク質中のトリプトファン（Trp）の存在状態に基づくタンパク質の変性状態の評価に用いられる。EY の蛍光スペクトルを EY のタンパク質の変性およびゲル化の新たな評価法として用いることができるかを検証することを最終的な目的とし、本研究では、EY の蛍光スペクトルが NaCl 添加や FT 処理によって変化するのかを検討した。
【方法】鶏卵を卵白と卵黄に分離し、卵黄から卵白の夾雑物を取り除き、卵黄膜を切開し、卵黄部のみ回収して、EY 試料とした。EY 試料約 40 ml を容器に入れて、様々な条件で FT 処理し、容器を傾けた際に試料が流動するかどうかを目視により観察した。様々な凍結ストレスを与えた EY に対して、その粘度測定および動的粘弾性測定、SDS-PAGE 分析、蛍光スペクトル（励起波長：220 nm～320 nm, 蛍光波長：225 nm～420 nm）測定を行った。
【結果】各温度で凍結させ、解凍した EY の外観観察と物性測定の結果から、NaCl の添加や凍結温度は EY の流動性に影響を及ぼすことが示された。NaCl 無添加の EY は、各温度での FT 処理後、流動性が失われた。NaCl を添加した EY を-20℃で凍結させた場合は、EY の流動性に顕著な変化は見られなかったが、-40℃で凍結させると、EY は FT 処理によって流動性が失われた。凍結温度、FT サイクル数、NaCl の有無によって SDS-PAGE のバンドパターンに違いは見られなかった。
すべての EY 試料で、励起波長 295 nm, 蛍光波長 330 nm～335 nm で最大蛍光が観察されたことから、蛍光スペクトルは主に EY のタンパク質中の Trp の蛍光に支配されていると考えられる。NaCl 無添加の EY では、各凍結温度で、FT サイクル数が増えるのに従い、最大蛍光強度の上昇が見られた。凍結温度が-20℃の 10 wt%加塩 EY では、NaCl 無添加の EY と比較して、FT サイクル数増加による蛍光強度の顕著な上昇は見られなかったが、これは NaCl 添加により EY の凍結変性が抑制されたためだと考えられる。凍結温度が-40℃の場合は、NaCl を添加しても FT サイクル数が増加するのに従い、蛍光強度が上昇したことから、NaCl 添加では EY の凍結変性が完全には抑制されないことが示唆された。EY の流動性の変化と蛍光スペクトル測定の結果との間には明確な関連性があり、分光蛍光法が FT 処理による EY のタンパク質の変性およびゲル化の評価法として用いることができる可能性が示唆された。

egg yolk, freeze-thaw, fluorescence spectrum

講演番号：2B02a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ B 校舎 02 会場

大豆タンパクとサイリウムガム混合ゲルの物性に関する研究

Physical properties of soy protein-psyllium seed gum mixed gel

○安藤 為明[1]、田中 克幸[1]、畠中 芳郎[2]、山内 朝夫[2] ([1]奥野製薬工業株式会社、[2]地方独立行政法人大阪市立工業研究所)
○TAMEAKI ANDO[1], KATSUYUKI TANAKA[1], YOSHIRO HATANAKA[2], ASAO YAMAUCHI[2] ([1]OKUNO CHEMICAL INDUSTRIES CO.,LTD, [2]OSAKA MUNICIPAL TECHNICAL RESEARCH INSTITUTE)

【目的】
大豆タンパク素材の新たな物性改変を目指して、大豆タンパクに多糖を混合した粉体を調製している。加水と加熱で得たハイドロゲルは、大豆タンパクが本来持つゲル物性と大きく異なるものがあり、特にサイリウムガムを混合したゲルは壊れにくい柔軟な物性になることを明らかにしている。さらに、混合粉体をあらかじめ押出成形機を用いて加熱混練すると、ゲル強度が高まることを見出している。本研究では、大豆タンパクのみの粉体や混合粉体を乾熱または加熱混練することで、熱がタンパク質や多糖に及ぼす作用を調べた。
【方法】
混合粉体は大豆タンパクに対してサイリウムガムを加えたものを用いた。ハイドロゲルは、混合粉体の 15%w/w 懸濁液をペースト状にした後、円柱状の型枠内で加熱して作製した。また、大豆タンパクのみの粉体や混合粉体を特定条件で乾熱または加熱混練したものについても、同様にサイリウムを添加してハイドロゲルを作製した。得られたゲルの物性は、テキソグラフを用いた圧縮変形法で測定した。
【結果】
まず、大豆タンパク粉体の乾熱によるゲル物性の変化を調べた結果、乾熱処理した大豆タンパク粉体に非乾熱のサイリウムガム粉体を混合したゲルは、非乾熱の混合ゲルと比べてゲル強度が高くなった。一方、サイリウムガムの粉体のみを乾熱処理した混合ゲルを調べたところ、非乾熱の混合ゲルと同程度のゲル強度しかなかった。これらの結果から、サイリウムガムではなく大豆タンパク粉体の乾熱処理がゲルを強化することがわかった。
次に、混合粉体の加熱混練を行ったところ、乾熱処理ではみられない効果が得られた。大豆タンパク粉体の加熱混練によるゲル強化は乾熱処理と同様に確認できた。サイリウムガムを含む混合粉体を加熱混練するとゲル強度がさらに高まった。以上のことは、加熱混練にはタンパク質粉体への加熱効果以外にゲルを強化する作用があることを示唆した。

soy protein, psyllium seed gum, Physical properties

講演番号：2B02a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ B 校舎 02 会場

グリアジン水和物のレオロジー特性に対する食塩の影響

Effects of salt on rheological properties of hydrated wheat gliadins

○東野 ゆうき、松宮 葵、小谷 正男、松村 康生、裏出 令子（京大院農・農学）
○Yuki HIGASHINO, Aoi MATSUMIYA, Masao KOTANI, Yasuki MATSUMURA, Reiko URADE (Kyoto Univ., Division of Agronomy and Horticultural Science)

【目的】小麦粉生地の物性は主にグルテンに起因すると考えられている。グルテンは主要タンパク質であるグリアジンとグルテニンが分子間相互作用により分子集合した複合体であるが、その物性発現の分子機構はいまだ不明である。また、小麦粉生地を用いた食品加工において生地の抗張性や伸長性を増加させる食塩が物性調節に重要な役割を担っているが、その作用機構はほとんど明らかとなっていない。本研究では、生地物性における食塩の作用機構の解明を目指して、グルテン構成タンパク質のうちグリアジンの水和物のレオロジー特性に食塩が及ぼす影響を検討した。**【方法】**グリアジンは食塩添加生地から純水で抽出した。グリアジンの分子種組成は等電点電気泳動と SDS-PAGE を組み合わせた 2 次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分析した。純水及び食塩水で水和させたグリアジンの動的粘弾性はレオロゾル-G3000（UBM 製）を用いて、曳糸性は Neva Meter（石川鉄工所製）を用いて測定した。**【結果】**先行研究で開発した食塩添加生地の純水洗浄による抽出法により、70%アルコール抽出法とほぼ同じ収量でグリアジンが抽出され、その分子種組成にも方法間でほとんど差がないことを明らかにした。純水抽出法で調製したグリアジンは純水に可溶性であったが、食塩濃度に依存して凝集し不溶化した。すなわち、グリアジン水溶液に食塩を 5mM になるように添加すると一部のグリアジンが不溶化し、500mM ではすべてのグリアジンが凝集した。なかでもωグリアジンは食塩によって凝集しやすく、10mM で大部分が沈殿した。グリアジンと純水あるいは食塩水を 4:6 の割合で混合した水和グリアジンの貯蔵弾性率 G’と損失弾性率 G’’を検討した。パン生地の作製に一般的に用いられている食塩水濃度である 0.5M までは G’と G’’の上昇は比較的緩やかであったが、うどん生地の作製に用いられる 2～3M食塩水で水和させると G’と G’’は急激に上昇した。また、tan δ(G’’/G’)は食塩の濃度に依存して減少し、弾性が増加することが明らかとなった。これらの結果から、食塩の濃度に依存してグリアジン間の分子間相互作用が増強しより密に凝集することで弾性が増加すると推定される。さらに、いずれの食塩濃度でも測定温度 4～66℃の範囲内で温度が上昇すると G’と G”の値が減少することから、食塩によるグリアジンの弾性の増加には水素結合や Van der Waals 力による分子間相互作用の寄与が大きいことが明らかとなった。一方、生地の伸長性にはグリアジンが重要な役割を果たしていると考えられている。伸長性の指標の一つと考えられる曳糸性も、食塩濃度に依存して劇的に増加した。したがって、食塩による生地の抗張性や伸長性の増加の一部は、グリアジンに対する食塩の作用によると考えられる。

gliadin, viscoelasticity, wheat flour

講演番号：2B02a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ B 校舎 02 会場

水和グリアジンが形成するナノ集合体と食塩との関係

Nanostructures of hydrated gliadins and effects of sodium chloride on its formation

○松宮 葵[1]、佐藤 信浩[2]、大場 洋次郎[2]、杉山 正明[2]、東野 ゆうき[1]、裏出 令子[1] ([1]京大院農・農学、[2]京大・原子炉)
○Aoi MATSUMIYA[1], Nobuhiro SATO[2], Yojiro OBA[2], Masaaki SUGIYAMA[2], Yuki HIGASHINO[1], Reiko URADE[1] ([1]Kyoto Univ., Division of Agronomy and Horticultural Science, [2]Kyoto Univ., Research Reactor Institute)

【目的】小麦粉生地の物性は、主要タンパク質であるグリアジンとグルテニンが分子間相互作用により分子集合したグルテンに起因すると考えられている。しかし、グルテンの物性発現の分子機構はいまだ不明である。タンパク質のような高分子化合物の物性の源は、高分子化合物が分子間相互作用により集合して形成するナノスケールの集合体(ナノ集合体) にあると考えられている。そこで本研究では、グルテンの物性発現の分子機構の解明を目指してグリアジンの水和物中のナノ集合体の存在を証明するとともに、ナノ集合体の存在状態に対する食塩の影響を検討した。**【方法】**グリアジンは食塩添加生地から純水で抽出した。X 線小角散乱測定は、Photon Factory リングの BL-10C にて行った。孤立分子の慣性半径は Guinier 近似式を用いて算出した。ナノ集合体間距離は、散乱プロファイルの屈曲点の散乱ベクトル q_s 値から Bragg の式により求めた。会合したグリアジン分子の解析は、タンパク質架橋剤 DTSSP を用いて水溶液中で会合しているグリアジンを架橋し、Bis-Tris 緩衝液系の PAGE と SDS-PAGE を組み合わせた 2 次元 PAGE により行った。**【結果】**グリアジン溶液のＸ線小角散乱プロファイルから、0.025～0.1%溶液中ではグリアジンは孤立分子として存在し、慣性半径は約 2nm であることが明らかとなった。さらに、円柱モデルを用いた解析により半径約 2.5nm, 長さ約 8nm の棒状分子とした場合、散乱曲線を最も良く再現できた。0.5%以上の溶液では散乱プロファイルに屈曲が現れ、グリアンジン分子間に相互作用が働いていることが示された。会合グリアジンの架橋実験により、特定のグリアジン分子種同士が相互作用していることが明らかとなった。15%水和グリアジンの散乱プロファイルには明確な屈曲点がありナノ集合体が形成されていることが初めて明らかとなった。ナノ集合体間距離は約 50nm であった。40%水和グリアジンでは、ナノ集合体間距離は 14nm に短縮した。さらに、15％水和グリアジン中のナノ集合体間距離が 5mM 食塩添加により 17nm に、50～500mM 食塩添加により約 10nm に短縮することを明らかにした。500mM 食塩存在下ではナノ集合体間に間隙がないと考えられ、集合体間距離から約 15 分子のグリアジンが一つのナノ集合体を形成していると計算された。以上の結果から、食塩によりグリアジン分子間相互作用が増加しナノ集合体から構成される凝集体が収縮することで抗張性や伸長性が増加すると推測される。

gliadin, nanostructures, X-ray small angle scattering

講演番号：2B02a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ B 校舎 02 会場

シクロデキストリンの包接能を利用したコエンザイム Q10 のナノミセル形成

Nanomicelle formation of coenzyme Q10 by using complexation of cyclodextrin

○上梶 友記子[1,2]、大西 麻由[2]、中田 大介[2]、寺尾 啓二[2]、PARTANEN Riitta[3]、吉井 英文[1] ([1]愛媛連大農、[2]シクロケムバイオ、[3]VTT)
○Yukiko UEKAJI[1,2], Mayu ONISHI[2], Daisuke NAKATA[2], Keiji TERAO[2], Riitta PARTANEN[3], Hidefumi YOSHII[1] ([1]UGAS Ehime Univ., [2]CycloChem Bio, [3]VTT)

【緒言】シクロデキストリン (CD) は D-グルコースが α-1,4 結合で環状に繋がった構造を取り、空洞内部は疎水性で外部は親水性を示す。その空洞内に疎水性のゲスト化合物を取込み、包接作用を有することで知られている。これまでに、疎水性の生理活性物質であるコエンザイム Q10 (CoQ10) の溶解性向上を目的として、CD 包接複合体を中間原料とした CoQ10 のミセル形成を検討してきた。本研究では、界面活性剤であるグリチルリチン酸 K_2 (GZK_2) を用いて調製した CoQ10 ナノミセルの物理化学的特性を評価した。
【方法】CoQ10 : γ-CD = 0.4 : 1 (モル比) の配合比で CD 包接複合体粉末を噴霧乾燥にて作製した。CD 包接複合体中の γ-CD 量に対して、0.1 ～ 4 モル倍の GZK_2 粉末を加え、純水 15 mL 中でスターラー撹拌した (30ºC、約 1,000 rpm)。調製した懸濁液を 0.2 μm PTFE フィルターで濾過し、CoQ10・GZK_2 ナノミセルを含有する水溶液を得た。ナノミセル溶液中の CoQ10 濃度は高速液体クロマトグラフ (LC-2010C, Shimadzu) にて定量し、表面張力は Force Tensiometer (Sigma 701, Biolin Scientific) にて測定した。
【結果・考察】不溶性の CoQ10/γ-CD 包接複合体に GZK_2 を添加するにつれ、CoQ10 の溶解度上昇が顕著に認められ、最大濃度は 2.5 mM に達した。さらに、CoQ10/γ-CD 包接複合体中に含まれる γ-CD に対して 1.6 モル倍の GZK_2 を添加した際に、CoQ10 の溶解度に屈曲点が認められ、それ以降は一定濃度で推移した。一方、γ-CD に関しても (CoQ10 ではなく) GZK_2 との包接複合体を形成することで溶解性の上昇が認められた。CoQ10/γ-CD 包接複合体としては水への溶解性が極めて低いが、GZK_2 を添加したことで γ-CD 空洞内において CoQ10 と GZK_2 の置換反応が起こり、γ-CD は水溶性の GZK_2/γ-CD 包接複合体を形成して溶解した。そして、置換反応によって γ-CD から解離した CoQ10 は周囲に存在する GZK_2 のナノミセルに包括され、溶解したものと推察された。溶解初期段階における みかけの溶解速度定数 k_A を算出したところ、k_{CoQ10} および $k_{\gamma\text{-CD}}$ は等しい値を示した。よって、GZK_2 添加による CoQ10/γ-CD 包接複合体からの GZK_2/γ-CD 包接複合体と CoQ10・GZK_2 ナノミセルの形成は、ほぼ等しい速度で進行したとされる。また、CoQ10/γ-CD 包接複合体に GZK_2 を添加した際の CoQ10・GZK_2 ナノミセル形成の反応式から、平衡定数 K およびナノミセル中の CoQ10 に対する GZK_2 の量論比を算出した。CoQ10 溶解度が直線的に上昇した濃度域 (モル比 GZK_2/γ-CD = 0.1 ~ 1.5) において近似したところ、平衡定数は K = 0.68 (-) と算出され、量論比は 1 分子の CoQ10 に対して 1 分子の GZK_2 が相互作用していることが推察された。また、GZK_2 の臨界ミセル濃度 (CMC) は表面張力の測定結果から、約 1.3 mM と求められた。CoQ10・GZK_2 ナノミセルの表面張力は CMC 近傍に屈曲点が認められ、CMC 以上では表面張力の低下が緩やかになった。

micelle, coenzyme Q10, cyclodextrin

講演番号：2B02a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ B 校舎 02 会場

クチクラ膜の強度に及ぼすクタンの役割

Function of cutan in cuticular membrane

○東 順一[1]、椿 俊太郎[2]、金山 裕亮[3]、米森 敬三[4]、宇山 浩[1] ([1]阪大院工、[2]高知大総研セ、[3]サンアクティス、[4]京大院農)
○Junichi Azuma[1], Shuntaro Tsubaki[2], Hiroaki Kanayama[3], Keizo Yonemori[4], Hiroshi Uyama[1] ([1]Osaka Univ., [2]Kochi Univ., [3]Sunactis Co., [4]Kyoto Univ.)

【目的】
果実の果皮は、水分の損失・侵入を防ぎ、病原菌に対するバリア、機械的支持に寄与するのみならず、見た目・棚もち性など品質を決める重要な組織である。その中でも、クチクラ膜は、ワックス、クチン、クタンと多糖類からなるコンポジットで、その特性が果皮の性質を決めていると言っても過言ではない。そこで、我々の研究グループでは、柿の果皮クチクラ膜を単離してその化学的・力学的性質について研究を進めている（Tsubaki et al., Food Chemistry, 132, 2135, 2012; PLOS ONE, 8(9),e75275, 2013；野口等, 日本食品科学工学会誌, 60(10), 582, 2013)。その過程で、ワックス、特にウルソール酸はナノフィラー様の機能を持つこと、多糖特にセルロースは強度・強靭性に寄与することなどを明らかにしてきた。本研究では、クタンに注目して物性への寄与について検討した。
【方法】
渋ガキ（平核無）と甘ガキ（富有）の成熟した果実（京都大学農学研究科北白川果樹試験場）から得た果皮層を木質試料に対して一般的に用いられる脱リグニン処理(Wise 法)と過酸化水素処理を行い、クチクラ膜の成分分析と力学的性質の変化を分析した。さらに、処理後のクチクラ膜のセルラーゼ製剤による処理を行い、多糖の除去効果もあわせて比較検討した。
【結果】
いずれの処理によっても、両柿のクチクラ膜はカロチノイド系の色素が分解して白色化した。酵素法によって調製した多糖含量が 2-3%と少ないクチクラ膜と比較すると、6-10%程度の多糖を残存することが可能となり、クチクラ膜の力学的性質に及ぼす多糖の影響の解析に適したクチクラ膜となった。また、Wise 法と過酸化水素による処理は両柿のクチクラ膜に対して類似した作用を及ぼし、処理後のクチクラ膜を直接 FT-IR 分析することにより、芳香族に由来する吸収が処理に伴い低下し、クタンレスクチクラ膜となることを容易に示すことができた。多糖含量も未処理のものと比較すると約 1/2 以下となった。力学的性質を比較検討した結果、処理により弾性係数は低下するが、最大応力と最大ひずみが大きくなる傾向が認められた。一方、クタンレスクチクラ膜を酵素処理して得たクチクラ膜は皺の多い構造体となり、最大ひずみが倍以上になり、残存クチンの弾性的ポリエステル性と一致した結果となった。以上の結果、クタンはセルロースとともにクチクラ膜の強度と弾性係数を支配し、クチクラ膜の剛直化に寄与していることが示唆された。

cutan, cuticlar membrane, function

講演番号：2B02a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ B 校舎 02 会場

トウモロコシ果皮の水分吸着特性

Water adsorption property of corn pericarp

○吉田 有希[1]、宇山 浩[2]、東 順一[2]、本田 与一[1] ([1]京大院農、[2]阪大院工)
○Tomoki Yoshida[1], Hiroshi Uyama[2], Jun-ichi Azuma[2], Yoichi Honda[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Osaka Univ.)

【目的】トウモロコシは、世界で大量に生産されており、世界三大食物のひとつである。トウモロコシは、長い栽培の歴史の中で様々な生育環境や使用目的に適合した品種が開発されている。典型的には、トウモロコシは、デンプンの蓄積状態と穀粒の見かけから、甘味種、爆裂種、馬歯種、硬粒種、もち種、軟粒種の 6 種に分類される。トウモロコシの乾燥速度や保存性等の品質に関わる因子の一つとして水分吸着特性が挙げられる。水分特性を左右する組織は果皮である。そこで、穀粒の最外層に位置する果皮に着目し、その厚さ、組成及び水分吸着特性を品種間で比較検討した。
【方法】トウモロコシ果実を蒸留水に一夜浸漬後、縦にカットし果皮を剥離した。剥離した果皮から上半分の部位を切り出し、オートクレーブ処理（121℃, 1 h）後、蒸留水で水洗し、凍結乾燥させたものを実験に使用した。甘味種（2 種)、爆裂種（2 種)、馬歯種（2 種)、硬粒種（1 種)、もち種（3 種)、合わせて 10 種におけるトウモロコシ果皮の組成分析（タンパク含量、脂質含量、灰分含量、糖含量、ウロン酸含量、デンプン含量）と中性糖組成分析を行った。また、果皮の水分吸着特性は、飽和塩を用いた重量法によって得られた水分吸着等温線を Hailwood-Horrobin model を用いて解析することにより評価した。
【結果】トウモロコシ果皮の厚さは 0.059-0.127 mm であり、爆裂種において最も厚い果皮、もち種において最も薄い果皮がみられた。トウモロコシ果皮は、いずれもタンパク含量（2.9-5.5%)、脂質含量（4.9-12.1%)、灰分含量（0.4-1.1%)、糖含量（81.6-94.6%)、ウロン酸含量（4.9-9.6 %)、デンプン含量（0.7-3.5%）にあり、品種間に特筆すべき差異は認められなかった。トウモロコシ果皮に含まれる多糖は、グルコース（18.8-29.7%)、キシロース（39.8-44.7%)、アラビノース（21.5-31.2%）から構成されており、主にセルロースとアラビノキシランから成ることが推察された。トウモロコシ果皮の水分吸着等温線は、いずれの品種においても IUPACⅡ型のシグモイド状を示した。解析には木材などの IUPACⅡ型の水分吸着等温線の解析に効果的であった Hailwood-Horrobin model を使用した。その結果、果皮の水分吸着速度定数は甘味種において最も高い値（28.3)、馬歯種において最も低い値 (11.0) が認められた。さらに、果皮の水分吸着速度定数と厚さ及び組成との相関を解析した結果、水分吸着特性は果皮の厚さではなく、組成に依存することが明らかとなった。特に、ヘミセルロース含量と高い負の相関関係にあり、アラビノキシランのアラビノース置換度が果皮の水分吸着特性を決定づけていることが推察された。

Corn pericarp, Water adsorption, Arabinoxylan

講演番号：2B02a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ B 校舎 02 会場

粘度 B 係数と部分モル比容から求めた水和パラメータ h と分子間相互作用

Hydration parameter h estimated by viscosity B-coefficients and partial molar volume of various sugars in water and its relationship with parameter representing molecular interactions

○佐藤 之紀[1]、關藤 祐加[1]、花垣 恵[1]、岩切 恵梨奈[1]、平澤 毬子[1]、宮脇 長人[2]([1]県立広島大生命環、[2]石川県大生資環)
○Yukinori Sato[1], Yuka Sekitou[1], Megumi Hanagaki[1], Erina Iwakiri[1], Mariko Hirazawa[1], Osato Miyawaki[2] ([1]Prefectural Univ. of Hiroshima, [2]Ishikawa Prefectural Univ.)

【目的】モル分率(Xs)と水分活性(Aw)の関係でのラウルの法則からのずれの指標は，パラメータ α という分子間相互作用を表すパラメータで示されている。ここでは，パラメータ α と水溶液の粘度と密度測定から得られる糖の水和パラメータ *h* の関係を解析し，パラメータ α の物理学的意義の解明に資する目的で行った。

【方法】ガラクトースのパラメータ α を常法に従って，氷の融解温度測定から算出した。一方，グルコース，スクロースなどの糖の水溶液を 0-0.5 mol/L の濃度になるように調製し、5-40℃でそれらの密度（ρ）を精密密度計(DMA 4500, Anton Paar)で測定し，キャノンフェンスケ粘度計（柴田）を用いた動粘度と密度測定の ρ の結果から,粘度 B 係数を求めた。さらに,部分モル比容(*V*$_2$) の算出には，Apparent molar volume（ϕv）と濃度（c）の算出式を c→0 に外挿して，*V*$_2$とした。

これらをもとに,Herscovits and Kelly (1973) による糖の水和パラメータ *h* を次式から算出した。

h = (1000B/ν −*V*$_2$) /18　ここで，ν は分子の大きさに関する係数で、アレンシュタインによる無限希釈状態での値である 2.5 を用いた。

【結果】ガラクトースのパラメータ α 値を算出したところ，この水溶液でも Xs-Aw 曲線は高い R^2 係数 (R^2 = 0.998)で示される式で近似可能であり，パラメータ α 算出式の適用が可能であった。求められたガラクトースのパラメータ α 値は，既知のマンノースやグルコースとほぼ同値であり，-2.075 を示した。一方，25℃での水溶液中における糖の粘度 B 係数を調べたところ，糖の *V*$_2$が大きくなると，粘度 B 係数も大きくなり，粘度 B 係数は *V*$_2$の一次式で表すことができた。また，25℃での *V*$_2$は，分子量 (Mw)の関数で示すことが可能であった。粘度 B 係数と *V*$_2$の関係から糖の水和パラメータ *h* を算出し，水和パラメータ *h* の温度依存性を調べたところ，水和パラメータ *h* は粘度 B 係数の温度依存性とほぼ同じ傾向を示したことから，粘度 B 係数の影響を受けやすいと考えられた。他方，溶質の水構造への効果を Water structure-maker か Water structure-breaker で示す指標の一つとしての dB/dT を求めたところ,用いた 7 種類すべての糖で負の値を示したことから一般的にガラクトースなどの糖は Water structure-maker と考えられ，Water structure-breaker として知られている尿素の dB/dT 値の符号や値とは異なっていた。さらに,糖のパラメータ α 値と 25℃でのパラメータ *h* の関係を調べたところ，R^2 = 0.903 で示され，アルコールを主としたパラメータ α とパラメータ *h* の関係のみならず，糖に限定した非電解質においても両者には密接な関係があることが示された。

hydration, water structure, viscosity

講演番号：2B02a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ B 校舎 02 会場

超音波パルスドップラー法による水の嚥下量が食道での流動性に及ぼす影響の解析
Ultrasound Pulsed Wave Doppler Imaging of Esophagus Illustrates the Effects of Water Volume on Bolus Kinematics
○神山 かおる、高 智紅（（独）農研機構・食総研）
○Kaoru KOHYAMA, Zhihong GAO (National Food Research Institute, NARO)

【目的】高齢社会の中、嚥下した食物が食道ではなく気道に入る誤嚥が増え、安全に嚥下できることが求められてきている。食物のテクスチャーと食塊量が嚥下運動に影響を及ぼし、誤嚥防止に重要な要因であることが報告されている。食道の入口部は食道の狭窄部であり、食塊、異物などがつまりやすい部位である。咀嚼・嚥下等の機能評価に広く用いられている X 線法は被曝の問題があるが、超音波は人体に対して非侵襲である。超音波ドップラ法を用いて咽頭部で嚥下した食物の流速を定量化した研究はあるが、食道入口部の観察に関する報告は見られない。そこで、本研究では超音波ドップラ法を食道入口部における嚥下した食物流速評価に適用するため、嚥下時における食道入口部の描出法の確立と、食道入口部における嚥下した食物量の違いによる流速の影響について検討を行った。
【方法】被験者は、本研究に対して同意が得られた健常成人(男女各 5 名、平均年齢 37.7 歳)である。3 mL、6 mL、9 mL、および 12 mL の水を試料とした。提示順はランダムとし、1 セッションにおける測定回数は 3 回以上とした。超音波画像診断装置 Aplio MX(SSA-780A、東芝メディカルシステムズ(株))を用い、同社製中心周波数 3.1 MHz のコンベックス式電子スキャンプローブ（PVT382）を被験者の頸部に当て、2D モードで食道を観察した後で、パルスドップラモードで食道入口部での嚥下した試料の通過時間 d、最大速度 v_{max}、平均流速 v_{mean} を測定した。同一実験日同一被験者の平均を繰り返しデータとして、統計ソフト SPSS Ver.14.0 を使用して反復測定分散分析を行った。さらに、有意差が認められたパラメータについては対応のある t 検定を行い、Holm の修正法により判定した。
【結果】被験者の間に差があるものの、同一被験者の中では一口嚥下量の違いによって食塊の流れに顕著な特徴があることが明らかになった。d、v_{max} と v_{mean} は一口嚥下量の増加により増加した。通過時間 d の平均は 0.28 s から 0.37 s であった。v_{max} は 100 cm/s～140 cm/s であった。v_{mean} に関しては、30 cm/s 程度で、ばらつきも小さかった。水は嚥下量の増加に影響されやすい試料であることが示唆された。食道入口部での食塊流速の変化は、食道直径、食道入口の嚥下圧の変化に関連していると考えられる。水は経験的に誤嚥しやすいと知られ、食道入口部を通過する時の速度が 100 cm/s を超える成分が存在していたが、健常成人では時間と速度を変化させることで、大きな一口嚥下量でも誤嚥せずに嚥下できるように調整されている可能性が示唆された。

ultrasound pulsed wave Doppler, flow properties, swallowing

講演番号：2B02a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ B 校舎 02 会場

ヒトのぜん動運動を備えた胃消化シミュレーターによる固形食品の消化動態の観測
Observation and analysis of solid food digestion by human gastric digestion simulator equipped with peristalsis

○神津 博幸[1,2]、小林 功[2]、中田 友輝[1]、中嶋 光敏[1,2]、ネヴェス マルコス[1,2]、植村 邦彦[2]、佐藤 誠吾[1]、市川 創作[1]([1]筑波大院生環科、[2]農研機構食品総合研究所)
○Hiroyuki Kozu[1,2], Isao Kobayashi[2], Yuki Nakata[1], Mitsutoshi Nakajima[1,2], Marcos Neves[1,2], Kunihiko Uemura[2], Seigo Sato[1], Sosaku Ichikawa[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]National Food Research Institute)

【目的】胃における食品の消化には、消化酵素や胃酸による化学的作用に加え、ぜん動運動に誘起される物理的作用が関与している。ヒトを含めた動物の胃における *in vivo* での食品消化動態の観測・評価は、実験上の制約がある。一方、一般に行われているフラスコ振とうによる *in vitro* 消化試験では、胃のぜん動運動による物理的作用を模擬することは困難である。そこで本研究グループでは、胃の中でも特にぜん動運動が活発な幽門部の形状と運動を模擬したヒト胃消化シミュレーター（Gastric Digestion Simulator (GDS)）を開発した。本研究では、この GDS を用いてタンパク含有食品である豆腐の消化挙動の観察および解析を行った。
【方法】GDS におけるぜん動運動の進行速度、幅および振幅等はヒトの健常者に関する文献値を参考に設定した。食品試料として絹ごし豆腐を使用した。一辺 5 mm の立方体形状の豆腐粒子（80 g）を人工唾液（30 mL）と混合した後、これを人工胃液（pH 1.3, 200 mL）と共に GDS に投入し 37℃で 60～180 分間消化試験を行った。GDS 本体の前後面は内部が観察できる様に透明とし、豆腐粒子の消化挙動をリアルタイムで直接観察した。消化試験後の豆腐粒子を目開き 3.35, 2.36, 1.18 および 0.60 mm の各篩いで分級し、各画分の乾燥重量を測定した。また、各画分の窒素含量を求めタンパク質含量の指標とした。対照として、300 mL 容フラスコに同じ内容物を投入して振とうする *in vitro* 消化試験を行った。振とう条件は 115 stroke/min、37℃とした。
【結果】GDS における消化試験により、豆腐粒子が消化時間の進行に伴い徐々に微細化される様子を直接観察できた。この豆腐粒子の微細化は、主にぜん動運動による胃壁の収縮を模擬したゴム板の収縮部近傍で生じている様子が観察された。GDS により 180 分間消化試験を行った豆腐粒子の形状は、消化前の立方体形状を反映せず不定形であった。一方、フラスコ振とうによる消化試験では、消化試験後も立方体の形状を維持した豆腐粒子が多く観察された。また、豆腐粒子のサイズ分布に関しても、GDS では中間サイズの画分（0.60 mm < d < 2.36 mm）が全体の約 40%存在していたが、フラスコ振とうでは 10%未満であり、両者に顕著な違いが認められた。これらの結果から、ぜん動運動が豆腐の微細化に大きく寄与していることが示唆された。GDS 消化試験 180 分後には、腸へとつながる胃の幽門のサイズと同程度の篩の目開き（2.36 mm）より小さい豆腐粒子の乾燥重量は試料全体の 73%に達していた。この画分には、全豆腐試料の 71%の窒素が含まれており、消化により多くのタンパク質がこの微細画分に移行したことがわかった。
（本研究は JSPS 科研費 25・1035 の助成を受けたものです）

Gastric peristalsis, Visualization, Food digestion

講演番号：2B02a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ B 校舎 02 会場

ぜん動運動を備えた胃消化シミュレーターを用いた米飯の消化特性の観測

Observation and analysis of cooked rice digestion by gastric digestion simulator provided with peristaltic function

王 政[1,2]、市川 創作[3]、神津 博幸[1,3]、中嶋 光敏[1,2,3]、NEVES Marcos A.[1,2,3]、植村 邦彦[1,2]、○小林 功[1,2]（[1]農研機構食総研、[2]筑波大北アフリカ研究センター、[3]筑波大生命環境）
Zheng WANG[1,2], Sosaku ICHIKAWA[3], Hiroyuki KOZU[1,3], Mitsutoshi NAKAJIMA[1,2,3], Marcos A. NEVES[1,2,3], Kunihiko UEMURA[1,2], ○Isao KOBAYASHI[1,2] ([1]NFRI, NARO, [2]ARENA, Univ. Tsukuba, [3]Univ. Tsukuba)

【目的】ヒトの消化は、食物中の栄養素を体内で利用できるように物理的・化学的・生物的に分解するプロセスである。ヒト胃における食品の消化では、ぜん動運動に駆動される物理的消化と胃液成分の作用による化学的消化が起きている。米飯の胃消化に関しては、動物実験を用いた *in vivo* 研究や振とう法等による *in vitro* 研究が報告されてきた。本研究グループでは、ぜん動運動を模擬した機構を備えたヒト胃消化シミュレーターを最近開発し、食品の胃消化動態のリアルタイム観測を可能にした。本研究では、ヒト胃消化シミュレーターを用いた米飯の消化挙動を観測・評価し、物理的消化と化学的消化を考慮した米飯の胃消化動態に関する基礎的知見を得ることを目的とした。
【方法】胃消化シミュレーターを用いた消火実験において、ぜん動運動の進行速度（2.5 mm/s）、発生頻度（1.5 min^{-1}）、振幅等はヒトに関する文献値を参考にして設定した。食品試料として、精白米（茨城県コシヒカリ）を炊飯して得られた米飯を用いた。まず、60 g の米飯試料に 30 mL の人工唾液（NaCl: 0.117 g/L, KCl: 0.14 g/L, $NaHCO_3$: 2.1 g/L, α-アミラーゼ: 2.0 g/L）を加え、37℃で 2 分間静置した。次に、人口唾液を添加した米飯と 200 mL の人工胃液（NaCl: 8.775 g/L, ペプシン（豚由来）: 1.0 g/L, pH 1.3）を胃消化シミュレーターに投入し、37℃で 180 分間消化実験を行った。胃消化物は篩い（3.35 mm、2.36 mm、1.18 mm、0.60 mm）を用いて分級し、各画分の乾燥重量等の測定を行った。また、米飯の胃消化挙動のリアルタイム観察も行った。
【結果】胃消化シミュレーターを用いた消化実験において、米飯粒子は消化時間の経過に伴って徐々に微細化された。消化実験後の胃消化物に関して、幽門の透過できるとされるサイズ（<2 mm）と同程度の目開き（2.36 mm）の篩を通過した米飯粒子の乾燥重量は、全画分の 69%に達していた。特に、サイズが 0.60 mm 以下の微小米飯粒子の割合は 51%を占めた。上記の結果より、胃消化物に含まれている大半の米飯粒子は、幽門を透過できるサイズであることが分かった。胃消化挙動の直接観察を行ったところ、胃消化シミュレーターの中で人工胃液に浸されていた米飯粒子が実験開始後 30 分以内に大幅に膨潤することが示された。この時、胃壁の収縮部近傍で米飯粒子の微細化も起きている様子が観察された。その後は、米飯粒子の微細化の方が顕著になった。本研究における米飯粒子の微細化は、米飯粒子への圧縮や米飯粒子同士のズリが主たる原因であると考察された。
（本研究は、平成 25 年度すかいらーく学術研究助成の助成により行われた。）

Cooked rice, Gastric digestion simulator, Grain disintegration

講演番号：2B02a17
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ B 校舎 02 会場

食品の塩蔵工程中における塩分濃度非破壊測定法の開発

Non-destructive measurement method of the salinity concentration in food during salting process

○名古 匡志、築舘 亜由美、秋山 美展、石川 匡子（秋田県立大学院生物資源）
○Masashi NAKO, Ayumi TSUKIDATE, Yoshinobu AKIYAMA, kyoko ISHIKAWA (Akita Pref. Univ.)

【目的】水産品、畜肉品、農産物の加工において塩蔵は、塩味の付与、食品の脱水、タンパク質の変性、腐敗防止などの目的に用いられる手法である。しかし、近年では、健康上の理由から減塩が推奨されており、最適な塩分濃度の見極めが重要になってきた。塩蔵過程における食品の塩分濃度は、食品の水抽出液を用いた成分分析によって求める方法が一般的であり、非破壊かつリアルタイムでモニタリング出来る方法はないため、漬けすぎによる高塩分摂取を防げない。そこで、本研究では、電気インピーダンス測定により、食品中での塩の浸透挙動および塩分濃度を非破壊かつリアルタイムにモニタリング出来るかを検討した。

【方法】試料には寒天、卵白ゲルを用いた。各ゲルをガラスセル（25 mm × 25 mm × 50 mm）に流し固め、テストピースを作製した。インピーダンス測定には LCR メータ(3532-80、日置電気株式会社)を用いた。電極として食品内部に差し込み可能なステンレス製の棒電極を作製し、絶縁スプレーで被膜することで、一部分のみがゲルに直接接触できるように加工した。各ゲル表面に異なる量の塩を一様に振りかけ、インピーダンス値を測定し、数値の変化がなくなった時間を平衡状態とした。さらに、平衡状態まで塩を浸透させたゲルを、電極の高さに合わせて切り分け、塩化物イオン濃度測定を行った。

【結果】寒天、卵白の 2 種類のゲル内部への塩の浸透挙動について、電気インピーダンス値の変化を検討した結果、いずれのゲルにおいても、電極の接触部位がゲル上部から下部に移行するにつれて、インピーダンス値は低下し、値が平衡に達するまでの時間が長くなった。この平衡時間は、寒天ゲルと卵白ゲルでは異なっていた。また、塩の浸透挙動を可視化するために、硝酸銀を混合した寒天ゲルに食塩を振りかけて浸透挙動を観察したところ、インピーダンス値の変化と同様の挙動を示した。さらに、平衡時間におけるゲル中の塩化物イオン濃度を測定した結果、いずれのゲルにおいても時間と共にゲル上部から下部への浸透濃度が増加し、この増加した塩化物イオン濃度はインピーダンス値の変化と相関性が高いことがわかった。以上の結果から、塩の浸透性には、ゲル表面の水分、成分などの影響を及ぼすと考えられ、またこのインピーダンス測定による方法は異なるゲルに対しても適応されたため、食品での測定が可能であることが示唆された。

penetration, salting process, Non-destructive measurement

講演番号：2B02p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ B 校舎 02 会場

生姜プロテアーゼを用いた新規コラーゲンペプチドの生成

Production of novel collagen peptide using ginger protease

○多賀 祐喜、楠畑 雅、鈴木 哲、林田 治、小山 洋一、服部 俊治（株式会社ニッピ）
○Yuki TAGA, Masashi KUSUBATA, Satoshi SUZUKI, Osamu HAYASHIDA, Yoh-ichi KOYAMA, Shunji HATTORI (Nippi Inc.)

【背景・目的】生姜根茎にはシステインプロテアーゼファミリーに属するジンジベインが存在し、この酵素にコラゲナーゼ活性があること、proline（Pro）の次のアミノ酸の C 末端側を切断する活性があること、高い相同性を持つ 2 種のアイソフォームが存在することなどが報告されている。コラーゲンは glycine(Gly)-X-Y の繰り返し配列から構成されており、X 位には Pro が、また Y 位には hydroxyproline（Hyp）が多く存在している。昔からジンジベインは、その強いコラーゲン分解活性により食肉軟化など食品加工においても利用されているが、その反応生成物（ペプチド）については注目されていない。本研究では、ジンジベインを用いて新規コラーゲンペプチドを生成することを目的とし、その検討を行った。
【方法・結果】生姜根茎をエタノール中でホモジナイズして濾過した後、その残渣を乾燥させてジンジベイン粗精製物を作製し、これをゼラチン溶液に添加して分解反応を行った。得られた分解溶液のオリゴペプチド含有量を LC/MS で測定した結果、Gly-Pro-Y 型に加えて X-Hyp-Gly 型のペプチドも検出され、ジンジベインが Hyp も認識することが確認された。また、反応時の pH によりそのオリゴペプチド生成量は変動するが、Gly-Pro-Y と X-Hyp-Gly とではその傾向が異なっており、これがジンジベインの 2 種のアイソフォームの基質特異性の違いによるものであることが示唆されている。X-Hyp-Gly は既存のコラーゲンペプチド製品ではほとんど検出されておらず、このジンジベインを用いて生成したコラーゲンペプチドに新たな効能効果が期待される。

collagen peptide, hydroxyproline, ginger

講演番号：2B02p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ B 校舎 02 会場

Stability of astaxanthin during the treatment of Isada krill in subcritical water

○ Intira Koomyart[1], Hironori Nagamizu[1], Takashi Kobayashi[1], Hirokazu Shiga[2], Hidefumi Yoshii[2], Shuji Adachi[1] ([1]Div. Food Sci. Agric., Kyoto Univ., [2]Dep. Appl. Biol. Sci., Kagawa Univ.)

Isada krill (*Euphausia pacifica*) is a small shrimp-like crustacean and caught mainly in Sanriku-coast. The raw krill (30 g) was treated with water (30 mL) for 10 min in the temperature range of 100 to 240°C using a pressure-resistant vessel of batch type. The astaxanthin contents in the extract and residue were determined by HPLC using Luna(R) 3μ silica column (4.6 x 150 mm). The eluent was a mixture of hexane and acetone (82:18 v/v) at 1.2 mL/min. The elution profile of astaxanthin was monitored using an UV-Vis detector at 474 nm. The astaxanthin in the extract and residue was extracted with a mixture of dichloromethane and methanol (25:75, v/v). The extracted astaxanthgin was directly analyzed by the HPLC, and a part of extracted astaxanthin was saponified with methanolic sodium hydroxide to be determined by the HPLC. Unsaponified samples showed 6 main peaks and saponified ones did 2 major and 2 minor peaks because the free astaxanthin of the krill consists of many isomers. The overall astaxanthin content in the extracts prepared at low temperatures (100 to 140°C) increased with increasing treatment temperature and the highest yield was achieved at 140°C. In a temperature range of 160 to 240°C, the extracted astaxanthin was degraded and its contents in the extract and residue decreased with the increasing treatment temperature.

Acknowledgements This study was performed during the project of The Creation of Innovative Technology for Marine Products Industry, Program for Revitalization Promotion, Japan Science and Technology Agency (JST).

astaxanthin, Isada krill, subcritical water

講演番号：2B02p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ B 校舎 02 会場

エビアレルゲンタンパクの多糖類による化学修飾と抗体反応性に及ぼす影響

Glycation of prawn allergen using polysaccharide and the effect on antibody reactivity.

関 美紗希、小磯 茉奈、○佐々木 萌、菰田 俊一（宮城大食産業）
Misaki SEKI, Mana KOISO, ○Moe SASAKI, Toshikazu KOMODA (Miyagi Univ.)

[目的]

本研究は、エビに含まれるアレルゲンタンパクを還元糖と共に加熱することにより、化学的な修飾を加え、その抗体反応性を低減化させることを目的とした。エビは世界各国で食される一般的な食材であるが、これに含まれる耐熱性のタンパク質(トロポミオシン、TM)が原因となりエビアレルギーに罹患する場合がある。我々のグループでは、以前より単糖類と TM を加熱することにより、TM の抗体反応性が変化することを見出してきているが、今回は多糖類との反応により TM がどのような変化を受けるか検討を行うこととした。

[方法および結果、考察]

はじめに、ブラックタイガー種のエビからタンパク質を抽出し、SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングによりトロポミオシンタンパク(TM)を確認した。この結果、TM のサイズは約 37kDa であり、煮沸程度の加熱では分解しにくいことが示された。次に TM と多糖類の反応を行った。今回は、市販のグアー豆抽出物を反応用の多糖類として用いた。一般にグアー豆抽出物には、多糖類としてガラクトマンナンが多く含まれている。ブラックタイガーより抽出した TM 溶液をグアー豆抽出物と共に乾燥し、80 ℃で最大 4 週間まで加熱を行った。反応の様子は SDS-PAGE により確認し、時間経過に伴って TM と多糖類の複合体(糖-タンパク複合体)が形成されることが確認された。次に、ドットブロット法と ELISA 法を用いて抗体反応性の評価を行った。使用した一次抗体は、市販のトロポミオシン認識抗体および TM を接種するこにより免疫を施したマウスまたはラットの血清とした。二次抗体には抗 IgG 抗体、抗 IgE 抗体を用いた。この結果、トロポミオシン認識抗体は、加熱により糖-タンパク複合体ができると、これらに対する反応性が高くなる傾向が示された。また、これとは逆に、マウス血清による評価では、糖-タンパク複合体ができると抗体がこれを認識しにくくなることがわかった。このことは、TM が多糖類と反応することにより、糖-タンパク複合体となると、アレルギーに関わる TM 認識抗体がこれを認識しにくくなることを示し、TM タンパクのアレルゲン性を低減化できる可能性を示すものであった。現在、モデルアレルギーマウスを用いることにより、アレルギー症状の発症の様子を動物レベルで評価している。

Prawn allergy, Glycation, Polysaccharide

講演番号：2B02p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ B 校舎 02 会場

ジメチルホルムアミドを用いた噴霧乾燥粉末中の油脂の包括率の測定

Measuring method of encapsulated fish oil by N,N-dimethylformamide in spray-dried powder

○足立 早映[1]、四日 洋和[1]、安達 修二[2]、吉井 英文[1] ([1]香大農、[2]京大院農)
○Sae Adachi[1], Hirokazu Shiga[1], Shuji Adachi[2], Hidefumi Yoshii[1] ([1]Kagawa Univ., [2]Kyoto Univ.)

[目的] 近年，乳児や高齢者向け食品の機能性向上に対して，魚油などに多く含まれる n-3 系多価不飽和脂肪酸が注目されている．しかし，これらの物質は容易に酸化して異臭を放つため，その安定化が重要である．現在，その方法の一つに，噴霧乾燥法による魚油の粉末化がある．粉末の含油率や，粉末中の油脂の過酸化物価（POV）を評価する場合，前処理として油脂の抽出が必要となるが，抽出操作が煩雑であるため，多くの時間を要することや，多量の有機溶媒を消費することなどが課題となっている．そこで本研究では，亜麻仁油粉末を例として，抽出溶媒として *N,N*-ジメチルホルムアミド（DMF）を用いた油脂の迅速・簡便な分析方法について検討した．
[方法] 亜麻仁油（30wt%），賦形剤としてマルトデキストリン（67.0wt%），乳化剤としてカゼインナトリウム（3.0wt%）を含有する粉末を使用した．この粉末 1 g に DMF 10 mL を加えて溶解した後，ヘキサン 10mL を加えて油分を抽出し，ヘキサン層を減圧濃縮して，得られた残存油分の重量から含油率を決定した．同様に，ヘキサン層 1 μL を薄層クロマトグラフィー検出装置（TLC-FID, イアトロスキャン MK-5, 三菱化学メディエンス）で分析して含油率を測定した．また，食品分析で広く用いられている Röse-Gottlieb 法により含油率を測定し，DMF 法から得られた結果と比較した．抽出した各油分について，ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS, GCMS-QP5050A, 島津製作所）による分析から脂肪酸組成を確認した．粉末中の亜麻仁油の POV は，DMF 9 mL に粉末 1 g を加えて溶解した後，American Oil Chemists' Society の公定法であるクロロホルム/酢酸法により決定した．
[結果] DMF 法により亜麻仁油粉末の含油率を測定したところ，重量法では 30.6wt%, TLC-FID 法では 29.7wt%であった．一方，Röse-Gottlieb 法で求めた含油率は 30.5wt%であり，DMF 法とほぼ同じ値となった．GC-MS 分析より，DMF 法および Röse-Gottlieb 法で得られた油脂の脂肪酸組成を比較したところ，クロマトグラムのパターンにはほとんど変化がみられなかった．亜麻仁油粉末 / DMF 溶液の POV を測定したところ，POV の値が若干増大した．この詳細について検討したところ，DMF そのものが POV の値に若干影響を及ぼすことが判明した．このように，DMF 法を用いることにより，短時間且つ少ない溶媒使用量で公定法とほぼ同じ含油率を得られることが示された．一方，POV は，若干高い値が得られたが，簡易分析法として用いるには迅速・簡便に測定できる有用な方法であることが示された．

Spray drying, Fish oil, Microencapsulation

講演番号：2B02p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ B 校舎 02 会場

Multiple case study analysis of Solid-Liquid equilibrium of organic molecules in Ethanol/Water system

○Ilyes Dammak[1], Marcos Neves[1,2], Hiroshi Nabetani[3], Sami Sayadi[4], Mitsutoshi Nakajima[1,2,3]
([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Alliance for Research on North Africa, University of Tsukuba, [3]National Food Research Institute, NARO, Tsukuba, [4]Centr of Biotechnology of Sfax, Tunisia)

【Objectives】Olive mill water (OMW) is an agricultural residue that results from the production of olive oil. In this work, valuable compounds from OMW could be physically separated by exploiting differences in solubility on water/ethanol systems to induce the separation.

【Methods】The solubility of different organic compounds, contained in OMW, in water/ethanol systems were measured at various temperatures and solution molar enthalpies *(*$\Delta H°$) were determined using van't Hoff plots. This includes saccharides with different polymerization degree, organic acid, polyphenols, fatty acid and amino-acid. Solubility data were estimated at constant temperature using a simple apparatus and HPLC analysis.

【Results】We observed that solubility, in pure water and in alcoholic solutions, increased with increasing temperature. The drowning-out phenomena for the prepared mixture at 298.15 K was confirmed. Result was interpreted in terms of the ability of the solute to form hydrogen bond with water and the electrical attraction between charged groups in saccharide molecules. The experimental data were correlated using a UNIQUAC-based model and were predicted using UNIFAC-based model. The method is completely predictive, as the strength of the molecular interactions is determined in solid/liquid phase equilibrium. The calculated solubility is in reasonably good agreement with experimental data, and in the case of raffinose, which is a trisaccharide, and gallic acid, the agreement between predicted and experimental values was confirmed. Also standard molar Gibbs free energies for drowning-out ($\Delta G°$) from pure water to ethanolic solutions were calculated from the solubility data. In order to estimate the contribution of enthalpic and entropic terms, standard molar enthalpies ($\Delta H°$) and entropies ($\Delta S°$) of drowning-out were also calculated. The decrease in solubility was correlated to the positive $\Delta G°$ value which is mainly of enthalpic origin.

Solubility, Solid-Liquid equilibrium, Separation

講演番号：2B02p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ B 校舎 02 会場

Preparation of monodisperse aqueous liquid microspheres containing high-concentration of L-ascorbic acid by microchannel emulsification

○Nauman KHALID[1,2], Isao KOBAYASHI[1], Marcos. A NEVES[3], Kunihiko UEMURA[1], Mitsutoshi NAKAJIMA[1,3], Hiroshi NABETANI[1,2] ([1]Food Engineering Division, National Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan, [2]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8257, Japan, [3]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan)

[Objective] Encapsulating L-ascorbic acid in food grade formulations is a big challenge for industries. The aim of this study was to prepare monodisperse aqueous liquid microspheres containing a high concentration of L-ascorbic acid with different concentrations of sodium alginate (Na-ALG) using microchannel (MC) emulsification.

[Experimental] The dispersed and continuous phases used here was water containing Na-ALG (0.5 to 4 wt.%), L-ascorbic acid (5 to 30 wt%), and magnesium sulphate ($MgSO_4$, 0 to 2 wt%) and decane containing 5 (w/w) % tetra glycerin condensed ricinoleic acid ester (TGCR), respectively. MC emulsification was carried out at 45 ºC by permeating the dispersed aqueous phase through MC arrays into the well filled with the continuous oil phase. The silicon MC array chip (model: MS407) used here has four MC arrays each consisting of 100 parallel channels with a 4-μm depth. The surfaces of the MC array chip and glass plate were hydrophobically modified by treating with hexamethyldidilazane reagent prior to the first use.

[Results and Discussion] The optimized disperse phase composition for successful microspheres generation containing a high concentration of L-ascorbic acid was 2 wt% Na-ALG and 1 wt% $MgSO_4$. In this case, the flow rate of the continuous phase was 10 mL/h, whereas the pressure applied to the disperse phase ranged between 10 and 15 kPa. Higher $MgSO_4$ concentrations resulted in bursting of microspheres, while lower $MgSO_4$ concentrations yielded unstable microspheres. The aqueous liquid microspheres generated from the MCs under the preceding optimized conditions had a mean diameter (d_{av}) of 14 to 16 μm and coefficient of variation (CV) less than 8%. The dispersed phase pressure had a major effect on microspheres productivity. The d_{av} of liquid microspheres slightly increased with increasing concentration of L-ascorbic acid. The d_{av} of the resultant liquid microspheres increased to 20 μm at low Na-ALG concentrations (0.5 and 1 wt%). At a high Na-ALG concentration (4 wt%) d_{av} of resultant microspheres increased to 25 μm and the microspheres productivity decreased.

[Conclusion] Monodisperse stable aqueous liquid microspheres containing a high concentration of L-ascorbic acid were successfully prepared using MC emulsification under appropriate compositions of the dispersed aqueous phase and operating conditions.

L-ascorbic acid microspheres, microchannel emulsification, sodium alginate

講演番号：2B02p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ B 校舎 02 会場

Formulation and characterization of triglycerides O/W emulsions stabilized by oleuropein using microchannel emulsification

○Safa SOUILEM[1,2,3], Isao KOBAYASHI[2], Marcos. A NEVES[1,2], Sami SAYADI[3], Mitsutoshi NAKAJIMA[1,2] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan, [2]Food Engineering Division, National Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan, [3]Center of Biotechnology of Sfax, Tunisia)

[Objective] The effectiveness of antioxidants present in food emulsions depends on their chemical and physical properties as well as their interfacial activity that could affect oxidative stability of the emulsions. The primary aim of this study was to investigate the formulation and characterization of triglyceride oil-in-water (O/W) emulsions stabilized by oleuropein, the major phenolic compound in olive leaves, using microchannel emulsification (MC).

[Experimental] The continuous phase was water containing 0.6 wt% oleuropein. The dispersed phase was extra virgin olive oil (purchased from a local market in Tunisia), refined olive oil, refine soybean oil, or medium chain triacylglycerol (MCT-8, Taiyo Kagaku Co., Ltd.). The MC emulsification setup consisted of a silicon grooved MC array plate (CMS6-2) mounted into a module, two syringe pumps to feed the continuous and dispersed phases and a microscope video system. The 25x28-mm^2 MC array plate has 10 MC arrays, each consisting of 107 MCs with a 5-μm depth. Droplet generation was performed by permeating the dispersed phase through MC arrays into the wells initially filled with the continuous phase. The pressure hight was applied to the dispersed phase. Interfacial tension measurement was carried out using interfacial tensiometer that adopts pendant drop method (PD-W, Kyowa Interface Science Co., Ltd.).

[Results and Discussion] MC emulsification results demonstrate that it is possible to formulate monodisperse oleuropein-stabilized O/W emulsions with an average droplet diameter of around 25 μm and a coefficient of variation (CV) below 5% in the absence of the cross-flowing continuous phase, except for the MCT-containing system. Monodisperse oleuropein-stabilized O/W emulsions with MCT oil droplets were formulated only at the flow rates of the continuous phase exceeding a threshold value. Interfacial tension data indicate that oleuropein molecules adsorb at the droplet interface. Successful continuous MC emulsification for 15 hours was observed when using the extra virgin olive oil, refined olive oil, and refined soybean oil-containing systems. The emulsifying ability of oleuropein suggests that the concentration of synthetic emulsifiers and preservatives in O/W emulsions could be reduced.

(This work was financially supported by the Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development (SATREPS) Project.)

Oleuropein, microchannel emulsification, emulsifying ability

講演番号：2B02p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ B 校舎 02 会場

Application of beta-lactoglobulin as the emulsifier for producing limonene droplets using microchannel emulsification technique

○Nanik PURWANTI[1,2], Marcos. A NEVES[1,3], Kunihiko UEMURA[1], Mitsutoshi NAKAJIMA[1,3], Isao KOBAYASHI[1] ([1]Food Engineering Division, National Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan, [2]Biosystem Division, Department of Mechanical and Biosystem Engineering, Campus IPB Darmaga, PO. BOX 220, Bogor, Indonesia 16002, [3]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan)

[Objective] Limonene is often used as a flavor or fragrance additive in foods and beverages, but this component is prone to oxidation and UV radiation. Encapsulating this compound by first producing oil-in-water (O/W) emulsions is one way to preserve its functionalities. Polydispersity of the emulsion is one of the major factors affecting efficacy of the encapsulated compound. Microchannel (MC) emulsification technique could be an option to produce monodisperse emulsions by considering proper emulsifiers. This study investigated application of non-heated and heat-aggregated β-lactoglobulin (β-lg) as the emulsifier to produce monodisperse O/W emulsions containing limonene by using MC emulsification method.

[Experimental] The continuous phase was β-lg solution (0.5, 2, and 3% w/w). The heat-aggregated solution was prepared by heating the solution at 90 °C for 30 min. The dispersed phase was D(+)-limonene. A 1.5x1.5-cm^2 grooved MC array plate (type: MS2A4) consisting of 100 channels at each side of the plate with 4-μm channel depth was used. MC emulsification was carried out at 25 °C by passing the dispersed phase through MC arrays to the well that has been filled with the continuous phase.

[Results and Discussion] Monodisperse emulsions of limonene were successfully produced using non-heated and heat-aggregated β-lg as the emulsifying agent. O/W emulsion droplets with average diameter of 18.6, 19.6, and 22.0 μm and coefficient of variance (CV) of less than 2% were produced when 0.5, 2, and 3% w/w non-heated β-lg solution were applied, respectively. Droplets with average diameter of 20, 24.7, and 25.9 μm with CV of less than 2% were produced when 0.5, 2, and 3% w/w heated β-lg solution were applied, respectively. Larger emulsion droplets were produced when higher concentrations of β-lg were applied. This is in contrast to the common practice that smaller emulsion droplets would be produced when higher concentrations of emulsifier were applied. This contrast trend could be related to the spreading behavior of limonene on the terrace of the MC plate before it detached. This spreading behavior might be affected by a coupling effect between viscosity of the continuous phase that is higher than that of the dispersed phase and relatively high interfacial tension.

[Conclusion] Monodisperse O/W emulsions containing limonene were successfully prepared using MC emulsification method with non-heated and heated β-lg as the emulsifier. The increase in droplet diameter was observed when concentration of β-lg was increased.

beta-lactoglobulin, microchannel emulsification, limonene

講演番号：2B02p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ B 校舎 02 会場

固体脂を用いた短鎖脂肪酸内包 W/O エマルションの作製と物理的安 定性評価

Encapsulation of short-chain fatty acid into W/O emulsions containing fat and their physical stability

○山中 洋平[1,2]、小林 功[2]、マルコス ネヴェス[1,2]、植村 邦彦[2]、中嶋 光敏[1,2] ([1]筑波大学生命環境系、[2]農研機構食総研)
○ Youhei YAMANAKA[1,2], Isao Kobayashi[2], Marcos Neves[1,2], Kunihiko Uemura[2], Mitutoshi Nakajima[1,2] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Food Engineering Division, National Food Research Institute)

[目的]ヒトに必要な栄養素の中で、短鎖脂肪酸は不快な味や匂いを有するために経口摂取しにくい。短鎖脂肪酸を内包した高安定性油中水滴 （W/O）エマルションの作製は、この問題に対位する有用な改善策になるものと期待される。また、サブミクロンエマルションは物理的安定性が高く、食品に応用した際の品質向上などが期待できる。本研究では、固体脂を用いた高安定性な短鎖脂肪酸内包 W/O サブミクロンエマルションを作製と保存安定性の評価を行った。
[方法]本研究では、短鎖脂肪酸として酪酸を使用した。W/O エマルションの作製に関しては、分散相として 5 wt%酪酸水溶液を使用し、連続相として TGCR（テトラグリセリン縮合リシノレート）を 5 wt%添加したパームステアリン（（株）ADEKA, 融点：54.2℃）を使用した。乳化に用いた二相系における分散相の割合(W_d)は、1, 5, 10, 20 wt%とした。W/O エマルションは、ホモジナイザー（Polytron PT3100）による予備乳化（10000 rpm, 5 分間）を行った後に高圧乳化（NanoVater Nv200, 100 MPa, 1 回処理）を行うことで作製された。なお、予備乳化と高圧乳化の操作温度は 75 ℃に設定した。作製された W/O エマルション試料の粒度分布は、動的光散乱法を用いた粒度分布測定装置（Zetasizer Nano ZS）を使用して測定した。測定された W/O エマルションの、平均粒子径としてザウター粒子径（$d_{3,2}$）を用いた。また、25 ℃で保存した W/O エマルション試料の粒度分布についても毎週（計 4 週間）測定した。
[結果と考察]W_d が 1 wt%と 5 wt%の場合では、サブミクロン領域に狭いピークが観察され、なおかつ平均粒子径もそれぞれ 0.26 μm と 0.36 μm であった。この結果より、短鎖脂肪酸を内包したサブミクロン W/O エマルションが得られることが示された。作製された W/O サブミクロンエマルションにおいて酪酸臭は認められなかった。また、4 週間保存後の W/O サブミクロンエマルションの平均粒子径は 0.3 μm（W_d：1 wt%）と 0.46 μm（W_d：5 wt%）であり、保存期間中における平均粒子径の変化は少なかった。一方、W_d が 10 wt%と 20 wt%の場合では、サブミクロン領域からミクロン領域にわたる広くなだらかな粒度分布が観察された。この時、わずかな酪酸臭が W/O エマルション試料から認められた。W_d が高い W/O エマルションの粒径は、経時的に増大して不安定であった。特に、W_d が 20 wt%の系において、部分的な分相が 3 週間保存後に確認された。以上の結果より、固体脂を用いた高安定な短鎖脂肪酸含有 W/O サブミクロンエマルションは、分散相の割合が 5 wt%以下の場合に作製可能であることがわかった。

W/O emulsion, Short-chain fatty acid, Physical stability

講演番号：2B02p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ B 校舎 02 会場

金属製非対称貫通孔型マイクロチャネルアレイを用いた単分散 O/W エマルションの作製特性

Preparation characteristics of monodisperse O/W emulsions using aluminum asymmetric straight-through microchannel arrays

○張 晏如[1]、小林 功[2]、和田 芳弘[3]、Neves Marcos A.[1]、植村 邦彦[2]、中嶋 光敏[1]（[1]筑波大院生命環境、[2]農研機構食総研、[3]イーピーテック）

○ YANRU ZHANG[1], ISAO KOBAYASHI[2], YOSHIHIRO WADA[3], MARCOS A. NEVES[1], KUNIHIKO UEMURA[2], MITSUTOSHI NAKAJIMA[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]National Food Research Institute, NARO, [3]EP Tech. Co., Ltd.)

【目的】マイクロチャネル(MC)乳化は、微細流路である MC が多数加工された MC アレイ基板を用いて変動係数 5%以下の単分散エマルションを作製可能な技術である。我々は、シリコン基板に微細加工された多数の非対称貫通孔（非対称貫通孔型 MC アレイ）を用いて均一径微小液滴を大量作製できることを報告してきた。シリコン基板は精密加工の面で優れているものの耐アルカリ性と耐衝撃性、耐久性が低いという欠点がある。安定性が高い金属製の非対称貫通孔型 MC アレイ基板が開発されれば、MC 乳化デバイスの汎用化につながるものと期待される。本研究では、非対称貫通孔型 MC アレイを有するアルミニウム（Al）製の MC 乳化基板の開発を行い、製作された基板を用いた水中油滴（O/W）エマルションの作製特性についての検討を行った。

【方法】Al 製の非対称貫通孔型 MC アレイの加工は、マイクロドリル加工と放電加工を用いて行われた。MC 乳化実験に関しては、分散相として精製大豆油を用い、連続相として Tween 20 またはドデシル硫酸ナトリウム（SDS）水溶液（乳化剤濃度 1wt%）を用いた。エマルション液滴の作製は、Al 製非対称貫通孔型 MC アレイを介して分散相を連続相領域中に圧入させて行った。なお、分散相の流量は 1 mL/h に設定した。

【結果】上記の加工プロセスにより、円筒 MC（直径 50 μm、深さ 830 μm）とマイクロスロット（長辺 350 μm、短辺 50 μm、深さ 170 μm ）から構成される非対称貫通孔型 MC が 30 本配置されている Al 製 MC アレイ基板を得た。また、サイズが相似な Al 製非対称貫通孔型 MC アレイ（チャネル直径 100 μm）も加工した。Al 製非対称貫通孔型 MC アレイの光学顕微鏡画像より、チャネルとスロット短辺のサイズが同一であることが示された。チャネル直径が 50 μm の MC アレイを用いた場合では、平均液滴径が 146 μm の均一径微小油滴（変動係数<4%）が作製された。また、チャネル直径が 100 μm の MC アレイを用いた場合では、平均液滴径が 294 μm の均一径微小油滴（変動係数<3%）が作製された。液滴径および液滴径分布は、本研究で用いた乳化剤の種類の影響を受けなかった。以上の結果より、新たに開発された Al 製非対称貫通孔型 MC アレイを用いることにより、MC 乳化基板を用いて液滴サイズが制御された単分散 O/W エマルションを安定的に作製できることが示された。

microchannel emulsification, monodisperse emulsion, aluminum microchannel arrays

講演番号：2B02p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ B 校舎 02 会場

プロペラファンを用いた食品冷却の最適条件化の検討

Optimization of Food Cooling Using Propeller Fan

○鈴木 翔、鈴木 徹、渡辺 学 (海洋大院)
○Sho SUZUKI, Toru SUZUKI, Manabu WATANABE (TUMSAT)

【背景】食品の製造工程における冷却作業の際，安価かつ大容量の風量が得られ，使用法が容易である事から，プロペラファンが広く導入されている．しかし，プロペラファンはファン効率が良くないとされる．これはファン効率が投入電力量に対して得られる平均風速で評価するからである．プロペラファンの気流には特有の乱れが存在し，乱れが強い位置ではエネルギーが大きい．しかし，ファンから離れるとエネルギーは熱として消散してしまう．そのため，乱れを有効利用すれば，冷却という側面ではプロペラファンの効率は他のファンに劣らない性能を示す可能性がある．現状，プロペラファンの使用法の工夫はファンによる有効冷却面積を増やすことが主であり，乱れを活かしていないことが多い．一つの要因として，プロペラファンに関する知見は騒音，羽根周りの気流に関する研究が主であり，プロペラファン下の流れ場に関するもの，冷却に関する物はほとんど見られない．そこで，本研究ではプロペラファンの流れ場を明らかにするとともに，食品冷却への応用を検討した．
【方法, 結果】実験用プロペラファンには食品工場にも導入実績のある排気型圧力扇(ϕ300mm)を用い，これを自作アルミフレームに固定した．このときファンから鉛直方向の距離，ファン中心から外周方向への距離の各位置での風速, 表面熱伝達率および乱れ強度の測定を行った. 風速は平均風速として，3 孔ピトー管を使用し測定した．その際，気流の主流方向を同時に測定した．表面熱伝達率は熱した真鍮球をプロペラファン下で冷却し，その際の温度履歴より算出した．また，乱れ強度は熱線流速計を用い流速の瞬時値を測定し，これより乱れ強度を算出した．その際，熱線流速計のプローブは 3 孔ピトー管にて測定した主流方向へ向けた．平均流速測定では，プロペラファンからの距離が近い程，半径方向の速度勾配が大きくなることが測定された．また，ファンからの距離が離れるほど流速は小さくなるが，減少の勾配が大きくなる位置において乱れが強く測定された．これは運動量が拡散した際に乱れが発生したためと考えられる．各位置での表面熱伝達率は概ね風速の値に連動して上下した．しかし，風速に比べ表面熱伝達率の減少は緩やかであり，これは乱れが影響しているためと考えられる．乱れの測定では，風速の減少の勾配が大きい位置の他ファン近傍にて大きい値が観察された．以上から得られた結果より，食品の二次元伝熱計算を行った．実際の食品製造ラインを想定したコンベア上で食品が整列し冷却される際, 表面から除去される熱量を算出した. ファンからの距離が遠い程，冷却有効面積が増えるため除去熱量は多くなるが，ファン近傍でも乱れが大きな位置においては除去熱量が多く算出された.

food cooling, propeller fan, heat transfer coefficient

講演番号：2B02p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ B 校舎 02 会場

界面前進凍結濃縮法における収率改善のための氷結晶部分融解装置の試作

An apparatus for partial ice-melting to improve yield in progressive freeze-concentration

○宮脇 長人[1]、グナチラカ ミヒリ[1]、道善 倫子[1]、北野 滋[2] ([1]石川県大生資環、[2]明和工業)
○Osato Miyawaki[1], Mihiri Gunathilake[1], Michiko Dozen[1], Shigeru Kitano[2] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Meiwa Kogyo)

［目的］　凍結濃縮法は蒸発法や膜濃縮法と比較して最も高品質を得ることのできる濃縮法である。凍結濃縮法には系に多数の微細氷結晶を生成する懸濁結晶法（SC 法）と系に唯 1 個の巨大氷結晶を生成する界面前進凍結濃縮法（PFC 法）があり、SC 法は既に実用化されているものの、複雑なシステムを要する大規模連続生産に特化した方式であり、その応用は極めて限られている。これに対して、PFC 法はシステムが単純な回分操作方式で、小規模生産にも適応可能なフレキシビリティの高い方法であり、凍結濃縮法の適用範囲を大きく拡大できる可能性がある。しかしながら、PFC 法においては、高濃度試料になればなるほど、氷結晶への溶質取り込みが大きくなり収率が低下することが大きな欠点であった。この点に関する改善法として氷結晶部分融解法[1)]が提案されており、本報告においては、このための小型装置を試作し、その有効性について検討する。

［方法］　氷結晶部分融解装置は直径 11cm、深さ 30cm のステンレス製ジャケット付き円筒で、底部はメッシュで、底部付近に撹拌翼が配置され、氷結晶を撹拌できる構造の氷融解槽が本体となり、これとジャケットに流体を供給して温度を制御するための恒温槽より構成される。試料としては、10%スクロース溶液を製氷皿で凍結した角状氷、および循環流壁面冷却型 PFC 装置を用いてラ・フランス果汁香気成分凝縮液、リンゴ果汁などを濃縮した際に生成した氷結晶を用いて、氷結晶部分融解挙動を解析した。糖度の分析は屈折計、香気成分の同定と定量は SPME 法を用いたキャピラリー GC/MS および GC によった。

［結果および考察］　角状氷を用いて、氷融解速度を測定した結果、ジャケット温度が高いほど、また、撹拌速度が大きいほど、氷結晶融解速度は大きくなった。次に、撹拌条件を一定として、ジャケット温度を変化させて、部分融解画分の経時変化を測定した結果、融解温度が低いほど初期画分濃度と後期画分濃度との差が拡大し、部分融解効果が高くなり、また、温度一定条件では撹拌速度が大きいほど部分融解効果が高くなることがわかった。次に、循環流壁面冷却型 PFC 装置で生成した氷結晶を用いたところ、ラ・フランス果汁香気成分凝縮液およびリンゴ果汁を PFC 濃縮後、氷結晶部分融解を行った結果、それぞれ、87→95%(40%氷融解；butyl acetate 基準)、65→87%(50%氷融解；Brix 基準)の収率改善効果が得られた。

本研究の一部は(独)科学技術振興機構(JST)の助成(A-Step)を受けて行われた。

（引用文献）1) O. Miyawaki, S. Kato, and K. Watabe, Yield improvement in progressive freeze-concentration by partial melting of ice. *J. Food Eng.*, 108, 377-382 (2012).

progressive freeze-concentration, partial ice-melting, yield improvement

講演番号：2B02p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ B 校舎 02 会場

界面前進凍結濃縮によるリンゴ果汁を用いたリンゴワインの製造と品質評価
Production of apple wine from progressive-freeze-concentrated apple juice and its quality evaluation
○石崎 佳奈[1]、グナチラカ ミヒリ[4]、笹木 哲也[2]、松田 章[2]、三輪 章志[1]、北野 滋[3]、小柳 喬[4]、宮脇 長人[4]([1]石川農総研、[2]石川工試、[3]明和工業（株)、[4]石川県大生資環)
○Kana ISHISAKI[1], Mihiri Gunathilake[4], Tetsuya SASAKI[2], Akira MATSUDA[2], Syouji MIWA[1], Shigeru KITANO[3], Takashi KOYANAGI[4], Osato MIYAWAKI[4] ([1]IshikawaAFRC, [2]IRII, [3]Meywa co.,Ltd., [4]Ishikawa pref. Univ.)

【目的】現在、液状食品の濃縮には主に蒸発法が用いられている。しかし、蒸発法は高温で濃縮するため、食品の香気成分の損失や栄養成分の変質が避けられない。これに対して凍結濃縮法は各種成分の保持率が高くいことから高品質な濃縮法として知られているが、既存法の懸濁結晶法は装置のスケールダウンが難しいため大規模濃縮に限られてしまう。そこで、我々は装置のスケールダウンが容易な「界面前進凍結濃縮法」を用いて、原液が数 L～数 10L 規模からの濃縮が可能な凍結濃縮装置を開発している。今回、界面前進凍結濃縮法により濃縮したリンゴ果汁を補糖せずにアルコール発酵させ、果汁の風味を活かしたリンゴワインを製造し、品質を評価したので紹介する。
【方法】リンゴ果実を粉砕、裏ごしした混濁果汁にペクチナーゼ製剤を添加し、果汁の粘性を低下させた。酵素処理後の果汁を珪藻土系のろ過助剤とともにろ過して清澄化した。調製したリンゴ果汁を界面前進凍結濃縮装置によって濃縮した。ワイン酵母培養液を果汁および濃縮果汁に添加し、25℃で 6 日間静置して発酵させリンゴワインを製造した。果汁とワインの香味は、味覚認識装置（インテリジェントセンサーテクノロジー SA402B)、およびにおい識別装置（島津製作所 FF-2A）を用いて評価した。また、香気成分は、固層マイクロ抽出法(SPME 法）により、GC-MS（アジレント・テクノロジー C8790A/5375C）を用いて分析した。
【結果】調製した果汁の回収率は果実に対して 65%であり、果汁の糖度は Brix13.7 であった。界面前進凍結濃縮装置により Brix25.5 程度まで濃縮することができた。この濃縮果汁の味分析では、濃縮による味の変質が少なく、項目によっては味が強まっていた。におい分析では濃縮果汁のにおいの質は一部変化していたが、濃縮果汁を水で割り戻した還元果汁は濃縮前の果汁とほぼ同質であった。GC-MS による香気成分分析では、エステル類、ヘキサノール等が検出され、還元果汁と原液の分析結果はほぼ一致していた。これらの結果より、果汁の香気成分は濃縮後も保持されていると考えられた。濃縮前の果汁を用いたリンゴワインおよび濃縮果汁を用いたものを比較したところ、アルコール濃度は濃縮前果汁を用いた場合には 6.8%と一般的なシードルワイン程度であったが、濃縮果汁を用いるとアルコール濃度は理論収率の約 90%の 11.6%となり、一般的なブドウワインと同等のアルコール濃度まで高める事ができた。発酵過程における香気成分の変化は現在検討中である。
本研究は経済産業省戦略的基盤技術高度化支援事業の採択を受けて研究開発中である。

freeze-concentration, fruit wine

講演番号：2B02p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ B 校舎 02 会場

共焦点レーザー顕微鏡を用いた乳化油噴霧乾燥粉末の表面油特性評価

Evaluation of surface-oil properties in emulsified fish oil powder by CLSM

○四日 洋和[1]、フランソワ レノン[3]、安達 修二[2]、吉井 英文[1] ([1]香大農、[2]京大院農、[3]アグロスップ ディジョン)
○Hirokazu Shiga[1], Renon Francois[3], Shuji Adachi[2], Hidefumi Yoshii[1] ([1]Kagawa Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Agrosup Dijon)

[目的] 近年, 乳化技術の進展により, ナノからサブミクロンサイズの油滴を含有した O/W エマルションから乳化油噴霧乾燥粉末が作製され, 注目を浴びている. 我々は, ナノエマルション化することで, 粉末中の不飽和脂肪酸の酸化安定性が顕著に向上することを報告し，その要因として，粉末中の未包括油（表面油など）の影響が大きいことを指摘した．しかし，油滴径と粉末表面油率の関係，及び粉末中での未包括油の存在状態などの詳細については明らかとなっていない．そこで本研究では，共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）を用いて，親油性蛍光色素であるナイルレッドを含有した魚油のナノ及びマイクロエマルションより乳化魚油噴霧乾燥粉末を作製し，ヘキサン洗浄時における未包括油分の粉末内分布について検討した.
[方法] 魚油は, 日油製の 27wt%ドコサヘキサエン酸含有品を用い, 魚油 1 g に対してナイルレッド 1 mg 添加して使用した．乳化剤（カゼインナトリウム（SC)）と賦形剤（マルトデキストリン（MD)）の混合水溶液（SC 濃度 1.5wt%, MD 濃度 18.5wt%）に魚油（30.0wt%）を加え，ホモジナイザーでマイクロエマルションを調製した．この乳化液をナノエマルション化する場合は，更に，高圧乳化機により 100 MPa（スターバーストミニ HJP-25001, スギノマシン）で 2 回の処理を行った．次いで，試料溶液を噴霧乾燥機（L-8 型, 大川原化工機）を用いて乾燥し，乳化魚油噴霧乾燥粉末を調製した．未包括油の粉末内の分布は, ナイルレッドの蛍光強度を指標として確認した. ヘキサン 5 mL に粉末 300 mg を分散し，その溶液を 5, 10, 15, 30 min 攪拌後，濾過してヘキサンを除去し，真空乾燥したものを CLSM で観察した. また, このときの含油率の経時変化を, 薄層クロマトグラフィー検出装置（TLC-FID, イアトロスキャン MK-5, 三菱化学メディエンス）で分析した.
[結果] マイクロ及びナノエマルションから作製した乳化魚油粉末は，粉末径 29.1, 29.2 μm，再構成エマルション油滴径 1.1 , 0.8 μm，含油率 67, 49wt%，表面油率 49, 12wt%であった．粉末上部より 2, 4, 8, 12, 16, 18 μm の位置における各切断面を確認したところ，油滴径に関係なくナイルレッドは粉末全体に分布していた. TLC-FID 分析により, ヘキサン洗浄における表面油分の経時変化を確認したところ, 攪拌 10 min までは減少し，その後一定値を示した．表面油分の減少量はナノに比べてマイクロエマルションの方が著しく大きかった．このときのナイルレッドの蛍光強度の減少傾向は，粉末外側に比べて内側の方が大きく，粉末内部における未包括油分の存在の可能性が示唆された.

Spray drying, Polyunsaturated fatty acid, Microencapsulation

講演番号：2B03a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ B 校舎 03 会場

食品加熱により生ずる 5-hydroxymethyl-furanal (5-HMF)に関する研究

Studies on 5-hydroxy-furanal produced through heat cooking

○新藤 一敏、斉藤 麻由美、山村 真弓（日女大・家政・食物）
○Kazutoshi SHINDO, Mayumi SAITO, Mayumi Yamamura (Japan Women's Univ)

【目的】天然の食品中に存在する様々な生理（薬理）活性物質については、これまで大変に多くの報告がある。一方我々は多くの場合食品を調理して摂取しているが、調理プロセスで発生する物質やその生理作用に関する報告は、メイラード反応産物などに関する一部研究以外ではあまり多くは見当たらない。そこで今回我々は、まず様々な二次代謝物質を多く含むスパイス類に着目し、これらを加熱処理した場合にのみ観察される物質が存在するかについて探索を実施することを試みた。
【方法と結果】探索対象として 6 種類のスパイス（ジュニパーベリー、コリアンダー、ターメリック、ジンジャーパウダー、クミン、クローブ）を用いた。「市販スパイスそのまま」及び「市販品をフライパン上 5 分間乾煎り（中火）したもの」について、それぞれをまず CH_2Cl_2-MeOH (1:1)（エキス A)、次に 50% MeOH（エキス B）で抽出し、以下の HPLC 条件でそれぞれのエキス A, B を分析して観察されるピークに違いがあるかを比較検討した[Column: CAPCELL PAK MG Ⅱ (4.6mm×100mm), Flow rate: 1.0 mL/min, Solvent: A 液 5% CH_3CN+20 mM H_3PO_4. B 液 95% CH_3CN+20 mM H_3PO_4. 0→3 min A 100%/3→18 min A 100% → B 100% linear gradient/18→30 min B 100%, Detect: 200 - 500 nm (DAD)]。その結果 6 種のスパイスのうち、ジュニパーベリーのエキス B において、市販品には存在せず、乾煎りしたものにのみ存在するピーク（上記 HPLC 条件で保持時間 4.6 min）が存在することを見出した。[ジュニパーベリー（せいようねず　学名 *Juniperus communis*）はヒノキ科の常緑樹であり、スパイスとしては果実を利用し、その薬理作用として、鎮痛、利尿、抗炎症作用が知られている。]
　そこで乾燥ジュニパーベリー3.0 g を出発原料として、これを乾煎り後、50% MeOH 抽出→分取 ODS HPLC[Column:Pegasil ODS(10 mm x 250 mm), Flow rate: 3.0 mL/min, Solvent: 5% CH_3CN]で保持時間 9.6 min に検出される目的ピークを分取]にて単離精製した(純品 4.8 mg)。目的ピークは不安点でエバポレーター濃縮で壊れるため、濃縮には凍結乾燥を用いた。各種 NMR 分析の結果、加熱物の抽出物にのみ含まれる目的物質を 5-hydroxymethyl-furanal (5-HMF)と同定した。5-HMF は果糖を有機酸の存在下で加熱すると生成することが報告されており、コーヒーなどにも多く含まれる。また 5-HMF には有用な生理活性（貧血改善等）についても報告があることが判明した。ジュニパーベリーは果糖を多く含むことが知られており、抽出エキスの pH を測定したところ酸性であったので、乾煎りによる 5-HMF の生成は合理的に説明された。現在、より果糖を多く含む食品であるハチミツなどを材料として効率的な 5-HMF 調製条件を検討中である。

5-hydroxymethyl-furanal, Juniperus communis, heat cooking

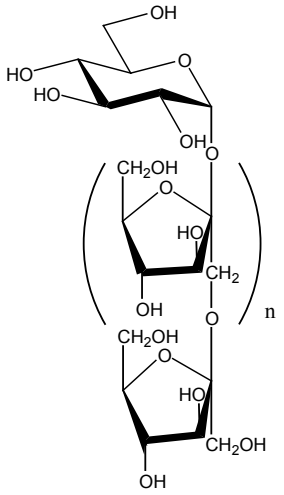
講演番号：2B03a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ B 校舎 03 会場

イヌリンオリゴ糖の分析・分取法の確立と構成成分 GF4～GF10 の単離

Development of analytical and preparative method for inulins and isolation of GF4-GF10

○松本 恵実、牧岡 富広、中塚 進一 (長良サイエンス株式会社)
○Emi MATSUMOTO, Tomihiro MAKIOKA, Shin-ichi NAKATSUKA (Nagara Science Co., Ltd.)

【目的】
イヌリンはチコリやキクイモ等の植物に含まれる多糖で、グルコースにフルクトースの β(2→1)結合重合体が結合した構造であり、植物中には重合度が 3～60 の混合物として存在している。イヌリンは人体において消化管で直接的に消化されず、低エネルギーの食品素材として利用されている。また腸内において人体に有益な細菌を増殖させたり、カルシウムの吸収を促進することが知られている。さらに食品加工用素材としての機能性もあることから注目されている化合物である。
イヌリンはフルクトースの重合度が異なる混合物で、機能性の評価には各構成成分の分布の制御と高純度品が欠かせない。しかしイヌリンは非常に水溶性が高く、構造が似ていることから分離精製が非常に困難である。そこで我々はイヌリンの高純度品を得るため、分析・分取法の確立と構成成分の単離を検討した。
【方法】
イヌリンの分離精製には HPLC を用いた。HPLC 分析・分取では化合物の検出に UV 検出器がよく用いられる。我々は特徴的な UV 吸収がなく UV 検出器による検出が極めて困難な化合物をエンド吸収(UV_{200nm} 等)と分取セル(セル長 1mm、0.2mm 等)を用いることで分析可能にしてきた*。イヌリンには特徴的な UV 吸収がないことから本法の利用を検討し、RI と共に各特長を生かして分析・分取した。
【結果】
イヌリンオリゴ糖を HPLC-UV_{200nm} で分取セル(セル長 0.2mm)を用いて分離精製し、GF4～GF10 の各オリゴ糖を 99%(HPLC)以上の高純度で得ることに成功した。
各オリゴ糖の精製量は数十 mg 以上であった。
以上によりイヌリンオリゴ糖の分析・分取法の確立と GF4～GF10 の単離に成功した。
現在 GF11 以上の長さのイヌリンオリゴ糖の単離及び構造に関する研究を進めている。



*松本恵実, 中塚進一, FOOD Style 21, **17**(3), 87-89 (2013).

inulin, oligosaccaride, FOS

講演番号：2B03a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ B 校舎 03 会場

連結 NH2 カラムによる糖質の分析とハチミツへの応用

Analysis of saccharides by connected NH2 columns and application for honey

○寺川 美加[1]、伊藤 新次[2]、榎本 俊樹[1] ([1]石川県立大院生資、[2]ハニーテックラボラトリー株式会社)
○Mika TERAKAWA[1], Shinji ITOH[2], Toshiki ENOMOTO[1] ([1]Ishikawa Prif. Univ., [2]Honey-tec lab. co.,ltd)

糖質は基本的に異性体の集合体であるため、現在分析の主流である質量分析のデータが使用しにくい。そこで糖質の分析には従来法である HPLC を使用し、カラムや検出器の選定により最適条件を見つけることが望ましい。

本研究においては各種の NH2 カラムを使用して単糖類，二糖類，三糖類の分離を試みた。

単糖類はアルドースである Glucose,Galactose,Mannose,Allose,Tarose の５種を、ケトースは Psicose,Tagatose,Sorbose,Fructose の４種の計９種類を選択した。二糖類はα-Glucose-Glucose 結合である Nigerose，Maltose，Kojibiose，Iso-maltose,Treharose の５種類を、β-Glucose-Glucose である Cellobiose,Laminaribiose,Sophorobiose，Gentiobiose の４種類を、Glucose-Fructose が Sucrose，Turanose，Palatinose，Maltulose,Leucrose,Treharulose の６種類，Glucose- Galactos 結合の糖である Lactose,Melibiose の２種類とし、計１７種類を選択した。三糖類は Maltotriose,Iso-maltotriose,Panose,Erlose,Merezitose,Raffinose の６種類を選び、総計３２種類の糖分離性能を７種のカラムを用いて行った。

すべてのカラムにおいて単体での分離は不可能であった。単糖類は Phenomenex LUNA と Zorbax NH2 の組み合わせで良好に分離できた。二糖類は Zorbax NH2 の２本連結， Zorbax NH2 と YMC pollyamin2 で二回分析することで分析は可能であった。ただし Maltose と Treharose ,Sorbose はどの組み合わせでも分離は不可能であった。三糖類は YMC pollyamin2 と YMC polyamin2 で６種の分離は良好にできた。これらの結果から Phenomenex LUNA，Zorbax NH2 、YMC pollyamin2 の４種の組み合わせで分析が可能であった。これらの結果をもとに分析条件を選定し、平成 25 年度に採取した秋田県産サクラハチミツ，北海道産クローバーハチミツの分析を行った。

Honey, NH2 column, Saccharides

講演番号：2B03a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ B 校舎 03 会場

収穫時期が異なる加賀レンコンから分離した澱粉の性質について

Physicochemical properties of starches from Kaga lotuses cultivated in different seasons

○山崎 徹也[1]、本多 裕司[1]、川嶋 ふみ[1]、岡崎 正規[1]、三輪 章志[2] ([1]石川県大・生資環、[2]石川県農総研)
○ Tetsuya Yamazaki[1], Yuji Honda[1], Fumi Kawashima[1], Masanori Okazaki[1], Shoji Miwa[2] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Ishikawa Agric. Res Center.)

【目的】加賀レンコンは石川県で栽培されている加賀野菜の 1 つであり、他府県産のレンコンと比較すると粘りが強い点が特徴である。レンコン可食部は約 16%が炭水化物であり、水分を除くと炭水化物が可食部の大部分を占めている。最近、我々は茨城県産レンコン由来澱粉と比較して、加賀レンコン由来澱粉の粘度が高いことを明らかにした[1)]。また近年のタロイモ由来澱粉の研究結果から、地下茎の澱粉の粘度は気温の変化の影響を受けることが判明している[2)]。

本研究では、収穫時期が異なる加賀レンコンから得られた澱粉の粘度を分析するとともに、それらの粘りの差異について解明することを目的とした。

【方法】石川県金沢市湖南町で 2012 年 9 月から 2013 年 5 月までに収穫された加賀レンコンを毎月入手し、各レンコン可食部から澱粉を分離精製した。得られた澱粉の糊化特性はラピッドビスコアナライザー (RVA) で分析した。澱粉の糊化熱量 (*ΔH*) は示差走査熱量計 (DSC) で測定した。澱粉のリン含量はモリブデン青法で定量した。澱粉のみかけのアミロース含量については、ヨウ素澱粉反応後の 680 nm の吸光度から算出した。

【結果】澱粉の粘りの強さの指標となる最高粘度を収穫月別に RVA で測定すると、最高粘度は 9 月 (215.2 RVU) から 12 月 (296.8RVU) にかけて増加した。そして RVU 値は 1 月 (276.4 RVU) から 3 月 (209.2 RVU) にかけて減少し、4 月 (232.7 RVU) および 5 月 (274.5 RVU) は上昇した。各澱粉の最高粘度の中では、12 月に採取した澱粉が最も高い RVU 値を示した。澱粉の *ΔH* を DSC で測定すると、*ΔH* は 9 月 (13.4 J/g) から 12 月 (5.7 J/g) にかけて減少した後に、12 月から 5 月 (12.7 J/g) にかけて *ΔH* が上昇した。各澱粉の *ΔH* の中では、12 月に採取した澱粉が最も低い値を示した。一般に、澱粉中のリン含量が高いと粘度が高くなることが知られている。澱粉中のリン含量を収穫月別に定量すると、9 月 (76 ppm) から 12 月 (131 ppm) にかけてリン含量が増加した。1 月から 3 月にかけてのリン含量は 77－94 ppm であったが、再び 4 月 (103 ppm) と 5 月 (104 ppm) は増加した。各澱粉のリン含量の中では、12 月に採取した澱粉が最も高い含量を示した。また、それぞれの澱粉のみかけのアミロース含量は収穫月が進むにつれて増加していった (23.8%－28.8%) 。

1) Y. Honda, et al. *J. Appl. Glycosci.* (2014) in press.
2) T. J. Lu, et al. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2208-2215 (2008)

starch, lotus, viscosity

講演番号：2B03a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ B 校舎 03 会場

日本で栽培されたモチ米から精製した胚乳澱粉の構造および物性

Structure and physicochemical properties of endosperm starches from waxy rice cultivars in Japan

○中浦 嘉子[1]、廣瀬 美佳[2]、小山 善幸[2]、松下 景[3]、後藤 明俊[4]、松葉 修一[5]、梶 亮太[6]、出田 収[7]、片岡 知守[8]、松木 順子[2]、山本 和貴[2]、井ノ内 直良[1]([1]福山大生命工、[2]農研機構・食総研、[3]農研機構・中央農研、[4]農研機構・作物研、[5]農研機構・北農研、[6]農研機構・東北農研、[7]農研機構・近中四農研、[8]農研機構・九州研)

○Yoshiko NAKAURA[1], Mika HIROSE[2], Yoshiyuki KOYAMA[2], Kei MATSUSHITA[3], Akitoshi GOTO[4], Shuichi MATSUBA[5], Ryota KAJI[6], Osamu IDETA[7], Tomomori KATAOKA[8], Junko MATSUKI[2], Kazutaka YAMAMOTO[2], Naoyoshi INOUCHI[1] ([1]Fukuyama Univ., [2]NFRI, NARO, [3]NARO/ARC, [4]NICS, [5]NARO/HARC, [6]NARO/TARC, [7]NARO/WARC, [8]NARO/KARC)

【目的】餅を多量の汁で長時間煮ると、溶けて小さくなるのみならず、汁が濁り粘度が増加する「煮溶け」現象のために食味が低下する問題があることから、長時間加熱しても煮溶けしにくい餅の開発が望まれている。そこで我々は、モチ米の主成分であり、餅の煮溶けに関与すると考えられる米澱粉について、その特性と煮溶けとの関係解明に取り組んでいる。本発表では、日本各地で栽培されているモチ米から澱粉を精製し、その構造特性及び理化学的特性を調べたので報告する。

【方法】農林水産省傘下の独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構（(独）農研機構）の各地域農業研究センター及び作物研究所で栽培されたモチ米 29 試料米と、国内作付量が最も高いヒヨクモチ（市販品、佐賀県産）との計 30 試料米を実験に供した。市販米を除く試料米は、完熟玄米を搗精した歩留り約 90%の精白米とし、冷アルカリ浸漬法にて胚乳澱粉を精製した。精製した澱粉を用いて、ヨウ素・澱粉複合体吸収曲線、中圧ゲル濾過法による単位鎖長分布、陰イオン交換クロマトグラフィーによるアミロペクチンの短鎖領域における側鎖長分布、平均鎖長、β-アミラーゼ分解限度、DSC による糊化温度及び糊化熱量（エンタルピー変化）、RVA による熱糊化挙動をそれぞれ測定した。

【結果】ヨウ素吸収曲線及び中圧ゲル濾過分析の結果、いずれの試料米もアミロースを含まないことが確認された。アミロペクチンの短鎖画分／長鎖画分比率（Fr.Ⅲ/Fr.Ⅱ）は 1.9 ～ 3.1 に分布したが、殆どの試料米は平均値の 2.5 付近の比率を示した。この比率が低い程、煮溶けし難いことが指摘されていることから、例えば、比率 1.9 の「こがねもち」は煮溶け性が低い品種と推定された。陰イオン交換クロマトグラフィー、平均鎖長、β-アミラーゼ分解限度、DSC の各測定の結果、アミロペクチン側鎖長分布には、多少の差異がある試料もあったが、多くの試料において大差は認められなかった。また、RVA 測定の結果、老化及びアミロペクチン側鎖長の指標と考えられるセットバック値には大きな差異は無かったが、粘度上昇開始温度については、ヨウ素吸収曲線の最大吸収波長が長い程、つまりアミロペクチン側鎖長が長い程、高くなる傾向が見られた。

【謝辞】本研究は、科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）若手研究 B の一環として実施されたものである。

starch, waxy rice

講演番号：2B03a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ B 校舎 03 会場

食味の異なる米飯から調製した組織切片の澱粉の解析

Analysis of starch in the tissue sections prepared from the cooked rice with different palatability

○辻井 良政[1]、川原 真由美[2]、高野 克己[2] ([1]アルファー食品（株)、[2]東京農大応生・化学)
○Yoshimasa TSUJII[1], MAYUMI KAWAHARA[2], KATSUMI TAKANO[2] ([1]Alpha Foods Co., Ltd., [2]Tokyo Univ. of Agriculture)

【背景・目的】

米飯食味の中でも重視される「粘り」は、炊飯過程において米澱粉の一部が米胚乳酵素の作用により部分分解され、炊飯後期に米飯表面に濃縮形成された糊液層によって惹起される。今回、食味の異なる米飯から作製した米飯切片から糊液層(外層)および内層部を切り分け局所的な澱粉構造の解析を行い、酵素作用による粘り物質の性状ならびに構造を解明することを目的とした。

【試料・方法】

山形県産コシヒカリを搗精(精米歩留り 90±0.2%)し、4℃保存した精白米(4℃保存)、および 35℃で 25 日間貯蔵した精白米(35℃保存)を用い、酵素活性量を測定した。

各試料米 10g を常法のカップ炊飯にて米飯を調製し物性比較を行った。また、Optimal Cutting Temperature Compound(SAKURA 社製)を用いて米飯を凍結包埋した。各試料は LEICA CM1100(ライカ社製)を用いて縦断に厚さ 14μm で切片化し、スライドガラスで回収した。その後、各切片をヨウ素蒸気にて染色し、光学顕微鏡（LMD6000 ライカ社製)を用いて観察した。ヨウ素で染色した米飯切片を LMD6000 にて米飯の外層と内層に切り分け、各層のヨウ素吸収スペクトル測定および HPAEC-PAD 法によるアミロペクチン側鎖長分析を行った。

【結果・考察】

4℃保存に比べ 35℃保存ではαおよびβ-amylase 活性量は 26.2%および 17.3%低下していた。また、米飯の付着性は 21.3%低下していた。

切り分けた米飯切片を溶解しヨウ素呈色の最大吸収波長の測定した結果、4℃保存の精白米で 546nm、米飯の内層で 559nm、外層で 551nm、35℃保存は順に 547nm、560nm、549nm となった。660nm の吸光度は、生米＞内層＞外層の順に吸光度が高くなった。すなわち、米飯の内層より外層の方がアミロペクチン分解物を多く含んでいることが推察された。

各切片のアミロペクチン側鎖長分析の結果、生米を基準として 4℃保存の内層・外層を比較すると、炊飯を行うことで a 鎖の割合が増加し、特に外層での増加が大きかった。また、4℃保存を基準として 35℃保存の内層・外層と比較すると、a 鎖の割合が少なかった。以上のことから、鮮度が良い米飯の外層のアミロペクチンは、a 鎖の割合が多いことから炊飯中の酵素作用よりアミロペクチン分解が進んでいることが示唆された。

cooked rice, the endogenous enzyme, starch

講演番号：2B03a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ B 校舎 03 会場

蒸米食味形成に関わる蒸煮中の胚乳細胞壁の変化

The steamed glutinous rice was disintegrated the endospermous cell wall by edosperm cell wall degrading enzymes during steaming

○渡邊 香[1]、辻井 良政[3]、高野 克己[2]（[1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・化学、[3]アルファー食品株式会社）
○Kaori WATANABE[1], Yoshimasa TSUJII[3], Katsumi TAKANO[2] ([1]Agrichem., Agr., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Biosci. Tokyo Univ. Agric., [3]Alpha Foods Co., Ltd.)

【背景・目的】米胚乳細胞壁は、調理中のデンプンの膨潤を制御し米粒の崩壊を防ぎ、構造を維持するとともに、米飯の硬さに関与している。これまでに炊飯中の細胞壁多糖分解酵素作用による細胞壁多糖の構造が変化し、米飯テクスチャーや食味へ影響することが報告されている。そこで本研究では、糯蒸米の食味と細胞壁多糖分解酵素との関係に着目し、蒸煮による細胞壁多糖の構造変化および米胚乳細胞壁多糖分解酵素の作用性について検討した。
【方法】試料米は平成 24 年産国産糯米 30 品種（ヒメノモチ[千葉 2 地域、岩手、茨城、山形、島根、鳥取]、こがねもち[新潟 3 地域]、風の子もち[北海道 5 地域]、きたゆきもち[北海道 3 地域]、ハクチョウモチ[北海道 4 地域]、ヒヨクモチ[九州、熊本、福岡]、峰の雪、もちだわら、みやこがねもち、ココノエモチ、上育 464 号）を用いた。いずれのサンプルも精米歩留り 90±0.2%に搗精し、4℃で保存した。これらについて米胚乳中に含まれる細胞壁多糖分解酵素 5 種の酵素活性量の測定および米飯物性の測定をした。そして各試験より得られた値を変数とし、ピアソンの相関関係の検定、主成分分析を用い検証を行った。さらに蒸米より作製した凍結切片の蛍光顕微鏡観察を行って視覚的な差異について検討した。
【結果】蒸米の表面の硬さ(H1)は 194～312(gw/cm^2)、全体の硬さ(H5)は 1517～2247(gw/cm^2)の範囲で変動した。また、米胚乳酵素活性量（U/g）は、β-galactosidase では 118～306、β-glucanase では 103～201、β-xylanase では 12～34、α-galactosidase では 89～266、α-mannosidase では 139～233 の間で変動していた。得られた値を統計処理したところ、蒸米の全体の硬さとβ-xylanase の間に負の相関(r=－0.3663、p<0.05)が得られ、同様に、β-glucanase との間にも負の相関(r=－0.4827、p<0.05)が得られたため、蒸煮中の細胞壁多糖分解酵素の作用が蒸米の硬さに影響することが考えられた。蒸米の凍結切片の蛍光顕微鏡観察では、蒸米の細胞壁を明瞭に観察することが出来た。さらに、もち蒸米の細胞壁は蛍光が強く外部の細胞壁の崩れが少ない様子が観察される一方、もち炊飯米を観察した場合は蛍光が弱く外周の細胞壁が崩れている様子であった。また、内部の細胞壁についても蒸米の方がより蛍光が強く観察された。したがって炊飯に比べ、水分の少ない状態で調製する蒸米では全体的に細胞壁の損傷が少なく、また、蒸煮中の細胞壁多糖分解酵素の活性量の違いにより、細胞壁の分解度に差が生じることが蒸米の硬さを左右しているのではないかと推察された。

cell wall, glutinous rice, enzyme

講演番号：2B03a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ B 校舎 03 会場

Aspergillus niger 休止菌体を利用したエチル-α-グルコシドの生産性向上について

Ethyl-alpha-glucoside production by Aspergillus niger cells

○兼重 知尚[1]、戸倉 慶大[1]、内野 昌孝[2]、高野 克己[2]、中西 載慶[3]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・化学、[3]東京農大短大・醸造)

○ Tomotaka Kaneshige[1], Keita Tokura[1], Masataka Uchino[2], Katsumi Takano[2], Kotoyoshi Nakanishi[3] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric., [2]Dept.Appl.Biol.Chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric., [3]Dept.Brew.Fermant.Tokyo Univ.Agric.)

＜目的＞　日本では、古来より酒や味噌といった麹菌を利用した発酵食品が多く製造されている。その中の食品に微量に含まれる成分の一つとしてエチル-α-グルコシド（以下α-EG）が挙げられる。α-EG は、味質の改善効果や整肌効果を有することから、甘味料や化粧品への応用が期待される。この物質は、化学合成法または酵素生産法により生産可能だが、化学合成法は、消費者に受け入れられにくく、ラセミ混合物が生じるため分離にコストがかかる。そこで本研究では、安心かつ低コストで生産可能な麹菌による転移反応および縮合反応による酵素生産法に着目した。本研究では、EG 生産菌として、日本酒の醸造時に使用される *Aspergillus oryzae* に着目した。

＜方法＞　供試菌体は情報の多い *Aspergillus oryzae* RIB40 株を用いた。供試菌体を MYP 培地にて培養し菌体を回収後、エタノール処理し不要酵素を失活させた。菌体を凍結乾燥後、加水分解活性を測定した。酵素力価を調整し、基質としてマルトース、受容体としてエタノールを使用し、α-EG 生産における最適条件の検討を行った。反応温度、反応 pH、マルトース濃度、エタノール濃度、使用菌体量、反応時間の各条件を変更して反応させ、α-EG 生産量の測定を行った。また、休止菌体の連続利用によるα-EG 生産試験を最適条件にて行った。

＜結果＞　α-EG 生産量は温度では、温度上昇と共にピークの 50℃までは生産量が緩やかに上昇し、以後急激に減少した。pH では、pH5.0 まで緩やかに生産量が上昇し、その後緩やかに減少した。マルトース濃度において、0.01M～0.15M までは生産量が急増したが、0.15M 以降は緩やかに減少した。エタノール濃度において、濃度上昇に伴い生産量が上昇し 6.0M にて最大値となり以後は減少した。反応時間において、時間の経過に伴い最大値を示した 24 時間後まで生産量が急激に増加し、その後は一定の生産量となった。菌体量において、菌体の量が上昇にするにつれて生産量が上昇した。また、菌体の連続利用によるα-EG 生産においては、7 回目まで安定した生産量を保った。1 回の反応で得られるα-EG の最大生産量は 49mM となり、反応 7 回目までにおけるα-EG の合計生産量は 300mmol となった。以上の結果を、本研究室で行われた *Aspergillus kawachii* N-3 株を利用した、菌体の連続利用における生産量と比較した。N-3 株は 1 回目の反応でα-EG 生産量は 82mM、反応 7 回目までにの合計生成量は、500mmol であった。すなわち、N-3 株には劣るものの、各生産量が約 1 %と通常発酵食品に含まれている量以上のα-EG 生産が見込めることが示唆された。

Aspergillus orysae, Ethyl-alpha-dlucosidase, Consecutive use

講演番号：2B03a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ B 校舎 03 会場

Aspergillus oryzae RIB 40 形質転換体を用いた機能性糖エチルグルコシド生産性について
Production of Ethylglucoside by Aspergillus oryzae transformant

○内野 昌孝[1]、兼重 知尚[2]、阿部 有希子[2]、戸倉 慶大[2]、中西 載慶[3]、高野 克己[1]([1]東京農大応生・化学、[2]東京農大院・農、[3]東京農大短大・醸造)
○Masataka Uchino[1], Tomotaka Kaneshige[2], Yukiko Abe[2], Keita Tokura[2], Kotoyoshi Nakanishi[3], Katsumi Takano[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric, [2]Agric., Grad. School Tokyo Univ. Agric., [3]Brew., Junior coll., Tokyo Univ. Agric)

【目的】

日本には様々な伝統的発酵食品があり、それらについて機能性を持つ物質の存在が多数報告されている。日本酒の主成分はエタノールやグルコースであるが、次いで 0.5%程度のエチルグルコシド(EG)が含まれている。この EG はグルコースの還元末端部にエチル基が付加されたものであり、その機能性として消臭効果や体重増加抑制効果、美肌効果（皮膚上皮細胞の保護）などが報告されている。この EG は転移能力を有するグルコシダーゼにより生産可能で、検討の結果、*Aspergillus niger* 由来がその能力が高いことが明らかとなった。

そこで我々はグルコシダーゼ高生産株取得を目的とし、*A. niger* 由来のグルコシダーゼを *Aspergillus oryzae* RIB40 に形質転換した株を作成、その EG 生産の最適化を行った。

【方法】

β-アミラーゼプロモーターを付加した *A. niger* 由来グルコシダーゼ ORF を *A. oryzae* RIB40 に形質転換した。形質転換体を培養後、集菌した菌体をエタノール処理し、不要酵素を失活させた。処理菌体を用い、緩衝液存在下、基質としてマルトース、アクセプターとしてエタノールを用い、反応を行った。なお、基本条件として反応温度、反応 pH、反応時間、マルトース濃度、エタノール濃度、菌体濃度を変化させ、EG 生産量を確認した。さらに、菌体の連続利用について検討した。

【結果】

EG 生産量は反応温度の上昇に伴い増加し、50℃で最大となった。また、pH の上昇により生産量が増加し、pH5～6 で最大となり、以降は低下した。反応時間に対する EG 生産性は時間と共に増加し、24 時間後に 60mM となり、以降は同値を示した。マルトース濃度では、濃度上昇に従い生産量は増加し、0.15M で最大の約 70mM となり、以降は低下した。エタノール濃度では、濃度上昇に伴い 6.0M で最大の約 65mM となり、以降は減少した。菌体量については、菌体量増加に従い EG 生産量も増加した。

以上の結果より、最適組合せの条件で反応させたところ、約 75mM と当初基本条件として設定した条件の約 1.4 倍まで生産量が増加した。また、菌体の連続利用に関して、繰返し回数の増加に伴い EG 量は低下したものの、7 回目の利用時でも 1 回目の 10%程度と比較的安定で連続利用が可能であることが伺えた。

今後は実際の生産に向けた規模を拡大した試験が必要と考えている。

Aspergillus oryzae, alpha-Glucosidase, Ethylglucoside

講演番号：2B03a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ B 校舎 03 会場

神経応答解析を用いた糖アルコールの味質評価

Taste evaluation of sugar alcohols by analysis of chorda tympani nerve responses in C57BL/6 mice

○伊藤 友紀[1,2]、十川 詩帆[2]、安松 啓子[1]、小関 宏明[2]、二ノ宮 裕三[1]([1]九州大院口腔機能解析学、[2]三菱商事フードテック株式会社)
○Yuki Ito[1,2], Shiho Sogawa[2], Keiko Yasumatsu[1], Hiroaki Koseki[2], Yuzo Ninomiya[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Mitsubishi Shoji Foodtech Co., Ltd.)

【目的】糖アルコールは糖類のアルデヒド基を還元して得られる鎖状多価アルコールであり、非う蝕性・低カロリーなどの性質を有しシュガーレス等の用途で多くの食品に用いられている。過去の検討により、糖アルコールはヒトと同様に C57BL/6 マウスに嗜好されることがわかっている[1)]が、その味覚特性についてはまだ明らかになっていないことが多い。そこで、マウスによる神経応答解析を用いて、糖アルコールの末梢の味覚器レベルの受容を明らかにすると共に、ヒトでの官能評価により呈味増強作用をもつとされている酵母エキスが糖アルコールの甘味質に与える影響について検討した。さらに、マウス神経応答解析により得られた味覚受容特性がヒトにも対応するか確認するため、官能評価による検証を行った。

【方法及び結果】

実験１）①実験動物として用いた C57BL/6 雄性マウスに、糖アルコール*（以下、無添加品）を約 0.1ml/秒の流速で約 30 秒間与え、鼓索神経全神経線維束応答を記録した。刺激開始後 140 秒間の応答も記録し、経時的な応答変化の影響を検討した。解析の結果、糖アルコールはスクロースに比べ応答が低いことがわかった。②糖アルコール＋0.1%酵母エキス（以下、酵母エキス添加品）について、①と同様に経時的な神経応答変化を測定し、無添加品と比較した結果、酵母エキス添加品は無添加品に比べいずれの時間においても応答が上昇し、酵母エキス添加による経時的な神経応答強度の増強が認められ、スクロースの応答に近づいた。

実験２）①訓練されたパネリストを用い、無添加品の甘味質を評点法（7 段階評価）及び TI 法(time-intensity test)にて官能評価を行った結果、無添加品はスクロースとは異なる甘味質を示した。②無添加品及び酵母エキス添加品の甘味質を官能評価した結果、マウス神経応答結果と同様に、酵母エキス添加品にて甘味質、甘味ピーク時間ともにスクロースに近づく傾向があった。

以上の事から、マウスを用いた神経応答解析により糖アルコールはスクロースに比べ低い応答を示すが、酵母エキスを添加することで末梢の味覚器レベルで応答が増強されることが判明し、その評価結果は、ヒトによる官能評価とも一致することが示唆された。

*糖アルコール…ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、マンニトール、マルチトール、パラチニット、還元水飴

1)　裕　哲崇，宜保　諒，杉村忠敬，山本　隆．日本味と匂学会誌 12，235-238(2005)

taste, sugar alcohol, chorda tympani nerve responses

講演番号：2B03a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ B 校舎 03 会場

脂肪酸が苦味を抑制する作用機序の解明-脂肪酸は苦味物質の立体構造を変化させる-

Fatty acids interact with bitter substances to suppress the bitterness in the mode of interaction fatty acids modify the stereochemistry of bitter substances.

○大木 伽耶子[1]、山下 治之[1]、井深 章子[2]、石丸 喜朗[1]、阿部 啓子[1]、朝倉 富子[1] ([1]東大院農、[2]山形大院理)
○Kayako OGI[1], Haruyuki YAMASHITA[1], Akiko IBUKA[2], Yoshiro ISHIMARU[1], Keiko ABE[1], Tomiko ASAKURA[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Yamagata Univ.)

(背景および目的) 苦味はコーヒーなど一部の嗜好品を除いて、本能的に忌避される味である。そのため食品加工において苦味の抑制は大きな課題の一つとなっている。昨年度の本大会で、脂肪酸は苦味物質と直接相互作用することで苦味抑制活性を示すことを報告した。苦味物質は脂肪酸と相互作用するときに立体構造変化を伴うと考えられるが、その詳細についてはほとんど知見がない。今回、脂肪酸無添加と添加後について主に ^{1}H NMR を用いて苦味物質の構造変化に関する解析を行い、物質側から見た苦味発現について分子レベルでの検討を行った。
(方法) 苦味物質は塩酸キニーネ(QHCl)、塩酸プロメタジン(PHCl)、塩酸プロプラノロール(PrHCl)、塩酸ヨヒンビン(YHCl)、塩酸ベルベリン(BHCl)、脂肪酸はラウリン酸(LA)及びオレイン酸(OA)を用いた。相互作用の測定は、等温滴定カロリメトリー(ITC)および ^{1}H NMR を行った。ITC は水溶液中で脂肪酸に対して 5 種の苦味物質の滴定を行った。^{1}H NMR は苦味物質単独および、苦味物質と脂肪酸の等モル混合液について測定を行い、個々のシグナルの変化を調べた。溶媒は DMSO-d_6 または D_2O を用いた。
(結果) ITC では LA に対して QHCl、PHCl、PrHCl を滴定した際に熱変化が観察され、相互作用が検出されたが、YHCl、BHCl では検出されなかった。OA は全ての苦味物質との間に相互作用が検出された。NMR では、D_2O での測定が困難であったことから DMSO-d_6 中での結果を用いて相互作用部位の推定を行った。また苦味物質との相互作用測定には、シグナルの重なりが少ないことから脂肪酸として LA を用いた。QHCl、PHCl、PrHCl では苦味物質単独と脂肪酸との混合液とを比較したところ、苦味物質の窒素原子周辺と水酸基周辺の水素原子で、相対的に大きく化学シフトの変化が見られた。YHCl および BHCl ではわずかな変化が観測されたが特定の傾向は認められなかった。
(考察) 脂肪酸との相互作用によって ITC でエントロピー変化が検出された QHCl、PHCl、PrHCl について NMR でも化学シフトの変化が観察された。以上より上記 3 物質は LA と混合することで、窒素原子周辺と水酸基周辺で構造変化が起こることが示唆された。YHCl、BHCl はオレイン酸では相互作用が見られたがラウリン酸では見られなかったことから、脂肪酸の鎖長が相互作用に影響していると考えられる。
以上の結果から、脂肪酸は苦味物質と相互作用することで苦味物質の立体構造を変化させ、苦味を抑制していることが推定された。

bitterness masking, fatty acid

講演番号：2B03a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ B 校舎 03 会場

燕麦の脂質特性

Lipid characteristics of the oats

○遠藤 泰志、ソ イ、津久井 隆行（東京工科大応生）
○Yasushi ENDO, Wei ZENG, Takayuki TUKUI (Tokyo University of Technology)

［目的］ 燕麦は世界的にも重要な作物の一つであり、伝統的に飼料用や肥料用として使用されている。さらに近年では食品への応用が増え続けている。燕麦の構成成分は、主に炭水化物であり、とくに食物繊維が多いが、タンパク質や、脂質も含まれている。燕麦に関する研究は、主に食物繊維に関するものが多いが、脂質に関する研究例は非常に少ない。そこで本研究では、6 種類の燕麦の脂質成分に及ぼす品種の影響を調べた。

［方法］ 試料として 6 種類燕麦（裸燕麦、スーパーハヤテ隼、ニューオールマイティ、ヘイオーツ、緑肥用エンバク、ウルトラハヤテ韋駄天）を使用した。6 種類の燕麦からヘキサンで脂質を抽出した後、ケイ酸カラムクロマトグラフィーで中性脂質、糖脂質、リン脂質に分画した。分画した各脂質を TLC および TLC－FID によって脂質組成を分析した。総脂質をメチルエステル化した後、ガスクロマトグラフィーで脂肪酸組成を分析した。また、高速液体クロマトグラフィーでトコフェロール含有量を測定すると共に、ガスクロマトグラフィーでステロール組成を分析した。

［結果］ 裸燕麦の脂質含有率は 3.7%で、皮燕麦の脂質含有率は平均で 4.9%であった。燕麦のヘキサン抽出脂質の組成を分析したところ、中性脂質が 90%以上で、糖脂質とリン脂質が少なかった。また、脂肪酸組成を分析したところ、品種に関わらず、18:1(オレイン酸)と 18:2(リノール酸)が 75%以上含まれていた。トコフェロール含有量は品種によって異なり、ヘイオーツのトコフェロール含有量が最も多く、1025μg/g 脂質であった。ステロール組成を分析したところ、6 種類の燕麦のステロールの主成分はβ-シトステロールとアベナステロールであり、最も多い品種は緑肥用エンバクで、総量は 82.87mg/g 脂質であった。

Oats, Lipid, Fatty acid composition

講演番号：2B03p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ B 校舎 03 会場

米アルブミンの物理化学的特性の評価

Evaluation of the physicochemical properties of rice albumin

○中嶋 夏子、金子 智博、稲 成信、赤尾 真、熊谷 日登美（日大・生資・生化）
○Natsuko Nakajima, Tomohiro Kaneko, Shigenobu Ina, Makoto Akao, Hitomi Kumagai (Nihon Univ.)

【目的】近年、日本における成人病や生活習慣病患者の増加に伴い、それらを予防する効果の期待された種々の機能性食品成分が同定され、特定保健用食品の開発も積極的に行われている。その中でも、タンパク質性の機能性成分は、血中コレステロール低下作用を有する大豆タンパク質をはじめ、数多く同定されている。しかし、タンパク質は一般的に、加熱に弱く、溶媒に対する溶解性も様々であり、乳化性や起泡性といった物理化学的特性も個々によって大きく異なる。このため、加工や製造工程において扱いづらく、製品として市場に出回っている数は、その他の成分と比較して少ない。従って、タンパク質性機能性成分の物理化学的特性を解明することは、その素材の利用・加工において重要である。

私達はこれまでに、米アルブミンが、血糖値上昇抑制作用を有し、糖尿病の予防に有効である可能性を明らかにしてきた。しかし、米アルブミンの食品タンパク質としての物理化学的特性は、不明な点が多い。そこで本研究では、米アルブミンの産業利用に向け、熱安定性・溶解性・乳化性・起泡性の解明を行なった。

【方法】試験には、米アルブミンの他に、比較対象として、物理化学的特性の良く知られた食品タンパク質である、カゼイン、大豆タンパク質、乾燥卵白を用いた。また、食品加工における加熱処理と、種々の pH 環境下での使用を想定して、各試験には、未加熱処理試料に加え、80℃で 10 分間処理したものを、また、試験溶媒として、pH 3-8 の種々の緩衝液を用いた。溶解性は、ケルダール法により測定したタンパク質溶液中の可溶性窒素量から求めた。乳化性は、タンパク質溶液とコーン油をホモジナイズし、得られた溶液の濁度より求めた。起泡性は、タンパク質溶液中に窒素ガスを送気し、発生した起泡体積から評価した。

【結果】米アルブミンは、pH 3-8 の範囲では、80%以上の高い溶解性を示した。また、その他のタンパク質が加熱処理により溶解性が低下したのに対して、米アルブミンは、加熱処理後も高い可溶性を維持し、熱安定性の高いタンパク質であることが示唆された。また、米アルブミンは、乳化力の高いカゼインと同程度の乳化性を示し、カゼインが等電点付近である pH 4-5 付近において乳化性が低下したのに対し、米アルブミンは全ての pH において高い乳化性を示した。さらに、米アルブミンは、起泡性の高いタンパク質である乾燥卵白と同程度の起泡性を示し、加熱処理後も高い起泡性と熱安定性を保持した。

Rice albumin, Physicochemical properties, Emulsifying capacity/stability

講演番号：2B03p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ B 校舎 03 会場

粒子径制御技術を用いた乳製品向け抗酸化製剤の開発

Development of the Antioxidative Formulation for the Dairy Products using Particle Size Control Technology

○門脇 章夫[1]、檜山 真一郎[1]、山本 幸弘[2]、原 節子[2]、大久保 泰宏[1]([1]太陽化学株式会社、[2]成蹊大理工)
○Akio KADOWAKI[1], Shinichiro HIYAMA[1], Yukihiro YAMAMOTO[2], Setsuko HARA[2], Yasuhiro OKUBO[1] ([1]Taiyo Kagaku Co. Ltd., [2]Seikei Univ.)

【目的】食品が販売される場面において、より美味しく見えるよう強い光が照射されていることが多い。光は食品にダメージを与える要因の一つであり、特に繊細な風味が特徴の食品では、展示中に風味が劣化することが問題となる場合がある。このような食品の嗜好的品質や栄養価値の低下は、食品中に含まれる脂質やタンパク質の酸化劣化が大きな原因となっている。我々はこれまでに、独自の乳化技術で脂溶性抗酸化素材と水溶性抗酸化素材を一剤化した抗酸化製剤（TS）を開発するとともに、TS の乳化粒子径制御による効率的な抗酸化効果の発現を確認している。昨年度は、生クリームをターゲットとして主に乳脂劣化物の分析を行い、TS の酸化抑制効果について報告した[1)]。本年度は乳製品向けに TS の組成を検討するとともに、無脂肪ヨーグルトの光劣化物の分析から、乳タンパク質に対する TS の劣化抑制効果について検証を行った。

【方法】脂溶性抗酸化素材としてトコフェロール（Toc）、水溶性抗酸化素材としてカテキンが主要成分となる茶抽出物を用い、これらを一剤化した抗酸化製剤（TS）を調製した。乳製品に TS を一定量添加し、冷蔵下で蛍光灯照射による虐待試験を行った。蛍光灯照射により劣化した試料は、官能評価、および各種機器分析により劣化物の測定を行った。同様に、乳成分劣化に対してより効果的な抗酸化素材のスクリーニング試験を実施した。

【結果】無脂肪ヨーグルトに対する光照射試験では、試料から揮発性成分を抽出、GC/MS で乳の劣化物質を分析した。その結果、乳タンパク質由来の劣化物として、ジメチルジスルフィド（DMDS）、ジメチルトリスルフィド（DMTS）、メチオナールといった低分子硫黄化合物を確認した。光照射前に TS をヨーグルトに添加したところ、これら低分子硫黄化合物の生成は有意に減少した。また、官能評価においても TS 添加品で劣化抑制効果が認められた。以上の結果より、TS が乳脂だけでなく乳タンパク質の劣化に対しても効果的に作用することが明らかとなった。また、乳の劣化に対して有効な抗酸化素材のスクリーニング結果から、より効果的な新規抗酸化製剤の開発を進めている。

1) 日本農芸化学会 2013 年度大会 要旨集 2A16p20

antioxidant, particle size, emulsion

講演番号：2B03p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ B 校舎 03 会場

金属イオンは豆腐形成におけるタンパク質会合開始因子である
Metal ions act as the initiator in tofu formation

○有井 康博[1]、岡村 麻衣[1]、鳥居 絵美[1]、西澤 果穂[1]、竹中 康之[2] ([1]武庫女大、[2]神戸松蔭大)
○Yasuhiro ARII[1], Mai OKAMURA[1], EMI TRII[1], KAHO NISHIZAWA[1], YASUYUKI TAKENAKA[2] ([1]Mukogawa Women's Univ., [2]Kobe Shoin Univ.)

【目的】豆腐形成における二価金属イオン（M^{2+}）の役割は豆乳タンパク質を凝集させることにあると述べられる。この凝集にはタンパク質中のグルタミン酸残基やアスパラギン酸残基の側鎖に位置するカルボキシ基に M^{2+}が結合し、タンパク質間を架橋すると考えられている。この仮説はタンパク質科学的には尤もらしい仮説である。しかしながら、これまでの研究において豆乳タンパク質に M^{2+}が結合することは示されているが、M^{2+}がカルボキシ基と結合し架橋を形成することでタンパク質が沈殿することについて実験的証拠は示されていない。本研究では、豆腐形成において本タンパク質間架橋が沈殿形成に関与していることを実験的に証明することを目的とした。

【方法】あらかじめ 80℃に加熱した豆乳に様々な金属塩を最終濃度 0-20 mM となるように添加した。

用いた金属塩は $MgCl_2$、$CaCl_2$、$CuCl_2$、$FeCl_2$、$FeCl_3$、$MnCl_2$ である。添加後は十分に加熱した後、氷上で急冷した。各標品を遠心することで、上清と沈殿に分離した。上清についてはタンパク質濃度の変化を、沈殿についはその湿重量変化を測定し、各金属イオン種の影響を調べた。

【結果と考察】凝固剤濃度に依存して、上清タンパク質が減少し、沈殿湿重量が増加することが明らかとなった。上清タンパク質濃度と沈殿湿重量の変化に対して curve fitting 解析を行い、凝固剤中点濃度を算出した。その結果、各金属イオンによる中点濃度と EDTA の安定化定数の間に高い相関性があることが分った。また、上清タンパク質濃度と沈殿湿重量の変化における両相関曲線がほぼ一致することが示された。EDTA は金属イオンの代表的なキレート剤であり、その分子内にある 4 つのカルボキシ基が金属イオンと錯体形成することが原子レベルで明らかになっている。これらの結果は、豆乳タンパク質上のカルボキシ基と金属イオンが結合すること、その結合によりタンパク質が会合することを示している。また、Fe^{3+}のような三価金属イオンを含む凝固剤によっても豆腐様の食品を加工することができる可能性を示した（有井康博、特開 2013-051906）。一方で、M^{2+}で形成した豆乳タンパク質の凝集体は高濃度（100 mM）の EDTA で可溶化を試みても豆乳には戻らない（Arii and Takenaka, 2013）。つまり、豆腐の保持には M^{2+}は重要でないことを示す。以上のことから、豆腐形成において金属イオンは豆乳タンパク質の会合を引き起こす開始因子であると考えた。

本研究は JSPS 科研費若手 B 研究（23700894）の助成を受けたものである。

Arii Y and Takenaka Y (2013) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 928-933.
Arii Y and Takenaka Y (2014) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, *in press*.

tofu, metal ion, protein association

講演番号：2B03p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ B 校舎 03 会場

ε-ポリリシンとの複合体化によるβ-コングリシニンの機能改変

Functional Improvement in ß-conglycinin by Conjugation with ε-polylysine

○橋本 健史、好田 正、服部 誠（東京農工大院農）
○Takeshi HASHIMOTO, Tadashi YOSHIDA, Makoto HATTORI (Tokyo University of Agriculture and Technology)

【目的】大豆タンパク質の主成分であるβ-コングリシニンは必須アミノ酸を豊富に含む良質のタンパク質であり、乳化性・気泡性・ゲル化性などの機能特性や、血中コレステロール低下作用、血圧上昇抑制、抗酸化作用、肥満防止効果などの生理機能を持つ有用な食品素材である。一方で、このタンパク質は酸性条件下で機能特性が低下するため、食品の調理・加工・保存における大豆タンパク質の利用の障害となっている。また、大豆アレルギーの原因物質であることが問題となっている。以上のことから、β-コングリシニンの機能を改変することには大きな意義がある。

本研究では、食品への応用を考慮して、食品加工に用いられる微生物由来トランスグルタミナーゼ（MTGase）により、β-コングリシニンとε-ポリリシン（PL）を複合体化することで、β-コングリシニンの機能特性の向上と低アレルゲン化を達成することを目的としている。

【方法】β-コングリシニンは、等電点沈殿と Q-Sepharose Fast Frow (2.5 ID×50 cm, GE Healthcare Bio-Science AB)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより、脱脂大豆粉末から抽出・精製した。精製β-コングリシニンの Gln 残基とＰＬのε-アミノ基のモル比が 1：1 となるように混合し、タンパク質溶液とした。１ｇのタンパク質に対して 200 unit の酵素力値となるように、タンパク質溶液と酵素溶液を混合した。pH 7.6、40℃で１時間 MTGase 反応させ、β-コングリシニン-PL 複合体を得た。アミノ酸分析により複合体の化学組成を調べた。機能特性の評価として、複合体の pH 依存的溶解性測定と乳化性測定、免疫原性の評価を行った。複合体の乳化性は濁度法により評価した。

【結果】MTGase 反応により、高分子のβ-コングリシニン-PL 複合体が得られた。アミノ酸分析により、β-コングリシニン１分子あたり約 18 分子の PL が結合していることが明らかとなった。溶解性測定により、複合体の酸性条件下での溶解性の改善が認められた。これは塩基性ポリペプチドである PL の結合により、複合体の等電点が塩基性側にシフトしたためであると考えられた。また、乳化性測定を行ったところ、酸性条件下と塩存在下での乳化性の改善が認められた。これは PL の結合により親水基が付与され、また PL の強い正電荷により界面が安定化したためによると考えられた。さらに免疫原性の評価を行ったところ、複合体化による免疫原性の低下を認めた。

以上より、本研究の手法がβ-コングリシニンの溶解性、乳化性、免疫原性といった機能性の改善に有効であることが明らかとなった。

β-conglycinin, ε-polylysine

講演番号：2B03p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ B 校舎 03 会場

小麦登熟過程における PDI および Ero1 の発現量解析

Expression analysis of PDI and Ero1 during ripening process

○徳本 脩[1]、塩野 弘二[2]、岡 大貴[2]、野口 治子[3]、内野 昌孝[3]、野口 智弘[2]、高野 克己[3] ([1]東京農業大院・農・農化、[2]東京農大・応生・食加技セ、[3]東京農大・応生・化学)
○Osamu TOKUMOTO[1], Kouji SIONO[2], Daiki OKA[2], Haruko NOGUTI[3], Masataka UTINO[3], Tomohiro NOGUTI[2], Katumi TAKANO[3] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric, [2]Fac.BioSci.Appl.,FPC.,Tokyo Univ.Agric., [3]Dept.Appl.Biol.chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric)

【目的】

プロテインジスルフィドイソメラーゼ（PDI）は、タンパク質のジスルフィド結合（SS 結合）形成を触媒し自らは還元型となりその機能を失うが、エンドプラズミックレティキュラムオキシドレダクターゼ 1（Ero1）の作用により、酸化型へと再生され機能を回復する。小麦においても登熟過程で合成されるタンパク質の SS 結合形成に両酵素が関与していることが知られている。小麦粉ではこの過程で発現した両酵素が残存し、小麦粉の加工特性に影響を及ぼしているものと推察される。そこで本研究では、両酵素の小麦粉加工特性への影響を検討するため、小麦登熟過程における両酵素の発現量を測定し、小麦品種間における両酵素の挙動の違いを解析することを目的とした。

【方法】

小麦試料には農林 61 号を用いた。小麦の開花日を 0 日目とし、穂を 0～30 日間経時的に採取、液体窒素にて瞬間冷凍したものを試料とした。PDI と Ero1 をコードする mRNA の発現量を比較するため、各冷凍穂から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR に供した。また、PDI と Ero1 の発現量を比較するため、各生育段階における小麦 10 粒から抽出したタンパク質をウェスタンブロットに供し、蛍光の濃淡により両酵素の発現量を測定した。同時に、タンパク質抽出溶液における PDI 活性(還元活性)を、基質にインスリンを用い測定した。

【結果】

PDI の mRNA 量は、粒の成熟につれ徐々に増加し、粒が急激に成熟する開花後およそ 10 日にピークとなりその後減少した。一方、Ero1 は粒の成熟につれ徐々に増加し 15 日目でピークを迎えその後減少した。両酵素において mRNA の発現時期に差異がみられた。次に、ウェスタンブロットにて両酵素の発現量を測定した結果、PDI では 5 日目で発現が確認され、mRNA の発現量が減少した後も PDI が増加していることから、PDI の蓄積が考えられた。また、Ero1 では 15 日目から発現が確認された。さらに、PDI 活性を測定した結果 10 日目までは低い値を示すが、15 日目より増加し、25,30 日目で 0 日目の約 4 倍の活性を示した。

Disulfide bond, Protein Disulfide Isomerase, Endplasmic Reticulum Oxidoreductase 1

講演番号：2B03p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ B 校舎 03 会場

小麦粉生地中のジルフィド結合形成に対する PDI-Ero1 の影響

Effect of PDI-Ero1 on formation of the disulfide bond in dough

○西堀 史也[1]、塩野 弘二[2]、岡 大貴[2]、野口 智弘[2]、高野 克己[3]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・食加技セ、[3]東京農大応生・化学)
○ Fumiya NISHIBORI[1], Kouji SHIONO[2], Daiki OKA[2], Tomohiro NOGUCHI[2], Katsumi TAKANO[3] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric, [2]Fac.Appl.Biol.Sci.,FPC,Tokyo Univ.Agric, [3]Dept.Appl.Biol.Chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric)

【目的】

小麦粉生地混捏時のグルテン形成には、様々なタンパク質分子間(内)の結合や相互作用が関与し、特にジスルフィド（SS）結合の形成が重要とされている。我々は、SS 結合形成を触媒するプロテインジスルフィドイソメラーゼ（PDI）および PDI の酸化再生に関与するエンドプラズミックレティキュラムオキシドレダクターゼ 1 （Ero1）に着目し、生地物性および製パン性に対する両酵素の影響について検討を行ってきた。両酵素系によって小麦粉タンパク質の SS 結合形成の促進について明らかにしてきたが、本報告では小麦粉生地タンパク質の SS 結合の定量について検討を行った。

【方法】

PDI および Ero1 は、小麦遺伝情報を基に大腸菌を用いた大量発現系にて発現取得した。強力粉(カメリア；日清製粉)に純水または PDI および Ero1 を添加して生地を混捏し、37℃にて 3 時間反応後、70%エタノールおよび 0.1M 酢酸の各溶液にて分画した。また、同様に強力粉から各溶液にて分画を行った。それぞれの溶液のタンパク質濃度を 100μg/ml に調製後、25mM モノブロモビマン(MBB)．50%アセトニトリルを加え、遊離 SH 基量を蛍光分光光度計にて励起波長 390nm, 蛍光波長 482nm を測定し、SH 基量の減少量から SS 結合形成量を算出した。また、70%エタノール抽出画分のタンパク質濃度を 2mg/ml に調製後、MBB を加え、Inertsil WP300 C8 カラムにてω, α/β, γグリアジンに分画し、それぞれの遊離 SH 基を励起波長 390nm, 蛍光波長 482nm にて検出した。

【結果】

強力粉から調製した生地より 70%エタノールおよび 0.1M 酢酸溶液にて分画した画分中の SH 基量を測定した結果、両画分ともに、生地を混捏しない強力粉から分画したものに比べ、遊離 SH 基量が減少した。また、PDI および Ero1 を添加して生地を混捏することで両画分の遊離 SH 基量はさらに大きく減少した。このことから両酵素による小麦粉生地タンパク質中にて SS 結合形成が促進していることが示唆された。そこで、70%エタノール画分中の遊離 SH 基を蛍光標識し、HPLC に供した結果、PDI および Ero1 を添加して生地を混捏することで、α/βおよびγグリアジンのピークエリア面積が減少した。よって、両酵素の添加により生地中に SS 結合の形成が示唆された。

disulfide bond, dough, PDI-Ero1

講演番号：2B03p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ B 校舎 03 会場

PDI、Ero1 を用いた国内産パン用小麦粉の製パン向上効果について

Effect of PDI-Ero1 on breadmaking of domestic flour

○塩野 弘二[1]、西堀 史也[2]、岡 大貴[1]、野口 智弘[1]、高野 克己[3]([1]東京農大応生・食加技セ、[2]東京農大院農・農化、[3]東京農大応生・化学)
○ Kouji SHIONO[1], Fumiya NISHIBORI[2], Daiki OKA[1], Tomohiro NOGUCHI[1], Katsumi TAKANO[3] ([1]Fac. Biosci., FPC, Tokyo Univ. Agric., [2]Agrichem., Agr., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Biosci. Tokyo Univ. Agric.)

【目的】

小麦グルテンの形成にはタンパク質間(内)の様々な結合や相互作用が関与し、特にジスルフィド結合(SS 結合)が重要であるとされている。我々は小麦粉に内在するＳＳ結合を形成する酵素であるプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)および PDI の酸化再生に関与するエンドプラズミックレティキュラムオキシドレダクターゼ１（Ero1）に着目し研究を進め、PDI、Ero1 間の電子伝達が行われていること[1)]、製パン性の劣る中力粉に PDI、Ero1 を添加することで比容積が向上することを報告している[2)]。現在、国内産パン用小麦粉では、外国産パン用小麦粉と同様のタンパク質含有量であるにも拘わらず製パン性に劣っている。そこで我々は、国内産パン用小麦粉に PDI、Ero1 を添加し製パン性の向上を試みた。

【方法】

PDI および Ero1 は、小麦遺伝情報を基に大腸菌を用いた大量発現系にて発現取得した。小麦粉は、国内産パン用小麦粉である「キタノカオリ」および「春よ恋」を用いた。製パンは、小麦粉 200g に水 130ml、砂糖 10g、ショートニング 8g、生イースト 8g、塩 4g を加え混捏、発酵、焼成した。また、PDI 50Units(11.5nmol)、Ero1 115nmol および FAD 11.5μmol を添加し検討を行った。製パン性の評価は、生地調製中の発酵過程における生地体積増加率をメスシリンダー法にて、焼成したパンの比容積は菜種置換法によって算出した。

【結果】

発酵による生地の体積増加率を求めたところ、発酵 3 時間後において酵素無添加でキタノカオリが約 560%、春よ恋で約 550％であったのに対し、PDI および Ero1、FAD 添加ではそれぞれ約 610％、約 580%と何れも増加し、ガス保持力が向上した。また、焼成後のパンの比容積は、キタノカオリ、春よ恋で酵素無添加をそれぞれ 100%とすると、両酵素を添加することでそれぞれ 103.8%、105.3%となり PDI、Ero1 を添加することで国内産パン用小麦粉の製パン性が向上した。

[1)] 日本食品科学工学会第 58 回大会講演要旨集 P99
[2)] 日本食品科学工学会第 57 回大会講演要旨集 P126

PDI, Ero1, breadmaking

講演番号：2B03p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ B 校舎 03 会場

製パン性に対する小麦粉タンパク質酸可溶性画分のω-グリアジンの効果について

Effect of ω-gliadin in acid-soluble wheat protein on the baking quality

○岡 大貴[1]、大原 慎太郎[2]、野口 智弘[1]、高野 克己[3]([1]東京農大応生・食加技セ、[2]東京農大院農・農化、[3]東京農大応生・化学)
○Daiki Oka[1], Shintaro Ohara[2], Tomohiro Noguchi[1], Katsumi Takano[3] ([1]Dept. Biosci., FPC, Tokyo Univ. Agric., [2]Agrichem. Agr., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】

小麦粉タンパク質の酸可溶性画分は、バイタルグルテンと共に製パン改良効果を有することが知られている。また、これらは原料小麦粉により製パン性の改良効果に差異があり、それら要因の詳細は不明である。我々は、同タンパク質含量の国内産小麦粉の製パン性の差異について検討を行い、同差異にω-グリアジンの量比が関与することを報告[1)]した。製パン改良効果を有する酸可溶性画分においても、ω-グリアジンの量比が製パン性に関与していることが推察された。そこで、製パン性が異なる 2 種の酸可溶性画分を用いて、ω-グリアジンの量比と製パン性との関係性について検討を行った。

【方法】

酸可溶性画分には品種が異なる小麦粉より分画された 2 種（A、B）を用いた。製パン試験は小麦粉として、カメリア（日清製粉社製）を用いストレート法にてパンを調製した。パン比容積（cm^3/g）は 3D 体積計測装置（ASTEX 社製）、クラムの硬さは 50%圧縮時の荷重（N）を圧縮型物性測定機（インストロン社製）にて測定した。酸可溶性画分を 0.1N 酢酸にて溶解後、RP-HPLC（Inertsil WP300 C8）にてグリアジンを分画し、得られたピークのエリア面積比よりω-グリアジン（%）を定量した。また、酸可溶性画分の表面疎水性度（F.I./mg protein）を ANS 法にて測定した。

【結果】

酸可溶性画分無添加ではパン比容積（cm^3/g）は 6.31、クラムの硬さ（N）は 2.32 を示したのに対し、酸可溶性画分を 3%添加した場合、A ではそれぞれ 6.56 および 2.16 を示し、有意に製パン性が向上した。一方、B ではそれぞれ 6.35 および 2.37 と、無添加とほぼ同様な値を示し製パン性の向上はみられなかった。両酸可溶性画分のω-グリアジン量（%）を RP-HPLC にて定量したところ、A では 14.9±1.9（±SD）、B では 11.9±1.4 を示した。さらに、酸可溶性画分の表面疎水性度（F.I./mg protein）を測定したところ、A では 135.8±4.6、B では 147.2±3.2 を示し、製パン性の向上効果を有す A ではω-グリアジン量が多く、表面疎水性度が低かった。

1. 日本食品科学工学会第 60 回大会講演要旨集, p73

ω-gliadin, baking quality, surface hydrophobicity

講演番号：2B03p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ B 校舎 03 会場

小麦粉生地形成に対するアスコルビン酸の作用と PDI-Ero1 の関係について

The relation of the action of ascorbic acid and PDI-Ero1 in dough formation

○野口 智弘[1]、西堀 史也[2]、塩野 弘二[1]、岡 大貴[1]、高野 克己[3] ([1]東京農大・応生・食加技セ、[2]東京農大院・農・農化、[3]東京農大・応生・化学)
○Tomohiro Noguchi[1], Fumiya Nishobori[2], Kouji Shiono[1], Daiki Oka[1], Katsumi Takano[3] ([1]Fac. Biosci., FPC, Tokyo Univ. Agric., [2]Agrichem., Agr., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Biosci. Tokyo Univ. Agric.)

【目的】

製パンにおいてアスコルビン酸（AA）が生地改良材として用いられている。AA は小麦生地中でデヒドロアスコルビン酸(DHA)に酸化され、DHA によってグルテンのジスルフィド（SS）結合形成が促進され、製パン性が向上すると言われている。しかし、DHA がグルテンの SS 結合形成に関与する機序は不明である。

我々は、生体内においてタンパク質の SS 結合形成を触媒するプロテインジスルフィドイソメラーゼ（PDI）および PDI の酸化再生に関与するエンドプラズミックレティキュラムオキシドレダクターゼ 1 （Ero1）に着目し、AA の生地改良効果は両酵素の作用を介して惹起生じるものと推論し、AA から DHA の生成および SS 結合形成にたいする PDI および Ero1 の影響について検討を行った。

【方法】

PDI および Ero1 は、小麦遺伝情報を基に大腸菌を用いた大量発現系にて発現取得した。AA、DHA および 2,3-ジケトグロン酸（DKG)量は、ヒドラジン法にて測定し、SS 結合形成量は DTNB 法にて遊離 SH 基量を測定し算出した。

AA に Ero1 を作用させた反応溶液に純水または還元型 PDI（redPDI)を添加し、DHA 生成量および DHA の redPDI への反応性を測定した。また、還元変性オボムコイド(redOM)を基質とし、AA、Ero1、PDI を反応させた後、SS 結合形成量を測定した。

【結果】

AA に Ero1 を作用させたところ、DHA の生成が確認された。この反応系に redPDI を添加したところ、DHA 量が低下し Ero1 によって生成した DHA が redPDI によって AA に還元されたことが示唆された。

次に、OM に対し AA および Ero1、PDI を作用させたところ、AA のみの添加では SS 結合形成はほとんどみられず、AA と Ero1 を作用させたものでは、2.5mol/OM 1mol の SS 結合形成が確認された。さらに、AA および Ero1、PDI を作用させたところ、3.9mol/OM 1mol と増加した。また、この際の AA 量は、AA と Ero1 の添加で 51.5%低下したが、PDI を添加すると 39.4%低下に減少した。

ascorbic acid, Ero1, PDI

講演番号：2B03p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ B 校舎 03 会場

緑豆由来の不凍活性を有するタンパク質の構造と機能

Structure and function of a protein having antifreeze activity from mung bean

○田中 里佳[1]、中地 学[1]、荒井 直樹[2]、片倉 啓雄[1]、河原 秀久[1]([1]関西大化生工、[2]カネカ)
○Rika Tanaka[1], Manabu Nakachi[1], Naoki Arai[2], Yoshio Katakura[1], Hidehisa Kawahara[1] ([1]Kansai Univ, [2]Kaneka)

【目的】変温性動物の幾種かは、低温下で棲息する際、不凍タンパク質(AFP)を生産する。これまでに、我々は、様々な低温環境下で棲息している生物種からAFPの検索を行った。冷凍食品の品質保持剤として利用することを目的として研究を進めた結果、大根の根菜および葉にAFPが複数存在していることが判明した[1]。しかしながら、5月以降の大根にはAFPは発現されていないので、年間を通してAFP製造できる工程のためカイワレ大根に着目した。カイワレ大根中には、氷再結晶化抑制活性のみ有するタンパク質が存在し、そのタンパク質は種子貯蔵タンパク質であることが判明した。そこで、市販されているマメ科植物種子を広く検索したところ、ササゲ系の緑豆にAFP活性があるタンパク質が存在することを明らかにした[2]。本研究では、AFP活性を持つタンパク質の諸性質および構造を解明し、大腸菌での組換えタンパク質の発現を試みた。
【方法】市販されている豆は、20 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)に浸け、一定期間低温室に置いた。ミキサーによって破砕した後、遠心分離して、得られた上澄み液(エキス)をアセトン沈殿あるいはpH処理した後、氷に結合するタンパク質のみ分離できるコールドフィンガー法によって分離した。この法は、サンプル水溶液を16時間で-1.6℃までゆっくりと温度制御して低下させ、真鍮の棒の周りに透明な氷を形成させる。この氷を回収し、再度同方法で処理することによって分離ができる。AFPの活性測定は、氷再結晶化抑制活性(RI活性)をシュークロースサンドイッチ法で測定した。
【結果】緑豆から調製したエキスの RI 活性は、市販不凍タンパク質(カイワレ大根)より弱かった。抽出エキスはアルカリ処理した後、コールドフィンガー法による 2 回の処理によって、目的タンパク質は精製できた。この収率は低く、緑豆 100 g 当たり 1 mg であった。このタンパク質は、SDS-PAGE 分析によって約 50 kDa の分子量で、氷に結合できるが、RI 活性のみ有していた。精製タンパク質は、アミノ酸配列解析から 8S α´グロブリンであることが判明した。そこで、その全遺伝子配列を大腸菌コドンに置き換えた合成遺伝子を調製し、大腸菌への組換えタンパク質の発現を試みた。組み換えタンパク質は発現し、現在、組み換え体の活性を確認している。

1. Kawahara H. *et al*, *Cryo. Letters*, **30**, 119-131 (2009).
2. 中地　学ら、日本農芸化学会 2011 年度大会講演要旨集、p240.

antifreeze protein, globulin, mung bean

講演番号：2B03p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ B 校舎 03 会場

グアー起泡性アルブミン溶液の表面張力

The surface tension of the guar foaming albumin solution.

○徐 知華[1]、土居 幸雄[2] ([1]京女大院家政、[2]龍谷大経済)
○Chifa SO[1], Yukio DOI[2] ([1]Kyoto Women Univ., [2]Ryukoku Univ.)

［**目的**］食品添加物として利用されるグアーガムの精製の際に廃棄されるグアーミールには卵白より起泡性の高いタンパク質画分が存在し，そのタンパク質をグアー起泡性アルブミン(GFA)と命名し、卵アレルギー患者などを対象に、卵白の代替食材としての可能性があることをこれまでに報告した。今回は、GFA 溶液の表面張力を各種条件下で測定し、食品素材としての利用における基礎データを収集した。

［**方法**］脱脂グアーミール試料を水抽出後、酸性条件下で得た沈殿を pH 7 で可溶化し、陰イオン交換クロマトグラフィーにより GFA を精製した。SDS-PAGE では 1 本のバンドが確認され、等電点電気泳動では pI= 5.1 であった。表面張力はウィルヘルミー法により測定した。オボアルブミン（OVA）を対照試料として用いた。

［**結果**］リン酸緩衝液を用いて表面張力のタンパク質濃度依存性を調べたところ、食塩、ショ糖、メルカプトエタノール (ME) の有無にかかわらず、いずれの場合も GFA 濃度の上昇にともない表面張力は急激に減少した後、0.05 ～ 0.1 mg/mL 付近から漸減し 45～50 mN/m まで低下した。食塩存在下（0.1 M）では、表面張力の低下はより大きく、高タンパク質濃度（1 mg/mL）では 45 mN/m まで低下した。OVA の場合は、食塩添加の影響はそれほど大きくなかった。ショ糖添加による表面張力の変化への影響も食塩の場合と同様にみられたが、OVA の場合と同程度であった。これに対して、ME 添加の影響は OVA で大きく、GFA で小さかった。表面張力の pH 依存性を調べたところ、GFA 溶液の表面張力は pH 4 付近で最小となり、等電点の近い OVA と同様な変化を示した。

［考察］水-空気界面はたんぱく質が最も集まりやすいところであり、水溶液中のたんぱく質は自発的に界面に集まる傾向にある。これは，界面活性剤と同様に，たんぱく質が水-空気界面で表面エネルギーを低下することで，平衡状態に達するためである。この結果，表面のたんぱく質濃度は，溶液中の濃度の数倍に達することがある。GFA の水-空気界面への吸着はいずれの場合も 0.05 ～0.1 mg/mL で飽和に達すると考えられた。また、GFA の界面吸着は、水溶液の pH や塩濃度に大きく影響を受けたことから、GFA の場合表面エネルギーの低下は分子間のイオン相互作用の影響が OVA の場合よりも大きいと考えられる。糖の添加による水和の影響は GFA,OVA ともに少ないことから、水素結合の特異的な関与は考えにくい。ME 添加による分子内 SS 結合の解離による影響は、OVA では顕著に現れ分子構造の柔軟性が気液界面におけるエネルギー低下に有利に働くが、GFA においてはそれほど大きくなかった。これは、GFA と OVA の分子量の違いを反映しており、GFA の構造安定性における SS 結合の関与がそれほど大きくないことが考えられた。結論として、起泡現象における最初の過程である表面張力の減少に関しては、GFA と OVA とでその機能発現において大きな違いが見られず、GFA と OVA の表面吸着におけるこれらの知見は、これまでの起泡性・泡沫安定性に関する実験結果と矛盾するものではなかった。

Guar protein, Foam, Surface tension

講演番号：2B03p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ B 校舎 03 会場

オボアルブミンの加熱凝集に対する N 末端ペプチドの役割

Role of the N-terminal region of ovalbumin during heat-induced aggregation and gelation

河内 悠希[1]、亀山 里菜[1]、半田 明弘[2]、○高橋 延行[3]、田中 直毅[1] ([1]京都工繊大生体分子工学、[2]キューピー（株）研究開発本部、[3]京都大学大学院農学研究科)
Yuki Kawachi[1], rina Kameyama[1], Akihiro handa[2], ○Nobuyuki Takahashi[3], naoki Tanaka[1] ([1]Kyoto Institute of Technology, [2]Kewpie Corporation, [3]Kyoto Univ.)

卵白アルブミン（OVA）の加熱によるゲル化過程については、条件によって異なる物性が得られることが知られ、そのメカニズムの詳細について多くの知見が得られてきた。我々は、アミロイド様の凝集体を形成する過程について、N 末端領域のαヘリックスに富む領域が加熱により構造変化を起こし、重合に至る可能性を見出し報告した（1）。本研究では、この構造変化が OVA の重合に及ぼす影響を調べるために、N 末端 22 残基のペプチド（$pN_{1\text{-}22}$）と、この部分を欠落した OVA 分子（pOVA）を調製し、その凝集ゲル化に及ぼす、N 末端ペプチドの役割を検討した。

【方法】＜$pN_{1\text{-}22}$ **の調製**＞OVA の N 末端から 22 残基に相当する配列のペプチドについて、天然のものと同様に N 末端 Gly のアセチル化されたペプチドを合成した。＜pOVA **の調製**＞北畠らの方法により、OVA 標品をペプシン存在下 pH4、25℃、12 時間反応させ、陰イオン交換カラムにて、ペプシンを除去、透析法により N 末端ペプチドを除去した（2）。＜**凝集物の透過型電子顕微鏡観察**＞1mg/ml のサンプルを酸性条件下（pH2.2）、65℃でインキュベートした後、リン-タングステン酸によりネガティブ染色を行って、日本電子 JEM-1200EX（85keV）により観察した。＜**ゲル強度の測定**＞TA インストゥルメンツ AR-1000 レオメータを用いサンプルの動的粘弾性を測定 G’、G”を算出した。

【結果と考察】OVA と pOVA について、それぞれ単独に酸性条件下（pH2.2）、65℃でインキュベートし、動的粘弾性測定を行うと、OVA がネットワーク構造を有したゲルに典型的な挙動を示すのに対し、pOVA の凝集体は強度も低く、OVA に比べてネットワーク構造が形成され難いことが示唆された。電子顕微鏡観察によると、pOVA の凝集体では OVA に比べて不均一な構造を持つことがわかり、ゲル強度に影響しているものと考えられた。同様の条件で、OVA、pOVA を加熱する際に、$pN_{1\text{-}22}$ を共存させると、両者において 320nm の吸収を指標とする Turbidity が増加し、本ペプチドの凝集増強作用が確認されたが、pOVA と $pN_{1\text{-}22}$ を共存させても、OVA 単独とは異なって、粒状の塊が生じていることが示唆された。本ペプチドの凝集増強作用が、他のタンパク質の凝集に及ぼす効果を検討するために、I 型コラーゲンの加熱凝集に対する、$pN_{1\text{-}22}$ の添加効果を検討した結果、添加量に応じて G’、G”の増加が見られ、$pN_{1\text{-}22}$ が凝集体の形成を促進する可能性が示唆された。

（1）Tanaka N. *et al. J. Biol. Chem.* 2011, **286**, 5884-5894
（2）Kitabatake N. & Doi E. *Agric. Biol. Chem.* 1985, **49**, 2457-2548

ovalbumin, conformation, aggregation

講演番号：2B03p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ B 校舎 03 会場

食用ペポカボチャ種子タンパク質のペプシン消化性

Pepsin digestibility of seed protein of a summer squash cultivar ‘Stripe pepo’

法村 美幸[1]、○吉田 訓子[1]、江原 清[2]、嘉見 大助[3]、園山 慶[4]、知地 英征[1]、中河原 俊治[1] ([1]藤女子大食物栄養、[2]（地独）道総研・上川農試、[3]（独）農研機構・北農研セ、[4]北大院農)
Miyuki NORIMURA[1], ○ Kuniko YOSHIDA[1], Kiyoshi EHARA[2], Daisuke KAMI[3], Kei SONOYAMA[4], Hideyuki CHIJI[1], Shunji NAKAGAWARA[1] ([1]Fuji Women's Univ., [2]HRO, [3]NARO, [4]Hokkaido Univ.)

【目的】近年、新規種実用ペポカボチャ品種（ストライプペポ）が開発され、道産食材として製菓等加工食品への利用が期待されている。そこで、ストライプペポ種子タンパク質の食物アレルゲン性に関する情報を得るために、0.076%ペプシンを含む人工胃液を用いて、ストライプペポ種子タンパク質の消化性を検討し、市販カボチャ種実、あるいは特定原材料である落花生、およびそれに準ずる大豆と比較した。
【材料と方法】ストライプペポ、落花生、大豆は北海道農業研究センターで栽培し、30℃で 3–6 日間風乾した。カボチャ種実は市販品を用いた。ペプシンはブタ胃粘膜由来 Pepsin (≧250U/mg , Sigma) を用いた。風乾試料を粉砕し *n*-ヘキサンで脱脂後、Tris-HCl buffer(pH8.0)でタンパク質画分を抽出した。抽出液を遠心 (15,600×*g*、20℃、20 min)し、上清を脱塩後、凍結乾燥して粗タンパク質粉末を得た。タンパク質含量は Bradford 法で定量した。粗タンパク質画分は 0.076%ペプシンを含む人工胃液に加え、37℃で消化試験を行った。消化液は、経時的（0, 0.5, 2, 5, 10, 20, 30, 60 min）に採取し、SDS-PAGE に供した。さらに粗タンパク質画分を 100℃、20 min で加熱処理して、人工胃液消化試験（10 min）および SDS-PAGE に供した。
【結果および考察】0.076%ペプシンを含む人工胃液消化試験および SDS-PAGE の結果、反応開始 5–10 分後にはストライプペポ種子タンパク質はほぼ消失したが、市販カボチャ種実においては、16, 20, 35 kDa 付近にバンドが残存した。また、落花生および大豆タンパク質では反応開始から 30 分以降も、落花生では 20, 25 kDa 付近、大豆では 17.5, 18, 48 kDa 付近にバンドが残存した。
一方、試料を 100℃、20 min で加熱処理し、人工胃液消化試験に供すると、反応開始 10 分後でストライプペポ種子タンパク質はほとんどが消失したが、市販カボチャ種実では 20, 30 kDa 付近に複数のバンドが見られ、同様に落花生では 25 kDa 付近、大豆では 28, 45, 48 kDa 付近にバンドが残存した。これらの結果から、人工胃液消化試験において市販カボチャ種実にはやや弱いペプシン耐性が認められ、また、特定原材料、およびそれに準ずるものに指定されている落花生および大豆では、いくつかのペプシン耐性を持ったタンパク質の存在が確認された。それに対し、ストライプペポ種子タンパク質ではほぼ完全に消失し、ペプシン消化性が非常に高いことがわかった。このことから、ストライプペポ種子タンパク質が食物アレルゲンとなる可能性の低いことが示唆された。

pumpkin seed protein, allergen, pepsin digestion

講演番号：2B03p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ B 校舎 03 会場

ダッタンソバ由来ルチン分解酵素のキャラクタリゼーションとその応用ダッタンソバ由来ルチン分解酵素のキャラクタリゼーションとその応用

Characterization of rutin degrading enzyme and its application

○秦 千比呂[1]、片山 茂[1,2]、大野 史晃[2]、岩本 珠佳[2]、中村 宗一郎[1,2] ([1]信州大院農、[2]信州大農)
○Chihiro Hata[1], Shigeru Katayama[1,2], Fumiaki Ohno[2], Mika Iwamoto[2], Soichiro Nakamura[1,2] ([1]Graduate school of Shinshu Univ., [2]Shinshu Univ.)

【背景と目的】ダッタンソバ（*Fagopyrum tataricum*）は普通ソバ（*Fagopyrum esculentum*）に比べて機能性成分であるルチンを多く含有していることから健康食品として注目を集めている。ダッタンソバにはルチン分解酵素であるルチナーゼが多く含まれており，分解により生成したケルセチンがダッタンソバの苦みの原因となっている。機能性食素材としてダッタンソバを活用するうえではルチナーゼのキャラクタリゼーションは欠かせないが，酵素特性に関する知見は数少ないのが実情であり，アミノ酸配列の全容もいまだ明らかではない。一方，本研究室ではルチナーゼの逆反応を利用して，バニリン酸の配糖化に成功しており，得られたバニリン酸ルチノシドがノロウイルスに対する抗ウイルス活性を有することを報告している [1)]。本研究では，ダッタンソバ由来ルチナーゼのキャラクタリゼーションを行うとともに，ルチナーゼ逆反応における基質選択性について検討した。

【方法】ルチナーゼは，ダッタンソバ粉末を 20mM 酢酸バッファー（pH 5.0）に溶解し，遠心分離によって上清を得た後，まず DEAE-Sepharose によって大きく分画し，その後 Sephacryl S-100 を用いた分子ふるいによって精製した。得られたルチナーゼは，至適温度および pH を測定し，N 末端シーケンス解析を行った。さらに，ルチンを含むフラボノイド配糖体および *p*-ニトロフェニル（*p*NP）誘導体を用いて加水分解特性を調べた。ルチナーゼの逆反応については，供試フェノール酸とルチンとの酢酸バッファー（pH5.0）懸濁液に、ルチナーゼを加えて，40℃24 h インキュベーションすることによって行った。新規ルチノシドは Inertsil NH2 カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより分離精製した。糖鎖の導入は NMR および FAB/MS によって確認した。

【結果】ルチナーゼの至適温度，pH を測定した結果，50℃，pH 5.0 であった。ルチナーゼの加水分解特性の測定としてフラボノイド配糖体を用いて検討した結果，ルチンだけでなく，ケルセチン-3-グルコシドと α - D - グルコシルルチンについても高い活性を示した。続いて pNP-β-D-グルコピラノシド，pNP-β-D-ガラクトピラノシド，pNP-β-D-フコピラノシドおよび pNP-アセチル-β-D-グルコサミニドの pNP 誘導体 4 種類に対する加水分解活性を調べた結果，いずれの pNP 誘導体に対しても活性を示し，pNP-β-D-ガラクトピラノシドに対して最も高い活性を示した。一方，ルチナーゼの逆反応を利用した配糖体合成においては，ケルセチン-3-グルコシドと α-D-グルコシルルチンを基質として，フェルラ酸配糖体の合成に成功した。

1) Katayama, S et al. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 9617-9622, 2013.

Tatary buckheat, Rutin, Rutinase

講演番号：2B03p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ B 校舎 03 会場

デンプン粒表層タンパク質が生デンプン分解性に与える影響

Effects of starch surface protein gives to raw starch degradability

○芳原 章太[1]、岡 大貴[2]、野口 治子[3]、野口 智弘[2]、高野 克己[3]([1]東京農大学院農・農化、[2]東京農大応生・食加技セ、[3]東京農大応生・化学)
○ SHOTA YOSHIHARA[1], DAIKI OKA[2], HARUKO NOGUCHI[3], TOMOHIRO NOGUCHI[2], KATSUMI TAKANO[3] ([1]Agrichem.Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric., [2]Fac.Appl.Biol.sci.,FPC,Tokyo Univ.Agric., [3]Dept.Appl.Biol.chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric.)

【目的】

生デンプンはその起源の違いによって、アミラーゼによる分解性に差異がみられ、その要因については結晶構造や粒子径に起因するなど様々な要因が考えられている。本研究では、デンプン粒表面に存在するタンパク質がアミラーゼによるデンプンの分解性に差を生む一要因であると考え、デンプンのアミラーゼによる分解性に及ぼすデンプン粒表層タンパク質(SSP)の影響について検討を行った。これまでに、トウモロコシおよび米デンプンの SSP について検討を行ったところ、トウモロコシでは SSP の除去によってアミラーゼによる分解が低下したのに対し、米デンプンでは SSP を除去すると分解が増大することを報告している。そこで本報では小麦および馬鈴薯 SSP が生デンプン分解性に与える影響の解析を目的とし検討を行った。

【方法】

試料は、小麦、馬鈴薯デンプンを用いた。SSP はデンプンに 1%SDS を加えて振盪処理し、抽出した。SSP を除去したものを SSP 除去デンプンとした。アミラーゼによる生デンプン分解試験は、各デンプン試料にα-アミラーゼ（SIGMA 社製；Bacillus 起源）を添加し、小麦 6 時間、馬鈴薯 24 時間酵素反応させ生成した遊離糖をフェノール・硫酸法にて測定し、分解率を算出した。

【結果】

小麦および馬鈴薯デンプンの SSP 量はデンプン 1ｇあたりそれぞれ 0.36ｇおよび 0.02ｇと馬鈴薯デンプンが著しく少量であった。

次に未処理デンプンおよび SSP 除去デンプンについてアミラーゼによる分解試験を行ったところ、未処理の分解率は小麦 13.1%、馬鈴薯 2.1%であったのに対し、SSP 除去デンプンの分解率はそれぞれ 7.5%および 0.9%に低下した。そこで、SSP 除去デンプンに SSP を加え同様に分解性試験を行ったところ、SSP 除去デンプンに比べ分解性が高くなり、未処理デンプンと同程度の分解率を示した。

さらに分解性の低い馬鈴薯デンプンについて、同 SSP 除去デンプンに他起源の SSP (3 ㎎/ﾃﾞﾝﾌﾟﾝｇ）を添加し、アミラーゼによる分解試験を行ったところ、米 SSP 添加では 1.2%、トウモロコシ SSP 添加では 1.7%、小麦 SSP 添加では 1.9%を示した。

Starch Surface Protein, Amylase, Raw starch degradability

講演番号：2B03p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ B 校舎 03 会場

ヨーグルトカードの凝固性に及ぼすκ－CN の影響について
Effect of κ-CN on the coagulation of yogurt card
○大原 慎太郎[1]、岡 大貴[2]、野口 智弘[2]、高野 克己[3]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・食化技セ、[3]東京農大応生・化学)
○ Shintaro OHARA[1], Daiki OKA[2], Tomohiro NOGUCHI[2], Katsumi TAKANO[3] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric., [2]Fac.Biosci.,FPC,Tokyo Univ.Agric, [3]Dept.Appl.Biol.chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric.)

【目的】 ヨーグルトカードの凝固特性およびテクスチャーについては、乳中のタンパク質の熱変性により差異が生じる。高度の加熱処理を施した脱脂乳はカード形成が良好で強固なカードとなるが、低度加熱処理では軟弱なカードとなる。これまで加熱によってカゼインミセル表面のκ-カゼイン（κ-CN）がβ-ラクトグロブリン（β-Lg）とジスルフィド結合にて複合体を形成してカゼインミセルから脱離し、ミセル表面の疎水性度が上昇してミセル間の凝集力が大きくなり強固なカードが形成されることを報告した[1)]。また、κ-CN には糖鎖が結合し、このためカゼインミセル表面は陰電荷を持ち乳中で反発し合い安定的に存在しているが、κ-CN が脱離することでその陰電荷が弱まりカード凝固が高まることも推察された。そこで、κ-CN の陰電荷がカード凝固に及ぼす影響について検討した。
【方法】 非加熱脱脂乳を超遠心分離しカゼインミセルを得た。カゼインミセルと未変性のβ-Lg を混合後、非加熱の試料と 80℃、30 分処理した試料をゲルろ過クロマトグラフィー（GPC ; Sephacryl S-500）により分画した。また、加熱した脱脂乳を超遠心分離により分画後、各画分のタンパク質の挙動を 2D-PAGE（Blue-Native-PAGE / SDS-PAGE）にて確認すると共に、不溶性画分から乳酸菌（*L.bulgaricus , S. thermophilus*）を用いてヨーグルトを調製しカード強度を測定（圧縮型物性測定機 ; Instron 社）した。さらに、カゼインミセル表面の糖鎖を *Clostridium perfringens* Neuraminidase（NaNase）を用いて切断し、グルコノ-δ-ラクトンを用い、ヨーグルトを調製後、カード強度を測定した。
【結果】 カゼインミセルとβ-Lg を混合後、非加熱、加熱（80℃、30 分処理）試料を GPC に供した結果、非加熱では単一のピークがみられたのに対し、加熱処理ではピークが高分子側と低分子側の 2 つのピークに分離した。そこで、各フラクションを SDS-PAGE に供したところ、加熱処理により生成した高分子のピークにκ-CN とβ-Lg の SS 結合物の存在が示唆された。次に、加熱処理を行った脱脂乳を超遠心分離により上澄と沈殿に分画し、2D-PAGE にてタンパク質の挙動を確認したところ、上澄画分にκ-CN とβ-Lg が検出され、沈殿画分にカゼインミセルが確認された。このカゼインミセルではκ-CN 量の減少が確認され、調製したヨーグルトのカード強度は顕著に上昇した。この現象は、κ-CN が持つ糖鎖による電荷の影響が推察されたため、非加熱脱脂乳を NaNase 処理し、κ-CN の糖鎖を切断後、ヨーグルトを調製したところ、カード強度が上昇した。
１）日本農芸化学会 2013 年度大会講演要旨集，3A11p06

kappa-casein, carbohydrate chain, yogurt card

講演番号：2B03p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ B 校舎 03 会場

大豆多糖との複合体化による β-ラクトグロブリンの機能改変

Functional Improvements in ß-lactoglobulin by Conjugation with soybean soluble polysaccharide

○稲田 直己、林 麻衣、好田 正、服部 誠（農工大院農）
○Naoki INADA, Mai HAYASHI, Tadashi YOSHIDA, Makoto HATTORI (Tokyo University of Agriculture and Technology)

[背景]
牛乳中の主要な乳清タンパク質である β-ラクトグロブリン（BLG）は必須アミノ酸をバランスよく含む良質のタンパク質であり、優れた乳化性、気泡性、ゲル化性などの機能特性を持つことから、優れた食品素材となる可能性を有している。この BLG の B 細胞エピトープ近傍に修飾糖鎖を結合させることで、機能特性を向上させたうえに、B 細胞エピトープが遮蔽され、BLG のアレルゲン性を低減化できると考えられる。本研究ではこの修飾糖鎖として大豆多糖(SSPS)を使用した。大豆は，脂質，蛋白質，糖質，食物繊維、ミネラルをバランス良く含む農作物である。しかしながら，大豆蛋白質を製造する際に副生するオカラは、一部が飼料として利用される以外は殆ど全てが廃棄処分されてきた。オカラに含まれる水溶性の多糖類に注目し、有効利用を目指す。
[方法]
まず、SSPS(分子量約 5,500,000)はメイラード反応後、免疫原性低減化および機能性の向上に適した分子量にするためにオートクレーブによる加水分解を 6 時間と 12 時間行い 2 つのタイプの SSPS を用意した。BLG と SSPS の重量比が 1 : 5 となるように蒸留水に溶解させたタンパク質溶液とし、凍結乾燥した。その後、相対湿度 79 %、温度 50℃のデシケーター内にて 24 時間メイラード反応を行い、BLG-SSPS 複合体を得た。立体構造においての変化を確認するためにレチノール結合能を測定し、モノクローナル抗体による競合 ELISA に供して特定部位へのモノクローナル抗体の結合を確認した。また、機能性を調べるために乳化性を測定した。さらに、この複合体をメスの BALB/c マウスに腹腔内注射し、免疫して得られた血清を非競合法 ELISA に供して特異的抗体量を測定することで、複合体の免疫原性を評価した。
[結果]
メイラード反応させることにより、分子量約 18,400 である BLG B 変異体は SSPS と分子量の大きな BLG-SSPS 複合体が得られたことを SDS-PAGE によって確認された。レチノール結合能とモノクローナル抗体による競合 ELISA では構造変化が確認され、乳化性が pH 5 において改善されることが明らかになった。複合体の免疫原性については BLG-SSPS 複合体投与時には BLG 投与時と比較して 6 時間と 12 時間加水分解したものいずれも抗 BLG 抗体産生が低下しており、有意な差が確認できた。また、抗 BLG-SSPS 抗体産生性を調べた結果、新たな免疫原性は生じなかった。本研究が BLG の乳化性の改善、免疫原性の低減化といった多面的な機能改変に、SSPS の結合による構造変化が有効であることが明らかとなった。

β-lactoglobulin, soybean soluble polysaccharide, immunogenicity reduction

講演番号：2B03p22
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ B 校舎 03 会場

Comparison of the digestibility of rice allergenic proteins by in vitro digestion

○Gang-hua LANG, Yukari KAGIYA, Kazumi KITTA (National Food Research Institute)

Rice is consumed as a staple food by more than half the world's population. Rice proteins account for 5~12 % of dried endosperm by weight, and the protein component is important in determining the texture, pasting property, and sensory characteristics of rice. Moreover, the digestibility of rice proteins is closely related to characteristics regarding their nutritional value and allergenicity. Several allergenic proteins have been identified as granule-bond starch synthetase (GBSSI), glyoxalase I (GlyI), α-globulin, and α-amylase/trypsin inhibitor family proteins and nonspecific lipid transfer protein-1 (nsLTP1). So far, variations of most of these allergens have been generally considered in the assessment of genetically modified (GM) rice.

A major characteristic of many food allergens is their resistance to gastric digestion. Food allergens are generally resistant to pepsin digestion, and digestibility analysis has been regarded as one of the appropriate methods for evaluating the allergenic potential of proteins, including expressed foreign proteins in GM organisms. Pepsinolysis assay has commonly been applied as a biological measure of protein stability, and pepsin resistance has generally been considered important evidence of allergenic potential.

So far, less is known about the solubility of rice allergenic and non-allergenic proteins in SGF solution, and the digestibility of rice allergenic proteins has not been compared simultaneously. In order to simultaneously compare the digestibility of rice proteins, including allergenic and non-allergenic proteins, in the liquid and solid phases of SGF reaction mixtures, as well as evaluate factors influencing the digestion efficiency of rice proteins, proteins in unheated and heat-processed rice grain powder were subjected to digestion with SGF. Rice proteins were extracted from both the liquid and solid phases of the digestion mixture and analyzed with SDS-PAGE. Rice allergenic proteins were detected with a multiplex immunodetection method. The digestion of soluble proteins was found to be carried out in both liquid and solid phases, while that of insoluble proteins only occurred in the solid phase. Rice allergenic and non-allergenic proteins were more quickly digested at pH 1.2 than other tested pHs. The influence of pH level, heat processing, starch matrix, and protein properties on the digestibility of allergenic protein was clarified.

Rice allergenic proteins, digestibility, immunodetection

講演番号：2B03p23
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ B 校舎 03 会場

ラクトフェリンによる *Acanthamoeba* sp. AA014 臨床分離株の生残性およびシスト形成に及ぼす影響

Effect of lactoferrin against cell viability and encystment of *Acanthamoeba* sp. AA014 clinical isolates.

○鈴木 智恵[1]、野町 美弥[2]、今安 正樹[2]、佐々木 香る[3]、冨田 信一[1]([1]玉川大院農、[2]株式会社メニコン、[3]星ヶ丘厚生年金病院)
○Chie SUZUKI[1], Miya NOMACHI[2], Masaki IMAYASU[2], Kaoru SASAKI[3], Shinichi TOMITA[1]([1]Tamagawa Univ., [2]Menicon Co.,Ltd., [3]Hosigaoka Koseinenkin Hospital)

［背景］近年，ソフトコンタクトレンズ（SCL）装用者でアカントアメーバによる角膜炎が増加している．その原因として，SCL 消毒剤であるマルチパーパスソリューション（MPS）のアカントアメーバに対する消毒効果が十分ではないことが挙げられる．国際標準化機構では，MPS の細菌や真菌に対する消毒基準は設けられているものの，アカントアメーバに対する基準は存在しない．また，ラクトフェリン（LF）は牛乳や母乳に含まれる鉄結合性糖タンパク質であり，鉄をキレート化することで抗微生物活性を示すことが知られている．
［目的］アカントアメーバ角膜炎は有効な治療薬がないために，角膜掻爬のような対処療法がおこなわれており患者の負担は非常に大きい．そこで，我々はこの角膜炎の治療や予防における LF の臨床応用を最終的な目的としている．今回は，ウシ LF（bLF）存在下における *Acanthamoeba* sp. AA014 臨床分離株の生残性や形態変化から bLF の抗アカントアメーバ活性について検討した．
［方法］AA014 細胞懸濁液に bLF を添加し（1×10^6 cells/mL），Log reduction 法ならびに Trypan blue 法で細胞の増殖および形態を観察し，Calcofluor white 染色によってシスト体を特異的に検出した．
［結果および考察］Log reduction 法により，脱鉄 bLF（apo-bLF）100 μM で AA014 細胞を 24h 処理したところ，約 3 log の低下を示し，apo-bLF の高い抗アメーバ活性が認められた．さらに Trypan blue 法において，apo-bLF 10 μM および 100 μM では処理時間 10 分でアメーバ細胞の約 80%が死滅し，1h 後には 90%以上の細胞が死滅した．そのときの細胞の状態は，多くが栄養体の不定形であった．一方，鉄飽和 bLF では，いずれの方法においても抗アメーバ活性はほとんど示さなかった．また，bLF のシスト化への誘導は，1 μM および 10 μM では全く認められなかったが，100 μM，24h 処理において Calcofluor white に対する染色陽性細胞は約 50%を示した．しかし，この細胞の Trypan blue 染色性は陽性であり，死滅していることが確認された．Positive control（0.5% プロピレングリコール）に apo-bLF を加えた場合，細胞のシスト化を抑制することはなかった．また，シスト化後に apo-bLF を加えた場合，栄養体に復帰するような作用はなかった．
本研究により，apo-bLF はアカントアメーバに対し，速効性で高い抗アメーバ活性を有することが認められた．しかし，その活性は bLF を鉄飽和することによって低下した．これらのことから，LF の抗アメーバ活性には，鉄キレート能が関与していることが明らかであった．シスト体は栄養体と比べると薬剤などへの耐性が高まるため，シスト体に対する LF の影響については今後の検討課題である．

lactoferrin, *Acanthamoeba*, cell viability

講演番号：2B04a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ B 校舎 04 会場

年産別収穫米の炊飯水蒸気中に含まれる香気成分と生理活性

Examination of aromatic components and physiological activities of cooked rice steam by year.

○村上 結城[1]、藤田 明子[2]、川上 晃司[2]、立花 伸哉[3]、岡田 芳治[1]、野村 正人[1]（[1]近畿大・院、[2]（株）サタケ、[3]甲南化工（株））
○Yuki MURAKAMI[1], Akiko FUJITA[2], Koji KAWAKAMI[2], Shinya TACHIBANA[3], Yoshiharu OKADA[1], Masato NOMURA[1] ([1]Kinki Univ., [2]Taste Research Lab. Engi. Div. Satake Co., [3]Konan Chem. Ind. Co., Ltd.)

【目的】世界三大穀物の一つである米は、世界で約 5 億 t、日本では約 1200 万 t が生産されている。これらの米は、収穫年度により新米と古米に区別され、貯蔵期間により香気成分が変化する。新米には 2-アセチル-1-ピロリンなどの新米特有の香りがあり、古米にはヘキサナールなどのアルデヒド類が生成され、古米臭が発生することが明らかになっている。この古米臭の発生原因は、米中に含まれる遊離脂肪酸がリポキシゲナーゼによる自動酸化を受けて過酸化脂質となり、その後アルデヒド類に変化することにより発生することが報告されている[1)]。そこで本研究では、収穫年度別広島県産ヒノヒカリ（平成 22～24 年度産）を用いて、炊飯条件の一つである研ぎ方を検討し、炊飯水蒸気中に含まれる香気成分と生理活性の相違について検討を行なった。

【方法】入手した米は、平成 22～24 年度広島県産ヒノヒカリの精白米（歩留 90%）を用いた。精白米 500 g の研ぎ方の方法として、研ぎ数 0 回を 0、研ぎ数 10 回を 1 として 5 回洗う操作を 10×5 および 50 回を 1 として 5 回洗う操作を 50×5 で表記した。次いで、これらの洗米を通常炊飯し、発生した水蒸気を回収し、ジエチルエーテルで抽出後、濃縮し油分を得た。それぞれの油分中の成分は、SPME 法を用いて GC/MS により成分の分析を行なった。また、生理活性試験として、DPPH ラジカル消去効果試験および活性酸素阻害試験を行なった。

【結果】SPME 法を用いた GC/MS 分析により、炊飯水蒸気中に含まれる香気成分の検索を行なった結果、香気成分を含む約 100 成分を検出確認した。そのうち、主成分は Benzothiazole であることを同定し、収穫年度が新しくなるにつれて増加している傾向を確認した。また、古米臭の原因物質である主な脂肪酸については、収穫年度が古くなるにつれて増加しているが、研ぎ方の相違により減少する傾向があることを確認した。古米化により、米の表層の糠中に存在する C_6~C_9 の主な脂肪酸が増加していることから、米の研ぎ方を工夫することにより、炊飯時の古米臭など不快に感じる香りの改善が可能であることがわかった。一方、生理活性試験について検討を行なったところ、収穫年度別（平成 22→24）および研ぎ方の相違（0→50×5）により、抗酸化能が低下する傾向も確認することができた。

1) 森高真太郎;醸協,**73**,690-696(1978).

Rice, Aromatic odor, Antioxidant activities

講演番号：2B04a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ B 校舎 04 会場

かまぼこ加工残渣を発酵させて開発を試みた新たな魚醤のイン・ビトロ系における抗酸化性

Antioxidant activity on fermented fish sauce made from residual kamaboko measured by using H-ORAC method

○原田 和樹、福田 翼、和田 律子、武智 美佳、谷口 成紀、前田 俊道（水大校・食科）
○Kazuki Harada, Tsubasa Fukuda, Ritsuko Wada, Mika Takechi, Shigenori Yaguchi, Toshimichi Maeda (National Fisheries Univ.)

【目的】本大会では、既に、我々が開発して商品化された魚醤などの水産発酵食品や、アルコール漬け瓶詰うに塩辛などの水産加工食品が持つ抗酸化性について報告してきた。今回は、利用性の低いかまぼこ加工残渣の有効利用を目的として、発酵技術を用いて新たな魚醤の開発を試み、そのイン・ビトロ系での抗酸化性を調べたので報告する。
【方法】かまぼこ加工残渣試料は、企業より提供されたものを用いた。発酵は、蒲鉾加工残渣試料に、食塩、水、速醸させるためにプロテアーゼの種類や量、麹添加の有無、発酵温度を変化させて、約1週間発酵させた。抗酸化性は、H-ORAC (Hydrophobic Oxygen Radical Absorbance Capacity) 法を用いて定法に従って調べ、ペルオキシラジカル消去活性能で評価した。実験はn = 3で行い、単位は、μ molトロロックス当量（TE）／100 gで示した（以下、単位省略）。
【結果】35℃発酵では、「かまぼこ＋塩＋水」をコントロールとすると、その時のORAC値は139であった。発酵魚醤のORAC値は2,533から8,975の間に分散した。最もORAC値が低かった成分組成は、コントロール組成にプロチンSD-NY10（*Bacillus amyloliquefacience*由来のエンド型中性プロテアーゼ、天野エンザイム製）を全体量の4.3%添加したもので、最もORAC値が高かった成分組成は、コントロール組成に醤油麹を全体量の20.3%加え、更に、ウマミザイムG（*Aspergillus oryzae*由来のペプチダーゼ及びプロテアーゼ、天野エンザイム製）を全体量の4.3%を添加したものであった。官能評価は、前者の試料が塩水に近いものであったのに対し、後者は旨みが感知できた。一方、50℃発酵では、コントロールのORAC値は132であり、発酵魚醤のORAC値は2,452から6,158の間に分散した。最もORAC値が低かった成分組成は、コントロール組成にプロチンSD-NY10を全体量の4.3%添加したもので、最もORAC値が高かった成分組成は、コントロール組成に醤油麹と米麹を等量ずつ全体量の20.3%加え、更に、プロテアーゼA-SD（*Aspergillus oryzae*由来のプロテアーゼ、天野エンザイム製）を全体量の0.3%を添加したものであった。この試料の官能評価では、独特の風味を呈していた。以上の結果から、抗酸化性の観点から見ると、35℃発酵で、コントロール組成に醤油麹を全体量の20.3%加え、更に、ウマミザイムGを全体量の4.3%を添加した試料が最も良いと判断した。

本研究の一部は、「宮城県に係る食料生産地域再生のための先端技術展開事業」において、「平成25年度低・未利用、低価格魚介藻及び加工残渣を原料とした加工品の開発等による水産加工の省コスト化・効率化、付加価値向上等に関する実証研究」の一環として行われた。

antioxidant activity, kamaboko, ORAC

講演番号：2B04a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ B 校舎 04 会場

マガキ由来の抗酸化物質における培養肝細胞保護作用

Hepatoprotective effect of a novel phenolic antioxidant isolated from the Pacific oyster on cultured human hepatocytes under oxidative stress

○布田 博敏[1]、渡邉 貢[2]、上甲 紗愛[1]、神 繁樹[1]、川西 範明[1]、吉田 繁[1]、惠 淑萍[1]、武田 晴治[1]、櫻井 俊宏[1]、Rojeet Shrestha[1]、池川 繁男[1]、三木 恵美子[2]、渡邉 孝之[2]、千葉 仁志[1] ([1]北海道大学大学院　保健科学研究院、[2]渡辺オイスター研究所)
○Hirotoshi FUDA[1], Mitsugu Watanabe[2], Sae Joko[1], Shigeki Jin[1], Noriaki Kawanishi[1], Shigeru Yoshida[1], Shu-Ping Hui[1], Seiji Takeda[1], Toshihiro Sakurai[1], Rojeet Shrestha[1], Shigeo Ikegawa[1], Emiko Miki[2], Takayuki Watanabe[2], Hitoshi Chiba[1] ([1]Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, [2]Watanabe Oyster Laboratory Co. Ltd.)

【背景と目的】酸化ストレスが関与する疾患の治療にビタミンＣやビタミンＥ等の抗酸化物質、あるいは多価不飽和脂肪酸(PUFA)が使われているが、より効果的な肝臓の保護・治療薬が求められている。我々は、新規の抗酸化物質(3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol、DHMBA)を マガキ抽出物より発見し、これがヒト LDL の金属酸化を抑制し、培養ヒト肝細胞の APPH 酸化を抑制することを報告した (J. Agric. Food Chem., 60, 830-835, 2012, Food Chem., 134, 2086-2089, 2012)。今回、DHMBA の培養肝細胞保護作用を検討するために、ヒト肝臓由来の株化細胞(C3A)を用いた cytotoxicity test、及び肝細胞障害時に血中に見られるトランスアミナーゼ(AST、ALT)活性の測定を実施した。また、酸化剤、2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)を用いた DHMBA とクロロゲン酸による cell viability assay、及び AAPH 誘導によるアポトーシスの抑制効果を観察した。
【方法と結果】C3A 細胞に各抗酸化物質及び PUFA を添加し、24 時間後に位相差顕微鏡による観察、及び CCK-8 法による cytotoxicity test を行った。その結果、DHMBA 添加群において細胞毒性は見られず、むしろ低濃度から細胞数の有意な増加が見られた。また細胞培養液中のトランスアミナーゼ活性も用量依存的に低下した。一方、合成の抗酸化物質である BHT は低濃度から、PUFA は高濃度から細胞毒性が見られ、トランスアミナーゼ活性においても有意な上昇が観察された。次に、DHMBA またはクロロゲン酸を添加した細胞に AAPH を用いて酸化後、CCK-8 法により cell viability の観察を行った。その結果、DHMBA は cell viability を濃度依存的に増加させたが、クロロゲン酸は影響がなかった。DHMBA やクロロゲン酸による AAPH 誘導によるアポトーシスの抑制効果を DNA fragmentation assay や Annexin V-FITC をプローブとしたフローサイトメトリーにより観察した。その結果、DHMBA は濃度依存的に抗アポトーシス効果が認められたが、クロロゲン酸においては認められなかった。
【考察】DHMBA を添加した C3A 細胞において、有意に細胞数の増加、細胞培養液中のトランスアミナーゼ活性の低下を認めた。また DHMBA により有意な cell viability の増加、アポトーシス抑制効果が観察されたことから、DHMBA はヒト培養肝細胞の酸化抑制作用に加え、保護作用も有すると考えられた。

antioxidant, apoptosis, cell viability

講演番号：2B04a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ B 校舎 04 会場

豚筋肉タンパク質加水分解物の抗酸化作用

Antioxidant activity of hydrolysates obtained from porcine muscle proteins by protease treatment

○井上 航、江草（雑賀） 愛、西村 敏英（日獣大 応生）
○Wataru Inoue, Ai Egusa(Saiga), Toshihide Nishimura (Nippon Veterinary And Life Science University)

【目的】

我々はこれまでに、豚の筋原線維タンパク質（Mf）の加水分解物が抗酸化作用を有することを報告してきた。[1-2] しかし、それ以外の筋漿タンパク質（Sp）や筋基質タンパク質（Ms）については、未だ検討をおこなっていない。そこで、本研究では、豚肉から抽出した各タンパク質と、それらを酵素処理したペプチドの抗酸化作用について調べた。

【方法】

豚胸最長筋から、Mf、Sp、Ms を抽出した後、各々に 1/100 量（w/w）のパパインを加えて、37℃で 48 時間加水分解処理をした。除タンパク処理した各溶液の上清を、Mf 由来ペプチド画分（MfP）、Sp 由来ペプチド画分（SpP）と Ms 由来ペプチド画分（MsP）とした。抗酸化の評価には、①リノレン酸の過酸化脂質生成抑制作用、②DPPH ラジカル捕捉作用、③各種活性酸素種（ClO・、OH・、ONOO・）によるオボアルブミン（OVA）の分解抑制作用、の 3 種類を用いた。各試験におけるポジティブコントロールとして、ビタミン E（V.E）、ビタミン C（V.C）、グルタチオン（GSH）を使用した。さらに、強い抗酸化活性を示したペプチド画分を陽イオン交換カラム、ならびに陰イオン交換カラムに供して抗酸化ペプチドの単離を試みた。

【結果】

各タンパク質を酵素処理により低分子化すると、Sp 以外の分解物は、分解前のものに比べて過酸化脂質の生成を有意に抑制した。特に、MfP は過酸化脂質の生成を 72.0％抑制しており、この値は GSH と同等であった。また、DPPH ラジカル捕捉作用では、すべてのペプチド画分に活性が認められ、SpP で 60.3％、MfP では 45.3％の捕捉作用を示した。さらに、ペプチド画分添加による OVA の分解抑制作用を調べた。SpP は、ClO・による OVA の分解を強く抑制し、GSH より強い作用を示した。OH・による OVA の分解では、SpP と MfP が、V.E に及ばなかったものの強い抑制作用を示した。ONOO・による OVA の分解でも、SpP が V.C と同等の抑制効果を示した。そこで、ペプチド画分によるタンパク質分解抑制効果の中で、最も強い活性を示した SpP をイオン交換カラムに供し、酸性、中性および塩基性画分に分けた。各画分について、ClO・が引き起こす OVA 分解の抑制作用を測定した結果、中性画分と塩基性画分に強い抑制作用が認められた。1) Saiga, A. *et al. J. Agric. Food Chem.* **51** 3661-3667 (2003), 2) Egusa Saiga, A. *et al. Biosci. Biotech. Biochem.* **77** 2201-2204 (2013)

Antioxidant, Peptide, Sarco plasmic protein

講演番号：2B04a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ B 校舎 04 会場

D-キシロースーグリシン系メイラード反応により生成するピロロピロール化合物の抗酸化性

Antioxidative Activity of Pyrrolopyrrole compound from D-Xylose-Glycine Maillard Reaction Model System

○高井 良輔、岩井 美由紀、渡辺 寛人、早瀬 文孝（明治大農）
○RYOUSUKE TAKAI, Miyuki Iwai, Hirohito Watanabe, Humitaka Hayase (Meiji Univ.)

【目的】 メイラード反応は還元糖などのカルボニル化合物とアミノ酸などのアミノ化合物間で生じる非酵素的褐変反応である。当研究室では、メラノイジンの構造や生成機構を明らかにするために、糖とアミノ酸のモデル反応系中で生成するピロロピロール化合物に焦点を当て、構造解析・機能性の評価を行ってきた。D-キシロースーグリシン系メイラード反応で生じる Blue-M1 にはメラノイジンよりも高い抗酸化活性を有していることが確認されている [1]。本研究では、ピロロピロール化合物である PPA-1 (Pyrrolopyrrole aldehyde-1) の抗酸化活性について検証した。
【実験方法】D-キシロース（1.0 M）とグリシン（0.1 M）を 60%エタノールに溶解し (pH 8.1)、26.5℃にて 5 日間インキュベートした。反応溶液を各種クロマトグラフィーにて精製し、PPA-1 を単離した。PPA-1 の抗酸化性を調べるため、POV (過酸化物価) 抑制試験、ESR を用いたヒドロキシラジカル消去活性試験、DPPH ラジカル消去活性試験を行った。さらに、PPA-1 と過酸化水素を混合したモデル系を作成し、HPLC、ESI-Qtof-MS、NMR 分析を行い、抗酸化性の発現機構について検証した。
【結果】 PPA-1 はヒドロキシラジカル、DPPH ラジカルに対して、濃度依存的に消去活性が上昇した。また、POV の抑制率においても同様に濃度依存的に POV 値の減少が認められた。等モル濃度の Blue-M1、Glycylpyrraline と比較したところ、すべての抗酸化試験において Blue-M1、PPA-1、Glycylpyrraline の順で抗酸化活性を示した。また、等重量%濃度の D-キシロースーグリシン系由来のメラノイジンと比較したところ、ヒドロキシラジカル、DPPH ラジカルに対して、同程度の消去活性を有することが明らかになった。

PPA-1 と過酸化水素を混合し、^{1}H-NMR 分析を行ったところ、ピロロピロール環上のシグナルが消滅していることが明らかになった。さらに、HPLC、ESI-Qtof-MS で分析した結果、ピロロピロール環が酸化したと考えられる化合物を検出した。従って、PPA-1 は抗酸化機構の一つとして、ピロロピロール骨格のプロトンが関与していることが推察された。

[1] F. Hayase, et al, Molecular Nutrition & Food Research. 50, 1171 – 1179 (2006)

antioxidant, pigment, Maillard reaction

講演番号：2B04a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ B 校舎 04 会場

N-アセチルシステインと各種抗酸化物の相乗効果

Synergistic effect of N-acetylcystein on the activity of antioxdants.

○小浜 友紀子[1]、山内 良子[2]、山元 涼子[3]、松井 利郎[4]、石川 洋哉[1,2] ([1]福岡女子大学院人間環境、[2]福岡女子大学国際文理、[3]熊本県立大学環境共生、[4]九州大学院農)
○ yukiko KOHAMA[1], ryoko YAMAUCHI[2], ryoko YAMAMOTO[3], toshiro MATSUI[4], hiroya ISHIKAWA[1,2] ([1]Graduate School of Human Environment Science, Fukuoka Women's University, [2]International College of Arts and Science, Fukuoka Women's University, [3]Department of Food and Health Sciences, Prefectural University of Kumamoto, [4]Faculty of Agriculture Graduate School, Kyushu University)

【目的】

当研究室では抗酸化物間での相互作用に着目し，薬剤の併用効果解析法である Median effect analysis を利用することにより，種々の抗酸化物間での相乗・相殺効果を明らかにしてきた。特に，チオール化合物であるグルタチオン及びシステインは，DPPH ラジカル消去反応において様々なポリフェノールに対して相乗効果を発現することを示してきた。本研究では，さらにサプリメント等に利用されている N-アセチルシステイン(NAC)に注目し，種々の抗酸化成分との相乗効果の解析を試みた。なお，これまでは水／エタノール溶媒系でのラジカル消去反応を検討してきたが，水／エタノール系では溶媒分子そのものが相乗効果の発現に影響を及ぼすことが懸念されたことから，本研究では新たにアセトニトリル系でのラジカル消去反応を採用し，その効果を比較検討した。

【方法】

NAC と抗酸化物（ポリフェノール類など）を試験物質として用いた。活性測定には DPPH ラジカル消去活性測定法を用いた。まず，2 種類の抗酸化成分を単独で測定した後，各々を IC_{50} の濃度比で混合し，再度活性を測定した。得られた結果を基に Median effect plot を行い，各直線の傾き m 値より各濃度レベルにおける Combination index （CI 値）を算出し併用効果の判定を行った（CI<1：相乗効果，CI=1：相加効果，CI>1：相殺効果）。

【結果】

まず，水／エタノール系での NAC と各種化合物との相乗効果を Median effect analysis により確認した結果，分子内にカテコールあるいはピロガロール構造を有しているカテキン類・ケルセチンなどの抗酸化物と NAC の組合せで相乗効果が確認された。また，供試した濃度範囲によって効果が異なり，より高濃度域において CI 値が小さくなる傾向，すなわち高濃度域で大きな相乗効果を発現することが確認された。アセトニトリル系で同様の検討を行った結果，水／エタノール系と比較して相乗効果の程度が増大する傾向が確認された。例えば，ケルセチンでは CI 値が 0.51～0.63（水／エタノール系）から，0.08～0.19（アセトニトリル系）と大幅に低下し，相乗効果の増大が認められた。同様の傾向がカテキン類等多数で確認された。この結果は，水／エタノール系において溶媒分子が相互作用に影響を与えていたこと，アセトニトリル系はより直接的な抗酸化物間での相互作用が発現することを示唆するものであった。

Synergistic effect, N-acetylcystein, antioxdant

講演番号：2B04a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ B 校舎 04 会場

カルノシンによる腸管におけるミトコンドリア生合成の亢進

Carnosine induces mitochondrial biogenesis in the intestinal epithelial cells

○藤井 薫[1]、松本 貴之[2]、森松 文毅[2]、片倉 喜範[1,3] ([1]九大院シス生、[2]日ハム中研、[3]九大院農院)
○kaoru fujii[1], takashi matsumoto[2], fumiki morimatsu[2], yoshinori katakura[1,3] ([1]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ., [2]R&D Center Nippon Meat Packers Inc., [3]Fac. Agri., Kyushu Univ.)

【目的】我々は、脳と腸との間の相互作用、すなわち脳腸相関の食品による活性化の可能性を追求することを第一の目的として研究を行っている。これまでに、食肉成分の一種であるカルノシン(β-Ala-L-His)が、腸管上皮細胞からの BDNF 発現を増強することを見出している。そこで本研究では、BDNF 産生をドミナントに制御する CREB に対するカルノシンの効果を明らかにするとともに、その活性化の分子基盤と機能性を解明することを目的として研究を行った。

【方法】ヒト腸管上皮細胞のモデルとしてヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を用いた。細胞内における CREB の活性化は、CRE を有するリポーターを用いたルシフェラーゼアッセイ及びリン酸化 CREB 特異的抗体を用いた免疫染色法により評価した。また、CREB 下流因子として PGC-1α に着目した。CREB 依存性については、ドミナントネガティブ体 CREB(CREB S133A)を導入した Caco-2 細胞を用いることにより評価した。ミトコンドリアは Mito Tracker Red により染色を行い、細胞内ミトコンドリアの数及び面積は IN Cell Analyzer 1000 を用いて定量化した。

【結論】ルシフェラーゼアッセイ及び免疫染色の結果から、カルノシンが Caco-2 細胞において CREB を活性化していることが明らかとなった。また、qRT-PCR の結果から、カルノシンは Caco-2 細胞において、CREB ターゲット分子の一つである PGC-1α の発現を増強させること、またその増強は CREB 依存的であることが明らかとなった。さらに、PGC-1α 発現増強の結果として、カルノシンは Caco-2 細胞におけるミトコンドリア量を有意に増加させることが明らかとなった。以上の結果から、カルノシンは腸管上皮細胞において、CREB の活性化を通じて PGC-1α の発現を誘導し、その結果としてミトコンドリアの生合成を亢進させる働きを有することが明らかとなった。

carnosine, Caco-2, mitochondria

講演番号：2B04a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ B 校舎 04 会場

ミトコンドリア機能不全による組織障害に対するりんごポリフェノールの保護作用

Apple polyphenols attenuate tissue damages associated with mitochondrial dysfunction induced by oxidative stress.

○増田 功[1,2]、小池 正人[1]、渡辺 憲史[1]、小澤 裕介[1]、澤田 陽子[2]、杉本 篤[2]、福田 和郎[2]、森光 圭司[3]、岩東 清茂[3]、横手 幸太郎[1]、清水 孝彦[1]（[1]千葉大学大学院医学研究院、[2]アサヒグループホールディングス株式会社、[3]アサヒフードアンドヘルスケア株式会社）
○ISAO MASUDA[1,2], MASATO KOIKE[1], KENJI WATANABE[1], YUSUKE OZAWA[1], YOKO SAWADA[2], ATSUSHI SUGIMOTO[2], KAZURO HUKUDA[2], KEISHI MORIMITU[3], KIYOSHIGE IWATO[3], KOUTARO YOKOTE[1], TAKAHIKO SHIMIZU[1]（[1]Chiba Univ., [2]Asahi Group holdings ,Ltd., [3]Asahi Food and Healthcare,Ltd.）

【目的】りんごポリフェノール（Apple polyphenols, AP）は、りんご幼果由来ポリフェノール粗抽出物で、高い ORAC 値を示す抗酸化物質プロシアニジンを主成分としている。我々はこれまで AP の抗腫瘍活性や抗アレルギー活性、メラニン生成抑制作用、脂肪蓄積抑制作用、また線虫での *Sir2* 依存的な寿命延長作用、ならびにアルツハイマー病の原因物質である amyloid βの凝集抑制作用などを報告してきた。さらに老化に関連した酸化-抗酸化恒常性維持機構においてミトコンドリア SOD2 に着目し、組織特異的遺伝子欠損技術と組み合わせて、組織特異的ミトコンドリア酸化ストレス障害モデルマウスを作出してきた。中でも、心筋特異的 SOD2 欠損マウス（*Heart-Sod2*$^{-/-}$）は致死性の拡張型心筋症（Dilated Cardiomyopathy, DCM）を再現性良く発症し、心筋ミトコンドリア酸化ストレスの病因的役割を明らかにした。本 DCM モデルマウスに AP 水を自由摂取させると、心筋細胞中活性酸素種（Reactive Oxygen Species, ROS）産生量の減少、心筋病態の改善、ならびに個体寿命が有意に延長し、酸化ストレスによるミトコンドリア機能不全に対する AP の保護効果が示された(1)。本研究では、新たに樹立した軟骨特異的 SOD2 欠損マウス（*Chondrocyte-Sod2*$^{-/-}$）由来軟骨細胞の解析と、ミトコンドリア機能障害による細胞外基質産生不全に対する AP の保護効果について報告する。
【方法】仔マウスの膝関節から単離した SOD2 欠損軟骨細胞および対照細胞を用い、ROS 産生量、ミトコンドリア膜電位、細胞生存率、遺伝子発現、ならびに細胞外基質量についての評価を行った。ROS 産生量とミトコンドリア膜電位はフローサイトメトリー、細胞生存率は MTT assay、遺伝子発現は RT-PCR、細胞外基質量は Alcian Blue 染色の手法を用いた。また AP 存在下で培養した時の細胞外基質量、および AP の SOD 様活性を測定した。
【結果】SOD2 欠損軟骨細胞では対照細胞に比べ、ミトコンドリア ROS 産生量の有意な増加、ミトコンドリア膜電位の低下、ならびに細胞生存率の低下が認められた。また遺伝子発現解析では合成系の *Col2a1*、*Acan* の発現低下、分解系の *Mmp13*、*Adamts5* の発現亢進が認められた。さらに細胞外基質量は、SOD2 欠損軟骨細胞で有意に減少していた。AP 存在下で SOD2 欠損軟骨細胞を培養したところ、細胞外基質量の増加が認められた。また AP の SOD 様活性も判明したことから、AP は酸化ストレスに起因するミトコンドリア機能不全細胞や組織障害に対し、保護作用を示す有望な食品素材と考えられる。

(1) Sunagawa, T. *et al.*, ***LSMR***, 2, 46-51 (2012).

Apple polyphenols, oxidative stress, mitochondrial dysfunction

講演番号：2B04a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ B 校舎 04 会場

C3G ならびにその熱分解物である PCA の生体抗酸化性

Antioxidant activity of C3G and PCA derived from C3G by heating in vivo

○近藤（比江森） 美樹[1,2]、永易 あゆ子[2]、中川 咲良[1] ([1]徳島文理大人間・食栄、[2]岡山県大保福・栄養)
○Miki Hiemori-Kondo[1,2], Ayuko Nagayasu[2], Sakura Nagayasu[1] ([1]Tokushima Bunri Univ., [2]Okayama Prefectural Univ.)

【目的】 アントシアニンは抗酸化性を示すことがよく知られている。我々はこれまで、加熱による食品中のアントシアニンの挙動について検討し、黒米や黒大豆の主要色素成分であるシアニジン 3-グルコシド(C3G)の約 80%は加熱中に分解され、プロトカテキュ酸(PCA)を生成することを明らかにしている。さらに、*in vitro* における PCA の抗酸化性は C3G よりも高いことを示してきた。本研究では、C3G ならびにその熱分解物である PCA の *in vivo* における抗酸化性の優位性を明らかにする目的で、マウスにおける血中動態ならびに酸化モデルマウスにおける抗酸化性を比較検討した。
【方法】 7 週齢の雄性 ICR マウスに C3G（0.1 mmol/kg BW）あるいは PCA (0.1, 1.0 mmol/kg BW)をゾンデにて投与後、一定時間(5～120 分)後に下大静脈より全血を採取し、前処理後、血漿中の C3G および PCA を HPLC-PDA により定量した。さらに、血漿の抗酸化性を H-ORAC 法により測定した。次いで、ICR マウスに PCA (0.25 および 0.5 mmol/kg BW)、C3G (0.5 mmol/kg BW)、既知の抗酸化物質として(+)-カテキン (0.25 および 0.5 mmol/kg BW) をゾンデにて投与し、15 分後に 10 mg/kg BW の鉄を含む鉄ニトリロ三酢酸を腹腔内投与して強制的に酸化を誘導した。その 1 時間後に解剖し、全血ならびに腎臓および肝臓を採取した。血漿の抗酸化性は、H-ORAC 法ならびに TBARS 法により検討し、組織についてはホモジネートを TBARS の測定に用いた。
【結果および考察】 0.1 mmol/kg BW の C3G あるいは PCA 投与マウスにおいて、C3G の血中最大濃度到達時間は 15 分であったのに対し、PCA の最大濃度到達時間は 5 分であった。また、血中最大濃度は PCA が C3G よりも 10 倍以上の高濃度を示し、投与量に対する移行率は約 10 倍であった。さらに、1.0 mmol/kg BW の PCA 投与マウスの血中 PCA 濃度と H-ORAC 値は正の相関を示した。一方、酸化モデルマウスにおいては、C3G および PCA の血中 H-ORAC 値への影響は認められなかった。しかし、TBARS 値は 0.5 mmol/kg BW の PCA 投与において有意に抑制され、この抑制効果は同濃度の C3G では認められなかった。

以上の結果から、*in vivo* においても *in vitro* と同様に PCA は C3G よりも高い抗酸化性を示し、その一要因として、速やかな血中への移行と高い血中濃度の関与が示唆された。現在、臓器への影響について解析中である。

cyanidin-3-glucoside, protocatechuic acid, antioxidant activity

講演番号：2B04a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ B 校舎 04 会場

クルクミン封入ナノ粒子の調製と生物学的利用能向上
Preparation of curcumin encapsulated nanoparticle for enhancement of bioavailability
○張替 敬裕[1]、宮澤 大樹[1]、庄司 求[1]、仲川 清隆[1]、藤井 智幸[2]、宮澤 陽夫[1,3]（[1]東北大院農・機能分子解析、[2]東北大院農・テラヘルツ、[3]東北大未来科学技術共同研究セ）
○Takahiro HARIGAE[1], Taiki MIYAZAWA[1], Motomu SHOJI[1], Kiyotaka NAKAGAWA[1], Tomoyuki FUJII[2], Teruo MIYAZAWA[1,3] ([1]Food and Biodynamic Chemistry, Tohoku Univ., [2]Terahertz Bioengineering, Tohoku Univ., [3]NICHe, Tohoku Univ.)

【背景】ウコンに含まれる黄色色素クルクミン（CUR）は、抗酸化、抗炎症、抗腫瘍、抗アルツハイマー病作用などを有することが報告されている。一方、経口摂取した CUR のほとんどは排出され、わずかに吸収されたものも代謝を受け、生体内では主にクルクミングルクロン酸抱合体（CUR-G）として存在する[1)]。CUR と CUR-G の生理機能を比較したところ、WST-1 試験では CUR が 25 μM で HepG2 の増殖を抑制したのに対し、CUR-G は全く作用を示さなかった。また、HepG2 の遺伝子発現では、GSTT1 など一部の遺伝子で有意な変動が認められたが、多くの遺伝子に CUR-G の影響はなかった。このように、CUR-G の生理活性は CUR に比べて低いと考えられた[2)]ため、CUR の生理作用を効率良く引き出すには、CUR の吸収性の増大と抱合化を受けないような化学的安定性が必要であると考えた。そこで、CUR をナノ粒子化し、PLGA で包むことで吸収性と安定性を向上させ、CUR の生物学的利用能を高めようとした。
【方法】CUR 封入ナノ粒子（C-NP）は、CUR、PLGA を有機溶媒に溶かし、界面活性剤と共に超音波を施して W/O エマルションとし、賦形剤のスクロースを加え凍結乾燥して作製した。作製した C-NP の抱合化に対する安定性を評価するため、C-NP と CUR をそれぞれグルクロン酸、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ（10%ラット肝臓ホモジネート）と反応させ、両者の CUR-G 生成量を比較した。
【結果と考察】ナノ粒子作製方法において、用いる PLGA、有機溶媒、界面活性剤の種類や分子量を変えることで、粒径や凝集性、封入率などの異なる性質を持った C-NP を得ることができた。この C-NP を UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼと反応させた結果、C-NP が抱合反応を受けて生じた CUR-G の量は、CUR から生じた CUR-G の量よりも有意に少なかった。このことから、C-NP 化によって CUR が代謝を免れて体内で作用しやすくなる可能性が示された。今後、Tween80 で C-NP 粒子をさらに覆うことで生体親和性を高め、これをラットに経口投与して吸収性、化学的安定性、生体親和性（特に血液脳関門を経由して直接、脳神経細胞に作用できる可能性）を in vivo で評価する予定である。

1) A. Asai & T. Miyazawa, JN (2001); A. Asai & T. Miyazawa, Life Sci (2000)
2) M. Shoji et al., Food Chem (2014)

curcumin, nanoparticle, metabolism

講演番号：2B04a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ B 校舎 04 会場

いも類・野菜類のフライ加工食品を組み合わせた活性酸素消去相乗効果の検討

Synergistic effect on reactive oxygen scavenging activity of fried vegetables by XYZ system

○石原 克之[1]、松橋 南[2]、久保 美沙子[1]、中田 民枝[1]、佐久間 塁[1]、古賀 秀徳[1]、秋山 美展[2]([1]カルビー（株)、[2]秋田県大・生物資源)
○Katsuyuki ISHIHARA[1], Minami MATSUHASHI[2], Misako KUBO[1], Tamie NAKADA[1], Rui SAKUMA[1], Hidenori KOGA[1], Yoshinobu AKIYAMA[2] ([1]CALBEE, Inc., [2]Akita Prefectural Univ. Faculty of Bioresource Sciences)

【目的】いも類・野菜類には、ガンや生活習慣病の原因物質である活性酸素を消去できる成分が含まれている。さらにフライ調理することで水分が蒸発し、食品中の抗酸化成分が濃縮される。例えばじゃがいもを原料とするポテトチップスは、フライ調理によりビタミンＣやクロロゲン酸などが濃縮されており、これにより抗酸化活性が増強されることが明らかとなっている。また最近の研究により、食品に含まれる抗酸化成分の中には、活性酸素消去相乗効果を発揮できるような成分同士の組み合わせが存在することが示されている。そこで本研究では食べ合わせを想定して、いも類・野菜類のフライ加工食品を組み合わせた際の活性酸素消去相乗効果の検討、さらに相乗効果関与成分を同定することを目的とした。
【方法】市販されているじゃがいも、さつまいも、たまねぎ、かぼちゃ、さといも、にんじん、ごぼうのフライ加工食品を試料とした。さらに、たまねぎの抗酸化成分の１つであるケルセチンやフライ調理前の生の素材を試料とした。活性酸素消去能は没食子酸を標準物質とした XYZ 系活性酸素消去発光法により測定した。
【結果】フライ加工食品の活性酸素消去能を XYZ 系分析法で測定した結果、さといも、ごぼう、たまねぎ、さつまいも、じゃがいも、にんじん、かぼちゃの順で高い値を示した。また、2 種の組み合わせでは、たまねぎとさといも、にんじん、じゃがいもで理論値に対してそれぞれ 1.9、1.6、1.5 倍の活性酸素消去相乗効果が認められた。相乗効果が認められた組み合わせ全てにたまねぎが含まれていることから、たまねぎに含まれる相乗効果を示す成分について検討を行った。その結果、ケルセチンとさといも、にんじん、じゃがいもの 2 種の組み合わせにおいてそれぞれ 2.2、3.8、4.7 倍の相乗効果が認められた。このことから、たまねぎの相乗効果関与成分はケルセチンであることが示唆された。さらに相乗効果が見られた組み合わせについて、フライ調理前の生の素材での相乗効果の検討を進めている。

synergistc effect, antioxidant, quercetin

講演番号：2B04a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ B 校舎 04 会場

凍結粉砕微粉により抽出したコーヒーの抗酸化特性

Antioxidant capacity of extracted liquid from frost shattered coffee beans

○内田 健太郎[1]、冨田 晴雄[1]、竹森 利和[1]、藤原 裕史[2]([1]大阪ガス株式会社、[2]株式会社リキッドガス)
○Kentaro UCHIDA[1], Haruo TOMITA[1], Toshikazu TAKEMORI[1], Hiroshi FUJIWARA[2] ([1]OSAKA GAS CO., LTD., [2]Liquid Gas CO., LTD.)

【目的】コーヒー豆のような油脂を含む食品は、粉砕過程において油分が凝集し流出するため微粉化が困難である。そのため、微粉化されたコーヒー粉の特性についてはあまり研究がなされていない。本研究では、コーヒー焙煎豆に対して－196 ℃の液体窒素を用いた凍結粉砕を用いることで、油分を凝集させることなくメディアン径（以下、粒径とする。）15 μm のコーヒー粉を作製した。この微粉から抽出した液体が有する抗酸化特性について ORAC, DPPH 等の指標について測定を行い、業務用電動式ミルを用いた粒径 1020 μm の粉と比較することを目的とした。
【実験手法】ブラジル産サントス・深煎り焙煎の豆を使用し、粉砕過程において粒径 15 μm（凍結粉砕)、粒径 1020 μm（業務用電動式ミル粉砕）の 2 種類のサイズの粉を用意した。それぞれの粉において市販コーヒーメーカーを使用し、粉 20 g、蒸留水 300 mL という条件で抽出を行った。この抽出液に対して色差および ORAC, DPPH 等の抗酸化特性について測定を行った。また、抽出後乾燥させた粉について SEM 像を確認した。
【結果・考察】それぞれの粒径の粉を用いた抽出液の色差測定値を図 1 に示す。1020 μm の抽出液と比較し、15 μm 粉の抽出液において L^*値、b^*値の低下が確認された。粒径が小さい粉の方が色素成分の抽出が促進されていることが示唆される。それぞれの粒径の粉を用いた抽出液の ORAC 値、DPPH 値を図 2 に示す。1020 μm の抽出液と比較し、15 μm 粉の抽出液は H-ORAC で 49 %、DPPH で 30 % の増加が確認された。それぞれの粒径の粉の構造について SEM 像を図 3 に示す。1020 μm 粉では、ハニカム構造が確認され、溶出していない部分も確認された。一方で、15 μm 粉においては、ハニカム構造が 1 個程度の孔にまで粉砕されている様子が確認された。これらの結果より、ハニカム構造の孔以下の大きさまで粉砕することで構造内部に水が侵入し、抽出成分を増加させたものと考えられる。

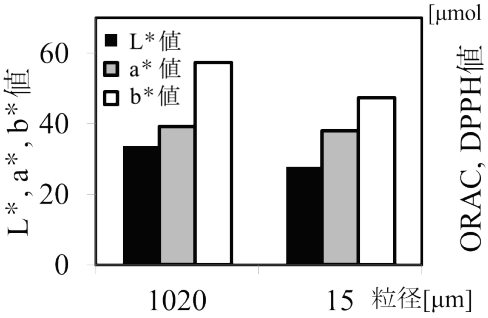


図1. 抽出液の色差

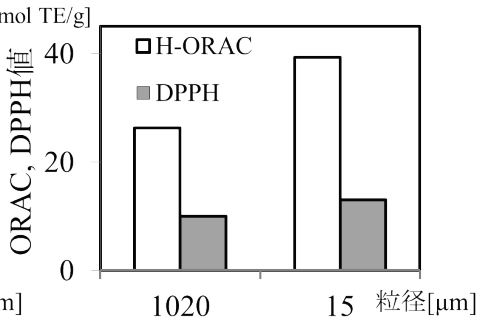


図2. 抽出液のORAC, DPPH値

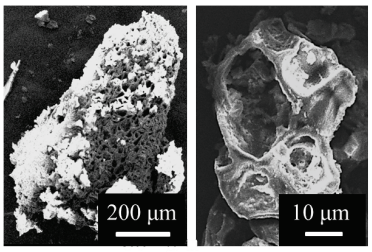


図3. コーヒー粉ハニカム構造

antioxidant capacity, coffee beans, frost shattering

講演番号：2B04a17
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ B 校舎 04 会場

ヒトカテコール-O-メチル基転移酵素発現酵母を用いたメチル化フラボノイドの調製
Whole cell dependent-production of methyl flavonoids using genetically engineered yeast cells expressing human COMT
○生城 真一、藤森 成美、西川 美宇、安田 佳織、鎌倉 昌樹、榊 利之（富山県大・工・生物工学）
○ Shinichi IKUSHIRO, Narumi FUJIMORI, Miyu NISHIKAWA, Kaori YASUDA, Masaki KAMAKURA, Toshiyuki SAKAKI (Dep. of Biotech., Fac. of Engineer., Toyama Pref. Univ.)

【目的】体内に吸収されたフラボノイド化合物は異物代謝過程において種々の抱合化反応（グルクロン酸抱合、硫酸抱合、メチル抱合など）を受けることにより、その体内動態や機能性が大きく影響を受けることが知られている。これら代謝物の分析及び機能性評価をおこなうためには標準化合物が必要とされるが、有機化学的手法による代謝物の合成は多段階のステップが必要であり困難な場合が多い。我々はこれまでに異物代謝酵素発現酵母株を開発することにより、種々の医薬品及び食品中機能性成分の抱合体の酵素合成を可能にしてきた。本研究ではヒト由来カテコール-O-メチル基転移酵素(COMT)発現酵母を用いて種々のメチル化フラボノイド゛化合物の調製技術開発をおこなった。
【方法・結果】酵母発現コドン頻度を用いて最適化したヒト COMT 遺伝子を合成し、染色体組込み型発現ベクター(pAUR)あるいは自律複製型発現ベクター(pGYR)を用いて酵母由来グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素プロモーター及びミネーターを付加して出芽酵母 AH22 株内において発現させた。酵母内における COMT タンパク発現は特異抗体を用いたウェスタンブロット法にて確認した。COMT 遺伝子発現酵母株より調製した静止菌体にメチル化基質及び 8%グルコース及び 0.02mg/mL L-メチオニンを添加し、６～２４時間反応させた。有機溶媒による菌体抽出画分に対して逆相カラムを用いた UPLC でメチル化体の分離定量をおこなった。モデル化合物としてカテコール構造を有するドーパミンを基質として添加したところ、メチル化体である 3-メチルドーパミンの産生が見られた。フラボノイド基質としてケルセチンを用いたところ、B 環の 3`位メチル化体であるイソラムネチンと同じ溶出時間を有する代謝物が産生された。最適反応条件下においては 1mM ケルセチン反応液の 60%がメチル化体に変換された。B`環におけるカテコール構造有するフラボノイドであるルテオリン、エリオジクチオールについてもそれぞれ 3`位メチル化体の効率的な産生が確認された。
【結論】ヒト由来 COMT を発現させた出芽酵母抱合体調製系を用いることにより、カテコール構造を有する種々のフラボノイドのメチル化体を調製することが可能である。生体内においてバイオファクターとして機能するフラボノイドの多様な代謝物の体内動態及びその機能性を解析することができるものと考えている。

Budding yeast, Methyl flavonoid, Catechol-o-metyhltransferase

講演番号：2B04p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ B 校舎 04 会場

紫外線照射ヘアレスマウスにおけるウシ初乳乳清蛋白質濃縮物投与の皮膚への影響

Oral administration of colostrum whey protein attenuates UV-induced skin photodamage in hairless mice

○大久保 俊平[1]、松本 剛弥[1]、村田 麻衣[1,2]、野村 義宏[1] ([1]東農工大農・硬蛋研、[2]森永乳業株・食基研)
○Shumpei Okubo[1], Takaya Matsumoto[1], Mai Murata[1,2], Yoshihiro Nomura[1] ([1]Tokyo Univ. Agri. & Technol., [2]Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

【目的】
初乳は、分娩後数日間にわたって分泌される乳汁であり、感染防御機能に関わる IgG などの機能性タンパク質や、仔牛の発育を促す成長因子などを豊富に含むことが知られている。初乳の哺乳は、病原体や紫外線に対する曝露をはじめ、誕生にともなって劇的に変化する外部環境への一つの適応機構として機能している可能性が考えられる。しかし、初乳の摂取が紫外線曝露を受けた皮膚に対して及ぼす影響については、これまで報告されていない。本発表では、ウシ初乳乳清蛋白質濃縮物が皮膚に及ぼす影響を検討するため、紫外線照射ヘアレスマウスを用いた研究を行ったので報告する。
【方法】
Hos:HR-1 系ヘアレスマウス（6 週齢♂）を皮膚水分量、経皮水分蒸散量 （TEWL）が均一になるよう、UV 非照射対照群、UV 照射対照群、UV 照射初乳乳清蛋白質濃縮物投与群に分け、紫外線を週 3 回、7 週間照射することで皮膚へのダメージを誘導した。ウシ初乳より分離・濃縮した初乳乳清蛋白質濃縮物は、紫外線照射期間中、1 日 1 回胃ゾンデにより投与した。皮膚の状態は、皮膚水分量を毎週測定することで経時的に評価し、解剖前に TEWL および粘弾性を測定した。試験終了時にマウスの背部皮膚を採取し、皮膚の病理染色後に顕鏡観察を行った。
【結果・考察】
UV 照射対照群では、紫外線の連続照射にしたがって皮膚水分量が有意に低下し、皮膚バリア機能の指標である TEWL の上昇が見られた。一方、UV 照射初乳乳清蛋白質濃縮物投与群では、2 週目以降、UV 照射対照群に対して皮膚水分量が有意に高い値を示し、試験終了時の TEWL は有意に低値を示した。また、皮膚の病理組織染色の結果、UV 照射初乳乳清蛋白質濃縮物投与群では表皮肥厚化の抑制傾向が見られた。本研究結果から、ウシ初乳乳清蛋白質濃縮物の経口投与は、紫外線曝露による皮膚バリア機能の低下や乾燥に対して抑制効果を有する可能性が示唆された。

skin, photodamage, colostrum whey protein

講演番号：2B04p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ B 校舎 04 会場

経口投与コラーゲンモデルペプチドの皮膚移行およびヘアレスマウス皮膚水分量向上効果

Orally administered collagen model peptides delivered to the skin improve skin hydration in hairless mice

○神保 希望[1]、陳 怡[1]、大久保 俊平[1]、金澤 怜子[1]、高島 正[2]、細谷 祥一[2]、杉原 富人[3]、小泉 聖子[3]、片岡 綾[3]、渡部 睦人[1]、千葉 一裕[1]、野村 義宏[1] ([1]農工大農、[2]吉田機械興業株式会社、[3]新田ゼラチン株式会社・ペプチド事業部)

○Nozomi JIMBO[1], Yi CHEN[1], Shumpei OKUBO[1], Reiko KANAZAWA[1], Tadashi TAKASHIMA[2], Shoichi HOSOYA[2], Fumihito SUGIHARA[3], Seiko KOIZUMI[3], Aya KATAOKA[3], Mutsuto WATANABE1,[1], Kazuhiro CHIBA[1], Yoshihiro NOMURA[1] ([1]Tokyou Univ. Agri. & Technol., [2]Yoshida Kikai Co., [3]Nitta Gelatin Inc.,Peptide Division)

【目的】

加水分解コラーゲンを経口投与することで、血液中に Hyp を含むジペプチドやトリペプチドが同定され（J.Agric.Food Chem./2005、2009）、これらコラーゲン由来のペプチドが皮膚状態を改善すると考えられている。そこで、本研究では、Pro-Hyp-Gly 配列を含むコラーゲンモデルペプチド及び難分解性である Pro-Hyp-Pro をマウスへ投与し、血液及び皮膚を LC-MS/MS で分析することによって、コラーゲンの代謝について調べることを目的とした。

【実験方法】

ヘアレスマウス（Hos:HR-1）に、$(Pro\text{-}Hyp\text{-}Gly)_2$ を 2 g/Kg body weight で経口投与し、30、60、120、240 分後に採血ならびに背部皮膚を採取し、血中及び皮膚中のペプチドを定量した。

また、コラーゲンモデルペプチド$(Pro\text{-}Hyp\text{-}Gly)_2$、$(Pro\text{-}Hyp\text{-}Gly)_3$、Pro-Hyp-Pro、および Pro-Hyp を 100 mg/Kg body weight、魚鱗由来の加水分解コラーゲンを 40 mg/Kg body weight、7 週間毎日経口投与し、背部皮膚の水分量を経時的に測定した。解剖前に経口投与（2 g/Kg body weight）し、投与後 30 分後に採血、ならびに皮膚を採取した。血中及び皮膚中のペプチドは LC-MS／MS にて定量した。

【結果および考察】

$(Pro\text{-}Hyp\text{-}Gly)_2$ を経口投与することで、30 分後には control と比較し、Pro-Hyp が血液中に約 6500 倍の濃度、皮膚中に約 880 倍の濃度で存在した。このことからコラーゲンモデルペプチドを経口投与することで、血液ならびに皮膚にコラーゲン特有のペプチドが移行することが分かった。

また、ヘアレスマウス背部皮膚の水分量が 5 週目では control 群に比べ、加水分解コラーゲンおよび$(Pro\text{-}Hyp\text{-}Gly)_3$投与により有意に高い皮膚水分量を示した。投与 30 分後の血液を分析したところ、加水分解コラーゲン、$(Pro\text{-}Hyp\text{-}Gly)_2$, $(Pro\text{-}Hyp\text{-}Gly)_3$, Pro-Hyp の投与により Pro-Hyp がそれぞれ 96.31、1096.73、513.96、1383.33 μM の濃度で検出できた。また皮膚でも Pro-Hyp がそれぞれ 25.90、171.38、94.75、258.17 μM の濃度で検出できた。$(Pro\text{-}Hyp\text{-}Gly)_2$ を投与した際に Hyp-Gly で切れる割合より Pro-Hyp で切れる割合の方が多く、Pro-Hyp として血中移行し、皮膚まで到達することが分かった。また、難分解性である Pro-Hyp-Pro は切れずに血液および皮膚に 141.22 μM および 225.32 μM、の濃度で滞留することが分かった。コラーゲンは、Pro-Hyp といったペプチドに分解され、血中に移行し、皮膚まで到達し、皮膚水分量を高めることが明らかとなった。

collagen, skin, moisture content

講演番号：2B04p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ B 校舎 04 会場

光老化モデル動物に対するラクトフェリン投与の皮膚保護効果
Protective effect of oral administration of bovine lactoferrin against UV-induced skin photodamage in hairless mice
○村田 麻衣[1,2]、佐藤 拓海[1]、若林 裕之[1]、山内 恒治[1]、阿部 文明[1]、野村 義宏[2]（[1]森永乳業株・食基研、[2]東農工大農・硬蛋研）
○Mai Murata[1,2], Takumi Satoh[1], Hiroyuki Wakabayashi[1], Koji Yamauchi[1], Fumiaki Abe[1], Yoshihiro Nomura[2] ([1]Food Science & Technology Institute, Morinaga Milk Industry Co., Ltd., [2]Tokyo Univ. Agri. & Technol.)

【目的】
加齢に伴う皮膚老化はヒトの QOL を大きく低下する因子とされる。紫外線曝露による光老化は皮膚のバリア機能にダメージを与え、皮膚老化を促進することから、抗光老化作用を示す食品成分が注目されている。乳タンパク質ラクトフェリン（LF）は、免疫調節作用や感染防御作用などを介し生体に有益な作用をもたらすことが報告されている。しかし、食品として摂取した際の皮膚の保護効果や作用機序は解明されていない。今回、LF 投与による皮膚の抗老化効果について紫外線照射光老化モデルマウスを用いた研究を報告する。
【方法】
7 週齢の Hos:HR-1 系雄マウスを UV 非照射対照群、UV 照射対照群、UV 照射 LF 投与群（各群 n=8）に分け、紫外線（UVB）を 3 回／週、7 週間連続照射した。LF の投与は UV 照射期間中毎日行った。光老化に対する経時的な皮膚状態改善の評価項目として、経皮水分蒸散量 （TEWL） および皮膚水分量を毎週測定した。試験終了時に背部皮膚および血清を採取し、炎症性サイトカイン量の定量、各種酸化関連因子の評価を行った。皮膚組織は病理組織染色による形態観察および表皮肥厚の測定を行った。
【結果・考察】
光老化モデルマウスを用いた検討の結果、UV 照射対照群に対して、LF 投与群では UV 照射による TEWL 上昇の抑制、皮膚水分量低下の改善が認められた。また組織染色の結果、UV 照射による異常な角化細胞増殖や表皮肥厚化の抑制が観察された。抗酸化指標として皮膚中の SOD 様活性を評価した結果、UV 照射により低値の傾向を示したが、被検物質投与による影響は見られなかった。さらにマウス皮膚および血清中の炎症性サイトカイン量を評価した結果、LF 投与群において皮膚中の炎症性サイトカイン量の低下が確認された。これらの結果から、LF の経口投与は、UV 照射に起因する皮膚の炎症プロセスに抗炎症的に作用し、皮膚のバリア機能の維持および保湿効果を示した可能性が示唆された。

skin, aging, lactoferrin

講演番号：2B04p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ B 校舎 04 会場

コラーゲンペプチドおよびビタミン C は SOD1 欠損マウスの加齢様皮膚萎縮を相加的に改善する

Collagen peptides and vitamin C additively attenuate age-related skin atrophy in *Sod1*-deficient mice

○澁谷 修一[1]、小澤 裕介[1]、戸田 年彦[1]、渡辺 憲史[1]、遠目塚 千紗[2]、小倉 孝之[2]、小山 洋一[2]、清水 孝彦[1] ([1]千葉大院医　先進加齢医学、[2](株) ニッピ　バイオマトリックス研)
○Shuichi Shibuya[1], Yusuke Ozawa[1], Toshihiko Toda[1], Kenji Watanabe[1], Chisa Tometsuka[2], Takayuki Ogura[2], Yoh-ichi Koyama[2], Takahiko Shimizu[1] ([1]Chiba Univ., [2]Nippi, Inc.)

高齢者で認められる皮膚萎縮はコラーゲン減少と強く相関し、コラーゲン恒常性の維持は皮膚機能を保つ上で重要である。コラーゲンペプチド経口摂取は Type I collagen 遺伝子発現を上昇させ、vitamin C (VC)摂取も Type I collagen 遺伝子発現を増加させることが報告されている。しかしながら、加齢様皮膚変化におけるコラーゲンペプチドと VC の相加効果については未解明である。我々は SOD1 欠損マウスが細胞内活性酸素を顕著に増加させ、皮膚萎縮や低代謝型骨粗鬆症などの加齢様変化を示すことを明らかにしてきた[1-3]。本研究では、SOD1 欠損により誘導される酸化ストレスと皮膚萎縮に対するコラーゲンペプチドおよび VC の改善効果を調べた。

皮膚変化を詳細に解析するために、hairless マウスと *Sod1*$^{-/-}$マウスを交配し hairless *Sod1*$^{-/-}$ 二重変異マウスを作製した。Hairless *Sod1*$^{-/-}$マウスにコラーゲンペプチド経口投与および背部皮膚への VC 誘導体経皮投与を 8 週間行い、皮膚病態改善効果を調べた。その結果、コラーゲンペプチドと VC 誘導体併用投与により hairless *Sod1*$^{-/-}$マウスの表皮および真皮厚が有意に増加し、皮膚萎縮が改善した。皮膚の酸化障害を調べたところ、併用投与により皮膚の malondialdehyde および 8-isoprostane 量が有意に減少し、皮膚中の過酸化脂質が減少した。さらに細胞外基質関連遺伝子の発現解析において、コラーゲンペプチドと VC 誘導体併用投与は *Col1a1* および *Has2* mRNA 発現が有意に増加し、細胞外基質増加が示唆された。さらにオリゴペプチド輸送に関わる proton-coupled oligopeptide transporter 遺伝子発現を調べたところ、欠損マウス皮膚で *Cit1* 遺伝子発現が有意に上昇し、併用投与により正常化した。次に、Hyp-Gly を含む 8 種類のコラーゲンオリゴペプチド混合液(COP)を調整し、*Sod1*$^{-/-}$ 線維芽細胞に対する COP と VC の相加効果を調べた。まず、*Sod1*$^{-/-}$ 皮膚片に COP および VC を添加し、培養皮膚片からの線維芽細胞の遊走および増殖能に対する効果を調べた。その結果、COP と VC 同時添加は VC 添加と比較して有意に浸潤細胞数が増加した。さらに *Sod1*$^{-/-}$ 線維芽細胞を培養し創傷治癒モデルに対する効果を調べたところ、COP と VC 同時添加は有意に創傷治癒速度を促進した。

以上の結果から、コラーゲンペプチドおよび VC の併用摂取は加齢様皮膚病態を協調的に改善することが明らかになった。

[1]Murakami, K. *et al. Biochem Biophys Res Commun* 382:475-461 2009, [2]Nojiri, H. *et al. J Bone Miner Res* 489:2682-2694 2011, [3]Shibuya, S. *et al. Handb Diet Nutri Skin* 21:350-364 2012

collagen peptide, vitamin C, skin atrophy

講演番号：2B04p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ B 校舎 04 会場

皮膚の光老化に対するリンゴポリフェノールの作用

Effects of apple polyphenols against photoaging of the skin

○武智 貴之[1]、土江 久美子[1]、小山 摂司[1]、上村 克己[1]、正木 仁[2] ([1]ちふれ化粧品、[2]東京工科大)
○Takayuki Takechi[1], Kumiko Tsuchie[1], Setsuji Koyama[1], Katsumi Kamimura[1], Hitoshi Masaki[2]
([1]Chifure Corp., [2]Tokyo Univ. of Tech.)

＜目的＞　外的環境に接している皮膚は、太陽光の影響を直接受ける。慢性的な紫外線曝露は不可逆的なシワ形成へ導き、表皮層や真皮層の秩序だった構造を著しく破綻させる。このような変化は、光老化皮膚として定義されている。この光老化皮膚の形成と酸化ストレスの関連性について、近年、多数の報告がなされている。リンゴポリフェノール（AP）は主成分をプロシアニジンとする高い抗酸化作用をもつ素材で、生体内で起こる酸化ストレスに対して有効であることがマウスを用いた試験で明らかになっている（Sunagawa et al., Int. J. Life Sci. Med. Res. 2012)。本研究では、AP の抗酸化作用に着目し、皮膚における抗光老化素材としての可能性を検討した。
＜方法＞　まず、AP の各種活性酸素種（ROS）に対する消去活性を ESR スピントラップ法（O_2^-、OH^-、$^1O_2$）と比色法（H_2O_2）を用いて測定した。次に、AP の細胞内 ROS に対する消去活性を確認する目的で、ヒト不死化表皮細胞株 HaCaT 細胞に UVB 照射を行い ROS 上昇に対する抑制作用を評価した。さらに、UVB 照射された HaCaT 細胞の培養上清（CM）を用いてヒト正常線維芽細胞（NHDF）を培養し、線維芽細胞が産生するコラーゲン分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ-1（MMP-1）の産生量に対する AP の抑制作用をウェスタンブロッティング法および ELISA 法で解析した。
＜結果と考察＞　AP は、各種 ROS に対する消去活性を有することが確認された。さらに、AP は UVB 照射による細胞内 ROS の発生を有意に抑えた。この結果から、AP の ROS 消去作用は培養細胞でも確認された。UVB 照射により上昇する ROS は、表皮細胞から様々な炎症性サイトカインの分泌を亢進する。このサイトカインは、真皮線維芽細胞に作用し、真皮マトリックス構成成分であるコラーゲン線維の分解と MMP-1 の産生を高め真皮構造を脆弱にさせる。AP は、UVB 照射された HaCaT 細胞由来の CM による NHDF 由来 MMP-1 の産生亢進を有意に抑制した。これらの結果から、抗酸化作用をもつ AP は紫外線曝露によって生じるシワ形成に対して抑制的に働く可能性が示唆された。

apple polyphenol, antioxidant, matrix metalloproteinase

講演番号：2B04p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ B 校舎 04 会場

レスベラトロールは皮膚老化様症状を改善する

Resveratrol reverses age-related skin atrophy in mice

○渡辺 憲史、小澤 祐介、澁谷 修一、小林 慶司、横手 幸太郎、清水 孝彦（千葉大学大学院・医学研究院）
○Kenji WATANABE, Yusuke OZAWA, Shuichi SHIBUYA, Keiji KOBAYASI, Koutaro YOKOTE, Takahiko SHIMIZU (Dept. of Adv. Aging Med., Chiba Univ. Grad. Sch. of Med.)

【目的】インドネシア原産の裸子植物メリンジョ(*Gnetum gnemon* L.)種子にはレスベラトロール(RSV)が豊富に含まれ、インドネシアでは欠かせない食材として重宝されている。このメリンジョ種子抽出物(MSE)は赤ワインと比較して数百倍以上もの trans-RSV を含むことからレスベラトロール源として期待される。酸化ストレスは加齢に伴い増加し、カロリー制限によって減少することから老化促進因子と考えられている。CuZn-superoxide dismutase (CuZn-SOD, SOD1)は細胞質に局在し、活性酸素代謝を制御する。我々はこれまでに SOD1 欠損マウスが血漿酸化ストレス亢進、皮膚萎縮、骨量減少、黄体機能不全、アルツハイマー病促進など様々な加齢様変化を呈することを報告してきた。本研究では SOD1 欠損マウスに RSV もしくは MSE 混餌飼料を与えて加齢様病態変化に対する保護効果を調べ、RSV の抗老化作用を明らかにすることを目的とした。
【方法】雄 SOD1 欠損マウスに 0.5%、0.1% MSE (山田養蜂場製)と 0.04% RSV 混餌飼料を自由摂取によって 4 週齢から 16 週齢までの 12 週間投与し、投与による加齢様病態改善効果の有無を組織学的、および生化学的に調べた。
【結果】混餌飼料摂取による摂餌量や飲水量、空腹時血糖値の変動は認められなかった。また、混餌飼料摂取により SOD1 欠損マウスの体重減少は抑制しなかったが、SOD1 欠損マウスの主な表現型の１つである皮膚萎縮に対する有意な改善効果が明らかとなった。皮膚萎縮改善は真皮厚で改善効果が認められた。さらに全ての混餌飼料投与によって骨髄細胞中の活性酸素産生減少が認められた。興味深いことに、赤血球数減少、脾臓肥大および骨格筋萎縮には病態軽減効果は認められなかった。
【考察】本研究によって RSV および MSE 経口投与の皮膚老化様症状に対する保護作用が明らかとなった。RSV により活性酸素産生抑制が認められたことから抗酸化作用を介した真皮層病態改善効果が示唆された。興味深いことに、RSV の作用点が臓器毎に異なることから RSV の組織特異的な作用も明らかとなった。また、0.5% MSE 混餌飼料中の RSV は非常に低濃度にもかかわらず同様な皮膚厚増加作用が見られたことから、MSE の経口摂取の有用性が示された。

Resveratrol, Superoxide dismutase, Reactive oxygen species

講演番号：2B04p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ B 校舎 04 会場

植物中に含まれる配糖体に対する *Lactobacillus paracasei* A221 株の影響
Metabolism of Plant-derived polyphenolic glycosides by *Lactobacillus paracasei* A221
○位上 健太郎、下条 洋輔、野渕 翠、小坂 邦男、伊藤 久富、宮崎 寿次（長瀬産業（株））
○KENTARO IGAMI, YOSUKE SHIMOJO, MIDORI NOBUCHI, KUNIO KOSAKA, HISATOMI ITO, TOSHITSUGU MIYAZAKI (NAGASE & CO., LTD.)

【目的】*Lactobacillus paracasei* A221 株（乳酸菌 A221 株）はオタネニンジン中に含まれる配糖体（人参サポニン）を代謝する乳酸菌として同定された株であり、オタネニンジンの効果をより高めることが報告されている（*１）。人参サポニンであるジンセノシド Rb1 は β-グリコシド結合によって二糖であるソホロース、ゲンチビオースがトリテルペンに結合しており、乳酸菌 A221 株は、これらのグリコシド結合を代謝する能力が高いと考えられる。一方、野菜を含む植物は様々な糖がグリコシド結合したポリフェノールを含んでいる。これらポリフェノールの中には、生理活性の面から、糖を加水分解した方が活性が高まると考えられるものが存在する（*２）ことから、乳酸菌 A221 株は、ポリフェノールの配糖体においても糖を代謝し、有効性を高める可能性が考えられた。そこで、本研究では植物に含まれるポリフェノールの配糖体に対する乳酸菌 A221 株の代謝活性について検討を行った。

【方法】本検討は、乳酸菌 A221 株、並びに比較対象として、*Lactobacillus paracasei* NBRC15889 株、 *Lactobacillus casei* NBRC15883 株を用いて行った。始めに、各菌の β–グルコシダーゼ活性を、*p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside（NPG）の代謝を指標に測定した。次に、植物に含まれる配糖体のうち、単糖が β-グリコシド結合した配糖体（ゲニスチン、アルクチン、ルテオリン-7-グルコシド、ケンフェロール-7-グルコシド、フロリジン、リクイリチン）、並びに二糖が β-グリコシド結合した配糖体（エリオシトリン、ルチン、ナリンジン、ケンフェロール-3-ソホロシド）を含んだ培地を調製し、各菌を添加後 24 時間 37 ℃培養し、その上清を HPLC に供して代謝効率を算出した。

【結果】NPG を用いて検討した結果、乳酸菌 A221 株は他の乳酸菌株に比べ、より高い β–グルコシダーゼ活性を示した。また、乳酸菌 A221 株は、ゲニスチン、アルクチン、フロリジンなど単糖が β-グリコシド結合した配糖体や、ケンフェロール-3-ソホロシドなどのソホロースが β-グリコシド結合した配糖体に対して、他の乳酸菌株より高い代謝活性を示した。一方で、ルチノースが β-グリコシド結合した配糖体に対して、代謝活性を示さなかった。今後、乳酸菌 A221 株の有効性についてさらに検討を進めていく予定である。

（*１）Kitaoka K et al. *Sleep* 2009;32(3):413-21
（*２）Yoo JH et al. *Food Chem Toxicol* 2010;48(8-9):2247-52

lactic acid bacteria, polyphenol, glycoside

講演番号：2B04p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ B 校舎 04 会場

Lactobacillus paracasei A221 株が「ケール」の表皮バリア増強作用に与える影響
Effect of *Lactobacillus paracasei* A221 on barrier-enhancing proparties of Kale
○下条 洋輔、位上 健太郎、野渕 翠、小坂 邦男、伊藤 久富、宮崎 寿次（長瀬産業（株））
○YOSUKE SHIMOJO, KENTARO IGAMI, MIDORI NOBUCHI, KUNIO KOSAKA, HISATOMI ITO, TOSHITSUGU MIYAZAKI (NAGASE & CO., LTD.)

【目的】*Lactobacillus paracasei* A221 株（乳酸菌 A221 株）は食品より分離された株で、これまでヒトでのプロバイオティクス効果が報告されている(*1)。また、人参サポニンの糖鎖を代謝してその薬効を高める機能も報告されており(*2)、本菌株には他にも食品素材中の配糖体を代謝してその機能性を高める可能性が考えられる。青汁素材として広く使われる「ケール」はアブラナ科の植物でポリフェノール配糖体を豊富に含み、その機能性との関連が注目されている。今回、美容に関わる表皮バリア機能に着目し、「ケール」の効果並びに乳酸菌 A221 株の影響を検討した。
【方法】正常ヒト新生児由来表皮角化細胞（NHEKn）をセルカルチャーインサートに播種し、コンフルーエントまで培養させた後、所定の用量のケール抽出物、あるいは乳酸菌 A221 株で処理したケール抽出物を与えた。乳酸菌による処理では基準株として *Lactobacillus paracasei* NBRC15889 株を用い比較検証した。24 時間後に経上皮電気抵抗値（TEER）を測定し、表皮バリアの指標とした。また、表皮バリアに関するタイトジャンクション関連遺伝子として、Claudin-1，Claudin-4，Occludin，ZO-1 及び､細胞分化関連遺伝子として Involucrin，Filaggrin の mRNA の発現を定量性 PCR により評価した。更に調製したケール抽出物の成分変化については HPLC により検証した。
【結果】
NHEKn 細胞にケール抽出物を与えたところ、24 時間後において、TEER は有意に上昇した。一方で乳酸菌により処理を施したケール抽出物では更に高い TEER の値が認められた。特に乳酸菌 A221 株で処理したケール抽出物は基準株で処理を施したものと比較してより強いバリア機能増強効果が認められた。これと一致するように、タイトジャンクション関連遺伝子及び細胞分化関連遺伝子の発現についても乳酸菌 A221 株処理により最も強い増強が認められた。成分変化に関して HPLC により検証したところ、基準株と異なり、乳酸菌 A221 株で処理したケール抽出物ではケンフェロールのピークが認められ、本成分が今回見られた差異に関与している可能性が考えられた。以上より、乳酸菌 A221 株には「ケール」の持つ表皮バリア増強作用を更に高める可能性が示唆された。

(*1) Hasegawa H and Benno Y *Journal of Traditional Medicines* 2006;23:42-46
(*2) Kitaoka K et al. *Sleep* 2009;32(3):413-21

Lactic acid bacteria, Kale, Epidermal barrier

講演番号：2B04p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ B 校舎 04 会場

金時草の血管新生抑制作用

Anti-angiogenesis activity of Kinjiso (*Gynura bicolor*

○吉城 由美子、吉田 沙織、田中 美由紀、仲山 薫 (石川県大食)
○Yumiko Yoshiki, Saori Yoshida, Miyuki Tanaka, Kaoru Nakayama (Ishikawa Pref. Univ.)

【目的】

血管新生は癌細胞の増殖、網膜症、関節炎など、様々な病気に関与することが知られている。これまで、梅やショウガなどの食用植物の血管新生におよぼす影響を調べ、金時草が強い抑制作用をもつことを明らかにした。そこで、本研究は金時草の血管新生抑制画分の分画と皮膚老化に対する影響について検討した。

【実験方法】

金時草 (2012 年、石川県産) を乾燥粉末にし、水抽出後、エーテルで分配し、水層を凍結乾燥した。その後、Sephadex G-15 (0→50 メタノール) で分画後、260 nm で吸光度の測定を行い、さらに分画した。これら画分を Sephadex G-50 で分画後、同様に 260 nm の吸光度測定から分画した。それぞれの画分、1mg/mL について、ヒトさい帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の増殖作用を観察した。金時草のＵＶによる皮膚老化に対する抑制効果を、Hos:HR-1 系ヘアレスマウス (4 週齢・雄) を用いた動物実験で観察した。１週間の予備飼育後、コントロール食 (Co 群)、コトロール食に金時草の画分を添加した群 (Gy 群) およびそれぞれの群にＵＶ (波長：280～320 nm、6 時間/日) を照射する群 (CoＵＶ群、GyＵＶ群) の 4 群とした。また、Co 群と CoＵＶ群の背中を 4 分割し、水および金時草画分 (1mg/mL) を 1 日 2 回 (ＵＶ照射前後) 塗布し、背部水分量を測定した。6 週間の飼育後、皮膚の組織標本を作製し、表皮厚を測定した。

【結果】

HUVEC の培養 10 日目の細胞数は、Control (8.68×10^5/cm^2) と比較して、金時草を添加した場合は (3.89×10^5、cell/cm^2)、4.23×10^5 cell/cm^2) と有意に減少し、金時草画分の増殖抑制効果を確認できた。動物実験による皮膚老化試験では、ＵＶ照射後、30 日目から皮膚水分量が低下し始め、飼育 37 日目では Co 群に対し、CoＵＶ群で 2.0%減少した ($P<0.05$)。一方、金時草画分塗布時の水分量は 13.3%、12.7%であり、水塗布時の 14.5%と比較し低下傾向にあった。しかしながら、ＵＶ照射後の水分量に変化はなく、また、表皮厚にも差がなかったことから、金時草画分のＵＶ照射に対する防御効果が期待された。

anti-angiogenesis, *Gynura bicolor*, antioxidation

講演番号：2B04p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ B 校舎 04 会場

Aβ，ApoAII 及び stefin B を標的としたクロロゲン酸及びその代謝産物の抗アミロイド効果

Anti-amyloid effects of chlorogenic acid and its metabolites against Aß, ApoAII and stefin B

○福本 高大[1]、片山 茂[1,2]、山内 陸[2]、中林 昌基[2]、中村 宗一郎[1,2] ([1]信州大院農、[2]信州大農)
○Takahiro Fukumoto[1], Shigeru Katayama[1,2], Riku Yamauchi[2], Masaki Nakabayashi[2], Soichiro Nakamura[1,2] ([1]Graduate school of Shinhu Univ., [2]Shinhu Univ.)

【背景と目的】

社会の超高齢化が進む中で，アルツハイマー病（Amyloid βprotein = $A\beta_{1\text{-}42}$）や全身性老化アミロイドーシス（Apolipoprotein AII = ApoAII など）といったアミロイド線維（Aβ や AApoAII など）の沈着によって引き起こされる疾病が大きな社会問題となっている。これまでの研究で，種々のフェノール化合物はアミロイド性タンパク質及びペプチドのアミロイド線維形成を阻害する効果があることが示されてきた。我々は，これまで，コーヒーに多く含まれているクロロゲン酸の抗老化作用に着目した研究を展開してきた。クロロゲン酸はキナ酸とカフェ酸とのエステルであり，キナ酸とカフェ酸は腸内細菌などによって生体内でフェルラ酸や安息香酸などに代謝されることが知られている。そこで本研究では，$A\beta_{1\text{-}42}$，ApoAII 及び stefin B といったアミロイド性タンパク質を標的として，クロロゲン酸及びその代謝産物のアミロイド線維化抑制・阻害効果について調べたので報告する。

【方法】

$A\beta_{1\text{-}42}$ は(株)ペプチド研究所 から購入したものを用いた。ApoAII については，Sawashita らの方法[1)]に従って，ApoAII 内のアミロイド性に富んだ 2 領域のペプチド（$D_6M_7Q_8S_9L_{10}F_{11}T_{12}Q_{13}Y_{14}F_{15}Q_{16}$ 及び $Q_{48}L_{49}T_{50}P_{51}L_{52}V_{53}R_{54}S_{55}A_{56}G_{57}T_{58}S_{59}L_{60}V_{61}N_{62}F_{63}F_{64}S_{65}$）を人工合成して用いた。Stefin B は, Nakamura らの方法[2)]に従って，ピキア酵母発現系によって調製した。本研究では，クロロゲン酸代謝産物は，キナ酸，カフェ酸，フェルラ酸，イソフェルラ酸，安息香酸，ヒドロキシ安息香酸及び馬尿酸の 7 種類とした。アミロイド線維形成は, チオフラビン T 蛍光発光法（ThT 法）及び透過型電子顕微鏡法（TEM 法）によって確認した。

【結果】

ThT 法によってクロロゲン酸及びその代謝産物の抗アミロイド効果を調べた結果，標的とするタンパク質の分子サイズと構造によって抗アミロイド効果にそれぞれ特徴があることが分かった。同様の結果は TEM によって追認された。本研究によって得られた知見は，今後の抗アミロイド剤の分子デザインの構築に貢献するものと期待される。

【文献】

1) Sawashita, J. et. al.: *Biochim. Biophys. Acta,* **1794**, 1517-1529, 2009.
2) Nakamura, K. et. al.: *Biotech. Appl. Biochem*. **60**, 283-288, 2013.

Amyloidogenic protein, Anti-amyloidal effect, chlorogenic acid derivative

講演番号：2B04p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ B 校舎 04 会場

老化促進マウス SAMP8 における大豆ペプチドの認知機能保護効果

Preventive effect of soy peptides on cognitive decline in SAMP8 mice

○今井 理恵[1]、片山 茂[1]、杉山 遥[1]、前渕 元宏[2]、中村 宗一郎[1] ([1]信州大農院、[2]不二製油)
○Rie IMAI[1], Shigeru Katayama[1], Haruka Sugiyama[1], Motohiro Maebuchi[2], Soichiro Nakamura[1] ([1]Shinshu Univ, [2]Fuji Oil Co.Ltd)

【背景と目的】老化は生活の中で避けられないものであり，組織や臓器の機能を低下させる。特に高齢者においては，認知機能の低下や認知症の発症が大きな問題となっている。認知機能の維持・向上には，バランスのとれた食生活や適度の運動が効果的といわれる。近年，大豆の健康効果として，大豆ペプチドの機能性に関する研究が行なわれており，これまでに筋肉損傷軽減作用や精神神経作用などが明らかになっている。本研究では，大豆ペプチド長期摂取が老化による認知機能の低下に及ぼす影響について検討した。短寿命で学習記憶障害を発症する老化促進マウス SAMP8 と正常老化型である SAMR1 マウスをコントロールとして使用した。
【方法】大豆ペプチドとしてハイニュート AM（不二製油社製）を使用し，市販の AIN-93M 飼料（オリエンタル酵母社製）のカゼイン半量をハイニュート AM に置換した飼料（ハイニュート AM7％含有）を作製した。17 週齢の雄性 SAMP8，SAMR1 をコントロール群と大豆ペプチド摂取群の 4 群に分け，自由摂取で 26 週間飼育した。摂取期間終了後，モリス水迷路試験を行い，空間記憶学習能力に及ぼす影響を検討した。続いて，リアルタイム PCR 法により，脳内の神経調節系遺伝子群の発現解析を行った。さらに，転写因子 CREB のリン酸化について，ウェスタンブロッティング法を用いてタンパク質レベルでの検証を行った。
【結果】モリス水迷路試験の結果，SAMP8 および SAMR1 ともにコントロールマウスに対して大豆ペプチド摂取群では記憶学習能力の上昇を示した。リアルタイム PCR 法により遺伝子発現解析を行ったところ，大豆ペプチド摂取により神経栄養因子である NGF，BDNF，NT-3 の mRNA 発現量が有意に上昇することが明らかとなった。これらの効果は SAMP8 の大豆摂取群において顕著であることが示された。さらに，SAMP8 マウスにおいては，転写因子 CREB のリン酸化が大豆ペプチド摂取において上昇していることが確認された。NGF や BDNF などの神経栄養因子は細胞内シグナル伝達を活性化し，神経細胞の生存・分化，神経突起形成などの調節作用を有することが報告されている。以上より，大豆ペプチドの長期摂取は転写因子 CREB の活性化を介して，神経栄養因子の遺伝子発現を上昇させることで，老化に伴う認知機能の低下を抑制することが示唆された。

soy peptide, SAMP8, neurotrophic factor

講演番号：2B04p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ B 校舎 04 会場

Melanogenesis-inducing effect of cirsimaritin through increase in microphthalmia-associated transcription factor and tyrosinase expression

○Hyo Jung KIM[1], Yin Dong[1], Ik Soo Lee[3], Toshiaki Teruya[4], Takayuki Yenazawa[5], Kazuo Nagai[1], Je-Tae Woo[1,2], Jin Sook Kim[3], Byung-Yoon Cha[1] ([1]Chubu University, [2]Erina Co., Inc., [3]Herbal Medicine Research Division, TKM-Based Herbal Drug Research Group, 1672 Yuseongdae-ro, Daejeon, Republic of Korea, [4]Ryukyu University, [5]Tokyo University)

Cirsimaritin has been known to have potent anti-oxidant and anti-bacterial activity. The main objective of the study was to investigate the melanogenesis inducing activity and its biochemical mechanism of cirsimaritin, an active flavone with methoxy groups. The tyrosinase activity and melanin content were increased by cirsimaritin in a dose-dependent manner in murine B16F10 melanoma cells. The protein levels of tyrosinase and TRP1 were also enhanced after the treatment with cirsimaritin for 48 h. Western blot analysis revealed that cirsimaritin upregulated the expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) after incubation for 24 h. Cirsimaritin activated dose-dependently extracellular signal-related kinase (ERK) 1/2 MAPK activation and cAMP response element (CRE) binding protein (CREB). Moreover, cirsimaritin-mediated increase of tyrosinase activity was attenuated significantly by H89, a cAMP dependent protein kinase A (PKA) inhibitor. These findings indicate that cirsimaritin could stimulate melanogenesis in B16F10 cells via the activation of CREB and the up-regulation of MITF and tyrosinase, which was, in turn, due to the activation of cAMP signaling. These results support useful application of cirsimaritin on photoprotection against UV and improvement of grey hair to black hair.

melanogenesis, Cirsimaritin, tyrosinase

講演番号：2B04p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ B 校舎 04 会場

ミッドカインを指標とした亜熱帯性農産物抽出液の抗腫瘍活性の解析

Analysis of Extraction of Subtropcal agricultural products for antitumor activities using midkine as an indicator

○伊波 幸紀[1]、藏屋 英介[2]、池松 真也[3] ([1]沖縄高専 専攻科、[2]沖縄高専 技術室、[3]沖縄高専 生物資源)
○Yukitoshi IHA[1], Eisuke Kuraya[2], Sinya Ikematsu[3] ([1]ONCT AC, [2]ONCT　DST, [3]ONCT)

［目的］
沖縄県は亜熱帯海洋性気候に属し、この気候に適応した数多くの亜熱帯性農産物の栽培が行われている。しかし、県で栽培されている亜熱帯性農産物に関しては、含まれている成分の科学的調査が行われていない品種もある。本研究では、今まで科学的調査が行われていない身近にある亜熱帯性農産物に着目し、機能性を有する新たな亜熱帯性農産物の探索と機能性成分の解析を行うことを目的とした。前年度の本大会では、沖縄県で栽培されている亜熱帯性農産物 30 種に関して“抗酸化活性試験”“チロシナーゼ阻害活性試験”を行ったところ、サクラバ、ヒカンザクラ、ジャボチカバ 3 種の葉に高い活性があることを報告した。一方、これまで多くの研究者が亜熱帯性農産物の機能性解析を行い、なかでも抗酸化活性が高い農産物の中には、抗腫瘍活性を有しているものがあることを報告している。本発表では、抗酸化活性が高かった 3 種類の農産物について、新たな機能性として抗腫瘍活性の評価を行った。
［方法］
抗腫瘍活性を評価する方法は、いくつか知られているが、本研究では、癌の発生・進展に関与し、多くの癌で広く発現しているミッドカイン(MK)と呼ばれる分泌タンパク質を指標とし、抗腫瘍活性を評価した。抗腫瘍活性の測定に供した抽出溶液は、それぞれの試料を凍結乾燥させた後、エタノールと熱水の 2 種類の溶媒を用いて調製した。抗腫瘍活性の測定は、神経芽腫細胞の 1 種である SK-N-SH を使用し、培養した細胞に亜熱帯性農産物から得た抽出溶液を一定量添加後、24 時間後、48 時間後の培養上清を回収した。その後、酵素標識免疫測定法を用いて、回収した培養上清中の MK タンパク質の分泌量の抑制割合をもとに抗腫瘍活性を評価した。
［結果］
亜熱帯性農産物の抽出溶液を SK-N-SH に一定量添加し培養したところ、エタノール抽出溶液では、ジャボチカバ(48 時間)、サクラバ(48 時間)の抑制率がそれぞれ 70%、50%、熱水抽出溶液では、ヒカンザクラ(24 時間)の抑制率 50%と MK タンパク質の分泌が大幅に抑制され、抗腫瘍活性があることが確認できた。MK タンパク質分泌を抑制した理由として、培養中細胞は生存していたことから、抽出溶液中の機能性成分が直接的に細胞を死滅させることに働いたのではなく、MK のシグナル伝達系に作用したと考えられた。

Midkine (MK), antitumor activity, Subtropcal agricultural products

講演番号：2B04p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ B 校舎 04 会場

ヒト神経芽細胞腫株SK-N-SHの6-OHDAおよび過酸化水素による細胞死に保護効果を示す物質の検討

Compounds which indicated protective effects on the cell death of human neuroblastoma cell line with 6-OHDA and H_2O_2

○中路 昌志、小川 智弘、藤原 宜弘、山田 康枝（近畿大院工）
○MASASHI NAKAMICHI, TOMOHIRO OGAWA, NORIHIRO FUJIWARA, YASUE YAMADA (Kinki Univ.)

【目的】神経細胞は酸化ストレスに対して脆弱であるため，この脆弱性を改善できればアルツハイマー，パーキンソン病などの酸化ストレスに原因の一端があると考えられている病気の症状改善につながる．6-ヒドロシキドーパミン（6-OHDA）は神経細胞に特異的に作用する神経毒で，ドーパミン作動性ニューロン及びノルアドレナリン作動性ニューロンによって取り込まれる．毒性として ROS の関与が示唆されている．過酸化水素(H_2O_2)は活性酸素の一種である．今回は，納豆，パセリに含まれ，抗酸化作用や神経保護効果があるとされているピロロキノリンキノン (PQQ)，ミツバチのつくる粘着性複合物質であるプロポリス，その成分であるアルテピリン C (ArC)，ポリフェノールと知られ，ブドウの果皮に含まれており，神経保護作用や抗酸化作用，血管拡張作用が見出されているレスベラトロール (RSV)の 6-OHDA と過酸化水素(H_2O_2)に対するヒト神経芽細胞腫株 SK-N-SH への細胞保護効果を検討した．検討の際，ラジカルスカベンジャーとして知られる L-アスコルビン酸 (AsA) を指標として用いた．

【方法】SK-N-SH 細胞を 2.0×10^5 cells/ml に調整し 96well マイクロプレートに播種し，24 時間 37℃ 5%CO_2 インキュベーター内で培養した．培養後，様々な濃度の酸化型と還元型の PQQ，プロポリス，ArC，RSV を添加し 10 分間インキュベートし，6-OHDA を 50μM，100 μM 添加 24 時間後，H_2O_2 を 10 mM 添加 10 分後，MTT アッセイ法により細胞生存数を求め，6-OHDA と H_2O_2 に対する抗酸化効果を検討した．

【結果・考察】6-OHDA 50 μM と 100 μM による細胞死を PQQ は 10 nM，100 nM，500 nM で抑制し，プロポリスは 0.5 μg/ml でほぼ 100％の保護効果を示した．ArC 1 μM で保護効果がプロポリスによる保護効果に及ばないことから，プロポリスの 6-OHDA に対する保護効果は ArC と他の物質の相乗効果であることが示唆された．AsA によって 6-OHDA に対する保護効果は得られなかった．従って，6-OHDA の毒性には ROS 以外の関与が考えられる．H_2O_2 に酸化ストレスに対し，PQQ 500 nM，プロポリス 0.5 μg/ml，RSV1 μM によって保護効果が確認できた．今回の実験で PQQ，プロポリス、RSV には神経保護効果があることが示唆された．今後は PQQ，プロポリスによる神経機能傷害回復にかかわる細胞内情報伝達系の解析効果を検討する．

Pyrroloquinoline quinone, 6-OHDA, H_2O_2

講演番号：2B04p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ B 校舎 04 会場

希少糖からのカロリー制限模倣物質の探索 －線虫寿命試験法の改良－

Exploration of calorie restriction mimetics from rare sugars － improvement of *C. elegans* lifespan assay－

○佐藤 正資[1]、砂古口 博文[1]、新谷 知也[2]、大隈 一裕[2]、何森 健[3] ([1]香川大・農、[2]松谷化学工業、[3]香川大・希少糖研究センター)
○Masashi Sato[1], Hirofumi Sakoguchi[1], Tomoya Shintani[2], Kazuhiro Okuma[2], Ken Izumori[3] ([1]Fac. of Agric., Kagawa Univ., [2]Matsutani Chemical Industry, [3]Rare Sugar Reseach Center, Kagawa Univ.)

【目的】摂取カロリーの制限は，様々なモデル動物の寿命を延長することが報告されている。ヒトにおいても，カロリー制限は加齢性疾患の発症を遅らせ，寿命を延長すると考えられている。その詳細な機序は明らかではないが，細胞内エネルギーレベルの低下がインスリン様経路，サーチュイン，AMPK などの複数のエネルギーセンサーによって媒介され、そのシグナルが抗酸化酵素の発現増強やミトコンドリア機能の保全などを誘導し、その結果，抗老化・寿命延長が起こると考えられている。しかし、栄養のバランスを保ちながらカロリー制限を長期間続けることは困難と苦痛を伴う。そこで，食事と一緒に摂取することでカロリー制限と同様の抗老化効果が得られるカロリー制限模倣物質(Calorie Restriction Mimetics, CRM)の開発が注目されている。これまで，CRM 候補として，サーチュインを活性化するレスベラトロールなどが報告されているが、効果や毒性に問題があり、薬剤として実用化されたものは無い。我々は，すでに D-フルクトース、D-グルコースそれぞれの C3 エピマーである希少糖 D-プシコースと D-アロースが線虫寿命を延長すること、その機序としてカロリー制限効果の関与が示唆されることを報告している。希少糖とは、自然界にまれにしか存在しない単糖およびその誘導体と定義される。我々は、数多い希少糖を網羅的に合成し、そこから線虫寿命延長活性を指標として CRM 候補を探索することを計画している。しかし、従来の我々の寿命試験法は労力、試料量の点で問題が多く、よりハイスループットな方法の開発が望まれていた。今回、その改良について報告する。
【方法】従来法は2mlの液体培地を入れた3.5cm径culture dishへ線虫成虫10頭を入れ、振とう培養を行い、1日おきに生き残った線虫を新しい培地に移し替えていた。今回、試験容器を96wellプレートに変え、1wellあたり100μlの液体培地に線虫一頭を入れ、静置培養し、植え替えは行わないこととした。
【結果】従来法においてD-プシコースは28mMで寿命延長が認められていた。今回報告する96wellプレート法においては5-14mMに活性を認め、より低濃度で活性を検出することが可能となった。また、植え替えを行わないため、同時に多数の検体の試験が可能となった。

calorie restriction, lifespan, *C. elegans*

講演番号：2B04p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ B 校舎 04 会場

日本食が生体寿命に与える影響

The effect of the Japanese food on life span in mice

○都築 毅[1]、本間 太郎[1]、北野 泰奈[1]、畠山 雄有[1]、鄂 爽[1]、山本 和史[1]、治部 祐里[2]、川上 祐生[2] ([1]東北大院農、[2]岡山県大保福)

○Tsuyoshi TSUDUKI[1], Taro HONMA[1], Yasuna KITANO[1], Yu HATAKEYAMA[1], Shuang E[1], Kazushi YAMAMOTO[1], Yuri JIBU[2], Yuki KAWAKAMI[2] ([1]Tohoku Univ., [2]Okayama Pref. Univ.)

【目的】日本人の平均寿命は着実に増加し、長寿国として知られている。平均寿命が延びた要因の一つとして食生活が注目され、日本人の食事は「日本食」として世界中で盛んに研究されている。現在、健康維持に効果のある日本食に特徴的な食品成分が広く研究されている。しかしこれらの研究は、単一もしくは数種の食品成分の摂取による影響を見ているものが主体であり、これらの成分が集まった「日本食」そのものの摂取がどう影響するか明らかではなかった。以前に我々は、現代日本食が現代欧米食と比べて健康維持に有益かをラットを用いて検討した。その結果、現代日本食は現代米国食と比べて健康有益性の高い食事であることを明らかとした。しかし、日本食の内容はここ 40～50 年間で大きく様変わりし、また、食の欧米化とともに生活習慣病の発症率が増加している。そのため、現代日本食の健康有益性が本当に高いのか疑わしい。最近我々は、時代とともに徐々に変化している日本食において、1975 年頃の日本食が高い健康有益性を持つことを、マウスを用いて示した。そこで本研究では、日本食の長期的摂取が「寿命」にどう影響するのかをマウスを用いて検討するとともに、最も健康有益性の高い日本食を明らかにすることを試みた。このことについて明らかとできれば、現代の食生活を見直し健康に加齢し、個人の QOL（quality of life）を向上させるための重要な手掛かりを得ることができる。

【方法】管理栄養士の指導の下、日本国民・栄養調査に基づき 2005 年（現代）、1990 年、1975 年、1960 年それぞれ 1 週間 21 食分の日本食の献立を再現し、調理したものを凍結乾燥・粉末化した。作製した各年代の日本食をそれぞれ通常飼育食（CE-2；日本クレア）に混合して 30%日本食混合物とし、老化促進モデルである SAMP8 マウス（4 週齢、雄性）に自由摂食させ、寿命まで飼育した。飼育中に外見の老化評価（グレーディングテスト）や学習記憶試験である受動的回避試験（パッシブアボイダンス）を行い老化の進行を調べた。死亡したマウスは直ちに解剖し、死因を調べた。

【結果】1975 年と 1990 年の日本食を摂取したマウスの平均寿命は、2005 年の日本食を摂取したマウスと比較して長く、長寿であった。グレーディングテストの結果より、1975 年と 1990 年の日本食を摂取したマウスは、老化の進行が遅延していることが確認された。パッシブアボイダンスの結果より、1975 年と 1990 年の日本食を摂取したマウスは、学習記憶能が良好な成績だった。加えて、1975 年の日本食を摂取したマウスは、がんの発生率が最も低かった。以上より、1975 年頃の日本食は老化を遅延し、長寿に有効であることが示唆された。

Japanese food, life span, senescence

講演番号：2B04p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ B 校舎 04 会場

各種食品素材の寿命延長効果スクリーニング

Screening of life span extension effect of various food ingredients

○高橋 千尋、西村 太輔、林田 茂、松永 政司 (NPO 法人遺伝子栄養学研究所)
○Chihiro TAKAHASHI, Daisuke NISHIMURA, Shigeru HAYASHIDA, Masaji MATSUNAGA (Gene Trophology Institute)

【諸言】
食の機能性、食成分の有効性が論じられて久しい。近年は国の方針もあり「健康寿命の延長」という点が特に注目されてきている。「健康寿命」とは、介護を必要としない、自立した生活ができる生存期間のことであり、言い換えれば「元気で長生き」ということである。「元気で長生き」を達成するため、食生活、睡眠時間、適度な運動といった生活習慣の改善が効果的であるといわれているが、我々は食の機能性に着目し、その有効性を検討することとした。
【素材】
大麦若葉（抽出物、粉末）・小豆抽出物・サケ白子分解物・アスパラガス擬葉・レスベラトロール
【方法】
C. elegans を用いて寿命延長試験を行った。まず、試験に適切な素材濃度を決定する為、96well プレートを用いた簡易的な方法で濃度スクリーニングを行い、その結果から投与素材濃度を決定した。本試験は、各素材を添加した液体培地により、*C. elegans* を培養し、1 日毎に培地交換と生存している *C. elegans* の匹数をカウントし、生存曲線を作成した。
【結果】
今回試験に用いたいくつかの素材において、通常エサ投与群（コントロール）と比較して、有意な寿命延長効果を認めた。
【まとめ】
寿命延長試験は線虫やショウジョウバエ、酵母を用いた検討が多い。いずれも操作の煩雑さなど問題があるが、今回提案した方法を用いることで、線虫を用いた寿命延長試験の効率化が達成できた。また、本方法を用いることで大麦若葉エキス、小豆抽出物、レスベラトロールに線虫の寿命を延長する効果があることが分かった。今後、これらの素材について、寿命延長効果の作用機序等を検討すると共に、より高等な生物を用いた寿命試験を実施することを予定している。

life span, c.elegans

講演番号：2B04p22
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ B 校舎 04 会場

大麦若葉エキス投与によるヒト繊維芽細胞遺伝子発現量変化

The effect of Arley Grass extract to human fibroblast gene expression

○西村 太輔、高橋 千尋、林田 茂、松永 政司 (NPO 法人遺伝子栄養学研究所)
○Daisuke NISHIMURA, Chihiro TAKAHASHI, Shigeru HAYASHIDA, Masaji MATSUNAGA (Gene Trophology Institute)

【諸言】
健康寿命の延長という観点から、様々な食素材の寿命延長効果について線虫を用いた系で検討した。その結果、大麦若葉エキス等に寿命延長効果を認めた。大麦若葉エキスがどのような作用機序で線虫の寿命を延長したか検討するため、正常ヒト線維芽細胞を用い各種遺伝子の発現量変化を検討した。
【方法】
大麦若葉エキス 1%を含有する D-MEME 培地で正常ヒト繊維芽細胞（以下 NHDF）を 48 時間培養した。通常培地のみで同条件での培養を行う群をコントロールとした。培養終了後、セルスクレイパーを用いて細胞を回収後し、totalRNA を抽出・精製した。逆転写により、cDNA を作成し、これをリアルタイム PCR の鋳型とした。Real-Time-PCR により、遺伝子発現量解析を行った。
【結果】
SOD-1・SOD-2、において、大麦若葉エキス 1%を投与した群で、コントロール群と比較して有意な mRNA の発現上昇がみられた。
【まとめ】
正常ヒト線維芽細胞へ大麦若葉エキスを投与した結果、SOD 遺伝子群の発現量が上昇していた。大麦若葉エキス投与により、細胞内 SOD 発現量が上昇、細胞内活性酸素濃度が低下していることが示唆された。SOD 遺伝子発現量、SOD 活性と寿命の関係性は完全には明らかとなっていないが、双方に何らかの関係性があるかもしれない。

sod, life span

講演番号：2B05a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ B 校舎 05 会場

L-システインによる LDL 受容体上方制御は、新規 TGF-α シグナル伝達経路によって媒介される

L-Cysteine-induced up-regulation of the low-density lipoprotein receptor is mediated via a novel transforming growth factor-alpha signalling pathway.

○田中 裕真、島田 昌也、長岡 利 (岐阜大応生)
○Yuma TANAKA, Masaya SHIMADA, Satoshi NAGAOKA (Gifu Univ.)

【目的】

血漿中の低密度リポタンパク質（LDL）コレステロールレベルは、動脈硬化症のリスクと正の相関があると知られており、主に肝臓で発現している LDL 受容体（LDLR）によってそのレベルが調節されている。そのため、LDLR 活性化因子の探索、及びその活性化作用機構の解明は、動脈硬化症の予防に対する新たな戦略の発見につながる。近年、含硫アミノ酸非含有の食事の摂取により、ヒトの血中脂質量が増加することが報告されているが(1)、含硫アミノ酸の脂質代謝に及ぼす影響やその作用機構については不明な点が多い。そこで本研究では、ヒト培養肝細胞 HepG2 を用いて、含硫アミノ酸、特に、L-システインの持つコレステロール代謝改善作用の機構解明を目的とした。

【方法・結果】

まず、HepG2 に含硫アミノ酸（S-Methyl-L-Cysteine Sulfoxide、L-Cysteine (Cys)、Taurine、N-Acetyl-L-Cysteine、L-Methionine）を添加し、WST-1 法により細胞増殖量を、リアルタイム PCR により LDLR、HMG-CoA reductase、CYP7A1 および SREBP2 の各 mRNA レベルを測定した。その結果、いずれの化合物も細胞毒性を示さず、Cys を添加した際に LDLR mRNA レベルが顕著に増加することを発見した。そこで、ウェスタンブロット法により LDLR タンパク質レベルを、ルシフェラーゼアッセイにより LDLR 遺伝子転写活性を測定したところ、Cys の添加により LDLR タンパク質レベルおよび遺伝子転写活性の両者において顕著な増加が誘導されることを明らかにした。さらに MAP キナーゼ（ERK、p38 MAPK、JNK）経路を阻害した HepG2 において、Cys 添加による LDLR mRNA レベルへの影響を検討したところ、ERK、p38 MAPK 経路を阻害することで、Cys による増加作用が消失することを発見した。そこで、MAPK 経路の活性化に関連する TGF-α タンパク質レベルに対する Cys の影響を ELISA 法により測定した結果、培養培地中の TGF-α タンパク質レベルは Cys によって増加することが判明した。さらに HepG2 への TGF-α の添加により、LDLR mRNA レベルが増加することを明らかにした。また、培養培地中において、Cys の添加により LDLR タンパク質の低下を招く PCSK9 タンパク質レベルが有意に減少することを発見した。L-システインによる LDL 受容体上方制御は、新規 TGF-α シグナル伝達経路によって媒介される。

(1) J. Nutr., 141, 1424-1431 (2011)

L-cysteine, Transforming growth factor-alpha, Low-density lipoprotein receptor

講演番号：2B05a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ B 校舎 05 会場

エピガロカテキンガレートによる LDL 受容体活性化及び PCSK9 減少の分子機構

Molecular mechanism of LDL receptor activation and PCSK9 reduction by epigallocatechin gallate

○北村 幸平、三島 周平、島田 昌也、長岡 利 (岐阜大応生)
○Kouhei KITAMURA, Syuhei MISHIMA, Masaya SHIMADA, Satoshi NAGAOKA (Gifu Univ.)

【目的】高い血漿低密度リポタンパク質(LDL)レベルは動脈硬化症等のリスクを増大させることが知られている。LDL レベルは主に肝臓で発現している LDL 受容体(LDLR)により調節されている。そして近年、LDLR タンパク質の分解を促進する因子として Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)が発見され、血漿 LDL レベルに影響を与える新たな因子として注目を集めている。我々は、茶に含まれる主要なポリフェノールである Epigallocatechin gallate (EGCG)がヒト培養肝臓細胞 HepG2 において、LDLR mRNA レベルを増加させることを報告した(Br. J. Nutr. 107, 769-773 (2012))が、その作用メカニズムは未だ不明な点が多く、PCSK9 に対する EGCG の作用も報告されていない。そこで、本研究では EGCG による LDLR mRNA レベル上昇作用の機構解明及び PCSK9 に対する EGCG の影響について、HepG2 細胞を用いて解析することを目的とした。【方法】〈実験 1〉HepG2 細胞に JNK、ERK、p38 の各シグナル伝達経路の阻害剤及び EGCG を添加して 24 時間培養後、全 RNA を回収して LDLR mRNA、PCSK9 mRNA レベルを Real-time 定量 PCR 法により測定した。また、細胞培地を回収し、PCSK9 タンパク質レベルを ELISA 法により測定した。〈実験 2〉HepG2 細胞に EGCG を 3、6、12、18 時間添加した後、全 RNA を回収して PCSK9 mRNA レベルを Real-time 定量 PCR 法により測定した。また、細胞培地を回収し、PCSK9 タンパク質レベルを ELISA 法により測定した。〈実験 3〉HepG2 細胞に EGCG、Genistein、Resveratrol、Quercetin それぞれを 24 時間添加し、全 RNA を回収して LDLR mRNA 及び PCSK9 mRNA レベルを Real-time 定量 PCR 法により測定した。また、細胞培地を回収し、PCSK9 タンパク質レベルを ELISA 法により測定した。【結果】〈実験 1〉EGCG による LDLR mRNA レベル上昇作用は ERK 及び p38 経路阻害剤により消失した。EGCG は培地の PCSK9 タンパク質レベルを著減させたが、PCSK9 mRNA レベルに減少はなく、阻害剤の影響も見られなかった。〈実験 2〉EGCG を 3、6、12、18 時間添加した場合においても、PCSK9 mRNA レベルに減少はなかったが、培地の PCSK9 タンパク質は EGCG のすべての添加時間帯で有意に減少した。〈実験 3〉すべてのサンプルで Control と比較して LDLR mRNA レベルの有意な上昇が見られた。培地の PCSK9 タンパク質レベルは EGCG 及び Quercetin 添加で有意に減少したが、mRNA レベルの減少は見られなかった。以上より、EGCG は ERK、p38 経路を介して LDLR mRNA レベルを増加させることを発見した。さらに、EGCG は培地の PCSK9 タンパク質を早期に著減させることを明らかにした。また、Quercetin が EGCG と類似する作用を示すことを新たに発見した。PCSK9 を低下させる成分の探索は、コレステロール代謝改善成分の発見に有用である。

Epigallocatechin gallate, Low density lipoprotein receptor, Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9

講演番号：2B05a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ B 校舎 05 会場

ラクトスタチンは ABCA1 発現低下を介してコレステロール吸収を抑制する

Lactostatin suppress cholesterol absorption via down-regulation of ABCA1 expression.

○小室 あゆ美[1]、山本 達記[1]、上田 浩[2]、島田 昌也[1]、長岡 利[1] ([1]岐阜大応生・応用生命、[2]岐阜大工・生命工)
○Ayumi KOMURO[1], Tatsuki YAMAMOTO[1], Hiroshi UEDA[2], Masaya SHIMADA[1], Satoshi NAGAOKA[1] ([1]Gifu University, Dept. Applied Biological Sciences, [2]Gifu University, Dept. Engineering)

【目的】当研究室では、牛乳β-ラクトグロブリンのトリプシン加水分解物より新規血清コレステロール低減化ペプチドであるラクトスタチン（IIAEK）を発見した(1,2)。さらに、ヒト小腸モデルである Caco-2 細胞においてラクトスタチンはコレステロール吸収を抑制するだけではなく、コレステロールを腸細胞の基底膜側に輸送する ABCA1 の遺伝子発現を抑制することを明らかにした。しかしながら、その詳細な ABCA1 遺伝子発現抑制機構は明らかとなっていない。そこで本研究では、小腸モデル Caco-2 細胞におけるラクトスタチンの媒介する新しいコレステロール吸収調節系を解明することを目的とした。
【方法】〈実験 1〉小腸上皮様に分化させた Caco-2 細胞に、コレステロールミセル（5mM タウロコール酸、250μM コレステロール）と 2mM ラクトスタチンを含む培地を 24 時間添加し、コレステロール代謝関連遺伝子（ABCA1、SR-B1、NPC1L1、ACAT2、MTP、ABCG5、ABCG8、CYP27A1）の mRNA レベルをリアルタイム定量 PCR 法により測定した。〈実験 2〉小腸上皮様分化 Caco-2 細胞に、コレステロールミセルと 2mM ラクトスタチンを含む培地を 48 時間添加し、ABCA1 タンパク質レベルをウエスタンブロット法により測定した。〈実験 3〉ヒト ABCA1 遺伝子プロモーターの長さを変化させたルシフェラーゼプラスミド（野生型-928～+107、欠損変異-536～+107 および-126～+107）を導入した小腸上皮様分化 Caco-2 細胞に、コレステロールミセルと 2mM ラクトスタチンを含む培地を 12 時間添加し、ABCA1 の遺伝子転写活性をルシフェラーゼアッセイにより測定した。〈実験 4〉5μM YM-254890（Gαq/11 タンパク質特異的阻害剤)により Gαq/11 タンパク質を特異的に阻害した小腸上皮様分化 Caco-2 細胞に、コレステロールミセルと 2mM ラクトスタチンを含む培地を 24 時間添加し、全 RNA を回収し、ABCA1 mRNA 発現をリアルタイム定量 PCR 法により測定した。
【結果】〈実験 1〉ラクトスタチン添加により、ABCA1、SR-B1、ACAT2、MTP、CYP27A1 の mRNA レベルは有意に低下した。〈実験 2〉ラクトスタチン添加により、ABCA1 タンパク質レベルは有意に低下した。〈実験 3〉ラクトスタチン添加により、野生型（-928～+107）および欠損変異（-536～+107、-126～+107）を含むプラスミドで ABCA1 の転写活性は有意に低下した。〈実験 4〉ラクトスタチンによる ABCA1 mRNA の誘導は、YM-254890 の添加によって抑制されなかった。

(1)Biochem.Biophys.Res.Commun., 281, 11-17 (2001)
(2)Biochem.Biophys Res.Commun., 352, 697-702 (2007)

lactostatin, cholesterol, ABCA1

講演番号：2B05a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ B 校舎 05 会場

LDL 受容体遺伝子発現を上昇させる食品成分の探索と作用機構解析

Screening and mechanism identification of food factor elevating LDL receptor activity

○落合 彩紗、宮田 慎吾、Shimizu Makoto、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農生科）
○Ayasa Ochiai, Shingo Miyata, Makoto Shimizu, Jun Inoue, Ryuichiro Sato (Univ. of Tokyo)

【目的】LDL 受容体は肝臓をはじめとして体内に広く存在し、血中 LDL の細胞内取込みを担う。血中 LDL の増加は動脈硬化のリスクファクターであることが知られており、LDL 受容体を活性化することは動脈硬化の予防・改善につながる。そこで、LDL 受容体の遺伝子発現を上昇させる食品成分の探索、およびその活性化メカニズムの解析を目的として研究を行なった。
【方法】LDL 受容体プロモーター領域(-595~+173)を含むレポーター遺伝子を恒常的に発現するヒト肝ガン由来細胞 Huh-7 細胞を使用し、およそ 140 種類の精製食品成分の中からプロモーター活性を上昇させる食品成分を探索した。LDL 受容体は SREBP(sterol regulatory element binding prptein)の活性制御を受けることが知られており、また今回用いたプロモーター領域には SRE(sterol regulatory element)が含まれていることから、食品成分によるプロモーター活性上昇が SREBP を介した経路であるかどうかについて、レポーターアッセイ、ウエスタンブロッティング、及びリアルタイム PCR によって検討した。さらに、今回見出した食品成分によって実際に LDL の細胞内取込みが上昇するかについて DiI-LDL を用いて検討を行なった。
【結果】アルカロイドに分類され、黒コショウの辛み成分である Piperine により、LDL 受容体のプロモーター活性が上昇した。Piperine によって SREBP 活性型は増加し、また活性上昇効果は LDL 受容体のプロモーター上の SRE への変異導入や SREBP のノックダウンで消失したことから、SREBP を介していると考えられる。さらに DiI-LDL の細胞内取込みが上昇していたことから、Piperine は LDL 受容体 mRNA の上昇にともない LDL 受容体を活性化し、抗動脈硬化活性を持つことが期待される。

LDLR, SREBP, Piperine

講演番号：2B05a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ B 校舎 05 会場

シナモン熱水抽出物は脂肪細胞での ACSL1 発現量を抑制して抗糖尿病作用を示す

Cinnamon extract improves abnormality in glucose tolerance by decreasing ACSL1 expression in adipocytes

○沈 燕[1]、小林 克也[1]、細野(深尾) 友美[2]、大嶋 みづき[1]、定村 祐加子[1]、高西 真貴子[1]、原田 彩絵子[1]、細野 崇[1]、関 泰一郎[1] ([1]日大生資科生命化、[2]お茶大生環研セ SHOKUIKU)
○Yan SHEN[1], Katuya Kobayasi[1], Tomoni Hosono-Fukao[2], Miduki Osima[1], Ukako Sadamura[1], Makiko Takanisi[1], Saeko Harada[1], Takasi Hosono[1], Taiitirou Seki[1] ([1]Nihon Univ., [2]Ochanomizu Univ.)

【目的】我々はシナモン熱水抽出物(CE)が脂肪細胞および筋管細胞において、グルコース輸送担体 GLUT4 の細胞膜への移行を促進し、グルコースの取り込みを増加させることによりインスリン非依存的に血糖を低下させることを明らかにした。本研究では、シナモン熱水抽出物の細胞内分子標的を明らかにする目的で培養脂肪細胞および 2 型糖尿病モデルマウスを用いて検討を行った。
【方法】成熟脂肪細胞に分化誘導した 3T3-L1 に CE を添加培養後、2 次元電気泳動法を用いて CE により変動するタンパク質を網羅的に解析した。また、CE および CE の標的分子に対して阻害剤の添加培養がグルコース取り込みに関する情報伝達系タンパク質のリン酸化レベル、脂質合成に関与する各種 mRNA の発現量に及ぼす影響について、Western blot 法および real-time PCR 法を用いて検討した。さらに、2 型糖尿病モデルマウス KK-Ay/TaJcl に CE を 8 週間経口投与し、耐糖能および脂肪組織での ACSL1 の発現量について検討した。
【結果】3T3-L1 脂肪細胞において、CE の添加培養特異的に出現する 45kDa のスポットを検出した。このスポットは LC-MS/MS 解析により acyl-CoA synthetase long-chain family 1 (ACSL1)と同定された。CE の添加培養時間と ACSL1 のタンパク質発現量について詳細に検討したところ、ACSL1 は CE 添加後経時的に減少した。2 次元電気泳動により検出された ACSL1 は CE の添加培養により断片化されたタンパク質であると考えられた。Fatty acid synthase や PPARγなどの mRNA 発現量は CE 添加群で減少した。一方、ACSL1 の阻害剤である Triacsin C や CE の添加培養は、グルコース取り込みに重要な役割を担っている AMPK シグナルを活性化した。2 型糖尿病マウスの脂肪組織における ACSL1 タンパク質の発現量は、非糖尿病マウスと比較して増加し、CE 投与群では減少した。
【考察】シナモンの脂肪細胞における、抗糖尿病作用の分子標的として、ACSL1 を同定した。CE は ACSL1 発現量を低下させると同時に AMPK シグナルを活性化し、グルコースの取り込みを促進させることにより 2 型糖尿病マウスの耐糖能異常を改善する可能性が明らかになった。ACSL1 の発現低下により脂質合成は抑制されるので、シナモンは 2 型糖尿病に対する肥満を誘発しない経口血糖降下薬としての応用が期待される。

Cinnamon, Diabetes, ACSL1

講演番号：2B05a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ B 校舎 05 会場

カルコンである cardamonin と flavokawain B は ERK の活性化を介して脂肪細胞分化を抑制する

The chalcones cardamonin and flavokawain B inhibit the differentiation of preadipocytes to adipocytes by activating ERK

○張 天順[1]、山本 憲郎[2]、芦田 均[1] ([1]神戸大院農、[2]ハウスウェルネスフーズ)
○Tianshun Zhang[1], Norio Yamamoto[2], Hitoshi Ashida[1] ([1]Kobe Univ, [2]House Wellness Foods Corporation)

【背景・目的】ポリフェノールは糖尿病や肥満を予防･改善する効果が期待されており、これまでに脂肪の蓄積や脂肪細胞の分化に及ぼす影響について報告されてきた。しかし、その作用機構は充分に解明されていない。そこで本研究では、3T3-L1 脂肪細胞を用いて脂肪蓄積を抑制するポリフェノールの探索を新たに行い、見出した有効な化合物の作用機構を解明することを目的とした。
【方法】有効化合物の探索には、cardamonin (CAR)と flavokawain B (FKB)を含む 46 種類のポリフェノールを用い、3T3-L1 脂肪細胞の脂肪蓄積に及ぼす影響を Sudan Ⅱ染色法で評価した。なお、CAR はショウガ科のソウズクやオオバンガジュツなどに、FKB はコショウ科のカバに含有される。実験にはソウズクから単離した CAR と化学合成した FKB を用いた。細胞生存率は、WST-1 試薬およびクリスタルバイオレット染色法を用いて測定した。脂肪細胞の分化については、ウェスタンブロッティングと RT-PCR 法を用いて、分化マーカーである C/EBPα、PPARγ ならびに GLUT4 の発現レベル、および PPARγ の上流である ERK のリン酸化レベルを調べた。
【結果・考察】評価した 46 種類の化合物のうち、CAR と FKB を含む 4 種の化合物が、5 μM で細胞毒性を示さず、3T3-L1 細胞における脂肪蓄積を有意に抑制した。特に、カルコンである CAR と FKB は脂肪蓄積抑制作用が強かった。そこで、CAR と FKB について作用機構を調べたところ、これらのカルコンは、脂肪細胞の分化マーカーである転写因子 C/EBPα と PPARγ の発現を mRNA とタンパク質レベルで抑制し、また、糖輸送担体 GLUT4 の発現をタンパク質レベルで抑制した。さらに、これらのカルコンは、ERK のリン酸化を濃度依存的に促進した。CAR と FKB による PPARγ の発現抑制と脂肪蓄積抑制は、ERK のリン酸化阻害剤である PD98059 によりキャンセルされた。以上の結果から、CAR と FKB は、ERK の活性化を介して、脂肪細胞の分化に関わる PPARγ と C/EBPα の発現を抑制し、その結果、細胞内の脂肪蓄積が減少することが判った。したがって、CAR と FKB は肥満の予防･改善に有効な食品因子であることが示唆された。

chalcone, adipocyte differentiation, adipocyte-specific transcription factors

講演番号：2B05a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ B 校舎 05 会場

ヒト肝細胞 HepG2 における短鎖脂肪酸の抗インスリン抵抗性作用の解明
Elucidation of anti-insulin-resistance action of short-chain fatty acids in human hepatocyte HepG2
○石井 恵、前田 歩海、赤川 貢（大阪府立大院生命環境科学）
○Megumi ISHII, Ayumi Maeda, Mitsugu AKAGAWA (Osaka Prefecture Univ. Grad. Sch. of Life & Environ. Sci.)

[目的] 2 型糖尿病は慢性高血糖を特徴とする疾患群であり、患者数の急増が世界中で社会問題化している。2 型糖尿病の最大の危険因子は肥満である。肥満状態では血中遊離脂肪酸濃度が上昇し、これに伴って発症するインスリン抵抗性が 2 型糖尿病の主因の一つとされている。一方、近年ヒトの健康と腸内環境の関係が注目されており、肥満状態では腸内細菌叢のバランスに破綻が生じていることが指摘されている。腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸は、肥満や糖代謝異常の改善作用を有することが示唆されており、生活習慣病の予防・改善への応用が期待されている。そこで本研究では、遊離脂肪酸が誘導するインスリン抵抗性の発症メカニズムを解析するとともに、インスリン抵抗性の発症に対する短鎖脂肪酸の効果を検証した。
[方法と結果] 始めに、血中の主要な遊離脂肪酸が HepG2 ヒト肝臓細胞のインスリンシグナリングに及ぼす影響を調べた。その結果、パルミチン酸（Pal）が最も顕著にインスリン処理によるインスリン受容体（IR)、インスリン受容体基質-1（IRS-1)および Akt の活性化を抑制することが明らかになった。同時に、Pal はこれらのタンパク質レベルを顕著に低下させたことから、そのメカニズムの解明を試みた。発現解析の結果から、Pal は mRNA レベルに影響を及ぼさないことが判明した。一方、プロテアソーム阻害剤である MG132 の存在下では IR、IRS-1 および Akt の減少が抑制された。しかしながら、MG132 を添加してもこれらシグナルタンパク質のリン酸化レベルは回復しなかった。そこで、ユビキチン活性化酵素 E1 阻害剤の PYR41 を用いて同様に実験を行ったところ、PYR41 の添加により IR、IRS-1 および Akt のリン酸化レベルが回復することが明らかになった。以上の結果から、Pal はインスリンシグナルタンパク質のユビキチン化を促進することでそれらの分解を誘導し、インスリン抵抗性を引き起こす可能性が示唆された。次に、Pal が惹起するインスリン抵抗性に対する短鎖脂肪酸の効果を検証したところ、酢酸、プロピオン酸および酪酸の共存下では、インスリン抵抗性の誘導が抑制された。また、短鎖脂肪酸は Pal による細胞死や脂肪蓄積には影響を及ぼさないが、インスリンシグナルタンパク質の分解を有意に抑制することが明らかになった。さらに、短鎖脂肪酸の共存によって Pal が亢進する HepG2 細胞の糖新生が有意に低下したことから、短鎖脂肪酸は肝臓細胞のインスリン抵抗性の発症を抑制することで２型糖尿病を予防する可能性が示唆された。

insulin resistance, free fatty acid, short-chain fatty acid

講演番号：2B05a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ B 校舎 05 会場

エミューオイルが 3T3-L1 脂肪細胞の脂質代謝に及ぼす影響

The effect of Emu oil on lipid metabolism in 3T3-L1 adiposite

○永田 もも子、加藤 由麻、妙田 貴生、藤森 嶺、戸枝 一喜、桜井 智野風、西澤 信（東農大・生物・食香）
○Momoko NAGATA, Yuma KATO, Takao MYODA, Takane FUJIMORI, Kazuki TOEDA, Tomonobu SAKURAI, Makoto NISHIZAWA (tokyo Univ. of Agric.)

【目的】

エミューは、ヒクイドリ目エミュー科のオーストラリアに生息する大型の走鳥類で、食物が豊かな時期には多くの脂肪を蓄えるという性質を持つ。このオイルは、古来よりアボリジニーの常備薬として利用された歴史を有し、抗炎症作用があると報告されている。演者らは、ラットに経口投与することで脂質代謝改善作用のあることを見出し、この効果にはオイル中の不ケン化物が関与することを示唆している。さらに、エミューオイル不ケン化物に特有の成分があることを報告した。そこで本研究では、エミューオイル不ケン化物の脂質代謝改善作用をマウスの脂肪前駆細胞 3T3-L1 により評価した。

【材料および方法】

エミューオイルより常法に従って不ケン化物を調製した。これを Inertsil C8-3 カラムを用いた分取 HPLC で分画した。細胞実験には、マウスの脂肪前駆細胞 3T3-L1 を用いた。培養液に不ケン化物あるいは各画分を最終濃度 10 μg/ml（不ケン化物当量）になるよう添加し、脂肪分解能と脂肪蓄積量の程度を測定した。脂肪分解能の測定は分化誘導から 9 日目の脂肪細胞に各分画と Isoproterenol の添加を行い、24 時間後培地へ放出されたグリセロール量を測定して評価した。脂肪蓄積量は Oil Red O 染色により、細胞内に蓄えられた TG の量を比色法により評価した。

【結果および考察】

エミューオイル不ケン化物に 2 種類の特有成分（E1 および E2）が確認できたことから、不ケン化物を分取 HPLC により 7 つの画分に分画した。これらの画分を 3T3-L1 細胞の培養液に添加し、細胞内に蓄積される TG の量を比較したところ、E2 を含む画分を添加した細胞において TG の蓄積量が減少した。脂肪分解反応も同様に比較したところ、E2 を含む画分で脂肪分解反応が促進されていることが認められた。以上より、エミューオイルの脂質代謝改善作用は不ケン化物に含まれる E2 に起因する効果であることが示唆された。なお、脂肪分解促進の作用機序を検討したところ、エミューオイルはアドレナリンアゴニストとしてではなく、細胞の脂質代謝経路に影響を及ぼしていると推察された。

Emu oil, 3T3-L1, lipolysis

講演番号：2B05a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ B 校舎 05 会場

培養筋細胞におけるロスマリン酸の脂肪酸代謝促進作用

The effect of rosmarinic acid on fatty acid metabolism in cultured myotubes

○阿部 大吾、齋藤 武、野方 洋一（農研機構　近中四農研）
○Daigo ABE, Takeshi SAITO, Yoichi NOGATA (NARO WARC)

【目的】

近年、食生活の欧米化に伴い、生活習慣病やメタボリックシンドロームが社会問題となっている。これらの病態には肥満が深く関わっており、摂取エネルギー過多が主要因として挙げられる。骨格筋は人体最大の組織であり、エネルギー(脂質)代謝において重要な役割を果たしている。骨格筋は運動などにより脂質代謝を促進することが知られているが、食品成分により同様の作用を亢進できれば、生活習慣病やメタボリックシンドロームの予防・改善に役立つと考えられる。我々は培養筋細胞を用いて脂肪酸代謝を促進する食品成分の探索を行い、シソ科植物に含まれるロスマリン酸を見出した。そこで本研究ではロスマリン酸の脂肪酸代謝促進作用について作用機序の解析を行うことを目的とする。

【方法及び結果】

マウス筋芽細胞 C2C12 を 2%ウマ血清で培養することにより筋管細胞へと分化させ、脂肪酸酸化試験に用いることとした。分化した筋管細胞は、無血清培地で数時間培養した後、試験化合物及びパルミチン酸を含む 2% BSA DMEM を加え培養した。20 時間後、培養上清を試験化合物および[^{3}H]-パルミチン酸を含む 2% BSA DMEM に交換し、プレートシールで密閉後、4 時間インキュベートした。培養上清はトリクロロ酢酸を加え遠心することで、タンパク及び脂肪酸を除去するとともに、活性炭・ガラス繊維フィルターで濾過した。得られた ^3H_2O を含む水を中和し、液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定することで脂肪酸酸化活性とした。上記の培養 20 時間後に、細胞ライセートを回収し、ウエスタンブロット分析に供試した。同様に total RNA を回収し、逆転写により cDNA を合成し、リアルタイム PCR に供試した。

様々な濃度のロスマリン酸を処理すると 30μM で最も脂肪酸代謝が高くなり、濃度依存的作用が確認された。またロスマリン酸は ACADL mRNA 発現を増加させており、AMPKαのリン酸化も促進していた。

myotube, fatty acid metabolism, rosmarinic acid

講演番号：2B05a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ B 校舎 05 会場

食餌脂肪酸の腸内細菌代謝物摂取は肥満に伴う代謝異常症を改善する

Fatty acid metabolites by gut microorganisms improve obesity-induced metabolic abnormalities

○古薗 智也[1]、山國 加成衣[1]、金 英一[1]、キム ミンジ[1]、西村 哲[1]、滝野 晃將[1]、後藤 剛[1,2]、北村 苗穂子[3]、朴 時範[3]、岸野 重信[3]、小川 順[2,3]、高橋 信之[1,2]、河田 照雄[1,2]（[1]京大院農・食品生物、[2]京大　生理化学研究ユニット、[3]京大院農・応用生命）

○Tomoya FURUZONO[1], Kanae YAMAKUNI[1], Young-II KIM[1], Minji KIM[1], Akira NISHIMURA[1], Akihiro TAKINO[1], Tsuyoshi GOTO[1,2], Nahoko KITAMURA[3], Si-Bum PARK[3], Shigenobu KISHINO[3], Jun OGAWA[2,3], Nobuyuki TAKAHASHI[1,2], Teruo KAWADA[1,2] ([1]Div. Appl. Life Sci. Grad. Sch. Agric. Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ. Research Unit for Physiological Chemistry, [3]Div. Food Sci. Biotech. Grad. Sch. Agric. Kyoto Univ.)

【背景・目的】

過栄養・運動不足を背景とする肥満および肥満に伴う代謝異常症の増加は世界的な健康問題となっている。リガンド要求性の核内受容体型転写因子、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体（PPARs）は生体の糖・脂質代謝調節において重要であり、その活性化は代謝異常症改善作用を示すことが知られている。PPARs のファミリー共通のリガンドとして脂肪酸が知られている。我々は最近、腸内細菌叢に存在する乳酸菌が水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸、部分飽和脂肪酸、共役脂肪酸を始めとする多彩な脂肪酸を産生することを明らかにしたが、これらの食餌脂肪酸の乳酸菌代謝物と PPARs 活性化能の関係、およびその生理機能については未解明な部分が多い。そこで、本研究では食餌脂肪酸乳酸菌代謝物の PPARs 活性化作用とその機能について検討を行った。

【方法・結果・考察】

PPARs 活性化作用について、培養細胞を用いたレポーターアッセイにより評価したところ、食餌脂肪酸乳酸菌代謝物の多くは強い PPARα 活性化能を示した。またいくつかの食餌脂肪酸乳酸菌代謝物は PPARγ に対しても強い活性化能を示した。PPARα、PPARγ 共に強く活性化するリノール酸由来の代謝物、10-keto-12c-18:1（ketoA)に着目し、肥満・糖尿病モデル動物である KK-Ay マウスに対する４週間の混餌投与を行った。0.1% ketoA 摂取群において、体重増加・体脂肪蓄積抑制作用が認められ、摂取開始２週目以降に血糖値の上昇抑制が認められた。また、血中中性脂肪量の低下も認められた。0.1% ketoA 摂取群では酸素消費量の増大が認められたため、褐色脂肪組織などにおいてエネルギー消費に重要な、脱共役たん白質 1（UCP1）発現量について検討したところ、ketoA 摂取群において、褐色脂肪組織、鼠径部白色脂肪組織における UCP1 発現量の増加が認められ、ketoA 摂取は UCP1 発現上昇を介した熱産生を亢進させることが示唆された。

以上の結果から、ketoA は PPARα、PPARγ に対する強い活性化作用を有しており、ketoA 摂取は肥満に伴う代謝異常症の予防・改善作用を示すことが示唆された。

obesity, UCP1, PPARs

講演番号：2B05a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ B 校舎 05 会場

食事共役リノール酸による卵巣摘出雌性ラットにおける肥満予防効果の検証

Verification of anti-obese effect by dietary conjugated linoleic acid in ovariectomized rats

小山 庸子、小栗 幹也、高橋 彩、○長田 恭一（明治大・農・農化）
Youko Oyama, Mikiya Oguri, Aya Takahashi, ○Kyoichi Osada (Meiji Univ.)

【目的】卵巣を摘出した閉経後肥満発症モデルラットに、共役リノール酸を摂取させた場合の肥満予防効果を検証した。
【方法】5 週齢の Wistar 系雌性ラットを 1 週間予備飼育した後、卵巣摘出手術(対照は偽手術)を行った。さらに、3 週間の予備飼育の後、卵巣を摘出した群を食餌により 2 群に分けた。以降の食餌では、対照には AIN76 純化飼料を、摘出群には純化飼料あるいは、同飼料に共役リノール酸を 1%添加した飼料を与えて飼育した。飼育 55 日目に腹部動脈より採血死させ、肝臓、腎臓、盲腸、皮下脂肪組織、内臓脂肪組織(卵巣周囲、腎臓周囲、腸間膜)を採取し、脂質代謝に関わるパラメーターを測定した。
【結果】対照群と比べて、卵巣摘出群は体重が有意に増加したが、共役リノール酸を摂取した群では卵巣摘出群と比べ体重に大きな変化は認められなかった。しかし、子宮周囲の白色脂肪組織を含めた内臓脂肪重量は、共役リノール酸の摂取により有意に低くなった。また、血中グルコース濃度、血中および肝臓トリグリセリド濃度は、対照群と比べて卵巣摘出群で有意に高くなったが、共役リノール酸摂取群では卵巣摘出群に比べて有意に低くなった。このことから、共役リノール酸の摂取により、卵巣摘出による炭水化物代謝および脂質代謝の変動が制御されているのではないかと考えられる。現在、肝臓の脂質代謝に関連する各酵素の活性を測定し、共役リノール酸の肥満予防効果の作用メカニズムを検討している。

conjugated linoleic acid, anti-obese, rat

講演番号：2B05a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ B 校舎 05 会場

腹部大動脈瘤発症に及ぼす n-3 系高度不飽和脂肪酸の影響評価

Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on the onset of abdominal aortic aneurysm

○久後 裕菜[1]、毛利 陽平[1]、柳本 賢一[2]、韓 力[2]、財満 信宏[1]、森山 達哉[1] ([1]近畿大農、[2]日本水産株式会社生活機能科学研究所)
○Hirona KUGO[1], Youhei MOURI[1], Kenichi YANAGIMOTO[2], Riki KAN[2], Nobuhiro ZAIMA[1], Tatsuya MORIYAMA[1] ([1]Kinki Univ., [2]Nissui Co.)

【目的】腹部大動脈瘤(Abdominal Aortic Aneurysm; AAA)は、腹部大動脈の進行的な拡張を主病変とする疾患であり、有効な薬物療法や予防法は確立されていない。血管が拡張する機構については完全には明らかにされていないが、血管壁の炎症による脆弱化が関与していると報告されている。エイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)などの n-3 系高度不飽和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids; PUFA)は魚油に多く含まれ、抗炎症作用を有する。本研究は、AAA 形成に及ぼす n-3 系 PUFA の影響を評価することを目的とした。
【方法】SD ラット(6 週齢、オス)を 1 週間予備飼育した後、n-3 系 PUFA 群には n-3 系 PUFA 高含有魚油(1.2g/kg/day)、コントロール群にはトリオレイン(1.2g/kg/day)を経口投与した。投与開始 1 週間後、両群に腹部大動脈結紮処置を施した。4 週間投与を続けた後に、形成された腹部大動脈瘤径を計測した。その後、腹部大動脈はパラホルムアルデヒド(PEA)固定後に凍結し、クライオスタットで 10μm 切片とした。作成した切片は、ヘマトキシリンエオジン(HE)染色、エラスチカワンギーソン(EVG)染色、ピクロシリウスレッド(PSR)染色、免疫組織化学染色で病理評価した。
【結果】n-3 系 PUFA 群で血管径の拡張は抑制されていた。病理染色により、n-3 系 PUFA 群で血管壁の肥厚は抑制されていることが分かった。それぞれの投与群で弾性線維の破壊が観察されたが、n-3 系 PUFA 群で弾性板が保持される傾向にあり、膠原繊維陽性面積は n-3 系 PUFA 群でコントロール群と比べて高値を示した。肥厚部におけるマトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase; MMP)-2、MMP-9、マロンジアルデヒド(malondialdehyde; MDA)の陽性部位の総面積は n-3 系 PUFA 群でコントロール群と比べて低値を示した。
n-3 系 PUFA により、血管壁において MMP-2、9 減少、弾性線維・膠原繊維分解抑制および形状保持などがなされた結果、血管の拡張が抑制されたと考えられる。本研究において、n-3 系 PUFA が AAA 発症や進行を抑制する効果があると示唆され、今後の AAA 予防法の確立に繋がることが期待される。

abdominal aortic aneurysm, n-3 polyunsaturated fatty acids, eicosapentaenoic acid

講演番号：2B05a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ B 校舎 05 会場

エイコサペンタエン酸８位および９位炭素への水酸基導入はペルオキシソーム増殖因子活性化受容体に対するリガンド活性を増強する

Hydroxylation of eicosapentaeic acid at the C-8 or C-9 position increases ligand activity of peroxisome proliferator-activated receptors.

○山田 秀俊[1]、菊地 明香[1]、箱崎 真友佳[1]、高橋 秀行[1]、木村 賢一[2] ([1]岩手生物工学研究センター、[2]岩手大学)
○Hidetoshi Yamada[1], Sayaka Kikuchi[1], Mayuka Hakozaki[1], Hideyuki Takahashi[1], Ken-ichi Kimura[2] ([1]IBRC, [2]Iwate Univ.)

必須栄養素である脂質は、主要なエネルギー源や細胞膜の構成成分、ホルモン等の生理活性物質として機能する恒常性維持分子である。他方、過剰蓄積は肥満症を引き起こし、糖尿病や心血管障害、がんなど様々な疾患の原因となることから、健康維持には脂質の摂取と合成、分解のバランスが重要である。過剰に摂取された脂質は主に脂肪組織に運ばれるが、それらの分解を制御するのがペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）である。核内受容体であるPPARは、不飽和脂肪酸や脂肪酸代謝物をリガンドとして認識し、脂質代謝に関わる遺伝子群の発現を増強することで、脂質分解、アディポネクチン産生、糖の取り込みを促進させる。即ち、PPARのリガンド依存的な活性化は、肥満を代表とする脂質異常の予防・治療の鍵となっている。

食事に含まれる多価不飽和脂肪酸（PUFAs）による健康増進作用は数多く報告され、ゴマやオリーブ、魚などがPUFAsの供給源として利用されている。オキアミにもエイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサヘン酸（DHA）が豊富に含まれており、オキアミ油においても魚油と同様に、抗炎症効果や脂質異常症の改善効果が報告されている。オキアミの機能性成分としては脂質成分が注目されることがほとんどであるが、我々はこれまでに、ツノナシオキアミ水溶性抽出物（WEPAK）摂取による肥満抑制効果を報告した（Sadzuka *et al.* Biol. Pharm. Bull, 2012）。WEPAK摂取マウスにおいて、体重増加の抑制と共に、肝臓中の中性脂肪値の低下と脂肪酸β酸化関連遺伝子群の発現増加が観察されたことから、WEPAK中の化合物がPPARリガンドとして機能していると考え、研究を行った。

PPAR リガンド活性を指標にツノナシオキアミ（乾燥）中の活性化因子を精製し、水酸化エイコサペンタエン酸（5-, 8-, 9-, 12-, 18-HEPE）を同定した。オキアミから単離した HEPE およびエイコサペンタエン酸（EPA）の活性を比較した結果、8-HEPE および 9-HEPE において EPA より高い PPAR リガンド活性が観察された。この結果は、EPA の 8 位もしくは 9 位炭素への水酸基導入が PPAR リガンド活性の増強に働くことを示唆しており、非常に興味深い。高い PPAR リガンド活性を有する 8-HEPE および 9-HEPE は脂質異常症や肥満症などの疾患に対する効果が期待されるため、医薬分野および機能性食品分野での活用が期待される。

peroxisome proliferator-activated receptors, hydroxy-icosapentaenoic acids, krill

講演番号：2B05a17
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ B 校舎 05 会場

低脂肪高炭水化物食と等カロリーの高脂肪低炭水化物食がエネルギーおよび脂質代謝に与える影響 -SD ラット-7% vs 21%ラード食-

Effects of isocaloric low-fat-high-carbohydrate and high-fat-low-carbohydrate diets on energy and lipid metabolism in SD rats

小川 望美、○井上 奈穂、池田 郁男（東北大院農）
Nozomi OGAWA, ○Nao INOUE, Ikuo IKEDA (Tohoku Univ.)

【目的】一般的に、飽和脂肪酸の多い高脂肪食は肥満を誘発すると信じられている。動物試験でも、高飽和脂肪食を与えて肥満させ、機能性食品成分を摂取させ影響を調べる試験が多く行われている。しかし、高脂肪食は高カロリー食でもあり、高脂肪のために肥満しているかどうかは判然としない。本研究では、カロリーの違いの影響を排除するため、等カロリー条件下で低脂肪高炭水化物食および高脂肪低炭水化物食をラットに与え、影響を調べた。
【方法】5 週齢雄性 SD ラットを大豆油 7%含有 AIN-93G 基準食で 1 週間馴化したのち、平均体重が等しくなるように 2 群に群分けした。各群に脂肪源としてラードを 7%添加した「低脂肪高炭水化物食（7L 群)」、ラードを 21%添加し等カロリーとなるように炭水化物量を減らした「高脂肪低炭水化物食（21L 群)」をそれぞれ与え、短期（4 週）あるいは長期（9 週）飼育した。飼育終了後、絶食せずに屠殺を行い、血液を採取し、各種臓器を摘出し、分析に供した。本試験開始直後および飼育 3 週目あるいは 7 週目に生体ガス質量分析計を用いて呼気ガス測定を 24 時間行い、エネルギー消費量、炭水化物消費量、脂肪消費量を算出した。
【結果】短期飼育、長期飼育いずれにおいても、飼育終了後の終体重および摂食効率は 21L 群で有意に高い値を示した。肝臓重量および内臓脂肪重量に群間で差は認められなかった。21L 群は 7L 群と比較し、脂肪消費量が有意に高く、炭水化物消費量は有意に低かったが、総エネルギー消費量には差はなかった。短期飼育において、21L 群は 7L 群と比較し、血清トリアシルグリセロール（TAG）濃度は有意に低い値を示し、肝臓 TAG 濃度は有意に高い値を示した。一方、長期飼育においては、血清および肝臓 TAG 濃度に群間で差はなかった。肝臓の脂肪酸生合成系酵素である Fatty acid synthase 活性は短期飼育、長期飼育いずれも、21L 群で顕著に低い値を示した。β酸化系酵素活性においては、Acyl-CoA oxidase 活性に差はなく、Carnitine palmitoyltransferase 活性が短期飼育時の 21L 群でわずかに高い値を示したのみであった。
【結論】短期飼育、長期飼育いずれにおいても、終体重および摂食効率が高かったものの、内臓脂肪重量に差がなかったことから、等カロリー条件下では高脂肪食摂取であっても、成長が促進されるのみで肥満は誘導されない可能性が示唆された。

obesity, high fat diet, energy metabolism

講演番号：2B05p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ B 校舎 05 会場

高イソフラボン大豆の摂取がラットの脂質代謝に及ぼす影響

Effect of high-isoflavone soybean on lipid metabolism in rats

○高橋 陽子、渡辺 純、石川（高野） 祐子（農研機構食総研）
○Yoko TAKAHASHI, Jun WATANABE, Yuko TAKANO-ISHIKAWA (NARO-NFRI)

【目的】イソフラボンは、大豆の脂質代謝改善作用に関わる食品成分の一つとして考えられており、細胞や遺伝子発現レベルの作用メカニズムが解明されつつある。しかし、ヒトや動物レベルでは、イソフラボンを摂取しても脂質代謝が改善しなかったとの報告もある。イソフラボンの脂質代謝改善作用にはまだ不明な点が多いが、精製物ではなく、大豆や大豆食品に含まれる形でイソフラボンを摂取することにより、脂質代謝改善に寄与する可能性が考えられる。本研究では、イソフラボン含有量が高い大豆を摂取したときの脂質代謝改善作用を解明するため、ラットを用いた実験系で評価した。

【方法】カゼインをタンパク質源（200 g/kg diet）とした食餌をコントロール食とした。その食餌タンパク質の一部を、一般的な大豆（フクユタカ）または高イソフラボン大豆（ゆきぴりか）に含まれるタンパク質と置き換えた食餌を調製し、いずれかの食餌を雄 SD ラットに 21 日間自由摂食させた。各食餌の脂質および食物繊維量は、100、および 50 g/kg となるように、パーム油およびセルロースで調整した。飼育期間終了後、血清、肝臓、糞中の脂質濃度と、肝臓の脂質代謝関連酵素の活性および遺伝子発現量を測定した。

【結果と考察】血清イソフラボン濃度は、高イソフラボン大豆食群で一般的な大豆食群よりも有意に上昇し、摂取した大豆中のイソフラボン量が反映されていた。コントロール食群と比べ、大豆食を摂取した群で、肝臓の中性脂肪濃度および肝臓と血清の総コレステロール濃度は有意に低下したが、大豆の品種間で差は認められなかった。糞中の総脂質は、大豆食摂取群で有意に増加した。大豆食摂取群では、品種にかかわらず肝臓での脂肪酸合成系酵素の活性および遺伝子発現量が有意に低下した。肝臓の脂肪酸酸化系においては、転写調節因子である PPARα の遺伝子発現量が、高イソフラボン大豆食群でコントロール食群や一般的な大豆食群と比べて上昇した。しかし、脂肪酸β酸化系酵素の活性や遺伝子発現量には、PPARα の発現量増加があまり反映されていなかった。以上の結果から、高イソフラボン大豆は、肝臓での脂肪酸β酸化を促進することが示唆されたが、本研究では血中や肝臓の脂質濃度低下作用はほとんど見られなかった。一方、肝臓での脂肪酸合成抑制など、その他の脂質代謝改善作用は、一般的な大豆とほぼ同等であった。

soybean, isoflavone, lipid metabolism

講演番号：2B05p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ B 校舎 05 会場

Flavan 3-ols 単回投与のエネルギー代謝亢進メカニズムの解明

Elucidation of the energy expenditure enhancement activity of flavan 3-ols

○松村 優介、見米 克之、神尾 直哉、工藤 直人、越阪部 奈緒美（芝浦工業大学）
○yusuke matsumura, katsuyuki mikome, naoya kamio, naoto kudo, naomi osakabe (Shibaura Inst. of Tech.)

【目的】ダークチョコレートの摂取がメタボリックシンドロームのリスクファクターである血圧・血糖値・脂質異常を改善することが介入試験結果より明らかとなっているが、その作用メカニズムについては未だ不明な点が多い。我々はこれまでに、catechin およびその重合物を含む flavan 3-ols 画分をマウスに単回投与した 2 時間後に血中カテコールアミン濃度が有意に上昇し、エネルギー代謝が亢進することを見出している。そこで、本研究ではその作用の詳細を明らかにするため、エネルギー代謝亢進因子の推移を RT-PCR 法及び Western Blotting 法にて検討することとした。
【方法】ICR 系雄性マウスを 2 群に分け、16 時間の絶食後、対照群には精製水を、flavan3-ols 群には flavan 3-ols(10mg/kg)を経口投与した。投与後 20 時間の酸素消費量・二酸化炭素排出量を自発運動計測装置を搭載した小動物用呼気分析装置 MK-5000RQ（室町機械社製）を用いて分析し、Weir の式を用いてエネルギー消費量を算出した。また、呼気分析と同様な条件で精製水または flavan 3-ols の経口投与前、経口投与 2、5、20 時間後に採血及び解剖を実施し褐色脂肪組織、骨格筋等を採取した。さらに採取した褐色脂肪組織における UCP-1 及び PGC-1α、骨格筋における UCP-3 mRNA 発現量を RT-PCR 法にて、また骨格筋における AMPK のリン酸化を Western Blotting 法にて定量した。
【結果】呼気分析の結果、対照群と比較して flavan 3-ols 群で酸素消費量・二酸化炭素排出量・エネルギー消費量が有意に上昇した。また、褐色脂肪組織中における UCP-1 及び PGC-1α mRNA 発現量は投与 2 時間後で、また骨格筋における UCP-3mRNA 発現量は投与 2 時間及び 5 時間後で対照群と比較して flavan 3-ols 群にて有意に上昇した。さらに骨格筋におけるリン酸化 AMPK 発現量は投与 2 時間及び 5 時間後に対照群と比較して flavan 3-ols 群で有意に上昇した。
【結論】Flavan 3-ols を単回投与した場合、褐色脂肪組織中における熱酸性タンパク質である UCP-1 及び脂質代謝におけるキーファクターである PGC-1α mRNA 発現量を上昇した。また骨格筋におけるリン酸化 AMPK の発現量及び UCP-3mRNA 発現量を上昇させることが明らかとなった。これらのことから flavan 3-ols は熱産生および脂質代謝亢進を介して総エネルギー消費量を亢進することが示唆された。また、先行研究結果より flavan 3-ols 単回投与は投与 2 時間後に血中カテコールアミン濃度を上昇させることから、褐色脂肪組織及び骨格筋における β2・β3 アドレナリン受容体を介してこれらの作用が発現することが推測された。

flavan 3-ols, energy metabolism, metabolic syndrome

講演番号：2B05p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ B 校舎 05 会場

コレステロールを給餌したラットに対する Oligonol の脂質代謝調節作用

Effect of daily oral administration of Oligonol on lipid metabolism in rats fed cholesterol

○日野原 顯[1]、鈴木 ひかる[1]、林 洪太[1]、長田 恭一[1]、北舘 健太郎[2] ([1]明治大院農、[2]アミノアップ化学)
○ Ken HINOHARA[1], Hikaru SUZUKI[1], Kouta HAYASHI[1], Kyoichi OSADA[1], Kentarou KITADATE[2] ([1]Meiji Univ., [2]Amino Up Chemical)

＜目的＞

プロシアニジン化合物を低分子化して生体吸収率を高めた Oligonol の脂質代謝調整作用について、コレステロール添加食(5%)をラットに与えた場合の効果を検証した。

＜方法＞

6 週齢の Wistar 系雄性ラットに、コーン油 5 %を含む AIN76 純化飼料を与えて 14 日間飼育した群を C 群、飼料にコレステロールを 5%添加した群を H 群、また、H 群の中で給餌 2 時間後に Oligonol を 1000 mg/kg B.W.のレベルで経口投与した群を O 群とした。なお、C 群と H 群には生理食塩水を経口投与した。飼育後、エーテル麻酔を施して動脈より採血死させて種々の脂質パラメータを測定した。

＜結果＞

体重は、C 群と比べて HO 群は減少傾向を示した。体重増加量は、HO 群は C 群よりも有意に低くなり H 群と比べて減少傾向を示した。体重 100 g 当たりの肝臓重量は、C 群よりも H 群は有意に高くなった。体重 100 g 当たりの内臓脂肪重量は、C および H の両群よりも HO 群は有意に低くなった。血漿コレステロール濃度は C および H 群と比べて O 群は有意に低くなった。肝臓コレステロール濃度は、C 群と比べて H および O の両群は有意に高くなったが、H 群よりも O 群は有意に低くなった。動脈硬化指数値は、C 群と比べて H 群は有意に高くなったが、O 群は H 群よりも有意に低くなった。血漿トリグリセリド濃度に有意な変化はなかったが、肝臓トリグリセリド濃度は、C 群よりも H 群は有意に高くなったが、H 群と比べて O 群は有意に低くなった。

＜考察＞

血漿コレステロール濃度は腸管からのコレステロール吸収および肝臓でのコレステロール生合成の変動に影響されるが、本研究結果については、Oligonol によるコレステロールの吸収阻害による効果が大きかったと思われる。また、吸収された Oligonol の代謝産物による影響も考えられるので、肝臓のコレステロール代謝に関する酵素の遺伝子発現については現在検討中である。

次に、肝臓のトリグリセリド濃度の変化については、Oligonol による脂肪吸収阻害作用の影響が大きいと考えられた。また、Oligonol の代謝産物による肝臓での脂肪酸代謝調節作用も生じていると思われるので、脂肪酸代謝酵素の遺伝子発現についても検討している。

Oligonol, cholesterol, rat

講演番号：2B05p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ B 校舎 05 会場

コレステロール酸化物（COP）がラットの代謝に与える影響

The Effect of Cholesterol Oxidation Products (COP) on Metabolism in Rats

○多田 篤生[1]、小川 真奈[2]、加藤 久典[2]、小林 彰子[2] ([1]東大農、[2]東大院農生科・応生化)
○Atsuki TADA[1], Mana OGAWA[2], Hisanori KATO[2], Shoko KOBAYASHI[2] ([1]Univ. Tokyo, [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo)

【目的】コレステロールの過剰摂取は動脈硬化や虚血性心疾患等の様々な病気を引き起こすことが知られている。近年、食品の調理・加工過程においてコレステロールの加熱によって生成されるコレステロール酸化物（cholesterol oxidation products; COP）が生体に悪影響を及ぼす可能性が報告されている。しかしながら、COP 摂取が生体に与える影響については不明な点が多い。本研究では、COP を摂取させたラットの肝臓を用いたトランスクリプトミクスにより COP が生体代謝に与える影響を解明することを目的とした。
【方法】COP は長田らの方法により、200℃で 6～12 時間加熱し作製した。加熱した COP の組成は薄層クロマトグラフィー（TLC）および LC-MS/MS で測定した。7 週齢の Wistar 系雄性ラットを用い、AIN93G を基本とした普通食群、0.3%コレステロール負荷食群、0.3%COP 負荷食群に分けて 21 日間自由摂食にて飼育した。1 日目、3 日目、10 日目、17 日目、および 21 日目に尾採血を行い、血中コレステロールおよびトリグリセリド（TG）を測定した。22 日目に解剖し、血液および肝臓を採取した。肝臓においてもコレステロールおよび TG を測定すると共に、total RNA を抽出し DNA マイクロアレイに供した。
【結果および考察】COP の組成は TLC により約 50%がコレステロール、約 50%がコレステロール酸化物と推察された。ラットの血中および肝臓のコレステロール濃度は、コレステロール食群＞COP 食群＞普通食群の順で高い傾向が見られた。一方 TG 濃度に関しては、血中では COP 食群がコレステロール食群よりも高く、肝臓ではコレステロール食群が COP 食群よりも高い傾向が見られた。肝臓 RNA のマイクロアレイ解析では、COP 食群とコレステロール食群は共に普通食群と比べてコレステロール合成経路および脂肪酸合成経路の遺伝子が低下していた。この理由として、コレステロール負荷食により血中および肝臓でのコレステロールおよび TG 濃度が上昇したため、肝臓における脂質代謝遺伝子が低下したことが考えられた。また、脂肪酸経路の遺伝子である *FASN（Fatty acid synthase）* は、コレステロール食群よりも COP 食群において発現低下の度合いが大きかった。さらに COP には肝臓における脂肪酸合成経路遺伝子の発現を低下させ、肝臓 TG 濃度を低下させる作用があることが示唆された。現在、マイクロアレイデータの詳細な解析を行っている。

cholesterol oxidation products, cholesterol, DNA microarray

講演番号：2B05p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ B 校舎 05 会場

胆汁を介さない小腸からのコレステロール排泄に影響する因子
Factors affecting direct cholesterol excretion in the intestine

村田 みのり、荒井 達也、船山 明日和、井上 奈穂、○池田 郁男（東北大学院農）
Minori Murata, Tatsuya Arai, Asuwa Funayama, Nao Inoue, ○Ikuo Ikeda (Tohoku Univ.)

【目的】体内からのコレステロール排泄の主要経路として、胆汁経路が知られている。すなわち、肝臓から胆汁を介して小腸内腔へ分泌され、糞便へと排泄される経路である。しかし近年、胆汁へのコレステロール分泌機能を損なったマウスでも、ある程度の糞中コレステロール排泄が見られる報告などから、コレステロール排泄には胆汁を介さない非胆汁経路が存在することが報告されている。しかし、未だこの経路の詳細は明らかではない。本研究では、ラットを用いて非胆汁経路を介したコレステロール排泄を測定する試験方法を確立し、この経路と胆汁経路のコレステロール排泄量の比較を行うことで非胆汁経路の重要性を明らかにすることを目的とした。そのため、非胆汁経路でのコレステロール排泄に影響する可能性の高い因子で試験することとした。コレステロール排泄のトランスポータである ATP-binding cassette transporter (ABC) G5/ABCG8 の発現を亢進する liver X receptor　agonist（T0901317(T0)）およびコレステロール排泄の亢進が予想される高コレステロール食の影響を調べた。
【方法】ソムノペンチル麻酔下、雄性 SD ラットの胆管にカニューレを挿入した後、十二指腸上部および回腸末端にチューブを挿入した。生理食塩水を十二指腸上部から注入し、回腸末端から小腸内容物を除去後、コレステロールアクセプタとなる胆汁酸含有液を注入した。腹部を閉じ、一定時間置いた後、再度麻酔し脱血後、小腸を取り出し、胆汁酸含有液を小腸内腔に注入し、小腸内腔液を集めた。試験中は同時に胆汁を採取した。胆汁及び小腸内腔液中のコレステロール量を測定した。摂食試験では、T0 摂取の有無、および、高コレステロール食摂取の有無の影響を調べた。
【結果】この試験方法で、小腸内腔液中にコレステロールが検出された。胆汁へのコレステロールの分泌は経時的に増加したが、小腸内腔液中のコレステロールは、0 time よりも増加したものの、6 時間までの試験では、経時的な増加は見られなかった。

T0 摂取により、摂取しない場合に比較し、胆汁コレステロール量は変化しなかったが、小腸内腔液中のコレステロール量は、有意に増加した。高コレステロール食により、無コレステロール食と比べ、胆汁および小腸内腔液中のコレステロール量はいずれも有意に増加した。両実験で、小腸内腔液に排泄されたコレステロール量は、総排泄量（胆汁+小腸内腔液）の約 40-70%を占めた。
【考察】非胆汁経路によるコレステロール排泄は胆汁経路と共に重要であり、一部は ABCG5/ABCG8 が関与する可能性が示唆された。

cholesterol excretion, bile, intestine

講演番号：2B05p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ B 校舎 05 会場

ガーリックオイルの抗肥満効果に関する研究

Studies on anti-obesity effect of garlic oil.

○香川 祐輝[1]、久宮 彩乃[1]、秋葉 知奈[2]、山口 花梨[2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日本大院生資科、[2]日本大生資科)
○Yuki KAGAWA[1], Ayano KUGU[1], China AKIBA[2], Karin YAMAGUCHI[2], Takashi HOSONO[1,2], Taiichiro SEKI[1,2] ([1]Nihon Univ. Grad. School, [2]Nihon Univ.)

【目的】近年、生活習慣の変化、食の多様化に伴って肥満が増加している。肥満はがんや脂肪性肝炎といった様々な疾病の発症リスクを高める。そのため、肥満の予防や脂質代謝の改善効果を示す機能性食品が注目されている。ガーリックは、血中脂質低下作用、抗血栓作用、抗がん作用、抗菌作用など様々な機能性を有している。これまでに我々はガーリックオイルが前駆脂肪細胞 3T3-L1 細胞の分化成熟を抑制することを明らかにしている。そこで本研究では、ガーリックオイルが食餌誘導性肥満モデルラットの肥満病態に及ぼす影響について検討した。
【方法】5 週齢 SD オスラットに AIN-76 を基準とした高脂肪食 (60% kcal fat)を 1 週間自由摂取させ予備飼育した後、Vehicle 群、Garlic Oil (GO)群に群分けした。その後 Vehicle 群にはコーン油のみ、GO 群にはコーン油に溶解した GO を 80 mg/kg b.w.となるように 2 日に 1 回 10 週間経口投与した。試験期間中、高脂肪食および水は自由に摂取させた。投与 9 週目には Oxymax 等流量システム (Columbus Instruments)を用いて、呼気ガス分析を実施した。試験終了後 CO_2 で安楽死させ、血液ならびに臓器を回収し、脂質濃度、脂質代謝関連遺伝子、UCP-1 の発現量などについて各種生化学的実験手法、real-time PCR により解析した。
【結果と考察】GO 投与は体重ならびに白色脂肪組織重量を有意に減少させた。血中脂質濃度、肝臓脂質量は GO 投与により減少する傾向を示した。呼気ガス分析の結果、O_2 消費量、エネルギー消費量のいずれにおいても GO 投与により有意に増加した。一方、呼吸商は GO 投与により 0.03 減少し、脂質燃焼型の代謝リズムに移行することが認められた。また、褐色脂肪組織における UCP-1 発現量は GO 投与により有意に増加したことから、GO は UCP-1 を介してエネルギー消費を亢進させることが示唆された。また、GO 投与は肝臓 fatty acid synthase mRNA level を減少させる傾向を示した。
【結論】 ガーリックオイルは、脂質合成の抑制に加えて、UCP-1 を介して脂質代謝を亢進させて肥満を抑制することがはじめて明らかとなった。

Garlic, Obesity, Energy expenditure

講演番号：2B05p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ B 校舎 05 会場

黒豆種皮成分の脂肪細胞小型化による糖尿病改善効果の解析

Black soybean seed coat components ameliorate diabetes by decreasing lipid droplet size in adipocytes

○松川 隼也[1]、稲熊 哲也[1]、HAN Junkyu[1,2]、長谷川 季男[3]、永尾 雅哉[3]、礒田 博子[1,2] ([1]筑波大院生命環境、[2]筑波大北アフリカ研究センター、[3]京都大院生命科学)
○Toshiya MATSUKAWA[1], Tetsuya INAGUMA[1], Junkyu HAN[1,2], Tokio HASEGAWA[3], Masaya NAGAO[3], Hiroko ISODA[1,2] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]ARENA, [3]Graduate School of Biostudies, Kyoto University)

【目的】
生活習慣病の一つである 2 型糖尿病の発症には肥満に伴う、インスリン抵抗性が大きく関与している。肥満によって脂肪細胞が肥大化すると、TNF-α 等の炎症性のアディポカインの分泌が増加し、insulin signal が阻害される。その結果、脂肪組織・筋肉組織での糖の取込み能力が低下し、血糖値の上昇が起こる。一方、小型化脂肪細胞ではアディポネクチンの産生が増えるため、インスリン抵抗性が改善される。そのため、脂肪細胞の分化はインスリン抵抗性の発症に大きく関与していると考えられている。近年、食資源由来のポリフェノールによる肥満・インスリン抵抗性改善効果が注目されている。そこで、我々はアントシアニンを豊富に含有する黒豆種皮に着目した。本研究では、糖尿病モデルマウス (db マウス)、3T3-L1 前駆脂肪細胞株を用いて、黒豆種皮抽出物の糖尿病改善効果、脂肪細胞の分化に与える影響について解析を行った。
【方法】
黒豆(常陸大黒)の種皮より熱水抽出を行い、その抽出物を糖尿病モデルマウス (db マウス) に 30 日間経口投与し、糖尿病改善効果を検証した。また、脂肪細胞の分化に与える影響を検証するために、3T3-L1 前駆脂肪細胞が成熟脂肪細胞に分化する際に、分化誘導培地に黒豆種皮抽出物および、その主な成分である Cyanidin-3-glucoside (Cy3G) を添加した。分化誘導後、アディポカインの産生、糖の取り込み、insulin signal に関わるリン酸化タンパク質の発現の定量を行った。
【結果・考察】
黒豆種皮抽出物を糖尿病モデルマウスに経口投与したところ、体重および白色脂肪組織重の増加抑制による糖尿病改善効果が示された。さらに、黒豆種皮抽出物および Cy3G で処理した 3T3-L1 前駆脂肪細胞は小型化脂肪細胞に分化誘導され、アディポネクチンの産生増加、TNF-α の産生減少、糖の取り込みの増加が確認された。さらに、インスリン刺激による、insulin receptor と Akt のリン酸化が増大し、insulin signal の活性化(インスリン感受性の亢進)が認められた。以上のことから、黒豆種皮抽出物に含まれる Cy3G によって、小型化脂肪細胞に分化誘導されることで TNF-α の産生が減少し、insulin signal が活性化される。その結果、糖の取り込みが促進され、糖尿病改善効果を示すことが示唆された。また Cy3G には PPARγ agonist 活性が認められなかったことから、チアゾリジン系の糖尿病治療薬と異なり、体重増加等の副作用が低いと期待できる。

black soybean, diabetes, adipocyte

講演番号：2B05p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ B 校舎 05 会場

ジネンジョによる脂質代謝改善作用の解析

The effect of wild yam on lipid metabolism regulation

○竹内 若子[1]、辻原 命子[1]、升井 洋至[2]、草野 由理[1] ([1]名女大、食栄、[2]武庫川女大、食栄)
○Wakako Takeuchi[1], Nobuko Tsujihara[1], Hironori Masui[2], Yuri Kusano[1] ([1]Nagoya Women's Univ., [2]Mukogawa Women's Univ.)

【目的】ジネンジョはヤマノイモ科の野生種とされ、粘質度が非常に高く、その関係成分の機能性が注目されているが、不明な点が多い。これまで私達は、ラットを用いた動物実験において、ジネンジョ及びその成分には体脂肪の蓄積抑制効果をはじめとする脂質代謝の改善効果があることを見出し、報告している。本年度は、これまでジネンジョに見出してきたこれらの脂質代謝の改善作用が、予め脂肪を蓄積させたラットにおいても効果的であるかという点を明らかにするために、高コレステロール(Chol)負荷ラットの飼育途中にジネンジョを摂取させ、その脂質代謝にみられる影響を検討した。
【方法】ラット（Slc:Wistar/ST, ♂６週齢）を予備飼育後、飼育開始から3週間、ジネンジョを摂取させる3週間飼育グループと、途中から摂取させる10週間飼育グループとに分けた。各グループ内は、一群6匹とする群に分け、0.5%Cholを負荷した高Chol食群（C-CRL群)、それを負荷しない対照群（CRL群)、26％ジネンジョ(凍結乾燥品)を摂取する群（C-Jin群）とした。但し、10週間飼育グループのC-Jin群は、飼育開始から6週間、高Chol食を摂取させ、さらに4週間、高Chol食に26 %ジネンジョ(凍結乾燥品)を添加した飼料を摂取させた。飼料はそれぞれ自由摂取とし、飼育終了前の糞回収および飼育終了後の採血をはじめ、腹腔内脂肪、肝臓などの組織を摘出し、脂質代謝と関連した血清および肝臓脂質濃度や糞中Chol濃度等について分析した。
【結果】3週間飼育グループのC-Jin群では、血中の総コレステロール(T-Chol)がCRL群及びC-CRL群の半分程度に、有意に低下した（$p<0.01$)。一方でHDL-Cholの低下はみられなかったことから、LDL-Cholの低下が示された。C-Jin群の肝臓におけるT-CholはC-CRL群より有意に低下し（$p<0.01$)、糞中Cholは増加、胆汁酸量は同程度であったことから、ジネンジョはCholの吸収を阻害することにより、体内でのChol代謝の改善効果に寄与することが示唆された。それと比較し、ジネンジョを途中から投与したC-Jin群でも、糞中Chol量の顕著な増加がみられたことから、Cholの吸収阻害が確認された。また肝臓T-Cholも有意に低下したことから（$p<0.01$)、ジネンジョはChol吸収阻害効果により、肝臓へのChol蓄積の改善が示唆された。また、10週飼育群のC-Jin群も腹腔内の蓄積脂肪量が低下していたことから、ジネンジョ投与は脂肪蓄積後でも脂肪代謝の改善には有効的であることが明らかになった。ジネンジョが示すこれらの効果は、ジネンジョ中の単独成分というよりも複合的な作用機序による改善効果ではないかと考えている。今回、飼育期間を延長することによってこれまではっきりしなかったジネンジョの有効性が再確認されたが、現在、そのメカニズムについても解析中である。

wild yam, rat, lipid metabolism

講演番号：2B05p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ B 校舎 05 会場

KK-Ay マウスにおける山薬および有効成分ジオスゲニンの血中トリグリセライド低下作用

Improvement of serum triglyceride levels in KK-Ay mice by the administration of sanyaku and diosgenin

○三好 規之、佐々木 香、三浦 進司、大島 寛史（静岡県立大学）
○Noriyuki MIYOSHI, Kaori SASAKI, Shinji MIURA, Hiroshi OHSHIMA (Univ. of Shizuoka)

【目的】食後高脂血症が動脈硬化性疾患の重要なリスク要因であることが近年指摘されている。我々はこれまでの研究より、生薬である山薬（ヤマイモの乾燥品）およびその有効成分であるジオスゲニンが肥満モデル動物の空腹時トリグリセライド値を低下させること、そのメカニズムの一つとして肝臓・筋肉・脂肪組織における lipoprotein lipase 遺伝子発現が誘導されることなどを明らかにしてきた。そこで本研究では、高脂血症を呈するモデル動物である KK-Ay マウスを用いて、脂質負荷試験を行い山薬およびジオスゲニンが食後の脂質吸収および代謝に及ぼす影響について検討した。
【方法・結果】8 週齢の雄性 KK-Ay マウス（各群 n=6～7）を一週間の予備飼育後、山薬あるいはジオスゲニン（終濃度 500 ppm）、または純水（対照群）を混合した脂質エマルジョン（大豆油、レシチン、グリセロール）を 10 mg/kg bw で経口投与する脂質負荷試験を行ったところ、群間での血漿中トリグリセライド値（C_{max}、AUC）に有意な相違は認められなかった。その後、8 週間高脂肪食投与した対照群では週齢依存的な空腹時血漿中トリグリセライド値の上昇が認められたが、山薬およびジオスゲニン（500 ppm）を含む高脂肪食投与群では血漿中トリグリセライド値上昇に対する抑制効果が認められた。高脂肪食投与 8 週目に山薬・ジオスゲニンを含まない脂質エマルジョンを用いた脂質負荷試験を行ったところ、対照群（C_{max}: 605±197 mg/dL、$AUC_{0\text{-}8h}$: 3381±1000 mg/dL）と比較して山薬群で血中トリグリセライド値の C_{max}（349±130 mg/dL）および $AUC_{0\text{-}8h}$（1988±617 mg/dL）が有意に低下しており、ジオスゲニン群でも抑制傾向（C_{max}: 469±187 mg/dL、$AUC_{0\text{-}8h}$: 1876±899 mg/dL）が認められた。さらにその 1 週間後に各群マウスを用いて呼気ガス（VO_2 および VCO_2）測定を行ったところ、山薬およびジオスゲニン群の呼吸商（VCO_2/VO_2）が低値を示したことから、山薬およびジオスゲニン摂取による脂質代謝促進作用が示唆された。一方、糞便中に排泄されたトリグリセライド量は群間で有意な差を示さなかった。
【考察】KK-Ay マウスにおいて、山薬およびジオスゲニンの持続的な摂取は、空腹時血中トリグリセライド値および脂質負荷試験後の高脂血症を抑制することが明らかとなった。これらの効果は脂質の吸収抑制によるものではなく、脂質代謝の促進による血中トリグリセライド値低下作用であることが示唆された。現在、山薬およびジオスゲニン摂取による脂質代謝関連遺伝子群の発現変動と各組織へのトリグリセライド蓄積量の影響を検討している。

Yam, Diosgenin, triglyceride

講演番号：2B05p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ B 校舎 05 会場

高脂肪食誘導肥満マウスにおけるシークワーサーエキスの抗肥満効果

Effects of shiikuwasa extract on obesity in high fat diet induced obese mice.

○車 炳允[1]、浅井 みどり[1]、照屋 俊明[1,3]、米澤 貴之[1,4]、金 孝靜[1]、永井 和夫[1]、禹 済泰[1,2]（[1]中部大学　生物機能開発研究所、[2]中部大学　応用生物学部、[3]琉球大学　教育学部、[4]東京大学　大学院工学系研究科）

○Byung-Yoon CHA[1], Midori ASAI[1], Toshiaki TERUYA[1,3], Takayuki YONEZAWA[1,4], Hyo-Jung KIM[1], Kazuo NAGAI[1], Je-Tae Woo[1,2] ([1]Research institute for biological functions. Chubu University, [2]Department of Biological Chemistry, Chubu University, [3]Pedagogy, Ryukyu University, [4]Engineering, Tokyo University)

【目的】　近年、食生活の変化と共に肥満を呈する人口が世界的に増えてきている。肥満とは体重、体脂肪が過剰に蓄積して体重過多となる状態であり、一般には過食や高脂肪食の摂取、身体活動（消費エネルギー）の低下が原因であると言われている。食生活の欧米化に伴い高脂肪食の摂取による食事性肥満は急増しており、メタボリックシンドロームや生活習慣病の重要な原因となることから、肥満の予防と治療は、今日の大きな課題の一つである。

以前に我々は、シークワーサー（*Citrus depressa Hayata*）から得られた Nobiletin が脂肪組織や中性脂肪を減少させ、耐糖能を改善させることを報告した。今回、Nobiletin を含むシークワーサーエキス（SE）を低濃度・長期間投与することで高脂肪食誘導肥満マウスにおいて抗肥満効果を有するか検討を行った。

【方法】　4 週齢の C57BL/6NCrSlc 雌マウスに、通常食または高脂肪食を摂取させ、肥満を誘導した。その後、22 週間、SE を 100mg/kg（Nobiletin として約 50mg/kg）で経口投与した。試験後、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、肝臓、肝臓重量を測定した。採取した血清からは血糖、中性脂肪、総コレステロール、HDL コレステロール、遊離脂肪酸を測定した。また、LDL コレステロールは Friedewald formula の方法を用いて算出した。

【結果】　SE 群の体重は、投与 12 週間目より増加が減少し、22 週目では有意に体重が減少した。投与後の肝臓、腎臓、褐色脂肪組織の重量は変化が認められなかった。しかし、測定した白色脂肪組織のなかでは、腸間膜周辺、生殖器周辺の脂肪組織重量が有意に減少した。また、血液中の肥満パラメーターである血糖、遊離脂肪酸、中性脂肪には変化が認められなかったが、総コレステロールは SE の投与で有意に減少した。HDL コレステロール、LDL コレステロールは減少傾向であった。

【考察】　SE は、長期投与することで体重や白色脂肪組織重量を有意に減少させ、総コレステロールを減少させた。以上の結果より、SE は低濃度で長期間投与することで個体レベルにおいても抗肥満作用を有することが示唆された。今後、SE がどのようなメカニズムで抗肥満に対して影響しているか、詳細に検討する必要がある。

Shiikuwasa, Obesity, High fat diet

講演番号：2B05p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ B 校舎 05 会場

Theaflavin のマウスエネルギー代謝への影響

Influence of theaflavin on energy metabolism in mice.

○工藤 直人[1]、新井 泰範[1]、神尾 直哉[1]、渡辺 悠人[1]、石井 剛志[2]、中山 勉[3]、越阪部 奈緒美[1] ([1]芝浦工業大学、[2]静岡県立大学、[3]日本獣医生命科学大学)
○Naoto KUDO[1], Yasunori ARAI[1], Naoya KAMIO[1], Yuto WATANABE[1], Takeshi ISHII[2], Tsutomu NAKAYAMA[3], Naomi OSAKABE[1] ([1]Shibaura Inst. of Tech., [2]Univ of Shizuoka., [3]School of Food Sci Technol.Nippon Vet. Life Sci. Univ.)

［背景］我々はこれまでに紅茶に含まれるポリフェノールの一種である theaflavin 画分の単回経口投与が骨格筋血流量および開存毛細血管数を増加させることを見出している。これらの結果は、theaflavin が骨格筋における酸素消費量を増大させる可能性を示唆していることから、今回 theaflavin 単回経口投与によるマウスエネルギー代謝への影響を間接カロリメトリ法で検証することとした。また併せて、脂肪組織・骨格筋中の熱産生タンパク質・脂質代謝関連遺伝子群の mRNA 発現量及び脂肪組織・骨格筋中の AMP-activated protein kinase(AMPK)α のリン酸化を Western blotting 法にて検討することとした。
［方法］ICR 系雄性マウス 8-10 週令を 2 群に分け、16 時間の絶食後、vehicle 群には精製水を、theaflavin 群には theaflavin 画分 10mg/kg を単回経口投与した。自発運動量計測装置を搭載した小動物用呼気分析装置 MK-5000RQ (室町機械社製)を用いて、投与後 20 時間の酸素消費量および二酸化炭素排出量を測定し、Weir の式を用いてエネルギー代謝量を算出した。また呼気ガス分析と同様な条件下で、精製水もしくは theaflavin 画分投与前、投与 2・5・20 時間後に EDTA 添加採血及び解剖を行い、脂肪組織・骨格筋・肝臓を採取した。RT-PCR 法を用いて脂肪組織・骨格筋における熱産生タンパク質および脂質代謝系酵素の mRNA 発現量を測定した。また、Western blotting 法による脂肪組織・骨格筋における AMPKα のリン酸化を測定した。
［結果］投与 20 時間の自発運動量には、vehicle および theaflavin 群間で差異は見られなかった。 総酸素消費量及び総エネルギー消費量は theaflavin 投与により vehicle 群に比較して、有意な上昇が確認された。また、theaflavin 投与前に比較し投与 5 時間後で褐色脂肪組織における uncoupling protein (UCP)-1mRNA 発現量は有意に増加し、投与 2 および 5 時間後で腓腹筋における peroxisome proliferator activated receptor γ co activator (PGC)-1αmRNA 発現量に有意な増加が確認された。
［結論］本実験の結果、theaflavin は褐色脂肪組織中の UCP-1 mRNA 発現量を増加させたことから、熱産生を亢進させることが示唆された。また骨格筋で AMPK のリン酸化が増加し、その結果脂質代謝のキーファクターである PGC-1α mRNA 発現量の増加したことから、脂質代謝の促進が示唆された。これらのことから、theaflavin は熱産生・脂質代謝を介してエネルギー消費を亢進することが推測された。

Theaflavin, energy metabolism, blood flow in skeletal muscle

講演番号：2B05p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ B 校舎 05 会場

アポＥ欠損マウスに対するヘスペリジン配糖体の抗動脈硬化作用

Antiarteriosclerotic effect of glycosylhesperidin in apolipoprotein E knockout mice

○東口 文治[1]、菅澤 典子[2]、中山 泰介[2]、樫谷 悠也[2]、木下 肇[2]、宅見 央子[1]、粟飯原 賢一[3]、黒部 裕嗣[2]、北川 哲也[2] ([1]江崎グリコ・健康科学研究所、[2]徳島大院・心臓血管外科、[3]徳島大院・生体情報内科学)

○fumiharu HIGASHIGUCHI[1], noriko SUGASAWA[2], taisuke NAKAYAMA[2], yuya KASHITANI[2], hajime KINOSHITA[2], hiroko TAKUMI[1], kenichi AIHARA[3], hirotsugu KUROBE[2], tetsuya KITAGAWA[2] ([1]Health Science Laboratory,Ezaki Glico Co.,Ltd, [2]Cardiovascular Surgery,Health Bioscience,Grad Sch,Tokushima Univ, [3]Medicine & Bioregulatory,Health Bioscience,Grad Sch,Tokushima Univ)

【背景・目的】
糖転移ヘスペリジンは、柑橘類に多く含まれるフラボノイドの一種であるヘスペリジンに、サイクロデキストリン合成酵素により澱粉からグルコースを付加させた構造で、ヘスペリジンに比べて、水溶性が 10000 倍以上に高まり、ヒトでの生体吸収性が約 3 倍向上することが確認されている。また、糖転移ヘスペリジンは、血流改善作用、高脂血症抑制作用、抗炎症作用などの多数の生理機能を有することが報告されている。そこで本研究では動脈硬化発症モデルであるapolipoproteinE（ApoE）欠損マウスを使用し、糖転移ヘスペリジンによる抗動脈硬化作用について検討を行った。
【方法】
動脈硬化発症モデルであるapolipoproteinE（ApoE）欠損マウス雄 10 週齢を、高脂肪食（オリエンタル酵母工業）を与えるＣ群と、高脂肪食＋糖転移ヘスペリジン 0.1％を与えるＨ群に群分けした。8 週間自由摂取下で飼育し、期間中、体重、血圧、脈拍の測定を行った。飼育終了後、麻酔下で採血し、血清中のトリグリセリド（TG）、総コレステロール（TC）、血糖値を測定した。同時に大動脈弁を含めた上行大動脈から腹部大動脈を摘出し、遺伝子発現解析・組織学的解析を行った。
【結果・考察】
Ｃ群およびＨ群の体重、血圧、脈拍および食餌摂取量に有意な差は認められなかった。血清中のトリグリセリド（TG）、総コレステロール（TC）、血糖値についても、両群で有意な差を認めることはできなかった。しかし、Ｈ群において、大動脈起始部における硬化病巣面積は有意に減少していた（Ｈ 群 0.753±0.119mm^2, Ｃ 群 0.497±0.235mm^2, $p<0.01$）。さらに、免疫組織化学染色により、大動脈起始部における硬化病巣へのマクロファージの浸潤を調べたところ、Ｈ 群において有意に減少していた（MAC-3 陽性面積：Ｈ 群 28.7±5.1％, Ｃ 群 21.7±2.9％, $p<0.05$）。遺伝子発現解析においては、両群に有意な差は認められなかった。
【結論】
今回の研究結果より、糖転移ヘスペリジンは動脈硬化進展に対して抑制効果をもつ可能性が示された。

glycosylhesperidin, antiarteriosclerotic, apolipoprotein E knockout mice

講演番号：2B05p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ B 校舎 05 会場

抗肥満・血糖低下効果を有する TGR5 アゴニスト活性成分の探索

Searching for TGR5 agonists that have anti-hyperglycemic and anti-obesity effects

○碇 菜穂[1]、Shimizu Makoto[1]、中村 明朗[2]、井上 順[1]、佐藤 隆一郎[1]([1]東大院農生科・応生化、[2]長谷川香料（株）・技術研)
○Naho IKARI[1], Makoto Shimizu[1], Akio Nakamura[2], Jun Inoue[1], Ryuichiro Sato[1] ([1]Dept. of applied Biol. Chem. , Grad. Sch. of Agri. and Life Sci. , Univ. of Tokyo, [2]Technical Res. Center, T. Hasegawa Co., LTD.)

【目的】TGR5 は、褐色脂肪組織や小腸 L 細胞、筋肉などに発現する G タンパク質共役受容体である。TGR5 は細胞膜貫通領域に疎水ポケットを形成し、そこに胆汁酸リガンドが結合することで活性化される。それに伴い、細胞内の cAMP 濃度が上昇し、PKA が活性化される。その結果、褐色脂肪組織や筋肉では cAMP 応答配列結合タンパク質のリン酸化により cAMP 応答配列の下流に存在する Dio2 の mRNA 発現が昂進し、それに伴う甲状腺ホルモン経路を介したエネルギー消費の昂進が起こる。さらに小腸での GLP-1 分泌促進など、TGR5 の活性化は抗肥満・血糖低下効果を示すことが知られている。我々はこれまでに TGR5 を活性化するかん橘成分ノミリンを同定し、その抗肥満効果を報告した[1)]。近年、香料成分は、単に香りづけをするだけではなく、抗肥満効果などの生理活性が注目されてきている。そこで今回、我々は低分子香気成分を含む新たな化合物ライブラリー、約 250 種類に対するスクリーニングを行い、TGR5 を活性化する新規化合物の探索を試みた。
【方法】cAMP 応答配列を組み込んだルシフェラーゼベクターと共にヒト TGR5 発現ベクターをヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイにより、添加した化合物により TGR5 が活性化しうるか検討した。また、食餌性肥満モデルマウスに対する化合物の長期投与を行った。
【結果】スクリーニングの結果、TGR5 を活性化する新規化合物として、ラズベリーの香気成分であるα-Ionone とグレープフルーツの香気成分である Nootkatone を同定した。また、食餌性肥満モデルマウスにα-Ionone を含む高脂肪食を長期投与することで、control 群と比較して体重増加量の減少や熱産生関連遺伝子の mRNA 発現亢進などの抗肥満効果を確認した。

1）Ono et al. Biochem Biophys Res Commun. 410. 677-81. (2011)

TGR5, α-Ionone, UCP-1

講演番号：2B05p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ B 校舎 05 会場

キサントフモールによる SREBP 活性抑制効果と作用機構解析

Analysis of SREBP inhibitory effect and mechanism of Xanthohumol

○宮田 慎吾、井上 順、SHIMIZU Makoto、佐藤 隆一郎（東大院農）
○Shingo MIYATA, Jun INOUE, Makoto SHIMIZU, Ryuichiro SATO (Tokyo Univ.)

【目的】メタボリックシンドロームを代表とする生活習慣病は、脂質代謝制御の破綻を発症基盤とする疾患である。その調節機構の中心に転写因子 SREBP(sterol regulatory element-binding protein)が存在する。SREBP の過剰活性化は脂質合成を過度に促進し、脂肪肝やインスリン抵抗性を惹起することが知られている。したがって、生活習慣病予防のためには SREBP 活性を適度に抑制することが望まれる。本研究では、SREBP の活性を低下させる食品成分を探索・同定し、その効果を検証すること、および作用機構を解明することを目的とした。
【方法】SREBP-1 の標的遺伝子 FAS(fatty acid synthase)のプロモーター領域(-987~+121)を含むレポーター遺伝子を安定発現するヒト肝癌由来 Huh-7 細胞株を樹立した。156 種類の食品由来成分の中から、この細胞におけるプロモーター活性を低下させる化合物を選抜した。次に、見出した食品成分を Huh-7 細胞に処理し、活性型 SREBP タンパク質量、SREBP 標的遺伝子の mRNA 量、脂質合成量への影響を解析した。さらに、SREBP の活性化を負に制御する因子 Insig(insulin-induced gene)の欠損株における活性型 SREBP のタンパク質量、活性化過程で行われる SREBP の小胞体・ゴルジ体間輸送への影響を解析した。また、食餌性肥満マウスにおいて摂食実験を行い、肝臓における SREBP の挙動を解析するとともに、抗生活習慣病効果を検証した。
【結果】FAS のプロモーター活性を抑制する化合物として、ホップに含まれる成分キサントフモールを見出した。その効果を検証したところ、キサントフモールは SREBP 標的遺伝子の mRNA 量、脂質合成量を低下させた。さらに、Insig 非依存的に SREBP の小胞体・ゴルジ体間輸送を妨げることにより、SREBP の活性化を抑制することが示された。また、キサントフモールを摂食したマウスの肝臓では SREBP の活性化が抑制されており、肥満や脂肪肝が改善されることが明らかとなった。今後、キサントフモールのより詳細な作用機構を解明することで、抗生活習慣病効果を有する新たな機能性食品開発への応用が期待される。

SREBP, Xanthohumol, Insig

講演番号：2B05p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ B 校舎 05 会場

VLDL 分泌に関与する MTP 遺伝子の転写を抑制するフラボノイドの機能解析

Studies on biological functions of flavonoids that affect the transcription of genes related to lipid metabolism

李 娟、○井上 順、CHOI Jung-Min、SHIMIZU Makoto、佐藤 隆一郎（東大院農生科）
Juan LI, ○Jun INOUE, Jung-Min CHOI, Makoto SHIMIZU, Ryuichiro SATO (Tokyo Univ.)

【目的】ミクロソームトリグリセリド転送タンパク質(MTP)は、肝臓や小腸においてアポリポタンパク B(apoB)と脂質との会合を触媒することで、VLDL およびキロミクロンの合成に関与する。MTP 活性の抑制は、血中トリグリセリドおよびコレステロール量を低下させることが知られている。そこで、抗動脈硬化活性を有する食品成分の同定を目指し、MTP プロモーター活性を指標としたスクリーニング系を構築した。このアッセイ系を用いて MTP プロモーター活性を抑制する食品成分を探索したところ、フラボノイドの一種である Luteolin(Lut)を見出すことに成功した。本研究では、Lut による MTP 遺伝子発現抑制機構の解析に加え、肥満モデルマウスへの Lut 食負荷の効果の検証を目的とした。
【方法】ルシフェラーゼ遺伝子の上流に、MTP 遺伝子プロモーター領域を挿入したレポータープラスミドを作製した。スクリーニング対象としては、約 100 種類の食品由来成分を用いた。最も抑制能が強かった Lut に着目して以下の検討を行った。肝がん由来細胞である HepG2 細胞に Lut を処理し、内因性 MTP の遺伝子発現および VLDL 分泌（培地中に分泌される ApoB 量で定量）への影響を検討した。核内受容体 HNF4α は、MTP 遺伝子発現を制御する転写因子である。そこで、HNF4α活性に及ぼす Lut の影響について、レポーターアッセイにより検討した。Lut による HNF4α活性抑制機構の解析のため、(1)HNF4α の DNA への結合(2)コファクターへの影響(3)Lut と HNF4α の結合について検討した。さらに肥満モデルマウスに 1.5%Luteolin 含有食を与え、その効果を検討した。
【結果および考察】スクリーニングに用いた成分の中で、Flavone に分類される Lut が最も強く MTP プロモーター活性を抑制した。同様に Flavone に分類される Apigenin や Acacetin、さらに Flavonol に分類される Fisetin や Kaempferol にも抑制活性が見られた。一方で Isoflavone である Daidzein には効果が見られなかった。Lut は内因性の MTP 遺伝子の発現を抑制し、培地中への ApoB の分泌量を低下させたことから、VLDL 分泌の抑制効果を有することが明らかになった。さらに Lut は HNF4α の活性を抑制した。Lut は HNF4α に直接結合し、DNA への結合やコファクターのリクルートメントを変化させた。肥満モデルマウスへの 1.5%Lut 食負荷は抗肥満を示し、血中トリグリセリドやコレステロールの低下に加え、肝臓での MTP 遺伝子の発現を低下させた。
以上の結果より、Lut は血中のトリグリセリドやコレステロール量の低下効果を有すること、さらにその効果は HNF4α活性抑制を介する可能性を示した。

Luteolin, HNF4α, MTP

講演番号：2B05p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ B 校舎 05 会場

酒粕摂取によるマウスの NASH 予防効果

Protective effects of *sake lees* on nonalcoholic steatohepatitis in mice fed high-fat diets

○大浦 新[1]、村上 直之[1]、入江 元子[1]、守田 麻由子[2]、堤 浩子[1]、内藤 裕二[2]、秦 洋二[1]（[1]月桂冠総研、[2]京都府立医大・消化器内科）
○Shin OURA[1], Naoyuki MURAKAMI[1], Motoko IRIE[1], Mayuko MORITA[2], Hiroko TSUTSUMI[1], Yuji NAITO[2], Yoji HATA[1] ([1]*Res. Inst., Gekkeikan Sake Co. Ltd.*, [2]Gastroenterology and Hepatology, Kyoto Prefectural University of Medicine)

【目的】非アルコール性脂肪肝炎（NASH)は，肝硬変や肝癌へと進行する予後不良の肝疾患であり，特に先進諸国ではその患者と予備軍の急増が報告されている．この NASH には確立された治療方法が無いことから，前段階である脂肪肝の改善が唯一の予防策であるとされ，食品における抗酸化物質や抗炎症物質が有望視されている．これまでに当社では，清酒が広く持つ効果効能について研究を続け，清酒および醸造副産物の多様な機能性と有効成分を明らかにしてきた．酒粕の肝機能保護効果についても，ガラクトサミン投与マウスを用いた肝障害モデルで確認している[1)]．そこで今回は，高脂肪食負荷マウスを用いた NASH モデル試験において，酒粕素材の肝臓保護効果を検討したので報告する．

【方法】C57BL/6J マウスの雄 6 週齢に対し，通常食による 1 週間の予備飼育の後，ココアバター(7.5%)＋コレステロール(1.25%)＋コール酸(0.5%)を配合した高脂肪食を摂取させて，これをコントロール群とした．酒粕サンプルとしては，酒粕をプロテアーゼ分解して得た上清を凍結乾燥した「酒粕ペプチド」，酒粕をアルカリ水で洗浄し凍結乾燥した粉末を「酒粕タンパク」とした．これらを高脂肪食にそれぞれ 10%配合したものをテスト群として，6 週間あるいは 12 週間自由摂取させた．試験終了後に血清の成分分析や肝臓の組織染色などを行い，肝障害の程度をコントロール群と比較した．

【結果】血清分析では，酒粕タンパク摂取群では 12 週で，総コレステロール，LDL-コレステロール，遊離コレステロール，リン脂質を通常食群に近い濃度まで抑制した．肝臓組織の HE 染色では，酒粕タンパク摂取群が 6 週で肝細胞の脂肪沈着と風船様変性を抑制し，また 12 週で炎症細胞巣への推移を抑制していた．一方 アザン染色では，酒粕ペプチド摂取群において 6 週，12 週とも肝臓組織の線維化を抑制していた．このように不溶性の酒粕タンパクでは肝臓への脂肪沈着と炎症を抑制し，また水溶性の酒粕ペプチドでは肝臓の線維化を抑制した結果から，酒粕の成分により NASH 予防の作用機作が異なる可能性が示唆された．

1)大浦ら 2010 年日本農芸化学会大会講演要旨集 3AKa15

sake lees, NASH, high-fat diet

講演番号：2B05p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ B 校舎 05 会場

米油の血漿コレステロール上昇抑制作用に関する研究

Studies on hypercholesterolemia suppressive effect of rice bran oil

○木村 ふみ子[1]、周 秀瑩[1]、仲川 清隆[1]、宮澤 陽夫[1,2]、橋本 博之[3]、簗野 卓夫[3] ([1]東北大学院・農・機能分子解析、[2]東北大未来化学技術共同研究センター、[3]簗野食品工業株式会社)
○Fumiko KIMURA[1], HhsiuYing CHOU[1], Kiyotaka NAKAGAWA[1], Teruo MIYAZAWA[1,2], Hiroyuki HASHIMOTO[3], Takuo TSUNO[3] ([1]Grad. Sch. Agr. Sci. Tohoku Univ., [2]NICHe, Tohoku Univ., [3]Tsuno Food Industrial Co., Ltd)

【目的】米油は米糠に 20%程度含まれる油であり、日本では江戸時代から食用として使用されていた実績をもつ。米油の血中コレステロール上昇抑制作用は 1970 年代以降、ヒト試験・動物試験で多数報告されており、その主な作用機序は植物ステロールやγ-オリザノールによる消化管でのコレステロール吸収阻害作用によるものと考えられている。しかし、生体内での作用機序解明に必要な動物実験では、この現象の再現が難しいため、詳細には不明な点が多い。本研究では、実験 1:齧歯類での血中コレステロール低下作用の証明に頻用されてきた、コレステロール負荷食ラットを用い、米油、ラードおよびパーム油の影響を比較するとともに、実験 2：高脂肪食摂取で肥満を発症する C57BL/6J マウスを用い、米油の血中コレステロール上昇抑制作用を検証した。
【方法】① 実験 1： 5 週齢の雄性 Sprague Dawley（SD）ラットを試験食群 3 群(米油群、パーム油群、ラード群)と対照群の 4 群に分けた(n=8)。飼料は ANI76 食に準じ、脂質含量を 10%w/w に改変し、試験食群にはコレステロール 1.25%、コール酸ナトリウム 0.3%を添加した。なお対照食の脂質源にはラードを使用した。飼育期間は 4 週間とした② 実験 2：C57BL/6J 雄性マウス 5 週齢を一週間予備飼育後、対照群、米油群（n=12)に分けた。対照群は市販の High Fat Diet 32(牛脂 20kcal%, ハイオレイックサフラワー油 36kcal%)を用いた。米油群は High Fat Diet 32 の油脂源を米油に置き換えた。飼育期間は 6 週間とした。各実験とも、肝臓・血液について脂質関連の生化学パラメータ、糞中コレステロール含量、コレステロール代謝関連遺伝子の測定を行った。
【結果と考察】① 実験 1：米油群はパーム油群、ラード群と比べ、血漿コレステロール濃度の増加が最も少なかった。糞中へのコレステロール排泄量は、米油群で有意に高い値を示した。コレステロール代謝関連遺伝子の SREBP-2、LDLR、CYP7A1 の発現を調べたが、米油群とパーム群で差はみられなかった。したがって、本モデルでのコレステロール上昇抑制の作用機構は、主に摂取コレステロールの糞中への排出促進であり、肝臓におけるコレステロール代謝関連遺伝子の制御機構の関与の可能性は低いことが示唆された。② 実験 2：飼育 6 週目に得た血漿のコレステロール値は、対照群と比べ、米油群で有意に低下した。また、米油群の肝臓総脂質と肝臓トリグリセリド量および肝臓 FAS（脂肪酸合成酵素）は、対照群と比べ有意に低下した。以上より、米油の摂取は高コレステロール食のみならず、食餌性肥満による血中コレステロールの上昇を改善することが示された。

rice bran oil, rat, mouse

講演番号：2B05p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ B 校舎 05 会場

βクリプトキサンチンは糖・脂質代謝異常を改善する

β-cryptoxanthin improves abnormality lipid and carbohydrate metabolism

○村上 弘樹[1]、高橋 信之[1,2]、古薗 智也[1]、大山 夏奈[1]、千田 真里[1]、杉浦 実[3]、後藤 剛[1,2]、河田照雄[1,2] ([1]京大院農・食品生物、[2]京大　生理化学研究ユニット、[3]農研機構　果樹研究所カンキツ研究領域)

○Hiroki Murakami[1], Nobuyuki Takahashi[1,2], Tomoya Furuzono[1], Kana Ooyama[1], Mari Senda[1], Minoru Sugiura[3], Tsuyoshi Goto[1,2], Teruo Kawada[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ. Research Unit for Physiological Chemistry, [3]NARO Institute of Fruit Tree Science)

【目的】食生活や生活環境の変化に伴い、日本を含む先進諸国を中心として、糖尿病や脂質異常症などの生活習慣病患者が増加している。これらの病気の根幹にある糖・脂質代謝異常を改善することは重要な課題である。ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体（PPAR）γは脂肪細胞に多く発現しており、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとして機能している。チアゾリジン系薬剤による PPARγの活性化はインスリン抵抗性を改善することは知られている。一方、肥満状態など PPARγが過剰に活性化されている状態では、PPARγ アンタゴニストにより PPARγ の活性を抑制することで、インスリン抵抗性が改善されたという報告がある。したがって、PPARγの活性を制御することがインスリン抵抗性を改善する上で重要であると考えられる。食品中には多くの PPARγのリガンドとなる成分が含まれていることが報告されているが、PPARγアンタゴニストとなる成分の報告はない。一方、温州みかんに多い β クリプトキサンチン（βCRP）の血中濃度がインスリン抵抗性リスクと有意に逆相関することが最近の疫学研究から報告されている。しかしこの分子メカニズムは明らかでない。そこで、βCRP の生理機能に着目し、その有用性について検討を行った。

【方法と結果】(1)リガンドアッセイ：βCRP は PPARγのリガンドアッセイにおいて合成アゴニストによる PPARγ の活性化を抑制し、3T3-L1 細胞への添加実験において脂肪細胞への分化を有意に抑制した。したがって βCRP は PPARγ のアンタゴニスト作用を持つことが示された。(2)肥満モデルマウスへの摂食実験：肥満モデルマウスである KKAy へ高脂肪食とともに βCRP を摂食させたところ、脂肪細胞の肥大化ならびに脂肪細胞分化マーカーの遺伝子発現が有意に抑制された。また βCRP 摂食群において血中レプチン濃度が有意に上昇し、肝臓や骨格筋における脂肪酸酸化関連遺伝子の発現が有意に上昇し、脂肪蓄積が有意に抑制された。(3)レプチン欠損マウスへの摂食実験：レプチン欠損マウスである ob/ob マウスへの摂食実験において、脂肪細胞分化抑制作用は KKAy マウスと同様に見られたものの、肝臓・骨格筋における脂肪蓄積抑制作用は見られなかった。

【まとめ】βCRP は PPARγの活性を抑制する、初の食品成分由来 PPARγアンタゴニストとして同定された。マウスへの摂食実験より、βCRP の摂食により脂肪細胞分化を抑制し、糖代謝異常を改善することが示された。また βCRP は血中レプチン濃度を上昇させること、肝臓・骨格筋における脂肪酸酸化を亢進させ、脂質代謝異常を改善することが示唆された。以上のことより、βCRP は日常的に摂食することによって、糖・脂質代謝異常の改善につながる有用な食品由来成分であると期待される。

PPARγ, adipocyte, metabolic syndrome

講演番号：2B05p22
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ B 校舎 05 会場

フコキサンチン含有海藻脂質の機能性および消化吸収性評価
Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin contained algae oil.
○菅野 翔伍[1]、庭野 吉己[2]、前多 隼人[1] ([1]弘前大院農、[2]東北大院歯)
○shogo KANNO[1], yoshimi NIWANO[2], hayato MAEDA[1] ([1]Hirosaki Univ., [2]Tohoku Univ.)

【目的】フコキサンチン(Fx)はワカメやコンブなどの褐藻類に特徴的に含まれるカロテノイドの一種である。抗がん作用や抗肥満作用などの生理作用が報告されている。特に白色脂肪組織において、UCP-1(uncoupling protein 1)を発現させ、内臓脂肪の減少作用を有すことから注目されている。一方で糖尿病肥満モデルマウスによる動物試験では、血糖値の改善効果を示すには飼料中の Fx 含量が 0.1%以上必要である。本研究では、Fx 含有海藻脂質(AL)による血糖値上昇抑制作用について、低い Fx の投与濃度で評価した。また、*in vitro* 試験による人工消化試験により、Fx の消化安定性の違いについて精製 Fx と AL で比較検討を行った。
【方法】糖尿病肥満モデルマウス(KK-*A*^{y})に対し AL(PoliNat 製)を投与した。実験飼料は AIN-93G の組成を基本に作成し、コントロール群、AL1%投与群、AL2%投与群で実験を行った。4 週間の実験飼育後、血漿成分、臓器重量の測定を行った。ELISA 法により、インスリンおよび高分子アディポネクチンの血漿中濃度を評価した。また Western Blot 法を用いて、脂質代謝の亢進に関わる UCP-1 やβ3Adr(β-3 adrenergic receptor)などのタンパク質発現量の変化について分析を行った。さらに AL の消化吸収時における安定性を評価するため、胃及び小腸の消化酵素処理による人工消化試験を行った。PBS に懸濁した飼料を消化酵素処理した後、色素抽出し HPLC により Fx 含量を測定した。
【結果】AL 投与群において白色脂肪組織重量が減少傾向を示した。またコントロール群と比較し AL1%、2%投与群では、血糖値がそれぞれ 10%、35%、インスリン濃度が 30%、35%低下した。一方、インスリン抵抗性改善に関わる血漿中の高分子アディポネクチン濃度が 20%、35%上昇した。さらに、AL 投与群において白色脂肪組織中の UCP-1 タンパク質の発現上昇傾向が認められた。人工消化試験の結果、精製 Fx は処理前と比較して Fx が 80%減少したのに対し、AL は 30%の減少にとどまった。このことから AL の方が消化処理による分解がされにくいことが示された。これらの結果から、AL は腸管内で消化の過程において安定性が高く、少量の Fx の摂取で効果を発揮することが示唆された。

Carotenoid, fucoxanthin, obesity

講演番号：2B05p23
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ B 校舎 05 会場

NAFLD モデルである *Fxr* 欠損マウスの肝脂質代謝に対するフコキサンチン投与の影響

Influence of Fucoxanthin Treatment on Hepatic Lipid Metabolism in NAFLD Model, Farnesoid X Receptor (*Fxr*)-Null Mice

○木下 佑一、田島 惟李、杉浦 義正、宮田 昌明（水大校・院）
○Yuichi KINOSHITA, Yuri TAJIMA, Yoshimasa SUGIURA, Masaaki MIYATA (Natl. Fish. Univ.)

【目的】フコキサンチンは、食用褐藻類に含まれている主要な非プロビタミン A カロテノイドであり、脂肪細胞分化の抑制や抗炎症、抗肥満および抗ガン効果等の多くの生物学的機能を有すると報告されている。フコキサンチンが肝臓の脂質代謝に影響を与えるかどうかは、未だ十分には明らかになっていない。核内受容体 farnesoid X receptor (FXR)は、胆汁酸センサーであるだけでなく脂質やグルコースのホメオスタシスの調節においても重要な役割を担っている。*Fxr* 欠損マウスは、脂質代謝異常が認められ、肝内 triglyceride (TG)や遊離脂肪酸および血清 alanine amino transferase (ALT)等の肝障害マーカーのレベルが高い。このため、*Fxr* 欠損マウスは、脂肪肝や脂肪性肝炎を含む非アルコール性脂肪性肝疾患(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)のモデルであると考えられている。本研究では、*Fxr* 欠損マウスにおけるフコキサンチン投与の影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】8～10 週齢の雄性 *Fxr* 欠損マウスに 1 日 1 回、2 日間にわたり、1 mg/kg のフコキサンチンを経口投与し、最終投与の 24 時間後に解剖を行い、血漿ならびに肝臓を採取した。血漿中の ALT 活性、肝内と血漿中の TG および総コレステロール(TC)濃度はそれぞれ市販のキットで測定した。肝臓の mRNA レベルの測定は、SYBR Premix Ex Taq II (タカラ バイオ株式会社)を使用した定量 PCR で実施した。
【結果と考察】2 日間のフコキサンチン投与は、*Fxr* 欠損マウスの血漿中 ALT 活性および血漿中、肝内の TG と TC のレベルを低下させなかった。しかし、脂肪酸を取り込む輸送担体である *CD36* や脂肪酸酸化経路におけるミトコンドリア酵素である *carnitine palmitoyltransferase 2* のような脂質に関連する遺伝子の肝発現レベルの有意な低下がフコキサンチン投与で認められたが、脂質合成酵素である *fatty acid synthase* や *stearoyl CoA desaturase 1* の肝内 mRNA レベルの有意な低下は認められなかった。一方でフコキサンチン投与は、核内受容体 pregnane X receptor の典型的なターゲット遺伝子であり、薬物代謝酵素である *Cyp3a11* や薬物輸送担体である *Mdr1a* の肝内 mRNA レベルを有意に低下させた。本研究は、2 日間のフコキサンチン投与では *Fxr* 欠損マウスの上昇した肝脂質レベルや血漿中 ALT 活性を有意に低下させないことを示した。しかしながら、フコキサンチン投与による肝内 mRNA レベルの変動は、フコキサンチンが肝臓の脂質代謝に影響を及ぼす可能性を示した。

fucoxanthin, NAFLD, lipid metabolism

講演番号：2B06a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ B 校舎 06 会場

抗原提示能を指標とした抗原感作性評価法の構築

Development of an alternative assay system for estimating allergen sensitivities

○小俣 洋奈[1]、片山 茂[1]、穐山 浩[2]、中村 宗一郎[1] ([1]信州大農、[2]国立衛研)
○Hirona Komata[1], Shigeru Katayama[1], Hiroshi Akiyama[2], Soichiro Nakamura[1] ([1]Shinshu Univ., [2]NIHS.)

【目的】先進国を中心にアレルギー患者が急増しているが，アレルギーの原因物質は時代の変化とともに変わっていくことが危惧されており，簡易的なアレルギー原因物質の評価方法が模索されている。現在，アレルゲンの *in vitro* レベルでのスクリーニングにおいて，ヒト末梢血単核球細胞（PBMC）由来樹状細胞や骨髄由来樹状細胞（BMDC）が用いられている。しかし，倫理的な問題や入手が容易でないことに加えて，ドナー間でのバラつきといった多くの問題を抱えているのが現状である。本研究室ではこれまでに，抗原感作性の評価手法の確立を目的として，ヒト単球細胞株 THP-1 の樹状細胞様（THP-1 derived dendritic cell，TDDC）への分化に成功している[1)]。そこで本研究では，TDDC 分化誘導条件の最適化を検討するとともに，マウス BMDC（mBMDC）の抗原提示能との比較検討を行い，TDDC を用いた本アッセイの抗原感作性評価法としての有用性について検討した。

【方法】THP-1 を培養プレートに播種し，PMA および IL-4 で分化誘導を行い，得られた接着細胞を TDDC とした。TDDC は PBS 洗浄後回収し，抗体染色後 FACS 解析により抗原提示分子 HLA-DR，補助刺激分子 CD86/80，樹状細胞マーカーCD11c および DC-SIGN，マクロファージマーカーCD14 の蛍光強度を測定した。TDDC を OVA や BSA で刺激し培養後，リアルタイム PCR 法により，TDDC の HLA-DR および CD86 の遺伝子発現を測定した。さらに，BALB/c マウスから調製した骨髄細胞を GM-CSF 刺激下で 6 日間培養し，マウス BMDC へ分化させた。抗原刺激した後，抗 MHC classⅡ I-Ab 抗体を用いて FACS 解析により蛍光強度を測定した。

【結果】CD11c，DC-SIGN，HLA-DR および CD86 の蛍光強度を指標として，分化誘導の最適化を検討したところ，これらの表面抗原の発現は分化日数の経過とともに上昇し，特に 2 日目以降に顕著な発現上昇が認められた。また，TDDC の抗原提示能は播種時の細胞濃度が低いほど顕著に上昇することが明らかとなった。このとき，CD14 の発現は PMA 刺激により上昇するが，PMA と IL-4 の同時刺激により顕著に低下することを確認した。TDDC は OVA 刺激により HLD-DR 発現を上昇させるが，この発現上昇は BSA 刺激では認められなかった。mBMDC でも同様に，OVA 刺激のみ I-Ab の発現上昇が認められた。以上の結果から，TDDC を樹状細胞の代替細胞とした本アッセイが抗原提示能を指標とした抗原感作性の評価法に有用であることが示された。

1)Katayama, S. et al. *Food Chem.*, 138, 757-761, 2013.

Dendritic cell, allergenicity, antigen presentation

講演番号：2B06a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ B 校舎 06 会場

樹状細胞の TGF-β産生を指標とした免疫調節物質の探索

Screening of immunomodulators with TFG-β inducing properties using dendritic cells

○大野 史晃[1]、片山 茂[1,2]、丹治 典子[1]、小俣 洋奈[1]、中村 宗一郎[1,2] ([1]信州大農、[2]信州大院農)
○Fumiaki Ohno[1], Sigeru Katayama[1,2], Noriko Tanji[1], Hirona Komata[1], Soichiro Nakamura[1,2] ([1]Shinshu Univ, [2]Graduate school of Shinshu Univ)

【背景と目的】アレルギーの治療法として経口免疫療法が注目されている。免疫寛容には，制御性 T 細胞による免疫抑制作用が関与しており，制御性 T 細胞は，樹状細胞などの抗原提示細胞によって産生する TGF-β といったサイトカインにより誘導される。フラボノイドなどのポリフェノールや糖質といったファイトケミカルに関しては，多様な免疫調節作用がこれまでに報告されている。一方，本研究室では，ルチナーゼによるルチン分解反応において産生したルチノースを逆反応によりフェノール性化合物に糖転移させる手法（酵素的手法による新規フェノール性化合物のルチノシル化）の確立に成功している[1]。そこで本研究では，免疫寛容誘導因子の探索を目的として，樹状細胞を用いたアッセイ系により TGF-β 産生促進作用に関するスクリーニングを行なった。天然ファイトケミカルに加えて，新規フェノール性化合物配糖体を供試試料として使用した。また，ヒト単核球細胞株 THP-1 から分化誘導して得た樹状様細胞（THP-1 derived THP-1 cell, TDDC）を樹状細胞として使用した。
【方法】フェノール性化合物の配糖化は，ダッタンソバ（*Fagopyrum tataricum*）由来ルチナーゼ，ルチン，フェノール酸を 20 mM 酢酸バッファー（pH 5.0）に懸濁後，40 ℃でインキュベーションすることによって行った。配糖体の分離精製は Inertsil NH2 カラムを用いた HPLC により行った。得られた配糖体は，NMR および FAB-MAS 解析により構造を決定した。スクリーニング試験では，THP-1 を IL-4，PMA 存在下において分化誘導した TDDC に供試試料を添加し 3 日間培養した。得られた培養上清の TGF-β 量を ELISA 法によって測定した。
【結果】これまでに，ヒドロキシ酸 10 種類（桂皮酸誘導体類，ヒドロキシ安息香酸類など），フラボノイド 2 種類（ミリセチン，カテキン）についてルチノース転移による配糖体の合成を確認した。しかし，フラボノイドでもイソフラボンやフラバノンでは合成は認められず，スチルベノイドやクルクミノイドについても合成物を得ることができなかった。一方，ルチン以外にも，ケルセチン-3-O-グルコシド，α-グルコシルルチンを基質とした糖転移反応により，ルチノース（二糖類）だけでなく，グルコース（単糖）やα-グルコシル化ルチノース（三糖類）による配糖化が可能であることが明らかとなった。次に，TGF-β 産生促進作用について TDDC を用いたアッセイ系により検討した結果，フェルラ酸とフェルラ酸配糖体において高い効果が認められた。なかでも，グルコシル化フェルラ酸が最も高い効果を示した。

1) Katayama, S et al. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 9617-9622, 2013.

ferulic acid, glycoside, immunomodulating activity

講演番号：2B06a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ B 校舎 06 会場

AGEs 結合タンパク質の同定

Identification of AGEs-binding protein

○近澤 未歩、柴田 貴広、内田 浩二（名大院生命農・応用分子生命科）
○Miho CHIKAZAWA, Takahiro SHIBATA, Koji UCHIDA (Nagoya Univ. Grad. Sch. Bioagri. Sci.)

【目的】最終糖化産物（AGEs）は加齢や糖尿病などの疾病時に生体内で形成され、生体タンパク質の機能低下や傷害に結びつくことが知られる。生体のストレスや組織傷害において形成・放出される細胞内分子や様々な修飾構造はダメージ関連分子パターン（DAMPs）として自然免疫系に認識され、速やかに除去されることで生体の恒常性が維持される。これまでの検討において IgM 自然抗体が AGEs などの酸化修飾タンパク質を認識すること、また AGEs 認識自然抗体が自己免疫疾患の予防や生体保護に寄与していることが示唆された。今回、スカベンジャー受容体や自然抗体といった既知の AGEs 相互作用分子以外にも AGEs と相互作用し生体内で機能性を有する分子があると予測し、その探索と機能の解明を目的として検討を行った。
【方法・結果】磁気ビーズにウシ血清アルブミン（BSA）をカップリングした後、デヒドロアスコルビン酸(DHA)と 37℃,5 日間インキュベートすることにより AGEs-BSA ビーズを作成した。BSA, AGEs-BSA ビーズとヒト血清をインキュベートし、結合タンパク質の SDS-PAGE を行った結果、AGEs-BSA に特異的なバンドが確認された。このバンドを切り出し、トリプシン消化、MALDI-TOF/TOF-MS 解析、Mascot を用いたデータベース解析を行った結果、補体因子である Complement C1q subunit A が同定された。C1q は病原体と結合することで補体古典経路を活性化し、病原体のオプソニン化と炎症反応の誘導に関与する自然免疫応答因子である。相互作用についてはビオチン化 AGEs を用いたリガンドブロットによっても確認され、C1q と AGEs は他の因子を介さず直接的に相互作用することが示唆された。また AGEs-BSA ビーズと同様に AGEs-lysine ビーズを作成し、ヒト血清を用いたプルダウン、anti-C1q 抗体による検出を行ったところ、AGEs-BSA と同様に C1q が検出された。このことより、糖化による lysine 残基の修飾で形成される構造が C1q と相互作用することが予想された。現在、AGEs 以外の酸化修飾タンパク質と C1q との相互作用の解析、AGEs による補体系の活性化について検討を行っている。

AGEs, Innate immunity, Complement

講演番号：2B06a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ B 校舎 06 会場

陰性荷電タンパク質の自己免疫原性
autoantigenecity of negatively charged proteins
○伊藤 美香、近澤 未歩、柴田 貴広、内田 浩二 (名大院農)
○Mika Ito, Miho Chikazawa, Takahiro Shibata, Koji Uchida (Nagoya Univ.)

【背景・目的】自然免疫系は生まれつき生体内に備わっている免疫システムであり、T 細胞や B 細胞が担う獲得免疫に先立って発動される初期防御システムである。中でも自然抗体である IgM 抗体は、病原体が侵入した際に最初に産生され、感染の初期防御に極めて重要な役割を果たす。この IgM 抗体は、加齢に伴い蓄積すると考えられている最終糖化産物や 4-oxo-2-nonenal などの脂質過酸化物などと反応し形成される翻訳後修飾タンパク質を認識し、DNA やアポトーシス細胞にも同様に交差性を示すことが報告されている。私たちのグループでは IgM 抗体がこれら抗原を認識する要因の 1 つとして抗原分子表面の陰性荷電を予想している (Chikazawa et al. J.B.C (2013))。そこで本研究では、表面電荷を下げる修飾としてアセチル化、スクシニル化、マレイル化などの化学修飾タンパク質を取り上げ、抗体や受容体による抗原認識メカニズムについて検討した。
【方法・結果】牛血清アルブミン (BSA) を無水酢酸、無水コハク酸あるいは無水マレイン酸と反応させ、アシル化タンパク質であるアセチル化タンパク質(AcBSA)、スクシニル化タンパク質(ScBSA)、マレイル化タンパク質(MaBSA)をそれぞれ調整した。ELISA 法により、それぞれの修飾タンパク質を固相に、Balb/c マウス血清を 1 次抗体に用い、IgM 抗体価を測定したところ、修飾による電荷変化が-1 である AcBSA よりも-2 の変化が起きる ScBSA や MaBSA で交差性が高く、かつそれぞれのタンパク質において修飾率依存的に交差性が高値を示した。さらに、この抗体価と zeta 電位測定による抗原分子表面電荷の関係を調べたところ、抗体価と陰性荷電に相関関係が示された。また、IgM 抗体との交差性が最も顕著であったマレイル化タンパク質の自己免疫原性を調べるため、keyhole limpet hemocyanin (KLH) を無水マレイン酸と反応させてマレイル化 KLH を作製し、マウス腹腔に免疫したところ、修飾タンパク質に対する IgM 抗体の交差性が経時的に上昇した。このことから、電荷が負に修飾されたタンパク質は抗原性を示すようになり、血清抗体量の増加を通して自己免疫応答の誘導に関与していることが示唆された。

acylated protein, negative charge, autoimmunity

講演番号：2B06a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ B 校舎 06 会場

自然抗体によるカテキン-タンパク質複合体の認識

Recognition of catechin-albumin complexes by natural antibodies

近澤 未歩[1]、○畑佐 行紀[2]、柴田 貴広[1]、赤川 貢[4]、立花 宏文[3]、内田 浩二[1] ([1]名古屋大院農、[2]名古屋大農、[3]九州大農、[4]大阪府立大生命環境科学)
Miho CHIKAZAWA[1], ○Yukinori HATASA[2], Takahiro SHIBATA[1], Mitsugu AKAGAWA[4], Hirofumi TACHIBANA[3], koji UCHIDA[1] ([1]Nagoya Univ. Grad. Sch. Bioagri. Sci., [2]Nagoya Univ., [3]Kyushu Univ. Fac. of Agri., [4]Osaka Pref. Univ. Coll. of Life Env. and Adv. Sci.)

【目的】代表的な生体防御機構である免疫系は獲得免疫と自然免疫からなり、このうち自然免疫は獲得免疫に先立っておこる初期の生体防御システムである。自然免疫の活性化には病原体などに由来する外因性物質である病原体関連分子パターン(PAMPs)に加え、疾病や酸化ストレスによって生体内で生成する内因性物質であるダメージ関連分子パターン(DAMPs)が関わっているものと考えられている。自然免疫の適度な活性化は恒常性維持・疾病予防に寄与する。本研究では、自然免疫系を活性化させる可能性のある因子として日頃我々が摂取している食品成分に着目し、血中タンパク質の大部分を占め、様々な機能を有する血清アルブミンと食品成分の複合体を用い、その新たな機能性の探索や作用機構の解析を行った。
【方法及び結果】25 種の食品成分を血清アルブミンと 37℃、1 時間インキュベートして作製した食品成分-アルブミン複合体を固相抗原タンパク質とし、様々な系統のマウス血清や、モノクローナル IgM 自然抗体との交差性を ELISA 法により検討したところ、エピガロカテキンガレート(EGCG)-アルブミン複合体が自然抗体に認識されることが確認された。様々な類縁体においても同様の検討を行ったところ、ECG 複合体や EGC 複合体でもわずかに認識されるものの、EGCG 複合体で特に認識された。構造上の特徴として、EGC は B-ring 上のピロガロール様構造を持ち、ECG はガロイル基を持つが、EGCG はこの両者を持つ。このことから両者の構造を持つことがタンパク質との相互作用において重要である可能性が考えられた。さらに、EGCG-アルブミン複合体におけるカルボニル基の形成について、ヒドラジドを用いた誘導体化による検討を行ったところ、複合体中ではカルボニル形成が進んでいることが確認された。この結果から、IgM による EGCG-アルブミン複合体の認識はカルボニル化タンパク質の生成によるものと予想した。そこでカルボニル化 BSA を作成し、血清やモノクローナル IgM 自然抗体との交差性を検討したところ、交差性が認められた。EGCG によるタンパク質カルボニル形成の詳しいメカニズムに関しては現在検討中である。

innate immunity, catechin, albumin

講演番号：2B06a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ B 校舎 06 会場

ピロール化タンパク質の機能特性

Functional properties of pyrrolated proteins

宮下 宙士[1]、○日沖 裕介[1]、近澤 未歩[1]、柴田 貴広[1]、松見 紀佳[2]、内田 浩二[1] ([1]名大院生命農・応用分子生命科、[2]北陸先端科学技術大学院大学)
Hiroaki MIYASHITA[1], ○Yuusuke HIOKI[1], Miho CHIKAZAWA[1], Takahiro SHIBATA[1], Noriyoshi MATSUMI[2], Koji UCHIDA[1] ([1]Grad.Sch.of Bioagric.Sci., Nagoya Univ., [2]Sch.of Materials Sci., JAIST)

【背景・目的】ピロールは平面構造を持つ芳香族五員環であり、求電子攻撃に高い反応性を持つこと、水素結合・金属錯体を形成すること、π-π 相互作用を示すことが化学的特性として知られている。また、生体内においてもヘムタンパク質中のヘムやトリプトファン、ビリルビンの一部として存在している。当研究室では、これまでに自己免疫疾患のひとつである全身性エリテマトーデス (SLE) 患者血清が DNA だけでなく、脂質過酸化由来アルデヒドによって修飾されたタンパク質に対しても抗体価を示すことを報告している。さらに、 SLE 患者血清中の自己抗体が DNA と修飾タンパク質の両方を認識することから、核酸染色試薬である SYBR Green I (SG) による修飾タンパク質の検出を試みたところ、 DNA と同様に染色されることを見出した。様々な修飾タンパク質の自己抗体・ SG 反応性の検討を行ったところ、γ―ケトアルデヒドによるリジン残基のピロール化が重要であると示唆された。本研究では、ピロールが自己抗体および SG の認識に関与していると想定して、ピロール定量・修飾部位の同定およびピロール化タンパク質の特性解析を行った。

【方法・結果】γ―ケトアルデヒドの最小単位である 1,4-butanedial (BDA) とウシ血清アルブミンを PBS 中で反応させ、ピロール化タンパク質を作製した。ピロール化タンパク質を加水分解した後、LC-MS によるピロール化リジン定量を行ったところ、 BDA 濃度依存的にピロールの生成量が増加することを確認した。同様に、 BDA 濃度依存的に自己抗体および SG による認識が強まることを確認した。また、ピロール化タンパク質の伝導性およびゼータ電位を測定したところ、核酸に類似した特性を有することが示唆された。生体中におけるピロール化タンパク質の存在が、LC-MS/MS を用いた血清タンパク質中のピロールリジンの検出定量により確認された。さらに、ピロール化タンパク質(マウス血清アルブミン)を Balb/c マウスに免疫したところ、自己抗体の産生も確認された。以上の結果から、タンパク質のピロール化が新しい翻訳後修飾として生命現象に関わることが示唆される。

Posttranslational modification, Pyrrolation, Autoantibody

講演番号：2B06a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ B 校舎 06 会場

次世代シーケンサーを用いたアナジー化 T 細胞で発現が変動する遺伝子の網羅的解析

Comprehensive analysis of anergy related genes by next generation sequencer

○吉岡 雄介[1]、古崎 利紀[2]、石井 一夫[2]、服部 誠[1]、好田 正[1] ([1]東農工大院・応生化、[2]東農工大・農学系ゲノム科学人材育成プログラム)

○Yusuke Yoshioka[1], Toshinori Kozaki[2], Kazuo Ishii[2], Makoto Hattori[1], Tadashi Yoshida[1] ([1]Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]Human Resource Development Program in Agricultural Genome Sciences, Tokyo University of Agriculture and Technology)

【目的】私たちは T 細胞のアナジー化のメカニズムを解明することを目的として研究を行っている。T 細胞のアナジー化は、長期にわたって維持される抗原特異的な不応答状態であり、免疫系の恒常性の維持において重要な役割を果たしている。これまでアナジー化 T 細胞において複数のアナジー関連遺伝子の発現が変動していることが報告されてきたが、それらを同一の実験系で網羅的に解析した研究はない。本研究では、アナジー誘導によって発現が変動する遺伝子を次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した。

【方法】ナイーブ T 細胞はアナジー誘導に対して抵抗性を示すことが報告されているため、本研究では、DO11.10 マウスの脾臓由来のナイーブ T 細胞を、OVA、IL-12 の存在下で 2 週間培養することで誘導した Th1 細胞を用いた。アナジー誘導のために、固相化した抗 CD3 抗体と共に 20 時間インキュベートした。3 日間のレスティングの後、固相化した抗 CD3/28 抗体で再刺激を行った。再刺激の 4 時間後に細胞から抽出した total RNA を用いて、トランスクリプトーム解析のためライブラリーを作製し、アナジー誘導によって変動した遺伝子発現量を網羅的に比較した。

【結果】抗 CD3 抗体処理により、用いた Th1 細胞にアナジーが正しく誘導されていることは、IFN-γ 産生量を ELISA および qPCR によってコントロール群と比較することで確認した。網羅的解析の結果、アナジー誘導後の相対的な遺伝子発現量はアナジー/コントロールの比で表し、1.5 より大きいものを増加、0.67 未満を減少、その間を不変とした場合、アナジー誘導によって約 13%の遺伝子の発現量が変動していた。発現量の増加が認められた遺伝子の中には、Sirtuin 3 や Histone deacetylase 7 が含まれていることが新たに明らかになり、それぞれ約 3 倍、2 倍の増加が認められた。また、既にアナジー誘導後に発現が増加することが報告されている GRAIL や Egr2 等の遺伝子も増加していたことから、本研究の結果は、種々の実験系で誘導されるアナジーに広く適用できることが示唆された。トランスクリプトーム解析の精度を確認するために、上記の 4 遺伝子を含むいくつかの遺伝子発現量を qPCR で比較したところ、次世代シーケンサーによる網羅的解析とほぼ同様の変化が認められた。これらの結果から、今回得られたトランスクリプトーム解析の結果は信頼できるものであり、アナジー誘導性遺伝子にはヒストンの修飾に深く関わっているものが含まれていることが示された。この結果より、アナジーの誘導や維持においてエピジェネティックな遺伝子発現の制御の関与が示唆された。

Oral tolerance, T cell anergy, Transcriptome Analysis

講演番号：2B06a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ B 校舎 06 会場

α－ディフェンシン 5 遺伝子の転写調節エレメントの同定

Idenntification of transcriptional enhancer elements of the alpha-defansin5gene

○小早川 哲朗、高橋 恭子、栗原 健太、杉 由高、細野 朗、上野川 修一 (日大生資科)
○tetsuro kobayakawa, kyouko takahashi, kennta kurihara, yutaka sugi, akira hosono, shuichi kaminogawa (Nihon Univ)

「目的」

近年、腸内細菌叢が健康の維持に重要な役割を果たすことが注目されている。腸管上皮細胞（IEC）より産生される抗菌ペプチド α–ディフェンシンは、腸管に侵入した病原菌からの防御に加え、腸内細菌叢の調節・維持に関わっている。また、クローン病や炎症性腸疾患の患者において α-ディフェンシンの発現異常が報告されている。本研究では、良好な腸内細菌叢の維持機構の一端を明らかにすることを目的とし、IEC における α–ディフェンシン 5 遺伝子の発現制御機構を解析した。

「方法」

マウス α–ディフェンシン 5 遺伝子の翻訳開始点上流 1033bp の 5′領域のうち、これまでに転写を活性化することを明らかにしている 2 ヶ所の領域 nt-827/-622 および nt-415/nt-210 につき、レポーターアッセイにより転写活性化エレメントの同定を行った。nt-777/-1, nt-737/-1, nt-677/-1, nt-621/-1 と nt-376/-1, nt-334/-1, nt-294/-1, nt-244/-1 に相当する領域をルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んだレポータープラスミド、さらに nt-677/-622 および nt-293/-245 中で転写因子の結合が予測される配列に塩基置換を導入したレポータープラスミドを構築した。これらを腸管上皮細胞株 Caco-2 に導入して一過性の発現試験を行い、各遺伝子断片の転写活性能を測定した。次に nt-279/-277 および nt-660/-653 を中心とする蛍光標識 DNA プローブを作製し、Caco-2 細胞から抽出した核蛋白を用い、プローブと同じ配列あるいは無関係な塩基配列の非標識 DNA を添加してゲルシフトアッセイをおこなった。

「結果」

nt-827/-622 および nt-415/nt-210 の 2 ヶ所の 5′領域をそれぞれ 5′端から数十 bp ずつ欠失させてレポーターアッセイを行った結果、nt-677/-622 および nt-293/-245 に転写活性化エレメントが含まれることが示された。さらに、塩基置換の導入により、nt-677/-622 では転写因子 NF-κB の結合モチーフが、nt-293/-245 では Ets および NRF-2 の結合モチーフが転写活性化に関わることが明らかになった。さらに、これらの領域を含む蛍光標識プローブを作製し、競合ゲルシフトアッセイを行った結果、nt-660/-653 を中心とする領域に配列特異的に結合する核タンパク質が存在した。これらの結果より α–ディフェンシン 5 遺伝子の nt-660/-653 および nt-279/-277 を中心とする領域が転写活性化エレメントとして機能すること、また、後者のエレメントには配列特異的に結合する転写因子が存在することが示された。

defennsin, immune

講演番号：2B06a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ B 校舎 06 会場

パイエル板樹状細胞において TLR2 は TLR9 応答を選択的に抑制する

TLR2 selectively suppresses TLR9-induced responses in Peyer's patch dendritic cells

○上滝 隆太郎 [1,2]、輪島 隼一 [1,2]、塩河 亜弥 [1,2]、八村 敏志 [1,2] ([1] 東大院農生科・応生化、[2] 東大院農生化・食の安全研セ)
○Koutaki Ryutarou[1,2], Shun-ichi Wajima[1,2], Aya Shiokawa[1,2], Satoshi Hachimura[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [2]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo)

【目的】消化器官である腸管は、経口的に摂取される食餌性抗原や多数の腸内細菌といった異物に常に曝されており、免疫器官としても重要である。免疫応答の制御を司る細胞として樹状細胞 (dendritic cells; DCs) が知られている。当研究グループは特に腸内細菌に対する免疫応答に着目し、小腸パイエル板 (Peyer's patch; PP) DCs の Toll 様受容体 (Toll-like receptors; TLRs) を介した応答について研究を進めてきた。

TLRs は複数のサブタイプをもつパターン認識受容体ファミリーであり、それぞれが異なる微生物成分をリガンドとして認識する。このことから、多くの微生物は複数の TLRs を同時に刺激することで DCs に認識されると考えられる。しかし、複数の TLR 同士のクロストークについて未だ完全な解明には至っていない。

当研究グループはこれまでに、PP DCs において TLR2 刺激が TLR9 刺激特異的な *Il12b* および *Il27* 遺伝子の発現を抑制することを見出した。本研究ではこのような TLR2 による抑制的なクロストークの特性を明らかとすることを目的とし、TLR9 以外の応答に対する TLR2 の作用を調べた。

【方法】BALB/cA マウスの PP から MACS 法により CD11c 陽性細胞を精製し、PP DCs として用いた。PP DCs を TLR リガンド等の存在下で 12 時間培養し、qPCR 法により mRNA 発現を解析した。

【結果】TLR9 リガンド (CpG) 以外に *Il12b*, *Il27* の発現を誘導するリガンドとして、TLR7 リガンド (R848) が見出された。また、CpG は CD40 刺激と相乗的に働くことが報告されている。そこで、これらの応答に対する TLR2 リガンド (Pam_3CSK_4; P3C) 同時刺激の作用を調べた。

その結果、R848 や抗 CD40 抗体刺激により誘導された *Il12b* や *Il27* の発現は P3C との同時刺激下でも抑制されなかった。これに対して、CpG と抗 CD40 抗体により相乗的に誘導された応答は P3C との同時刺激により抑制された。これらの結果から、TLR2 による抑制的なクロストークは TLR9 応答に対して選択的に働き、CD40 刺激下でも TLR9 応答に作用すると考えられる。

Il12b や *Il27* の最終産物である IL-12 や IL-23, IL-27 の機能の一つとして、炎症性 T 細胞サブセットの誘導・維持が知られている。本研究で示された抑制的なクロストークは腸管免疫系において、腸内共生細菌に対する過剰な免疫応答の抑制と病原性微生物に対する適切な免疫応答の惹起とのバランスを保つメカニズムの一端を担っていると考えられる。このような免疫抑制的な応答の解明は、より効果的なプロバイオティクスの開発などに貢献することが期待できる。

immunity, Toll-like receptors, dendritic cells

講演番号：2B06a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ B 校舎 06 会場

腸管関連リンパ組織の細胞フェノタイプの発現は腸管部位ごとに異なる特徴をもつ

The expression of cell-surface phenotype in gut-associated lymphoid tissue is different among the intestinal site

○於 鉄峥[1]、鈴木 誠[1]、八村 敏志[2]、高橋 宣聖[3]、高橋 恭子[1]、上野川 修一[1]、細野 朗[1] ([1]日大生資科　食品生命、[2]東大院農生科・食の安全研セ、[3]感染研・免疫)
○Tetsuzen Oh[1], Makoto Suzuki[1], Satoshi Hachimura[2], Yoshimasa Takahashi[3], Kyoko Takahashi[1], Shuichi Kaminogawa[1], Akira Hosono[1] ([1]Nihon Univ., [2]Univ of Tokyo, Res Center for Food Safty, [3]Dep of Immunol, NIID)

【目的】

腸の中には膨大な数と種類のさまざまな細菌が共生しており、これらの腸内共生菌が腸管免疫系に強い影響を与えていると考えられる。近年、腸内細菌叢を構成している細菌種の中に宿主の炎症症状や生活習慣病との関連が指摘されているものもあり、腸内共生菌と腸管免疫系との相互関係について解明することは我々の健康にとっても重要である。ほとんどの腸内共生菌は大腸部位に存在しているが、これまでに解明されている腸管免疫系についての研究は小腸に関するものが多く、大腸免疫系において膨大な数の腸内細菌に対して炎症反応を起こさずに腸内環境を維持できる仕組みや組織の発達、機能はまだ十分に解明されていない。そこで本研究では、大腸部位の腸管関連リンパ組織の細胞を小腸パイエル板細胞と比較することによりその特徴を明らかにすることをめざした。

【方法】

BALB/c マウス(10~12 週齢)から腸管関連リンパ組織として小腸パイエル板(PP)、盲腸リンパ節(CeP)、結腸リンパ節(CoP)を採取してそれぞれ細胞溶液を調製した。さらに、各リンパ組織の構成細胞の特徴を調べるため、フローサイトメトリーによる細胞表面分子の解析により T 細胞フェノタイプなどについての細胞間の比較を行った。

【結果・考察】

$CD4^+$ T 細胞の活性化/ナイーブマーカーである CD45RB、CD62L、CD44、および CD69 分子の発現について解析を行ったところ、CoP 細胞は $CD4^+$ $CD45RB^{low}$ および $CD4^+$ $CD69^{high}$ の発現が PP および CeP 細胞に比べて顕著に低いこと、さらに、CoP 細胞の $CD4^+$ $CD62L^{low}$ は CeP 細胞よりも発現が低い特徴がみられた。これにより、活性化/ナイーブマーカーの発現から CoP においては $CD4^+$ T 細胞の感作型細胞の割合が他の腸管関連リンパ組織に比べて低い特徴をもつことが示唆された。腸内共生菌の数が多い大腸部位において、CeP と CoP における細胞フェノタイプは異なっていることが明らかとなり、特に，結腸部位の CoP の細胞特性は PP および CeP とは異なる可能性が考えられる。

cell-surface phenotype, Peyer's patch, cecal patch, colonic patch

講演番号：2B06a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ B 校舎 06 会場

経口免疫寛容において誘導される CD62L$^{high/int}$CD44^{int} および CD62L^{low}CD44^{high} T 細胞の機能解析

Functional analysis of CD62L$^{high/int}$CD44^{int} and CD62L^{low}CD44^{high} T cells induced in oral tolerance

○芝原 恭子[1,2]、田邊 康祐[1]、塩河 亜弥[1,2]、佐藤 隆一郎[1]、八村 敏志[1,2]（[1]東大院農生科・応生化、[2]東大院農生科・食の安全研セ）
○Kyoko Shibahara[1,2], Kohsuke Tanabe[1], Aya Shiokawa[1,2], Ryuichiro Sato[1], Satoshi Hachimura[1,2]
([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [2]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo)

【目的】経口免疫寛容とは経口的に摂取した食品抗原に対する免疫応答が抑制される機構であり、食物アレルギーの発症抑制機構であると考えられる。経口免疫寛容の成立においては、抗原特異的な T 細胞が免疫抑制的にはたらくことが重要である。Rag2$^{-/-}$DO11.10 マウスは、CD4^{+}T 細胞のすべてに卵白アルブミン特異的 T 細胞抗原レセプターを発現するトランスジェニックマウスである。このマウスに経口免疫寛容を誘導すると、CD62L$^{high/int}$CD44^{int} T 細胞、CD62L^{low}CD44^{high} T 細胞の 2 種類の T 細胞群が誘導されることをこれまでに報告した。さらに、これらの細胞群は異なる免疫抑制機構を有し、CD62L$^{high/int}$CD44^{int} T 細胞は抑制性サイトカイン TGF-βを介して T 細胞の増殖を抑制する一方、CD62L^{low}CD44^{high} T 細胞は抑制性サイトカイン IL-10 を高産生し、制御性 T 細胞のマスターレギュレーターFoxp3 を高発現して強い抑制活性を持つことが明らかになっている。そこで、これらの細胞群の性質をさらに解析し、経口免疫寛容の成立にどのように関与するか明らかにすることを目的として研究を行った。
【方法】Rag2$^{-/-}$DO11.10 マウスに卵白アルブミンを溶解した滅菌水を 7 日間自由摂取させ、経口免疫寛容を誘導した。マウスの脾臓、腸間膜リンパ節および肝臓の CD4^{+}T 細胞における CD62L$^{high/int}$CD44^{int}、CD62L^{low}CD44^{high} 細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。また、セルソーターを用いて、脾臓 CD4^{+}T 細胞より CD62L$^{high/int}$CD44^{int}、CD62L^{low}CD44^{high} 細胞を分取した。さらに、卵白アルブミンを投与していないマウスより CD62L^{high}CD44^{low} 未感作 T 細胞を分取した。分取した細胞中の mRNA 発現について、リアルタイム PCR を用いて解析した。
【結果】各組織の CD4^{+}T 細胞における CD62L$^{high/int}$CD44^{int}、CD62L^{low}CD44^{high} 細胞の割合を解析したところ、CD62L$^{high/int}$CD44^{int} 細胞の割合は他の組織に対して脾臓で最も高い一方、CD62L^{low}CD44^{high} 細胞の割合は肝臓で最も高かった。以上の結果より、経口免疫寛容誘導時に両細胞群は、組織によって異なる割合で誘導されている可能性が示された。また、各細胞群における mRNA 発現量を解析した結果、CD62L$^{high/int}$CD44^{int}、CD62L^{low}CD44^{high} T 細胞において、CD62L^{high}CD44^{low} 未感作 T 細胞に対して、T 細胞の低応答化に関連する遺伝子である *Egr2* および *Grail* の発現が増加していた。よって、両細胞群は T 細胞低応答化関連遺伝子の発現を亢進させ、抗原刺激に対して低応答化していることが示唆された。

Oral tolerance, Regulatory T cell, Anergy

講演番号：2B06p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ B 校舎 06 会場

ピンクペッパーによるマクロファージの炎症抑制機構

Anti-inflammatory effects of pink pepper on modulation of signaling pathway in LPS-stimulated RAW264.7

○松崎 義明、平井 静、江頭 祐嘉合（千葉大院・園芸・応生化）
○Yoshiaki MATSUZAKI, Shizuka HIRAI, Yukari EGASHIRA (Chiba Univ.)

【目的】ピンクペッパーは南米原産のウルシ科コショウボク（Schinus molle）の果実を乾燥させたものである。解熱剤、鎮痛剤、下痢、リウマチ、痛風などの民間薬として使用されてきたが、学術的な研究は少ない。そこで、本研究では、ピンクペッパー抽出物による炎症抑制作用について検討するため、RAW264.7 マクロファージ様細胞における Lipopolysaccharide（LPS）誘導性の一酸化窒素（NO）産生と炎症性サイトカインの分泌に及ぼす影響を検討した。
【方法】ピンクペッパーの粉末を 80%エタノールで抽出後、水とヘキサンで分配し、水画分とヘキサン画分を得た。10%FBS 含有 DMEM 培地中で培養し、5×105 cells/mL で播種したマウス由来 RAW264.7 マクロファージ様細胞に LPS とこれらの抽出サンプルを 50、100、200 μg/mL の濃度で添加した。24 時間後に細胞培養液を回収し、培養液中に放出された NO を Griess Reaction 法で、また TNF-α および IL-6 を ELISA 法で測定した。また、効果のあった画分に含まれる有効成分の探索を行うため、メタノールで分配した後、高速液体クロマトグラフィーを用いてさらに分画を行った。また、LPS 添加後に細胞質タンパクの回収を行い、MAPK（ERK、JNK、p38）発現、IκBα 発現を Western blot 法にて測定した。
【結果】ピンクペッパーの 80%エタノール抽出物、ヘキサン画分の添加により LPS 誘導性の NO 産生および炎症性サイトカインである TNF-α、IL-6 の分泌が有意に抑制された。このことから 80%エタノール抽出物中のヘキサン画分に抗炎症成分が含まれていることが示唆された。また、高速液体クロマトグラフィーによる分画により、有効成分が含有しているフラクションを絞り込んだ。現在、有効成分の同定および作用点の検討を行っている。

pink pepper, anti-inflammatory, macrophage

講演番号：2B06p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ B 校舎 06 会場

ウメ酢ポリフェノールのマクロファージにおける抗炎症作用の解析

Polyphenols from plum vinegar reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in macrophages

○小佐田 翔平[1]、森尾 大智[1]、武本 淳史[1]、堀西 朝子[1]、三谷 隆彦[2]、永井 宏平[1]([1]近大生物理工、[2]（財）わかやま産業振興財団)
○ SYOUHEI KOSADA[1], DAITI MORIO[1], ATUSHI TAKEMOTO[1], ASAKO HORINISHI[1], TAKAHIKO MITANI[2], KOUHEI NAGAI[1] ([1]BOST Kinki Univ., [2]Wakayama Industry Promotion Foundation)

〔目的〕近年、動脈硬化や糖尿病などの生活習慣病の背後に、弱い炎症反応が長期間にわたって続く「慢性炎症」が潜み、病状を悪化させていることが明らかとなってきた。特に、脂肪を過剰に蓄積した脂肪組織においてマクロファージ細胞が起こす慢性炎症が生活習慣病の進展に及ぼす影響が注目を浴びている。一方、梅干し製造時に生成される梅酢からポリフェノール類（ウメ酢ポリフェノール）を抽出する方法が近年開発され、実験動物を用いた実験により、脂肪燃焼効果、疲労軽減効果、血圧低下効果など様々な健康増進作用を有することが明らかにされてきた。しかしながら、ウメ酢ポリフェノールの抗炎症作用、特に慢性炎症を抑制する効果については、いまだ検討されていない。そこで、本研究ではウメ酢ポリフェノールとその構成成分、体内代謝物の抗炎症作用を Lipopolysaccharide (LPS)刺激したマクロファージ細胞を用いて検討した。

〔方法〕被験物質としてウメ酢ポリフェノール混合物、その構成成分であるクロロゲン酸、カフェ酸、p-クマル酸、シリンガ酸、および、その体内代謝物である安息香酸、馬尿酸、プロトカテク酸、没食子酸を用いた。マウス由来マクロファージ様細胞（RAW264.7）を 24 時間培養した後に、大腸菌（E.coli 55:B5）由来の LPS （100 ng/ml)とウメ酢ポリフェノール混合物（11-720 μg/ml）もしくは、その他の被験物質（32-2000 μM）を加え、さらに 24 時間培養した。その後、培養上清中の NO 濃度を Griess 法で評価した。更に炎症性サイトカインである TNFαと IL6 の濃度を ELISA 法で測定した。また、培養後の細胞の viability を MTS 試薬を用いて測定し、細胞毒性を示さない濃度での抗炎症作用を評価した。

〔結果と考察〕ウメ酢ポリフェノール混合物は、LPS で活性化された RAW264.7 細胞の NO 産生を濃度依存的に抑制し、最大（720 μg/ml）で 90%低下させた。更に、ウメ酢ポリフェノールの構成成分や体内代謝物のうち、カフェ酸が NO, TNFα, IL6 の産生を濃度依存的に抑制し、最大で（1 mM）それぞれ 70%, 36%, 30%低下させた。ここから、カフェ酸がウメ酢ポリフェノールの抗炎症作用に強く関与していることが示唆された。カフェ酸はウメ酢ポリフェノールの給餌によりマウスの血中に μM 単位の濃度で検出されることがわかっており、In vivo においてもウメ酢ポリフェノールの抗炎症作用が発揮されることが期待される。

Polyphenol, Plum vinegar, anti-inflammatory

講演番号：2B06p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ B 校舎 06 会場

卵黄ペプチドの抗炎症効果に関する検討

A study on the anti-inflammatory effect of hen egg yolk peptides.

○中村 紀夫[1]、宇野 賀津子[2]、原田 清佑[1]、丸 勇史[1]、金 武祚[1]、吉川 敏一[3] ([1]株式会社ファーマフーズ、[2]財団法人ルイ・パストゥール医学研究センター、[3]京都府立医科大学)

○Toshio Nakamura[1], kazuko Uno[2], Seiyu Harada[1], Isafumi Maru[1], Mujo Kim[1], Toshikazu Yoshikawa[3] ([1]Pharma Foods international Co., LTD, [2]Louis Pasteur Center for Medical Research, [3]Kyoto Prefectural University of Medicine)

［目的］ 鶏卵には生体を構成する全ての要素が含まれており、栄養価に優れた良質な食品である。21 日間という短期間で雛が育まれることから、身体の成長や再生に寄与する有効成分を含むであろうことは容易に想像される。我々はこれまで、卵黄タンパクの加水分解物から骨形成の促進や軟骨再生に寄与するペプチド成分の実用化に成功している。しかし、糖鎖構造を有する成分の機能性については未だ研究蓄積が乏しく、不明な点が多い。そこで、今般、卵黄タンパクの加水分解物から糖鎖構成分画を調製し、免疫系への作用に焦点をあてて研究開発を行った。

［方法］ 脱脂卵黄より酵素処理した分解物を粗精製し対象サンプルとした。TNF-α産生能、産生抑制能に関してはマウス由来の RAW264.7 培養細胞、及び、ヒト由来の THP-1 培養細胞を用い、それぞれ培養上清中の TNF-α を ELISA で測定した。ヒト経口摂取試験では、サンプル摂取群、プラセボ群各 8 名とし、摂取前と 2 週間継続的にサンプルを摂取した後の血中サイトカイン量を比較検討した。サイトカインの測定には Bio-Plex を用い、27 種のサイトカインを一括解析した。さらに、有効成分の単離を目的とし、糖鎖構造をもつペプチドの濃縮画分から各種クロマトグラフィーを用いた精製をおこない、質量分析にて同定をおこなった。

［結果］ 細胞試験の結果、対象成分は LPS 刺激による炎症性反応を有意に抑制する事が明らかとなった。また、ヒト経口摂取試験では、数種の血中サイトカイン、特に炎症性サイトカインの産生量を減少させる効果が確認された。さらに、対象成分のセルロースレジン、陰イオン交換による分画と TNF-α産生抑制能の確認により、有効成分は酸性糖ペプチド、あるいは酸性ペプチドである可能性を見出した。上述のように、これらのペプチドが抗炎症作用を示す可能性が見出されたこから、関節炎などの炎症性疾患、更にはアレルギー性疾患などの症状を緩和する新規成分として期待された。近年、加齢に伴う慢性炎症、「加齢炎症」が問題視されている。本研究の成果は、そのような加齢に伴う炎症体質を改善する新たなアンチエイジング素材の創出を期待させるものである。

Egg yolk, Anti-inflammatory, glycopeptide

講演番号：2B06p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ B 校舎 06 会場

腸内細菌のリノール酸代謝産物 10-Hydroxy-cis-12-octadecenoic acid はマウス腸管上皮細胞における TNFR2 発現を抑制し腸炎を緩和する

A gut microbial metabolite of linoleic acid, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, ameliorates colitis in mice by suppression of TNFR2 expression in the intestinal epithelial cells

宮本 潤基[1]、水呉 太一[1]、PARK Si-Bum[2]、岸野 重信[2]、小川 順[2]、鈴木 卓弥[1]、○田辺 創一[1] ([1]広島大院生物圏、[2]京都大院農)
Junki MIYAMOTO[1], Taichi MIZUKURE[1], Si-Bum PARK[2], Shigenobu KISHINO[2], Jun OGAWA[2], Takuya SUZUKI[1], ○Soichi TANABE[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】

リノール酸の乳酸菌代謝産物である 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid (HYA) が腸管内に存在することが確認され[1)]、ヒト腸管ホメオスタシス維持に与える効果が期待されている。我々は昨年の本大会において、HYA がヒト腸管上皮細胞培養株 Caco-2 細胞のバリア損傷を回復することを報告した。本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性腸炎モデルマウスに対する HYA の腸炎抑制・腸管バリア保護効果を検証した。

【方法】

BALB/c マウス（♀、6 週齢）に、3.5% DSS 溶液を 5 日間自由飲水させ、腸炎を誘導した。HYA あるいは HYA の飽和化産物 (10-hydroxyoctadecenoic acid, HYB) は DSS 投与開始前 5 日間と投与開始後 5 日間の計 10 日間、毎日 100nmol ずつ経口投与した。DSS 投与 5 日目に解剖を行い、腸炎症状の評価（体重変化・糞便スコア・大腸長・H&E 染色）、腸管バリア機能の評価（real-time PCR・免疫染色）、TNF receptor 2 (TNFR2)の発現と局在（real-time PCR・免疫染色・flow cytometry）を解析した。

【結果および考察】

DSS 群では腸炎症状（体重減少、下痢・血便、大腸長の短縮）や上皮の損傷が確認されたが、HYA 投与群はそれらの悪化を有意に回復した。また、HYA は、DSS 群で観察されたタイトジャンクション関連因子の mRNA 発現および局在の異常を回復した。さらに、DSS 群では、腸管における TNFR2 mRNA 発現および TNFR2 陽性上皮細胞が有意に増加したが、HYA はそれらを有意に抑制した。一方、HYB にはこれらの効果が認められなかったことから、HYA のもつ不飽和構造が腸炎抑制・腸管バリア保護に重要であると考えられた。

HYA の効果が in vitro および in vivo で確認されたことから、炎症性腸疾患など腸管バリア損傷と関連する疾病の予防・軽減に寄与することが期待される。腸炎マウスにおける HYA の作用点について、GPR40 シグナルなどを中心に今後検討する予定である。

1) Kishino *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **44**, 17808-17813, 2013.

lactic acid bacteria, gut microbiota, DSS colitis

講演番号：2B06p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ B 校舎 06 会場

腸内細菌のリノール酸代謝産物 10-Hydroxy-cis-12-octadecenoic acid は GPR40 シグナルを介して Caco-2 細胞における腸管上皮バリアの損傷を回復する

A gut microbial metabolite of linoleic acid, 10-Hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, recovers the intestinal epithelial barrier impairment in Caco-2 cells via GPR40-signaling

○宮本 潤基[1]、畑堀 翔[1]、PARK Si-Bum[2]、岸野 重信[2]、小川 順[2]、鈴木 卓弥[1]、田辺 創一[1] ([1]広島大院生物圏、[2]京都大院農)
○Junki MIYAMOTO[1], Sho HATABORI[1], Si-Bum PARK[2], Shigenobu KISHINO[2], Jun OGAWA[2], Takuya SUZUKI[1], Soichi TANABE[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】

我々は昨年の本大会において、10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid (HYA) が、TNF-α 刺激によるヒト腸管上皮細胞培養株 Caco-2 細胞のバリア損傷を occludin および ZO-1 のタンパク質発現を制御することによって回復することを報告した。本研究では、HYA の腸管バリア保護メカニズムを検討した。

【方法】

二層式の培養装置 (Transwell)で Caco-2 細胞を培養した。HYA あるいは HYA の飽和化産物 (10-hydroxyoctadecenoic acid, HYB)を各 50μM ずつ Caco-2 細胞に添加し、24 時間後、基底膜側に IFN-γ (50 ng/mL)を添加し 24 時間刺激した。その後、Caco-2 細胞を回収し、遺伝子およびタンパク質レベルで TNF receptor 2 (TNFR2)の発現解析を行った。また、長鎖脂肪酸受容体 GPR40 および GPR120 の mRNA 発現を解析した。次に、IFN-γ→TNF-α で Caco-2 細胞を刺激し、バリア損傷を誘導した。このとき、GPR40 antagonist である GW1100 を Caco-2 細胞に作用させ、HYA による腸管バリア保護（経上皮電気抵抗および FD-4 透過性）に対する GPR40 シグナルの寄与について検討を加えた。

【結果および考察】

IFN-γ 刺激により TNFR2 発現は mRNA・タンパク質レベルで上昇したが、HYA はこれらを抑制した（TNFR1 は抑制傾向）。さらに、HYA は GPR40 の mRNA 発現を誘導しており、GPR40 シグナルが腸管バリア保護に関与すると考えられた。このことは、GPR40 antagonist により、HYA の腸管バリア保護効果が消失あるいは減弱し、HYA による TNFR2 mRNA・タンパク質上昇抑制が減弱したことから支持された。従って、HYA は GPR40 シグナルを介して TNFR2 発現を制御することが、腸管バリア保護メカニズムの一つであると示唆された。一方、HYB には TNFR2 発現抑制効果や腸管バリア保護効果が認められなかった。

これまで、腸管における GPR40 シグナルと炎症抑制に関する報告はないことから、腸炎抑制の新たなメカニズムとして期待される。今後、in vivo においても GPR40 シグナルについて検討する予定である。

lactic acid bacteria, linoleic acid, GPR40

講演番号：2B06p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ B 校舎 06 会場

デキストラン硫酸ナトリウムで誘発したヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 の細胞傷害に対するローヤルゼリータンパク質の影響

Effect of the royal jelly proteins on dextran sulfate sodium-induced inflammation in human intestinal epithelial Caco-2 cells.

○松浦 遼太郎[1]、村松 和香[2]、上妻 由章[1,2]、米倉 政実[1,2] ([1]茨城大院農、[2]茨城大学農)
○Ryotaro MATSUURA[1], Waka MURAMATSU[2], Yoshiaki KOUZUMA[1,2], Masami YONEKURA[1,2] ([1]Ibaraki Univ. graduate school, [2]Ibaraki Univ. col. of Agr.)

【目的】健康食品として利用されているローヤルゼリーには 9 種類の主要ローヤルゼリータンパク質(MRJP1～9)やアピシン（分子量約 35 万の糖タンパク質）が見出されている。アピシン、MRJP1 及び MRJP2 には培養動物細胞の増殖促進作用が報告されている。また、本研究室と岐阜薬科大学との共同研究により、MRJP3 にはデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)で誘発したマウスの潰瘍性大腸炎に対して抑制作用があることが示されている。本研究では MRJP3、アピシン及び MRJP2 をローヤルゼリーより分離精製し、ヒト腸管上皮細胞株（Caco-2）を用いて、DSS 誘発性細胞炎症傷害に対するローヤルゼリータンパク質の作用を調べた。
【方法】MRJP3 はローヤルゼリーから陽イオン交換及びアフィニティクロマトグラフィー次いでゲル濾過を行うことにより精製した。また、アピシンと MRJP2 は既報のイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。Caco-2 細胞は、10% 牛胎児血清を含む D-MEM を用い、37℃、5%CO_2 の条件下で培養した。Caco-2 細胞に対する細胞傷害は 2%DSS を 4 時間暴露することで誘導した。ローヤルゼリータンパク質及びそのプロテアーゼ消化物の作用は、DSS との同時添加により、細胞数の変化及び IL-8 分泌量に対する影響を自動セルカウンター及び ELISA 法を用いて測定することにより調べた。
【結果及び考察】DSS 処理による Caco-2 細胞の細胞数の変化は殆どなかったが、IL-8 量は有意に増加した。MRJP3 の添加により、Caco-2 細胞の細胞数は減少の傾向を示したが、IL-8 量は変化しなかった。一方、DSS と MRJP3 の同時添加では、細胞数は変化せず、DSS 処理により増加した IL-8 量は有意に減少した。MRJP3 のペプシン消化物の添加は、細胞数及び IL-8 量には影響しなかったが、DSS との同時添加により IL-8 量は大きく増加した。MRJP3 のペプシン・パンクレアチン二重消化物の添加では、細胞数が有意に増加したが、IL-8 量は有意に減少した。また、DSS との同時添加では IL-8 量は DSS 単独処理に比べ有意に減少した。アピシンの添加では細胞数の増加傾向が見られ、IL-8 量は有意に増加した。DSS との同時添加では IL-8 量は相乗的に増加した。アピシンのペプシン消化物の添加では IL-8 量は殆ど変化しなかったが、DSS との同時添加では減少傾向が認められた。アピシンのペプシン・パンクレアチン消化物の添加では、IL-8 量の減少傾向が見られ、DSS との同時添加では IL-8 量の有意な減少が認められた。以上の結果から、MRJP3 及びそのペプシン・パンクレアチン消化物は IL-8 分泌量を減少させ、炎症傷害を軽減する可能性が示唆された。またアピシンは MRJP3 とは異なった作用を示すことが分かった。MRJP2 の影響についても報告予定である。

royal jelly, Caco-2 cell, intestinal inflammation

講演番号：2B06p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ B 校舎 06 会場

乳由来スフィンゴミエリン濃縮物の抗炎症作用及びその機構解析

Anti-inflammatory effects of sphingomyelin concentrate from bovine milk and its mechanism of action

○副島 理人[1]、酒井 史彦[2]、門岡 幸男[2]、古崎 利紀[1]、石井 一夫[1]、矢ヶ崎 一三[1]、三浦 豊[1]([1]東京農工大学・大学院農学研究院、[2]雪印メグミルク株式会社・ミルクサイエンス研究所)
○Rihito SOEJIMA[1], Fumihiko SAKAI[2], Yukio KADOOKA[2], Toshinori KOZAKI[1], Kazuo ISHII[1], Kazumi YAGASAKI[1], Yutaka MIURA[1] ([1]Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]Milk Science Research Institute, Megmilk Snow Brand Co.)

【目的】我々は、乳由来スフィンゴミエリン濃縮物(SPM Concentrate: SPC)を摂取させることでアトピー様皮膚炎マウスの皮膚炎症状が改善されることをすでに明らかにしており、その際 SPC が全身および皮膚局所で抗炎症作用を示す可能性を確認している。そこで本研究では、炎症モデルラット、炎症モデルマウスを用いて SPC の抗炎症効果を検討するとともに、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析によりその作用機構解析を行った。
【方法・結果】実験食には、対照食である 20%カゼイン食（20C）および 20C の脂質分の一部を 12%の SPC で置き換えた SPC 含有食を用いた。実験動物には Wister ラット、Balb/c マウスを用いた。ラット実験では 3 つの実験群を設け、①Normal 群(炎症を惹起せず、20C 食を摂取)②Control 群(炎症を惹起し、20C 食を摂取)③SPC 群(炎症を惹起し、SPC 含有食を摂取)とした。マウスの実験では、それら 3 群に④SPM 群(炎症を惹起し、20C 食を摂取し、SPM 9mg/ml を 10ml/kg B.W で経口投与)を加えた 4 群とした。なお、炎症の惹起には 2%カラゲニン溶液を用い、解剖前日に背部皮下に注射した。腹腔、脾臓のマクロファージの TNF-α産生能と、脾臓、腸間膜リンパ節のリンパ細胞の IFN-γ産生能を測定し抗炎症効果を検討した。また、マウスの脾臓細胞より総 RNA を調製し、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行った。ラット、マウスともに SPC 含有食の摂取により、炎症によって上昇した腹腔、脾臓マクロファージの TNF-α産生能が低下した。また、マウスでは SPM の経口投与により、脾臓マクロファージの TNF-α産生能のみ低下した。マウス、ラットともに脾臓、腸間膜リンパ節細胞の IFN-γ産生能は、炎症によって低下したものが SPC 含有食の摂取で上昇し、マウスでは SPM の経口投与によっても上昇した。これらの結果から、炎症によって変化したラット、またはマウスの TNF-α、IFN-γ産生能が SPC もしくは SPM の摂取により正常値に近づき、抗炎症作用が発揮されることが確認された。次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行った結果、炎症・免疫に関連する遺伝子を含む 255 個の遺伝子の発現が炎症により変動することが確認された。また、炎症時に SPC または SPM を摂取させることで、それぞれ 67 個、199 個の遺伝子の発現が変動することが確認され、SPM 摂取群のみ炎症・免疫関連の遺伝子が含まれていた。さらに SPM の摂取により、炎症で発現が増加もしくは減少した 77 個の遺伝子の発現がそれぞれ減少もしくは増加しており、Normal 群での遺伝子発現に近づいていることが確認された。現在、GO(Gene ontlogy)解析により、SPC、SPM の抗炎症効果の作用発現メカニズムを検討している。

inflammation, sphingomyelin, transcriptomics

講演番号：2B06p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ B 校舎 06 会場

薬剤誘発耳介浮腫モデルマウスにおける低分子化ヒアルロン酸経口摂取の影響

Effect of dietary low molecular weight hyaluronic acid on ear swelling induced by dinitrofluorobenzene in mice

○周 敬棠[1]、羽鳥 由信[2]、真鍋 祐樹[3]、菅原 達也[3]([1]京都大学、[2]日本新薬・食開研、[3]京都大学院・農)
○Keitou SHU[1], Yoshinobu HATORI[2], Yuki MANABE[3], Tatsuya SUGAWARA[3] ([1]Kyoto Univ., [2]Nippon Shinyaku Co., Ltd., [3]Graduate school of Kyoto Univ.)

【背景・目的】I 型アレルギーは日本国民の 30%以上が罹患していると言われており、患者数は年々増加している。そのため、I 型アレルギーを予防または改善する食品機能成分の研究が注目されている。細胞外マトリクスの構成成分の一つであるヒアルロン酸は医薬品やサプリメント、化粧品など様々な用途に用いられているが、経口摂取による I 型アレルギーに対する効果は明らかになっていない。これまでに我々はヒアルロン酸の構成糖の一つである N-アセチルグルコサミンの経口摂取による抗炎症作用を報告している（Life Sci. 86, 337-343, 2010）。低分子化したヒアルロン酸は小腸上皮細胞から吸収される可能性が示されていることから、ヒアルロン酸の経口摂取にも同様の効果が期待された。そこで本研究室では薬剤誘発耳介浮腫モデルマウスを用い、低分子化ヒアルロン酸の経口摂取による抗炎症作用を評価した。
【方法】実験動物には 7 週齢雌の BALB/c マウスを用い、AIN93G 組成中のセルロースパウダーを 1, 5, 10%の粘度平均分子量約 3000 の低分子化ヒアルロン酸ナトリウムにそれぞれ置換した飼料で一週間飼育した後、マウス背面皮膚に 2,4-Dinitro-1-fluorobenzene(DNFB)溶液を塗布した（感作）。さらにヒアルロン酸含有飼料で 6 日間飼育した後に、耳介に DNFB 溶液を塗布することで浮腫を誘発した（惹起）。6 および 24 時間後の耳の厚さを測定することで浮腫を評価した。解剖後、盲腸内の短鎖脂肪酸量をガスクロマトグラフィーで定量し、脾臓のサイトカイン発現量を RT-PCR 法と ELISA 法を用いて解析した。
【結果・考察】1%ヒアルロン酸食群において、DNFB によって惹起させた浮腫がコントロール群に比べて有意に抑制された。5 および 10%ヒアルロン酸食群では盲腸重量の有意な増加が認められ、盲腸内の短鎖脂肪酸量が有意に増加した。RT-PCR 法による脾臓の遺伝子発現解析の結果すべてのヒアルロン酸食群で IL-10 発現量が有意に抑制され、1%ヒアルロン酸食群で IL-18 と IFN-γ発現量は有意に増加した。また、ELISA 法による結果 IL-4 産生量が有意に減少した。以上の結果から、低分子化ヒアルロン酸の経口摂取は Th1/Th2 バランスに影響し、Th1 細胞が優位となることで耳介浮腫の抑制作用を示したものと考えられた。

low molecular weight hyaluronic acid, anti-inflammation, Th1/Th2 balance

講演番号：2B06p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ B 校舎 06 会場

ヤマブシタケのマクロファージおよび脂肪細胞に対する抗炎症作用とその有効成分の探索
Anti-inflammatory effects of *Hericium erinaceus* on macrophage and adipocyte, and identification of the active substance

○森 光一郎[1]、平澤 典保[2]、菊地 晴久[2]、大島 吉輝[2]、大内 謙二[1]([1]ホクト（株)、[2]東北大院薬)
○Koichiro Mori[1], Noriyasu Hirasawa[2], Haruhisa Kikuchi[2], Yoshiteru Oshima[2], Kenzi Ouchi[1] ([1]Hokuto Corp., [2]Tohoku Univ.)

＜目的＞メタボリックシンドロームの根底にあるとされる脂肪組織炎症には、マクロファージの脂肪組織への浸潤と炎症性サイトカイン分泌が大きく関与している。我々は、きのこ類に脂肪組織炎症を改善する作用を見出す為、マクロファージの炎症性サイトカイン産生に対する抑制活性を指標としてスクリーニングを行った。その結果、ヤマブシタケ抽出物が TLR4 を介したマクロファージのサイトカイン産生を強く抑制した。そこでヤマブシタケの TLR4 シグナル阻害作用をさらに解析するとともに、マクロファージと脂肪細胞の共培養下において、脂肪細胞に対する抗炎症作用を検討した。また、ヤマブシタケの TLR4 シグナル阻害活性成分の探索を行った。
＜方法＞ヤマブシタケ子実体のエタノール抽出物を、酢酸エチルと水で分配して得られた酢酸エチル可溶画分を活性試験のサンプルとした。RAW264 マクロファージをヤマブシタケ抽出物で前処理した後に LPS による刺激を行い、TNF-αおよび IL-6 の遺伝子発現量を定量的 RT-PCR 法により、タンパク質発現量を ELISA 法により測定した。また、LPS 刺激後の ERK、JNK、p38、および NF-κB の活性化をウェスタンブロット法により解析した。さらに RAW264 マクロファージと 3T3-L1 脂肪細胞を、セルカルチャーインサートを介して共培養を行い、ヤマブシタケ抽出物の前処理と LPS 刺激後に、脂肪細胞の IL-6、TNF-αおよびアディポネクチン遺伝子発現量を測定した。また、活性画分をカラムクロマトグラフィーで繰り返し分画して活性成分を単離し、NMR スペクトル解析により同定した。
＜結果・考察＞ヤマブシタケ抽出物は、LPS 刺激された RAW264 マクロファージの IL-6 および TNF-α産生を濃度依存的に有意に抑制した。また、LPS による ERK、JNK および NF-κB の活性化を抑制した。3T3-L1 脂肪細胞では、RAW264 マクロファージとの共培養と LPS 刺激により、IL-6 および TNF-α遺伝子発現量の増加と、アディポネクチン遺伝子発現量の低下が見られたが、ヤマブシタケ抽出物はこれを濃度依存的に有意に抑制した。ヤマブシタケに含まれる TLR4 シグナル阻害活性成分の探索の結果、１種類の活性成分を単離し、6β-methoxyergosta-7,22-diene-3β,5α-diol（MEDD）と同定した。MEDD は濃度依存的に LPS 刺激されたマクロファージの TNF-αおよび IL-6 産生を強く阻害したが、MEDD と類似の構造を有するエルゴステロールは LPS の作用を阻害しなかった。以上の結果から、ヤマブシタケは TLR4 シグナル阻害作用を介してマクロファージの炎症性サイトカイン発現を阻害することにより、脂肪組織炎症とこれに続くメタボリックシンドロームの進展を抑制する可能性があると考えられた。またその有効成分の一つとして、MEDD の存在が示された。

Hericium erinaceus, inflammation, adipocyte

講演番号：2B06p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ B 校舎 06 会場

小麦アルキルレゾルシノールは脂肪細胞の慢性炎症を予防する

Wheat alkylresorcinol prevents the chronic inflammation of adipose cells.

○福田 真人[1]、菊池 洋介[1]、福留 真一[1]、渡辺 純[2]、石川 祐子[2]([1]日清製粉グループ本社、[2]（独）農研機構・食総研)
○Masato Fukuda[1], Yosuke Kikuchi[1], Shinichi Fukudome[1], Jun Watanabe[2], Yuko Ishikawa[2] ([1]Nisshin Seifun Group Inc., [2]NFRI)

【目的】

近年、メタボリックシンドロームの原因として、肥満した脂肪細胞が慢性炎症を引き起こし、血中遊離脂肪酸の上昇や炎症性サイトカインの過剰産生を誘発することが報告されている。

本研究では小麦外皮に多く含まれるアルキルレゾルシノール（ARs）に着目し、脂肪組織の慢性炎症を誘導する餌と ARs を同時にマウスに摂取させ、ARs に慢性炎症予防効果があるか検討した。

【方法】

ARs 含有小麦ふすま抽出物を高脂肪食に 0.5%(w/w)混和し、C57BL/6J マウス(16 週齢雄)に自由摂食させた（HF-ARs 群)。対照として、通常食及び高脂肪食を自由摂食させた（それぞれ、ND 群、HF 群)。3 週間の摂餌後、体重・精巣周辺脂肪量を測定し、血清を採取した。血清から遊離脂肪酸量を測定した。また、精巣周辺脂肪組織における IL-6, MCP-1 などの炎症性サイトカインの遺伝子発現量を測定した。

【結果及び考察】

ND 群と比較して HF 群は体重、精巣周辺脂肪重量、血中遊離脂肪酸量が有意に高値を示し、HF-ARs 群では HF 群と比較して有意に低値を示し、ND 群と同等であった。また、精巣周辺脂肪組織の遺伝子発現量を測定した結果、IL-6, MCP-1 は ND 群と比較して HF 群が有意に高く、HF-ARs 群では HF 群よりも有意に低く、これらの遺伝子発現が抑制されていた。アディポネクチンおよび TNF-α は、3 群間で有意な差が認められなかった。

以上の結果、ARs 摂取により慢性炎症予防効果がある可能性が示唆された。

Alkylresorcinol, Chronic inflammation, Cytokine

講演番号：2B06p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ B 校舎 06 会場

ケルセチンが西洋型食で誘導される脂肪組織の免疫システム活性化に及ぼす影響

Quercetin suppresses immune system activation in visceral adipose tissue in Western diet-induced obese mice.

○山内 優輝[1,2]、高橋 弓子[1]、大池 秀明[1]、一法師 克成[1]、小堀 真珠子[1]([1]（独）農研機構　食品総合研究所、[2]日本製粉)
○Yuki YAMAUCHI[1,2], Yumiko TAKAHASHI[1], Hideaki OIKE[1], Katsunari IPPOUSHI[1], Masuko KOBORI[1] ([1]National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, [2]Nippon Flour Mills Co., Ltd.,)

【目的】
私達はこれまでにフラボノイドのケルセチンがマウスの食餌性肥満とそれに伴うメタボリックシンドロームに関連する諸症状の軽減に有効であることを明らかにした。一方、最近では食餌性肥満の内臓脂肪組織におけるマスト細胞や T 細胞等の免疫細胞の増加や活性化が、肥満から生活習慣病への進行に重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。そこで本研究では、ケルセチンが食餌性肥満における内臓脂肪組織の免疫システム活性化に及ぼす効果を検討する。

【方法】
C57BL/6J マウス（雄性、5 週齢）に 1 週間の馴化飼育後、標準食、西洋型食（高脂肪・高ショ糖・高コレステロール食)、0.05%ケルセチン添加西洋型食を 18 週間摂取させ、精巣周囲脂肪の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ及びリアルタイム RT-PCR 法により測定した。また、併せて体重、脂肪等の組織重量、血糖値等を測定した。

【結果】
西洋型食を 18 週間摂取することにより、標準食を摂取したコントロールマウスに比べて体重、肝臓、内臓脂肪組織重量は増加したが、ケルセチンを摂取することによりこれらの増加は有意に抑制された。DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の結果、このとき西洋型を摂取したマウスの脂肪組織ではコントロールと比べて、炎症や免疫細胞等に関わる約 3800 遺伝子の発現が有意に変動していることが明らかになった。また、ケルセチンを摂取したマウスの脂肪組織では、このうちマクロファージやヘルパーT 細胞等に関わる遺伝子発現が有意に抑制されていた。RT-PCR の結果から、マクロファージのマーカーである F4/80 や炎症性サイトカインの TNFα等の発現が西洋型食で誘導され、ケルセチンで抑制されることが明らかになった。また、ケルセチンは西洋型食で抑制される抗酸化酵素の発現を改善した。現在、更に遺伝子発現解析等を進め、ケルセチンの免疫システム活性化抑制効果を検討している。

quercetin, adipose tissue, inflammation

講演番号：2B06p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ B 校舎 06 会場

フェルラ酸によるアセトアミノフェン肝障害の抑制機序
Mechanism of suppression of acetaminophen liver damage due to ferulic acid
○山田 大貴（千葉大院園）
○Daiki YAMADA (Chiba Univ.)

【目的】
アセトアミノフェン(N-acetyl-*p*-aminophenol：APAP)は、解熱鎮痛薬として広く用いられているが、過剰に摂取すると肝細胞壊死を特徴とする肝障害を誘発することが報告されている。そのため、APAP は薬物性肝障害の研究を行う上でよく利用されている。現在、APAP がチトクロム P450 により NAPQI(N-acetyl-*p*-benzoquinone imine)に代謝され、これが過剰にある場合、細胞のタンパク質と結合することで、細胞障害や細胞死を生じさせることが明らかになっているが、APAP 肝障害の発症メカニズムは未だ不明な点が多い。
米糠等に含まれるポリフェノールである 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid(FA)は、抗酸化・抗炎症・神経保護等、様々な薬理的効果が期待されている。しかし、FA の摂取が APAP 肝障害に及ぼす影響については報告がない。そこで本研究では、マウスを用いて FA が APAP 肝障害に及ぼす影響、及びメカニズムについて検討した。
【方法】
C57BL/6 マウスを A(標準群)、B(対照群)、C、D、E(FA 投与群)に群分けし、A・B 群に AIN-93G を、C・D・E 群には FA 含量の異なる AIN-93G 食餌を摂取させ 1 週間飼育を行った。解剖前日、B・C・D・E 群に APAP を腹腔内投与して肝障害を誘発し、24 時間後に解剖を行った。回収した血液・肝臓中の血清トランスアミナーゼ(GOT・GPT)活性値、炎症性サイトカインレベル、MAPK 関連のタンパク質の発現を測定した。
【結果と考察】
FA の添加量が増加するに従い、血清トランスアミナーゼ活性、TNF-α、IL-6 レベルが低下することが示唆された。現在、炎症におけるシグナル伝達経路の 1 つである MAPK 経路に着目し、関与するタンパク質等の発現を測定し、そのメカニズムを検討している。

N-acetyl-p-aminophenol, 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid

講演番号：2B06p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ B 校舎 06 会場

ガーリック由来香気成分 diallyl trisulfide による肝臓虚血再灌流障害抑制効果
The protective effect of diallyl trisulfide on hepatic ischemia reperfusion injury.
○日吉 滉平[1]、長須賀 美紀[2]、渡辺 師成[1]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日本大院生資科、[2]日本大生資科)
○Kohei HIYOSHI[1], Miki NAGASUKA[2], Kazunari WATANABE[1], Takashi HOSONO[1,2], Taiichiro SEKI[1,2] ([1]Nihon Univ. Grad. school, [2]Nihon Univ.)

【背景】虚血再灌流障害（IR 障害）は脳梗塞や心筋梗塞などの血管疾患の治療後や臓器移植後に血流が再開する際、急激な再酸素負荷による酸化ストレスが原因となり惹起される臓器障害である。これまでに、ブロッコリーに含まれる sulforaphane は第二相薬物代謝酵素を誘導し、腎臓 IR 障害を抑制することが報告されている(J surgi, 2008)。演者らは、これまでにガーリック由来香気成分 diallyl trisulfide（DATS）が第二相薬物代謝酵素を誘導し、四塩化炭素誘導性肝障害を抑制することを報告している(J Nutri, 2009)。本研究では、DATS が第二相薬物代謝酵素を誘導することで肝臓 IR 障害を抑制できるか検討した。さらに、肝臓 IR 障害の回復に関与することが報告されている matrixmetalloprotease 9（MMP-9）にも着目して検討した。
【方法】ICR オスマウス（6 週齢）を予備飼育後、大豆油に溶解した DATS（500 μmol/kg b.w.）もしくは同量の大豆油のみを 5 日間連続で投与した。DATS 最終投与後 24 時間絶食し、門脈を動脈クレンメで遮断し、肝臓の 70%を 60 分間虚血した。その後、クレンメを開放して 3-6 時間再灌流し、肝臓と血液を回収した。肝臓における第二相薬物代謝酵素 glutathione-*S*-transferase と quinone oxidereductase 1 の発現と活性をウェスタンブロッティングならびに分光光学的測定法により測定した。MMP-9 活性は zymography により測定した。また、血漿 ALT 活性は富士ドライケムを用いて測定した。
【結果】DATS 投与マウスの肝臓を 60 分間虚血後、3 時間再灌流して臓器障害を惹起したモデルマウスにおいて、第二相薬物代謝酵素の活性・発現が誘導された。一方、このタイムポイントでは、肝障害マーカーである ALT 活性に差はなかった。再灌流 6 時間のマウスにおける血漿 ALT 活性は、大豆油前投与マウスにおける IR 群と比較し DATS 投与 IR 群では約 60%減少したが、酸化ストレスの指標である TBARS に変化はなかった。MMP-9 活性は、3, 6 時間再灌流両者の DATS 投与マウス IR 群で顕著に上昇した。
【結論】DATS により誘導された第二相薬物代謝酵素と MMP-9 は、肝臓 IR 障害の回復に関与している可能性がある。

Garlic, Ischemia reperfusion, Matrix metalloprotease 9

講演番号：2B06p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ B 校舎 06 会場

プロバイオティクスの炎症抑制作用を媒介するエキソソーム

Exosomes mediate anti-inflammatory action of probiotics

青木（吉田） 綾子[2]、大角 有里沙[1]、鶴田 剛司[1]、○園山 慶[1] ([1]北大院農、[2]農研機構・畜草研)
Ayako Aoki-Yoshida[2], Arisa Ohsumi[1], Takeshi Tsuruta[1], ○Kei Sonoyama[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]NILGS:NARO)

【目的】我々は、 *Lactobacillus plantarum* No.14 株の経口投与が食餌誘導性肥満マウスおよび２型糖尿病 KK/Ta マウスの体脂肪蓄積を抑制するとともに白色脂肪組織における炎症性サイトカイン遺伝子の発現を抑制することを観察した [1, 2]。この作用機序について、細胞外膜小胞であるエキソソームが抗炎症作用を媒介すると想定し、これを証明することを目的として以下の解析を行った。
【方法】C57BL/6N マウス（雄性 7 週齢）に No.14 株あるいは *L. plantarum* 基準株（各 10^8 cfu/頭）を 7 日間混餌投与した後、腹腔滲出細胞（PEC）を分離し、LPS（1 μg/ml）添加培地で 24 時間培養した後の培地中 TNF-α濃度を ELISA で定量した（実験 1)。次に、同様に飼育したマウスの血清から超遠心法によりエキソソームを分離し、別の無処置マウスから分離した PEC の培地に添加し、前述と同様に LPS 依存的な TNF-α産生を調べた（実験 2)。さらに、同様にして得たエキソソームをマウスマクロファージ細胞株 RAW264 の培地に添加し、LPS 依存的な TNF-α産生を調べた（実験 3)。エキソソームの分離は､電子顕微鏡による観察およびウェスタンブロッティングによる CD63 の検出により確認した。
【結果】実験 1 において、PEC 培養上清中の TNF-α濃度は、No.14 株投与マウスにおいて担体投与マウスおよび基準株投与マウスに比較して低値を示したので、No.14 株の経口投与が炎症抑制作用を示すことが確認できた。また実験 2 において、PEC 培養上清中の TNF-α濃度は、No.14 株投与マウスの血清から分離したエキソソームを添加した群においてエキソソーム非添加群および乳酸菌株非投与マウスのエキソソーム添加群に比較して低値を示した。さらに実験 3 において、RAW264 細胞培養上清中の TNF-α濃度は、やはり No.14 株投与マウスの血清から分離したエキソソームを添加した群においてエキソソーム非添加群ならびに乳酸菌株非投与マウスおよび基準株投与マウスのエキソソーム添加群に比較して低値を示した。また、代表的なプロバイオティクスである *L. rhamnosus* GG 株投与マウスの血清から分離したエキソソームの添加においても､RAW264 細胞培養上清中の TNF-α濃度の低値が認められた。
【結論】プロバイオティクス乳酸菌株である *L. plantarum* No.14 株および *L. rhamnosus* GG 株が発揮する炎症抑制作用の少なくとも一部はエキソソームが媒介することが示唆された。現在は、エキソソームの構成因子として miRNA に着目し、解析を進めている。
1) Takemura *et al.* 2010 *Exp Biol Med*、2) Okubo *et al.* 2013 *BMFH*

probiotics, exosome, inflammation

講演番号：2B06p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ B 校舎 06 会場

植物ホルモン様ペプチド leginsulin の動物細胞に対する機能性解析
Insulin-like activities of plant hormone-like peptide, leginsulin, in animal cells.
○坂野 太研、伴野 勧、大島 寛史、三好 規之（静岡県大院薬食生命）
○Taiken SAKANO, Susumu TOMONO, Hiroshi OHSHIMA, Noriyuki MIYOSHI (Univ. of Shizuoka)

［目的］大豆は、枝豆として食される未成熟期には緑色を呈し、完熟すると黄色く変化するのに対し、収穫期（完熟）まで緑色を呈するエチゴミドリやキヨミドリなど青大豆品種はクロロフィル、ショ糖、大豆オリゴ糖などの多くの成分が豊富に含まれていることなどから、生体に対する機能性が注目されている。我々は青大豆に含まれる機能性成分を探索する目的で、大豆および青大豆脱脂画分のエタノール抽出物を UPLC-Q-TOF-MS にて成分分析を行ったところ、36 および 37 アミノ酸残基からなるペプチド分子 leginsulin が青大豆に特徴的に含まれることを見出した。Leginsulin は、植物が発現しているチロシンキナーゼ受容体に低濃度（1 nM）で作用することが報告されている植物ホルモン様ペプチドであり、分子内に 3 つのジスルフィド結合を有する。しかし、leginsulin の動物細胞に対する作用については全く不明である。そこで本研究では、植物ホルモン様ペプチドである leginsulin が動物細胞に対してインスリン様活性を示すかどうかについて検討した。
［方法］青大豆（エチゴミドリ）粉砕物をヘキサンで脱脂し、70%エタノール抽出、凍結乾燥を行うことで、青大豆 70%エタノール抽出物を調整した。この青大豆 70%エタノール抽出物 5 mg/mL から HPLC（ODS カラム）を用いて leginsulin を分取・精製した。Leginsulin の動物細胞におけるインスリン様活性は、ヒト大腸がん由来 SW480 細胞を用いてインスリンシグナルの重要な分子である Akt のリン酸化をウエスタンブロット法にて評価した。また、ウシインスリンがマウスマクロファージ RAW264 細胞へのリポ多糖（LPS）曝露によって誘導される誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）発現を抑制することが報告されているので、leginsulin の iNOS 発現誘導抑制活性についてもウエスタンブロット法にて検討した。
［結果］青大豆 70%エタノール抽出物からの leginsulin の収率はおよそ 1%であった。Leginsulin は SW480 細胞への曝露後 15 分で 36.6 ng/mL まで濃度依存的に Akt のリン酸化亢進活性を示した。また、leginsulin は 10 μg/mL まで濃度依存的に RAW264 細胞への LPS 曝露による iNOS 発現誘導を有意に抑制した（66%抑制）。
［考察］青大豆に特徴的に含まれる植物ホルモン様ペプチド leginsulin は、動物細胞に対してインスリン様活性を示すことが培養細胞を用いた検討より示唆された。現在、leginsulin のインスリン様活性について詳細な分子メカニズムの解析を行っている。

Leginsulin, *Aodaizu*, insulin-like activities

講演番号：2B06p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ B 校舎 06 会場

腸管上皮細胞からの TGF-β1 産生誘導を伴う *Lactobacillus plantarum* 22A-3 の腸管炎症抑制効果
Induction of TGF-β1 from intestinal epithelial cell in relation to the anti-inflammatory effect of *Lactobacillus plantarum* 22A-3

○ランウボン ジャルカン[1]、橋本 堂史[1]、林 多恵子[2]、西谷 洋輔[2]、水野 雅史[1] ([1]神戸大院農、[2]丸善製薬・研究開発本部)
○Jarukan Lamubol[1], Takashi Hashimoto[1], Taeko Hayashi[2], Yosuke Nishitani[2], Masashi Mizuno[1] ([1]Kobe Univ., [2]Muruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.)

【目的】　乳酸菌は腸管炎症抑制効果を含めて、様々な生理活性をもつことが報告されている。しかし、乳酸菌の免疫調節機能は株特異的なものであり、作用機構も異なることが知られている。これまでに我々は、*in vivo* デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘導性腸炎マウスモデルを用いて、*Lactobacillus plantarum* 22A-3 の経口投与により腸炎を抑制することを明らかにした。また腸管組織における抗炎症性サイトカインである TGF-β1 mRNA および制御性 T 細胞のマーカーである Foxp3 mRNA の発現増加が認められた。そこで本研究では、*L. plantarum* 22A-3 の腸管上皮細胞における TGF-β1 誘導効果を調べるため、*in vitro* 腸管炎症モデルおよび *in vivo* ループアッセイ法を用いて検討した。
【方法】　*In vitro* 腸管炎症モデルでは小腸上皮様 Caco-2 細胞とマクロファージ様 RAW264.7 細胞を用いた共培養系で、*L. plantarum* 22A-3 の死菌体および細胞壁画分 (1×10^8 CFU/ml)を Caco-2 細胞側に処理した。サンプル処理 3 時間後にリポ多糖（LPS）で RAW264.7 細胞を刺激し、さらに 3 時間後に RAW264.7 細胞の培養上清を回収し、炎症性サイトカインである TNF-α 産生量を Killing Assay 法および活性型 TGF-β1 産生量を ELISA 法で定量した。また Caco-2 細胞の total mRNA を抽出し、Real-time PCR 法により炎症性ケモカインである IL-8 mRNA と抗炎症性サイトカインである TGF-β1 mRNA の発現量を測定した。*In vivo* での腸管上皮細胞における 22A-3 株の影響を検討するため、マウス小腸を用いたループアッセイを行った。麻酔下のマウス回腸に 3 箇所の結紮部位を設け、PBS、22A-3 株死菌体溶液（1×10^9 CFU/ml）を 100 µl 注入した。2 時間静置した後、 結紮部位を摘出し、上皮を剥離した。小腸上皮の total mRNA を抽出し、 TGF-β1 mRNA 発現を Real-time PCR 法で測定した。
【結果】　*In vitro* モデルにおいては、*L. plantarum* 22A-3 株の死菌体あるいは細胞壁画分処理によって、LPS 刺激による TNF-α 産生がそれぞれ 53%と 41% 、IL-8 mRNA 発現量が 80%と 72%抑制された。さらに、Caco-2 細胞中の TGF-β1 mRNA 発現はそれぞれ 238%と 170%に亢進され、活性型 TGF-β1 の産生量は 60−80 pg/ml であった。 ループアッセイにおいて、マウス腸管上皮細胞における TGF-β1 mRNA 発現は PBS 処理と比較して 22A-3 株死菌体処理によって 108%に増加した。以上の結果から、*in vitro* 腸管炎症モデルにおいても、*in vivo* においても 22A-3 株死菌体および細胞壁画分は腸管上皮細胞に対して TGF-β1 産生を誘導することが示され、炎症抑制効果に寄与する可能性が示唆された。

probiotics, anti-inflammatory, TGF-β1

講演番号：2B06p22
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ B 校舎 06 会場

皮膚機能を改善するパイナップル果実由来グルコシルセラミドによる小腸の IL-23 mRNA 発現の亢進

IL-23 mRNA expression enhancement in small intestine by glucosylceramides from pineapple in improvement of skin barrier function

○桑田 崇志[1]、野嶋 潤[2]、大戸 信明[2]、桑原 浩誠[2]、橋本 堂史[1]、水野 雅史[1] ([1]神戸大院農、[2]丸善製薬株式会社)
○ Takashi KUWATA[1], Jun NOJIMA[2], Nobuaki Oto[2], Hiroshige KUWAHARA[2], Takashi HASHIMOTO[1], Masashi MIZUNO[1] ([1]Kobe Univ., [2]Maruzen Pharmaceuticals Co. Ltd.)

【目的】近年、スフィンゴ脂質の経口摂取により皮膚機能が改善することが報告されている。我々はこれまでに、乾燥肌モデルマウス試験において、パイナップル果実由来グルコシルセラミド(P-GlcCer)の経口摂取による皮膚機能の改善効果を明らかにしてきたが、その作用機構については未だ明らかとなっていない。また、小腸上皮様 Caco-2 細胞とマクロファージ様 RAW264.7 細胞を用いた *in vitro* 疑似腸管炎症モデルにおいて、P-GlcCer を供した際に RAW264.7 細胞中での IL-23 mRNA 発現量の有意な亢進を確認している。そこで本研究では、P-GlcCer 経口摂取による改善効果の作用機構解明を目的として**再度**乾燥肌モデルマウス試験を行い、皮膚および小腸組織への影響を検討した。
【方法】5 週齢、雄の Hos:HR-1 ヘアレスマウスを、通常飼料群、特殊飼料(HR-AD)群、P-GlcCer (P-GlcCer 0.1%配合 HR-AD)群の 3 群に分けて各飼料を摂取させ、4 週後には経表皮水分蒸散量(TEWL 値)を測定した。1 週間ごとに屠殺・解剖を行い、背部表皮の組織学的解析および小腸組織における IL-23 mRNA 発現量の経時的変化を測定した。背部表皮は組織切片を作成し、H&E 染色を行った。IL-23 mRNA 発現量は、小腸組織の全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法によって測定した。
【結果および考察】飼育期間中のマウスの背部表皮を観察したところ、飼料摂取 3 週目以降の P-GlcCer 群において特殊飼料によって誘導されたシワの形成が抑制されていることが観察され、通常飼料群と同等の外観を示した。また 4 週後には、P-GlcCer 群において特殊飼料群と比較して TEWL 値の上昇を有意に抑制した。H&E 染色を行った背部表皮組織切片では、3 週目以降の P-GlcCer 群において、特殊飼料群に見られる表皮の肥厚が抑制された。また、小腸組織における IL-23 mRNA 発現量は特殊飼料群において経時的に増加し、P-GlcCer 群においては 3 週目以降でその IL-23 mRNA 発現量の増加が有意に亢進していた。このことから、これまでに検討してきた疑似腸管炎症モデルにおける P-GlcCer の効果が、*in vivo* 試験においても同様に見られることが明らかとなった。IL-23 は Th17 反応を誘導する炎症性サイトカインであるが、Nakagawa らは Th17 反応の促進によってアトピー性皮膚炎などの Th2 反応が抑制されることを明らかにしている。したがって、P-GlcCer 経口摂取による IL-23 mRNA 発現量の亢進が皮膚機能低下の抑制に寄与している可能性が示唆された。

glucosylceramide, dry skin, interluekin-23

講演番号：2B07a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ B 校舎 07 会場

プチヴェールの機能解析

Performance analysis of a Petit Vert

○小瀬木 一真[1]、糟谷 亮介[1]、山田 千佳子[1]、松田 幹[2]、和泉 秀彦[1]([1]名古屋学芸大院、[2]名大院・生命農)
○Kazumasa OZEKI[1], Ryosuke KASUYA[1], Chikako YAMADA[1], Tsukasa MASTUDA[2], Hidehiko IZUMI[1] ([1]Nagoya University of Arts and Sciences, [2]Nagoya Univ.)

【目的】プチヴェールはケールと芽キャベツの交配によって作り出された新奇のアブラナ科植物である。両者の長所を受け継いだ非結球性の芽キャベツで、一般の野菜に比べて栄養価が高く、糖度も 11～13 度と高いため食べやすい。アブラナ科植物にはケルセチン、ケンフェロールなどの機能性を有するポリフェノールが含まれており、生活習慣病の予防やアレルギーに効果的であることが知られている。しかし、プチヴェールの機能性や、それに関与している成分については明らかにされていない。そこで、プチヴェールの成分を分離して、親野菜であるケールや芽キャベツと比較し、抗アレルギー作用を解析することを目的とした。

【方法】各野菜 200g を 70%メタノール 500ml でホモジナイズし、ろ過後、50ml に濃縮した。次に、80%メタノール 350ml、ヘキサン 400ml を加えて液液分配抽出を行った。下層のメタノール層に同量のヘキサンを加え、再度液液分配抽出を行い、脂質を除いた。このメタノール層を 20ml に濃縮したものをダイヤイオン HP20 カラムに通し、水溶出画分、70%エタノール溶出画分をそれぞれ集め 20ml に濃縮した。それぞれの画分について、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル（DPPH）ラジカル補足活性と総ポリフェノール量を測定した。また、高速液体クロマトグラフィーによる成分の分離を行い、各野菜間での比較およびケルセチン標品との比較を行った。さらに、プチヴェール抽出液についてはビタミン C の測定を行った。抗アレルギー作用については、I 型アレルギーに対する抗アレルギー作用を持つ物質のスクリーニングに広く用いられているラット好塩基球白血病細胞（RBL-2H3）にプチヴェール水溶出画分、70%エタノール溶出画分をそれぞれ添加し、脱顆粒に対する作用を調べた。

【結果】DPPH ラジカル補足活性、総ポリフェノール量ともに、プチヴェールはケールよりメキャベツに近い値を示した。高速液体クロマトグラフィーによる成分の分離パターンもプチヴェールとメキャベツは類似していた。各野菜からはアグリコンであるケルセチンは検出されなかった。また、プチヴェール水溶出画分からはビタミン C が検出された。抗アレルギー作用に関しては、プチヴェール水溶出画分、70%エタノール溶出画分ともに何らかの活性成分を含有している可能性が示唆された。現在、プチヴェール抽出液の成分をさらに分離し、抗アレルギー作用について解析中である。

Petit Vert, polyphenol, RBL-2H3

講演番号：2B07a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ B 校舎 07 会場

柿へた由来成分の機能性解析（第２報）

Study on functional components from hull of persimmon

○折居 千賀（公益財団法人　東洋食品研究所）
○Chika ORII (Toyo Institute of Food Technology)

【目的】柿（*Diospyros kaki*）は古来より食用、薬用や染料として用いられるなじみ深い果物である。近年、健康に対する意識の高まりにより、柿渋タンニンや果皮由来成分の抗酸化活性、抗菌活性をはじめとした様々な研究がなされている。へた部位は古来よりしゃっくり止めや去痰の薬として用いられているが、他の機能性については明らかにされていない。本研究では前報[1)]に引き続き、幼果あるいは規格外果実の有効活用法として、へた部位を対象とし、成分およびその機能性について調べた。
【方法】中国産柿蒂（してい）、富有柿および次郎柿の成熟果、幼果へた部位をエタノール抽出し、柿へた抽出液を得た。減圧乾固にてエタノール不溶成分が生じたため、同成分を水に再溶し、水画分とした。これらを試料とし、ポリフェノール量、糖の吸収に関与するα-グルコシダーゼ、脂肪吸収に関与するβ-リパーゼおよび血圧上昇に関与するアンジオテンシン（ACE）変換酵素に対する阻害活性（IC_{50}）を調べ、比較した。また、中国産柿蒂抽出物の GC-MS 分析を行い、機能性に関与する成分を調べた。
【結果】ポリフェノール量は富有柿幼果へたが最も高い値を示した（7.25 mg-没食子酸相当量/1.0 g）。α-グルコシダーゼ阻害活性ではそれぞれに活性画分の相違が見られた。富有柿成熟果へたはエタノール画分（IC_{50}＝5.8 mg/ml）、水画分（IC_{50}＝15.7 mg/ml）ともにα-グルコシダーゼ阻害活性を示したが、幼果へたはエタノール画分（IC_{50}＝2.5 mg/ml）のみ活性を示した。β-リパーゼ阻害ではいずれの試料においてもエタノール、水画分ともに活性が見られた。ACE 阻害活性では、富有柿成熟果へたに最も高い活性が見られた（IC_{50}＝300.2 μg/ml）。なお、柿生葉では ACE 阻害活性は見られなかった。このことより柿へたは血圧上昇抑制に関与する化合物を含有することが示唆された。中国産柿へた抽出物を GC-MS 分析し、標品と比較した結果、既報のウルソール酸、ベツリン酸、オレアノール酸といったトリテルペノイド類のほか、スチグマステロールおよびβ-シトステロールと保持時間およびフラグメントパターンが一致するピークが得られた。ウルソール酸（IC_{50}＝124.2 μg/ml）、オレアノール酸（IC_{50}＝1339.7 μg/ml）にβ-リパーゼ阻害活性が見られ、ベツリン酸、β-シトステロールにおいても弱い阻害活性が見られた。いずれの化合物も、α-グルコシダーゼ阻害活性は示さなかった。これらのことより柿へた由来抽出物には血糖値上昇抑制作用、抗肥満作用および血圧上昇抑制作用に関与する化合物が含まれることを明らかにした。

1）日本農芸化学会大会講演要旨集（2013），p.605

hull of persimmon, α-glucosidase inhibition, ß-lipase inhibition

講演番号：2B07a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ B 校舎 07 会場

タマネギ外皮抽出物の *Staphylococcus aureus* に対する抗菌効果に関する研究
Study on the antibacterial activity of onion peel extract against *Staphylococcus aureus*
○黄 達[1]、橋本 堂史[1]、藍原 祥子[1]、金沢 和樹[1,2]、水野 雅史[1] ([1]神戸大院農、[2]吉備国際大地域創成農)
○Da HUANG[1], Takashi HASHIMOTO[1], Yoshiko AIHARA[1], Kazuki KANAZAWA[1,2], Masashi MIZHUNO[1] ([1]Kobe Univ., [2]Kibi International Univ.)

【目的】タマネギ外皮抽出物は黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）に対して抗菌活性を示すことが既に報告されている。タマネギ外皮抽出物に含まれるケルセチンはグラム陽性細菌の II 型トポイソメラーゼを阻害することから、本抽出物においてもケルセチンなどのポリフェノール類が *S. aureus* に対して抗菌効果を示す可能性が示唆された。しかし、本研究ではタマネギ外皮抽出物に比べケルセチンの *S. aureus* に対する抗菌活性が低かったことから、ケルセチン以外に *S. aureus* に対する抗菌成分が存在すると考え、単離・同定を行うこと目的とした。
【方法】淡路島にて有機 JAS 認定栽培（無農薬・無化学肥料栽培）で生産されたタマネギ外皮を 50%エタノールで抽出し、これを乾燥粉末にしたものをタマネギ外皮抽出物として実験に用いた。タマネギ外皮抽出物中のケルセチン、ケルセチン 4'-グルコシド、プロトカテク酸の含有量は HPLC-PDA を用いて常法に従って分析した。さらに、タマネギ外皮抽出物をヘキサン、ジエチルエーテル、酢酸エチル、1-ブタノールで順次抽出し、各抽出画分を得た。得られた各抽出画分の *S. aureus* に対する抗菌活性を寒天平板法により測定し、50%阻害濃度（IC_{50} 値）を算出した。
【結果】HPLC 分析によりタマネギ外皮抽出物中のケルセチン、ケルセチン 4'-グルコシド、プロトカテク酸は、それぞれ 55.7、16.8 および 47.5 μg/mg であった。タマネギ外皮抽出物は濃度依存的に *S. aureus* に対して抗菌活性を示し、その IC_{50} 値は 4.78 mg/ml であった。しかし、これと同濃度のケルセチン、ケルセチン 4'-グルコシド、プロトカテク酸、さらにこれらを組み合わせた混合物においては、タマネギ外皮抽出物と同レベルの抗菌活性を示さなかった。その一方で、ジエチルエーテル抽出画分に抗菌活性が認められ、その IC_{50} 値は 0.422 mg/ml であった。現在、ジエチルエーテル抽出物中の抗菌成分の単離・同定を行っている。

antibacterial, onion

講演番号：2B07a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ B 校舎 07 会場

ガーリック由来香気成分 diallyl trisulfide による白血病細胞のアポトーシス誘導機構とその分子標的の解明

Induction of apoptosis by diallyl trisulfide in leukemic cells and its possible mechanism.

○渡辺 師成、今井 孝俊、日吉 滉平、細野 崇、関 泰一郎（日本大院生資科）
○kazunari watanabe, Takatoshi Imai, Kouhei Hiyoshi, Takashi Hosono, Taiichiro Seki (Nihon Univ.)

【背景・目的】ガーリックは古来より食に供されており、発がん抑制、抗菌、抗炎症作用など様々な生理作用を示すことが報告されている。これらの生理作用はガーリック特有のアリル基を持つ有機硫黄化合物によるものと考えられている。我々はガーリック由来の有機硫黄化合物 diallyl trisulfide (DATS) がヒト大腸がん細胞の β-tubulin のシステイン残基を *S*-allyl 修飾し、細胞周期を G2/M 期で停止させ、アポトーシスを誘導することを明らかにした (J Biol Chem, 2005)。また、ヒト白血病細胞に対しては、ミトコンドリアにアポトーシスシグナルを伝達する c-jun N-terminal kinase (JNK) の活性化、ミトコンドリア膜電位の低下、caspase-9 の活性化などを介して細胞周期非依存的にアポトーシスを誘導することを明らかにしてきた。しかし、DATS の分子標的は明らかにされていない。そこで本研究では、白血病細胞における DATS のアポトーシス誘導メカニズムを解明することを目的に、JNK の上流のアポトーシス誘導酵素 apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) と、システイン残基の酸化還元を介して ASK1 の活性を制御する thioredoxin に着目して解析を行った。
【方法】ヒト白血病細胞株 Jurkat は 10% FBS 含有 RPMI-1640 培地で前培養した後、DATS を添加して一定時間培養した。回収した細胞の lysate を調製し、共免疫沈降法とウエスタンブロッティングにより、アポトーシス関連タンパク質の活性化について解析した。また、caspase-8 の阻害剤 (Z-IETD- FMK) や glutathione (GSH), *N*-acetylcysteine (NAC) が DATS によるアポトーシス関連タンパク質の活性化に及ぼす影響をウエスタンブロッティングにより解析した。
【結果と考察】DATS は ASK1 の活性化に影響を及ぼさず、JNK のリン酸化阻害剤 (SP600125) の前処理は DATS によるアポトーシス誘導を抑制しなかった。これらの結果から、DATS は ASK1 の活性化とは異なるメカニズムによってアポトーシスを誘導することが示唆された。さらに、death receptor を介した caspase-8 の活性化について検討を行った。その結果、DATS は caspase-8 を活性化すること、caspase-8 阻害剤の前処理によって DATS によるアポトーシス誘導が抑制されることが明らかになった。また、GSH, NAC の前処理によって DATS による caspase-8 の活性化やアポトーシス誘導は抑制された。これらの結果から、DATS は特定のタンパク質のシステイン残基を修飾し、caspase-8 を活性化することで、アポトーシスを誘導することが示唆された。

Apoptosis, Diallyl trisulfide, Leukemia

講演番号：2B07a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ B 校舎 07 会場

ヒトの肌状態に対するイチジク発酵液の効果

Effects of fermented fig solution on skin properties of women

○福島 沙帆子[1]、吉村 麻奈未[1]、井口 隆文[2]、渡辺 敏郎[2]、高岡 素子[1]([1]神戸女学院大学、[2]ヤエガキ発酵技研(株))
○Sahoko FUKUSHIMA[1], Manami YOSHIMURA[1], Takafumi IGUCHI[2], Toshiro WATANABE[2], Motoko TAKAOKA[1] ([1]Kobe College, [2]YAEGAKI Bio-industry, Inc.)

【目的】イチジク（*Ficus carica*）はアラビア南部が原産のクワ科の果実である。古くから栽培されており、古代ローマでは重要な甘味源のひとつであった。日本には江戸初期に伝来し、生果・乾燥品の他、ジャムやコンポート、ソースの原料等、幅広く利用されている。イチジクは糖質をはじめミネラルやビタミンが含まれ、特に食物繊維は水溶性、不溶性とも豊富に含まれていることから、便通改善に有効とされている。我々は、イチジクの肌への作用に着目し、イチジクを酵母で発酵させることで肌に対する効果を高めることができないか検討した。

【方法・結果】兵庫県産のイチジクの可食部をピューレ状にして加水後、殺菌したものを発酵前のイチジク液とした。このイチジク液にハチミツから単離された酵母、*Schizosaccharomyces octosporus*（HNY-8 株）を接種し、28℃で 3 日間培養後、加熱殺菌し、遠心分離して菌体と発酵液に分離した。回収した発酵液は pH6.0 に調整後、膜処理（0.45μm）したものをイチジク発酵液とした。イチジク発酵液の肌に対する効果を調べるため、まず単回評価における保湿効果を検証した。健常で肌トラブルのない 14 名の女子大学生および女子職員（平均年齢 25.2±4.9 歳）を被験者とし、室温 22℃の恒温室において前腕内側部に 1.5cm 四方のろ紙を 3 枚乗せ、水、イチジク液、イチジク発酵液を一定量（0.03ml）ろ紙に含ませ、1 分間肌に浸透させた後、ろ紙を除去した。その後、30 秒ごとに 5 分間、コルネオメーター（Corneometer825：インテグラル）にて肌水分量を測定した。その結果、イチジク発酵液は水やイチジク液と比較して高い保湿効果が認められた。次に、同じ被験者において長期評価における肌に対する効果を調べた。被験者は毎朝晩 1 回、左の前腕内側部にイチジク発酵液、右の前腕内側部に対照の水を一定量（0.05ml）塗布し、自然乾燥させた。肌の測定は、塗布前、塗布開始 2 週間後、4 週間後および塗布終了 1 週間後に実施した。肌水分量では単回評価の結果と同様に、イチジク発酵液塗布により高い保湿効果が認められた。肌水分蒸散量をテヴァメーター（TewameterTM300：インテグラル）で測定した結果、イチジク発酵液塗布は水塗布と比較し、水分蒸散量を抑制した。また、塗布部位のレプリカを撮影（i-scope 50XPL lens：Moritex）後、その画像を Image J にて解析し、肌のキメを数値化した。その結果、イチジク発酵液塗布は、塗布 2、4 週間後、塗布終了 1 週間後において、水塗布と比較し有意に肌のキメを高めた。以上の結果からイチジク発酵液は肌に対する有用な効果があることが示唆された。

skin, fig, fermentation

講演番号：2B07a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ B 校舎 07 会場

小麦ふすまはメチル水銀の尿中排泄を促し、組織中水銀濃度を減少する

Wheat bran enhances urinary elimination and reduces accumulation of mercury after methylmercury exposure in mice.

○永野 匡昭[1]、藤村 成剛[1]、岩崎 一弘[2]、稲葉 一穂[2]([1]国立水俣病総合研究センター、[2]国立環境研究所)
○Masaaki NAGANO[1], Masatake Fujimura[1], Kazuhiro IWASAKI[2], Kazuho INABA[2] ([1]National Institute for Minamata Disease, [2]National Institute for Environmental Studies)

【目的】我が国を含め諸外国においても、メチル水銀曝露に対して感受性が高い胎児脳への影響を考慮し、妊婦や妊娠している可能性がある女性を対象として、水銀濃度が高い一部の魚介類等の摂食を制限する勧告が行われた。小規模金鉱山が多数存在するアマゾン川流域のコミュニティでは、平均毛髪水銀濃度が 15 ppm を超え、広範囲にメチル水銀曝露を受けている。さらに、魚を主食とするアマゾン川支流の村の女性を対象とした調査研究において、トロピカルフルーツの摂取頻度が高い人ほど毛髪水銀濃度が低いことが明らかとなっている。この報告は食生活（習慣）によって水銀被害のリスクを減らせる可能性を示唆している。本研究では、食物の機能からメチル水銀のリスク予防につなげることを目的とし、まずは水銀排泄作用を有することが報告されている食材として小麦ふすまに注目し、そのメカニズムについて検討を行った。
【方法】3 週令の BALB/c 系雌性マウスにベース飼料（AIN-76 精製飼料）または 30%小麦ふすま添加飼料を試験期間中与えた。摂餌開始 3 ヶ月後、塩化メチル水銀（5 mg/kg 体重）を単回経口投与し、投与後 4 週間の糞および尿を集めた。投与 6 週間後、エーテル麻酔下で心臓より採血を行い、生理食塩水を用いて全身還流後、脳、肝臓および腎臓を摘出した。排泄物および組織中水銀は酸素燃焼－金アマルガム法により測定した。
【結果・考察】実験終了時の組織中総水銀濃度を測定したところ、30%小麦ふすま添加飼料を摂餌したマウス（以下、小麦ふすま群）では、ベース飼料を摂餌したマウス（以下、対照群）に比べて血液、脳および腎臓において有意な減少が観察された。また、小麦ふすま群の組織中無機水銀の割合は、対照群と比べて肝臓および腎臓において有意な増加が認められた。次に、排泄物中総水銀濃度を測定したところ、小麦ふすま群の累積尿中総水銀排泄量は対照群と比べて顕著な増加が認められたが、累積糞中総水銀排泄量は有意な差は認められなかった。塩化メチル水銀投与 1 日および 28 日後の排泄物における無機水銀量を測定した結果、糞と尿ともに無機水銀の割合は低かったことから、その大部分はメチル水銀と考えられた。以上の結果から、塩化メチル水銀曝露後の小麦ふすまによる水銀排泄促進作用は、尿中への排泄が大きく寄与していることが明らかとなった。現在、小麦ふすまの水銀排泄促進作用のメカニズムについて引き続き検討中である。

Wheat bran, Methylmercury

講演番号：2B07a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ B 校舎 07 会場

サツマイモ茎葉中のカフェオイルキナ酸類分析法の単一試験室での妥当性確認

Single-laboratory validation for the determination of caffeoylquinic acid derivatives in sweet potato leaves

○佐々木 一憲、沖 智之、小林 透、甲斐 由美、奥野 成倫（農研機構・九州沖縄農研）
○Kazunori SASAKI, Tomoyuki OKI, Toru KOBAYASHI, Yumi KAI, Shigenori OKUNO (NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center)

［目的］サツマイモの茎葉及び塊根中には、ポリフェノールの一種であるカフェオイルキナ酸類（CQAs）が多く含まれている。CQAs は抗酸化性をはじめとする様々な生理機能を有していることが明らかとなっており、注目されているポリフェノールの一つである。一方、CQAs を対象とした分析法は数多くあるが、標準化された分析法は存在しない。標準化された分析法の存在は、分析値の信頼性を高めるため、また分析値の相互比較のためにも不可欠である。そこで本研究では、サツマイモ茎葉及び塊根中の CQAs 分析法の標準化を進めるため、サツマイモ茎葉及び塊根を材料として、HPLC で分別定量できる条件を設定するとともに、サツマイモ茎葉を材料として単一試験室での分析精度を確認した。
［方法］分析対象であるサツマイモ茎葉（品種「すいおう」）及び塊根（品種「アケムラサキ」、「パープルスイートロード」、「ムラサキマサリ」）は九州沖縄農業研究センター・都城研究拠点で栽培されたものを用いた。本研究では、クロロゲン酸（ChA）で作成した検量線を用いて、各 CQAs を ChA 当量で測定した後、その値にモル吸光係数と分子量から算出した定量係数を乗ずることにより、サツマイモ茎葉及び塊根中の CQAs を分別定量する分析法の条件を検討した。さらにサツマイモ茎葉については、異なる 3 濃度（総 CQAs：9.0、4.5、2.3 g/kg）の CQAs 濃縮物を添加して、一日あたり 2 反復の測定を異なる 5 日間行う繰り返し試験を実施することで、添加回収率と単一試験室での分析精度を確認した。
［結果］主要な 8 種の CQAs（CA、ChA、Crypto-ChA、Neo-ChA、3,4-diCQA、3,5-diCQA、4,5-diCQA、Tri-CQA）のピークがサツマイモ茎葉及び塊根由来の成分と分離する ODS カラムを用いた HPLC 条件を設定した。サツマイモ茎葉及び塊根から CQAs を効率良く抽出する溶媒組成と抽出回数について検討し、最適化を行った。設定した分析法にもとづいて行ったサツマイモ茎葉での添加回収試験の結果、Tri-CQA を除く 7 種の CQAs において回収率が 93.9~101.0%であり、AOAC の定める許容添加回収率の範囲に収まった。また併行相対標準偏差及び中間再現性相対標準偏差は、それぞれ 1.3~3.3%、1.9~5.5%の範囲であり、本分析法が良好な併行精度及び室内再現性を示すことが確認できた。

Single-laboratory validation, Caffeoylquinic acid, Sweet potato leaves

講演番号：2B07a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ B 校舎 07 会場

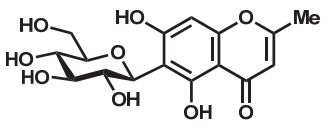
クローブ抽出物に含まれるテストステロン 5α-リダクターゼ阻害物質の探索

Search for testosterone 5α-reductase inhibitors from *Syzygium aromaticum*

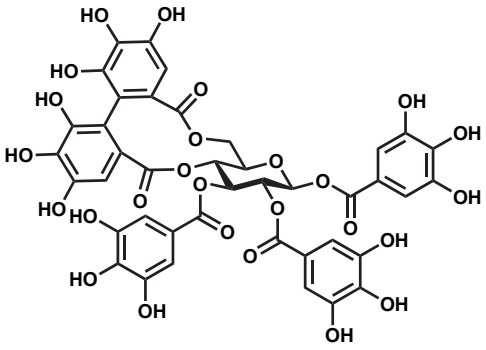
○上西 雄大、加藤 英介、川端 潤（北大院農）
○Yuta UENISHI, Eisuke KATO, Jun KAWABATA (Hokkaido Univ.)

研究背景） 男性型脱毛症（Androgenetic alopecia; AGA）はジヒドロテストステン（DHT）の蓄積が原因で生じる脱毛症である。DHT は男性ホルモンであるテストステロンがテストステロン 5α-リダクターゼ（T5αR）によって還元されて生成する。頭皮で蓄積した DHT は皮脂腺から皮脂の分泌の更新し、毛乳頭から毛髪の成長を停止するシグナルを誘発することで、脱毛を促進する。従って T5αR の阻害は、脱毛を遅らせ AGA の治療に有効である。現在男性型脱毛症治療薬として用いられているプロペシアは T5αR 阻害型の薬である。しかしプロペシアは処方箋が必要なうえに、自由診療扱いであるため治療費は全額自己負担になってしまう。また、肝機能障害の副作用が報告されている。そこで本研究では手軽に摂取でき、医薬品に比べて安価で、生体に悪影響を与えない穏やかな作用を有する男性型脱毛症対策機能性食品の開発を目指し、天然から T5αR 阻害物質の探索を行うこととした。

方法・結果） 各種植物抽出液および市販の漢方薬抽出液のスクリーニングを行った結果、クローブ(Syzygium aromaticum）の抽出液に高い T5αR 阻害活性を見出した。クローブを 50%メタノール水溶液で抽出し、ヘキサン、酢酸エチルで分液した。それぞれの画分を阻害活性試験に供したところ水層に最も高い活性が見られた。続いて水層を吸着カラムクロマトグラフィーに供し、逆相カラムクロマトグラフィーに 3 回供し、最後に HPLC で分取を行った。その結果、活性物質として Eugeniin (IC_{50} 760 μM)と Biflorin (IC_{50} 5 mM 以上)を単離した。



Biflorin



Eugeniin

Androgenetic alopecia, testosterone 5α-reductase, Syzygium aromaticum

講演番号：2B07a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ B 校舎 07 会場

サケ白子由来血糖値上昇抑制ペプチドの開発

Peptides controlling blood glucose level from salmon milt

○鎌田 彰[1]、稲橋 佑起[2]、小西 達也[1]、広瀬 あかり[1]、高橋 義宣[1] ([1]マルハニチロ、[2]北里大北里生命科学研)
○ Akira KAMATA[1], Yuki INAHASHI[2], Tatsuya KONISHI[1], Akari HIROSE[1], Yoshinori TAKAHASHI[1] ([1]MNHD, [2]Kitasato Institute for Life Sci.)

【目的】生活習慣病の１つである糖尿病の患者数は増加の一途をたどり、社会的な問題となっている。近年、予防に重要な食後血糖値の上昇抑制に対して、インスリン分泌を促進するインクレチン（GLP-1、GIP）の作用が注目を集めている。このインクレチンの分解酵素 Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP4）を活性を阻害し、インスリン分泌を維持することで、血糖値上昇抑制効果が期待されている。
【方法および結果】我々はこの DPP4 阻害に着目し、食経験を有する天然物、特に水産資源からの DPP4 阻害活性成分の探索を行った。

その中で、サケ白子のプロテアーゼ加水分解処理で得られた分解物に高い DPP4 阻害活性を見出した（IC_{50}=786 μg/mL）。また、SD ラットを用いたデンプン負荷試験においても分解物投与量 100 mg/kg で有意に食後血糖値上昇抑制効果を示した。よって、サケ白子酵素分解物には血糖値上昇抑制が期待された。また、サケ白子は一部は食用等に利用されているが、大部分は廃棄されており、廃棄物の活用としても有効であると考えられた。

そこで、DPP4 阻害活性を指標にサケ白子酵素分解物に含まれる活性成分の探索を行った。スチレン系合成吸着剤やシリカゲルカラムによる分画、LCMS-IT-TOF および NMR 分析の結果、3 種の新規配列を含む 12 種類の活性ペプチドを同定した（IP、LP、FP、VPI、VPL、IPI、IPL、LPL、LPF、VPFP、LPVL、FPVG）。また、LC-MS/MS によるこれらのペプチド定量方法を確立した。今回同定した活性ペプチド含量と酵素分解物の DPP4 阻害活性を測定し、相関関係があることを確認し、これらのペプチドが DPP4 阻害（血糖値上昇抑制）に対し重要な因子であると考えられた。

以上より、水産資源、特に未利用のサケ白子から DPP4 阻害活性ペプチドが得られ、血糖値上昇抑制効果が確認された。食品素材由来の血糖値改善効果は、食から健康を維持することにつながると考えられ、無理のない改善が期待された。

DPP4, Blood glucose level, Salmon milt

講演番号：2B07a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ B 校舎 07 会場

血管内皮細胞おける黒大豆の抗糖化作用

Anti-glycation activity of black soybean in vascular endothelial cells

○吉田 泉、原田 哲平、渡辺 章夫、三嶋 隆、藤田 和弘、渡井 正俊（日本食品分析センター）
○Izumi Yoshida, Teppei Harada, Akio Watanabe, Takashi Mishima, Kazuhiro Fujita, Masatoshi Watai (Japan Food Research Laboratories)

【目的】糖とタンパク質が非酵素的に結合する反応は糖化と呼ばれ、食品化学の分野ではメイラード反応として広く知られているが、近年、生体内でも糖化反応が起こっていることが明らかになってきた。糖化によって生成された最終糖化産物(Advanced Glycation Endproducts；AGEs)は、肌・骨・血管・脳・内臓などあらゆる場所に蓄積し、肌の老化(くすみ・しわ・たるみ)や骨の老化(骨粗しょう症・変形性関節症)だけでなく、最近では、動脈硬化症、神経性疾患、腎疾患など様々な症状を引き起こすことが報告されている。本研究では、AGEsが血管内皮細胞上に存在するAGEsの受容体(Receptor for AGEs；RAGE)と結合することにより情報が伝達され、炎症反応の惹起・接着因子の発現亢進が起こってアテローム性動脈硬化症を発症することに着目し、血管内皮細胞への単球接着抑制作用により抗糖化作用を評価する方法を確立した。今回、この方法を用い、黒大豆の血管内皮細胞における抗糖化作用の検討を行った。
【方法】黒大豆からの抽出は 50%エタノールで抽出を行った。抗酸化作用は ORAC 法により測定した。抗炎症作用は RAW264 細胞を用い、LPS 刺激による NO 産生亢進に対する抑制率により評価した。血管内皮細胞における抗糖化作用は、ヒト血管内皮細胞 HUVEC に黒大豆抽出液を AGEs と同時に反応させた後、蛍光色素(BCECF-AM)を導入したヒト単球性白血病細胞 THP-1 細胞と共培養し、接着抑制試験を行うことによって評価した。また、HUVEC における接着因子の発現はフローサイトメーターにより測定した。なお、比較対象として大豆についても同様に操作し、抗酸化作用、抗炎症作用、抗糖化作用を測定した。
【結果】抗酸化作用は、大豆に比べて黒大豆の方が強かった。抗炎症作用は、黒大豆と大豆においてほぼ同程度認められた。AGEs と反応した HUVEC への THP-1 細胞の接着反応は、黒大豆および大豆において濃度依存的な抑制作用が同程度見られた。また、接着因子 ICAM-1 の発現抑制も黒大豆および大豆において認められた。以上のことから、プロアントシアニジンなどのポリフェノールやイソフラボンを含む黒大豆には、従来報告されている抗酸化作用、抗炎症作用、抗肥満作用、骨代謝改善、更年期障害改善等に加えて、AGEs によって発症するアテローム性動脈硬化症を予防する可能性があることが示唆された。

AGEs, HUVEC, black soybean

講演番号：2B07a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ B 校舎 07 会場

トマト果実における oxo-octadecadienoic acids 及び脂肪酸のプロファイル解析

Profile analysis of oxo-octadecadienoic acids and free fat acids in tomato fruits

○鎌苅 浩介[1]、高橋 春弥[1]、鈴木 秀幸[2]、後藤 剛[1,3]、高橋 信之[1,3]、柴田 大輔[2]、河田 照雄[1,3]（[1]京大院農・食品生物、[2]（財）かずさ DNA 研、[3]京大 生理化学研究ユニット）
○ Kosuke KAMAKARI[1], Haruya TAKAHASHI[1], Hideyuki SUZUKI[2], Tsuyoshi GOTO[1,3], Nobuyuki TAKAHASHI[1,3], Daisuke SHIBATA[2], Teruo KAWADA[1,3] ([1]Grad. Sch. Agric. Kyoto Univ., [2]Kazusa DNA Res. Inst., [3]Kyoto Univ. Research Unit for Physiological Chemistry)

【目的】近年、先進国を中心に肥満人口が増加しており、それに伴い肥満に代表される生活習慣病が社会問題となっている。この生活習慣病の一つに脂質代謝異常があり、動脈硬化症や脂肪肝を引き起こす原因となっている。したがって脂質代謝異常の予防は健康を維持するために重要となる。ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体（PPAR）α は、脂質代謝関連遺伝子の転写制御を行うことから、PPARα活性化は、脂質代謝異常の改善に有効であると考えられる。当研究室では、PPARα のリガンドとなる 13 及び 9-oxo-octadecadienoic acids（13oxoODA 及び 9oxoODA, 以下まとめて ODA）をトマトから同定した。ODA は脂肪酸を基質とするリポキシゲナーゼの酸化反応よる生成物の一つであるが、トマト果実中での ODA や基質となる脂肪酸の局在性については不明な点が多く残されている。本研究では、トマト果実における ODA 及び脂肪酸の局在性を解明することを目的とした。
【方法・結果】(1) トマト果実（桃太郎）における ODA 局在性の検討：トマト果実をゼリー、果肉、果皮の部位別に分け、それぞれ室温破砕、液体窒素化破砕した。このときの各部位での ODA 含有量比較を行った。ODA は液体窒素化破砕において主に果肉、果皮に含有された。さらに ODA は室温破砕により各部位で増加し、特に果皮で著しく増加した。異性体別ではどの部位でも 13-oxo-ODA と比較し、9-oxo-ODA が多く含まれた。(2) トマト果実における脂肪酸局在性の検討：ODA 同様、部位別、抽出方法別に各種脂肪酸（C14～C22）を定量した。ODA の前駆体であるリノール酸に着目すると、ODA 含有量が低いゼリーにおいて比較的多く含有され、室温破砕により増加するのに対し、ODA 含有量が高い果肉、果皮では含有量も比較的少なく、室温破砕による著しい増加は見られなかった。これより、果肉、果皮に ODA 生成酵素が比較的豊富に存在し、室温破砕時に生成され基質となるリノール酸は即座に反応し ODA となる一方、ゼリーでは反応が進まず基質のリノール酸が蓄積されやすいことが示唆された。(3) 加温によるトマト中 ODA 量変化の検討：トマト果実破砕後、各温度（0, 37, 60℃）で 30 分培養し、ODA を定量したところ、37℃培養において ODA が最も多く含有された。またトマト果実破砕後、37℃で各時間（0, 5, 10, 20, 30, 60 分）培養し、ODA を定量した。時間依存的に ODA 含有量が増加した。
【まとめ】トマト果実中各部位での ODA 及び脂肪酸のプロファイルを明らかにした。また破砕、適度な加温により本来の含有量よりも ODA を増量させることが可能であることを見出した。

tomato, oxo-octadecadienoic acid, free fat acid

講演番号：2B07a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ B 校舎 07 会場

新規カシス抽出物の肥満・糖尿病における作用機構の解析

Action mechanism of new blackcurrant extract in obese and diabetes

○上野 有紀[1]、濱田 愛[1]、田中 麻奈未[1]、近藤 晴香[1]、有田 麻里絵[1]、瀧本 陽介[2]、大澤 俊彦[1]([1]愛知学院大心身科学、[2]株）ヘルスケアシステムズ)
○Yuki UENO[1], Ai HAMADA[1], Manami TANAKA[1], Haruka KONDO[1], Marie ARITA[1], Yosuke TAKIMOTO[2], Toshihiko OSAWA[1] ([1]Aichi Gakuin Univ., [2]Healthcare Systems Co., Ltd.)

【目的】我々の研究グループは、カシスジュース製造過程で生成する食物繊維を多く含む新規カシス抽出物を用いて、予備的な動物試験を行った結果、カシスジュースに比較して、肥満・糖尿病合併症の予防効果が期待されるという興味ある結果を得ることができた。本実験では、この新規カシス抽出物を用いて、肥満・糖尿病モデル動物に経口摂取することによる効果を検討することを目的とした。

【方法】肥満・糖尿病モデルマウス ob/ob マウスと対照系統+/+マウス（各 5 週齢、雄）を 1 週間予備飼育後、次のように 4 群に分け（①+/+マウス＋コントロール食、②ob/ob マウス＋コントロール食、③ob/ob マウス＋5%添加食、④ob/ob マウス＋10%添加食）飼育を行った。解剖時の血糖値、血清トリグリセリド、血清総コレステロール、血清遊離脂肪酸を測定した。DNA マイクロアレイ実験は、肝臓組織から total RNA を抽出し、cDNA の合成・精製、aRNA の合成・精製・断片化、DNA マイクロアレイとのハイブリダイゼーション、蛍光検出の手順で行った。各種遺伝子発現量は、リアルタイム PCR 法により測定した。

【結果】新規カシス抽出物投与期間中のマウスの体重増加は、ob/ob マウス＋コントロール食群と比較して、有意に低値であった。血清総コレステロールは、10%添加食群では、ob/ob マウス＋コントロール食群と比較して有意に低下した。DNA マイクロアレイ法では、炎症関連と抗酸化酵素遺伝子の発現の改善が見られた。リアルタイム PCR 法では、添加食群において、炎症関連遺伝子ならびに脂質代謝関連遺伝子の発現が改善することを確認した。

【結論】新規カシス抽出物は、肥満・糖尿病モデル ob/ob マウスにおいて、体重の増加を抑制し、血清コレステロールを低下すると共に、抗酸化酵素を誘導し、抗炎症作用を示すことから、肥満・糖尿病の改善効果が期待できる結果を得ることができた。またこれらとは別の機構での脂質代謝改善作用が考えられた。今後、これらの作用について、我々が開発した「抗体チップ」を用いたヒト臨床試験を行う予定である。

blackcurrant, obese, diabetes

講演番号：2B07a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ B 校舎 07 会場

蓮芯に含まれる筋細胞の糖取り込み促進活性成分の探索

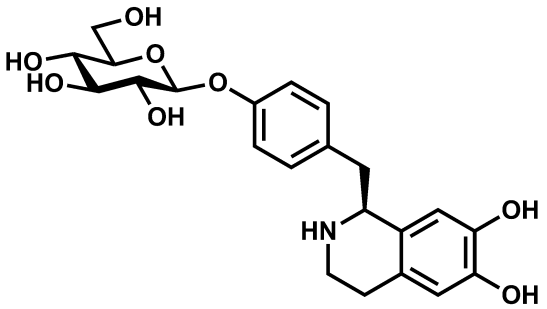
Identification of glucose uptake enhancer from the germ of *Nelumbo nucifera* seed

○加藤 英介[1]、木村 太郎[1]、稲垣 洋介[2]、藤田 裕之[2]、川端 潤[1]([1]北大院農、[2]日本サプリメント(株))
○Eisuke KATO[1], Taro KIMURA[1], Yosuke INAGAKI[2], Hiroyuki FUJITA[2], Jun KAWABATA[1]
([1]Hokkaido Univ., [2]Nippon supplement, Inc.)

糖尿病は、世界規模で患者数が増大している病気の一つである。血糖値の正常な制御に支障が生じた状態の糖尿病患者では、血糖値調節を司るホルモンの一つであるインスリンの働きに支障が生じていることが多い。従って糖尿病の治療薬には、インスリンによる血糖値調節経路を何らかの形で補助するものが多い。その一方で糖尿病対策食品の場合には、食後の高血糖を抑制する消化管酵素の阻害剤が有効成分として含まれている。我々は、消化酵素の阻害以外の作用による糖尿病対策食品を目指して、インスリンの働きに類似した効果（インスリン様活性）を示す植物とその活性成分に関する研究を行っている。

筋細胞のモデルである L6 細胞を用いて、インスリンの働きの一つである作用細胞の糖取り込みを促進する効果を指標として各種植物抽出液のスクリーニングを行った。その結果、蓮（*Nelumbo nucifera*）の実の芯を乾燥させた蓮芯に他の植物と比較して低濃度で活性が見られたため、各種分離手法を用いて活性成分の精製を行った。蓮芯の 50%メタノール抽出液を溶媒分配して得られた水層を逆相、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー及び HPLC を用いて精製した結果、活性成分として higenamine glucoside (**1**) を得た。

化合物 (**1**) が活性成分であるかを確かめるため、ドーパミン塩酸塩より **1** を合成して単離物と共に活性を検討した。その結果、化合物 **1** は単離物、合成物共に 10 μM の濃度で、インスリンには及ばないものの L6 細胞の糖取り込みを促進する働きを示し、蓮芯に含まれるインスリン様活性成分が **1** であることが明らかとなった。



Higenamine glucoside (1)

Glucose uptake, Diabetes mellitus, Nelumbo nucifera

講演番号：2B07a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ B 校舎 07 会場

マカ由来のインスリン様活性物質の探索

Search for insulin-mimetics from *Lepidium meyenii*.

○片山 紳司、町川 司、加藤 英介、川端 潤 (北大院農)
○Shinji KATAYAMA, Tsukasa MACHIKAWA, Eisuke KATO, Jun KAWABATA (Hokkaido Univ.)

【目的・背景】

糖尿病の患者数は年々増加の傾向にあり、予防や治療法の開発による患者数増加の緩和及び解消のために抗糖尿病作用を有する物質の探索が求められる。インスリンは、膵臓ランゲルハンス島β細胞から分泌されるペプチドホルモンの一種であり、血糖値の低下を促進する作用がある。これに類似した作用を有するインスリン様活性物質は、高血糖や糖尿病の合併症を緩和及び予防することが期待できる。そこで、天然素材の中でも特に食品や漢方からインスリン様活性物質を特定することを本研究の目的とした。

【方法・結果】

インスリン様活性試験には L6 細胞を用いた。試験溶液で細胞を刺激した後、2-デオキシグルコースの取り込み量を測定することで、コントロールとの比較からインスリン様活性を判断した。この方法により種々の食品及び漢方素材についてスクリーニングを行ったところ、マカ（*Lepidium meyenii*）に強い活性が認められた。マカ地下部の乾燥粉砕物を 50%メタノール水溶液により 2 回抽出して得られた抽出液を、次に水と酢酸エチルの間で溶媒分配を行った。酢酸エチル層により強い活性が確認されたため、続いて酢酸エチル層を Cosmosil 75C_{18}-OPN を用いた逆相クロマトグラフィーにより分離したところ、75%メタノール溶出画分に強い活性が認められた。次にこの画分を HPLC に供し、分画を行った。得られた画分のうち、高極性側に位置するピークに活性が見られたが、依然として夾雑物を含んでいたため、現在さらなる分画を行い、活性本体の特定を行っている。

Glucose uptake, Diabetes mellitus, Lepidium meyenii

講演番号：2B07a17
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ B 校舎 07 会場

レモングラスからのインスリン様活性物質探索

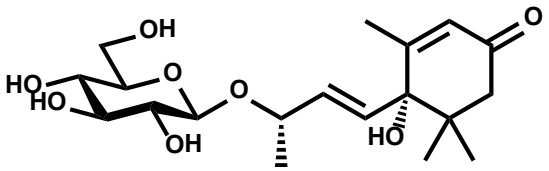
Search for insulin mimetics from lemongrass

○町川 司、加藤 英介、川端 潤（北大院農）
○Tsukasa MACHIKAWA, Eisuke KATO, Jun KAWABATA (Hokkaido Univ.)

【目的】糖尿病は、生活習慣病の1つである。慢性的な高血糖状態と定義され、治療には血糖値を下げることが必要である。ヒトは体内にインスリンを有し血糖値低下を担わせているが、糖尿病になるとこのインスリンの機能が破綻している。従って、インスリンの代替物として血糖値低下作用を持つ（インスリン様活性）物質があれば、糖尿病の治療・予防に有効である。本研究では市販ハーブ類からスクリーニング試験を行い、高い活性を示したレモングラス（*Cymbopogon citratus*）葉より活性成分の探索を行った。

【方法】ハーブ類を50%メタノール水溶液に浸漬して抽出した。活性評価はインスリンの作用のうち「骨格筋への糖取り込み促進」を指標として行った。ラット骨格筋由来モデル細胞 L6を用い、サンプル刺激による2-デオキシグルコースの取り込み量を測定することでインスリン様活性を評価した。

【結果】レモングラス乾燥葉（300 g）の50%メタノール水溶液抽出物を水－酢酸エチルで分配し、続いて水－ブタノールで分配した。活性は水層に確認されたため、これを逆相カラムクロマトグラフィーにより繰り返し分離を行った。得られた活性画分を、HPLC を用いて分離し、主要なピークから(6*S*, 9*S*)-roseoside (**1**) を単離した。得られた化合物について、現在活性を測定している。



(6*S*,9*S*)-Roseoside (1)

diabetes mellitus, glucose uptake, lemongrass

講演番号：2B07p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ B 校舎 07 会場

自然薯ムカゴのマウス肝臓遺伝子発現に対する影響

Effects of wild yam propagules on the hepatic gene expression in mouse

○篠崎 文夏[1]、亀井 飛鳥[1]、渡部 由貴[1]、荒井 綜一[1,2]、阿部 啓子[1,3]（[1]KAST、[2]東農大総研、[3]東大院農生科・応生化）
○Fumika SHINOZAKI[1], Asuka KAMEI[1], Yuki WATANABE[1], Soichi ARAI[1,2], Keiko ABE[1,3]
([1]KAST, [2]Tokyo Univ. of Agri., [3]The Univ. of Tokyo)

【目的】自然薯 *Dioscorea japonica* は、古くから生薬の一種として重用されている。その効果は多岐にわたり、滋養強壮をはじめとして、血糖降下作用や消化吸収促進作用などがあるとされる。自然薯は他のヤマノイモ類とは異なり皮ごと食べることができる。通常食する部分である担根体の他に、葉の根元にできるムカゴも食用である。ムカゴは漢方薬の素材として利用されていないため、担根体に比べ利用が少なく、効果・効能に関する知見はほとんどない。本研究では、自然薯ムカゴの生理的機能解明を目的として、高脂肪負荷マウスを用い肝臓の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。
【方法】ムカゴは 2012 年神奈川県伊勢原市産を使用した。ムカゴは皮ごとスチームにより加熱後凍結乾燥処理を行い、微粉末化した。微粉末化したムカゴは栄養成分含量、ポリフェノール含量などを測定した。また、生のムカゴと茹でたムカゴの抗酸化能を調べた。動物実験はマウス(C57BL/6J、雄、3 週齢)を用い、1 週間馴化した後群分けを行い、通常脂肪餌、高脂肪餌、および高脂肪餌に加熱ムカゴ粉末を添加した餌（高脂肪ムカゴ餌）を与え、4 週間飼育した。餌と水は自由摂取とした。16 時間の絶食後、採血・解剖し、肝臓を摘出した。血液は血漿の生化学成分分析を行い、摘出した肝臓からはトータル RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行った。
【結果】ムカゴ粉末のポリフェノール含量はホウレンソウやミカンなど一般的な野菜・果物と比べて多かった。また抗酸化能は茹でると約３５％減少するが、茹でてもキャベツ程度は残っていた。
　動物実験では 4 週間の高脂肪餌の摂取は通常脂肪餌群よりも体重を有意に増加させた。しかし、高脂肪餌と高脂肪ムカゴ餌との比較では体重に差はなかった。なお、飼育期間中の総摂取エネルギーは各群間に差はなかった。血漿生化学成分分析では、高脂肪餌群ではアラニンアミノトランスフェラーゼが通常脂肪餌群に比べて上昇したが、高脂肪ムカゴ餌群は有意ではないが高脂肪餌群よりも低く通常脂肪餌群に近づく傾向であった。肝臓の遺伝子発現は階層的クラスター解析の結果、各群は異なったプロファイルを形成しており、肝臓の遺伝子発現傾向は各群で異なっていることがわかった。また、高脂肪餌群と高脂肪ムカゴ餌で比較し、どのような遺伝子が変動しているかを調べた結果、脂質代謝関連遺伝子が変動していた。以上のことから、4 週間のムカゴ摂取は高脂肪負荷マウスの脂質代謝に関与することがわかった。

propagules, liver, gene expression

講演番号：2B07p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ B 校舎 07 会場

DNA マイクロアレイによる杜仲葉の食品機能性評価

Evaluation of food function of Eucommia ulmoides leaves by DNA microarray

○常岡 誉、中谷 祥恵、熊谷 祐哉、中野 弘香、清水 純、古旗 賢二、和田 政裕（城西大薬）
○Takashi TSUNEOKA, Sachie NAKATANI, Yuya KUMAGAI, Hiroka NAKANO, Jun SHIMIZU, Kenji KOBATA, Masahiro WADA (Josai Univ.)

【目的】杜仲（*Eucommia ulmoides* Oliv.）は中国原産の一科一属の植物である。樹皮は鎮静、利尿、強壮、血圧降下作用を薬効とした医薬品として利用されている。葉は血圧降下作用があるとして特定保健用食品の関与成分として認められている。最近では抗肥満、抗酸化、抗骨粗鬆症の作用を有することが報告されており、生活習慣病に対する機能性食品としての利用価値は高まっている。先行実験で杜仲葉抽出物（Eucommia leaves extract：ELE）が高血圧自然発症ラット（SHR）の血圧上昇を抑制した。そこで本研究は、ELE の摂取が SHR の大動脈および腎臓の遺伝子発現に与える影響を DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、ELE の新規機能性の探索を目的とした。
【方法】SHR(雄性、7 週齢）を Control（C）群および ELE 群に分け 5 週間飼育した。C 群は 1%NaCl を混合した AIN-93G 飼料、ELE 群は 1%NaCl と 3%ELE を混合した AIN-93G 飼料を与えた。ELE 群で血圧上昇抑制を確認後屠殺し、大動脈および腎臓を摘出した。各臓器から total RNA を抽出し DNA マイクロアレイを用いて、全遺伝子の mRNA 発現を網羅的に解析した。
【結果】DNA マイクロアレイ解析では、C 群に対する ELE 群の mRNA 発現が 2 倍以上を増加および 1/2 倍以下を減少とした。解析の結果、大動脈において終末糖化産物（Advanced Glycation End Products：AGE）受容体である *Advanced glycosylation end product-specific receptor*（*Ager*）が減少していた。また、腎臓においてミトコンドリア脱共役タンパク質である *Uncoupling protein-1*（*Ucp-1*）が増加していた。
【考察】ELE が大動脈の *Ager* の mRNA 発現量を減少させたことから、AGE 受容体の発現を減少させることで AGE 受容体を介する血管炎症を抑制する可能性が考えられた。これは ELE の血圧降下作用に関与している可能性がある。また、腎臓の *Ucp-1* の mRNA 発現量を増加させたが、腎臓での Ucp-1 の機能は明らかとされていない。ELE が腎臓での Ucp-1 発現を増加させ新しい機能性を有する可能性が考えられた。

Eucommia ulmoides, DNA microarray

講演番号：2B07p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ B 校舎 07 会場

茶に含まれるカテキン関連物質のレニン抑制活性

Renin-inhibitory activity of catechin-related compounds in tea

○八巻 幸二、李 風娟、亀山 眞由美、高橋 陽子（食品総合研究所）
○Kohji YAMAKI, Fengjuan LI, Mayumi OHNISHI-KAMEYAMA, Yoko TAKAHASHI (National Food Research Institute)

［目的・背景］お茶類の飲料に含まれるカテキン関連物質は、様々な健康機能が期待されており、これまで多くの報告がある。血圧を調節する重要な酵素であるレニンは腎臓から分泌されアンジオテンシンを産生し、血圧調節に関与する重要な酵素である。これまでアンジオテンシン変換酵素抑制効果を示す成分の探索は行われてきたが、レニンを抑制する成分の探索に関する報告はそれほど多くない。そこで茶に含まれるカテキン関連物質でのレニン抑制活性を探索し、幾つか抑制する成分が確認されたので報告する。
［実験方法］市販のカテキン類の標準品と新たに幾つかの市販の飲料茶から逆相系 HPLC 分離した精製抽出成分を用いて、レニンの抑制活性を調べた。市販の緑茶、ウーロン茶、紅茶を抽出原料として、逆相 HPLC を用いて、成分を分画した。ピーク分取後、フォトダイオードアレー検出器による UV スペクトルと精密質量分析のデータから、成分を同定して、レニンの抑制活性測定に用いた。これらの成分の精製純度は 95%以上であった。試料のレニン抑制活性は Cayman 社製 renin inhibitor screening kit を用いた。このキットは蛍光標識の基質を用いた高感度な測定法であり、マイクロプレートを用いて多検体の測定が可能である。
［結果・考察］代表的な市販のカテキン類としてカテキン、エピカテキン、エピカテキンガレート、エピガロカテキン、エピガロカテキンガレートおよび没食子酸を用いて、抑制活性を検討した結果、エピガロカテキンガレートが最大で 44.5 μM の IC50 値を示した。LB プロットの結果、この阻害は不競合阻害活性であった。茶に含まれる他の成分の抽出精製のため HPLC を行い、幾つかの成分を分取精製し、精密質量分析と UV スペクトル等で同定して、成分のレニン抑制活性を調べた。その結果 Theasinensin B と C、Strictinin を標品として得ることができ、その抑制活性を調べた結果、紅茶に含まれる Theasinensin B が用いた成分で最も高い IC50 値 19.3 μM を得た。このようにお茶の成分に幾つかのレニン抑制活性を見出したことより、これらの複合飲料であるお茶は、血圧の気になる人に期待できる飲料の開発が期待されると思われる。特に HPLC の結果で、発酵茶である紅茶には幾つかの抑制効果のある成分が含まれ、今後の開発の原料として期待できる。

renin, tea, catechin

講演番号：2B07p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ B 校舎 07 会場

カルコン類によるアリール炭化水素受容体の形質転換抑制効果について
Inhibitory effects of chalcones on transformation of aryl hydrocarbon receptor

○賀 超、張 天順、芦田 均 (神戸大院農)
○CHAO HE, TIANSHUN ZHANG, HITOSHI ASHIDA (Kobe Univ)

【目的】Aryl hydrocarbon receptor(AhR)はダイオキシン類などのリガンドと結合することでに形質転換して、薬物代謝酵素などの発現を誘導する転写因子である。AhR の形質転換は毒性発現の初発段階を担うことから、この形質転換を制御して抑制することができればダイオキシン毒性を軽減させる可能性が高い。この概念に基づいて、我々は AhR の形質転換を抑制する食品因子を探索し、これまでにフラボンやフラボノール類が AhR の形質転換を抑制することを見出した。そこで、本研究では、カルコン類に着目し、その AhR 形質転換抑制作用および構造-活性相関の解明を目的とした。
【方法】カルコン類が AhR の形質転換を抑制するか否かを評価するために、ラット肝臓細胞質画分に AhR のリガンドである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)を作用させ、ゲルシフトにより検討した。また、カルコン類が AhR とアゴニストとの結合を阻害するか否かを評価するために、[^{3}H]MC をアゴニストとして用いた結合試験によりカルコンの阻害効果を調べた。次に、マウス肝腫瘍由来 Hepa-1c1c7 細胞にカルコンの一つである cardamonin(2',4'-dihydroxy-6'-methoxychalcone)と TCDD を作用させ、cardamonin による AhR のシグナル伝達経路に及ぼす影響を検討した。
【結果】Cardamonin は、濃度依存的に TCDD による AhR の形質転換を抑制したが、cardamonin が閉環した構造を持つ alpinetin は AhR の形質転換抑制効果を示さなかった。一方、プレニルカルコンである 4-hydroxyderricin や xanthoangeol との比較でも、cardamonin はこれらより強い AhR 形質転換抑制効果を示した。そこで、我々は 11 種の合成カルコン類を用いて、その構造-活性相関を調べた。その結果、2'位または 6'位に水酸基あるいはメトキシ基を有するカルコン類は AhR の形質転換を強く抑制した。これに対し、4'位に官能基がある化合物では、AhR 形質転換の抑制効果が低くなった。次に、カルコン類が AhR とアゴニストとの結合を阻害するかどうかを評価したところ、特に、2'位に官能基を有するカルコンは AhR リガンド結合部位に作用することで、リガンドとの結合を競合的に阻害している可能性が強く示唆された。最後に、Hepa-1c1c7 細胞を用いて、TCDD が誘導する AhR のシグナル情報伝達の活性化に対する cardamonin の効果を評価したところ、cardamonin は、AhR のリン酸化、AhR の核内移行、AhR と AhR nuclear translocator (Arnt)との結合、AhR とダイオキシン応答配列との結合、薬物代謝第 I 相酵素 CYP1A1 の発現を抑制することが判った。以上のことから、cardamonin は AhR のアンタゴニストとして作用し、TCDD による様々な性化学的変化を正常化させる効果が強く示唆された。

aryl hydrocabon receptor, chalcones, inhibitors

講演番号：2B07p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ B 校舎 07 会場

食品ポリフェノールによる代謝ストレスの緩和に関わるエピゲノム調節領域の解析

The analysis of epigenomic regulatory region responsible for metabolic-stress-relaxation by food polyphenol

○原田 尚志[1]、姚 瑞卿[1]、牛尼 翔太[1]、岡田 由紀[1]、三坂 巧[1]、伊藤 隆司[2]、三浦 史仁[2]、安岡 顕人[3]、白髭 克彦[1]、阿部 啓子[1,3]、中井 雄治[1]([1]東大院農生科・応生化、[2]東大院理学系研究科、[3]KAST)
○Takashi Harada[1], Ruiqing Yao[1], Shota Ushiama[1], Yuki Okada[1], Takumi Misaka[1], Takashi Ito[2], Fumihito Miura[2], Akihito Yasuoka[3], Katsuhiko Shirahige[1], Keiko Abe[1,3], Yuji Nakai[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agri. Life Sci.,Univ. Tokyo, [2]Dept. Biophy. Biochem., Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo, [3]KAST)

背景) 近年、さまざまな環境要因が塩基配列以外の遺伝情報を担うエピゲノムを変化させ、個体や次世代の表現型に影響することが示されつつある。2010 年には父マウスの高脂肪食摂取が仔へ影響することが報告され、父マウスの低蛋白質食摂取が仔の肝臓のコレステロール生合成関連遺伝子の発現低下を引き起こすことも報告されている。しかし、その継承のメカニズムに関する報告は少ない。加えて、仔への影響を予防するような研究は殆どない。我々はマウスのアルコール性脂肪肝の誘導と食品ポリフェノールによるその緩和を肝臓トランスクリプトームから解析してきた。その結果、食品ポリフェノールがアルコールによるエピゲノム修飾を緩和するように働いている可能性が示唆された。本研究では、雄親のアルコール性脂肪肝が次世代に及ぼす影響と、食品ポリフェノールによるその緩和をエピゲノム修飾の面から解析し、子孫の健康維持に役立てることを目的とする。
結果と考察) 5 週齢の C3H/HeN 雄マウス 3 群(n=6)に、Lieber のエタノール非含有食、Lieber の 5%エタノール含有食、Lieber の 5%エタノール含有食に 73mg/L の Resveratrol を加えた食を 5 週間与え(C 群、E 群、ER 群)、直後に通常の C3H/HeN 雌マウスと交配した。得られた仔(C 群仔、E 群仔、ER 群仔)を離乳期 3 週齢で解剖し、血清の分析と肝臓転写物の DNA マイクロアレイ解析を行った。再度雄親マウスの飼育を同様に行い、遊走精子を採取し、全ゲノムのメチル化をバイサルファイトシークエンスにより解析した。3 週齢 E 群仔においては、C 群仔に較べて体重と血中中性脂肪値の増加が見られ、ER 群仔ではこれらが見られなかった。次に各群仔の肝臓の DNA マイクロアレイ解析を行った。DFW 法で正規化し、Rankproduct 法による 2 群間比較を行い、FDR (False Discovery Rate)＜0.05 となるプローブセットを抽出した。その結果、雌雄共に E 群仔 ＞C 群仔であったものが 530、Et 群仔 ＜C 群仔であったものが 479 抽出された。雌雄共に ER 群 ＞C 群であったものが 392、ER 群仔 ＜C 群仔であったものが 265 抽出された。530 セットにはコレステロール生合成に関与する遺伝子が含まれており、雄親のエタノール摂取が仔の代謝を変化させる可能性が示唆された。E 群仔で発現変動しているが ER 群仔では変動していないプローブセットを抽出した結果、E 群仔のみで発現上昇したものが 485、発現低下したものが 231 抽出された。これらのセットの機能解析の結果、細胞周期・DNA 複製時の巻き戻し・コレステロール生合成の亢進が示唆された。
今後は発現変動した遺伝子群のプロモーター領域における、精子のメチローム変化を検討する事で、雄親のエタノール摂取が仔の遺伝子発現に与える影響の継承メカニズムを明らかにする予定である。

polyphenol, epigenomics, methylation

講演番号：2B07p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ B 校舎 07 会場

食品由来のファイトケミカルによるタンパク質変性作用の評価

Evaluation of the protein denaturation effects of phytochemicals in food.

○今林 健登、中畑 恵利奈、大西 康太、田中 遼平、五十嵐 洋子、入江 一浩、村上 明 (京大院農)
○Kento IMAHAYASHI, Erina NAKAHATA, Kohta OHNISHI, Ryohei TANAKA, Yoko IGARASHI, Kazuhiro IRIE, Akira MURAKAMI (Kyoto Univ.)

【目的】ファイトケミカル(PC)は、様々な生理活性を有することが広く知られている。しかし、これらは動物にとっては異物であり、抗酸化・解毒酵素誘導などのストレス応答を引き起こす。近年、我々は、PC の一種である zerumbone が、生体タンパク質に対して非特異的に結合し、変性作用を示すことを報告した[1)]。そこで本研究では、タンパク質変性作用を有する PC の *in vitro* スクリーニング試験を行い、さらに活性化合物に関して、培養細胞や実験動物で変性能を評価することを目的とした。
【方法及び結果】PC の暴露濃度が高いと考えられる消化管粘膜(ICR マウス由来)から水溶性の高いタンパク質画分を調製した。12 種の PC を溶解できる最大濃度(1-25 mM)でそれぞれ添加し、37℃で 24 hr インキュベートした。その後、粘膜タンパク質を水溶性の差で分画し、タンパク質変性活性を不溶性画分と水溶性画分に含まれるタンパク質の量比 (I/S 比) で評価した。その結果、resveratrol(RSV)、curcumin (CUR)及び(-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG)を含む 6 種の PC が I/S 比を有意に増加させた。さらに、高い活性を示した RSV と EGCG に関して低濃度 (1-10 mM) で再評価を行ったところ、RSV のみに活性が認められた。次に、Hepa1c1c7 (マウス肝臓がん細胞) に CUR 及び RSV を 50-100 μM の濃度で処理して上記と同様に分画したところ、I/S 比は顕著に増加した。また、両者で処理した細胞を分子ローター色素で染色して観察したところ、変性タンパク質集合体であるアグリソームの形成が認められた。さらに、western blot 法によって、両者は解糖系酵素である GAPDH の顕著な不溶化及びアグリソーム構成因子 p62 の凝集体の形成を促進することも確認できた。
【結語】本研究により、RSV や CUR を含む数種の PC が *in vitro* 及び培養細胞系においてタンパク質を変性させる可能性が示唆された。一般的に、様々な機能性を示す PC が、生体にタンパク質変性ストレスを与えることは、一見すると矛盾するように思える。しかしながら、これらが動物にとって非栄養性の異物であることを考えると合理的な結果であるとも解釈できる。近年、適度なタンパク質変性はタンパク質品質管理機構の活性化を促し、それを介して抗発がん作用やメタボリックシンドロームの予防作用などに寄与することも報告されている[2)]。従って、PC が示す様々な生理機能の作用メカニズムの一部がタンパク質変性作用で説明できる可能性があると考えている。

1) Ohnishi K, *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 430, 616-22 (2013).
2) Christian P, *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 1831, 819-24 (2013).

phytochemical, denaturation, resveratrol

講演番号：2B07p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ B 校舎 07 会場

タンパク質変性作用に着目したクルクミンの脂肪分解機構の解明
Curcumin may induce lipolysis via proteo-stress
○バレンティン シンディ、入江 一浩、村上 明（京大院農）
○Cindy Valentine, Kazuhiro Irie, Akira Murakami (Kyoto Univ.)

【目的】秋ウコンに含まれるクルクミン（CUR）は、肝臓において脂肪酸酸化に関与する遺伝子の発現を亢進することで、抗肥満作用を示すと報告されているが、それより上流のシグナル伝達機構は未だ不明である。一方、植物の二次代謝産物（ファイトケミカル）であるクルクミンは、動物において異物代謝酵素の誘導などのストレス応答を引き起こすことも知られている。当研究室では、最近、クルクミンを含むいくつかのファイトケミカルがタンパク質を変性させ、その強度が適度な場合は、熱ショック応答（HSR）などの生体防御機構が活性化する現象を見出している。一方、HSR の誘導や異物代謝の過程に関与するタンパク質の機能発現は細胞内の ATP 濃度に依存している。そこで、本研究では、クルクミンに対する生体防御機構の活性化過程で ATP が消費され、それを補うために脂肪が分解するではないかと考え、その可能性について検証した。
【方法及び結果】CUR は Huh7（ヒト肝臓がん細胞）において、細胞内のトリグリセリド（TG）を減少させると共に、TG リパーゼの一種である ATGL と脂肪酸酸化酵素 CPT-1 の mRNA 発現量を顕著に増加させた。興味深いことに、タンパク質変性作用を示す熱ショック処理を行ったところ、上記と同様な現象が認められた。次に、細胞内タンパク質に対する変性作用を評価するために、HSR の誘導および p62（変性タンパク質集合体であるアグリソームの構成因子）の複合体形成能を検討した。その結果、CUR や熱ショック処理により、HSR のマーカータンパク質である HSP70 や HSP40 の発現量が顕著に増加し、CUR の場合は p62 複合体形成作用も認められた。さらに、CUR に対する生体防御機構の活性化や維持のために脂肪が分解される可能性について検討した。CUR は細胞内 ATP 量を減少させたが、その後、脂肪燃焼関連遺伝子の発現を顕著に増加させ、CUR による細胞毒性は低下していた。この結果は、脂肪酸酸化によって生じた ATP が CUR に対する生体防御機構に利用された可能性を示唆する。
【結語】CUR はこれまで、抗酸化・解毒酵素を誘導することが知られていたが、これらの活性は本化合物が酸化ストレスを引き起こす異物であるという特性に関連していると考えられる。同様に、CUR がタンパク質変性ストレスを誘導し、それに対する適応機構の活性化に必要な ATP を脂肪分解により供給する現象が、CUR の抗肥満メカニズムの一つであると推察した。

Curcumin, Lipolysis, Proteo-stress

講演番号：2B07p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ B 校舎 07 会場

線虫におけるクルクミンの熱耐性賦与作用に対する加齢の影響
Effects of aging on the thermo-resistance conferred by curcumin in *Caenorhabditis elegans*.
○村川 慧 (京大院農)
○Satoshi MURAKAWA (Kyoto Univ.)

【目的】ファイトケミカルは植物二次代謝産物の総称であり、食品中にも様々なものが存在する。例えば、秋ウコンに含まれるクルクミン（ポリフェノール）や、ブロッコリーのスルフォラファン（イソチオシアネート）などが知られている。これらの化合物は、抗がんや抗炎症作用等、様々な生理作用を有する一方で、生体に対して酸化ストレス、あるいはタンパク質変性ストレスを与える例が報告されている。このようなストレスに対して、生体は、それぞれ抗酸化酵素の誘導及びタンパク質品質管理機構の活性化によって適応している。一般に、ストレス応答能は加齢に伴って低下する現象に着目し、本研究では、ファイトケミカルに対する上記のストレス応答能が加齢と共に低下するとの仮説を立て、これを検証することを目的とした。
【方法及び結果】老化モデル生物として寿命が約 20 日と短い線虫（*Caenorhabditis elegans*）を用いた。ストレス応答能の指標として、変性タンパク質を修復する分子シャペロンである heat shock protein (HSP)の mRNA 誘導能及び熱ショック後の運動性を評価した。まず、4 日齢の若い線虫 (Day-4 線虫、通常 20℃で培養）に対し、33℃の温和な熱ストレスを与えると、HSP16.1/16.2/16.41/70 mRNA の発現量が増加した。しかしながら、Day-10 線虫における誘導能は顕著に低下していた。次に、熱ストレスによる形質変化について評価した。Day-1/-4/-7/-10 線虫において、37℃の高温な熱ショックにより運動性は著しく損なわれた。これに対し、予め熱ストレスを与えておくと、若老年期ともに運動性の低下はコントロールと比較し抑制された。さらに、このストレス応答効果は Day-4, -7, -10 の順に減少した。続いて、クルクミンを投与し HSPs mRNA 誘導能を評価したところ、若年期の線虫においては有意な発現量の増加が認められたが、老年期ではその発現量にほとんど変化がなかった。
【結語】若年期の線虫に熱ストレスを与えることで、HSP mRNA の発現量増加及び熱ショックによる運動性の低下に対する抑制作用が認められたが、この効果は加齢と共に減少した。本結果は、熱処理によるタンパク質変性ストレスに対する応答能が加齢と共に低下することを示唆している。また、クルクミンが若年期の線虫において HSP mRNA の発現量を有意に増加させた一方で、老年期ではこの誘導能が減少したことから、クルクミンが示すタンパク質ストレスに対する応答能は加齢と共に低下する可能性が考えられる。HSP の誘導により熱耐性の賦与が期待されるため、現在、熱ショック後の運動性の低下に対するクルクミンの抑制作用に関する加齢の影響を評価している。

curcumin, aging, *Caenorhabditis elegans*

講演番号：2B07p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ B 校舎 07 会場

セサミンと CYP2C9 代謝型医薬品の相互作用

Interactions between Sesamin and medical drugs

○上野 千来、安田 佳織、西川 美宇、鎌倉 昌樹、生城 真一、榊 利之（富山県立大学・工・生物工学)
○Sera UENO, Kaori Yasuda, Miyu Nishikawa, Masaki Kamakura, Shinichi Ikushiro, Toshiyuki Sakaki (Dep. of Biotech., Fac. of Engineer., Toyama Pref. Univ.)

セサミンはゴマに含まれるリグナン類の一つであり、コレステロール低下作用、脂肪酸代謝促進作用、アルコール代謝促進作用など、さまざまな生理作用を持つことが知られている。これら食品成分をサプリメントとして摂取する場合、医薬品と安全に併用するために医薬品と食品成分の相互作用を調べることが重要となる。中でも、サプリメント中の成分が薬物代謝酵素により代謝される場合、代謝中間体が酵素の活性部位に共有結合し不可逆阻害(MBI)を起こすことがあるが、通常の可逆阻害と異なり阻害作用が持続することから、慎重な評価が必要となる。

当研究室では、これまでにセサミンがヒト肝臓内の主要な薬物代謝型 P450 の一つである CYP2C9 によって、モノカテコール体へと代謝されることを明らかにしてきた。本研究では、医薬品とセサミンの安全な併用という観点から、*in vivo* でセサミンが CYP2C9 に対して MBI を起こすかどうか調べた。

ヒト肝ミクロソーム画分をセサミン(0～50μM)および NADPH 存在下、37℃でプレインキュベーション(0, 5, 10 分)した後に、CYP2C9 によって特異的に代謝されるジクロフェナク（非ステロイド性抗炎症薬）を添加し、代謝物である 4'位水酸化体を定量した。その結果、4'位水酸化活性はプレインキュベーションの時間とセサミン濃度依存的に低下した。すなわち、セサミンが CYP2C9 に対して MBI を起こすことが明らかになった。ラット肝ミクロソーム画分を用いて同様の実験を行ったところ、ラットでもヒトと同様、セサミンによるジクロフェナク代謝酵素への MBI がみられ、その MBI パラメーターはヒトとラットでほぼ同程度であった。

そこで、ラットを用いてセサミン摂取がジクロフェナクの血中半減期および代謝に与える影響を調べた。セサミンを経口投与したラットにジクロフェナクを経口投与し、ジクロフェナク血中濃度を測定した。その結果、セサミン(10mg/kg、100mg/kg)摂取群、コントロール群とで Cmax、Tmax、AUC における有意差はなかった。ヒトでの目安摂取量（10mg/日）から判断して、ヒトがジクロフェナクとセサミンを併用した場合、ジクロフェナクの代謝に対するセサミンの影響はほとんどないと考えられる。

Sesamin, CYP2C9, MBI

講演番号：2B07p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ B 校舎 07 会場

骨粗鬆症モデルマウスの骨代謝および equol 産生能に及ぼす大豆イソフラボン・セロオリゴ糖併用摂取の影響

A combination of soy isoflavones and cellooligosaccharides improves equol production and bone metabolism in ovariectomized mice.

○藤井 駿吾[1]、井上 博文[1]、勝間田 真一[1]、鈴木 和春[1]、吉川 裕治[2]、町田 誠[2]、上原 万里子[1] ([1]東農大院農、[2]日本製紙(株))
○ Shungo FUJII[1], Hirofumi INOUE[1], Shin-ichi KATSUMATA[1], Kazuharu SUZUKI[1], Yuji KIKKAWA[2], Makoto MACHIDA[2], Mariko UEHARA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Nippon Paper Industries Co., Ltd.)

【目的】大豆イソフラボンはエストロゲンと類似した構造を有し、エストロゲン受容体への親和性を持つことから植物エストロゲンと呼ばれており、これまでにその骨代謝改善作用が報告されてきた。特に、主要イソフラボンの daidzein 代謝産物である equol は、イソフラボノイドの中で最も生理活性が強いことで知られている。近年、いくつかの発酵性難消化性糖質の大腸における daidzein から equol への変換を促進する結果が報告されており、腸内細菌による難消化性糖質の資化は、大腸内 pH 低下をもたらし、大腸からのミネラル吸収を促進する効果も期待されている。セロオリゴ糖は、セルロースの分解過程で生成するグルコース 2 分子がβ - 1,4 結合した難消化性糖質で、*in vitro* 試験による daidzein から equol への変換を促進するとした報告はあるが、*in vivo* 試験での確認はされていない、そこで本研究では、閉経後骨粗鬆症モデルマウスを用いて、大豆イソフラボンとセロオリゴ糖併用摂取による equol 産生能向上の有無に加え、併用摂取による骨量減少抑制作用を中心とした骨代謝に及ぼす影響について検討した。**【方法】**被験動物として 8 週齢の ddY 雌マウスを用い、卵巣摘出術（OVX）もしくは偽手術（Sham）を施した後、Sham 群、OVX 群、ISO 群（OVX+0.16%イソフラボン配糖体)、COS 群（OVX+5%セロオリゴ糖（日本製紙㈱社製））、IC 群(OVX+0.16%イソフラボン配糖体+5%セロオリゴ糖)の計 5 群に分け、6 週間の飼育観察を行った。解剖前 1 週間に渡り出納試験を行い、解剖後、子宮重量、大腿骨および脛骨の骨密度(BMD)、骨代謝マーカーを測定した。飼料は全群同量投与とした。
【結果】子宮重量は Sham 群に比し、OVX 全群で有意に低値を示し、イソフラボンおよびセロオリゴ糖による子宮肥大はみられなかった。尿中 equol 排泄量は ISO 群に対して IC 群で有意に高値を示した。大腿骨 BMD は Sham 群に対して OVX 群で有意に低下したが、その骨量減少は ISO 群、IC 群で有意に抑制された。脛骨 BMD も大腿骨と同様の傾向を示した。骨強度（Stiffness）も OVX により低下したが、ISO 群で低下抑制傾向、IC 群では有意に低下抑制効果を示した。血中オステオカルシンおよび尿中 I 型コラーゲン C 末端テロペプチド(CTx)は OVX により上昇傾向を示し、OVX 群間で有意差は認められなかったが、骨吸収マーカーである尿中 CTx は OVX 群に対して ISO、IC 群で低値傾向を示した。
【結論】大豆イソフラボン・セロオリゴ糖併用摂取により equol 産生能の向上が確認された。OVX による骨量減少抑制効果はイソフラボン単独群と同様であったが、骨強度については各単独摂取よりも併用摂取でその低下を、より抑制する傾向を示した。骨代謝制御分子については現在解析中である。

equol, cellooligosaccharides, osteoporosis

講演番号：2B07p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ B 校舎 07 会場

3-Hydroxytyrosol は破骨細胞分化を抑制する活性本体である。

3-Hydroxytyrosol, but not tyrosol, plays a key role for suppressing osteoclast differentiation.

○井上 博文[1]、小林 謙一[2]、鈴木 司[2]、山本 祐司[2]、勝間田 真一[1]、鈴木 和春[1]、上原 万里子[1] ([1]東京農大・栄養、[2]東京農大・化学)
○Hirofumi INOUE[1], Ken-Ichi KOBAYASHI[2], Tsukasa SUZUKI[2], Yuji YAMAMOTO[2], Shin-Ichi KATSUMATA[1], Kazuharu SUZUKI[1], Mariko UEHARA[1] ([1]Tokyo. Univ. of Agri., Depart. Nutri. Sci., [2]Tokyo. Univ. of Agri., Depart. Appl. Bio. and Chem.)

［目的］我が国では骨粗鬆症をはじめとした骨疾患患者数は増加の一途を辿っている。その要因として、加齢とともに増大する活性酸素を介した骨吸収と骨形成による骨のリモデリング破綻がある。そこで本研究では、オリーブ葉に多く含まれ強い抗酸化能を有するポリフェノール類のオレウロペイン(Ole)およびその代謝産物であるヒドロキシチロソール(Hydro)およびチロソール(Tyl)と骨代謝制御(破骨細胞形成)に着目し、その詳細な作用機序を明らかにすることを目的とした。
［方法］6-10 週齢雄 BALB マウス大腿骨から調整した bone marrow cell(BMCs)に活性型ビタミン D(10^{-8}M)を添加し、6 日間培養することで多核破骨細胞分化へ誘導する系を用いた。Ole, Hydro および Tyl の破骨細胞に対する影響について、破骨細胞分化マーカーである酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)活性および染色を用いて解析した。また破骨細胞関連分子群(RANKL, M-CSF, Cathepsin K)および破骨細胞融合分子群(DC-STAMP, OC-STAMP)を RT-PCR 法、細胞分化増殖分子群(JNK, ERK, p38MAPK)を Western blot 法にて解析した。さらに Ole, Hydro および Tyl が破骨細胞分化過程のどのステップで作用するかを明らかにするために処理時間を 2, 4, 6 日間に設定し、TRAP 活性測定の変化を検討した。
［結果］BMCs に対して、すべてのオリーブポリフェノールは細胞毒性を与えなかった。Ole および Hydro は RANKL, M-CSF, Cathepsin K, DC-STAMP, OC-STAMP 遺伝子発現と TRAP 活性を有意に抑制した。さらに Ole は 4, 6 日間、Hydro は 2 日間処理において破骨細胞関連分子群の遺伝子発現と TRAP 活性を有意に抑制した。その一方で、Tyl の破骨細胞関連分子群および TRAP 活性に対する抑制作用は認められなかった。また JNK, ERK1/2, p38MAPK 活性を解析した結果、Hydro は Ole, Tyl よりも強くこれらの活性を抑制した。
［結論］オリーブポリフェノールは細胞毒性を示さず、特に 3-hydroxytyrosol は RANKL、MAPK シグナルおよび破骨細胞融合シグナルを Ole や Tyl よりも強く阻害することで破骨細胞の分化・形成を抑制することを明らかにした。またオリーブポリフェノールの破骨細胞分化抑制における活性本体は、tyrosol ではなく、3-hydroxytyrosol であることが示唆された。

olive polyphenol, osteoclast differentiation, cell-cell fusion

講演番号：2B07p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ B 校舎 07 会場

Sulforaphane は HO-1 の発現上昇を介して HMGB1 分泌を抑制し破骨細胞分化を阻害する。

Sulforaphane inhibits osteoclast differentiation by suppressing high mobility group box 1 protein release with up-regulation of heme oxigenase 1.

○高木 智弘、井上 博文、勝間田 真一、鈴木 和春、上原 万里子 (東農大院 食品栄養)
○Tomohiro TAKAGI, Hirohumi INOUE, Shin-Ichi KATSUMATA, Kazuharu SUZUKI, Mariko UEHARA (Dep.of Nutri. Sci., Tokyo Univ.of Agric.)

【目的】近年、我が国では急速な高齢化から骨粗鬆症をはじめとする生活習慣病罹患率の増加が問題となっている。骨粗鬆症による骨折は最悪の場合、寝たきりとなり著しい QOL の低下を招く事から、その疾病予防と骨折の予防が必要不可欠である。これまでの研究により、抗炎症作用を示す植物化学成分は骨代謝改善効果を示す事が報告されている。アブラナ科野菜中に含まれ、含硫化合物である isothiocyanate は抗炎症、抗酸化および抗腫瘍作用を示す事が知られているが、isothiocyanate と骨代謝制御(破骨細胞形成)に関する詳細な作用機構は明らかではない。そこで本研究では、isothiocyanate の一種である sulforaphane(SFA)、sulforaphene(SFE)が破骨細胞分化に及ぼす影響を明らかにする事を目的とした。
【方法】5 週齢雄性 BALB マウス大腿骨と脛骨から採取した bone marrow cell を用いて SFA、SFE を濃度依存的(0-20μM)に処理し、WST-8 法を用い細胞生存率を測定した。次に活性型ビタミン D_3(10^{-8}M)を添加し、6 日間培養する事で多核破骨細胞分化へ誘導する系を用いた。破骨細胞に対する効果を破骨細胞分化マーカーである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP)活性および染色による解析を行った。続いて SFA および SFE が破骨細胞分化過程のどの段階で作用するのかを明らかにするため、処理時間を 3 段階(2,4,6 日間)に設定し、TRAP 活性測定による解析を行った。また破骨細胞関連分子(RANKL, cathepsin K, DC-STAMP)を RT-PCR 法、heme oxigenase 1(HO-1)とそれにより制御を受ける high mobility group box 1(HMGB1)を western blotting 法にて解析した。
【結果】細胞生存率は SFA では 20μM、SFE では 10μM で有意に低値を示した。TRAP 活性および TRAP 陽性細胞数は SFA、SFE 共に 0.02μM から減少した。また SFA、SFE 共に 6 日間の処理条件下において TRAP 活性は有意に減少したが、4 および 2 日間の処理では活性抑制効果を示さなかった。破骨細胞関連分子群に関しては SFA、SFE ともに遺伝子発現に変化は見られなかったが、SFA において HO-1 の発現上昇と HMGB1 分泌の抑制がみられた。
【結論】SFA、SFE は初期段階で破骨細胞分化を抑制する事を明らかにした。そのメカニズムについては、RANKL 発現制御を伴わない経路を介した機構の存在が示唆され、特に SFA に関しては HO-1 の上昇を介して HMGB1 分泌を減少させる事で破骨細胞分化を抑制する事を明らかにした。SFE に関しては現在解析中である。

sulforaphane, osteoclast differentiation, osteoclastogenesis associated gene

講演番号：2B07p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ B 校舎 07 会場

スルフォラファンの変形性関節症予防効果とその作用機構
The preventive effect of sulforaphane on osteoarthritis and its mechanism
○柴田 紗知[1]、石飛 博之[2]、味八木 茂[2]、松原 主典[1] ([1]広島大院教育、[2]広島大病院)
○ Sachi SHIBATA[1], Hiroyuki ISHITOBI[2], Shigeru MIYAKI[2], Kiminori MATSUBARA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Univ. Hosp.)

【目的】高齢者に多い変形性膝関節症（osteoarthritis: OA）は、QOL の低下や運動不足による活動低下、更には脳機能低下とも関連していることが知られており、その予防は極めて重要である。我々は OA 予防効果を持つ食品機能成分について検討を行っている。近年の OA 発症機構に関する分子・病理解析の結果から､膝組織でのオートファジー誘導が OA 発症予防に繋がる可能性が示されている。そこで、オートファジー誘導作用が知られている食品機能成分スルフォラファンについて、OA 予防効果の可能性をヒトの軟骨及び滑膜細胞で検討した。更に、スルフォラファンの経口摂取による膝関節でのオートファジー誘導についても検討を行った。
【方法】細胞実験には、ヒト正常軟骨及び滑膜細胞を用いた。両細胞をスルフォラファンで一定時間処理した後、タンパク質を抽出し、オートファジーの指標タンパク質である LC3 に対する特異的抗体を用いたウエスタンブロット法で検討した。また、これらの細胞を用いて、OA 発症に関わるサイトカイン IL-1β処理に対するスルフォラファンの効果について、コラーゲン・プロテオグリカン・炎症サイトカイン（IL-6）・細胞外マトリックス分解酵素（MMPs）・アグリカン分解酵素 ADAMTS-5 の遺伝子発現への影響を定量 RT-PCR 法で検討した。スルフォラファンの経口摂取による膝関節でのオートファジー誘導については、10 週齢のマウス（C57BL/6）に 1 週間スルフォラファンを投与し、膝を回収した後、LC3 抗体を用いた免疫組織染色により評価した。
【結果】スルフォラファン処理により軟骨及び滑膜細胞で LC3-II タンパク質量が増加したことから、これらの細胞でもオートファジーが誘導されることが示された。また、IL-1β による OA 関連タンパク質の遺伝子発現に対する影響については、炎症性サイトカイン IL-1β・IL-6 や細胞外マトリックス分解酵素 MMP-3・MMP-13 などの遺伝子発現が強く抑制された。スルフォラファンのマウスへの経口投与では、対照マウスに比べ膝軟骨での LC3 が強く染色されたことから、経口摂取でも膝関節でのオートファジーが誘導できる可能性が示唆された。つい最近、スルフォラファンを経口摂取することは、OA に対して予防的に働くことが報告された（Davidson, R.K., et al., Arthritis. Rheum., 2013)。以上のことから、スルフォラファンはヒトにおいても経口摂取によって OA 予防効果が期待でき、その作用機構としてオートファジー誘導作用や OA 発症関連分子の発現抑制が関連していることが示唆された。

Sulforaphane, Osteoarthritis, Autophagy

講演番号：2B07p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ B 校舎 07 会場

ホモシステインおよびベタインの摂取が骨・関節組織に及ぼす影響

Effects of homocysteine and betaine intakes on bone and articular tissues

○勝呂 祐美[1]、中谷 祥恵[1]、千葉 大成[2]、古旗 賢二[1]、和田 政裕[1] ([1]城西大薬、[2]神奈川工科大応用バイオ科学)
○Yumi KATSURO[1], Sachie NAKATANI[1], Hiroshige CHIBA[2], Kenji KOBATA[1], Masahiro WADA[1] ([1]Josai Univ., [2]Kanagawa Institute of Technology Univ.)

【目的】ホモシステイン（Hcy）は、メチオニン代謝の中間生成物であり、動脈硬化などの危険因子として注目されている。Hcy は、葉酸誘導体をメチル基供与体とするメチオニン合成酵素およびベタイン（Be）をメチル基供与体とするベタイン - ホモシステイン - メチル転移酵素（BHMT）によってメチオニンに代謝される。葉酸の摂取は血中 Hcy 値を低下させることが報告されている。このことは、Be の摂取も葉酸摂取と同様に、高ホモシステイン血症（HHcy）を改善できる可能性を示している。最近の研究で、Hcy が骨の正常コラーゲン架橋の形成を阻害し、骨粗鬆症リスクを増加させることが明らかとなった。一方、Hcy が骨同様にコラーゲン豊富な組織である関節に与える影響についてはほとんど報告されていない。また、Be の摂取が Hcy に起因する骨・関節への影響を低減できるかの研究はされていない。そこで本研究では、HHcy モデルマウスに Be を摂取させ、Hcy および Be が骨・関節に及ぼす影響の解明を目的とした。
【方法】7 週齢、ddy 雄性マウスを通常食（N）群、低葉酸コントロール食（C）群、低葉酸＋メチオニン過剰添加食（M）群、M＋低濃度 Be 添加食（MLB）群、M＋高濃度 Be 添加食（MHB）群の 5 群に分け 20 週飼育した。飼育終了後、血漿 Hcy 濃度の測定、体重、体長、骨長、骨幅、海綿骨密度、皮質骨密度、骨強度、関節軟骨の厚さおよび細胞数の評価を行った。
【結果】M 群は N 群と比較し血漿 Hcy 値が有意に高く、メチオニン過剰添加が HHcy を誘導することが確認できた。また、Be 摂取群は M 群と比較して血漿 Hcy 値が有意に低く、Be の摂取は HHcy を改善させた。体重、体長、骨長では、M 群は N 群と比較して有意に低下したが、Be 摂取群は M 群の低下を回復させた。一方、骨幅は 5 群間で差がなかった。海綿骨密度では、M 群は N 群と比較して低下傾向であったが、Be 摂取群では N 群と比較して増加傾向だった。骨強度では、N 群と比較して他の群で低下傾向だった。
【考察】HHcy は骨の伸長を抑制させることが示唆された。また、Be の摂取は HHcy による骨伸長の抑制を改善することが示唆された。本実験では、HHcy および Be の摂取はマウス大腿骨海綿骨密度には大きな影響を与えなかった。さらに、骨強度への影響も見られなかった。骨は軟骨の分化によって伸長するため、Hcy や Be は軟骨分化を調節する可能性がある。現在、Hcy や Be が関節軟骨の厚さおよび細胞数、骨・関節の BHMT およびコラーゲン架橋関連遺伝子に与える影響を検討している。

Homocysteine, Betaine, Collagen

講演番号：2B07p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ B 校舎 07 会場

小腸上皮様細胞表面のヘパラン硫酸糖鎖にペクチンが与える影響の解明
Effects of pectin on cell-surface heparan sulfate on intestinal epithelial cells
○西田 光貴[1]、村田 一馬[2]、森 雄一郎[4]、山元 宏貴[4]、伊神 孝生[4]、北口 公司[2,3]、金丸 義敬[1,2,3]、矢部 富雄[1,2,3]（[1]岐阜大院・連農・生物資源、[2]岐阜大院・応生科・資源生命、[3]岐阜大・応生科・応用生命、[4]三基商事（株））
○Mitsutaka NISHIDA[1], Kazuma MURATA[2], Yuichiro MORI[4], Hirotaka YAMAMOTO[4], Takao IKAMI[4], Koji KITAGUCHI[2,3], Yoshihiro KANAMARU[1,2,3], Tomio YABE[1,2,3] ([1]Unit. Grad. Sch. of Agric. Sci., Gifu Univ., [2]Grad. Sch. of Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., [3]Fact. of Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., [4]MIKI Corp.)

【目的】水溶性食物繊維であるペクチンをラットに与えると，小腸絨毛の形態が変化することが報告されているが，ペクチンが腸内細菌などを介さずに小腸へ作用する仕組みはまだ解明されていない。我々は，細胞表面に普遍的に存在するヘパラン硫酸（HS）糖鎖が，硫酸化構造を変化させることで細胞の増殖や分化などの生理機能の調節に関与することに注目し，ペクチンが小腸絨毛に作用する仕組みを解明するために，株化細胞を複合培養した *in vitro* 小腸モデルを構築して，プルーンから精製したペクチンが小腸上皮様細胞表面の HS に与える影響について検討した。
【方法】トランスウェルに Caco-2 細胞を播種して，20 日間培養を続けて小腸上皮様に分化させた。その後，アウターウェルに陰窩のモデルとなる IEC-6 細胞を播種して，小腸上皮を模した複合培養系を構築した。プルーンから精製したペクチンを添加して，24 時間後の IEC-6 細胞の増殖を WST-8 法により評価した。次に，ペクチンを添加した 24 時間後の分化 Caco-2 細胞から HS を精製して，HPLC により HS の二糖組成をコントロールと比較した。さらに，ペクチンが分化 Caco-2 細胞の HS 6-*O*-Endosulfatases（HSulfs）の発現に与える影響を real-time RT-PCR により分析した。そして，ペクチンが HSulf-2 の発現を誘導する機構について，フィブロネクチン III_1C フラグメント（$FNIII_1C$）と RGD ペプチドを用いた阻害実験を検討した。最後に，ペクチンによる HS の硫酸化構造変化の意義を検討するために，ペクチン添加細胞またはコントロールから回収した HS を固定化したチップを作製して，小腸上皮の成長に必要な Wnt タンパク質との結合力の変化を SPR 法により解析した。
【結果】分化 Caco-2 細胞と IEC-6 細胞の複合培養系において，分化 Caco-2 細胞に添加したペクチンの濃度依存的に IEC-6 細胞が増殖した。また，分化 Caco-2 細胞にペクチンを添加すると，細胞表面 HS の硫酸化構造が大きく変化することを発見した。特に，GlcNAc の *N* 位と C 6 位・ウロン酸の C 2 位が硫酸化された二糖（Tri-S）が減少した。そこで，細胞表面で Tri-S を脱硫酸化する HSulf-1/2 に注目すると，ペクチン添加により HSulf-1 の発現が抑制され，一方で HSulf-2 の発現が誘導された。さらに，ペクチンによる HSulf-2 の発現誘導が $FNIII_1C$ と RGD ペプチドにより阻害されたことから，ペクチンはフィブロネクチンとα5β1 インテグリンを介して HS の硫酸化構造を変化させることが示唆された。また，ペクチンにより HS の硫酸化構造が変化すると，Wnt-3a や Wnt-11 と HS の結合力が著しく減少することを発見した。

heparan sulfate, pectin, small intestine

講演番号：2B07p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ B 校舎 07 会場

DNA マイクロアレイ解析による腸管細胞に対するカルノシンの機能推測

Effects of carnosine on Caco-2 cells revealed by DNA microarray analysis

○門岡 桂史[1]、松本 貴之[2]、森松 文毅[2]、片倉 喜範[1] ([1]九大院農院、[2]日ハム中研)
○Keishi KADOOKA[1], Takashi MATSUMOTO[2], Fumiki MORIMATSU[2], Yoshinori KATAKURA[1]
([1]Kyushu Univ., [2]R&D Center, Nippon Meat Packers, Inc.)

【背景・目的】
カルノシン（β-Ala-L-His）は食肉に多く含まれているジペプチドであり、様々な機能性を有することが既に報告されている。本研究において我々は、食品と生体との接点としての腸管に着目し、ヒト腸管に対するカルノシンの新たな機能性を明らかにすることを目的として研究を行った。
【方法】
ヒト腸管上皮細胞モデルとして、ヒト結腸ガン由来Caco-2細胞を用いた。Caco-2細胞における遺伝子発現の変化は、DNAマイクロアレイ法（Agilent, Human Whole Genome, 4×44フォーマット）により網羅的に解析した。
【結果】
これまでの解析で、カルノシンがCaco-2細胞において、BDNFを初めとした各種神経栄養因子の発現を増強することを明らかにしている。そこで本研究では、DNAマイクロアレイ解析により、カルノシン処理を行ったCaco-2細胞における遺伝子発現の変化を網羅的に追跡した。その結果、カルノシンはCaco-2細胞において、34,128個の遺伝子のうち746個の遺伝子について、有意な発現変動（p-value < 0.05, ratio > 2 / ratio < 0.5）を示していた。またKEGGのパスウェイ解析においては、心筋の収縮に関わる経路をはじめ、アラニン、アスパラギン酸及びグルタミン酸代謝に関する経路、ABCトランスポーターに関する経路について有意な発現変動が認められた。さらにDAVID解析により、糖タンパク質や分泌因子を含むクラスターやアミノ酸や有機酸の生合成プロセスに関わる遺伝子を含むクラスター、膜タンパク質に関わる遺伝子を含むクラスターなど、有意に発現変動している9つの機能クラスターが同定された。そのなかでも糖タンパク質をコードする156遺伝子、分泌因子をコードする68遺伝子、シグナル伝達に関わる115遺伝子を含むクラスターが最も有意に発現変動していることが明らかとなった。特に有意に発現増強された分泌因子の中でも、Cholecystokinin、Endothelin2、Noggin、Secretin、Urocortin2、FGF9、LIFについては、定量RT-PCR法においてもその発現の増強が確認された。
以上の結果から、カルノシンは腸管細胞を活性化し、分泌因子発現を増強することで、局所及び全身性に影響を及ぼしうるものと考えられた。

carnosine, Caco-2, DNA microarray

講演番号：2B07p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ B 校舎 07 会場

アロエステロール(R)含有 AVGP の光老化モデルにおける皮膚弾力性低下予防効果

AVGP containing Aloesterol(R) reduced skin damage and loss of elasticity induced by UVB in Hairless mouse

○齊藤 万里江、田中 美順、三澤 江里子、姚 瑞卿、山内 恒治、阿部 文明（森永乳業・食基研）
○Marie SAITO, Miyuki TANAKA, Eriko MISAWA, Ruiqing YAO, Kouji YAMAUCHI, Humiaki ABE (Morinaga Milk Industry Co., LTD)

【背景】
アロエベラゲルは、アロエベラの食用の葉肉部分で、ヨーグルトなどの食品素材として広く使用されている。我々はこれまでに、アロエベラゲルの抗糖尿病効果および抗肥満効果を確認し、その有効成分としてアロエステロール®を同定した。一方、皮膚へのアロエベラゲルの作用として、経口摂取または塗布による創傷治癒効果が報告されているが、我々は、動物試験および乾燥肌の女性を対象とした臨床試験において、アロエステロール®含有アロエベラゲルパウダー（AVGP）経口摂取による、シワ深度の改善および角層水分量の増加作用を明らかにしている。さらに in vitro 試験において、アロエステロール®を濃縮した抽出物（AVGE）が、繊維芽細胞からのコラーゲンおよびヒアルロン酸の産生を促進することを確認している。今回我々は、光老化モデルマウスを用いて、AVGP 摂取による皮膚水分量および皮膚弾力性に対する効果を確認するとともに、コラーゲンゲル収縮アッセイにて真皮組織の細胞外マトリクス（ECM）への AVGP 成分の効果を調べた。
【方法】
（1）10 週齢メス Hr-1 マウスに、UVB を週3回 6 週間、背部に照射して光老化モデルマウスとした。UVB 照射を開始する 2 週間前から、0（対照）、または 0.3 % AVGP の混餌投与を開始し、経時的に皮膚水分量と経皮水分蒸散量の測定を行い、照射開始6週目に皮膚粘弾性を評価した。（2）各濃度の AVGP 水溶性成分および AVGE を含むコラーゲン溶液に、ヒト正常繊維芽細胞（5×10^4 cells/mL）を添加した後、ゲル化した。このコラーゲンゲルを DMEM 中で培養し、経時的にゲルの直径を測定して面積を算出した。
【結果】
（1）UVB 照射により皮膚弾力性は低下したが、AVGP 摂取により、弾力性の指標 R2 は対照群と比較して高い傾向を示し、F3 の低下が有意に抑制されることが確認された。また、UVB 照射による顕著な皮膚水分量の低減と経皮水分蒸散量の増加は、AVGP 投与群において、有意に抑制された。（2）AVGP 水溶性成分の添加により、コラーゲンゲルの収縮は、有意に促進された。さらに AVGE で検討を行った結果、濃度依存的なコラーゲンゲルの収縮が確認された。
【結語】
光老化モデルにて AVGP 摂取により、皮膚水分量と弾力性の低下が予防された。さらに AVGP の成分とアロエステロール®濃縮抽出物によって、繊維芽細胞を介したコラーゲンゲル収縮が促進された。これらの結果より、アロエステロール含有®AVGP は皮膚のハリを維持し、たるみを改善する食品成分として有用である可能性が示された。

Aloe vera, photoaging, elasticity

講演番号：2B07p22
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ B 校舎 07 会場

共培養系においてセラミドが皮膚細胞へ及ぼす影響

Effect of Ceramide on Human Skin Cells in a Co-culture System

○赤木 裕[1]、レ ヴ ラン フォン[1]、薩 秀夫[1]、戸塚 護[1]、千田 和広[2]、清水 誠[3] ([1]東大院農・応生化、[2]東大院農・応動科、[3]東大院農・食の安全研究センター)
○Yutaka AKAGI[1], Phuong Le Vu Lan[1], Hideo SATSU[1], Mamoru TOTSUKA[1], Kazuhiro CHIDA[2], Makoto SHIMIZU[3] ([1]Dept.Appl.Biol.Chem., The Univ. Tokyo, [2]Dept.Anim.Reso.Scie., The Univ. Tokyo, [3]Rese.Cent.Food Safe., The Univ. Tokyo)

【目的】セラミドは牛乳やこんにゃくなどに含まれる食品成分であり、皮膚に対する機能改善効果を持つ機能性食品成分として近年注目されている。食品内に含まれるセラミドは、経口摂取されたのち消化管に運ばれて消化・吸収・代謝をうけ、その後体内に取り込まれて皮膚に作用していると考えられている。しかし、皮膚に対するセラミドの具体的な作用メカニズムについては、いまだ明らかになっていない。そこで本研究では、セラミドおよびその代謝産物が皮膚に影響を及ぼすメカニズムを解明することを目的として、２種のヒト皮膚細胞（繊維芽細胞、角化細胞）を用いた共培養系を構築した。そして、共培養系に加えたセラミドが繊維芽細胞や角化細胞の遺伝子発現変化に及ぼす影響を調べることで、両細胞の相互作用やセラミドの作用メカニズムの解析を試みた。

【方法】コラーゲンゲルに埋包させたヒト初代繊維芽細胞をセルカルチャーインサート内で２４時間培養した後、ヒト株化角化細胞であるＨａＣａＴ細胞をコラーゲンゲルの上に撒種し共培養を開始した。その２日後、ゲル表面の皮膚様層の形成と分化を促進するために培養面の空気曝露を行った。その後は２日に一度培地交換し、共培養開始１４日後に、グルコシルセラミド、およびその代謝物であるスフィンゴミエリン、スフィンゴシン、スフィンゴ−１−リン酸をそれぞれ基底膜側に添加した。添加３時間後および２４時間後にそれぞれの細胞を回収したのち、Ｒｅａｌ Ｔｉｍｅ ＲＴ−ＰＣＲ法に供し、各細胞における皮膚関連遺伝子のｍＲＮＡ発現変化を確認した。同様の実験をＨａＣａＴ細胞の単一培養系、初代繊維芽細胞の単一培養系でも行った。

【結果】共培養系において、セラミド合成酵素やＳ１Ｐ受容体などのｍＲＮＡ発現に変化が見られた。これらの変化は、同一ファミリー内の遺伝子群においても、その種類や添加物質・添加時間により違いが見られた。その一方、タイトジャンクション関連遺伝子などではｍＲＮＡ発現に変化が見られなかった。単一培養系における各遺伝子群の遺伝子発現変化と合わせ、本結果よりセラミドが皮膚に影響を及ぼすメカニズムの一端が示唆された。

Ceramide, Coculture, Skin

講演番号：2C01a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ C 校舎 01 会場

BetI 変異体と T7RNA ポリメラーゼを用いたコリン誘導系の開発
Development of choline-inducible genetic switches based on T7 RNA polymerase and BetI mutants
荒澤 悠輔、○池 紘平、宮口 明恵、冨永 将大、河合(野間) 繁子、斎藤 恭一、梅野 太輔（千葉大院・工・共生応化）
Yusuke ARASAWA, ○ Kohei IKE, Akie MIYAGUCHI, Masahiro TOMINAGA, Shigeko KAWAI(NOMA), Kyoichi SAITO, Daisuke UMENO (Dept. Appl. Chem. Biotech., Chiba Univ.)

【目的】
T7 RNA ポリメラーゼ（T7RNAP）は，宿主の転写ネットワークとほぼ独立したかたちで遺伝子発現制御ができること，誘導時の発現レベル上限が高いことなどから，人工代謝経路の構築において多用され始めている．本研究では，この T7RNAP を用いた発現系の制御様式の拡充を目指して，大腸菌のベタイン合成経路の転写制御因子 BetI を構成要素とする新規の T7 スイッチを構築し，その機能のラインナップ化を試みた．

【方法・結果】
BetIを定常的に発現するレギュレータプラスミド，およびT7プロモータ下流にBetIのオペレータ配列とGFP遺伝子とを配置したレポータプラスミドをそれぞれ作製した．これらを大腸菌株BL21AI(Δ*ara*B::T7*rnap*-*tet*A)に導入した．野生型のBetIは，細胞毒性がみられる～10^2 mMのコリンを培地に添加しても遺伝子発現の抑制を解除せず，GFP蛍光は観察されなかった．そこで，変異PCR法を用いて*betI*遺伝子全域にランダム変異を導入し，*betI*ライブラリを作製した．これをレポータプラスミドとともに大腸菌株BL21AIに導入し，コリンに応答してGFP蛍光を示すクローンを探索した．その結果,10-100 mM（培地濃度）の応答感度でコリンに応答するOff→On型の遺伝子スイッチ変異体を複数得た．興味深いことに，コリンの添加によって転写抑制が生じるOn→Off型（逆転型）の変異体も複数得られた．これらの遺伝子に見いだされたアミノ酸変異のsingle mutantsを部位特異的変異法によって作製し，この機能転換をもたらすアミノ酸置換を特定した．
本講演では，上記で得たBetI変異体の更に詳細な機能解析，そしてポジティブ／ネガティブ選択法を用いた更なる機能拡張の試みについても報告する．

T7 promoter, BetI, directed evolution

講演番号：2C01a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ C 校舎 01 会場

安定運転と弱毒化を指向した Autogene の進化工学
Directed evolution of T7 autogene.
○佐伯 和哉、池 紘平、宮口 明恵、冨永 将大、河合（野間） 繁子、斎藤 恭一、梅野 太輔（千葉大院・工・共生応化）
○ Kazuya SAEKI, Kohei IKE, Akie MIYAGUCHI, Masahiro TOMINAGA, Shigeko KAWAI(NOMA), Kyoichi SAITO, Daisuke UMENO (Dept. Appl. Chem. Biotech., Chiba Univ.)

【目的】
人工的な制御ネットワークや代謝経路を様々な宿主細胞で働かせるためには、T7RNA ポリメラーゼのように、宿主由来（細胞型）のポリメラーゼと転写開始配列が直交したシステムが望ましい。この「T7 ネットワーク」に自立性とポータビリティ（宿主間の移動能力）を与えるためには、P_{T7} 下流に T7RNAP 自身の遺伝子を配置し、「autogene」化することが望ましい。しかしながら、T7autogene は、T7RNAP そのものの示す高い触媒活性に加え、一旦起動すると必ず過剰発現に達するため、細胞内で長期間安定起動できない。本講演では、細胞を死滅させずに T7autogene の長期運転するためのふたつの試みについて報告する。
【方法・結果】
P_{T7} を T7RNAP 上流に導入するクローニングを行い、大腸菌細胞に導入し、autogene コンストラクトの作製を試みたが、細胞毒性が高すぎて目的のクローンを得ること自体が不可能であった。そこでまず、P_{T7} と T7RNAP の間に Lac オペレータを導入し、LacI による強い抑制が働くかたちに再デザインしたところ、IPTG 誘導によって初めて起動する緊縮性の高い T7autogene が得られた。しかし、IPTG 誘導を与えると、T7autogene が起動した細胞には強い生育阻害が見られた。そこで、この問題を解決するため、更に２つの試みを行なった。ひとつは、起動状態における「終端速度」を設定することであり、T7RNAP の低速化である。もうひとつは、T7autogene の形成するポジティブフィードバック回路に、ネガティブフィードバックを足すことである。具体的には、IPTG 非感受性 LacI（$LacI^{IS}$）を作製し、これを P_{T7} 下流に配置したものを作製し、T7atuogene と共存させた。更に、$LacI^{IS}$ の DNA 結合ドメインへの変異導入によってネガティブフィードバックの強度を調節しところ、細胞毒性が大きく改善された種々の T7autogene 変異体を得ることができた。

T7RNA polymerase, synthetic biology, genetic circuit

講演番号：2C01a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ C 校舎 01 会場

生理的濃度における非標識、迅速な生理活性成分評価のための *in vivo*-like セルベースアッセイの開発－1 時間以内で評価－

Evaluation by laser within 1 hour! Development of *in vivo*-like label-free and rapid cell-based assay for both efficacy and toxicity evaluation of bioactive food compounds at physiological concentration

○小名 俊博[1,2]、柴田 純子[2] ([1]九大院農、[2]オーケーラボ　Cell BET)
○Toshihiro ONA[1,2], Junko SHIBATA[2] ([1]Kyushu Univ., [2]OK lab. Cell BET)

【目的】生理的濃度で生理活性成分を探索する場合、生細胞を用いた *in vivo*-like セルベースアッセイが多く選択される。これは、細胞外マトリクスとの三次元培養による方法であり、2-4 週間の長い判定期間、蛍光色素と成分との競合反応による誤判定、判定試薬必要、効果と副作用（毒性）の同時判定が難しく、手技が煩雑で、労力が掛かる。一方、装置を用いる方法では、ターゲット成分の作用機序に左右される、従来法の結果との相関低、多剤併用薬効の評価難、という問題を抱えている。そこで、本研究では、レーザー分光法の一種である表面プラズモン共鳴法（SPR）を高精度化し開発した装置（HP-SPR）を用い、新規 *in vivo*-like セルベースアッセイの確立を検討した。

【方法】HP-SPR センサーチップ上に二次元培養したヒト生細胞を自己接着させ、コラーゲンを重層した後、測定成分を投与、投与後 1 時間の細胞応答の経時変化をモニターした。従来法による共培養では、CD-DST 法を用いた。

【結果】まず、抗がん成分で手法を確立した。三次元培養状態の細胞活性は、二次元培養細胞を細胞外マトリックスで重層することにより、短時間で、細胞分裂なしで得られることを見出した。これを用い、従来法である共培養と高い相関が得られた。HP-SPR により検出されるシグナルは、ミトコンドリア内膜電位変化に由来する。このため、測定成分添加後早期のミトコンドリアの内膜電位変化率が、細胞の最終挙動の定量的なカギであることが示唆された。得られた結果は個人差や成分の作用機序の違いにも依存しないことが確認できた。HP-SPR 法は、非標識なため、標識による誤判定もなく、細胞培養も不要なため、非常に短期間で *in vivo*-like な効果と毒性の判定が可能となった。次に、ミトコンドリアの内膜電位変化に関係する、脂肪燃焼促進、代謝活性化、肌のターンオーバー促進、冷え症改善などへのアプリケーション開発に成功した。

Kosaihira & Ona. *Anal Bioanal Chem* 391:1889 (2008), Nishijima et al. *Anal Sci* 26:529 (2010), Nomura et al. JP2009-122016A (2009), Ona. *WO 2013/039112 A1* (2013), Ona & Kosaihira. *JP2012-93369A* (2012); *US 2011/0003321 A1* (2011); *CN 200680052043.8* (2008); *EP 1 961 824 A1* (2008); *WO2007/069692 A1* (2007); *JP2005-17081A* (2005); *WO 2005/001472 A1* (2005), Ona & Shibata. *J Pharm Sci* 121: 132 (2013); *J Pharm Sci* 121: 159 (2013); *Anal Bioanal Chem* 398:2505 (2010), Ona et al. *Biophotonics* 9: 69910R (2008).

in vivo-like cell-based assay, screening, bioactive compound

講演番号：2C01a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ C 校舎 01 会場

微生物細胞の転移温度を決定づける主な要因は含水率である

Water content is the main factor determining the transition temperature of microbial cells

○中西 弘一[1]、藤田 康弘[2]、出内 桂二[2]、桑名 利津子[3]、高松 宏治[3]([1]ナノ・マイクロバイオ研、[2]キリン飲料技研、[3]摂南大薬)
○Koichi Nakanishi[1], Yaushiro Fujita[2], Keiji Deuchi[2], Ritsuko Kuwana[3], Hiromu Takamatsu[3] ([1]Nano-Micro Bio Research Lab., [2]Research Laboratories for Beverage Technologies, Kirin Co., Ltd., [3]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan Uni.)

【目的】
我々は走査型プローブ顕微鏡（SPM）とナノサーマルアナリシス（nanoTA）
取り付けた SPM-nanoTA システムで、細胞や芽胞を計測し、その栄養細胞や芽胞の線膨張率や転移温度の相違を特徴付けている要因について、含水率が関係していると考え、通常の菌株試料と凍結乾燥菌株試料の線膨張率と転移温度について比較した。
【方法並びに結果】
計測は、走査型プローブ顕微鏡（SPM）にナノサーマルアナリシス（nanoTA、）を取り付けた装置 SPM-nanoTA で行なった。4 種類の細菌と酵母の栄養細胞とその凍結乾燥菌体並びに 2 種類の Bacillus 属芽胞とその凍結乾燥芽胞を比較した。その結果、栄養細胞の凍結乾燥菌体では、線膨張率は対照と比べて大きく低下し、転移温度も高くなった。しかし、含水率の低い芽胞では、膨張量や転移温度には大きな差はなかった。栄養細胞の正常な状態のものと凍結乾燥菌体では、含水率の差と転移温度の上昇量の間に高い相関があった。
細胞の各生活環のステージにより、加熱による形状や大きさの変化は異なり、それを特徴つけている大きな要因は水分であると考えられた。その影響は含水率の高い栄養細胞で大きく、含水率の低い芽胞では小さかった。

water content, thermal expansion, scanning probe microscope

講演番号：2C01a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ C 校舎 01 会場

ウサギモノクローナル抗体の効率的取得法の開発
In vitro generation of rabbit monoclonal antibody using single-cell RT-PCR and cell-free protein synthesis
○加藤 晃代[1,2]、橋村 大[2]、山本 広晃[2]、兒島 孝明[2]、中野 秀雄[2] ([1]（公財）科技財団、[2]名大院生命農)
○ Teruyo KATO[1,2], Dai HASHIMURA[2], Hiroaki YAMAMOTO[2], Takaaki KOJIMA[2], Hideo NAKANO[2] ([1]ASTF, [2]Nagoya Univ.)

【目的】
モノクローナル抗体は、近年抗体医薬として注目を集めており、これまでに抜本的治療薬や予防薬が存在しなかった医療分野においてもその重要性が高まっている。現在のモノクローナル抗体取得法としては、ハイブリドーマ法が一般的であるが、この取得法は通常 3 ヶ月程の作製期間を要するため迅速性に欠け、突発的な感染症が発生した際の治療薬生産法としては適さないことが問題視されている。それに対し、当研究室で開発された SICREX(single-cell RT-PCR linked in vitro expression)法は、細胞 1 個由来のわずか数十コピーの mRNA を対象として、RT-PCR により L 鎖と H 鎖の Hd 部分をそれぞれ増幅させ、連続的に無細胞タンパク質合成系を用いることにより数日で抗体を作製することが可能である。今回は、1）抗体の抗原決定部位のバリエーションがマウスに比べ豊富であり、2）免疫化や採血がマウスに比べ非常に容易である。といった利点を有するウサギを新たな対象動物として、SICREX 法の確立と、食中毒菌を抗原とした特異モノクローナル抗体の取得を目的とした。

【方法・結果】
食中毒菌として、*Escherichia coli* 0157 および *Listeria monocytogenes* にてウサギを免疫化し、各細菌に対する免疫価が上昇したウサギ末梢血から B 細胞を分離した。次に、それぞれの細菌を固定化したマグネティックビーズを用いて、抗原結合能を有する B 細胞を選択的に回収した。これを 1 細胞/well となるよう 96 well プレートに分注し、ウサギ抗体特異的なプライマーにより RT-PCR 増幅、および無細胞タンパク質合成系によりその結合活性を評価した。その結果、0157 対して IgM および IgG 型抗体遺伝子を 25 種類取得することに成功した。同様に *Listeria monocytogenes* に対しては 5 種類の抗体遺伝子を取得した。現在、取得した抗体の結合能評価を行っている。

rabbit antibody, foodborne illness, cell-free protein synthesis

講演番号：2C01a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ C 校舎 01 会場

水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出法：糸状菌への適用

Microbial detection method using water-soluble tetrazolium salts: Application for the assay of filamentous fungi

○塚谷 忠之[1]、末永 光[1]、志賀 匡宣[2]、松本 清[3]([1]福工技セ・生物食品研、[2](株)同仁化学研、[3]崇城大・生物生命)
○Tadayuki TSUKATANI[1], Hikaru SUENAGA[1], Masanobu SHIGA[2], Kiyoshi MATSUMOTO[3] ([1]Fukuoka Industrial Technology Center, [2]Dojindo Laboratories, [3]Sojo Univ.)

【目的】アスペルギルス症など糸状菌による感染症は高い頻度で発生しており、その薬剤耐性化を防ぐ上で薬剤感受性試験は重要である。そこで、糸状菌の増殖を経時的に測定することを目的として、水溶性テトラゾリウム塩 WST-8 を用いた微生物検出法（WST-8 法）の適用を試みた。また、本法を薬剤感受性試験（MIC 測定）へ適用し、水溶性テトラゾリウム塩 XTT を用いた既存の手法との比較を行うことで WST-8 法の有用性を検証した。

【方法】

(1)検出試薬：水溶性テトラゾリウム塩と電子メディエータ2-methyl-1,4-naphthoquinone(NQ)を10%DMSO水溶液に溶解し、検出試薬とした。

- WST-8法：WST-8(10mM)及び2-methyl-1,4-NQ(0.1mM)
- XTT法：XTT(10mM)及び2-methyl-1,4-NQ(0.5mM)

(2)増殖アッセイ：96ウェルマイクロプレートにMOPS緩衝性RPMI-1640培地により調製した10倍希釈系列密度の胞子懸濁溶液190μLを分注し、これに検出試薬10μLを添加して30℃で460nmにおける吸光度を経時的に測定した。

(3)MIC測定：96ウェルマイクロプレートにMOPS緩衝性RPMI-1640培地により調製した２倍希釈系列濃度の抗生剤溶液95μLを分注し、これに胞子懸濁溶液95μLを加え、さらに検出試薬10μLを添加して30℃で24～48時間インキュベーションした。インキュベーション後、吸光度測定(460nm)に供し、ブランクと比較した吸光度変化が0.1以上のウェルを生育、以下を阻止と判定し、MIC値を測定した。

【結果】WST-8 法を用いた増殖アッセイ試験では初期胞子密度、培養時間、吸光度変化に良好な比例関係が認められ、定量的な測定が可能であった。一方、XTT 法では菌糸の伸長が抑制され、定量的な測定ができなった。特に低密度の胞子においては吸光度の増加が著しく阻害された。さらに、両法を薬剤感受性試験（MIC 測定）へ適用したところ、WST-8 法ではほとんどの糸状菌において 24 時間で MIC 値が測定可能であったが、XTT 法では増殖阻害により培養時間を 24 時間以上に延長しても測定が不可能であった。さらに、WST-8 法により得られた MIC 値は基準法（目視判定法、48～96 時間）により得られた MIC 値と良好に一致した。これらの結果から、増殖アッセイや薬剤感受性試験において WST-8 法の有用性が示された。

tetrazolium salt, filamentous fungi, minimum inhibitory concentration

講演番号：2C01p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ C 校舎 01 会場

プローブ修飾ナノ粒子を用いたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の電気化学的 DNA バイオセンシング
Sensitive electrochemical DNA biosensing for *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* using nanoparticle modified probe

○渡邊 和也[1]、桑田 典明[2]、里村 武範[2,3]、坂元 博昭[1]、末 信一朗[1,2,3]([1]福井大院・工・繊維、[2]福井大院・工・生物応化、[3]福井大・生命セ)
○Kazuya WATANABE[1], Noriaki KUWATA[2], Takenori SATOMURA[2,3], Hiroaki SAKAMOTO[1], Shin-ichiro Suye[1,2,3] ([1]Dept. Front. Fib. Technol. Sci., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [3]Res. Edu. Prog. Life. Sci., Univ. Fukui)

[背景]メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は病院で院内感染を引き起こす有害微生物として知られており、感染症を未然に防ぐために有害微生物に対する迅速で簡便な検出方法が求められている。しかし、従来の検出方法では操作が煩雑で時間がかかる等の問題点が挙げられる。そこで本研究では、プローブと DNA のハイブリダイゼーションを用いた MRSA の電気化学的センシングシステムを考案した。MRSA 固有の塩基配列として知られる *mecA* 領域と相補的な塩基配列を持つ、2 つのプローブを金ナノ粒子(AuNP)、磁気ナノ粒子(MNP)にそれぞれ修飾した。また AuNP には電気的なシグナルを得るためにフェロセンも修飾した。これにより 2 種のナノ粒子に修飾したプローブが MRSA 由来ゲノム DNA とハイブリダイズにより複合体を形成する。AuNP、MNP、ゲノム DNA によるハイブリダイゼーション産物を磁気分離により回収し、AuNP 上のフェロセンの酸化電流を測定することで検出を行った。
[方法]MRSA よりゲノム DNA を抽出し、熱処理によって 1 本鎖 DNA を得た。得られた 1 本鎖 DNA に修飾した AuNP、MNP を混合することでハイブリダイゼーションさせ、磁気分離によってハイブリダイゼーション産物を回収した。電気化学測定には、作用極と対極を炭素、参照極を銀塩化銀とした 3 電極型スクリーンプリント電極を用いた。+250mV を印加することでクロノアンペロメトリー法により測定サンプル中のフェロセンの酸化電流を測定した。また、フェロセンの酸化電流を増幅するために L-プロリンと L-プロリン脱水素酵素を用いた。
[結果及び考察]測定サンプルの電流応答を測定したところ酸化電流値がターゲット DNA 量に依存して得られた。その結果検出限界は 10 pM であり、0-166 pM の間で良好な直線性を有していた。一方、黄色ブドウ球菌由来ゲノム DNA を用いた測定では酸化電流値は得られず、本システムは MRSA に対する高い選択性を有していることを確認した。これらの結果より、PCR 等によるターゲット DNA の増幅を必要としない MRSA の電気化学的 DNA センシングシステムの構築に成功した。

nanoparticle, DNA sensor, magnetic separation

講演番号：2C01p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ C 校舎 01 会場

L-ヒドロキシプロリンのバイオセンシングシステムの構築

Construction of biosensing system for L-Hydroxyproline.

○小泉 岳[1]、渡邊 和也[1]、坂元 博昭[1,3]、渡辺 誠也[4]、里村 武範[2,3]、末 信一朗[1,2,3] ([1]福井大院・工・繊維先端、[2]福井大院・工・生物応化、[3]福井大・生命セ、[4]愛媛大)
○ Gaku KOIZUMI[1], Kazuya WATANABE[1], Hiroaki SAKAMOTO[1,3], Seiya WATANABE[4], Takenori SATOMURA[2,3], Shin-ichiro SUYE[1,2,3] ([1]Dept. Front. Fib. Technol. Sci., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [3]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui, [4]Ehime Univ.)

【目的】
コラーゲンのアミノ酸組成はグリシンが約 1/3 を占め、L-プロリン(L-Pro)及び L-ヒドロキシプロリン(L-Hyp)が 21%、アラニンが 11%と偏った構成となっている。L-Hyp はコラーゲン特有のアミノ酸で、タンパク鎖の形成の後に酸化酵素により L-Pro にヒドロキシ基が付加されることで生成される。
癌細胞は細胞外マトリクスであるコラーゲンに接着、分解、移動をすることで転移する。癌細胞によってコラーゲンが分解される際、体液中の L-Hyp の濃度が上昇することが知られている。そのため、L-hyp は癌の重要なバイオマーカーとして注目されている。ヒトの体液中には μM オーダーで L-Hyp が存在しており、早期がんの診断には μM オーダーでの L-Hyp 検出系の確立が求められる。通常、迅速かつ簡便なアミノ酸分析法としては酵素法があげられるが、アミノ酸脱水素酵素による酵素反応を用いた方法では基質特異性が広いため、L-Hyp の特異的な測定が困難である。そこで、本研究では L-Hyp を特異性の高い L-ヒドロキシプロリン異性化酵素(L-HypE)により異性化した後、D-Hyp を定量する方法を考案した。L-HypE と D-ヒドロキシプロリン脱水素酵素(D-HypDH)の共役反応系による簡便かつ迅速な測定を目的とし、電気化学的検出法による L-Hyp の検出法の構築を行った。
【方法】
スクリーンプリント電極(SPE)を使用した三電極法により、電気化学測定を行った。SPE 上に 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)を 12 μl、0.3 mM フェロセンを 1 μl、L-HypE と D-HypDH を酵素量 1:1 に混合させた溶液を 1 μl 添加し、フェロセンの酸化電位である+ 0.25 V におけるバックグラウンドを安定させた後、終濃度 0~500 μM の濃度範囲の L-Hyp を 1 μl ずつ逐次添加し、その電流応答を測定した。
【結果】
L-Hyp の添加により酸化電流の増大が見られ、L-Hyp から D-Hyp への変換と D-HypDH の酵素電極反応が確認された。L-Hyp 濃度 0~500 μM の間で電流応答に直線性が見られた。L-Pro を添加し、電流応答を測定したところ、電流応答は得られなかった。これは L-HypE は L-Hyp にのみ特異的であるために L-Pro とは反応しなかったことを示している。以上の結果より L-HypE と D-HypDH を用いることで L-Hyp を特異的に検出できることが明らかになった。

Biosensor, Bienzyme system, L-Hydroxyproline

講演番号：2C01p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ C 校舎 01 会場

検出系一体型アプタマーアレイ技術の開発とパツリンアプタマーへの応用
Novel aptamer array screening technology integrated with simplified colorimetric detection system and apprication to patulin aptamer
○冨田 康之[1]、森田 悠治[1]、秋吉 妙子[1]、菅 裕明[2]、藤原 大介[1]([1]キリン・基盤研、[2]東大院理・化学専攻)
○Yasuyuki Tomita[1], Yuji Morita[1], Taeko Akiyoshi[1], Hiroaki Suga[2], Daisuke Fujiwara[1] ([1]KIRIN Company, Ltd., [2]The University of Tokyo)

【目的】アプタマーは、抗体に代わる様々な利点を持った核酸分子である。通常、アプタマーの選抜には SELEX 法が用いられるが、ターゲット分子をカラム等に固定するための誘導体化、大規模なライブラリー（10^{14} レベル）からの濃縮・選抜にかかる膨大な労力・時間を要する上、テクニカルにもノウハウを要する点が大きな問題である。そこで、本研究では、①ターゲット分子を誘導体化せず、直接利用でき、②簡便な操作で、③直ちに配列情報、二次構造情報を知りうる方法として、アレイ上で高次構造を取りうる数万種類の配列とターゲット分子との相互作用を一気に評価可能な新規アプタマー選抜法である「アプタマーアレイ技術」の開発を目的とした。
【方法】まず初めに、ターゲット分子の誘導体化をせずに、候補配列を選抜可能な DNA 構造体の設計を行った。具体的には、高次構造を取りうるアプタマー部位と検出系として利用する酸化還元 DNAzyme を「高感度モジュール配列」と名付けた構造変化を鋭敏に伝達する配列で接続したものである。アプタマー候補部位には、二次構造情報を利用して 12,000 種類の配列を設計し、上記 3 つの部位からなる構造体を電気化学的な検出を行う DNA マイクロアレイ上に合成し、モデルターゲットとして、カビ毒の 1 種であるパツリンに対するアプタマーの取得を試みた。
【結果】パツリン無添加及び 100 μM 添加の 2 つの条件でアプタマーアレイ解析を行い、2 倍以上のシグナル比を示した 32 配列のパツリンアプタマー候補配列を取得した。候補配列の中には、パツリン濃度依存的にシグナル変化を示す候補配列が得られた。それら候補配列の検索の結果、共通するモチーフが見出された。最終的に配列の改変などを行い最も優れた感度のパツリンアプタマーとして、無添加サンプルと比較し、パツリン 10μM で吸光度変化を示す配列を取得することができた。最後に、パツリン汚染の可能性が高い食品として知られているりんご果汁からの on site/real time パツリン検出をシミュレーションするために、りんご果汁に規格基準（300 nM）のパツリンを添加し、上記パツリンアプタマーを含む DNA 構造体を用いて、簡便な濃縮前処理操作により調整した 20 μM の濃度の検出を試みたところ、視覚的にも判定が可能な結果が得られた。以上のように、従来難しいとされてきた低分子認識アプタマーを簡便な操作で取得できる「検出系一体型アプタマーアレイ法」を考案し、確立したので報告する。

Aptamer array, Simplified colorimetric detection, Patulin

講演番号：2C01p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ C 校舎 01 会場

fNIRS を用いたビールの香り提示時の脳機能計測

Measurement of brain response to beer odor using functional near-infrared spectroscopy

○小島 英敏[1]、渕本 潤[1]、丸山 弘明[1]、荒木 茂樹[1]、執行 達朗[1]、坂井 信之[2]([1]サッポロビール・価値創造フロンティア研究所、[2]東北大院文)
○Hidetoshi KOJIMA[1], Jun FUCHIMOTO[1], Hiroaki MARUYAMA[1], Shigeki ARAKI[1], Tatsuro SHIGYO[1], Nobuyuki SAKAI[2] ([1]SAPPORO BREWERIES LTD., [2]Tohoku Univ.)

【目的】ビールを味わう際の脳内情報処理機構は十分に明らかになっていない。本研究では、ビールの香りに対する脳応答を調べることを目的として、種々のビールの香りを嗅いだ際の脳機能を近赤外分光法(fNIRS: functional near-infrared spectroscopy)を用いて計測した。
【方法】実験参加者は男性 8 名とした。香りのサンプルは淡色ビール、黒ビールの 2 種類とし、香気と空気を交互に提示できる流量調整器を備える簡易型オルファクトメーターを用い、香りを 10 秒間提示した。その際の前頭部の酸素化ヘモグロビン(oxy-Hb)の変化を fNIRS により計測した。香りの提示は、鼻先に提示された香りを鼻から吸い込み、鼻から出す条件(前鼻腔条件)とチューブを通じて口腔内に提示された香りを鼻から出す条件(後鼻腔条件)の 2 条件で実施した。統計解析には SPSS16.0 を用いた。
【結果】前鼻腔条件では、淡色ビール、黒ビールの香り提示により前頭前野背外側部近傍 oxy-Hb は有意に増加した。また淡色ビールの香り提示では黒ビールに比べて、oxy-Hb が増加したチャンネルが多かった。香りの提示方法については、淡色ビールでは後鼻腔条件に比べて、前鼻腔条件での oxy-Hb 増加が有意に大きいチャンネルが複数見られた。以上のように、ビールの香りにより前頭前野背外側部近傍の oxy-Hb が増加すること、サンプルや香りの提示方法により応答が異なる可能性が明らかになった。

fNIRS, beer, odor

講演番号：2C01p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ C 校舎 01 会場

混ぜるだけで導入可能な細胞内温度計測用の新規蛍光性温度センサーの開発

Novel fluorescent thermometers with the ability to enter cells for intracellular temperature measurement.

○辻 俊一[1]、吉田 聡[2]、吉田 有人[1]、内山 聖一[3] ([1]キリン・基盤研、[2]キリン・酒類研、[3]東大院・薬)
○ Toshikazu TSUJI[1], Satoshi YOSHIDA[2], Aruto YOSHIDA[1], Seiichi UCHIYAMA[3] ([1]Kirin Company, Ltd.,Central Lab.for Key Technologies, [2]Kirin Company, Ltd., Research Lab. for Brewing Technologies, [3]University of Tokyo)

細胞内温度は、古くより細胞の複雑な機能と密接な関係にあると考えられている。例えば、お酒などの発酵品の製造工程では、微生物の働きを制御するために細かな温度調整をしており、細胞温度の重要性は経験的に理解されている。また、医学分野においても、がん細胞などの病態細胞は、正常細胞と比較して高温であることが指摘されている。このように細胞の温度計測は生物を扱う多くの学問に新しい視点をもたらす技術である。最近、アクリルアミド系高分子の蛍光温度プローブを用いて、細胞内の温度分布を高精度で測定可能とする温度計測技術が開発された（Okabe et al., 2012 *Nature Commun.*）。しかし、このプローブは細胞内への導入に、特別な装置・技術を要するマイクロインジェクション法を必要とし、酵母細胞などの小さい細胞には利用しにくいという課題を抱えていた。

今回、我々は酵母細胞に自発的に導入されるプローブの開発を目指して、高分子にカチオン性ユニットを組み込んだ新たな蛍光温度プローブ CFPT(Cationic Fluorescent Polymeric Thermometer)を合成した。CFPT は細胞懸濁液に混ぜるだけで 10 分以内に酵母細胞質内へ導入され、そこに留まった。そして、CFPT の１つである NN－AP2.5 は、25℃から 35℃で蛍光強度が約 2 倍、蛍光寿命も 6.2ns から 8.6ns へと変化し、最高で 0.09℃ものわずかな酵母細胞の温度差を検出できた。

さらに CFPT は、哺乳類浮遊細胞である MOLT-4 細胞（ヒト T 細胞系白血病細胞）にも酵母と同様に利用可能であった。NN-AP とは機能する温度範囲の異なるプローブの NN/NI-AP2.5 は、30℃から 40℃で蛍光強度が約 2 倍、蛍光寿命も 5.4ns から 8.1ns へと変化することを確認した。そして、HEK293T 細胞（ヒト胎児腎由来細胞）を用いた顕微鏡観察により、CFPT の蛍光強度が細胞内温度の上昇に伴って高くなることが確認され、接着細胞でも利用できることが明らかとなった。

自発的に起こる CFPT の細胞内への導入は、細胞の活性が抑えられた低温条件下でも常温条件下と同程度に起こり、エンドサイトーシスに関与する遺伝子を欠損させた酵母株でも認められた。加えて、10 分以内という短時間でも CFPT が細胞内に導入されたことから、CFPT の細胞内への導入は、化学的な細胞膜の透過によると考えられた。

以上の結果より、新たに開発した CFPT は酵母細胞、哺乳類細胞の懸濁液に混ぜるだけで導入可能な高感度の細胞内温度測定ツールであることが示された（Tsuji et. al., 2013 *Anal. Chem.*）。今後、本技術の活用により細胞内温度やエネルギー産生・消費という視点から、農芸化学をはじめ、医学、薬学、基礎生物学で新たな知見が得られることを期待している。

intracellular temperature measurement, yeast cells, mammalian cells

講演番号：2C01p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ C 校舎 01 会場

Fabricating Small-Scale Structures for Various Biomedical Applications via an Inexpensive and Easy-to-Handle Approach

Chung-Yao Yang, ○ Yu-Tsyr Huang, J. Andrew Yeh, Chao-Min Cheng (Institute of Nanoengineering and Microsystems, National Tsing Hua University)

This study describes an inexpensive but robust and easy-to-handle method, which can be used to fabricate three-dimensional polymeric structures with various geometries at the small scale through a combination of using a LED flashlight and adhesive tapes on planar or curved surfaces. The fabrication methods that we used to make biomedically-relevant devices (e.g., nitrite assay and microfluidics) significantly rely on the photolithography-based approaches with the characteristics of time-consuming and expensiveness. According to the World Health Organization, *in-vitro* diagnostic devices for use in less economically developed regions should be ASSURED (affordable, sensitive, specific, user-friendly, rapid and robust, equipment-free and deliverable to end-users). To date, various types of point-of-care diagnostic devices with the product characteristics such as polydimethylsiloxane-based microfluidics, glucose meters and lateral flow immunoassays have been widely demonstrated and applied for use in different disease-relevant situations. We have demonstrated a method that can be easily used to fabricate polymeric structures with various geometries and sizes at the millimeter scale within 3 hours for different biomedical applications such as low-cost diagnostic assays and fluidic-based systems with four steps, including: i) the patterned adhesive tape made through using a punch was placed on the substrate (e.g., coverslip); ii) a droplet of UV-activated polymer was dropped on the patterned tape and then the entire system was exposed via a UV LED flashlight for 30 minutes; iii) the patterned tape was peeled off in order to obtain the small-scale polymeric structures; and, iv) the polydimethylsiloxane-based diagnostic assay was performed through soft lithography technique. In this study, we used our proposed approach to fabricate a biomedical assay for nitrite ion detection. Sodium nitrite is used for the curing of meat because it prevents bacterial growth and, as it is a reducing agent, in a reaction with the meat's myoglobin, gives the product a desirable pink-red 'fresh' color, such as with corned beef. Because of the relatively high toxicity of nitrite, the maximum allowed nitrite concentration in meat products is 200 ppm. We have demonstrated that our nitrite ion assay can detect 2.07 ppm through using colorimetric method.

UV-activated materials, polymeric structures, biomedical devices

講演番号：2C01p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ C 校舎 01 会場

Food Safety Monitoring via Cotton-based Diagnostic Devices

○ Shang-Chi Lin, Ting-Chu Lin, Fan-Gang Tseng, Chao-Min Cheng (National Tsing-Hua University)

This abstract describes the development of a cotton-based diagnostic device – a commonly used material in our daily life – with the characteristics of inexpensiveness, ease-to-use/-make, robustness and mass production capacity, in particular, attempting to deal with the food safety issue around the world.

The examinations are necessary for consumer in order to detect the additives conditions of the food before the people get chronic food poisoning. Additives type varied according to many kind of food preservation and tasty, so that the “all-in-one analytical device” is important in the diagnostic system, especially in food safety diagnosis. Diagnostic technologies currently require the expertise and appropriate facilities to interpret the examination results from the food safety diagnostic devices. However, these diagnostic technologies are well functioned in the fully developed nations, but it is challenging that 1) those people, living in the developing or underdeveloped countries, can’t afford the expensive examinations and 2) the advanced diagnostic devices can’t function in where are lacking of electric power, instruments and well-trained people.

Here, we have demonstrated a new format of diagnostic tools, consisting of cotton and paper – once again, two commonly used materials in our daily life. The structure of this integrated diagnostic device included two folds: 1) the substrate of the fluidic channels for analytes transporting and 2) the substrate of the test pads for reagent reacting. The fluidic channels adopt out by cotton with uniform of water absorption and high efficiency of liquid diffusion (Diffusion rate: 27 +/- 4.92 (sec/cm)), offered from Shiseido, has a thin layer of hydrophobic surface forming boundaries to isolate each fluidic channel effectively (hydrophobic surface contact angle: 124.41 +/- 6.53°). The test pads are made out by chromatography paper that has higher water absorption than cotton. The analytes (i.e., nitrite……) in solution will be transport to the test pads sequentially through the cotton-made fluidic channels.

We believe this new diagnostic device made out of paper and cotton would reduce the contaminations during the detection, and this diagnostic device has a great potential of being applied in various kinds of examinations, in particular multiplexing diagnosis.

cotton-BASED, food safety, nitrite assay

講演番号：2C01p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ C 校舎 01 会場

Portable Diagnostic Devices for Monitoring Food Safety through a Combination of Using Paper and String

○Kuan-Hung Chen, Hsi-Kai Wang, Jhih-yan Cheng, Chao-Min Cheng (National Tsing-Hua University)

This abstract describes the development of a portable diagnostic device with the characteristics of inexpensiveness, simplicity, ease-to-use, ease-to-prepare, and mass production capacity through using a combination of two commonly-used materials in our daily life – paper and string, in particular, attempting to deal with the food safety issue, i.e., the detection of both chlorpyrifos and methomyl in the buffer system as well as either drinking tea or water. The food safety issue recently has been paid more attention around the world, especially in both underdeveloped and developing nations. We have attempted to switch our focus from the previous studies – the development of disease-based diagnostic devices – to the low-cost but robust diagnostic device for monitoring the food safety from different perspectives such as organophosphates, paraquat, nitrite. In here, we have incorporated the different material characteristics from both of them while using a piece of paper and cotton string, in order to make a functional device, for the detection of paraquat, the procedure as following; 1) we first created hydrophobic versus hydrophilic boundaries in paper, allowing us to obtain the test zone with the immobilization of specific reagents (i.e., sodium dithionite solution in this study); 2) we then placed a cotton string at the end of this test zone, in order to transport the targeted fluid from drinking water to the test zone in paper; and, 3) the colorimetric-based output signal ware obtained by digital camera.

The sensitivity of the current device that we have developed was about 0.3125 mM for the detection of nitrite in the buffer system, demonstrating the flexibility and application of these paper-string-based diagnostic devices. These promising results, we believe, has a great potential of offering new opportunities for the development of making low-cost diagnostic tools, no matter attempting to solving the clinically relevant or food safety issues.

food safety, paper, diagnostic devices

講演番号：2C01p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ C 校舎 01 会場

Using Hydrophobic and Hydrophilic Leaves as a Template to Prepare the Polymeric Substrate

○ Shu-Ting Fan, Jyun-Yu Lin, Chao-Min Cheng (Institute of NanoEngineering and MicroSystems, National Tsing-Hua University)

This abstract describes the demonstration of using leaves as a template to prepare the polymeric substrate at the nanometer scale, due to the physical-based differences – hydrophobicity and hydrophilicity – between different types of leaves obtained from aquatic plants. We first have collected the specific leaves (from aquatic plants), and then measured the contact angle of these leaves, in order to determine whether it was hydrophobic or not. We also have attempt to observe the surface morphology of these leaves via scanning electron microscopy, in order to have a more comprehensive understanding of whether the surface morphology influenced the hydrophobicity or not. We found that the leaf with the hydrophobicity – for example, *Nelumbo nucifera* Gaertn. and *Salvinia natans* L. – showed the specific pattern on their surfaces. The trichomes on the leaves might have influence in hydrophobicity and hydrophilicity of the leaves. We investigated the height and the width of trichomes, and the distance between two trichomes. Furthermore, we analyzed and compared these data of hydrophobic leaves with those of hydrophilic leaves to demonstrate the consistency in structure of hydrophobic or hydrophilic leaves and the difference in two kinds of leaves. These promising results, we believe, would allow us to have a better understanding of how to borrow the design from nature, in order to make the nanostructures, ultimately, functional devices at the nanometer scale.

hydrophobic, hydrophilic, polymeric substrate

講演番号：2C01p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ C 校舎 01 会場

In Situ Examination of Tea Drinks by Using Smartphone via a Combination of Paper-Based Device and Fluorescence Image Recording System

○Shih-Jie Lo[1], Ting-Lan Wang[1], Jung-Chun Kao[2], Da-Jeng Yao[1], Chao-Min Cheng[1] ([1]Institute of Nanoengineering and Microsystems, National Tsing Hua University, [2]Department of Computer Science, National Tsing Hua University)

This abstract describes the development of a portable fluorescence image recording device coupling with a commercially available smartphone (i.e., HTC smartphone) with the characteristics of inexpensiveness, ease-to-use, robustness, and mass production capacity, allowing us to use fluorescent-based assays in paper while building paper-based diagnostic devices for the food safety issue (i.e., determining whether true or fake tea in this study) instead of using colorimetric-based enzymatic assays. Paper-based diagnostic devices have been extensively applied in multiple academic and commercial communities such as monitoring the disease activity in human serum, diagnosing a specific infectious disease such as HIV in a few minutes, and of course, detecting either specific additives in food or heavy metal ions in drinking water. We have commonly used colorimetric-based enzymatic assays as the output response in paper-based diagnostic devices; for example, while using horseradish peroxidase (HRP) as the colorimetric readout, the color change in paper was from colorless to blue. The main disadvantage of using colorimetric-based enzymatic assays was restricted to the specific chemical reactions of these enzymatic assays, and while using the fluorescent-based assays, we currently have to use the expensive and large-size optical system - some of the longstanding issues in this community. The portable fluorescence image recording device coupling with the smartphone application (i.e., APP) that we have developed allows us to analyze the fluorescence intensity in paper-based diagnostic devices while using a specific fluorescence probe to label polyphenols in drinking tea. This portable fluorescence image-recording device is consisted of a UV-LED module, a light adjuster and a light filter. The functions of the smartphone application are 1) to extract one of the channels, specific to RGB channels, and 2) to evaluate the mean intensity of the selected area. The activity of the acetylcholinesterase, which could be suppressed by tea polyphenols from the tealeaves in nature, was measured by applying the fluorescein, and the fluorescent measurement was demonstrated as the performance of this custom-made fluorescence image-recording system. These promising results, we believe, would have a wide range of potential applications such as the development of low-cost diagnostic devices for monitoring food safety with its relevant issues.

Paper-base device, food safety, smartphone

講演番号：2C01p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ C 校舎 01 会場

Lignocellulosic-based Diagnostic Device

○ Chen-Meng Kuan, Ting-Yu Chen, Chao-Min Cheng (Institute of Nanoengineering and Microsystems, National Tsing Hua University)

This abstract describes the development of lignocellulosic-based diagnostic devices with the characteristics of inexpensiveness, ease-to-use, ease-to-fabricate, simplicity and mass production capacity, i.e., using either bamboo or wood as the main engineering material with different material properties in this study, with various functional designs such as lateral flow or three-dimensional formats, in particular, for colorimetric-based food safety monitoring. Lignocelluloses basically are abundant everywhere with a unique characteristic – passively transporting fluids without external energy, via capillary action, due to the vascular bundle structure, consisting of polysaccharide macrofibril. In this study, we used the conventional mechanical process (i.e., drilling) to prepare the lateral-flow-based lignocellulosic diagnostic device made out of bamboo, as following; 1) we first created a v-shaped groove on the lignocellulose surface as the test zone; 2) we immobilized some specific chemicals, i.e., sulfanilamide (50 mM), citric acid (330 mM), and N-(1-naphthyl) ethylenediamine (10 mm) in this study, into this test zone for a few minutes via physical adsorption; and, 3) we then placed this diagnostic device into the targeted solution (e.g., hot pot soup); due to, once again, the capillary action, the targeted solution was naturally transported to the test zone as well as the production of a specific chemical reaction, nitrite in this study with the potential induction of cancers, while the targeted solution contacted with the reagents. The sensitivity of this literal-flow-based lignocellulosic diagnostic device was about 0-2.5 mM for the diagnosis of nitrite in the buffer system (the nitrite concentration versus the color mean intensity of each concentration). However, in order to further improve the sensitivity and obtain the relative uniformity between devices (i.e., device-to-device variation) while using lignocellulosic-based diagnostic devices, we used different material properties offered by bamboo and wood to make a three dimensional lignocellulosic diagnostic device – the test zone and the transportation system made of wood and bamboo, respectively. These two interesting devices made of using bamboo and wood, with such promising results, we believe, have a potential to be as promising alternatives for a variety of settings.

Lignocelluloses, Diagnostic

講演番号：2C01p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ C 校舎 01 会場

質量分析イメージングによる傷害ストレス条件下でのトマト果実代謝物分布の可視化

Visualization of the metabolite distribution in tomato fruit in response to wounding stress using MALDI-MS imaging

○中村 純也 [1]、三浦 大典 [2]、藤村 由紀 [2]、割石 博之 [2,3] ([1] 九大院生資環、[2] 九大レドックスナビ、[3] 九大基教)
○Junya NAKAMURA[1], Daisuke MIURA[2], Yosinori FUJIMURA[2], Hiroyuki WARIISHI[2,3] ([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]ICMRN, Kyushu Univ., [3]Fac. Arts. Sci., Kyushu Univ.)

近年、生体での代謝物の挙動を包括的に理解し、ゲノム情報だけでは解明できない生体反応の解明を目指したメタボロミクス研究が盛んに行われている。LC-MS や GC-MS などの質量分析装置を用いた従来のメタボロミクス研究は基礎生物学や医学・農学等幅広い分野への応用が進められており、これまでにない情報の提供が可能となってきている。一方、より高度な生命現象の解明に向け、メタボローム生体内分布情報の有用性が指摘されている。植物は果実や葉など多彩な器官を有しており、これら器官の局所的な生命現象を捉えるためには、代謝物の空間分布情報を取得することが不可欠である。現在、生体分子の *in situ* マッピング法としてマトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）法を用いた質量分析イメージング（MSI）技術の開発が盛んに行われている。当研究室ではこれまでに MALDI-MSI を用いて果実の中で最も水分量が高いトマト果実の旨味成分に関与する核酸やアミノ酸、中央代謝系中間体などの代謝物分布可視化に成功している [1)]。

本研究では、傷害ストレス処理を施したトマト果実に対してこれまでに確立した手法を用いて局所的な代謝物空間分布情報を捉えることを目的とし、凍結ミクロトームにて作製したトマト果実薄切片（10 μm 厚）に対してエアーブラシを用いたスプレーコーティング法により一次代謝物および二次代謝物をイオン化可能なマトリックスをそれぞれ塗布した。その後、MALDI-MSI に供した。MALDI-MSI で取得したデータを解析した結果、果皮やゼリー質などトマト果実内各部位で傷害ストレス処理に応答した核酸やアミノ酸、中央代謝系中間体などの一次代謝物および先行研究にて明らかとなっているトマト果実に内在する二次代謝物の空間分布情報を捉えることに成功した。

[1)] 中村純也、加来麻衣子、藤村由紀、高橋勝利、三浦大典、割石博之（2013）日本農芸化学会 2013 年度大会 2C31a08

MALDI-MS imaging, tomato, wounding stress

講演番号：2C01p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ C 校舎 01 会場

ラジカル補足剤ＤＢＮＢＳを利用した抗酸化活性評価

Evalutation of total antioxidant activity by using DBNBS, a spin trap reagent

○浜崎 武記[1]、中西 恵[1,2]、中道 昇[1]、樺山 繁[3]、石井 嘉時[4]、照屋 輝一郎[1,2]、白畑 實隆[1,2] ([1]九大院農、[2]九大院シス生、[3]（株）日本トリム、[4]（株）日田天領水)

○ Takeki HAMASAKI[1], Megumi Nakanishi[1,2], Noboru Nakamichi[1], Shigeru Kabayama[3], Yoshitoki Ishii[4], Kiichiro Teruya[1,2], Sanetaka Shirahata[1,2] ([1]Dept. Biosci. Biotech., Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Systems Life Sci., Kyushu Univ., [3]Nihon Trim Co. Ltd, [4]Hita Tenryousui Co. Ltd)

[目的]

抗酸化物質の測定法は評価の難しさから多数の評価法が報告されている。本研究では ESR のスピントラップ剤である 3,5-dibromo-4-nitrosobenzene sulfonate sodium salt (DBNBS)を利用した新規抗酸化物質測定法を報告する。DBNBS は水溶性ラジカルトラップ剤として使われている試薬であり、DBNBS は水素ラジカルもトラップすることができることから DBNBS を水素移行反応である抗酸化物質の水素ラジカル移行量を直接的に評価できるのではないかと考え、抗酸化物質評価法の確立を試みた。

[方法]

DBNBS 還元生成物の分離、精製は HPLC を使用しカラムは C18ODS を用い流速 0.2ml/min で 40 分の間にアセトニトリル濃度が 10%から 90%になるようにして測定を行った。分子量及び構造解析は島津社製 LCMS-IT-TOF を使用した。DBNBS はそれぞれ酸性、中性、アルカリ性条件下で還元剤と 70℃でインキュベートを行い生成物の量的及び時間的変化について吸光度計を用いて測定した。

[結果及び考察]

解析の結果、DBNBS は還元および抗酸化物質と反応させると 3,5,3’,5’-Tetrabromoazobenzene sulfate sodium salt (TBABS)及び 3,5-Dibromo-4-aminobenzene sulfate sodium salt (DBABS)の二つの化合物を生成することが HPLC 及び LC-MS の結果から明らかとなった。また、ニトロソ化合物の還元反応過程から、DBABS は DBNBS の 4 水素還元によって 3,5-dibromo-4-hydroxyaminobenzene sulfate sodium salt (DBHABS)を経由して生成され、また、TBABS は４水素還元によって直接または 3,5,3’,5’-tetrabromoazoxybenzene sulfate sodium salt (TBAzoxyBS)生成を経由して生成されることが推測された。この DBNBS から生成した両産物 DBABS 及び TBABS は特徴的な吸収を持つ為、この生成量を持って抗酸化物質の量的な評価ができることが示唆された。次に既知の還元剤、抗酸化物質の測定を行いその評価を行ったところ抗酸化物質量と吸光度との間によい相関性が得られた。そこで実際に種々の食品サンプルについてその抗酸化量の測定を行った。対象として ORAC 測定を使用した。その結果、良好な相関性を得ることができ、新しい抗酸化量測定法として利用できると期待された。また、多数の天然水について評価したところ、大分県日田市中ノ島の深井戸水が最も強い DBNBS 反応を示すことが明らかとなった。

antioxidant, hydrogen, assay

講演番号：2C01p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ C 校舎 01 会場

安定同位体標識された幼木の多次元核磁気共鳴法による代謝流束およびバイオマス解析

Multi-dimensional NMR based Fluxomics and Biomass Analysis of Stable-isotope-labeled Young Trees

大石 梨紗[3]、○小松 功典[1,2]、篠 阿弥宇[2]、菊地 淳[1,2,3,4,5]（[1]横市大院生命医、[2]理研 CSRS、[3]横市大院生命ナノ、[4]理研 BMEP、[5]名大院生命農）

Risa Ohishi[3], ○Takanori KOMATSU[1,2], Amiu Sino[2], Jun Kikuchi[1,2,3,4,5] ([1]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., [2]Riken CSRS, [3]Grad. Sch. Nanobio., Yokohama City Univ., [4]Riken BMEP, [5]Grad. Sch. Bioagr., Nagoya Univ.)

【緒言】

森林生態系機能の維持，里山の整備による水源の安定供給，および石油代替資源として樹木が注目されている。樹木の炭素固定および窒素の利用変換過程の基盤的理解は，環境および資源科学の両面において重要な課題である。本研究では，安定同位体標識技術と核磁気共鳴（NMR）法を組み合わせて，幼木の標識代謝物および高分子バイオマス成分の代謝動態解析を試みた。

【実験】

幼木の安定同位体標識は，大気または根圏から安定同位体を取り込ませる 2 通りの方法でおこなった[1]。前者では，発芽した植物体を $^{13}CO_2$ 混合空気雰囲気のチャンバー内へと移し，光合成による炭酸同化を利用して安定同位体標識植物を育成した。また，後者では，発芽した植物体を ^{13}C-glucose および ^{15}N-ammonium nitrate を含んだ寒天培地へと移し，安定同位体標識植物を育成した。定期的にサンプリングした安定同位体標識植物から極性代謝物を抽出し，多次元 NMR 計測によるアイソトポマー解析をおこなった。また，リグノセルロースなどの細胞壁バイオマス成分は，多次元固体 NMR 計測をおこない安定同位体の蓄積を解析した。

【結果】

極性代謝物の NMR 計測から，共通してキナ酸が大量に蓄積していることが分かった。キナ酸は，シキミ酸の前駆体であり，幼木において特徴的に蓄積される成分である。樹木においてキナ酸蓄積量とシキミ酸蓄積量の負の相関が示されており，肥大成長における木化（リグニン化）との関係性が示唆されている[2]。また，多次元 NMR 計測によるアイソトポマー解析によって代謝物の流束（フラックス）情報を取得した[3]。それぞれの安定同位体標識法で根圏，種子，大気から取り込まれる安定同位体が異なる。大会当日は，異なる炭素および窒素源に由来するアイソトポマーの解析から代謝フラックス変動を討論する。

植物地上部の多次元固体 NMR スペクトルから，脂肪，セルロース，およびリグニン様物質が検出された。また，DDF-INADEQUATE 法[4]の適用によって非セルロース多糖の解析が可能になった。以上のように NMR 法は代謝フラックスからバイオマス全体まで幅広い情報をあたえる手法である。

【引用文献】[1] Kikuchi, J. and Hirayama, K., *Method. Mol. Biol*. **358** (2007) 273-286. [2] Luethykrause, B., Pfenninger, I., Landolt, W., *Trees* **4** (1990) 198-204. [3] Sekiyama, Y., and Kikuchi, J., *Photochemistry* **68** (2007) 2320-2329. [4] Komatsu, T. and Kikuchi, J., *J. Phys. Chem. Lett.* **4** (2013) 2279-2283.

metabolic flux analysis, biomass analysis, stable isotope labeling

講演番号：2C01p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ C 校舎 01 会場

シグナル帰属の困難な海藻混合物への新規多次元 NMR 解析法の構築

Novel method for multi-dimensional NMR analysis toward difficult signal assignment in seaweeds system

○伊藤 研悟[1]、小松 功典[1]、坂田 研二[2]、伊達 康博[1,2]、菊地 淳[1,2,3,4]（[1]横市院生命医、[2]理研 CSRS、[3]理研 BMEP、[4]名大院生命農）

○Kengo Ito[1], Takanori Komatsu[1], Kenji Sakata[2], Yasuhiro Date[1,2], Jun Kikuchi[1,2,3,4] ([1]Yokohama City Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]RIKEN BMEP, [4]Nagoya Univ.)

海藻類バイオマスの産業的価値は極めて高いと考えられるが、その効能について評価されていないものは多数存在し、海藻類の構成成分を網羅的かつ高感度に検出可能な計測技術高度化が望まれている。このような計測技術高度化において、安定同位体標識技術を利用した NMR 計測により網羅的な検出が可能であるが、データベースや既往論文に報告の無い海藻類の未知成分を帰属することは容易ではなく、従来の帰属手法に頼らない理論計算に基づく帰属方法の発展が期待されている。そこで我々は、海藻類の ^{13}C 標識サンプルを用いて、多様な NMR 計測法により代謝混合物群の網羅的な分析を行うと共に、それらの結合情報に対してグラフ理論に基づいた解析を行い、量子化学計算により推定構造の妥当性を検証した。緑藻類のヘライワズタ(*C. brachypus*)を対象に、$^{13}CO_2$ を 1L マリンフラスコ及び 60L 水槽の海水に常時流入させ、光合成により $^{13}CO_2$ を取り込ませることで ^{13}C 標識サンプルを作成した。採取した海藻は凍結乾燥後に破砕し、粉末サンプルとして各種計測機器に供試した。IR-MS により同位体比を計測し、^{13}C 標識率の時系列変化を調べた結果、40%程度の ^{13}C 標識化されたサンプルが得られた。また、海藻の分化細胞及び伸長部は元の部分及び成長が見られなかった細胞よりも高い ^{13}C 標識率であった。標識率の高い海藻サンプルを用いて、水及びメタノール可溶性画分の各種多次元溶液 NMR 計測により、未標識サンプルに比べて高感度に多数の交差シグナルを検出することが可能であり、多様な NMR 計測法により代謝混合物群の網羅的な分析が可能であった。得られた溶液 NMR スペクトルは当研究室で開発した SpinAssign ツール(http://prime.psc.riken.jp/)により代謝物のアノテーションを行った。しかし、3D-HCCH-COSY や INADEQUATE まで計測したにも関わらず、40%程度の ^{13}C 標識率では多くの交差シグナルの帰属が困難であった”ため新規解析手法の開発に着手することとした。まず、このような帰属困難な未知成分の結合情報を得るため、異なる NMR 計測法のシグナル情報を統合したネットワーク解析を行い、その連鎖結合情報から化学構造を推定した。推定構造は B3LYP/6-31G**レベルで最適化を行い、IGLO 法により化学シフトの理論値を算出し、実験値との比較を行った。L-Glutamate を例として解析を行った結果、HSQC 及び HSQC-TOCSY の統合ネットワーク解析により、L-Glutamate の主鎖の部分がグループ化された。量子化学計算により理論化学シフト値を予測した結果、計算手法のパラメータによりバラつきが見られたが、実測値に近似する値が得られた。以上のことから、各種計測データを統合的に評価する本手法を用いることで、既知物質の網羅的検出と、未知物質の構造推定を行うことが可能と考えている。

Stable isotope labeling, Graph theory, Quantum chemical calculation

講演番号：2C01p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ C 校舎 01 会場

小型表面プラズモン共鳴センサーによるがんワクチン適格性判定

Discrimination of the single nucleotide polymorphism associated with prognosis of cancer vaccine treatment by a surface plasmon resonance-based sensor

○奥村 史朗[1]、川内 強[2]、岩倉 宗弘[3]、小松 誠和[4]、久原 哲[5]、伊東 恭悟[4] ([1]福岡県工技セ、[2]久留米リサーチパーク、[3]九州計測器、[4]久留米大医、[5]九大院農)

○Shiro OKUMURA[1], Tsuyoshi KAWAUCHI[2], Munehiro IWAKURA[3], Nobukazu KOMATSU[4], Satoru KUHARA[5], Kyogo ITOH[4] ([1]Fukuoka ITC, [2]Kurume Research Park, [3]Kyushu Keisokki, [4]Kurume Univ., [5]Kyushu Univ.)

がんの治療法は外科療法、放射線療法、抗がん剤を用いた化学療法の 3 つが一般的であるが、近年、4 番目の治療法として、がんペプチドワクチン療法が注目されている。がんペプチドワクチン療法とは、がんを発症した患者にがんペプチドワクチンを投与し、人間に元来備わっている免疫機能を増強することでがんの進行を抑える方法である。がんペプチドワクチンは副作用が少ないが、患者によって効果のばらつきが大きく、それぞれの患者ごとに治療前に適格性予測を行うことが費用対効果向上のために重要である。我々はこれまでに特定の遺伝子の多型とがんペプチドワクチン治療の効果との間に相関があることを示している。この多型が G/G の遺伝子形である患者は治療が有効である一方で A/A の遺伝子形では有意な治療効果が得られていない。そこで、治療の現場で簡易・迅速にがんペプチドワクチンに対する適格性を判断するために、九州計測器製の小型の表面プラズモン共鳴（SPR）センサーを用いた患者の遺伝子多型判定方法を開発した。SPR センサーは光反射における物理現象を利用し分子間の相互作用をリアルタイムで観測可能な機器で、従来から多くの分野で利用されている。今回は小型 SPR センサーを用いて当該する多型判定に特化したプローブの開発および適切な測定条件の検討を行った。また、本法の有用性を確認するために、31 名の患者からゲノムを採取し、当該する多型を含む部分を増幅して小型 SPR センサーによる判定を行ったところ、A センサーにのみ応答する A/A 遺伝子形が 11 名、G センサーへのみ応答する G/G 型遺伝子形が 4 名、両センサーに応答する A/G 遺伝子形が 16 名確認され、この判定結果はシークエンス法による結果と完全に一致した。

single nucleotide polymorphism, surface plasmon resonance, cancer vaccine

講演番号：2C01p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ C 校舎 01 会場

ポテンショメトリッククーロメトリ法の開発

The potentiometric coulometry

聶 其華[1]、○北隅 優希[1]、白井 理[1]、山本 雅博[2]、加納 健司[1] ([1]京大院農、[2]甲南大理工)
Chi-Hua Nieh[1], ○Yuki Kitazumi[1], Osamu Shirai[1], Masahiro Yamamoto[2], Kenji Kano[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Konan Univ.)

[諸言]

電気化学バイオセンサーは試料中の目的物質を酸化還元酵素により電極と容易に反応できる酸化還元種(メディエータ)と反応させ、メディエータの濃度変化を電気化学的手法によって検出するデバイスである。濃度決定に用いられる電気化学的手法の中で、クーロメトリー法は試料中の目的物質をすべて電解し、それに要した電気量を測定する手法であり、基準のいらない絶対定量法として知られている。しかしながら、電解に基づく測定は非ファラデー電流の影響を排除できないという弱点がある。一方で、ポテンショメトリーは酸化還元物質の電極上での濃度比をネルンスト式に基づいた電位差測定により定量する手法であり、非ファラデー過程の影響を受けない。今回、我々は電極上にメディエータを極めて薄く固定化し、溶液中の微量試料と酵素によって反応させ、その反応によって変化したメディエータの酸化体／還元体の濃度比を電位差測定法により決定する、新たなクーロメトリックポテンシオメトリーを提唱する。この手法は、圧倒的な体積差をもつ電極表面に固定化されたメディエータと試料中に存在する希薄な目的物質との間の定量的な反応に由来する濃縮という、電気分析化学におけるストリッピングと似た濃縮効果を併せ持つことから分析の高感度化が可能であるという特性を併せ持つ。

[実験]

電極表面にメディエータとしてオスミウムのポリビニルイミダゾリウム錯体を固定化し、その上に酸化還元酵素としてペルオキシダーゼを固定化した。錯体の固定化量は酸化還元のボルタモグラムを記録することにより決定した。過酸化水素を含む緩衝液を電極に乗せ、銀塩化銀電極に対する電極電位を追跡した。

[結果]

記録された電位差は、過酸化水素の添加直後から徐々に正にシフトし、100 秒ほどで一定となった。観測された電位の変化は電極上のオスミウム錯体が溶液中の過酸化水素によって酸化され、全量が消費された場合に期待される理論値とよく対応した。この結果は、バイオセンサーの新規形態としてストリッピングポテンシオメトリーが実現可能であることを意味する。

[参考]

C.-H. Nieh, Y.Kitazumi, O. Shirai, M. Yamamoto, and K. Kano, Electrochem. Commun. 33 (2013) 135.

biosensor, charge accumulation, bioelectrocatalysis

講演番号：2C01p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ C 校舎 01 会場

チャネル形成剤-アンホテリシン B-によるイオンおよびグルコースの 脂質二分子膜透過とコレステロールの役割

The effect of cholestrol on the transport of ions and glucose across lipid bilayers by a channel-forming compound, amphotericin B

○白井 理、籠橋 宏樹、北隅 優希、加納 健司（京大院農）
○Osamu SHIRAI, Hiroki Kagohashi, Yuki Kitazumi, Kenji Kano (Kyoto Univ.)

1. 緒言

アンホテリシン B（AmB）は、真菌症の治療薬として広く使われている抗生物質であり、ステロール類（とくにエルゴステロール）と 1：1 で結合したものが複数個凝集してチャネルを形成することが知られている。人体での副作用はコレステロールとの結合とその凝集によるチャネル形成に起因すると考えられているが、ステロール類が存在しなくても AmB 添加により透過性が高くなることも報告されており、詳細は解明されていない。本研究では平面脂質二分子膜（BLM）及びリポソームを用いてコレステロールを膜中に含む場合（+Chl 系）と含まない場合 (–Chl 系) におけるイオン及びグルコースの AmB による透過促進効果について検討した。

2. 方法

レシチン及びコレステロールから構成される BLM（直径約 0.8 mm）は刷毛塗り法で作製した。BLM を介した 2 水相（W1 及び W2）間でのイオン移動は、W1 及び W2 間の電位差と W1 及び W2 間で流れる電流の関係曲線の解析により調べた。W1 及び W2 のイオン組成とゼロ電流電位の関係よりイオン透過選択性（イオン種による膜内透過性の違い）を評価した。また、グルコース溶液を封入したリポソームからの AmB 添加によるグルコースの外部溶液への流出挙動については、酵素型電気化学センサを用いて外部溶液中のグルコース濃度の測定により調べた。

3. 結果と考察

+Chl 系では、AmB を添加してから約 120 秒の間に、イオン透過特性はカチオン選択性からアニオン選択性に変化した。これより、AmB は単量体ではキャリアとして働き、時間経過と共に凝集してチャネルを形成すると考えた。なお、AmB を含む有機液膜（*n*-decane）を用いた場合でもカチオン選択性を示したので、AmB はキャリアとしても働くことが判明した。一方、–Chl 系ではカチオン選択性を示し、経時変化は現れなかった。これは、コレステロールを含まず、AmB はキャリアとして働くためと考えた。グルコース透過の実験では、+Chl 系及び –Chl 系のどちらの場合でも、AmB の添加によりグルコースは流出し始め、約 200 秒後にはグルコース透過の急激な抑制が観察された。13 時間後、+Chl 系ではグルコース透過がほとんど進んでいないのに対して、–Chl 系ではリポソーム内外のグルコース濃度は等しくなった。これはキャリア型ではグルコース輸送が可能だがチャネル型では不可能であることを意味し、水中での AmB の凝集を考慮すれば急激な抑制について理解できた。

amphotericin B, bilayer lipid membrane, transport

講演番号：2C01p22
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ C 校舎 01 会場

リアルタイム PCR による食品などの遺伝子解析方法の検討

A study on a gene analysis method with real-time PCR on food

○坂口 大介、原 宏佳、渋井 達郎（日本獣医生命科学大院応 食品バイオテクノロジー教室）
○Daisuke SAKAGUCHI, Hiroyoshi HARA, Tatsuro SHIBUI (Nippon Veterinary and Life Science Univ.)

食品材料の多くは生物由来であり、生物は DNA を遺伝物質として利用している。よって、多くの場合、食品には食材由来の DNA が残存していると考えられる。
一方、様々な生物の遺伝子（DNA）配列の解析が進められており、配列解析の結果はデータベース化され、現在、一般に利用可能となっている。
タンパク質や他の物質の解析に比べ DNA は複製・増幅が可能なことから、DNA は解析を行う上で多くの利点がある。さらに、DNA は比較的安定で、様々な加工食品等においても完全には分解されずに解析可能な状態で保存されているケースも多い。また、遺伝子の配列は生物に固有のもので、食品に残存する DNA の配列を解析することで食材に使われた生物の種類等が特定可能となる。
PCR 法及びそれを応用したリアルタイム PCR（定量 PCR）法は、食品における生物種の由来の鑑定や遺伝子組み換え生物の利用の有無の判定などに利用されている。更に定量 PCR 法は、逆転写酵素と組み合わせることにより、様々な食品に使用される生物の種々の組織での遺伝子（mRNA）の発現解析といったような分子生物学的な解析を利用した解析分野に応用・活用されている。
異種生物食材の混入について遺伝子での解析を行う場合は、現在、主に PCR 法によって定性的な検査を行い、定量的解析は主に ELISA 法などのタンパク質での解析方法を用いている。
昨年、我々は Nested PCR を応用した技術によりスタンダード DNA を調製し、食品試料中の目的遺伝子のコピー数を定量 PCR 法にて簡便に測定する方法を考案し、報告した。報告のリアルタイム PCR 法における遺伝子解析では、ゲノムサイズの判明している生物種おいて細胞当たりのミトコンドリアや葉緑体などの数、あるいは染色体上に挿入された目的遺伝子断片のコピー数の定量などが可能となる。
今回は、鶏のミトコンドリア DNA を用いて、様々な部位における 1 細胞当たりのミトコンドリア数を測定した結果を報告する。当研究の結果を積み重ねることにより、迅速で安価な方法によって、PCR 法では不可能であった食品などにおける同一生物種の異種部位混入などの検出も行うことができるようになることが期待される。

food, gene copy number, nested PCR

講演番号：2C01p23
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ C 校舎 01 会場

環境中の亜リン酸動態モニタリングのための簡便な亜リン酸検出法の開発

Development of a feasible phosphite detection system for monitoring phosphite in the environment

○作田 敦士[1]、廣田 隆一[2]、池田 丈[2]、黒田 章夫[2]([1]広島大工、[2]広島大院先端物質・分子生命)
○ Atsushi Sakuda[1], Ryuichi Hirota[2], Takashi Ikeda[2], Akio Kuroda[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Univ.)

[目的]

リンは生物にとって必須な元素であり、植物の肥料として農業にも欠かせない資源である。近年、還元型のリン酸である亜リン酸(酸化数:+Ⅲ)をリン肥料として利用することで、植物における生産物の品質の向上、収量の増加が認められると報告されている。今後亜リン酸肥料の使用が増大するに伴い、亜リン酸の環境中における動態を簡便にモニタリングする必要が生じるが、イオンクオマトグラフなどを用いた従来の測定法では測定に長時間を要し、また高コストであるため、簡便で安価かつ高感度な測定法が求められる。そこで本研究では、亜リン酸を NAD^+依存的にリン酸に酸化する亜リン酸デヒドロゲナーゼ(PtxD)とテトラゾリウム塩である WST-3 を用いた酸化還元反応よる発色方での亜リン酸測定法を検討した。

[方法・結果]

PtxD の共役反応により亜リン酸がリン酸に酸化する際に NAD^+から NADH が生成する。この NADH と電子キャリアーである 1-Methoxy phenazinium methylsulfate (PMS)と WST-3 を 10 分間反応させ、亜リン酸依存的に生成するホルマザンの吸光度(433nm)を分光光度計で測定することにより亜リン酸の濃度測定を行った。また、亜リン酸を肥料として使用したモデル実験系として、亜リン酸を黒ボク土などの土壌に吸着させた後、溶出液により溶出を行い、環境中における土壌中の亜リン酸の測定が可能か評価を行った。

亜リン酸濃度測定の結果、本手法での測定は 0.4μM までの測定が可能であった。また、土壌中の亜リン酸測定では、土壌の種類により効果が異なるものの、溶出液として 0.1M リン酸緩衝液を使用することで吸着した亜リン酸の 60-90%が溶出できることが明らかになった。

phosphite, PtxD, detection

講演番号：2C02a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ C 校舎 02 会場

アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド高含有醤油の開発とその降圧効果

Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide-enriched soy sauce

○仲原 丈晴、杉本 勝俊、山口 仁美、内田 理一郎（キッコーマン（株））
○Takeharu NAKAHARA, Katsutoshi SUGIMOTO, Hitomi YAMAGUCHI, Riichiro UCHIDA (Kikkoman Corp.)

【目的】

血圧上昇を抑制する食品成分として、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害ペプチドが知られている。一方、醤油中にも原料由来のタンパク質から生じるペプチドが存在することが報告されている。しかしながら、醤油中のペプチドの ACE 阻害活性や含有量についてはこれまで詳しく知られていなかった。

そこで本研究では、血圧降下作用を有する醤油を開発することを目的として、醸造法を改変することで通常の醤油よりも ACE 阻害ペプチドの含有量を増加させた大豆発酵調味液（FSS）を開発した。さらに FSS を配合した大豆ペプチド高含有減塩醤油を開発し、高血圧モデルラットおよび血圧が高めのヒトが継続摂取したときの血圧に与える影響を調べた。

【結果】

FSS は通常の濃口醤油よりもペプチド含量が多く、強い ACE 阻害活性を示した。そこで、高血圧自然発症ラット（SHR、各群 n=8）に対し、FSS を 10%（v/w）混餌した粉末飼料を 11 週間連続投与したところ、通常飼料と比較して血圧上昇を有意に抑制した。

次に、FSS から ACE 阻害活性を指標に成分の単離精製を行い、複数の ACE 阻害ペプチドを同定した。FSS および通常の濃口醤油に含まれるこれらのペプチドを定量したところ、FSS は通常の濃口醤油より多量の ACE 阻害ペプチドを含むことを確認した。また、同定した ACE 阻害ペプチドの Gly-Tyr および Ser-Tyr は SHR への単回投与において用量依存的な降圧作用を示した。

さらに、FSS を配合した大豆ペプチド高含有減塩醤油を被験食、FSS を配合しない通常の減塩醤油を対照食とし、I 度高血圧者および正常高値血圧者の成人男女 132 名を被験者として、無作為化二重盲検並行群間比較法による 12 週間の連続摂取試験を実施した。試験食品は 1 日に 1 回、8 mL を摂取させ、血圧値に与える影響およびその他の臨床的影響を調べた。その結果、試験期間終了時の FSS 配合減塩醤油摂取群の血圧は、対照群との群間比較、および摂取開始時との群内比較の両方で有意に低下した。被験食品に起因する有害事象は認められなかった。

【結論】

これらの結果から、大豆ペプチド高含有減塩醤油は、安全で降圧作用を有する有用な食品であることが示された。

soy sauce, peptide, antihypertensive effect

講演番号：2C02a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ C 校舎 02 会場

ガーリック由来香気成分 diallyl trisulfide による血小板凝集の抑制とそのメカニズムについて

Inhibition of platelet aggregation by diallyl trisulfide and its mechanism

○佐藤 明日香、細野 崇、関 泰一郎（日本大院生資科）
○Asuka SATO, Takashi HOSONO, Taiichiro SEKI (Nihon Univ.)

【背景・目的】血液凝固系は出血に対する生理的な防御機構であるが血小板のプライミングによる凝固機能の亢進は、心筋梗塞や脳梗塞などの血栓塞栓性疾患を惹起し、生活習慣病による直接の死亡原因となっている。ガーリックは、抗血栓作用、抗がん作用、抗炎症作用など多彩な薬理効果を示す食品として知られている。これまでに我々は、ガーリックの香気成分に血小板凝集抑制作用や抗血栓作用があることを見出しているが、直接の分子標的などは不明である。本研究では、ガーリックの香気成分 diallyl trisulfide (DATS) をモデルとし、その血小板凝集抑制作用メカニズムについてフローサイトメトリーやアグレゴメーターを用い、詳細な作用メカニズムを明らかにしようとした。
【方法】C57BL/6J マウス(7 週齢、オス)からクエン酸加血を採取し、洗浄血小板 (2×10^5 platelets/μl) を調製した。洗浄血小板に DATS または DATS の構造異性体である dipropyl trisulfide (DPTS)を室温で反応させた後、各種凝集惹起物質で刺激し、血小板凝集能をアグレゴメーターで測定した。また、洗浄血小板 (3×10^5 platelets/μl)を用いて血小板膜表面のインテグリンαIIbβ3 と P-selectin の発現量をフローサイトメトリーにより測定し、Western blotting により血小板活性化シグナルを検討することで血小板の活性化状態を評価した。
【結果】各種惹起物質による血小板凝集は DATS の濃度依存的に抑制された。また、thrombin 誘導性血小板活性化反応におけるインテグリンαIIbβ3 と P-selectin の発現も DATS により抑制された。一方、DPTS による血小板凝集及びαIIbβ3 と P-selectin の発現の抑制作用は DATS よりも弱かった。同様に血小板活性化シグナル因子のリン酸化は DATS によって抑制されたが、DPTS の抑制作用は DATS よりも弱かった。
【結語】DATS は、血小板活性化シグナルにおけるリン酸化反応の抑制、その後の血小板表面のαIIbβ3 と P-selectin の発現を抑制することで血小板凝集を抑制することが示唆された。また、DATS は DPTS よりも強力な効果を示し、アリル基が血小板機能の抑制に重要である可能性が明らかになった。

Diallyl trisulfide, Platelet, Thrombosis

講演番号：2C02a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ C 校舎 02 会場

第 1 相薬物代謝酵素シトクロム P450 2E1 の発現の特徴と diallyl trisulfide による抑制メカニズム
Characterization of the expression of hepatic Cytochrome P450 2E1 and its regulation by diallyl trisulfide.

○荒木 彩花、久宮 彩乃、秋葉 知奈、山口 花梨、細野 崇、関 泰一郎（日本大生資科生命）
○Sayaka ARAKI, Ayano KUGU, China AKIBA, Karin YAMAGUCHI, Takashi HOSONO, Taiichiro SEKI (Nihon Univ.)

【目的】ガーリックは、抗がん、抗炎症、抗肥満作用など様々な機能性を示す食品である。我々は、ガーリック由来の香気成分であるジアリルトリスルフィド(DATS)が第 I 相薬物代謝酵素を抑制、第Ⅱ相薬物代謝酵素を誘導することを報告してきた（J Nutri, 2009）。また、最近、DATS がアセトアミノフェン(APAP)代謝酵素の一つであるシトクロム P450 2E1(CYP2E1)を抑制することにより APAP 誘導性肝障害を抑制することを明らかにした。本研究では、DATS によるラット肝臓 CYP2E1 発現や活性の抑制メカニズムについて基礎的な検討を行った。
【方法】実験Ⅰ：6 週齢 Wistar 系オスラットに固型飼料 CRF-1 と滅菌水を自由に摂取させて、一週間予備飼育を行った。その後、DATS (500 μmol/kg/b.w.) を 5 日間連続で経口投与する DATS 群と、DATS を溶解させた Corn oil（2 ml/kg/b.w.）を経口投与する Control 群に群分けした。さらに、DATS 群、Control 群それぞれ朝 8 : 00 に投与する群と夜 20 : 00 に投与する群に群分けした。最終投与後 24 時間絶食し、心臓より採血後、肝臓を摘出した。これらの肝臓からミクロソーム画分を調製し、CYP2E1 タンパク質の発現をウエスタンブロッティングにより測定した。またクロルゾキサゾンを基質として用い CYP2E1 の酵素活性を測定した。実験Ⅱ：実験Ⅰと同一の実験群を設定後、DATS と Corn oil を上述の要領で単回投与し、投与後 0, 3, 6, 12, 24 時間後に血液、肝臓を採取し同様の解析を行った。
【結果と考察】Control 群と比較し DATS 群において CYP2E1 のタンパク質発現及び酵素活性は減少した。また、朝投与を行った群と夜投与を行った群を比較すると、Control 群、DATS 群ともに朝投与群よりも夜投与群において CYP2E1 のタンパク質発現、酵素活性ともに高い傾向を示した。DATS 単回投与実験の結果から CYP2E1 のタンパク質発現・酵素活性ともに投与後 12 時間で最低値を示した。また、Control 群と比較して、どのタイムポイントにおいても DATS 群は低値を示した。これらの結果から CYP2E1 のタンパク質の発現は DATS により抑制されることが明らかになった。CYP2E1 は、飢餓状態で誘導されるケトン体(β-ヒドロキシ酪酸, アセト酢酸, アセトン)によりタンパク質が安定化することが報告されている。また、朝投与群と夜投与群における CYP2E1 タンパク質発現レベルの差異や変動から、CYP2E1 は摂食のタイミング、サーカディアンリズムをはじめとする様々な要因の影響を受けることが考えられる。現在、血中ケトン体濃度の測定と CYP2E1 レベルの関連、DATS がケトン体産生に及ぼす影響について検討を行っている。

CYP2E1, diallyl trisulfide, garlic

講演番号：2C02a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ C 校舎 02 会場

LPS 誘導性炎症反応に対するアスコルビン酸の防御効果

Anti-inflammatory action of ascorbic acid in ODS rats treated with high-dose of LPS.

○徳田 優希[1]、川出 野絵[1]、辻野 祥伍[1]、小林 美里[1]、村井 篤嗣[1]、伊藤 浩行[2]、堀尾 文彦[1]([1]名大院生命農・応用分子生命科、[2]近畿大・生物理工)
○Yuki TOKUDA[1], Noe KAWADE[1], Shougo TSUZINO[1], Misato KOBAYASHI[1], Atsushi MURAI[1], Hiroyuki ITO[2], Fumihiko HORIO[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Kinki Univ.)

【目的】アスコルビン酸（AsA）は抗酸化作用を持つ水溶性ビタミンである。ODS ラットは遺伝的に AsA 生合成能を欠損しており、AsA の生理機能研究において有効なモデル動物である。我々は、ODS ラットに AsA 無添加飼料を与えた場合に、欠乏 12 日目以降に血中の炎症性サイトカイン濃度や肝臓の急性期タンパク質発現の上昇などの炎症様変化が起こることを見出している。これらの結果から、AsA 摂取が抗炎症作用を発揮することが期待される。本研究では、ODS ラットに炎症様変化が起こる以前の AsA 欠乏 8 日目において、炎症および敗血症の誘発モデルである LPS（Lipopolysaccharide）投与を行い、通常要求量および高用量の AsA 摂取の抗炎症効果を検討することを目的とした。
【方法】ODS ラット（雄、6 週齢）を AsA 含有量の異なる 3 種類の飼料で 8 日間飼育し、それぞれを欠乏群（AsA 無添加飼料摂取）、コントロール群（通常要求量摂取群:AsA300 mg/kg 添加飼料摂取）、高 AsA 群（AsA3,000 mg/kg 添加飼料摂取）とした。8 日目に LPS（15mg/kg 体重）を腹腔内投与することで炎症を誘発した後、実験 1 では LPS 投与 48 時間後までの生存率を、実験 2 では LPS 投与 2 および 6 時間後における炎症関連因子の発現を各群で比較した。
【結果】＜実験 1＞LPS 投与 48 時間後における生存率は欠乏群で 5.5%、コントロール群で 39%、高 AsA 群で 61%となり、AsA 摂取による有意な生存率改善効果が得られ、その効果は飼料に含まれる AsA の濃度依存的に強まることが示された。<実験 2＞LPS 投与 2 時間後においては、肝臓および血液細胞の炎症関連因子の mRNA レベルは AsA 摂取量の違いによる差は見られなかった。一方、LPS 投与 6 時間後においては、炎症反応を惹起する主要なサイトカインである TNF α の血液細胞の mRNA レベルが欠乏群に対して高 AsA 群で有意な低値を示した。また、炎症時に低血圧を誘発する原因となる一酸化窒素（NO）の血中濃度と、NO 合成酵素である iNOS の血液細胞の mRNA レベルが、欠乏群に対して高 AsA 群で有意な低値を示した。
【考察】LPS 投与による炎症・敗血症誘発モデルにおいて、AsA の摂取が生存率を改善すること、また AsA 摂取が血液細胞での炎症性サイトカイン発現上昇と血中 NO 濃度の上昇とを抑制することが示され、これらの効果は通常必要量よりも高用量の AsA の摂取によって強まることが明らかとなった。本実験より、通常要求量以上の AsA 摂取が抗炎症効果と炎症時の救命効果を有することが示唆された。

ascorbic acid, inflammation, LPS

講演番号：2C02a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ C 校舎 02 会場

茶抽出物の骨粗鬆症改善効果について

Anti-osteoporosis activity of tea extract

○橋本 尚央子、松田 智子、西尾 昌洋、梅川 逸人（三重大院生物資源）
○Naoko HASHIMOTO, Tomoko MATSUDA, Masahiro NISHIO, Hayato UMEKAWA (Graduate School of Biores. Mie Univ.)

【目的】

茶カテキンは, エピガロカテキン, エピガロカテキンガレート, エピカテキン, エピカテキンガレートの主に 4 種類で，タンニンとも呼ばれる茶の渋み成分である。カテキンは骨吸収を抑制する効果があることが示唆されている。そこで本研究では茶抽出物に含まれるカテキンの卵巣摘出マウスの骨に対する影響を検討した。

【方法】

（実験 1）ddY 系雌性マウスを 9 日間順化した後，卵巣摘出(OVX)と擬似手術(Sham)を施した。茶抽出物は，茶粉末を 70℃の湯で煎出し，ろ過した液体を凍結乾燥して調製した。これを重量比 1%，0.1%，0.01%で通常餌に混合し，手術日から 4 週間マウスに摂取させた。

（実験 2）実験 1 と同じ処置を施したマウスを 4 週間通常餌で飼育を行った後，凍結乾燥した茶抽出物をオートクレーブ処理したものを，重量比 1%で通常餌に混合したものを 4 週間与え（AC 群），未処理の茶餌群と比較した。両実験ともマウスの骨解析は実験動物用 3D マイクロ X 線 CT 装置にて大腿骨遠位部を撮影することにより行った。終了後にマウスの子宮重量を計測した。

上記マウス実験は，滅菌水の自由摂取，22±2℃，12 時間の明暗サイクルの条件で行った。

【結果】

実験 1 において，子宮重量において 1%，0.1%，0.01% OVX-茶餌群は 1%，0.1%，0.01% Sham-茶餌群に対して有意に低下していた(すべて $p<0.01$)。また，1%，0.1%，0.01%OVX-茶餌群は OVX-通常餌群に対して骨密度の低下が有意に抑制されていた($p<0.01$)。

実験 2 では，同様に子宮重量は OVX-群と Sham 群と比較して有意に低下していた($p<0.01$)。AC 群は茶餌群と比較して骨密度が有意に抑制されていた($p<0.01$)。茶には(-)-カテキン類が含まれるが，オートクレーブ処理することで(-)-カテキン類が(+)-カテキン類に変化することが知られている。カテキンの構造変化が骨密度の低下に影響にしたのと思われる。以上のことより茶抽出物に含まれる(-)-カテキン類は骨粗鬆症の改善作用を有することが示唆された。

osteoporosis, catechin, mouse

講演番号：2C02a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ C 校舎 02 会場

重合度の異なるβ-1,3-グルカンの気管支喘息モデルマウスに対する影響

Effect of various length of ß-1,3-glucan on mouse model of asthma

○中川 奈美、西尾 昌洋、松井 亜衣、磯野 直人、梅川 逸人（三重大院生物資源）
○Nami NAKAGAWA, Masahiro NISHIO, Ai MATSUI, Naoto ISONO, Hayato UMEKAWA (Graduate School of Biores. Mie Univ.)

【目的】
生物由来のβ-1,3-グルカンは微量にβ-1,6-グルカンも含んでおり，β-1,3-グルカンのみが有する機能を明らかにすることは困難である。近年，グルコース1-リン酸を原料としたβ-1,3型のみからなるグルカンの人工合成法が確立された。最近我々は，この方法によって合成した鎖長70のβ-1,3-グルカン（DP70）を気管支喘息モデルマウスへ投与することにより，気管支平滑筋の肥厚を防止し，血中IgEの増加を阻害することを見出した。本研究では，重合度の異なるβ-1,3-グルカン（DP2, DP33, DP70, カードラン）の気管支喘息モデルマウスに対する影響を検討することを目的とした。
【方法】
雄性BALB/c（7週齢）マウスを用い，オボアルブミンと免疫賦活剤Alumを混合したものを，1週間毎に3回腹腔内注射を行った。その後，超音波式ネブライザを用いて種々のβ-1,3-グルカン（DP2, 33, 70, カードラン：1 mg/ml）を毎日20分，計5日間吸入投与した。続いて，超音波式ネブライザで5% オボアルブミンを30分（5日間）吸入し，喘息誘発を行った（DP2, DP33, DP70，カードラン-OVA群）。また，喘息誘発のみを行ったものをCNT-OVA群，喘息非誘発群をnon-OVA群とした。これらの処置後，気管支および血漿を分析した。
【結果】
気管支切片における HE 染色の結果，CNT-OVA 群は non-OVA 群と比較し，有意な気管支平滑筋の肥厚がみられた（$p<0.05$）。DP2 以外のグルカン-OVA 群は，CNT-OVA 群に対して気管支平滑筋の肥厚が有意に抑制され，DP70 群が最も強力であった。また，DP70-OVA 群については，血漿中 IgE の上昇抑制と Th2 サイトカインの IL-4 の減少が認められた。
以上の結果から，オボアルブミン誘発性気管支喘息モデルマウスにおいて，DP70 は気管支平滑筋の肥厚，IgE および IL-4 産生を抑制する効果があり，喘息性気管支閉塞の予防に有効である可能性が示唆された。

glucan, asthma, mouse

講演番号：2C02a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ C 校舎 02 会場

アカメガシワ葉粉末及びその抽出成分の摂取によるラット皮膚への影響

Effects of Mallotus leaf powder and its extract component on the skin in rats

○周 洲[1]、中村 麻里[1]、原 早織[1]、平野 夏子[1]、山根 拓実[1]、服部 一夫[1]、田畑 光正[2]、勝部 拓矢[2]、大石 祐一[1]([1]東農大・応生科、[2]島根県産業技術)
○ ZHOU ZHOU[1], MARI NAKAMURA[1], SAORI HARA[1], NATUKO HIRANO[1], TAKUMI YAMANE[1], KAZUO HATTORI[1], MITUMASA TABATA[2], TAKUYA KATSUBE[2], YUICHI OISHI[1]
([1]Tokyo Univ of Agriculture, [2]Shimane Institute for Industrial Technology)

【目的】島根県の特産物の一つであるアカメガシワ(*Mallotus japonicus*) は、トウダイグサ科(Euphorbiaceae) の落葉高木であり、樹皮は健胃薬として利用されている。また、葉は豊富なポリフェノールを含有し、強い抗酸化活性を持つが、未利用資源となっているのが現状である。体内水分蒸散制御及び体外物質の体内への侵入を防ぐ皮膚は、食品により様々な影響を受けると言われている。そこで我々はラットを用いて、アカメガシワ葉摂取による皮膚への影響を検討した。
【方法】実験動物には、4 週齢雄性 Wistar 系ラットを用いた。飼料は AIN-76 組成に基づき調製した。1 週間の馴化飼育後、対照群(CO)とアカメガシワ乾燥葉粉末(MJ) 3 %、MJ から粗精製したタンニン(TA)0.148 %、熱水抽出後のメタノール抽出成分(W-M)0.06 %, W-M 0.18 %、W-M 0.6 %群を設け、28 日間の試験飼育を行った。解剖後に、皮膚関連分子の mRNA 量を Real-Time PCR 法にて測定した。Ⅰ型・Ⅲ型トロポコラーゲン量は Western blotting 法で、ヒアルロナンはウロン酸定量法で、セラミドは TLC 法で測定した。
【結果】Ⅰ型コラーゲンのα1 鎖 (COL1A1)mRNA 量は、CO 群に比して TA 群で有意な増加が認められ、W-M 0.18 %群で増加傾向を示した。Ⅲ型コラーゲンのα1 鎖 (COL3A1) mRNA 量は、CO 群に比して TA 群で有意な増加が認められ、W-M 0.18 %, W-M 0.6 %群で増加傾向を示した。ヒアルロナン(HA)合成酵素 2(HAS2)の mRNA 量は、CO 群に比して MJ 3 %群で有意な減少が認められ、TA 群と W-M 各群で減少傾向が認められた。表皮中 HA の主な合成酵素である HAS3 の mRNA 量は、CO 群に比して TA 群と W-M 0.06 %群で増加傾向を示し、W-M 0.6 %群で減少傾向が認められた。セラミド合成律速酵素(SPT)発現量は、CO 群に比して W-M 0.18 %群で増加傾向を示した。以上のことから、アカメガシワ葉及びその抽出成分の摂取による皮膚構成分子合成及びそれに関わる酵素遺伝子への発現変動が見出された。現在、真皮中Ⅰ型・Ⅲ型トロポコラーゲン量, ヒアルロナン量及び皮脂中セラミド量を測定中である。

Mallotus, Tropocollagen, Hyaluronan

講演番号：2C02a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ C 校舎 02 会場

骨細胞におけるミトコドリア抗酸化酵素 Sod2 の骨リモデリング制御機構

Mitochondrial SOD2 regulates bone remodeling in osteocytes

○清水 孝彦[1]、小林 慶司[1,2]、野尻 英俊[2]、渡辺 憲史[1]、小澤 裕介[1]、金子 和夫[2]、横手 幸太郎[1] ([1]千葉大院医、[2]順天堂大院医)
○Takahiko Shimizu[1], Keiji Kobayashi[1,2], Hidetoshi Nojiri[2], Kenji Watanabe[1], Yusuke Ozawa[1], Kazuo Kaneko[2], Koutaro Yokote[1] ([1]Chiba Univ., [2]Juntendo Univ.)

【背景】酸化傷害によってさまざまな加齢様変化が引き起こされることが知られている。Superoxide dismutase 2 （*Sod2*）は酸化還元バランス維持に重要な役割を果たすミトコンドリアマトリックス局在の抗酸化酵素である。近年、骨細胞が骨代謝の調節細胞として注目されているが、骨細胞における *Sod2* の生理的役割は明らかにされていない。本研究は、骨代謝制御における骨細胞での *Sod2* の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】骨細胞特異的 Dmp1-Cre マウスを *Sod2* flox マウスと交配し、骨細胞特異的 *Sod2* 欠損マウス（*Sod2* cKO）を作製した。12 週齢雄の *Sod2* cKO マウス大腿骨遠位部の骨密度と骨量を測定したところ、骨密度（-20%）、骨量（-29%）、皮質骨厚（-12%）が有意に減少し顕著な骨量減少を認めた。また、3 点曲げ試験では骨強度（-23%）の著しい低下を認め、骨脆弱性が明らかとなった。組織学的解析では、*Sod2* cKO マウス皮質骨で骨細胞が消失した empty lacunae の割合が有意に増加し、骨細管構造の異常が認められた。また *Sod2* cKO マウスは野生型マウスに比べ、カルセイン２重標識による骨形成測定において有意に低値を示した。一方、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ染色による骨吸収能解析は、逆に有意な高値を示し、骨形成低下と骨吸収亢進という骨リモデリング異常を認めた。初代骨芽細胞を用いた細胞実験で、長期培養による骨細胞分化時に石灰化結節形成の有意な抑制が認められ、骨形成低下を裏付けた。一方、骨髄細胞を用いた混合培養で破骨細胞分化は正常に生じ、骨吸収亢進と矛盾した。次に骨髄細胞を除去した骨組織での骨関連遺伝子発現を調べたところ、*Sod2* cKO 骨で Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (*Rankl*) 発現が顕著に増加し、二次的作用での骨吸収亢進を示唆した。

【考察】*Sod2* cKO マウスでは、骨芽細胞から骨細胞への分化過程で石灰化障害と、ミトコンドリア酸化ストレスによる骨細胞での *Rankl* 発現上昇が起こり骨形成・骨吸収の不均衡による骨量減少・骨脆弱性を引き起こした。以上より、骨細胞での SOD2 によるミトコンドリア酸化還元バランス制御が骨リモデリング制御に重要な役割を担う事が示唆された。

Osteocyte, Bone metabolism, Oxidative stress

講演番号：2C02a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ C 校舎 02 会場

骨における *Mab21l1* 遺伝子の機能解析
functional analysis of *Mab21l1* during bone development
○吉満 和、小島 拓哉、高橋 直樹（東大院農生科応生化）
○Nodoka YOSHIMITSU, Takuya KOZIMA, Naoki TAKAHASHI (Univ. of Tokyo)

Mab2111 は、*Hox* 遺伝子の一つである *Hoxc4* 転写産物の標的遺伝子として我々が同定した、線虫 *mab-21* 遺伝子のマウスオーソログである。アミノ酸配列が生物種間で高度に保存されていることから、*Mab2111* は発生過程で重要な役割を担っていると考えられるが、既知遺伝子との相同性を持たないため、その機能は不明であった。そこで、個体における機能を明らかにするために、ノックアウトマウスによる解析を行っており、これまでに網膜、包皮腺等の形態形成に異常があることを明らかにしてきた。解析を通して、*Mab2111* ノックアウトマウスは野生型よりも小柄であったことから、骨形成に異常がある可能性が考えられた。そこで、*Mab2111* ノックアウトマウスの骨の形態の観察と CT による骨密度測定を行い、野生型と比較した。その結果、肋骨にはホメオティック変異が見られ、*Hoxc4* ノックアウトマウスの表現型との類似性が示された。加えて、*Mab2111/Hoxc4* ダブルノックアウトマウスを作製したところ、ホメオティック変異を示す個体の割合に増加が認められ、*Mab2111* と *Hoxc4* の遺伝的相互作用が示された。さらに、*Mab2111* ノックアウトマウスは成体になってからも大泉門が未閉であるとともに、幾何学的形態計測から頭蓋骨の形態が野生型と異なることが明らかになった。また、骨盤は恥骨下枝の発育不全のため閉鎖しておらず、骨密度も低下していた。

骨形成の起源は各部で異なることから、一部の骨では *Hoxc4* との相互作用を介して *Mab2111* は機能していると考えられるが、例えば頭蓋骨の発生においては *Hoxc4* の発現は見られないため、他の分子との相互作用機構も存在することが考えられた。そこで、*Mab2111* に結合するタンパク質を探索した結果、RNA 結合タンパク質である SAM68 を同定した。現在、*Mab2111* と *Sam68* の関係について検討中であり、今回は *Sam68* との相互作用に基づく *Mab2111* の骨形成への寄与について報告する。

bone morphogenesis, bone differentiation, bone density

講演番号：2C02a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ C 校舎 02 会場

マウス脂肪組織における *Mab21l1* 遺伝子の機能解析

Functional analysis of *Mab21l1* in mouse adipose tissue.

○小栗 晶、小島 拓哉、高橋 直樹（東大院農）
○Akira OGURI, Takuya KOJIMA, Naoki TAKAHASHI (Tokyo Univ.)

糖尿病、高血圧などの生活習慣病の要因として、肥満が世界的に社会問題となっている。脂肪細胞には白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞の二種類あることがわかっているが、近年の研究で新たに beige 脂肪細胞という、その中間の性質を持つ細胞が発見された。白色脂肪細胞は beige 脂肪細胞と trans-differentiation を起こすという報告もされており、肥満解決への手がかりと考えられている。また脂肪組織中に存在する間葉系幹細胞の働きと肥満の関連を検討することも重要である。我々が現在飼育している *Mab21l1* 欠損マウスは野生型マウスと比べて体格が小さいことが認められるとともに、遺伝子発現プロファイル解析において *Mab21l1* は未分化状態の間葉系幹細胞において発現していることから、MAB21L1 分子が脂肪細胞の分化・生存・増殖過程に何らかの機能を果たしている事が推測され、高脂肪食摂取時等における影響性を検討した。

今回、生後 2 ヶ月齢を超えた雄マウスを用いて高脂肪食の給餌による体重変化・脂肪重量・血糖値・遺伝子発現等を調べた結果、*Mab21l1* 欠損マウスは野生型マウスに比べて体重が低く、脂肪蓄積能が低下していること、並びに脂肪肝とならないことが明らかになった。また糖負荷試験の結果から、*Mab21l1* 欠損マウスの耐糖能が上昇しており、*Mab21l1* の代謝への関与が示唆された。そこで鼠径部脂肪組織から RNA を抽出しマイクロアレイで解析したところ、摂食抑制および代謝に重要な働きを持つ *Leptin* の発現が増加していた。*Mab21l1* 欠損マウスは野生型マウスと比べて摂食量が少なかったことも含めて考え、*Mab21l1* の *Leptin* への関与が示唆された。現在、*Mab21l1* と *Leptin* を含む各種代謝関連遺伝子との関係を確認するとともに、脂肪細胞における MAB21L1 分子の役割を検証している。

adipocyte differentiation, lipid metabolism, adipose tissue-derived mesenchymal stem cell

講演番号：2C02a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ C 校舎 02 会場

転写因子 Bcl11b の脂肪細胞分化における機能の解析

Bcl11b, a novel regulator of adipocyte differentiation.

○塚本 大介、井原 悠介、Shimizu Makoto、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農生科）
○Daisuke Tsukamoto, Yusuke Ihra, Makoto Shimizu, Jun Inoue, Ryuichiro Sato (Tokyo Univ.)

【目的】BCL11B は T 細胞の初期分化を制御する、C2H2 型 Zn フィンガーモチーフを持つ転写因子である。*Bcl11b* KO マウスは生後 24 時間以内に死亡するが、出生直後において肩甲骨間の白色脂肪組織の顕著な萎縮が観察された。そこで本研究では、BCL11B がマウス生体において脂肪の蓄積に関与するかを検証するとともに、脂肪細胞分化を制御する可能性について検討した。
【方法】(1)マウスの脂肪組織における BCL11B の発現をリアルタイム PCR およびウエスタンブロッティングによって確認した。(2)ウイルスベクターを用いて、3T3-L1 細胞や MEFs における BCL11B の発現をノックダウンし、脂肪細胞分化への影響を調べた。(3)野生型および *Bcl11b* ノックアウトマウスの MEFs を調製し、脂肪細胞分化を誘導して脂肪蓄積や脂肪細胞分化マーカーの発現を比較した。(4)脂肪細胞分化において中心的な役割を担う転写因子である C/EBP ファミリーや PPARγの活性に与える、BCL11B の影響を、ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイにより検討した。さらに BCL11B と C/EBPβの結合について免疫沈降法により検討した。(5)野生型および *Bcl11b* ヘテロマウスに高脂肪食を 10 週間与え、体重増加や脂肪の蓄積を比較した。
【結果・考察】(1)BCL11B は脂肪組織に mRNA およびタンパク質レベルで発現しており、内臓脂肪よりも皮下脂肪組織に高い発現が観察された。(2)BCL11B は脂肪細胞分化過程で一過的に発現上昇した。また、ノックダウンにより分化が抑制された。(3)KO マウス由来 MEFs では脂肪細胞への分化能が低下していた。(4)BCL11B は C/EBPβの転写活性を上昇させた。また、BCL11B は C/EBPβと結合し、その結合には BCL11B の C 末端側が必須であった。以上の結果から、BCL11B が脂肪細胞分化を正に制御することが示された。(5)高脂肪食負荷時において、ヘテロマウスは野生型と比較して低体重であり、脂肪肝の発症が抑制されていた。摂食量に変化がないことから、BCL11B ヘテロマウスではエネルギー消費が亢進している可能性が考えられる。今後、BCL11B 欠損による脂肪蓄積抑制のメカニズムについて、脂肪組織特異的 KO マウスを作製し解析する予定である。

adipocyte, differentiation, Bcl11b

講演番号：2C02a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ C 校舎 02 会場

アンドロゲンによる形態的性差を生み出す分子メカニズムの解明

The molecular mechanism of the sexual dimorphic development of external genitalia

○鈴木 堅太郎[1]、沼田 朋和[1]、松下 祥子[1]、鈴木 裕子[1]、横山 智哉子[1]、高橋 智[2]、山田 源[1]([1]和歌山県立医大先端研、[2]筑波大医学医療系解剖発生)
○Kentaro Suzuki[1], Tomokazu Numata[1], Syoko Matsushita[1], Hiroko Suzuki[1], Chiako Yokoyama[1], Satoru Takahashi[2], Gen Yamada[1] ([1]Wakayama Med. Univ., [2]Tsukuba Univ.)

男性ホルモンであるアンドロゲンは、男性生殖器の器官形成や男性の二次性徴に不可欠な因子という印象が強い。しかし、近年、成人になってからは性に関わらず骨や血管をはじめとした生体の恒常性維持に不可欠であり、その機能は多様であることがわかってきた。さらに、アンドロゲンシグナルの破綻は、男性における前立腺がん、女性においては多嚢胞性卵巣症候群などアンドロゲンが起因となる病態が増加している。このようにアンドロゲンの重要性が明らかになる一方、その標的因子を含めアンドロゲンの作用機序はほとんどわかっていない。

アンドロゲンにより形態的雌雄差を有する代表的な器官である外生殖器は、アンドロゲンの標的遺伝子を同定する系として有効なモデルである。我々は、この外生殖器形成過程をモデルとして謎に包まれたアンドロゲンの作用機序の謎に迫りたいと考えている。これまで Cre-Loxp システムを用いて種々の AR コンディショナルノックアウトマウス（AR cKO マウス）を作成し解析を行ってきた。その結果、外生殖器原基の間葉細胞におけるアンドロゲンシグナルが外生殖器の形態的雌雄差の形成に必須であることを明らかにした。そらに、AR の標的遺伝子を同定するためマイクロアレーにより雌雄の外生殖器原基で発現する遺伝子を調べたところ、雄の外生殖器原器に強く発現する遺伝子を見出した。この遺伝子は、胎生中期から尿道が形成される領域の間葉細胞で雄特異的に発現し、アンドロゲン投与実験および AR cKO マウスの解析から、アンドロゲンの新規標的遺伝子である可能性が示唆された。更に、同遺伝子のノックアウトマウスを解析したところ雌では顕著な異常は観られず、雄の外生殖器のみに尿道下裂様の形成異常を呈することがわかった。

本大会では、遺伝子発現解析およびノックアウトマウス解析の結果から、マウス外生殖器形成過程における新規アンドロゲン標的遺伝子について論議したい。

sexual dimorphism, Androgen

講演番号：2C02a17
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ C 校舎 02 会場

ムスクの香りを感知する受容体と脳領域の決定
Olfactory Receptor and Neural Pathway Responsible for Highly Selective Sensing of Musk Odors
○白須 未香[1,2]、吉川 敬一[1]、高井 佳基[1]、中嶋 藍[3]、竹内 春樹[3]、坂野 仁[3]、東原 和成[1,2]([1]東京大学大学院農学生命科学研究科　応用生命化学専攻、[2]JST ERATO 東原化学感覚シグナルプロジェクト、[3]福井大学医学部医学科高次脳機能領域)
○ Mika SHIRASU[1,2], Keiichi YOSHIKAWA[1], Yoshiki TAKAI[1], Ai NAKASHIMA[3], Haruki TAKEUCHI[3], Hitoshi SAKANO[3], Kazushige TOUHARA[1,2] ([1]Tokyo Univ., [2]ERATO Touhara Chemosensory Signal Project, [3]Fukui Univ.)

ムスク系香料は、動物的で官能的な匂いを有し、多くの香粧品に用いられている。ムスク系香料のひとつであるムスコンは、ジャコウジカの臭腺から見出され、特徴的な大環状ケトン構造を有する。ジャコウジカの雄は発情期になると、臭腺から出るこの匂いで雌を呼び寄せる。また、ヒトに対して生理作用を持つという報告もある。今回私達は、産業的にも生物学的にも興味が持たれているムスコンの嗅覚神経系での情報処理メカニズムの解明を目指した。まず、マウスを用いて、嗅覚一次中枢である嗅球上でムスコンに応答する糸球体を探索した。既存の手法では測定不可能だった嗅球領域の匂い応答イメージング手法を確立したところ、嗅球内側前部の数個の糸球体のみがムスコンに応答を示すことが分かった。また、マウスにムスコンの匂いを呈示すると、神経応答の指標 c-Fos の発現が同様の領域に見られた。さらに、この領域を外科的に除去したマウスはムスコンを感知できなかった。これらの知見から、ムスコンの匂い信号は、せいぜい数種類の嗅覚受容体を介して脳に伝わり認知されていると示唆された。興味深いことに、ムスコンとは全く異なる化学構造を持つ他のムスク系香料のニトロムスク、多環式ムスク、大環状エステルも、ムスコンの応答糸球体とは異なるものの、嗅球内側前方の領域で受容されていた。ムスク系の香り全体を象徴する動物的かつ官能的な香調は、嗅球の内側前部という特定の領域の活性化により生み出されている可能性がある。次に、ムスコン応答糸球体に投射している嗅神経細胞に発現する嗅覚受容体を探索し、ムスコンを認識する特定の受容体を同定した。実際に、この受容体を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞や HEK293 培養細胞がムスコンに応答を示しただけでなく、この受容体を発現する嗅神経が投射するマウスの糸球体もムスコン刺激に対して応答を示した。また、マウスのムスコン受容体とアミノ酸配列が最も類似したヒトの受容体もムスコンに応答を示した。今回同定されたマウスとヒトのムスコン受容体は、生分解性に優れていて産業界でも重用されている大環状ケトン構造を持つムスク香料を特異的に認識することから、この匂い応答特性を利用した香料スクリーニング系を利用することで、産業的に有用なムスク系香料の新規開発につながると期待される。

odor, musk, olfactory receptor

講演番号：2C02p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ C 校舎 02 会場

肥満白色脂肪組織の慢性炎症像を可視化する非侵襲イメージングモデルマウスの作出
in vivo imaging model of adipose tissue inflammation

○真田 洋平[1]、山本 岳史[1]、金井 すみれ[2]、中村 美奈子[2]、加藤 範久[1]、Fons A.J. van de Loo[3]、矢中 規之[1] ([1] 広島大院　生物圏、[2] 広島大　生物生産、[3]Radboud University Nijmegen Medical Centre)
○Yohei Sanada[1], Takafumi Yamamoto[1], Sumire Kanai[2], Minako Nakamura[2], Norihisa Kato[1], van de Loo Fons A.J.[3], Noriyuki Yanaka[1] ([1]The Graduate School of Biosphere Sci., Hiroshima Univ., [2]Faculty of Applied Biological Sci., Hiroshima Univ., [3]Radboud University Nijmegen Medical Centre)

〈目的〉内臓脂肪型肥満を背景として発症するインスリン抵抗性や高血圧症などはメタボリックシンドロームと定義され，その予防法などの確立が社会的に強く求められている．現在では，メタボリックシンドローム発症には，肥満白色脂肪組織への単球･マクロファージの浸潤に伴った慢性炎症が大きく注目され，特に脂肪細胞と単球・マクロファージの相互作用は極めて重要な病態のシグナルと考えられている．以前，抗炎症作用を有する vitamin B6（B6）を摂取させた際の白色脂肪組織の遺伝子発現を解析した結果, B6 の摂取によって白色脂肪組織への単球･マクロファージの浸潤が抑制されたことから，マクロファージの浸潤を特異的に抑制するモデルとして利用し，肥満モデルマウス(db/db マウス)の白色脂肪組織で発現変動する遺伝子群の中から肥満発症において単球･マクロファージの浸潤に応答し，脂肪細胞における慢性炎症に関連した *in vivo* 因子群の選抜を行った．本研究では，単球・マクロファージと脂肪細胞との相互作用の解析などを通して，脂肪組織の慢性炎症時のマクロファージ浸潤量を反映する脂肪細胞因子を単離し，同遺伝子のプロモーター活性を利用した肥満脂肪組織の慢性炎症像を非侵襲的に評価しうる動物モデルの作出を試みた．〈方法・結果〉db/db マウスの白色脂肪組織において発現上昇する 1810 遺伝子の中から，B6 摂取によって発現が低下する遺伝子群を探索し 262 遺伝子を選抜した．さらに，マウス脂肪細胞株 3T3-L1 細胞とマウス単球系 RAW264.7 細胞の共存培養を行い，単離した候補遺伝子群の中から活性化マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において著しく発現上昇する脂肪細胞因子の絞り込みを行うことで，肥満脂肪組織内への単球・マクロファージの浸潤量の増加によって発現量が著しく増加する脂肪細胞由来の候補遺伝子として *serum amyloid A3 (SAA3)*を単離した．白色脂肪組織での *SAA3* の発現量は，浸潤する単球・マクロファージ数と正に相関した．野生型マウス，および db/db マウスの各組織の mRNA 発現を比較解析した結果, 肥満白色脂肪組織において *SAA3* の発現量が著しく増加していた. *SAA3* 遺伝子のプロモーター領域（-314/+50）を単離し，*luciferase* 遺伝子を連結した SAA3-luc を 3T3-L1 細胞に形質導入し，活性化した RAW264.7 細胞との共存培養によって転写活性は有意に上昇した．そこで，マクロファージとの相互作用によって発現量が増加する最適な候補遺伝子として，*SAA3* を選抜し，SAA3-luc トランスジェニックマウスを作出し，*in vivo* イメージングに供した．さらに化学発光に関して，脂肪組織特異的に解析を行うために adiponectin プロモーターと近赤外蛍光 FP635 遺伝子のダブルトランスジェニックマウスを作製し，そのイメージング解析を行った結果を報告する．

in vivo imaging, obesity, low-grade chronic inflammation

講演番号：2C02p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ C 校舎 02 会場

摂食パターンは脂肪の分布を変化させ体重増加に影響を与える

Restricted feeding is closely associated with body weight gain and the distribution of WAT in the body.

○大路 拓巳[1]、香川 祐輝[1]、久宮 彩乃[1]、秋葉 知奈[2]、伊藤 友香[2]、長須賀 美紀[2]、中野 絵里香[2]、新國 美由[2]、船戸 里香[2]、矢口 真実[2]、山口 花梨[2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日本大院 生資科、[2]日本大 生資科)
○Takumi OJI[1], Yuki KAGAWA[1], Ayano KUGU[1], China AKIBA[2], Yuka ITO[2], Miki NAGASUKA[2], Erika NAKANO[2], Miyu NIKKUNI[2], Rika FUNADO[2], Manami YAGUCHI[2], Karin YAMAGUCHI[2], Takashi HOSONO[1,2], Taiichiro SEKI[1,2] ([1]Nihon Univ. Grad. Scool, [2]Nihon Univ.)

【目的】肥満は、耐糖能異常、脂質異常症、高血圧とともに動脈硬化症を進展させる生活習慣病の危険因子である。肥満症の治療方法には、食事療法、運動療法、薬物療法等がある。食事療法として食事内容の改善やカロリー制限が一般的に行われるが、近年食事摂取の時間帯が重要であることが明らかにされてきた。本研究では活動期または休息期に限定した摂食が脂質代謝を活性化させ、体重増加を抑制するという仮説を立て、活動期または休息期 12 時間に限定した摂食条件で飼育したマウスについて、分子生物学、組織化学的手法により検討を行い、体重増加や代謝の特徴について評価した。
【方法】4 週齢 C57BL/6J オスマウスを不断給餌群(*ad libitum* feeding：ALF 群), 明期給餌群(light period feeding： LPF 群), 暗期給餌群(dark period feeding: DPF 群) (n=4-5)の 3 群に分けた。それぞれのマウスは 12h 明期、12h 暗期の明暗サイクル(明期 08:00-20:00)下で各群設定した時間（LPF 群：08:00-20:00, DPF 群：20:00-08:00, ALF 群：08:00-08:00）にカロリー比で 60%の高脂肪食を給餌し、水は自由に摂取させた。これらのマウスの肝臓、白色脂肪組織 (WAT:腸間膜、腎周囲、精巣上体、皮下)、褐色脂肪組織(BAT)、血漿を回収した。肝臓中 TG, TC 量はラボアッセイキット（和光純薬）を用いて、遺伝子発現は real-time PCR, 血漿 ALT はドライケム(富士フィルム)を用いて測定した。また肝臓、WAT, BAT について組織化学的な評価を行った。
【結果・考察】各群の体重変化を比較すると、ALF 群の体重増加率が著しく、また実験終了時の体重では DPF 群と比較して ALF 群で有意に高かった。LPF 群の体重変化は、他群と比較し明期、暗期で大きな振幅を示した。実験終了時の体重は、総摂食量が少ないにもかかわらず LPF 群は DPF 群と比較して高い傾向を示し、総脂肪量比は LPF 群で最も高く、ALF 群で最も低かった。また各群の WAT 分布は異なっており、時間制限食群は自由摂餌群と比較して精巣上体に多く分布し、腎周囲では少なかった。また肝臓中の TG, TC 量は ALF 群で最も高く、LPF 群で最も低値を示した。この結果は肝臓の組織化学的評価、血漿 ALT 活性と相関した。現在肝臓、脂肪組織中の代謝関連遺伝子について検討中である。
【結語】摂食のタイミングにより脂肪の蓄積量や組織分布が変化する可能性が考えられた。

high fat diet, obesity, white adipose tissue

講演番号：2C02p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ C 校舎 02 会場

摂食タイミング異常による肝臓時計異常と脂質代謝異常

Abnormality of liver clock and lipid metabolism by disrupted eating timing

○小田 裕昭[1]、片岡 裕太郎[1]、小林 悟[1]、望月 聡[2]([1]名古屋大院生命農、[2]大分大教育)
○Hiroaki ODA[1], Yutaro KATAOKA[1], Satoru KOBAYASHI[1], Satoshi MOCHIZUKI[2] ([1]Nagoya Univ., [2]Oita Univ.)

【目的】規則正しい食生活は健康に欠かせないといわれるように末梢組織の概日リズムは摂食により強く制御され、それが健康と関係が深いことが知られている。また、代謝の中心的臓器である肝臓の概日リズムの崩れは、生活習慣病やメタボリックシンドロームなどにつながる可能性がある。我々はこれまで、ラットに同じ食餌を同量食べてさせても、摂食リズムを崩壊させると血中コレステロール濃度が増加することを明らかにした 1)。本研究では、夜食症候群という休息期に主に摂食する群と、摂食タイミングが昼夜交互に変化する群を設けて、脳と肝臓の臓器間概日時計の調和の重要性について検討した。
【方法】Wistar 系雄ラットを自由摂食群、昼摂食群、シフト摂食群に分けた。昼摂食群は 1000-1800 のみ食餌を与えた。シフト摂食群は一週間ごと昼摂食、夜摂食に変えた。食餌として高コレステロール食を与えた。シフト摂食群の最終週は夜摂食になるようにした。最終日に 4 時間おきに屠殺し、肝臓 RNA を抽出して、時計遺伝子を中心に検討した。
【結果】昼摂食群、シフト摂食群でさらに血中コレステロール濃度が増加し、これは VLDL コレステロールの増加であった。肝臓コレステロールも両群で増加していた。CYP7A1 遺伝子発現のリズムは昼摂食群で完全には逆転していなかった。シフト摂食群では、自由摂食群とは、位相がずれていた。時計遺伝子のリズムは顕著な影響を受けるものや、影響を受けないものがあった。以上の結果より、摂食タイミングに昼夜のメリハリがった場合でも、脳と肝臓の臓器間の調和がとれていない場合にコレステロール代謝異常が生じることが明らかとなった。
1) Yamajuku, D. et al., Circulation Res. 105, 545-548 (2009)

chrono-nutrition, clock genes, liver clock

講演番号：2C02p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ C 校舎 02 会場

肥満に伴う脂肪組織炎症が白色脂肪細胞における UCP1 発現誘導に与える影響

The effects of Inflammation on UCP1 expression in obese adipose tissues

○新田 貴大[1]、坂本 智弥[1]、丸野 晃嗣[1]、後藤 剛[1,2]、高橋 信之[1,2]、河田 照雄[1,2] ([1]京大院農・食品生物、[2]京大　生理化学研究ユニット)

○Takahiro NITTA[1], Tomoya SAKAMOTO[1], Koji MARUNO[1], Tsuyoshi GOTO[1,2], Nobuyuki TAKAHASHI[1,2], Teruo KAWADA[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ. Research Unit for Physiological Chemistry)

【背景・目的】

脂肪細胞には白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞の 2 種類が存在する。白色脂肪細胞は余剰エネルギーをトリグリセリドの形で貯蔵する一方で、褐色脂肪細胞は脱共役タンパク質 1（UCP1：uncoupling protein 1）によってエネルギーを熱として放散する。また、UCP1 は交感神経系刺激に伴い白色脂肪細胞にも発現する(このような細胞は褐色様脂肪細胞と呼ばれる)。近年、こうした褐色様脂肪細胞がヒト成人においても発現し、全身のエネルギー代謝に寄与していることが明らかとなってきた。

しかし、UCP1 発現量や活性は、加齢や肥満に伴って低下してしまう。これによるエネルギー消費量低下が所謂「中年太り」に関与するとも推察されるが、そのメカニズムの全貌は明らかとなっていない。一方で、肥満状態の脂肪組織においては、マクロファージの浸潤が起こり、炎症が惹起されている。本研究ではこのことに着目し、肥満に伴い脂肪組織で生じる炎症が脂肪細胞の UCP1 発現に対してどのような影響を与えるのか、培養細胞および動物個体レベルで検討した。

【方法・結果】

（1）炎症状態の脂肪組織を模倣するため、3T3-L1 白色脂肪細胞と RAW264.7 マクロファージ様細胞の共培養を行った結果、イソプロテレノール（βアドレナリン作動薬）による *UCP1* mRNA 発現誘導が有意に抑制された。続いて、液性因子の関与を調べるため RAW264.7 細胞の培養上清を用いて 3T3-L1 細胞を培養したところ、*UCP1* mRNA 発現誘導および *UCP1* プロモーター活性の有意な抑制が観察された。更に、マクロファージが分泌する炎症性サイトカインの一つ tumor necrosis factor α (TNF-α) による前処理を行った 3T3-L1 細胞でも同様に *UCP1* mRNA 発現誘導が有意に抑制された。

（2）肥満状態の脂肪組織における UCP1 発現について調べるため、C57BL/6J マウス(食餌誘導性肥満モデルマウス)に対して 16 週間の高脂肪食負荷を行った。その結果、脂肪組織における *F4/80*（マクロファージマーカー遺伝子）及び *TNF-α* の mRNA 発現量が有意に増加し、寒冷刺激（4℃, 24 時間）による UCP1 発現誘導も有意に抑制された。続いて、マクロファージの関与を調べるため、3 週間の高脂肪食負荷 KK-Ay マウス（肥満モデルマウス）に対してクロドロネートリポソームの腹腔内投与 (30 mg/kg body weight, 48 時間) を行い、脂肪組織中のマクロファージを減少させた。その結果、肥満に伴い抑制されていた UCP1 発現誘導が、PBS 投与群と比較して有意に上昇した。更に、TNF-α の関与を調べるため、C57BL/6J マウスに対して TNF-α の腹腔内投与 (100 mg/kg body weight, 24 時間) を行った。その結果、寒冷刺激による UCP1 発現誘導が有意に抑制された。

【考察】

以上の結果より、肥満に伴い脂肪組織に浸潤したマクロファージが分泌する炎症性サイトカインが、白色脂肪細胞における UCP1 発現誘導を抑制するという新たなメカニズムが示唆された。

UCP1, adipocyte, inflammation

講演番号：2C02p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ C 校舎 02 会場

ob/ob マウス糞便に含まれる起炎症性分子の探索

Search for inflammatory molecules in fecal extraction of ob/ob mice

○真田 峻佑、大島 寛史、三好 規之（静県大院薬食生命）
○shunsuke sanada, hirosi ohshima, noriyuki miyosi (Univ.of Shizuoka)

【目的】肥満や糖尿病などの生活習慣病対策は国家的・世界規模での課題である。肥満や糖尿病などのメタボリック症候群様症状においては、低レベルの持続的な炎症がそれらの疾患を惹起・進行・重症化させることが示唆されている。さらに、低レベルの持続的な炎症を誘導する重要な因子の一つとして腸内細菌叢の変化が指摘されている。しかし、メタボリック症候群に伴う腸内細菌叢の変化に関連した腸管内の起炎症性分子の動態についてはほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、血中サイトカイン等よりも早期に且つ正確に評価できるバイオマーカの確立を目的として、肥満モデル *ob/ob* マウスおよび対照マウス糞便の分析化学的手法を用いた網羅的解析により、腸管内容物から採取した起炎症性分子の探索・同定を行った。

【方法】C57BL/6J マウス (7週齢、雄、n=5) および *ob/ob* (7週齢、雄、n=5) マウス用い、搬入後から研究終了まで完全配合飼料 AIN76 を不断給与できる環境で 1 匹ずつ個別のゲージで 24 週間飼育した。体重・摂餌量等を経時的に測定し病態生理学的な基礎データ得た。また、2 週おきに代謝ゲージを用いて糞の採取を行った。採取した飼育 20 週目の糞便を Bligh‐Dyer 法で抽出し、有機溶媒可溶画分と水溶性画分に分画した後、乾固させた。この乾固物を DMSO で溶解した試料を NF-κB レポータージーンプラスミドを導入した培養細胞 (HT29、SW480、RAW264) に曝露し、NF-κB 活性化の指標とした。また乾固物の一部は、UPLC-Q-TOF-MS 分析に供した。得られた MS データを多変量解析ソフトウェアにて統計学的に処理し、群間で有意に変動する化合物の探索・同定を行った。

【結果】C57BL/6J マウス (体重 31.48±4.2g) と比較して *ob/ob* マウス (体重 55.87±2.5g)では顕著に体重が増加しており、肥満を呈している事が確認された。NF-κB レポータージーンプラスミドを導入した細胞 (HT29、SW480、RAW264) に飼育 20 週目の糞便抽出物を振りかけたところ、*ob/ob* 群水溶性画分で有意な NF-κB 活性化が認められた。また両群マウスの糞サンプルを UPLC-Q-TOF-MS 分析の後、MS データを多変量解析ソフトウェアにて統計学的に処理したところ、*ob/ob* マウスの有機溶媒可溶画分と水溶性画分の両方で C57BL/6J マウスと比較して有意に上昇する複数の MS イオンピークが観察された。現在、群間で有意な変動をした MS イオンピークの MS/MS 解析より起炎症性マーカー分子の同定を行っている。

ob/ob mouse, inflammation, biomarker

講演番号：2C02p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ C 校舎 02 会場

五加の実がマウス脂質代謝に及ぼす影響

The effect of Eleutherococcus senticosus fruit on lipid metabolism in mice

○齋藤 哲男、西田 美也子、永塚 貴弘、西田 浩志（新潟薬科大学）
○ TETSUO SAITOU, MIYAKO NISHIDA, TAKAHIRO EITSUKA, HIROSHI NISHIDA (NUPALS)

【目的】短梗五加（五加）はウコギ科の落葉低木で、根や乾燥根皮は古くから生薬として中国で利用されてきた。五加の根にはサポニン、クロロゲン酸などの機能性成分が多く含まれており、抗炎症作用、抗疲労作用、神経保護作用などの効能を有することがこれまでの研究で報告されている。一方で、五加の実についての研究報告はほとんどなく、また脂質代謝についての研究もなされていない。そこで我々は、五加の実がマウスの脂質代謝に及ぼす影響について検討した。

【方法】10 週齢の C57BL/6J 雄性マウスを通常食群（CONT 群）、高脂肪食群（HF 群）、高脂肪食摂餌に五加の実乾燥粉末（500mg/kg）を経口投与した群（HFG 群）の 3 グループに分けた。投与試験中は糞中の胆汁酸量、トリグリセリド（TG）量及び総コレステロール（T-Cho）量を測定した。マウスは 35 日後に解剖し、血漿、肝臓、内臓脂肪及び筋肉を採取した。血漿中 TG 量、T-Cho 量を測定し、肝臓中は TG と T-Cho に加えて、カルニチンパルミドイル転移酵素（CPT）、脂肪酸合成酵素（FAS）の比活性を測定した。さらに、筋肉及び肝臓中の AMP 活性化プロテインキナーゼ（AMPK）のリン酸をウェスタンブロット法により検討した。

【結果・考察】本試験期間中では各群の体重の推移に有意な差は認められなかった。糞中の TG、T-Cho 量に顕著な差は認められなかったが、HFG 群は HF 群よりも排泄された胆汁酸量が高い傾向を示した。血漿中 TG 量は HF 群よりも HFG 群において低い傾向を示し、肝臓の TG、T-Cho 量においても HFG 群で低い傾向が認められた。また、肝臓中 FAS 活性 HF 群よりも HFG 群は比活性が低下し、CPT 比活性が上昇する傾向が認められた。CPT/FAS 比で比較すると、HFG 群の方が HF 群よりも有意に高かった。さらに、マウスの肝臓および筋肉における AMPK のリン酸化を解析した結果、HF 群よりも HFG 群で AMPK 活性が高くなる傾向が認められた。以上のことから、五加の実は肝臓中で CPT を活性化することで脂質の燃焼を促進させることが明らかとなった。さらに、AMPK シグナルを活性化する成分を含むことが示唆された。

AMPK, Lipid metabolism, Eleutherococcus senticosus

講演番号：2C02p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ C 校舎 02 会場

胎児・乳児期における過剰栄養状態は成長後の生体内脂質過酸化を亢進させる

Overnutrition during fetal and infant period promotes postgrowth intravital lipoperoxidation

○伊藤 隼哉[1]、加藤 俊治[1]、木村 ふみ子[1]、仲川 清隆[1]、宮澤 陽夫[1,2]（[1]東北大院農、[2]東北大学未来科学技術共同研究セ）
○Junya ITO[1], Shunji Kato[1], Fumiko Kimura[1], Kiyotaka Nakagawa[1], Teruo Miyazawa[1,2] ([1]Tohoku Univ, [2]NICHe at Tohoku Univ)

【背景・目的】メタボリックシンドロームは世界規模で蔓延しており、発症メカニズムの機構解明や予防法の構築が強く要請されている。メタボリックシンドロームの進展には酸化ストレスの関与が示唆されているが、その証明には生体内酸化ストレスを適切に評価する手法が必要である。その中で当研究室では、酸化ストレスを鋭敏に評価できる過酸化リン脂質（PCOOH）の測定法である CL（化学発光）-HPLC を構築した。一方、妊娠・授乳期の母マウスに高脂肪食を与えると、仔マウスのメタボリックシンドローム発症リスクが高まる。しかしながら、この現象におけるメカニズムには不明な点が多く、特に酸化ストレスとの関連はほとんど明らかになっていない。本研究では、この仔マウスを用い、メタボリックシンドロームの進行と酸化ストレスの関係解明を目指した。
【方法】試験には C57BL/6J マウスを用い、母マウスが妊娠・授乳期に普通食を摂取する群と妊娠・授乳期に高脂肪食を摂取する群に分けた。仔マウスは離乳時である 3 週齢と 11 週齢で屠殺し、生体内酸化ストレス指標である肝臓の PCOOH を測定した。また、血液と肝臓の脂質組成、肝臓における抗酸化関連分子の遺伝子発現量を測定した。
【結果】妊娠・授乳期の両期間にわたり母マウスに高脂肪食を与えると、仔マウスの肝臓 PCOOH 濃度が増加した。一方で内臓脂肪重量や血中の脂質組成に大差はなかった。以上より、妊娠・授乳期における母親の高脂肪食摂取によって仔マウスの酸化ストレスが増加することが明らかとなった。このことから、仔マウスの成長後にけるメタボリックシンドローム発症リスクの増大に酸化ストレスが関与することが示唆され、さらなるメカニズムの解明に興味が持たれた。

Oxidative stress, Metabolic syndrome, Maternal nutrition

講演番号：2C02p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ C 校舎 02 会場

高脂肪食摂取により変動する表皮タンパク質のプロテオーム解析

Proteomic analysis of epidermis in rats fed a high fat diet

○梅澤 悠、大高 万実、黒木 鷹、山根 拓実、服部 一夫、大石 祐一（東農大・応生科）
○Yu UMEZAWA, Mami OTAKA, You KUROKI, Takumi YAMANE, Kazuo HATTORI, Yuichi OISHI (Tokyo University of Agriculture)

【目的】これまでに、高脂肪食摂取が皮膚中のコラーゲンやヒアルロン酸、セラミド量に影響を及ぼすことが報告されており、皮膚中の様々なタンパク質の発現量が高脂肪食摂取で変動する可能性が考えられる。高脂肪食摂取で特異的に変動する皮膚、特に表皮タンパク質が存在すれば、そのタンパク質をマーカーとして肥満の判定に用いることができる。しかし、高脂肪食摂取による表皮タンパク質の変動を網羅的に解析した研究は報告されていない。そこで本研究では、高脂肪食を摂取させたラットの表皮を採取し、表皮中のタンパク質を、二次元電気泳動を用いて網羅的に解析し、高脂肪食摂取により変動するタンパク質を見出し、同定することを目的とした。
【方法・結果】実験には 4 週齢 SD 系雄性ラットを用いた。1 週間の馴化飼育後、AIN-76 を基本組成としたコントロール食群（CO 群）と、コーン油をラードに置換した 25%高脂肪食群（HF 群）の 2 群に分け、4 週間飼育した。その後、背部より表皮を採取し、二次元電気泳動を行った。等電点電気泳動には、pH3-10NL で 18 cm のドライストリップを用いた。二次元目の SDS-PAGE は、低分子量域と高分子量域を分けて行った。低分子量域の分離には、12.5%アクリルアミドゲルを用いて、添加するタンパク質量を 75 μg とした。高分子量域の分離には、10%アクリルアミドゲルを用いて、20 μg とした。スポットの可視化には銀染色法を用いた。以上の方法を用いて、CO 群と HF 群でスポットを比較した結果、CO 群と比較して変動が見られたスポットは、低分子量域では 33 個存在した。高分子量域については測定中である。また現在、変動が見られたスポットについては MALDI-TOF-MS を用いてタンパク質の同定を行っているので併せて報告する。

high fat diet, proteomic analysis, epidermis

講演番号：2C02p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ C 校舎 02 会場

UVB 照射がヘアレスマウスの肝臓 TGF β1 と PAI-1 遺伝子発現に及ぼす影響

Effect of UVB irradiation on the gene expression of hepatic TGFß1 and PAI-1 in hairless mice

○松居 翔、上杉 康之、長野 真帆、山根 拓実、服部 一夫、大石 祐一（東農大・応生科）
○Syo MATHUI, Yasuyuki UESUGI, Maho NAGANO, Takumi YAMANE, Kazuo HATTORI, Yuichi OISHI (Tokyo University of Agriculture)

【目的】これまでに我々は、ヘアレスマウスに対する UVB の照射が、Calcitonin gene-related peptide (CGRP) の発現と放出の増加というかたちで、皮膚-脳を介して肝臓に UVB 照射シグナルが伝わることを報告している。本研究では、UVB 照射シグナルが肝臓においてどのような効果を示すのか、CGRP を中心に In vivo、In vitro の系を用いて検討した。

【方法】In vivo の実験には Hos:HR-1 ヘアレスマウス (雌、6 週齢) を用い、7 日間の馴化飼育後、UVB(-) 群と UVB(+) 群に群分けを行った。UVB のエネルギー量は 1.6 J/cm^2 とした。UVB(-) 群、UVB(+) 群ともに試験 24 時間後、解剖を行い、肝臓中の CGRP、Transforming growth factor β1 (TGFβ1)、Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) mRNA 量を Real-time PCR 法にて測定した。In vitro の実験では、HepG2 を基本培地、CGRP (100 nM) 添加培地、TGFβ1 (5 ng/mL) 添加培地、TGFβ1 (5 ng/mL) +CGRP (100 nM) 添加培地で 0、1、2、4、8、12、24 時間培養後、Total RNA を抽出し、Real time PCR 法にて mRNA 量を測定した。

【結果・考察】肝臓中の CGRP の mRNA 量は、UVB(-) 群に比して UVB(+) 群で有意に増加した。このことから、UVB 照射のシグナルが肝臓にまで到達していることを確認した。また、肝臓における CGRP の働きの一つに、肝線維化の進行を緩和させる効果が報告されている。そこで、肝線維化において重要な因子である TGFβ1 と、TGFβ1 により誘導され、肝線維化を増悪させる PAI-1 の遺伝子発現量を調べた。その結果、TGFβ1 の mRNA 量は、UVB(-) 群に比して UVB(+) 群で有意な増加を示した。肝臓中の TGFβ1 の遺伝子発現は、血中アディポネクチン量と負の相関を示すことや、UVB 照射により血中アディポネクチン量が減少することが報告されている。このことから、UVB 照射により肝臓中で TGFβ1 の mRNA が増加した要因には、血中アディポネクチン量の減少が関与することが考えられた。一方、肝臓中の PAI-1 mRNA 量は、UVB(-) 群に比して UVB(+) 群で有意な減少を示した。そこで、HepG2 に対して TGFβ1 を添加し、UVB 照射時の肝臓の状態と類似した条件下で CGRP 添加による PAI-1 の遺伝子発現への影響を調べた。TGFβ1 添加により誘導された PAI-1 mRNA 量は、CGRP の添加 4、8 時間で有意な減少を示した。すなわち、UVB 照射により増加した肝臓中の CGRP は、TGFβ1 により誘導された PAI-1 の発現を抑制する作用を有することが明らかとなった。

Ultraviolet B, Calcitonin gene-related peptide, Plasminogen activator inhibitor 1

講演番号：2C02p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ C 校舎 02 会場

非アルコール性脂肪肝に及ぼす BCG 菌投与の影響

Effect of BCG administration on the development of nonalcoholic fatty liver disease

○稲福 征志、屋 宏典（琉球大熱生研）
○Masashi INAFUKU, Hirosuke OKU (Univ. Ryukyus. TBRC)

【背景】　メタボリックシンドロームは贅沢病として考えられてきたが、時代の変化とともに近年では貧困層においての罹患率が増加しつつある。その要因として社会的経済弱者の不規則な生活環境（夜間労働や食生活の乱れなど）が考えられている。また、貧困層の生活環境はヒトの病原体への感染リスクを高め、医療費負担に耐えられないことからも感染症罹患率が高くなる傾向にある。三大感染症の一つである結核は、産業革命や都市化などの大きな社会変革とともに消長してきた病気であり、かつて高い蔓延状況を示していた日本においても例外ではない。しかしながら、20 世紀後半から日本において「再興感染症」として結核は再び注目を浴びており、高齢者や社会的経済弱者における罹患が目立っている。その様な背景を踏まえ、本研究は流行域の重複が懸念される「メタボリックシンドローム」と「結核」の両疾患、特に結核菌感染がメタボリックシンドローム病態に与える影響についての基礎的知見を得るべく検証を行った。
【方法】　結核感染のプロトタイプとして *Mycobacterium bovis* BCG (BCG 菌)を用い、さらにはメタボリックシンドローム病態モデルとして *ob/ob* マウス（5 週齢、♂）を用いた。PBS に懸濁した BCG 菌（1×10^7cfu）を尾静脈より投与して、CE-2 食による飼育を 4 週間行った。なお、対照群には PBS のみを投与した。
【結果】　BCG 菌投与によって脾臓肥大と血中の炎症性サイトカインレベルの上昇が認められた。両実験群の食餌摂取量および体重に差は認められなかったが、BCG 群の精巣周辺白色脂肪組織の重量は有意に減少していた。両実験群の血中脂質濃度に差はなかったが、BCG 群の血中インスリン濃度およびインスリン抵抗指数 HOMA-IR は有意に低下していた。また、血中の高分子量アディポネクチン濃度は BCG 菌投与により有意に上昇していた。BCG 群の肝臓中性脂肪濃度およびコレステロール濃度が有意に低下しており、病理組織学的にも BCG 群の脂肪肝が改善していることが確認された。肝臓の脂質代謝関連遺伝子の発現を調べたところ、脂質合成系遺伝子である Fatty acid synthase (FAS)、Acetyl-CoAcarboxylase (ACC) 1、ACC2、Steroyl-CoA desaturase1 の mRNA 量が BCG 群にて有意に減少していた。また肝臓の脂肪酸合成律速酵素である FAS の活性と脂肪酸合成系に NADPH を供給するリンゴ酸酵素の活性が BCG 菌投与によって有意に低下していた。

Mycobacterium bovis BCG, Nonalcoholic fatty liver disease, ob/ob mice

講演番号：2C02p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ C 校舎 02 会場

経口摂取したロイシンの骨格筋同化シグナルへ及ぼす PGC-1α の影響

The effect of PGC-1α on skeletal muscle anabolic signal by oral leucine administration

○吉村 亮二[1]、佐藤 沙耶[1]、南 貴美子[1]、只石 幹[2]、三浦 進司[3]、亀井 康富[1] ([1]京府大院生環、[2]国立健康栄養研、[3]静岡県大食栄)
○Ryoji Yoshimura[1], Saya Sato[1], Kimiko Minami[1], Miki Tadaishi[2], Shinji Miura[3], Yasutomi Kamei[1] ([1]Kyoto Prefectural Univ., [2]Natl Inst of Health & Nutri., [3]Univ. of Shizuoka)

【目的】 ロイシンは筋タンパク質合成を促進し、筋タンパク質分解を抑制することが知られている。その合成促進効果は、mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) の活性化、その基質である eukaryotic initiation factor 4-binding protein 1(4EBP1)、70-kDa ribosomal protein S6 kinase (S6K1) のリン酸化を介していると考えられている。一方、転写共役因子である peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α (PGC-1α) は骨格筋の赤筋化などの性質を制御しており、PGC-1α の過剰発現により筋萎縮は抑制される。さらに、PGC-1α1 のアイソフォームである PGC-1α4 を過剰発現させることにより筋線維が肥大することも報告されている。しかし、ロイシンによる筋タンパク質合成促進作用が PGC-1α を介しているかは明らかにされていない。そこで本研究では、ロイシンによる mTORC1 経路の活性化の条件を検討し、PGC-1α 骨格筋特異的遺伝子改変マウスを用いてロイシンによる mTORC1 経路活性化は PGC-1α を介するか検討した。

【方法】 11 週令の C57BL/6 雄性マウスを 18 時間絶食させ、0.5%キサンタンガム/生理食塩水へ懸濁したロイシン (1.35 mg/10 μl/g body weight) を胃管により投与した。投与 30 分後に解剖し、骨格筋 (腓腹筋) を採取した。その後、腓腹筋からタンパク質を抽出し、mTORC1 経路関連分子をウエスタンブロット法により検出した。

【結果】 mTORC1 の標的分子である 4EBP1 のリン酸化量は、ロイシン投与により顕著に増加した。そこで現在、絶食状態の PGC-1α 骨格筋特異的遺伝子改変マウスを用いて、ロイシンによる 4EBP1、S6K1 のリン酸化に及ぼす影響を検討中である。

Leucine, mTORC1 signaling, PGC-1α

講演番号：2C02p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ C 校舎 02 会場

1 日の低タンパク質食摂取が成長期のラット肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響

DNA microarray analysis of rat liver gene expression under 1-day protein restriction

○尾崎 依[1]、斉藤 憲司[2]、中澤 京子[2]、伯野 史彦[3]、高橋 伸一郎[3]、加藤 久典[2]、竹中 麻子[1]([1]明治大農・農化、[2]東大・総括寄付講座「食と生命」、[3]東大・院・農生科)
○ Yori OZAKI[1], Kenji SAITO[2], Kyoko NAKAZAWA[2], Fumihiko HAKUNO[3], Shin-Ichiro TAKAHASHI[3], Hisanori KATO[2], Asako TAKENAKA[1] ([1]Meiji Univ., [2]Org. Interdisciplinary Res. Proj., Univ. of Tokyo, [3]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. of Tokyo)

【目的】成長期のラットに低タンパク質食を給餌すると，成長遅滞や肝臓トリグリセリド蓄積量の増加が生じる。演者等はこれまでに，低タンパク質食を給餌して 1 日で肝臓インスリン様成長因子（IGF）-I 遺伝子の発現が抑制され，肝臓トリグリセリド蓄積量が増加することを明らかにしてきたが，その分子機構の詳細は未だ明らかでない。そこで本研究は，短期間で肝臓 IGF-I 遺伝子の発現抑制や肝臓トリグリセリド蓄積量の増加が生じる分子機構の検討を目的として，低タンパク質食を 1 日摂取したラット肝臓の遺伝子発現変動を網羅的に調べた。
【方法】6 週齢の Wistar 系雄ラットに，5%のカゼインを含む低タンパク質食（5C）あるいは 15%のカゼインを含む対照食（15C）を 8 時間給餌した。16 時間の絶食後に肝臓を採取し，total RNA を抽出して rat genome 230 2.0 array genechip（Affymetrix）を用いた DNA マイクロアレイ解析に供した。次に，ラット肝臓由来 RL-34 細胞をアミノ酸を含む培地と含まない培地でそれぞれ培養し，DNA マイクロアレイ解析において顕著な発現誘導および抑制を示した各 10 遺伝子につき，定量的リアルタイム PCR で発現量を比較した。
【結果】DNA マイクロアレイ解析の結果，IGF-I 遺伝子の発現を制御することが知られる成長ホルモン（GH）シグナルの下流の遺伝子群に共通の発現変動は認められず，IGF-I 遺伝子発現の抑制は GH シグナルを介さずに生じる可能性が示された。一方，5C 群において activating transcription factor（ATF）4 の標的遺伝子群の発現誘導が認められ，低タンパク質食を 1 日摂取したラット肝臓において ATF4 が活性化することが示唆された。ATF4 の標的遺伝子であり，マイクロアレイ解析の結果 5C 群で発現量が有意に増加した fibroblast growth factor（FGF）21 は，トランスジェニックマウスにおいて IGF-I の遺伝子発現量や血中濃度が低下することが報告されている。そのため，低タンパク質食摂取時の FGF21 遺伝子発現の増加は IGF-I 遺伝子発現を抑制する一因である可能性が考えられ，現在詳細な解析を進めている。また，5C 群でトリグリセリド合成に関与する遺伝子群の発現誘導は認められなかったが，コレステロール合成に関与する遺伝子群の顕著な発現抑制が認められた。さらに，ラット RL-34 細胞をアミノ酸を含まない培地で培養したところ，ATF4 の標的遺伝子の発現量は増加し，コレステロール合成に関わる遺伝子の発現量は低下した。したがって，低タンパク質食を摂取して 1 日目のラットの肝臓では，アミノ酸欠乏に直接応答して ATF4 の活性化とコレステロール合成の抑制が生じる事が示唆された。本研究は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業委託事業の成果である。

Protein restriction, DNA microarray, Liver

講演番号：2C02p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ C 校舎 02 会場

タンパク質低栄養による肝臓脂質蓄積機構
Effect of protein malnutrition on hepatic lipid accumulation.
○竹之内 柚貴乃[1]、大谷 りら[2]、蟹沢 壮平[1]、小幡 祐子[1]、関 亜理砂[1]、加藤 久典[2]、竹中 麻子[1]([1]明治大学農、[2]東大・総括プロジェクト機構)
○Yukino TAKENOUCHI[1], Lila OTANI[2], Sohei KANISAWA[1], Yuko OBATA[1], Arisa SEKI[1], Hisanori KATO[2], Asako TAKENAKA[1] ([1]Meiji Univ., [2]Org. Interdisciplinary Res. Proj., Univ. Tokyo)

【目的】
低タンパク質食摂取時には肝臓トリグリセリドが蓄積することが報告されている。しかし、この現象が特定の摂取アミノ酸量の低下によって生じるのか、あるいは摂取窒素量の低下によって生じるのかは明らかになっていない。特定のアミノ酸の摂取量低下が肝臓脂質蓄積を引き起こすかどうかを検討した実験では、必須アミノ酸の中でアルギニン欠乏が肝臓脂質蓄積を引き起こす可能性が示された。そこで本研究では、低タンパク質食と低アルギニン食が肝臓脂質蓄積を引き起こす要因をそれぞれ検討した。
【方法】
6 週齢の Wistar 系雄ラットに対照食(AIN76 に準じた組成のアミノ酸混合物を 15%含む飼料,15P)、低タンパク質食(アミノ酸混合物を 5%含む飼料,5P)、低アルギニン食（対照食のアルギニン量を 5P と同程度にまで減らした飼料,15P-Arg）のいずれかを与え、11 日間飼育した。飼育終了後、肝臓各脂質（トリグリセリド,リン脂質,コレステロール）量を測定した。また、肝臓脂質蓄積に関与する可能性のある、肝臓中のアポリポタンパク質(ApoA1,B,CⅠ,CⅡ,CⅢ,E)、小胞体ストレス関連遺伝子(CHOP,BiP,X-BP1)、ATF4 標的遺伝子(ASNS,REDD1,FGF21)、脂肪酸合成関連酵素(FAS,ACC)、β-酸化関連酵素(ACO,MCAD,CPT1α)、VLDL 受容体（VLDLR)、脂肪滴生成関連因子（ADRP)の各種 mRNA 発現量をリアルタイム PCR にて測定した。
【結果】
15P 群と比べ 5P 群と 15P-Arg 群で肝臓トリグリセリド量、コレステロール量が有意に増加し、低タンパク質食と同様に低アルギニン食でも肝臓に脂質が蓄積することを確認した。アポリポタンパク質、β酸化関連酵素、脂肪酸合成関連酵素、ADRP の mRNA 量には、15P 群と比較して 5P 群、15P-Arg 群で顕著な変化はみられなかった。ATF4 標的遺伝子である ASNS と VLDLR の mRNA 発現量は、15P 群と比べ 5P 群と 15P-Arg 群で有意に増加した。このことから、ATF4 の活性化、特に VLDL 受容体合成の増加が、低タンパク質食と低アルギニン食で肝臓に脂質蓄積する要因である可能性が示された。本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業委託事業の成果である。

protein malnutrition, liver lipid, arginine

講演番号：2C02p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ C 校舎 02 会場

リポポリサッカライド投与は低タンパク質食による肝臓脂質蓄積を抑制する

Lipopolysaccharide administration represses hepatic lipid accumulation under protein malnutrition

○小幡 祐子、蟹沢 壮平、関 亜理砂、竹之内 柚貴乃、竹中 麻子 (明治大農)
○Yuko OBATA, Sohei KANISAWA, Arisa SEKI, Yukino TAKENOUCHI, Asako TAKENAKA (Meiji Univ)

【目的】タンパク質摂取量の低下は肝臓脂質の蓄積を引き起こすことが古くから知られている。本研究では、炎症応答を惹起する LPS（リポポリサッカライド）の投与が低タンパク質食摂取時の肝臓脂質蓄積を抑制することを見いだし、この分子機構の解析を行った。
【方法】6 週齢の Wistar 系雄ラットを 20%カゼイン食で 4 日間飼育し、環境に順化させた。その後、対照食(20%カゼイン食、20C)あるいは低タンパク質食(5%カゼイン食、5C)の給餌と、LPS 投与(0.25 mg/kg 体重を 1 日 1 回腹腔内投与)の有無で、①20C 群、②5C 群、③20C+LPS 群、④5C+LPS 群の 4 群に分け、1 週間飼育した。飼育最終日に 18 時間の絶食を経た後に解剖し、肝臓と血漿を採取した。肝臓脂質、血中脂質、血中肝障害マーカー(GPT、GOT 濃度)を測定した。さらに肝臓脂肪蓄積との関連が予想される遺伝子として、アポリポタンパク質(ApoA1,B,CⅠ,CⅡ,CⅢ,E)、小胞体ストレス関連遺伝子(CHOP, BiP,X-BP1)、ATF4 標的遺伝子(ASNS,REDD1,FGF21)、脂肪酸合成関連酵素(FAS,ACC)、β-酸化関連酵素(ACO,MCAD,CPT1α)、VLDL 受容体 (VLDLR)、脂肪滴生成関連因子 (ADRP)の発現量をリアルタイム PCR により測定した。
【結果】血中 GPT 濃度は 20C 群と比較して 5C 群で上昇したが、LPS 投与の影響は受けなかった。また 5C 群で肝臓トリグリセリド蓄積が確認されたが、この蓄積は LPS 投与により抑制された。血中脂質濃度には群間で有意差は見られなかった。アポリポタンパク質、脂肪酸合成関連酵素、β酸化関連酵素、小胞体ストレス関連遺伝子の発現は LPS 投与により低下した。ATF4 標的遺伝子の ASNS と FGF21 の発現は 5C 群で上昇し、LPS 投与で低下した。VLDLR の発現は 5C で上昇し、LPS 投与でさらに上昇した。各種遺伝子発現の結果より、5C 群のトリグリセリド蓄積と連動した変化として ATF4 標的遺伝子の活性化と VLDLR 発現の上昇を見いだした。さらに LPS 投与によるトリグリセリド蓄積抑制の要因として、(1)脂肪酸合成が低下する、(2)小胞体ストレスが抑制され脂質蓄積が抑制される、(3)ATF4 標的遺伝子の発現低下を介して脂質蓄積が抑制される、の 3 つの可能性が考えられた。本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業委託事業の成果である。

Lipopolysaccharide, hepatic lipid accumulation, protein malnutrition

講演番号：2C02p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ C 校舎 02 会場

アミノ酸欠乏培地で培養した肝細胞ではインスリン受容体基質（IRS）-2 量が増加し脂肪蓄積が起こる

Culturing liver cells under amino acid-free medium induces increases in insulin receptor substrate (IRS)-2 and lipid accumulation.

○森 友美[1]、亀井 宏泰[1]、赤西 成美[1]、尾添 淳文[1]、伯野 史彦[1]、千田 和広[1]、加藤 久典[2]、豊島 由香[3]、竹中 麻子[4]、高橋 伸一郎[1]([1]東大・院・農生科、[2]東大・総括プロジェクト機構、[3]日本医大・老研、[4]明治大・農)
○Tomomi Mori[1], Hiroyasu Kamei[1], Narumi Akanishi[1], Atsufumi Ozoe[1], Fumihiko Hakuno[1], Kazuhiro Chida[1], Hisanori Kato[2], Yuka Toyoshima[3], Asako Takenaka[4], Shin-Ichiro Takahashi[1] ([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Org. Interdisciplinary Res. Proj., Univ. Tokyo, [3]Inst. Gerontology, Nippon Medical School, [4]Sch. Agric., Meiji Univ.)

【目的】これまで我々は、「成長期のラットに低タンパク質を給餌すると、血中インスリン様成長因子（IGF）-I 濃度が低下し、成長遅滞が起こる。同時に、血中インスリン濃度が低下する一方で、肝臓でインスリンシグナル伝達に重要な役割を果たしているインスリン受容体基質（IRS）-2 のタンパク量や摂食依存的なチロシンリン酸化量が増加し、同時にトリグリセリド（TG）の蓄積が起こる」ことを報告してきた。そこで今回、培養肝細胞を用いて、①アミノ酸欠乏シグナルが IRS-2 量および TG 量に及ぼす影響、②IRS-2 量の増加が TG 量の増加に果たす役割を検討することにした。
【方法】ヒト肝癌細胞 HuH7 細胞あるいはラット初代培養肝細胞をアミノ酸欠乏培地で 24 時間培養後、IRS-2 タンパク量を immunoblotting で、細胞内・培地中の TG 量を化学的定量および Oil red O 染色で調べた。また、IRS-2 を過剰発現あるいは siRNA を用いて IRS-2 を発現抑制した HuH7 細胞の TG 量を解析した。
【結果】HuH7 細胞をアミノ酸欠乏培地で 24 時間培養すると、IRS-2 量が顕著に増加し、細胞中の TG 量も有意に増加した。また、アミノ酸欠乏培地で培養したラット初代培養肝細胞においても TG 量の増加する傾向が観察された。一方、IRS-2 を過剰発現した HuH7 細胞では、アミノ酸欠乏培地で培養しなくても細胞中 TG 量の増加が確認され、IRS-2 発現を抑制した HuH7 細胞では、アミノ酸欠乏培地での培養に応答して起こる TG 量の増加が抑制された。
【結論】一連の結果から、①肝臓細胞は培地中のアミノ酸欠乏を感知し、何らかの機構で IRS-2 を増加させる、②肝臓細胞の IRS-2 の増加はアミノ酸欠乏に応答した TG 量の増加に重要な役割を果たしていると結論した。今回、細胞レベルで、アミノ酸欠乏シグナルとインスリンシグナルが相互作用し、脂肪肝が誘導される可能性を初めて示すことができた。本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業委託事業の成果である。

amino acids, IRS-2, fatty liver

講演番号：2C02p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ C 校舎 02 会場

乳児期における栄養状態が成長後の健康状態に与える影響
The influence that nutritional state for lactation gives to medical condition in the future
○本間 太郎、畠山 雄有、北野 泰奈、鄂 爽、山本 和史、都築 毅（東北大院・農）
○Taro HONMA, Yu HATAKEYAMA, Yasuna KITANO, Shuang E, Kazushi YAMAMOTO, Tsuyoshi TSUDUKI (Tohoku Univ.)

【目的】摂取エネルギー量を制限する「カロリー制限」は、様々な実験動物を用いた研究により、加齢性疾患であるがんや糖尿病、心血管疾患の発症率低下、さらに老化遅延や寿命延長に効果的であることが示され、健康有益性が証明されている。一方、妊娠・授乳期の母親の栄養状態が子の将来の健康状態に影響を与えることが明らかとなり、特に胎児・乳児期の「カロリー制限」による低栄養状態は、子が成長してからの肥満や 2 型糖尿病、高血圧、循環器疾患などのメタボリックシンドロームの発症率を増加させることが知られている。このように、「カロリー制限」は実施する時期によって健康に与える影響が異なる。しかし、乳児期のみの栄養状態に着目して、子の将来に与える影響を検討した報告はほとんどない。そこで本研究では、乳児期のみの栄養状態、特に「カロリー制限」が成長後のメタボリックシンドローム発症リスクに与える影響について、マウスを用いて検討した。
【方法】妊娠した C57BL/6J マウスを通常飼育条件で出産させ、雄の仔マウスのみ選別し、3 群に分けた。通常飼育条件であるコントロール群（C 群）は母獣 1 匹に仔を 8 匹、過剰栄養摂取群（E 群）は母獣 1 匹に仔を 4 匹、カロリー制限群（L 群）は母獣 1 匹に仔を 12 匹として飼育した。3 週齢で離乳させ、肥満を誘導するために高脂肪食を 8 週間摂食させた。11 週齢にて絶食後に屠殺し、各種分析に供した。また、コントロール群とカロリー制限群において、離乳後に普通食を摂取させた CC 群と LC 群を設定し、同様の試験を行った。
【結果】乳児期にエネルギーを過剰摂取したマウス（E 群）において、白色脂肪組織重量が増加し、白色脂肪細胞は肥大化した。一方、乳児期に「カロリー制限」をしたマウス（L 群）では、白色脂肪組織重量は少なく、白色脂肪細胞の肥大化は抑えられた。以上のことから、乳児期の「カロリー制限」は成長後に内臓脂肪が蓄積しにくく、太りにくい体質になることが示された。以上のように、乳児期の「カロリー制限」に有益な効果が見られた一方で、血中グルコース濃度の上昇やインスリン分泌能の指標である HOMA-β の低下が見られた。また E 群において、血中グルコース濃度や血中インスリン濃度が上昇傾向を示し、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR 値が上昇した。よって、乳児期の栄養状態によって糖代謝が大きく変動することが明らかとなった。授乳期の「カロリー制限」と離乳後の普通食摂取の LC 群においてもインスリン分泌能の低下が確認された。以上より、乳児期のみの「カロリー制限」は、成長後の肥満発症リスクを低減させるが、インスリン分泌能を低下させ、糖代謝調節能を低下させることが示され、将来の健康維持に有効ではないことが明らかとなった。

insulin, lactation, DOHaD

講演番号：2C02p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ C 校舎 02 会場

脂質の種類と量がインスリン抵抗性に及ぼす影響について

The influence of dietary lipid on the insulin resistance in mice.

○佐藤 友宏[1]、江口 輝[1]、佐藤 明日香[1]、船戸 里香[2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日本大院生資科、[2]日本大生資科)
○Tomohiro SATO[1], Akira EGUCHI[1], Asuka SATO[1], Rika FUNADO[2], Takashi HOSONO[1,2], Taiichiro SEKI[1,2] ([1]Nihon Univ. Grad., [2]Nihon Univ.)

【背景・目的】近年、食餌由来の遊離脂肪酸が全身のインスリン抵抗性を増悪させることが報告されている。しかしながら、遊離脂肪酸がインスリン抵抗性を誘導する詳細なメカニズムは明らかでない。本研究では、食餌に含まれる脂質の量と種類が肝臓や脂肪組織のインスリン抵抗性に及ぼす影響について基礎的に検討した。
【方法】**(1)** 脂質の摂取量が全身のインスリン抵抗性に及ぼす影響について検討する目的で 7 週齢の ddY 雄性マウスにラードを 60%（カロリー比）含有する高脂肪食(D12492, Research Diets, Inc.)もしくは Control として CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を給餌して 12 日間飼育した。これらのマウスに経口糖負荷試験(1.5 g/kg b.w.)を実施し、耐糖能を評価した。また、給餌開始 15 日後にインスリン(0.5 U/kg b.w.)を下大静脈から投与し、肝臓、精巣上体脂肪組織、骨格筋を回収した。各臓器のインスリン応答能は、western blotting により Akt のリン酸化を指標に測定した。**(2)** 飽和脂肪酸が全身のインスリン抵抗性に及ぼす影響を検討する目的で、飽和脂肪酸を豊富に含有するバターを 40%（カロリー比）含有する western diet を調製し、7 週齢の ddY 雄性マウスに 12 日間給餌して飼育後、(1)と同様の方法でインスリン抵抗性を評価した。Control として同週齢の ddY 雄性マウスにコーン油を 10%（カロリー比）含有する飼料を給餌し同様に分析した。**(3)** 多価不飽和脂肪酸が全身のインスリン抵抗性に及ぼす影響を検討するため n-6 系多価不飽和脂肪酸、n-3 系多価不飽和脂肪酸をそれぞれ豊富に含有するベニバナ油、アマニ油をカロリー比で 40%含有する western diet を調製した。これらの食餌と、control として 10%コーン油を含有する飼料を 7 週齢の ddY 雄性マウスに 12 日間給餌して飼育後、(1)と同様の方法でインスリン抵抗性を評価した。
【結果】**(1)** 脂質を 60%含有する高脂肪食を負荷したマウスでは、control マウスと比較して経口糖負荷試験における曲線下面積は有意に増加し、耐糖能異常が明らかになった。また、脂肪組織における Akt のリン酸化が減少した。**(2)** 40%バターを含有する western diet 給餌群では、対照群と比較して体重、摂餌量に差はなかった。経口糖負荷試験の結果、バターを含有した western diet の給餌によりインスリン抵抗性は有意に増加した。**(3)** ベニバナ油、アマニ油を 40%含有する western diet 給餌群の体重、摂餌量、インスリン抵抗性は対照群と比較して差はなかった。
【結語】インスリン抵抗性には、脂質の摂取量と種類の両方が重要であることが示唆された。

Fatty acid, Insulin resistance, Diabetes

講演番号：2C02p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ C 校舎 02 会場

プテロスチルベンの抗糖尿病作用解析
Anti-diabetic effect of pterostilbene and its mode of action
○古橋 慶亮、三浦 豊、矢ヶ崎 一三 (東京農工大院農)
○Keisuke FURUHASHI, Yutaka MIURA, Kazumi YAGASAKI (Tokyo University of Agriculture and Technology)

【目的】近年、糖尿病患者数は世界的に増加している。食品成分により血糖値上昇を早期から制御できれば、その発症、進展を予防、抑制することが可能と考えられる。これまでに我々は、レスベラトロール（RES）が骨格筋細胞の糖取り込みをインスリン非依存的に促進し、血糖値上昇を抑制することを報告した。ブルーベリーやブドウに含まれるプテロスチルベン（PTE）はレスベラトロールの類似体で、抗糖尿病作用を呈することがこれまでに報告されているが、その作用機序は明らかとなっていない。そこで本研究では、PTE が *in vitro* において骨格筋細胞の糖代謝に及ぼす影響を検討するとともに、*in vivo* での抗糖尿病作用への関与についても検討した。
【方法】グルコース取り込み能の検定にはラット骨格筋由来 L6 細胞を用いた。L6 筋芽細胞を、10%牛胎児血清（FBS）を含む DMEM（10%FBS/DMEM）培地で培養し筋管に分化させた後、Hepes を含む Krebs-Henseleit （KHH）buffer に交換して 2 時間培養した。その後、PTE と 11mM のグルコースの入った KHH buffer で 4 時間培養し、前後のグルコース濃度の差から、グルコース取り込み量を算出した。PTE による糖取り込み制御の機構を検討するため、同様の方法で培養した L6 筋管細胞から細胞タンパク質を調製し、ウェスタンブロット法により、AMP-activated protein kinase（AMPK）と Akt の活性化状態を測定した。また PTE の glucose transporter 4（GLUT4）の膜移行への関与を検討するため、Halo Tag® GLUT4 expression vector をトランスフェクトした L6 筋芽細胞を 100μM の PTE と 11 mM のグルコースを含む KHH buffer 中で 30 分培養し、Halo®-GLUT4 と細胞膜マーカーである caveolin-3 を、抗 Halo Tag®抗体と抗 caveolin-3 抗体、および蛍光プローブを結合した二次抗体による細胞免疫染色で検討した。
【結果】PTE は 0～100μM の濃度において、L6 筋管細胞のグルコース取り込みを濃度依存的に促進した。この糖取り込みの増加は、AMPK インヒビターである Compound C を 10μM 加えることで抑制され、また PTE と 1μM のインスリンの供添加では相加的な糖取り込みの増加が見られた。リン酸化 AMPK/トータル AMPK 比は 100μM の PTE 添加により増加したが、Akt のリン酸化には変化は見られなかった。以上より、PTE は AMPK シグナル経路の活性化を介して、インスリン非依存的に L6 筋管細胞のグルコース取り込みを促進することが示唆された。GLUT4 膜移行への作用について、および *in vivo* における抗糖尿病作用の詳細についても検討し、RES との作用の違いについても比較を行いたい。

diabetes mellitus type 2, pterostilbene, AMPK signaling pathway

講演番号：2C02p22
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ C 校舎 02 会場

短梗五加葉抽出物による脂肪細胞分化および骨格筋細胞の AMPK 活性化作用

Effects of Goka leaf extract on 3T3-L1 preadipocyte differentiation and AMPK activity in L6 myotubes.

○西田 美也子、平山 匡男、金崎 桃子、伊藤 大貴、永塚 貴弘、小西 徹也、佐藤 眞治、西田 浩志 (新潟薬大・応生科)
○Miyako Nishida, Masao Hirayama, Momoko Kanazaki, Hiroki Ito, Takahiro Eitsuka, Tetsuya Konishi, Shinji Sato, Hiroshi Nishida (Niigata Univ. Pharm. Applied Life Sci.)

【目的】五加（短梗五加）は、サポニンやフラボノイド、リグナンなどのポリフェノールを多く含むウコギ科の低木であり、その根皮は中国で生薬として滋養強壮や糖尿病治療に用いられているが、その詳細なメカニズムは解明されていない。また、五加の葉や実の機能性に関する研究はほとんど見当たらない。我々はこれまでの研究で、五加葉抽出物が 3T3-L1 細胞の分化を促進することでアディポネクチンの分泌を増加させることを明らかにした。本研究では五加葉の抗糖尿病作用についてさらに詳細に解析するため、3T3-L1 細胞のアディポネクチン分泌促進作用を示す成分、および骨格筋細胞の AMPK 活性化作用を持つ成分を特定するための基礎的研究を行った。
【方法】五加の葉の 80%MeOH 抽出物をヘキサン・酢酸エチル・ブタノール・水で順次分画した。それぞれの画分において 3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化に対する影響を Oil Red-O 染色により評価した。また、脂肪細胞分化の指標である PPARγ発現量と細胞内のアディポネクチン発現量をウェスタンブロット法により解析した。さらに、五加葉抽出物が骨格筋の糖吸収シグナルに及ぼす影響を調べるため、ラット L6 細胞の AMPK のリン酸化活性に対する五加葉抽出物の作用を検討した。
【結果・考察】Oil Red-O 染色の結果から、五加葉のヘキサン画分・酢酸エチル画分で 3T3-L1 細胞の脂肪蓄積量が五加の葉 80%MeOH 抽出物より増加した。脂肪細胞分化を促進する成分はヘキサン画分・酢酸エチル画分に含まれている可能性が示された。細胞内 PPARγ発現量およびアディポネクチン発現量は五加葉抽出物のヘキサン画分を培地に添加することにより増加する傾向が認められた。また、L6 細胞の培地に五加の葉 80%MeOH 抽出物を添加したところ、0.5 時間後に細胞内 AMPK のリン酸化が確認された。以上の結果から、五加葉ヘキサン画分は脂肪細胞でアディポネクチンの分泌を増加させることが明らかとなった。さらに五加葉抽出物は骨格筋細胞の AMPK 関連シグナルの活性化を促進することで糖の吸収を効率的にして抗糖尿病作用を示す可能性が示唆された。

Goka, adiponectin, ampk

講演番号：2C03a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ C 校舎 03 会場

トキシコゲノミクスデータベースを用いた肝臓肥大の遺伝子発現制御ネットワークの構築

Construction of gene expression regulatory network of liver hypertrophy using a toxicogenomics database

○古川 竜矢、荒木 啓充、久原 哲 (九州大院農)
○Tatsuya FURUKAWA, Hiromitsu ARAKI, Satoru KUHARA (Kyushu Univ.)

[背景・目的]

医薬開発において、非臨床試験で検出されなかった毒性が臨床の場で現れることがしばしばあり、患者への負担、研究開発費の高騰等の問題を招いている。これを受けて、開発候補化合物の毒性評価・予測システムの構築を目指し、国立医薬品食品衛生研究所、(独)医薬基盤研究所、製薬企業 15 社によるトキシコゲノミクスプロジェクトが実施された。同プロジェクトで開発されたデータベース、TG-GAGEs には、約 150 の化合物をラット個体、及びラット・ヒト細胞株へ暴露した際の毒性情報、遺伝子発現情報などが収載されている。本研究では、肝毒性の一つである肝臓肥大に着目して研究を行った。肝臓肥大は化合物の毒性試験においてしばしば確認され、心臓や肺を圧迫し、呼吸困難や肺炎、神経痛様の痛みの原因となる場合がある。本研究では TG-GATEs を用い、肝臓肥大を誘発する 52 個の化合物の遺伝子発現制御ネットワークを構築し、毒性メカニズムの解明、毒性マーカー候補遺伝子の同定を目的とする。

[使用データ・方法]

ラット個体へ 28 日間、高容量の反復投与を行い、最終投与の 24 時間後に取得したサンプルに肝臓肥大が認められた 52 個の化合物（中枢神経系用薬 16 種、代謝性医薬品 6 種、循環器官用薬 5 種、化学物質 5 種、ホルモン剤 4 種、抗生物質 3 種、他 13 種）の遺伝子発現データを使用した。各遺伝子のシグナル検出の Absent コールの割合及び変動係数の閾値を設定し、フィルタリングを行った。全遺伝子間の相関係数を算出し、共発現又は逆相関の関係にある遺伝子発現制御ネットワークを構築した。

[結果・考察]

構築した遺伝子発現制御ネットワークから、その中心となるハブ遺伝子群を解析し、毒性マーカー候補遺伝子を同定した。

gene expression regulatory network, toxicogenomics, liver hypertrophy

講演番号：2C03a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ C 校舎 03 会場

カロリー制限を施したラットの DNA マイクロアレイデータを用いた発現変動遺伝子の同定方法の検討

Study of identification methods of differentially expressed genes using DNA microarray data of caloric restricted Rattus norvegicus

○山本 祐生[1]、權 娟大[2]、宮崎 智[2] ([1]東京理科大院・薬、[2]東京理科大・薬)
○ YUU YAMAMOTO[1], YEONDAE KWON[2], SATORU MIYAZAKI[2] ([1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science., [2]Department of Medical and Life Science, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science.)

【背景・目的】

カロリー制限のラットから得られた DNA マイクロアレイデータの利用法として、ヒートマップ作成や二群間の倍数比較から刺激によって発現量が変化する遺伝子（以下、発現変動遺伝子）を求めるのが一般的である。DNA マイクロアレイから得られるデータは発現量を数値として扱えるため、対照群の発現量と実験群の発現量を比較する事で発現変動遺伝子の同定が可能である。しかし、この同定では、統計的仮説検定を行うために偶発的に発現量に差がある事を示す検定結果が多くなる多重比較問題が発生する。一般的な多重比較問題の制御法である FamilyWise Error Rate（FWER）制御法は数万の検定数に伴い、検出力が大幅に低下してしまう。そのため、FWER 制御法は DNA マイクロアレイデータを用いた解析に不適であると言われている。その問題の解決策の一例として、False Discovery Rate（FDR）制御法がある。この手法は、有意と判断された仮説のうち、実は α 過誤を犯している割合をある一定の値以下に抑える制御法である。本研究では、既存の FDR 制御法の再現性や精度の再検証を実行した後、発現量の推定法と統計学的手法の組み合わせのうちどの組合せが最適な組合せであるかを検討した。

【方法】

遺伝子発現情報データベースである Gene Expression Omnibus から取得したカロリー制限条件下のラット DNA マイクロアレイデータ（GSE30668,GSE21681）の解析を統計解析ソフト「R」上で行った。検討した組み合わせは発現量の推定法で一般的である RMA と MAS5.0 の 2 種と統計学的手法 5 種の計 10 通りで発現変動遺伝子の同定を試みた。なお、FDR のカットオフ値を 5%と設定した。

【結果・考察】

本研究により、どの FDR 制御法を選択するかによって同定されるカロリー制限条件下での発現変動遺伝子が大きく異なる可能性が示唆された。また、発現量の推定法と統計学的手法の組み合わせによっても、発現変動遺伝子の同定数及び同定した遺伝子に相違がみられた。これらの結果から、FDR 制御を有効に行うための発現量の推定法と統計学的手法の組み合わせ条件の立案を行った。

DNA microarray, False Discovery Rate, caloric restriction

講演番号：2C03a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ C 校舎 03 会場

低タンパク質食摂取は mTORC1 経路を介して IGFBP-1 mRNA 量を増加させる

Low-protein diet induces IGFBP-1 mRNA via mTORC1 pathway

○日野 美佳、竹内 香菜恵、竹中 麻子 (明治大農)
○Mika HINO, Kanae TAKEUCHI, Asako TAKENAKA (Meiji Univ.)

［序論］低タンパク質食を摂取した若齢動物では成長が遅延する。この原因の一つに IGFBP-1 の増加によるインスリン様成長因子-I (IGF-I)活性の低下が挙げられるが、その機構は不明な点が多い。IGFBP-1 はインスリンにより合成が抑制されるが、この制御にはインスリンシグナル経路のアミノ酸センサーである mTORC1 が関わっている。本研究では、in vivo 肝臓において低タンパク質食摂取で mTORC1 活性が低下し、これにより IGFBP-1 合成が増加する可能性を検討した。
［方法］実験 1：6 週齢 Wistar 系雄ラットに 20%あるいは 5%カゼイン食（20P, 5P）を 14 日間与えた。15 日目に絶食下でラパマイシン（1 mg/kg BW）あるいは DMSO を投与し、7 時間後に 16 時間絶食あるいは 6 時間再給餌の状態で解剖した。実験 2：6 週齢 Wistar 系雄ラットに 20%あるいは 4%カゼイン食（20P, 4P）を 7 日間与えた。8 日目に絶食下でインスリン（3U/kg BW）あるいは PBS を投与し、さらに 2 時間絶食あるいは再給餌の状態で解剖した。採取した肝臓の IGFBP-1、インスリン標的遺伝子（PEPCK、SREBP-1c、FAS、ACC）、mTORC1 制御下の遺伝子（Sc5d、PDGFRα）の mRNA 量を qPCR で、mTORC1 基質である 4E-BP1、リン酸化 4E-BP1 量を WB で測定した。
［結果と考察］実験 1：20P 群では再給餌によって IGFBP-1 mRNA が減少したのに対し、5P 群では減少しなかった。また、対照群ではラパマイシン投与が再給餌による IGFBP-1 mRNA の減少を抑制した。この結果から、低タンパク質食摂取による IGFBP-1 mRNA 増加は摂食による mRNA 低下の阻害で生じること、この mRNA 低下は mTORC1 を介していることが示された。実験 2：mTORC1 を介さずにインスリンの制御を受ける遺伝子（SREBP-1c、FAS、PEPCK）は 4P 群でも 20P 群と同様に再給餌・インスリン投与によって発現量が変化した。一方 mTORC1 制御下の IGFBP-1、PDGFRα mRNA 量は 4P 群では再給餌・インスリン投与の制御を受けなかった。また 4P 群では、4E-BP1 リン酸化が摂食・インスリンにより増加しなかった。この結果から、低タンパク質食摂取によってインスリンシグナルの mTORC1 下流経路が不活性化して、食餌摂取に応答した IGFBP-1 mRNA 低下が阻害される可能性が示された。本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業委託事業の成果である。

low-protein diet, mTORC1, IGFBP-1

講演番号：2C03a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ C 校舎 03 会場

MIG12 による ACC ポリマー化亢進機構の解明

Mechanism of Acetyl-CoA Carboxylase polymerization by MIG12

○和泉 彬子、池内 江美奈、宮田 慎吾、Shimizu Makoto、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農生科）
○Akiko Izuimi, Emina Ikeuchi, Shingo Miyata, Makoto Shimizu, Jun Inoue, Ryuichiro Sato (Tokyo Univ.)

【背景と目的】LXR(Liver X Receptor)は脂質代謝における転写制御に関与する核内受容体である。我々は、LXR の新規標的遺伝子として MIG12 を同定し、脂肪酸合成に関与することを示してきた[1)]。MIG12 は脂肪酸合成の律速酵素である ACC(Acetyl-CoA Carboxylase)のポリマー化を亢進することにより ACC を活性化し、脂肪酸合成を上昇させるが、ACC ポリマー化に重要な MIG12 の部位については明らかになっていない。そこで、本研究では MIG12 とアミノ酸レベルで高い相同性を持つ Spot14 に着目した。Spot14 は MIG12 同様、脂肪酸合成に関与することが知られているが、MIG12 とは違い、ACC とは結合せず、ポリマー化も亢進しない。これらの違いが、相同性の低い領域の差によるものと仮定し、それらの領域を組み替えることで MIG12 の ACC ポリマー化に重要な領域を同定することを本研究の目的とした。
【方法】MIG12 と Spot14 の相同性が高い領域と低い領域に分かれていることに着目し、相同性の低い 2 つの領域のうち片方、あるいは両方を組み替えたキメラタンパク質発現プラスミドを作製した。それらをヒト肝がん由来 HepG2 細胞に過剰発現させ、ACC のポリマー化状態を Blue-Native PAGE 法を用いて検証した。また、ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞にそれぞれのキメラタンパク質を過剰発現させ、免疫沈降法により、内因性 ACC との結合の変化を検証した。
【結果】MIG12 の上流部位のみを Spot14 と組み替えると、ACC のポリマー化は野生型 MIG12 過剰発現群以上に亢進された。また、下流部位のみを組み替えると、ポリマー化は抑制され、両方を組み替えると野生型と同レベルのポリマー化が見られた。一方、Spot14 を MIG12 と組み替えてもポリマー化レベルに影響は見られなかった。また、免疫沈降法で内因性 ACC との結合能を検証したところ、組み替えによる ACC ポリマー化レベルの変動と相関した結合能の変化が見られた。これらの結果より、MIG12 の上流部位は、ACC ポリマー化に抑制的に働く領域と考えられる。また、下流部位は ACC との結合に重要な領域と考えられる。しかし、この領域を Spot14 に組み込んでもポリマー化が亢進されなかったことから、この領域はポリマー化に重要な領域の 1 つであることが示唆された。この領域には、リン酸化修飾を受けるアミノ酸残基が 2 か所存在することから、このリン酸化修飾がポリマー化亢進に関与するかどうか今後検討していく予定である。

1) J. Inoue *et al.* Mol. Endocrinol. **25**, 995–1005. (2011)

MIG12, ACC, LXR

講演番号：2C03a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ C 校舎 03 会場

ストレス刺激により発現上昇する FGF21 の機能解析

The function of FGF21 induced by stress

○丸山 竜人[1]、SHIMIZU Makoto[1]、井上 順[1]、伊藤 信行[2]、佐藤 隆一郎[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]京大院・薬)
○Ryuto MARUYAMA[1], Makoto SHIMIZU[1], Jun INOUE[1], Nobuyuki ITOH[2], Ryuichiro SATO[1] ([1]Dept. of Applied Biol. Chem. , Grad. Sch. of Agri. and Life Sci. , Univ. of Tokyo,, [2]Department of Genetic Biochemistry, Kyoto University Graduate School of Pharmaceutical Sciences,)

【目的】

FGF21(Fibroblast Growth Factor 21)は肝臓で高発現する分泌性線維芽細胞増殖因子(FGF)である。FGF21 は白色脂肪組織での脂質分解の亢進や肝臓でのケトン体合成の亢進、全身のインスリン感受性の改善に関与している。また、FGF21 の発現は絶食により亢進することが知られている。我々は、これまでに様々な化合物を用いたスクリーニングから小胞体ストレスにより FGF21 の発現が亢進することを見出し、個体レベルにおいても確認した。レポーターアッセイを用いた解析から、FGF21 のプロモーター上に 3 つの ATF4(Activating Transcription Factor 4)結合部位が存在することを同定した。ATF4 は小胞体ストレス以外に酸化ストレスやアミノ酸インバランスによっても活性化される。本研究では、小胞体ストレス以外の ATF4 活性化刺激による FGF21 の発現解析及びこれらの刺激下での FGF21 の機能解析を行った。

【方法及び結果】

野生型マウスに酸化ストレス誘導剤である亜ヒ酸ナトリウムを経口投与したところ、肝臓において、酸化ストレスマーカーである HO1(Heme-Oxygenase-1)の発現亢進とともに FGF21 の発現上昇及び血中への FGF21 の分泌の増加が確認された。次に、野生型マウスに ATF4 を活性化する他の刺激としてロイシン欠損食を与えたところ、酸化ストレスと同様に肝臓における FGF21 の発現上昇及び血中への FGF21 の分泌増加が確認された。

FGF21 欠損マウスでは脂肪組織における脂質分解の阻害やケトン体食摂取時に脂肪肝が見られケトーシスが阻害されるといった報告がなされている。そこで、ATF4 が活性化される様々な刺激における機能解析を FGF21 欠損マウスを用いて行った。その結果、酸化ストレス刺激においていくつかのストレス応答が FGF21 欠損で亢進していた。FGF21 がストレス状況下における代謝改善に寄与しているかは今後、さらに詳細な実験が必要である。

FGF21, ATF4, oxidative stress

講演番号：2C03a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ C 校舎 03 会場

様々なストレス刺激における FGF19 の発現調節

Regulation of FGF19 gene expression induced by various kinds of stress

○森本 ひとみ、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農）
○Hitomi MORIMOTO, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (Tokyo Univ.)

【背景・目的】肥満や糖尿病などの生活習慣病は先進諸国間で重大な問題であり、その予防・治療法の発見は急務となっている。FGF19(Fibroblast Growth Factor 19)は小腸で高発現しており、血中を介して肝臓に作用し、胆汁酸代謝や糖代謝を調節している。実際、FGF19 はトランスジェニックマウスや、リコンビナントタンパクの投与実験の結果から、食事性肥満を抑制し、インスリン感受性を改善することが報告されている。以上から、FGF19 は生活習慣病予防のターゲットとして期待されている。我々はスクリーニングを行った結果、小胞体ストレスが FGF19 の発現を亢進し、それが ATF4(activating transcription factor 4)を介することを見出した。ATF4 は小胞体ストレスに加えて、酸化ストレス、アミノ酸インバランスにより活性化される。そこで、本研究では小胞体ストレス以外の ATF4 を介した FGF19 発現調節機構について、検討を行った。【方法】ヒト小腸上皮様細胞 Caco2 細胞に酸化ストレス（亜ヒ酸ナトリウムを添加）、及び、アミノ酸インバランス（ロイシン枯渇培地）状態を負荷させ、RNA を回収しリアルタイム PCR に供した。また、個体レベルの解析に関しては、マウスに亜ヒ酸ナトリウムの経口投与し、また、1 週間のロイシン枯渇食を与えることで、それぞれ酸化ストレス、アミノ酸インバランスを再現した。その後、マウスの回腸の RNA を回収し、遺伝子発現の解析を行った。【結果・展望】Caco2 細胞に酸化ストレスを与えたところ、ATF3 などの ATF4 標的遺伝子及び FGF19 の発現が亢進した。一方、ロイシン枯渇状態では ATF4 標的因子及び FGF19 発現に変動は見られなかった。また、マウスの回腸における遺伝子発現変動を確認したところ、酸化ストレスにより HO-1 などの酸化ストレスマーカー遺伝子の発現変動は確認されたが、FGF15(ヒト FGF19 のマウスホモログ)の発現変動は見られなかった。また、マウスにアミノ酸枯渇食を与えたところ、肝臓ではアミノ酸インバランスによる ATF4 標的因子の変化は確認されたが、小腸での ATF4 標的遺伝子及び FGF15 の発現変動は確認されなかった。以上から、小胞体ストレスは細胞レベル及び個体レベルで FGF19 の発現を亢進するが、酸化ストレスに関しては細胞レベル、また、アミノ酸インバランスでは細胞、個体共に遺伝子発現変動が見られなかった。さらに、ストレス刺激における FGF19 の機能解析のため、アデノウイルスを用いた FGF19 の発現系を構築した。マウスに FGF19 を発現するアデノウイルスを投与した結果、血中の FGF19、及び標的遺伝子である肝臓の Cyp7a1 の発現変動が見られた。現在、この実験系を用いてストレス刺激下での FGF19 の機能解析を行っている。

FGF19, ATF4, stress response

講演番号：2C03a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ C 校舎 03 会場

SREBP-2 はヒト消化管由来細胞で FGF19 の FXR 依存的な転写を負に調節する

SREBP-2 negatively regulates FXR-dependent transcription of FGF19 in human intestinal cells

○宮田 昌明[1,2]、畑 竜也[1]、山添 康[1]、吉成 浩一[1] ([1]東北大院薬、[2]水大校)
○Masaaki MIYATA[1,2], Tatsuya HATA[1], Yasushi YAMAZOE[1], Kouichi YOSHINARI[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Natl. Fish. Univ.)

[目的]消化管に発現するエンドクリンホルモンの fibroblast growth factor (FGF)19 は肝臓の受容体に作用し、脂質や糖代謝調節に関与するとされている。FGF19 は肝臓でコレステロールからの胆汁酸合成を負に制御し、自身の発現は胆汁酸/farnesoid X receptor シグナルにより正の調節を受けることが知られている。一方胆汁酸の前駆体であるコレステロールによる FGF19 の発現調節機構については未だ知見がない。本研究ではコレステロールによる FGF19 発現調節について明らかにする研究の一貫として、コレステロールにより発現が調節される転写因子の sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-2 による FGF19 の発現調節についてヒト大腸癌由来の LS174T 細胞を用いて検討した。

[方法] LS174T 細胞に cholesterol/25-hydroxycholesterol（C/25HC）を添加あるいは活性型 SREBP-2 を強制発現させ定量的 PCR により FGF19 mRNA レベルを解析した。FGF19 遺伝子の FXR 応答領域(IR-1)を含むレポータープラスミドを用い、活性型 SREBP-2 発現によるレポーター活性を測定した。Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)と chromatin immunoprecipitation assay (ChIP assay)により FXR 応答配列への FXR の結合について解析した。GST pull-down assay により SREBP-2 と FXR の相互作用を解析した。

[結果] LS174T 細胞に C/25HC を処置すると核内の活性型 SREBP-2 タンパクレベルの減少と FGF19 mRNA レベルの有意な増加が認められた。LS174T 細胞に活性型 SREBP-2 を強制発現させると FGF19 mRNA レベルの有意な減少が認められた。FXR 応答領域を含む FGF19 レポーター活性は FXR 強制発現と GW4064 添加により増加したが、その活性増加は活性型 SREBP-2 強制発現により減弱した。FXR 応答配列に突然変異を導入したレポータープラスミドではこのような活性の増加も、活性の減弱も認められなかった。EMSA により FGF19 遺伝子の FXR 応答領域への FXR の結合が活性型 SREBP-2 の添加により減弱することが示された。ChIP assay により C/25HC 処置は細胞内で FGF19 遺伝子の FXR 応答配列への FXR の結合を増強させることが示された。GST pull-down assay により FXR と活性型 SREBP-2 の間のタンパク相互作用が認められた。

[結論] LS174T 細胞内において活性型 SREBP-2 は FXR との相互作用を介して FXR の FGF19 遺伝子上の FXR 応答配列への結合を低下させることにより FGF19 遺伝子の FXR 依存的な転写活性化を抑制することが示唆された。

1) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 132, 41-47 (2012). 2) Biochem. Biophys. Res. Commun. in press.

SREBP-2, FGF19, FXR

講演番号：2C03p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ C 校舎 03 会場

SUMO 化によるパーキンソン病関連転写因子 PARIS(ZNF746)の転写抑制活性の調節

SUMOylation Regulates the Transcriptional Repression Activity of PARIS (ZNF746).

○西田 有、山田 芳司（三重大・生命科学研究支援センター）
○Tamotsu Nishida, Yoshiji Yamada (Life Sci. Res. Ctr., Mie Univ.)

KRAB-Zn フィンガー転写抑制因子 PARIS/ZNF746 は家族性パーキンソン病の原因遺伝子 *parkin* の産物であるユビキチンリガーゼ Parkin の新たな基質として同定された(Shin et al. Cell 2011)。PARIS はヒトのパーキンソン病患者の脳に蓄積し、転写コアクチベーターPGC-1α とその標的遺伝子の発現を抑制することによりドーパミン神経の変性に深く関与していることが示唆されている。しかし、PARIS の転写抑制の制御機構はほとんど明らかにされていない。

ユビキチン様タンパク質 SUMO は翻訳後修飾により様々な細胞内プロセスを制御していることが知られている。既に KRAB-Zn フィンガーファミリー転写因子を含む多くの転写抑制因子において SUMO 化による制御が明らかにされていることから、我々は PARIS の転写抑制活性が SUMO 化によって制御されているのではないかと考え研究を進め、以下のような結果を得た。①培養細胞系または in vitro の SUMO 化アッセイ実験を行ったところ PARIS が SUMO 化されることを見出した。②SUMO 化は SUMO E3 リガーゼ CBX4/Pc2 により促進された。③KRAB ドメインに隣接した中央ドメインの２ヶ所に SUMO 化部位を同定した。④培養細胞に SUMO-1 と共発現させると SUMO 化サイト依存的に核内スペックルに共局在した。⑤ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞において非 SUMO 化変異型 PARIS は野生型に比べ PGC-1α 遺伝子プロモーターの転写活性抑制効果が減少することを明らかにした。さらに KRAB ドメインの欠失により転写活性が顕著に増大することから KRAB ドメインは転写抑制に機能し、PARIS は潜在的な転写活性化能を有すると考えられた。興味深いことに、この転写活性化は非 SUMO 化変異型 PARIS では起こらなかった。

以上の結果は PGC-1α 遺伝子プロモーターにおける PARIS の KRAB ドメインを介した抑制メカニズムへの SUMO 化の関与を示唆している。

SUMO, PARIS, transcriptional repression

講演番号：2C03p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ C 校舎 03 会場

記憶形成能力に対する前脳領域におけるレチノイン酸情報伝達系の役割の解析

Retinoic acid signaling pathway plays critical role in regulation of memory formation in forebrain

○海老原 てい[1]、篠沢 貴寛[1]、野本 真順[1]、武田 陽平[1]、内田 周作[1]、喜田 聡[1,2] ([1]東京農大院、[2]科学技術振興機構 CREST)
○Tei EBIHARA[1], Takahiro SHINOZAWA[1], Masanori NOMOTO[1], Yohei TAKEDA[1], Shusaku UCHIDA[1], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]CREST, JST)

ビタミン A の活性本体であるレチノイン酸は転写調節因子レチノイン酸受容体（RAR）の特異的なリガンドとして機能している。この RAR はレチノイド X 受容体（RXR）とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子の転写を調節することで生体機能を制御している。特に、RAR は脳内で広範囲に発現していることから、脳機能において重要な役割を果たしていることが予想される。我々は、これまでに、前脳特異的ドミナントネガティブ型 RARα過剰発現マウス（dnRAR-TgM）の作製および行動学的解析を行い、レチノイン酸情報伝達系の不活性化（loss-of-function）により、海馬依存性記憶能力に障害が観察されることを明らかにしてきた（Nomoto et al., 2012）。本発表では、海馬依存性記憶形成能力に対するレチノイン酸情報伝達系の役割を明らかにすることを目的とし、遺伝学的及び薬理学的手法を用いてレチノイン酸情報伝達系の活性化（gain-of-function）の効果を解析した結果を中心に報告する。RARαのアンタゴニスト Ro41-5253 を野生型マウスの海馬に局所注入した結果、社会的認知記憶形成に障害が観察された。一方、RARαのリガンド All trans retinoic acid（ATRA）もしくは、9 cis-retinoic acid を野生型マウスの海馬に局所注入した結果、社会的認知記憶及び恐怖条件付け文脈学習課題などの海馬依存的学習課題において記憶形成の顕著な向上が観察された。さらに、前脳特異的野生型 RARα過剰発現マウス（wtRAR-TgM）を作製し、その表現型を解析した。その結果、興味深いことに、トランスジェニックマウスでは、ATRA 投与 4 時間後に海馬依存的学習課題に供したところ、新規物体認知記憶、社会認知記憶、および空間記憶課題において、記憶形成能力の顕著な向上が観察された。以上より、レチノイン酸情報伝達系は海馬記憶機能に必須であるばかりではなく、この情報伝達経路の活性化により、記憶能力が向上することが示された。従って、レチノイン酸情報伝達系は海馬記憶機能を正に制御する情報伝達経路であると結論した。また、以上の結果から、ビタミン A が記憶能力を決定する重要な栄養素であることが示され、ビタミン A の応用利用による認知機能改善の可能性が示唆された。

RAR, memory, Vitamin A

講演番号：2C03p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ C 校舎 03 会場

社会的認知記憶に基づく新規性認識メカニズムの組織学的解析

Identification of memory circuit discriminating novel and familiar mice

○谷水 俊之[1]、門間 和音[1]、岡野 絵美子[1]、張 悦[1,2]、福島 穂高[1,2]、喜田 聡[1,2]([1]東農大院農、[2]科学技術振興機構)
○ Toshiyuki TANIMIZU[1], Kazune KADOMA[1], Emiko OKANO[1], Yue ZHANG[1,2], Hotaka FUKUSHIMA[1,2], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]CREST, JST)

記憶は保持時間の観点から、数時間程度しか保持されない短期記憶と最長一生保持される長期記憶に分けられる。不安定な記憶は新規遺伝子発現依存的な固定化のプロセスを経ることによって、安定な長期記憶として保持される。マウスは他のマウスに対して接触行動を行い、既知であるか初対面であるかを調べている。社会的認知記憶課題は幼若マウスに対する成熟マウスの接触行動を指標にして、幼若マウスを覚えているか、すなわち、幼若マウスのことを記憶しているかを解析する課題である。例えば、成熟マウスは、既知の幼若マウスを提示された場合、初対面の幼若マウスを提示された場合よりも有意に短い接触時間を示すため、相手のことを記憶していると判断できる。そこで、本研究では、社会的認知記憶課題を用いて、成熟マウスが幼若マウスを記憶する社会的認知記憶の固定化、さらに、記憶固定化後に幼若マウスが既知であるか新規であるかを認識するメカニズムを組織学的に解析した。初期応答遺伝子 c-fos 及び Arc の発現誘導を指標とした免疫組織化学染色法を用いて、社会的認知記憶固定化時に遺伝子発現が誘導される脳領域を同定した。その結果、固定化時に前頭前野、前帯状皮質、扁桃体基底外側部、海馬において、顕著な c-fos 及び Arc 発現誘導が観察され、これら脳領域が社会的認知記憶固定化に関与することが示唆された。さらに、これら脳領域にタンパク質合成阻害剤アニソマイシンを局所注入した結果、前頭前野、前帯状皮質、扁桃体あるいは海馬における遺伝子発現阻害により、社会的認知記憶固定化の阻害が観察され、これら脳領域における新規遺伝子発現は社会的認知記憶固定化に必須であることが示された。続いて、既知と初対面（新規）の幼若マウスを提示した場合に遺伝子発現が誘導される脳領域を c-fos 発現を指標にして比較した。その結果、社会的認知記憶固定化誘導時と同様に、前頭前野、前帯状皮質、扁桃体基底外側部では、新規及び既知どちらの幼若マウスを提示した場合でも顕著な c-fos 発現誘導が観察された。しかし、海馬では既知の幼若マウスを提示した場合には c-fos 発現誘導は観察されないことが明らかになった。従って、海馬はマウスの新規性を認識する機構に関与しており、新規のマウスと認識した場合のみ活性化されることが示唆された。

social recognition, memory, discrimination

講演番号：2C03p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ C 校舎 03 会場

前脳領域 BMAL1 による記憶想起のサーカディアン制御

Time-dependent regulation of memory retrieval by forebrain BMAL1

○長谷川 俊介[1,2]、細田 浩司[1]、張 悦[1,2]、太田 美穂[1]、岡田 辰太郎[1]、谷水 俊之[1]、Frankland Paul[3]、Josselyn Sheena[3]、喜田 聡[1,2]（[1]東農大応生科バイオ、[2]科学技術振興機構 CREST、[3]トロント大学）
○Shunsuke HASEGAWA[1,2], Hiroshi HOSODA[1], Yue ZHANG[1,2], Miho OHTA[1], Shintaro OKADA[1], Toshiyuki TANIMIZU[1], Paul Frankland[3], Sheena Josselyn[3], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dept. Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]CREST, JST, [3]Univ. of Toronto)

認知機能や記憶に時刻の影響があることは知られているが、この影響を媒介する分子メカニズムは不明である。哺乳類において、サーカディアンリズムは多くの生理や行動のプロセスを制御している。サーカディアンリズムの中枢は視床下部の視交叉上核（SCN）であり、SCN は行動のリズムを産生し、末梢組織で発振するリズムを同調させる役割を果たしている。細胞レベルのサーカディアンリズムを制御する中心的な遺伝子は転写調節因子 BMAL1 であり、BMAL1 による転写制御によりサーカディアン転写リズムが産生されることが知られている。我々は、学習・記憶能力と前脳領域で発振しているサーカディアン転写リズムとの関係を明らかにするために、前脳特異的にドミナントネガティブ型 BMAL1（dnBMAL1）を発現するマウス（dnBMAL1 マウス）を作製し、解析してきた。これまでに、dnBMAL1 マウスでは時間帯特異的に海馬依存性記憶の想起に障害が観察されることを報告しているが、今回は、dnBMAL1 マウスの生化学的・行動学的解析をさらに進めた結果をまとめて報告する。dnBMAL1 マウスの海馬 CA1 領域では、野生型マウスと比較して CLOCK/BMAL1 標的遺伝子群（DBP、PER2）の発現レベルが有意に減少しているものの、SCN では DBP、PER2 の発現に異常は観察されず、さらに、この結果に一致して、SCN に依存する概日行動リズムにも異常は認められなかった。以上より、dnBMAL1 マウスでは前脳領域特異的にサーカディアンリズムが破壊されていることが示唆された。また、行動学的解析から、dnBMAL1 マウスは記憶形成には障害を示さないものの、明期開始 8～12 時間後（ZT8-12）においてのみ、海馬依存性記憶の想起に障害を示すことが示唆された。さらに、c-fos の遺伝子発現を指標にした免疫組織染色法を用いて、恐怖文脈記憶想起時の dnBMAL1 マウス海馬の活性化状態を評価した。その結果、dnBMAL1 マウスでは、恐怖記憶を形成させた文脈に再エクスポージャーさせることで、ZT4 では野生型マウスと同程度の c-fos 発現誘導が観察されたものの、ZT10 では c-fos の発現誘導が観察されなかった。従って、dnBMAL1 マウスでは、行動レベルの記憶想起の障害に相関して、ZT10 付近では海馬も活性化されず、生化学的観点からも海馬において記憶想起が起こっていないことが明らかになった。この結果から、dnBMAL1 マウスでは ZT10 付近で記憶表出に障害が起こっているのではなく、記憶想起自体、すなわち、記憶回路の再活性化に障害が起こっていることが強く示唆された。さらに、野生型マウスにおいても、海馬 BMAL1 mRNA レベルの低下に伴って ZT10 付近で記憶想起効率の低下が観察されることが明らかとなった。以上の結果から、記憶想起のサーカディアン制御基盤が存在し、この制御に BMAL1 が中心的役割を果たすことが明らかとなった。

BMAL1, memory, circadian rhythm

講演番号：2C03p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ C 校舎 03 会場

転写因子 CREB の恒常的活性化は学習速度を向上させる
Enhanced learning by constitutive activation of CREB

○芹田 龍郎[1]、福島 穂高[1,2]、喜田 聡[1,2] ([1]東京農大院、[2]JST・CREST)
○Tatsurou SERITA[1], Hotaka FUKUSHIMA[1,2], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Tokyo Univ.of Agriculture, [2]JST, CREST)

我々は、転写因子 CREB による転写の阻害により長期記憶に障害が観察されることから、長期記憶形成には CREB による遺伝子発現が必須であることを明らかにしてきた。さらに、恒常活性化型 CREB 変異体 (CREB DIEDML) を前脳領域で発現する変異型マウス(DIEDML マウス)を作製し､学習･記憶制御に対する CREB 活性化（gain of function）の効果を行動学的・生理学的に解析し、CREB 活性化により記憶能力及び海馬長期増強（LTP）が向上することを明らかにした。以上の一連の解析の過程で、興味深いことに、DIEDML マウスでは、長期記憶のみならず、短期記憶の向上も観察されることを報告してきた。本年度は、DIEDML マウスを用いて、学習能力に対する CREB 活性化の効果を解析した結果を報告する。時間間隔を空けて条件刺激(CS; 音)と非条件刺激(US; 電気ショック)を提示して、CS と US の関連付けを学習させる痕跡恐怖条件付け課題（trace fear conditioning）を用いて、DIEDML マウスの学習能力を解析した。その結果、強い非条件刺激（0.2 mA）用いた場合には DIEDML マウスは野生型マウスと同程度の学習能力を示したものの、弱い非条件刺激（0.05 mA）用いた場合には、DIEDML マウスは野生型マウスよりも速く CS と US の関連づけを学習することが明らかとなった。さらに、モリス水迷路課題を用いて DIEDML マウスの学習速度を解析した。水迷路における水面下に設置した足場（hidden platform）の位置を毎日変更し、マウスをプールに放して足場を探させる試行を 1 日 4 回、連日行った（トレーニング)。トレーニング開始当初こそ、DIEDML マウスは野生型マウスと同程度の学習能力を示したが、トレーニングを重ねるに連れて、各日の 1 回目の試行で足場の位置を学習できるようになった。以上の結果から、DIEDML マウスは優れた学習能力を示し、高い難度の学習課題においても、素早く学習できることが明らかとなった。従って、CREB 情報伝達系が長期記憶・短期記憶のみならず、学習能力をも正に制御することが示唆された。現在、DIEDML マウス脳内ニューロンの形態学的解析を進め、CREB 活性化による学習能力向上のメカニズム解明を試みている。

CREB, learning, dendritic spine

講演番号：2C03p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ C 校舎 03 会場

カルシニューリンを起点とした想起後の受動回避記憶強化
Enhancement of inhibitory avoidance memory after retrieval through calcineurin-induced proteasome-dependent protein degradation
○福島 穂高[1,2]、張 悦[1,2]、石川 理絵[1]、金 亮[1]、喜田 聡[1,2]（[1]東京農大・応生科・バイオ、[2]JST, CREST）
○Hotaka FUKUSHIMA[1,2], Yue ZHANG[1,2], Rie ISHIKAWA[1], Ryang KIM[1], Satoshi KIDA[1,2]
([1]Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, [2]CREST, JST)

想起された恐怖記憶は、プロテオソーム依存的なタンパク質分解を介して不安定化され、遺伝子発現依存的な再固定化のプロセスを経ることで再安定化される。再固定化は想起された記憶の維持や強化に関わると考えられているものの、その意義は明らかにされていない。そこで我々は、恐怖記憶再固定化の意義を理解するために、受動的回避反応課題を用いて恐怖記憶再固定化の制御機構を解析してきた。現在までに、受動回避記憶が想起されると、１）恐怖記憶が強化され（強くなる)、この課題では再固定化により記憶が強化されること、２）扁桃体は再固定化と強化の両方の責任領野であり、一方、海馬と前頭前野は強化の責任領野であること、３）これら領野において、プロテオソーム依存的なタンパク質分解と遺伝子発現の両方が誘導されることを示した。本年度は、受動回避記憶再固定化と強化に対する脱リン酸化酵素カルシニューリンの役割について解析した結果を報告する。まず、カルシニューリン阻害剤 FK506 (5μg) の局所注入により、再固定化と強化に対するカルシニューリンの役割を解析した。扁桃体に FK506 を局所注入した結果、受動回避記憶強化が妨げられ、また、タンパク質合成阻害剤アニソマイシン（Ani, 62.5μg）と FK506 の同時注入の結果、Ani による受動回避記憶再固定化の阻害も妨げられた。よって、扁桃体ではカルシニューリンが起点となって受動回避記憶の再固定化と強化が誘導されることが示唆された。一方、海馬または前頭前野に FK506 を局所注入した場合でも、受動回避記憶強化が観察されず、海馬と前頭前野におけるカルシニューリン活性化も強化に必須であることが示唆された。続いて、初期応答遺伝子である c-fos 発現誘導及びポリユビキチン鎖（Ub-Lys48）の増加を指標とした免疫組織化学染色法を用いて、カルシニューリンを起点とする記憶強化のメカニズムを解析した。受動回避記憶想起時に FK506 (5 mg/kg) を腹腔内投与した結果、扁桃体、海馬、前頭前野における c-fos の発現誘導は認められたものの、Ub-Lys48 レベルの増加は阻害された。従って、カルシニューリンはプロテオソーム依存的なタンパク質分解系の活性化を誘導すること、一方、カルシニューリンは強化に必要な転写因子 CREB 依存的な遺伝子発現誘導には関与しないことが明らかとなった。以上より、恐怖記憶が想起されるとカルシニューリンを起点としたプロテオソーム依存的タンパク質分解系により不安定化が誘導され、想起された記憶が強化されることが示された。

Memory reconsolidation, Memory enhancement, Amugdala

講演番号：2C03p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ C 校舎 03 会場

NMDA 受容体阻害剤メマンチンによる海馬依存性記憶の破壊
Erasure of hippocampus-dependent memory by memantine

○石川 理絵[1]、Paul W. Frankland[2]、喜田 聡[1,3] ([1]東農大院・農・バイオ、[2]University of Toronto、[3]CREST,JST)
○Rie ISHIKAWA[1], W. Frankland Paul[2], Satoshi KIDA[1,3] ([1]Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]University of Toronto, [3]CREST,JST)

恐怖記憶は動物が危険を回避するための防御機構の一つであるが、恐怖記憶制御の破綻は心的外傷後ストレス障害（PTSD）などの重篤な精神疾患を引き起こす。現在、最も効果的な PTSD の認知行動療法としてエクスポージャー療法が知られているが、長時間の治療による高いコストを要するため、治療期間の短縮が望まれている。さらに、このエクスポージャー療法の生物学的基盤は「恐怖記憶消去」であることが世界的にも認識されている。しかし、恐怖記憶消去を誘導したとしても、恐怖記憶は破壊される（失われる）わけではなく、一定の期間経過後に、恐怖記憶が自然回復する現象が知られており、この自然回復は PTSD の根治を導く上での障害と考えられている。一方、我々の研究グループでは、海馬神経新生の亢進が海馬依存性記憶を喪失させることを示唆し、また、NMDA 受容体非競合的阻害剤であるメマンチンの高濃度投与により成体海馬神経新生が著しく亢進することを示している。以上の背景から、本研究では、海馬依存的恐怖記憶に対するメマンチン投与の効果を解析した。マウスに恐怖文脈条件付けを施した後、メマンチン（50 mg/kg body weight）を 1 週間後に単回、あるいは、1 週間毎に計 4 回腹腔内投与し、恐怖条件付け 4 週間後の恐怖記憶を評価した。その結果、メマンチンの投与回数依存的な恐怖記憶の減弱が観察された。さらに、この一ヶ月後に再び恐怖記憶を評価した場合でも、恐怖記憶の自然回復は観察されなかったため、恐怖記憶消去誘導による恐怖記憶の減弱とは異なり、メマンチン投与によって一時的に恐怖記憶が減弱するわけではなく、恐怖記憶が破壊されることが強く示唆された。このようなメマンチン投与による記憶破壊は、海馬依存的な恐怖記憶である受動回避記憶においても観察された。また扁桃体依存的な音条件付け恐怖記憶ではメマンチン投与による影響は観察されず、一方、NMDA 受容体阻害剤 CPP あるいは ifenprodil を投与した場合には、恐怖記憶破壊は観察されなかった。従って、記憶破壊はメマンチン依存的であること、メマンチン投与による記憶破壊は海馬依存的記憶に限定されることが示唆された。以上までのメマンチン投与による恐怖記憶の破壊は、恐怖条件付け直後に観察されているが、現在、メマンチン投与により、恐怖条件付け後長期間経過した海馬非依存性恐怖記憶を破壊する方法を検討している。以上の結果は、メマンチンを利用した新たな PTSD 治療法開発に貢献するものと考えられる。

adult neurogenesis, memantine, fear memory

講演番号：2C03p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ C 校舎 03 会場

恐怖記憶固定化に対するヒストン修飾の役割の解析

Roles of histone modifications in consolidation of fear memory

○天野 翔次郎[1]、喜田 聡[1,2] ([1]東農大院・農・バイオ、[2]CREST,JST)
○ Shojiro AMANO[1], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]CREST,JST)

記憶は数分から数時間程度しか保持されない不安定な短期記憶と、数日から最長で一生保持される安定な長期記憶に大別される。短期記憶は新規遺伝子発現依存的な固定化のプロセスを経て長期記憶として保持される。ヒストンに対するアセチル化、メチル化及びリン酸化などの翻訳後修飾によるクロマチンリモデリングは転写制御に重要な役割を果たしており、記憶制御にも関わることが最近明らかになりつつある。しかし、組織学的観点からの記憶固定化に対するヒストン修飾の役割の解析、すなわち、ヒストン修飾が起こったニューロンの同定やそのニューロンの性状解析はほとんど行われていないのが現状である。そこで、本研究では、免疫組織染色を用いて、恐怖記憶固定化時にヒストン修飾が誘導されるニューロンの同定を試みた。恐怖記憶固定化誘導のため、電気ショックチャンバーにマウスを入れ、148 秒後に 0.4mA の電気ショックを 2 秒間与え、その 30 秒後にマウスを取り出した（Shock+群）。その 90 分後に灌流固定を行い、脳を摘出、凍結した。コントロール群として、電気ショックを与えなかった群（Shock-群）と、何の処置も施さなかった群（Home cage 群）を設定した。抗ヒストン H3S10 リン酸化 K14 アセチル化抗体（以下、H3S10pK14ac）を用いた免疫組織化学染色法により、転写活性化マーカーとなるヒストン H3 の 10 番目のセリンリン酸化と 14 番目のリジンアセチル化が誘導された H3S10pK14ac 陽性細胞を解析した。その結果、Shock+群では、Shock-群及び Home cage 群と比較して海馬における H3S10pK14ac 陽性細胞数が顕著に多くなっていた。従って、海馬領域において恐怖記憶固定化時にヒストン H3 リン酸化アセチル化修飾を介した転写活性化が誘導されることが示唆された。現在、海馬以外の脳領域におけるヒストン H3 のリン酸化及びアセチル化レベルの解析を行っている。

memory, histone, chromatin

講演番号：2C03p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ C 校舎 03 会場

海馬におけるポリ ADP リボシル化による恐怖記憶の制御

Regulation of contextual fear memory by poly ADP-ribosylation in the hippocampus

○稲葉 洋芳[1]、塚越 昭紀[1]、喜田 聡[1,2] ([1]東京農大院・農・バイオ、[2]JST・CREST)
○Hiroyoshi INABA[1], Akinori TSUKAGOSHI[1], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]CREST, JST)

獲得した情報は不安定な短期記憶として一時的に脳内に保持され、新規遺伝子発現依存的な固定化のプロセスを経ることで、安定な長期記憶として貯蔵される。固定化された記憶は想起されることにより不安定化され、再貯蔵のために記憶再固定化のプロセスを必要とする。一方、恐怖記憶想起後には消去のプロセスも誘導され、恐怖記憶が減弱される。想起後に誘導される再固定化と消去の対照的な二つのプロセスも新規遺伝子発現を必要とする。Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) はヒストンや転写因子など核タンパク質に対するポリ ADP リボースの共有結合（ポリ ADP リボシル化）を触媒し、転写制御に関わることが知られている。近年の研究から、PARP によるポリ ADP リボシル化は神経可塑的変化や記憶形成に重要な役割を果たすことが示唆されているが、記憶の中枢である海馬における役割は不明である。そこで、本発表では、恐怖条件付け文脈学習課題を用いて、恐怖記憶制御に対する海馬におけるポリ ADP リボシル化の役割を行動薬理学的に解析した結果を報告する。恐怖条件付け時に PARP 阻害剤である 3-aminobenzamide（3AB）をマウスの海馬に局所注入した場合、恐怖条件付けの 2 時間後の短期記憶には影響が観察されなかったものの、恐怖条件付けの 24 時間後の長期記憶形成が薬剤濃度依存的に阻害された。従って、海馬におけるポリ ADP リボシル化は恐怖記憶の固定化に必須であることが示唆された。同様に、再固定化誘導時に海馬に 3AB を局所注入した場合、再固定化誘導の 2 時間後には記憶に影響が観察されなかったものの、再固定化誘導の 24 時間後には記憶の破壊が観察された。従って、海馬におけるポリ ADP リボシル化は恐怖記憶の再固定化に必須であることが示唆された。対照的に、消去誘導時に海馬に 3AB を局所注入した場合、恐怖記憶消去の獲得及び消去誘導の 24 時間後における消去の維持に影響が観察されなかったことから、海馬におけるポリ ADP リボシル化は恐怖記憶の消去に必須でないことが示唆された。以上の結果から、恐怖記憶の固定化及び再固定化に対する海馬におけるポリ ADP リボシル化の重要性が明らかとなった。

contextual fear memory, poly ADP-ribosylation, hippocampus

講演番号：2C03p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ C 校舎 03 会場

ビタミン B1 欠乏は海馬依存的学習・記憶形成の障害を誘導する

Thiamine deficiency induces deficits in hippocampus-dependent memory formation

○岸本 拓也[1]、大石 諭[1]、永田 幹[1]、長谷川 俊介[1,2]、喜田 聡[1,2]（[1]東農大院農、[2]科学技術振興機構・CREST）
○Takuya KISHIMOTO[1], Satoru OHISHI[1], Kan NAGATA[1], Shunsuke HASEGAWA[1,2], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dep.of Bio,Tokyo Univ. of Agri, [2]JST,CREST)

必須栄養素の一つであるビタミン B1（B1）は糖代謝系や ATP 産生に対する補酵素として機能するばかりではなく、神経系の機能維持にも重要な役割を果たすことが示されている。特に、ヒトにおけるウェルニッケコルサコフ症候群を代表例として、B1 欠乏が記憶障害を引き起こすことが明らかにされているが、その発症メカニズムは不明である。我々は過去の大会において、B1 欠乏回復マウスを作製・解析し、B1 欠乏回復マウスに記憶障害が観察されたことを示してきた。本大会では B1 欠乏と記憶形成能力の関係性をより詳細に解析し、さらに、B1 欠乏の影響を組織学的に解析した結果を報告する。C57/Bl6N マウスに B1 欠乏飼料を 10 日間給餌し、この間 B1 アンタゴニストであるピリチアミンを連日腹腔内投与し、B1 欠乏状態を誘導した。その後、通常飼料を 3 週間以上給餌し、B1 欠乏状態から回復させることで B1 欠乏回復マウスを作製した。B1 欠乏回復マウスでは、正常な運動能力及び行動活性が観察され、情動行動においても異常は観察されなかった。海馬依存的学習課題である新規物体認知記憶課題、恐怖条件付け文脈記憶課題、及び空間記憶課題を用いて記憶能力を評価した結果、B1 欠乏から 3 週間の回復処置を施した B1 欠乏回復マウスでは、重篤な記憶形成能力の障害が観察され、この記憶障害は、3 ヶ月間後にも同様に観察された。以上の結果から、B1 欠乏によって海馬依存的記憶形成能力の障害が誘導され、この障害は、少なくとも 3 ヶ月は持続する慢性的なものであることが示唆された。一方、扁桃体依存的学習課題である恐怖音条件付け記憶課題及び味覚嫌悪記憶課題に供した結果、どちらの記憶課題においても、B1 欠乏回復マウスにおける記憶形成能力の障害は観察されなかった。以上より、B1 欠乏による海馬の記憶機能に障害が誘導されることが示唆された。また、B1 欠乏から 3 ヶ月の回復期間を設けたマウスの脳形態を解析した結果、脳室の拡大と海馬の萎縮が観察された。現在、B1 欠乏が脳形態に与える影響をより詳細に評価しており、以上の結果をまとめて報告する。

memory, hippocampus, Vitamin B1

講演番号：2C03p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ C 校舎 03 会場

マウスとヒト組織における哺乳類キチナーゼ mRNA レベルの解析

Analysis of mammalian chitinase mRNA levels in human and mouse tissues

○大野 美紗[1]、富樫 勇斗[1]、津田 京子[1]、大川 一明[1]、釜谷 美則[2]、坂口 政吉[1]、菅原 康里[1]、小山 文隆[1] ([1]工学院大学工学部応用化学科、[2]工学院大学工学部環境エネルギー化学科)
○ Misa OHNO[1], Yuto TOGASHI[1], Kyoko TSUDA[1], Kazuaki OKAWA[1], Minori KAMAYA[2], Masayoshi SAKAGUCHI[1], Yasusato SUGAHARA[1], Fumitaka OYAMA[1] ([1]Department of Applied Chemistry, Kogakuin Univ., [2]Department of Environmental and Energy Chemistry, Kogakuin Univ.)

キチンは，*N*-アセチル-D-グルコサミンの重合体で，甲殻類，昆虫，寄生虫，真菌類など様々な生物に広く存在する。キチナーゼは，キチンを加水分解する酵素である。哺乳類は，キチンを合成しないが，二種類の活性のあるキチナーゼを発現している。マウスとヒトでは，chitotriosidase (Chit1) と acidic mammalian chitinase (AMCase) が知られている。Chit1 は哺乳類で最初に発見されたキチナーゼで，ゴーシェ病，アルツハイマー病，慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者や喫煙者でレベルが増加する。他方，AMCase は酸性領域に至適 pH をもち，喘息，アレルギーモデルマウスで多量に発現される。これら二種のキチナーゼの役割として，キチンを含む有害生物（寄生虫，ダニ，真菌類）への生体防御としての機能が考えられている。しかし，これら哺乳類キチナーゼの生物・医学的役割について，不明な点が多い。我々は，哺乳類キチナーゼの機能解明のため，これらの遺伝子の発現レベルの解析を行った。これまでに二種類のキチナーゼと housekeeping 遺伝子などの対照遺伝子の発現を同じ尺度で定量する手法を確立し，マウスでは AMCase が胃で，消化酵素並みの非常に高いレベルで発現することを見出した。この定量法を応用し，ヒトとマウス組織間でのキチナーゼ mRNA レベルを定量した。その結果，Chit1 の発現レベルはヒトとマウスの肺でほぼ同じレベルであった。一方，AMCase はマウスの胃で過剰に発現していたが，ヒトの胃ではほとんど発現していなかった。次に，マウスとヒトでの AMCase mRNA レベルの差がタンパク質レベルの差として反映されているかどうか調べた。4-methylumbelliferyl β-D-*N, N'*-diacetylchitobiose (4MU-chitobiose) を基質に，pH 2.0 と pH 5.0 で胃組織の酵素活性を測定した。その結果，マウスの胃の抽出液において，pH 2.0 で高いキチナーゼ活性を検出し，pH 5.0 でも同様に強い活性を検出した。一方，ヒトでは pH 2.0 では活性が検出できず，pH 5.0 でも非常に低い活性であった。さらに，AMCase 抗体は，マウスの胃の抽出液では強い一つのタンパク質バンドを検出できたが，ヒトの胃ではそのシグナルが認められなかった。従って，ヒトとマウスの胃での mRNA レベルの違いは，キチン分解活性とタンパク質発現レベルに反映されていた。これらの結果は，胃における AMCase の発現レベルが種特異的であることを示している。以上のことから，マウスの胃の AMCase は，キチン含有病原体に対する生体防御とキチン含有食物を分解する主要な消化酵素としての役割を果たしていると考えられる。

quantitative real-time PCR, Acidic mammalian chitinase, Chitotriosidase

講演番号：2C03p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ C 校舎 03 会場

転写因子 ATF5 による嗅覚受容体の発現調節

The role of ATF5 transcription factor on the expression of mouse olfactory receptors

○金子 将人、雨宮 ゆう子、中野 春男、梅村 真理子、高橋 滋、高橋 勇二（東薬大生命・環境応用動物）
○ Masato KANEKO, Yuko AMEMIYA, Haruo NAKANO, Mariko UMEMURA, Shigeru TAKAHASHI, Yuji TAKAHASHI (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

嗅覚は哺乳動物における食物の探索行動や、生殖行動及び社会行動に重要な役割を担っている。匂い物質を検出する嗅上皮には嗅覚受容体を発現した嗅細胞が存在し、そして 1 個の嗅細胞には 1 種類の嗅覚受容体のみが発現していることが知られている。嗅細胞における嗅覚受容体の発現には、転写因子やエピジェネティクスの関与が考えられているが未だ不明な点が多い。Activating transcription factor 5 (ATF5)は低酸素、重金属暴露、及びアミノ酸欠乏ストレス応答性を持つ CREB/ATF ファミリーに属する転写因子であり、マウス嗅上皮において mRNA が高発現している。また、我々が作製した ATF5 遺伝子欠損型マウスにおいては、嗅球サイズの減少や嗅細胞分化の抑制が見出されており ATF5 と嗅覚形成との関連が示されている。本研究において、我々は嗅上皮における 11 種類の嗅覚受容体の mRNA 発現量を定量 PCR 法により調べたところ、9 種類の嗅覚受容体について野生型と ATF5 遺伝子欠損型との間に発現量の差異が認められた。次に 2 種類の嗅覚受容体（Olfr524, Olfr729）のプロモーター領域を pGL3 ルシフェラーゼ発現プラスミドにクローニングした。これらのレポータープラスミドと ATF5 発現プラスミドを HEK293 細胞にリポフェクト導入しルシフェラーゼ活性を測定したところ、ATF5 強制発現により Olfr729 レポーターのルシフェラーゼ活性が増加した。これらの結果から ATF5 が嗅細胞における嗅覚受容体の発現を調節しうることが示めされた。

CREB/ATF, Olfactory receptor, Mouse

講演番号：2C03p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ C 校舎 03 会場

プロリン異性化酵素 Pin1 による P 糖タンパク質の発現制御機構の解析
Peptidyl prolyl cis/trans isomerase Pin1 regulates P-glycoprotein expression level
○川邉 庸介、坂場 義正、内田 隆史（東北大院農）
○YOSUKE KAWABE, YOSHIMASA BANBA, TAKAFUMI UCHIDA (Tohoku Univ.)

ATP-binding cassette transporters の一種である P 糖タンパク質（P-glycoprotein ： Pgp）は、非特異的と思えるほど様々な構造の化合物を基質として細胞外に輸送することから、抗癌剤をはじめとした薬剤の体内動態を調節する重要な因子であると考えられている。癌細胞では抗癌剤への暴露により Pgp の発現が誘導され、複数の抗癌剤に対して同時に非感受性になることがある。この問題は癌を治療する上で大きな障壁となっているが、その詳しいメカニズムは分かっていない。

Pin1 はタンパク質中のリン酸化 Ser/Thr-Pro を特異的に認識し、同部位の異性化を触媒することでターゲットタンパク質の構造と機能を変化させる酵素である。Pin1 は基質に CyclinD1, p53, c-myc など癌に関係するタンパク質が多く、癌との深い関わりが示唆されている。我々は癌治療にとって重大な問題である薬剤耐性に関して、この形成に関わる Pgp の発現が Pin1 によって制御されている可能性について検討した。

野生型および Pin1 ノックアウトマウス由来の胎児繊維芽細胞（MEF）に対して抗癌剤 Doxorubicin を暴露し、Pgp の発現を誘導させた。Western blot などによる解析から、Pin1 欠損下では Doxorubicin に対する Pgp の発現誘導が野生型に比べ過剰に起こることが明らかになった。しかし、この過剰な誘導は Pin1 をレスキューすることで無効化されたことから、Pin1 は Doxorubicin に対する Pgp の発現誘導を抑制する因子であることが示された。

Pgp 発現を抑制する因子であるとされる p53 は、Pin1 により活性化されることが報告されている。このことから、Pin1 は p53 を介して Pgp の発現誘導を抑制していると考えた。しかし、Pin1 と p53 をともに欠損した MEF での解析から、Pin1 は p53 に依存しない経路でも Pgp の発現誘導を抑制することが明らかになった。

p53 以外の Pin1 が作用する因子として、我々は Forkhead box O3 (FoxO3)に着目した。FoxO3 はストレス刺激に応じて活性化し、Pgp の発現を促進することが報告されている。この報告をもとに、我々は本研究でも Pgp の発現誘導と対応して FoxO3 の発現も上昇していることを見出した。さらに、FoxO3 の分解系を阻害した実験から、Pin1 は FoxO3 の分解を促進していることが示唆された。

以上の結果から、Pin1 は FoxO3 の分解を介して Doxorubicin に対する Pgp の発現誘導を抑制することが示唆された。

P-glycoprotein, peptidyl prolyl cis/trans isomerase, proteasomal degradation

講演番号：2C03p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ C 校舎 03 会場

GATA2 によるマスト細胞の ST2 遺伝子発現制御機構

GATA2 regulates *ST2* gene expression in mast cells

○笠倉 和巳[1]、八代 拓也[1]、奥村 康[2]、西山 千春[1] ([1]東京理科大学 生物工、[2]順天堂大学 医 免疫学)
○KAZUMI Kasakura[1], TAKUYA Yashiro[1], KO Okumura[2], CHIHARU Nishiyama[1] ([1]Department of Biological Science and Technology, Tokyo University of Science, [2]Department of Immunology, Juntendo University School of Medicine)

ゲノムワイド関連解析により ST2 遺伝子がアトピー疾患の発症と関連があることが報告された。また、ST2 のリガンド IL-33 は近年アレルギー反応への関与が注目されている。ST2 遺伝子は膜結合型 ST2L と選択的スプライシングにより生じる分泌型 sST2 をコードしている。ST2 発現には 2 つのプロモーターが存在し、それらは細胞種によって選択的に使い分けられている。マスト細胞においては主に distal プロモーターが使われていることが報告されているが、プロモーターの使い分けやスプライシングを制御するメカニズムは明らかにされていない。これまでに我々は、distal プロモーターの解析によりマスト細胞において ST2L 発現を制御する転写因子として GATA2 を同定した。一方、sST2 の発現制御機構はまだ十分明らかにされていない。そこで、ヒトマスト細胞株 LAD2 を用いて、マスト細胞における sST2 発現制御機構の解明を試みた。まず、ST2 遺伝子産物のバリアントの発現が distal および proximal プロモーターのどちらの制御下にあるのか検討した。その結果、ST2L 発現には distal プロモーターが、sST2 発現には distal と proximal プロモーターの両方が関与していた。そこで、distal プロモーターに加えて proximal プロモーターについてレポーターアッセイを行った結果、転写開始点上流約 500bp 領域に転写活性化配列があることが示された。また、その領域には 2 つの GATA 結合サイトが存在していることから抗 GATA1 および抗 GATA2 抗体を用いて ChIP アッセイを行った結果、GATA2 のみに結合が認められた。次に GATA2 siRNA 導入による sST2 発現を解析した結果、GATA2 のノックダウンにより ST2L に加えて sST2 の mRNA 発現及び sST2 産生が抑制された。以上の結果から、マスト細胞の ST2L および sST2 発現は GATA2 が直接 ST2 遺伝子の distal および proximal プロモーター活性を調節することにより制御されていることが示された。

mast cells, GATA2, ST2

講演番号：2C03p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ C 校舎 03 会場

樹状細胞における OX40L 発現制御機構の解析

Gene expression of OX40L in dendritic cells

○八代 拓也[1]、奥村 康[2]、西山 千春[1,2] ([1]東京理科大基礎工、[2]順大医)
○Takuya YASHIRO[1], Ko OKUMURA[2], Chiharu NISHIYAMA[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Sci., [2]Juntendo Univ.)

【背景】全身に広く分布する樹状細胞 (DC)は抗原を捕捉すると活性化し、断片化した抗原を MHC class II に乗せて提示すると共に、サイトカインや補助刺激分子を高発現することで、抗原特異的な T 細胞分化を誘導する。これまでに我々は、血球系細胞特異的転写因子 PU.1 が、MHC class II の発現を制御していることをはじめとして、DC による適応免疫誘導に重要であることを報告してきた。OX40L (OX40 ligand)は、TNFSF (Tumor necrosis factor super family)に属し、DC の成熟化に伴って発現し、T 細胞表面に存在する OX40 に結合することで、Th9 や Treg (regulatory T cell)への分化を誘導することが報告されている。本研究では、DC において PU.1 が OX40L の発現を制御するかについて検討した。
【方法・結果】BALB/cマウス由来骨髄細胞をGM-CSF存在下で培養し、BMDC (Bone marrow-derived DC)を得た。これにPU.1 siRNAを導入した後、LPSで刺激して、OX40Lの発現をReal-time RT-PCR及びFACSにて解析した。その結果、PU.1ノックダウンによりOX40LのmRNA量およびタンパク質量共に減少することが確認された。マウスOX40Lのプロモーター領域をクローニングし、構築したレポータープラスミドをマウス樹状細胞株JAWSIIに導入して、挿入断片のプロモーター活性をLuciferase assayにて評価した。その結果、転写開始点直上域に転写調節領域が複数存在することが示唆された。BMDCにおいて、クロマチン上のこの領域へのPU.1の結合をChIP assayにより解析したところ、その他の領域に比べて有意にPU.1の結合が多いことが示された。さらに、ヒト末梢血由来単核細胞をGM-CSF及びIL-4存在下で培養して作製したヒトDCにおいても、同様にChIP assayを行ったところ、転写開始点直上域にPU.1が結合していることが示された。以上の結果から、DCにおいてPU.1は、OX40Lのプロモーター領域に結合し、転写を正に制御していることが明らかになると共に、この機構は種間で保存されていることが示唆された。

PU.1, OX40L, dendritic cells

講演番号：2C03p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ C 校舎 03 会場

骨格筋 LPL 発現調節における AMPK の役割

The role of AMPK in skeletal muscle LPL expression

○佐々木 崇[1]、中田 理恵子[2]、井上 裕康[2]、清水 誠[1]、井上 順[1]、佐藤 隆一郎[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]奈良女大院・人文科・食栄)
○Takashi SASAKI[1], Rieko NAKATA[2], Hiroyasu INOUE[2], Makoto SHIMIZU[1], Jun INOUE[1], Ryuichiro SATO[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Nara Women's Univ)

【目的】近年、先進国を中心にメタボリックシンドロームが深刻な社会問題となっている。メタボリックシンドロームの予防および治療にあたっては、運動療法が非常に効果的である事がよく知られている。特に運動時に骨格筋で活性化する LPL(Lipoproteon lipase)は脂質代謝改善効果に重要な役割を担うと考えられており、LPL 発現量のコントロールはメタボリックシンドロームの予防・治療において重要な課題の 1 つとなっている。そこで骨格筋における LPL 発現上昇メカニズムを分子レベルで明らかにする事を目的とし、研究を行った。
【方法・結果】4 週間に渡りトレッドミル走行運動を負荷したマウスから骨格筋を採取し、qPCR により遺伝子発現変動を解析した。従来の報告通り、運動後の骨格筋では LPL の発現亢進が確認されたが、この時、核内受容体 PPAR(Peroxisome proliferator-activated receptor)γ の発現が上昇している事を新たに見出した。我々は PPARγ が骨格筋において LPL 発現を調節している可能性が有ると考え、マウス由来培養骨格筋細胞 C2C12 にレンチウィルスを用いて PPARγ を過剰発現し、遺伝子発現変動を調べた。解析の結果、PPARγ の過剰発現により LPL 発現が大きく亢進する事を明らかにした。更に我々は、骨格筋における PPARγ 発現調節メカニズム解析を試みた。その結果、運動時に細胞内エネルギーの枯渇を感知して活性化するエネルギーセンサータンパク質 AMPK(AMP-activated protein kinase)が PPARγ 発現を mRNA レベルで調節する事、そしてその一部は PPARγ mRNA の安定化を介したものである事を明らかにした。最後に、AMPK が PPARγ 発現亢進を介して LPL 発現を調節している事を確認するため、shRNA により PPARγ をノックダウンした C2C12 細胞への AMPK 活性化剤 AICAR 投与実験を行った。その結果、control 群の C2C12 では AICAR 投与により LPL 発現が上昇したのに対し、PPARγ をノックダウンした C2C12 ではこの応答が抑制される事が明らかとなった。以上の結果より、筋細胞では AMPK の活性化により、PPARγ mRNA の安定化を介した発現亢進が誘導され、それにより LPL の発現調節がなされている事が明らかになった。本研究で明らかになった AMPK-PPARγ-LPL 経路は、運動による骨格筋 LPL 発現亢進を説明し得るものであり、新たなメタボリックシンドローム予防法確立の一助となる事が期待される。

AMPK, PPARγ, LPL

講演番号：2C03p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ C 校舎 03 会場

ゼブラフィッシュを用いた Chondromodulin-I の軟骨特異的な転写制御機構の解析

Analysis of the regulatory mechanisms underlying cartilage-specific expression of Chondromodulin-I

○山下 寛[1]、宿南 知佐[1,2]、開 祐司[1] ([1]京都大・再生研、[2]広島大・医歯薬保健研究院)
○Hiroshi YAMASHITA[1], Chisa SHUKUNAMI[1,2], Yuji HIRAKI[1] ([1]Inst. for Front. Med. Sci., Kyoto Univ., [2]Inst. of Biomed. & Health Sci, Hiroshima Univ.)

近年ますます加速する高齢化社会において、加齢による軟骨の減少・消失が引き起こす関節痛や運動障害の改善は今後の大きな課題であり、再生医療の実践に向けた軟骨組織の形成・維持機構の解明に期待が寄せられている。軟骨は間葉系組織には珍しい無血管な組織であり、無秩序に軟骨に血管が侵入すると軟骨組織が破壊され、リウマチなどの血管新生病が引き起こされることから、軟骨組織の形成・維持には組織が無血管でありつづけることが非常に重要である。Chondromodulin-I (ChM-I) は軟骨マトリックスに蓄積し、軟骨細胞の増殖促進や血管の侵入を阻害することによって、軟骨組織の形成・維持に寄与することが知られているが、その組織特異的な発現制御メカニズムは分かっていない。本研究では、発生過程が透明で、顕微鏡での生体蛍光観察が容易なゼブラフィッシュを用いて、*in vivo* での軟骨組織特異的な *Chm1* 遺伝子の転写制御機構の解明を目指している。

組織特異的な *Chm1* 遺伝子の転写に必要な領域を探索するため、プロモーターを含むと考えられる zebrafish *Chm1* (z*Chm1*) 遺伝子の翻訳開始点上流約 1.5 kbp に *Gal4* 遺伝子を連結したプラスミドを作成し、Gal4 タンパク質の発現に応じて GFP を発現する(UAS-EGFP)トランスジェニックフィッシュ胚にインジェクションした。その結果、*in situ* hybridization で観察される内在性 z*Chm1* 遺伝子の発現パターンと同様、脊索、ヒレ、耳胞および頭部の軟骨において GFP の発現が見られた。*Gal4* 遺伝子に接続する翻訳開始点上流の領域を 300 bp まで短くしても GFP の発現パターンは変化しなかったが、150 bp まで短くすると頭部の軟骨の GFP の発現のみが消失した。そこで、翻訳開始点上流の領域を 300 bp から 150 bp まで徐々に短くし、同様に頭部の軟骨での転写活性を解析した。その結果、翻訳開始点上流の領域を 207 bp まで短くしても頭部の軟骨で GFP の発現が見られたが、181 bp まで短くすると GFP の発現がほとんど消失した。これにより、頭部の軟骨組織における z*Chm1* 遺伝子の発現に、翻訳開始点上流 207 bp から 182 bp の領域が必要であることが示唆された。

そこで、生後 5 日目のゼブラフィッシュ胚から核抽出物を調整し、DNA プルダウン法によって翻訳開始点上流 207 bp および 181 bp の領域に結合するタンパク質を比較した。これにより、翻訳開始点上流 207 bp の領域にのみ結合するタンパク質として、Regulation of nuclear Pre-RNA Domain containing 1B (RPRD1b)を同定した。現在、RPRD1b が z*Chm1* 遺伝子の転写に与える影響を解析中である。また、The JASPAR database を利用したデータベース検索により、翻訳開始点上流 207 bp から 182 bp の領域に結合すると予測された転写因子についても、現在解析を進めている。

Chondromodulin-I, zebrafish, cartilage

講演番号：2C03p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ C 校舎 03 会場

受動的 DNA 脱メチル化に伴う DNA 損傷誘導機構の解明

Mechanism of DNA damage induced by passive DNA demethylation

○奥村 克純、栗谷 健志、生野 彰宏、吉村 健、来馬 啓介、伊藤 克（三重大院生物資源）
○ Katsuzumi OKUMURA, KENJI KURIYA, AKIHIRO IKUNO, TAKESHI YOSHIMURA, KEISUKE KURUMA, SUGURU ITO (Mie Univ.)

【目的】ゲノム DNA のメチル化は，遺伝子発現制御において重要な役割を担うエピジェネティックな機構の１つであり，がんや慢性疾患への関与が示されるなどその役割が注目されている。DNA のメチル化は CpG 配列中のシトシン残基で起こり、維持メチル化酵素 DNA methyltransferase 1 (DNMT1)が DNA 複製で合成された娘鎖に、親鎖のメチル化様式をコピーし DNA のメチル化パターンが保たれる。DNMT1 の欠損や減少によりゲノムワイドな DNA の低メチル化(受動的脱メチル化)が引き起こされるが，同時に DNA 損傷が誘導され，このことから DNA メチル化はゲノムの安定性に寄与していると考えられるが，どのようなメカニズムにより，DNA 損傷を誘導するかについては不明である。
【方法】ノックダウンした細胞，または DNMT 阻害剤 5-aza-2’-deoxycytidine (5-aza-dC)で処理した細胞をもちいて, DNA 損傷マーカーであるγ-H2AX の免疫染色により DNA 損傷レベルを解析した。受動的 DNA 脱メチル化の DNA 複製への影響を解析するために Molecular Combing 法により，複製フォークの解析を行った。また，クロマチン免疫沈降法 (ChIP)により γ-H2AX の蓄積する領域を回収し，次世代シーケンサーによる γ-H2AX 蓄積領域の chip-sequence や，ヒトセントロメア周辺の CpG リッチなリピート配列である human satellite 2 (Sat2), human satellite α (Satα)の回収率を PCR，リアルタイム PCR により解析した。さらにヘミメチル化 DNA を調べるために hairpin-bisulfite sequence 法を用い、CpG リッチの LINE1 配列について一回目の複製後の CpG site を解析した。
【結果】UHRF1 と呼ばれるタンパク質に着目した。UHRF1 は、ヘミメチル化 CpG に特異的に結合し、DNMT1 をヘミメチル化 CpG 配列へリクルートする。DNMT1 により娘鎖がメチル化されると UHRF1 は外れるが、DNMT1 減少細胞では娘鎖をメチル化することができず、UHRF1 はヘミメチル化 CpG に結合したままの状態になる。この UHRF1 が、複製フォーク進行の際に物理的な障害になることが予想され、DNMT1 減少細胞において複製フォーク進行を妨げている一因ではないかと考えた。この仮説をもとにした当研究室の研究で、DNMT1 阻害剤或いは siDNMT1 で細胞を処理すると、複製フォーク進行停止に伴い DNA 損傷が誘導されることを見出した。さらに、DNMT1 の阻害或いは減少によって引き起こされる複製フォーク進行の停止は、ヘミメチル化 DNA に結合して解離できなくなった UHRF1 に、複製フォークが衝突することが原因であるということが示唆された。メチル化阻害時の G1 期におけるメチル化 CpG 領域への UHRF1 の蓄積などについても報告する。

epigenetics, DNA methylation, DNA damage

講演番号：2C03p22
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ C 校舎 03 会場

5-ブロモデオキシウリジンによる老化応答遺伝子のヌクレオソーム構造の変化

Changes in nucleosome structure of the senescence associated genes induced by 5-bromodeoxyuridine

○末松 佑理、山上 義巳、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大（横浜市大生命ナノ）
○Yuri SUEMATSU, Yoshimi YAMAKAMI, Kensuke MIKI, Michihiko FUJI, Dai AYUSAWA (Yokohama City Univ.)

私たちは、チミジン類似体である 5-ブロモデオキシウリジン(BrdU)が、任意の哺乳動物培養細胞を速やかに老化誘導することを見出した。したがって、BrdU の作用機序の解析は老化の機構解明に役立つと考えられるが、その詳細は不明な点が多い。BrdU は DNA に取り込まれてヘテロクロマチンの脱凝集を起こすことから、BrdU はクロマチン構造の変化を介して作用すると考えられる。そこで、BrdU の作用機序を分子レベルで解析するために、出芽酵母のヌクレオソーム形成モデルを採用した。マイクロコッカルヌクレアーゼ(MNase)でリンカーDNA を部分的に切断し、制限酵素で切断後、サザンブロット解析を行いヌクレソーム構造を解析した。これらの解析から出芽酵母において、BrdU は AT-rich 配列特異的にヌクレオソーム構造を破壊し、遺伝子発現が変化させることを明らかにしてきた。

本研究では、ヒト培養細胞を用いて、BrdU がヌクレオソーム構造にどのような影響を与えるのか調べた。ヒト細胞の場合は出芽酵母の系と異なり、主に検出感度の問題からヌクレオソーム構造の解析が難しい。そのため、まず、ヒト細胞において広範囲のヌクレオソーム構造を鋭敏に検出する方法の改良を行った。具体的には、MNase 処理の後、プライマー伸長法および PCR 法によりゲノム DNA を増幅し、得られた DNA に対しサザンブロット解析を行うことで、ヌクレオソーム構造の検出感度の向上を図った。そして、現在、この方法を用いて BrdU 応答遺伝子の近傍におけるヌクレオソーム構造を解析しているので、その結果について報告する。

5-bromodeoxyuridine

講演番号：2C04a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ C 校舎 04 会場

次世代シークエンサーを用いた、マーカーフリー米型経口ワクチン MucoRice-CTB の複数系統および野生型の変異解析および比較

A Genome-Wide Nucleotide Variation Analysis and Comparison among Marker-Free Rice Type Oral Vaccine MucoRice-CTB strains and Wild Type Rice by Next Generation Sequencer

○鹿島 光司[1,2]、目島 未央[1]、黒田 昌治[3]、竹山 夏実[1]、黒河 志保[1]、福山 賀子[1]、清野 宏[1]、幸 義和[1]（[1]東大医科研、[2]朝日工業社、[3]中央農研北陸セ）
○ Koji KASHIMA[1,2], Mio MEJIMA[1], Masaharu KURODA[3], Natsumi TAKEYAMA[1], Shiho KUROKAWA[1], Yoshiko FUKUYAMA[1], Hiroshi KIYONO[1], Yoshikazu YUKI[1] ([1]IMS, The Univ. of Tokyo, [2]Asahikogyosha Co., Ltd., [3]Crop Development Div. NARO)

我々は最近、アグロバクテリウム法を用いた共感染法によりイネ（*Oryza sativa* L. cv. *Nipponbare*）の遺伝子組換えをおこない、コレラトキシン B 鎖を胚乳に発現する、選択マーカーフリーの系統を数種類（MucoRice-CTB 50A, 51A および 55A）樹立した。今回、次世代シークエンサー（Illumina 社の HiSeq2000 システム）を用い、これらの組換え系統に加え、組換え原種として使用した野生型の日本晴を対象に、ゲノム全域に渡る変異解析および比較をおこなったので報告する。

イネ幼苗よりゲノムを抽出し、定法に従いリシークエンスデータを得た。得られたデータをインターネット上に公開されているイネゲノムデータベースと比較し、組換え系統ならびに野生型との変異すなわち、挿入、欠失、塩基多型に関する情報をそれぞれについて調査した。それら変異情報を総合して比較し、それぞれの系統に特異的な変異および共通する変異を同定した。

重複を省いた解析の結果、野生株を含むそれぞれの系統における変異数はゲノム全体で約 20000 ヶ所であった。イネの持つ 12 の染色体それぞれにおける変異を比較すると、全系統で共通した傾向となり、4 番染色体でもっとも多く、11.0 ヶ所/Mbp であった。共通する変異および系統特異的な変異を合わせて考慮すると、組換え前の原種の段階で 4 番染色体には既に変異が他の染色体より多く存在したことが示され、4 番染色体は他の染色体と比べ、変異を起こしやすい可能性が示唆された。

配列情報にアノテーション（機能等の情報）を付加し、変異により引き起こされる影響を予想した結果、遺伝子と予測されている領域（5'UTR, 3'UTR, エクソンおよびイントロン）における変異はゲノム全体で約 2000 ヶ所あり、そのうちコドンの変化を伴う、比較的影響が強いと考えられる変異は約 1100 ヶ所であった。これらの変異の数は、系統間でほとんど違いは見られなかった。

系統特異的な変異は、組換えをおこなった系統である 50A, 51A および 55A でそれぞれ 3009, 2559 および 3442 ヶ所であった。一方、野生型に特異的な変異は 2362 ヶ所であり、組換え操作によりゲノムに引き起こされる影響は比較的小さいと予想された。

Rice genome resequencing, Nucleotide variation analysis, Rice-based oral vaccine

講演番号：2C04a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ C 校舎 04 会場

ウンシュウミカンのトランスクリプトーム解析
Transcriptome Analysis of Satsuma mandarin

○永野 幸生、三村 高史、松本 亮司 (佐賀大)
○Yukio NAGANO, Takashi Mimura, Ryoji Matsumoto (Saga Univ.)

果樹の生育ステージは複数ある。一つは「幼若相」であり、栄養生長を続け実をつけない。もう一つは「成熟相」であり、生長が落ち着き多くの実をつける。さらに、成熟相を接木した場合、しばらくの間「栄養的成熟相」になり、成熟相にあるけれども栄養生長を続ける。つまり、最初は実をつけずに生長し、大きく生長してから実をつけることになる。この三つのステージのウンシュウミカン(*Citrus unshiu*)の葉においてトランスクリプトームに差異があるかどうかについて、我々は RNA-seq で解析した。各々のステージで生物学的反復を 3 点取り、合計 9 サンプルについて解析を行った。多くの遺伝子は群内での変動も群間の変動も大きかった。それにもかかわらず、明らかに群間で顕著に発現に差異がみられる遺伝子が複数見つかった。また、その他いくつか興味深い知見が得られたので、併せて報告する。

Transcriptome, RNA-seq, Satsuma mandarin

講演番号：2C04a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ C 校舎 04 会場

ナショナルバイオリソースプロジェクト「トマト」における Micro-Tom を基盤としたトマトリソースの整備

Development of Micro-Tom based resources in the National BioResource Project 'Tomato'

○四方 雅仁[1]、星川 健[1]、有泉 亨[1]、福田 直也[1]、久保 康隆[2]、金山 喜則[3]、青木 考[4]、江面 浩[1]
([1]筑波大生命環境、[2]岡山大院自然科学、[3]東北大院農学、[4]大阪府立大院生命環境科学)
○Masahito SHIKATA[1], Ken HOSHIKAWA[1], Tohru ARIIZUMI[1], Naoya FUKUDA[1], Yasutaka KUBO[2], Yoshinori KANAYAMA[3], Koh AOKI[4], Hiroshi EZURA[1] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]Okayama Univ., [3]Tohoku Univ., [4]Osaka Pref. Univ.)

トマトは世界で最も生産されている果菜類である。その果実にはビタミン A、ビタミン C のような栄養成分や、リコピン、GABA といった機能性成分を多く含み、人類の健康増進のための作物として注目されている。またトマトはナス科のモデル植物として位置づけられるほか、果実を発達させる点や日長応答が中性であることなど、シロイヌナズナやイネのような他のモデル植物にはない特徴を持っており、学術的にも重要な作物である。2012 年には全ゲノム配列が解読され、今後の基礎研究および開発研究の発展が大いに期待される。我々は 2007 年にナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)の枠組みでトマトバイオリソースの整備を開始している。矮性品種である Micro-Tom を基盤とし、中核機関である筑波大学が個体レベル、サブ機関である大阪府立大学が DNA レベルでのトマトリソースの整備を担当しており、さらに災害によるバイオリソース喪失の危惧を未然に防ぐためのバックアップ機関として岡山大学と東北大学が参画している。Micro-Tom は狭い面積で多数の個体を育てられ、蛍光灯下でも正常に発育すること、ライフサイクルが一般のトマト品種よりも短いこと、形質転換系が確立していることなど、モデル植物としての要件を満たした品種である。

個体レベルでのトマトリソースとしては、これまでに ethylmethanesulfonate (EMS)処理で 7,015 系統、ガンマ線照射で 4,620 系統の、合計 11,635 系統の Micro-Tom 変異体を作出してきた。外見的変異の認められる 1,644 系統について、その表現型をデータベース'TOMATOMA' (http://tomatoma.nbrp.jp/)に登録しており、M3 種子のリクエストを受け付けている。変異体に加えて Micro-Tom を始めとした各種栽培種や近縁野生種トマトの種子、染色体置換系統も保持しており、これまでに国内および海外へのべ 1,601 系統の種子の配布を行ってきた。今後、変異体リソースの質の向上のため、果実のアミノ酸や糖などの代謝情報を付加していく予定である。一方 DNA レベルのトマトリソースは、マイクロトム完全長 cDNA を 13,227 クローン収集しており、配布を行っているほか、EST クローン、プロモータークローンの収集も行っている。完全長 cDNA は 'KafTom' (http://www.pgb.kazusa.or.jp/kaftom/)にて、EST は 'MiBASE' (http://www.pgb.kazusa.or.jp/mibase/)にてそれぞれ情報を公開している。以上のトマトバイオリソースがトマトおよびナス科植物の研究者にとって有用なツールとなるよう情報提供を行うとともに、ユーザーからの要望・意見も随時受け付けている(requestomato@gene.tsukuba.ac.jp)。

resource, tomato, mutant

講演番号：2C04a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ C 校舎 04 会場

紫外線照射で生じる植物ゲノムの突然変異の検出及び解析

Detection and analysis of UV-induced mutations in plant genome using a *supF*-based system

○中村 宗久[1]、長谷部 航[1]、牧野 耕三[1]、布柴 達男[2]、平津 圭一郎[1] ([1]防衛大、[2]国基大)
○Munehisa NAKAMURA[1], Wataru HASEBE[1], Kozo MAKINO[1], Tatsuo NUNOSHIBA[2], Keiichiro HIRATSU[1] ([1]NDA, [2]ICU)

【目的】植物における突然変異は種の多様化や育種に寄与する重要な生命現象だが、それに関わる分子機構の知見は微生物や哺乳類のそれと比して少ない。シロイヌナズナのゲノム配列情報からは DNA の複製･修復因子には他の真核生物との高い共通性が示されたが、植物には種特異的な遺伝子が多く存在し、これらの変異誘発機構への関与は未解明の部分が多い。

本研究室では、植物において突然変異に関与する因子を研究するためのツールとして、ゲノムに生じる変異を幅広いスペクトルで検出できる実験系の開発を行ってきた。本学会 2012-2013 大会では、多くの生物種で用いられている大腸菌 *supF* 遺伝子を変異ターゲットとした変異検出系を植物へ導入するために、*supF* バイナリーベクターおよびこれを用いた突然変異検出用の *supF* 導入シロイヌナズナを作製し、アルキル化剤であるエチルメタンスルホン酸（EMS）処理による誘発変異の検出検証実験を行い本実験系の有効性を報告した。

今年度大会では、本実験系を用いて EMS と変異メカニズムの異なる紫外線（UV-C）による誘発変異を検出することを目的とし、実験条件の検討と本検出系の有効性検証実験を行った。

【方法】*supF* は TAG ストップコドンにチロシンを挿入するサプレス能を有する tRNA をコードしている。我々の開発した植物変異検出系では、大腸菌で自律複製する *supF* プラスミドをゲノムに挿入した植物体に変異原処理を行い、植物ゲノムからプラスミドを回収して変異検定用大腸菌に導入することによりサプレス能を失った変異 *supF* を選択し、塩基配列を決定して変異スペクトルを同定する。

UV-C による植物への変異導入は、EMS とは異なり確立された実験条件が無いため、本研究ではまず UV-C 処理の条件を検討した。その結果、播種後 10 日間生育した 100 個体/MS プレートの *supF* 導入シロイヌナズナに対し、UV-C（254nm）を 1000J/m^2 照射後に 24 時間遮光し、さらに 18 日間生育して変異導入処理を行った。UV-C 未処理の比較対象群も同様に育成し、これらのゲノムを精製して変異検出実験に用いた。

【結果】UV-C 照射した試料では、塩基置換および欠失変異が検出された。これらの変異は 5′-PyPy-3′ 配列に起きており、UV-C 照射により生じたピリミジン二量体/6-4 光産物に起因する変異と示唆された。一方、UV-C 未処理の試料では、現在まで変異は検出されていない。今後さらにデータを蓄積し、これらの結果を解析して UV-C 照射により植物ゲノムに起こる変異率、変異スペクトルの特徴及び本検出法の有効性の検証結果を報告する。

mutation, UV-C, *Arabidopsis*

講演番号：2C04a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ C 校舎 04 会場

発芽期大豆種子からクローニングされた糖転移酵素遺伝子の特徴付け

Molecular characterization of a glycosyltransferase gene from germinated soybean seeds.

○河上 茉奈実[1]、市村 悠子[1]、御園 久代[1]、佐藤 光朗[2]、小島 俊雄[2]、高原 英成[2]、白岩 雅和[1]（[1]茨城大院農・食品生化、[2]茨城大院農・分子生化）
○ Manami KAWAKAMI[1], Yuko ICHIMURA[1], Hisayo MISONO[1], Mituaki SATO[2], Toshio KOJIMA[2], Hidenari TAKAHARA[2], Masakazu SHIRAIWA[1] ([1]Ibaraki Univ.Food.Bio.Chem., [2]Ibaraki Univ.Bio.Chem.Mol.Biolo.)

【目的】高等植物は二次代謝産物や植物ホルモンなどの成分を蓄積するために糖転移酵素を利用して配糖体化を行う。大豆（*Glycine max*〔L〕Merrill）には二次代謝産物や植物ホルモンが豊富に含まれているにも関わらず、糖転移酵素に関する知見が乏しい。そこで今回は特に細胞分裂が盛んな部位で二次代謝産物や植物ホルモンなどが豊富に生成されている大豆の根に存在する糖転移酵素の新たな知見を得るために、未知糖転移酵素の探索及び機能分析を行ったので報告する。
【方法】根の生長に関与する *Pisum sativum* 由来の糖転移酵素遺伝子（*PsUGT1*）に対して高い相同性を示す大豆 EST 情報を基に発芽期大豆の胚軸から cDNA クローニングを行った。得られたホモログ（*SoyUGT1B*）について構造と機能を予測するため *in silico* 解析を行った。大豆における各生長段階（完熟期、発芽期、生長初期）、各生長部位に対する *SoyUGT1B* の発現動態解析とタマネギ表皮細胞における SoyUGT1B の細胞内局在を調査した。
【結果及び考察】マメ科の既知糖転移酵素遺伝子（*PsUGT1*）を基に発芽期大豆の胚軸から cDNA クローニングを行った結果、ホモログが得られ、*SoyUGT1B* と仮称した。大豆のゲノムデータベースより、*SoyUGT1B* はダイズ 14 番染色体に座乗する配列であり、C 末端領域に糖転移酵素の活性中心ドメイン（PSPG-BOX）を有するため、糖転移酵素であることが確認された。また、BLAST 検索を行った結果、SoyUGT1B と相同性が高い植物由来糖転移酵素は機能未知なものが多数占めている中、cytokinin *O*-glycosyltransferase と推定されている *Medicago truncatula* 由来の G7KBB5 と高い相同性（78%）を示した。ClustalW を用いて植物由来既知糖転移酵素の全アミノ酸配列系統樹解析を行った結果、*Medicago truncatula* 由来 cytokinin *O*-glycosyltransferase（G7KBB5），*Pisum sativum* 由来 UDP-glucuronosyltransferase（PsUGT1），*Arabidopsis thaliana* 由来 cytokinin *O*-glycosyltransferase（UGT85A1）とその他 4 種類の植物由来既知糖転移酵素と同一クラスターに属することが判明した。次に大豆における *SoyUGT1B* の発現動態解析を行った結果、発芽期の子葉と胚軸、生長初期の根と茎に発現が確認された。特に生長初期の根に強く発現が確認された。これは同一クラスターに属していた cytokinin *O*-glycosyltransferase（UGT85A1）の発現パターンと類似した傾向を示した。さらに、タマネギ表皮細胞における SoyUGT1B の細胞内局在を調査した結果、細胞質と核に局在する UGT85A1 と類似した局在を示した。以上の結果から、SoyUGT1B は cytokinin *O*-glycosyltransferase である可能性が示唆された。

glycosyltransferase, soybean, root

講演番号：2C04a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ C 校舎 04 会場

ジャガイモ塊茎を形成するストロンの原基である地中腋芽における *RanGTPase1* 遺伝子 の発現解析
Expression of the *RanGTPase1* gene in potato underground axillary buds for stolon and tuber induction

加藤 彰[1]、福井 由記[1]、蘆田 弘樹[1]、明石 欣也[1]、梶川 昌孝[1]、重岡 成[2]、○横田 明穂[1]([1]奈良先端大バイオ、[2]近畿大農)
Akira Katoh[1], Yuki Fukui[1], Hiroki Ashida[1], Kinya Akashi[1], Masataka Kajikawa[1], Shigeru Shigeoka[2], ○Akiho Yokota[1] ([1]Nara Inst. Sci. Technol., [2]Kinki Univ.)

カラハリ砂漠由来の野生種スイカは土壌乾燥に伴い根を活発に発達させる。急速に発達中の根のプロテオーム解析から、2 種の RanGTPase（RAN）タンパク質が誘導されることを見出した。それらの遺伝子をクローニングし、*RAN1* 及び *RAN2* と命名した。*RAN1* 及び *2* のプロモーターに *GUS* 遺伝子を連結して野生種スイカ毛状根で発現させた結果、*RAN1* は根端及び側根原基のみで発現し、*RAN2* は根全体で発現することが示唆された。このような結果から、*RAN1* は土壌乾燥時に野生種スイカの根の発達に関わると考えた。*RAN* 遺伝子は広く真核生物に存在し、細胞分裂、核と細胞質間の物質移動、さらには核膜形成などに関わる重要なタンパク質である。そこで、野生種スイカの *RAN1* 遺伝子を CaMV35S プロモーター制御下でジャガイモに導入すると、明らかにベクターコントロールより根の発達が認められた。このジャガイモを土壌栽培すると、いも塊茎数が倍以上に増加した。ジャガイモは地中の腋芽を分化発達させ、その先端直下を肥大化させて塊茎を形成する。野生種スイカの *RAN1* 導入ジャガイモでは、一次ストロン数は野生株と大差ないが、第二次及び第三次ストロン数が大きく増加した。このことは、*RAN1* がジャガイモでは根の発達のみならずストロン誘導にも関わる可能性を示唆している。そこで本研究では、ジャガイモ内生 *RAN* 遺伝子の動態を解析したので報告する。

無菌培養したジャガイモの節間を 1 外植片に 1 腋芽が存在するように切断し、3%ショ糖を含む MS 培地上に置き暗黒下で培養した。この条件では 4、5 日後に腋芽がストロン化し、その後に急速に発達した。この系を使ってジャガイモ内生 *RAN* 遺伝子発現の動態を解析した。ジャガイモゲノム DNA には、*RAN1a*、*RAN1b*、*RAN2* という推定アミノ酸配列が異なる 3 種の遺伝子が存在していた。*1a* と *1b* は 99%相同だったが、*1b* にはアミノ酸配列は 100%相同だが 5'-flanking 領域が一部異なる *1b1* と *1b2* が存在した。これらをすべて個別に発現量を測定するために、塩基配列が異なる 5'-flanking 領域と翻訳領域内部の 5'-側配列間を用いて qRT-PCR を行った。その結果、*RAN1b* では 2 遺伝子とも誘導条件下で 18 時間後には増加し始め、24 時間後には 8～9 倍の増加を示した。*RAN1a* では 4 倍の増加となったが、*RAN2* には変動は認められなかった。このことから、野生種スイカで土壌乾燥時の根の発達に関わる *RAN1* 遺伝子は、ジャガイモでは根の発達に加え腋芽からのストロン誘導に関与すると考えられる。（謝辞：この研究は JST, CREST の助成を受けている。）
現所属：蘆田、神戸大人間環境；明石、鳥大院農；梶川、京大院生命

RanGTPase, potato stolon, axillary bud

講演番号：2C04a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ C 校舎 04 会場

ジャガイモ・ストロン分化時に発現する遺伝子の網羅的な解析

Transcriptome analysis of axillary buds of potato during stolon differentiation

○加藤 彰[1]、重岡 成[2]、横田 明穂[1] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]近畿大・農)
○Akira KATOH[1], Shigeru SHIGEOKA[2], Akiho YOKOTA[1] ([1]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, [2]Dep. Adv. Bio., Kinki Univ.)

ジャガイモは地下にほふく枝（ストロン）を伸長し、ストロン茎頂直下の組織を塊茎に分化させ、そこにデンプンを貯蔵する。このようにストロンの発達は塊茎分化に先立つ現象で、デンプン貯蔵組織形成の重要な第一ステップである。我々は、ジャガイモ腋芽のストロンへの分化メカニズムの分子機構を研究してきた。これまで、茎頂直下の組織が塊茎に分化するプロセスに強い関心が持たれ、様々な研究がなされてきた。その結果として、遺伝子発現プロファイルやタンパク質蓄積プロファイルのデータベース（DB）が公開されているが、ストロン分化プロセスに関する報告はほとんど無い。そこで、マイクロアレイを用いて、ストロン分化プロセスにおける転写物レベルの網羅的な解析を行った。

頂芽を切除した植物片を暗黒条件下で *in vitro* 培養すると腋芽からストロンが発達する（この条件を D 条件とする）。明条件下では小植物体へ発達する（L 条件）。頂芽を切除せずに植物片を暗黒条件下で培養すると腋芽は発達しない（AD 条件）。前演者の発表にあるように、我々は *RAN-GTPase (RAN)* 遺伝子がストロンの発達に深く関与すると考えているので、*RAN* 遺伝子量のレベル上昇を指標にして、培養開始後、24h (22℃)の時点で植物片上の腋芽のサンプリングを行った。これら 3 条件に加えて、実験開始時 (0h)の腋芽（B 条件）を加えた 4 条件のサンプルを得た。腋芽サンプルから RNA を抽出し、ジャガイモ転写物の公開 DB を基にして設計したスライドを用いて、マイクロアレイ解析を行った。得られた転写物レベルの情報に対して主成分分析 (PCA)を行い、ローディング値を基にしてサンプルのグループ分けの傾向を調べた。その結果、第 1 主成分 (PC1)だけで寄与率が 93%を示し、ほとんどの傾向を説明しており、この PC1 でサンプルは L、D 条件と AD、B 条件の 2 グループに分かれる傾向を示すことが判った。B 条件は実験開始時を設定したものであるが、頂芽を切除せずに植物片を明条件下で培養した状態と解釈すると、L、D 条件と AD、B 条件のグループ分けは、光条件には関係がなく、頂芽がない条件とある条件のグループ分けとみなすことができる。スコア値を基に、グループ分けの傾向を説明する発現遺伝子を調べたところ、頂芽がないグループを説明するような発現レベルを示す遺伝子群に RAN 遺伝子が含まれていた。本発表では、以上のマイクロアレイ解析の結果の詳細を報告する。　（謝辞：この研究は JST, CREST の助成を受けている。）

stolon, tuber, RAN-GTPase

講演番号：2C04a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ C 校舎 04 会場

イネにおけるサクラネチン生合成酵素遺伝子のジャスモン酸依存的な発現制御機構の解明

JA-dependent mechanism of the flavonoid phytoalexin-biosynthetic gene in rice

○小川 哲史[1]、清水 崇史[1]、山根 久和[1,2]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]帝京大・バイオ)
○Satoshi OGAWA[1], Takafumi SHIMIZU[1], Hisakazu YAMANE[1,2], Hideaki NOJIRI[1], Kazunori OKADA[1] ([1]The University of Tokyo, [2]Teikyo University)

【背景と目的】イネのフラボノイド型化合物であるサクラネチンは，病原菌感染時にイネ葉身に蓄積し抗菌活性を発揮する主要なファイトアレキシンの一つと考えられている．サクラネチン生合成の最終ステップでは，前駆体であるナリンゲニンが naringenin 7-*O*-methyltransferase (NOMT) によりメチル化を受けることでサクラネチンを与えることが示されていたが，最近我々は NOMT をコードする遺伝子 *OsNOMT* をイネから単離した[1)]．また，*OsNOMT* の発現を RNAi 法により抑制するとサクラネチンの誘導的な生産が抑えられることから，*OsNOMT* がサクラネチン生合成を担う必須遺伝子であることも判明した．*OsNOMT* の発現機構の詳細については明らかになっていないが，これまでに我々はジャスモン酸 (JA) 類生合成変異体の解析によって，植物ホルモンの JA から生合成される活性型の jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) がサクラネチンの生産誘導に必須であることを明らかにしており[2)]，*OsNOMT* の発現誘導は JA シグナルに依存すると考えられた．そこで本研究では，*OsNOMT* の JA 依存的な発現制御機構の解明に向け，*OsNOMT* 遺伝子の転写レベルでの発現変動およびプロモーター活性について検討した．

【結果】播種後 6 日経過したイネに JA を処理すると，葉身において *OsNOMT* の発現が処理後 24 時間で顕著な上昇を示し，また LC-MS/MS 分析によりサクラネチンの蓄積も確認された．一方，根においては JA 処理によるサクラネチンの生産誘導は見られなかった．そこで，*OsNOMT* の転写開始点上流域 5 kb をルシフェラーゼ遺伝子に連結し，イネ葉身を用いてレポータージーンアッセイを行うことで，JA による *OsNOMT* の発現誘導に必要な領域の同定を試みた．播種後 6 日経過したイネ葉身にパーティクルガンを用いてレポータープラスミドを導入し，JA 処理後 24 時間でルシフェラーゼ活性を測定したところ，JA によるレポーターの誘導は認められず，逆にルシフェラーゼ活性が抑制される傾向が見られた．領域を上流 2 kb とした試行においても同様の結果となった．この結果から，*OsNOMT* の転写開始点上流 2 kb までにおいて JA による発現抑制に関する領域が存在する可能性が示唆された．現在，より短い領域を用いた解析や JA-Ile 生合成変異株を用いた解析を行い，JA による *OsNOMT* の発現制御に関わる領域の探索を進めている．

1) Shimizu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 287(23): 19315-25 (2012)
2) Shimizu *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77(7): 1556-64 (2013)

rice, flavonoid phytoalexin, jasmonic acid

講演番号：2C04a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ C 校舎 04 会場

イネの免疫反応に関与する *PR* 遺伝子の発現制御に関与する新規転写因子の同定

Identification of novel transcription factor involved in the regulation of *PR* gene in rice immune response

○宇野 雄太[1]、平井 洋行[1]、四井 翔太[1]、寺沢 勇治[1]、堀家 史哉[2]、久保 健一[3]、仲下 英雄[4]、蔡 晃植[1]（[1]長浜バイオ大・院バイオ、[2]長浜バイオ大学・バイオ、[3]奈良先端科学技術大学大学院、[4]東農大・応生化）

○Yuta Uno[1], Hiroyuki Hirai[1], Syota Shii[1], Yuji Terasawa[1], Fumiya Horiie[2], Kenichi Kubo[3], Hideo Nakashita[4], Fang-Sik Che[1] ([1]Graduate School of Biosciences, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [2]Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [3]Nara Institute of Science and Technology, [4]Department of Applied Biology and Chemistry, Tokyo University of Agriculture)

これまで我々は、*EPR1* 遺伝子過剰発現イネ（*EPR1*-ox）がイネ白葉枯病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*（*Xoo*）に対して病害抵抗性を示すことを明らかにした。そこで、*EPR1* 過剰発現により誘導される病害抵抗性の分子機構について研究を行った。まず、*EPR1*-ox と野生株（WT）の培養細胞に *Xoo* を接種したときの活性酸素発生と過敏感細胞死の誘導について調べたところ、*EPR1*-ox の培養細胞は WT と同様に活性酸素発生と過敏感細胞死を誘導しなかった。次に、*EPR1*-ox と WT の培養培地における *Xoo* の生育について調べたところ、*EPR1*-ox の培養培地では *Xoo* の生育が抑制されることが示された。このことから、*EPR1*-ox 培養細胞は培地中に抗菌性物質を分泌している可能性が示唆された。そこで、*EPR1*-ox と WT の培養培地に硫酸アンモニウムを加え、生じた沈殿を限外濾過し培地に添加したところ、*Xoo* に対する生育抑制活性が認められた。次に、*EPR1*-ox の培養培地に存在するタンパク質について二次元電気泳動と質量分析計を用いて解析したところ、*EPR1*-ox の培養培地には Pathogenesis-related protein である PR５、PR７、PR８が顕著に蓄積していることが明らかとなった。また、これら *PR* 遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR を用いて解析したところ、*EPR1*-ox イネ培養細胞において WT の培養細胞よりも発現量が上昇していた。そこで、これらの *PR* 遺伝子の発現を制御する転写因子を同定するため、44K イネオリゴ DNA マイクロアレイを用いて *EPR1*-ox イネ培養細胞で発現上昇している転写因子遺伝子を解析したところ、34 個存在することが明らかとなった。この 34 個の転写因子のなかで、*PR5, 7, 8* 遺伝子の発現を制御している転写因子を同定するため、*PR5, 7, 8* 遺伝子のプロモーターの転写活性を指標としたレポーターアッセイを行った。その結果、OsNTF1 (NAM domain-containing transcription factor) という NAM ドメインを持つ新規の転写因子が *PR5, 7, 8* の発現を制御していることが明らかとなった。以上のことから、*EPR1* の発現上昇により OsNTF1 転写因子が活性化し、各種 PR タンパク質の発現量を増加させることで、病害抵抗性が付与されている可能性が示された。

PR gene, transcription factor, immune response

講演番号：2C04a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ C 校舎 04 会場

シロイヌナズナ熱ショック転写因子 HsfA2 の Ca^{2+} シグナリングによる発現制御機構の解明

Transcriptional regulation of Arabidopsis heat shock transcription factor A2 via Ca^{2+} signaling

○中村 朋美[1]、野坂 亮太[1]、小林 宏太[1]、田部 記章[2]、薮田 行哲[3]、丸田 隆典[4]、田茂井 政宏[1,2]、重岡 成[1,2] ([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]鳥取大・農・生資環、[4]島根大・生資科・生命工)

○Tomomi Nakamura[1], Ryota Nosaka[1], Kota Kobayashi[1], Noriaki Tanabe[2], Yukinori Yabuta[3], Takanori Maruta[4], Masahiro Tamoi[1,2], Shigeru Shigeoka[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]Fac. Agr., Tottori Univ., [4]Dept. Life Sci. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.)

【目的】　シロイヌナズナの熱ショック転写因子 HsfA2 は種々の環境ストレスに対して迅速に応答し、防御遺伝子の発現を誘導することで酸化的ストレス耐性能の獲得に寄与する重要な転写因子である（*Plant J.* 2006）。これまでに我々は、21 種類存在する Hsf ホモログのうち HsfA1d および HsfA1e が HsfA2 プロモーター領域に存在する Hsf 認識配列（HSE）を介して HsfA2 の発現を制御していることを明らかとした（*Plant Cell Physiol.* 2011）。ところで、これまでに Calmodulin 3（CaM3）が HsfA2 の標的遺伝子である熱ショックタンパク質（HSP）の発現制御に関与していること、HsfA1a の HSE への結合能が CaM 結合プロテインキナーゼによるリン酸化によって制御されていることが報告されている。以上のことから、HsfA2 の発現制御もまた Ca^{2+}シグナリングが関与すると考えた。そこで、野生株への Ca^{2+}シグナリング阻害剤処理および CaM3 欠損株における HsfA2 の熱応答を解析した。また、Ca^{2+}シグナリングによる HsfA1d の活性化制御機構は不明であるため、大腸菌を用いた Bimolecular fluorescence complementation（BiFC）法により HsfA1d と相互作用するタンパク質の探索を行った。

【方法および結果】2 週齢のシロイヌナズナ野生株に Ca^{2+}シグナリング阻害剤（0.5-3 mM EGTA、25-100 μM $LaCl_3$、0.5-3 mM Verapamil, 20 min）を前処理し、その後熱ストレス（37℃, 15 min）を付与したところ、阻害剤処理による濃度依存的な HsfA2 の熱応答の抑制が認められた。特に、5 mM EGTA 処理ではコントロールと比較して約 50%の抑制が認められた。次に、CaM3 遺伝子破壊株を用い、熱ストレス条件下（37℃, 30 min）での HsfA2 の熱応答を野生株と比較した。その結果、HsfA2 の熱応答が約 56%まで抑制された。以上のことから、Ca^{2+}シグナリングが HsfA1d を介した HsfA2 の熱ストレス応答に関与することが示唆された。しかしながら、Ca^{2+}シグナリングによる HsfA1d の活性化制御機構は不明である。そこで次に、HsfA1d の相互作用因子を探索するために、大腸菌を用いた BiFC 法によるスクリーニングを行った。HsfA1d の N 末端およびシロイヌナズナ cDNA ライブラリーの C 末端側にそれぞれ蛍光タンパク質 Venus の N 末端半分（VN）と C 末端半分（VC）を融合したタンパク質を発現させるベクターを構築した。まず、本法による HsfA1d 相互作用因子の探索が可能か判定するため、VN-HsfA1d および Hsp90.2-VC を大腸菌内で共発現させたところ、Venus 由来の蛍光が観察され、両タンパク質の相互作用が示唆された。以上の結果より、本法でのスクリーニングが可能であると判断し、現在 HsfA1d 相互作用因子の探索を行っている。

heat shock transcriptional factor, screening, Arabidopsis

講演番号：2C04a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ C 校舎 04 会場

モモ黄肉種に存在するカロテノイド代謝酵素 *CCD4* の変異

Mutations in the *CCD4* Carotenoid Catabolic Gene of Yellow-Flesh Peaches

深松 陽介[1]、田村 隆行[2]、日原 誠介[2]、○小田 賢司[1]([1]岡山生物研、[2]岡山県農総センター農業研)
Yosuke Fukamatsu[1], Takayuki Tamura[2], Seisuke Hihara[2], ○Kenji Oda[1] ([1]RIBS Okayama, [2]Res Inst for Agric, Okayama)

モモの果肉は、含有するカロテノイド量の違いにより、白色の品種（白肉種）と黄色の品種（黄肉種）が存在する。日本の生食用品種は白肉種が主流で、黄肉種は缶詰用に加工されることが多い。このように、果実の色は消費者の購買行動に直接影響する農業上の重要形質であるものの、これまで、モモの果実色を支配する遺伝子について詳しい研究は行われておらず、未知の部分が多い。そこで、我々はモモの果肉色を支配する遺伝子の探索を試みた。

これまでの遺伝学的な研究により、モモの果肉色は白色が黄色に対して優性であり、第 1 連鎖群の一つの遺伝子座（*Y*）により支配されることが明らかとなっている。また、一部のジャガイモや菊が黄色を呈するのはカロテノイド代謝酵素 *CCD4* の変異に因ること、モモの黄肉種でも *CCD4* の遺伝子発現が低下していることが報告されている。そこで、*CCD4* のゲノム上の位置を調べたところ、*Y* 遺伝子座と一致し、*CCD4* が果肉色を直接支配している可能性が示唆された。次に、白肉種である白鳳と黄肉種である山手清水のゲノムより *CCD4* 遺伝子を増幅したところ、山手清水 *CCD4* の前半部分は白鳳に比べて約 7kb 長いことが明らかとなった。塩基配列を同定したところ、山手清水の *CCD4* にはレトロトランスポゾンが挿入されていた。トランスポゾンの有無を他の 37 品種について調べたところ、トランスポゾンを持たないものが 9 品種、ヘテロにもつものが 22 品種、ホモに持つものが 6 品種存在した。このことは、日本の栽培品種の *CCD4* にはトランスポゾンが広まっていることを示している。調べた 37 品種には黄肉種が 7 種類含まれているが、そのうち 6 種類はいずれもトランスポゾンをホモに持っていた。しかし、黄肉種であるゴールデンピーチはトランスポゾンの挿入がある *CCD4* とない *CCD4* の両方を有していた。トランスポゾンのない *CCD4* を詳細に解析したところ、N 末付近にあるマイクロサテライト領域にフレームシフト変異が見出された。そこで、他の品種についてフレームシフト変異の有無を調べたところ、白肉種である白秋がヘテロに持つ他はいずれにも存在せず、フレームシフト変異は日本の栽培品種にはあまり広まっていなかった。*CCD4* の変異の有無と果肉色の関連をさらに調べるため、我々が栽培している 181 の交配樹について解析したところ、果肉色は *CCD4* の 2 つの変異で完全に説明できた。このことは、DNA を解析することにより果肉色が予測できる可能性を示している。モモの育種は、作出個体の果実形質の判定までに長い年月や広大な圃場、多大な管理作業を必要とするため、幼苗にも適用可能な DNA マーカーは実用上極めて有効であると考えている。

Yellow-flesh peach, carotenoid, Carotenoid Cleavage Dioxygenase

講演番号：2C04a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ C 校舎 04 会場

緑藻 *Euglena gracilis* における *trans*-2-エノイル-CoA レダクターゼの同定と機能解析
Identification and functional analysis of *trans*-2-enoyl CoA reductase in green algae *Euglena gracilis*

○冨山 拓矢[1]、玉木 峻[1,3]、山口 由貴[1,3]、羅 軍[1,3]、吉田 勇太[1]、丸田 隆典[1,3]、澤 嘉弘[1]、重岡 成[2,3]、石川 孝博[1,3] ([1]島根大・生物資源・生命工、[2]近畿大・農・バイオ、[3]JST・CREST)
○takuya TOMIYAMA[1], syun TAMAKI[1,3], yuki YAMAGUCHI[1,3], jun LUO[1,3], yuta YOSHIDA[1], takanori MARUTA[1,3], yoshihiro SAWA[1], shigeru SHIGEOKA[2,3], takahiro ISHIKAWA[1,3] ([1]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]JST・CREST)

微細藻類ユーグレナ（*Euglena gracilis*）は、好気条件において貯蔵多糖パラミロン（β-1,3-グルカン）を多量に蓄積（従属栄養条件では最大乾燥重量当たり 50%以上）し、嫌気条件に移行することで中鎖脂肪酸と脂肪アルコールから構成されるワックスエステルを乾燥重量当たり約 20～25%生産する。このパラミロンからワックスエステルへの変換は ATP の生産を伴うため、ワックスエステル発酵と呼ばれている。ユーグレナが生産するワックスエステルの主成分はミリスチルミリステート C28 であり、その構成脂肪酸であるミリスチン酸 C14 は、耐ノック指数のセタン価が高くバイオディーゼル燃料としての利用が期待できる。ワックスエステル発酵の代謝経路はすでに明らかにされており、解糖系からピルビン酸を経由してミトコンドリアでの脂肪酸合成を経た後、ミクロソームで最終的にワックスエステルが生合成される。ミトコンドリアの脂肪酸合成経路は通常の脂肪酸合成経路とは異なり、マロニル CoA ではなくアセチル CoA を C2 供与体とするいわゆるβ-酸化の逆反応で進行する。この合成経路においてエノイル CoA からアシル CoA への変換には、*trans*-2-エノイル-CoA レダクターゼ（TER）が機能しているが、嫌気条件に応答した脂肪酸合成の調節機構については明らかではない。そこで、今回、ミトコンドリア脂肪酸合成経路の嫌気応答機構解明を最終目標に、TER に着目してその機能解析を行った。

ユーグレナ RNA-Seq データより、ミトコンドリア局在が予測された２つの TER パラログ（*TER1* および *TER2*）の配列情報を得た。TER1 および TER2 はタンパク質レベルでお互い 16%の同一性を示し、進化的に TER1 および TER2 はそれぞれバクテリアおよび真核生物のクレードに属することが示唆された。FPKM および定量的 PCR の結果より、好気/嫌気条件下における *TER1* および *TER2* 遺伝子の発現レベルに顕著な変動は認められなかった。大腸菌発現系を用い、ミトコンドリア移行シグナルを削除した成熟型 TER1 および TER2 の組換え体酵素を作製した。組換え体 TER1 は crotonyl-CoA および octenoyl-CoA を基質として活性測定を行い、TER1 は crotonyl-CoA に高い活性を示し octenoyl-CoA にも中程度の活性を示したが、TER2 はいずれの基質に対しても活性が検出されなかった。エレクトロポレーションによりユーグレナ細胞に二本鎖 RNA を導入し、TER1 および TER2 発現抑制細胞を作製した。TER1 発現抑制細胞の細胞増殖および嫌気条件下での脂肪酸レベルの低下は観察されなかったが、TER2 発現抑制細胞は細胞増殖の顕著な抑制および好気条件下における定常レベルの脂肪酸量の顕著な増加が認められた。

Euglena gracilis, wax ester fermentation, expression analysis

講演番号：2C04a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ C 校舎 04 会場

ヒメツリガネゴケのアスコルビン酸生合成調節に関わる *VTC3* 遺伝子の発現解析

Functional analysis of *Physcomitrella VTC3* gene involving in regulation of ascorbate biosynthesis

○袖山 翼[1]、原井 健司[1]、丸田 隆典[1]、澤 嘉弘[1]、重岡 成[2]、石川 孝博[1] ([1]島根大・生資科・生命工、[2]近畿大・農・バイオ)
○ Tsubasa SODEYAMA[1], Kenji HARAI[1], Takanori MARUTA[1], Yoshihiro SAWA[1], Shigeru SHIGEOKA[2], Takahiro ISHIKAWA[1] ([1]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ.)

【目的】維管束植物のアスコルビン酸生合成は、D-マンノースおよび L-ガラクトースの誘導体を代謝中間体とする経路が主要経路として機能している。これまでの植物アスコルビン酸生合成に関する研究は、シロイヌナズナアスコルビン酸欠乏 *vtc* 変異体の解析を中心に進められており、5 種類存在する *vtc* 変異体のうち、*vtc1*、*vtc2*、*vtc4*、*vtc5* はそれぞれ D-マンノース/L-ガラクトース経路構成酵素をコードすることが判明している。一方、最近になってこれまで未解明だった *vtc3* 変異体の原因遺伝子がようやく同定され、プロテインキナーゼ/フォスファターゼの融合タンパク質をコードすることが示された。*VTC3* の相同遺伝子は多くの維管束植物や蘚類ヒメツリガネゴケなどにも広く保存されており、リン酸化・脱リン酸化を介したアスコルビン酸生合成調節機構への関与が推測されている。そこで、本研究では植物におけるアスコルビン酸生合成調節機構の解明を目的に、遺伝子ターゲティングが可能なヒメツリガネゴケに着目し、*VTC3* 遺伝子の機能解析を行った。

【結果】データベースから相同性検索により、ヒメツリガネゴケの *VTC3* 遺伝子を得た。ヒメツリガネゴケ *VTC3* 遺伝子は、シロイヌナズナ *VTC3* 遺伝子とは 55%の同一性、87%の類似性を示した。定量的 PCR により、ヒメツリガネゴケの *VTC3* 遺伝子の発現とアスコルビン酸レベルとの関連を検討した結果、*VTC3* 遺伝子の発現レベルは原糸体から茎葉体への生育に伴うアスコルビン酸レベルの増加と良い相関性を示した。相同組換えを利用してヒメツリガネゴケ *VTC3* 遺伝子破壊株（Δ *vtc3*）を作製した。ヒメツリガネゴケΔ *vtc3* は、シロイヌナズナ *vtc3* 変異体と同様、葉におけるアスコルビン酸レベルの光応答性が喪失しており、VTC3 はアスコルビン酸の光調節に関与することが示唆された。定量的 PCR によりΔ *vtc3* の D-マンノース/L-ガラクトース経路構成酵素遺伝子の発現レベルについて検討したところ、野生株と比較して明暗時の発現パターンに顕著な違いは認められなかった。GFP ノックイン株を作製し VTC3 の局在を調べたところ、VTC3 タンパク質は葉緑体に局在することが示唆された。

ascorbic acid, light regulation, Physcomitrella patens

講演番号：2C04a17
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ C 校舎 04 会場

ズッキーニにおけるダイオキシン類の取り込みに係わる遺伝子の機能解析
Functional analysis of genes related to uptake of dioxins and dioxin-like compounds in zucchini plants

○乾 秀之[1,2]、廣田 又士[2]、後藤 純弥[2]、吉原 亮平[1]、兒玉 典子[2]、松井 智美[2]、山崎 清志[2]、殷 熙洙[3] ([1]神戸大遺伝子、[2]神戸大院農、[3]農環研)
○ Hideyuki INUI[1,2], Matashi HIROTA[2], Junya GOTO[2], Ryouhei YOSHIHARA[1], Noriko KODAMA[2], Tomomi MATSUI[2], Kiyoshi YAMAZAKI[2], Heesoo EUN[3] ([1]Kobe Univ. Res. Ctr. Environ. Genomics, [2]Kobe Univ. Grad. Sch. Agric. Sci., [3]Nat. Inst. Agro-Environ. Sci.)

【目的】ダイオキシン類を含む高脂溶性汚染物質は、低濃度で広範囲の環境を汚染している。これらは極めて水に溶けにくく微生物による分解を受けにくいため、食物連鎖を通じて上位の動物に高濃度に蓄積され、しかも、地球全体に汚染が拡大することから、世界的な問題となっている。近年、植物を利用した環境浄化法であるファイトレメディエーションが、安価に、しかも広範囲に広がる低濃度の汚染物質を浄化できる方法として注目を浴びている。しかし、一般に植物は土壌中の高脂溶性の化学物質を取り込みにくいため、高脂溶性汚染物質の浄化には適していない。一方、ウリ科植物はこれら汚染物質を他の植物種より効率よく取り込むことが可能であることから、ファイトレメディエーション用植物として有望である。そこで、ウリ科植物の中で最も取り込み効率の高いズッキーニからダイオキシン類の取り込みに係る遺伝子を取得し、その機能を明らかにすることにより、ウリ科植物が持つダイオキシン類の取り込みメカニズムの解明を試みた。
【方法】ダイオキシン類低蓄積ズッキーニ品種*Cucurbita pepo* subsp. *ovifera* cv. Patty Greenと高蓄積ズッキーニ品種*C. pepo* subsp. *pepo* cv. Black Beauty並びに*C. pepo* subsp. *pepo* cv. Gold Rushの間で発現量の異なる遺伝子の一つとして、ジンクフィンガーモチーフを持つ転写因子（*ZFP*）遺伝子をクローニングした。本遺伝子の機能解析のため、アリルハイドロカーボン受容体（AhR）の作用によりレポーターであるβ－グルクロニダーゼ（*GUS*）遺伝子が誘導発現する形質転換タバコ植物に*ZFP*遺伝子を過剰発現した。AhRのリガンドでダイオキシン類の一種ポリ塩化ビフェニル（PCB）を含む寒天培地において本形質転換タバコ植物を培養し、地上部のGUS活性を測定した。さらに、本形質転換タバコ植物の根において発現が増加している遺伝子を定量RT-PCRを行うことにより特定した。また、発現が増加している遺伝子について組換えタンパク質を作製し、PCBとの結合活性を測定した。
【結果】*ZFP* 遺伝子を AhR と GUS を持つ形質転換タバコ植物に発現し、PCB を添加した寒天培地で培養した結果、ベクターコントロール植物に比べ *ZFP* 過剰発現植物は、葉の GUS 誘導倍率が有意に上昇した。このことから、本遺伝子はズッキーニによる高脂溶性汚染物質の効率のよい取り込みに係っていると考えられる。さらに、本形質転換タバコ植物において、複数の遺伝子の発現レベルが増加しており、これら遺伝子の産物のうち、PCB と結合するものが存在することが判明した。これらの結果から、ZFP がウリ科植物において高脂溶性汚染物質の輸送に係る因子の遺伝子を高発現させることにより、ウリ科植物は地上部に高脂溶性汚染物質を効率よく蓄積すると推測された。

Cucurbita pepo, dioxin, zinc finger protein

講演番号：2C04p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ C 校舎 04 会場

イネにおけるモミラクトン輸送体遺伝子の探索

Screening of cDNA encoding momilactone transporters in rice.

○千葉 光浩[1]、菅野 裕理[2]、岡田 憲典[3]、長谷川 守文[4]、三橋 渉[1]、瀬尾 光範[2]、豊増 知伸[1]([1]山形大農、[2]理研 CSRC、[3]東大生物工学セ、[4]茨城大農)

○Mitsuhiro Chiba[1], Yuri Kanno[2], Kazunori Okada[3], Morifumi Hasegawa[4], Wataru Mitsuhashi[1], Mitsunori Seo[2], Tomonobu Toyomasu[1] ([1]Yamagata Univ., [2]RIKEN Center for Sustainable Resource Science, [3]Biotechnology Research Center,University of Tokyo, [4]Ibaraki Univ.)

【背景・目的】

モミラクトンは、イネ(*Oryza sativa*)が生産するジテルペン系フィトアレキシンの一つである。フィトアレキシンとは、植物が病原菌などにさらされたときに植物側で合成・蓄積される低分子の抗菌性化合物のことである。さらに最近、モミラクトン B は、イネの根から浸出し、水田雑草など周辺植物の生長を抑制するアレロパシー物質としても振る舞う可能性が示された。演者らの研究グループは、モミラクトンの生合成に関与するジテルペン環化酵素遺伝子を同定し、そのノックダウン変異体を利用してモミラクトンの上記 2 つの役割を逆遺伝学的に示唆した。このように、いもち病菌や水田雑草といったイネにとっての外界の生物ストレスに対峙するモミラクトンについて、その生合成遺伝子は同定されているが、細胞外排出に関する分子レベルでの知見は今のところ無い。つまりモミラクトンはイネの根から輸送体タンパク質により制御されて排出されるのか、あるいはイネ細胞の内と外のどちらに存在することで、葉におけるいもち病抵抗性を示すのか、など不明な点が多い。そこで本研究では、モミラクトンの排出機構とその生理的意義を追究することを目的として、モミラクトンの輸送体遺伝子の同定を試みた。

【方法・結果】

他の植物において同定されたテルペノイド関連輸送体のアミノ酸配列をもとに、イネゲノム配列に対して BLASTp 検索し、ホモログ遺伝子を複数選抜した。次にそれらについて、遺伝子発現パターンにより、2 種に絞りこんだ。そこで、この 2 種の候補遺伝子の全長 ORF について、イネ葉身由来の cDNA プールを鋳型とした RT-PCR により cDNA クローニングした。これら 2 種の cDNA を組み込んだ酵母細胞を調製し、それを利用した機能解析を行う予定なので、本大会ではその結果についても報告する。

Rice, Phytoalexin, Transporter

講演番号：2C04p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ C 校舎 04 会場

植物病害抵抗性の抑制化合物の構造展開

Structure development of a chemical regulator for plant disease resistance

○栗本 哲哉、姜 凱、徐 銀卿、中村 英光、浅見 忠男（東大院・農生科）
○TETSUYA KURIMOTO, Kai Jiang, Eunkyung Seo, Hidemitsu Nakamura, Tadao Asami (Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo)

（目的）
植物は病原菌に対する免疫機構の一つとして、サリチル酸（SA）を介して誘導される全身獲得抵抗性（Systemic Acquired Resistance, SAR）を備えており、二次感染を防御していることが知られている。しかしそのメカ ニズムの詳細については、不明な点も多い。これまで SAR メカニズムの解明研究には BIT (1,2-benzisothiazol-3(2H)1,1-dioxide)や BTH (Benzo-(1,2,3)-thiadiazole- 7-carbothioic acid S-methyl ester）などの SAR 誘導剤が活用されてきた。一方で誘導剤と同様に SAR のメカニズム研究に有効であると予想される SAR シグナルをターゲットにする阻害剤は知られていなかった。そこで我々は SAR 誘導阻害剤の探索研究に取り組み、これまでに数種類の阻害剤候補物質を報告してきた。それら化合物中で最も活性が高かったのが 4-phenyl-2-{[((3-(trifluoromethyl)anilino)methylidene)cyclohexane-1,3-dione（PAMD）である。PAMD は SAR 誘導阻害剤として高い活性を有していたが、同時に植物の生育阻害効果を示すことが特徴であった。そこで植物の生育阻害活性と SAR 誘導阻害活性との間の相関を調べる事を目的として、PAMD の構造展開を行うことにした。
（結果）
合成は、シクロヘキサンジオン化合物、オルトギ酸トリエチルとアニリンを原料として用いて 1 段階で合成した。活性評価は、得られた PAMD 類縁体を PR1:GUS シロイヌナズナに処理し、GUS 染色と RT-PCR を行う事で病害抵抗性のマーカー遺伝子である PR1 の発現状況を調べることで行った。その結果、生育阻害活性が大きく低下したにもかかわらず、SAR 阻害効果が向上した化合物を見いだすことができた。以上の結果は PAMD の生育阻害活性と病害抵抗性誘導阻害活性間に関連はないこと、そして今回得た化合物が新規の作用点を有する阻害剤である可能性を示唆している。

salicylic acid, SAR, PAMD

講演番号：2C04p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ C 校舎 04 会場

新奇エチレン様活性物質の構造活性相関及び生理作用解析

Structure-activity relationships of ethylene mimics and characterization of their activity

○堅固山 裕子[1,2]、北畑 信隆[3]、安藤 卓也[1,2]、浅見 忠男[1,2]（[1]東大院・農生科・応生化、[2]科学技術振興機構・CREST、[3]東理大・理・応用生物科学科）
○Yuko KENGOYAMA[1,2], Nobutaka KITAHATA[3], Takuya ANDO[1,2], Tadao ASAMI[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]JST, CREST, [3]Appl. Biol. Sci., Tokyo Univ. of Science)

【背景と目的】
エチレンは植物の果実成熟や落葉落花を促進し、芽生えの形態形成に影響を与えるなど広範囲で植物の生長に関わる植物ホルモンである。また根寄生植物の自殺発芽を誘導する可能性も示唆されており、その点でも注目されている。しかし気体であるため、成長制御剤として農業利用を試みる局面においては、濃度調節の難しさや周囲への拡散といった問題が発生する。一方、エチレンの機能阻害剤は切り花の鮮度保持などに用いられているが、高価かつ重金属を含むなどの問題がある。このような状況から、利用可能な新しい性質を有するエチレン制御剤が求められている。本研究においては、エチレン様活性を有するリード化合物 HJ2 の構造展開を行い、植物成長制御剤として実用可能性のある活性物質の探索を行った。

【方法と結果】
ジベレリン受容体阻害剤探索のために行った、Ligand-based スクリーニングにおいて見出された物質の構造展開を行う過程で見つかったエチレン様活性物質 HJ2 を、本研究のリード化合物として用いた。構造展開した化合物の活性評価には、エチレン活性の指標となる暗所植物体における三重反応を用いた。化合物含有培地の暗所発芽 3 日後の野生型シロイヌナズナにおいて、三重反応を示している個体の割合が高いほど活性が高い化合物であると判断することで活性検定を行った。また化合物の特異性を調べるためにエチレン非感受性変異体 ein2 の化合物に対する応答性も調べた。

構造活性相関を追究した結果、HJ2 のエチル基部分にかさ高い置換基を導入することにより、エチレン活性を高めることが出来た。最も高い活性を示した化合物は、エチル基をシクロヘキシル基に変化させた KUT15 であった。この化合物を用いて明所植物体への形態形成への影響やエチレン応答性遺伝子発現量の観察も行ったので、合わせて報告する予定である。また根寄生植物に対する発芽誘導性試験の結果についても報告する予定である。

ethylene, phytohormone, chemical biology

講演番号：2C04p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ C 校舎 04 会場

雌雄異花植物テンナンショウの性転換に関わる化学物質の探索

Investigation of chemical compounds involved in sex determination in Arisaema

井上 智宏[1]、池田 修也[2]、渡辺 修治[3]、○大西 利幸[2,4] ([1]静大農、[2]静大院農、[3]静大院工、[4]静大グリーン研)
Tomohiro Inoue[1], Shuya Ikeda[2], Naoharu Watanabe[3], ○Toshiyuki Ohnishi[2,4] ([1]Facul. Agric., Shizuoka Univ, [2]Grad. School Agric., Shizuoka Univ., [3]Grad. School Eng., Shizuoka Univ., [4]RIGST, Shizuoka Univ.)

[背景・目的]
高等植物には、雌花と雄花を別の個体にもつ雌雄異株が存在する。雌雄異株植物であるサトイモ科テンナンショウ(*Arisaema*) は、主に温帯域に分布する多年草であり、根茎は生薬として中国で用いられている。テンナンショウは、根茎重量が小さい時は花を咲かせず、肥大するにつれ雄花、次に雌花をつける「性転換」の特徴を有する。高等植物の性分化は染色体または植物ホルモンで制御されることが報告されており、例えば雌雄異花植物であるアスパラガスやホップの雄化にはオーキシンが、ヤマアイやホウレインソウの雌化にはサイトカイニンが関与しいている。しかし、その分子メカニズムは未解明なままである。テンナンショウは根茎重量により性転換することから、演者らは植物ホルモンが性転換に寄与していると推定した。植物ステロイド化合物が成熟した花粉の花粉管の伸長を促進すること (Ylstra *et al.*, 1995)、また植物ステロイドホルモンであるブラシノステロイドがトウモロコシにおいて雄化を誘導することが報告されている (Hartwig *et al.*, 2011)。そこで本研究ではテンナンショウの性転換メカニズムを化合物レベルで明らかにすることを目的に、テンナンショウ雄株および雌株の花、茎、根茎部位における植物ホルモン (特にステロイド化合物) の定量解析を試みた。
[実験方法・結果]
テンナンショウの植物ステロイド化合物の定性分析を行うことを目的として雄と雌のそれぞれのテンナンショウの植物体全体をメタノールで抽出し、有機溶媒で分配を行い、シリカゲルクロマトグラフィー、逆相固相カートリッジカラムで精製を行った。精製した画分を高速液体クロマトグラフ-質量分析装置で分析した結果、動物の性ステロイドであるプロゲステロンを検出した。次にテンナンショウの部位別にプロゲステロンを定量解析した結果、生殖器官である雄蕊と雌蕊におけるプロゲステロン内生量に有意差が認められた。現在、プロゲステロン以外の化合物についての定性および雄株及び雌株の花、茎、根茎における植物ステロイド化合物の定量を試みている。
<文献>
1) Ylstra *et al*., *Plant Physiol*, **107**, 639-643 (1995)
2) Hartwig *et al*., *PNAS*, **108**, 19814-19819 (2011)

steroid, progesterone

講演番号：2C04p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ C 校舎 04 会場

部位特異的に作用するジベレリン受容体阻害剤の選抜と機能解析
Chemical screening and characterization of a site-specific inhibitor for gibberellin receptors
○尹 禎敏、安藤 卓也、福井 康祐、大谷 征史、Park Seung-Hyun、中嶋 正敏、浅見 忠男（東大院・農生科・応生化）
○Jung-Min Yoon, Takuya Ando, Kosuke Fukui, Masato Otani, Seung-Hyun Park, Masatoshi Nakajima, Tadao Asami (Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo)

【目的】　ジベレリンは種子の発芽や茎の伸長、花芽形成など植物の様々な生長に関わる植物ホルモンとして知られる。ジベレリンからの信号伝達は、受容体へのジベレリンの結合を発端として始まり、ジベレリンと結合した受容体により信号伝達を負に制御する DELLA 因子の機能が弱まる結果、下流へ向けて信号が伝わり始める。演者らは、ジベレリン依存的に生じる受容体–DELLA 因子間の相互作用のモニターが可能な酵母 two-hybrid 系を受容体機能阻害剤の選抜系に転用し、市販の化合物ライブラリー1 万種から候補化合物を選抜した。既に本大会で報告した最終選抜化合物 TY13 は種子発芽や幼植物体の生長過程に阻害的な効果を示し、双子葉・単子葉を問わず広範囲の植物に対して作用する。本発表では、中間候補化合物の再評価を行い、その中から TY13 と異なり作用部位特異性を示す化合物 TY25 を新たに見出したので、その詳細を報告する。
【方法・結果】　シロイヌナズナ幼植物体を用いた化合物を再評価するにあたり、胚軸部や根部など部位別の効力評価を実施した。この中で、新たに見出した TY25 は、種子の発芽過程や幼植物体胚軸部の生長過程などにはほとんど影響を与えないのに対して、幼植物体根部の生長過程には阻害効果を示した。そこで、この TY25 の作用部位特異性についてより詳しく調べたところ、開花後の種子形成過程を強く阻害することが明らかとなった。TY25 を処理した個体の花の顕微鏡観察から、雄しべの短化に伴い適正に受粉が成立していないことが種子形成不全の主要因と考えられた。さらに、TY25 の構造類縁体を有機合成の手法を用いて調製し、阻害効果との相関関係を調べたところ、TY25 と同様に種子形成阻害効果が際だつ化合物、TY25 が付帯していない胚軸の生長過程に対する阻害活性が新たに付与された化合物など、互いに類似する構造ながら異なる作用部位特異性を示すことが判明した。今後、作用部位特異性とジベレリン信号伝達過程との関連性についてより詳しく調べる予定である。

gibberellin, inhibitor, receptor

講演番号：2C04p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ C 校舎 04 会場

側枝形成における植物ホルモンを介した糖シグナリングの関与

Involvement of sugar signaling on shoot branching via hormone metabolism

○大鳥 久美[1,2]、福井 祥太[1]、Daniel Padilla-Chacon[1,2]、田部 記章[1,2]、田茂井 政宏[1,2]、重岡 成[1,2]
([1]近畿大・農・バイオ、[2]JST・CREST)
○Kumi Otori[1,2], Shota Fukui[1], Daniel Padilla-Chacon[1,2], Noriaki Tanabe[1,2], Masahiro Tamoi[1,2], Shigeru Shigeoka[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., [2]JST・CREST)

【目的】ショ糖合成系の律速因子である細胞質 FBPase を強化した形質転換タバコは、通常 CO_2 環境下では野生株と有意な差が見られないが、高 CO_2 環境下では側枝数、葉数が野生株より増加することを明らかにしてきた(*Photosynth Res.* 2011)。このことは、植物体内におけるショ糖分配の変化がシグナルとなり、側枝数、葉数を制御することを示唆している。そこで、ショ糖分配の変化が側枝形成に及ぼす影響を分子レベルで明らかにするために、ラン藻由来 FBPase-Ⅱを細胞質で発現させたシロイヌナズナ(AcF)を作出し、形態形成に関わる植物ホルモン関連遺伝子群の発現解析を行った。
【方法・結果】AcF 株は通常 CO_2(360 ppm)環境下では野生株と同様の生育を示したが、高 CO_2(1000 ppm)環境下では側枝数が野生株と比較して有意に増加し、生重量は野生株の 1.2～1.5 倍に増大していた。このとき、AcF 株におけるヘキソース量、ショ糖量は野生株と比較して増加していた。そこで、形態変化が見られる直前（5 週齢）のロゼッタ葉から RNA を単離し、側枝形成に関与する植物ホルモンの生合成および応答遺伝子群の発現量を Real-time PCR により比較した。AcF 株ではオーキシンの貯蔵に関与する *GH3* が増加し、ストリゴラクトンの合成遺伝子である *MAX4* や応答遺伝子 *MAX2* が減少していた。また、サイトカイニン活性化に関与する *AtLOG2* が増加、レスポンスレギュレーターの *ARR7* が減少していた。さらに、サイトカイニンやストリゴラクトンと関連して側枝形成を抑制している TCP ファミリーの *BRC1* が減少していた。そこで次に、外部からの糖処理によるこれら遺伝子発現への影響を明らかにするために、通常 CO_2 環境下で 4 週間水耕栽培したシロイヌナズナの野生株を、ショ糖、グルコース、フルクトースを含む水耕液で 24 時間処理後 mRNA を単離し、遺伝子発現量を比較した。その結果、全ての糖処理により *BRC1*、*MAX4* の発現量は減少していた。これらの結果から、側枝形成は、ショ糖、グルコース、フルクトース量の変化により、サイトカイニンやストリゴラクトンなどの植物ホルモンを介して *BRC1* などの形態形成に関連する遺伝子発現を制御することにより調節されていることが示唆された。現在、根、頂芽、基部など部位別に上記遺伝子の発現量を比較するとともに、糖シグナリング関連遺伝子(*STP1*、*HXK1* など)のノックアウト株を単離し、形態形成への影響について解析を行っている。

branching, sugar signaling, hormone

講演番号：2C04p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ C 校舎 04 会場

Characterization of physiological roles of PYR/RCAR/PYL in *Arabidopsis*
○Kai JIANG, Eun-kyung Seo, Hidemitsu Nakamura, Tadao Asami (The Univ. of Tokyo)

ABA is an important plant hormone that regulates many aspects of plant growth and development such as seed germination, root elongation, stomatal movements and so on. Elucidation of the mechanism of ABA signaling pathway will uncover the roles of ABA and increase agricultural productivity.

Recent breakthrough in ABA signaling research was the finding of canonical ABA receptor PYR/RCAR/PYL (PYL) and the establishment of the main ABA signaling pathway induced by PYLs. There are 14 members in PYL family. Biochemical, structural biological and physiological studies indicated that these PYLs play redundant and distinct roles. In addition their spatio-temporal expression levels in plant are not in the same pattern. The physiological roles of each PYL are still to be further elucidated.

In the last conference in 2013, we reported that some PYLs played negative roles in seed germination, seedling establishment and root elongation. We also showed that some PYLs regulate the hypocotyl elongation. Thereafter, we further studied the mechanism of PYL in regulating the hypocotyl growth. In addition, we also investigated the roles of PYL in responses of other treatments to Arabidopsis.

ABA, PYR/RCAR/PYL, receptor

講演番号：2C04p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ C 校舎 04 会場

イネの ABA 受容体 OsPYL の機能解析

Functional analysis of reice ABA receptors OsPYL

○地頭 広貴[1]、竹内 純[2]、大西 利幸[1,3]、轟 泰司[1,3] ([1]静大院農、[2]静大院創造、[3]静大グリーン研)
○Koki Jito[1], Jun Takeuchi[2], Toshiyuki Ohnishi[1,3], Yasushi Todoroki[1,3] ([1]Grad. School Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad. School Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ.)

アブシジン酸（ABA）は種子の休眠や環境ストレス応答に必須の植物ホルモンである。主としてシロイヌナズナを用いた遺伝学・逆遺伝学および化学遺伝学的研究により，ABA は START タンパク質である PYR/PYL/RCAR（AtPYL）に結合することでその配座変化を誘導してタンパク質脱リン酸化酵素（PP2C）に対する阻害能を付与し，ABA シグナル伝達をトリガーすることがわかっている。他の植物においても，PYL 様タンパク質と PP2C が ABA シグナル伝達に重要な役割を果たしていることが徐々に明らかにされつつあるが，例えば食物生産上重要な穀類の PYL については，シロイヌナズナほど詳細な解析はまだ行われていない。イネには AtPYL のオーソログ（OsPYL）が 10 種類存在する。この中で OsPYL5 は AtPYL と同様に ABA 依存的に PP2C を阻害することで，ABA シグナルをトリガーしていることを示唆する研究が最近報告された（Kim et al. 2012）*。しかし，OsPYL5 以外の OsPYL の機能は未解明であり，OsPYL5 も含めて，ABA との結合様式や PP2C 阻害活性の in vitro 解析はまだ行われていないため，OsPYL には AtPYL のようにモノマー型とダイマー型の両方が存在するのか，78 種類ある OsPP2C のどれを主に阻害しているのか，など不明の点が多い。

演者らは，ABA 依存的な相互作用が示唆されている OsPYL5 と OsPP2C30 を大腸菌を用いて発現し，アフィニティーカラムにより精製した。これらと ABA を用いて，*p*-nitrophenyl phosphate を基質とした in vitro PP2C 阻害試験を行ったが，阻害活性を確認することはできず，Kim らの報告とは異なる結果となった。シロイヌナズナの PYL と PP2C の複合体形成に関与するアミノ酸の一つである Val が OsPP2C30 では Met になっているため，OsPYL5 は OsPP2C30 と安定な複合体を形成せず，その活性を阻害できなかったのかもしれない。そこで，この Val が保存されている OsPP2C53 を発現して PP2C 阻害試験に供したところ，OsPYL5 は ABA 依存的に OsPP2C53 を阻害することがわかった。

*Kim et al. *J Exp Bot* **63**, 1013 (2012).

abscisic acid, ABA, receptor

講演番号：2C04p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ C 校舎 04 会場

高等植物における ABA 信号伝達因子の細胞周期制御系への関与について

Is cell cycle regulated by ABA-signal transduction-machinery in higher plant?

○二村 美恵、阿部 央樹、高橋 伸明、豊増 知伸、三橋 渉 (山形大学農)
○Misato FUTAMURA, Ouki ABE, Nobuaki TAKAHASHI, Tomonobu TOYOMASU, Wataru MITSUHASHI (Yamagata Univ.)

高等植物の細胞周期停止因子 Kip-related proteins(KRPs)の新規機能探索に興味を抱き、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)KRP を材料に結合タンパク質の単離・同定を酵母 two-hybrid 法(Y2H)で行ってきた。これらの結合候補タンパク質の１つがアブシジン酸(Abscisic Acid, ABA)の受容体、PYR/PYL/ RCAR であった。PYR/PYL/RCAR は ABA との結合によって立体構造を変化させ、ABA の信号伝達に関わる protein phosphatase 2C(PP2C)との結合力が高められる。結合によって PP2C がトラップされることで、ABA 信号は正に制御されることが知られている。KRP との結合は ABA 受容体に立体構造の変化を引き起こす可能性や、PP2C との結合に影響を与える可能性を想起させ、ABA 受容体を介した細胞周期への働きかけがありそうに思われた。そこで、本研究では、PYR/PYL/RCAR が Y2H 法における擬陽性タンパク質である可能性を否定するために *in vitro* プルダウン・アッセイ法での検討を行った。加えて、PYR/PYL/RCAR 側の KRP との結合部位の検討を Y2H 法で行ったので報告する。

プルダウン・アッセイ法では KRP はグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)-tag との融合タンパク質(GST-KRP)として、PYR/PYL/RCAR は His-tag との融合タンパク質(His-PYL)として、それぞれを大腸菌で異所性発現させて用いた。GST-KRP は菌体の破砕後、グルタチオンセファロースビーズで回収した。ビーズの洗浄後、沈殿画分にニッケルビーズで精製した His-PYL 画分を混合し、再度、グルタチオンセファロースビーズで回収を行なった。両タンパク質の検出は、ウエスタンブロッティング後、各抗 tag 抗体で発色することで行なった。その結果、GST-KRP と His-PYL に該当する有意なバンドが検出され、両者の相互作用が確認された。また、Y2H 法を用いた PYR/PYL/RCAR 側の結合部位の検討では、bait に KRP を、pray に PYL の全長または断片を用いて行い、PYR/PYL/RCAR の N 末側に KRP が結合することが示された。これらの結果に加え、ABA 受容体の細胞周期への関与についても考察を加える予定。

Abscic acid, Cell cycle, Arabidopsis

講演番号：2C04p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ C 校舎 04 会場

PYL アンタゴニスト PAO4 の生化学的機能解析
Biochemical functional analyses of PYL antagonist PAO4

○竹内 純[1]、岡本 昌憲[2]、大西 利幸[3]、轟 泰司[1,3,4] ([1]静大院創造、[2]鳥取大乾燥地研究センター、[3]静大院農、[4]静大グリーン研)
○Jun TAKEUCHI[1], Masanori OKAMOTO[2], Toshiyuki OHNISHI[3], Yasushi TODOROKI[1,3,4] ([1]Grad. School Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Arid Land Research Center, Tottori Univ., [3]Grad. School Agric., Shizuoka Univ., [4]RIGST)

アブシジン酸（ABA）は種子の休眠や環境ストレス応答において重要な役割を果たす植物ホルモンである。シロイヌナズナの ABA 受容体 PYL（PYR1 および PYL1-12）は，ABA との結合によってゲート閉鎖型配座となり，タンパク質脱リン酸化酵素 PP2C（HAB1，ABI1 など）に結合してその機能を阻害することで，ABA シグナル伝達をトリガーする。演者らは ABA による PYL-PP2C 間相互作用誘導メカニズムに着目し，ABA と同様に PYL に結合してゲート閉鎖を誘導するが，ABA とは違って PYL-PP2C 間相互作用を妨害する化合物（PYL アンタゴニスト）の開発を行っている。ABA の環部に S-直鎖ヘキシル基を導入した AS6 は，ABA と同じ強さおよび様式で PYL に結合してゲート閉鎖を誘導する。しかし，PYL-AS6 複合体は PYL-ABA 複合体と異なり，PYL 外に突出したヘキシル基が立体障害となって PP2C を阻害できない。したがって，AS6 は PYL アンタゴニストとしての機能を有した分子と考えられるが，植物において同時に投与した ABA の効果を明確に打ち消すには，ABA の 3 当量以上を必要とする。ABA と同程度の PYL 親和性を持っていても，PYL-ABA-PP2C 複合体を形成してタンパク質内に強く閉じ込められる ABA と互角に競合するのは難しいようだ。

そこで演者らは，PYL に対する結合親和性の向上を狙って AS6 の改良を検討した。配座自由度の大きい S-ヘキシル鎖の一部をあらかじめ固定することで，PYL に捕捉された際のエントロピー損失を低減できれば，PYL に対する親和性が増大するかもしれないと考え，AS6 の S-ヘキシル基の一部をベンゼン環で固定した化合物 PAO4 を設計・合成した。昨年度の本大会では，PAO4 は ABA による発芽阻害作用を抑制すること，また光学異性体のうち（+）体のみがその活性を示すことを報告した。本大会では，PYL-PP2C 間相互作用に対する(+)-PAO4 の効果を検証した。

大腸菌発現系により調製した PYL と HAB1 を用いて PP2C 活性試験を行ったところ，(+)-PAO4 は試験した全ての PYL に対して ABA 依存的な PP2C 阻害を抑制し，アンタゴニスト活性を示した。次に，等温滴定型カロリーメーターを用いて PYL-(+)-PAO4 間相互作用の熱力学的解析を行った。PYL5 に対して，(+)-PAO4 は AS6 よりも結合時の発熱量（エンタルピー変化）は小さかったが，意図した通りエントロピー的には有利であり，解離定数で比較すると，AS6 に対して約 4 倍強い PYL5 親和性を有することがわかった。一方 PYL10 に対しては，AS6 よりも大きな発熱量を示した反面，エントロピー損失も増大したため，トータルでは AS6 と同程度の PYL10 親和性に落ち着いた。ベンゼン環導入の効果が真逆になったことは大変興味深く，PYL アイソフォーム間の微妙な構造の違いが結合様式に影響している可能性がある。

abscisic acid, ABA, antagonist

講演番号：2C04p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ C 校舎 04 会場

新規ストリゴラクトンミミックの合成と活性評価

Synthesis of new strigolactone mimics and evaluation of their biological activity

○加藤 雄太[1]、福井 康祐[1,2]、太田 鋼[1]、中村 英光[1,2]、浅見 忠男[1,2] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]JST CREST)
○Yuta Kato[1], Kosuke Fukui[1,2], Tsuyoshi Ohta[1], Hidemitsu Nakamura[1,2], Tadao Asami[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo., [2]JST CREST)

【背景】

植物ホルモンの一つであるストリゴラクトン（SLs）は様々な生理活性作用を持ち、主として植物の枝分かれを抑制することや、根圏共生菌である AM 菌の菌糸分岐を誘導すること、根寄生植物の発芽を誘導することが知られている。農作物の枝分かれ収量を左右する重要な形質であるために、SL を介した枝分かれの制御は食糧生産の観点から重要な技術となる。

一方、根寄生植物とはサハラ砂漠以南のアフリカ大陸の農作物に寄生し、多大な被害をもたらしている植物であり、その防除法の開発が待たれている。根寄生植物は種子が非常に小さく、物理的防除が困難であり、一度土壌が汚染されてしまうと、汚染前の状態に回復させる決定的な手段は現在のところ存在しない。被害を防ぐために有効な手段として現在考えられている方法として、寄生に対して抵抗性を持つ作物の創出や発芽誘導物質を用いて種子の自殺発芽を誘導する化学的な防除法を挙げることができる。

本研究グループはこれまでに、化学的な防除法に着目し、発芽誘導活性を有する化合物の合成探索を行ってきた。我々が開発したストリゴラクトンミミックであるデブラノンは、高い植物の枝分かれ抑制効果を示すにも関わらず、根寄生雑草種子発芽活性は著しく低い。そこで、根寄生雑草種子発芽活性の高い化合物の創製を目的として、デブラノンの構造に基づいた誘導体の合成を行い、これまでに、発芽誘導活性に特化した誘導剤を開発することに成功している。

【目的と方法】

これまでの構造活性相関研究を通して、SL 類の活性発現には、D14 による水酸化された D 環の生成が重要であると考えている。そこで、ストリゴラクトン活性を持つ新たなリード化合物の発見及びその化合物を用いたストリゴラクトン作用機構の解明を目的として、水酸化された D 環および D 環誘導体が生じる可能性のある様々な化合物を合成した。また、D14 による水酸化されない構造を有するデブラノン誘導体も合成した。これら化合物について、イネと根寄生植物の一種である *S. hermonthica* を対象に活性を調べたので結果を報告する。

strigolactone, seed germination, shoot branching

講演番号：2C04p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ C 校舎 04 会場

デブラノン類はストリゴラクトンの複数の作用を個別にミミックできる
Debranones can mimic multiple strigolactone functions separately
○福井 康祐 [1,2]、加藤 雄太 [1]、山上 大智 [1,2]、中村 英光 [1,2]、浅見 忠男 [1,2] ([1] 東大院農生科応生化、[2]JST-CREST)
○Kosuke Fukui[1,2], Yuta Kato[1], Daichi Yamagami[1,2], Hidemitsu Nakamura[1,2], Tadao Asami[1,2] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]JST-CREST)

ストリゴラクトン（SL）は枝分かれを抑制する新規植物ホルモンとしての作用が 2008 年に報告された、カロテノイドから生合成される４環性の化合物である。この発見以前には SL はストライガ属の根寄生植物の種子発芽誘導物質として、また根共生菌の一種である AM 菌の菌糸分岐誘導物質として知られていた。植物ホルモン作用としては上に挙げた枝分かれ抑制のほか、根毛の伸長や不定根の形成阻害などの根の形態形成に関わることが知られているが、その他機能の全容は未だ明らかになっていない。また、植物体内での受容体はα/β加水分解酵素ファミリーに属する D14 タンパク質であると考えられており、現在も受容の詳細なメカニズムに関する研究が活発に行われている。以上のように SL に関しては受容や作用、局在など未だ多くのことが明らかになってはおらず、今後の進展のためには様々なアプローチが必要である。我々の研究グループでは、これまでに植物の枝分かれ抑制に対し強く作用する新規ストリゴラクトンミミック『4BD』を開発しており、4BD を含むフェノキシフラノン誘導体をデブラノンと呼称している。これまでに報告した 4BD は植物の枝分かれを強く抑制する一方で、根寄生植物 *Striga hermonthica* の種子発芽誘導活性は弱く、高濃度でのみ誘導するという機能選択性を持っていた。この機能選択性が、化合物の受容体に対する親和性で決まるのであれば、逆の選択性を持つ化合物の合成も可能なのではないかと考えた。そこでデブラノン類の構造活性相関について詳細な検討を行うことで、根寄生植物の種子発芽は誘導するが植物の枝分かれは抑制しない化合物の合成探索を試みた。その結果、根寄生植物発芽誘導活性が高く、枝分かれ抑制活性が低いというこれまでとは逆の活性を有する化合物の取得に成功した。これら異なる選択性を持つ２つの化合物を用いて、機能の違いの原因をタンパク質レベルで明らかにすることができれば、SL の受容と情報伝達に関する新たな知見が得られると期待できる。今回、まず植物や根寄生植物を用いてこれら２つの化合物の特性を調べ、比較したのでその結果を発表する。

strigolactone, Striga, branching

講演番号：2C04p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ C 校舎 04 会場

タルウマゴヤシが生産するストリゴラクトン medicaol の生合成経路解析
Biosynthetic study of medicaol , a strigolactone produced by the model legume *Medicago truncatula*
○徳永 珠美[1]、謝 肖男[2]、米山 弘一[2]、秋山 康紀[1] ([1]阪府大院・生命環境、[2]宇都宮大・雑草科学)
○Tamami Tokunaga[1], Xiaonan Xie[2], Koichi Yoneyama[2], Kohki Akiyama[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]Utsunomiya Univ.)

【目的】
ストリゴラクトン（strigolactone, SL）は植物においてアーバスキュラー菌根菌や根寄生雑草との相互作用における根圏情報物質として作用するのみでなく，地上部の枝分かれを制御する内生ホルモンとしても働くアポカロテノイドである。これまでに 20 種以上の SL が天然から単離同定されており，solanacol を除き，すべて 5-deoxystrigol（5DS）を共通の基本骨格としている。昨年度の本大会において，我々はマメ科モデル植物であるタルウマゴヤシ（*Medicago truncatula*）が生産する新規 SL である medicaol の単離・構造決定について報告した。スペクトル解析の結果，medicaol は A 環に cycloheptadiene の 7 員環を持つ新規骨格の SL であると推定されたため，その 4-deoxy 体を合成し，NMR スペクトルを比較することにより構造を決定した。今回，medicaol の生合成経路の解明を目的として，重水素ラベルした前駆体 SL の取り込み実験を行うこととした。タルウマゴヤシが生産する SL を LC-MS/MS により分析して，medicaol の前駆体と考えられる SL を推定した。それら SL の重水素ラベル体を合成し，タルウマゴヤシ根への取り込み実験を行って medicaol へ変換されるかどうかを調べることとした。
【方法および結果】
タルウマゴヤシが medicaol の他にどのような SL を生産しているのかを調べるために根分泌物酢酸エチル可溶中性物質画分を LC-MS/MS により分析した。その結果，medicaol に加えて，fabacyl acetate 異性体，orobanchol，そして *ent*-2'-*epi*-5DS が検出された。しかし，昨年度に構造決定のために合成した 4-deoxymedicaol は検出されなかった。これらのことから，medicaol は 4-deoxymedicaol の 4 位の水酸化により生合成されるのではなく，*ent*-2'-*epi*-5DS の 4 位が水酸化された orobanchol から生合成される可能性が高いと考えた。この orobanchol の 8 位に置換したメチル基が水酸化されて 9- あるいは 10-hydroxyorobanchol に変換され，さらに環拡大反応を経て medicaol は生合成されると推測された。そこで，これら medicaol の前駆体と考えられる orobanchol と *ent*-2'-*epi*-5DS について重水素ラベル体を合成した。2-Methylcyclohexanone から CD_3I および $NaNH_2$ により [2-CD_3]-2,2-dimethylcyclohexanone を合成し，続く 5 段階の反応により ABC ラクトンを合成した。この重水素ラベル化 ABC ラクトンから [8-CD_3]-*ent*-2'-*epi*-5DS および [8-CD_3]-orobanchol をそれぞれ合成した。現在，水耕栽培したタルウマゴヤシの根を用いた取り込み実験を行っている。

Strigolactone, *Medicago truncatula*, Biosynthesis

講演番号：2C04p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ C 校舎 04 会場

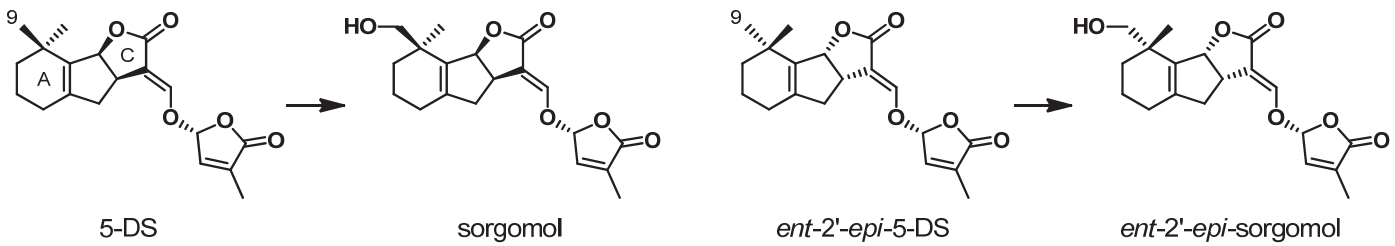
ソルガムにおける 5-deoxystrigol から sorgomol への変換反応

Bioconversion of 5-deoxystrigol to sorgomol by the sorghum

○上野 琴巳[1]、本並 宜子[1]、中嶌 瞳[1]、水谷 正治[1]、滝川 浩郷[1,2]、杉本 幸裕[1,2]（[1]神戸大院農、[2]JST/JICA, SATREPS）
○ Kotomi UENO[1], Noriko MOTONAMI[1], Hitomi NAKASHIMA[1], Masaharu MIZUTANI[1], Hirosato TAKIKAWA[1,2], Yukihiro SUGIMOTO[1,2] ([1]Grad. School of Agric. Sci., Kobe Univ., [2]JST/JICA, SATREPS)

ストリゴラクトン（SL）は、リンや窒素の不足に応答して生合成される植物ホルモンで、腋芽の伸長を抑制し、根の伸長や葉の老化を促進する。その一方で根圏にも分泌され、リンの供給に関わるアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐を誘導して共生を促す。また宿主の根に寄生するストライガやオロバンキなどの根寄生雑草の種子は、SL によって発芽する。SL は三環ラクトンとエノールエーテルで結合したブテノライドから成る 5-deoxystrigol（5-DS）を基本骨格としているが、ラクトン以外の二環部分が酸化修飾されている類縁体が数多く知られている。植物の種類や品種によって生合成している酸化修飾体の種類や割合は異なっているため、酸化修飾の意義は不明である。

Sorgomol は、5-DS の A 環メチル基（9 位）が水酸化された SL で、ソルガムやレンゲで生合成されている。Sorgomol が 5-DS から生合成されているのかを確認するために、ソルガムの sorgomol 高生産品種に 5-DS の立体異性体 4 種を投与した。その結果、ソルガムが生合成する sorgomol と同じ立体を有した 5-DS の 9 位が水酸化された。それに加え、C 環の立体が異なっている *ent*-2'-*epi*-5-DS も 9 位（C 環に対してシスの関係にあるメチル基）が水酸化された。他の 2 種の立体異性体では 9 位の水酸化は観察されなかった。同じく sorgomol を生合成しているレンゲでは 5-DS のみを水酸化したことから、植物が有する 5-DS 水酸化酵素は植物によって性質が異なっていると示唆された。これらの水酸化反応はいずれも cytochrome P450 の阻害剤である uniconazole-P によって濃度依存的に阻害されたことから、反応には P450 が関与していると考えられた。ソルガムの根からミクロソーム画分を調製して水酸化反応を行ったところ、P450 が反応に関与していることを示唆する結果がいくつか得られたので、あわせて報告する。



strigolactone, biosynthesis, hydroxylation

講演番号：2C04p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ C 校舎 04 会場

Isolation and structural determination of novel germination stimulant produced by maize
○PICHIT KHETKAM[1,2], Takaya Kisugi[1], Xiaonan Xie[1], Kaori Yoneyama[1], Takahito Nomura[1], Koichi Yoneyama[1] ([1]Weed Sci. Center, Utsunomiya Univ., [2]United Grad. School of Agric. Sci., Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)

Witchweeds (*Striga* spp.) and broomrapes (*Orobanche* and *Phelipanche* spp.) are devastating root parasitic weeds which cause significant crop losses in many parts of the world. Seed germination of these root parasites can only be induced by germination stimulants produced by and released from host roots. Among the germination stimulants characterized so far, strigolactones (SLs) are most important as they are indispensable host recognition signals for symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere and function as a novel class of plant hormones regulating shoot and root architecture *in planta.* Maize (*Zea mays*) is a major host of *S. hermonthica* and *S. asiatica* and has been shown to produce several SLs including strigol. In addition, Jamil *et al.* (*Field Crops Res.,* **134**, 1–10, 2012) reported presence of two novel SLs, SL1 and SL2, as major stimulants in maize root exudate. In the present study, isolation and structural determination of germination stimulants from root exudate of maize plants (cv. Pioneer 2817) were conducted. Maize plants were grown hydroponically with tap water and root exudate collected by using activated charcoal. The root exudate adsorbed on charcoal was eluted with acetone, and the aqueous residue after evaporating the acetone under reduced pressure was extracted with ethyl acetate. The bioassay-guided purification of germination stimulants on *O. minor* seeds revealed that maize plants produce four known SLs, orobanchol, strigol, sorgomol, and 5-deoxystrigol. In addition to these known SLs, two novel stimulants (SL1 and SL2) and some other minor ones were detected by LC–MS/MS analysis of root exudate. Both SL1 and SL2 were found to be mixtures of isomers and one isomer of SL2 could be purified to homogeneity. Spectroscopic analyses of the purified compound suggested that it is not an SL but a carlactone derivative. This is the first report on the isolation and structural determination of carlactone-type germination stimulants.

Strigolactone, Root parasitic plants, Maize

講演番号：2C04p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ C 校舎 04 会場

植物におけるインドール-3-酢酸生合成機構の解析
Biochemical analysis of the indole-3-pyruvic acid pathway in plants
○増口 潔、神谷 勇治、榊原 均、笠原 博幸（理研・環境資源科学研究センター）
○Kiyoshi MASHIGUCHI, Yuji KAMIYA, Hitoshi SAKAKIBARA, Hiroyuki KASAHARA (RIKEN CSRS)

天然オーキシンであるインドール-3-酢酸（IAA）は、植物の成長や発達において中心的な役割を果たす植物ホルモンである。多岐にわたるオーキシンの生理作用を理解する上で、その初発となる IAA の生合成及びその制御機構を明らかにすることは重要である。最近、私達は植物の主要な IAA 生合成経路としてインドール-3-ピルビン酸（IPA）経路を同定した。IPA 経路では、トリプトファンアミノ基転移酵素（TAA）によってトリプトファンから IPA が合成された後、フラビン含有モノオキシゲナーゼ YUCCA（YUC）による IPA の酸化的脱炭酸反応を介して IAA が生合成される。しかし、本経路の律速段階を担う YUC の酵素機能をはじめとして、IPA 経路の酵素タンパク質レベルでの制御機構についてはほとんど明らかにされていない。そこで、本研究ではシロイヌナズナに 11 個存在する YUC ファミリーの生化学的な解析を足がかりに、IPA 経路の全容解明を試みた。

本発表では、系統樹上で異なるグループに属する数種の YUC の酵素学的性質を示し、グループ間での酵素特性の相違点の有無や、酵素特性と生理的機能の関係性などを議論する。また、TAA タンパク質と YUC タンパク質を同時に混在させた IPA 経路の試験管内再構成によって得られてきた知見などについても報告したい。

auxin, flavin-containing monooxygenase, plant hormone

講演番号：2C04p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ C 校舎 04 会場

オーキシン代謝における C24 エチルステロールの生理機能解明

Studies on the auxin metabolism and distribution in sterol methyltransferase mutant

○中本 雅俊、太田 大策（大府大院生命環境）
○Masatoshi NAKAMOTO, Daisaku Ohta (Osaka Pref Univ.)

植物の発達には適切なステロール組成が必要であるとされているが，多様な植物ステロール分子が独自の生理機能を担うかは検証されていない．植物ステロール組成は側鎖 C24 位のアルキル化修飾が異なる C24 メチルステロールと C24 エチルステロールの比で決まる．C24 位のアルキル化反応には 2 種類の S-アデノシルメチオニン依存のメチル基転移酵素が関与する．すなわち第一段階の反応は酵母など真核微生物にも保存された SMT1 が反応を触媒し，C24 メチルステロールが生合成される．第 2 段階は陸上植物に特異的な SMT2 および SMT3 が反応を触媒し，1 段階目の反応で付加されたアルキル基炭素へのメチル基付加によって C24 エチルステロールが生合成される．そこで本研究では，陸上植物に特異的に存在する C24 エチルステロールが担う新規の生理機能解明を目的とし，シロイヌナズナの *SMT2* と *SMT3* の二重変異体（*smt2smt3*）を作出した．*smt2smt3* は重力屈性反応の異常や培養根の二次根発生発達の阻害など，オーキシン局在性の異常が原因と思われる表現型が観察された．また根端部および培養根の二次根における *DR5::GUS* レポーター遺伝子発現の結果から，著しいオーキシン局在性の異常が示唆された．*smt2smt3* の根においてオーキシンの輸送体である PIN2 と GFP の融合タンパク質である PIN2-GFP の局在性を観察したところ，局在性の異常が観察されたことから，*smt2smt3*の根における異常表現型はオーキシン輸送の撹乱に伴うオーキシンの組織内分布の破綻が原因であると考察した．さらに PIN2-GFP の局在異常が観察された根の epidermis と cortex とこれらの層を形成する stem cell で細胞分裂極性の撹乱と細胞板形成の停滞による複核細胞の形成が認められた．二次根の発達異常が認められる培養根の培地に C24 エチルステロールであるβ-sitosterol を添加したところ培養根の異常表現型および *DR5::GUS* の発現パターンが一部回復した．そこで，β-sitosterol を添加した培養根のステロール組成を分析したところ，*smt2smt3* のステロール組成に変化は認められなかった．培養根から単離した *smt2smt3* のプロトプラストでは細胞分裂が完了しない細胞が多数観察された．一方，β-sitosterol を添加して培養した *smt2smt3* の根から得たプロトプラストは細胞分裂を完了する細胞数が著しく増加した．以上の結果からは，植物ステロールの組成比ではなくβ-sitosterol が細胞分裂と細胞質分裂後に決定される PIN2 の局在に関与することが明らかとなった．これらの結果を基にしてβ-sitosterol が，オーキシン恒常性と組織内分布を介して根系発達に関わる機構の考察をする．

Plant sterol, Auxin, Cytoskelton

講演番号：2C04p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ C 校舎 04 会場

昆虫におけるインドール酢酸生合成

Biosynthesis of indole-3-acetic acid in insects

○鈴木 宏佳[1]、横倉 淳平[1]、伊藤 つかさ[1]、永田 晋治[2]、浅見 忠男[3]、鈴木 義人[1] ([1]茨城大農、[2]東大院新領域、[3]東大院農生科)
○Hiroyoshi SUZUKI[1], Junpei YOKOKURA[1], Tsukasa ITOU[1], Shinji NAGATA[2], Tadao ASAMI[3], Yoshihito SUZUKI[1] ([1]Ibaraki Univ., [2]Univ. of Tokyo, Front. Sci., [3]Univ. of Tokyo)

【背景と目的】虫えい（ゴール）は寄生者である昆虫が，植物組織に異常な分裂や変形を誘導し，形成する組織である．演者等はシバヤナギにゴールを形成するハバチやヨモギにゴールを形成するタマバエ等のいくつかのゴール形成昆虫に高濃度のインドール酢酸（IAA）およびサイトカイニンが含まれること，また，これらの昆虫がトリプトファン（Trp）から IAA への生合成能があることを示し，ゴール形成昆虫が生産する植物ホルモン類がゴール形成の重要な要素となっている可能性を強く示唆してきた．さらに，IAA はゴール形成昆虫以外の昆虫にも広く存在しており，ショウジョウバエやカイコにおける Trp からの IAA 生合成能も確認している．このことから，ゴール形成は進化の過程で昆虫が本来有している IAA 生合成能を一部の昆虫が更に発達させ，利用したものと考えられた．本研究では, ゴール形成昆虫の IAA 生産の重要性を明らかにするためハバチおよびカイコにおける IAA 合成経路を決定するとともに，IAA 合成阻害剤の取得を目的とし，入手の容易なカイコの酵素系を用いて阻害剤の探索を行った．

【方法および結果】カイコは様々な組織を用いた代謝実験の結果，絹糸腺に強い Trp→IAA 活性が認められた．また，ハバチは幼虫を水に浸漬して得られる酵素液を用いた．植物や微生物で知られている IAA 生合成中間体を対象に, 内生量の分析, 標識 Trp からの変換量の分析, およびそれらを与えたときの IAA 内生量への影響を調べた結果, インドールアセトアルドキシム（IAOx）が中間体の最有力候補と考えられた．また，カイコでは Trp→IAOx が律速段階になっているのに対し，ハバチではこの変換活性が強化されていると考えられる結果が得られた．

カイコ絹糸腺における IAOx→IAA の変換に対する阻害剤を，Maybridge 社の化合物ライブラリーからスクリーニングを行った．約 2000 の化合物をスクリーニングした段階で，8 つの化合物に阻害活性が認められ，詳細な活性検定を行ったところ，濃度依存的かつ高活性な阻害剤が 1 つ確認された．本化合物は絹糸腺のみならず，ハバチから調製した酵素液に対しても，標識 Trp→標識 IAA の変換を阻害することが判明した．今後，カイコ個体への投与実験行うとともに，ゴール形成期のハバチへ投与し，ハバチにおける IAA 合成への阻害効果およびゴール形成能への効果を確認する予定である．

indole-3-acetic acid, insect, gall

講演番号：2C04p22
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ C 校舎 04 会場

IAA 生合成阻害剤を用いたオーキシン関連変異体の探索

Auxin related mutants isolated by screening with IAA biosynthesis inhibitor

○安藤 卓也[1,2,7]、中村 英光[1,7]、近藤 陽一[4]、松井 南[4]、長田 裕之[2,3]、仲野 雄司[2,5,7]、嶋田 幸久[6]、浅見 忠男[1,7]([1]東大院・応生化、[2]理研・抗生物質、[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[4]理研 CSRS・合成ゲノミクス、[5]理研 CSRS・機能開発、[6]横浜市大・木原生物学研究所、[7]科学技術振興機構・CREST)
○Takuya Ando[1,2,7], Hidemitsu Nakamura[1,7], Youichi Kondo[4], minami Matsui[4], HIroyuki Osada[2,3], Takeshi Nakano[2,5,7], Yukihisa Shimada[6], Tadao Asami[1,7] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem, Univ. of Tokyo, [2]RIKEN, Antibiotics Lab., [3]RIKEN CSRS, Chemical Biology, [4]RIKEN CSRS, Synthetic Genomics, [5]RIKEN CSRS, Gene Discoverly, [6]Kihara Institute for Biological Chemistry, Yokohama City Univ., [7]JST CREST)

【背景と目的】

植物ホルモン indole-3-acetic acid（IAA）は植物において多様な生理機能を示す事が知られているが、その生合成及びシグナル伝達経路は多岐に渡っており全容解明には至っていない。また、他の植物ホルモンとのクロストークに関しても様々な知見が蓄積されてきているが、具体的な因子や詳細な制御機構に関しては未だ不明な点が多い。最近になって IAA 生合成阻害剤である L-2-aminooxy-3-phenylpropionic acid（AOPP）がマイクロアレイデータの比較解析によって見出された。(Soeno et. al., 2010)。そこで本研究では、この阻害剤を用いて新たな IAA 関連変異体のスクリーニングを行い、得られた変異体 *rai*（*resistant to auxin inhibitor*）の性状解析と原因遺伝子の解析を通した IAA の生合成及びシグナル伝達機構の解明を目指した。

なお、阻害剤を用いた変異体スクリーニングの利点として、生育に重要な生合成遺伝子の機能を抑えた擬似的な二重変異体のスクリーニングが可能である事、目的に応じて濃度を変える事によって致死にならない範囲での抑制が可能である事、他の阻害剤と組み合わせることも可能である事、等を挙げることができる。

【方法と結果】

理化学研究所 CSRS で開発され保存されている FOX（full-length cDNA overexpressor gene）ラインを対象として AOPP 抵抗性変異体のスクリーニングを行った結果、抵抗性変異体 1 ラインを取得し、これを *rai5-D*（*rai5-dominant*）と命名した。*rai5-D* の原因遺伝子はアクアポリンの一種である *plasma membrane intrinsic protein 1D*（*PIP1D*）をコードしていたが、現在に至るまでアクアポリンとオーキシンシグナルとの関連についての情報は非常に少なかったため、アクアポリンの過剰発現がオーキシンシグナルに与える影響を中心に変異体の解析を行った。*RAI5-ox* は AOPP に抵抗性を示すものの、通常条件培地では根の伸長量に変化が無く、また IAA 応答性遺伝子の発現量も WT と比較して差が無かったため、恒常的オーキシンシグナル過剰変異体である可能性は低いと考えた。35S::RAI5-GFP 形質転換体を作出し存在部位について詳細に観察したところ、細胞膜の上下方向に多く局在するというオーキシン排出キャリアである PIN1 や PIN2 と類似した様相を示すことが明らかとなった。また 35S プロモーターで発現誘導しているにも関わらず蛍光が視認出来ない細胞があり、翻訳後制御を受けている可能性が示唆された。RAI5::GUS 形質転換体を作出し発現部位についての観察を行った所、オーキシン応答性遺伝子である DR5::GUS と比較しておよそ逆の発現パターンを示し、また IAA 処理によって発現が誘導される事を確認した。

Auxin, biosynthesis inhibitor, FOX hunting system

講演番号：2C05a01
講演日時、会場：3 月 28 日 09:00～ C 校舎 05 会場

ショ糖による翻訳制御を受けるトマト bZIP 型転写因子遺伝子の特徴づけ

Characterization of tomato genes encoding bZIP-type transcription factors which show sucrose-induced repression of translation

○田中 俊[1]、井澤 翔[1]、ベルベリッヒ トーマス[2]、草野 友延[1] ([1]東北大院生命、[2]BiK-F)
○Shun TANAKA[1], Sho IZAWA[1], Thomas BERBERICH[2], Tomonobu KUSANO[1] ([1]Tohoku Univ., [2]BiK-F)

【背景】グループ S に属する bZIP タンパク質をコードするシロイヌナズナ *AtbZIP11* 遺伝子から転写される mRNA 構造をみると 5’-leader 領域に短い上流 ORF（uORF）を 4 つ含んでいた。このうち 2 番目の uORF は進化的に保存されており、下流の bZIP11 タンパク質をコードする ORF の翻訳を抑制する機能を持っていた。さらに、外部から加えたショ糖はこの翻訳抑制を強める役割を持つことが Smeekens のグループにより報告されていた。この現象は Sucrose-induced repression of translation 、SIRT と略称された。我々は、タバコの葉の老化に伴い発現が高まる遺伝子として *tbz17* 遺伝子を単離していたが、この遺伝子は分子系統解析の結果より、*AtbZIP11* 遺伝子に極めて近縁関係にあること、上述の進化的に保存されている uORF を 5’-leader 領域にもつこと、そして *tbz17* でもこの uORF 依存的に SIRT が起こることを確認した。さらに、*tbz17* の 5’-leader 領域を除去した形の *tbz17* cDNA を過剰発現する形質転換タバコ植物を作出した所、得られた植物ではいずれも野生株に比べて約 4 倍高いショ糖を含んでいた。
【目的】*tbz17* のトマト相同遺伝子 *SlbZIP1* と *SlbZIP2* を用いて、高ショ糖濃度のトマト果実の作出を目的とし、両遺伝子の特徴付けを行った。
【方法と結果】
（1） Database の情報を基に、*SlbZIP1* と *SlbZIP2* の全長 cDNA の単離を行った。
（2） *SlbZIP1* と *SlbZIP2* がコードする bZIP タンパク質が、植物細胞内で核に局在することを、GFP 融合法を用いて確認した。
（3） 転写検定法を用いて、SlbZIP1 および SlbZIP2 が転写活性化因子であることを確認した。
（4） 両 cDNA の 5’非翻訳領域には進化的に保存された upstream ORF が存在していた。一過的な発現解析系を用いて、*SlbZIP1* と *SlbZIP2* 遺伝子においても SIRT が起こることを確認した。さらに SIRT の際に進化的に保存された upstream ORF が要求されることを確認した。
（5） 老化葉において、*SlbZIP1* と *SlbZIP2* の発現量の増加が確認されたため、*tbz17* と同様に老化誘導性であることが示唆された。
今回の結果を踏まえ、高ショ糖含有植物を作出する手法を論議する。

Solanum lycopersicum, bZIP transcription factor, sucrose

講演番号：2C05a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ C 校舎 05 会場

スクロース誘導性プロモーターを用いた *Nicotiana plumbaginifolia* 毛状根における GUS の高発現
High-level expression of sucrose inducible promoter-GUS fusion gene in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* hairy roots
○本間 洋平、山川 隆（東大院農）
○Youhei HONMA, Takashi YAMAKAWA (Tokyo Univ.)

[目的]毛状根は、*Agrobacterium rhizogenes* の感染によって生じるが、植物を用いた物質生産系の開発において有用な材料であると考えられている。植物を用いた物質生産系の開発において、CaMV35S プロモーターの様な常時発現型のプロモーターでは導入遺伝子の過剰発現による宿主植物の生育阻害やコサプレッションによる発現抑制などの問題点が指摘されている。一方、植物の組織や器官において特異的に発現誘導するプロモーター、および物理的刺激や化学物質によって発現誘導するプロモーターは特定の条件下でのみ効率よく導入遺伝子の発現を誘導することから、植物を用いた有用物質の生産系の開発研究に利用されている。サツマイモの塊根に蓄積される貯蔵タンパク質であるスポラミンは、塊根内の全貯蔵タンパク質の約 8 割を占め、スポラミンのプロモーター領域の解析からスクロース濃度に応じて発現することが解明されている。更に、スポラミンプロモーターの最少領域 (spo^{min}) が決定されている(1)。そこで本研究では spo^{min} が *Nicotiana plumbaginifolia* の毛状根において、特定条件下で異種タンパク質を大量に生産させることが可能であるかを検討した。

[材料と方法]Morikami らによって決定された spo^{min} と CaMV 35S プロモーターの下流に GUS の cDNA、および GUS を細胞質、アポプラスト、ER に輸送する配列をそれぞれ連結した 6 種類のコンストラクトをそれぞれ導入した組換え *N. plumbaginifolia* を作成した(2)。この組換え体に *A. rhizogenes* ATCC 15834 株をリーフディスク法、葉挿し法によって感染させ、毛状根を誘導した（25℃、暗黒下）。毛状根の一部を切り取り、無菌的にスクロース溶液 (100 ml スケールのコニカルビーカーに 10 ml のスクロース 0、6、10%含有の脱イオン水) に浸して振盪培養し（60 rpm、25℃、暗黒下）、GUS の発現を誘導した。スクロース処理 7 日目において誘導された GUS の活性を測定した。

[結果] spo^{min} によって発現誘導された毛状根における GUS の活性は検討した範囲内でスクロース濃度依存的に上昇し、CaMV 35S プロモーターによる GUS の活性と同等以上であった。また、培養液中からも GUS 活性が僅かだが検出された。10%スクロース溶液による GUS 活性は 6%スクロース溶液による GUS の活性に比べて増減した。これはスクロース濃度依存的に GUS の活性が上昇したが、10%スクロース溶液では高浸透圧刺激となり組織がダメージを受けた為と推測された。以上から spo^{min} によって誘導された GUS の発現は CaMV 35S プロモーターによる GUS の発現量を超えると考えられる。

1　Morikami *et al*., 2005 Mol. Gen. Genomics 272: 690‐699.
2　本間、山川、日本植物分子細胞生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集、p141 (2013)

hairy roots, sucrose inducible promoter, *Agrobacterium rhizogenes*

講演番号：2C05a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ C 校舎 05 会場

サツマイモ由来 Rubisco small subunit プロモーターの単離と発現解析

Isolation of light-inducible promoter of the gene encoding Rubisco small subunit from sweet potato.

○田部 記章[1,2]、豊田 雄介[1]、大鳥 久美[1,2]、Padilla-Chacon Daniel[1,2]、田茂井 政宏[1,2]、重岡 成[1,2]
([1]近畿大・農・バイオ、[2]JST, CREST)
○NORIAKI TANABE[1,2], Yusuke TOYODA[1], Kumi Ohtori[1,2], Daniel Padilla-Chacon[1,2], Masahiro Tamoi[1,2], Shigeru Shigeoka[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [2]JST, CREST)

【目的】Rubiscoは葉緑体において、カルビンサイクルにおけるCO_2固定の最初の反応を触媒する酵素であり、葉の総可溶性タンパク質の50%にも及ぶほど高蓄積しているタンパク質である。Rubiscoを構成する小サブユニット遺伝子(*rbcS*)は核にコードされており、葉緑体移行シグナルを有している。このことから*rbcS*プロモーターは、外来遺伝子を葉緑体内に高発現させる際に有用である。ところで、サツマイモ（*Ipomoea batatas*）はシンク能力が高く、光合成代謝産物を塊根に大量に蓄積可能であることから、バイオマス増産のための重要な作物である。しかし、サツマイモは雄性不稔、自家不和合性、6倍体であるため従来の育種法では収量を増大させた品種を作出するのは難しい。これまでに我々は、カルビンサイクルの律速酵素と考えられるfructose-1,6-bisphosphatase（FBPase）とsedoheptulose-1,7-bisphosphatase（SBPase）の両反応を触媒するラン藻由来のFBP/SBPaseをタバコやレタスの葉緑体で発現させることによりソーク機能を増強し、収量を増大させることに成功している。そこで本研究では、サツマイモ葉緑体でのFBP/SBPase高発現による収量増大を目指し、サツマイモrbcSプロモーター(*Ib RbcS*)の単離を試みた。

【方法と結果】種々の植物の*RbcS*遺伝子に高く保存された配列から作成したプライマーを用いて*Ib rbcS* ORFの一部を単離し、LA PCR *in vitro* Cloning Kit(TaKaRa)により5’領域を決定した。その結果、現在までに5’UTR領域を含む上流1,000 bpまでの配列を同定した。データベース検索により同定した領域の-500 bpまでに光応答性のシス因子が多数重複して存在していることが明らかとなった。

同様に上記のキットを用いて*Ib RbcS*遺伝子の完全長cDNAを決定した。その結果、*Ib RbcS*は2つのイントロンに分断された3つのエキソンから構成されていた。Ib RbcSの推定アミノ酸配列を他の双子葉植物のRbcSと比較したところ、全ての植物間で60%以上のアミノ酸が保存されていた。またIb RbcSの推定葉緑体トランジットペプチド配列も他の植物RbcSのそれと高い相同性を示した。次に、明/暗期の葉における*Ib RbcS*遺伝子の発現を半定量的RT-PCRで解析した結果、*Ib RbcS*遺伝子の発現は明期特異的であった。現在、*Ib RbcS*プロモーター制御下でIb RbcS葉緑体トランジットペプチドと*FBP/SBPase*を融合した遺伝子を植物感染用ベクターpRI201に導入したコンストラクトを作成し、アグロバクテリウムを介してサツマイモへの形質転換を行い、導入株の選抜を行っている。

sweet potato, rbcs, promoter

講演番号：2C05a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ C 校舎 05 会場

バイオディーゼル燃料植物ヤトロファの遺伝子導入系の最適化

Improvement of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of Jatropha (*Jatropha curcas* L.)

○七里 吉彦、木戸 真史、明石 欣也（鳥取大農）
○Yoshihiko NANASATO, Masafumi KIDO, Kinya AKASHI (Tottori Univ.)

ヤトロファ（*Jatropha curcas* L.）は、中央アメリカを原産地とするトウダイグサ科の植物である。この植物は、バイオディーゼルに好適な脂肪酸組成を持つトリアシルグリセリドを種子に 30～40%程度含む。単位面積当たりの油脂収量が高く、耕作に不適な荒れ地でも生育が可能であることから、食糧生産と競合しない次世代型のエネルギー作物として注目されている。ヤトロファ育種の歴史は浅いが、油脂生産性とストレス耐性が向上した優良品種が世界各地で選抜されてきている。これらヤトロファ品種の生産性をさらに高めるため、開発基盤として分子育種技術の改良が求められている。

ヤトロファの形質転換法は過去にいくつか報告されているが、これらは選抜マーカーとして微生物由来の抗生物質耐性遺伝子を利用しており、実用化に際して安全性が懸念されていた。また形質転換の効率も高いものではなく、実用化を図る上で障害となっていた。我々のグループはこれまでにインドネシア系統 IP-2P において、除草剤ビスピリバックと選抜マーカー遺伝子として植物由来の変異型 *ALS* 遺伝子を用いた形質転換系を報告した(Kajikawa et al., (2012) Plant Biotechnol 29, 145-153)。本研究では、形質転換効率のさらなる向上を目指すために、以下のような条件検討を行った。

従来法の問題点としてアグロバクテリウムの感染効率が悪いことが挙げられた。そこで、感染効率の向上のため、インドネシアの選抜系統である IP-3P を用い、アグロバクテリウム感染時に-0.094 MPa 条件下で 5 分間の減圧処理を 2 回行い、導入遺伝子である GUS の発現を可視化した。その結果、減圧処理により GUS 染色を有する外植体の頻度が約 5 倍に向上した。次に、植物体の外植体とアグロバクテリウムとの共存培養の際の培地支持体として、従来法の寒天ではなく、液体培地を染みこませたろ紙を用いた。その結果、外植体へのダメージの原因となるアグロバクテリウムの過剰増殖が抑制された。さらに、従来法ではエスケープシュートの割合が高く、形質転換体の選抜効率が悪かったことから、可視化マーカーとして GFP バリアント *Venus* 遺伝子の利用を試みた。その結果、形質転換カルスとエスケープとの差異が Venus 蛍光により明瞭に区別することが可能となった。実体蛍光顕微鏡にて Venus 蛍光が観察された 11 系統のシュートについて、ゲノム PCR により導入遺伝子の挿入を確認した結果、9 系統で導入遺伝子のゲノムへの挿入が確認された。則ち、約 82%の確率で形質転換体を選抜することが可能となった。現在、改良した形質転換法を用い、アフリカ・ボツワナ由来の JK-01 系統など他のジャトロファ系統についても有効性を検証していると共に、改良した形質転換法を用い、ストレス耐性因子を導入した形質転換体の作出を行っている。

transformation, *Jatropha curcas* L.

講演番号：2C05a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ C 校舎 05 会場

植物の形質転換に有用な特性を持つリゾビウム属細菌作出法の改良
Improvement of a method for producing useful Rhizobium species for plant transformation.
○山本 真司、鈴木 克周（広島大院理）
○Shinji YAMAMOTO, Katsunori SUZUKI (Hiroshima Univ.)

アグロバクテリアの植物形質転換特性（遺伝子導入が可能な植物種の範囲やその効率）は病原プラスミド(Ti, Ri)と染色体バックグラウンド，そしてその組み合わせによって予期せず大きく変わる．我々はアグロバクテリアを用いた植物形質転換技術の高効率化・適用可能な生物種の拡大を視野に，現在まで形質転換に利用されてこなかったアグロバクテリア病原株を含むリゾビウム属細菌に着目し，これらを簡便かつ容易に形質転換に利用できる菌株へ加工する技術の開発を目指している．

アグロバクテリアの病原プラスミドあるいは染色体 DNA に由来する形質転換特性を評価するには，各菌株がもつ病原プラスミドを同一のものに統一するなど，病原プラスミドの簡便な除去・移入技術が不可欠である．現在までに我々は，病原プラスミドに一時的に転移起点(*oriT*)を含む小型プラスミドを融合させることで，RP4 接合系を介して効率よくアグロバクテリア間で病原プラスミドを移動させることに成功した．同技術を用い，アグロバクテリアを含むリゾビウム属細菌間で病原プラスミドの移行を試みた結果，一部の病原プラスミドと受容菌株の組み合わせでは，移動効率が著しく低くなることがわかった．これら菌株間の病原プラスミドの受容効率の違いは，受容菌株のもつ駐在プラスミドと導入する病原プラスミドの不和合性に依るものと考えられた．そこで，病原プラスミドが属する四種類の不和合性グループ(incRh1, incRh2, incRh3, incRh4)の全てについて，同じ不和合性グループに属する駐在プラスミドを除去するためのプラスミドを作成した．本発表では，これら除去用プラスミドによる駐在プラスミドの除去効率，そしてその結果得られる病原プラスミド交換株について，*vir* 遺伝子発現能など形質転換に関わる特性を併せて報告したい．

Agrobacterium, transformation, Ti plasmid

講演番号：2C05a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ C 校舎 05 会場

複数遺伝子の発現が可能な植物形質転換用リサイクルベクターシステムの開発

Development of Recycle Vector System for plant transformation for multi-gene expression

芝原 健太[1]、○田中 優史[1]、木村 哲哉[2]、中川 強[1]([1]島根大・総科センター・遺伝子、[2]三重大院・生物資源)
Kenta SHIBAHARA[1], ○Yuji TANAKA[1], Tetsuya KIMURA[2], Tsuyoshi NAKAGAWA[1] ([1]Int. Cen. Sci. Res., Shimane Univ., [2]Dept.Sust.Res.Sci.,Grad.Schl.Biores.,Mie Univ.)

【目的】近年、タンパク質複合体の細胞内機能、局在の研究のために複数種の遺伝子を簡便に植物へと導入し、安定発現が可能な遺伝子導入技術の開発が必要となった。我々は LR 反応を繰り返して遺伝子を同一のベクターに順次クローニングする方法の開発を進めてきた。これまでに attL5-Pro-attR1-attR2-T_{NOS}-attR4-attR3-attL6 の構造を持つ pRED ベクターと attL4-attR5-attR6-attL3 の変換用ベクターを交互に用いて Gateway カセットのリサイクルを行うシステムを構築しており、現在までに本システムを利用して 5 つの発現ユニットを導入した。本システムでは複数遺伝子の安定発現を目指し、各遺伝子ユニットの間に HSP ターミネーターや MD8（matrix attachment region）が組み込まれており、今回はプロモーターに NOS プロモーターを、レポーターに G3GFP,mRFP,GUS,LUC,XYL の 5 種類を用い、両者について比較検討をおこなうとともに、発現安定化因子が最も効果的に働く条件を検討した。さらに、トマトにコンストラクトを導入し、本システムが様々な植物種において使用可能で、発現安定化因子が効果を示すのかの調査を行ったので報告する。
【方法・結果】本システムを利用して 4 つ又は 5 つのレポーター遺伝子を組み込んだ発現クローンを構築し、アグロバクテリウムを介してタバコ培養細胞 BY-2 に導入した。得られたクローン導入 BY-2 において、各レポーターの顕鏡解析、GUS と LUC 定量解析を行った。一つのクローン導入 BY-2 につき独立的な 18 ラインをすべて同条件で観察した。その結果、すべてのレポーターの発現が観察された。定量解析より、T_{HSP} より MD8 タイプの方がレポーターの発現量が多いことが示された。以上の結果から、本システムで複数遺伝子を安定発現させるためには MD8 の方が適していると結論付けた。次に、MD8 の効果が最も現れる条件を検討するため。3 つの遺伝子導入コンストラクトにおいて MD8 が全く組み込まれていない、先頭のレポーターのみに、先頭を最後のレポーターに MD8 が組み込まれているコンストラクトを作製し、同様に BY-2 へと導入して解析を行った。その結果、MD8 が全く組み込まれていないコンストラクト導入 BY-2 ではレポーターの発現がほとんど見られず、部分的に組み込まれているものは先頭から次第に発現が弱くなっていくことが示された。以上の結果から、本システムにおいて複数遺伝子を安定的に発現させる場合、プロモーターに NOS プロモーターを発現安定化因子として MD8 を各遺伝子の上流に組み込むことが最適であると結論付けた。

また、本システムを用いて作製したコンストラクトが BY-2 以外でも使用可能で、MD8 が複数遺伝子の安定発現に寄与するのか調べた。MD8 を組み込んだ 5 レポーターコンストラクト、3 レポーターコンストラクトと、MD8 を組み込んでいない 3 レポーターコンストラクトをトマトに導入し顕鏡解析と GUS の定量解析を行った結果、トマトにおいても複数遺伝子の安定発現が確認された。

Gateway, Arabidopsis, transformation

講演番号：2C05a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ C 校舎 05 会場

Development of Dual Site R4 Gateway Binary Vector System Driven by Any Desired Promoter for Plant Transformation

○Mostafa ABOULELA, Tsuyoshi NAKAGAWA (Shimane University)

The development of diverse techniques for plant transformation and regeneration has enabled the production of transgenic plants for the majority of commercially important species. We developed the dual site R4 Gateway binary vector system (DsR4pGWB) to enable the delivery of two sets of promoter and open reading frame (ORF) into the plant genome using Gateway cloning technology. Our DsR4pGWB give the researchers a great advantage to make a variety of fusion constructs driven by any desired promoter and to carry out many transgenic experiment under unified conditions. The new vector system consists of four series, named DsR4pGWB64xx-MD8, DsR4pGWB65xx-MD8, DsR4pGWB66xx-MD8 and DsR4pGWB67xx-MD8, having four different selection markers, kanamycin resistance, hygromycin resistance, BASTA resistance and tunicamycin resistance marker respectively, leading to wide range of selectability in plants. Having this wide range of selectability is critically important for repetitive transformation in order to introduce new transgenes into previously transformed plants. We employed fifteen different reporters and epitope tags in our system namely; synthetic green fluorescent protein (sGFP), ß-glucuronidase (GUS), luciferase (LUC), enhanced yellow fluorescent protein (EYFP), enhanced cyan fluorescent protein (ECFP), G3 green fluorescent protein (G3GFP), monomeric red fluorescent protein (mRFP), tag red fluorescent protein (tagRFP), hexahistidine tag (6xHis), FLAG tag (FLAG), trible HA tag (3HA), four and ten repeats of Myc tag (4xMyc and 10xMyc), glutathione S- transferase (GST) and T7 epitope tag (T7) for fusion with ORF. The efficiency of the DspGWB has been assessed using transformation of different combinations of promoter1-ORF1-reporter1 + promoter2- ORF2-reporter2 in *Arabidopsis thaliana* plants. Finally we believe that the new developed DsR4pGWB can contribute to more efficient plant transformation technologies and to extra production of genetically modified transgenic plants and that should accelerate plant research.

Gateway cloning, Binary vector, Plant transformation

講演番号：2C05a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ C 校舎 05 会場

保存野菜からの PCR 用 DNA の最簡便抽出・検出法 “10-sec Prep”

The easiest preparation and detection “10-sec Prep” of DNA from stored vegetables for PCR

○望月 峰子[1]、清水 正則[2]、小林 裕和[1] ([1]静岡県大・院薬食生命・食品栄養科学、[2]常葉大・健康プロデュース)
○ Mineko MOCHIZUKI[1], Masanori SHIMIZU[2], Hirokazu KOBAYASHI[1] ([1]Lab. Plant Mol. Improv., Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2]Sch. Health Promot. Sci., Tokoha Univ.)

【目的】
PCR による植物 DNA の分析は、種･品種、遺伝子組換え等の判別において、最強の手段である。これを安価・迅速かつ簡便に行うための DNA 抽出は、さらなる改良の余地があると考える。特に、野菜類は収穫後の保存においてポリフェノール酸化物の含量が増大するため、この種の植物から PCR に適した DNA を抽出する簡便な方法が望まれる。市販のキットに加え、既に報告されている植物からの DNA 抽出法を精査し、冷蔵あるいは冷凍レタスからの最簡便 DNA 抽出・検出法を開発した。
【材料および方法】
リーフレタス（品種：グリーンウェーブ）を供試材料とし、DNA 抽出を行った。試料として、サンプリング後そのまま抽出に用いた新鮮な葉、サンプリング後 1 週間冷蔵あるいは冷凍した葉の 3 種類を供した。抽出法として、ISOPLANT II（ニッポンジーン）、シロイヌナズナに最適化された Clean-PCR 法および One-Step 法を用い、それぞれに 3 反復の抽出を行った。抽出した DNA を 1、3.2、10、32、100、320、1,000 および 3,200（3.2 の n 乗）の 8 段階に希釈し、鋳型 DNA として用いた。PCR 反応には、ExTaq（タカラバイオ）を用い、94℃1 分間の後、94℃30 秒間、58℃30 秒間、72℃45 秒間を 40 サイクル、その後、72℃5 分間の処理を行った。増幅された DNA は、通常のアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロマイドにより染色した。
【結果および考察】
抽出した DNA を希釈せず、そのまま鋳型 DNA として用いた場合、Clean-PCR 法および One-Step 法を適用した新鮮葉および冷蔵葉では、DNA が検出されなかった。しかし、既法に対して、抽出液を 500 倍程度希釈することにより、検出されるようになった。ISOPLANT II では、サンプルの状態にかかわらず、ほとんど希釈しなくても DNA を検出することができた。冷凍葉について、いずれの方法で抽出した DNA に対しても、希釈により検出が確実になった。Clean-PCR 法および One-Step 法は、簡易抽出法であり、夾雑物が多い。特に野菜類は保存時にポリフェノール酸化物含量が増大するため、簡易法で抽出した DNA は PCR に適さない。今回、希釈することにより、夾雑物が希釈され、DNA が増幅されやすくなったと考えられる。キットを用いれば、より精製された DNA を得ることはできるが、高価であり、やや手間がかかる。本法は、10 秒で DNA 抽出液が調製でき、これを約 500 倍にまで希釈することにより、安価･迅速かつ簡便に DNA の PCR 検出を可能にするものである。

vegetables, DNA extraction, PCR

講演番号：2C05a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ C 校舎 05 会場

米型経口コレラワクチン Marker Free MucoRice-CTB のイネゲノム導入部位と導入配列について

The transgene location and structure on rice genome of the selection marker free rice-based oral cholera toxin B subunit vaccine

○目島 未央[1,2]、鹿島 光司[2]、黒田 昌治[3]、竹山 夏実[2]、黒河 志保[2]、福山 賀子[2]、清野 宏[2]、三ツ井 敏明[1]、幸 義和[2] ([1]新潟大院・自然科学、[2]東大・医科研、[3]中央農研・北陸セ)
○ Mio MEJIMA[1,2], Koji KASHIMA[2], Masaharu KURODA[3], Natsumi TAKEYAMA[2], Shiho KUROKAWA[2], Yoshiko FUKUYAMA[2], Hiroshi KIYONO[2], Toshiaki MITSUI[1], Yoshikazu YUKI[2] ([1]Niigata Univ., [2]Tokyo Univ. IMS, [3]Crop Development Di v . NARO)

【目的】コレラ毒素 B 鎖発現組換え米（MucoRice-CTB）は、RNAi 技術を用いて主要貯蔵タンパク質である 13kDa プロラミン・グルテリンの発現を抑制するとともに、ワクチン抗原であるコレラ毒素 B 鎖（CTB）の発現を強化した組換えイネ種子を利用した米型経口コレラワクチンである。本研究では、ヒトへの経口投与を可能とするために、選抜マーカーであるハイグロマイシン耐性遺伝子を含まない Marker Free 米型経口コレラワクチンを作出し、T-DNA 領域（導入遺伝子）の染色体導入部位の決定および導入遺伝子の全配列決定といったゲノム解析を行うことを目的とした。
【方法・結果】ワクチン抗原である CTB 遺伝子は、胚乳細胞特異的プロモーターであるイネ 13kDa プロラミンプロモーター下で発現させた。イネの形質転換は、CTB 遺伝子過剰発現カセット入り T-DNA ベクターpZAAMP-CTB-10Li45GB3A またはハイグロマイシン耐性遺伝子カセット入り T-DNA ベクターpZH2B をそれぞれ単独で保持する 2 種類の組換えアグロバクテリウムを作製し、これらの菌液を一定の比率で混合するコ・トランスフォーメーションで日本晴カルス胚へ導入した。さらに、ハイグロマイシンを含んだ培地で再分化した植物体の中から CTB 遺伝子過剰発現カセットとハイグロマイシン耐性遺伝子カセットの双方を持つ個体を PCR により選抜・栽培し、イネ種子での発現解析を行った結果、最終的に 6 系統の Marker Free MucoRice-CTB の作出に成功した。その中で、ワクチン抗原高発現株であった 51A 系統を選択し、ホモ個体を得るために自家受粉による継代を 6 世代（T6）まで進め、種子バンクとした。51A 系統における種子バンクでの T-DNA 領域の染色体導入部位および導入遺伝子の全配列確認は、組換えイネゲノムのリシークエンスデータから得られた情報をもとに推定された導入部位近傍にイネゲノム特異的プライマーを設計し、PCR によってイネ 3 番染色体およびイネ 12 番染色体に T-DNA 領域が挿入されたことを確認した。また、導入遺伝子の全配列分析からイネ 3 番染色体には T-DNA 領域 2 コピーがタンデムに挿入されていたが、イネ 12 番染色体には設計上の T-DNA 領域の構造とは異なり RNAi カセットが逆位で挿入され T-DNA 領域の一部が欠損する形で 1 コピーが挿入されていることがわかった。これらの知見は、Marker Free MucoRice-CTB51A 系統を用いた経口投与による臨床試験を行う上での導入遺伝子のイネゲノム上での影響と遺伝的安定性を評価するための有用な情報となると思われる。

MucoRice, oral vaccine, rice-based vaccine

講演番号：2C05a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ C 校舎 05 会場

作物の多系統少量種子生産に適したグロースチャンバーでの簡便省力水耕栽培法

A simple hydroponics method for small-scale crop seed production in a plant incubator

○黒田 昌治[1]、池永 幸子[2] ([1]農研機構中央農研、[2]農研機構東北農研)
○Masaharu Kuroda[1], Sachiko Ikenaga[2] ([1]NARO Agric. Res. Cent., [2]NARO Tohoku Agric. Res. Cent.)

【研究目的とこれまでの経過】

植物体が大きくなる作物の研究は、温室等の設備に依存する部分が大きい。そこで、小規模な施設でも効率よく作物の研究が行えるように、汎用機材を用いる簡便な種子生産用水耕栽培法の確立を試み、前大会で報告した。今回は、イネにおいて栽培試験を反復するとともに、畑作物（ダイズ他）の栽培条件を検討した。

【方法と結果】

栽培方法は昨年度大会で報告したものを踏襲した。すなわち、側面蛍光灯照射タイプの普及型グロースチャンバー（東京理化 FLI2000A）を用いて、昼 12 時間 27 度／夜 12 時間 22 度の短日条件に統一し、その他の条件調整は一切行わなかった。植物体については、穴をあけたポリプロピレンチューブに直接植物体を入れ、それごと希釈した MS 培地で満たした深型ステンレスバットに入れてチャンバーに設置した。培地交換は 2 週間に 1 度とし、その間は週 3 回水道水を補給するにとどめた。

上記条件でインディカを含むイネ 10 品種を栽培できた。日本晴の場合、1 世代が 4 ヶ月以内で完結し、144 個体の同時栽培で全ての株から種子を収穫できた。個体当たり種子数はおおむね 20-30 粒、1 粒重量は約 20mg で胚乳外観はほぼ透明など、人工環境下で収穫した種子としては十分な品質を持っていた。また、ジャポニカイネの場合は、植物体の高さがおおむね 65cm 前後にとどまり、グロースチャンバー（庫内の高さ 100cm）の上部 1/3 は、育苗等の別目的に使用できるなど効率的な運用が可能であった。

同じ方法を用いて、短日植物であるダイズ、アズキ、トウモロコシでも種子を収穫できた。例えばダイズ（エンレイ）の場合、培地交換を 1 週間に 1 度に変更することで、1 世代は約 2.5 ヶ月の短期間で個体当たり 10 粒程度の収穫となった。アズキも同様に栽培できたが、トウモロコシは雄花と雌花の成熟タイミングが異なるため、安定した種子収穫には細かい条件検討が必要と考えられた。

以上のように、この方法ではハイグレードなチャンバーは必要なく、その他の機材や培地も汎用品で再利用もできる。また栽培手技も最低限に抑えてあり、低コスト・省スペース・省エネルギーな設計となっている。世代促進など最低限の種子数を確保すれば良い場合は、本方法はとりわけ有用である。

Rice, Soybean, Hydroponics

講演番号：2C05a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ C 校舎 05 会場

日本在来藍のインディカン生産に対するストレスホルモンおよび紫外線の影響

Effects on indican production in Japanese indigo plants by stress related hormones and UV light

○高田 雄輔[1]、松川 哲也[1,2]、堀端 章[1,2]、梶山 慎一郎[1,2]([1]近大生物理工、[2]近大院生物理工)
○Yusuke TAKATA[1], Tetsuya MATSUKAWA[1,2], Akira HORIBATA[1,2], Shin'ichiro KAJIYAMA[1,2]
([1]Dept. Biotechnol. Sci., Kinki Univ., [2]Grad. Sch. BOST, Kinki Univ.)

【目的】タデ科植物のアイ(*Polygonumtinctorium*)は，葉に豊富なインディカンを含み古来より青色染料および顔料の原料植物として我が国で栽培・利用されてきた。戦後インドアイなどの安価な外国産アイや合成染料の普及により，伝統的な藍染が衰退し，それに伴いアイ栽培も衰微しつつあったが，近年，その色合いの豊かさから伝統工芸以外に化粧品などへの日本在来アイの利用が始まり，インディカン含量の高い在来アイの安定供給が求められてきている。現在アイ収量の安定的増加を目指して伝統的な露地栽培法に加えてハウス栽培や植物工場を用いた通年栽培が試験的に試みられている。しかし，アイ葉中に含まれるインディカン量に関してはその生合成の制御に関する知見が乏しく，未だに効率的な栽培条件の確立には至っていないのが現状である。本研究では，インディカン量を増加させる要因を探索するため，アイ葉に環境応答ホルモンおよび紫外線ストレスを与え，インディカン量の変化を定量的に分析した。
【方法および結果】植物材料としては徳島県で採種された千本および小上粉の 2 品種を用いた。はじめに，葉に含まれるインディカンの抽出方法について検討を行った。インディカンは葉に物理的な傷害を与えると細胞内の加水分解酵素と接触することによりインドキシルへと変換され，その後化学的酸化により速やかにインディゴへと変換される。本研究では，加水分解酵素の作用を抑制するため，アイ葉を液体窒素中で凍結磨砕を行うことにより粉末状にし，得られた粉末に MeOH を加えて懸濁した。懸濁後の溶液を遠心分離に供し，上清を MeOH 抽出液とした。残渣に DMSO を加えて懸濁し，同様の操作を行うことにより DMSO 抽出液を得た。得られた抽出液を逆相系 HPLC を用いて分析し，抽出液に含まれるインディカンおよびインディゴの量を定量した。その結果，インディゴは痕跡量に抑えられており，葉に含まれるインディカンを変換することなく抽出されることが示唆された。
次に，エリシターとしてジャスモン酸メチル(MeJA)，1-アミノシクロ-1-プロパンカルボン酸(ACC)およびアブシジン酸(ABA)を千本の葉に投与し，前述の方法で葉に含まれるインディカン量の変動について検討を行った。その結果， MeJA および ACC 処理では変化が認められなかったが，ABA 処理ではインディカン量の有意な低下が認められた。また，紫外線ストレスを与えた結果では，千本の葉では変化が認められなかったが，小上粉の葉ではインディカン量の有意な増加が認められた。

indigo plant, indican, plant stress hormone

講演番号：2C05a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ C 校舎 05 会場

イネ種子プロテインボディタイプⅠ（PB-I） におけるプロラミン蓄積機構の解析

Analysis of prolamin's accumulating mechanism within protein body type I (PB-I) in rice seeds

○佐生 愛[1]、重光 隆成[1]、森田 重人[1,2]、佐藤 茂[1,2]、増村 威宏[1,2] ([1]京都府大院・生命環境、[2]京都農技セ・生資セ)

○ Ai SASOU[1], TAKANARI SHIGEMITSU[1], SHIGETO MORITA[1,2], SHIGERU SATOH[1,2], TAKEHIRO MASUMURA[1,2] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]Kyoto Pref. Agri., Forestry and Fisheries Technol. Res. Center)

【背景】

イネ種子は，次世代幼植物の窒素源として登熟過程にプロラミンおよびグルテリンを合成し，貯蔵オルガネラであるプロテインボディ(PB)に蓄積する．そのうち，プロラミンは小胞体（ER）膜上で合成され，そのまま ER 内腔に蓄積し，プロテインボディタイプ Ⅰ (PB-I)を形成する．プロラミンは，複数の分子種より構成され，10 kDa プロラミン，13a プロラミン，13b プロラミン，16 kDa プロラミンに分類されている．これまでに，種子中の PB-I 内部では，各種プロラミンが層状に蓄積していることが明らかとなっている(Saito et al., Plant J., 2012)．また，各種プロラミン-GFP 融合タンパク質をイネカルスで発現させると，ER 由来の PB 様構造体を形成し，プロラミン自体に凝集能があるということが明らかにされている(Shigemitsu et al., Plant Cell Rep., 2012)．

しかし，プロラミンのポリペプチド配列内には ER 残留シグナルが存在しないため，なぜプロラミンが ER 内腔に蓄積し，層状構造を形成するのかについては未解明である．そこで，本研究ではプロラミンポリペプチド配列の中で，層状構造を形成するのに重要な領域を明らかにすることを目的とした．

【方法】

各種プロラミンのうち， 13a プロラミン（Cys-rich）と 13b プロラミン（Cys-less）の各々の配列を段階的に削り GFP との融合タンパク質を発現する遺伝子コンストラクトを作製し，プロラミンプロモーター制御下でイネに導入した．得られた形質転換イネ種子を用いて，蛍光顕微鏡観察による融合タンパク質の局在部位の解析を行った．また， PB-I の詳細な構造について透過型電子顕微鏡観察を行った．

【結果・考察】

各種顕微鏡観察の結果から，13a プロラミンは N 末端側の数十残基の配列があれば PB-I に分配され，層状構造を形成した．一方，13b プロラミンは同等の長さの配列では PB-I へ分配されなかったが，全長に近い長さの 13b プロラミンの場合は，PB-I に分配された．以上より，プロラミンの種類によって PB-I において層状構造を形成するために必要とする配列長が異なることが示唆された．

rice grain, seed storage protein, prolamin

講演番号：2C05a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ C 校舎 05 会場

Production of Human Glucocerebrosidase in Nicotiana benthamiana Plants

○Juthamard LIMKUL[1], Ryo MISAKI[1], Ko KATO[2], Kazuhito FUJIYAMA[1] ([1]Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Biological Sciences, Nara Inst. Science Technol.)

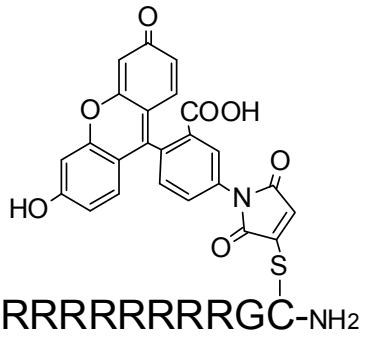
Gaucher's disease is a lysosomal storage disorder caused by mutations in the gene encoding glucocerebrosidase (GCase). This disease is currently treated by enzyme replacement therapy using recombinant GCase (Cerezyme®) expressed in Chinese hamster ovary (CHO) cells. Although enzyme replacement therapy is highly effective, treatment often costs more than 125,000 USD annually for each patient. Development of cost-effective bioreactors is required for GCase-production. An effective expression system is really necessary to express a foreign gene in plants. We focused on both translational enhancer element and effective terminator for human GCase expression in *Nicotiana benthamiana* plants. Here, we used three plasmid constructs named as pGC-NOS, pGC-HSP, and pAt-GC-HSP. For pGC-NOS and pGC-HSP, GCase gene expressed *under the control* of the CaMV 35S *promoter* and terminated by Arabidopsis heat shock protein (HSP) terminator and nopaline synthase (NOS) terminator, respectively. The pAt-GC-HSP consists of CaMV 35S promoter, 5' untranslated region (5'-UTR) of Arabidopsis alcohol dehydrogenase (AtADH) gene-translational enhancer element, human GCase cDNA, and HSP terminator. T2 generation of transgenic *N. benthamiana* plants carrying pGC-NOS, pGC-HSP, and pAt-GC-HSP successfully produced active GCase. The GCase activity of pAt-GC-HSP transgenic *N. benthamiana* plants shown the highest activity compared with pGC-NOS, pGC-HSP. Therefore, we concluded that the combination of 5'-UTR AtADH and HSP terminator of pAt-GC-HSP provides a powerful expression system for human GCase in *N. benthamiana*. This transgenic plant would pave a way to provide a promising stable plant-production system for low cost-large amount human GCase production.

glucocerebrosidase, *Nicotiana benthamiana*, Gaucher's disease

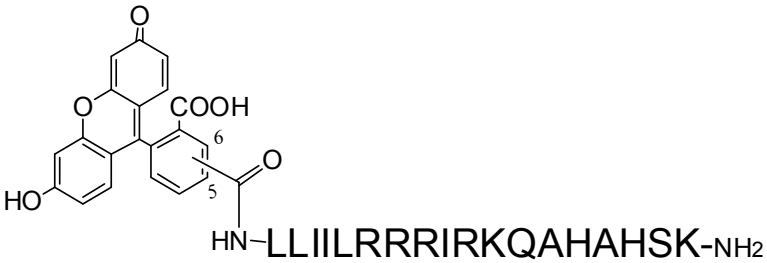
講演番号：2C05a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ C 校舎 05 会場

植物細胞に対するオリゴアルギニンと *p*VEC の透過性の比較
Evaluation of the permeability of oligoarginine and *p*VEC for the plant cells
○橋野 友里恵、宮下 正弘、宮川 恒（京都大院農）
○YURIE HASHINO, MASAHIRO MIYASHITA, HISASHI MIYAGAWA (Kyoto Univ.)

【目的】オリゴアルギニンは cell-penetrating peptide（CPP）の一つであり、優れた細胞膜透過性を示す。このペプチドをタンパク質などの大きな分子に融合させることにより、速やかに細胞内へ移行させることができる。我々はこれまでに、タバコ懸濁細胞に対するオリゴアルギニンの透過性の評価を行い、その細胞内への移行を確認している。しかしながら、顕微鏡による観察の結果から、オリゴアルギニンは細胞壁へ強く吸着することが分かっており、このことが透過効率に影響を及ぼしている可能性があった。そこで本研究では、細胞壁への吸着性が低く、かつ透過性の高い CPP の探索を目的とし、オリゴアルギニンとは異なる機構で細胞内に移行すると考えられている *p*VEC（LLIIRRRIRKQAHAHSK-$_{NH2}$）の植物細胞への透過性を評価し、オリゴアルギニンと比較した。
【方法】オリゴアルギニンとしてアルギニン 8 残基を含むペプチド（R8：RRRRRRRRGC-$_{NH2}$）と *p*VEC を Fmoc 固相合成法により合成した。さらに、R8 のシステイン側鎖を fluorescein 5-maleimide により、また *p*VEC の N 末端アミノ基を 5(6)-crboxyfluorescein により蛍光標識した（下図）。それぞれのペプチドをタバコ懸濁細胞へ処理した後、蛍光顕微鏡観察により評価した。透過効率については、ペプチドを細胞に処理し、トリプシンを加えて吸着したペプチドを除去した後に抽出操作を行い、これを蛍光光度計で測定することにより算出した。
【結果】蛍光顕微鏡観察により、R8 については細胞壁への顕著な吸着が見られたが、*p*VEC については吸着は比較的少ないことが分かった。また透過効率の測定結果より、R8 に比べて *p*VEC の方が透過効率が高いことが示された。これらの結果より、植物細胞における細胞膜透過に用いるベクターとして、オリゴアルギニンよりも *p*VEC が有用であることが示唆された。



R8



*p*VEC

cell-penetrating peptide, plant cell, cell wall

講演番号：2C05a17
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ C 校舎 05 会場

イネの SPK に対する RNAi 遺伝子の誘導的発現抑制による貯蔵デンプン生合成のスイッチング制御の試み

An attempt to establish an inducible control-system that may cancel the RNAi effect for lacking storage starch in immature rice seeds.

○山本 祐子、阿部 孝太、竹田 遥、竹本 佳奈子、草野 博彰、島田 浩章（東京理科大生物工）
○Yuko Yamamoto, Kota Abe, Haruka Takeda, Kanako Takemoto, Hiroaki Kusano, Hiroaki Shimada (Tokyo Univ. of Sci.)

SPK(Seed-development specific protein kinase) は、セリン/スレオニン型に分類されるカルシウム依存性のプロティンキナーゼであり、登熟中期のイネ未熟種子で特異的に発現し、貯蔵デンプンの生合成に関わる SPK は Sucrose synthase のリン酸化酵素として機能する。Sucrose synthase は、ショ糖と UDP(ADP)からフルクトースと UDP グルコース(ADP グルコース)を生成するショ糖分解反応と、その逆反応（ショ糖合成反応）を可逆的に触媒する。SPK はこれをリン酸化することで、この活性を制御する。Sucrose　synthase はシンク器官でのショ糖代謝の初期反応を触媒する鍵酵素の 1 つであることから、SPK は未熟種子でのショ糖代謝を制御する因子の 1 つであると考えられる。アンチセンス *spk* 遺伝子を導入した形質転換体イネは、Sucrose　synthase が活性化されず、貯蔵デンプンの蓄積が制御され、水モミが生じる。この水モミを誘導的に作り出すために Dexamethason (DEX)の投与により SPK 遺伝子の遺伝子発現抑制のオン・オフを誘導的に行うことができるスイッチング制御のシステムの構築を試みた。このシステムでは、DEX を投与しないときには SPK 遺伝子に対する RNAi 遺伝子が発現し水モミが生じるが、DEX を投与したときには RNAi 遺伝子の発現が抑制され正常な種子となることを期待した。このために様々な部位に対応する RNAi 遺伝子を構築し、これを導入した制御システムを作製し、これを導入した形質転換体イネでの DEX 投与による水モミの発生効率を検定した。その結果、これを導入した形質転換体イネは、DEX を投与しなかった場合には SPK に対する RNAi が機能し水モミが生じたが、DEX を投与した場合には正常な種子が生じる割合が増加した。このことから、このシステムが機能し、DEX の投与により RNAi による SPK の発現抑制を解除することが可能であることが示唆された。

rice, watery seeds, storage starch

講演番号：2C05p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ C 校舎 05 会場

ホウ酸トランスポーターBOR1 の極性局在の意義

Polarity of BOR1 borate transporter required for efficient root-to-shoot translocation of boron

○笠井 光治、藤原 徹 (東大院農)
○Koji KASAI, Toru FUJIWARA (Univ. of Tokyo)

シロイヌナズナのホウ酸トランスポーターBOR1 は、植物の微量必須栄養素であるホウ素の地下部から地上部への輸送に重要な役割を果たしている。ホウ素欠乏条件下で、BOR1 は根細胞の導管側（内側）の細胞膜領域に極性を持って偏在しており、その極性は、ホウ素の根導管への効率的な積み込みに重要であると考えられる。しかしながら、これまでに栄養輸送体の極性の役割を明らかにした研究例はない。本研究では、BOR1 の極性局在の生理学的意義を明らかにするために、極性を示さない変異をもつ BOR1 変異体を発現するシロイヌナズナ形質転換体を作製、解析した。これまでに、BOR1 の C 末端細胞内領域に存在する 652-655 番目の連続した 4 つのセリン残基をすべてアラニンに置換した変異体（S652-655A）は極性を示さないことを明らかにしている。極性の役割を明らかにするために、極性を持つ野生型 BOR1 もしくは極性を持たない S652-655A 変異体を BOR1 プロモーター支配下で GFP 融合タンパク質として発現させるコンストラクトをホウ素欠乏感受性である *bor1/bor2* 二重変異株に導入した形質転換体を 9 ラインずつ作製し、ホウ素欠乏下での生育および地上部のホウ素量を比較観察した。野生型 BOR1 発現株と S652-655A 変異体発現株すべてにおいて、B 欠乏下での地上部の生育の回復が観察されたが、回復の度合いの高い上位 3 ラインは全て野生型 BOR1 発現株であった。また、地上部のホウ素量は野生型 BOR1 発現株すべてのラインで S652-655A 変異体発現株の量を上回った。以上の結果から、BOR1 の極性が地上部への効率的な B 輸送に必要であることが示唆された。また、効率的な物質輸送への効果が示された極性局在の能力を他の輸送体に付与できる可能性があるかどうかを調べるために、BOR1 パラログであり、内側への極性を示さない BOR4 の C 末端細胞内領域を BOR1 の C 末端細胞内領域の配列と置き換えたキメラタンパク質を作製し、その局在を調べた。このキメラタンパク質は根端領域では極性を示さなかったが、根成熟領域の内皮細胞では内側への極性を示し、BOR1 の C 末端細胞内領域の配列を用いることで、BOR4 に内側への極性を付与できることが明らかになった。この結果は、細胞膜タンパク質の極性局在を制御する技術の構築につながると期待される。

boron, borate transporter, polar localization

講演番号：2C05p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ C 校舎 05 会場

AtMRS2-4 is a transporter required for the maintenance of Mg concentration in *Arabidopsis*

○Koshiro ODA[1], Takehiro KAMIYA[1], Shuji SHIGENOBU[2], Katsushi YAMAGUCHI[2], Toru FUJIWARA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]NIBB)

Magnesium (Mg) is the most abundant divalent cation in cells and is required for various enzyme reactions. Therefore, there are a number of reports about Mg uptake and translocation in plant. However, the transporters for Mg uptake from soil or for maintenance of Mg concentration in cell are still elusive. We have previously demonstrated that a novel *Arabidopsis* mutant, *kudo8*, is sensitive to low Mg condition. *kudo8* has a mutation that leads to amino acid substitution in *MRS2-4*, a Mg transporter, and the T-DNA insertion mutant of this gene also showed a low Mg sensitivity. This phenotype of the mutant was caused by not only low Mg, but also high calcium (Ca) and high strontium (Sr) conditions. Mg, Ca, and Sr are congeners belonging to the alkaline earth metal. Mg concentration of *mrs2-4* mutants are remarkably decreased in both shoot and root under the low Mg condition compared to wild type, although other ions (Ca, K and Na, etc.) were not significant differences. Moreover, the ratio of Mg concentration between shoots and roots in the mutants were similar to wild type in any examined conditions.

Taken together, we found that *MRS2-4* is involved in Mg uptake from soil, not in root-to-shoot transfer in *Arabidopsis*.

Magnesium, Transporter, Arabidopsis

講演番号：2C05p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ C 校舎 05 会場

Oryza sativa（イネ）における窒素、リン欠乏感受性変異体 HCA7 の解析

Studies on nitrogen and phosphate sensitive mutant, HCA7.

○吉永 良平、大森 良弘、藤原 徹（東大院農）
○Ryohei YOSHINAGA, YOSHIHIRO OMORI, Toru FUJIWARA (Tokyo Univ.)

窒素、リン、カリウムは高等植物の生長に重要な三大栄養素であり、現代農業では高い食物生産性を維持するために、窒素・リン・カリウムを含む化学肥料の施肥が必要不可欠である。しかしながら、過剰な化学肥料の使用により様々な問題が生じており、現在では適切な施肥管理が重用視されるとともに化学肥料の低減が求められている。そのためには、作物における栄養の吸収・利用機構を分子レベルで解析することが重要である。これまでシロイヌナズナをもちいた研究から様々な栄養素の吸収に関するトランスポーターが単離され、植物の栄養吸収に関する分子生物学的研究が進んでいる。一方で、低栄養条件下での植物の栄養利用（低栄養適応性）の分子機構については未だ不明な点が多い。そこで我々は、低栄養適応性の分子機構を明らかにすることを目的に、低栄養条件下での生育が野生型に比べ悪くなる新規イネ変異体を単離・解析したので報告する。

当該研究室では、メチルニトロソ尿素変異源処理変異体系統のうち、HCA7 と呼ぶ変異体系統では脱イオン水で水耕した場合、野生型に比べ生育が悪くなることを見出した。そこで、HCA7 における生育制御因子となる栄養素を調べたところ、HCA7 において脱イオン水で水耕した場合の生育制御因子は窒素およびリンであると示唆される。脱イオン水で生育させた場合、ミネラルの供給源は胚乳である。そこで、HCA7 における生育阻害が、玄米中のミネラル濃度に起因するのかを誘導結合プラズマ質量分析装置ならびに炭素・窒素同時定量装置を用いて調査した。その結果、HCA7 の根では必須元素のうち窒素の濃度が野生型に比べ有意に高いことが解った。そこで、2 週間の窒素欠乏水耕時における植物体中窒素含有量について詳細な解析を行ったところ、HCA7 では玄米中窒素含有量に比べ植物体中窒素含有量が低かった。このことから HCA7 の玄米中には水耕栽培 2 週間後にもまだ窒素が残存しており、HCA7 は玄米中の窒素をうまく使えていない可能性が示唆される。また、我々は、圃場における生育調査を行ったところ、野生型と比べて HCA7 では分げつ数が有意に少ないことを明らかにした。栄養生長期に吸収された窒素量と分げつ数には高い相関があることが報告されており、上記の結果と併せて、HCA7 では窒素の吸収・輸送に支障をきたしている可能性が考えられる。

現在は、次世代シーケンサーを用いてリシーケンスした HCA7 のゲノム情報からマップベースドクローニング用の分子マーカーを作成し、遺伝子の単離を進めている。HCA7 は窒素と同時にリンの欠乏にも影響されるため、今後、リン欠乏に関する解析を併せて行うことで、イネの窒素およびリン栄養への応答や利用に関する新たな知見が得られることが期待される。

plant nutrition, nitrogen, phosphorus

講演番号：2C05p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ C 校舎 05 会場

イネ培養細胞におけるムギネ酸類生合成酵素の局在解析

Localized analysis of the mugineic acids biosynthetic enzymes in the clutured cell

○古賀 悠介、長坂 征治（東洋大院　生命科）
○Yusuke Koga, Seiji Nagasaka (Toyo Univ.)

植物において鉄は電子伝達系、クロロフィル生合成、酸化還元反応などに関与している重要な元素である。植物が鉄欠乏になるとクロロフィルの生合成が阻害されるなどして生育が低下し、場合によっては枯死する。その為、鉄が不溶性状態で存在する石灰質土壌などでは植物の鉄利用が困難であり、石灰質土壌は不良土壌の一つとされる。このようなことから鉄利用能の高い作物の作出が進められており、近年では鉄欠乏耐性の形質転換イネの作出報告もされている。さらに鉄利用能の高め、実用性の高い作物を作出するには植物の鉄吸収機構の全容解明が必須である。

イネ科植物はムギネ酸類（MAs）と呼ばれる鉄キレーターを用いて根圏土壌から鉄を吸収する。この MAs の生合成、根圏への分泌、取り込みに関与するタンパク質、遺伝子群は明らかにされている。しかし、植物体内における MAs 生合成酵素の局在、輸送経路については未知の部分が多い。そこで本研究では細胞内での MAs 生合成酵素の局在解明を目的とした研究を行った。

MAs 生合成酵素の局在解析の実験材料として比較的簡便に実験が行えるイネ培養細胞（Oc 細胞）を用いた。Oc 細胞の MAs 生合成についての報告が無いことから、まず初めに Oc 細胞における MAs の生合成について理解する必要があった。MAs 生合成経路上ではたらく酵素であるニコチアナミン合成酵素（NAS)、ニコチアナミンアミノ基転移酵素（NAAT）の発現を解析した。鉄を含まない培地と、鉄を含む通常の培地で生育させた Oc 細胞のタンパク質を抽出しウエスタンブロットを行った。この結果、Oc 細胞においてもイネの植物体同様 NAS と NAAT の発現が見られ、鉄欠乏に応答して NAS の発現が上昇するという傾向が見られた。この結果から Oc 細胞内においても植物体と同様に MAs 生合成が行われていることが示唆された。

Oc 細胞において MAs 生合成が示唆された為、Oc 細胞内での NAS, NAAT の局在解析を行った。*NAS* または *NAAT* と緑色蛍光タンパク質（*GFP*）のコンストラクトを含むベクターを PEG 法を用いて Oc 細胞に導入、数日間インキュベートし、一過的に融合タンパク質を発現させた。その後、共焦点レーザー顕微鏡での観察を行った。この結果、ベクターを導入した Oc 細胞において細胞表面付近に GFP の蛍光が観察されたが、局所的な蛍光は観察されなかった。現在、形質転換後のインキュベート条件などの検討を行い、さらに詳細な解析を行っている。

mugineic acids, Fe deficiency, localization

講演番号：2C05p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ C 校舎 05 会場

イネにおけるムギネ酸顆粒の研究

Mugineic acid family phytosiderophores (MAs)-vesicles in the Rice

○野副 朋子[1]、長坂 征治[1]、バシル クーラム[1]、高橋 美智子[1]、小林 高範[2]、中西 啓仁[1]、西澤 直子[2] ([1]東大院農、[2]石川県立大生物資源)
○Tomoko Nozoye[1], Seiji Nagasaka[1], Khurram Bashir[1], Michiko Takahashi[1], Takanori Kobayashi[2], Hiromi Nakanishi[1], Naoko Nishizawa K.[2] ([1]The Univ. Tokyo, [2]Ishikawa Pref. Univ.)

イネ科植物は土壌中の不溶態の三価鉄を吸収するために三価鉄のキレーターであるムギネ酸類を根で合成して根圏に分泌する。イネはムギネ酸類としてデオキシムギネ酸（DMA）を分泌する。オオムギではムギネ酸類は粗面小胞体由来のムギネ酸顆粒で合成されると考えられている。本研究ではムギネ酸顆粒が鉄欠乏イネの根においても存在すること、ムギネ酸類生合成経路で働くニコチアナミン合成酵素 OsNAS2 と蛍光タンパク質 sGFP との融合タンパク質がイネの根において顆粒状に局在し、細胞内を活発に動いていることを見出した。これまで同定されている全てのニコチアナミン合成酵素には細胞内極性輸送モチーフと推定されているチロシンモチーフ及びダイロイシンモチーフが保存されている。これらの細胞内極性輸送モチーフに変異を導入した OsNAS2 に sGFP を連結したコンストラクトを *OsNAS2* プロモーターの制御下で発現させた組換えイネを作出して解析を行った。チロシンモチーフに変異を導入した OsNAS2 が局在する顆粒は凝集し、動きが見られなくなった。一方、ダブルロイシンモチーフに変異を導入すると、顆粒状構造が見られなくなった。ムギネ酸顆粒にはチロシンモチーフ及びロイシンモチーフが関与すると考えられる。

Iron (Fe), mugineic acid family phytosiderophores (MAs), nicotianamine (NA)

講演番号：2C05p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ C 校舎 05 会場

ダイズ１１Ｓグロブリンの種子貯蔵液胞への輸送解析

Storage vacuolar sorting of soybean 11S globulins in seeds

○丸山 伸之[1]、奥田 英子[1]、寺川 輝彦[2]、石本 政男[3] ([1]京大院農、[2]北興化学、[3]農生資研)
○Nobuyuki Maruyama[1], Eiko Okuda[1], Teruhiko Terakawa[2], Masao Ishimoto[3] ([1]Kyoto Uni., [2]Hokko Chem., [3]NIAS)

【目的】植物における特徴的な細胞内小器官である液胞は、種子の発芽の際の栄養源となる貯蔵タンパク質の蓄積などの機能をもつ。貯蔵タンパク質などの液胞へ運ばれるタンパク質は、自身のもつ選別輸送シグナルが受容体に認識されることにより選択的に輸送される。11S グロブリンは多くの植物の種子に存在する貯蔵タンパク質であり、ダイズでは複数のサブユニットにより構成される。これまで、ダイズ 11S グロブリンの A1aB1b サブユニットの C 末端部は選別輸送シグナルとして機能し、液胞への選別輸送の受容体である Vacuolar sorting receptor(VSR)と相互作用を示すことを明らかにしている。一方、A3B4 サブユニットでは、A1aB1b サブユニットの C 末端部に相同する配列は存在していないことから、サブユニットによっては選別輸送機構が異なる可能性が示唆されている。そこで、本研究では、ダイズ 11S グロブリンのサブユニットの種子におけるタンパク質貯蔵液胞への選別輸送機構について解析を試みた。

【方法および結果】1)一般的なダイズ品種の種子において 11S グロブリンは複数のサブユニットが会合した 6 量体構造をとる。単独のサブユニットの液胞輸送を解析するために、主要な貯蔵タンパク質を欠失したダイズ系統に A3B4 サブユニットを発現する形質転換体を作製した。種子の免疫電子顕微鏡観察から、A1aB1b サブユニットと同様に A3B4 サブユニットも他のサブユニットが存在しない品種においてタンパク質貯蔵液胞に輸送されることを明らかにした。 2)A1aB1b サブユニットの液胞へ選別輸送を解析するために、A1aB1b サブユニットの C 末端 10 残基と緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質(GFP-CT10)および VSR と赤色蛍光タンパク質との融合タンパク質(mRFP-VSR)をダイズ登熟期種子において一過的に共発現させた。一部の細胞において、GFP-CT10 はタンパク質貯蔵液胞とともに、VSR-mRFP と共局在するドット状の構造体にも局在が見られた。さらに、野生型あるいはドミナンドネガティブ変異型の Rab5 を GFP-CT10 と共発現させたところ、野生型との共発現では GFP-CT10 の液胞輸送が阻害されなかったが、ドミナンドネガティブ型の共発現により、液胞への輸送が阻害され、細胞外に分泌された。これらの結果は、A1aB1b サブユニットの C 末端部による貯蔵液胞への選別輸送では、VSR が主に局在するプレ液胞区画を経由するとともに、その経路に Rab5 が関与することを示唆している。

・本研究の一部において京都大学生存圏研究所・生態学研究センターDASH システムを利用した。

sorting, vacuole, soybean

講演番号：2C05p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ C 校舎 05 会場

葉緑体蛋白質輸送における膜透過中間体の形成
Formation of Protein Translocation Intermediates in Chloroplastic Protein Transport

○秋田 充、ポハレ マノジ、山本 祐希、米永 貴洋、今井 綾奈 (愛媛大農)
○Mitsuru AKITA, Manoj POHARE, Yuki YAMAMOTO, Takahiro YONENAGA, Ayana IMAI (Ehime Univ.)

葉緑体は自身のゲノムを有しているが、葉緑体に局在する蛋白質の大部分は、核内ゲノムにコードされており、細胞質ゾルで翻訳されたのち、葉緑体に輸送される。これらの蛋白質の多くは、アミノ末端部に葉緑体移行シグナルであるトランジット配列を有した前駆体蛋白質として翻訳され、葉緑体を囲む外・内の包膜に存在する蛋白質輸送装置（トランスロコン）を通って葉緑体内に輸送されると考えられている。蛋白質がトランスロコンを通過する際、*in vitro* では、低濃度の ATP や低温など、輸送に必要なエネルギーを制限することで、前駆体蛋白質は、葉緑体と不可逆的な結合、すなわちドッキングすることで初期膜透過中間体を形成する。

われわれは、制限エネルギー下で前駆体蛋白質の挙動を、プロテアーゼ限定分解や部位特異的光反応性架橋法等、生化学手法を用いて解析することで、異なる条件下で少なくとも 3 種の初期膜透過中間体が存在することを明らかにした（1-3)。しかし、ドッキング後、輸送が完了するまでの前駆体蛋白質の挙動および前駆体蛋白質を含む中・後期膜透過中間体については、現時点では、ドッキングのように人為的に透過反応を停止することができないために不明である。そこで、われわれは、以下の実験材料を調製し、この課題に取り組むこととした。

前駆体蛋白質のカルボキシ末端部に立体障害を引き起こすような部位を付加し、前駆体蛋白質がトランスロコンを目詰まりすることで、中・後期膜透過中間体を形成させることの可能性を考えた。一例をあげると、Rubisco 小サブユニット前駆体蛋白質（prSS）の C 末端に DHFR を連結した prSS-DHFR 融合蛋白質を作製し、DHFR をフォールディングする作用のあるメトトレキセート処理を施した prSS-DHFR 融合蛋白質を *in vitro* 蛋白質輸送実験系に添加する、等。本大会においては、他にもさまざまに手を加えた前駆体蛋白質を用いて行った実験結果について紹介する。

○引用文献

1．Inoue, H. and Akita, M. *J. Biol. Chem.*, **283**: 7491-7502 (2008).
2．Inoue, H. and Akita, M. *Arch. Biochem. Biophys.*, **477**: 232-238 (2008).
3．Akita, M and Inoue, H. *Methods Enzymol.*, **466**: 43-65 (2009).

Chloroplast, Protein transport, Precursor protein

講演番号：2C05p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ C 校舎 05 会場

シロイヌナズナ葉緑体アスコルビン酸取込み機構の解明

Analysis of uptake mechanism of ascorbic acid in Arabidopsis chloroplasts

○竹内 崇[1]、丸田 隆典[1]、澤 嘉弘[1]、重岡 成[2]、石川 孝博[1] ([1]島根大・生資科・生命工、[2]近畿大・農・バイオ)

○TAKASHI TAKEUCHI[1], Takanori Maruta[1], Yoshihiro Sawa[1], Shigeru Shigeoka[2], Takahiro Ishikawa[1] ([1]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ.)

植物細胞内のアスコルビン酸量は、細胞壁やデンプンなどを除いた可溶性糖質の約 10%にも相当する。その濃度は細胞内でも特に光合成による活性酸素種の生成場所となる葉緑体において、最大で約 100 mM もの高濃度に達することが報告されている。植物のアスコルビン酸は D-マンノースと L-ガラクトースの誘導体を代謝中間とし、L-ガラクトノ-1,4-ラクトンを最終前駆体としてミトコンドリアに局在する L-ガラクトノ-1,4-ラクトン脱水素酵素により合成されることが明らかになっている。この事実は、葉緑体へのアスコルビン酸供給は細胞質からの能動輸送に依ることを意味するが、その輸送機構については明らかではない。我々の研究グループでは最近、シロイヌナズナ葉緑体のアスコルビン酸欠乏変異体 *dca*（deficiency of chloroplastic ascorbate）の単離に成功している。本研究では葉緑体におけるアスコルビン酸取込み機構の解明を目的に、野生株および *dca* 変異体からの単離葉緑体におけるアスコルビン酸取込み活性を比較検討した。

シロイヌナズナ葉からテープサンドウィッチ法により葉肉細胞のプロトプラスト調製後、無傷葉緑体を単離した。アスコルビン酸の取込み活性は、4.2 mM L-[1-^{14}C]-アスコルビン酸、10 mM 塩化ナトリウム、0.35 M ソルビトールを含む 50 mM HEPES 緩衝液（pH 7.8）用い、シリコンレイヤー法により評価した。シロイヌナズナ野生株から単離した葉緑体のアスコルビン酸取込み活性は、ミカエリス・メンテン型のキネティックスを示し、アスコルビン酸添加後約 60 秒で最大取込み活性を示した。一方、*dca* 変異体の葉緑体は、野生株と比較してアスコルビン酸取込み活性の顕著な抑制が観察された。現在、野生株からの単離葉緑体を用い、アスコルビン酸取込み活性の Na^+依存性およびコンペティターや阻害剤の影響について生化学的検討を進めている。

Arabidopsis, Ascorbic acid, Chloroplasts

講演番号：2C05p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ C 校舎 05 会場

シアノバクテリアにおける酸素依存型代替的電子伝達系の役割と種間差

O_2-dependent Large Electron Flow Functions as Electron Sink, Replacing the Steady-state Electron Flux in Photosynthesis in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, but not in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942.

○釋 啓一郎、林 良祐、嶋川 銀河、三宅 親弘 (神戸大院農)
○Keiichiro SHAKU, Ryosuke HAYASHI, Ginga SHIMAKAWA, Chikahiro MIYAKE (Kobe Univ.)

植物は光照射により光合成電子伝達反応を行うことで ATP や NADPH を生成し、それを利用して炭酸固定反応を行っている。強光や低 CO_2 環境下では光合成電子伝達反応が炭酸固定反応に比べて過剰に起こることで電子伝達鎖は還元状態になる。そして電子が酸素に渡ることで Reactive Oxygen Species(ROS)が発生する。高等植物では代替的電子伝達(AEF)を用いて電子伝達鎖の還元を防ぐことで ROS の発生を抑えている。本研究では PAM-Chl fluorometer と酸素電極をキュベットの蓋を閉めない開放系で用い、クロロフィル蛍光と同時にサンプル中の酸素濃度の変化を長時間測定することでシアノバクテリアの光合成電子伝達において酸素発生を伴わない AEF が生じているかを検証した。その結果として大気条件生育の *Synechocystis* sp. PCC 6803 (S. 6803(WT))ではサンプル中の CO_2 が欠乏し光合成による酸素発生が減少することによりサンプル中の酸素濃度が低下した。しかし低下した後も光化学系 II の電子伝達活性 Y(II)が維持された。シアノバクテリアで活性酸素を発生させずに酸素を水に還元する AEF を担うとされる Flavoprotein1,3 を欠損した FLV1/3 二重欠損体 S.6803(⊿FLV)でも S.6803(WT)と同様の表現型を示した。一方で *Synechococcus* sp. PCC 7942 (S. 7942)では CO_2 の欠乏後、酸素発生の減少により生じるサンプル中の酸素濃度の低下と共に Y(II)が減少した。この S.6803 で見られた AEF は N_2 bubbling によりサンプル中の酸素を窒素に置き換えると活性は見られなくなった。これらのことから S.6803 では CO_2 が欠乏し光合成が抑制された後に、Flavoprotein1,3 による AEF とは異なる酸素に依存した AEF が主な電子のシンクになり、光合成電子伝達を担っていた。そのために Y(II)が維持されたと考えられた。一方で S.7942 では CO_2 が欠乏し光合成が抑制されるとともに Y(II)が低下した。このことから CO_2 が欠乏すると電子伝達反応が過剰に起こるために電子伝達鎖が還元状態にあると考えられた。また AEF の電子のシンクとしての活性は S.7942 で S.6803 に比べて低いことが示唆された。これらの結果は種間における酸素発生を伴わない AEF への依存性の違いを示している。本研究結果に基づいて我々は AEF の分子メカニズムと生理学的役割を考察した。

Alternative electron flow, Cyanobacteria, Oxygen

講演番号：2C05p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ C 校舎 05 会場

ランソウにおける活性カルボニル解毒機構

Scavenging systems for reactive carbonyls in cyanobacteria

○嶋川 銀河[1]、鈴木 麻由実[1]、山本 宏[2]、三宅 親弘[1] ([1]神戸大院農、[2]京都大院理)
○Ginga SHIMAKAWA[1], Mayumi SUZUKI[1], Hiroshi YAMAMOTO[2], Chikahiro MIYAKE[1] ([1]Kobe Univ., [2]Kyoto Univ.)

糖代謝は生物にとって生きていく上で不可欠な生命活動であると同時に、危険な面も持ち合わせている。糖代謝の過程で副次的に生じるメチルグリオキサールやアクロレインなどの有毒な活性カルボニル(RCs)は生体内でタンパク質を修飾してその機能を失活させてしまう。光合成を行う原核生物であるランソウはオルガネラのない一つの細胞の中に呼吸系と光合成系という二つの大きな糖代謝を持っているため、より RCs の危険にさらされていると考えられる。そこで本研究では RCs がランソウに及ぼす毒性を検証した。メチルグリオキサール(10 mM)やアクロレイン(0.2 mM)を生育途中のランソウに添加したところ、その生育が著しく阻害された。アクロレインで処理したランソウはその光合成が阻害され、面白い事にその阻害は光照射下の処理でのみ見られた。我々は呼吸や光合成で生成した RCs はランソウの生体内で解毒される必要があると考え、細胞抽出液における RCs 解毒活性を測定したところ NADPH を電子供与体として RCs を還元する活性を見出した。われわれはランソウのゲノムから RCs 解毒に関わると考えられる酵素を選び出し、大腸菌を用いて発現、精製した結果、異なる酵素ファミリーから 3 つの RCs 解毒酵素を見出した。Aldo-keto reductase (AKR)である Slr0942、Medium-、Short-chain dehydrogenases/reductases (MDR, SDR)である Slr1192 および Slr0315 はそれぞれメチルグリオキサールやアクロレインなど RCs に対する解毒活性を持っており、その活性は、報告されている高等植物の AKR, MDR および SDR よりも高かった。さらに我々はランソウにおいて初めて Glyoxalase (GLO)を見出した。GLO は多くの生物でメチルグリオキサール解毒に働いている機構である。今後想定される高 CO_2 環境では、光合成が促進されると同時に RCs 生成量が増加すると考えられる。蓄積した RCs は光合成を阻害してしまうため、光合成生物における RCs 解毒機構の解明と応用は今後より深く解明していく必要がある。

Cyanobacteria, Reactive carbonyls, Plant diabetes

講演番号：2C05p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ C 校舎 05 会場

Synechococcus elongatus PCC7942 における RuBisCO 発現量によるカルボキシソーム形成制御
RuBisCO expression controls carboxysome formation in *Synechococcus elongatus* PCC7942.
○蘆田 弘樹[1,2,3]、向川 佳子[1]、横田 明穂[1] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]神戸大院・人間発達環境学、[3]JST・さきがけ)
○Hiroki Ashida[1,2,3], Keiko Mukougawa[1], Akiho Yokota[1] ([1]Grad. Sch. Biological Sciences., NAIST, [2]Grad. Sch. Human Development and Environment, Kobe Univ., [3]JST PRESTO)

シアノバクテリアが利用する光合成 CO_2 固定酵素 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO)は、CO_2/O_2 specificity が低く、高い O_2 反応性を示す。この RuBisCO の CO_2 固定酵素としての非効率性は、シアノバクテリアにおいて CO_2 濃縮機構により補われている。シアノバクテリアの CO_2 濃縮機構では、まず無機炭素トランスポーターによって炭酸水素イオンが細胞内に濃縮される。濃縮された炭酸水素イオンは、タンパク質シェルから構成される細胞内小器官カルボキシソーム内へ拡散輸送された後、carbonic anhydrase により迅速に CO_2 へ変換される。このように、CO_2 濃縮機構によりカルボキシソーム内に形成された高 CO_2 濃度環境は、carbonic anhydrase とともにカルボキシソーム内に高密度にパッキングされた RuBisCO へ提供される。このカルボキシソームを利用した CO_2 濃縮機構により、RuBisCO は O_2 によってほとんど阻害されることなく、CO_2 固定反応を触媒することが可能となる。このため、シアノバクテリアは、全 RuBisCO 量の 90%以上をカルボキシソーム内に局在させ、最適に CO_2 固定を行っている。このことから、ルビスコ発現量とカルボキシソーム形成の間には、何らかの関連性があると予想されるが、その存在は、これまで明らかにされてこなかった。

本研究では、ルビスコ発現量とカルボキシソーム形成の関係性を解析するために、RuBisCO 発現量を増加もしくは低下させた *Synechococcus elongatus* PCC7942 変異株の作製を試みた。*psbAI* プロモーター下流に *S. elongatus* PCC7942 RuBisCO ラージサブユニットとスモールサブユニットの遺伝子オペロンを連結させた発現カセットをゲノム上の neutral site II へ挿入した株 (OX1 株)では、野生株と比較して RuBisCO 量が 2.5 倍に、同じ発現カセットを発現プラスミド pUC303 を用いて導入した株(OX2 株)では、RuBisCO 量が 10 倍に増加していた。また、ゲノム上の RuBisCO 遺伝子オペロンを薬剤耐性マーカー遺伝子挿入によりヘテロに破壊した株 (KD 株)では、RuBisCO 量が野生株の 0.6 倍に低下していた。このように作製した変異株の電子顕微鏡観察から、RuBisCO 量の増加によりカルボキシソームが肥大すること、また RuBisCO 量の低下によりカルボキシソームが縮小し、その数も減少することが明らかになった。これらの結果から、RuBisCO 発現量によるカルボキシソーム形成制御機構の存在が明らかとなった。現在、RuBisCO 量増加・低下株の光合成能等の解析を進めており、これらの結果も併せて報告する。

Rubisco, carboxysome, cyanobacteria

講演番号：2C05p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ C 校舎 05 会場

植物葉緑体のプリンヌクレオチド生合成制御における ppGpp の役割
Role of ppGpp in regulation of purine biosynthesis in plant chloroplasts
○野村 勇太[1]、泉 厚志[3]、福永 芳規[1]、楠見 健介[2]、射場 厚[2]、中平 洋一[3]、野澤 彰[3]、戸澤 譲[3]
([1]愛媛大院・理工、[2]九州大院・理、[3]愛媛大・PROS)
○Yuhta NOMURA[1], Atsushi IZUMI[3], Yoshinori FUKUNAGA[1], Kensuke KUSUMI[2], Koh IBA[2], Yoichi NAKAHIRA[3], Akira NOZAWA[3], Yuzuru TOZAWA[3] ([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Ehime Univ., [2]Dept. Biol., Fac. Sci., Kyushu Univ., [3]PROS, Ehime Univ.)

【目的】バクテリアの緊縮制御に関わる ppGpp シグナル制御系は、高等植物の葉緑体にも保存されており、維管束植物の Ca^{2+}活性型 ppGpp 合成酵素が種子形成に必須であることが明らかにされている。我々は、これまでに植物での ppGpp の標的分子の１つが葉緑体翻訳系であることを報告している。今回、新たな標的分子候補として、グアニン核酸生合成に必須のグアニル酸キナーゼ (GK) およびアデニン核酸生合成に必須のアデニロコハク酸合成酵素 (AdSS)について生化学的機能解析を行い、葉緑体プリンヌクレオチド生合成制御における ppGpp の役割を調査した。

【方法】イネ (*O. sativa*)由来の葉緑体局在型 GK (GKpm)、細胞質局在型 GK (GKc)、および葉緑体局在型 AdSS (AdSS1, AdSS2)タンパク質をそれぞれ大腸菌にて発現・精製し、GK の触媒活性(GMP を基質とした GDP 合成)および AdSS の触媒活性 (IMP を基質としたアデニロコハク酸合成)に与える ppGpp の影響を *in vitro* アッセイ系により評価した。

【結果と考察】本解析で、イネの葉緑体に局在する GKpm の触媒活性が ppGpp により顕著に阻害されることが明らかとなった。ppGpp は GMP と競合して GKpm に強く作用しており (K_m^{GMP} が 73 µM に対して、K_i^{ppGpp} が 2.8 µM)、ppGpp の阻害濃度 IC_{50} は約 10 µM であった。この値は、葉緑体翻訳系の阻害濃度 (250 µM)と比べ著しく低い。一方、イネの細胞質に局在する GKc は酵母の細胞質に局在する GK と同様に ppGpp に対して非感受性であることが明らかになった。さらに、単離したエンドウマメの葉緑体の抽出液を解析した結果、エンドウマメの葉緑体に内在する GKpm の活性も ppGpp による顕著な阻害を受けることを確認した。つづいて、イネの葉緑体局在型 AdSS (AdSS1, AdSS2)の解析を行い、両酵素の触媒活性が ppGpp に対して感受性を示すことを見出した。しかしながら、本解析では基質の GTP および GDP でも ppGpp と同様の強い AdSS への親和性が確認されたことから、葉緑体内における ppGpp による AdSS 活性の抑制効果は限定的である可能性が高い。これらの結果から、GK が葉緑体における ppGpp の主たる標的分子であると推察される。

ppGpp, chloroplast, purine nucleotide

講演番号：2C05p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ C 校舎 05 会場

日本東海地方における社寺林の研究

A study o Foreste of Shrines and Temples in Provincial Tokai in Japan

○高村 仁 (高村生命科学研究所)
○Hitoshi TAKAMURA (Takamura life science laboratory)

【目的】社寺林は神社仏閣の境内林として各地に見られるが、その多くは長い間にわたって伐採を禁止して保存されて来た森林が多いので、その他固有の森林樹種を知ることが出来る。それゆえ本調査は学術上価値あるものの保存、緑地保全に役立たせんがためになされた。研究の一環として東アフリカの乾燥適応進化植物、ブラジル熱帯多雨林の研究を行った。
【方法】樹木幹の目通りの周囲は巻尺、樹高は、弧度法を用いた。土壌酸性度は pH メーターを用いた。環境条件は気象庁のデーターベースにお願いした。調査地は、日本植物分布中、温．暖帯植物区に属している。中間系、南方系、北方系、亜熱帯系 - 樹木の種類、樹木数、常緑樹：落葉樹の比を調査した。
【結果】(1)瑞浪市社寺林 112 社、調査期間昭和 49 年 4 月 1 日～昭和 62 年 3 月 31 日 (12 年間)、平成 24 年度環境条件、年平均気温 14.9℃、年降水量 1858 ㎜、標高 175m～800.1m、調査地標高 175m～600m、調査樹木数は 18878 本、樹種 81 種、暖地性植物帯、中間系：南方系：北方系＝9.6：1.3：2.5、落葉樹：常緑樹＝4：3、調査境内地総面積＝209093 ㎡、位置、東経 137° 25′ 、北緯 35° 32′ の位置にあり暖地性植物区に位置している。(2)恵那市蛭川村社寺林 5 社、調査期間昭和 60 年 4 月 1 日～平成元年 3 月 31 日 (5 年間)、位置、東経 137° 257′ 北緯 35° 327′ 環境条件、年平均気温 13.1℃、年降水量 1917 ㎜、標高 300m～1128m、調査社寺林標高、300m～360m、調査樹木数 688 本、樹木種 60 種、落葉樹：常緑樹＝3.0：2.5、暖地性植物帯、中間系：南方系：北方系＝23：17：12 である。(3)可児市社寺林 5 社の調査、位置可児市市役所、北緯 35° 25′ 、東経 137° 0359′ 調査地年降水量 1444.6 ㎜、年平均気温 14.4℃、調査樹木数 98 本、樹種、24 種、暖地性植物区中間系：南方系：北方系＝11：10：3、常緑樹：落葉樹＝10：8 であった。(4)東京伊豆大島の植物相、山頂社寺林と登山道標高 1m～758m、北緯 34° 7′ 、東経 139° 5′ 、樹木種 36 種、中間系：南方系：北方系：亜熱帯系＝3：7：1：1、常緑樹：落葉樹＝3：3：3、環境条件（1981 年から 2010 年までの平均値）16.3℃、年平均降水量 2827.1 (㎜)、日照時間 18043 (h)、(5)浜松市佐鳴湖畔蜆塚遺跡；一、標高 60m、北緯 35° 1′ 、東経 135° 6′ （1981 年からの平均値）年平均気温 16.3℃、年平均降水量 1809.1 ㎜、年日照時間の年平均値 (h)、2207.9 (h) 樹木数 875 本、樹種 55 種、常緑樹：落葉樹＝41：12、中間系：南方系：北方系＝12：40：3 であった。(6)東アフリカ草原の乾燥適応進化植物、アカシア属樹木、多肉植物等 (7)南米ブラジル、赤色光青色光光合成植物ブーゲンビリア、などが特徴的であった。

講演番号：2C05p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ C 校舎 05 会場

Analysis of nitrogen fixing bacteria in agricultural soil

○Chalee KONGWICHIAN, Masaki MUKAI, Dinesh ADHIKARI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

Introduction:

Nitrogen (N) is one of the important nutrients for plant growth. The concerns on N use efficiency and its impact on environment have renewed interest in exploring alternative or supplementary N source for sustainable agriculture. Enhancement of biological nitrogen fixation activity, therefore, could be an alternative for the efficient crop production and environmental safety. It is worthwhile to understand the suitable environmental conditions for nitrogen fixing bacteria and their activity in soils. The objective of this study is to compare the number of nitrogen fixing bacteria in different condition of agricultural soil.

Methods and results:

Soil samples were collected from various agricultural fields. Numbers of nitrogen fixing bacteria, total bacteria, total nitrogen (TN), and total carbon (TC) were analyzed. Number of nitrogen fixing bacteria was estimated by quantification of *nifH* gene using real-time PCR. Total bacteria were estimated by the slow-stirring method. Average numbers of nitrogen fixing bacteria in paddy and upland soils were 1.00×10^8 and 1.02×10^6 cells/g-soil, respectively. Average numbers total bacterial number in paddy and upland soils were 2.20×10^9 and 7.75×10^8 cells/g-soil, respectively. The higher proportion of nitrogen fixing bacteria in paddy fields (64 times) suggests that flooding condition enhances the number of nitrogen fixing bacteria. To confirm the paddy condition is suitable for nitrogen fixing bacteria, a laboratory experiment was also carried out. Almost same results were obtained in field and laboratory experiment, indicating that the paddy condition seems to be suitable for nitrogen fixing bacteria compared with upland condition.

Nitrogen fixing bacteria, Paddy field, Upland field

講演番号：2C05p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ C 校舎 05 会場

土壌環境中における環境バクテリアとリン循環の関係解析

Relationship between environmental bacteria and organic phosphorus mineralization in soil

○ADHIKARI Dinesh、仲林 聡、向 真樹、久保 幹（立命館大生命）
○Dinesh ADHIKARI, Satoshi NAKABAYASHI, Masaki MUKAI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景および目的】

リンは植物生長において最も重要な栄養物の一つであり、有機リンを植物が利用可能な無機リンへ効率的に変換することが重要である。これまでに、土壌中のリン循環を定量的に解析するため、土壌環境中で豊富に存在する有機態リンである、フィチン酸の無機化を指標としたリン循環活性定量法を構築してきた。本研究では、土壌環境中においてリン循環を活性化させるため、土壌環境中における環境微生物と各種リンとの関係を解析することを目的とした。

【方法および結果】

環境バクテリアの定量は、環境 DNA（eDNA）を指標としたスロー・スティアリング法を用いた。全リン（TP）、有機態リン（OP）、無機態リン（IP）、および水溶性リン（WSP）は、常法に従い定量した。土壌サンプルは、農地を中心とし、畑および水田の土壌を用いた（126 サンプル）。

土壌環境中において、環境バクテリア数とフィチン酸から生成される WSP 量の相関関係を解析したところ、強い相関関係は認められなかった（$R^2 = 0.02$）。一方、環境バクテリア数とフィチン酸から生成される IP 量は、正の相関関係があった。

これらの結果から、土壌環境中において、有機態リン酸の無機化は、環境バクテリアが深く関与しており、環境バクテリア数を上昇させることで有機態リンの無機化が促進されることが示唆された。また、無機化された水溶性リン酸は、土壌環境中に存在する金属イオンと直ちに吸着して保持されることが確認された。土壌環境中で植物の栄養素である IP を OP より効率よく供給させるためには、土壌中の環境バクテリア数とリン酸を吸着する金属イオンを把握し、コントロールしていくことが重要であると考えられた.

Environmental bacteria, Organic phosphorus, Inorganic phosphorus

講演番号：2C05p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ C 校舎 05 会場

土壌肥沃度指標（SOFIX）を基盤とした実圃場におけるバレイショ栽培

Potato cultivation based on Soil Fertile Index (SOFIX) under field condition

○向 真樹、アディカリ ディネシュ、久保 幹（立命館大生命）
○Masaki Mukai, Dinesh Adhikari, Motoki Kubo (Ritsumeikan Univ.)

【目的】

これまでに、物質循環の活性を定量的に評価する土壌肥沃度指標(Soil Fertile Index, SOFIX) に基づく土壌評価法を構築できた。SOFIX に基づいて様々な土壌を分析し、土壌肥沃度の改善に資する土壌データベースを作成したところ、総細菌数、総炭素量 (TC)、総窒素量 (TN)が重要であることが明らかになった。本研究では、実圃場で検証を行うため、土壌肥沃度を有機資材と化学肥料で調整した圃場でバレイショを栽培し、収量および品質を解析した。

【方法と結果】

農地土壌 126 サンプルについて、総細菌数、TC、TN、総リン量(TP)、総カリウム量(TK)、C/N 比、C/P 比、亜硝酸酸化活性、リン循環活性、アンモニア態窒素量、硝酸態窒素量、亜硝酸態窒素量、水溶性リン量、水溶性カリウム量、アンモニア態窒素量の減少比、亜硝酸態窒素の減少比の各項目を計測し、データベースを作製した。

データベースを分析したところ、総細菌数と TC、総細菌数と TN には正の相関が認められた。そこで、TC と TN を有機資材で調整した土壌で有機栽培を行った。化学栽培は、バレイショの施肥基準に従い、化学肥料で窒素、リン酸、カリウムの施肥を行った。これら 2 圃場は、それぞれ 24m² で、80 株のバレイショ（学名 : Solanum tuberosum L.）を定植した。

収穫においては、有機栽培は化学栽培と比較して、S サイズ（49g-99g）で 21%、M サイズ（100g-159g）で 66%、L サイズ(160g 以上)で 3%、総収穫量で 29%多かった。バレイショ収穫量の全国平均と化学栽培は同程度の収量であったのに対し、有機栽培で 29%%多かった。有機栽培では、化学栽培と比較して、有機栽培のほうが収穫量が多く、特に、M サイズのバレイショにおいて顕著な差が見られた。

内容物については、TC は有機栽培で 121mg/g、化学栽培で 107mg/g、TN は有機栽培で 3.28mg/g、化学栽培で 2.25mg/g、TP(総リン酸量)は有機栽培で 0.94mg/g、化学栽培で 0.63mg/g であった。したがって、TC、TN、TP に関しては、有機栽培の方がバレイショ 1g あたりの量が多かった。ビタミン C 量は、有機栽培と化学栽培で差は見られなかった。

total carbon, total nitrogen, bacterial number

講演番号：2D01a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ D 校舎 01 会場

補酵素非依存型酵素を利用したバニリン合成プロセスの開発

Biotechnological production of vanillin by coenzyme-independent enzymes

○古屋 俊樹、三浦 美沙、木野 邦器（早大理工・応化）
○Toshiki Furuya, Misa Miura, Kuniki Kino (Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】食品や化粧品のフレーバーとして有用なバニリンは植物 *Vanilla planifolia* から得られるがその供給量は限られており、工業的には専ら化学合成に依存している。付加価値の高いナチュラルなバニリンを提供するための代替手法として、微生物や酵素を利用したバイオプロセスに関心が寄せられている。これまでに、バイオマス資源であるフェルラ酸を原料としてバニリンを合成する検討が多くなされているが、従来法ではフェルロイル-CoA を中間体とする合成経路において CoA および ATP を補酵素として必要とするため、その供給が反応の律速となってしまう。本研究では、この律速性を回避するために、補酵素非依存型の新規合成経路を設計してバニリンの高生産を試みた。

【方法・結果】補酵素非依存型脱炭酸酵素によるフェルラ酸から 4-ビニルグアヤコール（4-VG）への変換、および補酵素非依存型酸化酵素による 4-VG からバニリンへの変換の二段階からなる合成経路を設計した（図 1）。後者のような反応特性を示す酵素は知られていないため、ゲノム情報を利用して探索を試みた。その結果、*Caulobacter segnis* 由来の酵素が補酵素非存在下で 4-VG に対して高い酸化活性を示し、バニリンに変換することを見出した。そこで、当該酸化酵素遺伝子と既知のフェルラ酸脱炭酸酵素遺伝子を共発現させた組換え大腸菌を造成し、フェルラ酸と反応させた。その結果、4-VG を経由してバニリンが生成することを確認し、生成量はリッター当たりグラムスケールに達した。現在、さらなる高生産に向けて反応条件等を詳細検討中である。

本研究の一部は、平成 25 年度 A-STEP 探索タイプ（JST）の事業として実施した。

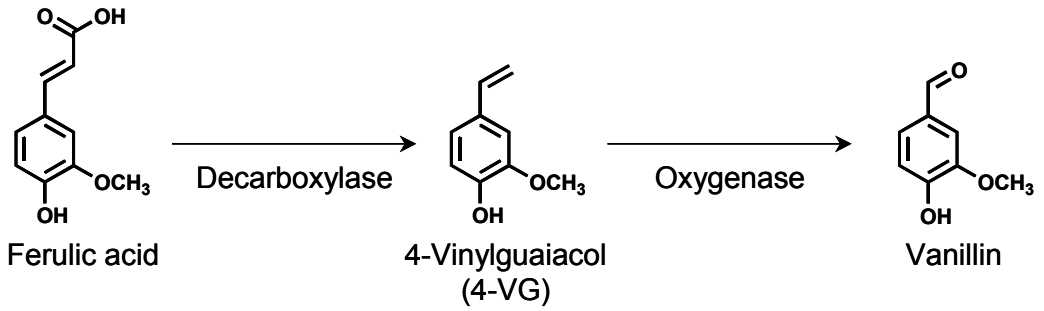


図 1　補酵素非依存型の新規バニリン合成経路

decarboxylase, oxygenase, vanillin

講演番号：2D01a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ D 校舎 01 会場

耐熱性向上型フルクトシルペプチドオキシダーゼの開発

Development of thermostable fructosyl peptide oxidase

○鉞 陽介[1]、一柳 敦[1]、中津 亨[2]、加藤 博章[2]、五味 恵子[1] ([1]キッコーマン研究開発本部、[2]京大院薬)
○Yosuke MASAKARI[1], Atsushi ICHIYANAGI[1], Toru NAKATSU[2], Hiroaki KATO[2], Keiko GOMI[1] ([1]R&D Div., Kikkoman Corp., [2]Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyoto Univ.)

【目的】世界の糖尿病患者数は 2012 年に 3 億 7100 万人に達し、2030 年には 5 億 5180 万人まで増加すると予測されており、それに伴い糖尿病診断の重要性も増している。日本国内では 2010 年の糖尿病診断基準の改定より、血糖値とともにヘモグロビン A1c (HbA1c)値が糖尿病診断用マーカーとして重要視されている。HbA1c はヘモグロビンの β 鎖 N 末端のバリン残基に血中のグルコースが結合し、アマドリ転移して生成する糖化タンパク質である。血中の総ヘモグロビンに占める HbA1c の割合は過去 1～2 ヶ月の平均血糖値を反映する。我々はこれまでに、HbA1c の β 鎖 N 末端から遊離される N^{α}-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-valyl-L-histidine (F-VH)を酸化的に脱糖化する酵素フルクトシルペプチドオキシダーゼ (FPOX)を発見し、世界初の酵素による HbA1c 測定法を開発した(1) 。この酵素による HbA1c 測定法の利便性をより高めるための 1 つの方策として、測定用キットの常温流通や長距離輸送等を可能とすることが挙げられる。そこで、酵素が処方されたキットの保存性を高めるために、優れた耐熱性を有する FPOX が必要となる。本研究では、部位特異的変異導入によって、FPOX に水素結合を新たに導入し、耐熱性を向上させることを目指した。

【方法・結果】分子内部の水素結合は構造の安定化に重要な要素の 1 つであるが、積極的に耐熱性向上のために導入された報告は少ない。そこでまず、水素結合の距離が 2.5～3.6 Å であることから、*Coniochaeta* 属由来 FPOX の結晶構造に基づき、Tyr に置換することで水素結合を新たに形成し得る Phe を探索したところ、6 残基あることが示唆された。以前までに構築した耐熱性向上型 *Coniochaeta* 属由来 FPOX (FPOX-T9)に対して、この 6 残基の Phe をそれぞれ Tyr に置換した変異体を大腸菌により発現させ、熱処理後の残存活性を評価した結果、43 位、267 位、286 位の Phe を Tyr に置換することで耐熱性が向上し、新たに水素結合が形成されたことが示唆された。また、F43Y 変異体と F286Y 変異体は FPOX-T9 と同等の F-VH に対する触媒効率を示した。

次に、以前に開発したジスルフィド結合導入型 FPOX 変異体 (FPOX-T9/A151C)に対して、2 つの耐熱性向上型変異 F43Y、F286Y を組み合わせたところ、F-VH に対する触媒効率を維持しつつ、55 °C、10 分間加熱処理による半減期が FPOX-T9/A151C と比較して 6.2 倍に向上することが分かった。以上のことから、部位特異的変異導入によって水素結合を新たに導入することは、効率的に目的タンパク質の耐熱性向上を実現できる手法であるといえる。

(1) Hirokawa, K. *et al*., *FEMS Microbiol. Lett*., **235**, 157-162 (2004)

fructosyl peptide oxidase, thermostabilization, hydrogen bond

講演番号：2D01a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ D 校舎 01 会場

HbA1c 由来糖化ヘキサペプチドに作用するフルクトシルペプチドオキシダーゼの開発

Development of fructosyl peptide oxidase capable of oxidizing the fructosyl hexapeptide derived from HbA1c

○一柳 敦[1]、鉞 陽介[1]、渡辺 文太[2]、中津 亨[3]、加藤 博章[3]、五味 恵子[1] ([1]キッコーマン研究開発本部、[2]京大化研、[3]京大院薬)
○Atsushi ICHIYANAGI[1], Yosuke MASAKARI[1], Bunta WATANABE[2], Toru NAKATSU[3], Hiroaki KATO[3], Keiko GOMI[1] ([1]R&D Div., Kikkoman Corp., [2]Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., [3]Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyoto Univ.)

【目的】世界の糖尿病患者数は 2012 年に 3 億 7100 万人に達し、2030 年には 5 億 5180 万人まで増加すると予測されており、それに伴い糖尿病診断の重要性も増している。日本国内では 2010 年の糖尿病診断基準の改定より、血糖値とともにヘモグロビン A1c (HbA1c)値が糖尿病診断用マーカーとして重要視されている。HbA1c はヘモグロビンの β 鎖 N 末端のバリン残基に血中のグルコースが結合し、アマドリ転移して生成する糖化タンパク質であり、血中の総ヘモグロビンに占める HbA1c の割合は過去 1~2 ヶ月の平均血糖値を反映する。臨床検査項目の標準化推進組織である国際臨床化学連合(IFCC)は、HbA1c を Glu-C プロテアーゼで分解した際に生じる、β 鎖 N 末端由来の糖化ヘキサペプチド(F-6P)を定量する方法を HbA1c 測定法として推奨している。しかしながら、IFCC 推奨の HbA1c 測定法を実現し得る、F-6P に高い反応性を示すオキシダーゼはこれまで存在しなかった。そこで本研究では、β 鎖 N 末端由来の糖化ジペプチド(F-VH)を酸化的に脱糖化する酵素であるフルクトシルペプチドオキシダーゼ(FPOX)を部位特異的変異導入により改変し、高い F-6P 酸化活性を獲得した変異型 FPOX の取得を目指した。
【方法】F-VH の第二級アミノ基を硫黄原子に置換した酵素反応阻害剤(F-VH アナログ)を合成し、*Coniochaeta* 属由来 FPOX との複合体結晶の調製に使用した。複合体結晶は、沈殿剤として NaH_2PO_4、Na_2HPO_4、PEG400 を用いてシッティングドロップ蒸気拡散法により調製した。複合体結晶の回折データは大型放射光施設 SPring-8 を利用して 1.65 Å 分解能まで収集した。FPOX の結晶構造を利用した分子置換法により初期位相を決定し、FPOX と F-VH アナログ複合体の分子モデルの構築および精密化を行った。決定した複合体の結晶構造から F-6P の認識に関与し得るアミノ酸残基を推定し、これらのアミノ酸残基を置換した変異型 FPOX の基質特異性(F-6P/F-VH)、および F-6P の定量性を評価した。
【結果】FPOX と F-VH アナログ複合体の結晶構造から、FPOX の活性部位は 8 本の β-ストランドから成る β-シート、16 残基から成る α-ヘリックス、3 本のループにより囲まれており、これらの二次構造を構成するアミノ酸残基が F-6P の認識に関与すると推察された。これらのアミノ酸残基を対象とした変異導入実験で得た 7 重変異型 FPOX は、F-6P と F-VH に対する活性比率(F-6P/F-VH)が 0 から 2.3 まで向上した。また、7 重変異型 FPOX を含む試薬を用いた F-6P 定量試験では、0.5 μM の F-6P まで定量可能であることが示され、IFCC 推奨の HbA1c 測定法を実現可能な FPOX の開発に初めて成功した。

fructosyl peptide oxidase, fructosyl hexapeptide, hemoglobin A1c

講演番号：2D01a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ D 校舎 01 会場

連続グルコース計測への応用を目指した真菌由来 FAD グルコース脱水素酵素の改良

Development of engineered fungi derived FAD glucose dehydrogenases and its potential application for the continuous glucose monitoring

○坂井 元気[1]、森 一茂[2]、小嶋 勝博[2]、フェリ ステファノ[1]、早出 広司[1,2] ([1]東京農工大院工、[2]有限会社アルティザイム・インターナショナル)
○ Genki SAKAI[1], Kazushige MORI[2], Katsuhiro KOJIMA[2], Stefano FERRI[1], Koji Sode[1,2] ([1]Dep.Biotechnol.Tokyo Univ. of Agric. and Technol., [2]Ultizyme International Ltd.)

【目的】真菌由来 FAD グルコース脱水素酵素(FADGDH)はグルコースに対する基質特異性が高いことから、人工電子受容体を用いる血糖自己計測装置におけるグルコースセンサ素子の代表的な酵素として認識されるようになった。当研究室ではこれまでに真菌のゲノムデータベースから新規な FADGDH を見出し、大腸菌を用いた組換え生産について報告している [1)]。一方で連続グルコース測定(持続血糖測定システム ; Continuous Glucose Monitoring; CGM)用グルコースセンサは皮下に埋め込んだグルコース計測用の酵素センサにより細胞間質液中のグルコースを一定期間連続的に計測する装置であり、血糖値管理ならびにインスリンポンプとの組み合わせにより今後の糖尿病治療への重要な役割が認識されている。本研究では FADGDH の CGM への応用を目指し、同酵素の安定性の改良及び改良型酵素の連続グルコース計測への応用を試みた。
【方法】野生型ならびに変異型 FADGDH は大腸菌を用いて組み換え生産することで水溶性タンパク質として調製した酵素試料を用いた。酵素の安定性は同酵素を一定温度で一定時間処理した後の残存活性を計測することで半減期を算出した。連続グルコース測定は光架橋ポリマーにより酵素を固定化した酵素電極を作成し、電子受容体の存在下、37℃で行った。
【結果】大腸菌において組み換え生産された野生型 FADGDH の安定性を検討したところ、37℃における安定性はきわめて低くかった。同酵素の予測構造をもとに FADGDH 内にジスルフィド結合が形成されるように変異を導入した改良型 FADGDH を構築した。改良型酵素は大幅に安定性が向上するとともに、その酵素活性ならびに基質特異性は野生型酵素と同一であった。改良型 FADGDH を固定化した酵素電極を用いた連続グルコース測定では、長期にわたり計測に十分な応答を示した。今後、改良型 FADGDH を用いる連続グルコース測定についての詳細を検討する予定である。

1) “Screening of *Aspergillus*-derived FAD: -glucose dehydrogenases from fungal genome database”. K. Mori et al., Biotechnol Lett. ;33(11):2255-63 (2011)

FAD glucose dehydrogenase, Continuous glucose monitoring, Enzyme engineering

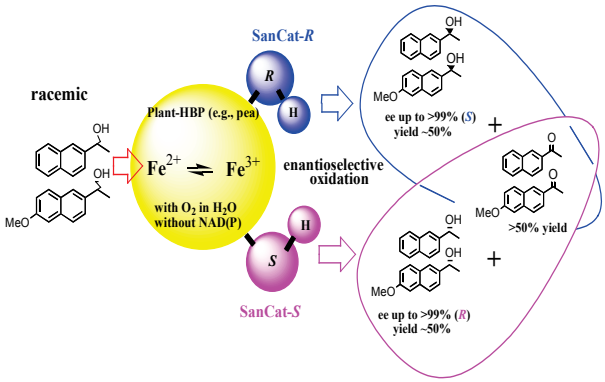
講演番号：2D01a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ D 校舎 01 会場

植物由来鉄電子移動系を用いた不斉酸化触媒（SanCat-S/-R）の開発

Application of a Heme-binding Protein eluted from Encapsulated Biomaterials to the Catalysis of Enantioselective Oxidation (SanCat-S/-R)

○永岡 宏行（サンヨー食品開発）
○Hiroyuki NAGAOKA (Sanyo Shokuhin Co., Ltd. R & D)

【目的】エンドウ豆から得られる鉄結合蛋白質（ＨＢＰ）に、ＮＡＤ（Ｐ）非依存型な２級アルコール脱水素反応（２ｎｄ－ＡＤＨ）を見出し、ＳａｎＣａｔ開発に至ったので報告する。菌由来２ｎｄ－ＡＤＨは、ＮＡＤ（Ｐ）―水素脱着が律速となるためコスト負担を生じ、更に、組み換え微生物に関しては保存／反応培地／廃棄を含めたコスト負担が不要となる。従って、ＳａｎＣａｔは、植物由来ＮＡＤ（Ｐ）非依存型ＨＢＰ粉末であるので、リパーゼ粉末の不斉加水分解反応と同様、“簡便”で“コスト安”を可能にする不斉酸化触媒として活用できる。[1)]



【本文】SanCat-R（30mg）不斉酸化反応は、試験管（18 mm×15 mL）に撹拌子挿入後、1）フタ開放系にて、３）水溶媒中（4mL）、４）DMSO 基質溶液(20,000ppm、30μL（1.2 mM)）添加後、40℃で撹拌（700rpm）すれば生じる。基質濃度 2.4mM は、2 回に分けて基質添加（30μL×2）すれば消化する。SanCat-R 不斉酸化による一方の鏡像体の収量は 40%～50%であり、*R*-アルコールが全てケトンへ酸化された時点で反応は終了する。反応後は、濾過又は遠心にて分離でき、植物由来なのでそのまま廃棄できる。SanCat-R は、水溶液(4mL、40℃）中、試験管キャッで撹拌すると、基質ラセミ（rac-**1** or **-2**）の R―アルコールを不斉酸化し、*S*-(+)-**1**（*S*-ナプロキセン前駆体, >99% ee, 収率～50%）を好適に合成する。SanCat-S は、同系にて基質ラセミ中 S―アルコールを不斉酸化して、*R*-(-)-**1**（>99% ee, 収率～50%）を合成できる。また、SanCat-R/-S の比活性は、それぞれ、0.6ｍU／0.8ｍU（1 U = 1 μmol/(min·mg)）である。更に、エンドウ豆粉末／アルギン酸Ｎａ$^{+}$ゲルより水抽出される SanCat を、ゲル濾過分取・SDS-PAGE による単一バンド・該バンドの N 末シーケンス（３３アミノ酸残基の同定）・BLAST 解析に供した結果から、膜蛋白中に隠れた hemophore HasA（Fe^{2+} ⇄ Fe^{3+} with O_2）と判定した。[2)] 即ち、ＳａｎＣａｔ不斉脱水素反応がエンドウ由来 NAD（P）H 非依存型であり、例えば、過酸化酸素駆動型シトクローム P-450 に類似する反応と示唆された。尚、ＳａｎＣａｔは和光純薬工業株式会社より No. 355-34211 (1g) No.351-34213（5g）の２つが販売中である。[2)]

References:

1) H. Nagaoka, K. Udagawa, K. Kirimura, *Biotechnol. Prog.*, **28**, 953 (2012).
2) H. Nagaoka, *ACS Catalysis*, In Press (2013).

heme-binding protein, hemophore, asymmetric oxidation

講演番号：2D01a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ D 校舎 01 会場

ヒト由来 CYP2R1 発現酵母を用いたビタミン D 25 位水酸化体の生成

Production of 25-hydroxyvitamin D in the recombinant yeast cells expressing human CYP2R1

○安田 佳織[1,2]、遠藤 真理子[1]、生城 真一[1]、鎌倉 昌樹[1]、太田 美穂[3]、榊 利之[1] ([1]富山県大工、[2]（株）TOPU バイオ研究所、[3]相愛大人間)
○ Kaori YASUDA[1,2], Mariko Endo[1], Shinichi Ikushiro[1], Masaki Kamakura[1], Miho Ohta[3], Toshiyuki Sakaki[1] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]TOPU BIO Research. Co., Ltd, [3]Soai Univ.)

ビタミン D_3（VD_3）およびビタミン D_2（VD_2）は体内で 25-ヒドロキシビタミン D（25(OH)D）を経て、1α,25-ジヒドロキシビタミン D（1α,25$(OH)_2$D）へと変換されることによって生理作用を示す。このことから、1α,25$(OH)_2$D およびその誘導体が骨粗鬆症や乾癬治療薬として使用されているが、近年、25(OH)D にも生理作用があることが報告されている。また、骨粗鬆症や前立腺癌の予防のために、血中 25(OH)D 濃度の測定が重要であることが示唆されており、標準品としての 25$(OH)D_3$ および 25$(OH)D_2$ の需要が今後、急速に増加する可能性が高い。本研究では、生理的に重要なビタミン D 25 位水酸化酵素として知られる CYP2R1 を発現する酵母を利用したバイオコンバージョン法によるビタミン D 水酸化体の生成を試みた。

ヒト由来 CYP2R1 発現酵母菌体を 4%グルコースおよび 0.2% 3-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンを含む 0.1M リン酸緩衝液（pH.7.4）に懸濁し、VD_2, VD_3, 1α$(OH)D_2$, 1α$(OH)D_3$ のいずれかを基質として添加後、37℃で振とうした。24 時間後、代謝物を HPLC により分析したところ、各基質の 25 位水酸化体の生成が確認された。次に、酵母内在性のエルゴステロールが UV 照射によって VD_2 に変換されることを利用し、基質を添加することなく、25$(OH)D_2$ を生成することを試みた。CYP2R1 発現酵母菌体懸濁液に UV を照射し、その後 37℃で 24 時間振とうした。その結果、エルゴステロールが VD_2 に変換され、さらに CYP2R1 によって $25D_2$ へと変換されることわかった。最適 UV 照射条件下における 25$(OH)D_2$ の生成量は、50 μM の VD_2 を基質として添加させた場合よりも高く、酵母自身のもつエルゴステロールから変換された VD_2 を基質とすることで、効率よく 25$(OH)D_2$ が生産されたと考えられる。

Vitamin D, P450, yeast

講演番号：2D01a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ D 校舎 01 会場

anammox 菌 KSU-1 株由来ヘテロ 2 量体シトクロム *c* (NaxLS) の軸配位子置換とそのヒドラジン合成反応への影響

Effect of axial ligand replacement on hydrazine synthase activity of heterodimeric cytochrome *c* (NaxLS) from an anammox bacterium strain KSU-1

○大久保 寛幹[1]、市川 智美[1]、平 大輔[1]、古川 憲治[2]、藤井 隆夫[1] ([1]崇城大応生命、[2]熊大院自然科学)
○Hiroki Okubo[1], Satomi Ichikawa[1], Daisuke Hira[1], Kenji Furukawa[2], Takao Fujii[1] ([1]Fac. Appl. Life Sci., Sojo Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Tech., Kumamoto Univ.)

【目的】ある種の細菌が「嫌気性アンモニア酸化（anaerobic ammonium oxidation：anammox）」を行うことが 1995 年に発見された。anammox では、亜硝酸イオンが電子受容体となり、アンモニアが嫌気的に酸化され窒素ガスが生じる。この反応過程では中間体としてヒドラジン（N_2H_4）が生成することが明らかとなっているが、反応機構の全容解明には至っていない。2011 年、オランダのグループからヒドラジン合成酵素（HZS）に関する報告 [1)]があったが、この論文ではヒドラジン合成の分子活性がおよそ 0.08 min^{-1} と、酵素活性としては非常に低い値だった。また、生成物である N_2H_4 そのものは検出されていなかった。他方、我々は独自に集積した anammox 菌 KSU-1 株より、HZS とは別に、ヘテロ 2 量体シトクロム c (NaxLS)を精製し、ヒドラジン合成反応には、HZS に加えて NaxLS が必要であることを明らかにし、反応基質として NH_3 と NH_2OH、もしくは NH_3 と NO を用いることで、生成物 N_2H_4 そのものの定量に成功している。本研究では、ヒドラジン合成反応における NaxLS の役割を明らかにすることを目的として、NaxLS 配位子 Cys の変異体を作成し、これら変異型 NaxLS のヒドラジン合成への影響を調べた。
【方法】NaxLS は NaxL、NaxS の 2 つのサブユニットからなり、各サブユニットに 1 個の *c* 型ヘムを有しており、そのヘム鉄のシステイン配位により非常に低い酸化還元電位を有していることが分かっている。構築済みの NaxLS 発現用プラスミドを改変することで、NaxL の配位子 Cys のみを Met に変異させた NaxLS_C7M、 NaxLS 両サブユニットの配位子 Cys を Met に変異させた NaxLS_C7M_C75M_H67Q を構築した。発現タンパク質は各種カラムにかけ精製し、吸収スペクトルの測定を行い、NH_3 と NO を反応基質とした HZS のヒドラジン合成活性測定に用いた。
【結果・考察】精製した NaxLS 変異体の吸収スペクトル測定により、配位子 Cys を Met に置換することで、そのヘムは容易に還元されるようになり、酸化還元電位が上昇することが確認された。変異体を用いたヒドラジン合成反応活性において、NaxLS_C7M では約 80%、NaxLS_C7M_C75M_H67Q では約 40%に活性値が低下した。このことから、NaxLS の低い酸化還元電位は HZS のヒドラジン合成活性に必須ではないが、反応を促進していることが示唆された。ヒドラジン合成反応において NaxLS は HZS への電子供与体として働くのではないかと考え、両タンパク質間の電子移動反応について検討を行っている。

1) Kartal B et al. *Nature* **479** 127-130. (2011)

anammox, heme protein, hydrazine

講演番号：2D01a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ D 校舎 01 会場

anammox 菌 KSU-1 株で発現している 2 種類の可溶性シトクロム *c* の同定と大腸菌発現

Identification, expression, and characterization of two soluble cytochromes *c* from the anammox bacterium strain KSU-1

○平 大輔[1]、野元 美樹[1]、古川 憲治[2]、藤井 隆夫[1] ([1]崇城大応生命、[2]熊大院自然)
○Daisuke HIRA[1], Miki NOMOTO[1], Kenji FURUKAWA[2], Takao FUJII[1] ([1]Fac. Appl. Life Sci., Sojo Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Tech., Kumamoto Univ.)

【目的】ある種の細菌が「嫌気性アンモニア酸化（anaerobic ammonium oxidation：anammox）」を行うことが 1995 年に発見された。anammox では、亜硝酸イオンが電子受容体となり、アンモニアが嫌気的に酸化され窒素ガスが生じる。そのため種々の排水中のアンモニアの革新的な除去法として注目され、anammox 菌の排水処理への応用研究が盛んに行われている。一方、その反応過程においてはヒドラジン（N_2H_4）が中間体となることが明らかとなっているが、anammox 反応機構の全容解明には至っていない。我々は独自に集積した anammox 菌 KSU-1 株より anammox 反応に関わる酵素・タンパク質群を精製し、反応機構の解明に取り組んできた。本研究では、KSU-1 株より新たに 2 種類の機能未知シトクロム *c* を精製し、それらの生化学的性質について解明した。
【方法】anammox 菌 KSU-1 株を集積した汚泥より、疎水カラムクロマトグラフィによりヘム蛋白質の精製を行った。ヘムを含有する画分のうち、2 番目に溶出した画分をさらにゲルろ過カラムクロマトグラフィにより精製した。この精製試料を逆相カラムクロマトグラフィにかけたところ、2 種類のシトクロム *c* を含むことが判明し、それぞれの N 末端アミノ酸配列を決定し、解読済みの KSU-1 株ゲノムから目的の遺伝子を同定した（遺伝子番号 *b_428*、*c_855*）。同定した両者がコードするアミノ酸配列をもとに相同性検索を行った。さらに、プラスミド pET20 に *b_428*、*c_855* をそれぞれ挿入し、両シトクロム *c* それぞれを大腸菌 BL21(DE3 株)で発現させた。発現させた両シトクロム *c* を精製し、吸収スペクトル測定により、両者の性質を調べた。
【結果・考察】精製した 2 種類のシトクロム *c* について相同性検索を行ったところ、b_428 は anammox 菌 *Candidatus* Kuenenia stuttgartiensis から精製されているシトクロム c_{552} [1)]とのみ高い相同性を示した。c_855 についても既知のシトクロム *c* との相同性は低く、*Ca.* K. stuttgartiensis ゲノム中のシトクロム *c* 遺伝子とのみ高い相同性がみられた。従って、両者は anammox 菌に特有のシトクロム *c* であると考えられた。大腸菌発現後、各種カラムで精製した b_428 は典型的な His/Met 配位のシトクロム *c* と類似する吸収スペクトルを示し、そのヘムは容易に還元されることがわかった。一方、c_855 は His/Met 配位のシトクロム *c* とは異なる吸収スペクトルを示し、還元後にヒドロキシルアミンを添加するとさらにスペクトルが変化し、付加体を形成することがわかった。b_428 は電子伝達タンパク質としての機能を有し、c_855 はアナモックス反応中間体の窒素小分子の結合能を有していると推定された。
1) Cirpus IE et al. *FEMS Microbiol. Lett.* **252** 273-278. (2005)

anammox, cytochrome *c*, heme protein

講演番号：2D01a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ D 校舎 01 会場

ギ酸/二酸化炭素対の可逆反応系に対する生物電気化学的アプローチ
Bioelectrocatalysis for interconversion between HCOOH and CO_2
○阪井 研人[1]、河井 翔太[1]、高木 一好[2]、北隅 優希[1]、白井 理[1,3]、加納 健司[1,3]（[1]京都大院農、[2]立命館大理工、[3]CREST）
○Kento SAKAI[1], Shota KAWAI[1], Kazuyoshi TAKAGI[2], Yuki KITAZUMI[1], Osamu SHIRAI[1,3], Kenji KANO[1,3] ([1]Kyoto Univ., [2]Ritsumeikan Univ., [3]CREST)

【目的】
二酸化炭素の排出を抑え持続可能な社会の実現に向け，クリーンなエネルギー媒体を用いた技術開発が望まれている. そのような未来志向のアプローチの一つとしてギ酸/二酸化炭素対の相互変換系の構築が挙げられる．ギ酸は常温で液体であり，エネルギー密度が比較的高いため，貯蔵が容易な材料である．一方で二酸化炭素をギ酸に可逆的に還元できれば，二酸化炭素の有効利用につながる．本研究では，そのような反応系を生物電気化学的に高い変換効率で実現するため，ギ酸脱水素酵素に着目した．本酵素は NAD^+依存型酵素として知られ，*in vivo* ではギ酸を二酸化炭素に酸化し，NAD^+を還元するが, *in vitro* ではビオロゲン類のような低分子酸化還元物質（メディエータ）を電子受容体とする．そこで，本酵素の電子受容体特性，あるいは逆反応の電子供与体特性を，熱力学的および速度論的観点で調べ，ギ酸/二酸化炭素対の生物電気化学的可逆触媒系を構築することを目的とした.
【方法】
ギ酸脱水素酵素は *Methylobacterium extroquens* AM1 を培養後，単離精製した．電子受容体あるいは供与体をメディエータとして酵素反応と電極反応を共役させた反応系を構築し，酵素－メディエータ間の速度解析を行った．基質－メディエータ間の熱力学的反応駆動力は，酸化還元電位の異なるメディエータの利用と，ギ酸/二酸化炭素対の酸化還元電位の pH 依存性を基盤にして制御，調整した.
【結果と考察】
酵素反応速度解析の結果から，酵素―メディエータ間の二分子反応速度定数と熱力学的駆動力との間に自由エネルギー直線関係(LFER)が確認された．NAD^+もその関係に含まれることから，本酵素に対して NAD^+は特異的に反応するものではないと結論した．この考えを演繹すれば，逆反応における酵素―メディエータ間も LFER 特性が期待され，実際そのことを実験的に示した．正方向，逆方向に対して，LFER 特性が観られたことから，ギ酸/二酸化炭素対の酸化還元電位($E^{\circ\prime}_S$)に比較的近い酸化還元電位をもつメチルビオロゲンに注目し，その酸化還元電位($E^{\circ\prime}_M$)が $E^{\circ\prime}_S$ に等しくなる pH で電気化学的触媒反応系を観測したところ, 両方向の酵素電極反応に起因する触媒電流の観測に成功した. また, pH を変えて反応駆動力を形成したところ, 酸化もしくは還元方向に触媒活性が偏ることが分かった. これらの結果より，この生物電気化学系により，最小エネルギーでギ酸と二酸化炭素と相互変換ができることがわかった．今後，本系を物質生産とエネルギー生産に応用していく予定である.

formate dehydrogenase, bioelectrocatalysis, reversible reaction

講演番号：2D01a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ D 校舎 01 会場

酸化還元酵素－電極界面電子移動の解明のためのアプローチ

analysys of　electron transfer between redox enzyme and electrode

○河井 翔太[1]、北隅 優希[1]、白井 理[1]、薬師 寿治[2]、松下 一信[2]、加納 健司[1] ([1]京大院農、[2]山口大院農)

○Shota KAWAI[1], YUKI KITAZUMI[1], OSAMU SHIRAI[1], TOSHIHARU YAKUSHI[2], KAZUNOBU MATSUSHITA[2], KENJI KANO[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Yamaguchi Univ.)

【目的】

呼吸鎖や解糖系といった生命維持活動における酸化還元酵素の役割は大きい。これら酸化還元酵素の機能を利用する手段の一つに酵素機能性電極がある。酵素の基質特異性と、電子のシンクあるいはタンクとしての電極を組み合わせて、高感度バイオセンサやバイオ電池などに応用されている。これらデバイスの基幹システムは酵素反応と電極反応の共役方法である。とりわけ、酵素自身が電極を基質としてみなし、直接電子授受を行う直接電子移動型酵素電極反応（DET反応）は、最もシンプルな反応系であり、世界の多くの研究者が注目している。しかしながら、DET反応を行う酵素の報告例は少なく、その反応メカニズムの詳細も未だに不明な点が多い。本研究ではDET反応メカニズムの解明を目指し、DET型酵素の一つであるフルクトース脱水素酵素（FDH）に着目した。FDHは他のDET型酵素に比べその反応性が非常に高い。その挙動を詳細に追究することが、DET反応の本質を解き明かす鍵になり、また将来的応用展開になると考えた。その第一歩として遺伝子工学、分光学、電気化学的アプローチからヘテロトリマー構造であるFDHの各サブユニット分離発現と特性評価を行った。

【結果・考察】

FDHはフラビンを有するサブユニット（fdhL）、ヘムCを3つ有するサブユニット（fdhC）、機能未知なサブユニット（fdhS）からなるヘテロトリマー構造をしている。そこで、fdhSLとfdhCを別々に発現、精製した。

FdhSLは基質の酸化活性を保持していたが、DET活性は消失した。また、基質還元したfdhSLからfdhC内のヘムCへは速やかに電子移動するのに対し、fdhSLからcytchromeCへの電子移動は極めて遅かった。

一方、fdhCは微弱ながら、電気化学的なレドックスシグナルを与えた。また、FDHに対しては良好な電子受容体であるコエンザイムQ_1はfdhSLとはほとんど反応しないのに対し、fdhCを添加することで反応性は増加した。この反応速度は加えたfdhC濃度に対し直線的に増加し、一定値に達した。化学量論的にほぼfdhSL:fdhC = 1:1となったことからfdhSL及びfdhCが溶液内にて再結合していることが示唆された。さらにfdhSLにfdhCを混合することによりDET反応活性が復元した。

以上の結果より、fdhSL と fdhC の特異的相互作用によりサブユニット間電子移動が促進され、さらに、FDH の DET 反応やコエンザイムへの電子移動には fdhC が深く関わっていることが判明した。これらの知見は今後の DET 系のデザインにも有用である。

fructose dehydrogenase, direct electron transfer, heme C

講演番号：2D01a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ D 校舎 01 会場

タンパク質バイオマスを原料とした酵素燃料電池用素子の開発

Development of elements for biofuel cells from a protein biomass.

○里村 武範[1,2]、川上 竜巳[3]、坂元 博昭[1]、櫻庭 春彦[4]、大島 敏久[5]、末 信一朗[1,2] ([1]福井大院工、[2]福井大生命セ、[3]徳島大院総合、[4]香川大農、[5]大阪工大工)
○Takenori SATOMURA[1,2], Ryushi KAWAKAMI[3], Hiroaki SAKAMOTO[1], Haruhiko SAKURABA[4], Toshihisa OHSHIMA[5], Shin-ichiro SUYE[1,2] ([1]Univ. Fukui, [2]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui, [3]Univ. Tokushima, [4]Kagawa univ., [5]Osaka Inst. Technol.)

【目的】

酵素電池は、酸化還元酵素を用いて基質である糖やアルコールなどが持つ化学エネルギーを電気エネルギーに変換するデバイスである。現在までにグルコース脱水素酵素を電池用素子として、様々な電極への固定化法の開発が行われており、高い出力性能を示す酵素電池の報告が数多くなされている。しかしながら、酵素電池用電極の修飾方法の開発の進展に比べて酵素電池用素子の開発は遅れている。そこで本研究では、グルコースを燃料とするグルコース脱水素酵素電池に代わる新たな酵素電池を開発することを目的としてタンパク質系バイオマスであるゼラチン分解産物のプロリン、ヒドロキシプロリンをエネルギー源とする酵素電池用素子の探索と機能解析を行った。

【実験・結果】

我々の研究グループでは、プロリン、ヒドロキシプロリンに高い反応性を示す色素依存性プロリン脱水素酵素を超好熱性アーキア *Aeropyrum prenix* より見出し酵素化学的性質の解析とタンパク質立体構造の解析に成功している(1)(2)。本酵素を初発酵素として、超好熱菌より 4 種類の酵素を組み合わせることによってプロリン及びヒドロキシプロリンより 6 電子を抽出可能な代謝経路をデザインし、タンパク質発現系の構築、電子伝達性の評価を行った。その結果、デザインした代謝経路を構成する 4 種類の酵素のうち 3 種類酵素の発現に成功した。現在、これら酵素の電子伝達評価を進めている。

(1) Satomura T, Hara Y, Suye S, Sakuraba H, Ohshima T
Biosci Biotechnol Biochem 76, 589-593 (2012)
(2) Sakuraba H, Satomura T, Kawakami R, Kim K, Hara Y, Yoneda K, Ohshima T
J Biol Chem 287, 20070-20080 (2012)

dye-linked dehydrogenase, hyperthermophile, proline

講演番号：2D01a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ D 校舎 01 会場

分子内ケトンを持つ新規な酸化糖の酸化発酵を触媒する膜酵素

Membrane-bound dehydrogenase catalyzing formation of novel oxidized sugars having intramolecular ketone

○足立 収生[1]、アワーズ ロケ A.[2]、赤壁 善彦[1]、阿野 嘉孝[3]、品川 恵美子[4]、片岡 尚也[1]、薬師 寿治[1]、松下 一信[1] ([1]山口大学・農、[2]CINDEFI, UNLP、[3]愛媛大学・農、[4]宇部高専)
○ Osao ADACHI[1], Roque A. HOURS[2], Yoshihiko AKAKABE[1], Yoshitaka ANO[3], Emiko SHINAGAWA[4], Naoya KATAOKA[1], Toshiharu YAKUSHI[1], Kazunobu MATSUSHITA[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]CINDEFI, UNLP, [3]Ehime Univ., [4]Natl. Coll. Ube. Technol.)

【目的】最近の酸化発酵の研究から、10 種類以上の分子内ケトンを持つ新規な酸化糖が酢酸菌によって生成されることが明らかになってきた。それらの生成には、リボース 4-脱水素酵素 (R4DH) [1)]、4-ケトリボース-1-脱水素酵素、及びペント酸-4-脱水素酵素 (PNDH) [2)] に相当する三種類の未同定な膜結合型脱水素酵素が関係していることも明らかになった。しかし、関係する膜酵素を細胞膜から可溶化して精製を試みると著しい失活が起るために、それらの酵素化学的、理化学的諸性質をはじめ、酸化発酵機構などは未だ解明されていない。本報では、そのうちのひとつ、4-ケトリボース、2-デオキシ-4-ケトリボースや、4-ケトアラビノースなどの生成を触媒する膜酵素 R4DH の可溶化・精製に挑戦した。

【方法】グルコース、Na-グルコン酸、グリセリン及び酵母エキス、及びペプトンを含む培地で *Gluconobacter thailandicus* NBRC 3258 を培養して得られた菌体から細胞膜画分を調製した。細胞膜による糖類の酸化反応で生成される分子内ケトンを持つ酸化反応生成物の確認には、Dowex 1x4 (acetate 型) によるイオン交換クロマト、TTC を発色剤とする TLC クロマトのほか、レゾルシノールやカルバゾールによる比色法を併用した。酵素活性測定は PMS-DCIP や K-フェリシアニドを電子受容体として行った。

【結果】R4DH は *n*-octyl-glucoside, *n*-octyl-thioglucoside, *n*-dodecyl-maltoside や、Mydol10（花王）によって可溶化された。R4DH は CM-Toyopearl, DEAE-Sephadex A-50 及び Hydroxyapatite を使ったカラムクロマトによって、既報の PQQ を含むグルコース脱水素酵素 (QGDH) と異なる位置に溶出された。QGDH は PQQ 以外にクロモフォアを持たないが、R4DH は 410 nm 付近に小さな特徴的な吸収極大をもつ新規なキノプロテインであると結論した。一方、もうひとつ別の膜酵素、アラボン酸を 4-ケトアラボン酸へ、リボン酸を 4-ケトリボン酸へ酸化する PNDH は、R4DH と同じ可溶化液中に見出されたが、R4DH の精製過程で急速に失活した。本報で対象とした酵素の不安定性についても考察を試みる。

1) O. Adachi *et al*, *BBB*, **77**, 1131-1133 (2013).
2) O. Adachi *et al*, *BBB*, **74**, 2555-2558 (2010).

acetic acid bacteria, novel sugars, oxidative fermentation

講演番号：2D01p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ D 校舎 01 会場

グラム陰性菌由来 D 型乳酸脱水素酵素の機能-構造解析

Structural and functional characteristics of D-lactate dehydrogenase from gram-negative bacteria.

○古川 那由太[1]、戸川 美里[1]、宮永 顕正[2]、中島 将博[1]、田口 速男[1] ([1]東理大院理工、[2]東工大院理工)
○Nayuta FURUKAWA[1], Misato TOGAWA[1], Akimasa MIYANAGA[2], Masahiro NAKAJIMA[1], Hayao TAGUCHI[1] ([1]Tokyo Univ. Sci., [2]Tokyo Tech)

D 型乳酸脱水素酵素 (D-LDH) は、NAD を用いてピルビン酸と D 型乳酸間の酸化還元反応を触媒し、嫌気的な代謝に重要な役割を担うとともに、有用酵素として産業上での利用が期待される酵素である。これまで、*Lactobacillus* 属乳酸菌の D-LDH では、構造と機能に関する知見が数多く得られているのに対して、これらと系統的に隔たるグラム陰性細菌の D-LDH ではこうした知見が未だほとんどない。唯一、大腸菌の D-LDH の性質が 1960 年代に報告されているが、アロステリック特性をもつなど、乳酸菌由来の酵素にはみられない特徴が記載されている。そこで、本研究では、通性嫌気性の大腸菌 (ECLDH)、偏性嫌気性の *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* (FNLDH)、好気性の *Pseudomonas aeruginosa* (PALDH)と、タイプの異なる 3 種類のグラム陰性菌において、それぞれの D-LDH の機能と構造の解析を行った。

各 D-LDH の pH プロフィールを検討したところ、ECLDH や FNLDH では中性から弱アルカリ性において基質ピルビン酸による正の協同性が認められたのに対し、PALDH では逆に負の協同性が認められた。また、アロステリック活性化因子を探索したところ、FNLDH と PALDH では、解糖系の中間代謝産物である Fructose-1,6-bisphosphate (FBP)や、Mg^{2+}などの二価金属イオンが顕著な活性化効果を示したが、ECLDH においては、これらはいずれも有意な活性化効果を示さなかった。一方、側鎖の異なる 2-ケト酸を用いて各酵素の基質特異性を検討したところ、ECLDH はピルビン酸以外の基質に対しては高活性を示さず、ピルビン酸に高い特異性を示したのに対して、FNLDH はピルビン酸より側鎖の大きい基質に対して幅広く高活性を示し、広い基質特異性を備えている事が明らかになった。これらの結果から、グラム陰性菌の D-LDH には、アロステリック型酵素が広く分布しており、さらにそれらの調節特性や基質特異性は多様であることが示された。

一方、X 線結晶構造解析により、それぞれの酵素の立体構造を解析した結果、いずれの酵素もホモ二量体である乳酸菌由来の D-LDH と異なり、基本的にホモ四量体構造を形成していることが明らかになった。乳酸菌酵素と比較すると、サブユニットの三次構造や、二量体単位での四次構造には大きな相違がみられなかったことから、四量体を形成することが、これらのグラム陰性菌酵素に多様なアロステリック特性を与える要因となっていることが示唆された。

D-lactate dehydrogenase, allosteric, gram-negative bacteria

講演番号：2D01p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ D 校舎 01 会場

好酸好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来の非リン酸化型グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素におけるアロステリック制御にともなう構造変化

Conformation change during allosteric regulation of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from a thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*

伊藤 史晃、三宅 将之、中村 周吾、清水 謙多郎、伏信 進矢、○若木 高善（東京大学・院農生科・応生工）
Fumiaki ITO, Masayuki MIYAKE, Syugo NAKAMURA, Kentaro SHIMIZU, Shinya FUSHINOBU, ○Takayoshi WAKAGI (Univ. Tokyo, Dept Biotechnology)

Sulfolobus tokodaii は、pH 2~3、75~80°C を至適生育条件とする古細菌で、解糖経路として分岐型の変形エントナ-ドウドロフ経路を用いている。その解糖系は典型的なエントナ-ドウドロフ(ED)経路とは異なり、グルコースのリン酸化を伴わず解糖系全体で ATP の生成を行わない非リン酸化型 ED 経路と、解糖系全体で ATP を 0 もしくは 1 分子生成する半リン酸化型 ED 経路の両方を使用している。本菌の半リン酸化型経路で働く非リン酸化型グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(St-GAPN) はホモ四量体として精製され、補酵素として $NADP^+$を優先的に使い、無機リン酸非依存的にグリセルアルデヒド-3-リン酸 (GAP) を酸化するが、グリコーゲン代謝の中間産物であるグルコース-1-リン酸 (Glc1P)によって GAP に対する正の協同性が失われ大幅に活性化され、GAP への親和性が上昇する (K 型のアロステリズム)。同属古細菌である *Sulfolobus solfataricus* 由来の GAPN (Sso-GAPN)では、GAP への協同性は見られず、Glc1P によって V_{max} の値が顕著に上昇する (V 型のアロステリズム)。StGAPN の Tyr139 を Arg に置換するとアロステリズムの特性が K 型から V 型へと変換される。これらのユニークなアロステリック調節の構造的な基盤を明らかにするために、立体構造を推測し、円偏光二色性 (CD) によってリガンド共存に伴う構造変化を調べた。

類似性の高い *Thermoproteus tenax* 由来 GAPN (1UXT) を鋳型として、分子動力学的シミュレーションを行い、StGAPN の立体構造を推測した。この構造では、ホモ四量体のサブユニット会合面につきだしたβストランドの根本付近に Tyr139 および Glc1P 結合部位が位置し、ここから離れたドメイン界面に基質 GAP と $NADP^+$が結合した。

遠紫外領域の CD では StGAPN は典型的なαヘリックスとβストランドの混合したスペクトルを示し、その比率は GAP の添加に影響されないが、Glc1P の添加で僅か (2-3%) なαヘリックス減少とβストランド増加を示した。近紫外領域の CD は、StGAPN でも SsoGAPN でも 320nm 付近に特徴的な谷を示し、これは Glc1P に影響されず GAP の添加で消失した。280−290nm 付近には Tyr、Trp、Phe の側鎖に由来する小さな山や谷が見られ、Glc1P や GAP の添加により複雑に変化した。これらの構造変化と、本酵素の特徴的なアロステリズムとの関係を議論する。

dehydrogenase, allosteric, conformation

講演番号：2D01p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ D 校舎 01 会場

Tetragenococcus halophilus 由来 D 型マンデル酸脱水素酵素ホモログの酵素学的性質
Characterization of D-mandelate dehydrogenase homologs from *Tetragenococcus halophilus*
○森田 一弘[1]、古川 那由太[1]、宮永 顕正[2]、中島 将博[1]、田口 速男[1] ([1]東京理科大院理工、[2]東京工業大院理工)
○Kazuhiro MORITA[1], Nayuta FURUKAWA[1], Akimasa MIYANAGA[2], Masahiro NAKAJIMA[1], Hayao TAGUCHI[1] ([1]Tokyo Univ. Sci., [2]Tokyo Tech.)

D 型マンデル酸脱水素酵素(D-ManDH)は、補酵素 NAD(P)を用いてベンゾイルギ酸と D 型マンデル酸間の酸化還元反応を触媒する酵素である。これまで、我々は *Enterococcus faecalis* IAM10071 株由来の D-ManDH(EFManDH)の構造と機能の解析を進めてきた。EFManDH は、NAD を特異的な補酵素とし、ベンゾイルギ酸以外にも疎水性の大きな側鎖を持つ 2-ケト酸に対して幅広い基質特異性を示す。また、構造的には 2-ケトパント酸還元酵素(KPR)と類似しているが、補酵素と基質に対する特異性はいずれも KPR とは大きく異なる。このことは、D-ManDH-KPR ファミリーが、多様な酵素機能を分岐させてきたことを示唆している。しかし、D-ManDH ホモログは微生物に広く分布しているが、これまで EFManDH 以外のもので得られた知見はほとんどない。そこで、本研究では *Tetragenococcus halophilus* NBRC 12172 株のゲノム上に存在する 2 つの D-ManDH ホモログを THManDH-A, THManDH-B として、それぞれの大量発現系を構築・精製し機能解析を行った。

2 つの酵素の pH 安定性を調べたところ、いずれも由来する菌の生育至適 pH である弱アルカリ性において高い安定性が認められた。また、ベンゾイルギ酸を基質として作用 pH を調べたところ、THManDH-A（B）は中性付近に至適作用 pH を示し、酸性領域に至適作用 pH をもつ EFManDH とは異なる性質を示した。さらに、側鎖の異なる種々の 2-ケト酸を用いてそれぞれの酵素の基質特異性を検討した。その結果、2 つの THManDH は、いずれも EFManDH と同様に、比較的大きな疎水性側鎖をもつ 2-ケト酸に対して高活性を示したが、THManDH-A が今回用いた基質の中でフェニルピルビン酸に対して最も高い触媒効率を示したのに対して、THManDH-B はフェニルピルビン酸には高活性を示さず、2-ケトイソカプロン酸により高い触媒効率を示した。以上のように、EFManDH と 2 つの THManDH は、互いに pH 依存性や基質特異性の上で顕著な相違を示した。3 つの酵素は互いに高いアミノ酸同一性をもち、僅かなアミノ酸置換が性質の多様性を生みだしていると考えられる。

d-mandelate dehydrogenase, Tetragenococcus halophilus, 2-ketopantoate reductase

講演番号：2D01p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ D 校舎 01 会場

ヤスデにおけるマンデロニトリル酸化酵素の精製と諸性質の検討
Purification and characterization of mandelonitrile oxidase from the millipede *Chamberlinius hualienensis*

○市来 弥生[1,2]、森田 將史[1,2]、石田 裕幸[1,2]、ダダシプール モハンマド[1,2]、山口 拓也[1,2]、桑原 保正[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○ Yayoi Ichiki[1,2], Masashi Morita[1,2], Yuko Ishida[1,2], Mohammad Dadashipour[1,2], Takuya Yamaguchi[1,2], Yasumasa Kuwahara[1,2], Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO)

【目的】

オビヤスデ目ヤスデ類は防御物質benzaldehyde、mamdelonitrile、benzoyl cyanide、mandelonitrile benzoate を主成分として分泌する。我々は、青酸を発生させる機構として mandelonitrile とその酸化生成物である benzoyl cyanide から、Schotten-Baumann 反応を介して青酸と mandelonitrile benzoate が生成する経路を考え、この mandelonitrile から benzoyl cyanide への変換が酵素反応であることを提唱してきた。本研究では、この過程が熱変性により失活することから酵素関与であることを確認し、mandelonitrile を酸化する酵素をヤンバルトサカヤスデ *Chamberlinius hualienensis* (Polydesmida: Paradoxosomatidae)から精製し、諸性質の検討を行った。

【方法および結果】

ヤンバルトサカヤスデは鹿児島県で群遊期の成虫を大量に採集し、-80℃で保存していたものを使用した。このヤスデを液体窒素中、乳鉢でホモジナイズし、40 mM KPB (pH 7) で抽出した。残渣を遠心分離して除き粗酵素液とした。酵素活性は mandelonitrile を基質とし、生成物である benzoyl cyanide および共存する mandelonitrile benzoate を HPLC 分析により定量して求めた。粗酵素液は硫安分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーに供し、benzoyl cyanide 生成活性を指標として目的酵素を精製した。SDS-PAGE で単一バンドのタンパク質についてアミノ酸配列の解析を行った。精製酵素は N 末端アミノ酸がブロックされた 2 種類のタンパク質であったが、内部配列解析と分子生物学的手法により全アミノ酸一次配列を決定できた。得られた配列から推定される分子質量は 62,818 Da と 64,695 Da であった。本酵素は反応に NAD^+あるいは $NADP^+$を必要とせず、反応の過程で過酸化水素を発生する酸化酵素であることがわかった。

millipede, mandelonitrile, oxidase

講演番号：2D01p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ D 校舎 01 会場

Crystal structure of pyridoxine 4-oxidase from *Mesorhizobium loti*

○ ANDREW MUGO[1], Jun Kobayashi[2], Bunzo Mikami[2], Taiji Yamasaki[1], Yu Yoshikane[1], Toshiharu Yagi[1], Kouhei Ohnishi[1] ([1]Kochi Univ., [2]Kyoto Univ.)

[Aims] To elucidate the complex structure of pyridoxine 4-oxidase (PNOX) with its substrate analogue, pyridoxamine (PM). PNOX, an FAD-dependent enzyme from *Mesorhizobium loti* MAFF303099, is the first enzyme in the degradation pathway 1 for pyridoxine and belongs to Glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductases family.

[Methods] PNOX with a His_6-tag was overexpressed in *E. coli* JM109 cells and purified with a Ni-NTA agarose column and a QA52 column. Crystallization was done by the sitting-drop vapour-diffusion method at 277 K. The structure was solved by molecular replacement method.

[Results] The crystal structures of PNOX and PNOX-PM were determined at 2.2 Å and 2.1 Å, resolution respectively. The overall structure consisted of FAD-binding and substrate-binding domains. The FAD interacts with the PNOX protein through a network of hydrogen bonds which are mainly found in the ribose and pyrophosphate moieties of the FAD molecule. PNOX had an opening socket for access of substrates. The opening was followed by a bottleneck, formed from several hydrophobic residues, and a tunnel. The tunnel ended up at the active site cavity. In the active site, His460, His462, and Pro504 were located on the re-face of the isoalloxazine ring of FAD. The activities of H460A and H462A mutants of PNOX were very low, and the H460A/H462A double mutant exhibited no activity. His462 may act as a general base for abstraction of a proton from the 4'-hydroxyl of pyridoxine. The comparison of active site residues in GMC oxidoreductase shows that Pro504 in PNOX corresponds to Asn or His of the conserved His-Asn or His-His pair in other GMC oxidoreductases.

Crystal structure, pyridoxine 4-oxidase

講演番号：2D01p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ D 校舎 01 会場

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の耐熱化イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の圧力耐性について
Effect of high-pressure on the *Thermus thermophilus* 3-isopropylmalate dehydrogenase.

○濱島 裕輝[1,2]、永江 峰幸[3]、赤沼 哲史[4]、山岸 明彦[4]、今井 竹夫[1]、渡邉 信久[3,5]、牧野 龍[1]、山田 康之[1]、加藤 千明[2] ([1]立教大院生命、[2]海洋研究開発機構、[3]名大院工学、[4]東京薬科大生命、[5]名大シンクロトロン)
○Yuki Hamajima[1,2], Takayuki Nagae[3], Satoshi Akanuma[4], Akihiko Yamagishi[4], Takeo Imai[1], Nobuhisa Watanabe[3,5], Ryu Makino[1], Yasuyuki Kato-Yamada[1], Chiaki KATO[2] ([1]Rikkyo Univ., [2]JAMSTEC, [3]Nagoya Univ., [4]Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, [5]NUSR)

深海に生息する好圧菌の酵素は、高圧力に適応しており加圧下でも活性が高いことが知られている。マリアナ海溝深度 10898 m 由来の絶対好圧菌 *Shewanella benthica* DB21 MT-2 のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(IPMDH)の加圧下の活性を調べた結果、常圧菌 *Shewanella oneidensis* の IPMDH よりも 200 MPa における活性が 33%高く。その耐圧性は 266 番目のアミノ酸が常圧型 *Son*-IPMDH では Ser、好圧型 *Sbe*-IPMDH では Ala と、1 アミノ酸の違いが耐圧性を決めていることが明らかとなっている。高温環境に生息する好熱菌の酵素は、熱安定性が高いことが知られているが、その酵素の加圧下の活性は明らかではない。そこで、すでに熱安定性が明らかな、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の IPMDH と、この *Tth*-IPMDH に 1 アミノ酸置換とその組み合わせ変異の導入により耐熱化した *Tth*-IPMDH 変異酵素(L134N,V181T,A335E,Sup3,Sup4)を材料にその耐圧性を調べた。

結果、*Tth*-IPMDH の 60℃,150 MPa における耐圧性は、Wild では 51.4%で、L134N を含まない *Tth*-IPMDH の変異酵素では、ほぼ同じ耐圧性を示した。一方 L134N-*Tth*-IPMDH の耐圧性は 28.6%と低下しており、耐熱性と耐圧性に違いがみられた。この結果から高度好熱菌 *T. thermophilus* の IPMDH は野生型・変異型ともに耐圧性は高くなく、L134N-*Tth*-IPMDH 以外の変異酵素では熱安定性が上昇しても耐圧性に影響はなかった。L134N-*Tth*-IPMDH 変異酵素の耐圧性は Wild よりも低くなり、熱安定性の上昇と耐圧性の減少に関与していることが明らかとなった。以上の結果から、IPMDH の耐熱性と耐圧性に関しては相関関係がないことがあきらかとなった。

現在、L134N-*Tth*-IPMDH の 1 アミノ酸の違いがどのように酵素の耐圧性の減少に関与しているのかを明らかとするため、L134N-*Tth*-IPMDH の結晶構造解析を行い、Wild-*Tth*-IPMDH の構造と比較する予定である。また、*Tth*-IPMDH の耐圧性に関与する可能性のある変異箇所として、*Shewanella* 属で耐圧性に影響することが明らかである 266 番目のアミノ酸と同じ部分に位置する Pro258 を、常圧型 *Son*-IPMDH の Ser、好圧型 *Sbe*-IPMDH の Ala に置換して、その耐圧性の測定を行う予定である。このような測定を行うことで、IPMDH の加圧下の活性は何に影響をされているのかより明らかにしていきたいと考えている。

Thermus thermophilus, IPMDH, high-pressure

講演番号：2D01p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ D 校舎 01 会場

過酸化物分解酵素系　NADH oxidase(Nox)-AhpC(Prx)の複合体形成(第 5 報)

Complex formation NADH oxidase (Nox)-AhpC (Prx) (Part 5)

望月 大地[1]、新井 俊晃[1]、○原 敬太[1]、有坂 文雄[2]、松本 崇[3]、中川 純一[4]、佐藤 純一[1]、川崎 信治[1]、新村 洋一[1] ([1]東農大応生科・バイオ、[2]東工大生命理工・分子生命科学、[3]リガク、[4]東農大生物産業・食香)

Daichi MOCHIZUKI[1], Toshiaki ARAI[1], ○ Keita HARA[1], Fumio ARISAKA[2], Takashi MATSUMOTO[3], Junichi NAKAGAWA[4], Junichi SATO[1], Shinji KAWASAKI[1], Youichi NIIMURA[1] ([1]Dept. Bio. Tokyo Univ. Agric., [2]Dept.Bio.and Biotec. Tokyo Inst. Teck., [3]Rigaku Co., [4]Dept. of Food.and cosmetic Science　Tokyo Univ. Agric.)

【背景】

当研究室で単離命名した *Amphibacillus xylanus* (*A. xylanus*) は一般的な好気性菌の有する呼吸鎖、heme –catalase, -peroxidase などを欠如しているにもかかわらず、酸素濃度 0 % ～ 80 % まで良好な生育を示し、*Escherichia coli* に匹敵する酸素吸収を示す[1)]。我々の研究室では、本菌の強い酸素ストレス抵抗性と酸素吸収に着目した研究を試み、NADH oxidase (Nox) -AhpC (Prx) が酸素代謝、過酸化物分解、酸化還元バランスの維持を行うシンプルな酸素代謝系を推定した。*A. xylanus* において、Nox -Prx 系の過酸化物分解反応は、2 タンパク質に存在する 4 官能基 (1 FAD と 3 ジスルフィド)が関与するにもかかわらず、初期反応のタンパク質に結合する FAD の還元速度 (200 sec^{-1})とほぼ同速(150～180 sec^{-1})で過酸化物分解反応が完結するという高速反応性を有している[2)]。本酵素系の高速反応メカニズムを解明する為、私たちはこれまでに、表面プラズモン共鳴解析（Biacore、 GE ヘルスケア社）動的光散乱法（DLS）、沈降速度法を試み、Nox-Prx が複合体を形成することと、複合体形成は「イオン強度」が重要であることを見いだした[3) 4)]。本発表では下記の 3 手法による Nox-Prx 複合体分子量、複合体構造の解析を試みたため、ここに報告する。

【方法、結果】

Blue native PAGE

塩強度 0 から 600mM 条件下で Nox, Prx, Nox-Prx を Blu native PAGE に供した。Nox は塩強度にかかわらず 2 量体を形成し、Prx は塩強度に応じて 2～20 量体を示した。Nox, Prx を混合した時のみ、複合体と推定される 300 kDa 付近のバンドを観察した。

静的光散乱法

Nox 0.5 mg/ml, Prx 0.95 mg/ml に調整し、pH 7.0 50 mM HEPES (300 mM 硫酸アンモニウム含有) buffer 条件下で静的光散乱法 (Calypso Wyatt technology 社)に供したところ、分子量は Nox :105.8 kDa, Prx: 201.6 kDa, $K_d = 7.04 \times 10^{-6}$ M と算出された。測定値からの分子量計算に際して、Nox, Prx =2:1 条件が最も良いフィッティングを示した。

X 線小角散乱法

Nox-Prx 複合体の構造を得る為に、現在小角散乱法 (Bio-SAXS Rigaku 社)を用いた複合体構造のビーズモデリングを試みている。

以上の解析より Nox-Prx の高速な過酸化物分解反応機構を考察する。

1) 木俣真弥ら　2013 農芸化学会　年次大会
2) Niimura Y. et al. (1996) *J. Biol. Chem.* vol. 271 p. 30459-30464
3) 立見真也ら　2008 農芸化学会　年次大会　3A08p13
4) 新井俊晃ら　2009 農芸化学会　年次大会　3P0241A

NADH oxidase, AhpC, Prx

講演番号：2D01p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ D 校舎 01 会場

金属還元細菌 *Geobacter sulfurreducens* のマルチヘムセレンタンパク質の複合体解析

Analysis of protein complex formation of multiheme-containing selenoprotein of the metal-reducing bacterium *Geobacter sulfurreducens*

杉山 慧[1]、○嶌本 奈々[1]、谷 泰史[1,2]、斎藤 茂樹[1,2]、田島 寛隆[1,2]、三原 久明[1] ([1]立命館大・生命科学・生物工、[2]立命館大・R-GIRO)

Satoru SUGIYAMA[1], ○Nana SHIMAMOTO[1], Yasushi TANI[1,2], Shigeki SAITO[1,2], Hirotaka TAJIMA[1,2], Hisaaki MIHARA[1] ([1]Dept. Biotechnol., Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]R-GIRO, Ritsumeikan Univ.)

【目的】グラム陰性絶対嫌気性金属還元細菌 *Geobacter sulfurreducens* のゲノムにコードされる111 種の *c* 型シトクロム (Cyt *c*) 様タンパク質と 9 種のセレンタンパク質は、嫌気的エネルギー代謝における電子伝達および金属還元に重要であると考えられている。我々はこれまでに、サブユニット当たり 5 つのヘム結合モチーフと 1 つのセレノシステイン残基を持つ Cyt *c* 様セレンタンパク質 (multiheme-containing selenoprotein, MHSEP) が本菌のペリプラズム間隙に局在することならびに、*mhsep* 遺伝子欠損株はモリブデン酸化物の還元能を損なうことを見出してきた。*mhsep* 遺伝子はゲノム上で、10 個の ORF から成るオペロン様の遺伝子クラスター (*gsu2940-2932*) 内に位置しており、本クラスターには電子伝達に関わるCyt *c* および Cyt *b* のホモログやポリン様タンパク質等がコードされている。そこで、MHSEPは *gsu2940-2932* にコードされる他のタンパク質と共に機能する可能性が考えられる。本研究では、*gsu2940-2932* 上の遺伝子群がオペロンを形成しているか調べるとともに、MHSEP が他のタンパク質と相互作用し複合体を形成する可能性について検討した。

【方法・結果】*mhsep* 遺伝子近傍に位置する ORF がオペロンを形成しているかを調べるために、元素状硫黄の添加により *mhsep* 遺伝子の発現を誘導した野生株の菌体から total RNA を抽出し、RT-PCRで解析した結果、少なくとも、*mhsep* 遺伝子の上流 3 ORF (*gsu2940*、*gsu2939*、*gsu2938*) と下流の 1 ORF (*gsu2935*) が同一 mRNA 上に転写されることが明らかとなり、*gsu2940-2932* がオペロンを形成している可能性が示唆された。次に、上記と同様に *mhsep* 遺伝子発現を誘導した菌体からペリプラズム画分を調製し、Q-Sepharose カラムで粗精製したサンプルを複合体解析に供した。ゲルろ過でサイズ分画した各画分に対して、抗MHSEP 抗体で検出したところ、MHSEP (サブユニット質量 47 kDa) は 170-390 kDa 画分に分布していた。ゲルろ過後の MHSEP 画分を blue native PAGE 解析したところ、MHSEP は 285 kDa に相当するタンパク質バンドに含まれていた。さらに、*gsu2940-2932* にコードされる各タンパク質に対するペプチド抗体でも検出したところ、MHSEP が含まれる blue native PAGE 上の同一バンドには Cyt *c* 様タンパク質 GSU2934 (47 kDa) 及び外膜ポリン様タンパク質 GSU2939 (45 kDa) が存在することが分かった。また、MHSEP が含まれるバンドはヘム染色により強く染色された。従って、MHSEP はペリプラズム間隙で少なくとも、GSU2934 及びGSU2934 と複合体を形成している可能性が示唆された。

c-type cytochrome, selenoprotein, *Geobacter sulfurreducens*

講演番号：2D01p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ D 校舎 01 会場

メタン生成アーキアの膜脂質生合成に関わるフェレドキシンの特性評価
Characterization of ferredoxin required for the biosynthesis of archaeral membrane lipid
○廣瀬 加奈、磯部 圭祐、吉村 徹、邊見 久（名大院生命農・応用分子生命科）
○ Kana HIROSE, Keisuke ISOBE, Tohru YOSHIMURA, Hisashi HEMMI (Grad.Sch.of Bioagr.Sci.,Nagoya Univ.)

【目的】アーキアは、バクテリアや真核生物といった他のドメインの生物とは異なる、特徴的な膜脂質を持つ。その構造は、二重結合が全て還元されたイソプレノイド鎖がグリセロール骨格にエーテル結合したものである。ゲラニルゲラニルレダクターゼ(GGR)は、膜脂質生合成中間体中のゲラニルゲラニル基の二重結合を還元する酵素である。我々は最近、メタン生成アーキア *Methanosarcina acetivorans* 由来 GGR の生理的な電子供与体としてフェレドキシン様タンパク質 MA1485 を同定した。その遺伝子 *MA1485* は GGR 遺伝子 *MA1484* に隣接して存在する。本研究ではこの MA1485 の性質を解明することを目的とした。
【方法･結果】フェレドキシンによるGGRへの電子供与を評価するために､我々はプラスミドpBAD-ALB6を用いた。これは *MA1484* と *MA1485* を含む *M. acetivorans* 由来の膜脂質生合成遺伝子６個を同一のプラスミドに挿入したものであり、同プラスミドを導入した大腸菌は完全飽和したアーキア膜脂質、ジフィタニルグリセリルホスホグリセロールを蓄積する。一方で、これから *MA1485* を除いたプラスミド pBAD-ALB5 を有する大腸菌は、未還元の脂質であるジゲラニルゲラニルグリセリルホスホグリセロールを蓄積する。
MA1485 オーソログの多重配列アライメントを行った結果、データベースに登録された MA1485 は他の *Methanosarcina* 属などのアーキアに存在するオーソログと比較して非常に長い配列を持つことが明らかになった。したがって、*MA1485* の読み枠が誤ってアサインされている可能性が示唆された。そこで *MA1485* の真の開始コドンを決定するために、5’側の配列を削り、下流に位置する複数の推定開始コドンから翻訳が起きるようにした同遺伝子を pBAD-ALB5 に挿入した。各プラスミドにより形質転換した大腸菌から脂質を抽出し、LC/MS で解析した。また、大腸菌内で発現された MA1485 の N 末端アミノ酸シークエンスを解析し、これらの結果から *MA1485* の真の開始コドンを推定した。また現在、MA1484 と MA1485 の相互作用の解析を進めている。

archaea, isoprenoid, ferredoxin

講演番号：2D01p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ D 校舎 01 会場

大腸菌ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼの嫌気下での精製と機能解析
Purification and kinetic characterization of *Escherichia coli* dihydropyrimidine dehydrogenase under anaerobic conditions

○吉岡 博史[1]、石田 哲夫[2]、谷 泰史[1,3]、三原 久明[1] ([1]立命館大・生命科学・生物工、[2]滋賀医大・生化学、[3]立命館大・R-GIRO)
○Hiroshi YOSHIOKA[1], Tetsuo ISHIDA[2], Yasushi TANI[1,3], Hisaaki MIHARA[1] ([1]Dept. Biotechnol., Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Dept. Biochem. Mol. Biol., Shiga Univ. Med. Sci., [3]R-GIRO, Ritsumeikan Univ.)

【目的】ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ (DPD) は、NAD(P)H を還元剤としてウラシルの C5 と C6 炭素間の二重結合を還元し 5,6-ジヒドロウラシル (DHU) を生成する反応を触媒する。結晶構造から、哺乳動物 DPD では次の 3 段階で反応が進むと推定されている。①NADPH 結合部位で FAD が 2 電子を受け取り、②約 8Å間隔で分子内に配置された 4 つの[4Fe-4S]クラスターを介してウラシル結合部位の FMN に電子を伝達、③2 電子還元 FMN からウラシルの C5 炭素にヒドリドが、システインの SH 基から C6 炭素にプロトンが供与される。しかし、哺乳動物 DPD は基質阻害を示し、また、酸素存在下では NADPH オキシダーゼ反応が競合するため正確な機能解析が困難である。大腸菌 K-12 株の DPD は、一次構造上の相同性から哺乳動物 DPD と似た立体構造をとることが推定される。本研究では、本酵素を嫌気下で簡単に大量精製する方法を確立し、得られた高活性酵素を用いてその反応動力学的性質を詳しく調べた。

【方法】NADH オキシダーゼ反応を完全に排除するため、活性測定は嫌気チャンバー内で行い、340 nm の吸光度変化を測定して初速度を求めた。DPD をコードする *preT* と *preA* 遺伝子を、PreA の C 末端に His-tag が付くように、DPD 遺伝子欠損大腸菌内で発現させた。1.5 L の培地で培養し、濁度と酵素活性を数時間毎に測定し、酵素活性が最大に達した時点で集菌した。DPD の精製は、遠心器の使用と HPLC によるゲル濾以外は、菌の超音波破砕を含めすべて嫌気チャンバー内で行った。ニッケルカラムからの溶出は 2 段階で行い、本酵素に特有の茶色を指標に主ピークのみを分画した。初速度測定は 1 mL または 3 mL の反応液を用い、pH を 6 から 11、基質濃度を 2～1000 μmol/L の広い範囲で変えて行い、ウラシルの還元と DHU の酸化のそれぞれについて調べた。

【結果】酵素活性は、濁度の上昇から少し遅れて急速に増加し、濁度が定常状態に近づいて数時間すると低下した。培養で 5 g/L の菌体が得られ、15 g の菌体から 25 mg の DPD を得た。酵素試料を SDS-PAGE で評価した結果、ほぼ全ての不純物の除去に成功した。精製酵素の比活性は 17.6 μmol/min/mg であり、従来法で精製した標品の比活性と比べて、約 3 倍高い値を示した。精密な pH profile を作成したところ、ウラシル還元反応の至適 pH は 6.1、DHU 酸化反応の至適 pH は 8.0 であった。哺乳動物 DPD と異なり、基質阻害は確認されなかった。pH 6.1 でのウラシル還元反応においては、k_{cat} = 11.0 s^{-1}、$K_{m(uracil)}$ = 37.5 μM、$K_{m(NADH)}$ = 7.77 μM であり、pH 8.0 での DHU の酸化反応においては、k_{cat} = 7.74 s^{-1}、$K_{m(DHU)}$ = 1180 μM、$K_{m(NAD^+)}$ = 0.40 μM であった。

pyrimidine, kinetics, [4Fe-4S] clusters

講演番号：2D01p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ D 校舎 01 会場

新規フェノールオキシダーゼの立体構造が示唆するタイプ 3 銅蛋白質の機能分化について

Crystallographic analysis of a novel phenoloxidase from crustacean reveals the mechanism for functional difference among type 3 copper proteins

○増田 太郎[1]、百次 恭佑[2]、平田 孝[2]、三上 文三[3]（[1]京大院農・農学、[2]京大院農・応用生物、[3]京大院農・応用生命）
○Taro MASUDA[1], Kyosuke Momoji[2], Takashi Hirata[2], Bunzo Mikami[3]（[1]Agr. Horticult. Sci. Kyoto Univ., [2]Appl. Biosci. Kyoto Univ., [3]Appl. Life Sci. Kyoto Univ.）

【背景・目的】

チロシナーゼは、活性中心に二つの銅を有する「タイプ III 銅蛋白質」に分類され、チロシンなどモノフェノールの ortho 位への水酸基付加、それに続くキノンへの酸化を触媒する。この反応は、メラニン生合成経路の律速段階となっている。甲殻類由来のチロシナーゼは、特にフェノールオキシダーゼ（PO）と呼ばれ、他生物種由来のチロシナーゼと同様の二核銅を含む活性中心を有するが、３つのドメインからなる特徴的な立体構造をとると考えられている。一方、甲殻類における酸素運搬蛋白質ヘモシアニンもタイプ III 銅蛋白質であるが、PO と酷似した活性中心を持ちながら PO 活性は示さない。本研究では、クルマエビより見出した新規 PO（POβ）の X 線結晶構造解析による詳細な立体構造解析を行い、ヘモシアニンと PO の機能的な差異を与える要因の解明を試みた。

【材料・方法】

結晶化、活性測定に用いた POβは、クルマエビ生鮮試料から採取した血漿より、塩析と３段階のクロマトグラフィーにより単一に精製した。得られた結晶について、活性中心の銅原子による単波長異常分散法により構造決定を行い、分解能 1.8 Åまでの回折強度データを用いて構造の精密化を行った。

【結果・考察】

POβ結晶は、空間群 *R*3 に属し、非対称単位中に 2 つのサブユニットを含んでいた。各サブユニットは、pro 領域ドメインとドメイン I, II, III、そして C-末端ドメインから成っており、生理的条件において 6 量体を形成することが示唆された。C-末端ドメインを除くドメイン構造は、節足動物由来 PO として唯一立体構造が解明されている昆虫（*Manduca sexta*）由来の PO（以下 MsPO）と類似していたが、MsPO はヘテロダイマーとして機能することから、四次構造については POβと MsPO は大きく異なっていた。また、POβの C-末端ドメインは、他の PO にはない独特の領域で、Cys682-Cys687 間のジスルフィド結合による環状ペプチドを形成しており、隣接サブユニットとの相互作用に寄与していた。

POβの二核銅を含む活性中心の構造は、銅原子間の距離、銅に対する配位子である６つのヒスチジン残基の位置など主要な点について、構造既知である MsPO、甲殻類ヘモシアニンの二核銅中心の構造とほぼ一致していた。しかしながら、POβには、ヘモシアニンにはない分子表面から活性中心に至る芳香族アミノ酸側鎖に縁どられたクレフトが存在しており、POβとヘモシアニンにおける活性の差は、二核銅中心への基質のアクセスが決定要因の一つになっている可能性が示された。

tyrosinase, phenoloxidase, type 3 copper protein

講演番号：2D01p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ D 校舎 01 会場

グリコール酸酸化活性を有する *Ochrobactrum* sp. AIU 033 由来アルコール酸化酵素の諸性質解明

Alcohol oxidase with glycolate oxidase activity from *Ochrobactrum* sp. AIU 033

○山田 美和[1]、東山 貴紀[1]、岸野 重信[2]、片岡 道彦[3]、小川 順[2]、清水 昌[4]、礒部 公安[1]([1]岩手大・農、[2]京大院農・応用生命、[3]阪府大院・生命環境、[4]京都学園大・バイオ環境)
○Miwa YAMADA[1], Takanori HIGASHIYAMA[1], Shigenobu KISHINO[2], Michihiko KATAOKA[3], Jun OGAWA[2], Sakayu SHIMIZU[4], Kimiyasu ISOBE[1] ([1]Iwate Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Osaka Pref. Univ., [4]Kyoto Gakuen Univ.)

【目的】グリオキシル酸は、医療、農業、食品工業など幅広い分野で応用可能な有用物質である。本化合物は、グリオキサールと硝酸を用いた酸化反応で化学合成されているが、不要な副反応生成物が大量に合成される欠点がある。そこで我々は、酵素を用いてグリコール酸をグリオキシル酸に変換することを目的に、グリコール酸酸化活性を有する酵素産生菌 *Ochrobactrum* sp. AIU 033 を見出してきた。本研究では、分離菌より目的の酵素を精製し、その性質を解明した。
【実験】酵素活性は、グリコール酸の酸化によって生じる過酸化水素を、ペルオキシダーゼとのカップリング反応によって 555 nm で比色測定した。目的酵素は、1,2-プロパンジオール培地で 2 日間培養した菌体を、マルチビーズショッカーで破砕して粗酵素液を調製し、硫安塩析と Pheny-Toyopearl、GigaCap Q-Toyopearl、Hydroxylapatite の各カラムクロマトグラフィーを組み合わせて精製した。得られた精製酵素を用いて本酵素の諸性質を解析した。
【結果・考察】20 L 培養液の菌体を用いて上記の方法で精製した結果、Native-PAGE 分析で単一なバンドが得られた。得られた精製酵素を用いて基質特異性を検討した結果、本酵素は、グリコール酸、乳酸、および C2-C10 の炭素鎖を有する第一級アルコールに作用したが、グリオキシル酸、エチレングリコール、グリセロール、メタノールには作用しなかった。そして、反応の動力学的解析を行った結果、本酵素のグリコール酸に対する K_m 値は、第一級アルコールに対する K_m 値よりも非常に高かった。また、本酵素は 52 kDa のαサブユニットと、14 kDa の β サブユニットからなるα2β2 構造であり、共有結合したフラビンと 2 分子の Fe を有していた。これらの性質より、本酵素はアルコール酸化酵素に分類されると推定されたが、既知のアルコール酸化酵素や植物由来グリコール酸酸化酵素とは異なる性質であった。本酵素は pH 5.5-6.0 および 20-30℃ で 80%以上の活性を示し安定であり、グリコール酸酸化活性の最適反応 pH は 5.5 であった。そこで、本精製酵素と 200 mM グリコール酸を、pH 5.5 で 20℃、24 時間反応させた。その結果、グリオキシル酸生成量は時間経過とともに増加したが、グリオキシル酸の酸化反応物であるシュウ酸は検出されなかった。よって、上記の分離菌が産生する酵素はグリオキシル酸合成に有用なことが示唆された。

Ochrobactrum sp., Alcohol oxidase, Glyoxylate

講演番号：2D01p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ D 校舎 01 会場

深海脱窒細菌 *Pseudomonas* sp. strain MT-1 の亜硝酸塩還元酵素に対する電子供与体
Electron donor for nitrite reductase in deep-sea denitrifier *Pseudomonas* sp. strain MT-1
○榛村 惟[1]、古川 千真[1]、荒木 琢磨[1]、掘越 弘毅[2]、加藤 千明[2]、為我井 秀行[1] ([1]日本大文理、[2]海洋研究開発機構)
○ Yui SHINMURA[1], Kazuma FURUKAWA[1], Takuma ARAKI[1], Koki HORIKOSHI[2], Chiaki KATO[2], Hideyuki TAMEGAI[1] ([1]Nihon Univ., [2]JAMSTEC)

【目的】*Pseudomonas* sp. strain MT-1 はマリアナ海溝チャレンジャー海淵水深 11000m から単離された深海脱窒細菌である。16s rRNA 配列において浅瀬もしくは陸上由来の *Pseudomonas stutzeri* と近縁であるが、MT-1 は *P. stutzeri* と比べて低温・高圧に耐性があることが知られている。脱窒とは窒素サイクルの一部を担う経路で、硝酸イオンを分子状窒素まで還元する逐次反応であり、窒素栄養源を生態系より奪うが、窒素サイクルを完成させる系として、地球環境の恒常性維持に重要な経路である。MT-1 は初めて深海から単離された脱窒細菌であり、本細菌を用いた研究を行うことで、深海における窒素サイクルやエネルギー代謝について解明されることが期待できる。本研究では、脱窒に関与する酵素の中の亜硝酸塩還元酵素に着目している。亜硝酸塩は生体内で有毒であるので速やかに還元する必要があるため、この酵素は脱窒系のなかで必須である。脱窒細菌の異化型亜硝酸塩還元酵素にはシトクロム cd_1 型(NirS)と銅型(NirK)の 2 種類があり、MT-1 は NirS を持つことが知られている。また、一般的には亜硝酸塩還元酵素への電子供与体は *c* 型シトクロムなどの電子伝達タンパク質が働いていると考えられている。しかし、現在 MT-1 の亜硝酸塩還元酵素への電子供与体が何であるかは解明されていない。そこで本研究では精製タンパク質を用いて、電子供与体の特定をおこなった。
【方法】MT-1 を硝酸塩存在下で嫌気培養・集菌した。得られた菌体を超音波により破砕し、超遠心分離によって可溶性画分を調整した。この可溶性画分からイオン交換クロマトグラフィーによって、*c* 型シトクロムを抽出し、さらに硫安分画、ゲル濾過クロマトグラフィーによって精製を行った。精製した *c* 型シトクロムのスペクトル測定を行い、ミリモル吸光係数を算出した。また、精製の過程で得られたシトクロム cd_1 の粗精製画分を用いて活性測定を行い、亜硝酸塩還元酵素への電子供与体の特定を行った。
【結果・考察】精製した *c* 型シトクロムは SDS-PAGE によって、単一バンドであることが確認され、ヘム染色により分子内にヘムが存在することも確認された。また、N 末端配列解析、1 分子中のヘムの数、分子量及びドラフトゲノム情報より NirM であることが示された。この NirM を用いてスペクトル測定を行った結果、還元型と、(還元型 - 酸化型) のミリモル吸光係数がそれぞれ 30.8 と 22.6 であった。さらに、還元型 NirM を基質、シトクロム cd_1 を酵素とし、酸化活性測定を行ったところ、還元型 NirM が酸化されたことが確認された。以上の結果より、MT-1 において NirM が亜硝酸塩還元酵素シトクロム cd_1 の電子供与体であることが明らかとなった。

denitrification, nitrite reductase, electron donor

講演番号：2D01p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ D 校舎 01 会場

メチロトローフ細菌 *Methylobacterium extorquens* AM1 の希土類に対する メタノールデヒドロゲナーゼの応答機構

Expression analysis of methanol dehydrogenases by rare earth elements in *Methylobacterium extorquens* AM1

○三井 亮司[1]、峰松 由季[1]、桑原 朋代[1]、中川 智行[2]、谷 明生[3]、田中 三男[1] ([1]岡山理大理、[2]岐阜大応生科、[3]岡山大資植研)
○Ryoji Mitsui[1], Yuki Minematsu[1], Tomoyo Kuwabara[1], Tomoyuki Nakagawa[2], Akio Tani[3], Mitsuo Tanaka[1] ([1]Okayama Univ. of Sci., [2]Gifu Univ., [3]Okayama Univ.)

【目的】近年 *Methylobacterium* 属細菌は植物との共生、相互作用に関する知見が集積されつつある。葉上の優占種である *Methylobacterium* 属は植物から放出されるメタノールを利用して生育することが知られている。これまでに私たちは *M. extorquens* AM1 を用いて、植物から放出されたメタノールを代謝するための初発酵素であるメタノールデヒドロゲナーゼ（MDH）について検討を行ってきた。*M. extorquens* AM1 には従来知られていた Ca 依存型 MDH でヘテロテトラマー構造を持つ MxaF/I に加えて MxaF と一次構造の類似した *xoxF1* と *xoxF2* が存在しており、そのうち *xoxF1* は La に依存する新奇な MDH をコードすることを明らかにしてきた[1)]。今回、*M. extorquens* AM1 においてこれら複数の MDH が持つ役割を明らかにすることを目的として発現誘導などに関して検討を行った。
【結果と考察】メタノールを炭素源として培養した菌体から調製した無細胞抽出液中の MDH 活性は、La の存在下で培養したものの方が Ca の場合と比較して 4 倍程度上昇した。そこで、等電点電気泳動によりこれらの MDH を分離し、活性染色によりバンドを確認した。この結果、La を加えて培養したときと Ca を加えて培養したときでは全く異なる MDH が発現していた。そこで *mxaF*, *xoxF1*, *xoxF2* の各遺伝子破壊株を用いてその由来を確認したところ、La では中性から塩基性側（pI7.4-8.4）に *xoxF1* に由来するブロードなバンドが発現しており、菌体内で複雑な構造をとっていることが示唆された。また、さらに塩基性側（pI9.3）にもう一つのバンドが確認された。一方 Ca では *mxaF* に由来する中性(pI7.4)に等電点を持つバンドに加えて *xoxF2* に由来する酸性(pI5.6)側にバンドが検出された。次に培養液中の Ca と La の濃度比を変えて生育させ、MDH の発現パターンを解析した。この結果、La の添加量に応じて XoxF1 のバンドが濃くなり、それに伴い、MxaF と XoxF2 のバンドは消失していくことが明らかになった。このことから *M. extorquens* AM1 は La と Ca を厳密に認識して、使用する MDH を切り替えて使い分けることが明らかとなった。また活性染色に基づく発現パターンの検討に加えてタンパク発現量を比較するため、C 末側に 6xHis タグを付加した *xoxF1* を破壊株に相補させた株を作製した。この相補株は MDH 活性、生育、電気泳動のパターンとも野生株と同等であった。このことから、この相補株を用いて Anti-His タグ抗体を用いて Western blot により確認したところ、*xoxF1* の発現は La により誘導され、La 濃度依存的に発現量を制御していることが明らかとなった。

[1)] T. Nakagawa *et al.*, A Catalytic Role of XoxF1 as La^{3+}-Dependent Methanol Dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* Strain AM1. PLoS ONE 7: e50480 (2012).

Methylobacterium extorquens, methanol dehydrogenase, rare earth elements

講演番号：2D01p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ D 校舎 01 会場

脱窒菌 *Pseudomonas stutzeri* 由来ケルセチナーゼ遺伝子の *Brevibacillus* を宿主とする異種発現
Heterologous expression of quercetinase gene from denitrifying bacterium *Pseudomonasu stutzeri* in *Brevibacillus* host system

○片岡 邦重、ウィディアトニングラム タリサ、牛山 大地、櫻井 武（金沢大院・自然科学）
○Kunishige KATAOKA, Talitha Widiatningrum, DAICHI USHIYAMA, TAKESHI SAKURAI (kanazawa Univ.)

【緒言】ケルセチナーゼ（ケルセチン 2,3-ジオキシゲナーゼ）は，6 本鎖の β バレルフォールドドメインから成るタンパク質でクピンスーパーファミリーに属する。本酵素は，抗酸化作用や抗炎症作用，抗菌作用を持つフラボノイドの一種，ケルセチンを酸化分解してデプシドと一酸化炭素を生成する反応を触媒する金属酵素である。一方，同じくクピンスーパーファミリーに属し，真核生物の転写活性化やアポトーシスに関与するピリン及びその相同体であるピリン様タンパク質はケルセチナーゼ活性を示す。ゲノム解析により多くのバクテリアがピリン様タンパク質遺伝子を持つことがわかっているが，その生理的な機能は明らかではなく，大腸菌由来のタンパク質(YhhW)以外ではほとんど研究が進んでいない。脱窒菌である *Pseudomonas stutzeri* もピリン様タンパク質遺伝子を持つが，このタンパク質がケルセチナーゼ活性を示すか否かは明らかではない。そこで本研究では，ピリン様タンパク質の生理的機能の解明を目標に，*Pseudomonas stutzeri* のゲノムからピリン様タンパク質（ケルセチナーゼ）遺伝子のクローニングと異種発現の構築，および組換え型タンパク質の諸性質の検討を行った。
【方法及び結果】ゲノム情報が明らかな *P. stutzeri* のピリン様タンパク質遺伝子を基に合成したプライマーを用い，*P. stutzeri* Zobell (ATCC 14405)のゲノム DNA を鋳型に PCR 法で遺伝子断片を増幅し，ゲノムウォーキングにより全領域のピリン様タンパク質遺伝子を得た。この遺伝子は *Aspergillus japonicus*，*Bacillus subtilis*，*Penicillium olsonii* 由来のケルセチナーゼ遺伝子とそれぞれ 25%，29%，21%の配列相同性を持ち，大腸菌由来のピリン様タンパク質(YhhW)とは 40%の相同性を示した。*Brevibacillus* Expression System（ヒゲタ醤油）のプラスミドベクターpBIC3 を用いて，*B. choshinensis* 由来 P22 タンパク質プロモーターの制御下に，P22 タンパク質分泌シグナルペプチド及び 6xHis タグコード配列を本タンパク質 N 末端コード配列に in-frame で連結した発現ベクターを作製し，*B. choshinensis* をホストに組換え型タンパク質を分泌発現させた。Ni アフィニティークロマトグラフィーを用いて培養上清から組換え型タンパク質を精製した。SDS-PAGE を行った結果，ケルセチナーゼの計算分子量 30.97kDa にほぼ一致するタンパク質のバンドが 30kDa 付近に確認できた。しかし，サイズが約 2kDa 小さなバンドも確認され，C 末端領域がプロテアーゼで切除された分子種との混合物であることが示唆された。組換え型ケルセチナーゼはアポ体として発現していたので，金属イオンの添加によるケルセチナーゼ活性発現を検討したところ，Cu^{2+}及び Fe^{2+}の存在下でケルセチン分解活性を示すことが明らかになった。

Quercetinase, Quercetin, Pirin

講演番号：2D01p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ D 校舎 01 会場

Carbazole 1,9a-dioxygenase における核間二水酸化反応の機構解明
Molecular mechanism of angular dioxygenation catalyzed by carbazole 1,9a-dioxygenase
○松澤 淳[1]、梅田 隆志[1]、藤本 瑞[2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1] ([1]東大生物工学セ、[2]農生資研)
○Jun MATSUZAWA[1], Takashi UMEDA[1], Zui Fujimoto[2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The University of Tokyo Biothechnology Research Center, [2]National institute of agrobiological sciences)

【目的】細菌の carbazole (CAR)代謝の初発酸化酵素である CAR 1,9a-dioxygenase (CARDO)は CAR の 1 位と 9a 位に水酸基を *cis* 型に添加する酵素であり、terminal oxygenase (Oxy)、ferredoxin (Fd)、Fd reductase の 3 つのコンポーネントから構成される。Oxy の内部には Rieske [2Fe-2S]クラスターと非ヘム鉄が含まれており、同様の特徴を示す酸化酵素は Rieske non-heme iron oxygenase (RO)と呼ばれ、多くの難分解性芳香族化合物分解菌から発見されている。CARDO は、水酸基を挿入する位置が通常の RO が行うような多環芳香族化合物の末端ではなく、環の繋ぎ目つまりヘテロ原子の隣接位置であるという特徴を有し、特に核間二水酸化酵素と呼ばれている。昨年度本大会において、還元型 Oxy 単体の結晶構造を取得し、Oxy-Fd 間の酸化還元依存的な相互作用と、Fd による Oxy の還元から CAR と酸素分子の結合に至るまでの反応機構を詳細に解明した。しかし、引き続き行われる基質の酸化に伴う反応産物の生成機構及び Oxy-生成物間の解離機構は未解明である。そこで還元型 Oxy の結晶を元に Oxy による基質酸化プロセスを解析することとした。
【方法と結果】嫌気チャンバー内で作成した還元型 Oxy 単体の結晶を、CAR を含む結晶化溶液にソーキングすることで還元型 Oxy-CAR 複合体を作成した。また、この結晶をさらに好気条件に晒すことで酸化型 Oxy-O_2-CAR 複合体を、また還元型 Oxy を好気条件に晒すことで酸化型 Oxy-O_2 複合体の結晶構造を取得することを試みた。還元型 Oxy-CAR 複合体については基質ポケットに CAR が入った構造が得られず、また酸化型 Oxy-O_2 複合体に関しては結晶のモザイク性の上昇及び分解能の低下が生じたために構造解析は行えていない。しかし、酸化型 Oxy-O_2-CAR 複合体では平面型の CAR が基質ポケットに挿入された構造が得られ、一部基質は反応生成物であるビフェニル型の物質に変換されていることが明らかになった。また、これまで報告されている CARDO の基質ポケットは他の RO には見られない特殊な形をしており、ビフェニルに対しても高い酸化活性を示すことがこれまでの研究により明らかになっているが、今回解明した構造から、CARDO の基質ポケットは平面型の基質とビフェニル型の生成物の両方を入れるのに適した形であることが予想された。今までのところ CAR と反応生成物の混合状態と考えられる構造しか得られていないが、現在、より高確率で反応生成物が結合した構造の取得を試みている。また実験条件を制御し、反応中間体の構造を取得することを試みており、その結果を併せて報告する。

Rieske oxygenase, angular dioxygenation, structure

講演番号：2D01p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ D 校舎 01 会場

カルバゾール分解酵素群の相互間作用解析
Interaction of carbazole degrading enzymes

○井上 慎也、岩田 健一（芝浦工業大学大学院　理工学研究科　システム理工学専攻）
○Shinya INOUE, Kenichi IWATA (Shibaura Institute of Technology)

【背景と目的】Carbazole(CAR)は原油やシェールオイル等に含まれる変異原性や発がん性を有する含窒素難分解性芳香族化合物である。環境中には CAR を唯一の炭素源、窒素源として生育できる細菌が存在している。現在までに CAR 分解菌として陸生の *Psedomonas resinovoras* CA10 株、*Novosphingobium* sp. KA1 株、*Nocardiodes aromaticivoras* IC177 株, *Janthinbacteriumo* sp. J3 株や海洋性の *Hyphomonas* sp. OC7 株、*Erythrobacter* sp. OC8S 株、*Caulobacter* sp. OC10 株などが単離されている。CAR の分解には多くの酵素が関わっており、その中でも代謝物が生体物質に至るまでに働く、初発酸化酵素(CARDO)、メタ開裂酵素(CarBaBb)、加水分解酵素(CarC)が中心的なものとなっている。CARDO はターミナルオキシゲナーゼ(CarAa)、フェレドキシン(CarAc)、フェレドキシンレダクターゼ(CarAd)の三つのサブユニットによって構成されている。　CarAa は基質の酸化時に電子を失うが、CarAc によって失われた電子は再び供給される。CarAc はさらに CarAd によって還元され、CARDO の酵素活性は維持されている。CarBaBb は CarBa と CarBb の二つのサブユニットで構成され、鉄を含む活性中心は CarBb が持ち CarBa はその安定化に寄与していると考えられている。各酵素の機能的諸性質については長く研究が行われており結晶化も試みられている。しかし、これらの酵素が菌体内でどのような形で存在しているのかは現在まで明らかになっていない。基質の分解反応が迅速かつ安定的に起こることから、これらの酵素が菌体内で効率よく分解するために複合体を形成していることを予想している。そこで本研究では CAR 分解の中心的な役割を果たしている CARDO、CarBaBb、CarC の相互作用解析を行うことによって、分解系酵素群の知見の蓄積を目指すことを目的とした。
【方法】CARDO、CarBaBb、CarC の中でまず初めに CarBaBb および CarC の相互間作用解析を行うこととした。pET15b ベクターに *Xba* I および *Bam*H I サイトで C 末端に His タグ配列を付加した *carBaBb* と *carC* をそれぞれ導入したプラスミドを作成した。それを大腸菌 *Escherichia coli BL21*(*DE3*)へ形質転換し、その大腸菌に IPTG による誘導をかけそれぞれの酵素を大量発現させた。大腸菌を超音波破砕し抽出した粗酵素溶液を His-trap HP によってアフィニティークロマトグラフィーを行った後、Superde 200 を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った。それによって精製酵素標品を得た。現在、これらの酵素標品を使用し、Biacore を用いて相互間作用の解析を行うとともに CARDO の酵素標品の作製を行っている。

Carbazole, degrading enzyme, interaction of protein

講演番号：2D01p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ D 校舎 01 会場

2 サブユニット型芳香環メタ開裂酵素 FlnD1D2 の発現系の構築と機能解析

Expression and partial characterization of 2-subunit-type extradiol dioxygenase FlnD1D2 from *Rhodococcus* sp. DFA3

○小竹 立朗[1]、松澤 淳[2]、宮本 皓司[3]、岡田 憲典[2]、野尻 秀昭[2]、岩田 健一[1] ([1]芝工大シ生、[2]東大生物工学セ、[3]帝京大・バイオ)

○ Tatsuro KOTAKE[1], Jun MATSUZAWA[2], Koji MIYAMOTO[3], Kazunori OKADA[2], Hideaki NOJIRI[2], Kenichi IWATA[1] ([1]Shibaura Institute of Technology, [2]Univ. of Tokyo, [3]Teikyo Univ.)

［目的］環境汚染物質の完全分解を達成するため、また新たに強力な分解性微生物を育種するために現在までに様々な芳香族化合物の分解菌や分解酵素の解析が行われている。先行研究により環境汚染物質である dibenzo-*p*-dioxin と構造が類似な芳香族化合物である dibenzofuran を唯一の炭素源として生育可能な *Rhodococcus* sp. DFA3 株が単離された[1)]。DFA3 株が有するタンパク質 FlnD1D2 は dibenzofuran が初発酸化酵素により分解されて生じた 2,2',3-trihydroxybiphenyl に対して芳香環の開裂を引き起こすメタ開裂酵素である。メタ開裂酵素は通常 1 種のサブユニットから構成されるが、DFA3 株のメタ開裂酵素 FlnD1D2 は触媒ドメインを有する large subunit FlnD1 と構造の安定化を担うと考えられる small subunit FlnD2 の 2 種のサブユニットから構成されている。2 種のサブユニットタイプのメタ開裂酵素はこれまでに *Sphingomonas paucimobils* SYK-6 株の LigAB[2)]や *Pseudomonas resinovorans* CA10 株の CarBaBb[3)]などが報告されているが、2 サブユニット型メタ開裂酵素の機能の共通性や特殊性は殆ど解明されていない。そこで、さらなる 2 サブユニット型メタ開裂酵素の機能解析を行うことを目的とし FlnD1D2 の発現系の構築、精製と機能解析を行った。

［方法と結果］大腸菌におけるタンパク質発現系を構築するため、large subunit である FlnD1 の C 末端に histidine-tag を付加した FlnD1D2 遺伝子をタンパク質発現用ベクターである pET-26b(+)の T7 promoter 下に組み込んだ。構築したベクターを *E. coli* BL21 (DE3)に形質転換し、タンパク質を発現させた結果、SDS-PAGE で可溶性画分として目的タンパク質と予想されるバンドが確認されたので、さらに目的タンパク質が発現するような最適培養条件の検討を行った。その結果、培養培地は LB 培地を使用し、培養温度 30℃、発現誘導基質である IPTG を終濃度 0.1 mM で培養開始直後に添加、12 時間培養が最適培養条件であるという結果が得られた。発現させたタンパク質をアフィニティークロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーによって精製し、基質に 2,3-dihydroxybiphenyl を加えた結果、活性を確認した。現在、精製酵素を用いて基質特異性、温度依存性、pH 依存性などの詳細な酵素化学的性質の解析を行っており、その結果も併せて報告する。

1) Noumura T et al. (2004) FEMS Microbiol. Lett. 239(1):147-55.
2) Masai E et al. (1999) J. Bacteriol. 181(1):55-62.
3) Iwata K et al. (2003) Biosci. Biotechnol. Biochem. 67(2):300-7.

extradiol dioxygenase, expression, characterization

講演番号：2D01p22
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ D 校舎 01 会場

多環芳香族炭化水素分解に関わる初発酸化酵素 NidAB,A3B3 の基質特異性

Substrate Specificities of PAHs Dioxygenases NidAB,A3B3

○土田 健人[1]、都築 周作[1]、吉村 武朗[1]、後藤 純雄[2]、峯木 茂[1] ([1]東理大院・応生科、[2]麻布大・環境科)
○Kento Tsuchida[1], Syusaku Tsuzuki[1], Takeo Yoshimura[1], Sumio Goto[2], Shigeru Mineki[1] ([1]Tokyo University of Science, [2]Azabu University)

【目的】多環芳香族炭化水素(PAHs)は重要な発癌関連環境汚染物質群の一つであり、4 環以上の PAHs は難分解性で環境中に残留しやすい。*Mycobacterium* sp.H2-5 は当研究室で都内の土壌より単離されピレンを唯一の炭素源として生育できる。本菌株は基質によって分解能に差があり、難分解性 PAH の分解においては他の PAH との共酸化を示すことが知られているが、そのメカニズムの詳細は明らかになっていない。そこで、H2-5 株の保持する初発酸化酵素(RHO)である NidA、NidB および NidA3、NidB3 を大腸菌内で発現させ、RHO の基質特異性や PAH の共酸化機構についての検証を行った。
【方法】RHO をコードする遺伝子 *nidA*、*nidB* を pETDuet-1 のプロモーター部を組み込んだ pET22b に、同じく RHO をコードする遺伝子 *nidA3*、*nidB3* を pETDuet-1 に、電子伝達に関わる遺伝子 *phtAc*、*phtAd* を pCOLADuet-1 にそれぞれ挿入し、発現用大腸菌株 Tuner(DE3)に導入することで、*nidAnidBphtAcphtAd* 系(AB 系)、*nidA3nidB3phtAcphtAd* 系(A3B3 系)を構築した。

基質特異性の検証を行うために、AB 系、A3B3 系を発現誘導後、M9 最少培地を用いて菌体を懸濁して各種 PAH(フェナントレン(Phe)、アントラセン、ピレン、フルオランテン(Flu)、クリセン、ベンズ[a]アントラセン、ベンゾ[a]ピレン(BaP))を終濃度 50～200 μM になるように添加し、30℃、100 rpm で 48～72 時間反応させた。反応後、ジクロロメタンで抽出し、反応産物と PAH 残存量を GCMS-QP2010(Shimadzu)で分析した。PAH の共酸化では、同様の菌体懸濁液に BaP と Phe をそれぞれ終濃度 25 μM、100～200 μM になるように添加し、30℃、100 rpm で 48 時間反応させた。
【結果】発現プラスミドのプロモーター部分の工夫により、前回の報告[1]で発現を検出できなかった NidB の発現に成功した。

AB 系、A3B3 系共に、クリセン以外で反応産物である水酸基付加体が検出された。また、本菌株の A3B3 系は Phe を最も変換し、近縁種 *M.vanbaalenii* PYR-1[2]の NidA3NidB3 が Flu を最も変換するという基質特異性とは異なっていた。

AB 系、A3B3 系共に、BaP が Phe と共存した場合とそれぞれが単独で存在した場合の変換率に有意な差は見られず、BaP に対する RHO 活性は Phe の共存で影響を受けないことがわかった。

[1]都築 周作ら　日本農芸化学会大会講演要旨集 3C09p05 (2012)
[2] Kweon O. *et al.*, *MBio* **1(2)** e00135-10 (2010)

PAHs, *Mycobacterium*, Dioxygenase

講演番号：2D02a02
講演日時、会場：3 月 28 日 09:11～ D 校舎 02 会場

希少糖生産酵素 *Acinetobacter* sp.由来 L-リボースイソメラーゼの X 線結晶構造解析
Crystal structure of L-ribose isomerase from *Acinetobacter* sp. which is useful for rare sugar production

○吉田 裕美[1]、吉原 明秀[2]、寺岡 美沙[1]、何森 健[2]、神鳥 成弘[1]([1]香川大総合生命研究セ、[2]香川大希少糖研究セ)
○ Hiromi YOSHIDA[1], Akihide YOSHIHARA[2], Misa TERAOKA[1], Ken Izumori[2], Shigehiro Kamitori[1] ([1]LSRC, Kagawa Univ., [2]RSRC, Kagawa Univ.)

【目的】L-リボースイソメラーゼは、L-リボースとL-リブロース間の異性化反応を触媒する酵素である。L-リボースはL-ヌクレオシド類似体合成の前駆体、すなわち核酸の複製阻害剤として利用することができることから、抗菌剤や抗ウィルス剤、抗癌剤などの医薬品への利用が期待されている。*Acinetobacter* sp.由来L-リボースイソメラーゼ（L-RI）は上記のような天然に微量にしか存在しない希少糖の生産酵素として発見され、他の酵素とのアミノ酸配列の相同性が見られない新規酵素として既に報告されていた。演者らは、これまでに希少糖生産酵素として、D-フルクトースからD-プシコースの大量生産に最初に用いられたD-タガトース 3-エピメラーゼ、D-プシコースからD-アロースの生産に利用されるL-ラムノースイソメラーゼ、D-アロースからD-アルトロースの生産が可能なD-アラビノースイソメラーゼの構造解析を報告してきており、今回新たな希少糖生産酵素として、L-RIの立体構造、基質との複合体構造解析を遂行することを目的とした。
【方法】既にクローニングされていたL-RIの構造遺伝子を用いてpQE30ベクターへのサブクローニングを行い、N末端側にHisタグを付けたHis-tagged L-RIとして発現させ、アフィニティカラムを用いて精製酵素を調製した。得られた精製酵素はシステインカルバゾール法によりL-リボースに対する酵素活性を測定し、X線結晶解析には、10 - 13 mg/mlまで濃縮した精製酵素を用いてハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶を作成した。位相決定にはセレノメチオニン置換体を作成し、同様に作成して得られた結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構PF-AR NW12Aにてデータ収集を行った。
【結果】*Acinetobacter* sp.由来 L-RI のセレノメチオニン置換体から得られた結晶中には非対称単位あたり 2 分子、ネイティブの結晶から得られた結晶中には非対称単位あたり 1 分子の His-tagged L-RI が存在しており、結晶中ではホモダイマーを形成しているようであった。また、アミノ酸配列の相同性は 18%程度であるが、全体構造は既に報告されていた *E. coli* O157:H7 由来 D-リキソースイソメラーゼの全体構造と似ていた。

X-ray structure, L-ribose isomerase, rare sugar

講演番号：2D02a03
講演日時、会場：3 月 28 日 09:22～ D 校舎 02 会場

Production of 1,5-anhydro-D-fructose by α-glucosidases belonging to glycoside hydrolase families 13 and 31

○Janjira Maneesan, Hideyuki Matsuura, Takayoshi Tagami, Momoko Kobayashi, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Atsuo Kimura (Hokkaido Univ.)

[Objective**]** 1,5-Anhydro-D-fructose (AF) was produced by α-1,4-glucan lyase from starch, glycogen or maltooligosaccharides as substrate. α-1,4-Glucan lyase is classified to glucoside hydrolase family (GH) 31 and catalyzes the elimination reaction, but on the other hand the α-glucosidase in the same family displays the hydrolytic reaction with retaining mechanism, suggesting that GH 31 α-glucosidases also produce AF by elimination reaction. There is the other α-glucosidase belonging to GH 13. Ability of elimination reaction to form AF needs to study at both GH 13 and GH 31 α-glucosidases. The purpose of this study is production of AF by α-glucosidases belonging to GH 13 and GH 31.

[Method and result**]** For studying generation of AF by α-glucosidase, [^{13}C]AF was necessary for internal standard. *Chlorella* starch labeled by ^{13}C was used for the production of [^{13}C]AF. This formation was catalyzed by α-1,4-glucan lyase and then [^{13}C]AF was purified by Bio-Gel P2 and HPLC. The molecular weight of [^{13}C]AF was estimated to be 168. For analysis of AF-formation, AF was modified to be 1,5-anhydro-D-fructose *O*-ethyloxime (AFOX) by treatment with *O*-ethylhydroxyamine/HCl (molecular weight of [^{12}C]AFOX and [^{13}C]AFOX representing 205 and 211, which corresponded to molecular formula of [^{12}C]$C_8H_{15}O_5N$ and [^{13}C]C_6[^{12}C]$C_2H_{15}O_5N$, respectively). [^{13}C]AFOX was used as internal standard for AF-production by *Aspergillus niger* α-glucosidase (ANGase; GH 31 α-glucosidase) and dextran glucosidase from *Streptococcus mutans* (SMDG; GH 13 α-glucosidase). The results of LC-MS-MS showed that small amount of AF was produced by ANGase from maltooligosaccharide as substrate. AF-production was decreased with increase of reaction time. SMDG also produced small amount of AF when it was reacted with isomaltooligosaccharide as substrate, and AF amounts were accumulated with increase of reaction time.

1,5-anhydro-D-fructose, α-glucosidase, elimination

講演番号：2D02a04
講演日時、会場：3 月 28 日 09:33～ D 校舎 02 会場

Aspargine 694 in Aspergillus niger α-glucosidase is related to its specificity
○Min MA, Megumi SATO, Masayuki OKUYAMA, Haruhide MORI, Atsuo KIMURA (Hokkaido Univ.)

【Objective】α-Glucosidase from *Aspergillus niger* (ANG), a member of glycoside hydrolase family 31, is industrially used for the production of isomaltooligosaccharides. The enzyme displays an α-1,4-glucosidic linkage specificity in hydrolysis and preferential formation of an α-1,6-glucosidic linkage in transglucosylation. Although ANG is one of the most important industrially-used enzymes, only a few studies have noted the relationship between structure and function. The clarification of the relationship must be conductive to the efficient production of isomaltooligosaccharides. This study aims to elucidate the amino-acid residue related to the specificity of ANG and reveal that type of the residue at the position of Asn694 is important for the formation of panose from maltose.

【Methods and Results】The target residue was decided according to a comparison of amino-acid sequence with a structure-known homologous enzyme, human intestinal glucoamylase, since a three-dimensional structure of ANG was unavailable. Asn694 was chosen as the target residue, because the corresponding residue, Phe1560 in the glucoamylase, significantly contacts with the substrate at subsite +2 and +3. Site-directed mutagenesis enzymes (N694A, L, F, and W) and wild-type enzyme were produced with *Pichia pastoris*, and their substrate specificity in hydrolysis and transglucosylation properties were investigated. The transglucosylation was carried out with 100 mM maltose as substrate and its initial velocities on production of glucose, panose, maltotriose (G_3) and 2,4-di-*O*-(α-D-glucosyl)-D-glucose (centose) were analyzed by HPAEC-PAD. The wild type produced α-1,6-linkage predominantly, and the production ratio of G_3 / panose was 26 / 74. The mutation of Asn694 changed regio-selectivity in the transglucosylation, in particular, the ratio was 53 / 43 /4 (G_3 / panose / centose) in N694F. The ratio of the formation of panose tended to decrease with the increase in the bulk of side chain. The decrease in the formation of panose agreed with the reduction in k_{cat}/K_m for hydrolysis of panose. These results indicated that the enzyme with the bulky side chain at the position of Asn694 disfavors the binding of panose.

α-glucosidase, transglucosylation, specificity

講演番号：2D02a05
講演日時、会場：3 月 28 日 09:44～ D 校舎 02 会場

Halomonas sp. H11 株由来α-グルコシダーゼ D274G 変異酵素の一価カチオンによる活性化機構の解析

Analysis of Activation Mechanism by the Monovalent Cations of D274G Mutant of α-Glucosidase from *Halomonas* sp. H11

○城戸 悠輔[1]、佐分利 亘[1]、小島 晃代[2]、松井 博和[1]、森 春英[1]([1]北大院農、[2]日本食品化工)
○Yusuke KIDO[1], Wataru SABURI[1], Teruyo OJIMA[2], Hirokazu MATSUI[1], Haruhide MORI[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Nihon Shokuhin Kako)

【背景・目的】*Halomonas* sp. H11 株由来 α-グルコシダーゼ（HaG）は，アミノ酸配列からグリコシドヒドロラーゼファミリー13（GH13）に分類されている．二糖への特異性が高く，マルトースやスクロースなどの α-グルコシド結合を加水分解する酵素であり，K^+やNH_4^+などの一価カチオンにより活性が上昇する．GH13 α-グルコシダーゼの一価カチオンによる活性化は他に 2 例の報告があるが，活性化機構は明らかにされていない．HaG を含む一価カチオン活性化酵素は共通して一般酸塩基触媒から 2 残基 C 末端側に Gly-Asp を持つ．我々は HaG の該当 Gly273 がカチオン結合サイトを形成しており，活性化に重要であることを示した．今回は Asp274 を改変した変異酵素 D274G を作製して解析した．

【結果・考察】野生型酵素（WT）と同様に変異酵素 D274G を，大腸菌を宿主として生産，調製した．D274G のスクロースに対する k_{cat} は 7.6×10^{-4} sec^{-1} であり，WT の k_{cat}（0.20 sec^{-1}）と比べて著しく減少した．様々な濃度の一価カチオン（K^+，Rb^+，NH_4^+，および Cs^+）存在下の見かけの k_{cat} および K_m から反応スキームを解析すると，WT はいずれのカチオンでも 1 分子と結合して活性化する（図 1，実線）のに対し，D274G は K^+および Rb^+では 2 分子まで結合して活性化し（図 1，点線），NH_4^+および Cs^+では，1 分子の結合により活性化する一方，2 分子の結合により基質と結合出来なくなる（図 1，破線）と考えられた．K^+および Rb^+はイオン半径が小さく，NH_4^+および Cs^+は大きい．すなわち 2 分子結合後の基質結合には，イオン半径が小さい必要があると考えられた．各反応スキームから得られた速度式から速度パラメータを求めると，K^+および Rb^+の k_{cat2}/k_{cat} は 130 および 56 であった．また，k_{cat3}/k_{cat} は 10000 および 7400 であり，WT の k_{cat2}/k_{cat}（220 および 170）と比べて高くなった．NH_4^+および Cs^+の k_{cat2}/k_{cat} は 6100 および 6100 であり，WT の k_{cat2}/k_{cat}（170 および 110）と比べて高く，K^+および Rb^+の k_{cat3}/k_{cat} と同程度の値であった．K^+および Rb^+の K_A，K_{SA}，および K_{AA} と比べ K_{SAA} は高い値であり，ESAA 複合体が形成し難いことが考えられた．また，NH_4^+および Cs^+の K_A および K_{SA} は WT の K_A および K_{SA} と比べて著しく高い値であり，変異の導入によりカチオンとの親和性が低下したことが考えられた．

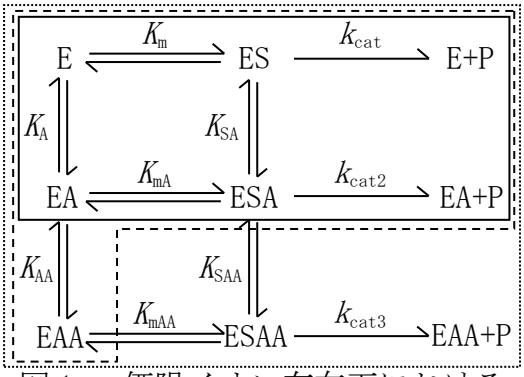


図 1 一価陽イオン存在下における反応スキーム
（E：酵素，S：基質，A：カチオン）

α-glucosidase, GH13, activation

講演番号：2D02a07
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ D 校舎 02 会場

Caulobacter グルコアミラーゼの発現と諸性質の解析
Cloning and expression in *Escherichia coli* and functional identification of *Caulobacter* glucoamylase

○坂口 政吉[1]、松嶋 裕大[1]、南雲 利之[1]、清野 淳一[1]、宮川 聡[1]、本田 翔太郎[1]、菅原 康里[1]、小山 文隆[1]、川喜田 正夫[1,2] ([1]工学院工、[2]東京都医学研)
○Masayoshi Sakaguchi[1], Yudai Matsushima[1], Toshiyuki Nankumo[1], Junichi Seino[1], Satoshi Miyakawa[1], Shotaro Honda[1], Yasusato Sugahara[1], Fumitaka Oyama[1], Masao Kawakita[1,2] ([1]Kogakuin Univ., [2]Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science)

30℃で生育する *Caulobacter* 属のマルトデキストリン輸送システムは報告されているが，そのマルトデキストリンを分解する酵素群は調べられていない。この *Caulobacter* 属染色体上には，その推定一次構造が糖質分解酵素ファミリー15 に属するグルコアミラーゼと類似している遺伝子が存在する。我々は，この遺伝子をクローニングし，大腸菌中でその遺伝子産物を発現し，その諸性質を解析した。

宿主を大腸菌として，種々の発現系で発現を試みたが，発現したタンパク質は主として不溶性タンパク質として検出された。しかし，プロテイン A 融合タンパク質として発現させた場合，マルトトリオース分解活性を持つ可溶性タンパク質を検出できた。この酵素タンパク質は，IgG セファロースカラムを用いたアフィニティクロマトグラフィにより精製することができた(分子質量 約 96kDa)。

この精製酵素は，α-1,6 結合を持つオリゴ糖や多糖にはほとんど作用せず，可溶性デンプンとマルトトリオースからβ-D-グルコースを遊離するエキソ型の酵素であることがわかった。マルトトリオースを基質とした場合，至適 pH は 5 付近であり，4℃・60 分間の条件下，pH5-9 の範囲で酵素活性は安定であった。また，至適温度は 40℃，温度安定性においては 40℃までは 60 分間安定であった。熱転移温度の測定では熱転移温度が 42.9℃を示した。また，デンプン，マルトースとマルトトリオースなどの高濃度側と低濃度側において分解活性に差異がみられたため，種々のマルトデキストリンを用いて速度論パラメータを測定した。30℃における種々のマルトデキストリン分解活性は，低濃度側では高い値を示したが，高濃度では基質濃度に依存した活性低下が観測された。本酵素は，これまで報告されてきた好熱性酵素と比較して，熱不安定な性質を持ち，低めの温度および低めの濃度で作用するグルコアミラーゼであることがわかった。

expression, characterization, thermolabile glucoamylase

講演番号：2D02a08
講演日時、会場：3 月 28 日 10:16～ D 校舎 02 会場

*Bacillus subtilis*FP-133 由来耐塩性アミラーゼの特性解析
Characterization of halotolerant amylase from *Bacillus subtilis* FP-133
○竹中 慎治、宮武 彩香、田中 耕生、吉田 健一 (神戸大院農)
○shinji Takenaka, Ayaka Miyatake, Kosei Tanaka, Kenichi Yoshida (Kobe Univ.)

【目的】　タンパク質や糖質を含む食品は、食塩を加えた状態で加工することがあるため、これまでに塩存在下で安定かつ高活性を示す好塩性酵素について特性解析がなされてきた。一方、塩存在下および非存在下の両方において安定で同程度の活性を示す耐塩性酵素も産業用酵素としての利用が期待されるが、酵素の特性や構造の解析はあまり進んでいない。耐塩性酵素について耐塩性メカニズムを明らかにすることは、塩に対して不安定な酵素に対しての遺伝子改変による耐塩性の付与と変異酵素の利用につながると期待される。*B. subtilis* FP-133 は種々の菌体外耐塩性酵素を分泌する。我々は、すでに 2 種の耐塩性菌体外プロテアーゼについてそれらの特性を明らかにした [1, 2]。本研究では、FP-133 株の生産する糖質分解酵素の中から生産量の多いアミラーゼを研究対象とし、酵素化学的諸性質を明らかにすることを目的とした。本報では、本菌の生産する耐塩性アミラーゼの精製および遺伝子をクローニングしたので報告する。
【方法】　FP-133 株の培養：既報の方法 [1] を参考に、可溶性デンプン添加培地（pH 6.8）にて 1 から 7 日間振とう培養した。酵素活性：可溶性デンプンを基質とし、3,5-DNS 法による還元糖量の定量を行うことにより測定した。酵素精製：培養上清を活性炭処理した後、陰イオンカラムクロマトグラフィーにより精製した。
【結果】　FP-133 株の培養上清中には荷電の異なる 2 種のアミラーゼ（AmyI および AmyII）が含まれ、培養初期は AmyII の総活性が高く、定常期以降は AmyI の総活性が増大した。AmyI および AmyII を精製し、これらの酵素化学的諸性質を調べた。両酵素はともに糖化型の α-アミラーゼで、N 末端アミノ酸配列、安定性や触媒化学的性質の点で類似していたが、Native での分子量および耐塩性に相違が見られた。つまり、AmyII と比較し、AmyI は、塩濃度 0 から 10%の範囲で同程度の活性を示した。また、ゲル濾過法により、AmyI は 4 量体を形成することも分かった。本菌のアミラーゼ遺伝子（*amyA*）を解析したところ、同遺伝子は 1 つであった。同遺伝子はアミノ酸 659 残基をコードし、その一次構造はアミノ酸 45 残基からなるプレプロ領域とアミノ酸 615 残基からなる成熟タンパク質で構成されていた。AmyI の分子量（57,086.13）および AmyA の一次配列から、AmyA の Amy_C 領域よりもさらに C 末端側の ^{515}Q-^{516}A-^{517}Q 付近で限定的に加水分解（truncation）され AmyI が生じたと考えた。1) S. Endang et al., Biosci. Biotech. Biochem., 70:433-40(2006); 2) S. Takenaka et al., Biosci. Biotech. Biochem., 75:148-51(2011).

halotolerant enzyme, amylase

講演番号：2D02a09
講演日時、会場：3 月 28 日 10:27～ D 校舎 02 会場

Streptomyces corchorusii 由来細胞表層結合型アミラーゼの触媒ドメイン間の相互作用
Interaction of two catalytic domains of Cell-Surface-Associated Amylase from *Streptomyces corchorusii*

○久保 江里果、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院・生環科）
○Erika KUBO, Shuji TANI, Junichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI (Osaka Pref. Univ.)

［目的］蛋白性アミラーゼ阻害剤を生産する放線菌 *S. corchorusii* は、阻害剤によって他の放線菌が生産するアミラーゼを阻害しつつ、自身はその阻害剤に非感受性の細胞表層結合型アミラーゼ（Cell-Surface-Associated Amylase, CSAA）を用いて菌体周辺のデンプンを分解し、その分解産物を拡散させる前に素早く吸収することによって環境中で優位にデンプンを資化していると考えられている。CSAA は、N 末端側に α-amylase、C 末端側に pullulanase の触媒ドメインが存在し、その間には基質結合ドメインである CBM41 および CBM48 が存在するといった非常にユニークなドメイン構造をもつと推定されている。α-amylase と pullulanase が別々の酵素としてではなく一つのポリペプチドとして存在するのは、おそらく各ドメイン間の協調的な相互作用によって、効率よくデンプンを分解するためであると考えられるが、その詳細は不明である。そこで、本研究では各触媒ドメイン間における協調的な相互作用の解明を目的とした。
［方法と結果］各ドメインの相互作用を解明するにあたり、各ドメインを欠失させた 6 種類の変異酵素遺伝子の異種宿主による発現を試みたが、α-amylase と CBM41 のドメインのみ存在する変異酵素しか生産されず、ドメイン欠失変異酵素の生産は困難であると考えられた。そこで、CSAA の α-amylase ドメインの酸/塩基触媒として働く Glu を Gln に置換した変異酵素（CSAA-E350Q）および pullulanase ドメインの求核剤として働く Asp を Asn に置換した変異酵素（CSAA-D1406N）の作製を試みた。変異を導入した各 CSAA 遺伝子を放線菌用発現プラスミドである pSEV 1 由来のプラスミドに挿入し、*S. lividans* TK21 での異種発現を試みた結果、α-amylase 活性が著しく低下した CSAA-E350Q および pullulanase 活性が著しく低下した CSAA-D1406N の生産が確認された。そこで、両変異酵素について菌体表層から遊離後、各種クロマト操作を経ることで電気泳動的に単一に精製した。今後は 2 種類の変異酵素におけるそれぞれの触媒ドメイン単独の活性を評価するとともに、2 種類の変異酵素を混合したものと野生型酵素の各種デンプン基質に対する分解活性を比較することで 2 つの触媒ドメイン間に協調的な相互作用が存在するかどうかを確認する予定である。

Streptomyces corchorusii, α-amylase, pullulanase

講演番号：2D02a10
講演日時、会場：3 月 28 日 10:38～ D 校舎 02 会場

Kitasatospora sp. MK-1785 株由来マルトトリオース生成アミラーゼの部位特異的変異による転移活性の向上

Improvement of transglycosylation activity of maltotriose-forming amylase from *Kitasatospora* sp. MK-1785 by site-directed mutagenesis

○掃部 正浩[1]、西村 重徳[1]、谷 修治[1]、炭谷 順一[1]、多田 俊治[2]、川口 剛司[1]([1]阪府大院・生環科、[2]阪府大院・理)
○Masahiro Kamon[1], Shigenori Nishimura[1], Shuji Tani[1], Jun-ichi Sumitani[1], Toshiji Tada[2], Takashi Kawaguchi[1] ([1]Dept. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【背景と目的】

化合物の水溶性や安定性を改善する方法のひとつとして配糖体化があり,食品，化粧品，医療品などの分野で利用されている．配糖体を合成する酵素のほとんどは単糖を転移する酵素であり，特定のオリゴ糖を転移する転移酵素はあまり知られていない．*Kitasatospora* sp. MK-1785 株が生産するマルトトリオース生成アミラーゼ（G3Amy）は澱粉から特異的にマルトトリオース（G3）を生成することから G3 製造に非常に有用な酵素であるが，さらに本酵素は水酸基を有する各種化合物に対して G3 を転移する活性も有し，G3 配糖体合成酵素としての応用が期待される．しかしながら，転移活性よりも加水分解活性のほうが高く，さらなる G3 転移活性の向上が望まれる．そこでアクセプター部位に存在するアミノ酸に部位特異的変異を導入することで転移活性が向上した変異酵素の取得を試みた.

【方法と結果】

アクセプター部位に存在すると考えられる 12 個のアミノ酸（W179, L191, R223, H229, F258, G260, T280, S283, K284, D323, T325, K361)を選択し，これらのアミノ酸について側鎖の性質が異なる 10 種類程度のアミノ酸に置換することで，合計約 120 種の変異酵素を作製した．これらの変異酵素を発現させた大腸菌の無細胞抽出液を粗酵素液として，2.0% グルコース存在下で 1.0% 可溶性澱粉と反応させ，加水分解反応による産物とみなされる G3 と転移反応による産物とみなされる G4 の生成量について TLC を用いて解析した．その結果，触媒残基近くのアミノ酸においては，L191R, R223K, F258H, D323R, D323W, D323H, 触媒残基から遠いアミノ酸においては，T280, S283 に変異導入を行った変異酵素すべてで加水分解に対する転移活性の向上が確認された.
今後は，変異部位を組み合わせることで G3 転移活性がさらに向上した変異酵素の取得を試みるとともに，取得した変異酵素のカイネティックパラメーターを決定していく予定である.

maltotriose-forming amylase, transglycosylation, site-directed mutagenesis

講演番号：2D02a11
講演日時、会場：3 月 28 日 10:49～ D 校舎 02 会場

複合基質を用いた効率的配糖化反応における糖転移メカニズム解明 のためのプロセッシブ機構モデル

A proposed model of processive mechanism of alpha-amylase-catalyzed reaction: Elucidation of the influence of substrate complexation on the effective alpha-amylase-catalyzed transglycosylation reaction

○伊藤 博、小林 厚志、正田 晋一郎（東北大院工）
○Hiroshi ITO, Atsushi KOBAYASHI, Shin-ichiro SHODA (Tohoku Univ.)

研究背景：糖加水分解酵素による配糖化反応は、水溶液中では多量に存在する水分子のために、加水分解反応との競争反応となり一般に変換率が低い。α-アミラーゼによる糖転移反応も同様に変換率が低く、とりわけ糖脂質を糖受容体にした場合はほとんど反応が進行しない。この問題の解決手段として、我々はこれまでにα-アミラーゼの糖供与体であるアミロースの脂溶性分子に対する包接能に着目し、アミロースと糖脂質（*n*-octyl β-D-glucopyranoside,C8G1）を複合化させた基質を用いることにより *Aspergillus oryzae* 由来のα-アミラーゼによる糖転移反応の高効率化を達成した。しかしながら本糖転移メカニズムは、基質である C8G1 のみならず反応中間生成物であるアルキルポリグリコシドに大きく依存するため、反応の最適化の為に系内を俯瞰するには、検討するパラメータが非常に煩雑であることから、実験的に解決することは現実的では無い。そこで我々は、α-アミラーゼによる糖転移反応のさらなる高効率化を目指すための反応シミュレーションを確立することを目的とした。

プロセッシブ機構モデルの適用：我々は新たな試みとして、多糖加水分解挙動を表現した既存 のプロセッシブ機構モデルを用い、C8G1 介在による加水分解物の生成挙動変化をシミュレーションによる推算により検証した。今回、シミュレーションにより得られた解析結果と C8G1 の添加濃度を変化させて得られる実験結果とを比較することで、本反応系における C8G1 の影響を検討した結果について議論する予定である（Fig.1）。

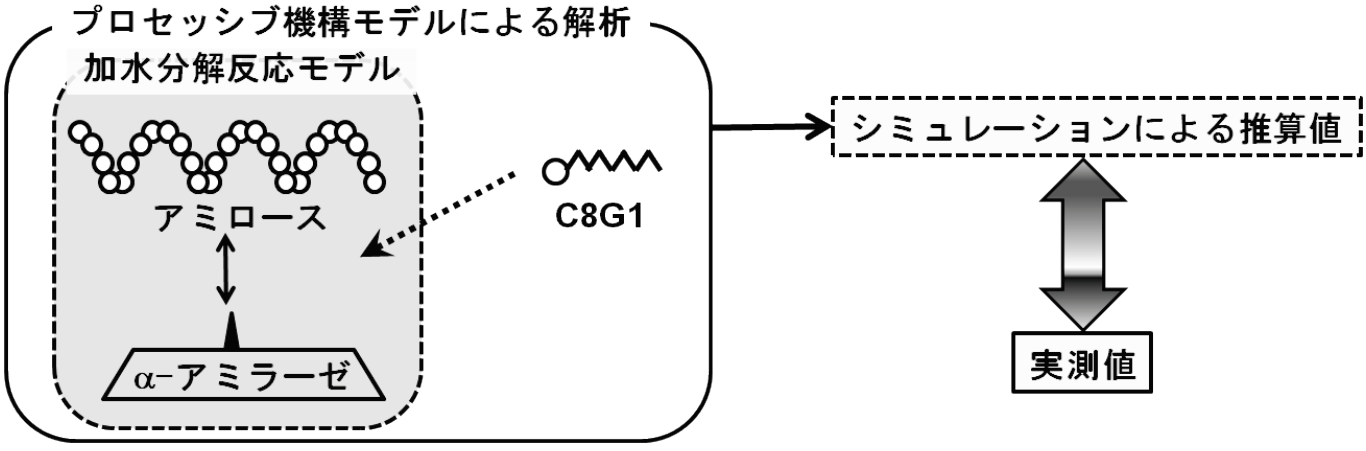


Fig.1 プロセッシブ機構モデルを用いた推算値と実測値の比較による C8G1 の影響の可視化

enzyme mechanism of alpha-amylase, processive mechanism, computer simulation

講演番号：2D02a13
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ D 校舎 02 会場

Arthrobacter globiformis T-6 由来イソマルトデキストラナーゼとパノースとの複合体の立体構造解析

Crystal structure of *Arthrobacter globiformis* T-6 isomaltodextranase complexed with panose

○岡沢 唯香、宮崎 剛亜、西河 淳、殿塚 隆史 (東京農工大院農)
○Yuka OKAZAWA, TAKATSUGU MIYAZAKI, ATSUSHI NISHIKAWA, TAKASHI TONOZUKA (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】

イソマルトデキストラナーゼ(IMD)は糖質加水分解酵素ファミリー（GH）27 に分類されている酵素であり、多糖デキストランを加水分解し、イソマルトース（Glc-α1→6-Glc）を生成させる酵素である。GH27 の酵素のほとんどはガラクトースを構成糖とする糖に作用するガラクトシダーゼや *N*-ガラクトサミニシダーゼに分類されており、IMD の構造機能相関に興味がもたれる。IMD は、イソマルトースを構成糖としている *p*-ニトロフェニルα-イソマルトシド（Glc-α1→6-Glc-α1→*p*NP）を加水分解し *p*-ニトロフェノールを遊離するが、パノース（Glc-α1→6-Glc-α1→4-Glc）は分解しない。今回、IMD とパノースとの複合体の立体構造解析を行ったので報告する。

【方法】

IMD は His-tag 融合タンパク質として大腸菌を用いて発現させ、Ni-NTA カラムを用いて精製した。ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化し、パノースをソーキングした結晶の X 線回折強度測定を行い、複合体構造を決定した。また、基質として *p*-ニトロフェニルα-イソマルトシド、阻害剤としてパノースを用い、IMD の反応速度論的解析を行った。

【結果】

IMD とパノースとの複合体の立体構造を、分解能 1.5Å で決定した。IMD は TIM バレルより成り活性中心が存在するドメイン 1、8 つのβストランドにより構成されるドメイン 2、βサンドイッチ構造をもつドメイン 3 の 3 つのドメインより構成される。糖に相当する電子密度は、ドメイン 1 に 1 分子、ドメイン 3 に 1 分子に結合していることが分かった。ドメイン 3 は Carbohydrate-binding Module(CBM)35 に属する構造である。ドメイン 3 においては、Glc-α1→6-Glc の 2 糖に相当する電子密度しか観察されなかった。ドメイン 1 では活性中心にパノースの明瞭な電子密度が観察され、サブサイト-2、-1、+1 に結合していると考えられた。

isomaltodextranase, GH27, panose

講演番号：2D02a14
講演日時、会場：3 月 28 日 11:21～ D 校舎 02 会場

Gluconobacter oxydans 由来 dextran dextrinase の直鎖イソマルトメガロ糖の効率的な合成に関わる領域の解析

Analysis of the region related to efficient synthesis of linear-isomaltomegalosaccharide by dextran dextrinase from *Gluconobacter oxydans*

○熊谷 祐也、Lang Weeranuch、貞廣 樹里、奥山 正幸、森 春英、木村 淳夫 (北大院農)
○Yuya Kumagai, Weeranuch Lang, juri Sadahiro, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Atsuo Kimura (Hokkaido Univ.)

【目的】直鎖イソマルトメガロ糖（L-IMS）はα-1,6-グルコシド結合から成る重合度が 10 から多糖までの糖質を示す。*Gluconobacter oxydans* 由来 dextran dextrinase（DDase; EC 2.4.1.2）は不均化反応を触媒する酵素であり、マルトオリゴ糖からα-1,6-結合から成る多糖デキストランを合成することが知られている。L-IMS はオリゴ鎖長に比べフラボノイド配糖体のバイオアベイラビリティ亢進に寄与するデータが得られている。しかしながら、DDase はデキストランを主に生産し、メガロ糖の生産量が少ない。これまでに DDase の C 末端から 382 残基分を欠失させた C 末端削除体（Δ382C）は野生型酵素（WT）と比較して効率的に L-IMS を合成できることが明らかとなった。このことは削除した C 末端側に生成物を特異的に伸長させる領域があることが予想された。ここでは C 末端側に存在する L-IMS の生産に関わる領域について検討した。

【方法】DDase（WT および各 C 末端削除体）は大腸菌を宿主として生産し、Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。L-IMS はマルトヘキサオース／マルトヘプタオース（G6G7）を基質としてまず DDase を作用させ､次に残存するα-1,4-結合はブタ膵臓由来αーアミラーゼにより分解し、アルコール沈殿法により分画して調製した。生成物の定量はフェノール硫酸法を用いた。分子量分布はゲル濾過クロマトグラフィーおよび HPAEC-PAD により評価した。

【結果】G6G7 から L-IMS の調製の収率は、WT では 21%（w/w）、Δ382C では 41%（w/w）であった。削除した C 末端は 2 つの領域（B および C）から成る。B-C 両領域および C 領域を大きく欠失した変異酵素（それぞれΔ364C およびΔ255C）は L-IMS の収率はそれぞれ 43%および 22%であった。このことから L-IMS の合成には B 領域が寄与すると推測された。B 領域を含むΔ255C の C 末端削除体の Asn916 を Ala に置換した点変異体ではデキストランの生成量が低下し、L-IMS の生成量が増加することが確認された。このことから DDase の B 領域が生成物のサイズ制御に関わることが示された。本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援のもとで行われた。

Linear-isomaltomegalosaccharide (L-IMS), dextran dextrinase (DDase), C-terminal truncated DDase

講演番号：2D02a15
講演日時、会場：3 月 28 日 11:32～ D 校舎 02 会場

澱粉様貯蔵多糖を蓄積するシアノバクテリア由来グリコーゲン合成酵素の機能解析
Biochemical characterization of glycogen synthases from cyanobacteria accumulating insoluble starch-like alpha-glucan
○鈴木 龍一郎、種市 良祐、藤田 直子、鈴木 英治（秋田県立大生物資源）
○Ryuichiro SUZUKI, Ryousuke TANEICHI, Naoko FUJITA, Eiji SUZUKI (Akita Prefectural Univ.)

【目的】シアノバクテリアは貯蔵多糖として可溶性のグリコーゲンを蓄積するが、一部の単細胞窒素固定種は不溶性の澱粉様貯蔵多糖を貯蔵することが知られている。これら貯蔵多糖の生合成には、ADP グルコースピロホスホリラーゼ、グリコーゲンシンターゼ(GS; EC 2.4.1.21)、枝作り酵素、枝切り酵素の少なくとも 4 種類の酵素群が関与する。これら酵素群の遺伝子数は、種によって多様である。これらのうち GS 遺伝子は、グリコーゲンを蓄積する種の一部では 1 種類であるが、澱粉様貯蔵多糖を蓄積する種では必ず 2 種類存在する。我々は全てのシアノバクテリアに普遍的に存在する GS 遺伝子を 1 型 GS、一部の種に存在する GS 遺伝子を 2 型 GS と定義した。上述の背景から 1 型 GS 遺伝子は、グリコーゲンの生合成に必須であると考えられる。それに対して澱粉様貯蔵多糖の生合成には、1 型および 2 型 GS 遺伝子の両方が必須であると予想される。そこで我々は、グリコーゲンを蓄積する種（*Synechococcus elongatus* PCC 7942、*Synechocystis* sp. PCC 6803、*Cyanothece* sp. PCC 7424）および澱粉様貯蔵多糖を蓄積する種（*Cyanothece* sp. PCC 8802、*Cyanothece* sp. ATCC 51142）由来の 1 型および 2 型 GS の組換え酵素を調製し、それらの酵素特性を比較したので報告する。

【方法】シアノバクテリア（PCC 7942、PCC 6803、PCC 7424、PCC 8802、ATCC 51142）株から抽出したゲノム DNA を鋳型として 1 型および 2 型 GS 遺伝子を PCR 増幅し、発現ベクターにクローニングした。これら遺伝子群を大腸菌内で発現させ、Ni アフィニティークロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。組換え酵素群の活性を Native-PAGE/GS 活性染色によって検出した。また、グリコーゲン、アミロペクチン、マルトオリゴ糖を基質として酵素反応を行い、反応産物をキャピラリー電気泳動法によって分析した。

【結果】すべての 1 型および 2 型 GS 遺伝子について、大腸菌内での発現を試みたところ大部分が封入体となったが、ごく一部は可溶性画分に発現した。SDS-PAGE によって組換え酵素群の精製度を確認したところ、バンドが複数現れたが、糖質加水分解酵素などは混入していなかった。これら組換え酵素群の酵素特性を解析した結果、1 型および 2 型 GS の基質特異性および反応産物の鎖長に差異がみられた。

glycogen synthase, cyanobacteria, starch

講演番号：2D02a16
講演日時、会場：3 月 28 日 11:43～ D 校舎 02 会場

化学修飾によるコムギβ-アミラーゼの熱安定性および酵素活性の向上

Improvement in the thermal stability and enzyme activity of wheat ß-amylase by chemical modification

Tadessa DABA、○兒島 憲二、井上 國世（京大院・農）
Tadessa DABA, ○Kenji KOJIMA, Kuniyo INOUYE (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

［目的］β-アミラーゼ (BA) はデンプンの加水分解を触媒し，非還元末端からマルトースを生成する酵素である．BA の中でも熱安定性の高いダイズ BA (SBA) が主に産業的に利用されてきた．コムギ BA (WBA) は SBA に比べて熱安定性が低いが，安価であり，SBA に替わる BA として期待されている [1)]．本研究は, WBA の熱安定性および酵素活性を化学修飾により向上させることを目的とした．

［方法］WBA はハイマルトシン（エイチビィアイ）を用いた．化学修飾には 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS), 2,4-ビス (*o*-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ-*s*-トリアジン (mPEG) およびグルタルアルデヒド (GA) を用いた．化学修飾は, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0)，25℃で, 2.4 μM WBA と 10 mM TNBS, 9.6 μM mPEG, 22 mM GA を等量混合することにより行った．化学修飾されたアミノ基数は TNBS 修飾後の 340 nm における吸光度から定量した. WBA の酵素活性の測定には，基質として可溶性デンプンを用い，酢酸緩衝液 (pH 5.4)，25℃で酵素反応を行い，生成した還元糖をネオクプロイン法により定量した．熱安定性の測定では, WBA を 25, 35, 45 および 55℃で任意の時間保温した後，残存活性を保温時間に対してプロットし，熱失活の一次速度定数 (k_{obs}) を算出した．k_{obs} の Arrhenius プロットおよび Eyring プロットから活性化エネルギー (E_a)，活性化 Gibbs エネルギー ($\Delta G^{\ddagger}$)，活性化エンタルピー ($\Delta H^{\ddagger}$) および活性化エントロピー ($\Delta S^{\ddagger}$) を算出した．

［結果］WBA は 32 個の Lys 残基を有し, 5 mM TNBS により 6 個, 4.8 μM mPEG により 4 個, 11 mM GA により 5 個のアミノ基が修飾された. 30 分間の保温により WBA の酵素活性が半減する温度 T_{50} は，未修飾 WBA では 47±1℃であったが, 5 mM TNBS, 4.8 μM mPEG および 11 mM GA 修飾により，それぞれ 48±2, 55±2, 54±2℃に上昇した. 55℃での熱失活における $\Delta G^{\ddagger}$, $\Delta H^{\ddagger}$, $T\Delta S^{\ddagger}$ は，未修飾 WBA でそれぞれ 94±3, 41±1, -53±1 kJ/mol; 5 mM TNBS で修飾した WBA で 95±2, 30±2, -65±2 kJ/mol; 4.8 μM mPEG で修飾した WBA で 94±2, 24±2, -70±3 kJ/mol; 11 mM GA で修飾した WBA で 96±2, 22±2, -74±1 kJ/mol であり，化学修飾による熱安定性向上はエントロピー駆動的であった. WBA の酵素活性は, 5 mM TNBS および 11 mM GA による修飾でそれぞれ 15%および 59%減少し, 4.8 μM mPEG 修飾では 39%増大した．化学修飾により WBA の熱安定性および酵素活性が向上することが示された．特に, mPEG による化学修飾では熱安定性と酵素活性の両方が向上した [2)].

1) Daba *et al*. (2012) *Enzyme Microb. Technol*., **51**, 245-251
2) Daba *et al*. (2013) *Enzyme Microb. Technol*., **53**, 420-426

β-amylase, chemical modification, thermal stability

講演番号：2D02a17
講演日時、会場：3 月 28 日 11:54～ D 校舎 02 会場

X線結晶構造解析によるダイズβ-アミラーゼの反応機構の解明

Elucidation of reaction mechanism of soybean β-amylase by X-ray crystallography

○三上 文三[1]、姜 有那[1]、安達 基泰[2]、河村 和広[1]、水谷 公彦[1]、高橋 延行[1] ([1]京大院農、[2]日本原子力機構)
○Bunzou Mikami[1], Youna Kang[1], Motoyasu Adachi[2], Kazuhiro Kawamura[1], Kimihiko Mizutani[1], Nobuyuki Takahashi[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Japan Atomic Energy Agency)

【目的】β－アミラーゼの活性中心付近には触媒残基である二つのGlu残基の他に、最大11Å移動する9残基のフレキシブルループと構造が切り換わる5残基のインナーループの二つの可動ループが存在する。また、触媒残基の近くに存在するLys295は基質の結合状態によってその側鎖の構造を変化させる。野生型の酵素では、インナーループの構造がアポ型からプロダクト型に変化することが触媒反応に重要であると推定されている。このインナーループの構造変化とLys295の側鎖の構造変化は連動している。今回は、ダイズβ-アミラーゼのインナーループ上のThr342とLys295の変異体の結晶を用いて、基質アナログ複合体のX線結晶構造解析を行い、それぞれの役割について検討した結果を報告する。
【方法】インナーループ上の変異体としてT342V, T342S, T342Aを、Lys295の変異体としてK295Aを作製し、それらの結晶化とマルトース複合体の構造解析を行った。回折データの収集にはSPring-8でのBL38B1およびBL26B1のIPデテクターを用い、構造の精密化は分解能1.1～1.4Åまでのデータを用い、SHELXLによって行った。サブサイト-2,-1および+1,+2に結合しているマルトースの占有率とループ開閉のマルトース濃度依存性を各変異体の結晶に異なる濃度のマルトースをソーキングした後に構造解析を行うことによって調べた。
【結果】硫酸アンモニウムを沈殿化剤としてpH5.4でハンギングドロップによって得られたダイズβ-アミラーゼの変異体の結晶の空間群はすべて$P3_121$であり、非対称単位に一分子の酵素を含む。T342V, T342S, T342A, K295Aの変異体では酵素活性が野生酵素に比べて、それぞれ7.7%、0.3%、0.06%, 0.5%に減少した。それぞれの結晶を用いて、インナーループの構造変化のマルトース濃度依存性を調べた結果、T342AとK295Aではアポ型の構造からプロダクト型への構造変化が認められたのに対して、T342Vではプロダクト型の構造のみをとり、T342Sでは逆にアポ型の構造のみをとることが分かった。T342SとT342Aではサブサイト-1に結合しているグルコース残基の環の歪みは認められず、T342VとK295Aではサブサイト-2,-1に結合するマルトースの親和力が大きく低下していた。以上の結果から、インナーループ上のThr342の側鎖は、インナーループの構造の切換えに重要であり、アポ型で基質の取り込みを促進し、プロダクト型で生成物の遊離を促進すると考えられた。また、Lys295の側鎖はサブサイト-1の親和力に重要であると同時に、その構造変化により触媒効率の上昇に寄与すると推定された。

β-amylase, X-ray crystallography, enzyme mechanism

講演番号：2D02p01
講演日時、会場：3 月 28 日 14:00～ D 校舎 02 会場

ランダム変異導入による *Microbacterium saccharophilum* K-1 株由来β-フルクトフラノシダーゼの耐熱化

Improvement of thermostability of β-fructofuranosidase from *Microbacterium saccharophilum* K-1 by random mutagenesis

○伊藤 哲也[1]、大田 ゆかり[2]、嶋根 康弘[2]、岸野 恵理子[1]、藤田 孝輝[1]、三國 克彦[1]、西河 淳[3]、殿塚 隆史[3]、秦田 勇二[2]([1]塩水港精糖株式会社、[2]海洋研究開発機構、[3]東京農工大・院農)
○Tetsuya Ito[1], Yukari Ohta[2], Yasuhiro Shimane[2], Eriko Kishino[1], Koki Fujita[1], Katsuhiko Mikuni[1], Atsushi Nishikawa[3], Takashi Tonozuka[3], Yuji Hatada[2] ([1]Ensuiko Sugar Refining Co., Ltd., [2]JAMSTEC, [3]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】

Microbacterium saccharophilum（旧名 *Arthrobacter* sp.）K-1 株由来β-フルクトフラノシダーゼ(以下 FFase）は、ラクトースとスクロースを原料として、整腸作用およびミネラル吸収促進作用を有するラクトスクロースを生成する酵素である。現在、ラクトスクロースは、バッチ法で生産されているが、低コストでかつ地球環境に優しい方法で生産させるには FFase を固定化して連続的に反応させるバイオリアクターシステムが有効である。しかし、バイオリアクターシステムでは微生物汚染や原料の析出を防止するために反応温度を 60℃程度の高温域に保つ必要があり、FFase の熱安定性では不十分であった。そこで、本研究ではランダム変異導入法により耐熱化酵素の作出を試みた。

【方法と結果】

PCR ランダム突然変異誘発キットを用いて FFase 遺伝子にランダム変異を導入した後、pET21a ベクターを使って大腸菌 BL21(DE3)を形質転換し、大腸菌ライブラリーを構築した。寒天培地上に形成したコロニーのうち約 3,000 個を 96 穴プレートの液体培地に接種した。培養後、遠心分離にて菌体を回収し、タンパク質抽出試薬を用いて粗酵素液を調製した。粗酵素液は、55℃で 30 分の熱処理を行った後、スクロース分解活性を測定し、耐熱化酵素のスクリーニングを行った。その結果、野生型酵素よりも高い残存活性を示した変異体酵素を 4 種類取得した。取得した変異体酵素の変異部位の解析を行ったところ、47 位、200 位、447 位、470 位、500 位、530 位の 6 ヶ所のアミノ酸が置換されていた。次に、これらの変異部位を組み合わせた変異体を各種作成し、耐熱性の評価を行ったところ、5 重変異体である 24Y 変異体酵素（T47S / S200T / F447V / F470Y / P500S）が 60℃、30 分間の熱処理で最も高い残存活性を示した。さらに、24Y 変異体酵素の 5 ヶ所の変異部位に対してサチュレーション変異導入を行い、より高い耐熱性を有する変異体酵素の取得を試みた結果、大幅に耐熱性が向上した 24Y447P 変異体酵素（T47S / S200T / F447P / F470Y / P500S）の取得に成功した。得られた変異体酵素は、いずれも野生型酵素ではラクトスクロースの生成が急激に低下する 60℃以上の高温域において高いラクトスクロース生成能を示し、特に 24Y447P 変異体酵素は、連続反応試験によって 60℃における熱失活の半減期が野生型酵素に比べて約 20 倍長いことが確認された。

β-fructofuranosidase, lactosucrose, thermostability

講演番号：2D02p02
講演日時、会場：3 月 28 日 14:11～ D 校舎 02 会場

Microbacterium saccharophilum K-1 由来β-フルクトフラノシダーゼ耐熱化酵素の立体構造解析
Structural analysis of thermostabilizing mutations of β-fructofuranosidase from *Microbacterium saccharophilum* K-1

○盛 まりな[1]、横井 岳[1]、佐藤 祥名[1]、宮崎 剛亜[1]、大田 ゆかり[2]、嶋根 康弘[2]、秦田 勇二[2]、藤田 孝輝[3]、伊藤 哲也[3]、西河 淳[1]、殿塚 隆史[1] ([1]東京農工大・院農、[2]海洋研究開発機構、[3]塩水港精糖株式会社)
○ Marina MORI[1], Gaku YOKOI[1], Shona SATO[1], Takatsugu MIYAZAKI[1], Yukari OHTA[2], Yasuhiro SHIMANE[2], Yuji HATADA[2], Koki FUJITA[3], Tetsuya ITO[3], Atsushi NISHIKAWA[1], Takashi TONOZUKA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, [2]JAMSTEC, [3]Ensuiko Sugar Refining Co., Ltd.)

【緒言】　*Microbacterium saccharophilum* K-1由来β-フルクトフラノシダーゼ（以下FFase）は、スクロースとラクトースを基質として、ラクトスクロース（Gal-β(1→4)-Glc-α(1↔2)β-Fru）を生成させる酵素である。本研究では取得したFFaseの耐熱化酵素のうち、4重変異体 T47S/F447V/F470Y/P500S（24Y200S、以下 Mutant-A）、4重変異体 T47S/S200T/F447V/P500S（24Y470F、以下 Mutant-B）、5重変異体 T47S/S200T/F447P/F470Y/P500S（24Y447P、以下 Mutant-C）の3種類の耐熱化FFaseの立体構造を決定したので報告する。

【方法】　各耐熱化酵素とも大腸菌を用いて発現させ、HiPrep Phenyl FFを用いた疎水クロマトグラフィーおよびHiLoad Q-Sepharose HPを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーで、電気泳動的に均一になるまで精製した。得られた結晶のX線回折データの収集を行い、野生型FFaseによる分子置換法により立体構造を決定した。

【結果と考察】　Mutant-A、Mutant-B、Mutant-Cについて、それぞれ1.81、2.0、2.27-Å分解能で立体構造を決定した。FFaseは、β-プロペラより成る触媒ドメイン、および、C末端側にα-ヘリックスから成る小ドメインから構成されている。5ヶ所の変異のうち、Thr47→Ser、Phe447→Val/Pro、Pro500→Serは触媒ドメインに存在する活性中心から離れた残基の変異であり、Ser200→Thr、Phe470→Tyrは活性中心を形成するクレフト内の残基の変異であった。

耐熱化機構は各変異によってさまざまであり、Thr47→Serは表面に露出する疎水性領域の減少、Ser200→Thrは側鎖のゆらぎの解消、Phe470→Tyrおよび Pro500→Serは近傍の残基や水分子との新たな水素結合の形成によるものと考えられた。

変異の中で最も特徴的なのが、Phe447 の変異である。Phe447→Val においては、447 番目のアミノ酸残基に近接する His477 のコンフォメーションが変化し、その結果、His477 と Pro445 の間に水素結合が新たに形成されることが分かった。さらに、Phe447→Pro においては、His477 と Pro445 の間の水素結合の形成に加え、447 番目の残基を Pro に置換したことによりβターンが安定化することにより、さらなる耐熱化に至るものと考えられた。

β-fructofuranosidase, lactosucrose, thermostability

講演番号：2D02p03
講演日時、会場：3 月 28 日 14:22～ D 校舎 02 会場

MD・FMO 計算による *Microbacterium saccharophilum* K-1 株由来β-フルクトフラノシダーゼの耐熱化

Improvement of thermostability of β-fructofuranosidase from *Microbacterium saccharophilum* K-1 using MD and FMO calculations.

○嶋根 康弘[1]、殿塚 隆史[2]、臼井 けい子[1]、伊藤 哲也[3]、岩沢 美佐子[1]、西 真郎[1]、大田 ゆかり[1]、森 梢[1]、三國 克彦[3]、秦田 勇二[1]([1]海洋研究開発機構、[2]東京農工大・院農、[3]塩水港精糖株式会社)
○Yasuhiro SHIMANE[1], Takashi Tonozuka[2], Keiko Usui[1], Tetsuya Ito[3], Misako Iwasawa[1], Shinro Nishi[1], Yukari Ohta[1], Kozue Mori[1], Katsuhiko Mikuni[3], Yuji Hatada[1] ([1]Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, [2]Ensuiko Sugar Refining Company, [3]Tokyo University of Agriculture and Technology)

【目的】 *Microbacterium saccharophilum* K-1 株由来β-フルクトフラノシダーゼ（FFase）はラクトースとスクロースを原料として、整腸作用やミネラル吸収促進作用を有する機能性オリゴ糖ラクトスクロースを合成する酵素であり、現在のところバッチ法による工業生産プロセスに利用されている。近年、二酸化炭素排出量抑制や廃棄物量の低減、エネルギー利用効率の向上等を背景として、製糖プロセスの効率化が求められており、耐熱性酵素を固定化したバイオリアクターシステムによる連続反応への移行が望まれている。これまでの研究で、野生型酵素に 5 つのアミノ酸変異を導入した 24Y447P 変異体を取得して耐熱性の大幅な向上に成功しているが、オリゴ糖を効率的に生産するためには更なる耐熱化が不可欠である。本研究ではシミュレーションを利用してこれまでに取得した酵素の耐熱化機構の解析や、更なる耐熱化に有効なアミノ酸変異の予測を試みた。

【方法】 野生型と耐熱化変異体の分子挙動を解析するために、X 線回折で得られた 24Y447P の三次元構造をベースとして、野生型及び変異体構造をホモロジーモデリングにより構築して、水存在下、CHARMm 力場で分子動力学計算を実施した。得られた時変動データから一定間隔で構造を抽出し、1 アミノ酸を 1 フラグメントに分割して FMO 計算を実施した。

【結果】MD 計算結果から耐熱化変異体 24Y447P では C 末端側の小ドメイン内に形成されている水素結合数が増加している事が示唆された。FMO 計算で求めた安定性へのエネルギー的寄与は野生型よりも最大-400kcal/mol 程度大きかった。実際に小ドメインを欠損させた変異体では耐熱性が著しく低下した事から、本酵素の耐熱化には小ドメインの安定化が重要と考えられた。そこで近傍に位置する 247 番アミノ酸を Lys から Asp に置換（K247D）して、同様に安定性の予測と性質評価を実施した。K247D 変異体は 24Y447P と比較して小ドメイン内の水素結合数が有意に増加すること、エネルギー的に安定化する事が示唆され、その 62°C における半減寿命は 24Y447P の 1.5 倍に達していた。

【謝辞】 本研究は文部科学省「地球シミュレータ産業戦略利用プログラム」の一部として実施しました。FMO 解析ソフトウェア ABINIT-MP は文部科学省「イノベーション基盤シミュレーションソフトウェアの開発」において東京大学生産技術研究所で開発されたものを使用させて頂きました。

β-fructofuranosidase, thermostability, FMO

講演番号：2D02p04
講演日時、会場：3 月 28 日 14:33～ D 校舎 02 会場

β-キチンナノファイバーを用いた簡便なキチナーゼ活性測定法の開発

A simple chitinase assay using beta-chitin nanofiber.

○西平 知世[1]、宮野 有紗実[2]、大沼 貴之[1]、成廣 和枝[3]、山下 和彦[3]、後藤 猛[4]、高橋 砂織[5]([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]ヤエガキ醗酵技研(株)、[4]秋田大院工、[5]秋田総食研)
○Tomoyo NISHIHIRA[1], Asami MIYANO[2], Takayuki OHNUMA[1], Kazue NARIHIRO[3], Kazuhiko YAMASHITA[3], Takeshi GOTOH[4], Saori TAKAHASHI[5] ([1]Grad. Kinki Univ., [2]Kinki Univ., [3]YAEGAKI Bio-industry,Inc., [4]Akita Univ., [5]Akita Reserch Institute of Food and Brewing)

［目的］キチナーゼはキチンのβ-1,4グリコシド結合を加水分解する酵素である。これまで、グリコールキチンや、オリゴ糖の誘導体などを用いて、キチナーゼの活性測定が行われてきたが、生成した還元糖を定量する際の煩雑さ、またはオリゴ糖の誘導化に伴うアーティファクトなどが問題点として挙げられていた。一方、β-キチンナノファイバーは、イカの軟骨に含まれるβ-キチンをナノレベルまでサイズダウンさせ、繊維状に加工した物質であり、水溶液に分散しやすいという特性を示す。このような特性をもつβ-キチンナノファイバーを用いることによって、より簡便なキチナーゼ活性測定法の開発が可能になると考えられる。本研究では、*Serratia marcescens*由来、バキュロウィルス由来および植物由来キチナーゼを用いて、β-キチンナノファイバーの加水分解を行い、新規活性測定法の確立を試みた。
［方法］基質であるβ-キチンナノファイバー懸濁液を用いて、540 nmの波長で濁度を測定し、0.9～1.0 の値になるように 0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)で濃度を調整した。この基質懸濁液 1 mL に対して、酵素終濃度が 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0μM になるように酵素を加え、37 ℃ で反応させた。その後、反応進行に伴う濁度の減少を 540 nm で追跡した。
［結果］植物由来キチナーゼとβ-キチンナノファイバーを混合したところ、濁度の減少は確認できなかった。しかし、*Serratia marcescens* 由来キチナーゼ B(SmChi-B)およびバキュロウィルス由来キチナーゼ(AcMNPV-Chi)を用いると、濁度は酵素濃度依存的に減少し、簡便に加水分解反応を追跡できることがわかった。また、SmChi-B は AcMNPV-Chi に比べると高い活性を示した。今回用いた SmChi-B と AcMNPV-Chi は、結晶性キチンに対して高い分解活性を有するプロセッシブ酵素であり、その他の酵素は非プロセッシブ酵素である。このことから、β-キチンナノファイバーを用いて酵素の分解活性を評価することは、プロセッシブ酵素か非プロセッシブ酵素かを判断する上で有用な手段のひとつになり得るものと考えられた。現在、キチン結合ドメインをもつ酵素ともたない酵素における、β-キチンナノファイバーに対する分解活性を評価している。

chitinase, beta-chitin nanofiber

講演番号：2D02p05
講演日時、会場：3 月 28 日 14:44～ D 校舎 02 会場

Streptomyces griseus 由来の AA10, SgCBP V の諸性質と機能解析

Study of functions and properties of SgCBP V belonging to AA10 family.

○千葉 大介、畠山 彩乃、戸谷 一英、中川 裕子（一関高専・物化工）
○Daisuke CHIBA, Ayano HATAKEYAMA, Kazuhide TOTANI, Yuko NAKAGAWA (Ichinoseki National. College. Tech.)

［研究背景］

カニ殻やエビ殻の主要成分であるキチンを分解することによって得られる *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）は，美容商品や健康食品として需要が増加している．従来の製造法では，強酸・強アルカリを用いる工程が必要であるため，より環境負荷の少ない酵素糖化法の使用が推奨されているが，主に酵素のコスト面で，実用化は難しい．酵素によるキチン分解反応効率の向上は，環境調和型の GlcNAc 生産プロセスの実用化において不可欠である．

近年 *Serratia marcescens* 由来のキチン結合タンパク CBP21（AA10 family: Auxiliary Activity family 10（旧 CBM33: carbohydrate binding module family 33））が，キチンの酵素分解を促進する効果を持つことが明らかとなった．本研究では，CBP21 と同じ AA10 family に属し，食品生産への応用が期待される *Streptomyces griseus* 由来の推定分泌型キチン結合タンパク SgCBP V が，キチン分解に与える影響を詳細に解析した．

［研究内容］

医薬品製造にも使用され，ゲノム配列が明らかな *S. griseus* のゲノム DNA には，6 つのアノテーションされた AA10 が存在する．このうちの一つ，Sgr199 は，推定キチン結合部位とセルロース結合部位の 2 つのドメインをもつ特徴的な遺伝子である．そこで，Sgr199 のシグナル配列を除いた全配列（SgCBP V）及びキチン結合ドメインからリンカー部位まで（SgCBP V $_{ChiBM}$+linker）をシャトルベクターpNCNO2 に組み込み，*Brevibacillus* による異種発現を行った．これらの組換え酵素をキチンアフィニティーカラム，及び強陰イオン交換カラムによって精製したのち，組換えキチナーゼ ChiA, B, C (*S. marcescens* 由来)と共に市販のα-及びβ-キチンに作用させ，酵素分解促進効果を検証した．SgCBP V においては，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて主要な酵素分解産物である $(GlcNAc)_2$ を定量したところ，α-及びβ-キチンの両基質に対し，3 つ（ChiA, B, C)全てのキチナーゼの酵素分解を促進することが分かった．効果の大きかった rSgCBP V と ChiB の組み合わせでは，未添加の場合と比較して 24 時間後の $(GlcNAc)_2$ 生産量がα -キチンで 3 倍，β -キチンで 2.6 倍に増加し，SgCBP V によるキチンの酵素分解促進効果が証明された．また，SgCBP V は幅広い pH 範囲で安定な活性を示したことからも，産業化への応用が期待される．

AA10 (Auxiliary Activity family 10), *Streptomyces griseus*, chitin

講演番号：2D02p07
講演日時、会場：3 月 28 日 15:05～ D 校舎 02 会場

Streptomyces griseus 由来の AA10 family のキチン酵素分解促進効果

AA10-type proteins from *Streptomyses griseus* accelerated enzymatic chitin solubilization.

○中川 裕子[1]、工藤 まどか[1]、竹林 晃[1]、戸谷 一英[1]、大塚 未来[2]、渡邉 剛志[2,3]、Eijsink Vincent[4]、Vaaje-Kolstad Gustav[4] ([1]一関高専・物化工、[2]新潟大院・自然科学、[3]新潟大・農・応生化、[4]Norwegian Univ. Life Sci. Chem. Biotech. Food Sci.)
○Yuko NAKAGAWA[1], Madoka KUDO[1], Hikaru TAKEBAYASHI[1], Kazuhide TOTANI[1], Miku OTSUKA[2], Takeshi WATANABE[2,3], Vincent Eijsink[4], Gustav Vaaje-Kolstad[4] ([1]Ichinoseki National College of Technol., [2]Grad. Sch. Sci. & Tech., Niigata Univ., [3]Niigata Univ., [4]Norwegian Univ. Life Sci. Chem. Biotech. Food Sci.)

キチンを分解して得られる *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）は関節痛軽減や美肌効果が知られており，健康食品などに添加され，大きな市場を有する．第二のバイオマスと呼ばれるキチンを環境に負荷をかけずに分解し, GlcNAc を製造するためには, 酵素分解法のみを用いることが望ましい. しかし，キチンは水に不溶で結晶性が高く，そのままでは酵素による分解効率が著しく低いため，酵素分解法のみで GlcNAc を作る方法は未だに実用化されていない．酵素分解法を実現するためには，酵素自身の効率化とともに，分解の促進物質の添加が有効であると考えられる．我々は，食品製造用菌株として食品添加物リストに収載されている *Streptomyces* 属由来の AA10 (旧 CBM33) family を対象として，キチンの酵素分解における促進効果を調べた．本研究によって得られた基礎的知見は，最終的に効率的かつ経済的にキチンの酵素分解を達成する系を確立する上で重要になる．

【研究内容】

キチンを炭素源に *Streptomyces griseus* を培養すると，AA10 family に属する推定キチン結合タンパク 4 種全てで mRNA 蓄積量が有意に変化した（2010 年度大会要旨）．これら 4 つを SgCBP I-IV と名付けた．シグナル配列を除いた *SgCBP I* 遺伝子を大腸菌，*SgCBP II-IV* 遺伝子を *Brevibacillus* の発現用ベクターに連結し，異種発現させた．得られた組換え SgCBP（rCBPs）はキチンアフィニティカラムによって精製し，それぞれの活性を測定した．キチンを基質に 4 つの SgCBP を作用させると，全ての酵素が基質の酸化活性を示した．そこで，各種の組換えキチナーゼ（*Serratia marcescens* 由来の ChiA と ChiB，ChiC）を組み合わせてキチンを酵素分解し，主な反応生成物であるキチン二糖 $(GlcNAc)_2$ を HPLC で定量することにより，rSgCBP がキチンの酵素分解に与える影響とα-キチン，β-キチンに対する反応性の違いを比較した．いずれの基質を用いても，また，いずれのキチナーゼとの組み合わせにおいても各 rSgCBP を加えた反応系において $(GlcNAc)_2$ の生成量が増加した．また，rSgCBP 添加による影響はα-キチンよりもβ-キチンの方が顕著であった．最も顕著な分解促進効果を示したのは rSgCBP IV で，α-キチンの酵素分解においては，rSgCBP IV の添加により 24 時間後の $(GlcNAc)_2$ の生成量は 4 倍から 6 倍程度に増加した. 基質にβ-キチンを供した場合は，24 時間後の $(GlcNAc)_2$ の生成量が最高で 30 倍程度まで増加し，キチンの酵素糖化において rSgCBP が多大な効果を与えることが明らかになった.

AA10 (Auxiliary activity family 10), Chitin, *Streptomyces griseus*

講演番号：2D02p08
講演日時、会場：3 月 28 日 15:16～ D 校舎 02 会場

キチン分解細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* が保有するキチン分解酵素 ChiJ,ChiK の解析

Characterization of chitinolytic enzymes encoded by *chiJ* and *chiK* in the bacterium, *Chitiniphilus shinanonensis*

○中野 萌、兪 佳怡、野川 優洋、田口 悟郎、下坂 誠（信州大繊）
○ Moe NAKANO, Jiayi YU, Masahiro NOGAWA, Goro TAGUCHI, Makoto SHIMOSAKA (Shinshu Univ.)

【目的・背景】*Chitiniphilus shinanonensis* SAY3 株は、本研究室で分離同定した新属のキチン分解細菌である。SAY3 株は強力なキチン分解能を有しフレーク状キチンを効率よく分解資化した。これまでに大腸菌を宿主に用いた発現スクリーニングにより、15 個のキチン分解関連酵素遺伝子（*chiA-chiO*）を見出した(1)。今回は SAY3 株ゲノム配列のドラフトシークエンスにより、新たなキチン分解関連酵素遺伝子の探索を行った。また、糖質加水分解酵素 family 18 と相同性を示す *chiJ, chiK* の機能解析を行った。

【方法】次世代シークエンサにより決定した SAY3 株ゲノム配列に対して、open reading frame (ORF) 探索とアミノ酸配列相同性解析を行い、キチン分解関連酵素の推定遺伝子を抽出した。*chiJ*、*chiK* の PCR 増幅断片は発現ベクターpColdI に組み込み、大腸菌 BL21(DE3)株を宿主として誘導発現させた。

【結果】得られたゲノム配列（全長 4.16 Mbp, 86 contigs）より 3278 個の ORF を決定し、そのうち 49 個がキチン分解関連酵素をコードする遺伝子と判定した。この中には既に見出した 15 遺伝子（*chiA-chiO*）が全て含まれており、新たに検出した遺伝子は 34 個（chi1-chi34 と命名）であった。触媒ドメインに注目すると family18, family19 に相同性を示す遺伝子がそれぞれ 22 個、3 個見出された。SAY3 株は多種多様なキチン分解酵素を産生することによって強力なキチン分解能を獲得したことが予想された。ChiJ, ChiK は、その触媒ドメインのアミノ酸配列において 74%の高い相同性を示し、両組換え酵素は互いによく似たキチン分解活性を示した。*N*-Acetyl-D-glucosamine (GlcNAc)の 6 量体に対する反応生成物を HPLC 分析した結果、family 18 キチナーゼに特有な retaining 型の分解様式を示し、GlcNAc2 量体を優先的に生成した。不溶性のコロイダルキチンを基質に用いた場合にも反応初期から GlcNAc 2 量体が蓄積した。以上の結果より、ChiJ、ChiK はエンド型反応よりも、非還元末端側から連続的に GlcNAc 2 量体を切り出す processive 型の反応特性がより強い酵素であることが明らかとなった。

(1) Huang *et al*., J. Biosci. Bioeng. 113, 293-299, (2012).

family 18 chitinase, *Chitiniphilus shinanonensis*, processive chitinolytic enzyme

講演番号：2D02p09
講演日時、会場：3 月 28 日 15:27～ D 校舎 02 会場

キチン分解細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* における遺伝子操作系の開発

Development of gene disruption system by an allelic exchange in the bacterium, *Chitiniphilus shinanonensis*

○園田 紀恵、兪 佳怡、野川 優洋、田口 悟郎、下坂 誠（信州大繊維）
○Norie SONODA, Jiayi YU, Masahiro NOGAWA, Goro TAGUCHI, Makoto SHIMOSAKA (Shinshu Univ.)

【背景と目的】

微生物由来のキチン分解酵素を用いたキチンオリゴ糖の生産を目指して、強力なキチン分解細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* SAY3 株(1)が有するキチン分解酵素系を調査してきた。これまでに SAY3 株のゲノムドラフトシークエンスから 49 個のキチン分解酵素関連遺伝子を見出した。このうち *chiF* がコードするタンパク質は、N 末端側に位置する 2 つのキチン結合ドメインと機能未知ドメインにより構成されていたが、大腸菌で発現させた ChiF 組換えタンパク質にはキチン分解活性が認められなかった。一方、*chiI* は SAY3 株ゲノムに唯一存在するエキソ型 *N*-アセチルグルコサミニダーゼをコードする遺伝子である。今回は、両酵素の生理学的役割を調査するため、SAY3 株における目的遺伝子の破壊系を構築した。

【方法と結果】

遺伝子破壊は Mohamad らによる allele exchange 法(2)を改変して行った。*chiF* および *chiI* 遺伝子の上流および下流側領域を、それぞれ隣り合わせにグラム陰性細菌用広宿主域 suicide 型ベクターである pMo130 に挿入した。構築したプラスミドは、大腸菌から SAY3 株に接合伝達させたのち、ゲノム中の該当遺伝子領域で相同組換えを起こさせて、プラスミド全体が挿入された kanamycin 耐性株を得た。続いて、2 回目の相同組換えを起こさせて、ゲノムからプラスミドが切り出された結果生じる *chiF* および *chiI* の遺伝子破壊株（kanamycin 感受性）を選抜した。*chiF* 遺伝子破壊株は、キチン培地における増殖速度およびキチン分解活性をはじめとする表現型において、野生株との間で差異は認められなかった。一方、*chiI* 遺伝子破壊株はキチン培地において親株と同程度の増殖速度を示した。しかし、*chiI* 遺伝子が破壊された結果、培養上清中の pNP-GlcNAc 分解活性は野生株の 0.1%に低下していた。それにも関わらず、破壊株の粗酵素抽出液には pNP-GlcNAc および GlcNAc2 量体に対する分解活性が残存していたことから、キチンの分解資化に関与する別のエキソ型 *N*-アセチルグルコサミニダーゼ酵素が存在することが示唆された。現在、本酵素の精製、性質調査を試みている。

(1) Sato *et al.*, J. Gen. Appl. Microbiol., 55, 147-153, (2009)　(2) Mohamad *et al*., Gene, 430, 123-131 (2009)

Chitiniphilus shinanonensis, gene disruption, exo-*N*-acetylglucosaminidase

講演番号：2D02p10
講演日時、会場：3 月 28 日 15:38～ D 校舎 02 会場

Paenibacillus 属細菌由来キチン分解酵素 ChiW の N 末端領域の解析

Characterization of the N-terminal region of *Paenibacillus* chitinase ChiW

○伊藤 貴文[1]、日ビ 隆雄[1]、高宮 杏奈[1]、鈴木 史子[1]、杉本 郁美[1]、藤井 豊[2]、武藤 明[3]、木元 久[1] ([1]福井県大・生物資源、[2]福井大・医、[3]福井工大・工)
○Takafumi ITOH[1], Takao HIBI[1], Anna TAKAMIYA[1], Fumiko SUZUKI[1], Ikumi SUGIMOTO[1], Yutaka FUJII[2], Akira TAKETO[3], Hisashi KIMOTO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Univ. of Fukui, [3]Fukui Univ. of Tech.)

【目的】*Paenibacillus* sp. str. FPU-7 は真菌細胞壁の分解能力に優れたグラム陽性の土壌細菌である。本細菌は複数種のキチン加水分解酵素(キチナーゼ)群を菌体外に分泌することが明らかとなっているが(1)、キチナーゼ ChiW も同時に細胞表層に提示している。ChiW は細胞表層で真菌細胞壁キチンを分解する際に働くことが示唆される。我々は、ChiW によるキチン分解の分子機構を明らかにすることにより、環境負荷の少ない不溶性多糖の効率的な分解方法の開発を目指している。これまでに、本酵素の大腸菌大量発現系を構築し、精製酵素の諸性質を明らかにした。また、アミノ酸配列の相同性検索から、ChiW にはシグナルペプチド(1-30)の他に、自身の細胞壁表層(Surface layer)に結合するためのドメイン(Surface layer homology domain, SLH, 31-197)と 2 つの触媒ドメイン(Glycoside hydrolase family 18, GH-18, 464-1418)が存在した。SLH と GH-18 の間には約 300 残基の機能不明領域がある。今回、この領域の機能を明らかにするため、大腸菌による大量発現系の構築と不溶性多糖との結合実験を行った。

【方法】アミノ酸配列 198 から 449 のみからなる領域の大腸菌大量発現系を構築した。タンパク質は大腸菌細胞質中に大量に発現させた後、固定化金属イオンアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。次に、不溶性の多糖であるキチン、キトサン、β-1,3-グルカン、キシラン、セルロースの 1% (W/W)懸濁溶液を調製し、精製タンパク質と 4℃で 1 時間混合した。そして、ポアサイズ 0.45 μm でのフィルターろ過を行うことで、多糖と結合した画分を得た。最後に多糖と結合したタンパク質を SDS-PAGE サンプルバッファーで回収し、結合量を SDS-PAGE で確認した。

【結果と考察】ChiW に含まれる機能不明の領域はキチンやキトサン(添加した総タンパク質の 17%が結合)よりもβ-1,3-グルカン(84%)、キシラン(62%)、セルロース(58%)と良く結合した。ChiW は ChiW の直接の基質であるキチンよりも捕食標的の細胞壁に含まれる他の多糖と結合することで細胞壁キチンを効率よく分解することが示唆された。

(1) Itoh, T. Hibi, T., Fujii, Y., Sugimoto, I., Fujiwara, A., Suzuki, F., Iwasaki, Y., Kim, J-K., Taketo, A. and Kimoto, H. *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 7482–7490, 2013.

Chitinase, *Paenibacillus*, Chitin

講演番号：2D02p11
講演日時、会場：3 月 28 日 15:49～ D 校舎 02 会場

ユーグレナ由来キチナーゼのクローニング，発現および酵素化学的諸性質

cDNA cloning, expression, and characterization of chitinase from *Euglena gracilis*

○具志堅 央、菅田 瑚紅、伊藤 進、平良 東紀（琉大農）
○Chika GUSHIKEN, Kobeni SUGATA, Susumu ITO, Toki TAIRA (Ryukyu Univ.)

[目的]

キチナーゼ(EC 3.2.1.14)は、キチンの N-アセチル-β-1,4 - グルコサミニド結合を加水分解する酵素である。キチナーゼは細菌、真菌類、植物および動物など生物界に広く見出されている酵素であり、それぞれの生物で様々に異なる生理的役割を果たしていると考えられている。例えば、細菌由来キチナーゼは環境に存在するキチンを分解資化するために生産されると考えられる。植物においては細胞壁成分としてキチンを含む病原性真菌類に対する生体防御機構の一部と考えられている。外骨格の構成成分としてキチンをもつ昆虫や甲殻類では脱皮のために、またキチン質を含む生物を捕食する動物では、その消化のためにキチナーゼが必要である。一方、キチナーゼの原生生物における研究はほとんど無く、その役割は未解明である. 本研究では、原生生物の 1 種であるユーグレナ（*Euglena gracilis*）由来キチナーゼの cDNA クローニングを行い、大腸菌で発現させ, 酵素化学的諸性質について調べた。

[方法]

Euglena gracilis の EST データベースよりキチナーゼをコードすると推定された配列断片(713 塩基)を得た。EST 配列をもとにプライマーを作製し、*E. gracilis* 由来 mRNA から合成した cDNA を鋳型に、5'RACE および 3'RACE 法により *E. gracilis* のキチナーゼ候補遺伝子のクローニングを行った。得られた配列のうち、触媒ドメインをコードする領域を発現用ベクターpET22b に連結し、大腸菌 Rosetta-gami(DE3 株)に導入し、形質転換体を得た。IPTG 誘導により得られたリコンビナントキチナーゼを精製し、その諸性質を調べた。キチナーゼ活性の測定には基質としてグリコールキチンを用いた。オリゴ糖の分解パターンは、Amido-80 カラムを装着した HPLC により解析した。

[結果・考察]

cDNA クローニングの結果、*E. gracilis* 由来キチナーゼ(EgChi)候補遺伝子断片 2448 塩基を得た。推定アミノ酸配列の解析により、EgChi は少なくとも触媒ドメイン(糖質加水分解酵素ファミリー18)とキチン結合ドメイン(糖質結合モジュールファミリー18)が 2 回繰り返す構造を含んでいることが分かった。C 末端側の触媒ドメインのみを大腸菌で発現させ解析を行った。最適 pH は pH 3.0 付近、最適温度は 50℃付近であることがわかった。キチンオリゴ糖の加水分解パターンより、本酵素は基質の結合部位のアノマー型を維持するリテイニング酵素であり、4 糖から 2 糖への分解速度が速いことなどがわかった。

chitinase, Euglena, chitin

講演番号：2D02p13
講演日時、会場：3 月 28 日 16:10～ D 校舎 02 会場

ガジュマル（*Ficus microcarpa*）乳液由来キチナーゼ-B のクローニング，発現および抗真菌活性
cDNA cloing, expression, and antifungal activity of chitinase from *Ficus microcarpa* latex

○平良 東紀、平安名 一、西江 史人、伊藤 進 (琉大農)
○Toki TAIRA, Hajime HENNA, Fumihito NISHIE, Susumu ITO (Ryukyu Univ.)

[目的]
植物の乳管細胞は特殊化した細胞であり、その細胞内液は乳液（ラテックス）と呼ばれている。乳管細胞の役割は昆虫等による食害や侵入微生物に対する生体防御作用であると考えられている。我々は乳液中のタンパク質の役割を明らかにする目的で、これまでに生体防御タンパク質の一種とされているキチン分解酵素（キチナーゼ）を熱帯地方に分布するクワ科の常緑高木であるガジュマル（*Ficus microcarpa*）の乳液より複数単離している。そのうちの最も抗真菌活性の強かったキチナーゼの構造と機能について調べるために、本酵素をコードする遺伝子をクローニング、大腸菌による発現系を構築し、本酵素の諸性質および抗真菌活性について調べた。

[方法]
ガジュマル乳液より単離したキチナーゼ（Gazyumaru latex chitinase-B: GlxChi-B）の N 末端及び内部アミノ酸配列をもとに設計した縮重プライマーを用い、乳液より調製した mRNA から合成した cDNA を鋳型に、RT-PCR，5’RACE および 3’RACE 法により GlxChi-B 候補遺伝子のクローニングを行った。得られた ORF のうち N 末端および C 末端のシグナルを除くコード領域を発現用ベクターpET22b に連結し、大腸菌 Rosetta-gami (DE3) 株に導入し、形質転換体を得た。IPTG 誘導により得られたリコンビナントキチナーゼを精製し、その諸性質を調べた．キチナーゼ活性の測定には基質としてグリコールキチンを用いた。抗真菌活性の測定には *Trichoderma viride* を用いた。

[結果・考察]
クローニングの結果、318 アミノ酸残基をコードする 957 塩基の ORF を含む全長 1134 塩基の cDNA を得た。推定アミノ酸配列の解析により、GlxChi-B 遺伝子は N 末端の hevein 様キチン結合ドメイン（糖質結合モジュールファミリー18）と C 末端側の触媒ドメイン（糖質加水分解酵素ファミリー19）とがリンカーで結合された植物クラス I キチナーゼをコードしていることが分かった。N 末端には 22 残基の小胞体輸送シグナル配列があり、C 末端の LLLVDSM はタバコクラス I キチナーゼの液胞輸送シグナル配列と高い相同性があった。N 末端および C 末端のシグナルを除く領域を大腸菌で発現させ解析を行った。最適 pH は pH 7.0 付近であり、強い抗真菌活性が観察された。

chitinase, latex, antifungal activity

講演番号：2D02p14
講演日時、会場：3 月 28 日 16:21～ D 校舎 02 会場

ソテツ由来クラス V キチナーゼの結晶構造解析およびアロサミジン結合性
Crystal Structure and Allosamidin-Binding Property of a class V chitinase from cycad, *Cycas revoluta*

○梅本 尚之[1]、神田 有華[1]、大沼 貴之[1]、平良 東紀[2]、沼田 倫征[3]、作田 庄平[4]、深溝 慶[1]([1]近畿大院農・バイオ、[2]琉球大、[3]産総研、[4]東京大)
○ Naoyuki UMEMOTO[1], Yuka KANDA[1], Takayuki OHNUMA[1], Toki TAIRA[2], Tomoyuki NUMATA[3], Shohei SAKUDA[4], Tamo FUKAMIZO[1] ([1]Kinki Univ., [2]Univ. of Ryukyus, [3]AIST, [4]Univ. of Tokyo)

【目的】植物キチナーゼはアミノ酸配列の相同性に基づいて少なくとも 5 つのクラスに分かれており、クラス I、II、IV キチナーゼは Family GH19 に、クラス III、V キチナーゼは Family GH18 に分類されている。Family GH18 に分類されている植物キチナーゼのうち、クラス V キチナーゼは、生物的と非生物的なストレスの両ストレスによって発現誘導され、多様な生理的役割を担っていると考えられる。我々の研究室において、シロイヌナズナ由来(AtChiC)、タバコ由来(NtChiV)およびソテツ由来(CrChi-A)の植物クラス V キチナーゼの構造と機能に関する研究が進められてきた。その中でも、CrChi-A は植物キチナーゼで初めて顕著な糖転移活性を有する酵素として報告されている。本研究では、CrChi-A および基質との複合体の結晶構造を決定するとともに、等温滴定カロリメトリー(ITC)により、阻害剤であるアロサミジンとの結合性を調べた。さらに、得られた結果を AtChiC と NtChiV と比較することにより、糖転移反応の触媒機構の解明を試みた。
【方法】大腸菌の発現系を用いて野生型 CrChi-A を発現させ、イオン交換および疎水性相互作用カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。精製酵素を用いて結晶化の初期スクリーニング(500 条件)を行った。また、キチンオリゴ糖との複合体結晶構造を決定するため、CrChi-A の不活性変異体(CrChi-A E119Q)を作製し野生型と同条件での結晶化を行なった。さらに、アロサミジンとの結合性を調べるために、20 mM リン酸カリウムバッファー pH 6.0 の条件下で、MicroCal 社製 iTC200 を用いて ITC 測定を行なった。
【結果】結晶化スクリーニングを行った結果、野生型 CrChi-A の結晶化に成功し、1.6 Å 分解能で結晶構造を決定することに成功した。さらに、CrChi-A E119Q とキチンオリゴ糖との複合体結晶構造を決定した。得られた結晶構造を AtChiC および NtChiV と比較した結果、プラス側サブサイトに存在するループ構造に違いがみられた。また、オリゴ糖との複合体結晶構造から、そのループ構造に存在する芳香族アミノ酸残基がアクセプター分子の結合に重要であることが示唆された。さらに、アロサミジンを用いた ITC 測定により熱容量変化(ΔC_p)を求めたところ、AtChiC と NtChiV はそれぞれ-135 cal/K mol、-125 cal/K mol であるのに対し、CrChi-A においては-47 cal/K mol であった。この結果とアロサミジンがマイナス側サブサイトに特異的に結合することから考え、CrChi-A は、マイナス側サブサイトの基質結合に伴う脱水和が AtChiC、NtChiV と比べて少ないと推定できる。現在、これらのデータと CrChi-A の高能率な糖転移反応触媒能との関連を調べている段階である。

Plant class V chitinase, Allosamidin, Crystal structure

講演番号：2D02p15
講演日時、会場：3 月 28 日 16:32～ D 校舎 02 会場

ループ 3 欠損型ファミリー１９キチナーゼの構造と機能

Structure and function of family GH 19 chitinase lacking the loop 3

○大沼 貴之[1]、高木 丈二[1]、近藤 香織[1]、沼田 倫征[2]、梅本 尚之[1]、深溝 慶[1] ([1]近畿大農、[2]産総研)
○ Takayuki OHNUMA[1], Jyoji TAKAGI[1], Kaori KONDO[1], Tomoyuki NUMATA[2], Naoyuki UMEMOTO[1], Tamo FUKAMIZO[1] ([1]Kinki Univ., [2]AIST)

[緒言]
糖質加水分解酵素ファミリー19 に分類されるキチナーゼは、構造上主に 6 つのループ構造すべてを有する loopful 型と、ループ 3 を除くすべてのループを欠損している loopless 型に分けられる。また、ループ 3 のみを欠損しているループ 3 欠損型も存在している。我々はこのループ 3 欠損型ファミリー19 キチナーゼの構造と機能に興味をもち、本酵素の酵素学的性質を調べた。また、酵素の X 線結晶構造解析を試みた。
[実験方法]
ライムギに見いだされたループ 3 欠損型ファミリー19 キチナーゼ CHT46 の遺伝子を取得した(1)。成熟タンパク質をコードする領域を pETBlue-1 に連結後、大腸菌 SHuffle に導入しリコンビナント CHT46 を生産させた。CHT46 の精製は、6xHis タグアフィニティーおよび Sephacryl S-100 によるゲル濾過クロマトグラフィーによって行った。キチンオリゴ糖の切断様式は、TSKgel G2000PW カラムを連結した HPLC システムによって分析した。酵素の結晶は濃度を 5 mg/ml に濃縮後、シッティングドロップ蒸気拡散法によって作製した。
[結果]
CHT46 によるキチンオリゴ糖の切断様式を調べた結果、6 糖→2 糖+4 糖および 3 糖+3 糖、5 糖→2 糖+3 糖、4 糖→2 糖+2 糖および 3 糖+単糖、3 糖→2 糖+単糖の様式で切断した。この切断様式は loopful 型キチナーゼ RSC-c と loopless 型である BcChi-A のオリゴ糖切断様式とよく似ていたが、4 糖→3 糖+単糖の切断様式は、CHT46 を用いた時のみ見られた。RSC-c および BcChi-A とキチンオリゴ糖 4 糖との複合体構造を調べた結果、ループ 3 は基質との結合に直接関与していないことがわかった (2、3)。しかしループ 3 はグリコン結合部位側に存在していることから、欠損により CHT46 の同結合部位における基質結合力に何らかの影響がもたらされたものと考えられた。現在得られた CHT46 の結晶の構造解析を行っている。

1. Yeh et al, Plant Physiol., 124, 1251-64 (2000)
2. Ohnuma et al., FEBS Lett., 587, 2691-7 (2013)
3. Ohnuma et al., Submitted

Chitinase, Crystal structure, GH19

講演番号：2D02p16
講演日時、会場：3 月 28 日 16:43～ D 校舎 02 会場

Serratia marcescens 2170 由来 CBP21 のファミリー19 キチナーゼによるキチン分解への効果
Effect of CBP21 from *Serratia marcescens* 2170 on family 19 chitinases

高橋 亮大[1]、森山 拓実[1]、猪又 義広[1]、杉本 華幸[1,2]、中川 裕子[3]、鈴木 一史[1,2]、戸谷 一英[3]、○渡邉 剛志[1,2] ([1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大農・応生化、[3]一関高専・物化工)
Ryota Takahashi[1], Takumi Moriyama[1], Yoshihiro Inomata[1], Hayuki Sugimoto[1,2], Yuko Nakagawa[3], Kazushi Suzuki[1,2], Kazuhide Totani[3], ○Takeshi Watanabe[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. & Tech., Niigata Univ., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Facul. Agric., Niigata Univ., [3]Ichinoseki National College of Technology)

【目的】*Serratia marcescens* 2170 は、キチンまたはキチンオリゴ糖存在下で培養すると 3 つのキチナー ゼ(ChiA, ChiB, ChiC1)とキチン結合タンパク質 CBP21 を分泌する。このうち、CBP21 は、当初キチナーゼ活性を持たないキチン結合蛋白質として発見されたが、比較的最近 V.G.H. Eijsink らのグループによってこのタンパク質が酸化酵素であることが報告され、現在 Lytic polysaccharide monooxygenase として CAZy データベースの AA10 に分類されている。そして、このグループのタンパク質は、キチナーゼやセルラーゼによる不溶性／結晶性の多糖の分解を促進する活性を持つことから、バイオマス変換の有力なツールとなることが期待され、注目されている。本研究では、CBP21 のファミリー１９キチナーゼによるキチン分解に対する効果を調べるため、微生物由来のファミリー１９キチナーゼとして *Streptomyces griseus* HUT6037 の ChiC および 海洋細菌 *Vibrio fisheri* MKT20 株由来 Chi19b、植物のファミリー１９キチナーゼとしてイネキチナーゼ Cht-2 (別名 OsChia1b)を用いて、CBP21 の分解促進効果を検証した。
【方法・結果】用いたキチナーゼのうち、イネキチナーゼ Cht-2 は植物クラスⅠに属し、触媒ドメインに特徴的な５つのループ構造を持つキチナーゼであり、*S. griseus* HUT6037 の ChiC は５つのうち３つのループ構造を欠いている。また、*V. fisheri* の Chi19b は、微生物のファミリー１９キチナーゼとしては珍しい植物クラスⅠキチナーゼに特徴的なループ領域に相当するアミノ酸配列を持つキチナーゼである。まず、*V. fisheri* の Chi19b については大腸菌を用いた発現系を構築し、ヒドロキシアパタイトカラムを用いて精製した。*S. griseus* HUT6037 の ChiC とイネキチナーゼ Cht-2 については、常法により精製標品を得た。CBP21 無添加の場合、コロイダルキチンに対する分解活性は ChiC＞Cht-2＞Chi19b の順であった。また, Cht-2 と Chi19b では３糖以上のオリゴ糖が検出された。これらのキチナーゼに対する CBP21 の分解促進効果を、コロイダルキチンを基質としてアスコルビン酸の存在・非存在下で分析した。CBP21 はアスコルビン酸存在下でのみすべてのキチナーゼに促進効果を示し、分解活性を２倍から４倍に増加させた。特に Chi19b に対する促進効果が顕著であった。また、CBP21 の添加は、生成したキチンオリゴ糖のパターンに有意な影響を与えなかった。

Chitinase, CBP21, AA10

講演番号：2D02p17
講演日時、会場：3 月 28 日 16:54～ D 校舎 02 会場

Gongronella butleri の生産する exo-chitobiohydrolase の切断特異性
Cleavage specificity of an exo-chitobiohydrolase from *Gongronella butleri*
○西山 安江、川野 明日香、古田 椋子、関 清彦、光富 勝（佐賀大農）
○Yasue NISHIYAMA, Asuka KAWANO, Ryoko FURUTA, Kiyohiko SEKI, Masaru MITSUTOMI (Saga Univ.)

【目的】キチン質分解酵素は真菌類の成長と形態形成に重要な役割を果たしているばかりでなく、キチン質の効率的分解やオリゴ糖の調製に有用である。キトサン分解酵素にはエンド型の chitosanase (EC 3.2.1.132)とエキソ型の exo-β-D-glucosaminidase (EC 3.2.1.165)が報告されているが、キトサンをキトビオース単位で切断するエキソ型の酵素である exo-chitobiohydrolase についての詳細な研究は少なく、その切断特異性、触媒機構、立体構造については明らかにされていない。我々は、*Gongronella butleri* NBRC105989 がキトオリゴ糖の存在下において誘導的に exo-chitobiohydrolase を生産することを見出した。本研究では、ヘテロキトオリゴ糖を基質に用いて本酵素の切断特異性について検討した。
【方法】キトオリゴ糖を含む培地で本菌株を 25℃で 7 日間振盪培養し、得られた培養上清を塩析後、さらに CM-Sephadex C-50 および Sephadex G-100 を用いて精製し、電気泳動的に均一な酵素標品を調製した。基質として用いたヘテロキトオリゴ糖は部分 *N*-アセチルキトサンを酵素分解することにより調製した。キトオリゴ糖を基質にしたときの分解活性は分解生成物を Rondle-Morgan 法により定量することにより求めた。また、ヘテロキトオリゴ糖の分解生成物は HPLC および TLC により分析した。
【結果】本酵素はキトサンおよび重合度 4 以上のキトオリゴ糖を分解したが、キチン、コロイダルキチンおよびカルボキシルメチルセルロースは分解しなかった。また、本酵素によるキトサンの分解生成物を TLC で分析したところ、生成物は$(GlcN)_2$のみであった。本酵素は還元末端に GlcNAc を有する$(GlcN)_5$-GlcNAc を分解し、$(GlcN)_2$、GlcN-GlcNAc および$(GlcN)_3$-GlcNAc を生成した。また、$(GlcN)_2$-GlcNAc-$(GlcN)_2$-GlcNAc からは $(GlcN)_2$および GlcNAc-$(GlcN)_2$-GlcNAc を生成した。一方、GlcN-$(GlcNAc)_2$-GlcN-GlcNAc および GlcN-GlcNAc-$(GlcN)_3$は分解されなかった。これらの結果から、本酵素はキトサンを非還元末端側から 2 糖単位で分解し、GlcN-GlcN および GlcN-GlcNAc 間を切断するが、GlcNAc-GlcN および GlcNAc-GlcNAc 間は切断しないことが明らかとなった。

exo-chitobiohydrolase, cleavage specificity, *Gongronella butleri*

講演番号：2D02p19
講演日時、会場：3 月 28 日 17:15～ D 校舎 02 会場

Serratia marcescens 2170 のキチン分解利用機構　－*chiPQ-ctb* オペロンの機能－
Chitin degradation and utilization system of *Serratia marcescens* 2170　-Function of *chiPQ-ctb* operon-

○三浦 拓馬[1]、今井 裕也[1]、小川 知佐奈[1]、杉本 華幸[1,2]、鈴木 一史[1,2]、渡邉 剛志[1,2]([1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大・農・応生化)
○Takuma Miura[1], Yuya Imai[1], Chisana Ogawa[1], Hayuki Sugimoto[1,2], Kazushi Suzuki[1,2], Takeshi Watanabe[1,2] ([1]Tech., Niigata Univ, [2]Facul. Agric., Niigata Univ)

【目的】*Serratia marcescens* はキチナーゼ高生産菌として知られており、これまで多くの研究者の関心を集めてきた。我々は、*S. marcescens* 2170 株をモデルに、自然界におけるキチン循環のキーステップを理解すべく、*S. marcescens* のキチン分解利用機構の全体像の解明を目指している。*S. marcescens* 2170 は、キチンまたはキチンオリゴ糖存在下で培養すると 3 つのキチナー ゼ(ChiA, ChiB, ChiC)とキチン結合タンパク質 CBP21 を分泌する。これらのタンパク質の発現には転写調節因子 ChiR が必須である。また本菌のペリプラズムおよび細胞外にはキトビアーゼ が存在し、キチンの分解によって生ずる $(GlcNAc)_2$ を部分的に GlcNAc に変換する。GlcNAc および $(GlcNAc)_2$ の細胞質内への取り込はそれぞれに特異的な PTS 系によっておこなわれ、PTS による $(GlcNAc)_2$ の取り込みがキチナーゼおよび CBP21 の発現に必須であることがわかっている。さらに、最近 ChiR 及び *chiPQ-ctb* オペロンの発現が small RNA ChiX によって制御されていることが明らかとなった。*chiPQ-ctb* オペロンは、キトポリンと推定されるタンパク質、機能未知のリポタンパク質およびキトビアーゼをコードしている。

本研究では、*S. marcescens* のキチン分解利用系をさらに詳細に解明するために、一昨年度の本大会で報告したキチン分解利用関連遺伝子 *chiP*, *chiQ*, *chiX* を Allelic exchange により欠損させた変異株の性質を解析し、それらの遺伝子および遺伝子産物のキチン分解利用における重要性とその機能の解明を試みるとともに、新たにキトビアーゼ遺伝子の欠損株を取得しその性質を解析した。

【方法・結果】*chiP*, *chiQ*, *chiX* の欠損変異株Δ*chiP*, Δ*chiQ*, Δ*chiX* のキチン分解利用における重要性を調べるため、異なる鎖長のキチンオリゴ糖を添加した M9 最少培地を用いて、それぞれの欠損変異株の生育を観察した。その結果、Δ*chiP* は低濃度の $(GlcNAc)_2$ での生育が顕著に低下し、さらに３糖以上のキチンオリゴ糖ではほとんど生育できなかった。そして、ChiP が外膜に検出されるなどの他のデータとあわせて、*chiP* がキトポリンをコードしていると結論づけた。次に、キトビアーゼのキチン分解利用における重要性を調べるために、キトビアーゼ遺伝子の欠損株Δ*ctb* を構築した。Δ*ctb* は２糖ばかりでなく３糖以上のキチンオリゴ糖での生育が顕著に低下し、２糖以上のキチンオリゴ糖の利用に重要であることがわかった。以上のことから、*chiPQ-ctb* オペロンはキチンオリゴ糖の利用に必須の非常に重要な役割を担っていることが明らかとなった。これらの研究の過程で存在が明らかとなった *S. marcescens* 2170 の新規キチナーゼについても、キチン分解利用系の一部として報告する。

Chitinase, Chitobiase, Chitoporin

講演番号：2D02p20
講演日時、会場：3 月 28 日 17:26～ D 校舎 02 会場

small RNA を介した *Serratia marcescens* キチン分解利用系制御への NagC 及び ChbR の関与
Involvement of NagC and ChbR in the regulation of chitin degradation and utilization system through small RNA in *Serratia marcescens*

鈴木 一史[1,2]、○小川 知佐奈[1]、南 晴香[2]、杉本 華幸[1,2]、渡邉 剛志[1,2]（[1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大・農・応生化）
Kazushi SUZUKI[1,2], ○Chisana OGAWA[1], Haruka MINAMI[2], Hayuki SUGIMOTO[1,2], Takeshi WATANABE[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. & Tech., Niigata Univ., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Facul. Agric., Niigata Univ.)

Serratia marcescens は不溶性多糖キチンの分解能に優れた細菌として良く知られており、プロセッシブ型キチナーゼ（ChiA 及び ChiB）、エンド型キチナーゼ（ChiC）、キチン鎖を切断して酸化末端を生じるキチン結合タンパク質 CBP21 を生産し、これらの相乗効果によって効率的にキチンを分解し利用している。*S. marcescens* 2170 の 3 種のキチナーゼと CBP21 の誘導生産には、分解産物である $(GlcNAc)_2$ と転写調節因子 ChiR が必須であり、$(GlcNAc)_2$ の効率的な利用には$(GlcNAc)_2$ のみならず GlcNAc の菌体内への取込み機構と$(GlcNAc)_2$ を GlcNAc に分解するキトビアーゼが重要である。さらに我々は、外膜タンパク質やキトビアーゼをコードしている *chiPQ-ctb* オペロンの遺伝子上流非翻訳領域（5'UTR）に相補配列を有する「アンチセンス型 small RNA, ChiX」が、*chiR* の発現抑制を介してキチナーゼ及び CBP21 の発現を制御するモデルを報告した。*chiP* 5'UTR の発現によりキチナーゼが発現することから、ChiX が *chiP* 5'UTR に結合することで *chiR* の発現抑制が解除されると考えられる。したがって、*chiP* の発現によってキチナーゼの発現が可能となると考えられた。今回、*chiP* の発現調節機構を明らかにするため、２つの転写調節因子に着目した。

野生株において、*chiP* の発現は、$(GlcNAc)_2$ により強く誘導されるが、GlcNAc によっても低レベルで誘導された。また、*chiP* 上流配列の解析から、GlcNAc の取り込みと代謝に関する *nag* オペロンの転写抑制因子 NagC が *chiP* の転写に関与していると考えられた。そこで、*nagC* 破壊株を構築し、*chiP* の発現及びキチナーゼ生産への影響について調べた。野生株と *nagC* 破壊株における培養上清のキチナーゼ及びキトビアーゼ活性はザイモグラムによって、*chiP* mRNA は RT-PCR によって検出した。*nagC* を破壊したことで、GlcNAc 非存在下においても、GlcNAc 誘導時と同等のキトビアーゼ生産と *chiP* 発現が認められた。このことは、NagC が *chiP* の転写を抑制していることを示唆していた。

また、*chiP* の転写は GlcNAc よりも$(GlcNAc)_2$ により強く誘導されたことから、NagC 以外の転写調節因子の関与も考えられた。 *E. coli* において、$(GlcNAc)_2$ の取り込みと代謝に関する *chb* オペロンに存在する転写調節因子 ChbR は、*chb* オペロンの転写を活性化することが報告されている。さらに、*Salmonella* において、*chbR* にトランスポゾンが挿入された株では、$(GlcNAc)_2$ による *chiP* 発現の誘導が減少したことが報告された。以上のことから、*S. marcescens* において、*chiP* の転写は ChbR によって活性化されると予想された。そこで、*chbR* 欠損株を構築し、*chiP* 及びキチナーゼ発現への ChbR の関与について解析中である。

Chitinase, small RNA, *Serratia marcescens*

講演番号：2D02p21
講演日時、会場：3 月 28 日 17:37～ D 校舎 02 会場

2 種の Shewanella 属由来キチンオリゴ糖脱アセチル化酵素の酵素化学的性質の解明

Characterization of two types of chitinoligosaccharide deacetylase from the genus Shewanella

○白石 晴香[1]、上原 理絵[1]、平野 貴子[2]、加藤 達[2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科、[2]日大生資科)
○HARUKA SHIRAISHI[1], RIE UEHARA[1], TAKAKO HIRANO[2], TATSURU KATO[2], WATARU HAKAMATA[1,2], TOSHIYUKI NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】海洋細菌には海底土壌中に蓄積したキチン塊を酵素分解し、栄養源として資化しているものがある。これらの細菌は、キチナーゼを分泌してキチンからジ-*N*-アセチルキトビオース[$(GlcNAc)_2$]を生産しているが、一部の *Vibrio* 属はさらにキチンオリゴ糖脱アセチル化酵素(COD)を分泌し、β-D-*N*-アセチルグルコサミニル-(1,4)-D-グルコサミン(GlcNAc-GlcN)を生産する。これまでに我々は、本ヘテロ二糖が COD 生産性細菌に対して特異的な酵素生産誘導因子や遊走性因子として働くことを解明してきた。また、数種の *Vibrio* 属由来 COD の諸性質についても、本大会で報告してきた。しかし、既報の COD 生産性細菌はいずれも *Vibrio* 属であり、その他の属種からの報告はない。我々は新たに *Shewanella* 属の 2 菌種が COD 遺伝子を有することを発見し、本属種由来 COD はそのアミノ酸配列から *Vibrio* 属と同じタイプの COD と新規なタイプの COD が存在することを確認した。本大会では両 COD の酵素化学的性質について報告する。

【方法と結果】全ゲノム配列が解明されている菌の中から、BLAST 検索により *Vibrio* 属由来 COD のアミノ酸配列と相同性の高い配列を有する菌を探索したところ、*Shewanella woodyi* と *Shewanella baltica* を発見した。2 菌種由来 COD のアミノ酸配列について数種のプログラムを用いてモチーフ検索を行ったところ、*S. woodyi* 由来のものは既報の *Vibrio* 属由来 COD と同様に 1 つの polysaccharide deacetylase domain (catalytic domain)と 2 つの carbohydrate binding domain (CBD)を有しており、*S. baltica* 由来のものは catalytic domain と CBD を 1 つずつ有していることが確認できた。また、*S. woodyi* 由来推定 COD アミノ酸配列は *Vibrio* 属由来 COD と概ね 64 – 67%の相同性を示し、*S. baltica* 由来推定 COD と *Vibrio* 属由来 COD の各 catalytic domain のアミノ酸配列の相同性は 44 – 48%程度であった。以上より、これら 2 菌種は COD 生産性細菌と判断でき、これは *Vibrio* 属以外で初めての報告となる。中でも、*S. baltica* 由来 COD はそのモチーフ数から新しいタイプの COD であると考えられる。これらの酵素化学的性質の決定を行うために、本研究ではまずリコンビナント体の作製を行うことにした。2 菌種のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、推定 COD 遺伝子を増幅させ pET21-(+)ベクターに連結した。その後、大腸菌宿主を検討し、発現条件を決定した。両リコンビナント COD を精製し、至適 pH や至適温度、基質特異性などを調べた。

chitin oligosaccharide deacetylase, characterization, Shewanella

講演番号：2D02p22
講演日時、会場：3 月 28 日 17:48～ D 校舎 02 会場

沖縄県の土壌より単離した微生物が生産するキトサナーゼ

Chitosanases produced by microorganisms from soil of Okinawa

○佐久本 太一（沖縄高専生物資源）
○Taichi SAKUMOTO (ONCT)

【緒言】沖縄県は、温暖な亜熱帯性の気候で、生物多様性の高い地域である。この生物多様性の高さは土壌中の細菌など微生物にも及んでいると推定される。これら多様な微生物が生産する酵素もまた多様性に富んでいると考えられる。これまでにキトサナーゼは糖質加水分解酵素のファミリー3、5、7、8、46、75、80 に属するものが報告されてきた。生物多様性の高い沖縄の土壌から新規のキトサナーゼを見出すことを目的とし、キトサン分解酵素生産菌のスクリーニングを行った。
【材料と方法】沖縄県各地の土壌を採取し、サンプルとした。それぞれの土壌を滅菌水に懸濁し、静置した上清を 0.2%コロイダルキトサン最小寒天培地に塗布した。30℃で培養し、コロイダルキトサン分解斑の形成を観察してキトサン分解酵素生産菌のスクリーニングを行った。単離できた菌株のキトサン分解酵素について各種カラムクロマトグラフィーによる精製や性質の検討を行った
【結果】石垣島の海岸付近の土壌から２株、沖縄本島北谷の土壌から１株、沖縄本島宜野湾の土壌から１株のキトサン分解酵素を分泌する微生物を単離した。それぞれの菌株について 16SrRNA 遺伝子の塩基配列による系統解析を行った。石垣島由来の 1 株が生産するキトサン分解酵素の精製及び性質の一部については報告済みである。今回は本酵素の N 末端アミノ酸配列についても検討した。
また、北谷株・宜野湾株から分泌されるキトサン分解酵素についてもその性質を検討した

Chitin.Chitosan, Chitosanase

講演番号：2D02p23
講演日時、会場：3 月 28 日 17:59～ D 校舎 02 会場

Paenibacillus sp. IK-5 キトサナーゼのキトサン結合モジュール: キトサン結合に関わるアミノ酸残基
Chitosan-binding modules in *Paenibacillus* sp. IK-5 chitosanase: Amino acid residues responsible for chitosan binding

○新家 粧子[1]、尾井 宏美[2]、大沼 貴之[1]、木元 久[3]、草桶 秀夫[4]、深溝 慶[1] ([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]福井県大・生、[4]福井工大・工)
○Shoko Shinya[1], Hiromi Oi[2], Takayuki Ohnuma[1], Hisashi Kimoto[3], Hideo Kusaoke[4], Tamo Fukamizo[1] ([1]Grad. Kinki Univ., [2]Kinki Univ., [3]Fukui Pref. Univ., [4]Fukui Univ. Tech.)

目的　我々は、*Paenibacillus* sp. IK-5 が生産するキトサナーゼの、Family GH8 触媒ドメインの C 末端側に 2 つ縦列して存在する糖質結合モジュール(CBM32)、DD1 および DD2、がキトサンオリゴ糖[(GlcN)n]に対して高い特異性をもつことを見出した[1)]。DD1 と DD2 は 72%のアミノ酸配列相同性をもつにも関わらず、DD1 は DD2 よりも明らかに高い(GlcN)n との親和性を示す。NMR による滴定実験とドッキング計算によってこれら 2 つのドメインの(GlcN)n 結合部位を予測できたが、これらが(GlcN)n にのみ高い特異性を示す構造的な要因はまだ明らかでない。そこで、DD1 と DD2 の結合部位に存在するアミノ酸残基について部位特異的変異導入を行い、(GlcN)n との相互作用解析を行った。
方法　部位特異的変異法により、DD1 の 36 番目の Glu 残基をそれぞれ、Tyr、Gln に変異させた変異体 E36Y、E36Q を作製した。また、DD2 の 36 番目の Tyr 残基を Glu、Gln に変異させた Y36E および Y36Q 変異体を作製した。これらの変異体を用いて、CD スペクトルによる(GlcN)n 結合に伴う熱安定性の上昇より、結合性を評価した。また、ITC を用いてキトサン 4 糖の結合に伴う熱力学定数を求めた。
結果　各変異体の CD スペクトルによる熱変性実験の結果、DD1-WT, E36Y, E36Q はそれぞれ$(GlcN)_4$との結合に伴って、16.4, 2.4, 4.7 ℃ の熱安定性上昇がみられた。また、DD2-WT, Y36E, Y36Q を用いて同様の実験を行った結果、5.6, 10.0, 10.0 ℃ の熱安定性上昇がみられた。ITC による$(GlcN)_4$滴定実験より、DD1-WT の結合定数が 5.0×10^5 M^{-1} であるのに対し、DD1-E36Y は 5.6×10^3 M^{-1} であった。また、DD2-WT と DD2-Y36E の結合定数はそれぞれ 6.0×10^3 M^{-1} と 2.9×10^4 M^{-1} であった。以上より、DD1 の Glu 残基の変異が(GlcN)n との結合力を大きく低下させること、また、DD2 の Tyr36 を Glu 残基に変異させることによって結合力が上昇することが明らかになり、このことから、DD1 と DD2 の(GlcN)n に対する結合力の差には、36 番目に存在するアミノ酸残基が関与していることが明らかになった。しかしながら、DD2 において Tyr 残基を Gln に変異させた DD2-Y36Q の結合定数は 7.2×10^4 M^{-1} であり、DD2-Y36E とほぼ同程度の結合力を示すことから、DD2 の Tyr36 の Glu 残基への置換による結合力の上昇は、キトサンオリゴ糖との静電気的相互作用の形成によるものではないと考えられる。現在、各変異体のより詳細なオリゴ糖結合様式を明らかにするため、NMR を用いたキトサンオリゴ糖滴定実験を行っている。

1) Shinya et al., J. Biol. Chem. 288, 30042-53, 2013

chitosanase, chitosan binding module, carbohydrate binding module

講演番号：3A01a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ A 校舎 01 会場

高収率・高生産型ホモブタノール生産菌を目指したクロストリジウム属微生物の育種

Strain improvement aimed at homo-butanol-fermentative Clostridia with high yield and high efficiency.

○向山 正治[1]、中ノ庄 正弘[1]、市毛 栄太[1]、土橋 幸生[1]、中山 俊一[2] ([1]株式会社日本触媒、[2]東京農業大学)
○ Masaharu Mukoyama[1], Masahiro Nakanosho[1], Eita Ichige[1], Yukio Dobashi[1], Shunichi Nakayama[2] ([1]Nippon Shokubai, [2]Tokyo University of Agriculture)

【目的】
n-ブタノールは化学品として広く使用されており、自動車向けの燃料としても利用可能であることから、近年、再生可能原料からの化学品生産の一環として ABE 発酵が再検討されている。ABE 発酵ではブタノール以外にアセトン、エタノールが著量生成するためブタノール収率が低い問題がある。日本で分離された Clostridium saccharoperbutylacetonicum ATCC27021 株はアセトン:ブタノール:エタノールを 3:6:1 の重量比で生成する。　この株を用いて n-ブタノールのみを生成するブタノールホモ発酵菌株の構築を目指して菌株の改良を行った。
【方法】
pKNT19 プラスミドをベースとして GroupII イントロンを使用した遺伝子破壊プラスミド pNS を作成した。　このプラスミドにリターゲッティング断片を挿入した後、C.sac ATCC27021 株を形質転換し、Cm 耐性を示したクローンを得た。この株を植え継ぎ培養した中からゲノム上に活性な Em 耐性遺伝子が挿入され Em 耐性になったクローンを分離した。この操作によって、ブタノール発酵に関与する遺伝子 pta、ptb1、ctfB、adc、ldh1 を破壊した株を取得した。　また薬剤耐性マーカーを切り出すためのプラスミド pKNT19C-FLP を形質転換し、ゲノム上に挿入された Em 耐性遺伝子を削除し、遺伝子破壊プラスミドで再度形質転換することで pta、ptb1 の両方が破壊された株、さらに ldh1 も破壊された株を取得した。
【結果】
作成した破壊株を培養評価したところ、Δpta 株では培養時に pH が低下し、生育不良となるとともに n-ブタノール収率が低下した。 Δptb1 株はアセトン生成が半減し、ブタノール収率が 15%向上した。Δptb1Δpta 株はアセトン生成が 1/20 に低下し、グルコースからのブタノール収率が理論収率の 85%に達した。(野生株 53mol%) さらに Δptb1 Δpta Δldh1 株では収率が 87mol%となった。　またオレイルアルコールを重層しグルコース高濃度条件で培養した場合、野生株では油層、水層合わせて 23.6g/L のブタノール生成（収率 41.2mol%）であったが、Δptb1Δpta 株では 2 倍以上の 52.5g/L(収率 84.1mol%)となった。
現在、産業上の利用性を更に高めるために、これらの株を親株として、より高濃度のブタノールを生成できる変異株を作成するとともに、ゲノムへの遺伝子導入方法を開発中である。

n-butanol, homo-butanol-fermentation, Clostridium saccharoperbutylacetonicum ATCC27021

講演番号：3A01a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ A 校舎 01 会場

デザインドバイオマスによるバイオプロセスの開発～ブタノール発酵でのセロビオースによるカーボンカタボライト抑制の回避とその機構の解明～

Development of bioprocess with designed biomass: Elimination of carbon catabolite repression by cellobiose in butanol fermentation and elucidation of its mechanism

○野口 拓也[1]、田代 幸寛[1]、酒井 謙二[1]、園元 謙二[1,2] ([1]九大院・農、[2]九大・バイオアーク)
○Takuya Noguchi[1], Yukihiro Tashiro[1], Kenji Sakai[1], Kenji Sonomoto[1,2] ([1]Fac. Agr., Kyushu Univ., Japan, [2]Bio-Arch., Kyushu Univ., Japan)

【背景】近年の世界的な気候変動や食糧問題に対する懸念によりリグノセルロース系バイオマスを原料とした再生可能エネルギーが盛んに研究されている。アセトン-ブタノール-エタノール発酵（ABE 発酵）によって生産されるブタノールは、エタノールと比較して優れた燃料特性を有しており、次世代バイオ燃料の一つとして注目されている[1)]。リグノセルロース系バイオマスは種々の前処理および糖化処理を経て、主にグルコース（G）やキシロース（X）を含む混合糖成分に加水分解される。しかしながら、グルコースはキシロースを含む他の糖類の消費を抑制するカーボンカタボライト抑制（CCR）を引き起こすことが知られており、これまで CCR の回避を目的とした ABE 発酵微生物の分子育種が研究されてきた。一方、我々はこれまでにグルコースをセロビオース（C）に置き換えたセロビオース/キシロース（CX）混合糖を用いることで、野生株による CCR を回避したブタノール生産に世界で初めて成功した[2)]。本研究では CCR 回避機構の解明および混合糖の実用性について発酵工学的、分子微生物学的観点から検討を行った。

【方法・結果】*Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 を使用菌株とし、30°C、嫌気条件下で 72 h 培養を行った。5-25 g/l の G、C と 30 g/l の X を含む三種混合糖において、各糖の消費挙動を比較した。その結果、30 g/l 未満の G 濃度では CCR が生じないということが明らかとなった。したがって、CCR は G の存在ではなくその濃度により制御されることが示唆された。また、エナジーケーン、広葉樹（ユーカリなど）のセルロース/ヘミセルロース比を基に、各バイオマスの加水分解物を想定した三種混合糖（それぞれ C40G5X20、C50G25X10）を基質とした発酵では、全ての糖が同時に消費され、それぞれ 16.1 g/l、14.7 g/l のブタノールが生産された。

次に、CCR 回避機構を調べるために、X 代謝経路の最上流に位置するキシロースイソメラーゼ（XI）とその下流のキシルロースキナーゼ（XK）について、CCR 条件および非 CCR 条件の両者間でこれらの酵素活性を測定した。非 CCR 条件下における XI 活性は CCR 条件下と比較して約 3 倍高いことが明らかとなった。一方、XK 活性は両者の間で有意な差は見られなかった。したがって、CCR 条件下では、XI が X 消費における律速酵素の一つであることが示唆された。今後はβ-グルコシダーゼ、糖輸送系および他の代謝酵素の活性測定とそれらの発現量測定を行い、CCR 回避機構の解明を試みる。

1) Tashiro et al., *Eng. Life Sci.,* 13, 432–445, 2013
2) Noguchi et al., *J. Biosci, Bioeng.,* 116, 716-721, 2013

Acetone-butanol-ethanol fermentation, Carbon catabolite repression, Xylose isomerase

講演番号：3A01a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ A 校舎 01 会場

オールパーム樹液からのバイオブタノール生産
Biobutanol production from oil palm trunk sap

○荒井 隆益[1]、オスマン スレイマン[2]、ロキア ハシム[2]、クナスンダリ バラクリシャン[2]、カーマ シュデシュ[2]、ウチタラ ボンルングノック[1]、森 隆[1]、小杉 昭彦[1] ([1]国際農研、[2]マレーシア理科大)
○Takamitsu Arai[1], Sulaiman Othman[2], Hashim Rokiah[2], Balakrishnan Kunasundari[2], Sudesh Kumar[2], Bomrungnok Wichittra[1], Yutaka Mori[1], Akihiko Kosugi[1] ([1]JIRCAS, [2]USM)

【目的】
オイルパーム(*Elaeis guineensis*)は果実にオイルを蓄積する油糧作物として、マレーシアやインドネシアを中心に栽培される世界最大の植物油脂資源である。オイルパームは樹齢 25 年ほどで油脂生産能力などの低下により伐採され再植されるが、伐採された幹は組織が脆弱なために使途がなく、古木は伐採後に破砕され放置あるいは薬剤注入により立ち枯らされてきた。我々は、伐採されたオイルパーム廃棄木の樹液中に大量の遊離糖が存在しバイオエタノールの原料として有望であることをこれまでに示した。樹液はグルコースなどの発酵可能遊離糖の他に各種アミノ酸、ビタミン、ミネラルなどを含む天然の優良培地である。今回、樹液からのブタノール発酵阻害物質の簡便な除去方法及び処理樹液を用いたブタノール生産ついて報告する。
【方法及び結果】
生産菌として *Clostridium saccharobutylicum* NBRC10935 を用いた。約 10 パーセント遊離糖を含む樹液を用いてブタノール生産を行ったところ同じ糖含量を含む合成培地の生産量と比較して約半分であった。樹液中に発酵阻害物質の存在が示唆されたために樹液の前処理を行った。樹液の前処理には、活性炭処理、アルカリ処理、ポリ塩化アルミニウム処理を行った。前処理により阻害物質以外の遊離糖の減少も考えられるため処理樹液の糖濃度の測定を行ったが顕著な減少は観られなかったことからブタノール生産にこれらの処理樹液を用いた。処理樹液を培地としたブタノール生産量は、無処理の樹液と比較して約２倍の生産量(1.2 V/V%)を示した。前処理により樹液中の阻害物質が除去されたために生産量が増加したことが示唆された。樹液中の発酵阻害物質を測定するために GC/MS を用いて樹液中の成分を測定した、無処理と処理後の樹液中の物質を比較したところ処理樹液中の para-Hydoxybenzoic acid、3,4-dimethoxybenzoic acid、Vanillic acid、Syringic acid、para-Coumaric acid、Ferulic acid などのフェノール物質成分の減少が観られた。これらのフェノール物質が発酵阻害であることが考えられることからさらにこれらの成分を前処理樹液に追添加し発酵をおこなった所、para-Hydoxybenzoic acid、3,4-dimethoxybenzoic acid、Ferulic acid 加えた培地において強い阻害を示した。このことから樹液のバイオブタノール発酵においてもこれらのフェノール物質が阻害における影響を与えていることが示唆された。樹液中の阻害物質を簡便に除去する方法を開発すると共に処理樹液を用いて効率的にブタノール生産に成功した。

biobutanol, oil palm, biofuel

講演番号：3A01a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ A 校舎 01 会場

シリカライト膜によるバイオブタノールの高選択的浸透気化分離

Highly selective separation of bio-butanol by pervaporation using a silicalite membrane

○池上 徹[1]、根岸 秀之[1]、中山 俊一[2]、小林 元太[3]、榊 啓二[1] ([1]産総研・環境化学、[2]東農大・応生科、[3]佐賀大・農)
○Toru IKEGAMI[1], Hideyuki NEGISHI[1], Shunichi NAKAYAMA[2], Genta KOBAYSHI[3], Keiji SAKAKI[1] ([1]AIST, [2]Tokyo Univ. Agr., [3]Saga Univ.)

【目的】液体エネルギー資源や化成品原料となる(*n*-)ブタノールが、ポスト・バイオエタノールとして注目されている。バイオエタノールと同様に、低濃度バイオブタノールの濃縮技術として蒸留法が一般的であるが、省エネルギー的観点から、代替え技術の開発が不可欠である。

演者らは、これまでに、疎水性シリカライト膜を用いる浸透気化分離プロセスによって、1 wt%ブタノール水溶液からブタノールを80 wt%以上に濃縮して回収できることを報告している[1)]。本研究では、当該膜分離プロセスを実発酵液中のブタノール濃縮へ適用し、発酵液中の種々の物質が膜分離性能に及ぼす影響について検討した。

【方法】*Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4を用いてABE発酵液を調製した。グルコース4 wt%、トリプトン（TRY）0.6 wt%、酵母エキス（YE）0.2 wt%を含むTYA培地を基本発酵用培地とした。また、TRY、YE、およびコーンスティープリカー（CSL）の組成を変えた培地も発酵に使用した。得られた発酵液を供給液として、シリコーンゴムコーティングしたシリカライト膜を用いて、浸透気化分離（at 45 ˚C）を行った。分離性能の指標として、膜透過液中のブタノール濃度、および膜透過流束を用いた。

また、発酵原料である糖（グルコース、キシロース）と膜素材（シリカライト粉末）との吸着実験（at 30 ˚C）、ならびにブタノール/グルコース/水-3成分系供給液の浸透気化分離（at 45 ˚C）も行った。

【結果】ABE 発酵液（ブタノール 1.1 wt%、アセトン 0.3 wt%）から 83 wt%ブタノール液を回収することができた。しかしながら、この場合の膜透過流束は、ブタノール/水-2 成分系を対象とした場合の約半分まで低下した。発酵液を対象とした場合に惹起された膜透過流束の低下は、培地中の栄養源として CSL を用いることや、その含有量を削減することによって、その程度を軽減することが可能であった。

発酵原料となるグルコース、およびキシロースは、シリカライト粉末に吸着されなかった。ブタノール/グルコース/水-3 成分系供給液の浸透気化分離では、膜透過流束が低下することが明らかとなった。

【文献】

1) T. Ikegami et al., J Chem Technol Biotechnol., **86**:845-851 (2011).

bio-butanol, pervaporation, Silicalite

講演番号：3A01a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ A 校舎 01 会場

Saccharophagus degradans 由来アルギン酸分解酵素群の基質特異性の解析
Analysis of substrate specificity of alginate lyases from *Saccharophagus degradans*

○横井 貴大[1,2]、高木 俊幸[1,2]、柴田 敏行[2,3,4]、森坂 裕信[1,2]、黒田 浩一[1,2]、植田 充美[1,2] ([1]京大院農・応用生命、[2]JST, CREST、[3]三重大院・生資・生物圏生命、[4]三重大・新産業)
○Takahiro YOKOI[1,2], Toshiyuki TAKAGI[1,2], Toshiyuki SHIBATA[2,3,4], Hironobu MORISAKA[1,2], Kouichi KURODA[1,2], Mitsuyoshi UEDA[1,2] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]CREST, JST, [3]Dept. Life Sci., Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., [4]Ind. Technol. Innov. Inst., Mie Univ.)

【背景・目的】エネルギー資源の乏しい我が国にとって、広大な海洋面積を活かして安価で大量供給可能な大型藻類からのエタノール生産技術の確立が必要となってきている。大型藻類の主成分は、マンヌロン酸（M）とグルロン酸（G）を構成単糖とする多糖アルギン酸であり、polyM, polyG, polyMG の３つのブロックからなる。また、大型藻類に含まれるアルギン酸は、ブロック比が種によって異なる。そのため大型藻類のアルギン酸を有効利用するには、アルギン酸分解酵素群の基質特異性を明らかにし、アルギン酸ブロックを効率的に分解することが重要となる。そこで本研究では、アルギン酸分解能の強い *Saccharophagus degradans* 由来のアルギン酸分解酵素群に着目し、酵母ディスプレイ法により構築したアルギン酸分解酵素提示酵母を育種して、反応条件や基質特異性を解析した。
【方法・結果】*S. degradans* 由来のアルギン酸分解酵素群を細胞壁アンカータンパク質である α-アグルチニンと融合して発現させ、アルギン酸分解酵素群をそれぞれ酵母細胞表層に提示させた。蛍光抗体染色による提示を確認した後、各々のアルギン酸分解酵素提示酵母によるアルギン酸分解反応を行い、DNS アッセイによる還元糖の定量や TLC による糖の分離検出を行い、アルギン酸分解活性を検出した。また、アルギン酸標品から polyM 画分、polyG 画分を調製し、アルギン酸分解酵素群の基質特異性を検討したのでまとめて報告する。

alginate lyase, *Saccharophagus degradans*, cell surface enginnering

講演番号：3A01a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ A 校舎 01 会場

アルギン酸からのエタノール生産を目指した酵母の合成生物学的育種

Molecular breeding of yeast for ethanol production from alginate by synthetic biology

○高木 俊幸[1,2]、横井 貴大[1,2]、森坂 裕信[1,2]、黒田 浩一[1,2]、植田 充美[1,2]（[1]京大院農・応用生命、[2]JST, CREST）
○Toshiyuki TAKAGI[1,2], Takahiro YOKOI[1,2], Hironobu MORISAKA[1,2], Kouichi KURODA[1,2], Mitsuyoshi UEDA[1,2] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]CREST, JST)

【背景・目的】現在、化石燃料大量消費に伴う温暖化や自然エネルギーを主体とするエネルギー政策への方向転換により、バイオマスの有効利用が注目されている。その一つとして、褐藻類などの水圏バイオマスがあげられる。褐藻類の主成分であるアルギン酸からのエタノール生産の報告はこれまでに二例報告されているのみで、これらはいずれも細菌類によるものである。しかし、エタノールや塩分への耐性の観点から酵母によるエタノール生産が期待されているが、酵母はアルギン酸分解物である単糖ウロン酸の取り込み及び資化が出来ない。そこで、本研究では酵母によるエタノール生産を最終目標として酵母の合成生物学的育種を行った。
【方法・結果】単糖ウロン酸取込み能を酵母に付与するために、アルギン酸資化性菌*Saccharophagus degradans*の Hexuronate transporter をクローニングし、多コピー性ベクターを用いて酵母*Saccharomyces cerevisiae*に導入した。Hexuronate transporter の膜への局在は、C末端側にEGFPを融合し、蛍光を観察することで確認した。また、単糖ウロン酸をピルビン酸に変換する遺伝子群を大腸菌*Escherichia coli*からクローニングし、ゲノム組込み型ベクターを用いて酵母*S. cerevisiae*に導入した。一方、*S. degradans*を用いて基質となる単糖ウロン酸の調製も試みた。*S. degradans*培養上清を1 %アルギン酸ナトリウムと反応させて分解物を薄層クロマトグラフィーで分離し、単糖付近のスポットを抽出して質量分析を行った結果、スペクトル上に単糖に相当する176 m/zピークを検出した。これらの結果をもとにして、酵母によるアルギン酸の資化を検討したのでまとめて報告する。

yeast, alginate, bioethanol

講演番号：3A01a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ A 校舎 01 会場

統合型リグノセルロース系エタノール生産プロセスに資するセルラーゼ表層提示酵母の開発

Development of cellulase-displaying yeasts for consolidated bioethanol production from lignocellulosic biomass

○猪熊 健太郎[1]、番場 崇弘[2]、蓮沼 誠久[1,3]、近藤 昭彦[1,2] ([1]高機能遺伝子デザイン技術研究組合、[2]神戸大院・工・応化、[3]神戸大・自)
○ Kentaro INOKUMA[1], Takahiro BAMBA[2], Tomohisa HASUNUMA[1,3], Akihiko KONDO[1,2] ([1]TRAHED, [2]Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch, Kobe Univ., [3]Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.)

近年、低炭素循環型社会実現の観点から、再生可能資源であるリグノセルロース系バイオマスからエタノールを製造する技術の導入が望まれている。その普及には植物原料をエタノールに変換するための多段階の工程を統合し、効率化した、低コスト型の同時糖化発酵プロセス（Consolidated Bioprocessing, CBP)の構築が急務である。我々は、この CBP 実現に向けて、セルラーゼやヘミセルラーゼを細胞表層に提示することでバイオマス糖化能力を付与した CBP 用酵母の作製と、その糖化能力の改良に取り組んでいる。これまでに、セルラーゼを効率的に提示するための表層提示用遺伝子カセットの改良を行い、遺伝子を発現させるためのプロモーターと、酵素を細胞壁に固定化するためのアンカー領域を同一遺伝子由来のものに統一した遺伝子カセットを用いることで、セルラーゼの表層提示効率が向上し、酵母の表層セルラーゼ活性が従来に比べて大幅に上昇することを明らかにした。本研究では、この改良型遺伝子カセットを用いてセルラーゼ遺伝子を発現させた酵母の表層セルラーゼ活性をさらに向上させるため、その発現に適した宿主酵母株の分子生物学的改良と特性解析を試みた。また、表層提示酵母が最も効率良くバイオマスからエタノールを生産できる発酵条件についても検討しており、その結果についても報告する。

cell surface display, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol production

講演番号：3A01a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ A 校舎 01 会場

染色体多重組込みによるキシロース資化性サッカロマイセス酵母のエタノール収率向上

Improvement of ethanol yield in xylose-assimilating *Saccharomyces* yeasts by chromosomal multiple integration

○小西 仁、福田 明、牟田口 梢栄、上村 毅、雨宮 正臣（JX 日鉱日石エネルギー（株）中央技術研）
○Jin Konishi, Akira Fukuda, Kozue Mutaguchi, Takeshi Uemura, Masaomi Amemiya (JX Nippon Oil & Energy Corp. Central Technical Research Lab.)

【背景・目的】リグノセルロース系バイオマスからの効率的なエタノール生産には、バイオマスの主成分の１つであるキシロースの利用が必須である。また工業的利用のためにはセルフクローニング株を使用することが望ましい。我々は酵母*Saccharomyces cerevisiae* の持つキシロース資化に関わる遺伝子（*GRE3*、*SOR1*、*XKS1*）を染色体上に組み込むことにより、キシロースからエタノールを高収率で得ることができた。今回更なる収率向上を図るため、染色体上に多コピーでキシロース資化遺伝子を組み込みその効果を調べた。また、ペントースリン酸経路の増強効果についても検討した。

【方法】菌体内のキシリトール蓄積を防ぐために、*PGK1*プロモーター支配下に*GRE3-SOR1*、*XKS1-SOR 1* 断片を構築し、サッカロマイセス酵母の染色体上に導入した。キシロースを炭素源としたSCプレート上に生育したコロニーから、キシロース液体培地で生育する株を選抜した。*SOR1*過剰な状態でキシロース資化遺伝子が組み込まれていると考えられるこれらの株についてフラスコ培養による評価をおこない、特に収率の高い株についてペントースリン酸経路上の*TAL1*、*TKL1*を増強した。

【結果】収率の高かった３株についてキシロース還元酵素（XR）活性、キシリトール脱水素酵素（XDH）、キシルロースリン酸化酵素（XK）活性を調べたところ、XDH活性はいずれの株もコントロール株よりも高い値を示したが、XR、XK活性はコントロール株と変わらないものもみられた。最も活性の高かった株ではXR, XDH活性がともに向上していた。この株に*TAL1*、*TKL1*を増強したところ、グルコース・キシロース混合糖を炭素源とした無機塩培地でエタノール収率８０%を示した。

Saccharomyces cerevisiae, ethanol, multiple integration

講演番号：3A01a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ A 校舎 01 会場

線虫と出芽酵母を用いた遺伝子組み換え体の有効利用法の開発
Development of the utilization of the genetically-modified creature using a nematode and the budding yeast
○水野 貴之、大岩 嵩裕、前田 淳史、文谷 政憲 (徳島文理大理工)
○Takayuki MIZUNO, Takahiro OIWA, Atsushi MAEDA, Masanori BUNYA (Tokushima bunri Univ.)

C. glabrata は干し柿や天然酵母パンに使われるなど日常的に使用されるほか、ピルビン酸の大量発酵に応用されている。我々は、*C. glabrata* の産業的な利用方法の開発を行ってってきた。*C. glabrata* は酸や塩に対する耐性が強く、増殖速度も速い事から *Saccharomyces cerevisiae* に比べて効率良くエタノールを生産することが可能である。本研究室では、濃硫酸を用いる事で効率的にセルロースからエタノールを生産する見いだしている。しかし、*C. glabrata* は産業的に有用であると同時に日和見感染症の原因となることも知られている。その患者数は真菌を原因とする感染症の第二位を占めている。日和見感染とはいえ産業的に利用する上で安全上重大な問題を抱えている。我々は、感染症を引き起こさない *C. glabrata* 株を育種することを目的として、日和見感染症の感染および発症機構の解析を行ってきた。その中で、線虫 *Caenorhabditis elegans* を宿主として *C. glabrata* は常在化可能で有ること、そして、*C. glabrata* が体内で増殖することを見いだした。本研究室では線虫を宿主とした解析システムを構築した。このシステムでは、CTC 染色法によって透明な線虫の表皮をとして生きた *C. glabrata* の数や動態を観察することが可能である。現在、このシステムを用いて、抗真菌薬のスクリーニングを行っている。

線虫を宿主とした解析システムを構築する仮定で、栄養要求性を持つ *C. glabrata* が培地上では生育できないが線虫の体内では生育可能である事を見いだした。このことは、線虫体内で生育して *C. glabrata* が線虫の外、あるいは線虫の死後には増殖を停止する可能性を示している。我々は、このことを利用することで解放系での組み換え酵母を環境中に拡散する事なく使用可能なシステムを構築可能と考えている。そこで、本研究室では、線虫体内に常在化した酵母を用いたセルロース分解系の構築を試みている。本大会では、その経過を示すとともに様々な応用法についても議論したい。

Budding Yeast, nematode, genetically-modified creature

講演番号：3A01a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ A 校舎 01 会場

エタノール発酵接合菌を用いたアルカリ-酸処理ペーパースラッジからの効率的バイオエタノール生産

Effective bioethanol production from paper sludge treated by alkali and acid with ethanol-producing zygomycota

○高野 真希、星野 一宏（富山大院理工）
○Maki TAKANO, Kazuhiro HOSHINO (Univ. Toyama)

【目的】リグノセルロースを原料としたバイオエタノール生産に関する研究が盛んに行われている。しかしリグノセルロースの複雑かつ強固な構造を分解するための高エネルギー前処理や、発酵糖を得るためのコストが問題となっている。一方、産業廃棄物であるペーパースラッジ(PS)は、製紙工場から多量に発生する繊維残渣であり、Cellulose および Hemicellulose を含んでいる。また、PS は製紙工程において脱リグニンおよびアルカリ処理などがすでに施されており、高エネルギーが必要な前処理を必要としないという利点を有することから、PS を新たな Ethanol 生産のためのバイオマスとして着目した。PS には製紙製造工程で混入する無機物や界面活性剤などが含まれているが、このような物質が存在する環境下でも PS から Ethanol 生産が可能な *Mucor* 属糸状菌を選択した。この菌株を用いて加水分解酵素と組合わせた同時糖化発酵(SSF)を行ったところ、PS 含有物質の阻害により発酵効率は低く、効率的な Ethanol 生産には至っていない。本研究では PS から発酵糖生産効率および Ethanol 生産効率の向上を目的とし、PS 含有の無機物や有機物の除去法について検討を行った。さらに、選択した糸状菌および加水分解酵素を用いた処理 PS の SSF による Ethanol 生産を検討した。

【方法・結果】某製紙工場より譲与された生 PS を基質として使用した。PS の成分は Cellulose 22.5%、Hemicellulose 10.2%、有機成分 25.4%、灰分（無機成分）41.9%であった。使用菌株は *M. circinelloides* NBRC 4563 である。本菌株を用い、100 g/L PS の加水分解に最適化した Cellulase cocktail を組み合わせた SSF による Ethanol 生産を行った結果、36 h で 6.97 g/L の Ethanol を生成できたが、その発酵効率は 41.7%と低かった。この原因として多量に含まれる無機成分による加水分解反応および発酵阻害が考えられる。PS の大部分は製紙填料として使用される $CaCO_3$ であり、これが Cellulose 繊維を覆っているため加水分解酵素や本菌株が接触できていない可能性がある。そこで HCl に浸漬することで $CaCO_3$ の除去を試みた。未処理の PS を 1 M HCl に一晩浸漬し、洗浄後、乾燥して用いた。この処理により無機成分は 13.2%減少した。この HCl 処理 PS を用いて SSF を行った結果、Ethanol 生産量は 12.5 g/L まで上昇したが、その発酵効率は 44.5%とわずかに上昇したのみであった。これは無機成分の削減により PS の疎水性が増加し、酵素や菌株の接触効率が低下したためと考えられた。そこで PS を 1 M NaOH に一晩浸漬した後、1 M HCl に浸漬したところ、無機成分は 19.4%減少することができた。この NaOH-HCl 処理を行った PS を用いて Cellulase cocktail および 4563 株による SSF を行ったところ、Ethanol 生産量は 17.8g/L であり、その発酵効率は 56.0%となった。

bioethanol, paper sludge, SSF

講演番号：3A01a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ A 校舎 01 会場

微生物によるバイオディーゼル廃グリセロールからのエタノール生産

Bio-ethanol fermentation from waste biodiesel fuel

○瀬田 幸平[1]、鈴木 敏弘[1]、茂野 俊也[2]、野村 暢彦[1]、中島 敏明[1]([1]筑波大院生命環境、[2]つくば環微研)
○Kouhei SETA[1], Toshihiro SUZUKI[1], Toshiya SHIGENO[2], Nobuhiko NOMURA[1], Toshiaki NAKAJIMA[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]Tsukuba Environ Microorg Inst.)

【背景と目的】化石燃料に代わる燃料資源として、バイオマス由来エネルギーであるバイオディーゼル燃料（以下 BDF）が注目されている。しかし BDF の製造過程において生じるグリセロールは、市場において供給過多であり、これらは廃棄されているのが現状である。本研究では、微生物によってグリセロール含有廃液から燃料として使用可能なエタノールの生産に着目した。これまでに高収率・高濃度のエタノール生産を示す微生物 *Klebsiella variicola* TB-83D 株を取得しており、その最適な培養条件を検討することで 40 g/L 以上のエタノール生産を行うことを目的とした。以前の研究結果より培地成分として酵母エキスがエタノール生産に特に有効であることを示し、酵母エキス 15 g/L 添加時に、培養 4 日でエタノール生産量 30 g/L 程度、最大で 32 g/L を達成している。酵母エキス中に含まれるアミノ酸やビタミンが有効に作用したのではないかと考察している。しかし、酵母エキスは高価なため製造コストの増大を招き、実用化の大きな障害となる。そこで今回は、酵母エキスに変わる安価な栄養源の探索を行った。
【方法】TB-83D 株を 500 mL または 1 L の 50 g/L グリセロール培地で微好気培養した。培養には pH の制御が可能な小型培養器を使用し、NaOH により培地 pH を 8 に維持し、50 g/L グリセロール逐次添加培養を行った。経時的にサンプリングした培養液を HPLC 分析に供することでグリセロールおよび各生産物濃度を定量した。
【結果】複数の安価な栄養源についてエタノール生産性を調べたところ、グリセロール以外の唯一栄養源として滅菌したメタン発酵残渣（全窒素量で酵母エキス 15 g/L 相当）を用いた場合において培養 5 日で約 20 g/L、最終的に 22 g/L のエタノールが生産され、酵母エキスには及ばないものの比較的高いエタノール生産量を達成した。現在はメタン発酵残渣の添加量や酵母エキスなどの混合添加による生産性の向上と生産コストの削減を試みているところである。

ethanol, glycerol, *Klebsiella*

講演番号：3A01a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ A 校舎 01 会場

人工進化実験による *Synechocystis* sp. PCC 6803 へのイソブタノール耐性の賦与
Adaptive evolution experiment of *Synechocystis* sp. PCC 6803 for isobutanol tolerance
○松迫 卓也、仲嶋 翼、吉川 勝徳、清水 浩（阪大院情報バイオ情報）
○Takuya MATSUSAKO, Tsubasa NAKAJIMA, Katsunori YOSHIKAWA, Hiroshi SHIMIZU (Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

[背景・目的]

近年、地球温暖化などの環境問題が問題視さている。その原因である二酸化炭素から光合成により物質生産ができるという点で、光合成能力が高い微細藻類を用いたバイオ燃料生産などが世界的に研究されている。イソブタノール（IB）は、エネルギー密度が高く、吸湿性が低いという点でバイオ燃料の有用な候補の一つである。しかし、微細藻類を用いた IB 生産では、生産した IB の培地への蓄積により細胞がストレスを受け、生産性が低下することが報告され、IB 耐性の向上が生産性の向上につながると期待される。近年、生物が元来有する環境適応能力を利用し、ストレス環境下で長期間植え継ぎ培養を行う人工進化実験により、ストレス耐性の賦与に成功した研究が報告されている。そこで、本研究ではモデル生物である *Synechocystis* sp. PCC 6803 株を用いて、人工進化実験により IB 耐性を賦与することを目的とした。

[方法と結果]

本研究では、*Synechocystis* sp. PCC 6803 株を親株とし、50 mM の $NaHCO_3$ を添加した BG11 培地を用いて、シリコン栓で密閉したフラスコで 34℃, 40 μmol-photon/m²/s, 150 rpm の条件下で培養を行った。IB 濃度と *Synechocystis* の増殖の関係を確認した結果、IB 2 g/L において培養開始 72 時間後の菌体濃度が IB を加えない場合と比較し 1/2 となり、5 g/L では増殖がみられなかった。また IB 2 g/L 以上では菌体の凝集が見られた。

IB 耐性株の取得を目指し、親株の増殖速度が低下した IB 2 g/L の条件で、3.5 日間隔で植え継ぎ培養を行った。植え継ぎに伴い徐々に増殖速度が増加し、23 回目の植え継ぎにおいて増殖速度の増加が停止し、本株を IB 耐性株とした。獲得した IB 耐性株は 2 g/L 以上の IB 濃度下で親株と比べて比増殖速度が有意に増加し、さらに親株は増殖できなかった 5 g/L においても増殖が確認された。また 2 g/L 以上の IB 濃度において親株で見られた凝集は耐性株では観察されなかった。さらに、IB 耐性株について IB 以外のアルコール耐性も確認した結果、1-ブタノールとイソペンタノールに耐性を有することがわかった。

adaptive evolution, *Synechocystis* sp. PCC 6803, isobutanol

講演番号：3A01a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ A 校舎 01 会場

微細藻類を用いたエタノール生産における malic enzyme の影響

Effect of malic enzyme on the ethanol production using cyanobacteria

○吉川 勝徳[1,2]、平沢 敬[2,3]、清水 浩[1,2] ([1]阪大・院情報・バイオ情報、[2]Crest, JST、[3]東工大・院生命理工・生物プロセス)
○Katsunori YOSHIKAWA[1,2], Takashi Hirasawa[2,3], Hiroshi Shimizu[1,2] ([1]Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]Crest, JST, [3]Dep. Bioen., Tokyo Inst. Techol.)

【背景と目的】

近年、持続可能な環境調和型社会の実現に向け、シアノバクテリアを用いた光合成によるバイオ燃料・化成品の生産が注目を集めている。シアノバクテリアを用い、エタノールやブタノールなどのバイオ燃料生産の研究が進んでいる。しかし、シアノバクテリアを用いた物質生産において、代謝経路の改変が生産性に与える影響の知見は未だ少ない。目的物質の生産性の向上に向け、その前駆体の供給を制御することは重要な代謝改変戦略の一つである。エタノール生産において、malic enzyme はエタノールの前駆体となるピルビン酸の供給に関わる。そこで、本研究では、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 株を用いたエタノール生産において、malic enzyme がエタノールの生産性に与える影響を解析した。

【方法と結果】

Synechocystis sp. PCC 6803 株に、*Zymomonas mobilis* 由来の pyruvate decarboxylase をコードする *pdc* と alcohol dehydrogenase II をコードする *adh* を導入することで、エタノール生産株を構築した (以降、親株と記載)。*pdc* と *adh* の発現には *Synechocystis* 由来の *nblA* のプロモータを用いた。培養は、BG11 培地を用い、白色 LED による 100 μmol/m^2/s の光照射下で行った。*me* を破壊した結果、親株と比較し、増殖速度に変化は生じなかったが、エタノールの生産速度が有意に低下した。*me* 破壊株に、*Synechocystis* 由来の *me* を *me* のプロモータ領域とともに導入した結果、エタノール生産性は親株と同等に戻り、エタノールの生産性の低下は *me* の破壊が原因であることが確認された。さらに、*me* の過剰発現がエタノール生産に与える影響を解析するために、*me* 過剰発現株を構築したが、エタノールの生産性は親株と同等であった。*me* の過剰発現には強発現プロモータである *psbA2* のプロモータを用いたため、エタノール生産に最適なレベルより発現量が増加しすぎた可能性がある。以上の結果より、malic enzyme はエタノール生産に必要であり、生産性の向上には最適な活性レベルが存在することが示唆された。

Ethanol, Synechocystis sp. PCC 6803, Malic enzyme

講演番号：3A01p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ A 校舎 01 会場

竹バイオマスのバイオリファイナリーの研究

Studies on biorefinery from bamboo biomass

○新井 一斗[1]、石川 貴大[1]、西澤 正平[1]、椎葉 究[1]、平木 純[2] ([1]東京電機大学、[2]JNC 株式会社)
○Kazuto ARAI[1], Takahiro ISHIKAWA[1], Syouhei NISHIZAWA[1], Kiwamu SHIIBA[1], Jun HIRAKI[2]
([1]Tokyo Denki Univ., [2]JNC Co.)

竹はイネ科に属していて、国内では大量の繁茂が環境問題を引き起こすほどバイオマスとして多く存在しており、成長が２～３年と早く、リグニンが木質と比較して少ない点から、バイオ資源として注目されている。実際、竹からバイオエタノール原料として研究が行われ、JNC(株)ではパイロットプラントも動き始めている。しかしながら、硫酸や高アルカリを用いるようなエタノール発酵前の前処理と糖化処理については、生産コスト高や廃液処理、残渣処理などの環境的な課題もある。更に、効率的なエタノール化技術も求められている。本研究では、竹を高温と酵素により処理することにより、ヘミセルロースの加水分解物（ＢＯＳ）を採取し、バイオリファイナリー成分として回収したのち、その残渣から強酸や強塩基を用いることなくホロセルロース部分を抽出・糖化しバイオエタノールを生産する方法について検討した。

（方法）

- 孟宗竹の粗粉砕物を水洗し、圧力(121℃、10 分)処理後、植物細胞壁破壊酵素により処理した(50℃、1～2 時間)。その後、遠心分離した上清をヘミセルロース加水分解物（BOS）とした。
- BOS 中の成分は、Shephadex カラムにより分画し HPLC（LiChroCART ｶﾗﾑ、RI）により精製した。それぞれの抗酸化性を DPPH 法により、また、ﾌｪﾙﾗ酸濃度を HPLC(同上、UV)により求めた。
- BOS 抽出残渣は過酸化水素水および希 NaOH に溶解後、湿式粉砕（ﾏｽｺﾛｲﾀﾞｰ）により粉砕後、遠心分離して水溶液を回収した。(RF-1 区分)
- その残渣は植物細胞壁崩壊酵素(同上)で処理して遠心分離により水溶液を回収した。(RF-2 区分)
- 最終的に RF-1 および RF-2 区分を混合した糖化溶液から濃度調製後、*Zymomonas mobilis* と海洋水から分離した *Candida parapsilosis*（5 炭糖ｴﾀﾉｰﾙ化選抜株）を用いてエタノールを生産した。
- 全ての糖組成は、2N TFA により加水分解後、HPLC（LiChroCART ｶﾗﾑ、RI）により測定した。

（結果）

・BOS を孟宗竹 100ｇから約 3.6g を調製した。BOS およびｶﾗﾑ溶出液分画成分は、抗酸化能が強く、ﾌｪﾙﾗ酸量を含み、構成糖は主としてキシロースとグルコースであった。

・BOS 抽出残渣から、強酸や強塩基を用いることなくホロセルロース部分を抽出・糖化しバイオエタノールを生産する効率的な方法を見出した。

本研究は、平成 25 年度 JST 研究成果展開事業 A-step の研究課題の一環である。

ethanol, energy, oligo saccharide

講演番号：3A01p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ A 校舎 01 会場

竹バイオマス中のオリゴ糖成分のコレステロール上昇抑制作用と腸内細菌への影響

Effects of Bamboo-oligosaccharides on plasma cholesterol concentration and intestial microbial flora in mice

○堀内 美穂、小笠原 真実、椎葉 究（東電大理工学部）
○Miho HORIUCHI, Mami OGASAWARA, Kiwamu SHIIBA (Tokyo Denki Univ.)

竹はイネ科に属していて、国内では大量の繁茂が環境問題を引き起こすほどバイオマスとして多く存在しており、成長が２～３年と早く、リグニンが木質と比較して少ない点から、バイオ資源として注目されている。実際、竹からバイオエタノール原料として研究が行われ実用化プラントも動き始めている。しかしながら、硫酸や高アルカリを用いるようなエタノール発酵前の前処理と糖化処理については、生産設備コストや生産コストが高く、低コスト化が求められている。当研究室では、そのひとつの解決策として、１）強酸や強塩基を用いることなく抽出・糖化する方法と２）付加価値の高い成分をバイオファイナリーとして調製することを目的として、バイオエネルギー生産コストを下げる研究を行っている。今回、孟宗竹から、抗酸化性の高いオリゴ糖を含むヘミセルロース加水分解物質を調製し、その構造と性状分析について研究を行ったので、報告する。

（方法）

・孟宗竹を機械的に粗粉砕し 1.5 ㎝角の金属篩でスルーした粉砕物を水洗し、ｵｰﾄｸﾚｰﾌﾞにより圧力(121℃、10 分)処理後、植物細胞壁破壊酵素により酵素処理（50℃、2 時間）した。その後、遠心分離した上清を凍結乾燥して粗竹オリゴ糖（BOS）とした。

・自由摂食できる環境下で、高脂肪食のみ（コントロール区）と高脂肪食に BOS を５％混合した食餌（テスト区）をマウス（オス各４匹）に１か月間与え、その間、体重測定、採血及び糞を採取した。

・採血後、血しょう中の全コレステロール濃度を測定（Cholesterol Ester Quantitaion Kit）した。

・採取した糞は、ｐH 測定および全細菌の DNA 抽出し、２種類の GC タグ付きプライマー（ユニバーサルおよび乳酸菌のプライマー）を用いて PCR で増幅、DGGE 法により菌叢を比較した。

（結果）

・BOS を孟宗竹 100ｇから約 3.6g 調製した。

・テスト区コントロール区で体重の増加は、ほとんど変化なかった。血しょう全コレステロール値は、コントロール区では高脂肪食摂食により明らかに増加したが、テスト区では、その増加率は低かった。

・糞のｐH は、摂食中、テスト区ではコントロール区と比較して低い値であった。糞中の微生物の DGGE 結果は、高脂肪食摂食前と比較してコントロール区で高脂肪食投与により大きく変化したが、テスト区では、その変化が低く、菌叢を維持している傾向が認められた。乳酸菌でも同様の傾向があった。

本研究は、JST 研究成果展開事業 A-step の研究課題の一環である。

DGGE, prebiotics, hemicellulose

講演番号：3A01p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ A 校舎 01 会場

超音波霧化技術による木質バイオマスの有効利用

Effective use of woody biomass by ultrasonic atomization technology

○北村 唯[1]、菅野 匠[2]、袴田 淑篤[1]、工藤 孝[1]、米山 雄二[3]、野口 正孝[4]、川島 徳道[5]、斉木 博[1]、石河 睦生[2]、下村 美文[1] ([1]東京工科大学、[2]桐蔭横浜大学、[3]文化学園大学、[4]神戸芸術工科大学、[5]環太平洋大学)

○ Yui KITAMURA[1], Takumi KANNO[2], Yoshiatsu HAKAMATA[1], Takashi KUDOH[1], Yuji YONEYAMA[3], Masataka NOGUCHI[4], Norimichi KAWASHIMA[5], Hiroshi SAIKI[1], Mutsuo ISHIKAWA[2], Mifumi SHIMOMURA[1] ([1]Tokyo University of Technology, [2]Toin University of Yokohama, [3]Bunka Gakuen University, [4]Kobe design University, [5]International Pacific University)

【背景・目的】我々が抱えている環境問題を解決するためには、現在の社会システムを見直し、資源やエネルギーが持続的に循環できるような社会を構築することが必要である。バイオマス資源を利用することは、そのような社会の構築に貢献できると期待される。しかし、現状ではバイオマス資源の利用率は十分でない。特に、木質バイオマスは堆肥や飼料等としてわずかに利用されているのみで、ほとんど未利用である。なかでも、青森ヒバは優れた防腐効果があり、広葉樹と異なり腐りにくく、堆肥としては利用しにくい。これは青森ヒバに含まれる抗菌成分によるものである。抗菌成分のなかでも、ヒノキチオールは青森ヒバ廃材から 0.01%採取される貴重な成分で、これを効率よく利用する方法が必要である。そこで本研究では、ヒノキチオール含有量の多い青森ヒバおよびヒノキ樹皮から抽出を行い、超音波霧化法を用いて抗菌性を布に付加することでヒノキチオールの効率の高い利用法を検討した。

【実験】本研究ではまず、水蒸気蒸留法を用いて青森ヒバおよびヒノキ樹皮から抽出溶液を作製した（表 1）。これらの溶液は超音波霧化装置を用いて、栄養寒天培地に塗布した。抗菌活性は落下菌測定法で評価した。次に、同様の溶液を浸漬法で綿およびガーゼに塗布し、大腸菌によるハロー法で繊維の抗菌性の評価を行った。

表1 溶液の調製

		NaOH ＋	NaOH －	pH	中和
純水			①	7.20	－
ヒノキチオール [μg/mL]	25		②	7.64	－
	50		③	7.33	－
青森ヒバ樹皮 [55g/750mL]		④		7.42	○
		⑤		11.98	－
			⑥	4.86	－
ヒノキ樹皮 [55g/750mL]		⑦		7.54	○
		⑧		11.08	－
			⑨	5.03	－

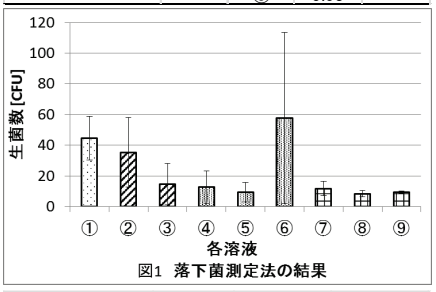


図1 落下菌測定法の結果

【結果・考察】すべての溶液で超音波霧化が可能であったが、霧化効率に差が出た。各溶液に対する抗菌活性を図 1 に示す。木質バイオマスからの抽出溶液での空中落下菌の生菌数は溶液③より抑制された。つまり、抽出溶液は 50 μg/mL ヒノキチオールを超える抗菌活性を示した。各溶液と布に対する抗菌活性をハロー法で比較した結果を表 2 に示す。ほとんどの溶液でハローの形成が確認されたことから、抗菌活性ありと判定した。ガーゼと綿によるハローの幅にほとんど差はなく、抗菌活性に差はなかった。

今後は抽出溶液の組成を HPLC で測定し、抗菌成分を明らかにする。また、超音波霧化法を用いて布に抽出溶液を塗布し、ハロー法を行い、抗菌活性を明らかにする。

表2 溶液と布に対する抗菌活性

	溶液	布の種類 ガーゼ	布の種類 綿
ハローの幅 [mm]	①	なし	なし
	②	なし	なし
	③	1	2
	④	1	1
	⑤	1	1
	⑥	1	1
	⑦	2	2
	⑧	1	2
	⑨	1	1

Woody biomass, Ultrasonic atomization technology, Hinokitiol

講演番号：3A01p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ A 校舎 01 会場

$Ca(OH)_2$ 前処理稲わらの CO_2 加圧糖化リアクターによる酵素糖化技術の開発

Enzymatic saccharification of $Ca(OH)_2$-pretreated rice straw in a CO_2-pressurizing saccharification reactor

○池 正和、尹 旻洙、趙 鋭、城間 力、徳安 健（農研機構・食総研）
○Masakazu IKE, Min-Soo YUN, Rui ZHAO, Riki SHIROMA, Ken TOKUYASU (NFRI-NARO)

【目的】我々は、草本系バイオマスを原料としたエタノール等の有価物生産のための前処理・糖化プロセスとして、CaCCO(Calcium Capturing by Carbonation)法を開発してきた[1, 2]。本法は水酸化カルシウム（$Ca(OH)_2$）前処理後のバイオマスの中和に CO_2 を用いることを特徴としており、カルシウムイオンは炭酸カルシウムとして沈澱するため、洗浄・固液分離工程を行うことなく、同一容器内で糖化反応を行うことができる。また、CaCCO プロセスにおける酵素糖化工程として、これまでに CO_2 加圧条件下での反応が有効であることを報告している。本研究では、CaCCO 前処理- CO_2 加圧糖化法による稲わらからの高濃度糖液の製造を目的とし、原料の粉砕・前処理及び糖化工程条件の検討を行うとともに、10kg 原料スケールでの糖液製造試験を行った。

【方法・結果】稲わら粗粉砕物（13mm-cut）に対する粉砕・前処理条件の検討を行い、①含水率（（乾燥原料＋水）に対する水の重量比）70%以下の試料の湿式粉砕工程、$Ca(OH)_2$ 量 10%（w/w、対乾燥原料）以上、湿式条件下での混合粉砕同時処理、②前処理条件は、95℃で 1 時間を標準条件とした。乾物換算 10kg の稲わら粗粉砕物に対して、上述の条件で粉砕・前処理を行い、高基質条件下での CO_2 加圧糖化を実施した。前処理物を、高基質濃度条件下でも充分な撹拌が可能な 100L 容 CO_2 加圧糖化リアクター[3]に投入し、CO_2 吹きつけによる中和（CO_2 分圧 0.9MPa、overnight）を行った。その後、糸状菌由来市販酵素混合液や *Trichoderma reesei* M2-1 由来オンサイト酵素等の糖化酵素を添加し、CO_2 分圧 0.9MPa、40℃の条件下で 72 時間糖化反応を行った。尚、糖化反応時の固形分濃度は 20%-30%（w/w）に設定した。糖化反応後、糖化液上清中に含まれる単糖及びオリゴ糖量を定量し、可溶化率（酵素糖化により可溶化した糖の割合）を算出した。固形分濃度 28%（w/w）の前処理原料に対して、市販セルラーゼ製剤（12FPU/g-原料）を用いて CO_2 加圧糖化による糖液製造試験を行った結果、糖化液上清の総糖濃度は約 17%（w/v）であり、この時の可溶化率は、グルカン 77%、キシラン 87%（総可溶化率 81%）であった。CO_2 加圧糖化リアクターを用いることで、高基質濃度条件下での CaCCO 前処理物の効果的な酵素糖化が可能となり、高濃度の糖液を得ることができた。本発表では、市販酵素及びオンサイト酵素を用いた糖液製造試験、投入酵素量の低減に向けた検討の結果なども併せて報告する。

1) Park et al. Bioresour.Technol. 101,6805-6811 (2010)
2) Shiroma et al. Bioresour.Technol.102,2943-2949(2011)
3) Ike et al. J.Appl.Glycosci. 60,177-185 (2013)

enzymatic saccharification, lignocellulosic biomass, biorefinery

講演番号：3A01p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ A 校舎 01 会場

単一海藻給餌に対するサザエ腸内微生物フローラの適応

Adaptive responce of gut microflora of marine invetebrates through one-month experimental feeding of single algae

○伊藤 通浩[1,2]、渡邊 幸太郎[3]、モリ テツシ[1,2]、丸山 徹[3]、丹羽 健太郎[4]、緑川 直子[1,2]、張 成年[4]、竹山 春子[1,3] ([1]早稲田大 ASMeW、[2]JST-CREST、[3]早稲田大院先進理工、[4]水産総合研究セ)
○Michihiro Ito[1,2], Kotaro Watanabe[3], Tetsushi Mori[1,2], Toru Maruyama[3], Kentaro Niwa[4], Naoko Midorikawa[1,2], Seinen Chow[4], Haruko Takeyama[1,3] ([1]Waseda Univ., ASMeW, [2]JST-CREST, [3]Waseda Univ., ASE, [4]National Research Institute of Fisheries Science)

【背景・目的】陸上植物と競合しないバイオマス資源として海藻が注目されている。海藻を摂餌する海産無脊椎動物の腸内にはアルギン酸などの主要海藻成分の分解微生物群が棲息すると考えられる。我々は、それら海産無脊椎動物に継続的に特定の海藻を給餌することで、腸内微生物フローラが適応的に変化し、海藻成分分解酵素遺伝子の効率的取得が可能な優れた遺伝子資源となる可能性を考えた。そこで本研究では、この可能性の検証を目的として、単一種の褐藻を 1 カ月間給餌した個体と天然個体の (1) 腸内細菌叢、(2) アルギン酸リアーゼ遺伝子群の組成、および (3) 腸内微生物群の有するアルギン酸分解活性の 3 点の比較から、単一海藻給餌に対する海産無脊椎動物腸内微生物フローラの変化を評価した。

【方法】単一海藻給餌試験の餌にはアルギン酸を豊富に含むとされるカジメ (*Ecklonia cava*) を用いた。海産無脊椎動物には神奈川県横須賀市で採取したサザエ (*Batillus cornutus*) を用いた。サザエ腸内細菌叢の解析は、16S rDNA 部分配列を PCR 増幅し、第 2 世代シーケンサーGS Junior を用いて増幅産物をシーケンスすることにより行った。アルギン酸リアーゼ遺伝子群の組成解析は、PL7 タイプのアルギン酸リアーゼ遺伝子部分配列を縮重プライマーを用いて PCR 増幅産物し、増幅産物をクローンライブラリ解析することにより行った。それぞれの PCR の鋳型 DNA には、採取時のサザエから抽出した腸内メタゲノム DNA (天然標本) と、1 カ月間の給餌試験後のサザエから抽出した腸内メタゲノム DNA (給餌標本) を用いた。腸内微生物フローラのアルギン酸分解活性は Somogyi-Nelson 法により評価した。

【結果・考察】16S rDNA 部分配列を用いた細菌叢の主座標分析では、天然標本の腸内細菌叢は各個体間でばらついた。一方で、給餌標本では各個体の細菌叢は比較的まとまったクラスターを形成した。アルギン酸リアーゼ遺伝子部分配列を用いた主座標分析においても、天然標本では細菌叢の結果と同様にばらついたが、給餌標本ではまとまったクラスターを形成した。以上から、カジメをサザエの単一の餌とする一カ月間の給餌試験により、サザエの腸内細菌叢およびアルギン酸リアーゼ遺伝子の組成は一定の傾向を伴って変化することが示唆された。また、サザエ腸内微生物フローラのアルギン酸分解活性は、給餌標本が天然標本より統計的に有意に高い値を示した。以上の結果より、本方法は海産無脊椎動物腸内において海藻成分分解酵素遺伝子群をエンリッチするのに有用である可能性が示唆された。

seaweed, biomass resource, alginate lyase

講演番号：3A01p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ A 校舎 01 会場

白色腐朽菌を用いた木質バイオリファイナリーに関する研究　ー酢酸発酵能改善についてー

Studies on woody biorefinery with white-rot fungi -Improvement of acetic acid fermentation ability-

○隅谷 友紀[1]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2,3]（[1]静大院・農、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造）
○Tomoki SUMIYA[1], Hirofumi HIRAI[1,2], HIROKAZU KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Graduate School of Agriculture, Shizuoka Univ., [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ., [3]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ.)

【背景・目的】

近年、地球温暖化や化石資源の枯渇が問題視されている。これを解決すべく、カーボンニュートラルな資源であり食料と競合しない木質バイオリファイナリー技術の構築は必須である。*Phanerochaete sordida* YK-624 株を含む多くの白色腐朽菌はゲノム中に pyruvate decarboxylase 遺伝子（*pdc*）および aldehyde dehydrogenase 遺伝子（*aldh*）を有しているものの、木材腐朽時における発現は確認されていない。しかし *pdc* や *aldh* を高発現させることで、木材を分解しつつ酢酸生産能を持つ白色腐朽菌の分子育種が可能となる。本研究では、高活性リグニン分解菌 *P. sordida* YK-624 株を用いて *pdc* および *aldh* 高発現による酢酸発酵能改善について検討した。

【方法・結果】

P. sordida YK-624 株由来 *pdc*、*P. chrysosporium* 由来 *aldh* を取得し、それぞれを glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 遺伝子(*gpd*)プロモーターを有するベクターに連結させた発現プラスミドを構築した。構築したプラスミドを *P. sordida* YK-624 株に形質転換し、遺伝子導入株を取得した。遺伝子導入株を YPD 培地にて培養し、培養液中の酢酸量を測定した結果、遺伝子導入株において野生株よりも高い酢酸生産能が確認された。また、経時的に酢酸生産量を測定した結果、培養 5 日目において酢酸量が最大になることが判明した。以上の結果より、*pdc*・*aldh* を導入することで、酢酸発酵能を付与可能である事が示された。

white-rot fungi, biorefinery, acetic acid

講演番号：3A01p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ A 校舎 01 会場

高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株におけるリグニン分解誘導物質の探索
Screening of lignin-degrading inducer produced by hyper lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624

○橋爪 勇樹[1]、王 剣橋[2]、平井 浩文[3,4]、河岸 洋和[2,3,4] ([1]静大・農、[2]静大院・創造、[3]静大院・農、[4]静大・グリーン研)
○ Yuki HASHIZUME[1], Jianqiao WANG[2], Hirohumi HIRAI[3,4], Hirokazu KAWAGISHI[2,3,4] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka Univ., [2]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., [3]Graduate School of Agriculture, Shizuoka Univ., [4]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ.)

【背景・目的】

木質バイオマスは、セルロース、ヘミセルロースといった多糖と、それを被覆するリグニンから構成されている。このリグニンを自然界において唯一、高度に分解できるのが白色腐朽菌といった微生物群であり、リグニン生分解機構の研究が活発に行われてきているが、リグニン分解を促進する物質についての報告はない。そこで本研究では、白色腐朽菌の中でも特にリグニン分解力に優れている高活性リグニン分解菌*Phanerochaete sordida* YK-624株を用いて、本菌の生産するリグニン分解促進物質の探索を行った。

【方法・結果】

P. sordida YK-624 株を Kirk (HN-HC)液体培地に接種し、30℃で 3 週間静置培養を行った。培養後、菌体と培養液をろ別し、培養液を n-ヘキサン、酢酸エチル、1-ブタノールで順次抽出した。また、凍結乾燥した菌体を n-ヘキサン、酢酸エチル、メタノール、水で順次抽出した。各抽出液をリグニン分解活性試験に供した結果、菌体の n-ヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部でリグニン分解促進活性が認められた。現在、活性が確認された画分から活性物質の単離を進めている。

white-rot fungi, lignin, biodegradation

講演番号：3A01p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ A 校舎 01 会場

新規な *Euglena gracilis* 株の従属栄養培養
Heterotrophic cultivation of newly isolated *Euglena gracilis*
赤司 昭[1]、○竹崎 潤[1]、濱田 武志[1]、出村 幹英[2]、米澤 夏岐[2]、河地 正伸[3]、渡邉 信[2] ([1]（株）神鋼環境ソリューション、[2]筑波大院・生命環境系、[3]国立環境研究所)
Akira AKASHI[1], ○ Jun TAKEZAKI[1], Takeshi HAMADA[1], Mikihide DEMURA[2], Natsuki YONEZAWA[2], Masanobu KAWACHI[3], Makoto WATANABE[2] ([1]Kobelco Eco-Solutions Co., Ltd., [2]Univ. Tsukuba, [3]NIES)

【背景と目的】*Euglena gracilis* は、①バイオマス生産性に優れること、②環境適応力が高いこと、③燃料化が比較的容易であること、④燃料以外にも付加価値の高い有価物を生産することから最近注目が集まっている。*E. gracilis* は、光合成や従属栄養培養により乾燥重量の 50%以上もの β-1,3-グルカン（パラミロン）を蓄積し、嫌気条件ではワックスエステル発酵によりパラミロンを原料としてワックスエステルを生産する。我々は、日本の湖沼より、研究に多用されている *E. gracilis* Z 株よりバイオマス生産性やパラミロン生産性に優れる新規株を単離した。以下にその従属栄養培養を検討した結果について報告する。

【材料と方法】新規分離株の同定は形態観察と 18SrRNA 遺伝子塩基配列の GenBank データベース検索を基に行った。また、既存の *Euglena* 株との差別化は、RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)法により行った。本株及び Z 株（NIES-48 株）の従属栄養培養は、無機塩類や微量金属を含む基礎培地にグルコース（Glc）と酵母エキス（YE）を添加した培地を使用した。パラミロンの精製は、SDS とアセトンにより除タンパクと脱脂を行った残存物の乾燥重量を測定することにより定量した。

【結果】本分離株は、形態的特徴、さらに 18SrRNA 遺伝子塩基配列より *Euglena gracilis* に同定された。また、RAPD 法による解析により新規株であるものと推察され、EOD-1 株と命名した。EOD-1 株は、YE によりその増殖が促進され、Glc のバイオマス転換率は 60%以上に達した。また、Glc のパラミロン転換率も約 50%に達したことから、有価物の生産のための株として優れたものであると考える。

microalgae, Euglena, heterotrophic cultivation

講演番号：3A01p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ A 校舎 01 会場

嫌気処理および暗黒処理が *Euglena gracilis* の極性脂質に及ぼす影響

Effect of the anaerobic treatment and the long-term dark treatment on the polar lipid accumulation profiles in *Euglena gracilis*

○小川 拓水[1]、古橋 剛[2]、西尾 和樹[1]、岡澤 敦司[1]、太田 大策[1]([1]阪府大院生命環境、[2]理研 CSRS)
○Takumi Ogawa[1], Takeshi Furuhashi[2], Kazuki Nishio[1], Atsushi Okazawa[1], Daisaku Ohta[1]
([1]Osaka Pref. Univ., [2]RIKEN CSRS)

藻類の脂質代謝研究を進める上で，個々の脂質分子を網羅的に測定する技術の開発は不可欠である．GC-MS は，脂肪酸や脂肪族アルコールなどの分析に威力を発揮するが，質量数の大きい脂質（膜脂質などの極性脂質）の分析には適さない．膜脂質の分析には，LC-MS/MS が用いられているが，実測値に基づく極性脂質マススペクトラムの公開データは限定的であり，また同定・定量に使用可能な標準物質の入手も容易ではない．このことは藻類を含めた様々な生物の 脂質代謝研究を展開する上での制限要因となっている．そこで我々は，標準物質の有無に依存しない新たな極性脂質同定手法の確立を目指し，12 万の脂質分子をカバーする *in silico* の脂質 MS/MS ライブラリ (LipidBlast; http://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/LipidBlast) を使用した迅速プロファイリングを実施した．LipidBlast は，実測値と文献値に基づいて構築された約 12 万の脂質 MS/MS データを格納する *in silico* MS/MS ライブラリである．LipidBlast ライブラリ検索によって，未同定の脂質 MS/MS スペクトルに対して迅速に注釈 (構造情報) を付与することができる．今回，嫌気条件下でワックスエステル発酵を行うユニークな性質を持つ *Euglena gracilis* の極性脂質プロファイリングを行い，検出されたすべての代謝物イオンシグナルに注釈（推定された構造情報）を付与し，それらの注釈情報をサンプル間で比較した．

まず，様々な培養条件（ワックスエステル発酵を誘導する嫌気条件，葉緑体膜の退化を促す完全暗黒条件）で生育させた *E. gracilis* から抽出した総脂質を LC-MS/MS によって分析し，脂質抽出液に含まれる個々の化合物の MS/MS スペクトルを得た．次に，それらの MS/MS スペクトルに注釈を付与するために，LipidBlast 検索を実施した．クエリとして使用した個々の MS/MS スペクトルに対して，LipidBlast ライブラリ中の最も類似性が高い MS/MS スペクトルを選び，その化合物の注釈とした．その結果，嫌気条件下で培養した細胞は，注釈として lysoPE が付与された化合物の数が増加することが分かった．また，完全暗黒条件下で培養した細胞は，PC と注釈された化合物数が増加し PE と注釈された化合物数が減少することが分かった．これらの結果から，*E. gracilis* のワックスエステル発酵の過程と葉緑体膜の退化の過程で膜脂質の組成が変化することが示唆された．本解析手法は，様々な生物を対象とした脂質代謝研究に適用可能である．

LipidBlast, polar lipid profiling, *Euglena gracilis*

講演番号：3A01p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ A 校舎 01 会場

沖縄工業高等専門学校周辺環境から単離される微細藻類が産生する脂質成分の分析

Analysis of lipids producted by isolated microalgae from environment of Okinawa National College of Technology

○長崎 泰真[1]、池松 真也[2] ([1]沖縄高専　専攻科、[2]沖縄高専　生資工)
○Yasuma NAGASAKI[1], Shinya IKEMATSU[2] ([1]ONCT AC, [2]ONCT)

＜研究目的＞

現代において石油は，燃料やプラスチックなどの材料としてあらゆる形で私たちの生活に関わっているが，その埋蔵量は底が見え始めていると言われている．そこで，近年では新たなバイオマス資源として微細藻類が研究されており，例えば緑藻の一種である *Botryococcus braunii* は細胞間隙に炭化水素を蓄積することが知られている．そこで，本研究では，沖縄工業高等専門学校（以下，沖縄高専）周辺環境より採水を行い，単離した微細藻類の中にバイオマスとして有望な微細藻類を見出すことを目的とした．

＜研究方法＞

はじめに，沖縄高専周辺から収集したサンプルを寒天希釈法によって単離し，AF-6 培地（NIES）が 10 ml 分注されたねじ口試験管で 25℃，蛍光灯下で培養を行った．次に，培養微細藻類を，微分干渉顕微鏡を用いて形態を観察し，さらに中性脂質を染色するナイルレッドで染色した後，蛍光顕微鏡を用いて培養微細藻類ごとに脂質産生の様子を視覚的に定性した．産生脂質の定量分析のため，すべての培養微細藻類について十分量培養した後で微細藻類に対して凍結乾燥を行った．その後，*tert*-ブチルメチルエーテル:メタノール = 2:1 の混合液で粗抽出を行い，脂肪酸メチル化キット（ナカライテスク社製）を用いて粗抽出液中に含まれる脂肪酸をケン化・メチルエステル化した後，メチル化脂肪酸精製キット（ナカライテスク社製）で精製して培養微細藻類由来脂肪酸メチルエステル溶液を調製した．GC/MS による産生脂質の分析を行った．

＜結果＞

脂質成分分析の結果，単離した 25 サンプルのうち，2 サンプルが主として C16:0 などの脂質成分を多量に産生していることがわかった．本研究により，組成やそれぞれの脂質成分の産生量の特徴から，沖縄高専周辺にて，ナタネやパームヤシのようにバイオディーゼルとしての利用が検討できる脂質を産生する 2 つの微細藻類を見出すことができた．

Microalgae, lipid

講演番号：3A01p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ A 校舎 01 会場

コウキクサ由来細菌による水生植物の成長促進

Growth promotion of an aquatic plant, Lemna minor, by its associated bacteria

○尾島 拓也[1]、山賀 文子[1]、菅原 雅之[1,2]、森川 正章[1,2] ([1]北大院環境、[2]JST-ALCA)
○ Takuya OJIMA[1], Fumiko YAMAGA[1], Masayuki SUGAWARA[1,2], Masaaki MORIKAWA[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]JST-ALCA)

【背景及び目的】植物ホルモンの調節や栄養塩の可溶化など、複数の機構によって植物成長を促進する細菌が多く知られているが、水生植物の成長を促進する細菌の報告は少ない。当研究室では水生植物であるウキクサと細菌の共生関係に着目しており、北海道大学付属植物園に自生するウキクサから多くの細菌を単離してきた。その中でこれまでに *Acinetobacter* sp. P23 はウキクサの成長促進活性を有することを実証した[1)]。このことから水生植物成長促進活性を有する菌株が他にも存在することが期待される。そこで本研究では成長速度が大きく、植生浄化やバイオマス生産への応用が期待できるコウキクサを植物材料として用い、水生植物成長促進細菌を探索することを目的とした。
【方法】対象となる細菌はコウキクサ表面に付着して成長を促進できることが望まれるため、先ずウキクサから単離した細菌を植物培養液に懸濁し、そこへ無菌コウキクサを植えて培養した。次に細菌が付着したコウキクサ 2 葉状体を新たな植物培養液が入ったフラスコに移して培養し、10 日後の葉状体数と乾燥重量の増加を指標として植物成長促進活性を評価した。また植物成長促進活性の高かった菌株に関して 16S rDNA 配列に基づく簡易な菌種同定を行った。
【結果】43 菌株の植物成長促進活性を調べたところ、培養 10 日後の無菌コウキクサに比べて葉状体数を 2 倍以上に増加させた菌株は 6 株あり、*Acinetobacter* sp. P23 の他 5 菌株は *Pseudomonas* 属細菌であると同定した。最も植物成長促進活性の高かった *Pseudomonas* sp. N13 は葉状体数を 3.2 倍に増加させ、フラスコあたりの乾燥重量を 4.4 倍に増加させた。細菌が植物成長を促進する機構は複数存在するため、現在無菌コウキクサに対して 2 種類の細菌を同時に接種し、より高い成長促進活性が得られるか否かを評価している。また実環境水中において成長促進活性の持続性を評価する予定である。

1) Yamaga F, Washio K, and Morikawa M, *Environ. Sci. Technol.*, **44**, 6470-6474 (2010).

Lemna minor, Plant growth promoting bacteria, Pseudomonas

講演番号：3A01p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ A 校舎 01 会場

おから分解菌のスクリーニング法開発

Development of screening method for soy pulp degradation bacteria

○袴田 航[1,2]、小笠原 駿[2]、平野 貴子[2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科、[2]日大生資科・生命化)
○Wataru Hakamata[1,2], Shun Ogasawara[2], Takako Hirano[2], Toshiyuki Nishio[1,2] ([1]Graduate school, Nihon Univ., [2]Nihon Univ.)

【目的】日本を含むアジア地域における歴史ある食文化において、大豆は重要な地位を占めている。大豆は大豆油、豆乳、納豆、豆腐、醤油、味噌をはじめ重要な食材原料であり、それゆえ生産粕であるオカラ・醤油粕などはアジア地域において代表的な農産廃棄物となっている。近年、これら農産物廃棄物の有効利用およびそれに由来する環境汚染を軽減しようという試みが数多くなされており、今後も解決すべき課題として強く認識されている。そこで、このような大豆由来廃棄物を強力に分解する微生物を効率的に探索する方法について研究することにより、農産廃棄物の資源化を目的とした。

本発表では、大豆由来農産廃棄物の可溶化にフォーカスし、以下のコンセプトに基づき、廃棄物を高度に分解可能な分解菌のスクリーニング法開発を試みた。（１）代表的な大豆由来の農産廃棄物である「おから」を良く水洗し不溶性部分のみとする、（２）洗浄済みおからに蛍光物質を導入する、（３）蛍光修飾したおからへ様々な微生物を作用させる、（４）微生物作用により蛍光修飾おからが分解され、低分子化された蛍光団を含むおから断片が遊離する、（５）不溶性部分と可溶性部分を濾過分離し、可溶性部分の蛍光強度の強弱により微生物によるおから分解活性を定量的に評価する。本系により分解菌の探索系が開発できれば、多検体のおから分解活性を定量的に評価可能となり、おからを高度に分解可能な分解菌および分解微生物群を効率よく探索することが可能となる。

【方法および結果】まず始めに、おからへ導入する蛍光物質として青色蛍光団を採用した。しかしながら、土壌微生物のほとんどが青色蛍光物質を生産しており、微生物の自家蛍光を考慮しなくてはならないという問題が生じた。そこで青色蛍光団を本研究に使うことを断念し、微生物の自家蛍光を考慮しなくてよい長波長励起であり、蛍光が pH に依存しない（微生物の培養液は様々な pH となる）・高い量子収率を有する（感度が高い）4-carboxy-TokyoGreen（Ex = 440 nm, Ex = 555 nm）を選択し、微生物探索系の開発を試みた。これら一群の化合物は市販されていないため、4-carboxy TokyoGreen を合成し、三重結合を導入したおからへクリック反応により本蛍光団とおからを結合した。本蛍光修飾おからに励起光を照射し蛍光を確認したところ、鮮明な緑色蛍光を発したことから、緑色蛍光修飾おからを合成した事を確認した。次に、合成した蛍光修飾おからを用いて、土壌微生物からのおから分解菌の探索を行った結果、微生物の自家蛍光の影響を受けることなく、いくつかの微生物の菌体外画分に比較的強いおから分解活性を見いだした。本系を用いることにより、様々な探索対象に存在する微生物に対して、定量的かつ高速におから分解菌の探索が可能になると考えている。

soy pulp, screening, fluorescence

講演番号：3A01p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ A 校舎 01 会場

草食性甲殻類消化管からのバイオマス分解細菌の単離

Isolation and properties of biomass-degrading bacteria from herbivorous crustacea

○三宅 克英[1]、裏 佳織[1]、柳井 清治[2]、北原 隆志[2]、山岸 明日翔[2] ([1]石川県大資源研、[2]石川県大環境)
○Katsuhide MIYAKE[1], Kaori Ura[1], Seiji Yanai[2], Takashi Kitahara[2], Asuka Yamagishi[2] ([1]Res. Inst. Biores. Biotech., Ishikawa Pref. Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

日本の海岸に面した森林、いわゆる水辺林（魚つき林）では、草食性の陸ガニやエビなどの生息がよく観察される。これらの甲殻類は落ち葉や木片などのバイオマスを食料として利用する。カニやエビは森林物質循環と河口域の生態系（特に魚類生産）の中で重要な役割を果たしているが、そのバイオマス分解メカニズムはほとんどわかっていない。本研究では草食性のアカテガニとヨコエビを材料として、新規バイオマス分解システムを明らかにし、バイオマス有効利用技術への応用をはかることを目的としている。これらの甲殻類は木や葉といったバイオマスのみで生育可能であり、強力なバイオマス分解能力を持っている可能性が高い。本研究ではエビとカニの消化管からバイオマス中のセルロースやリグニン、タンニンを分解できる細菌群の単離を試みる。将来的にはこれらの甲殻類自体の分解酵素とあわせて *in vitro* で甲殻類消化管の複合バイオマス分解系を構築する予定である。

加賀地方や能登地方の水辺林に生息する草食性アカテガニから新規バイオマス分解細菌を単離、解析、応用するために以下の実験を行った。まずアカテガニを氷冷し、解剖したアカテガニから消化管を摘出した。次に PBS に懸濁後、段階希釈して LB 培地にプレーティングした。好気条件下 37˚C 培養で 15 種類の細菌を得ることができた。これらの菌を同定するために 16S rRNA をコードする DNA を PCR で増幅し、塩基配列を決定した。バイオマス分解活性のスクリーニング法として、セルラーゼ活性に関しては CMC（カルボキシメチルセルロース)-congo-Red 法、リグニン変換活性に関しては Remazol Brilliant Blue(RBB)法を用いてプレート上でのハロの形成を指標として一次スクリーニングを行った。結果として、得られた菌株のほとんどがセルロース分解活性を示し、一方で RBB に反応した菌株は２株だけであった。セルロース分解活性はすべてにおいて培養上清から検出され、分泌型酵素であることが示された。TLC で活性を調べたところ、いずれの場合も CMC はグルコースにまで分解されていた。上記単離菌のうち、セルロースとリグニンの両方に反応性を示したものは Shewanella 属と Bacillus 属であり、現在はその活性の定量的解析と基質特異性の検討を行っている。

cellulase, biomass, herbivorous crustacea

講演番号：3A01p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ A 校舎 01 会場

廃棄物系バイオマスの高温可溶化メタン発酵に適した好熱性細菌の探索

Search for thermophilic microorganisms that are suitable for a high-temperature methane fermentation of waste biomass

○薬師寺 佑佳（熊本県立大学）
○Yuka Yakushiji (Kumamoto Prefectural Univ.)

深刻な環境問題の一つである地球温暖化は異常気象をもたらし、さらには生物への悪影響を引き起こすことが危惧されている。温暖化問題は二酸化炭素（CO_2）などの温暖化ガスが大きな要因となっている。廃棄物系バイオマス（家畜の糞尿など）を利用したメタン発酵は CO_2 の排出を抑え、エネルギーを生み出す技術であり、温暖化問題に貢献できると期待されている。メタン発酵は次の 3 工程より成り立っている。１）高分子有機物の可溶化（加水分解）、２）低分子からの酸生成、３）メタン菌によるガス発生。高分子有機物を多く含む廃棄物系バイオマスの可溶化工程は、メタン発酵の高効率化に繋がる重要なプロセスである。我々はこの可溶化工程に注目し、メタン発酵の高効率化を目指した。高分子有機物を可溶化させるため、メタン発酵槽の前に可溶化槽を設け、可溶化促進およびメタン発酵の阻害物質であるアンモニア除去のため 80℃に加熱した。しかし、熱処理による可溶化率は約 15%であった。さらなる可溶化率向上は、メタン発酵の高効率化に繋がる。そこで、高分子有機物の可溶化向上に好熱性細菌の利用を試みた。本研究は高分子有機物の可溶化に適した好熱性細菌の探索を目的とした。

好熱性細菌を分離するため、温泉地である熊本県阿蘇群小国町岳の湯の土壌から微生物を分離した。得られた土壌試料を Yeast-malt extract (YM) agar に塗沫し、60℃で培養した。生育してきたコロニーを高分子有機物（スキムミルク、セルロース、リグニン）含有 YM 培地に植菌し、ハロー形成を指標に有機物可溶化能を有する好熱性細菌を選択した。スキムミルクを可溶化できる細菌が多く得られ、その中から 20 株を選択した。16s rDNA 部分塩基配列（約 500 bp）を解析した結果、19 株が *Geobacillus* sp.および 1 株が *Anoxybacillus* sp.であった。

選択した 20 株を Waksman 液体培地へ植菌し、60℃で振盪培養を行った。1～5 日間サンプリングを行い、遠心分離により培養上清を得た。その培養上清に終濃度 1%になるようにスキムミルクを添加し、60℃で一晩インキュベートした。スキムミルクの可溶化率を 600 nm の吸光度を測定することにより評価し、7 株を高分子有機物分解好熱性細菌として選択した。その 7 株は培養日数により活性発現に違いが観察された。KK12-14 株は培養 1～2 日目にかけ高い可溶化活性を示した。KK12-12 と-17 の 2 株は、培養 1~5 日にかけて中程度の活性を示した。KK12-09, -10, -15, -16 の 4 株は、培養 5 日目に高い活性を示した。今後、家畜糞尿を用いた試験管レベルで可溶化試験を実施した後に、実プラントで高分子有機物の可溶化促進効果を検討する。

thermophilic microorganisms, high-temparature methane fermentation, waste biomass

講演番号：3A01p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ A 校舎 01 会場

放射性物質汚染バイオマスの嫌気消化によるエネルギー回収

Energy recovery from radioactive material-contaminated biomass with anaerobic digestion

○中島田 豊[1]、久保 希[1]、仁木 大輔[1]、中村 雅哉[2]、大塚 祐一郎[2]、金原 和秀[3]、佐々木 健[4]、加藤 純一[1]([1]広島大院先端、[2]森林総研、[3]静岡大工、[4]広島国際学院大工)
○ Yutaka NAKASHIMADA[1], Nozomi Kubo[1], Daisuke Niki[1], Masaya Nakamura[2], Yuichiro Otsuka[2], Kazuhide Kinbara[3], Ken Sasaki[4], Junichi Kato[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]FFPRI, [3]Shizuoka Univ., [4]Hiroshima Kokusai Gakuin Univ.)

東日本大震災により引き起こされた福島第一原子力発電所事故の結果、放出された放射性物質により汚染されたバイオマスの処理が大きな課題となっている。バイオマスの多くはそのままでは、かさ密度が小さく、中間貯蔵に大きなスペースを必要とする。そこで我々は、被災地域にて処理対象となるバイオマスの嫌気消化（メタン発酵）法による減容化・エネルギー化するための研究開発を行っている。この目的のために今回、汚染地域、特に福島県内の処理対象バイオマスの選定、及び対象バイオマスのメタン発酵ポテンシャルを調査したので報告する。

まず、福島県全域と現地処理試験を予定している福島県西郷村におけるバイオマス賦存量統計調査、および現地での聞き取り調査などから、本プロジェクトにて検討対象とするバイオマスとして、福島県下で賦存量の多い稲ワラ、雑草・牧草類、そして、枝打ちなどで大量に排出されると予想される木質系バイオマスを選定した。選定したバイオマスについてそれぞれ、1）稲ワラ、2）牧草（バミューダヘイ）、3）スギ粉砕粉末をモデルバイオマス（非放射能汚染）としてメタン生成ポテンシャルを測定した。広島県内の下水浄化センターから採取した高温嫌気消化汚泥と上記バイオマスを混合、さらに非放射性塩化セシウムを 10mg/L 添加し、55℃、無酸素条件下でメタンガス生成の継時変化を測定したところ、使用した高温嫌気消化汚泥がこれらバイオマスを分解し、メタン生成する能力を持つことが見いだされた。バイオマス中の VS 当たりのメタン生成ポテンシャル計算したところ、1) 稲ワラ、2）牧草ではそれぞれ、234 ml/g-VS、185 ml/g-VS であり、大きな違いは見られなかった。一方、3）スギ粉砕物（森林総合研究所より供試）のメタン生成ポテンシャルは 27ml/g-VS となり稲ワラ、牧草と比較して顕著に低かった。そこで、湿式ミリング法によりスギ粉砕物を処理したところ、処理後の固形画分のメタン生成ポテンシャルは大幅に向上したことから、スギなどの木質系バイオマスの湿式ミリング処理の有効性が示唆された。また、添加した非放射性セシウムは主に可溶性画分に存在していた。

なお、本研究は文部科学省の「国家課題対応型研究開発推進事業」『原子力基礎基盤戦略研究イニシアティブ』」の委託研究として遂行された。

Biomass, Radioactive materials, Energy recovery

講演番号：3A01p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ A 校舎 01 会場

同時糖化発酵による希硫酸前処理バイオマスからのフェニル乳酸生産

Simultaneous saccharification and fermentation of dilute acid-treated biomass for phenyllactic acid production

○川口 秀夫[1]、寺村 浩[1]、中村 聡子[1]、荻野 千秋[1]、老沼 研一[2]、高谷 直樹[2]、平野 恒[3]、佐塚 隆志[3]、北野 英己[3]、近藤 昭彦[1]([1]神戸大院・工、[2]筑波大・生命環境、[3]名大・生物機能セ)
○Hideo KAWAGUCHI[1], Hiroshi TERAMURA[1], Satoko NIIMI-NAKAMURA[1], Chiaki OGINO[1], Ken-Ichi Oinuma[2], Naoki TAKAYA[2], Ko HIRANO[3], Takashi SAZUKA[3], Hidemi KITANO[3], Akihiko KONDO[1] ([1]Dept. Chem. Sci. Eng., Kobe Univ., [2]Life & Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]Biosci. Biotechnol. Center, Nagoya Univ.)

【背景と目的】リグノセルロース系バイオマスは莫大な賦存量と遍在性、また非可食性等の利点から、光合成による二酸化炭素の再資源化をベースとするバイオ燃料及びケミカル生産産業における利活用が研究されている。フェニル乳酸はポリ乳酸等の従来型オレフィン系バイオポリマーに代わる、新規芳香族系バイオポリマー素材としての応用が期待される。これまでに、遺伝子組換え大腸菌を用いてグルコースから29 g/L のフェニル乳酸発酵を確認しているが、バイオマス原料からの生産性については未知数であった。そこで本研究では、リグノセルロース系バイオマスからフェニル乳酸を生産するバイオプロセスを構築するために、エネルギー作物として注目されるイネ科の C4 植物であるソルガムの残渣を原料とする同時糖化発酵を検討した。
【結果と考察】ソルガムの主茎部を微粉砕した後、希硫酸で前処理した固体画分を基質に、酵素製剤によるセルロースの糖化と、糸状菌由来 3-フェニル乳酸生産酵素（PPR）を高発現させた組換え大腸菌による発酵を組み合わせた、同時糖化発酵プロセスを構築した。また対照として、ろ紙を原料とする同時糖化発酵を同時に実施した。大腸菌を植菌しない糖化条件の反応速度を比較した結果、糖化速度は cellulase 酵素製剤添加容量依存的に増加し、希硫酸前処理したソルガムからはろ紙よりも最大で 1.7 倍高い糖化速度が得られた。また、大腸菌を植菌した同時糖化発酵におけるフェニル乳酸の終濃度は、ろ紙を基質とする条件よりも希硫酸前処理したソルガムを基質とする条件の方が高く（それぞれ約 1.3 g/L, 1.7 g/L）、ソルガムのバイオマス原料としての有用性が示された。さらに、セルロースからのフェニル乳酸収率は、糖化後発酵条件で 4%であったのに対し、同時糖化発酵条件では 25% と有意に高く、ソルガム前処理物に含まれる発酵阻害物質の影響が同時糖化では軽減される可能性が示唆された。
本研究は、文部科学省「植物 CO2 資源化研究拠点ネットワーク（NC-CARP）」の支援を受けて実施した。

Fermentation, Biomass, *Escherichia coli*

講演番号：3A01p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ A 校舎 01 会場

Schizophyllum commune を用いた糖化発酵同時進行によるセルロース系バイオマスからの L-リンゴ酸の直接生産

Direct production of L-malic acid from cellulosic biomass by consolidated bioprocessing with *Schizophyllum commune*

○長根 江里、高野 真希、星野 一宏（富山大院理工）
○Eri NAGANE, Maki TAKANO, Kazuhiro HOSHINO (Univ. Toyama)

【目的】現在、生物変換法によりバイオマスから有用な化学物質を製造することが求められている。特に、L-リンゴ酸は、米国エネルギー省 (DOE) がバイオリファイナリー基幹物質として定めた物質の 1 つであり、清涼飲料の酸味料、減塩醤油や薬剤の原材料としての利用も期待されている。現在、この製造法は化学合成および酵素反応の組み合わせにより行われているが、従来より *Schizophyllum commune* (スエヒロタケ) を用いた好気発酵により Glucose から直接生産できることが知られていた。しかし、バイオマス資源から直接生産できるか不明である。そこで本研究では、*S. commune* を利用し各種加水分解酵素の分泌および加水分解と酸化発酵を同時に達成する糖化発酵同時進行(CBP)により、各種バイオマスから L-リンゴ酸を直接生産させることを検討した。
【方法・結果】本研究で使用した担子菌は *S.commune* NBRC 4928 である。初めに、基質として単糖としては Glucose と Xylose を 50 g/L、セルロース系バイオマスとして、稲わら、木粉、微細セルロース (Sigmacell)、α-Cellulose などを使用した。培養は 100 mL の三角フラスコに培養液 25 mL とし、28℃で 18 日間、好気条件下で 120 rpm で振盪することにより行った。培養液中の糖質および L-リンゴ酸は HPLC を用いて定量を行い、担子菌が分泌した加水分解酵素は β-Glucosidase (BG)、Cellobiohydrolase (CBH)、*endo*-β-glucanase (EBG)を測定した。Glucose 50 g/L の炭素源を用いて培養を行った時、培養 9 日目に最大 29 g/L の L-リンゴ酸を直接生産できた。また、Xylose 50 g/L では培養 18 日目に最大 22 g/L 生産できた。次に α-Cellulose 100 g/L を用いたとき、培養 9 日目に BG 5.42 U/mL、CBH 0.43 U/mL、EBG 0.07 U/mL とセルラーゼを分泌生産し、そして培養 18 日目に 13.3 g/L の L-リンゴ酸を直接生産できた。しかし、稲わら、木粉、および Sigmacell を基質とした場合、L-リンゴ酸を直接生産することはできなかった。そこで、*S.commune* が分泌する各種セルラーゼの生産能力を調べるために、分泌酵素および菌体に存在する酵素のセルラーゼ活性を調べたところ、分泌した BG は 14.6 U/mL、CBH 0.52 U/mL、および EBG 0.03 U/mL、また、菌糸側では BG 21.0 U/g-dry cell、BH 1.88 U/g-dry cell、および EBG 0.20 U/g-dry cell の活性が認められた。これらの結果から、本菌は各種セルラーゼを良好に分泌し、セルロース系バイオマスを加水分解し、生成した単糖を取り込み L-リンゴ酸を直接生産できることが判明した。また、構造の強固なセルロース系バイオマスから L-リンゴ酸を直接生産させるためには、CBH および EBG の産生能を向上させる必要があることが判明した。現在、イオンビーム変異法を活用した変異株の取得を試みている。

L-malic acid, CBP, *Schizophyllum commune*

講演番号：3A01p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ A 校舎 01 会場

キシロース資化の新規代謝経路設計による L-グルタミン酸発酵法の開発
Design of a novel xylose metabolic pathway for L-glutamic acid production
○山田 和輝、山本 洋子、西尾 陽介、原 吉彦、安枝 寿（味の素（株））
○ Kazuteru YAMADA, Youko YAMAMOTO, Yousuke NISHIO, Yoshihiko HARA, Hisashi YASUEDA (Ajinomoto Co., Inc.)

我々は、食糧と競合しない非可食炭素源をアミノ酸発酵の主原料として用いることで、環境調和型のアミノ酸生産方法を確立したいと考えている。特に、リグノセルロース系バイオマスは世界中に広く存在する非可食炭素源であるが、これを発酵原料として十分に活用するには、バイオマスに含まれる五炭糖であるキシロースを効率良く目的物質へと変換できることが重要になる。我々は、キシロースからの L-グルタミン酸生産代謝経路において、Weimberg 経路を導入し経由させることでキシロースから高効率にて L-グルタミン酸が生産できる事ことを見出した。Weimberg 経路では、キシロースはキシロン酸へ変換された後、ペントースリン酸経路そして解糖系に入らずに L-グルタミン酸の前駆体である 2-ケトグルタル酸まで変換されるため、主原料のカーボンを無駄にすることなく L-グルタミン酸を生成することができる。本報告では、その新規代謝経路の設計による高効率型の L-グルタミン酸生産方法について報告する。

Corynebactrium glutamicum は L-グルタミン酸生産菌として汎用されている微生物であるが、キシロースイソメラーゼ(XI)を有していないために本来キシロースを資化することはできない。そこで、Weimberg 経路上の５つの代謝酵素をコードする全遺伝子を *C. glutamicum* ATCC13869 株に導入したところ、炭素源としてキシロースのみを含む最少培地でその生育を確認することができた。次に、その生産菌にてキシロースを発酵主原料とした L-グルタミン酸生産培養（ビオチン制限法による生産）を行ったところ、L-グルタミン酸の蓄積量は少なく、代わりに代謝中間体であるキシロン酸が著量に蓄積することが判明した。*In vitro* 酵素活性測定の結果からキシロン酸デヒドラターゼ（XylD）活性の不足が示唆されたため、我々は *xylD* 遺伝子の発現を強化した菌株を改めて構築した。その生産菌にて L-グルタミン酸の生産培養を実施した結果、*xylD* 遺伝子未強化の株と比較してキシロン酸の蓄積量が減少する一方で、L-グルタミン酸の蓄積量は約 20 倍に増加することが分かった。また、この時の L-グルタミン酸蓄積量は、XI を導入した生産株での蓄積量も大きく上回った。

以上の結果、キシロースの資化経路として Weimberg 経路を *C. glutamicum* の代謝系に組み入れることで、効率良くキシロースから L-グルタミン酸を生産できる可能性があることが判明した。

glutamic acid, fermentation, xylose

講演番号：3A01p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ A 校舎 01 会場

リグニン類化合物からバイオ生産されるベンゼン環構造を含まない新規有機蛍光物質

Chemical analysis of novel non-aromatic polymers with fluorescent activity (NAFP) derived from low-molecular weight lignins

○松藤 寛[1]、濱口 峻[2]、川村 以杏[2]、砂入 道夫[2]、岩淵 範之[2] ([1]日大生資科食品生命、[2]日大生資科応用生物)
○ Hiroshi MATSUFUJI[1], Takashi HAMAGUCHI[2], Ian KAWAMURA[2], MICHIO SUNAIRI[2], Noriyuki IWABUCHI[2] ([1]Dept. Food Biosci. Biotechnol. Nihon Univ., [2]Dept. Appl. Bio. Sci. Nihon Univ.)

【目的】我々は、先行研究において、震災直後の被災地沿岸より、低分子リグニンの一種であるシリングアルデヒド(SYAL)を基質として、菌体外に水溶性の蛍光物質を生産する菌株 *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 を単離した。本蛍光物質は、SYAL が酸化され、シリンガ酸(SYAC)となり、脱メチル化により 3-*O*-メチルガリック酸(3-MGA)を経て、その後重合することにより生産されると考えられた。また、本蛍光物質は同族細菌の生産する既知物質(フルオレセインやシリングアルガダジン)とは全く異なること、熱及び pH に対して安定であること、プロテアーゼ耐性を示すことが判明した。加えて、本蛍光物質は固体のリグニン類混合物からも常温・常圧の静置培養でも生産でき、ITH-SA-1 株は未利用バイオマス資源の有効活用を可能にするバイオプロセスの魅力的な宿主であることが示唆された。そこで、本研究では ITH-SA-1 が SYAL から作り出す蛍光物質の構造的知見を得ることを目的とした。
【方法】マリンブロス培地で培養した ITH-SA-1 培養液に 0.1%(w/v)の SYAL を添加し、約 20 日間培養を行った。0.45 μm のフィルターで菌体を除去後、再生セルロース透析膜(MWCO:3.5kDa)を用いて精製し、その後凍結乾燥することにより、蛍光物質粉末(BPF)を得た。BPF のメタノール可溶画分(MSFL)を乾固し、蛍光検出器を備えたゲルろ過 HPLC 分析及び各種スペクトル分析に供した。
【結果】BPF の水及びメタノール溶液は蛍光を示したが、エタノールには難溶で、プロパノール、アセトニトリル、アセトン、DMSO には全く溶解せず、溶液は蛍光を示さなかった。一方、メタノールに溶解させた際、不溶性の沈殿物が認められた。そこで、メタノールに対する溶解性の違いにより、簡易的に精製できると考え、メタノール可溶画分(MSFL)を入手し、これを以後の実験に用いることとした。MSFL の水溶液は最大励起波長 356 nm、最大蛍光波長 498 nm の青緑色の蛍光を発した。また、ゲルろ過 HPLC により、本 MSFL は複数種の蛍光物質の混合物であり、2.1～8.5 kDa の蛍光物質（平均分子量 7.2 kDa）を含んでいた。MSFL は各種 NMR 測定のケミカルシフト値から、ベンゼン環構造に由来するシグナルは見られず、多数の C=O カルボニル基やアルキル基からなること、さらに FT-IR 測定においてもベンゼン環由来ピークは認められず、本蛍光物質は SYAL 由来開環産物が重合することにより生成すると考えられた。したがって、本蛍光物質は SYAL の中間代謝産物の重合体であるにも係わらず、ベンゼン環構造を有しない新規な有機蛍光物質(NAPF: Non-Aromatic Polymers with Fluorescent activity)であると考えられた。ベンゼン環構造を含まないのになぜ蛍光を発するのかは構造化学的にも不可思議で興味深く、現在より詳細な構造について検討を行っている。

Fluorescence, Biomass, Syringaldehyde

講演番号：3A02a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ A 校舎 02 会場

担子菌 *Flammulina velutipes* の産生するエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ FV のプロセシング酵素の遺伝子クローニング

Cloning of the gene encoding the metalloprotease involved in the processing of endo-β-*N*-acetylglucosaminidase FV in the basidiomycete, *Flammulina velutipes*

高橋 剛生、海住 宜広、○伊藤 和央 (阪市大院・理)
GO TAKAHASHI, TAKAHIRO KAIZUMI, ○KAZUO ITO (Grad. Sch. of Sci., Osaka City Univ.)

【目的】我々は、エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼが多くの担子菌に発現していることを見出し、これらの性質を明らかにするとともに構造解析を行ってきた。また、担子菌*F. velutipes*の産生するエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ(エンドFV)は、プロセシング酵素(EPE)によって翻訳後限定分解を受けることを見出した。そして、*F. velutipes*からEPEを精製し、本酵素がカルシウム依存性亜鉛メタロプロテアーゼで、他の担子菌にも発現していることを明らかにしてきた。本研究では、*F. velutipes*由来のEPEをコードする遺伝子をクローニングし、本酵素の一次構造上の特徴を調べた。
【方法】EPEの活性測定は、組換えエンドFV(rエンドFV)を基質とし、SDS-PAGEによって反応生成物を分離・定量して行った。そして、37℃において1分間に1 μmoleのrエンドFVをプロセシングする酵素量を1 単位とした。精製したEPEの部分アミノ酸配列をもとに設計したプライマーを用いて、*F. velutipes*のRNA画分からRT-PCRによってcDNAをクローニングした。
【結果】クローングした EPE の cDNA は、532 以上の塩基から成る 5'-UTR と 864 塩基から成る ORF および 106 塩基から成る 3'-UTR から構成されていた。精製した EPE の部分アミノ酸配列領域はすべてこの ORF がコードする一次構造中に見出された。また、EPE の N-末端領域は ORF から推定されるアミノ酸配列の内部に位置していた。このため、EPE は翻訳後 N-末端領域でプロセシングを受けている可能性が示唆された。また、EPE の推定一次構造中には 2 ヶ所のアスパラギン結合型糖鎖付加部位が存在した。さらに、伸長した亜鉛結合サイトモチーフとその下流の C-末端側に Met-ターンを構成するメチオニンが存在した。このため、EPE は metzincin 族のメタロエンドプロテアーゼであった。さらに、亜鉛結合サイトモチーフと Met-ターンのコンセンザス配列から、EPE は pappalysin ファミリーのメタロエンドプロテアーゼで、MEROPS ファミリーM43B に属するものと考えられた。また、EPE と相同性の高いタンパク質をコードする遺伝子が広く担子菌に見出された。pappalysin ファミリーの酵素は亜鉛結合サイトモチーフと Met-ターンの間隔が生物種によって異なっているが、EPE と担子菌由来相同タンパク質では共通していた。

endo-β-*N*-acetylgulcosaminidase FV, *Flammurina velutipes*, processing enzyme

講演番号：3A02a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ A 校舎 02 会場

植物エンドグリコシダーゼの部位特異的変異導入による酵素活性制御
Regulation of Enzyme Activity of Plant Endo-ß-N-Acetylglucosaminidase by Site-Directed Mutagenesis
前田 恵[2]、○瀬尾 和子[1]、岡本 尚子[2]、木村 吉伸[2] ([1]岡山大学農学部、[2]岡山大学大学院環境生命科学研究科)
MEGUMI MAEDA[2], ○ KAZUKO SEO[1], NAOKO OKAMOTO[2], YOSHINOBU KIMURA[2] ([1]Okayama Univ., [2]Okayama Univ.)

【目的】植物エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ（ENGase）は，*N*-グリカンの還元末端にあるキトビオース（GlcNAcβ1-4GlcNAc）間を加水分解し，分化生長中の植物細胞において GN1 型遊離 *N*-グリカンの生成を司る酵素であり，新生タンパク質の品質管理系において重要な役割を担っている。これまで，植物 ENGase の機能特性解析，遺伝子同定，果実熟成に伴う遺伝子発現解析，ノックアウト（*Arabidopsis thaliana*）及びノックダウン（トマト）植物体構築を進めてきた。また，植物 ENGase は GH Family 85 に属しており, 加水分解活性に加えて糖転移活性を有することを明らかにしている。従って，植物 ENGase は糖鎖デザイニングのツールとして有用であると考えられる。そこで，本研究では当研究室において大腸菌での発現系を確立しているイネ ENGase（Endo-Os）を用いて，部位特異的変異導入による活性部位の同定と基質特異性の改変を試みた。【方法・結果】微生物 ENGase（Endo-M）の触媒ドメイン構造を基に，植物 ENGase の間で高度に保存されているアミノ酸を選択しプライマーを設計した。Endo-Os の変異株は，pET41-b(+)/Endo-Os プラスミド（野生株）をテンプレートに部位特異的変異導入法により作成した。得られたプラスミドは DNA シークエンスを確認後, *E. coli* BL21 株 に形質転換し 20℃で 36 時間培養することによって組換えタンパク質を発現させた。組換えタンパク質は Ni カラムに供し，吸着画分を酵素液として活性測定に用いた。組換え Endo-Os の加水分解活性測定は基質として蛍光標識したハイマンノース型 *N*-グリカン（Man6-PA）あるいは複合型 *N*-グリカン（Gal2GlcNAc2Man3-PA）を用い，内部標準として植物複合型 *N*-グリカン（Man3Fuc1Xyl1-PA）を使用した。その結果, 加水分解活性にとって必須であるアミノ酸（N189, E191, W236）を同定できた。一方，分子モデリングから触媒部位近傍に存在すると推定されるチロシン残基の変異体（Y225F）は，Man6-PA に対して加水分解活性の強い上昇（180%）を示した。また，トレオニン残基の変異体（T259W）は，Man6-PA に加えて Gal2GlcNAc2Man3-PA に対して弱いながらも加水分解活性を示したことから，基質特異性の改変が確認された。

ENGase, endo-Os, free N-glycan

講演番号：3A02a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ A 校舎 02 会場

トマト実生中における ENGase と PNGase の発現解析及び遊離糖鎖の分布解析

Expression analyses of ENGase/PNGase and distributional analysis of free *N*-glycans in tomato seedlings

前田 恵[2]、○松丸 千紘[1]、木村 吉伸[2]（[1]岡山大学農学部、[2]岡山大学大学院環境生命科学研究科）
MEGUMI MAEDA[2], ○CHIHIRO MATSUMARU[1], YOSINOBU KIMURA[2] ([1]Okayama Univ., [2]Okayama Univ.)

【目的】分化・成長中の植物細胞には，エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ（ENGase）の働きによって生成した還元末端に 1 残基の *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）を有するハイマンノース型遊離 *N*-グリカン（GN1 型）がマイクロモル濃度で存在している。遊離 *N*-グリカンは，胚軸の伸長や果実の熟成に関わる植物ホルモン様活性が提唱されているものの，生化学的・分子生物学的な見地からの確証は未だ得られていない。また，*Arabidopsis thaliana* は ENGase 遺伝子をノックアウトすると，GN1 型遊離 *N*-グリカンの代わりに，ペプチド: *N*-グリカナーゼ（PNGase）によって遊離したと考えられる還元末端に 2 残基の GlcNAc を有するハイマンノース型遊離 *N*-グリカン（GN2 型）が検出されており，ハイマンノース型 *N*-グリカンの遊離には，ENGase/PNGase の 2 種酵素が補完し合って機能していることが明らかとなっている。そこで今回，植物の分化・成長をコントロールするシグナル分子としての遊離 *N*-グリカンの生理機能を明らかにする研究の一端として，トマト実生を用いて根・茎・葉それぞれの部位における ENGase および中性 PNGase（cPNGase）遺伝子の発現解析と，それら遊離 *N*-グリカンの組織分布解析を行った。
【方法・結果】実生トマト（播種後 7 日目）を根，茎，葉に分け，遺伝子（ENGase および cPNGase）発現解析と各組織で生成している遊離 *N*-グリカンの構造解析に用いた。ENGase および cPNGase 遺伝子の発現は，試料から Total RNA を抽出し，cDNA を合成後，Real-time RT-PCR によって解析した。その結果，いずれの遺伝子も根での発現量が多く，茎や葉に比べて 2～3 倍の発現量が確認された。一方，遊離 *N*-グリカンについては，試料を液体窒素中で粉砕後，0.1 N アンモニア水により糖鎖を抽出し, 脱塩水（3 L）に対して透析後, 透析外液から陽イオン交換, 陰イオン交換, ゲル濾過（Sephadex G-25 Superfine）により調製した。ピリジルアミノ（PA）化による蛍光標識を行い，PA 化 *N*-グリカンを逆相 HPLC，順相 HPLC によって分離精製後，酵素消化及び ESI-MS によって構造解析を行った。その結果，遊離 *N*-グリカンは茎・葉に比べ，根において多量発現されていることが明らかになった。この結果は，根で強く発現している ENGase の作用により *N*-グリカンが遊離していることを示唆するものであった。詳細な糖鎖構造については，現在解析を進めているので合わせて報告する。

ENGase, PNGase, free *N*-glycan

講演番号：3A02a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ A 校舎 02 会場

淡水性藻類に発現される *N*-グリカンの構造解析：ルイス a エピトープ含有糖鎖のスクリーニング

Structural analysis of *N*-glycans expressed in freshwater alga: Screening for plant antigenic *N*-glycans harboring Lewis a epitope.

前田 恵[2]、○谷 美里[1]、木村 吉伸[2] ([1]岡山大学農学部、[2]岡山大学大学院環境生命科学研究科)
Megumi MAEDA[2], ○Misato TANI[1], Yoshinobu KIMURA[2] ([1]Okayama Univ., [2]Okayama Univ.)

【目的】植物細胞の糖タンパク質に結合する *N*-グリカンは，動物細胞と共通構造であるハイマンノース型 *N*-グリカンに加えて，トリマンノシルコア構造に α1-3 結合フコースや β1-2 結合キシロースを有する植物特異的な抗原性 *N*-グリカンが結合している。この 植物抗原性 *N*-グリカンは，非還元末端が ルイス a 抗原（Galβ1-3[Fucα1-4]GlcNAc）によって修飾されている場合があり，ヒト免疫系に対する生理活性に興味が持たれている。しかしながら，ルイス a 抗原含有 *N*-グリカンは存在量が少なく，免疫活性評価に必要な量を調製することは容易ではない。そこで本研究では，ルイス a 抗原含有 *N*-グリカンの有用なスクリーニングを目的として, 河川で大繁殖し河川環境問題の要因となっている外来淡水藻オオカナダモ (*Egeria densa*)，コカナダモ（*Elodea nuttallii*），在来種であるササバモ（*Potamogeton wrightii Morong*）等について，それらに発現されている糖タンパク質糖鎖の構造解析を行った。
【方法・結果】淡水藻を水道水で充分洗浄後，5%ギ酸中でホモジナイズした後，ペプシン消化（37 度，48 時間）を行った。遠心分離後，上清から糖ペプチドを陽イオン交換とゲル濾過を組み合わせることで部分精製した。糖ペプチド画分を凍結乾燥後，ヒドラジン分解によって糖鎖を切り出し，ピリジルアミノ（PA）化により蛍光標識糖鎖を調製した。PA 化糖鎖を逆相 HPLC，サイズフラクショネーション HPLC によって分離・精製後，酵素（Endo-H，α1,3/4-フコシダーゼ，β1,3/6-ガラクトシダーゼ，β-*N*-アセチルグルコシダーゼ，α1,2-マンノシダーゼ，α-マンノシダーゼ）消化及び ESI-MS によりそれらの構造を解析した。その結果，コカナダモ糖タンパク質に結合する *N*-グリカンは植物抗原性糖鎖が主要構造を占め，ルイス a 抗原含有構造が存在する一方，ハイマンノース型糖鎖は殆ど検出されなかった。抗原性糖鎖の存在割合は，GlcNAc2Man3Fuc1Xyl1GlcNAc2 (37%)，Gal1Fuc1GlcNAc2Man3Fuc1Xyl1GlcNAc (16%)，Gal2Fuc2GlcNAc2Man3Fuc1Xyl1GlcNAc2 (14%)であった。コカナダモ 291g からルイス a 抗原含有 *N*-グリカン（PA 化物）を約 500 nmol 精製可能であり，機能性糖鎖の有効な供給源になることが分かった。一方, ササバモ由来の *N*-グリカンはハイマンノース型構造（Man5-9GlcNAc2）が主要糖鎖であり，植物抗原性 *N*-グリカンは検出されなかった。今回得られた Lewis a 含有 *N*-グリカンを多価数カップリングさせた糖鎖ポリマーの作成を現在行っている。

plant antigenic *N*-glycan, Lewis a, freshwater alga

講演番号：3A02a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ A 校舎 02 会場

Structural Analysis of the *N*-glycans of Selected Basidiomycetous Yeasts in the Subphylum Agaricomycotina (Phylum Basidiomycota)

○Ronilo Jose Flores[1], Takao Ohashi[1], Hiroko Kawasaki[2], Kazuhito Fujiyama[1] ([1]International Center for Biotechnology, Osaka University, Japan, [2]NITE Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japan)

The early stages of *N*- glycan biosynthetic pathway in yeast and other higher eukaryotes are considered to be evolutionarily conserved and thus may serve as a potential criterion for understanding yeast taxonomy and evolution. Structural analysis of *N*-glycans is therefore necessary to understand the relationship between the current yeast taxonomy and *N*-glycan structural diversity. Recent advances in yeast taxonomy have resulted in a number of changes in the yeast taxonomic groupings. Differences in the detailed terminal structures of *N*-glycans may also potentially be used as an additional criterion in formulating a more unified classification in the basidiomycetous yeasts based on a polyphasic approach. Subphylum Agaricomycotina includes the common mushrooms as well as some dimorphic basidiomycetous yeasts species. In this study, *N*-glycan structural analysis was performed on selected basidiomycetous yeasts coming from three orders in the Agaricomycotina. These yeasts were *Dioszegia hungarica, Fellomyces polyborus* and *Trichosporon cutaneum* from Order Tremellales*, Filobasidium uniguttalatum* from Order Filobasidiales and *Cystofilobasidium capitatum and Mrakia frigida* from Order Cystofilobasidiales. *N*-glycans were prepared by citrate buffer extraction followed by hydrazinolysis and pyridylamination and were structurally analyzed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Mass Spectrometry. Size-fractionation HPLC revealed the presence of various *N*-glycans sizes. *N*-glycan peaks ranging from Man_3-$Man_{12}GlcNAc_2$-PA sized standard glycans were detected in the selected basidiomycetous yeasts coming from the three abovementioned Orders. Various enzymatic analyses were carried out to identify the possible linkages within the glycan moiety. Mass spectrometry was also conducted to confirm the composition of the glycan peaks. This study is the first report on the structural analysis of the *N*-glycan structures of *C. capitatum, M. frigida, F. uniguttalatum, D. hungarica, F. polyborus* and *T. cutaneum*.

N-glycan, Structure, Basidiomycota

講演番号：3A02a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ A 校舎 02 会場

FGF を用いたヘパラン硫酸糖鎖の構造変化検出法の開発

Development of detection method for structural alteration of heparan sulfate by using FGF

○小堺 健生[1]、西田 光貴[2]、北口 公司[3]、金丸 義敬[3]、矢部 富雄[3]([1]岐阜大院・応生科・応用生命、[2]岐阜大院・連農・生物資源、[3]岐阜大・応生科・応用生命)
○Takeru KOZAKAI[1], Mitsutaka NISHIDA[2], Koji KITAGUCHI[3], Yoshihiro KANAMARU[3], Tomio YABE[3] ([1]Grad. Sch. of Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., [2]Unit. Grad. Sch. of Agric. Sci., Gifu Univ., [3]Fact. of Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.)

【目的】細胞表面に普遍的に存在するヘパラン硫酸（HS）糖鎖は，ウロン酸と *N*-アセチルグルコサミンを基本骨格とし，その様々な位置に硫酸基が付加されることで無限ともいえる構造多様性をもつ。HS は，刺激を受けて硫酸化構造を変化させることにより様々な生理機能を調節するので，HS の機能を解明するためには，HS の硫酸化構造を分析する手法の開発が求められている。そこで，線維芽細胞増殖因子（FGF）が，細胞表面 HS の特定の硫酸化構造を認識して相互作用することを利用し，HS に対する FGF の相互作用の変化を分析することにより，HS の硫酸化構造の変化を推定できるのではないかと考えた。我々は，マウス線維芽細胞（L-M 細胞）表面 HS の硫酸化構造がアドレナリンにより変化することを見出しているため，この現象に注目して，FGF と HS の相互作用を SPR 法を用いて解析し，HS の硫酸化構造の変化を分析する手法の確立を目指した。

【方法】アドレナリンを添加した 6 時間後の L-M 細胞表面の HS を回収・精製して，アドレナリンの刺激によって硫酸化構造の変化した HS（aHS）を得た。得られた aHS の還元末端をビオチン化し，それをストレプトアビジンでコーティングされたセンサーチップに固定して，aHS 固定化チップを作成した。それを基に，異なる硫酸化構造を識別する 3 種類の FGF（FGF-1，2，10）と aHS の結合力を SPR 法で測定し，アドレナリン無添加の L-M 細胞由来の HS（cHS）と比較した。

【結果】FGF-1 と HS の相互作用を解析した結果，aHS に対する解離定数は 150±9 nM であり，cHS（104±4 nM）と比べて結合力は有意に低下した。また，FGF-1，2，10 を添加した 9 分後の HS への結合量を算出すると，cHS 1 mol に対してそれぞれ 0.21，2.2，2.3 mol 結合したことから，アドレナリン無添加の L-M 細胞表面 HS は，FGF-2 や 10 に結合しやすい硫酸化構造を持つことが示唆された。さらに，aHS への結合量を算出すると，それぞれの結合量が約 85%，62%，47% 減少した。これらの結果より，SPR 法を用いて HS に対する FGF の結合量の変化を調べることにより，HS の硫酸化構造の変化を確認する方法を確立することができた。本法では，従来の二糖組成分析と異なり，HS を分解せずに HS 鎖全体の硫酸化構造の変化を観察することが可能である。細胞表面 HS は FGF と相互作用することでシグナル伝達を調節することが分かっており，今後はアドレナリンによる HS の硫酸化構造変化がもたらす生理的な影響について解析を行う。

heparan sulfate, FGF, SPR

講演番号：3A02a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ A 校舎 02 会場

魚類コンドロイチン硫酸の含有量と組成分析

Contents and compositional analysis of chondroitin sulfates derived from fish

○中谷 なつみ、水田 結貴、中田 有美、山本 麻伊、大下 加奈恵、問田 椋介、田村 純一（鳥取大地域環境）
○Natsumi NAKATANI, Yuki MIZUTA, Tomomi NAKATA, Mai YAMAMOTO, Kanae OSITA, Ryosuke TOITA, Jun-ichi TAMURA (Dep. Regional Environ., Tottori Univ.)

【目的】コンドロイチン硫酸(CS)は、近年医薬品やサプリメントとして注目されており、たいへん需要が高い。現在市販されているものの多くはサメやブタを資源生物としているが、サメは捕獲制限を受け、ブタは感染症の恐れがあるため、今後安定した原料の確保が困難になる可能性がある。そのため、サメやブタに代わる資源生物の探索が必要となっている。CS は動物にほぼ普遍的に存在しているが、生物や部位により含有量や組成に違いがある。今回我々はいくつかの魚類について、部位別に CS の単離精製を行い、その含有量と硫酸化パターンを解析したので報告する。
【方法と結果】対象となるカレイなどの魚類について、部位別に粉砕、脱脂、タンパク質の分解除去を行い、エタノールによる粗糖鎖の沈殿を得た。さらに、イオン交換樹脂による分離・精製を行い、透析とゲルろ過を用いて脱塩し、CS 精製を得た。得られた精製糖鎖をコンドロイチナーゼ ABC により二糖単位にまで分解し、アミノカラムを装着した HPLC で不飽和二糖の組成と含有量の分析を行った。その結果、魚類頭部は他の部位に比べて CS 含有量が多いことが判明した。また、魚種によって CS 含有量が異なるものの、調査した魚類の各部位にはいずれも CS が含まれていることが明らかになった。

chondroitin sulfate, compositional analysis, Fish

講演番号：3A02a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ A 校舎 02 会場

ウォンバットミルクオリゴ糖の構造解析
Chemical characterization of wombat milk oligosaccharides
○平山 賢太郎[1]、メッサー マイケル[2]、福田 健二[1]、斉藤 忠夫[3]、浦島 匡[1]([1]帯広畜産大学、[2]シドニー大学、[3]東北大農)
○ Kentaro Hirayama[1], Michael Messer[2], Kenji Fukuda[1], Tadao Saito[3], Tadasu Urashima[1] ([1]Obihiro Univ., [2]Sydney Univ., [3]Tohoku Univ.)

[目的] 哺乳動物の乳は数%の糖質を含み、多くの真獣類種の乳では主要糖質はラクトース; Gal(β1-4)Glc である。一方有袋類や単孔類の乳ではミルクオリゴ糖の方がラクトースよりも優先的である。有袋類の中で、これまでにタマーワラビーの中性オリゴ糖やアカカンガルーの酸性オリゴ糖、およびコアラの中性、酸性オリゴ糖の化学構造が決定されており、還元末端のラクトース単位に対して直鎖のβ(1-3)Gal が 1～5 単位付加されたような構造や、それに Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)が付加された構造など、単孔類や真獣類とは異なる特徴を有している。一方で、これまでに有袋類の一種、ウォンバットのミルクオリゴ糖は研究されていないので、本研究ではその構造解析を目的として行った。
[方法] ウォンバットの乳から抽出された糖質画分を BioGel P-2 によるゲル濾過クロマトグラフィーに供して、分子量分画を行った。それを薄層クロマトグラフィーに供して単一性が確認された画分は、^{1}H-NMR で構造決定した。複数のオリゴ糖の存在が示された中性オリゴ糖画分は、グラファイトカーボンカラムを使用した高速液体クロマトグラフィーによって分離・精製した。一方酸性オリゴ糖は、陰イオン交換クロマトグラフィーや Amide-80 カラムを使用した順相系の高速液体クロマトグラフィーに供して精製した。精製されたオリゴ糖は ^{1}H-NMR と MALDI-TOF/MS に供して構造決定した。
[結果と考察] 構造決定された中性オリゴ糖は、3～5 糖のβ(1-3)ガラクトシルラクトースシリーズであった。酸性オリゴ糖はそれに Neu5Ac(α2-3)が付加した構造や、
Gal(β1-3)[Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)]Gal(β1-4)Glc に Neu5Ac(α2-3)が付加した構造であり、少量ながら硫酸基を含むオリゴ糖も発見された。タマーワラビーやアカカンガルーに比べると単純なオリゴ糖組成であることが示唆された。

Milk oligosaccharides, Wombat, Milk

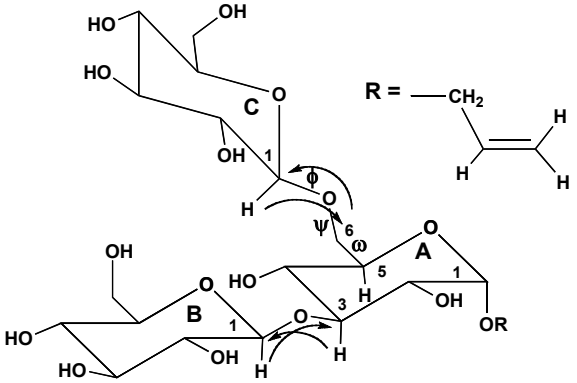
講演番号：3A02a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ A 校舎 02 会場

6 位にグリコシド結合を持つ糖鎖の NMR による配座解析

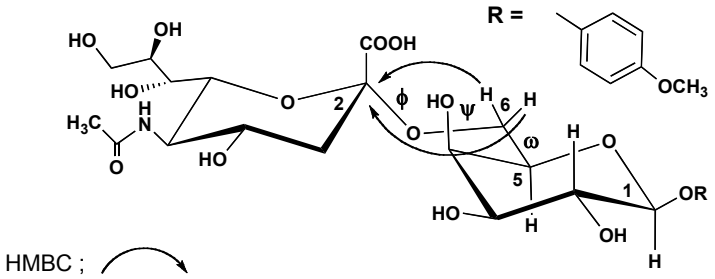
NMR analysis of the glycosidic torsion angles at 6 position of oligosaccharides

○鵜澤 洵[1]、加藤 雅樹[1]、関 宏子[2]、桝 飛雄真[2]、山口 芳樹[1] ([1]理研　糖鎖構造、[2]千葉大　共用機器センター)
○Jun UZAWA[1], Masaki Kato[1], Hiroko Seki[2], Hyuma Masu[2], Yoshiki Yamaguchi[1] ([1]RIKEN Structural Glycobiology, [2]Center for Analytical Instrumentation)

以前に演者らは HMBC(Hetero-nuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy)法から得られる糖残基間の結合情報と、NOE/ROE スペクトルから得られる距離情報を組み合わせることによって、グリコシド結合まわりの配座に関する情報が得られることを述べた[1)]。



1



2

1-6 結合を含むモデルオリゴ糖鎖 **(1)** や alpha2-6 結合を含むシアロ糖鎖 **(2)** において 6 位のグリコシド結合部分は、ω、φ、ϕ の 3 つの 2 面角で規定される。従来から分子動力学計算などの計算の初期構造には NOE/ROE からの距離情報と H-5 と H-6 間のスピン結合定数から得る 2 面角の情報を使って各配座の割合が求められている。演者らは **(1)** の ^{13}C selective HMBC (HMBCS)スペクトルにおいてアノメリックプロトンから C6 へのクロスピークを観測した。これは φ が 0 度または 180 度に近いことを示している。一方 **(2)** において、Gal-H-6*proR* と H-6*proS*[2)]から NeuAc-C2 へのクロスピークがほぼ等しい強度で観測された。これは、ϕ に関する情報を含んでいる。このように、NOE/ROE からの情報と H-5 と H-6 間のスピン結合定数に加えて、HMBC スペクトルから得られる情報を使うことにより、より正確な配座情報を得ることが可能である。

参考文献

1.Y. Kubota, H. Hori, R. Sawa, H. Seki and J.Uzawa; *Magn.Reson.Chem.,***50**, 659(2012).
2. H.Ohrui, Y.Nishida, H.Itoh and H.Meguro; *J.Org.Chem.*,**56**,1726(1991).

Glycosidic torsion angles at 6 position, HMBCS, Molecular dynamics simulation

講演番号：3A02a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ A 校舎 02 会場

合成糖鎖を用いた UGGT2 の基質特異性解析

Substrate specificity analysis of UGGT2 using synthetic glycans

○武田 陽一[1]、瀬古 玲[1]、八須 匡和[1]、大黒 周作[1]、和泉 雅之[2]、小泉 晶彦[1]、藤川 紘樹[1]、梶原 康宏[1,2]、伊藤 幸成[1,3] ([1]JST, ERATO、[2]阪大院理、[3]理研 細胞制御化学)
○Yoichi TAKEDA[1], Akira SEKO[1], Masakazu HACHISU[1], Shusaku DAIKOKU[1], Masayuki IZUMI[2], Akihiko KOIZUMI[1], Kohki FUJIKAWA[1], Yasuhiro KAJIHARA[1,2], Yukishige ITO[1,3] ([1]JST, ERATO, [2]Osaka Univ., [3]RIKEN, Synthetic Cellular Chemistry Laboratory)

「目的」
新生タンパク質は粗面小胞体内腔で $Glc_3Man_9GlcNAc_2$(G3M9)からなる糖鎖が付加され、様々なプロセシング酵素およびレクチンシャペロンの働きにより、正しい高次構造へと導かれる。このうち、UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase (UGGT)はミスフォールドした糖タンパク質上の糖鎖に対してのみグルコースを 1 残基転移する酵素である。モノグルコシル化された基質糖タンパク質は小胞体レクチンシャペロンである calnexin、calreticulin に対する親和性を獲得し、これらの働きによってフォールディングが促進されることから、UGGT はフォールディングセンサーとして機能していると考えられている。ヒト UGGT の２つのアイソフォームのうち、UGGT2 は UGGT1 と 50%以上のアミノ酸の相同性があり、活性部位が存在しているにもかかわらず、現在までにグルコース転移活性が確認されていない[1]。本研究では合成糖鎖プローブを用いたアッセイ系[2]を用いることで、UGGT2 の酵素活性について再検討した。
「方法および結果」
293T 細胞で発現させたヒト UGGT2 は、蛍光官能基をアグリコンに導入した糖鎖 M9-Gly-BODIPY に対してグルコースを転移することを見出した。そこで、我々が構築した高マンノース型糖鎖ライブラリー[3]を用いて様々なグライコフォームに対するグルコース転移を比較したところ、基質特異性は UGGT1 とほぼ同じであり、還元末端の N-アセチルグルコサミン残基を認識していること、A-arm 末端のマンノースに対してグルコースを転移することが示唆された。また、化学合成によって得られた M9 型糖鎖を有するインターロイキン-8 (IL8-M9) [4]を基質として酵素反応を行ったところ、UGGT2 はミスフォールドした IL8-M9 に対してのみ活性を示したことから、UGGT2 もタンパク質のフォールディング状態を見分けていることが強く示唆された。本発表では ER に局在するセレノタンパク質 Sep15 との複合体形成が UGGT2 のグルコース転移活性に与える影響についても合わせて報告する。

[1] Arnold et al., *Biochemistry*, **2000**, 39, 2149.
[2] Totani et al., *Biochemistry*, **2009**, 48, 2933.
[3] Koizumi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 7426.
[4] Izumi et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 7238.

high-mannose-type glycan, endoplasmic reticulum glycoprotein quality control, UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase

講演番号：3A02a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ A 校舎 02 会場

IgG_1 抗体の *N*-結合型糖鎖付加コンセンサス配列の改変による抗体諸性質への影響

Effects of mutations within the *N*-glycosylation consensus sequence of IgG_1 antibody on its biological activities.

○高島 晶、八須 和子、天野 純子 (野口研・糖鎖生物)
○Shou Takashima, Kazuko Hirose-Hachisu, Junko Amano (The Noguchi Inst.)

[目的]糖タンパク質の糖鎖には、タンパク質のフォールディングや安定化、機能発現などにおいて重要な役割を果たすものがある。糖タンパク質製剤等の生産では、このような機能性糖鎖を効率よく付加させたり、糖鎖の数や糖鎖構造を改変することによって、活性、安定性、生産性などの向上をはかることが検討されてきている。抗体の場合、抗体依存性細胞傷害活性などの発現には、その Fc 領域に存在する *N*-結合型糖鎖が重要な役割を果たすことが知られており、抗体医薬品の開発においては、その機能向上を目指した糖鎖改変技術が注目されてきている。本研究では、ヒト IgG_1 抗体の *N*-結合型糖鎖付加コンセンサス配列を改変した場合に、抗体糖鎖の付加状況やレセプターとの相互作用にどのような影響が現れるのかを解析した。

[方法] *N*-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列は NXS/T（X はプロリン以外のアミノ酸）であるが、一般に X アミノ酸の違いによって糖鎖付加効率が変化する場合があること、および X アミノ酸が同じならば NXS のほうが NXT より糖鎖付加効率が低い場合が多いことが知られている。ヒト IgG_1 抗体 Fc 領域にある *N*-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列は NST なので、この配列を NXT および NXS に置換した一連の変異体を HEK293 細胞に生産させ、その糖鎖付加状況等を解析した。

[結果] 野生型 IgG_1(NST)の場合、9 割以上の分子には糖鎖が付加されていた。NXT 変異体の場合、一部の場合を除いてその糖鎖付加効率はほぼ野生型と同様であった。一方、NXS 変異体では、野生型配列 NST を NSS に変えることで糖鎖付加効率が 7 割程度まで減少するとともに、X アミノ酸の違いによっても糖鎖付加効率が変動した。また NXT、NXS いずれの変異体においても、野生型とくらべて糖鎖の構造パターンに変化が認められる場合があった。これら変異抗体と抗原との結合性については、調べた限りにおいては特に影響は認められなかったが、FcγRIIIa レセプターとの結合性については、NXS 変異体の親和性が失われていた。以上より、ヒト IgG_1 抗体の *N*-結合型糖鎖付加コンセンサス配列 NST の 1～2 アミノ酸を置換するだけで、糖鎖付加状況や FcγRIIIa レセプターとの結合性を変化させ得ることが判明した。この結果は、抗体医薬品の糖鎖改変において、どのようなアミノ酸置換が有効/無効であるのかのヒントになると思われる。

antibody, glycosylation

講演番号：3A02a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ A 校舎 02 会場

Identification of the Protein Glycosylation Operon from *Campylobacter jejuni* JCM 2013

○Akkaraphol SRICHAISUPAKIT, Takao OHASHI, Kazuhito FUJIYAMA (International Center for Biotechnology, Osaka University)

Campylobacter jejuni is a human enteropathogenic bacterium possessing glycosylation systems. In this work, protein glycosylation (*pgl*) operon conferring prokaryotic glycosylation in *C. jejuni* JCM 2013 was cloned and identified. Fourteen open reading frames (ORFs) were identified in the *pgl* operon. The organization of the *pgl* operon was similar to that of the *C. jejuni* NCTC 11168 with 98% and 99% identities in overall nucleotide and amino acid sequence, respectively. The *pgl* operon was heterologously co-expressed with model protein CmeA in *Escherichia coli* BL21 mutant. The immuno- and lectin-blotting analysis indicated the protein glycosylation activity on the recombinant CmeA. Furthermore, to analyze glycan composition, the recombinant CmeA was purified and subjected to in-gel trypsin digestion followed by nano liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. The mass spectrometry analysis revealed the predicted prokaryotic glycosylation. Further glycan structural study using the conventional fluorophore-labeling method showed that the glycan was *N*-linked and the structure was composed of *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) residues at the non-reducing end. In conclusion, the functional *pgl* operon from *C. jejuni* JCM 2013 was successfully transferred into *E. coli* and the prokaryotic glycosylation was observed.

prokaryotic glycosylation, *Escherichia coli*, *N*-glycan analysis

講演番号：3A02a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ A 校舎 02 会場

マウスシグレック F に結合する内因性糖タンパク質の同定

Identification of endogenous glycoproteins that bind to mouse Siglec-F

○加藤 紀彦[1]、際本 拓未[2]、エヴァンス クリストファー[3]、ブルメット メアリー[4]、ハドソン シェリー[4]、ズウ ゾウ[5]、ボクナー ブルース[6]、ティーマイヤー マイケル[7] ([1]石川県立大、[2]筑波大、[3]コロラド大、[4]ジョンズホプキンス大、[5]イェール大、[6]ノースウェスタン大、[7]ジョージア大)

○Toshihiko KATOH[1], Takumi KIWAMOTO[2], Christopher EVANS[3], Mary BRUMMET[4], Sherry HUDSON[4], Zhou ZHU[5], Bruce BOCHNER[6], Michael TIEMEYER[7] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Univ. of Tsukuba, [3]Univ. of Colorado, [4]Johns Hopkins Univ., [5]Yale Univ., [6]Northwestern Univ., [7]Univ. of Georgia)

シアル酸結合レクチンの一種である Siglec-F は、マウス好酸球表面に発現する糖鎖結合ドメインを持つ膜タンパク質であり、人における Siglec-8 と機能的相同性を有する。これまでの研究で、抗 Siglec-F/8 抗体によって Siglec-F/8 が架橋されると、マウス・ヒトのそれぞれの好酸球アポトーシスが誘導されることが明らかとなっている。さらに、glycan array によって Siglec-F および Siglec-8 はシアル酸と硫酸基を持つルイス X 型糖鎖抗原（6'-sulfo-sialyl-Lewis^x）に最も強く結合することが示されていた。すなわち、好酸球上の Siglec-F/8 が糖鎖リガンドと結合し架橋されることで好酸球の細胞死を誘導すると考えられている。このメカニズムを応用すれば、喘息に見られる気管での慢性的な好酸球炎症を抑制する薬剤の開発につながる可能がある。しかしながら、そのような糖鎖抗原を持つ生体内の Siglec-F/8 リガンドタンパク質はこれまで明らかにされていなかった。

そこで、我々はマウス気管上皮細胞培養及び肺検体を用い、Siglec-F 結合性糖タンパクの同定を試みた。Siglec-F と IgG Fc 領域の融合タンパク質である Siglec-F-Fc を用いたウェスタンブロットの結果、試料タンパク質抽出液より 500kDa および 200kDa 付近に顕著なバンドを検出した。免疫学的手法と質量分析法の組み合わせによる解析により、これらの Siglec-F 結合タンパク質として Muc5b および Muc4 を 同定した。さらに試料より抽出精製した Muc5b/Muc4 混合物のムチン型糖鎖を質量分析を用いて分析したところ、シアル酸を末端に持つ糖鎖構造を多数検出した。さらに精製 Muc5b/Muc4 混合物は Siglec-F 結合能を持ち、アポトーシスにより好酸球の生存率を低下させることを確認した。 以上の結果より気道粘液成分である Muc5b および Muc4 はマウス Siglec-F のリガンドとして好酸球炎症を制御している可能性が示唆された。

Siglec-F, Mucin, O-glycan

講演番号：3A02a17
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ A 校舎 02 会場

ブタ精漿由来新規レクチン WGA16 の精子表面への結合機構の解明
Discovery and characterization of a novel heparin-binding protein WGA16 from boar sperm

○北島 健[1,2]、ガレノ エステル[1,2]、金川 真由美[3]、土山 智之[1,2]、堀 和紀[1,2]、金澤 尊[1,2]、千葉 満[4]、安江 博[5]、池田 明美[3]、山口 芳樹[3]、佐藤 ちひろ[1,2]（[1]名大生物機能セ、[2]名大生命農学、[3]理研糖鎖構造、[4]弘前大医、[5]農業生物資源研家畜ゲノム）
○Ken KITAJIMA[1,2], Estelle GARENAUX[1,2], Mayumi KANAGAWA[3], Tomoyuki TSUCHIYAMA[1,2], Kazuki HORI[1,2], Takeru KANAZAWA[1,2], Mitsuru CHIBA[4], Hiroshi YASUE[5], Akemi IKEDA[3], Yoshiki YAMAGUCHI[3], Chihiro SATO[1,2]（[1]Nagoya Univ. BBC, [2]Nagoya Univ. Grad. Sch. Bioagr. Sci., [3]RIKEN Str. Glycobiol., [4]Hirosaki Univ. Sch. Med., [5]Natl. Inst. Agrobiol. Sci.）

哺乳類に特徴的な精子の受精能獲得は、雌性生殖器官内で起こり、精子と卵の相互作用に必須である。この過程では、精子表面成分の再編成が起こることが知られている。最近、我々はブタ精子の受精能獲得時に細胞表面から消失する糖タンパク質を探索して、小麦胚芽アグルチニン(WGA)エピトープに富み高度に糖鎖修飾されたタンパク質を見出し、WGA16 と命名した。本研究は、WGA16 の受精における役割解明を目的として、構造、生合成部位、受精能獲得時の局在変化を解析し、以下の結果を得た。(1) 特異的抗体を用いた免疫染色法による解析結果から、WGA16 は前立腺で生合成されて精漿中に分泌され、その一部が精子表面に結合して存在する; (2) 精子上の WGA16 は脂質ラフト画分に存在し、受精能獲得時に消失する; (3) 精子および精漿から精製した WGA16 のアミノ酸配列解析、およびその配列情報に基づく cDNA クローニングの結果から、WGA16 はジャカリン関連レクチン(JRL)ファミリーに属し、Zymogen Granule Protein 16 (ZG16)と高い相同性をもつ新規タンパク質である; (4) ヘパリン結合能をもち、精子表面 WGA16 はヘパリン存在下で精子から解離する; (5) X 線結晶構造解析から、WGA16 は JRL ファミリー分子に特徴的な b-シート構造のみからなる b プリズム I 構造をもち、糖鎖結合部位と推定ヘパリン結合部位が互いに反対側に位置する非対称構造をしている; (6) 精漿糖タンパク質の主要 *N*-型糖鎖の非還元末端がα-Gal 残基であるのと異なり、WGA16 の *N*-型糖鎖は GlcNAc および GalNAc 末端をもつ; (7) 精子を UDP-Gal で処理すると、WGA16 は精子表面から遊離すると同時に、精子表面に存在するβ-ガラクトース転移酵素の作用によってその糖鎖末端にβ-Gal 残基が付加される。以上のことから、WGA16 は前立腺から分泌されて雄性生殖器官中で精子表面のβ-ガラクトース転移酵素と結合することによって取り込まれ、精子を安定化して活性化を防ぐ働きをしており、受精能獲得時、雌性生殖器内に存在するヘパリンによって精子表面から除去されることによって、精子を受精可能な状態へと活性化させるものと推定される。

sperm, capacitation, lectin

講演番号：3A02p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ A 校舎 02 会場

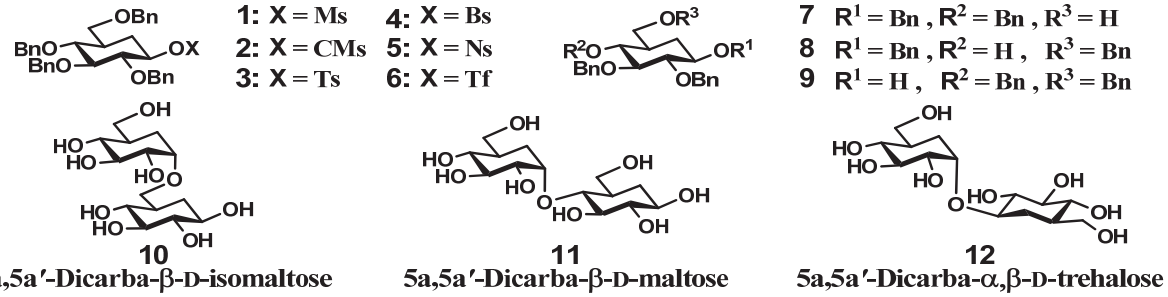
高濃度条件下での分子間カップリング反応によるジカルバグルコビオースの合成

Synthesis of Dicarbaglucobiose by use of intermolecular coupling reaction under high concentration condition

○館田 尚家、宮崎 達雄、鯵坂 勝美（新潟薬大院・応用生命科学）
○Naoya Tateda, Tatsuo Miyazaki, Katsumi Ajisaka (Grad. School of Niigata Univ. of Pharmacy and Applied Life Sciences)

カルバ糖は天然型の糖の環酸素原子がメチレン基に置換された化合物の総称である。この擬似単糖は生体内での酵素的・非酵素的反応が起こりにくい化学的構造を有しているので *in vivo* において高い安定性が期待できる分子である。また、近年ではそれらカルバ糖をもつ擬似二糖の合成がいくつか報告されている。例えば、非還元末端にカルバ糖を有する二糖は相当するグリコシダーゼの加水分解反応を受けない特徴をもつ。一方、還元末端にカルバ糖を有する二糖は、ヘミアセタール部位を有さないため非酵素的なメイラード反応を引き起こさない利点がある。さらに、両末端がカルバ糖である二糖ミミック分子は、これらの特徴を併せもつので、より高い生体内安定性を示す。しかしながら、これまでにカルバ糖のみで構成された二糖の合成報告は極めて少ない。これはカルバ糖のアノメリック位と別のカルバ糖のヒドロキシ基を効率的に繋ぐ手法がないことが原因である。そのため我々は、容易に合成できるカルバ-β-D-グルコースを鍵原料としてジカルバグルコビオースの合成研究を展開している。本発表では、分子間カップリング反応によりカルバグルコース同士を効率よく繋ぐために、カルバグルコースドナーの脱離基がカップリング反応に与える影響、および反応基質濃度の最適化について検討した結果を述べる。

大量合成したカルバ-β-D-グルコースを出発原料として、アノメリック位に種々の脱離基を有するカルバグルコースドナー（**1**-**6**）と遊離のヒドロキシ基をひとつ有するカルバグルコースアクセプター（**7**-**9**）を合成した。それらを用いて分子間カップリング反応における脱離基の検討を試みた。その結果、最も脱離能の高いトリフレート体 **6** のみカルバ二糖保護体が合成できることが分かった。ついで、反応条件に関して種々検討した結果、反応温度 0 ˚C にて高い反応基質濃度（2.4 M）にすると収率の向上が見られた。その後、このカップリング反応条件を用いることにより、最終的に三種類のジカルバグルコビオース（**10**-**12**）の合成を達成した。



Carbaglucose, Disaccharide mimics, Intermolecular coupling reaction

講演番号：3A02p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ A 校舎 02 会場

ウミシダ由来の糖リン脂質 CJP-シリーズの合成研究

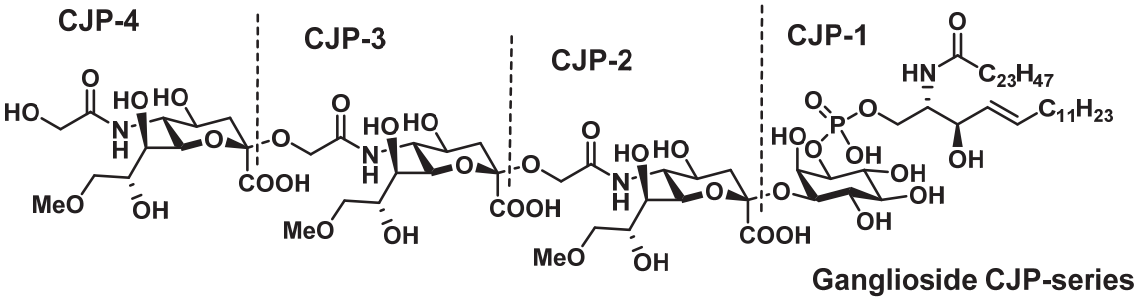
Synthetic Study on Glycophosphosphingolipids CJP-series from Comatulida Comonthus japonica

○武田 陽[1]、水野 孝星[1]、玉井 秀樹[1,2]、植木 章晴[1,2]、今村 彰宏[1]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMs)

○Yo TAKEDA[1], Takashi MIZUNO[1], Hideki TAMAI[1,2], Akiharu UEKI[1,2], Akihiro IMAMURA[1], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【目的】CJP-シリーズは、棘皮動物ニッポンウミシダ(*Comonthus japonica*)より発見されたイノシトールホスホセラミドを共通構造とした糖脂質である。棘皮動物に由来するシアル酸含有糖脂質（ガングリオシド）はいずれも、ラット褐色腫由来細胞PC-12に対してNGF（神経成長因子）存在下で強い神経突起進展作用を示すことが報告されている。一方、ニッポンウミシダ(*Comonthus japonica*)より発見されたCJP-シリーズは、NGF非存在下においても神経突起進展作用を有することが報告されており、各種神経疾患治療薬のシード化合物として期待されている。[1] しかしながら、極微量成分のため生理活性評価に対する十分な試料を天然より供給することは困難であり、有機合成による均一かつ大量の供給が望まれている。そこで、本研究ではCJP-シリーズの生理活性評価及び構造活性相関の解明をガングリオシド見据え、一連の糖脂質の全合成に取り組んだ。

【方法・結果】CJP-シリーズは、0～3残基の9-*O*-メチル-*N*-グリコリルシアル酸残基と*myo*-イノシトールから成る糖鎖部分とセラミドが、リン酸エステル結合を介して繋がった特異な構造を有している。そこで、CJP-シリーズを部分修飾シアル酸供与体、*myo*-イノシトール誘導体、リン酸セラミド部位に分割し各ユニットを合成後、非還元末端より順次伸長させることとした。シアル酸二量体、三量体構造を持つCJP-3,4の合成を見据え、9-*O*-Me-*N*-Trocシアル酸供与体を収率よく合成した。Bruzikらの手法[2]に従いスピロケタール形成による光学分割を経て、*myo*-イノシトール誘導体を合成した。さらに、CJP-シリーズ特異の短鎖スフィンゴシンを有するホスホリルセラミドの合成を行い、イノシトール誘導体との縮合反応によりCJP-シリーズの共通構造であるイノシトールホスホセラミド (CJP-1) 骨格の構築を達成した。さらに、CJP-2骨格の構築を検討したので、本発表にて報告する。



[1] Arao, K. *et al. Chem. pharm. Bull.* **2004**, *52*, 1140-1142.

[2] Bruzik, K. S. *et al. Carbohydr. Res.* **1989**, *195*, 67-73.

Glycophosphosphingolipids, Sialic acid, Organic synthesis

講演番号：3A02p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ A 校舎 02 会場

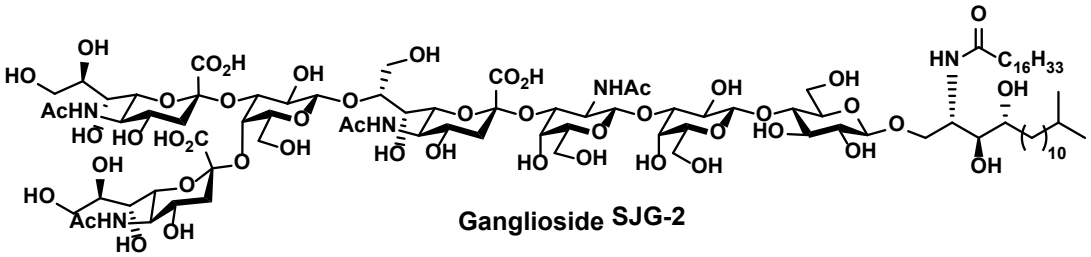
ガングリオシド SJG-2 に特異なシアル酸配列の合成研究

Synthetic study on unique sialoside sequence of ganglioside SJG-2

○坂本 紘一[1]、中島 慎也[1,2]、玉井 秀樹[1,2]、今村 彰宏[1]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Koichi SAKAMOTO[1], Shinya NAKASHIMA[1,2], Hideki TAMAI[1,2], Akihiro IMAMURA[1], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【目的】スフィンゴ糖脂質は、脊椎動物のみならず海綿動物、環形動物、原索動物、棘皮動物の細胞成分として豊富に存在する。シアル酸含有スフィンゴ糖脂質であるガングリオシドは、無脊椎動物類では棘皮動物門の動物にみられる。棘皮動物ガングリオシドは、哺乳類ガングリオシドとは異なる特異な構造を持つことが報告されている。さらに、棘皮動物ガングリオシドは、PC12に対して強力な神経突起伸展活性を示すことが明らかとなり、各種神経疾患に対するシード化合物として注目されている。本研究では、最も強い神経突起伸展活性が報告されたマナマコ(*Stichopus japonicus*)由来のガングリオシドSJG-2 [1)]の特異な分岐構造に着目し、構造活性相関解明に向けてSJG-2の全合成を目指した。

【方法・結果】ガングリオシドSJG-2は、七糖からなる糖鎖部分とセラミドで構成される。特に、内部シアル酸の8位水酸基から伸びるガラクトース残基には、3, 4位水酸基の双方に、さらにシアル酸が結合し、他に類を見ない特異な分岐構造を形成している。本研究ではまず、このユニークかつ合成困難と予想される分岐構造の構築を目指した。当研究室で開発した*N*-Trocシアリルガラクトース[2)] から誘導される種々の糖受容体を用い、ガラクトース4位へのシアル酸残基の導入を検討した。種々検討した結果、*N*-Trocシアリルガラクトースから誘導される、1,5 - ラクタム型シアリルガラクトースにおいて、α優先的に3,4-ジシアリルガラクトースを合成することに成功した。また、内部シアル酸8位へのグリコシル化反応についても検討したので報告する。



Ganglioside SJG-2

1) M. Kaneko, F. Kisa, K. Yamada, T. Miyamoto, R. Higuchi, *Eur. J. Org. Chem*. **2003**, 1004-1008.
2) T. Fuse, H. Ando, A. Imamura, N. Sawada, H. Ishida, M. Kiso, T. Ando, S.-C. Li, Y.-T. Li, *Glycoconjugate J.* **2006**, *23*, 329–343.

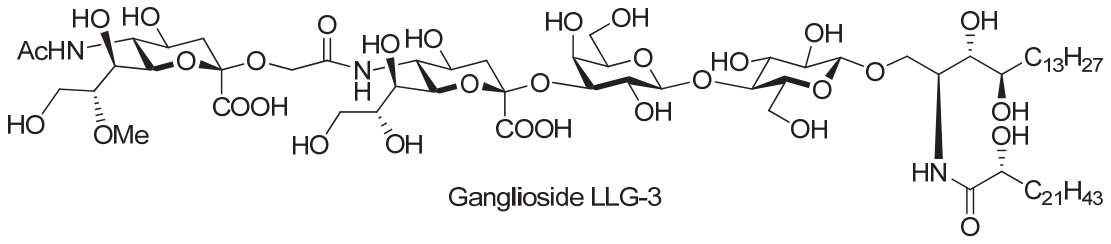
ganglioside, sialylation, organic synthesis

講演番号：3A02p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ A 校舎 02 会場

神経突起伸展活性をもつガングリオシド LLG-3 の構造活性相関研究 2
Structure-activity relationship study on neuritegenic ganglioside LLG-3 part 2

○山岸 愛実[1]、矢部（細田） 律子[1,2]、玉井 秀樹[1,2]、小西 美紅[1,2]、今村 彰宏[1]、矢部 富雄[1]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Megumi YAMAGISHI[1], Ritsuko HOSODA-YABE[1,2], Hideki TAMAI[1,2], Miku KONISHI[1,2], Akihiro IMAMURA[1], Tomio YABE[1], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【目的】棘皮動物由来ガングリオシドの多くは、ラット副腎髄質由来褐色細胞腫（PC12）に対して神経成長因子（NGF）存在下において神経突起伸展活性を示すことが明らかとなり、神経疾患の医薬資源として期待されている。我々は、比較的単純な直鎖四糖構造とセラミドから成るガングリオシド LLG-3 が、調べられた棘皮動物ガングリオシドの中で二番目に強力な神経突起伸展活性を有することに着目し、その構造活性相関の解明や最小有効構造の決定を目指してきた。昨年度の大会にて、ガングリオシド LLG-3 は糖鎖のみでも神経突起伸展活性を示すことと非還元末端側シアル酸の 8 位メチル基修飾が重要であることを報告した。今年度は、さらに種々の類縁体を合成し、最小有効構造の決定、及び作用機序の解明を目指した。
【方法・目的】まずは最小有効構造の決定に向け、非還元末端側シアル酸の 8 位にメチル基を有する三糖、二糖、単糖類縁体を設計し、有機化学的手法により合成した。これらの活性評価を行ったところ、三糖類縁体のみが神経突起伸展活性を示したため、ガングリオシド LLG-3 の神経突起伸展活性発現の最小有効構造を三糖構造とした。また、メチル基修飾の位置が神経突起伸展活性に与える影響を調べるため、非還元末端側シアル酸の 9 位にメチル基を有する三糖類縁体を合成した。さらに、活性の増強を目指し、決定した最小有効構造を用いた二量体、及び多量体の合成を試みた。本発表では、これらの類縁体の合成とともに活性評価から得られた知見について報告する。



Ganglioside LLG-3

1) M. Kaneko, K. Yamada, T. Miyamoto, M. Inagaki, R. Higuchi, *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 462–463.
2) H. Tamai, H. Ando, H.-N. Tanaka, R. Hosoda-Yabe, T. Yabe, H. Ishida, M. Kiso, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2330–2333.

ganglioside, neurite outgrowth, PC12 cell

講演番号：3A02p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ A 校舎 02 会場

II 型 ABO 抗原糖鎖の化学合成

Chemical synthesis of ABO histo-blood group type 2 antigens

○原 温[1]、今村 彰宏[1]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Atsushi HARA[1], Akihiro IMAMURA[1], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

＜目的＞　ABO 抗原糖鎖は、赤血球膜上の複合糖質中に存在し血液型糖鎖抗原として広く認識されている。これらの糖鎖抗原は、O 抗原糖鎖（Fucα1→2Gal）をコア構造として糖残基の種類および糖残基間の結合様式の違いによって定義され、さらに還元末端に続く糖鎖構造により 6 つのサブタイプ（I～VI）に分別される。II 型とは、ABO 糖鎖の Gal 残基が GlcNAc の 4 位にβ結合する様式を指し、サブタイプの中で最も多く存在する。ABO 糖鎖の生理学的役割のいくつかは知られているが、分子レベルでの機能解明はほとんど進んでいない。また、これらの糖鎖の合成例は限られ、特に II 型糖鎖の合成報告は数例しかない。本研究では、従来の化学合成法と異なる独自の戦略により II 型 ABO 抗原糖鎖を効率的に合成し、これらの機能解明に寄与することを目的とする。
＜方法・結果＞　II 型糖鎖は、*N*-アセチルラクトサミン（Galβ1→4GlcNAc）骨格をコア構造として持つ。*N*-アセチルラクトサミンは市販されているが極めて高価であることから、従来、ガラクトース供与体とグルコサミン受容体をそれぞれ別途合成しカップリングさせることで調製されてきた。しかしながら、II 型糖鎖の効率的合成を指向した場合、反応段階数の削減が重要な課題となる。そこで本研究では、Heyns 転位反応を利用して、比較的安価なラクツロースから簡便にラクトサミン誘導体へ導くこととした。また、A, B 型抗原を合成する際には、O 型コア糖鎖にガラクトサミン、ガラクトースをそれぞれα結合で導入する必要がある。本研究では、当研究室で独自に開発した DTBS 効果 [1]を利用して効率的にα-GalNAc/Gal 構造の構築を目指すこととした。

まず、本研究の鍵化合物となるラクトサミン誘導体を Heyns 転位反応により簡便に合成した。得られた二糖を適切な保護基の組み合わせにより受容体へと導き、フコース供与体との縮合反応に供す事で II 型 O 抗原糖鎖を合成した。次にアグリコンとして *N*-Cbz 保護されたアミノアルコールを高収率で導入した。得られた三糖誘導体のガラクトース 3 位のみを遊離の水酸基とすることで、A, B 型糖鎖の構築に向けた共通受容体とした。次に 4,6 位に DTBS 基を有したガラクトサミンおよびガラクトース供与体を調製し、先の共通受容体とカップリングさせることで A, B 型抗原糖鎖をそれぞれ合成した。最後に、すべての保護基を除去し、目的の ABO 抗原糖鎖を得た。

[1] Imamura, A.; Ando, H.; Korogi, S.; Tanabe, G.; Muraoka, O.; Ishida, H.; Kiso, M. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6725–6728.

glycosylation, oligosaccharide, histo-blood group

講演番号：3A02p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ A 校舎 02 会場

ビオチンリンカーに結合したケラタン硫酸オリゴ糖の合成

Synthesis of keratan sulfate oligosaccharides having biotin linker

○武田 尚子[1,2]、田村 純一[1,3]([1]鳥取大院工、[2]学振特研ＤＣ、[3]鳥取大地域環境)
○Naoko TAKEDA[1,2], Jun-ichi TAMURA[1,3] ([1]Grad. School Eng., Tottori Univ., [2]JSPS Research Fellow, [3]Dep. Regional Environ., Tottori Univ.)

【目的】損傷を受けた中枢神経の軸索は、損傷神経周辺のグリア瘢痕に蓄積されるプロテオグリカンやミエリン由来のタンパク質などで再生を阻害されることが報告されている。特に、軸索再生阻害作用にはプロテオグリカンの中でもケラタン硫酸(KS)が密接に関与していることが判明しつつある。天然に存在する KS オリゴ糖は、β-ガラクトース(Gal)とβ-N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)で構成された二糖単位の繰り返し構造をもつ直鎖多糖であり、Gal と GlcNAc の 6 位硫酸基の有無によって複雑な硫酸化パターンからなるヘテロ構造をもつ。現在 KS の生理活性の検討に使用されている基質は天然由来の化合物を用いることが多いため、分子の微細構造と生理活性との関係を議論しにくい。本研究では、軸索再生阻害活性のある KS オリゴ糖の硫酸化パターンや糖鎖長を分子レベルで明らかにすることを目的として、構造が明確な KS オリゴ糖の合成を行った。異なる硫酸化パターンをもつ KS オリゴ糖を個別に合成していく方法では繁雑な行程を要するため、糖鎖伸長の際に受容体にも供与体にも誘導できる二糖中間体を用いることによって、少ない行程数で KS オリゴ糖を合成することにした。また、軸索再生阻害が確認できるように、KS オリゴ糖の還元末端にリンカーを介してビオチンを結合させ、糖鎖を固相担体に保持できるようデザインした。
【方法・結果】複数の硫酸化パターンをもつ KS オリゴ糖を効率的に合成するため、硫酸化する水酸基を選択的に保護した二糖中間体を合成して用いた。この二糖から誘導された供与体と受容体を縮合することによって、KS オリゴ糖を位置選択的かつ立体選択的に合成できた。また、最小単位である二糖ではビオチンリンカーが結合した 4 種類の硫酸化パターンをもつ KS 二糖の合成に成功した[1)]。

1) N.Takeda and J. Tamura, ***Biosci. Biotechnol. Biochem.,*** in press.

Keratan sulfate, synthesis, oligosaccharide

講演番号：3A02p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ A 校舎 02 会場

ビオチン化コンドロイチン硫酸 D 型オリゴ糖の化学合成

Synthesis of biotinylated chondroitin sulfate D oligosaccharides

○松下 健也[1]、田村 純一[1,2] ([1]鳥取大院工、[2]鳥取大地域環境)
○Kenya MATSUSHITA[1], Jun-ichi TAMURA[1,2] ([1]Grad. School Eng., Tottori Univ., [2]Dep. Regional Environ., Tottori Univ.)

コンドロイチン硫酸(CS)は、D-グルクロン酸(GlcA)と N-アセチル-D-ガラクトサミン(GalNAc)からなる二糖単位の繰返しで構成される直鎖多糖である。CS は、この繰返し二糖の硫酸化パターンによって、CS-O、-A、-C、-D、-E などに分類されている。これら CS は、硫酸化パターンの違いによって様々な生理活性を示すことが知られている。例えば、 [β-GalNAc 6S(1→4)β-GlcA 2S]を繰返し二糖単位とする CS-D はニューロン伸長促進作用のあることが報告されている。しかし、通常使用される CS は天然物由来であり、同じ型のみで構成されていない。したがって硫酸化パターンやウロン酸の 5 位の立体配置に関して構造が不均一である。そのため、実際に CS のどのような微細構造が活性発現に関与しているのかは明らかでない。

近年、当研究室では、ビオチンリンカーを共有結合させた CS-O、-A、-E 4 糖をそれぞれ合成し、ミッドカインとの相互作用を検証した[1)]。本研究では CS-D オリゴ糖の機能を明らかにするため、ビオチン化 CS-D オリゴ糖の化学合成を行った。二糖ユニット合成では、隣接基関与能のないアジド基を 2 位に持つガラクトシル供与体を用いても、高収率かつβ選択的に二糖が得られることを示した。得られた二糖ユニットは、数工程を経て二糖供与体へと誘導した後、*N*-Z-2-アミノエタノールと縮合した。その後、硫酸化・ビオチン化等の工程を経てビオチン化 CS-D オリゴ糖を合成したので報告する。

1) J. Tamura, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **22**, 1371-1374 (2012).

Chondroitin Sulfate, synthesis, oligosaccharide

講演番号：3A02p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ A 校舎 02 会場

ナマコ由来フコシルコンドロイチン硫酸繰返し三糖の合成

Synthesis of fucosyl chondroitin sulfate repeating trisaccharide isolated from sea cucumber

○田村 純一[1,2]、田中 晴奈[2]、中村 歩[2]、武田 尚子[1,3]（[1]鳥取大院工、[2]鳥取大地域環境、[3]学振特研 DC）
○Jun-ichi Tamura[1,2], Haruna Tanaka[2], Ayumi Nakamura[2], Naoko Takeda[1,3] ([1]Grad. School Eng. Tottori Univ., [2]Dep. Regional Environ. Tottori Univ., [3]JSPS Research Fellow)

ナマコ体壁に存在する酸性多糖は、コンドロイチン硫酸繰返し領域にフコース分岐のある特異な構造をもつ。この多糖は経口投与でも抗血液凝固作用を示すことが知られており、医薬品開発への展開が期待される。しかし、フコース分岐の頻度や結合するフコースの数、糖鎖の硫酸化パターンには多くの多様性があり、構造と生理活性との関連はたいへん興味深い。今回、この多糖に頻出する繰返し三糖単位：β-D-GalNAc(4,6-diS)(1-4)[α-L-Fuc(2,4-diS)(1-3)]-β-D-GlcA の合成に初めて成功した[1)]ので報告する。糖鎖骨格の組み上げは、$GalN_3$-Glc 二糖に Fuc を結合する経路のみ成功し、Fuc-Glc 二糖に $GalN_3$ を縮合することはできなかった。縮合は立体選択的に行われ、水酸基の硫酸化後、脱保護を経て標的三糖に誘導した。

1) Tamura, J. et al. *Tetrahedron Lett.,* **54**, 3940 (2013).

Fucosyl chondroitin sulfate, Oligosaccharide synthesis, Acidic polysaccharide

講演番号：3A02p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ A 校舎 02 会場

分子内アグリコン転移反応を利用した、Extensin 親水性モチーフの合成研究

Synthetic study of hydrophilic motif of extensin using intramolecular aglycon delivery

○石渡 明弘[1]、Kaeothip Sophon[2]、武田 陽一[2]、伊藤 幸成[1,2] ([1]理研、[2]ERATO, JST)
○Akihiro ISHIWATA[1], Sophon KAEOTHIP[2], Yoichi TAKEDA[2], Yukishige ITO[1,2] ([1]RIKEN, [2]ERATO, JST)

【目的】ヒドロキシプロリンリッチ糖タンパク質 (HRGP) は、植物などに見られる翻訳後修飾、即ち、ヒドロキシプロリン (Hyp) に結合したオリゴ L-アラビノフラノシド (オリゴL-Ara*f*) などを含む糖鎖構造を有している[1)]。HRGP に分類される extensin のほか、CLV3 や CLE などの糖ペプチドホルモンの構造には、β-L-Ara*f* がみられる。β-L-Ara*f* は β-1,2-*cis* 配置であるため、化学合成上、その調達は困難である[2)]が、最近、当研究室ではナフチルメチルエーテル (NAP) を介した分子内アグリコン転移 (IAD)[2a)] を利用し、立体選択的に合成する手法を見いだし[3)]、ビフィズス菌より見いだされた新規β-L-アラビノフラノシダーゼ[4)]の基質としてパラニトロフェニル β-L-Ara*f* の立体選択的合成に成功している[5)]。今回、当研究室で開発した IAD を利用し、extensin のオリゴ L-Ara*f* ４糖構造などの立体選択的合成を行い、extensin の親水性モチーフの一つ、[Ser(Gal*p*$_1$)-Hyp(Ara*f*$_4$)-Hyp(Ara*f*$_4$)-Hyp(Ara*f*$_3$)-Hyp(Ara*f*$_1$)] の合成研究をおこなったので報告する。

【方法と結果】 植物由来の extensin の親水性モチーフには、Hyp リッチな繰り返し構造 (Ser-Hyp-Hyp-Hyp-Hyp) があり、その中には Hyp(Ara*f*$_4$) のようなオリゴ L-Ara*f* で修飾されたアミノ酸構造 (α-L-Ara*f*-(1→3)-L-Ara*f*-(1→2)-β-L-Ara*f*-(1→2)-β-L-Ara*f*-Hyp) も見いだされている。その合成の中で問題となる構築困難な β-L-Ara*f* 結合は、NAP エーテルを介した IAD を利用し合成することとした。Hyp(Ara*f*$_4$) 誘導体の合成では、まず α-L-Ara*f*-(1→3)-L-Ara*f* フラグメント、及び２度の IAD を用いて β-L-Ara*f*-(1→2)-β-L-Ara*f*-Hyp 誘導体を、それぞれ合成した。２つのフラグメントの IAD、すなわち DDQ 酸化による混合アセタールの形成を経て、MeOTf–DTBMP での分子内グリコシル化をおこなったところ、目的の三連続の β-L-Ara*f* を含む Hyp(Ara*f*$_4$) 誘導体を立体選択的に調製することに成功した。また、Hyp(Ara*f*$_3$) と Hyp(Ara*f*$_1$) 誘導体も同様に合成し[3)]、さらに Ser(α-Gal*p*) 誘導体の IAD による立体選択的に合成についても完了した。それらの接続による extensin の親水性モチーフの合成検討についても合わせて報告する。

参考文献
1) Velasquez, S. M. et al. *Science,* **2011**, *332*, 1401.
2) (a) Ishiwata, A. et al. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 4250; (b) Ishiwata, A. et al. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5525.
3) Kaeothip, S. et al. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 4250.
4) (a) Fujita, K. et al. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 38079; (b) Fujita, K. et al. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 5143.
5) Kaeothip, S., et al., *Carbohydr. Res.* **2013**, 382, 95.

hydroxyproline rich glycoprotein, stereoselective glycosylation, intramolecular aglycon delivery

講演番号：3A02p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ A 校舎 02 会場

4-メチルベンジル基を保護基とする O-結合型糖アミノ酸の合成と応用

Synthesis and application of O-glycosylated amino acid having 4-methylbenzyl protecting groups

○朝比奈 雄也[1,2]、武居 俊樹[3]、藤本 梨菜[1]、瀬戸 茉莉絵[1]、田中 洋成[1]、中原 義昭[1]、北條 裕信[1,4] ([1]東海大工生命、[2]東海大糖鎖研、[3]東海大理化学、[4]大阪大蛋白研)
○Yuya Asahina[1,2], Toshiki Takei[3], Rina Fujimoto[1], Marie Seto[1], Hiromasa Tanaka[1], Yoshiaki Nakahara[1], Hironobu Hojo[1,4] ([1]Dept. Appl. Biochem., Tokai Univ., [2]Inst. Glycoscience, Tokai Univ., [3]Dept. Chem., Tokai Univ, [4]Inst. Protein Res. Osaka Univ.)

我々は糖鎖水酸基の保護基としてベンジル(Bn)基を用いる糖アミノ酸、及び糖タンパク質合成を行っている。Bn 保護糖は、グリコシル化時に高い反応性を持つため、効率の良いオリゴ糖調製を可能とする。またペプチド固相合成法の最終脱保護後に、Low-acidity TfOH 処理を行うことによりペプチド鎖に損傷を与えることなく Bn 基の除去が可能である。本戦略により複雑な糖鎖骨格を有するコア 2 型 10 糖アミノ酸の構築と、その糖ペプチド合成が達成されている[1]。しかし、巨大な糖ペプチドになるにつれて、その糖鎖に損傷を与えること無く、選択的に Bn 基を脱保護することが困難となった。Bn 基と同様に糖誘導体に高い反応性を与え、同時に、より温和な酸性条件にて脱保護できる保護基が求められている。そこでより温和な酸性条件で脱保護が可能であると考えられる 4-メチルベンジル基を糖水酸基の保護基として用いることで、上記問題を解決できるかどうか検討することにした。

O-結合型コア 1 型 2 糖アミノ酸を目的化合物とし、合成に着手した。論文既知の Phenyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-galactopyranoside を出発物質とし、2 工程でメチルベンジル保護されたガラクトース供与体を調製した。得られた糖供与体とガラクトサミン誘導体を当研究室で開発したβ-ガラクトシル化法にて縮合し、2 糖へと誘導した。得られた 2 糖をフッ化糖へと導いた後、アミノ酸とグリコシル化反応を行い、目的のコア 1 型糖アミノ酸誘導体へ導いた。得られた糖アミノ酸が温和な酸性条件であるトリフルオロ酢酸処理により効率よく脱保護できるかどうかを検討した。また、得られたユニットの糖ペプチドチオエステル合成への応用結果についてもあわせて報告する。

[1] Ueki, A.; Takano, Y.; Kobayashi, A.; Nakahara, Y.; Hojo, H.; Nakahara, Y. *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 1742-1759.

Glycopeptide, Glycoprotein, Thioester

講演番号：3A02p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ A 校舎 02 会場

分子内グリコシド結合生成反応を利用する Kdo2 糖の合成研究

Synthetic study of a 2-4 linked Kdo disaccharide using intramolecular glycoside formation

○田坂 瑞葵、門脇 拓哉、蟻 瑞欽、一柳 剛（鳥取大農）
○Mizuki Tasaka, Takuya Kadowaki, Ruiqin Yi, Tsuyoshi Ichiyanagi (Tottori Univ.)

【目的】グラム陰性細菌は細胞外膜に複合糖脂質リポ多糖（LPS）を産生する．これらは，多糖，コア糖鎖，Lipid A からなり，その多くはコア糖鎖と Lipid A との架橋部にα2-4 結合を有する 2～3 分子の酸性糖 3-deoxy-D-*manno*-oct-2-ulosonic acid (Kdo)を有している. 我々は Kdo を含むコア糖鎖の合成を目指しており，これまでに Kdo 2 糖の合成に適した Kdo 中間体の合成方法を開発し，Kdo2 糖糖鎖および分岐 3 糖の合成を達成している［1]．しかし，Kdo 誘導体を糖供与体に用いるグリコシル化では 3-デオキシ糖である理由から立体制御，反応性の調節が困難なため選択性，収率に問題が残されている. 本研究では, Kdo 糖供与体の 1 位カルボキシル基と Kdo 糖受容体の 5 位をエステル化し，続いて分子内反応とすることにより，上記問題が同時に解決できるのではないかと考え[2]Kdo2 糖の合成を試みた.

【方法と結果】D-マンノースから 8 段階の合成を経て Kdo 糖鎖合成に適した Kdo 中間体 methyl 7,8-di-*O*-benzoyl-4,5-*O*-isopropyliden-3-deoxy-D-*manno*- oct-2-ulosonate を合成した. この化合物のアノマー水酸基をパラジウム触媒と炭酸アリルエチルによりアリル化し, 続いて 90%トリフルオロ酢酸水溶液で 4,5 位のイソプロピリデン基を除去したのち，塩化トリエチルシリルにより 4 位を選択的に保護を行う事で糖受容体とした．一方，アノマー水酸基を三フッ化ジメチルアミノ硫黄によりフッ素に変換し，25%アンモニア水溶液によりメトキシカルボニル基の加水分解を行い，糖供与体とした．これらの糖受容体および糖供与体を用いて N,N-ジシクロヘキシルカルボジイミドにより糖受容体の 5 位と糖供与体の 1 位のエステル化を達成した．今回はエステル化反応の詳細および分子内でのグリコシル化の反応の検討結果を報告する.

Reference [1] Ichiyanagi T. et al. *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 5964-5971. [2] Ando H. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6759 –6763.

LPS, glycosylation, Kdo

講演番号：3A02p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ A 校舎 02 会場

3-Deoxy-GlcNAc の合成
Synthesis of 3-Deoxy-GlcNAc
○狐塚 哲也、岩山 祐己、稲津 敏行（東海大工）
○Tetsuya Kitsunezuka, Yuki Iwayama, Toshiyuki Inazu (Tokai Univ.)

［はじめに］

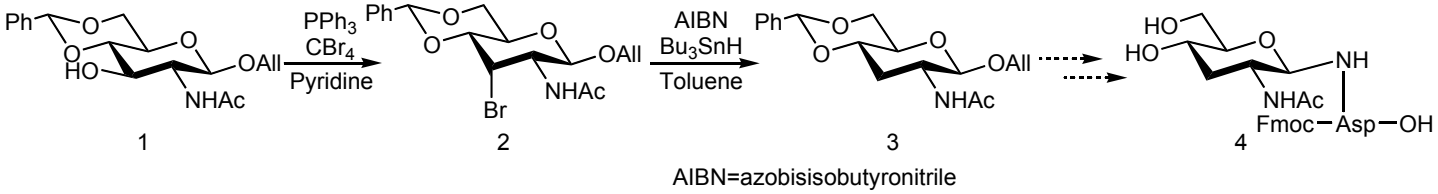
Mucor hiemalis 由来の endo-β-*N*-acetylglucosaminidase(Endo-M)は、N 結合型糖鎖の GlcNAc-GlcNAc 間を加水分解する酵素である。しかし、系内に GlcNAc 誘導体が存在していると、切り取った天然糖鎖を丸ごと、GlcNAc 誘導体上に転移させることができるため、糖鎖工学上注目されている。

ところで、この Endo-M を用いた糖鎖転移反応における受容体必須構造の解明など様々な研究から、GlcNAc3 位水酸基が酵素活性に大きな影響を与えていることが示唆されている。そこで、3 位水酸基と酵素活性との因果関係を検証するために、3-デオキシ GlcNAc 誘導体 **4** を用いる糖鎖転移反応を計画した。本研究では、その合成中間体であるアリル 2-アセトアミド-4,6-*O*-ベンジリデン-2,3-ジデオキシ-β-D-グルコピラノシド(**3**)の合成を検討した。

［実験方法及び結果］

常法により、合成した 4,6-*O*-ベンジリデン-β-アリルグリコシド **1** をそれぞれメシル化、トリフラート化し 3 位のデオキシ化の検討を行った。まず、3-*O*-メシル体、3-*O*-トリフラート体をそれぞれ THF 中、$LiAlH_4$ 存在下種々の条件で反応させたが、反応系が複雑になり 3-デオキシ体 **3** を得ることができなかった。

次に 3-ブロモ体 **2** のラジカル脱離によってデオキシ化することを検討した。3-*O*-メシル体、3-*O*-トリフラート体をそれぞれアセトン中 LiBr と反応させたが反応は進行しなかった。そこで、Appel 反応を用いてブロモ化を行った。**1** と四臭化炭素をピリジン中トリフェニルホスフィン存在下反応させたところ、**2** が得られることがわかった。得られた **2** と Bu_3SnH をトルエン中 AIBN 存在下反応させると目的とする **3** が 88%の収率で得られた。



3-Deoxy-GlcNAc, chemical synthesis, radical reduction

講演番号：3A02p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ A 校舎 02 会場

凍結反応を用いた糖鎖へのアミノ酸導入反応の検討

Examination of condensation reaction for glycosylamines and amino acid under the frozen condition

○藤川 紘樹[1]、松尾 一郎[2]、小泉 晶彦[1]、八須 匡和[1]、迫野 昌文[1]、高谷 万紀[1]、武田 陽一[1]、瀬古 玲[1]、伊藤 幸成[1,3] ([1]JST, ERATO、[2]群馬大院工、[3]理研)
○Kouki FUJIKAWA[1], Ichiro Matsuo[2], Akihiko Koizumi[1], Masakazu Hachisu[1], Masafumi Sakono[1], Maki Takatani[1], Yoichi Takeda[1], Akira Seko[1], Yukishige Ito[1,3] ([1]JST, ERATO, [2]Gradurated School of Engineering, Gunma University, [3]RIKEN)

【目的】タンパク質上のアスパラギン残基に結合した*N*-結合型糖鎖は、細胞内外あるいは細胞膜上で、様々な細胞内プロセスに関与し、重要な生物学的機能を担っている。これら糖タンパク質の構造と機能を有機化学的に解明していく上で、糖鎖とタンパク質中のアミノ酸残基を結合する反応は、糖タンパク質や糖タンパク質プローブの合成において極めて重要な段階として存在している。しかしながら、複雑な糖鎖とアミノ酸あるいはペプチド鎖の結合収率は、糖鎖とペプチド鎖の立体障害やグリコシルアミンの不安定さなどにより、芳しくない。これまでに我々は、キシレン等の比較的高い融点を持つ溶媒を凍結条件下、グリコシル化反応に用いる事で、反応速度が増加し、収率よくグリコシドが得られる現象を報告してきた[1]。本研究では、不安定なグリコシルアミンを用いたアミノ酸の導入に、凍結反応を適用し、その効果について検討を行った。

【方法及び結果】*N*-アセチルキトビオースのアミノ体とFmocグリシンペンタフルオロフェニルエステル(Fmoc-Gly-OPfp)を塩基存在下、DMSO(融点18.4℃)またはDMF(融点-61℃)に溶解し、濃度や温度を変えて反応を行い、HPLCを用いて反応を追跡した。その結果、基質濃度が20 mMの場合には、いずれの溶媒でも反応は円滑に進行したのに対し、2 mMの場合には、凍結が起こる条件のみが、良好な収率を与えた。これらの検討を基に、いくつかの高マンノース型糖鎖に対して凍結反応を用いたアミノ酸の導入を行い、高収率にて糖アミノ酸を得ることができた。

[1] Takatani, M.; Nakano, J.; Arai, M. A.; Ishiwata, A.; Ohta, H.; Ito, Y. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 3929-3932.

high-mannose type glycan, frozen condition, glyco protein

講演番号：3A02p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ A 校舎 02 会場

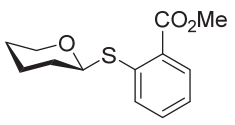
チオサリチル酸誘導体を脱離基にもつ各種糖供与体の反応挙動

Reactivity of thioglycosyl donors carrying thiosalicylic acid derivatives as leaving group

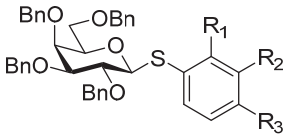
○田村 真奈美、櫻井 理沙、小林 真己、西田 芳弘、土肥 博史（千葉大院融合）
○Manami TAMURA, Risa SAKURAI, Masaki KOBAYASHI, Yoshihiro NISHIDA, Hirofumi DOHI (Chiba Univ.)

我々が以前に報告したチオサリチル酸メチルを脱離基にもつグリコシルドナー**1** [1, 2]は、不快臭を発することなく調製可能であり、種々のオリゴ糖鎖の合成が可能である。その一方で、カルボキシメチル基が塩基性条件下に弱いため、保護・脱保護反応時に一部分解するといった欠点がある。本研究では、本ドナーの立体選択性の制御および糖鎖合成における幅広い汎用性を目指して、*o*, *m*, *p* 位にメトキシカルボニルフェニル基を脱離基にもつガラクトシルドナー**2**–**4**およびグルコシルドナー**6**–**8**を、またジエチルアミドドナー**5** および **9** をそれぞれ設計した。これらドナーを合成してグリコシル化反応における反応性と立体選択性を検討したので報告する。

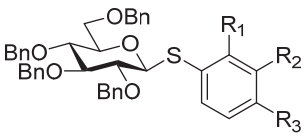
per–*O*–アセチル–β–D–ガラクトースおよびグルコースに *o*–, *m*–, *p*–メトキシカルボニルチオフェノールをそれぞれ作用させて脱離基を導入後、糖の保護基をベンジル基へと変換し、グリコシルドナー**2**–**4** および **6**–**8** を得た。得られたグリコシルドナー**2** および **6** のメチル基をジエチルアミド基に変換してジエチルアミドドナー**5** および **9** を合成した。各ドナーとグルコース由来のアクセプターとグリコシル化反応を行い、その反応性と立体選択性を比較した。その結果、ガラクトース型の *o* 体 **2** に比べて *m* 体 **3** は反応性が高く、*p* 体 **4** は同様の反応性を示した。ジエチルアミドドナー**5** および **9** は対応する *o* 体に比べて反応性が乏しかったが、活性化剤の等量を増やすことで同等の反応性を示した。立体選択性に関しては、一級アクセプターとのグリコシル化では高い β 選択性、2 級アクセプターに対しては α 選択性をそれぞれ発現した。



1



2: $R_1 = CO_2Me$, $R_2 = H$, $R_3 = H$
3: $R_1 = H$, $R_2 = CO_2Me$, $R_3 = H$
4: $R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = CO_2Me$
5: $R_1 = CO_2NEt_2$, $R_2 = H$, $R_3 = H$



6: $R_1 = CO_2Me$, $R_2 = H$, $R_3 = H$
7: $R_1 = H$, $R_2 = CO_2Me$, $R_3 = H$
8: $R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = CO_2Me$
9: $R_1 = CO_2NEt_2$, $R_2 = H$, $R_3 = H$

(1) Dohi, H.; Nishida, Y., et al. *Synlett* **2001**, 1446−1448.
(2) Miyachi, A.; Dohi, H.; Nishida, Y., et al. *Carbohydr. Res*. **2009**, *344*, 36−43.

Glycosylation, Oligosaccharides, Stereoselectivity

講演番号：3A02p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ A 校舎 02 会場

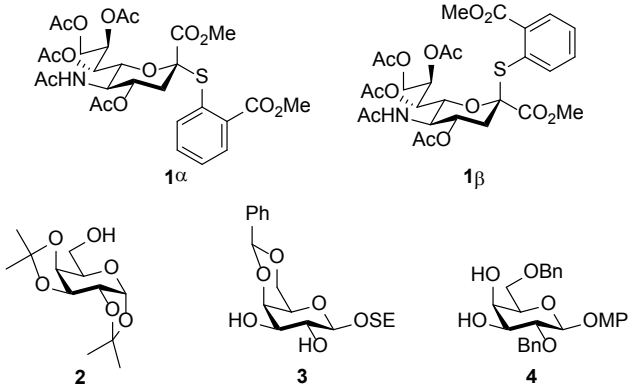
チオサリチル酸メチルを脱離基に持つシアリルドナーに関する研究

Investigation of sialic acid donors carrying methyl thiosalicylate as leaving group

○若杉 裕樹、田山 和哉、駒井 亮太、池田 理絵、木村 智文、西田 芳弘、土肥 博史（千葉大院融合）
○ Yuki WAKASUGI, Kazuya TAYAMA, Ryota KOMAI, Rie IKEDA, Tomofumi KIMURA, Yoshihiro NISHIDA, Hirofumi DOHI (Chiba Univ.)

立体選択的シアリル化は糖質合成における重要な課題の一つである。我々はチオサリチル酸メチルを脱離基に持つ糖供与体が特異な立体選択性を示し、生理活性糖鎖の合成に有用であることを報告してきた[1−3]。本研究では、この脱離基をシアリル化反応へ展開することを目的として、シアリルドナー **1α** および **1β** を設計・合成し、これらの反応性と立体選択性を調べた。

シアル酸のカルボン酸をメチルエステルへと変換した後、水酸基を全てアセチル化し、酸性条件下でチオサリチル酸メチル基を導入しシアリルドナーを **1β** 得た。メチルエステル化したシアル酸に塩化アセチルを作用させてβ−クロロ体を得た後、塩基性条件下でチオサリチル酸メチルを反応させて **1α** を合成した。得られた各ドナーに対し、適切に保護した様々なアクセプター**2**−**4** に対してシアリル化を行い、その立体選択性及び反応性を比較した。その結果、ジクロロメタン中でアクセプター**2** に対してシアリル化を行ったところ、**1α** は **1β**, SPh 体と比べて高い α−選択性を示した（α/β=4/1）。ニトリル系溶媒中でのアクセプター**3** に対するシアリル化においても、**1α** は **1β**, SPh 体と比べて高い α−選択性を示した（α/β=2.6/1）。アクセプター**4** に対するニトリル系溶媒中でのシアリル化においては、**1α** のみ反応が進行し、SPh 体に比べてやや反応性が低いものの高い α−選択性を示した（α/β=6.7/1）。



References
[1] Dohi, H.; Nishida, Y.; Tanaka, H.; Kobayashi, K. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 983-989; [2] Miyachi, A.; Miyazaki, A.; Shingu, Y.; Matsuda, K.; Dohi, H.; Nishida, Y. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 36-43; [3] Nishida, Y.; Tsurumi, T.; Sasaki, K.; Watanabe, K.; Dohi, H.; Kobayashi, K. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3775-3778.

Sialylation, Stereoselectivity, Oligosaccharides

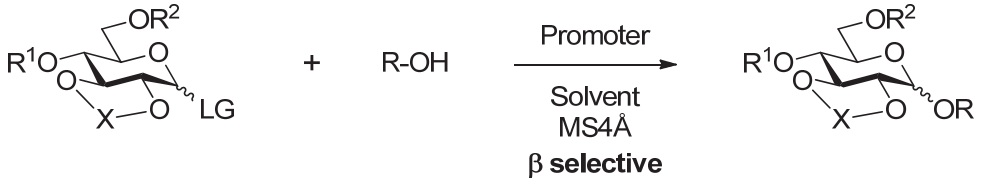
講演番号：3A02p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ A 校舎 02 会場

環状シリル系保護基を用いた立体選択的グリコシル化の検討

Examination of stereoselective glycosylation using cyclic silyl protecting group

○八神 なほ子[1]、小西 美紅[1,2]、玉井 秀樹[1,2]、植木 章晴[1,2]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Nahoko YAGAMI[1], Miku KONISHI[1,2], Hideki TAMAI[1,2], Akiharu UEKI[1,2], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【背景・目的】グリコシル化反応は糖鎖合成において鍵となる反応であり、糖鎖を効率的に合成する場合、グリコシド結合を立体選択的に形成することが非常に重要となる。現在、立体制御法としては、アノマー効果や隣接基効果、溶媒効果が一般的に用いられている。しかし、これらの効果は一定の立体選択性を発揮するものの、完全な立体選択性が得られることは稀であり、反応基質の構造、脱離基と活性化剤の組み合せなどにより影響されることが散見される。また、選択性を発現させる条件下では、基質の溶解性の低下、使用できる保護基が制限される等の問題がしばしば生じる。これらの実情を踏まえると、効率的かつ実用的な合成戦略を立てるために、立体制御法の選択肢を増やし、従来とは異なる方法論を開発することが有用であると考えられる。近年、当研究室ではガラクトース及びガラクトサミンの 4,6 位水酸基にシリル系の環状保護基を用いると、α優先的にグリコシド結合を形成するという知見が得られ[1]、保護基の嵩高さが立体制御に有効に働くことが示唆された。そこで本研究では、この知見を基にして、電子的関与に頼らない立体制御法の開発を目指し、保護基の嵩高さを利用したグリコシル化反応の立体制御を検討することとした。
【方法・結果】嵩高い置換基を糖供与体のアノマー位近傍に配置させることで、立体選択性を得ようと着想し、グルコ型のピラノースの 2,3 位水酸基に環状保護基を導入した糖供与体を合成した。得られた糖供与体をグリコシル化反応に供し、立体選択性を検証した結果、2,3 位にシリル系の環状保護基を導入したグルコース供与体において、優位なβ選択性が得られることが分かった。また、この立体選択性は 4,6 位水酸基の保護基に影響されることも明らかとなった。本発表では、これらの詳細について報告する。



[1] a) Imamura, A.; Ando, H.; Korogi, S.; Tanabe, G.; Muraoka, O.; Ishida, H.; Kiso, M. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6725–6728., b) Imamura, A.; Kimura, A.; Ando, H.; Ishida, H.; Kiso, M. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 8862–8870.

Cyclic silyl protecting group, Stereoselectivity, Glycosylation

講演番号：3A02p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ A 校舎 02 会場

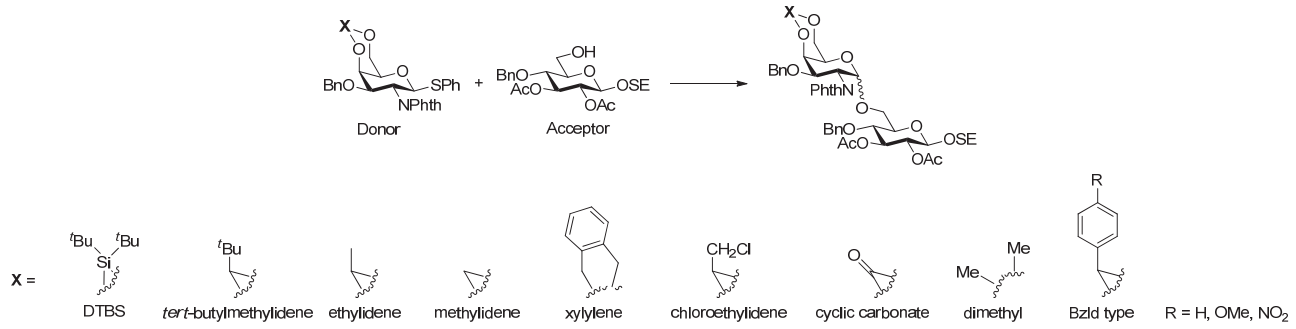
グリコシド化反応において環状保護基の存在が与える影響

The impact of cyclic protecting groups in the glycosylation.

○酒井 静雄[1]、今村 彰宏[1]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2]([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Shizuo SAKAI[1], Akihiro IMAMURA[1], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2]
([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【背景・目的】グリコシド結合は 1,2-*cis* 結合と 1,2-*trans* 結合に大別され、D-ガラクトサミンにおいては 1,2-*cis* / *trans* 結合はそれぞれα / β結合に対応する。天然において D-ガラクトサミンはα / β結合のいずれの結合様式でも存在し、多くの生理活性糖鎖中に見出される。ところが、有機化学的なα-ガラクトサミニドの合成はβ-ガラクトサミニドの合成に比べて困難であった。近年、ガラクトース及びガラクトサミンの 4,6 位水酸基保護基に di-tert-butylsilylene（DTBS）基や benzylidene（Bzld）基などの環状保護基を用いることで、α-選択性が向上するという興味深い知見が得られた。しかしながら、4,6 位水酸基保護基がなぜグリコシド化の立体選択性に影響を与えているかを系統的に研究した報告はない。そこで、本研究では特に環状保護基の立体的な嵩高さ及び保護基が形成する環構造の電子環境、並びに環構造の有無に着目し、それぞれの因子が立体選択性に与える影響を検討することとした。

【方法・結果】下図に示したような嵩高さ及び電気陰性度が異なる環状保護基並びに非環状保護基を 4,6 位水酸基に導入したガラクトサミンドナーを合成した。得られたドナーを共通のアクセプターとのグリコシド化反応に供し、立体異性体の生成比を比較することでそれぞれの保護基がグリコシド化反応に及ぼす影響を検証した。その結果、4,6 位水酸基保護基は以下のように立体選択性に影響を与えるという可能性が示唆された。（１）より嵩高い保護基はα-選択性を高める。（２）保護基が形成する環構造は六員環である時にα-選択性を高める。（３）DTBS 基が与える高いα-選択性には Si 原子の存在が関与する。（４）電気陰性度の大きい保護基はβ-選択性を高める。（５）環構造の存在がα-選択性を高める。得られた結果をもとに、環状保護基がグリコシド化反応の立体選択性に与える影響（原因）について考察した。

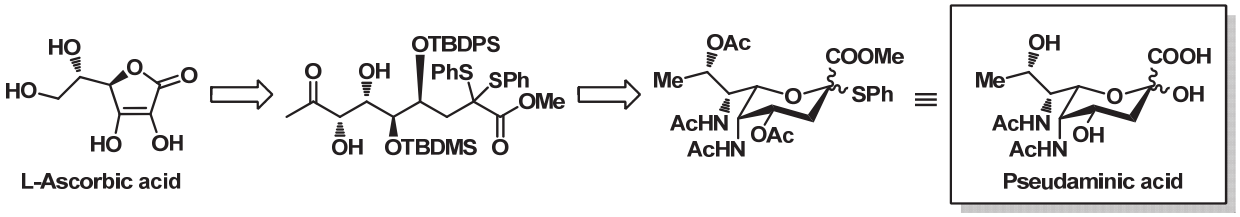


glycosylation, protecting group, stereoselectivity

講演番号：3A02p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ A 校舎 02 会場

シュウダミン酸糖供与体の合成研究
Synthetic study of pseudaminic acid derivatives as the glycosyl donor
○岩井 一晃[1]、鈴木 達哉[1,2]、植木 章晴[1,2]、玉井 秀樹[1,2]、今村 彰宏[1]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○ Kazuaki IWAI[1], Tatsuya SUZUKI[1,2], Akiharu UEKI[1,2], Hideki TAMAI[1,2], Akihiro IMAMURA[1], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【目的】胃腸炎や胃潰瘍の原因菌である *Helicobacter pylori* や *Campylobacter jejuni* などの細菌はフラジェリンと呼ばれるタンパク質を主成分とした鞭毛を有しており、その生育及び感染には鞭毛運動が重要であることが知られている。シュウダミン酸はフラジェリンを高度に修飾する九炭糖ウロン酸であり、近年、その生合成異常により細菌の生育阻害を引き起こすことが明らかとなり生物学的に注目されている。しかしながら天然から得られるシュウダミン酸は微量であるため、これら鞭毛性細菌類の感染機構解明に向けた生物学的研究には有機化学的アプローチによる安定供給が必須であり、これにより新しい原理に基づく感染予防薬の開発が期待できると考えた。現在までに、その全合成は伊藤ら[1)]によって報告されているものの、シュウダミン酸含有糖鎖の合成にはグリコシル化反応における反応性や立体選択性などの課題が残されている。そこで今回我々は、これら問題点の克服を目指した新規糖供与体の合成法の開発に着手した。即ち、シュウダミン酸 5 位及び 7 位アセトアミド基のグリコシル化反応への影響を考慮し、合成経路終盤にこれらを導入し、保護基及び導入段階を検討することにより制御可能であると考え合成を行うこととした。
【方法】本研究では合成過程にてアリールチオ基を導入し、糖供与体として有用なチオグリコシド体を構築する合成戦略を立案した。L-アスコルビン酸を出発原料とし、Wittig 反応による増炭を含む 7 工程を経て六炭素鎖の化合物へと誘導した。シュウダミン酸の 2 位に相当するカルボニル炭素α位のジチオアセタール化及び官能基変換を経てアルデヒド体へと導いた後、HWE 反応および不斉ジヒドロキシル化によりシュウダミン酸のグリセロール側鎖部分を構築した。これを基質とするシュウダミン酸の基本骨格の構築について報告する。



1) Y. J. Lee, A. Kubota, A. Ishiwata, Y. Ito, *Tetrahedron Lett*. **2011**, *52*, 418-421.

pseudaminic acid, total synthesis, glycosyl donor

講演番号：3A02p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ A 校舎 02 会場

新規セレノグリコシド合成法の開発とセレン多置換糖鎖合成への応用

Development of a Novel Synthetic Method for Selenoglycosides and It's Application for the Synthesis of Multiply-Selenium-substituted Glycan

○鈴木 達哉[1,2]、林 知衣香[1]、河村 奈緒子[1,2]、安藤 弘宗[1,2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2]
([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Tatsuya SUZUKI[1,2], Chieka HAYASHI[1], Naoko KOMURA[1,2], Hiromune ANDO[1,2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1], Makoto Kiso[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【目的】糖鎖の高次機能発現には糖鎖-蛋白質複合体の形成が重要であり、その認識複合体の立体構造情報の取得は分子レベルでの糖鎖の生物学的意義の解明において不可欠である。タンパク質の立体構造解析ではセレン原子の異常散乱効果を利用する位相決定法（MAD 法）を用いた X 線結晶構造解析が有力であるが、セレン標識蛋白質の調製がしばしば困難化することが一つの課題とされている。そこで我々は糖鎖-蛋白質複合体の X 線結晶構造解析において MAD 法を容易に適用可能とするセレン標識糖鎖の開発に取り組んでいる。これまでに、簡便な糖セレノ化反応を用いたセレノ糖の構築を報告しており[1]、一昨年度大会では合成した 6-MeSe-セレノラクトースとヒト由来ガレクチン 9NCRD との共結晶の MAD 法による X 線結晶構造解析について報告した[2]。しかしながら、1 つのセレン原子で位相決定ができる分子量は 20kDa (または 200 アミノ酸残基)が上限とされているため、大型蛋白質への MAD 法の適用には、セレン多置換糖鎖が必要となる。そこで本研究では、セレン多置換糖鎖の合成を行った。

【方法及び結果】アグリコン転移反応に発想を得て、セレノグリコシドを模倣した直鎖型セレノアセタールである BOMSeR (R=Me,Ph,SE)とグリコシルイミデート体をルイス酸存在下で反応させることで、単糖から四糖までの糖鎖の還元末端に 70%以上の収率で RSe を立体選択的に導入することに成功した。また、SE 体を TBAF により活性化しメチルセレノ基を有する求電子剤と反応させることで 1 分子内に 3 つのセレン原子をもつシアリルα(2-6)ガラクト―スの合成を達成した。

[1] Y. Kawai, H. Ando, H. Ozeki, M. Koketsu, H. Ishihara, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4653-4656.
[2] 2012 年度大会 2A32P38

Selenoglycoside, Glycan, X-ray crystallography

講演番号：3A02p23
講演日時、会場：3 月 29 日 17:59～ A 校舎 02 会場

セレノフコースの合成とフコース認識レクチンＡＯＬとの共結晶立体構造解析
Synthesis of Selenium-labelled Fucose derivatives and its application for the X-ray structural analysis of Fucose specific lectin AOL

○島袋 隼平[1]、牧尾 尚能[2]、鈴木 達哉[1,3]、安藤 弘宗[1,3]、山田 悠介[2]、石田 秀治[1]、若槻 壮市[2,4,5]、加藤 龍一[2]、木曽 真[3]([1]岐阜大・応用生物、[2]高エネ機構・放射光、[3]京都大・iCeMS、[4]スタンフォード大・医、[5]SLAC 国立加速器研究所)
○JUNPEI SHIMABUKURO[1], Hisayoshi Makio[2], Tatsuya Suzuki[1,3], Hiromune Ando[1,3], Yusuke Yamada[2], Hideharu Ishida[1], Soichi Wakatsuki[2,4,5], Ryuichi Kato[2], Makoto Kiso[3] ([1]Gifu Univ., [2]KEK-PF, [3]iCeMS, [4]Stanford Univ. Medicine, [5]SLAC Natl. Accelerator Laboratory)

【目的】糖鎖リガンドの高次機能発現には糖鎖 - 蛋白質複合体の形成が重要である。複合体形成は分子間の構造的な相補性に立脚しているため、その立体構造情報の取得は糖鎖の分子生物学的意義の解明に際して不可欠である。蛋白質の立体構造解析においてセレン原子の異常散乱を位相決定に利用する X 線結晶構造解析法(SAD 法、 MAD 法)は有力な手法の一つであり、蛋白質の立体構造解析が加速したと言われている。しかし、これらの手法においてはセレン標識蛋白質の調製がしばしば困難化することが 1 つの課題とされている。この課題の解決策として、我々の研究グループはセレノ糖を用いた糖鎖-蛋白質複合体の SAD 法・MAD 法による構造解析を報告した[1]。しかしながら、1 つのセレン原子につき位相決定ができる蛋白質の分子量は、20kDa(およそ 200 アミノ酸残基)が上限とされているため、大型の蛋白質への MAD 法の適用には問題があった。そこで我々は 1 分子内に複数の糖鎖認識ドメインを持つ蛋白質に対しては、セレノ糖を複数結合させることでこの問題を解決できるのではないかと推測した。本研究では、1 分子内に 6 箇所のフコース認識ドメインを有することが予測されていた 311 アミノ酸残基からなる *Aspergillus oryzae* 由来フコース特異的レクチン(AOL)を研究対象とし、フコースの水酸基をメチルセレノ基で置換したセレノフコシド誘導体を合成し、AOL との共結晶化と MAD 法による X 線結晶構造解析を試みることとした。

【方法及び結果】フコースに含まれる 4 つの水酸基をそれぞれメチルセレノ基に置換したフコース誘導体を目的化合物として設定し、α-およびβ-メチルセレノフコシドに関してはアグリコントランスファー法で、2,3,4 位置換体に関してはセレノ安息香酸誘導体を用いる糖セレノ化法[2]により合成した。次に合成したα-およびβ-メチルセレノフコシドと AOL の共結晶化を行ったところα-体において良好な共結晶を作成することができ、MAD 法を用いて AOL の立体構造を決定することができた。これらのことから、セレノ糖と複数の結合部位を有する蛋白質との共結晶を作成し MAD 法を適用することにより、位相決定及び立体構造解析が可能であることが初めて示された。

[1]2012 年度大会 2A3P38
[2]Yumiko Kawai, Ando Hiromune, Hideya Ozeki, Mamoru Kotetsu, Hideharu Ishida. *Org. Lett.* 2005, 7, 4653-4656.

Seleno fucoside, X-ray crystallography, lectin

講演番号：3A03a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ A 校舎 03 会場

低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 のエイコサペンタエン酸生合成酵素の局在性解析
Localization of eicosapentaenoic acid biosynthetic enzymes in a psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10
○小倉 隆太郎、趙 賢南、川本 純、栗原 達夫（京大化研）
○Ryutaro OGURA, Hyunnam CHO, Jun KAWAMOTO, Tatsuo KURIHARA (Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

【目的】エイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸(DHA)を含む ω-3 高度不飽和脂肪酸はリン脂質のアシル基として細菌からヒトまでの多様な生物に存在している。近年では、これらの脂肪酸が、私たちの健康に有益な効果をもたらすとされ、健康食品として注目されている。ヒトはこれらの脂肪酸を *de novo* 合成できないので、魚や植物から直接あるいはそれらの脂肪酸の前駆体を摂取する必要がある。南極海水より単離された低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は EPA を含むリン脂質を低温誘導的に生産する。遺伝子欠損株を用いた実験から、5 つの EPA 生合成に必要な遺伝子（*orf2*, *orf5*, *orf6*, *orf7*, 及び *orf8*）が同定された。これらの遺伝子はクラスターを作っており、ポリケチド生合成酵素と類似したタンパク質をコードしている。これらの EPA 生合成酵素は、アセチル CoA とマロニル CoA から EPA を生合成すると考えられる。これらの遺伝子欠損株では、低温において生育速度の遅延や細胞形態の異常が観察された。この生育・形態異常が EPA の培地への添加によって回復したこと、また、蛍光標識した EPA アナログ含有リン脂質プローブを外部添加したとき、プローブ分子が細胞分裂サイトに局在を示したことから、EPA は本菌の低温における細胞分裂に重要な役割を担っていることが示唆されている。本研究では、*S. livingstonensis* Ac10 の EPA 含有生体膜マイクロドメインの形成機構を明らかにすることを目的とし、EPA 生合成酵素の細胞内局在性を解析した。
【方法】*orf5* 及び *orf8* にコードされる EPA 生合成酵素に対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマをラットリンパ節細胞から作製した。生産された抗体について、抗原タンパク質への特異性を ELISA 法、及びウェスタンブロッティングにより評価した。本抗体を用いた免疫染色法によって、*S. livingstonensis* Ac10 の Orf5 及び Orf8 の細胞内局在性を蛍光顕微鏡観察した。
【結果と考察】抗 Orf5 抗体、及び抗 Orf8 抗体について、ELISA 及びウェスタンブロッティングにより、それぞれの抗体が Orf5 及び Orf8 を特異的に検出することがわかった。4°C で培養した *S. livingstonensis* Ac10 について、本抗体を用いた免疫染色を行った結果、Orf5 と Orf8 はともに細胞の両極、及び分裂サイトに局在することがわかった。以上の結果から、これらの EPA 生合成酵素の局在性が *S. livingstonensis* Ac10 の細胞分裂サイトにおける EPA 含有マイクロドメインの形成に寄与しているという可能性が示唆された。

eicosapentaenoic acid, protein localization, membrane microdomain

講演番号：3A03a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ A 校舎 03 会場

Subcellular localization of 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase responsible for the synthesis of EPA-containing phospholipids in *Shewanella livingstonensis* Ac10

○Hyun-Nam CHO, Wataru KASAI, Jun KAWAMOTO, Nobuyoshi ESAKI, Tatsuo KURIHARA
(Institute for Chemical Research, Kyoto University)

Shewanella livingstonensis Ac10, a psychrotrophic bacterium, produces omega-3 polyunsaturated fatty acid, eicosapentaenoic acid (EPA), as an *sn*-2 acyl chain of phospholipids at low temperatures. Our previous studies revealed that EPA plays a role in membrane organization and cell division at low temperatures. In addition, a chemically synthesized probe, a fluorescent phospholipid containing the eicosapentaenyl group, formed a membrane microdomain at the cell division site of this strain. Phosphatidic acid (PA) is a crucial intermediate in the synthesis of membrane phospholipids. In *Escherichia coli*, PA is produced from lysophosphatidic acid by 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase (PlsC). PlsC is supposed to be responsible for incorporation of EPA into PA. *S. livingstonensis* Ac10 has five genes coding for proteins homologous to *E. coli* PlsC (named PlsC1 through 5). When the PlsC1 gene was disrupted, the amount of phospholipids containing EPA was remarkably decreased, suggesting that PlsC1 is responsible for incorporation of EPA. Functional expression of PlsCs in a temperature-sensitive *plsC* mutant of *E. coli* showed that the substrate specificity of PlsC1 for fatty acyl-CoAs was similar to that of *E. coli* PlsC, including its activity toward EPA-CoA. The *plsC1* knockout strain showed a phenotype similar to that of the EPA-less mutant: the cells became filamentous, and multiple nucleoids were observed in a single cell at 4˚C. The size of the *plsC1* knockout mutant became normal by expressing PlsC1 from a plasmid in this strain. However, when *E. coli* PlsC was expressed in the *plsC1* knockout mutant, the cells remained filamentous though EPA-containing phospholipids were produced. By immunofluorescence microscopy, we found that PlsC1 is localized at the middle of the cells, whereas *E. coli* PlsC was not localized at this position. Mid-cell localization of PlsC1 was not observed in the EPA-less mutant that lacks *orf5*, one of the EPA-biosynthesis genes. These results suggest that the localization of PlsC1 depends on the presence of EPA-biosynthesis enzyme, and EPA-enriched domain is generated by the activity of PlsC1 localized at cell division site of *S. livingstonensis* Ac10.

eicosapentaenoic acid, 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase, membrane microdomain

講演番号：3A03a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ A 校舎 03 会場

エイコサペンタエン酸による低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の細胞分裂タンパク質の制御
Regulation of cell division protein of psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10 by Eicosapentaenoic acid
○岩野 友里子、永久 由利絵、川本 純、江崎 信芳、栗原 達夫 (京都大学)
○Yuriko IWANO, Yurie EIKYU, Jun KAWAMOTO, Nobuyoshi ESAKI, Tatsuo KURIHARA (Kyoto Univ.)

南極海水から単離されたグラム陰性桿菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は、低温誘導的に多価不飽和脂肪酸の一種であるエイコサペンタエン酸 (EPA) を生産する。EPA 生合成遺伝子を破壊した EPA 欠損株は、低温での生育速度が低下し、伸長した多核細胞 (> 4 μm) を形成した。さらに、本菌は細胞分裂サイトに EPA 含有リン脂質を含むマイクロドメインを形成していたことから、細胞分裂において、核様体の分離以降に関与する細胞分裂タンパク質の機能発現に EPA が重要であることが示唆されている。グラム陰性細菌の細胞分裂は、細胞分裂関連タンパク質群が分裂装置を形成することにより開始する。分裂装置に含まれる FtsE と FtsX の複合体は ABC トランスポーターのホモログであり、細胞分裂サイトにおいてペプチドグリカン層の加水分解に関わっていると考えられているが、生理的役割や機能発現機構の詳細は未だ不明である。本研究では、*S. livingstonensis* Ac10 の細胞分裂関連タンパク質 FtsEX と EPA の生理的相互作用を解明することを目的とした。EPA 欠損株に、FtsE、FtsX それぞれを高発現させるベクターを導入した結果、EPA の欠損による生育速度の低下、および細胞の伸長は抑制された。抗 FtsE、FtsX 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行い、EPA による FtsE、FtsX の膜局在性への影響を解析した結果、野生株の FtsE、FtsX は共に膜画分に局在したのに対し、EPA 欠損株では、膜局在性の FtsE が約 75% 減少していた。また、FtsE を高発現させた EPA 欠損株において、膜局在性の FtsE は増加していた。終濃度 65 μM の EPA を添加した培地を用いて EPA 欠損株を培養したとき、膜局在性の FtsE は野生株と同程度に回復した。さらに、HA タグ融合型の FtsE、FtsX それぞれを高発現させるベクターを導入し、EPA 欠損株の低温での生育と形態への影響を解析した結果、定常期初期において、伸長した細胞の形成が抑制され、野生株同様の約 2 μm の菌体が形成された。また、抗 HA タグ抗体を用いた免疫染色の結果、HA 融合型 FtsE と FtsX はいずれも細胞分裂部位と極に局在していた。これらの結果から、EPA の欠損は FtsE と FtsX の相互作用を妨げ、細胞分裂を阻害していることが示唆された。

eicosapentaenoic acid, cell division, psychrotroph

講演番号：3A03a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ A 校舎 03 会場

低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の低温誘導性外膜タンパク質の機能解析

Characterization of a cold-inducible protein of a psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10

○浅井 梓、杉浦 美和、水谷 彩乃、川本 純、江崎 信芳、栗原 達夫（京大化研）
○Azusa ASAI, Miwa SUGIURA, Ayano MIZUTANI, Jun KAWAMOT, Nobuyoshi ESAKI, Tatsuo KURIHARA (Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

【目的】南極海水由来の好冷性細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は、低温条件下において高度不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸（EPA）を生産する。EPA 生合成遺伝子破壊株（ΔEPA）では、低温での生育速度の低下、および細胞分裂障害が生じる。EPA の欠損が本菌の膜流動性には顕著な影響を及ぼさないこと、また、EPA が本菌の特定のタンパク質の機能発現に関与していることが示唆されている。本菌が低温誘導的に生産する主要外膜タンパク質の一つである Omp74 は、ΔEPA では野生株とは異なる構造を形成していたことから、Omp74 と EPA 含有リン脂質の相互作用を解析した。その結果、EPA 含有リン脂質存在下で、Omp74 は速やかにフォールディングすることが明らかとなった。EPA は脂溶性分子シャペロンとして機能し、Omp74 の構造形成に影響するものと考えられた。さらに、EPA 含有リン脂質が Omp74 の C 末端領域の構造変化を誘導することがわかった。Omp74 の C 末端領域にはペプチドグリカンとの結合モチーフが保存されていたことから、EPA の有無が Omp74 とペプチドグリカンとの相互作用を制御している可能性が示唆された。本研究では、*in vivo* における Omp74 とペプチドグリカンの相互作用について解析した。
【方法】細胞膜透過性の架橋剤として、*N*-ヒドロキシスクシンイミドエステルを有する DSP を用いた。DSP を野生株および ΔEPA に添加することで、ペプチドグリカンとペプチドグリカン周辺に存在するタンパク質のアミノ基を架橋した。架橋反応後の菌体からペプチドグリカンを精製し、SLP (Silkworm Larvae Plasma) 試薬を用いて定量後、SDS-PAGE に供した。同時に、精製したペプチドグリカンを還元剤で処理することで、DSP 中のジスルフィド結合を開裂し、SDS-PAGE に供した。抗 Omp74 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、ペプチドグリカンに架橋された Omp74 を解析した。
【結果・考察】野生株と EPA 欠損株から架橋後のペプチドグリカンを精製し、ウェスタンブロッティング解析を行った結果、いずれの場合も非還元条件では Omp74 は検出されなかった。一方、メルカプトエタノールで還元処理することで DSP を開裂し、ウェスタンブロッティング解析に供したときには、Omp74 が検出された。以上のことから、Omp74 とペプチドグリカンは DSP によって架橋される約 12 Å 以内の近接した位置に存在することが示された。本発表では、Omp74 のペプチドグリカンとの相互作用における EPA の影響についても報告する。

outer membrane protein, psychrotroph, peptidoglycan

講演番号：3A03a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ A 校舎 03 会場

ω-エチニル型エイコサペンタエン酸の合成法の確立

An efficient synthesis of ω-ethynyl eicosapentaenoic acid

○徳永 智久、渡辺 文太、川本 純、栗原 達夫（京大化研）
○Tomohisa TOKUNAGA, Bunta WATANABE, Jun KAWAMOTO, Tastuo KURIHARA (Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

【目的】南極海水より単離された低温適応細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は エイコサペンタエン酸（EPA）を *sn*-2 位にもつリン脂質を低温誘導的に生合成する。本菌の EPA 生合成遺伝子を破壊した EPA 欠損株では、低温での生育速度が低下する。さらに、細胞分裂の異常により伸長した細胞を形成する。これらの細胞異常は EPA を外部から添加することで抑制されることから、本菌の低温での生育に EPA が重要な生理機能を担っていると考えられる。しかし、その詳細な分子機構は明らかでない。エチニル基は炭素数 2 の非極性官能基であり、他の官能基とほとんど反応しないが、アジド基とは環化付加反応が効率良く進行する。この反応はクリックケミストリーに用いられる。ω-エチニル基を有する EPA（cEPA）はクリックケミストリーを応用した EPA 修飾タンパク質の検出や蛍光団の導入などに利用可能である。また、エチニル基は他の生体内物質にない特徴的なラマンスペクトルを有するためラマン顕微鏡法に利用できる。本研究では、EPA の生理機能発現における分子機構の解明に有効であると考えられる cEPA の効率の良い合成法の確立を目的とした。

【方法及び結果】
化合物 **1** および **2** を銅触媒によりカップリングし、TMS 基を除去して化合物 **3** を得た（図）。同様に化合物 **4** および **5** をカップリングした後、水酸基を臭素原子で置換して化合物 **6** を得た。次いで化合物 **3** および **6** をカップリングして化合物 **7** を得た。さらに化合物 **7** の非共役三重結合を P-2 ニッケルを用いて部分還元し、アセタールを加水分解して化合物 **8** とした。最後に化合物 **8** および **9** を Wittig 反応により縮合して目的とする cEPA のメチルエステル **10** を得た。

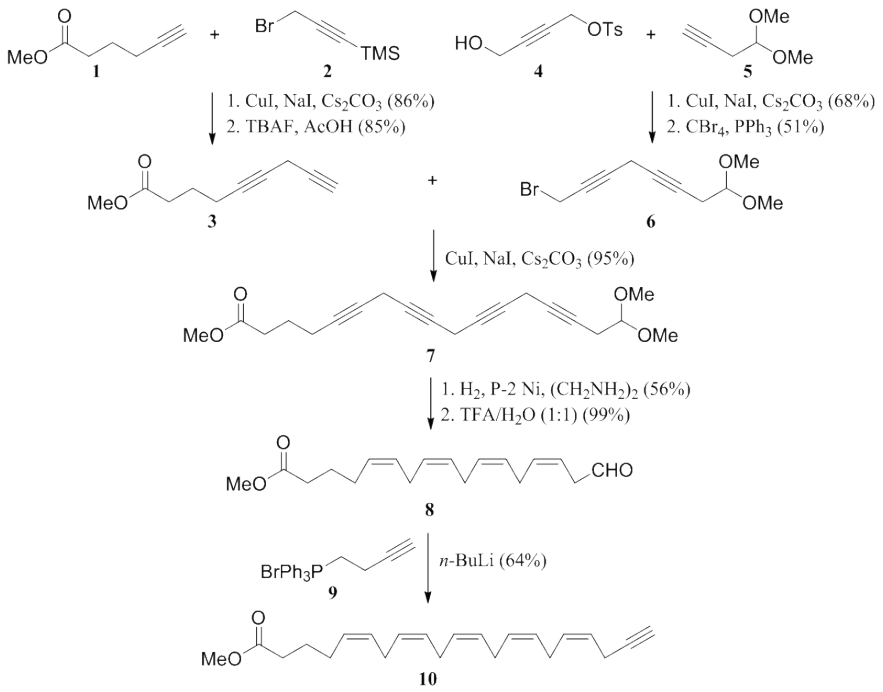


図. cEPA メチルエステルの合成.

polyunsaturated fatty acid, click chemistry, bioorthogonal tag

講演番号：3A03a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ A 校舎 03 会場

ω-エチニル型脂肪酸を用いた血管内皮細胞における不飽和脂肪酸修飾タンパク質の同定法開発
Identification of proteins modified with unsaturated fatty acid by click chemistry in HUV-EC-C
○山浦 貴之[1]、佐藤 翔[2]、川本 純[1]、江崎 信芳[1]、佐藤 智[3]、栗原 達夫[1] ([1]京大化研、[2]京都大学、[3]京大 LTM センター)
○Takayuki YAMAURA[1], Sho SATO[2], Jun KAWAMOTO[1], Nobuyoshi ESAKI[1], Satoshi SATO[3], Tatsuo KURIHARA[1] ([1]Inst.Chem.Res.,Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Res.Cent. LowTemp. Mat.Sci.,Kyoto Univ.)

【目的】近年、生活習慣病に対する関心が高まる中、エイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸（DHA）などの長鎖高度不飽和脂肪酸（PUFA）が有する効能に大きな注目が集まっている。特に、動脈硬化や高脂血症などの血管疾患の抑制に PUFA は有効である。また、オレイン酸（OLA）などの脂肪酸の作用を指摘する報告もある。しかしながら、PUFA の細胞に対する詳細な作用機構は明らかとなっていない。そこで、本研究では、極めて高い官能基選択性でヒュスゲン環化付加反応することが知られているアジドとアルキンによるクリックケミストリーを利用し、血管内皮細胞（HUV-EC-C）を用いて PUFA などの効果の作用機構解明へ繋がる、脂肪酸に修飾されるタンパク質の同定法開発を目的とした。
【方法】クリックケミストリーを利用するため、脂肪酸のメチル末端にエチニル基を導入したオレイン酸（cOLA）を合成した。この cOLA あるいは市販のエチニル基を付加したパルミチン酸 (cPAM)を添加した培地で HUV-EC-C を培養した。細胞内へのこれらの標識脂肪酸の取り込みは GC-MS を用いて確認した。標識脂肪酸が修飾するタンパク質を探索するために細胞を溶解後、Biotin-Azide もしくは Tetramethylrhodamine-Azide（TAMRA-Azide）を添加し、クリック反応を行った。SDS-PAGE 後、標識されたタンパク質を蛍光法あるいはウェスタンブロッティング-ストレプトアビジン HRP 法によって検出した。画像解析によって結果を解析した。さらに Affinity-purification mass spectrometry 解析を試みた。
【結果と考察】cOLA 処理した細胞から総リン脂質を抽出し、含まれる脂肪酸を GC-MS で解析した結果、cOLA が検出された。このことから cOLA は細胞の膜リン脂質に取り込まれることが示唆された。また、 cOLA または cPAM で修飾されるタンパク質が蛍光法、ウェスタンブロッティング-ストレプトアビジン HRP 法により検出された。今回開発した検出系は HUV-EC-C において OLA により修飾されるタンパク質を初めて示したものであり、この系はタンパク質を修飾し得る他の脂肪酸へ応用可能であると考えられる。

click chemistry, oleic acid, endothelial cell

講演番号：3A03a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ A 校舎 03 会場

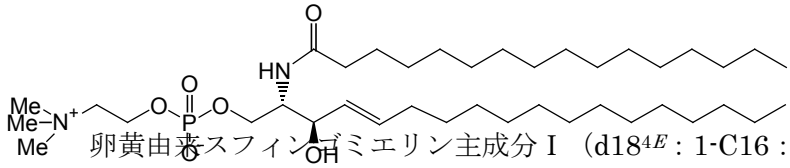
卵黄及びミルク由来のスフィンゴミエリン構成成分の単離

Isolation of the components from yolk and milk sphingomyelin

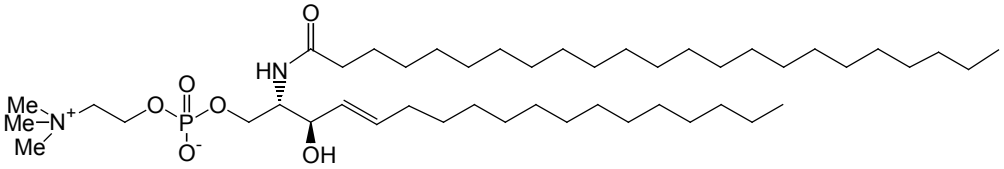
牧岡 富広、○石野 暢好、松本 恵実、中塚 進一 (長良サイエンス)
Tomihiro MAKIOKA, ○ Nobuyoshi ISHINO, Emi MATSUMOTO, Shin-ichi NAKATSUKA (Nagara Science)

【目的】スフィンゴミエリンは植物から高等動物まで様々な生物において広く分布しているリン脂質の一つである。また、生体リン脂質の中で唯一のスフィンゴリン脂質としてその機能に注目が集まっている。古くから研究対象とされてきたスフィンゴミエリンは他のリン脂質とは分離できるがスフィンゴイド塩基部や脂肪酸部の構造の違いによる各構成成分の分離には至っていない。スフィンゴミエリンの詳細な機能を解明するためには構成成分の分離精製は必須である。そこで、本研究ではスフィンゴミエリンの各構成成分を逆相HPLCにより精密な分析・分離を試みた。

【結果】スフィンゴミエリン等のリン脂質をHPLCで分析する場合、共役系が無く吸光度が低いためエンド吸収による検出に頼らざるを得ない。そのため高価なHPLC用溶媒を用いないと溶媒中の不純物の影響でベースの不安定化等が起こり、幾何異性体などのマイナー成分を厳密に検出することは困難である。これは植物セラミドにおいても同様であるが、我々はすでにコメなど4種の植物においてグルコシルセラミド構成成分22種を分離精製している。これは、通常の分析で用いる分析用セルをセル厚の薄い分取用セルに変えることで溶媒の影響を減少させる方法による*。この方法はスフィンゴミエリンの分析にも有効であり、複雑なミルク由来のスフィンゴミエリンにおいて、幾何異性体を含めて各ピークを検出することに成功した。卵黄及びミルク由来の各構成成分の分離精製を進めて、卵黄では約1gの主成分Ⅰを含む2種類、ミルクでも主成分Ⅱを含む6種類の成分を純度99%で得ることができた。



卵黄由来スフィンゴミエリン主成分Ⅰ（$d18^{4E}$：1-C16：0）



ミルク由来スフィンゴミエリン主成分Ⅱ（$d18^{4E}$：1-C23：0）

＊松本恵実, 中塚進一, FOOD Style 21, 17(3), 87-89, (2013).

Sphingomyelin, Phospholipid, Ceramide

講演番号：3A03a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ A 校舎 03 会場

原始腹足類の精巣から見いだされたユニークなコレステロール前駆体

Unusual cholesterol precursors in gonads of marine archaeogastropods

○川島 英城 (岩県大宮短大部)
○Hideki Kawashima (Iwate Pref. Univ.)

【目的】原始腹足類の性差を明らかにするために、ベッコウカサガイ（*Cellana grata*）の生殖腺を用いて、雌雄のステロール組成の解析を行ってきた。卵巣の場合、主要なコンポーネントとして、cholesterol 及び desmosterol から構成されていたが、精巣ではこれらに加え、zymostenol 及び zymosterol が認められた[1,2]。今回は、ベッコウカサガイを含む優占種（4 種類）の生殖腺を用いて、新たに delta 8 位に二重結合を有するコレステロール前駆体の同定を行ったので、その分析結果を報告する[3]。

【方法】常法に従って、カサガイ類生殖腺（4 種類）の全脂質をケン化後、分取用 TLC を用いて精製し、目的のステロール画分を得た。得られた画分を TMS 化後、誘導体を GLC 及び GC-MS で分析した。

【結果】本研究では、ベッコウカサガイの精巣からマイナーコンポーネントとして、delta 8 位に二重結合を有するコレステロール前駆体 4 種類が同定された。即ち、これらはすべて delta 8 位に二重結合を有する構造、5α-cholesta-8,14-dien-3β-ol、4-methyl-5α-cholesta-8,24-dien-3β-ol（4-methylzymosterol）4,4,14α-trimethyl-5α-cholesta-8,24-dien-3β-ol（lanosterol)、及び 4,4-dimethyl-5α-cholesta-8,24-dien-3β-ol（4,4-dimethylzymosterol)であった。さらに、これらの精巣及び卵巣での分布を検討した結果、主に精巣にその存在が認められた。これまでの結果から、ベッコウカサガイやヨメガカサガイ(*Cellana toreuma*)の精巣において、delta 8 位に二重結合を有するコレステロール前駆体の構造的多様性がより明確に認められた。なお、本研究で見いだされた前駆体の中で、4-methylzymosterol 及び 4,4-dimethylzymosterol は、マウス卵細胞において、減数分裂の活性化に関与することが既に報告されている[4]。

(1) *Lipids* **44**, 665 (2009), (2) *J Oleo Sci,* **60**, 501 (2011), (3) *J Oleo Sci,* **62**, 465 (2013)(4) *Nature* **374**, 559 (1995)

gonads, cholesterol precursor, gastropod

講演番号：3A03a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ A 校舎 03 会場

脂肪滴サイズによる脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸鎖の違い

Differences in fatty acid chains of monolayer phospholipid by the size of lipid droplet

○有澤 琴子、市 育代、安川 由希子、吉田 好海、藤原 葉子（お茶大院ライフ）
○Kotoko Arisawa, Ikuyo Ichi, Yukiko Yasukawa, Konomi Yoshida, Yoko Fujiwara (Ochanomizu Univ.)

脂肪滴はリン脂質の一重膜が中性脂肪を囲んだ構造をしており、膜上には脂肪合成・分解に関わる種々のタンパク質が局在している。リン脂質の脂肪酸鎖は細胞膜の流動性などの性質を規定し、細胞形態や膜タンパク質の機能に関与していることが示唆されているが、脂肪滴における膜リン脂質脂肪酸の意義は未知である。

我々は以前、白色脂肪細胞のモデル細胞である 3T3-L1 を用いて、脂肪細胞の分化に伴い脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸組成が変化することを報告した。脂肪滴の肥大化に伴い、脂肪滴一重膜のホスファチジルコリン（PC）およびホスファチジルエタノールアミン（PE）において飽和脂肪酸は減少し、一価不飽和脂肪酸は増加していたことから、脂肪滴膜の脂肪酸組成の違いが、脂肪滴の大きさと関連を持つ可能性があると考えた。

そこで、脂肪分解により小型脂肪滴脂肪滴を形成させた際の、脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸組成の変化について調べた。分化開始後 12 日目の成熟した 3T3-L1 細胞に 5 μM isoproterenol を添加して脂肪分解刺激を行い、6 時間後に細胞を回収した。この細胞と刺激を与えていない細胞から脂肪滴を分画し、それぞれのリン脂質膜に含まれる脂肪酸を GC-MS にて測定した。脂肪分解を誘導した細胞の脂肪滴膜の PC、PE では、刺激を与えていない細胞と比較して飽和脂肪酸が多く、一価不飽和脂肪酸は少なかった。以上より、脂肪分解時の飽和脂肪酸および一価不飽和脂肪酸では、脂肪細胞の分化に伴う変化と逆の現象が見られることが示された。

次に、3T3-L1 細胞以外の細胞種においても脂肪滴サイズと脂肪酸組成の関係について評価した。NIH3T3 細胞に脂肪滴融合タンパク質である FSP27 (fat specific protein 27) を過発現させ、これにより形成される大型脂肪滴と、コントロール細胞の小型脂肪滴を比較した。NIH3T3 細胞はオレイン酸添加により通常では直径 1～5 μm ほどの脂肪滴を形成するが、FSP27 を過発現させた NIH3T3 細胞では、直径 10 μm 以上の大きな脂肪滴が確認された。しかしながら、成熟した 3T3-L1 細胞の脂肪滴は直径 20 μm にも達することから、FSP27 の過発現のみでは 3T3-L1 細胞と同サイズの脂肪滴を得ることはできないことがわかった。また、FSP27 過発現時における脂肪滴膜の脂肪酸組成についても検討したが、コントロールとの間に有意な差は見られなかった。

現在、脂肪滴サイズとその膜リン脂質脂肪酸の関係をより詳細に検討するために、NIH3T3 細胞を用いてさらに大型の脂肪滴を作成させる方法を検討中である。

lipid droplet, fatty acid, phospholipid

講演番号：3A03a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ A 校舎 03 会場

スフィンゴ脂質並びにその代謝物が消化管に与える影響
Effect of sphingolipid and its metabolite on gastrointestinal cells
○榮田 拓起[1]、坪谷 朗行[1]、古田土 麗[1]、大西 正男[2]、木下 幹朗[1]、間 和彦[3]、高崎 一人[4]、原口 浩幸[4]([1]帯広畜大食品、[2]藤女子大人間生活、[3]日本製粉中研、[4]ファスマック研究開発部)
○Hiroki EIDA[1], Akiyuki TSUBOYA[1], REI KOTADO[1], MASAO OHNISHI[2], MIKIO KINOSHITA[1], Kazuhiko AIDA[3], Kazuhito TAKASAKI[4], Hiroyuki HARAGUCHI[4] ([1]Obihiro Univ., [2]Fuji Women Univ., [3]Nippon Flour Mill, [4]Fasmac)

先に我々の研究室では，スフィンゴ脂質特に植物スフィンゴ脂質（グルコシルセラミド（GlcCer））の食品成分としての機能について研究を行ってきており，大腸腺腫抑制効果1)やアトピー性皮膚炎様症状緩解効果等2)を報告してきた。しかしながら，スフィンゴ脂質,特に植物スフィンゴ脂質の消化管における代謝的運命は不明な点も多く，体内吸収についても否定的な報告も多い。そこで今回我々は，食餌性植物グルコシルセラミドの消化管動態について精査した。
材料及び方法：実験食は AIN-76 を基準に調製し，飼料重量当たり 0.5%となるように，添加する油脂に均一に懸濁させた状態で添加し調製した。実験動物としては，マウス Balb/c を用いて，全 2 週間，AIN-76(GlcCer）未添加で予備飼育を行い，消化管内の GlcCer をウォッシュアウトしたのち，16 時間絶食の後，2hr の間、0.5%GlcCer 混合飼料を投与した。投与の後，糞便を経日採取した。採取された糞便から常法により総脂質を抽出した後，TLC 並びに GC-MS に供し，定量・定性分析を行った。また，腸内菌叢解析の動物実験は試験期間を５週間とし，採便を 4 -5 週目に行った。解剖時，血清を採取した。得られた糞便は，pH 測定を行った後。糞便の一部から DNA を抽出し，次世代シーケンサーを用いて腸内細菌叢を解析した。
結果：短期的なスフィンゴ脂質の投与によって，マウスの糞便状態に，見かけの異常（下痢、血便等）は観察されず，糞便の見かけの採取量は有意に増加した。また，１週間の糞便のすべてを回収した場合，消化管内では分解されないと報告のある SG と比較して GlcCer，は有意に減少していた。一方，血清分析ではトリグリセリドが有意に低下した。また，糞中 pH はコントロール群で 7.8±0.5、0.1%GluCer 群で 8.0±0.4、0.5%GluCer 群で 7.7±0.3 と有意な差は見られなかった。また、次世代シーケンサーによる腸内細菌叢解析での結果についても報告予定である。
Aida et al, *J. Oleo Sci.* (2005)： Kinoshita et al, J. *Food Lipid* (2009)
Ono et al, Eur. J. Lipid Sci. Technol.(2010)

Glucosylceramide, digestion, sphingoid base

講演番号：3A03a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ A 校舎 03 会場

心筋梗塞自然発症モデルウサギのリポプロテイン脂質プロファイリング

Lipoprotein lipid profiling of myocardial infarction-prone rabbits

○竹田 浩章[1]、小池 智也[2]、山田 貴之[1]、和泉 自泰[1]、塩見 雅志[2]、吉田 優[2]、福崎 英一郎[1]、馬場 健史[1] ([1]大阪大院工、[2]神戸大院医)
○ Hiroaki TAKEDA[1], Tomonari KOIKE[2], Takayuki YAMADA[1], Yoshihiro IZUMI[1], Masashi SHIOMI[2], Masaru YOSHIDA[2], Eiichiro FUKUSAKI[1], Takeshi BAMBA[1] ([1]Osaka Univ., [2]Kobe Univ.)

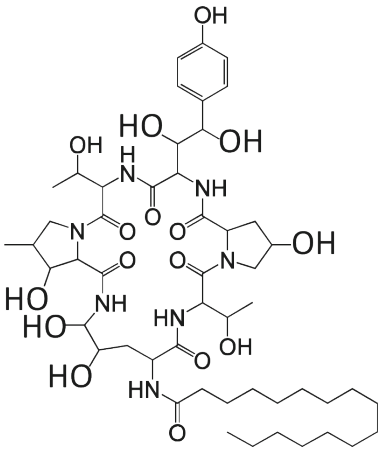
【研究背景】脂質は生体膜の主要な構成成分，エネルギー源であると同時に，神経伝達や生体防御を調節している．疎水性の高い脂質は血液に溶けないため，超低密度リポプロテイン (VLDL)，低密度リポプロテイン (LDL) などのリポ蛋白質を介して様々な組織に輸送されるが，その均衡が一旦崩れると重篤な循環器系疾患を引き起こすことが知られている．例えば，心筋梗塞は脂質代謝異常が危険因子の一つとされているが，自覚症状はなく，重症度を測る適切なバイオマーカーも発見されていない．よって，心筋梗塞などの冠動脈疾患の解明や信頼性の高いバイオマーカーを発見するためには，リポ蛋白質を形成している個々の脂質の役割を明らかにする必要がある．我々は，これまで脂質分子種の包括的かつ精確なプロファイリングを実施するために，超臨界流体クロマトグラフィー質量分析 (Supercritical fluid chromatography/mass spectrometry, SFC/MS) によるリピドーム解析手法を開発してきた．そこで，本研究では，心筋梗塞自然発症モデルウサギを用いたリポ蛋白質リピドーム解析により，病態発症時により特異的に変動する脂質分子種を明らかにすることを試みた．
【方法と結果】正常群として 25 月齢の日本白ウサギ，疾患群として 21 月齢の心筋梗塞自然発症モデル WHHLMI ウサギを用いた．それぞれのウサギから血清を採取し，超遠心分離により LDL および VLDL 画分を採取した．脂質抽出は Bligh and Dyer 法により行い，脂質分析は SFC/MS により実施した．脂質分子種の同定は Lipid Search (三井情報株式会社) により行った．正常群および疾患群のウサギ血清，LDL, VLDL 抽出物の SFC/MS 分析を行った結果，遊離脂肪酸 (FFA) やリン脂質 (LPC, PC, LPE, PE, PI, SM, Cer)，中性脂質 (DAG, TAG)，コレステロールエステル (CE) など合計 172 種類の脂質代謝物が定量された．両群の血清脂質プロファイリング結果を比較したところ，心筋梗塞の発症により FFA 以外の脂質クラスにおいて統計学的に有意な変動が確認された．さらに，個々の脂質分子種に着目すると，エーテル型脂質や ω-6 脂肪酸を側鎖に有する脂質等，炎症に関与する種々の脂質が著しく増加していることが分かった．一方，リポ蛋白質では多くの脂質成分において血清と類似した変動を示したが，一部の脂質分子種において VLDL 或いは LDL 画分に特異的な変動が観察された．以上の結果から，本研究では，心筋梗塞自然発症モデルウサギの血清およびリポ蛋白質中の包括的脂質プロファイリングにより診断マーカー候補となり得る多数の脂質分子種を捉えただけでなく，リポ蛋白質画分特有の情報を獲得できたことから，心筋梗塞の発症メカニズムの解明におけるリポ蛋白質リピドーム解析の有用性が示された．

lipoprotein, lipidomics, myocardial infarction

講演番号：3A04a01
講演日時、会場：3 月 29 日 09:00～ A 校舎 04 会場

キャンディン系抗真菌化合物アクレアシンの生合成に関わるオキシゲナーゼ遺伝子の同定
Identification of oxygenase genes involved in the biosynthesis of aculeacin, a candin antifungal agent

○荒井 裕太郎[1]、星野 泰隆[2]、清野 優花[1]、佐藤 浩之[1]、石川 淳[1,2] ([1]東邦大院理、[2]国立感染研)
○Yutaro ARAI[1], Yasutaka HOSHINO[2], Yuka SEINO[1], Hiroyuki SATOH[1], Jun ISHIKAWA[1,2] ([1]Grad. sch. sci. Toho Univ., [2]NIID)



【目的】糸状菌である *Aspergillus aculeatus* が産生する Aculeacin は環状ヘキサペプチドとアシル鎖からなる抗真菌化合物で、その生合成経路は未だ明らかでない。Aculeacin はその骨格に 4 つのヒドロキシアミノ酸を有しており、生合成への複数のオキシゲナーゼの関与が推定される。*A. aculeatus* のゲノム解析により見出した Aculeacin 生合成遺伝子群と考えられるクラスター内には、2 つの Cytochrome P450 遺伝子(*6043* 及び *6046*)と 3 つの 2OG-Fe(II) oxygenase 遺伝子*(6040*、*6044* 及び *6052*)が存在する。本研究では、3 つの 2OG-Fe(II) oxygenase 遺伝子に着目して遺伝子破壊・相補実験を行い Aculeacin 生合成への関与を検討した。
【方法】遺伝子破壊株はアグロバクテリウムを用いた ATMT 法により作成した。破壊株の相補には、自律複製型プラスミド pII99AMAI にそれぞれの遺伝子をクローニングした相補プラスミドを protoplast-PEG 法により導入して作成した。Aculeacin の生産性は *Candida albicans* を用いたバイオアッセイおよび LC-MS で解析した。
【結果】*6044* または *6052* 遺伝子欠損株では、Aculeacin 生産性の消失を確認し、同時に分子量が酸素原子 1 つ分小さい新たな代謝産物を認めた。一方、*6040* 遺伝子欠損株では、Aculeacin の生産性が減少し、Aculeacin の類縁体と考えられる別の代謝産物の生産性が増加した。以上の結果から、3 つの遺伝子が Aculeacin の生合成に関与している事が明らかとなった。現在、物理化学的手法を用いて代謝産物の構造解析を行っている。

oxygenase, lipopeptide, antifungal

講演番号：3A04a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ A 校舎 04 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来タイプ III 型ポリケタイド合成酵素 CsyB による 3-acetyl-6-alkyl-α-pyrone の生成

Production of 3-acetyl-6-alkyl-α-pyrones by a type III polyketide synthase CsyB from *Aspergillus oryzae*

○橋元 誠[1]、高圓 宰[1]、高橋 宏明[1]、須田 千尋[1]、北本 勝ひこ[2]、藤井 勲[1] ([1]岩手医科大薬、[2]東大院・農生科・応生工)

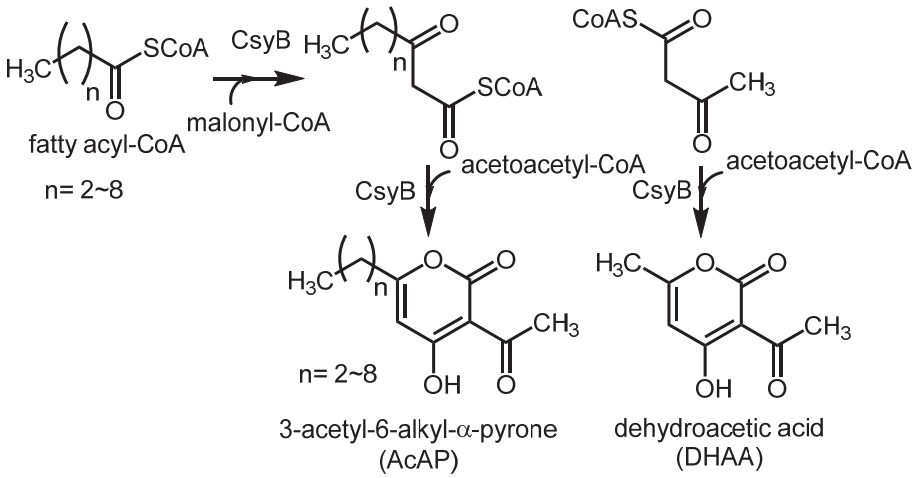
○Makoto HASHIMOTO[1], Tsukasa KOEN[1], Hiroaki TAKAHSASHI[1], Chihiro SUDA[1], Katsuhiko KITAMOTO[2], Isao FUJII[1] ([1]School of Pharmacy, Iwate Medical Univ.,, [2]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】

糸状菌由来のタイプ III 型ポリケタイド合成酵素（PKS）は 6-alkyl-α-pyrone や resorcylic acid を生産する。我々は、最近、*Aspergillus oryzae* 由来タイプ III 型 PKS である CsyB が開始基質の butyryl-CoA に malonyl-CoA（m-CoA）と acetoacetyl-CoA（aa-CoA）を順次縮合し、6 位にプロピル基をもつ 3-acetyl-6-alkyl-α-pyrone（AcAP）を生成すること見出している。CsyB のように 2 分子のジケタイドを縮合し、AcAP を生成するタイプ III 型 PKS は他に報告例がない。このユニークな反応を利用した新規有用物質の創出を目指し、今回、CsyB の開始基質の基質特異性および 2 分子のジケタイド縮合活性について解析した。

【方法・結果】

csyB 遺伝子を pColdTF にクローニング後、大腸菌 BL21(DE3)にて一晩誘導培養した。活性試験は Ni-NTA カラムにて精製した TF-CsyB 融合タンパクを用いた。C6～18 の fatty acyl-CoA と m-CoA、aa-CoA を用いて *in vitro* 解析した結果、C6～10 の fatty acyl-CoA を開始基質に用いた時、特異的に生成するピークを確認した。新たに生成したピークは UV 吸収スペクトルおよび LC-ESI-MS 解析から AcAP と判断した。また各反応で 2 分子の aa-CoA が縮合した dehydroacetic acid（DHAA）の生成も同時に確認された。次に aa-CoA の DHAA への変換を指標として、CsyB の 2 分子ジケタイド縮合活性を調べた結果、37℃、pH 8.0 付近で最大の活性を示すことを明らかにした。K_m は 14.4 μM、k_{cat} は 20.0 s^{-1} であった。



Proposed catalytic reaction of CsyB

type III polyketide synthase, biosynthesis, fungi

講演番号：3A04a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ A 校舎 04 会場

ヒカゲノカズラ由来新規トリテルペン合成酵素の遺伝子クローニング
Cloning of a novel triterpene synthase gene from Lycopodium clavatum

○荒木 健志、荒谷 博、久城 哲夫 (明治大院農)
○Takeshi ARAKI, Hiroshi ARAYA, Tetsuo KUSHIRO (Meiji Univ.)

【目的】

多様な構造と生理活性を有するトリテルペンの生合成において、oxidosqualene 環化酵素（OSC）はその基本炭素骨格を構築する鍵酵素である。シダ植物であるヒカゲノカズラ（*Lycopodium clavatum*）から見出された onocerin は、鎖状基質の両側から２環ずつ環化反応が起こったと考えられる特異な構造を有するトリテルペンである。通常は oxidosqualene のエポキシド側からのみ環化反応が起こるのに対し、onocerin では 2(3),22(23)-dioxidosqualene が基質となり両側のエポキシドから環化が起こるものと推測される。既知の OSC では、両側のエポキシドから基質を環化する酵素は報告されていない。そこで、どのような OSC により特異な構造が生じるのかを明らかにするため、本研究では onocerin の生合成に関与するヒカゲノカズラ由来 OSC の遺伝子クローニングとその酵素の機能解析を行った。

【方法】

ヒカゲノカズラ地上部より RNA を抽出・逆転写し、相同性を利用した PCR ならびに RACE 法により、OSC 遺伝子の全長 cDNA 得た。Lanosterol 合成酵素欠損酵母変異株での発現により生成したトリテルペンをヘキサンにて抽出後、GC-MS や NMR 解析を行い、構造決定を行った。

【結果】

PCR 法により 3 種類のヒカゲノカズラ由来の OSC 遺伝子と思われる配列断片が得られた（*LcA, LcB, LcC*）。これらは互いに約 55%のアミノ酸配列同一性を示し、他の植物由来 OSC の配列と比較したところ、*LcC* のみ既知の OSC と低い相同性を示した。LcC に関して酵母での発現を行ったところ、GC-MS 解析によってトリテルペンの生成が確認された。本生成物は分子イオンピークとして *m/z* 442 与えたことから、2(3),22(23)-dioxidosqualene を基質として反応が行われたことを示唆している。また、onocerin 標品のリテンションタイムと異なることから生合成の中間体であることが推測された。本化合物の NMR を測定したところ、22,23 にエポキシドを有する２環性トリテルペンであることが判明した。これにより、本生成物は onocerin の生合成中間体ではないかと考えられ、*LcC* はヒカゲノカズラの onocerin 生合成の第一段階をコードする新規トリテルペン合成酵素遺伝子であることが示唆された。

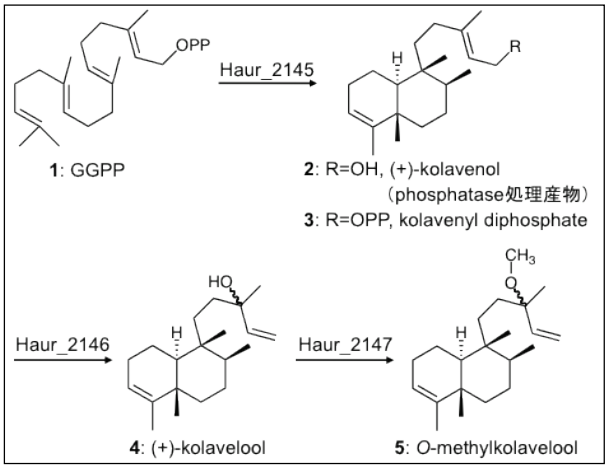
oxidosqualene cyclase, onocerin, Lycopodium clavatum

講演番号：3A04a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ A 校舎 04 会場

Herpetosiphon aurantiacus 由来の新規ジテルペン生合成遺伝子群の機能解析
Functional analysis of a novel diterpene biosynthetic gene cluster from *Herpetosiphon aurantiacus*.

仲野 千秋[1]、○大嶋 美咲[2]、佐藤 努[1,2]、星野 力[1,2] ([1]新潟大院自、[2]新潟大農)
Chiaki NAKANO[1], ○Misaki OSHIMA[2], Tsutomu SATO[1,2], Tsutomu HOSHINO[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agri., Niigata Univ.)

【背景】我々は、以前結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv の Rv3377c が GGPP **1** から tuberculosinyl diphosphate を合成するジテルペン環化酵素であり、隣接する Rv3378c が二リン酸の脱離に伴う水付加反応を触媒し、結核菌の免疫調節因子である tuberculosinol および (13*R*, *S*)-isotuberculosinol を合成するジテルペン合成酵素であることを明らかにした[1-4]。Rv3378c は、既知のテルペン合成酵素と相同性を示さない新規酵素である。そこで我々は、本酵素ファミリーの更なる知見を得ること、および新規テルペンの発掘を目的とし、Rv3378c 相同遺伝子の探索と機能解析を行った。
【方法・結果】緑色非硫黄細菌の *Herpetosiphon aurantiacus* DMS 785 の Haur_2146 が Rv3378c と 24% の相同性を示した。また、上流の Haur_2145 は Rv3377c と 28%の相同性を示し、下流の Haur_2147 は methyltransferase ホモログであることが判明した。そこで、大腸菌発現系にて調製した各組み換え酵素を精製し **1** との酵素反応を行った。Haur_2145 は環化開始のプロトン付加を担う DXDD motif を有するが、二リン酸の脱離を担う DDXXD motif を持たないことから、酵素反応産物は二リン酸体と考えた。そこで、Haur_2145 と **1** との酵素反応後、phosphatase 処理を行い、ヘキサン抽出物を GC-MS にて解析したところ、未知アルコール体 **2** を検出した。単離・構造解析の結果、**2** の構造を(+)-kolavenol と決定した。従って、Haur_2145 は **1** から kolavenyl diphosphate **3** への環化反応を担うジテルペン環化酵素と同定した。続いて、Haur_2145、Haur_2146 と **1** との酵素反応を行い、(+)-kolavelool **4** を単離同定した。即ち、Haur_2146 は二リン酸の脱離に伴う水付加反応を担う酵素であり、Rv3378c とは異なり水付加反応の立体化学を厳密に制御していることが分かった。最後に、Haur_2145、Haur_2146、Haur_2147 と SAM を用いた **1** との酵素反応により、新規物質 *O*-methyl-kolavelool **5** が得られ、Haur_2147 が **4** の水酸基をメチル化する *O*-methyltransferase であることが判明した。本研究により、Rv3378c 相同遺伝子を含む新規ジテルペン生合成遺伝子群の機能を明らかにすることができた。



1) C. Nakano *et al*., *Chem. Commun*., 1016, (2005). 2) C. Nakano & T. Hoshino, *ChemBioChem*, **10**, 2060, (2009). 3) C. Nakano *et al*., *BBB*., **75**, 75, (2011). 4) T. Hoshino *et al*., *OBC*, **9**, 2156, (2011).

diterpene, *Herpetosiphon aurantiacus*, terpene synthase

講演番号：3A04a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ A 校舎 04 会場

Methylococcus capsulatus スクアレン合成酵素～特に NADPH 結合サイトの特定～
Squalene synthase from Methylococcus capsulatus: identification of the NADPH binding site
○大竹 佳奈[1]、渋谷 智[1]、星野 力[1,2] ([1]新潟大院自、[2]新潟大農)
○Kana OTAKE[1], Satoshi SHIBUYA[1], Tsutomu HOSHINO[1,2] ([1]Grad.Sch.Sci.Technol.,Niigata Univ., [2]Fac.Agri.,Niigata Univ.)

【背景】本研究で使用したメタン酸化細菌 *Methylococcus capsulatus* は、真核生物のみが産生するとされていたステロール物質（ラノステロール等）を多量に産生できる珍しい原核生物である。[1)] 原核生物由来のスクアレン合成酵素（SQS）に関する研究は未だ *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 由来の 1 例のみしか報告されておらず[2)]、この細菌は squalene-hopene cyclase により hopanoid のみを生産する点で *M. capsulatus* と異なるが、C 末に膜貫通ドメインを持たないという点で共通している。我々は、FPP の結合部位を部位特異的変異実験によって同定してきた。[3)] ヒト SQS のＸ線構造解析が報告されているが、スクアレンの産生に必須な NADPH の結合部位は未だ特定されてない。また、反応過程で生じるカルボカチオン中間体を安定化するアミノ酸残基も特定されてない。
【方法・結果】当研究室では、これまで *mc*SQS の NADPH 結合部位を特定するための予備的な実験結果を報告したが [4)]、*mc*SQS の活性が低く、信頼性が乏しかった。[4,5,6)] そこで酵素精製方法及び酵素活性測定の至適条件の再検討を行い、酵素活性を 10 nmol/min/mg から 800 nmol/min/mg と他の生物種由来の SQS と遜色ない数値に上昇させることができた。[6)]新たな実験方法で NADPH の結合に関与する可能性があるアミノ酸残基を置換した変異酵素を作製し直し、再度中間体プレスクアレン２りん酸(PSPP) 及びスクアレンの定量と速度解析による K_M, kcat, kcat/ K_M 値の算出を行い、M291, T295, L296, V311, K312, T314, R315 が NADPH 結合部位を構成することを明らかにした。K312, R315 は側鎖の+電荷で NADPH をトラップすると考えられる。T295 と T314 は水素結合を介した NADPH 結合に関与し、M291, L296,V311 は空間を埋め、極性アミノ酸残基を正しい位置に配置させる役割があると推定した。さらに、ホモロジーモデルを詳細に検討し、反応途中で生じるカルボカチオンを安定化しそうな芳香族アミノ酸残基をピックアップした。変異酵素を作製し速度解析実験を行った結果、W224 と F32 のπ電子がカルボカチオンの安定に関与する可能性が示唆された。
【参考文献】1) C. Nakano et al. *BBB,* **71**, 2543-2550 (2007).2) S. Lee & C.D. Poulter, *J. Bacteriol.* **190**, 3808 –3816 (2008). 3）大竹ら(2012)、農芸化学会 3C22p19.4)渋谷ら（2009)、農芸化学会要旨集 p.167.5) 佐々木ら (2005)、農芸化学会要旨集 p.5. 6) 小林ら (2006). 第 16 回ドリコールおよびイソプレノイド研究会例会要旨集、p 16. 7）斉藤、大竹ら（2012)、ドリコールおよびイソプレノイド研究会例会 p.11.

squalene synthase, NADPH, Methylococcus capsulatus

講演番号：3A04a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ A 校舎 04 会場

イネ由来のパルケオール合成酵素 Y257 残基の役割について

Functional analysis of Y257 residue involved in parkeol synthase from Oryza sativa

○鈴木 明日香[1]、相川 侑子[2]、伊藤 遼介[1]、星野 力[1,2] ([1]新潟大院自、[2]新潟大農)
○Asuka SUZUKI[1], Yuko AIKAWA[2], Ryosuke ITO[1], Tsutomu HOSHINO[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agri., Niigata Univ.)

【目的】当研究室では *Oryza sativa* 由来のトリテルペン合成酵素(OSC)を同定した。[1] その中で parkeol のみを産生する酵素(以下 OsOSC2)を見出した。これは parkeol 合成酵素として初めての例である。Parkeol **2** と lanosterol **1** 生合成の相違点は、反応終結の際のプロトン脱離の位置が異なる点のみである（parkeol は H-11 脱離、lanosterol は H-9 脱離)。*S. cerevisiae* 由来の lanosterol 合成酵素(ERG7)の場合は、H234-Y510 の 2 残基が H-9 脱離に関与する。[2] OsOSC2 の Y257 が ERG7 の H234 に相当する。H234 残基は 3 環性、4 環性カチオンの安定化に関与すると推定された。[2] OsOSC2 の Y257 も同様の機能があるかどうかを検討した。

【方法】QuikChange 法により Y257 残基を Ala に置換し、*S. cerevisiae* GIL77 株へ形質転換した。野生株と変異株の酵素産物の変化を *in vivo* において解析した。

【結果】Y257A 変異株が産生するトリテルペンを図 1 に示した。**2~11** の計 10 個の産物を同定した。ERG7 H234A では、**1**、**2**、**6**、**7** の 4 環性プロダクトのみを産生した。[2] OsOSC2 の Y257A 変異株では、4 環性のプロダクトが大部分を占めた。また、ERG7 H234A では見出されていない 3 環性プロダクト **5** もわずかに検出した。興味深いことに立体化学が異なる産物(**3** と **4**; **7** と **8**; **2** と **9**：20-epimer 体)が複数確認された。この事から Y257 残基は立体化学の制御に重要な役割を担っていると考えられた。なお、化合物 **3** と **4** の 20 位の立体化学は **4** の、化合物 7 と 8 の 20 位の立体化学は **7** の Me-21 の化学シフトをそれぞれ参考にした。[3] [4]

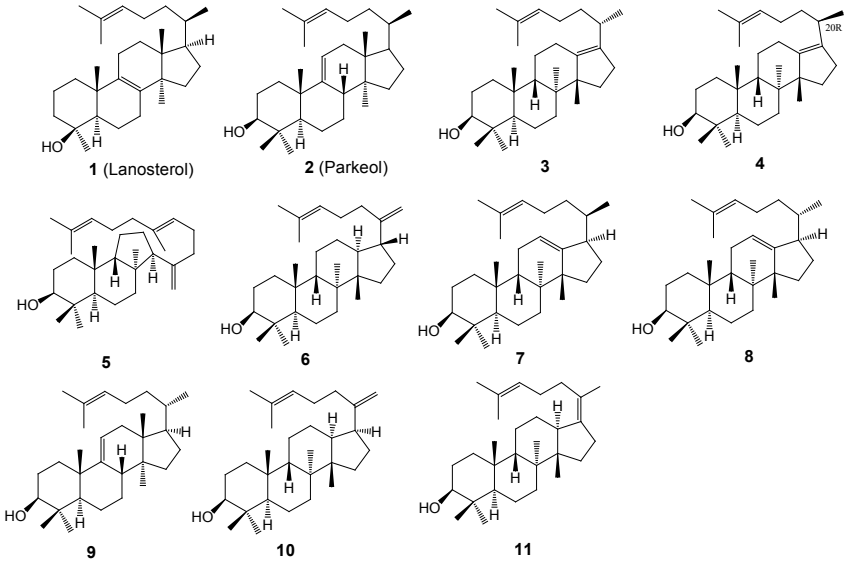


図 1　Y257A 株の酵素産物

【文献】1) R. Ito et al, *Org. Lett.*, **2011**, 13, 2678-2681　2) T. K. Wu et al, *J Am Chem Soc*, **2006**, 128, 6414-6419　3) H. Mitsuguchi et al, *J Am Chem Soc*, **2009**, 131, 6402-6411　4) T. K. Wu et al, *Org. Lett.*, **2006**, 7, 1319-1322

parkeol synthase, oryza sativa, triterpene cyclase

講演番号：3A04a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ A 校舎 04 会場

ミドリサンゴβ―アミリン合成酵素の Y259 及び W257 の機能解析

Functional analyses of Y259 and W257 residues of β-amyrin synthase from *Euphorbia tirucalli*

○仲田 知佳[1]、天利 佳奈子[2]、伊藤 遼介[1]、星野 力[1,2] ([1]新潟大院自、[2]新潟大農)
○ Chika NAKADA[1], Kanako AMARI[2], Ryosuke Ito[1], Tsutomu Hoshino[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agri., Niigata Univ.)

【目的と背景】β-amyrin **1** と lupeol **4** の作り分けに関する部位の特定を目指した変異導入実験が報告され、β-amyrin 合成酵素 PNY の W259 と Y261 残基が生成物特異性に関する部位であると推測されている。[1)] しかし、この部位への変異は single mutation のみで、また、酵素活性の報告はない。我々は、β-amyrin 合成酵素 EtAS W257 と Y259 残基（PNY W259 と Y261 に相当）の種々の変異体を作製し、*in vivo* での詳しい機能解析を行った【方法】QuikChange 法により EtAS Y259 残基を A、V、I、L、H、F、W に、W257 残基は A、V、I、L、H、F、Y に、置換し、*S. cerevisiae* GIL77 へ形質転換した。菌体内で生成する EtAS 量を western blot 法で、生産されたトリテルペンを GC で定量した。【結果】Y259 部位の A、V、I、L 及び H 変異株では、**1** が生成せず、四環性化合物（図 1：**5**～**10**)が生成した。これは、Y259 残基は dammarenyl cation から lupanyl cation への環拡張の機能(cation-π 相互作用)を担うことを示唆している。これらの変異体の相対活性は野生株の 20%程度しなかったが、F 変異体では、野生株とほぼ同じ活性で **1** を生産した。従って、Y259 のπ電子によって lupanyl cation の安定化されたと証明できた。H 残基は脱プロトンとして働き **5**～**10** が生成したと考えられる。一方、W257 部位の変異株すべてにおいて 40～60%の lupeol **4** の産生が見られた、この事は、報告された通り、[1)] lupanyl cation から oleanyl cation への環拡張に寄与することを示唆している。野生株に対するβ-amyrin **1** の相対活性は、A(9.3%)、V(6.4%)、I(19.4%)、L(15.0%)、H(6.1%)、F(40.0%)、Y(36.4%)となった。脂肪族の変異体で活性が低いことから、W257 残基でもカチオン-π相互作用が働き oleanyl cation の安定化に関与することが考えられる。芳香族の F と Y 変異体でも **4** が産生されたことについては、カチオン-π結合エネルギーの減少が考えられる。実際この部位の残基が F になっている Lupeol 合成酵素(トウゴマ由来)も存在する[2)]。

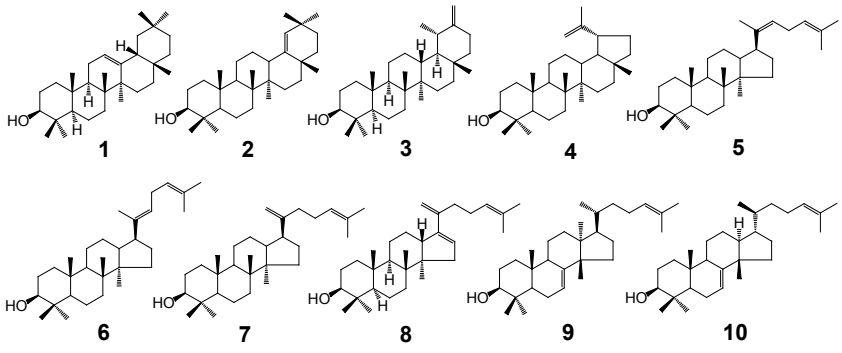


図 1. W257 と Y259 変異体の産生するプロダクト

1) Kushiro T. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6816-6824. 2) O. uhling. *et al. Arch. Biochem. Biophys.*. **2006**, *448*, 60-72

β-amyrin, oxidosqualene, triterpene cyclase

講演番号：3A04a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ A 校舎 04 会場

β－アミリン合成酵素の F474 残基の機能解析～嵩高さの重要性～

Functional analyses of F474 residue of β-amyrin synthase from Euphorbia tirucalli

○伊藤 遼介[1]、増川 友夏里[1]、仲田 知佳[1]、天利 佳奈子[2]、仲野 千秋[1]、星野 力[1,2]([1]新潟大院自、[2]新潟大農)

○Ryousuke ITO[1], Yukari MASUKAWA[1], Chika NAKADA[1], Kanako AMARI[2], Chiaki NAKANO[1], Tsutomu HOSHINO[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agri., Niigata Univ.)

【目的】β-amyrin 合成酵素の活性部位残基の機能解析はほとんど進展してない。 F474 残基は、トリテルペン環化酵素間で高度に保存されており、スクアレン–ホペン環化酵素（SHC）F365 残基や酵母ラノステロール合成酵素（ScERG7）F445 残基に相当する。カチオン–π 相互作用により、SHC F365 残基は２環性カチオンを安定化することを当研究室で証明し、[1]ScERG7 F445 残基では３環性カチオンを安定化することが示唆されてきた。[2]そこで F474 残基も同様の機能を有するのかを検討した。

【方法】F474 残基の芳香環あるいはバルクサイズが重要なのかを調べるために QuikChange 法により F474 残基を G、A、V、L、M、Y、W、H、T に置換した。それを *S. cerevisiae* GIL77 株へ形質転換し、F474A 及び M が産生するトリテルペンを同定した。また *in vivo* での野生株及び変異株の酵素発現量をウェスタンブロット法により求めた。

【結果と考察】F474 変異体産物を NMR で同定した（図１）。F474 変異体産物は立体化学の異なる２環性産物（**2**-**6**）、４環性の **7** と **8**、oleanane 型産物（**1**、**9**、**10**）であった。*chair-chair* 型から熱力学的に不安定な *chair-boat* 型（**2**、**3**）への変換は初めての例となった。そして全産物の相対活性は F474G（45.8%）、F474A（44.8%）、F474V（48.5%）、F474L（73.8%）、F474M（90.7%）、F474Y（91.8%）、F474W（5.0%）、F474H（19.8%）、F474T（25.0%）であり、脂肪族残基でもある程度保持された。更に oleanane 型産物生成の相対活性の大小は G<A<V<L<M<Y で側鎖の van der Waals 体積と正の相関関係を示した。よって、F474 残基はカチオン–π 相互作用よりもそのバルクサイズにより基質の正確な折りたたみ形成に関与していることが示唆された。一方、W、H 及び T 変異株の相対活性が低下した理由として、１）W はバルクサイズが大きすぎ、２）H、T は極性側鎖であるため周辺の残基と水素結合などのネットワークを形成したため、周辺の側鎖の配向に影響を及ぼし、局所的な構造変化が起きたためと考えられる。1) N. Morikubo *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*(40), 13184-13194. 2) T-K. Wu *et al.*, *Org. Lett.*, **2006**, *8*(21), 2006, 4691-4694.

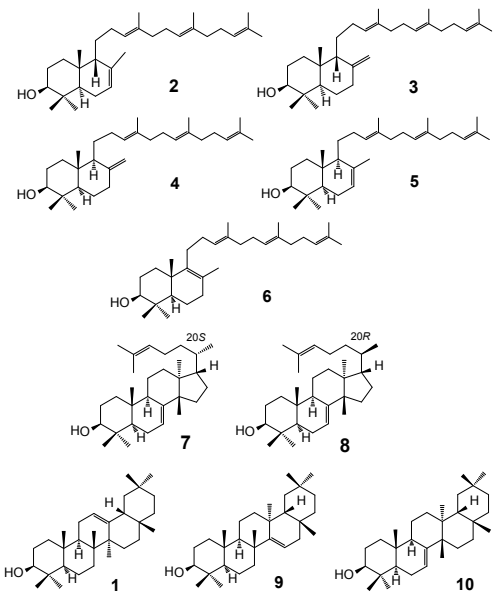


図１．F474 変異株のトリテルペン産物

β-amyrin, oxidosqualene, triterpene cyclase

講演番号：3A04a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ A 校舎 04 会場

スクアレンの両末端環化:オノセロイド合成酵素の初めての同定および龍涎香主成分 ambrein の酵素合成
Cyclization of Squalene from Both Termini: Identification of an Onoceroid Synthase and Enzymatic Synthesis of Ambrein
○上田 大次郎、星野 力、佐藤 努（新潟大院自然・農）
○DAIJIRO UEDA, TSUTOMU HOSHINO, TSUTOMU SATO (Niigata Univ.)

我々は､セスクアテルペン（C_{35} テルペン）の生合成研究を行ってきている。その背景の下、*Bacillus megaterium* 由来の tetraprenyl-β-curcumene 環化酵素（BmeTC）が、生体内において C_{30} のスクアレン（**3**）も環化する二機能性酵素であることを明らかにした(図１)[1)]。

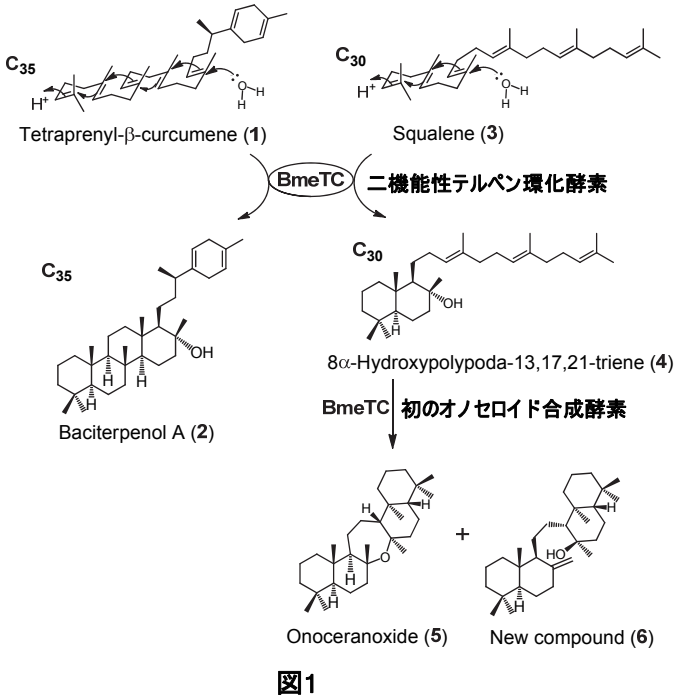


図1

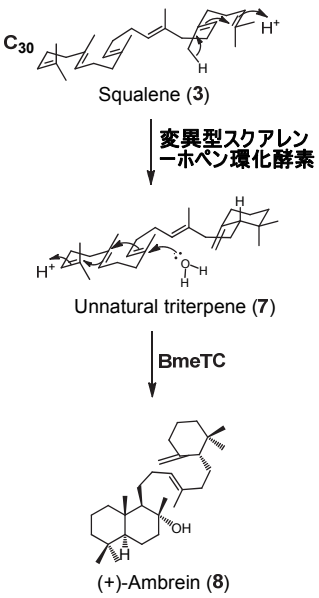


図2

今回､スクアレンからの二環性生成物（**4**）が、さらに BmeTC 酵素内に取り込まれて化合物 **5** と **6** を生産することを新たに見出したので報告する（図１）[2)]。**5** と **6** は *B. megaterium* 菌体内に存在する天然物であった。スクアレンの両末端環化によって生合成されるトリテルペンはオノセロイドと呼ばれているが、オノセロイド合成酵素の同定は初めての例である。オノセロイドは動物、高等植物、シダ植物から見出されているが、バクテリアからの発見は初めてである（**5** はシダ植物から単離されているが、**6** は新規天然物である)。本研究によって、対称および非対称構造のオノセロイドが、１つの酵素によって、片側末端が環化した中間体を経て生合成されることを初めて証明することができた。

さらに、BmeTC の新たな機能を利用して、自然界から入手困難な龍涎香（マッコウクジラ由来の高級香料）の主成分 ambrein（**8**）を容易に入手可能な **3** から、変異型スクアレン-ホペン環化酵素の触媒反応を経て、酵素合成することに成功した（図２）[2)]。

【文献】1) T. Sato *et al. JACS*, *133*, 17540 (2011). 2) D. Ueda *et al. JACS, in press*.

onoceroid, ambrein, terpenoid

講演番号：3A04a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ A 校舎 04 会場

イネのフィトアレキシンであるサクラネチンのいもち病菌による代謝

Metabolism of sakuranetin, a rice phytoalexin, by *Magnaporthe oryzae*

○濱名 一穂、戸嶋 浩明、長谷川 守文（茨城大農）
○Kazuho HAMANA, Hiroaki TOSHIMA, Morifumi HASEGAWA (Ibaraki Univ.)

【背景・目的】

フィトアレキシンは病原菌の侵入などの刺激によって植物に蓄積される低分子抗菌活性物質である．一方，植物病原菌はフィトアレキシンの解毒代謝能力を有していると考えられている．イネいもち病菌に対して高い抗菌活性を示すフラボノイド系フィトアレキシンであるサクラネチンは，いもち病菌によって抗菌活性の低いゲンクワニン及びナリンゲニンに代謝されることがすでに明らかになっている．しかし，ゲンクワニン及びナリンゲニンの蓄積量はサクラネチンの減少量と比較し非常に少ない．これは，ゲンクワニン及びナリンゲニンが速やかに他の物質に代謝されているか，またはゲンクワニンやナリンゲニンを経由しない他の代謝経路が存在していることを示唆している．本研究では，サクラネチンのいもち病菌による代謝についてゲンクワニンとナリンゲニン以外の代謝産物の同定を目的とした．

【方法・結果】

イネいもち病菌をポテトデキストロース寒天培地上で〇〇日間培養した後，寒天培地を細断し，ポテトデキストロース液体培地に植菌した．〇〇日間振とう培養した後，培地にサクラネチンを 100 ppm の濃度で添加してさらに培養し，代謝産物をメタノールで抽出した．メタノール抽出液の LC/ESI-MS 分析を行い，サクラネチン未添加の対照区との比較により，サクラネチン代謝産物と推定される物質由来のピークを探索した．

LC/MS 分析の結果，サクラネチン添加後６時間培養した培地中に$[M+H]^+$が m/z 303 と推定される物質由来の顕著なピークを確認した．サクラネチンは添加後１～５時間にかけて減少し，この物質はサクラネチン添加後１～６時間にかけて経時的に蓄積していた．したがって，この物質はサクラネチンの減少に伴い蓄積することから，サクラネチンの代謝産物である可能性が高いと示唆された．

現在，この代謝産物候補化合物の単離・精製及び各種スペクトル測定を用いた構造解析の検討を行っている．また，いもち病菌胞子発芽阻害活性試験についても検討を行う予定である．

rice, phytoalexin, flavonoid

講演番号：3A04a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ A 校舎 04 会場

ジャポニカ種およびインディカ種のイネにおけるファイファイトアレキシン、サクラネチンの蓄積
Accumulation of the rice phytoalexin, sakuranetin in japonica and indica cultivars

○西口 沙也加[1]、吉本 理子[1]、中島 廣光[1]、寺石 政義[2]、森 直樹[2]、奥本 裕[2]、石原 亨[1]([1]鳥取大農、[2]京大院農農)
○Sayaka NISHIGUCHI[1], Riko YOSHIMOTO[1], Hiromitsu NAKAJIMA[1], Masayoshi TERAISHI[2], Naoki MORI[2], Yutaka OKUMOTO[2], Atsushi ISHIHARA[1] ([1]Tottori Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】イネは病原菌感染やジャスモン酸（JA）処理などにより多種のファイトアレキシンを生成、蓄積する。しかし、ファイトアレキシンの生物学的重要性や誘導のメカニズムには明らかにされていない点も多い。また、イネは大きくジャポニカ種とインディカ種の二つの亜種に分けられるが、ファイトアレキシンの蓄積など抵抗反応における、亜種間の違いについてはあまり調べられていない。本研究では、ジャポニカ種の日本晴とインディカ種のカサラースにおいて、フラボノイド型ファイトアレキシン、サクラネチンの蓄積量に大きな違いがあることを見出した。そこで、染色体断片置換系統群や戻し交雑自殖系統群といった、日本晴とカサラースから作出された系統群を用いて、その原因を明らかにしようとした。

【方法・結果】日本晴とカサラースを播種後２週間生育させ、第三葉にイネごま葉枯病菌（*Bipolaris oryzae* MAFF305425)の分生子を接種した。一定時間培養した後、第三葉を 80%メタノールで抽出し、サクラネチンとその前駆体のナリンゲニンを LC-MS/MS のマルチプルリアクションモニタリングにより定量した。日本晴と比べ、カサラースではサクラネチンの生成量が少なく、ナリンゲニンの蓄積量が大きいことがわかった。また、日本晴とカサラースの葉を 1 mM の JA で処理した場合にも同様の傾向が見られた。

そこで、日本晴の遺伝的背景をもつが、染色体の一部がカサラースに置換された染色体断片置換系統群の葉を JA で処理し、サクラネチンとその前駆体であるナリンゲニンの蓄積量を調べた。すると、第 12 染色体の特定の領域がカサラース型に置換された系統は、サクラネチンをあまり蓄積せず、ナリンゲニンを高濃度に蓄積した。さらに、日本晴とカサラースの間で作出された戻し交雑自殖系統群を用いて同様に JA 処理を行い、量的形質遺伝子座（QTL）解析を行った。その結果、染色体断片置換系統群の解析によって見出された領域を含む 12 番目の染色体の一部にサクラネチンとナリンゲニンの蓄積量に関係する QTL が有り、この領域がカサラース型に置換されると、サクラネチンが減少するとともにナリンゲニンが増加することがわかった。また、この領域には、ナリンゲニンからサクラネチンを生成する naringenin 7-*O*-methyltransferase（NOMT）の遺伝子が存在していた。そのため、日本晴とカサラースにおけるサクラネチンとナリンゲニンの蓄積量の違いには、NOMT 遺伝子やその制御領域の変異が関与している可能性が示唆された。

rice, phytoalexin, sakuranetin

講演番号：3A04a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ A 校舎 04 会場

ムラサキ培養細胞におけるナフトキノン骨格生成： 3’’-ヒドロキシゲラニルハイドロキノン中のアルコール性水酸基の酸化

Biosynthesis of naphthoquinone skeleton in *Lithospermum erythrorhizon*: Oxidation of alcoholic OH in 3”-hydroxygeranylhydroquinone

○塚原 美香[1]、町田 典子[1]、矢崎 一史[2]、和田 昭盛[3]、山野 由美子[3]、山本 浩文[1]（[1]東洋大院生命、[2]京大生存圏研、[3]神戸薬大）
○Mika Thukahara[1], Noriko Machida[1], Kazufumi Yazaki[2], Akimori Wada[3], Yumiko Yamano[3], Hirobumi Yamamoto[1] ([1]Toyo Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Kobe Pharm. Univ.)

【研究目的】

ナフトキノン系赤色色素であるシコニン及びその関連化合物エキノフランはphenylalanineからgeranylhydroquinone, *trans*-3"-hydroxygeranylhydroquinone (*t*-GHQ 3"-OH) を経て生合成されることが明らかにされている。しかしそれ以降の環化に関与する側鎖の酸化過程についてはほとんどわかっていない。そこでこれらの色素を生産するムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) 培養細胞より粗酵素画分を抽出し、*t*-GHQ 3"-OH の酸化反応を触媒する酵素活性の探索を行った。

【実験方法及び結果】

<u>粗酵素画分中の GHQ 3"-OH 変換活性</u>

1 μM IAA と 10 μM kinetin を含む改変 LS 培地中で 7 日間培養したムラサキ培養細胞から粗酵素を抽出し、1mM *t*-GHQ 3”-OH 及び 1mM $NADP^+$とインキュベートしたところ、2 種の化合物の生成が確認された。これらを単離し、各種機器スペクトルデータを測定することにより、基質の立体異性体である *cis*-GHQ 3”-OH、及びその側鎖水酸基が酸化された化合物(*cis*-GHQ-3'-CHO) であると決定した。また、反応条件を変更して検討することにより、*t*-GHQ 3"-OH は酸化反応によって t*rans*-GHQ-3'-CHO へと変換された後非酵素的に *cis*-GHQ-3'-CHO に異性化し、その一部が逆反応により *cis*-GHQ 3”-OH へと還元されていると考えた。

<u>GHQ 3"-OH dehydrogenase の生化学的諸性質</u>

GHQ 3"-OH dehydrogenase 活性は、シコニン類を生産しないクララ（*Sophora flavescens*）やアシタバ（*Angelica keiskei*）培養細胞では検出されなかった。また、シコニンを生産しないがエキノフランを生産する LS 改変培地だけでなく、シコニン生産 M9 培地で培養したムラサキ細胞からもこの酸化活性が検出されたことから、GHQ 3"-OH dehydrogenase はシコニン類の生合成に関与していると考えられる。

本酵素の至適 pH は 8.5 付近であった。また、iodoacetamide, *N*-ethylmaleimide, *o*-phenanthroline で阻害されたことから、cysteine 残基が本酵素の活性発現に関与していると考えられた。本酵素は GHQ3”-OH のみを基質とし、geraniol, linalool, lavandulol, *p*-hydroxyphenethylalcohol は酸化されなかった。また *t*-GHQ 3”-OH に対する K*m* 値は 19.89 ± 1.27 μM、$NADP^+$に対する K*m* 値は 5.08 ± 0.19 μM であった。

shikonin biosynthesis, 3"-hydroxygeranylhydroquinone dehydrogenase, *Lithospermum erythrorhizon*

講演番号：3A04a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ A 校舎 04 会場

脂肪酸合成経路の遮断による一次代謝産物の生産能の強化

Overproduction of primary metabolites by blocking fatty acid biosynthesis

○大石 奈穂美、山梨 智也、曽根 祐輔、田辺 友紀、山本 聡、金 承榮、鮒 信学 (静県大院食栄)
○Naomi OHISHI, Tomoya YAMANASHI, Yusuke SONE, Yuki TANABE, Satoshi YAMAMOTO, Seung-Young KIM, Nobutaka FUNA (Univ. of Shizuoka, GDNES)

【目的】 malonyl-CoA は一次代謝産物であり、二次代謝産物の重要な前駆体である。また、malonyl-CoA は脂肪酸合成酵素の基質である。そのため、微生物で malonyl-CoA を基質とする二次代謝酵素を発現しても高い生産量は得られない。我々は、大腸菌において脂肪酸合成経路を遮断することにより、malonyl-CoA 量が増強された、二次代謝産物の生産に適した大腸菌宿主の開発を目指した。

【方法および結果】 III 型 PKS である RppA は、5 分子の malonyl-CoA から 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (THN)の合成を触媒する。モノオキシゲナーゼ MomA は、THN から flaviolin、flaviolin から mompain の酸化反応を触媒する。我々は、RppA 、MomA を T5 プロモーターの制御により発現誘導するプラスミド pQE2-*rppA*rbs*momA* を作製した。flaviolin および mompain を定量することで malonyl-CoA 生産能を間接的に評価できる。

cerulenin は微生物および動植物の脂肪酸合成を阻害する抗生物質であり、脂肪酸合成経路の FabB/F を阻害する。cerulenin を用いて pQE2-*rppA*rbs*momA* 組換え *E. coli* BL21 株の脂肪酸合成酵素を阻害した。LB 培地に 1%植菌後、1.5 時間後に IPTG 誘導、計 12 時間後に flaviolin を定量した。その結果、6.3 μg/ml の cerulenin を投与すると、培養液は flaviolin および mompain により赤紫色になった。HPLC 分析により flaviolin および mompain を定量したところ、flaviolin に換算すると 103 μg/ml の収量でポリケタイドが生産されていることが判明した。高濃度の cerulenin 存在下では生育阻害が観察された。以上より、cerulenin を用いて脂肪酸合成酵素を阻害すると、ポリケタイドの生産量が増えることが明らかになった。

λ Red recombinase による相同組換えおよび Cre/loxP 系を用い、脂肪酸合成酵素遺伝子 *fabH*、*fabF*、*fabB* の in-frame mutant を作製した。また、*fabB*/*fabH*、*fabH*/*fabF* の二重破壊株も作製した。各破壊株の脂肪酸量は減少していることを GC-MS により確認した。*E. coli* BL21 株および各破壊株において、pQE2-*rppA*rbs*momA* を形質転換し、RppA と MomA を発現させた。その結果、LB 培地にて 36 時間培養したところ、*fabB*/*fabH* 破壊株において 108 μg/ml と親株 *E. coli* BL21 株と比較して 26 倍の flaviolin を生産していることが判明した。LC-tripleQ MS を用いて細胞内 acetyl-CoA および malonyl-CoA を定量した結果、*fabH*/*fabF* 破壊株において acetyl-CoA、malonyl-CoA の生体内量は親株と比較してそれぞれ 6 倍、45 倍であった。以上より、脂肪酸合成経路の遮断により、脂肪酸の生合成が抑制され、その結果、malonyl-CoA 量が増えたことが示された。

polyketide, fatty acid synthase, biosynthesis

講演番号：3A04a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ A 校舎 04 会場

Acetyl-CoA carboxylase の発現によるクルクミンの微生物生産

Microbial production of curcumin by utilizing acetyl-CoA carboxylase

○曽根 祐輔、山梨 智也、大石 奈穂美、天野 結香子、金 承榮、鮒 信学（静県大院食栄）
○YUSUKE SONE, Tomoya YAMANASHI, Naomi OHISHI, Yukako AMANO, Seung-Young KIM, Nobutaka FUNA (Univ. of Shizuoka, GDNES)

【目的】　脂肪酸合成経路を遮断すると脂肪酸の生合成が制限され、その結果、acetyl-CoA 量と malonyl-CoA 量が増大する。我々は、脂肪酸合成酵素遺伝子破壊株を用い、ウコンの有効成分、Curcumin の生産を行った。また、我々は、*Corynebacterium glutamicum* 由来の acetyl-CoA carboxylase（ACC）を脂肪酸合成酵素遺伝子破壊株に導入することにより、malonyl-CoA 量のさらなる増大を計画した。
【方法および結果】 我々は以前、イネゲノムの III 型ポリケタイド合成酵素を解析し、新規酵素、クルクミノイド合成酵素（CUS）を発見した [1)]。また、4-coumaroyl-CoA ligase（4CL）、CUS を共発現させることにより、ferulic acid から curcumin の生合成を大腸菌生体内で再構築した [2)]。具体的には、CUS を pET にクローニングした pET-CUS、 4CL を pCDF にクローンニングした pCDF-4CL、および *C. glutamicum* 由来の ACC の構成因子 AccBC、DtsR1 を pRSF にクローンニングした pRSF-ACC を大腸菌 BLR 株に形質転換し、得られた形質転換体に 1 mM の ferulic acid を投与することで 113 μg/ml の curcumin の生産に成功した [2)]。今回、我々は、CUS および 4CL の発現効率を高めるために、大腸菌のコドン出現頻度を最適化した合成遺伝子を用いた。また、汎用な大腸菌ホストでの curcumin 生産のため、T5 プロモーター制御下、CUS および 4CL をポリシストロニックに発現するプラスミド pQE2-*CUS*rbs*4CL* を構築した。脂肪酸合成酵素遺伝子破壊株の湿潤菌体 0.5 g を 20 mL の最小培地中に再懸濁し、4% glucose, 4 mM ferulic acid と共に 36 時間振とうしたところ、*E. coli ΔfabFΔfabH*/pQE2-*CUS*rbs*4CL* において親株と比較し 55 倍増え 150 μg/ml の crucumin を生産した。
ACC は acetyl-CoA より malonyl-CoA を合成する酵素である。*C. glutamicum* の ACC の構成因子は、AccBC（accD1）、DtsR1（accD2）の他にビオチンリガーゼ BirA[3)]と ACC の活性を上昇させる ε サブユニット、AccE[4)]が知られている。また、*accE* のすぐ下流に存在する機能未知遺伝子 *maf* も ACC への関与が示唆されている [5)]。現在、これら ACC 構成因子と 4CL、CUS の共発現系を構築中である。
【引用文献】

1) Katsuyama *et al. J. Biol. Chem.* **282**, 37702-37709 (2007)
2) Katsuyama *et al. Biosci. Biotech. Biochem.* **74**, 641-645 (2010)
3) Peters-Wendisch *et al. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93** 2493-2502 (2012)
4) Rodríguez *et al. Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4166-4176 (2001)
5) Nickel *et al. Mol. Microbiol.* **78**, 253-265 (2010)

curcumin, acetyl-CoA carboxylase, E. coli

講演番号：3A04a17
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ A 校舎 04 会場

Microbial bioconversion of an active natural compound, curcumin

○ Azam Hassaninasab, Yoshiteru Hashimoto, Michihiko Kobayashi (Institute of Applied Biochemistry and Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan)

Curcumin is a chemical of the polyphenol family derived from the rhizome of spice turmeric (*Curcuma longa* Linn) that belongs to the ginger (Zingiberaceae) family. Curcumin is a super compound with the far-reaching medical properties including antitumor, anticancer, anti-inflammatory, antioxidant, and analgesic uses. Despite the impressive applications of curcumin particularly in medicine prospective, it exhibits poor bioavailability both *in vivo* and *in vitro*. Therefore there is a need to investigate modified curcumin or curcumin-derived compounds for improved pharmacokinetics properties of this nature's miracle substance.

Microorganisms with the curcumin-degrading potency have been isolated from different sources. To isolate the microorganisms with curcumin-converting ability, samples were inoculated in a test tube containing liquid media with the addition of curcumin. Cultivation was performed with shaking at 28°C for 1 week. Once a week, 1 ml of the culture was inoculated into 10 ml of fresh media. After 4 weeks of acclimatization culture, the culture solution was spread on agar plates and growing microorganisms were isolated. They were liked to be different according to their colony morphology. These microorganisms were identified based on biochemical tests and 16SrRNA sequence analysis. The ability of curcumin degradation by the isolated microorganisms was investigated by means of resting cell and cell-free extract reactions with curcumin as the substrate. The curcumin degradation was measured by HPLC equipped with a reverse-phase column. The peak related to curcumin decreased and new peaks for feasible products derived from curcumin degradation were detected at different wavelengths. We are now trying to purify the enzyme involved in curcumin degradation.

Curcumin, Biodegradation, Microorganism

講演番号：3A04p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ A 校舎 04 会場

Aspergillus wentii による(+)-(1*S*)- および (−)-(1*R*)-camphorquinone の生物変換

Biotransformation of (+)-(1*S*)- and (−)-(1*R*)-camphorquinone by *Aspergillus wentii*

○宇佐見 享嗣、本岡 良太、宮澤 三雄 (近畿大理工)
○Atsushi USAMI, Ryota MOTOOKA, Mitsuo MIYAZAWA (Kinki Univ.)

【目的】我々は微生物の所有する、有機化合物の特異的変換能力の探索に関する基礎研究の一環として、カルボニル基を有する化合物への基質特異性を解明する目的で、*Aspergillus wentii* を用いて camphane 骨格を有するモノテルペノイドである(+)- および (-)-camphorquinone (**1** および **2**) の変換反応について検討したしたので報告する。

【方法および結果】*A. wentii* の培地の組成は、glucose (1.5%)、sucrose (1.5%)、polypeptone (0.5%)、K_2PO_4 (0.1%)、$MgSO_4$・$7H_2O$ (0.05%)、KCL (0.05%)、$FeSO_4$・$7H_2O$ (0.001%)を用いた。マイヤーに上記培地を 300 ml 注入し、植菌後、27 ℃で 3 日間前培養を行った。その後、基質 **1** および **2** を 2 mg/ml の濃度で添加し 24 時間変換反応を行った。

この変換反応における経時変化を TLC、GC-MS および ^{1}H NMR により検討した結果、カルボニル基の還元が進行した 4 種のケトアルコール体 hydroxycamphor とカルボニル基の酸化が進行し環が開裂したジカルボン酸が得られた。またこの系における各種変換生成物の主要変換生成物は基質 **1** では 2-*exo*-hydroxycamphor が 65%、基質 2 では 2-*endo*-hydroxycamphor を 84%得た。

以上のように、*A. wentii* による **1** および **2** の変換反応において、カルボニル面立体区別反応が進行することを明らかにした。

biotransformation, *Aspergillus wentii*, camphorquinone

講演番号：3A04p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ A 校舎 04 会場

生体触媒としてハスモンヨトウ(*Spodoptera litura*)を用いた (-)-myrtenal の生物変換

Biotransformation of (-)-myrtenal by common cutworm (*Spodoptera litura*)

○本岡 良太、宇佐見 享嗣、宮澤 三雄 (近畿大理工)
○Ryota MOTOOKA, Atsushi USAMI, Mitsuo MIYAZAWA (Kinki Univ.)

【目的】我々は、昆虫であるハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) の幼虫が有する異物代謝酵素を生体触媒として用い、新規有用物質の生産を目的として植物界に広く存在するテルペノイドの生物変換に関する研究を行っている。本研究では、ラベンダーの精油に含まれている[3,1,1] bicyclo 骨格を有するモノテルペノイドである(-)-myrtenal (**1**) のハスモンヨトウによる生物変換反応について検討を行ったので報告する。

【方法および結果】変換反応には、市販の昆虫用人工飼料 (インセクト LFS) にて 4~5 齢まで育成したハスモンヨトウの幼虫 400 匹を使用した。幼虫の飼料は基質を投与する 2 日前より人工飼料 (トウロク豆：100 g , 寒天：12 g , 水：250 ml) に切り替え、基質 1000 mg を濃度 3 mg/g diet で混入し、幼虫へ経口投与した。投与終了後さらに 2 日間、体内からテルペノイドを完全に排出する目的で基質を投与していない同組成の人工飼料を与えることにより全ての代謝物を採取した。得られた排泄物を ethyl acetate にて抽出を行ったところ、1952mg の抽出物を得た。

一方、基質を含まない人工飼料のみを幼虫に与え、得られた排泄物を前述の溶媒を用いて抽出し、得られた抽出物をブランクとし、TLC および GC-MS 測定の結果を比較することにより変換生成物の存在を確認した。変換反応にて得られた抽出物を分画操作を行うことにより変換生成物を単離した。変換生成物の構造を決定する目的で各種スペクトルデータを測定した結果、アルデヒド基が酸化された myrtenic acid (**1-1**) を生成することを明らかにした。

Biotransformation, *Spodoptera litura*, (-)-myrtenal

講演番号：3A04p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ A 校舎 04 会場

Real-time observation of microbial metabolism by dynamic nuclear polarization NMR (DNP-NMR)

○Dana Ulanova, Keiko Kumagai, Mai Akakabe, Masashi Tsuda (Kochi Univ.)

Nowadays, noninvasive methods for in vivo observation of living cells metabolism are attracting a great attention. Real-time NMR employing hyperpolarized natural substrates is a one of such methods for visualization and characterization of cellular processes in vivo.

Dynamic nuclear polarization is a hyperpolarization technique, which transfers spin polarization from electrons to nuclei by microwave irradiation. Such polarization increases the NMR signal intensities by several orders of magnitude and enables to observe the signal of interest in almost background-free NMR spectrum. Thus, this technology is a powerful tool for assaying the intracellular reactions in short-time scale after feeding living cells with hyperpolarized substrates of interest.

In this study, we are analyzing metabolism of living microbial cells using real-time DNP-NMR assays. We will discuss the application of this technique in a field of primary and secondary microbial metabolism research.

dynamic nuclear polarization NMR, microbial metabolism, secondary metabolite biosynthesis

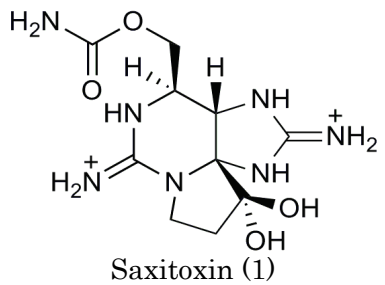
講演番号：3A04p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ A 校舎 04 会場

麻痺性貝毒の生合成中間体の定量及び未知中間体について
Quantitative analysis of biosynthetic intermediates for paralytic shellfish toxins and study of the unknown intermediates

○土屋 成輝[1]、長 由扶子[1]、吉岡 廉平[1]、此木 敬一[1]、長澤 和夫[2]、大島 泰克[3]、山下 まり[1]([1]東北大院農、[2]東京農工大院工、[3]東北大院生命科学)
○ Shigeki Tsuchiya[1], Yuko Cho[1], Renpei Yoshioka[1], Keiichi Konoki[1], Kazuo Nagasawa[2], Yasukatsu Oshima[3], Mari Yotsu-Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ. Agr., [2]Tokyo Univ. of Agric. and Technol. Tech., [3]Tohoku Univ. Life Sci.)

[背景・目的]サキシトキシン(STX, **1**)とその類縁体は、強力な神経性毒であり、麻痺性貝中毒の原因物質である。海産渦鞭毛藻が生産した毒が食物連鎖により二枚貝に蓄積され、死亡率の高い食中毒を引き起こす。淡水産藍藻も生産することが報告され、かけ離れた生物の特定の種のみが麻痺性貝毒を含有することが明らかになったものの生合成については長年不明のままであった。近年、淡水産藍藻(*Anabaena circinalis*, *Lyngbya wollei*)及び海産渦鞭毛藻(*Alexandrium fundyense*, *A. minutum*)のゲノム中に STX 生合成遺伝子クラスターやその相同遺伝子が発見され、生合成経路が推定された[1-2]。我々はこれまでに、推定された生合成中間体 Int-A', Int-C'2 とその関連物の D"2 を化学合成した。これらの合成化合物を HILIC-UPLC-Q-TOF-MS の標品として用い、実際に藍藻及び渦鞭毛藻の培養細胞中に、Int-A'と Int-C'2 が存在することを初めて証明した[3]。本研究では、有毒生物中の Int-A'と Int-C'2 を定量し、麻痺性貝毒量と比較した。また、遺伝子より推定された化合物以外にも生合成中間体が存在することが示唆されたので、その化学構造を明らかにし、生合成経路との関連を考察する。

[方法・結果・考察]藍藻 *Anabaena circinalis* 有毒株(TA04)及び渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* 有毒株(Axat-2)を 3-4 週間培養し、抽出液を調製した。合成 Int-A'、Int-C'2 を標品とし、LC/MS を用いてこれらの化合物を定量した。麻痺性貝毒成分（TA04：C1, C2, GTX2, 3, dcGTX2, 3、Axat-2：C1, C2, GTX1, 4, neoSTX）は蛍光化-HPLC を用いて定量した[4]。その結果、今回の培養条件下で得られた細胞中では、Int-A'、Int-C'2 は麻痺性貝毒総量の約 1/10-1/30 であった。また Int-C'2 を化学合成する際に得られた副生成物を HILIC-UPLC-Q-TOF-MS に供したところ、この化合物と保持時間、精密分子量、MS/MS のフラグメントパターンの一致するピークが、*A. circinalis* (TA04)及び *A. tamarense* (Axat-2)抽出液から検出された。このことから、この副生成物がこれらの生物中に存在する未知の生合成中間体ではないかと推定した。現在、本副生成物の構造の詳細な分析を行うとともに、生合成との関連を考察している。


Saxitoxin (1)

[References]
1) Kellmann, R. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74, 4044-4053. 2) Stüken, A. *et al.*, *PLoS One* **2011**, 6, e20096 3) Tsuchiya, S. *et al.*, 日本農芸化学会 2013 年度大会、2C22p11. 4) Oshima, Y. *J. AOAC Int.* **1995**, *78*, 528-532.

paralytic shellfish toxins, biosynthetic intermediate, saxitoxin

講演番号：3A04p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ A 校舎 04 会場

致死性海藻食中毒原因物質ポリカバノシド A の起源生物の推定

Elucidation of the organism producing polycavernoside A, the causative agent for the lethal seaweed poisoning

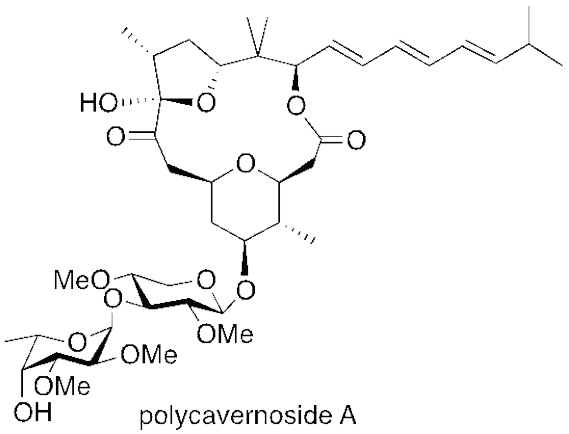
○前田 高輔[1]、田谷 有妃[1]、大水 絵理[1]、Mirriam A. Cayme[2]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]、Sherwood Hall[3]、福代 康夫[4]、安元 健[5]、山下 まり[1]([1]東北大学院農、[2]フィリピン NFRDI、[3]アメリカ FDA、[4]東大アジアセ、[5]日本食品分析セ)

○Kosuke Maeta[1], Yuki Taya[1], Eri Omizu[1], Mirriam A. Cayme[2], Yuko Cho[1], Keiichi Konoki[1], Sherwood Hall[3], Yasuo Hukuyo[4], Takeshi Yasumoto[5], Mari Yotsu-Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Philippines, National Fisheries Research and Development Institute, [3]U.S. Food and Drugs Administration, [4]Asian Natural Environmental Science Center, The University of Tokyo, [5]Japan Food Research Laboratories)

[背景・目的] ポリカバノシド A (PA)は、グアム (1991 年)とフィリピン (2002-2003 年)で発生した紅藻カタオゴノリ *Gracilaria edulis* による致死性の食中毒の原因物質として同定したマクロライド配糖体である[1,2] 。本研究は、PA の生産生物 (起源生物)を同定することを目的とする。

[方法] フィリピンで食中毒を引き起こした *G. edulis* (20 g)より表面の付着物を水洗したところ、その洗液に浮遊している藍藻塊が得られた。藍藻塊をピペットで集めた後、洗液中の粒子を金属メッシュ(1000 μm, 250 μm, 53 μm)で粒径ごとに分画した。水洗した *G. edulis*、藍藻塊および粒径画分した粒子をそれぞれメタノールとアセトンで抽出し、抽出物を LC/MS (MRM)に供して PA の定量を行った。また、藍藻塊中の藍藻を同定するために、顕微鏡で形態を観察後に DNA を抽出した。その DNA をテンプレートとし、藍藻特異的プライマーを用いて 16S rDNA を PCR で増幅した。得られた産物をクローニングし、複数クローンのシークエンス解析後、Blast で既知藍藻の配列と比較した。

[結果・考察] 水洗した *G. edulis* と付着物中の PA 濃度を比較すると、水洗 *G. edulis* (91 ng/g, wet)が最高で、次に藍藻塊 (67 ng/g, wet)が高かった。藍藻塊にはフィラメント状の藍藻が観察された。藍藻塊中の藍藻の 16S rDNA 配列を解析した結果、*Lyngbya polychloa*, *L. majuscula*, *L. bouillonii* と高い相同性 (99 ~ 100%)を示すクローンが複数得られた。PA と類似した構造を持つ lyngbouilloside[3]は *L. bouillonii* から、また lyngbyaloside[4]は *Lyngbya* sp.から単離されているため、PA も上記の *Lyngbya* 属の藍藻が起源である可能性が高い。現在、1991 年にグアムで食中毒を引き起こした *G. edulis* の PA の定量、*G. edulis* 付着物に含まれる藍藻の系統解析を行っている。



polycavernoside A

[References]

1) Yotsu-Yamashita, M. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *115*, 1147-1148.
2) Yotsu-Yamashita, M. *et al.*, *Chem. Res. Toxicol.*, **2004**, *17*, 1265-1271.
3) Tan, L. T. *et al.*, *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 925-928.
4) Klein, D. *et al.*, *J. Nat. Prod.*, **1997**, *60*, 1057-1059.

polycavernoside A, cyanobacteria, 16S rDNA

講演番号：3A04p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ A 校舎 04 会場

10-hemiketal 型テトロドトキシン類縁体の構造決定と生合成経路の考察

Structural determination of 10-hemiketal type tetrodotoxin analogs, and new hypothetic pathway of the tetrodotoxin biosynthesis

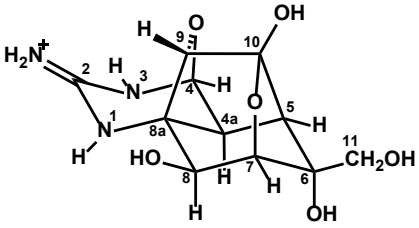
○工藤 雄大[1]、山下 瑶子[1]、此木 敬一[1]、長 由扶子[1]、安元 健[2]、山下 まり[1] ([1]東北大・院農、[2]日本食品分析セ)

○ Yuta Kudo[1], Yoko Yamashita[1], Keiichi Konoki[1], Yuko Cho[1], Takeshi Yasumoto[2], Mari Yotsu-Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Japan Food Res. Lab.)

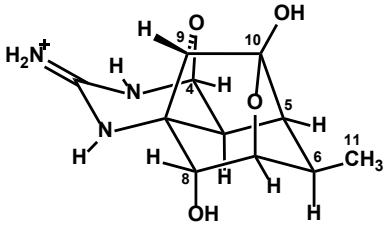
[背景・目的] テトロドトキシン (TTX)は電位依存性ナトリウムチャネルを特異的に阻害する強力な神経毒である。我々は TTX 生合成経路の手がかりを得るため、新規 TTX 類縁体の探索を行ってきた[1,2]。今回、オキナワシリケンイモリ (*Cynops ensicauda popei*)から新規 TTX 類縁体 2 種を単離・構造決定し、その構造、及び各生物における分布から TTX の生合成経路を考察した。

[方法] *C. e. popei* を希酢酸加熱抽出し、活性炭カラムで粗精製した。粗精製物を HILIC-LC-MS を用いて精査し、$[M+H]^+$ *m/z* 286, 254 の未知化合物 (**1, 2**)を検出した。**1, 2** は MS/MS 解析において、TTX 類縁体に特徴的なフラグメントイオンを生成したため、新規 TTX 類縁体であると推定された。次いで **1**, **2** を各種カラムクロマトグラフィーで精製し、^{1}H NMR, COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY1D に供し構造解析した。また、各生物の抽出物を HILIC-LC-MS に供し、TTX 類縁体の組成を調べた。

[結果･考察] **1, 2** の分子式は HR-ESI-MS を用いてそれぞれ $C_{11}H_{15}N_3O_6$ 及び $C_{11}H_{15}N_3O_4$ と決定した。**1** は、分子式より monodeoxyTTX の脱水体と推測され、更に H5 が TTX に比べて大きく高磁場シフト (-2.04 ppm)していたことから 5-deoxy 体であると考えられた。HMBC では C5/H9 及び C10/H4a の相関が観測され、C5 と C10 が直接結合した 10-hemiketal 構造を持つと考えられた。さらに NOE の情報も加えて、**1** を 4,9-anhydro-10-hemiketal-5-deoxyTTX と推定した (Fig. 1)。また **2** を 4,9-anhydro-10-hemiketal-8-*epi*-5,6,11-trideoxyTTX と推定した (Fig. 1)。これまで 10-hemiketal 型の構造を持つ TTX 類縁体は報告がない。**1** は生息地域、種が異なる有毒イモリにほぼ共通して存在した。このことから **1** が TTX の生合成において重要な化合物だと考え、TTX の生合成経路を新たに推定したので報告する。



4,9-anhydro-10-hemiketal-5-deoxyTTX (**1**)



4,9-anhydro-10-hemiketal-8-*epi*-5,6,11-trideoxyTTX (**2**)

Fig. 1 The structures of novel TTX analogs (**1**, **2**).

[References] 1. Kudo, Y.; Yasumoto, T.; Konoki, K.; Cho, Y.; Yotsu-Yamashita, M. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 655-667.

2. Yotsu-Yamashita, M.; Abe, Y.; Kudo, Y.; Ritson-Williams, R.; Paul, V. J.; Konoki, K.; Cho, Y.; Adachi, M.; Imazu, T.; Nishikawa, T.; Isobe, M. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2799–2813.

tetrodotoxin, newt, structural determination

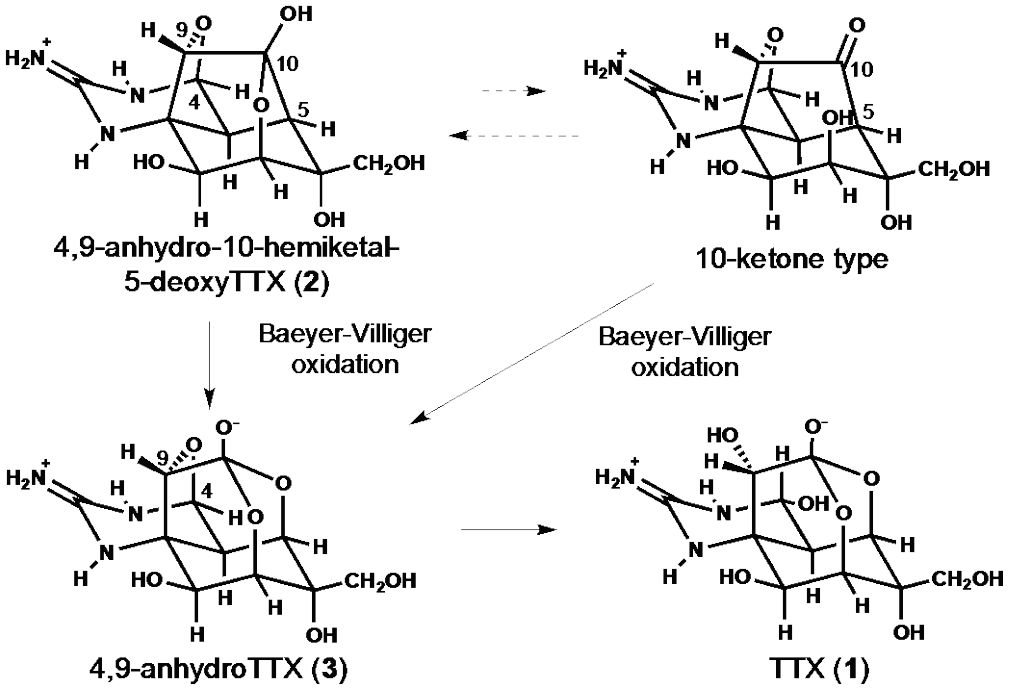
講演番号：3A04p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ A 校舎 04 会場

メタゲノムからの 新規 Baeyer-Villiger monooxygenase のスクリーニング

Screening of new Baeyer-Villiger monooxygenases from metagenomes

山下 瑶子、○山下 まり、工藤 雄大、長 由扶子、此木 敬一（東北大学院農）
Yoko YAMASHITA, ○Mari YAMASHITA, Yuta Kudo, Yuko Cho, Keiichi Konoki (Tohoku Univ. Agri.)

Baeyer-Villiger monooxygenase(BVMO)は、NAD(P)H を補酵素とし、主として環状ケトンよりラクトンを生成する酵素で、微生物を中心に広く分布する。近年、本酵素は、重要な天然物の生合成に関わる例が示され、また、有機化合物の *in vitro* での反応に応用され、グリーンケミストリー分野からも注目されている[1)]。我々は、フグ毒として知られるテトロドトキシン(TTX, 1)の多くの天然類縁体を単離し、その化学構造を決定し、その化学構造から生合成機構を解明しようと試みてきた[2,3)]。その過程で、シリケンイモリより、4,9-anhydro-10-hemiketal-5-deoxyTTX (2)を単離、構造決定した。本化合物は、TTX の生合成過程において、BVMO により 4,9-anhydroTTX(3)の変換されるのではないかと考えられた。また、上記のように、BVMO は種々の化学反応に応用可能な酵素である。そこで、本研究では、環境中のメタゲノムより、新規の BVMO を探索し、多様性について調べ、可能なものは発現させてその活性を *Rhodococcus jostii* RHA1 の BVMO[4)]と比較した。



詳細については、口頭で発表する。

[References]

1) Leisch, H. *et al*., *Chem. Rev*., **2011**, *111*, 4165-4222. 2) Kudo, Y. *et al*., *Mar. Drugs,* **2012**, *10*, 655-667.
3) Yotsu-Yamashita, M. et al., *Mar. Drugs,* **2013**, *11*, 2799–2813. 4) Szolkowy, C. *et al*., *ChemBioChem*, **2009**, *10*, 1208-1217.

biosynthesis, BVMO, metagenome

講演番号：3A04p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ A 校舎 04 会場

昆虫食害で誘導されるオオイタドリ由来フェニルアセトニトリルの生合成中間体
Biosynthetic intermediates of herbivore-induced phenylacetonitrile from *Fallopia sachalinensis*
○野下 浩二、阿部 誠、田母神 繁（秋田県大・生資科）
○Koji NOGE, Makoto ABE, Shigeru TAMOGAMI (Akita Pref. Univ.)

【目的】昆虫食害を受けた植物は様々な応答を示す．そのひとつに，テルペン類など特有の揮発成分が誘導的に生産・放出されることが知られている．我々は，マメコガネに食害されたオオイタドリ（タデ科）がオシメンなどテルペン類に加え，植物成分としては比較的珍しいフェニルアセトニトリル（PAN）を生産・放出すること，PAN 生合成が植物ホルモンであるジャスモン酸メチル（MeJA）処理により再現されること，PAN の前駆体がフェニルアラニン（Phe）であり，その Phe 生合成もまたマメコガネ食害や MeJA 処理により誘導されることを報告した．一方，MeJA 処理したオオイタドリ葉中で Phe が脱炭酸して生成・蓄積すると考えられるフェネチルアミン以外，PAN の生合成中間体と予想される化合物はこれまで検出されていなかった．そこで，オオイタドリにおける PAN 生合成の詳細を明らかにすることを目標に，本研究では，PAN 生合成の中間体と予想されるフェネチルアミンやフェニルアセトアルドキシムといった化合物がニトリルに代謝されるか検討した．
【方法】オオイタドリから葉を切り取り，その葉柄からグリホサート水溶液を処理すると，葉での Phe 生合成が阻害されるため，MeJA 処理しても PAN が生成しない．ここに外生の Phe を与えると PAN の生成が回復することから，グリホサートと MeJA 処理によって PAN は生成されないが，Phe から PAN の生合成は活性化された状態を作ることができる．この系を用いて，PAN 生合成中間体と予想されるフェネチルアミンやフェニルアセトアルドキシムを与えた場合，PAN 生成が見られるか調べた．オオイタドリ葉をグリホサート 0.8% 水溶液で 6 時間前処理し，予想生合成中間体を水溶液もしくは蒸気としてオオイタドリ葉に取り込ませ，MeJA 処理した．MeJA 処理 18 時間後に，生成した揮発成分を SPME で集め，GC–MS で分析し，生成した PAN を定量した．
【結果と考察】グリホサートで処理したオオイタドリ葉に，水溶液もしくは蒸気としてフェネチルアミンを与え，MeJA 処理をすると，いずれの場合も PAN の生成が認められた．同様にフェニルアセトアルドキシムを与えた場合も PAN の生成が確認できた．したがって，フェネチルアミンもフェニルアルドキシムも PAN 生合成の中間体であることが明らかとなった．これまで，アミノ酸が P450 によりアルドキシムへと変換されニトリルが生成する経路が植物や微生物で知られているが，オオイタドリにおいてはこの経路に加えて，アミンを経由する経路の存在も示唆された．オオイタドリ葉にはチロシンが脱炭酸して生じたと考えられるチラミンが豊富に見られることから，オオイタドリにおいて芳香族アミノ酸の脱炭酸経路はアミノ酸由来代謝物の生成の鍵となる反応と考えられる．

nitrile biosynthesis, methyl jasmonate, insect-plant interaction

講演番号：3A04p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ A 校舎 04 会場

ハスモンヨトウ幼虫の腸管内容物抽出液によりダイズ葉で誘導される二次代謝物
Secondary metabolites of soybean induced by gut contents of *Spodoptera litura*

○中田 隆[1]、村上 真一郎[1]、網干 貴子[1]、吉永 直子[1]、石原 亨[2]、寺石 政義[1]、SCHMELZ Eric[3]、小野 肇[1]、西田 律夫[1]、奥本 裕[1]、森 直樹[1] ([1]京大院農、[2]鳥取大農、[3]USDA ARS, CMAVE)
○Ryu NAKATA[1], Shinichiro MURAKAMI[1], Takako ABOSHI[1], Naoko YOSHINAGA[1], Atsushi ISHIHARA[2], Masayoshi Teraishi[1], Eric SCHMELZ[3], Hajime ONO[1], Ritsuo NISHIDA[1], Yutaka OKUMOTO[1], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Tottori Univ., [3]USDA ARS, CMAVE)

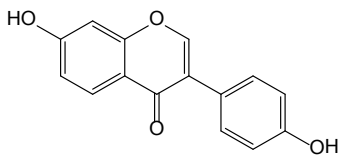
【目的】

植物は昆虫の食害や病原菌の感染に対して様々な誘導性の防御機構を持つ．ダイズ *Glycine max* では，鱗翅目幼虫によって葉が食害されると，幼虫の吐き出し液(腸管内容物)に含まれる volicitin によってテルペン類などの揮発成分が誘導される．一方，不揮発成分のイソフラボン daidzein [1] と formononetin [2] がハスモンヨトウの食害によって葉で増加することを本研究室で明らかにした．鱗翅目幼虫の腸管内容物抽出液を葉に塗布することで食害を再現できることが可能であり，本研究は，この手法を用いて [1] と [2]のダイズ葉における誘導の仕組みを詳細に調べた．品種にはタマホマレを用いた．

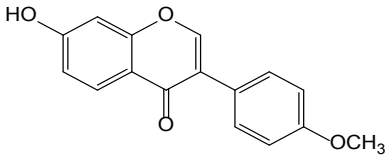
【方法・結果】

ダイズ第一本葉にピンで穴をあけ，ダイズの害虫であるハスモンヨトウ *Spodoptera litura* 5 齢幼虫腸管内容物の 50 mM リン酸バッファー抽出液 (pH 8.0, 0.05 匹当量) を塗布した. 処理は 16L8D 条件のインキュベータ（25℃）中で行った．処理後，第一本葉の処理した領域，処理部から離れた領域, および第二本葉を 80% メタノールで抽出後, その抽出液を LC/MS で分析し, [1] と [2] を定量した．その結果，第一本葉では [1] と [2] のいずれも処理領域でのみ誘導され，処理部から離れた領域では誘導されなかった. また、第二本葉では [1] と [2] のいずれも誘導されなかった. 次に，腸管内容物抽出液に加え、[1] と [2] の生合成前駆体であるフェニルアラニンのラベル体 (U-$^{13}C_9$, 97-99%) を第一本葉に塗布したところ，ラベル体の [1] と [2] が検出された.

以上の結果から，腸管内容物抽出液を用いた処理によって，処理領域のみでフェニルアラニンから [1] および [2] に至る代謝経路が活性化されることが示唆される.



Daidzein [1]



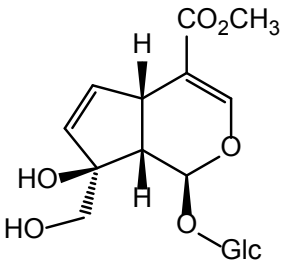
Formononetin [2]

Glycine max, *Spodoptera litura*, isoflavone

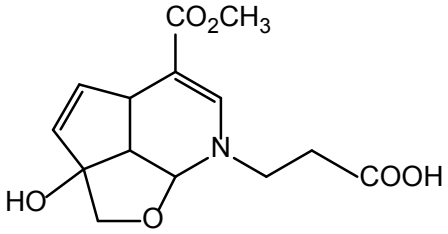
講演番号：3A04p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ A 校舎 04 会場

ハスモンヨトウ腸管内に誘導されるβ-alanine と iridoid 代謝
β-Alanine induction and iridoid metabolism in common cutworm intestinal tract
○志野 真実子[1]、内藤 裕彬[1]、齊藤 準[2]、網干 貴子[1]、吉永 直子[1]、小野 肇[1]、西田 律夫[1]、森 直樹[1] ([1]京大院農・応用生命、[2]京工繊大工科)
○Mamiko SHINO[1], Hiroaki NAITO[1], Hitoshi SAITO[2], Takako ABOSHI[1], Naoko YOSHINAGA[1], Hajime ONO[1], Ritsuo NISHIDA[1], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Institute of Technology)

［背景と目的］
アカネ科クチナシ（*Gardenia jasminoides*）は日本に自生する常緑低木で、その果実は古くから漢方薬や着色料として用いられてきた。また、食害を受けにくい植物でもある。我々は、鱗翅目ヤガ科ハスモンヨトウ（*Spodoptera litura*）幼虫を用いてクチナシの化学的防御機構の解明を試みたところ、食害によってクチナシ中の β-glucosidase が活性化され、葉の主要成分である iridoid 配糖体 gardenoside［1］の aglycone が遊離することが判明した。この gardenoside aglycone が幼虫腸管内の種々のタンパク質と結合して、栄養価の低下や酵素の阻害を引き起こし、クチナシの防御反応として機能すると考えている。昨年、クチナシを摂食したハスモンヨトウ幼虫腸管内に β-alanine が多量に放出されることを報告した。この β-alanine が gardenoside aglycone と結合し、その毒性を低下させている可能性が示唆された。また、実際にクチナシを摂食したハスモンヨトウ幼虫の糞を LC/MS で分析したところ、β-alanine と gardenoside aglycone が結合した物質と考えられる（$[M–H]^-$, *m*/*z* 294）のピークが検出された。そこで、この物質の同定を試みた。
［方法と結果］
Gardenoside aglycone 水溶液と β-alanine 水溶液を imidazole-HCl buffer（pH 7.5）中で 24 時間インキュベートした。そして、LC/MS で分析を行い、生成物を確認した。その結果、 gardenoside aglycone（$[M–H]^-$, *m*/*z* 241）由来のピーク一つが減少し、*m*/*z* 294 のピークが増加した。このピークは糞中に含まれていたものと保持時間も一致した。よって、これを糞中の物質と同一であると考え、逆相 HPLC で分取を行い、^{13}C-NMR、^{1}H-NMR を測定して構造を決定した［2］。



Gardenoside［1］



β-Alanine と gardenoside aglycone の結合物質［2］

Gardenia jasminoides, iridoid, β-alanine

講演番号：3A04p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ A 校舎 04 会場

鱗翅目幼虫，キイロショウジョウバエ，コオロギにおける FACs パターンおよび生合成

FACs pattern and synthesis in lepidopteran caterpillars, fruit flies and crickets.

○森田 沙代、吉永 直子、網干 貴子、小野 肇、西田 律夫、森 直樹（京大院農・応用生命）
○Sayo MORITA, Naoko YOSHINAGA, Takako ABOSHI, Hajime ONO, Ritsuo NISHIDA, Naoki MORI (Kyoto Univ.)

【背景・目的】鱗翅目幼虫の一部，*Gryllus* 属コオロギ，キイロショウジョウバエは，脂肪酸とアミノ酸の縮合物である FACs (Fatty acid Amino acid Conjugates) を吐き出し液中に持つ．鱗翅目幼虫が植物を食害する際，吐き出し液中の FACs が傷口に接触し，植物全身からの揮発成分放出を誘導する．この揮発成分を手掛かりとして，天敵の寄生蜂が幼虫を発見する．FACs のアミノ酸部分はグルタミンとグルタミン酸のみが知られている. 鱗翅目幼虫ではグルタミン型が主流であるのに対し，タバコスズメなどの少数の鱗翅目幼虫, エンマコオロギおよびキイロショウジョウバエはグルタミン酸型を持つ．また，カイコのように FACs を持たない種も多数見つかっている（Table 1）．これまで、鱗翅目ヤガ科ハスモンヨトウおよびアワヨトウ, 鱗翅目カイコガ科カイコの幼虫を用いた *in vitro* 生合成試験において、いずれの種も主にグルタミン型を縮合し、グルタミン酸型の縮合量はその数十分の一であることを報告した. 本研究は，グルタミン型，グルタミン酸型の FACs パターンに昆虫種間で違いが生じる理由および FACs の生理的意義を解明することを目的としている．そのために，グルタミン酸型の FACs を持つキイロショウジョウバエ，タバコスズメおよび同スズメガ科のオオスカシバを新たに用いて FACs の生合成の比較検討を行った.

Table 1 保有する FACs

	Gln 型	Glu 型
ハスモンヨトウ (ヤガ科)	○	×
アワヨトウ (ヤガ科)	○	×
オオスカシバ (スズメガ科)	○	×
タバコスズメ (スズメガ科)	○	○
カイコ (カイコガ科)	×	×
アゲハチョウ (アゲハチョウ科)	×	×
キイロショウジョウバエ (ショウジョウバエ科)	×	○
タイワンエンマコオロギ (コオロギ科)	○	○

【方法・結果】鱗翅目スズメガ科オオスカシバおよびタバコスズメ幼虫腸管，双翅目キイロショウジョウバエ幼虫虫体から粗酵素抽出液を調製し、リノール酸ナトリウムおよびグルタミンまたはグルタミン酸とインキュベートした．その結果、3 種いずれもグルタミンに対して高い縮合活性を示し、グルタミン酸に対してもわずかではあるが縮合活性を示した.
以上の結果から，鱗翅目幼虫の FACs 縮合酵素は保有する FACs パターンに関係なくグルタミン・グルタミン酸選択性に類似性が見られたこと, 双翅目キイロショウジョウバエの FACs 縮合酵素のグルタミン・グルタミン酸選択性も鱗翅目幼虫と類似していることが示唆された.

FACs, insect, in vitro biosynthesis

講演番号：3A04p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ A 校舎 04 会場

淡水性甲殻類スジエビ（*Palaemon paucidens*）における FACs の同定
Identification of FACs in the freshwater prawn, *Palaemon paucidens*
○森田 智也、森田 沙代、吉永 直子、網干 貴子、小野 肇、西田 律夫、森 直樹（京大院農・応用生命）
○Tomoya MORITA, Sayo MORITA, Naoko YOSHINAGA, Takako ABOSHI, Hajime ONO, Ritsuo NISHIDA, Naoki MORI (Kyoto Univ.)

【目的】FACs (Fatty acid Amino acid Conjugates) は脂肪酸とアミノ酸の縮合物であり、植物防御応答を誘導するエリシターとして鱗翅目シロイチモジヨトウ幼虫の吐き出し液から同定された。FACs は植物に揮発成分の放出を誘導し、天敵を介した植物の間接防御反応に関わっている。このように FACs は昆虫自身には不利に働く一方で、鱗翅目幼虫の窒素代謝を効率化する働きがあることを明らかにした(Yoshinaga et al., 2008)。また、直翅目のエンマコオロギや双翅目のショウジョウバエの腸管からも FACs を同定した(Yoshinaga et al., 2007)。このことから FACs には植物－植食者－天敵の三者間でエリシターとして働く機能の他にも、より普遍的な機能があると示唆された。
今回、昆虫とは系統的に離れた甲殻類に属する十脚目のスジエビ（*Palaemon paucidens*）からも FACs を発見した。本研究では、スジエビと鱗翅目ハスモンヨトウ幼虫の FACs および FACs 合成酵素のアミノ酸基質特異性を比較することで、昆虫類と淡水性甲殻類の FACs 生合成における類似性を調べた。
【方法と結果】1. スジエビの腸管組織、そ嚢組織およびそれらの内容物を 50%アセトニトリルで抽出し、LCMS で分析したところ腸管内容物から *N*-acyl-L-glutamine および脂肪酸部分が水酸化された類縁体を検出した。そ嚢組織、そ嚢内容物および腸管組織からは FACs は検出されなかった。2. スジエビの腸管粗酵素抽出液を調製し、これに基質として各種アミノ酸とリノレン酸ナトリウム溶液を加え、FACs 縮合酵素の基質特異性を調べた。スジエビ腸管内 FACs 合成酵素の基質特異性は、リシン・スレオニン・アルギニンに対する選択性が高いという点でハスモンヨトウと異なっていたが、グルタミン・グリシン・ヒスチジン・メチオニン・セリン・アラニンに対する選択性では同様の傾向が見られた。
【考察】スジエビ生体内からグルタミン縮合物が検出され、さらに FACs が腸管内容物に局在していたことはハスモンヨトウと共通していた。また、FACs 縮合酵素の基質特異性を調べると、数種のアミノ酸に対する選択性において両者で違いが見られた。

Yoshinaga et al., 2007. JOURNAL OF CHEMICAL ECOLOGY 33:1376-1381
Yoshinaga et al., 2008. PNAS 105:18058-18063

FACs, prawn, in vitro biosynthesis

講演番号：3A04p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ A 校舎 04 会場

ホタル生体への安定同位体標識化合物のインジェクションと LC/MS を用いたホタルルシフェリンの生合成に関する研究

Studies on biosynthesis of firefly luciferin using LC/MS and by injecting stable isotopic compounds into living fireflies

○蟹江 秀星[1]、大場 裕一[1]、吉田 尚生[1]、小鹿 一[1]、井上 敏[2]（[1]名古屋大院生命農、[2]JNC 株式会社横浜研究所）
○Shusei KANIE[1], Yuichi OBA[1], Naoki YOSHIDA[1], Makoto OJIKA[1], Satoshi INOUYE[2] ([1]Nagoya Univ., [2]JNC Co.)

【背景・目的】

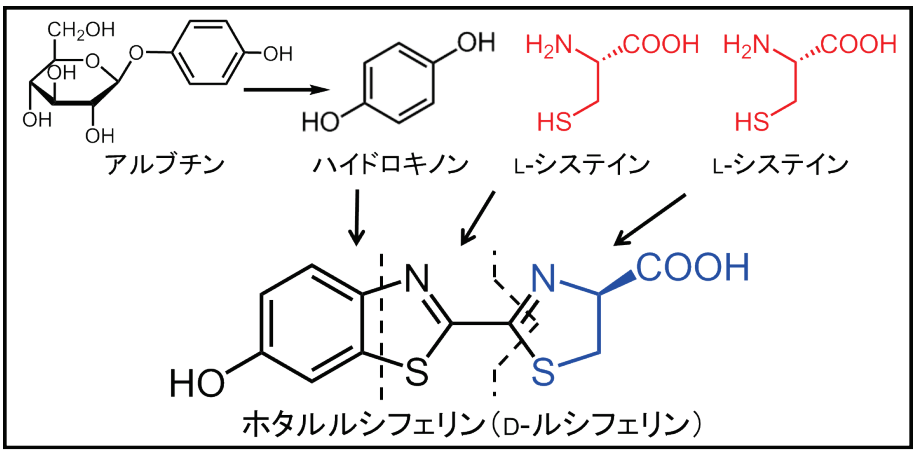
本研究は，ホタルの発光基質であるホタルルシフェリンの生合成単位を明らかにすることを目的とする．ホタルの発光酵素（ルシフェラーゼ）の遺伝子はすでに解明されており，バイオイメージング技術として生命科学分野で広く利用されている．その一方で，ホタルルシフェリンの生合成経路は未だ詳細が明らかでない．真の生合成単位の特定は，生合成酵素をはじめとするホタルルシフェリンの生合成経路の解明のための鍵となる可能性がある．

【方法・結果】

予想される生合成基質の安定同位体標識体をヘイケボタル成虫の発光器に注射し，24 時間後に注射個体から抽出したホタルルシフェリンを LC/ESI-TOF-MS により分析した．その結果，ホタルルシフェリンが 2 分子の L-システインと 1 分子のハイドロキノンから生合成されることが明らかとなった．またフラグメントイオンの解析から，ベンゾチアゾール環の形成時に L-システインのカルボキシ基の炭素が脱離することも明らかとなった．さらにホタル体内には，ハイドロキノンのかわりにアルブチン（ハイドロキノンの配糖体）が存在することが明らかとなった．このことは，毒性の強いハイドロキノンを遊離の状態ではなく配糖体としてホタルが保有していることを示唆する．



ヘイケボタル（成虫）

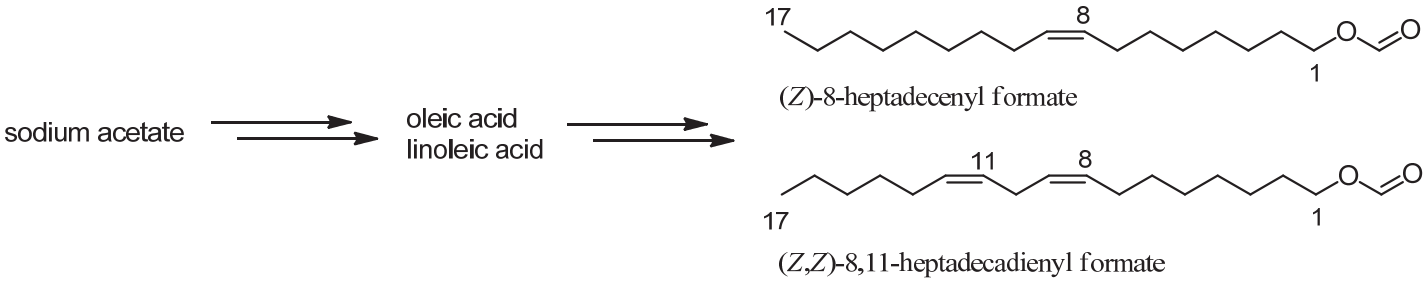


firefly, luciferin, biosynthesis

講演番号：3A04p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ A 校舎 04 会場

コナダニ *Sancassania* sp. “sasagawa” における脂肪族ギ酸エステルの生合成
Biosynthesis of aliphatic formate in the astigmatid mite *Sancassania* sp. “sasagawa”
○清水 伸泰[1]、坂田 大介[1]、宮崎 帆波[1]、桑原 保正[2]([1]京都学園大バイオ環境、[2]富山県大工・生工研セ、JST、ERATO)
○ Nobuhiro SHIMIZU[1], Daisuke SAKATA[1], Honami MIYAZAKI[1], Yasumasa KUWAHARA[2] ([1]Kyoto Gakuen Univ., [2]Toyama Pref. Univ., JST, ERATO)

【目的】コナダニ類は炭素数 15 と 17 の飽和・不飽和炭化水素を分泌する種が多い．ゴミコナダニ *Sancassania* sp. “sasagawa”は炭化水素以外に，天然物としては珍しい 2 種の脂肪族ギ酸エステルを主成分として分泌する．両化合物とも新規の化合物であったため，脂肪酸を基質としたバートンラジカル**脱炭酸反応を利用して**標品を合成し，化学構造を決定した．両化合物ともアルコール部分の炭素数は 17 であるが，不飽和結合の位置から炭素数 18 のリノール酸とオレイン酸がそれぞれの前駆物質と推定できる．これまで脂肪族ギ酸エステルの生合成に関する報告は無く，生成過程におけるギ酸部分の炭素の由来および減炭機構は未解明である．昨年度の本大会では，サトウダニ *Carpoglyphus lactis* に対して同位体標識化合物の取り込み実験を行い，コナダニ類のリノール酸生合成能を証明したことを報告した．今大会では，*Sancassania* sp. “sasagawa”に対して同様の取り込み実験を行い，2 種の脂肪族ギ酸エステルの生合成に関する知見を得たので報告する．
【方法と結果】^{13}C で同位体標識した酢酸ナトリウムを給餌したダニをヘキサンに浸漬し，2 種の脂肪族ギ酸エステルを抽出した．それぞれの化合物をカラムクロマトグラフィーで単離した後，^{13}C NMR スペクトルを測定し，同位体標識された炭素原子を帰属した．また取り込み実験を行ったダニから別途，脂質を溶媒抽出し，加水分解とエステル化反応を行って脂肪酸エステルに誘導した．オレイン酸メチルとリノール酸メチルを単離し，ギ酸エステルと同様に ^{13}C NMR スペクトルをそれぞれ測定し，同位体標識された炭素原子を帰属した．これらのデータから，2 種のギ酸エステルはリノール酸とオレイン酸が前駆体となっていることが判明した．また，ギ酸炭素の標識の有無から，各脂肪酸がアルデヒドに還元された後，減炭反応を伴わず酸化的にギ酸エステルに誘導されていることが示唆された．



biosynthesis, aliphatic formate, mite

講演番号：3A04p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ A 校舎 04 会場

アクリドン類の合成および前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制活性

Synthesis of acridones and their antiproliferative activity on HL-60

○岸本 真帆[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県大資料)
○maho kishimoto[1], satoru kawai[1], tetsuo tokiwano[2], yuko yoshizawa[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Prefectural Univ.)

【目的】ミカン科植物が含有するポリフェノール類、フラボノイド類、カロテノイド類、クマリン類、アクリドン類などの二次代謝化合物には、健胃整腸作用、鎮咳作用、抗菌作用、抗酸化作用など人間に有用な様々な効果が認められている。このためオウバク、キジツ、サンショウ、チンピなどミカン科植物を原料とする生薬が数多く知られている。このような化合物の中にはがん細胞増殖抑制効果を示すことから注目を集めているものもある。このうちのアクリドン類は、アクリジンの 9 位がオキソ化されたケトン誘導体であり、植物アルカロイドで強い生物活性を示すことが知られている。アクリドン類は、1948 年 *Acronychia* 属植物の根皮から初めて acronycine が単離され、その後 1981 年に *Severinia*、*Glycosmis*、*Citrus* 属植物から多数のアクリドンアルカロイドが単離されている。その多くはプレニル基やメトキシ基、ピラン環を持っており活性発現にこのような置換基がどのように関与しているかに興味が持たれている。しかし、アクリドン類は天然資源中には微量にしか存在しないため、構造活性相関についての知見はあまり得られていない。また、アクリドン類をリード化合物とする創薬研究の報告も少ないことから、本研究ではアクリドン類を系統的に合成し、その化合物に対する前骨髄性白血病細胞 HL-60 の増殖抑制効果を調べることでアクリドン類の構造活性相関に関する知見を得ることを目的としている。
【方法】*o*-ヨード安息香酸を出発物質とし、塩基性条件下で種々のアニリン類を反応物質として添加することで，種々の *N*-フェニルアントラニル酸中間体を合成した。PPA 存在下でこれらの分子内 Friedel-Crafts アシル化を行うことで環化させることにより、様々な位置に置換基を有するアクリドン類を合成した。また、水素化ナトリウム触媒下で無置換アクリドンの DME 溶液にベンジルクロリド類を滴下し、さらにヨウ化カリウムを添加することで 10 位にベンジル基を有するアクリドン類を合成した。合成したアクリドン類の生物活性は、前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制効果により評価した。
【結果】本研究では、アクリドン骨格に種々の官能基を導入した数十種類のアクリドン類を合成した。各化合物について前骨髄性白血病細胞 HL-60 増殖抑制試験による活性評価を行った結果、酸素官能基を導入すると活性上昇し、複数導入によりさらに活性が増強される傾向が認められた。一方、ハロゲン基を導入すると活性が弱まることも明らかとなった。ハロゲン基導入によりアクリドン類の溶解度低下が活性低下の主な要因と考えられる。

acridone, HL-60, antiproliferative

講演番号：3A04p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ A 校舎 04 会場

ハロゲン原子を導入したフラボノイド類の合成と出芽酵母遺伝子破壊株増殖阻害に関する研究
Synthesis of halogenated flavonoids and their antiproliferative activity of gene-knockout strain of Saccharomyces cerevisiae

○金子 綾希[1]、川井 悟[1]、吉澤 結子[2]、田島 知子[1] ([1]東電大院理工、[2]秋田県大生資科)
○Aki KANEKO[1], Satoru KAWAII[1], Yuko YOSHIZAWA[2], Tomoko TAZIMA[1] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Pref. Univ.)

【目的】多くの生物は、生体防御の一環として代謝による薬剤無毒化や薬物の細胞外排出を行っている。薬剤の細胞外排出には膜タンパクによる輸送が関与しており、その幅広い基質特異性が膜輸送タンパクの大きな特徴となっている。共通点のない様々な薬剤を基質として認識し、細胞外に排出する薬剤排出が、がん治療や真菌治療を困難にしている原因の一つである。真菌や植物の保有する膜タンパク遺伝子 pdr は ABC トランスポーターをコードする遺伝子の一種であり、多剤耐性に関与していると考えられている。しかし、詳細な機能についてはまだ不明な点も多く、その機能解明が待たれている。フラボノイド類には真菌の多剤耐性を阻害し、増殖抑制効果を示すものも報告されていることから、多剤耐性のメカニズムを解明するためのツールとなることが期待されている。本研究では、種々のフラボノイド類縁体を合成し、一連の多剤耐性遺伝子破壊酵母株に対する増殖抑制効果を調べることで、多剤耐性遺伝子の機能解明の一助とすることを目的とした。
【方法】演者らは、これまでにフラボノイド B 環にハロゲン基を導入した化合物が顕著な活性を示すことを報告している。そこで本研究ではフラボノイド A 環へのハロゲン基導入が活性発現にどのように影響するか検討することとした。出発物質であるハロゲン化-2'-ヒドロキシアセトフェノン類は市販されていないため、その合成を検討した。その結果、ハロゲン化フェノール類を出発物質として、これを無水酢酸とピリジン存在下で加熱還流することで酢酸フェニル類を調製し、これらを塩化アルミニウム(Ⅲ)とニトロベンゼン存在下で加熱還流して Fries 転位反応を行うことで、ハロゲン化-2'-ヒドロキシアセトフェノン類を効率的に合成することができた。塩基性条件下、合成したアセトフェノン類とベンズアルデヒドの Claisen-Schmidt 縮合により、2'-ヒドロキシカルコン類を合成した。また、この 2'-ヒドロキシカルコン類から、酢酸ナトリウム／エタノール中で還流することでフラバノン類を、ヨウ素／ポリエチレングリコール中加熱攪拌することでフラボン類を、また塩基性条件下過酸化水素で処理することでフラボノール類を、それぞれ合成した。生物活性は、*Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子破壊株に対する増殖抑制効果により評価した。
【結果】本研究では、フラボノイド骨格にハロゲン基を導入した数十種類のフラボノイド類を合成した。各化合物の活性評価の結果、５位にフッ素原子あるいは塩素原子が結合したカルコン類に顕著な増殖抑制効果が認められた。また、ハロゲン基以外の置換基についても検討したので、あわせて報告する。

flavonoid, gene-knockout strain, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：3A04p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ A 校舎 04 会場

セミカルバゾン類の合成とそのシステインプロテアーゼ阻害活性

Synthesis of semicarbazones and the cysteine proteinase inhibitory activity

○樋口 佳遥[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県大生資料)
○Yoshiharu HIGUCHI[1], Satoru Kawaii[1], Tetsuo Tokiwano[2], Yuko Yoshizawa[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Prefectural Univ.)

【目的】世界的な人口増加による生活空間の拡大を背景として、トリパノソーマ症やマラリアなどの原虫感染症が増加している。これらの治療において、第一選択薬の強い副作用や薬剤耐性原虫の出現などが問題となっており、新たな作用機序の抗原虫薬の開発が急務となっている。これまでにシステインプロテアーゼ阻害剤が原虫の成長や変異を阻害することが明らかにされており、新たな抗原虫薬としての期待が寄せられている。なかでもセミカルバゾン類が抗原虫薬のリード化合物として注目を集めている。しかし、なぜセミカルバゾン類がシステインプロテアーゼを阻害するのか、その阻害様式が完全には解明されたとは言い難い。本研究では、システインプロテアーゼ阻害に必要な最小構造単位の同定を試みるとともに、構造活性相関に関する知見を得ることを目的として、さまざまなセミカルバゾン類とその構造類似体を合成し、そのプロテアーゼ阻害活性を調べることを計画した。
【方法】セミカルバゾンのヒドラジノ基側部分（X 部分）、セミカルバジド部分（Y 部分）、およびアミノ基側部分（Z 部分）に分けて系統的合成を試みた。X 部分構築には、出発物質として種々のベンズアルデヒド類やアセトフェノン類を使用した。また、Z 部分構築には、種々のアニリン類より調製したフェニルウレア類を用いた。さらに、Y 部分を検討するためセミカルバゾン類とチオセミカルバゾン類を調製した。X～Z 部分の組み合わせにより、種々のセミカルバゾン類およびチオセミカルバゾン類を合成した。具体的には、各種アニリン類をシアン酸ナトリウムまたはチオシアン酸アンモニウムで処理することによりフェニルウレア類／フェニルチオウレアを合成し、さらにエタノール溶媒中ヒドラジン一水和物と還流することで、フェニルセミカルバジド類／フェニルチオセミカルバジド類を調製した。これらをベンズアルデヒド類またはアセトフェノン類とメタノール溶媒中で還流することでセミカルバゾン類／チオセミカルバゾン類を合成した。生物活性は、パパインをシステインプロテアーゼのモデルとして、これに対する阻害効果により評価した。酵素基質には Z-Phe-Arg-AMC を使用し、酵素反応により遊離する 7-amino-4-methylcoumarin の蛍光を測定した。
【結果】本研究で合成したセミカルバゾン類およびチオセミカルバゾン類のパパイン阻害活性を調べたところ、チオセミカバゾン類はセミカルバゾン類よりも強い活性を示す傾向が認められた。また、ヒドラジノ基側フェニル基に導入した官能基の種類などの活性への影響についても検討したので、合わせて報告する。

Thiosemicarbazone, Cysteine proteinase, Z-Phe-Arg-AMC

講演番号：3A04p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ A 校舎 04 会場

ピラノクマリン類の合成および前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する影響

Effect on promyelocytic leukemia cells HL-60 and synthesis of such Pyranocoumarins

○田中 祐希[1]、川井 悟[1]、吉澤 結子[2] ([1]東京電機大学理工学部、[2]秋田県立大学資料)
○Yuki TANAKA[1], SATORU KAWAI[1], YUKO YOSHIZAWA[2] ([1]ToukyouDenki University Faculty of Science and Technology, [2]Akita Pref. Univ.)

【目的】天然資源由来のクマリン類の中には、その基本骨格にピラン環やフラン環が縮合した化合物も数多く知られており、それぞれピラノクマリン類やフロクマリン類とよばれている。一般に、ピラノクマリン類やフロクマリン類は単純クマリンよりも強い生物活性を持つことが知られている。半耐寒性常緑低木イソマツ科植物 *Plumbago zeylanica* 等に含まれる seselin は、最も単純なピラノクマリンであるが、数種のがん細胞に対する増殖抑制、フィトヘムアグルチニン刺激によるヒト末梢血単核細胞増殖の抑制、マウスに対する抗侵害受容作用などの興味深い生物活性を持つことが報告されている。天然資源中には多様なピラノクマリン類が存在するが、いずれも微量にしか含有されていないため、構造活性相関に関する研究は十分には行われていない。本研究では、ピラノクマリン類の系統的合成を行うとともに、それらの前骨髄性白血病細 HL-60 に対する増殖抑制効果を調べることで、構造活性相関に関する知見を深めることを目的とした。
【方法】クマリン骨格ベンゼン環または δ-ラクトン環にピラン環を縮合するため、ベンゼン環または δ-ラクトン環にヒドロキシル基を有するクマリンを出発物質として、塩化インジウム、トリフルオロメタンスルホン酸銅(II)、またはフェニルボロン酸などの酸触媒存在下でブテナール類を Michael 付加することにより合成を試みた。この方法ではクマリン骨格 5-6 位にピラン環が縮合したピラノクマリン類の合成は困難と予想されたため、ジヒドロキシアセトフェノン類を出発物質とする合成法の検討も行った。具体的には、2,6-ジヒドロキシアセトフェノン類にピリジン触媒存在下でブテナール類を Michael 付加することによりエーテル中間体を調製し、次いで環化することでピラノヒドロキシアセトフェノン類とし、これを DCC と DMAP 存在下ジクロロメタン溶媒中でフェニル酢酸類と反応させてエステル中間体を調製し、さらに DBU 中で環化させて 3-フェニル-4-メチル-ピラノクマリン類とする方法の検討を行った。合成したピラノクマリン類の生物活性は、前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制活性により判定した。
【結果】これまでに数十種のピラノクマリン類を合成した。単純クマリン類に比較して、ピラン環を導入することで活性が増強される傾向が認められた。このことより、拡張したπ電子系が活性発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。ピラン環の縮合位置、ピラン環に導入した官能基の生物活性への影響についても検討したので、合わせて報告する。

Pyranocoumarin, Promyelocytic leukemia cells hl-60, Michael addition

講演番号：3A04p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ A 校舎 04 会場

翻訳後修飾によりトリプトファンがイソプレニル化された新規ペプチドの探索
Screening of a novel post-translational tryptophan isoprenyltransferase and modified peptide
○宇佐美 翔平、林 峻輔、中村 優太、岡田 正弘（中部大院応生）
○Syohei USAMI, Shunsuke HAYASHI, Yuta NAKAMURA, Masahiro OKADA (Chubu Univ.)

＜概要および目的＞

枯草菌のオリゴペプチド型のクオラムセンシングフェロモンである ComX フェロモンは、C 末端から 2~4 番目のトリプトファン残基のインドール環の 3 位にイソプレニル基が結合し、それに伴い、プロリン様の五員環が生成し三環性骨格を形成するという特徴的な翻訳後修飾を受けている。翻訳後修飾によるイソプレニル化として C 末端のシステイン残基のイソプレニル修飾があるが、この翻訳後修飾は、そのコンセンサス配列が明らかにされ、相同性検索などから真核生物に普遍的に存在することが明らかになっている。しかしトリプトファンの場合は、菌株ごとに ComX フェロモンのアミノ酸配列が大きく異なるためにコンセンサス配列は解明されておらず、現在までに枯草菌以外からは発見されていない。そこでトリプトファンの翻訳後修飾によるイソプレニル化の普遍性の解明を目的として、*in vitro* 酵素反応系を用いた修飾酵素に着目したイソプレニルトリプトファンを有する修飾ペプチドの探索を行い、構造を決定することを目指した。

＜方法および結果＞

ComXフェロモンの生合成酵素ComQの相同性検索を行い、相同性の高いトリプトファンイソプレニルトランスフェラーゼ候補タンパクのオープンリーディングフレームを大腸菌に導入した。候補タンパクを過剰発現させた菌体を回収した後に、超音波破砕を行うことで、粗酵素液を調製した。また、C末端から2~4番目にトリプトファン残基を有する基質候補ペプチドをペプチド固相合成法により化学合成し、基質溶液を調製した。それぞれ調製した基質溶液と粗酵素液に加えて、別途調製したファルネシル二リン酸溶液を混合し、マグネシウムイオンの存在下、*in vitro* 酵素反応を行った。得られた反応液をLC/MSを用いて分析した結果、目的のファルネシル基分の分子量が増大した修飾トリプトファン残基を有する修飾ペプチドを検出することに成功し、候補タンパクがトリプトファンファルネシルトランスフェラーゼ活性を有することが明らかとなった。現在、ペプチド固相合成法を用いた修飾ペプチド構造推定体の合成を行い、合成ペプチドとの比較による構造決定を進めているところである。

Isoprenylation, Post-translational modification, Tryptophan

講演番号：3A04p23
講演日時、会場：3 月 29 日 17:59～ A 校舎 04 会場

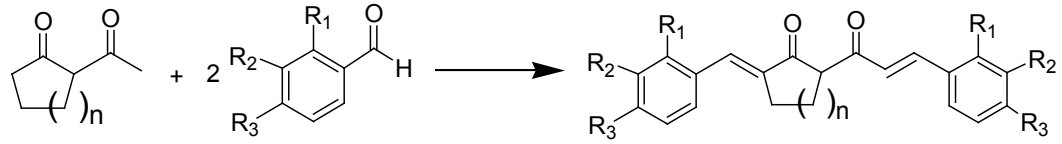
クルクミン類縁体による α-アミラーゼ阻害活性評価

Evaluation of curcumin analogues for α-amylase inhibitory activity

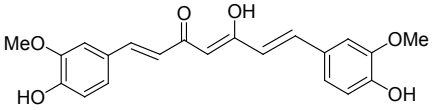
○近藤 あずさ [1]、増田 温子 [1]、米本 龍太 [2]、加藤 英介 [2]、川端 潤 [2]、柳瀬 笑子 [1] ([1]岐阜大応生、[2]北大院農)
○Azusa KONDO[1], Atusko MASUDA[1], Ryuta YONEMOTO[2], Eisuke KATO[2], Zyun KAWABATA[2], Emiko YANASE[1] ([1]Gifu Univ., [2]Hokkaido Univ.)

【背景および目的】クルクミン類はウコンに含まれる黄色色素であり、抗腫瘍、抗菌作用などの生理活性が報告されている。クルクミン類の構造的特徴として、ベンゼン環部の置換基の違い、分子内 β-ジケトン構造、分子内ジエン構造と自由回転可能な C-C 結合に起縁する分子全体のコンホメーション変化があり、これらの違いがクルクミン類で知られる様々な生理活性に深く影響している可能性がある。本研究では、分子内に環構造をもち、ベンゼン環部の置換基の異なる各種クルクミン類縁体を合成し、α-アミラーゼ阻害活性試験を用いてその活性評価を行うことにした。
【方法と結果】適当なアセチルシクロアルカノンと置換様式の異なるベンズアルデヒド誘導体を原料に、アルドール縮合反応を用いて、各種クルクミン類縁体の合成に成功した。合成した類縁体を α-アミラーゼ阻害活性試験に供したところ、β-ジケトン部に有する環の大きさやベンゼン環部の置換基の種類で阻害率に違いがあることがわかった。更に、天然型であるクルクミン I 500μM の阻害活性は約 20%と低かったのに対し、β-ジケトン部に 5 員環あるいは 6 員環をもつクルクミン類縁体のいくつかはそれよりも強く、特に化合物 **1** では 500μM で 97%の阻害率を示した。現在、構造活性相関を明らかにする目的でさらに様々なクルクミン類縁体を合成し、その阻害活性について検討している。

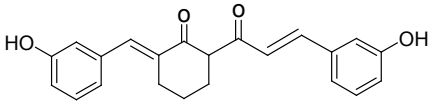
＜クルクミン類縁体の合成方法＞



＜阻害活性評価＞



クルクミン I　20%



化合物 **1**　97%

cursumin, α-amylase

講演番号：3A05a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ A 校舎 05 会場

Hydrogen-Deuterium Exchange of Cross-Linkable α-Amino Acid Derivatives in Deuterated Triflic Acid

○Lei Wang[1], Yuta Murai[2], Takuma Yoshida[1], Masashi Okamoto[1], Yasuko Sakihama[1], Yasuyuki Hashidoko[1], Makoto Hashimoto[1] ([1]Division of Applied Science, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, [2]Faculty of Advanced Life Science, Frontier Research Center for Post-Genome Science and Technology, Hokkaido University)

Incorporation of stable isotopes and its application for mass spectrometry have been used as useful strategies to identify and analyze biological functions of small molecules in proteomics. Previously, we have already reported the stable isotopes incorporated α-amino acids with direct hydrogen/deuterium exchange by deuterated trifluoromethanesulfonic acid (TfOD)[1]. This exchange is rapid and is also controllable by conditions of reagent amount, reaction time and temperature. Photophores in photoaffinity labeling, 3-aryldiazirine, benzophenone and arylazide, are able to form cross-linkage between ligands and receptor under UV irradiation. Photophores incorporated α-amino acids is an effective strategy to study the interaction between α-amino acids and biological molecules. The combination of photoaffinity labeling and hydrogen/deuterium exchange will be one of promising ways to analyze biological function.

In this work, hydrogen/deuterium exchanges by TfOD were performed on cross-linkable α-amino acids including 4-[3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl]-$_L$-phenylalanine(**1**), 4-benzoyl-$_L$-phenylalanine(**2**), 4-azido-$_L$-phenylalanine(**3**), $_L$-DOPA(**4**) as well as their corresponding acetylated derivatives. Hydrogen/deuterium exchanges were easily observed at the above α-amino acids while azido substitution could readily react with TfOD which hindered the hydrogen/deuterium exchange on aromatic protons. Higher than 90% incorporated ratio (detected by ^{1}H NMR) was observed in **4** within 1 hour while less than 40% incorporated ratio was observed in **1** and **2** which indicated electron effect played an crucial role in the exchange process. **1** was not stable in TfOD at room temperature due to the decomposition of diazirine group under strong acid condition. As for other α-amino acids (**2** and **4**), exchange ratio showed no difference at room temperature or 0℃. Furthermore, it was found that acetylated derivatives showed higher exchange rate than unacetylated α-amino acids which was obviously presented in **1**. As for **4** and **2**, acetyl group had no significant effect on the exchange rate due to the relative high and low reactivity, respectively.

1. Yuta Murai, Lei Wang et al. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 5111-5116.

Hydrogen-deuterium exchange, Aromatic α-amino acid, Triflic acid

講演番号：3A05a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ A 校舎 05 会場

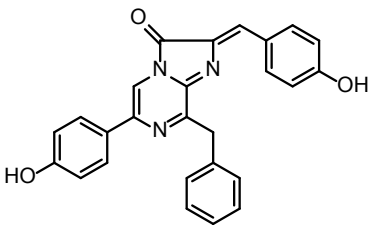
発光タンパク質（フォラシン）の発光基質誘導体の合成とその発光活性

Synthesis of bioluminescent substance for the photoprotein (pholasin) and its activity

○松岡 絢香[1]、南郷 成子[1]、古市 卓也[2]、久世 雅樹[1]、滝川 浩郷[1] ([1]神戸大院農、[2]岐阜女子大家政)
○ Ayaka MATSUOKA[1], Naruko NANGO[1], Takuya FURUICHI[2], Masaki KUSE[1], Hirosato TAKIKAWA[1] ([1]Kobe Univ., [2]Gifu Women's Univ.)

【目的】

発光タンパク質は細胞内における生体成分の濃度変化をリアルタイムで可視化する。ヒカリカモメガイの発光タンパク質（フォラシン）はデヒドロセレンテラジン（DCL）を基質として利用し、活性酸素種（ROS）の刺激により発光する。この性質を利用すれば、生細胞内における ROS の濃度変化が測定できる。フォラシンは 490nm の発光を示すが、分子基質の分子構造を修飾して異なる波長で発光させることが可能になれば、この発光系の利用範囲は広がる。本研究では生物発光基質アナログによる発光波長の改変を目的とした。



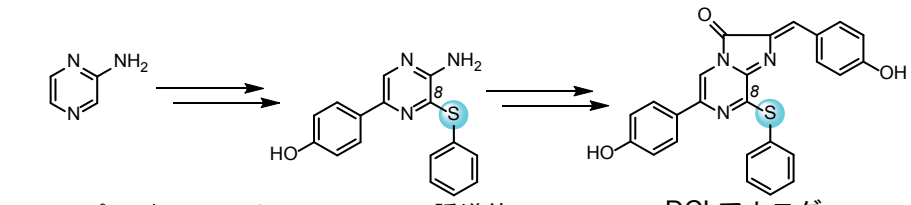
DCL

【方法】

フォラシンの発光基質である DCL について、その分子構造を修飾して発光波長を改変させることにした。DCL の 8 位にフェニルチオール基が導入できれば、硫黄原子の置換基効果により発光波長をシフトさせることが可能になる。そこで、DCL の 8 位にフェニルチオール基を導入する新規方法を確立することにした。

【結果】

市販のアミノピラジンを出発原料として臭度化、フェニルチオール基の導入、Suzuki-Miyaura カップリング反応によって、セレンテラミン誘導体を化学合成した。これをフェニルピルビン酸と縮合してデヒドロアミノ酸へと誘導し、最後に無水酢酸で処理して、DCL アナログの化学合成を達成した。この DCL アナログは、人工基質の中で初めてフォラシン発光活性を示した。



アミノピラジン　セレンテラミン誘導体　DCLアナログ

bioluminescence, chromophore, photoprotein

講演番号：3A05a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ A 校舎 05 会場

体外受精におけるフラバン二量体処理マウス精子の効果

Effect of flavan dimer-treated mouse sperm on in vitro fertilization

○荒舘 忠[1]、谷井 一郎[1]、小宮 顕[2] ([1]富山大医生物、[2]富山大医腎泌尿器)
○Tadashi ARADATE[1], Ichiro TANII[1], Akira KOMIYA[2] ([1]Univ.of Toyama, Medical Bio., [2]Univ.of Toyama, Urology)

【目的】哺乳類の受精には精子の超活性化（Hyperactivation）が重要である。我々は、精子活性化剤の開発を目指して、その誘導物質を天然物から探索しており、カワラケツメイの莢から分離した 3 種類のフラバン二量体、7,4'-dihydroxyflavan-(4β→8)-catechin（**1**）、7,4'-dihydroxyflavan-(4β→8)-afzelechin（**2**）、7,3',4'-trihydroxyflavan-(4β→8)-catechin（**3**）がマウス精子の Hyperactivation 様運動を誘導することを見出した。この効果が、受精に対してどのように影響するのかを調べるために、効果が最も高かった化合物 **2** で処理したマウス精子を用いて体外受精（IVF）を行い、受精率に対する影響を評価した。
【方法】体外受精および精子の運動能解析には、C57BL/6J マウスの雄（12～19 週齢）、雌（8～13 週齢）を用いた。精子運動速度および Hyperactivation 様運動の誘導効果は、精子運動能解析装置 SMAS により評価した。雌マウスに PMSG（5IU）を投与し 48 時間後に hCG（5IU）を投与することで過排卵処理を行った。hCG 投与から 16～17 時間後に卵管膨大部から卵丘細胞-卵複合体（COC）を採取した。精巣上体尾部より採取したマウス精子は、TYH 培地で 37℃、5%CO_2 下で 90 分間培養し、受精能獲得（Capacitation）状態にしてから、各濃度（12.5～150μM）のフラバン二量体を含む TYH 培地で 30 分間培養した。体外受精：フラバン二量体処理した精子を 20 sperm/μL になるように COC が入った TYH 培地に加えて媒精し、24 時間後、2 細胞胚および未受精卵の数から受精率を算出した。
【結果】マウス精子の Hyperactivation 様運動を誘導する化合物の探索には ICR マウス精子を用いたが、C57BL/6J マウスで体外受精を行うにあたり、C57BL/6J マウス精子に対してフラバン二量体の同効果を調べた結果、ICR マウス精子と同様な効果を示すことが確認された。化合物 **2** で処理した精子による体外受精の受精率は、12.5～50μM 処理精子を用いた場合に上昇する傾向がみられ、50μM 処理群をピークにしてそれ以上の濃度では減少したので、至適濃度があることが分かった。体外受精の成立には、Hyperactivation の誘導と精子の運動速度の関係が重要ではないかと考えられる。他のフラバン二量体および関連モノマー化合物で処理したマウス精子を用いた体外受精の受精率に対する効果について、さらに検討中である。

flavan dimer, hyperactivation, mouse sperm

講演番号：3A05a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ A 校舎 05 会場

新規 RNA 5’-トリホスファターゼ阻害物質 MI481-42F6 A,B,C および D に関する研究

MI481-42F6 A, B, C and D, novel RNA 5’-triphosphatase inhibitors from *Kribbella* sp.

○梅北 まや[1]、五十嵐 雅之[1]、澤 竜一[1]、山崎 学[1]、林 千草[1]、波多野 和樹[1]、藤原 俊伸[1]、水本 清久[2]、野本 明男[1] ([1]微化研、[2]北里大)
○Maya UMEKITA[1], Masayuki IGARASHI[1], Ryuichi SAWA[1], Manabu YAMAZAKI[1], Chigusa HAYASHI[1], Masaki HATANO[1], Toshinobu FUJIWARA[1], Kiyohisa MIZUMOTO[2], Akio NOMOTO[1] ([1]BIKAKEN, [2]Kitasato Univ.)

【目的】　近年、コンプロマイズド・ホストの増加に伴って深在性真菌症が増加しているが、これに対する治療薬は、5 系統の薬剤しか登録されていない。これらには、安全性、抗菌スペクトラム、耐性化等の問題を有する薬剤が多く、深在性真菌症等の難治性真菌症に有効な新規機序を有する化合物が切望されている。真核生物の mRNA の 5’末端に付加するキャップ構造は、遺伝子発現において必須の機能を果たしている。この形成は mRNA キャッピング酵素によって行われ、その反応は２つの素過程（RNA 5’-トリホスファターゼ活性と RNA グアニル酸転移酵素活性）からなる。中でも、RNA 5’-トリホスファターゼについて、真菌とヒトの間でアミノ酸配列の相同性は低いことが知られている。本研究では、真菌類とヒトの mRNA キャッピング酵素の違いに着目し、選択性の高い抗真菌剤探索を目的としてスクリーニングを行った。今回、この過程で４種の新規活性物質 MI481-42F6 A、B、C および D を見出した。本物質の単離・精製、構造解析について報告する。

【方法・結果】　スクリーニングは、出芽酵母由来およびヒト由来 RNA 5’-トリホスファターゼに対する選択阻害活性を指標に探索を行なった。この過程で、東京都練馬区の土壌より分離した一放線菌 *Kribbella* sp. MI481-42F6 株の培養液に、酵母由来 RNA 5’-トリホスファターゼを阻害する活性を見出した。活性物質の精製・単離は、以下のように行なった。即ち、MI481-42F6 株の培養液 4 リットルより菌体を集め、これを MeOH で抽出し、MeOH 溜去後、BuOH 抽出を行なった。活性画分は、逆相カラムクロマトおよび HPLC を用いて 4 種の新規活性物質、A (78.8 mg)、 B (83.3 mg)、C(25.6 mg)および D(12.6 mg)をそれぞれ単離した。4 種の新規活性物質 MI481-42F6 A、B、C および D は、高分解能 ESIMS より、それぞれ $C_{30}H_{56}O_{14}$, $C_{24}H_{46}O_9$, $C_{31}H_{58}O_{14}$ およびお $C_{25}H_{48}O_9$ と決定した。本物質の平面構造は、各種 NMR スペクトルの解析により、グルコン酸およびグルコースを含有する新規アルキルグリセリルエーテル配糖体であると決定した。MI481-42F6　A、B、C および D の酵母由来 RNA 5’-トリホスファターゼに対する IC_{50} は、6～11 μM であった。また、本物質は、酵母の増殖を 3.13～100 μg/ml で阻害する事が確認された。現在、立体化学構造の解析と生物活性について検討を行っている。

RNA 5'-triphosphatase, mRNA capping enzyme, antifungal drug

講演番号：3A05a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ A 校舎 05 会場

新規ヒスチジンキナーゼ阻害剤 Waldiomycin の作用機構

The modes of action of new antibiotics, waldiomycin targeting histidine kinases

○犬飼 洋一[1]、江口 陽子[1]、栃尾 尚哉[2]、木川 隆則[2]、岡島 俊英[3]、五十嵐 雅之[4]、梅北 まや[4]、内海 龍太郎[1] ([1]近畿大院・農・バイオ、[2]理研横浜、[3]阪大・産研、[4]微化研)
○ Youichi INUKAI[1], Yoko EGUCHI[1], Naoya TOCHIO[2], Takanori KIGAWA[2], Toshihide OKAJIMA[3], Masayuki IGARASHI[4], Maya UMEKITA[4], Ryutaro UTSUMI[1] ([1]Kinki Univ., [2]Riken Yokohama, [3]Osaka Univ., [4]IMC(BIKAKEN))

近年既知の抗生物質に耐性を持つ多剤耐性菌の発生が問題となっている。既存の抗生物質とは異なる作用機構を示す、新規分子標的剤の開発が求められている。二成分制御系 WalK (ヒスチジンキナーゼ, HK) / WalR は、枯草菌や黄色ブトウ球菌等のグラム陽性菌に保存され、細胞増殖に必須であることが知られている。新規抗生物質を単離するために、放線菌の天然抽出物を用いて WalK/WalR を標的としたスクリーニングが実施され、新たに、Waldiomycin が見出された(1)。Waldiomycin は、angucycline 抗生物質の一種で、WalK（HK）の自己リン酸化活性を阻害する。また、Waldiomycin は枯草菌や黄色ブドウ球菌においては、WalK/WalR 制御の遺伝子発現制御とそれに伴う細胞壁代謝異常による細胞分裂・増殖阻害を引き起こし、抗菌性を示す。Waldiomycin はグラム陽性菌の WalK だけでなく、グラム陰性細菌の HK の自己リン酸化も阻害し、細菌の HK に共通に存在する領域を標的にした新規な HK 阻害剤であることが示唆された。本研究では、立体構造がよく知られている大腸菌 HK, EnvZ を用いて NMR 法により Waldiomycin と細菌 HK の分子間相互作用を解析するとともに分子生物学的検証を行った。

最初に、NMR 法において 、EnvZ の DHp （２量体化）ドメインと Waldiomycin の相互作用解析を行ったところ、DHp ドメインのヘリックス I の N 末側およびヘリックス II の C 末側領域にシグナル強度の減弱が認められた。ヘリックス I の N 末側には、HK に保存されたヒスチジン残基（H243, 自己リン酸化部位）が含まれ、自己リン酸化阻害との関連が強く示唆された。Waldiomycin のカルボキシル基のメチルエステル化は、WalK の自己リン酸化阻害活性および抗菌活性がともに低下することから、Waldiomycin の WalK 阻害活性にカルボシル基が重要であることが示唆されている(1)。そこで Waldiomycin によって自己リン酸化が阻害される HK (WalK, VicK, EnvZ) において、共通に存在するリン酸化ヒスチジン残基周辺に保存されている塩基性アミノ酸リジンおよびアルギニンをアラニンに置換し、Waldiomycin の自己リン酸化阻害活性 (IC_{50}:50% 阻害濃度) を測定した。その結果、EnvZ の R246A, K272A, R289A 各変異体では、野生型 EnvZ と比べ大きな違いが見られなかった。一方、R234A 変異体は、 IC_{50} が野生型に比べ約 60 倍高い値を示した。 以上のことから、Waldiomycin は、EnvZ の細菌 HK に共通して存在する DHp ドメインに存在する R234 と直接相互作用して、その自己リン酸化反応を阻害する新規なヒスチジンキナーゼ阻害剤であることが示された。

1) Igarashi M., Watanabe T., Hashida T., Umekita M., Yanagita Y., Kino H., Kinoshita N., Sawa R., Nishimura Y., Utsumi R., Nomoto A. *J. Antibiot*. 66, 459-464 (2013)

histidine kinase inhibitor, antibiotics, TCS

講演番号：3A05a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ A 校舎 05 会場

香気性の植物抽出物の細菌の増殖に与える影響の解析
Analysis of aromatic plant extracts affecting bacterial cell growth
○朝井 計、小穴 秋弓、今泉 優、長谷川 登志夫（埼玉大学院理工）
○Kei ASAI, Ayumi OANA, Yu Imaizumi, Toshio HASEGAWA (Saitama Univ.)

【背景】植物抽出物中には、動物・昆虫や微生物に対して生理活性を持つ化合物数が数多く存在し、それらは古くから薬やお香など様々な用途に利用されている。その様な植物抽出物にはエッシェンシャルオイルとして用いられる香気的なものも存在し、その中にはテルペン類に属する化合物が多数含まれている。エッシェンシャルオイルは人体だけでなく、種々の微生物に対しても抗生作用があると言われているが、有効成分やその作用機序はあまり知られていない。また、それらの化合物は既に人体に使用されており、安全性がある程度保障されている。そこで我々は新たな作用機序をもつ耐性の現れにくい抗生物質の探索をめざし、いくつかのエッシェンシャルオイルの原料となる植物体から、テルペン化合物を抽出・精製し、それらが細菌の対数増殖・定常期を含む生活環に与える影響を調べた。
【結果・考察】ベチバー根抽出物と白檀抽出物を、グラム陽性土壌細菌である枯草菌とグラム陰性腸内細菌である大腸菌の対数増殖期細胞に添加したところ、大腸菌に比べ、より低濃度で枯草菌の増殖を阻害し、加えて濁度の減少を誘発した。さらに、定常期の枯草菌培養液中に添加しても、濁度減少・生菌数の低下を引き起こした。これらの抽出物は枯草菌に対して、すみやかな溶菌作用を有することが示された。蛋白質や細胞壁の合成阻害活性を持つ、既知の抗生物質では見られない特徴である。
ECF シグマ因子群は細菌の細胞壁や細胞膜に影響する様々なストレスシグナルに応答し、適応に関わるシグマ因子群である。植物抽出物添加により、どのような ECF シグマ因子が活性化されるか調べることで、植物抽出物添加が、どのようなストレスシグナルに対応しているか予測した。
定常期の細胞に SDS や triton X-100 等の界面活性剤、またはリゾチームを暴露することで、植物抽出同様の濁度減少・溶菌がおこった。また細胞壁分解酵素遺伝子の多重破壊によって、本抽出物による溶菌誘発がある程度抑制された。この時薬剤処理時の細胞を、蛍光染色により細胞膜やヌクレオイド等の細胞構造を可視化し顕微鏡観察した。
これらの結果から、植物抽出物による溶菌現象は、細胞膜の恒常性に影響を与えた結果、細胞壁中に局在している溶菌酵素が制御を失い、細胞壁の溶解が起こり、溶菌が誘導されたと考え、解析を行っている。

essential oil, terpenoids, Bacillus subtilis

講演番号：3A05a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ A 校舎 05 会場

Hsp90 を活性化する天然小分子化合物

Natural small-molecule Hsp90 activators

○仲本 準、天谷 洋介（埼玉大院理工）
○Hitoshi NAKAMOTO, Yosuke Amaya (Saitama Univ)

代表的分子シャペロンの一つであり、シグナル伝達分子等の構造・機能・安定性を保証する Hsp90 は、ヒト培養細胞では全タンパク質量の 2 %を占める生存に必須のタンパク質である。これに対して、原核生物の Hsp90（HtpG）は、非ストレス下では必須ではないが、ストレス下では重要な働きをすることがシアノバクテリア（藍藻）を用いた当研究室の先行研究により明らかになっている。Hsp90 のシャペロン作用機構は未だ十分に解明されていない。

Hsp90 は癌細胞の生存・増殖にとっても必須であり、Hsp90 阻害剤は抗癌剤としての薬効があり臨床試験も行われている。そのため Hsp90 の活性を増減する化合物の探索はシャペロン作用機構の解明のみならず、医薬品の開発にも有用であると期待される。

我々は Hsp90 の機能を調節する小分子化合物を探索する中で、天然小分子化合物 Zerumbone（ZER）がその活性に影響を及ぼすことを発見した。そこで本研究では、酵母の Hsp90 やシアノバクテリア HtpG に及ぼす Zerumbone（ZER）の影響を解析し、その作用機構を解明することを目的とした。

ZER は Hsp90 や HtpG の ATPase 活性を活性化した。Hsp90 の活性化剤は、最近報告されたタモキシフェンのみであった。ZER が Hsp90 の構造に及ぼす影響を調べるために、Trp 残基の蛍光解析を行ったところ、HtpG の Trp 蛍光は ZER を添加することにより濃度依存的に減少した。Trp 残基は HtpG の中間ドメインに多数存在するため、基質結合に関与する中間ドメインの構造変化が起きたと考察される。

続いてモデル基質タンパク質のリンゴ酸脱水素酵素を用いて、ZER が HtpG の凝集阻止活性に及ぼす影響を調べたところ、ZER が活性を増大させることが明らかになった。これまでに Hsp90 の凝集阻止活性を促進する化合物は報告されておらず、ZER は Hsp90 の ATPase 触媒機構やシャペロン機構の解明に有用であると考えられる。

Molecular chaperone, Hsp90, Small-molecule activator

講演番号：3A05a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ A 校舎 05 会場

bZIP 型転写因子の 14-3-3 結合に関する生化学的研究

Biochemical study on interaction of bZIP transcription factor to 14-3-3 protein

○藤岡 興[1]、千葉 光浩[2]、深澤 壽太郎[2]、三橋 渉[1]、加藤 修雄[3]、豊増 知伸[1] ([1]山形大農、[2]広島大院理、[3]大阪大産研)
○Ko FUJIOKA[1], Mitsuhiro Chiba[2], Jutarou Fukazawa[2], Wataru Mitsuhashi[1], Nobuo Kato[3], Tomonobu Toyomasu[1] ([1]Yamagata Univ., [2]Hiroshima Univ., [3]The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University)

14-3-3 タンパク質は全ての真核生物に存在する制御タンパク質で、転写因子や酵素などとリン酸化依存で相互作用することで、標的タンパク質の機能を制御する重要なアダプタータンパク質である。その標的タンパク質における結合モチーフはリン酸化 S/T を含み、mode1 から mode3 まで定義されている。フシコクシン(FC)は、モモ枝折れ病菌(*Phomopsis amygdali*)が生産する二次代謝ジテルペン配糖体であり、植物原形質膜上の H^+-ATPase の C 末端と 14-3-3 タンパク質の複合体と直接結合し、安定化することで H^+-ATPase を恒常的に活性化することが知られている。H+-ATPase の C 末端の 14-3-3 結合モチーフは、尻切れ型であり、mode3 とされた。一方、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)において花成に関連する bZIP 転写因子 AtFD1 は、H+-ATPase と同様に C 末端に 14-3-3 結合モチーフを有するが、それは mode1 に属する。演者らは、昨年度の本大会において、AtFD1 は C 末端において 14-3-3 とリン酸化依存で相互作用すること、しかし FC によりその相互作用は安定化しないことをプルダウンアッセイにより示し、さらにその mode1 モチーフ配列について、FC により 14-3-3 結合が安定化するモチーフへの改変に成功したことを報告した。本大会においては、AtFD1 の C 末端 14-3-3 結合モチーフについて、アミノ酸置換・削除により種々変異体を調製し、14-3-3 結合に与える影響を調べ、構造活性相関を検討した結果を報告する。

bZIP transcription factor, 14-3-3 protein, protein protein interaction

講演番号：3A05a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ A 校舎 05 会場

T7 ファージディスプレイ法によるリダイフェン G 標的タンパク質の探索

Identification of Target Protein of Ridaifen G by T7 Phage Display Screen

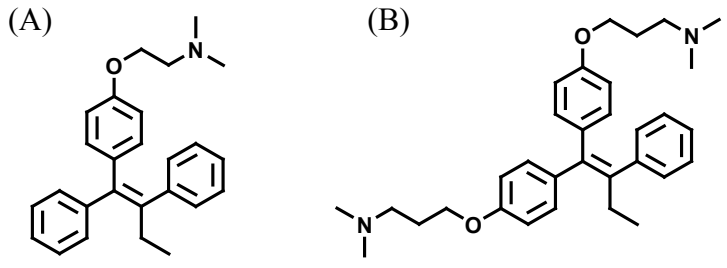
○池田 健太郎[1]、紙透 伸治[1]、草柳 友恵[1]、九十田 千子[1]、渡邊 千尋[2]、植竹 祥子[2]、椎名 勇[2]、菅原 二三男[1] ([1]東理大院理工、[2]東理大理)
○Kentaro IKEDA[1], Shinji KAMISUKI[1], Tomoe KUSAYANAGI[1], Senko TSUKUDA[1], Chihiro WATANABE[2], Shoko UETAKE[2], Isamu SHIINA[2], Fumio SUGAWARA[1] ([1]Tokyo Univ. of Sci. Fac. of Sci. and Tech., [2]Tokyo Univ. of Sci. Fac. of Sci.)

乳がん治療に使用されるタモキシフェン (TAM) は、長期投与により子宮内膜がんを誘発する副作用を有している。そこで、その副作用改善を目指した TAM 類縁体リダイフェン G (RID-G) が合成された。TAM は、エストロゲン受容体 (ER) へ作用して抗がん活性を示す。一方、様々な解析から RID-G には TAM とは異なる作用機構の存在も示唆されているが、その詳細は未だ不明である。そこで本研究では、RID-G の作用機構の解明を目的とし、T7 ファージディスプレイ (PD) 法による RID-G 結合タンパク質の探索に着手した。

いくつかのヒトがん細胞由来の cDNA T7 ファージライブラリーを用いた PD 法により、Calmodulin (CAM) や heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2/B1) など 5 つの RID-G 結合候補タンパク質を得た。

CAM は、Ca^{2+} 結合に伴いその構造を変化させ、Ca^{2+} シグナルを伝達する。TAM は、ER に対する作用の他にも CAM のアンタゴニストとしての働きも知られている。このことから、RID-G も同様の働きを有することが予想される。そこで、表面プラズモン共鳴装置を用いて RID-G と CAM の相互作用を解析した。その結果、RID-G と CAM は Ca^{2+} 依存的に相互作用し、その相互作用は TAM よりも強かった。さらに、HeLa 細胞を用い、CAM の下流に存在する extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化に対して RID-G が及ぼす影響を検証した。その結果、RID-G は ERK1/2 の過剰で長時間に渡るリン酸化を誘導した。

今後は、引き続き RID-G がヒト培養細胞に及ぼす影響を検証していくとともに、結合部位など CAM と RID-G のより詳細な関連性を検証していく。また、CAM 以外の結合候補タンパク質と RID-G の関連も明らかにする。



タモキシフェン (A) 及びリダイフェン G (B)

T7 Phage Display Screen, Tamoxifen, Calmodulin

講演番号：3A05a17
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ A 校舎 05 会場

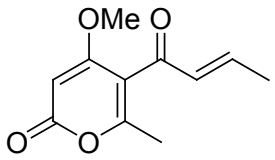
単極紡錘体を誘導するピレノシン A の作用機構解析

The mechanism of action of pyrenocine A that induces monopolar spindle.

○紙透 伸治[1]、明畠 佑典[1]、九十田 千子[1]、東 恒仁[1]、知念 拓実[2]、竹本 健二[1]、志村 聡美[1]、松永 朋子[1]、佐原 弘益[3]、臼井 健郎[2]、松永 幸大[1]、菅原 二三男[1] ([1]東理大理工、[2]筑波大院生命環境、[3]麻布大獣医)

○Shinji KAMISUKI[1], Yusuke MYOBATAKE[1], Senko TSUKUDA[1], Tsunehito HIGASHI[1], Takumi CHINEN[2], Kenji TAKEMOTO[1], Satomi SHIMURA[1], Tomoko MATSUNAGA[1], Hiroeki SAHARA[3], Takeo USUI[2], Sachihiro MATSUNAGA[1], Fumio SUGAWARA[1] ([1]Tokyo Univ. of Science, [2]Univ. Tsukuba, [3]Azabu Univ.)

天然資源から得られる生理活性物質は、医薬や農薬として多く用いられている。一方、天然生理活性物質を用いて様々な生命現象が解明されてきた。我々は、主に真菌から天然有機化合物を単離し、新規物質を多く含む独自の化合物ライブラリーを構築してきた。これら化合物ライブラリーに対して各種生理活性試験を行い、様々な生理活性物質を見出している。これらの中でピレノシン A[1)]は、子宮頸がん細胞（HeLa 細胞）に対して細胞増殖抑制活性を示した。この化合物の細胞増殖抑制活性のメカニズムを調べるために、本化合物に対してライブセルイメージングを用いた解析を行った結果、興味深い作用を示した。



ピレノシン A

本研究では、GFP 融合ヒストン H1 を恒常的に発現する HeLa 細胞（以下 HeLa-GFP と呼ぶ）を用いた。HeLa-GFP は染色体の動態を GFP の蛍光により観測できるため、細胞分裂期（M 期）における細胞周期の進行状況を視覚的に観察することができる。そこで、HeLa-GFP を同調し M 期に入る細胞をピレノシン A で処理した。顕微鏡下で一定時間ごとに GFP の蛍光を撮影し、染色体の動態を観察した。その結果、ピレノシン A 処理した細胞では分裂が進行せず、染色体がリング状になる細胞が多数観察された。ピレノシン A が誘導する染色体配置の異常を検証するために、抗チューブリン抗体を用いて免疫染色し紡錘体を観察した。その結果、ピレノシン A は微小管自体には影響を与えず、通常二つの極になる紡錘体が一つの極に形成されることが明らかになった。このような形態は単極紡錘体と呼ばれ、これを誘導する化合物としてはモナストロール[2)]が知られている。この化合物は、モータータンパク質 KSP を阻害することで単極紡錘体を誘導する。そこでピレノシン A の KSP に与える影響を調べた。KSP は ATP アーゼ活性を有し、単極紡錘体を引き起こすモナストロールなどの KSP 阻害剤は、この酵素活性を阻害する。ピレノシン A による *in vitro* の KSP の ATP アーゼ活性の阻害効果を調べた結果、この酵素活性を阻害せず、他のタンパク質を標的としていることが示唆された。現在、ピレノシン A の更なる作用機構解析を行っている。

1) H. Sato *et al.*, *Agric. Biol. Chem.*, 43, 2409-2411 (1979)
2) T. U. Mayer *et al.*, *Science*, 286, 971-974 (1999)

natural product, monopolar spindle, imaging

講演番号：3A05p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ A 校舎 05 会場

ミトコンドリア NADH-ユビキノン酸化還元酵素（複合体-I）の部位特異的化学修飾

Site-specific chemical labeling of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I)

○桝谷 貴洋、村井 正俊、三芳 秀人（京大院農　応用生命）
○Takahiro Masuya, Masatoshi Murai, Hideto Miyoshi (Kyoto Univ.)

【背景と目的】ミトコンドリア NADH-ユビキノン酸化還元酵素（複合体-I）は、基質の酸化還元反応と共役したプロトン輸送を行う膜タンパク質複合体である。2010 年に好熱細菌複合体-I の全体構造が明らかにされ、酵素の分子レベルでのメカニズム解明が焦点になってきた。この課題に対して、蛍光発色団やマイクロビーズなどの機能性分子を用いたいわゆる“１分子計測”が威力を発揮するものと期待されるが、未だ誰も着手できていない。本研究では、１分子分光法によって複合体-I のコンフォメーション変化を解析することを将来的な目標に見据え、酵素の鍵サブユニットを機能性プローブ分子で部位特異的に化学修飾（アルキン化）することを試みた。

【化合物のデザイン】複合体-I を化学修飾する方法として Ligand-Directed Tosyl Chemistry（トシル化学）を用い、図 1 に示したプローブ分子（acetogenin probe **1**, AP-**1**）を 25 ステップの反応で合成した。トシル化学とは、生理活性リガンドの持つ高い結合親和性を利用して合成分子を標的タンパク質へ誘導し、分子内に組み込んだ機能性のタグを標的タンパク質に求核置換によって固定させるというものである。標的タンパク質へタグを運ぶためのリガンド部には、複合体-I の最も強力な阻害剤であるアセトゲニンを採用した。タグには末端アセチレンを用い、これを足場としてクリックケミストリーにより蛍光団やビオチンなどの機能性分子を導入することを意図した。

【結果】AP-1 はウシ心筋亜ミトコンドリア粒子（SMP）中の複合体-I に対して、高い親和性を示した（IC_{50}=3.2 nM）。SMP を AP-1 存在下 24 時間インキュベート後、クリックケミストリーによって蛍光あるいはビオチンタグを導入し、各種生化学解析を行ったところ、ユビキノン結合部位の構成成分である 49 kDa サブユニットが高い反応効率で特異的修飾を受けることが分かった。さらに、蛍光標識された 49 kDa サブユニットを複数のプロテアーゼで消化し、修飾部位の解析を行った結果、その修飾部位は 49 kDa サブユニットの N 末端側から 125 番目の Leu から 176 番目の Lys にかけての領域であることを現在までに明らかにしている。

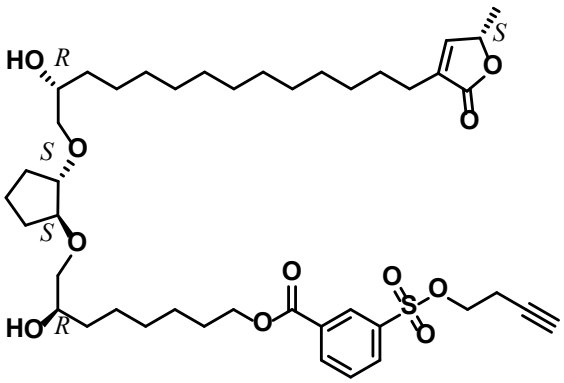


図 1　プローブ分子の構造

Mitochondrial respiratory complex I, Acetogenin, Ligand-directed tosyl chemistry

講演番号：3A05p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ A 校舎 05 会場

キナゾリンのミトコンドリア ADP/ATP 輸送体における結合部位の同定

Identification of the binding site of quinazoline in mitochondrial ADP/ATP carrier

○浅野 周、村井 正俊、三芳 秀人 (京都大　農)
○Shu Asano, Masatoshi Murai, Hideto Miyoshi (Kyoto Univ.)

【背景と目的】キナゾリン型化合物は、ミトコンドリア NADH-ユビキノン酸化還元酵素（複合体-I）に対する特異的阻害剤の一つである。これまでに、当研究室では光反応性キナゾリン([^{125}I]AzQ、図 1)を用いた光親和性標識実験を進めてきたが、その研究過程において、[^{125}I]AzQ が複合体-I のユビキノン結合部位だけでなく、ミトコンドリア ADP/ATP 輸送体（ADP/ATP carrier：AAC）を強く標識することが明らかになった。AAC はミトコンドリア内膜上で ADP と ATP の交換反応を行う膜輸送体であり、ミトコンドリアで生産された ATP を細胞質へ供給する役割を果たしている。キナゾリン骨格を有する化合物が AAC に結合するという報告はこれまでになく、そもそも複合体-I と構造的な類似性も無い AAC に[^{125}I]AzQ が高い親和性で結合すること自体が非常に興味深い。本研究では、AAC における光反応性キナゾリンの結合部位を明らかにすることを目指して光親和性標識実験を進めた。

【方法と結果】光反応性キナゾリンの構造を図 1 に示した。放射性同位元素でラベルした[^{125}I]AzQ に加え、末端アセチレン構造を有する click-AzQ (CAQ)を合成した。本化合物は、クリックケミストリーを利用して蛍光発色団あるいはビオチンタグを導入し、標識タンパク質の検出や、標識タンパク質の精製を行うことを意図した。ウシ心筋亜ミトコンドリア粒子（submitochondrial particles：SMP）を材料に光親和性標識実験を行ったところ、CAQ は[^{125}I]AzQ の場合と同様に、複合体-I と AAC を強く標識することを確認した。CAQ で標識された SMP を Triton X-100 で可溶化し、ヒドロキシアパタイトカラムを用いて AAC を単離した。この AAC に対して蛍光タグをクリックケミストリーで導入し、蛍光標識された AAC をプロテアーゼ限定消化のサンプルとした。CNBr、V8-プロテアーゼ、リジルエンドペプチターゼ(Lys-C)を用いて AAC を消化したところ、蛍光標識された断片はそれぞれ 20 kDa, 12 kDa, 4 kDa の位置に移行した。現在、これらのペプチド断片の同定作業を進めている。

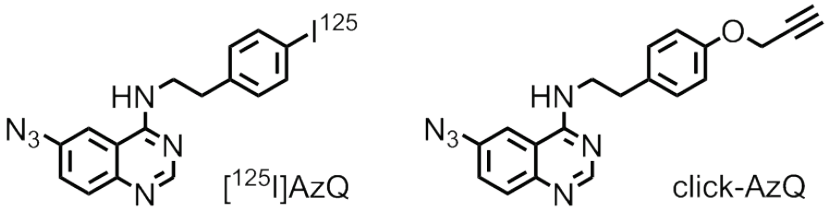


図 1

Quinazoline, ADP/ATP carrier, Photoaffinity labeling

講演番号：3A05p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ A 校舎 05 会場

ユビキノン結合性タンパク質 Coq10 におけるキノン結合部位の同定

Identification of ubiquinone binding site in mitochondrial Coq10 using a synthetic ubiquinone probe

○松延 広平[1]、村井 正俊[1]、川向 誠[2]、三芳 秀人[1] ([1]京大院農、[2]島根大生物資源科学)
○Kohei MATSUNOBU[1], Masatoshi MURAI[1], Makoto KAWAMUKAI[2], Hideto MIYOSHI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Shimane Univ.)

【背景・目的】ユビキノンに代表されるキノン類は、バクテリアから高等生物に至るまで幅広く分布する生理活性分子であり、その主な役割は呼吸鎖電子伝達系における基質（電子伝達担体）としてはたらくことである。出芽酵母や分裂酵母を用いた近年の研究で、Coq10 と呼ばれる新規なタンパク質の存在が明らかとなった。ミトコンドリア内膜上に局在する約 20 kDa のタンパク質である Coq10 は、ユビキノン生合成には直接的に関与しないものの、生合成されたユビキノンに“シャペロン的”に作用し、ミトコンドリア内膜中で円滑な電子伝達をサポートしているのではないかと考えられているが、その役割は依然として不明である。我々は合成ユビキノンプローブを用いた光親和性標識実験を切り口に、ミトコンドリアにおける Coq10 の役割を明らかにすることを目的とした。

【結果】ユビキノンのベンゾキノン環とイソプレン側鎖末端に、それぞれアジド基とアルキンを導入した化合物 1（図 1）を合成した。本化合物は光親和性標識実験後に、クリックケミストリー（[3+2]-環化付加反応）を利用してビオチンなどの任意の検出タグを導入することができる。分裂酵母由来の Coq10 を発現させた大腸菌膜標品を、化合物 1 によって光親和性標識し、クリックケミストリーによってビオチンタグを導入した。ウェスタンブロットやアビジン沈降、および精密質量分析によって標識後の膜標品の解析を進めた結果、化合物 1 は Coq10 に対して特異的に結合していることを明らかにした。さらに、プロテアーゼ限定分解によって Coq10 のタンパク質化学解析を進め、その架橋領域を F39-K45（7 アミノ酸残基）にまで絞り込むことに成功した。また、CoQ2 などの短鎖ユビキノンを過剰に共存させることにより、標識は完全に抑制されることを確認した。一方、本領域の保存されたアミノ酸残基をアラニン置換した Coq10 変異体(F39A, P41A)を作成し、化合物 1 による光親和性標識を行ったところ、野生型 Coq10 と比較して標識量は有意に減少した。分裂酵母ミトコンドリアを用いて行った各種アッセイの結果を踏まえ、Coq10 の生理的な意義についても考察する予定である。

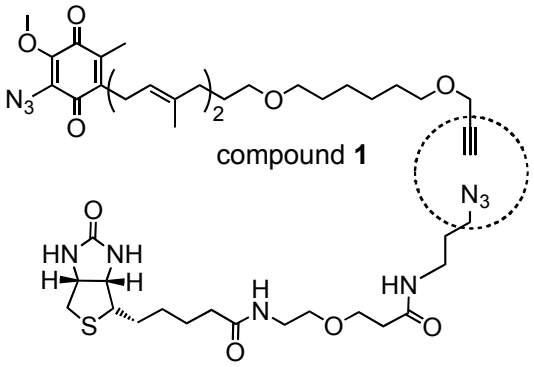


図 1. ユビキノンプローブとビオチンタグの構造.

Ubiquinone binding protein Coq10, Photoaffinity labeling, Click chemistry

講演番号：3A05p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ A 校舎 05 会場

シトクロム *c*-カルジオリピン複合体のペルオキシダーゼ活性誘導の分子機構

Molecular mechanism for the induction of peroxidase activity of cytochrome *c*-cardiolipin complex

○三木 祐子、安部 真人、三芳 秀人（京都大院農）
○Yuko MIKI, Masato ABE, Hideto MIYOSHI (Kyoto Univ.)

【背景】カルジオリピン（CL、図1）はミトコンドリア内膜に局在するリン脂質であり、種々の電子伝達系酵素やトランスポーターの活性発現に必須とされている。また、ヒトの先天性心筋症を伴うバース症候群では、CL の脂肪酸組成の異常が顕著に認められることが報告されている。最近の研究から、CL はミトコンドリア内で発生した活性酸素種に起因するアポトーシスにおいて、シトクロム *c*(cyt *c*)のミトコンドリア外漏出を制御していることがわかっている。Cyt *c* の漏出機構については、概ね次のように考えられている。すなわち、「アポトーシス初動過程において、①cyt *c* は CL と特異的な複合体（CL–cyt *c* 複合体）を形成する。②これによって cyt *c* にペルオキシダーゼ活性が誘導され、CL が過酸化される。③過酸化 CL は cyt *c* と解離し、細胞質へと漏出する。」というものである。しかし、それぞれの素過程の詳細な分子機構は未解明である。

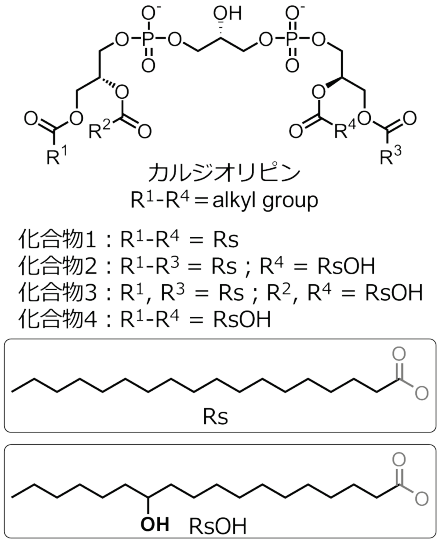


図1. カルジオリピンの化学構造

【目的】CL–cyt *c* 複合体の形成において、CL の脂肪酸部による疎水性相互作用の寄与が示唆されており、CLが過酸化されると cyt *c* との親和性が低下し、cyt *c* が解離すると考えられているが、未だに実証されている訳ではない。そこで本研究では、CL–cyt *c* 複合体形成とペルオキシダーゼ活性誘導におけるCL脂肪酸部の疎水性の寄与について明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】当研究室で確立した CL 類の有機合成法に基づき、CL の4つの脂肪酸について位置特異的に水酸基を導入した一連の類縁体を設計・合成した（図 1、化合物 **1**–**4**）。これらの CL 類縁体をホスファチジルコリンとそれぞれ混合し（モル比 1:9）、リポソームを調製した。このリポソームを用いて、CL–cyt *c* 複合体形成によって誘導されるペルオキシダーゼ活性を評価した。脂肪酸部に水酸基を持たない化合物 **1** に比べて考えると、R^4 のみに水酸基を導入した化合物 **2** がペルオキシダーゼ誘導を低下させた。一方、R^1 と R^3 に水酸基を導入した化合物 **3**、およびすべての脂肪酸に水酸基を導入した化合物 **4** はペルオキシダーゼ活性を顕著に上昇させた。

cardiolipin, cytochrome *c*, apoptosis

講演番号：3A05p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ A 校舎 05 会場

リン脂質カルジオリピンのシトクロム *c* に対する結合部位の同定

Characterization of the binding site of cardiolipin against cytochrome *c*

○小坂 亜弓、田邊 有貴恵、安部 真人、三芳 秀人（京大院農）
○Ayumi KOSAKA, Yukie TANABE, Masato ABE, Hideto MIYOSHI (Kyoto Univ.)

【背景と目的】カルジオリピン（CL、図1）はミトコンドリア内膜に局在するリン脂質であり、4 つの脂肪酸部と 2 つのリン酸部から構成される。ミトコンドリア内で発生した活性酸素種に起因するアポトーシスにおいて、CL がシトクロム *c*（cyt *c*）のミトコンドリア外漏出を制御していることがわかっている。この際に、CL は cyt *c* と特異的な複合体（CL–cyt *c* 複合体）を形成し、活性酸素種存在下でペルオキシダーゼ活性が誘導されると考えられているが、詳細はわかっていない。CL–cyt *c* 複合体は次の 2 つの因子によって形成されると考えられる。すなわち、①極性頭部における静電的相互作用、②脂肪酸部における疎水性相互作用である。本研究では特に①に注目し、光親和性標識法によって、cyt *c* に対する CL の結合部位を同定することを目的とした。

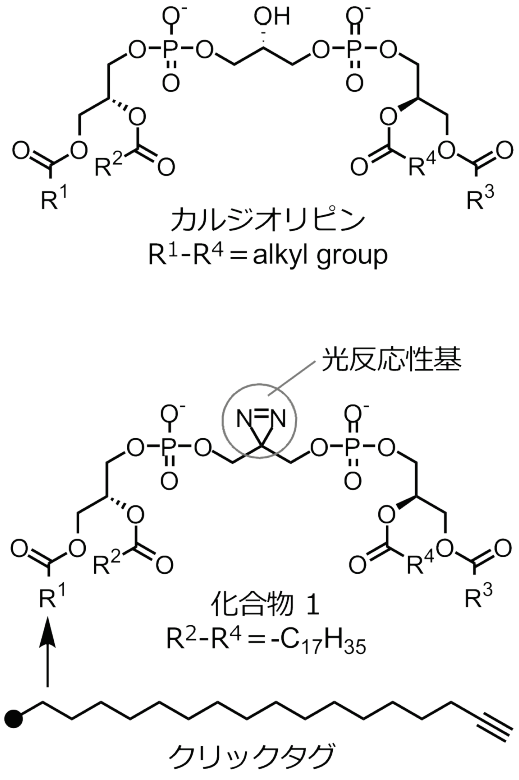


図1. カルジオリピンおよび化合物1の化学構造式

【方法】当研究室でのこれまでの研究から、CL–cyt *c* 複合体形成において、CL の極性頭部に位置する OH 基は必須ではなく、構造修飾の余地があることがわかった。そこで、この位置に光反応性基であるジアジリン環を、脂肪酸部末端にクリックタグとしてアルキンをそれぞれ導入した光反応性 CL プローブ（化合物 1）を設計・合成した。ホスファチジルコリンと化合物 1 を 9:1 の混合物とした上でリポソームを調製して用いることとした。Cyt *c* との複合体形成を行ったのちに、紫外線照射によって不可逆的な共有結合形成を行うことで光親和性標識を行った。続いて各種電気泳動や精密 MS 分析を行うことで結合部位の解析を行った。

【結果】当研究室で確立した CL 全合成法に基づき、総工程 12 steps にて化合物 1 を合成した。ウマ心筋 cyt *c* に対する光親和性標識実験から、化合物 1 は cyt *c* を特異的に標識することがわかった。さらに各種プロテアーゼを用いたペプチド化学解析を行うことで化合物 1 の結合部位の絞り込みを行った。

cardiolipin, cytochrome *c*, apoptosis

講演番号：3A05p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ A 校舎 05 会場

合成ノビレチンの経口投与によるラットの真皮への影響

Effects of orally administered synthetic nobiletin on rat dermis.

○倉本 純子[1]、井上 隆之[1]、元矢 知志[1]、野村 正人[2]、大谷 浩[1] ([1]島根大医、[2]近畿大学工)
○Junko KURAMOTO[1], Takayuki INOUE[1], Tomoyuki MOTOYA[1], Masato NOMURA[2], Hiroki OTANI[1] ([1]Shimane Univ.Med, [2]Kinki Univ.Eng)

【背景】シークワシャー（*Citrus depressa* Hayata）に含まれるフラボノイドの一種ノビレチン（Nobiletin）は、抗酸化、抗炎症作用に加えて皮膚の老化によるしわの一因となる一酸化窒素の生成を抑制することも報告されており、過剰な一酸化窒素による傷害から皮膚を守ることが期待される。本研究では合成ノビレチンを雄ラットに 2 週間経口投与し、真皮における抗酸化作用および真皮の膠原繊維を分解してしわの原因となるマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）産生への影響を解析した。
【方法】8～12 週齢の Jcl:Wistar 雄ラットに、合成ノビレチン（50 mg/kg 体重/日）10%DMSO 水溶液を 2 週間 0.5 mL 強制経口投与した。対照群には等量の 10%DMSO 水溶液を投与した。投与終了後、麻酔下にて真皮を採取し、液体窒素で急速凍結して解析まで-80℃で保存した。解析には、リアルタイム PCR を用いて mRNA の相対量を測ることにより、活性酸素除去酵素であるカタラーゼ、スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）、 グルタチオンペルオキシダーゼ（GPx）、繊維分解に関与する MMP および MMP の発現に関与するペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体（PPARα、γ、δ）の遺伝子発現を解析した。
【結果】投与終了前後の各群の体重に有意差はみられなかった。ノビレチン投与群において、カタラーゼ、Gpx の mRNA が有意に増加した。PPARα、γ、δ mRNA はノビレチン投与群において顕著に増加した。MMP2、9 の mRNA はノビレチン投与群において有意に減少した。
【考察】加齢によるしわには、皮膚組織の活性酸素増加による酸化が関与することが報告されている。ノビレチンは MMP の産生を抑制する機能が報告されており、MMP9 の産生抑制、MMP インヒビター産生促進が *in vitro* 実験において明らかにされている。PPAR は MMP 産生を抑制する物質であり、特に PPARγが活性化されると MMP9 遺伝子の転写調節を抑制する。さらに、*in vitro* 実験においてノビレチンは繊維芽細胞などの脂肪細胞への分化を促進することが報告されており、脂肪細胞分化過程において重要な役割を果たす PPARγを直接あるいは間接的に活性化させていることが示唆されている。本研究において、ノビレチン投与群のカタラーゼ、Gpx の mRNA が有意に増加し、ノビレチン経口投与によるラット真皮への抗酸化作用が示唆された。またノビレチン投与群の PPARα、γ、δ mRNA は有意に増加し、MMP2、9 mRNA は有意に減少したことから、ノビレチン経口投与による PPARs mRNA の有意な増加は MMP2、9 の産生を抑制することが示唆された。したがってノビレチンは、真皮において抗酸化作用を示し、膠原線維の分解を抑制することが示唆された。

Nobiletin, dermis, anti-oxidant

講演番号：3A05p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ A 校舎 05 会場

Senna occidentalis 抽出物は線維芽細胞の増殖に影響を与える
Senna occidentalis extract affected the growth of fibroblast.
○元矢 知志[1]、野村 正人[2]、大谷 浩[1] ([1]島根大医、[2]近畿大工)
○Tomoyuki MOTOYA[1], Masato NOMURA[2], Hiroki OTANI[1] ([1]Shimane Univ. Med., [2]Kinki Univ. Eng.)

【目的】生薬には様々な種類があり，その効能も多岐にわたる。近年では，生薬に含まれる生理活性物質や生体内での挙動について報告されつつあるが，多くは解明されていない。本研究で用いた，*Senna occidentalis* (*S.occidentalis*，生薬名:望江南) の種子や葉を煎じたものは，民間伝承によると創傷や口内炎などに対する効果があるとされている。しかし，*S.occidentalis* の生理活性に関する報告は少なく，上記の効果は科学的に裏付けられていない。我々は，皮膚創傷モデルラットにおいて，*S.occidentalis* 抽出物が創傷治癒を促進し，肉眼観察および組織観察により，創傷治癒過程において，上皮組織の伸長促進，膠原線維の増加などの効果を持つことが示唆されることを報告した。今回は皮膚創傷モデルラットで得た，膠原線維増加の所見から，*S.occidentalis* 抽出物が，膠原線維を産生する線維芽細胞の細胞増殖に与える影響について MTT 法を用いて評価を行ったので報告する。
【方法】*S.occidentalis* 種子 (2009 年採取，岐阜県産)を水温 75℃で抽出し，凍結乾燥させたものを water extract (WE)とし，これを phosphate buffered saline (PBS)に溶解したものを試料とした。Jcl:ICR マウス由来線維芽細胞 (当教室にて初代培養)を 96-well プレートに 9.0×10^{4} cell/ml で播種し，無血清の Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM)中で 24 時間予備培養した後，WE の濃度が 1.0, 1.0×10^{-1}, 1.0×10^{-2}, 1.0×10^{-3} mg/ml (各群 n=9)となるように添加したものを実験群とした。また，対照群は PBS 添加とした。試料添加後，24 時間経過時および 48 時間経過時の時点で，3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)/PBS 溶液(5 mg/ml)を添加し，3 時間反応させた。その後，酸性イソプロパノールを加え，色素を溶解させ，595 nm の波長で吸光度を測定し，細胞増殖について定量を行ない，実験群と対照群を比較した。
【結果・考察】各群の線維芽細胞の増殖について比較すると，試料添加 24 時間後の時点で，実験群のうち，WE 濃度 1.0×10^{-1}, 1.0×10^{-2}, 1.0×10^{-3} mg/ml の群で対照群と比較し，細胞の増加傾向が見られ，48 時間後の時点では，実験群のうち，先に述べた 3 つの群について，細胞増殖が有意に促進していた。一方，WE 濃度 1.0 mg/ml 群では両時間ともに対照群と有意差はなかった。創傷治癒において線維芽細胞の増殖は，欠損組織の充填や再上皮化に深く関与することが知られており，創傷治癒の進行を示すファクターとなっている。実験群は対照群と比較し，有意に線維芽細胞の増加が見られることから，*S.occidentalis* 抽出物は，濃度依存性ではないが，線維芽細胞の増殖に影響を与えることが示唆された。

Senna occidentalis, fibroblast, wound healing

講演番号：3A05p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ A 校舎 05 会場

Camptothecin 耐性癌細胞に対する植物アルカロイド nitidine の有効性の検証

Effect of plant alkaloid, nitidine, on Camptothecin resistant cancer cells

○平良 直幸[1]、岩崎 公典[2]、稲福 征志[2]、屋 宏典[2] ([1]鹿児島大院連合農、[2]琉球大学農)
○ naoyuki taira[1], hironori iwasaki[2], masashi inahuku[2], hirosuke oku[2] ([1]Kagoshima Univ, [2]Ryukyu Univ)

【目的】がんの化学療法において最も解決すべき問題として、効果的な抗腫瘍効果を示している薬剤に対して耐性を有する細胞集団の存在が知られている。この薬剤耐性形質を持つ癌細胞は、現在用いられている多くの抗がん剤の排出に関連する細胞膜たんぱく質である ABC transporter 群の発現が高いことが知られており、この薬剤耐性細胞群に対する効果的な抗腫瘍剤の開発が望まれている。

当研究室が着目している Nitidine(NTD)は現在までに癌細胞に特異的に細胞毒性を示すことが明らかとなっている。また NTD の感受性の違いを調べた先行研究の結果から、NTD は ABC transporter 群の発現が高い(すなわち薬剤耐性形質を有する)A549 細胞(肺線癌細胞株)に対して、特に効果的な細胞毒性を示していることが明らかとなっており、この結果から NTD は薬剤耐性を持つ癌細胞集団に対しても効果的な細胞毒性効果が期待できることが示唆された。本研究は薬剤耐性形質を持つ癌細胞群に対する NTD の有効性を明らかにすることを目的とした。

【方法】薬剤耐性形質を持つ細胞群を選抜するために通常の培地で培養している A549 細胞(normal)を Camptothecin (CPT)で 1 週間処理し、生存した細胞を薬剤耐性細胞群(CRCs)とした。CRCs と normal の発現比較により CRCs に ABC transporter 群が増加しているのかを確認した。また、NTD は薬剤を排出する ABC transporter 群による細胞外輸送が起こらないことが示唆されていることから、ABC transporter 群を高発現している CRCs に対して NTD は細胞内に蓄積しているのかを蛍光顕微鏡下において確認した。さらにこの CRCs に対して NTD が効果的な細胞毒性を示すのかを MTS assay による細胞毒性試験およびカスパーゼ測定によるアポトーシス誘導を検証することで NTD が薬剤耐性形質をもつ癌細胞に対して有効であるのかを検討した。

【結果および考察】CRCs と normal の ABC transporter 群の発現比較の結果、CRCs において数多くの ABC transporter の発現が増加していた。normal および CRCs に同濃度の NTD を処理した結果、両群間の蛍光強度に差は見られなかった。このことから、NTD は従来の薬剤と異なり、ABC transporter 群が高発現していても細胞内に蓄積することが示唆された。MTS assay の結果から、CRCs は従来の薬剤である CPT に対しては耐性を示していたが、NTD に対しては normal と同様の細胞毒性が生じていることが示唆された。また、カスパーゼ 9 の測定結果から NTD は CRCs に対してもアポトーシスを誘導していることが示唆された。これらの結果から NTD は従来の薬剤と異なり、薬剤耐性をもつ癌細胞群に対しても効果的な抗腫瘍効果を示す可能性が示唆された。

cancer, drug resistant, ABC transporter

講演番号：3A05p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ A 校舎 05 会場

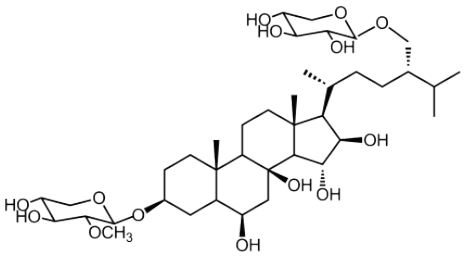
オニヒトデ由来の神経突起伸長活性物質に関する研究

A Study on Neuritogenic Compounds from Crown-of-thorns Starfish

○原田 翔太、山田 理紗、小鹿 一 (名大院生命農)
○Shota Harada, Risa Yamada, Makoto Ojika (Nagoya Univ.)

【背景・目的】

近年の高齢化に伴いアルツハイマー型認知症の患者数は大きく増加しているが、その根本的治療法は確立されていない。NGF (神経成長因子) は神経細胞の分化・生存に必須の因子として神経変性疾患治療薬として期待されたが、投与の困難さに課題が残る。当研究室において神経モデル細胞である PC12 細胞を用いて NGF 様物質の探索を行った結果、沖縄産オニヒトデ *Acanthaster planci* より acanthasteroside B3 が単離された。また、この化合物はマウスに対して記憶改善効果を有することも判明した。本研究では、オニヒトデから acanthasteroside B3 以外の新規な NGF 様物質・NGF 増強活性物質を探索すること、および acanthasteroside B3 の作用機構を明らかにすることを目的とした。



acanthasteroside B3

【方法・結果】

神経突起伸長活性は次のように評価した。NGF (1 ng/mL)とサンプルを無血清培地に溶かし、30 分間インキュベート (37℃、5 % CO_2) した後、PC12 細胞に投与した。6 日間インキュベートした後、細胞の長形よりも長い突起を持つ細胞の割合を神経突起伸長率とした。この生物検定法を用いてオニヒトデより神経突起伸長活性をもつ物質の探索を行った。まず、オニヒトデ湿重量 9.6 kg をメタノール抽出し、ODS カラムによって 4 画分に分離した。そのうち acanthasteroside B3 を含む画分 (Fr. 2) を silica gel カラムによって分離し、神経突起伸長活性を示す画分 (Fr. 2-2、Fr. 2-6) を得た。この内 Fr.2-6 を HPLC によって分離し、acanthasteroside B3 (70 mg) を単離した。また、Fr. 2-2 より神経突起伸長活性を有する物質を得た。現在この化合物のさらなる精製および構造解析を行っている。

一方、精製した acanthasteroside B3 を用いて作用機序の解析も行った。Acanthasteroside B3 は PC12 細胞に対する NGF の突起伸長活性を増強する。無血清培地中で 3 時間以上インキュベートした NGF を PC12 細胞に投与すると活性の低下が見られたが、そこに acanthasteroside B3 を共存させると活性はある程度保持された。この結果から acanthasteroside B3 は NGF の安定化に寄与していることが考えられる。今後、さらに詳細に作用機構を解析する予定である。

PC12, NGF, Crown-of-thorns Starfish

講演番号：3A05p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ A 校舎 05 会場

フラノース型 D-アロース中鎖脂肪酸エステルのヒト白血病 MOLT-4F 細胞増殖抑制活性

Antiproliferative activity of D-allose fatty acid esters with furanose rings against human leukemia cell line MOLT-4F

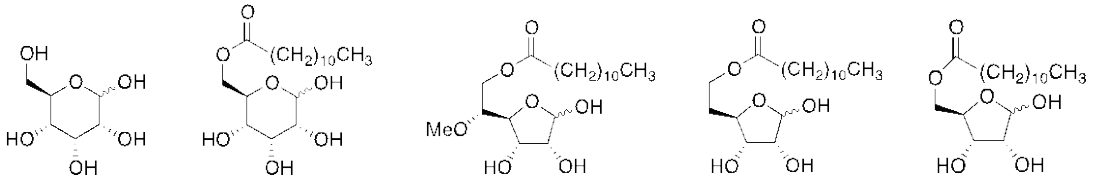
○小橋 克哉、柳田 亮、芦田 能基、山足 陽和、川浪 康弘（香川大農）
○Katsuya Kobashi, Ryo C. Yanagita, Yoshiki Ashida, Haruka Yamaashi, Yasuhiro Kawanami (Kagawa Univ.)

[目的]

D-Glucose の C-3 位のエピマーである D-allose は天然に稀にしか存在しない希少糖の一種であり，様々な種類のがん細胞に対して増殖抑制効果を示すことが明らかにされている．D-Allose は正常細胞に対して細胞毒性を示さないため，副作用の少ない抗がん剤シードとして注目されている．しかしながら，D-allose のがん細胞に対する有効濃度は mM オーダーと比較的高く，活性の大幅な向上が求められている．最近，我々の研究グループでは，D-allose の C-6 位水酸基を中鎖脂肪酸エステル化することで, がん細胞に対する増殖抑制活性が D-allose の 10 倍以上向上することを見出した．D-Allose 誘導体は，D-glucose 誘導体とは 3 位水酸基の立体配置が異なるだけでなく，溶液中では furanose 型と pyranose 型の平衡状態にある．本研究では，D-allose C-6 位アシル化誘導体の furanose 型異性体のがん細胞増殖抑制活性に対する寄与を調べることを目的として，環構造を furanose 型に制限した誘導体を合成し，それらの活性を評価した．

[方法と結果]

6-*O*-Dodecanoyl-5-*O*-methyl-D-allose (**1**)，5-deoxy-6-*O*-dodecanoyl-D-allose (**2**) は市販の allose 保護体からそれぞれ 8 段階，9 段階で合成した．また，D-allose の furanose 型と立体配置が同じである 5-*O*-dodecanoyl-D-ribose (**3**) はリパーゼを用いた選択的アシル化反応によって合成した．各種誘導体の活性は，D-allose に対して相対的に高い感受性を示すヒト白血病細胞株である MOLT-4F に対する増殖抑制試験によって評価した．化合物 **1**, **2** および **3** の活性は 6-*O*-dodecanoyl-D-allose (All-C12) よりも低く D-glucose 誘導体の活性と同等であったことから，All-C12 の furanose 型のがん細胞増殖抑制活性に対する寄与は小さく，pyranose 型が重要であることが示唆された [1].



D-Allose　All-C12　**1**　**2**　**3**

1) Yanagita, R. C., *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2013**, *in press.*

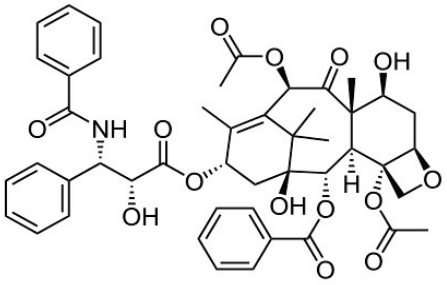
D-allose, rare sugar, leukemia

講演番号：3A05p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ A 校舎 05 会場

イチイ *Taxus cuspidata* 由来α、βチューブリンの発現とタキソール結合性の評価

Expression of α and β tubulins from *Taxus cuspidata* and evaluation of binding affinity to taxol

○工藤 佑馬、長 由扶子、山下 まり、此木 敬一（東北大院農）
○Yuma KUDO, Yuko CHO, Mari YOTSU-YAMASHITA, Keiichi KONOKI (Tohoku Univ.)



【背景・目的】タキソールは *Taxus cuspidata*（イチイ）より単離されたジテルペンである [1]。タキソールは細胞分裂に必須な微小管の脱重合を阻害することで細胞分裂を抑制する作用を持ち、抗がん剤として用いられる。一方で、その高い活性故に正常細胞に対しても毒性を示すため、副作用が問題となっている。しかし、イチイはタキソールを保持しながら生息できる点から、タキソールに対し耐性機構を獲得していると考えられる。我々は、タキソール標的分子である微小管を構成するタンパク質α、βチューブリンの変異によるタキソール結合性の低下を想定し、イチイのタキソール耐性機構の解明を目指した。

【方法・結果】イチイの葉より total RNA を抽出し、逆転写により cDNA を得た。得られた cDNA に対し既知の植物チューブリン遺伝子配列を元に内部配列の増幅を行ったのち、3'及び 5'RACE によりイチイα、βチューブリン遺伝子の全長配列を得た。イチイチューブリンのアミノ酸配列をヒトチューブリンの配列と比較したところ、タキソール結合部位として知られるアミノ酸残基に変異が見られた。続いて、リコンビナントチューブリンを得てタキソールの結合性を評価した。チューブリンの ORF を発現ベクターに組み込み、大腸菌による異種発現を行った。目的タンパク質を不溶化画分に確認したため、リフォールディングにより可溶化画分に回収した。リコンビナントチューブリンのタキソール結合性を、波長 350 nm における濁度の上昇により評価した。その結果、イチイチューブリンはヒトチューブリンに比べ重合を促進するタキソール濃度が高かった。

【考察】イチイはタキソール結合分子であるチューブリンに変異を持ち、耐性を獲得していると考えられた。また、既知のタキソール耐性の細胞はチューブリンにイチイチューブリン同様の変異を起こしている点も本説を支持する [2]。今後、がん細胞はイチイ型の変異を獲得する可能性が考えられ、本研究で得られた知見を新規薬剤の開発に活かすことができると考えられる。

【参考文献】

1) Wani *et al., J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325.
2) Malathi *et al., Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 270.

taxol, tubulins, secondary metabolite

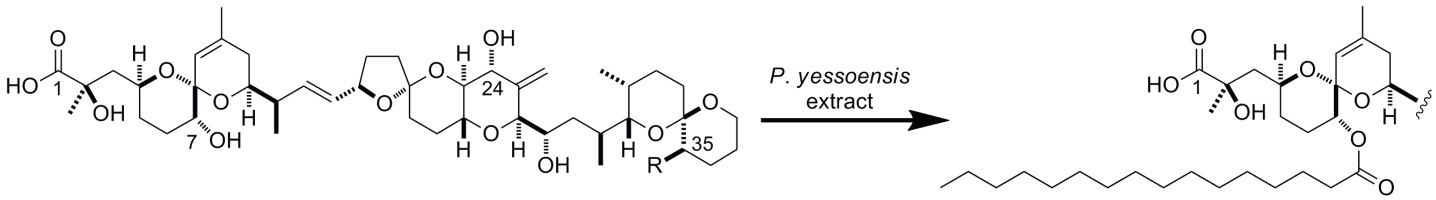
講演番号：3A05p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ A 校舎 05 会場

ホタテ貝中で進行する下痢性貝毒オカダ酸のアシル化反応

Acylation of okadaic acid, one of the diarrhetic shellfish poisoning toxins, in *Patinopecten yessoensis*

○此木 敬一、古用 幸愛、小野田 竜也、長 由扶子、山下 まり（東北大院農）
○ Keiichi KONOKI, Sachie FURUMOCHI, Tatsuya ONODA, Yuko CHO, Mari YOTSU-YAMASHITA (Tohoku Univ.)

[背景・目的]渦鞭毛藻 *Prorocentrum* 属、*Dinophysis* 属によって生産されるオカダ酸（Okadaic acid, OA)、ディノフィシストキシン 1（Dinophysistoxin 1, DTX1）は、これら渦鞭毛藻が大発生する海域で二枚貝に蓄積される下痢性貝毒である。これら化合物の一部は二枚貝中で 7-*O*-アシル体（Dinophysistoxin 3, DTX3）へ変換される。DTX3 は OA や DTX1 が標的とする Protein phosphatase 1（PP1）および 2A（PP2A）に対して結合性を示さない一方で、下痢性を保持すると報告されており、アシル化反応の生理的意義は不明である。我々は、このアシル化反応を司る酵素の単離を目指して研究を行っているが、今回、その鍵となる酵素活性の測定法について検討を行ったので報告する。



Okadaic Acid (OA): R=H
Dinophysistoxin 1 (DTX1): R=Me

DTX3: 7-*O*-Acyl DTX1

[結果・考察]既に 2013 年度大会にて当該酵素が膜タンパク質であること[1)]、そのため、分画・精製過程で界面活性剤の使用が不可欠であり、それまで活性画分の探索のために行ってきた LC-MS/MS 法に替わる新たな手法が必要であることを報告した。DMEQ-TAD は高反応性を示す蛍光性ジエノフィルであり、様々な天然有機化合物の微量検出に用いられてきた。そこで、本研究では共役ジエンを有する脂肪酸を元に CoA エステルを調製し、アシル化反応に用いることにした。まず、1:1 THF-H_2O を溶媒とし K_2CO_3、PyBOP 存在下、CoA と市販の 9E,11E-octadecadienoic acid（C18:2）を室温中で反応させ、CoA エステルを得た。これを用いてアシル化反応を試みたが、反応は進行しなかった。しかし、別途、octadecanoic acid（C18:0）の CoA エステルを用いてアシル化反応を試みたところ、反応の進行が確認された。以上の結果より、ジエン部位の位置が重要であることがわかった。本発表では以上の詳細に加え、分子末端にジエンを有する脂肪酸の合成とその CoA エステルを用いたアシル化反応について報告する。

[参考文献]1)Konoki *et al.*, *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 300.

diarrhetic shellfish poisoning, okadaic acid, detoxification

講演番号：3A05p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ A 校舎 05 会場

ヒト培養細胞中に見られるβ-アロシダーゼ活性に関する研究:光アフィニティーラベル法による標的タンパク質の同定

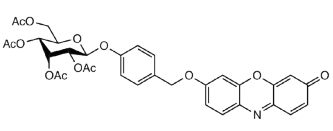
Research of beta-allosidase activity in human cultured cells

○三浦 一輝[1]、荒瀧 幸和実[2]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科・生物資源利用、[2]日大生資科・生命化)

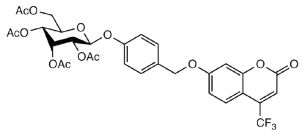
○kazuki miura[1], sawami arataki[2], wataru hakamata[1,2], takako hirano[2], toshiyuki nishio[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Dept. Chem. and Life Sci., Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】タンパク質の翻訳後修飾は真核生物で普遍的に行われ、糖鎖を介したタンパク質の品質管理は真核生物において重要な役割を果たしており、様々な疾病との関係が数多く報告されている。これまでに我々は、ヒト培養細胞内の翻訳後修飾に関わる新規細胞内糖鎖プロセシング活性の探索を行うため、下図の蛍光基質 (化合物 **1** - **4**) の設計と合成を行った。それらの蛍光基質を用いて糖鎖プロセシング過程ではこれまでに報告されていない新規なβ-アロシダーゼ活性をゴルジ体に確認した（三浦一輝ら, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 4A37a02)。そこで、ゴルジ体に局在するβ-アロシダーゼ活性を持つ酵素を同定し、新しい創薬ターゲットとして機能解析行うことを目指して、光アフィニティーラベル法による標的タンパク質の同定を本研究の目的とした。

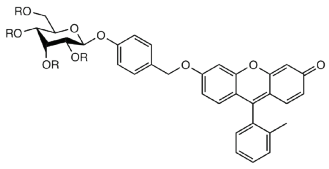
【方法と結果】これまでに標的タンパク質の同定のため、光アフィニティーラベル法を用いて標的タンパク質の単離を試みた。光アフィニティープローブは、酵素認識部位としてβ-アロシド骨格・光反応性基としてベンゾフェノン基・ラベル化用官能基として三重結合を有する分子設計とし、合成を行った。本プローブをヒト培養細胞（HeLa 細胞）に投与し、標的タンパク質の単離を試みたが、標的タンパク質を単離することが出来なかった（Kazuki Miura *et al*, International Chemical Biology Society 2013, No. 43)。その原因は、本プローブが標的タンパク質の基質となり分解されることによりラベル化が十分に進行しなかった、と考えた。そこで、光アフィニティープローブの分子設計を変更し、*O*-グリコシド結合を *S*-グリコシド結合とした標的酵素の基質となりえないプローブ（化合物 **5** – **6**）の設計・合成を行った。得られた化合物 **5** - **6** を HeLa 細胞へ投与しインキュベート後、UV (365 nm) を 30 分間照射することにより、標的タンパク質の光ラベル化を行なった。その後、セルライセートを作成し、光ラベル化されたタンパク質に対してクリック反応を行うことで標的タンパク質の蛍光ラベル化を行った。最後に、SDS-PAGE によりタンパク質を分離し蛍光観察を行った。現在、種々の条件検討を行い標的タンパク質の単離と同定を試みているので、その結果について発表する。



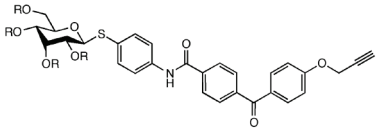
1 (Red, Ex/Em=571/584 nm)



2 (Blue, Ex/Em=385/502 nm)



3: R=Ac, **4**: R=H
(Green, Ex/Em=491/510 nm)



5: R=Ac, **6**: R=H

fluorescent probe, photoaffinitylabel, ß-allosidase

講演番号：3A05p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ A 校舎 05 会場

フェニルプロパン酸骨格を有する SARS 3CL protease 阻害剤の合成と構造活性相関研究

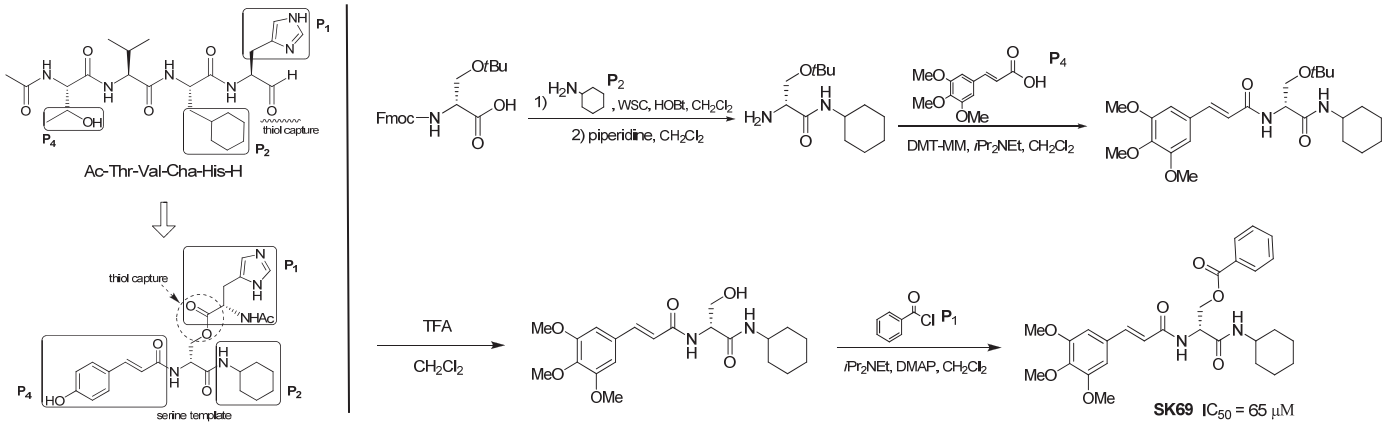
Synthesis and structure-activity relationship study of a phenyl propanoic acid derivatives for SARS 3CL protease inhibitor

○若林 雅貴[1]、高沼 大樹[1]、似内 郁美[1]、赤路 健一[2]、今野 博行[1] ([1]山形大院理工、[2]京都薬大)
○Masaki WAKABAYASHI[1], Daiki TAKANUMA[1], Ikumi NITANAI[1], Kenichi AKAJI[2], Hiroyuki KONNO[1] ([1]Yamagata Univ., [2]Kyoto Pharm. Univ.)

[目的] 重症急性呼吸器症候群 (Severe Acute Respiratory Syndrome; SARS) は SARS コロナウィルスにより引き起こされる新型肺炎である。 宿主細胞中, ウィルス増殖必須プロテアーゼである SARS-CoV 3CL protease は抗 SARS 薬開発における重要な標的蛋白質である。 演者らの研究グループは 3CL protease の安定性を高めた R188I mutant の作成と簡便で精度の高い評価系の確立 [1], さらに強力な阻害活性を有するペプチドアルデヒド (Ac-Thr-Val-Cha-His-H : IC_{50} = 98 nM) の開発に成功している [2]。 しかしながらチオールキャプチャーとしてアルデヒドをもつため, 酵素選択性や化合物安定性に改良の余地があった。 そこで演者らは新しいコンセプトに基づいたエステル系阻害剤の開発を行うことにした。

[方法] 阻害剤のデザインはセリンをテンプレートにして, 演者らが最適化した P1, P2, P4 の各部位を修飾した。阻害剤 Ac-Thr-Val-Cha-His-H の構造を基に低分子化を試み, 構造と合成の簡略化を図った。 すなわち合成法は Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH を原料としカルボン酸部分を P2, アミン部分を P4, 水酸基部分を P1 にそれぞれ導入し, 全 5 工程とした。 今回は P4 部分を中心に構造活性相関を行った。 また, P1 部分の自由度を抑えるために直鎖構造内に環状骨格を導入した化合物の合成の検討も行った。

[結果] 様々な官能基を導入した化合物の合成とアッセイを検討した結果, P4 位にはシンナモイル基にメトキシ基を修飾したもの, 特に 3 つのメトキシ基を修飾した 3,4,5-トリメトキシシンナモイル基が有効であった (SK69 : IC_{50} = 65 μM)。 現在は直鎖構造を連結し環構造とした化合物の設計と合成を検討しており, その詳細を報告する。



1) Akaji, K.; Konno, H. *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9400-9408
2) Akaji, K.; Konno, H. *et al. J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7962-7973

SARS, 3CL protease inhivitor, serine template

講演番号：3A05p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ A 校舎 05 会場

アミロイドβ凝集阻害剤を指向したクルクミン誘導体の構造活性相関研究

Structure activity relationship study of curcumin derivatives for the inhibitors of amyloid be-ta aggregation

遠藤 仁、伊勢 里美、中館 眞美子、○今野 博行（山形大院理工）
Hitoshi ENDO, Satomi ISE, Mamiko NAKADATE, ○Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ.)

＜目的＞

アミロイドベータ (Aβ) はアミノ酸残基 38-43 で構成されるペプチドであり、アミロイドベータ前駆体蛋白質 (amyloid β protein precursor: APP) からβセクレターゼとγセクレターゼによって切り出され産生することが知られている。老人斑と呼ばれる Aβ高度凝集物は脳の機能低下を招き、アルツハイマー病を引き起こす原因の一つと考えられていることから、根本治療薬として Aβ凝集阻害剤の開発が望まれている。過去の阻害剤探索研究の報告 [1] からクルクミンが強力な Aβ凝集阻害効果を有することは知られているが、その詳細な作用部位は今だ未決定である。我々は数年来クルクミン骨格を有する化合物の設計、合成と阻害能評価からなる構造活性相関研究を行ってきた。今回、更なる構造展開を行い天然クルクミンよりも強力な阻害剤の創製に成功したので報告する。

＜方法と結果＞

クルクミン誘導体の合成には Pabon らの手法を用いた。[2,3] すなわちベンズアルデヒド誘導体と 2,4-ペンタンジオンを B_2O_3/$B(OEt)_3$/piperidine 存在下に反応させ、対称あるいは非対称なクルクミン誘導体を合成した。反応性の低い、あるいは不安定なベンスアルデヒド誘導体はメチルエーテル等の保護基を導入した後にクルクミン骨格を形成し、三臭化ホウ素などで脱保護することで望む化合物に導いた。Aβ 凝集阻害能評価は Aβ(1–42) と合成化合物をインキュベーション (0, 2, 4, 6, 8, 20 h) し、反応液をチオフラビン T (ThT) 法により Aβ 凝集体の量を測定することで行った。天然クルクミンがおよそ 80%の凝集阻害率で定常状態になる条件の下、ほぼ 100%の凝集阻害率を示す化合物を見出すに至った。詳細な構造活性相関からフェノール性水酸基の位置と数の組み合わせがその阻害効果に大きく影響を及ぼすことがわかり、特にオルト位に水酸基を配置した場合に顕著であった。一方でクルクミン類は難水溶性であり、その取扱いや物性も重要な要素となることから、溶解度、融点などについても調査した。

1) Ono, K.; Hasegawa, K. *J. Neurosci. Res.* **2004**, *75*, 742.
2) Pabon, H. Y. Y. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1984**, *83*, 379.
3) Konno, H.; Endo, H.; Ise, S.; Miyazaki, K.; Aoki, H.; Kobayashi, K.; Hattori, Y.; Akaji, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett. in press.* DOI10.1016/j.bmcl.2013.11.039

Alzheimer disease, amyloid ß, curcumin

講演番号：3A05p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ A 校舎 05 会場

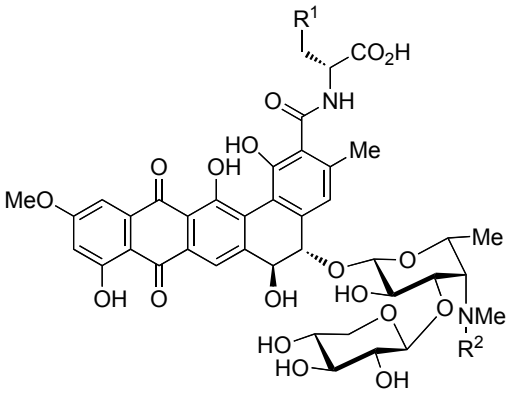
糖結合性天然物・pradimicin A の二量体構造

Dimeric structure of pradimicin A, a sugar-binding natural product

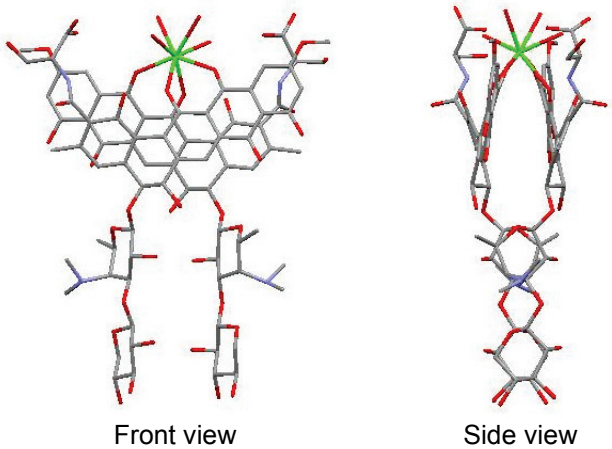
○中川 優[1]、橋爪 大輔[1]、土井 崇嗣[2]、竹腰 清乃理[2]、五十嵐 康弘[3]、伊藤 幸成[1] ([1]理研、[2]京大院理、[3]富山県大)
○Yu NAKAGAWA[1], Daisuke HASHIZUME[1], Takashi DOI[2], Kiyonori TAKEGOSHI[2], Yasuhiro IGARASHI[3], Yukishige ITO[1] ([1]RIKEN, [2]Kyoto Univ., [3]Toyama Prefectural Univ.)

【目的】 Pradimicin A (PRM-A) は，Ca^{2+} 存在下で D-マンノース (Man) を認識するユニークな天然低分子化合物である．PRM-A は単量体では Man 結合能を示さず，Ca^{2+} を介して二量体となることで Man と結合する．現在のところ，二分子の PRM-A がカルボキシル基部分で Ca^{2+} と結合して二量体を形成すると考えられているが，本仮説を実証した研究例はない．そこで本研究では，PRM-A の真の活性種である二量体の構造を明らかにすることを目的とした．

【方法および結果】 PRM-A は Ca^{2+} 存在下で容易に凝集するため，二量体を結晶化させるのは困難である．そこで，凝集性の低い PRM-A アナログである BMY-28864 (**1**) を用いて MOPS バッファー中 $CaCl_2$ 存在下で結晶化を試みたところ，赤色の結晶が得られた．X 線構造解析の結果，本結晶は **1** の二量体に由来するものであり，二分子の **1** がアントラキノン部分で Ca^{2+} と結合していることが明らかになった．そこで，本結晶構造が PRM-A の真の活性種である二量体を反映しているかどうかを確かめるため，PRM-A/Ca^{2+}/Man 複合体を凝集体として調製し，その構造を固体 NMR で解析した．その結果，Man を結合した複合体において PRM-A は **1** の結晶構造に対応する二量体を形成している可能性が高いことが確認された．これらの結果は，PRM-A はカルボキシル基部分ではなく，アントラキノン部分で Ca^{2+} と結合して二量体を形成し，Man と結合することを示唆している．



Pradimicin A (PRM-A) : $R^1 = R^2 = H$
BMY-28864 (**1**) : $R^1 = OH$, $R^2 = Me$



BMY-28864 (**1**) の二量体の結晶構造
(緑：Ca^{2+}，灰色：C，赤：O，青：N)

pradimicin, solid-state NMR, X-ray crystallography

講演番号：3A05p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ A 校舎 05 会場

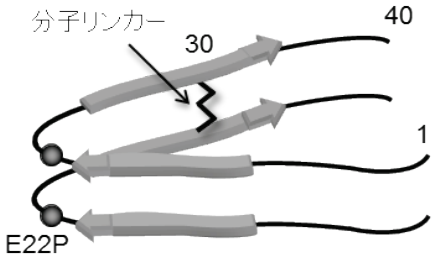
アミロイド β ダイマーの合成と活性評価

Synthesis and biological activities of amyloid ß dimer

○鈴木 天志[1]、村上 一馬[1]、佐藤 瑞穂[1]、岩崎 真実[2]、久米 利明[2]、入江 一浩[1]（[1]京都大学大学院農学研究科、[2]京都大学大学院薬学研究科）
○Takashi SUZUKI[1], Kazuma MURAKAMI[1], Mizuho SATO[1], Mami IWASAKI[2], Toshiaki KUME[2], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University)

【背景と目的】 アルツハイマー病 (AD) の原因物質である 40，42 残基のアミロイドβペプチド (Aβ40, Aβ42) は，分子間βシートを形成して凝集し，神経細胞毒性を示す．近年，Aβ 凝集体の中で毒性本体とされる可溶性オリゴマーの形成には，2 量体あるいは 3 量体を最小基本単位とした 2 種類の経路（2 x *n* 量体，3 x *n* 量体）が提唱されている．しかしながら，Aβ オリゴマーがどのような立体構造を有しているのかは全く明らかにされていない. 本研究グループはこれまでに，固体 NMR 実験などによって Aβ の凝集体中に Glu22, Asp23 残基付近でのターン構造を特徴とした毒性コンホマーの存在を明らかにし，これが会合した 2 量体（毒性オリゴマー）の推定構造を提唱した.[1)] Aβ40 の 2 量体合成は過去に報告されているが，このような毒性コンホメーションに着目した 2 量体合成の例はない．本研究は，この推定構造に基づいて Aβ の 2 量体を化学合成し，その生物活性を評価することで，AD 発症における 2 量体の役割を明らかにすることを目的としている．

【方法と結果】分子間平行βシート領域で近接している Ala30 残基に着目し，本残基を分子リンカーである L,L-2,6-ジアミノピメリン酸 (DAP) に置換する Kok らの方法[2)] を用いて Aβ42 の 2 量体の固相合成を試みた．この際，毒性コンホマーを形成しやすい E22P 変異体を用いた．その結果，Aβ42 の 2 量体の存在は MALDI-TOF-MS で確認できたが，溶解性が著しく低かったため精製できなかった．そこで，Aβ42 よりも毒性は低いものの，溶解性の高い Aβ40 を用いて同様の手法で 2 量体を合成したところ，E22P-Aβ40dimer を収率 3.1%で得ることができた．本 2 量体の凝集能をチオフラビン T 蛍光法および HPLC を用いた遠沈法でそれぞれ評価したところ，コントロールの E22P-Aβ40 は 24 hr で凝集したのに対して，E22P-Aβ40dimer は 1 週間経過してもほとんど凝集せず，可溶性オリゴマーの状態で存在していた．しかしながら，E22P-Aβ40dimer は，ラット由来初代培養神経細胞を用いた MTT 試験では毒性を示さなかった．これより Aβ40dimer は，Aβ の毒性発現にあまり寄与していない可能性が高いと考えられる．



Aβ の 2 量体モデル

【参考文献】1) Murakami, K., *et al. Geriatr. Gerontol. Int.* **1999**, *10 (Suppl. 1)*, S169-S179
2) Kok, W. M., *et al. Chem. Commun.* **2009**, 6228-6230

Amyloid ß, Oligomer, Neurotoxicity

講演番号：3A05p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ A 校舎 05 会場

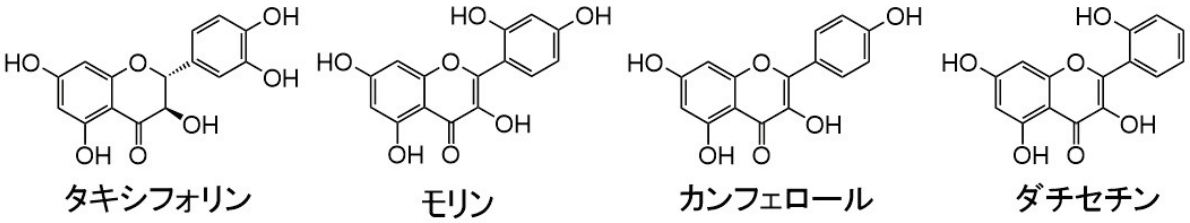
非カテコール型フラボノイドによるアミロイドβ４２凝集抑制機構

Inhibitory mechanism for amyloid ß42 aggregation by non-catechol-type flavonoids

○佐藤 瑞穂[1]、村上 一馬[1]、赤木 謙一[2]、入江 一浩[1] ([1]京都大院農、[2]医薬基盤研)
○Mizuho SATO[1], Kazuma MURAKAMI[1], Ken-ichi AKAGI[2], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]NIBIO)

【背景と目的】アルツハイマー病 (AD) の原因物質である 42 残基のアミロイドβペプチド (Aβ42) は，分子間βシート構造を形成することによって凝集し，神経細胞毒性を示す．このことから，Aβ42 の凝集を抑制する化合物は AD の予防薬として期待される．近年，食品中に含まれる種々のフラボノイドが Aβ42 の凝集を抑制することが知られているが，その凝集抑制機構は不明な点が多い．本研究グループはこれまでに，カテコール型フラボノイドであるタキシフォリンが，自動酸化されて *o*-キノン体を形成した結果，Aβ42 の分子間βシート領域に位置する Lys 残基とマイケル付加体を形成することによって凝集を抑制する機構を提唱した.[1)] 一方，非カテコール型フラボノイドの中にも凝集抑制活性を有するものがあるが，その詳細な機構は不明である．本研究は，各種機器分析を用いて，非カテコール型フラボノイドによる Aβ42 の凝集抑制機構を分子レベルで明らかにすることを目的としている．

【方法と結果】タキシフォリンと同等の Aβ42 凝集抑制能をもつ非カテコール型フラボノイドとして，カンフェロール，モリン，ダチセチンに注目した．CD スペクトルから，これらは Aβ42のβシート形成を顕著に抑制することが判明した．しかしながら，酸素非存在下でも，これらの非カテコール型フラボノイドは Aβ42 の凝集を抑制したことから, 自動酸化を介さないことが示唆された．さらに，非カテコール型フラボノイドは，Lys 残基をノルロイシンに置換した Aβ42 変異体の凝集を，野生型 Aβ42 と同程度に抑制したことから，これらの凝集抑制機構はタキシフォリンによる凝集抑制機構 [1)] とは異なることが明らかとなった．非カテコール型フラボノイドは，α,β-不飽和カルボニル構造をもち，共役効果によって平面性が増大している可能性が高い．そこで，2 次元 NMR 法 (^{1}H-^{15}N HSQC) によって，Aβ42 との相互作用を調べたところ，13, 14 番目のヒスチジン残基が相互作用部位の一つであることを示唆するデータを得た．



【参考文献】1) Sato, M., *et al. J. Biol. Chem*. **2013**, *288*, 23212-23224

Amyloid ß, Flavonoids, Interaction

講演番号：3A05p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ A 校舎 05 会場

伝統生薬チョウトウコウに含まれるアミロイドβ凝集抑制物質
The inhibitors of amyloid ß aggregation in a traditional herbal medicine *Uncaria rhynchophylla*
○村上 一馬、井戸 恭平、佐藤 瑞穂、山口 加乃子、入江 一浩（京大院農）
○Kazuma MURAKAMI, Kyohei IDO, Mizuho SATO, Kanoko YAMAGUCHI, Kazuhiro IRIE (Kyoto Univ.)

【背景と目的】アルツハイマー病 (AD) の原因物質であるアミロイドβペプチド (Aβ42) は，凝集することによって神経細胞毒性を示す．このことから，Aβ42 の凝集阻害剤は抗 AD 薬として期待される．近年，漢方薬の抑肝散は AD 病態の進行を遅らせることが知られており，すでに臨床薬として用いられている．しかしながら，Aβ42 の凝集能への影響などメカニズムの詳細はほとんど不明である．ごく最近，本研究グループは，抑肝散の構成生薬であるチョウトウコウ（アカネ科カギカズラ *Uncaria rhynchophylla*）のアセトン抽出物が Aβ42 凝集活性を強く抑制することを見いだした．本研究は，チョウトウコウに含まれる活性成分を単離・同定することを目的としている．
【方法と結果】 中国湖南省で採集されたチョウトウコウ（かぎ状の茎刺部，乾燥重量 500 g）のアセトン抽出物を溶媒分配し，酢酸エチル層 (5.7 g) を得た．これを Aβ42 の凝集能に対する抑制活性を指標にして，各種クロマトグラフィーにより分画した．凝集抑制活性は，チオフラビン T 蛍光法で評価した．その結果，各種機器分析（NMR，MS，IR，旋光度）により，トリテルペノイドエステルである uncarinic acid A (0.8 mg)，B (1.1 mg)，C (2.0 mg)，D (2.4 mg) の 4 種類を単離・同定した．これらはいずれも既知化合物である.[1,2] 一方，チョウトウコウの主成分であるイソリンコフィリンには凝集抑制能はなく，本研究によってチョウトウコウに含まれる凝集抑制物質が初めて明らかになった．Uncarinic acid A～D のようなトリテルペノイドならびにフェルラ酸構造からなる化合物は，新しいタイプの凝集抑制物質である．さらに，uncarinic acid A～D が含まれていた画分より，高極性画分に顕著な抑制活性を見いだしており，現在，活性成分の単離及び構造解析を進めている．

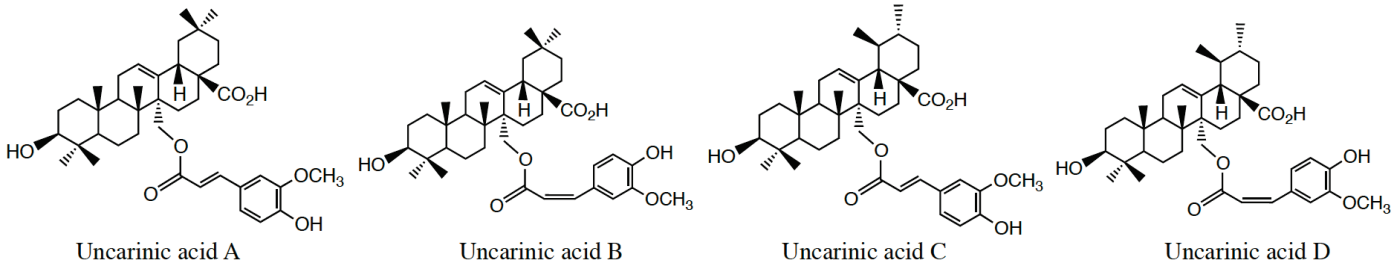


図　Uncarinic acid A~D の構造式

【参考文献】1) Lee, J. S., *et al., Bioorg. Med. Chem. Lett*. **1999**, *9*, 1429-1432
2) Lee, J. S., *et al., J. Nat. Prod*. **2000**, *63*, 753-756

amyloid ß, aggregation, Kampo

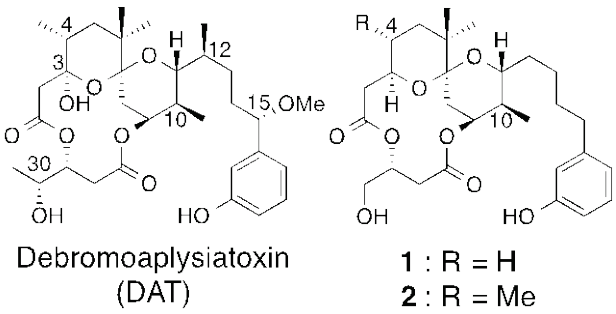
講演番号：3A05p23
講演日時、会場：3 月 29 日 17:59～ A 校舎 05 会場

Debromoaplysiatoxin の 4 位不斉メチル基の生物活性における役割

Role of C4 Methyl Group for Biological Activities of Debromoaplysiatoxin

○菊森 将之[1]、徳田 春邦[2]、鈴木 信孝[2]、村上 明[1]、入江 一浩[1] ([1]京大院農、[2]金沢大院医)
○Masayuki KIKUMORI[1], Harukuni TOKUDA[2], Nobutaka SUZUKI[2], Akira MURAKAMI[1], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kanazawa Univ.)

発がん促進物質とは, DNA の損傷により生じた腫瘍細胞の増殖を促進する化合物群の総称である．ホルボールエステルに代表される発がん促進物質は，細胞内情報伝達の鍵酵素群である protein kinase C (PKC) アイソザイムの調節領域に結合し，強力に活性化することが知られている．一方，PKC 活性化剤はアルツハイマー病やエイズ等の難治性疾患の治療に有用である可能性が示されており，副作用の少ない新しい PKC 活性化剤の開発が強く求められている．当研究室はこれまでに，発がん促進物質の構造を利用し，PKC アイソザイム活性化能を保持した上で，その発がん促進活性のみを選択的に低下させた薬剤を創製することを試みてきた．近年，アメフラシ由来の発がん促進物質・debromoaplysiatoxin (DAT) の単純化アナログである **1** が, 種々のがん細胞株の増殖を DAT よりも強く抑制する一方で，発がん促進活性を示さないことを明らかにした [1)]．また、当研究室におけるこれまでの構造活性相関研究から，DAT のスピロケタール部分の疎水性置換基が PKC 結合能に特に重要と考えられた．本研究では，DAT の発がん促進活性ならびにがん細胞増殖抑制活性に関わる構造要因をさらに調べることを目的として, **1** のスピロケタール部分の 4 位に不斉メチル基を導入した誘導体 (**2**) を，*m*-hydroxycinnamic acid から 25 段階，0.53%の総収率で合成した．がん細胞増殖抑制ならびにアポトーシスに関与するとされる PKC アイソザイムの一種・PKCδ に対する結合能と 39 種のがん細胞株に対する増殖抑制能を評価した結果，**2** の活性は **1** および DAT と同等であった．一方，*in vivo* の発がん促進活性と高い相関性のある，分化 HL-60 細胞に対する $O_2^{\cdot-}$産生誘導能ならびにマウス耳に対する炎症作用を評価した結果，**2** は発がん促進活性を有する可能性が示唆された．そこで，マウス皮膚発がん 2 段階試験を行なったところ，**2** は **1** とは異なり，DAT の 5 倍量の塗布によって僅かではあるが有意に腫瘍形成を促進した．以上のような **1** と **2** の発がん促進活性の差異をもたらす要因を調べることを目的として PKC アイソザイム結合選択性を評価した．DAT は他の発がん促進物質と同様に conventional PKC (cPKC) ならびに novel PKC (nPKC) の両方に強く結合したのに対し，**1** は nPKC に対して選択的に結合した．一方，**2** の nPKC 結合選択性は **1** と比べて低いものであった．以上より，cPKC に対する結合が発がん促進活性の一つの要因として考えられた．



Debromoaplysiatoxin (DAT)

1 : R = H
2 : R = Me

1) Kikumori, M. *et al*., *J. Med. Chem.* **2012,** *55,* 5614.

protein kinase c, tumor promoter, debromoaplysiatoxin

講演番号：3A06a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ A 校舎 06 会場

放線菌の生産する DPPH ラジカル捕捉物質 12T061A の単離と化学構造

12T061A, a DPPH radical scavenger from *Streptomyces* sp.

○菰田 俊一[1]、佐伯 奈央子[1]、越野 広雪[2]、清田 洋正[3]（[1]宮城大食産業、[2]理研、[3]岡山大院・環境生命）
○Toshikazu KOMODA[1], Naoko SAEKI[1], Hiroyuki KOSHINO[2], Hiromasa KIYOTA[3] ([1]Miyagi Univ., [2]RIKEN, [3]Okayama Univ.)

[目的]

一般に、抗酸化関連化合物は食品の品質維持や生体組織の劣化抑制に利用できる可能性があり、様々な面から研究が進められている。このことから、我々は、以前から抗酸化能を評価する手法として DPPH 試薬を用いたラジカル捕捉活性を指標に、天然由来の抗酸化関連化合物を見出す取り組みを進めてきた。今回、この過程の中で新たに微生物の代謝産物中に機能性成分を見出すことができたため、この成分を単離精製し、物理化学的性状および化学構造を明らかにすること、さらに、その生理機能を明らかにすることを目的として研究を行うこととした。

[方法および結果、考察]

はじめに、仙台市内を中心とした各地の土壌から放線菌を単離し、ここから活性菌を選抜することとした。単離された放線菌は試験管による培養を行い、その培養ろ液を電気化学検出器(ECD)付き HPLC にて分析した。ECD は、化合物の酸化還元電位を測る検出器であるが、ポリフェノール類等の抗酸化関連化合物がしばしば検出されるため、今回の取り組みの中ではスクリーニングの初期に用いることとした。約 300 の放線菌をグルコース、酵母エキス、モルトエキスからなる培地中で液体培養し、HPLC-ECD 分析法によりスクリーニングを行った結果、21 株の菌株を選抜することができた。次に、これら 21 菌株の抗酸化関連機能を再度評価するため、DPPH 退色法によるラジカル捕捉試験を行った。各々の培養ろ液の酢酸エチル抽出画分を TLC により展開し、DPPH 溶液を噴霧して、DPPH の脱色を確認した結果、放線菌 12T061 株が活性を示したため、この株を次の大量培養に供することとした。回転培養により、14 日間の培養を行った後、ろ液(9.6L)を酢酸エチルにより抽出した。続いて、この酢酸エチル抽出画分をシリカゲルカラムクロマト、セファデックス LH-20、分取 HPLC にて精製し、活性物質 12T061A(**1**)を 50 mg 得た。**1** の分子式は高分解能質量分析の結果により $C_{19}H_{20}O_7$ であることが示され、平面構造は ^{1}H-NMR、^{13}C-NMR および各種二次元 NMR データを解析して明らかにされた。この結果、**1** は 3 つの連続した 6 員環を持つ化合物であると推定した。また、**1** は DPPH ラジカル捕捉活性を示し(ED_{50}: 370 μM)、大豆リポキシゲナーゼに対しては、弱い阻害活性を持つことが示された(IC_{50}: 1 mM)。現在、**1** の化学構造の詳細な解析の他、12T061 株の生産する **1** 類縁化合物の単離精製およびこれらの構造解析を進めている。

DPPH radical scavenger, *Streptomyces*

講演番号：3A06a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ A 校舎 06 会場

放線菌の生産する DPPH ラジカル捕捉物質 13T030A の単離と化学構造

13T030A, a DPPH radical scavenger from *Streptomyces* sp.

佐伯 奈央子[1]、○杉浦 舞[1]、越野 広雪[2]、清田 洋正[3]、菰田 俊一[1] ([1]宮城大食産業、[2]理研、[3]岡山大院・環境生命)

Naoko SAEKI[1], ○Mai SUGIURA[1], Hiroyuki KOSHINO[2], Hiromasa KIYOTA[3], Toshikazu KOMODA[1] ([1]Miyagi Univ., [2]RIKEN, [3]Okayama Univ.)

[目的]

我々は、抗酸化関連化合物を簡便に検出する方法として、電気化学検出器(ECD)付き HPLC 装置を利用できる可能性について検討を行ってきた。この結果、放線菌由来のフェナジン関連化合物やカビ由来のソルビシリノイド関連化合物など、天然由来の抗酸化関連物質をいくつか見出してきている。今回、この方法を用いてスクリーニングを行うことにより、放線菌の代謝産物中から、新たな機能性成分を見出したので、その単離精製、物理化学的性状と化学構造を明らかにすること、および見出した成分の持つ生理機能を明らかにすることを目的とした。

[方法および結果、考察]

土壌より分離した約 300 株の放線菌を、グルコース、酵母エキス、モルトエキスからなる培地で液体培養し、その培養ろ液を電気化学検出器(ECD)付き HPLC により分析して菌株のスクリーニングを行った。この結果、21 株の菌株に抗酸化物質を生産している可能性が示唆された。選抜された 21 菌株は、その抗酸化能を再度評価するため、DPPH ラジカル捕捉活性試験に供した。まず、各々の菌株を試験管培養(5 mL)し、その培養ろ液を酢酸エチルにより抽出した。次に、この酢酸エチル抽出画分を TLC により展開し、DPPH 溶液を噴霧した後、ラジカルが消去されることによる退色を目視にて確認した。この結果、放線菌 13T030 株にラジカル捕捉活性があることが確認されたので、大量培養(9.6 L)に供することとした。30 ℃、7 日間の回転培養を行った後、この培養ろ液を酢酸エチルにより抽出、シリカゲルカラムクロマト、セファデックス LH-20(メタノール系)、逆相 HPLC(メタノール/水/TFA 系およびアセトニトリル/水/TFA 系)分取により精製し、活性物質として 13T030A(**1**)を 20 mg 得た。**1** の分子式は、高分解能質量分析の結果から $C_{10}H_{14}O_3$ であることが示され、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR 及び各種二次元 NMR データを解析した結果、その平面構造は、6 員環部分と 5 員環部分を含むスピロアセタール化合物と推定した。また、**1** の DPPH ラジカル捕捉活性を調べた結果、その活性は弱いものであった (ED_{50}:1 mM)。現在、**1** の化学構造の詳細な解析および各種生理活性の評価を行っている。

Streptomyces sp., DPPH

講演番号：3A06a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ A 校舎 06 会場

タイ植物由来 *Microbispora* 属放線菌 GMKU363 が生産する新規ポリケタイドの絶対配置の決定と生物活性

Absolute configuration and bioactivity of new polyketides from Thai endophytic *Microbispora* sp.

○秋山 浩文[1]、奥 直也[1]、Indanada Chantra[2]、Thamchaipente Arinthip[2]、及川 勉[3]、五十嵐 康弘[1]([1]富山県立大・生工研セ、[2]タイ Kasetsart 大・理、[3]神奈川県立保健福祉大・保)

○Hirofumi Akiyama[1], Naoya Oku[1], Chantra Indanada[2], Arinthip Thamchaipente[2], Tsutomu Oikawa[3], Yasuhiro Igarashi[1] ([1]Toyama Pref Univ., [2]Kasetsart Univ., [3]Kanagawa Pref Univ.)

【目的】植物内生菌は宿主植物に対して成長促進作用や耐病性を示す代謝物を生産することから生理活性物質の探索源として注目されている。我々は微生物からの新規生理活性物質探索の過程において、タイ産植物から分離した放線菌 *Microbispora* sp. GMKU363 が新規ポリケタイド化合物 linfuranone A, B を生産することを見出した(農芸化学会 2011 年度大会)。その後の研究により、培養条件を変えることでそれらの新規類縁体 linfuranone C が生産されることを見出した。本発表では、linfuranone C の単離・精製、構造決定、linfuranone B と C の絶対配置、また生物活性について報告する。

【方法及び結果】タイ産薬用植物 Lin Ngu Hao の根から分離された *Microbispora* sp. GMKU363 を 25～50℃の範囲で温度勾配試験を行った結果、最適生育温度は 37℃付近を示した。そこで本菌株を 30℃と 37℃で培養後、HPLC により生産物を比較したところ、37℃培養では全体的に生産量が高く、30℃培養では見られない代謝物のピークが複数見られた。そこで本菌株を 37℃で培養し、その培養液をブタノール抽出し、その濃縮物を各種クロマトグラフィーにより精製することで linfuranone C を得た。各種二次元 NMR スペクトル及び HRESITOFMS により、本物質は、linfuranone 類に近縁の新規化合物であることを明らかにした。絶対配置については、新 Mosher 法、NOESY 解析、部分分解により決定した。Linfuranone C の不斉炭素 1 ヶ所については現在、絶対配置の決定を試みている。Linfuranone B と C はマウス前駆脂肪細胞 ST-13 の脂肪細胞への分化誘導活性を示した。

Microbispora, polyketide, endophyte

講演番号：3A06a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ A 校舎 06 会場

Production of phthoxazolin, a lipophilic triene compound, is triggered by disruption of an autoregulator receptor homologue in *Streptomyces avermitilis*

○Dian Anggraini Suroto[1], Shigeru Kitani[1], Kiyoko Miyamoto[1], Haruo Ikeda[2], Takuya Nihira[1]
([1]International Center for Biotechnology,Osaka Univ., [2]Kitasato Institute for Life Sciences,Kitasato Univ.)

Secondary metabolites are important source of bioactive compounds. For decades *Streptomyces* species have been the richest source of those molecules, and genome-based approach had revealed numerous biosynthetic gene clusters which exceed the number of detected secondary metabolite. The efforts to activate those silent biosynthetic clusters become big challenge, since many of them are poorly understood and expressed at low level in laboratory condition. During our effort to investigate the role of an autoregulator receptor homologue AvaR3 for secondary metabolism in *Streptomyces avermitilis*, a remarkably large peak was found from the agar culture of the *avaR3* mutant compared with that in the wild-type strain.

Here we describe the structure elucidation of the peak by spectroscopic methods. Methanol extract from solid cultivation was further fractionated by reversed-phase chromatography and preparative HPLC. Structure elucidation with 1D- and 2D-NMR and MS methods revealed moieties of triene and oxazole are found in the structure of the purified compound, and all of the δ_C and δ_H values are agreed well with those of phthoxazolin A, an inhibitor of cellulose biosynthesis as well as potential anti prostate cancer. Interestingly, production of phthoxazolin A has not yet been reported in *S. avermitilis*, although the complete genome sequence is available so far. Thus, disruption of an autoregulator receptor homologue AvaR3 in *S. avermitilis* affected not only morphological development and production of major secondary metabolites, but also production of the silent secondary metabolite phthoxazolin.

Streptomyces avermitilis, phthoxazolin, secondary metabolism

講演番号：3A06a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ A 校舎 06 会場

放線菌の生産する環状デプシペプチドによるクオラムセンシング阻害活性

Inhibition of quorum sensing by cyclodepsipeptides produced by actinomycetes

○庄島 あかね[1]、松藤 貴久[1]、Desouky Said Elsayed[1]、大久保 謙一[1]、五十嵐 康弘[2]、園元 謙二[1,3]、中山 二郎[1] ([1]九大院農、[2]富山県大・生工研、[3]九大バイオアーク)
○ Akane SHOJIMA[1], Takahisa MATSUFUJI[1], Said Elsayed Desouky[1], Kenichi OKUBO[1], Yasuhiro IGARASHI[2], Kenji SONOMOTO[1,3], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Toyama Pref. Univ., [3]Bio-Arch. Kyushu Univ.)

【目的】クオラムセンシング(QS)とは、細菌が細胞密度依存的に特定の遺伝子発現を制御する機構である。ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*、腸球菌 *Enterococcus faecalis* は、それぞれ *agr* 制御系、*fsr* 制御系と呼ばれる QS によって自身の病原因子発現を制御している。QS 阻害剤は殺菌、静菌作用がなく、病原因子発現のみを抑制することから、耐性菌の出現を助長しないと考えられている。そして、抗生物質に代わる新たな薬剤として QS 阻害剤の開発が期待されている。そこで本研究では、*S. aureus* および *E. faecalis* の QS を標的とした阻害剤のハイスループットスクリーニングを行い、新たな抗感染症薬開発に向け、その一助とすることを目的とした。
【方法・結果】放線菌培養液抽出物 909 サンプルを *agr*、*fsr* 系の二段階の阻害活性評価によるハイスループットスクリーニングに供した。*agr* 系の阻害活性評価においては、P3 プロモーター下流にルシフェラーゼおよび GFP 遺伝子をコードしたプラスミド(pSB2035)を導入した *S. aureus*8325-4 株をレポーター株として用いた。*fsr* 系においては、*E. faecalis* におけるゼラチナーゼの自己誘導量を酵素アッセイにより評価した。その結果、Y67-1、Y67-2、608、609、X33 が *agr* 系および *fsr* 系の両者を抑制した。Y67-1 および Y67-2 は、高分解能 MS 解析、MS/MS 解析により、環状デプシペプチド WS9326A($C_{54}H_{68}N_8O_{13}$)および WS9326B($C_{54}H_{70}N_8O_{13}$)と同定された(Hayashi K et al. J Antibiot 1992)。WS9326A および WS9326B は、それぞれ IC_{50}=2.5 μM、2 μM で *S. aureus* の P3 プロモーターの自己誘導活性を阻害し、IC_{50}=16 μM、13 μM で、*E. faecalis* のゼラチナーゼの自己誘導を阻害した。さらに、これらの QS 阻害剤は、*fsr* 系においてオートインデューサーと受容体との結合を阻害するアンタゴニストとして機能している可能性が示唆された。608 および 609 は、高分解能 MS 解析および UV スペクトル解析により、環状デプシペプチド cochinmicin($C_{46}H_{46}N_7O_{12}Cl$)と同定された(Lam YK et al. J Antibiot 1992)。cochinmicin は、*S. aureus* の P3 プロモーターの自己誘導活性を 0.3 μM で阻害した。WS9326 は、神経伝達ペプチドである tachykinin アンタゴニスト、cochinmicin は血管の収縮作用に関与するペプチドホルモンである endothelin アンタゴニストとして知られている。そこで、*E. faecalis* の *fsr* 系のオートインデューサーである GBAP とこれらのヒト受容体との結合活性を調べた。その結果、GBAP は、tachykinin 受容体 NK_2 との結合を 5 μM で 58%、endothelin 受容体 ET_A との結合を 50μM で 88%阻害した。細菌の生産する環状ペプチドが、細菌界を超えて、動物細胞のホルモン受容体に作用することは、非常に興味深い。

quorum sensing, cyclodepsipeptide, antagonist

講演番号：3A06a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ A 校舎 06 会場

Hamigera 属糸状菌が生産するクオラムセンシング阻害物質に関する研究
Quorum sensing inhibitors from filamentous fungi *Hamigera*
○門嶋 泰斗[1]、郷田 史也[1]、花房 知朗[1]、松藤 貴久[2]、中山 二郎[2]、五十嵐 康弘[1] ([1]富山県立大・生工研セ、[2]九大院・農)
○Taito Kadoshima[1], Fumiya Gouda[1], Tomoaki Hanafusa[1], Takahisa Matsufuji[2], Jiro Nakayama[2], Yasuhiro Igarashi[1] ([1]Biotech Res Center Toyama Prefecture Univ., [2]Kyushu Univ.)

[目的]クオラムセンシング(QS)は、菌密度に依存して遺伝子発現を制御するシステムであり、病原菌では QS により毒素生産を制御している。QS 阻害剤は菌増殖に影響を与えず、病原性因子の遺伝子発現のみを抑制するため、薬剤耐性菌の発生を伴わない新しい抗感染症薬として期待されている。我々は、*Hamigera* 属糸状菌 8 種 19 株を対象としてスクリーニングした結果、*Hamigera ingelheimensis* NRRL29060 から 黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* の QS を阻害する物質を生産することを見出した。本発表では、同菌株が生産する QS 阻害物質の単離、精製、構造決定について報告する。
[方法及び結果]糸状菌 *H. ingelheimensis* NRRL29060 の培養液をブタノール抽出し、その濃縮物 2.44 g をシリカゲルカラムクロマトグラフィーと ODS カラムクロマトグラフィーより精製し、160 mg の粗精製物を得た。さらに、そのうち 20 mg を HPLC 分取に供し、9 mg の阻害物質を得た。本化合物は新規化合物であったので、avellanin C と命名した。本化合物の分子式は NMR データ及び HR-ESITOFMS により $C_{34}H_{37}N_5O_5$ と決定した。各種 2 次元 NMR スペクトルの解析により、本化合物はアラニン、プロリン、フェニルアラニン、*N*-メチルフェニルアラニン、アントラニル酸から成る環状ペプチドであることを明らかにした。また、本化合物を 6N HCl 中で加水分解した後、FDLA 誘導体に変換し、アミノ酸標品と LC-MS により比較し、D-Ala, L-Pro, L-Phe と決定した。*N*-メチルフェニルアラニンの絶対配置は検討中である。病原遺伝子発現に関与する P3 プロモーター、蛍光遺伝子 *gfp*、発光遺伝子 *lux* を持つプラスミドで形質転換した *S. aureus* を用いて、発光または蛍光の強度で QS 阻害作用の評価をした結果、avellanin C は菌の増殖には影響を与えずに 1.25～2.5 μg/mL で *lux* 遺伝子の発現を抑制した。この結果は、avellanin C が *S. aureus* の AIP を介する QS シグナル伝達を阻害したことを示している。

quorum sensing, *Hamigera*, avellanin

講演番号：3A06a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ A 校舎 06 会場

ジャガイモ疫病菌 *Phytophthora* のファイトアレキシン誘導性エリシターの探索
Isolation of phytoalexin-inducing elicitors from *Phytophthora infestans*
○天廣 志保、松田 健太郎、村田 涼、川北 一人、小鹿 一 (名大院生命農)
○Shiho TENHIRO, Kentarou MATSUDA, Ryo MURATA, Kazuhito KAWAKITA, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

【目的】ジャガイモ疫病菌 *Phytophthora infestans* はジャガイモ・トマト等に感染し、葉や果実を軟化腐敗させる。世界中でのジャガイモ疫病菌による被害総額は年間数十億ドルにのぼり、その防除は農業上極めて重要である。現在、その防除にはフェニルアマイド系の殺菌剤が広く使用されているが、これらの殺菌剤に耐性を持つ疫病菌の出現が問題となっている。

この問題を解決する一つの有用な防除法が「エリシター」の応用である。植物に病原菌が侵入すると、活性酸素の生成、ファイトアレキシン(低分子抗菌物質)の蓄積、過敏感細胞死に代表される様々な抵抗反応が起こる。エリシターとはこのような植物の抵抗反応を誘導する生理活性物質の総称であり、疫病菌や昆虫などから得られる。従って、エリシターの性質を上手く応用することができれば、植物の抵抗力を向上させる自然農薬の開発につながると考えられる。

これまでの研究で、*Phytophthora* より活性酸素生成活性を示すエリシターの単離同定が成功している。しかし、これらの化合物はファイトアレキシン誘導活性を示さなかった。そこで本研究では、ファイトアレキシン誘導活性を示すエリシターの単離同定を目的とする。

【方法・結果】エリシターの探索は、*Phytophthora* 菌体のメタノール抽出物から行った。また、ファイトアレキシン誘導活性検定は、まずジャガイモ塊茎に直径 9 mm の穴をあけ、サンプルの 5% DMSO 溶液をいれた。48 時間後に穴の中の溶液を取り出し、酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル層をシリカゲル TLC で展開することでファイトアレキシンを検出した。標品はジャガイモにおいて誘導される代表的なファイトアレキシンであるリシチンを用いた。活性物質の精製は、*Phytophthora* 菌体のメタノール抽出物をブタノール抽出し、このブタノール層を 2 回のシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーによって分離した。その後、活性画分をさらに HPLC（99% MeOH）により分離し、ファイトアレキシン誘導活性のある画分を得た。この画分の NMR（^{1}H、^{13}C、二次元 NMR）測定結果より、活性物質は分子式が $C_{41}H_{66}O_5$ の 1,2-ジアシルグリセロール（Fig. 1）であると同定した。また、このアシル転移異性体である 1,3-ジアシルグリセロールにもファイトアレキシン誘導活性があることが分かった。

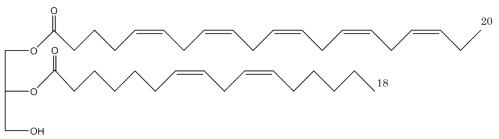


Fig. 1　ジアシルグリセロール

Phytophthora, elicitor, phytoalexin

講演番号：3A06a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ A 校舎 06 会場

海洋性粘液細菌のゲノムデータに基づく新規二次代謝産物の探索

Search for Novel Secondary Metabolite from a Marine Myxobacterium Based on Genome Database

○佐藤 潤一[1]、孫 雨偉[1]、不藤 亮介[2]、飯塚 俊[3]、小鹿 一[1]([1]名大院生命農、[2]バイオインダストリー協会、[3]味の素（株）イノベーション研究所)
○Junichi Sato[1], Yuwei Sun[1], Ryosuke Fudou[2], Takashi Iizuka[3], Makoto Ojika[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Japan Bioindustry Association, [3]Institute for Innovation, Ajinomoto Co.,Inc)

【目的】

粘液細菌は難培養性の微生物で、環境中に普遍的に存在しているが、その培養の難しさからあまり注目されてこなかった。しかし近年、その二次代謝産物の多くは、新規骨格を形成し、抗真菌性・抗菌・細胞毒性などの生理活性を示すことから、医薬品シードの探索源として注目されている。

我々は海洋性粘液細菌の最初の例である *Haliangium ochraceum* から抗真菌性物質 haliangicin を発見した。*H. ocharaceum* のゲノム情報から haliangicin 生合成遺伝子クラスター以外のポリケチド生合成遺伝子クラスターが複数存在することが示唆されたため、本研究では、*H. ochraceum* から新規生理活性物質を単離・同定することを目的とした。

【方法・結果】

10 cm デッシュにて VY2/SWS 寒天培地で 2 週間培養した *H. ochraceum* を寒天ごと細切れにし、三角フラスコ中カジトンを基本成分とした液体培地で振盪培養した。培養 4 日後に吸着樹脂を加え、計 2 週間培養した。培養物を濾過して、菌体と吸着樹脂を集めてメタノールで抽出し、得られたメタノール抽出物を 2 度の ODS オープンカラム、逆相 HPLC を用いて精製した。

生理活性検定は、B16 メラノーマ細胞を用いた細胞毒性検定、植物疫病菌 *Phytophthora capsici* を用いての抗真菌活性検定の 2 種を行い、ODS オープンカラムの後、その両方の検定で活性のある画分を得た。この活性画分を HPLC で分離したところ、haliangicin とともに化合物 A が単離された。NMR を中心とした構造解析の結果、ポリケチド - ペプチド混合型二次代謝産物であることがわかった。

この構造から予想される生合成遺伝子クラスターを探索したところ、1 つが見つかった。この生合成遺伝子クラスターでは、モジュールはスターターを認識することより始まり、1 つの NRPS によりアミド構造が、4 つの PKS によりさらに 4 回伸長反応が起こることにより、炭素骨格が形成されると予想されたが、化合物 A はこのモジュールと対応する構造を有していた。この化合物 A の生理活性および立体配置は現在、検討中である。

myxobacterium, secondary metabolite, PKS-NRPS

講演番号：3A06a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ A 校舎 06 会場

Chloroflexi 門好熱性細菌 *Thermosporothrix* の二次代謝能の解析
Analysis of secondary metabolism in a thermosphilic bacterium *Thermosporothrix* in the phylum *Chloroflexi*
○山田 和、山本 和樹、奥 直也、五十嵐 康弘（富山県大・生工研セ）
○Nodoka YAMADA, Kazuki YAMAMOTO, Naoya OKU, Yasuhiro IGARASHI (Biotech Res Center Toyama Pref Univ.)

【目的】50~60℃を生育至適温度とする *Ktedonobacteria* 綱細菌は、分岐した気菌糸に胞子を着生し、セルロース、キチンなどの繊維質を分解するなど放線菌に類似した性質を示すが、進化系統上は *Actinobacteria* とは全く異なる *Chloroflexi* 門に属する。放線菌に特有の形態分化と二次代謝能の相関性が指摘されていること、また、*K. racemifer* のゲノムサイズは 13Mbp と放線菌をはじめとする二次代謝能の高い細菌類に匹敵する大きさであることから *Ktedonobacteria* 類の二次代謝能に興味が持たれた。

そこで我々は *Ktedonobacteria* 綱細菌の一つである *Thermosporothrix hazakensis* NBRC105916 の二次代謝能の解析に着手した。本発表では本菌株の二次代謝物の単離・精製、構造決定、及び生合成について報告する。

【方法及び結果】本菌株を 50℃で培養し、その培養液ブタノール抽出物を各種クロマトグラフィーにより精製した結果、2 種類の既知アントラニル酸誘導体、ならびに 4 種類のフェニル基を有する化合物 benzenepropanoic acid, sattabacin, sattabacin B, ktedonoketone を得た。そのうち sattabacin B と ktedonoketone は新規物質であった。次に、sattabacin 類のアシロイン構造（α-ヒドロキシケトン）の生合成に興味が持たれたため、^{13}C 標識化合物の添加培養実験を行った。その結果、sattabacin はフェニルアラニンとロイシン、sattabacin B はフェニルアラニンとスレオニンから生合成されることが明らかとなった。

Chloroflexi, *Thermosporothrix*, sacondary metabolite

講演番号：3A06a17
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ A 校舎 06 会場

Lycopene cyclase 高発現酵母（改変 *Xanthophyllomces dendrorhous*）が生産する新規カロテノイド 3-hydroxy-7',8'-dihydro echinenone

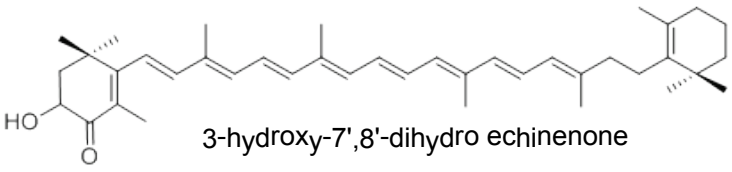
The novel carotenoid, 3-hydroxy-7',8'-dihydro echinenone produced by modified *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

○大澤 絢子[1]、位寄 かのこ[1]、Gerhard Sandmann[2]、新藤 一敏[1] ([1]日女大家政・食物、[2]フランクフルト大学)
○Ayako OSAWA[1], Kanoko IKI[1], Gerhard SANDMANN[2], Kazutoshi SHINDO[1] ([1]Japan Women's Univ., [2]Frankfurt Univ.)

【背景と目的】astaxanthin は優れた抗酸化作用を有するカロテノイドであり、化粧品やサプリメントとしての利用が広まっている。また、サケやマスなどの養殖では餌に添加して魚肉の色上げ剤として利用されている。astaxanthin の産業的調製方法としては完全化学合成法或いは *Haematococcus pluvialis* の大量培養法等が既に確立されている。しかしながらこれら調製法を用いても astaxanthin は未だ非常に高価であり、より効率的な astaxanthin 生産方法は依然として希求されている。そこで我々は、代謝工学的手法により astaxanthin 高生産性酵母 *Xanthophyllomces dendrorhous*(=*Phaffia rhodozyma*)の lycopen cyclase (Crt YB, astaxanthin 生合成経路の酵素の 1 つ) を高発現し、効率的に astaxanthin を生産する微生物を作製した。

一方で、得られた改変 *X. dendrorhous* を培養し生産されるカロテノイドの HPLC 分析を実施したところ、微量ではあるが、野生種 *X. dendrorhous* には存在しなかった 450 nm に吸収極大波長を有する未同定カロテノイドが新たに生産されていることが明らかとなった。そこで今回は、この改変 *X. dendrorhous* より新たに得られた未同定カロテノイドの単離・構造解析と抗酸化活性評価（$^1O_2$ 消去活性）を実施したので報告する。

【方法と結果】改変 *X. dendrorhous* を YM 培地を用いて 20℃, 180 rpm で 8 日間培養した（10 L)。菌体内で産生されたカロテノイドをアセトン抽出後、溶媒分画、各種クロマトグラフィーを用いて 450 nm に吸収極大を有するカロテノイドを精製した。最終ステップとしては ODS HPLC カラム{Develosil C_{30}-UG-5, CH_3CN-CH_2Cl_2-EtOH (60:40:2)}で 11.6 min に溶出される未同定カロテノイドを単離した。本カロテノイドを HRESI-MS、各種 NMR 解析を用いて構造解析した結果、新規カロテノイド 3-hydroxy-7',8'-dihydro echinenone (0.8 mg、下図）であると決定した。3-Hydroxy-7',8'-dihydro echinenone の $^1O_2$ 消去活性評価（methylene blue 法）を実施したところ、IC_{50} は 50 μM であった。(3-hydroxy echinenone 28 μM, astaxanthin 9 μM)。



3-hydroxy-7',8'-dihydro echinenone

本化合物は、lycopene cyclase の基質認識が甘く neurosporene も基質として認識するため、高発現することにより lycopene cyclase が desaturase よりも先に neurosporene に作用して産生されるようになったと考えられる。

Xanthophyllomces dendrorhous, carotenoid, 3-hydroxy-7',8'-dihydro echinenone

講演番号：3A06p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ A 校舎 06 会場

アコヤガイ貝殻靭帯部から見出された PfTIMP の構造・機能解析

Structural and functional analyses of PfTIMP from the hinge ligament of the Japanese pearl oyster, Pinctada fucata

○鈴木 道生[1]、小暮 敏博[2]、前山 薫[3]、服部 文弘[3]、作田 庄平[1]、長澤 寛道[1] ([1]東大院農、[2]東大院理、[3]御木本製薬)
○Michio Suzuki[1], Toshihiro Kogure[2], Kaoru Maeyama[3], Fumihiro Hattori[3], Shohei Sakuda[1], Hiromichi Nagasaw[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Grad. Sci. Univ. Tokyo, [3]Mikimoto Cosmetics)

【目的】貝殻は軟体動物が作る炭酸カルシウムを主成分とするバイオミネラルである。バイオミネラルには無機物だけでなく少量の有機基質が含まれ、この少量の有機基質がバイオミネラリゼーションに重要な役割を果たすことが示唆されてきた。これまで、貝殻からは様々な有機基質が単離・同定され、それらの機能が推測されてきたが、炭酸カルシウムの特徴的な形態を制御する分子機構についてはその多くが明らかになっていない。本研究では特に二枚貝貝殻の蝶番部分に存在する靭帯の炭酸カルシウム結晶の形成に着目し研究を行った。靭帯は針金状に伸長したアラゴナイト結晶とそれを覆うように多量の有機基質から構成されている。各々のアラゴナイト結晶の繊維の中央部に、伸長方向に平行に配置された 1 つもしくは 2 つの{110}双晶面を含むことが知られている。このように貝類の靭帯においてはアラゴナイト結晶の形態と欠陥の密度が厳密に制御されている可能性が考えられた。そこで、アコヤガイ貝殻靭帯部より、特徴的なアラゴナイト結晶の形成を制御する有機基質を明らかにすることを目的に研究を行った。
【方法と結果】アコヤガイ貝殻の真珠層と靭帯部を採取し、1 M の酢酸で脱灰し、可溶性の有機基質を抽出し、SDS-PAGE に供した。真珠層と靭帯からのそれぞれの有機基質抽出液の SDS-PAGE の泳動パターンの比較を行ったところ、約 10 kDa 付近に特異的なバンドがあることが判明した。これを逆相 HPLC で精製し、アミノ酸配列解析の結果より、配列を決定し、cDNA クローニングにより全塩基配列を明らかにした。相同性検索の結果、細胞外マトリックスを分解する金属酵素の阻害剤である Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP) であることが判明し、アコヤガイ (*Pinctada fucata*) の TIMP であるので、PfTIMP と命名した。PfTIMP は主に靭帯を形成すると思われる mantle isthmus において発現していることが判明した。また Matrix Metalloproteinase (MMP) Inhibitor Profiling Kit を用いて PfTIMP の活性を確認したところ、PfTIMP は MMP2、MMP9、MMP12、MMP13 を強く阻害することが分かり、金属プロテアーゼの活性を阻害することで靭帯内の有機基質の繊維構造の形成を調整する役割があるのではないかと考えられた。

biomineralization, Pinctada fucata, TIMP

講演番号：3A06p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ A 校舎 06 会場

アコヤガイ貝殻稜柱層カルサイト結晶内の小角粒界の形成機構
Formation mechanism of the small angle grain boundary in the calcite crystals of the prismatic layer in Pinctada fucata

○近都 浩之[1]、奥村 大河[2]、小暮 敏博[2]、作田 庄平[3]、鈴木 道生[3]（[1]東大農、[2]東大院理、[3]東大院農）
○Hiroyuki KINTSU[1], Taiga OKUMURA[2], Toshihiro KOGURE[2], Shohei SAKUDA[3], Michio SUZUKI[3] ([1]Faculty of Agriculture, Univ. Tokyo, [2]Graduate School of Science, Univ. Tokyo, [3]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, Univ. Tokyo)

【目的】アコヤガイ貝殻稜柱層は主に炭酸カルシウムのカルサイト結晶から構成される。有機基質の枠組みで区切られた一つの稜柱構造には、複数のカルサイト結晶が含まれるが、単結晶のカルサイトの内部においても有機物のネットワークが存在することが、これまでの研究から明らかになった。この有機物のネットワークがカルサイト結晶内の小角粒界を形成し、結晶に歪みを与えることで劈開での断裂を防ぎ、貝殻の強度を高める作用があると考えられている。しかし、このような小角粒界を多く含むカルサイト結晶の形成機構は未だ不明である。そこで、本研究では、稜柱層のカルサイト結晶の内部から有機物ネットワークを抽出し、そこに含まれる有機基質を明らかにすることで、その形成メカニズムを明らかにすることを目的とした。
【方法】稜柱層を次亜塩素酸で処理し、カルサイト結晶間の有機物を除去した。残った結晶を酢酸で脱灰して酸可溶性成分と酸不溶性成分に分離した。さらに酸不溶性画分をSDS/DTT溶液で煮沸し、結晶内有機基質抽出画分を得た。結晶内有機基質抽出画分と酸可溶性画分をSDS-PAGEに供し、結晶内有機基質抽出画分のみに見られたバンドを見出し、LC/MS/MSを用いてバンドに含まれるタンパク質の同定を行った。次に、塩化カルシウムを含むキチンゲルを作製し、*in vitro*でのキチンゲル内での炭酸カルシウム結晶形成実験を行った。
【結果】結晶内有機基質抽出画分において、高分子側に特異的なバンドが観察された。このバンドに含まれるタンパク質について LC/MS/MS によるアミノ酸配列解析を行ったところ、キチナーゼ、キトビアーゼ、そして BLAST 検索において相同な配列が見い出せない新規の酸性タンパク質の複合体であることが判明した。アコヤガイ稜柱層では有機基質の骨格となる成分はキチンであると考えられており、今回得られたキチナーゼやキトビアーゼがキチンに作用して、そのキチン繊維の太さを調節することで、カルサイト結晶に含まれる小角粒界の形成に何らかの影響を与えていると推測された。そこで、キチナーゼ、キトビアーゼ活性を有するヤタラーゼを用いてキチンゲルを処理し、キチン繊維を細くした状態で、ゲル内で炭酸カルシウム結晶形成実験を行った。その結果、酵素処理をしていないキチンゲル内では通常の菱面体カルサイト結晶が多数形成されキチンの繊維が結晶の形成に何の影響も与えなかったのに対し、酵素で 24 時間処理したゲルでは細くなったキチン繊維が結晶の内部に入り多結晶体を形成した。このことからキチナーゼやキトビアーゼが貝殻内でキチン繊維の太さを調整することで、有機物ネットワークの結晶形成に与える影響を制御している可能性が示唆された。

biomineralization, calcite, chitin

講演番号：3A06p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ A 校舎 06 会場

軟体動物の貝殻形態形成に関与するキチナーゼの解析

Study on chitinases related to the molluscan shell formation

○米澤 舞[1]、小暮 敏博[2]、作田 庄平[1]、鈴木 道生[1] ([1]東大院農、[2]東大院理)
○Mai YONEZAWA[1], Toshihiro KOGURE[2], Syohei SAKUDA[1], Michio SUZUKI[1] ([1]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, Univ. Tokyo, [2]Graduate School of Science, Univ. Tokyo)

【目的】軟体動物における巻貝の貝殻は、成長と共に螺旋が何重にも巻いた構造をしており、螺旋の内部の殻は非常に薄くなることが知られている。これは成長した生体部を収納する空間を確保するためであると考えられ、厚く石灰化した貝殻を再度溶かす機構の存在が予想される。これまで軟体動物の貝殻形成において、貝殻の石灰化に関与する生体有機分子についての報告は数多くあるが、その溶解に関与する分子についての報告はほとんど見られず、貝殻の脱石灰-再石灰化機構については明らかになっていない。そこで本研究ではモノアラガイ（Lymnaea stagnalis）を実験材料として、貝殻の溶解の機構を明らかにすることを目的とする。貝殻の石灰化はキチンを足場としていることより、キチンの分解に関与するキチナーゼに着目し、貝殻あるいは外套膜に発現しているキチナーゼについて解析を行った。
【方法】モノアラガイの殻を酢酸で脱灰し、得られた酸可溶性成分を限外ろ過で脱塩、濃縮し、貝殻抽出液を得た。この貝殻抽出液に対して 4-MU を用いたキチナーゼの活性測定を行った。また、同時にキチナーゼの阻害剤であるアロサミジンを添加し、阻害の効果を確認した。同時に、この貝殻抽出液を SDS-PAGE に供し、グリコールキチンを含むゲル内で酵素反応を行った後、calcofluor で蛍光染色することで、キチンを分解する活性を有するバンドの確認を行った。次にアコヤガイや他の貝のもつキチナーゼのアミノ酸配列を基にホモロジークローニングを行い、モノアラガイのキチナーゼ遺伝子の cDNA 配列の決定を行った。またアロサミジン溶液中で稚貝を飼育し、その貝殻形態に変化がないか観察した。
【結果】モノアラガイ貝殻酸可溶性画分にキチナーゼ活性を確認し、この活性はアロサミジンによって阻害されることが明らかとなった。また、ゲル内での活性染色の結果、貝殻可溶性画分にキチナーゼ活性を有する約 28 kDa のバンドが存在した。また外套膜から調製した cDNA を用いて、2 種類のキチナーゼ遺伝子 chi-Ⅰ、chi-Ⅱをクローニングした。chi-Ⅰは外套膜での発現が低く、足で発現が高かった。一方、chi-Ⅱは外套膜を含むいくつかの組織で発現が多く見られた。さらにアロサミジン溶液中で、モノアラガイの幼生および稚貝を飼育し、その貝殻の形態の変化を観察しているところである。

biomineralization, chitinase, Lymnaea stagnalis

講演番号：3A06p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ A 校舎 06 会場

イボタガ（カイコガ上科イボタガ科）の性フェロモンの同定と野外誘引試験

Sex pheromone of the Japanese owl moth, *Brahmaea japonica* (Bombycoidea: Brahmaeidae): Identification and field attraction

○熊野谿 明子[1]、中 秀司[2]、鐘ヶ江 明子[1]、宮地 崇司[1]、安藤 哲[1] ([1]東京農工大院 BASE、[2]鳥取大学)

○Akiko Kumanotani[1], Hideshi Naka[2], Akiko Kanegae[1], Takashi Miyachi[1], Tetsu Ando[1] ([1]Tokyo Univ. Agriculture and Technology, [2]Tottori Univ.)

【目的】カイコガ上科イボタガ科は世界でも約 20 種からなる小さなグループで、日本ではイボタガ（*Brahmaea japonica*）の一属一種のみが知られている。owl moth との英名が示すように 10 cm ほどの大型な成虫は特徴的な眼状紋のある外見を有し、この種がどの様に独自の進化を遂げてきたかは非常に興味のあるところである。そこでこの種の分化を考えるための 1 つのツールとして、生殖に関わり高い種特異性が予想される性フェロモンの化学構造を解明することとした。

【方法と結果】野外で採集した交尾雌から採卵し、イボタの葉を用いて幼虫を飼育した。雌雄それぞれ 5 頭ほどの成虫が得られ、それらを材料に実験を行った。まず雌のフェロモン腺抽出物（0.5 頭分）を GC-EAD 分析に供したところ、EAG 活性を示す 3 成分（Ⅰ～Ⅲ）の存在が示された(図 1、Ⅰが主成分)。同様に 0.5 頭分の抽出物を用いた GC-MS 分析の結果、Ⅰは炭素数 16 のモノエンアルデヒド、ⅡとⅢは炭素数 16 のジエンアルデヒドであることが判明した。合成標品の Rt との比較からⅠは(*Z*)-11-hexadecenal（Z11-16:Ald）であることが、また、ⅡとⅢのマススペクトルには特長的な *m/z* 82 と 95 の開裂イオンが存在することから、それらは 11,13-ジエン構造を有していることが推定された。

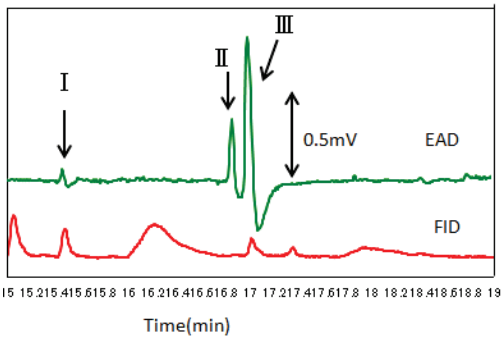


図 1：GC-EAD 分析の結果(0.5 頭分)

そこで、アセチレン化合物のホルミル化や Wittig 反応を利用し、(11*Z*,13*E*)-体と(11*Z*,13*Z*)-体の標品の合成を行ったところ、それらのマススペクトルは天然成分のものと一致する結果が得られた。その後、別途合成した幾何異性体を含めて Rt を比較し、Ⅱは(11*Z*,13*E*)-11,13-hexadecadienal (Z11,E13-16:Ald)で、Ⅲはその(11*Z*,13*Z*)-体 (Z11,Z13-16:Ald) であることが明らかになった。以上の同定結果を踏まえ、合成化合物を用いて鳥取県鳥取市において 2013 年 4 月に野外誘引試験を行った。その結果、雄蛾は成分Ⅲである Z11,Z13-16:Ald のみの誘引源にも特異的に誘引され、その同定結果を裏付けることができた。一方、Z11,Z13-16:Ald に、主成分である Z11-16:Ald や、もう一つの微量成分として考えられた Z11,E13-16:Ald を加えても誘引数は増加しなかった。Z11,Z13-16:Ald は、同じカイコガ上科に属するスズメガ科の昆虫からすでに同定されている化合物であり、さらに分類学上離れたメイガ上科の昆虫などにおいても性フェロモン成分として報告されている。今後、更に誘引試験を重ね、成分ⅠやⅡの働きを明確にする予定である。

insect pheromone, Lepidoptera, GC-MS

講演番号：3A06p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ A 校舎 06 会場

アワダチソウグンバイ *Corythucha marmorata* 成虫分泌物の性フェロモン活性
Sex pheromone activity of the secretion from adult chrysanthemum lace bugs, *Corythucha marmorata*
○渡邊 綺咲、清水 伸泰（京都学園大バイオ環境）
○Kisaki WATANABE, Nobuhiro SHIMIZU (Kyoto Gakuen Univ.)

【目的】アワダチソウグンバイ *Corythucha marmorata* は北米原産の侵入害虫であり，平成 12 年に兵庫県のセイタカアワダチソウで初めて発生が確認されて以来，西日本から東日本へと分布を拡大している．セイタカアワダチソウ以外ではヒマワリやキク等のキク科植物をはじめ，ナスでも被害が報告されている．アワダチソウグンバイの成虫は体長約 3 mm で軍配に似た形状をしていて，特徴的な褐色斑をもつ．終齢の若虫は体長約 2 mm で，全身が褐色の紡錘形で多数の棘を有する．交尾行動は，雄が雌の背中に乗って体を上下に振ることから始まり，それからしばらくして交尾に至る．本研究では，成虫が分泌する化合物に着目し，その化学構造を決定するとともに性フェロモン活性を検討した．また，分泌化合物と食草中に含まれる化合物との成分比較を併せて行った．
【方法と結果】成虫から分泌される化合物を分析する目的で，虫体をヘキサンに 3 分間浸漬し，抽出液をそのまま GC-MS で分析した．雌雄ともに特徴的な化合物を検出し，そのマススペクトルからモノテルペンの borneol と推定した．標品の保持時間とマススペクトルは天然物と完全に一致したことから，雌雄分泌成分を borneol と同定した．虫体の抽出物を用いた予備的な生物試験から，雄が雌の背中に乗る行動が活発化するのを確認できたため，標品を用いて性フェロモン活性を測定した．生物試験では雄を対象として，特定の濃度の borneol を塗布した 5 mm 四方のろ紙片を，静止したアワダチソウグンバイに供試し，背中に乗って体を振る行動をカウントした．その結果，特定の濃度に対して顕著な性フェロモン活性を示した．また，雌に対しても同様の試験を行ったが，顕著な行動は確認できなかった．これらのことから分泌量に多少の違いはあるものの，雌雄共に borneol を分泌しており，雄が性フェロモンとして利用していることが判明した．さらに本研究では，食草に含まれる成分を分析し，性フェロモンの由来についても検討したので，その結果を併せて報告する．

Sex pheromone, lace bug, *Corythucha marmorata*

講演番号：3A06p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ A 校舎 06 会場

Reexamination of the Female Sex Pheromone of the Sweetpotato Vine Bore Moth: Identification of Tricosatriene and Its Field Evaluation

○Qi YAN[1], Le Van Vang[2], Tetsu Ando[1] ([1]BASE, Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]Department of Plant Protection, Can Tho University)

The sweetpotato vine borer moth, *Omphisa anastomosalis* Guenée (Lepidoptera: Pyraloidea: Crambidae: Pyraustinae), is a serious pest in tropical and subtropical Asia-Pacific regions. From a Okinawa population, Wakamura *et al.* have identified (10*E*,14*E*)-10,14-hexadecadienal (E10,E14-16:Ald) as a main pheromone component in addition to (*E*)-10- and (*E*)-14-hexadecenals as minor components, but traps baited with the synthetic compounds were less effective on male attraction in the field than that of the virgin females [*Appl. Entomol. Zool.*, 45, 635 (2010)]. While Pyraloidea females usually produce only Type I compounds with a terminal functional group, mating communication of some Pyraloidea species are interestingly mediated by a combination of the Type I compounds and unsaturated hydrocarbons classified into Type II compounds without a terminal group. Based on this knowledge, we examined the pheromone of the females inhabiting Vietnam by GC-MS, and successfully found (3*Z*,6*Z*,9*Z*)-3,6,9-tricosatriene (Z3,Z6,Z9-23:H) in a pheromone gland extract of the virgin females. A mixture of synthetic E10,E14-16:Ald and Z3,Z6,Z9-23:H could effectively attract the males in a Vietnamese field, indicating the strong synergistic effect of the Type II compound. On the field test with synthetic monoenyl aldehydes, mixing of the minor pheromone components to the binary blend did not increase the numbers of male moths captured. Combination of Z3,Z6,Z9-23:H and another geometrical isomer of E10,E14-16:Ald scarcely attracted the males. This result confirmed 10*E*,14*E* configuration of the natural dienyl component. We are evaluating now activities of other unsaturated hydrocarbons, such as 3,6,9-trienes with a different chain length and 3,6,9,12,15-pentaenes, in order to make clear whether Z3,Z6,Z9-23:H is a specific synergist for male attraction of *O. anastomosalis*. The identification of a highly attractive sex pheromone will help in developing efficient strategies for monitoring and control of *O. anastomosalis* populations in sweetpotato fields.

Sex pheromone, Omphisa anastomosalis, (3Z,6Z,9Z)-tricosatriene

講演番号：3A06p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ A 校舎 06 会場

ヒロヘリアオイラガ幼虫分泌液由来の発疹誘起物質

A rash caused by the peptide of slug caterpillar (*Parasa lepida*) venom

○野呂 真奈美、平川 祥成、水谷 祐輔、西尾 昌洋、今井 邦雄、勝崎 裕隆（三重大院生資）
○Manami NORO, Yoshinari HIRAKAWA, Yusuke MIZUTANI, Masahiro NISHIO, Kunio IMAI, Hirotaka KATHUZAKI (Mie Univ.)

＜背景・目的＞

ヒロヘリアオイラガ(*Parasa lepida*)はチョウ目イラガ科の昆虫であり、幼虫の体表には多数の棘が存在する。イラガの幼虫に刺されると痛みや痒みを伴う発疹を生じるが、この原因として考えられているのが棘の先端から出す分泌液である。しかし、分泌液内のどの成分が作用しているかは未解明である。一方、当研究室では過去にヒロヘリアオイラガの分泌液からペプチドである Iratin Pll-1 が単離、構造決定された。そこで本研究では、この Iratin Pll-1 の化学合成を行い、また発疹活性について検討することを目的とした。

＜方法・結果＞

ヒロヘリアオイラガの分泌液は棘から分泌されたものをキャピラリーで採取し、超純水に溶解した。採取した分泌液は逆相 HPLC のグラジエント溶出で分取を行った。保持時間 101 分のピークを LC-MS（ESI）で質量分析したところ、Iratin Pll-1 の分子量と一致した。次に Iratin Pll-1 の化学合成を行った。鎖状ペプチドの合成には固相法を適用した。その後鎖状ペプチドをグルタチオンによって還元化し、ジスルフィド結合を形成した。逆相 HPLC で合成物を精製した後、質量分析したところ天然物の Iratin Pll-1 と分子量が一致した。天然物と合成物が一致しているか確認するために、co-injection による HPLC 分析を行ったところ、1 本のピークになった。次に酵素によるペプチドの断片化をして HPLC、LC-MS で分析したところ、天然物と合成物は同じような挙動を示した。これらの結果から天然物と合成物は同一であると判断した。

Iratin Pll-1 が発疹を誘起する物質であるか調べるためにウサギを用いて発疹活性測定を行った。発疹活性測定はウサギの耳裏に皮内注射して発疹が生じるかどうかを観察するという手法を用いた。まず、分泌液から採取した天然物の Iratin Pll-1（濃度未定）をウサギの耳裏に皮内注射したところ、3 時間後に発疹が確認された。次に合成物の Iratin Pll-1（10μM 50μL）を皮内注射したところ、3～6 時間後に発疹が確認された。この結果から、Iratin Pll-1 がウサギに対して発疹を誘起する物質であることが判明した。

slug caterpillar (*Parasa lepida*), rash

講演番号：3A06p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ A 校舎 06 会場

スクミリンゴガイ卵塊の化学防御機構に関する研究
Study on the Unpalatability factors in the egg mass of *Pomacea canaliculata*
○安部 洋生、奥 直也、五十嵐 康弘（富山県大・生工研セ）
○Hirowo ABE, Naoya OKU, Yasuhiro IGARASHI (Biotech Res Center Toyama Pref Univ.)

【目的】スクミリンゴガイは南米より帰化した大型のタニシである。日本には、1980 年代前半に食用として台湾経由で輸入され野生化した。本種が稲の幼苗に食害するため、アジア各国で大きな問題とされている。このタニシは、水上の植物や側溝などに卵塊を産み付ける。この卵塊は大きさが 3～4 ㎝程度、非常によく目立つピンク色をしており、ある種のアリやヤスデを除いて捕食されない。卵塊を実際に味わうと咀嚼して 30 秒ほどで喉の奥に苦味を感じる。これらの事から、卵塊の色彩は警戒色として機能しており、苦味は捕食忌避効果を担うことが予想されている。また、卵は産卵されてから約 2 週間で孵化するが、その間腐敗することはない。これは、卵塊に微生物汚染の防御物質が含まれているためと考えられる。そこで、未利用資源の有効活用を目指す一環として、スクミリンゴガイ卵塊より忌避作用の物質的本体と考えられる苦味成分および微生物生育阻害成分の同定を試みた。
【方法及び結果】まず苦味物質が、卵殻もしくは卵細胞質のどちらに存在するか調べるため、凍結した卵塊(2.68 g)をスパーテルを用いて破砕後、遠心分離で卵細胞質部分と卵殻部分に分離し、官能試験に供した。その結果、卵細胞質画分のみに苦味を感じた。卵細胞質を水で希釈後、*n*-BuOH で脂溶性成分を抽出した。水層が苦味を呈した事から、苦味成分は水溶性であることが明らかとなった。凍結卵塊(43.8 g)の一部より得た水層(3.63 g)をイオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーにて精製を進め、苦味画分を得た。NMR 及びサイズ排除クロマトグラフィーの結果から苦味物質は高分子であることが予想されたため、SDS-PAGE に供した結果、分子量 29～39 kDa の間に 2 つのスメアなバンドを得た。

一方、分画初期に得られた *n*-BuOH 抽出物に対して溶媒分画を行い、ヘキサン層、90 %メタノール層、60 %メタノール層の 3 画分を得た。これらをカビ 2 株、酵母 2 株、グラム陽性菌 4 株、グラム陰性菌 1 株からなる 9 種の検定菌に対する抗微生物試験に供したところ、90 %メタノール画分に酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に対する活性を得た。活性を指標にゲルろ過クロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて分画を進めた結果、活性画分に脂肪酸を得た。現在、さらなる精製を進めている。

Pomacea canaliculata, Unpalatability factors, fatty acid

講演番号：3A06p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ A 校舎 06 会場

シロカイメンタケに含まれる炎症抑制物質
Anti-inflammatory compound(s) from Piptoporus soloniensis

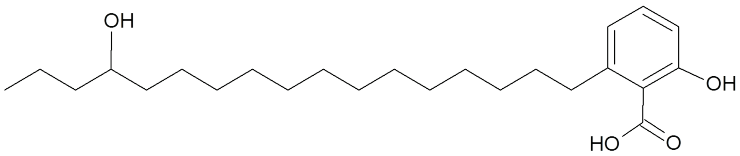
○野村 瑞樹、廣田 満（信州大院農）
○Mizuki Nomura, Mitsuru Hirota (Shinshu Univ.)

【目的】 私たちは，TPA によって起こる炎症を抑制する化合物の探索を行っている。最近，野生きのこのスクリーニングで, シロカイメンタケ(*Piptoporus soloniensis*)に炎症抑制作用を認めたことから，このきのこに含まれる炎症抑制物質の精製，単離を試みた。

【方法と結果】シロカイメンタケの子実体 (F.W. 65.7 g)をメタノールにて抽出し，得られた抽出物をトルエン/水，次いで酢酸エチル/水で分配することにより，トルエン可溶部 (1.88 g)および酢酸エチル可溶部 (170 mg)を得た。トルエン可溶部をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し，化合物 **1** (52.4 mg)を単離した。

化合物 **1** の FABMS は m/z 391.2794 に$[M-H]^-$のイオンピークを示したことから，**1** の分子式は $C_{24}H_{40}O_4$ であると考えられる。また，^{1}HNMR，^{13}CNMR および二次元 NMR から，**1** はアルキル側鎖を持つオルトヒドロキシ安息香酸であり，アルキル側鎖上には一つのヒドロキシ基が存在すると推定される。側鎖上のヒドロキシ基の位置は，**1** をメチル化した後，Dess-Martin 酸化によりケトンに変換し，二次元 NMR を用いて決定した。**1** は 2-hydroxy-6-(14-hydroxyl-heptadecanoyl)benzoic acid であると決定した。

1 は，マウスを用いた炎症抑制試験において，500μg の塗布で TPA による炎症を 51% 抑制した。



2-Hydroxy-6-(14- hydroxy-heptadecanoyl)benzoic acid (**1**)

Anti-inflammation, Piptoporus soloniensis, TPA

講演番号：3A06p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ A 校舎 06 会場

エノキに含まれるオオムラサキの産卵刺激物質
Oviposition stimulants of a nymphalid butterfly ,*Sasakia charonda*, in the *Celtis sinensis* elm tree.
○和田 篤史、中出 彩、小野 肇、吉永 直子、森 直樹、西田 律夫（京大院農・応用生命）
○Atsushi WADA, Aya NAKADE, Hajime ONO, Naoko YOSHINAGA, Naoki MORI, Ritsuo NISHIDA (Kyoto Univ)

【背景・目的】

日本の国蝶であるオオムラサキ *Sasakia charonda* (タテハチョウ科)はエノキ *Celtis sinensis* ver. *japonica* (ニレ科) を寄主としている. 本種の雌成虫は前肢の跗節先端にある味覚感覚子でエノキの葉に接触することにより寄主植物特有の成分を認識している. エノキ葉のエタノール抽出物を染み込ませた濾紙を雌成虫に差し出すと産卵行動を誘導できることから，エノキに含まれるオオムラサキの産卵刺激物質を追究した.

【方法・結果】

エノキ葉のエタノール抽出物を酢酸エチル - 水で分液し得られた水層を ODS カラムで分画し，各画分の産卵刺激活性を検定した［産卵反応率 : H_2O 画分 (33 %) ; 40% MeOH 画分 (65%)］. 40% MeOH 画分を HPLC で分析したところ主に 2 種類のフラボノイド配糖体で構成されていた. この 2 種類のフラボノイド配糖体を LCMS および NMR スペクトルで分析したところ，一つは $[M + H]^+ = 433$ であり isovitexin (apigenin 6-*C*-glucoside) であることが判明した. もう一つは $[M + H]^+ = 565$ であり apigenin 二配糖体 ($C_{26}H_{28}O_{14}$) であることが判明した.

これらのフラボノイド配糖体を産卵試験に供したところ，isovitexin 自体には活性がみられなかったが H_2O 画分と混合することにより有意な協力作用を示した［産卵反応率：H_2O 画分 (33 %) ; isovitexin (0%) ; isovitexin + H_2O 画分 (62%)，χ^2 検定 $P < 0.05$］. このことから isovitexin は産卵刺激物質の 1 成分であると結論した.

一方， apigenin 二配糖体は単独で 30% の産卵反応率を示し，H_2O 画分と混合すると有意差は認められなかったが 46% に上昇した. そのため apigenin 二配糖体も産卵刺激物質の一つである可能性が示唆された. この 2 種類のフラボノイド配糖体を混合して産卵試験を行った結果，apigenin 二配糖体同程度の低い活性しかみられず， 40% MeOH 画分の産卵反応率 65% と比較して低かった. このことから 40% MeOH 画分には他にも産卵刺激因子が含まれていると考えられた.

oviposition stimulant, host selection, butterfly

講演番号：3A06p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ A 校舎 06 会場

花粉に含まれる蛍光物質の化学生態学

Chemical ecology of fluorescent compounds in flower pollens

○森 信之介[1]、大石 雅典[1]、(故)福井 宏至[2]、(故)後藤 勝実[3]、月岡 淳子[3]、佐久間 正幸[1]、平井 伸博[1] ([1]京都大院農、[2]香川大名誉教授、[3]京都薬科大附属薬用植物園)
○Shinnosuke MORI[1], Masanori OISHI[1], Hiroshi FUKUI[2], Katsumi GOTO[3], Junko TSUKIOKA[3], Masayuki SAKUMA[1], Nobuhiro HIRAI[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Prof. emeritus of Kagawa Univ., [3]Garden Med. Plants, Kyoto Pharm. Univ.)

【目　的】

多くの植物の花粉が紫外線照射の下で蛍光を発することが発表者の一人・福井によって見出されている。葯は多くの場合、花の外側へ突出しているため花粉中の遺伝子は紫外線障害の危険性に強く曝されている。蛍光は吸収した光のエネルギーの一部を熱として、残りをより長波長の光に変換して発光する現象であることから、遺伝子を紫外線による損傷から保護する機能があると推定される。さらに昆虫が花粉を視認することに役立っている可能性も考えられる。花粉に含まれる蛍光物質はこれまでほとんど研究されていない。そこで本研究は蛍光物質の機能解明を目的として、蛍光物質の単離・構造決定と、昆虫を使った行動実験を行った。

【結果と考察】

実験材料のスクリーニングのため、蛍光を示す花粉あるいは葯を複数の植物から採取し、それらのメタノール抽出物の紫外線下での蛍光を調べた。その結果、強い青白色蛍光を示すヘラオオバコ（オオバコ科 *Plantago lanceolata*）とオニナベナ（マツムシソウ科 *Dipsacus fullonum*）の葯を実験材料として選んだ。蛍光を指標としてヘラオオバコ葯のメタノール抽出物を精製し、アグリコンとして caffeoyl 基と phenylethoxy 基を含む配糖体 acteoside を主蛍光物質として同定した。Acteoside は励起極大波長（Ex）を 374 nm に、蛍光極大波長（Em）を 455 nm に示し、葯中の含量は約 20 mg/g FW であった。オニナベナ葯のメタノール抽出物も同様に精製し、主蛍光物質を 3,5-dicaffeoylquinic acid（3,5-diCQA）と同定した。3,5-diCQA は Ex を 368 nm、Em を 452 nm に示し、葯中の含量は約 44 mg/g FW であった。両化合物の Em は、共通する部分構造である caffeoyl 基に由来しており、花粉（葯）が紫外線下で示す青白色蛍光の波長域と一致した（caffeic acid: Ex 371 nm, Em 443 nm）。また、両化合物は caffeoyl 基に由来すると考えられる抗酸化活性を有しており、花粉に含まれる蛍光物質が紫外線から遺伝子を保護するための抗酸化剤として機能していることを支持している。昆虫の蛍光視認能力を調べるために、セイヨウミツバチ（*Apis mellifera*）を用いて行動実験を行った。野外太陽光の下でショ糖水溶液を入れた給餌器の上に 10 mg/g の caffeic acid 含有ろ紙と含ませないろ紙を置き、それぞれに訪れた個体数を計測したところ、caffeic acid 含有ろ紙には caffeic acid を含まないものよりも 2 倍以上多くの個体が訪れた。この結果は、花粉中の蛍光物質が虫媒花と訪花昆虫の相利共生にも寄与していることを示唆している。

Fluorescent compounds, Pollens, Honeybees

講演番号：3A06p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ A 校舎 06 会場

紫外線照射イネ葉からの新規ファイトカサン類縁体の同定

Identification of a novel phytocassan-like compound from UV-irradiated rice leaves

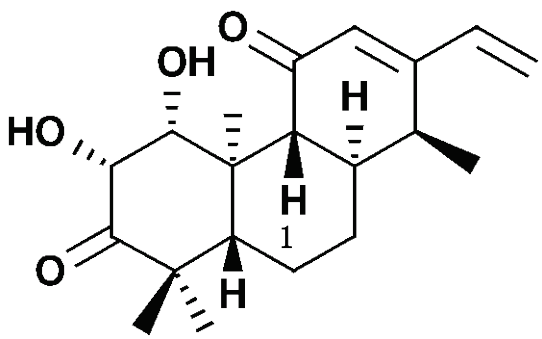
井上 靖乃[1]、堀江 清孝[2]、戸嶋 浩明[1,2]、○長谷川 守文[1,2] ([1]茨城大農、[2]東京農工大院連農)
Yasuno INOUE[1], Kiyotaka HORIE[2], Hiroaki TOSHIMA[1,2], ○Morifumi HASEGAWA[1,2] ([1]Ibaraki Univ., [2]TUAT)

【背景および目的】

イネのフィトアレキシンはジテルペンであるモミラクトン類・オリザレキシン類・ファイトカサン類，フラバノンであるサクラネチンの計 15 種類が知られていたが，最近，演者らはジテルペン系フィトアレキシンとして新たに *ent*-10-oxodepressin を同定した．*ent*-10-Oxodepressin は従来知られていたイネのジテルペン系フィトアレキシンとは異なる casbane 骨格を有しており，イネのストレス誘導性二次代謝産物が予想以上に多様であることが明らかとなった．本研究では，フィトアレキシンを簡便に蓄積させる方法である紫外線照射処理を行ったイネ葉片からストレス誘導性化合物の探索を行い，さらに新たなフィトアレキシンやその関連化合物（生合成中間体や代謝産物）を同定することを目的とした．

【方法および結果】

ファイトトロンにおいて播種後 1～3 ヶ月生育させたイネから葉身を切り取り，紫外線殺菌灯を 20 cm の距離から 20 分間照射することによって紫外線照射処理を行った．処理後のイネ葉は湿度を保った状態で連続光下，26℃でインキュベートした．紫外線照射イネ葉と対照区である紫外線未照射イネ葉のメタノール抽出物を LC/ESI-MS によって分析し，紫外線照射イネ葉においてのみ特異的に観測されるピークを探索した．紫外線照射後 2 日間インキュベートしたイネ葉において，*m*/*z* 333 のイオンを示すピークが特異的に検出されたので，このピークを指標に物質の単離を行った．紫外線照射後 2 日間インキュベートしたイネ葉 400 g の 80%メタノール抽出物から各種クロマトグラフィーによって 1.9 mg の化合物 1 を単離した．化合物 1 の分子式は高分解能質量分析により $C_{20}H_{28}O_4$ と推定された．各種 NMR スペクトルによる構造解析の結果，化合物 1 をファイトカサンの類縁体である 1α,2α-dihydroxy-*ent*-12,15-cassadiene-3,11-dione と同定した．化合物 1 はイネいもち病菌胞子発芽阻害活性および発芽管伸長阻害活性をほとんど示さなかったため，これ自体はフィトアレキシンではなく，ファイトカサン類の活性のない代謝産物であると考えられる．



rice, diterpene, phytoalexin

講演番号：3A06p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ A 校舎 06 会場

ストリゴラクトン分子の起源-カロテノイド光酸化仮説-
Is the origin of strigolactones a photo-oxidation product of carotenoids?
○寺本 匡[1]、米山 弘一[2]、秋山 康紀[3]、山口 信次郎[4]、眞岡 孝至[5]、平井 伸博[1] ([1]京都大院農、[2]宇都宮大雑草科学研セ、[3]大阪府大院生命環境、[4]東北大院生命科学、[5]生産開発研)
○ Tadasu TERAMOTO[1], Koichi YONEYAMA[2], Koki AKIYAMA[3], Shinjiro YAMAGUCHI[4], Takashi MAOKA[5], Nobuhiro HIRAI[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Weed Sci. Center, Utsunomiya Univ., [3]Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [4]Grad. Sch. Life Sci., Tohoku Univ., [5]Res. Inst. Prod. Develop.)

【目的】ストリゴラクトンは根寄生植物の種子発芽刺激物質として発見されたアポカロテノイド系植物ホルモンであり、アーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導作用や植物の枝分かれ抑制作用を有している。ストリゴラクトンの生合成経路として、 β-carotene の異性化と酸化により carlactone が生じ、それがストリゴラクトンに変換される経路が提案されている。ストリゴラクトンの他に β-carotene から生合成される植物ホルモンとしてアブシジン酸 (ABA)が知られており、その生合成中間体の xanthoxin は violaxanthin の光酸化によって *in vitro* で非酵素的に生じることが報告されている。このことはストリゴラクトンあるいは carlactone も同様に β-carotene の光酸化によって生じ、それがストリゴラクトン分子の起源となった可能性を示している。本研究ではこの仮説を検証するために、実際に β-carotene の光酸化によりストリゴラクトン様の生理活性物質が生じるか否かを調べることを目的とした。
【方法と結果】ストリゴラクトン活性は、根寄生植物のヤセウツボ (*Orobanche minor*)を用いた種子発芽試験により検出した。β-Carotene の光酸化は、ろ紙に含ませたβ-carotene をメタルハライドランプを用いて 30,000 lx、37℃で光照射することによって行った。ろ紙を経時的にサンプリングして MeOH-EtOAc (1:1)で抽出した。抽出物中のβ-carotene は急速に減少し、48 hr 照射後には元の 10%になった。一方、抽出物のヤセウツボ種子発芽活性はβ-carotene の減少に反比例するように上昇し、48 hr 照射後の発芽率は 80%に達した。このことは、β-carotene の光酸化によってストリゴラクトン様活性物質が生じたことを示している。この活性成分を同定するために、β-carotene 光酸化物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc-Toluene) にて精製したところ、5 %および 10 % EtOAc 溶出区に強い活性が認められた。10% 溶出区を ODS カラムを用いて分取 HPLC (水-MeOH) で精製したところ、 MeOH 水溶液中での減圧濃縮により活性はほとんど消失した。この不安定な性質はストリゴラクトンに酷似している。活性成分は超微量のため、現在、大量の β-carotene を太陽光照射し活性成分の精製を進めている。なおβ-carotene の光酸化物として、dihydroactinidiolide と 7,7-dimethyl- 6,7-dihydroisobenzofuran-1,4 (3H,5H)-dione (新規)を単離同定したが、これらには種子発芽活性は認められなかった。発芽活性成分のアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導活性および枝分かれ抑制活性ならびにβ-carotene 以外のカロテノイド光酸化物のストリゴラクトン活性も調べる予定である。

strigolactones, photo-oxidation, carotenoids

講演番号：3A06p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ A 校舎 06 会場

シモクレン（*Magnolia liliiflora*）花被に含まれる生理活性物質
Bioactive substance from flower petal of *Magnolia liliiflora*
○上石 和樹[1]、佐久間 裕貴[1]、板垣 和幸[1]、武山 佳代[1]、塩野 義人[1]、貫名 学[1]、木村 賢一[2]、村山 哲也[1]([1]山形大院農、[2]岩手大院農)
○Kazuki Ageishi[1], Yuuki Sakuma[1], Kazuyuki Itagaki[1], Kayo Takeyama[1], Yoshihito Shiono[1], Manabu Nukina[1], Ken-ichi Kimura[2], Tetsuya Murayama[1] ([1]Yamagata Univ., [2]Iwate Univ.)

（背景）モクレン科植物の蕾を乾燥させて作る辛夷は、漢方薬の材料として古くから用いられてきた。そのため成分の研究も多くなされており、lignan や neolignan、sesuquiterpene 等の様々な生理活性物質が報告されている。そのようなモクレン科植物の中で、シモクレンは比較的研究報告が少ない。これは辛夷の材料として近縁種のハクモクレンやコブシなどの蕾が多く使われる傾向にあるためと考えられる。また、開花後の花被は辛夷に用いられないため、研究報告はほとんど無い。これらの背景から、シモクレンの開花後の花被には蕾と同等の生理活性を有し、且つ、新規の構造を持つ化合物が存在する可能性があると考えた。そこで本研究では、一次スクリーニングとしてレタス種子の発芽・成長調節試験を用い生理活性物質の探索を行った。
（方法と結果）シモクレン花被（F.w13.0ｋg）をメタノールに浸漬し、減圧濃縮を行い、メタノール抽出物（470ｇ）を得た。これをヘキサン、酢酸エチル、メタノール、水を用いて分配した。これらの画分を生理活性試験にかけたところ、ヘキサン画分と酢酸エチル画分において比較的強い成長阻害活性が見られた。そこで、この 2 つの画分から活性物質の探索を行うこととした。Sephadex-LH20 カラム、順相シリカゲルカラム、ODS カラム等を用いて活性物質の単離を試みた。
（結果）活性物質 1～5 を単離した。1 は 1～5 の中で最も強い活性を示し、50ppm の濃度でレタス種子の発芽を完全に阻害した。現在 HMQC、HMBC 等により平面構造を検討中である。2～5 は、500ppm の濃度でレタス幼胚軸・幼根の成長を 50～80%阻害した。これらは 1H、13C-NMR スペクトルより、neolignan 類であることが示唆された。また、HMQC、HMBC により 2～5 の平面構造を推定した。2 は 1H-NMR スペクトルにおいて 9 位のメチル基が 0.6ppm と非常に高磁場に現れていた。lignan や neolignan において 9 位のメチル基のピークが 1.0ppm 以下に現れている例は少ない。現在 NOE 測定により立体構造を検討中である。同様に 3～5 も立体構造を検討中である。
1～5 は、構造を決定次第、レタス種子以外の生理活性試験も行うのでその結果も合わせて報告する予定である。

Magnolia liliiflora, Neolignan, NMR

講演番号：3A06p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ A 校舎 06 会場

気孔分化を調節する stomagen の普遍性に関する研究

Studies on the generality of stomagen that controls stomatal differentiation

○西澤 美智[1]、村上 一馬[2]、入江 一浩[2]、坂神 洋次[1]、近藤 竜彦[1] ([1]名大院生命農、[2]京大院農)
○Michi NISHIZAWA[1], Kazuma MURAKAMI[2], Kazuhiro IRIE[2], Youji SAKAGAMI[1], Tatsuhiko KONDO[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Kyoto Univ.)

現在地球上に存在する植物の中で、シダ植物以降に派生したほとんどの植物種の表皮において気孔は観察することが出来る。通常植物の表皮細胞において気孔は偏りなく均等に分布しており、このような気孔の均一な分布は、気孔分化に関する精密な制御システムのはたらきによる。近年、この気孔分化を制御する因子が相次いで発見されており、この中でも、stomagen は気孔分化を正に制御するペプチドホルモンとして当研究室で同定された。これまでの前任者の研究によりシロイヌナズナにおける stomagen の構造や機能が明らかとなったが、シロイヌナズナ以外の植物における stomagen の機能には不明な点が多い。そこで本研究では、シロイヌナズナ以外の植物の stomagen オルソログを合成し、その機能を解析することで stomagen の普遍性について調べた。

はじめに、公開されている植物ゲノムデータベースに対して *STOMAGEN* オルソログの探索を行った。その結果、シダ植物以降に派生した全ての植物種が *STOMAGEN* オルソログを持つことが明らかとなった。我々は、この中でシロイヌナズナと同じアブラナ科に属するハクサイと、stomagen と相同性の非常に高いアミノ酸配列をコードするダイズに着目し、ペプチド合成機を用いてハクサイおよびダイズ stomagen オルソログを合成した。その後、リフォールディングによりシロイヌナズナ stomagen と同様の分子内ジスルフィド結合を形成していることを確認した。合成した stomagen を液体培地に添加し、その培地を用いてハクサイを生育させた結果、表皮の気孔密度は上昇し、気孔クラスターが形成された。一方ダイズについては、合成ペプチド処理による気孔密度の上昇を観察することは出来なかった。

さらに、抗 stomagen 抗体を用いた免疫沈降実験により、微量 stomagen の検出方法を確立し、これを用いて天然 stomagen の検出を試みた。シロイヌナズナ野生株のアポプラスト抽出を行い、免疫沈降実験を行った結果、MALDI-TOF MS 解析により、シロイヌナズナ野生株からの天然 stomagen を検出することができた。さらに、同様の方法でハクサイ、ダイズのアポプラスト抽出液について免疫沈降実験を行った結果、両者から stomagen オルソログの分子量とほぼ一致するシグナルを検出することに成功した。これらの結果より、ハクサイやダイズでも、シロイヌナズナ同様、stomagen オルソログはプロセシングを受けた C 末端 45 残基のペプチドとして機能していることが強く示唆された。

peptide hormone, stomata, stomagen

講演番号：3A06p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ A 校舎 06 会場

植物由来カフェ酸誘導体の肝細胞増殖因子産生促進活性
Induction of Hepatocyte Growth Factor Production by Caffeic Acid Derivatives
○繁森 英幸[1]、栗栖 真奈美[1]、中曽根 理絵[1]、宮前 友策[1]、松浦 大輔[2]、金谷 裕敏[2]、谷野 伸吾[2] ([1]筑波大院生命環境、[2]（株）バスクリン)
○Hideyuki SHIGEMORI[1], Manami KURISU[1], Rie NAKASONE[1], Yusaku MIYAMAE[1], Daisuke MATSUURA[2], Hirotoshi KANATANI[2], Shingo YANO[2] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]Bathclin)

【目的】肝臓における再生を担う因子の一つである肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor ; HGF）は、肝細胞の他、上皮系細胞、内皮細胞、間葉系細胞などの様々な細胞の増殖を促進するのみならず、血管新生促進、抗アポトーシス作用などの多様な作用も知られている。したがって、HGFは肝硬変や心筋梗塞、神経変性疾患など、様々な疾患の治療への応用が期待されている。そこで種々の植物からHGF産生促進物質の探索を行った結果、寄生植物アメリカネナシカズラ（*Cuscuta pentagona*）から単離したカフェ酸誘導体4,5-di-*O*-caffeoylquinic acidならびに別種の寄生植物ヤセウツボ(*Orobanche minor*)から単離したカフェ酸誘導体acteosideに正常ヒト皮膚線維芽細胞に対するHGF産生促進活性があることを見出した。そこで本研究では、これらのカフェ酸誘導体ならびに関連化合物を用いてHGF産生促進活性に対する構造活性相関を調べ、活性発現機構の解明を目的として研究を行った。
【方法および結果】アメリカネナシカズラおよびヤセウツボを抽出し、各種クロマトグラフィーを用いて4,5-di-*O*-caffeoylquinic acidおよびacteosideを単離した。正常ヒト皮膚線維芽細胞に対し、0.5%FBS含有DMEM培地にて希釈した上記のカフェ酸誘導体および関連化合物を添加し、24時間培養した後、上清を回収してHGFサンドイッチELISAに供し、HGF産生量を算出した。その結果、4,5-di-*O*-caffeoylquinic acidおよびacteosideに有意なHGF産生量の増加が確認された。また、関連化合物との活性の比較により両化合物に共通する部分構造であるカフェオイル基が活性発現に重要であることが示唆された。
以上のことから、本研究により HGF 産生促進活性が認められた 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid および acteoside は急性肝炎や血管障害等の疾患治療に対する臨床応用に繋がる可能性が期待される。さらに当研究室ではこれまでに両化合物にはアルツハイマー症の原因タンパク質アミロイドβからの神経細胞保護作用を有することも明らかにしている。一方で、HGF は神経細胞保護作用も有することが報告されていることから、4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid や acteoside による神経細胞保護機構の一つとして HGF 産生促進活性が関与している可能性も示唆される。これらのカフェ酸誘導体は、サツマイモ、コーヒー、プロポリス、オリーブ等の食品にも含まれていることから、これらの食品を用いて HGF 産生を促進することにより、肝炎や神経疾患等の予防や治療への応用が期待される。

hepatocyte growth factor, caffeoylquinic acid, acteoside

講演番号：3A06p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ A 校舎 06 会場

Studies on Antitrypanosomal Activity of Myanmar Medicinal Plants

○NYUNT KHINESWE[1], Ahmed ELKHATEEB[2], Ken KATAKURA[1], Hideyuki MATSUURA[1]
([1]Hokkaido Univ., [2]National Research center, Egypt)

T. evansi is a flagellated protozoan parasite known to infect a variety of mammals and ruminants. It causes epidemics of a disease called surra, which is of great economic threat in Africa, Asia and South America, where thousands of animals died by *T. evansi* infection each year. Acutely infected animals die within weeks or months, but in other case, chronic infections may continue several years. It is mechanically transmitted by blood-sucking insects such as *Tabanus* and *Stomoxys* species. Currently, the most commonly used drugs for treatment of *T. evansi* infection usually cause several and severe side effects. Previous study has revealed that the crude extract of Myanmar Medicinal Plants showed *in vitro* inhibitory activity against *T. evansi* [1]. In this study, further observation of these medicinal plants on its inhibitory activity against *T. evansi* was done. *Phyllanthus simplex* (Family: Euphobiaceae, IC_{50} = 96.1 µg/mL) is indigenous to South East Asia, Southern India and China. In Myanmar, it is locally used in the treatment of jaundice and dysentery. According to the bioactivity-guided fractionation using culture of *T. evansi*, lupeol (**1**, 5.0 mg) and Ψ–taraxasterone (**2**, 1.1 mg) were isolated from the EtOH extract of *P. simplex*. *Vitex arborea* (Family: Verbenaceae, IC_{50} = 48.6 µg/mL) is a small to medium-sized evergreen tree distributed in Asia and is used for the treatment of fever, antiparasitic and diarrhea. Moretenyl palmitate (**3**, 8.6 mg) was isolated from the EtOAC fraction of *V. arborea*. *Ampelopsis brevipedunculata* var. *heterophylla* (Family: Vitaceae, IC_{50} = 16.4 µg/mL) is extensively cultivated in Asia, where it is often used as a folk medicine, and have been used as tea. Resveratrol (**4**, 7.5 mg) and compound (**5**, 3.4 mg) were purified as antitrypanocidal compounds from the EtOH extract of *A. brevipedunculata* according to bioassay guided fractionation. Structural elucidations and identifications of other active compounds isolated from *A. brevipedunculata* remain to be further studied. Evaluation of the IC_{50} value of antitrypanocidal effect of isolated compounds is in progress.

[1]. Saw et al., Evalution of Myanmar Medicinal Plant Extracts for Antitrypanosomal and Cytotoxic Activities. *J. Vet. Med. Sci.* 72 (4): 525-528, 2010

Trypanosoma evansi, Myanmar medicinal plants, antitrypanosomal activity

講演番号：3A06p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ A 校舎 06 会場

馬鈴薯を原料とした機能性食品ポテインからのトリプシンインヒビターの同定
Identification of Trypsin Inhibitor from Potato Extract
○矢高 圭祐[1]、友澤 寛[2]、鍔田 仁人[2]、山口 和也[2]、中村 浩蔵[1]([1]信州大院農、[2](株)東洋新薬)
○Keisuke YATAKA[1], Hiroshi TOMOZAWA[2], Masahito TSUBATA[2], Kazuya YAMAGUCHI[2], Kozo NAKAMURA[1] ([1]Grad. Sch. Agric. Shinshu Univ., [2]Toyo Shinyaku co. Ltd.)

【目的】馬鈴薯抽出物・ポテイン®は，高いトリプシン阻害活性を示し，動物試験で食欲抑制作用が確認された[1]。この食欲抑制作用は，ポテイン中のトリプシンインヒビター(TI)がトリプシンによるコレシストキニン(CCK) 分泌因子の分解を阻害し，CCK 分泌を増加させることで引き起こされると推察されている[2]。しかしながら，ポテインに含まれる TI は明らかにされていない。そこで本研究では，ポテインに含まれる TI の構造決定を行った。
【方法】ポテインに含まれるTIを，ダイヤイオンHP20を用いたフラッシュカラムクロマトグラフィー，ビバスピン(MWCO 10,000)を用いた限外ろ過，Sephadex G50を用いたゲルろ過クロマトグラフィー，ODSカラムを用いたHPLCで精製し，TIを含むHPLC精製物を得た。各精製過程では，ウシ膵臓トリプシンとBenzoyl-D,L-arginine-*p*-nitroanilide(BAPA)を用いた比色法によりトリプシン阻害活性を測定し50%阻害濃度(IC_{50})を求めた。HPLC精製物は，2次元電気泳動法により分離し，銀染色によりタンパク質スポットを検出し，各スポットに含まれるTIをエドマン分解とペプチドマスフィンガープリンティングでアミノ酸配列を推定した。
【結果】上記精製を行い，ポテインから収率 0.5%で HPLC 精製物を得た。HPLC 精製物のトリプシン阻害活性は，ポテイン(IC_{50}値 52.1 μg/mL)の約 13 倍(IC_{50}値 4.1 μg/mL)であった。この HPLC 精製物を 2 次元電気泳動で分離したところ，分子量 15 KDa および 18 KDa 付近に 8 つのスポットが確認された。各スポットを切り出し，構造解析した結果，等電点 5-6，15 KDa 付近のスポットから 6 種の既知の馬鈴薯由来 TI(proteinase inhibitor type II P303 51 precursor, proteinase inhibitor type II K precursor IIK PC, proteinase inhibitor type II precursor, proteinase inhibitor type II CM7 precursor, wound induced proteinase inhibitor II precursor, proteinase inhibitor II OS *Solanum tuberosum* PE2SV1)の N 末端アミノ酸が 5-30 残基欠落したタンパク質(Potein proteins 1-6)が特定された。Potein proteins 1-6 の Sequence coverage はそれぞれ 83.0, 91.1, 52.3, 57.7, 58.1, 81.5%であった。N 末端アミノ酸の欠落は Ala または Asp の C 末端で引き起こされており，酸性アミノ酸特異性エンドペプチダーゼが作用した可能性が示唆された。

1. Chen, W. et al. (2012) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 1104-1109.
2. Holt, S. et al. (1995) *Eur. J. Clin. Nutr.*, **49**, 675-690.

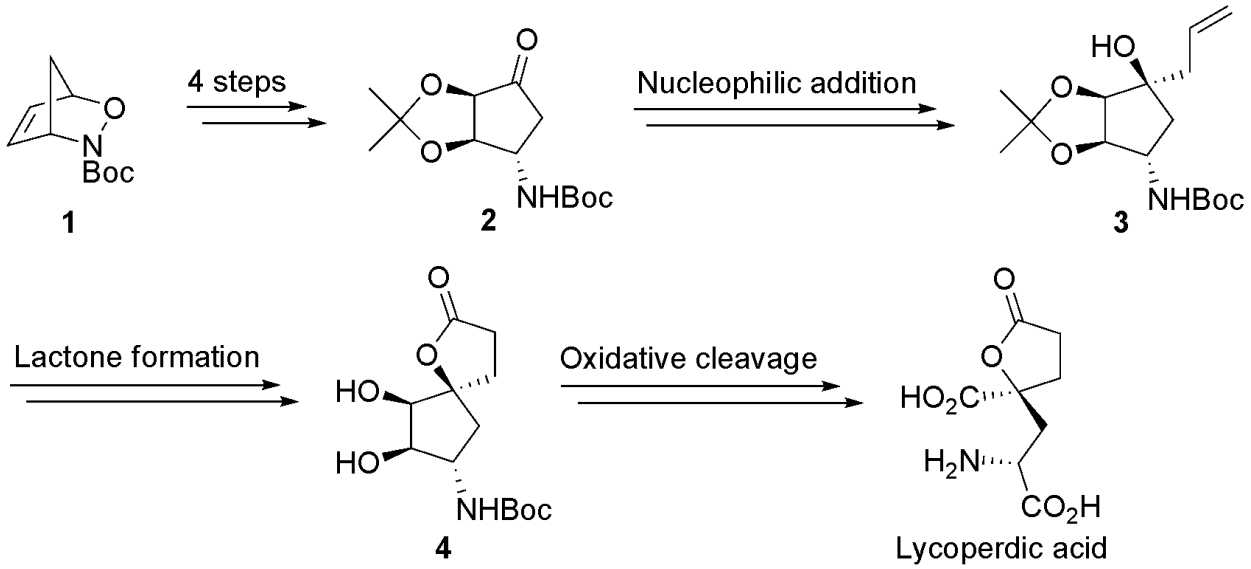
peptide mass fingerprinting, trypsin inhibitor, potato

講演番号：3A07a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ A 校舎 07 会場

ホコリタケに含有されるグルタミン酸誘導体 lycoperdic acid の合成
Total Synthesis of Lycoperdic Acid, A Mushroom Derived Glutamic Acid Derivative

○石内 隆太郎、勝田 亮、矢島 新、額田 恭郎（東農大院応生）
○Ryutaro ISHIUCHI, Ryo Katsuta, Arata Yajima, Tomoo Nukada (Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】Lycoperdic acid は、1978 年 Lamotte らによってホコリタケ(*Lycoperden perlatum*)から単離された異常アミノ酸で、γ 位に 5 員環ラクトンを置換基として持つグルタミン酸誘導体である [1)]。ホコリタケは日本で古くより食用、あるいは、薬用として利用されてきたが、その成分である lycoperdic acid の生物活性は未だ明らかとなっていない。γ 位に置換基を持つグルタミン酸類は特徴的な生物活性を示すものが多く、非常に強い甘味を持つ monatin や、興奮性アミノ酸である neodysiherbaine などが報告されている。従って、我々は lycoperdic acid の生物活性を明らかにすべく合成研究を実施した。なお、本化合物の全合成は既に 5 件の報告があるが、今回我々は lycoperdic acid のジカルボン酸部分を、1,2-ジオールの酸化開裂により一挙に構築する効率的な合成経路の開発を目指した。
【方法及び結果】文献既知の二環性化合物 **1** を出発原料とし、4 段階でケトン **2** を合成した。これに対し、lycoperdic acid のγ位の置換基となるアリル基を立体選択的に付加させ、アルコール **3** とした。続いてラクトンを形成させることによりスピロラクトン **4** を合成し、**4** の 1,2-ジオール部分を酸化的に開裂することで、lycoperdic acid を 11 工程、総収率 8%で合成することに成功した。



1) Lammote, J.; Oleksyn, B.; Dupont, L.; Dideberg, O.; Campsteyn, H.; Vermeire, M. *Acta Cryst*. 1978, **B34**, 3653-3638.

lycoperdic acid, synthesis, amino acid

講演番号：3A07a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ A 校舎 07 会場

キノコから単離された ganomycin I と fornicin A の合成と生物活性
Syntheses and biological activities of ganomycin I and fornicin A

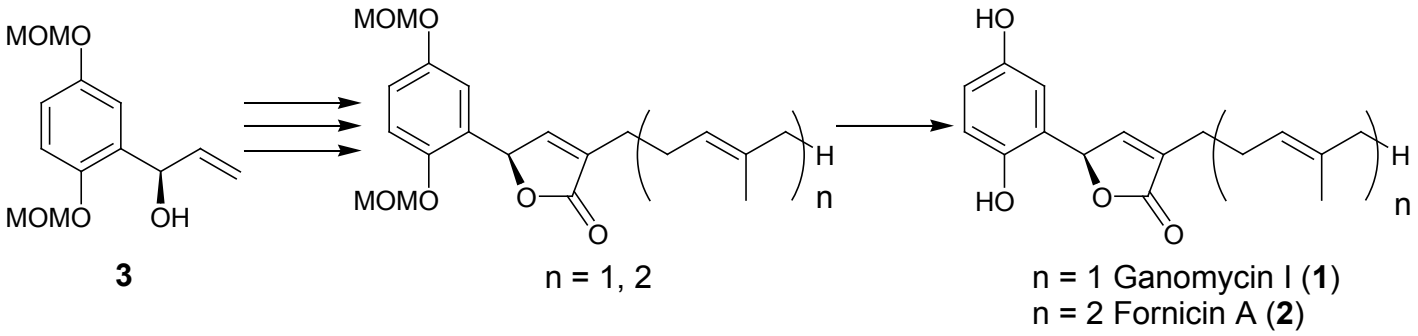
○浦尾 翔太、矢島 新、勝田 亮、額田 恭郎（東農大院農）
○Syota Urao, Arata Yajima, Ryo Katsuta, Tomoo Nukada (Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】

Ganomycin I (**1**)は 2009 年、富山大学の服部らによりベトナム産キノコ(*Ganoderma colossum*)から単離されたメロテルペノイドであり、ヒト免疫不全ウィルス 1 型(HIV-1)プロテアーゼ阻害活性を示すことが報告された[1)]。また fornicin A (**2**)は 2006 年、Che らにより中国産キノコ(*G. fornicatum*)から単離され、ヒト喉頭ガン細胞(Hep-2)に対する細胞毒性を示すことが報告された[2)]。本研究では ganomycin I の両鏡像体と類縁体である fornicin A を合成することにより、天然物の絶対立体配置を決定することとした。

【方法・結果】

2,5-ジヒドロキシベンズアルデヒドより Sharpless 不斉ジヒドロキシ化、Kocienski 型オレフィン化を鍵反応として光学活性中間体 **3** を高い鏡像体純度で合成した。続いて側鎖部位を山口エステル化により連結し、閉環メタセシス反応によりブテノリドを合成した。保護基を除去することにより 12 行程、総収率 31.3%で ganomycin I の全合成を達成した。合成した両鏡像体と天然物の比旋光度を比較した結果、天然物の絶対立体配置は *R* であることを確認できた。同様の手法により fornicin A も合成し、その絶対立体配置は ganomycin I と同じく *R* であることを明らかとした。また合成品の HIV-1 プロテアーゼ阻害活性試験も行ったので併せて報告する。



3　　n = 1, 2　　n = 1 Ganomycin I (**1**)
n = 2 Fornicin A (**2**)

1) R. S. El Dien, A. M. El Halawany, C.-M. Ma, M. Hattori, *J. Nat. Prod*. **2009**, *72*, 2019-2023.
2) X.-M. Niu, S.-H. Li, H.-D. Sun, C.-T. Che, *J. Nat. Prod*. **2006**, *69*, 1364-1365.

Asymmetric synthesis, Ring-closing metathesis, Terpenoid

講演番号：3A07a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ A 校舎 07 会場

ヨードベンゼンを触媒とした酸化的環化反応による 1*H*-インダゾールの簡便合成

Efficient synthesis of 1*H*-indazoles via iodobenzene-catalyzed oxidative cyclization

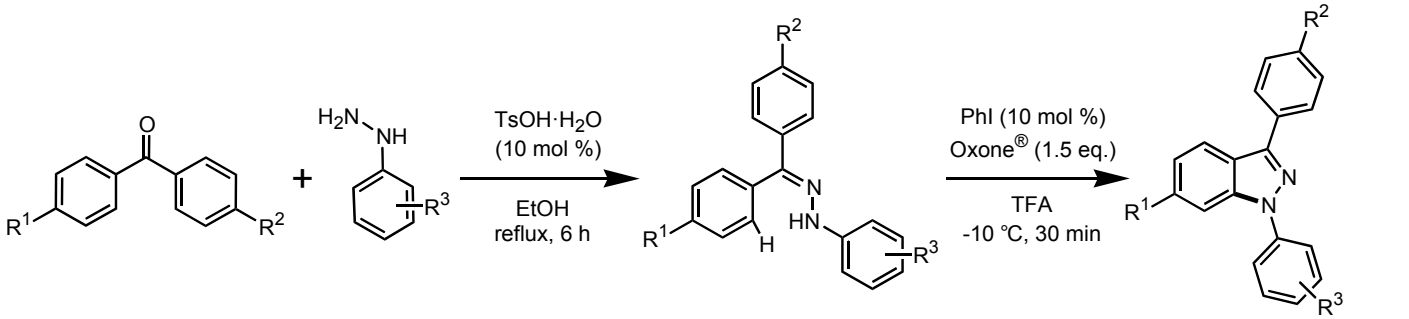
○柏 充裕、谷森 紳治（大阪府大院生命環境）
○Mitsuhiro KASHIWA, Shinji TANIMORI (Osaka Pref. Univ.)

【諸言】

1*H*-インダゾール誘導体は，抗がん，抗炎症作用など強い生理活性を示すものが多く，医農薬を開発する上で重要な構造モチーフの一つである．しかし，従来の合成法では，高価で有毒な遷移金属を必要とするものが多く，また反応条件が高温，長時間であるなどの問題点がある．グリーンケミストリーの観点から本研究では，安価かつ低毒性であり，取り扱いも容易なヨードベンゼンを触媒とした C-H 活性化による分子内環化反応に着目し，より穏和な条件での 1*H*-インダゾール体の新規合成法を開発した．

【実験方法と結果】

まず, ベンゾフェノン（**1a**）とフェニルヒドラジン（**2a**）より容易に合成可能な 1-（ジフェニルメチレン）-2-フェニルヒドラジン（**3a**） をモデル基質に用い，酸化的環化反応を種々の条件で試みた．その結果，触媒にヨードベンゼン（10 mol %），酸化剤にオキソン®（1.5 当量）を用いてトリフルオロ酢酸溶液中-10℃，30 分という反応条件下で，目的とした 1*H*-インダゾール体（**4a**）を 84%と高収率で得た．次に，芳香環上に様々な置換基を有するヒドラゾン誘導体を用いて本反応を行ったところ，中程度から良い収率で目的とする 1*H*-インダゾール体が得られた．また，ベンゾフェノンのモノ置換体を用いた場合，電子豊富なベンゼン環側で環化反応が優先的に進行した．さらに，**4a** についてはワンポット法も検討し，中間体 **3a** を単離することなく 61%の収率で目的物が得られた．



R^1=R^2=R^3= H (**1a**, **2a**)
R^1=R^2= OMe, R^3= H
R^1=R^2= F, R^3= H
R^1=R^2= H, R^3= *o*-OMe
R^1=R^2= H, R^3= *m*-F
R^1=R^3= H, R^2= OMe

R^1=R^2=R^3= H (**3a**)
R^1=R^2= OMe, R^3= H
R^1=R^2= F, R^3= H
R^1=R^2= H, R^3= *o*-OMe
R^1=R^2= H, R^3= *m*-F
R^1=R^3= H, R^2= OMe

R^1=R^2=R^3= H (**4a**) 84%
R^1= OMe, R^2= OMe, R^3= H 77%
R^1= F, R^2= F, R^3= H 73%
R^1=R^2= H, R^3= *o*-OMe 64%
R^1=R^2= H, R^3= *m*-F 52%
R^1= OMe, R^2=R^3= H 69%

1*H*-indazole, oxidative cyclization, green chemistry

講演番号：3A07a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ A 校舎 07 会場

N,N,N'-Trimethylethylenediamine を用いるポリアセトキシベンズアルデヒドのオルト脱アセチル化反応

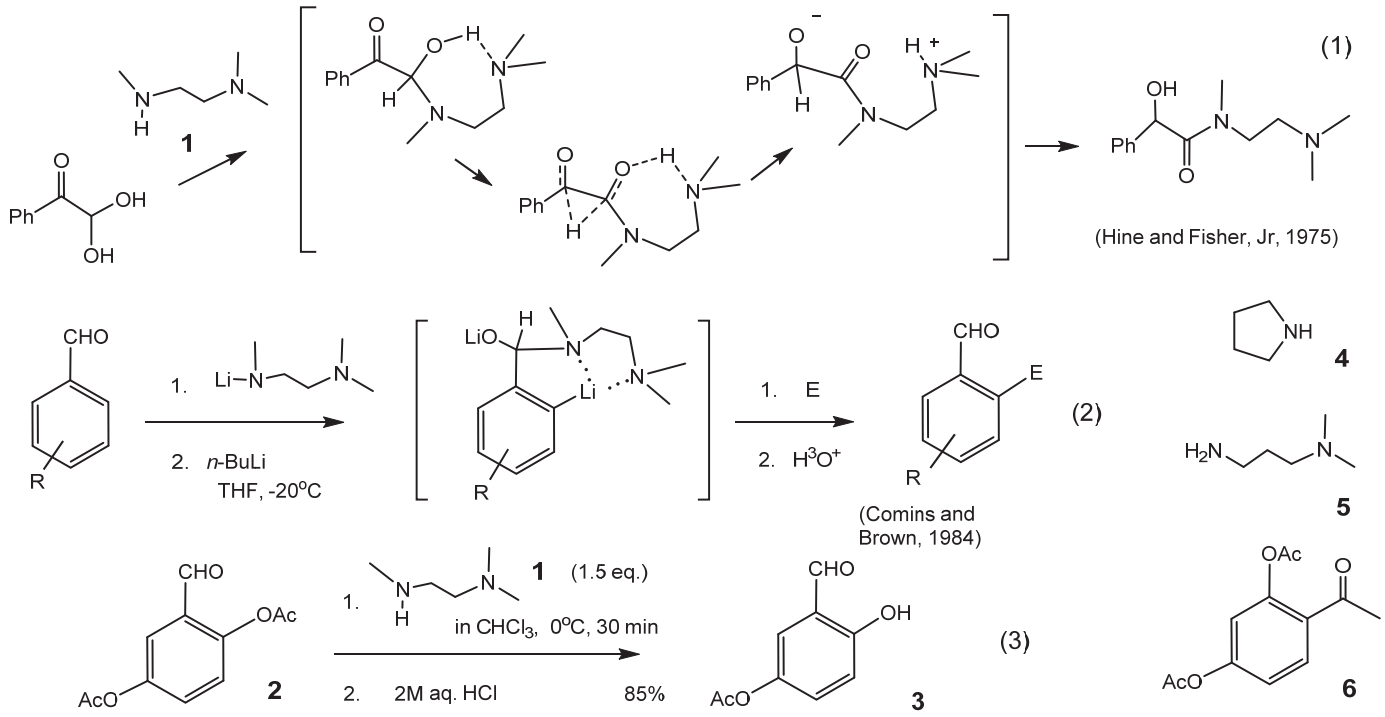
N,N,N'-Trimethylethylenediamine mediated *ortho*-deacetylation of polyacetoxybenzaldehydes

○福士 幸治 (北大院農)
○Yukiharu Fukushi (Hokkaido Univ.)

【目的】*N,N,N'*-Trimethylethylenediamine **1** は分子内に2級アミンと3級アミンを有し、3級アミン部分の塩基性を利用した反応が知られている。1975年にHineとFisher, Jrは、phenylglyoxal hydrate とジアミン **1** からマンデル酸アミドを合成した（式１）[1]。1984年にCominsとBrownは、芳香族アルデヒド、ジアミン **1** および2当量の*n*-BuLiからオルト位に置換基を導入する反応を報告した（式２）[2]。今回、反応中間体として使用する5-acetoxy-2-hydroxylbenzaldehyde **3** の大量合成法について検討した。

【方法と結果】2,4-Diacetoxybenzaldehyde **2** を原料にアミン **1**，**4**，**5** 等と反応を行ったところ、**1** でのみ収率よくオルト選択的脱アセチル化反応が進行した（式３）。一方、2,4-diacetoxyacetophenone **6** とジアミン **1** との反応では、ランダムに脱アセチル化した混合物が得られた。現在、多数のポリアセトキシベンズアルデヒドとジアミン **1** との反応およびその反応機構の解析を進めている。

1) Hine and Fisher, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 6513–6521 (1975).
2) Comins and Brown, *J. Org. Chem.*, **49**, 1078-1083 (1984).



N,N,N'-trimethylethylenediamine, ortho-deacetylation, polyacetoxybenzaldehyde

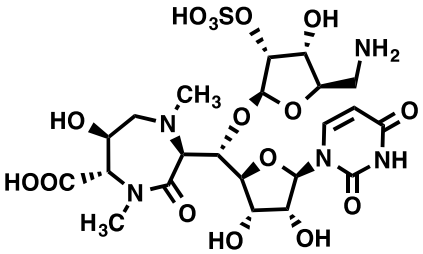
講演番号：3A07a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ A 校舎 07 会場

リポシドマイシンの合成研究 2: ジアゼパノン環の環化反応の検討

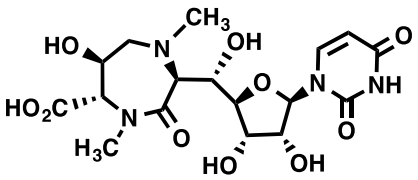
Synthetic Study of Liposidomycin Diazepanone Ring System

○中島 範行、濱田 昌弘、岸本 崇生、古野 愛、富崎 裕紀子、清田 太一 (富山県大工)
○ Noriyuki NAKAJIMA, Masahiro HAMADA, Takao KISHIMOTO, Ai FURUNO, Yukiko TOMISAKI, Taichi SEIDA (Toyama Prefectural Univ.)

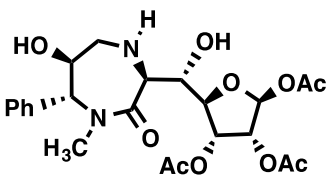
【目的】リポシドマイシン類（1）はペプチドグリカン合成阻害効果を有するヌクレオシド抗生物質である。当研究室では以前、1 の分解物 2 の合成を検討したが、 3 のグリコシル化を進行させることができず、 目的物を得ることができなかった。その原因がジアゼパノン環部の 3 級アミンにあり、これを Ns 基で保護したモデル化合物でのグリコシル化では、β-選択性は低いながらもグリコシル化が進行することを確認している。しかし、合成したジアゼパノン誘導体 3 のアミン部を直接 Ns 基で保護することは出来なかった。そこで、Ns 基を有するジアゼパノン環の合成について検討した。



1: R^1 = alkyl chain, R^2 = acyl chain

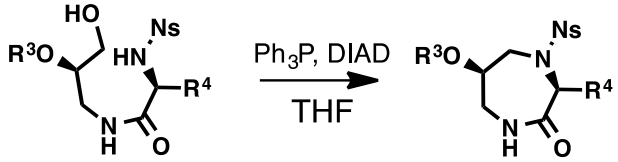


2



3

【方法と結果】Ns 基を有するモデル化合物（**4a, b**）を用いてジアゼパノン環部の合成を検討した。**4a, b** を光延反応によって環化させたところ、 水酸基の保護基にアセチル（Ac）基を有する **4a** では、31%の収率でジアゼパノン **5a** を得ることが出来たが、再現性が得られなかった。そこで、保護基をベンジル（Bn）基に換え **4b** で環化反応を行なったところ、収率 60%でジアゼパノン **5b** を得ることが出来た。これら環化反応の詳細について報告する。



4a: R^3 = Ac, R^4 = Me
4b: R^3 = Bn, R^4 = $CH(CH_3)_2$

5a: 31%
5b: 60%

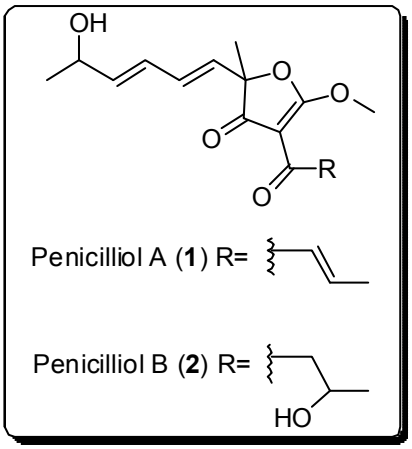
liposidomycin, diazepanone ring, synthesis

講演番号：3A07a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ A 校舎 07 会場

DNA ポリメラーゼ Y ファミリー阻害剤 ペニシリオール類の合成研究

Synthetic study of Penicilliols, novel inhibitors of DNA polymerase Y family

○遠藤 正伍[1]、黒澤 敦[1]、志村 聡美[1]、竹内 倫文[1]、鈴木 孝洋[2]、紙透 伸治[1]、小林 進[2]、菅原 二三男[1] ([1]東理大院理工、[2]東理大薬)
○Shogo ENDO[1], Atsushi KUROSAWA[1], Satomi SHIMURA[1], Toshifumi TAKEUCHI[1], Takahiro SUZUKI[2], Sinji KAMISUKI[1], Susumu KOBAYASHI[2], Fumio SUGAWARA[1] ([1]Fac. of Sci. and Tech., Tokyo Univ. of Sci., [2]Fac. of Pharm. Sci., Tokyo Univ. of Sci.)

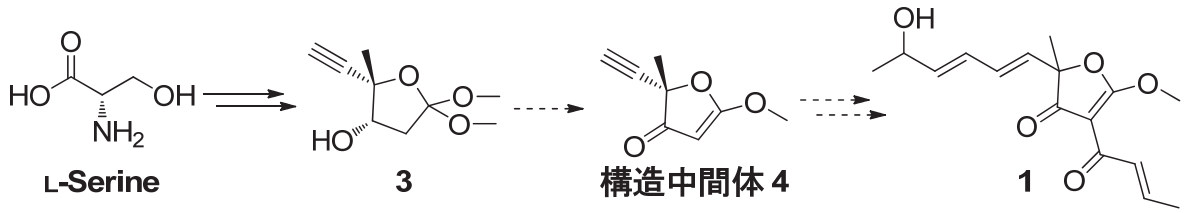


【背景・目的】

Penicilliol A (**1**) および B (**2**) は、*Penicillium daleas* から単離された新規天然有機化合物である[1]。構造的特徴として、不飽和度の高い 5-メトキシ-2-メチルフラン-3-オン 骨格を有する。また、これらの化合物は哺乳類の DNA ポリメラーゼ Y ファミリーを選択的に阻害する(IC_{50} = 19.8 μM)。さらに、ヒト大腸がん細胞 (HCT116 cells) の増殖を抑制する事も明らかとなった。真核生物の DNA ポリメラーゼ Y ファミリーは修復系として不可欠であるだけでなく、癌発症のメカニズムに関わる事も明らかとなっている。Penicilliol A および B は Y ファミリーポリメラーゼの選択的阻害剤であるため、Y ファミリーポリメラーゼの機能解析のツールとして有用である。しかし本化合物の天然からの供給は不安定であり、かつ活性を議論する上で不可欠な立体配置が相対・絶対ともに未決定である。本研究は、Penicilliol 類の立体配置の決定、および立体選択的な合成経路の確率を目的とした。

【研究経過】

Penicilliol 類を効率的に合成するため、構造中間体として 5-メトキシ-2-メチルフラン-3-オン骨格を有する化合物 **4** を設定した。**4** にヘキサジエンユニット、クロトン酸ユニットをそれぞれ導入する事で、効率的に Penicilliol A および B を合成できると考えた。現在までに、L-セリンを原料とし、13 工程で構造中間体 **4** の前駆体であるジメトキシアルコール **3** を合成した。現在、**3** を酸化する事で構造中間体 **4** を合成し、さらにこの構造中間体 **4** を用いる事で、Penicilliol の合成を検討している。



1) Kimura, T. *et al*. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 1811-1816

synthetic study, DNA polymerase, Penicilliol

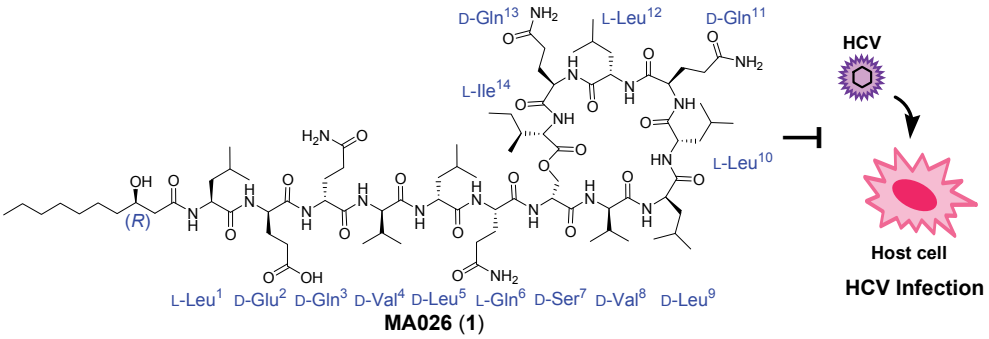
講演番号：3A07a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ A 校舎 07 会場

抗ウイルス活性を有する新規環状デプシペプチド MA026 の合成研究と標的分子の探索

Total Synthesis and Anti-Hepatitis C Virus Activity of MA026, a Novel Lipocyclodepsipeptide

○志村 聡美[1]、中嶋 翔[1,2]、藤井 俊孝[1]、池田 健太郎[1]、イザギレ - カルボネル へスス[1]、石間 正浩[1]、竹内 倫文[1]、紙透 伸治[1]、鈴木 孝洋[3]、倉持 幸司[4]、渡士 幸一[1,2]、小林 進[3]、菅原 二三男[1]
([1]東理大院理工、[2]国立感染症研究所　ウイルス第 2 部、[3]東理大薬、[4]京府大院生命環境)
○ Satomi SHIMURA[1], Syo NAKAJIMA[1,2], Toshitaka FUJII[1], Kentaro IKEDA[1], Jesus IZAGUIRRE-CARBONELL[1], Masahiro ISHIMA[1], Toshifumi TAKEUCHI[1], Shinji KAMISUKI[1], Takahiro SUZUKI[3], Koji KURAMOCHI[4], Koichi WATASHI[1,2], Susumu KOBAYASHI[3], Fumio SUGAWARA[1] ([1]Fac. of Sci. and Tech., Tokyo Univ. of Sci., [2]Dep. Viol. II, Nat. Inst. of Infect. Dis., [3]Fac. of Pharm. Sci., Tokyo Univ. of Sci., [4]Kyoto Pref. Univ.)

水産養殖の現場では、魚類ウイルス感染症が漁獲量に深刻な影響を及ぼす。サケ科魚類の伝染性造血器壊死症ウイルス (Infectious hematopoietic necrosis virus: IHNV) はニジマス養殖に甚大な被害をもたらすが、一部の個体は IHNV に対する耐性を有していた。調査の結果、IHNV への耐性を示す個体は、特定の細菌が消化管に共生していることが明らかとなった。この細菌が生産し、抗ウイルス活性を示す物質として MA026 (**1**) が単離された [1)]。MA026 は当研究室で単離、構造決定された新規環状デプシペプチドであり、IHNV だけでなく C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) の増殖も阻害する。MA026 は新たな抗 HCV 薬として応用が期待されるが、その作用機序は解明されていない。本研究は、MA026 とその誘導体の効率的な化学合成法の確立、及び抗 HCV 活性における標的分子の同定を目的とした。MA026 はアミノ酸 14 残基からなる鎖環デプシペプチドに脂肪酸が結合した複雑な構造を有する。我々は、MA026 を環状デプシペプチドと側鎖部分の 2 つのセグメントに分割し、それぞれを液相法により合成した。得られた 2 つのセグメントを縮合し、脱保護を経て MA026 (**1**) の全合成を達成した [2)]。また、この液相法による柔軟な合成経路を用いて MA026 の各種誘導体を合成した。次に我々は MA026 の標的分子を同定するため、ファージディスプレイ法による探索を行った。その結果、MA026 の標的候補タンパク質として Claudin-1 が挙げられた。Claudin-1 はタイトジャンクションを形成する膜タンパク質であり、肝臓細胞で高発現している。HCV の感染機構では、HCV のエントリーレセプターとして機能することが示された [3)]。我々は、表面プラズモン共鳴分析により、Claudin-1 リコンビナントタンパク質と MA026 の濃度依存的な相互作用を観察した [4)]。以上の結果から、MA026 は Claudin-1 と相互作用し、その結果 HCV の感染を阻害する可能性が示唆された。現在、より詳細な抗 HCV 活性機構を解明するため、MA026 と各種誘導体を用いてさらに研究を進めている。



MA026 (1)

1) PCT WO 02/062831, **2002**. 2) 日本農芸化学会 2012 年度大会 2A07p06 3) Evans, M. J. *et al*. *Nature* **2007**, *446*, 801-805.
4) Shimura, S. *et al*. *J. Am. Chem. Soc*. **2013**, *in press*.

synthetic study, cyclodepsipeptide, antiviral activity

講演番号：3A07a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ A 校舎 07 会場

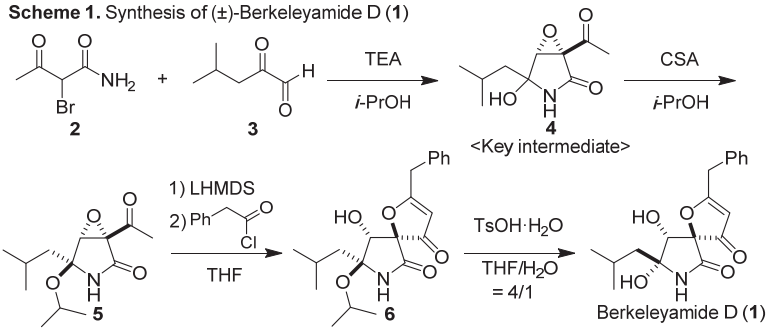
Berkeleyamide D の短段階合成と VCD 励起子キラリティー法による絶対立体配置の決定

Short-Step Synthesis and Determination of Absolute Configuration of (±)-Berkeleyamide D

小森 健太[1]、谷口 透[2]、水谷 将馬[1]、門出 健次[2]、○倉持 幸司[1]、椿 一典[1] ([1]京府大院生命環境、[2]北大院先端生命)
Kenta Komori[1], Tohru Taniguchi[2], shoma mizutani[1], Kenji Monde[2], ○ Kouji Kuramochi[1], Kazunori Tsubaki[1] ([1]Kyoto Prefectural Uni., [2]Hokkaido Uni.)

【目的】Berkeleyamide D (**1**) は *Penicillium rubrum* Stoll. から単離された化合物であり、caspase-1 及び MMP-3 阻害活性を有する。構造的には 1-oxa-7-azaspiro[4.4]non-2-ene-4,6-dione 骨格を持つ事が報告されているが、その詳細な立体化学は明らかにされていない。そこで我々は、未知の立体化学を明らかにするため、Berkeleyamide D の全合成研究に着手した。

【方法と結果】α-ブロモ-β-ケトアミド **2** とイソブチルグリオキサール (**3**) を塩基で処理し、Darzens 反応に続く分子内環化反応を進行させ、鍵中間体となるエポキシラクタム **4** へと導いた (Scheme 1)。続いてヘミアミナール水酸基の保護、アシル化に続く分子内スピロ環化反応、アセタールの脱保護の 3 工程での変換により、(±)-Berkeleyamide D (**1**) の合成を達成した。合成した化合物の NMR データは天然物のスペクトルと一致し、NOESY 相間からその相対立体配置を Scheme 1 のように決定した。次に合成したラセミ体の Berkeleyamide D (**1**) をキラル HPLC を用いて光学分割した (Figure 1)。分離した両エナンチオマーの比旋光度を測定したところ、一方のエナンチオマーが $[\alpha]^{17}_{D} = -85.7$ (*c* 0.25, MeOH)、他方が $[\alpha]^{17}_{D} = +84.6$ (*c* 0.25, MeOH) であった。なお、天然の Berkeleyamide D の比旋光度は $[\alpha]^{25}_{D} = -56.9$ (*c* 0.003, MeOH) と報告されている。光学分割した両エナンチオマーの絶対立体配置は VCD (赤外円二色性スペクトル) 励起子キラリティー法を用いて決定した。すなわち、天然型の (−)-**1** が低波数側から正→負の VCD を示す事から、カルボニル基は時計回りに配置していると判明した。よって、 (−)-**1** のスピロ四級炭素の立体を *S* と決定した。この事から、天然の (−)-Berkeleyamide D の絶対立体配置は 11*S*, 14*R*, 19*R* と決定することができた。



Scheme 1. Synthesis of (±)-Berkeleyamide D (**1**)

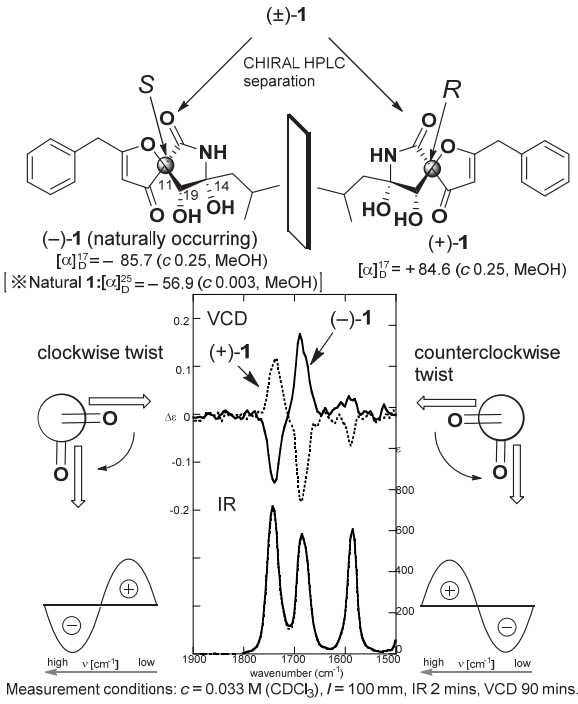


Figure 1. Determination of the absolute configuration of **1** by VCD

total synthesis, natural product, VCD exciton chirality method

講演番号：3A07a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ A 校舎 07 会場

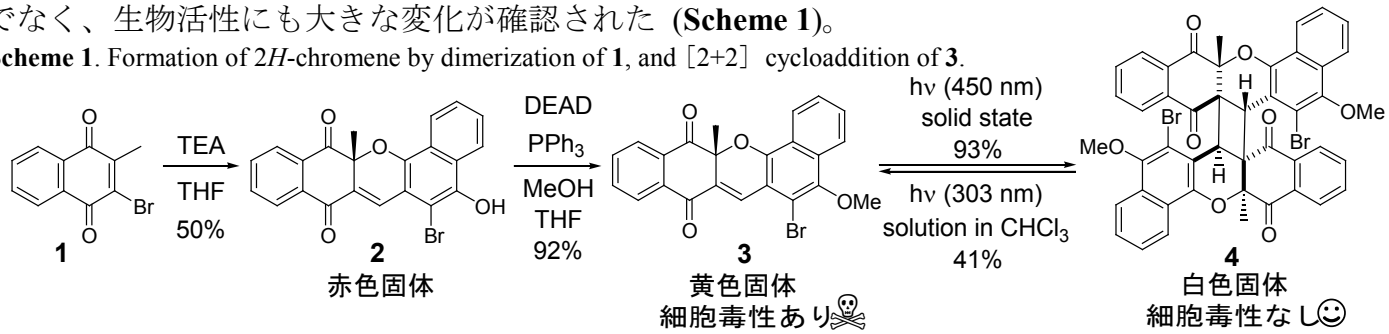
弱い分子間相互作用の集積を駆動力とした立体選択的光二量化反応の発見：光応答性分子としての可能性

Discovery of Stereoselective Photodimerization Driven by Weak Intermolecular Interactions：Its Possibility as a Photoresponsive Molecule

○太田 元博[1]、笹森 貴裕[2]、水品 善之[3,4]、時任 宣博[2]、倉持 幸司[1]、椿 一典[1]（[1]京府大院生命環境、[2]京大化研、[3]神戸学院大栄養、[4]神戸学院大 LSC）
○ MOTOHIRO OTA[1], TAKAHIRO SASAMORI[2], YOSHIYUKI MIZUSHINA[3,4], NORIHIRO TOKITOH[2], KOUJI KURAMOCHI[1], KAZUNORI THUBAKI[1] ([1]Kyoto Prefectural Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Kobegakuin Univ., [4]Kobegakuin Univ. LSC)

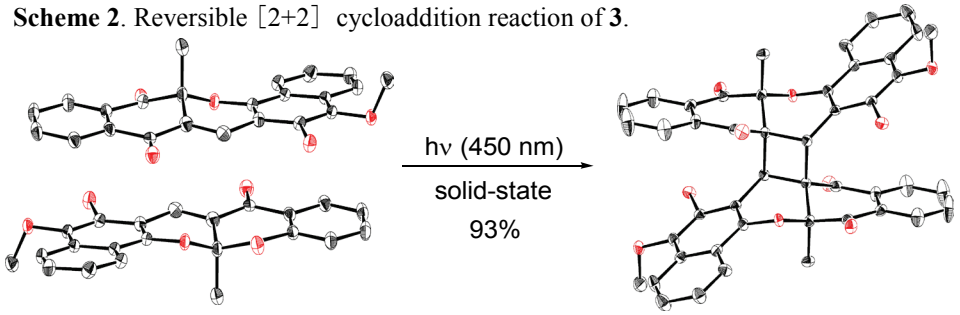
キノン類は一般にその反応点の多さから、反応制御が困難である。しかし、その一方で反応条件を厳密に制御すれば、特異な反応を選択的に進行させることが可能になる。我々の研究室では、2-ブロモ-3-メチル-1,4-ナフトキノン **(1)** の多様な二量化反応の開発を行い、様々な骨格を選択的に構築することに成功している。[1)] 今回我々は **1** を THF 中、トリエチルアミンで処理することで、2*H*-クロメン骨格を形成する新たな二量化反応を見出した。この 2*H*-クロメン **(2)** は鮮やかな**赤色**を呈しているが、**2** のメチル化体 **(3)** は**黄色**を呈した。この **3** に固体状態で 450 nm の光を照射すると［2+2］環化付加反応が進行し、**白色**の環化付加体 **(4)** を得た。また、**4** のクロロホルム溶液に 303 nm の光を照射することで逆環化反応が進行した。光反応の前後で化合物の分光特性が劇的に変化するだけでなく、生物活性にも大きな変化が確認された **(Scheme 1)**。

Scheme 1. Formation of 2*H*-chromene by dimerization of **1**, and［2+2］cycloaddition of **3**.



この［2+2］環化付加反応の駆動力は、単一分子間に働く弱い分子間相互作用の集積にあった。すなわち、X 線結晶構造解析の結果から、横方向にメトキシ基が CH-π 結合を、縦方向にブロモ基がハロゲン-π 結合をそれぞれ形成していることが分かった。そのため、反応点の二重結合同士が接近する特異的なパッキングを取り、［2+2］環化付加反応が進行したと考えられる。本反応は単に興味深いだけではなく、反応の前後で物性が大きく異なることからドラッグデリバリーなどへの応用が期待される。

Scheme 2. Reversible［2+2］cycloaddition reaction of **3**.



1) Azuma, S.; Nishio, K.; Kubo, K.; Sasamori, T.; Tokitoh, N.; Kuramochi, K.; Tsubaki, K. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 4812.

photodimerization, naphthoquinone, photoresponsive molecule

講演番号：3A07a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ A 校舎 07 会場

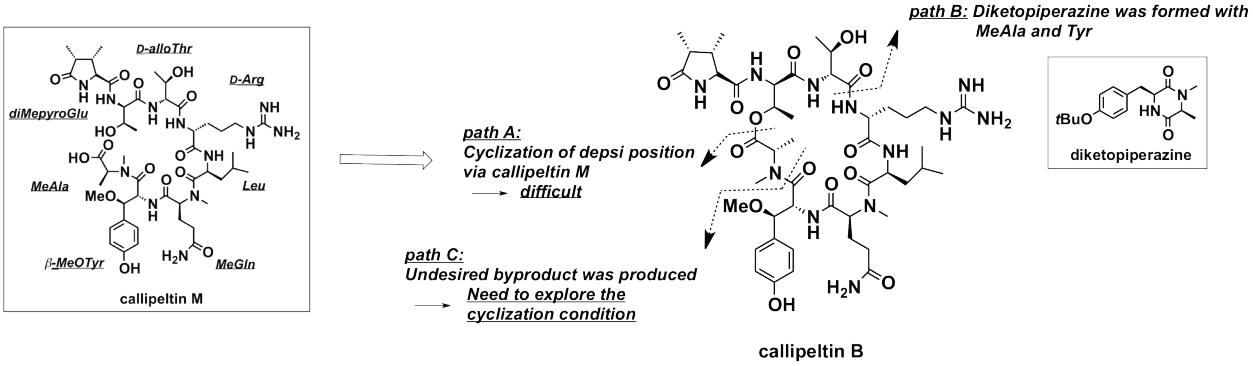
Callipeltin B の合成研究：環化部位の探索

Synthetic study of callipeltin B: Investigation of cyclization position for the construction of cyclic depsipeptide

○菊池 真理、今野 博行（山形大院理工）
○Mari KIKUCHI, Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ.)

【目的】 Callipeltin B は海綿 *Callipelta* sp. から単離された異常アミノ酸含有環状デプシペプチドである [1]. 抗 HIV 活性並びに細胞毒性を示すが, その詳細については明らかにされていない. そこで callipeltin B の構造活性相関研究を進めるため, callipeltin B の固相全合成を検討している. 今回, 環化部位並びに縮合条件の最適化を行った.

【方法と結果】 はじめに, callipeltin B の環化前駆体である callipeltin M (2013 年度年会にて報告) を用いて環化を検討することにした. 2-クロロトリチル樹脂上で PyBOP/HOBt または COMU/HOAt をカップリング剤に用いて *C* 末端からの縮合を行い, 樹脂から切り出すことで保護 callipeltin M を得た. MSNT/MeIm の条件により保護 callipeltin M の環化を行ったが, 環化効率が低く, 低収率であった (path A). 次に, デプシ部を早い段階でカップリングするため, Thr-Arg を環化部位とした直鎖ペプチドの合成を行ったところ, MeAla-Tyr によるジケトピペラジンの形成が優先されることがわかった (path B). その結果, MeAla-Tyr ジケトピペラジン形成を避けるためには Tyr-MeAla を環化部位としたルートが最適であることがわかった (path C) [2]. そこで βMeOTyr からカップリングを行ったところ, 望む直鎖ペプチドを得た. これを用いて環化反応を検討した. HPLC, ^{1}HNMR により解析した結果, βMeOTyr 部で構造変換が起こった副産物が主として生成し, 目的とする環化体は得られなかった. 現在, callipeltin B の環化条件を探索中である. これらについて詳細を報告したい.



[1] D'Auria, M. V., Sepe, V., D'Orsi, R., Bellotta, F., Debitus, C., Zampella, A. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 131-140.
[2] Kikuchi, M., Watanabe, Y., Tanaka, M., Akaji, K., Konno, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4865-4868.

callipeltin, cyclization, solid phase peptide synthesis

講演番号：3A07a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ A 校舎 07 会場

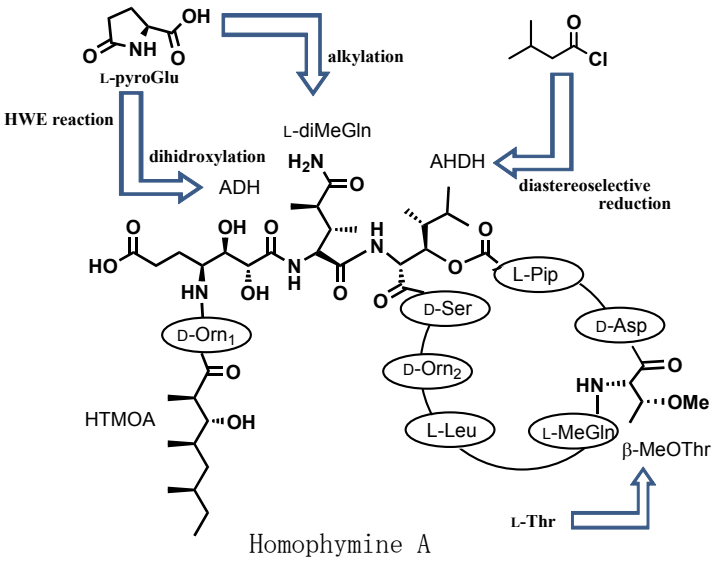
Homophymine A の全合成を目指した立体選択的異常アミノ酸の合成と環状部構築へアプローチ

Synthesis of unusual amino acids and construction of cyclic fragment toward the total synthesis of Homophymine A

○東海林 由憲、武田 祥、菊池 真理、今野 博行（山大院理工）
○Yoshinori TOKAIRIN, Sho TAKEDA, Mari KIKUCHI, Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ.)

＜目的＞ HIV はヒト免疫細胞膜上の CD4 ならびに CCR5/CXCR4 と相互作用することにより感染する。海綿 *Homophymia* sp. より単離、構造決定された Homophymine A は CCR5 と結合することで、HIV ウィルスの侵入を阻害すると考えられている（IC_{50}＝75 nM）[1]。本天然物は β-MeOThr（β MOT）、2-amino-3-hydroxy-4,5-dimethylhexanoic acid (AHDH)、diMeGln (DMQ)、4-amino-2,3-dihydroxy-1,7-heptandioic acid (ADH)、3-hydroxy-2,4,6-trimethyloctanoic acid (HTO) 等の異常アミノ酸や脂肪酸側鎖を有する環状デプシペプチドである。我々はこの特徴的な構造と高い活性に注目し、構造活性相関へ向けた Homophymine A の全合成研究を行った。

＜方法と結果＞ 合成計画として各異常アミノ酸を立体制御下に合成し、それぞれを Fmoc 固相合成法によりカップリングすることを考えた。まず L-pyroGlu を出発原料に ADH と diMeGln の合成を検討した。ADH は Z 選択的 Horner-Wadsworth-Emmons 反応、つづくジヒドロキシル化、脱保護により導いた。また、二度のジアステレオ選択的アルキル化などにより diMe-Gln の合成を行うことができた。



Homophymine A

次に、Thr より数工程で Fmoc-β-MeOThr の合成と、イソ吉草酸クロリドよりジアステレオ選択的な還元反応を経て Fmoc-AHDH の合成法を確立することができた。合成した各異常アミノ酸は固相合成で利用するために保護基の変換等を検討中である。さらに Fmoc 固相合成法を用いて、環状部を構成するアミノ酸をカップリングし、直鎖ペプチドを得ることができた。その後、デプシ部での環化を試みたが反応は進行しなかった。現在、環化部位の検討をおこなっている。

1) Zampella, A. *et al.*, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5319-5327.

cyclic depsi peptide, CCR5 inhibitor, unusual amino acid

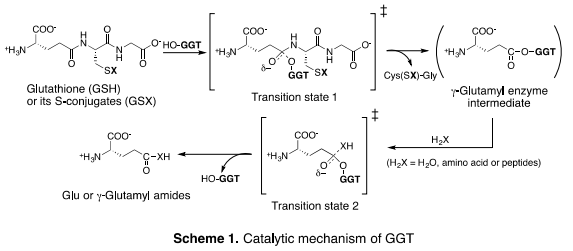
講演番号：3A07a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ A 校舎 07 会場

ヒトγ-グルタミルトランスペプチダーゼの強力な反応機構依存的カーバメート阻害剤の開発

Development of Potent Mechanism-Based Carbamate Inhibitors of Human Gamma-Glutamyl Transpeptidase

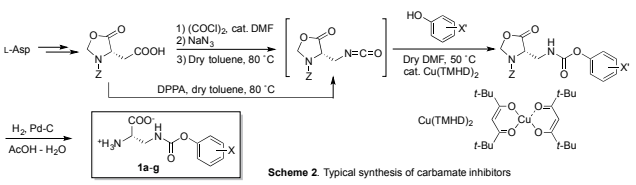
○李 春杰[1]、尾崎 文音[1]、渡辺 文太[1]、肥塚 崇男[2]、平竹 潤[1] ([1]京都大院農、[2]山口大農)
○Chunjie Li[1], Ayane Ozaki[1], Bunta Watanabe[1], Takao Koeduka[2], Jun Hiratake[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Yamaguchi Univ.)

【背景と目的】γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) は、抗酸化物質グルタチオン(GSH) の加水分解およびγ-グルタミル基転移反応を行うほぼ唯一の酵素である。GGT は細胞外の GSH を加水分解し、細胞の新たな GSH 生合成に必要な Cys を供給するため、一般に抗酸化酵素と考えられている。しかしその一方、GSH を加水分解し、活性なチオールである Cys-Gly を生じ、これが活性酸素種を発生させるため、GGT はプロオキシダント酵素としての側面をもち、GGT の高発現はガン細胞の抗ガン剤耐性獲得や虚血性心疾患、動脈硬化症などの病態と深く関係している。そこで、本研究では、GGT の反応機構 (Scheme 1) に基づき、ヒト GGT を強力に阻害するカーバメート系の新しい反応機構依存的阻害剤を開発した。



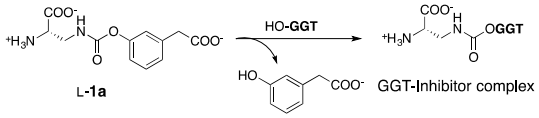
Scheme 1. Catalytic mechanism of GGT

【方法】 L- および D-Asp から誘導した β-アシルアジドを Curtius 転位によりイソシアナートに導き、銅触媒存在下で、置換フェノールを付加させ、カーバメートを合成した。$Cu(TMHD)_2$ 触媒が収率よく、カーバメートを与えることを見いだし、diphenylphosphoryl azide (DPPA) を用いたワンポット Curtius 転位とともに合成ルートを確立した。



Scheme 2. Typical synthesis of carbamate inhibitors

【結果】カーバメート系阻害剤は強力かつ不可逆的に GGT を阻害した。特に L-Asp から誘導した化合物 L-**1a** のヒト GGT に対する阻害活性 k_{on} (酵素失活の二次反応速度定数) は 39,600 M^{-1} s^{-1} に達し、天然物由来の GGT 阻害剤アシビシン (k_{on} = 0.40 M^{-1} s^{-1}) の約 99,000 倍、現在最強の GGT 阻害剤 GGsTop^{TM} (k_{on} = 51 M^{-1} s^{-1}) の約 780 倍の非常に強い阻害活性を示した。興味深いことに、フェノールの置換基の位置によって著しい阻害活性の違いが見られ、*m*-カルボキシメチル基がヒト GGT の活性中心に対する強い親和性のカギとなることが判明した。また、D-体のカーバメート D-**1a** もヒト GGT を不可逆的に阻害し、その阻害活性は L-体の 18%程度であった。阻害剤により失活した酵素は、室温 24 時間あるいは 4°C で一週間経っても活性を回復せず、酵素の活性中心残基と強固な結合を形成していることが推定され（Scheme 3）、安定なカーバメート系 GGT 阻害剤は広い応用が期待される。



Scheme 3. Proposed mechanism of GGT inactivation by carbamate inhibtior **1a**

GGT, Inhibitor, Carbamate

講演番号：3A07a17
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ A 校舎 07 会場

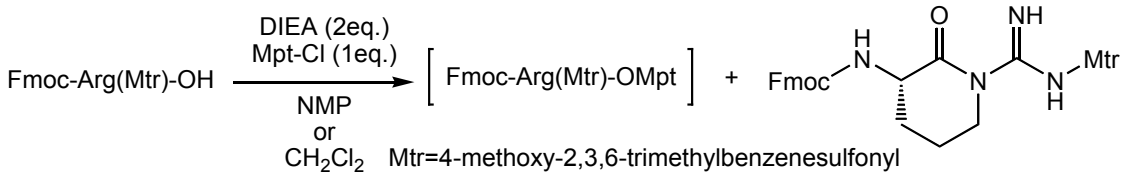
Fmoc-アルギニン誘導体―ジメチルチオホスフィン酸混合酸無水物のラクタム化の抑制
Lactam formation of Fmoc-arginine-dimethylphosphinothioic mixed anhydride derivative

○赤司 里奈、岩山 祐己、稲津 敏行（東海大工）
○Rina Akashi, Yuki Iwayama, Toshiyuki Inazu (Tokai Univ.)

【はじめに】

ペプチド合成では一般に、α-アミノ保護したアミノ酸のカルボキシル基を活性化させ、反応が進められる。また、側鎖に官能基を持つ場合、それらを保護する必要がある。しかし、アルギニン残基の場合は、側鎖のグアニジノ基の求核性が高く、保護しても分子内でアシル化し、δ－ラクタム構造を形成する。古くから、Z-Arg(NO_2)- ONp でさえもラクタムを形成することが知られている。最近では、Fmoc-Arg(Pbf)-OH と *N*-メチルペプチドを(1-シアノ-2-エトキシ-2-オキソエチリデンアミノオキシ)ジメチルアミノ-モルホリノ-カルベニウムヘキサフルオロリン酸塩(COMU)でカップリングすると、室温で 3 時間では 55%、75℃で 20 分では 88%、ラクタムを生成することが報告されている [1]。

一方、アミノ酸―ジメチルチオホスフィン酸混合酸無水物(Mpt-MA)は、酸素求核剤との反応性を示さず、窒素求核剤と選択的にカルボニル基側でのみ反応できるため、糖水酸基を無保護で使用でき、糖ペプチド合成に広く利用されている [2]。しかし、アルギニンを含有するペプチドの場合、収率の低下が認められることがある。そこで本研究では、Fmoc-アルギニン誘導体を Mpt-MA に導いた際に生成するラクタム体を定量し、その抑制条件を明らかにすることを目的にした。



【実験方法】

N-メチル-2-ピロリジノン(NMP)中、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン(DIEA) 2 当量存在下 Fmoc-Arg(Mtr)-OH と塩化ジメチルホスフィノチオイル(Mpt-Cl)を反応させ、対応する Mpt-MA を調製した(30min 22%)。この時、同時に生成する対応するラクタム体をシリカゲル薄層クロマト単離し収率を求めた。種々検討した結果、溶媒に CH_2Cl_2 を用いると、ラクタムの生成が大きく減少することが分かった。現在さらに詳細に条件検討を行っている。

【参考文献】
1)R. Roodbeen, S. L. Pedersen, M. Hosseini, K., *J. Org. Chem.*, 2012, **32**, 7106-7111.
2)Y. Tomabechi, Y. Odate, R. Izumi, K. Haneda, T. Inazu, *Carbohydr . Res.*, 2010, **17**, 2458-2463.

dimethylphosphinothioic mixed anhydride, Fmoc-arginine derivative, lactam formation

講演番号：3A07p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ A 校舎 07 会場

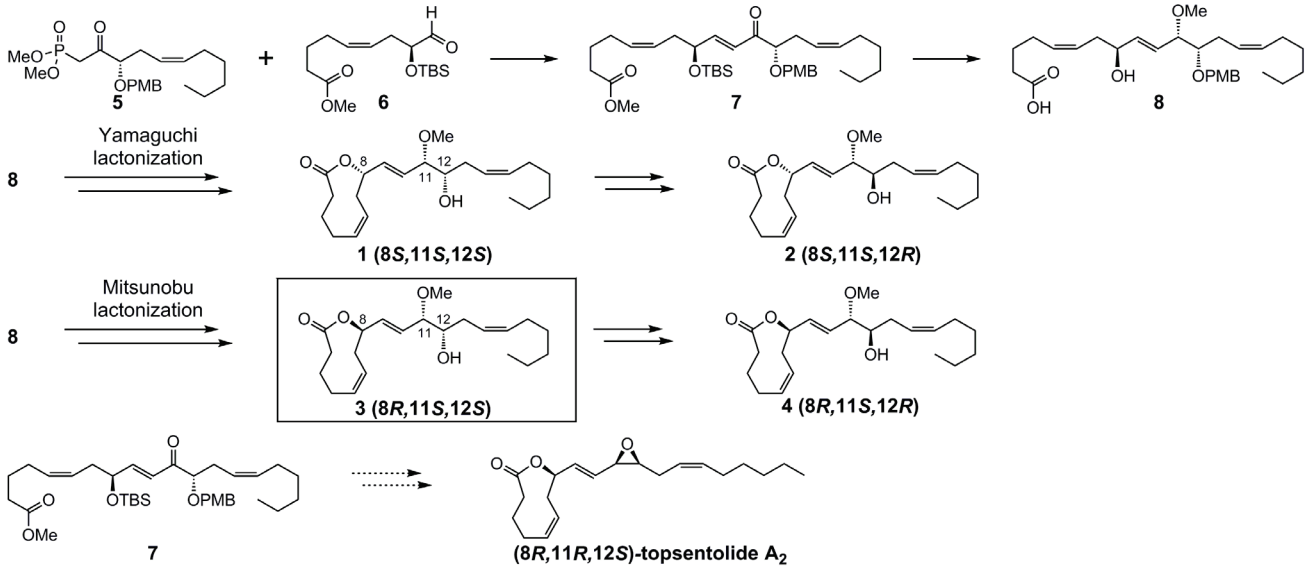
topsentolide C_2 および A_2 の合成研究

Synthetic studies on topsentolide C_2 and A_2

○十和田 諒、倉科 友輔、桑原 重文 (東北大院農)
○Ryo TOWADA, Yusuke KURASHINA, Shigefumi KUWAHARA (Tohoku Univ.)

[目的]topsentolide C_2 は 2006 年に Jung らにより海綿 *Topsentia* sp. より単離された、9 員環ラクトンを有する不飽和脂肪酸であり、その C-8、11 位の絶対立体配置は未決定である[1)]。本研究では、4 種のジアステレオマーを合成し、NMR データの比較を行うことによりその絶対立体配置を決定することを目的とした。また、同時に単離された topsentolide A_2 を、topsentolide C_2 合成の中間体より導くことで同様にその絶対立体配置を決定することとした。

[方法・結果]phosphonate **5** と aldehyde **6** との HWE 反応により **7** とし、数工程の変換を経て共通中間体 **8** を得た。**8** を山口法または光延法でラクトン化した後に PMB 基を脱保護することにより **1** 、 **3** を合成し、それぞれの C-12 位の水酸基を光延反転することにより **2**、**4** を得た。得られた 4 つのジアステレオマーの ^{1}H、^{13}C－NMR データから、天然物は 8*R*、11*S*、12*S* 体（**3**）であると決定した。また、topsentolide A_2 の絶対立体配置を 8*R*、11*R*、12*S* であると予想し、現在中間体 **7** からの合成を進めている。



1)H. Jung *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 567-571.

Topsentolide, Total synthesis, Lactonization

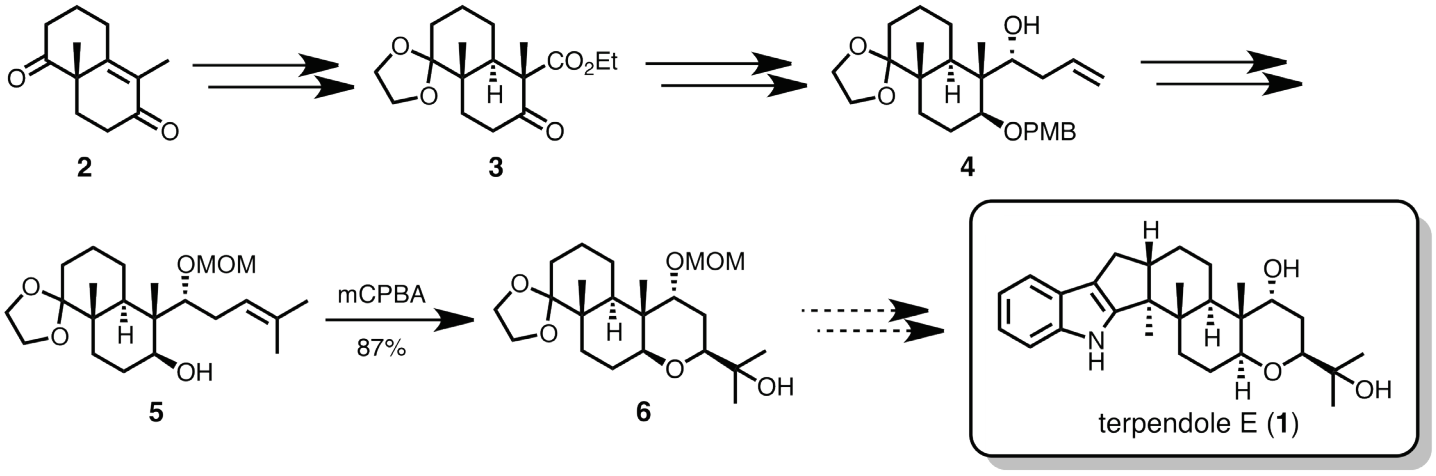
講演番号：3A07p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ A 校舎 07 会場

Terpendole E の合成研究

Synthetic studies on terpendole E

○寺西 貴昭、桑原 重文（東北大院農）
○Takaaki TERANISHI, Shigefumi KUWAHARA (Tohoku Univ.)

［背景］ Terpendole E (**1**)は 1995 年、大村らにより土壌糸状菌 *Albophoma yamanashiensis* の培養液より単離されたインドールジテルペン化合物であり、アシル CoA:コレステロールアシルトランスフェラーゼ阻害活性を有すると報告された [1]。その後、長田らにより微小管に作用することなく、細胞分裂の M 期特異的なモータータンパク質である Eg5 を阻害し、紡錘体形成異常を引き起こすという作用が報告され、抗がん剤への応用が期待されている [2,3]。我々は **1** の初の全合成を達成するとともに、標品および類縁体等の供給を通して、新規医薬品開発研究へと展開することを目指した。
［方法・結果］ Wieland-Miescher ketone 類縁体 **2** を出発物質とし、文献に従ってエステル **3** へと導いた後、アリル単位を導入してアルコール **4** を得た。**4** より Lemieux-Johnson 酸化、Wittig 反応などの数工程でアルケン **5** を調製した。**5** を mCPBA で処理したところ、エポキシドを経由したエーテル環形成が立体選択的に進行し 3 環性化合物保護体 **6** を良好な収率で得た。今後は当研究室で確立された方法に基づき、シクロペンタン部およびインドール環を構築することで **1** へと導く予定である。



1) Omura, S. *et al.*, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 793.
2) Osada, H. *et al.*, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 131.
3) Osada, H. *et al.*, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 1611.

terpendole E, kinesin, intramolecular etherification

講演番号：3A07p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ A 校舎 07 会場

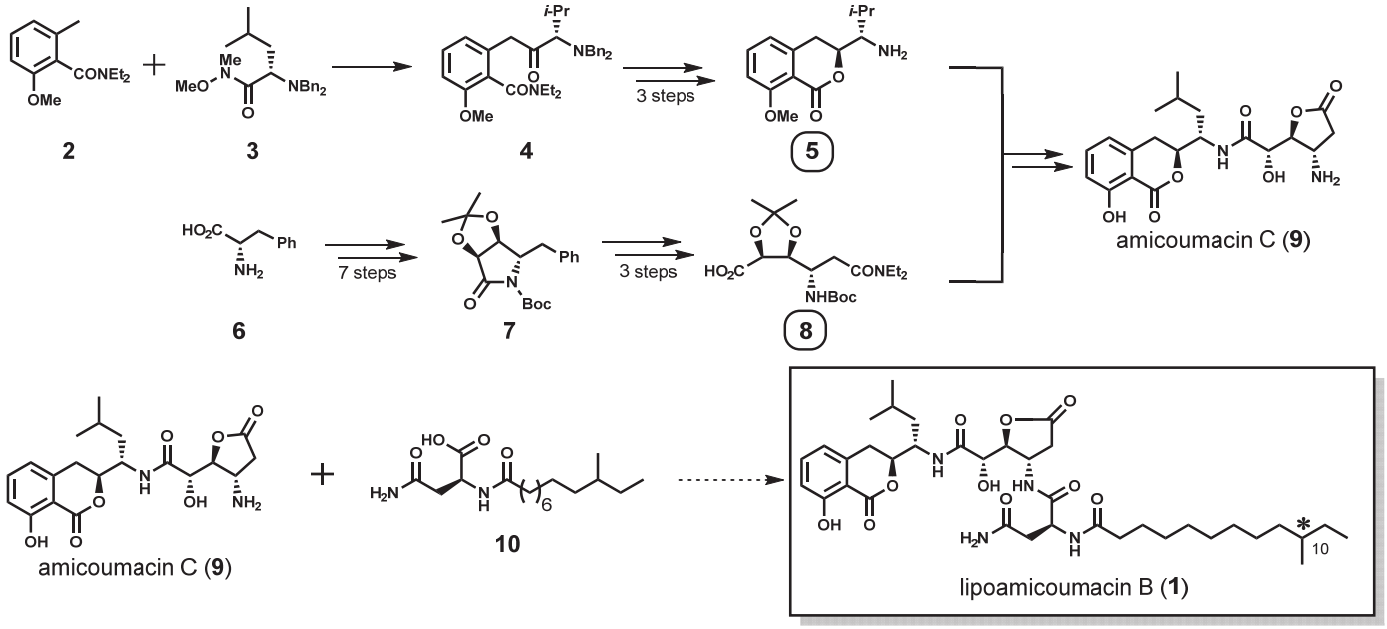
lipoamicoumacin B の全合成研究

Synthetic studies on lipoamicoumacin B

○鈴木 智美、永沢 友裕、桑原 重文（東北大院農）
○Tomomi SUZUKI, Tomohiro NAGASAWA, Shigefumi KUWAHARA (Tohoku Univ.)

【目的】lipoamicoumacin B (**1**) は海洋細菌 *Bacillus subtilis* の培養液より単離された新規リポアミクマシン化合物である。**1** の C-10 位の絶対立体配置が未決定であるため、本研究では合成的手法を用いて絶対立体配置を決定することを目的とした。

【方法・結果】L-ロイシンから 3 工程で得た **3** により、別途調製した **2** をアシル化することでケトアミド **4** とした後、ケトンの立体選択的還元と環化によって左側アミンフラグメント **5** を調製した。一方、L-フェニルアラニン（**6**）を出発原料とし、7 工程の変換を経てラクタム **7** を得た。**7** に対し、芳香環の酸化開裂と生じたカルボン酸のアミド化、続くラクタムの加水分解により右側カルボン酸フラグメント **8** を調製した。得られた **5** と **8** とを縮合、続いて環化することで、amicoumacin C (**9**) の全合成を達成した。現在、β-シトロネロールを出発原料とし、側鎖フラグメント(**10**) を調製している。今後、amicoumacin C (**9**) と側鎖フラグメント(**10**) との縮合によって、lipoamicoumacin B (**1**) へと導けるものと考えている。



1) Pei-Yuan Qian. *et al.*, *Marine Drugs* **2012**, *10*,319.

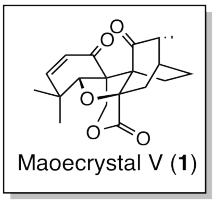
total synthesis, lipoamicoumacin B, amicoumacin C

講演番号：3A07p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ A 校舎 07 会場

抗腫瘍物質マオエクリスタル V の合成研究

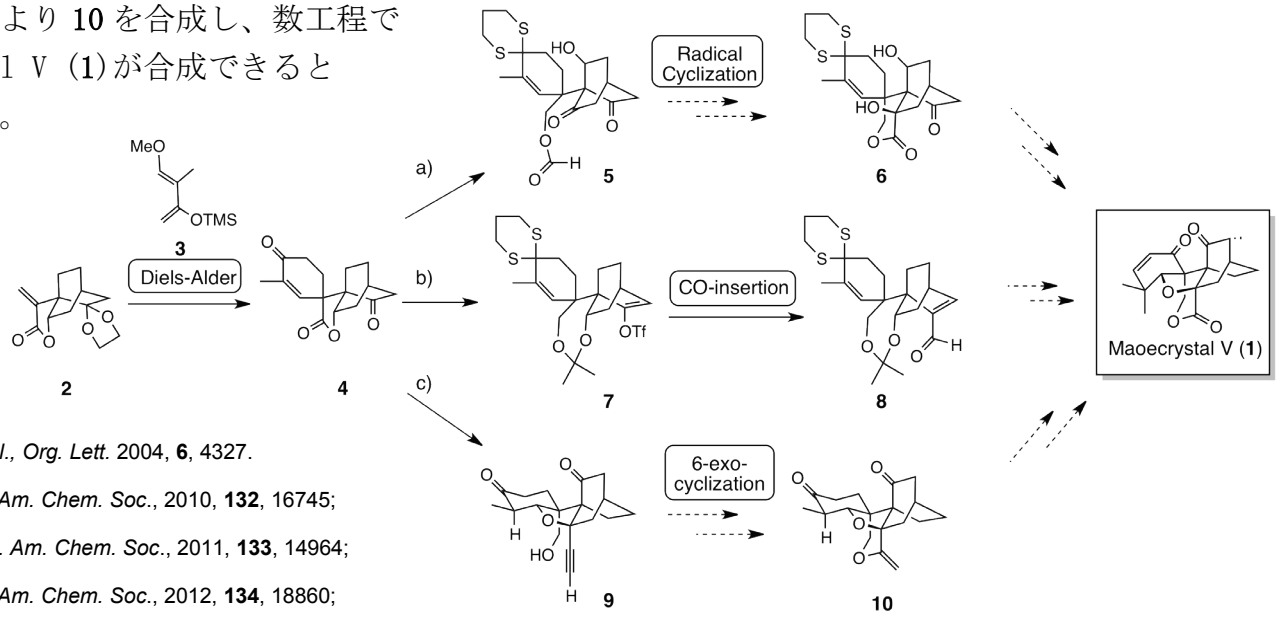
Synthetic Study of Maoecrystal V

○佐藤 恵里子[1]、小竹 正晃[1]、佐々木 郁香[1]、浅尾 洋樹[1]、島崎 泰治[1]、山田 てい子[1]、桑原 重文[1]、清田 洋正[2] ([1]東北大院農・生物産業創成、[2]岡山大院・環境生命)
○Eriko SATO[1], Masaaki KOTAKE[1], Ayaka SASAKI[1], Hiroki ASAO[1], Yasuharu SHIMASAKI[1], Teiko YAMADA[1], Shigehumi KUWAHARA[1], Hiromasa KIYOTA[2] ([1]Tohoku Univ., [2]Okayama Univ.)



【目的】Maoecrystal V (**1**)は、中国産ハーブの一種 *Isodon eriocalyx* より単離、構造決定された転位型カウレノイドである[1]。HeLa 細胞に対して選択的に強い細胞毒性(IC_{50} = 0.02 μg/ml)を示すことから、新規抗ガン剤のリードとして期待されている。既に全合成が報告されているが[2]、我々も異なるアプローチで高選択的な全合成を目的として研究を行っている。

【方法・結果】Cyclohexen-1-one を出発原料とし、８工程でジエノフィル **2** を得た。**2** とジエン **3** から Diels-Alder 反応によりケトラクトン **4** を高収率かつ立体選択的に得ることに成功した。ルート a では、**4** より６工程でホルマート **5** を得た。**5** に SmI_2 を用いたラジカル環化でラクトン **6** を合成しようと試みたが、望む化合物は得られなかった。ルート b では、**4** より５工程でエノールトリフラート **7** を合成し、Pd を用いた CO 挿入反応によりアルデヒド **8** を得た。現在酸化の検討をしており、今後エステル交換により６員環ラクトン形成を行う予定である。ルート c では、一方のケトカルボニル基に選択的にアルキンを求核付加させ、その後ハロエーテル環化などを経て **9** を得た。今後は 6-*exo*-環化反応により **10** を合成し、数工程で maoecrystal V (**1**)が合成できると考えている。



1) S. H. Li *et al., Org. Lett.* 2004, **6**, 4327.
2) J. Gong, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 16745;
J. Y. Cha, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 14964;
F. Peng, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 18860;
P. Lu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 14552.

radical cyclization, Diels-Alder reaction, bromoetherification

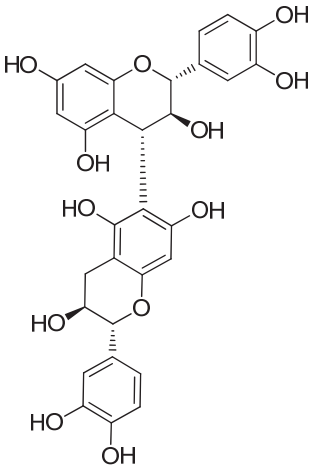
講演番号：3A07p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ A 校舎 07 会場

分子内反応を用いた 4-6 縮合型(+)-catechin 2 量体 procyanidin B6 の立体選択的合成

Regioselective synthesis of procyanidin B6, 4-6 condensed (+)-catechin dimer, using intramolecular condensation reaction.

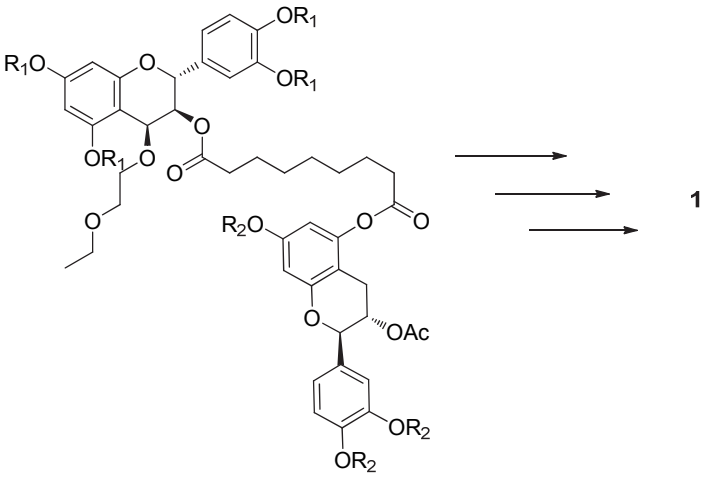
○東野 雄祐[1]、森 一起[2]、岡本 泰輔[1]、中島 範行[3]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大院・工、[2]大阪電通大・工、[3]富山県大・工)
○Yusuke Higashino[1], Kazuki Mori[2], Taisuke Okamoto[1], Noriyuki Nakajima[3], Akiko Saito[1,2] ([1]ASE,OECU, [2]OECU, [3]TPU)

【目的】プロアントシアニジンは、いわゆる「カテキン」が重合化した化合物であり様々な食品・植物に含まれている。我々は、日々、フルーツとして、ジュースとして、お茶やカカオ製品として大量に摂取しており、健康によい「ポリフェノール」として広く知られている。しかし、様々な重合度・修飾・立体化学が異なるものが混合物として存在し純粋に単離することが難しいため詳細な構造活性相関研究が難しい。我々は様々な立体を持つプロアントシアニジンの化合物ライブラリーを構築し、その活性発現機構の解明を進めている。プロアントシアニジンの中でも、4 位と 6 位が縮合したオリゴマーは天然でも微量であり、入手が困難であった。本発表では、立体選択的・高収率で 4-6 型オリゴマーの合成が可能な手法の開発を達成したので報告する。



4-6 type catechin dimer
Procyanidin B6 (**1**)

【方法と結果】我々はこれまでに分子間反応と分子内反応の両方を駆使して、様々な立体を持つ化合物の合成を行ってきた。様々な検討の結果、求核体の 5 位と求電子体の 3 位をアゼライン酸で結合させて分子内反応を行う事で、完全に立体選択的に 4-6 結合を構築することに成功した。ごく最近、8 位を修飾した化合物を用いた 4-6 縮合型オリゴマーの効率的な合成法の開発が報告された [1)]。一方我々の方法も、8 位の修飾を必要とせずさらに長いオリゴマーを合成可能な非常に有用な手法だと考えている [2)]。



1） G. Watanabe, K. Ohmori and K. Suzuki*, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 5210.

procyanidin B6, Regioselective synthesis, intramolecular coupling

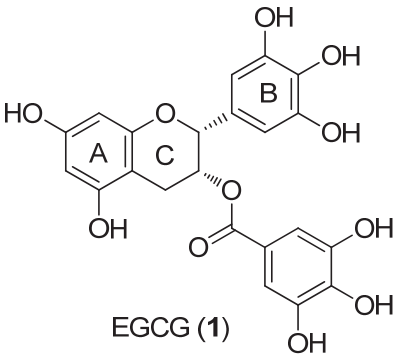
講演番号：3A07p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ A 校舎 07 会場

Epigallocatechin 2 量体の合成と構造-活性相関研究

Synthesis of epigallocatechin dimer and their structure-activity-relationships study

○高野 翔太[1]、岡本 泰輔[2]、法島 太一[1]、岡本 修平[2]、石原 沙也加[2]、土井 翔馬[2]、石田 匡彦[1]、中島 範行[3]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大・工、[2]大阪電通大院・工、[3]富山県大・工)
○ Shota TAKANO[1], Taisuke OKAMOTO[2], Taichi HOJIMA[1], Syuhei OKAMOTO[2], Sayaka ISHIHARA[2], Shoma DOI[2], Masahiko ISHIDA[1], Noriyuki NAKAJIMA[3], Akiko SAITO[1,2] ([1]OECU, [2]OECU.ASE, [3]TPU)

【目的】

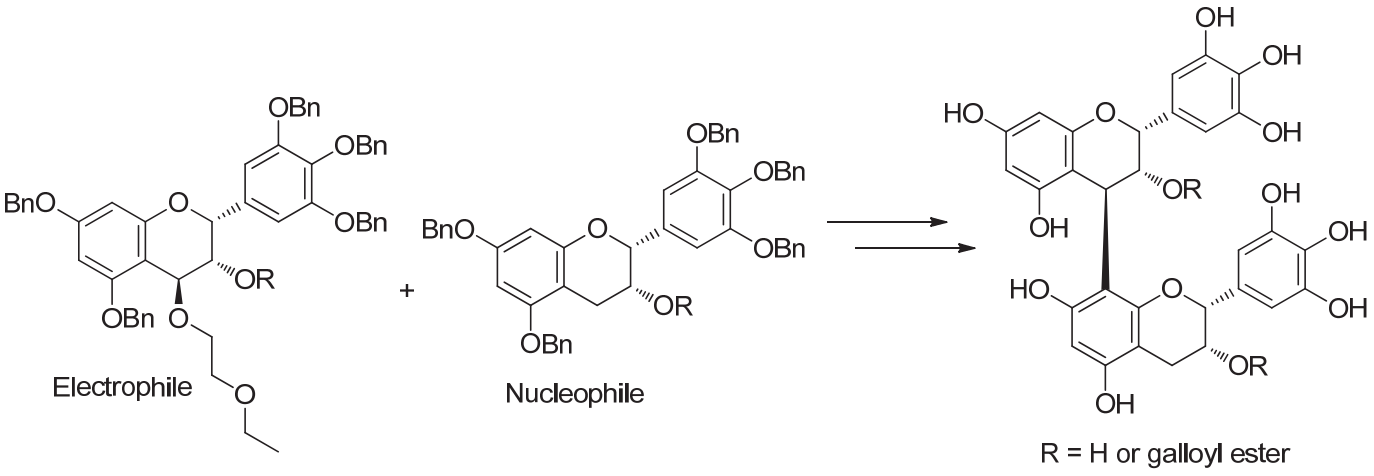


EGCG (**1**)

緑茶カテキンとして知られているエピガロカテキンガレート(EGCG)(**1**)は、強い抗酸化活性や、ガン細胞選択的細胞増殖活性等、様々な生物活性を持つことが知られている。また、我々はflavan-3-ol類のオリゴマー、proanthocyanidinの強い活性に興味を持ち、オリゴマー合成法の開発、及び、構造-活性相関研究を進めてきた。それらの研究において、ガロイル基を持つprocyanidin類2量体(B環に水酸基を2個持つグループ)がHeLa S3細胞（ヒト子宮頸ガン細胞）に対して非常に強い細胞増殖抑制活性を示すことを明らかにしてきた。これらの研究結果から、EGCG(**1**)のオリゴマーであれば、さらに強い活性を有することが予想される。そこで我々は、EGCG(**1**)をユニットとするオリゴマー合成法の開発を進めた。

【方法と結果】

EGCG（**1**)を出発原料として、ElectrophileとNucleophileを合成した（Rは、水酸基、または、ガロイル基である)。それらを縮合することで、中程度の収率でEGCGオリゴマーを得ることができた。現在、合成した化合物の構造-活性相関研究を進めている。



proanthocyanidin, procyanidin, HeLa S3 cells

講演番号：3A07p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ A 校舎 07 会場

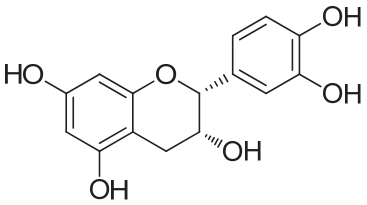
有機合成 procyanidin oligomer 2~6 量体の SARS-コロナウイルス増殖阻害活性、および、ガン細胞増殖抑制活性

Inhibitory activities of proliferation of SARS-coronavirus and cancer cells by synthesized procyanidin oligomers (2~6 mers)

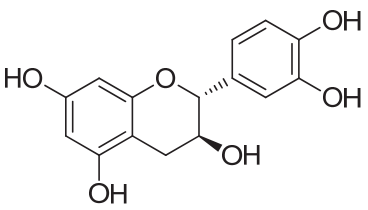
○濱田 義知[1]、岡本 泰輔[2]、吉仲 由之[3]、石原 沙也加[2]、岡本 修平[2]、伊藤 孝太郎[1]、中島 範行[4]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電気通信大・工、[2]大阪電気通信大院・工、[3]東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・ウイルス制御、[4]富山県立大・工)
○Yoshitomo HAMADA[1], Taisuke OKAMOTO[2], Yoshiyuki YOSHINAKA[3], Sayaka ISHIHARA[2], Syuhei OKAMOTO[2], Kotaro ITO[1], noriyuki NAKAJIMA[4], Akiko SAITO[1,2] ([1]OECU, [2]ASE,OECU, [3]TMDU, [4]TPU)

【目的】

Proanthocyanidin (PAs)は、お茶やカカオの嗜好品、ブドウ等の果物類、スギ等の樹皮など、多くの植物に含まれる高機能性ポリフェノール化合物である。これらは、極めて強い抗酸化活性・動脈硬化抑制活性・抗腫瘍活性・抗炎症作用・発ガン抑制作用等、様々な生物活性を示す。しかし、天然からは複雑な類縁体化合物として得られ純粋に単離することが難しく、詳細な構造-活性相関研究や活性発現機構についてはほとんど解明されていない。我々はこれまでに、立体選択的な PAs 合成法の開発を進め、詳細な構造-活性相関研究を進めている。これまで我々は、(-)-epicatechin 5 量体まで、(+)-catechin 3 量体までの合成を報告している [1)]。本発表ではさらに合成研究を進め、(-)-epicatechin 6 量体、(+)-catechin 4～6 量体の合成を行い、ウイルスに対する増殖阻害活性試験、及び、ガン細胞増殖阻害活性試験を行ったので報告する。



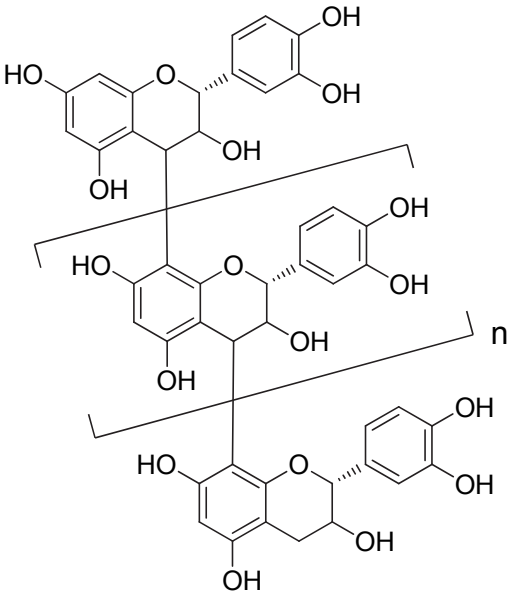
(-) - epicatechin (**1**)



(+) - catechin (**2**)

【方法と結果】

1、および、**2** から誘導した electrophile と nucleophile を用いて上記の長さを持つ procyanidin oligomer を合成した。現在までに(-)-epicatechin (**1**)の 2、3、6 量体について、SARS-コロナウイルス (SARS-CoV) に対する増殖阻害活性試験を行ったところ、2 量体には増殖阻害活性が見られなかったが、3、6 量体には強い活性が見られた。IC_{50} は、3 量体が 15 μg/mL、6 量体が 20 μg/mL と、3 量体が 6 量体よりも SARS-CoV の増殖阻害活性が強い事を確認した。3 量体の 100μg/mL では細胞増殖にはほとんど影響はなかった。また、3 量体以上のオリゴマーには、強いガン細胞増殖阻害活性が確認されており、これらをまとめて報告する予定である。



procyanidin oligomers

1) A. Saito *et al.*, *Tetrahedron* **65** (2009) 7422-7428.

procyanidin iligomer, inhibition of SARS-coronavirus proliferation, inhibition of cancer cells proliferation

講演番号：3A07p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ A 校舎 07 会場

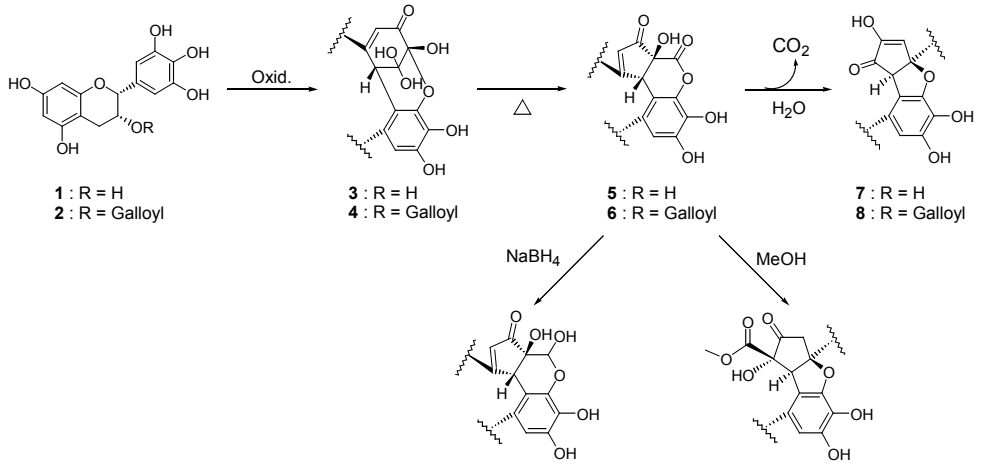
ウーロンテアニン類の生成機構の証明

Formation Mechanism of Oolongtheanins

○廣瀬 紗弓、柳瀬 笑子 (岐阜大院応生)
○Sayumi HIROSE, Emiko YANASE (Gifu Univ.)

【目的】カテキン類は茶葉に多く含まれており、抗酸化作用、抗がん作用など様々な生理的機能が報告されている。茶葉中のカテキン類は紅茶やウーロン茶の製造過程で酸化、重合し、特徴的な二量体やポリマーを形成する。oolongtheanin 類はウーロン茶中に含まれる二量体であり、様々な生理的機能が期待されているが、微量成分であるが故にその詳細な研究は難しく、有機化学的合成法も確立されていない。そこで本研究では、効率的な合成法の確立を目指し、oolongtheanin 類の生成機構について研究を行い、その証明に至ったので報告する。

【方法・結果】EGC (**1**)及び EGCg (**2**)の酸化反応の検討を行った結果、酸化剤として $CuCl_2$ を用いた場合に oolongtheanin 類 (**7, 8**)が得られることが分かった。この反応について詳細に追跡したところ、三段階の反応が進行しており、2 つの中間体 (**I**, **II**)の存在が明らかとなった。各種機器分析及び誘導化反応の結果、中間体 **I** は既知化合物 dehydrotheasinensin C(**3**)または A (**4**)、中間体 **II** は **5** または **6** のような構造であると決定し、pro-oolongtheanin 類と名付けた。これらの中間体を基に、oolongtheanin 類の酸化生成機構を推定した。**II** から最終目的物への反応は、GC-MS により脱二酸化炭素が起きていることを確認した。また、NMR チューブ中で **II** と水を反応させ、NMR で経過を追跡することでもう 1 つの中間体 (**III**)を捉えることに成功している。



1) Tanaka, T. Yan, Li., Matsuo, Y., Shibahara, A., Kouno, I. (2010) XXV th International Conference on Polyphenols. Polyphenols Communications 2010 1:165

2) Hirose, S.; Tomatsu, K.; Yanase, E. *Tetrahedron lett.* 2013, 54, 7040.

Catechin, Oolong tea, Oolongtheanin

講演番号：3A07p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ A 校舎 07 会場

天然フラボノイド ugonin 類縁体の選択的合成法の開発

Development of selective synthetic method of natural flavonoid ugonin analogues

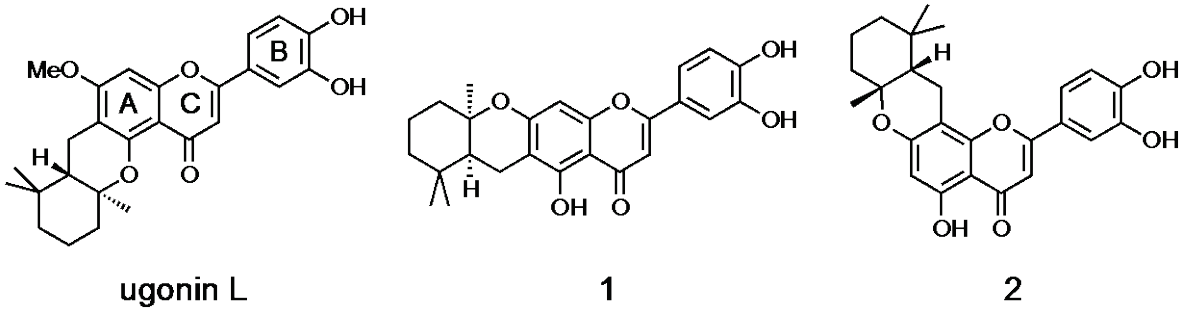
○田中 寛知[1]、長谷川 啓[2]、森 由希恵[2]、川井 悟[3]、吉澤 結子[2]、常盤野 哲生[2] ([1]秋田県立大院生資科、[2]秋田県立大生資科、[3]東京電機大理工)
○Hirotoshi TANAKA[1], Kei HASEGAWA[2], Yukie MORI[2], Satoru KAWAII[3], Yuko YOSHIZAWA[2], Tetsuo TOKIWANO[2] ([1]Akita Pref. Univ. Grad. Sc., [2]Akita Pref. Univ., [3]Tokyo Denki Univ.)

【背景と目的】

フラボノイドはジフェニルプロパン構造を持つ植物の二次代謝産物で、抗酸化ポリフェノール化合物の一種として知られている。このフラボノイド骨格にプレニル基が付加した化合物も天然にはよく見出され、母核とは異なる生物活性を発現することが多い。2003 年にミヤコジマハナワラビから単離された化合物群（Fig. 1）は、フラボノイド骨格に付加したプレニル側鎖がさらに環状化した構造を特徴としており、好中球のスーパーオキシドアニオン生成とエラスターゼ生成の阻害活性を示すことが報告されている(1)。これまで当研究室では、プレニルフラボノイド化合物群に汎用性の高い合成法を確立し、天然物の一つである ugonin L を合成した。今回は、確立した経路を利用することで同一の出発物から複数の類縁体を作り分け可能な合成法の開発を行い、エーテル環化する水酸基やプレニル化の位置が異なる類縁体 **1**、**2** の合成を目指した。

【結果】

3,5-dimethoxyphenol にゲラニル基を導入し、シクロヘキサンおよびエーテル環が縮環した A 環部分を合成した。続くケイ皮酸誘導体に直接 Friedel-Crafts 反応を行うと、ugonin L へ至る中間化合物が主生成物として得られる。そこで反応点の一方をハロゲン化し、その後 Friedel-Crafts 反応に供することで、天然物類縁体 **1**、**2** へ至るカルコン異性体を得ることができた。今後は脱ハロゲン化した後にフラボノイド骨格を構築することで、天然物 **1**、**2** の合成を目指す。さらに合成化合物について細胞毒性試験を行う予定である。



ugonin L　　1　　2

Fig. 1

文献(1) Y.-C. Huang, *et al*., *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1273-1278.

flavonoid, terpene, synthesis

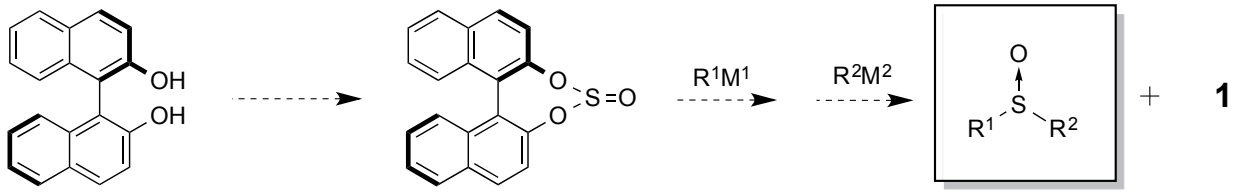
講演番号：3A07p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ A 校舎 07 会場

C_2 対称キラルサルファイトを用いる光学活性スルホキシドの合成

Synthesis of Optically Active Sulfoxides Using C_2 Symmetry Chiral Sulfite

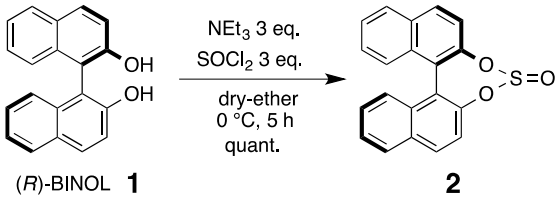
○林 光輝、濱本 博三、塩入 孝之、松儀 真人 (名城大農)
○Koki HAYASHI, Hiromi HAMAMOTO, Takayuki SHIOIRI, Masato MATSUGI (Meijo Univ.)

【目的】 医薬品をはじめとする生理活性物質には、光学活性なスルホキシド部位を有するものが存在する。光学活性スルホキシドの合成法として、 Andersen 法 [1] や Kagan 酸化 [2] がよく用いられるが、前者ではジアステレオマーの分離精製が必要であり、後者ではジアリール型スルフィドの高エナンチオ面選択的酸化反応は困難である。今回演者は、(*R*)-BINOL **1** 由来の C_2 対称性を有するサルファイト体 (C_2 対称キラルサルファイト) **2** を用い、高光学純度のジアリール型スルホキシドを合成する手法を計画した (**Scheme 1**) 。すなわち、**2** を不斉源として利用し、これに 2 種の異なるアリール型置換基を有する有機金属試薬を順番に反応させることで、ジアリール型の光学活性スルホキシドが高い光学純度で合成可能ではないかと考えた。そこで、まず **2** を合成し、予備的実験としてフェニルメチルスルホキシド **3** の不斉合成を試みた。

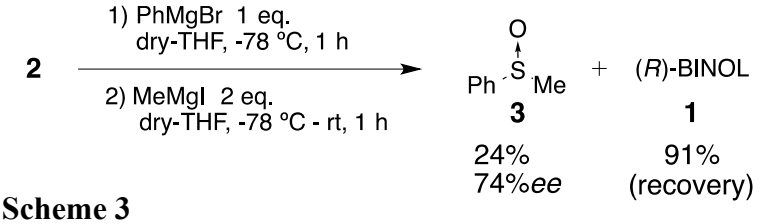


Scheme 1

【結果】 (*R*)-1,1'-bi-2-naphthol **1** に塩化チオニル、トリエチルアミンを作用させ **2** を定量的に合成した (**Scheme 2**) 。高希釈条件下、 PhMgBr の THF 溶液を -78 ºC で **2** の THF 溶液へ滴下した後、MeMgI のジエチルエーテル溶液を加え室温へと昇温させながら 1 時間反応をおこなった。その結果 、 **3** を低収率ではあるが、光学純度 74% *ee* で得ることができた (**Scheme 3**) 。



Scheme 2



Scheme 3

【References】

1) Andersen, K. K. *et al*. *J*. *Org*. *Chem*. **1984**, *49*, 4070-4072.
2) Kagan, H. B. *et al*. *J*. *Am*. *Chem*. *Soc*. **1984**, *106*, 8188-8193.

asymmetric synthesis, C_2 symmetry chiral sulfite, optically active sulfoxides

講演番号：3A07p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ A 校舎 07 会場

分子内 CH/π 相互作用を利用する高活性型メタセシス触媒の開発

Development of Highly Activated Metathesis Catalyst Utilizing Intramolecular CH/π Interaction

○犬飼 紗絵、小林 佑基、塩入 考之、濱本 博三、松儀 真人 (名城大農)
○Sae INUKAI, Yuki KOBAYASHI, Takayuki SHIOIRI, Hiromi HAMAMOTO, Masato MATSUGI (Meijo Univ.)

メタセシス反応は炭素-炭素結合を形成する重要な有機合成反応の一つであり、一般に Grubbs-Hoveyda 2nd generation **1a** が触媒として汎用されている。これまでに我々は、メタセシス触媒のリガンド部位を置換基修飾することで市販触媒 **1a** よりも高活性な触媒の合成に成功している [1]。

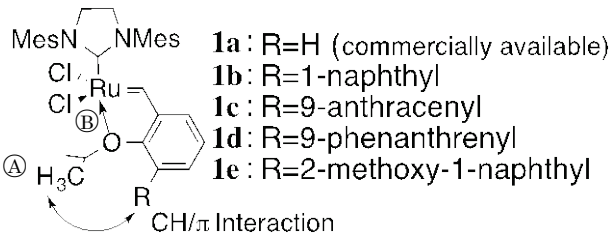


Figure 1

今回我々は、分子内 CH/π 相互作用 [2] に基づくリガンドのコンフォメーション制御がメタセシス触媒の活性に与える影響について調べた。リガンドの R 部位へ π 共役系を有する芳香族置換基を導入し、イソプロポキシ基の水素 Ⓐ との間に CH/π□ 相互作用を働かせることで、配位環境 Ⓑ に変化が生じ、触媒活性に影響を与える可能性があると考えた。π 共役系芳香族置換基として 1-naphthyl 基、9-anthracenyl 基、9-phenanthrenyl 基、2-methoxy-1-naphthyl 基を有する新規メタセシス触媒 **1b-1e** を合成した (**Figure 1**)。

今回合成した触媒 **1b-1e** の ^{1}H NMR および触媒 **1c** の Natural Bond Orbital 解析 [3] では、触媒のリガンド部位に分子内 CH/π 相互作用が働いていることが示唆された。これらの触媒を用いて、三置換ジエン体 **2** を基質とした閉環メタセシス反応を行ったところ、いずれの触媒においても市販触媒 **1a** よりも高い触媒活性を示すことがわかった (**Figure 2**)。

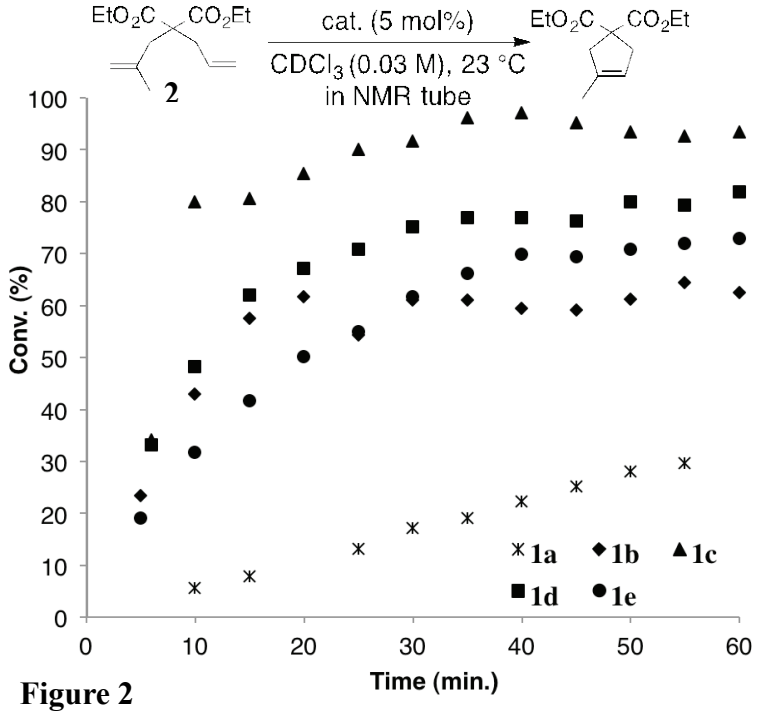


Figure 2

1) Matsugi, M. et al. *J. Org. Chem*. **2010**, *75*, 7905. 2) Nishio, M. et al. *The CH/π Interaction*; Wiley-VCH: New York, 1998. 3) M. J. Frisch, et al. Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

metathesis, CH/π Interaction, activation

講演番号：3A07p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ A 校舎 07 会場

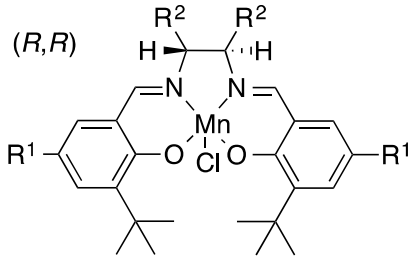
ライトフルオラスサレンマンガン錯体の合成と triphenylethylene の不斉エポキシ化反応

Synthesis and Asymmetric epoxidation of Triphenylethylene Using Light fluorous Salen Manganese Complex

○浅井 直輝、小林 佑基、塩入 孝之、濱本 博三、松儀 真人 (名城大農)
○Naoki ASAI, Yuki KOBAYASHI, Takayuki SHIOIRI, Hiromi HAMAMOTO, Masato MATSUGI (Meijo Univ.)

【目的】

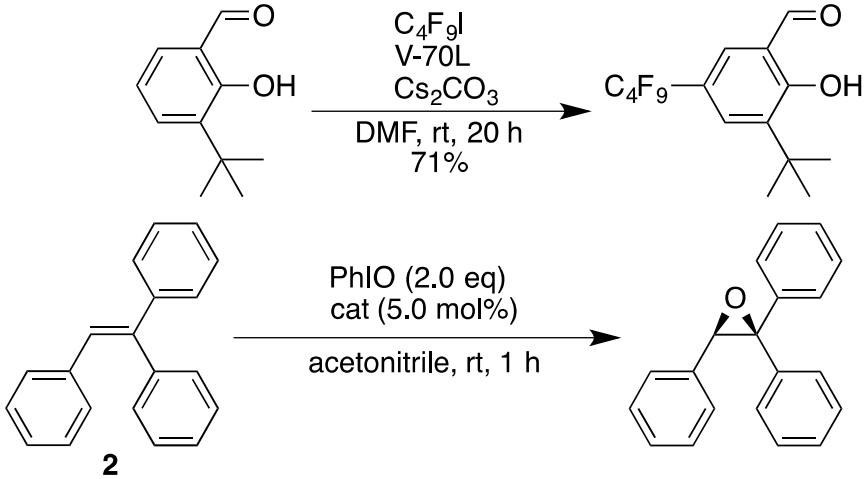
これまでに、当研究室ではライトフルオラスケミストリーを基点とすることで、高活性かつ回収可能なフルオラス向山縮合試薬 [1] やフルオラスメタセシス触媒 [2] を開発してきた。今回演者は、光学活性なサレンマンガン錯体のリガンド構造中にフルオラスタグを導入したフルオラスサレンマンガン錯体 **1a**, **1b** を合成し、オレフィンの不斉エポキシ化反応における本錯体の触媒活性とエナンチオ面選択性を調べた。



1a : $R^1 = C_4F_9$, R^2 = Ph
1b : $R^1 = C_4F_9$, -(R^2-R^2)- = -(C_4H_8)-
1c : R^1 = ^{t}Bu, -(R^2-R^2)- = -(C_4H_8)-

【結果】

当研究室で開発したパーフルオロアルキル化反応 [3] を鍵反応に用いることで、フルオラスサレンマンガン錯体 **1a**, **1b** を簡便に合成することに成功した。合成した錯体 **1a**, **1b** を触媒として用い、下図の条件で triphenylethylene **2** の不斉エポキシ化反応を行い、触媒活性と立体選択性を調べた。その結果、錯体 **1a**, **1b** のエナンチオ面選択性は市販触媒 **1c** (Jacobsen 触媒) より若干低かったが、酸化の触媒活性は向上していることがわかった。



cat	yield (%)	*ee* (%)
1a	85	58
1b	81	62
1c	70	64

【References】

1) Matsugi, M. et al. *Tetrahedron* **2012***, 68*, 3885. 2) Matsugi, M. et al. *J. Org. Chem*. **2010***, 75*, 7905.
3) Matsugi, M. et al. *Tetrahedron Lett*. **2008***, 49,* 4189.

light fluorous tag, salen manganese complex, perfluoroalkylation

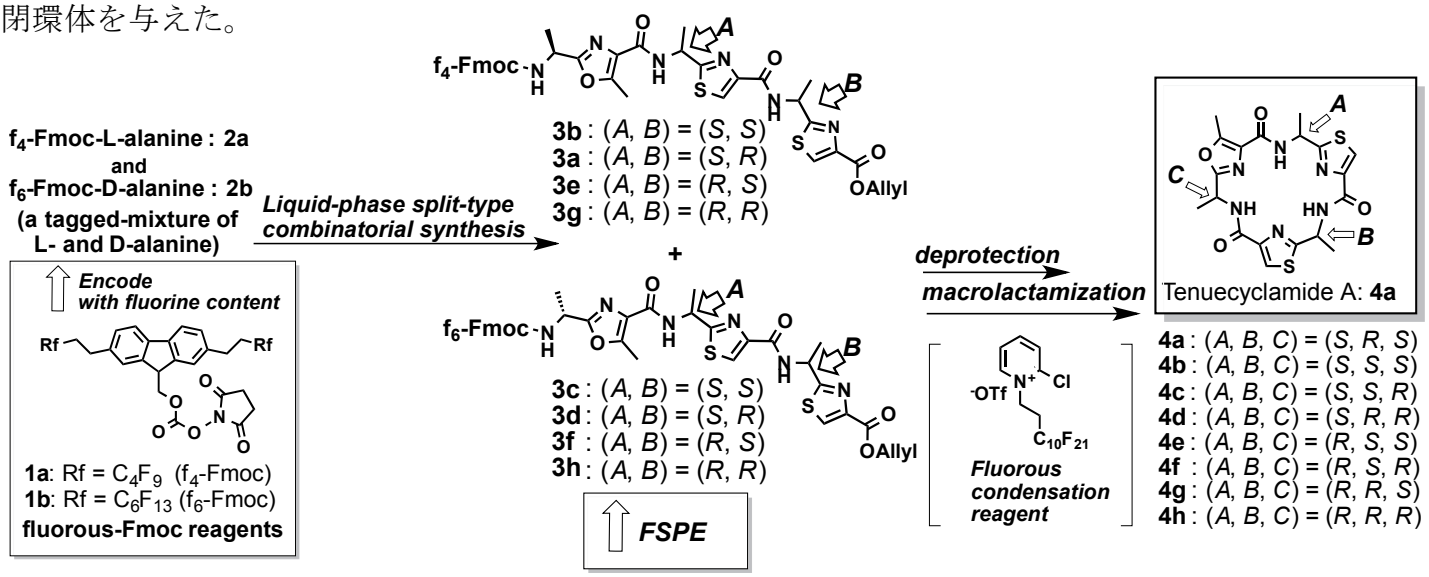
講演番号：3A07p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ A 校舎 07 会場

ライトフルオラス Fmoc 試薬を活用した Tenuecyclamide A 全立体異性体のスプリット型簡易合成
Split-type Concise Synthesis of All Stereoisomers of Tenuecyclamide A Utilizing Light Fluorous-Fmoc Reagents

○杉山 祐也、江口 文崇、高橋 広明、濱本 博三、塩入 孝之、松儀 真人 (名城大農)
○Yuya SUGIYAMA, Fumitaka EGUCHI, Hiroaki TAKAHASHI, Hiromi HAMAMOTO, Takayuki SHIOIRI, Masato MATSUGI (Meijo Univ.)

含フッ素化合物はフッ素含量の違いに基づいて、Fluorous Solid Phase Extraction (FSPE) により簡便に分離できる。したがって、フッ素含量の異なる様々なライトフルオラスタグを導入した Fmoc 試薬で立体配置の異なるアミノ酸を保護すると共に、本保護基を不斉中心のエンコード化試薬として利用すれば、FSPE による分離を経て、立体配置の異なる多様なペプチド類縁体のスプリット型液相コンビナトリアル合成 (Fluorous Mixture Synthesis: FMS) が可能となる。今回我々は、生物活性ペプチド類縁体である Tenuecyclamide A をターゲットとして、本化合物の全立体異性体を FMS により一挙に全合成することに成功したので報告する。

f_4-Fmoc-OSu (**1a**)、及び f_6-Fmoc-OSu (**1b**) を用いて絶対配置の異なるアラニンの *N* 末端をそれぞれ保護し、本保護体 (**2a**、及び **2b**) の混合物を出発原料として、液相スプリット型合成法により、閉環前駆体の混合物へと 21 段階で誘導した。次に、これらの混合物のペアを FSPE によりフッ素含量の違いに基づき分離し、8 種類の閉環前駆体 (**3a–h**) を単一で得た。最後に、 **3a–h** の両末端を脱保護し、閉環することで、 Tenuecyclamide A (**4a–h**) の 8 種類の立体異性体を一挙に全合成することに成功した。[1] 閉環段階においては、フルオラス縮合剤 [2] を用いるマクロラクタム化反応が、効率良く閉環体を与えた。



1) Matsugi, M. *et al*. *J. Org. Chem*., **2013**, *78*, 10264.; 2) Matsugi, M. *et al*. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 3885.

light fluorous fmoc reagent, split type concise synthesis, Tenuecyclamide A

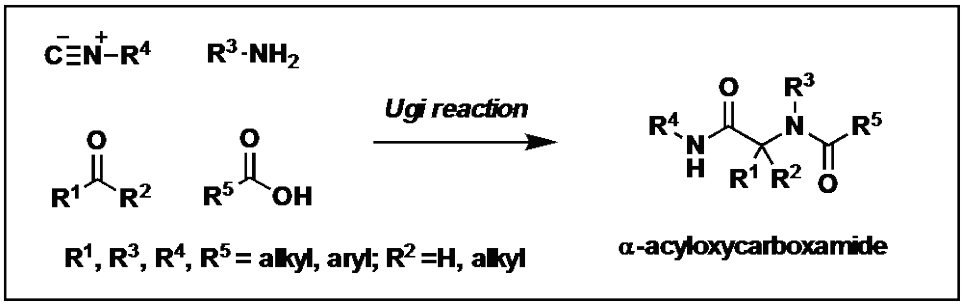
講演番号：3A07p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ A 校舎 07 会場

Ugi 反応を用いた海洋天然物の合成研究

Synthetic studies of marine natural products

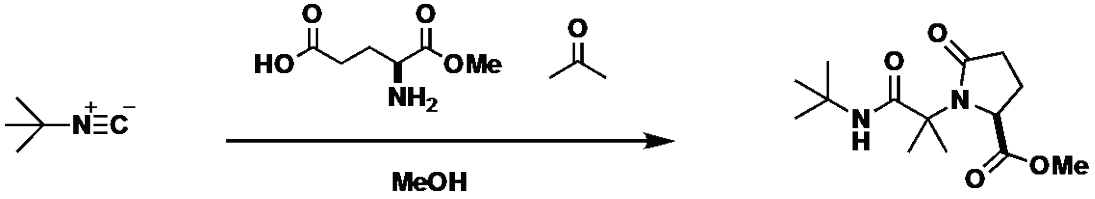
○市川 善康、齋藤 健太、三村 利香 (高知大学理学部)
○Yoshiyasu ICHIKAWA, Kenta Saito, Rika Mimura (Faculty of Science, Kochi University)

イソシアニド，アミン，カルボン酸とケトン(あるいはアルデヒド)を混合すると， Ugi 反応が進行する。そして四成分が結合した α-アシルアミノカルボキサミドを，高収率で生成する。それぞれの成分を変えて Ugi 反応を行えば，多様な誘導体を速やかに合成できる。この長所を活かして，研究開発現場の誘導体合成において，ハイスループットな手法として Ugi 反応は注目され，汎用されている。



我々の研究グループは，海洋生物から単離されたテルペン合成研究の途上で，ボネラタミド，エギグリン，ハリコナジン G の骨格が，「Ugi 反応によって形成されている」と想像した。そして「海洋生物が Ugi 反応を活用して，第２次代謝産物の多様性を獲得している」という仮説を提案した。

提出した仮説を立証するために，モデル化合物を用いて，Ugi 反応によるボネラタミドの骨格合成を検討した。反応は速やかに進行して，ボネラタミドの右側部分の構造に対応する生成物の合成に成功した。



参考文献

Saito, K.; Nishimori, A.; Kotsuki, H.; Nakano, K.; Ichikawa, Y. *Synlett* **2013**, *24*, 757–761.

Ugi reaction, marine natural producs, synthesis

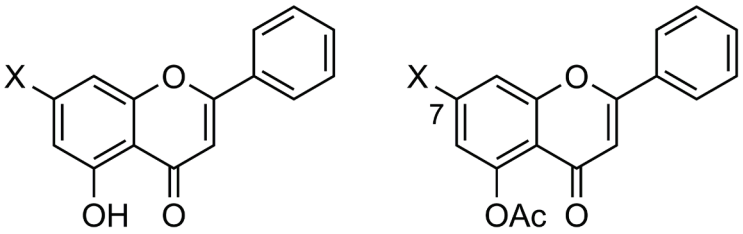
講演番号：3A07p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ A 校舎 07 会場

位置選択的変換を鍵段階とする、希少フラボノイド類の合成研究

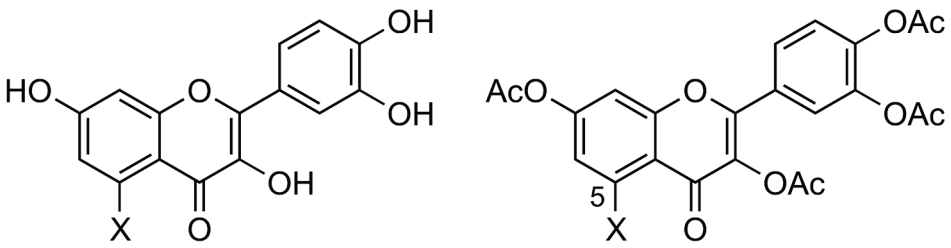
Synthetic study on rare flavonoids based on regioselective transformation

○須貝 威、松内 佑輔、花屋 賢悟、庄司 満、木内 文之（慶應大薬）
○Takeshi SUGAI, Yusuke MATSUUCHI, Kengo HANAYA, Mitsuru SHOJI, Fumiyuki KIUCHI (Keio Univ.)

Tectochrysin (**1a**)、fisetin (**2a**)はそれぞれプロポリス、イチゴなどに含まれるフラボン類で、前者にはメラニン生成抑制活性 [1]、後者には糖尿病合併症の改善効果 [2]が報告されている。しかし、各種生物試験を大規模に試みるには、現状では十分に供給可能とはいえない。そこで、化学合成、あるいは植物の抽出によって、比較的容易かつ大量に得られる chrysin (**1b**)、quercetin (**2b**)を出発原料とする合成研究に取り組んだ。



1a X = OCH_3 (tectochrysin)　　**1c** X = OAc
1b　OH (chrysin)　　**1d**　OH



2a X = H (fisetin)　　**2c** X = OAc
2b　OH (quercetin)　　**2d**　OH
　　2e　OTf

Tectochrysin (**1a**)の合成には、7-位ヒドロキシ基のみ遊離とした **1d** が不可欠である。chrysin の全アセチル体 **1c** を基質として、7-位の酢酸エステルのみ脱アセチル化する条件を探したところ、*C. antarctica* 由来のリパーゼ B (Novozymes, Novozym 435)を触媒とし [3]、ジオキサン中 65℃でシクロペンタノールを求核剤として作用させると位置選択的に反応が進行、**1d** が得られた。遊離ヒドロキシ基のメチル化を経て **1a** に導いた。

一方、quercetin の全アセチル体 **2c** にジオキサン中 85℃で三フッ化ホウ素エーテル錯体 [4]を作用させたところ、5-位にのみ脱アセチル化が進行し、**2d** が得られた。遊離ヒドロキシ基をトリフリル化によって活性化(**2e**)、接触還元 [5]により脱酸素し、最後に 4 カ所のアセチル基を脱保護して **2a** を得た。

1) 木内ら、日本生薬学会第 60 回年会講演要旨集 p. 246 (2013); 2) 近藤, ファルマシア、**2012**, *48*, 153; .3) 須貝ら、有機合成化学協会誌、**2013**, *71*, 237; 4) Kumar ら, *Tetrahedron Lett*. **2008**, *49*, 4409; 5) 佐治木ら、*Tetrahedron* **2007**, *63*, 1270.

tectochrysin, fisetin, lipase-catalyzed transesterification

講演番号：3A07p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ A 校舎 07 会場

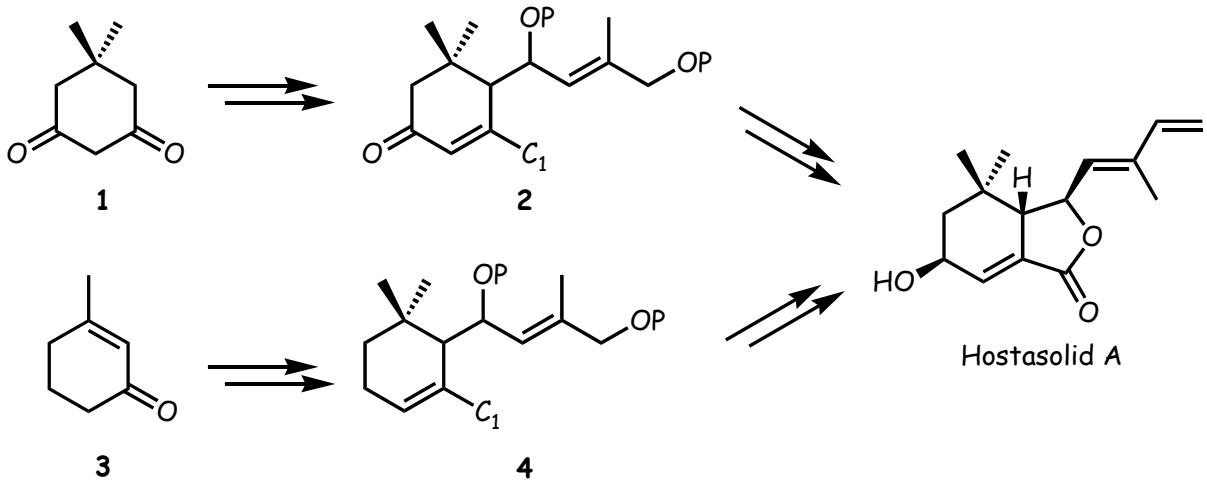
Hostasolid A の合成研究

Synthetic Studies on Hostasolid A

○山本 駿、久世 雅樹、滝川 浩郷 (神戸大院農)
○Shun YAMAMOTO, Masaki KUSE, Hirosato TAKIKAWA (Kobe Univ.)

【目的】Hostasolid A[1] はユリ科ギボウシ属の *Hosta ensata* より単離されたセスキテルペンである。この植物は古来より民間薬として用いられてきたが、Hostasolid A の生物活性は未だ明らかになっていない。我々は、類縁体の合成も見据えた Hostasolid A の化学合成を目的とした。

【方法・結果】6 員環化合物に対しアルドール反応によって側鎖部分を導入した。続いて C1 単位の導入により Hostasolid A に必要な炭素骨格の構築を試みた。現在、出発原料である 5,5-dimethylcyclohexane-1,3-dione (**1**)と 3-methylcyclohex-2-enone (**3**)を用い、Hostasolid A の合成に取り組んでいる。



1. C. L. Long *et al.*, *Chemistry of Natural Compounds*, **2012**, *48*(4), 580-582

Hostasolid A, sesquiterpene, introduction of C1 unit

講演番号：3A07p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ A 校舎 07 会場

抗菌活性物質 aurachin 類およびそのアナログ化合物の合成研究

Synthetic Study of Antibiotic Alkaloid Aurachins & Their Analogs

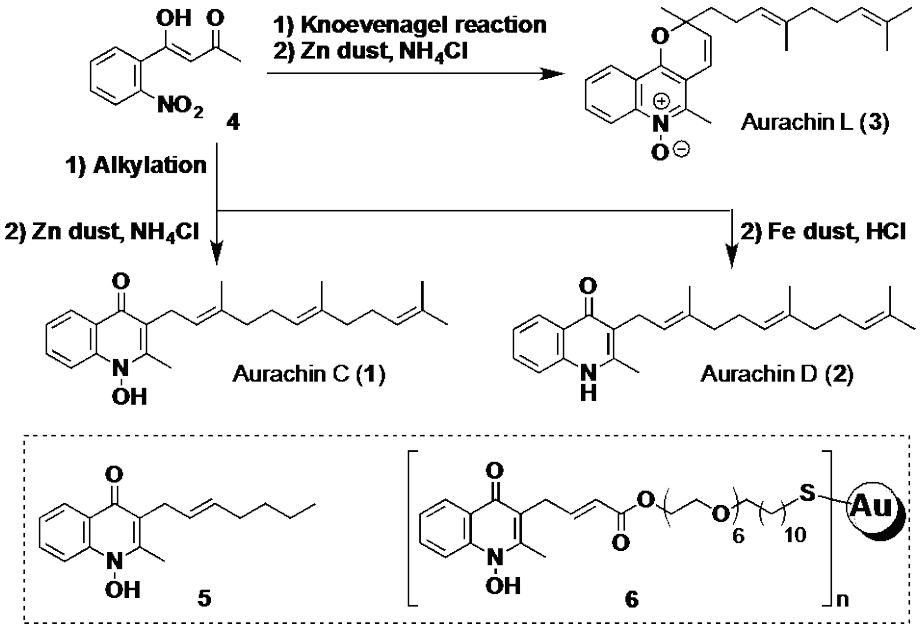
○榎本 賢、北川 航、安武 義晃、清水 弘樹（産業技術総合研究所生物プロセス研究部門）
○Masaru ENOMOTO, Wataru KITAGAWA, Yoshiaki YASUTAKE, Hiroki SHIMIZU (AIST Bioproduction Research Institute)

【目的】

aurachin C（１）, D（２）および L（３）は Höfle らにより単離・構造決定されたキノリンアルカロイドである [1]。１および２は *Bacillus subtilis* に対して MIC 0.15 μg/ml 程度の抗菌活性を示すことが知られているが、３はこれまでに抗菌活性が報告されていない。１および２はキノロン部位がメナキノン等の電子伝達物質のミミックとして作用することで抗菌活性を示すと考えられていることから、キノロン部位を有するアナログ化合物でも抗菌活性を示すと予想された。そこで、１、２および３の全合成とともに、構造単純化と活性増強を目指してキノロン部位を有するアナログ化合物を合成して活性試験を行うことにした。

【方法・結果】

既知物質４をアルキル化後に亜鉛粉末で還元することにより１を、鉄粉末で還元することにより２を２工程で全合成することに成功した。一方３は、Knoevenagel 反応とそれに連続して進行する電子環状反応によりピラン環を構築し、その後亜鉛粉末によって還元することで全合成を達成した。確立した合成経路を基に、側鎖を単純化した１のアナログ（５）を合成した。また、キノロン部位を金ナノ粒子上に担持しクラスター化することで活性が増強されることを期待して、６も合成した。５、６とともにこれまで活性が知られていない３についても抗菌活性試験を行ったので、その結果を会場にて報告する。



1) Kunze B & Höfle G, Reichenbach H, *J. Antibiot.*, **40**, 258–265 (1987).

antibiotics, aurachins, gold nanoparticles

講演番号：3A07p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ A 校舎 07 会場

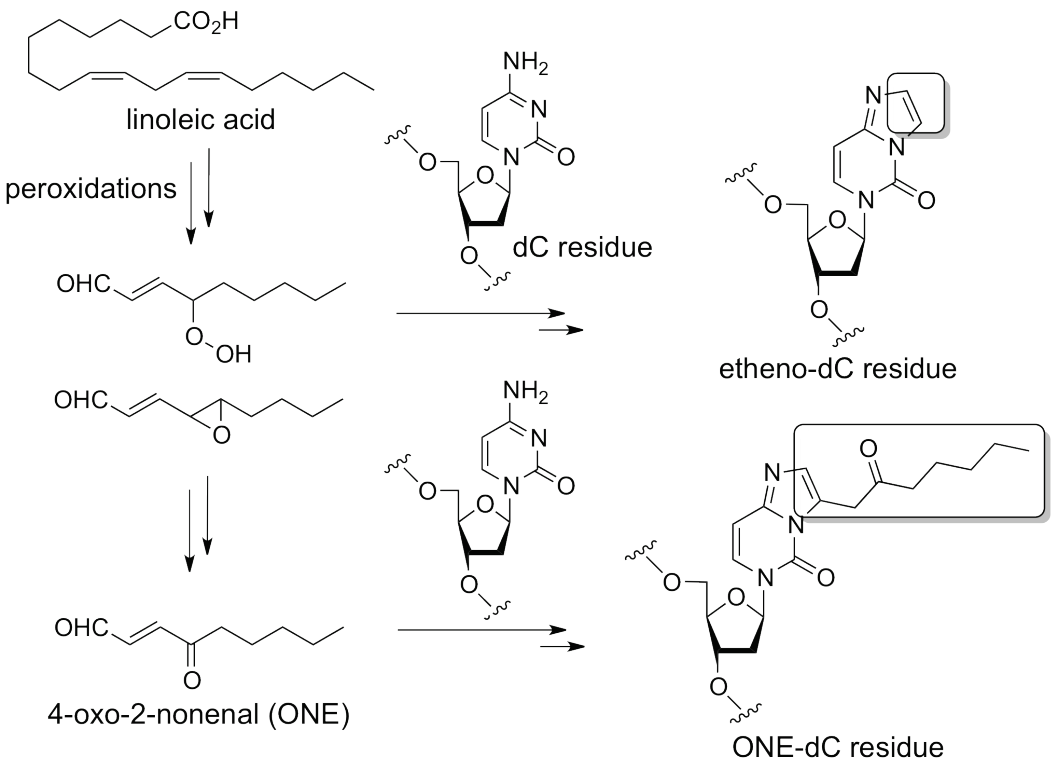
塩基除去修復酵素の活性評価を目的とした脂質酸化物による DNA 付加体とそのアミダイト体の合成研究

Syntheses of lipid peroxidation-derived DNA adducts and their phosphoramidites for the estimation of the activities of mammalian base excision repair enzymes

○松島 芳隆[1]、記野 順[1]、後藤 正憲[2]、新村 和也[2]、椙村 春彦[2] ([1]浜松医科大学・化学、[2]浜松医科大学・腫瘍病理学)

○Yoshitaka Matsushima[1], Jun Kino[1], Masanori Goto[2], Kazuya Shinmura[2], Haruhiko Sugimura[2] ([1]Dept. of Chemistry, Hamamatsu Univ. School of Medicine, [2]Dept. of Tumor Pathology, Hamamatsu Univ. School of Medicine)

DNA は活性酸素により酸化的損傷を受けることが広く知られているが、脂質酸化物との反応によっても損傷を受ける。その際生じた DNA 付加体(adducts)は突然変異を誘発することが多く、さまざまな臓器において発がんを引き起こすと考えられている。最近、ヒト発がん予測指標の確立を目指して、DNA 付加体の網羅的解析たる「DNA アダクトーム(Adductome)解析」が提唱されている。DNA 付加体と塩基除去修復酵素との関係などは多くは未解明であり、我々はこれら DNA 付加体に対するヒト塩基除去修復酵素（MYH、OGG1、NTH1 、 NEIL1 、 SMUG1、UNG、TDG など）の活性を調べ、その修復経路を明らかにすることを目的として、特に脂質酸化物に由来すると考えられている付加体を含む DNA オリゴマーを基質として手に入れるため、各種 DNA 付加体を合成し、そのアミダイト体への変換反応を行った。今回の発表では、合成の詳細のほか、塩基除去修復酵素の活性試験の結果についても報告する予定である。また、これら脂質酸化物由来の DNA 付加体以外についてなど、医学研究における合成化学の意義についても合わせて報告する予定である。



DNA adductome, DNA adduct, synthesis

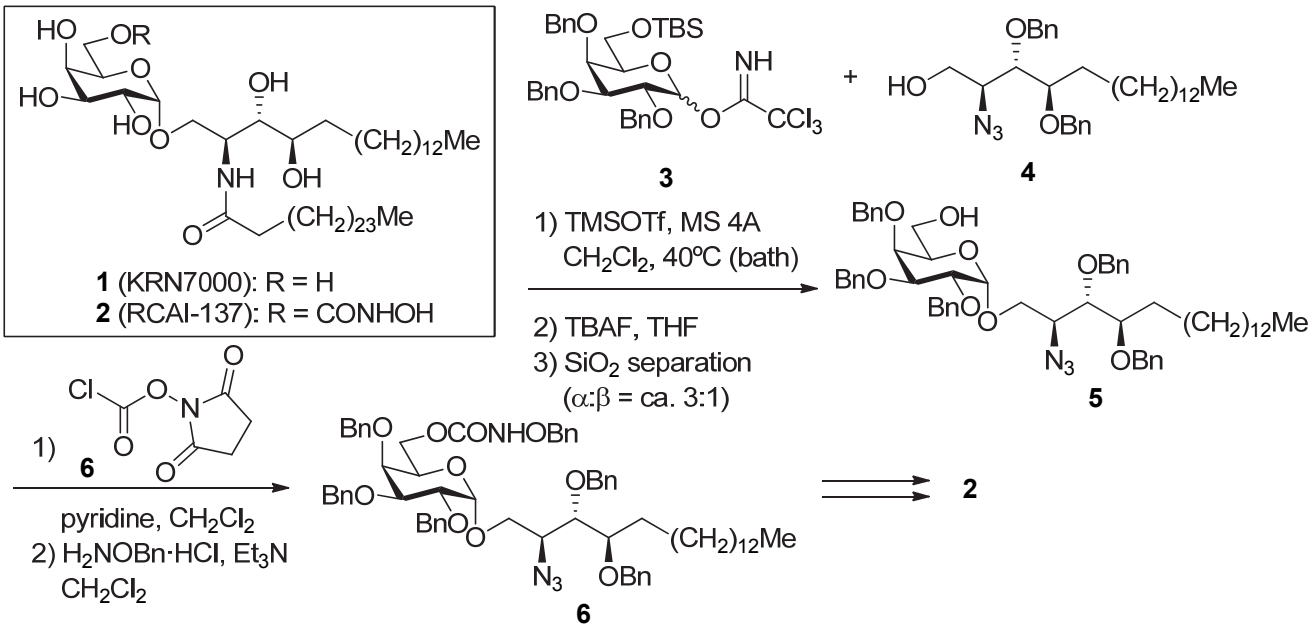
講演番号：3A07p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ A 校舎 07 会場

カルバモイル基を有するスフィンゴ糖脂質の合成と免疫賦活活性

Immunostimulatory activity of glycosphingolipids possessing a 6′-carbamoyl group

○田代 卓哉[1]、重浦 智邦[2]、渡会 浩志[2]、小山 裕雄[1]、谷口 克[2]、森 謙治[1] ([1]理研創薬、[2]理研 IMS)
○Takuya TASHIRO[1], Tomokuni SHIGEURA[2], Hiroshi WATARAI[2], Hiroo KOYAMA[1], Masaru TANIGUCHI[2], Kenji MORI[1] ([1]RIKEN CLST, [2]RIKEN IMS)

目的：免疫細胞の一種であるナチュラルキラーT (NKT)細胞は、多様性の無い T 細胞受容体(TCR)を持ち、自然免疫と獲得免疫の橋渡し役を担う特異な系列の免疫細胞である [1]。抗原提示細胞の膜上タンパク質である CD1d と糖脂質との複合体を認識して活性化され、様々なサイトカインを産生して免疫反応を誘導する。キリンビール（株）により開発された KRN7000 (1)と共培養した樹状細胞を投与する細胞療法が、1 の単独投与よりも高い抗腫瘍活性を示すことが知られている [2]。より効率良く樹状細胞を活性化できる糖脂質の開発を目指す。



方法と結果：上に示す方法により、6′-位にカルバモイル基を持つ糖脂質 RCAI-137 (2)の合成を行った。3 と 4 とのガラクトシル化反応では、加温条件下で行うと目的とするα-体が優先的に得られた。生物活性試験では、2 と共培養した樹状細胞の投与は 1 よりも多量の IFN-γ産生を誘導した。他の糖脂質の合成ならびに活性について報告する。

[1] M. Taniguchi, et al., *Annu. Immunol. Rev.* **21**, 483-513 (2003).
[2] I. Toura, et al., *J. Immunol.* **163**, 2387-2391 (1999).

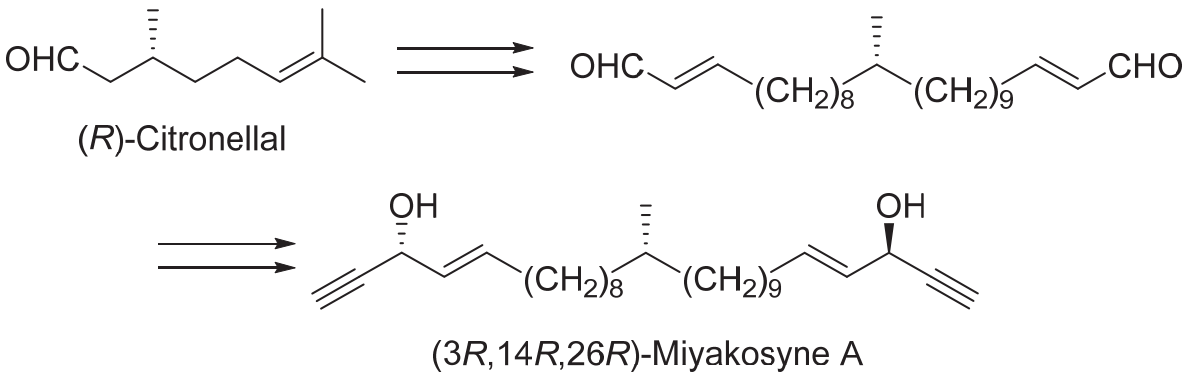
carbamate, glycosphingolipid, natural killer T cell

講演番号：3A07p23
講演日時、会場：3 月 29 日 17:59～ A 校舎 07 会場

ミヤコシン A の全立体異性体の合成と HPLC 分析による天然ミヤコシン A の絶対立体配置決定
Determination of the absolute configuration of miyakosyne A by the synthesis and HPLC analysis of all of its stereoisomers

○森 謙治[1,2]、赤坂 和昭[3]、松永 茂樹[4]（[1]東洋合成工業（株）、[2]理研、[3]尚絅学院大、[4]東大院農生科）
○Kenji MORI[1,2], Kazuaki AKASAKA[3], Shigeki MATSUNAGA[4] ([1]Toyo Gosei Co., Ltd., [2]RIKEN, [3]Shokei Gakuin Univ., [4]Univ. of Tokyo)

目的：X 線結晶解析により 3*R*, 14*S*, 26*R* と推定されたミヤコシン A［(4*E*, 24*E*)-14-メチルオクタコサ-4, 24-ジエン-1, 27-ジイン-3, 26-ジオール］の絶対立体配置を全立体異性体を合成し HPLC 分析して天然物と比較することで決定する。
方法:シトロネラールの両鏡像体よりジアルデヒドを経由して図示のようにミヤコシン A を合成する。3, 14, 26 位の不斉はシトロネラールの不斉炭素とリパーゼ PS による不斉アセチル化反応により導入する。分析は大類試薬による誘導体化の後 HPLC で行う。



結果：天然物は 95.7%の(3*R*, 14*R*, 26*R*)-体と 4.3%の(3*R*, 14*S*, 26*R*)-体の混合物であった。

miyakosyne A, Ohrui reagent, lipase PS

講演番号：3A08a01
講演日時、会場：3 月 29 日 09:00～ A 校舎 08 会場

大腸菌の高圧二酸化炭素処理ストレス応答機構の解明

Stress response mechanism of *E.coli* against high-pressure carbon dioxide treatment.

○田上 峻、古川 壮一、森永 康（日大院・生資科）
○Shun TAGAMI, Soichi FURUKAWA, Yasushi MORINAGA (Nihon Univ.)

【背景・目的】

大腸菌は GAD system（GAD）と呼ばれる酸耐性システムを有し、グルタミン酸（L-Glu）を基質として脱炭酸し GABA に変換する過程で細胞内の H^+を消費し、細胞内の pH 低下を抑制している。L-Glu 発酵では、この GAD が働くと L-Glu が消費されてしまい収率低下を招く可能性があるため、GAD 欠損変異株が用いられる場合がある。しかしながら、GAD 欠損株の場合、発酵後期に想定される高濃度二酸化炭素環境下において、細胞内 pH の低下により発酵能が低下する可能性がある。

本研究では、高圧二酸化炭素環境下における大腸菌 GAD 欠損株の挙動を解析することにより、発酵後期の発酵能の向上に役立つ基礎的知見を得ることを目的とした。

【方法】

供試菌株として *E. coli* K12 BW25113（野生株）とその Glu 脱炭酸酵素欠損株（Δ*gadAB* ）と Glu/GABA アンチポーター欠損株（Δ*gadC* ）およびリジン（ L-Lys ）、アルギニン（ L-Arg ）の脱炭酸反応系関連欠損株（Δ*ldcC*、Δ*adiY* ）を用いた。一代培養菌液を生理食塩水にて洗浄後、pH 7.0 に調整した処理溶媒（生理食塩水、1mM L-Glu 添加生理食塩水、1mM L-Lys 添加生理食塩水、1mM L-Arg 添加生理食塩水）に懸濁した。その後、高圧二酸化炭素処理装置（AKICO 社製）を用いて二酸化炭素をバブル状にして吹き込み、3 MPa・37℃・30 min の条件で高圧二酸化炭素処理を行い、処理前後の生菌数を平板法で測定した。

【結果・考察】

アミノ酸無添加で二酸化炭素処理を行った場合、すべての株が同等の感受性を示した。L-Glu を添加すると、野生株、Δ*ldcC*、Δ*adiY* は耐性が有意に向上したが、Δ*gadAB* の耐性は向上しなかった。一方、L-Arg を添加すると、Δ*adiY* 以外の株で耐性が有意に向上した。さらに、L-Lys 添加では野生株の耐性向上はわずかであったが、Δ*gadAB* の場合は顕著な耐性向上が認められた。

これらの結果より、野生株などの GAD system が存在する株では、L-Lys の脱炭酸反応の酸耐性への寄与は弱いが、GAD system が完全に欠失した株では、Lys の脱炭酸系が誘導的に高発現して、欠損した GAD system を補完して酸耐性を補っている可能性が考えられた。これに対して、L-Arg の脱炭酸反応は GAD system の有無にかかわらず弱いながらも構成的に機能しているものと考えられた。

E.coli, Carbon dioxide, GAD system

講演番号：3A08a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ A 校舎 08 会場

Leuconostoc 属乳酸菌と出芽酵母の複合バイオフィルム形成と共凝集
Biofilm formation and co-aggregation between budding yeasts and *Leuconostoc* strains.
○山岸 明日香、平山 悟、古川 壮一、森永 康（日大院・生資科）
○ASUKA YAMAGISHI, SATORU HIRAYAMA, SOICHI FURUKAWA, YASUSHI MORINAGA (Nihon Univ.)

【目的】
鹿児島県の伝統的発酵食品福山酢から分離された乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ML11-11(以下 ML)を出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と共培養すると両菌細胞からなるバイオフィルム(以下複合 BF)が顕著に形成され、その形成に乳酸菌と酵母の細胞間接着・共凝集が関与することが明らかになっている。本報告では、伝統的発酵食品の馴れ鮨より新たにスクリーニングして得られた複合 BF 形成性乳酸菌 3 菌株の同定結果、ならびに出芽酵母との相互作用について解析した結果を報告する。
【方法】
〈同定試験〉16SrDNA 法により同定した。
〈BF 形成試験〉乳酸菌及び酵母（*Saccharomyces cerevisiae* BY4741）の前培養菌液を YPD 培地に接種し、それらをマイクロタイタープレート（96 well）に 100 µl ずつ分注した。その後 30℃にて 24 h 培養し、洗浄後 0.1% クリスタルバイオレットで 15 min 染色を行い、70% エタノールで抽出して吸光度を測定し、その値を BF 形成量として評価した。
〈共凝集試験〉単独培養した乳酸菌と酵母をそれぞれ菌体回収後、新たな培地にて懸濁した。両菌の懸濁液をチューブ内で混合後、静置し経時的に定位置からサンプルを採取した。凝集沈降に伴う濁度変化を測定することで凝集を評価した。
【結果】
16SrDNA 解析の結果、複合 BF 形成性乳酸菌 3 菌株はいずれも *Leuconostoc citreum* と同定された。これら 3 菌株を出芽酵母と複合培養すると、いずれも対照株として用いた ML の場合と同程度の複合 BF 形成量を示した。
共凝集性を定量評価した結果、ML の場合には試験開始後速やかに濁度が低下し、30 分後には約 20%の低下がみられたのに対し *Leu.citreum* の場合は、濁度低下の進行は緩やかで、20%以上低下するまでに 3 時間程度を要した。また、*Leu.citreum* のみの単独系でも出芽酵母との複合系と同様の緩やかな濁度低下を示した。このことから、*Leu.citreum* は出芽酵母の有無に関わらず凝集し、ML が示すような出芽酵母との強い共凝集性は示さないことが明らかとなった。これらの結果より、新規に分離した *Leu.citreum* 3 菌株は、ML のように酵母、乳酸菌の共凝集が関与して複合 BF を形成するのではなく、何らかの異なる機序に基づいて複合 BF を形成していることが示唆された。

lactic acid bacteria, biofilm, co-aggregation

講演番号：3A08a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ A 校舎 08 会場

酵母との複合バイオフィルム形成能を有する乳酸菌のゲノムシーケンス及びポストゲノム解析
Genome sequencing and post-genomic analyses of lactic acid bacteria that form mixed-species biofilm with yeast.

○平山 悟、古川 壮一、森永 康（日大院・生資科）
○Satoru HIRAYAMA, Soichi FURUKAWA, Yasushi MORINAGA (Nihon Univ.)

鹿児島県の伝統発酵食品である福山酢より分離した乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ML11-11 は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* との共存により、顕著な複合バイオフィルム形成や共凝集性を示す。これらの細胞間接着は乳酸菌表層タンパク質と酵母表層マンナンを介して起こることが明らかにされている。一方、ML11-11 同様の活性を有する乳酸菌を伝統的水産発酵食品からスクリーニングしたところ、市販のサバ鮨から強い活性を有する株 *L. plantarum* HM23、HP9 株を分離することができた。これら 2 株も ML11-11 と同様の機構で酵母との細胞間接着を起こすと考えられる。

本検討では、*L. plantarum* ML11-11、HM23、HP9 株について、次世代シーケンサによるゲノム解析を行った。読み取り鎖長 75 bp のシーケンスランを行い、得られた一次解析データより、*L. plantarum* WCFS1 株のゲノム配列をリファレンスに用いてマッピングした。WCFS1 株は既にゲノム配列が公開されているが、ML11-11 のような酵母との複合バイオフィルム形成能・共凝集活性を持たない。マッピングの結果、全菌株で概ね全領域にわたってタグがカバーされたが、一部スパイク状に depth の高い部分が見られた。また 3 菌株のゲノム上に、WCFS1 の配列にマッピングされない箇所が散在していることが確認され、特に HM23・HP9 では共通の位置で多く現れていた。この領域は WCFS1 とは異なる配列、または WCFS1 の配列から欠落した部分と考えられた。次に SNP 解析を行ったところ、3 株に共通の SNP が多かったが、HM23・HP9 に共通の SNP 割合が高いことが明らかになった。また、これら 3 菌株の 16S rDNA 配列は WCFS1 と完全に一致していたが、*gyrB* 遺伝子配列を比較すると、各菌株のコンセンサス配列内に僅かな違いが見られた。これらに含まれる SNP は HM23・HP9 で共通していたが、ML11-11 では菌株特異的であった。これらのことから、3 菌株と WCFS1 のゲノム配列の類似性は高く、中でも ML11-11 が最も近縁と推察された。

また、乳酸菌 ML11-11 と酵母 *S. cerevisiae* BY4741 の共培養時のトランスクリプトーム、及びメタボローム解析を行った。共培養によって、乳酸菌ではトランスポーターや糖代謝関連の遺伝子が、酵母では糖代謝関連の遺伝子が高発現するなど、単独培養に比較して多くの遺伝子発現の違いが見られた。培養上清を用いたメタボローム解析では、単独培養に比較して、共培養系で生成量が変化した物質がいくつか見出された。今後も解析を進めることで、乳酸菌株間のゲノム構造の違いや、共培養系の相互作用について詳細に明らかにできると考えている。

genome sequencing, post-genomic analysis, *Lactobacillus plantarum*

講演番号：3A08a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ A 校舎 08 会場

りんご未熟果搾汁残渣を利用した麹菌の液体培養によるα-アミラーゼ生産における無機塩の効果

Effect of minerals on α-amylase production by submerged culture of *Aspergillus oryzae* using unripe apple pulp

○井澤 弘美[1]、佐藤 勉[2]、藤田 修三[1]([1]青森県立保健大健康科学、[2]秋田今野商店)
○Hiromi IZAWA[1], Tsutomu SATO[2], Shuzo FUJITA[1] ([1]Aomori Univ. of Health and Welfare, [2]AKITA KONNO CO., LTD.)

【緒言】

りんご生産工程中の摘果作業で廃棄される未熟果は、多くのでんぷんを含んでいる未利用資源である。このりんご未熟果で麹を作成すれば高付加価値商品を生産することができ、りんご産業の発展に大きく貢献することが期待できる。これまで演者が所属する研究室では、りんご未熟果を唯一の栄養源として生育する市販麹として秋田今野商店製の *Aspergillus oryzae* AOK139 株が妥当であることを明らかにした。そこで本研究ではさらにα-アミラーゼ生産性が高まるような生育条件を探ることを目的として、①固体培地と液体培地の比較と②各種無機塩添加の比較を検討した。

【研究方法】

麹菌の培養培地の栄養源は、りんご未熟果の搾汁残渣の乾燥物あるいはその粉砕物を用い、オートクレーブ滅菌して固体培地や液体培地を作成した。対照として米を用いた。培地に加えるりんご未熟果や米の量は、あらかじめそれぞれのアミロース+アミロペクチン量を測定して、同量になるようにした。無機塩の添加試験には、0.3%$NaNO_3$、0.1%KH_2PO_4、0.05%$MgSO_4 \cdot 7H_2O$、0.05%K0Cl および 0.01%$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ の混合物（以下、ミックスミネラルとする）を使用した。麹菌懸濁液を培地に接種し 40℃あるいは 30℃で数日間静置培養やまたは振盪培養した。培養 24 時間ごとにサンプリングし、各種分析を行った。

【結果および考察】

りんご未熟果を唯一の栄養源として利用した固体静置培養ではα-アミラーゼ活性はほとんど認められなかったが、液体振盪培養では活性が認められた。ミックスミネラルを添加して培養した場合、りんごを利用した液体振盪培養のα-アミラーゼ活性が、米を利用した液体振盪培養のものよりかなり活性が高くなった。しかし $NaNO_3$除去ミックスミネラル添加培地では活性がほとんど認められなかった。また、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 除去ミックスミネラル添加培地では活性は低値を示した。これらのことから、$NaNO_3$や $MgSO_4$がα-アミラーゼ活性に影響していると考えられた。$NaNO_3$と $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ のみを添加した培地では、ミックスミネラル添加培地には及ばないものの、α-アミラーゼの高い活性が認められた。$NaNO_3$のみを添加した培地でも活性が認められたのに対し、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ のみを添加した培地や基本培地では活性がほとんど認められなかった。以上のことから、りんご未熟果を利用した麹菌の培養においてα-アミラーゼ生産性を高めるためには液体振盪培養が適しており、$NaNO_3$を添加することで生産性が飛躍的に高まり、なおかつ $MgSO_4$の添加でさらに生産性が増強されることが示された。

unripe apple, *Aspergillus oryzae*, α-amylase

講演番号：3A08a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ A 校舎 08 会場

固体培養中に培養基質水分を低下させた時の酵素生産への影響

Influence of enzyme production on drying culture substrate during solid-state fermentation

○伊藤 一成[1]、五味 勝也[2]、狩山 昌弘[3]、三宅 剛史[1] ([1]岡山県工技セ、[2]東北大院農、[3]フジワラテクノアート)
○Kazunari ITO[1], Katsuya GOMI[2], Masahiro KARIYAMA[3], tsuyoshi MIYAKE[1] ([1]Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, [2]Tohoku University, [3]Fujiwara Techno-Art Co, Ltd.)

【目的】　糸状菌の固体培養による酵素生産において、液体培養に比べ非常に高い生産性であることは周知の事実である。固体培養で生産性の高い酵素は、水分活性が低い培養基質において培養した場合に遺伝子発現が高いなど、水分が少ないことに起因する。その一方で、培養開始時から基質水分を少なくすると菌体量が増えず、酵素生産の総量としては低下する。酵素生産量を増加させるという点では、培養開始時は水分を多くし菌体を出来るだけ多く増殖させ、菌体量がある程度増えたところで培養基質を乾燥させることが重要になってくると思われる。しかしながら、この培養条件を達成するためには、培養中に培養条件を変化させつつ、その変化に対応して基質全体を均一に保つことが絶対条件となるが、従来の固体培養法ではこの達成が難しい。このことが固体培養における酵素生産の詳細なメカニズムの解明を難しくさせていた面もある。本研究では、上記の培養条件を可能にする無通風箱培養法を採用し、培養中に基質水分を低下させた時の酵素生産への影響について確認した。
【方法】　一定の水分量を含む小麦ふすまに *Aspergillus oryzae* AOK11 株を植え付け、ePTFE (expanded polytetrafluoroethylene) 膜を装着した木製の無通風箱の中に入れた。この箱を恒温恒湿槽内に入れ、25℃, 95%RH の環境下で 24 時間培養した後、48 時間かけて恒温恒湿槽内の相対湿度を 60～90%RH の範囲で低下させ、基質水分が徐々に低下していく経過をたどらせた。培養後、酵素活性測定と同時に菌体量も測定した。
【結果】　培養終了まで相対湿度を変化させなかった場合と比べ、培養 24 時間から乾燥させた方が酵素生産の向上が見られ、測定したどの酵素においても総じて 80%RH に乾燥させた時が顕著であった。それ以下に湿度を下げると逆に生産が低下していく傾向であった。また、この時の菌体量は大きな変化が見られなかったものの少なからず差があり、菌体量当たりの酵素生産量を見ると大きな差が見られた。これらのことから、培養後期の基質水分の減少は酵素生産量に影響することが示された。

solid-state fermentation, substrate drying, enzyme production

講演番号：3A08a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ A 校舎 08 会場

回転ドラム型製麹機が麹菌の生理と物質生産に及ぼす影響
Effect of the rotation of solid-state fermentor on the physiolosy and product formation of *Aspergillus oryzae*
○横田 林太郎[1]、徳岡 昌文[1]、岩下 和裕[2]、進藤 斉[1]、佐藤 和夫[1] ([1]東京農大・農・醸造、[2]酒総研)
○Rintarou Yokota[1], Masafumi Tokuoka[1], kazuhiro Iwashita[2], Hitoshi Shindo[1], Kazuo Sato[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]National Research Institute of Brewing)

【目的】醸造工程における米麹の撹拌は「手入れ」と言われ、褐変性や分生子形成に影響することから、米麹の品質と深く関連していることが経験的に知られている。当研究室では手入れの効果について解析を行うために、米麹を回転ドラム型製麹機（Rotating Drum Fermantation，RDF）で継続的に撹拌する製麹方法について研究を行った結果、これまでに RDF で作製した麹（RDF 麹）は分生子を形成しないことを見出している。本研究では、手入れが米麹の品質に及ぼす影響についての新たな知見が得ることを目的とし、RDF 麹の特徴についてより詳細な解析を実施した。
【方法・結果】長期間製麹を行った *Aspergillus oryzae* RIB128 株の米麹を蒸留水に浸漬したところ、対照の麹は褐変したが、RDF 麹はほとんど褐変しなかった。しかし、RIB40 株では褐変性への影響が異なったことから、手入れが褐変に及ぼす影響は菌株により異なることが示唆された。一方、分生子形成については、リアルタイム PCR 解析の結果、RDF 麹の分生子形成関連の遺伝子発現量は対照の麹と比較して低かったことから、RDF 麹では、遺伝子レベルで分生子形成が抑制されていることが示された。さらに、RDF 麹と対照の麹の間における製麹期間中の麹菌の酸素消費量および菌体量を調べたところ、差はほとんど無く、α－アミラーゼなど醸造上重要な酵素についても力価には差が無かった。しかし、粗酵素抽出液の SDS - PAGE 解析から、対照麹において生成する約 20 kDa タンパク質が RDF 麹においては少ないことを見出した。MALDI - TOFMS による内部アミノ酸配列の解析から、本タンパク質は麹菌のゲノムデータベースの機能未知遺伝子である AO0805490000220 の翻訳産物であることが示されたが、予測分子量は 16 kDa であり、SDS - PAGE 解析の結果と整合性が得られなかった。本遺伝子の機能解析を行うために、遺伝子破壊株作製し、SDS - PAGE 解析を行ったところ約 20 kDa のバンドが消失したことから、RDF 麹において減少したタンパク質が AO0805490000220 遺伝子の翻訳産物であるということを確認した。半定量 PCR による解析からも、RDF 麹は対照麹と比較して本遺伝子の発現量が低く、RDF の環境が本遺伝子の発現を抑制したことが示唆された。現在、遺伝子破壊株を用いて、RDF を含む様々な条件製麹条件で解析を行い、製麹における機能の解明を試みている。

Aspergillus oryzae, koji, aerial hyphae

講演番号：3A08a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ A 校舎 08 会場

味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株由来酸性ホスファターゼ（AphC）の酵素学的特性

Characterization of acid phosphatase (AphC) from *miso koji* mold, *Aspergillus oryzae* KBN630

○安田（吉野） 庄子[1]、中村 恵美[1]、小野 奈津子[1]、長谷川 摂[1]、和久 豊[2]、杉本 達哉[3]、楠本 憲一[4]、北本 則行[1] ([1]あいち産科技総セ・食工技セ、[2]（株）ビオック、[3]ナカモ（株）、[4]農研機構・食総研)

○ Shoko YOSHINO-YASUDA[1], Emi NAKAMURA[1], Natsuko ONO[1], Osamu HASEGAWA[1], Yutaka WAGU[2], Tatsuya SUGIMOTO[3], Ken-Ichi KUGIMOTO[4], Noriyuki KITAMOTO[1] ([1]Food Res. Center, Aichi-Inst, [2]Bio'c Co. Ltd., [3]NAKAMO Co. Ltd., [4]NFRI, NARO)

【目的】核酸系調味料（5'-リボヌクレオチド二ナトリウム）を添加した調味味噌は、味噌中の酸性ホスファターゼ（Aph）による旨味成分の分解防止のため、高温の加熱失活処理が不可欠である。しかし、高温加熱により味噌の品質が低下するため、我々はAph低生産麹菌を利用した新規な省エネルギー型味噌製造技術の開発を試みている。これまでに、味噌用麹菌*A. oryzae* KBN630株において8個の酸性ホスファターゼ遺伝子（*aphA-H*）の単遺伝子破壊を行い、そのうち*aphC*遺伝子が豆麹培養中の酸性ホスファターゼ活性および5'-IMPの脱リン酸化活性において最も主要な役割を担っていることを明らかにした[1)]。今回は *A. oryzae* によるAphCの高生産と精製、および酵素学的性質の解析を行い、豆麹中の5'-リボヌクレオチド分解活性へのAphCの関与について検討した。

【方法および結果】*aphC*遺伝子産物の酵素学的性質を明らかにするために、*A. oryzae* によるAphCの分泌生産を試みた。*A. oryzae* KBN630の*aphC*遺伝子（GenBank accession number AB775132）は、47 bpの2個のイントロンを含む1,678 bpから成り、527アミノ酸をコードするORF を含んでいた。*A. oryzae* における最も強いプロモーターの一つである*taaG2*遺伝子プロモーターの下流に*aphC*遺伝子を連結した高発現ベクターpTAAphCを構築し、宿主*A. oryzae* PDE1（*pyrG*$^{-}$, *alp*$^{-}$）に導入した。得られた形質転換株のうち 7 株を液体培養した結果、培地中に約200～500 U/mlのAph活性が検出された。高活性株APC15の培養液から2回のイオン交換クロマトグラフィーと1回の疎水クロマトグラフィーによってAphCタンパク質を精製した。SDS-PAGEによるAphCの分子量は約69.0 kDaで、エンドグリコシダーゼ処理により糖鎖の付加が示された。AphCのpNPリン酸に対する比活性は、既に報告したAphA[2)] に比べて約13倍と高かった。AphCの至適pHは4.5、至適温度は50℃であった。pH安定性は酸性域で広く、温度安定性は低かった。AphCの基質特異性は比較的広かったが、フィチン酸に対する比活性は非常に低く、一方、5'-IMPおよび5'-GMPに対する比活性はAphAに比べてそれぞれ70倍および30倍と非常に高かった。この結果から、AphCは*A. oryzae* およびその豆麹における5'-リボヌクレオチドの脱リン酸化活性（分解活性）に深く関与していることが示唆された。

本研究は「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」の一環として実施した。

１）2011年度日本農芸化学会大会講演要旨 講演番号3B21p04
２）Food Science and Technology Research (2011) 17:161-166

acid phosphatase gene, *Aspergillus oryzae*, IMP dephosphorylation

講演番号：3A08a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ A 校舎 08 会場

米グルテリンから見た麹菌 PepA の醸造機能の再検討

Reexamination of fermentation function of *Aspergillus oryzae* PepA from the perspective of rice glutelin

○濱田 雄太郎[1,2]、垣内 慎吾[1,2]、北村 洋朗[1,2]、磯谷 敦子[1,2]、織田 健[2]、岩下 和裕[1,2] ([1]広大院・先端研、[2]酒総研)

○Yutaro HAMADA[1,2], Shingo KAKIUCHI[1,2], Hiroaki KITAMURA[1,2], Atsuko ISOGAI[1,2], Ken ODA[2], Kazuhiro IWASHITA[1,2] ([1]Hiroshima Univ, [2]NRIB)

１麹、２酛、３造りの言葉通り、製麹は清酒醸造における非常に重要なプロセスである。古くから、麹菌のα-アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性プロテアーゼ（PepA）、酸性カルボキシペプチダーゼ等が、その過程において特に重要とされ、酵素剤および精製酵素を用いて、蒸米の溶解性への影響などの検討がなされてきた。特に PepA は、米麹中のタンパク質を分解することで、無効吸着したα-アミラーゼを遊離させ蒸米の溶解に間接的に寄与している。麹菌のプロテアーゼは、醪中において米タンパク質としてプロテインボディー（PB）II 中のグルテリンを主に分解している。麹中の生産量から PepA が酸性プロテアーゼの主要なものと考えられていたが、米グルテリン分解への寄与度は判っていなかった。そこで、*pepA* 破壊株およびその相補株を作出し、PepA が醸造に与える影響を再検討し、さらに米グルテリンに対する反応性について探った。

まず、control 株、破壊株について米麹を作成し諸性質の検討を行った。破壊株では、菌体量が３割程度に減少し、それに伴い生産されるタンパク質も減少していた。また、各種酵素活性について検討したところ、破壊株では、アミラーゼ活性は７割程度、グルコアミラーゼ活性は４割、酸性プロテアーゼ活性は４割程度に低下していた。一方で、酸性カルボキシラーゼ活性は、約２割上昇していた。このように各種酵素の生産に影響を与え、PEPA は、米麹の作製には、非常に重要な酵素であることが再確認された。

次に、米麹中のタンパク質の変化をプロテオーム解析により探ったところ、破壊株では、PepA のスポットが消失し、またグルテリンを含む米タンパク質由来のスポットの増加が確認され、米タンパク質分解への影響が示された。

さらに米麹より抽出した粗酵素を用いて米グルテリンおよび一般活性定量の基質カゼインを用いて活性を検討した。その結果、control 株でカゼインを基質とした場合よりも米グルテリンを基質とした場合で 3.5 倍の比活性の上昇が確認された。また、破壊株において、カゼインに対しては control 株と比較して 64%の活性が減少するのに対し、米グルテリンに対しては 96%の活性の減少が観察された。以上の事から、米麹においては、PepA が米グルテリンを分解するほとんどのエンドプロテアーゼ活性を担っていることが示唆された。

Aspergillus oryzae, protease, glutelin

講演番号：3A08a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ A 校舎 08 会場

A. flavus-A.oryzae 菌株群のゲノムワイドな系統解析
Genome wide analysis of *A. flavus-A. oryzae* strains
大田 民[1]、織田 健[1]、後藤 奈美[1]、○岩下 和裕[1,2] ([1]酒総研、[2]広大先端)
Tami Ohta[1], Ken Oda[1], Nami Gotoh[1], ○Kazuhiro Iwashita[1,2] ([1]NRIB, [2]Hiroshima Univ.)

【背景及び研究目的】*Aspergillus flavus* はアフラトキシンやその他の毒素を作ること等から非常に有害な菌であると認識されている。一方で *A. oryzae* は醸造産業等に使用される有用な菌であるが、*A. flavus* は非常に近縁であり,両菌株群の分類上の議論が長くなされている。このため両菌株群を分別する事は重要であり,ゲノムの構造上の違いについて解析し明らかにする事が必要である。*A. flavus* は *Flavi* 節に属し *A. oryzae* も本節に含まれる。これら 2 種は鑑別分類学の視点から区別可能であるとされてきた。しかし一応の分別は可能であるものの判別が困難な場合も多かった。近年のマイクロサテライトやシーケンスを利用した解析で判別可能と報告されているが、菌株が少ない等の問題があった。また、*Aspergillus* 属の菌株のゲノムシーケンスが広くなされると、*A. flavus* と *A. oryzae* のシーケンス全体は良く類似しており、再度分類の議論がなされるようになった。そこで今回我々は ATCC, NRRL, NBRC などから *A. flavus* 31 株（うち 2 株は NBRC と NRRL から同じ株を入手）を入手し ITS 領域のシーケンス解析,ISSR 解析および麹菌 DNAchip による進化系統解析を行ったので報告する。
【方法と結果】入手した株について単コロニー分離を行い、単離した株についてゲノム DAN を単離して、rRNA 領域を PCR 増幅すると共に ITS 領域のシーケンス解析を行った。その結果,6 株は *A. parasticus*, *A. sojae* など相同性を示し別種属と考えられる株であった。これらの菌株はアウトグループとして以降も使用した。続いて、これまでに両菌株群を判別可能であると報告されている ISSR 解析により両菌株群の系統解析を試みた。*A. oryzae* 13 系統の代表株を加え ISSR1 (GTG)5 および ISSR2(GACA)4 をプライマーとして使用し PCR を行い、得られたバンドパターンから系統樹の作成を行った。この結果,両菌株群は、大まかに 3 系統に区別され、*A. oryzae* をメインとする系統, *A. flavus* をメインとする系統に分類されたが、全ての系統において両株が混在したため, 両種を完全に区別するにはより詳細な解析を行う必要があると考えられた。そこで ISSR 系統結果に基づき広範で偏りのない解析となるよう *A. flavus* 菌株を選抜し麹菌 DNAchip を用いてゲノムアレイ解析を行った。*A. oryzae* の各系統 13 株と今回得られた *A. flavus* のデータを使用し Gene spring にて系統解析を行ったところ両菌株群は明確に分かれた。しかし、NRRL482 株については、*A. oryzae* 系統に分類されたが、本菌株は村上等によっても *A. oryzae* とされた株で、アフラトキシンも生産しない。以上の事から麹菌 DNAchip を用いる事で *A. flavus* 菌株群と *A. oryzae* 菌株群を明瞭に区別する事が可能となったので報告する。

Aspergillus oryzae, Aspergillus flavus, genome analysis

講演番号：3A08a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ A 校舎 08 会場

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* のペクチンメチルエステラーゼ遺伝子破壊株の機能解析（第 2 報）

Characterization of the deletion mutants of pectin methylesterase genes in *Aspergillus luchuensis*.

○水谷 治、柿薗 ダララット、高橋 徹、山田 修 (酒総研)
○Osamu Mizutani, Dararat Kakizono, Toru Takahashi, Osamu Yamada (NRIB)

【目的】 焼酎製造では、官能的に必須な香気成分ばかりでなく、メタノールのような望まない成分も微量であるが生成することがある。特に原料に芋を用いて焼酎を製造した場合に、メタノールが含まれてしまうことが経験上知られている。焼酎のメタノール濃度において、わが国の食品衛生法では製品あたり 1,000 mg/L 未満とされており、全く問題となっていないが、台湾の輸入基準では 100% エタノールあたり 1,000 mg/L 以下と設定されており、芋焼酎においては輸出ができない場合も想定され、解決しなければならない問題となっている。メタノールは、エタノールと近い性質から蒸留等の工程による除去は難しく、現状では醸造工程で生産させないことが最善の方策と考えられる。現在のところ、メタノールは原料である芋に含まれるペクチンを基質として焼酎麹菌が産生するペクチンメチルエステラーゼ (Pme) の関与によって生成する見方が有力である (1), (2)。本研究では、Pme に焦点をあて、その低減方法について検討を行うことを目的としている。今大会では原因遺伝子の破壊株を用いて米麹を作成し、芋焼酎小仕込み試験を行ったので報告する。

【結果】 我々は現在までに、焼酎麹菌 (*A. luchuensis*) のゲノムデータベースより、*Aspergillus oryzae* の PmeA と相同性を示す遺伝子を見出し、*pmeA*, *pmeB*, *pmeC* と命名した。これら遺伝子のメタノール生成活性調べたところ、PmeA, B において、ペクチンを基質としてメタノール生成活性を有している事が明らかとなった。また、*pmeA*, *pmeB* 各遺伝子の単独破壊を行い、メタノール生成活性を調べた結果、*ΔpmeA* 株では 80%、*ΔpmeB* 株では 20% 程度、親株と比較して、その活性が減少することを見出した (1), (2)。そこで本大会では、更なるメタノール生成活性の減少が見られるかを調べるために、*pmeA*, *pmeB* 遺伝子二重破壊株の造成を試みた。*A. luchuensis ΔpmeA* 株を宿主として、ブレオマイシン耐性遺伝子を用いて、*pmeB* 遺伝子の破壊を行った。得られた形質転換体を、コロニー PCR、サザン解析により調べた所、目的の位置のみで相同組換えが行われた株 (*ΔpmeApmeB*) が得られた。*ΔpmeApmeB* 株のメタノール生成活性を調べた結果、*ΔpmeA* 株と比較して若干減少することが明らかとなった。続いて、実際の芋焼酎においてもメタノールが低減化されるかを明らかにするために、各破壊株の米麹を用いた芋焼酎小仕込み試験を行った。各芋焼酎醪の発酵経過を炭酸ガス減量で比較したところ、どの破壊株も親株と同等の発酵経過を示していた。蒸留後の各芋焼酎サンプルのエタノール濃度及びメタノール濃度を測定した。その結果、各破壊株麹で醸造した芋焼酎のエタノール濃度は親株とほぼ同等であった。一方、メタノール濃度は親株と比較して *ΔpmeA* 株及び *ΔpmeApmeB* 株で大きく減少することが明らかとなった。

(1) 水谷ら, 日本農芸化学会 2011 年度大会要旨集 p. 1709.
(2) 水谷ら, 日本農芸化学会 2012 年度大会要旨集 p. 2187.

Aspergillus luchuensis, pectin methylesterase, shochu

講演番号：3A08a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ A 校舎 08 会場

白麹菌 *Aspergillus kawachii* のクエン酸高生産に関わる遺伝子の探索

The quest for genes involved in citric acid productivity of a white koji mold, *Aspergillus kawachii*

田代 智史[1]、○二神 泰基[2]、森 一樹[2]、和田 正太郎[3]、田代 康介[2]、久原 哲[2]、梶原 康博[3]、高下 秀春[3]、竹川 薫[2]、後藤 正利[2] ([1]九大院生資環、[2]九大院農、[3]三和酒類)
Satoshi TASHIRO[1], ○Taiki FUTAGAMI[2], Kazuki MORI[2], Shotaro WADA[3], Kosuke TASHIRO[2], Satoru KUHARA[2], Yasuhiro KAJIWARA[3], Hideharu TAKASHITA[3], Kaoru TAKEGAWA[2], Masatoshi GOTO[2] ([1]Grad. Sch. Biores. Bioenviron., Kyushu Univ., [2]Faculty of Agriculture, Kyushu Univ., [3]Sanwa Shurui Co. Ltd.)

【目的】焼酎の醸造に用いられる白麹菌 *Aspergillus kawachii* の特徴のひとつとして、クエン酸を高生産し、麹やもろみの pH を低く保つことで雑菌の増殖を防ぐ役割をもつことが挙げられる。麹造りにおいて、40℃から 30℃への温度低下をきっかけとして、白麹菌はクエン酸の高生産を開始する。また、マイクロアレイ解析の結果、同過程で白麹菌が熱ストレスから解放されることが示唆されている。本研究では、白麹菌のクエン酸高生産に関わる遺伝子の探索を行った。
【方法および結果】麦麹造りにおいて 40℃から 30℃に温度を低下させたクエン酸高生産誘導条件と、40℃を維持したクエン酸高生産非誘導条件における白麹菌の遺伝子発現をマイクロアレイ解析により比較して、クエン酸高生産誘導時に発現変動する遺伝子を同定した。その結果、解糖系においては、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が 1/10 に発現減少し、グリセリン酸ムターゼ遺伝子の 1 つが 2.2 倍発現上昇した。TCA 回路とγ-アミノ酪酸経路においては、2 倍以上の発現変動を示す遺伝子は認められなかったが、グリオキサル酸経路において、リンゴ酸合成酵素遺伝子の 2.8 倍の発現上昇が認められた。次に、クエン酸の高生産に重要であると予想されているミトコンドリア局在の推定有機酸輸送体遺伝子の中で、クエン酸高生産誘導時に発現上昇するものとして、推定ジカルボン酸輸送体（5.1 倍上昇）、推定コハク酸-フマル酸輸送体（3.8 倍上昇）、2 種の推定トリカルボン酸輸送体（1.8 倍上昇）、5 種の推定ミトコンドリア輸送体（1.5-1.8 倍上昇）をコードする遺伝子を同定した。さらに、推定転写制御遺伝子の中から、クエン酸高生産誘導時に発現変動するものを 7 遺伝子同定した。これらの発現変動遺伝子が実際にクエン酸の高生産に関わっているのかどうかを評価するために、*A. kawachii* Δ*ligD* 株を宿主として計 20 遺伝子の破壊株を取得した。現在、遺伝子破壊がクエン酸を含めた有機酸生産量に及ぼす影響を解析している。

white koji mold, Aspergillus kawachii, citric acid

講演番号：3A08a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ A 校舎 08 会場

沖縄自然界からの泡盛黒麹菌の単離と酒造好適株の選抜

Isolation of *Aspergillus awamori* in Okinawa and screening of the strains for awamori brewing

仲間 加奈、坂元 理奈、金城 悠希菜、○渡邉 泰祐、外山 博英（琉球大農・亜熱生資）
Kana NAKAMA, Rina SAKAMOTO, Yukina KINJO, ○Taisuke WATANABE, Hirohide TOYAMA (Dept. Biosci. Biotech. Fac. Agr., Univ. the Ryukyus)

【目的】麹菌は酒、味噌、醤油の醸造に用いられてきた。発酵食品における麹菌の役割は、原料を分解する酵素の生産であり、酒質等の品質に与える影響は多くないと考えられてきた。しかし最近の研究で、泡盛黒麹菌の菌種の違いが泡盛酒質に影響を与えることが明らかになってきている[1)]。現在、泡盛酒造所の8割以上が同一の種麹を使用していることから、醸造に適した黒麹菌を選抜することによって、今までにない新しい酒質の泡盛を提供することができると考えられる。そこで、沖縄県の自然環境中から単離された泡盛黒麹菌候補株の中から、酒造好適株を選抜することとした。泡盛黒麹菌の代表的な特徴であるクエン酸生産性とα-アミラーゼ活性測定を行った。さらに、*Aspergillus*属特異的なプライマーを用いたPCR法による候補株の簡易的同定、マイコトキシンの一種であるオクラトキシンA（OTA）生合成遺伝子の有無について検討を行った。
【実験方法】供試菌株として*Aspergillus awamori* NBRC4314株、NBRC4388株、ISH1株、*A. saitoi* ISH2株、*A. niger* NBRC33023株、*A. oryzae* NBRC30102株、*A . kawachii* NBRC4308株、研究室に保存されている泡盛黒麹菌候補株139株を用いた。30ºCで3日間の製麹を行い、48, 72時間後の麹の酸度を測定した。麹中の酸度は、蒸米間のロット差を補正するために、標準株に対する候補株の酸度も加味して評価した。麹の水抽出物におけるα-アミラーゼ活性は、キッコーマンバイオケミファ社製「α-アミラーゼ測定キット」を用いて測定した。各候補株から抽出した染色体DNAを鋳型として、*Aspergillus*属に特異的なプライマーを用いたPCR反応を行い、候補株が*Aspergillus*属であるかを評価した。OTA生合成に関わる*A. niger*のAn15g07920遺伝子を増幅させるプライマーを用いたPCR反応を行い、この遺伝子の有無を電気泳動によって評価した。
【結果と考察】現在泡盛醸造に使用されている代表的な泡盛黒麹菌である ISH1 株と ISH2 株は、α-アミラーゼ活性と酸度測定の結果、過去にも報告されたように ISH1 株の方が高い活性を示し、ISH2 株の方が高い酸度を示した。合計 139 株のうち、ISH1 よりも高い α-アミラーゼ活性を示し、且つ ISH2 株よりも高い酸度を示す株が複数見出された。*Aspergillus* 属に特異的なプライマーを用いた PCR 法による解析の結果、全ての候補株について *Aspergillus* 属に特異的な DNA 断片の増幅が確認された。候補株の染色体 DNA 上に OTA 生合成遺伝子の 1 つ An15g07920 遺伝子が存在しているかを明らかにするために、PCR 法を用いた解析を行った。その結果、解析を行った 129 株全てについて、An15g07920 遺伝子が検出されなかった。したがって、全ての候補株は OTA 非生産株であると考えられた。以上の結果から、沖縄県の自然環境中に泡盛黒麹菌が多数存在し、酒造に適した新しい菌株を取得できる可能性が示された。

1) 2013 年度日本農芸化学会大会講演要旨集 3B22a09

Aspergillus, Awamori, Brewing

講演番号：3A08a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ A 校舎 08 会場

花から分離した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の清酒醸造特性解析

Analysis of *sake* brewing characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from flowers

○小野 奈津子[1]、安田（吉野） 庄子[1]、三井 俊[1]、船越 吾郎[1]、加藤 雅士[2]、北本 則行[1]([1]あいち産科技総セ・食工技セ、[2]名城大・農)
○Natsuko ONO[1], Shoko YOSHINO-YASUDA[1], Shun MITSUI[1], Goro FUNAKOSHI[1], Masashi KATO[2], Noriyuki KITAMOTO[1] ([1]Food Res. Center, Aichi-Inst, [2]Dept. of Agr., Meijo Univ.)

【目的】食生活の多様化に伴い、従来にない嗜好的特徴や地域ブランド性など新たな付加価値のある発酵食品の製造が求められている。このような発酵食品開発の取組みの一つとして、我々は自然界からの酵母 *S. cerevisiae* の新規分離および新規分離株を用いた発酵食品の開発を目指して研究を行っている。我々は *S. cerevisiae* の優先的な増殖を可能とする選択的集積培地を活用した自然界からの *S. cerevisiae* の迅速な分離手法を確立し[1)]、愛知県内の様々な花から 25 株の *S. cerevisiae* を分離することに成功した。この 25 株の新規分離 *S. cerevisiae* に 28 株の産業用酵母（清酒酵母 9 株、パン酵母 10 株、ワイン酵母 9 株）と 1 株の実験室酵母を加えた 54 株の *S. cerevisiae* についてマイクロサテライト解析を行ったところ、新規分離 *S. cerevisiae* の大部分は産業用酵母とは異なる独自のクラスターを形成することを見出した[2)]。今回は、新規分離 *S. cerevisiae* と産業用酵母の清酒醸造特性について比較解析を行ったので、報告する。
【方法および結果】マイクロサテライト解析に供した 54 株の *S. cerevisiae* について、始めに YPD 液体培地(glucose10%)での発酵定量試験を行った。生成エタノール濃度は清酒酵母が 3.9%-5.0%、パン酵母が 4.2%-5.1%、ワイン酵母が 4.5%-5.4%、実験室酵母が 4.9%であったのに対し、新規分離 *S. cerevisiae* は 4.7%-5.4%であり、産業用酵母よりやや高いアルコール発酵能を示した。次に、総米 30g の清酒小仕込試験を行い成分分析（エタノール濃度・日本酒度・酸度・アミノ酸度）を行った。エタノール濃度は清酒酵母が 14.2%-17.5%、パン酵母が 12.4%-16.1%、ワイン酵母が 10.7%-16.1%、実験室酵母が 13.2%であったのに対し、新規分離 *S. cerevisiae* は 4.9%-16.3%であり、産業用酵母に比べて全体的に低い値を示した。日本酒度も同様の傾向が見られた。酸度は新規分離 *S. cerevisiae* は産業用酵母に比べて全体的に高い値を示した。アミノ酸度は、清酒酵母がほぼ同じ値を示したのに対し、新規分離 *S. cerevisiae* はパン酵母・ワイン酵母と同様に幅広い値を示した。マイクロサテライト解析により清酒酵母クラスターに分類された 2 株の新規分離 *S. cerevisiae* の成分分析値は清酒酵母と類似していたが、独自のクラスターに分類された 23 株の新規分離 *S. cerevisiae* の成分分析値は、清酒酵母に比べてエタノール濃度・日本酒度が低く酸度が高いという特徴があった。これらの結果から、マイクロサテライト解析の結果と清酒小仕込試験の結果は相関関係があることが示された。

1）日本食品科学工学会誌（2011）第 58 巻（9 号）：433-439
2）2012 年度日本農芸化学会大会講演要旨　講演番号 2C20a11

Saccharomyces cerevisiae, microsatellite, *sake* brewing characteristics

講演番号：3A08a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ A 校舎 08 会場

思川桜からの酒造用酵母の分離

Isolation and characterization of fermentative yeasts from omoigawa-zakura

○荻野目 あづさ[1]、三川 隆[2]、上田 誠[1]([1]小山高専物質工学科、[2]三菱化学メディエンス)
○ Azusa OGINOME[1], Takashi MIKAWA[2], Makoto UEDA[1] ([1]Oyama National College of Technology, [2]Mitsubishi Chemical Medience)

【目的】各種アルコール飲料は発酵原料や製造法が異なるため、その製造に用いられる醸造用酵母は、その製造するアルコール飲料に適したもの、例えば清酒には清酒酵母、ビールにはビール酵母等が選択され使用されている。清酒については、殆どのものが醸造協会系酵母を使用して製造されているが、個性的なお酒のニーズから独自の酵母を地域性を活かして花や果実から新たに探索する試みもなされている。本研究では、栃木県小山市の市花である思川桜からの酒造用酵母の取得を試みた。思川桜（*Prunus subhirtella forma omoigawa*）は小山市原産の桜で、ソメイヨシノと八重桜の中間の時期に淡い紅色の花を咲かせる。

【方法】思川桜の花を YPS（スクロース 20%、酵母エキス 0.3%、ポリペプトン 0.3%）液体培地に直接漬け込み培養を行った。数日から十日間程度静置し、菌の生育と泡の発生が認められたサンプルから酵母を単離した。分離株の中から *Saccharomyces* 属酵母を選別するために、クロムアガーカンジダ寒天培地に培養液を塗布し、出現するコロニーが白から紫色を呈する菌株を選択的に単離した。これら分離株について、スクロースでの発泡性等確認し、TTC 染色によって酵母の日本酒醸造能を調べた。さらに 26S rDNA D1/D2 領域および ITS 領域の塩基配列解析から種の同定を行った。

【結果】小山市が管理する思川桜などから、開花のタイミングと天候を考慮し複数回サンプルを採取した。YPS 培地に漬け込んだ 265 サンプル中、92 サンプルに発泡が確認された。これらの培養サンプルからクロムアガーカンジダ培地により、*Saccharomyces* 属酵母または *Saccharomyces* 属類縁の酵母と予想される菌を、顕微鏡観察の結果も含めて分離し、さらに発泡性が優れている微生物 21 株を選択した。これらの株の中から TTC 染色で赤色を呈する株として OPJ-1 株を選択した。OPJ-1 株の発酵特性を確認したところ、スクロースを炭素源とした培地で高い発泡性を示し、産膜形成やキラー特性は認められなかった。OPJ-１株はリボゾーム DNA の遺伝子解析の結果から *Saccharomyces cerevisiae* と同定した。*Saccharomyces cerevisiae* OPJ-1 のアルコール耐性等の諸性質や他の分離酵母についても併せて報告する。

Saccharomyces cerevisiae, sake, isolation

講演番号：3A08a17
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ A 校舎 08 会場

酵母識別 DNA マーカーを有する尿素非生産性清酒酵母の単離

Isolation of a non-urea producing sake yeast strain carrying discriminable molecular marker

○栗林 喬[1]、田村 博康[2]、安澤 義彦[2]、平田 大[3]、渡邊 健一[1] ([1]新潟県醸造試験場、[2]朝日酒造、[3]広島大・先端研)
○Takashi KURIBAYASHI[1], Hiroyasu TAMURA[2], Yoshihiko ANZAWA[2], Dai HIRATA[3], Ken-ichi WATANABE[1] ([1]Niigata Prefectural Sake Research Institute, [2]Asahi Sake Brewing Co., Ltd., [3]AdSM, Hiroshima Univ.)

【目的】醸造産業において、発酵に用いる微生物のトレーサビィリティ解析（同定・識別）は、製造の効率性や製品の安全性を保証する上で重要である。清酒製造において、カルバミン酸エチル（ECA）は、酵母によるアルギニンの分解で生ずる尿素とエタノールから生成される。ECA を低減するため、尿素生産に関与するアルギナーゼを欠損した変異酵母の分離法（CAO 培地）が開発され、尿素非生産性清酒酵母が実用化されているが、CAO 培地で取得された変異株のアルギナーゼ遺伝子（*CAR1*）の変異部位の解析報告はない。そこで、本研究では、CAO 培地により分離されたアルギナーゼ欠損変異株の *CAR1* 変異部位を同定し、その変異型の多様性を解析するとともに、識別可能な *CAR1* 変異配列を有する尿素非生産性清酒酵母の取得を試みた。
【方法】新潟県醸造試験場が保有する新潟吟醸 9 号（G9）と新潟吟醸 G74 号（G74）を親株とし、CAO 培地により、アルギナーゼ欠損変異株を分離した。分離株の *CAR1* 内の変異部位を同定し、変異部位を標的とした Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism（PCR-RFLP）法によって、菌株の判別が可能な変異株を選抜した。選抜株を用いて、実用規模の醸造試験を行い、PCR-RFLP 法による識別の可否と、変異株の非尿素生産性を調査した。
【結果】G9 株と G74 株から CAO 培地によりアルギナーゼ欠損変異株を選抜した結果、G9 株から 2 株、G74 株から 7 株の、自然変異株を分離した。変異株の *CAR1* 塩基配列解析の結果、G9 株由来 1 株と G74 株由来 6 株で、1 塩基置換変異を確認した。また、2 bp の欠失変異株が、G9 株と G74 株から 1 株ずつ（G9arg および G74arg）得られ、これらの変異株では、菌株判別のための PCR-RFLP 解析系を構築することができた。そこで、G9arg 株と G74arg 株を用いて、実用規模の醸造試験（G9arg:総米 6,000 kg，G74arg:総米 120 kg）を行った。その結果、酒母・醪において、PCR-RFLP 解析により、変異株を正確に同定でき、また、発酵期間中、酒母・醪いずれにおいても尿素は検出されず、製成酒の尿素および ECA も不検出であった。さらに、変異株を使用した製成酒の一般成分や官能審査の結果は、親株と遜色なかった。以上より、CAO 培地により単離した変異株の中から、清酒の酒母・醪において、簡便かつ迅速な PCR-RFLP 法により同定可能な尿素非生産性酵母の分離に成功した。現在、本酵母判別法が、市販清酒の識別にも応用可能かを検討している。

公表論文: Kuribayashi *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press (2013)

non-urea producing sake yeast, identification, ethyl carbamate

講演番号：3A08p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ A 校舎 08 会場

ピルビン酸低減清酒酵母のミトコンドリア代謝・活性解析
Analysis of mitochondrial metabolism and activity of pyruvate-underproducing sake yeast.
アグリミ ゲンナロ [3]、メナ マリア [3]、泉 知輝 [1]、ピサノ イザベラ [3]、ゲルミナリオ ルクレジア [3]、福崎 久誌 [1]、パルミエリ ルイジ [3]、ブランク ラース [2]、○北垣 浩志 [1] ([1]佐賀大学農、[2]アーヘン工科大学、[3]バリ大学)
Gennaro Agrimi[3], Maria Mena[3], Kazuki Izumi[1], Isabella Pisano[3], Lucrezia Germinario[3], Hisashi Fukuzaki[1], Luigi Palmieri[3], Lars Blank[2], ○Hiroshi Kitagaki[1] ([1]Saga University, [2]RWTH Aachen University, [3]University of Bari)

［背景］
アルコール発酵時のピルビン酸の残存はジアセチルなどのオフフレーバーの発生に結びつくため、低アルコール清酒や吟醸酒、ビールなどの醸造で技術課題となってきた。この課題を解決するため、我々はミトコンドリア輸送阻害剤への耐性株を取得することで、ピルビン酸低減清酒酵母を育種した。この株は工場スケールの清酒醸造で発酵能の減耗を伴わずにピルビン酸の減少を示すが、その詳しいメカニズムはわかっていなかった。そこでこの株のミトコンドリア活性測定・代謝フラックス解析を行った。
［方法結果］
ピルビン酸低減株ではミトコンドリア呼吸活性が増加していたが、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性は減少していた。このことからピルビン酸低減株ではピルビン酸デヒドロゲナーゼ以外のメカニズムでミトコンドリアの呼吸活性を増加させていると考えられた。13C-glucose を使った代謝フラックス解析を行うと、ピルビン酸低減株では呼吸時のミトコンドリアにおける炭素代謝が向上していた。以上のことから、ピルビン酸低減株ではミトコンドリアの活性が上昇していることが明らかとなった。
清酒醸造中には最終電子受容体である酸素がほとんどないことを考えると、ミトコンドリア活性が清酒醸造中にピルビン酸の低減に結びつくことは考えにくく思われたので、酸素がある環境から酸素がない環境に移行した時の酵母ミトコンドリアの形態を調べた。その結果、ミトコンドリアの活性の高い株では無酸素移行時のミトコンドリアの filamentous な構造維持の時間が長く、低い株では時間が短かった。ミトコンドリアの filamentous な構造はミトコンドリアの大きな電位を表している。このことから、ミトコンドリア活性の高い株では無酸素環境移行時にミトコンドリア電位を維持する時間が長いために、ピルビン酸を多く資化できると考えられた。
以上の研究から、アルコール発酵初期の無酸素環境移行時の酵母ミトコンドリアの活性には株ごとに差があり、これを制御することでピルビン酸を低減できる可能性が考えられた。
Agrimi et al., *FEMS Yeast Research*, in press (2013)

pyruvate, sake, mitochondria

講演番号：3A08p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ A 校舎 08 会場

ミトコンドリアの自食作用（ミトファジー）阻害による酵母の発酵力増強
Enhancement of ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strain by disrupting mitophagy function.
○城間 祥大[1]、ジャヤコディ ラヒル[1,2]、堀江 健太[1]、岡本 浩二[3]、北垣 浩志[1,2]（[1]佐賀大、[2]鹿児島大院連合農、[3]阪大院生命機能）
○ Shodai SHIROMA[1], Lahiru JAYAKODY[1,2], Kenta HORIE[1], Koji OKAMOTO[3], Hiroshi KITAGAKI[1,2] ([1]Saga Univ., [2]Join Grad. Sch. of Agri., Kagoshima Univ., [3]Grad. Sch. of Front Biosci., Osaka Univ.)

【背景・目的】
バイオマスを使ったバイオエタノールの発酵条件は、多くの場合酵母にとって栄養分が最適ではなく不足している。またアルコール飲料の製造においても、吟醸酒のような高度精白米を使う日本酒、少ない麦芽を使う発泡酒などの醸造条件で栄養不足の条件になる場合があるが、そのような条件下で酵母でどんなイベントが起きているのか、またそれが発酵力にどのように影響しているのかはこれまでほとんどわかっていなかった。
一方、酵母が栄養不足の場合にはオートファジーが起きることが報告されている。また近年我々はアルコール発酵においても酵母ミトコンドリアが役割を持つことを明らかにしていることから、こうした条件でミトコンドリアのオートファジー（ミトファジー）が起きることは充分に考えられる。しかしこれまでアルコール発酵におけるミトファジーの報告はなかったことから、その解析を行った。
【方法・結果】
ミトコンドリアを GFP で可視化した清酒酵母を作成し、吟醸酒を醸造して液胞を FM4-64 で赤色に染色し観察したところ、ミトコンドリアが液胞膜に fusion したことを示す黄色シグナルが多く観察され、吟醸酒醸造条件ではミトファジーが起きていることが明らかとなった。
次にミトファジーを制御する *ATG32* を遺伝子破壊した清酒酵母を作製し、吟醸酒を醸造すると、*atg32* 破壊株は親株よりも増加した発酵速度、最終エタノール濃度を示した。最小培地（15%グルコース）のアルコール発酵条件でも同様に発酵力が向上していた。*atg32* 破壊株ではバイオマスへの carbon flux が減少しエタノールへの carbon flux が増加し、細胞の大きさも小さくなっていた。このことから、低栄養の発酵条件では酵母はミトファジーによりミトコンドリアを分解し栄養成分を得て自分の細胞の構築に回しており、この過程を阻害することでエタノール発酵力を増加させることができることが明らかとなった。この過程はアルコール発酵における新たなプロセスであることから、発酵微生物の育種・発酵制御の新たなターゲットになると期待される。
1）Shiroma et al., ***Appl. Environ. Microbiol.***, in press (2014)

mitophagy, sake yeast, sake brewing

講演番号：3A08p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ A 校舎 08 会場

オートファジー欠損清酒酵母の醸造特性解析

Brewing characteristics of autophagy-defective sake yeast

○佐田 尚隆、山内 隆寛、浅井 拓也、明石 貴裕（白鶴酒造（株））
○Naotaka Sada, Takahiro Yamauchi, Takuya Asai, Takahiro Akashi (Hakutsuru sake brewing co. ltd)

【目的】オートファジーはユビキチン・プロテアソーム分解系と並ぶ細胞内の主要分解系として知られる機構であり、ストレス条件、特に飢餓条件でオートファジーが強く誘導されることなどから、生物にとって生理的意義が極めて大きいと考えられている。一方、清酒醪は窒素源が少なく、かつ高糖濃度・高エタノール濃度といったストレス環境であることが一般的に知られていることから、我々は、清酒醪中で清酒酵母が活動を行う上でオートファジーは重要な機構のひとつであると考えた。そこで、清酒醸造における清酒酵母のオートファジーの意義を明らかにすることを目的として、オートファジー欠損清酒酵母の醸造特性解析を行った。
【方法および結果】遺伝子工学的手法を用いて、きょうかい 7 号酵母（K701）のオートファジー遺伝子 *ATG1* を破壊し、オートファジー欠損清酒酵母 K701*atg1*Δを作製した。K701、および K701*atg1*Δの 2 つの試験区で総米 1 kg の試験醸造を行い、発酵中から製成酒までの各種成分値を比較した。その結果、K701*atg1*Δ醪では K701 醪に比べて発酵が良好であり、製成酒におけるアルコール度数も K701*atg1*Δ使用酒の方が明瞭に高かった。K701*atg1*Δ試験区ではそれ以外にも、酸度の低下、アミノ酸度の上昇、酢酸エステル類（酢酸イソブチル、および酢酸イソアミル）の増加、などの変化が見られた。以上のことから、清酒酵母のオートファジー欠損は清酒の一般的な香味バランスに影響を及ぼすことが示唆されると同時に、オートファジー遺伝子群をターゲットとした清酒酵母を育種することで、特徴的な香味を有する清酒を創出できる可能性が示された。発表では、酢酸エステル類増加の要因解析についても合わせて報告する。

sake brewing, autophagy, S. cerevisiae

講演番号：3A08p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ A 校舎 08 会場

清酒もろみから分離したリンゴ酸高生産清酒酵母のゲノム解析

Genomic analysis of high malate-producing *Saccharomyces cerevisiae* isolated from sake-mash

○大場 孝宏[1]、吉瀬 友紀[2]、泉本 英次[2]、渡辺 大輔[3,4]、赤尾 健[3] ([1]福岡工技セ生物食品研、[2]久留米高専生化、[3]酒総研、[4]現　奈良先端大バイオ)
○Takahiro Oba[1], Yuki Kichise[2], Eiji Izumoto[2], Daisuke Watanabe[3,4], Takeshi Akao[3] ([1]Biotech. and Food Res. Inst.,FITC, [2]Dept. Biochem. Appl. Chem., Kurume Natl. Col. Tech., [3]NRIB, [4]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

【目的】我々は酒質の多様化を目指し、清酒もろみから爽やかな酸味を示すリンゴ酸の生産性が増大した清酒酵母の取得を行った[1)]。取得した複数のリンゴ酸高生産清酒酵母のうち、16BY7-6 株と親株である K901 株の酵素活性比較を行ったところ、16BY7-6 株の pyruvate carboxylase 活性ならびに malate dehydrogenae 活性が K901 に対して上昇していたことからミトコンドリア活性の低下がリンゴ酸の生産量が増大の原因であると推察し、フローサイトメトリーによりミトコンドリア活性の低下が起きていることを明らかしている[2)]。以上のことから、リンゴ酸高生産株ミトコンドリア活性の低下により、細胞質内のピルビン酸からオギサロ酢酸を経てリンゴ酸が生成する経路が活性化されたことが、リンゴ酸生産量増大の原因であると推定している。今回、リンゴ酸高生産株 16BY7-6 と親株 K901 について次世代シークエンサーを利用した比較ゲノム解析を行い、リンゴ酸高生産の原因遺伝子の探索を行った。

【方法及び結果】16BY7-6 と K901 について次世代シークエンサーによるゲノム配列の解読を行い、得られた両株のショートリードについてきょうかい 7 号(K7)のゲノムを参照配列としてマッピングを行った。その結果、25 遺伝子について nonsynonymous な一塩基多型(SNPs)が見つかった。それら 25 遺伝子のヘテロ二倍体である BY4743 由来破壊株及び BY4743 について、YM-5 液体培地を用いた発酵試験を行い、HPLC によりリンゴ酸の生産量を測定した。その結果、18 の遺伝子破壊株が親株 BY4743 よりリンゴ酸を多く生産していた。それら 18 の遺伝子破壊株について、ローダミン 123 でミトコンドリアの染色を行い、フローサイトメーターで蛍光強度とその個体数分布を測定し、ミトコンドリア活性測定を行ったところ、*ΔRSM24, ΔHSP78* が親株に比べてミトコンドリア活性が低下していることが示された。*RSM24* 遺伝子は Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit を、*HSP78* 遺伝子は Oligomeric mitochondrial matrix chaperone をコードしており、ともにミトコンドリアに関連する遺伝子である。したがって、清酒もろみから分離したリンゴ酸高生産株の *RSM24*, *HSP78* 遺伝子に変異が起きたことでミトコンドリアの活性が低下し、リンゴ酸高生産性を示すようになったのではないかと推察した。

1) 大場ら：日本醸造学会誌，103，949-953 (2008)
2) 吉瀬ら：第 64 回日本生物工学会大会要旨集 P163

Saccharomyces cerevisiae, malate, genomic analysis

講演番号：3A08p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ A 校舎 08 会場

高リンゴ酸生産・低酢酸生産性変異株の細胞内代謝物プロファイル

Global metabolic change in respiratory inhibitor 2,4-dinitrophenol (DNP) resistant sake yeast

○中山 俊一[1]、小杉 慎吾[1]、清 啓自[1]、満生 慎二[2]、門倉 利守[1]、中里 厚実[1] ([1]東農大・応生・醸造、[2]九産大・工・物質生命化学)
○Shunichi NAKAYAMA[1], Shingo Kosugi[1], Keiji Kiyoshi[1], Shinji Mitsuiki[2], Toshimori Kadokura[1], Atsumi Nakazato[1] ([1]Tokyo Univ. Agric., [2]Kyushu Sangyo Univ.)

【目的】これまでに我々は、呼吸阻害剤 2,4-dinitrophenol（DNP）耐性株を取得することで、リンゴ酸高生産性・酢酸低生産性清酒酵母を取得している。この DNP 耐性株は、親株であるきょうかい酵母 K901 と比較してミトコンドリア活性が低下しており細胞質中の NADH/NAD^+比が上昇していた。このことから、解糖系で生じたピルビン酸がミトコンドリアで代謝されず、また細胞質内の NADH/NAD^+比が高いことで NADH を消費するリンゴ酸生成経路が活発になることを明らかとした。本研究では、メタボローム解析によりミトコンドリア活性の低下、NADH/NAD^+比上昇による細胞内代謝物への影響を明らかにすることを目的とした。
【方法･結果】DNP 耐性株と親株である K901 をグルコース 10%を含む YM 培地にて 24 時間静置培養し、集菌後菌体より代謝物を抽出し細胞内代謝物を測定した。DNP 耐性株の解糖系の代謝物においては、NAD^+要求性の Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)を境に上流の代謝物が増加しており、下流の代謝物は減少していた。またこの蓄積に付随して、DNP 耐性株においてはペントースリン酸経路の代謝物も顕著に蓄積していた。DNP 耐性株は親株と比較して、エタノール発酵開始が遅延するが、この発酵遅延が NADH/NAD^+比の増加により NAD^+要求性の G3PDH が律速経路になることが示唆された。そこで、酸化剤アセトインを添加することで高い NADH/NAD^+比の改善を試みたがエタノール発酵遅延は解除されなかった。しかしながら、アセトインの添加により NADH 要求性のリンゴ酸生成量が減少し、NAD^+要求性の酢酸生成量が増加した。このことから、DNP 耐性株における NADH/NAD^+比は発酵遅延には直接関与しないものの、リンゴ酸・酢酸生成には重要な因子の一つであることが明らかとなった。さらに、DNP 耐性株では親株と比較して各種アミノ酸量が減少していた。アミノ酸生合成はミトコンドリア内で合成される中間代謝物を基に生合成される経路が多いため、ミトコンドリア活性の低下により DNP 耐性株ではアミノ酸生合成が低下していることが示唆された。以上の様に、ミトコンドリア活性低下と NADH/NAD^+比の上昇により様々な代謝経路に影響を及ぼすことが明らかとなった。

Sake yeast, metabolome, redox balance

講演番号：3A08p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ A 校舎 08 会場

二種類の糖の同時資化が酵母にもたらす増殖阻害
Growth defect caused by simultaneous assimilation of two kinds of sugars in *Saccharomyces cerevisiae*

○畠中 治代[1,2]、光永 均[2]、大村 文彦[1]、石黒 正路[3]、馬場 健史[2]、福崎 英一郎[2]([1]サントリーSIC、[2]大阪大院・生命先端工、[3]新潟薬科大・応生命)
○ Haruyo Hatanaka[1,2], Hitoshi Mitsunaga[2], Fumihiko Omura[1], Masaji Ishiguro[3], Takeshi Bamba[2], Eiichiro Fukusaki[2] ([1]Suntory SIC, [2]Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [3]Niigata Univ. of Phamacy and Appl. Life Sci.)

麦汁は、主にグルコース、マルトース、マルトトリオースの 3 種類の糖を含んでおり、ビール発酵においては、これらの糖が遅滞なく資化されることが望まれる。*S. cerevisiae* は、マルトースを取り込むトランスポーターとして、*MALX1*(X=1,2,3,4,6)を、マルトースとマルトトリオースの両方を取り込むトランスポーターとして、*AGT1* を持っている。これらの遺伝子はカタボライトリプレッションを受けるため、グルコースの存在下では発現されない。また Mal61p や Mal31p は細胞膜上に局在した後も、グルコース存在下ではすみやかにエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれ、液胞にて分解される事(glucose-induced degradation)が報告されている。従って、ビール発酵においては、麦汁中のグルコースが資化された後に、酵母はマルトースとマルトトリオースの資化へと移行する。我々は、今までに、①グルコース存在下での半減期が、Mal61p は 33 min、 Agt1p は 11 min であり、Agt1p は Mal61p よりもすみやかに分解される事、②III 番染色体に存在する Mal21p が、例外的に glucose-induced degradation に対して耐性を持つ事、③Leu55 を Pro に置換した変異型 Agt1 (Agt1-55P) がグルコース存在下でも非常に分解しにくい事、等を明らかにしている。Mal21p や Agt1-55P は、グルコース存在下でも取り込み活性を維持しているため、麦汁中の 3 種類の糖の資化促進に有用であることが予想された。ところが、これらのトランスポーターを構成的に発現する実験室株は、グルコース、あるいはマルトースを C 源とする培地には良く増殖するが、両糖を含む培地においては非常に長いラグタイムを示した。取り込み活性を持たない変異型トランスポーターを発現させた場合には、この現象は見られない事から、マルトースの取り込み自体が原因である事が確認された。このラグタイムは、マルターゼ遺伝子(*MAL62*)も同時に高発現した場合には生じないことから、マルトースが代謝されず細胞内に蓄積することが原因であると予想された。また、Agt1p はマルトースの他にシュークロースも取り込むことができるため、シュークロースの場合も同様の現象が生じるか調べたところ、シュークロースでも非常に長いラグタイムが観察され、マルトースに特異的な現象ではないものと思われた。ラグにおける細胞内のメタボローム解析を行ったところ、予想通りマルトース、あるいは、シュークロースが大量に蓄積していた。また、細胞内には、分枝アミノ酸合成経路の活性化を促すα-isopropylmalate の蓄積が見られ、数種のアミノ酸の減少が観察された。グルコースとマルトースを同時に含む培地で生じる、これらトランスポーター高発現株の増殖阻害について、様々な解析を行ったので報告する。

α-glucoside transporter, growth defect, maltose

講演番号：3A08p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ A 校舎 08 会場

休止期移行欠損株における下面発酵ビール酵母の発酵性

Fermentation ability of bottom-fermenting yeast lacking function of quiescence entry

○大室 繭[1]、加藤 拓[1]、山岸 裕美[1]、相澤 正幸[1]、周 延[2]、渡辺 大輔[2,3]、赤尾 健[2]、後藤 奈美[2] ([1]アサヒビール（株）、[2]（独）酒総研、[3]現・奈良先端大)
○Mayu OOMURO[1], Taku KATO[1], Hiromi YAMAGISHI[1], Masayuki AIZAWA[1], Yan ZHOU[2], Daisuke WATANABE[2,3], Takeshi AKAO[2], Nami GOTO[2] ([1]Asahi Breweries LTD., [2]NRIB, [3]NAIST)

ビール醸造において、酵母はアルコール生成のみならず香味に関しても重要な役割を果たす。従って、使用されるビール酵母の発酵性は、単に発酵期間だけではなく製品の品質にも大きな影響を与える。

我々は、ビール酵母の発酵性に関わる因子を特定するため、清酒もろみ中において高発酵性を示す清酒酵母に着目した。近年、その高発酵性の一因として、清酒酵母はアルコール濃度の上昇を含む多様な外界ストレスを感知しても増殖を停止せず、休止期移行に欠損を示すこと、即ち細胞周期と関係があることが報告されている。多くの酵母は、ストレスを感知すると Rim15p の活性化によって休止期移行が引き起こされるが、清酒酵母においては、*RIM15* 遺伝子上の機能欠失変異によって休止期移行に欠損が生じる。また、実験室酵母において、*RIM15* 遺伝子の破壊、あるいは G1 期進行に関わる G1 サイクリン Cln3p の分解抑制によって休止期移行を阻害する *CLN3-1* 変異を導入すると、発酵速度が向上することが明らかとなっている。

本研究では、休止期移行欠損がビール酵母の発酵性に影響を与えるかどうか検討するため、下面発酵ビール酵母 W34/70 を用いて、*S. cerevisiae* 型 *RIM15* 遺伝子破壊株及び、*S. cerevisiae* 型 *CLN3-1* 変異導入株を造成した。造成した両株では、元株と比較して発酵速度が向上することが確認された。この結果より、下面ビール酵母の発酵性と細胞周期に関連があることが示唆された。

bottom-fermenting yeast, quiescence entry, fermentation rate

講演番号：3A08p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ A 校舎 08 会場

ビールの泡持ちを低下させる液胞プロテアーゼ PrA と関連するタンパク質の解析

Analysis of beer foam stability-affecting vacuolar protease PrA and its relevant proteins

○佐伯 圭[1]、陶山 明子[2]、竹川 薫[2]、佐藤 雅英[1]、執行 達朗[1] ([1]サッポロビール・価値創造フロンティア研究所、[2]九大院・生資環・生命機能)
○Kei SAEKI[1], Akiko SUYAMA[2], Kaoru TAKEGAWA[2], Masahide SATO[1], Tatsuro SHIGYO[1] ([1]SAPPORO BREWERIES LTD., [2]Kyushu Univ.)

【目的】

ビールにとって泡は極めて重要な品質のひとつである。酵母が有する液胞プロテアーゼの一種 Proteinase A (PrA) は、ビール中のタンパク質を分解することでビールの泡品質を低下させることが知られている。これまで、ビール中の PrA については、その活性測定法の検討を中心に研究が行われてきたが、本来液胞に局在するはずの PrA が細胞外に漏出する機構について、詳細な研究はなされていない。そこで我々は、本機構の解明を目的として、PrA 及びその輸送に関わる因子の細胞内外での挙動について解析を行った。

【方法】

PrA は主にゴルジ体後期に局在する液胞タンパク質レセプターである Vps10p を介して液胞へと輸送される。Vps10p は液胞プロテアーゼである Carboxypeptidase Y (CPY)の輸送にも関与していることから、PrA を含めたこれら 3 つのタンパク質の存在比が変化することによって PrA が細胞外へと漏出する可能性が高まるとの仮説を立て、それぞれの細胞内外での存在量をウエスタン解析及びプロテアーゼ活性測定により解析を行った。また、麦汁による発酵が PrA の挙動に与える影響を調べるため、様々な組成の麦汁を用いた発酵試験を行い、細胞外の PrA 活性の変化を比較した。

【結果】

ビール酵母を様々な培地の条件で振盪培養を行い、PrA・CPY・Vps10p の各タンパク量およびプロテアーゼ活性の挙動について解析を行った結果、培養条件によって各タンパク質の量や活性、各タンパク質の存在量のバランスが変化することが確認された。これらの結果を基に、ビール製造工程において PrA が細胞外に漏出する機構について考察したので報告する。

beer foam stability, vacuolar protease, intracellular transport

講演番号：3A08p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ A 校舎 08 会場

海水からの発酵性酵母の分離と分離株のワイン醸造学的性質

Enological characteristics of fermentative yeasts isolated from seawater

○小森 光紗[1]、乙黒 美彩[1]、岸本 宗和[1]、佐野 憲悟[2]、佐野 邦夫[2]、柳田 藤寿[1]([1]山梨大・ワイン研、[2]伊豆食文化公園（株））
○Misa KOMORI[1], Misa OTOGURO[1], Munekazu KISHIMOTO[1], Kengo SANO[2], Kunio SANO[2], Fujitoshi YANAGIDA[1] ([1]Enol. Vitic. Univ. Yamanashi, [2]Izu food culture Co., Ltd.)

[目的] 近年、地域産業の振興を目的に、果実や花などから多くの発酵性酵母が分離され、ワインをはじめとする酒類の醸造に利用されている。しかし、栄養が乏しく塩濃度が高い海水からの分離例や発酵食品への利用は極めて少ない。本研究では、プロピオン酸 Na 添加 YPD 培地(P-YPD 培地)を用いた集積培養法[1)]により、海水から *Saccharomyces* 属酵母の分離を試みるとともに、分離株のワイン醸造への利用を検討した。

[方法] 2012 および 2013 年に、静岡県伊東市沿岸の 3 地点（留田浜田公園、オレンジビーチ、伊東港）より四季を通して採取した海水計 84 L を、P-YPD 培地と人工海水粉添加 P-YPD 培地を用いて集積培養し、発酵性酵母を分離した。20 %スクロース添加 YM 培地とブドウ果汁(22.8° Brix、pH 3.18)を用いたアルコール発酵試験、26S rDNA D1/D2 領域の塩基配列解析、および 10～300 ppm の亜硫酸耐性試験を行い、優良株を選抜した。さらに 2013 年収穫の甲州種ブドウ(21.0° Brix、pH 3.06)を原料として、発酵温度 17 ℃で 1.5 L 規模の醸造試験を行った。比較対照には、ワイン酵母 EC1118 を用いた。

[結果・考察] 静岡県伊東市沿岸(留田浜田公園、オレンジビーチ、伊東港)の海水から、発酵性酵母 192 株を分離した。各海水採取地点における 1 L あたりの分離頻度は、1.7～3.3 株と大きな差はみられず、夏に多く分離された。分離株の中の 47 株が、20 %スクロース添加 YM 培地およびブドウ果汁においてアルコール分を 10 %(v/v)以上生成した。これらは、42 株が *Saccharomyces cerevisiae*、3 株が *Saccharomyces* sp.、2 株が *Torulaspora delbrueckii* と同定された。特にアルコール生成が高い *Saccharomyces* 属酵母の 6 株について亜硫酸耐性試験を行ったところ、すべてに 100 ppm の耐性が認められた。甲州種ブドウを用いた醸造試験において、6 株のうちの M4-5 3、M4-6 2、M4-5-c 1 株が良好な発酵能を示し、アルコール分を 12 %(v/v)以上生成した。製成ワインの香気成分分析において、これら 3 株により醸造したワインは、EC1118 株と比較して酢酸イソアミルを 1.4～1.8 倍、酢酸β-フェニルエチルを 1.9～3.0 倍、フェネチルアルコールを 1.6～1.9 倍多く含有した。現在、さらに詳細なワイン醸造学的な性質について検討を進めている。

1)柳田ら、2013 年日本農芸化学会大会(仙台) 講演番号 3B22a14

wine, yeast, identification

講演番号：3A08p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ A 校舎 08 会場

ワインアロマを作る酵母の解析

Analysis of Yeasts that generate wine aroma

○小野 大洋、池原 作務、曽 少豊、藤森 嶺、妙田 貴生、西澤 信、遠藤 明仁、宮地 竜郎、中川 純一（東京農業大院生物産業）
○Hiromi ONO, Samu IKEHARA, Syoufon SOU, Takane FUJIMORI, Takao MYODA, Makoto NISHIZAWA, Akihito ENDO, Tatsuro MIYAJI, Junichi NAKAGAWA (Tokyo Univ. Agr)

【目的】

ワインにとって香り(アロマ)とはその品質を決定する為の重要なファクターの一つとされ、原料となるブドウ由来の第一アロマ、発酵過程の酵母や乳酸菌に由来する第二アロマ、熟成過程で生成される第三アロマに大別される。

本研究では、ワインの第二アロマ生成に関与するとされる酵母由来の加水分解酵素である β-グルコシダーゼに着目した。酵母株は *S.cerevisiae* BY4741 株の野生型、ワイン醸造用酵母である OC-2 株、公益財団法人日本醸造協会より分与されたきょうかい 1 号・3 号・4 号の 5 株を使用し、ワインアロマ生成に関わる酵母の β-グルコシダーゼの遺伝子発現解析及び、発酵による各酵母間でのワインアロマの差異を明らかにすることを目的とした。

【方法】

YPD 培地又はブドウ果汁で酵母を用いて発酵を行い、香気成分の解析と並行して酵母グリコシダーゼ遺伝子群の発現を RT-PCR 法により解析した。

【結果】

実験室培地である YPD 培地において生育させた各酵母株のグリコシダーゼ遺伝子の発現解析を行ったところ、遺伝子の発現に顕著な差は見られなかった。今後培地をブドウ果汁(北海道産ワイン醸造用種のブドウ)に変更し、ブドウ果汁中における遺伝子発現の確認を行う。各酵母株により生成されるワインの香気成分については現在解析中である。

Saccharomyces cerevisiae, Wine aroma, Glycosidase

講演番号：3A08p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ A 校舎 08 会場

酵母菌株間での dimethyl sulphoxide reductase の違い

Difference of reducing dimethyl sulphoxide to dimethyl sulphide by yeast during fermentation

○菅井 竹彦、金内 誠、畑中 咲子、下山田 真（宮城大食産）
○Takehiko SUGAI, Makoto KANAUCHI, Sakiko HATANAKA, Makoto SHIMOYAMADA (Miyagi Univ)

【目的】Dimethyl sulphide(DMS)はビールの香気成分の一つであり、その含量はビールの品質に大きく影響する。一般的にビール中での DMS の閾値は 25ppb 程度で、20ppb の差でもビールの品質を左右する。とくにビール中の DMS が 80ppb を超えると、茹でたキャベツやトウモロコシ、あるいは青海苔様の望ましくない香りを与え、品質を低下させる。

ビール醸造では、大麦麦芽中の *S*-methylmethionine がマッシング中等に空気に触れ、酸化され dimethyl sulphoxide(DMSO）が生成される。この DMSO は酵母が持つ dimethyl sulphoxide-reductase により還元されて発酵工程中に DMS が増加することが知られている。これまで、常温発酵で、開放化の発酵においてはビールの DMS 含量が減少すると報告されている。さらに麦汁組成中の DMSO 前駆体が少ないことにより、DMS 生成に大きく影響を与えることが報告されている。また、発酵工程における DMS の形成抑制が品質向上に重要であるとされている。しかし、酵母の菌株間での DMS 形成能を比較した報告はなく、発酵中に揮散させることで DMS を制御するのみである。

そこで本研究は、ビール酵母や各種醸造用酵母の DMSO reductase を測定し、菌株間での DMS 形成能の差異を明らかにすることを目的とした。

【方法】供試菌株は、lager yeast、ale yeast、清酒酵母、その他酵母とし、菌株間で比較を行った。各種酵母は炭素源・窒素源を異とする glucose-salts（5% glucose）、maltose-salts (5% maltose)および malt extract 培地(Plato 12°)で 20℃、3 日間培養した。得られた酵母を遠心分離で回収し、ガラスビーズで破砕後、酵素を抽出した。1.4 mM DMSO-200 mM リン酸カリウム緩衝液を基質として、反応させ、生成された DMS を測定した。DMS の測定は、ヘッドスペース法を用いた GC-FID にて行った。カラムは HP-INNWAX(Agilent J&W)とし、50℃から 100℃の昇温分析を行った。また酵素の至適 pH、および NADPH や NADH などの補酵素の検討を行った。

【結果】酵母菌株のすべては、窒素・炭素源に富む malt extract 培地で増殖量が多い傾向があった。一方、glucose-salts 培地にて培養した酵母は、増殖量が少ないが、定常期に達する時間が短い傾向があった。DMS 形成量においては、glucose-salts 培地で培養した酵母からの酵素液を DMSO 基質に添加したものは、最大となった。一方で、malt extract 培地で培養した酵母からの酵素液では低いものであった。このことから、培地成分により、酵母増殖中に酵素が誘導されることが示唆された。さらに、本酵素は NADPH により反応が進んでいることが明らかとなった。

dimethyl sulphide, brewing, yeast

講演番号：3A08p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ A 校舎 08 会場

誘導物質非存在下でβ-グルコシダーゼを分泌する新種酵母 Ogataea　neopini

The new spiecies Ogataea　neopini　can secret beta-glucosidase with no inducer .

○齋藤 聡志（トヨタ自動車　バイオ・緑化）
○Satoshi SAITOH (Toyota Motor Co.)

【目的】Ogataea　neopini　は、セロビオース発酵性酵母をスクリーニングし26S-rDNA解析等により新種酵母であることが判明した。2009年度本大会においてセロビオースを炭素源としたエタノール生産性について報告している。本報告ではその培養液、上清のβ-グルコシダーゼ（BGL）活性について解析し、BGL生産酵母としての可能性を検討した。
【方法】O.neopiniのゲノムドラフト解析により二つのBGL遺伝子ONBGL1、ONBGL2を同定した。ONBGL1を実験室酵母、ワイン酵母OC-2へそれぞれ導入し、BGLさらにO.neopini野生株を加えBGL活性について測定した。
【結果】①YPH500/ONBGL1 ゲノム導入株、OC-2/ ONBGL1 ゲノム導入株の BGL 活性についてセロビオースを単一炭素源として、その活性を比較したところ OC-2/ONBGL 株が 10 倍以上高活性を示したことから宿主酵母により、その BGL 活性は大きく影響すると考えられた。一方、いずれの株においても菌体外への分泌活性は確認できなかった。②O.neopini 野生株の BGL 活性は OC-2/ONBGL1 ゲノム導入株の約１０倍の活性を示した。更に単一炭素源をセロビオースからグルコースに置き換えても BGL 活性は 1/3 程度低下した。更に、培養液から菌体除去した培養上清にも BGL 活性を確認することができた。
【結論】O.neopini は、セロビオースを炭素源としてエタノール生産が可能であることに加えて、炭素源がグルコースであっても高い BGL 活性を有する事、更に菌体外に BGL を分泌していることを確認できたことからから BGL 生産菌として有望であると考えられた。

beta-glucosidase, Ogataea neopini, Enzyme production

講演番号：3A08p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ A 校舎 08 会場

機能性アミノ酸に着目したストレス耐性パン酵母の育種と製パン特性の解析

Amino acid function-based breeding of stress-tolerant industrial baker's yeast strains and evaluation of their fermentation ability

橋田 恵介、渡辺 大輔、○高木 博史（奈良先端大バイオ）
Keisuke Hashida, Daisuke Watanabe, ○Hiroshi Takagi (Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】当研究室では、実験室酵母を用いてアミノ酸の代謝制御や生理機能に着目したストレス耐性機構を解析し、得られた知見を産業酵母の育種に応用することを目指している。現在までに、プロリンによる細胞保護効果や、プロリン・アルギニンの代謝を介した一酸化窒素（NO）の合成亢進による新規なストレス耐性機構を見出している。また、得られた知見を活用し、セルフクローニング法によってストレス耐性を強化した実用パン酵母が、製パン過程における様々なストレス（乾燥、高浸透圧、冷凍など）に曝されても野生型株に比べて良好な発酵特性や製パン性を示すことを報告している。しかし、遺伝子組換え技術に対する社会的受容性が低いため、このような酵母菌株の実用化は未だに困難な状況にある。そこで、本研究ではプロリンやアルギニンの機能性に着目し、非遺伝子組換え技術に基づく従来型の育種法によってプロリンまたはアルギニンを蓄積する実用パン酵母菌の変異株を取得するとともに、それらのストレス耐性や製パン性の評価を行うことを目的とした。
【方法・結果】まず、エチルメタンスルホン酸（EMS）処理により実用パン酵母（野生型株）に突然変異を導入し、細胞毒性を有するアミノ酸アナログ（プロリンアナログ：アゼチジン-2-カルボン酸（AZC）、アルギニンアナログ：カナバニン（Can））に対して耐性を示す変異株を単離した。菌体乾燥重量当たりの細胞内アミノ酸含量を測定し、野生型株と比較した結果、AZC 耐性変異株ではプロリン含量が最大で約 9 倍に（親株：0.033%、変異株：0.306%）、Can 耐性変異株ではアルギニン含量が最大で約 3 倍に（親株：0.879%、変異株：2.602%）それぞれ増加していた。さらに、これらの変異株の増殖や生存率などの表現型に基づき、製パン過程において酵母が曝される高浸透圧ストレス（高濃度グルコース、ソルビトール、スクロース）や冷凍ストレスに対する耐性を評価し、野生型株より高いストレス耐性を示す変異株を選抜した。各変異株の発酵特性を調べるために、30%スクロースを含有する高糖生地や、7 日間または 30 日間凍結保存した冷凍生地を用いて発酵試験を行い、アルコール発酵に伴い発生する二酸化炭素ガス量をファーモグラフにより測定した。その結果、二酸化炭素ガス発生量が野生型株と比較して、高糖生地において最大で約 60%、冷凍生地において最大で約 30%それぞれ上昇した変異株を取得することに成功した。以上の結果から、アミノ酸アナログ耐性を指標とした従来型の育種法により、対応するアミノ酸の高蓄積に伴ってストレス耐性が向上し、発酵生産力が改善された産業酵母を育種できる可能性が示された。

stress tolerance, baker's yeast, amino acid function

講演番号：3A08p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ A 校舎 08 会場

ED 経路導入による酵母中央代謝系路の拡張

Introduction of ED pathway to carbon central metabolism in yeast

○森田 啓介[1]、梶畠 秀一[1]、石井 純[2]、松田 史生[1]、清水 浩[1] ([1]阪大院・情報・バイオ情報、[2]神大・研究環)
○Keisuke MORITA[1], Shuichi KAJIHATA[1], Jun ISHII[2], Fumio MATSUDA[1], Hiroshi SHIMIZU[1] ([1]Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]Org. Adv. Sci. Kobe Univ.)

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は様々なストレスに耐性を持つ有用物質生産のための優れた宿主である。しかしバクテリアなどの他の宿主と比べると、エタノール以外のバイオアルコールを過剰生産する代謝改変株の構築が困難であることが知られている。そこで、酵母の中央代謝経路を有用物質生産に適したものへと拡張することを目指し、エントナー・ドウドロフ経路 (ED 経路) に着目した。ED 経路を機能させると、細胞内の NADH や NADPH のバランスを変えることが可能となる。本研究では、大腸菌由来の ED 経路関連遺伝子を導入した酵母株を構築し、その影響を解析した。
【方法】大腸菌のゲノム DNA から ED 経路を構成する 2 遺伝子 (*eda, edd*) をクローニングし、多コピー型プラスミドベクターに挿入した pGK423-Eceda および pGK425-Ecedd を構築した。このプラスミドを酢酸リチウム法により実験室酵母 (*S. cerevisiae* BY4742) の *PFK1* および *GND1* 欠損変異株に導入し、形質転換体を作成した。作成株を 5 mL の SD 培地中で培養 (30℃, 150rpm) を行い、比増殖速度を調べた。さらに、[1-^{13}C]グルコースを単一炭素源とした SD 培地中で培養を行い、対数増殖期の菌体タンパク質の酸加水分解によって得られたアミノ酸を、MTBSTFA で誘導体化し、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) によって測定した。ここではピルビン酸から生合成されるアラニンに着目し、[M-85]および[M-57]のフラグメントのマススペクトルから、ピルビン酸に取り込まれた ^{13}C 濃縮度を測定した。
【結果】*PFK1* および *GND1* 遺伝子を欠損した酵母株は ED 経路の前駆物質である 6-ホスホグルコン酸が蓄積していると期待される。これらの株を宿主として、ホスホグルコン酸デヒドラターゼと KDPG アルドラーゼをコードする大腸菌由来の *eda* および *edd* を導入し、ED 経路を構築した改変株を作成した。増殖速度を空ベクター株と比較したところ、*PFK1* 欠損株に ED 経路を追加した YKM019 株では比増殖速度がほとんど変化しなかったのに対し、*GND1* 欠損株に ED 経路を追加した YKM027 株では比増殖速度が 0.19±0.007 h^{-1} から 0.22±0.004 h^{-1} に上昇した。そこで、[1-^{13}C]グルコースを用いたトレーサー実験を実施し、GC-MS を用いてアラニンの ^{13}C 標識の割合を調べたところ、標識率に変化が見られた。本研究は NEDO「先導的産業技術創出事業 (若手研究グラント) 」の一環で行われたものである。

Carbon central metabolism, Entner-Doudoroff pathway, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：3A08p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ A 校舎 08 会場

代謝シミュレーションにもとづく酵母イソブタノール生産能の向上

Metabolic simulation-guided development of isobutanol producing yeast

○松田 史生[1,2]、石井 純[3]、近藤 貴志[4]、伊田 賢吾[5]、手塚 裕紀[5]、近藤 昭彦[2,5]（[1]阪大院情報、[2]理研 CSRS、[3]神戸大自然科学、[4]横国大環境情報、[5]神戸大院工）
○Fumio Matsuda[1,2], Jun Ishii[3], Takashi Kondo[4], Kengo Ida[5], Hironori Tezuka[5], Akihiko Kondo[2,5]
([1]Osaka Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Org. Adv. Sci. Kobe Univ., [4]Yokohama Nat. Univ., [5]Dep. Eng. Kobe Univ.)

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は発酵時のさまざまなストレスに耐性をもち、イソブタノールなどのバイオアルコール生産の有望な宿主とされている。しかし、バクテリアに比べると代謝改変株のイソブタノール収率が低いことが問題となっている。そこで本研究では、代謝シミュレーション法を用いた代謝デザインにもとづく酵母中心代謝の改変、および拮抗代謝経路の破壊により、酵母のイソブタノール生産能の向上を試みた。
【方法】代謝シミュレーションはフラックスバランス解析に基づく方法でおこなった（MATLAB2010a, 線形計画法ソルバ glpk 2.3, 生育フラックス最大化による最適化）。酵母 BY4741 株より、*PYC2*, *MDH2*, *MAE1* 遺伝子をクローニングし、*MAE1* のミトコンドリア移行シグナルを除去した *sMAE1* 遺伝子を作成した。これらを発現するためのプラスミドベクターを作成し、*PYC2*, *MDH2*, *MAE1*, *sMAE1* 遺伝子を導入した株を作成した。5 mL の SD 培地中で形質転換酵母を培養し、GCMS をもちいてイソブタノール生産量を測定した。
【結果】代謝シミュレーション法とは、計算機を用いて酵母細胞内の代謝物の流れを予測する技術であり、代謝ステップの追加や削除がイソブタノールの生産量にあたえる影響を予測できる。解析の結果、イソブタノール生合成経路の活性化時に生じる NADH 過剰と NADPH 不足のアンバランスを、PYC-MDH-MAE シャントの導入で解消できることを見出した。酵母 BY4741 株にイソブタノール生合成経路を構築し、さらにミトコンドリア内および細胞質中の上流経路を活性化した BSW187 株は 42mg/L のイソブタノール生産能を示した。さらに PYC-MDH-MAE シャントを追加導入した BSW192, BSW193 株では、85-95 mg/L までイソブタノール生産量が向上した。さらに、競合する経路の酵素遺伝子を破壊した 12 株のイソブタノール生産能を調べ、ピルビン酸脱水素酵素複合体を構成する *LPD1* 遺伝子を破壊するとイソブタノール生産能が大きく向上することを見出した。BSW192, BSW193 株に追加して *LPD1* を破壊した BSW205、BSW206 株では、イソブタノール生産量がさらに 2 倍以上増加し、221-230 mg/L に達し、50mL スケールで発酵試験で、1.52g/L のイソブタノール生産を達成した。
本研究は NEDO「先導的産業技術創出事業(若手研究グラント)」の一環で行われたものである。

Isobutanol, Metabolic simulation, Saccharomyces cerevisiae

講演番号：3A08p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ A 校舎 08 会場

産業用バイオエタノール酵母由来の *HAA1* 遺伝子過剰発現株と糖蜜を用いたバイオエタノール生産

An organic acid-tolerant *HAA1*-overexpression mutant of an industrial bioethanol strain of *Saccharomyces cerevisiae* and its application to the production of bioethanol from sugarcane molasses

○稲葉 拓哉[1,2]、渡辺 大輔[3,4]、吉山 洋子[2]、田中 晃一[2]、小川 順[1]、高木 博史[3]、下飯 仁[4]、島 純[2] ([1]京大院農・応用生命、[2]京大・微生物科学、[3]奈良先端大・バイオ、[4]酒類総合研究所)
○Takuya Inaba[1,2], Daisuke Watanabe[3,4], Yoko Yoshiyama[2], Koichi Tanaka[2], Jun Ogawa[1], Hiroshi Takagi[3], Hitoshi Shimoi[4], Jun Shima[2] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Div. Microb., Kyoto Univ., [3]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, [4]Natl. Res. Inst. Brewing)

【背景・目的】バイオエタノール生産プロセスにおいて、雑菌汚染が問題となる可能性が指摘されている。乳酸菌などによる雑菌汚染が生じると無駄な糖消費や乳酸などの発酵阻害物質生産を招き、結果的にエタノール収率が減少する。これまでに雑菌汚染を防ぐために抗生物質が用いられるケースが報告されているが、コスト高や薬剤耐性菌の出現の原因となり得る。そのため、抗生物質等を用いない雑菌汚染防止技術の開発は重要であると考えられる。酢酸などの有機酸は微生物の生育や機能を抑える性質を備えている。例えば、リグノセルロース系バイオマスを用いたバイオエタノール生産ではバイオマスの加水分解物中に酢酸やギ酸が含まれており、それらが酵母の発酵阻害物質として作用している。これまでに DNA マイクロアレイ解析を用いて、酢酸耐性を有する *Saccharomyces cerevisiae* の自然分離株において酢酸耐性に関与する転写活性化因子をコードする *HAA1* 遺伝子の発現レベルが高いことを明らかにした。さらに、実験室酵母を用いて *HAA1* 遺伝子過剰発現株を構築したところ、高度に酢酸耐性が向上することを示した。本研究では、産業用バイオエタノール酵母を用いて *HAA1* 過剰発現株を構築し、*HAA1* 過剰発現株と酢酸を組み合わせることで雑菌汚染を防ぎ、エタノール収率を向上させることを目的とした。
【結果】バイオエタノール生産に用いられている *S. cerevisiae* Ethanol Red（以下 ER）を用いて *HAA1* 過剰発現株（以下 ER HAA1-OP）を構築した。ER と比較して、ER HAA1-OP では *HAA1* 遺伝子の転写量が増加し、酢酸耐性が向上したことをリアルタイム PCR 法及びスポットテスト法により確認した。次に、YPD 培地及び糖蜜培地に酢酸を添加した条件で発酵試験を行った。その結果、ER はエタノールをほとんど生産しなかったが、ER HAA1-OP は酢酸非添加条件と同程度のエタノール生産性を示した。さらに、人為的に乳酸菌を培地に接種した発酵試験では、酢酸添加培地で ER HAA1-OP を培養した方が酢酸非添加培地で ER を培養するよりもエタノール生産性が高いことが示唆された。

Saccharomyces cerevisiae, acetate tolerance, ethanol fermentation

講演番号：3A08p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ A 校舎 08 会場

油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 由来 *Δlig4* 株を用いた分子育種株の構築

Construction of molecular breeding strains by using a *Δlig4* strain derived from oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4

○菊川 寛史[1]、櫻谷 英治[1]、安藤 晃規[1,2]、落合 美佐[3]、清水 昌[1,4]、小川 順[1,2]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大・生理化学ユニット、[3]サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社、[4]京都学園大・バイオ環境）

○Hiroshi Kikukawa[1], Eiji Sakuradani[1], Akinori Ando[1,2], Misa Ochiai[3], Sakayu Shimizu[1,4], Jun Ogawa[1,2] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Uni. Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3]Suntory Global Innovation Center Ltd., [4]Fac. Bioenviron. Sci., Kyoto Gakuen Univ.)

【背景・目的】

近年，高度不飽和脂肪酸(PUFA)のもつ様々な生理機能が注目され，それらの安定供給が必要とされつつある。これまでに我々は，油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 による PUFA 生産とその生合成経路の解明を行ってきた。しかし，本菌での脂質代謝経路の解明及び厳密な代謝制御による PUFA 生産を行うために，遺伝子ターゲティング技術の確立が必要であった。そこで，非相同末端結合に不可欠な DNA リガーゼである LIG4 をコードする *lig4* 遺伝子をノックアウトすることで相同組換え頻度が向上した株の作製に成功した。さらに我々は、得られた *Δlig4* 株のウラシル要求性株を 5-フルオロオロチン酸（5-FOA）含有培地上で選抜し、高効率遺伝子ターゲティング宿主株とした。本研究では、相同組換えによる遺伝子破壊を利用した代謝工学による稀少有用脂肪酸の高生産を目指し、Δ5 脂肪酸不飽和化酵素（Δ5DS）遺伝子破壊によるジホモ-γ-リノレン酸（DGLA）高生産株の取得を試みた。

【方法・結果】

二回交差相同組換えを介する *Δ5ds* 遺伝子破壊コンストラクトを構築し、形質転換を行った。得られた形質転換株を GY 液体培地（Glucose 2%, Yeast extract 1%）にて培養後、菌体内総脂質をメチルエステル誘導体化し、ガスクロマトグラフィーによる定性・定量分析に供した。その結果、形質転換株 15 株中 1 株において DGLA の高生産が認められた。さらに、破壊株と予想される株のゲノムを鋳型とした PCR 及びシーケンスにより、相同組換えを介した *Δ5ds* 遺伝子領域への遺伝子導入が確認された。本菌 *Mortierella alpina* 1S-4 での任意遺伝子の破壊による分子育種の成功例としては、本報告が初である。

【展望】

今後、脂質代謝関連遺伝子の破壊を介した代謝工学により、多種にわたる PUFA の高生産株シリーズの構築を目指す。

Mortierella alpina, Homologous recombination, Metabolic engineering

講演番号：3A08p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ A 校舎 08 会場

油糧微生物 *Mortierella alpina* におけるオレイン酸およびリノール酸生産性の向上
Improvement of oleic acid and linoleic acid productivities in *Mortierella alpina*

○阪本 鷹行[1]、櫻谷 英治[1]、安藤 晃規[2]、島 純[3]、小川 順[1,2] ([1]京大院農・応用生命、[2]京大生理化学、[3]京大微生物科学)
○Takaiku SAKAMOTO[1], Eiji SAKURADANI[1], Akinori ANDO[2], Jun SHIMA[3], Jun OGAWA[1,2] ([1]Kyoto Univ. Appl. Life Sci., [2]Kyoto Univ. Physiol. Chem., [3]Kyoto Univ. Microbial Sci.)

【背景】近年、石油の代替資源とすべく、植物バイオマスなどから酵素糖化や発酵によって有機酸類やアルコール類を生産するバイオリファイナリープロセスの構築が盛んに試みられている。しかし、現有するケミカルリファイナリーにおける基幹合成原料は還元度の高い炭化水素構造を骨格に水酸基、カルボキシル基、不飽和結合等を有する化合物であるため、これらの有機酸類やアルコール類では分子構造上の特性が異なり、代替物としての利用が難しい。一方で、油脂は高還元度化合物の炭化水素骨格を有するため基幹合成原料の代替物として有用である。本研究では、油脂、特に脂肪酸をモノマー原料へ転換することを想定し、油糧微生物 *Mortierella alpina* においてオレイン酸（OA）およびリノール酸（LA）の生産性向上を目的とした。
【方法】*M. alpina* の脂肪酸生合成において、高度不飽和脂肪酸生合成経路を遮断・抑制することで OA および LA それぞれを高蓄積する変異株の獲得を試みた。具体的には、ニトロソグアニジンによる変異処理を行った *M. alpina* の変異株群から脂肪酸生合成経路後期の不活性化に伴って OA および LA が高生産される変異株を選抜した。また、選抜した OA 高生産株においてアグロバクテリウム法を用いた形質転換によって遺伝子発現抑制（RNAi）を行い、より OA を蓄積する分子育種株の作出を試みた。
【結果】Δ12 desaturase（DS）活性欠損株群より、総脂肪酸当たりの OA を 50%近く生産する JT-180 株を OA 高生産株として選抜した。さらに、JT-180 株において *Δ6DS1* 遺伝子の RNAi を行った結果、ミード酸生産性の低下に伴って OA 含有量が 60%を上回る分子育種株が得られた。一方、Δ6DS 活性低下株群において、総脂肪酸に占める LA の割合が最も高かった YB214 株を LA 高生産株として選抜した。また、LA および OA の割合の和が最も高かった ST66 株を同様に LA 高生産株として選抜した。現在、これらの LA 高生産株における LA 生産性をさらに向上させるべく分子育種株の作製を試みている。

Mortierella alpina, Oleic acid, Linoleic acid

講演番号：3A08p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ A 校舎 08 会場

油糧性糸状菌 *Mortierella alpina* S14 株における RNAi 法を用いた Δ12 不飽和化酵素発現抑制によるエイコサジエン酸（EDA）の生産

Production of eicosadienoic acid (EDA) by RNA interference of Δ12-desaturase gene expression in mutant strain S14 derived from *Mortierella alpina* 1S-4

○奥田 知生[1]、安藤 晃規[1,2]、根来 宏明[1]、櫻谷 英治[1]、島 純[3]、小川 順[1,2]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大・生理化学、[3]京大・微生物科学）
○Tomoyo OKUDA[1], Akinori ANDO[1,2], Hiroaki NEGORO[1], Eiji SAKURADANI[1], Jun SHIMA[3], Jun OGAWA[1,2] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [3]Res. Div. Microb. Sci., Kyoto Univ.)

【緒言】

アラキドン酸生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 株から誘導された変異株 S14 は、Δ5 不飽和化酵素活性が低下しており、ジホモ-γ-リノレン酸（DGLA）を著量蓄積することから、DGLA の実用生産株として利用されている。

我々はこれまでに、RNAi 法を用いた *M. alpina* の遺伝子発現抑制によって、生産脂肪酸組成の改変に成功している。しかしながら従来の方法では RNAi コンストラクトの導入にパーティクルガンを用いるため、断片化したコンストラクトが染色体上に多コピー挿入されること、導入による菌体へのダメージが大きいこと等の問題があった。

本研究では、穏和な条件かつ 1 コピーでの遺伝子導入が可能なアグロバクテリウム法を用いることにより、*M. alpina* S14 株の Δ12 不飽和化酵素遺伝子の発現抑制を行ない、ミード酸前駆体として様々な生理機能が期待されるオメガ 9 脂肪酸であるエイコサジエン酸（EDA, 20:2n-9）の生産を試みたので報告する。

【方法・結果】

Δ12 不飽和化酵素遺伝子の発現抑制を行なうための RNAi コンストラクトを構築した。本コンストラクトを *M. alpina* S14 ウラシル要求性株にアグロバクテリウム法にて導入し、安定な形質転換株を取得した。形質転換株を 28°C で培養し、生産脂肪酸をガスクロマトグラフィーにて分析したところ、EDA の生産が確認できた。本形質転換株の EDA 生産性について詳細な検討を行なった。

＊本研究の一部は、生研センターイノベーション創出基礎的研究推進事業の支援を受けて行われました。

PUFA, eicosadienoic acid, *Mortierella alpina*

講演番号：3A08p23
講演日時、会場：3 月 29 日 17:59～ A 校舎 08 会場

油糧微生物 *Mortierella alpina* への外来Δ17 不飽和化酵素遺伝子導入による常温 EPA 生産

Eicosapentaenoic acid (EPA) production by *Mortierella alpina* expressing exogenous Δ17-desaturase gene under normal temperature

○村椿 達哉[1]、安藤 晃規[2]、根来 宏明[1]、菊川 寛史[1]、櫻谷 英治[1]、島 純[3]、小川 順[1] ([1]京大院農・応用生命、[2]京大・生理化学、[3]京大・微生物科学)
○tatsuya muratsubaki[1], Akinori Ando[2], Hiroaki Negoro[1], Hiroshi Kikukawa[1], Eiji Sakuradani[1], Jun Shima[3], Jun Ogawa[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [3]Res. Div. Microb. Sci., Kyoto Univ.)

【緒言】

アラキドン酸の実用生産株として利用されている油糧糸状菌 *M. alpina* 1S-4 は、低温条件下で培養することでエイコサペンタエン酸（EPA）を蓄積することがわかっている。我々はこれまでに、本菌の内在性酵素遺伝子の制御による脂肪酸組成の改変を報告してきた。本発表では、他生物由来のΔ17 不飽和化酵素遺伝子を本菌に導入することにより、常温下における EPA 生産能の付与を試みたので報告する。

【方法】

M. alpina 1S-4 の ω3 不飽和化酵素活性弱化株である *M. alpina* ST1358 をホスト株として用いた。糸状菌 *Saprolegnia diclina* 由来 Δ17 不飽和化酵素遺伝子のコドン使用頻度を *M. alpina* 様に改変し、恒常発現プロモーターである histone プロモーターにて制御した発現カセットを構築した。本発現カセットをウラシル要求性のマーカー遺伝子とタンデムに連結したバイナリーベクターを構築し、アグロバクテリウム法にて本菌に導入した。

【結果】

安定な形質転換株を選抜後、10 ml の GY 培地（グルコース 2%、酵母エキス 1%）にて、28°C ならびに 12°C 液体培養を行なった。脂肪酸を抽出後、ガスクロマトグラフィーに供し分析したところ、28°C、12°C いずれの培養においても、外来遺伝子である Δ17 不飽和化酵素の発現によるオメガ 3 系脂肪酸の蓄積が確認できた。また、5 L スケールジャーファーメンターを用いて形質転換株の大量培養を行なった結果、28° C、12 日間培養において、脂肪酸生産量は培地あたり 7 g/L、EPA 含有率は総脂肪酸あたり 20%に達した。

＊本研究の一部は、生研センターイノ ベーション創出基礎的研究推進事業の支援を受けて行われました。

Mortierella alpina, EPA, heterologous gene expression

講演番号：3A09a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ A 校舎 09 会場

植物内生細菌による宿主植物の重金属蓄積及び耐性能獲得メカニズムの解析

Analysis of mechanism of acquisition of accumulation and resistance to heavy metal in host plant by endophytic bacteria.

○市橋 明大、大嶋 俊介、長田 賢志、山路 恵子、野村 暢彦（筑波大・院・生命環境）
○ Akihiro ICHIHASHI, Shunsuke OSHIMA, Satoshi NAGATA, Keiko YAMAJI, Nobuhiko NOMURA (Tsukuba Univ.)

【背景・目的】近年、植物-微生物間相互作用に関して多数報告されているが、既存の研究は根圏の土壌微生物と植物との関係を中心に研究されている。一方で植物に内生している微生物との相互作用の報告は少ない。本研究では、重金属汚染地である日立鉱山に自生するセリ科植物ドクゼリ (*Cicuta virosa L.*)と内生細菌間の相互作用に着目し研究を行っている。先行研究より、ドクゼリは重金属蓄積及び耐性能を持つ事が観察され、これらの能力に内生細菌が関与する事が示唆された。16S rRNA の相同性解析を行った結果、内生細菌の多くは *Paenibacillus* 属細菌である事が同定された。

Paenibacillus 属細菌の中には植物の生育を促進する種が存在する事は既に知られている。しかし、植物に内生する *Paenibacillus* 属細菌が宿主である植物の重金属蓄積及び耐性能に関わるという報告は未だない。本研究では、ドクゼリから単離した *Paenibacillus* 属細菌が宿主の重金属蓄積及び耐性能に関わるか検証し、そのメカニズムについて追求を行う事で重金属汚染環境下における植物と微生物の相互作用についての新規知見を得る事を目的とした。

【方法】無菌的に生育させたドクゼリの実生を滅菌した重金属汚染土壌に植えた後、実環境中に生息していたドクゼリの根より単離した *Paenibacillus* 属細菌を接種区と非接種区の２つの区に分け 1 ヶ月無菌的に培養させた後、植物体の茎及び根の長さを２つの区で比較をした。その後、植物体を茎と根に分け硝酸分解を行い、プラズマ発光分光分析装置を用いて植物体中の重金属濃度を調べた。

【結果・考察】無菌ドクゼリ実生への *Paenibacillus* 属細菌の接種試験の結果、重金属汚染土壌下において非接種区の植物体が枯死するのに対して、接種区の植物体においては生育が確認された。また、非接種区に比べ接種区の根部において Zn, Pb, Cd, Ni,Cu が非接種区に比べ 5～20 倍蓄積されている事が分かった。この事から植物内生細菌である *Paenibacillus* 属細菌は宿主植物であるドクゼリに重金属蓄積及び耐性能を付与する事が示された。

plant-microbe interaction, heavy metal, endophytic bacteria

講演番号：3A09a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ A 校舎 09 会場

外生菌根菌の生育に対するフラボノイド類の効果
The growth effects of flavonoids for several ectomycorrhizal fungi.
○足立 亜衣、加瀬谷 泰介 ((公財)東洋食品研究所)
○AI ADACHI, TAISUKE KASETANI (Toyo Institute of Food Technology)

[背景および目的] 外生菌根菌と宿主植物の菌根共生成立の一端を、菌糸生育促進物質が担っていることが指摘されてきた。しかしながら、生育促進物質の報告は僅かで、未だ不明な点が多いことから、その探索及び同定を行ったところ、宿主植物由来の taxifolin-3-*O*-glucoside を同定した。今回は、構造が類似したフラボノイド類を外生菌根菌 *Lyophyllum shimeji*、*Boletellus elatus*、*Boletus reticulatus* に適用し、生育評価、作用物質の構造的特徴について検討したので報告する。
[方法] Taxifolin-3-*O*-glucoside と構造が類似する計 21 種類のフラボノイド類を、20% ($^{v}/_{v}$) dimethyl sulufoxide を溶媒として、それぞれ 1 pM、1 nM、1 μM、10 μM、100 μM に調製した。各溶液を MMN 寒天平板培地（10 ml）の表面に 20 μl 添加し、全体に塗り拡げた。対照区には、同量の 20% dimethyl sulufoxide を添加した。その培地の中心へ、予め同じ培地で培養しておいた外生菌根菌の菌糸体 disk (直径 5 mm)を置き、一ヶ月間培養し、菌糸伸長を測定した。供試菌には *L. shimeji*、*Boletellus elatus*、*Boletus reticulatus* の 3 種を用いた。
さらに効果が確認された物質の構造的特徴を比較し、共通する官能基やその結合位置等について考察を行った。
[結果] 供試した 21 物質のうち、10 物質において *L. shimeji* の菌糸生育に対する菌糸伸長促進効果が確認された。その内、繰り返して安定した効果を示したのは 6 物質（Baicalein-3-*O*-glucoside、Fisetin、Myricetin、Naringenin-7-*O*-rhamnoglucoside、Quercetin-3-*O*-glucoside、Taxifolin)であり、それらは最大で対照区の 1.25 倍の生育促進効果を示した。さらに、添加溶液の至適濃度は概ね 1 μM 付近であり、物質によってはその効果を 1 pM で示すものもあった。
この 6 物質をさらに *Bolete. elatus*、次いで *Boletu. reticulatus* へと供試した結果、Naringenin-7-*O*-rhamnoglucoside を除く 5 物質が両菌株に対して同様の効果を示した。この内、*Bolete. elatus* では 4 物質、*Boletu. reticulatus* では 3 物質が、安定した効果を示した。以上、*L. shimeji* で選抜した物質は、*Bolete. elatus*、*Boletu. reticulatus* でも同様の効果を示すことが示唆された。しかしながら、効果の安定性は菌によって異なり、3 菌株全てに対して安定した効果を示すのは Fisetin、Myricetin、Quercetin-3-*O*-glucoside の 3 物質であった。
さらに作用物質の構造を検討したところ、官能基や結合する糖の種類、それらの結合位置の比較から、共通するいくつかの傾向を確認した。

ectomycorrhizal fungi, flavonoid, hyphal growth

講演番号：3A09a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ A 校舎 09 会場

高温性堆肥における経時的・空間的温度変化に伴う菌叢変化

Alteration of bacterial consortium with temporal and spatial changes in temperature in high-temperature compost

○粟冠 真紀子、福丸 琢人、東 俊之、千葉 悠佳、木村 哲也、粟冠 和郎（三重大院生資）
○Makiko SAKKA, Takuto HUKUMARU, Toshiyuki ADUMA, Yuka TIBA, Tetuya KIMURA, Kazuo SAKKA (Mie Univ.)

【目的】100℃に近い高温による堆肥化では、有機物の分解速度が速いと考えられており、そのような環境中にどのような細菌が生息しているか関心が持たれる。過去の研究では、1 点もしくは数点を対象にした温度の経時的変化は明らかにされているが、空間的変化（深さによる温度の違い）は詳細には解明されていない。そこで本研究では、超高温の堆肥化過程における温度と微生物群の経時的・空間的変化を解析することを目的とした。

【方法・結果】堆肥化は、汚泥等を縦 13 m×横 7 m ×高さ 3 m に積むことで行われた。堆肥上面にハンドオーガで穴を開け、熱電対を 25 cm 間隔で設置した竹の棒を差し込み、データロガーを用いて 1 週間程度温度測定を行った。その後、温度測定を行った地点まで側面より堆肥を除去し、堆肥表面から等間隔の深さで試料を採取した。採取後、堆肥を切り返して温度測定を続けた。この一連の操作を 7 日毎に繰り返した。堆肥化 52 日までは下部より強制通気を行い、それ以降は強制通気を行わなかった。採取した堆肥を用いて、生菌数（培養法及び sFDA 法）と全菌数（EB 法）を測定した。また、堆肥化初期(14 日後)と堆肥化終了（81 日後）の堆肥を用いて、クローン解析を行った。

温度測定の結果、堆肥化開始直後の温度は均一で 55℃程度であったが 150 cm より上層では徐々に温度は上昇した。特に堆肥の最上層(25～75 cm)では最高で 90℃近くにまで達した。強制通気を停止した 52 日以降、どの地点においても温度上昇は見られず、55～75℃に推移した。EB 法では経時的・空間的な変化は見られず、全菌数は 10^9～10^{10} cells/g で推移した。sFDA 法では、生菌数の空間的分布に違いは見られなかったが、堆肥化の過程で生菌数が 10^9 から 10^8 cells/g まで減少した。培養法では、いずれの培養条件（37、60、70℃）においても下層(225 cm)の生菌数は上層(25、125 cm)よりも多い傾向を示した。また堆肥化開始時、培養温度 70℃の生菌数は 10^4 cfu/g 存在していたが、堆肥化に伴い、徐々に低下し、43 日以降の計数が不可能となった。培養温度 37℃、60℃の生菌数は 10^6～10^7 cfu/g で推移した。クローン解析の結果、堆肥化 14 日後の優占菌は *Bacillus*、*Planifilum*、*Cerasibacillus* 属であり、優占度はそれぞれ 36%、16%、10%であった。一方、堆肥化 80 日後の優占菌は *Planifilum*、*Bacillus* 属であり、優占度はそれぞれ 61%、18%であった。以上の結果から、堆肥の温度が高温に維持され続けると生菌数が減少すること、さらに堆肥化の進行に伴い、*Planifilum* 属の優占度が増大する一方で、*Bacillus* 属が減少することが明らかとなった。

compost, bacterial consortium, DGGE

講演番号：3A09a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ A 校舎 09 会場

還元的酢酸生成菌と酢酸還元菌の共培養系
The coculture of acetogen and acetate-reducing bacterium
○阿藤 真、石井 正治、五十嵐 泰夫（東大院農生・応生工）
○MAKOTO ATO, ISHII MASAHARU, IGARASHI YASUO (Dept. Biotech. Grad. Sch. Agri. Life. Sci. Univ. Tokyo)

【背景・目的】
還元的酢酸生成菌は CO_2 から酢酸を、酢酸還元菌は酢酸から酪酸をそれぞれ還元的に生成する嫌気性細菌である。我々はこれまでの研究で、還元的酢酸生成菌と酢酸還元菌とをアミノ酸を電子供与体として共培養すると、両者の代謝が「異種間酢酸伝達」によって連結し「CO_2 からの酪酸生成反応」という新規反応を触媒することを見出してきた(1)。本研究では反応系の安定性と培養系内での二者の比率との関係性を模索することを目的に、構築した共培養系を複数回継代し、継代前後の二者の比率を定量 PCR 法により解析する実験を行った。
【方法・結果】
還元的酢酸生成菌 *Blautia hydrogenotrophica* と酢酸還元菌 *Clostridium acetireducens* をそれぞれイソロイシン（20 mM）とイソロイシン（20 mM）＋酢酸（30 mM）を含む培地で 24 時間前培養したのち、2.5 %濃度ずつイソロイシン（20 mM）を含む新鮮培地に混合接種することによって共培養系を構築した。共培養系は培養 4 日目にはイソロイシン酸化物である 2-メチル酪酸を 20 mM、酪酸を 5 mM 程度蓄積した。代謝中間体である酢酸濃度は 2 mM 以下に抑えられていた。この共培養を 4 日ごとに 5 %濃度で新鮮培地に継代したところ、3 代目では酢酸と酪酸の生成量比がほぼ 1:1 となり、培養系の代謝が酪酸生成から酢酸生成にシフトしたことが示された。培養系内の二者をそれぞれ検出するための特異的プライマーを新たに設計し、共培養系から抽出した DNA を対象とした定量 PCR 解析を行った。その結果、1 代目の培養では 2 日目に *B. hydrogenotrophica* が培養系内で 80 %にまで優占化していたが、培養 4 日目には 60 %程度にまで減少していた。また、3 代目の培養 4 日目には両者の比率はほぼ 1:1 となっており、二者の比率は継代の前後で変動しつづけていた。
(1) 日本農芸化学会 2013 年度大会　講演番号 3B21a10

Coculture, Anaerobic bacteria, Amino acid

講演番号：3A09a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ A 校舎 09 会場

木材チップ分解性メタン生成微生物群集の構築とその特性

Development and characterization of wood chip-degrading methanogenic microbial consortia

○白鳥 初美[1]、石井 匡志[2]、上田 賢志[1] ([1]日大生物資科・生命セ、[2]アゴラ造園株式会社)
○Hatsumi SHIRATORI[1], Masashi ISHII[2], Kenji UEDA[1] ([1]Nihon Univ., [2]AGORA Landscape Architecture Co., Ltd)

【目的】近年、木質バイオマスの資源化技術として最も注目される一つは、再生可能エネルギーへの転換である。微生物機能を用いたエネルギー転換は、環境負荷が少ない利点がある一方、いくつかの課題を抱えている。例えば、木質はセルロースをリグニンが取り囲む複雑な構造の固形有機物であるため、微生物分解が難しい。そのため木質分解に関与する微生物として腐朽菌類の研究例が多い一方、細菌群の果たす役割はほとんど明らかになっていない。さらに、木質を基質とするメタン発酵については研究例が少なく、複合微生物を利用した木質バイオマスの積極的なエネルギー転換に関する知見は乏しい。本研究では、木材チップおよび木材チップ堆肥に由来する微生物を用いて木質分解性のメタン発酵液を構築し、その菌相構造と特性調査を実施した。
【方法】嫌気性細菌培養用の合成培地をバイアルビンに添加し、窒素充填下で、(i)伐採枝を粉砕した木材チップ、または(ii)長期間木材チップの継ぎ足しと野積みを行った熟成堆肥を接種し、55℃で半連続培養した。1 週間ごとにガス量測定、ガスクロマトグラフィーによるガス組成分析および培地と木材チップの添加等を行い、約 2 年にわたりメタン発酵微生物群集構築の経過を観察した。また同時に、安定した培養条件の検討を行った。木材チップ、熟成堆肥およびそれらから立ち上げたメタン発酵液について DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を標的とする PCR-DGGE 法により真正細菌およびメタン生成アーケアの菌相を可視化し、メタン発酵微生物群集構築の過程をモニタリングした。さらに、メタゲノム解析を実施し、変遷する菌群の構成を解析した。
【結果】木材チップまたは木材チップより培養したメタン発酵液のバイオガス発生は、3g の木材チップから平均して 300ml/週を示し、その値は約 20 週で安定化した。メタンガスの割合は基質の木材がチップ状（5mm）では 15%程度だったが、粉状では 24%に上昇した。培養経過に伴い、バイオガス発生と関連した菌相変化はメタン生成アーケアの菌相に特異的に見られた。木材チップ堆肥からメタン生成アーケアの 16S rRNA 遺伝子をクローン解析した結果、水素資化性の *Methanobacterium* 属および酢酸資化性の *Methaosarcina* 属のアーケアが多く検出された。一方、培養法では水素資化性メタン生成アーケアが優勢に生育した。メタゲノム解析から、木材チップ堆肥を高温メタン発酵すると、高温性の嫌気性細菌である *Clostridium* 属、*Moorella* 属および *Thermoanaerobacter* 属などの菌群が優占化するとともに、元来堆肥に存在したグラム陰性細菌群が減少することが分かった。これらの結果を受け、現在はメタン生成アーケアおよび嫌気性セルロース分解菌の分離培養を試みている。

methanogenic consortia, wood chip, compost

講演番号：3A09a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ A 校舎 09 会場

花に生息する嫌気性菌に関する研究

Characterization of anaerobes living in flowers

○上野 一輝、菅原 麻美、黒沢 佳奈、篠 奈津実、青木 由加里、板橋 貴智、新村 洋一、川崎 信治(東農大バイオ)
○Kazuki UENO, Asami SUGAWARA, Kana KUROSAWA, Natumi SINO, Yukari AOKI, Takanori ITABASI, Yoichi NIIMURA, Sinji KAWASAKI (TUA)

【目的】嫌気性細菌であるビフィズス菌の多くは動物腸管内に生息するが、例外としてO_2耐性能の高いビフィズス菌がミツバチの腸管から単離された報告がある。我々はミツバチの腸内細菌が花に由来する可能性を推定した。糖源が豊富な蜜を含む花には特有の微生物叢の存在も推定されることから、2006年から花に生息する嫌気性細菌の探索を行っている。その結果、花から乳酸など酸を生成する嫌気性細菌のコロニーが多く検出され、花に特有の嫌気微生物叢の存在が強く推定された。またその過程で動物からは単離報告例のない新種の乳酸菌が単離され*Lactobacillus floricola*と*Lactobacillus ozensis*を提唱した[1)]。本研究では花に生息する嫌気性細菌の生態分布の解明と新たな微生物資源の探索を目的とする。
【方法】花試料は2006年～2013年にかけ尾瀬や北海道などの国立公園を中心に日本全国で採取した。採取した花は主にMRS培地を用いて嫌気培養した。得られたコロニーをランダムに選択し、16S rRNA遺伝子解析を行った。また、同抽出液からビーズフェノール法によってDNAを抽出し、微生物叢解析を行った。
【結果】尾瀬国立公園等の人の生活圏外で採取した花からは*Lactobacillus*属、*Lactococcus*属、*Leuconostoc*属などの乳酸菌が主に単離され、多いもので花1輪あたり10^4～10^8ものコロニーが得られた。また、ミズバショウからは地域性を問わず多くの*Carnobacterium*属細菌に分類される乳酸菌が単離され、両者が共生関係にある可能性が推定された。これらの菌が花に生息する意義の解明を目的として、生理学的な特性の解析を進めている。また、PCR-DGGE法やメタゲノム解析の手法を用いて、培養法との相関性を解析している。

1）Kawasaki *et al.* IJSEM 61:1356-1359 (2011), IJSEM 61:2435-2438 (2011)

anaerobe, lactic acid bacteria, flower

講演番号：3A09a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ A 校舎 09 会場

トマトネコブセンチュウ防除に有効な放線菌の探索

Screening for actinomycete suppressing root-knot nematode

○猶塚 陽介、石神 洸太、徳山 真治（静大院農）
○Yosuke NAOTSUKA, Kota ISHIGAMI, Shinji TOKUYAMA (Shizuoka Univ.)

【背景・目的】ネコブセンチュウは広範囲の作物に寄生して作物の生育を阻害し、毎年農業生産に大きな被害を与えている。その防除法として土壌殺菌や糸状菌（*Monacrosporium phymatopagum*）を用いた生物農薬などがあるが、あまり効果的でないために有効な防除方法の開発が期待されている。近年、放線菌を用いた農業資材が植物病害を予防的に防除することが知られている。我々は放線菌の農業における可能性に着目し、ネコブセンチュウの農業被害を軽減する新たな防除方法を開発することを目的として、トマトネコブセンチュウの生育を抑制し、ネコブセンチュウの防除に有効な放線菌の探索を行った。

【方法】探索に用いた放線菌は TSB 培地およびフミン酸培地などを用いて、有機栽培された各種野菜の葉、茎、根および根圏土壌から内生放線菌および土壌放線菌として分離した。放線菌によるネコブセンチュウ生育抑制効果は、放線菌培養菌体とトマトの根こぶを培養土に添加したポット栽培試験で検討した。ポット栽培試験は、ネコブセンチュウの卵嚢を含むネコブを培養土に 0.05～0.2%添加し、これに播種から 2 週間経過したトマト苗を移植し、4～6 週間栽培した。寒天培地上での生育抑制効果は、予め TSB 寒天プレート上で培養した放線菌に、トマト圃場土壌から採取したネコブセンチュウを添加して検討した。土壌中のネコブセンチュウはベルマン法に従い計測した。

【結果】ネコブを添加（放線菌無添加）したポットでは、移植後 4 週間の栽培でトマトの根にネコブが形成され、地上部分の生育もネコブ無添加のポットに比べて明らかに阻害（30～70%）された。
有機野菜およびその根圏土壌から分離した放線菌約 230 株を 4 株毎にポット栽培試験を行ったところ、5 グループがネコブセンチュウ抑制効果を示した。3 グループはネコブ形成が抑制され、2 グループは地上部の生育が改善し、ネコブの形成も抑制された。
根の重量は、放線菌およびネコブセンチュウ無添加のトマトに比べ、ネコブセンチュウ添加のトマトは 50%に低下した。放線菌を添加したポットではトマトの根の重量が 80%以上に改善した。現在、ネコブセンチュウ生育抑制効果を示した放線菌 5 グループ（20 株）に関して、ネコブセンチュウ生育抑制の要因を検討している。

root-knot nematode, endophytic actinomycete, biocontrol

講演番号：3A09a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ A 校舎 09 会場

カメムシ共生細菌 *Burkholderia* sp. SFA1 株の農薬分解および耐性機構
Insecticide-degradation and -resistance mechanisms of *Burkholderia* sp. SFA1, an endosymbiont of stinkbugs
○佐藤 由也[1]、小池 英明[2]、竹下 和貴[2]、伊藤 英臣[2]、菊池 義智[2]、堀 知行[1] ([1]産総研・環境管理、[2]産総研・生物プロセス)
○ Yuya SATO[1], Hideaki KOIKE[2], Kazutaka TAKESHITA[2], Hideomi ITOH[2], Yoshitomo KIKUCHI[2], Tomoyuki HORI[1] ([1]AIST EMTech, [2]AIST BPRI)

【背景・目的】生物の中には他の生物種と協力して生存競争を乗り越える「共生」という戦略をとるものが知られている。その一例として、動植物がその体内に微生物を保持する「内部共生」が自然界には数多くみられる。最近我々は、農業害虫のカメムシ類が土壌中のフェニトロチオン（有機リン系殺虫剤の一種で通称 MEP）分解細菌“*Burkholderia* sp.”を体内に共生させ、MEP 抵抗性を獲得するという興味深い現象を発見した（Kikuchi *et al*., PNAS, 2012）。しかし、カメムシに共生する MEP 分解細菌の MEP 分解代謝経路の全容については未解明である。MEP の部分的な生分解経路や、MEP と類似した構造を持つ他の有機リン系殺虫剤の分解代謝経路はいくつかの細菌で報告されているものの、分解経路に関わる酵素群は多様であり、カメムシ共生細菌における MEP 生分解系の全体像は未だ明らかではない。そこで本研究では、カメムシ類の共生細菌であり MEP 分解能を有する *Burkholderia* sp. SFA1 株に着目し、培養試験、トランスクリプトーム解析、遺伝子破壊実験などを行い、本菌の MEP 分解経路を網羅的に明らかにすることを試みた。
【方法・結果】まず SFA1 株の MEP 分解および資化能を観察するため培養試験を行った。MEP およびクエン酸（対照区）を炭素源として培養したところ、いずれの基質でも生育が確認された。しかし、クエン酸により前培養した菌体を MEP 培地に植え継いだところ、培養液には MEP の第一分解産物である 3-methyl-4-nitrophenol（3M4N）の蓄積が確認され、再び対数増殖期に達するまでに 10 時間以上を要した。このことから MEP 分解代謝経路（少なくともその一部）は誘導性であること、本菌には 3M4N が有害であることが示唆された。3M4N の毒性については別の培養試験でも確認した。次に上記の条件で培養した菌体についてトランスクリプトーム解析を行った。各条件下の対数増殖期で回収した菌体から mRNA を調整し、次世代シークエンサー（illumina、MiSeq）を用いて遺伝子転写産物を同定・定量し比較することで、本菌の有する MEP 分解代謝経路について考察した。その結果、本菌は既報の二つの MEP 分解経路を組み合わせて利用していること、それら分解酵素遺伝子の多くは MEP により発現誘導されることが示唆された。カメムシに対しては MEP が有毒で 3M4N は低毒性であることが知られているが、本研究により SFA1 株に対しては 3M4N が有害で MEP は無害であることが示された。このような MEP を巡る両者の利害関係の違いが、共生の成立と維持に重要である可能性が考えられる。発表ではさらに、MEP 分解酵素の遺伝子破壊株を用いた解析結果についても紹介し、本菌の MEP 分解・耐性機構に加えカメムシとの共生関係についても総合的に議論する。

Insecticide-degradation, Insecticide-resistance, Symbiosis

講演番号：3A09a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ A 校舎 09 会場

次世代シークエンサーの適用による RNA-SIP の高感度化

Enhanced sensitivity of RNA-stable isotope probing by the 16S rRNA gene deep sequencing

○青柳 智[1]、佐藤 由也[1]、伊藤 英臣[2]、花田 智[2]、菊池 義智[2]、堀 知行[1] ([1]産総研・環境管理、[2]産総研・生物プロ)
○Tomo AOYAGI[1], Yuya SATO[1], Hideomi ITOH[2], Satoshi HANADA[2], Yoshitomo KIKUCHI[2], Tomoyuki HORI[1] ([1]AIST EMTech, [2]AIST BPRI)

【目的】Stable isotope probing (SIP) は、微生物による安定同位体標識基質の取り込みを、生体分子の質量変化を指標に追跡する手法である。RNA-SIP では安定同位体基質で環境試料を培養した後、そこから抽出した RNA を超遠心によって密度ごとに分離し、高密度画分に含まれる同位体標識 RNA の塩基配列を決定する事で基質を取り込んだ微生物を系統学的に特徴付ける。RNA-SIP の感度は同位体標識 RNA の検出および塩基配列決定方法 (T-RFLP やクローンライブラリ解析など) に依存すると考えられるが、その定量的な評価は行われていない。同位体標識された RNA を多量に得るために、SIP 実験では高濃度の同位体基質添加や長期間の培養が採用されてきた。一方でこの事は、実環境条件と SIP 実験条件との間に隔たりを生み、実環境における微生物機能の同定を困難にしている。近年登場した次世代シークエンサーは高速・大規模な塩基配列の解読を可能にし、特に 16S rRNA 遺伝子を標的とした 16S deep sequencing では環境中の微生物を数万種レベルで同定できる。本研究は、RNA-SIP に次世代シークエンサー解析を融合させる事で検出感度の向上を試みた。
【方法・結果】同位体標識 RNA の検出感度を評価するために、枯草菌 ^{12}C-RNA に大腸菌 ^{13}C-RNA または ^{12}C-RNA を 3%～0.0001%の割合で混合した標準試料を超遠心に供し、密度分離された各画分の RNA の微生物組成を T-RFLP (従来法) および 16S deep sequencing により解析した。結果として、T-RFLP では 3%～0.05%の条件下で大腸菌 ^{13}C-RNA に由来する T-RF が高密度画分において検出された。16S deep sequencing ではより低いレベルの 0.05%～0.001%条件で、高密度画分における ^{13}C-RNA の優占度が大腸菌 ^{12}C-RNA に比べて 3 倍以上に増加していた。このように本研究では、次世代シークエンサーの適応により、これまで捉えられなかった僅かな同位体標識 RNA が検出可能である事が示された。この同位体標識 RNA の高感度検出法は、環境中における増殖速度の遅い微生物や重要な反応を担うマイナー微生物の機能解明に有効であると考えられる。

stable isotope probing (SIP), 16S rRNA gene deep sequencing, sensitivity improvement

講演番号：3A09a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ A 校舎 09 会場

固体培地での生育能の低下した大腸菌変異株の分析

Properties of *Escherichia coli* mutants with defective growth on solid media

○納庄 一樹、三井 智玄、池端 祐仁、小川 哲弘、日高 真誠、正木 春彦（東大院農）
○Kazuki Nosho, Tomohiro Mii, Yuto Ikehata, Tetsuhiro Ogawa, Makoto Hidaka, Haruhiko Masaki (Tokyo Univ.)

【目的】旧来、バクテリアの生死は、おもにコロニー形成能の有無で定義されてきた。しかし近年、環境中では、生きていてもコロニーを形成しないバクテリアが多数派であることが認識されるようになった。ここに、コロニー形成とは、生きている以上のどういう状態なのかという根本的な問いが生まれる。我々は、これに応える一つのアプローチとして、コロニーを作らない変異株の分離を試みた。環境中のバクテリアでは、液体培養で生育できる菌数が固体培養のコロニー形成数よりほぼ 1 桁多いという経験をもとに、我々は、液体培地での増殖と固体培地での増殖とで必要な遺伝子発現系が異なると考え、固体培地ではコロニーを形成しないが、液体培地では増殖できるという大腸菌変異株を求めた。まず温度感受性変異ライブラリーから、脂肪酸生合成系の縮合酵素遺伝子の *fabB-ts* 株が分離され、改めて野生株 MG1655 をもとに、オレイン酸添加 L-broth を用いて作製した *ΔfabB* 株は、L-broth 液体培地では一旦 10^6 cells/mL 程度まで増えた後コロニー形成能を失っていくのに対し、寒天培地では増殖しないことが判った。その後、条件によっては、固化剤やオレイン酸を分散させる界面活性剤による阻害が観察されたので、今回は、培地に加える成分と固化剤を再検討したのち、*ΔfabB* 株の液体培養と固体培養での生育を改めて比較した。
【方法】培地は M9 カザミノ酸グルコース培地を基本とし、添加する界面活性剤は生育阻害を起こさない 100 ppm の Triton-X100 を使用した。固体培養では、菌を塗布して各種時間培養した後、M9 培地でプレート表面をゆすいで菌を集め、*ΔfabB* 株が定量的にコロニー形成できるオレイン酸を十分量加えた L-agar に塗布して cfu を記録した。また、コールターカウンターにより全菌数を記録し、Live/Dead 染色により生菌数を測定した。
【結果】*ΔfabB* 株は、オレイン酸を十分量（20 ppm）加えた条件では、液体培地で full-growth まで増殖し、固体培地上でもコロニーを目視できるまで増殖する。オレイン酸を制限すると、液体培地では 10^6 cells/mL 程度まで増えるが、固体培地上では全く増殖しない濃度条件のあることが確認された。オレイン酸添加量を更に制限すると、液体培地、固体培地ともに全く増殖しなくなる。このことから、*ΔfabB* 株の生育に必要な脂肪酸量は、液体培地と固体培地で異なっていることがわかる。現在、*ΔfabB* 株で見られた、固体培養で全く増殖せず液体培養で一旦増殖したのち cfu が減少する現象の原因、および野性株における変化を検討している。

colony formation, *Escherichia coli*, fatty acid synthesis

講演番号：3A09a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ A 校舎 09 会場

大腸菌の VBNC 化を緩和する遺伝子のスクリーニング

Screening of the genes restraining *Escherichia coli* from falling into the VBNC state

○高丸 玲子、森本 亜希子、西尾 優宏、小川 哲弘、日高 真誠、正木 春彦（東大院農）
○Reiko TAKAMARU, Akiko MORIMOTO, Masahiro NISHIO, Tetsuhiro OGAWA, Makoto HIDAKA, Haruhiko MASAKI (The University of Tokyo)

【目的】微生物学では長い間、バクテリアの生死がコロニー形成能の有無で定義されてきた。しかし近年、自然のバクテリアの大多数はコロニーを作れない状態にあることが認識されるようになり、コロニー形成とは何かを改めて問い直さなければならなくなった。大腸菌のように一般的な培養条件でコロニーをつくるバクテリアでも、低温／飢餓などのストレスに曝されると次第にコロニー形成数が低下していく。この時、検鏡下で推定した分裂能をもつ生菌の数（DVC）や細胞膜の完全性をもとに定義される生菌数に比べて、コロニー形成率が大きく低下していく状態を、VBNC（Viable But Non-Culturable）状態と呼び、自然のバクテリアのコロニー形成能が低い現象のモデルと考えられる。

我々は、バクテリアのVBNC状態を引き起こす生理現象を知るため、まず、VBNC状態への移行が、何らかの生理的な機能の減衰によって起こると仮定し、その機能を司る遺伝子を、大腸菌をモデルとして特定しようと考えた。

【方法】大腸菌のASKAクローンライブラリーを用いて、大腸菌内で高発現したときに、低温飢餓状態のVBNC処理を経て生き残りやすい遺伝子、すなわちコロニー形成率を高く保つような遺伝子をスクリーニングした。ASKAクローンライブラリーは、大腸菌の全ORFをひとつずつクローニングした多コピープラスミドを大腸菌に導入したライブラリーである。全クローンを機械的に8つのグループに分け、各グループの大腸菌を混合した上で、それぞれVBNC状態を引き起こす処理を経たのち、寒天培地に形成させたコロニーがもつプラスミドの多様性を調べた。全体に占める割合が増加したプラスミドの挿入遺伝子を、VBNC化を緩和させる遺伝子の候補とした。さらに、それらの候補クローンについて同様の操作を繰り返すことで、特に効果の高い遺伝子を特定した。

【結果】ASKAクローンライブラリーを用いたスクリーニングによって、大腸菌のVBNC化を緩和する遺伝子の候補が7種類得られた。それらの遺伝子をもつプラスミドを導入した大腸菌どうしを等量混合したものでVBNC状態を誘導すると、出現するコロニーのうち、*sdaB*挿入プラスミドを保持したクローンの割合が上昇した。また、これを単独で培養すると、ベクターを保持する対照株に対しVBNC化が緩和されることを確認した。*sdaB*はセリンデアミナーゼ遺伝子で、大腸菌のもつホモログ*sdaA*と*tdcG*についても同様の処理を行ったが、これらにはVBNC化を緩和させる効果が見られなかった。*sdaB*が発現する酵素活性の寄与や、ホモログ遺伝子間での効果の相違について検討を進めている。

viable but non-culturable, colony formation, serine deaminase

講演番号：3A09a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ A 校舎 09 会場

アジア人の腸内フローラに見られる２つのエンテロタイプと地域特異性

Two distinct enterotypes and local variation in gut microbiota among Asian children

○東 佳那子[1]、JIAHUI Jiang[1]、渡辺 幸一[2]、DEMBEREL Shirchin[8]、NITISINPRASERT Sunee[3]、PARK Yongha[9]、ENDANG S. Rahayu[4]、REN Fa-Zheng[5]、Tsai Ying-Chieh[6]、園元 謙二[1]、LEE Yuan-Kun[7]、中山 二郎[1] ([1]九大院農、[2]ヤクルト中央研究所、[3]カセサート大学、[4]ガジャ・マダ大学、[5]中国農業大学、[6]国立陽明大学、[7]シンガポール国立大学、[8]モンゴル州立農業大学、[9]ヨンナム大学)

○Kanako HIGASHI[1], Jiang JIAHUI[1], Koichi WATANABE[2], Shirchin DEMBEREL[8], Sunee NITISINPRASERT[3], Yongha PARK[9], Rahayu ENDANG S.[4], Fa-Zheng REN[5], Ying-Chieh Tsai[6], Kenji SONOMOTO[1], Yuan-Kun LEE[7], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Yakult Central Institute, [3]Kasetsart Univ., [4]Gadjah Mada Univ., [5]China Agricultural Univ., [6]National Yang-Ming Univ., [7]National University of Singapore, [8]Mongolian State Univ. of Agriculture, [9]Yeungnam Univ.)

【背景】腸内フローラと健康や疾病との関係が次々と明らかにされ、次なる重要研究課題として、食と腸内細菌叢の関係が注目されている。特に、豊富で優良な食文化が根付くアジアは、食と腸内フローラと健康の調査コホートとして魅力的である。そこで我々は、Asian Microbiome Project(AMP)を設立し、アジア 10 か国と共同でアジア人の食と腸内フローラと健康に関する調査を行っている。第一期調査では、地域特有の食習慣を維持していると期待される児童の腸内フローラに着目した。

【方法】アジア 7 ヶ国（中国、日本、台湾、タイ、インドネシア、大韓民国、モンゴル）、12 都市に住む健康な児童（7 歳から 11 歳）計 355 名を対象として、糞便のサンプリングと食と健康に関するアンケート調査を行った。糞便から細菌 DNA を抽出し、ユニバーサルプライマーにより細菌 16S rRNA 遺伝子 V6-V8 領域を網羅的に増幅させ、そのアンプリコンを次世代シーケンサー（Roche 454 titanium）により大量に配列解析した。得られた配列データを用いて細菌の系統解析を行い、各糞便サンプルの菌組成を求めた。そして、菌組成データを用いて、国および都市別の有意差検定、主成分分析およびサンプル間の類似度解析等を行った。

【結果】355 名の腸内細菌叢プロファイルデータは、主成分分析により、大きく 2 つのタイプに分けられた。一方は日本および中国、台湾、大韓民国の児童に多く見られたビフィドバクテリウム属とバクテロイデス属を中心とするタイプ（BB エンテロタイプ）であり、もう一方はインドネアとタイのコンケンの児童に多く見られたプレボテラ属を中心とするタイプ（P エンテロタイプ）であった。タイのバンコクおよびモンゴルの児童には P エンテロタイプと BB エンテロタイプが混在していた。個人間の類似度解析の結果、日本と大韓民国の間に非常に高い類似性が見られた。特に、日本と大韓民国の児童の腸内細菌叢は共通して、ビフィドバクテリウム属を多く含み、また、多様度指数（richness）が他国に比べて有意に低かった。しかし、日本の児童の腸内細菌叢は、大腸菌群とプレボテラ属の存在比が極めて低いという点で、他国の児童にはない特徴を示した。

【考察】このような各国の児童の腸内細菌叢構成の特徴は、食習慣や生活環境の違いが反映されている可能性が示唆される。以上のようにアジアの児童の腸内細菌叢構成は地域特異性を示すことが明らかとなったが、現在さらに対象とする調査国および年齢層の拡大を進めており、食習慣と腸内細菌叢、さらにはその菌叢と宿主の健康状態との関連性について、多くの知見が得られることが期待される。

gastro-intestinal tract microbiota, Asian children, 16S rRNA gene

講演番号：3A09a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ A 校舎 09 会場

コール酸長期摂取ラットにおける糞便中胆汁酸組成の変化と腸内細菌叢との関係

Changes in bile acid compositions and gut microbiota in rats during long-term cholic acid feeding

○馬場 菜那子[1]、萩尾 真人[1]、李 慈英[1]、吹谷 智[1]、小椋 義俊[2,3]、清水 英寿[1]、大岡 唯祐[2]、林 哲也[2,3]、石塚 敏[1]、横田 篤[1]([1]北大院農、[2]宮崎大医、[3]宮崎大フロンティア)
○Nanako BABA[1], Masahito HAGIO[1], Ja-Young LEE[1], Satoru FUKIYA[1], Yoshitoshi OGURA[2,3], Hidehisa SHIMIZU[1], Tadasuke OOKA[2], Tetsuya HAYASHI[2,3], Satoshi ISHIZUKA[1], Atsushi YOKOTA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Miyazaki Univ., [3]Miyazaki Univ. Frontier)

【背景と目的】　ヒトの腸内には百兆個以上の腸内細菌が生息し，それらのバランスが健康と関連することが明らかになっている. 高脂肪食により腸内細菌叢中の Firmicutes 門と Bacteroidetes 門の比(Firmicutes/Bacteroidetes) が上昇し, それが宿主の肥満に関連することはその一例である. したがって菌叢変化と病態発症の間には何らかの因果関係が想定されるが，高脂肪食摂取による菌叢変化の要因は未解明である．そこで我々は胆汁酸に着目した．胆汁酸は脂質を乳化し吸収を助ける両親媒性物質で，肝臓で合成された後（一次胆汁酸），大腸で腸内細菌による変換を受けて二次胆汁酸となる．胆汁酸は疎水性が強いものほど細胞毒性が強い傾向にある．以上より，高脂肪食摂取による胆汁酸量増加と，腸内細菌による強毒性の二次胆汁酸の生成が，菌叢変化の要因の一つではないかと考えた．ラットを用いて行った我々の過去の研究では，ヒトの主要な一次胆汁酸であるコール酸（CA）を添加した試験食を 10 日間摂取させることにより, 強毒性の二次胆汁酸であるデオキシコール酸（DCA）が増加し，高脂肪食摂取時様の菌叢崩壊が起こることが確認されている（Islam *et al.*, *Gastroenterology*, 2011）．そこで本研究では，長期間（8 週間）CA を投与したラットの糞便および盲腸内容物の胆汁酸分析と菌叢解析を行った．胆汁酸が菌叢変化の要因の 1 つであることを裏付け，最終的には病態発症との因果関係を解明する基盤データを取得することが本研究の目的である．

【手法】　3 週齢の WKHA 雄ラットを 3 日間予備飼育後，通常食または 0.05%CA 添加食を 8 週間摂取させた．その間糞便を回収し，飼育終了時には盲腸内容物を回収した．糞便中の胆汁酸は LC/MS を用いて分析した．腸内細菌叢は，糞便をサンプルとした GS Junior による 16S rDNA 配列のメタ解析と，盲腸内容物を用いた蛍光顕微鏡による FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) 法により解析した．FISH 解析では 16S rRNA を標的とした蛍光標識プローブにより，特定の細菌（生菌，Firmicutes 門の *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale* group, Bacteroidetes 門の *Bacteroides* group）を検出した．

【結果と考察】　胆汁酸分析の結果，予想に反して 2 週の CA 群では DCA の増加は見られず，7-oxo-DCA が増加した．8 週になると以前と同様，DCA が優勢になった．続いて FISH による 8 週の菌叢解析により，CA 群で *C. coccoides-E. rectale* group の増加，*Bacteroides* group の減少が確認された．2 週と 8 週では胆汁酸の分子種が異なることから，菌叢も異なることが予想され，両者の関連に興味が持たれた．そこで，現在 2 週と 8 週の菌叢について，メタ 16S rDNA 解析を行っている．

bile acid, gut microbiota, fluorescence in situ hybridization

講演番号：3A09p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ A 校舎 09 会場

Lactobacillus gasseri を用いた発酵大豆製品製造への新たなアプローチ
New approach to manufacturing soy products fermented by *Lactobacillus gasseri*
○荒川 健佑[1]、松永 佳奈子[1]、滝廣 宗平[1]、川井 泰[2]、増田 哲也[2]、宮本 拓[1] ([1]岡山大院環境生命、[2]日大生資科)
○Kensuke ARAKAWA[1], Kanako MATSUNAGA[1], Shuhei TAKIHIRO[1], Yasushi KAWAI[2], Tetsuya MASUDA[2], Taku MIYAMOTO[1] ([1]Okayama Univ., [2]Nihon Univ.)

【目的】ヒト小腸優勢の乳酸桿菌である *Lactobacillus gasseri* は，様々な生理機能を有したプロバイオティクスとして知られる。しかし，*Lb. gasseri* は牛乳や豆乳などの食品素材中での生育が緩慢であり，その利用性が損なわれている。本研究では，*Lb. gasseri* の栄養要求性を明らかにし，*Lb. gasseri* を用いた発酵大豆製品の新たな製造方法の検討を行うこととした。

【方法】MRS 培地，窒素源を除いた MRS 培地（MRS-N），および MRS-N にカゼイン，トリプトンまたはカザミノ酸を添加した培地に *Lb. gasseri* 3 菌株をそれぞれ接種・培養し，培養液 pH および濁度を経時的に測定した。次に，還元脱脂乳を各種食品利用可能なプロテアーゼで処理した培地を用い，*Lb. gasseri* JCM 1131^{T} の生育性（培養液 pH，滴定酸度および生菌数）を調べた。さらに，大豆タンパク質添加 MRSL-N（MRS-N の糖源をラクトースにした培地）および豆乳を培地とし，ペプシン処理の有無による JCM 1131^{T} 株の生育性の差を調べた。

【結果】供試した *Lb. gasseri* 3 菌株は，いずれもカゼインもしくはカザミノ酸を添加した MRS-N では生育しなかったが，トリプトンを添加した MRS-N では良好な生育性を示した。このことは，*Lb. gasseri* が窒素源としてタンパク質や遊離アミノ酸ではなく，ペプチドを要求することを表していた。そこで，乳中での生育性を改善するために，還元脱脂乳を各種プロテアーゼで処理した培地を作製し，*Lb. gasseri* JCM 1131^{T} を接種・培養した。その結果，ペプシンで加水分解した還元脱脂乳中で最も高い生育性が見られた。ペプシン処理の生育促進効果は，大豆タンパク質添加 MRSL-N および豆乳においても確認された。以上のことから，食品利用可能なプロテアーゼ（特にペプシン）で処理することによって，*Lb. gasseri* を用いた発酵大豆製品の製造が可能であることが明らかとなった。

Lactobacillus gasseri, fermented soy product, peptide

講演番号：3A09p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ A 校舎 09 会場

Moorella thermoacetica 芽胞の発芽と発芽誘起剤

The germination and germinant of *Moorella thermoacetica* spores

○青山 好男（（公財）東洋食品研）
○Yoshio AOYAMA (Toyo Inst. of Food Tech.)

【目的】加温販売される低酸性飲料ではフラットサワー変敗が問題となるが、その変敗原因菌の多くは高い耐熱性をもっている。特に*M. thermoacetica*の芽胞の耐熱性は非常に強く、低酸性飲料の加熱殺菌における指標菌となっている。本菌の増殖防止技術には、発芽に関する情報が重要であるが、その情報はきわめて乏しい。本研究では、*M. thermoacetica*芽胞の発芽挙動および発芽誘起剤を調べた。
【方法と結果】加温販売の変敗缶詰ミルクコーヒーから分離された菌株を変法チオグリコレート培地で55℃、10日間嫌気培養し、芽胞を形成させた。コロニー回収で得られた芽胞-栄養細胞懸濁液を加熱処理、リゾチーム処理、SDS処理により芽胞精製した（芽胞率95%以上）。

変法チオグリコレート培地中の55℃での経時的な濁度低下を指標に発芽評価した結果、約２時間で発芽が完了していた。耐熱性消失や位相差顕微鏡での暗色化による評価でも同様の経過をたどった。発芽速度に及ぼす温度、pHの影響を調べた結果、最適温度は60～65℃で、最適pHは6.5～8.0であった。また最大発芽速度の70%以上の温度域、pH域は55～70℃、pH5.5～8.5で、栄養増殖における増殖速度の温度域、pH域（55～65℃、pH6.5～7.5）に比べて、やや広い。

変法チオグリコレート培地の成分を中心に発芽に必須な成分を調べたところ、トリプチケースペプトン、酵母エキス、L-システイン、チオグリコール酸ナトリウムの４成分の組合せ液で発芽することが分かった。トリプチケースペプトン、酵母エキスを薄層クロマトグラフィー（TLC）で分画し、その画分の発芽試験により発芽誘起成分を特定した。トリプチケースペプトンのTLCの特定画分に発芽能があり、その画分のRf値から６つのアミノ酸が発芽誘起成分候補として絞られた。それら６つのアミノ酸と酵母エキス、L-システイン、チオグリコール酸ナトリウムの組合せで発芽した。各アミノ酸のオミットテストの結果、L-セリン、L-アラニン、グリシン、L-スレオニン、L-アスパラギン酸の５つのアミノ酸が発芽に関与していることが分かった：この順に関与の程度が大きかった。酵母エキスについても同様にTLC画分の発芽能を調べた。塩基性アミノ酸が多い画分に発芽能があった。その画分をさらに４分画したところ、個々の画分単独では発芽能は無かったが、その内の２つの画分をトリプチケースペプトン、L-システイン、チオグリコール酸ナトリウムと組合せると発芽した。

spore, germination, food spoilage bacteria

講演番号：3A09p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ A 校舎 09 会場

超好熱菌の分岐鎖ポリアミン合成酵素の役割
Role of branched-chain polyamine synthase for cell growth of　the hyperthermophile
○岡田 和真[1]、秀瀬 涼太[1]、今中 忠行[2]、藤原 伸介[1] ([1]関西学院大学、[2]立命館大学)
○Kazuma Okada[1], Ryota Hidese[1], Tadayuki Imanaka[2], Shinsuke Fujiwara[1] ([1]Kwansei Univ., [2]Ritsumeikan Univ.)

【研究目的】ポリアミンは核酸の安定化や細胞増殖・分化等、様々な生命現象に関与している低分子の塩基性物質である。好熱菌では一般的なポリアミンの他にも、長鎖または分岐型の特殊なポリアミンが発見されており、これらは核酸の安定化能が高い。超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* はアミノプロピルスペルミジン[3(3)4]及びビスアミノプロピルスペルミジン[3(3)(3)4]という分岐型ポリアミンを持ち、これらのポリアミンが細胞の高温環境への適応に関与していると思われる。我々は先行研究において *TK1691* 遺伝子が分岐型ポリアミン合成酵素（Tk-BpsA）をコードしていることを明らかにした。本研究では、*T. kodakarensis* の *Tk-bpsA* 遺伝子を破壊し、生育への影響を調べることを目的とした。またあわせて細胞内で蓄積するポリアミンを分析し、生合成経路の検証を行った。

【実験方法及び結果】*Tk-bpsA* 遺伝子の上流及び下流領域をベクターpUD2 に挿入し、その後 *Tk-bpsA* 領域を *Tk-pdaD* で置換し、*Tk-bpsA* 破壊ベクターを構築した。*Tk-bpsA* 破壊ベクターをアグマチン合成酵素の欠損株である *T. kodakarensis* DAD 株（*ΔpyrF*, *ΔpdaD*)に導入後 ASW-YT-S 培地にて 60℃で培養し、アグマチン非要求株を得た。さらにアグマチン非要求株を 5-フルオロオロト酸（5-FOA）を含む ASW-YT-S 培地で 60℃にて培養し、アグマチン非要求性と 5-FOA 耐性の表現型を示す変異株(*Tk-bpsA* 破壊株 DBP1)を選抜した。DBP1 株(*ΔpyrF*, *Tk-bpsA*::*pdaD*) と KU216 株(*ΔpyrF*)を ASW-YT-S 培地にて 60℃、85℃、及び 93℃にて培養し、生育特性を解析した。両株は 85℃において生育差はみられなかったが、85℃においては DBP1 株でのみ比増殖速度の低下が認められた。両株の最終菌体量は同等であった。また 93℃において DBP1 株は KU216 株に比べ、比増殖速度及び最終菌体量に大幅な低下が見られた。分岐型ポリアミンは tRNA を安定化するため、DBP1 株では tRNA が不安定となり、結果として代謝関連遺伝子等の翻訳効率が低下し、生育が低下したと考えられる。DBP1 株の細胞内ポリアミンを分析したところ、顕著な量のスペルミジンと微量のスペルミンの蓄積がみられた。DBP1 株においては高濃度のスペルミジン、あるいは微量のスペルミンが協同的に機能することで分岐鎖ポリアミンの役割を代替したと考えられる。

Archea, *Thermococcus kodakarensis*, Polyamine

講演番号：3A09p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ A 校舎 09 会場

安定性の異なる *trpC* 遺伝子の置換が超好熱菌の生育に及ぼす影響

Effect of *Tk-trpC* replacement with mesophilic and further thermophilic orthologues on *Thermococcus kodakarensis* cell growth.

○三浦 歌織[1]、藤原 綾子[1]、秀瀬 涼太[1]、今中 忠行[2]、藤原 伸介[1]（[1]関西学院大理工生命科学、[2]立命館大院生命生工）
○Kaori Miura[1], Ayako Fujiwara[1], Ryota Hidese[1], Tadayuki Imanaka[2], Shinsuke Fujiwara[1]（[1]Kwansei Gakuin Univ., [2]Ritsumeikan Univ.）

【研究目的】生物の進化は点変異の蓄積により達成されると考えられている。特に 1 つの遺伝子の変異はサプレッサーや介助因子の誘導を引き起こす場合がある。本研究では、60℃から 100℃で生育する超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の生育に必須な 1 遺伝子の変異や他のオルソログとの置換が、どのような生育変化を引き起こすのかということに注目した。本研究ではトリプトファン合成系酵素の 1 つである TrpC（インドール−3−グリセロールリン酸合成酵素）を標的とした。今回、*T.kodakarensis* の *trpC* 遺伝子欠損に加え、本菌とは生育温度範囲の異なるアーキアである *Methanothermobacter thermoautotrophicus*（生育温度範囲 40～70℃）、*Pyrococcus furiosus*（70～103℃）、*Pyrobaculum calidifontis*（80～110℃）の *trpC* 遺伝子を導入した置換株を構築し、1 遺伝子の置換が生育に及ぼす影響を検証することを目的とした。

【実験方法及び結果】KU216 株を親株としてダブルクロスオーバーの相同組換え法を用いて、DT2 株（*⊿Tk-trpC::Pf-trpC*）、DT3 株（*⊿Tk-trpC::Mt-trpC*）、DT4 株（*⊿Tk-trpC::Pc-trpC*）の構築を行った。これらの株を用いて、栄養培地及びトリプトファン制限培地下での異なる温度（60、70、80、90℃）における生育特性を精査した。まず栄養培地において生育を調べたところ、全ての置換株は親株と同等に生育した。一方、トリプトファン制限培地においては、DT2 株及び DT3 株はいずれの温度でも生育しなかった。また DT4 株では 70℃から 90℃で親株と変わらない生育を示したが、60℃で最終菌体収量の低下が確認された。DT2 株及び DT3 株に関して、*Pf-trpC* 及び *Mt-trpC* 遺伝子には *T.kodakarensis* にとって使用頻度の低いコドンが散在する。このためこれらの遺伝子は翻訳効率が著しく低く、結果として制限培地で生育しなかったと考えられる。一方、*Pc-trpC* は *Tk-trpC* に比べて利用されているコドンに顕著な差はなく、生育した DT4 株は *Pc*-TrpC を発現していると考えられた。また、我々の先行研究により *T.kodakarensis* の *Tk*-TrpC は 60℃において低温誘導型シャペロニン CpkA により捕捉され、機能分子に再生されることが明らかにされている(1)。*Pc*-TrpC は *T.kodakarensis* 細胞内において、効率的に捕捉されない、あるいは再生されないことが考えられる。60℃における DT4 株の CpkA の誘導性を調べたところ、低温誘導性は確認されたが、親株に対して増加は認められなかった。(1)Gao, L. *et al.*, Appl.Environ.Microbiol., 78, 3806−3815（2012）

Thermococcus kodakarensis, *trpC*, orthologues

講演番号：3A09p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ A 校舎 09 会場

好アルカリ性細菌 Bacillus pseudofirmus OF4 株由来の機能未同定低分子量タンパク質 BpOF4_01690 の機能解析

Characterrization of the alkaliphily-related small protein, BpOF4_01690, of alkaliphilic Bacillus pseudofirmus OF4.

○高橋 哲亮、伊藤 政博（東洋大院・生命科学）
○TETSUAKI TAKAHASHI, MASAHIRO ITO (Graduate school of Life science, Toyo Univ.)

【研究背景・目的】

一般に、好アルカリ性細菌は pH10 の高アルカリ性環境下で良好な生育を示し、生育に Na^+を要求する。この時、細胞内 pH は 8 付近に維持されている。これは、好アルカリ性細菌がもつ生理学的特徴であるアルカリ適応機構が機能しているためである。このアルカリ適応機構の研究に関しては、*Bacillus pseudofirmus* OF4 株（以後、OF4 株と記す）において多くの知見が得られている。

OF4 株におけるアルカリ適応機構は大きく 2 つに分けることができる。1 つ目は、細胞表層タンパク質の役割である。OF4 株の細胞表層存在する S-レイヤータンパク質は酸性アミノ酸含量が非常に多く、等電点(pI)が低いという特徴がある。2 つ目は、細胞内外での Na^+サイクルの役割である。細胞膜に存在する Na チャネルや Na^+駆動型べん毛モーター、Na^+/栄養素シンポーターなどにより細胞内に Na^+が流入するが、Na^+/H^+アンチポーターにより細胞内から細胞外へ Na^+が排出され、細胞内 Na^+濃度の上昇を抑えている。それと同時に、H^+が細胞外から細胞内へと流入し、細胞内 pH を外環境よりも pH ユニットで 2 程度低くしている。

これまでの好アルカリ性細菌のアルカリ適応機構の研究において、*Bacillus halodurans* C-125 株（以後、C-125 株と記す）からアルカリ感受性変異株が取得された。この変異株のアルカリ感受性を相補するタンパク質として、機能未同定な低分子量タンパク質(Small protein)である BH2819（62aa）が報告された。しかし、C-125 株では目的の遺伝子を破壊する手法が確立していないため、遺伝子工学的手法による BH2819 の機能解析は未だに行われていない。

2011 年に、OF4 株の全ゲノム解析が完了した。その中で、BH2819 の相同タンパク質である BpOF4_01690（59aa）が同定された。BLAST サーチの結果、この低分子量タンパク質は、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌のみに存在することがわかった。本研究では遺伝子工学的手法が確立している OF4 株を用いて、BpOF4_01690 の生理的機能解析を行うことを目的とした。

【結果・考察】

野生株は pH10.5 のリンゴ酸を炭素源とする培地（MYE 培地）において良好な生育を示したが、OF4_Δ01690 株は生育及び、NADH oxidase 活性や Succinate dehydrogenase 活性が低下した。これらのことから、BpOF4_01690 タンパク質は、電子伝達系に関与する低分子量タンパク質であることが推察された。

Alkaliphily-related protein, Small protein, Alkaliphilic Bacillus pseudofirmus OF4

講演番号：3A09p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ A 校舎 09 会場

平板法によって評価した大腸菌の無傷および加熱損傷細胞の生存性における酸化ストレスの関与

Involvement of oxidative stress in the viability of intact and heat-injured cells of *Escherichia coli* cells estimated by the plate-count method

○西谷 巧太、坂元 仁、土戸 哲明（関西大化生工）
○Kota NISHITANI, Jin SAKAMOTO, Tetsuaki TSUCHIDO (Kansai Univ.)

【目的】細菌細胞の生存数評価には通常、平板法が汎用される。この時、対象微生物の液体培養細胞を固体寒天培地に移す操作が行われる。この操作を液固シフトとする。当研究室では *Escherichia coli* NBRC 106482（OW6）株の過酸化水素による酸化ストレス応答の転写制御遺伝子である *oxyR* の欠損株において液固シフトにより、内因性酸化ストレスの発生による著しい生存数の低下を見出している。本研究では加熱処理に曝された大腸菌野生株の損傷細胞における液固シフトにともなう培地の寒天濃度に依存した二次的死滅の影響を調査した。

【方法】*E. coli* OW6 とその *oxyR* 遺伝子欠損株を使用した。比較のため、その他の大腸菌株も用いた。0.1％カザミノ酸を含む M9 液体培地（EM9）で約 16 時間前培養後、新たな EM9 に 0.2％植菌し、OD_{650}=0.3 に達した対数期細胞を集菌した。50mM リン酸カリウム緩衝液（pH7.0、以下 KPB と略す）で 2 回洗浄し、KPB に再懸濁した。加熱処理は 50℃予備保温した KPB 中で 100 倍希釈法により急速加熱した。生存数評価にはコロニーカウント法を用いた。KPB 中で希釈し、EM9 寒天培地に塗布した。寒天培地の寒天濃度は 1.5%と 0.75%を用いた。

【結果】未加熱処理の *oxyR* 欠損株は液固シフト時に 1.5%寒天濃度ではコロニーは検出されなかったが、0.75%寒天濃度では野生株と同程度の生存性を示した。次に野生株を加熱処理に曝し、寒天濃度の影響を調査した結果、加熱処理時間に依存して 1.5%寒天濃度では死滅率の傾きが急激になり、0.75%寒天濃度では、死滅率の傾きは緩やかで、死滅の抑制が観察された。活性酸素スカベンジャーとして働くピルビン酸ナトリウムを 1.5％寒天濃度の培地に添加したところ、死滅は抑制された。この結果から野生株の加熱損傷後の細胞においても、生存数評価に用いられる 1.5%寒天濃度の培地上での酸化ストレスによる二次的死滅の影響が示唆された。

oxidative stress, heat injury, plate-count method

講演番号：3A09p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ A 校舎 09 会場

枯草菌胞子のコア内の酸性 pH および発現タンパク質に対するジピコリン酸の役割

Role of dipicolinic acid for acidic pH and the heat stability of a protein expressed in the core of *Bacillus subtilis* spores

○前田 伸彦[1]、坂元 仁[1]、古田 雅一[2]、土戸 哲明[1] ([1]関西大学、[2]大阪府大)
○Nobuhiko MAEDA[1], JIN SAKAMOTO[1], Masakazu FURUTA[2], Tetsuaki TSUCHIDO[1] ([1]Kansai Univ., [2]Osaka Prefecture Univ.)

【背景】グラム陽性細菌の一部は飢餓ストレスにより細胞内代謝系を停止した休眠状態の細胞である胞子の形成を開始する。この細菌胞子は熱や薬剤などの物理・化学処理に対して高い抵抗性を示すことから、食品製造分野ではその対策が常に問題になっている。成熟した枯草菌胞子ではコア内タンパク質の移動が観察されないことから、極端な低水分状態であると推定されている。これまで胞子コア内の脱水機構モデルには、Setlow らの報告によるコルテックスのペプチドグリカン合成酵素欠損による含水量の多い胞子の形成から、コルテックスによるコアの締め付け脱水モデルや、胞子の乾燥重量の 10-20%を占めるジピコリン酸(DPA)の合成酵素欠損株胞子の位相差顕微鏡像でのフェーズダーク化から、ジピコリン酸蓄積脱水モデルなどがある。
【目的】本研究では枯草菌胞子の熱損傷や耐熱性化要因や、胞子コア内 pH 制御におけるジピコリン酸の影響を調査するため、親株とその DPA 合成酵素欠損株を基に熱変性指標となる耐熱性蛍光タンパク質や pH 指示薬となる蛍光タンパク質の胞子コア内発現系を用いて解析を試みた。
【方法】*Bacillus subtilis* 168 株とその *spoVFAB* 欠損株（DPA 合成酵素欠損株）に対して胞子コア内発現用の挿入組換えプラスミドにより、耐熱性蛍光タンパク質 YFP3.2 または pH 指示薬となる dKeima-Red を発現する挿入組換え体を供試菌とした。Schaffer 胞子形成培地にて培養し、胞子を調製した。DPA 欠損株では胞子形成培地に各濃度の DPA を添加した系も用いた。50mM リン酸カリウム緩衝液（pH7.0、以下 KPB と略す）中で各胞子を懸濁し、位相差および蛍光顕微鏡観察、蛍光光度計で測定した。加熱処理は KPB 中で行った。
【結果】DPA の胞子コア内の蓄積が、胞子コア内 pH に影響しているのかどうかを調査した。pH 指示薬となる 168 株における dKeima-Red コア内発現胞子での推定されるコア内 pH は 5.4 であった。一方､DPA 合成酵素欠損株における dKeima-Red コア内発現胞子での推定されるコア内 pH は 6.4 であった。胞子形成培地への DPA の添加により、DPA 合成酵素欠損株ではコア内 pH の酸性化が観察された。位相差顕微鏡像から親株系ではフェーズブライト、DPA 合成酵素欠損株ではフェーズダーク、DPA 添加によりフェーズブライトに近づく傾向が観察された。これらの結果から DPA がコア内の脱水化だけでなく酸性化に関与しているものと考えられる。また DPA による脱水化がコア内タンパク質の保護に関与する可能性から、コア内 YFP3.2 の蛍光強度を指標として DPA 濃度とコア内タンパク質の熱安定性の関連について検討中である。

Bacillus subtilis, dipicolinic acid, heat stability

講演番号：3A09p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ A 校舎 09 会場

枯草菌の抗酸化遺伝子多重欠損株を用いた“ストレス感受性/抵抗性マトリックス解析”

“The stress susceptibility/resistance matrix analysis” using *Bacillus subtilis* multiple mutants defective in antioxidative systems and its method

○御厨 真幸、坂元 仁、土戸 哲明（関西大化生工）
○Masayuki MIKURIYA, Jin SAKAMOTO, Tetsuaki TSUCHIDO (Kansai Univ.)

〔目的〕演者らは枯草菌の抗酸化酵素遺伝子群（カタラーゼ群、SOD 群、有機ペルオキシド防御関連遺伝子群）の多重遺伝子破壊株を用いた各種ストレス処理における増殖阻害・生存率評価の過程で、顕著に耐性化（R）または感受性化(S)するなど、表現型が多様に変動する現象を見出した。これに端を発し、各遺伝子群のユニットの組合せの遺伝子欠損と種々のストレス処理における耐性化・感受性化パターンである“ストレス S/R マトリックス”を調査してきた。この生存率評価においてコロニーカウント法よりも作業者の負担が著しく軽減される液体培養に基づく自動光学密度測定装置バイオスキャナーを用いた生育遅延解析法を適用してきた。この増殖遅延解析法に用いるバイオスキャナーは L 字管 48 本を同時培養可能であるが、特殊な装置であり、一般には普及していない。そこで、一般に入手しやすい温度制御と振とう機能を備えた 96 穴マイクロプレートリーダーを用いて培養スケールと装置を小型化した系での増殖遅延解析法を適用し、生存率評価によるストレス S/R マトリックスのパターンの取得を試み、従来法との比較を行った。
〔方法〕*Bacillus subtilis* 168 を親株として、SOD 遺伝子群(*sodA, sodF, yojM*)、カタラーゼ遺伝子群(*katA, katE, katX*) 、有機ペルオキシダーゼ遺伝子群(*ahpCF, ohrARB*) の各ユニットの単ユニット欠損株および２重、３重ユニット欠損株を用いた。前培養および本培養は 37℃、L 培地(pH7.0)で行った。各種ストレス処理後の生存率の評価には自動増殖記録装置としてサーモフィッシャーサイエンティフィック社製の MULTISKAN GO を用いて生育遅延解析法により生存率を求めた。
〔結果〕これまでのバイオスキャナー系（以後 B 系と略す）を用いた S/R マトリクスを参考にマイクロプレートリーダー系（以後 M 系と略す）による増殖遅延解析法との比較を行った。結果として M 系でも生育遅延解析法の適用は可能であった。注意点としては、マイクロプレートの蓋への曇り・結露対策としてサーモヒーターによる予備保温が必須であること、B 系よりもエアレーションが悪く、増殖速度が遅い傾向があった。培養プロセスでは B 系では L 字管 1 本当たり 4ml の培養液を用いていたが、M 系にすることで培養液一穴当たり 200μl と 1/20 に大幅に減少した。B 系の L 字管は高価なため洗浄・再利用が必須で手間はかかるがランニングコストは安く、M 系のマイクロプレートは使い捨てのため、ランニングコストはかかるが手間はかからない。また M 系ではマルチピペットにより作業の迅速化が可能になった。ストレス処理により S/R マトリクスが B 系と M 系ではほぼ一致する場合と、異なる場合があった。細胞損傷後にさらされる培養プロセスの影響ではないかと考えられる。

stress susceptibility/resistance matrix analysis, *Bacillus subtilis*, antioxidative genes

講演番号：3A09p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ A 校舎 09 会場

枯草菌における新規緊縮応答制御機構の解析

A analysis of novel stringent response in Bacillus subtilis

○高田 啓[1]、清水 翔[1]、大竹 俊平[1]、志波 優[2]、斉藤 菜摘[3]、福永 芳規[4]、戸澤 譲[4]、吉川 博文[1,2]（[1]東京農大・応生科・バイオ、[2]東京農大・ゲノム解析セ、[3]慶応大・先端生命研、[4]愛媛大・無細胞セ）

○Hiraku TAKADA[1], SHO SHIMIZU[1], SHUNPEI OTAKE[1], YUH SHIWA[2], NATSUMI SAITO[3], YOSHINORI FUKUNAGA[4], YUZURU TOZAWA[4], HIROFUMI YOSHIKAWA[1,2]（[1]Tokyo Univ. Agric., [2]NGRC, [3]IAB, [4]Ehime Univ.,Cell-Free Sci. Tech. Res. Cen.）

【背景・目的】微生物は様々な環境で生息し、環境の変化に応じて増殖速度を制御する。その制御の一つとしてトリガー分子であるアラーモン(p)ppGpp による緊縮応答が挙げられる。枯草菌において、(p)ppGpp の細胞内濃度の調節は合成のみを行う YwaC、YjbM と、合成・分解の両方の活性を持つ RelA によって行われる。そのため、*relA* 破壊株では(p)ppGpp の蓄積による顕著な生育遅延を示す。しかし、RelA による(p)ppGpp 細胞内濃度の制御に関してはまだ不明な点が多い。そこで、本研究では RelA による栄養条件に応じた(p)ppGpp 分解活性制御機構の解明を目的とする。

【方法・結果】我々は、生育遅延を示す *relA* の変異株(*relA 691*)を取得しているが、その変異個所である ACT ドメインは、アミノ酸などの低分子と結合して酵素活性を制御するドメインであることから、(p)ppGpp の分解活性が低下していると考えられる。また、*relA691* 株に(p)ppGpp 合成のみを行う *ywaC*、*yjbM* 破壊カセットを導入しても生育遅延が抑圧されないことから、(p)ppGpp 合成活性は保持していると考えられた。これらのことから、なんらかの低分子が ACT ドメインに結合し(p)ppGpp 分解活性を促進していることが示唆された。そこで *relA 691* 株より生育遅延を抑圧する抑圧変異株を取得し、次世代シークエンサーによるマッピング解析により、(p)ppGpp の分解活性制御に関与する因子の同定を試みた。その結果、アミノ酸飢餓時に誘導されるメチオニン代謝関連酵素遺伝子 *mtnA* の ORF 内にフレームシフト変異を同定した。*mtnA* 破壊カセットの導入により *relA691* 株の生育遅延が抑圧される一方で、メチオニン代謝において MtnA の上流に位置する MtnK の破壊カセットを導入しても抑圧されなかった。このことから、MtnA が触媒する反応の基質となる MTR-1P が RelA の ACT ドメインに結合し、(p)ppGpp 分解活性を正に制御していることが考えられた。HPLC を用いて細胞内(p)ppGpp 濃度を測定したところ、*relA691* 株において(p)ppGpp のピークは検出できず、かわりに ppGp が蓄積していることが分かった。さらに、ppGp の蓄積は抑圧変異株において検出できなかった。これは、枯草菌において ppGp がアラーモンとして作用していることを示唆している。また PCR を用いた人為的変異導入法により、生育遅延を示す *relA* 変異株を複数取得したところ、それら全ての変異が ACT ドメイン内に同定された。現在は RelA の ACT ドメインと MTR1-P との関連性について、さらに詳細な解析を行っている。本大会では以上二者の関係性を中心に、栄養状態に応じた RelA による ppGp 分解活性制御機構について議論したい。

Bacillus subtilis, Stringent response, relA

講演番号：3A09p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ A 校舎 09 会場

レーザー計測技術を用いた大腸菌コロニー形成過程の３次元リアルタイム解析

Real-time analysis of colony formation process of Escherichia coli by laser profilometry

○津留 美紀子、出口 茂（海洋機構）
○Mikiko TSUDOME, Shigeru DEGUCHI (JAMSTEC)

【目的】ロベルト・コッホらにより 19 世紀末に確立された微生物固体培養法は、微生物の純粋分離を可能にし近代微生物学の確立に大きく貢献した。固体培養法は今日においても、生菌数の測定や、コロニー形態を指標とした分類など、微生物を扱う上で必要不可欠な技術である。しかしながら濁度測定などで増殖を比較的容易に測定できる液体培養法とは異なり、培地表面に微生物が立体的な集落を形成する固体培養では、増殖を正確に定量する方法がなく、もっぱら直径などの２次元情報のみに基づいて評価されているのが現状である。我々はレーザー計測技術を用いて、固体培地表面に形成された微生物コロニーの形状を３次元可視化し、コロニー形成過程を非破壊かつリアルタイムに定量する手法を確立した。
【実験方法】大腸菌（*Escherichia coli* W3110）を希釈平板法にて LB 寒天平板培地(寒天 1.5～5%)に植菌・培養し、培地表面でコロニーが形成される過程を、平面基板表面の凹凸を非接触でリアルタイムに計測可能な 3D レーザーマイクロスコープ（キーエンス製）を用いて経時測定した。
【結果】寒天培地の表面で大腸菌が単一細胞が分裂を繰り返し、最終的に３次元ドーム状のコロニーを形成していく過程を経時的に観察することに成功した。コロニーに含まれる全ての細胞の体積が一定であると仮定すると、コロニーの体積は細胞数に比例する。そこで各培養時間におけるコロニーの体積を精密測定し、その経時変化から微生物の増殖曲線を取得し、増殖速度を測定することに成功した。次に寒天濃度が異なる平板培地上での大腸菌のコロニー形成過程を比較した。光学顕微鏡を用いた２次元観察では、5%寒天培地表面で形成されたコロニーは、1.5%寒天培地表面で形成されたコロニーよりもサイズが小さく、寒天濃度の上昇によって大腸菌の増殖が阻害されることが示唆された。ところがコロニーの立体形状を 3D レーザーマイクロスコープによって比較したところ、5%寒天培地表面では大腸菌のコロニーが水平方向よりも高さ方向へと顕著に成長する傾向が見られた。そこで増殖曲線を測定し比較したところ、両者に顕著な差異は見られなかった。固体培地表面での微生物増殖を正しく解析する上で、コロニーの３次元形状を測定することの重要性が明らかとなった。

colony formation, growth, agar medium

講演番号：3A09p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ A 校舎 09 会場

腸内細菌による鉄還元

Ferric iron reduction by intestinal bacteria

○櫻井 友樹[1]、鈴木 義規[2]、斎木 博[2]([1]東京工科大学大学院、[2]東京工科大学)
○Yuuki SAKURAI[1], Yosinori SUZUKI[2], Hiroshi SAIKI[2] ([1]Tokyo University of Technology Graduate School, [2]Tokyo University of Technology)

【背景・目的】 地球上に存在するほとんどの生物は生体元素として鉄を必要としている。しかし、通常の鉄は三価鉄であり、不溶性の化合物として存在している。そのため生体内に取り込むには三価鉄を還元し二価鉄として可溶化するか、キレーターと反応させて可溶化させることが必要である。
人の腸内には duodenal cytochrome b（Dcytb）という鉄を還元させる酵素があり、鉄の吸収に重要な役割を果たしている。しかし、Dcytb を欠損しているマウスを鉄欠乏状態にしても体内に鉄が蓄積しており、Dcytb 存在下とあまり変化が見られなかったという報告もある。よって哺乳類の環境において微生物により不溶性の三価鉄を還元させて吸収させる方法が考えられる。昨年の発表では腸内細菌の Fe(Ⅲ)EDTA（可溶性にされた三価鉄）の還元が確認できた。
そこで本研究では腸内細菌を不溶性の三価鉄（固体）を還元して、可溶化させているかを検証した。
【実験方法】まず、腸内細菌として乳酸菌(*Lactobacillus casei* NBRC155883)、ビフィズス菌(*Bifidobacterium bifidum* NBRC100015)についてバイアル瓶に三価鉄をそれぞれ加えた培地で培養した。まず、培地は *L.casei* は BCP 培地、*B.bifidum* は NBRC に記載されているビフィドバクテリウム培地を使用した。また三価鉄としてマグネタイト、ヘマタイト、FeOOH をそれぞれ加えた。次に嫌気条件としてバイアル瓶を密閉し、N_2(窒素)100%、150kPa で気相置換を行い、*L.casei* は 37℃, 静置培養、*B.bifidum* は 30℃,120rpm 振とう培養で行った。菌体密度測定として顕微鏡で計測し、二価鉄の測定としてオルトフェナントロリン吸光光度法で測定した。
【結果・まとめ】*L.casei.*と *B.bifidum* の菌体密度を測定したところ、使用している全ての三価鉄において三価鉄非存在下と比べた時、増殖の差は確認できなかった。
L.casei での三価鉄の還元量の測定では 24 時間後、マグネタイト 0.0048g（2 mM 相当）中から二価鉄 0.15 mM の生成が見られ、ヘマタイトでは 0.0032g（2 mM 相当）中から二価鉄 0.12mM の生成が見られ、FeOOH では 0.0062g（2 mM）中から二価鉄 0.17mM の生成が見られた。また *B.bifidum* では L.casei と同様の三価鉄の濃度で培養したところ、24 時間後にマグネタイトでは二価鉄 0.10 mM の生成が見られ、ヘマタイトでは二価鉄 0.13 mM の生成が見られ、FeOOH では二価鉄 0.12 mM の生成が見られた。
よってこの２つの細菌は三価鉄による増殖への影響は見られないが、固体状の不溶性三価鉄の鉄還元能を有しており、腸内での吸収に関与していると考えられる。

magnetite, iron reduction, intestinal bacteria

講演番号：3A09p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ A 校舎 09 会場

大腸菌における鉄還元酵素の探索

Study of ferric reductase in *E.coli*

佐藤 純一[1]、○湯本 小百合[1]、中元 翔太[1]、石井 達也[1]、武田 晃治[2]、吉村 悦郎[3]、中川 純一[4]、西田 雄三[5]、阿部 晃[6]、川崎 信治[1]、新村 洋一[1] ([1]東農大応生科・バイオ、[2]東農大・教職、[3]東大院農生科・応生科、[4]東農大生物産業・食香、[5]金沢医大、[6]札幌医大・眼科)

Junichi Sato[1], ○Sayuri Yumoto[1], Shouta Nakamoto[1], Tatsuya Isii[1], Kouji Takeda[2], Etsuro Yoshimura[3], Junichi Nakagawa[4], Yuzo Nishida[5], Akira Abe[6], Shinji Kawasaki[1], Youichi Niimura[1] ([1]Dept. of Bioscience., Tokyo Univ. of Agric., [2]Edu. cource,Tokyo Univ. of Agric., [3]Dept. of App. Biol. Chem., The Univ. of Tokyo, [4]Dept. of Food and Cosmetic Sci., Tokyo University of Agric., [5]Kanazawa Med. Univ., [6]Dept. of Ophthal., Med. Univ.)

【背景・目的】鉄は地殻に豊富に存在し、呼吸鎖や光合成に必要とされる、生物にとって不可欠な金属元素である。生体内において鉄は３価鉄として保存されており、２価鉄に還元されて鉄硫黄クラスターやヘムなどの合成に利用される。このように生体の鉄利用に重要な役割を担う鉄還元反応を触媒する酵素は、遊離 flavin(タンパク質非結合性フラビン)関与のもの、非関与のものが報告されている。当研究グループでは、大腸菌（*Escherichia coli* JM109）から遊離 flavin 非関与の鉄還元酵素として ferredoxin $NADP^+$ reductase （以下、Fpr）、oxygen insensitive NAD(P)H nitroreductase（以下、NfnB）を精製した[1)]。遊離 flavin 関与の鉄還元酵素としては、大腸菌から flavin reductase（以下、Fre）が提唱されている。これら酵素を精製する際の鉄還元活性測定法は電子供与体である NAD(P)H の酸化を指標とするもの(①)と、鉄還元反応より生成する２価鉄を検出するもの(②)がある。更に、遊離 flavin 関与の鉄還元酵素は、自身が還元した遊離還元 flavin が３価鉄を２価鉄へと還元すると推定されていることから、この酵素自身が NAD(P)H を電子供与体とした flavin 還元活性(③)も有することが推察される。しかし、これまでに３つの測定方法を用いた遊離 flavin 存在下、非存在下における鉄還元酵素の探索は行われていない。そこで今回は、これら３つの測定法(①～③)を用い、大腸菌において既に報告されている酵素（Fpr、NfnB、Fre）以外の鉄還元酵素の探索を試みたので報告する。

【方法・結果】大腸菌の無細胞抽出液を可溶性画分、膜画分に分画し、①の測定法で高い鉄還元活性を示した可溶性画分を Butyl TOYOPEAL650S に供し、①、③の測定法で活性を示す５つの画分 A～E に分画した。画分 B、画分 C は①の測定法で遊離 flavin 非存在下において鉄還元活性を示し、更に、抗 Fpr 抗体、抗 NfnB 抗体を用いたウェスタン解析から、画分 B は Fpr、画分 C は NfnB であることが示唆された。画分 A は①、②の測定法で遊離 flavin 非存在下、存在下において鉄還元活性を示し、活性に有意な差は観察されなかった。画分 D は①、②の測定法で遊離 flavin 非存在下において鉄還元活性を示し、遊離 flavin 存在下において鉄還元活性の上昇が観察された。画分 E は①、②の測定法で遊離 flavin 存在下でのみ鉄還元活性を示した。更に③の測定法を指標とした分画により画分 E に複数の酵素の存在が予想されたため、これら酵素の精製を試みた。その結果、２種類の酵素の存在が推定され、１種については現在も精製を試みており、もう１種の酵素は同定後、酵素の大量取得、機能解析を行っている。

1)Takeda,K. et al. (2010) Biometals 23,727-737.

E.coli, Ferric reductase, Free flavin

講演番号：3A09p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ A 校舎 09 会場

Amphibacillus xylanus における遊離フラビン関与の好気代謝と微生物界における遊離フラビンの分布

Aerobic metabolism involved in free flavins in *Amphibacillus xylanus* and their distribution in bacteria.

木俣 真弥[1]、望月 大地[1]、○富塚 駿[1]、新井 俊晃[1]、藤田 信之[2]、阿部 晃[3]、中川 純一[4]、佐藤 純一[1]、川崎 信治[1]、新村 洋一[1]([1]東農大応生科・バイオ、[2]NITE、[3]札幌医大医・眼科、[4]東農大生物生産・食香)

Shinya KIMATA[1], Daichi MOCHIZUKI[1], ○Syun TOMIZUKA[1], Toshiaki ARAI[1], Nobuyuki HUJITA[2], Akira ABE[3], Junichi NAKAGAWA[4], Junichi SATO[1], Shinji KAWASAKI[1], Youichi NIIMURA[1] ([1]Dept. Bio. Tokyo Univ. Agri., [2]NITE, [3]Dept. Oph. Sapporo Med. Univ., [4]Dept. Food and Cosmetic. Tokyo Univ. Agri)

【背景・目的】

一般的にフラビンは酵素タンパク質に結合する補欠分子族として知られる。一方、タンパク質に結合しないフラビン（遊離フラビン）関与の酵素反応が報告されている。我々は、*Amphibacillus xylanus*(*A. xylanus*)細胞中に遊離フラビンを見いだし、酸素代謝酵素 NADH oxidase (NOX)の遊離フラビン存在下での活性化を報告した[1)]。*A. xylanus* は呼吸鎖を欠如するが、呼吸鎖を有する大腸菌と同等の酸素吸収力を有し、好気生育時に鉄を要求する。本発表では、*A. xylanus* の好気代謝の解明を目的とし、遊離フラビンが関与する酸素代謝酵素と鉄還元酵素の精製を試みた。さらに、*A. xylanus* 以外の微生物における遊離フラビンの存在について報告する。

【結果・考察】

①遊離フラビンが関与する酸素代謝酵素：以前、我々は酸素代謝酵素 NOX を精製した。今回、算出された遊離フラビン濃度値を基に遊離フラビンが関与する酸素代謝酵素の精製を試みた。その結果、前述の NOX と共に NAD(P)H oxidoreductase (NPO)が精製され、両酵素が *A. xylanus* における遊離フラビンが関与する酸素代謝酵素であることが示唆された。NOX は NADH を電子供与体として利用するが NADPH への活性は低い。一方、NPO は NADH と NADPH の両方を利用する。NPO は好気代謝における $NADP^+$の再利用に関与することが推定される。

②遊離フラビンが関与する鉄還元酵素：遊離フラビン非存在下、存在下で鉄還元酵素の精製を試みた。遊離フラビン非存在下での鉄還元酵素活性は低いが、遊離フラビン存在下で活性化される 4 画分を見いだした。中でも著しい活性化が見られた画分は NOX と NPO を含む 2 画分であった。そこで、NADH と NADPH を電子供与体とし、フェロジン法によりクエン酸鉄還元活性を測定した。NOX と NPO は共に遊離フラビン存在下で活性化され、NOX は NPO の 13 倍の活性を有した。

③微生物界における遊離フラビンの存在分布：呼吸鎖を有す菌 2 種 (*Escherichia coli* NRIC 1518 , *Bacillus licheniformis* IAM 11054)、欠如する菌 5 種 (*Amphibacillus xylanus* Ep 01 , *Lactobacillus plantarum* NRIC 1067^T , *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* NRIC 0665^T , *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NRIC 1149^T, *Pediococcus pentosaceus* NRIC 0099^T) を試料として菌体内遊離フラビン定量を行ったところ、全供試菌において遊離フラビンの存在が観察された。

1) Ohnishi K. et al. *J.B.C.* (1994), 269, 31418-31423

free flavin, aerobic metabolism, iron metabolism

講演番号：3A09p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ A 校舎 09 会場

プラスミドの負荷軽減化における宿主由来転写制御因子の影響
The role of transcriptional regulator MexT for reducing plasmid cost

○久保 彩[1]、能登 優[1]、高瀬 識之[1]、高橋 裕里香[1]、松本 貴嗣[2]、吉川 博文[2]、土金 恵子[3]、細山 哲[3]、藤田 信之[3]、岡田 憲典[1]、山根 久和[4]、野尻 秀昭[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]東農大・生物資源ゲノム解析セ、[3]NITE、[4]帝京大・バイオ)
○ Aya KUBO[1], Suguru NOTO[1], Noriyuki TAKASE[1], Yurika TAKAHASHI[1], Takashi MATSUMOTO[2], Hirofumi YOSHIKAWA[2], Keiko TSUCHIKANE[3], Akira HOSOYAMA[3], Nobuyuki FUJITA[3], Kazunori OKADA[1], Hisakazu YAMANE[4], Hideaki NOJIRI[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Tokyo Univ. of Agriculture and Tech., [3]NITE, [4]Teikyo Univ.)

【目的】プラスミドの水平伝播に伴い、宿主は難分解性物質分解能や薬剤耐性といった新規形質を獲得できる一方、プラスミドは宿主にとって生育負荷となることが経験的に知られる。本研究はプラスミドの負荷を軽減する因子の解析を通じ、プラスミド保持株の集団中での生残性に関しより深い知見を得ることを目的としている。

【背景】カルバゾール分解プラスミド pCAR1 は、*Pseudomonas* 属細菌内で安定に保持される自己伝達性 IncP-7 群プラスミドである。pCAR1 改変プラスミドである pCAR1PK を用い、*Pseudomonas putida* KT2440 株の pCAR1PK 保持株と非保持株を 144 時間にわたり競合培養すると、pCAR1PK 保持株は集団中で 0.1%まで減少する。しかし、競合培養後に生残した pCAR1PK 保持株を選抜し、再びプラスミド非保持株との競合培養に供する過程を約 350 世代分繰り返すと、反対に集団中で pCAR1PK 保持株が優占化する。この長期培養実験は 2 度行われ、計 4 株の自然変異株(a501、a502、b501、b502)が取得されている。これら自然変異株と長期培養に供した元の pCAR1PK 保持株(以降親株と呼ぶ）のゲノムを比較した結果、*mexT* 遺伝子中に変異があることが自然変異株全てに共通しており、これらは全てアミノ酸置換を伴っていた。

【本年度の結果】上述の結果によりプラスミドの負荷軽減化に重要な因子であると予想された MexT は LysR 型転写制御因子である。そこで本年度はまず、MexT によって正に制御されていることが知られている *mexEF-oprN* および PP_4858[1)] に関して自然変異株 4 株と親株の遺伝子発現量を qPCR により比較した。その結果、自然変異株において上記 2 つの遺伝子発現量が親株に比べ減少していることが明らかになった(図 1)。これにより、自然変異株で検出された変異は MexT の機能に影響を及ぼしている事が示唆された。次に、実際に MexT がプラスミドの負荷に関与するか確認するため、親株の *mexT* 中に自然変異株と同様の変異を導入した一塩基置換株を作製し、プラスミド非保持株との競合培養を行った。本大会ではこれらの結果を含め、プラスミド負荷軽減の機構について現在解析している段階までを発表する予定である。

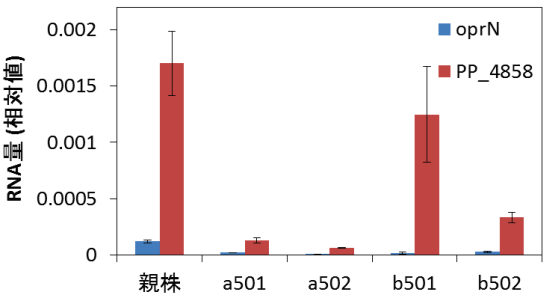


図 1 親株・自然変異株間における *oprN* および PP_4858 の発現量比較

1) Tian *et al.*, 2009. Nucleic Acids Res. 37(22): 7546-7559

Plasmid, fitness cost, Pseudomonas

講演番号：3A09p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ A 校舎 09 会場

細菌群集中で優占化するプラスミド保持株の解析

Dominance of plasmid-harboring strains in bacterial population

○杉山 大介、高橋 裕里香、岡田 憲典、野尻 秀昭（東大・生物工学セ）
○Daisuke SUGIYAMA, Yurika TAKAHASHI, Kazunori OKADA, Hideaki NOJIRI (Univ. Tokyo)

【背景・目的】 プラスミドは宿主間を水平伝播し、宿主に多剤耐性や難分解性物質分解能等の新規形質を与える一方で、宿主の生育にとって負荷となる場合もあることが知られている。このことからプラスミド保持菌株は細菌群集中で他の細菌に淘汰されやすいことが示唆されるが、実際には淘汰されずに生き残る場合や、さらには他の細菌に対して優占化する現象も観察される。そこで本研究では、優占化する原因の解明を目的として、非選択条件下で優占化したプラスミド保持株の解析を行った。
【方法･結果】多剤耐性プラスミド RP4 (IncP-1､60 kb) を保持させた *Pseudomonas putida* KT2440 株と、プラスミドを持たないもとの KT2440 株(以下 KT とする)とを、コハク酸を唯一の炭素源とする液体培地(SUC 培地)に同程度ずつ混合し、24 h ごとに植え継ぎながら 144 h の培養を行った(競合培養)。その後､24 h ごとに RP4 保持株(以下 KTRP4 とする)の比率を調べることで集団中での KTRP4 の生き残りやすさ(Fitness)を評価した。KTRP4 は競合培養初期には比率が減少したものの、最終的に集団中で優占化した(Fig. 1)。優占化した KTRP4(以下優占化株とする)を単離し表現型及び遺伝子型の解析を行った。表現型については生育曲線・コロニーサイズ・Fitness を測定した。SUC 培地で優占化株を生育させた際、KTRP4 との間に生育の差は見られなかった。LB 寒天培地上に形成するコロニーの大きさを観察したところ、KTRP4 はほとんどのコロニーが KT よりも小さく、KT と同じ大きさのコロニーはわずか数%であったのに対し、優占化株はほぼ全てが KT と同等か KT よりやや大きいコロニーを形成していた(Fig. 1)。優占化株を用いて KT との競合培養を行ったところ、優占化株の比率はほとんど減少しないまま上昇に転じており競合培養前に比べて Fitness が高くなっていた。遺伝子型については、Illumina 社の Miseq を用いて全ゲノムシーケンスを行い、優占化株と KTRP4 との間で全塩基配列を比較した。複数の優占化株に共通して見られる 1 塩基単位の置換・挿入・欠失は PP_5401 及び PP_5402 の遺伝子間領域に 1 箇所のみだった(Fig. 2)。大規模な DNA 再構成については現在解析中であり、その結果も併せて発表する。

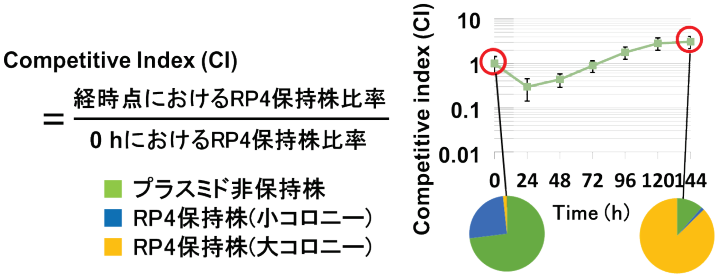
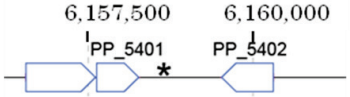


Fig. 1. 競合培養結果及び教養培養前後のコロニー比率



*：SNPs の位置

Fig. 2. 競合培養後の RP4 保持株における変異

mutation, plasmid, *Pseudomonas*

講演番号：3A09p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ A 校舎 09 会場

Methylobacterium 属細菌の植物上での窒素代謝
Nitrogen metabolism of *Methylobacterium* in the phyllosphere
○多賀 寛樹[1]、井口 博之[1,2]、由里本 博也[1]、阪井 康能[1,2] ([1]京大院農・応用生命、[2]JST・ALCA)
○Hiroki TAGA[1], Hiroyuki IGUCHI[1,2], Hiroya YURIMOTO[1], Yasuyoshi SAKAI[1,2] ([1]Kyoto Univ. Agric., [2]JST ALCA)

【目的】メタノール資化性細菌である *Methylobacterium* 属細菌は pink-pigmented facultative methylotroph(PPFM)とも称され、植物葉面に生息する細菌である。PPFM は植物ホルモンやビタミンなどを合成し、植物の生長を促進する。我々は PPFM が植物上で生育する上で必要とする生理機能の解明を目指している。PPFM は植物から放出されるメタノールを炭素源として利用していることが明らかになっているが、PPFM が植物上でどのような窒素源を利用しているかは不明である。植物上では主な窒素源として硝酸とアンモニアが存在すると考えられている。そこで、PPFM が植物上で利用している窒素源を明らかにするため、本研究では PPFM の硝酸代謝について解析を行った。
【結果】PPFM のモデル菌株である *M. extorquens* AM1 株のゲノム配列から硝酸代謝に関わる酵素遺伝子を探索した結果、硝酸レダクターゼをコードする遺伝子 *nasA* を見出した。*nasA* 破壊株では硝酸のみを窒素源として含む培地では生育できなくなったことから、この遺伝子が硝酸代謝に必須であることが分かった。次に、AM1 株の植物上での硝酸代謝を調べるため、*nasA* 破壊株と野生株とをシロイヌナズナ上で競合させて、生育を評価した。その結果、*nasA* 破壊株が植物上で生育できることがわかり、また、硝酸のみを窒素源とする培地で育てたシロイヌナズナ上では *nasA* 破壊株の生育が野生株よりも悪くなった。本結果より、PPFM は植物上で硝酸の代謝を行っていること、硝酸以外の窒素源も利用していることが示唆された。

methylotroph, nitrogen metabolism, plant

講演番号：3A09p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ A 校舎 09 会場

植物共生メタノール資化性細菌の時計遺伝子ホモログの機能解析
Functional analysis of clock gene homologues in epiphytic methylotrophic bacteria
○井口 博之[1,3]、多賀 寛樹[1]、藤澤 健斗[1]、由里本 博也[1]、小山 時隆[2]、阪井 康能[1,3]([1]京大院農・応用生命、[2]京大院理・植物、[3]JST・ALCA)
○ Hiroyuki IGUCHI[1,3], Hiroki TAGA[1], Kento FUJISAWA[1], Hiroya YURIMOTO[1], Tokitaka OYAMA[2], Yasuyoshi SAKAI[1,3] ([1]Kyoto Univ. Agric., [2]Kyoto Univ. Sci., [3]JST ALCA)

【背景】*Methylobacterium* 属細菌は植物が放出するメタノールを利用して葉面に優占的に生息しており、そこでは、昼夜変動を伴った外的環境や植物代謝からのストレスと栄養に応答して生育していると考えられている。シアノバクテリアでは、昼夜に応じた遺伝子発現の調節に、KaiABC タンパク質群が司る概日時計が使われていることが知られている。近年のゲノム解読の結果、様々な細菌やアーキアから *kaiC* 遺伝子ホモログが見つかり、*Methylobacterium* 属でもゲノム情報が公開されている 10 種すべてに *kaiC* 遺伝子が存在していた。しかし、シアノバクテリア以外の *kaiC* 遺伝子の機能は不明である。そこで本研究では、植物上での生育に果たす役割に注目し、*Methylobacterium* 属細菌の *kai* 遺伝子の機能解析を行った。
【結果】*M. extorquens* AM1 株のゲノム配列中には、2 セットの *kai* オペロン、*kaiC1-B2-B1*-'A1' と *kaiC2*-'A2' が存在する。まず RT-PCR により、両オペロンが発現していることを確認した。次に、シアノバクテリアと同様に、*kai* 遺伝子の発現が概日リズムを持つか調べた。P_{kaiC1}、P_{kaiC2} にルシフェラーゼ遺伝子 *luxAB* を連結したレポーター株をそれぞれ作製し、光と温度の日周リズムを与えて培養を行ったが、発光のリズムは観察されなかった。続いて、*M. extorquens* AM1 株のシロイヌナズナへの定着能を評価した。種子に競合させて 2 種の菌を接種し、生長した植物体に生息する菌数を評価した結果、野生株に比べて、*ΔkaiC1* 株と *ΔkaiC2* 株の定着能が低下していた。本結果より、*kaiC1* 遺伝子と *kaiC2* 遺伝子ともに植物定着に正に働いていることが明らかになった。

circadian clock gene, methylotroph, plant

講演番号：3A09p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ A 校舎 09 会場

緑膿菌のカイコへの病原力を低下させる自発的突然変異の解析
Analysis of a spontaneous mutation that affects virulence of *Pseudomonas aeruginosa* against the silkworm, *Bombyx mori*
○森 栄揮[1]、飯山 和弘[2]、石井 正治[1]、新井 博之[1]([1]東大院・応生工、[2]九大院・農)
○Hisaki Mori[1], Kazuhiro Iiyama[2], Masaharu Ishii[1], Hiroyuki Arai[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Kyushu Univ.)

【目的】緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)は日和見感染性の病原菌であり、ヒトを含めた多くの動物、植物、昆虫に対して病原性を示す。感染宿主免疫系は毒性の高いフリーラジカルである一酸化窒素(NO)を生産して感染菌を攻撃するが、緑膿菌は嫌気条件での NO 解毒作用のある NO 還元酵素(NOR)と、好気条件での NO 解毒作用のあるフラボヘモグロビン(Fhp)を持っているため、NO に対して耐性が高い。我々は昨年度本大会において、カイコを宿主とし、緑膿菌の *nor* 変異株と *fhp* 変異株を用いた感染試験より、NOR は緑膿菌の病原力に関与するが、Fhp は病原力には寄与しないことを報告した。しかし、別の方法で作製した *fhp* 変異株の中に、顕著に病原力が低下した菌株が見つかった。この変異株では *fhp* 以外の遺伝子の自発的突然変異により病原力が低下したと考えられたため、本研究では病原力低下の原因となる変異遺伝子の同定と、その機能を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】緑膿菌の野生株と *fhp* 変異株の培養液を段階的に希釈し、カイコの４齢幼虫に接種後、カイコの死亡率を 10 日間にわたり測定したところ、カイコの死亡率に顕著な低下が認められる変異株が見つかった。病原力低下に関わる変異を同定するため、マイクロアレイ解析により病原力が低下した *fhp* 変異株と低下しなかった *fhp* 変異株のトランスクリプトームを比較したところ、病原力が低下した変異株では *phoPQ* と *arn* オペロンの転写量増加、ピオシアニン生合成遺伝子群の転写量低下などの変化が認められた。これらの転写パターンの変化は、*phoQ* 遺伝子変異株で報告されていたものと類似していたため、病原力低下株の *phoQ* 遺伝子の塩基配列を決定したところ、1 塩基置換の点変異が認められた。PhoPQ は Mg^{2+}濃度を感知し、lipid A の糖化修飾に関わる *arn* オペロンの抑制や、病原因子の発現制御に関わる転写制御因子である。*phoQ* の自発的突然変異は緑膿菌の臨床分離株によく見られ、炎症性の高い表現型を示すが、ラットやレタスへの病原力が低下することが報告されている。カイコへの病原力が低下した *fhp* 変異株においても、*arn* オペロンの *arnB* プロモーターと *lacZ* との転写融合を用いたプロモーターアッセイにより、顕著な転写活性の増大が認められた。これらの結果から、緑膿菌の *phoQ* 変異は、高等動植物だけでなく、昆虫のカイコへの病原力にも影響を及ぼすことが明らかになった。また、*fhp* 変異株では好気条件での活性窒素に対する感受性が高くなっているため、このことが *phoQ* の自発的突然変異の誘発に関与している可能性が考えられた。

Pseudomonas aeruginosa, *Bombyx mori*, PhopQ

講演番号：3A09p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ A 校舎 09 会場

好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 のガス消費
Gas consumption of thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6
○山口 依里香、新井 博之、石井 正治（東大院・農生科・応生工）
○Erika YAMAGUCHI, Hiroyuki Arai, Masaharu Ishii (Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* は水素をエネルギー源、二酸化炭素を唯一の炭素源として生育する絶対独立栄養性細菌である。本菌は最終電子受容体として酸素を利用する好気的生育が可能である。本菌の培養は無機塩培地を加えたバイアル瓶の気相部分を水素、二酸化炭素、酸素で置換し 70ºC で振とうすることで行われている。

これまで、本菌においてどのようにガス消費が進行しているかといった報告はなされていなかった。ガス状物質の消長を追跡することで本菌の代謝に対して新たな知見が得られるものと考え、本研究では、ガスクロマトグラフィーを用いて経時的なガス消費を明らかにすることを目的とした。

酸素 10％、あるいは 15％で培養を開始し(ガス組成はそれぞれ H_2:O_2:CO_2:N_2=65:10:15:10、H_2:O_2:CO_2:N_2=65:15:15:5 とした。) 、経時的にガス消費を測定した。

その結果、菌体量と酸素消費量には相関性が見られた。しかし、菌体量に対する酸素消費量は初発酸素濃度を 10%とした時に比べて、15%とした時の方が大きい値となった。高い酸素濃度での生育の際は菌体増殖に繋がらない何らかの酸素消費が行われていることが示された。

水素消費に関しては培養の初期、中期、後期で違いが見られた。初期では菌体量に対する水素消費量が大きく、中期でのそれは小さくなるが、後期で再び大きくなった。水素由来のエネルギーは O_2 を還元して ATP などを生成することと、CO_2 を還元して菌体成分を生合成することの二種に使われている。今回の結果から、培養の初期には主に O_2 還元に水素が使われ、中期には菌体増殖に水素が使われるといったように、培養過程で二種を切り替えながら生育しているということが推測された。

また、本菌の有する Hox ヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊株は、高酸素環境下で生育できないことが明らかとなっている。今回の発表ではこの *hox* 遺伝子破壊株についてガス消費を調べた結果も併せて報告する。

hydrogen-oxidizing bacteria, gas comsunption, gas chromatography

講演番号：3A09p23
講演日時、会場：3 月 29 日 17:59～ A 校舎 09 会場

Shewanella livingstonensis Ac10 の金属呼吸における外膜タンパク質 PhoE の機能
Function of outer membrane protein PhoE in metal respiration by *Shewanella livingstonensis* Ac10
○丸山 沙織、川本 純、樽井 淳、王 玉、江崎 信芳、栗原 達夫（京大化研）
○Saori MARUYAMA, Jun KAWAMOTO, Jun TARUI, Yu WANG, Nobuyoshi ESAKI, Tatsuo KURIHARA (Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

【目的】近年、嫌気性条件下で種々の金属を呼吸の最終電子受容体としてエネルギーを獲得する微生物が存在することが明らかとなってきている。こうした金属呼吸能を有する微生物は、バイオレメディエーションやバイオテクノロジーの分野での応用が期待されている。しかしながら、従来の研究は常温性細菌である *Shewanella oneidensis* MR-1 や *Geobacter sulfurreducens* などを中心に進められており、地球環境の大部分を占める 0 ℃ 付近の低温環境において活発に金属還元を行う微生物に関する研究はほとんど行われていない。南極海水から単離された *Shewanella livingstonensis* Ac10 は低温適応性のグラム陰性桿菌である。本菌は *S. oneidensis* MR-1 と同様に約 40 種のシトクロム関連遺伝子を有しており、三価鉄、三価コバルトを最終電子受容体として生育可能である。本研究では、本菌がクエン酸鉄存在下で誘導生産するリン酸選択的チャネルタンパク質のホモログ (PhoE) について、金属呼吸における生理的役割を明らかとすることを目的とした。
【方法】PhoE 遺伝子破壊株 (Δ*phoE*)、および *phoE* のプロモーター領域と *phoE* 遺伝子を含む *phoE* 発現用プラスミド (pNatPhoE) を Δ*phoE* に導入した相補株を作製した。野生株、Δ*phoE*、および相補株を、水溶性のクエン酸鉄、コバルトアセチルアセトナート、不溶性の酸化鉄（Ⅲ）、対照としてフマル酸のいずれかを電子受容体として含む合成培地で培養し、PhoE の有無による生育速度への影響を解析した。
【結果・考察】クエン酸鉄依存的に増加する膜タンパク質群のうち PhoE は、大腸菌や *Pseudomonas* 属細菌においてリン酸欠乏時に発現が誘導されるリン酸選択的チャネルとして知られている。PhoE は正電荷を有するアミノ酸残基が多く存在する親水的な筒状構造を形成すると考えられているが、金属呼吸との関連は報告されていない。フマル酸含有培地では、Δ*phoE* は野生株と同様に生育するのに対して、クエン酸鉄、コバルトアセチルアセトナート含有培地では Δ*phoE* の生育速度が著しく低下し、還元能が低下することがわかった。一方、不溶性の酸化鉄（Ⅲ）では PhoE の有無による生育と還元能の差はみられなかった。pNatPhoE を導入した相補株は、クエン酸鉄、コバルトアセチルアセトナート含有培地で正常に生育したことから、可溶性三価鉄、三価コバルトの還元において、PhoE が生理的に重要な役割を担うことが示された。以上の結果から、本菌の異化的金属還元おいて、負の電荷をもつ可溶性の金属錯体が PhoE を介して細胞内に取り込まれ、最終電子受容体として利用されることが示唆された。

metal metabolism, outer membrane protein, Shewanella

講演番号：3A10a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ A 校舎 10 会場

セルロース系バイオマスからの物質生産を可能にしたスーパー麹菌の開発

Genetically engineered *Aspergillus oryzae* coexpressing three types of cellulases

○若井 暁[1]、浅井 菜々実[1]、山田 亮祐[1]、荻野 千秋[2]、堤 浩子[3]、秦 洋二[3]、近藤 昭彦[2]([1]神戸大・自然、[2]神戸大院・工、[3]月桂冠・総研)
○Satoshi WAKAI[1], Nanami ASAI[1], Ryosuke YAMADA[1], Chiaki OGINO[2], Hiroko TSUTSUMI[3], Yoji HATA[3], Akihiko KONDO[2] ([1]Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., [3]Res. Inst., Gekkeikan Sake Co.)

石油資源に替わるエネルギー・化成品原料資源としてセルロース系バイオマスを利用することは急務の課題である。石油資源の枯渇はシェール（ガス・オイル）の利用により軽視されつつあるが、シェールの利用は二酸化炭素排出の問題がある。そのため、二酸化炭素排出の問題を回避できるバイオマスエネルギーの利用が期待されている。しかしながら、バイオマス利用は、頑強なセルロースをどのように糖質まで分解して、容易に物質生産に繋げていくかという問題を抱えている。我々はこれまでに微生物による物質生産の基盤として、デンプンや糖からバイオプラスチックの原料となる乳酸を高濃度に生産する麹菌の創生に成功している。本研究では、これに加えて、麹菌の高いタンパク質分泌能を用いてセルラーゼを生産することでセルロース系バイオマスからの物質生産を可能にしたスーパー麹菌の創生を目指した。

セルロースをグルコースまで効率的に分解するためには、少なくとも三種類のセルラーゼが必要である。セルラーゼの結晶領域を分解するセロビオハイドロラーゼと非結晶部分を分解するエンドグルカナーゼとβグルコシダーゼである。この三種セルラーゼを異なる三つのプロモーターおよびターミネーターと結合し、麹菌の栄養要求性株にマーカー遺伝子とともに同時に形質転換（コトランスフォーメンション）することで、セルロース分解能を有した麹菌の創生に成功した。

三種セルラーゼ遺伝子を一つの DNA 断片として繋げて形質転換を行った時、三種セルラーゼが全て染色体上に組換えを起こしていることが確認できた。一方で、三種セルラーゼ遺伝子をバラバラの DNA 断片として形質転換した場合、セルラーゼ遺伝子が全て揃った形質転換体を得ることが難しかった。形質転換体の培養上清を用いてセルロース分解試験を行った結果、形質転換に用いた宿主と遺伝子マーカーの違いによって、活性が大きく異なった。活性が最も高いものは 600 U/L-medium（30℃、pH 5.0）を示し、低いものでは 40 U/L-medium となった。定量 PCR を用いて染色体上に組み込まれた遺伝子のコピー数を測定した結果、形質転換体の染色体 DNA 重量当たりのコピー数は、前者の方が 10 倍多いコピー数を示したことから、前者では、染色体上の複数個所に連結したセルラーゼ遺伝子が導入されていると考えられる。

我々は現在までに組換え麹菌による乳酸の大量生産に成功しており、今回創生したセルラーゼ発現麹菌に当該遺伝子を形質転換することで、セルロース系バイオマスからの物質生産（乳酸）が可能になる。

Aspergillus oryzae, cellulase, biomass

講演番号：3A10a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ A 校舎 10 会場

機能性スクリーニングによる有機養液栽培根圏微生物群からの新規セルロース分解酵素の探索と同定

Identification of novel cellulolytic enzymes from rhizosphere microbiome by functional metagenomic approaches

○山口 滋生 (慶應大院理工)
○Shigenari YAMAGUCHI (Keio Univ.)

【目的】

セルロース系バイオマスの酵素を用いた効率的な糖化は、非食料資源からのバイオエタノール生産プロセスにおいて希求される重要な技術である。我々は、有機質肥料活用型養液栽培（有機養液栽培）の養液中において、根圏微生物群が示す、高い植物細胞壁分解能に着目している。本研究では、有機養液栽培の根圏微生物群をセルロース分解酵素の新たなスクリーニング源として捉え、そのメタゲノムから機能性セルロース分解酵素遺伝子の探索を行った。

【方法】

有機物肥料として焼津産カツオ煮汁を用い、トマト(Micro-Tom)の有機養液栽培を実施した。その際、養液中に濾紙を沈め、20日間放置した。その後、根部に形成されたバイオフィルム、及び濾紙表面に付着したバイオフィルムよりメタゲノムを抽出し、λファージベクターを用いてメタゲノムライブラリーを構築した。次に、これらのライブラリーがパッケージングされたλファージを大腸菌に感染させ、酵素活性を指標としたエンドグルカナーゼ遺伝子、及びβ-グルコシダーゼ遺伝子のハイスループットスクリーニングを行った。

【結果】

養液から取り出した濾紙は形状に著しい劣化が見られ、その表面にはバイオフィルム状の構造物が確認できた。機能性スクリーニングの結果、濾紙表面から採取したバイオフィルム由来のライブラリーから、エンドグルカナーゼ活性を示すクローンを82個、β -グルコシダーゼ活性を示すクローンを4個得た。インサートDNAの塩基配列を解読した結果、エンドグルカナーゼ活性を示すクローンは5種類、β -グルコシダーゼ活性を示すクローンは1種類であった。これまでに、これらのクローンから、family 5 Glycoside hydrolase (GH5)に属する遺伝子を2種類、GH9に属する遺伝子を1種類、GH3に属する遺伝子を1種類見出している。また、これらに対応するタンパク質の、データベース上に存在する配列との相同性は56%～72%であり、いずれも新規性の高い酵素であることが期待される。現在、これら遺伝子の大腸菌を用いた組み換え型タンパク質を作製し、その機能解析を試みている。

Metagenomics, Cellulase, Functional screening

講演番号：3A10a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ A 校舎 10 会場

バクテリアセルロース生産に用いる微細藻類の処理方法の検討

Examination of Treatment Method of Microalgae Used for Bacterial Cellulose Production

○松野 良亮[1]、平戸 祐喜[1]、重 雅俊[1]、旗谷 惇[1]、谷川 実[1]、西村 克史[2] ([1]日大理工、[2]日大短大船橋)
○RYOSUKE MATSUNO[1], YUKI HIRATO[1], MASATOSHI SHIGE[1], JUN HATAYA[1], MINORU TANIGAWA[1], KATSUSHI NISHIMURA[2] ([1]Nihon Univ, [2]Nihon Univ Junior College)

地球資源を消費することなく光エネルギーと二酸化炭素を高等植物より効率よく有機物に変換することができる微細藻類を用いて，持続可能な微生物生産システムを開発することがわれわれの目的である．本研究では，微細藻類と細菌の組合せによる二酸化炭素を炭素源としたファインケミカルの生産システムの構築を試みた．

二酸化炭素固定化モジュールとして緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) と藍藻 *Arthrospira platensis* (*A. platensis*)，ファインケミカル生産モジュールとしてバクテリアセルロースを生産する酢酸菌 *Gluconacetobacter xylinus* (*G. xylinus*) を用いた．*G. xylinus* はデンプン等の高分子炭素源を利用することができないため，酸による加水分解を試みた．硫酸を用いて藻類を加水分解するときの最適条件を検討するために，各濃度の硫酸で処理した藻類中の生成グルコース量を調べた．*A. platensis*，*C. reinhardtii* のどちらを用いた場合も，生成グルコース量は硫酸 200 mM の時に最大値の 80%以上に達し，その後少しずつ増加した．*A. platensis* は 300 mM，*C. reinhardtii* は 200 mM の硫酸で処理したとき，BC 生産量が最も高くなった（培地 10mL 中にそれぞれ 7.8 mg, 14.5 mg）．*A. platensis*，*C. reinhardtii* どちらの場合も，500 mM まで硫酸濃度を上げるとグルコース量は増加するにもかかわらず，BC 生産量が著しく低くなることが分かった．そこで，加水分解後に培地を中和するときに生成する硫酸塩が BC 生産に与える影響を調べた．培地に Na_2SO_4 を加えて培養し BC 生産量を測定したところ，少量の塩は BC 生産量を増加させるが 500 mM 以上の高濃度の塩は BC 生産量を減少させることがわかった．

固体酸 (DOWEX 50Wx8 と H-MOR Zeolite) を用いた加水分解が藻類に対して有効であるかどうかを調べるために，デンプンをモデル高分子炭素源として用いて固体酸による加水分解を試みた．DOWEX を用いた 10 時間の処理によって，デンプンの約 93% が分解された．Zeolite を用いた場合，DOWEX より分解率が低かった（約 1/6）．次に，固体酸を用いて *A. platensis* を加水分解できるかどうかを調べた．Zeolite を用いた 129℃，10 時間の処理ではほとんど分解されなかった（グルコース収率 1.47%，還元糖収率 4.36%）にもかかわらず，予想より多くの BC が生産された（生産量 4.5 mg）．固体酸を含まない 129℃の熱水処理でも，同様の傾向が見られた（グルコース収率 1.37%，還元糖収率 11.4%，生産量 2.1 mg）が，Zeolite の場合がより顕著であった．DOWEX を用いた加水分解理により，グルコース収率 39.0%，還元糖収率 59%，BC 生産量 7.0 mg という結果が得られた．

Bacterial cellulose, microalgae, solid acid

講演番号：3A10a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ A 校舎 10 会場

担子菌を用いたメラニン脱色機構の解析

Analysis of melanin decolorization by basidiomycete

○沼田 大志[1]、南 正彦[2]、齋藤 洋太郎[2]、中沢 威人[1]、小池 謙造[3]、本田 与一[1] ([1]京大院農、[2]京大生存研、[3]花王株式会社　ビューティケア研究センター)
○Motoshi Numata[1], Masahiko Minami[2], Yotaro Saito[2], Takehito Nakazawa[1], Kenzo Koike[3], Yoichi Honda[1] ([1]Kyoto Univ., [2]RISH, Kyoto Univ., [3]Kao Corporation)

【背景・目的】

メラニンは一般的に茶～黒色を呈し、複雑な化学構造をもつ天然の高分子色素である。動物、植物、微生物などに幅広く分布しており、ヒトでは主に髪と皮膚に含まれている。従来のメラニン分解法では、H_2O_2 や酸、アルカリといった強力な化学的条件を用いているため、皮膚や毛髪にダメージを与えている可能性がある。近年、木材成分の一つであるリグニンを分解する担子菌（白色腐朽菌）の一部が、菌体外酵素系を用いてメラニンを分解する可能性についての報告がなされた[1)]。担子菌の酵素系は比較的温和な条件でメラニン分解を行うことができると期待されることから、新たな美白剤としての化粧品や髪の脱色剤等への応用の可能性が考えられる。そこで本研究では、より効率的にメラニンを脱色できる担子菌の選抜を行い、担子菌によるメラニン脱色系についての解析を行うことを目的とした。

【方法】

菌を選抜するために、毛髪メラニンを含有する寒天プレート培地に、数種の白色腐朽菌を植菌し脱色試験を行った。次に、選抜した菌を用いて、合成メラニンを基質としたメラニン溶液内での脱色を吸光度計で測定した。また、Czapek-Dox 培地で生長させた菌体を 0.025%メラニン溶液に移し替えて脱色反応を行った。採取したメラニン脱色液を順相 TLC にアセトニトリルと水で調製した展開溶媒を用いて分離し、UV365 nm を照射することで反応産物の検出を行った。

【結果】

選抜により高効率にメラニンを脱色する株 KU-1 が見出された。この KU-1 は毛髪にダメージを与えることなく、毛髪内部にまで脱色が進んでいることが観察された。一方、他の担子菌では毛髪表面に剥がれや損傷があるものも観察された。また、メラニン溶液中における合成メラニンの脱色では、KU-1 は他の株より遥かに高いメラニン脱色活性を示し、6 日ほどで吸光度が 75~80%減少するまで脱色が進んだ。さらに、脱色液を TLC で解析した結果、日数経過とともに、メラニンのスポットが消失し、脱色されたメラニン由来と思われる UV365 nm 照射によって蛍光する成分が増加した。この反応系により、菌処理による溶液中の合成メラニン脱色についての解析方法を確立した。

1) Nagasaki, K., et al. (2008) *Appl. Environ. Microb.* **74** (16) : 5106-5112

melanin, decolorization, basidiomycete

講演番号：3A10a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ A 校舎 10 会場

深海環境よりリグニン代謝微生物を探索
Isolation of Lignin Metabolizing Bacteria from Deep-Sea .
○佐藤 玲央奈[1,2]、大田 ゆかり[2]、丸山 正[2]、秦田 勇二[2] ([1]横浜市立大院生命ナノ、[2]海洋研究開発機構)
○Reona SATO[1,2], Yukari OHTA[2], Tadashi MARUYAMA[2], Yuji HATADA[2] ([1]Yokohama City Univ., [2]JAMSTEC)

【目的】リグニンは木質の 20～30%を占める構成成分の一つであり、自然界において二番目に多く存在するバイオマスである。その構造は数種類の芳香族モノマーが重合したヘテロポリマーであり、フェノール環構造を維持したまま低分子化できれば、バイオ燃料やプラスチックとしての応用が期待される。しかし、強固で複雑な構造によってこれまでにその利用は進んでおらず、有効な応用手段が求められている。海洋環境はリグニン代謝活性に対する探索源として未開発であったが、深海域サンプルよりリグニン関連芳香族化合物を代謝するバクテリア群を採取しその系統解析を行った。さらに同代謝活性の高い分離株のゲノム DNA 解析を行い、安息香酸・カテコール類代謝に関連する遺伝子群を検出したのでこれらを合わせて報告する。

【方法および結果】駿河湾より採取した沈木サンプルを調製した後、選択用培地に塗布し 25℃で 5 日間培養した。これより単離された微生物 510 株に対してリグニン関連芳香族化合物代謝評価を行った。単離株を 8 種類の芳香族モノマーを含む液体培地で培養し、培養後の培養上清を HPLC 分析に供して残存する被験化合物と代謝物を検出した。また、代謝物の構造推定には GC/MS、LC/MS を用いた。試験に用いた芳香族モノマーのうち最も多く検出された代謝はプロトカテク酸の資化であり、バニリン酸の酸化・資化がそれに続いた。この結果より、カテコール類を経由する、β-ケトアジピン酸経路が主流となることが推定された。また、芳香族モノマー代謝能を有する 208 株について 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統分類学的解析を行った。BLAST での検索結果より、単離株は Firmicutes、Bacteroidetes、Proteobacteria に及ぶ種々の門に分類され、59 株が新規分離菌であることが判明した。

続いて分離株の中から、多数の芳香族化合物に対する広範な代謝活性を示した *Halomonas titanicae* 近縁の新規分離株について次世代シークエンサーによるドラフトゲノム解析を行った。結果として合計 6536 遺伝子が検出され、この中から芳香族化合物代謝に関連すると推定されるフェノール酸、安息香酸、カテコール分解酵素遺伝子が検出され、これらはクラスターを形成していることが判明した。フェノール酸は水酸化反応を経由し、カテコールへと変換されること、安息香酸・カテコール類は芳香族水酸化反応及びオキシゲナーゼによる開裂反応を経て、β-ケトアジピン酸経路、TCA 回路へと繋がる代謝経路で代謝されることが予想された。

lignin, bacteria, Deep-sea

講演番号：3A10a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ A 校舎 10 会場

Pseudomonas sp. YL 株由来ハロ酸脱ハロゲン化酵素（L-DEX YL）の立体選択性の機構解析
Mechanism analysis of stereoselectivity in halo acid dehalogenase from *Pseudomonas* sp. YL strain.
○出来 弘幸、村瀬 泰明、中村 卓 (長浜バイオ大バイオサイエンス)
○Hiroyuki Deki, Yasuaki Murase, Takashi Nakamura (Nagahama Univ)

[目的]
環境中において有害な有機ハロゲン化合物の分解を触媒する代表的な酵素としてハロ酸デハロゲナーゼが研究されている。特に *Pseudomonas* sp. YL 株由来 L-2-ハロ酸デハロゲナーゼ（L-DEX YL）において、結晶構造や代表的な基質である L-2-クロロプロピオン酸（L-CPA）に対する反応過程の研究が進められている。本研究では、L-DEX YL が D-2-クロロプロピオン酸（D-CPA）に対して活性を持たないことに注目し、L-DEX YL の基質認識部位に変異を導入し D-CPA を分解することが可能か確認を行い L 体の基質認識に重要なアミノ酸残基を同定することを目的とした。
[方法]
ドッキングシミュレーション（MOE, 2011.10. ASE Dock）を用いて L-DEX YL - L-CPA 複合体を作成し、L-CPA の部分を D-CPA に置換した。また量子化学計算（Gaussian09, revB.0.1）を用いて求核攻撃を行う D10、L-CPA または D-CPA（基質）と活性部位周辺の 1 残基を取り出したものと、D10 と基質を取り出したものとのエネルギー差を比較した。変化が確認された残基に変異を加えるために pQE30Xa に L-DEX YL の遺伝子を導入したベクターと東洋紡の KOD-Plus-Mutagenesis Kit を用いた部位特異的変異導入法により活性部位周辺に存在するアミノ酸に対して Y12A、N119A、Y12A と N119A の Double Mutant（DM）、L45A、F60A、F60Y、W179A の 7 種類の L-DEX YL 変異遺伝子を作製し、大腸菌 JM109 で大量発現させた。精製をより簡単かつ大量に行うためにヒスチジン (His) タグを利用したアフィニティークロマトグラフィーを用いて野生型 (WT)、Y12A、N119A、DM、L45A、F60A、F60Y、W179A、の変異体酵素を精製した。精製後、チオシアン酸水銀を用いた塩化物イオンの比色定量法あるいは pH 指示薬[チモールブルー（TB）]を用いて L-CPA、D-CPA に対する活性を確認した。
[結果]
前年度大会で報告したようにドッキングシミュレーションでは L-DEX YL の Y12 と N119 で D-CPA が接触していることが確認された。今回、量子化学計算の結果から新たに L45、F60、W179 が L-CPA の認識に重要だと考えられたのでこれらの変異体を作製および精製し活性測定を行った。Y12A、N119A 変異体の L-CPA、D-CPA に対する比活性は前年度大会で報告した値よりも上昇した。また WT、DM、L45A、F60A、F60Y、W179A と L-CPA、D-CPA での活性測定結果は本学会で発表する。

L-DEX YL, substrate recognition, Quantum chemical calculation

講演番号：3A10a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ A 校舎 10 会場

ハロ酸デハロゲナーゼスーパーファミリーに属するフルオロ酢酸デハロゲナーゼの炭素－フッ素結合切断機構解析

Analysis of reaction mechanism of carbon-fluoride bond cleavage catalyzed by fluoroacetate dehalogenase belonging to haloacid dehalogenase superfamily

○新川 雄也、福井 拓海、中村 卓（長浜バイオ大院）
○Yuuya SHINKAWA, Takumi Hukui, Takashi Nakamura (Ngahama Univ.)

[目的]

我々は環境に有害な有機ハロゲン化合物の分解を触媒する代表的な酵素として *Pseudomonas* sp.YL 由来の L-2-ハロ酸デハロゲナーゼ（L-DEX YL）を研究している。L-DEX YL は、塩素や臭素のついたハロ酸を分解できるが、フルオロ酢酸(MFA) などのフッ素のついたハロ酸は分解できないと報告されている。その原因として炭素-フッ素（C-F）結合は炭素に対する最も強い共有結合であり、L-DEX YL はそれを切断できないと考えられる。一方で C-F 結合を切断できるフルオロ酢酸（MFA）デハロゲナーゼ（MFADEX）が存在し、その C-F 結合切断機構については既に研究されている。近年 L-DEX YL と同じハロ酸デハロゲナーゼ（HAD）スーパーファミリーに属する MFADEX が発見され MFA 分解活性が報告されているが、その C-F 結合切断機構については明らかになっていない。本研究では、HAD スーパーファミリーに属する MFADEX の C-F 結合切断機構を解明することを最終目標としている。

[方法]

立体構造既知の L-DEX YL、HAD スーパーファミリーの MFADEX として新規に見つかった *Polaromonas* sp.由来の Bpro_0530、*Rhodococcus* sp.由来の RHA1_ro00230 をそれぞれ同じ発現系（pQE30Xa+E.coli JM109）で過剰発現させ、His-tag を利用し Ni-NTA アフィニティクロマトグラフィーで精製を行った。得られた酵素を使い、MFA を基質として pH 指示薬及びグリコール酸定量を用いた活性測定を行った。

[結果]

Coomassie Brilliant Blue 染色やウエスタンブロッティングを用い、L-DEX YL、Bpro_0530、RHA1_ro00230 の発現を確認した後、Bradford 法よりタンパク質濃度を算出して収量を計算したところ、L-DEX YL、Bpro_0530、RHA1_ro00230 の順に液体培地 100 ml あたり 20.9 mg、9.1 mg、6.4 mg 精製できた。グリコール酸定量による活性測定を行った結果、比活性が低い値ではあったが、L-DEX YL の活性が最も高かった。今回の結果について、アミノ酸配列のアライメントや立体構造から考察した結果も本学会で発表する予定である。

L-DEX, Dehalogenasa, Activity measurement

講演番号：3A10a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ A 校舎 10 会場

ロドコッカス属細菌によるフッ素化合物の代謝
Fluorine compound metabolism by *Rhodococcus* sp.
○岩井 伯隆、矢野 憲一、渡辺 洋介、北爪 智哉、和地 正明（東工大院・生命理工・生物プロセス）
○Noritaka IWAI, Kenichi Yano, Yosuke Watanabe, Tomoya Kitazume, Masaaki Wachi (Dept. Bioeng., Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

フッ素化合物は耐熱性やはっ水性に優れ，酸やアルカリなどにも強いため，工業材料・一般家庭用品において幅広く利用されている。これらを支えている技術は目下のところ、有機化学や高分子化学など化学を基礎としたものであり、現在のフッ素化学分野におけるバイオテクノロジーの貢献度は非常に低い。しかし、環境中での安全性や資源問題などフッ素を取り巻く今後の社会問題を解決する新たな方策として、フッ素科学技術における生物機能の応用は高い期待が持てる分野である。我々は安全面に配慮したフッ素資源回収技術と新しいフッ素系創製技術の開発を目指して、微生物の能力を利用した技術を模索してきた。その中で、微生物スクリーニングから芳香族系フッ素化合物を代謝する能力を持つロドコッカス属細菌を見出した。

本菌はベンゼン環にフッ素が導入されたフルオロベンゼンとトルエンのメチル基が全てフッ素に置換したベンゾトリフルオリド（トリフルオロメチルベンゼン）を、それぞれ脱フッ素化できる能力を持っていた。特にトリフルオロメチル基はもともと天然に存在しない構造であることから、この能力は学術的にも興味深い。社会で利用されている多くのフッ素化合物が分解困難な多置換体であることから、本菌の脱フッ素化能力はこれからのフッ素化合物の分解・回収技術に貢献できる可能性がある。

本発表では、このロドコッカス属細菌が持つベンゾトリフルオリドの代謝能力と脱フッ素化機構の解明について、これまでに明らかにしたことを述べたい。タンパク質の発現解析では、二次元電気泳動法からベンゾトリフルオリドによって芳香族代謝系のタンパク質が誘導されていることを明らかにした。また、代謝物については、培養液の 19F-NMR スペクトルの解析を行った結果、単純な分解物とは考えにくい化合物の存在を発見した。この化合物は、代謝途中から分解経路を分岐することで新しいフッ素化合物へ変換されていることが推測された。このことから、本菌によるフッ素化合物の代謝は、これまでの有機化学的手法だけでは合成が困難な新しいフッ素化合物の創製技術としても利用できる可能性が拓けた。発表では微生物の代謝能力（発酵技術）による、フッ素化合物の分解技術の可能性と新しいフッ素化合物の創製法について展望を述べたい。

Rhodococcous sp., biodegradation, fluorine chemistry

講演番号：3A10a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ A 校舎 10 会場

細菌におけるセレン微粒子生成に関わるタンパク質の同定
Identification of proteins involved in the bacterial synthesis of selenium nanoparticles
大内田 竜大[1]、○田島 寛隆[1,4]、山本 紘資[1]、斎藤 茂樹[1,4]、谷 泰史[1,4]、峯元 高志[3]、PRAKASH N. Tejo[2]、三原 久明[1]([1]立命館大・生命科学、[2]Dept. Biotech. Environ. Sci.・Thapar Univ.、[3]立命館大・理工、[4]立命館大・R-GIRO)
Ryuta OUCHIDA[1], ○Hirotaka TAJIMA[1,4], Kosuke YAMAMOTO[1], Shigeki SAITO[1,4], Yasushi TANI[1,4], Takashi MINEMOTO[3], N. Tejo PRAKASH[2], Hisaaki MIHARA[1] ([1]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Dept. Biotech. Environ. Sci., Thapar Univ., [3]Coll. Sci. Eng., Ritsumeikan Univ., [4]R-GIRO, Ritsumeikan Univ.)

【目的】
セレンは 16 族元素であり、同族である硫黄と化学的に似た性質をもつ。セレンは、産業面では半導体や顔料に用いられている。また、動物の必須微量元素のひとつであるが、必要量と中毒量との差が小さいことが知られる。環境中では主に、水溶性のオキシアニオン（セレン酸、亜セレン酸）として存在するが、これらは毒性が高く汚染原因物質ともなっている。そこで近年、セレンオキシアニオンを還元し、毒性の低い元素状セレンの微粒子に変換する微生物が注目されている。微生物によるセレン微粒子形成に関与するタンパク質として、*Thauera selenatis* の SefA が近年同定された。しかし、SefA は *T. selenatis* に固有のものであり、有意な相同性を示すタンパク質は他の生物種に存在しない。これまでの研究で我々は、インド北西部の高濃度セレン蓄積地帯の土壌より、亜セレン酸を還元し元素状セレンを生成する細菌を 12 株単離した。そのうちの一株であるグラム陽性細菌 *Cellulomonas* sp. D3a 株は、亜セレン酸を嫌気条件下でのみ還元しセレン微粒子を生成するというユニークな性質をもつことが明らかとなっている。本研究では、細菌によるセレン微粒子形成機構の解明を目指し、*Cellulomonas* sp. D3a 株を用いてセレン微粒子形成に関わるタンパク質の同定を試みた。

【方法・結果】
Cellulomonas sp. D3a 株は高い亜セレン酸耐性を示し、500 mM 亜セレン酸含有 TSB 寒天培地上でも生育した。D3a 株を 1 mM 亜セレン酸含有 TSB 培地で培養し、得られた沈殿を 80%スクロースに重層し、遠心分離により菌体とセレン粒子とを分離した。回収した粒子を 0.5% SDS で洗浄し、SDS-PAGE で粒子に結合したタンパク質を分離した。分離したタンパク質のうち比較的量の多いものついて、ESI-Qq-TOF-MS 解析による同定を行った。その結果、シャペロニン GroEL、flagellar hook-associated protein FlgK、外膜ポリン OmpC を含む 8 つのタンパク質が同定され、これらのタンパク質がセレン粒子の形成に関与する可能性が考えられた。大腸菌もセレン粒子を生成することが知られていたため、上記 D3a 株で同定されたタンパク質に対応する遺伝子を欠失した大腸菌変異株に亜セレン酸を与えてセレン粒子を形成させた。その結果、OmpC を欠失した株では野生株と比較して平均粒子径が約 35%増加することを見出した。これらの結果より、OmpC はセレン微粒子の粒径の制御に関わっている可能性が示唆された。

nanoparticle, selenium, porin

講演番号：3A10a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ A 校舎 10 会場

Cellulomonas sp. D3a 株におけるテルル酸還元に関わる遺伝子の同定
Identification of a gene involved in the tellurate reduction in *Cellulomonas* sp. D3a

○名田 イサナ[1]、田島 寛隆[1,3]、斎藤 茂樹[1,3]、谷 泰史[1,3]、PRAKASH N. Tejo[2]、三原 久明[1]（[1]立命館大・生命科学、[2]Dept. Biotech. Environ. Sci. ・Thapar Univ.、[3]立命館大・R-GIRO）
○Isana NADA[1], Hirotaka TAJIMA[1,3], Shigeki SAITO[1,3], Yasushi TANI[1,3], N. Tejo PRAKASH[2], Hisaaki MIHARA[1] ([1]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Dept. Biotech. Environ. Sci., Thapar Univ., [3]R-GIRO, Ritsumeikan Univ.)

【目的】
硫黄やセレンの同族元素であるテルルは、太陽電池や電子部品材料として先端産業分野で利用されている。テルルのオキシアニオン（テルル酸、亜テルル酸）は水に可溶性であり細胞毒性を示すが、工業廃水や環境中で比較的安定して存在することから、これらを不溶性の元素状テルルに還元する微生物が注目されている。高濃度セレン地帯の土壌から単離されたグラム陽性細菌 *Cellulomonas* sp. D3a 株は好気・嫌気いずれの条件下でもテルル酸を元素状テルルに還元し、また、嫌気条件下でのみ亜テルル酸を元素状テルルに還元するというユニークなテルルオキシアニオン還元特性をもつ。しかし、本菌におけるテルルオキシアニオン還元の機構は不明である。本研究では、*Cellulomonas* sp. D3a 株のゲノム DNA へのトランスポゾン挿入変異により、テルル酸還元に関与する遺伝子の同定を試みた。

【方法・結果】
Cellulomonas sp. D3a 株は、5 mM テルル酸を含む TSB 寒天培地において、好気および嫌気下でテルル酸を還元し黒色のコロニーを生じる。テルル酸還元に関与する遺伝子を同定するため、トランスポゾン Tn*916* を保有する *Enterococcus faecalis* CG110 株と D3a のストレプトマイシン耐性変異株とを接合させた後、5 mM テルル酸および 10 μg/mL テトラサイクリン、1000 μg/mL ストレプトマイシンを含有する TSB 培地上に塗布し、黒色にならないコロニーを単離した。その結果、好気条件下におけるテルル酸還元速度が野生株に比べて著しく低下した変異株が 4 株得られた。カセット PCR 法により解析したところ、これら変異株 4 株のうち少なくとも 3 株において、Tn*916* は同一遺伝子 (*ybbP*) の上流に挿入されていた。従って、変異株においては、Tn*916* の挿入が *ybbP* の発現に影響を及ぼすことにより、テルル酸還元能が低下したものと考えられた。*ybbP* がコードするタンパク質の配列は、*Bacillus subtilis* の cyclic di-AMP 合成酵素と高い相同性を示した。一方、好気条件下でテルル酸還元能を示さない *Cellulomonas fimi* のゲノム上には、*ybbP* と有意な相同性を示す遺伝子は見られなかった。以上より、*Cellulomonas* sp. D3a 株の高いテルル酸還元能に *ybbP* が関与することが示唆された。

tellurate, tellurium, Cellulomonas sp.

講演番号：3A10a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ A 校舎 10 会場

新規ポリエチレンテレフタレート代謝酵素群の同定と機能解析
Functional identification of novel PET-metabolyzing enzymes

○吉田 昭介[1]、捧 開維[1]、小田 耕平[2]、宮本 憲二[1] ([1]慶應大理工、[2]京都工繊大応生)
○Shosuke YOSHIDA[1], Kai SASAGE[1], Kohei ODA[2], Kenji MIYAMOTO[1] ([1]Keio Univ., [2]Kyoto Inst. Technol.)

【背景・目的】Poly(ethylene terephthalate) (PET) は、テレフタル酸とエチレングリコールが縮重合した芳香族ポリエステルである。強度や柔軟性が高く、ボトルや衣服などの素材として広く利用されている。これまで PET は生分解性を持たないとされてきたが、近年、我々は世界に先駆け、PET を資化する新種の細菌 *Ideonella* sp. No. 201-F6 株の分離に成功した。本研究では、No. 201-F6 株の PET 資化に寄与する酵素群の同定を目的とした。

【方法】No. 201-F6 株の次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行った。さらに、本菌を様々な基質を主な炭素源とする培地で培養後、total RNA を抽出し、RNA-Seq 解析を行った。候補遺伝子はクローニング後、大腸菌を用いて組み換えタンパク質を作製し、精製タンパク質の PET 分解能を評価した。

【結果】ゲノム解析の結果、5529 個の遺伝子を推定した。機能が推定できた遺伝子のうち、2.6%が芳香族化合物の代謝遺伝子であった。また、RNA-Seq 解析により、PET により大幅に発現が誘導される遺伝子を多数同定した。ゲノム解析、RNA-Seq 解析で見出された PET 分解候補タンパク質のうち、推定リパーゼタンパク質 (LipA) が PET フィルム加水分解活性、及び bis(2-hydroxy ethyl) terephthalate (BHET)加水分解活性を示した。また、推定クロロゲン酸エステラーゼタンパク質 (ClgA)は mono(hydroxy ethyl) terephthalate (MHET)に対して高い加水分解活性を示した。これらの結果から、本菌が LipA、ClgA の働きにより、PET 資化性を実現していることが強く示唆された。

Poly(ethylene terephthalate), RNA-Seq, Cutinase

講演番号：3A10a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ A 校舎 10 会場

ベルベリン分解菌 BD3100 株の単離と解析
Isolation and characterization of berberine degrading bacterium, *Sphingobium* sp. strain BD3100
○武田 尚[1]、石川 和樹[1]、若菜 大悟[1]、佐藤 文彦[2]、細江 智夫[1] ([1]星薬大、[2]京大院・生命)
○Hisashi TAKEDA[1], Kazuki ISHIKAWA[1], Daigo WAKANA[1], Fumihiko SATO[2], Tomoo HOSOE[1] ([1]Hoshi Univ., [2]Kyoto Univ.)

植物や真菌類から有用性の高い二次代謝産物を得るために、その生合成に関与する酵素遺伝子の解析や、休眠遺伝子の覚醒方法の検討が盛んに行われている。本研究は、二次代謝産物から新たな有用性の高い化合物を創製する手法として、バクテリアの持つ分解・資化能力に着目し、近年微生物による生合成方法が確立したベルベリン(BBR)を対象として分解菌の取得および分解経路の解明や分解に関与する酵素遺伝子の機能解析を行うことを目的とした。BBR は、キハダやオウレンなどの植物に含まれ、鮮やかな黄色を呈するベンジルイソキノリンアルカロイドの 1 種であり、抗菌作用を持つ止瀉薬として、大腸菌や抗生物質が無効な菌に有効で、腸内細菌によって惹起された腸内腐敗及びそれに伴う下痢に効果がある。BBR は抗菌作用の強さから、バクテリアに対する抗菌作用や効力の報告例は多いが、分解に関する報告は無い。私達は生薬含有製剤の製造工場内の土壌から BBR を唯一のエネルギー源として生育可能な BD3100 株を集積培養により単離した。BD3100 株の 16S rDNA を PCR で増幅して塩基配列を決定し、相同性検索を行った結果、*Sphingobium yanoikuyae* と 99.8%の相同性を示したが、*S. yanoikuyae* ATCC 51230 株は BBR を資化することも分解することもできなかった。BD3100 株は LB 培地に添加した 0.5 mM の BBR を生育とともに 10 時間で完全に分解した。BBR 分解における培養液の経時変化を HPLC によって分析したところ、BBR の減少とともに増加する 2 つのピークを確認した。これらを分取し、NMR および ESI-MS による構造解析を行い demethyleneberberine および 11-hydroxydemethyleneberberine と同定した。BBR 分解酵素の誘導性を調べるために BBR による誘導休止菌体と非誘導休止菌体を作製し、HPCL により両者の BBR 分解性を比較した。BBR で誘導した休止菌体は反応後から速やかな BBR の分解が確認されたが、非誘導の休止菌体による BBR 分解は、反応後約 4 時間から徐々に分解された。この結果から、BBR 分解に関与する酵素は誘導されている可能性が示唆された。BBR の類縁体である oxoberberine, berberrubine, *N*-methylcanadine, palmatine を化学合成し、これらを基質として休止菌体反応による分解を調べた。その結果、BBR で誘導した休止菌体において、berberrubine, *N*-methylcanadine, palmatine の分解が見られ、palmatine については生育基質であることを確認した。

Berberine, Sphingobium

講演番号：3A10a17
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ A 校舎 10 会場

ビフェニルジオキシゲナーゼサブタイプ複合型の細菌触媒によるポリ塩化ビフェニル類の分解
Degradation of polychlorinated biphenyls by bacterial catalyst with engineered multi-biphenyl dioxygenases.
○西山 亜紀[1]、高塚 由美子[2]、片倉 苑香[2]、大場 好弘[2]、原 富次郎[2] ([1]山形大工、[2]山形大院理工)
○Aki NISHIYAMA[1], Yumiko TAKATSUKA[2], Sonoka KATAKURA[2], Yoshihiro OHBA[2], Tomijiro HARA[2] ([1]Yamagata Univ., [2]Grad. School of Science & Engineering, Yamagata Univ.)

【背景と目的】 ポリ塩化ビフェニル類(PCBs)は生体毒性を示す難分解性有機塩素化合物の一つで、209 種類もの異性体が存在する。微生物による PCBs 分解は有効な無害化方法の１つとして様々に検討されてきたが、単一株で全ての PCBs を分解することは困難と結論付けられている。我々は、細菌由来で PCBs 分解の初発に働く多様なビフェニルジオキシゲナーゼ(BDO)の基質選択性に着目し、山形県米沢市周辺の環境から単離した高活性な新規株 *Comamonas testosteroni* YU14-111(2012 年度本大会で報告)を含む 200 株以上の PCBs 分解細菌の中から、異性体分解特性の異なる複数株を選抜し複合化することでの高効率な分解について試行を重ねた。その結果、ビフェニル-2,3-ジオキシゲナーゼ(2,3-BDO)を産生するも分解特性が異なる菌株を人工的に複合した複合微生物触媒により、広範囲の異性体を協調的に分解できること、また、菌株の複合比率を変化させることで分解率を正へも負へも制御できることを見出した。具体的には、自然環境下において有機栄養物に対する反応性が高い *C. testosteroni* と低反応性の *Rhodococcus* sp.を複合した場合、最も高い PCBs 分解率(85%)を得られた複合比は 8:2 だった。だが分解率向上には成功したものの、2,3-BDO では分解不可能な異性体の残存に課題が残った。この解決にはさらなる BDO の多様性が重要と考えたため、今回、2,3-BDO とは明確に基質選択性が異なるビフェニル-3,4-ジオキシゲナーゼ(3,4-BDO)を導入した遺伝子組換え大腸菌株を作製し、本菌株と野生型細菌株を複合した場合の PCBs 分解特性について検証した。
【方法と結果】 *Burkholderia xenovorans* LB400 株の 3,4-BDO 活性を持つ BphA 遺伝子(*bphA1A2A3A4*、約 3.7 kbp)を pET-15b に挿入し、*E. coli* BL21(DE3)株を使用した大量発現系を構築した。発現条件検討から、低濃度の誘導剤で短時間処理すると最も活性があり、誘導 3 時間以上では発現量は増加するが活性は逆に低下することが判明した。サブユニット４種の発現量比が重要な可能性を疑った。最適な誘導菌体を用いた微生物触媒は、市販 PCBs カネクロール KC-300(5 ppm)を 24 時間で 80%以上分解し、2,2',5,5'-四塩化ビフェニル等が完全に消失したことから 3,4-BDO の異性体分解特性を確認した。初発分解酵素で 3,4-BDO のみ保有する本組換え菌株と、2,3-BDO 以下全ての分解代謝酵素を保有する *C. testosteroni* の複合微生物触媒での KC-300(5 ppm)分解率は複合比率により変化し、濁度比 8:2 で 97%と極めて高い分解活性を示した。BDO の基質選択性と発現量(比活性)とが異なる細菌株を最適な量比で複合することで、高効率な PCBs 分解を実現できることが示唆された。各菌株の BDO 発現量(比活性)の差異と複合比・分解率との相関、及び分解代謝産物について、現在解析中である。

biphenyl dioxygenase, polychlorinated biphenyls, bacterial catalyst

講演番号：3A10p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ A 校舎 10 会場

出芽酵母細胞壁成分β-1,6-グルカン合成関連タンパク質 Kre9 の解析
Analysis of the Kre9 protein involved in the biosynthesis of the cell wall ß-1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*
○林田 光弘、野田 陽一、依田 幸司（東大院・農生科・応生工）
○Mitsuhiro HAYASHIDA, Yoichi NODA, Koji YODA (Tokyo Univ.)

【目的】細胞壁は浸透圧に対する抵抗性や、細胞の形態維持に関与し、真菌の生育に必須である。出芽酵の細胞壁はマンナンタンパク質、β-1,3-グルカン、β-1,6-グルカン、キチンから成る。キチンとβ-1,3-グルカンは細胞膜の合成酵素により合成されることが分かっているが、β-1,6-グルカンがどのように合成されるかについては不明である。だが、β-1,6-グルカン合成に関与する遺伝子は、β-1,6-グルカンをリセプターとして細胞膜に穴を空ける K1 killer toxin にβ-1,6-グルカン減少に伴い耐性を示す変異体から見つかっている。これらの遺伝子は *KRE* (K1 killer toxin resistant)と命名されている。*KRE*遺伝子の一つに *KRE9* があり、*KRE9* の遺伝子産物である Kre9 がどのようにβ-1,6-グルカン合成に関与しているか明らかにすることを本研究の目的としている。
【方法と結果】染色体上の *KRE9* を置換することで Kre9 の C 末端に 3HA を付加した Kre9-3HA を染色体より発現させる形質転換体を取得した。Kre9-3HA 発現株の K1 killer toxin 感受性に影響はなく、Kre9 に 3HA を付加したことでその機能に影響を及ぼさないことを確認した。細胞内の Kre9-3HA の局在をショ糖密度勾配遠心と間接蛍光抗体法で調べた結果、Kre9-3HA は小胞体に多く局在することが示唆された。また、間接蛍光抗体法で観察した結果出芽部位にも多く Kre9-3HA が検出されていた。この結果から、ER に多く局在し間接蛍光観察で出芽部位に検出される Kre6 と相互作用することが予想され、免疫沈降法により相互作用を確かめた。その結果 Kre9-3HA と Kre6 が相互作用することが明らかになった。さらにウェスタンブロットにおいて野生株の Kre6 はリン酸化と脱リン酸化状態として検出されるが、Kre9-3HA と相互作用する Kre6 は脱リン酸化状態のみの Kre6 であった。また、*kre9*Δ株における Kre6 は脱リン酸化状態のみであり、Kre6 のリン酸化には Kre9 が必要であることが示唆された。

β-1,6-glucan, cell wall, protein

講演番号：3A10p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ A 校舎 10 会場

出芽酵母小胞体からの膜タンパク質の選択的輸送機構の解析
Study on the mechanism of selective protein transport from the endoplasmic reticulum in Saccharomyces cerevisiae.
○藤井 聖也、野田 陽一、依田 幸司（東大院・農生科・応生工）
○Shoya Fujii, Yoichi Noda, Koji Yoda (Department of Biotechnology, University of Tokyo)

【目的】COPII 小胞に存在する膜タンパク質（以下 COPII 膜タンパク質）は小胞体から搬出すべきタンパク質と結合して、タンパク質の選択的輸送を行う。しかしどの COPII 膜タンパク質がその役割を担っているのかはまだ不明な点が多い。その理由の一つは複数の COPII 膜タンパク質によって輸送されるタンパク質が存在する場合、単独の遺伝子破壊では輸送に影響が出ない可能性があるためである。そのため本研究では COPII 膜タンパク質をコードする遺伝子の多重破壊株を作製し、この株を解析することで、より深く COPII 膜タンパク質の機能に迫ることを目的とした。
【方法】*Saccharomyces cerevisiae* の COPII 膜タンパク質をコードする遺伝子を相同的組み換えにより順番に破壊した。破壊の後に、使用した選択マーカー（*URA3*）の抜き出しを行い、同じマーカーを次の破壊に使い回した。これにより作成した多重遺伝子欠損株の表現型を解析し、同時に共焦点顕微鏡とショ糖密度勾配遠心により細胞内のタンパク質の局在を追跡した。
【結果】これまでに *svp26*、*erv41*、*erv46*、*erv14*、*erv29*、*emp46*、*emp47*、*got1* の 8 重破壊株の作製に成功した。破壊株は 4 重破壊（*erv14* まで）の時点で野生株と比べ生育速度の低下を示し、8 重破壊（*got1* まで）の時点でさらなる低下を示した。また 8 重破壊株は 16℃、37℃におけるコロニー形成能力を失っており、前者は他研究者の論文からおそらく *ERV14* の破壊が原因であることが推測されたが、後者の原因がどの遺伝子にあるかは不明だった。破壊した COPII 膜タンパク質の遺伝子をプラスミドで戻したところ、37℃での生育阻害は *ERV14* あるいは *GOT1* 遺伝子の導入によって回復した。したがってこれらの遺伝子の二重破壊が 37℃での生育阻害の原因であることが強く示唆された。
抗体を使用して 8 重破壊株におけるタンパク質の局在を調べたところ、二つのタンパク質の局在に異常が見出された。一つはゴルジ体に局在するマンノース転移酵素の Mnn1、もう一つは細胞膜に局在する GPI アンカー型タンパク質の Gas1 である。Δ8 ではこれらのタンパク質の一部が ER に蓄積していた。Mnn1 については ER からの輸送を担う因子は過去に報告されていなく、また個々の遺伝子の単独破壊株では正常な局在を示していた。Gas1 については輸送因子が COPII 膜タンパク質の一つである Emp24 であることが報告されていたが、今回破壊した 8 個の遺伝子の中には含まれていない。解析の結果、Gas1 は *ERV14* の破壊によって ER からの搬出が遅延していることが示された。本研究により、複数の COPII 膜タンパク質が同一のタンパク質の輸送に関与している可能性が示された。

Protein transport, Endoplasmic reticulum, Saccharomyces cerevisiae

講演番号：3A10p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ A 校舎 10 会場

分裂酵母ロンボイドプロテアーゼの役割と切断機構の解析

Analysis of roles and catalytic mechanisms of rhomboid protease in fission yeast

東 玲那[1]、渋谷 大介[1]、竹川 薫[2]、田淵 光昭[1]、○田中 直孝[1] ([1]香川大・農・応用生物、[2]九大院・農・生物機能)
Reina AZUMZ[1], Daisuke SHIBUTANI[1], Kaoru TAKEGAWA[2], Mitsuaki TABUCHI[1], ○Naotaka TANAKA[1] ([1]Kagawa Univ., [2]Kyushu Univ.)

ロンボイドプロテアーゼ（以下、ロンボイド）は膜内セリンプロテアーゼであり、基質である膜タンパク質の膜貫通領域を切断する。様々な膜内で機能することが報告されているが、ゴルジ体局在のロンボイドについては、ショウジョウバエの増殖因子の遊離に関与している報告のみであり、真核微生物においても報告はない。そこで本研究では、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* のゴルジ体膜に局在するロンボイド（Rob1、Rob2 (Rhomboid)）の機能解析と基質の同定、基質の切断機構の解明を目的とした。

破壊株を単離し、種々の表現型を確認した結果、Rob1 は細胞内の亜鉛・コバルトの恒常性や、ゴルジ体における液胞タンパク質の選別輸送、液胞融合の過程、コロニーの凝集性に関与していることが示唆された。また、Rob1 に保存されている様々なモチーフに変異導入を行った結果、127 番目のセリンが活性中心であることが示唆され、Rob1 はロンボイドとしてゴルジ体で多面的に機能していることが分かった。

また近年、ロンボイドの基質には特定のアミノ酸配列（基質認識モチーフ）が存在することが明らかになり、分裂酵母はこのモチーフを有する一回膜貫通タンパク質が 24 個存在していた。複数回膜貫通タンパク質にも解析の範囲を広げ、基質認識モチーフを有する膜 2 回貫通タンパク質の一つであるゴルジ体膜結合型転写因子 Sre2 の細胞内局在を確認した結果、*rob1*Δ株のみで、核への移行が確認できなかった。さらに、Sre2 の基質認識モチーフに変異導入を行った結果、P1 位に変異導入した GFP-Sre2 S705P のみが核局在を示さず、ウェスタンブロッティングによる分子量の確認により、Sre2 の P1 位における切断には Rob1 が関与していることが明らかになった。

さらに、ER においてタンパク質の品質管理に関与しているヒトのロンボイドである RHBDL4 の C 末端領域には、ユビキチンと相互作用するモチーフ（Ubiquitin-interacting motif (UIM)）が保存されていることが報告された。この UIM が Rob1 の C 末端領域にも保存されているかどうか調べたところ、類似のアミノ酸が保存されていたため、変異導入を行った。その結果、227 番目のロイシンが Sre2 の切断に必須であることが分かった。これらの結果からゴルジ体膜のロンボイドはユビキチンと連関してプロテアーゼ活性が制御されている可能性が示唆された。

fission yeast, rhomboid protease, Golgi apparatus

講演番号：3A10p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ A 校舎 10 会場

ジスフェリンドメインのみからなる出芽酵母 Spo73 の機能解析
Functional analysis of a dysferlin domain protein, Spo73, in *Saccharomyces cerevisiae*
○奥村 祐哉[1]、中村 毅[1]、井上 一朗[1]、田中 貴之[1]、須田 恭之[2]、舘川 宏之[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]理研・光量子工学研究領域・ライブセル分子イメージング)
○Yuya OKUMURA[1], Tsuyoshi NAKAMURA[1], Ichiro INOUE[1], Takayuki TANAKA[1], Yasuyuki SUDA[2], Hiroyuki TACHIKAWA[1] ([1]Tokyo Univ., [2]RIKEN)

出芽酵母は栄養飢餓状態になると、第一および第二減数分裂を行い、二倍体の細胞内に一倍体の胞子を 4 個生成する。この胞子形成の過程で、第二減数分裂時、紡錘極体近傍で輸送小胞が融合することにより、前胞子膜と呼ばれる新規二重膜構造が 4 つ形成される。前胞子膜は、笠状の膜構造として出現し、その後、小さな球状構造となる。更に進むと、細胞質やオルガネラを取り込む様に、カシューナッツ状（楕円状）に伸長する。最後に前胞子膜はその伸長末端が閉鎖して大きな球状へと変化し、胞子の前駆体となる。このように前胞子膜形成は、新規の膜構造が独特の形態変化を示し、新しく産生された細胞の形の基となるため、生体膜の形成過程のモデルとして考えることができる。

当研究室では、前胞子膜マーカーを用いたヴィジュアルスクリーニングにより、前胞子膜の形態変化に異常をきたす変異株として *spo73* 破壊株を取得した。この破壊株において前胞子膜は形成されるものの、カシューナッツ状に伸長しなくなる。Spo73 は肢帯型筋ジストロフィー原因遺伝子である Dysferlin 、Myoferlin に保存された機能未知の Dysferlin ドメインのみからなる 143 アミノ酸のタンパク質である。本研究では、Spo73 の機能解析を行った。

電子顕微鏡観察を行った結果、*spo73* 破壊株では、前胞子膜の膜間で小胞が蓄積されて形成される MVB (multivesicular body) 様の、野生株では見られない構造体が確認された。このことから Spo73 は前胞子膜が正常な膜構造を保つのに必要であると考えられる。局在を調べた結果、Spo73 は前胞子膜に局在し、更にその局在に必要な正電荷のアミノ酸部位を同定した。当研究室では既に、遺伝子破壊株が *SPO73* と同じ様な表現型を示す *SPO71* を取得している。Spo73 の局在は、*SPO71* の欠損によって影響を受けなかったが、前胞子膜に局在できない変異型 Spo73 の局在は、Spo71 の過剰発現により前胞子膜へと回復した。さらに、two-hybrid 解析を行った結果、Spo71 の 1 つ目の PH (Pleckstrin homology) ドメインと Spo73 が結合することが判明した。以上より Spo73 は前胞子膜上で Spo71 と相互作用してその伸長において働くことが示唆された。現在、他の遺伝子との関係や脂質との結合性について検討を行っている。今後、Spo73 のさらなる解析により Dysferlin ドメインのもつ機能を解明したい。

sporulation, prospore membrane, Dysferlin

講演番号：3A10p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ A 校舎 10 会場

出芽酵母の胞子形成に必須な PP1 ターゲティングサブユニットの解析

Analysis of targeting subunit of PP1 required for sporulation of Saccharomyces cerevisiae.

○沼尻 祐未、井上 一朗、舘川 宏之（東大院農生科・応生化）
○Yumi Numajiri, Ichirou Inoue, Hiroyuki Tachikawa (Tokyo Univ.)

出芽酵母の胞子は、前胞子膜という新規二重膜構造の形成とその段階的な伸長を経て、膜間に細胞壁が合成されるという形態形成の過程をたどる。以前の研究で、胞子形成時特異的に発現する Gip1 が、ターゲティングサブユニットとして Glc7 と複合体を形成し PP1(Protein Phosphatase type1）として機能していることが明らかにされた。Glc7 は出芽酵母の PP1 において唯一のカタリティックサブユニットであり、様々なターゲティングサブユニットタンパク質と PP1 を形成し多様な機能を果たすことが知られている。また、*gip1* 破壊株では段階的な膜伸長が行われず胞子形成不全であるため、この PP1 複合体は膜伸長に必須であることが明らかにされた。しかし、PP1 の膜伸長における機能は全く不明であり、これを解明することは、リン酸化および脱リン酸化を介した生体膜の形態形成の制御の理解につながると考える。

今回、我々は Gip1-GFP の観察により、Gip1 が胞子形成の進行とともに局在を変えていることを明らかにした。さらに Gip1 の局在化機構および機能ドメインを知るために、N 末端および C 末端の一部を欠失させた Gip1 部分欠失株や点変異導入株を用いて細胞内局在の観察および胞子形成率の測定を行った。その結果、Gip1 の膜局在に必須な２つのαヘリックス、セプチンバー状局在あるいは前胞子膜伸長の機能に必須なドメインをそれぞれ同定した。その他 Two-hybrid assay による Gip1 の相互作用タンパク質同定など、さらなる解析を行っている。本研究を通じ、PP1 による膜の形態形成の制御の分子機構の一端を明らかにした。

Saccharomyces cerevisiae, sporulation, Protein phosphatase type1

講演番号：3A10p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ A 校舎 10 会場

花粉アレルゲンと相同性をもつ分裂酵母胞子壁タンパク質 Isp3 の解析

The fission yeast spore is coated by a proteinaceous surface layer comprising mainly Isp3, a pollen allergen-homologous protein

○福西 加奈[1]、宮首 佳奈[1]、畠中 内子[1]、大鶴 なつみ[1]、平田 愛子[2]、下田 親[1]、中村 太郎[1]([1]大阪市大院理、[2]東大院新領域)
○Kana FUKUNISHI[1], Kana MIYAKUBI[1], Mitsuko HATANAKA[1], Natsumi OTSURU[1], Aiko HIRATA[2], Chikashi SHIMODA[1], Taro NAKAMURA[1] ([1]Osaka City Univ., [2]Tokyo Univ.)

分裂酵母の胞子は、凸凹とした非常に強固な胞子壁で覆われている。胞子壁はストレス耐性に重要な構造である。我々は、胞子壁の表層に大量に存在するタンパク質として、Isp3 を同定した。Isp3 はプロリンが 5 つ連続した配列、続いて塩基性アミノ酸、酸性アミノ酸に富む領域、さらに C 末端にはホソムギ(*Lolium perenne*)の花粉アレルゲンと類似した配列などの特徴的な配列を含んでいた。*isp3*+を破壊しても、栄養増殖、減数分裂のどちらにも影響がみられず、胞子の形状にも変化はなかった。しかし、*isp3Δ*の胞子は、熱、エタノール、消化酵素などのストレスに対する耐性が著しく低下した。また、蛍光顕微鏡及び電子顕微鏡による解析により、Isp3 は胞子の最表層で、電子密度の高い構造として観察された。以上のことから、分裂酵母の胞子は Isp3 を主としたタンパク質性の層に覆われ、この構造が胞子にストレス耐性を与えるのに重要な役割を果たしていることが明らかになった。

yeast, pollen, cell wall

講演番号：3A10p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ A 校舎 10 会場

出芽酵母を用いたホスファチジルエタノールアミンのオルガネラ間輸送に関する解析
The Interorganellar Transport of Phosphatidylethanolamine in *Saccharomyces cerevisiae*
○水池 彩[1]、小林 新吾[1]、堀内 裕之[1]、太田 明徳[2]、福田 良一[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]中部大・応生・応生化)
○Aya MIZUIKE[1], Shingo KOBAYASHI[1], Hiroyuki HORIUCHI[1], Akinori OHTA[2], Ryouichi FUKUDA[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Chubu Univ)

生体膜の主要構成成分の一つであるホスファチジルエタノールアミン(PtdEtn)は、ミトコンドリアの機能に重要な役割を担っている。出芽酵母において、ミトコンドリアの PtdEtn は、小胞体から運び込まれたホスファチジルセリンを Psd1p により脱炭酸して合成される。この Psd1p を欠失するとミトコンドリア内の PtdEtn 量が低下して呼吸機能欠損が生じるため、*PSD1* の破壊株はグリセロールや乳酸などの非発酵性炭素源を資化することができない。酵母はエタノールアミンからケネディ経路を介して小胞体膜上で PtdEtn を合成することもできるが、*PSD1* 破壊株の非発酵性炭素源の資化能欠損がエタノールアミンの添加によって抑圧されることから、酵母内には他のオルガネラで合成された PtdEtn をミトコンドリアに輸送する機構が存在すると考えられる。しかしながら、このような PtdEtn のオルガネラ間の輸送機構については未解明である。
我々は、ミトコンドリアへの PtdEtn の輸送機構を明らかにすることを目的として、*PSD1* 破壊株の乳酸資化能欠損を高発現した場合に抑圧する遺伝子の探索を行い、解析を進めてきた。その結果、見出された遺伝子産物のうちの 1 つは、高発現すると細胞内およびミトコンドリアの PtdEtn 量が増加すること、また実際に細胞内で PtdEtn と結合していたことから、PtdEtn の輸送タンパク質として機能する可能性が考えられた。今回、本遺伝子産物が *in vitro* で人工リン脂質により作製したリポソームから PtdEtn を引き抜くことができることが示唆されたので報告する。

phosphatidylethanolamine, mitochondria, lipid transport

講演番号：3A10p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ A 校舎 10 会場

酵母を用いた小胞体からミトコンドリアへのステロールの輸送に関する解析
Sterol transport from endoplasmic reticulum to mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*
○田 スチ[1]、堀内 裕之[1]、太田 明徳[2]、福田 良一[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]中部大・応生・応生化)
○Siqi TIAN[1], Hiroyuki HORIUCHI[1], Akinori OHTA[2], Ryouichi FUKUDA[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Chubu Univ)

ステロールは、真核生物の生体膜を構成する主要な脂質の 1 つであり、様々なオルガネラ膜に含まれている。ステロールは小胞体で合成され、各オルガネラへ輸送される。また、ステロールの一部は小胞体上でステロールアシルトランフェラーゼによりアシル化されてステリルエステルとなり、脂質顆粒に貯蔵される。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、主要ステロールであるエルゴステロールはミトコンドリア膜にも含まれており、ミトコンドリアの形態等に重要であることが示されているが、小胞体で合成されたエルゴステロールがどのようにミトコンドリアに輸送されるのかは未解明である。この原因の 1 つとして、オルガネラ間のステロール輸送を簡単に測定、評価する系がないことが挙げられる。本研究では、エルゴステロールの細胞内輸送機構を解明することを目的として、小胞体からミトコンドリアへのエルゴステロール輸送を評価する系を構築した。

酵母のステロールアシルトランフェラーゼの欠損株において、ミトコンドリアにステロールアシルトランフェラーゼを局在させることができれば、小胞体で合成されたステロールがミトコンドリアへ送られてエステル化されることを指標に、ミトコンドリアへのステロール輸送を評価できると考えられた。そこで、酵母ステロールアシルトランフェラーゼをコードする *ARE1* および *ARE2* の破壊株において、細菌由来のステロールアシルトランスフェラーゼ SatA に、ミトコンドリアターゲッティングシグナルおよび膜貫通領域と EGFP を連結した融合タンパク質、Mito-SatA-EGFP を発現させた。Mito-SatA-EGFP は、酵母内で安定に発現した。また、Mito-SatA-EGFP の局在を蛍光顕微鏡観察および細胞抽出液のショ糖密度勾配遠心により解析したところ、Mito-SatA-EGFP はミトコンドリアに局在していた。さらに、*ARE1* と *ARE2* の二重破壊株において Mito-SatA-EGFP を発現させるとステロールエステルが検出されたことから、Mito-SatA-EGFP が酵母細胞内でステロールアシルトランスフェラーゼとして機能することが確認された。以上の結果から、この系により小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送を測定、評価できると期待された。

sterol, mitochondria, lipid transport

講演番号：3A10p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ A 校舎 10 会場

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた脂肪滴オートファジー分解の誘導機構解析
Analysis of induction mechanism of autophagic degradation toward lipid droplets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

○近藤 健史、前田 佑一郎、奥 公秀、阪井 康能（京大院農・応用生命）
○Takeshi KONDO, Yuichiro MAEDA, Masahide OKU, Yasuyoshi SAKAI (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景・目的】

脂肪滴は中性脂質を細胞内に貯蔵する細胞内小器官である。中性脂質がタンパク質を含むリン脂質一重膜に覆われた構造をもち、酵母から高等生物に至るまで真核生物において広く保存されている。脂肪滴および細胞内脂質の量制御を担う分子機構の解明は、バイオ燃料の高生産をはかる上でも重要である。脂肪滴の分解機構の一つとしてオートファジーが示唆されている。オートファジーは、細胞内成分の大規模な分解機構であり、細胞内構成成分を分解コンパートメントである液胞やリソソームへ輸送して分解する。一般にオートファジーは、飢餓条件において誘導される非選択的な分解機構として知られているが、近年、過剰なペルオキシソームや損傷したミトコンドリアなど、オルガネラ選択的オートファジーの存在も明らかとなってきた。脂肪滴においても選択的オートファジー（リポファジー）が示唆されているが、その分子機構には不明な点が多い。そこで、本研究では、出芽酵母を用いてリポファジーの誘導条件およびその分子機構の解明を目的とし、出芽酵母を用いたリポファジーの検出系構築・改良と、それによるリポファジー関連遺伝子のスクリーニングを行った。

【方法・結果】

脂肪滴の液胞内輸送および分解を検出するため、脂肪滴局在タンパク質を対象とした切断アッセイ系を構築した。脂肪滴局在タンパク質の一つである Srt1 と GFP との融合タンパク質を発現する酵母株を作製し、グルコース完全培地（YPD 培地）で培養後、GFP 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。その結果、野生型では融合タンパク質の分解産物が検出されたが、液胞内分解活性の著しい減少を示す *PEP4* 破壊株では検出されなかった。同様の結果が、別の脂肪滴局在タンパク質である Erg6 でも得られた。これらのことから、脂肪滴が液胞へ輸送・分解されることが強く示唆された。さらに、上記の融合タンパク質 GFP-Srt1 の分解を経時的に調べた結果、この分解が特に定常期初期に誘導されることが明らかとなった。現在、本検出系を用いて、酵母リポファジー経路に関わる新規遺伝子のスクリーニングを進めている。

autophagy, lipid droplet, yeast

講演番号：3A10p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ A 校舎 10 会場

出芽酵母液胞内プロテアーゼ Atg15 の脂肪滴動態における役割り
The role of vacuolar lipase Atg15 for lipid droplet dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*
○前田 佑一郎、奥 公秀、阪井 康能 (京大院農)
○Yuichiro MAEDA, Masahide OKU, Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ.)

（背景）
脂肪滴は酵母からほ乳類に至るまで保存されているオルガネラであり、トリアシルグリセロール、ステロールエステルといった中性脂質を貯蔵している。長らく、エネルギー貯蔵以外には役割りがないと考えられてきたが、近年、脂肪滴の生理的な機能が明らかになってきている。特に、ほ乳類においては、脂肪滴動態とオートファジーの関わりが研究されてきているが、未だ不明な点が多い。そこで、本研究では、真核生物のモデル生物である出芽酵母を用いてオートファジーと脂肪滴動態の関わりについて研究を行うことにした。
これまでに当研究室において、オートファジー関連遺伝子破壊株と脂肪滴動態との関連について調べてきた。オートファジーに関わる遺伝子の中でも *ATG15* 破壊株において顕著に脂肪滴が減少することを見出した。Atg15 は中性脂質を分解するリパーゼモチーフをもっており、飢餓時にオートファジーによって液胞内に運ばれるリン脂質二重膜からなるオートファゴソームを分解することが明らかになっている。
（方法）
最初に、液胞内で Atg15 のリパーゼ活性に必要かどうかを種々の変異体を用いた実験を行い検討した。また、オートファジーとの関連性について、*ATG15* と他のオートファジー関連遺伝子との二重破壊株においても Atg15 による脂肪滴の減少が引き起こされるかどうかを検討した。
（結果）
脂肪滴の形成にはオートファゴソームが液胞内に運ばれること、ならびに Atg15 の液胞内でのリパーゼ活性が必要であるということが明らかになった。

Lipid droplet, Lipase, Autophagy

講演番号：3A10p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ A 校舎 10 会場

メタノール資化性酵母の窒素源変化に伴うオートファジーの役割
The role of autophagy in response to nitrogen sources in the methylotrophic yeast
○白石 晃將、奥 公秀、由里本 博也、阪井 康能（京大院農・応用生命）
○KOSUKE SHIRAISHI, MASAHIDE OKU, HIROYA YURIMOTO, YASUYOSHI SAKAI (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】
酵母はタンパク質、アミノ酸あるいはアンモニア等の様々な化合物を窒素源として利用可能である。酵母における多様な窒素源利用のメカニズムは、そのトランスポーターや代謝酵素の遺伝子発現制御及び生化学的性質について多くの知見が得られている。しかし一方で、利用可能な窒素源の変化における代謝酵素群の動態についてはほとんど知られていない。本研究では、葉上に存在する硝酸を窒素源として利用するメタノール資化性酵母 *Candida boidinii* を用いて、硝酸から他の各種窒素源への培地変化に伴う、硝酸レダクターゼ（Ynr1p）の発現とその細胞内局在を調べた。
【結果】
蛍光タンパク質 Venus と Ynr1 との融合タンパク質 Venus-Ynr1 を Ynr1 自身のプロモーター制御で発現する株を作成した。ウエスタンブロッティングによりその発現を調べたところ、硝酸培地からアンモニウムやメチルアミンなどを窒素源とする培地にシフトした 6、12 時間後に Venus 単体とほぼ同じサイズを示すバンドが確認され、Venus-Ynr1 が分解を受けていることが強く示唆された。この時間にサンプリングした細胞を蛍光顕微鏡観察に供すると、Venus の蛍光が液胞に拡散している様子が観察された。一方、オートファジー不能株である *atg1Δ* 株、*atg11Δ* 株では Venus の遊離バンド、Venus の液胞への細胞内局在のどちらも見られなかった。さらに、硝酸からメチルアミンを含む培地へ細胞を移したところ、Cvt 経路の基質であるアミノペプチダーゼ 1（Ape1p）と Ynr1p が共局在することが分かった。これらより、Ynr1p がオートファジーの基質となることを見出し、選択的オートファジー経路の一つである Cvt 経路により液胞へと運ばれることが示唆された。

methylotrophic yeast, nitrate reductase, autophagy

講演番号：3A10p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ A 校舎 10 会場

酵母液胞アミノ酸トランスポーターAvt4 の N 末端親水性領域に存在する保存配列の機能

The role of conserved sequences in the N-terminal hydrophilic region of a vacuolar amino acid transporter Avt4 in *Saccharomyces cerevisiae*

○佐藤 有美香[1]、石本 晶也[1]、本藤 加奈[1]、河田 美幸[1,2]、関藤 孝之[1]、柿沼 喜己[1,2]（[1]愛媛大農、[2]愛媛大 INCS）
○Yumika Sato[1], Masaya Ishimoto[1], Kana Hondo[1], Miyuki Kawano-Kawada[1,2], Takayuki Sekito[1], Yoshimi Kakinuma[1,2] ([1]Ehime Univ., Fac. Agr., [2]Ehime Univ., INCS)

（目的）出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の AVT トランスポーターファミリーに属する Avt3 と Avt4 は、液胞からの中性アミノ酸全般の排出に重複して機能する。さらに Avt4 は窒素飢餓条件において液胞内に蓄積した塩基性アミノ酸の排出に重要な役割を担うことが示唆されている。トポロジー予測により Avt4 の N 末端側に約 300 アミノ酸残基の長い親水性領域の存在が推定され、この領域内に他生物ホモログとのアラインメントより５つの保存配列（Ⅰ～Ⅴ）が見出された。本研究ではこれら保存配列の機能について解析を行った。

（方法）SD+CAS 培地（2% glucose, 0.5% casamino acid, 0.5% ammonium sulfate, 0.17% YNB w/o amino acids and ammonium sulfate, 20 mg/L tryptophan）で対数増殖初期まで培養した細胞を栄養豊富条件試料とし、これを SD-N 培地（2% glucose, 0.17% YNB w/o amino acids and ammonium sulfate）に移しさらに６時間培養した細胞を窒素飢餓条件試料とした。液胞画分は銅処理により調製し、アミノ酸自動分析装置でアミノ酸組成を解析した。液胞膜小胞はフィコールを用いた超遠心分画により単離し、0.1 mM ^{14}C 標識アミノ酸条件下で ATP 依存的な輸送活性を測定した。

（結果・考察） N 末端保存配列欠損変異型 Avt4（Avt4-ΔI、Avt4-ΔII、Avt4-ΔIII、Avt4-ΔIV、Avt4-ΔV）の GFP 融合タンパク質は、いずれも野生型 Avt4（Avt4-WT）とほぼ同じ細胞内レベルで、*avt3*Δ*avt4*Δ株の液胞膜に局在した。窒素飢餓条件における液胞内塩基性アミノ酸は、Avt4-WT および Avt4-ΔV の発現により顕著に減少したが、Avt4-ΔI、Avt4-ΔII、Avt4-ΔIII、Avt4-ΔIV の各変異型 Avt4 発現株では減少が抑制された。また中性アミノ酸含量においても同様の傾向が見られ、保存配列 I、II、III、IV がそれぞれ Avt4 機能に促進的に作用することが示唆された。一方、栄養豊富条件での液胞内塩基性／中性アミノ酸含量が Avt4-ΔV 発現により Avt4-WT 発現株よりも大幅に減少した。また保存配列 V の 14 アミノ酸残基のうち保存度の高いアミノ酸残基のアラニン置換変異型 Avt4 の発現でも同様にアミノ酸含量が大きく減少した。さらに Avt4-ΔV 発現株より単離した液胞膜小胞は ATP 依存的なアルギニン取り込みが低下し、アラニン排出が増加した。これらの結果は保存配列Ⅴが液胞からのアミノ酸排出に抑制的に作用することを示唆する。保存配列 I、II、III、IV 全てを欠損した Avt4-Δ200 発現株は液胞内アミノ酸含量が増加したのに対し、さらに保存配列 V を欠損した Avt4-Δ200ΔV の発現株は Avt4-ΔV 同様に液胞内アミノ酸含量が減少した。この結果は、保存配列 V の欠損による抑制解除作用は他の保存配列の欠損効果に対してドミナントであることを示唆している。

transporter, *Saccharomyces cerevisiae*, vacuole

講演番号：3A10p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ A 校舎 10 会場

リジン添加による出芽酵母生育阻害に伴う細胞内アミノ酸組成の変化とその分子機構

Change of intracellular amino acid composition in *Saccharomyces cerevisiae* during growth inhibition by addition of lysine to the medium

○村尾 奈美[1]、山口 翔吾[1]、河田 美幸[1,2]、関藤 孝之[1]、柿沼 喜己[1,2]（[1]愛媛大農、[2]愛媛大 INCS）
○Nami Murao[1], Shogo Yamaguchi[1], Miyuki Kawano-Kawada[1,2], Takayuki Sekito[1], Yoshimi Kakinuma[1,2] ([1]Ehime Univ., Fac. Agr., [2]Ehime Univ., INCS)

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 細胞内の塩基性アミノ酸（リジン・アルギニン・ヒスチジン）はその 70-90%が液胞内に蓄積し、窒素飢餓条件で液胞からサイトゾルへと排出される。我々は液胞膜トランスポーターAvt4 が液胞から塩基性アミノ酸を排出することを見出した。一方 *AVT4* 遺伝子欠損株 *avt4*Δは窒素飢餓条件において野生株と同様の生存率を示し、顕著な表現型の違いを示さない。*S. cerevisiae* はプロリンを窒素源とした培地にリジンを添加すると生育が阻害されることが報告されている。本研究ではこのリジンによる生育阻害と液胞リジン蓄積との関連性について検討するためリジン添加に伴う生育と、細胞内アミノ酸含量の変化を野生株と *avt4*Δ株を用いて解析した。
【方法】*S. cerevisiae* 野生株および *avt4*Δ株は *URA3* プラスミド導入後 SD+CA 培地（0.17% yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate, 0.5% casamino acids, 0.5% ammonium sulfate, 2% glucose, 20 mg/L tryptophan）で対数初期まで培養し、SD+Pro 培地（0.17% yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate, 2% glucose, 10 mM proline）もしくは SD+Pro 培地にリジン（記述のない場合は終濃度 0.1 mM）を添加した SD+Pro+Lys 培地に移し生育および細胞内アミノ酸含量を調べた。
【結果と考察】 0.3 mM リジン添加 SD+Pro+Lys 培地では野生株と *avt4*Δ株ともに生育しなかったが、0.1 mM リジンを添加した場合、*avt4*Δ株のみ生育しなかった。また、0.05 mM リジン添加では両者とも生育したことから *AVT4* はリジン添加による生育阻害を部分的に抑制することが分かった。SD+Pro もしくは SD+Pro+Lys 培地での培養 6 時間目での細胞内のアミノ酸含量を調べたところ、両株とも SD+Pro 培地では細胞内のプロリン含量が増加したのに対し、リジンを添加するとプロリン含量が大幅に減少し、リジンの含量が増加した。さらに SD+Pro+Lys 培地で培養 1 日目、２日目、３日目でのアミノ酸組成を調べたところ、野生株では細胞内リジン含量が経時的に減少し、プロリン含量が増加したのに対し、*avt4*Δ株ではリジン含量の減少が抑制され、プロリン含量が低いままであった。これらの結果はリジン添加直後では野生株／*avt4*Δ株ともにプロリンの取り込みが阻害され、さらに長時間の処理では *avt4*Δ株において液胞からのリジンの排出が低下し、プロリンの細胞内への取り込みが抑制されたことを示唆する。プロリンの細胞内への取り込みに機能するトランスポーターGap1 および Put4 の GFP 融合タンパク質は野生株／*avt4*Δ株いずれにおいても SD+Pro 培地では細胞膜局在を示し、リジンを添加して 6 時間後には細胞膜局在が減衰し、液胞内への移行が見られた。液胞内リジン含量とトランスポーターの細胞内局在の関係について今後検討を進める予定である。

lysine, *Saccharomyces cerevisiae*, transporter

講演番号：3A10p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ A 校舎 10 会場

出芽酵母胞子形成過程における液胞アミノ酸リサイクルの役割について
The role of vacuolar amino acid recycling during sporulation process in *Saccharomyces cerevisiae*
○山中 敦詞[1]、刀根 潤一[1]、杉本 直子[1]、河田 美幸[1,2]、関藤 孝之[1]、柿沼 喜己[1,2] ([1]愛媛大農、[2]愛媛大 INCS)
○atsushi yamanaka[1], junichi tone[1], naoko sugimoto[1], miyuki kawada[1,2], takayuki sekito[1], yoshimi kakinuma[1,2] ([1]Ehime Univ.,Fac.Agr, [2]Ehime Univ.,INCS)

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 二倍体株は、酢酸等非発酵性炭素源存在下で窒素源が枯渇すると減数分裂を誘導し、胞子を形成する。オートファジー欠損株は胞子形成能をもたないことから、オートファジータンパク質分解によって液胞内に産生したアミノ酸が胞子形成過程で利用されることが示唆されている。我々は AAAP（Amino Acid/Auxin Permease）ファミリーに属する液胞アミノ酸排出系 Avt3、Avt4、Avt6 について調べた結果、一倍体株の解析ではこれらトランスポーターを欠損すると窒素飢餓条件での液胞内アミノ酸含量の減少が大幅に抑制されることを見出した。本研究ではこれらトランスポーターを欠損した二倍体株を単離し、胞子形成への影響を調べることにより、液胞内アミノ酸プールの生理的役割について検討を行った。
【方法】 *S. cerevisiae* SEY6210 株および SEY6211 株において *AVT3*、*AVT4*、*AVT6* 各遺伝子を薬剤耐性マーカーとの置換により破壊し、接合後、アデニンとリジンの欠損培地で二倍体株を選抜した。二倍体株を胞子形成培地（1% potassium acetate, 0.1% yeast extract, 0.05% glucose）にて培養し、経時的に顕微鏡画像より全体の細胞数と胞子を形成した細胞数を計測した。液胞画分は銅処理によって調製し、アミノ酸含量を自動アミノ酸分析計（日立 L8900）により測定した。発芽胞子数はザイモリエース処理後、胞子培地中の二倍体細胞を浸透圧破壊し、残った胞子数を血球計算板によって計測し、その後一定胞子数を YPD プレートに広げ、生えてきたコロニー数により計測した。
【結果・考察】胞子形成培地中での二倍体 *avt3*Δ*avt4*Δ*avt6*Δ株の生存率は二倍体野生株とほぼ同じであったが、胞子形成効率については、培養 3 日目の時点で野生株が約 55%だったのに対し、*avt3*Δ*avt4*Δ*avt6*Δ株は約 40%と有意に減少した。さらに 6 日目では野生株が約 65%まで増加したのに対し、*avt3*Δ*avt4*Δ*avt6*Δ株では胞子を形成した細胞数は増加しなかった。また一定数の胞子を YPD 培地に広げ、生えてきたコロニー数を計測したところ *avt3*Δ*avt4*Δ*avt6*Δ株のコロニー数は野生株の約半分と発芽効率が明らかに減少した。胞子形成培地での培養 1 日目での二倍体 *avt3*Δ*avt4*Δ*avt6*Δ株の液胞内アミノ酸含量は野生株よりも明らかに高く、*avt3*Δ*avt4*Δ*avt6*Δ株では液胞アミノ酸排出能が低下したと考えられた。以上の結果は液胞アミノ酸のリサイクルが胞子形成過程に重要な役割を果たすことを示唆する。今後は胞子形成過程に機能する因子の合成への影響について検討する予定である。

Vacuole, Sporulation, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：3A10p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ A 校舎 10 会場

Identification of vacuolar amino acid transporter from *Fusarium oxysporum*

○Siriporn LUNPROM[1], Pongsanat PONGCHAROEN[1], Miyuki KAWADA-KAWANO[2], Takayuki SEKITO[1], Koichi AKIYAMA[2], Yoshimi KAKINUMA[1,2] ([1]Ehime Univ. Agriculture, [2]Ehime Univ. INCS)

【Aims】

Regulation of amino acids concentration in cytosol is important for many biological processes such as protein synthesis, vegetative growth and differentiation of fungi. One of the regulation systems is accumulation of amino acids in vacuoles or export of amino acids from vacuole to cytosol. Such transport of amino acids is governed by vacuolar amino acid transporters. We have identified vacuolar amino acid transporters in the family of VBA and AVT of *Saccharomyces cerevisiae* and of *Schizosaccharomyces pombe*. *Fusarium oxysporum*, which is a phytopathogenic fungi causing wilt against various crops, also has orthologs of these amino acid transporters in the genome. We have indicated that the SpAVT3p of *Sch. pombe*, a vacuolar amino acid exporter, was related to spore formation. Because the virulence of *F. oxysporum* has been involved with many processes such as spore formation, germination, growth and differentiation in plant, the regulation of amino acid concentration is probably related to such processes. To clarify the function of vacuolar amino acid transporter in *F. oxysporum*, we try to identify AVT family of *F. oxysporum*.

【Methods and Results】

Blast search of genome database in *F. oxysporum* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/Fusarium group/MultiHome.html) revealed that *FOXG11334* was highly homologous to *AVT3* or *AVT4* of *S. cerevisiae*. To demonstrate whether the gene encodes vacuolar amino acid transporter or not, heterologous expression system by *S. cerevisiae* was constructed. *FOXG11334* gene was amplified from *F. oxysporum* (MAFF# 103054) genomic DNA by PCR methods, and cloned into p416-ADH plasmid. The plasmid was then transformed into *S. cerevisiae* strain in which *AVT1*, *AVT3* and *AVT4* genes were deleted (*avt1*Δ*avt3*Δ*avt4*Δ). After that, vacuolar amino acids were extracted by copper treatment methods and analyzed. The results showed that the vacuolar contents of amino acids such as proline, serine and alanine were decreased due to expression of *FOXG11334*. Next we examined the transport activity of these amino acids using vacuolar membrane vesicles isolated from the *avt1*Δ*avt3*Δ*avt4*Δ strain expressing *FOXG11334*. ATP-dependent extrusion of proline from the membrane vesicles pre-loaded with [^{14}C]-proline was significantly enhanced by the expression of *FOXG11334*. These results suggest that *FOXG11334* gene encodes one of a vacuolar amino acid transporter in *F. oxysporum*.

vacuolar amino acids, transporter, *Fusarium oxysporum*

講演番号：3A10p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ A 校舎 10 会場

ハンセヌラ酵母モリブデン輸送体の探索
Approaches for molybdenum transporters in Hansenura yeast
○中西 洋一、川嶋 輝美、前田 道子、鵜飼 杏奈、前島 正義（名大院生命農）
○ Yoichi NAKANISHI, Terumi KAWASHIMA, Michiko MAEDA, Anna UKAI, Masayoshi MAESHIMA (Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

モリブデン（Ｍｏ）は遷移金属元素の一種で、細胞内でいくつかの酸化還元酵素の活性中心として働き、炭素、窒素、硫黄の代謝経路を支えている。このためＭｏは生物にとって極々微量であるが欠かすことの出来ない超微量必須元素となっている。Ｍｏはモリブデン酸アニオン（MoO_4^{2-}）の形で膜輸送により細胞に取り込まれるが、その吸収システムは生物界によって異なる。原核生物ではＡＢＣ輸送体（ModABC）を介するのに対し、真核生物ではMOT1（高等植物、藻類）、MoT2（藻類、動物）など二次輸送体が担うとされるが、不明な点も多い。我々が実験材料にしている単細胞菌類のハンセヌラ酵母（*Hansenula polymorpha*）は、これまでの遺伝学的な解析から３つの異なる型のＭｏ吸収輸送システム（高親和性型、高速型、Ｍｏ誘導型）をもつと推定される。しかし、同酵母のドラフトゲノム解析では、上述分子群のオルソログと推定される分子は見出すことが出来なかった。そこで本研究では、ハンセヌラ酵母のＭｏ輸送体の同定を目指し、以下の研究をすすめた。

ハンセヌラ酵母Ｍｏ関連変異株（硝酸同化能変異株およびタングステン耐性株）で、遺伝子破壊ベクターでタグされる遺伝子配列を解析し、複数の変異株でタグされる領域を決定した。ドラフトゲノム情報を活用して周辺領域にある分子の機能を推定し、輸送体候補遺伝子を絞り込んだ。また、これと並行して無作為の発現スクリーニングも実施した。ハンセヌラ酵母ｃＤＮＡ発現ライブラリをＭｏ輸送能の低いパン酵母を宿主として作出し、これを細胞内Ｍｏ応答性のイーストスリーハイブリッドシステムを持つレポーター株と接合させて評価した。得られた候補遺伝子をクローニングし、パン酵母異種発現系や動物培養細胞ＨＥＫ２９３Ｔの異種発現系で強制発現させて、Ｍｏ輸送能を検討中である。

molybdenum, membrane transport, Hansenunla

講演番号：3A10p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ A 校舎 10 会場

麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー関連ステロール-グルコシルトランスフェラーゼ様遺伝子 *Aoatg26* の解析

Analysis of the autophagy-related sterol glucosyltransferase-like gene *Aoatg26* in *Aspergillus oryzae*

○菊間 隆志、田所 隆之、北本 勝ひこ（東大院農生科・応生工）
○Takashi KIKUMA, Takayuki TADOKORO, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】オートファジーにおける隔離膜伸長およびオートファゴソーム形成の分子機構は未だ謎が多く，またステロールグルコシルトランスフェラーゼをコードするオートファジー関連遺伝子 *ATG26* の機能はほとんどわかっていない。メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* PpAtg26 は，メタノール誘導性の大きなサイズのペルオキシソームのペキソファジーに関与するが，通常の大きさのペルオキシソームのペキソファジーには必須ではないことから，大きなサイズのオートファゴソーム形成に必要であると考えられている。一方，出芽酵母 *Sccharomyces cerevisiae* の *atg26* 破壊株は表現型を示さない。このように，Atg26 は酵母においても種によって機能に差があり，一般的な生理機能はあまり解明されていない。本研究は，糸状菌である麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるオートファゴソーム形成機構解明を目的とし *Aoatg26* の機能解析を行った。

【方法・結果】*A. oryzae* において *Aoatg26* 遺伝子破壊株を作製し，表現型解析を行ったところ，気中菌糸および分生子形成が顕著に抑制された。これは *A. oryzae* におけるオートファジー欠損株の特徴的な表現型であることから，*S. cerevisiae* と異なり *Aoatg26* は非選択的オートファジーにも関与することが示唆された。そこでオートファジーのマーカータンパク質である EGFP-AoAtg8 を *Aoatg26* 破壊株に発現させ，観察したところオートファゴソーム形成が途中で停止した隔離膜の蓄積が観察された。また，Cvt 経路のカーゴである AoApe1-EGFP の *Aoatg26* 破壊株における挙動を観察した結果，比較的小さな基質の輸送経路である Cvt 経路は機能していることが示された。さらに *Aoatg26* 破壊株におけるペルオキシソーム，ミトコンドリアなどの選択的オートファジーについて解析したところ，ペキソファジーおよびマイトファジーの効率が低下した。以上より，AoAtg26 はオートファゴソーム形成に重要な役割を果たし，ペキソファジーのみならず，非選択的オートファジーやマイトファジーにも関与することが示唆された。

現在、*A. oryzae* で観察されるオートファジーによる丸ごとの核の分解を *Aoatg26* 破壊株において解析中である。

Aspergillus oryzae, autophagy, *ATG26*

講演番号：3A10p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ A 校舎 10 会場

麹菌　*A. oryzae* におけるオートファジー関連膜タンパク質 AoAtg9 の機能解析

Functional analysis of the autophagy-related membrane protein AoAtg9 in *Aspergillus oryzae*

○藤木 耕平、菊間 隆志、北本 勝ひこ（東大院農生科・応生工）
○Kohei FUJIKI, Takashi KIKUMA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】

オートファジーは二重膜構造を持つオートファゴソームを介して細胞内成分をリソソーム/液胞で分解する機構である。この機構は真核生物に広く保存されており, 栄養飢餓などのストレスに応答して誘導される。現在, オートファゴソーム形成過程でその膜成分がどこから来るのかについて議論されている中で, 近年 Atg9 が注目されている。Atg9 は Atg タンパク質の中で唯一の複数回膜貫通ドメインを持つタンパク質である。また, オートファゴソーム形成のために pre-autophagosomal structure(PAS)へ膜脂質を供給する役割を担っていると考えられており, オートファゴソーム形成に重要であるとされている。しかし, オートファゴソームの形成機構は未だ不明な点が多い。そこで本研究では, 糸状菌におけるオートファゴソーム形成の分子機構を明らかにするため, 麹菌 *Aspergillus oryzae* における AoAtg9 の機能解析を行った。

【方法と結果】

出芽酵母 *S. cerevisiae* の *ATG9* のホモログである *Aoatg9* 破壊株を作製し, 寒天培地における生育を観察したところ, 気中菌糸形成の抑制, 分生子数の著しい減少といった *A. oryzae* におけるオートファジー欠損本来の特徴的な表現型を示した。また, オートファジーのマーカータンパク質である AoAtg8 の EGFP 融合タンパク質を *Aoatg9* 破壊株に発現させ, 窒素飢餓条件で観察したところ, 液胞への取り込みが観察されなかった。これらの結果より, AoAtg9 が *A. oryzae* においてオートファジーに必須であることが分かった。AoAtg9 の局在を調べるため AoAtg9-EGFP を発現させ, 観察を行ったところ, 大きいドットと小さいドットが細胞質中に存在し, 小さいドットが微小管依存的に動いていることが分かった。また, 窒素飢餓条件で液胞膜及び液胞内に蛍光が観察された。さらに AoAtg9-EGFP と mDsRed-AoAtg8 を共発現し, 局在観察を行ったところ, オートファジー誘導条件下において一部の AoAtg9 が AoAtg8 のドット状構造, リング状構造に共局在していた。この結果より, 一部の AoAtg9 が PAS 及びオートファゴソーム膜に局在していることが示唆された。他の AoAtg タンパク質との関与を調べるため, 様々な *Aoatg* 破壊株において AoAtg9 の局在を調べたところ, *Aoatg1* 破壊株において AoAtg9 が PAS に蓄積していた。この結果より, AoAtg9 の輸送に AoAtg1 が関与していることが示唆された。現在, AoAtg9 が隔離膜に局在しているかどうかを調べるために, AoAtg8 との共局在観察を進めている。

Aspergillus oryzae, autophagy, Atg9

講演番号：3A10p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ A 校舎 10 会場

AoLAH regulates position, movement and function of Woronin body in *Aspergillus oryzae*

○PEI HAN, FENG JIE JIN, JUN-ICHI MARUYAMA, KATSUHIKO KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

[Purpose] Woronin body is a Pezizomycotina-specific organelle observed near the septum, and it plugs the septal pore in response to cellular wounding. Previously, we characterized AoHex1 as the major protein of Woronin body in *Aspergillus oryzae*[1)], and investigated the Woronin body differentiation from the peroxisome[2)]. Recently, we characterized *Aolah* gene encoding a Woronin body tethering protein in *A. oryzae*[3)]. AoLAH was predicted to be a single polypeptide of 5,727 amino acids; it is composed of conserved N- and C-terminal regions and a long unconserved middle region. Deletion of *Aolah* gene caused disappearance of Woronin bodies near the septum and decreased the function to prevent the excessive loss of cytoplasm upon hyphal injury. We also found that AoLAH N-terminal and C-terminal regions function for Woronin body binding and tethering to the septum, respectively. However, the function of unconserved middle region of AoLAH has not been investigated. In this study, we attempt to further investigate the roles of AoLAH, especially its unconserved middle region, in regulating Woronin body position and function in *A. oryzae*.

[Results] When the middle region-deleted AoLAH was expressed in *Aolah* disruptant, Woronin bodies were found near the septum by transmission electron microscopy, which was due to the functions of AoLAH N- and C-terminal regions. However, Woronin bodies tethered by the middle region-deleted AoLAH had a shorter distance to the septum as compared with those tethered by the full-length AoLAH. Some of the Woronin bodies tethered by the full-length AoLAH displayed back-and-forth movement, which was not observed for those with the middle region-deleted AoLAH. This suggests that AoLAH middle region confers elasticity to the Woronin body movement. Expression of the middle region-deleted AoLAH in *Aolah* disruptant did not restore the decreased function to prevent the excessive loss of cytoplasm. These indicate that the unconserved middle region of AoLAH is involved in regulating the position and movement of Woronin bodies near the septum and it affects the Woronin body function to prevent the excessive loss of cytoplasm.

1) Maruyama *et al.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331:1081-1088.
2) Escaño *et al.* (2009) *Eukaryot. Cell* 8:296-305.
3) Han *et al.* (2013) *The Annual Meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry* 4B13a08.

Aspergillus oryzae, Woronin body, septum

講演番号：3A10p23
講演日時、会場：3 月 29 日 17:59～ A 校舎 10 会場

麹菌 *A. oryzae* における 2 つの acyl-CoA binding protein の局在及び機能解析

Localization and functional analysis of two acyl-CoA binding proteins in *Aspergillus oryzae*

○川口 航平、菊間 隆志、北本 勝ひこ（東大院農生科・応生工）
○Kouhei KAWAGUCHI, Takashi KIKUMA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】

多くの真核生物で報告されている特殊な分泌経路(unconventional secretion pathway)によるタンパク質分泌の一つとして、酵母においては、小胞体 - ゴルジ体を経由しない経路による acyl-CoA-binding protein(Acb1)の細胞外への分泌が報告されている。Acb1 は分泌シグナル配列を持たないタンパク質であるが、栄養飢餓条件で細胞外へ分泌される。その分泌機構にはオートファジー関連タンパク質などのタンパク質が必要とされる。酵母では特殊分泌経路の研究が行われているが、糸状菌においてはこの分泌経路の研究はほとんどなされていない。また、酵母を始めとする多くの生物種では ACBP (Acyl-CoA Binding Protein)モチーフを有するタンパク質は 1 つだけであるが，糸状菌の多くでは ACBP モチーフを持つタンパク質が 2 つ存在する。そこで、*Aspergillus oryzae* が有する 2 つの acyl-CoA-binding protein の機能を明らかにすること、糸状菌における特殊分泌経路を発見することを目的として本研究を行った。

【方法と結果】

Saccharomyces cerevisiae の Acb1 とのホモロジー検索により見出した遺伝子 *Aoacb1* と *Aoacb2* はそれぞれ 365 アミノ酸、143 アミノ酸をコードしており、*S. cerevisiae* の Acb1 と同様に、ACBP モチーフが保存されている。AoAcb2-EGFP 発現プラスミドを導入した株を取得して蛍光顕微鏡観察で観察したところ、AoAcb2-EGFP は細胞質全体に広く存在していることがわかった。通常の方法では *Aoacb2* 破壊株を得ることができなかったため、*thiA* プロモーター制御下で *Aoacb2* を発現させ、培地中にチアミンを添加して発現を抑制したところ、コロニー半径の減少が観察された。以前我々は、オートファジーを誘導する *Aoatg1*、オートファゴソーム形成に関与する *Aoatg4* や *Aoatg8* の破壊株では AoAcb1-EGFP が野生株よりも大きなドット状の構造を形成し、微小管依存的な移動を行わなくなることを示した。今回、オートファゴソームの膜脂質の供給源であると示唆されている *Aoatg9* の破壊株でも同様に、AoAcb1-EGFP が大きなドット上構造を形成することがわかった。一方、選択的オートファジーに関与する *Aoatg11* の破壊株では、AoAcb1-EGFP の局在の変化は見られなかった。これらの結果より、オートファゴソームが AoAcb1 の正常な局在に必要であることがさらに強く示唆された。現在、AoAcb1 と AoAcb2 が細胞外に分泌されているのかどうか、また、AoAcb1 が通常のオートファジー機構に関与するタンパク質なのかどうかについて解析を進めている。

Aspergillus oryzae, unconventional secretion, acyl-CoA binding protein

講演番号：3A11a01
講演日時、会場：3 月 29 日 09:00～ A 校舎 11 会場

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のセリンタイプカルボキシペプチダーゼ遺伝子におけるイントロン残存性の解析

The intron retention analysis of serine-type carboxypeptidase gene in *Aspergillus oryzae*

○石田 健、久保島 恵、森田 寛人、前田 浩、岡本 綾子、竹内 道雄、山形 洋平（東京農工大院・応生化）
○Ken ISHIDA, Megumi KUBOSHIMA, Hiroto MORITA, Hiroshi MAEDA, Ayako OKAMOTO, Michio TAKEUCHI, Youhei YAMAGATA (Department of Applied Biological Science, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【背景・目的】

オルタナティブスプライシング（AS）とは転写後の修飾過程の違いにより、同一の遺伝子から異なる mRNA が作られる現象を指す。高等真核生物では多くの遺伝子でプロテオームの多様性を増やす手段として AS が行われることが示されているが、真菌における AS の報告は限られている。本研究室の解析により、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のセリンタイプカルボキシペプチダーゼ遺伝子の1つ、*ocpG* 遺伝子において AS が起こることが示された。さらに、この遺伝子の成熟 mRNA 中にはイントロンの残存が起こったものが混在しており、その割合は培地成分依存的に変化することを明らかにした。 *ocpG* 遺伝子中には3つのイントロンが存在しているが、各イントロンで残存割合が異なっていた。本研究では、イントロンの配列もしくは位置がスプライシングに影響を与えていると推測し *ocpG* 遺伝子のイントロン配列のみを入れ替えた株を作製してスプライシングパターンを解析した。

【方法・結果】

ocpG 遺伝子欠損株をホストとして、*ocpG* 遺伝子の第1イントロン配列と第2イントロン配列の位置を入れ替えた株を作製した。スキムミルクを窒素源とした Czapek-Dox 液体培地でこの株を 24 時間培養し、得られた菌体から mRNA を精製し、 cDNA 合成を行なった。得られた cDNA を鋳型として *ocpG* 遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行なった。これらの PCR 産物をプラスミドに挿入してライブラリーを作製し、イントロン中に含まれる制限酵素サイトを利用した制限酵素処理または PCR によってスプライシングパターンを確認した。

解析の結果、 *ocpG* イントロン入れ替え株は野生型の*ocpG* 遺伝子とは異なるスプライシングパターンを示した。一般的に AS が生じる要因として、イントロンの塩基配列であるスプライシングシグナルと、 mRNA の分子内塩基対により形成される二次構造が考えられているが、*ocpG* イントロン入れ替え株は塩基配列に依存的なスプライシングパターンを示さなかった。そこでスプライソソームのイントロンへの結合を阻害しスプライシング効率に影響を与えると考えられる *ocpG* 遺伝子の mRNA の二次構造を予測し、同じスプライソソーム関連タンパク質に認識される3'スプライスサイトおよび分岐点の位置に着目した。その結果、これらの二次構造中の位置の変化とスプライシング割合の変化との間に関係性が見られた。

なお、本研究の一部は生研センター基礎推進事業の一環として行われたものである。

Aspergillus oryzae, intron retention, mRNA secondary structure

講演番号：3A11a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ A 校舎 11 会場

Aspergillus oryzae における 331-25 sense RNA, 331-25 antisense RNA の機能解析
Analysis of 331-25 sense RNA, 331-25 antisense RNA in *Aspergillus oryzae*
○辻井 雅、竹内 道雄、山形 洋平（東農工大・応生科）
○masaru Tsujii, michio Takeuchi, Youhei Yamagata (Dept. of Applied Biological Science, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【背景と目的】
黄麹菌の分生子及び発芽分生子の EST 解析の結果、 331-25 遺伝子領域から読み出される mRNA は分生子にのみ見出され、 528 の 分生子における EST のうち 43 回という高頻度で読まれた。前年度大会において、分生子では 331-25 sense RNA (sense RNA) と 331-25 antisense RNA (antisense RNA)の両方が転写されていること、及び 331-25 遺伝子破壊株とコントロール株の表現系に差異が無いことを報告した。[1)] そこで本研究では 331-25 遺伝子領域から転写され、分生子で最もよく発現している sense RNA 及び antisense RNA の機能を明らかにすることを目的とした。
【本発表の概要】
まず、RACE 法により、antisense RNA が複数の転写終結点で転写が終了した mRNA 様構造をもつ一群の約 1.7 kb の RNA であることが明らかとなった。さらに、RT-PCR によって、分生子、発芽分生子、菌糸において、 antisense RNA は複数のスプライシングバリアントを持つことが示された。また、定量 PCR によって、分生子、発芽分生子、菌糸における sense RNA、antisense RNA 存在量を調べたところ、いずれも分生子で存在量が多いことが確認された。さらに、Δ*brlA* 株を作製し、寒天培地で培養した菌体を分生子着生直前の菌体として、antisense RNA 存在量の比較を行ったところ、antisense RNA は僅かな存在量しか示さなかった。これらのことから、antisense RNA は分生子特異的な転写産物であると考えられた。さらに、分生子における sense RNA と antisense RNA の存在量の比較を行ったところ、 antisense RNA は sense RNA の 189 倍存在していることが示された。また、sense RNA、antisense RNA 両方の破壊株を作製して、表現系の観察を経時的に行ったところ、破壊株においてコロニー直径の縮小、分生子数の減少が観察された。また、発芽率を計測したところ、差異は見られなかった。このことから、331-25 遺伝子領域から転写される sense RNA、antisense RNA は分生子の発芽ではなく、形成、成熟に関与していることが推測された。分生子の乾燥に対する耐性など分生子の成熟に関わる項目の検討を行っている。また、両 mRNA がタンパク質として翻訳されるかどうかの検証を行っている。
1)日本農芸化学会 2013 年度大会 、辻井ら

Aspergillus oryzae, natural antisense trancript, conidia

講演番号：3A11a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ A 校舎 11 会場

Aspergillus oryzae のハイドロフォービン HypA の局在機構の解析
Localization analysis of hydrophobin HypA in *Aspergillus oryzae*
○早川 芙佑華、山川 結、石田 千絵、千代 優、水野 佑香、中島 春紫（明治大農）
○Fuyuka HAYAKAWA, Yui YAMAKAWA, Chie ISHIDA, Yu CHIYO, Yuka MIZUNO, Harushi NAKAJIMA (Meiji Univ.)

【背景・目的】
ハイドロフォービンはカビやキノコが分泌する低分子量(70～150 a.a.)のタンパク質であり、細胞外に分泌され、気中菌糸の表層で強固に自己集合し、菌体に撥水性を与える。1 つの菌株は相同性の低い複数のハイドロフォービン遺伝子を有しているが、その使い分けについてはほとんど解明されていない。

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* では、ハイドロフォービンをコードすると考えられる *hypA, B, C, D, E* の 5 つの遺伝子の存在が推定され、*hypA, B, C* についてはその発現を確認している。HypA, HypB は発現量が多く、撥水性などの表現型に影響を与え、HypA が分生子に HypB が菌糸に局在することを観察している。さらに、これまでの研究から HypA, Hyp はアミノ酸配列ではなく、プロモーター依存的に局在性が決定されることを見出している。本研究では HypA のみが特異的に分生子に局在する機構をプロモーター構造に焦点を当て解析を行った。

【結果・考察】
hypA プロモーターに蛍光タンパク質を連結し、麹菌に導入して発現解析を行ったところ、*hypA* プロモーターは分生子形成期に分生子で活性化されることが観察された。

そこで、*hypA* ORF 上流(-1200～0)の領域について欠失解析を行い、分生子特異的発現に関与する領域の解析を行なった。その結果、(-400～0)領域まで分生子特異的発現が保持されたが、(-200～0)領域では特異性が消失した。一方、(-1200～-400)領域では特異性が保持されていた。これより、部位特異的発現に寄与する領域は(-1200～-400)および(-400～-200) 領域に独立して存在すると考えられる。続いて、(-400～-200) 領域について 40 bp ずつ欠失解析を行なった。その結果、(-280～-200)領域に部位特異性に寄与する領域が存在することが示された。この 80 bp 内には分生子形成を制御する転写因子の推定結合領域が 3 つあり、分生子特異的発現とこのエレメントとの関与が示唆された。

hydrophobin, Aspergillus oryzae, promoter analysis

講演番号：3A11a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ A 校舎 11 会場

Aspergillus oryzae の機能性ペプチド融合ハイドロフォービン（HypB）による細胞表層工学システムの構築

Construction of cell surface display systems using hydrophobin (HypB) with functional peptides in *Aspergillus oryzae*

○大橋 信太郎、中間 聖、藍 悠子、石倉 幹大、中島 春紫（明治大農）
○Shintaro OHASHI, Satoshi NAKAMA, Yuko AI, Kandai ISHIKURA, Harushi NAKAJIMA (Meiji Univ.)

【背景・目的】

Hydrophobin(ハイドロフォービン)は空気中に菌糸を伸長する糸状菌や担子菌類の細胞表層タンパク質である。低分子量の両親媒性タンパク質であり、単量体として菌体外に分泌された後、細胞表層で疎水性表面を外側に向けて自己集合することで単層を形成し、気中菌糸や胞子・分生子に対して疎水性を付与している。

本研究では清酒・味噌・醤油の製造に用いられる *Aspergillus oryzae* に注目し、Hydrophobin をコードすると推測される遺伝子 *hypA*～*C* の発現を確認している。これまでの研究から、*hypB* 遺伝子は菌糸伸長が盛んな時期に高発現するとこと、および HypB タンパク質が菌糸表面に局在することを確認している。

細胞表層工学とは微生物表面に外来のタンパク質を発現させることにより、機能的なタンパク質にコートされた細胞を生物触媒として提供する技術のことで、これまで酵母を中心に研究されている。そこで本研究では、*A. oryzae* の細胞表層に目的タンパク質を細胞表層に繋ぎ留めるアンカーとして細胞表層に局在する Hydrophobin を利用することにより、*A. oryzae* における細胞表層工学システムの構築をめざしている。

【方法・結果】

hypB 遺伝子に *egfp* 遺伝子を融合した融合タンパク質を *hypB* プロモーターにより発現させたところ、*A. oryzae* の菌糸表面に菌糸表面の HypB-eGFP 融合タンパク質の蛍光が観察された。菌体を Proteinase K 処理したところ GFP の蛍光の退色が観察され、HypB 融合タンパク質が重合して細胞表層に局在していることが示唆された。一方、HypB-eGFP 融合タンパク質発現株の細胞内、細胞壁、細胞表層の各画分をウエスタンブロットにより解析したところ、細胞内及び細胞壁画分から単量体 HypB-eGFP 融合タンパク質のバンドを検出された。現在、融合 HypB の発現効率を向上させるため、HypB タンパク質と機能性ペプチドを繋ぐリンカーの検討を行っている。

Aspergillus oryzae, hydrophobin, cell surface display

講演番号：3A11a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ A 校舎 11 会場

麹菌のアミノ酸トランスポーター遺伝子の機能解析
Functional analysis of the *Aspergillus oryzae* amino acid transporter
○宮西 史則、寺瀬 裕、浜中 大夢、金子 明裕、佐野 元昭、尾関 健二、大箸 信一（金沢工大・ゲノム研）
○Fuminori MIYANISHI, Yutaka TERASE, Hiromu HAMANAKA, Akihiro KANEKO, Motoaki SANO, Kenji OZEKI, Shinichi OHASHI (KIT)

【目的】
外界の栄養源の取り込みには細胞膜上に存在するトランスポーターが重要な働きをしている。トランスポーターの働きは、外界の栄養源の濃度や種類などにより、各種遺伝子で複雑な制御を受けることが知られている。

麹菌(*Aspergillus oryzae*)のトランスポーターに関係している遺伝子やアミノ酸の取り込み能についてはあまり研究されていない。昨年度の本大会では、酵母の様々なアミノ酸の取り込みに関係しているとされる General amino acid permease (Gap 1)と高い相同性をもつ麹菌遺伝子(Gap A)の遺伝子破壊株を用いて、寒天培地でのアミノ酸の違いによる生育について報告を行った。今回、液体培地での麹菌および Gap A 破壊株のアミノ酸の違いによる取り込みと寒天培地での生育について検討を行ったので報告する。

【方法および結果】
A. oryzae RIB40 株を用いてアミノ酸を単一窒素源とした液体培地で培養を行い、菌体乾燥重量の測定でアミノ酸の取り込みと寒天培地上での生育観察を行った。その結果を酵母と比較したところ、同じように取り込みが良かったアミノ酸としてアスパラギン、悪かったアミノ酸としてヒスチジンであることが分かった。麹菌での特徴的なアミノ酸として、バリンでは酵母と異なり取り込みが良く、アルギニンでは取り込みが悪いことが分かった。また、液体培地での取り込みと寒天培地での生育とを比較した結果、アラニンでは同じように取り込みおよび生育が良く、ロイシンでは取り込みおよび生育が悪くなることが確認された。現在、Gap A 破壊株でのアミノ酸の違いによる取り込みおよび生育について検討を行っている。

Aspergillus oryzae, amino acid permease

講演番号：3A11a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ A 校舎 11 会場

麹菌 *A. oryzae* における *Aoste23* の機能解析
Functional analysis of *Aoste23* in *Aspergillus oryzae*
○三谷 隆宏、川口 航平、菊間 隆志、丸山 潤一、北本 勝ひこ（東大院農生科・応生工）
○ Takahiro MITANI, Kouhei KAWAGUCHI, Takashi KIKUMA, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Ste23 は接合因子 a-factor のプロセシングを行う Zinc-dependent metalloprotease であり、真核生物と原核生物の両方に見られる M16 protease に含まれる。M16 protease の代表的なものとして、ヒトの IDE(insulin-degrading enzyme)が挙げられる。IDE はインスリンとアミロイドβペプチドを分解し、２型糖尿病とアルツハイマー病との関連が指摘されている。IDE と Ste23 の M16 protease ドメインの配列は良く保存されており、IDE は a-factor のプロセシングが可能であることが報告されている。そのため、*S. cerevisiae* の Ste23 は医療上重要な IDE の機能解析に寄与する可能性があるとして研究されている。一方で、糸状菌においては M16 protease の機能に関する研究は行われていない。そこで、麹菌 *Aspergillus oryzae* における *STE23* のオルソログ *Aoste23* の機能解析を目的として本研究を行った。

【方法と結果】

AoSte23 と *S. cerevisiae* の Ste23、ヒトの IDE 配列の相同性を比較した結果、これらのタンパク質は相同性を持ち、AoSte23 は M16 protease ドメインを保存していることが分かった。*Aoste23* の mRNA の 5’末端領域を解読するために 5’Race を行ったところ、データベースに登録されているよりも 237 残基上流に翻訳開始点となりうる開始コドンがあることが分かった。次に、AoSte23 の局在を解析するために、AoSte23-EGFP 発現プラスミドを *A. oryzae* に導入し、蛍光顕微鏡で観察した。データベースの配列タンパク質の場合、AoSte23 は *S. cerevisiae* と同様の細胞質全体に広く存在する局在を示した。一方で、データベースの開始点よりも 237 残基上流の点から開始した配列タンパク質の場合、AoSte23 はドット状の構造に集まっているのが観察された。また、*Aoste23* 破壊株を作成して野生型との表現型、生育の比較を行った。*Aoste23* 破壊株は、分生子形成に若干の減少を引き起こすことが観察された。現在、発現している AoSte23 のサイズをウェスタンブロッティングで確認し、AoSte23 の正しい転写開始点を確定させること、および *Aoste23* 破壊株を用いた生理的機能の詳細な解析を進めている。

Aspergillus oryzae, M16 protease, *STE23*

講演番号：3A11a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ A 校舎 11 会場

糸状菌の環境センサー、HysA を介した活性酸素種（ROS）の発生制御

Control of reactive oxygen species production through histidine kinase, HysA in *Aspergillus nidulans*

○林 早紀、小島 憲介、松井 哲児、木村 真、金丸 京子、小林 哲夫（名古屋大院生命農）
○Saki HAYASHI, Kensuke KOJIMA, Tetsuji MATSUI, Makoto KIMURA, Kyouko KANAMARU, Tetsuo KOBAYASHI (Nagoya Univ.)

生物は、環境変化に応答した速やかな適応を可能とするための遺伝子発現制御システムを有している。その中でも、環境センサーであるヒスチジンキナーゼ（HK）と下流制御因子レスポンスレギュレーター（RR）間のリン酸基転移を介した情報伝達機構（His-Asp リン酸リレー情報伝達機構）は、バクテリアから酵母、カビ、植物まで広く保存された環境応答システムである。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* には、15 種類の HK と 4 種類の RR、それらの間のリン酸基転移を仲介する YpdA（HPt）が存在し、これらは環境応答のための情報ネットワークを構成していると考えられる。われわれは、糸状菌における His-Asp リン酸リレー情報伝達機構の全体像を明らかにするため、その構成因子について網羅的な解析を行ってきた。生育段階別に、各因子の発現レベルや発現部位を決定し、本情報伝達機構が *A. nidulans* の環境に応答した生育と分化の制御に重要であることを示唆した。また、*in vitro* において精製タンパク質を用いたリン酸基転移実験を行い、他の生物同様、*A. nidulans* においてもリン酸リレーによる情報伝達が機能することを証明した。

酸素呼吸を行う生物にとって活性酸素種（ROS)の発生は不可避であり、ROS の 70~80%はミトコンドリアの電子伝達系に起因する。ROS は細胞にダメージを与える一方で正常な生育に不可欠なシグナルでもあるため、ROS 量の制御システムは好気性生物にとって必携のものである。昨年度の本大会では、15 種類の HK の破壊株について ROS の集積を顕微鏡下で観察し、HysA が ROS 量制御に関与する可能性を示唆した。

本大会では、*hysA* 破壊による ROS 集積が生育・分化に与える影響、その原因、さらに ROS 量制御に関わる HysA 下流の情報伝達について解析した。ROS の集積が見られた培養条件での *hysA* 破壊株の形態観察の結果、*hysA* 破壊は菌糸融合を促進し、分生子形成部分である conidiophore の vesicle、metulae、phialide で形態異常を引き起こすことが示された。ミトコンドリア活性と ROS 集積との関連を検討するため、ミトコンドリアの膜電位差を検出する MitoTraker Red で染色したところ、破壊株の分生子形成部分において活性のあるミトコンドリアの分布異常が観察された。従って、HysA はミトコンドリア機能を制御する HK であると考えられる。*A. nidulans* に存在する 4 つの RR 破壊株における解析をもとに、HysA 下流の情報伝達についても考察する予定である。

Aspergillus nidulans, reactive oxygen species (ROS), His-Asp phosphorelay

講演番号：3A11a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ A 校舎 11 会場

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の WASP オルソログの機能解析
Isolation and characterization of a WASP ortholog in *Aspergillus nidulans*
○テイ ロ、星 浩臣、堀内 裕之（東大院農生科）
○Lu ZHENG, Hiroomi HOSHI, Hiroyuki HORIUCHI (Univ. of Tokyo)

糸状菌の菌糸先端生長は、菌糸先端より少し後方で起こるエンドサイトーシスと密接に関連しており、エンドサイトーシスにより取り込まれたタンパク質が再度菌糸先端に輸送されるリサイクリング機構が重要であることが示唆されている。一方、演者らのグループでは糸状菌 *Aspergillus nidulans* を用いて、菌糸先端生長に重要な働きを持つミオシン様ドメイン融合型キチン合成酵素 CsmA が菌糸先端に局在することを示している。そこで今回、CsmA の菌糸先端への局在化におけるエンドサイトーシスの関与について検討するため、Wiskott-Aldrich syndrome family proteins（WASP）のオルソログをコードする遺伝子を *A. nidulans* より単離し機能解析を行った。WASP は酵母から動物細胞まで保存されたアクチン細胞骨格の形成に関与するタンパク質で、エンドサイトーシス等の過程で重要な働きを担うことが明らかにされている。

A. nidulans ゲノム配列情報より WASP のオルソログをコードする遺伝子を探索したところ *AN11104* が同定された。そこで *AN11104* の破壊株の単離を試みたところ、野生型の核と *AN11104* が破壊された核を共に持つヘテロカリオンしか取得できなかった。*A. nidulans* は単核の分生子を形成することから、得られたヘテロカリオンより分生子を調製し、その選択培地上での生育について検討したところほとんどの分生子の生育は無方向性の生長のみで停止し、残りの分生子についても極性成長開始直後で生育を停止した。これらのことから *AN11104* は *A. nidulans* の生育に必須の遺伝子であり、分生子発芽時の極性形成において重要な役割を持つことが示唆された。

さらに、*AN11104* のプロモーターを発現制御可能なものと置換した株を作製し、*AN11104* の発現を誘導した状態で生育させた菌糸において *AN11104* の発現を抑制したところ、菌糸先端付近でのエンドサイトーシスが阻害されることが明らかになった。そこで *AN11104* の発現が制御可能であり CsmA に EGFP をつないだ CsmA-EGFP を発現する株を作製し、その菌糸内での挙動について検討したところ、CsmA-EGFP は菌糸先端より少し後方でエンドサイトーシスにより取り込まれ、菌糸先端へ再輸送されていることが示唆された。

Aspergillus nidulans, endocytosis, chitin synthase

講演番号：3A11a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ A 校舎 11 会場

Aspergillus nidulans の GfsA は *O*-グリカンの Gal*f* を合成する糖転移酵素である
GfsA is a novel galactofuranosyltransferase involved in biosynthesis of Gal*f* of O-glycan in *Aspergillus nidulans*.

○岡 拓二[1]、二神 泰基[2]、浴野 圭輔[1]、竹川 薫[2]、後藤 正利[2]、野村 善幸[1] ([1]崇城大生物生命、[2]九大農)
○Takuji OKA[1], Taiki FUTAGAMI[2], Keisuke EKINO[1], Kaoru TAKEGAWA[2], Masatoshi GOTO[2], Yoshiyuki NOMURA[1] ([1]Sojo Univ., [2]Kyushu Univ.)

Aspergillus 属の細胞壁に含まれる糖鎖のうち、ガラクトマンナン，*N*-結合型糖鎖および *O*-結合型糖鎖にはガラクトフラノース(Gal*f*)という糖が含まれている。Gal*f* は，糸状菌に特異的に存在する糖であることから抗真菌剤の標的として注目を集めている。しかし，この Gal*f* 糖鎖の生合成を担う糖転移酵素については知られていなかった。我々は，これまでに *Aspergillus nidulans* の GfsA が Gal*f* 転移酵素であり、その遺伝子の破壊は、菌糸形態の異常や分生子形性能の低下を引き起こすことを報告してきた。今回，GfsA の受容基質が *O*-グリカンの非還元末端に存在する Gal*f* であることを明らかにしたので報告する。*ΔgfsA* より抽出したガラクトマンノプロテイン(GMP)を受容基質として，精製した GfsA-3xFLAG および UDP-Gal*f* と共に反応させた後に，EB-A2 によってウェスタンブロットを行うと 40-200 kDa の範囲でシグナルが検出される。このシグナルの由来を調べるために GMP を PNGase F 処理もしくはβ-elimination 処理した。その結果，PNGase F 処理ではシグナル強度に影響を受けなかったがβ-elimination 処理ではシグナル強度が減少した。また，*O*-グリカンの合成開始を担う *pmtA* および *pmtC* 遺伝子の破壊株から抽出した GMP では wt に比べてシグナルが減少していた。次に，*O*-グリコシル化タンパク質である WscA-HA を発現する wt，*ΔgfsA* をそれぞれ構築し，各株より WscA-HA を精製した。それぞれを HA 抗体と EB-A2 を用いて解析した。その結果，*ΔgfsA* 由来 WscA-HA の EB-A2 によるシグナル強度が減少することが明らかになった。さらに，*ΔgfsA* より精製した WscA-HA を受容基質として精製 GfsA-3xFLAG を用いて *in vitro* Gal*f* 合成酵素活性を検出したところ，WscA-HA 上の Gal*f* 残基が検出された。以上のことから，GfsA が *O*-グリカンの非還元末端に存在する Gal*f* を合成する酵素であることが明らかになった。

Aspergillus, glycosyltransferase, cell wall

講演番号：3A11a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ A 校舎 11 会場

イネいもち病菌の非病原性タンパク質 AVR-Pia の相互作用の解析

Protein-protein interaction of avirulence protein AVR-Pia in *Magnaporthe oryzae*.

○樋口 裕也[1]、佐藤 佑樹[1]、尾瀬 農之[2]、曾根 輝雄[1] ([1]北大院農、[2]北大院薬)
○YUYA HIGUCHI[1], YUKI SATO[1], TOYOYUKI OSE[2], TERUO SONE[1] ([1]Grad. Sch. Agr. Hokkaido Univ., [2]Res. Fac. Pharm. Hokkaido Univ.)

イネいもち病はイネの最重要病害であり，その防除に抵抗性品種が使用されている．抵抗性反応は，病原菌の AVR 遺伝子産物を宿主の R 遺伝子産物が認識することによって起こるとされているが，その詳細は未だわかっていない．

AVR 遺伝子の 1 つである *AVR-Pia* の遺伝子産物は，分泌型のタンパク質と推定されている．AVR-Pia タンパク質の相互作用を Yeast two hybrid 法により解析すると，シグナルペプチドを除いた AVR-Pia タンパク質同士に強い相互作用がみられ，多量体化すると推測した．

AVR-Pia の多量体化の宿主 R 遺伝子との相互作用における重要性を明らかにするため，本研究では多量体化に必要なアミノ酸領域を明らかにすることを試みた．まず，アミノ酸欠損体を用いた Yeast two hybrid 法により相互作用の有無の確認を行った．その結果、シグナルペプチドを除いた AVR-Pia の N 末端から 38 番目フェニルアラニンと 40 番目バリンをそれぞれ欠損した 2 つの変異体で相互作用の低下が見られた．さらに，これら 2 つのアミノ酸を共にアラニンに置換した 2 アミノ酸置換体において相互作用の有無を確認したところ，この変異体で最も相互作用の低下が見られ，この 2 つの残基が AVR-Pia 同士の相互作用に重要だと示唆された．

AVR-Pia は，これに対応した宿主の R 遺伝子である *Pia* を構成する遺伝子の 1 つの RGA5-A の C 末端部分と相互作用することが Cesari ら(2013)によって既に報告されている．この RGA5-A の C 末端部分と今回作成した 2 アミノ酸置換体の間の相互作用を Yeast two hybrid 法により調べたところ，野生型の AVR-Pia と RGA5 との場合と同等の相互作用があることがわかった．従って，AVR-Pia の多量体化を弱めた 2 アミノ酸置換体でも宿主の R 遺伝子産物と結合できることが示唆された．

そこで現在，この AVR-Pia の 2 アミノ酸置換体遺伝子を AVR-Pia を持たないイネいもち病菌変異株に形質転換し，多量体を形成できるかどうかが AVR-Pia の非病原性タンパク質としての機能やイネへの感染能に影響を与えるかについて，接種試験による評価を行っている．

AVR-Pia, effector, *Magnaporthe oryzae*

講演番号：3A11a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ A 校舎 11 会場

宿主グルタチオン代謝を制御する病原菌エフェクターの酵母システムによる機能解析

Functional analysis of the pathogen effector, which regulates the host glutathione homeostasis using yeast system.

藤原 祥子、田中 直孝、○田淵 光昭 (香川大農)
Shoko FUJIWARA, Naotaka TANAKA, ○Mitsuaki TABUCHI (Kagawa Univ.)

ヒトや植物に感染する多くの病原菌は、Ⅲ型分泌装置と呼ばれる注射針の様な構造物を用いて、宿主細胞内にエフェクターと呼ばれる病原因子を注入することにより、その病原性を発現する。エフェクターの分子機能の解明は、病原菌の感染戦略を理解するためにも重要である。

一部のエフェクターは酵母細胞において発現させると宿主標的因子の酵母カウンターパートに作用することにより、酵母に増殖阻害を引き起こすことが知られている。我々は、酵母の増殖阻害を指標として植物病原細菌である青枯病菌の病原因子エフェクターの機能解析を行い、これまで酵母に強い増殖阻害を引き起こす RSp1022 に着目し、解析を行ってきた。

RSp1022 は、モチーフ検索により、ChaC ドメインと呼ばれる大腸菌からヒトにまで保存されたドメインを有していた。最近、本ドメインを持つ酵母およびヒトタンパク質がグルタチオンを特異的に分解するγ-グルタミルシクロトランスフェラーゼ（γ-GCT)であることが明らかにされた (Kumar et al., EMBO rep, 13: 11095-101, 2012)。RSp1022 の ChaC ドメインと酵母やヒト由来の ChaC タンパク質との相同性は、それぞれ 18,11%と低いが、三次構造予測プログラムにより予測された構造は、哺乳動物由来のγ-GCT と高い類似性があり、活性中心アミノ酸残基も保存されていた。そこで、RSp1022 が、実際にγ-GCT 活性有するかを酵母及び大腸菌発現系により調べた。

RSp1022 を酵母で過剰発現させると、酵母に強い増殖阻害を引き起こし、細胞内のグルタチオンを通常レベルの 30%程度まで減少させた。また、予測立体構造からγ-GCT の活性中心と考えられるグルタミン酸をグルタミンに置換した変異体では、酵母に増殖阻害を引き起こさず、細胞内グルタチオン濃度を減少させなかった。興味深いことに RSp1022 は、大腸菌で発現させてもγ-GCT 活性を持たないが、酵母で発現させた場合においてのみ、酵母内在性のγ-GCT やその他生物由来のγ-GCT と比較して 10 倍以上の高い比活性を有していた。

以上の結果から、RSp1022 は、細胞内レドックス代謝において機能するグルタチオンを特異的に分解するγ-GCT であること、本酵素は不活性な状態として合成され、宿主細胞内に注入されることにより宿主真核生物由来の未同定の活性化因子によりγ-GCT が活性化されると考えられた。本酵素の活性化メカニズムの解明は、青枯病菌の感染戦略の理解につながり、本酵素を標的とした防除法の開発が期待される。

pathogen effector, yeast, glutathione

講演番号：3A11a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ A 校舎 11 会場

分裂酵母の SPB 構成因子 Cdc31 の G1-S 期における機能解析

Functional analysis in G1-S phase of Cdc31, a component of fission yeast SPB.

○中林 修、山下 茂（東邦大・医・生化）
○Osamu Nakabayashi, Shigeru Yamashita (Dept. Biochem., Toho Univ. Sch. Med.)

Cdt1 は DNA 複製前複合体の形成に必須の因子である。geminin は複製開始後の S 期において、Cdt1 がクロマチンに再結合することを阻害し、DNA の重複製を抑制しているが、分裂酵母においては geminin が存在していないため、異なる制御機構が働いている可能性がある。

我々は Cdt1 の生物種を越えた普遍的な制御因子を得るため、Two-Hybrid 法を用いて分裂酵母 Cdt1 と相互作用する因子のクローニングを試みた。その結果、spindle pole body（SPB）の形成に関わる因子である Cdc31 が Cdt1 と結合することが判明した。また、欠失変異体の解析から、Cdc31 は Cdt1 の C 末端側に結合することが示された。

Cdc31 の cDNA を nmt プロモーターの下流に結合させた過剰発現ベクターを作成し、分裂酵母に導入したところ、Cdc31 を強制発現させた細胞では、1 回の細胞周期に必要な時間の延長がみられ、細胞周期の各段階を FACS により解析したところ、G1-S 期の細胞の増加が観察された。

さらに、HU を用いて細胞周期を同調後、HU を除いて細胞周期の進行を観察したところ、Cdc31 を強制発現させた細胞では、G1-S 期の延長が示された。一方、Cdt1 を共発現させた細胞では、G1-S 期の延長はみられなかった。このことは Cdc31 の強制発現の効果が、Cdt1 共発現により打ち消されたものと考えられる。また、Cdc31 が結合する C 末端側を欠失させた Cdt1 を共発現させた細胞では Cdc31 の強制発現の効果を打ち消す効果はみられなかった。これらのことから、Cdc31 は、Cdt1 との結合を介し、G1-S 期の進行に影響を与える機能を持つことが示唆される。

Cdc31 と GFP の融合蛋白質を作成し、細胞における局在の解析を行なったところ、Cdc31 は G1 期において、Cdt1 の共発現の有無にかかわらず、SPB および核に局在することが観察された。

SPB, Cdc31, Cdt1

講演番号：3A11a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ A 校舎 11 会場

耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* における高効率遺伝子破壊法の開発
Development of an efficient gene disruption method in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*

○奥林 裕也[1]、星田 尚司[2]、赤田 倫治[2] ([1]山口大工、[2]山口大院医)
○Yuya OKUBAYASHI[1], Syoji HOSHIDA[2], Rinji AKADA[2] ([1]Yamaguchi Univ, [2]Yamaguchi Univ Grad Med)

【目的】遺伝子破壊は遺伝子の機能を最も明確に決定できる方法である。一般的に遺伝子を破壊するには目的領域の遺伝子配列を相同組換えを介してマーカー遺伝子で置換する。しかし、*Saccharomyces cerevisiae* を除くほとんどの生物では、相同配列を持たせたマーカー遺伝子が高頻度に染色体上にランダムに挿入され、相同組換え効率が低い。耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* でもランダム挿入の方が高頻度に起き、遺伝子破壊効率は低い。そこで、遺伝子破壊効率を高める方法の開発を行った。
【方法と結果】遺伝子破壊は *ADE2* 遺伝子をターゲットとした。*ADE2* 遺伝子を破壊された遺伝子は赤いコロニーが生成するため、遺伝子の破壊効率を求めることができる。マーカー遺伝子として *URA3* を、その前後に相同配列として、*ADE2* のプロモーター側とターミネーター側の配列 1 kbp を持つ遺伝子断片を使用した。増殖期にある細胞を得るために培養液を希釈して培養を開始し、培養時間 5 時間で集菌し、コンペテントセルを調整した。培養液を 100 倍に希釈したものが比較的効率良く遺伝子破壊が起きた。形質転換体を増やすために、振とう培養量を増加させた。振とう培養量が多いほど形質転換体が増加傾向にあったが、遺伝子の破壊効率は減少した。次に、形質転換用の酢酸リチウムの濃度を変化させた。形質転換液中の酢酸リチウムの濃度を増加させることにより、形質転換体数も多く、高効率での破壊ができるようになった。さらに遺伝子破壊効率を上げるため、相同組換え用の配列構造に工夫を与えた。今まではマーカー遺伝子の両側に相同配列を 1 kbp を持つ 1 断片を使用していた。改良法ではマーカー遺伝子にプロモーターを持たせず、さらに、マーカー機能をなくす様に C 末アミノ酸配列を削除した。一方、上流側の相同配列には、ADE2 のプロモーター配列を与え、マーカー遺伝子と相同組換えしたときのみマーカー遺伝子にプロモーターが与えられるように設計した。C 末側も同様に相同配列と組換えができたときのみマーカー遺伝子が機能するように工夫した。3 つの断片を同時に形質転換し相同組換えが生じた場合にだけ、形質転換体が得られるようになっている。その結果、遺伝子の破壊効率はより高効率になった。

Gene targeting, Homologous recombination, Transformation

講演番号：3A11a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ A 校舎 11 会場

Debaryomyces hansenii のフェノール代謝系遺伝子-catechol 1,2-dioxygenase (C12O)遺伝子の解析
Analysis of phenol biodegradation gene of *Debaryomyces hansenii*

○柴田 光治[1]、前田 剛志[2]、能木 裕一[3]、浜本 牧子[1,2] ([1]明治大院農、[2]明治大、[3]独立行政法人海洋研究開発機構)
○Koji SHIBATA[1], Takayuki MAEDA[2], Yuichi NOGI[3], Makiko HAMAMOTO[1,2] ([1]Meiji Univ. Grad. Sch, [2]Meiji Univ., [3]JAMSTEC)

【目的】

我々は高濃度フェノールを *ortho*-経路で代謝する深海酵母 *Debaryomyces hansenii*[1)] が、*D. hansenii* の基準株において芳香環の *ortho*-開裂を触媒する酵素 catechol 1,2-dioxygenase（C12O）遺伝子であると推測されている F 染色体上の配列と類似の配列をもつ遺伝子を保有していることを明らかにした[2)]。本研究では、この高濃度フェノール資化性深海酵母および *D. hansenii* 基準株が保有する C12O 遺伝子および類似遺伝子の機能解析と発現解析を行った。

【方法と結果】

１．C12O 遺伝子および類似遺伝子破壊株のフェノール資化性

Debaryomyces hansenii の基準株をベースに作製されたヒスチジン要求性株 DBH9、選択マーカーとして *DhHIS4* 遺伝子[3)] を用い、PCR を用いた相同組換えにより、高濃度フェノール資化性深海酵母および *D. hansenii* 基準株が保有する C12O 遺伝子および類似遺伝子の破壊株を取得し、これら破壊株のフェノール資化性を調べた。その結果、*D. hansenii* 基準株では、C 染色体上に存在する C12O 遺伝子を破壊した株はフェノールを単一炭素源とする培地に生育しなかった。一方、F 染色体上に存在する C12O 遺伝子を破壊した株はフェノールを単一炭素源とする培地で生育がみられた。高濃度フェノール資化性深海酵母の遺伝子破壊株については解析中である。

２．C12O 遺伝子および類似遺伝子の発現量

フェノールを単一炭素源とした培地の液体振盪培養から経時的に集菌した菌体から抽出した total RNA を鋳型として、逆転写酵素により cDNA 合成を行い、*D. hansenii* 基準株の C12O 遺伝子を特異的に増幅するプライマーを用いて、リアルタイム PCR により発現解析を行った。その結果、高濃度フェノールの資化能が *D. hansenii* 基準株に比べて著しく高い深海酵母の C12O 類似遺伝子の転写量は、*D. hansenii* 基準株の F 染色体上に存在する C12O 遺伝子の転写量と同程度であった。

[1)] 中野ら，２０１１年度日本農芸化学会大会講演要旨集
[2)] 中野ら，２０１２年度日本農芸化学会大会講演要旨集
[3)] Minhas A *et al.,* (2009) FEMS Yeast Res 9, 95–102

biodegradation, *Debaryomyces*, phenol

講演番号：3A11a17
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ A 校舎 11 会場

線虫遺伝子 R13A5.9 のシナプスにおける役割

Role of Caenorhabditis elegans R13A5.9 gene in synapse

○米沢 大地[1,2]、辻 俊佑[1]、坂田 和実[1]、小栗栖 太郎[1] ([1]岩手大学、[2]日本農芸化学会)
○Daichi Yonezawa[1,2], Syunsuke Tsuji[1], Kazumi Sakata[1], Taro Ogurusu[1] ([1]Iwate Univ., [2]JSBBA)

線虫 *C. elegans* 遺伝子 *R13A5.9* は膜タンパク質をコードしており、そのホモログはヒトにも存在している。この遺伝子の欠損変異体において繁殖力や運動速度の低下が観察され、腸内では卵黄タンパク質を含む巨大な液胞が存在している。これらの結果等から、我々は R13A5.9 が膜輸送系に関与していると考えている。本研究では筋シナプスにおけるアセチルコリン放出への関与を調査するため、レバミゾールおよびアルジカルブによる麻痺効果を検討した。レバミゾールはアセチルコリン受容体と反応し麻痺を起こさせる。一方アルジカルブはコリンエステラーゼを阻害するためシナプス間隙にアセチルコリンが蓄積し麻痺が起こる。この性質の違いを利用し、*R13A5.9* 変異体のシナプス小胞における働きを検討した。実験には L4 幼虫～ヤングアダルトの野性型線虫 N2 株、*R13A5.9* 変異体、変異体に R13A5.9 を導入した線虫、レバミゾール非感受性の *lev-1* 変異体(CB211 株)、アルジカルブ非感受性の *ric-3*(MF200 株)および *ric-4*(RM956 株)の 6 種類の線虫を用いた。20℃で、濃度の異なる薬剤により 3 時間処理した線虫をプラスチックシャーレ中で撮影し、さらに 3 分後撮影した。2 回の撮影データを重ね合わせ、線虫の位置が重なっているものを麻痺と判断した。

CB211 株はレバミゾールに抵抗性を示したが、*R13A5.9* 変異体は野性型と同じ感受性を示した。アルジカルブについては、MF200 および RM956 と同様に *R13A5.9* 変異体は抵抗性を示した。変異体に R13A5.9 を導入した線虫は N2 株同様の感受性となった。これらの結果は R13A5.9 がシナプスにおける正常な アセチルコリンの分泌に必要なことを示唆する。変異体において筋シナプスにおけるアセチルコリン放出量が少ない原因を調べるため、シナプス小胞マーカーであるシナプスブレビンを緑色蛍光タンパク質で標識した CZ333 株と *R135.9* 変異体との掛け合わせ、シナプス小胞の分布について検討した。R13A5.9 変異体において、野性型と同様に背索においてシナプス小胞の集積が観察された。CZ333 株とのシナプス小胞の分布の違いを定量的に解析中である。

Caenorhabditis elegans, Synapse, secretion defect

講演番号：3A11p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ A 校舎 11 会場

有胞子細菌の胞子形成期における遺伝子再構築の多様性

Diversity of gene reconstitution during sporulation in spore-forming bacteria

○津田 嵩平[1]、吉成 輝[1]、安部 公博[2]、佐藤 勉[1,2] ([1]法政大・生命科学部、[2]法政大・マイクロナノテクセンター)
○Syuhei TSUDA[1], Akira YOSHINARI[1], Kimihiro ABE[2], Tsutomu SATO[1,2] ([1]Dept. Frontier. Biosci.,Hosei Univ., [2]Research Center for Micro-Nano Tech., Hosei Univ.)

枯草菌は栄養源が枯渇すると、細胞内に胞子を形成する。枯草菌 168 株の胞子形成過程において、プロファージ由来の *skin* (*sigK* intervening)element (48 kb) が、母細胞側で切り出され、染色体上に胞子形成特異的シグマ因子σ^Kをコードする *sigK* 遺伝子が再構築される。我々は、SPβプロファージにより分断されている胞子表層ポリサッカライド合成酵素をコードする *capD* 遺伝子が、胞子形成期母細胞において再構築されることを見出した。さらに、*Bacillus weihenstephanensis* においては、42kb のプロファージ様配列により分断されているジピコリン酸合成酵素をコードする *spoVFB* が、母細胞で再構築されることを明らかにした(1)。

これらの結果から、自然界の多くの有胞子細菌の様々な母細胞特異的な遺伝子にプロファージ様配列が入り込み、胞子形成期に再構築するシステムを有している可能性が考えられた。そこで、我々は公共データーベースを用い、母細胞特異的遺伝子にプロファージ様配列が介在している遺伝子を持つ有胞子細菌を調べた。その結果、*sigK*、*capD*、*spoVFB* 以外に、母細胞で機能する *gerE*、*spoVR*、*spoVK* などの胞子形成遺伝子が、それぞれ *B. cereus* ATCC10987、*Geobacillus thermoglucosidasius* C56-YS93、*B. vallismortis* DV1-F-3 において分断されていることが示された。そこで、分断されているこれらの遺伝子の胞子形成期における DNA 再編成を、サザンブロットにより確認したところ、これらの遺伝子すべてが胞子形成期において再構築されることが示された。

さらに、我々は自然界から分離された 25 株の枯草菌株の DNA 再編成による遺伝子再構築の有無について調べた。まず、*sigK* について調べたところ、12 株が *skin* element を有し、DNA 再編成により、胞子形成期に再構築することが示された。枯草菌 168 株の *skin* element は、ファージ誘導薬剤であるマイトマイシン C により切り出しがおこらない欠陥プロファージであるが(2)、12 株中 5 株の *skin* element が欠失し、染色体上に *sigK* が再構築された。以上の結果から、有胞子細菌において、胞子形成期の DNA 再編性は普遍的であるが、標的となる遺伝子および介在配列においては多様性があることが明らかになった。

参考文献

(1) Abe K, Yoshinari A, Aoyagi T, Hirota Y, Iwamoto K, Sato T. Mol. Microbiol. 90(2):415-427(2013)
(2) Kimura T, Amaya Y, Kobayashi K, Ogasawara N, Sato T. J Bacteriol.192(23):6209-6216(2010)

Bacillus subtilis, DNA reaffangement, sporulation

講演番号：3A11p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ A 校舎 11 会場

枯草菌における SPβプロファージを介した遺伝子再編成と胞子の成熟化

SPβ prophage-mediated gene reconstitution in the process of *Bacillus subtilis* spore maturation

○安部 公博[1]、岩本 敬人[2]、稲井 貴志[2]、佐藤 勉[1,2,3]（[1]法政大・マイクロ・ナノテクセンター、[2]法政大・生命科学部、[3]法政大院・理工学部）

○Kimihiro ABE[1], Keito IWAMOTO[2], Takashi INAI[2], Tsutomu SATO[1,2,3] ([1]Research Center for Micro-Nano Tech., Hosei Univ., [2]Dept. Frontier Biosci., Hosei Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Eng., Hosei Univ.)

枯草菌は外環境の栄養源が枯渇すると内性胞子を形成する。胞子形成関連遺伝子は、胞子形成の前期・後期、母細胞側・前胞子側の各々に特異的な 4 つのσ因子によって、発現の時期と場所が厳密に制御されている。胞子形成期後期における母細胞特異的シグマ因子σ^Kをコードする *sigK* 遺伝子は、栄養増殖期中の枯草菌ゲノム上では 48 kb に及ぶ *skin* element と呼ばれる介在配列によって *spoIVCB* と *spoIIIC* の 2 つの ORF に分断されている。しかし、胞子形成期になると、*skin* element 上にコードされる DNA 組換え酵素 SpoIVCA が母細胞特異的に発現し、部位特異的な DNA 組換えを引き起こすことによって *sigK* 遺伝子を再構築することが知られている。*skin* element 上の約 70%の遺伝子がファージ関連遺伝子であることから、*skin* element はファージ由来であると推測されるが、ファージ粒子形成能は無く、胞子形成期の *sigK* 再構築に特化した介在配列であることが報告されている。

一方、枯草菌 168 株のゲノム上にはファージ粒子形成能をもつ完全なプロファージ SPβが存在する。SPβプロファージは capsular polysaccharide synthesis protein D をコードする *capD* 遺伝子内に挿入されているため、これまで枯草菌 168 株の *capD* は機能しないと考えられてきた。今回、我々は、SPβ プロファージがファージ誘発剤マイトマイシン C によりファージ粒子の形成が誘導されるだけでなく、胞子形成期の母細胞ではファージ誘発剤を必要とせずにゲノム上から切り出されて、分断されていた *capD* が再構築されることを見出した。また、再構築された *capD* は胞子形成期後期の母細胞特異的に発現する新奇の胞子形成関連遺伝子であり、これまで知られていなかった胞子最外のポリサッカライド層の形成に必須であることがわかった。さらに、*capD* の他に胞子形成期母細胞側で発現する *cge* オペロンと *sps* オペロンが胞子ポリサッカライド層の形成に必要であることが明らかとなった。ポリサッカライド層を欠損した胞子は、熱やリゾチームに対する耐久性には野生株胞子と比べて大きな差は見られなかったが、ガラスなどの固相表面に吸着しやすく、また、水に溶けにくくなった。以上の結果から、本研究で発見された枯草菌胞子最外のポリサッカライド層は胞子の耐久性には寄与しないが、胞子が自然環境において水流に乗って広く拡散するのにきわめて重要な働きがあると推測された。

Bacillus subtilis, DNA　rearrangement, sporulation

講演番号：3A11p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ A 校舎 11 会場

枯草菌 SPβによる遺伝子再編成の調節機構

Regulation of DNA rearrangement mediated by SPβ prophage in *Bacillus subtilis*

○河野 裕太[1]、新井 健司[2]、中村 甫[2]、丸山 祐輝[2]、安部 公博[3]、佐藤 勉[1,2,3] ([1]法政大院・理工学部、[2]法政大・生命科学部、[3]法政大・マイクロ・ナノテクセンター)
○Yuta KAWANO[1], Kenji ARAI[2], Hajime NAKAMURA[2], Yuki MARUYAMA[2], Kimihiro ABE[3], Tsutomu SATO[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Hosei Univ., [2]Dept. Frontier Biosci., Hosei Univ., [3]Research Center for Micro-Nano Tech., Hosei Univ.)

枯草菌の σ^K をコードする *sigK* 遺伝子は、ファージ由来と考えられる 48 kb の *skin* element によって分断されている。しかし、胞子形成期の母細胞では *skin* element 上にコードされる部位特異的組換え酵素 SpoIVCA が発現し、*skin* element を切り出すことで *sigK* 遺伝子を再構築することが知られている。このようなダイナミックな DNA 再編成は稀有な現象と考えられていたが、近年、本研究室で新たに枯草菌 168 株の胞子最外層構造に関与する *capD* 遺伝子が胞子形成期に再構築されることが見出された。*capD* を分断しているのは SPβ と呼ばれるテンペレートファージであり、通常は 168 株のゲノム内に溶原化している。栄養増殖期の細胞をマイトマイシン C（MMC）で処理すると、SPβ は溶菌サイクルへと移行し、SPβ はゲノム上から切り出されてファージ形成が誘発される。一方、胞子形成期の母細胞では、SPβ はゲノム上から自発的に切り出され、その結果胞子形成遺伝子 *capD* が再構築されることが示された。本研究では *capD* 再編成の制御機構の解析を行った。

SPβ 内には SpoIVCA のパラログであり、リゾルベース型の部位特異的 DNA 組換え酵素 YokA がコードされている。*yokA* を破壊すると SPβ の切り出しが起こらなくなることが示された。また、*yokA* の発現を解析したところ、*yokA* は胞子形成や MMC 処理に応答せず構成的に発現することが示された。このことから、SPβ の切り出しを制御する因子は YokA 以外に存在することが考えられた。枯草菌の類縁種である *B. amyloliquifaciens* も *capD* 遺伝子内に SPβ 様領域を有しており、*B. amyloloquifaciens* FZB42 株は SPβ 由来遺伝子の大部分が消失しているが、胞子形成期において *capD* の再編成がみられた。*B. amyloliquifaciens* の SPβ 様配列の遺伝子構成を調べてみると、*yokA* の他に *yotN* が保存されていることがわかった。そこで枯草菌 168 株の *yotN* を破壊してみたところ、SPβ の切り出しが起こらなくなった。また、*yotN* は胞子形成期特異的及び MMC に応答した発現を示した。さらに *yokA* と *yotN* 以外の全ての SPβ 遺伝子を取り除いた最小化 SPβ においても切り出しが行われたことから、*capD* 再編成には *yokA* と *yotN* の 2 遺伝子のみが必要で、その他 SPβ 遺伝子は必要としないことが明らかとなった。次に、SPβ の切り出しと *yokA* 及び *yotN* の発現時期との関連性を検証するために、*yokA* 及び *yotN* の IPTG 誘導株を作製し、それぞれ栄養増殖期で IPTG を添加し発現誘導させた。その結果、*yokA* を IPTG によって誘導しても SPβ の切り出しは起こらなかったが、*yotN* の発現を誘導すると速やかに SPβ の切り出しが行われた。以上の結果から、YotN は SPβ の切り出しのタイミングを制御する因子であることが示唆された。

Bacillus subtilis, DNA rearrangement, sporulation

講演番号：3A11p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ A 校舎 11 会場

枯草菌の不稔感染遺伝子 *nonA* が SP10 ファージ増殖に与える影響
Effect of multiplication of SP10 phage by abortive infection gene *nonA* in *Bacillus subtilis*
○山本 達也[1]、尾花 望[1]、イー リーメン[2]、朝井 計[3]、野村 暢彦[1]、中村 幸治[1] ([1]筑波大院生命環境、[2]東大生物工学セ、[3]埼玉大院理工)
○Tatsuya YAMAMOTO[1], Nozomu OBANA[1], Lii Mien YEE[2], Kei ASAI[3], Nobuhiko NOMURA[1], Kouji NAKAMURA[1] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]The Univ. of Tokyo, [3]Saitama Univ.)

ファージは環境中で細菌の 10 倍程度存在しており、細菌は常にファージ感染の脅威にさらされているため、ファージに対する様々な防御機構を獲得してきている。このような防御機構はファージの細菌への付着を防いだり、制限酵素のようにファージ DNA が細胞内に挿入された直後に切断するなど、ファージ増殖が始まる前に防御する機構と、ファージ増殖開始後に DNA 複製や蛋白質合成などを阻害することで、ファージの増殖・拡散を防ぐ不稔感染と呼ばれる機構に分けられる。不稔感染に関与する遺伝子は様々な細菌で見つかっているが、その発現制御機構や分子機構については未解明な点が多い。枯草菌 Marburg 株は不稔感染遺伝子 *nonA* により SP10 ファージに抵抗性を持つことが知られている。前大会では、枯草菌ゲノム中のプロファージ領域 SPβ に存在する *nonA* が SP10 ファージ感染後期に、SP10 ファージのシグマ因子によって転写が誘導され、翻訳された NonA が膜に局在化することを明らかにした。

NonA による、SP10 ファージの遺伝子発現に与える影響をノーザンブロット及び SDS-PAGE により調べたところ、SP10 ファージの感染前期、中期、後期に発現する遺伝子の mRNA 量は *nonA* の発現に関わらず、大きな違いはみられなかった。一方、蛋白質では、*nonA* 欠損株において SP10 ファージ感染後、時間経過とともにファージ蛋白質と考えられる複数の蛋白質の蓄積がみられた。特に蓄積が見られた 61 kDA 及び 51 kDa の蛋白質を MALDI-TOF MS にて解析したところ、これらの蛋白質はそれぞれ、SP10 ファージのシース（sheath）及びカプシド（capsid）蛋白質と同定された。これらの蛋白質の蓄積は *nonA* 遺伝子存在下では阻害されていた。また、透過型電子顕微鏡による観察では、*nonA* を持つ枯草菌内のファージ粒子数は著しく少なかった。以上のように、*nonA* を持つ枯草菌内では SP10 ファージ後期遺伝子の転写まで行われているが、NonA の発現時期では、シースやカプシド蛋白質の発現及びファージ粒子の形成が著しく阻害されていた。また、枯草菌で NonA を発現誘導すると、ファージ非感染時においても生育の阻害と呼吸活性の低下が見られた。この NonA の発現誘導による生育の阻害は大腸菌においても同様に見られた。以上のことから、NonA はファージの遺伝子発現を直接阻害するのではなく、枯草菌の増殖能を阻害することにより、不稔感染を成立させていると考えられる。

・参考文献

Tatsuya Yamamoto *et al*. *Journal of Bacteriology.* In press.

Bacillus subtilis, bacteriophage, abortive infection

講演番号：3A11p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ A 校舎 11 会場

Thermus thermophilus HB27 株の toxin-antitoxin system の解析

Analysis of toxin-antitoxin system in *Thermus thermophilus* HB27 strain

○FAN Yuqi[1]、星野 貴行[2]、中村 顕[2] ([1]筑波大院生命環境、[2]筑波大生命環境)
○Yuqi FAN[1], Takayuki HOSHINO[2], Akira NAKAMURA[2] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Tsukuba Univ., [2]Fac. Life Environ. Sci., Tsukuba Univ.)

＜背景及び目的＞

多くのバクテリアは toxin-antitoxin system を保有していることが知られている。このうちの toxin は細胞に毒性を示すが、通常は同時に発現している antitoxin によりその毒性が抑制される。ストレス条件では不安定な antitoxin が分解され、toxin の持つ毒性により細胞増殖の停止、もしくは細胞死が引き起こされる。ゲノムプロジェクトにより、これらの遺伝子が様々な菌種に存在することが知られているが、実験的には大腸菌では 10 種類が確認されたのに対し、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* では報告がない。そこで今回 *T. thermophilus* の toxin-antitoxin system について解析したので報告する。

＜結果＞

Toxin-antitoxin database (http://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/TADB/)を用いて検索した結果、HB27 株ゲノム中には既知の toxin-antitoxin と相同性を示す遺伝子が 7 種(VapBC family 4 種、HicBA family 3 種)見出されたが、機能既知の toxin との相同性は５%～４１%と低かった。そこでそれぞれの toxin 遺伝子単独または toxin-antitoxin 遺伝子をペアで *tet* プロモーターの下流に接続し、DH5αZ1 株に導入した。toxin 遺伝子導入株を培養し Dox により発現誘導を行ったところ、*TTC0125* toxin 遺伝子発現を誘導した場合にのみ生育抑制が認められた。この生育抑制は 43℃の高温で培養した場合にはより顕著にみられ、また *TTC0126* antitoxin 遺伝子を同時に導入した場合には認められなかった。このことから、系統解析の結果と合わせて、少なくとも TTC0125 は VapC toxin として機能することが示唆された。

HB27 株ゲノム中の *TTC0125, TTC0126* 遺伝子の破壊を行ったところ、*TTC0125* 破壊株を取得することができ、この遺伝子破壊は菌の生育に影響を与えなかったが、*TTC0126* 破壊株は取得できなかった。このことからも TTC0126 は antitoxin として機能することが裏付けられた。

pET system を用いて、大腸菌を宿主として His-TTC0126・TTC0125 を複合体として生産・精製し、さらに trypsin 処理により TTC0125 のみを精製した。同様の手法により TTC0126 も精製した。これら精製タンパク質及び、*T. thermophilus* もしくは真核生物から抽出した total RNA を用い、RNase assay を行ったところ、TTC0125 が RNase 活性を有すること、およびこの RNase 活性が TTC0126 添加により阻害されることが明らかになった。この特徴は VapBC family で報告されているものと一致した。

以上より、TTC0125-TTC0126 は VapBC family に所属する toxin-antitoxin であることを明らかにした。今後さらに TTC0125 の tRNA 分解能の有無、及びこれら toxin-antitoxin の生理意義について検討していく予定である。

Thermus thermophilus, toxin-antitoxin system, VapBC family

講演番号：3A11p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ A 校舎 11 会場

好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 における DNA 修復系遺伝子の発現変化
Expression changes of DNA repair genes in the thermophile *Geobacillus kaustophilus* HTA426
○鈴木 宏和、小林 淳平、古川 恵 (九大院農)
○Hirokazu SUZUKI, Jyumpei KOBAYASHI, Megumi FURUKAWA (Kyushu Univ.)

【目的】前年度大会において我々は，好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 の DNA 自発変異は，対数増殖期細胞が薬剤による生育ストレスを受けた際に上昇すること，ならびに幾つかの DNA 修復系遺伝子（*mutSL*，*mutY*，*ung*，および *mfd*）の破壊によって高頻度になることを報告した．対数増殖期細胞において高い自発変異を示す微生物はこれまでに知られておらず，*G. kaustophilus* の自発変異性は生物の DNA 変異ならびに進化を理解する上で極めて興味深い．本研究では，*G. kaustophilus* 自発変異機構の理解を目的とし，薬剤ストレス下における *mutSL*，*mutY*，*ung*，および *mfd* 遺伝子の発現変化を解析した．
【方法】*G. kaustophilus* の実験モデル株 MK370 を LB 液体培地に接種し，60?C で振盪培養した．菌体濁度が 1.0 の時（対数増殖中期），それから 2 時間（対数増殖後期），4 時間（定常期初期），および 6 時間後（定常期中期）の菌体を回収し，総 RNA を抽出した．また対数増殖中期および定常期中期の培養液にストレプトマイシンを添加し，それから 2，4，および 6 時間培養を続けた後の細胞からも総 RNA も抽出した．得られた RNA からランダムプライマーを用いて cDNA を合成し，それを鋳型とした定量的リアルタイム PCR 法により *mutS*，*mutY*，*ung*，*mfd*，および *rpoA*（RNA ポリメラーゼ）遺伝子の転写産物量を解析した．各遺伝子の発現レベルは ^{16}S rRNA 量に対する相対量として評価した．
【結果と考察】*mutY* および *ung* 遺伝子については対数増殖期から定常期にかけて構成的に発現していた．*mutS*，*mfd*，および *rpoA* 遺伝子の発現レベルは対数増殖中期において最も高く，培養にしたがい緩やかに減少した．定常期細胞にストレプトマイシンを添加したところ，これら遺伝子の発現レベルは緩やかに減少した．それに対し，対数増殖期細胞にストレプトマイシンを添加した場合，発現レベルは急激に減少した．DNA 自発変異は常温よりも高温下において高頻度であること，ならびに DNA 複製は増殖期において活発であることから，DNA 修復系遺伝子の発現急減は頻繁な DNA 変異につながる．これが *G. kaustophilus* が対数増殖期細において高い自発変異性を示す主原因と考えられる．ただし，DNA 修復に関係のない *rpoA* 遺伝子についても同様な発現急減が見られたことから，これは DNA 修復系遺伝子に特異的な現象ではなく，細胞活動が阻害された際に，増殖期により活発なリボヌクレアーゼが全 mRNA を急速に分解した結果と思われる．以上の結果は，様々な生育阻害が *G. kaustophilus* の高自発変異性を引き起こし，それが *G. kaustophilus* の環境適応に重要な役割を果たしている可能性を示唆している．本研究は生研センターイノベーション創出事業の支援を受けて行った．

Geobacillus, thermophile, spontaneous mutation

講演番号：3A11p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ A 校舎 11 会場

好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 の高変異性株を利用した耐熱化指向性の酵素遺伝子変異
Generation of thermostable enzyme genes using spontaneous mutation in the thermophile *Geobacillus kaustophilus* HTA426

○和田 圭介、小林 淳平、古川 恵、土居 克実、鈴木 宏和（九大院農）
○ Keisuke WADA, Jumpei KOBAYASHI, Megumi FURUKAWA, Katsumi DOI, Hirokazu SUZUKI (Kyusyu Univ.)

【目的】酵素触媒の耐熱性向上は，高い保存安定性や長い触媒寿命につながることから，その産業的利用機会を拡大させ得る可能性を秘めている．先行研究において我々は，好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 が高い DNA 自発変異性を有すること，ならびに本変異性は DNA 修復系遺伝子 *mutSL*，*mutY*，*ung*，および *mfd* の欠失によって向上することを見出した．本研究では，これら修復系遺伝子を全欠失させた *G. kaustophilus* 株を作製し，当該細胞内での自発変異を利用した酵素耐熱化指向性の遺伝子進化を検討した．
【実験と結果】実験モデル株 *G. kaustophilus* MK242 の *mutSL*，*mutY*，*ung*，および *mfd* 遺伝子を欠失させた高変異性株 MK480 を作製した．リファンピシンおよびストレプトマイシン耐性株の発生頻度を指標に自発変異性を評価したところ, MK480 株は MK242 株よりも 10^1–10^4 倍高い DNA 変異率を示した．*Bacillus subtilis* 由来の *pyrF* 遺伝子（*BSpyrF*）を *E. coli-Geobacillus* シャトルプラスミド pGKE75 に挿入し，大腸菌からの接合伝達によって MK242 株と MK480 株に導入した．*pyrF* 遺伝子はピリミジン生合成の必須遺伝子で，MK242 株と MK480 株は内因性 *pyrF* 遺伝子を欠失しているため，本来はウラシル要求性である．しかし，*BSpyrF* 遺伝子を有する MK480 株をウラシル欠乏最少培地中 70°C で培養したところ, 2 日間で有意に生育した. 得られた細胞が有する *BSpyrF* 遺伝子を解析したところ，C497T 変異が見出された．これは *BSpyrF* 発現産物の A166V アミノ酸置換の原因となる．本変異遺伝子 *BSpyrFe1* は *BSpyrF* よりも細胞内機能温度の上限が 5°C ほど上昇しており，*BSpyrFe1* 発現産物は *BSpyrF* 発現産物よりも熱安定であることが示唆された．MK242 株中では *BSpyrFe1* 遺伝子が発生しなかったことから，MK480 株は *BSpyrF* 遺伝子の耐熱化指向性分子進化に有効であったといえる．また同様にして，*Streptomyces azureus* 由来チオストレプトン耐性遺伝子（*SAtsrR*）を MK480 株に導入し，チオストレプトン含有培地中 45°C–60°C で経代培養を繰り返したところ, 0.5 μg/ml のチオストレプトンを含む LB 固体培地上 60°C で生育する株を得た．得られた細胞が有する *SAtsrRe1* 遺伝子を解析したところ，C772T 変異が見出された．これは *SAtsrR* 発現産物の H258P アミノ酸置換の原因となる．本変異遺伝子 *SAtsrRe1* の細胞内機能温度の上限も 5°C ほど上昇しており，*SAtsrRe1* を有する MK242 株は 55°C でもチオストレプトン耐性を示した．現在，変異遺伝子 *BSpyrFe1* と *SAtsrRe1* の発現産物を調製し，それらの変性温度を解析している．本研究は生研センターイノベーション創出事業の支援を受けて行った．

Geobacillus, spontaneous mutation, thermostable protein

講演番号：3A11p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ A 校舎 11 会場

好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 で機能するクロラムフェニコール耐性プラスミドの創出

Creation of chloramphenicol resistance plasmid workable in thermophilic bacteria *Geobacillus kaustophilus* HTA426

○小林 淳平、古川 恵、鈴木 宏和（九大院農）
○Jyumpei KOBAYASHI, Megumi Hurukawa, Hirokazu Suzuki (Kyushu Univ.)

【目的】我々は、好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 細胞内の DNA 自発変異を利用した、酵素耐熱化指向性の酵素遺伝子分子進化法を研究している。本手法では、まず DNA 修復系遺伝子を破壊した *G. kaustophilus* 高変異性株（MK480）に対象遺伝子を導入し、高温条件下での継代培養を繰り返しながら，対象遺伝子に変異を導入していく．この際，対象遺伝子発現産物の活性に依存した生育阻害ストレスを与えることができれば，発現産物が耐熱化した変異遺伝子をもつ細胞を容易に選択できる．本研究では、*Staphylococcus aureus* 由来クロラムフェニコール（Cm）耐性遺伝子（*SAcat*）を実験対象とし、本手法による耐熱化指向性の変異導入を行った．

【実験】*SAcat* 遺伝子を *E. coli-Geobacillus* シャトルプラスミド pGKE75 に挿入し、大腸菌からの接合伝達によって MK480 株に導入した。得られた細胞を, 10 μg/ml の Cm を含む LB 平板培地上 60°C で，24 h ごとに継代培養を繰り返し、最終的に 50 μg/ml の Cm を含む培地上で生育する株 CM-A を得た。つづいて本株から抽出したプラスミドを MK480 株に再導入し, 10 μg/ml の Cm を含む LB 培地上 60°C で 24 h 培養した。生育した細胞を過酸化水素で処理することで DNA 変異を促進させ、さらに同濃度 Cm を含む LB 培地上 65°C で 24 h 培養した。このような継代培養を繰り返し、最終的に 10 μg/ml の Cm を含む培地上 70°C で生育する株 CM-B を得た。CM-A および CM-B 株からプラスミドを調製し、*SAcat* 遺伝子領域ならびにプロモーター領域の塩基配列を決定した。また，当該プラスミドを再導入した *G. kaustophilus* を Cm 含有 LB 平板培地に塗布し，様々な温度で培養することで，各温度における *SAcat* 遺伝子の細胞内機能性を評価した．

【結果と考察】CM-A 株が有するプラスミドは，*SAcat* 遺伝子（*SAcatE1*）中に G412A 変異をもち，その発現産物が A138T アミノ酸置換を有することが示唆された。*SAcatE1* 遺伝子の細胞内機能性を調べたところ，*SAcat* よりも高い確率で *G. kaustophilus* に Cm 耐性を付与した（*SAcat* : 37% at 55°C，26% at 60°C，0.1% at 65°C ; *SAcatE1* : 77% at 55°C，46% at 60°C，0.3% at 65°C）。プロモーター領域に変異は見られなかったことから，*SAcatE1* 発現産物が *SAcat* 発現産物よりも熱安定化している可能性が考えられる．興味深いことに，CM-B 株から調製したプラスミドは，より高温領域で機能したが（55°C, 20% ; 60°C, 71% ; 65°C, 88%）、その *SAcat* 遺伝子配列は *SAcatE1* 配列と同一で，プロモーター領域中にも変異は見出されなかった。詳細は解析中であるが、プラスミド複製起点等への変異が考えられる。

本研究は生研センターイノベーション創出事業の支援を受けて行った。

Geobacillus, Spontaneous mutation, Thermostable protein

講演番号：3A11p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ A 校舎 11 会場

中性環境における好アルカリ性細菌と好中性細菌の Na^+駆動型べん毛モーター固定子 MotPS のイオン流入制御機構の解析

Analysis of the inflow control mechanism of Na^+ at neutral pH of Na^+-driven flagellar motor stator MotPS in *Bacillus pseudofirmus* OF4

○高橋 優嘉[1,2]、野口 有希奈[1]、伊藤 政博[1,2]（[1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大・バイオナノ）
○Yuka TAKAHASHI[1,2], Yukina Noguchi[1], Masahiro Ito[1,2] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ., [2]Bio-nano, Toyo Univ.)

多くの細菌は、べん毛と呼ばれる運動器官を回転させることで自由な遊泳を行っている。べん毛の回転駆動力は、特異的なイオン（H^+または Na^+）の電気化学ポテンシャル差を利用している。モーター部分は主に回転子と固定子から構成され、特に固定子は回転駆動力変換ユニットとして機能する。

好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 株は、pH10 以上の高アルカリ環境で良好に生育し、中性環境でも生育できる通性好アルカリ性細菌である。一般に好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌は高アルカリ性環境でべん毛の回転に Na^+駆動型固定子 MotPS を利用している。OF4 株の運動性は、pH8 以上の環境中で良好な遊泳を示し、pH10、200mM-Na^+条件で最大の遊泳を示す。しかし、pH7 付近では極端に運動性が低下する。原因として、中性環境では H^+濃度がアルカリ性環境中と比較して非常に濃いため固定子である MotPS に Na^+が流入する際に H^+との競合阻害が起こるためと推定されている。一方で、好中性細菌である枯草菌は OF4 株同様に Na^+駆動型固定子 MotPS を持つが、中性環境でも Na^+濃度に依存した遊泳が報告されている。このように好中性細菌と好アルカリ性細菌が持つ MotPS では、生育する環境 pH に応じた進化を遂げていることが推察された。

当研究室では、これまで枯草菌の固定子欠損株（*ΔmotAB ΔmotPS* 株）の染色体上に好アルカリ性細菌である OF4 株の *motPS* 遺伝子を導入した株から中性環境において Na^+濃度に依存した運動性を示す運動性向上株（pH7up 株）を取得した。pH7up 株の解析結果から、*motP* 遺伝子内の 186 番目のアスパラギン（N）がアスパラギン酸（D）へ置換された変異（MotPN186D）が中性環境での Na^+濃度に依存した運動性に重要であることが示唆された。取得された OF4 株由来の MotPS の中性環境における運動性向上株はすべて、低 Na^+濃度では運動性が極端に低下した。しかし、枯草菌の MotPS は、中性環境においても低 Na^+濃度で良好な運動性を示す。

本研究では、中性環境での好アルカリ性細菌由来と好中性細菌由来の Na^+駆動型べん毛モーターの流入イオン制御の違いを明らかにすることを目的とし、OF4 株由来の MotPS が低 Na^+濃度条件の中性環境でも運動性を示す運動性向上株の取得を試みた。取得した運動性向上株の *motPS* 遺伝子領域から同定した変異箇所は、MotS サブユニットの膜貫通領域やイオンチャネルとして機能する固定子が非活性化時にイオンの流入を阻害するために重要な領域（Plug 領域）に存在していた。このことから、OF4 株の Na^+駆動型固定子 MotPS は、中性環境下では Na^+の流入を抑制する適応進化を遂げていることが推定された。

Na^+-driven flagellar motor, *Bacillus pseudofirmus* OF4, stator

講演番号：3A11p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ A 校舎 11 会場

PGA 合成関連遺伝子 *pgsE* がγ-ポリグルタミン酸（PGA）生産に与える影響 －PGA 生産菌の由来による *pgsE* の機能比較－

Effect of *pgsE* on microbial production of γ-polyglutamic acid -Comparison with function of *pgsE* in PGA producing strains-

○猪井 崇弘[1]、信田 晃佑[1]、荻田 亮[1,2]、田中 俊雄[1]、藤田 憲一[1] ([1]阪市大院・理、[2]阪市大・健康研セ)
○Takahiro INOI[1], Kousuke SHINODA[1], Akira OGITA[1,2], Toshio TANAKA[1], Ken-ichi FUJITA[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]Res. Cntr. for Urban Health & sports , Osaka City Univ.)

γ-ポリグルタミン酸(PGA)は納豆のネバネバの主成分でグルタミン酸が γ 位のカルボキシル基でアミド結合した生分解性ポリマーである。本研究室で単離された *Bacillus* sp. F-2-01 株は一般的な PGA 生産菌である納豆菌 *B. subtilis* var. natto に比べて PGA を 10 倍以上生産することがわかっているが、その理由は不明である。PGA 合成オペロンに含まれる 4 つの関連遺伝子 *pgsB, C, A* および *E* のうち、PgsE におけるアミノ酸配列は、*Bacillus* sp. F-2-01 と納豆菌との間で大きく異なっていた。

【目的】まず、*Bacillus* sp. F-2-01 株による PGA 高生産は PgsE のアミノ酸配列が納豆菌と異なっていることに起因しているかどうかを検討した。さらに本株の *pgsE* が PGA 生産にどのような影響を与えるのか解析した。

【方法及び結果】*Bacillus* sp. F-2-01 由来の *pgsBCA*、*pgsBCAE* および *B. subtilis* 168 由来の *pgsBCA*、*pgsBCAE* を用いた強制発現系を PGA 非生産菌 *B. subtilis* 168 へ構築し、PGA 生産試験、PGA 分子量測定を行った。HPLC 解析、アガロース電気泳動の結果、*Bacillus* sp. F-2-01 と *B. subtilis* 168 と共に *pgsBCAE* 発現系は *pgsBCA* のそれに比べて PGA 生産量、PGA 分子量が増大することが確認された。さらに、*Bacillus* sp. F-2-01 由来の遺伝子群は *B. subtilis* 168 由来の遺伝子群に比べて PGA をより高生産させ、高分子量化させた。以上より、*pgsE* は PGA 高生産化を引き起こしている以外にも PGA の分子量を増大する機能をもっていることが判明した。さらに *Bacillus* sp. F-2-01 による PGA 超高生産・高分子量化は自身が保有する PgsE のアミノ酸配列に起因していることが示唆された。

gamma-polyglutamic acid, *Bacillus* sp., natto

講演番号：3A11p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ A 校舎 11 会場

放線菌 *Streptomyces* における *afsS* 遺伝子座の機能解析
Functional analysis of the *afsS* locus in *Streptomyces*

○辛 利弥、大西 康夫（東大院農生科・応生工）
○Toshiya SHIN, Yasuo OHNISHI (Tokyo Univ.)

【背景・目的】

放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)は二次代謝産物として、色素性抗生物質アクチノロージン（Act）を生産する。Act の生産は AfsK-AfsR-AfsS シグナル伝達経路による制御を受けている。外界からのシグナルを受けた AfsK をはじめとする Ser/Thr キナーゼにより、転写活性化因子 AfsR はリン酸化され、活性化されることが示唆されている。活性化された AfsR は RNA ポリメラーゼをリクルートし、機構未知な Act 生産活性化因子をコードする *afsS* の転写を活性化する。*afsS* 遺伝子は *Streptomyces* 間で配列の保存性が低いが、そのアミノ酸配列に特徴的な繰り返し配列を含んでおり、繰り返し配列を破壊することで Act 生産活性化能を失う。

通常の培養条件で色素生産を行わない *S. lividans* に、繰り返し配列を Ala 置換により破壊した変異型 *afsS* を含む *afsS* 遺伝子座を高コピーベクターで導入したところ、Act 生産が見られた。これは、AfsS の活性に繰り返し配列が重要であることと一致しない結果であった。そこで、本研究では *afsS* 遺伝子座が *S. lividans* に Act 生産を引き起こす原因の解明を目指した。

【結果】

切り縮めを行った *afsS* 遺伝子座を高コピーベクターで *S. lividans* に導入したところ、*afsS* 上流の 5’非翻訳領域（5’UTR）が Act 生産活性化を引き起こしていることが示唆された。さらに切り縮めを行った 5’UTR の導入実験を行ったところ、5’UTR に含まれているヘアピン領域が Act 生産活性化に重要であることが示唆された。変異を導入しヘアピン構造を破壊した 5’UTR を導入しても Act 生産を行わなかったが、ヘアピン構造を再生する二重変異を導入した 5’UTR では Act 生産活性化能が保持されていた。この結果から、5’UTR のヘアピン構造が Act 生産に重要であることが示された。

他菌の *afsS* 様遺伝子の 5’UTR を高コピーベクターで *S. lividans* に導入したところ、*S. coelicolor* A3(2)および *S. avermitilis* の 5’UTR は Act 生産を活性化したが、*S. griseus* の 5’UTR は Act 生産を活性化しなかった。一方、主要σ因子をコードする *hrdB* のプロモーターと 5’UTR により *afsS* を *S. lividans* に導入したところ、*afsS* の ORF 単独でも Act 生産を活性化する作用を有していた。同様に他菌の *afsS* 様遺伝子の ORF を導入したところ、*S. griseus* の ORF は Act 生産を活性化したが、*S. avermitilis* の ORF は Act 生産を活性化しなかった。これらの結果は、*afsS* 遺伝子座に存在する 5’UTR と ORF が独立して Act 生産活性化能を有することを示す。本研究により、一つの転写単位に non-coding RNA として機能する領域と ORF をコードする領域が存在する「二機能性 RNA」として *afsS* 遺伝子座が機能することが明らかになった

Streptomyces, non-coding RNA, antibiotic biosynthesis

講演番号：3A11p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ A 校舎 11 会場

セルラーゼ高分泌性放線菌 *Streptomyces argenteolus*M178 株由来のセルラーゼ遺伝子群の解析
Analysis of the cellulase genes from cellulolytic *Streptomyces argenteolus* strain M178

○春日 和[1]、日景 真紀[1]、安達 紗由香[1]、友常 久実子[1]、志村 洋一郎[1]、小林 正之[1]、石川 淳[2]、池田 治生[3]、小嶋 郁夫[1] ([1]秋田県大、[2]国立感染研、[3]北里大・北里生命研)
○Kanou Kasuga[1], Maki Hikage[1], Sayuka Adachi[1], Kumiko Tomotsune[1], Youichirou Shimura[1], Masayuki Kobayashi[1], Jun Ishikawa[2], Haruo Ikeda[3], Ikuo Kojima[1] ([1]Akita Pref. Univ., [2]National Institute of Infectious Diseases, [3]Kitasato Inst. Life Sci., Kitasato Univ.)

【背景・目的】

Streptomyces 属放線菌は、有用な抗生物質生産菌として高度に産業利用されている。一方、自然界において放線菌はセルロース系バイオマスの分解者であり、これまでに放線菌由来のセルラーゼやその遺伝子が報告されている。我々は、セルロース系バイオマスを原料とする抗生物質発酵生産系の確立をめざし、セルロース分解性放線菌、およびその有用なセルラーゼ遺伝子群を探索している。

これまでに土壌や木片試料より約 1,000 の放線菌株を分離し、カルボキシメチルセルロース(CMC)の分解を指標として、セルラーゼを高分泌する *Streptomyces argenteolus* M178 株を選抜した。*Streptomyces lividans* TK21 を宿主としたショットガンクローニングにより、M178 株の CMC 分解活性(CMCase)の高分泌を導く遺伝子として、糖質加水分解酵素(GH)のファミリー5 および 12 に属するセルラーゼの遺伝子 *cel5A*, *cel12B* を単離した。本研究では、M178 株のセルロース分解に関わる遺伝子群の解明を目的として、ゲノム解読（ドラフトシーケンス）によりセルラーゼ遺伝子を探索し、さらにその遺伝子産物によるセルロース分解について検討した。

【方法・結果】

M178 株のゲノムのドラフトシーケンスより、*cel5A* と *cel12B* 以外に、新たに *cel5B*, *cel5C* (GH5) , *cel6A*, *cel6B*, *cel6C* (GH6), *cel9A* (GH9), *cel12A* (GH12), *cel48A* (GH48)の 8 種の推定セルラーゼ遺伝子を見出した。M178 株には数多くのセルラーゼ遺伝子が存在していたため、これら遺伝子産物がさまざまな分解様式でセルロースの分解に関与していると推定される。

これら 10 種の（推定）セルラーゼ遺伝子を、放線菌染色体組込み型ベクターpKU460 の構成的発現プロモーターP*rpsJ* の下流に連結してそれぞれの発現プラスミドを構築した。発現プラスミドを TK21 株に導入し、各形質転換体の培養上清に分泌された CMC 分解活性 (CMCase)、および濾紙分解活性 (FPase)を調べ、セルラーゼ活性の分泌を評価した。これまでに *cel6A*, *cel9A* 以外の 8 遺伝子の発現株について活性評価を行い、*cel5A* 導入株からは両活性を、*cel12B* 導入株からは CMCase 活性のみを検出した。これら以外の 5 遺伝子産物は単独では CMC または濾紙の分解にほとんど関与しないと考えられる。さらに、複数の遺伝子導入株の培養上清の組み合わせによる、CMC および濾紙の分解への遺伝子産物の相乗効果について検討し、Cel5A に対して Cel6C または Cel12A を加えると濾紙の分解を向上させることが示された。現在、*cel6A*, *cel9A* 発現株の培養上清のセルラーゼ活性評価を含めて検討をすすめている。

Streptomyces, cellulase

講演番号：3A11p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ A 校舎 11 会場

セルラーゼ高分泌放線菌 *Streptomyces thermocarboxydus* C42 のゲノム解読より見出された推定セルラーゼ遺伝子群の発現解析および発現タンパク質によるセルロース分解

The gene expression and cellulase activities of putative cellulase genes found in the genome of cellulolytic *Streptomyces thermocarboxydus* C42.

○友常 久実子[1]、春日 和[1]、佐藤 梓織[1]、小林 正之[1]、志村 洋一郎[1]、石川 淳[2]、池田 治生[3]、小嶋 郁夫[1] ([1]秋田県大、[2]国立感染研、[3]北里大・北里生命研)
○Kumiko TOMOTSUNE[1], Kano KASUGA[1], Shiori SATO[1], Masayuki KOBAYASHI[1], Yoichiro SHIMURA[1], Jun ISHIKAWA[2], Haruo IKEDA[3], Ikuo KOJIMA[1] ([1]Dept. Biotechnol., Akita Pref. Univ., [2]National Institute of Infectious Diseases, [3]Kitasato Inst. Life Sci., Kitasato Univ.)

【目的】

Streptomyces 属放線菌は抗生物質を生産することから医薬分野において重要な微生物である。一方，同属放線菌はセルロース系バイオマス (CB)の分解において主要な微生物で，これまでに複数の株からセルラーゼの精製やその遺伝子群の単離が報告されている。これらセルラーゼ遺伝子群に共通な特徴は、これら上流域に転写抑制因子 CebR が結合する領域 CebR box (14 bp の逆位反復配列)が存在することである。CebR は構成的に発現して CebR box に結合して遺伝子の転写を抑制するが，セルロースの構成糖であるセロビオースにより脱抑制される。

近年のゲノム解読により，同属放線菌のゲノムから複数の推定セルラーゼ遺伝子群が見出されているが，有用抗生物質の生産菌におけるセルロース資化やセルロースを原料とした発酵生産の報告はない。そこで我々は，抗生物質生産菌にセルロース資化能を付与することにより，未利用資源の CB を原料とした抗生物質の発酵生産をめざしている。

我々は土壌より分離した約 1,000 の放線菌株より，セルラーゼを高分泌する *Streptomyces thermocarboxydus* C42 を選抜した。さらに *Streptomyces lividans* TK21 を宿主としたショットガンクローニングにより，糖質加水分解酵素 (GH)ファミリーの GH5 および GH9 に属するセルラーゼ遺伝子 *cel5A* および *cel9A* を得ている。本研究では， (1) C42 株ゲノム解析より見出された推定セルラーゼ遺伝子群の発現解析，および(2) これら遺伝子群の発現タンパク質によるセルロース分解について報告する。

【方法・結果】

（1）C42 株ゲノムから見出された推定セルラーゼ遺伝子群の発現解析

C42 株ゲノムのドラフトシーケンシングより，*cel5A* と *cel9A* とともに，GH5，GH6，GH12 および GH 48 に属する 7 種の推定セルラーゼ遺伝子 (*cel5B*，*cel6A*，*cel6B*，*cel6C*，*cel12A*，*cel12B* および *cel48A*)を見出した。*cel5B*，*cel6A*，*cel9A*，*cel12A* および *cel48A* の上流域には CebR box が存在し，これら遺伝子群の発現はセロビオースにより誘導されることが示唆された。そこで，セロビオースとグルコース (コントロール)を炭素源とした培養において，9 種のこれら遺伝子群の発現について RT-PCR により確認した。発現量については real time-PCR により解析している。

（2）C42 株から見出された推定セルラーゼ遺伝子群の発現タンパク質によるセルロース分解

9 種の推定セルラーゼ遺伝子群を単離後，染色体組込み型ベクターpKU460 の高発現プロモーターP*rpsJ* の下流に連結し，TK21 株に導入した。カルボキシメチルセルロース (CMC)分解を指標として各形質転換株のセルラーゼ分泌を検討した結果，*cel5A*，*cel9A* に加えて *cel12A* の導入株は菌体外にセルラーゼを分泌した。さらに，各遺伝子産物の CMC，アビセルおよび濾紙を基質としたセルラーゼ活性測定について報告する。

Streptomyces, cellulase, antibiotics

講演番号：3A11p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ A 校舎 11 会場

The *tpg-tap* gene pair of the linear plasmid functions to maintain the linear chromosome in *Streptomyces rochei* 7434AN4

○Yosi NINDITA[1], Zhisheng CAO[1], Yuh SHIWA[2], Hirofumi YOSHIKAWA[2], Kenji ARAKAWA[1], Haruyasu KINASHI[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Tokyo Univ. Agri.)

Streptomyces rochei 7434AN4 is a producer of two structurally unrelated polyketide antibiotics, lankamycin and lankacidin. This strain carries three linear plasmids, pSLA2-L (211 kb), pSLA2-M (113 kb), and pSLA2-S (18 kb), whose complete sequences have been determined. pSLA2-L and pSLA2-M shares identical 14.6 kb of their rightmost sequences, while pSLA2-S has no homology with pSLA2-L or pSLA2-M. Southern hybridization analysis using 3.7 kb of pSLA2-L right-end probe revealed that the *S. rochei* chromosome shares 3.1 kb of homology with the right end of pSLA2-L and pSLA2-M. However, the plasmidless strain 2-39 showed no positive signal with this probe, suggesting that the chromosome had lost the telomere. In the meantime, new plasmidless mutants were generated from strain 51252 (pSLA2-L$^+$) by protoplast regeneration method. Among 200 colonies obtained from the protoplast regeneration, two colonies (YN-P7 and YN-P145) showed no antibiotic activity in bioassay against *Micrococcus luteus*. As expected, both mutants showed no telomere signals. This result suggested that the chromosome lost the telomeres and was circularized concomitant with the loss of linear plasmids.

Terminal protein gene (*tpg*) encodes covalently bound protein to the 5'-end of linear replicons. pSLA2-L and pSLA2-M contain the terminal protein gene (*tpg*), while pSLA2-S does not. Together with the fact that no additional intact *tpg* genes have been found on the chromosome, we hypothesized that the *tpg* genes on pSLA2-L and pSLA2-M is essential to maintain the linear topology of the chromosome and pSLA2-S. To prove this hypothesis, complementation of *tpg* from pSLA2-M (*tpgRM*) was carried out in strain 51252 (pSLA2-L$^+$). Pair gene *tpgRM-tapRM* was introduced to *E. coli-Streptomyces* shuttle vector pRES18, resulting complementation plasmid pYN15. Plasmid pYN15 was transformed into strain 51252, followed by curing of pSLA2-L by protoplast regeneration method in the presence of thiostrepton to retain pYN15. Obtained mutants which carry pYN15 but lost pSLA2-L, still retained the chromosomal end. This result indicated that the *tpg-tap* of pSLA2-M could maintain the linear chromosome. Finally, curing of pYN15 was done by protoplast regeneration without antibiotic suppression. All the obtained mutants carrying neither pSLA2-L nor pYN15 lost the chromosomal end. These results demonstrate that *tpg-tap* gene pair is essential to maintain the linear topology in *S. rochei* 7434AN4.

terminal protein, *Streptomyces*, linear plasmid

講演番号：3A11p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ A 校舎 11 会場

*Streptomyces rochei*7434AN4 株の線状染色体の塩基配列解析
Nucleotide sequence of a linear chromosome of *Streptomyces rochei* strain 7434AN4
○稲田 晋宣[1]、曹 志生[2]、ニンディタ ヨシ[2]、片岡 憂祐[2]、田上 道平[3]、レジャヴァ アレキサンダー[3]、志波 優[4]、吉川 博文[4]、石川 淳[5]、木梨 陽康[2]、荒川 賢治[2] ([1]広島大・自然科学セ、[2]広島大院・先端研、[3]理研・OSC、[4]東農大・応生科、[5]国立感染研)
○Kuninobu INADA[1], Zhisheng CAO[2], Yosi NINDITA[2], Yusuke KATAOKA[2], Michihira TAGAMI[3], Alexander LEZHAVA[3], Yuh SHIWA[4], Hirofumi YOSHIKAWA[4], Jun ISHIKAWA[5], Haruyasu KINASHI[2], Kenji ARAKAWA[2] ([1]N-BARD, Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ., [3]RIKEN, [4]Tokyo Univ. of Agric., [5]NIID)

【目的】放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は抗生物質ランカサイジン、ランカマイシンを生産する。また本菌は 3 つのプラスミド（pSLA2-L、M、S）を保持しており、染色体およびこの全てのプラスミドが線状構造をしているという特徴を持つ。この 3 つの線状プラスミドについてはその全塩基配列を決定し、抗生物質生産遺伝子や生体防御関連の遺伝子がプラスミド上にコードされていることを明らかにした。本研究では *S. rochei* 7434AN4 株の染色体の全塩基配列を決定し、染色体やプラスミドの起源や構造相関性、さらにはアーム領域に含まれる二次代謝遺伝子群の詳細解析を目指した。
【方法および結果】*S. rochei* 7434AN4 株のゲノム解析は次世代シークエンサ Illumina GAII シークエンサを用いて行った。その解析の結果、80 塩基のリードが 2600 万ペア得られた。これらをアセンブリーし、以前得られた Roche 454 シークエンサ由来の contigs と組み合わせて、500 bp 以上の hybrid contig が 213 個得られた。この結果とプラスミドの結果と合わせて解析した結果、約 8.5Mb の染色体由来の配列が得られた。
今回我々は全ゲノム解析を行うに当たり解決すべき点として、rRNA(16S-23S-5S)の塩基配列に着目した。これまでにゲノム配列が報告されている *Streptomyces* 属放線菌と比較した結果、*S. rochei* 7434AN4 株の ORF の相同性は *S. hygroscopicus* 5008 株に近縁であった。rRNA について解析を行うために、得られた contigs の配列で rRNA を含む配列を検索した。その配列を基に、23S および 5S の下流部の領域を PCR で増幅後、その塩基配列を決定した。得られた配列の比較解析から、*S. rochei* 7434AN4 株は他の *Streptomyces* 属放線菌と同様に染色体上に 6 コピーの rRNA を保持していることが示唆された。アーム領域解析を含めた詳細についても報告する。

Streptomyces, genome sequence

講演番号：3A11p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ A 校舎 11 会場

肺炎連鎖球菌における過酸化水素耐性機構の解析
Study on the mechanism of resistance to hydrogen peroxide in *Streptococcus pneumoniae*
○山本 裕司、伊東 諒、鈴木 亜也菜、向井 孝夫 (北里大学獣医)
○Yuji YAMAMOTO, Ryo Itoh, Ayana Suzuki, Takao Mukai (Kitasato Univ.)

【背景と目的】肺炎連鎖球菌 *Streptococcus pneumoniae* は、ヒトの鼻腔や咽頭に棲息する常在菌の一種であるが、宿主の免疫が低下すると、肺炎や敗血症、髄膜炎などの重篤な感染症を引き起こす。本菌の棲息及び感染部位はいずれも好気的環境であることから、酸素への適応能力は病原性と密接に関連すると推測される。しかし本菌は呼吸鎖やカタラーゼを持たず、酸素への適応機構については不明な点が多い。特に本菌は典型的な H_2O_2 産生菌であり、産生された H_2O_2 は他の細菌の増殖阻害や組織の炎症に関与するとされているが、肺炎連鎖球菌自身がどのように H_2O_2 の毒性から身を守っているかは不明であった。

これまでに我々は、肺炎連鎖球菌の H_2O_2 耐性因子として鉄結合蛋白質である Dpr のホモログに注目し、本菌の *dpr* 欠損株が顕著な酸素感受性を示すこと、マウスの肺炎モデルにおいて病原性が低下することを見出した。解析の結果、Dpr 分子は Ferritin のような鉄結合タンパク質であり、細胞内の鉄イオンをキレートすることで、H_2O_2 のヒドロキシラジカルへの変換を妨げると推測される。一方、Hajaj らは *S. pneumoniae* の H_2O_2 耐性因子として Thiol peroxidase(TpxD)を報告した（J. Bacteriol. 2012, 80:4333)。そこで本研究では、*S. pneumoniae* の H_2O_2 耐性と病原性における両遺伝子の役割を解析することを目的とした。

【実験方法】本実験では D39 株を親株として、各遺伝子の欠損株を作製した。*tpxD* 欠損株の作製には、２点相同組換えを用いゲノム上の *tpxD* 遺伝子にエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入した。また、*dpr, tpxD* の 2 重欠損株は、*tpx* 欠損株に *dpr* の変異を導入することで作製した。感染試験には、6～9 週齢の雌の C57BL/6J マウスを用い、腹腔内あるいは経鼻より野生株及び各遺伝子欠損株を投与した。

【結果と考察】昨年度までに取得した *dpr* 欠損株に加え、新たに *tpxD* 欠損株及び *dpr, tpxD* の 2 重欠損株を作製した。生育試験を行った結果、好気条件下では *dpr* 欠損株、*dpr, tpx* 欠損株で顕著な生育の遅延が認められたものの、*tpxD* 欠損株は野生株と同等の生育能を示した。各欠損株の H_2O_2 蓄積能を比較した結果、*dpr, tpxD* 欠損株においてのみ野生株と較べ低下が認められた。マウスを用いた感染試験では、腹腔内投与では各株間に顕著な違いは認められなかったが、経鼻投与では、*dpr* あるいは *tpxD* の単独欠損株を投与したマウスの生存時間は野生株較べ向上し、*dpr, tpxD* 欠損株を投与したマウスは観察期間中全てが生存した。以上の結果から、Dpr と TpxD は *S. pneumoniae* の肺での感染に寄与し、相補的な役割を持つと推測された。

Oxidative stress, Hydrogen peroxide, Streptococcus pneumoniae

講演番号：3A11p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ A 校舎 11 会場

Lactobacillus reuteri における Elongation factor Tu のシグナル配列非依存的な分泌機構に関する研究

Study on the signal sequence-independent export mechanism of Elongation factor Tu in *Lactobacillus reuteri*

○西山 啓太、南條 早由利、遠藤 紗耶、小菅 晴香、山本 裕司、向井 孝夫（北里大獣医）
○Keita NISHIYAMA, Sayuri NANJO, Saya ENDO, Haruka KOSUGE, Yuji YAMAMOTO, Takao MUKAI (School of Veterinary Medicine, Kitasato Univ.)

【目的】細菌が細胞外に分泌する蛋白質の多くは、分泌装置である Sec 分泌系あるいは TAT 分泌系を介して細胞表層に提示される。このような経路で分泌される蛋白質は、N 末端に特徴的な分泌シグナル配列をもち、シグナル配列依存的に分泌される。一方、近年、細胞内酵素であるエノラーゼや GAPDH において、既知の分泌シグナル配列とは異なる特定の領域が分泌に寄与していることが明らかになってきた。しかし、これらの領域に共通性は見出されておらず、分泌シグナル非依存的な蛋白質の分泌に関しては不明な点が多い。これまで我々は、乳酸菌 *Lactobacillus reuteri* の Elongation factor Tu (EF-Tu)が細胞外に分泌されることを見出してきた [1)]。EF-Tu は蛋白質合成の際にはたらく因子であり、既知の分泌シグナルは保存されておらず、その分泌機構については殆ど不明である。本研究では、EF-Tu の分泌シグナルの探索とその分泌経路を明らかにすることを目的とした。

【方法】EF-Tu の N 末端に FLAG タグを付加した EF-Tu を乳酸球菌由来ベクターに構築した。さらに Inverse PCR によりアミノ酸残基を欠損および置換した変異 EF-Tu を作製し、これらを *L. reuteri* に導入することで、アミノ酸残基の変異が EF-Tu の分泌に及ぼす影響について検討した。EF-Tu の分泌は、抗 EF-Tu または抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した。また、細胞質内マーカーとして RNA ポリメラーゼ抗体を用いた。

【結果】EF-Tu の N/C 末端に存在する約 90 アミノ酸残基を欠損すると C 末端欠損体のみ分泌が著しく低下した。続いて、C 末端の DomainⅢ領域内の 35 アミノ酸残基を欠損すると、同様に分泌は低下し、EF-Tu の特定の領域が分泌に関与することが推察された（図）。そこで、本領域の疎水性アミノ酸残基をグリシンに置換した変異体を用いて分泌パターンを確認した結果、幾つかのアミノ酸残基が分泌の際に重要な役割を果たしていることが示された。また細胞外画分に対する RNA ポリメラーゼ抗体の反応、さらに超遠心分離により得られた膜小胞を含む画分に対する EF-Tu 抗体の反応はいずれも殆ど検出されないことから、溶菌や膜小胞形成が EF-Tu の分泌に関与する可能性は低いと考えられた。以上から、我々は EF-Tu の C 末端領域が分泌シグナルのように機能すると考え、その分泌経路についてさらに解析を行っている。

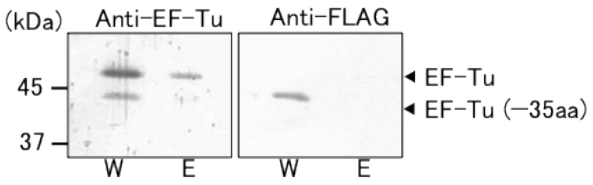


図. EF-Tu の C 末端欠損体(-35aa)の分泌パターン.
W: Whole cell lysate, E: Extracellular を示す.

[1)] Nishiyama *et al.*, *PloS One.* In press

EF-Tu, Secretion, Signal sequence

講演番号：3A11p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ A 校舎 11 会場

Lactobacillus reuteri DSM 20016^{T} 腸管付着因子 MapA とムチンの相互作用解析
In vitro interaction of an adhesin MapA from *Lactobacillus reuteri* DSM 20016^{T} to mucin
○本橋 健太、梶川 揚申、佐藤 英一、岡田 早苗（東農大院）
○Kenta MOTOHASHI, Akinobu KAJIKAWA, Eiichi SATOH, Sanae OKADA (Tokyo university of agriculture)

［背景・目的］*Lactobacillus reuteri* は腸管付着因子の一つとして mucus adhesion promoting protein (MapA)を有しており、MapA がヒト大腸由来 HT29 細胞の産生する粘液に付着することが明らかになっているが、その詳細は検討されていない。そこで、粘液の主要構成成分である糖タンパク質、ムチンに着目した。ムチンは N 末端、C 末端側の cysteine rich 領域とその間の tandem repeat 配列から構成されている。また、それぞれのドメインは翻訳後修飾を受け、糖鎖が *N* もしくは *O* グリコシド結合していることが知られている。現在、ムチンと結合する腸管付着因子の研究においては、ムチン中の糖鎖を認識して結合するレクチン様の結合様式を解析することが一般的である。しかし、*L. reuteri* の MapA は本来 cysteine を基質として取り込む ABC transporter の構成要素であるため、ムチン中の糖鎖だけではなくムチン中の N 末端および C 末端側に存在する cysteine rich 領域を認識して結合している可能性も考えられる。そこで、本研究は MapA とムチンの結合性を検討することで、*L. reuteri* と粘液の付着性の詳細を明らかにすることを目的とした。
［結果・考察］*L. reuteri* とムチンの付着性に MapA が関与しているか否かを確認するために *L. reuteri* DSM 20016^{T}(WT 株)およびその MapA 欠損株(ΔMapA 株)を用いてブタ胃ムチン標品との付着性を検討した。その結果、ΔMapA 株は WT 株と比較して有意に付着性が低下したことから、WT 株とムチンの付着性に MapA の関与が示唆された。つづいて、MapA は腸管付着因子の一つであることからムチン中の糖鎖を認識して結合していることが考えられる。そこで、ブタ胃ムチンを過ヨウ素酸によって処理し糖鎖を開裂させたムチンと無処理のムチンに対する WT 株および ΔMapA 株の付着性を検討した。その結果、WT 株においては無処理ムチンに比べて糖鎖開裂ムチンへの付着性が有意に低下した。一方、ΔMapA 株においては無処理ムチンと糖鎖開裂ムチンへの付着性において差は認められなかった。この結果から、MapA はムチン中の糖鎖に対して結合していることが強く示唆された。また、MapA がムチン中の cysteine rich 領域と結合するかを確認するため、大腸菌発現系により取得した MapA と MapA 中の cysteine 結合部位をブロックした(MapA+Cys)を用いてブタ胃ムチンに対する結合性を ELISA 法により評価した。その結果、両者の結合性には差が認められなかった。以上の結果から、WT 株のムチンへの付着は WT 株が有する MapA がムチン中の糖鎖と結合することに起因すると考えるのが妥当であると結論した。現在、MapA と糖鎖の結合の詳細を解析中である。

Lactobacillu reuteri, Mucin, Adhesion

講演番号：3A11p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ A 校舎 11 会場

マウス腸管粘膜における *Lactobacillus reuteri* DSM 20016^T の付着
Adhesion of *Lactobacillus reuteri* DSM 20016^{T}in the mouse intestinal mucosa
○永倉 洋憲、梶川 揚申、佐藤 英一、岡田 早苗（東農大応生科・化学)
○Hironori NAGAKURA, Akinobu KAJIKAWA, Eiiti SATOH, Sanae OKADA (Tokyo Univ. Agr.)

【背景・目的】 *Lactobacillus reuteri* DSM 20016^T はアドヘシンとして機能する MapA を菌体表層に保持しており、Caco-2 細胞に対し付着能を示す。しかし、実際の腸管内では上皮細胞は粘液で覆われており、外来異物の上皮細胞への接触は困難である。そのため、粘液を産生しない Caco-2 細胞を用いた実験系で明らかになったことがそのまま腸内環境下で起こるとは考え難い。したがって、*L. reuteri* DSM 20016^T の腸管付着性を明らかにするには *in vivo* での検討が不可欠である。一般に腸管管腔内での細菌は、粘液表面・粘液上層・上皮細胞層の何れかに存在する。腸内に定着する細菌は、これらの層中に定着の場を築き、粘液の流れなどに逆らっていると考えられる。そこで、経口投与された *L. reuteri* DSM 20016^T が各層中の何れに存在するかを、*in vivo* で調べる必要があると考えた。さらに、付着因子である MapA の欠如により腸内残存性が下がったことから、MapA の影響についても同時に検討が必要である。よって本研究では、腸管中の *L. reuteri* DSM 20016^T の存在やその位置の詳細と、MapA の関連性について *in vivo* で明らかにすることを目的とした。
【方法】 *Lactobacillus reuteri* DSM 20016^T とその *mapA* 遺伝子欠損変異株（ΔMapA）を供試菌株とした。蛍光強度の低下で細胞分裂回数を計測できる CFSE で蛍光染色した菌体を雌の Balb/c に 7 日間反復投与し、3 日の休止期間後に小腸を摘出した。小腸は空調・回腸をそれぞれ近位端と遠位端に分割した。分画ではまず、粘液表面を PBS で洗浄した。続いて粘液の主成分であるムチンを分解し上皮細胞から除去できる DTT 溶液を用いて粘液層を得た。最後に EDTA 溶液で腸片を洗浄して上皮細胞層を得た。それぞれの溶液中の供試菌株の検出は FACS で行った。
【結果・考察】空腸近位端から回腸遠位端にかけて野生株・ΔMapA 株ともに検出され、基底膜側に下がるほど菌体数は減っていた。野生株は各部位の上皮細胞層や粘液層下部でも検出されたのに対し、ΔMapA 株は粘液層下部より基底膜側ではみられなかった。このことから、運動性を持たない菌株でも上皮細胞と接触する機会があることが示唆された。また、MapA の有無で経口投与した菌体の腸内での局在が異なることが明らかとなった。さらに、検出された野生株、ΔMapA 株ともに蛍光強度は初期蛍光強度と比べて下がっているものがみられた。以上の結果から、*L. reuteri* DSM 20016^T は小腸内の粘液表面から上皮細胞にかけて存在し、付着因子の有無によって局在が変化することや、腸管内で細胞分裂をしている可能性があると結論した。現在、蛍光強度の低下が菌体の細胞分裂に起因するものかどうか、また分裂した回数についても検証している。

Lactobacillus reuteri, adhesion protein, mouse intestine

講演番号：3A11p23
講演日時、会場：3 月 29 日 17:59～ A 校舎 11 会場

Lactococcus lactis 由来新規 m5C MTase による大腸菌ゲノム DNA のメチル化割合の変更
Novel m5C MTase in *Lactococcus lactis* affects percentage of methylated DNA in *Eschericia coli*
○小林 美穂、萩 達朗、鈴木 チセ、木元ー新良 広実、守谷 直子、野村 将（畜草研）
○Miho Kobayashi, Tatsuro Hagi, Chise Suzuki, Hiromi Kimoto-Nira, Naoko Moriya, Masaru Nomura (NARO Inst Lives Grassl Sci)

［背景・目的］細菌のファージ耐性機構として働く Type II 制限・修飾システム（Type II R-M）は、特定の塩基配列を切断する制限酵素と DNA メチル化修飾酵素（MTase）から成る。MTase による DNA メチル化は、制限酵素による分解から自己 DNA を保護するだけでなく、自己遺伝子の発現を調節し、菌株の表現型に影響する場合もある。これまでに我々は *Lactococcus lactis* 2 株から、C(5)-シトシン MTase（m5C MTase）コード遺伝子と相同性の高い遺伝子配列（*llaS1ORF1157MP* および *llaJ50ORF2079MP*)を見出し、大腸菌（CopyCutter™ EPI400™ *E. coli*: *E.coli* EPI400）にクローニングし、さらにクローニングした遺伝子が大腸菌でも発現することを報告した。今回は *llaS1ORF1157MP* および *llaJ50ORF2079MP* にコードされる推定 m5C MTase（M.LlaS1ORF1157P および M.LlaJ50ORF2079P）が、宿主大腸菌のゲノム DNA メチル化割合に与える影響を調べた。
［方法］推定 m5C MTase コード遺伝子 *llaS1ORF1157MP* または *llaJ50ORF2079MP* を pGEM-T Easy vector に結合した組換えプラスミド pMCS13（4.2 kb）および pMCJ504（5.1 kb）を保有する大腸菌、また、宿主大腸菌 *E.coli* EPI400 を、LB 培地、37ºC で培養し、定常期の菌体から全ゲノム DNA およびプラスミド DNA を抽出した。各 DNA 試料について、MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit（Colorimetric）を用いてメチル化 DNA 量を測定し、全 DNA 当たりのメチル化 DNA の割合（重量%）を算出した。
［結果・考察］*E.coli* EPI400 から抽出した全ゲノム DNA のメチル化割合は 0.19%であった。一方、pMCS13 および pMCJ504 保有株から抽出した全ゲノム DNA のメチル化割合は各々0.04%および 1.45%であり、M.LlaS1ORF1157P は宿主の全ゲノム DNA のメチル化割合に影響しないが、M.LlaJ50ORF2079P はメチル化割合を約 8 倍に増加させることが明らかとなった。また、プラスミド DNA のメチル化割合は各々2.3%および 2.4%であり、全ゲノム DNA よりもメチル化割合が高かった。組換えプラスミドは、分子内に乳酸菌遺伝子由来の配列を含むことから、特に M.LlaS1ORF1157P は、*L. lactis* のゲノム DNA で出現頻度の高い配列を認識し、メチル化するように特化しているのかもしれない。本研究は JSPS 科研費 24580400 の助成を受け実施した。

Lactococcus lactis, DNA methyltransferase

講演番号：3A12a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ A 校舎 12 会場

大腸菌を用いた、金属イオン存在下での酸化による fALS SOD1 異常化の評価

*Escherichia coli*cells serve as a tool for monitoring formation of abnormal fALS SOD1 protein under metal-catalyzed oxidation.

○黒川 洋一、桜田 真一、松井 義隆（福井県大生物資源）
○Youichi Kurokawa, Shin'ichi Sakurada, Yoshitaka Matsui (Fukui Pref. Univ.)

【目的】SOD1変異体は神経疾患fALS の原因物質として知られる。凝集形成を含む、その異常化には酸化が関わる説が有力視されているが、その詳細は不分明な点が多く、どのように異常化が引き起こされるか解明することに関心が持たれた。私どもはこれまでに、Metal-catalyzed oxidationを引き起こす条件下で、fALS SOD1の異常化に伴うストレス応答が誘導されることを見出している。本研究では、このストレス応答がSOD1蛋白質の異常化の初期段階を反映するか検証することとした。
【方法と結果】ヒトSOD1野生型あるいは点変異体とペリプラズム移行シグナルとの融合体を、ストレス応答をモニターできる大腸菌細胞*SR1458*において発現させ、種々の薬剤存在下での応答レベルを*LacZ*活性として測定した。また、酸化修飾を受けることが報告されているシステインなどの残基を改変した変異体を作成し、同様の実験を行った。SOD1分子表面に存在し、オリゴマー形成に関わるトリプトファン残基あるいは遊離システイン残基を改変した変異体発現細胞では、塩化銅(II)添加時のストレス応答レベルは非添加時の約二倍に上昇し、野生型発現細胞と同程度であった。一方、金属結合部位に存在するヒスチジン残基を改変した変異体発現細胞では、応答レベルの上昇はほとんど起こらなかった。また、SOD1の凝集を抑制することが報告されている低分子化合物を添加しても、ストレス応答レベルは抑制されなかったが、炭素中心ラジカル特異的な捕捉剤を添加すると、その濃度に応じてストレス応答は抑制されたことから、SOD1異常化の初期段階における炭素中心ラジカルの関与が示唆された。
【考察】以上の結果は、金属イオン触媒によるSOD1の酸化（Rakhit *et al. JBC* **277**(49)(2002)）においても、炭素中心ラジカルが関与することを示唆している。これは、既存の報告例（Zhang *et al. JBC* **278**(26)(2003)）とは異なる発生メカニズムに基づくと推定される。また、オリゴマー形成に関わる残基を改変したSOD1変異体でも異常化に伴うシグナルが観測されたことから、銅イオン添加時のストレス応答レベルの上昇は、オリゴマー形成より早い時期に起こる、SOD1異常化の初期段階を反映すると仮定しても矛盾なく説明できる。これらの知見は、SOD1の酸化的凝集を抑制する化合物の探索に重要であると期待される。

SOD1, unfolded protein response, metal-catalyzed oxidation

講演番号：3A12a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ A 校舎 12 会場

Chlamydomonas reinhardtii 実験系におけるタイプ B トリコテセン系マイコトキシンの毒性評価
Development of Chlamydomonas reinhardtii experimental system for the evaluation of type B trichothecenes
○鈴木 忠宏、岩橋 由美子（農研機構 食総研）
○Tadahiro SUZUKI, Yumiko Iwahashi (NARO NFRI)

【目的】デオキシニバレノール（DON）やニバレノール（NIV）等のタイプ B トリコテセン系マイコトキシンは、これまで動物試験による毒性影響が報告され、細胞レベルの毒性試験によってタンパク質合成阻害のような代表的な毒性作用機構が明らかにされてきた。しかし、NIV に対する強い感受性の報告は動物細胞の実験系が主であり、酵母細胞や植物組織等の試験では十分な感受性を得られず、中間生成物であるフザレノン X 等との毒性の比較も十分には実施されていない。そこで、本研究では光合成や光感受性のモデル生物として活用されている単細胞の緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* をタイプ B トリコテセン系マイコトキシンの毒性評価に活用することを検討し、植物毒性などにも応用可能な評価系の構築を目指した。

【方法】*C. reinhardtii* の野生型株 137C を Tris-Acetate-Phosphate (TAP)培地, 白色光, 25℃の条件で 4 日程度穏やかに振とう培養して前培養液を調製した。前培養液を希釈して 96 ウェルプレートに分注し、タイプ B トリコテセンとして deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), 3-acetyl-deoxynivalenol (3AcDON), 15-acetyl-deoxynivalenol (15AcDON), 及び fusarenon-X (FusX)を最終濃度 100ppb から 25ppm となるように TAP 培地に加えた。コントロールとしてマイコトキシンの溶媒に用いている DMSO を培地に添加した。光量子束密度（PPFD）を変更可能な LED 光源を用意し、白色、青色(470nm), 赤色(660nm)の光条件を設定した。混合(Mix)条件は赤：青＝3：1 となるように砲弾型 LED を調節して作製した。

【結果】タイプ B トリコテセンの *C. reinhardtii* 137C 株に対する最適な曝露濃度を検討した結果、10ppm 以上の暴露で各マイコトキシンの毒性に変化が生じ、25ppm 条件において顕著にマイコトキシン感受性が識別可能となった。また、*C. reinhardtii* 実験系では NIV の感受性が FusX と同様に高かった。従属栄養条件と光独立栄養条件の違いによるマイコトキシン感受性を調べるために明所と暗所においてそれぞれ 25ppm のカビ毒に対する感受性を観察した結果、増殖速度と関係なく感受性の傾向は一致し、DON, NIV, FusX に対する強い毒性が示唆された。波長の違いによるマイコトキシン感受性への影響を調べたところ、感受性の傾向は各色でおおむね一致していた。

mycotoxin, typ B trichothecene, Chlamydomonas reinhardtii

講演番号：3A12a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ A 校舎 12 会場

過酷な生育環境に生息する微細藻類の探索とストレス耐性機構の解析

Isolation of microalgae from extreme severe environments, and analysis of stress tolerance mechanism.

○高橋 妙華、牛奥 佳澄、岡田 和隆、長嶋 雄大、峰村 拓、川崎 信治（東農大　バイオ）
○Taeka TAKAHASHI, Kasumi Ushioku, Kazutaka Okada, Yuta Nagashima, Taku Minemura, Shinji Kawasaki (TUA Bio)

【目的】一般的に光合成生物は、強光が付随する高塩濃度、乾燥、高温や低温などの環境ストレスが混在する過酷な生育環境下では、光合成系で光酸化ストレスが発生し、生育が阻害される。当研究グループでは、光合成生物の生存が困難な過酷な環境（直射日光下の真夏のアスファルトやコンクリート壁、砂漠土壌など）から光独立栄養的に増殖する微細藻類を探索し、現在までに約70株ほどの微細藻類を単離・保有している。単離された微細藻類は、単離源の特徴からも高度な環境ストレス耐性能を有することが推定される。本学会では研究室で保有する微細藻類の分類学的な性状と有用機能の解析結果に関して報告する。

【方法・結果】過酷な環境の表面土壌から単離された藻類のうち、培養に成功した菌体を使用して強光条件下で乾燥ストレスや塩ストレスを付与し、その経過を観察した。モデル藻類のクラミドモナスやクロレラはストレス付与に伴い菌体の白色化や死滅化が観察されたが、単離株の多くは赤色化を伴い長期間生存し、回復実験においてすみやかに緑色に回復する能力を有していた。また赤色化を伴わない常緑株も存在した。現在、単離株の中でも特に優れたストレス耐性能を示した数種類の菌株を用いて、分類学的な解析を行っている。またストレス耐性期のプロテオーム解析などを行い、菌株の個性に対応するストレス耐性機構の解明を試みている。

Microalgae, Environmental Stress, oxidative stress

講演番号：3A12a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ A 校舎 12 会場

真夏のアスファルトから単離した真核微細藻類が生産するアスタキサンチンを水溶化するタンパク質の発見と機能特性

A novel astaxanthin binding aqueous carotenoprotein from a eukaryotic microalga isolated from asphalt in midsummer.

○川崎 信治、水口 佳祐、牛奥 佳澄、高橋 妙華、佐藤 大、河野 哲也、清水 宏文 (東農大 バイオ)
○Shinji KAWASAKI, Keisuke Mizuguchi, Kasumi Ushioku, Taeka Takahashi, Masaru Sato, Tetuya Kono, Hirofumi Shimizu (TUA Bio)

アスタキサンチンはエビやカニの甲羅、フラミンゴの羽などに含まれる天然の脂溶性カロテノイドで、高い抗酸化力を持つことから化粧品や機能性食品に幅広く利用されている。アスタキサンチンは真核微細藻類のヘマトコッカス藻が細胞内に油滴として蓄積するものが古くから研究されており、商業生産にも用いられている。

水溶性のカロテノイド結合タンパク質に関しては、原核生物のラン藻が強光下で水溶性の orange carotenoid protein (OCP)を生産することが知られており、強光防御反応への関与が詳細に研究されているが、アスタキサンチンの結合報告例は無く、また真核藻類における類似のタンパク質の分布は確認されていなかった。我々は真夏のアスファルトから単離した高い環境ストレス抵抗性を有する真核の微細藻類(Ki-4 株)が、強光ストレス付与時に細胞抽出液がオレンジ色に変色することに着目し研究を進めた結果、オレンジ色の水溶性タンパク質の精製に成功した [1]。

精製タンパク質（AstaP）は、アスタキサンチンを主要なカロテノイドとして結合し、かつ糖鎖を結合する分子量約 35～40kDa のモノマーであった。タンパク質の一次構造を解析した結果、AstaP は N 末端部分に細胞外分泌シグナルを有し、かつ脊椎動物で細胞間接着因子として同定されている Fasciclin ドメインを保持し､生物界に広く分布するファシクリンファミリーのタンパク質群と高い構造類似性を示した。ただしファシクリンファミリータンパク質の中でカロテノイドを結合するものは現在までに報告例がない。

AstaP は強光ストレス環境下で大量に合成され、純水に可溶な水溶性を示し、水溶液中で 1 重項酸素消去活性を発現した。また 100℃で 1 時間の熱処理後も水溶特性と活性を失わない熱安定性を示した。Ki4 株は液体による大量培養が可能であり、AstaP は精製が容易であることから、各種産業への有効利用が期待される。AstaP のホモログは海洋(微)生物に広く分布することが推定されたが、全て機能未知のタンパク質であった。現在は他生物における分布の調査と、結合カロテノイドとしてアスタキサンチンを選択した生理的意義の解明を主目的として研究を進めている。

1) Kawasaki et al. Plant Cell Physiology, 54(7) 1027-1040 (2013).

Astaxanthin, Microalgae, oxidative stress

講演番号：3A12a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ A 校舎 12 会場

シックハウスシンドローム原因物質が酵母細胞に及ぼす影響の解析

Effects of sick building syndrome inducers on yeast cells

○河合 孝朗、芳本 奈々、井澤 真吾（京都工繊大院　工芸科学)
○Takao KAWAI, Nana YOSHIMOTO, Shingo IZAWA (Kyoto Inst. Technol.)

シックハウスシンドロームは気密性の高い室内で化学物質などに長時間さらされることによって生じる疾患の総称であり、新築の家やマンションへの入居後などにしばしば発症する。主要な原因物質は建材の塗料や接着剤などに含まれる揮発性有機化合物であり、代表的なものとしてホルムアルデヒドやトルエン、キシレン、スチレンなどが知られている。中でもトルエンとキシレンは生産量や工業消費量が非常に多い芳香族炭化水素である。トルエンやキシレンが人体におよぼす影響は比較的よく知られているが、細胞や分子レベルでの作用については十分な情報があるとは言い難い。そこで本研究では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いてトルエンおよびキシレンが細胞に与える影響を検討した。

解析の結果、トルエンあるいはキシレンの存在下では、酵母の生育が濃度依存的に阻害されることが明らかになった。また、トルエンとキシレンは低濃度でミトコンドリアの断片化を速やかに誘導することを見出した。この現象は濃度依存的かつ可逆的であった。ミトコンドリア断片化の一因として酸化的ストレスが報告されていることから(Lefevre *et al*. *BBRC*, 2012)、細胞内酸化度や酸化的ストレス応答性転写因子 Yap1 の活性化などを検討したが、キシレンおよびトルエンによる酸化的ストレスの惹起は認められなかった。一方で、様々なストレスに応答する転写因子 Msn2 および Msn4 については核への移行・蓄積が誘導され、トルエンやキシレンによって Msn2/Msn4 標的遺伝子の転写が活性化される可能性が示唆された。

さらに、mRNA flux に対する影響についても検討をおこなった。ある種のストレス条件下では、非翻訳状態の mRNA が蓄積する P-body や stress granule (SG)が形成されることが知られている。そこで、これらの cytosolic mRNP granules の形成を検討したところ、トルエンおよびキシレンによって P-body の形成は誘導されたが、SG は形成されなかった。また、ポリソーム解析をおこなった結果、キシレンが bulk の翻訳活性を著しく阻害することを見出した。また、*SSA4* などの Msn2/Msn4 標的遺伝子の翻訳産物レベルはキシレン存在下で増加しなかった。

以上の結果から、トルエンおよびキシレンは酵母細胞のミトコンドリアや mRNA flux に対し、酸化的ストレス非依存的に影響を及ぼすと考えられた。また、酵母の翻訳活性に対する影響が両者で異なることが明らかとなった。現在、mRNA の核外輸送を阻害する可能性について FISH 解析をおこなって検討している。

mRNA flux, sick building syndrome, xylene

講演番号：3A12a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ A 校舎 12 会場

出芽酵母での局所麻酔薬や抗精神病薬の作用・毒性の機構とその緩和法
Mechanisms of action and toxicity of local anesthetics and antipsychotic drugs in yeast.
○上園 幸史[1]、荒木 智之[2]、東江 昭夫[3]、野口 航[1]、寺島 一郎[1] ([1]東大院理、[2]埼玉医大医、[3]千葉大真菌セ)
○Yukifumi UESONO[1], Tomoyuki ARAKI[2], Akio TOH-E[3], Ko NOGUCHI[1], Ichiro TERASHIMA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Saitama Med. Sch., [3]Chiba Univ. MMRC)

局所麻酔薬や抗精神病薬は臨床作用だけでなく副作用も引き起こすが、その作用と毒性の機構はいまだによくわかっていない。特に臨床で使用する低濃度でも引き起こされる術後認知障害やパーキンソン病症候群などは発症頻度が高いが毒性機構は不明なためその解明は重要である。我々は出芽酵母を用いて、それらの細胞レベルでの機構解明を目的としている。

出芽酵母では高浸透圧やグルコース飢餓などの環境ストレスが急速な翻訳開始の阻害とアクチン細胞骨格の破壊を同時に引き起こすが、局所麻酔薬やフェノチアジン系抗精神病薬でも同様な現象が起こるため、環境ストレスと薬剤作用には何らかの関係があると考えられる。これら臨床薬剤は両親媒性構造を有するため、それらの界面活性能による細胞溶解が高濃度毒性の一因である事を明らかにしているが、臨床で使用される低濃度では、細胞溶解を伴わずに翻訳阻害、アクチン骨格破壊、また細胞生存率の低下を引き起こす。今回、主に局所麻酔薬テトラカイン(TC)を用いて、細胞溶解を伴わない低(臨床)濃度での作用と毒性の機構、及びそれらの緩和法について調べた結果を報告する。

TC による翻訳阻害機構を調べたところ、翻訳開始因子 eIF2α は細胞溶解を伴う高濃度(10mM)でのみリン酸化されたが、どの濃度(2.5-10mM)でも P-body を形成する事がわかった。細胞溶解を伴わない低濃度(2.5mM)での P-body 形成と翻訳開始阻害は、mRNA 脱キャップ化因子 Pat1 に部分的に依存しており、これはグルコース飢餓による翻訳阻害機構と類似している。そこでグルコースとの関係を調べたところ、TC はグルコースの取り込みを阻害し、逆に高濃度グルコースの投与は、低濃度 TC によって引き起こされる種々の表現形(増殖阻害、翻訳阻害、アクチン骨格破壊、細胞生存率低下)を回復した。他の局所麻酔薬(リドカイン、ジブカイン)やフェノチアジン系抗精神病薬(クロルプロマジン、トリフルオペラジン)による増殖阻害も高濃度グルコースの投与で回復したため、これら臨床薬剤に共通する酵母での標的はグルコース取り込み系であり、その阻害によりグルコース飢餓疑似状態を引き起こすことで種々の細胞内反応を誘導すると考えられる。従ってグルコース飢餓疑似状態の緩和が薬剤毒性の軽減に繋がる可能性がある。

yeast, anesthetic, glucose starvation

講演番号：3A12a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ A 校舎 12 会場

Candida albicans における植物ディフェンシン AFP1 の作用機序解析
The mechanism of action of the plant defensin AFP1 in *Candida albicans*
○小黒 芳史、山崎 晴丈、高木 正道、高久 洋暁（新潟薬大応生科）
○Yoshifumi OGURO, Harutake YAMAZAKI, Masamichi TAKAGI, Hiroaki TAKAKU (Applied Life Science Niigata Univ.)

植物には哺乳動物のような適応免疫がないため、自然免疫である抗菌性蛋白質による生体防御機構は非常に重要なシステムである。我々はこれまでに植物抗菌性蛋白質の 1 つであるカラシナ由来ディフェンシン AFP1 が日和見感染菌 *Candida albicans* に対し高い抗菌作用を示すことを明らかにしている。本大会では、*C. albicans* に AFP1 を作用させた際の反応応答および AFP1 の感受性に関与しているグルコシルセラミド(GlcCer)の分子構造と AFP1 抗菌活性の関連性ついて解析した結果を報告する。

AFP1 を *C. albicans* に作用させた際、菌体内において細胞膜の脱分極化および活性酸素種(ROS)の誘導蓄積が生じる現象がこれまで観察されていた。今回、脱共役剤であるカルボニルシアニド 3-クロロフェニルヒドラゾン(CCCP)で前処理した菌体を用いて AFP1 感受性を検証したところ、AFP1 誘導による細胞膜脱分極、ROS 蓄積および細胞死が抑制された。これは CCCP 誘導による脱分極作用により AFP1 が細胞表層上の GlcCer と相互作用できないからではないかと推測された。また、抗酸化剤アスコルビン酸存在下においても ROS 蓄積および細胞死が抑制された。このことから、AFP1 の細胞膜への作用および ROS の蓄積誘導が細胞死に関与していることが示唆された。

次に、抗菌活性に関する重要因子 GlcCer の分子構造に注目した。これまでに GlcCer は、AFP1 感受性に関する重要な因子であることを明らかにしている。しかし、AFP1 感受性および非感受性の菌体由来の GlcCer 構造を比較したところ 2 カ所異なっていた。そこで我々は、AFP1 感受性真菌 *C. albicans* を利用して、変異型 GlcCer 構造を有する *C. albicans* 変異株を作製した。これら変異株は、野生株と比較して GlcCer 含有量の低下と共にドデシル硫酸ナトリウム(SDS)感受性を示した。そこで、GlcCer 合成酵素遺伝子を過剰発現させ、細胞あたりの GlcCer 含有量が増加した変異株に対し、AFP1 抗菌活性および SDS 感受性の検討を行った。その結果、SDS に対しては野生株と同様に耐性を示した。しかし、変異株は GlcCer 含有量が増加したにも関わらず野生株と比較して AFP1 低感受性を示した。すなわち、AFP1 が抗菌活性を示すには、、GlcCer 分子構造の認識が大きく関与していることが示唆された。

antifungal activity, Defensin, *Candida albicans*

講演番号：3A12a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ A 校舎 12 会場

酵母に見出した Tah18 タンパク質依存的な NO 生成の制御機構

Regulation mechanism of Tah18-dependent NO production found in yeast.

○吉川 雄樹、川原 寛弘、西村 明、那須野 亮、高木 博史（奈良先端科学技術大学院大学）
○Yuki YOSHIKAWA, Nobuhiro KAWAHARA, Akira NISHIMURA, Ryo NASUNO, Hiroshi TAKAGI (Nara Institute of Science and Technology)

【目的】当研究室ではこれまでに、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、高温ストレス下で細胞内に生成する一酸化窒素（NO）がストレス耐性に寄与することを見出した。また、酵母の NO 合成酵素（NOS）活性に関与するタンパク質として Tah18 を同定している。Tah18 はジフラビンレダクターゼファミリーに属し、Dre2 タンパク質と複合体を形成し、細胞質の鉄硫黄クラスタータンパク質の形成に関わることが報告されている。この Tah18-Dre2 複合体は、高濃度の過酸化水素下で解離し、Tah18 がミトコンドリアに局在化することで細胞死を誘導すると報告されているが、その詳細な機構は明らかになっていない。また、NO は細胞死を誘導するシグナル伝達物質として知られていることから、当研究室では Tah18 依存的な NO 生成と細胞死に何らかの関連があると考えている。本研究では、Tah18 の相互作用タンパク質である Dre2 が Tah18 依存的な NOS 活性に及ぼす影響と Tah18 による細胞死誘導機構の解明を目的とし、Dre2 による Tah18 依存的な NO 生成の制御機構について解析した。
【方法・結果】酵母の遺伝子ノックダウン株および組換えタンパク質を用いて、Dre2 が Tah18 依存的な NOS 活性を抑制することを *in vivo* および *in vitro* の実験から明らかにした。また、酵母の過酸化水素、高温ストレス下での NO 生成はストレス開始後 5 分で既に誘導され、関連遺伝子（TAH18,DRE2 など）の転写レベルでの制御ではないことが判明した。これらの結果から、高温ストレスによって Tah18-Dre2 複合体が解離し、Tah18 が遊離することで迅速に NOS 活性が誘導され、ストレス耐性に寄与する可能性が示された。また、Tah18 を過剰発現株させた酵母では細胞死が誘導され、顕著な生存率の減少が観察された。さらに、Tah18 過剰発現株で Dre2 も過剰発現させることで、生存率が有意に回復した。以上の結果から、Dre2 が Tah18 依存的な NO 生成を制御すること、および Tah18 依存的な NO 生成が Tah18 の過剰発現に伴う細胞死誘導に関与することが示唆された。現在、Tah18-Dre2 複合体の解離を共免疫沈降法によって検出することを試みている。また、Tah18 依存的な NO の生成、細胞死およびストレス耐性に関わるタンパク質の同定を目的として、プルダウン法、ニトロソ化タンパク質特異的な抗体によるウエスタンブロット法などを用いた NO の下流因子の解析を行っている。

nitric oxide, yeast, Tah18 protein

講演番号：3A12a17
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ A 校舎 12 会場

酵母における銅代謝関連転写因子 Mac1 を介した NO による高温ストレス耐性機構の解析
Analysis of NO-mediated high-temperature stress tolerance mechanism via the transcription factor Mac1 involved in cupper metabolism in yeast.
○相徳 珠帆、那須野 亮、高木 博史（奈良先端大バイオ）
○Miho Aitoku, Ryo Nasuno, Hiroshi Takagi (Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】当研究室では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、一酸化窒素（NO）がアルギニンから Tah18 タンパク質の NO 合成酵素（NOS）様活性により生成し、酸化ストレスの一種である高温ストレスへの耐性に寄与することを明らかにしている。NO は哺乳類においてシグナル分子として詳細に研究されているが、酵母などの真菌類における NO の生成機構や生理機能、特に NO が関与するストレス耐性機構はほとんど不明である。我々はこれまでに、非酵素的な NO 発生ドナー（SNAP）で処理した酵母を用いた解析から、NO が銅イオンの細胞内への取り込みと輸送を促進する転写因子 Mac1 の活性化を介して、細胞内の銅含量と銅依存性スーパーオキシドディスムターゼ Sod1 の活性を上昇させることを示唆する結果を得ている。NO はタンパク質のシステイン残基を *S*-ニトロソ化修飾し、活性を制御することが知られている。また、Mac1 の活性制御はシステイン残基の銅への配位により行われている。以上のことから我々は、高温ストレス下で酵母の細胞内で生成した NO が Mac1 を *S*-ニトロソ化修飾により活性化すること、また活性型の Mac1 が銅の取り込み促進を介して Sod1 を活性化することで、高温に伴い細胞内に発生する活性酸素種が除去され、ストレス耐性を獲得すると言う仮説を考えている。本研究では、酵母における NO による高温ストレス耐性機構の解明を目指し、高温ストレス下で生成される NO が Mac1 の活性化および Sod1 の活性化に及ぼす影響を解析した。
【方法・結果】NO および Mac1 と高温ストレス耐性の関連を検証するために、野生株および Mac1 遺伝子破壊（Δ*mac1*）株を用い、哺乳類 NOS の阻害剤（NAME）を添加した条件で細胞を高温ストレスに曝した。その後、経時的に生存率を測定したところ、Δ*mac1* 株は野生株に比べて有意な生存率の低下が認められた。また興味深いことに、NAME の添加によって野生株の生存率は低下したが、Δ*mac1* 株では生存率に変化は見られなかった。この結果は、酵母には NOS 由来の NO および Mac1 依存的なストレス耐性機構が存在することを示しており、上記の仮説を支持した。現在、NO および Mac1 依存的なストレス耐性機構を明らかにする目的で、①NO による Mac1 の *S*-ニトロソ化修飾、②高温ストレス下での Mac1 の活性化、③高温ストレス下での細胞内銅含量、④Mac1 による Sod1 の活性化などを解析中である。

nitric oxide, copper ion, stress tolerance

講演番号：3A12p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ A 校舎 12 会場

HKR1 の発現調節による *Saccharomyces cerevisiae* の HM-1 キラー・トキシン耐性機構

Mechanism of HM-1 killer toxin-resistance by controlling *HKR1* expression levels in *Saccharomyces cerevisiae*

○武藤 紘子、笠原 紳（宮城大食産業）
○Hiroko MUTO, Shin KASAHARA (Miyagi Univ.)

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は，キラー酵母 *Hansenula mrakii*（*Williopsis saturnus* var. *mrakii*）が生産する HM−1 キラー・トキシンに極めて高い感受性を示し，その作用点は細胞壁 β−グルカン合成系であるとされている [1]。*S. cerevisiae* の細胞表層に存在するムチン様タンパク質 Hkr1p は，同菌の浸透圧応答等に関与することが知られているが，もとはその過剰発現により HM-1 キラー・トキシンに対する耐性を付与する因子として同定，単離されたものである。Hkr1p は 1 回の膜貫通領域をもつ I 型の膜タンパク質で，その細胞外領域はセリンとスレオニンに富み，高度に糖鎖付加されていると考えられる。また，その細胞内領域にはカルシウムイオン結合モチーフである EF ハンドを有している。細胞外領域を含めた全体構造は，同菌の Msb2p と酷似しているが，Msb2p の過剰発現は HM-1 キラー・トキシン耐性をもたらさず，機能的には一致しない点も多い [2), 3)]。

S. cerevisiae の *GAL1* プロモーター支配下に Hkr1p 遺伝子である *HKR1* を配置し，誘導的過剰発現による HM-1 キラー・トキシン耐性を評価した際に，対照実験として逆方向に *HKR1* を挿入した場合にも強い HM-1 キラー・トキシン耐性が認められた。このクローンでは，転写によりアンチセンス RNA が生じることで，*HKR1* の正常な転写産物が不活性化されていると考えられた。この結果から，*HKR1* の過剰発現のみならず，発現抑制によっても HM-1 キラー・トキシン耐性が獲得されることが示された。また，これらの *HKR1* の過剰発現株および発現抑制株について，出芽の方向性に基づく細胞極性の変化を観察したところ，いずれの場合も野生株と比較して顕著な相違が見られた。このことから，*HKR1* が通常レベルで発現していれば細胞極性は正常に維持されるが，その場合には HM-1 キラー・トキシンに対する感受性が高く，*HKR1* の発現レベルが通常よりも高い，または低い場合のいずれにおいても細胞極性は乱れ，HM-1 キラー・トキシンに対する感受性が低くなっていることが示された。

さらに，Hkr1p の細胞内領域と相互作用する *S. cerevisiae* のタンパク質について，主に酵母ツー・ハイブリッド法による探索，確認を行ったので，あわせて報告する。

1) Yamamoto, T. *et al.* (1986) *FEBS Lett.* 195, 253–
2) Kasahara, S. *et al.* (1994) *J. Bacteriol.* 176, 1488–
3) Tatebayashi, K. *et al.* (2007) *EMBO J.* 26, 3521–

Saccharomyces cerevisiae, killer toxin, cell polarity

講演番号：3A12p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ A 校舎 12 会場

分裂酵母プロテインキナーゼ A によるスピンドルチェックポイント制御機構
Protein kinase A is required for kinetochore localization of spindle assembly checkpoint proteins in fission yeast.
酒井 智健、山家 雅之、川向 誠、○松尾 安浩（島根大・生物資源・生命工）
Tomotake SAKAI, Masayuki YAMAGA, Makoto KAWAMUKAI, ○Yasuhiro MATSUO (Shimane Univ.)

分裂酵母でプロテインキナーゼＡは触媒サブユニット Pka1 と調節サブユニット Cgs1 からなるヘテロ 4 量体の複合体であり、炭素源が豊富な条件下で、調節サブユニットと触媒サブユニットが解離し、活性化され、下流の因子をリン酸化することで生体内の反応を調節している。これまでに分裂酵母では、糖新生、減数分裂過程移行への制御、ストレス応答、経時的老化に関与していることが報告されている。

細胞周期には、正常に細胞分裂を進行するためにいくつかのチェックポイントがある。有糸分裂期ではスピンドルチェックポイントがあり、細胞分裂の際に姉妹染色分体が正しく分配できるように監視している。当研究室では、これまでに分裂酵母において *pka1* 欠損株が微小管重合阻害剤に対して感受性を示すことを新たに見出し、この解析を進めていく上で Pka1 がスピンドルチェックポイントに関与していることを明らかにしてきた。そこで、本研究ではその詳細な関係性を解析することでメカニズムの解明を目的としている。

スピンドルチェックポイント因子が *pka1Δ*のマルチコピーサプレッサーに成りうるかを微小管重合阻害剤に対する感受性を用いて解析したところ Mad1、Mad2 あるいは Mad3 を高発現させた場合のみ相補されることが明らかになった。また、これらのタンパク質と Pka1 の相互作用を解析した結果、Mad2 と特異的に相互作用していることを明らかにした。次に、スピンドルチェックポイントの因子は微小管重合阻害剤の存在下でキネトコアへ局在することが知られており、その局在には 3 層の階層構造が存在することが報告されている。また、Mad2 は Mad1 及び Mad3 と複合体を形成することが知られている。そのため、*pka1Δ*においてスピンドルチェックポイントのタンパク質が正常にキネトコアへ局在できるのかを解析したところ、中間層のうち Bub3 は野生株と比べ変化がなかったが、Bub1 はキネトコアへの局在が低下していた。また、最下層である Mad1、Mad2 及び Mad3 も同様に局在が低下していた。そこで、*pka1Δ*においてキネトコア自体の形成に異常がないかを Mis6 及び Mis12 の局在解析によって調べたところ、Mis6 及び Mis12 の局在には異常がなく、キネトコア自体は正常に形成されていることが示唆された。

以上のことから、Pka1 はスピンドルチェックポイントの最下層の Mad2 に結合し、これを制御することでスピンドルチェックポイントのキネトコアへの局在を制御していることが示唆された。

Protein kinase A, spindle checkpoint, fission yeast

講演番号：3A12p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ A 校舎 12 会場

分裂酵母の有性生殖を亢進させる *sam* 変異株と $CaCl_2$ 感受性の関連性

Relationship of *sam* mutants which induce sexual differentiation and $CaCl_2$ sensitivity in fission yeast.

○伊藤 有紀、川向 誠（島根大院生物資源）
○Yuki ITOH, Makoto KAWAMUKAI (Shimane Univ.)

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は通常栄養豊富な条件下で、体細胞分裂により一倍体で増殖する。しかし、グルコースや窒素源が枯渇している栄養飢餓の条件下では、細胞周期を G1 期で停止させ、有性生殖過程へと移行する。

当研究室では、栄養豊富な条件下でも有性生殖過程へと移行する *sam*(skip stavation for mating)変異株の解析を行っている。これまでの解析で、*sam* 表現型(栄養培地上での接合・胞子形成)を示す変異株のうち *pka1* (プロテインキナーゼ A), *rad24* (14-3-3), *aco1* (アコニターゼ)などの変異株が、$CaCl_2$ 感受性も示すということを明らかにしている。Pka1 はグルコースから cAMP へのシグナル伝達系に関与し、*pka1* 破壊株では、糖源枯渇と類似の表現型を示す。14-3-3 はフェロモンのシグナル伝達の下流に位置する Byr2 を負に制御することから、*rad24* 破壊株では有性生殖過への移行が亢進している。しかしながらこれらの遺伝子と $CaCl_2$ シグナルとの関連性は不明である。そこで有性生殖と Ca^{2+}の関係性を調べるため、*S. pombe* 非必須遺伝子破壊株ライブラリー (BIONEER) 約 3,400 株を用い、*sam* 表現型と $CaCl_2$ 感受性の両方を示す株を探索することで、有性生殖過程と $CaCl_2$ シグナルの関連性を調べることを目的とした。

はじめに、$CaCl_2$ 感受性を示す破壊株の 1 次スクリーニングを 0.3M $CaCl_2$ を添加した YES 栄養培地を用いて行った。その後 2 次スクリーニングとして、0.1, 0.2, 0.3M $CaCl_2$ をそれぞれ添加した YES 栄養培地に、1 次スクリーニングで得られた候補株をストリークし、感受性を示す濃度を調べた。これまでにスクリーニングした 3,295 株の結果、$CaCl_2$ 0.1M 感受性を示す株が 17 株、0.2M 感受性を示す株が 92 株、0.3M 感受性を示す株が 153 株見出された。

次に、それらの株の中から *sam* 表現型を示す破壊株のスクリーニングを行った。$CaCl_2$ 感受性のスクリーニングにより得られた株と、接合型の異なる *pka1Δ* 株を YES 栄養培地上でかけ合わせ、顕微鏡観察により、接合・胞子形成している株のリストアップをした。これまでにスクリーニングした 3,295 株の結果として、*rad24Δ* 株や *tfg3* (転写因子 TFIIF) *Δ* 株を含む 36 株が $CaCl_2$ 感受性かつ *sam* 表現型を示す株として得られた。これらの新たな *sam* 表現型の解析を進めることにより、有性生殖過程と $CaCl_2$ シグナルの関連性を調べている。

fission yeast, sexual differentiation, $CaCl_2$ sensitivity

講演番号：3A12p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ A 校舎 12 会場

出芽酵母 SCZ 遺伝子が関与する寿命制御機構の解析

Analysis of the SCZ genes involved in the control of lifespan of budding yeast

○山名 一綱、小川 貴史、椿山 諒平、平田 大、水沼 正樹（広島大学院）
○ Ikko YAMANA, Takafumi OGAWA, Ryouhei TSUBAKIYAMA, Dai HIRATA, Masaki MIZUNUMA (Hiroshima Univ.)

すべての生命体には有限の寿命が存在し、老化・寿命メカニズムの解明は分子生物学における課題の一つとなっている。これまでに、酵母や線虫などさまざまなモデル生物を用いて寿命メカニズムの解明が行われてきた。これまでの解析から、寿命制御因子が出芽酵母のようなシンプルな生物から高等生物まで高く保存されていることが明らかになりつつあるが、いまだ不明な点も多い。

私たちは、Ca^{2+}シグナルが細胞周期および増殖制御へ関わることを発見した。その全容を明らかにするため出芽酵母を用いて解析を行っている。本制御機構に携わる機能分子を同定するため、細胞周期進行に異常がある*Δzds1* 株が示す Ca^{2+}感受性を抑圧する *scz* 変異が 14 種類取得された。その中の１つである *scz14* 変異の原因遺伝子が *SIR3* であった。*SIR3* は遺伝子発現制御のほか、寿命制御にも関わることが報告されていた。このことから、他の *SCZ* 遺伝子も寿命制御に関与するのではないかと予想された。そこで、現在、すべての *scz* 変異株について寿命解析を行っている。

これまでに、*scz* 単独変異株において複製寿命（１つの母細胞が出芽できる回数）の測定を行ったところ、どの株においても野生株よりも寿命の短縮が確認された。これらの中でも*Δmpk1/scz2* や *pkc1/scz6* 株など Ca^{2+}シグナルに応答できないことが既知であった株については顕著に短命であった。また、野生株について細胞外の Ca^{2+}レベルを上昇させると複製寿命の短縮が観察された。Ca^{2+}シグナル伝達経路の主要分子であるカルシニューリンを欠損させると、*Δzds1* 株において寿命の回復が確認された。以上から、Ca^{2+}シグナルの恒常性が複製寿命に影響を及ぼすことが示唆された。

さらに、*scz* 変異株の経時的寿命（分裂しない状況下での細胞集団の生存時間）についても測定を行った。複製寿命ではすべての *scz* 変異株が野生株よりも短命だったのに対し、経時的寿命では*Δcnb1/scz4*、*Δsir3/scz14* 以外の株について野生株よりも短命となった。さらに、現在*Δzds1* と *scz* との二重変異株の経時的寿命について測定を行っている。以上、*SCZ* 遺伝子の Ca^{2+}シグナルと寿命制御との関連性について解析をすすめている。

Yeast, Lifespan, Ca

講演番号：3A12p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ A 校舎 12 会場

出芽酵母 *Δzds1* 株の Ca^{2+}感受性を抑圧する多コピーサプレッサーの寿命への影響

Effect of Lifespan of the Multicopy Suppressors that Suppress Ca^{2+} Sensitivity of *Δzds1* Strain

○上野 史記、小山 哲也、平田 大、水沼 正樹（広島大院）
○Fuminori UENO, Tetsuya KOYAMA, Dai HIRATA, Masaki MIZUNUMA (Hiroshima Univ.)

寿命・老化研究は、酵母や線虫、ショウジョウバエ、マウスなどのモデル生物を用いて、世界中で活発に行われており、多くの寿命制御因子が同定されてきたが、その分子機構については不明な点も多い。

我々はこれまでに Ca^{2+}シグナルによる細胞周期制御機構を発見し、その全貌解明を目指して解析を行ってきた。これまでの解析で、*ZDS1*（G_2期における細胞周期制御因子である *SWE1* を転写抑制する遺伝子)を破壊すると、Ca^{2+}感受性、Ca^{2+}依存的極性成長、および G_2期遅延を示すことがわかった。Ca^{2+}シグナルによる細胞周期および形態制御に関与する新たな分子を探索するため、*Δzds1* 株の示す Ca^{2+}感受性を抑圧する変異として *scz*（Suppressor of Ca^{2+}-induced abnormal morphology of *zds1*）が多数取得されており、順次解析が行われている。これら *scz* として取得された遺伝子の中には寿命関連遺伝子である *SIR3* が含まれていた。また、*scz* 遺伝子を変異、あるいは破壊した株では複製的寿命（母細胞が一生で産生する娘細胞の数で定義)が短縮するなど、Ca^{2+}シグナル系は寿命にも機能的関連があることが予想された。

一方、このアプローチとは別に高発現により *Δzds1* 株の示す Ca^{2+}感受性を抑圧する遺伝子（多コピーサプレッサー)の取得が実施され、17 種類取得された。そこで、これらの多コピーサプレッサー遺伝子の中にも寿命制御となんらかの関わりをもつ遺伝子が存在することが予想された。本研究では、新たな寿命制御因子の同定を目的として、これらの多コピーサプレッサー遺伝子に注目して解析を行った。

まず、*Δzds1* 株の経時的寿命（分裂しない状況下の細胞集団の生存時間)を測定すると、*Δzds1* 株は野生株と比較して短命であった。次に、*Δzds1* 株に 17 種類の多コピーサプレッサー遺伝子それぞれを高発現させた株を用いて経時寿命を測定したところ、いくつかの株において *Δzds1* 株で観察された短命の部分的な回復が見られ、一方、*Δzds1* 株よりもさらに短命となる株も存在した。この結果から、多コピーサプレッサーとして取得された遺伝子も寿命制御に寄与する可能性が示唆された。現在、WT においても多コピーサプレッサー遺伝子を高発現させた株を構築し、それらの寿命を解析中である。また、高発現により寿命が部分的に回復した多コピーサプレッサー中のいくつかの遺伝子に焦点を当てて解析も行っている。

Yeast, Lifespan, Calcium

講演番号：3A12p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ A 校舎 12 会場

酵母を指標とした微高圧炭酸ガスストレス応答の解析

Metabolome analysis of stress response induced by *petite* pressure carbon dioxide in *Saccharomyces cerevisiae*

○貝沼 瑞生[1]、牛 力源[1]、野村 一樹[1]、岩橋 均[1]、松岡 寛之[2]、河内 哲史[2]、鈴木 良尚[2]、田村 勝弘[2] ([1]岐阜大応生、[2]徳島大ソシオ)
○ Mizuki KAINUMA[1], Liyuan NIU[1], Kazuki NOMURA[1], Hitoshi IWAHASHI[1], Hiroyuki MATSUOKA[2], Satoshi KAWACHI[2], Yoshihisa SUZUKI[2], Katsuhiro TAMURA[2] ([1]Gifu Univ., [2]Tokushima Univ.)

【目的】微高圧炭酸ガス殺菌技術は、高圧ガス保安法が適用されない程度の炭酸ガス圧により、食品原料などを殺菌する技術であり、ガス圧殺菌技術（1）のひとつである。しかし、炭酸ガス圧ストレスによって微生物の増殖阻害が引き起こされるメカニズムは明らかになっていない。我々は、酵母細胞を指標として 0.5 MPa 炭酸ガス下におけるストレス応答を観察することでメカニズムの解析を試みてきた。これまでに、DNA マイクロアレイ技術を用いて、尿素サイクルや鉄イオンを中心とするトランスポーター遺伝子群の発現が誘導されることを確認している。本学会発表では、同条件におけるメタボローム解析を行ったので報告する。

【方法】指標微生物は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* S288C 株を用いた。また、炭酸ガス圧ストレス応答は、YPD 培地における対数増殖期細胞を用いて観察した。25°C、0.5 MPa、1-2 h の条件で炭酸ガス圧処理を施した。圧力処理前後に濁度を測定し、増殖阻害を評価した。圧力処理後、メタボロミクスのサンプル用に細胞をフィルター濾過して洗浄・回収し、メタノールで代謝反応を停止させて-80 °C で保存した。メタボロームの解析は CE-TOFMS 依頼分析により行った。 RT-PCR は *HAS1*, *SSZ1*, *SIT1*, *ACT1* に対して評価を行った。

【結果】未処理サンプルと比較して、圧力処理サンプルでは、炭酸ガス圧による増殖阻害が確認された。また、本試料における RT-PCR の解析結果は DNA マイクロアレイ解析結果と一致しており、炭酸ガス圧によるストレスを受けていることが確認された。

メタボローム解析の結果、酵母細胞内に蓄積していた代謝物は GABA, Pipecolic acid, Spermidine, Choline, Adenine, Nicotinamide, Urea であった。Urea の蓄積は尿素サイクルの活性化を示しており、二酸化炭素の明らかな影響であると考えられる。一方、3-Methyladenine, β-Ala-Lys, Pantothenic acid, Tyr, Uridine, UTP, UDP-*N*-acetylglucosamine, UMP などが減少していた。現在この理由を検討している。

参考文献

（1）村本桂久, 田村勝弘, 荒尾俊明, 谷脇孝典, 鈴木良尚, (2004)スダチ果汁の酸素ガス加圧殺菌., 日本食品科学工学会誌. 51:604-612.

petite pressure, carbon dioxide, yeast

講演番号：3A12p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ A 校舎 12 会場

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* への圧力感受性付与における Proline 代謝の影響

Proline metabolism contributes to barosensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*

○野村 一樹[1]、岩橋 均[1]、井口 晃徳[2]、重松 亨[2] ([1]岐阜大院連農、[2]新潟薬大応生科)
○Kazuki NOMURA[1], Hitoshi IWAHASHI[1], Akinori IGUCHI[2], Tru SHIGEMATSU[2] ([1]Gifu Univ., [2]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

【目的】1000 気圧以上の高圧力を用いて非加熱的に食品を加工する技術は、従来の加熱による食品加工技術と比較して、食材の有用成分の劣化が少なく、新鮮な風味や色を保つ高品質の食品の製造を可能にする。我々は有益な発酵微生物のひとつである酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデルとして、圧力により食品の発酵を制御する(Pressure Regulated Fermentation; PReF)技術の開発を目指して研究を進めている[1]。PReF 技術には、より低い圧力で発酵が制御できる圧力感受性能を付与された酵母株の作出および圧力感受性メカニズムの解明が必要である。これまでに UV 照射法により圧力感受性変異株 a924E1 株を作出し、その表現型を解析した[2-3]。本研究では、DNA microarray およびメタボロミクスにより、細胞内代謝から圧力感受性メカニズムを解析した。
【方法・結果】a924E1 株およびその親株 KA31a 株の定常期細胞から total RNA およびメタボロームを抽出した。total RNA は、Yeast オリゴ DNA microarray を用いて 1 色法により解析した。クオンタイル法により正規化し、MPIS(http://www.helmholtz-muenchen.de/en/ibis)を用いて分類解析したところ、ミトコンドリアに局在するタンパク質をコードする多くの遺伝子において発現量の有意な変動が認められた(210 genes / 1047 genes)。2, 3, 5-Triphenyl-2*H*-tetrazolium chloride(TTC)染色法により、呼吸機能の欠損が示された。これらの結果は、ミトコンドリアの機能不全が圧力感受性に寄与していることを示唆した。メタボロームは、CE-TOFMS により測定し、284 種類の化合物を検出した。それぞれの化合物の Relative Area、DNA microarray より得られた関連酵素をコードしている遺伝子の発現量を KEGG (http://www.genome.jp/kegg/)により解析した。その結果、Proline およびその代謝産物である Glutamate、Pyrrolibe 5-carboxylic acid、Urea cycle の Ornithine、Citrulline、Argininosuccinate、Arginine 等を含む 91 種類の化合物が 0.5 倍以下に減少していた。これらを代謝する Put1、Arg3、Arg4 等の酵素をコードする遺伝子の発現量も 0.5 倍以下に減少していた。Proline 代謝系、Urea cycle に関与する一部の酵素はミトコンドリアに局在しており、酸化・凍結・高温乾燥・高浸透圧ストレスに関連することが報告されている[4]。以上の結果は、ミトコンドリアの機能不全によるエネルギー不足や Proline 代謝機能の低下が引き起こされたことが、圧力感受性能を付与された原因のひとつである可能性を示している。
本研究の一部は、JST-CREATE により実施した。
[1]Nomura *et al*., 2013 APS-SCCM and AIRAPT-24 Joint Conference. [2]Shigematsu *et al*., J. Food Sci., 2010. [3]Shigematsu *et al*., High Pres. Res., 2010. [4]Kitagaki and Takagi, J. Biosci. Bioeng.,2013 (Available online).

Proline, barosensitivity, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：3A12p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ A 校舎 12 会場

酵母のストレス耐性に関与するプロリン合成酵素γ-グルタミルキナーゼの機能解析

Functional analysis of the proline synthetic enzyme γ-glutamyl kinase involved in stress tolerance in yeast

○立橋 祐樹、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Yuki TATEHASHI, Hiroshi TAKAGI (Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のプロリン合成は、γ-グルタミルキナーゼ（GK）によってグルタミン酸がリン酸化されることで開始される。また、GK の酵素活性は最終産物のプロリンによるフィードバック阻害を受けることで制御されている。これまでに、GK 遺伝子の破壊株が高温などのストレスに対して感受性を示すことが知られ、この表現型は単純にプロリン合成能の低下によるものと考えられた。しかしながら、同じプロリン合成経路にあるγ-グルタミルリン酸レダクターゼ（GPR）の遺伝子破壊株は高温ストレスに感受性を示さなかったことから、GK にはプロリン合成以外にストレス耐性に重要な働きがあることが示唆される。大腸菌や酵母など多くの微生物の GK は、触媒活性を示すキナーゼドメインの他に C 末端側に pseudouridine synthase andarchaeosine transglycosylase（PUA）ドメインを有している。PUA ドメインは全生物種で広く保存された RNA 結合モチーフの一つで、RNA 修飾酵素や真核生物の翻訳開始因子などの RNA と相互作用するタンパク質に多く存在している。しかしながら、RNA 代謝と一見関わりのない GK における PUA ドメインの機能は不明である。そこで本研究では、GK の PUA ドメインとストレス耐性の関連を明らかにすることを目的とする。
【方法・結果】GK 遺伝子の破壊によるストレス感受性が GK の酵素活性に依存するか否かを明らかにするため、酵素活性を消失させた変異型 GK（D156A-GK）を作製した。この D156A-GK を GK 遺伝子破壊株で発現させたところ、野生型 GK の発現と同程度まで高温ストレスに対する生育の回復が見られた。次に、ゲノム上の GK 遺伝子から PUA ドメインを削除した株（GKΔPUA 株）を作製し、ストレス耐性の評価を行った。その結果、GKΔPUA 株は GK 遺伝子の破壊株と同様にストレス感受性を示した。これらの結果から、GK によるストレス耐性の獲得には、GK の酵素活性ではなく、PUA ドメインの機能が重要であることが確認された。PUA ドメインは一般的に RNA との結合に関わると考えられているため、GK の PUA ドメインが RNA との相互作用を介してストレス耐性に関与している可能性について検証した。既知の RNA と相互作用する PUA ドメインとの構造比較から、RNA との相互作用に重要であると考えられる PUA ドメイン内のアミノ酸残基をアラニンに置換した変異株を構築した。各変異株のストレス耐性を評価したところ、R420A, E421A, N422A の変異株がストレス感受性を示した。また、これらの変異は GK の酵素活性に影響を及ぼさないことも確認した。これらの結果から、GK の PUA ドメインが RNA との相互作用を介してストレス耐性に寄与していることが示唆された。現在、GK の PUA ドメインと RNA との結合について解析している。

glutamyl kinase, RNA-binding domain, stress tolerance

講演番号：3A12p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ A 校舎 12 会場

出芽酵母の酢酸耐性は Haa1 依存的な細胞内グリセロールの蓄積により増強される

Haa1-dependent accumulation of intracellular glycerol enhances acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*.

○田中 晃一[1]、小川 順[2]、島 純[1] ([1]京大・微生物科学、[2]京大院・農・応用生命)
○Koichi TANAKA[1], Jun OGAWA[2], Jun SHIMA[1] ([1]Res. Div. Microbial Sci., Kyoto Univ., [2]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景・目的】
バイオエタノール生産の高効率化・低コスト化を図る目的で、出芽酵母株に酸ストレス耐性を付与する育種法の開発を進めている。昨年度の本大会において、弱酸ストレス応答性転写因子をコードする *HAA1* 遺伝子を過剰発現させると、実験室酵母株の酢酸耐性が飛躍的に向上することを報告した。そこで本研究では、酢酸耐性株の更なる育種戦略に向けて、*HAA1* 遺伝子による酢酸ストレス耐性化のメカニズムについて解析をおこなった。

【結果】
実験室酵母株 S288C に酢酸ストレスを与えると細胞内にグリセロールが蓄積することを見いだした。*HAA1* 遺伝子を破壊するとストレスに応答したグリセロール蓄積量が減少し、逆に *HAA1* 遺伝子を過剰発現させると酢酸が存在しない条件でも顕著にグリセロールを蓄積した。また、グリセロールを合成できない株（*gpp1Δ gpp2Δ*二重破壊株）は酢酸ストレスに対して感受性を示し、グリセロールを高蓄積する株(*GPD1* 過剰発現株)は耐性を示すことが明らかとなった。以上の結果より、グリセロールは酢酸ストレスに応答して Haa1 依存的に細胞内に蓄積され、出芽酵母の酢酸ストレス耐性に重要な役割を果たすと考えられる。

次に Haa1 が細胞内にグリセロールを蓄積させるメカニズムについて解析をおこなった。酢酸ストレスを負荷した条件でグリセロール合成関連遺伝子の発現解析をおこなったところ、グリセロール-1-フォスファターゼをコードする *GPP2* 遺伝子の発現が Haa1 依存的に顕著に上昇することが明らかとなった。また、グリセロールを細胞外へ排出するチャネルとして機能する Fps1 は酢酸ストレスが加わると分解されることが知られていたが、Haa1 はこの分解を促進することが示された。従って、酢酸ストレス条件下において、Haa1 は生合成の活性化と細胞外排出の抑制を介して、細胞内にグリセロールを蓄積させることが示唆された。

Saccharomyces cerevisiae, acetic acid, Haa1

講演番号：3A12p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ A 校舎 12 会場

出芽酵母のアセトアルデヒドストレス耐性におけるグルタチオンおよびその分解経路の役割
Molecular function of glutathione and its metabolite on acetaldehyde tolerance in budding yeast
○佐藤 優太、早川 享志、中川 智行（岐阜大院応生）
○Yuta SATO, Takashi HAYAKAWA, Tomoyuki NAKAGAWA (Gifu Univ.)

【目的】
アセトアルデヒドはタンパク質などと付加体を形成し、酵素活性の阻害などを引き起こすなど、細胞にとって強い毒性を示すストレス因子である。ところがアセトアルデヒドは、アミノ酸代謝などの様々な生体内反応において必ず生成される中間代謝産物でもある。特に、出芽酵母のアルコール発酵においてアセトアルデヒドは細胞内で多量に生成されることから、酵母はアセトアルデヒドの毒性を回避するための何らかのシステムを保持していると推察できる。我々は、これまでに出芽酵母のアセトアルデヒド耐性機構にはペントースリン酸経路の活性化による NADPH 供給が重要な役割を持つこと、グルタチオン（GSH）生合成系の欠損が強いアセトアルデヒド感受性を示すこと、さらには GSH がアセトアルデヒドを直接捕捉し、アセトアルデヒドの毒性回避に寄与することを示した。[1)] しかし、細胞内 GSH の挙動がアセトアルデヒドの捕捉だけでは十分に説明できず、近年報告された GSH 代謝経路のアセトアルデヒド耐性機構への新たな関与が推察された。そこで、本研究では GSH 代謝に関与する DUG 経路のアセトアルデヒド耐性機構における役割について解析することを目的とした。
【方法・結果】
出芽酵母は、アセトアルデヒドストレス下では細胞内 GSH 量を著しく減少させるが、その減少量は GSH のアセトアルデヒド捕捉能だけでは説明がつかない。一方、GSH の分解系として、液胞内局在の Ecm38 に加えて、近年、細胞質局在型の DUG 経路が報告された。DUG 経路は GSH を Cys-Gly に分解する Dug2/Dug3 複合体と Cys-Gly を Cys に分解する Dug1 で構成されている。これらの遺伝子破壊株 *dug1*Δ、*dug2*Δ、*dug3*Δ と *ecm38*Δ のアセトアルデヒド感受性を観察したところ、*ecm38*Δ、*dug3*Δ は感受性を示さず、*dug2*Δ は強いアセトアルデヒド感受性を示した。一方、*dug1*Δ はアセトアルデヒド耐性能の向上を示した。そこで、*DUG2*、*DUG3* のアセトアルデヒドに対する発現応答を評価したところ、P_{DUG2} および P_{DUG3} は 40 mM アセトアルデヒドに 8 時間曝露すると発現量が有意に増加した。さらに、*met4*Δ 株では、P_{DUG2} および P_{DUG3} のアセトアルデヒド応答が観察されなかったことから、Met4 が *DUG2*、*DUG3* のアセトアルデヒドに対する遺伝子発現を制御している可能性が示唆された。
以上のことから、GSH だけでなく、その分解物である Cys-Gly もアセトアルデヒド耐性機構に大きく関与していることが強く示唆された。
1）Matsufuji Y, *et al*., 2013. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 97: 297-303.

acetaldehyde tolerance, budding yeast, glutathione

講演番号：3A12p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ A 校舎 12 会場

リボソーム生合成調節蛋白質 Rrs1 および Ebp は 核膜において分泌経路遮断時のシグナル伝達に機能する

Regulators of ribosome biosynthesis, Rrs1 and Ebp1, are involved in the secretory response at the nuclear periphery

○矢吹 友佳理、水田 啓子（広島大院）
○Yukari YABUKI, Keiko MIZUTA (Hiroshima Univ.)

細胞が正常に増殖するためには、染色体の複製だけでなく、細胞膜や蛋白質など細胞を構成する様々な成分がバランスよく合成される必要がある。特に、細胞はリボソームの生合成に莫大なエネルギーを費やしているため、その生合成量は他の制御機構と連携して厳密に調節されている。出芽酵母において、出芽時の膜合成に必須な分泌経路が遮断されると、リボソーム蛋白質遺伝子と rRNA 遺伝子の転写が特異的に、かつ著しく抑制される。これは、分泌経路の遮断によって生じた細胞膜ストレスを、細胞表層ストレスセンサーWsc が感知し、そのシグナルがプロテインキナーゼ C を経て核へと伝達されるためと考えられるが、その詳細な機構は明らかになっていない。

当研究室において、このシグナル伝達に関与する因子として、互いに相互作用し、リボソーム生合成に必須な調節蛋白質 Rrs1 と Ebp2 を同定した。Rrs1 と Ebp2 は、主に核小体に局在して 25S rRNA 前駆体のプロセシングや 60S リボソームサブユニットのアセンブリに機能をもつ。さらに、一部は SUN ドメイン蛋白質 Mps3 の N 末端との相互作用を介して核膜辺縁にも局在し、核の形態維持やテロメアのクラスター形成に機能する。*rrs1* 変異株と *ebp2* 変異株は、変異型の Rrs1 と Ebp2 の核膜への局在を失うだけでなく、シグナル伝達にも強い欠陥を示す。このことから、分泌経路遮断時のシグナル伝達において、Rrs1 と Ebp2 は核膜において機能する可能性がある。

そこで今回、2 つの条件を用いて解析を行った。まず一つ目の実験として、野生株に Mps3 の N 末端領域を過剰発現させ、Rrs1 と Ebp2 を核膜から遊離させた条件で、分泌経路遮断時のシグナル伝達への影響を調べた。その結果、Mps3 の N 末端を過剰発現させることにより、リボソーム蛋白質遺伝子の転写抑制が弱まる傾向がみられた。このことから、核膜に局在する Rrs1 と Ebp2 が分泌経路遮断時のシグナル伝達に関与することが示唆された。2 つ目の実験として、*ebp2* 変異株に Ebp2-Mps3 融合蛋白質を発現させ、*ebp2* 変異株において Ebp2 を核膜に繋ぎとめた条件で、分泌経路遮断時のリボソーム蛋白質遺伝子の転写への影響を調べた。その結果、Ebp2-Mps3 融合蛋白質の発現は、*ebp2* 変異株におけるシグナル伝達の欠陥を回復しなかった。これらの結果から、Rrs1 および Ebp2 は、核膜において分泌経路遮断時のシグナル伝達に機能するが、核膜に繋ぎとめられているだけでなく、自由に移動できる必要があることが示唆された。

ribosome biosynthesis, vesicle transport, nuclear envelope

講演番号：3A12p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ A 校舎 12 会場

出芽酵母 RNase T2 を介したストレス応答機構の解析
Mechanism of stress response mediated by the yeast RNase T2, Rny1p
○陣内 凱、島 日佳理、大石 早希子、大本 哲也、小川 哲弘、日高 真誠、正木 春彦（東大院農生科・応生工）
○Gai Jinnai, Hikari Shima, Sakiko Oishi, Tetsuya Omoto, Tetsuhiro Ogawa, Makoto Hidaka, Haruhiko Masaki (Univ. of Tokyo)

【目的】RNase T2 は、タカジアスターゼから分離された日本発のリボヌクレアーゼである。ほぼ全ての生物ゲノムに認められることから、生物学的に重要な役割を持つと考えられるが、機能についてはほとんど明らかにされてない。出芽酵母では、Rny1p（RNase in Yeast 1）が、唯一の RNase T2 型リボヌクレアーゼである。Rny1p は、高温や高浸透圧ストレスに応答して一過的に発現上昇し、同条件下での生育を助ける。また、我々は、*RNY1* 破壊株が翻訳阻害剤に感受性を示すことを報告した [1)]。近年、シロイヌナズナやゼブラフィッシュの RNase T2 が、rRNA を分解することが明らかにされた。また、出芽酵母をラパマイシン処理すると、rRNA が速やかに分解されることが報告された。以上を踏まえ、我々は、Rny1p がラパマイシン処理に応答した rRNA 分解に関与すると予想した。そこで、本研究では、これを実験的に証明し、その生理学的意義について検討した。
【方法・結果】ラパマイシン処理した野生株および *rny1*Δ株の生育を調べた。野生株は一旦生育が遅延した後、再度生育を開始したが、破壊株ではほぼ横ばいとなった。次に、これらの株より経時的に rRNA を調製し、泳動パターンを比較した。その結果、*rny1*Δ株では、野生株に比べて rRNA 分解の速度が低下しており、予想通り Rny1p が rRNA 分解に関わることが分かった。この Rny1p を介した rRNA 分解が、細胞にどの様な影響を与えるかを、遺伝子発現パターンに基づいて解釈することを試みた。そこで、ラパマイシン処理した野生株および *rny1*Δ株より poly(A) mRNA を調製し、DNA マイクロアレイに供して比較解析した。その結果、*rny1*Δ株では、新規リボソーム合成に関連する遺伝子の発現が限定的に遅れることが分かった。以上の結果から、出芽酵母には、ラパマイシン等のストレスに応答したリボソーム排除機構が存在するが、Rny1p はこれに関与すること、またこのリボソーム排除が適切に行われないと、ストレスに適応した後の新規リボソーム合成が妨げられ、生育が阻害されることが考えられた。

1) 大石ら、日本農芸化学会 2012 年度大会講演要旨集

ribonuclease, stress response, ribosome

講演番号：3A12p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ A 校舎 12 会場

酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 の改変による異常タンパク質分解能の向上

Engineering of the yeast ubiquitin ligase Rsp5 for improvement of the degradation ability of aberrant proteins

WIJAYANTI Indah、○渡辺 大輔、WATCHARAWIPAS Akaraphol、高木 博史（奈良先端大バイオ）
Indah WIJAYANTI, ○Daisuke WATANABE, Akaraphol WATCHARAWIPAS, Hiroshi TAKAGI (Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】真核生物のモデルとして用いられる出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、高温やエタノールなどのストレス環境下において傷害を受けた異常タンパク質の修復・除去のための様々なシステムを備えている。当研究室では、*S. cerevisiae* の生存に必須な唯一の HECT 型ユビキチンリガーゼ Rsp5 を介したストレス応答に着目して研究を行っており、Rsp5 が異常タンパク質を特異的に認識し、分解する分子メカニズムの解明を目指している。本研究では、パーキンソン病などの神経変性疾患の原因タンパク質として知られるヒトα-シヌクレインを酵母に過剰発現させ、この外来異常タンパク質による毒性の低減を指標として、高機能型 Rsp5 変異体の取得とその機能解析を行うことを目的とした。

【方法・結果】まず、Rsp5 の基質認識に重要な WW ドメインを含む領域に PCR によるランダム変異を導入したプラスミドライブラリーを作製し、α-シヌクレインを過剰発現する Rsp5 の機能欠損変異株（*rsp5*^{A401E}）に導入した。得られた形質転換体から、α-シヌクレインの過剰発現による増殖阻害を抑圧できるクローンを選抜し、プラスミドの DNA 配列を決定したところ、4 種類の Rsp5 変異体（T255A, D295G, P343S, N427D）を単離することができた。これらの変異型 Rsp5 発現株では、野生株と比べてユビキチン化を介したα-シヌクレインの分解が促進されていた。また、当研究室で取得した高機能型の優性変異 *RSP5*^{T357A} が、アミノ酸パーミアーゼ Gap1 のユビキチン化を介した分解を促進することでアミノ酸の取込みを低下させ、プロリンアナログ（アゼチジン-2-カルボン酸: AZC）に対する耐性を付与するのに対し（*Genes Cells*, **18**, 459, 2013）、本研究で同定した変異は AZC 耐性に影響を及ぼさなかったことから、Rsp5 によるα-シヌクレインと Gap1 の認識に関わるアミノ酸残基は異なっている可能性が示された。そのことを確認するために、現在、Rsp5 と基質とのタンパク質間相互作用に関する解析を行っている。さらに、これらの Rsp5 変異体のうち、*RSP5*^{T255A} だけが酢酸および乳酸存在下での増殖阻害を回復する、という新規な表現型も見出された。この結果は、Thr255 がα-シヌクレインに加え、例えば有機酸トランスポーターなどのユビキチンを介した分解の調節にも関与している可能性を示唆している。以上の知見を踏まえると、Rsp5 の WW ドメインが異常タンパク質認識の特異性・多様性を生み出すことによって、酵母は様々なタイプの環境ストレスに対し、幅広く適応できる能力を獲得できるのではないかと考えられる。

ubiquitin ligase, Rsp5, α-synuclein

講演番号：3A12p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ A 校舎 12 会場

麹菌マルトースパーミアーゼ分解におけるユビキチン化マシナリーの作用機構

Involvemetn of ubiquitination machinery in degradation of maltose permease in Aspergillus oryzae

○松浦 優佳、田中 瑞己、平本 哲也、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大院農）
○Yuka Matsuura, Mizuki Tanaka, Tetsuya Hiramoto, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi (Tohoku Univ.)

【目的】

細胞は外部環境に応じて不要となった膜タンパク質を速やかに分解する機構を有している。我々はこれまでに、グルコース存在下において麹菌 *Aspergillus oryzae* のマルトースパーミアーゼ MalP がエンドサイトーシス依存的に液胞へ輸送され、液胞で分解されることを明らかにしている。我々は昨年度の本大会において、麹菌のアレスチン様タンパク質である CreD を欠損することで MalP のエンドサイトーシス依存的な分解が抑制されることを報告した（1）。本研究ではさらに、Rsp5 のオーソログである HulA の MalP 分解への関与について解析を行った。

【結果】

HulA は生育必須遺伝子であると予想されたことから、チアミン存在の有無により発現をコントロールできる *nmtA* プロモーターを利用した条件的発現株を作製して sGFP-MalP の蛍光顕微鏡観察を行ったところ、HulA 発現抑制条件下ではグルコースを添加しても sGFP-MalP の液胞への移行は認められなかった。したがって、HulA が MalP のエンドサイトーシス依存的な取り込みに関与することが示された。

麹菌 HulA には 3 つの WW ドメインが存在しており、CreD-3FLAG と GST-HulA-WW ドメイン融合タンパク質を用いてプルダウンアッセイを行った結果、CreD と HulA は WW ドメインを介して結合することが明らかになった。続いて、HulA の WW ドメインとの相互作用に関与すると考えられる CreD 上のプロリンに富んだ配列（PPLY および 3 か所の PXY）に変異を導入した株を作製し、CreD-HulA 間の相互作用について解析を行った。プルダウンアッセイの結果から PPLY モチーフに変異を持つ CreD は HulA と相互作用しなかったため、CreD - HulA 間の相互作用にはこの領域が重要であることが分かった。さらに共免疫沈降を行い、*in vivo* における CreD - HulA 間の相互作用の解析を行った結果についても報告する。

1）平本ら、2013 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、2B12a09

Aspergillus oryzae, Maltose permease, Ubiquitination machinery

講演番号：3A12p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ A 校舎 12 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* の高温誘導性遺伝子の機能に関する研究
Characterization of a heat shock transcription factor gene in *Aspergillus oryzae*
○江嵜 豪[1]、伊藤 香苗[2]、前橋 健二[1]、柏木 豊[1] ([1]東農大院農、[2]東農大応生)
○Go EZAKI[1], Kanae ITO[2], Kenji MAEHASHI[1], Yutaka KASHIWAGI[1] ([1]Grad. Sch. Agri.,Tokyo Univ. Agriculture, [2]Tokyo Univ. Agriculture)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* は清酒・味噌・醤油の醸造に欠かせない微生物である。*A.oryzae* は，2005 年にゲノムの全塩基配列が決定され，約 12,000 の遺伝子が存在することがわかっている。現在は，得られたゲノム情報を利用したポストゲノム研究が盛んに行われている。当研究室では，熱ストレスに応答し発現が強化される熱ショックタンパク質(HSP)の発現を促進する熱ショック因子(HSF)に着目した。麹菌ゲノムデータベースには 2 種の HSF 遺伝子(AO Genome ID：AO090003001329，AO090003000362)が存在し(仮にそれぞれ HSF1，HSF2 とする)，HSF1 は *Kluyveromyces lactis* の HSF とアミノ酸配列レベルで 25 %の相同性を示す他，さまざまな生物の HSF に存在する特定のアミノ酸配列と高い相同性を持つ配列を含んでいる。一方 HSF2 は，*Schizosaccharomyces pombe* の HSF と 70 %と高い相同性を示している。麹菌は清酒麹の製麹過程において 40 ℃を超える生育の限界に近い温度に曝されることから，これらの熱ストレスに関わる遺伝子の機能を解析することは大変有用であると考えられる。本研究では，これらの遺伝子を破壊あるいは過剰に発現させた場合に，表現型がどのように変化するかを明らかにすることを目的とした。
【実験方法および実験結果】*A.oryzae* の HSF2 遺伝子について，ピリチアミン耐性(PT^r)をマーカーとしたプロトプラスト-PEG 法を用いて，破壊株および過剰発現株の取得を試みた。破壊株については，形質転換によって得られた PT^r 株約 300 株をコロニーPCR によって解析したが，野生型遺伝子と破壊遺伝子が共存する株が得られたのみであり，純粋な HSF2 遺伝子破壊株は得られなかった。過剰発現株については取得に成功し，30 ℃および 40 ℃における生育速度を野生株と比較を行った。その結果，30 ℃および 40 ℃において野生株との生育速度の違いは見られなかった。現在は，HSF１遺伝子過剰発現株を取得しており，野生株との生育速度の違いを検討していく他，HSP 遺伝子の発現量や醸造に活用される酵素の活性について，野生株との比較を行っている。

Aspergillus oryzae, heat shock transcription factor

講演番号：3A12p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ A 校舎 12 会場

糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるプロテインキナーゼ C の sterigmatocystin 合成制御に関わる機能の解析

Functional analysis of Protein kinase C in sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*

○片山 琢也、堀内 裕之（東大院）
○Takuya KATAYAMA, Hiroyuki HORIUCHI (Univ. of Tokyo)

プロテインキナーゼ C（PKC）は真核生物に広く保存されたセリン／スレオニンキナーゼである。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の PKC である Pkc1p は細胞壁の完全性維持に関わるシグナル伝達経路（cell wall integrity（CWI）経路）において中心的な役割を担う。*Aspergillus nidulans* にも CWI 経路の構成因子のオルソログが保存されており、*A. nidulans* の PKC である PkcA も CWI 経路で機能することが強く示唆されている。一方で PkcA は菌糸の極性生長やペニシリン合成など糸状菌に特有の現象に関わる機能を持つことが示唆されている。当研究グループではこれまでに PkcA 失活条件における網羅的転写解析を行っており、この結果 PkcA が sterigmatocystin（ST）合成の制御に関与する可能性が考えられた。そこで本研究では PkcA の ST 合成に関わる機能を解明することを目的とした。

まず *pkcA* 温度感受性株を用い、PkcA が部分的に失活する条件において ST 生産量を測定したところ、この条件において ST 生産量が野生型株と比較して著しく増加していた。次に、活性化型 PkcA を高生産できる株を用い、PkcA 活性化条件における ST 生産量を測定したところ、この条件において ST 生産量が野生型株と比較して著しく減少していた。また、リアルタイム定量 PCR 法を用い、PkcA 活性化条件における *aflR* と ST 合成に関わる *stc* 遺伝子群の一つである *stcU* の mRNA 量を測定したところ、この条件ではこれらの遺伝子の mRNA の増加がほとんど見られなかった。これらのことから、PkcA が *aflR* や *stc* 遺伝子の転写を制御することで ST 合成を負に制御することが示唆された。

一方、これまでに PkcA は転写制御因子 AnBH1 を介してペニシリン合成に関わる遺伝子の転写を負に制御することが示唆されている。そこで、*anbH1* の発現を抑制できる株を作製し、ST 生産量を測定した。その結果、*anbH1* の発現を抑制した場合 ST 生産量の増加が見られたことから、AnBH1 が ST 合成を負に制御することが示唆された。一方、PkcA 活性化条件においては *anbH1* の発現を抑制しても ST 生産量の増加が見られなかったことから、PkcA による ST 合成制御は AnBH1 を介さない機能であることが示唆された。

現在、PkcA による ST 合成制御が *aflR* の転写制御だけで行われるかどうかについて検討するため、PkcA 活性化条件において *aflR* を高発現した場合の ST 生産量について解析を行っている。さらに、ST 合成に関わる遺伝子はエピジェネティック制御を受けることが示されていることから、PkcA がこれらの遺伝子のエピジェネティック制御に関与するかどうかについて解析を行っている。

aspergillus, protein kinase C, sterigmatocystin

講演番号：3A12p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ A 校舎 12 会場

糸状菌 PKC に対する選択的阻害剤の開発に向けた酵母スクリーニング系の構築
Development of yeast screening system for a novel inhibitor Z705 specific for fungal PKC.
○庄司 郁央[1]、中山 真由美[2]、吉見 啓[2]、藤岡 智則[3]、河合 清[3]、堀内 裕之[4]、梅山 秀明[5]、阿部 敬悦[1,2] ([1]東北大院農、[2]東北大・未来研、[3]クミアイ化学工業、[4]東大院・農生科、[5]中央大理工)
○ Fumio SHOJI[1], Mayumi NAKAYAMA[2], Akira YOSHIMI[2], Tomonori FUJIOKA[3], Kiyoshi KAWAI[3], Hiroyuki HORIUCHI[4], Hideaki UMEYAMA[5], Keietsu ABE[1,2] ([1]Tohoku Univ., [2]NICHe. Tohoku Univ., [3]Kumiai Chemical Industry Co., Ltd., [4]Univ. of Tokyo., [5]Facul. Sci. Engin. Chuo Univ.)

[背景・目的] 真菌の細胞壁は，細胞の保護や形態の維持だけでなく，細胞外の情報を細胞内へと伝達する役割をも担っており，菌の生育に必須の存在である。また，真菌の細胞壁は，ヒトや植物に存在しない特有の構造体であることから，農薬や抗真菌剤の薬剤標的として注目されている。真菌の細胞壁構築機構については，出芽酵母 Saccharomyces cerevisiae において詳細な研究が成されており，Cell wall integrity signaling (CWIS) 経路として知られるシグナル伝達系が重要な役割を担っている。本経路は，センサータンパク質群，プロテインキナーゼ C (PKC)，下流の MAP キナーゼ経路から構成されており，多くの細胞壁合成関連遺伝子群の転写を制御している。本経路の構成タンパク質のうち PKC は中心的役割を担うと考えられており，モデル糸状菌 Aspergillus nidulans の PKC (AnPkcA) やイネいもち病菌の PKC (MgPkc1) の欠損が致死であることから，糸状菌においても PKC の重要性が認識されている。我々は，糸状菌の PKC が新たな抗真菌剤の標的となると考え，糸状菌の PKC 阻害剤の探索を進めてきた。まず，糸状菌の PKC 阻害剤探索を目的に MgPkc1 の立体構造モデルに基づくインシリコスクリーニングを行った。その結果，数種の MgPkc1 阻害剤候補化合物が見出され，平板寒天培地上での生育阻害試験から，MgPkc1 阻害剤として Z-705 が選抜された。一方，本化合物はイネ葉上では効果が認められず，化合物改変による活性向上が必要と判断された。本研究では，Z-705 の改良を見据え，Z-705 およびその類縁体の活性を評価するスクリーニング系の構築を試みた。また，糸状菌に比べて扱いが容易な酵母を用いることにより，高効率な評価系の構築を目的とした。
[方法・結果] 酵母の PKC1 破壊株において，酵母内高発現ベクター pYES2 を用いて，糸状菌 PKC を発現させた。本スクリーニング系を評価するため，Z-705 に対する生育阻害試験をおこなったところ，糸状菌 PKC 発現株にのみ Z-705 に対する感受性の上昇が認められた。したがって，Z-705 が糸状菌 PKC に対して高い選択毒性を有すること，本系が糸状菌 PKC 阻害剤探索に有効であることが示唆された。さらに，本スクリーニング系を最適化するため，酵母ゲノム上の PKC1 配列を改変し，酵母 Pkc1 のキナーゼドメインを糸状菌由来のものに置換した，酵母-糸状菌キメラ PKC の発現株を作製した。キメラ PKC 発現株は酵母 PKC1p 発現株と比較して Z-705 に高い感受性を示したことから，本薬剤は糸状菌 PKC のキナーゼドメインに高い選択性を有することが示唆された。現在，本薬剤の CWIS 経路への影響を評価するため，Z-705 存在下での形態観察，CWIS 経路標的遺伝子の転写解析，Pkc1 下流 MAP キナーゼのリン酸化解析を進めている。

Protein kinase C, Cell wall integrity, Filamentous fungi

講演番号：3A12p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ A 校舎 12 会場

糸状菌 *Cryphonectria parasitica* の低分子量 GTP 結合タンパク質

Small GTP binding proteins in filamentous fungus *Cryphonectria parasitica*

○望月 翔子[1]、山内 優輝[1]、高橋 拓也[1]、鈴木 信弘[2]、笠原 紳[1] ([1]宮城大・食産業、[2]岡山大・植物研)
○Shoko MOCHIZUKI[1], Yuki YAMAUCHI[1], Takuya TAKAHASHI[1], Nobuhiro SUZUKI[2], Shin KASAHARA[1] ([1]Miyagi Univ., [2]Okayama Univ.)

糸状菌 *Cryphonectria parasitica*（旧 *Endothia parasitica*）は，凝乳活性をもつ酸性プロテアーゼを高産生し，わが国でも古くから研究対象とされてきた糸状菌であるが，クリなどの果樹に対して胴枯病を引き起こす植物病原菌でもある。100 年余り前に日本から米国東部にもたらされた本菌が，感受性の高いアメリカグリ（American Chestnut）を山野からほぼ一掃したことは植物病理学史上，特に有名である。本菌のゲノム解析はほぼ終了しており，Ras スーパーファミリーに属する低分子量 GTP 結合タンパク質が，少なくとも 4 つ存在することが認められている。そのうち 3 つ（RAS1，RAS2 および RAS3）について機能の推定を行った。

① RAS1 の遺伝子である *ras1* の破壊株（Δ*ras1*）は，野生株と比較してコロニーおよび細胞の形態変化が顕著であり，寒天培地上のコロニー成長速度は著しく低下しており，細胞は酵母状（卵形）であった。クリ幹への病原性は消失していた。一方，液体培地中においては，多くの細胞が菌糸状形態を維持していた。また， 細胞内 cAMP 濃度を測定したところ，対照となる原株（DK80 株）と比較して，その濃度は上昇傾向にあった。

② RAS2 の遺伝子である *ras2* の破壊株（Δ*ras2*）は，野生株と比較して寒天培地上では約 55%のコロニー成長速度の低下が見られた。顕微鏡観察では，野生株と比較して細胞形態は変化していなかったが，クリ幹に対する病原性は低下していた。また，細胞内 cAMP の濃度は，Δ*ras1* と同様に DK80 株と比較して上昇傾向にあった。

③ RAS3 の遺伝子である *ras3* の破壊株（Δ*ras3*）は，野生株と比較して寒天培地上では約 40%のコロニー成長速度の低下が見られた。また，顕微鏡観察では，野生株と比較して細胞形態は変化していなかったが，クリ幹に対する病原性は低下していた。細胞内 cAMP 濃度に関しては，DK80 株との間に有意差は見られなかった。低分子量 GTP 結合タンパク質の多くは，C 末端に膜結合に関与する CAAX box（脂質付加コンセンサス配列）をもつことが知られているが，RAS3 はこの CAAX box を欠いていた。RAS3 の細胞内局在を観察するために GFP と融合させた RAS3 を発現させたところ，細胞表層に強い蛍光が認められた。C 末端 32 アミノ酸を欠失させた RAS3 は，この局在を示さず，細胞質全体に分散して発現していた。このことから，C 末端 32 アミノ酸が膜結合に関与している可能性が示された。さらに，大腸菌中で発現させた RAS3 について GTP 分解活性を評価し，本タンパク質が生化学的に GTPase として機能することが示された。

filamentous fungus, small GTP-binding protein, signal transduction

講演番号：3A12p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ A 校舎 12 会場

出芽酵母および糸状菌における植物-真菌融合ヒスチジンキナーゼの機能相補とエチレン応答

Functional complementation and ethylene response of plant-fungal fusion histidine kinase in yeast and filamentous fungi

○中山 真由美[1,2]、古川 健太郎[3]、吉見 啓[2]、阿部 敬悦[1,2]([1]東北大・未来研、[2]東北大・院農・生物産業創成、[3]Univ. of Gothenburg, Dept. of Chemistry and Molecular Biology)
○Mayumi NAKAYAMA[1,2], Kentaro FURUKAWA[3], Akira YOSHIMI[2], Keietsu ABE[1,2] ([1]NICHe., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Argric. Sci., Tohoku, Univ., [3]Univ. of Gothenburg, Dept. of Chemistry and Molecular Biology)

糸状菌の固体培養は，液体培養とは異なり遺伝子発現制御のための誘導・抑制化合物の拡散が困難で，遺伝子発現制御を容易に行うことができない。そこで我々は，有効に拡散する誘導・抑制化合物として，ガス状の植物ホルモンであるエチレンに着目した。モデル植物のシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* においてエチレンセンサーとして機能する AtETR1 はヒスチジンキナーゼ（HK）活性を持ち，エチレンによって HK 活性が制御されている。HK はレスポンスレギュレーター（RR）とともに二成分情報伝達系(TCS)を構成し，外界からの多様な環境刺激を感知し TCS を介して下流にシグナルを伝達している。TCS は原核生物のバクテリアから真核生物の酵母，糸状菌および植物にまで広く保存される環境応答機構として知られており，モデル糸状菌の *Aspergillus nidulans* においては，10 数種の HK が存在し，そのうちキナーゼドメインと RR ドメインの 2 つを併せ持つハイブリッド型 HK である AnNikA および AnTcsB が浸透圧センサーとして刺激を感知し TCS を介して下流にシグナルを伝達している。また，出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては唯一の HK として浸透圧センサーの ScSln1p が存在し，この機能を糸状菌 HK の AnTcsB が相補することが確認されている。そこで本研究では，植物由来のエチレン結合ドメイン(EBD)と酵母唯一の HK である ScSln1p および酵母での HK 機能相補が認められている糸状菌 HK の AnTcsB および主要な HK である AnNikA のヒスチジンキナーゼドメイン(HKD)と融合した HK を造成し，エチレン応答性の HK に機能改変した分子による新規シグナル伝達系の創出を試みた。

シロイヌナズナ AtETR1 の EBD と出芽酵母 ScSln1p および糸状菌 AnTcsB の HKD との融合 HK の発現系を構築し，出芽酵母 Sln1p 温度感受性株において ScSln1p の HK 機能相補性を評価した結果，AtETR1(EBD)-ScSln1p(HKD)および AtETR1(EBD)-AnTcsB(HKD)が ScSln1p の HK 活性を相補することを確認した。また，エチレン処理によって，融合 HK を導入した株で生育の抑制と TCS 下流の HOG 経路の制御が認められ，融合 HK のエチレン応答性を確認した。また，同様に糸状菌 AnNikA についても融合 HK 発現系を構築し評価した結果，HK 機能相補性およびエチレン応答性を確認し，加えて浸透圧刺激の感受に重要とされる HAMP ドメインの機能が融合 NikA に維持されていることを確認した。現在，出芽酵母において HK 機能相補性を確認した融合 HK について糸状菌での発現系を構築し，解析を進めている。

（本研究は生研センターイノベーション創出基礎的研究推進事業の支援を受けた。）

Two-component regulatory system, Histidine kinase, Ethylene

講演番号：3A12p23
講演日時、会場：3 月 29 日 17:59～ A 校舎 12 会場

Fusarium asiaticum の窒素代謝におけるアグマチン添加の影響
Influence of agmatine supplemented culture medium on nitrogen metabolism in *Fusarium asiaticum*.
○岩橋 由美子、鈴木 忠宏（（独）農研機構）
○Yumiko IWAHASHI, Tadahiro SUZUKI (NARO)

近年、地球環境の変化により、以前はその存在が確認されていなかった南方系のかび類の穀類汚染が日本国内でも散見するようになり、収穫した穀物に新たなかび毒汚染リスクが迫っている。通常のカビ毒の検査はカビ毒そのものを測定することがほとんどのため、極微量のカビが存在していても、そのカビがその時点で毒素を生産していなければ検出出来ない。というのも、穀物のかび毒汚染量は、産生かびの種類、宿主の種類やその栄養状態、気温や水分の環境要因、競合微生物の影響等の様々な要因が単独あるいは複数関与しているものと思われるが、その要因を詳細に解明するに至っていないからである。つまり、いつどのような条件であればカビ毒を生産するようになるのか、暗中模索の中で貯蔵・流通が行われている。このようなかび毒の生産を制御するためにはまず、かび毒生産機構そのものについての理解を深めることが最重要である。カビ毒を生産するカビのうち、トリコテセンカビ毒の一つであるデオキシニバレノール（DON）は赤カビ病原菌である *Gibberella zeae* 及びその無性胞子を形成する不完全時代の *Fusarium graminearum, F.culmorm* 等により生産される。本研究では、*Fusarium* 属カビの全遺伝子の発現量の変化を検出する事が出来る DNA マイクロアレイを作成し、かび毒生産における遺伝子の動態を解析するとともに、LC-TOFMS を用いて代謝産物の変動を測定した。日本を含むアジア全般に分布地域が広がっている *F.asiaticum* において、DON を高効率で生産する条件下（アグマチン添加培地）で、ABC トランスポーターを始めとする多くのトランスポーター遺伝子の誘導がみられ、またグルタミン酸やアスパラギン酸等、多数の代謝産物が増加していた。同時に、核酸の分解量の増加、硝酸態窒素の取り込み及び還元に関与する酵素群遺伝子の発現が増大していた。さらに、窒素代謝調節因子（NIT2/areA）及び bZIP 転写因子などの発現誘導がみられ、アグマチン添加によって、*F.asiaticum* は植物との窒素を含む栄養素の競合を認識して代謝系を素早く変換させ、栄養素の取り込み能力を増大させるとともに、植物への抵抗物質としてかび毒などを生産しているものと考えられた。

Fusarium asiaticum, agmatine, nitrogen

講演番号：3A13a01
講演日時、会場：3 月 29 日 09:00～ A 校舎 13 会場

コリネ型細菌におけるアラビノース応答性転写因子 AraR の制御機構の解明
Identification of the regulatory mechanism of arabinose-responsive transcriptional regulator AraR in *Corynebacterium glutamicum*
○久下 貴之[1]、寺本 陽彦[2]、乾 将行[2]、湯川 英明[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Takayuki KUGE[1], Haruhiko TERAMOTO[2], Masayuki INUI[2], Hideaki YUKAWA[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】我々は、有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* の糖利用能の向上を目指し、関連遺伝子の機能および発現制御機構の解析を進めてきた。その中で ATCC 31831 株がアラビノース資化能を有することを見い出し、その代謝酵素遺伝子 *araBDA* を同定した[1]。また C5 糖トランスポーター遺伝子 *araE* が、リグノセルロース系バイオマスを原料とした高効率バイオプロセスのキーとなる C6･C5 混合糖同時利用に有効に活用できることを示した[2]。上述のアラビノース代謝関連遺伝子はアラビノース存在下で高発現し、それぞれのプロモーター領域にアラビノース応答性転写因子 AraR が結合することを既に本会で報告している。本研究では、アラビノース代謝関連遺伝子発現制御における AraR の役割を明らかにする為、AraR 認識配列を同定した。
【方法と結果】*C. glutamicum* ATCC 31831 株のゲノム上では、*araBDA* と *araE* は、LacI ファミリーの転写因子をコードする *araR* とクラスターを形成している。DNase I footprinting によって、*araB* 遺伝子内に 1 カ所、*araE* 遺伝子上流領域に 2 カ所の AraR 結合サイトが検出された。次に、*araB* 遺伝子内に見出された AraR 結合サイトに 3 塩基毎の配列置換を行い、それぞれの DNA 断片を用いて EMSA を行った。その結果 AraR は-CG-を中心とする不完全なパリンドロームを認識することが明らかになった。類似の配列が *araE* 上流領域の 2 カ所の AraR 結合サイト内に認められた為、同様に配列置換の効果を調べた。その結果、AraR は 3 カ所の標的配列を同様の機構で認識していることが明らかになった。さらに、染色体上の上記 3 カ所の AraR 認識配列に変異を導入した株を作製し、定量 RT-PCR を行った結果、アラビノース非存在下における AraR による遺伝子発現の抑制が一部解除されることが確認された。
1) Appl Environ Microbiol (2009) 75, 3419.
Appl Microbiol Biotecnol (2009) 85, 105.

Corynebacterium glutamicum, sugar metabolism, transcriptional regulation

講演番号：3A13a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ A 校舎 13 会場

コリネ型細菌 ArnR による硝酸還元酵素およびフラボヘモグロビン遺伝子の NO 応答制御機構
NO-responsive regulation of nitrate reductase and flavohemoglobin genes by *Corynebacterium glutamicum* ArnR

○西村 拓、寺本 陽彦、乾 将行、湯川 英明 (RITE)
○Taku NISHIMURA, Haruhiko TERAMOTO, Masayuki INUI, Hideaki YUKAWA (RITE)

【目的】我々は有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* の嫌気条件下における物質代謝調節機構について解析を進めてきた。これまでに本菌の転写因子 ArnR が、好気条件下において硝酸還元酵素オペロン *narKGHJI* およびフラボヘモグロビン遺伝子 *hmp* の発現を抑制すること、嫌気硝酸呼吸条件へのシフトにより同抑制活性が解除されることを報告してきたが、その応答シグナルは不明であった[1]。今回は硝酸呼吸に伴って発生することが予想される一酸化窒素(NO)に応答した ArnR による発現制御メカニズムについて新たな知見を得たので報告する[2]。
【方法と結果】まず定量 RT-PCR の結果から、嫌気条件下であっても硝酸が存在しなければ ArnR の転写抑制活性が維持されることを見出した。この硝酸に応答した ArnR による転写抑制の解除が、*narG* 破壊株ではまったく観察されないことから、ArnR は硝酸呼吸時に発生する硝酸誘導体を感知することが示唆された。本菌の硝酸呼吸時における主要な硝酸代謝産物が亜硝酸であること、また *hmp* 遺伝子が NO の解毒に関与することが認められたことから、亜硝酸および NO を ArnR の応答シグナルの候補として以降の実験を進めた。その結果、好気および嫌気条件下において *hmp* 遺伝子の亜硝酸あるいは NO の添加による ArnR 依存的な発現上昇が観察された。また *narK* および *hmp* プロモーター領域に対する ArnR の *in vitro* DNA 結合解析から、両プロモーターへの結合が亜硝酸よりも NO によって強く阻害を受けることを認めた。さらに ArnR が示す鉄硫黄クラスタータンパク質様の吸収スペクトルのパターンが NO の添加によって大きく影響を受けることも確認した。以上の観察結果から、ArnR に結合するコファクターが *narKGHJI* オペロンや *hmp* 遺伝子の NO に応答した発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。

1) J Bacteriol (2008) 190, 3264.
2) J Bacteriol (in press)

Corynebacterium glutamicum, nitric oxide, transcriptional regulation

講演番号：3A13a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ A 校舎 13 会場

イソブタノールストレスが及ぼすコリネ型細菌のトリプトファン生合成遺伝子の発現への影響

Effects of isobutanol on tryptophan biosynthetic gene expression in *Corynebacterium glutamicum*

○辻本 敏博[1]、豊田 晃一[2]、寺本 陽彦[2]、乾 将行[2]、湯川 英明[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Toshihiro TSUJIMOTO[1], Koichi TOYODA[2], Haruhiko TERAMOTO[2], Masayuki INUI[2], Hideaki YUKAWA[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】イソブタノールはエネルギー含有量が高く、吸湿性および腐食性が低いことから、次世代のバイオ燃料として期待されている。しかし低濃度でも微生物細胞の増殖や機能に悪影響を及ぼすことが知られており、この細胞毒性の強さが微生物を用いたイソブタノールの生産技術の開発において大きな障壁となっている。イソブタノールに対する微生物のストレス応答機構を解明することは、高効率生産株の構築を推し進めるための重要な手掛かりとなる。有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* は、他の工業微生物と比較して高いイソブタノール耐性を有することから、本菌のイソブタノールストレス応答機構に着目し、転写レベルでの応答機構を解明することを目的とした。

【方法と結果】対数増殖期の培養液に 1%または 2%イソブタノールを添加し、添加前後の菌体から RNA を回収して、マイクロアレイ解析を行った。1%および 2%イソブタノールの両条件で発現変化が見られた遺伝子のうち、アミノ酸生合成系では唯一トリプトファン(Trp)生合成遺伝子の発現が上昇した。この Trp 生合成遺伝子のイソブタノール応答性発現上昇の機構を調べるため、イソブタノールと共に Trp を対数増殖期の培養液に添加し、添加前後における Trp 生合成遺伝子の mRNA 量を定量した。その結果、イソブタノール応答性の発現上昇は消失した。この結果から、Trp 生合成遺伝子のイソブタノール応答性発現上昇は、Trp 濃度に依存していることが明らかとなった。以上のことから、イソブタノール条件下では細胞内 Trp 濃度が低下していることが示唆され、これに付随して Trp 生合成遺伝子の発現上昇が見られたと考えられる。

Corynebacterium glutamicum, Isobutanol, Stress response

講演番号：3A13a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ A 校舎 13 会場

コリネ型細菌の ECF シグマ因子 SigH のレギュロンの同定

Identification of the SigH regulon in *Corynebacterium glutamicum*

○豊田 晃一、寺本 陽彦、乾 将行、湯川 英明（地球環境産業技術研究機構）
○Koichi TOYODA, Haruhiko TERAMOTO, Masayuki INUI, Hideaki YUKAWA (RITE)

【目的】Extracytoplasmic function（ECF）シグマ因子は微生物における環境ストレス応答や形態変化に関与することが知られている。多くの ECF シグマ因子の活性は anti シグマ因子とのタンパク質相互作用により負に制御されている。ストレス環境下において anti シグマ因子の失活により遊離した ECF シグマ因子は特異的な認識プロモーター配列を有する遺伝子の発現を誘導する。このような遺伝子によってコードされるタンパク質の多くはストレスによって損傷を受けた生体分子の修復、相補に関与する。有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* のゲノム上には 5 つの ECF シグマ因子がコードされている。このうち SigH は熱、酸化ストレス応答に関与し、ヒートショックプロテイン（シャペロン、プロテアーゼ）遺伝子の活性化に寄与する[1]。*C. glutamicum* におけるストレス応答機構をより深く理解するために SigH regulon の詳細な解析を行った。
【方法と結果】SigH の anti シグマ因子 RshA をコードする *rshA* の破壊株では構成的に SigH が活性化状態にあり、SigH 制御下にある遺伝子の発現が誘導される。*rshA* 破壊株のトランスクリプトーム解析から SigH regulon にはこれまでの解析から推定されていたものより多数の遺伝子が含まれることが示唆された。*rshA* 破壊株を用いた ChIP-chip 解析によりゲノム上の SigH 認識プロモーターを網羅的に同定した結果、既知の 25 プロモーターに加えて新たに 38 プロモーターが得られた。推定オペロン構造を考慮すると新たに 74 遺伝子が SigH regulon に加えられた。また、新規 regulon 遺伝子の多くの発現が *rshA* 破壊株において上昇していることを確認した。新規 regulon には Fe-S クラスター含有酵素遺伝子をはじめ、ペントースリン酸経路、リボフラビン合成経路、亜鉛取り込みトランスポーターをコードする遺伝子群が含まれていた。また、*rshA* や主要シグマ因子 SigA をコードする *sigA* 上流にも SigH 認識プロモーターを見出した。新たに同定した SigH プロモーターの機能解析として、当該プロモーター下流にある遺伝子がヒートショックに応答して誘導されること、その誘導が SigH 依存的であること、そして、*rshA* 破壊株においてその遺伝子の発現がストレス非依存的に上昇することを示した。以上の結果から、SigH のストレス応答に関わる新たな生理学的機能が明らかとなった。
1）J Bacteriol（2009）191, 2964.

ChIP-chip, sigma factor, Corynebacterium glutamicum

講演番号：3A13a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ A 校舎 13 会場

コリネ型細菌における転写因子 OxyR によるレドックス応答制御機構
Redox-responsive transcriptional regulation by OxyR in *Corynebacterium glutamicum*
○寺本 陽彦、乾 将行、湯川 英明 (RITE)
○Haruhiko TERAMOTO, Masayuki INUI, Hideaki YUKAWA (RITE)

【目的】OxyR は大腸菌における酸化ストレス防御遺伝子の転写促進因子として同定され、その制御機構は細菌におけるレドックス応答制御のモデルとして確立している。多くの細菌で、酸化型 OxyR が catalase、peroxidase、alkylhydroperoxide reductase などの過酸化物解毒酵素遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写を促進することが知られている。我々は、有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* の代謝調節機構を解明するため、様々な遺伝子発現制御機構の解析を進めてきた。本研究では、本菌において OxyR により直接的に制御される遺伝子を同定し、そのレドックス応答制御機構について解析した[1]。
【方法と結果】定量 RT-PCR 解析の結果、catalase 遺伝子（*katA*）の他、*dps*、*ftn*、*cydA* の発現が *oxyR* 遺伝子の欠損により上昇することを見出した。また、培養液中に過酸化水素を添加することにより *katA* と *dps* の発現が顕著に誘導された。*dps* と *ftn* は鉄恒常性に関わることが予想され、*cydA* は低酸素条件下で呼吸鎖において重要な働きを担う cytochrome *bd* oxidase をコードする。*in vitro* DNA 結合解析により、還元型 OxyR がこれら 4 個の遺伝子それぞれのプロモーター領域に特異的に結合するのに対し、酸化型 OxyR は非特異的な DNA 結合活性を示すことが明らかとなった。また、過酸化水素処理に対する耐性が *oxyR* 遺伝子の欠損により向上するのに対し、*katA* 遺伝子の欠損により低下することを確認した。以上の結果から、従来の OxyR による制御モデルとは異なり、*C. glutamicum* においては、OxyR は主要な酸化ストレス防御遺伝子の転写抑制因子として働き、酸化条件における OxyR の DNA 結合活性の特異性の低下により標的遺伝子の転写抑制が解除されることが示唆された。
1）FEBS J（2013）280, 3298.

Corynebacterium glutamicum, redox response, transcriptional regulation

講演番号：3A13a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ A 校舎 13 会場

コリネ型細菌における転写因子 GntR1 の標的遺伝子探索と発現解析

Genome-wide analysis of the role of global transcriptional regulator GntR1 in Corynebacterium glutamicum

○田中 裕也、伊藤 輝二、寺本 陽彦、乾 将行、湯川 英明（RITE）
○Yuya TANAKA, Terukazu Ito, Haruhiko Teramoto, Masayuki Inui, Hideaki Yukawa (RITE)

【目的】　我々は有用工業微生物 *Corynebacterium glutamicum* における糖代謝調節機構について解析を進めている。転写因子 GntR1 は、グルコン酸代謝、ペントースリン酸経路遺伝子を発現抑制し、グルコースの主要取り込み経路 PTS 遺伝子の発現活性化を行う。GntR1 の DNA 結合能はグルコン酸により低下することから、*C. glutamicum* におけるグルコン酸応答は GntR1 によって行われていると考えられている。しかしながら、GntR1 の標的遺伝子の全容は明らかでなく、役割について未解明の部分が多い。そこで本研究では、転写因子 GntR1 の標的遺伝子を網羅的に探索し、得られた標的遺伝子の解析から GntR1 の機能解明を目指した。
【方法と結果】　GntR1 による ChIP-chip 法により *in vivo* における結合領域として 77 ヵ所を同定した。この中にはこれまで結合が確認されていた 7 ヵ所の領域全てが含まれていた。得られた領域の配列比較から GntR1 の結合コンセンサス配列を決定した。*gntR1* 遺伝子欠損株におけるマイクロアレイ解析から、*gntR1* 欠損株では PTS 遺伝子、グルコン酸代謝遺伝子、糖新生遺伝子等の発現に変化が観察された。さらに ChIP-chip で得られた標的候補遺伝子についてレポーターアッセイを行い、GntR1 が *pckA* 遺伝子等のプロモーターを活性化していることが判明した。
以上の結果から、GntR1 がグルコン酸代謝、PTS による糖取り込み、糖新生に関わる遺伝子発現を制御しており、グルコン酸-PTS 糖の代謝バランス調節に関わることが示唆された。

GntR, corynebacterium glutamicum, transcriptional regultation

講演番号：3A13a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ A 校舎 13 会場

コリネ型細菌 Riboflavin transporter 遺伝子の FMN-riboswitch による RNA 分解を介した発現制御
Regulation of riboflavin transporter gene expression by FMN-riboswitch in *Corynebacterium glutamicum*

○竹本 訓彦、田中 裕也、乾 将行、湯川 英明（ＲＩＴＥ）
○Norihiko Takemoto, Yuya Tanaka, Masayuki Inui, Hideaki Yukawa (RITE)

【目的】FAD や FMN は様々な酸化還元反応の補酵素として働く。Riboflavin は FAD,FMN の前駆体であり、多くの細菌は ribulose-5 リン酸と GTP からの Riboflavin 合成経路を有する。一部の細菌では Riboflavin 合成経路に加え、細胞外からの Riboflavin 取込みを担う輸送体が同定されており、Riboflavin 合成・取込み経路遺伝子の発現制御が細胞内 Flavin 補酵素レベルの維持のために重要である。これまで我々は有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* において、細胞内 Flavin 濃度低下時に Riboflavin transporter(RibM)の発現量が大幅に上昇すること、この制御に *ribM* 遺伝子の 5’UTR に存在する FMN-riboswitch が必要であることを明らかにした[1)]。しかしながら、その制御メカニズムについては未解明であった。そこで本研究では、*C. glutamicum* の riboflavin transporter 遺伝子(*ribM*)の FMN-riboswitch による発現制御機構について解析を行った。
【方法と結果】FMN-riboswitch による発現制御メカニズムを解析するため *ribM* mRNA 量を測定した。その結果、細胞内 Flavin 量低下時に *ribM* mRNA 量が大幅に上昇することが明らかとなった。また、*ribM* mRNA の安定性について検討したところ、細胞内 Flavin 量低下時には mRNA が安定化されていることが明らかとなった。このことから *ribM* の FMN-riboswitch は FMN 依存的に mRNA の安定性を制御していると考えられる。次に、この制御に関わる RNase を探索した。その結果、RNaseEG 破壊株では、細胞内 Flavin 量に応じた *ribM* mRNA の分解制御が失われた。以上の結果から、*ribM* の FMN-riboswitch が RNaseEG 依存的 mRNA 分解制御を行うことが示唆された。

1) 本学会 2013 年度大会発表

riboswitch, RNase, non-coding RNA

講演番号：3A13a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ A 校舎 13 会場

コリネ型細菌における RNaseJ 遺伝子の発現制御解析
Regulation of the expression of ribonuclease J in *Corynebacterium glutamicum*
○濱本 渚[1]、田中 裕也[2]、竹本 訓彦[2]、乾 将行[2]、湯川 英明[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Nagisa HAMAMOTO[1], Yuya TANAKA[2], Norihiko TAKAMOTO[2], Masayuki INUI[2], Hideaki YUKAWA[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】我々は有用工業微生物 *Corynebacterium glutamicum* の遺伝子発現制御機構について解析を進めている。これまで *C. glutamicum* における遺伝子発現制御解析は転写開始制御が中心であり、転写後制御についての報告は少ない。しかし細胞内の mRNA 量は、転写、および分解により調節されているため、分解制御の解析は重要である。近年様々な mRNA が分解により制御されていることが報告されている。RNA 分解制御のカギとなるタンパク質として大腸菌における RNaseE/G、および枯草菌での RNaseJ1/J2 がある。RNaseE/G の発現制御機構については研究が盛んに行われているが、RNaseJ の発現制御に関しては研究が進んでいない。興味深いことに *C. glutamicum* には、RNaseEG と RNaseJ の両者の相同タンパクが共に存在する。本研究では RNaseJ の遺伝子発現制御について解析を行った。
【方法と結果】これまでに大腸菌の RNaseE や PNPase などの RNA 分解酵素の発現は自己制御されていることが報告されている。そこで *C. glutamicum* の RNaseJ に関しても自己制御が存在する可能性を検討した。*rnj* プロモーター領域と、*lacZ* を融合させたレポーターアッセイの解析から、*rnj* 遺伝子破壊株において *rnj-lacZ* の遺伝子発現上昇を観察した。さらに *rnj* 破壊株で mRNA の安定化も観察されたことから RNaseJ は自己の 5'UTR を特異的に認識し、分解制御していることが示唆された。また、*rneG* 欠損株を用いて *rnj* mRNA 量の定量を行ったところ、*rnj* mRNA の安定性増加が観察された。以上の結果から、*rnj* 遺伝子は RNaseJ および RNaseE/G の両者によって複雑に制御されている可能性が示唆された。

Corynebacterium glutamicum, ribonuclease, regulation

講演番号：3A13a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ A 校舎 13 会場

コリネ型細菌におけるキナ酸・シキミ酸代謝経路のコリスミ酸による発現制御

Chorismate-dependent transcriptional regulation of quinate/shikimate utilization genes in *Corynebacterium glutamicum*

○久保田 健、田中 裕也、竹本 訓彦、渡邉 彰、平賀 和三、乾 将行、湯川 英明 (RITE)
○ Takeshi KUBOTA, Yuya TANAKA, Norihiko TAKEMOTO, Akira WATANABE, Kazumi HIRAGA, Masayuki INUI, Hideaki YUKAWA (RITE)

【目的】 *Corynebacterium glutamicum* はアミノ酸等の生産に広く利用される有用工業微生物として知られている。当菌はキナ酸とシキミ酸を利用するための遺伝子群(*qsu*)を有し、これら有機酸の存在下で培養すると *qsu* 遺伝子群の mRNA 発現は誘導される。転写制御因子 QsuR がこの発現制御を担うことが報告されているが、詳細な制御機構は不明であった。代謝マップ上で *qsu* 遺伝子群がコードするタンパク質が触媒するステップは芳香族化合物の合成経路と分解経路の分岐点に位置し、*qsu* 遺伝子群によって分解が促進される。そのため *qsu* 遺伝子群の発現誘導は芳香族化合物の生成量調節に深く関わる。本研究では *qsu* 遺伝子群の発現制御機構について詳細な解析を行った。
【方法と結果】 *in vitro* DNA 結合解析により QsuR が *qsu* 遺伝子群のプロモーター領域に特異的に結合することを示した。このプロモーター領域内の塩基配列を置換し、QsuR によるバンドシフトが消失する変異を探索することで、QsuR の認識配列を特定した。この認識配列は DNase I footprinting による結果と一致した。*qsu* 遺伝子群はキナ酸とシキミ酸によって発現が誘導されるが、活性化制御因子である QsuR に対する直接のエフェクターは特定されていなかった。このエフェクター探索のため芳香族化合物の合成経路と分解経路上に位置する中間代謝物を候補として検討したところ、合成経路の下流に位置するコリスミ酸を反応系中に添加した時のみ DNase I footprinting のバンドパターンに変化が現れた。さらに、*qsu* 遺伝子群の発現が誘導される条件で細胞内コリスミ酸濃度が上昇することをメタボローム解析により明らかにした。このことから、QsuR はエフェクターであるコリスミ酸の濃度上昇を引き金として *qsu* 遺伝子群の発現を誘導することが示された。以上の結論から導き出される、コリスミ酸依存的な炭素の流れの切り替え制御モデルについて考察する。

effector, aromatic amino acid, metabolic intermediate

講演番号：3A13a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ A 校舎 13 会場

大腸菌における全 tRNA 遺伝子オペロンの発現プロファイルの解析　-Fis の関与-

Characteristic expression analyses of all tRNA operons in *Escherichia coli* - involvement with Fis -

○秋元 隼風[1]、吉川 慎[1]、石浜 明[2]、前田 理久[1]([1]明治大農、[2]法政大ナノ)
○Hayate Akimoto[1], Shin Yoshikawa[1], Akira Ishihama[2], Michihisa Maeda[1] ([1]Meiji Univ., [2]Housei Univ.)

トランスファーRNA(tRNA)は、mRNA 上の情報(コドン)を対応するアミノ酸配列に翻訳する小さなアダプター分子である。生物は 20 種類のアミノ酸に対応した tRNA を持っているが、各種 tRNA の存在量は各 tRNA 分子種によって異なっている。大腸菌のクロモソーム上には 86 の tRNA 遺伝子が存在し、オペロンでは 43 存在する。rRNA 遺伝子と共に転写される tRNA 遺伝子が見られることや翻訳過程で重要な役割を演じていることから、rRNA と同様な発現制御を受けていることが予想されたが、これまでの解析から、全く異なるものであることが示唆されている。発現プロファイルの解析は、*in vivo* promoter-activity assay system (*i* PAS) を用いて行われ、全 tRNA オペロンの標準条件における発現プロファイルが既に決定されている。発現プロファイルは 3 タイプ(タイプ A, B, C)に分類され、rRNA オペロンよりも早くピークを示し、定常期においても高い転写活性を示すプロファイルが大部分(タイプ A, 31 オペロン)であった。また、最少培地条件における発現プロファイルも決定されたが、予想に反し栄養豊富な標準条件と同様なプロファイルを示した。

そこで、われわれは rRNA オペロンの発現制御に関与していることが既に明らかにされている Fis, H-NS, Lrp に関しても、異なる制御様式であることが予想されるため、各遺伝子欠損株における発現プロファイル決定することにした。Fis 欠損株における発現プロファイルは、野生株に比べ、プロモーター活性が上昇し、最大を示す時間が遅延したものとなった。この結果は、これまで提案されている Fis の制御様式とは明らかに異なっているため、新たな制御モデルを考える必要がある。そこで、Fis の制御が直接的であるか否かを推測するためにゲルシフトアッセイを行っている。また、H-NS あるいは Lrp 欠損株におけるプロファイルの決定も進めている。

tRNA, Fis, Expression profile

講演番号：3A13a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ A 校舎 13 会場

大腸菌 GadE によるゲノム発現制御メカニズムの解明

Regulation of genome expression by GadE in *Escherichia coli* genome.

○山中 幸[1]、志波 優[3]、山本 健太郎[1]、川岸 郁朗[1,2]、吉川 博文[3,4]、石浜 明[1,2]、山本 兼由[1,2] ([1]法政大・生命科学、[2]法政大・マイクロナノセンター、[3]東京農大・ゲノム解析セ、[4]東京農大・バイオ)

○Yuki YAMANAKA[1], Yuh SHIWA[3], Kentaro YAMAMOTO[1], Ikuro KAWAGISHI[1,2], Hirofumi YOSHIKAWA[3,4], Akira ISHIHAMA[1,2], Kaneyoshi YAMAMOTO[1,2] ([1]Dept. Front. Biosci., Hosei Univ., [2]Res. Cent. Micro-Nano Tech., Hosei Univ., [3]NODAI Genome Res. Cent., [4]Dept. BioSci., Tokyo Univ. Agricul.)

細菌の多様な環境適応能は、ゲノム上の厳密な選択的遺伝子発現の制御で行われる。遺伝子発現の制御は、その初反応である転写反応における RNA ポリメラーゼのゲノム上の特異的プロモーター認識が重要であり、転写因子がその機能を制御する。一方、細菌も真核生物クロマチンと同様に、核様体とよばれる高次なゲノム構造を形成している。真核生物細胞はクロマチン再構成因子によりゲノム高次構造を変換することが知られているが、細菌には同じメカニズムは不明である。本研究では、大腸菌転写因子GadEが核様体タンパク質によりジーンサイレンシグされる遺伝子群の活性化のメカニズムを議論する。

大腸菌の H-NS はヒストン様タンパク質であり、主要な核様体構成因子である。実際に、H-NS はゲノム上に多数結合し、1000 以上の遺伝子の発現を抑制する。GadE はグルタミン酸依存的酸耐性システム遺伝子群のマスターアクチベーターとして知られており、野生株と *gadE* 欠損株を用いた Transcriptome 解析の結果、酸耐性遺伝子群を含む 19 オペロンを活性することを見出した。興味深い事に、これら 19 オペロンの遺伝子群発現は H-NS に抑制されていた。さらに、ChIP-seq 解析により大腸菌ゲノム上の GadE 結合の分布を調べた結果、2 カ所のみに結合し、殆どの既知標的遺伝子プロモーターに結合してなかった。一方、GadE の細胞内局在を調べるため、GFP との融合タンパク質を構築して *gadE* 欠損株に発現させ、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、GFP-GadE は細胞内にシングルドットを形成し、その局在には規則性が見出された。これらの結果をふまえ、グローバルレギュレーターGadE によるゲノム発現制御メカニズムについて議論したい。

Escherichia coli, transcription regulation, GadE

講演番号：3A13a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ A 校舎 13 会場

ビフィズス菌との相互作用で誘導される大腸菌遺伝子（群）の同定と発現制御
Transcription regulation of *Escherichia coli* genes induced after cell-cell interaction with *Bifidbacterium longum*

○小島 渓晃[1]、森田 英利[3]、石浜 明[2]、山本 兼由[1,2]（[1]法政大・生命科学、[2]マイクロナノセンター、[3]麻布大・獣医）
○Taniaki KOJIMA[1], Hidetoshi MORITA[3], Akira ISHIHAMA[2], Kaneyoshi YAMAMOTO[1,2] ([1]Front. Biosci., Hosei Univ., [2]Cent. Micro-Nano Tech., [3]Vet. Med., Azabu Univ.)

自然環境においては、細菌は他の生物種と相互作用し、種の存続を維持させている。細菌では、低分子化合物シグナルを介した細胞間交信 Quorum Sensing (QS)が知られている。動物腸内は、数百種の細菌が共存し、特異な細菌-細菌間および細菌-宿主動物間の相互作用が推測されており、動物の成長過程で腸内の細菌叢が大きく変動する。特に、ヒト腸内細菌叢ではビフィズス菌（*Bifidobacterium* 属）の占有率が高く、腸内の適正を図っていると考えられている。本研究では、腸内の大腸菌が他種細菌から由来する QS シグナル感知と応答のゲノム制御を理解することを目指し、ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* が分泌するシグナルを介した大腸菌の応答機構の解明を目的とした

まず、ABCM 培地で嫌気的に培養した *B. longum* の定常期培養液から上清を調製し、それを用いた大腸菌の増殖可能な調整培地を作製した（BLCM 培地）。BLCM 培地と ABCM 培地により対数期まで培養させた各大腸菌から全 RNA を調製し、Cy3 と Cy5 により標識した cDNA を合成した。その後、DNA マイクロアレイにハイブリダイゼーションさせ、アレイスキャナーでスライド上の各スポットの蛍光強度を測定した。その結果、125 種類の遺伝子発現が増加し、82 種類の遺伝子発現が減少することを確認した。次に、同様な実験を同じ大腸菌の培養上清調整培地（ECCM 培地）で行った結果、47 種類の遺伝子発現が増加し、16 種類の遺伝子発現が減少することを確認した。これらのうち、BLCM 培地で特異的に発現が増加した大腸菌遺伝子について、ノーザンブロッティング法を用いて解析した。その結果、六炭糖リン酸輸送システムをコードする *uhpT* 遺伝子が、BLCM 培地特異的に mRNA 量が増加することを確認した。また、*uhpT* mRNA の BLCM 培地での特異的な発現誘導は、異なる遺伝的背景の大腸菌 K 株でも確認され、大腸菌 K 株に共通の応答機構であることが示唆された。一方で、*uhpT* 遺伝子は、二成分制御系 UhpAB システムによって細胞外グルコース-6-リン酸に依存して発現誘導されることが知られている。そこで、BLCM 培地特異的な *uhpT* 遺伝子発現誘導について *uhpAB* 欠失株で調べた結果、*uhpAB* 欠失株では BLCM 培地特異的な *uhpT* 遺伝子発現誘導は確認されなかった。これらの結果より、*B. longum* の培養上清には、大腸菌の二成分制御系 UhpAB により感知され、その結果として *uhpT* 遺伝子の発現を誘導することが示唆された。

Escherichia coli, Bifidobacterium longum, quorum sensing

講演番号：3A13a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ A 校舎 13 会場

システイン代謝遺伝子転写因子 YdcN の包括転写因子としての機能

The cysteine biosynthesis regulator YdcN plays as a global regulator in *Escherichia coli*

○中野 雅博[1,2]、多田 麻里永[2]、石浜 明[1,2]、山本 兼由[1,2]（[1]法政大マイクロナノ研究セ、[2]法政大生命）
○Masahiro NAKANO[1,2], Marie TADA[2], Akira ISHIHAMA[1,2], Kaneyoshi YAMAMOTO[1,2] ([1]Res. Cent. Micro-Nano Tech., Hosei Univ., [2]Dept. Front. Biosci., Hosei Univ.)

大腸菌の環境変化への応答は、転写の段階における対象遺伝子の選択と発現レベルの制御により行われている。それは転写装置 RNA ポリメラーゼコア酵素の 7 種類のシグマ因子および約 300 種類の転写因子との相互作用によるものである。しかしながらおよそ 100 種類の転写因子に関しては、その機能が明らかとされていない。そこで本研究では、大腸菌全転写因子の制御機構解明の一環として、大腸菌機能未知転写因子 YdcN の機能解明を目的とした。

YdcN は Xre ファミリーに分類され、古細菌を含む原核生物に広く保存されている。これまでの研究で、YdcN は自身のプロモーターを抑制することが明らかであった。そこで、精製した YdcN タンパク質を用い、ゲルシフト解析と DNaseI フットプリンティング解析を行った結果、*ydcN* プロモーターの-35 エレメントのすぐ上流にあるダイレクトリピート GCGC-$(N)_4$-GCGT（YdcN-box）に結合することを明らかとした。さらに、原子間力顕微鏡の 1 分子観察より、YdcN は RNA ポリメラーゼを *ydcN* プロモーターに抑留させることで転写抑制することを明らかとした。*ydcN* 欠失株のトランスクリプトーム解析の結果、YdcN は少なくとも 28 種類の遺伝子を抑制していた。また、YdcN-box は大腸菌ゲノム上に 284 ヶ所見出した。これらの結果から推定される YdcN の直接の標的について、ChIP-PCR 解析を行った。クロマチン免疫沈降法（ChIP）によって細胞内から YdcN と結合した DNA を取り出し、ここで得られた DNA を鋳型としてゲノム上に推定された結合領域について PCR を行った。その結果、*ydcN* プロモーターに加え、YdcN により発現抑制される *cysE*、*mdtK*、*fliZ*、*yhcH* 遺伝子上流に対しても YdcN が結合することが明らかとなった。これらの結果より、YdcN はシステイン代謝に関与する遺伝子などを抑制するグローバルリプレッサーである可能性が示唆された。

transcription regulation, cysteine metabolism, repressor

講演番号：3A13a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ A 校舎 13 会場

大腸菌システイン合成遺伝子群を制御する CysB-Cbl カスケード

Regulation of genes involved in cysteine biosynthesis by CysB > Cbl cascade in Escherichia coli

○山本 兼由[1,2]、山田 佳代子[1]、岩田 紀子[1]、小澤 貴博[1]、富山 あや乃[1]、千野 拓馬[1]、石井 絵里[1]、鈴木 孝太[1]、尾崎 友紀[1]、石浜 明[1] ([1]法政大・生命科学、[2]法政大・マイクロナノセンター)
○Kaneyoshi YAMAMOTO[1,2], Kayoko YAMADA[1], Noriko IWATA[1], Takahiro OZAWA[1], Ayano TOMIYAMA[1], Takuma CHINO[1], Eri ISHII[1], Kota SUZUKI[1], Yuki OZAKI[1], Akira ISHIHAMA[1] ([1]Dept. Front. Biosci., Hosei Univ., [2]Res. Cent. Micro-Nano Tech., Hosei Univ.)

大腸菌のシステイン生合成は、システイン前駆体であるアセチルセリンをリガンドとする転写因子 CysB により転写レベル調節されることが知られている。CysB は、システインのチオール基供給化合物であるサルファイドの代謝酵素をコードする遺伝子群を活性化する。加えて、CysB と非常に高い相同性もつ Cbl の発現も転写レベルで活性化し、Cbl は CysB と同様な遺伝子発現制御することが報告されているが、CysB > Cbl カスケードのシステイン合成遺伝子発現ネットワークの詳細は不明である。本研究では、CysB の全標的遺伝子（CysB レギュロン）と Cbl の全標的遺伝子（Cbl レギュロン）の同定により、CysB > Cbl カスケードによるシステイン合成制御を解明することを目的とした。

まず、CysB の全標的遺伝子(CysB レギュロン)の解明を目指し、ChIP-chip 解析を行った。cysB-3xflag 遺伝子を染色体上にもつ大腸菌から、FLAG 抗体によって細胞内 CysB-DNA 複合体を単離し、結合した DNA をタイリングアレイによって解析を行った。その結果、13 ヶ所の CysB 結合位置を検出し、これらの CysB 結合付近の遺伝子には、CysB で活性化するサルファイド代謝遺伝子群や cbl 遺伝子の上流を含んでいた。cysB 欠失株を用いたトランスクリプトーム解析、少なくとも 7 つのプロモーターを活性化し、4 つのプロモーターを抑制することが示唆された。CysB レギュロンのプロモーター制御に対する Cbl の影響を調べるため、cdl-3xflag 遺伝子を染色体上にもつ大腸菌から、免疫沈降法により Cbl-DNA 複合体を調製し、それを鋳型に PCR を行い、ゲノム上の CYsB レギュロンプロモーターへの Cbl 結合を確認した。これらの結果を踏まえ、CysB＞Cbl カスケードのシステイン合成遺伝子発現ネットワークについて議論したい。

Escherichia coli, transcription regulation, CysB > Cbl cascade

講演番号：3A13a17
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ A 校舎 13 会場

大腸菌の L-アラニン排出輸送体 AlaE(YgaW)の発現制御解析

Analysis of *alaE* (*ygaW*) expression, the gene encoding L-alanine exporter in *Escherichia coli*

○伊原 航平、佐藤 一樹、堀 初弘、安藤 太助、磯貝 恵美子、米山 裕（東北大院農）
○Kohei IHARA, Kazuki SATO, Hatsuhiro HORI, Tasuke ANDO, Emiko ISOGAI, Hiroshi YONEYAMA (Tohoku Univ)

【目的】細菌が外界の変化に対応して生存していくために必要な細胞内の恒常性を保つうえで、細胞膜を介する物質輸送は重要な役割を果たしている。近年、細菌において一次代謝産物であるアミノ酸の排出輸送体が見いだされ、細胞内の恒常性を維持するための「安全バルブ」として機能していることが示唆されている。しかし、細菌にとってアミノ酸は重要な栄養素であり、それをエネルギーを消費してまで細胞外に排出することはエネルギーの浪費となることから、アミノ酸排出輸送体の機能ならびに発現は厳密な制御下にある必要がある。本研究では、近年新たに同定された大腸菌の L-アラニン排出輸送体 AlaE（以前は YgaW）の発現制御機構を明らかにすることを目的とした。
【方法】これまでに明らかとなったアミノ酸排出輸送体の多くは、グローバルレギュレータである Leucine-Responsive Regulatory Protein（Lrp）によって制御されていることが知られている。本研究ではこの Lrp に着目し、*alaE* 遺伝子の上流域に Lrp が作用する制御領域が存在しているかどうか検証するために β-ガラクトシダーゼアッセイ法を用いて検証した。β-ガラクトシダーゼアッセイでは大腸菌の野生株 MG1655 の β-ガラクトシダーゼ欠損株（MG1655 Δ *lacZ*）または β ガラクトシダーゼと *lrp* 遺伝子の二重欠損株（MG1655 Δ *lacZ* Δ *lrp*）を用いた。これらの菌株に *alaE* 遺伝子の上流域 60 bp から 300 bp と *lacZ* 遺伝子を融合させた融合遺伝子を作製し、それを導入した形質転換体を得た。これらの形質転換体を 6 mM の L-アラニル L-アラニン（Ala-Ala）を含む培地で培養し、Lrp の有無と Ala-Ala の有無による *lacZ* 遺伝子の発現量の違いを観察した。
【結果】β-ガラクトシダーゼアッセイを行った結果、*alaE* 遺伝子の 240 bp 上流域をもつ *lacZ* レポーターを導入した MG1655 Δ *lacZ* を 6 mM の Ala-Ala 存在下で培養したとき、LacZ の発現が観察された。一方で MG1655 Δ *lacZ*, Δ *lrp* に *alaE* 遺伝子の 240 bp 上流域と *lacZ* の融合遺伝子を導入した場合、Ala-Ala の有無にかかわらず LacZ の発現が認められなかった。また、180 bp より短い *alaE* 遺伝子上流域をもつ *lacZ* レポーター遺伝子を導入した形質転換体については Ala-Ala の有無にかかわらず LacZ の発現は確認できなかった。
以上の結果から、*alaE* 遺伝子は Ala-Ala 存在下において Lrp により正の制御を受けることが明らかとなった。また、Lrp による発現制御にかかわる領域は *alaE* 遺伝子の 240～180 bp 上流に存在していると考えられる。

AlaE, L-alanine exporter, *Escherichia coli*

講演番号：3A13p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ A 校舎 13 会場

酵母メタノール誘導性遺伝子発現に重要な Wsc ファミリータンパク質の機能解析

Functional analysis of the Wsc family proteins important for methanol-inducible gene expression in methylotrphic yeasts

○大澤 晋、由里本 博也、阪井 康能（京都大院農・応用生命科学）
○Shin OHSAWA, Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ.)

【目的】メタノール資化性酵母はメタノールによって特異的かつ強力に誘導されるプロモーターを有しており、異種遺伝子高発現のための宿主として利用される。我々はこのメタノール誘導性プロモーターを用いた有用タンパク質生産ならびに、メタノール誘導性遺伝子発現に関連する転写制御因子についての研究を進めている。メタノール誘導性に関わるシグナル伝達に関してはまったく研究が進んでいなかったことから、メタノール誘導性遺伝子発現に関わるシグナル伝達関連因子を当研究室のスクリーニングによって探索したところ、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞膜におけるストレスセンサーとして知られる Wsc タンパク質がメタノール誘導性遺伝子発現に関連していることが示唆された。そこで本研究では、メタノール資化性酵母における Wsc タンパク質のメタノール誘導性遺伝子発現における機能解析を目的とした。

【方法・結果】*S. cerevisiae* Wsc タンパク質アミノ酸配列を用いた BLAST 検索により、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* において Wsc タンパク質をコードし得る *PpWSC1, PpWSC2, PpWSC3* の 3 遺伝子を同定した。次にそれぞれの遺伝子破壊株を作成し、メタノール培地での生育を調べたところ、*Ppwsc1 Δ*株においてのみ特徴的な生育遅延が見られた。また、その株においてメタノール誘導性遺伝子の発現レベルが低下していた。さらに、*Ppwsc1 ΔPpwsc2 Δ*二重破壊株においては、*Ppwsc1 Δ*株よりさらにメタノール誘導性遺伝子の発現レベルが低下していた。以上の結果から、*PpWSC1* と *PpWSC2* はメタノール誘導性遺伝子発現に重要であることが示された。ScWsc1 の Cysteine rich domain (CRD) 中の Cysteine 残基への変異株は高温ストレス感受性となることが報告されている。そこで、PpWsc1 の CRD 中の 8 つの Cysteine 残基の 1 つもしくは 2 つを Alanine 残基への置換変異を導入したところ、置換された Cysteine 残基の位置によってメタノール誘導性遺伝子の発現レベルが異なることが分かった。このことから、PpWsc1 のメタノール誘導性遺伝子発現においては、特定の Cysteine 残基の機能が必要であることが示唆された。

Wsc family proteins, methylotrphic yeasts, cysteine rich domain

講演番号：3A13p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ A 校舎 13 会場

酵母メタノール誘導性遺伝子発現に必要な転写因子 CbHap3p の C 末端領域の解析

Analysis of the C-terminal region of the transcription factor CbHap3p which is necessary for methanol-inducible gene expression in the methylotrphic yeast

○小田 沙織、由里本 博也、阪井 康能（京大院農・応用生命）
○Saori ODA, Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI (Div. Appl. Life sci., Grad. Sch. Agric. Kyoto Univ.)

【目的】メチロトローフ酵母(C1 酵母)は、メタノールを単一炭素源・エネルギー源として生育できる酵母である。本酵母が持つ強力なメタノール誘導性遺伝子プロモーターを利用した異種遺伝子発現系が開発され、工業レベルで実用化されているが、メタノール誘導の詳細な分子機構は不明な点が多い。我々はこれまでに、C1 酵母 *Candida boidinii* においてメタノール誘導性遺伝子発現を制御する転写因子として、CbTrm1p、CbTrm2p、CbMpp1p および CbHap3p を同定してきた。Hap3p は真核生物に広く保存された CCAAT-binding factor(CBF)のひとつであり、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては Hap2p/3p/4p/5p 複合体を形成し、呼吸代謝に関わる遺伝子の発現を活性化することが知られている。本研究では *C. boidinii* における Hap 複合体の役割を解明するため、CbHap3p の機能解析を行った。

【方法と結果】*S. cerevisiae* の Hap3p(ScHap3p)は、全長 144 アミノ酸にわたって他酵母の Hap3p と高い相同性を示す。一方 CbHap3p は全長 292 アミノ酸であり、N 末端領域が他酵母の Hap3p と高い相同性を示すのに加えて、C1 酵母間のみで高度に保存された C 末端領域が存在する。*Schap3Δ* 株がグルコース以外の非発酵性炭素源で生育不能となるのに対し、*Cbhap3Δ* 株はメタノールでのみ生育不能となり、他の炭素源では野生株と同様の生育を示した。また、CbHap3p は *Schap3Δ* 株のグリセロールでの生育を相補できたが、ScHap3p は *Cbhap3Δ* 株のメタノールでの生育を相補できなかった。以上の結果から、CbHap3p は ScHap3p と異なりメタノール誘導特異的に機能することが示唆され、このメタノール誘導特異的な機能が C 末端領域に由来すると推察された。そこで、ScHap3p 全長に CbHap3p の C 末端領域を融合したキメラタンパク質を *Cbhap3Δ* 株において発現させたところ、この株はメタノールで生育可能であり、メタノール誘導性遺伝子の発現レベルが野生株と同等に回復した。このことから、CbHap3p の C 末端領域がメタノール誘導性遺伝子発現に必須であることが示唆された。

Hap complex, methylotrophic yeast, *Candida boidinii*

講演番号：3A13p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ A 校舎 13 会場

出芽酵母のクロマチンリモデリング因子 RSC によるオートファジー調節因子の転写制御

Regulatory mechanisms of RSC chromatin-remodeling complex for autophagy related genes in budding yeast

○余 斐斐、今村 優子、土屋 英子（広島大学・先端物質科学研究科・分子生命機能科学）
○Feifei YU, Yuko Imamura, Eiko Tsuchiya (Department of Molecular Biotechnology. Graduate School of Advanced Sciences of Matter. Hiroshima Univ.)

［目的］

生育に必須な ATP 依存性クロマチンリモデリング因子 RSC(Remodel the Structure of Chromatin)は転写制御、DNA 複製、染色体分配等の幅広い染色体高次構造変換に寄与しており、Rsc1 または Rsc2 を subunit として持つ 2 種類の複合体が存在している。RSC2 は RSC1 の約 10 倍存在し、主要な機能を果たしていると考えられる。しかし、この二つの RSC 複合体における機能の違いは明らかにはなっていない。

当研究室では RSC と機能的に関連する遺伝子の網羅的解析によって、autophagy 関連遺伝子が取得された。autophagy は細胞の恒常性を維持する重要な機構であり、また、近年の研究により、autophagy がガンやパーキンソン病などの様々な疾患に関与することが明らかになっている。そこで、本研究では、RSC による autophagy の制御機構の解明を目的としていて、研究を行った。

[方法及び結果]

RSC と autophagy との関連を調べた結果、Rsc1 欠損株では窒素源飢餓で誘導される autophagy 活性が著しく低下しており、この低下は RSC1 を含む複合体特異的で RSC2 を高発現しても代替できないことを見出した。ゆえに、RSC1 複合体は autophagy を促進することが明らかになった。また、Rsc1 欠損株では autophagosome の形成因子である *ATG8* の転写が抑制されたこと、また RSC の中心因子である Nps1 が窒素源飢餓に伴って *ATG8* の promoter 領域に結合したことから、RSC1 複合体は *ATG8* の転写を制御していることが分かった。*ATG8* の promoter 領域には窒素源カタボライト抑制に働く転写因子 Gln3 及びストレス応答に働く転写因子 Msn2/4 の結合部位が存在したが、*ATG8* の転写には Gln3 が必須であることを見出した。Gln3 結合部位は autophagy 関連因子である *ATG7* や *ATG17* にも存在し、RSC1 欠損株ではこれらの転写量も有意に低下していた。さらに、Rsc1 と Gln3 の関係を解析するために、Gln3 を制御するタンパク質キナーゼ TOR の阻害及び欠損株を用いて、autophagy 活性を調べたところ、RSC1 欠損株による活性の低下を回復することができなかった。その結果より、Rsc1 複合体は TOR 経路の下流またはこれとは独立に制御されていることが明らかになった。現在、さらに RSC1 複合体による autophagy 調節因子の転写制御を解析中である。

autophagy, RSC

講演番号：3A13p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ A 校舎 13 会場

出芽酵母のタンパク質発現量を 2 倍以上高める DIT1 ターミネーター

DIT1 terminator region increases the protein yield of a transgene in Saccharomyces cerevisiae

○松山 崇[1]、伊藤 洋一郎[1]、山西 守[1]、池内 暁紀[1]、今村 千絵[1]、徳弘 健郎[1]、北川 孝雄[2]([1]（株）豊田中央研究所、[2]山口大学)
○Takashi MATSUYAMA[1], Yoichiro ITO[1], Mamoru YAMANISHI[1], Akinori IKEUCHI[1], Chie IMAMURA[1], Kenro TOKUHIRO[1], Takao KITAGAWA[2] ([1]TOYOTA Central R&D Labs., Inc., [2]Yamaguchi Univ.)

代謝工学的な手法を用いて、バイオ樹脂原料やバイオ燃料を生産する遺伝子組換え酵母を開発するには、目的物質の代謝に関わる酵素遺伝子を導入し、強力に発現させることが求められる。

遺伝子のターミネーター領域は、転写の終了や polyA の付加などの役割に加え、3′-UTR として、mRNA 半減期・翻訳効率・細胞内局在等の制御を通じて遺伝子発現を調節している。これまでに我々は、GFP タンパク質をレポーターとして用いて、発現量をフローサイトメーターで定量する手法を確立し[1,2]、ターミネーター領域の上流のタンパク質発現量を向上させる活性の測定系を確立した[3]。次に、これを用いて、出芽酵母ターミネーター活性の網羅的な評価を行い、*PGK1t* や *CYC1t* などの常用されているターミネーターと比べて、2 倍以上高い活性を有するターミネーターを同定した[4]。

今回、活性が上位 5 種類のターミネーター（*RPL41Bt, RPL15At, DIT1t, RPL3t, IDP1t*）について、培地の炭素源、生育時期、親株等が上流に配置した導入遺伝子のタンパク質生産（蛍光タンパク質及びセルラーゼ）に与える影響を調べた。その結果、代謝工学に用いる場合には、*DIT1t* が最も優れていることが判明した[5]。

1. Matsuyama T*, Yamanishi M, Takahashi H. (2011) Improvement of galactose induction system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* **111**, 175–177
2. Yamanishi M, Matsuyama T*. (2012) A modified Cre-*lox* genetic switch to dynamically control metabolic flow in transgenic *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol*, **1**, 172-180.
3. Yamanishi M, Katahira S, Matsuyama T*. (2011) *TPS1* terminator increases mRNA and protein yield in *Saccharomyces cerevisiae* expression system. *Biosci Biotechnol Biochem*, **75**, 2234-2236
4. Yamanishi M, Ito Y, Kintaka R, Imamura C, Katahira S, Ikeuchi A, Moriya H*, Matsuyama T*. (2013) A genome-wide activity assessment of terminator regions in *Saccharomyces cerevisiae* provides a “terminatome” toolbox. *ACS Synth Biol*, **2**, 337-347.
5. Ito Y, Yamanishi M, Ikeuchi A, Imamura C, Tokuhiro K, Kitagawa T, Matsuyama T*. (2013) Characterization of five terminator regions that increase the protein yield of a transgene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol*, in press.

transgene expression, terminator, Saccharomyces cerevisiae

講演番号：3A13p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ A 校舎 13 会場

Saccharomyces cerevisiae におけるイントロン配列を利用したタンパク質の高発現

Enhanced protein production by using intron sequences in the yeast Saccharomyces cerevisiae.

○近藤 真樹[1]、小林 隆文[2]、星田 尚司[2]、赤田 倫治[2] ([1]山口大工、[2]山口大院医系)
○Masaki KONDO[1], Takahumi KOBAYASHI[2], Hisashi HOSHIDA[2], Rinji AKADA[2] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Yamaguchi.Univ)

【目的】これまでに *S. cerevisiae* 遺伝子破壊株セットを用いたスクリーニングにより、*SNT309* 遺伝子破壊により分泌性タンパク質を高発現できることを明らかにした。*SNT309* はスプライシング関連遺伝子として知られている。また、酵母のイントロン遺伝子の約 41%がリボソームタンパク質であり、そのほとんどが高発現タンパク質に分類されるので、発現とイントロン及びスプライシングには何らかの関係があると考えられる。イントロンは最終的にスプライシングによって削除されてしまう配列でありながら、なぜ高等生物の遺伝子中に数多くのイントロンが含まれているのか明らかにされていない。そこで *SNT309* 破壊株での遺伝子発現とイントロン配列が遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。
【方法･結果】*SNT309* 遺伝子破壊株において、これまでに用いていた *TDH3* プロモーターにかえて *GAL10*、*CWP2* プロモーターを用いた時の発現を調べた。レポーター遺伝子には分泌性ルシフェラーゼ（*yCLuc*）を用いた。分泌性ルシフェラーゼ活性を野性株と比較したところ、*SNT309* 遺伝子破壊株はどちらのプロモーターでも約二倍以上の高い活性を示した。また、レポーター遺伝子に非分泌性の *LUC2* 遺伝子を用いた時の活性を比較したところ、*SNT309* 破壊株は非分泌性タンパク質の場合にも約 8 倍と高い活性を示した。この結果から、*SNT309* 遺伝子を破壊することによってプロモーターの種類や遺伝子の発現場所に関わらず、タンパク質を高発現できることがわかった。
イントロンの発現への影響を調べるために、*S. cerevisiae* から Sc*ACT1* 遺伝子のイントロン部分 Sc*ACT1*(11～319)を PCR によって増幅し、イントロンを含まない *yCLuc* 遺伝子の上流部分 500～501 間と下流部分 1500～1501 間にそれぞれ組み込んだ遺伝子を構築した。得られた形質転換体の分泌性ルシフェラーゼ活性をイントロンのない *yCLuc* を比較したところ、Sc*ACT1* のイントロンを持たせた遺伝子は約 30 倍と高い活性を示した。また、イントロンを *yCLuc* 遺伝子の上流部分に入れたものと下流部分に入れたものでは、発現量に差があまり見られなかった。この結果から、イントロンを挿入することでタンパク質の発現量を上昇させることがわかった。

intron, *Saccharomyces cerevisiae*, *SNT309*

講演番号：3A13p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ A 校舎 13 会場

Aspergillus nidulans の Sirtuin A 阻害剤の探索
Novel inhibitors of sirtuin A from Aspergillus nidulans
○張本 修平、高谷 直樹、老沼 研一、伊藤 英里子（筑波大生命環境）
○Shuhei HARIMOTO, Naoki TAKAYA, Ken-Ichi OINUMA, ERIKO ITOU (Tsukuba Univ.)

[目的] *A. nidulans* の sirtuin (SirA)は NAD^+を基質とし、ヒストンのアセチルリジン部位を脱アセチル化する酵素であり、エピジェネティック制御因子である。さらに、SirA はヒストン脱アセチル化反応に伴い *ipnA* や *aflR* といった二次代謝系遺伝子の発現を活性化する転写因子の転写を抑制する。*A.nidulans* の SirA のヒストン脱アセチル化活性の阻害剤は、*A. nidulans* の二次代謝系遺伝子の発現を活性化させることができると期待される。また、糸状菌の多くの化合物の生合成遺伝子群の発現はエピジェネティック抑制を受けていることが判明していることから、これらの阻害剤は様々な糸状菌に利用可能な化合物の生合成遺伝子群の発現誘引物質として利用できると期待される。これは、遺伝子組み換え系が構築されていない様々な糸状菌が潜在的に持つ生合成マシナリーの発掘に有用である。そこで、本研究では、SirA の阻害活性機能を持つ化合物を、糸状菌 200 種×2 培養条件の抽出物をスクリーニング源とし、探索・精製し、様々な糸状菌に汎用的な二次代謝発現活性化物質を獲得することを目指す。糸状菌の二次代謝産物には医農薬を含む生物活性物質などの有用化合物が多く知られており、本研究は、この分野に大きく貢献する。

［**方法・結果**］糸状菌 200 種×2 培養条件の酢酸エチル抽出物をターゲットとし、SirA の酵素活性を測定することが可能な SIRT1/Sir2 Deacetylase Fluorometric Assay Kit によるスクリーニングと、HPLC 分析によるスクリーニングを行った。選抜後、培養抽出のスケールアップを行い、SirA 阻害活性の再現性を図る。現在 50 種の菌株抽出物をスクリーニングにより選抜した。さらに、培養抽出のスケールアップの阻害活性の再現性を現在確認しており、現時点で 1 種類の菌株抽出物のスケールアップ時の阻害活性の再現性が確認できている。今後、同様の操作を引き続き行っていき、最終的に選抜された糸状菌から、NMR で SirA の阻害活性機能をもつ化合物の分離、精製及び化合物の決定を行う。

Aspergillus nidulans, Sirtuin, inhibitors

講演番号：3A13p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ A 校舎 13 会場

麹菌における自己切断型 Cre/*loxP* 選択マーカーリサイクリングカセットを利用した多重遺伝子導入・破壊システム

Self-excising Cre/*loxP* marker recycling system for multiple gene integrations and consecutive gene deletions in *Aspergillus oryzae*

○張 斯来[1]、伴 暁彦[1]、江原 直樹[1]、水谷 治[2]、田中 瑞己[1]、新谷 尚弘[1]、五味 勝也[1] ([1]東北院農、[2]酒総研)
○Silai Zhang[1], Akihiko Ban[1], Naoki Ebara[1], Osamu Mizutani[2], Mizuki Tanaka[1], Takahiro Shintani[1], Katsuya Gomi[1] ([1]Grad.Sch,Agric.Sci.,Tohoku Univ, [2]NRIB)

麹菌は二次代謝化合物生産のクリーンホストとしての利用が期待されているものの、利用出来る選択マーカーが限られているため、生合成マシナリー構成遺伝子を全て導入することが困難である。我々はこれまでに、変異型 *loxP* を用いた Cre/*loxP* システムによる選択マーカーリサイクリングシステムの構築に成功している(張ら, 2013)。しかし、望まない Cre 反応を完全に抑制するためには、選択マーカーと Cre 発現カセットを同時に脱落させるシステムが望ましい。そこで、本研究では自己切断型選択マーカーカセットを用いた多重遺伝子導入システムの構築を目指した。

形質転換マーカー *adeA* と キシラナーゼ遺伝子（*xynG2*）プロモーターに連結した Cre 発現カセットを同時に脱落させるため、両者を変異型 *loxP* で挟んだプラスミドの構築を試みた。しかし、大腸菌内で Cre 反応が生じてしまい、マーカーと Cre 発現カセットが切り出されたプラスミドのみが得られた。そこで、大腸菌内での Cre 発現を抑えるために Cre 遺伝子内に人為的にイントロンを挿入したところ、目的のプラスミドを取得することができた。作製したプラスミドを *adeA* 破壊株に導入し、得られた形質転換体をグルコースおよびキシロースを炭素源とした培地で培養後、ゲノム PCR を行った結果、Cre 誘導条件で *adeA* マーカーと同時に Cre 発現カセットも脱落していることが確認された。しかし、麹菌内でリサイクリングプラスミドが *xynG2* プロモーターの位置に挿入されて、選択マーカーと Cre 発現カセットが脱落されない形質転換体も得られた。そのため、Cre 発現のための条件的発現プロモーターとして *Penicillium chrysogenum* の *xylP* 遺伝子のプロモーターを使用することとした。*xylP* 遺伝子のプロモーターを用いたリサイクリングプラスミドを構築し、*adeA* 破壊株に導入した。得られた形質転換体は Cre 誘導条件で *adeA* マーカーと同時に Cre 発現カセットも脱落していることが確認された。また、PCR でマーカーの脱落が確認された株の表現型を調べた結果、*adeA* 破壊株と同様に YPD 培地上で赤色を呈し、アデニン要求性を示した。以上のことから、自己切断型選択マーカーカセットを用いたマーカーリサイクリングシステムの構築に成功したことが示された。構築したシステムを用いて麹菌の持つコウジ酸生合成酵素の遺伝子 *kojA*、*kojT* 導入株とα-1,3-グルカン合成酵素遺伝子(*agsA, agsB, agsC*) の三重破壊株を作製し、それぞれをゲノム PCR により確認した結果、*kojA* 、 *kojT* が導入されたこととα-1,3-グルカン合成酵素の三つの遺伝子がすべで破壊されたことが確認された。このことから、構築したシステムを用いて多重遺伝子導入と多重遺伝子破壊株の作製が可能であることが示された。

marker recycling, Cre/*loxP*, *Aspergillus oryzae*

講演番号：3A13p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ A 校舎 13 会場

麹菌アレスチン様タンパク質 CreD の翻訳後修飾の解析とカーボンカタボライト脱抑制への関与

Analysis of post-translational modification of *Aspergillus oryzae* arrestin-like protein CreD and its involvement in carbon catabolite derepression.

○田中 瑞己、平本 哲也、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大院農）
○Mizuki TANAKA, Tetsuya HIRAMOTO, Takahiro SHINTANI, Katsuya GOMI (Tohoku Univ.)

糸状菌の多糖類分解酵素遺伝子の発現はグルコースにより強く抑制されることが知られている。糸状菌のカーボンカタボライト抑制は転写因子 CreA によって制御されていることが明らかとなっており，モデル糸状菌である *Aspergillus nidulans* では，CreA 以外のカーボンカタボライト抑制制御因子として CreB，CreC，CreD が同定されている。CreB と CreC は複合体を形成して脱ユビキチン化に関わると推定されているのに対し，アレスチン様タンパク質 CreD はユビキチンリガーゼと標的タンパク質とのアダプターとして機能すると推定されている。麹菌において CreB 破壊によりカーボンカタボライト抑制が解除されるのに対し，*creB* と *creD* の二重破壊により *creB* 破壊株が示すカーボンカタボライト抑制の解除が抑えられたことから，CreD はカーボンカタボライト脱抑制の制御に関わっていることが示唆された。本研究では CreD の C 末端に FLAG タグを融合した CreD を発現させ，CreD の翻訳後修飾ならびにそのカーボンカタボライト脱抑制制御への関わりについて解析を行った。

ウェスタン解析により FLAG タグ融合 CreD を検出した結果，CreD の予想分子量よりも大きい複数のシグナルとして検出された。アルカリフォスファホターゼ処理により高分子側のシグナルが消失したことから、CreD はリン酸化修飾を受けていることが明らかとなった。また，免疫沈降法で CreD を回収後，抗ユビキチン抗体を用いたウェスタン解析によりシグナルが検出されたことから，CreD はユビキチン化修飾も受けていることが示された。CreD のホモログである出芽酵母の Rod1 は，カーボンカタボライト抑制の制御に関わる Snf1 キナーゼによりリン酸化されることが知られている。CreD 内に存在する 2 箇所の Snf1 標的様セリンをアラニンに置換した結果，高分子側のシグナルが消失したことからこの 2 箇所のセリンがリン酸化されていることが示された。また，*creB* 破壊株において CreD のリン酸化部位をグルタミン酸に置換したところ，カーボンカタボライト抑制の解除が抑えられたことから，CreD の脱リン酸化がカーボンカタボライト脱抑制に関与していることが明らかとなった。一方，共免疫沈降法により，リン酸化部位をアラニンおよびグルタミン酸に置換した CreD と HECT ユビキチンリガーゼ HulA との相互作用を調べた結果，リン酸化・脱リン酸化状態に関わらず CreD は HulA と相互作用し，ユビキチン化修飾を受けていることが示唆された。また，HulA との相互作用に関わる PPLY モチーフに変異を導入した CreD ではユビキチン化が検出されなかったことから，CreD は HulA によってユビキチン化されていることが示唆された。

（本研究は生研センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」の支援を受けて行われた。）

Aspergillus oryzae, Carbon catabolite repression, Ubiquitin

講演番号：3A13p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ A 校舎 13 会場

麹菌の固体培養特異的遺伝子発現制御に関わる転写因子の探索

Screening of transcription factor involved in specific gene regulation in *Aspergillus oryzae* solid-state culture

○吉村 緑、田中 瑞己、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大農）
○Midori YOSHIMURA, Mizuki TANAKA, Takahiro SHINTANI, Katsuya GOMI (Tohoku Univ.)

背景．目的

麹菌（*Aspergillus oryzae*）は、小麦ふすまなどを基質として用いた固体培養において液体培養よりも酵素生産が増加することが知られており、古くから醸造産業などにおいて固体培養が広く利用されてきた。特に、グルコアミラーゼの 1 つである GlaB は、液体培養ではほとんど発現しないのにもかかわらず固体培養において大量に生産されることが知られている。しかし、固体培養特異的な遺伝子発現制御機構についてはほとんど解明されていない。そのため、固体培養特異的な制御に関わる転写因子を同定し、それを利用した発現系を構築することにより、固体培養における有用物質の高生産が可能になるものと期待される。そこで本研究では、（公財）野田産業科学研究所などによって作製された約 480 株の麹菌転写因子遺伝子破壊株ライブラリーを利用し、GlaB 生産量が減少する株をスクリーニングすることで固体培養特異的遺伝子発現の制御に関わる転写因子を探索することとした。

方法・結果

転写因子破壊株全ての固体培養を行うには多大な労力と時間を必要とすることから、一度に多くの菌株を植菌可能なプレート培養において GlaB の発現量を比較する方法の検討を行った。固体培養特異的に発現する GlaB の発現は、ポアサイズが小さなメンブレン上での培養による菌糸成長阻害条件、低水分活性条件、および高温培養条件という 3 条件により、プレート培養においても誘導が可能であることが知られている。そこで、菌糸成長阻害条件を利用し、寒天培地に載せたナイロン膜上で麹菌を培養した後､抗 GlaB 抗体を用いて生産された GlaB を抗体反応により検出する方法の検討を行った。その結果、麹菌を生育させたナイロン膜を寒天培地からはがした後、新しいナイロン膜を寒天培地に載せて寒天培地上に分泌された GlaB を吸着させることにより、抗体反応で再現性高く GlaB を検出することに成功した。次に、この方法を用いて実際に 381 株の転写因子破壊株のスクリーニングを行ったところ、明らかに GlaB の生産が減少する株として 15 株の破壊株を選抜できた。選抜された破壊株からグルコアミラーゼ活性が特異的に減少している株を選抜するため、この 15 株について小麦ふすまを用いた固体培養を行い、グルコアミラーゼ活性とα-アミラーゼ活性を測定した。その結果、α-アミラーゼ活性に対するグルコアミラーゼ活性が *glaB* 破壊株と同程度まで低下した破壊株が 1 株存在した。現在この転写因子についての更なる解析を進めているところである。

（本研究は生研センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」の支援を受けて行われた。）

Aspergillus oryzae, transcription factor, solid-state culture

講演番号：3A13p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ A 校舎 13 会場

糸状菌の鉄恒常性に関わる転写因子 HapX の機能解析

Functional analysis of iron-homeotasis transcription factor HapX in filamentous fungy

○金子 優平、中村 隼人、祖父江 衣純、志水 元享、加藤 雅士 (名城大学院農)
○yuhei Kaneko, Hayato Nakamura, izumi Sobue, Motoyuki Shimizu, Masashi Kato (Meijo Univ)

＜概要＞

HapX は、真菌類に特有の転写制御因子であり、CCAAT-box に特異的に結合する HapB/C/E 複合体と相互作用し、鉄欠乏時に、鉄をコファクターとして含む酵素や鉄取り込み系に関わる遺伝子群の転写抑制因子である SreA の遺伝子発現を抑制する。鉄関係の酵素を制御している他に、病原性菌類の病原性にも関与することが明らかになっているため、HapX の機能を明らかにすることは臨床医学的にも重要である。しかしながら、HapB/C/E 複合体との相互作用ドメインや鉄の感知機構については分かっていない。そこで本研究では、*hapX* の点変異株や C 末端欠失株を作製して、HapX の機能を解明することを目的に研究を行った。

＜方法・結果＞

1. HapX 中の HapB/C/E 複合体相互作用ドメインと推定される部位を欠失させた HapX を、Δ*hapX* 株に導入し、表現型を調べた結果、Δ*hapX* 株と同様の傾向を示すことがわかった。このことからこの部位が、HapX にとって重要であることが考えられた。現在、それぞれのリコンビナントタンパク質を調製し、HapB/C/E との相互作用を *in vitro* で解析している。
2. HapX と C 末端部位を欠失させた HapX のリコンビナントタンパク質を調製し、それぞれの吸収スペクトルを測定したところ、HapX の C 末端部位を欠失させるとスペクトルに変化が生じた。このことから、C 末端部位に何らかのコファクターを保持している可能性が示された。
3. HapX の C 末端部位に FLAG-His-tag を融合し、それをΔ*hapX* 株で発現させ、鉄存在条件と鉄制限条件で培養を行った。FLAG ビーズと Ni ビーズで二段階精製を行い SDS-PAGE に供した結果、鉄の有無でバンドパターンに違いが見られた。この結果より、HapX は鉄の有無によって相互作用するタンパク質が異なると示唆された。

現在、これらを通じて HapX と HapB/C/E との相互作用を含めた HapX の詳細な機能を解析している。

HapX, iron-homeotasis, complex

講演番号：3A13p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ A 校舎 13 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* ADAM は、分生子表層構造構築と細胞壁ストレス応答に関与する

involvement of *Aspergillus oryzae* ADAM in construction of conidial surface structure and cell wall stress response

○小林 拓嗣、前田 浩、竹内 道雄、山形 洋平（東京農工大院・応生化）
○Takuji KOBAYASHI, Hiroshi MAEDA, Michio TAKEUCHI, Youhei YAMAGATA (Dept. of Applied Biological Chemistry, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【背景・目的】

麹菌 *Aspergillus oryzae* のプロテアーゼ遺伝子の中には、ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) との相同性を持つものが 2 つ存在する。我々は、これら 2 つを *admA* , *admB* とした。ADAM は、金属プロテアーゼドメインとディスインテグリンドメインを持つタンパク質であり、ADAM ファミリーとして 30 を超えるメンバーが存在する。ADAM の機能は、特にヒトやマウスで多くの報告があり、細胞接着やタンパク質プロセッシング、シグナル伝達などに関与することが知られている。真菌の ADAM では、*A.fumigatus* の組換え型 ADM-B が金属プロテアーゼ活性を有し、sheddase として機能し得ることや分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の Mde10 が胞子表層構造の構築に働くと推定されているものの、真菌での生物学的な機能は明らかになっていない。そこで本研究では、麹菌 *A.oryzae* における ADAM の機能を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

admA , *admB* 単独破壊株 Δ*admA* 株と Δ*admB* 株、および二重破壊株 Δ*admA*Δ*admB* 株を作製し、寒天平板培養での表現型観察を行った。コントロール株と各破壊株では、最小培地における生育の差は認められなかったが、細胞壁撹乱剤である calcofluor white もしくは congo red を添加した培地では若干の感受性を示し、さらに 37℃に温度を上げて培養すると、この感受性が増加した。このことから、*adm* 破壊株では細胞壁ストレス応答に変化が生じていると考えられる。また、走査型電子顕微鏡により分生子を観察したところ、破壊株の分生子は分生子表面の構造がコントロール株と異なっていた。この結果から、麹菌 *A.oryzae* の ADAM は分生子の成熟に関与することが示唆された。

以上の結果から、*adm* 破壊株では分生子の細胞壁構成多糖や表層タンパク質に変化が生じていることが考えられ、現在、分生子細胞壁構成多糖の分画と表層タンパク質の抽出を試みている。

なお、本研究の一部は、生研センター基盤研究推進事業の一環として行われたものである。

Aspergillus oryzae, ADAM, cell wall

講演番号：3A13p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ A 校舎 13 会場

Aspergillus oryzae の菌体内金属プロテアーゼ saccharolysin homolog の機能解析
Functional analysis of intracellular metalloproteases saccharolysin homolog in *Aspergillus oryzae*

○石川 雄一朗、前田 浩、竹内 道雄、山形 洋平（農工大院・応生化）
○Yuichiroh ISHIKAWA, Hiroshi MAEDA, Michio TAKEUCHI, Youhei YAMAGATA (Division of Applied Biological Chemistry, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

[背景・目的] *A. oryzae* のゲノムには、約 130 種のプロテアーゼ遺伝子が存在している。アミノ酸配列の相同性から、これらのうち 3 つのプロテアーゼ遺伝子が *S. cerevisiae* の *saccharolysin* のオルソログ遺伝子であると推定され、 *ols A* 、 *ols B* 、 *ols C* とした。Saccharolysin は酵母において、大部分がサイトゾルに局在し、活性の 3~5%がミトコンドリア膜間腔に局在する金属ペプチダーゼで、ミトコンドリアタンパク質の分解によって産生されるペプチドや、ペプチダーゼによって切断されたミトコンドリアのシグナルペプチドを分解する機能が知られている。酵母ゲノム中には、saccharolysin 遺伝子は 1 つしか存在しない。これに比して、 *A. oryzae* ゲノム中には、3 つの遺伝子が存在していることから *A. oryzae* ではこれらの酵素の機能分担の可能性が示唆された。前回大会では、ミトコンドリア脱共役剤 2、4-dinitrophenol(DNP) 添加によるコントロール株の *ols A* 、 *ols B* 、 *ols C* の転写量増加や 2、4-DNP 添加による *ols A* 、 *ols B* 、 *ols C* 各遺伝子の破壊株の表現型の変化という結果から、2、4-DNP 存在下では *ols A* 、 *ols B* 、 *ols C* が重要な役割を担っている事が示唆された。さらに *olsC* 破壊株では、 *olsA* の転写量が大幅に減少していることを報告した。[1] *A. oryzae* ols の機能解析の一環として高発現株を作製したので、その解析について報告する。

[方法・結果] *ols A* 、 *ols B* 、 *ols C* 各遺伝子を *glaA142* プロモーターの下流に配置した過剰発現株を作製し、コントロール株と比較した。*olsA* 過剰発現株では、発現誘導条件においてコントロール株よりコロニー径、分生子の着生が減少していた。*ols A* 、 *ols B* 、 *ols C* 各遺伝子の過剰発現株の転写解析を行った。その結果、*olsC* 過剰発現株において *olsA* の転写量が増加していた。前回大会の結果と合わせ、転写レベルにおいて、OlsC が OlsA の上流で転写制御している可能性が示唆された。*ols A* 、*ols B* 、*ols C* 各遺伝子の過剰発現株における菌体内可溶性タンパク質の発現解析を行った。その結果、SDS-PAGE において *olsA* 過剰発現株では、 コントロール株とタンパク質量が変化しているバンドがいくつか確認された。それらに関して、 MALDI-TOF-MS を用いてタンパク質の同定を行ったところ、Alcohol dehydrogenase や Aldo-keto reductase 、 D-3-phosphoglycerate dehydrogenase といった NAD もしくは NADH 依存型の reductase である事が示唆された。

なお、本研究の一部は、生研センター基盤研究推進事業の一環として行われたものである。

1)日本農芸化学会 2013 年度大会 , 石川ら

Aspergillus oryzae, saccharolysin homolog, 2,4-dinitrophenol

講演番号：3A13p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ A 校舎 13 会場

醤油麹菌 *Aspergillus sojae* における *manR-xlnR* 二重強制発現株の解析

Effect of *manR-xlnR* double overexpression on the production of carbohydrate hydrolases in *koji*-mold *Aspergillus sojae*

○小川 真弘、吉村 太郎、松島 健一朗、小山 泰二（キッコーマン株式会社）
○ Masahiro OGAWA, Taro YOSHIMURA, Kenichiro MATSUSHIMA, Yasuji KOYAMA (Kikkoman Corporation)

【目的】

糸状菌 *Aspergillus sojae* は、主として醤油醸造に用いられるため、醤油麹菌と呼ばれる。我々は、食品産業分野や、木質バイオマス利用分野への応用を目的に、セルラーゼおよびヘミセルラーゼ生産を強化した醤油麹菌の育種に取り組んでいる。これまでに、*A. sojae* の近縁種である *A. oryzae* では、マンナン加水分解酵素遺伝子群の転写制御因子である ManR と、キシラン加水分解酵素遺伝子群の転写制御因子である XlnR が、本菌のセルラーゼおよびヘミセルラーゼの生産を正に制御していることが報告されている。このことから、*manR* と *xlnR* を醤油麹菌にて二重強制発現させた場合には、本菌のセルラーゼ・ヘミセルラーゼの生産量が増大し、バイオマス分解を促進することが期待される。そこで醤油麹菌にて *manR-xlnR* 二重強制発現株を作製し、期待されるような効果が見られるか検証を行った。

【方法】

A. sojae NBRC4239 株を親株とし、*ku70*、*pyrG* および *adeA* を破壊した株を宿主とし、これに、*xlnR* 遺伝子をアルカリプロテアーゼプロモーターにより、*manR* 遺伝子を *tef1* プロモーターによりそれぞれ制御されるよう設計した強制発現カセットを導入した。また、宿主株に *xlnR* 強制発現カセットのみ、もしくは *manR* 強制発現カセットのみを導入した、*xlnR* 単独強制発現株および *manR* 単独強制発現株についても作製した。得られた形質転換体に、強制発現カセットが正しく導入され、核が純化されていることを確認した。上記 3 種の強制発現株と、コントロール株である *A. sojae* NBRC4239 *Δku70* 株を用いて、三角フラスコ中の醤油麹を作製した。この醤油麹より、リン酸ナトリウム緩衝液を用いて菌体外に分泌された酵素を抽出し、そのカルボキシメチルセルロース分解活性(CMCase 活性)、アビセル分解活性、マンナナーゼ活性およびキシラナーゼ活性を測定した。

【結果】

CMCase 活性およびアビセル分解活性については、*manR* および *xlnR* 単独強制発現株においてコントロールよりも高い活性が見られ、*manR-xlnR* 二重強制発現株では *manR* および *xlnR* 単独強制発現株のいずれをも上回る高い活性が確認された。また、*manR* 単独強制発現株と *manR-xlnR* 二重強制発現株ではマンナナーゼ活性が、*xlnR* 単独強制発現株と *manR-xlnR* 二重強制発現株ではキシラナーゼ活性が、コントロール株と比較し顕著に増大していた。以上のことから、*manR-xlnR* 二重強制発現は、期待していた通り、醤油麹菌のセルラーゼおよびヘミセルラーゼの生産能を同時に増強することが確認された。

Aspergillus sojae, transcription activators, carbohydrate hydrolases

講演番号：3A13p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ A 校舎 13 会場

Aspergillus nidulans 転写因子 ManS が制御する多糖分解酵素遺伝子の同定

Identification of ManS-regulated polysaccharide-hydrolyzing enzyme genes in *Aspergillus nidulans*

○渡邉 亜也子、金丸 京子、木村 真、小林 哲夫（名大院生命農）
○Ayako WATANABE, Kyoko KANAMARU, Makoto KIMURA, Tetsuo KOBAYASHI (Nagoya Univ.)

【目的】 *A. oryzae* において同定された転写因子 ManR は，マンナナーゼ・セルラーゼ生産に必須の因子である。一方，*A. nidulans* は *manR* に加えてそのホモログである *manS* を有しており， *manR* と *manS* の単独破壊株ではマンナナーゼ生産能の完全な消失には至らないが，二重破壊株では完全にマンナナーゼ生産性が失われる。本研究では *manS* 制御下のバイオマス分解酵素遺伝子の網羅的同定を行い，ManR と ManS のマンナン・セルロース分解における役割について考察した。
【方法】1. 野生株，Δ*manS* 株を konjac glucomannan (KG)を単一炭素源として 24 時間誘導し，抽出した RNA を用いて RNA シークエンシングを行った。2.リン酸膨潤セルロース，galactomannan (GM)を誘導物質として *manS* 破壊が推定マンナナーゼ，セルラーゼ遺伝子群の発現に与える影響について Northern ブロット解析により確認を行った。
【結果】1. エンドマンナナーゼ遺伝子である *manC*, *manE*, *manF* 遺伝子が ManS による制御を受けていることが示された。ManR 制御のエンドマンナナーゼ遺伝子は *manB* と *manC* であり，*manC* を除くと ManR と ManS は異なるマンナナーゼ遺伝子を制御していることが示された。ManR と ManS により共通して制御される多糖分解酵素遺伝子には *manC* だけでなく，エンドグルカナーゼ遺伝子 *eglA*, *eglB*，セロビオハイドロラーゼ遺伝子 *cbhA*，*cbhD* も含まれていた。すなわち，主要セルラーゼ遺伝子の一部は ManR だけでなく ManS によっても制御されていた。カルボキシメチルセルロース（CMC）による誘導では *manS* 破壊が EglA，EglB 生産に影響を与えないことを考慮すると，ManS は異なる誘導物質に応答して ManR と一部重複する遺伝子を制御すると考えられる。2. RNA シークエンシングの結果同様, *manE*, *manF* 遺伝子が ManS 単独による制御を受けていることが示された。また, *manC*, *eglA*, *eglB* 遺伝子が，炭素源としてリン酸膨潤セルロースによる誘導では ManR に，GM による誘導では ManS により制御されていることも確認された。今後は ManS の DNA 結合部位を同定するため, EMSA を用いて解析を行う予定である。
●本研究は，生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業の一環として行われたものである。

Aspergillus nidulans, transcription factor, polysaccharide-hydrolyzing enzyme

講演番号：3A13p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ A 校舎 13 会場

Aspergillus oryzae 転写因子 XlnR/AraR の DNA 結合をめぐる競合
Competition between XlnR and AraR for DNA binding in *A. oryzae*.
○石川 香南、金丸 京子、木村 真、小林 哲夫 (名大院生命農)
○Kana ISHIKAWA, Kyoko KANAMARU, Makoto KIMURA, Tetsuo KOBAYASHI (Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】XlnR と AraR は、*Aspergillus* 属糸状菌のもつ $Zn(II)_2Cys_6$ 型の DNA 結合ドメインを有する転写因子である。これらは、アミノ酸配列の類似した相同因子だが機能は異なっている。XlnR は D-キシロースに応答したキシラナーゼ、セルラーゼ遺伝子群の転写活性化に働き、キシランの多様な修飾基の加水分解に関わるいわゆる Accessory Enzyme をコードする遺伝子群の転写も制御する。一方、AraR もα-アラビノフラノシダーゼなどを含む16種のグリコシドハイドロラーゼ遺伝子の転写活性化因子として働くが、その多くは未知酵素である。これら因子はいずれもペントース代謝系遺伝子群を正に制御するが、遺伝子によっては明らかな両者の競合が見られる。この協調的かつ一部競合的な制御機構の詳細を明らかにするため、本研究では、ペントース代謝系の第一反応の酵素をコードする *xyrA* 及び *larA* のプロモーター領域に存在する XlnR、AraR 結合部位を同定した。その結果をもとに、協調的かつ競合的な制御機構について考察する。

【方法・結果】大腸菌を宿主として生産した XlnR、AraR の DNA 結合ドメインを用い、*xyrA*、*larA* プロモーターに存在する DNA 結合部位を EMSA により同定した。*xyrA* プロモーターでは、二つの XlnR 結合配列と一つの AraR 結合配列が 60bp の領域内に存在する。これらの配列への XlnR、AraR の結合検討した結果、AraR は予想通り 1 カ所の 5'-CGGGTAAA に結合するのに対し、 XlnR は予想した 2 カ所の 5'-GGCTAA に加え、AraR 結合配列にも結合した。*larA* プロモーターでは、AraR は 3 カ所のコンセンサス配列 5'-CGGGTAAT、5'-CGGATAAT、5'-CGGAAAAT に結合し、XlnR は 5'-CGGAAAAT 以外の AraR 結合配列 2 カ所に結合した。以上より、XlnR と AraR の結合配列は一部の重複しており、その結果 DNA を巡る競合が起こると考えられる。従って、*xyrA*、*larA* だけでなく XlnR、AraR 制御下の遺伝子群の発現レベルは、競合結合配列の有無、XlnR、AraR の核内のモル比、それぞれの活性化状態、競合結合配列の発現レベルへの貢献度により決定されることになる。本報告では、既知の XlnR 結合配列に加えて、5'-GGGTAA、5'-GGATAA も XlnR の結合配列であることが明らかとなった。そこで、XlnR 制御下遺伝子の一つである *xynF1* のプロモーターに存在する XlnR、AraR の結合コンセンサス配列について行った XlnR、AraR の結合配列自由度解析の結果も合わせて報告する予定である。

本研究は、生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業の一環として行われたものである。

Aspergillus oryzae, transcription factor, DNA binding

講演番号：3A13p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ A 校舎 13 会場

Trichoderma reesei における pH 依存的セルラーゼ・ヘミセルラーゼ生産制御機構の解析
Effect of pH value on cellulase and hemicellulase producivity of *Trichoderma reesei*
○平沢 大樹、塩屋 幸樹、志田 洋介、小笠原 渉 (長岡技科大　生物)
○Hiroki HIRASAWA, Koki SHIOYA, Yosuke SHIDA, Wataru OGASAWARA (Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech.)

【目的】

糸状菌 *Trichoderma reesei* は、多種多様なセルラーゼ･ヘミセルラーゼを生産し、効率的なセルロース分解を行っている．そのため、工業用セルラーゼ生産菌として広く使用されており、各研究機関で突然変異導入によるセルラーゼ高生産変異株の開発が行われている．日本においても、世界的標準株 QM9414 株を親株とし、セルラーゼ高生産菌変異株 PC-3-7 株が取得されている．

糸状菌において、外的環境因子は菌の増殖や生産されるセルラーゼ・ヘミセルラーゼの種類および量に重要な影響を及ぼす．pH は重要な環境因子の一つであり、糸状菌は外的環境の pH 変化に応答した遺伝子発現制御機構を持っている．PacC は糸状菌の pH 応答制御における中心的な役割を担う転写調節因子であり、*Aspergillus nidulans* において、PacC によるキシラナーゼやアラビノフラノシダーゼの発現制御が報告されている．*T. reesei* のゲノム配列上に PacC と相同性を示す遺伝子がコードされており、PacC 推定結合配列が多くのセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子のプロモーター領域中に存在している．そのため、*T. reesei* において PacC を介した pH 応答によるセルラーゼ・ヘミセルラーゼ生産が示唆されていて、pH のセルラーゼ生産への影響は未だ不明な点が多い．そこで本研究では、*T. reesei* の pH 依存的セルラーゼ・ヘミセルラーゼ生産制御機構の解明を試みた．

【方法と結果】

T. reesei PC-3-7 株を pH 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 に調製したセルラーゼ誘導培地である 1％Avicel 培地で培養を行った．この培養上清の SDS-PAGE 解析を行った結果、pH がアルカリ側になるにつれて、XYN I、XYN II 及び EG III などのタンパク質生産が増加していた．そこで、Xylanase 活性測定した結果、pH 5.0 の培養上清で pH 3.5 と比較して約 4 倍活性が高かった．また、pH 5.5 の培養上清の Cellobiase 活性も、 pH3.5 と比較して約 6 倍活性が高かった．しかし、 CMCase 活性とタンパク質生産量では、pH による影響は見られなかった．

現在、標準株 QM9414 株での pH 応答によるセルラーゼ生産能の評価し、PC-3-7 株との比較を行っている． また、PacC 相同性遺伝子の破壊を行い、PacC を介したセルラーゼ生産制御機構の解析を行う予定である．

transcriptional mechanism, cellulase, pH

講演番号：3A13p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ A 校舎 13 会場

糸状菌 *Trichoderma reesei* のアスパラギン酸プロテアーゼの発現誘導機構の解析
Transcriptional mechanism of *Trichoderma reesei* aspartic protease.
○塩屋 幸樹、雪 真弘、佐藤 春菜、志田 洋介、小笠原 渉 (長岡技科大 生物)
○ KOKI SHIOYA, MASAHIRO YUKI, HARUNA SATO, YOSUKE SHIDA, WATARU OGASAWARA (Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech.)

【目的】

糸状菌 *Trichoderma reesei* において、セルロース・キシラン系誘導物質による種々のセルラーゼ・ヘミセルラーゼ誘導発現機構が研究されており、これらの遺伝子の転写制御において中心的な役割を担う転写因子 XyrI が報告されている。一方で、*T. reesei* が自然界で生育する環境中には様々な栄養源が存在し、それらに応答して誘導される未知のタンパク質発現機構の存在が考えられている。本研究では、種々な植物細胞壁構成成分への発現応答を明らかにすることにより、*T. reesei* の新規誘導発現機構の解明を目的とした。

【方法と結果】

T. reesei を種々の植物細胞壁構成成分を炭素源として培養を行い、その培養液上精を SDS-PAGE により解析した結果、炭素源特異的な発現挙動を示すタンパク質が存在していた。そのうち、ガラクトース等に強い応答性を示したバンドを質量分析で解析し、アスパラギン酸プロテアーゼ（TrAsP）を同定した。*TrAsP* 遺伝子の発現に既知のセルラーゼ遺伝子転写調節因子が関与しているかを明らかにするために、*xyrI*、*aceI*、*aceII*、*creI* 破壊株を用いて解析を行った。その結果、*TrAsP* の発現がこれらの転写調節因子の制御下にないことが示唆された。また、Real-time RT-PCR を用いてセルラーゼと *TrAsP* の遺伝子発現挙動解析を行った結果、セルラーゼ遺伝子はセルラーゼ誘導物質に応答して誘導されたのに対し、*TrAsP* 遺伝子はセルラーゼ誘導物質では誘導されず、ガラクトース特異的に誘導されていることが示された。これらの結果より、*TrAsP* の発現は既知のセルラーゼ誘導発現機構とは異なる制御下にあることが示唆された。

次に、様々な窒素源を用いて上記と同様な実験を行った結果、*TrAsP* 遺伝子が窒素源依存的にも誘導され、特に窒素源に BSA を用いた時に強く誘導されることが示された。そこで、BSA とガラクトースを含む培地で誘導実験を行った結果、*TrAsP* の発現量は BSA 単独の時より低くなっていた。このことより、ガラクトースによる TrAsP の誘導発現機構は窒素源による誘導発現機構と異なることが示唆された。

現在は、DNA マイクロアレイを用いてガラクトース特異的に発現する遺伝子の網羅的解析を行い、新規誘導発現機構の解明を試みている。

Aspartic protease, Cellulase, Transcriptional mechanism

講演番号：3A13p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ A 校舎 13 会場

Aspergillus aculeatus セルロース誘導初期の遺伝子発現を制御する因子の同定と機能解析

Identification and functional analysis of a factor controlling the early phase of the cellulose responsive gene expression in *Aspergillus aculeatus*

○遊亀 翔太、國武 絵美、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院・生環科）
○ SYOTA YUKI, EMI KUNITAKE, SHUJI TANI, JUN-ICHI SUMITANI, TAKASHI KAWAGUCHI (Grad. Sch. Life & Env. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【目的】糸状菌 *Aspergillus aculeatus* においてセルロース系バイオマス分解酵素遺伝子の発現は，基質存在下で，ポジティブフィードバック機構により誘導される。そこで我々は，この誘導生産を調節する経路特異的な因子を同定してその機能を分子レベルで解明するとともに，得られた知見を基盤として包括的な酵素大量生産系を構築することを目指している。
【方法及び結果】新規セルラーゼ生産調節因子を同定するために，アグロバクテリウム形質転換法 (AMT) を用いて T-DNA 挿入変異株ライブラリを構築した。AMT の宿主にはセルロースに応答して発現が誘導される cellobiohydrolase I 遺伝子 (*cbhI*) プロモータの発現様式を orotidine 5'-phosphate decarboxylase 遺伝子をレポータとしてモニタできる株を用いた。これにより T-DNA ランダム挿入変異によりセルラーゼ生産調節因子が破壊された株は，5-fluoroorotic acid を含むセルロース培地上で生育できるようになることを利用して，目的遺伝子破壊株を優先的に選抜した。これらの株からセルロース資化能のみが低下した株を単離し，各株における *cbhI* 発現量をノーザンブロット法により定量した結果, 誘導条件下において *cbhI* 発現量が検出限界以下まで減少している株を一株取得した(B7 株)。サザンブロット解析, inverse PCR 法を用いて B7 株における T-DNA 挿入座位を限定した結果，T-DNA の片側はある遺伝子 (*gene1*) の ORF の中央に挿入されていることが明らかとなったが，反対側の領域を特定するには至らなかった。T-DNA 挿入により染色体 DNA が数 kb にわたって欠失する場合があるため，*gene1* およびその周辺遺伝子をそれぞれ pPTRII プラスミドを用いて B7 株に導入したところ，*gene1* の導入により *cbhI* 発現量，セルロース資化能が共にコントロール株と同等レベルまで回復した。そこで *gene1* 欠損株及び相補株を改めて作出し，qRT-PCR により各種酵素遺伝子の発現量を定量した結果，*gene1* 破壊株ではセルロース誘導初期においてセルロース系バイオマス分解酵素遺伝子の発現量がコントロール株と比較して 25% 程度まで減少していた。一方，キシラン誘導条件下では各種遺伝子発現量に変化は観察されなかったことから，*gene1* はセルロースに応答した初期の遺伝子発現誘導を制御していることが示された。このことは，*gene1* 破壊株のセルロース培地上での生育はコントロール株と同等であり，培養上清中に蓄積するエンドグルカナーゼ，キシラナーゼ量にも影響はなかった結果と一致した。現在は translation elongation factor 1α 遺伝子プロモータの制御下で *gene1* を高発現させた株を作出し，セルロース系バイオマス分解酵素遺伝子発現への影響と，酵素生産への影響を解析している。

gene regulation, cellulase, *Agrobacterium*

講演番号：3A13p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ A 校舎 13 会場

Aspergillus aculeatus セロビオース応答因子 ClbR とそのパラログ因子 ClbR2 の作用機序解析
Functional analysis of cellobiose response regulator (ClbR) and its paralog (ClbR2) in *Aspergillus aculeatus*.

○川村 彩乃、國武 絵美、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院 生環科）
○ Ayano KAWAMURA, Emi KUNITAKE, Shuji TANI, Jun-ichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI (Osaka Pref.Univ.)

【目的】糸状菌 *Aspergillus aculeatus* においてセルロースによる遺伝子発現誘導を正に制御する因子 cellobiose response regulator (ClbR) は，セルロースに応答して XlnR 非依存的に誘導される cellobiohydrolase I (*cbhI*), carboxymethyl cellulase 2 (*cmc2*), FIa-xylanase (*xynIa*), hydrocellulase (*cel7b*) 遺伝子及び XlnR により誘導される carboxymethyl cellulase 1 (*cmc1*), FIb-xylanase (*xynIb*) 遺伝子の発現を亢進する。一方で，*clbR* 高発現株を小麦ふすまを炭素源として培養した場合には，ClbR 制御下の遺伝子のうち *xynIa* 発現量が劇的に増加するが，*cbhI, cmc2, cmc1, xynIb* の発現量は変わらず，*cel7b* の発現量は有意に減少した。このふすま培養における *clbR* 高発現の多様な影響は，ClbR が他の転写因子と協調的，或いは競合的に遺伝子の発現を制御していることに起因しているものと想定し，我々は ClbR 相互作用因子を同定してその作用機序解析を進めている。
【方法・結果】Yeast two hybrid 法により ClbR の相互作用因子を探索したところ, ClbR と相同性 42% のパラログ因子 ClbR2 が同定された。*clbR* 及び *clbR2* 単独破壊株と *clbR, clbR2* 二重破壊株を作製し，各株における遺伝子発現量を定量した結果，ClbR と ClbR2 は共に *cbhI, cmc2, cel7b* 遺伝子の発現だけでなく, セルロース誘導及びβ-マンナン誘導を制御する転写因子 *manR* の発現も制御していることが明らかとなった。また，*manR* 破壊株において，*cbhI, cmc2, cel7b* 遺伝子の発現量が有意に減少していたことから，*clbR, clbR2* 破壊によるこれら遺伝子発現量の減少は，*manR* 発現量の減少に伴う間接的な影響であることが示唆された。一方 *xynIa* の発現誘導には ClbR2, ManR 共に関与していなかった。次に，MalE と N 末端から 250 アミノ酸までを含む ClbR 融合タンパク質 (MalE-ClbR$_{1\text{-}250}$) と MalE-部分 ClbR2 融合タンパク質 (MalE-ClbR2$_{1\text{-}295}$) の *in vitro* における DNA 結合特性を *xynIa* プロモーター領域を DNA プローブとして Electrophoresis mobility shift assay (EMSA) 法により解析した。その結果，MalE-ClbR$_{1\text{-}250}$ と MalE-ClbR2$_{1\text{-}295}$ はそれぞれ独立して *xynIa* プロモーターに結合し得るものの，両リコンビナントタンパク質が共存しても付加的なシフトバンドが検出されなかったことから，両タンパク質の結合領域が競合していることが示唆された。現在，両タンパク質の *xynIa* プロモーター上の結合領域を限定するとともに，ClbR と ClbR2 によって協調的に制御されると考えられる *manR* のプロモーター領域に対する結合特性を解析しているところである。

Aspergillus aculeatus, Cellobiose response regulator, gene regulation

講演番号：3A13p23
講演日時、会場：3 月 29 日 17:59～ A 校舎 13 会場

糸状菌 cellobiose response regulator （ClbR）パラログの機能解析
Functional analysis of the cellobiose response regulator （ClbR) paralog in filamentous fungi
○藤原 麻友美、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院・生環科）
○Mayumi HUJIWARA, Shuji TANI, Jun-ichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI (Osaka Pref. Univ.)

【目的】近年当研究室において、糸状菌 *Aspergillus aculeatus* のセルロース系バイオマス分解酵素遺伝子のセロビオース応答を制御する転写因子として、真菌の転写因子に特異的にみられる $Zn(II)_2Cys_6$ DNA 結合モチーフを有す転写因子 cellobiose response regulator (ClbR) が同定された。*A. aculeatus* のドラフトゲノムデータベースから ClbR パラログを検索した結果、ClbR とそれぞれ 42% (ClbR2)、25% (ClbR3) の相同性をもつパラログ遺伝子が見いだされた。本研究ではそのパラログ遺伝子のうち、ClbR3 の機能を解明することを目的とした。
【方法・結果】まず、遺伝子置換により *clbR3* の破壊株（Δ*clbR3*）と、構成的に高発現する translation elongation factor 1α 遺伝子プロモーターを用いて *clbR3* 高発現株（OEclbR3）を作製した。これらの株とその宿主株を 2% 小麦ふすまを炭素源とした完全培地で生育させた場合のエンドグルカナーゼ・キシラナーゼの酵素生産量を経時的に測定した結果、高発現株、破壊株共に宿主株との有意な差は観察されなかった。しかし、 carboxymethyl cellulose (CMC) と xylan を基質に用いて活性染色を行ったところ、高発現株において carboxymethyl cellulose 1 (CMC1) と、FIa-xylanase （XynIa）の生産が宿主株より遅れていたことから、ClbR3 はそれら酵素生産を調節する因子であることが示唆された。そこで、各株におけるセルラーゼ遺伝子の発現量をノーザンブロッティングと qRT-PCR により定量した。その結果、アルカリ膨潤セルロースを炭素源として誘導したとき、ManR 制御下にある cellobiohydrolase I 遺伝子（*cbh1*), carboxymethyl cellulase 2 遺伝子（*cmc2*）と、XlnR 制御下にある *cmc1,* FIb-xylanase 遺伝子（*xynIb*）の発現量が、高発現株において宿主株の 1/5 以下に減少していた。一方で、 xylan を炭素源として誘導したときは、 XlnR 制御下にある *cmc1, xyn1b* の発現量が、高発現株において宿主株の数倍に増加した。これらの結果から、 ClbR3 はキシランの加水分解物に応答した遺伝子発現の調節を行っていることが示唆された。また、セルロースに応答した遺伝子の発現量が OEclbR3 株において減少することについては、セルロース誘導を制御する転写因子のタイトレーションによって間接的に発現量が減少している可能性も含め、今後解析を進めていく計画である。

gene regulation, cellulase, Aspergillus aculeatus

講演番号：3A14a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ A 校舎 14 会場

新規二次代謝制御因子 *Aospt3* の機能解析
Functional analysis of *Aospt3* secondary metabolic regulator
○廣瀬 雅人[1,2]、河内 護之[1,2]、織田 健[2]、岩下 和裕[1,2] ([1]広大院先端研、[2]酒総研)
○Masato Hirose[1,2], Moriyuki Kawauchi[1,2], Ken Oda[2], Kazuhiro Iwashita[1,2] ([1]Hiroshima Univ, [2]NRIB)

糸状菌の 2 次代謝物質は、有用な物質から有害な物質まで多岐にわたり、その制御機構を解明することは、物質生産や安全性の観点から重要である。当研究室ではこれまで、ヒストンアセチル化修飾関連因子について研究を行っており、それら遺伝子の破壊株を作製し、2 次代謝物質 (secondary metabolites：以下 SMs) 制御との関係について解析を行ってきた。その結果、SMs 制御に影響を与えるいくつかの興味深い因子が得られ、その 1 つに *Aospt3* が存在していた。本実験では、SMs 制御への関与が示唆された *Aospt3* に着目し、麹菌における新規な SMs 制御因子として、その制御機構の解明を目的として研究を行った。

本研究では、SMs のモデル物質としてコウジ酸を用いている。*ΔAospt3* におけるコウジ酸生産性解析を行ったところ、control と比べ生産量は約 100 倍に増加していた。また、*ΔAospt3* でのコウジ酸生産性増加の表現型は、正常な *Aospt3* 遺伝子を導入することで相補されることが確認された。次に、*ΔAospt3* におけるコウジ酸遺伝子クラスター (*kojA*、*kojR*、*kojT*) の発現解析を行ったところ、control と比べ遺伝子の発現上昇が見られ、またその上昇のタイミングはコウジ酸生産量増加のタイミングと一致していた。これらのことから、*Aospt3* はコウジ酸生産を遺伝子発現レベルで負に制御していることが明らかとなった。

糸状菌において、複数の SMs 生産制御に関わる代表的な因子として *laeA* が知られている。麹菌においても、*laeA* を破壊するとコウジ酸生産が見られなくなることから、コウジ酸生産を正に制御していることが示唆されている。そこで、*Aospt3* と *laeA* の関係に着目し、*ΔAospt3* における *laeA* の遺伝子発現についてノーザン解析を行った。その結果、*ΔAospt3* において *laeA* の発現が上昇している事が明らかとなった。さらに、*ΔAospt3*／*ΔlaeA* 2 重破壊株、*ΔlaeA*／*Aospt3* 高発現株、*ΔAospt3*／*laeA* 高発現株を作製し、コウジ酸生産制御における *Aospt3* と *laeA* の遺伝学的な関係について解析を行った。その結果、*Aospt3* は、*laeA* の上流で機能する事が明らかとなった。以上の結果から、*Aospt3* は、*laeA* の遺伝子発現制御を介してコウジ酸生産を負に制御していることが明らかとなった。

Aspergillus oryzae, secondary metabolite, epigenetics

講演番号：3A14a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ A 校舎 14 会場

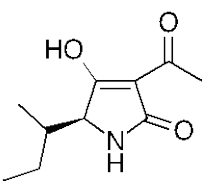
糸状菌の情報伝達系攪乱による二次代謝活性化及び生産誘導される化合物の解析

Activation of secondary metabolism by disturbance of signal transduction systems of a filamentous fungus and analysis of a induced compound

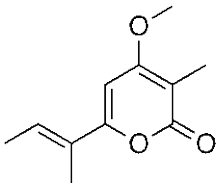
○本山 高幸[1]、尹 忠鉄[1]、二村 友史[1]、廣田 洋[1]、長田 裕之[1,2] ([1]理研・抗生物質、[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)
○ Takayuki MOTOYAMA[1], Choong-Soo Yun[1], Yushi Futamura[1], Hiroshi Hirota[1], Hiroyuki Osada[1,2] ([1]RIKEN, Antibiotics Lab., [2]RIKEN CSRS, Chemical Biology)

【目的】糸状菌は放線菌と同様に、ゲノム中に膨大な数の二次代謝遺伝子群を維持してきた。環境中でのサバイバルのための戦略と考えられる。ところが、これらの遺伝子群が作る二次代謝産物の機能や、外部刺激に応答して生産制御するメカニズムは大部分が未解明である。我々は、これらを解明し、糸状菌の膨大な能力の効率的制御・利用を可能にすることを目指している。前回までに、モデル植物病原糸状菌であるイネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* を用いて、環境応答に関与する二成分情報伝達系因子の遺伝子破壊株を作製し、情報伝達系攪乱による二次代謝産物生産誘導が可能なことを明らかにした。二成分情報伝達系の下流で働く p38 MAP キナーゼ（p38 MAPK）遺伝子破壊によりポリケタイド-非リボソームペプチド融合化合物テヌアゾン酸が、p38 MAPK と HPt の二重遺伝子破壊によりポリケタイド化合物ネクトリアピロンが生産誘導された。今回、情報伝達系による制御と二次代謝グローバルレギュレーターとの関連、別の MAPK の二次代謝制御への関与、及び生産誘導されるテヌアゾン酸の生理活性について報告する。

【方法と結果】テヌアゾン酸の生産誘導は p38 MAPK 遺伝子（*OSM1*）破壊と、DMSO 処理により起こる。糸状菌二次代謝のグローバルレギュレーターである LaeA がテヌアゾン酸生産誘導に関与するかどうかを明らかにするため、イネいもち病菌のオルソログ遺伝子 *LAE1* を破壊したところ DMSO 処理によるテヌアゾン酸生産誘導が起こらなくなり、大量発現させたところ DMSO なしでもテヌアゾン酸の生産誘導が起こるようになり、テヌアゾン酸生産への LAE1 の関与が明らかになった。p38 MAPK 遺伝子破壊株でのテヌアゾン酸生産誘導に LAE1 が関与しているかどうかを明らかにするために、*OSM1* と *LAE1* の二重遺伝子破壊株を作製したところ、この株ではテヌアゾン酸の生産誘導が起こらなくなり、p38 MAPK 遺伝子破壊によるテヌアゾン酸生産誘導は LAE1 を介して起きていることが示唆された。別の二つの MAPK 遺伝子（*PMK1*、*MPS1*）の遺伝子破壊株及び大量発現株を作製し、代謝物を解析した結果、両遺伝子とも大量発現株でテヌアゾン酸の生産誘導が認められ、これらの MAPK の二次代謝制御への関与が明らかとなった。テヌアゾン酸について生物活性を調べた結果、特に強い活性を示すことはなかったが、イネいもち病菌とテヌアゾン酸を一緒にイネに散布するとイネいもち病菌のイネに対する感染能の低下が観察された。



テヌアゾン酸



ネクトリアピロン

本研究の一部は、生研センターイノベーション創出事業による支援を受けた。

Magnaporthe oryzae, secondary metabolism, silent gene cluster activation

講演番号：3A14a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ A 校舎 14 会場

ポリエン系抗生物質と相乗的に働く新規抗真菌剤の探索

Search for novel fungicide showing synergistic effect with polyene antibiotics

○吉岡 麻里子[1]、木下 浩[1]、中村 美有希[1]、井原 史雄[2]、仁平 卓也[1]([1]阪大・生物工学国際交流セ、[2]農研機構・果樹研)
○Mariko YOSHIOKA[1], Hiroshi KINOSHITA[1], Miyuki NAKAMURA[1], Fumio IHARA[2], Takuya NIHIRA[1] ([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]Nat. Inst. Fruit Tree Sci.)

【背景と目的】

ポリエン系抗生物質は、真菌の細胞膜にあるエルゴステロールと結合することで細胞膜に小孔を形成し、膜の透過性を上昇させることが知られている。その結果、真菌の膜内外で物質の無差別な流出入が起こり、抗真菌作用を示すと考えられる。

我々は、本性質を利用して新規抗真菌剤の発見に繋げることを考えた。すなわち単独では細胞内に侵入できないため抗真菌活性を示さない物質であっても、ポリエン系抗生物質と共存することで、細胞内への流入が可能となり、その結果潜んでいた抗菌活性が現れることが期待される。本研究では、様々な二次代謝産物を生産すると考えられる昆虫病原性糸状菌を新規抗真菌剤の探索源として用い、ポリエン系抗生物質を投与した場合にのみ抗真菌効果を示す化合物を同定することを試みた。

【方法及び結果】

本研究では、プレート培養した被験菌 *Candida albicans* に、ポリエン系抗生物質 nystatin と共にサンプルを投与することにより、抗真菌活性を検出した。抗真菌物質の探索源としては、保有している昆虫病原性糸状菌群の中から、過去の解析において高い二次代謝物質の生産性を示した 26 菌株を選抜した。この 26 菌株を 2 種類の培地（A3M 培地、SMY 培地)、2 種類の培養日数（14 日間、21 日間）において 28℃で静置培養を行い、2 種類の抽出方法（培養上清 : 酢酸エチル、培養液全体 : *n*-ブタノール）により菌が生産する二次代謝物質を含む抽出物を取得した。

得られた抽出物を用いて、nystatin と共に抗菌活性測定を行ったところ、抽出物単独では活性を示さないにも関わらず、nystatin と共に投与すると、156 サンプル中 53 サンプルが被験菌に対して活性を示した。なかでも、強い活性を示した *Torrubiella minutissima*　HF809 由来の抗真菌化合物を同定した結果、既知化合物 Terramide A であった。Terramide A における抗真菌活性の報告は本研究が初めてである。

antifungals, secondary metabolites, filamentous fungi

講演番号：3A14a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ A 校舎 14 会場

Search for anti-Rhodotorula compounds showing synergistic effects with antifungal polyene

○Sarach WONGSUNTORNPOJ[1], Hiroshi KINOSHITA[1], Mariko YOSHIOKA[1], Fumio IHARA[2], Takuya NIHIRA[1] ([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]Nat. Inst. Fruit Tree Sci.)

[Objectives]

Rhodotorula species, previously believed to be non-pathogenic, has increasingly been suspected as opportunistic yeasts, which can be fatal to human beings, especially for immunocompromised patients or ones with hospitalized venous catheter infection. Furthermore, the prevalence of antibiotics-resistant *Rhodotorula* has been reported, even in a case when antimycotic polyene is prescribed for treatment under strict physician's supervision. The purpose of our study is to find novel compounds which show synergistic anti-*Rhodotorula* activity together with polyene-type antibiotic, from entomopathogenic fungi.

[Results]

Thirty one representative strains of entomopathogenic fungi were selected from our culture collections, statically cultivated at 28ºC using A3M and SMY media for 14 days or 21 days, and the culture extracts were prepared by ethyl-acetate or *n*-butanol extraction, respectively. Twenty five extracts showed synergistic anti-*Rhodotorula* activity in the presence of a polyene compound, nystatin. Among them, one active component which showed extremely strong activity was purified from the extract of *Akanthomyces novoguineensis*. Chemical characterization identified the compound as mycophenolic acid which was originally isolated from *Penicillium brevicompatum* as immunosuppressant but has not been reported for its anti-*Rhodotorula* activity. Accordingly, the discovery could be beneficial to clinical application of mycophenolic acid to prevent *Rhodotorula* infection in organ transplant surgeries.

secondary metabolites, antifungals, filamentous fungi

講演番号：3A14a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ A 校舎 14 会場

ハイグロマイシン B の活用による紅麹菌の潜在的二次代謝能活性化

Activation of the potential to produce secondary metabolites in *Monascus pilosus* NBRC 4520 by using hygromycin B

○水上 智也[1]、越智 幸三[2]、保坂 毅[3] ([1]信州大院・農、[2]広工大・生命、[3]信州大・農)
○Tomoya MIZUKAMI[1], Kozo OCHI[2], Takeshi HOSAKA[3] ([1]Grad. Sch. Agri. Shinshu Univ., [2]Fac. Life Sci. Hiroshima Inst. Technol., [3]Fac. Agri. Shinshu Univ.)

【背景】

我々は先行研究で，リボソームに作用する抗生物質を用いて，糸状菌の二次代謝活性化方法を検討してきた。その結果，紅麹菌 *Monascus pilosus* NBRC 4520 に「ハイグロマイシン B 耐性を付与する」，あるいは同菌株を「ハイグロマイシン B に亜致死濃度で曝す」ことが，二次代謝活性化につながることを見出した。今回我々は，これら二つの活性化アプローチを組み合わせることで，*M. pilosus* NBRC 4520 の二次代謝産物生産性がさらに向上することを明らかにした。本発表ではその成果を報告する。

【結果・考察】

紅麹菌 *M. pilosus* NBRC 4520（親株）と同菌株から取得したハイグロマイシン B 耐性変異株（MGP 液体培地での赤色色素生産性が親株の 2 倍に向上した菌株）を使用した。親株と変異株に対するハイグロマイシン B の最小生育阻止濃度（MIC）は，それぞれ，40 μg/ml（親株）と 80 μg/ml（変異株）であった。親株を MIC の 1/80～1/5 量のハイグロマイシン B を含む MGP 液体培地で培養したところ，二次代謝産物の生産性が向上し，赤色色素の生産量は最大でハイグロマイシン B 非添加時の約 8 倍増加した。この知見をもとに，ハイグロマイシン B 耐性変異株で同様の検討を行った。その結果，変異株においても二次代謝産物生産性の向上が認められ，MIC の 1/20 量のハイグロマイシン B 存在下における赤色色素の生産量は，非存在下の親株に比べて 10 倍以上まで上昇することが明らかになった。

以上のように，ハイグロマイシン B を活用した遺伝学的および生理学的な異なる二つの活性化アプローチを組み合わせると，効果的に紅麹菌 *M. pilosus* NBRC 4520 の潜在的二次代謝能を引き出せることが判った。本研究で見出した知見は，糸状菌の二次代謝研究の発展に大きく貢献し得る重要な成果といえる。

現在，*M. pilosus* NBRC 4520 で認められる色素以外の二次代謝産物（血中コレステロール降下作用を示すモナコリン K など）の生産性が，今回のアプローチでどの程度変化するか調べている。今後は，ハイグロマイシン B および同薬剤への耐性を付与する変異により糸状菌の二次代謝が活性化する仕組みを，生化学・分子生物学的な面から解析する予定である。

Monascus pilosus, hygromycin B, secondary metabolites production

講演番号：3A14a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ A 校舎 14 会場

Water-soluble adipogenesis inhibition activity produced by genus *Monascus*

○Indika WANNINAIKA, Hirohide TOYAMA, Schinjiro TACHIBANA (Dept. Biosci. Biotech., Fac. Agr., Univ. the Ryukyus)

[Objectives] Obesity evoked by the excessive adipogenesis is the most serious risk factor of pathogenic diseases such as diabetes, cancer, heart disease, hypertension, and osteoporosis. *Monascus* fermented rice, known as red mold rice (RMR) or beni-koji mainly have been used in fermented food industries in East Asia. RMR has also been used as Chinese herbal medicine to decrease serum cholesterol and improve blood circulation since long time ago. Monacolin K (identical to lovastatin) and citrinin, showing adipogenesis inhibitory activity, are water-insoluble secondary metabolites of *Monascus* spp. Recently, it has been reported also that two types of water-insoluble yellow pigment, monascin and ankaflavin, show anti-obesity effects. However, it has not been paid attention regarding water-soluble adipogenesis inhibitory substance so far. The aim of this study is to seek water-soluble adipogenesis inhibitors from different types of RMR samples and uncover those properties to use in food industry as functional food material.

[Methods] A total of 25 strains of *Monascus* fungi were used in screening for adipogenesis inhibitory activity. *Monascus* strains were maintained on PDA medium at 30ºC for 7 to 10 days. Spores of these strains were collected and stored at 4ºC until use. Each strain was cultivated on steamed rice or barley (red mold barley: RMB) with 5×10^4 spores/mL/100 g dry weight at 30ºC and 35ºC for 7 and 14 days. Both water and methanol extracts were prepared from each RMR and RMB sample. Presence of lovastatin and citrinin in each extract was confirmed by TLC analysis. Mouse 3T3-L1 cells were maintained in DMEM containing 10% FCS and differentiated with DMEM supplemented with 50 μg/mL of insulin, 0.5 mM IBMX, and 1 μM DEX. Cell viability was determined by WST-1 assay. Accumulation of triglyceride in adipocytes was evaluated by oil red staining and measured absorbance at 510 nm.

[Results] TLC results showed that lovastatin is completely water-insoluble and citrinin is partially water-soluble feature. We selected RMR prepared by *M. pilosus* NBRC 4507 as the best strain showing the adipogenesis inhibitory activity in the water extract. Both water and methanol extracts of RMR samples showed higher adipogenesis inhibitory activity than other RMB samples. Adipogenesis inhibitory activity of the water extract of NBRC 4507 showed increasing with dose-dependent manner. Cultivation condition of the selected strain was therefore determined at 30ºC for 14 days based on the degree of inhibitory activity of triglyceride accumulation.

Genus *Monascus*, Adipogenesis inhibition, Red mold rice

講演番号：3A14a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ A 校舎 14 会場

麹菌が産生する鉄キレート環状ペプチド　デフェリフェリクリシンの大量生産技術の開発 - 培地成分の Dfcy 生成への影響について -

Development of mass production technology of Deferriferrichrysin, an iron-chelating cyclic peptide produced by *Aspergillus oryzae* - Influence of the medium composition -

○村上 直之[1]、戸所 健彦[1]、中川 拓哉[1]、福田 克治[1]、松村 憲吾[1]、入江 元子[1]、小林 由佳[2]、堤 浩子[1]、大石 真也[2]、藤井 信孝[2]、秦 洋二[1] ([1]月桂冠総研、[2]京大院薬)
○Naoyuki MURAKAMI[1], Takehiko TODOKORO[1], Takuya NAKAGAWA[1], Katsuharu FUKUDA[1], Kengo MATSUMURA[1], Motoko IRIE[1], Yuka KOBAYASHI[2], Hiroko TSUTSUMI[1], Shinya OISHI[2], Nobutaka FUJII[2], Yoji HATA[1] ([1]Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd., [2]Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyoto Univ.)

【背景および目的】

麹菌 *Aspergillus oryzae* は鉄非存在条件下において，3 分子の N^{δ}- acetyl-N^{δ}-hydroxyornithine（Aho），2 分子の serine，1 分子の glycine からなる 6 残基ペプチドのシデロフォアであるデフェリフェリクリシン（Dfcy）を産生する．Dfcy は無色の化合物であるが，環境中の鉄を特異的にキレートし，赤色のフェリクリシン（Fcy）となる．Dfcy および Fcy は，高い水溶性，広い pH 領域での熱安定性，および無味無臭であるといった特徴を持ち，抗酸化活性など生理活性を有することから，食品や医薬品への応用が期待できる．これまでに我々は種々の検討の結果，培地に有機窒素源として酒粕のプロテアーゼ分解物（酒粕分解物）を添加することで効率良く Dfcy を生産することに成功し，2013 年度本大会にて報告した [1)]．

今回，有機窒素源として酒粕分解物添加時の Dfcy 生成量増加の機構を明らかにするため，Dfcy 生合成遺伝子発現解析や菌体内の代謝物解析を行ったので報告する．

【方法および結果】

ツァペックドックス培地を基本として，有機窒素源に酵母エキス，カザミノ酸，酒粕分解物をそれぞれ 0.5%（w/v）添加した培地と有機窒素源の非添加培地を作製し，鉄濃度を一定（0.157ppm）に調整した．各培地に Dfcy 高生産株として育種した *A. oryzae* F14 株を植菌し，30℃で振とう培養を行った．培養 41 h での Dfcy 生合成遺伝子発現を定量し，培養 70 h で培養液中の Dfcy 生成量，菌体量および菌体内代謝物の解析を行った．代謝物解析は LC-MS/MS により，一次代謝物に加え，Dfcy の構成アミノ酸である Aho を測定した．Aho （$C_7H_{15}N_2O_4$ MW 191.10)は，化学合成・精製したものを標品として用いた．

各培地で菌体量当たりの Dfcy 生成量を比較した結果，有機窒素源非添加に対し，酒粕分解物添加では約 2 倍，酵母エキス添加およびカザミノ酸添加で約 1.6 倍の Dfcy 生成が確認された．Dfcy 生合成に関与する *sid2* 遺伝子の発現量を比較すると，酒粕分解物添加培地では他の有機窒素源添加培地と比べ有意に高発現となり，代謝物解析では Dfcy 構成アミノ酸の 1 つである Aho とその前駆体 ornithine 量が有意に減少していた．酒粕分解物を有機窒素源として用いることで，Dfcy 構成アミノ酸である Aho が効率よく生合成され，かつ Dfcy 生成が促進していることが示唆された．

[1)]戸所ら 2013 年日本農芸化学会大会講演要旨集　2B21p03
[2)]**K.Kobayashi,** *et al.*, Bioorg Med Chem **20** (2012) 2651-2655

Aspergillus oryzae, siderophore, metabolic analysis

講演番号：3A14a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ A 校舎 14 会場

糸状菌が産生する有用芳香族化合物の探索と構造解析

Screening for industrially useful aromatic compounds from metabolites of various fungal strains

○茂本 亮輔、老沼 研一、高谷 直樹（筑波大生命環境）
○Ryosuke Shigemoto, Ken-Ichi Oinuma, Naoki Takaya (Tsukuba Univ.)

【目的】芳香族化合物には、医薬品や高機能性プラスチック材料の原料など産業上有用なものが多く含まれる。特に、含窒素芳香族化合物は、強度と耐熱性に優れたスーパーエンジニアプラスチックや他の機能性材料の原料となるものが多い。我々は、多くの代謝系が未解明である糸状菌に着目し、これらの代謝産物から、新たな有用芳香族化合物を探索している。これまでに、含窒素芳香族化合物と高い反応性を示すジメチルアミノベンズアルデヒド(DMAB)を指示薬とした TLC 解析を行い、190 種の菌株の代謝産物を検索したところ、本試薬と反応する化合物を産生する 23 種の菌株を発見した。本発表では、これらの菌株が生産する化合物を精製し、構造解析を行った結果を報告する。
【方法と結果】疎水性担体を充填したオープンカラムクロマトグラフィーや逆相カラムを使用した HPLC を用いて 13 種の菌株より 16 種の DMAB と反応する化合物を精製した。これらの化合物を高分解能質量分析計に供し、分子量を推定した。さらに化合物のマスフラグメント解析から、このうち 2 つの化合物がイソアロキサジン骨格を有する Lumichrome、および N-Phenylacetyl-phenylalanine であることが示された。後者の化合物は Phenylacetate と Phenylalanine がアミド結合により結合した構造であり、現在までに天然物より単離された例はない。さらに NMR を用いた構造解析により *Clathrosphaerina zalewskii* が産生する化合物は Emodin 由来のアントラキノン構造の開裂と修飾によって生じる Sulochrin であると決定した。この化合物は本菌株と同じ子嚢菌類に属する *Aspergillus terreus* において生合成経路が明らかになっており、本菌株においても同様の経路によって産生されると予測される。

fungi, second metabolites, aromatic compounds

講演番号：3A14a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ A 校舎 14 会場

液-液界面培養法を基幹とする抗生物質生産カビの高感度スクリーニング法
Screening of antibiotic-producing fungi with a liquid-liquid interfacial cultivation system

○小田 忍、岡南 雅教、榊原 雄介、大箸 信一（金沢工大ゲノム研）
○Shinobu ODA, Masanori Okanan, Yusuke Sakakibara, Shinichi Ohashi（Kanazawa Inst. Technol.）

【目的】 多様な遺伝子を有し様々な属種を含むカビは, 抗生物質の生産源として極めて有用な微生物である。抗生物質生産カビのスクリーニングとして一般的な液体培養法に対し、筆者らは、中空微粒子を用いて液体培地液面に形成させたカビマットの上に疎水性有機溶媒を重層して培養する、抽出液面固定化（Ext-LSI）システム[1)]をスクリーニングシステムに応用してきた。Ext-LSI システムでは、グルコースが高濃度で存在していてもカタボライト抑制が発現しないこと[2)]、液体培養法では生産されない脂溶性二次代謝物が高濃度で生産されることを報告してきた[3)]。これらの特長は菌株のスクリーニングシステムにおいて、静置培養や抽出操作が不要なことと並んで ”高感度” という大きな長所を導く。本研究では、このスクリーニングシステムにおける抗真菌物質生産カビのヒット率を大体的に調べることを目的とした。

【方法・結果】 比重 0.06、粒径 30 μm のポリアクリロニトリル製中空微粒子（MS）層を修正サブロー培地（5 ml）の液面（表面積 16.6 cm^2）に形成させ、その MS 層表面に自然界より分離してきたカビの切片（約 570 株；1 x 1 mm）を、爪楊枝を用いて２点植菌した。25 ℃で 3 日間静置培養して MS 粒子を取り込む形でカビマットを形成させた後、低粘性ジメチルシリコンオイル（KF-96L-0.65CS）を有機層として 1.5 ml 重層し、7 日間培養を継続した。培養終了後に有機層を回収・濃縮した後、ペーパーディスク法によって抗真菌活性を判定した。対象とした真菌は、*Pichia anomala* NBRC 10213、*Candida utilis* NBRC 0619、*Rhodotorula minuta* NBRC 0387 の 3 株とした。その結果、上記の 3 株に対して明瞭なハローを形成したカビのヒット率は、それぞれ 21.9%、1.1%、4.9%となった。なお、抗真菌活性画分の検定法である TLC–バイオアッセイ法並びに活性画分
の力価試験の結果についても報告する。

1) Oda, S., *et al*., Process Biochem., **44**, 625 (2009).
2) Oda, S., *et al*., J. Biosci. Bioeng., **113**, 742 (2012).
3) 菅原慧ら, 2011 年度日本生物工学会大会講演要旨集, p.173 (2011).

QuickTimeý Ç²
êLí£ÉvÉçÉÓÉâÉÄ
Ç™Ç±ÇÃÉsÉNÉ`ÉÉÇ¾à©ÇÈÇžÇ½Ç…ÇÕïKóvÇ-Ç ÅB

screening system, antibiotic-producing fungi, interfacial cultivation

講演番号：3A14a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ A 校舎 14 会場

新規天然型トリコテセンの同定と毒性評価
Identification and chracterization of newly purified unnatural trichothecenes
○鎌田 賢太朗[1]、田中 彰[1]、多久島 遼[1]、相川 俊一[2]、吉田 泰彦[1]、安藤 直子[1] ([1]東洋大・工研、[2]東洋大・バイオナノセンター)
○ Kentaro KAMATA[1], AKira TNAKA[1], Ryo TAKUSHIMA[1], Shunichi AIKAWA[2], Yasuhiko YOSHIDA[1], Naoko ANDO[1] ([1]Toyo Univ. Graduate School of Engineering, [2]Toyo Univ. Baio-Nano Centre)

【目的】トリコテセンとは 12,13-epoxytrichothec-9-ene 骨格を有する化合物の総称であり、その一部は *Fusarium* 属の糸状菌が重要穀類に感染し二次代謝産物として生産される。トリコテセンは、食の安全を脅かす存在ではあるが、抗がん剤や免疫抑制剤として期待されるトリコテセンも存在する。トリコテセンは生合成経路の多様性から非天然型新規トリコテセンの創成も可能であると考えられる。そこで、本研究では *F. graminearum* の希少代謝物を異種の *F. sporotrichioides* に添加することで非天然型トリコテセンの創成を行い、その構造決定及び毒性の評価を行った。
【実験方法】まず、*F. graminearum* の生合成遺伝子である *Tri11* の破壊体を用い、shunt pathway の生成物である 7-hydroxy isotrichodermin (7HIT) を分取装置 Purif-Rp2 を用いて分取した。次に *F. sporotrichioides* Δ*Tri5* 株の菌糸を採取し、7HIT の濃度が 10 μg/ml になるように調整・添加し、feeding assay を行った。feeding assay により非天然型トリコテセンの生産を試みた。さらにこれらのトリコテセンに、C-3 位アセチル化酵素 TRI101 とアセチル CoA を添加し、それぞれの C-3 位アセチル化体の生産を試みた。これらを、LC-MS/MS を用いて分析し、結果を構造式から予想されるフラグメントイオンと比較することで同定を行った。また、トリコテセンに高感受性を示す多重遺伝子破壊酵母（BY4742 株 *rpb4*Δ*pdr5*Δ*erg6*Δ）を用い、培養液の濁度から酵母の生育阻害を算出し、新規トリコテセンの毒性評価を行った。
【結果】Fig. 1 の lane①に示すように、7H T-2 toxin (7hydroxy T-2 toxin)、7H HT-2 toxin (7hydroxy HT-2 toxin)と推定される化合物の生産が確認された。また、TRI101 の C-3 位アセチル化によりそれぞれの C-3 位アセチル化体の生産に成功したと考えられる（lane②）。LC-MS/MS にて 7H T-2 toxin 及び 7H HT-2 toxin と推定される 2 つの非天然型トリコテセンを LC-MS/MS にアプライしたところ、得られたフラグメントイオンのパターンが推定される MS/MS パターンとよく一致したことから、これら物質が推定された物質であることが高い確率で示された。酵母を用いた毒性評価においては、これらトリコテセンの毒性は T-2 toxin (IC50 0.002 μg/ml)＞7HT-2 toxin (0.015 μg/ml)＞7HIT (10 μg/ml)の順となった。
今後は、NMR によりこれらのトリコテセンの構造を確認する。加えて、多重遺伝子破壊酵母や動物細胞を用い、その毒性やアポトーシス誘導を評価していく予定である。

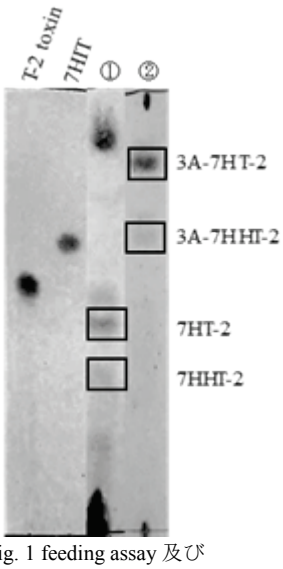


Fig. 1 feeding assay 及び
酵素反応の TLC 解析結果

trichothecene, LC-MS/MS, NMR

講演番号：3A14a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ A 校舎 14 会場

トリコテセン C-4 位アセチル化酵素 TRI7 の発現と性状解析
Expression and characterization of trichothecene C-4 acetylase TRI7
○田中 彰、杉山 智樹、吉田 泰彦、安藤 直子（東洋大院・工研）
○Akira TANAKA, Tomoki SUGIYAMA, Yasuhiko YOSHIDA, Naoko TKAHASHI-ANDO (Toyo Univ.)

【目的】トリコテセンは赤かび病菌等によって生産されるカビ毒であり、食の安全を脅かす。そのため、トリコテセン生合成に関する研究は古くから行われている。生合成遺伝子クラスター内の *Tri7* 遺伝子を破壊した株は、C-4 位がアセチル化されていないトリコテセンを生産するため、C-4 位のアセチル化を担っていると考えられる。しかし、TRI7 酵素は単離や異種発現には成功しておらず、C-4 位のアセチル化にこの酵素が直接係わっているかは明らかにされていない。そこで、本研究では TRI7 の機能解析を目的に、*Tri7* を持たない deoxynivalenol（DON）生産菌に *Tri7* 遺伝子を導入し、C-4 位アセチル化活性の有無を調べた。さらに、粗酵素における活性についての確認も行った。
【実験方法】DON の生産菌である JCM9873 株の Tri5 遺伝子を破壊しトリコテセン生産能を失わせ、*Tri7* 遺伝子を導入した(以後 JCM Δ*Tri5*+*Tri7* と呼称する)。この菌糸をとり、3,15-diacethylnivalenol (3,15-diANIV) を添加し、C-4 位アセチル化の有無を調べた。また、この株の菌糸を破砕し、粗タンパク質溶液を回収して粗酵素とした。この粗酵素に Acetyl CoA と 3,15-diANIV 加えて *in vitro* assay を行い、C-4 位アセチル化活性の有無を確認した。
【結果】基質添加実験の結果から、*Tri7* 遺伝子を導入することで野生株(WT)では起こらない C-4 位のアセチル化が起こることがわかった(Fig 1)。よって、TRI7 酵素は C-4 位アセチル化酵素の本体であることが強く示唆された。また、この菌糸から回収した粗酵素においても、C-4 位アセチル化活性が保持されていた(Fig 2)。しかしながら、粗酵素による *in vitro* assay では脱アセチル化酵素との競合により、再現性が低かった。今後は遠心分画等により TRI7 酵素を単離し、その性状解析を行っていく。

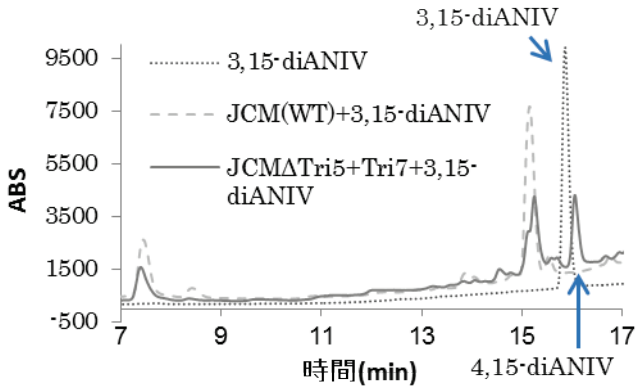


Fig 1. Δ*Tri5*+*Tri7*のFeeding assay結果

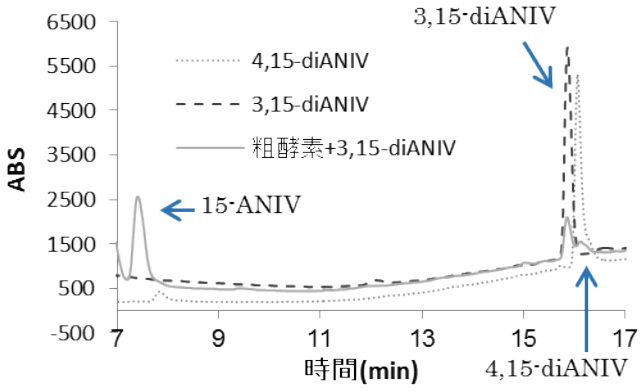


Fig 2. JCM9873Δ*Tri5*+*Tri7*の酵素活性

Fusarium, Trichothecene, Micotoxin

講演番号：3A14a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ A 校舎 14 会場

麹菌でアフィディコリンを異種高生産させるための生合成酵素の細胞内局在解析
Subcellular localization of aphidicolin biosynthetic enzymes expressed in the heterologous host, Aspergillus oryzae.
○伴 暁彦[1]、田中 瑞己[1]、藤居 瑠彌[2]、南 篤志[2]、及川 英秋[2]、新谷 尚弘[1]、五味 勝也[1] ([1]東北大院農、[2]北大院理)
○Akihiko Ban[1], Mizuki Tanaka[1], Ryuya Fujii[2], Atsushi Minami[2], Hideaki Oikawa[2], Takahiro Shintani[1], Katsuya Gomi[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Hokkaido Univ.)

糸状菌や放線菌は二次代謝産物と呼ばれる生理活性の高い化合物を生産し，ペニシリンなどの抗生物質は医薬品として広く利用されてきた。さらに，近年のゲノム解析の進展により，これらの微生物には，一般的な培養条件下では生産されない，もしくは極微量しか生産していないものを含め，さらに多くの二次代謝産物を生産するポテンシャルがあることが明らかとなっている。そこで現在は，これらのサイレントな二次代謝産物の生産を誘導したり，生合成遺伝子クラスターを同定したり，といった研究が盛んに行われている。また，その中でも特に有用な二次代謝産物の生合成系を構成する酵素群を異種宿主に導入して高生産させようという試みも行われており，自身の二次代謝産物低生産性から糸状菌宿主のクリーンホストとしての利用が期待されている麹菌 *Aspergillus oryzae* に植物病原菌 *Phoma betae* が生産する DNA polymerase 阻害剤であるアフィディコリンの生合成遺伝子クラスターを導入することで異種生産させることにも成功している[1)]。一方，効率的な二次代謝産物の生合成反応を考えると，糸状菌のような真核生物では生合成が細胞質ではなく何らかのオルガネラ内で行われている可能性を考慮する必要がある。しかしながら糸状菌における二次代謝産物の生合成反応がどのオルガネラで行われているかについての報告はあまりなされていない。そこで本研究では，生合成反応が行われるオルガネラや排出に関わるトランスポーター（TP）に着目し，それらの細胞内局在についての解析を行った。

各生合成酵素やオルガネラマーカータンパク質を GFP または RFP との融合タンパク質として共発現させ，蛍光顕微鏡観察を行うことで，融合タンパク質の局在部位を同定した。その結果，アフィディコリン生合成反応の最終段階に関わる 2 種類の Cytochrome P450 は小胞体への局在が認められた。続いて P450 による水酸化反応が小胞体の内外どちらで起こるのか，すなわち P450 の触媒ドメインが小胞体ルーメン側にあるのか細胞質側にあるのかどうかを含めて，更なる解析を進めている。また，最終産物の排出に関わっていると推定される TP は，発現量に応じて小胞体から細胞膜へと局在を変える様子が観察され，効率的な排出という観点からも重要性が示唆された。そこで現在は，この輸送体がアフィディコリンの生産に与える影響についての検討を行っている。

1) Fujii *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1813-1817 (2011)

Aspergillus oryzae, Secondary metabolites, Cytochrome P450

講演番号：3A14p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ A 校舎 14 会場

細胞性粘菌の予定柄細胞分化誘導に関するポリケタイド合成酵素の働き
The prestalk cell inducing factor hunting in *Dictyostelium discoideum*
○佐藤 有紀江[1]、齊藤 玉緒[2] ([1]上智大院理工、[2]上智大理工)
○YUKIE SATO[1], TAMAO SAITO[2] ([1]Graduate School of Science and Technology, Sophia Univ., [2]Faculty of Science and Technology, Sophia Univ.)

【背景】ポリケタイドは植物や微生物などで酢酸・マロン酸経路によって生産され、抗生物質や抗腫瘍物質などの有用な生理活性物質として注目されている化合物である。土壌微生物であり、社会性アメーバとして知られている細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は 45 個ものポリケタイド合成酵素(PKS)遺伝子を持っており、分子生物学的手法が用いやすいことなどから、ポリケタイド研究において有用なモデル生物といえる。*D. discoideum* におけるポリケタイドの機能や産物は未解明のものが多いが、45 個もの PKS 遺伝子は全て飢餓をきっかけとし多細胞体である子実体を形成する過程において発現することが示されている。また、PKS の必須ドメインであるケトシンターゼの活性を阻害するセルレニン存在下では、子実体の形態形成に異常が見られる。これらの背景から、*D. discoideum* の PKS は子実体の形態形成において重要な役割を担うと推測し、その機能を予定柄細胞分化誘導に着眼して解析している。

【目的】*D. discoideum* におけるポリケタイドの役割は主に細胞間コミュニケーションや分化誘導であると考えられているが、上述の通りその多くが未解明のままである。柄分化誘導因子として SteelyB の産物である DIF-1 の研究が行われてきたが、主要な柄を形成することになる予定柄細胞分化誘導因子は未だに発見されていない。そこで、本研究では *D. discoideum* における予定柄細胞分化誘導因子の探索を通して、ポリケタイド合成酵素の働きを解明することを目的とする。

【結果】*D. discoideum* で発見された 2 つの新規ハイブリッド型ポリケタイド合成酵素(PKS)の SteelyA, SteelyB は、本来独立して働いている I 型 PKS とⅢ型 PKS が融合した構造を持ち、共に分化誘導因子の生合成に関わっており広く細胞性粘菌の種間で保存されている。その他に種を超えて保存されている PKS 遺伝子は存在しないが *pks2* だけは近縁種間で保存されている。予定柄細胞分化は細胞性粘菌に共通した機構でありポリケタイドによって誘導されることが示唆されていることから、保存されている 3 つの PKS が協調して予定柄の主要な部分を誘導しているのではないかと考え、それぞれの二重遺伝子破壊株を作製し予定柄細胞マーカー遺伝子の発現を観察した。その結果、*stlA*/*stlB* 二重遺伝子破壊株と *pks2* 遺伝子破壊株において、マーカー遺伝子の発現異常が見られた。これらの実験事実に基づき予定柄細胞分化およびパターン形成と、ポリケタイドの関連について考察したい。

Dictyostelium, polyketide, differentiation

講演番号：3A14p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ A 校舎 14 会場

細胞性粘菌の発生初期における新規ハイブリッド型ポリケタイド酵素 SteelyA の役割

The function of SteelyA, a novel hybrid type polyketide synthase, in the early stage of development in *Dictyostelium discoideum*

○成田 隆明[1]、Pauline schaap[2]、齊藤 玉緒[3] ([1]上智大院理工、[2]ダンディー大、[3]上智大理工)
○Takaaki NARITA[1], Pauline SCHAAP[2], Tamao SAITO[3] ([1]Grad. sch. of Sci. and Tech., Sophia Univ., [2]Col. of Life Sci., Univ. of Dundee, [3]Fac. of Sci. and Tech., Sophia Univ.)

【目的】Steely酵素はI型とIII型のポリケタイド合成酵素 (PKS)が融合した新規ハイブリッド型酵素であり、細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum*で初めて発見された。Steely酵素は細菌・植物以外で初めて発見されたIII型PKSであると同時に、天然で唯一発見されたハイブリッド型酵素である。そのため、新規有用物質の開発やコンビナトリアル生合成への応用などが期待されている酵素であり、その基礎的理解は非常に重要である。2種類存在するSteely酵素のうち、SteelyAは*in vivo*で4-methyl-5-pentylbenzene-1, 3-diol (MPBD)を合成しており、この物質は*D. discoideum*の発生過程の中で、最終段階に作用して胞子成熟を誘導している。ところが、SteelyA遺伝子 (*stlA*)は胞子成熟が起こる発生後期だけでなく発生初期にも強く発現しており、この事からSteelyAは発生初期にも何らかの役割を担っていると考えられた。そこで本研究では、SteelyAの発生初期における機能解析を行い、Steely酵素についての理解をより深めることを目的とした。
【方法】SteelyA遺伝子破壊株 (*stlA*$^-$株)を用いて、発生初期における表現型の観察を行った。そして表現型の欠損が、SteelyAの産物であるMPBDによって相補されるのか検証した。
【結果】*stlA*$^-$株の発生初期における表現型の観察を行った結果、*stlA*$^-$株は野生株 (Ax2)に比べて細胞集合の開始が遅れ、さらにAx2に比べて小さな多細胞体を形成する様子が観察された。Ax2の細胞はcyclic adenosine monophosphate (cAMP)に対する走化性を示したが、*stlA*$^-$株はAx2に比べてcAMPに対する走化性の比率が減少していた。しかし、このcAMPに対する走化性の欠損はMPBDによって相補された。ところが*stlA*$^-$株にcAMPを加えることによって、MPBD非存在下においても*stlA*$^-$株の細胞集合および走化性の欠損は回復した。そこでAx2と*stlA*$^-$株の細胞外cAMP濃度を測定したところ、*stlA*$^-$株は細胞外に放出するcAMP量がAx2に比べて少ないことが明らかとなった。つまり、MPBDは発生初期においては細胞集合に必要不可欠であるcAMPの合成・分泌に関与していると考えられる。
以上より、SteelyAの産物であるMPBDは胞子成熟を誘導する物質であると同時に、*D. discoideum*の発生初期においては細胞の走化性制御に関与していると考えられる。*D. discoideum*の発生過程の中で、細胞集合や胞子成熟は*D. discoideum*が生き残るために欠かせない現象である。よって、SteelyAにより合成されるMPBDは、*D. discoideum*が「生き残る」という生命現象を司る物質である。

Dictyostelium, polyketide, chemotaxis

講演番号：3A14p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ A 校舎 14 会場

Dictyostelium monochasioides の *stlA* 遺伝子のクローニングと機能解析
Cloning and Functional Analysis of *stlA* gene of *Dictyostelium monochasioides*
○小西 智子[1]、齋藤 玉緒[2] ([1] 上智大学院・理工、[2] 上智大学・理工)
○TOMOKO KONISHI[1], TAMAO SAITO[2] ([1]Graduate School of Science and Technology, Sophia Univ., [2]Faculty of Science and Technology, Sophia Univ.)

【目的】細胞性粘菌 *Dictyostelium monochasioides* から単離された新規含塩素レゾルシノール誘導体の合成に関与する遺伝子の探索を試みた。細胞性粘菌に特徴的な含塩素ポリケタイドの生合成機構の種間、グループ間比較を目指し、合成に関与していると予想した *stlA* 遺伝子のクローニングと機能解析を行った。
【背景】細胞性粘菌は分子系統学的に 4 つにグループ分けされており、*D. discoideum* は最も進化したグループ 4 に、*D. monochasioides* はグループ 3 に分類される。細胞性粘菌は陸上生物ではめずらしく、含塩素化合物をもつことが知られており、柄細胞分化誘導活性のあるポリケタイド DIF-1 はその代表例である。*D. discoideum* では 45 個ものポリケタイド合成酵素遺伝子（*pks*）をもち、そのうち新規ハイブリッド型酵素の Steely A と Steely B と脂肪酸合成酵素遺伝子がグループ 3、4 間において保存されている。*D. discoideum* において Steely A は胞子成熟を制御する MPBD を合成しそれと同時にレゾルシノールが合成されることが分かっている。今回単離された含塩素レゾルシノール誘導体の合成に Steely A が関与しているのではないかと予想し *D. monochasioides* から *stlA* 遺伝子の単離、および機能解析を行った。
【方法】*D. monochasioides* から *stlA* 遺伝子の単離を試みるにあたって *D. discoideum* とグループ 4 の *Polysphondylium pallidum* の 2 種を用いて degenerate primer を作製し *stlA* 遺伝子の ACP ドメインから III 型 PKS ドメインまでの塩基配列を決定した。その塩基配列を元に *in vitro* 再構成実験を行った。また、*D. monochasioides* の *stlA* 遺伝子の時間的・空間的発現パターンをそれぞれ RT-PCR と *in situ* hybridization で調べた。
【結果】*D. monochasioides* の *stlA* 遺伝子の ACP ドメインから III 型 PKS ドメインまでの塩基配列を決定した。また、RT-PCR による発現解析によって *D. monochasioides* の *stlA* 遺伝子は中期に強く発現していることが分かった。*in situ* hybridization では発生ステージによって異なる箇所で発現することが分かった。塩基配列の結果より *D. monochasioides* の *stlA* 遺伝子は *P. pallidum* と高い相同性を示すことが分かった。また RT-PCR の結果でも中期に強く発現しているというのは *P. pallidum* と傾向が似ていた。この二つの結果よりグループ 3 に所属する *D. monochasioides* はグループ 4 よりグループ 2 に近い進化を遂げたのではないかと推定することができる。現在、*in vitro* 再構成実験によって新規含塩素レゾルシノール誘導体を合成するかについて検討中である。

Dictyostelium monochasioides, *stlA*, Polyketide

講演番号：3A14p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ A 校舎 14 会場

細胞性粘菌における *Dictyosterol* の進化的保存性の解明
Elucidation of the evolutionary conservation of Dictyosterol in cellular slime mold
○深澤 汐香[1]、齊藤 玉緒[2]、品川 知則[1]、森田 直樹[3] ([1]上智大学院・理工、[2]上智大学・理工、[3]産業技術総合研究所生物プロセス研究部門分子生物工学研究グループ)
○ KIYOKA FUKAZAWA[1], TAMAO SAITO[2], TOMONORI SINAGAWA[1], NAOKI MORITA[3] ([1]Graduate School of Science and Technology, Sophia Univ., [2]Faculty of Science and Technology, Sophia Univ., [3]AIST)

【目的】本研究では、細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の持つ脂質 *Dictyosterol* の進化的保存性の解明を目的とする。
【背景】細胞性粘菌は土壌中に存在する真核微生物であり、現在 4 つのグループに大別されている。この中で、最も進化した Group 4 に属する *D. discoideum* は、粘菌の細胞膜を構成するステロールである *Dictyosterol*（ Delta22-stigmasten-3beta-ol ）を持つ。*Dictyosterol* は細胞性粘菌に特徴的なステロールで、中枢神経細胞突起伸長作用や、コレステロールの吸収を抑制する効果を有する植物ステロールとして利用が期待されている。他の生物における一般的なステロールとは構造が異なるが、*D. discoideum* と同グループに属する *D. purpureum* においても単離されたという報告がある。しかし、下位のグループに属する粘菌中に *Dictyosterol* が存在しているのか、もしくは種別に別のステロールを合成しているのかは未解明である。
【方法】*Dictyosterol* が粘菌のグループ間において保存されているのか、もしくは構造の似た新規のステロールが合成されているのかを解明するため、*D. discoideum* からの *Dictyosterol* の単離・分析と、異なるグループの粘菌から抽出した脂質の精製・解析を行った。まず、*D. discoideum* の子実体から得た柄細胞抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離・精製して、NMR および X 線結晶構造解析を行い、その詳細な構造を決定した。次に粘菌のグループ間における脂質の進化的保存性の確認を試みた。今回、既に全ゲノムの情報が解読されている *D. discoideum*（Group 4）、*D. purpureum*（Group 4）、*Polysphondelium pallidum*（Group 2）、*D. fasiculatum*（Group 1）、*Acytostelium subglobosum*（Group 2）の 5 種類の細胞性粘菌を使用した。各粘菌の子実体から Bligh-Dyer 法を用いて脂質を抽出し、分配法により精製した。試料を GC/MS による分析を行った。
【結果】GC/MS の結果より、Group1、2 の粘菌において *Dctyosterol* に相当するピークは確認出来ず、細胞性粘菌において最も進化した Group 4 に属する *D. disucoideum* および *D. purpureum* においてのみ、*Dictyosterol* に相当するピークが現れた。よって、細胞性粘菌において、*Dictyosterol* は粘菌の進化とともに合成されるようになったステロールであり、グループ間において保存性は無いということ、またそれぞれの粘菌種が異なるステロールを合成していることが示唆された。

Dictyostelium discoideum, *Dictyosterol*

講演番号：3A14p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ A 校舎 14 会場

脂質エンジニアリングを目指したタイ王国産高脂質生産酵母における簡易形質転換系の開発

Development of easy transformation system in an oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* DMKU3-TK16 for lipid engineering

金沢 孟紀[1]、○大橋 貴生[1]、リムトン サビトリー[2]、藤山 和仁[1]（[1]大阪大学生物工学国際交流センター、[2]カセサート大学理学部）
Takenori KANAZAWA[1], ○ Takao OHASHI[1], Savitree LIMTONG[2], Kazuhito FUJIYAMA[1] ([1]ICBiotech, Osaka University, [2]Faculty of Science, Kasetsart University)

高脂質生産酵母とは、乾燥菌体重量あたり 20%以上の脂質を生産することのできる酵母のことで、石油資源に取って代わる持続可能なエネルギー源として多大な注目を浴びている。酵母の種や株によって脂質生産能が大きく異なることから、産業利用の観点では高い脂質生産能を有する株を宿主に選択することが重要である。本研究で取り扱っている酵母である DMKU3-TK16 株（TK16 株）はタイの土壌サンプルから単離し、D1／D2 ドメインにおけるリボソーム大サブユニットの塩基配列から *Rhodosporidium toruloides* と同定した。TK16 株は極めて高い脂質生産能を示し、至適条件下では脂質生産量が乾燥菌体重量あたり 70%に達することが分かった（Limtong *et al.,* 2010）。TK16 株の高脂質生産能を活用し脂質エンジニアリングを行うためには、簡便な形質転換系の構築が求められる。

本研究では TK16 株における非相同組換えを利用した形質転換系の構築に取り組んだ。*R. toruloides* ATCC 10657 株よりグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素プロモーター（Liu *et al.,* 2012）をクローニングし、*Streptoalloteichus hindustanus* 由来ゼオシン耐性遺伝子（*ble*）を下流に連結し、異種タンパク質発現用の遺伝子断片を調製した。PCR 法により増幅した遺伝子断片を酢酸リチウム法で TK16 株に導入し、ゼオシン耐性を有する形質転換体を得た。得られた形質転換体に対してコロニーPCR 法を行い、形質転換体の染色体に導入した遺伝子断片が挿入されていることを確認した。本研究で確立された形質転換系は簡便であり特別な技術を必要としないことから、TK16 株における脂質エンジニアリングにおいて重要な礎となることが期待できる。

Oleaginous yeast, Rhodosporidium toruloides, heterologous protein expression

講演番号：3A14p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ A 校舎 14 会場

合成生物学的手法を用いた酵母で効率的な分泌を示す人工分泌シグナルの創出

Artificially creating of effective secretion signal peptide in yeast with synthetic biological approach

○鎗水 透、星田 尚司、赤田 倫治（山口大院医系）
○Tohru YARIMIZU, Hisashi HOSHIDA, Rinji AKADA (Yamaguchi Univ.)

分泌性タンパク質に特有の分泌シグナルペプチドは、疎水性アミノ酸のストレッチであることは良く知られているが、疎水性であっても分泌能力に差があり、分泌シグナルとして効果的な働きをするアミノ酸配列を決定することは難しい。異種生物の分泌タンパク質を発現させる場合には分泌能力の低下がしばしば起こるが、由来となった生物ではある程度の分泌能力を持っていたと考えられるので、種特有の分泌シグナル配列があるのではないかと予想できる。しかし多数の変異を構築して調べる事は難しく、解析を困難にしている。そこで我々は、高い非相同末端結合（Non-homologous end joining: NHEJ）の能力を持ち、遺伝子末端同士を配列とは関係なく接続できる酵母 *Kluyveromyces marxianus* を利用した。これにより、プライマーで人工的な配列を構築できるようになり、合成生物学的なアプローチを用いることができるようになった。

分泌タンパク質のモデルとして *Gaussia princeps* 由来のルシフェラーゼ(GLuc)遺伝子を使用し、PCR で変異体を合成した。NHEJ によって形質転換体を取得し、その活性を比較することでアミノ酸配列と分泌の相関関係を評価した。

人工的な改変を与えた GLuc 変異体を約 300 程度構築し、そのルシフェラーゼ活性を比較した。中でも Gluc タンパクの N 末端付近においてアミノ酸の削除を施した変異体を調べたところ、たった一つのアミノ酸の削除でもルシフェラーゼの活性を無くすことが分かった。次に、4 番目の K を他のアミノ酸に置換すると、この部位にはリジンやアルギニンなどの陽電荷を持つアミノ酸があることが望ましかった。アミノ酸の削除及び置換によって解析したところ、一定の長さの疎水性のアミノ酸が必須であったが、アミノ酸によって必要なペプチドの長さやその影響が異なることがわかった。以上の結果から、分泌シグナル配列は陽電荷を持つアミノ酸と一定の長さの疎水性ペプチドで構築されていることが示された。さらに、疎水性アミノ鎖を構成するものを合成生物学的なアプローチによって、単純な配列として構成した。

Synthetic biology, Yeast, Secretion

講演番号：3A14p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ A 校舎 14 会場

部位特異的非天然アミノ酸導入を利用した翻訳スイッチの性能に影響する因子

Factors affecting switchability of translational switches using site-specific unnatural amino acid incorporation

○加藤 祐輔、皆葉 正臣（農業生物資源研）
○Yusuke KATO, Masaomi MINABA (Natn Inst Agrobiol Sci)

部位特異的非天然アミノ酸導入は、ある非天然アミノ酸を特異的に基質とする、進化的に離れた生物に由来するアミノアシル tRNA シンテターゼ（aaRS）と tRNA のペアを利用して、アンバー終止コドンに非天然アミノ酸を導入する技術である。

私達は、これまでに、大腸菌において、非天然アミノ酸 3-iodo-L-tyrosine（IY）の部位特異的導入[1]を、新しい翻訳を制御する装置（翻訳スイッチ）として利用することを着想し、誘導時には T7 プロモーターによる強力な発現を保持し、かつ非誘導時には毒素タンパク質コリシン E3 酵素ドメイン[2]の発現コンストラクトを維持できる、誘導性の高収量無漏洩発現系の構築に成功している。

本年度は、この翻訳スイッチの性能に影響を及ぼす因子を詳細に明らかにし、最適化を試みた。aaRS/tRNA 遺伝子を駆動するプロモーターの選択、IY/aaRS/tRNA によるスイッチ間の相乗効果、および標的遺伝子に挿入するアンバー終止コドンの重ね数が、大きく影響した。結果として、IY の添加/非添加によるスイッチ（IY スイッチ）のオフ/オン時の翻訳効率比は、以前は約 7%程度であったが、<1%に改善された。

[1] Sakamoto, K., Murayama, K., Oki, K., Iraha, F., Kato-Murayama, M., Takahashi, M., Ohtake, K., Kobayashi, T., Kuramitsu, S., Shirouzu, M. and Yokoyama, S. (2009) Genetic encoding of 3-iodo-L-tyrosine in *Escherichia coli* for single-wavelength anomalous dispersion phasing in protein crystallography. *Structure*, **17**, 335-344.
[2] Masaki, H, and Ohta, T. (1985) Colicin E3 and its immunity genes. J. Mol. Biol. 182, 217-227.

recombinant proteins, expression system, synthetic biology

講演番号：3A14p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ A 校舎 14 会場

1.5% (w/v) 微結晶セルロース含有寒天培地を透明化するトリコデルマ株の構築

Construction of *Trichoderma* strain that turns the agar plate containing 1.5% microcrystalline cellulose (w/v) transparent

○外山 英男 (南九大食)
○Hideo Toyama (Minamikyushu Univ.)

目的：演者はこれまでに、セルラーゼ生産性糸状菌、*Trichoderma reesei* QM 9414 に、独自に考案した低温同質倍数化法を適用して、1.0% (w/v)微結晶セルロース含有寒天培地を透明化する株を構築することに成功し、平成 25 年度日本生物工学会大会で報告した。その時点では、寒天培地の中央部に、「食い残し」と称すべき未分解の微結晶セルロースが円盤状に残存した。今回は、さらに微結晶セルロース分解力を向上させて、この残存部までも分解可能な株の構築を目指した。また、1.5% (w/v)微結晶セルロース含有寒天培地を透明化することも目指した。

方法：これまでの結果から、倍数化温度がなおも高すぎるように思われたので、さらに低温で倍数化を行うことにした。また同質倍数化用培地も一定期間使用後交換することにした。一定期間処理するごとに微結晶セルロース含有寒天培地上で培養後、セルロース分解酵素の最適温度である 50℃で 48 時間加熱し、生じる透明域を観察した。菌体中の核状況はギームザ液で核染色を行って観察した。

結果：同じ培地で長期間倍数化処理を続けると、微結晶セルロース分解力の向上がもはや望めなくなることがあった。しかし、新鮮な培地に交換することにより、微結晶セルロース分解力の向上を継続させることができた。一定期間以上処理した菌体は、上記の残存部まで透明化できることが判明した。1.5% (w/v)微結晶セルロース含有寒天培地の透明化については、最新の結果を報告する。

"Construction of *Trichoderma reesei* strain that turns the agar plate containing 1.0% microcrystalline cellulose (w/v) transparent", The Scitech Journal, 01(01), 12-14, 2014, Hideo Toyama

"Enhancement of microcrystalline cellulose degrading ability in *Lentinula edodes* by autopolyploidization at reduced temperature"
International Journal of Advanced Biotechnology and Research, Volume 4(3), 308-314, 2013, Hideo Toyama

Trichoderma, Cellulase, Cellulose

講演番号：3A14p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ A 校舎 14 会場

酵素複合体を導入したシアノバクテリアによるエチレン生産

An Engineered Platform for Bioethylene Production by a Cyanobacterium Expressing a Chimeric Complex of Plant Enzymes

○神藤 定生[1]、早稲田 葵[2]、増井 寛[2]、細田 晃文[2]、田村 廣人[2]([1]名城大理工、[2]名城大農)
○Sadanari Jindou[1], Aoi Waseda[2], Hiroshi Masui[2], Akifumi Hosoda[2], Hiroto Tamura[2] ([1]Meijo Univ., [2]Meijo Univ. Faculty of Agriculture)

【目的と背景】

エチレンは合成樹脂や石油化学製品を製造する初発物質として極めて重要な工業用原料ガスである。しかし、その製造は石油化学プラントにおいてナフサの熱分解法を用いたエネルギー多消費型プロセスで大規模に行われている。このため、脱石油依存および二酸化炭素排出削減を可能にする新規なエチレン製造法の確立は、喫緊の課題である。そこで、本研究では二酸化炭素消費型の新規なエチレン製造法を確立するため、二酸化炭素から光合成的にエチレンを生産するシアノバクテリアを合成生物学の手法で設計することを目的とした。

【方法および結果】

セルロース分解性嫌気性細菌由来のドックリンとエチレン合成に関わる 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)合成酵素(ACS)および ACC 酸化酵素(ACO)をそれぞれキメラ化し、2 種のキメラ骨格サブユニット(ACS-Ctdoc および ACO-Acdoc)を構築した。さらにこれらをキメラ骨格タンパク質(Cip2)上に配向させたエチレン合成型人工酵素複合体(SOC)を構築した。つぎに、シャトルベクター pUC303 を用いて、SOC をコードする遺伝子群を *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (R2-PC)株に導入し、エチレンの合成をガスクロマトグラフィーで確認した。最後に、酵素複合体形成の有無によるエチレン合成活性を比較検討するため、複合体の形成株(strain SOC)および非形成株(strain SOC(Cip-))を構築し、エチレン合成能の比較を行った。この結果、2 種の酵素を局在化させた酵素複合体による酵素の近接効果により、3.7 倍高いエチレン合成活性が得られたので、これを報告する。

ethylene, cyanobacteria, cellulosome

講演番号：3A14p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ A 校舎 14 会場

Lactobacillus plantarum における表層タンパク質の機能解析
The function analysis of surface proteins on *Lactobacillus plantarum*
○小山 二花[1]、柿原 健佑[1]、尾花 望[2]、久保田 浩美[3]、清川 達則[1]、河嶋 伊都子[1]、細谷 幸一[3]、湯井 幸治[3]、野村 暢彦[1,2] ([1]筑波大学大学院生命環境科学研究科、[2]筑波大学生命環境系、[3]花王株式会社安全性科学研究所)
○nika koyama[1], kennsuke kakihara[1], nozomu obana[2], hiromi kubota[3], tatsunori kiyokawa[1], itsuko kawashima[1], koichi hosoya[3], koji yui[3], nobuhiko nomura[1,2] ([1]Graduate School of Life and Environment Sciences, University of Tsukuba, [2]Faculty of Life and Environment Sciences, University of Tsukuba, [3]Safety Science Research Laboratories, Kao Corporation)

Lactic acid bacteria (LAB)は、有益菌として知られている一方、食品危害菌としても認知されている。危害菌としての LAB は主に原料や食品中で、バイオフィルム(BF)形態をとっており、BF を形成することで様々なストレスに対しての耐性能を獲得していると考えられる。しかし、危害菌としての乳酸菌 BF に関する知見は少ない。そこで将来的な乳酸菌 BF の制御法を見据えて、乳酸菌 BF に影響を与える因子の探索、そのメカニズムの解明を目的とした。*Lactobacillus* 属において菌体表層に局在しているタンパク質は細胞の付着に関与していることが明らかとなっている。そこで、本研究では *L. plantarum* の菌体表層のタンパク質が環境中の BF 形成にも関与していると考え、菌体表層タンパク質と BF 形成及びストレス耐性の関係性を解析した。
行研究より、*L. plantarum* の表層タンパク質は高 pH で処理することによって遊離することが明らかとなっている。そこで pH 処理を用いて、*L. plantarum* の BF の表層タンパク質を除去し、共焦点レーザー顕微鏡によって BF の構造を解析した結果、pH 処理によって BF 構造が破壊された。さらに質量分析法を用いて *L. plantarum* の表層タンパク質を解析したところ、主要タンパク質として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を同定した。そこで、抗 GAPDH 抗体を作成し、GAPDH の BF への影響を解析した。抗 GAPDH 抗体を培養液中に添加する事により、細菌の生育および BF 形成が抑制された。以上の結果より *L. plantarum* において表層タンパク質およびその主要な構成タンパク質である GAPDH は BF 形成に関与していることが示唆された。

biofirm, Lactic acid bacteria, surface proteins

講演番号：3A14p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ A 校舎 14 会場

ファージ尾部状バクテリオシンを利用したファージ宿主細胞認識の研究

Application of phage tail-like bacteriocin for a study of the mechanism of phage host-specificity.

○樋口 大祐[1]、鈴木 敦斗[1]、木村 啓太郎[2]、阿部 直樹[1]、金子 淳[1] ([1]東北大院農、[2]食総研)
○Daisuke Higuchi[1], Atsuto Suzuki[1], Keitarou Kimura[2], Naoki Abe[1], Jun Kaneko[1] ([1]Tohoku univ., [2]NFRI.)

【背景】

野菜軟腐菌（*Pectobacterium carotovorum*）はグラム陰性桿菌であり、ミオ型ファージ尾部のみで類縁株に抗菌活性を持つバクテリオシン（carotovoricin, 以下 Ctv）を産生する。Ctv 生産に関与する遺伝子群の解析から Ctv の標的菌体の認識に関わる尾部繊維を同定し、複数株の Ctv 尾部繊維遺伝子の比較から尾部繊維タンパク質の N 末端側領域は Ctv 本体（Baseplate）に結合するために、C 末端側領域は Ctv が菌体を認識するために重要であると推定した。実際に、尾部繊維 C 末端側を入れ替えることで標的菌体の認識が変化することを確認した（Nguyen et al., *J. Bacteriol.*, 2001）。

以上の事実から、Ctv 尾部繊維 C 末端側アミノ酸配列を他種のバクテリオファージ尾部繊維と入れ替えたキメラ尾部繊維を Ctv に導入し、入れ替えたファージの尾部繊維に特異な宿主を認識する改変 Ctv を構築できると考えた。ファージの感染が成立するか否かは宿主の認識・吸着、DNA の注入、複製、溶菌等の複数の段階で決定されるため、ファージの宿主細胞認識そのものを見分けるのは難しい。改変 Ctv は宿主を認識、尾部繊維が持つ宿主認識機構のみを解析するツールとなりうる。

【方法と結果】

尾部繊維としてミオ型の納豆菌ファージφNIT1 の推定尾部繊維を使用した。本ファージは納豆菌（*Bacillus subtilis natto* NAFM5 株）には感染できるが、ほとんどの枯草菌株には感染できない。一方、ミオ型ファージ SP50 は枯草菌・納豆菌ともに感染できる。

P. carotovorum Ar 株尾部繊維遺伝子の N 末端側コード領域とφNIT1 尾部繊維遺伝子の様々な長さの C 末端側領域を接続したキメラ遺伝子を作製し、pTrc99a ベクターに組み込んで Ctv 産生株を形質転換した。Ctv の産生株には *P. carotovorum* Er 株の尾部繊維遺伝子欠損株を用いた。標的菌体への吸着能は、導入株からマイトマイシン C 誘導により調製した改変 Ctv と標的菌体とのプルダウンを行い、上清に残る未吸着の改変 Ctv をウエスタンブロットによって検出ことで評価した。

その結果、改変 Ctv が納豆菌に吸着していることが確認された。一方で納豆菌の溶菌は起こらず、吸着と溶菌は別の機構であることが示唆された。従って、本改変 Ctv システムは、φNIT1 の宿主認識機構を解析するために有効である。現在、φNIT1 尾部繊維と SP50 ファージの尾部繊維の推定アミノ酸配列を比較し、両者のキメラ尾部繊維を有する改変 Ctv の構築を進め、φNIT1 尾部繊維における納豆菌吸着ドメインの探索を行っている。

bacteriocin, bacteriophage, host-specificity

講演番号：3A14p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ A 校舎 14 会場

Aspergillus fumigatus TH7-1 株由来キシラナーゼ遺伝子の発現パターンの解析
Analysis of expression pattern of xylanase genes from *Aspergillus fumigatus* TH7-1.
○榎本 洋平[1]、高橋 結[1]、若井 嘉人[2]、古田 正美[2]、村上 周一郎[3] ([1]明治大院農、[2]鳥羽水族館、[3]明治大農)
○Yohei Enomoto[1], Yui Takahashi[1], Yoshito Wakai[2], Masami Furuta[2], Shuichiro Murakami[3] ([1]Grad. Sch. Agric., Meiji Univ., [2]Toba Aquarium, [3]Sch. Agric., Meiji Univ.)

【背景・目的】
木質系バイオマスの効率的な分解を目的とし、草食性の水生動物の糞から植物細胞壁分解糸状菌の分離を試みたところ、セルラーゼおよびキシラナーゼの生産性が高い *Aspergillus fumigatus* TH7-1 株をアオウミガメの糞から単離した。本菌を 1.0%キシラン培地で培養した際、複数のキシラナーゼが生産され、かつその生産性が培地の pH に依存していることが観察された[1)]。一方で、*A. fumigatus* Af293 株のゲノム情報は明らかにされている。そこで本研究では、Af293 株のゲノム情報を利用して、TH7-1 株が生産する複数のキシラナーゼとその遺伝子の発現との相関を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】
TH7-1 株のゲノム中にどのようなキシラナーゼ遺伝子が存在するのかを確認するため、本菌の total DNA を抽出し、Af293 株の推定キシラナーゼ遺伝子の配列に基づいて作成したプライマーを用いて、TH7-1 株の有するキシラナーゼ遺伝子を PCR により増幅した。その結果、Af293 株の有する 7 種の推定キシラナーゼ遺伝子のホモログの増幅が確認され、推定されるエキソン領域では、いずれの酵素においても Af293 株由来の酵素と 98.2%以上の同一性を有していた。
次に、キシラナーゼ遺伝子の発現と生産されるキシラナーゼの関連性を調べるために、TH7-1 株を 1.0%キシラン培地で培養し、経時的に培養上清および菌体を回収した。回収した菌体から mRNA を調製後、RT-PCR により培養時間毎のキシラナーゼ遺伝子の発現を調べた。また、得られた培養上清を native-PAGE に供し、キシランを基質としたザイモグラム分析を行い、培養上清中に含まれるキシラナーゼを検出した。その結果、培養 24 時間では、少なくとも 4 種のキシラナーゼ遺伝子の発現が確認されたが、ザイモグラム分析では、キシラナーゼ活性を有するバンドは 1 本のみだった。この結果から、培養開始 24 時間後では、本菌のキシラナーゼ遺伝子は複数発現しているものの、翻訳後の段階で調節を受けている可能性が示唆された。また、培養 72 時間後では、1 種のみのキシラナーゼ遺伝子の発現が確認されたが、ザイモグラム分析の結果、培養上清中には少なくとも 3 種のキシラナーゼ活性を有するバンドが検出された。これらの結果から、翻訳後調節によって複数のアイソフォームが生成している可能性が示唆された。
1) 榎本ら：日本生物工学会第 64 回大会講演要旨集 p.121

Aspergillus fumigatus, xylanase, plant cell wall degrading filamentous fungi

講演番号：3A14p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ A 校舎 14 会場

黄麹菌 *Aspergillus oryzae pepO* 遺伝子欠損株の菌体外エンド型プロテアーゼについて

Extracellular endoproteases of *Aspergillus oryzae pepO* gene deletion strain

○上野 絢子、前田 浩、山形 洋平、竹内 道雄（農工大院・応生化）
○Ayako UENO, Hiroshi MAEDA, Youhei YAMAGATA, Michio TAKEUCHI (Division of Applied Biological Chemistry, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

〈 目的 〉ゲノム解析の結果、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB 40 にはプロテアーゼをコードすると推定される遺伝子が 126 個存在することが明らかになった。そのうち 11 種類がアスパルティックプロテアーゼ（ APase ）をコードすると推定されている。APase は、活性中心にアスパラギン酸残基をもち、酸性領域で作用するエンド型プロテアーゼのことである。APase は基質アナログとしてはたらくペプスタチン A により阻害される。*A. oryzae* RIB40 がもつ APase 遺伝子の産物は液胞局在、細胞壁局在、菌体外分泌の 3 種に分類されている。5 つある菌体外分泌型の APase のうちのひとつが PepO である。以前の報告で、RIB 40 を培養したとき、菌体外に検出される APase は PepO のみであることが示された。そこで、本研究では、*pepO* を *pyrG* で置換した *pepO* 遺伝子欠損株を作製し、その欠損が酸性で作用する菌体外エンド型プロテアーゼに及ぼす影響について調べることを目的とした。
〈 方法・結果 〉*pepO* 遺伝子欠損株（Δ*pepO* ）を作製した。*pepO* 遺伝子の欠損は PCR、サザンブロット解析により確認した。Δ*pepO* 株の他の APase 遺伝子発現に及ぼす影響について半定量 PCR で調べたところ、野生株との違いは認められず、他の APase 遺伝子発現には影響を及ぼさないことが示唆された。このΔ*pepO* 株を Czapek-Dox 液体培地の窒素源を大豆タンパク質として 48 時間培養した培養上清について、酸性条件下で作用するエンド型プロテアーゼの活性についてカゼインを基質として測定したところ、野生型の RIB 40 に比べ約 5 割程度のカゼイン分解活性が認められた。そこで、Δ*pepO* 株の培養上清に各種のプロテアーゼ阻害剤を添加して活性測定をした結果、ペプスタチン A、EDTA、PMSF、ベンザミジンによっては阻害されず、antipain により強く阻害される酵素であることが明らかになった。この結果から、残存していた活性は APase によるものではないことが明らかになった。*A. oryzae* がもつ酸性エンド型プロテアーゼ遺伝子の産物のうち、antipain により阻害され酸性領域で作用するプロテアーゼは AorsinA である可能性が高い。そこで AorsinA の合成基質である Z-Arg-Arg-MCA を用いて pH4.0 における活性測定を行った結果、AMC を遊離する活性が認められた。また、野生株 RIB 40 とΔ*pepO* 株における *aorsinA* 遺伝子の転写量に変化は認められなかった。以上より、RIB 40 の菌体外において酸性条件下で作用する主なエンド型プロテアーゼは PepO と AorsinA であることが示唆された。

なお、本研究の一部は、生研センター基盤研究推進事業の一環として行われたものである。

Aspergillus oryzae, APase, AorsinA

講演番号：3A14p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ A 校舎 14 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* のエラスターゼインヒビター様タンパク質の単離
Isolation of elastase inhibitor-like protein from *Aspergillus oryzae*

○山下 伸雄[1]、奥村 欣由[2]、打矢 恵一[2]、小川 賢二[3]、鶴田 宏樹[4]、明石 貴裕[1]、二改 俊章[2]([1]白鶴酒造研究開発、[2]名城大薬、[3]東名古屋病院臨床研究部、[4]神戸大学連携創造本部)
○Nobuo Yamashita[1], Yoshiyuki Okumura[2], Kei-ichi Uchiya[2], Kenji Ogawa[3], Hiroki Tsuruta[4], Takahiro Akashi[1], Toshiaki Nikai[2] ([1]Hakutsuru sake brewing co., Ltd., [2]Meijo univ., [3]Higashi-nagoya hospital, [4]Kobe univ.)

【目的】演者らは *Aspergillus* 糸状菌の産生するエラスターゼインヒビターについて、特性、構造、応用を検討している[1, 2)+]。今回、麹菌 *Aspergillus oryzae* の液体培養上清にエラスターゼインヒビター様の活性を見出したため、インヒビター物質の精製・単離を試みた。
【方法と結果】麹菌 *A. oryzae* の 5 日後の培養上清を透析、DE52、ゲルろ過等で精製し、HPLC によりほぼ単一と思われる活性画分を取得した。この物質を MALDI/TOF-MS で分析した結果、分子質量 6300.54 の比較的小さなタンパク質であることが分かり AOEI と仮に命名した。AOEI は日和見感染菌である *A. fumigatus* や *A. flavus* 由来のエラスターゼに対し、強い阻害活性を示した。ヒトの好中球エラスターゼに対しては弱い阻害活性を示したが、ブタすい臓や蛇毒由来のエラスターゼに対しては阻害活性を示さなかった。AOEI は熱安定性、pH 安定性ともに高く、阻害活性は 100℃においても失活しなかった。また AOEI のアミノ酸配列を約 40 残基決定した結果、その配列に該当する cDNA が *A. oryzae* RIB40 の EST ライブラリー (http://www.nrib.go.jp/data/EST2/est.htm) に見出され、固体培養で多く発現していた。1)J Biol Chem, 288:17451-9(2013), 2)Med Micol J, 54:279-284(2013)

Aspergillus oryzae, elastase inhibitor

講演番号：3A14p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ A 校舎 14 会場

Bacillus thuringiensis A324 株由来抗菌タンパク質の解析
Analysis of antimicrobial protein produced by *Bacillus thuringiensis* strain A324
○浴野 圭輔[1]、齋藤 浩之[2]、岡 拓二[1]、三田 光章[3]、野村 善幸[1]、新 隆志[1]、水城 英一[2]([1]崇城大・応微工、[2]福岡工技セ・生食研、[3]中村産業開発（株））
○Keisuke Ekino[1], Hiroyuki Saito[2], Takuji Oka[1], Mitsuaki Mita[3], Yoshiyuki Nomura[1], Takashi Shin[1], Eiichi Mizuki[2] ([1]Applied Microbial Technology, Sojo University, [2]Fukuoka Industrial Technology Center, [3]Nakamura Sangyo Kaihatsu Co,.Ltd.)

【目的】*Bacillus thuringiensis* A324 株は、ジャガイモそうか病菌に対する抗菌物質生産菌として分離された。本抗菌物質は、培養菌体を酢酸エチルで抽出した際に生じる水相画分に存在している。一方、この抗菌物質とは別に本菌株の培養上清には、*Bacillus* 属細菌に対して抗菌活性を示す物質が存在することが明らかになった。本研究ではこの *Bacillus* 属細菌に対して抗菌活性を示す分子を明らかにすることを目的とした。
【方法および結果】まず、*B.thuringiensis* A324 株をブイヨン培地で一晩培養した。その培養上清をサンプルとして、研究室で分離した *Bacillus* 属細菌（B 株）に対する抗菌活性を指標に本物質の精製を行った。CM-Sepharose による精製の結果、電気泳動的に単一な約 13kDa のタンパク質を取得した。本タンパク質について、*Bacillus* 属細菌を中心に 15 株の細菌に対する抗菌活性を検討した。その結果、*B.brevis*、*B.sphaericus* の 2 株のみに抗菌活性を示した。
本タンパク質の pH 安定性について検討した結果、pH4 から pH10 では抗菌活性に変化は見られなかった。また、本タンパク質は 50℃で 1 時間の処理までは安定で、60℃以上の温度で 1 時間処理および、100℃、10 分間の処理でその抗菌活性が消失した。B 株に対する MIC について検討した結果、約 17μg/ml、100μl 添加のサンプルまで抗菌活性を確認することができた。
本タンパク質の一次構造解析による配列情報より、遺伝子のクローニングを行った結果、520bp の構造遺伝子を取得した。本遺伝子は 171 アミノ酸からなる 18.5kDa のタンパク質をコードしており、発現後、118 アミノ酸からなる 12.8kDa の成熟型へとプロセシングされることが明らかとなった。また、本タンパク質は機能が明確なタンパク質とは相同性を示すものはなく、ゲノム配列が明らかとなっている *B.thuringiensis* HD-771 株の機能未知タンパク質と約 58%の相同性を示した。
本遺伝子の大腸菌による発現を行った。ベクターに pET32b、宿主に BL31(DE3)および Rosetta-gami を用いた。構造遺伝子全長および成熟型タンパク質をコードする遺伝子領域ともに発現を試みた。その結果、Rosetta-gami を宿主として、25℃で培養を行うことで両遺伝子とも可溶性画分に発現することができた。しかしながらともに抗菌活性を確認することができなかった。

Bacillus thuringiensis, antimicrobial protein

講演番号：3A14p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ A 校舎 14 会場

高度好塩菌由来 nucleoside diphosphate kinase の構造形成と塩の役割について

Effect of NaCl on folding and assembly of nucleoside diphosphate kinase from an extremely halophilic archaea

○石橋 松二郎、内野 真奈美、徳永 正雄 (鹿児島大学農学部)
○Matsujiro Ishibashi, Manami Uchino, Masao Tokunaga (Kagoshima Univ.)

【目的】我々は高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* 由来にもかかわらず、30℃以下では安定性や活性に塩を必要としない極めて稀な酵素 nucleoside diphosphate kinase (HsNDK)を見出した。この酵素に対する塩の役割を調べたところ、構造形成には高濃度の塩を必要とした。しかし、従来の我々の方法では、構造形成におけるフォールディングとサブユニットの会合を分けて考察することが出来なかった。そこで今回サブユニット間にジスルフィド結合を形成する D148C 変異体をデザインし、この変異体を用いて HsNDK の構造形成と塩の関係を詳細に調べたので報告する。
【結果】His-tag 配列をコードしている pET15b (Novagen)に *ndk* 遺伝子を組み込んだ pETHisNDK を鋳型にして、QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene)を用いて HsNDK の 148 番目の Asp が Cys に変異するように様にデザインしたプラスミド pETD148C を構築した。このプラスミドを用い、大腸菌を形質転換し、発現した目的の D148C 変異体を Ni-カラムで精製した。スロンビン消化後、さらに Q カラムで精製したところ単一な標品を得ることが出来た。この標品の性質を検討したところ、0.2 M NaCl 存在下 40℃、5 分でインキュベーション後の残存活性は、ワイルドタイプでほぼ 0%であったのに対し、D148C 変異体は 100%保持し、60℃で完全に失活した。この結果は静電的な相互作用でサブユニット構造が強化された G114R 変異体の結果と類似しており、サブユニット構造の強化は低い塩濃度下で HsNDK を安定化させること示している。また構造形成実験において、ワイルドタイプの構造形成には 2M 以上の NaCl が必要であるのに対し、D148C 変異体はたった 0.1M NaCl 存在下でも構造形成した。しかし、還元剤 DTT でジスルフィド結合を切断後、構造形成を行うと、D148C 変異体でも 2M NaCl を必要とした。この事はサブユニット間の会合には 2 M 以上の NaCl を必要とする事を示している。次に二次構造のフォールディングと塩の役割を調べるために CD スペクトルを測定した。その結果、熱変性後 0 M NaCl 存在下でのワイルドタイプの CD スペクトルはコントロールの活性を持ったワイルドタイプの CD スペクトルと異なっていたが、0.1 M NaCl 存在下での CD スペクトルは活性型の CD スペクトルとほぼ一致していた。この事から HsNDK の二次構造の形成には 0.1 M 程度の NaCl で十分であることが分かった。

nucleoside diphosphate kinase, halophilic enzyme, folding

講演番号：3A14p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ A 校舎 14 会場

大腸菌発現系における植物酵素ヒドロキシニトリルリアーゼの可溶性変異体の探索と解析

Screening and analysis of the soluble mutants at hydroxynitrile lyase in E. coli expression system

○川原 寛弘[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Nobuhiro KAWAHARA[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO)

【目的】ヒドロキシニトリルリアーゼ(HNL)は、様々な植物から発見されており、ケトン又はアルデヒドとシアン化合物から医薬品などの中間体である光学活性シアノヒドリンの合成反応を触媒する。しかし、大腸菌内で発現させると、ほとんどが不溶性蛋白質として発現されてしまうことが産業利用上大きな問題となっている。またほかにも多くの異種タンパク質が大腸菌内で不溶性蛋白質として発現される例が知られており、その解決策として様々な研究がなされているが、その手段は一般化されていない。

我々は以前よりα/β-hydrolase 型キャッサバ(*Manihot esculenta*)由来の *Me*HNL において進化分子工学的な手法から H103L や H103M などの変異型酵素が顕著に活性型酵素として可溶性に発現されることを見出している。今回、アミノ酸配列や構造上類似しているα/β-hydrolase 型 HNL における H103 部位の解析、新規な可溶性変異体の探索とその機能解析を行うことで、大腸菌発現系における植物酵素 HNL の可溶性変異導入の一般化を目的とした。

【方法および結果】まず、他の植物種由来 HNL(*Hevea brasiliensis Hb*HNL, *Baliospermum montanum Bm*HNL)における H103 の機能解析のため、飽和変異により変異体を構築し、可溶性発現を検討した。*Me*HNL と同様に他の HNL においても H103 部位における飽和変異体(H103L,I,C)は可溶性を向上させた。しかし、*Bm*HNL においてのみ可溶性の顕著な増加は見られなかった。そこで *Bm*HNL の可溶性変異体を error-prone PCR により構築したランダム変異導入ライブラリーから網羅的に探索した。その中で、*Bm*HNL において可溶性、活性の向上に寄与するアミノ酸変異体をいくつか取得した。その変異箇所の多くは構造の表面に位置し、活性部位とは比較的離れたものであった。その中で N156D では、最も顕著な HNL 活性の向上が見られた。これまでに HNL における N156 の機能や役割に関する報告はなく、不溶性に発現されるα/β-hydrolase 型 HNL に高度に保存されていることから、HNL の可溶性発現に影響する新規なアミノ酸残基であると予測された。さらに N156 部位を詳細に解析するため、精製酵素を調製し高次構造やリフォールデリングを野生型と比較した。今回は、可溶性に寄与するアミノ酸変異を網羅的に探索した結果と HNL の変異型酵素の解析から、大腸菌発現系におけるアミノ酸変異の影響を明らかにした。

Hydroxynitrile lyase, Soluble protein, Protein engineering

講演番号：3A15p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ A 校舎 15 会場

Mangromicin 類の質量分析と新規類縁体の検出

Mass spectrometric analysis of mangromicins and detection of new analogs

神谷 義之[1]、○中島 琢自[2]、谷口 貴子[3]、岩月 正人[4]、高橋 洋子[1,4]、谷口 寿章[3]、大村 智[4] ([1]北里大感染制御科学府、[2]北里大感染制御研究機構、[3]徳島大疾患酵素学研究センター、[4]北里大生命研)
Yoshiyuki KAMIYA[1], ○Takuji NAKASHIMA[2], Takako TANIGUCHI[3], Masato IWATSUKI[4], Yoko TAKAHASHI[1,4], Toshiaki TANIGUCHI[3], Satoshi OMURA[4] ([1]Kitasato Univ. Grad. Sch. Infect. Cont. Sci., [2]Kitasato Univ. Res. Organi. Infect. Cont. Sci., [3]Tokushima Univ. Inst. Enz. Res., [4]Kitasato Univ. Inst. Life Sci.)

【目的】我々は多様な二次代謝産物生産能を有する放線菌を用い、吸収スペクトル、分子量や極性など化合物特有の物理化学的性質を指標とした新規物質の探索（Physicochemical screening）を実施した。その結果、希少放線菌 *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216 の代謝産物から mangromicin 類 9 化合物を発見し報告した[1,2,3]。Mangromicin は tetrahydrofuran 環及び 5, 6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrone 環を含むユニークな cyclopentadecan 骨格の構造物である。Mangromicin 類のような炭素のみからなる環状化合物の場合、MS /MS 解析による構造決定は困難を伴う。我々は、mangromicin 類の MS/MS フラグメントの開裂パターン解析とそれを利用した未同定類縁体の探索を実施したので報告する。

【方法】MS/MS 解析に FT-ICR-MS（Thermo Fisher 製）を用いた。Mangoromicin H は類縁体の中で最もシンプルな構造であり、分子量は 380（$C_{21}H_{32}O_6$）である（Fig. 1）。以下に、mangromcin H を例に MS/MS による開裂パターンの解析結果を示す。

【結果】Mangoromicin H の 3 位の水酸基がプロトン付加された $[M+H]^+$（381.2272）が観察された（**A**）。次に、m/z 値 345 のプロダクトイオン（345.2062, $C_{21}H_{29}O_4$）は 3 位の脱水および 9 位と 10 位もしくは 10 位と 11 位の間にオレフィンが形成されたフラグメントである考えられた（**B**）。続いて、m/z 値 345 を MS/MS すると m/z 値 301.2161（$C_{20}H_{29}O_2$）のプロダクトイオンが観察され、2 位から 5 位の脱炭酸により開裂したフラグメントであると推定された（**C**）。さらに、m/z 値 301 を MS/MS すると m/z 値 232.1458（$C_{15}H_{20}O_2$）のプロダクトイオンが観察され、3 位から 7 位部分が開裂したフラグメントであると考えられた（**D**）。以上の結果から、mangromicin H は 5, 6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrone 環部分から開裂することが示唆された。これらの特徴的なプロダクトイオンを指標に新規類縁体の探索を行い、複数の類縁体を同定することに成功した。

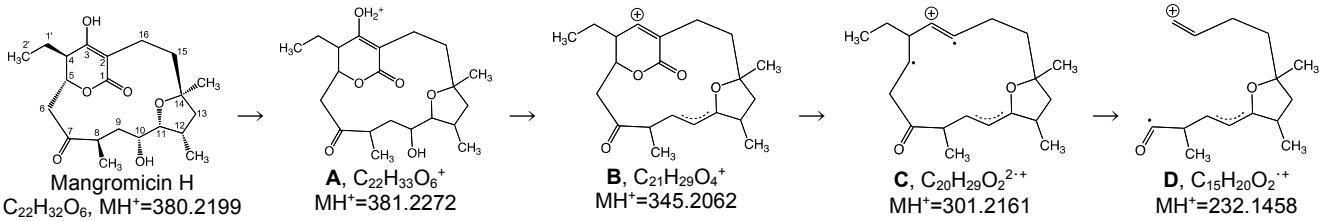


Fig. 1 Mangromicin H の MS/MS 開裂パターン

1) WO2013031239A1, 2) Journal of Antibiotics (*in press*), 3) Journal of Antibiotics (submitted)

secondary metabolites, mass spectrometric analysis, Mangromicins

講演番号：3A15p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ A 校舎 15 会場

放線菌による 3,4-AHBA 合成とキシロース代謝

Metabolic engineering for 3-Amino-4-hydroxybenzoic acid production and xylose metabolism in Streptomyces lividans

○中村 聡子[1]、川口 秀夫[1]、荻野 千秋[1]、菅井 佳宣[2]、勝山 陽平[2]、大西 康夫[2]、近藤 昭彦[1]([1]神戸大院工、[2]東京大院農)
○ Satoko NAKAMURA[1], Hideo KAWAGUCHI[1], Chiaki OGINO[1], Yoshinori SUGAI[2], Yohei KATSUYAMA[2], Yasuo OHNISHI[2], Akihiko KONDO[1] ([1]Kobe Univ., [2]Tokyo Univ.)

3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸（3,4-AHBA）は、芳香環を有した化学物質であり、高機能性ポリマー・ポリベンゾオキサゾールの原料となる。*Streptomyces griseus* より同定された GriH, GriI によって、ジヒドロキシアセトンリン酸（DHAP）とアスパラギン酸-4-セミアルデヒド（ASA）を前駆体とした 3,4-AHBA の生合成経路が報告されている。微生物による高機能性ポリマー原料の生合成は、石油代替資源として植物バイオマスを原料とするバイオリファイナリーの「CO_2 資源化」プロセスに有効である。放線菌は、多様な糖類を資化できるため、バイオマスからの物質生産の宿主として有用と考えられる。

本研究では、放線菌 *Streptomyces lividans* を宿主として、*Streptomyces griseus* 由来の GriH, GriI をコードする遺伝子をクローニングし、放線菌タンパク高発現ベクターを用いて *S. lividans* の形質転換を行い、3,4-AHBA の生産株を構築した。グルコースを糖源として TSB 培地を用いてフラスコ培養した結果、96 時間後に培養上清中に 0.9 g/L の濃度で 3,4-AHBA の生産を確認した。

植物バイオマスの木質系、草本系バイオマスは、おもにセルロース、ヘミセルロース、リグニン、でんぷん等から構成され、バイオマス前処理物中の固体画分となるセルロース分解物には、C6 糖のグルコースが多く含まれ、液体画分には C5 糖のキシロースが存在する。*S. lividans* はキシロースも資化できることが知られ、エタノールや桂皮酸生産などでは、グルコースを資化した場合と同程度の生産が得られる。多様なバイオマス前処理物の利用を目的とし、TSB 培地にキシロースを添加し、3,4-AHBA 生産を行った結果、グルコース資化より、生産量・収率ともに高い値を示した。*S. lividans* において、3,4-AHBA 生産にはグルコースよりキシロースが有効であることがわかった。3,4-AHBA 生合成は、前駆体として DHAP と ASA の 2 物質を必要とし、それぞれ解糖系とアミノ酸生合成系の中間体であり、グルコースとキシロースの代謝においてこれら前駆体へのフローが異なることが推察された。

本研究は、文部科学省「植物 CO_2 資源化研究拠点ネットワーク（NC-CARP）」の支援を受けて実施した。

3-Amino-4-hydroxybenzoic acid (3,4-AHBA), *Streptomyces lividans*, xylose assimilation

講演番号：3A15p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ A 校舎 15 会場

有機塩素系殺虫剤分解能を有するスフィンゴモナッド細菌株の有機炭素源非添加無機寒天培地での生育を司る機構に関する研究

Oligotrophic growth of a sphingomonad strain capable to degrade an organochlorine pesticide

○永田 裕二、平野 丈、宇井 博紀、大坪 嘉行、津田 雅孝（東北大学院生命科）
○Yuji Nagata, Joe Hirano, Hiroki Ui, Yoshiyuki Ohtsubo, Masataka Tsuda (Tohoku Univ.)

【背景・目的】好気性従属栄養細菌でα-proteobacteria に属する *Sphingobium japonicum* UT26 株は、高度に難分解性の多様な物質分解能を有する様々な株が属することで知られるスフィンゴモナッド細菌群の一員であり、環境汚染物質である有機塩素系殺虫剤γ-hexachlorocyclohexane(γ-HCH) を唯一炭素源として生育できる。我々は、本株のγ-HCH 分解資化能に関する研究過程で、有機炭素源非添加の無機寒天培地で CO_2 固定を伴ってコロニー形成する突然変異株を複数取得した。これら突然変異株の解析から、変異による Zn-dependent alcohol dehydrogenase ホモログ遺伝子（*adhX*）の高発現が本表現型の要因のひとつであることが示唆された。さらに、UT26 株に *adhX* を高発現するプラスミドを導入した株も本表現型を示したことから、少なくとも *adhX* の高発現が本表現型の直接の要因となり得ると結論した。そこで、本研究では、本 *adhX* 高発現株が有機炭素源非添加の無機寒天培地で CO_2 固定を伴ってコロニー形成するのに必要な他の複数遺伝子を同定し、本表現型が成立するための機構に関する知見を得ることを目的とした。
【方法・結果および考察】*adhX* 高発現株にプラスポゾンによる突然変異を導入し、succinate 添加無機寒天培地では生育するが、炭素源非添加無機培地では生育しない株を選択した。約 3,000 株のスクリーニングの結果、7 株の目的クローンを得、それらのプラスポゾン挿入部位の解析から、最終的に本表現型への pyruvate/phosphate dikinase, acetyl-CoA synthetase, isocitrate lyase をコードすると推定される 3 遺伝子の関与が示唆された。そこで、これら 3 遺伝子の再破壊株および相補株を作製し、有機炭素源非添加無機寒天培地上での生育と CO_2 固定能を検討したところ、これら 3 遺伝子の再破壊株では表現型が失われ、相補株では表現型が回復したことから、本 3 遺伝子は本表現型関与遺伝子であると結論した。pyruvate/phosphate dikinase は pyruvate を phosphoenol pyruvate (PEP)に、acetyl-CoA synthetase は acetate を acetyl-CoA に、isocitrate lyase は isocitrate を glyoxylate と succinate にそれぞれ変換する酵素活性を有しており、acetate と pyruvate の供給源は不明であるが、炭素放出を抑制する glyoxylate 回路を含む一連の過程が炭素源非添加無機寒天培地での生育の際の同化過程として機能している可能性が強く示唆された。本仮説が正しいとすれば、CO_2 固定の過程を担い PEP を oxaloacetate に変換する PEP carboxylase、および acetyl-CoA と glyoxylate から malate を合成する malate synthase も本表現型に必須であると予想される。UT26 ゲノム中には、これら酵素をコードすると推定される遺伝子が存在するため、現在、これら遺伝子の本表現型への関与を検討している。

sphingomonad, oligotroph, carbon fixation

講演番号：3A15p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ A 校舎 15 会場

超好熱・好酸性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* におけるアミノ酸生合成経路の調節機構の解析

Analysis of regulation mechanism of amino acid biosynthesis in thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*

○秋山 渚、富田 武郎、葛山 智久、西山 真（東大・生物工学セ）
○ Nagisa AKIYAMA, Takeo TOMITA, Tomohisa KUZUYAMA, Makoto NISHIYAMA (Biotechnology Research Center, The Univ. of Tokyo)

【目的】一般にバクテリアは DAP 経路によりリジンを生合成することが知られているが、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* はα-アミノアジピン酸（AAA）を中間体とする AAA 経路によってその生合成を行う。この AAA 経路前半部はロイシン生合成や TCA 回路の一部と、後半部はアルギニン生合成と類似しており、AAA 経路とこれらの代謝経路の間に進化的な関連があることが示唆される。AAA 経路を構成する遺伝子はクラスターを形成しており、リジン生合成は転写のアテニュエーションと初発酵素であるホモクエン酸合成酵素（HCS）のフィードバック阻害によって制御されている。古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* も AAA 経路によってリジンを生合成するが、後半部を構成する遺伝子がクラスターを形成しそれらが転写因子 LysM によって制御される一方で、前半部に関わると推測される遺伝子は全てゲノム上に個別に存在し各遺伝子の機能は不明である。*S. acidocaldarius* のゲノム上には 3 つの HCS ホモログが見出されたが、それらの機能を配列情報から推測することはできない。そこで、活性評価を含む機能解析に加え、生体内での制御機構についても明らかにすることを目指した。【方法・結果】3 つの HCS ホモログ Saci_1304、Saci_2325、Saci_0940 について、それぞれ比活性の測定と遺伝子破壊によりその機能を明らかにした。まず、Saci_1304 は HCS の基質である 2-オキソグルタル酸に対し最も高い活性を示し、さらに転写因子 LysM を介してリジンによる酵素活性の阻害を受けることが示唆された。Saci_1304 は既知の HCS には見られない RAM (Regulation of amino acid metabolism) ドメインを C 末端側に有しており、RAM ドメインを介してリジンによるフィードバック阻害を受けることが示唆される。また、*saci_1304* 遺伝子発現量はリジン存在下で抑制され、上流配列に LysM の結合が見られたことから、LysM が *saci_1304* の転写制御にも関わる可能性が示唆された。次に、Saci_2325 はピルビン酸に対して最も高い活性を示し、*saci_2325* 破壊株はイソロイシン要求性を示した。このことから、Saci_2325 がピルビン酸を初発物質とするイソロイシン生合成経路の初発酵素 Citramalate synthase 活性を持つことが示唆された。イソロイシン生合成はスレオニンを初発物質とする経路が一般的であり、*S. acidocaldarius* は両方の経路を持つと考えられる。最後に、Saci_0940 はロイシン生合成の初発酵素 IPMS の基質である 2-オキソイソ吉草酸に対し最も高い活性を示した。しかし、Saci_0940 が既知の IPMS で活性に必要とされる制御ドメインを欠いていることから推測されたように、その活性はロイシンによって阻害されなかった。一方、*saci_0940* 遺伝子発現はロイシンにより抑制され、ロイシン生合成は転写レベルで制御されていることが示唆された。

Sulfolobus acidocaldarius, amino acid biosynthesis, homocitrate synthase

講演番号：3A15p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ A 校舎 15 会場

大腸菌は D-アラニン排出システムをもつのか？

Does *Escherichia coli* have a D-alanine efflux system?

○勝部 哲、佐藤 一樹、安藤 太助、磯貝 恵美子、米山 裕（東北大院農）
○Satoshi KATSUBE, Kazuki SATO, Tasuke ANDO, Emiko ISOGAI, Hiroshi YOMEYAMA (Tohoku Univ.)

【目的】細菌も含め、すべての生物はタンパク質の構成ユニットとして L 体アミノ酸を使用している。一方、鏡像異性体である D-アミノ酸が各種生物で見いだされ、その生理機能に興味がもたれている。当研究室ではこれらのアミノ酸の中でアラニンに着目し、その代謝に関する研究を行ってきた。大腸菌における D-アラニン(D-Ala)の合成に関しては、ピルビン酸からアラニンアミノトランスフェラーゼを介して、L-アラニン(L-Ala)が合成され、次いでL-Alaからアラニンラセマーゼを介してD-Alaが合成される。そして、D-アミノ酸脱水素酵素の作用により D-Ala は再びピルビン酸に異化されるという代謝経路をもつ。当研究室の堀はこの L-Ala の代謝に関する研究の中で、L-Ala に特異的な排出輸送体をコードする *alaE* 遺伝子を大腸菌で初めて同定した。細菌は L-Ala の鏡像異性体である D-Ala を合成し利用していることから、私は大腸菌が D-Ala の特異的排出システムを有しているとの仮説をたて、その存在を検証することにした。

【方法】本実験では、細胞内の L-Ala レベルの上昇に伴いアラニンラセマーゼの働きを介して D-Ala 量が増大する結果、細胞外に D-Ala が排出されると考え、異種のアラニン脱水素酵素遺伝子を持つプラスミドの導入と、ペプチドフィーディング法による代謝変換を施した大腸菌株を培養し、細胞外に分泌された D-Ala を HPLC で測定した。

【結果】いずれの代謝フロー改変株でも細胞外に D-Ala と思われるピークが検出された。このピークが本当に D-Ala のピークであるのか調べるために、培養上清に D-アミノ酸オキシダーゼを加え 37℃にて 1 時間処理した結果、HPLC で検出された D-Ala と思われるピークは消失した。このことからこのピークは D-Ala であることが示唆された。さらに、これらの培養上清中に D-Ala が排出されていることを検証するために、バイオアッセイによる生物学的な評価を行った。バイオアッセイの指標菌として 2 つのアラニンラセマーゼをコードする遺伝子を欠損した D-Ala 要求性の大腸菌変異株を用いた。もし培養上清サンプルに一定量の D-Ala が含まれていれば、指標菌である D-Ala 要求株の生育が見られるはずである。バイオアッセイの結果、D-Ala 標準液を添加した場合、D-Ala 濃度に依存して指標菌の生育ゾーンが大きくなった。一方、代謝改変株の培養上清を添加すると指標菌の生育が認められ、その生育ゾーンの大きさは 1 mM の D-Ala 標準液とほぼ同等であった。

これらの結果より、代謝改変株の培養上清中に HPLC 測定によって検出されたピークは D-Ala であり、大腸菌は何らかの方法で D-Ala を細胞外へ排出していることが明らかとなった。

E.coli, D-alanine, secretion

講演番号：3A15p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ A 校舎 15 会場

ura4 遺伝子破壊株の細胞溶解時代謝物の検討

Investigation of metabolites in ura4 deletion cells undergoing cell lysis

○西野 耕平、松尾 祐児、川向 誠（島根大学　生物資源　生命工）
○ KOUHEI NISINO, YUZY MATSUO, MAKOTO KAWAMUKAI (Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University)

ポリペプトンはカゼインの分解物であり微生物の培養の際に広く使用されている。ポリペプトンを含む YPD 培地は出芽酵母の培養によく使用されているが、分裂酵母においては生育阻害などが観察されることがあり、使用は敬遠されている。我々は分裂酵母の *ura4* 遺伝子変異株が YPD 培地において劇的な細胞溶解を示すことを見出し、その原因を追求している。

ura4 遺伝子は *de novo* UMP 経路の下流に位置する Orotidine-5-monophosphate (OMP) decarboxylase をコードしている。この経路には Ura4 以外に Ura1、Ura2、Ura3、Ura5 があり、Ura4 は OMP から UMP を生成する最後の反応を触媒する酵素である。細胞溶解現象は *ura4* 以外の遺伝子破壊株においては起こらず、*ura4* と他の *ura* 遺伝子との二重遺伝子破壊株においては細胞溶解が抑圧されることがわかっている。また、OMP の前駆体であるオロト酸のアナログである 5-FOA は、二重遺伝子破壊株（*ura1 ura4*、*ura2 ura4*、*ura3 uar4*）の細胞溶解を誘導する。これらの結果から我々は、Ura4 の反応の前駆体である OMP の蓄積が細胞溶解の原因であると考えた。

そのことを検討するために、液体クロマトグラフィーを用いて代謝物を分離し PDA と質量分析器を検出器として用いた前駆体の解析を行った。その結果、野生株と *Δura4* 株を YPD 液体培地で培養し代謝物を比較すると *Δura4* 株において OMP が顕著に蓄積していることが明らかになった。また、野生株と *Δura4* 株の代謝物を LC-MS で比較した所 *Δura4* 株特異的に蓄積している物質が存在することが分かった。その物質は UV260nm を用いることで測定することができるが、OMP とは保持時間や分子量が異なり、OMP ではなかった。しかし、解析を続けるとその物質は OMP を脱リン酸化することで生じる Orotidine であることがわかった。その後の解析により OMP と Orotidine を種々の条件下で測定し細胞溶解と相関性があることがわかったのでそれを報告する。

また、分裂酵母非必須遺伝子破壊株ライブラリーを用いたスクリーニングにより細胞溶解を抑圧する株を 128 株取得したのでその結果についても報告する。

S. pombe, metabolite, cell lysis

講演番号：3A15p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ A 校舎 15 会場

分泌型マルターゼ Agl1 の Atf1/Pcr1 による制御

Regulation of Maltase Agl1 by Atf1/Pcr1

加藤 太陽[2]、吉良 新太郎[1]、○川向 誠[1]([1]島根大生資生命工、[2]島根大医生化)
Hiroaki Kato[2], Shintaro Kira[1], ○Makoto Kawamukai[1] ([1]Shimane Univ.. Life Env. Sci., [2]Shimane Univ.. Med.)

分裂酵母 Atf1/Pcr1 は CREB/ATF ファミリーに属する bZIP 転写因子であり、ヘテロダイマーとして CRE（cyclic AMP responsible element）と呼ばれる配列に結合し、転写を正負に制御する。

我々は、*Δatf1* 株と*Δpcr1* 株が糖源をマルトースとする培地で増殖遅延を示すことを発見した。興味深い事に、その増殖遅延は隣接する野生株のコロニーの存在によって抑圧された。この現象を解明するため、我々は、分泌型マルターゼの発現が Atf1/Pcr1 に依存しており、野生株の細胞から細胞外に分泌されたマルターゼが*Δatf1* 株や*Δpcr1* 株の細胞の周囲のマルトースをグルコースに分解し、そのグルコースが変異株の増殖遅延を抑圧したのではないかと考えた。予想通り、４つのマルターゼ候補遺伝子(*agl1*, *gto1*, *gto2*, *mal1*)のうち分泌型マルターゼである *agl1* 遺伝子の破壊株のみが糖源変更に応じて*Δatf1* 株や*Δpcr1* 株と同様の挙動を示した。それだけでなく、Atf1/Pcr1 依存的な *agl1* の発現誘導が確認された。しかしながら、CRE コンセンサス配列は *agl1* 遺伝子のプロモーター領域には見つからず、*agl1* 遺伝子の上流約 12kb の位置に Atf1/Pcr1 が *in vivo* で結合する CRE が存在していた。この遺伝子座に存在する 6 遺伝子の糖源変更後の挙動を RT-PCR で解析すると、驚いたことに、*agl1* を含む４つの遺伝子が Atf1/Pcr1 依存的に発現誘導された。さらに、ChIP 解析により、Atf1 および Pcr1 が Agl1 コーディング領域にマルトース依存的に分布すること、ポリメラーゼ II や転写メディエーターのマルトース依存的な広範囲な分布がみられた。これらのことから、Agl1 とその周辺領域は糖源変更によって Atf1/Pcr1 依存的に転写可能な状態へと変化する染色体ドメインであると考えている。Atf1/Pcr1 は、特定の CRE コンセンサス配列に結合して制御するのみならず、広範囲に染色体構造を変えうる因子として、新たな転写活性化のモデルを提唱したい。

Kato et al. PLoS ONE e80572(2013)

maltase, fission yeast, atf1

講演番号：3A15p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ A 校舎 15 会場

Gluconacetobacter xylinus NBRC 3288 の高温適応育種にともなう酢酸発酵能の向上
Adaptive mutation of *Gluconacetobacter xylinus* NBRC 3288 enhances acetic acid fermentation ability
○伊藤 光平、松谷 峰之介、藥師 寿治、松下 一信（山口大・農・生物機能）
○ Kohei ITO, Minenosuke MATSUTANI, Toshiharu YAKUSHI, Kazunobu MATSUSHITA (Yamaguchi Univ.)

【背景・目的】酢酸発酵は、酢酸菌の典型的な酸化発酵であり、中でも *Acetobacter* 属や *Gluconacetobacter* 属菌による発酵は食酢の製造に産業的に利用されている。この産業的な酢酸発酵は、一般に 30°C 程度で行われているが、発酵熱によって生じる温度上昇を抑えるため冷却および温度管理に多大なコストと労力が要求される。これまでに、中酸度酢酸製造に用いられる *Acetobacter* 属菌では、*Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 株およびタイで分離された *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 株を用いて高温発酵条件下で適応育種が行われ、それぞれ 39°C および 40°C で発酵可能な耐熱化株が得られている。一方、高酸度酢酸製造によく用いられている *Gluconacetobacter* 属菌では、完全ゲノムの明らかになっている *Gluconacetobacter xylinus* NBRC 3288 株を用いて、高温適応育種が行われ、35°C で発酵可能な耐熱化株が得られ、その変異部位も明らかになっている[1]。今回、この耐熱化株の耐熱化にともなう酢酸発酵能力の向上について解析を行った。

【方法・結果】33°C の生育限界温度(発酵条件下)を有する *Ga. xylinus* NBRC 3288 株を 34、34.5、35°C で順次継代培養を行い、それぞれの温度段階での適応株 ITO-1、ITO-2、ITO-3 株を取得した。これらの耐熱化株は親株に比べて生育温度が上昇していること、またより高い温度で発酵が可能であることが確認されている。今回、この適応育種（耐熱化）が酢酸発酵能力にどのように影響しているかを明らかにするため、30°C 一定温度で培地中の酢酸濃度を 0~2%またエタノール濃度を 0~6%で変化させて、発酵能の比較を行った。その結果、耐熱化にともなって、より高濃度の酢酸およびエタノール存在下で発酵を行う能力が獲得されていることが明らかになった。これらのことから、適応育種の継代培養プロセス中に、温度に対する耐性だけではなく、酢酸やエタノールへの耐性能が上昇したことが予想される。現在、発酵に及ぼす通気の影響および酢酸耐性能を解析しているので併せ報告する。

[1]伊藤ら：日本生物工学会平成 25 年度大会

acetic acid fermentation, *Gluconacetobacter xylinus*, adaptive mutation

講演番号：3A15p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ A 校舎 15 会場

Gluconobacter 属酢酸菌のジヒドロキシアセトン代謝に関わるリン酸化酵素
A kinase involved in dihydroxyacetone metabolism in *Gluconobacter* spp.
○河尻 恵理佳[1]、小東 陽[2]、松谷 峰之介[1]、後藤 勝[2]、薬師 寿治[1]、足立 収生[1]、松下 一信[1]([1]山口大農、[2]東邦大理)
○ Erika KAWAJIRI[1], Akira KOHIGASHI[2], Minenosuke MATSUTANI[1], Masaru GOTO[2], Toshiharu YAKUSHI[1], Osao ADACHI[1], Kazunobu MATSUSHITA[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Toho Univ.)

Gluconobacter 属酢酸菌はグリセロールを酸化し、その産物であるジヒドロキシアセトン(DHA)を培地中に蓄積する。この反応は細胞膜の外側(ペリプラズム)でグリセロール脱水素酵素により触媒される。一方、生産される DHA のその後の代謝については十分に解明されていない。そこで本研究では遺伝学的手法を用いて DHA の代謝に関与する遺伝子を特定することを試みた。
Gluconobacter thailandicus NBRC3255 と完全ゲノムが明らかな *Gluconobacter oxydans* ATCC621H をグリセロールで培養した結果、両株はともにグリセロールを酸化し、DHA を産生した。その後、NBRC3255 においては培地中の DHA の減少がみられたが、ATCC621H においては DHA の減少がみられなかった。この結果より NBRC3255 には DHA 代謝に関与する酵素群が存在すると考えられた。本菌のドラフトゲノム情報と ATCC621H のゲノム情報を比較解析した結果、NBRC3255 には、DHA 代謝能が低い ATCC621H がもっていないタイプの DHA kinase 遺伝子(*dhaK*)をもつことが分かった。そのため *dhaK* 遺伝子の破壊株を作製した。破壊株と野生株でグリセロール培養を行った結果、破壊株において培地中の DHA の減少が顕著に抑制された。この遺伝子を破壊株に戻した相補株では培地中の DHA の減少が野生株並みであった。この結果から、*dhaK* 遺伝子産物が NBRC3255 において DHA 代謝に関与していることが強く示唆された。野生株と破壊株の DHA kinase 活性を測定したところ、野生株では pH7 に活性が確認されたが、破壊株では pH 7 でほとんどみられなかった。

Gluconobacter, dihydroxyacetone, kinase

講演番号：3A15p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ A 校舎 15 会場

酢酸菌 *Acetobacter* 属菌の熱耐性に関与する Na^+/H^+アンチポーターの解析
Characterization of Na^+ / H^+ antiporter involved in the thermotolerance of *Acetobacter* spp.
○辰野 真木[1]、ソエンポール ビッチャイ[2]、岡田 隆宏[1]、薬師 寿治[1]、松下 一信[1] ([1]山口大・農・生物機能、[2]コンケン大学)
○Maki TATSUNO[1], Wichai Soemphol[2], Takahiro OKADA[1], Toshiharu YAKUSHI[1], Kazunobu MATSUSHITA[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Khon Kaen Univ.)

【目的】酢酸菌 *Acetobacter tropicalis* SKU1100 はタイで単離された耐熱性株であり、37～40℃の高温で厚い菌膜を作って生育し、最大 42℃まで生育が可能である。本菌 *A.tropicalis* SKU1100 の耐熱性メカニズムを解明するため、トランスポゾン(Tn10)変異法を用いて 30 の高温感受性変異株が取得された。それらの高温感受性変異株のうちの 1 つ（3-45 変異株）は、Na^+ /H^+アンチポーターと予想される遺伝子が欠損した変異株である。この 3-45 変異株（アンチポーター欠損株）は高温下、特に中性~アルカリ pH 域で、生育が不良であり、その生育不良は Na^+の添加によって部分的に相補される。一方、K^+ではその様な効果はみられず、逆に高濃度の K^+存在下では常温下でもこの変異株に生育阻害をもたらす。それ故、このアンチポーターは、特に K^+に依存した細胞内の pH 制御に関与していると推測された。
【方法・結果】*A.tropicalis* SKU1100 野生株および 3-45 変異株から反転膜小胞を調製し、アクリジンオレンジの蛍光分析によって、Na^+および K^+イオンの H^+に対するアンチポート活性を測定した。その結果、本アンチポーターは中性域で Na^+と K^+の両方に対してアンチポート活性を持ち、45℃まで安定にアンチポート活性を保持できることがわかった。一方、本菌には本アンチポーターとは別に、アルカリ側で働く普遍的な Na^+/H^+アンチポーターが機能しており、この酵素の機能が Na^+存在下で変異株の生育を相補していると考えられた。
　このようにして、本アンチポーターは高温下での細胞内 pH 制御に重要な役割を有していると推測された。

Acetobacter, theromotolerance, Na^+/H^+antiporter

講演番号：3A15p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ A 校舎 15 会場

乳酸菌 *Enterococcus faecalis* W11 株のフマル酸非依存性の嫌気性グリセロール代謝

Pyruvate formate lyase is essential for fumarate-independent anaerobic glycerol utilization in *Enterococcus faecalis* strain W11

○土肥 裕希（岡山理大　工）
○Yuki Doi (Okayama University of Science)

【諸言】*Enterococcus faecalis* は、グリセロール資化性を有する乳酸菌である。嫌気条件下でグリセロールを資化する *E. faecalis* は、その代謝で生じた NADH を NAD^+に再酸化するためにフマル酸を要求する。これは、*E. faecalis* のグリセロール代謝では 1 分子のピルビン酸に対して 2 分子の NADH が生じるのに対し、乳酸発酵では 1 分子の NADH しか酸化されないためである。一方で、本学で単離された *E. faecalis* W11 株（W11 株）は、嫌気条件下でのグリセロールの資化にフマル酸を必要としない。したがって、本研究では W11 株のグリセロール代謝を解析した。
【結果】好気条件下でグリセロールを資化した W11 株の最終代謝産物は主に酢酸、アセトイン、L-乳酸であり、グルコースを資化した W11 株のそれらと同様であった。一方で、嫌気条件下で培養された W11 株では、ほとんどのグルコースは L-乳酸に変換されたが、グリセロールは主にエタノールに変換され、さらにエタノールと同量のギ酸が生産された。このことから、嫌気条件下でグリセロールを資化した W11 株は、ピルビン酸-ギ酸リアーゼ（Pfl）によってピルビン酸から生産されたアセチル CoA を利用して、エタノール発酵を行っていることが示された。

W11 株の Pfl 遺伝子破壊株（Δpfl 株）は、嫌気条件下において、グリセロールを資化して生育することができなかった。一方で、グルコースやジヒドロキシアセトンなど、1 分子のピルビン酸に対して 1 分子の NADH が生じる炭素源を資化したΔpfl 株は、酸素の有無にかかわらず W11 株と同等の生育を示した。これらから、W11 株は NADH の生産を伴わない Pfl と 2 分子の NADH の酸化反応を伴うエタノール発酵を組み合わせることで、グリセロール代謝で生じた 2 分子の NADH を酸化させ、細胞内のレドックスバランスを整えていることが示唆された。

Δpfl 株の細胞からは、グリセロール代謝の初発酵素である NAD^+依存性グリセロールデヒドロゲナーゼ（Gld）活性が検出された。また、その細胞内 NADH/NAD^+比は明らかに酸化側に偏っており、Gld 反応に必要な NAD^+に不足は認められなかった。これらの結果は、嫌気条件下で Pfl-エタノール発酵経路が利用できなくなった W11 株は、過剰な NADH による還元ストレスを回避するために、グリセロールを細胞内に取り込まないことで、その代謝を停止することを示した。
【まとめ】W11 株の Pfl は、フマル酸非依存性の嫌気性グリセロール代謝において、NADH の酸化のためにエタノール発酵へアセチル CoA を供給するとともに、グリセロールの取り込み制御に重要な役割を果たした。

glycerol metabolism, pyruvate formate lyase, lactic acid bacteria

講演番号：3A15p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ A 校舎 15 会場

連鎖球菌による宿主細胞外マトリクス（グリコサミノグリカン）の代謝機構

Streptococcal metabolic mechanism of host extracellular matrices, glycosaminoglycans

○橋本 渉[1]、丸山 如江[1]、高瀬 隆一[1]、中道 優介[1]、三上 文三[1]、村田 幸作[2]（[1]京大院農、[2]摂南大理工）
○Wataru Hashimoto[1], Yukie Maruyama[1], Ryuichi Takase[1], Yusuke Nakamichi[1], Bunzo Mikami[1], Kousaku Murata[2] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Fac. Sci. Eng., Setsunan Univ.)

【背景と目的】哺乳類において細胞外マトリクスとして存在するグリコサミノグリカンは、細胞間相互作用に重要な機能を示す。これまでに、病原性連鎖球菌が多糖リアーゼと不飽和グルクロニルヒドロラーゼ（UGL）の協調作用によりグリコサミノグリカンを単糖（不飽和グルクロン酸とアミノ糖）にまで分解し、宿主細胞に侵入・感染することを示唆してきた。そのゲノムには、グリコサミノグリカンの断片化と分解に関わる遺伝子群がクラスターを形成している（UGL 遺伝子クラスター）。細菌によるアミノ糖の代謝に関しては、大腸菌を中心に関連酵素とその遺伝子が解析されている。一方、C4 位と C5 位に二重結合をもつ不飽和グルクロン酸の代謝に関しては不明である。本研究では、連鎖球菌を対象に、不飽和グルクロン酸の代謝機構とそれに関わる酵素の立体構造について解析を進めた。
【方法と結果】連鎖球菌（*Streptococcus agalactiae*）の UGL 遺伝子クラスターにコードされる Gbs1892 と Gbs1891 は、一次構造上、各々イソメラーゼと還元酵素に類似しているが、その機能は明らかにされていない。Gbs1892 と Gbs1891 の各大量発現系を大腸菌内に構築し、各タンパク質を精製した。不飽和グルクロン酸を基質として、Gbs1892 と Gbs1891 を加えて反応を解析したところ、Gbs1892 が不飽和グルクロン酸に作用するイソメラーゼとして機能すること、並びに Gbs1891 が Gbs1892 の反応により生じた 3-デオキシ-D-グリセロ-2,5-ヘキソジウロソン酸に作用する NADH 依存型還元酵素であることが明らかになった。Gbs1891 の反応により生じる 2-ケト-3-デオキシ-D-グルコン酸（KDG）は、UGL 遺伝子クラスターにコードされるキナーゼ（KdgK）とアルドラーゼ（KdgA）により、ピルビン酸とグリセルアルデヒド-3-リン酸に代謝されることが示唆された。

X 線結晶構造解析により、Gbs1892 と Gbs1891 の立体構造を各々1.6 と 2.8 Å 分解能で決定した。Gbs1892 は、α/β-構造を基本骨格にもつサブユニットから構成される。Gbs1891 は、$\alpha/\beta/\alpha$ の 3 層からなるサブユニットをもち、典型的な short-chain dehydrogenase/reductase ファミリーと同様の構造特性を示した。その分子中央には 1 枚の β-シートが配置され、その周りを α-ヘリックスが取り囲む。

Gbs1892 と Gbs1891 のホモログ遺伝子は、連鎖球菌のみならず、他の病原性細菌（*Clostridium* など）の UGL 遺伝子クラスターにも見出される。したがって、両酵素は細菌によるグリコサミノグリカン代謝に重要であることが示唆された。
【結論】細菌による宿主細胞外マトリクス（グリコサミノグリカン）の分解で生じる不飽和グルクロン酸は、イソメラーゼと還元酵素の逐次反応により代謝されることが初めて明らかになった。

Streptococcus, glycosaminoglycan, metabolism

講演番号：3A15p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ A 校舎 15 会場

海洋性好酸性硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* SH 株の硫黄代謝

The dissimilatory sulfur metabolism in the marine acidophilic sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* strain SH

○金尾 忠芳[1]、梶谷 泰之[2]、上村 一雄[1] ([1]岡山大院環境生命、[2]岡山大農)
○Tadayoshi Kanao[1], Yasuyuki Kajitani[2], Kazuo Kamimura[1] ([1]Grad. School, Okayama Univ., [2]Okayama Univ.)

【背景と目的】

当研究室において岡山県下津井の海水試料より単離された *Acidithiobacillus thiooxidans* SH 株は、その生育にナトリウムイオンを要求する好塩性好酸性の硫黄酸化細菌である。低品位鉱石から有用金属を溶出させるバイオリーチングは塩濃度の高い環境下で行われる場合もあり、その際には好塩性の硫黄酸化細菌の利用が必要となる。本研究では SH 株のバイオリーチングへの応用に重要な硫黄酸化機構を解明するため、この代謝に関わる鍵酵素であるテトラチオン酸ハイドロラーゼ（4THase）について研究を行った。我々は既に、テトラチオン酸を唯一のエネルギー源として無機塩独立栄養生育した SH 株菌体細胞より 4THase を精製し、その性質を明らかにした。また本酵素遺伝子（SH-*tth*）から推定される一次配列から本酵素はシグナル配列を有しており、これを除いた ORF は 1443 bp, 481 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。今回は、SH 株の硫黄代謝における 4THase の役割を調べるために、抗-SH-Tth 抗体を利用した Western blot 解析を行った。

【方法および結果】

大腸菌を宿主として発現した組換え型 SH-Tth をウサギに注射することで抗体を調製した。これに対して、生育基質に元素硫黄（S^0）チオ硫酸（$S_2O_3^{2-}$）およびテトラチオン酸（$S_4O_6^{2-}$）を唯一のエネルギー源として用いた培地で培養した全菌体タンパク質を SDS-PAGE に供した後、PVDF 膜に転写したもので Western blot 解析を行った。この結果、チオ硫酸とテトラチオン酸で生育した菌体では、SH-Tth はほぼ同程度のシグナル強度を示したが、元素硫黄生育菌体ではそれらの 20%程度に減少していた。*A. thiooxidans* と近縁種である *Acidithiobacillus caldus* における 4THase 活性はテトラチオン酸生育菌体では検出されるが、元素硫黄生育菌体では検出されず、テトラチオン酸生育による誘導酵素であることが報告されている。*A. thiooxidans, A. caldus* ともに全ゲノム解析から元素硫黄を代謝する SOX 酸化経路に関わる遺伝子群の存在が明らかとなっており、また元素硫黄で生育した場合には 4THase 活性が検出されないことから、中間代謝物としてのテトラチオン酸の生成は無いと考えられている。今回、SH-Tth が元素硫黄やチオ硫酸で生育した菌体においても検出されたことから、SH 株は *A. thiooxidans* ではあるが、SOX 経路ではなく代謝中間体にテトラチオン酸を生じる S4-Intermediate 経路を利用している可能性が示唆された。

tetrathionate hydrolase, sulfur metabolism, acidophilic bacteria

講演番号：3A15p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ A 校舎 15 会場

A. ferrooxidans 由来 cytochrome oxidase による還元型無機硫黄化合物からの亜硫酸の生成
Production of sulfite from reduced inorganic sulfur compounds by cytochrome oxidase of *A. ferrooxidans*

○杉尾 剛[1]、杉尾 理恵[1]、根岸 敦規[2]、井川 秀樹[3]、竹内 文章[4] ([1]杉尾化学合成独立栄養細菌研究所、[2]安藤ハザマ・先端技研、[3]日本ヒューム・技研、[4]岡大・環境管理セ)
○tsuyoshi Sugio[1], Rie Sugio[1], Atsunori Negishi[2], Hideki Igawa[3], Fumiaki Takeuchi[4] ([1]Sugio Inst. of Chemolithoautotrophy, [2]Tech. Res. Inst. Hazama Ando Corp., [3]Tech. Res. Lab. Nippon Hume Corp., [4]Environ. Manage. Cen. Okayama Univ.)

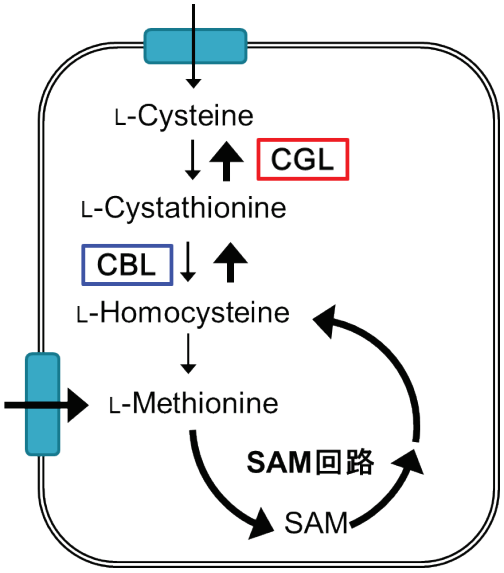
【目的】*A. ferrooxidans*(Af)は、２価鉄及び還元型無機硫黄化合物の両方をエネルギー源にして増殖できる化学合成独立栄養細菌で、有用金属のバイオリーチングに最も重要な細菌と考えられている。本菌は鉄と硫黄の両方を酸化できるが、硫黄酸化の際にも鉄酸化の末端酸化酵素として機能している cytochrome oxidase(COase)が機能することを示すデーターが集積しつつある。我々は、「Afが元素硫黄やテトラチオン酸を電子供与体にして3価鉄を還元し、２価鉄を生成する鉄還元酵素活性を持つために、硫黄酸化の際にも必ずCOaseが機能している」と提案してきた。前回、単一に精製したCOaseが元素硫黄依存性の鉄還元酵素活性を持つことを報告した。今回、COaseがどのようにして鉄還元酵素活性を示すのか、その機構を検討した。
【方法及び結果】バイオリーチング活性の高い *A. ferrooxidans* D3-2 株の洗浄細胞を、界面活性剤オクチルグルコシドで可溶化後、硫安分画、各種カラムクロマトグラフィーを行い COase を電気泳動的に単一に精製した。精製 COase は、pH 2.25 で、元素硫黄及び３価鉄とインキュベートすると２価鉄を生成した（鉄還元酵素活性の存在)。一方、5 以上の pH で、COase を元素硫黄のみとインキュベートすると亜硫酸(SO_3^{2-})を生成した(亜硫酸の生成はパラローズアニリン法で定量した)。亜硫酸生成の最適 pH は 7.0 にあった。しかし、pH 5 以下では亜硫酸は分解し易いため，生成を検出できなかった。亜硫酸の生成反応は COase の特異的阻害剤であるシアン化ソーダで強く阻害された。COase は pH7.0 で、元素硫黄の他に、テトラチオン酸、二チオン酸、ペンタチオン酸、パイライト(FeS_2)、銅精鉱を基質にして亜硫酸を生成した。pH 2.25 の場合とは異なり、pH 7.0 では 3 価鉄を存在させても 2 価鉄の生成は観察しにくかった。しかし、2 価鉄に特異的なキレート剤である *o*-phenanthroline を共存させておくと、2 価鉄の生成を示すオレンジ色が発色した。また、pH 7.0 で、3 価鉄の添加は亜硫酸の生成を強く阻害した。以上の結果より、COase が、pH 2.25、元素硫黄と 3 価鉄の存在下、2 価鉄を生成した理由は、「COase が、元素硫黄から亜硫酸を生成する酵素活性を持つため、生成された亜硫酸が非酵素的に 3 価鉄を 2 価鉄に還元したため」と考えられる。

Acidithiobacillus ferrooxidans, cytochrome oxidase, sulfite

講演番号：3A15p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ A 校舎 15 会場

ビフィズス菌の逆流硫黄経路の同定と活性染色法による C-S リアーゼの解析
Analysis of reverse transsulfuration pathway in bifidobacteria
○鈴木 梓、和田 大、吹谷 智、横田 篤（北大院農）
○Azusa SUZUKI, Masaru WADA, Satoru FUKIYA, Atsushi YOKOTA (Hokkaido Univ.)

【目的】ビフィズス菌はヒトの腸内細菌であり，宿主の健康促進に寄与する多くの機能が報告されている．しかし，このような機能を引き起こす要因やその作用機構の解析は遅れている．これまでビフィズス菌の代謝研究はオリゴ糖を代表とする糖代謝に注目が集まっており，アミノ酸代謝については知見が少ない．そこで我々はビフィズス菌の必須アミノ酸であるシステインに注目した．これまでビフィズス菌は有機硫黄源としてシステインに要求性を示し，他の含硫アミノ酸では代替できないと考えられてきた ．しかし我々の解析から，一部の菌株はメチオニンを単一硫黄源として生育可能であり，メチオニンをシステインへと代謝する逆流硫黄経路をもつことが明らかになった（図参照）．本研究では，複数のビフィズス菌種を対象に含硫アミノ酸の代謝能力について調べるとともに，代謝経路を構成する酵素のうち C-S リアーゼに注目し，培地中の含硫アミノ酸による発現誘導を解析した．
【方法・結果】初めに，ヒト，動物の大腸由来のビフィズス菌 6 株を対象として，メチオニンを含む最少培地で生育試験をおこなった．その結果，逆流硫黄経路の働きが強い株 2 株，弱い株 4 株に分類された．次に，含硫アミノ酸による酵素の発現誘導を解析した．逆流硫黄経路の働きが強い *Bifidobacterium longum* 105-A 株を対象に，システイン，メチオニンをそれぞれ単一硫黄源とする最少培地で培養し，粗酵素溶液の C-S リアーゼ活性を活性染色法により確認した．その結果，システインを単一硫黄源とした場合には 1 種類の C-S リアーゼのみが検出されるのに対し，メチオニンを硫黄源とした場合，2 種類の C-S リアーゼの発現が確認された．この結果から，*B. longum* 105-A ではシステインを硫黄源とする場合にはシスタチオニン β リアーゼ（CBL）のみが発現しており，メチオニンを硫黄源とする場合には，シスタチオニンからシステインを生成するシスタチオニン γ リアーゼ（CGL）が発現誘導を受けることが示唆された．



逆流硫黄経路

なお本研究の成果は，独立行政法人科学技術振興機構 研究成果展開事業 Ａ－ＳＴＥＰ フィージビリティスタディ 探索タイプにおける成果である．

bifidobacteria, methionine, sulfur-containing amino acid

講演番号：3A15p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ A 校舎 15 会場

排出系を欠損した *Lactobacillus plantarum* VL103 の代謝解析
Metabolic analysis of an efflux system-lacking *Lactobacillus plantarum* VL103
○今井 祐斗、梶川 揚申、佐藤 英一、岡田 早苗（東農大応生科・化学）
○Yuto IMIA, Akinobu KAJIKAWA, Eiichi SATOH, Sanae OKADA (Dept. Appl. Biol. Chem. Tokyo Univ. Agr.)

【目的】*Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 の乳酸生成経路を欠損した *L. plantarum* VL103 に対し、基質取込み系・細胞内生合成経路・代謝産物排出系を包括的に改変することによりコハク酸生成モデルを構築することを目的とした検討を続けてきた。その結果、基質となる糖の取込み系・細胞内生合成経路の遺伝子改変により、大幅なコハク酸生成量の向上が報告された 1)。しかしながら、*L. plantarum* NCIMB 8826 におけるコハク酸排出系遺伝子が特定されていないことから、コハク酸排出系に関する知見が不足している。本菌におけるコハク酸排出系の検討を加えることにより、輸送基質・制御・速度などの輸送機構についての情報が得られ、今後の効率的なコハク酸生成系の基盤整備をするうえで重要な項目となると考えた。そこで、*L. plantarum* NCIMB 8826 におけるコハク酸排出系を解析することにした。
【結果・考察】*L. plantarum* NCIMB 8826 のゲノム情報からコハク酸排出系遺伝子を選抜した。コハク酸排出系遺伝子が特定されている他菌種の遺伝子情報を参考に相同性検索をし、5 つの候補遺伝子（lp_2818、lp_3049、lp_0558、lp_2799、lp_1102）を選抜した。また、選抜した遺伝子が発現しているか確認するために RT-PCR を行ったところ、lp_2818、lp_0558、lp_1102 で発現を確認した。その中でも最も相同性が高い lp_2818 に着目し、相同組換え法により *L. plantarum* VL103 の lp_2818 欠損株（Δ2818）を取得した。次に、Δ2818 の有機酸生成量・生育を測定したところ、*L. plantarum* VL103 に比べてコハク酸が消失したのと同時に乳酸が生成されるようになり、ギ酸の生成量も向上していた。この時、生育の向上も同時に観察された。コハク酸生成が認められなかったため lp_2818 はコハク酸排出に関与している可能性が高くなった。*L. plantarum* VL103 は乳酸生成経路を欠損しているにもかかわらず乳酸が生成された理由としてはマロラクティック発酵が考えられた。lp_2818 の欠損により細胞内で有機酸が蓄積する恐れがあったため、リンゴ酸を菌体外へ排出し、マロラクティク酵素によりリンゴ酸を乳酸に変換することで細胞内代謝の均衡を維持したと考えた。生育が向上したことに関しては、2011 年 Browen らによりマロラクティク発酵時に ATP 生産を行う F 型 ATPase が活性化し、菌体内で ATP が生産されるという報告から Δ2818 でも同様の現象が起こったと考えた。現在、マロラクティック酵素の発現解析や細胞内 pH の測定など、乳酸の生成と生育の向上に関する詳細な検討を進めている。
1）辻ら　日本農芸化学会 2013 年度大会

Lactobacillus plantarum, metabolic analysis, succinic acid efflux system

講演番号：3A15p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ A 校舎 15 会場

アーキア型 phosphoribulokinase の機能解析

Functional analysis of archaeal type phosphoribulokinase

○河野 卓成[1,2]、遠藤 千夏子[1]、木津 奈津子[3]、木村 浩之[4]、溝端 栄一[3]、井上 豪[3]、松村 浩由[3]、横田 明穂[1]、蘆田 弘樹[1,5,6] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]JSPS 特別研究員 DC、[3]阪大院・工、[4]静岡大院・理、[5]JST-さきがけ、[6]神戸大院・発達科学)

○ Takunari Kono[1,2], Chikako Endo[1], Natsuko Kizu[3], Hiroyuki Kimura[4], Eiichi Mizohata[3], Tsuyoshi Inoue[3], Hiroyoshi Matsumura[3], Akiho Yokota[1], Hiroki Ashida[1,5,6] ([1]Grad. Sch. of Biol. Sci., NAIST, [2]JSPS Research Fellow, [3]Osaka Univ., [4]Shizuoka Univ., [5]JST-PRESTO, [6]Kobe Univ.)

【背景・目的】地球上では年間1,400億トンのCO_2が、光合成生物の利用するカルビンサイクルによって固定されており、地球上の炭素循環の中心を担っている(Thauer et al., 2008)。カルビンサイクルは計１１種の酵素で構成されており、その中でもCO_2固定酵素であるribulose-1,5-bisphosphate carboxylase /oxygenase (RuBisCO)と、RuBisCOのCO_2/O_2アクセプター基質であるribulose-1,5-bisphosphate (RuBP)を合成するphosphoribulokinase (PRK)は、この回路の鍵酵素である。近年のゲノム解析から、非光合成生物であるアーキアの多くがRuBisCOを有することが明らかにされたが、同時にPRKを有しているという報告はなかった。これらのアーキアでは、PRKを利用しない代替経路によって合成されたRuBPを基質にRuBisCOがCO_2固定を行うことが報告されている(Sato et al., 2007)。我々は、メタン菌 *Methanospirillum hungatei*をはじめとする、いくつかのアーキアがRuBisCOとPRK両ホモログ遺伝子を同時に有していることを見出した。そこで、アーキアが持つ２つのカルビンサイクル鍵酵素ホモログの機能及び、アーキアと光合成生物の関連性を調べる目的で研究を行った。

【結果・考察】ゲノム解読が完了しているアーキアの内、15 種のアーキアが RuBisCO ホモログ遺伝子及び、PRK ホモログ遺伝子を有していた。本研究では、メタン菌 *M. hungatei* を主な研究対象とし、解析を進めた。*M. hungatei* RuBisCO ホモログと PRK ホモログの大腸菌リコンビナントタンパク質を用いて酵素活性の有無を解析した結果、それぞれ CO_2 固定活性 (0.146 μmol/min/mg) 、PRK 活性 (29.17 μmol/min/mg) を示した。また、*M. hungatei* PRK の結晶構造解析を行ったところ、バクテリア型 PRK とのアミノ酸配列相同性は 30%以下と低いものの、単量体の構造は非常に良く似ていた。しかし興味深いことに、二量体形成様式は全く異なっており、アーキア型とバクテリア型 PRK 間での酵素学的パラメータの違いが、構造に起因することが示唆された。更に、RuBisCO や PRK が実際にアーキアの生体内で機能しているのかを調べるために、*M. hungatei* の菌体粗酵素溶液を用いて活性測定を行ったところ、PRK 活性(84.14 nmol/min/mg)が得られた。RuBisCO の活性検出に関しても、現在行っているところである。本研究の結果から、これまでに同定されていた光合成型 PRK に加え、アーキア型 PRK の存在が明らかになった。また、*M. hungatei* を始めとした PRK を持つアーキアにおいて、RuBisCO と PRK を利用した原始カルビンサイクルとも言える新規炭素代謝経路が機能している事を予想した。これは生物進化上、光合成生物の出現以前にカルビンサイクルの原型が完成していたことを示唆するもので、アーキアからの光合成生物進化を議論するうえで、重要な知見になることが期待される。

archaea, phosphoribulokinase, Calvin cycle

講演番号：3A15p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ A 校舎 15 会場

サクラ周辺環境より単離された *Pseudomonas* sp.のクマリンの代謝
Coumarin metabolism of *Pseudomonas* sp. isolated from a herbivore insect larva on a cherry leaves.
○田村 駿、島崎 真実、今井 政裕、米山 恵介、岡田 貴博、清水 文一（東洋大生命）
○ Shun TAMURA, Mami SHIMAZAKI, Masayuki IMAI, Keisuke YONEYAMA, Takahiro OKADA, Bun-ichi SHIMIZU (Toyo Univ.)

【目的】
サクラの葉には芳香性を示すクマリンの前駆体が蓄積する。クマリンは、抗菌・抗酸化活性を示し、植物の防御物質の一種であると考えられている。
サクラの葉は秋から冬にかけて落葉し、葉に含まれるクマリンがサクラの周辺環境に供給されるが、土壌中においてクマリンの蓄積は見られない。サクラ周辺の環境中にはクマリンを分解するなんらかの機能が存在していると考えられるが、クマリンの動態については不明である。
サクラの葉を食害するアメリカシロヒトリ(*Hyphantria cunea*)幼虫のフンより単離した *Pseudomonas taiwanensis* のクマリンの代謝を HPLC で追跡した。時間の経過とともに添加したクマリンの含有量が減少する一方で、培養前には見られなかった melilotic acid (2-hydroxyphenylpropionic acid) が生じることを昨年の日本農芸化学会大会で報告した。
本研究では、本菌における melilotic acid の代謝をさらに解析した。また、サクラ周辺環境からのクマリン代謝微生物の単離を進めたので報告する。

【結果】
本菌での代謝を HPLC にて追跡したところ、melilotic acid の次の代謝物と考えられるピークを確認した。この代謝物を LC-HRMS を用いて質量分析したところ m/z = 181.0533[M-H]$^-$で、組成式は $C_9H_{10}O_4$ と考えられた。これは、melilotic acid に酸素原子が 1 つ導入されたものと予想された。酸素が導入された部位を確認するため、代謝物の単離・精製を行い ^{1}H、^{13}C-NMR を用いて代謝物の構造決定を行った。
また、1、5、10 mM のクマリンを含むそれぞれの培地を用いて、サクラの葉、樹皮および土壌からさらにクマリンを炭素源として生育できる微生物を単離した。これら微生物を 16S rRNA 部分塩基配列比較によって同定を行った。その結果、*Pseudomonas* sp.に加えて *Klebsiella* sp.を単離・同定した。

Coumarin, *Pseudomonas* sp., Melilotic acid

講演番号：3A15p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ A 校舎 15 会場

海洋性アルケン資化性菌によるエポキシアルカン代謝について

Epoxyalkane metabolism in marine alkene-assimilating bacteria

○古松 星来[1]、矢澤 友規[2]、鈴木 敏弘[3,4]、布施 博之[2] ([1]芝工大院・シ理工・シ理工、[2]芝工大・シ理工・生命、[3]芝工大院・地域環境、[4]筑波大・生命環境)
○Seira FURUMATSU[1], Tomoki YAZAWA[2], Toshihiro SUZUKI[3,4], Hiroyuki FUSE[2] ([1]Grad. School of Eng. and Sci., Shibaura Inst. Tech., [2]Shibaura Inst. Tech., [3]Grad. School of Regional Environ. Syst., Shibaura Inst. Tech., [4]Tsukuba Univ.)

【目的】エチレンやプロピレン等のアルケン化合物は、化学工業分野において多く利用されている。これらの物質は、アルケン資化性菌の持つアルケン代謝経路において、初発酸化酵素によりアルケンがエポキシ化され、生じたエポキシアルカンは Epoxyalkane Coenzyme M Transferase（EaCoMT）により Coenzyme M（CoM）が付加されることが報告されている。本研究室が海洋からの単離に成功した、海洋性プロピレン資化性菌 PE-TB08W 株と、海洋性エチレン資化性菌 ETY-M 株、ETY-NAG 株においても、代謝経路内において EaCoMT に関連する遺伝子の存在が明らかとなっている。プロピレン代謝においては光学活性体が存在するため、活性体の利用の面からも興味が持たれる。PE-TB08W 株は短鎖炭化水素では、プロピレン、n-ブタン、1-ブテンを資化し、ETY-M 株、ETY-NAG 株についてはエチレンを資化するということが明らかとなっている[1), 2)]。本研究では、海洋性プロピレン資化性菌 PE-TB08W 株、海洋性エチレン資化性菌 ETY-M 株、ETY-NAG 株の EaCoMT の反応について検討を行うことを目的とした。
【方法と結果】EaCoMT の活性を確認するために、まず各菌株より EaCoMT をコードする遺伝子を PCR により増幅し、その遺伝子をベクターに組み込み、大腸菌にて発現させた。ベクターは、PE-TB08W 株には pET32b を、ETY-M 株、ETY-NAG 株には pET15b を使用した。大腸菌は、DNA クローニングには *E. coli* DH5α 株を、発現には *E. coli* BL21（DE3）株を使用した。SDS-PAGE を行い、発現の確認をした。その後、EaCoMT の活性を、ガスクロマトグラフィーを使用し、基質の減少を測定することで確認した。基質には、プロピレンオキシドの他に、酸化アルケン数種を使用した。その結果、PE-TB08W 株由来の EaCoMT を含むサンプルでは、基質の減少が確認された。また、プロピレンオキシドを R 体、S 体に分けて測定を行った結果、S 体よりも R 体の方が反応速度が速いということが明らかとなった。さらに、エチレン代謝経路に関係しているであろうエチレンオキシドについても活性測定を行った結果、基質の減少が確認され、PE-TB08W 株由来の EaCoMT は、本来の代謝経路における基質以外にも反応を示すことが判明した。現在、海洋性エチレン資化性菌 ETY-M 株、ETY-NAG 株においても、EaCoMT の発現と活性測定を行っている。

【参考文献】 1) 2012 年度農芸化学会大会発表
2) Suzuki et. al., (2012) Microbes Environ 27:54-60

Epoxyalkane coenzyme m transferase, Propylene, Ethylene

講演番号：3A15p23
講演日時、会場：3 月 29 日 17:59～ A 校舎 15 会場

沖縄からの酢酸菌のスクリーニングとピロロキノリンキノン生産条件の検討

Screening of acetic acid bacteria from Okinawa which produce high amount of pyrroloquinoline quinone and examination of culture conditions

○又吉 智尋（琉球大院農）
○CHIHIRO MATAYOSHI (Univ. Ryukyus)

【目的】酢酸菌は食酢を初めソルボースやケトグルコン酸などの有用物質を生産する発酵微生物である。Pyrroloquinoline quinone (PQQ)は酢酸菌のペリプラズム側に面する膜結合型脱水素酵素の補酵素であり、抗酸化作用などの生理活性を示すことから、日本国内においては化粧品に添加され販売されるなど注目が集まっている。現在、PQQ はメタノールを原料にメタノール資化性菌により発酵生産されている。PQQ を食品添加物として応用するには、メタノール資化性菌よりも食経験のある酢酸菌を使用する方が好ましいが、メタノール資化性菌が約 300 μM の PQQ を生産するのに対し、酢酸菌標準株の PQQ 生産量は約 0.1 μM 程度である。そこで、沖縄由来の植物サンプルから単離した酢酸菌の中から PQQ 生産能力の高い酢酸菌を選抜し、培養条件を検討して酢酸菌による PQQ 生産を目的に研究を行った。

【方法】沖縄県産の植物サンプルから酢酸菌の単離を試みた。エタノールの酸化能力の高い *Acetobacter* 属用には 4%または 6% ethanol、もしくは 2%または 4% acetic acid を用いて、糖や糖アルコールの酸化能力の高い *Gluconobacter* 属用には 0.1% yeast extract、0.1% peptone、1% D-mannitol/D-sorbitol を含む pH4.0 の培地を用いてそれぞれ集積培養を行い、培養液を寒天培地上にスプレッドし、形成されたコロニーから生酸性の高いコロニーを酢酸菌候補株として単離した。PQQ 生産用合成培地には glutathione 65 μM、glycerol 54 mM、L-glutamate 32 mM、KH_2PO_4 15 mM、K_2HPO_4 12 mM、$MgSO_4$ 0.8 mM、$FeSO_4$ 36 μM、NaCl 0.17 mM、$MnSO_4$ 45 μM、thiamine hydrochloride 1.2 μM、nicotinic acid 3.3 μM、calcium(+)-pantothenate 0.84 μM、*p*-aminobenzoic acid 0.73 μM を用いた。培地上清中の PQQ 生産量は、アポ型のグルコース脱水素酵素を用いた酵素法で測定した。酢酸菌候補株の菌株同定は、一般に細菌全般に用いられている 27f と 1492r の 2 つのプライマーを用いて PCR 反応で増幅させた DNA 断片を直接塩基配列を決定して、得られた 16S rRNA の遺伝子配列をもとに決定した。

【結果】沖縄由来の植物サンプル 154 種から酢酸菌候補株を 348 株単離した。酢酸菌候補株の中から 0.3 - 0.5 μM 程度の PQQ 生産量を示した株を 4 株選抜した。16S rDNA 遺伝子解析で 4 株とも *Gluconobacter frateurii* と 99%相同と同定された。選抜した 4 株の中から 33S2-1 株を用いて合成培地の各成分の濃度検討を行ったところ、L-glutamate 濃度を 128 mM、KH_2PO_4濃度を 18 mM、K_2HPO_4 濃度を 14 mM、L-tyrosine 濃度を 0.6 mM、glutathione 濃度を 0 mM に変更することで PQQ 生産量を約 1 μM まで増加させることができた。

acetic acid bacteria, pyrroloquinoline quinone, PQQ production

講演番号：3B02a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ B 校舎 02 会場

高温気流によるそば粉の加熱殺菌処理

Heat sterilization of soba flour with high temperature air

○森川 卓哉[1]、盛内 成貴[2]、伊藤 綾香[2]、三浦 靖[1,2]、廣瀬 宏一[3]、船崎 健一[3]、齋藤 和良[4]、川端 實[5] ([1]岩手大三陸水産研究センター、[2]岩手大農、[3]岩手大工、[4](株)平岩鉄工所、[5](株)川喜)
○Takuya MORIKAWA[1], Nariki MORIUCHI[2], Ayaka ITO[2], Makoto MIURA[1,2], Koichi HIROSE[3], Ken-ichi FUNAZAKI[3], Kazuyoshi SAITO[4], Minoru KAWABATA[5] ([1]SFRC, Iwate Univ., [2]Fac. of Agri., Iwate Univ., [3]Fac. of Eng., Iwate Univ., [4]HIRAIWA IRON WORKS Co., Ltd, [5]KAWAKI Co., LTD)

【背景・目的】そば粉や小麦粉などから製造される生麺は，原料粉体中に存在する微生物によってその保存期間が制限されるため，エタノール製剤を添加して販売されるのが一般的である。しかし，アルコール臭により本来の風味が損なわれているため，原料粉体の風味や特性を損なうことなく殺菌できる装置が必要であるが，十分な性能をもつ殺菌装置は現存しない。そこで，本研究では，高温気流を利用して対象の理化学的品質を保持しつつ高効率で殺菌する粉体用連続式殺菌装置を開発するために，最適な殺菌条件を検討した。
【方法】フンケンオートフィーダー (FS-SJ2-SP，粉研パウテックス㈱)を用いて，気流式粉体用殺菌装置 (HTD-202Labo，平岩鉄工所㈱) にそば粉を供給して加熱殺菌処理した。装置の気流温度 (試料捕集管手前の温度) を 140, 160,180ºC, 加熱殺菌処理パス数を 1～5 回, 空気流量 (ブロワー吹出圧) を 6.0, 12.0kPa に設定して加熱殺菌処理した。試料中の一般生菌，大腸菌，大腸菌群，黄色ブドウ球菌，セレウス菌の生菌数を測定するとともに，水分含量，水分活性，匂い特性 (におい識別装置 FF-2020, ㈱島津製作所)，色特性，デンプン糊化特性を測定し，加熱殺菌処理試料と無処理試料の理化学的品質を比較した。
【結果・考察】試料中の一般生菌数は，気流温度よりも加熱殺菌処理パス数の増加に依存して減少した。また，同一の気流温度・加熱殺菌処理パス数の場合に，空気流量が少ない (加熱殺菌装置内の滞留時間が長い) 条件で，より高い殺菌効果が得られた。大腸菌，大腸菌群に対しては，すべての加熱殺菌処理条件で生菌数が 300 CFU/g 以下になった。黄色ブドウ球菌は，すべての加熱殺菌処理条件で検出されず，セレウス菌は，加熱殺菌処理パス数および気流温度に伴って生菌数が減少した。加熱殺菌処理に伴う試料の理化学的品質の変化を検討したところ，気流温度および加熱殺菌処理パス数の増加に伴って色度は青色から黄色方向へ変化し，水分含量が減少する傾向が見られた。気流温度よりも加熱殺菌処理パス数や空気流量といった要因が匂い特性に影響を及ぼしたことから，これらの調整によって匂い特性の変化を軽減することができると考えられる。以上の結果から，気流温度 160ºC，加熱殺菌処理パス数 3 回，ブロワー吹出圧 6.0kPa での加熱殺菌処理が，殺菌と理化学的品質の保持を両立させるのに適していた。当該条件で加熱殺菌処理したそば粉から調製した日本そばの理化学的特性，外観，風味および食品テクスチャーについても報告する。
*本研究は，JST 平成 24・25 年度復興促進プログラム (マッチング促進) により実施された。

heat sterilization, soba flour, Japanese noodle

講演番号：3B02a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ B 校舎 02 会場

ヤーコンの加熱・凍結処理における物性および構造変化

Changes of texture and micro structure of yacon after heating and freezing process

春田 直樹、○石田 信昭 (石川県立大学)
Naoki Haruta, ○Nobuaki Ishida (Ishikawa Prefectural University)

【目的】ヤーコンは南米原産のキク科のいもで、炭水化物をデンプンではなくフラクタンとして貯蔵する。フラクトオリゴ糖やポリフェノールを多く含むため、甘みもあり機能性も期待される野菜であるが、貯蔵性が悪く利用にとっての妨げとなっている。ここでは、ヤーコンの保存として冷凍貯蔵を行うことを目的として、レオメーターおよびNMR制限拡散測定により加熱および凍結によるヤーコンの物性と細胞構造変化を検討した。

【方法】3cmx3cmx1cmに切り出したヤーコンを、60～100℃で10分間加熱した後、-30℃のフリーザーに入れ5日間貯蔵後、室温で解凍して物性および細胞構造の変化を調べた。物性はレオメーターにより2mmおよび5mm陥入させた時の加重の変化で、細胞構造の変化はNMR（JEOL ECX400:400MHz）による細胞内の水の制限拡散の変化として捉えて比較した。制限拡散の測定は、各種処理をした試料を円柱状に切り抜き、径10mmのNMR試料管に入れ、拡散時間50ms～1sにおける見かけの拡散係数の変化を求めた。

【結果】ヤーコンに含まれている多糖はデンプンではないため、ジャガイモのように加熱することにより軟化することが少なく、加熱後もしゃきしゃきとした独特の歯触りを持つ。レオメーターの最大荷重値は加熱温度が高くなると低下していくが、低下の程度は少なかった。生のヤーコンを凍結するとそのような物性はなくなり、レオメーターの最大荷重は2mm陥入時で40Nから13Nへと1/3に低下するとともに、スポンジのような物性となった。加熱後の凍結では、60，70℃処理後の凍結では解凍後の硬さは生よりさらに低下するが、それ以上温度を上げると凍結後の硬度は高くなり、100℃では凍結前とほとんど変わらない硬さとなった。

このときの細胞破壊の様子をNMR制限拡散で調べると、生のヤーコン組織は拡散時間が長くなるにつれて見かけの拡散係数が低下していく制限拡散を示すが、加熱温度70℃以上では制限拡散の程度が少なくなり、自由拡散に近づいていた。生および加熱後の凍結では、解凍後の組織は拡散時間によらずほとんど同じ拡散係数の値を示し、限りなく自由拡散に近づいていた。

ヤーコンの品質でもう一つ問題となるのはポリフェノールの酸化による褐変である。生の試料では50分の放置で若干黒ずんでくるが、生を凍結・解凍すると激しい褐変を生じるようになった。加熱処理を行った後の凍結では、80℃処理ではまだ激しい褐変を生じるが、100℃で処理することにより抑えることができた。

Yacon, Freezing, NMR

講演番号：3B02a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ B 校舎 02 会場

魚肉の鮮度低下が凍結時の氷結晶形態に及ぼす影響

The Effects of Freshness on the Ice crystal Morphology in Frozen Fish Tissue

○小南 友里、渡辺 学、鈴木 徹（東京海洋大学）
○Yuri KOMINAMI, Manabu WATANABE, Toru SUZUKI (Tokyo Univ. of Marine Sci. & Tech.)

【目的】

魚肉は畜肉よりも死後変化の進行が速く、すなわち鮮度の低下が速いといえる。これまでに、鮮度が低下した魚肉では凍結時の氷結晶が顕著に粗大化し、また細胞外で氷結晶が成長し易いことが報告されている。鮮度低下に伴って生じる組織構造変化が氷結晶生成過程に大きな影響を及ぼしていると予想される。そこで、本研究では鮮度低下に伴う結合組織や保水力の変化と凍結時の氷結晶生成の関係について検討した。

【方法】

活マアジ(*Trachurus japonicus*)を試料に用いた。活マアジを延髄切断によって即殺し、直ちに三枚に卸した。皮を取り除き、背側筋肉のみを使用した。得られた組織について、ATP 関連物質の抽出・分析、アルカリ水浸軟法による結合組織の SEM 観察、遠心法による筋肉組織の保水力評価及び凍結試験を行った。凍結試験では 5×2×1cm 程度に切り出した組織をラップフィルムで包み中心部に熱電対を挿入して、温度計測を行いながら凍結に供した。凍結した試料は液体窒素中で割断し、クライオコーティング法による凍結組織内氷結晶痕観察を行った。また、即殺後 4℃で 1 日ないしは 2 日保存した魚体についても上記の実験操作を行った。

【結果】

即殺後、保存に伴ってマアジ筋肉組織内の ATP 量が減少し、ATP 分解生成物の増加が確認された。しがって鮮度が低下していたといえる。また、結合組織の SEM 観察では保存日数が長いほど結合組織の構造が粗くなっている様子が観察され、筋肉組織の保水力評価では保存日数に伴う保水力低下がみられた。すなわち、鮮度の低下に伴って組織の崩壊が進行していたといえる。そして、凍結組織については魚肉の鮮度が低下するほど氷結晶が大きく成長し、氷結晶により多くの細胞が断裂している様子が観察された。さらに、画像解析より魚肉の鮮度が低下するにつれて凍結時に生成する氷結晶の数が減少し、平均サイズが大きくなることが定量的に示された。これらの結果から、魚肉の鮮度低下に伴う結合組織の脆弱化と保水力の低下が凍結時の氷結晶生成に大きく影響を及ぼしていることが示唆された。

Freezing, Ice Crystal, Fish

講演番号：3B02a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ B 校舎 02 会場

小麦デンプン発酵過程の微生物叢とアミラーゼ生産菌の探索

microbial flora of the fermented wheat starch and screening of amylase producing bacteria

○野口 治子、内野 昌孝、高野 克己（東京農大応生・化学）
○Haruko NOGUCHI, Masataka UCHINO, Katsumi TAKANO (Tokyo Univ. Aguric.)

【目的】　発酵小麦デンプンとは、グルテン製造の副産物であるデンプンを約一年半発酵させたものであり、「久寿餅」の原料として利用されている。デンプン発酵過程は pH3～4 の酸性条件であり、発酵中にはデンプン粒の一部が崩壊する様子が観察されている。このような発酵中のデンプンの変化が糊化特性やゲル化特性に影響することで、久寿餅に特有なもっちりとした弾力のある食感が付与されると考えた。本研究では小麦デンプンの発酵に対する微生物の関与を明らかにすることを目的として、発酵過程における微生物叢を調べ、デンプン分解能を有する微生物のスクリーニングを行った。
【方法】　小麦デンプンの各発酵過程（未発酵、前発酵、発酵 1 日、発酵 2 ヶ月、12 ヶ月、完成品）より試料を採取した。一般細菌、乳酸菌、カビ・酵母の生菌数を SYP 寒天培地、MRS 寒天培地、RBC 寒天培地を用いて測定した。デンプンを含む SYP 寒天培地（pH6.0 および 3.5）にて培養後、培地をヨウ素染色しハロー形成の有無によりデンプン分解菌をスクリーニングした。ハロー形成した株については Blue-value 法にてα-アミラーゼ活性を測定した。生デンプン分解試験も行った。活性測定において強い活性を示した株については、16S rRNA によるシーケンス解析にて微生物種の同定を試みた。
【結果および考察】　各過程の生菌数は、一般細菌とカビ・酵母は $10^{3\text{-}4}$ cfu/ml であり発酵期間に伴う変化はみられなかった。一方、乳酸菌のみ 0～10^4 cfu/ml と変化がみられたが発酵期間との関連性はみられなかった。pH6.8 の SYP 寒天培地にて 83 株でハロー形成し、pH3.5 に調整した培地では 57 株でハロー形成が観察された。分離した 83 株の培養液を用いてアミラーゼ活性を測定したところ、pH6.8 および pH3.5 において全ての分離株で活性があることを確認した。実際の発酵環境に近い 15℃にて測定したところ pH6.8 において約半数の株が活性を示し、これらは pH3.5 においても活性を有することを確認した。発酵 12 ヶ月より分離した株が最も多く、活性の強い株も多くが 12 ヶ月より分離されていたものであった。活性の強い 21 株についてシーケンス解析した結果、*Bacillus* 属、*Paenibacillus* 属、*Lysinibacillus* 属、*Stenotrophomonas* 属と高い相同性を示した。
　発酵過程よりアミラーゼ生産菌を分離し、それらが実際の発酵環境に近い低温、低 pH においても活性を示すことから、これらの細菌が発酵小麦デンプンの形成に関与していると推察された。

wheat starch, fermentation, amylase

講演番号：3B02a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ B 校舎 02 会場

どぶろくの醸造に対する柿渋の作用
Effect of Kakishibu (Tannin of Persimmon) on Fermentation of A Raw Sake
○馬路 泰藏[1]、馬路 明子[2]、酒向 嘉彦[3]（[1]修文大学健康栄養、[2]床下からみた白川郷事務局、[3]松井屋酒造場）
○Taizou Maji[1], Akiko Maji[2], Yoshihiko Sako[3]（[1]Shubun Univ., [2]"The Unknown History of Shirakawago" Bureau, [3]Matsuiya SAKE Brewery Museum）

どぶろくとは、日本酒を製造する際、原料である蒸し米や米麹を除いていない醪の状態の酒を指す言葉である。酒類が豊富に流通していなかった高度経済成長期以前において、多くの家庭で自家消費用のどぶろくが製造されていたことは周知の事実である。しかし、日本では、自家消費用であっても家庭内で製造したどぶろくも密造酒として国税庁に摘発される。そのため、家庭内で伝承されてきたどぶろくの作り方を自ら公にすることはあり得ず、その醸造技術の詳細はほとんど知られないまま放置されてきた。

演者らは、山間地域でどぶろくの醸造法について、聞き取りをすることができた。その結果、どぶろくの醸造には、柿渋を塗った専用の桶を使い、他の用途の桶を使うことはない。柿渋を桶に塗ることは漏水を防ぐためと理解していたので、戦後になって「ポリバケツ」を使ったところ、うまくどぶろくができなかったとのエピソードを聞くことができた。日本酒の醸造の場では、醪の搾り袋を柿渋で染めること、清酒の滓引きに用いられることはよく知られている。さらに、冬の酒造りの契約依頼の意味で、夏場に杜氏が醪の搾り袋を柿渋で染める木桶や小道具類、室の中の床や壁にも柿渋を塗ることが、江戸期から酒造業で行われていた。これらのことは、柿渋が醪（濁酒）の発酵に何らかの作用を持っていることを示唆するものである。そこで、どぶろく醸造時における柿渋の効果について、柿渋を塗布した容器を塗布しない容器を比較することによって検討し、以下の結果を得た。

柿渋の塗布の有無にかかわらず、すべての醪がエタノール発酵を起こした。しかし、柿渋を塗布しない容器の醪は、早くから腐敗臭を生じ、青色のカビのコロニーが発生した。これに対し、柿渋を塗布した容器では、醪に腐敗臭が生じず、青色のカビのコロニー発生が認められなかった。さらに、エタノール発酵の対数期には醪のｐＨの低下を抑制した。このように、柿渋はどぶろくを好ましい性状に保つ効果を持っていた。この柿渋の効果は、有害な微生物の生育を抑制する作用によるものと思われた。

Persimmon, Tannin, Raw sake

講演番号：3B02a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ B 校舎 02 会場

石川県産発酵食品からの抗菌物質生産乳酸菌の分離および抗菌物質の性質決定

Isolation of lactic acid bacteria producing antimicrobial substances from the fermented food made in Ishikawa Prefecture, and characterization of those substances

○辻 篤史[1]、井上 智実[1]、道畠 俊英[1]、小柳 喬[2] ([1]石川工試、[2]石川県大・生資環)
○Atsushi TSUJI[1], Tomomi INOUE[1], Toshihide MICHIHATA[1], Takashi KOYANAGI[2] ([1]Ind. Res. Inst. for Ishikawa, [2]Ishikawa Pref. Univ.)

【背景】

近年, 各地域に固有の発酵食品中に様々な生理活性物質を生産する乳酸菌が存在することが報告されている。発表者らはこれまで，石川県産の発酵食品から種々乳酸菌を分離してその生理機能の評価を行い，地域乳酸菌のライブラリを作製してきた。本研究では，乳酸菌ライブラリより抗菌物質生産株を探索し，イカ黒作り（イカ塩辛にイカ墨を混合した食品）由来でバクテリオシン様抗菌物質を生産する乳酸菌を見出した。また，この乳酸菌の生産する抗菌物質について，各種の性質決定を行ったので報告する。

【方法・結果】

石川県で製造された発酵食品から分離した乳酸菌約 200 株の培養上清を使用し，代表的な食品汚染微生物である枯草菌 *Bacillus subtilis*, 腸球菌（乳酸菌）*Enterococcus faecalis*, 表皮ブドウ球菌 *Staphylococcus epidermidis* に対して抗菌活性を示す乳酸菌株をハロー法により探索した。その際，食品への利活用を考慮し，中性付近においても活性を示す菌株を選抜するために，乳酸菌培養後に pH を 6.5-7.0 に調整した培養上清を抗菌試験に用いた。その結果，イカ黒作り由来の乳酸菌株（I106 株）の培養上清が *E. faecalis* に対して高い抗菌活性を示した。16S rDNA シーケンス解析の結果，I106 株は *Enterococcus faecium* との高い相同性が認められた。

I106 株培養上清の性質検討を行った結果，上清に存在する抗菌物質は，プロテアーゼ処理により抗菌活性が消失することからタンパク（ペプチド）性であることが明らかとなった。限外ろ過膜（分子量 3,000）を通過させた上清においても抗菌活性は消失したことから，有機酸等の乳酸菌が一般的に生産する低分子化合物ではないことが示唆された。また，100ºC で 5 分間の加熱後，冷蔵または冷凍での 1 ヶ月以上の保存後も抗菌活性は同等レベルを保持した。さらに，培養上清の各種グラム陽性・陰性細菌に対する抗菌スペクトルを調査した結果，中性付近において，*Enterococcus* 属以外に *Listeria innocua*， *Bacillus coagulans* に対して高い抗菌活性を示し，Class IIa に属するバクテリオシンであると推定された。

lactic acid bacteria, antimicrobial substance, fermented food

講演番号：3B02a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ B 校舎 02 会場

食中毒菌の毒素産生および活性に対するカテキン類の抑制効果

Screening of catechins for inhibitory effects on the biological activity and production of staphylococcal enterotoxin A

○杉山 由華[1]、島村 裕子[1]、浅川 倫宏[2]、菅 敏幸[2]、増田 修一[1]([1]静岡県立大学　食品栄養科学部、[2]静岡県立大学　薬学部)
○Yuka SUGIYAMA[1], Yuko SHIMAMURA[1], Tomohiro ASAKAWA[2], Toshiyasu KAN[2], Syuichi MASUDA[1] ([1]Department of Food and Nutritional Sciences,University of Shizuoka, [2]Department of Pharmaceutical Sciences,University of Shizuoka)

【目的】近年、我が国の衛生環境はかなり改善されているが、黄色ブドウ球菌や腸管出血性大腸菌 O-157、O-111 等による食中毒事故の発生が社会問題となっている。食中毒菌の汚染防止策として、抗菌成分や抗生物質が利用されているが、それらの濫用により生態系に影響を及ぼし、有益菌まで殺菌してしまう問題点があることから、殺菌作用を示さず毒素の活性のみを阻害する方法が求められている。本研究では、毒素型食中毒起因菌である黄色ブドウ球菌の毒素産生および活性に対するカテキン類（EC、EGC、ECG、EGCG、テアビゴ（三栄源エフ・エフ・アイ株式会社より供与））およびメチル化カテキン類（EGCG3”Me、EGCG4”Me、EGCG5”Me）の抑制効果について検討した。
【方法】*Staphylococcus aureus* C-29 (staphylococcal enterotoxin A (SEA) 産生、ヒト分離株）に対して殺菌作用を示さず、毒素の活性のみを阻害または産生を抑制するカテキン類およびメチル化カテキン類の濃度を決定するために、各試料の抗菌活性を調べ、以下の試験において抗菌活性を示さない濃度で用いた。SEA 産生に対する影響を評価するために、カテキン類（終濃度: 0.03～3.0 mM）を *S. aureus* C-29 (終濃度: 10^3～10^4 CFU/mL）と混合し、37 °C で 24 時間培養後、ウエスタンブロット法により SEA 量を測定した。また SEA との結合親和性を調べるために、SEA (終濃度 9 μg/mL）とカテキン類（終濃度: 0.3～3.0 mM）を混合し、37 °C で 24 時間反応させた後、ウエスタンブロット法により SEA 量を測定した。SEA と結合親和性を有した試料については、マウス脾臓細胞を用いて、毒素活性阻害能を検討した。
【結果および考察】抗菌活性を示さない濃度の試料を添加した培地で *S. aureus* C-29 を培養し、ウエスタンブロット法で SEA を定量した結果、EC を除く全てのカテキン類およびメチル化カテキン類において、終濃度 3.0 mM で SEA のバンド強度の減弱または消失が認められた。これらの試料と SEA 分子との結合親和性をウエスタンブロット解析によって調べた結果、EGC、ECG、EGCG、EGCG4”Me およびテアビゴの 5 試料が SEA との結合親和性を有した。これら 5 試料の毒素活性阻害能を調べた結果、全ての試料が SEA の毒素活性を有意に抑制した。以上の結果より、ガレート型カテキン類は、SEA との結合親和性が高く、強い毒素活性阻害能を有し、また、メチル化カテキンのメチル基の位置が SEA との結合親和性に関与する可能性が示唆された。現在、各試料の SEA 遺伝子発現への影響について検討中である。本研究は、財団法人日本食品化学研究振興財団の助成を受けたものである。

Staphylococcal Enterotoxin A, catechin, methylated catechin

講演番号：3B02a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ B 校舎 02 会場

E.coli O157 :H7 の生育に対する各種食品添加物の影響
Effect of food additive on growth of *E.coli* O157:H7
○河村 沙也加[1]、内野 昌孝[2]、高野 克己[2] ([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・化学)
○ Sayaka KAWAMURA[1], Masataka UCHINO[2], Katsumi TAKANO[2] ([1]Agrichem.,Agr.,Grab.Sch.,Tokyo Univ.Agric., [2]Dept. Appl. Biol. Chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric.)

【目的】日本の食中毒患者数は、近年の 20 年間において毎年 20,000 人を下回ることはなく、その中でも腸管出血性大腸菌による食中毒は過去 2 年間で死亡者が出ている。これまでに確認された同食中毒発生の原因には牛肉や同加工品だけでなく、井戸水やサラダ、カイワレダイコン、白菜漬け、メロンなど、一般的な食品も挙げられるなどのことから、同リスク低減のため、病原性大腸菌の制御は重要である。

そこで本研究では、病原性大腸菌制御に効果的な食品添加物の検索のため、食品添加物 32 種について、抗菌性の確認を複数の方法を用いて検討した。

【方法】供試菌には *E. coli* O157：H7 株を用いた。抗菌性の確認は以下の方法にて行った。A. 直接滴下：10^6CFU/ml となるように調整した菌液 100ul を TSA に塗沫した。その後、試験水溶液を 50ul 滴下し、30℃および 37℃でそれぞれ一晩培養後、供試菌の発育度合を観察し、抗菌性を確認した。B. ペーパーディスク法：10^6CFU/ml となるように調整した菌液 100ul を TSA に塗沫した。試験水溶液を抗生物質検定用ろ紙 13mm(Whatman)に染み込ませ、それぞれ培地の上に静置し、上記と同条件で培養後ろ紙周辺の阻止円を観察し、抗菌性を確認した。C. アガーウェルディフュージョン：各供試菌を 10^6CFU/ml となるように 0.75%TSA で調整し、これを TSA に重層した。寒天が固化後、直径 1cm のコルボーラーで上層部をくり抜き、ここに試験水溶液を 50µl 加え、上記条件で培養後阻止円の大きさを観察し、抗菌性を確認した。

【結果】各種試験方法を用いて抗菌性の確認を行った結果、柿抽出物、グレープフルーツ種子抽出物、グローブフレーバー、タイムフレーバーおよびε-ポリリジンで効果が確認された。アガーウェルディフュージョンによる抗菌性では、阻止円の大きさはグレープフルーツ種子抽出物、タイムフレーバー、クローブフレーバー、柿抽出物、ε-ポリリジンの順で大きくそれぞれ、20.0、13.9、8.4、8.4、7.8(mm)であった。グレープフルーツ種子抽出物は、無色透明で効果を示した濃度では匂いもほぼ確認できなかった。フレーバー類では効果を示す濃度ではハーブ特有の匂いが強く感じられた。

E.coli O157 :H7, antibacterial, foodadditives

講演番号：3B02a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ B 校舎 02 会場

高圧処理したミミズに含まれる各種酵素活性及び生菌数変化について

Enzyme activities and viable bacterial count in pressure-treated earthworm

○赤澤 真一[1]、徳山 遥香[1]、横山 圭佑[1]、渡邉 俊則[2]、脇本 真之介[2]、金子 信博[3] ([1]長岡高専物質工、[2]ワキ製薬、[3]横国大環境情報)
○Shin-ichi AKAZAWA[1], Haruka TOKUYAMA[1], Keisuke YOKOYAMA[1], Toshinori WATANABE[2], Shinnosuke WAKIMOTO[2], Nobuhiro KANEKO[3] ([1]Nagaoka Natl. Col. Tech., [2]Waki Pharm., [3]Yokohama Natl. Univ.)

【目的】近年，食品に圧力をかけた際の機能性の変化が注目されており，高圧の活用は食品の加工やサプリメントへの応用など，様々な事に応用されている．我々が研究対象としているミミズは古くからコンポスト等へ利用されており，強力な糖質加水分解酵素群やプロテアーゼ等様々な機能性酵素群を有する事が明らかとなっている．我々はこれまでにエンド-1,4-β-グルカナーゼ（EG）2 種を見出し，その内の 1 種はシロアリ等と比較しカルボキシメチルセルロース（CMC）に対し高い比活性を有する事[1)]やα-アミラーゼが低温で高活性である事[2)]等を明らかにしてきた．また一方で，ミミズにはバイオマス資化酵素群だけでなく，血栓分解酵素ルンブルキナーゼの存在が知られており，凍結乾燥粉末は健康食品としても市販されている．しかしながら，ミミズを高圧処理し食品加工に利用しようとした例はない．そこで本研究では，用いたミミズを同定し，ミミズを高圧処理し食品加工に利用出来るか検討すると共に，ミミズが有する様々な機能性酵素群の圧力依存性を明らかにする事を目的とした．
【方法】ミミズの同定は形態観察と動物のバーコーディングで一般的に用いられているミトコンドリアのチトクロム C 酸化酵素サブユニット I（COI）遺伝子を増幅するプライマーセットを用いて系統解析を行う事により行った．ミミズに対する圧力処理は以下のように行った．体内の土を排出させたミミズを水洗後，イオン交換水を加えミキサーで破砕し，破砕液を作製した．その後遠心分離を行い上清をプラスチックバックに分注し，様々な温度・圧力で圧力処理を行った．圧力処理後の溶液を遠心分離し，上清を圧力処理溶液として様々な酵素活性を測定した．また，食品加工への応用を考え生菌試験も行った．
【結果・考察】形態観察と系統解析の結果から，本研究で用いたミミズはシマミミズ *Eisenia fetida* であった．圧力処理による様々な酵素の圧力依存性について検討したところ，50°C，200 MPa までの処理においてはβ-グルコシダーゼ活性が減少したが，ルンブルキナーゼは活性が約 1.6 倍に亢進した．また，圧力処理後の溶液を用いて生菌試験を行ったところ，大腸菌，一般細菌数ともに大きく減少した．以上の事から高圧処理はミミズの食品加工に有効である事が明らかとなった．

[1]赤澤 真一，横山 圭佑，五十嵐 佑樹，雪 真弘，森川 康，小笠原 渉．日本農芸化学会．2012 年 3 月．講演番号 3C10p03．京都．
[2]五十嵐 佑樹，雪 真弘，森川 康，小笠原 渉，赤澤 真一．日本農芸化学会．2012 年 3 月．講演番号 2C10p03．京都．

earthworm, fibrinolytic enzyme, high pressure

講演番号：3B02a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ B 校舎 02 会場

中高圧処理による枯草菌の発芽誘導

Germination of Bacillus subtilis induced by medium high hydrostatic pressure

○山本 和貴、森松 和也、鐘 雷、木村 啓太郎、稲岡 隆史（農研機構食総研）
○Kazutaka YAMAMOTO, Kazuya MORIMATSU, Lei ZHONG, Keitarou KIMURA, Takashi INAOKA (NFRI, NARO)

【目的】食品安全性の確保において、芽胞菌が形成する芽胞の制御は極めて重要であるが、中高圧処理で芽胞の発芽を効率的に誘導し、同時に自滅させる自滅的発芽誘導殺菌が有望視されている。芽胞は、発芽すると熱耐性が低く弱い栄養細胞になることが知られているが、芽胞の発芽は一旦開始すると止まらない特性がある。よって、栄養細胞にとって劣悪な環境であっても発芽が止まらないことを利用して、栄養細胞が死滅しうる温度条件で中高圧処理により発芽を誘導し、芽胞を自滅的に発芽させて殺菌することができる。これを自滅的発芽誘導殺菌と呼ぶ。しかしながら、中高圧処理による芽胞の発芽誘導特性及び自滅的発芽誘導について検討した先行研究は十分ではなく、関連する基礎データの蓄積が求められている。そこで、本研究では、芽胞菌の代表として枯草菌を対象とし、中高圧処理による発芽誘導特性について種々の条件で検討した。
【方法】枯草菌として、*Bacillus subtillis* 168 株または ATCC 6633 株を用いた。凍結保存芽胞を芽胞形成液体培地で一晩前培養し、残存する栄養細胞を死滅させるために 65℃で 30 分間加熱した。その後、遠心分離により菌体を 3 回洗浄し、滅菌生理食塩水に懸濁して再度 65 ℃で 30 分間加熱することで芽胞懸濁液とした。芽胞懸濁液を 20 倍量の各種水溶液で希釈した後に、レトルト用透明パウチに密封し、中温中高圧（65 ℃・100 MPa）処理を 30 分間行った。処理後の試料を適宜希釈後、標準寒天培地に塗布し、30 ℃で 24 時間培養することで生菌数を測定した。
【結果】*B. subtilis* 168 株を無栄養液体培地として用いた滅菌生理食塩水に懸濁した場合では、中温中高圧処理を施すことでの芽胞菌数は 3 log (CFU / ml) 程度減少した。また、栄養液体培地として用いた TSB (trypticase soy broth) に懸濁した場合では、中温中高圧処理を施すことで同様に 3 log (CFU / ml) 程度減少した。芽胞は、栄養液体培地のように増殖に有利な好環境で発芽するとされるが、中高圧下では栄養の有無に拘らず、芽胞の発芽が誘導されることが示唆された。一方、*B. subtilis* ATCC 6633 株を TSB に懸濁した場合では、中温中高圧処理を施すことで芽胞菌数は 5 log (CFU / ml) 程度減少し、168 株における効果を上回ったことから、中高圧処理による発芽誘導効果は、菌株により異なることが示された。
【謝辞】本研究は、農林水産省実用技術開発事業 24014 及び同省委託プロジェクト「食品の安全性と動物衛生の向上のためのプロジェクト」の成果の一部を纏めたものである。

Bacillus subtilis, germination, pressure

講演番号：3B02a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ B 校舎 02 会場

ブリ胃廃棄物を用いたチャンジャ様発酵食品

Production of a Novel Fermented Food from Cultured Yellowtail Visceral Waste

○福田 翼、吉山 慧、犬塚 由真、古下 学、芝 恒男、原田 和樹（水大校食品）
○Tsubasa FUKUDA, Akira YOSHIYAMA, Yuma INUZUKA, Manabu FURUSHITA, Tsuneo SHIBA, Kazuki HARADA (National Fisheries Univ.)

【目的】日本で最も養殖漁獲量が多いブリ内臓の廃棄物量は、9,600 t/年と推測される。ブリ内臓廃棄物は有効利用法がなく大半が焼却処分をされている。ブリ内臓廃棄物は筋肉よりも軟らかく遊離アミノ酸量も低いため嗜好性が低い。一方、韓国伝統食品のチャンジャは内臓の中でも比較的硬い胃、特に外皮のみを塩蔵しコチュジャンに漬け込んだ嗜好性の高い高級食品である。また、コチュジャンは麹を用いた唐辛子味噌であり、プロテアーゼなどの酵素を含む。そこで高プロテアーゼ活性のコチュジャンを製造し、ブリ胃廃棄物のチャンジャ様発酵食品への可能性を調査した。
【方法】ブリ胃廃棄物はブリ養殖場（山口県下関市）より入手した。入手したブリ胃廃棄物は真水に数時間含浸後、内皮と外皮に分離した。この分離した胃廃棄物を 20%[w/w]で塩蔵したものを基本条件とした。麹は蒸米に *Aspergillus* 属菌を接種し、30°C で約 48 時間培養したものを利用した。コチュジャン作製は、麹、唐辛子粉末、蒸した糯米、塩を混合し、30°C で発酵させた。チャンジャ様発酵食品は、塩蔵した胃廃棄物をコチュジャンに漬け込み 4°C で熟成させた。
酸性プロテアーゼの活性は Anson-hemoglobin 変法により測定した。酸性プロテアーゼの酵素単位 1 unit は 1 分間に 1 μg のチロシンを遊離する酵素量として、基質 1 g あたりの酵素活性を酵素生産性の指標とした。抗酸化性は、H-ORAC (Hydrophobic Oxygen Radical Absorbance Capacity) 法を用い、ペルオキシラジカル消去活性能で評価した。単位は、μmol トロロックス当量(TE)/100 g で示した。
【結果】*Aspergillus* 属 13 菌株を用いたコウジの酸性プロテアーゼ生産性を調査し、スクリーニングを行った。結果、黄コウジ (269±25.1 U/g -substrate-)、*A. awamori* (102±13.7 U/g -substrate-)、吟クール S (64±16.7 U/g -substrate-)を選定し、さらに韓国の伝統的コウジの Meju (78±2.4 U/g -substrate-)をコチュジャン製造に用いた。コチュジャン熟成期間中の酸性プロテアーゼ活性を調査した結果、いずれのコウジにおいても時間経過と共に活性は減少する傾向が見られた。45 日間熟成したコチュジャンでは、黄コウジ (40±3.6 U/g -substrate-)、*A. awamori* (22±3.3 U/g -substrate-)、吟クール S (25±2.6 U/g -substrate-)および Meju (10±3.6 U/g -substrate-)であった。この時、ORAC 値は Meju (3573±384 μmol TE/100g)が最も高く、黄コウジ(2954±268 μmol TE/100g)、*A. awamori* (2971±267 μmol TE/100g)、吟クール S (2679±187 μmol TE/100g)は同等であった。塩蔵したブリ胃廃棄物の内皮と外皮でチャンジャを製造した結果、いずれの場合も遊離アミノ酸量および ORAC 値の増大が確認された。これらの結果より、ブリの胃廃棄物利用の可能性が示唆され、チャンジャ様水産発酵食品の創生が可能となった。

underutilized fisheries resources, fermented food, filamentous fungi

講演番号：3B02p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ B 校舎 02 会場

デキストランとの多糖修飾による蕎麦全タンパク質の分子表面機能特性の改善

Improving surface functionalities of whole proteins from buckwheat by glycation with dextran

○平林 正大[1]、片山 茂[1,2]、山口 大樹[1]、内堀 友貴[1]、Ntshepisa Lebetwa[2]、田澤 茂[2]、中村 宗一郎[1,2] ([1]信州大農、[2]信州大院農)
○Masahiro Hirabayashi[1], Shigeru Katayama[1,2], Daiki Yamaguchi[1], Yuki Uchibori[1], Lebetwa Ntshepisa[2], Shigeru Tazawa[2], Soichiro Nakamura[1,2] ([1]Shinshu Univ., [2]Graduate school of Shinshu Univ.)

【背景と目的】蕎麦はアレルギー症状が重篤であることから，厚生労働省により表示義務のあるアレルギー特定原材料として指定されている。我々はこれまで，蕎麦アレルゲンの中でも分子量 22kDa のグロブリン Fag e 1 及び分子量 16kDa のアルブミン Fag e 2 に着目し，それらのアレルギー性を低減化しようとする研究を展開してきた[1)]。しかし，実際には Fag e 1 や Fag e 2 以外にも蕎麦アレルギーを惹起するタンパク質は蕎麦中に複数存在していることが推測される。また，蕎麦タンパク質は，アミノ酸バランスが良いことから，アレルギー性を低減化し，乳化性や親水性といった分子表面機能特性を改善することができれば栄養性に富んだ食品素材としての利用が可能となる。本研究は，天然に起こるメイラード反応を利用して蕎麦全タンパク質をデキストラン修飾し新規な栄養機能食材を開発することを目的としている。
【方法】蕎麦粉末に 10 倍量のアセトンを加え十分に脱脂して得られた脱脂蕎麦粉末に 0.5MNaCl 含有 50mM リン酸緩衝液（pH7.5）を加え，4℃で一夜撹拌することによって蕎麦全タンパク質を調製した。蕎麦全タンパク質と平均分子サイズ 6kDa，17.5kDa，40kDa，75kDa 及び 200kDa のデキストランとを所定の比率で混合し，混合溶液は一旦凍結乾燥した。凍結乾燥粉末はシャーレに移し，飽和 KBr 溶液を満たしたデシケータ内（相対湿度 79%）で 60℃にドライヒーティングした。ドライヒーティングによって多糖修飾された蕎麦全タンパク質はサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。遊離アミノ基は TNBS 法によって測定した。アレルギー性の変化は蕎麦アレルギー患者血清を用いてドットブロティング法と QCM 法によって測定した。また乳化性にはコーンオイルを用いた。
【結果】SDS-PAGE の結果，分子サイズの小さいデキストランほど効率よく蕎麦全タンパク質と反応することが示された。蕎麦全タンパク質のアレルギー性は多糖修飾によって著しく低減化していることが明らかにされた。一方，蕎麦全タンパク質の乳化性及び親水性は多糖修飾によって著しく改善されていることが示された。また，有効リジンも高い割合で保存されていることが明らかにされた。以上のことから，今回調製された蕎麦全タンパク質－デキストラン複合体を新しいタイプの栄養機能食材として利用することの可能性が示された。
【文献】1)Suzuki, Y. et al. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 9787-9792, 2009.

surface functionalities, buckwheat whole proteins, glycation

講演番号：3B02p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ B 校舎 02 会場

界面活性を有する米粉由来糖質素材の開発と加工食品への利用効果

The development of the glucide material derived from rice flour having surface activity and use effect to a processed food

○三輪 章志[1]、石崎 佳奈[1]、深山 敏明[1]、三國 克彦[2]、三浦 靖[3]、鈴木 大介[4]、野田 實[5]、小林 昭一[3]([1]石川農林総研、[2]塩水港精糖、[3]岩手大農、[4]敷島製パン、[5]スギヨ)
○Shouji Miwa[1], Kana Ishisaki[1], Toshiaki Miyama[1], Katsuhiko Mikuni[2], Makoto Miura[3], Daisuke Suzuki[4], Minoru Noda[5], Shoichi Kobayashi[3] ([1]Ishikawa AFRC, [2]Ensuiko Sugar Refining Co., Ltd., [3]Iwate Univ., [4]Shikishima Baking Co., Ltd., [5]Sugiyo Co., Ltd.)

【目的】食品業界では、消費者の安全・安心志向から食品添加物の利用を避ける傾向にある。しかし、油脂と水を均質化できる乳化剤は、加工食品の品質を保持・向上するために必要不可欠である。これまで、演者らは、従来の乳化剤に替わる食品素材を開発することを目的に、米粉-油脂-クエン酸混合物を過熱水蒸気（SHS）処理することで米粉に界面活性（乳化能，油脂吸着能）を付与することを検討している。前報[1,2]では、原料の配合、過熱水蒸気処理条件等について報告した。本報では、SHS 処理に加えてリパーゼにより酵素処理することで糖質素材を調製し、その水溶性画分に乳化能、不溶性画分に油脂吸着能を付与した糖質素材について報告する。
【実験方法】米粉-油脂-クエン酸混合物（質量比93:5:2）をキルン方式の過熱水蒸気処理装置（ハイブリッドキルンミニ，日清エンジニアリング㈱）を用いてSHS処理（250℃，10 min）した。これにリパーゼ（AY「アマノ」30SD）を添加し、45℃で48時間反応させて糖質素材を調製した。糖質素材2.0gに蒸留水20mlを加えて室温で1分間振盪後、固液分離して得られたろ液に0.1%(w/w)アスタキサンチン油0.1mlを添加して攪拌後に一定時間静置して吸光度(470nm)を測定して糖質素材の水溶性画分の乳化能を評価した。糖質素材0.2gに蒸留水5mlと0.05%(w/w)アスタキサンチン油0.5mlを添加し、室温で1分間振盪後に固液分離して得られた沈殿物から*n*-ヘキサンでアスタキサンチンを抽出し、抽出液の吸光度(470nm)を測定して不溶性画分の油脂吸着能を評価した。さらに、加工食品での糖質素材の機能評価を食パンやかまぼこ等で行った。
【結果】米粉をSHS処理してから更にリパーゼ処理することで不溶性画分の油脂吸着能が向上した。また、アミロース含有率が高い米粉を用いるほど不溶性画分の油脂吸着能が向上する傾向であった。さらに、糖質素材の機能性を評価したところ、乳化剤と同程度の添加量で、食パンの硬化抑制ならびにかまぼこの離水抑制などの効果が乳化剤と同様に得られた。

本研究は、農林水産省平成22～24年度新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業およびJST平成25年度JST研究成果展開事業・研究成果最適展開支援プログラム　シーズ顕在化ステージの研究予算で実施した。

1) 日本応用糖質科学会第 60 回大会講演要旨集，p. 41 (2011). 2) 日本応用糖質科学会第 61 回大会講演要旨集，p. 46 (2012).

rice flour, surface activity, glucide material

講演番号：3B02p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ B 校舎 02 会場

餅硬化性が異なる糯米品種の澱粉物理化学的特性

Comparison of starch physicochemical properties of waxy rice cultivars having different hardening rate

○佐々木 朋子[1]、神山 かおる[1]、岡本 和之[2]（[1]農研機構・食総研、[2]茨城農総セ・生工研）
○Tomoko Sasaki[1], Kaoru Kohyama[1], Kazuyuki Okamoto[2] ([1]NARO, NFRI, [2]Ibaraki Agric. Inst.)

【目的】澱粉の物理化学的特性は澱粉を主成分とする穀類加工食品のテクスチャーに大きな影響を与える。糯米の代表的な加工食品である餅の食味において、テクスチャーは最も重要な因子であるため、餅の品質向上および加工特性を明らかにするためには、テクスチャーの制御要因を明らかにすることが不可欠である。本研究では餅に加工した時に硬化性が異なり、特徴的なテクスチャーをもつ品種を含む６品種の糯米から澱粉を精製し、糯米澱粉の糊化および老化特性、そしてゲル特性の解析を行い、品種間の比較を行った。
【方法】6 品種系統（こがねもち、マンゲツモチ、はくちょうもち、生研 123 号、陸稲関東糯 172 号、BC3）の糯米から澱粉を精製した。澱粉の糊化特性はラピッドビスコアナライザー（RVA）および示差走査熱量測定装置（DSC）によって解析した。さらに、40%(w/w)澱粉懸濁液を一度糊化させた後、1、3、5、7 日間 5℃で保存した試料について、アミロペクチンの再結晶化にともなう吸熱エンタルピーの変化を DSC によって解析した。また、40%(w/w)澱粉ゲルを調製し、テクスチャーアナライザー(TA-XT Plus)を用いて圧縮試験を行った。
【結果】糯米澱粉の糊化・老化特性は各品種間で顕著な差が認められた。RVA粘度特性値に関しては、高速餅硬化性を示す陸稲関東糯172号とBC3の2品種は最低粘度、最終粘度、セットバック、および糊化開始温度が高い傾向を示した。一方で、はくちょうもちと生研123号の2品種は最高粘度、ブレークダウンが高く、糊化開始温度が低い傾向を示した。DSCによる糊化開始温度も同様の結果を示した。アミロペクチンの老化（再結晶化）にともなう吸熱エンタルピーについては、陸稲関東糯172号とBC3の2品種が保存期間を通して極めて高い値を示した。冷蔵保存1日目に急激に老化が進行したが、その後は緩やかな増加を示した。一方、生研123号は冷蔵保存1日目には吸熱ピークが見られず、3日目以降に吸熱ピークが認められたが、6品種の中では最も低い値を示し、アミロペクチンの再結晶化が進行しにくい品種であることが明らかになった。マンゲツモチとこがねもちは中間的な傾向を示した。1日冷蔵保存した40%(w/w)澱粉ゲルの中心部を、円柱型のプランジャーで圧縮した時の圧縮荷重値については、生研123号とはくちょうもちの2品種が他の品種と比較すると顕著に低い値であった。陸稲関東糯172号とBC3の澱粉ゲルは、荷重－変形曲線から硬いが脆いゲルの特徴を示した。こがねもちとマンゲツモチは中間的な荷重値を示した。

waxy rice, starch, gelatinization and retrogradation

講演番号：3B02p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ B 校舎 02 会場

小麦粉の品質との関係解明を目指したコムギプロテインジスルフィドイソメラーゼの同定および特性解析

Identification and characterization of wheat protein disulfide isomerase families and their contents in wheat flour

○木村 静香[1]、北尾 悠樹[1]、増田 太郎[1]、長澤 幸一[2]、伊藤 美環子[2]、田引 正[2]、裏出 令子[1]([1]京大院農・農学、[2]農研機構・北農研)
○Sizuka KIMURA[1], Yuki KITAO[1], Taro MASUDA[1], Koichi NAGASAWA[2], Miwako ITO[2], Tadashi TABIKI[2], Reiko URADE[1] ([1]Kyoto Univ., Division of Agronomy and Horticultural Science, [2]NARO)

【目的】小麦粉中の内因性プロテインジスルフィドイソメラーゼ（PDI）ファミリーが生地の作製時にグルテニンマクロポリマーの脱重合を抑制し、生地の抗張性を維持する作用を有することが先行研究により明らかにされている[1]。そこで、小麦粉の品質と含有される PDI ファミリーの種類と量との関係を明らかにすることを目的に、主要なコムギ PDI ファミリーの同定及び特性解析を行い、それぞれの登熟種子及び小麦粉中の含有量を検討した。**【方法】**コムギの未熟種子から調製した mRNA を鋳型として、5 グループの PDI ファミリー（TaPDIL1、TaPDIL 2、TaPDIL 3、TaPDIL 4、TaPDIL 5）に特異的なプライマーを用いた RT-PCR により cDNA をクローニングした。それぞれの cDNA を用いて大腸菌発現系を確立し、大量発現させたリコンビナントタンパク質を His タグアフィニティクロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。精製したリコンビナントタンパク質について、酸化的リフォールディング活性を還元変性させた RNase を基質としてその活性の回復速度から測定した。リコンビナント PDI ファミリーに対して作製したモルモット抗血清を用いてコムギ種子切片を免疫蛍光染色し、種子における各 PDI ファミリーの組織分布及び細胞内局在性を実体蛍光顕微鏡及び共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察した。登熟種子及び小麦粉中の各 PDI ファミリーの含有量は、既知量のリコンビナント PDI ファミリータンパク質のウエスタンブロットのバンド強度から検量線を作成し、試料の PDI ファミリータンパク質のバンド強度を検量線と比較することにより定量した。
【結果】リコンビナントコムギ PDI ファミリーの酸化的フォールディングモル比活性は、TaPDIL1 を１とすると TaPDIL2、TaPDIL4、TaPDIL5 はそれぞれ 0.39、0.24、0.24 であった。活性中心のアミノ酸配列が他の PDI ファミリーとは異なる TaPDIL3 には、活性が検出されなかった。すべての PDI ファミリーが種子の登熟初期から発現しており、乾燥した成熟種子にも残存していた。また、すべての PDI ファミリーが種子組織の中でも特に胚で最も高濃度に存在し、次いでアリューロン細胞や表皮細胞に多く存在していた。さらに、未熟種子および完熟種子の胚乳全体にすべての PDI ファミリーが存在しており、胚乳の粉砕物である小麦粉に検出される酸化的フォールディング活性はこれらの PDI ファミリーに由来することが示唆された。3 種類の小麦粉（きたほなみ、ゆめちから、キタノカオリ）間では、きたほなみが他の品種に比してタンパク質当たりの TaPDIL１含量が最も高いことが明らかとなった。また、同じ品種の小麦粉間でも差があり栽培環境等の差により PDI ファミリーの量が影響を受ける可能性があることが明らかとなった。[1] *J. Agric. Food Chem.* 2010, **58**, 12970-12975.

protein disulfide isomerase, wheat, endosperm

講演番号：3B02p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ B 校舎 02 会場

米粉特性がパン製造加工特性に与える影響

Rice bread making properties based on rice flour characters

○奥西 智哉[1]、岡留 博司[1]、松木 順子[1]、鈴木 啓太郎[2]、宮下 香苗[1]([1]農研機構・食総研、[2]農研機構・作物研)
○Tomoya OKUNISHI[1], Hiroshi Okadome[1], Junko Matsuki[1], Keitaro Suzuki[2], Kanae Miyashita[1] ([1]NARO-NFRI, [2]NARO-NICS)

【目的】従来用いられてきた小麦粉とはその特性を大きく異にする米粉を製パン材料にする場合、生地の特性が大きく異なってくることは容易に想像できる。それによって、生地の混捏条件、発酵条件および焼成条件等が影響を受けることは自明の理である。これまで、著者らは米粉のパン加工適性について、ファリノグラフ特性あるいはパン比容積から米粉パンにおける最適吸水率を決定する方法を提案した。これらの知見を元に米粉パン生地物性に関する検討を行った。

【実験方法】原料米は一般飯用米であるひとめぼれ、ヒノヒカリ、低アミロース米であるミルキークイン、高アミロース米であるモミロマンおよびモチ品種のマンゲツモチを精米したのち、湿式気流粉砕、乾式気流粉砕あるいはロール粉砕したものを米粉試料として供試した。

見かけのアミロース含量は Juliano 法により測定した。検量線の作成には標準アミロース（ポテトアミロース Type Ⅲ, Sigma）とヒヨクモチを用いた。粒度分布はレーザー回折散乱式粒度分布計（LS13 320, BECKMAN COULTER 製）で測定した。損傷澱粉量は Starch damage assay kit（Megazyme 社）により測定した。

各種米粉を水分 14%換算のグルテン 20%ミックス粉になるように調製し、硬粘度 400 BU になるような加水条件下でファリノグラフ（8101 型，ブラベンダー社製）による生地物理特性を測定した。2%食塩水を加え、前記ファリノグラフのミキサーで作成した生地についてエクステンソグラム（型式：860000、ブラベンダー社製）を用い、エクステンソグラフにより生地の伸張抵抗と伸張度を測定した。

米粉パンを製造した．製法は直捏生地法にて行った．油脂を除く原料をミキサー（KTM-10, 関東混合機工業(株)製）を用いてミキシングした後，油脂を添加しミキシングした．生地は 420g 分割し，27℃，RH75%で 20 分ベンチタイムをとった．ワンローフ型に成形して，38℃，RH85%で 65～70 分発酵を行った．発酵終了は生地上端高さが焼型縁と一致した時点とした．熱風式ロータリーオーブン（9H923，Revent 製）で 200℃で 20 分焼成した．

【実験結果】異なる粉砕原理によって得られた米粉の特性について、乾式気流粉砕米粉は平均粒径が小さく、損傷澱粉率が大かった。吸水は特に多く、ファリノグラフチャートは生地の弱化が激しい様相を呈した。湿式気流粉砕米粉は損傷澱粉および平均粒径ともに小さい値を得た。小麦粉のファリノグラフチャートと同様の波形を示し、パン比容積も大きかった。ロール式粉砕米粉は平均粒径が大きく、損傷澱粉率が小さかった。強力粉のファリノグラフチャートに非常に似通った波形を示したが、さほどパン比容積は大きくなかった。一方エクステンソグラフ解析では、米品種が影響を与えた。アミロース含量と生地強度に特に相関がみられ、低アミロース含量ほど生地が弱くなった。

rice bread, farinograph, extensograph

講演番号：3B02p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ B 校舎 02 会場

T2-MR 画像による米粉パンの評価および製粉方法の違いが及ぼす影響

Effect of milling methods on the T2-distribution in rice flour bread

○関山 恭代[1]、堀金 明美[1]、宮下 香苗[1]、小野 裕嗣[1]、奥西 智哉[1]、藤井 智幸[2] ([1]農研機構・食総研、[2]東北大院農)
○Yasuyo SEKIYAMA[1], Akemi Horigane[1], Kanae Miyashita[1], Hiroshi Ono[1], Tomoya Okunishi[1], Tomoyuki Fujii[2] ([1]NARO Food Res. Inst., [2]Tohoku Univ.)

【目的】近年、米粉のパンへの利用が広がりつつある。米粉パンの特徴のひとつとして「しっとり」とした食感があり、パンの水分はその食感に影響を及ぼす要因の一つであると考えられる。磁気共鳴画像法（MRI）では水分分布の他に水の運動性を示すパラメータの一つである横緩和時間 (T_2 緩和時間)を計測することができ、力学的物性試験などのデータと組み合わせることでより多面的な評価を行える可能性がある。我々はこれまで、小麦粉の一部を米粉で置換したパンは小麦粉 100%のパンよりも T_2 緩和時間が長くなり、いずれのパンも時間の経過とともに T_2 緩和時間が短くなること、米粉のアミロース含量が低いパンほど T_2 緩和時間が長くなる傾向が見られることなどを報告してきた。今回は、製粉方法の異なる米粉を配合したパンおよびパン生地について検討したので報告する。
【方法】ヒノヒカリを湿式気流粉砕および乾式気流粉砕で製粉した米粉 80%にグルテンを 20%配合したパンを焼成し、中心部から切り取ったクラムを解析に供した。計測は、焼成当日から 3 日後まで経時的に行った。また、米粉と水を混捏した生地についても、同様に解析に供した。MRI 装置は Bruker、DRX300WB (21ºC) を用い、スピンエコー法により T_2 緩和時間の分布画像を得た。パン横断面および生地の T_2 分布画像の解析により、米粉の粉砕方法の違いが及ぼす影響を評価した。
【結果】焼成したパンの水分含量はほとんど同じであるが、乾式気流粉砕で製粉した米粉を配合したパンの T_2 緩和時間は、湿式気流粉砕で製粉した米粉を配合したパンよりも長くなった。いずれのパンも、小麦粉 100%パンの場合と同様に、時間の経過とともに T_2 緩和時間は短くなった。米粉と水を混捏した生地でも同様に、乾式気流粉砕で製粉した米粉を用いた生地の方が、T_2 緩和時間が長くなった。以上から、原料米粉の粉砕方法の違いがパンおよびパン生地の T_2 緩和時間に反映されることが示唆された。従って、米粉パンの品質には、米粉の成分組成のみならず微細構造の違いが影響すると考えられた。さらに、画像を構成する各ボクセルが示す T_2 緩和時間の頻度分布を調べた所、分布の形状は製粉方法によって異なり、従ってパン内部において、水分子の運動性の分布が米粉の製粉方法によって異なることが示唆された。乾式気流粉砕の米粉パンの方が分布の半値幅が小さく、水分子の運動性の分布が湿式気流粉砕の場合よりも均一であると考えられた。製粉方法の違いは、米粉の微細構造や吸水特性に影響を与えることが知られている。このような原料米粉の特性の違いがパン生地およびパン内部の水分子の運動性に影響をおよぼすことが示唆されたため、これらの関係について今後検討を進める予定である。

MRI, rice flour bread, spin-spin relaxation time (T2)

講演番号：3B02p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ B 校舎 02 会場

アルギン酸エステル添加による製パン性改良効果について

Improvement of breadmaking properties by the addition of propylene glycol alginates

○田原 彩[1]、宮島 千尋[2]、笠原 文善[2]、瀬口 正晴[1]([1]神女大・家政、[2]株式会社キミカ)
○Aya TABARA[1], Chihiro MIYAJIMA[2], Fumiyoshi KASAHARA[2], Masaharu SEGUCHI[1] ([1]Kobe Women’s Univ., [2]KIMICA Corporation)

【目的】2013 年度の本大会において、アルギン酸エステル、アルギン酸ナトリウムの添加により製パン性（パン高（mm）、比容積（cm^3/g））の改良したことを報告した。製パン性の改良する原因は不明である。本研究では、アルギン酸エステルの製パン性の改良効果にもたらす影響について、2 次発酵中（38˚C）のガス漏洩量、焼成時間の経過に伴うオーブンスプリングの変化、製パン性と加水量の関係などを検討した。
【方法】アルギン酸エステル（アルギン酸プロピレングリコールエステル）を用いた。製パン試験はこれまでの方法 [1)] で行い、加水量はブラベンダーファリノグラフで測定した吸水率を用いた。また、ベーキングは 210˚C のオーブン中で 30 分間とし、パン高（mm）、比容積（cm^3/g）から製パン性を評価した。2 次発酵中（38˚C）のガス漏洩量はファーモグラフ（AF-1101W ATTO Corp. Tokyo, Japan）を用いて測定した。
【結果】アルギン酸エステルを小麦粉に 1.5%添加した粉を調製し、ファリノグラフによる小麦粉の吸水率の測定、製パン試験を行った。その結果、アルギン酸エステル添加の方が未添加のものより吸水率が高く、製パン性の増加がみられた。一方、2 次発酵中（38 ˚C）のガス漏洩量においては、アルギン酸エステル添加、未添加に違いは認められなかった。210˚C のオーブン中のドウの変化を調べるため、10、20、30 分経過後の各ドウの製パン性を比較した。アルギン酸エステル添加、未添加とも、10 分までは同一の製パン性の増加が認められた。しかし、10 分以降、アルギン酸エステル添加の方が未添加よりも製パン性のより大きくなることがわかった。パンドウは 10 分以上で中心部温度が 100 ˚C 程度になるが、アルギン酸エステル添加の方が未添加より、加水量の多いためか高温度下（100˚C 近辺）でもドウの伸張性が大きかった。

1) Cereal Chem. 87:231-236, 2010.

propylene glycol alginates, breadmaking properties, alginates

講演番号：3B02p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ B 校舎 02 会場

多糖類（キサンタンガム、グアガム、タマリンドシードガム）添加による冷凍ドウ劣化パンの改良について

Improvements of breadmaking properties by the addition of polysaccharides such as Xanthan gum, Guar gum, and Tamarind seed gum to frozen bread dough

○瀬口 正晴、森元 直美、田原 彩（神戸女子大）
○Masaharu Seguchi, Naomi Morimoto, Aya Tabara (Kobe Women's Univ.)

【目的】冷凍ドウを用いて製パンを行うと製パン性（パン高、比容積）の劣化することが知られている（1）。しかし解凍ドウにイースト、砂糖を入れて、re-mix、再発酵後、製パンを行うと製パン性に回復が認められた（2）。冷凍によってドウ中の水の存在の仕方が変化したものと思われた。そこで保水力の大きい各種多糖類（キサンタンガム、グアガム、タマリンドシードガム等）を添加して製パンすると、解凍後の製パン性の劣化が少なかった。今回これらの多糖類の製パン時の特徴が、オーブンスプリングで認められたので報告する。【方法】冷凍、解凍、製パン方法はこれまでの方法（1, 2）で行った。多糖類はキサンタンガム、グアガム、タマリンドシードガムを用いた。何れもブラベンダーファリノグラフで求めた加水量を添加し、ベーキングは 220℃のオーブンで 30 分間行った。【結果】キサンタンガム、グアガム、タマリンドシードガムを 1，3，５％小麦粉に添加したドウを調製し、冷凍、解凍後、製パンを未添加コントロールドウの場合と比較した。その結果、何れの添加ドウによる製パン性も未添加ドウに比べて改良され、特にキサンタンガムの効果が大きかった。220℃のオーブン中で 5，10，20，30 分経過後、各ドウを取り出し、パン高，比容積等の製パン性を比べると、特にキサンタンガムはドウ中心部温度がほぼ 100℃になる 10 分後の状態でもさらに膨張を続け、他の多糖類では認められないようなキサンタンガム添加ドウの高温度（100℃付近）に置けるドウの伸張性が認められた。

(1) Cereal Chem. 80: 264-268, 2003
(2) Cereal Chem. 88: 409-413, 2011

frozen dough, polysaccharides, Xanthan gum

講演番号：3B02p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ B 校舎 02 会場

中高圧処理した加工米の物性評価

Evaluation of physical property of processed rice by high-hydrostatic pressure treatment

○藤井 華蓮、甲田 万紀子、藤田 智之（信州大院農）
○Karen FUJII, Makiko KOUDA, Tomoyuki FUJITA (Sinshu Univ.)

【目的】

玄米にはフェルラ酸などの機能性成分が豊富に含まれているものの、その多くは果皮や胚芽などの糠層に存在しており、精白時に除去されている。筆者らは、精白米への機能性富化を目的として、玄米に水を添加して加温・加圧（55℃, 100MPa）処理を行い、精白米中のポリフェノール成分量が顕著に増加することを明らかにした [1)]。今回は、加工処理した精白米を用いて調製した米粉の加工特性を評価するために、粒度分布およびデンプン損傷率の測定、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いたデンプン粒の観察を行い、加工処理が精白米の物性に与える影響を調査した。

【方法】

原料の玄米は 2009 年度産のコシヒカリを用いた。玄米に水を添加して、常温（20℃）または加温（55℃）、常圧（0.1MPa）または加圧（100MPa）の各条件下で 24 時間加工処理を行った。加工後の玄米を送風乾燥し、家庭用精米機で精米したのち、ロータースピードミル P-14（篩サイズ：梯子型穴 0.08mm, ローター：12 枚刃）に投入して米粉を調製した。この米粉を用いて、粒度分布およびデンプン損傷率を測定した。粒度分布は日機装株式会社製レーザー回析式粒度分布測定装置を用いて乾式法で平均粒径を求めた。デンプン損傷率の測定には Megazyme 社の STARCH DAMAGE KIT を使用した。また、精米して得た精白米を前処理し、SEM 観察に用いた。

【結果】

加工処理精白米粉の平均粒径を測定した結果、コントロールと比較して、加温処理した精白米粉でわずかに小さくなった。また、粒径 40μm 以下の米粉の割合は加温処理したもので、10%程度増加した。デンプン損傷率を比較したところ、コントロールの 17.3%に対して、加工処理精白米粉では 14.6~16.2%となり、1.1~2.7%の低下が認められた。各処理区においては、加温・加圧処理を併用することにより、デンプン損傷率は低下する傾向が認められた。

SEM を用いて、加工処理精白米のデンプン粒を観察した結果、未処理と比較して加工処理した精白米のデンプン粒は、角がとれ丸みを帯びた形状となっていることが分かった。特に、加温・加圧処理を併用することにより、丸みは強くなった。以上の結果から、加工処理した精白米粉は粒度が細かく、デンプン損傷率が低いという特性を持っていることが示された。

1）日本食品科学工学会第 58 回大会講演集，p. 106（2011）

Brown rice, rice flour, hydrostatic pressure

講演番号：3B02p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ B 校舎 02 会場

菌体内プロテアーゼを利用する高圧食品加工

High-pressure food processing using bacterial protease

○大山 結香[1]、上野 茂昭[1]、藤井 智幸[1]、伊藤 淑恵[2]、毛利 哲[2]、齋藤 静香[3]、井戸川 詩織[3]、岩元 靖[3]、塚田 義弘[3] ([1]東北大院農、[2]宮城県産業技術総合センター、[3]太子食品工業株式会社)
○Yuka OYAMA[1], Shigeaki UENO[1], Tomoyuki FUJII[1], Yoshie ITO[2], Satoshi MORI[2], Shizuka SAITO[3], Shiori IDOGAWA[3], Yasushi IWAMOTO[3], Yoshihiro TSUKADA[3] ([1]Tohoku Univ., [2]Miyagi Ind.Tech.Inst., [3]Taishi-Food Inc.)

【背景および目的】

発酵食品の製造においては、カマンベールチーズのように微生物菌体を固体状食品素材の外表面に塗布して熟成させる場合には、徐々に内部に酵素作用が進行していくため長い発酵期間を要する。そこで、発酵期間を短縮する方法として微生物菌体を予めタンパク質性食品の内部に均一に分散させ、その後高圧処理によりゲル化させると同時に菌体を破壊することができれば、より短い発酵時間で発酵食品を製造することができる可能性がある。本研究では植物性高タンパク質食品で低カロリーである低脂肪豆乳を原料とし、乳酸菌を添加して高圧処理を施し、保存中におけるタンパク質の分解挙動について実験的に検討した。

【方法および結果】

低脂肪豆乳(固形分 8.93%)を−5.5℃±0.3℃の条件で凍結させ、50 時間保持した後、4℃で 70 時間保持することにより解凍させて凍結濃縮を行った。凍結濃縮によりゲル状の濃縮物が得られた。固形分は 20.3%であった。得られた濃縮物に中性プロテアーゼを持つ乳酸菌(*Lactobacillus sakei* MBR474 株、宮城県産業技術総合センター)を均一に分散させた。それを真空パックした後高圧処理(300、400、500、600MPa、25℃、10 分)を施してゲル化させ、25℃で 5 日間保存した。

保存中に生成する遊離アミノ酸を定量し、タンパク質の分解過程を評価した。試料から遊離アミノ酸を抽出しダブシル化させ、HPLC 分析によりアミノ酸定量を行った。

凍結濃縮と高圧処理を併用することにより、低脂肪豆乳を加熱することなくゲル化させることができた。乳酸菌添加高圧処理試料を保存したところ、300、400MPa 処理の試料は 5 日後も遊離アミノ酸濃度に変化は見られなかった。これに対して 500、600MPa 処理の試料は 5 日後になると顕著に遊離アミノ酸濃度が増加し、遊離アミノ酸総量は未処理試料と比べて 2～3 倍となった。また、5 日後の各試料の pH を測定したところ、未処理、300、400MPa 処理の試料では 5.0 以下まで低下したのに対し、500、600MPa 処理の試料では変化が見られなかった。このことから、500、600MPa の高圧処理では乳酸菌が死滅して pH が低下しなかったため、内在する中性プロテアーゼが菌体破壊によって作用するようになり、遊離アミノ酸量が増加したと考えられた。故に、タンパク質素材を凍結濃縮し高圧処理を施すことによって、固体状発酵食品を短期間で製造することが可能であることが示された。本研究の一部は、平成 23 年度経済産業省戦略的基盤技術高度化支援事業の援助を受けた。

soymilk, high-pressure processing, protease

講演番号：3B02p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ B 校舎 02 会場

無塩みそ風調味料の製造方法について

The manufacturing method of the salt-free miso-like seasoning

○中原 達雄[1]、川野 隆史[2] ([1]丸善製薬、[2]ますやみそ)
○Tatsuo NAKAHARA[1], TAKASHI KAWANO[2] ([1]Maruzen pharmaceuticals, [2]Masuyamiso)

【目的】近年、塩分は生活習慣病の発症リスクの一因とされる高血圧を引き起こす要因の一つであるとも言われている。また、「味噌」は製造期間が長期間に及ぶことも知られている。我々は、圧力酵素分解装置を用いて、食塩を用いない「味噌」、いわゆる「無塩みそ風調味料」の開発を通常の味噌製造より短期間で行うことを目的とする。本研究では、「無塩みそ風調味料」を製造するための製造方法について検討を行った。
【方法】圧力酵素分解装置を用い、大豆と米麹のみを用いて「無塩みそ風調味料」の製造を行った。その際、大豆と米麹の比率、反応温度、反応圧力等の条件設定を変え、出来るだけ短時間に製造を行う検討を行った。評価方法は、官能試験、一般分析とした。
【結果】各種条件検討の結果、ナトリウム含量以外は「味噌」と同様の成分組成である「無塩みそ風調味料」が製造できた。また、風味についても「味噌」と同様のものができた。
【考察】本結果より、無塩みそ風調味料は調味料としてのみ使用するのではなく、食品素材として、例えば、パン、ケーキ、クッキーなどに配合して新しい食品を作り出すことが可能になってくるとも考えられる。さらに、これまで「味噌」は食塩が含有されていることから *in vivo* での有効性試験が行いにくかった。しかし、「無塩みそ風調味料」は食塩を含有していないため、*in vivo* 試験を実施することが可能になる。*in vivo* 試験を実施することにより生体内におけるみその本来の有効性の解明に期待ができる。

miso-like seasoning, pressure enzyme decomposing device

講演番号：3B02p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ B 校舎 02 会場

二枚貝の中高圧開脱殻における溶出物質

Eluted substances upon bivalve shucking by medium high hydrostatic pressure

○森松 和也、小田 真知子、バウム 博美、山本 和貴（農研機構食総研）
○Kazuya Morimatsu, Machiko Oda, Hiromi Baum, Kazutaka Yamamoto (NFRI, NARO)

【目的】100 MPa 程度以上の中高圧力もしくは 400～600 MPa 程度の高圧力で処理することにより、二枚貝を開殻して脱殻することが知られている。中高圧処理または高圧処理による二枚貝の開脱殻は既に一部で実用的に産業利用されているが、開脱殻効果に及ぼす処理条件、二枚貝の種類等の影響は十分に解明されておらず、また、中高圧処理または高圧処理によって貝類の身に及ぼす影響もまた不明な点が多い。本研究では、実用的な処理として期待される中高圧処理による二枚貝の開脱殻において、処理条件が貝類の品質に及ぼす影響を、溶出成分の観点から検討した。

【方法】二枚貝としては、加工用の剥き身を得る目的で高圧処理で開脱殻されているアサリ（*Ruditapes philippinarum*）を用いた。アサリは、水道水で洗浄後、20 ℃の 3 %食塩水に暗所で 2 時間浸漬し、砂抜きした。透明レトルトパウチに無作為に選んだアサリ 12 個（約 70～120 g）を入れ、100ml の蒸留水を加水して脱気密封した。この試料を冷却・加熱可能な中高圧処理装置（まるごとエキス α；東洋高圧）を用いて、20 ℃で 100、150、200 MPa で 10 分間処理した。独自に定義した開脱殻点数及び開殻率によって開脱殻効率を評価し、更に、処理試料中の液体部に溶出した蛋白質量、NaCl 量、全糖量、還元糖量を各々定法によって測定し、アサリ重量当たりの値として比較検討した。また、比較のため、沸騰水中で 1 分間または 10 分間の熱水処理を施した試料を併せて調製した。

【結果】処理圧力が高い程、開脱殻点数[点]及び開殻率[%]は高くなり、各値は、100 MPa 処理では 1 分間熱水処理と近く 3 点弱及び 80 %弱と不十分であり、150 MPa 処理では 3 点強及び 100%で、開殻していても身が若干取り難く、200 MPa 処理では 10 分間熱水処理と近く 4 点及び 100 %であり、開脱殻の作業性が高いことが示された。一方、溶出成分に関しては、10 分間熱水処理によって、いずれの溶出成分量も著しく高くなることが明らかとなった。また、いずれの中高圧処理条件においても、処理圧力が高い程、溶出成分量が増加する傾向はあるものの、1 分間熱水処理と同水準もしくはそれ以下に溶出が抑制されることが明らかとなった。

【謝辞】本研究は、文部科学省東北マリンサイエンス拠点形成事業（新たな産業の創成につながる技術開発）「高度冷凍技術を用いた東北地区水産資源の高付加価値化推進」の成果の一部である。

bivalve, shucking, pressure, medium high hydrostatic pressure

講演番号：3B02p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ B 校舎 02 会場

かき玉形成への剪断の影響とオボムチンの関与

Influence of shear on “Kakitama” formation and participation of ovomucin

○伊與田 哲也[1]、中村 卓[1]、星野 貴[2]、滝田 裕二[2]、山口 祐輝[2]、五十部 誠一郎[3] ([1]明治大院農・農化、[2](株)フロンティアエンジニアリング、[3](独)農研機構・食総研)
○ tetsuya iyoda[1], Takashi Nakamura[1], Takashi Hoshino[2], Yuji Takita[2], Yuki Yamaguchi[2], Seiichiro Isobe[3] ([1]Meiji Univ., [2]FRONTIER ENGINEERING CO., [3]National Food Research Institute)

【目的】

液全卵は生卵に近い機能性を持ち、割卵の手間が省け簡便に扱える。そのため、工業的に広く利用されている。しかし、サルモネラ菌による食中毒が危惧されるため、加熱殺菌処理を行う必要がある。この加熱殺菌処理では、間接加熱殺菌処理とジュール加熱殺菌処理が用いられている。この内、ジュール加熱処理後の液全卵ではかき玉が形成されるのに対して、間接加熱処理では形成されない。その原因として、加熱方法の違いや細い間隙を通る事による剪断の影響が考えられる。これまでの研究にて、加熱の均一性と昇温速度の違いによる過加熱が影響する事を明らかにした。

また、強い剪断を掛けた液全卵ではかき玉が形成されない事を示した。そして、前回大会にて、かき玉形成の要因として卵白の寄与が大きい事を報告し、かき玉の凝集体部分に高分子量オボムチンとオボトランスフェリンが多く存在する事を明らかにした。そこで本研究では、かき玉形成の要因を追求するために、卵白タンパク質成分の寄与を明らかにする事を目的とした。特にオボムチンに着目し、オボムチンゲルを分離して解析を行った。

【方法】

市販卵を割卵し、卵黄を除いて卵白のみを目開き850μmの篩に通し、Native液卵白サンプルとした。さらに、ホモジナイザーを用いて減圧状態でそれぞれ1500、4500、9000rpmで1分間攪拌した。これら４種類の液卵白サンプルについて動的粘弾性測定と、水への分散性について比較した。また、液卵白サンプルに塩溶液を加えて分離したオボムチンゲルについて、SDS-PAGEによりタンパク質成分の分析を行った。さらに走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて微細構造観察を行った。

【結果】

液卵白の動的粘弾性測定について、剪断力を強くするに従い貯蔵弾性率(G′)と損失弾性率(G”)の直線領域の値が低下した。また、ゲル化点における歪率では剪断力が強くなるに連れて有意に低下した。水への分散性において、Nativeと1500rpmの液卵白ではまとまりながら直線的に落下した。4500rpmではやや拡散しながら落下する様子が観察され、9000rpm では水に投入された直後から大きく拡散する様子が観察された。したがって、液卵に剪断を加える事で粘弾性が低下し、それにより分散性が増加し、かき玉が形成されなくなる事が示唆された。さらに、剪断処理のオボムチンゲルへの影響について報告する。

liquid egg, shearing, ovomucin

講演番号：3B02p23
講演日時、会場：3 月 29 日 17:59～ B 校舎 02 会場

生姜ミルクプリンの作成条件に関する研究

Study on conditions to make the ginger milk pudding.

○山田 徳広（帝塚山大現代生活食物栄養）
○Norihiro Yamada (Tezukayama Univ.)

【目的】中国には、加温した牛乳または水牛乳に生姜の絞り汁を加えて固めたデザートがある。このデザートが固まる機構には、牛乳に含まれるたんぱく質が生姜汁に含まれるプロテアーゼの作用によって部分的に分解されることが関係していると考えられている。これまでに、生姜汁による凝乳活性が 60℃または 70℃で最高となることなどが報告されているが、生姜汁による牛乳のゲル化機構は十分に解明されていない。本研究は、生姜汁による牛乳のゲル化機構を解明する一環として、生姜汁の添加量，反応温度および反応時間を変化させた場合のゲルの硬さ応力，凝集性，付着性，ガム性応力などへの影響を検討した。
【方法】生姜から低速圧縮ジューサーを用いて搾汁した後、3,000r.p.m.で 10 分間遠心分離して得られた上清をろ紙 No.2 でろ過したものを生姜汁として用いた。反応温度と反応時間の影響は、牛乳 50mL に対して生姜汁 1.5mL を添加して測定した。反応温度の影響は、40℃～90℃の間を 10℃きざみで測定し、反応時間は 60 分とした。反応時間の影響は、生姜プロテアーゼの最適温度であると報告されている 60℃の条件において、15 分,30 分,45 分,60 分,90 分および 120 分の条件で測定した。生姜汁添加量に関する実験は、最終検体量 50mL とし、生姜汁添加濃度 2.5%,5%,7.5%および 10%において測定した。ゲルは、直径 48mm の円形容器で形成し、反応終了後、直ちに氷冷水中に入れて反応を停止させた。ゲルのテクスチャー特性は、4℃で 12 時間放置したものを測定した。ゲルの硬さ応力，凝集性，付着性およびガム性応力は、直径 16 mm の円形のプランジャーを用い、圧縮速度 1mm/sec、クリアランスは試料の高さの 50%とした。なお、牛乳への生姜汁の添加は 20℃で行い、添加後直ちに各反応温度で加温した。
【結果】ゲルの硬さ応力に及ぼす生姜汁の添加濃度の影響は、生姜汁 2.5%ゲルにおいて 1.73×10^4[Pa]だったのに比べ、同 5%ゲルにおいて 2.01×10^4[Pa]と、約 17%の高値を示し、それ以上生姜汁濃度を 7.5%，10%と増加させてもほとんど変化しなかった。ゲルの硬さ応力に及ぼす反応温度の影響は、40℃において 1.36×10^4[Pa]を示し、80℃までは反応温度の上昇とともにゲルの硬さ応力は上昇した。そして 80℃において 2.19×10^4[Pa]となった。しかしながら、90℃では 0.49×10^4[Pa]と、急激に低下した。ゲルの硬さ応力に及ぼす反応時間の影響は、15 分において 1.46×10^4[Pa]を示し、30 分，45 分，60 分，90 分，120 分と、反応時間が長くなるに従がってゲルの硬さ応力は上昇した。そして 120 分において 2.00×10^4[Pa]となった。その他、40℃～70℃までは、生姜汁を加えてから加温するよりも、牛乳加温してから生姜汁を添加した方がゲルの硬さ応力は高値を示したが、牛乳を 80℃に加温してから生姜汁を添加すると、ゲルは形成しなかった。また、60℃で 60 分間ゲル形成を行った後に、80℃に 30 分間放置すると、ゲルの硬さ応力が約 35%上昇した。

Milk-clotting, Ginger, texture

講演番号：3B03a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ B 校舎 03 会場

ピリドキサミン由来メイラード反応生成物の化学構造

Chemical structure of pyridoxamine-derived Maillard reaction products

○能見 祐理、大塚 譲（お茶大・生環研セ）
○Yuri NOMI, Yuzuru OTSUKA (Ochanomizu Univ.)

[背景・目的]

アミノ化合物とカルボニル化合物の間に起こる非酵素的褐変反応であるメイラード反応の抑制に、チアミンやピリドキサミンなどのアミノ基を有するビタミンが有効であることが知られている。メイラード反応抑制作用を担う一因として、これらビタミンがカルボニル化合物と競合的に反応することが予想されるが、形成されるメイラード反応生成物についての報告は少ない。

これらビタミン由来メイラード反応生成物の探索を行った結果、ピリドキサミンとキシロースとの反応で生成する主要なメイラード反応生成物 (XP-1)を見出した。本研究では、この反応生成物の単離と構造解析、および生成機構の解析を行った。

[方法]

ピリドキサミンとキシロース (各 60 mM)を 0.5 M リン酸緩衝液(pH 7.4)に溶解し、90℃で 5 時間反応させた。得られた反応溶液を分取 HPLC に供して精製し、主要な生成物である XP-1 について LC-ESI-QTOF-MS, NMR を用いて構造解析を行った。また、反応機構の解析のため、^{13}C でラベル化したキシロースを用いて同様の実験を行った。

[結果と考察]

LC-ESI-QTOF-MS による質量解析および組成演算の結果から、XP-1 は分子量 263, 分子式 $C_{13}H_{13}N_1O_5$ であると決定した。これはキシロース 1 分子、ピリドキサミン 1 分子から水 2 分子、アンモニア 1 分子、水素 1 分子が脱離した構造に相当する。また NMR による構造解析の結果、XP-1 は新奇化合物であることが確認された。現在、この物質の生成機構について解析中である。

pyridoxamine, xylose, Maillard reaction

講演番号：3B03a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ B 校舎 03 会場

3-deoxyosone 修飾 ribonuclease A の解析
Analyses of 3-deoxyosone-modified ribonuclease A
○石渡 まどか[1]、臼井 照幸[2]、渡辺 寛人[1]、早瀬 文孝[1]([1]明治大農、[2]昭和学院短大・ヘルスケア栄養)
○Madoka Ishiwata[1], Teruyuki Usui[2], Hirohito Watanabe[1], Fumitaka Hayase[1] ([1]Meiji Univ., [2]Showagakuin Junior College)

【目的】
メイラード反応は還元糖などのカルボニル化合物とアミノ酸などのアミノ化合物の非酵素的反応であり、食品中や生体内で起こることが知られている。α-ジカルボニル化合物である 3-deoxyglucosone (3-DG) や 3-deoxyxylosone (3-DX) などの 3-deoxyosone 類は、メイラード反応における重要な中間体である。これらの化合物は、タンパク質のリジン残基、アルギニン残基等を修飾して advanced glycation end-products (AGEs) 生成や、タンパク質の重合、架橋を引き起こす。メイラード反応によるタンパク質の構造の変化は、タンパク質の機能を著しく低下させる。しかしながら、3-DX によるタンパク質のグリケーション機構についての知見は乏しい。
本研究では、塩基性タンパク質である ribonuclease A (RNase A) を用い、3-deoxyosone 類修飾タンパク質における二次構造や酵素活性の変化、また AGEs の生成によるリジン残基とアルギニン残基の損傷度などについて検討した。
【方法】
3-DG (10 mM) または 3-DX (10 mM) と RNase A (5 mg/ml) を 0.2 M リン酸緩衝液 (pH7.4) に溶解し、37℃で所定時間 (0 時間から 240 時間) インキュベートした。反応溶液は脱塩および未反応 3-DG または未反応 3-DX を除くために超純粋中で透析した。各サンプルを CD スペクトル測定、酵素活性測定、SDS-PAGE、アミノ酸分析、逆相 HPLC による AGEs 定量分析、などに供し、3-deoxyosone 類により修飾されたタンパク質の解析を行った。
【結果】
酵素活性測定の結果、3-DG 系では活性が緩やかに低下した。しかしながら、3-DX 系では急激に活性が低下することが判明した。CD スペクトル測定や SDS-PAGE、架橋 AGEs の定量などの結果から、3-DG 系では RNase A の活性部位であるリジン残基が修飾されたことが活性低下の主な要因であると考えた。一方、3-DX 系では活性部位のリジン残基の修飾よりも、タンパク質の二次構造の変化や架橋 AGEs による重合が、活性低下の主な要因であると考えられた。

3-deoxyosone, glycation, ribonuclease A

講演番号：3B03a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ B 校舎 03 会場

グリセルアルデヒド修飾タンパク質における酵素活性低下機構の解析

Reduction of enzymatic activity by modification with glyceraldehyde

○長谷川 俊樹[1]、臼井 照幸[1,2]、渡辺 寛人[1]、早瀬 文孝[1]（[1]明治大農、[2]昭和学院短大・ヘルスケア栄養）
○Toshiki HASEGAWA[1], Teruyuki USUI[1,2], Hirohito WATANABE[1], Fumitaka HAYASE[1]（[1]Meiji Univ., [2]Showagakuin Junior College）

【目的】　メイラード反応とは、タンパク質などのアミノ化合物と、還元糖などのカルボニル化合物との間で起こる、非酵素的褐変反応であり、Advance glycation end products（AGEs）を生成する。メイラード反応によるタンパク質中のリジン残基、アルギニン残基の修飾は、タンパク質の機能低下を引き起こす。グリセルアルデヒド（GLA）は代謝異常や糖の分解などで生成し、カルボニル化合物としてタンパク質を修飾する。GLA 由来の主要な AGEs として、リジン、アルギニン共存下で生成される GLAP や MG-H1 などが報告されている[1][2]。GLA 由来の AGEs は、ストレプトゾトシン誘発性糖尿病ラットにおいて増加することなどから、糖尿病合併症発症に関与していると考えられている。本研究では、Lysozyme（LZ）および RibonucleaseA（RNaseA）を GLA と生理的条件下で反応させた際の機能性の変化やそのメカニズムを解明することを目的とした。
【実験方法・結果】　酵素タンパク質と GLA を、それぞれ 1 mg/mL、10 mM となるように 200 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）に溶解し、37℃で 0～120 時間インキュベートした。反応溶液を超純水中にて 3 日間透析後、凍結乾燥し、糖化タンパク質サンプル（GLA-LZ、GLA-RNaseA）を得た。GLA-LZ、GLA-RNaseA について、それぞれ Micrococcus lysodeikticus を基質とした溶菌活性、リボ核酸を基質としたエンドヌクレアーゼ活性を測定したところ、GLA とのインキュベート時間に依存して酵素活性の低下が確認された。また、各糖化タンパク質 1 mg を 6 N 塩酸を用いて酸加水分解後、RP-HPLC および LC-Q-TOF MS を用いて GLA 由来の主要な AGEs の測定およびアミノ酸分析を行った結果、継時的な糖化による AGEs の増加およびそれに伴う塩基性アミノ酸の減少が確認された。さらに、円偏光二色性スペクトルにより、GLA による修飾はタンパク質の二次構造の変化を引き起こすことを確認した。
　以上の結果より、GLA の修飾に伴う酵素活性の低下は、主として LZ においては塩基性アミノ酸の減少に伴う基質との親和性の低下、RNaseA においては二次構造の変化によるものであることが示唆された。

[1] Usui, T., and Hayase, F.,：*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67 (4), 930-932, 2003
[2] Usui, T., M., Watanabe, H., and Hayase, F.,：*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70 (6), 1496-1498, 2006

glycation, glyceraldehyde, Maillard reaction

講演番号：3B03a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ B 校舎 03 会場

ピロロキノリンキノンによるメイラード反応抑制作用の解析

Inhibition of Maillard reaction by pyrroloquinoline quinone

○大関 菖平、早瀬 文孝、渡辺 寛人（明治大院農）
○Shouhei OOZEKI, Fumitaka HYASE, Hirohito WATANABE (Meiji Univ.)

【目的】メイラード反応により生体内に蓄積する AGEs（advanced glycation end products）は糖尿病合併症などの疾患の原因となっており、AGEs 形成阻害剤はこれら疾患発症を抑制しうると期待されている。われわれは、これまでに AGEs 形成を阻害する食品・生体関連成分を探索し、ある種の因子がメイラード反応の重要中間体であるアマドリ化合物を分解する活性を有することを見出している。本研究では新たな因子を見出すことを目的として探索を行い、o-キノン骨格を持つ PQQ（pyrroloquinoline quinone）の AGEs 形成阻害作用について解析を行った。
【方法】1.グルコースと p-toluidine の反応によりアマドリ化合物である fructose-p-toluidine を作製し、これを PQQ とともにリン酸緩衝液（pH7.4）中、37℃で 24h 反応させた。反応後のアマドリ化合物を逆相 HPLC にて分析・定量することにより、PQQ のアマドリ化合物分解作用を評価した。
2. PQQ の存在下、または非存在下でグルコースあるいはグリセルアルデヒド（GLA）とタンパク質とを 37℃で反応させ、AGEs 形成を評価した。具体的には（1）反応物を SDS-PAGE に供し、AGEs 形成によるタンパク質重合度を評価するとともに、（2）透析後の反応物を酸加水分解、固相抽出（Sep-PakC18）に供したのちに、形成した GLA 由来 AGEs を逆相 HPLC にて定量した。
【結果】PQQ は低濃度において、これまでに報告した因子と同等の分解活性を持つことが明らかとなった。また PQQ はメイラード反応によるタンパク質の重合を顕著に抑制した。さらに生理活性が強く、合併症発症に深く関与するとされる GLA 由来 AGEs の形成量を PQQ は有意に減少させることが明らかとなった。これらの結果から、PQQ がアマドリ化合物を分解することで AGEs の形成を阻害する高い活性を有することが示唆された。

Maillard reaction, pyrroloquinoline quinone, glycation

講演番号：3B03a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ B 校舎 03 会場

酸化修飾タンパク質のアダクトーム解析

Adductome analysis of oxidized protein

○柴田 貴広[1,2]、清水 和真[1]、内田 浩二[1] ([1]名大院生命農、[2]JST, さきがけ)
○Takahiro SHIBATA[1,2], Kazuma SHIMIZU[1], Koji UCHIDA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]JST, PRESTO)

[背景・目的]
反応性の高い短鎖アルデヒド類は、大気汚染物質として環境中に広く存在するだけでなく、食品における脂質の酸化的劣化産物として知られている。また、酸化ストレス条件下においては、細胞膜を構成する多価不飽和脂肪酸の酸化により、生体内においても生成される。このように、我々は外因的あるいは内因的に、アルデヒド類にさらされているものといえる。こうした脂質過酸化反応により生じるアルデヒド類は、高い親電子性ゆえに、タンパク質中の求核性アミノ酸残基を介して共有結合し、その結果として、タンパク質分子上には様々な構造を有した修飾付加体が形成される。これまでの研究では、それぞれ個別の修飾付加体に注目した研究がなされてきたが、実際は複雑多岐にわたる修飾付加体が形成しているものと想定されるため、その全体を解析する必要があると考えられる。そこで本研究では、アルデヒドによる複雑なタンパク質修飾付加体を総体として理解するアダクトーム解析法を確立し、血清サンプルへの応用を試みた。

[方法・結果]
アルデヒド修飾タンパク質を水素化ホウ素ナトリウムにより還元処理した後、塩酸雰囲気下で 110℃、24 時間インキュベーションすることにより、アミノ酸単位まで完全加水分解を行った。この加水分解サンプルを UPLC-MS/MS による SRM 解析を行った。この時、リジン残基およびヒスチジン残基に特徴的なフラグメントパターンを利用することにより、それぞれのアミノ酸残基に特徴的な付加体の検出を可能とした。UPLC の保持時間、質量電荷比、およびピーク面積よりアダクトームマップを作製し、各種アルデヒドに特徴的な修飾付加体の同定を行った。また、in vitro において酸化させたヒト低密度リポタンパク質(LDL)におけるアダクトームマップを作製し、酸化 LDL に特徴的な修飾付加体の同定を行った。現在、血清サンプルにおけるアダクトーム解析を行っている。

lipid peroxidation, adductome

講演番号：3B03a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ B 校舎 03 会場

米胚乳タンパク質の血清尿酸値低下効果

The lowering effect of rice endosperm protein on the serum uric acid level

○細島 康宏[1,2]、青池 郁夫[3]、近藤 葉月[4]、藤井 幹夫[4]、久保田 真敏[1]、門脇 基二[1]、斎藤 亮彦[5]([1]新潟大学自然科学系（農学部)、[2] 新潟大学医歯学総合病院　腎・膠原病内科、[3] 向陽メディカルクリニック、[4] 亀田製菓株式会社、[5] 新潟大学機能分子医学講座)

○ Michihiro HOSOJIMA[1,2], Ikuo AOIKE[3], Haduki KONDOU[4], Mikio FUJI[4], Masatoshi KUBOTA[1], Motoni KADOWAKI[1], Akihiko SAITO[5] ([1]Faculty of Agriculture, Niigata University, [2]Division of Clinical Nephrology and Rheumatology, Niigata University, [3]Koyo medical clinic, [4]Kameda seika corporation, [5]Department of Applied Molecular Medicine, Niigata University)

【背景・目的】植物性タンパク質には、動物性タンパク質にはない生理機能が知られている。我々はこれまでに、食味に優れた新規の米胚乳由来タンパク質素材（米胚乳タンパク質）の精製に成功している。しかし、米胚乳タンパク質がヒトに与える影響についての詳細は不明であるため、成人肥満者および血液透析患者において検討を行った。

【方法】研究 1：BMI25kg/m^2 以上の成人肥満者 18 名を 2 群に分け、クロスオーバー方式で米胚乳タンパク質またはカゼイン（10g/日）を 4 週間ずつ摂取してもらい、試験開始 0、4、8 週目に血液および尿検査を行った。研究 2：全身状態が安定し、低栄養傾向のある維持血液透析患者 9 名に米胚乳タンパク質（5g/日）を 2 週間摂取してもらい、試験開始 0、2 週目に血液検査を行った。

【結果】研究 1：クロスオーバー試験の前半期間において、米胚乳タンパク質摂取群ではカゼイン摂取群に比較して HDL-コレステロール値の上昇、血清尿酸値および炎症性ケモカイン MCP-1 値の低下が認められた。後半期間では、いずれの項目でも有意差はなかったが、前半期間と同様の傾向がみられた。研究 2：米胚乳タンパク質摂取による血清カリウムおよび無機リン値への影響を検討したが、有意な上昇は認められなかった。一方、血清尿酸値の有意な低下が認められた。

【考察】研究 1、2 より米胚乳タンパク質は血清尿酸値の低下効果を有することが示唆された。血清尿酸値低下の作用機序は不明だが、透析患者においては尿酸の尿排泄は認められないため、尿酸の産生低下を含むその他の機序を介していることが示唆される。今後、米胚乳タンパク質による血清尿酸値への影響を主要解析項目とした研究を行う予定である。なお、本研究は農林水産省委託事業「農林水産物・食品の機能性を解析・評価するための基盤技術の開発」として実施された。

rice endosperm protein, uric acid, vegetable protein

講演番号：3B03a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ B 校舎 03 会場

発酵食品に含まれる蛋白質酵素分解物の RBL-2H3 細胞に対する脱顆粒抑制作用

Inhibitory effects of the protein hydrolysates in fermented foods on degranulation in RBL-2H3 cells

○曽根田 祐太[1]、下田 博司[3]、小野瀬 淳一[2]、柏木 豊[1]、前橋 健二[1]([1]東農大院醸造、[2]東農大応生栄養、[3]オリザ油化株式会社)
○Yuta Soneda[1], Hiroshi Shimoda[3], Jun-ichi Onose[2], Yutaka Kashiwagi[1], Kenji Maehashi[1] ([1]Tokyo Univ. Agriculture Fermentation Sci., [2]Tokyo Univ. Agriculture Nutrition Sci., [3]Oryza Oil & Fat Chemical Co., Ltd.)

【目的】厚生労働省の調査によると日本人の 2 人に 1 人が何らかのアレルギーを持っているとされており，アレルギーは我が国の大きな社会問題である。Ⅰ型アレルギー反応においてはマスト細胞や好塩基球上の抗体と抗原が結合することによってヒスタミンやセロトニン等のケミカルメディーエーターが放出され，アレルギー症状が誘発される。これらの一連の反応は脱顆粒と呼ばれている。近年，日常的に摂取されている食品から様々な生理活性作用が見出されている。米に含まれるトコトリエノールやγ-オリザノールの脱顆粒抑制作用について報告されている。しかしながら，その他の発酵食品原料由来のペプチドについての報告はほとんどされていない。そこで本研究では，発酵食品の原料として重要である米，小麦及び大豆の蛋白質酵素分解物について抑制作用の検討を行った。
【方法】米蛋白質，小麦蛋白質及び大豆蛋白質は市販の食品添加用素材を用いた。酵素としてはブロメライン，トリプシン等の精製酵素標品の他スミチームやビオプラーゼ等食品製造用酵素製剤を用いた。蛋白質の酵素分解物の分離は Amberlite IR120B，IRA410，Sephadex G-25，及び ODS カラムにより行った。脱顆粒抑制作用の評価は RBL-2H3(ラット好塩基球性白血病)細胞を用いた実験により行った。すなわち，RBL-2H3 細胞をマウスモノクローナル抗 DNP-IgE 抗体により感作後，DNP-BSA を添加することで脱顆粒を誘発させ，その際のβ-hexosaminidase 放出率を脱顆粒の指標とした。そして，DNP-BSA 添加の前に試料を添加した際のβ-hexosaminidase 放出率を測定し，脱顆粒抑制作用を評価した。
【結果】蛋白質酵素分解物の脱顆粒抑制作用はイオン交換によって分離することによって現れた。中でも米及び大豆蛋白質の酵素分解物からは顕著な脱顆粒抑制作用が確認されたため，これらのフラクションから脱顆粒抑制作用を有する低分子ペプチドの精製を行った。

degranulation, hydrolysate, rice

講演番号：3B03a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ B 校舎 03 会場

運動時の脂肪燃焼効果が高いアミノ酸の探索

Enhancing effect of fat metabolism by amino acids during exercise

○上田 啓輔[1]、山口 真[1]、高井 祥子[1]、藤田 聡[2]、山地 健人[1]、伊藤 裕之[1] ([1]株式会社明治、[2]立命館大学)
○Keisuke UEDA[1], Makoto YAMAGUCHI[1], Shoko TAKAI[1], Satoshi FUJITA[2], Taketo YAMAJI[1], Hiroyuki ITOH[1] ([1]Meiji Co.,Ltd, [2]Ritsumeikan Univ)

【目的】近年、身体活動量の低下による肥満者が増加しつつあり、適度な運動や身体活動による改善が重要視されている。肥満改善に効果的な食品を提供すべく、脂肪燃焼効果の高いアミノ酸を探索した。
【方法・結果】(1)運動時の脂肪分解効果をより高めるアミノ酸を選抜するため、中性脂肪の分解物である血漿中グリセロールを指標として、ラットに各種アミノ酸(1g/kg)を経口投与し、その 30 分後に副腎髄質ホルモンであるアドレナリン（0.2mg/kg）を腹腔内投与して脂肪分解を促す試験系を構築した。結果、フェニルアラニン、アルギニン、アラニンに高い脂肪分解促進効果が見られた。(2)選抜したアミノ酸 3 種を主体として、風味・物性を考慮したアミノ酸混合物(D-V.A.A.M.)を作製した。D-V.A.A.M.の脂肪分解能を上述のモデルで評価したところ、対照群(水投与)に対してグリセロールが有意に上昇し、高い脂肪分解促進効果を認めた。(3)D-V.A.A.M.の抗肥満効果を評価するため、高脂肪食飼育下のマウスに D-V.A.A.M.(1g/kg)を毎日経口投与(運動負荷日は運動30分前に投与)しながら、トレッドミル運動(20m/min、40min、週3回)を負荷する試験系を構築した。結果、D-V.A.A.M.群では、対照群(溶媒投与)に比較して、体重増加と腎周囲脂肪重量の増加を有意に抑制した。また、エネルギーを熱として散逸する褐色脂肪組織中 UCP-1 の発現量が有意に増加した。(4)健常な 20 歳以上の男子大学生 12 名を対象とした二重盲験クロスオーバー試験を実施した。試験食品は D-V.A.A.M. 3ｇ（A群）と空カプセル（P群)、ウォッシュアウト期間は 1 週間とした。試験食品摂取後 30 分間は座位安静にし、その後 60 分間の自転車運動（50%VO_2Max）を負荷した。結果、運動時の呼吸交換比の変化量はA群で低く推移しており、運動終盤から終了後にかけて有意な差が認められた。また、血漿中グリセロールと遊離脂肪酸はA群で高い推移を示した。脂肪の分解を促進するグルカゴンはA群で高く、運動開始 45 分後と運動終了 30 分後に有意な差が認められた。さらに脂肪酸の代謝物である 3-hydroxybutyrate、アセト酢酸は、A群が高く、運動開始 30 分後で有意な上昇が認められた。
【まとめ】D-V.A.A.M.の単回摂取において、運動時の脂肪分解を促進することが動物・臨床試験の両方で示された。また、グルカゴンの分泌を促すことで脂質酸化を亢進することが示唆された。D-V.A.A.M.を継続摂取しながら運動することにより得られた抗肥満効果については、血中の遊離脂肪酸濃度の高い状態が繰り返されるため、それに対する適応として褐色脂肪組織内の UCP-1 発現量が増加し、熱産生の分だけエネルギー消費量が増えた結果、体重・蓄積脂肪量の増加が抑制されたと推察する。

fat metabolism, vespa amino acid mixture, glycerol

講演番号：3B03a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ B 校舎 03 会場

高血圧自然発症ラットにおける発酵キョウバクの血圧上昇抑制作用

Suppressive effect of fermented buckwheat sprout on blood pressure elevation in spontaneously hypertensive rat

○小山 正浩[1]、石田 竜也[2]、猪狩 直樹[3]、加藤 智[3]、中村 浩蔵[1,2]([1]信州大農、[2]信州大院農、[3]大和薬品（株））
○Masahiro KOYAMA[1], Ryuya ISHIDA[2], Naoki IGARI[3], Satoshi KATO[3], Kozo NAKAMURA[1,2]([1]Agric. Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Shinshu Univ., [3]Daiwa pharm.)

【目的】ソバスプラウトを原料とした乳酸発酵食品・発酵キョウバクは，高血圧自然発症ラット（SHR）に対して 10 μg/kg 用量の単回経口投与で優れた降圧作用を示す。そこで本研究では，発酵キョウバクを配合した飼料で SHR を飼育し，発酵キョウバクの血圧上昇抑制作用および血管内皮機能改善作用を評価した。
【方法】混餌投与試験：雄性 14 週齢 SHR（n=9）に発酵キョウバク凍結乾燥物を 0.01%w/w 配合した混餌(以下，発酵キョウバク混餌)と水道水を自由摂取させ，42 日間飼育した。対照群（n=9）には標準飼料（MF 固形飼料）を与え同様に飼育した。試験期間中は，体重，摂水量，摂餌量を毎週 2 回（月，木曜日）測定し，収縮期血圧および拡張期血圧をテイルカフ法（Softron BP-98A）で毎週 1 回（木曜日）測定した。
血管内皮機能評価試験：試験終了後の SHR をエーテル麻酔下で放血死させた後，摘出した胸部大動脈から血管リング標本を作製した。血管リング標本は，栄養液を満たしたマグヌス実験装置(UFER UC-5A)にセットし安定化させ，静止張力 1.5 g を負荷した状態で収縮剤（フェニレフリン）で血管を収縮させプラトーに達した後，拡張剤・アセチルコリンを終濃度 10^{-9}～10^{-4} M で累積添加し張力変化を測定し血管内皮機能を評価した。
【結果】飼育期間中，対照群の収縮期血圧および拡張期血圧は加齢とともにそれぞれ 11 mmHg，13 mmHg 上昇した。発酵キョウバク混餌投与群では加齢による血圧上昇は抑制され，投与 42 日後に収縮期血圧が，投与 28 日および 42 日後に拡張期血圧が，対照群と比較して有意に低値を示した。血管内皮機能評価試験では，発酵キョウバク混餌投与群の血管リング標本は，低濃度のアセチルコリン（10^{-8} M）で対照群と比較して有意に強い血管拡張作用を示した（p<0.05）。発酵キョウバク混餌投与群の平均摂餌量および平均体重は，それぞれ 20.5 g/匹/日，355 g/匹であり，一日当たり発酵キョウバク凍結乾燥物摂取量は 5.9 mg/kg であった。SHR は，加齢に伴って血圧が上昇するとともに血管内皮機能が低下し，アセチルコリン添加による血管拡張作用が低下する[1]。以上の結果から，発酵キョウバク 0.01%混餌投与で，加齢による SHR の血管内皮機能が改善され血圧上昇が抑制できることが示唆された。
1.砂野ら，薬学雑誌，123(7)，495-515（2003）.

Suppressive action of blood pressure elevation, lactic fermentation of buckwheat sprouts, improvement of endothelial function

講演番号：3B03a17
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ B 校舎 03 会場

発酵キョウバク由来降圧ペプチドの生体内 ACE 活性に与える影響

in vivo ACE activity of blood pressure lowering peptides from fermented buckwheat sprout

○石田 竜也[1]、小山 正浩[2]、服部 成治[1]、中村 浩蔵[1,2] ([1]信州大院農、[2]信州大農)
○Ryuya ISHIDA[1], Masahiro KOYAMA[2], Seiji HATTORI[1], Kozo NAKAMURA[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. Shinshu Univ., [2]Agric. Shinshu Univ.)

【目的】ソバスプラウトを乳酸発酵させた発酵キョウバクから単離された 7 種の降圧ペプチド（FQ, GHG, VAE, VVG, DVWY, WTFR, FDART）は，高血圧自然発症ラット（SHR）において *in vivo* アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性を示したが，*in vitro* ACE 阻害活性は弱かった。この *in vivo* および *in vitro* ACE 阻害活性の差異は，各測定系での ACE 阻害剤-ACE-基質の相互作用の差異に基づくと推測された。そこで本研究では，生体内での阻害剤-ACE-基質相互作用を模倣した環境で ACE 阻害活性を測定できる *ex vivo* ACE 阻害活性試験系を開発し，単離ペプチドの生体 ACE 阻害活性を評価するとともに，高血圧状態および正常血圧状態での ACE 発現および ACE 阻害状態の差異について考察した。
【方法】*in vitro* 試験は，阻害剤，ACE，基質が均一に分散した生体内とは異なる条件下で行われる。*in vivo* 試験は生体 ACE として組織ホモジネートを用いるため，ACE 以外の生体ペプチダーゼが基質と相互作用する可能性がある。そして両試験とも ACE 本来の基質であるアンジオテンシン I（Ang I）ではなく合成基質を用いている。そこで，新たに開発した *ex vivo* 試験では，生体 ACE に胸部大動脈リング標本を，基質に Ang I を用い生体環境を模倣した。エーテル麻酔下で放血死させた SHR および正常血圧ラット（SDR）から胸部大動脈を摘出し，血管内皮由来の血管作動物質の影響を除くために内皮を除去したリング標本を作製した。クレブス栄養液を満たしたマグヌス実験装置に血管リング標本をセットし平衡化後，単離ペプチドを終濃度 0.1，1.0，10 μM となるように添加，30 分間インキュベートした。この操作で血管組織 ACE と単離ペプチドを十分に相互作用させた。その後，Ang I を終濃度 0.2 μM となるように添加し，組織 ACE により生成したアンジオテンシン II（Ang II）により引き起こされる血管張力の変化と生成 Ang II の LC-MS 定量により *ex vivo* ACE 阻害活性を評価した。
【結果】*ex vivo* 試験において，血管リング標本からの内皮除去が ACE 活性に及ぼす影響はわずかであり，試験結果を補正する必要は無いと判断された。*ex vivo* 試験の結果，SHR 胸部大動脈では FQ, DVWY, WTFR, FDART が Ang II の生成を有意に抑制し，Ang II 由来血管収縮を抑制していた。これらのペプチドの Ang II 生成抑制作用と血管収縮抑制作用間には高い相関があり，Ang II 生成抑制が直接血管収縮を抑制していることが示された。血管収縮抑制は血圧降下に直接関与する生体反応である。つまり，*ex vivo* 試験により血圧降下に関わる ACE 阻害活性を評価することができたと考えられた。一方，SDR 組織を用いた *ex vivo* ACE 阻害活性試験では SHR とは異なる ACE 阻害挙動が見られた。

blood pressure-lowering peptide, *ex vivo* ACE inhibition assay, ACE inhibition responsible for blood pressure-lowering

講演番号：3B03p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ B 校舎 03 会場

S-1-Propenyl-L-cysteine sulfoxide を高含有するタマネギエキスの製造

Production of onion extract containing a high concentration of S-1-propenyl-L-cysteine sulfoxide

○稲川 裕人、片柳 悠紀、新村 由紀、原田 昌卓、池本 裕之、福富 竜太、八幡 信広（日清ファルマ(株)）
○ YUTO INAGAWA, YUKI KATAYANAGI, YUKI SHIMMURA, MASATAKA HARATA, HIROYUKI IKEMOTO, RYUTA FUKUTOMI, NOBUHIRO YAHATA (NISSHIN PHARMA INC.)

【背景】タマネギに含まれる含硫アミノ酸の一種である S-1-propenyl-L-cysteine sulfoxide（以下 PeCSO）は加齢やストレスによる性腺機能の低下を防ぎ、男性ホルモンの一種であるテストステロンを回復させる作用が報告されており、男性更年期障害（LOH 症候群）の予防効果が期待される[1)2)]。一方で、PeCSO はタマネギの破砕によって活性化するアリナーゼによる分解、あるいは加熱処理による変質などの理由から安定性が悪く、これまで PeCSO を高含有するタマネギエキスの安定的な製法は確立されていなかった。我々はタマネギ品種の選定と精製処理により、安定的かつ安全性の高いタマネギエキスの製造方法を検討した。

【方法】北海道産のタマネギ品種中の PeCSO 含有量を分析し、PeCSO の品種間差、及び収穫後の変動を調査することで、PeCSO を高含有する品種の選定を行った。さらにタマネギ中の PeCSO を安定的かつ効率的に精製するため、丸ごと加熱工程、グルタミナーゼ処理工程、及び強陽イオン交換樹脂精製工程を含む製法を検討した。得られたタマネギエキスの安全性を急性毒性試験及び変異原性試験により評価した。

【結果と考察】

(1)PeCSO 含有量の品種間差を検討した結果、スーパー北もみじの PeCSO 含有量が他の品種に比べて高い傾向が見られた。また、グルタミナーゼ処理を行うことで PeCSO 含有量が高まることが明らかとなった。

(2)丸ごと加熱工程、グルタミナーゼ処理工程、及び強陽イオン交換樹脂精製工程を含む製法により得られたタマネギエキスは、PeCSO 含有量が精製前の約 3 倍に高まった。

(3)急性毒性の結果、経口 LD_{50} は 5,000 mg/kg BW 以上と推定された。変異原性試験では変異原性は認められなかった。

以上より、PeCSO を含むタマネギエキスの安定的な製法を確立し、安全性が確認された。

1)西村ら　第 145 回日本農芸化学会東北支部大会(2010)
2)井口ら　第 13 回日本抗加齢医学会（2013）

onion, PeCSO, sulfur-containing amino acid

講演番号：3B03p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ B 校舎 03 会場

イオン性多糖類を用いた胃内浮遊性炭酸飲料の設計

Formulation of carbonated beverage with gastric floating system using ionic polysaccharide

○堂本 隆史、坂田 茜、深見 麻里江、武井 拓人（大正製薬株式会社セルフメディケーション開発研究所）
○Takashi DOMOTO, Akane SAKATA, Marie HUKAMI, Takuto TAKEI (Taisho Pharmaceutical Co., Ltd. Self Medication Business R&D Laboratories)

【目的】

肥満症の発症および治療阻害要因の一つとして、過食や間食などの行動要因が挙げられる。これを改善するには空腹感の制御が重要と考えられるが、日常的に手軽に空腹感を抑制できる十分な方法はない。

我々は、空腹感に影響する因子の一つである胃壁の伸展に関し、胃壁を持続的に伸展させることで空腹感を抑制する方法を考えた。そこで今回、イオン性多糖類のゲル化能および炭酸に着目し、胃内でゲル化、膨張、浮遊する飲料（胃内浮遊性炭酸飲料）の設計を試みた。

【方法】

各種イオン性多糖類（LM ペクチン、HM ペクチン、アルギン酸ナトリウム、ジェランガム、カラギーナン、キサンタンガム）の溶液を調製し、精製水または市販の炭酸水で希釈することにより、多糖類の水溶液または炭酸水溶液を調製した。冷却（1℃）したこれらの溶液を加温（37℃）した人工胃液（日本薬局方崩壊試験第一液 pH1.2）または緩衝液に滴下し、混合溶液の状態を確認、混合溶液全体の体積を測定することによりゲルの膨張率を評価した。

【結果】

検討したイオン性多糖類の中で、LM ペクチン、アルギン酸ナトリウムおよびジェランガムの水溶液を人工胃液へ滴下することにより、ゲル化し塊状となった。これら 3 種のイオン性多糖類の炭酸水溶液を人工胃液に滴下した場合には、炭酸ガスにより膨張したゲルの浮遊が観察された。この胃内浮遊性炭酸飲料は、いずれも炭酸飲料として設計可能な pH 範囲、嗜好性と両立可能な低粘度であった。特に、LM ペクチンを用いた場合は低 pH でも設計が可能で、かつ低粘度でも膨張率が高く、設計に最適であった。

胃内浮遊性炭酸飲料は空腹時の胃内 pH ではゲル化、膨張、浮遊する一方、食後の胃内 pH ではゲル化しないため、満腹時に摂取しても必要以上に胃壁を伸展させる恐れの少ないこと、人工胃液滴下 6 時間後まで膨張・浮遊状態を維持し持続性があること、などの特性が確認できた。

以上より、胃内浮遊性炭酸飲料の設計条件及び特性を把握し、設計可能であることを確認することができた。この胃内浮遊性炭酸飲料は、空腹時の摂取により胃内でゲル化、膨張、浮遊し、胃壁を持続的に伸展させることで空腹感を抑制する可能性がある。

gel, beverage, polysaccharide

講演番号：3B03p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ B 校舎 03 会場

茶生葉酵素を利用したテアフラビン類高含有飲料の開発

Development of Theaflavin rich RTD tea, making use of enzymatic actions of tea leaves

○淺沼 俊倫[1]、高木 啓詞[1]、袴田 雅俊[1]、上野 千恵[1]、上村 慎子[1]、油上 保[1]、杉山 直人[1]、望月 一男[1]、笹野 直紀[2]、太田和 宏宣[2]、片岡 良充[2] ([1]静岡県工業技術研究所、[2]静岡ジェイエイフーズ株式会社)

○Toshimichi ASANUMA[1], Hiroshi TAKAGI[1], Masatoshi HAKAMATA[1], Chie UENO[1], Mitsuko KAMIMURA[1], Tamotsu YUGAMI[1], Naoto SUGIYAMA[1], Kazuo MOCHIZUKI[1], Naoki SASANO[2], Hironori OOTAWA[2], Yoshimitsu KATAOKA[2] ([1]Industrial Research Institute of Shizuoka Prefecture, [2]Shizuoka JAfoods Co., Ltd)

【目的】

テアフラビン類は茶葉中の酸化酵素によってカテキン類が酸化重合することによって生成する重合ポリフェノールであり、色素成分として紅茶の水色（すいしょく）に影響を与えるほか、抗酸化活性や抗肥満活性などを有する機能性成分としても知られている。テアフラビン類は一般的に高級茶葉に多く含まれる傾向にあると言われているが、市販飲料中には僅かしか含まれていない。そこで、本研究では手軽にテアフラビン類を摂取可能なテアフラビン高含有飲料の開発を目的とした。

【方法】

酵素反応の基質となるカテキン類の供給源として、緑茶抽出物を粉体化したインスタントグリーンティー（IGT）をイオン交換水に溶解し、CTC 破砕した茶生葉（やぶきた二番茶）を酵素源として添加して酸化反応を行った。得られた反応液を PET ボトルに充填して発酵茶飲料を作製した。

【結果】

反応の結果、水色が赤く変化し、特有の発酵香が生じると共にテアフラビン類が経時的に増加した。その後の殺菌工程である程度減少したものの、最終的な PET ボトル飲料中に一般的な市販飲料と比較して高濃度のテアフラビン類が含有されていることを確認できた。

ラボスケールの飲料試作試験で実際にテアフラビン高含有飲料が作製できたことから、工業スケールへのスケールアップを検討した。飲料製造工場の実機を用いて 2ｔスケールで反応を行い、清澄化、調合、殺菌工程を経て飲料を試作した。実機においてもラボスケールと同様に、酵素反応によってテアフラビン類が経時的に生成し、テアフラビン類高含有飲料が製造できた。

今後はより高効率な反応条件の検討や飲料香味の調整などを行い、商品化を目指す。

本研究は、独立行政法人科学技術振興機構の静岡県・静岡市地域結集型研究開発プログラム「静岡発世界を結ぶ新世代茶飲料と素材の開発」の一環として行った。

theaflavin, fermentation

講演番号：3B03p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ B 校舎 03 会場

茶葉ポリフェノールオキシダーゼ活性の簡易的測定方法の構築と評価

Evaluation for the activity of polyphenol oxidase in tea leaves

○袴田 雅俊、高木 啓詞、淺沼 俊倫、望月 一男（静岡県工業技術研究所）
○ Masatoshi HAKAMATA, Hiroshi TAKAGI, Toshimichi ASANUMA, Kazuo MOCHIZUKI (Industrial Research Institute of Shizuoka Prefecture)

【目的】

テアフラビン類は紅茶の色素成分として知られており、抗ウイルス作用、脂肪吸収抑制効果などの機能性も報告されている。このテアフラビン類は茶葉中のポリフェノールオキシダーゼ(PPO)の作用によって生成することが知られている。そこで本研究では、テアフラビン類高含有の紅茶を製造するために、テアフラビン類の生成を指標として、茶葉の PPO 活性を簡易的に評価する方法を構築することとした。さらにその方法を用いて PPO 活性の評価を試みた。

【方法】

茶生葉を液体窒素で凍結しながら粉砕後、冷水で洗浄することで茶葉中のカテキン類を除去した。その茶葉にエピガロカテキン(EGC)およびエピカテキン(EC)を加えて反応させ、反応上清液を超高速液体クロマトグラフで分析することでテアフラビン(TF)の生成量を測定した。TF 増加量を PPO 活性の指標とし、1 分間に TF が 1μmol 生成するときを 1U として評価した。

【結果】

反応開始初期では反応時間に比例して TF が増加したことから、TF 生成の初速度を比較することで PPO 活性を評価することとした。茶葉中の PPO 活性は pH4.5～5.0 付近、温度 40～45℃付近で活性が最大となった。テアフラビン類には構造が類似した 4 種類の化合物があるが、生成速度を比較すると、EC+EGC (TF)＞ECg+EGC (TF3’g)＞ECg+EGCg (TFDg)＞EC+EGCg (TF3g)であった。また茶葉と茎との比較では茎において PPO 活性が高かった。さらに品種や茶期による酵素活性の違いもみられた。本方法により、茶葉から酵素を抽出することなく茶葉全体での PPO 活性を評価・比較することができた。

本研究は、独立行政法人科学技術振興機構の静岡県・静岡市地域結集型研究開発プログラム「静岡発　世界を結ぶ新世代茶飲料と素材の開発」の一環として行った。

polyphenol oxidase, tea, theaflavin

講演番号：3B03p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ B 校舎 03 会場

テアフラビン類高含有紅茶葉の製造方法の開発
Development of manufacturing method of theaflavins-rich black tea leaf
○高木 啓詞、袴田 雅俊、淺沼 俊倫、望月 一男（静岡県工業技術研究所）
○ Hiroshi TAKAGI, Masatoshi HAKAMATA, Toshimichi ASANUMA, Kazuo MOCHIZUKI (Industrial Reseach Institute of Shizuoka Prefecture)

【目的】
テアフラビン類は紅茶の赤色色素成分のひとつで、抗ウイルス作用や脂肪吸収抑制効果などの機能性成分として注目されている。テアフラビン類はカテキン類をチャ（*Camellia sinensis*）に含まれる酸化酵素であるポリフェノールオキシダーゼ（PPO）を利用して発酵させることで生成することが知られている。しかし、チャに含まれるカテキン量や PPO 活性が異なるため、発酵条件を同じにしても紅茶に含まれるテアフラビン類量は同じになるとは限らない。そこで、本研究では PPO 活性を調べることによって、原料茶葉に合わせた発酵条件を推定し、テアフラビン類高含有紅茶の製造を目的とした。

【方法】
冷凍保存しておいた茶生葉を室温で解凍し、CTC 機で破砕後、直ちに 25～40℃、湿度 90%の条件で発酵させた。20 分毎に発酵茶葉をサンプリングし、発酵が進まないよう-25℃で冷凍した。発酵茶葉中のテアフラビン類量を調べるため、メタノール抽出したサンプルを超高速液体クロマトグラフィーで分析した。また、冷凍破砕茶生葉の PPO 活性をエピカテキンとエピガロカテキンを基質に用いて測定し、テアフラビン類生成量が最大となった時間との相関を調査した。

【結果】
テアフラビン類生成量は最初増加し、ある時間を境に減少していくことがわかった。これは、酸化重合がさらに進み、テアルビジンに変化しているためと考えられる。テアフラビン類生成量が最大になる時間と PPO 活性との間には相関が認められた。このことから、PPO 活性を調査することでテアフラビン類生成量が最大となる発酵時間を予測できることが示唆された。

本研究は、独立行政法人科学技術振興機構の静岡県・静岡市地域結集型研究開発プログラム「静岡発　世界を結ぶ新世代茶飲料と素材の開発」の一環として行った。

theaflavin, black tea, fermentation

講演番号：3B03p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ B 校舎 03 会場

LC/MS 及び多変量解析を用いた緑茶成分の分析
Analysis of green teas by LC/MS and multivariate statistics
○岡田 明子、清水 博、則武 智哉（（株）UBE 科学分析センター）
○Akiko OKADA, Hiroshi SHIMIZU, Tomoya NORITAKE (UBE SCIENTIFIC ANALYSIS LABORATORY, INC.)

【目的】緑茶にはカテキン類に代表されるフラボノイドや、ビタミン、アミノ酸、カフェイン等、多数の成分が含まれている。これら成分の機能性は注目されており、特にフラボノイドは抗酸化作用や体脂肪低下作用等の効果から、健康増進を目指した製品も多く市販されている。研究開発において製品の特徴づけは重要と考えられるが、全成分を分析し、製品間で差を比較したり、ある製品に特徴的な成分を探索したりすることは大変な労力を要する。
今回、緑茶成分の特徴を探索するために、LC/MS（液体クロマトグラフ/質量分析）及び統計解析手法である多変量解析を組み合わせて分析を行った。

【方法】試料には緑茶計 15 種を用い、0.45 μm のフィルターにてろ過して分析に供した。液体クロマトグラフによる分離には、カラムとして Waters 製 ACQUITY UPLC HSS T3（2.1×100 mm）を用い、移動相には 0.1 %ギ酸含有 5 %THF 水溶液及びアセトニトリルを用いてグラジエント条件にて測定した。流速は 0.4 ml/min、カラム温度は 40 ℃とした。質量分析部においては、ESI（エレクトロスプレーイオン化法）のネガティブモードにて、質量範囲 m/z 50-1000、n=4 で測定した。測定後、多変量解析ソフトを用いて試料の比較や特徴成分の探索を行った。

【結果】15 種の緑茶を多変量解析にて分析した結果、試料のグルーピングや、試料に特徴的な成分（カテキン、エピカテキン、カテキンガレート、エピカテキンガレート、ガロカテキン、エピガロカテキン、ガロカテキンガレート、エピガロカテキンガレート等）を検出することができた。さらに、不明成分(m/z 755)を LC/MS により詳細に分析した結果、精密質量測定から組成式、MS/MS 測定によるフラグメントイオンから構造情報が得られ、フラボノイドの配糖体と推定された。

multivariate statistics, LC/MS, green tea

講演番号：3B03p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ B 校舎 03 会場

亜臨界水抽出による茶の味および香りに関する化学的研究

Chemical studies on taste and fragrance of tea by sub-critical water extraction

○宮下 知也（静大院農）
○TOMOYA MIYASHITA (Shizuoka Univ.)

【目的】

本研究では亜臨界水が持つ特殊な作用に着目し、緑茶の抽出として有効利用できないか検証を行った。亜臨界水は有機溶媒に似た性質で優れた成分抽出作用や加水分解作用を持った技術である。これまでに亜臨界水処理の技術は廃棄物処理や再資源化などの工業的な利用として活用されているが、食品加工技術としての実例がほとんどない。その中で静岡県の特産品である緑茶の抽出に応用することを考え、バッチ式の亜臨界水抽出装置を用いて緑茶の味、香りの改善に関する研究を行った。緑茶には様々な有用成分が含まれおり、過去の研究によって数多くの生理機能が報告されている。本研究では亜臨界水抽出と従来の抽出方法である熱水抽出および加圧抽出との違いを検証するため、各抽出の味や香りに関する成分の変化について比較し、亜臨界水抽出の特徴を明らかにすることを目的とした。また、従来品よりも付加価値の高い緑茶飲料の開発も目指して研究を行った。

【方法】

緑茶（茶葉）に蒸留水を加えて撹拌し、熱水（常圧、９０℃)、加圧（０．２ＭＰａ、１２０℃)、亜臨界水（３．０ＭＰａ、１２０～１８０℃）の条件で抽出を行った。使用した茶葉は２～３番茶にあたる煎茶を用いた。それぞれの抽出条件で得られた抽出液を濾過し、緑茶抽出液と茶殻に分離した。その後、緑茶抽出液をフリーズドライにより粉末化させ、分析用サンプルの作成を行った。味や色に関する分析ではアミノ酸、カテキン類、カフェイン、遊離糖類、有機酸類およびクロロフィルなどの成分をＨＰＬＣで分析し、香り成分においてはＧＣ－ＭＳ分析で評価し、定量的に比較を行った。

【結果】

緑茶の味に関与する成分を測定した結果、亜臨界水抽出では従来の抽出方法に比べて、アミノ酸のテアニンやグルタミン酸およびアルギニンの増加、カテキン類のＥＧＣおよびＥＣの増加、糖類のスクロースおよびペクチンの増加が確認された。この要因として亜臨界水が持つ加水分解作用が抽出量に影響していることが考えられた。また、クロロフィルにおいては著しい増加が確認され、亜臨界水は緑茶抽出液の色の変化にも影響することが示唆された。香りについては亜臨界水抽出において従来の抽出方法よりも香気成分含有量が高くなることが確認された。従って、亜臨界水抽出は味や香りに関与する成分を従来の抽出方法よりも効率的に抽出することが可能であると示唆された。今後、新たな機能性について細胞レベルおよび動物レベルで検討していく予定である。

Sub-critical water, Tea, Taste

講演番号：3B03p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ B 校舎 03 会場

ドライエイジング処理が牛肉の香気に及ぼす影響

Effects of dry aging treatment on flavor of beef

○池ヶ谷 篤[1]、油上 保[1]、渡瀬 隆也[1]、青野 博志[2]、篠田 和代[2] ([1]静岡県工業技術研究所、[2]アオノフレッシュミート株式会社)
○ Atsushi IKEGAYA[1], Tamotsu YUGAMI[1], Takaya WATASE[1], Hiroshi AONO[2], Kazuyo SHINODA[2] ([1]Industrial Reserch Institute of Shizuoka Prefecture, [2]Aono Fresh Meat Co.Ltd.,)

【目的】

ドライエイジング処理は牛肉や羊肉、鹿肉等を枝肉またはブロックの状態で０～４℃、湿度８０％程度で２～６週間程度熟成させるものである。熟成中にたんぱく質がアミノ酸に分解し、うまみが増加することは良く知られているが、同時に香気も香ばしく、濃厚なものになる。ドライエイジング処理による肉の香気の変化については報告が少ないため、分析を行った。

【方法】

今回は自身でドライエイジング処理を行っているレストランのドライエイジング処理後生肉及び冷凍保存しておいた原材料生肉、アオノフレッシュミート社で試作したドライエイジング処理後生肉及び原材料生肉について、ミルサーでミンチ状にし、それぞれ 1g を 18ml のバイアルにいれ、ヘッドスペース法でヘッドスペースガスをサンプリングし、GC/MS で分析した。

【結果】

ドライエイジング処理を施した牛肉はいずれも原材料の牛肉よりも検出された香気成分量が増加しており、より複雑な香気なったと考えられる。ドライエイジング処理牛肉はいずれも 3-methyl-1-Butanol、Hexanal、1-pentanal 等が処理前よりも大幅に増加していた。また、原材料の牛肉には大きな香気の差は見られなかったが、処理方法の違いにより、香気に大きな差がみられ、レストラン処理肉では Benzyl Alcohol、Methyl Isobutyl Ketone が、アオノフレッシュミート社処理肉は Phenylethyl Alcohol、Dimethyl disulfide、Phenol がそれぞれ検出された。

Benzyl Alcohol や Phenylethyl Alcohol は芳香を放つ成分であるし、Methyl Isobutyl Ketone や Dimethyl disulfide は単体では良い香りではないが、いずれもピーク面積値は小さく、少量であれば、肉の香りに熟成感のある深みを与えると考えられるため、ドライエイジングは牛肉の香気を向上させるものと考えられた。

また、処理方法の違いにより、香気発現に大きな差がみられたため、今後、より有効な処理方法を検討したい。

dry aging, flavor, beef

講演番号：3B03p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ B 校舎 03 会場

スパゲティの香気成分に及ぼす乾燥温度・乾燥時間の影響について

Effect of drying condition (temperature, time) on volatile organic compounds from spaghetti

岩瀬 翔太郎、杉山 健二郎、○山田 昌治（工学院大学院工）
Shotaro IWASE, Kenjiro SUGIYAMA, ○Masaharu YAMADA (Kogakuin Univ.)

【目的】スパゲティはデュラム小麦由来の粗挽き粉（セモリナ）を水とともに混練し、押し出し成形して乾燥させたものであり、生スパゲティと異なりアルデンテの食感を楽しむ食品である。スパゲティは茹であげると独特なグリーンな香気が生じ、ソースを絡めたときにスパゲティ料理の総合的な香りを形成している。イタリアには多くのスパゲティメーカーがあり、各々独自の工程で製造しており、その工程がスパゲティの香気に影響を与えている。スパゲティの製造工程で、スパゲティの香気に大きな影響を与えるのは乾燥工程である。筆者らは、スパゲティの乾燥工程と最終的な乾燥スパゲティの香気との関係を把握するため、GC/MS を用いて様々な温度で乾燥させたスパゲティのゆで上げ時の香気を測定したところ、15 種類の香気成分を検出し、そのうち 2 種類（2-pentylfuran, benzaldehyde）に乾燥温度依存性があることを示した。本研究では、乾燥温度に加えて乾燥時間の影響を明らかにする。
【方法】カナダ産のデュラム小麦セモリナと水を 5:2 の割合でミキサーを用いて 10 分間混練し、パスタマシンによって製麺した。その後、恒温乾燥機を用いて 40, 60, 80, 100℃で、それぞれ 5～48 時間乾燥させた。でき上がった乾燥スパゲティについて、ゆで上げ条件を一定にしてゆで上げた麺線を一定時間放冷し、バイアルビンに充てんしてヘッドスペース型 GC/MS で香気成分の分析を行った。
【結果および考察】
前回の報告で強度に温度依存性があることを示した 2 種類の香気成分のうち、2-pentylfuran は、40℃および 60℃では強度が頭打ちになるのに対し、80℃および 100℃では、乾燥時間とともに強度が増加した。一方の benzaldehyde は、80℃までは強度が頭打ちになるのに対し、100℃では乾燥時間とともに強度が増加した。このことからそれぞれの香気成分の生成反応の活性化エネルギーが異なることが示唆される。なお、検出された香気成分の一つである Hexanal は、80℃までは乾燥時間に伴う変化はほとんど見られなかったが、100℃では、乾燥時間 7 時間程度まで直線的に強度が増加した。Hexanal は穀粉中の脂肪酸の酸化で生成することが知られているが、100℃乾燥では、脂肪酸の酸化が進行するものと思われる。2-pentylfuran および benzaldehyde ともに加熱香気成分と考えられており、また、Hexanal は穀粉由来のグリーンな香気に相当するので、大ざっぱにいって、80℃以上での乾燥温度では、乾燥時間が長くなるにつれて加熱香気成分が強くなり、60℃以下の乾燥条件では、乾燥時間に関わらず穀物由来の香気成分が際立つと考えられた。

GC/MS, drying, spaghetti

講演番号：3B03p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ B 校舎 03 会場

赤ワインタンニンのタンパク質結合性による分画
Fractionation of red wine tannin using protein binding activity
○奥田 徹、近田 有哉法、井上 絵梨、斉藤 史恵、久本 雅嗣 (山梨大院ワイン研)
○Tohru Okuda, Yukinori Chikada, Eri Inoue, Fumie Saito, Masashi Hisamoto (Univ Yamanashi)

【目的】赤ワインのポリフェノールは健康に寄与する成分として注目されている。赤ワインのポリフェノール濃度は 1.5～3.0g/L 程度であるが、その大部分は proanthocyanidin 類（通称タンニン）と呼ばれる高分子重合物である。タンニン類は、catechin や epicatechin が重合した構造をしており、赤ワインの場合、主にブドウの果皮と種子に由来する。また、タンパク質と結合する性質を持ち、ワインを飲んだ際に、唾液中のタンパク質と結合することで、不溶性の沈殿を形成し、収斂味を与えると考えられている。赤ワイン中のタンニンを分析する場合、牛血清アルブミン（BSA）にタンニンを結合させ、沈殿を得て、この沈殿物中のポリフェノール濃度を定量する方法(Harbertson-Adams Assay)が一般的に用いられている。しかし、これまでの HPLC による分析や Folin Ciocalteau 法との差から、BSA に結合しないタンニン類が多量に存在すると推測された。BSA に結合しない性質は、収斂味を与えず、通常のタンニンとは異なる作用を持つと考えられる。そこで、本実験では、BSA 結合性のタンニンと、非結合性のタンニンの違いを明らかにすることを実験の目的とした。
【方法】2013 年に山梨大学で製造した Cabernet Sauvignon 赤ワインを試料とした。ワインに BSA 溶液（pH 5.3）を加え、室温で反応後、遠心分離し沈殿と上清を得た。沈殿は 50% MeOH に可溶化後、ODS カラムによりモノマー画分（0.1% TFA-50% MeOH 溶出）とポリマー画分（0.1% &TFA-66% Acetone 溶出）に分画した。また、上清も同様にモノマーとポリマーの画分に分画した。これらの液を塩酸加水分解し、phrologlucinol で誘導体化し、HPLC でタンニンの組成を調べた[1]。また、Folin Ciocalteau 法によりポリフェノール濃度を定量した。
【結果】赤ワインポリフェノールのうち約 1/4 が BSA によって沈殿し、3/4 が上清となった。これらを分画し HPLC で分析した結果、上清中にはアントシアニン類が含まれたが、加水分解によりエピカテキンに相当する誘導体が検出されたことからタンニンも存在することが示唆された。また、ポリマー画分の組成を調べた結果、BSA で沈殿した画分と、沈殿しなかった画分の組成に大きな違いは認められなかった。沈殿形成に影響を与える化合物として多糖類が考えられるため、これらの影響について分析する予定である。

1 J. A. Kennedy and G. P. Jones (2001) J. Agric. Food Chem., 49, 1740-1746.

wine, tannin, proanthocyanidin

講演番号：3B03p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ B 校舎 03 会場

甲州種ワイン醸造におけるヒドロキシシンナム酸エチルエステルの生成と呈味に与える影響
Formation of hydroxycinnamic acid ethyl ester during wine making and effect on the taste of Koshu wine
○斉藤 史恵、林 周美、久本 雅嗣、奥田 徹（梨大・ワイン研）
○Fumie SAITO, Megumi HAYASHI, Masashi HISAMOTO, Tohru OKUDA (Enol. Vitic. Univ. Yamanashi)

【目的】国産白ワインである甲州種ワインは、辛口になるにつれて後味に独特の苦味を呈することが知られている。これまでに、その苦味に関わる物質として *p*-coumaric acid や caffeic acid、これらの酒石酸エステルである coutaric acid と caftaric acid、エチルエステルである ethyl *p*-coumarate と ethyl caffeate の寄与について報告した。このうちエチルエステルは、ブドウ果汁中には含まれないことから醸造中に生成していると考えられるが、その生成機構については不明であった。その後の研究で、果汁の清澄化に用いられる *Aspergillus niger* 由来のペクチナーゼ製剤にエステラーゼ活性を有するものがあり、この逆反応によりエチルエステルが生成する可能性が示された。そこで、本研究ではエチルエステル生成活性が認められたペクチナーゼ製剤を用いて、甲州ワインの醸造試験を行い、醸造過程でエチルエステルが生成するか検討を行った。また、醸造した甲州ワインについてペクチナーゼ製剤の有無により呈味に違いが生じるか検討を行った。
【方法・結果】甲州種ブドウ果汁にワイン醸造用酵母（EC 1118）を添加し、ペクチナーゼ製剤を添加しないもの（control（＋））と 200 mg/L になるように添加したもの（pectinase（＋））を調製した。また、無発酵区として、甲州種ブドウ果汁に亜硫酸を 200 mg/L になるように添加し、同様にペクチナーゼ製剤の添加なし（control（－））と添加あり（pectinase（－））を調製した。これらを 15 ℃で 12 日間インキュベーションし、一定期間ごとに *p*-coumaric acid および caffeic acid、coutaric acid、caftaric acid、ethyl *p*-coumarate、ethyl caffeate を高速液体クロマトグラフィーを用いて定量した。ペクチナーゼ製剤無添加では、ブドウ果汁に含まれる coutaric acid および caftaric acid はほとんど減少しなかった。一方、ペクチナーゼ製剤添加では発酵開始直後から coutaric acid および caftaric acid が急激に減少し、同時に *p*-coumaric acid と caffeic acid が増加していった。さらに発酵区では発酵開始 2 日目よりアルコール生成が認められ、同時に ethyl *p*-coumarate と ethyl caffeate の生成が認められた。発酵 12 日間の coutaric acid および caftaric acid、*p*-coumaric acid、caffeic acid、 ethyl *p*-coumarate、ethyl caffeate の濃度はペクチナーゼ無添加（control（＋））ではそれぞれ 73、200、0.1、0.8、0.0、0.0 mg/L となった。一方、ペクチナーゼ添加（pectinase（＋））では 1.0、32、2.5、53、2.9、21 mg/L となった。これら 2 つの醸造ワインについて、苦味の違いが生じるか官能試験を行って比較検討した。

Koshu wine, hydroxycinnamic acid, enzyme preparation

講演番号：3B03p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ B 校舎 03 会場

イチゴジャムのペクチン濃度がフレーバーリリースに及ぼす影響

The effects of pectin concentration on flavor release of strawberry jam

○黒飛 知香[1]、干野 隆芳[1]、風見 由香利[2]、神山 かおる[2]、早川 文代[2] ([1]アヲハタ（株）、[2](独)農研機構・食総研)
○TOMOKA KUROTOBI[1], TAKAYOSHI HOSHINO[1], YUKARI KAZAMI[2], KAORU KOHYAMA[2], FUMIYO HAYAKAWA[2] ([1]AOHATA Corp., [2]NARO, National Food Research Institute)

【目的】イチゴジャムのフレーバーリリースは、消費者の製品受容性に直接関与する重要な品質要素である。我々は、ジャムの官能特性の違いを客観的かつ動的に把握できる評価方法として Time-Intensity（以下、TI）法が適していることを報告した[1)]。本研究では、ペクチン濃度を変化させたモデルジャムを用いて粘度とフレーバーリリースに及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】ベース配合をイチゴ（45%）、砂糖（44%）、クエン酸（0.25%）とし、低メトキシル（以下 LM）ペクチン 0.4、0.6、0.8%を添加・調製したジャム 3 種類（低糖度タイプ：イチゴ）を用いた。ジャムの粘度は、Line Spread Test(以下、LST)法を用いて測定した。官能評価は、「甘味」、「酸味」、「イチゴフレーバー」の 3 項目とし、ISO8586 に準拠し選抜・訓練された 13 名のパネリストで個別ブースにて行った。TI 法は、試料を口に入れてから感じられた各項目の強度を 0（感じない）～10（強い）の幅で継続的に評価させた。10（強い）のリファレンスには、「甘味」に 45%ショ糖水溶液、「酸味」に 0.3%クエン酸水溶液、「イチゴフレーバー」は LM ペクチン無添加イチゴジャムを用い、パネル討議による評価尺度合わせを行った。試料を単独で提示し、2 反復行った。MP150（Biopac System 社）で収録した波形データを解析し、各項目の最大強度（Imax）、Imax に到達する時間（Tmax）、持続時間（Ttot）、曲線下面積（AUC）を算出した。統計解析には、SPSS Statistics 19.0 を用いた。
【結果】LST 法の測定結果より、ペクチン濃度 0.4、0.6、0.8%でジャム（165g）の広がりを表す直径が小さくなったことから、ペクチン濃度の増加に伴い粘度が高くなっていくことが確認された。また、官能評価からは、フレーバーリリースに関するパラメータの値を得ることができ、「甘味」、「酸味」、「イチゴフレーバー」の Imax は、ペクチン濃度の増加に伴いそれぞれの強度が有意に減少した（$p<0.05$）。中でも、「酸味」は AUC においても有意に縮小し、全体的な酸味強度も減少した（$p<0.05$）。以上の結果から、ペクチン濃度の増加に伴い粘度が高くなり、かつフレーバーリリースの強度や持続も悪くなることが明らかとなった。これは、物理的性質がフレーバーリリースの程度に大きく影響を及ぼしているものと考えられる。

1) 黒飛ら、日本食品科学工学会第 59 回大会講演要旨集,p182（2012）

flavor release, Time-Intensity(TI), pectin

講演番号：3B03p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ B 校舎 03 会場

液状食品モデルにおける各種増粘剤の香気放散挙動に与える影響
Effects of Thickening Agents on the Flavor Release from Model Liquid Foods
○吉田 遼[1]、松宮 健太郎[1]、林 和寛[2]、松村 康生[1]([1]京都大院農、[2]味の素(株)食品研)
○Ryo YOSHIDA[1], kentaro MATSUMIYA[1], Kazuhiro HAYASHI[2], Yasuki MATSUMURA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Ajinomoto Co., Inc. Institute of food sciences & technologies)

香りは消費者が食品を購入する際の判断基準として重要な役割を担っている。食品の香りは数百種類の香気物質から構成されており、その放散挙動は食品添加物（塩類や乳化剤、増粘剤など）によって変化することが知られている。食品添加物と香気成分との関係性については様々な研究が行われてきたが、スープやソースのような液状食品中の香気成分を対象にした研究はほとんど行われておらず、その知見は少ない。本研究では、化学的性質の異なる香気物質を含んだ液状食品のモデル再構成液を調製してサンプルとした。また液状食品の製造過程で使用される増粘剤に注目し、一定の粘度において、異なる種類の増粘剤が香気放散挙動に与える影響の違いについて検討した。

【材料および方法】

サンプルとして香気物質 14 種（アルコール類 4 種、アルデヒド類 3 種、ケトン類 3 種、エステル類 4 種）を含んだ再構成液を調製した（各香気物質の濃度は 1 ppm)。増粘剤にはキサンタンガム・豚ゼラチン・CMC（カルボキシメチルセルロース）を選択した。EMS 球回転式粘度計（京都電子産業（株）製）を用いて実際の液状食品の粘度を測定し、最終粘度が 3、6、12 mPa・s になるようにそれぞれの添加濃度（w/v %）を定めた。増粘剤添加溶液と再構成液を合わせた混合液 20 ml をバイアル瓶に注入し、60℃のウォーターバスで静置後、撹拌しながら HS-SPME（ヘッドスペース固相マイクロ抽出）法を用いて捕集し、GC-FID で分析を行った。得られた結果から香気成分の気液分配係数を算出し、増粘剤添加による香気放散量への影響について検討した。

【結果および考察】

分析の結果、増粘剤添加によって香気放散量が有意に異なった。香気放散量の減少は増粘剤と香気成分の結合によって、その放散が抑えられたためであると考えられる。一方、キサンタンガム添加溶液と豚ゼラチン添加溶液では一部の化合物で放散量の増加がみられた。過去の文献ではキサンタンガムの「塩析効果」による香気放散量の増加が示されており、今回もその影響が現れた可能性が示唆された。CMC は他の増粘剤に比べて香気放散量への影響が少なく、香気成分と相互作用しにくいと考えられる。疎水度（log*P*）に注目してみると、*log4* 付近の化合物群は他と比べて保持率が高く、疎水性の強い香気成分が増粘剤と結合しやすいと思われる。これまでは粘度の増加によって香気放散量が抑えられると考えられてきたが、今回の結果はそれと異なるものであった。今後は撹拌速度を変えて香気成分分析を行うなど、香気放散量の変動要因について詳しく検討していく予定である。

Flavor Release, Thickening Agents, Viscosity

講演番号：3B03p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ B 校舎 03 会場

自己駆動型クーロメトリーを用いたＮＡＤＨの定量とその応用

Determination of NADH using self-driven bio-coulometry and its application.

○川嶋 浩平、北村 誠、三木 功次郎（奈良工業高専）
○Kohei KAWASHIMA, Makoto KITAMURA, Kojiro MIKI (Nara Natl. Col. Tech.)

【目的】クーロメトリーは、電解反応によって流れた電気量を測定することで目的物質の絶対量を測定できる方法である。さらに、作用極に注入した試料物質と対極に含まれる電池活物質との酸化還元電位の差を駆動力として、電池と同様に自発的に放電電流を発生させ、電解に電源を必要とせずに迅速に測定できる自己駆動型クーロメトリー法が報告されている[1)]。本研究では、NADH 酸化酵素であるジアホラーゼと電子受容体として 2,3-ジメトキシ-5-メチル-*p* -ベンゾキノン（UQ_0）を用い、自己駆動型クーロメトリーによる NADH の測定を行い、その応用を試みた。

【実験】アクリル樹脂性の透析セル（㈱サンプラテック製）を加工してクーロメトリックセルとして用い、作用極（カーボンフェルト、約 5 cm^3）と対極（カーボンフェルト、約 5 cm^3）を陽イオン交換膜で隔てた。作用極には Mcllvaine 氏緩衝液（pH 6.0）、対極には被還元物質として 0.45 M $K_3[Fe(CN)_6]$を含む Mcllvaine 氏緩衝液（pH 6.0）をそれぞれ含浸させた。作用極と対極の間に抵抗を接続し、デジタルボルトメーターを用いて電流を測定した。NADH および、電子受容体となる UQ_0 を含む溶液（pH 6.5）にジアホラーゼ溶液を添加し、37℃で一定時間反応させた。酵素反応が終了したこの溶液をクーロメトリックセルに 10 μL 添加し、デジタルボルトメーターを用いて電流を測定し、電流を測定した。

【結果・考察】ジアホラーゼによる NADH の酸化反応に伴い生成する還元型 UQ_0 と $[Fe(CN)_6]^{3-}$の酸化還元電位の差による自己駆動により流れた電解電流より[2)]、電気量および、NADH 濃度を算出した。5 mM NADH 溶液 100 μL、25 mM UQ_0 100 μL、100 units/mL ジアホラーゼ 50 μL、（合計 250 μL、それぞれ Mcllvaine 氏緩衝液（pH 6.5）に溶かした溶液）とした場合、3 分以内に反応が終了し、吸光法によって求めた NADH 量とよく一致した電気量が得られた。本測定法の応用として NAD 依存性酵素である乳酸脱水素酵素（LDH）を組み合わせて、迅速・簡便・安価なピルビン酸定量法の検討を行った。

1) 内山俊一 編、高精度基準分析法クーロメトリーの基礎と応用、学会出版センター、1998
2) 川嶋浩平 他、 日本農芸化学会 2013 年度 大会 要旨集、3A11p15

coulometry, NADH, pyruvate

講演番号：3B03p23
講演日時、会場：3 月 29 日 17:59～ B 校舎 03 会場

LC-Orbitrap MS によるトウモロコシ中のカビ毒配糖体（マスクドマイコトキシン）の検出（第 3 報）

Detection of mycotoxin glucosides (masked mycotoxins) in corn by LC-Orbitrap MS (3rd report)

○松尾 洋輔[1]、高原 健太郎[2]、佐合 由紀[1]、長嶋 等[1]、中川 博之[1] ([1]（独）農研機構・食総研、[2]（株）サーモフィッシャーサイエンティフィック)
○Yosuke Matsuo[1], Kentaro Takahara[2], Yuki Sago[1], Hitoshi Nagashima[1], Hiroyuki Nakagawa[1] ([1]Nat'l. Agr. Food Res. Org. Nat'l. Food Res. Inst., [2]Thermo Fisher Scientific)

【目的】カビ毒（マイコトキシン）は一部の糸状菌が産生する二次代謝産物であり、各種の農作物においてその汚染が度々問題になっている。近年、マイコトキシンに糖（グルコース）が付加した配糖体（マスクドマイコトキシン）の存在が穀類等において報告されている[1)]。これらの配糖体は加水分解によって元のマイコトキシンを遊離する可能性があることから、潜在ハザードとして注目されている。演者らはこれまでに、トウモロコシ試料においてトリコテセン系マイコトキシン（T-2 トキシン、HT-2 トキシン）由来のマスクドマイコトキシンを見出している[2)]。今回、同試料において新規マスクドマイコトキシンを検出したので報告する。

【方法】マイコトキシンによる汚染を受けたトウモロコシ粉末試料について抽出操作を行った。得られた上清の一部を採取し窒素ガス気流下で乾燥し、アセトニトリル/水/酢酸混合液（5/94/1, v/v/v）に再溶解し、分析試料とした。分析には液体クロマトグラフ-高分解能質量分析装置（LC-Orbitrap MS）を用いた。イオン化には electrospray ion source（ESI）を使用し、正および負イオン化条件による測定を行った。LCにおける移動相は酢酸および酢酸アンモニウムを添加した水/アセトニトリル混合溶液を用い、C18 逆相分離カラムを用いたアセトニトリル直線濃度勾配により溶出を行った。

【結果】設定分解能 10 万の full MS scanモード（外部標準法）にて得られたMSクロマトグラムについて、精密質量（<5 ppm）によるスクリーニングを行ったところ、新規マスクドマイコトキシンと考えられるピークが複数検出された。さらにこれらの化合物に対しcollision energyをかけた時のマススペクトルを確認したところ、トリコテセン系マイコトキシンとは異なるマイコトキシンと、当該化合物由来と思われるフラグメントイオンがそれぞれ検出された。また、これら新規マスクドマイコトキシンはLCにおいて元のマイコトキシンよりも早い保持時間で溶出されていたことから、糖が付加したことにより極性が増加しているものと考えられた。

1) 中川博之, 農研機構食品総合研究所研究ニュース, 28, 4-7 (2012)
2) Nakagawa H et al., World Mycotoxin Journal, 5, 271-280 (2012)

masked mycotoxin, LC-Orbitrap MS, corn

講演番号：3B04a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ B 校舎 04 会場

高濃度カルシウム含有天然水の機能評価

Functional evaluation of natural water containing a high concentration of calcium.

○白畑 實隆[1,2]、濱崎 武記[1]、金城 智也[2]、中道 昇[1]、飛矢 和司[3]、冬木 久善[4]([1]九大院農、[2]九大院シス生、[3]（有）明日香、[4]（株）青葉)
○Sanetaka SHIRAHATA[1,2], Takeki Hamasaki[1], Tomoya Kinjo[2], Noboru Nakamichi[1], Kazushi Hiya[3], Hisayoshi Fuyuki[4] ([1]Dept. Biosci. Biotech., Fac. Agric., Kyushu Univ, [2]Grad. Sch. Sysmtems Life Sci., Kyushu Univ., [3]Asuka Co. Ltd., [4]Aoba Co. Ltd.)

[目的]常温の水、とりわけ細胞内の水は種々のクラスター構造を持つ高密度水、低密度水、液晶水が混在し、外部環境及び内部環境に応じて瞬時に構造を変化させ、エネルギー蓄積・エネルギー変換・記憶など様々な機能を発揮することが明らかとなってきた。また、日常的に飲用する水も生体水に影響し種々の機能を発揮することが示唆されている。我々は細胞内活性酸素種消去能を持つ天然水を天然還元水と呼び、それらの水の抗糖尿病効果を報告してきた。三重県松阪市飯高町森の奥伊勢香肌峡の鍾乳洞窟から湧出する天然水（以下、香肌峡天然水）は、カルシウムを 110 mg/L と多量に含んでおり、日本の天然水では珍しい硬水（硬度 320 mg/L）である。ここでは、香肌峡天然水の機能を、原子状水素（活性水素）供与能、細胞内活性酸素消去能、及び細胞内糖取り込み促進能を指標に評価した。
[方法] 天然水の活性水素供与能は3,5-ジブロモニトロソベンゼンスルホン酸ナトリウム（DBNBS）と天然水中の活性水素供与物質が反応することにより生成すトリブロモアゾベンゼンスルホン酸ナトリウム(TBABS)を定量する DBNBS 抗酸化力測定法で評価した。細胞内活性酸素消去能はヒト線維肉腫細胞 HT1080 内の過酸化水素量を Bes-H_2O_2蛍光試薬を用いて細胞イメージ解析装置（インセルアナライザー1000）により定量した。対照水として、2 mM NaOH 水をバッチ型電解装置(日本トリム社製 TI-200 型)により 100 V で 1 時間電解した電解還元水を用いた。また、天然還元水の抗糖尿病効果の指標として、ラット筋管細胞 L6 内への ^{3}H-2-デオキシグルコースの取り込み速度に及ぼす天然水の効果を評価した。対照水としては超純水及び市販天然水を用いた。
[結果及び考察] DBNBS 活性水素供与試験では香肌峡天然水は強い還元活性を示した。1 mM N-アセチルシステイン及び電解還元水は細胞内過酸化水素を有意に消去した。香肌峡天然水は有意差がわずかに認められなかったものの、細胞内過酸化水素を消去する傾向を示した(P=0.066)。香肌峡天然水は筋管細胞への糖取り込みを促進する強いインスリン様活性を示した。対照として用いた天然水にはそうした効果は認められなかった。活性水素供与反応、細胞内活性酸素種消去作用、細胞内糖取り込み促進作用を指標にした天然還元水の総合機能評価法は健康に良い機能水を探索する上で有用であることが示唆された。

Oxidative stress, Natural reduced water, Anti-diabetes

講演番号：3B04a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ B 校舎 04 会場

過酸化リン脂質異性体の精密定量による生体酸化ストレスの評価

Evaluation of oxidative stress by determination of phospholipid hydroperoxide isomers

○加藤 俊治[1]、仲川 清隆[1]、浅井 明[2]、及川 眞一[2]、永島 和幸[3]、宮澤 陽夫[1,4]([1]東北大・院・農・機能分子解析、[2]日医大・内分泌代謝、[3]心研・附属病院、[4]東北大未来科学技術共同センター)
○Shunji Kato[1], Kiyotaka Nakagawa[1], Akira Asai[2], Shinichi Oikawa[2], Kazuyuki Nagashima[3], Teruo Miyazawa[1,4] ([1]Tohoku Univ., [2]Nihon Med. Univ., [3]The Cardiovascular Institute, [4]NICHe, Tohoku Univ.)

【背景・目的】生体膜の主要構成脂質であるホスファチジルコリンは種々の酸化ストレスにより酸化一次生成物であるホスファチジルコリンヒドロペルオキシド（PCOOH）を生成する。当研究室では生体酸化ストレスを評価するため､PCOOHを高感度かつ選択的に分析できる化学発光検出HPLCを開発し、高脂血症ではPCOOHが高値であり、PCOOHが単球の血管内皮細胞接着を促進する生理活性物質であることを見出した。こういった背景からPCOOHの正確な濃度に興味がもたれ、近年ではタンデム質量分析(MS/MS)を用いたPCOOH定量法が報告されつつある。一方で生体内のPCOOHは-OOH基の位置によって様々な異性体が存在し、最近は異性体ごとに生理活性が異なる可能性が示唆されている。我々はこれまで、MS/MSを用いたPCOOH精密定量法を確立するため、高純度PCOOH標品の調製法やPCOOHの抽出法、さらにMS/MS条件を検討してきた。これらの点を考慮したうえで、本研究ではさらにPCOOH異性体分析が可能な新たなMS/MS法を確立し、ヒト血漿中のPCOOH異性体解析に応用した。
【方法・結果】リノール酸メチルエステルのラジカル酸化を応用し、高純度な13-hydroperoxy-octadecadienoic acid (13-HpODE) と 9-hydroperoxy-octadecadienoic acid (9-HpODE)標品を調製した。調製した 13-HpODE、9-HpODE と LysPC(16:0)から、PCOOH 異性体標品(16:0/13-HpODE PC、16:0/9-HpODE PC)を合成した。これらの標品のMS/MS解析では、親イオンにNa付加体を用いることで、PCOOH異性体特異的な分析・定量が可能であることがわかった。ヒト血漿中PCOOH異性体解析の結果、健常人の16:0/13-HpODE PCと16:0/9-HpODE PC濃度はそれぞれ36.1±11.5と33.1±10.2 pmol/mL(means±SDs)であった。また血漿中のリノール酸型PCOOH総量(16:0/HpODE PC)量は72.3±23.5 pmol/mLであり、ラジカル酸化産物である16:0/13-HpODE PCと16:0/9-HpODE PCの総量にほぼ一致することがわかった。この結果から、ヒト血漿中では一重項酸素酸化はほとんど生じていないと考えられた。また、過去の報告と一致して脂質代謝異常症者の血中PCOOH濃度は上昇していたが、16:0/9-HpODE PCの *cis-trans* 異性体比に違いがみられたことから、疾病患者において酸化機構が変化している可能性が示唆された。

本法は脂質過酸化物のうち、酵素酸化による酸化物とラジカルによる酸化物、さらに一重項酸素による酸化物を定量的に明らかにできると考えられる。今後その他の異性体分析へと応用することで、より詳細な生体内脂質過酸化の評価につながることが期待される。

Phosphatidylcholine hydroperoxide, LC-MS/MS, Oxidative stress

講演番号：3B04a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ B 校舎 04 会場

LC-MS/MS によるヒト血漿アラキドン酸型 PCOOH の定量

Development of LC-MS/MS Method of human plasma PCOOH (16:0/15-HpETE PC)

○水落 俊介[1]、加藤 俊治[1]、宮澤 大樹[1]、仲川 清隆[1]、浅井 明[2]、及川 眞一[2]、永島 和幸[3]、宮澤 陽夫[1,4] ([1]東北大院農・機能分子解析、[2]日医大・内分泌代謝、[3]心研、[4]東北大未来科学技術共同研究センター)

○Shunsuke MIZUOCHI[1], Shunji KATO[1], Taiki MIYAZAWA[1], Kiyotaka NAKAGAWA[1], Akira ASAI[2], Shinichi OIKAWA[2], Kazuyuki NAGASHIMA[3], Teruo MIYAZAWA[1,4] ([1]Grad. Sch. Agr. Sci. Tohoku Univ., [2]Nippon Med. Sch., [3]The Cardiovascular Institute, [4]NICHe,Tohoku Univ.)

【目的】多くの生体膜はホスファチジルコリン(PC)を含み、PC は活性酸素で酸化され酸化一次生成物ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド(PCOOH)を生じる。当研究室では生体脂質の酸化ストレスを評価すべく、PCOOH の精密定量法を確立し(1)、細胞障害性や生理活性を明らかにしてきた(2,3)。PCOOH には構成脂肪酸の違いや-OOH 基の位置により多くの分子種・異性体が存在し、それぞれ生理活性が異なる可能性が考えられる(4)。この背景から、当研究室では構造情報が得られるタンデム質量分析(MS/MS)を用いて、PCOOH の分子種・異性体分析法の開発を検討してきている。中でもアラキドン酸を有する過酸化リン脂質は炎症亢進作用があるが、今まで血中の量を定量的に論じられてこなかった。本研究では、アラキドン酸型 PCOOH に着目し、MS/MS 条件を検討し、異性体ごとの MS/MS 分析法を確立しつつ、血中 PCOOH 解析に応用した。

【方法と結果】ダイズ lipoxygenase を用いて *sn-2* 位に 15-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid(15-HpETE)を有する高純度 PCOOH(16:0/15-HpETE PC 及び 18:0/15-HpETE PC)を調製した。MS/MS 条件の検討において、PCOOH の Na 付加体を親イオンとした解析により-OOH 位置特異的なフラグメンテーションを取得し、安定して-OOH 位置異性体を特異的に定量できるようにした。ヒト血漿中の濃度を解析すると、健常者より高脂血症者で有意に高値を示した。現在臨床サンプルの解析を進めている。

1. T. Miyazawa et al., Anal. Lett., 20, 915-925 (1987); 2. A. Asai et al., *J. Lipid Res.*, 50, 957-965 (2009); 3. K. Nakagawa et al., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1810, 1205-1211 (2011); 4. V.B. O'Donnell et al., *Blood*, 120, 1985-1992 (2012)

lipid peroxide, hyperlipidaemia, LC-MS/MS

講演番号：3B04a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ B 校舎 04 会場

DNA 損傷に対するアーユルヴェーダハーブの防御効果
Protective effects of ayurvedic herbs on DNA damage
○高氏 裕貴[1]、森野 香子[1]、三木 健輔[1]、山内 正剛[2]、HOSSAIN Mohammad N[1]、藤井 道彦[1]、鮎沢 大[1] ([1]横浜市大院・生命ナノシステム、[2]放医研・防護研究センター)
○Yuki TAKAUJI[1], Kyoko MORINO[1], Kensuke MIKI[1], Masatake YAMAUCHI[2], Mohammad N HOSSAIN[1], Michihiko FUJII[1], Dai AYUSAWA[1] ([1]Grad. Sch. of Nanobiosci., Yokohama City Univ., [2]Res. Center for Rad. Pro., NIRS)

DNA は紫外線、放射線などの環境要因や活性酸素、DNA 複製に伴う異常などの内的要因により，頻繁に損傷を受けている。損傷の種類は様々であるが、最もダメージの大きい二本鎖 DNA 切断は、X 線などの電離放射線だけでなく、種々の抗がん剤（ブレオマイシン、イリノテカン、エトポシド等）によっても誘発される。これに対して細胞は多様な修復機構を駆使して DNA を修復するが，損傷の激しい場合にはチェックポイント機構で細胞周期を停止することで十分な修復の時間を確保し，また修復不能な場合はアポトーシスを誘導して損傷した細胞を取り除いている。上記のように、DNA 損傷に対する防御機構を生物は有しているが、DNA 損傷が酷く、多くの細胞がアポトーシスを起す場合は個体死を起こし、また修復が完全ではない場合はガンなどの疾患を発症する可能性がある。このようなことから、DNA 損傷防御に関わる物質を探索することは非常に意義がある。
そこで我々はインド亜大陸で 5 千年以上の歴史を持つ伝承医学アーユルヴェーダで用いられているハーブに着目した。アーユルヴェーダ医学では 10000 種類以上のハーブを組み合わせて健康維持や病気治療に用いる。本研究では、DNA 損傷に対するアーユルヴェーダハーブの防御効果について検証した。我々はバングラデシュの専門大学と提携し、ハーブを輸入しハーブレシピを作成した。ある種のハーブレシピに DNA 損傷防御効果があることを見出し、その分子メカニズムや有効成分の同定を行なっている。

ayurvedic herbs, DNA damage, radiation

講演番号：3B04a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ B 校舎 04 会場

線虫の脂肪蓄積を抑制するアーユルヴェーダハーブの探索

Search for Ayurvedic herbs affecting fat accumulation in C.elegans

○武田 あすか、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大（横浜市大院生命ナノシステム）
○ASUKA TAKEDA, KENSUKE MIKI, MICHIHIKO FUJI, DAI AYUSAWA (Yokohama city Univ.)

過剰な脂肪の蓄積は高血圧や糖尿病などの生活習慣病を引き起こす要因の一つとされる。近年、メタボリックシンドロームが特に懸念されており、我が国では中年男性の 2 人に 1 人がメタボリックシンドロームと強く疑われる者、または予備軍と考えられ、これらをあわせると約 1,960 万人にのぼると推定されている。それら疾患の根本原因は内臓脂肪の蓄積であり、これを抑えることが出来れば症状の予防や改善が可能であろう。したがって、脂肪の蓄積を抑制する物質は人々の健康に有用であると考えられる。

当研究室ではインド地方の伝統医学であるアーユルヴェーダに用いられるハーブ類を材料に、有用物質のスクリーニングを行ってきた。そこで本研究では、これらアーユルヴェーダハーブとモデル生物の線虫（*Caenorhabditis elegans*）を用いて、脂肪蓄積を抑える物質の探索を行った。*C. elegans* は約 1000 個の細胞からなる全長 1㎜ 程度の小さな多細胞生物であり、飼育や遺伝的取扱いの簡易さから分子遺伝学のモデル生物として多く用いられてきた。加えて、最近では小スペースで多数の検体を処理できることから、機能性物質のスクリーニングにも用いられるようになった。

C. elegans の野生株 (N2) にハーブの抽出液を添加して、脂肪の蓄積に効果のあるハーブをスクリーニングした。これまでに約 200 種類のハーブをスクリーニングし、2 種類のハーブで顕著に脂肪蓄積が抑えられていることを見出した。現在、この 2 種類のハーブ成分を HPLC で分画し、成分の精製を進めている。

lipid metabolism, Ayurveda, C.elegans

講演番号：3B04a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ B 校舎 04 会場

ケルセチンの長期および過剰摂取が正常マウスに及ぼす影響

Chronic dietary intake of quercetin reduces oxidative stress in normal C57BL6J mice fed a standard diet

○高橋 弓子、秋元 由香里、大池 秀明、一法師 克成、小堀 真珠子（農研機構　食品総合研究所）
○Yumiko TAKAHASHI, Yukari AKIMOTO, Hideaki OIKE, Katsunari IPPOUSHI, Masuko KOBORI (National food research institute)

【緒論】ケルセチンはタマネギ、リンゴ、緑茶等、日常親しまれている食品に含まれるフラボノイドで、その高い抗酸化作用や抗炎症作用から一般的にも注目度の高い機能性成分である。我々はこれまでに糖尿病や西洋型食モデル動物を用いて、生体におけるケルセチンの有効性、作用機構等の解明を進めてきた。本研究では、ケルセチンの長期ならびに過剰摂取が普通食を摂取させた正常マウスに及ぼす影響について検討を行った。

【材料および方法】C57BL6J マウス（雄性、5 週齢）を 1 週間の馴化飼育後、実験に供した。標準飼料として AIN-93G を用い、対照（Control）群は AIN-93G のみ、また実験群として 0.05%ケルセチン添加 AIN-93G（Q0.05）群および、1.0%ケルセチン添加 AIN-93G（Q1.0）群の 2 群を設けた。実験期間中は、隔日で体重および摂餌量を計測し、4 週間毎に尾静脈より採血を行い、血糖値を測定した。実験開始後 20 週目に解剖し、採血および各種臓器重量の測定を行った。その後、肝臓、小腸、骨格筋および内臓脂肪（精巣周囲、腎臓周囲、腸管膜周囲）を採材し、以下の解析に用いた。血液から血漿を分離し、血漿中の脂質（総コレステロール、遊離脂肪酸、トリグリセリド）濃度、トランスアミナーゼ（ALT(GPT)、AST(GOT)）濃度および 8-イソプロスタン濃度を測定した。さらに肝臓の酸化ストレス評価を目的として、肝臓マロンジアルデヒド量およびグルタチオン酸化還元比率の解析を行った。また肝臓における抗酸化酵素遺伝子（グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)1、カタラーゼ、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)1）の発現量をリアルタイム PCR 法にて測定した。

【結果および考察】実験の結果、実験期間中の各群の体重、摂餌量および血糖値には差は認められなかった。また実験開始後 20 週目における肝臓および内臓脂肪重量、血中脂質濃度および血中トランスアミナーゼ値についても、各群間に差は認められなかった。血中 8-イソプロスタン濃度および肝臓マロンジアルデヒド量は、Q1.0 群において対照群および Q0.05 群に比較して有意に低下した。また肝臓グルタチオン酸化還元比は、対照群に比較して実験群における還元型グルタチオンの比率が有意に上昇した。抗酸化酵素遺伝子の発現量は、GPx1 では Q1.0 群が対照群および Q0.05 群に比較して有意に上昇し、カタラーゼおよび SOD1 では Q0.05 および Q1.0 群が対照群に比較して有意に高い値を示した。以上の結果から、普通食を摂取させた正常マウスでは、ケルセチンの長期ならびに過剰摂取において、体重、血糖値、肝機能には影響を及ぼすことなく、血中及び肝臓中の酸化ストレスを改善することが示唆された。現在、骨格筋および小腸におけるケルセチンの影響について解析を進めている。

quercetin, oxidative stress, chronic intake

講演番号：3B04a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ B 校舎 04 会場

焙煎コーヒー豆中のキサンチンオキシダーゼ(XO)阻害能を有するクロロゲン酸ラクトン
Identification of xanthine oxidase inhibitory chlorogenic acid lactones in roasted coffee beans

○本田 沙理、三浦 ゆか理、稲井 美由紀、増田 俊哉（徳島大院・総合）
○Sari HONDA, Yukari MIURA, Miyuki INAI, Toshiya MASUDA (Tokushima Univ.)

【目的】近年，植物性食材由来のポリフェノールに様々な有用機能が見いだされている。一方で，ポリフェノールはそれほど安定な物質ではなく，食品の加工や保蔵中に，化学的な変化を受けると考えられる。我々は，これまでポリフェノールの酸化的な構造変化とその生成物の機能について報告してきた[1)]。ところで， 2007 年，アメリカにおいて行われた大規模な疫学的調査で，コーヒーを飲用することで痛風及びその前段階の高尿酸血症を軽減できることが報告された。コーヒーは世界で最も消費されている嗜好飲料であり，健康増進機能が期待されるクロロゲン酸などのポリフェノールの含量も高い。しかし，コーヒー中のどのような成分が，実際に痛風の軽減に寄与しているのか不明であった。なお，痛風は尿酸の過剰生成によって発症し，その尿酸はキサンチンオキシダーゼ(XO)により作られる。そこで本研究では，XO に対する阻害能を指標に，コーヒーの成分を精査することにした。

【方法および結果】コーヒーは，コーヒーの木の実を採集し，種子部を取り出し，生豆とし，その生豆を乾燥後，焙煎加工をした後に飲用とする。その一連の過程で，コーヒー豆中の成分も何らかの変化を受けている可能性があるため，コーヒーの生豆，乾燥豆，焙煎豆をそれぞれ熱水で抽出し，その抽出物の XO 阻害活性を測定し比較した。その結果，焙煎豆の抽出物のみに，XO 阻害活性を認めた。活性が認められた焙煎豆抽出物の Toyopearl HW-40F を用いたゲル浸透クロマト分画を行ったところ，強い阻害活性が，溶出の遅い低分子または吸着画分に認められた。その一方で，溶出の早い高分子画分には促進活性が認められた。最も強い阻害活性が認められた分画を LC-TOFMS および PDA 分析を行ったところ，主要な成分はクロロゲン酸の脱水体でないかと予想できた。そこで，焙煎コーヒー豆 2 kg を入手し，熱水抽出，ODS による固相抽出，ゲル浸透クロマト，ODS カラムを用いた分取 HPLC により，該当するピーク成分を分離し，最終的にピーク物質 4 種を精製した。その物質を NMR および MS で分析ならびにデータを詳細に解析したところ，それらはいずれも，クロロゲン酸が脱水ラクトン化したクロロゲン酸ラクトン類であることがわかった。現在，単離したクロロゲン酸ラクトン類の XO 阻害活性を確認しており，その結果を併せて報告する。

coffee, xanthine oxidase inhibition, Chlorogenic acid lactones

講演番号：3B04a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ B 校舎 04 会場

フラボノイドとシステイン類との酸化的成分間反応物との構造と機能―XO 阻害活性の増強について―

Structures of the products of oxidative reaction between flavonoid and cysteines, and their enhancing effect on the xanthine oxidase inhibition.

○三浦 ゆか理、本田 沙理、稲井 美由紀、増田 俊哉（徳島大院・総合）
○Yukari MIURA, Sari HONDA, Miyuki INAI, Toshiya MASUDA (Tokushima Univ.)

【目的】ポリフェノールは食用植物などの植物資源に広く存在し，抗酸化性などの各種の機能に優れた物質である。ポリフェノールが示す強い抗酸化の反応機構から，ポリフェノールが酸化的な環境下において容易に，生体や食品中に存在する求核性の生体成分との成分間反応を起こすことが予想される。我々は，これまで，ポリフェノールと生体成分間との酸化的成分間反応物の化学構造と機能について研究してきた。その過程で，ポリフェノールであるカフェ酸類がチオール性物質と反応することで，その抗酸化性が増強することを報告し[1)]，またある種のフラボノイドにおいても同様の現象を見出した[2)]。ところで，最近では，食品成分としてのポリフェノールに，食生活が主要な要因である生活習慣病と考えられる糖尿病や高尿酸血症等の予防や軽減効果が期待され，機能性食品などの開発もされている。そこで，我々は，酸化的条件，たとえば食品の加熱加工操作などで，生成しうるポリフェノールの成分間反応物に，上記の生活習慣病の軽減に資する可能性を探ることにした。本研究では，ポリフェノールの中からフラボノイドを取り上げ，求核性及びラジカル反応性を有するチオール基を持つシステイン類との酸化的成分間反応物を作り，それらのキサンチンオキシダーゼ（XO）に対する効果を検証することにした。なお，XO は，高尿酸血症や痛風の原因となる尿酸生成酵素であり，その阻害活性は，痛風の軽減に寄与すると考えられる。
【方法及び結果】フラボノイドとしてケンフェロール，ケルセチン，モリン，ミリセチン，ルテオリン，タキシフォリン，カテキンを対象にした。ポリフェノールの酸化は基本的にラジカル種を経ることから， DPPH を用いたラジカル酸化条件において，システインおよびシステイン誘導体と酸化的成分間反応を行った。続いて，反応物の DPPH 還元物を除去後，その XO 阻害活性を測定した。結果として，ルテオリンとシステインエチルとの成分間反応物に特に強い活性を認めた。そこで，その活性を示した成分間反応物を特定するために，精製・単離して，化学構造の解析を行った。結果，活性物質は，ルテオリンの B 環 2 位にシステインエチルのチオール基が付加し，さらにアミノ基が 3 位に脱水縮合して，6 員環を形成後，再度酸化されたものであることがわかった。なお，この物質は，元のルテオリンが有する XO 阻害活性の 4 倍以上の強さを示すこともわかった。

1)Fujimoto,A; Inai, M; Masuda,T, *Food Chemistry* **2013**, *138*, 1483-1492.
2)Masuda,T; Miura,Y; Inai, M; Masuda, A, *Biosci. Biotechnol. Biochem.***2013**, *77*, 1753-1758.

flavonoid, cysteine, xanthine oxidase inhibition

講演番号：3B04a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ B 校舎 04 会場

TNF-αによる筋タンパク質合成抑制に対する 1-デオキシノジリマイシンの改善作用

1-Deoxynojirimycin ameliorates the suppression of protein synthesis induced by TNF-α.

○藤谷 直輝[1]、羽鳥 由信[2]、平田 孝[1,3]、菅原 達也[1]([1]京大院・農、[2]日本新薬・食開研、[3]四條畷学園大・リハビリテーション学部)
○Naoki FUJITANI[1], Yoshinobu HATORI[2], Takashi HIRATA[1,3], Tatsuya SUGAWARA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Nippon Shinyaku, [3]Shijonawate Gakuen Univ.)

[目的]加齢に伴い骨格筋量の減少と筋機能の低下が引き起こされる現象はサルコペニアと呼ばれており、高齢者の QOL 低下を招く要因の一つとされ、食品成分を用いた予防改善策が望まれている。発症メカニズムの全容は未だ不明であるが、炎症性サイトカイン TNF-α が高齢者の血中で増加することで骨格筋におけるインスリン抵抗性が惹起され、その結果筋タンパク質合成能が低下することがメカニズムの一つとして挙げられている。また TNF-α が引き起こすインスリン抵抗性は、セラミドが重要な役割を果たすことが報告されている。そこで本研究では TNF-α によるインスリン抵抗性によって引き起こされる筋タンパク質合成能の低下を改善する食品成分の探索を目的として培養細胞を用いた評価系を構築し、その作用機序をスフィンゴ脂質代謝の観点から調べた。
[方法] 筋管細胞へと分化させたマウス筋芽細胞株 C2C12 を TNF-α (15ng/ml)と被験物質存在下で 48 時間培養した後、インスリン刺激によるタンパク質合成に与える影響を調べた。インスリン(100nM)で 30 分刺激後、メチオニンアナログである L-アジドホモアラニン(AHA)(100μM)で 3 時間処理し、細胞溶解液中の AHA をテトラメチルローダミンアルキンにより蛍光誘導体化した後、タンパク質画分の蛍光強度を測定することでタンパク質合成能を評価した。また、ウエスタンブロット法により Akt や 4E-BP1 のリン酸化に与える影響を評価した。さらに、細胞内スフィンゴ脂質量の変動を LC/MS を用いて定量した。
[結果]約 50 種の化合物を評価したところ、桑葉に含まれる 1-デオキシノジリマイシン(1-DNJ)が TNF-α によるインスリン刺激後のタンパク質合成能低下を有意に抑制した。しかしながら、インスリン刺激後の Akt や 4E-BP1 のリン酸化には影響を与えなかった。1-DNJ 処理はセラミドモノヘキソシド量を増加させたが、スフィンゴミエリン量には影響を与えなかった。さらに 1-DNJ は TNF-α 処理によるセラミド量の増加を有意に抑制した。
[考察]Akt-mTOR 経路に変化が認められなかったことから、他の経路を介してインスリン刺激後のタンパク質合成が低下しているものと考えられた。また、1-DNJ は TNF-α 処理によるセラミド量の増加を抑制したことから、スフィンゴ脂質代謝に影響を与えることでインスリン抵抗性を改善する可能性が示唆された。

Skeletal muscle, TNF-α, Protein sythesis

講演番号：3B04a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ B 校舎 04 会場

高分岐鎖アミノ酸食によるラット脳におけるキヌレン酸産生制御

High branched-chain amino acid diets suppress kynurenic acid production in rat brain

○福渡 努、丸山 明子、東山 沙織、佐野 光枝、柴田 克己（滋賀県大人間文化）
○Tsutomu FUKUWATARI, Akiko MARUYAMA, Saori HIGASHIYAMA, Mitsue SANO, Katsumi SHIBATA (The Univ. of Shiga Pref.)

【目的】トリプトファン代謝産物キヌレン酸は生理的濃度で α7 ニコチン性アセチルコリン受容体のアンタゴニストとして作用する．脳におけるキヌレン酸濃度の上昇によってシナプスからのドーパミンやグルタミン酸などの神経伝達物質の放出が抑制され，認知機能が低下することから，キヌレン酸産生の増加が脳神経系疾患に関与する可能性が指摘されている．我々はこれまでに，高トリプトファン食の摂取がラット脳におけるキヌレン酸産生を亢進し，細胞外ドーパミン濃度を低下させることを明らかにしてきた．脳におけるキヌレン酸産生は前駆体キヌレニンの濃度に依存し，キヌレニンは中性アミノ酸輸送体（LAT）を介して血中から脳に取込まれる．本研究では，キヌレニンと同じく LAT の基質である分岐鎖アミノ酸に着目した．*In vitro* および *in vivo* において，分岐鎖アミノ酸がラット脳におけるキヌレニン取込みおよびキヌレン酸産生におよぼす影響について検討した．
【方法】*In vitro* 実験では，Wistar 系雄ラットの大脳皮質から組織切片を作成し，10 μmol/L～3 mmol/L のバリン，ロイシン，イソロイシンのいずれかを含む緩衝液中で培養した．キヌレン酸合成能の指標として緩衝液に放出されたキヌレン酸量を，キヌレニン取込みの指標として組織中のキヌレニン濃度を測定した．*In vivo* 実験では，バリン，ロイシン，イソロイシンのいずれかを 3%添加した 1%トリプトファン添加食を 8 週齢の Wistar 系雄ラットに与え，7 日間飼育した．大脳皮質におけるキヌレニンおよびキヌレン酸濃度を測定した．
【結果・考察】*In vitro* 実験において，いずれの分岐鎖アミノ酸によっても緩衝液中のキヌレン酸量および組織中のキヌレニン濃度が減少した．ロイシンとイソロイシンはバリンよりも強い阻害作用を示し，30 μmol/L 以上の濃度で阻害作用が認められた．*In vivo* 実験において，トリプトファン添加食によって大脳皮質のキヌレン酸濃度は 2.0 倍，キヌレニン濃度は 2.4 倍に上昇した．大脳皮質のキヌレン酸濃度の増加はロイシンおよびイソロイシン添加食によって 1.3 倍に抑制されたが，バリン添加食による増加抑制作用は認められなかった．キヌレニン濃度の増加はいずれの分岐鎖アミノ酸添加食によっても 1.8 倍に抑制された．以上の結果から，以上の結果から，高ロイシン食および高イソロイシン食の摂取は脳へのキヌレニン取込みを阻害し，キヌレン酸産生を抑制することが示された．食事によってキヌレン酸産生を制御することにより，高次脳機能を調節できることが期待される．

Amino acids, Dopamine, Brain

講演番号：3B04a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ B 校舎 04 会場

筋特異的分岐鎖アミノ酸代謝亢進マウスの解析

The effect of increased branched-chain amino acid metabolism in muscle.

○北浦 靖之、石川 卓弥、伊丹 雄也、加藤 里奈、犬飼 彩美、門田 吉弘、下村 吉治（名古屋大院生命農）
○YASUYUKI KITAURA, TAKUYA ISHIKAWA, YUYA ITAMI, RINA KATO, AYAMI INUKAI, YOSHIHIRO KADOTA, YOSHIHARU SHIMOMURA (Nagoya Univ.)

【目的】ロイシンをはじめとする分岐鎖アミノ酸(Branched Chain Amino Acids: BCAA)は、タンパク質の構成成分であるとともに、遊離アミノ酸としてタンパク質の合成促進と分解抑制、さらに近年、糖代謝を制御することが報告されている。BCAA は必須アミノ酸であり、動物体内では分解系のみが存在するが、その律速酵素である分岐鎖αケト酸脱水素酵素（BCKDH）は BCAA で共通であり、リン酸化により阻害される。その特異的リン酸化酵素である BCKDH キナーゼ（BDK）遺伝子を全身で欠損させたマウスでは、BCAA 代謝の亢進、血中 BCAA 濃度の低下、成長不良、さらに癲癇（てんかん）を発症することが報告されている。これらの現象は全身もしくは組織特異的な BCAA 代謝の変化により引き起こされるかは不明である。BCAA 代謝は筋組織で最も盛んに行われ、全身の BCAA 濃度を調節している可能性が考えられるため、本研究では筋特異的に BDK 遺伝子を欠損させ、筋組織でのみ BCAA 代謝を亢進させたマウスを用いて、１）体重変化、２）血中 BCAA 濃度、３）てんかん発症、３）糖代謝機能について解析を行った。
【方法と結果】BDK の活性部位をコードするエクソン 9 から 12 の上流にスプライシング受容部位を挿入（エクソントラップ）することにより、全身で BDK の活性部分を欠損したマウス（BDK-KO マウス）を作製した。さらに、上記エクソンを loxP で挟んだゲノムを持つマウス（BDK floxed マウス）を作製した。このマウスと筋特異的クレアチニンキナーゼ(CK)プロモーターにより Cre を発現する CK-Cre トランスジェニックマウスを掛け合わせることにより、筋特異的コンディショナル（muscle-specific conditional）BDK-KO マウス（BDK-mcKO マウス）を作製した。BDK floxed マウスをコントロールマウスとして、BDK-mcKO および BDK-KO マウスの血中 BCAA 濃度をアミノ酸分析機により調べた。その結果、血中 BCAA 濃度は、BDK-KO マウスでコントロールマウスの約 50%に減少したのに対して、BDK-mcKO マウスではコントロールマウスの約 70%に減少していた。一方、BDK-KO マウスでは成長不良が見られるのに対し、BDK-mcKO マウスの体重はコントロールマウスと同程度であった。以上の結果から、筋組織での BCAA 代謝亢進により血中 BCAA 濃度は低下するが、成長不良は筋以外の組織（脳・中枢神経系など）における BCAA 代謝亢進により引き起こされる可能性が示唆された。現在このマウスでの、てんかん発症の有無と糖代謝への影響について解析中である。

branched-chain amino acids, metabolism, muscle

講演番号：3B04a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ B 校舎 04 会場

安定同位体を用いた腸内常在菌によるアルギニンからのプトレッシン産生の証明

Analysis of putrescine produced by intestinal bacteria from arginine using stable isotope-labeled arginine.

○中村 篤央、松本 光晴（協同乳業株式会社）
○Atsuo Nakamura, Mitsuharu Matsumoto (Kyodo Milk Industry Co., LTD)

【背景および目的】ポリアミン（Putrescine; PUT, Spermidine; SPD, Spermine; SPM）は、老年病の主要因である慢性炎症の抑制効果と、強い抗変異原性作用を有することから、健康寿命との関連性が注目されている。我々は大腸内の PUT 濃度を増加させる物質としてアルギニン(Arg)を見出し、マウス、ラットへの経口投与試験にて投与量依存的に糞便中の PUT 濃度が高まることを確認してきた。しかしながら､腸内常在菌により Arg から PUT が産生されていることを直接的には証明できていない。また、経口投与した Arg が消化管より吸収されて、宿主細胞から放出されている可能性も排除できていない。そこで安定同位体を用いた *in vitro*（糞便培養系）及び *in vivo*（大腸カニューレによる注入)試験にて、Arg を基質とした腸内常在菌による PUT の産生を証明することを目的とした。
【方法】①雄性 Crj:CD(SD)ラットの糞便に安定同位体標識化標識化 L-Arginine-$13C_6$,$15N_4$ を 1mM になるように添加し、37℃嫌気下で培養した。経時的に培養上清を採取し、ポリアミン濃度及びその標識化率を GC-MS にて測定した。②大腸カニューレーション（近位結腸にカニューレを挿入）施術をした雄性 Crj:CD(SD)ラット 3 匹に､安定同位体標識化 Arg をイソフルラン麻酔下でカニューレから注入した。注入量は 6.6mg/kg weight とした。注入 6 時間後に開腹し、結腸内容物から菌体を破壊しないように代謝産物を抽出し、ポリアミン及びアミノ酸濃度とそのラベル化率を CE-TOFMS にて測定した。
【結果および考察】糞便培養試験の結果、3 個体全ての糞便培養液から標識化された PUT が検出され経時的に濃度が上昇することが確認された。カニューレによる大腸への注入試験でも同様に、3 個体全てで標識化された PUT が検出された。同時に、標識化されたオルニチン(Orn)やシトルリン(Cit)も検出され、Arg から PUT までの中間物質も菌体外へ放出されていることが認められた。また、L-Arginine-$13C_6$,$15N_4$ を基質とすれば M＋6 の PUT が産生されるはずであるが、興味深いことに M＋5 の PUT も検出された。この M＋5 の PUT の基質と考えられる M＋6 の Orn も検出されていることから、ある菌によって菌体外へ放出された Orn を別の菌が利用し PUT へ変換したことが示唆された。以上の結果から、大腸内では腸内常在菌により Arg から PUT が産生され、菌体外すなわち腸内環境中へ放出されていることが確認された。また、単独菌体内で Arg から PUT が合成されているだけでなく、中間物質を放出する細菌と利用する細菌の共同作業で PUT が合成されていることが示唆された。

plyamine, microflora, stable isotope

講演番号：3B04p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ B 校舎 04 会場

長野県の伝統野菜「八町きゅうり」の香気特性

Characteristics of aroma compounds in Hattyo-Kyuri which are one of the traditional vegetables of Nagano

○小木曽 加奈[1]、金子 昌二[2]、中澤 弥子[1] ([1]長野県短大生活科学、[2]長野県工技センター)
○Kana KOGISO[1], Shoji KANEKO[2], Hiroko NAKAZAWA[1] ([1]Nagano Pref. Col., [2]NPGIT Cent.)

【目的】長野県では県内で古くから栽培されている野菜を一定の基準に基づいて“信州の伝統野菜”として認定する制度を 2007 年から始めている。このうち信州の伝統野菜として登録されている須坂市の「八町きゅうり」は、皮が薄く、実は肉厚で味は良く、種子数の少ないのが特徴である。1955 年頃に出荷量は最大であったが、一般のきゅうりに比べると収量がとても少ないこと、市場での評価の下落や地元農家における果樹への生産量増加などによってきゅうり生産は急減した。近年では地元の園芸高校や農家有志が「八町きゅうり」の保存に力を入れつつある。本研究では「八町きゅうり」の香気成分の特徴を解析することで、加工や調理特性を検討し、「八町きゅうり」の保存と継承の一助とすることとした。
【方法】きゅうりの香気成分は組織を破壊することによって生成されるため、皮ごとすりおろしたものをサンプルとした。「八町きゅうり」と比較するため市販のきゅうりを対照とした。それぞれのサンプル 10g をバイアル瓶に封入し、瓶ごと 60°C で 20 分加熱後、そのヘッドスペースガス 1ml を GC-MS に供した。
【結果と考察】「八町きゅうり」にはきゅうりに特徴的な香気成分であるスミレ葉アルデヒド(2*E*,6*Z*)-nonadienal は市販のきゅうりの 15％程度であった。またキュウリアルコール(2*E*,6*Z*)-nonadienol は市販のきゅうりには検出されたが「八町きゅうり」には検出されなかった。きゅうりにとってあまり好ましくない香気成分であるノナナールは「八町きゅうり」においては市販のきゅうりの 20%程度であった。きゅうりの匂いに寄与度が高いその他のヘキサナールやノナノールなども「八町きゅうり」については半分程度と少なかった。その一方で硫化化合物の二硫化炭素、ジメチルジスルフィドは市販のきゅうりには検出されなかったが、「八町きゅうり」には検出された。ジメチルスルフィドはどちらにも検出されたが八町きゅうりは市販のきゅうりの倍以上含まれていた。以上のことから「八町きゅうり」はきゅうりらしい香気成分が少なく、一方で低沸点硫黄化合物などを含んでいることによって市販のきゅうりとは異なった風味を有することがわかった。

traditional vegetables, cucumber, aroma compounds

講演番号：3B04p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ B 校舎 04 会場

施肥条件の異なるミズナにおける官能評価と香気成分の関連性解析
Relationship between sensory attributes and volatile profiles in mizuna grown in different fertilizer conditions

○福田 朋彦[1,2]、岡崎 圭毅[3]、渡邊 彩乃[4,5]、信濃 卓郎[2,3,6]、岡 紀邦[2,3]（[1]ホクレン農総研、[2]北大院農、[3]農研機構　北海道農研、[4]北大農、[5]農林水産消費安全技術セ、[6]農研機構　東北農研）
○ Tomohiko FUKUDA[1,2], Keiki OKAZAKI[3], Ayano WATANABE[4,5], Takuro SHINANO[2,3,6], Norikuni OKA[2,3] ([1]Hokuren, [2]Hokkaido Univ., [3]NARO/HARC, [4]Hokkaido Univ, [5]FAMIC, [6]NARO/TARC)

【背景・目的】施肥条件の違いは農産物の品質に影響を及ぼすことが知られている。これまでに、ダイコンおよびコマツナに牛糞麦稈堆肥を施与すると一次代謝物の変化が成分分析により観測され、さらにミズナでは堆肥施与だけでなく、有機肥料と化学肥料の差によっても成分プロファイルの変化が検出されることが明らかになっている。そこで、本研究では施肥条件の違いが食味へどのような影響を及ぼすか、さらにそれに寄与する成分との関連性についてミズナを用いて解明することを試みた。
【方　法】施与処理区は堆肥の有無および化学肥料および有機肥料の 2 元配置とした。具体的には堆肥の有無（牛糞堆肥 0 または 3 kg m-2）それぞれに対して、化学肥料（硫安および緩効性肥料 12 gNm-2）または有機質肥料（魚かす 12 gNm-2）の 6 区画を設置し、ミズナを 6 月上旬から 37 日間、1/2000a ポットにて栽培した。ミズナの品質評価は充分にトレーニングされたパネル 6 名による官能評価および GC/MS による香気成分一斉分析を行った。
【結果・考察】官能評価ではパネル全員に共通して認識された官能特性としてフレーバー、基本味、テクスチャーを含む 7 項目を抽出した。評価の結果、堆肥施与したミズナは「苦み」、「辛み」などが有意に低下し、さらにいくつかのテクスチャー項目から有意な差が検出された。香気成分はミズナ地上部より検出された 49 成分を解析対象とした。主成分分析を実施したところ官能評価結果、香気成分分析結果ともに第一主成分において堆肥施与の有無に区分された。官能特性と作物成分の関連性を PLS 回帰分析を用いて解析したところ、「辛み」についてはイソチオシアネートやニトリル類を含む含硫黄・窒素化合物が高度に寄与していた。
　結果より堆肥施与したミズナはイソチオシアネートなどの含硫黄・窒素成分が有意に低下し、「苦み」や「辛み」といった項目が低下したことが考えられた。これらの項目はミズナを含むアブラナ科作物の特徴的な食味特性であり、またイソチオシアネートなどはこれらの官能特性を持つ成分であるが、施与の違いにより化学的な根拠をもって食味をコントロールできる可能性が示唆された。今後、施肥の違いに対する作物体内の環境応答機序と食味に関わる成分動態の化学的な関連性について解析を行いたい。

sensory, volatile, fertilizer

講演番号：3B04p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ B 校舎 04 会場

二条裸麦「ビューファイバー」搗精粉の加水処理による香気成分の変化

Changes in flavour compounds of pastes of pearled two-rowed hull-less barley cv. Beau-fiber during incubation

○神山 紀子、一ノ瀬 靖則、金子 成延、柳沢 貴司、小前 幸三（農研機構作物研）
○Noriko Kohyama, Yasunori Ichinose, Shigenobu Kaneko, Takashi Yanagisawa, Kozo Komae (NARO NICS)

【目的】近年、大麦食の血糖値上昇抑制効果や血中コレステロール改善効果が注目されている。食用大麦は麦ごはんのように粒食として利用されることが多いが、麺やパン等の原料として粉体利用も期待されている。しかし大麦粉を用いたパン生地の調製時に、小麦粉とは異なる独特の不快臭があるとの指摘があり、においの改善が課題になっている。そこでβ-グルカン含量が高いことを特徴とする二条裸麦品種「ビューファイバー」の 60%搗精粉を用い、においの改善を目的として加水処理後の経時的な香気成分の変化を調べた。
【方法】2013 年、愛知県産のビューファイバーの玄麦を 60%歩留まりまで搗精し、気流粉砕により搗精粉を得た。ガラスバイアルに搗精粉 1.0ｇと蒸留水または 50mM クエン酸ナトリウム緩衝液 3.0ml を加え、ペーストを調製して密封した。これを 30℃で 0、6、12、18 または 24 時間貯蔵し、ヘッドスペースガスを SPME 法（DVB/CAR/PDMS）で 60℃、60 分間抽出し、GC-MS で分析した。比較対象として小麦粉の加水処理による香気成分も同様に測定した。検出された香気成分のうち、小麦に比べてビューファイバーで多い成分に注目し、主イオンのピーク面積から定量し、含量の変化を解析した。
【結果及び考察】ビューファイバー搗精粉に蒸留水を添加した場合、悪臭成分である 2-メチルブタナール、3-メチルブタナールとヘキサナールは 12 時間以降に有意に減少し、好ましい香気成分であるベンジルアルコール、フェネチルアルコールは 18 時間以降に顕著に増加した。24 時間の貯蔵中にペーストの pH は 4.7 から 5.2 まで経時的に上昇した。4 種類の緩衝液を添加した場合、ペーストの pH は 4.2、4.9、5.5、5.9 となり、4.2 では 18 時間後でも 2-メチルブタナール、3-メチルブタナールとヘキサナールの有意な減少は見られなかったが、pH4.9～5.9 では有意に減少した。一方、ベンジルアルコールとフェネチルアルコールは pH4.2 では貯蔵中に増加しなかったが、pH4.9 では顕著に増加した。以上のことから、ビューファイバー搗精粉に加水して 30℃で 18 時間貯蔵すると、悪臭成分の減少と芳香成分の増加により、においの改善が期待できること、この現象が pH に依存していることが示唆された。

barley, flavour, autolysis

講演番号：3B04p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ B 校舎 04 会場

リンゴ‘ふじ’の栽培法に関連した香味物質の特徴
Characterization of organic 'fuji' apple with sensory evaluation and flavor components
○田中 福代[1]、岡崎 圭毅[2]、宮澤 利男[3]、伊藤 伝[4]([1]（独）農研機構・中央農研、[2]（独）農研機構・北農研、[3]小川香料株式会社、[4]（独）農研機構・果樹研)
○ Fukuyo TANAKA[1], Keiki OKAZAKI[2], Toshio MIYAZAWA[3], Tsutae ITOH[4] ([1]NARO/ARC, [2]NARO/HARC, [3]Ogawa & Co., Ltd., [4]NIFTS)

有機農産物の香味には消費者の高い関心が寄せられている。本課題ではリンゴについて、化学合成農薬・肥料を使用しない栽培を研究所内で再現し、官能評価とメタボローム解析による比較を行った。
【方法】概要：盛岡市の果樹研究所リンゴ研究拠点内の同一園地で同様に栽培されていた‘ふじ’について、2009 年度から一部の樹について化学合成農薬の使用を中止し、代替として希釈した食酢の散布を防除手段とする栽培に転換した。各収穫物について QDA およびメタボローム解析（一次代謝物と香気成分のプロファイリング）を 2012 年までの 4 年間にわたり実施した。
試料：果樹研産・慣行（CI）、果樹研産・有機（OI）、果樹研近郊農家・減農薬栽培（CF）、未知（量販店で購入、UN）とした。CF は 4 年間同一生産者から直接入手したが、UN は年々産地や価格帯が異なる商品であった。分析：1)官能評価（QDA）は小川香料専門パネルで実施した。皮をむいた一口大の試料を試食し、評価ワード（フローラル感、フルーティ感、甘味、酸味、グリーン感）について評価した。 2）プロファリング a)香気成分は、リンゴに 20%の NaCl を添加しジュースを調製、SPME-GC/MS 法によりヘッドスペースガスの分析を行った。b）一次代謝物質は、a)と同一個体から調製した凍結乾燥試料について、メトオキシム-TMS 化した誘導体を GC/MS で分析した。c)糖度、酸度、エチレン生成量などのリンゴに関する一般的項目については常法により測定した。
【結果】慣行栽培（CI・CF）区のリンゴは毎年フローラル感と甘味が強く、これに対応する脂肪酸エステル類、アルコール類、糖類の比率が高かった。特に、CF では大部分が蜜入りであり、sorbitol 含量の高さとも一致した。また、エステル類の中でもエチルエステルが多かったが、これは蜜によって果実の中心部分が低酸素状態となり ethanol が集積したことによるものと推定した。一方、OI では 4 年間を通してグリーン感が強くフローラル感が弱い特徴があった。メタボローム解析の結果、エステル類や sucrose、dehydroascorbate が少なく、glutamate 以外のアミノ酸、citrte、quinate、2-methylbutanol 等が高まった。グリーン感を与える香気成分として特に注目すべき成分は認められなかったため、フローラル感や甘味の弱さから未熟なイメージがグリーン感として捉えられたものと推定した。2-methylbutanoyl-CoA に由来するリンゴ様香気成分に注目すると、有機では 2-methylbutanol とそのアセチル体の比率が高かったのに対し､慣行では各種エステルが優位であり、この過程における AAT(alcohol acyl-CoA transferases)と ADH(alcohol dehydrogenase)活性の相違が果実の香気特性に対して強く影響しているものと考えられる。

QDA, GC/MS-metabolomics, organic apple

講演番号：3B04p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ B 校舎 04 会場

チャ生葉低温保管による香気成分 indole の蓄積

Accumulation of indole in tea leaves with a low temperature storage process

○勝野 剛[1,2]、友村 美穂[3]、中村 順行[1,4]、渡辺 修治[2]([1]静岡県農林技研茶研センター、[2]静岡大創造院、[3]静岡大院農、[4]静岡県立大)
○Tsuyoshi KATSUNO[1,2], Miho TOMOMURA[3], Yoriyuki NAKAMURA[1,4], Naoharu WATANABE[2] ([1]Tea Res. Center, Shizuoka Pref. Res. Inst. of Agri. and For., [2]Shizuoka Univ. Grad. Sch. of Sci. and Tec., [3]Shizuoka Univ. Grad. Sch. of Agri., [4]Univ. of Shizuoka)

【目的】茶の香りはその品質と特徴を決定づける重要な要素の一つである。煎茶は摘採後速やかに蒸熱するため、独特の若葉の香りを特徴としているが、最近の嗜好の多様化から香りの多様性が求められている。これまでに、摘採後のチャ生葉を低温保管し、煎茶を製造することで花様の香りが強くなり、香気寄与度の高い indole, jasmine lactone, linalool が増加することを確認した。併せて、生葉低温保管時の蓄積量が多い indole に着目すると保管 16 時間で最大値に達しその後減少に転じることを明らかにした。本研究では、indole が L-tryptophan 生合成中間体の一つであることをヒントに、その蓄積のメカニズムを解明することを目的に、その前駆物質、代謝物質の探索を行った。
【方法】静岡県農林技術研究所茶業研究センターにおいて露地栽培されている、「さやまかおり」の一番茶 (5 月上旬摘採) を用いた。摘採後のチャ新芽の上位 3 葉を 10mM [^{15}N]anthranilic acid、あるいは 10mM L-[$^{2}H_5$]tryptophan 溶液、およびそれらの混合溶液に浸し、減圧条件でチャ葉に吸収した。処理後のチャ葉をペトリシャーレ上に広げ蓋をし、25℃、Rh70%で 4 時間インキュベートした。標識 indole はジエチルエーテルで抽出後 GCMS にて分析した。標識 indole 代謝物質はメタノールで抽出し LCMS にて分析した。
【結果及び考察】[^{15}N]Anthranilic acid を投与することにより indole および[^{15}N]indole が増加した。L-[$^{2}H_5$]tryptophan 投与では indole 量はわずかであった。[^{15}N]Anthranilic acid、L-[$^{2}H_5$]tryptophan を同時投与したものは indole 量はわずかであったが、[^{15}N]indole が増加した。[$^{2}H_5$]Indole は L-[$^{2}H_5$]tryptophan 投与および[^{15}N]anthranilic acid、L-[$^{2}H_5$]tryptophan $_5$同時投与で検出されたが極わずかであった。 [^{15}N]Anthranilic acid 投与区について ^{15}N を指標に indole 関連代謝物を探索したところ、[^{15}N]indole, L-[^{15}N]tryptophan が検出された。さらに indole より 0 原子が 1 個多い分子式 $C_8H_7N_1O_1$ を有する化合物が 2 種検出され、これらを hydroxy-indole あるいは keto-indole(OX-indoles)と推定した。その他多くのアルカロイドと考えられる分子量の大きい物質が検出されたが、[^{15}N]anthranilic acid 無投与区から検出されなかったため、これらは、anthranilic acid の過剰投与により生成したものであり indole の正常な代謝物の可能性は低いと考えられた。以上から、チャ生葉における indole は anthranilic acid を前駆物質として生合成されることで増加し、L-tryptophan および OX-indoles へと代謝されることで減少することが示唆された。併せて L-tryptophan による chorismic acid から anthranilic acid への変換を抑制するフィードバック制御の存在が示唆された。

Tea, Indole, Anthranilic acid

講演番号：3B04p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ B 校舎 04 会場

包括的二次元 GC-TOFMS を用いたワカメの香気物質の網羅的解析

Analysis of odorants emitted from wakame seaweed using comprehensive 2D GC-TOFMS

○山下 哲郎、加藤 恭子、小枝 まどか、中野 晴日、小野 久弥、宮崎 雅雄 (岩手大農)
○Tetsurou Yamashita, Kyoko Kato, Madoka Koeda, Haruhi Nakano, Hisaya Ono, Masao Miyazaki (Iwate Univ.)

【目的】食品の香りは、非常に多種多様の揮発性物質が複雑に組み合わさって構成されている。よって食品の香りを特徴付ける香気成分を探索するためには、香気成分の比率をできるだけ保ち、微量成分であっても確実に濃縮できる前処理法と高分解能の質量分析装置の組み合わせが望ましい。そこで本研究では、Entech7200 自動濃縮装置と包括的 GC×GC-TOF-MS をオンラインで接続した分析システムを構築し、三陸産ワカメから揮発する化合物の網羅的解析を試みた。
【方法】【方法】三陸産の原藻ワカメ、塩蔵ワカメ 10g を 1L 容器に密閉し、そのヘッドスペースガス 100ml を Entech7200 で濃縮後、GC×GC-TOF-MS (Pegasus4D、LECO) で解析した。
【結果】包括的 GC×GC-TOF-MS 分析システムで原藻ワカメと塩蔵ワカメのヘッドスペースガスからそれぞれ 2000 個以上、1000 個以上の化合物が検出された。ライブラリーサーチの結果、類似度 80%以上の化合物は、原藻ワカメ 888 個、塩蔵ワカメ 577 個であった。Entech7200 自動濃縮装置を前処理に用いたところ、通常の Tenax 吸着管による濃縮法では保持されにくかった低沸点揮発物質を効率よく濃縮できることができることが示された。本実験で同定されたワカメの香りのベースに寄与すると示唆される化合物 20 種類に着目した場合、9 化合物は芳香や果実臭を持っていることが分かった。また、原藻ワカメ特異的な化合物は、19 種類同定でき、うち 4 化合物は不快臭であり、ワカメの磯臭さの要因になっていることが示唆された。本研究で確立した香気成分の網羅的解析技術を用いることにより、産地の違うワカメの香り成分の比較解析や塩蔵加工による香気成分の変化等について詳細な解析が可能になり、ワカメの産地判定や新規ワカメ加工技術の開発等に応用できると考えられる。

odorant, wakame, GCMS

講演番号：3B04p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ B 校舎 04 会場

乾燥ワカメの主要香気成分の同定
Identification of Volatile Components in the essential oil of dried wakame *Undaria pinnatifida*
○寄元 祥平、高山 志穂、赤壁 善彦（山口大農）
○shohei YOSEMOTO, Shiho TAKAYAMA, Yoshihiko AKAKABE (Yamaguchi Univ.)

1. 目的

日本において、褐藻のワカメ(*Undaria pinnatifida*)は最も一般的な海藻の 1 つであり、塩蔵および乾燥して保存性を高め、酢の物や汁物の具として利用する。塩蔵や乾燥ワカメの香気はそれほど強くないものの、生ワカメとは異なる特徴をもつ。そこで、今回は乾燥ワカメから精油を調製し、その特徴的香気成分の同定を研究目的とした。

2. 方法および結果

乾燥ワカメ(2013 年 2 月製造)を試料として用い、ペンタンとジクロロメタンを抽出溶媒として、連続蒸留抽出法(SDE 法)によって精油を調製し、得られた精油は GC-MS 分析した。その結果、乾燥ワカメの精油において、50%以上の主要な香気成分が検出され、シリカゲルカラムクロマトにより単離を行い、各種 NMR(^{1}H,^{13}C-NMR、Dept、H-H COSY、HMQC、HMBC)解析したところ、1,6,9,12,15,18-henicosahexaene と推定した。そこで、この構造を確認するために、(5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)-icosapentaenoic acid を出発物質として DIBAL 還元によりアルデヒドへと変換した後に、Wittig 反応により末端アルケンを導入して目的の化合物を合成した。そこで、合成品と精油中より単離した主要香気成分を GC-MS ならびに各種 NMR データと比較したところ、完全に一致したため、乾燥ワカメの主要香気成分は（1*Z*,6*Z*,9*Z*,12*Z*,15*Z*,18*Z*)-1,6,9,12,15,18-henicosahexaene であると決定した。

marine algae, volatile components

講演番号：3B04p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ B 校舎 04 会場

調味液のコクに寄与する香気成分の解析

Analysis of Odorants Contributing to the Koku Taste of Seasoning Soy Sauce

○加藤 祥恵、宮下 泰明、渡辺 寛人、早瀬 文孝 (明治大農)
○Sachie KATO, Yasuaki MIYASHITA, Hirohito WATANABE, Fumitaka HAYASE (Meiji Univ.)

【目的】

つゆは鰹節や昆布などからとった“だし”に醤油、砂糖、みりんなどを加えて調製される調味液である。つゆはそばつゆや煮物などの和風料理に幅広く用いられ、その消費量は増加傾向にある。また、つゆは加熱することで食欲をそそる香ばしいフレーバーと、コクが生じる。当研究室ではつゆのコクに香気成分が寄与し、コク寄与香気成分として 1-Octen-3-ol、 2-Acethylfuran、 2-Ethylhexanol を報告した [1]。

本研究では、さらに上記以外のつゆのコク形成や増強に寄与する香気成分の探索を試みた。

【実験方法】

1. 調味液の加熱香気分析

鰹節ダシ、または鰹節と昆布の合わせダシに淡口醤油、砂糖を加え調製した二種類の自作のつゆ（コントロールつゆ・昆布増量つゆ）に対し、SDE（連続水蒸気蒸留）法を用いて揮発性成分を抽出した。抽出された揮発性成分を GC、GC-MS、GC-O 分析に供し、各成分の同定・定量を行った。

2. 官能評価によるコク寄与成分の探索

官能評価では、つゆのコクを「風味のひろがり」、「風味の持続性」と定義して行った。コクに対する官能評価は 0.5%NaCl と、0.3%Sodium glutamate を含む水溶液（コントロール）に各香気成分を添加し、二点試験法を用いて行った。さらに、コクに寄与することが認められた香気成分と、既知のコク寄与成分である 2.5-Dimethylpyrazine をコントロールつゆに添加し、コクの増強効果を評点法により評価した。

【結果・考察】

コントロールつゆに比較して昆布増量つゆではコクが増強した。二種類のつゆ間で定量値に有意差が認められた化合物、または FD factor（Flavor Dilution factor）に差が認められた化合物として Ethyl lactate、 4-Ethyl-2-methoxyphenol、 2-Methoxy-4-methylphenol、 1.2-Dimethoxybenzene を同定した。これら 4 種の化合物を用い二点試験法による官能評価を行った結果、4-Ethyl-2-methoxyphenol および Ethyl lactate を添加したサンプルにおいてコクへの寄与が認められた。さらに、それぞれをコクへの寄与が認められた濃度で添加したコントロールつゆは風味のひろがり・風味の持続性・おいしさを有意に増強した。

[1] 早瀬文孝, 高萩 康, 渡辺寛人 ; 日本食品科学工学会 60, 59-71 (2013)

flavor, Koku, Ethyl lactate

講演番号：3B04p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ B 校舎 04 会場

D-キシロースーグリシン系メイラード反応で生成する青色色素の生成機構について

The Formation Mechanism of The Blue Pigments Produced in D-Xylose - Glycine Model Maillard Reaction

○伊藤 惠介、渡辺 寛人、早瀬 文孝 (明治大農)
○Keisuke Ito, Hirohito Watanabe, Fumitaka Hayase (Meiji Univ.)

【目的】 食品の加工、貯蔵、調理の際には、タンパク質や糖質をはじめとする食品成分間の反応が起こる。その一つとして知られるメイラード反応は、カルボニル化合物とアミノ化合物間の非酵素的褐変反応であり、食品の品質形成や劣化に関する重要な反応である。その最終生成物である褐色色素のメラノイジンは、難分解性の高分子化合物であるため、その構造や生成経路には不明な点が多い。D-キシロースーグリシンモデル系において Blue-M1 [1]、Red-M1 [2]をはじめとする色素化合物が同定されており、それらはピロロピロール骨格を有し、単独で褐変することなどからメラノイジンの重要な中間体であると推測されている。本研究では、D-キシロースーグリシンモデル系において主要に生成する Blue-M1 に着目し、その生成機構について検討した。

【方法】 D-キシロースとグリシンを 60%エタノールに溶解し(pH 8.1)、26.5℃にて 24 時間インキュベートした。反応溶液を各種クロマトグラフィーにて精製し、青色色素前駆体画分を得た。同様に、アミノ酸にβ-アラニンを用いて青色色素前駆体画分を得た。これらを 26.5℃にて 15 時間反応させ、生成する青色色素を LC-ESI-Q-TOF-MS、NMR による構造解析に供した。

【結果】 グリシン系で得られた前駆体画分とβ-アラニン系で得られた前駆体画分を反応させると、新奇青色色素 Blue-GB が生成した。Blue-GB はグリシン由来の側鎖からなるピロロピロール構造とβ-アラニン由来の側鎖からなるピロロピロール構造のヘテロダイマーであった。本研究より、青色色素前駆体はピロロピロール構造を有することが示唆された。また、その推定反応機構についても考察した。

[1] F. Hayase, et al, Biosci. Biotechnol. Biochem., 63 (8), 1512-1514 (1999)
[2] R. Shirahashi, H. Watanabe and F. Hayase, Biosci. Biotechnol. Biochem., 73 (10), 2287-2292 (2009)

MAILLARD REACTION, Pigments, Pyrrolopyrrole

講演番号：3B04p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ B 校舎 04 会場

メイラード反応により生成する色素のピロロピロール構造特異的抗体の作製

Preparation of pyrrolopyrrole structure-specific antibodies of the pigment formed by the Maillard reaction

○青木 真洋[1]、臼井 照幸[2]、渡辺 寛人[1]、早瀬 文孝[1] ([1]明治大院農、[2]昭和学院短大・ヘルスケア栄養)
○Masahiro AOKI[1], Teruyuki USUI[2], Hirohito WATANABE[1], Fumitaka HAYASE[1] ([1]Meiji Univ., [2]Showagakuin Junior College)

【目的】 当研究室ではメラノイジンの中間体として、D-キシロース－グリシン系メイラード反応において、Blue-M1 [1]をはじめ多くの色素化合物を同定してきた。これら色素化合物は還元糖やアミノ酸を変えた異なる反応系でも確認されており、いずれもピロロピロール構造を有し、単独で褐変する性質を有する。 従って、メイラード反応においてピロロピロール化合物は普遍的に生成すると考えられ、その重要性が示唆されてきた。本研究では D-キシロース－6-アミノヘキサン酸系において同定されたピロロピロール化合物である PPA-AH1 (1,4-(dicarboxypentyl)-5-(2,3-dihydroxypropyl)-pyrrolo[3,2-b]pyrrole-2-carbaldehyde)をハプテンとして用い、ピロロピロール構造を特異的に認識する抗体作製を試みた。さらに、この抗体を用いてメラノイジン中に含まれるピロロピロール骨格の存在について検討した。

【方法】 D-キシロースと 6-アミノヘキサン酸を 60%エタノールに溶解し(pH 8.1)、26.5℃にて 5 日間インキュベートした。反応溶液中の PPA-AH1 を各種クロマトグラフィーにて精製し、MS、NMR による構造解析に供し同定した。メラノイジンは D-グルコースと各種アミノ酸 (グリシン、6-アミノヘキサン酸、グルタミン酸ナトリウム、アスパラギン酸ナトリウム)を水に溶解し、95℃にて 7 時間還流した。反応溶液を水中で 2 週間透析し、モデル系メラノイジンサンプルとした。抗体作製は、PPA-AH1 をハプテンとして、キャリアタンパク質の Keyhole Limpet Hemocyanin（KLH）に結合し、PPA 抗原を調製した。この抗原を BALB/c 系雌マウスに免疫し、血清を採取して抗 PPA 特異的抗体を得た。さらに、この抗体がピロロピロール構造特異的抗体であること、またメラノイジンを認識することを確認するため競合 ELISA 法を行った。競合剤のメラノイジンとして D-グルコース－グリシン系メラノイジン、D-グルコース－6-アミノヘキサン酸系メラノイジン、D-グルコース－アスパラギン酸系メラノイジン、D-グルコース－グルタミン酸系メラノイジンを用いた。

【結果】 マウス血清に対し ELISA 法により抗 PPA 抗体価の上昇を確認した。競合 ELISA 法の結果より得られた抗体は PPA 特異的であり、ピロールやピロールアルデヒドとは反応を示さなかった。本抗体は各種モデル系メラノイジンを認識することを確認した。以上のことより、メラノイジン中にピロロピロール骨格の存在を示唆した。

[1] F. Hayase, et al, Biosci. Biotechnol. Biochem., 63 (8), 1512-1514 (1999)

maillard reaction, melanoidin, pyrrolopyrrole

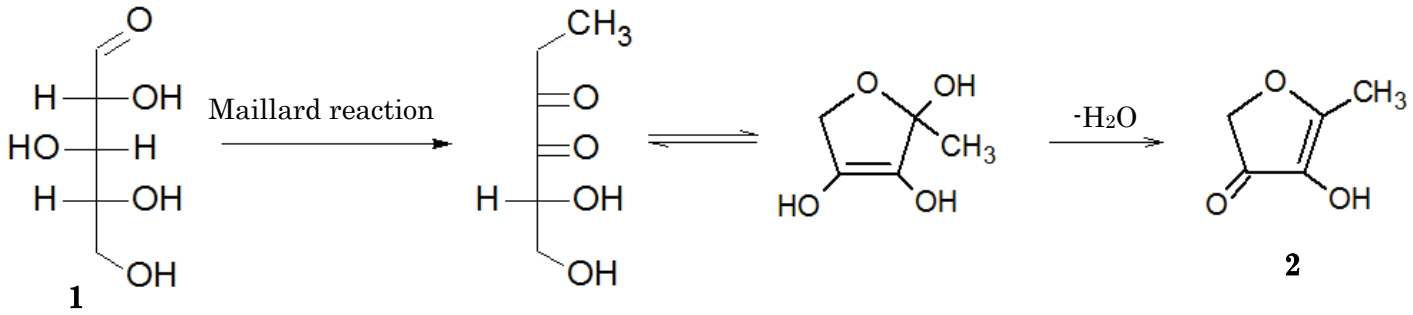
講演番号：3B04p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ B 校舎 04 会場

キシロースーリジン系メイラード反応により形成される主要反応生成物の同定

Identification of a Major Reaction Product from Xylose-Lysine Maillard Model System

○見上 葉子[1]、山田 眞二[2]、村田 容常[1] ([1]お茶大院・ライフ、[2]お茶大院・理学)
○Yoko MIKAMI[1], Shinji YAMADA[2], Masatsune MURATA[1] ([1]Department of Nutrition and Food Science, Ochanomizu Univ., [2]Department of Chemistry, Ochanomizu Univ.)

【目的】キシロース（**1**）－リジン系メイラード反応における色素形成（dilsyl-dipyrrolone A、B、C[1) 2)]）に、pH がどのような影響を与えているのかを調べる過程で、285 nm に極大吸収を有する主要物質（**2**）を HPLC 上に検出した。本研究では、化合物 **2** の単離・同定を行った。
【方法】HPLC 分析は ODS カラムを用い、検出は DAD（250-500 nm）、溶離液として MeOH-0.1 % TFA 水溶液系を用いて行った。キシロース（0.3 M）とリジン（0.3 M）を 0.2 M リン酸緩衝液（pH 7.0）に溶解し、100℃で 60 分加熱した。反応溶液を酢酸エチルで抽出し、濃縮を行ったところ、赤色溶液中に結晶を認めたので分け取った。得られた結晶を NMR、MS、X 線構造解析に供し、構造解析を行った。
【結果】加熱後反応溶液を、逆相系 HPLC に供したところ、400 nm の検出では dilsyl-dipyrrolone A、C、B の順に検出され、また、280 nm では **2** と furfral が検出された。**2** はキシロースーリジン系メイラード反応サンプル中の総面積に対して 60－80%程度の高い割合を示した。酢酸エチル抽出後の面積比では 96%を示した。構造解析の結果、**2** を 4-hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanone と同定した。キシロース（13.3 mM）とリジン（34 mM）を pH 6.0 から pH 8.0 の緩衝液に溶解し、加熱したところ **2** の生成は pH 6.5－7.0 で最大となり、約 20 mg/ 100 ml だった。また、本物質は濃縮段階で重合褐変が認められたため、褐変の前駆体である可能性が示唆された。



1) Sakamoto *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **73**, 2065 (2009).
2) Nomi *et al.*, *Food Funct.*, **4**, 1067 (2013).

Maillard reaction, xylose, furanone

講演番号：3B04p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ B 校舎 04 会場

メラノイジンの分解菌の検索と分解物の性質

microbiological screening of melanoidin

○本間 清一[1]、松井 芳光[2]、中西 康博[2]、山本 祐司[2]、能見 祐理[1]、大塚 譲[1] ([1]お茶大、[2]東農大)
○ Seiichi HONMA[1], YOSIMITU MATUI[2], YASUHIRO NAKANISI[2], YUUZI YAMAMOTO[2], YURI NOUMI[1], YUZURU OUTUKA[1] ([1]Ochanomizu UNIV., [2]Tokyo UNIV.of Aguriculuture)

目的
還元糖とアミノ酸とのメイラード反応で生成する褐色色素はメラノイジンとよばれ、両性の重合高分子の性質がある。しかし、この高分子の化学構造は未祥である。この分野は低分子物質の解明から高分子像に着実に迫る低分子から高分子への研究方向が主流である。本研究は、メラノイジンが重合高分子であることに着目し、メラノイジンの構造に化学的繰り返し単位構造が存在していると想定し、温和条件下で、微生物により高分子メラノイジンンの低分子化を図るものである。
方法及び結果
メラノイジンの調製　モデル系メラノイジンは、グルコースとグリシン（各 0.1M）、40~60℃で、反応時間中に NaOH で pH7±0.05 に調整しつづけた。反応終了後、透析膜で透析し、内液を濃縮し冷凍保存した。　モラセスメラノイジンは廃糖蜜の水溶性部分を透析後、モデル系と同様に処理・保存した。
微生物の探索
　鹿児島・沖縄諸島のサトウキビ畑、長年にわたりモラセスが廃棄されていた土地の土壌や近辺の河川の汚泥、さらにマングローブ林の周辺から検体を採取した。平成 25 年は、とくにマングローブ林からの試料採集を強化した。微生物の培養は、GYP 培地、YP 培地（モラセス培地）にメラノイジン、収集した土壌等を加え、30℃に静置した。
　培養液は肉眼で脱色が起こっていると観察できるものを選抜し、二次培養に供した。濾過除菌後、３D-HPLC（200~500nm 検出）にかけて選抜した。
微生物分解　クロマトグラフ全体のパターンを微生物を接種していないコントロールと比較し選抜した。HPLC は TSKG3000、6000PWH カラムを用い、水(95%)―アセトニトリル(5%)の溶出液を用いた。
　モデルメラノイジン：コントロールのクロマトグラフィーでは認められなかった保持時間 15~20 分の成分が生成し、ボイドボリューム付近のピークを減少・変化させる菌株 11 以上が最後の選抜に残った。培養で新たに生成した低分子化成分の吸収スペクトルにはコントロールと類似の領域があり、メラノジンの低分子化の最終判断にはさらなる分析が必要である。
モラセスメラノイジン：3 株以上の菌株を得たが、マングローブ林に多く見つかるのは興味深い。

melanoidin, degradation, microbiological depolymerization

講演番号：3B04p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ B 校舎 04 会場

クロロフィルの光退色に及ぼす溶媒の影響

Effect of solvent on discoloration of chlorophyll by light irradiation

○安田 みどり[1]、織田 恵輔[2]、上田 敏久[2]、田端 正明[3] ([1]西九大健福、[2]佐賀大農、[3]佐賀大院工)
○Midori YASUDA[1], Keisuke ODA[2], Toshihisa UEDA[2], Masaaki TABATA[3] ([1]Nishikyushu Univ., [2]Saga Univ., Faculty of Agriculture, [3]Saga Univ., Graduate School of Science and Engineering)

【目的】植物や藻類に含まれる緑色色素クロロフィルは、酸、アルカリ、酵素、光に不安定であることが知られている。特に、光によるダメージは大きく、光照射を受けると低分子化合物に分解され、最終的には無色になることが知られている。近年、ペットボトル入りの緑茶飲料の消費量が増大しているが、透明容器であるため光による退色が問題となっている。本研究では、緑茶の色の保持を目的として、クロロフィルの光退色に及ぼす溶媒の影響について検討を行った。

【方法】クロロフィルは緑茶に多く含まれるクロロフィル-a を用いた。溶媒は、水とメタノールを用い、紫外線（365 nm）を照射し、一定時間毎にサンプリングを行った。クロロフィルは、HPLC にて分析を行い、その条件は ODS カラム、溶離液はメタノールを用い、流速 1 ml/min、検出は Vis 430 nm であった。また、凝集体の粒径の測定は、ゼータ電位・粒径測定システム（ELS Z-1、大塚電子）を用いて行った。

【結果】水とメタノールの割合を変化させてクロロフィルの光による影響を調べたところ、メタノールの割合が高いほどクロロフィルの光による退色が起こりやすいことが明らかとなった。この要因として、クロロフィルの凝集状態が影響していると考えられたため、動的光散乱法にて凝集体の粒径を測定したところ、水の割合が高いほど粒径が大きくなっていることがわかった。つまり、水溶液中では弱い凝集状態で存在していると考えられ、光に対する保護効果があると思われる。一方、メタノール中ではクロロフィルは分散し、光に直接さらされるため、退色が容易に起こってしまうと考えられる。

また、水溶性の銅クロロフィリンを添加した場合、クロロフィルの光による分解がさらに抑制された。動的光散乱法にて粒径を測定したところ、クロロフィルのみの場合よりも銅クロロフィリンを添加した場合の方が粒子径が大きくなっていた。これは、銅クロロフィリンがクロロフィルと疎水性相互作用を行い、安定な凝集体を生成したため、クロロフィルの光照射によるダメージを軽減したと考えられる。このように、クロロフィルの光退色には溶液中の凝集状況が大きく関与していることが示唆された。

chlorophyll, discoloration, aggregation

講演番号：3B04p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ B 校舎 04 会場

着色系“松館しぼりダイコン”交配種のアントシアニン分析
Analysis of anthocyanins in the colored radish "Matsudate Shibori" hybrid
○畠山 研人[1]、椿 信一[2]、大木 梓織[3]、櫻井 健二[3]、常盤野 哲生[3]、吉澤 結子[3] ([1]秋田県立大院生資科、[2]秋田県農業試験場、[3]秋田県立大生資科)
○ Kento HATAKEYAMA[1], Nobuichi TSUBAKI[2], Shiori OHKI[3], Kenji SAKURAI[3], Tetsuo TOKIWANO[3], Yuko YOSHIZAWA[3] ([1]Akita Pref. Univ. Grad. Sc., [2]Akita Agricultural Experiment Station, [3]Akita Prefectural Univ.)

【緒言】
伝統野菜は、栽培上その土地に適し、個性的な風味を有し、自家採種できるといった利点があるが、収穫期や形・大きさの不揃い、病害に弱いものもあるため、生産量が減少していた。しかし最近では、その味の個性や地域伝統文化との結びつきが見直され、また、機能性成分を持つものも見出されていることから、再度、保存や栽培、新しい加工利用等を目指す取組みが始まっている。
“松館しぼりダイコン”は秋田の伝統野菜の一つで、そのしぼり汁に独特の風味と極めて強い辛味があることから、薬味としておろし専用で利用されている。現存しているのは根部が白色に限られるが、以前には赤ないしは紫もあったとの伝承がある。秋田県農業試験場では、商品の多様性やアントシアニン類の機能性に着目し、着色（赤ないしは紫）系“松館しぼりダイコン”の新品種育成を目指し、白色“しぼりダイコン”と各種着色ダイコンとの交配を試みるなかで、交配種の色の発現が不規則であることや色調が多様に変化することがわかった。
そこで、本研究では、“松館しぼりダイコン”の交配先に用いた着色系ダイコンの色素と、その交配種の色素を分析し、交配種の色素組成と機能性や発現の規則性について知見を得ることを目的とした。各交配段階で得られた品種のアントシアニン類を分析し、また、その機能性の評価としては抗酸化活性を調査した。

【実験方法】
交配試験に用いた着色系ダイコンと、“しぼりダイコン”との交配で得られた交配種について、アントシアニン類を抽出し、HPLC 分析を用いて市販品と比較しアントシアニン化合物の同定と定量を行った。また、各種の試料ダイコンから得られた粗アントシアニン抽出物について、DPPH 消去活性試験を用いて抗酸化活性を評価した。

【結果】
着色系ダイコンからのアントシアニン類の抽出方法を検討し、凍結乾燥後に 5%ギ酸水溶液を用いる方法が HPLC 分析に適していることを見出した。含有されているアントシアニン類化合物の種類と量の変化、および、それらと抗酸化活性との関係について報告する。

Anthocyanin, *Raphanus sativus* L., Antioxidant

講演番号：3B04p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ B 校舎 04 会場

紅イモ（*Ipomoea batatas*）に含まれるアントシアニンの固定化酵素による構造の改変

Structural modification of anthocyanins in red sweet potato (*Ipomoea batatas*) by immobilized enzyme

○山田 恭正、河合 梢、前田 美樹（同志社女大食栄）
○Yasumasa YAMADA, Kozue KAWAI, Miki MAEDA (Doshisha Women's Coll. Dept. Food sci. Nutri.)

［目的］沖縄県では有色甘藷(*Ipomoea batatas*)である紅イモの品種として備瀬、沖夢紫[1)]、ちゅら恋紅が栽培されている。これまでの研究では有色甘藷を摂取した際に、含有量の多いジアシル化アントシアニンは小腸から吸収されないで、モノアシル化アントシアニン Peonidin 3-(6-caffeoyl-sophoroside)-5-glucoside のみが選択的に吸収されるという報告[2) 3)]がある。そこで紅イモに含まれるジアシル化アントシアニンの糖部と有機酸（カフェ酸、フェルラ酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸など）とのエステル結合を固定化酵素によって選択的に加水分解し、効率よくモノアシル化アントシアニン Peonidin 3-(6-caffeoyl-sophoroside)-5-glucoside や Cyanidin 3-(6-caffeoyl-sophoroside) -5-glucoside などに変換することを目的とした。

［方法と結果］ちゅら恋紅から抽出したアントシアニンのアシル基を選択的に加水分解するために、酵素クロロゲン酸エステラーゼを固定化する無機担体として(1)沸石（酸化アルミニウムを主成分とする多孔質の粒子)、(2)フェニルアミノ基で化学修飾されたカオリナイト（Toyonite 200-P，東洋電化工業）を用いた。担体を酵素溶液（pH 6.4 のリン酸緩衝液）に一晩浸漬してクロロゲン酸エステラーゼを固定化した。次に固定化酵素の粒子を充填したカラムに、基質であるアントシアニンの水溶液を注入し、37℃でインキュベーションした。一定時間おきに溶液をサンプリングし、ODS カートリッジで固相抽出してから HPLC および LC-MS/MS で分析を行った。その結果、固定化担体(1)を用いた反応では、モノアシル化アントシアニンの生成を確認したが、固定化担体(2)を用いた反応では、基質のアシル化アントシアニンよりも質量数の大きなイオンが検出されたので、MS/MS によりプロダクトイオンおよび非アシル化アントシアニンのプリカーサイオンを検索した。酵素を固定化する担体の種類によって生成するアントシアニンの構造が異なった。

文献

1) Y. Yamada, N. Oomi, M. Yamane, N. Nakatani, Jpn. J. Food Chem. Safety, **19**(1), 59 (2012).
2) I. Suda, T. Oki, M. Masuda, Y. Nishiba, S. Furuta, K. Matsugano, K. Sugita, N. Terahara, J. Agric. Food Chem., **50**, 1672 (2002).
3) K. Harada, M. Kano, T. Takayanagi, O. Yamakawa, F. Ishikawa, Biosci. Biotechnol. Biochem., **68**, 1500 (2004).

Ipomoea batatas, anthocyanin, immobilized enzyme

講演番号：3B04p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ B 校舎 04 会場

既存添加物「クチナシ赤色素」の製造法に関する研究

Studies on the preparation of a food colorant Gardenia Red

○森本 麻紀[1]、伊藤 裕才[2]、杉本 直樹[2]、穐山 浩[2]([1]東京理科大薬、[2]国立医薬品食品衛生研究所)
○MAKI MORIMOTO[1], YUSAI ITO[2], NAOKI SUGIMOTO[2], HIROSHI AKIYAMA[2] ([1]Tokyo Univ. of Science, [2]National Institute of Health Sciences)

[**目的**]既存添加物「クチナシ赤色素」はクチナシ果実中のイリドイド配糖体であるゲニポシドのメチルエステルの加水分解物に、タンパク質分解物およびβ-グルコシダーゼを添加して得られる色素である。ゲニポシドをエステル加水分解せずに得られる反応物は青色を呈し「クチナシ青色素」として利用されている。これら「クチナシ赤色素」および「クチナシ青色素」は、イリドイド化合物とアミノ基との間の連鎖反応で生成する高分子重合体であるため、色素の化学構造や形成機構については不明な点が多い。特に「クチナシ赤色素」は色調の差が生じやすく、赤色ではなく赤紫色になることが問題視されている。「クチナシ赤色素」の製造法に関する過去の研究によれば、反応液を嫌気状態にしてさらにクエン酸や五炭糖類を添加することで赤みが増加すると報告されている[1]。しかしながら、これら添加剤が赤色素形成においてどのような働きをしているかは不明である。そこで、本研究では赤色色素を安定に製造するための反応条件およびクエン酸等の添加剤の必要性について検討を行った。

[方法・結果] クチナシ果実を粉砕して 50%メタノールで 3 時間抽出した後、抽出液を ODS カラムに負荷し、黄色色素(クロシン)を除去してゲニポシド画分を得た。ゲニポシドを 0.5M NaOH 溶液で加水分解した後、再び ODS カラムに負荷し、10%アセトニトリル(0.1%ギ酸添加)でゲニポシド酸を溶出させた。なおゲニポシド酸の形成は LC/MS 分析によって確認した。得られたゲニポシド酸を水に溶かし、アミノ基源として等量のグリシン、2 等量のクエン酸、そしてβ-グルコシダーゼを添加し、窒素曝気による嫌気条件下で色素形成反応を行った。ゲニポシド酸の濃度が 1%(w/w)の場合、反応液は赤色(極大吸収波長 530nm)ではなく青色(極大吸収波長 580nm)を呈した。試料濃度を変えて反応させた結果、濃度を高めるほどに赤みが強くなることが確認され、濃度 15%(w/w)でほぼ赤色の反応液を得ることができた。次に試料濃度 15%において添加するクエン酸の量を変えて反応を行った結果、クエン酸を添加しない場合、反応液は青色を呈したが、クエン酸濃度が高まるにつれて青色素が形成されず赤みが増すことが確認された。クエン酸がキレーターとして働いている可能性が示唆されたため、クエン酸の替わりにエチレンジアミン四酢酸を用いて反応を行ったが、反応液は青色を呈した。このように赤色素の形成は濃度に依存し、またクエン酸の添加が必須であることが示された。

1) 漏留、中島、藤井、日本食品科学工学会誌、第 44 巻、第 11 号、p16-23、1997 年

gardenia red, geniposide, iridoide

講演番号：3B04p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ B 校舎 04 会場

キサントフィル酸化的代謝産物によるマウス 3T3-L1 脂肪前駆細胞の分化誘導抑制効果

Oxidative metabolites of xanthophylls inhibit the differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes

○小竹 英一、長尾 昭彦、長谷 恵、小林 みゆき（独立行政法人　農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所）
○Eiichi KOTAKE, Akihiko NAGAO, Megumi HASE, Miyuki KOBAYASHI (Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization)

[目的]　カロテノイド／キサントフィルは様々な機能性を有することが報告されているが、そのような機能をカロテノイド分子そのものが発揮しているのか、あるいは代謝産物が発揮しているのかについてはよくわかっていない。β-カロテンからビタミン A に代謝変換されることはよく知られているが、哺乳類において、プロビタミン A カロテノイド以外の代謝変換についてはほとんどわかっていない。これに対し演者らは近年、キサントフィルからのケトカロテノイドへの酸化的代謝変換が哺乳動物体内で起こることを報告している。本研究では、このような代謝産物の生物活性としての抗肥満効果をマウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 を用いて検討した。

[方法]　ヒト血中に存在する主要なカロテノイドであるルテイン及び β-クリプトキサンチンの代謝産物として、3’-hydroxy-ε，ε-caroten-3-one 及び β，ε-carotene-3’-one をそれぞれ実験に用いた。これらは補酵素 NAD 存在下のマウス肝臓ホモジネート中でこれらのカロテノイドをインキュベートし、代謝産物を TLC 等で精製して実験に供した。カロテノイド及びその代謝産物は、細胞培養用の培地に液中乾燥法にて溶解し、これを細胞へ添加した。3T3-L1 細胞は insulin、dexametansone、3-isobutyl-1-1methylxanthine で分化誘導開始、その後、insulin とカロテノイド等を細胞へ添加、数日後さらに同じ内容で培地交換を行った。陽性コントロールとして、ベルベリンを用いた。脂肪の蓄積量をトリグリセライド E-テストワコーで測定し、同時に細胞内カロテノイド量、タンパク量を測定した。さらに、肥満関連タンパクの発現に及ぼす影響をウエスタンブロットで調べた。

[結果] 3T3-L1 におけるカロテノイドの分化誘導抑制作用に関しては、これまでに、β-カロテン、β-クリプトキサンチン、フコキサンチン、ネオキサンチンが効果を発揮することが報告されている。一方で、ルテインにはそのような効果は無いと報告されている。本研究においても、確かに、ルテインに分化誘導抑制作用は認められなかった。しかしながら、その代謝産物である 3’-hydroxy-ε，ε-caroten-3-one に効果が認められた。この結果は、カロテノイドによっては吸収後に体内で活性化体に代謝変換されて機能性を発揮する可能性を示している。本研究では、この他、細胞内カロテノイド濃度や化学構造と分化誘導抑制効果との相関関係や、アディポネクチン、PPARγ などのタンパク発現に及ぼす代謝産物の効果について報告する。

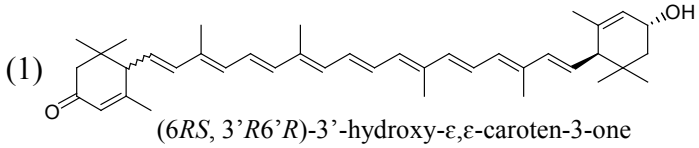
lutein, 3T3-L1, carotenoid

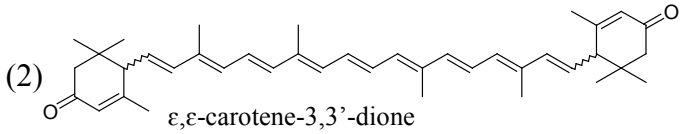
講演番号：3B04p23
講演日時、会場：3 月 29 日 17:59～ B 校舎 04 会場

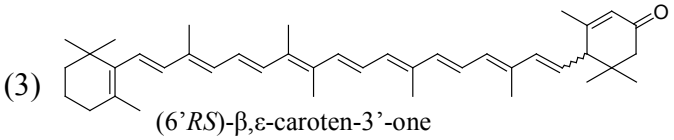
ヒト血漿中に検出されるキサントフィルの酸化的代謝産物
Oxidative metabolites of xanthophylls in human plasma

○長尾 昭彦、小竹-奈良 英一、小林 みゆき（農研機構食総研）
○Akihiko NAGAO, Eiichi KOTAKE-NARA, Miyuki KOBAYASHI (NFRI, NARO)

［目的］演者らはこれまでにフコキサンチンやルテインなどのキサントフィルをマウスへ投与すると酸化的代謝産物が組織に蓄積すること，また，マウス肝臓には補酵素 NAD 存在下でキサントフィルのβ末端基に結合する水酸基を酸化しカルボニル基をもつε末端基に変換する代謝活性が存在することを報告した．本研究では，ヒトで同様な代謝が起きているか調べるため，ヒト血漿中に含まれるキサントフィル及びその代謝産物の分析を試みた．一方，いくつかのカロテノイドはマウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞による NO 産生を抑制する生物活性が報告されている．そこで，キサントフィルから生成するこれらの酸化産物が NO 産生に及ぼす影響を調べた．
［方法］各種キサントフィル代謝産物は，キサントフィルとマウス肝臓ホモジネートを補酵素 NAD 存在下で反応させて調製した．さらに，TLC 及び HPLC により分離精製した後，HPLC 分析及び培養細胞試験に供した．ヒト血漿抽出物は，シアノニトリルカラムを用いた順相 HPLC で分析した．キサントフィル及びその酸化的代謝産物をマウスマクロファージ由来 RAW264 細胞と 24 時間インキュベーション後，LPS 刺激による NO 産生を Griess 試薬によって測定した．
［結果と考察］マウス肝臓ホモジネートにβ－クリプトキサンチンをβ，ε-caroten-3’-one に酸化する活性を見いだしていたが，ヒト血漿を分析するとこの代謝産物が検出された．ヒトにおいても，マウスと同様なキサントフィルの酸化的代謝が起きているものと考えられた．ルテインやβ－クリプトキサンチンには RAW264 細胞による NO 産生を抑制する活性は認められなかった．一方，ルテイン由来の 3’-hydroxy-ε,ε-caroten-3-one(1)，ゼアキサンチン由来の ε,ε-carotene-3,3’-dione(2)，及びβ－クリプトキサンチン由来のβ，ε-caroten-3’-one（3）は濃度依存的に NO 産生を抑制した．β，ε-caroten-3’-one 処理細胞では，濃度依存的な iNOS のタンパク発現抑制が認められた．NO 産生抑制は酸化的代謝によって生成したα，β-不飽和カルボニル構造に起因するものと考えられた．







lutein, β-cryptoxanthin, carotenoid

講演番号：3B05a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ B 校舎 05 会場

ChREBPβの組織における発現分布と機能の解析

Expression pattern and function of ChREBPbeta in tissues

○井上 聖哉、井上 順、Shimizu Makoto、佐藤 隆一郎（東大院農）
○Seiya INOUE, Jun INOUE, Makoto SHIMIZU, Ryuichiro SATO (Grad. Sch. of Agrc. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【目的】

ChREBP(Carbohydrate response element-binding protein)は糖の刺激に応答して、糖・脂質代謝関連遺伝子の発現を誘導する転写因子である。近年、この転写因子には、ChREBPαとChREBPβの 2 つのアイソフォームが存在することが発見された。転写活性が極めて高いとされる ChREBPβの発現は脂肪組織におけるインスリン感受性と強く相関することが報告されているが、他の組織における発現分布と機能は不明である。そこで本研究においては、ChREBPβがどの組織で発現しているか調べ、その組織における ChREBPβの機能を解析した。

【方法】

マウスの肝臓、精巣上体脂肪組織、骨格筋、空腸、血液における ChREBPβの mRNA 量を定量した。また、生理的な条件下で ChREBPβの発現が変動しうるか調べるために、高糖質食（スターチ食、フルクトース食）もしくは高脂肪食（ラード食、大豆油食）をマウスに 1 週間与え、各組織における ChREBPβの発現量の変化を調べた。さらに、フルクトース誘導性脂肪肝との関連を調べるために、スターチ食もしくはフルクトース食を 10 週間与えたマウスの肝臓における ChREBPβ、糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量の変化を調べた。

【結果】

各組織における ChREBPβの mRNA 発現量を調べた結果、肝臓、空腸および精巣上体脂肪組織で ChREBPβが発現していることが確認された。また、高脂肪食を 1 週間与えたマウスと比較して、高糖質食を与えたマウスの肝臓と空腸では ChREBPβの発現が顕著に誘導された。さらに、スターチ食を 10 週間与えたマウスと比較してフルクトース食を与えたマウスの肝臓では、ChREBPβと糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量が増大するのと同調して、肝脂肪の蓄積が亢進した。

【考察・結論】

以上の結果から、これまでに報告されていた脂肪組織以外にも肝臓や空腸において ChREBPβが発現しており、これらの組織では糖質の摂取により ChREBPβの発現が誘導されることが明らかとなった。また、フルクトース摂取によって発現が誘導された糖・脂質代謝関連遺伝子の多くは ChREBP の標的遺伝子であることから、フルクトース誘導性脂肪肝の進行に ChREBPβの発現誘導が関与する可能性が示された。

Chrebp, Fructose, Liver

講演番号：3B05a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ B 校舎 05 会場

N-アセチルスクロサミンの諸性質と腸内細菌による資化性

Physicochemical properties of *N*-acetylsucrosamine and *N*-acetylsucrosamine assimilation properties of Intestinal bacteria.

○篠崎 佑子[1]、豊田 葉月[2]、平野 貴子[2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科・生物資源利用、[2]日大生資科・生命化)
○YUKO SHINOZAKI[1], HAZUKI TOYODA[2], TAKAKO HIRANO[2], WATARU HAKAMATA[1,2], TOSHIYUKI NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Dept. Chem. and Life Sci. , Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】当研究室では、糖転移型 β-フルクトフラノシダーゼを含む *Aspergillus oryzae* の乾燥菌糸を用いて、*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)とフルクトースから成る 2 糖である *N*-アセチルスクロサミン(SucNAc)の酵素合成に成功した[1)]。さらに、本菌の菌糸を充填したカラムリアクターを用いることにより SucNAc の連続生産[2)]が可能となったため、現在、本オリゴ糖について用途開発を行っている。本研究では、SucNAc の諸性質調査を行うと共に、本オリゴ糖のプレバイオティクスとしての可能性に着目し、腸内細菌による資化性試験を行うことにした。
【方法】SucNAc の諸性質調査は、構造類似体である Suc の性質と比較して行った。両オリゴ糖の酸・熱安定性は、各オリゴ糖溶液を pH 3～9、25～100 ℃ 1 時間インキュベートした後、TLC と HPLC によりその分解の程度を調べた。酵素分解性は、ラット小腸由来のスクラーゼや微生物由来の β–フルクトフラノシダーゼなどの Suc 分解酵素を作用させることにより調べた。また、腸内細菌による SucNAc 資化性を調べるため、*Bifidobacterium* 属と *Lactobacillus* 属の細菌を MRS 培地で培養後、生理食塩水で洗浄し前培養液由来のグルコースを除去した後、各オリゴ糖含有培地に添加し培養した。菌の増殖は OD_{600} における菌体濁度を測定して調べた。また糖の分析は、TLC と TLC から糖の定量を行う Gel Documentation system を用いて調べた。
【結果】酸・熱安定性では、弱アルカリ性から弱酸性では両オリゴ糖共に安定であったが、pH 3、100 ℃の条件下で、Suc はほぼ分解したのに対して SucNAc は 60%程度残存した。酵素分解性では、Suc はすべての酵素で速やかに分解したのに対して、SucNAc は本オリゴ糖を合成するときに用いた転移型 β-フルクトフラノシダーゼでしか分解されなかった。このことから、SucNAc が化学的にも生物的にも安定なオリゴ糖であること分かった。また、腸内細菌の資化性試験では、*Bifidobacterium* 属と *Lactobacillus* 属の細菌共に SucNAc に対する資化性は低かった。しかし、*Bifidobacterium breve* や *Bifidobacterium infantis* といった一部の細菌では SucNAc を資化することを確認した。このことから、SucNAc は幼児の腸管内で優勢な *Bifidobacterium* 属の細菌を特異的に増殖させる可能性が示唆された。

1) Takako Hirano, Toru Wada, Sumire Iwai, Hitoshi Sato, Makoto Noda, Mai Juami, Masatoshi Nakamura, Yasuko Kumaki, Wataru Hakamata, and Toshiyuki Nishio, *Carbohydr. Res.*, **353**, 27-32 (2012)
2) Hitoshi Sato, Saeko Yokochi, Terumi Kasama, Takako Hirano, Wataru Hakamata, and Toshiyuki Nishio, *J. Appl. Glycosci.*, **59** 153-160 (2012)

N-acetylsucrosamine, intestinal bacteria, physicochemical properties

講演番号：3B05a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ B 校舎 05 会場

高アミロース米及び超硬質米の食味及び機能性改善

Improvement of palatability and funtion of high-amylose or super-hard rice

○大坪 研一[1]、中村 澄子[1]、笹原 茂樹[2]、松下 景[2]、長岡 一朗[2]、山口 誠之[2]（[1]新潟大院自然、[2]農研機構）
○Ken’ichi OHTUBO[1], Sumiko NAKAMURA[1], Shigeki SASAHARA[2], Kei MATSUSHITA[2], Ichirou NAGAOKA[2], Masayuki YAMAGUCHI[2]（[1]Niigata Univ., [2]NARO）

【目的】わが国の 39%という食料自給を改善するには米の消費拡大が必要であるが、国産米は高コストであり、安価な外国産米に対抗するには、食味や機能性等によって高付加価値化する必要がある。本研究では、硬質米の食後血糖上昇抑制効果に着目し、調理炊飯方法を工夫することで、機能性を維持・向上させながら、米飯食味を改善することを目的とした。
【試料及び実験方法】本研究では、農研機構中央農研センター北陸センターで育成された高アミロース米「越のかおり」および超硬質米「北陸粉 243 号」を試料とし、コシヒカリを対照とした。食味の理化学評価のため、アミロース含量（Juliano のヨード呈色法）、タンパク質含量（ケルダール法）、精米粉の糊化特性試験（RVA 法）、米飯物性測定（テンシプレッサーによる高圧縮・低圧縮試験）を行った。米飯食味を改善するための炊飯方法として、赤タマネギ添加発芽処理玄米と精白米とのブレンド、味噌浸漬炊飯、および米麹溶液浸漬炊飯の３種類を行い、米飯物性値およびレジスタントスターチ含量、グルコース含量、グルタミン酸含量および DPPH ラジカル消去能の測定を行い、機能性をともなう食味改善について、通常の炊飯の場合と比較検討した。
【結果】米麹浸漬炊飯米および無塩味噌浸漬炊飯米では、前者の炊飯米の表層の硬さは、普通炊飯の硬さより 47%減少し、全体の硬さは 68%減少した。また、全体の粘りは約 5 倍増加し、物性値が改善された。味噌添加炊飯米は米麹炊飯米に比べやや硬く粘りも弱い物性となった。レジスタントスターチ含量、グルコース含量、グルタミン酸含量および DPPH ラジカル消去能において、米麹浸漬炊飯米が高い傾向を示した。味噌浸漬炊飯により、レジスタントスターチ含量は低下せず、グルタミン酸含量は「越のかおり」と「北陸粉 243 号」で低下し、グルコース含量、DPPH ラジカル消去能は増加する傾向を示した。特に北陸粉 243 号の抗酸化性が顕著に高くなることが明らかとなった。赤タマネギ添加発芽玄米を 50%ブレンドした米飯では、対照の白飯に比べて硬さとコシが増加し、粘りと付着性が減少したが、GABA やポリフェノールの増加により、DPPH ラジカル消去能が増加した。以上の結果、澱粉構造に起因して食味の劣る高アミロース米あるいは超硬質米の機能性を顕著に損なうことなく、米飯食味を改善する可能性が示された。

rice, palatability, function

講演番号：3B05a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ B 校舎 05 会場

栗渋皮ポリフェノールの膵アミラーゼ阻害機構の解析

The mechanism of pancreatic alpha-amylase inhibition by polyphenol from chestnut astringent skin.

○辻田 隆広、高久 武司 (愛媛大総合科学)
○Takahiro tsujita, takeshi takaku (Ehime Univ.)

【目的】栗渋皮ポリフェノールには強いα-アミラーゼ阻害作用および糖吸収抑制作用が存在し、その主成分は縮合型タンニンと加水分解型タンニンの混合物であることが推測されている。栗渋皮ポリフェノールのアミラーゼ阻害機構について検討したので報告する。

【方法】アミラーゼ活性は、可溶性デンプンを基質として用い、遊離するオリゴ糖の還元力の増加を測定した。ポリフェノールとアミラーゼの相互作用は、Trpの蛍光消光法を用いた。ポリフェノールとアミラーゼを混合して25℃で30分間インキュベーションした後、この混合液を、日立F2700蛍光分光光度計を用いて、Trpの励起波長292nmにおける波長300から400nmの蛍光スペクトルを測定し、その蛍光の極大値とその波長を算出した。

【結果】栗渋皮に含まれるポリフェノールはカテキン単位で 10 個以上重合しており、カテキンやエピガロカテキンガレート等の低分子ポリフェノールの 100 倍以上強くα-アミラーゼを阻害し、アカルボースと同等以上であった。アミラーゼの阻害はｐＨに依存し、酸性側では強く阻害し、アルカリ側では弱く、ｐH9 ではほとんど阻害作用は認められなかった。ラットへの澱粉負荷試験ではそのポリフェノール濃度に依存して血糖値の上昇が穏やかになり、総吸収量も濃度依存的に抑制した。α-アミラーゼと栗渋皮ポリフェノールの相互作用解析では、ポリフェノールの濃度に依存して蛍光強度の減少が認められ、この蛍光強度の減少は阻害活性と同様に、酸性側で強くアルカリ側で弱い傾向が観察された。栗渋皮ポリフェノールは牛血清アルブミンとも相互作用し、ポリフェノールの濃度に依存して蛍光強度の減少が認められた。しかし蛍光強度の減少はアルカリ側で強くなり、アミラーゼ阻害活性とは逆の傾向が認められた。

【結論】タンニンに代表されるように高分子ポリフェノールはタンパク質と非特異的に結合し、タンパク質を凝集、変性させその活性を消失させることが知られている。しかし栗渋皮ポリフェノールは特異的にα－アミラーゼに作用し、その活性を阻害している可能性が示唆された。

chestnut astringent skin, polyphenol, amylase inhibitor

講演番号：3B05a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ B 校舎 05 会場

脂肪酸添加による馬鈴薯澱粉の難消化性付与

Processing of resistant potato starch by adding with fatty acids

○秋山 美展[1]、松橋 南[1]、小原 幸[1]、納谷 美日子[1]、石川 匡子[1]、石原 克之[2]、佐久間 塁[2]、古賀 秀徳[2]（[1]秋田県大・生物資源、[2]カルビー（株））
○Yoshinobu Akiyama[1], MInami Matsuhashi[1], Miyuki Ohara[1], Mikako Naya[1], Kyoko Ishikawa[1], Katsuyuki Ishihara[2], Rui Sakuma[2], Hidenori Koga[2] ([1]Akita Pref. Univ. Biores. Sci., [2]Calbee co., Ltd.)

【目的】わが国の 2 型糖尿病の患者数はその予備軍も含めると人口の約 27%を占めると報告されており、糖尿病の予防は喫緊の保健課題となっている。従来の糖尿病栄養指導は、食品に含まれる糖質量のコントロールを基礎として行われてきた。しかし、同じ糖質食品でも摂取後の血糖値の動態に及ぼす影響は異なっていることが明らかになっている。このような観点から、食後血糖値の上昇を抑制できる糖質食品の開発が望まれている。われわれは、澱粉に脂肪酸を添加し加熱することにより難消化性を付与する方法の開発を進めている。
【方法】馬鈴薯澱粉に、リノール酸およびパルミチン酸を各 3%(w/w)添加し、恒温器中で 160℃に加熱した。加熱保持時間は 0, 30, 60, 90 分とした。試料は加熱後ただちに室温まで冷却した。パンクレアチンα-アミラーゼとアミログルコシダーゼによる澱粉分解性を指標として、*in vitro* 法によるグリセミック指数推定値(EGI)を求めた。EGI の算出は白パンの消化性を基準とした Goni らの方法によって算出した。
【結果】脂肪酸を添加した馬鈴薯澱粉は 160℃の加熱によって一旦は EGI 値が僅かに上昇するが、加熱保持時間に比例して EGI 値が低下した。リノール酸添加試料では 160℃加熱試料では無添加加熱試料の約 40%まで EGI 値が低下していた。脂肪酸添加加熱によって馬鈴薯澱粉に難消化性を付与することが可能となった。

potato, fatty acid, resistant starch

講演番号：3B05a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ B 校舎 05 会場

リグニンスルホン酸による脂肪細胞分化促進作用とα-グルコシダーゼ活性阻害作用

Lignosulfonic acid promotes adipocyte differentiation and inhibits α-glucosidase activity

○川南 諭、阿部 貴大、高橋 浩司、長谷川 靖（室蘭工大院工）
○Satoshi KAWAMINAMI, Takahiro ABE, Koji TAKAHASHI, Yasushi HASEGAWA (Muroran Institute of Technology)

1. 背景

製紙工場では木材から原料となるセルロースを取り除いた後、リグニン分解物である黒液が副産物として排出される。この黒液にはリグニンが低分子化したリグニンスルホン酸が大量に含まれているが、ほとんどは焼却処分されており、その量は日本国内だけで年間 700 万トンにも及ぶ。

本研究ではリグニンスルホン酸の新たな有効利用法を探るべく、リグニンスルホン酸のマウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 の分化促進作用、及びα-アミラーゼ、α-グルコシダーゼ活性阻害作用について検討した。

2. 実験方法・結果

① 培養した 3T3-L1 細胞をリグニンスルホン酸存在下で、インスリン、デキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチンを用いて分化誘導したところ、コントロールの細胞に比べて、脂肪滴のサイズが大きくなることがわかった。リグニンスルホン酸が脂肪細胞の分化を促進していることを確認するため、リグニンスルホン酸存在下で分化させた細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて脂質形成に関わる遺伝子の発現量を調べた。その結果、脂質合成を調節する SREBP 等の遺伝子の発現量がコントロールと比較して上昇する傾向が見られた。また、予備実験としてラットにリグニンスルホン酸を 2%含む餌を食餌させたところ、コントロールとして 2%セルロース食餌させたラットに比べて、後腹膜脂肪組織重量が増加する傾向が見られた。これらの結果からリグニンスルホン酸が in vitro 及び in vivo においても脂肪細胞の分化を促進する可能性が示唆された。

② リグニンスルホン酸が糖の分解、吸収に関わるα-アミラーゼ活性、α-グルコシダーゼ活性にどのような影響を与えるかを調べたところ、リグニンスルホン酸はいずれの活性も阻害することがわかった。

現在、リグニンスルホン酸が in vivo においても脂肪細胞の分化を促進するかどうか、脂肪細胞の分化を促進することで糖の取り込みを促進するかどうか、また、α-アミラーゼやα-グルコシダーゼの活性を阻害することで、in vivo での糖の吸収を抑える作用があるかどうか検討を行っている。

lignosulfonic acid, adipocyte differentiation, α-glucosidase

講演番号：3B05a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ B 校舎 05 会場

蚕サナギの 1-デオキシノジリマイシン含量および糖質分解酵素阻害作用

DNJ content of silkworm pupae and glucosidase inhibitory activity

○友竹 浩之、片桐 充昭 (飯田女子短期大学)
○Hiroyuki Tomotake, Mitsuaki Katagiri (Iida Women's Junior College)

【目的】 これまで、我々は、長野県内で古くから食されてきた昆虫に注目し、成分分析を行ってきた。その結果、蚕サナギは非常に良質のタンパク質を含んでおり、未来のタンパク質源となる可能性を見出した。一方、桑葉は強いα-グルコシダーゼ阻害成分である 1-デオキシノジリマイシン(DNJ)を多量に含み、糖尿病予防効果をもつことが知られている。また、桑葉を食べる蚕幼虫は DNJ を 2.7 倍濃縮することが報告されている。本研究では、蚕サナギの DNJ 含量および糖質分解酵素阻害作用について調べることを目的とする。

【方法】 群馬県の製糸組合より入手した蚕サナギを試料として用いた。サナギは繭から取り出し、凍結乾燥した後、粉末化した。DNJ は試料から 50%エタノールを用いて抽出し（60℃、30 分)、高速液体クロマトグラフィーにて分析した（カラム:UK-Amino、移動相： 10mM 炭酸アンモニウム含有アセトニトリル/水（90：10)、検出：示唆屈折計)。α-グルコシダーゼ阻害活性の測定にも、同じ抽出液を用いた。0.5M マルトースまたはシュークロース溶液と抽出液を混合し、酵素溶液（ラット小腸アセトン粉末）を添加した後、反応させた。反応停止後、遊離したグルコースをグルコース CII テストワコーにて測定した。

【結果】蚕サナギの DNJ 含量は、5.9mg/100g 乾燥重量（0.006%）だった。この量は、桑葉や蚕幼虫の DNJ 含量よりも少なかった。試料のα-グルコシダーゼ阻害活性を測定した結果、蚕のサナギ抽出液に強い活性がみられたものの、比較のために測定した桑葉抽出液の活性よりは弱かった。今後、ラットを用いた糖負荷試験を行う予定である。

silkworm pupae, DNJ, glucosidase inhibitor

講演番号：3B05a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ B 校舎 05 会場

ナツメに含まれる糖取り込み誘導活性成分の同定
Activation of glucose uptake in skeletal muscle cells by extracts from *Zizyphus jujuba* , and identification of active compounds.
○成瀬 翔真[1]、北村 賢治[1]、上前 知之[1]、高橋 正和[1]、大東 肇[1]、入江 一浩[2]、川畑 球一[1] ([1]福井県大院・生物資源、[2]京大院農・食生科)
○Shoma Naruse[1], Kenji Kitamura[1], Tomoyuki Uemae[1], Masakazu Takahashi[1], Hajime Ohigashi[1], Kazuhiro Irie[2], Kyuichi Kawabata[1] ([1]Fukui Pref Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】肥満者が高血糖を併発したメタボリックシンドロームは、動脈硬化の発症リスクを高める。骨格筋は血糖調節における重要な組織であり、インスリン刺激によって活性化された糖トランスポーターを介して血中の糖を取り込むことで上昇した血糖値を低下させる。このため、筋肉糖取り込み誘導活性成分を持つ食素材はメタボリックシンドロームや動脈硬化の予防に有用である可能性が高い。我々は漢方の大棗としても使われ、高い生理機能性が期待されるナツメについて筋肉糖取り込み誘導活性を評価し、その活性成分の単離・精製を試みた。
【方法】ナツメ乾燥果実のメタノール抽出物を水–酢酸エチル分配に供した。得られた酢酸エチル可溶画分について各種クロマトグラフィーにより分画し、糖取り込み誘導活性を指標として、活性成分の精製・単離を行った。糖取り込み誘導活性の測定には、ラット骨格筋由来 L6 筋芽細胞を用いた。分化 L6 筋管細胞を試料添加培地で 4 時間培養した後、糖アナログの 2-deoxyglucose（2DG）を取り込ませた。細胞内に蓄積した 2DG-6-phosphate を基質とし、G6PDH、$NADP^+$および diaphorase から成る連鎖的な酵素反応を介して resazurin より resorufin を生成し、その蛍光強度を測定することで 2DG 取り込み量を算出した[1]。
【結果】酢酸エチル可溶画分をオープンカラムクロマトグラフィー（トルエン–酢酸エチル、ステップワイズ法）で分画し、糖取り込み誘導活性を評価した結果、酢酸エチル 0~40%画分に特に高い活性が認められた。さらに酢酸エチル 10%および 20%画分を中圧カラムクロマトグラフィー（ヘキサン-酢酸エチル、ステップワイズ法）により 14 のフラクション（Fr.1~14）に分画したところ、いくつかのフラクションにインスリンと同程度の強い活性が認められた。活性画分を HPLC-PDA により分析し、シンプルなピークを示した Fr.9 について精製を行った。その結果、単一の活性化合物 92 mg が得られ、現在、各種機器分析により構造解析を進めている。さらに、その他の活性画分からの活性成分の単離・同定を試みている。
[1] Yamamot N. *et al.* , Curr. Protoc. Pharmacol. , Chapter 12 , Unit 12.14 , 2011

Zizyphus jujuba, glucose uptake, muscle cells

講演番号：3B05a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ B 校舎 05 会場

田七人参由来ダンマラン系トリテルペンと習慣的な走行運動の併用で血糖値上昇が効果的に抑制され、骨格筋重量が増加する

Chronic exercise combined with ingestion of dammarane-type triterpene from *Panax notoginseng* effectively suppresses hyperglycemia and increases skeletal muscle mass in KK-A^y mice

○岩本 拓[1]、高村 裕介[1]、北村 久美子[1]、野村 充[1]、村越 倫明[1]、眞鍋 康子[2]、藤井 宣晴[2]([1]ライオン（株)、[2]首都大学東京院)
○Taku IWAMOTO[1], Yusuke TAKAMURA[1], Kumiko KITAMURA[1], Mitsuru NOMURA[1], Michiaki MURAKOSHI[1], Yasuko MANABE[2], Nobuharu L. FUJII[2] ([1]Lion Corporation, [2]Tokyo Metropolitan Univ.)

【背景・目的】我々は薬用人参の一つである田七人参から、独自の手法を用いて作製したダンマラン系トリテルペン類を高含有したエキス（田七人参加工粉末）に、空腹時、及び食後血糖値の上昇を抑制する効果があることを示している。さらに、田七人参加工粉末中の主要なダンマラン系トリテルペンであるパナキサトリオールが、血糖値上昇抑制効果を示す有効成分の一つであることを明らかとしている。昨年度までの本大会において、パナキサトリオールは骨格筋細胞での糖取込みを亢進させ、その作用機序はインスリンにより制御されるシグナル伝達経路の活性化であることを報告した。本年度は、高血糖モデル動物である KK-A^y マウスを用いて、「パナキサトリオール摂取」と糖尿病の 3 大治療の一つとして推奨されている「習慣的な運動」の併用が血糖値に与える影響を評価した。
【方法】5 週齢雄性 KK-A^y マウスを馴化後、①安静群(コントロール群)、②パナキサトリオール摂取群、③運動群、④パナキサトリオール摂取と運動の併用群、の 4 群に分けた。パナキサトリオールは 0.24%の濃度で混餌投与し、運動はトレッドミルを用いた走行運動を 15m/min、45min、傾斜角度 0°、5 日/週の条件で 38 日間行った。運動開始後 10、17、31、38 日目に血糖値を測定し、試験終了時に各組織重量を測定した。摘出した骨格筋から total RNA を抽出後、mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。
【結果】コントロール群では試験開始から血糖値が漸次増加した。運動群の血糖値は、運動開始 31 日目以降でコントロール群と比較して有意に低値を示した。一方、パナキサトリオール摂取と運動の併用群の血糖値は、運動開始 10 日目以降でコントロール群と比較して有意に低値を示した。ヒフク筋重量は、コントロール群と比較してパナキサトリオール摂取と運動の併用群でのみ、有意に高値を示した。また、ヒフク筋での Glut4、PGC1α の mRNA 量もコントロール群と比較して、パナキサトリオール摂取と運動の併用群で有意に高値を示した。
【結論】以上の結果から、パナキサトリオール摂取と習慣的な運動を併用する事で、単独で運動を行うよりも早期に血糖値の上昇が抑制される事を見出した。また、その作用機序として、骨格筋重量の増加、及び GLUT4、PGC1α の発現量の増加が関与している可能性が示された。

Chronic exercise, dammarane-type triterpene from *Panax notoginseng*, anti-hyperglycemia

講演番号：3B05a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ B 校舎 05 会場

新種玉ねぎ「さらさらゴールド」による血糖値上昇抑制作用
Quercetin rich onion extracts ameliorate blood glucose level and improve adiponectin secretion in diabetic KK-Ay mice
○荒尾 紗代[1]、庭野 吉己[2]、塚田 愛[3]、前多 隼人[1] ([1]弘前大学農学生命、[2]東北大学大学院歯学研究科、[3](株)ハーバー研究所)
○Sayo Arao[1], Yoshimi Niwano[2], Ai Tsukada[3], Hayato Maeda[1] ([1]Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki Univ, [2]Gladuate School of Dentisty, Tohoku Univ., [3]HABA Laboratories, Inc.)

【目的】玉ねぎに含まれるポリフェノール類の一種であるケルセチンは、高い抗酸化活性を有する他、様々な疾患の予防改善効果を示すことが報告されている。「さらさらゴールド」は、ケルセチン含有量が多い品種として開発された玉ねぎである。これまでの研究で脂質代謝の制御に関与する核内転写因子である PPARγ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ) に対して、高いリガンド活性を有する成分を含むことが明らかになっている。本研究では、さらさらゴールド抽出物の糖代謝に及ぼす影響及びその作用メカニズムについて、糖尿病肥満モデルマウス（ KK-*A*^{y}）を用いて検討した。

【方法】7 週齢雌の KK-*A*^{y}マウスに対し、脂質を 20%含む高脂肪食のコントロール群、コントロール群の飼料にさらさらゴールド抽出物 0.5%または 2.0%を添加した 0.5%群、2.0%群の 3 群に分け、4 週間実験飼育を行った。飼育終了後、臓器重量、血漿脂質成分、血糖値を測定した。又、血漿中におけるインスリン抵抗性に関与する TNF-α(Tumor necrosis factor α) と高分子アディポネクチンの濃度を ELISA 法で分析した。更に、白色脂肪組織の組織切片を作製し、脂肪細胞の大きさを評価した。

【結果】マウスの体重、摂食量に有意差は見られなかった。一方、0.5%投与群では血糖値に減少傾向が見られ、2%投与群ではコントロール群と比較して 20%の有意な減少が見られた。又、血漿中 TNF-α 濃度は 2%投与群ではコントロール群と比較し 38%低下した。又、高分子アディポネクチン濃度は、2%投与群ではコントロール群と比較し 1.3 倍上昇していた。よって、血糖値の低下は、TNF-α とアディポネクチンの変化によるインスリン抵抗性の改善を介したものであることが示された。又、さらさらゴールド投与群で白色脂肪組織における脂肪細胞の肥大化の抑制と重量の減少傾向が見られた。以上のことから、さらさらゴールドはアディポサイトカインの調節により血糖値上昇と脂肪細胞肥大化の抑制作用を有することが示唆された。

Quercetin, Onion, Diabete

講演番号：3B05a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ B 校舎 05 会場

高脂肪高ショ糖食摂食マウスモデルにおけるメチル化 EGCG のインスリン抵抗性改善作用

A methylated EGCG improves HF/HS diet-induced insulin resistance

○日高 詩織[1]、熊添 基文[1]、篠田 有希[2]、山口 航[2]、豊田 唯[2]、山本(前田) 万里[3]、山田 耕路[1]、立花 宏文[1,4] ([1]九大院農院・生機科、[2]アサヒ飲料、[3]農研機構食総研、[4]九大食品機能デザイン)
○ Shiori HIDAKA[1], Motofumi KUMAZOE[1], Yuki SHINODA[2], Wataru YAMAGUCHI[2], Yui TOYODA[2], Mari MAEDA-YAMAMOTO[3], Koji YAMADA[1], Hirofumi TACHIBANA[1,4] ([1]Department of Bioscience and Biotechnology, Kyushu University, [2]Products Research & Development Laboratory, Asahi Soft Drinks Co, Ltd., [3]National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, [4]Food Functional Design Research Center, Kyushu University)

【目的】緑茶品種の一種である「べにふうき」はヒト試験において抗アレルギー作用が示されるなどその機能性が注目されている。べにふうきの特徴は、Epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG)の 3”位がメチル化された Epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl)gallate (EGCG3”Me)を他の茶品種に比べ高含有していることである。EGCG3”Me は吸収性が高く、血中での安定性が高いため、EGCG に比べ高い機能性が期待されている。そこで本研究では、高脂肪高ショ糖食摂取マウスにおける EGCG 及び EGCG3”Me のインスリン抵抗性改善作用について検討した。

【方法】C57BL/6 マウスに通常食を摂食させた群(通常食群)、高脂肪高ショ糖食を摂食させた群(高脂肪高ショ糖食群)、EGCG(0.9 mg/mice/day)を含む高脂肪高ショ糖を摂食させた群(EGCG 群)、EGCG3”Me(0.9 mg/mice/day)を含む高脂肪高ショ糖を摂食させた群(EGCG3”Me 群)の 4 群に分け 8 週間飼育した後、インスリン抵抗性に関するパラメーターである空腹時血中インスリン濃度とインスリン抵抗性指標(HOMA-IR)を測定した。さらに、脂肪組織における制御性 T 細胞及びマクロファージの数について免疫組織染色にて検討した。

【結果】高脂肪高ショ糖食群では HOMA-IR が通常食群と比べ上昇していたが、EGCG3”Me 群では高脂肪高ショ糖食摂食によって誘導される HOMA-IR の増加が抑制されていた。また、高脂肪高ショ糖食群では肥満との関連が注目されている脂質合成に関与する遺伝子の発現の増加が肝臓において確認されたが、EGCG3”Me 群では抑制されていた。これらの EGCG3”Me による抑制効果は、EGCG よりも顕著であった。さらに、EGCG3”Me 群では高脂肪高ショ糖食によって引き起こされる脂肪組織へのマクロファージの浸潤が阻害されるとともに、制御性 T 細胞の減少が緩和されていた。

【結論】EGCG3”Me の摂取は高脂肪高ショ糖食によって引き起こされるインスリン抵抗性を改善すること、また、インスリン抵抗性改善効果に EGCG3”Me の抗炎症作用が関与していることが示唆された。

Insulin resistance, Macrophage, EGCG

講演番号：3B05a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ B 校舎 05 会場

コーヒーの STZ 誘発性糖尿病発症抑制効果と膵β細胞へ与える影響の解析

Protective effect of coffee on STZ-induced diabetes - effects on pancreaticßcell.

○浜名 芳輝[1]、小林 美里[1]、倉田 貴生[1]、井上 孝司[2]、坂井田 和裕[2]、村井 篤嗣[1]、堀尾 文彦[1] ([1]名大院農、[2]ポッカサッポロ中研)
○ Yoshiki HAMANA[1], Misato KOBAYASHI[1], Takao KURATA[1], Kouji INOUE[2], Kazuhiro SAKAIDA[2], ATSUSHI MURAI[1], Fumihiko HORIO[1] ([1]Nagoya Univ., [2]POKKA SAPPORO Ltd.)

【背景】糖尿病はインスリン抵抗性とインスリン分泌不全の両者の組み合わせで発症するが、日本人では欧米人に比べてインスリン分泌不全の寄与率が高い。我々はこれまでに 2 型糖尿病モデルマウスにおいて、コーヒー摂取が肝臓および骨格筋でのインスリンシグナルを増強し、インスリン抵抗性を改善することで糖尿病発症を抑制することを報告している[1]。しかし、コーヒー摂取がインスリン分泌能へ与える影響については解明されていない。本研究ではコーヒー摂取と膵β細胞機能との関連を明らかにするために、実験 1 では膵β細胞を特異的に破壊するストレプトゾトシン(STZ)誘発性糖尿病モデルに対する効果を検討し、実験 2 ではコーヒー摂取がマウス膵島へ与える影響を検討した。
【方法】実験 1 ：C57BL/6J マウス(4 週齢、雄性)を 3 群に分け、水(water 群)、コーヒー2.5 倍希釈液(coffee 群)、カフェインレスコーヒー2.5 倍希釈液(decaf 群)を飲水として投与した。10 日間の飲水投与後、STZ を腹腔注射し膵β細胞の破壊を誘発した。STZ 投与後 2,5,8,12 日目に血糖値の測定を、12 日目に解剖を行い、膵臓インスリン含量の測定を行った。なお、飲水投与は解剖時まで継続した。
実験 2 : C57BL/6J マウス(12 週齢、雄性)を 2 群に分け、水(water 群)、コーヒー2.5 倍希釈液（coffee 群）を飲水として投与した。飲水投与 10 日目に、コラゲナーゼ法により膵島を単離し、real-time RT-PCR により抗酸化酵素の mRNA 量を測定した。
【結果】実験 1 : STZ 投与 2 日後より coffee 群は water 群に比べて有意に低い血糖値を示した。decaf 群の血糖値は water 群に比べて低い傾向を示した。12 日目における糖尿病発症率は water 群に比べて coffee 群で有意に低下し、糖尿病発症が抑制された。膵臓インスリン含量は coffee 群および decaf 群が、water 群に比べて高い傾向を示した。実験 2 ： コーヒー摂取によりマウスの膵島では Glucose transporter 2 (GLUT2)の mRNA レベルが有意に上昇した。STZ により生じる活性酸素の除去に関わる superoxide dismutase 2 (SOD2)の mRNA レベルも、コーヒー摂取により上昇する傾向が見られた。
【考察】コーヒー摂取が STZ 誘発性糖尿病の発症を抑制することを見出した。また、コーヒー中のカフェイン以外の成分が膵β細胞保護において重要である可能性が示唆された。今後はコーヒー摂取による膵島での GLUT2 および SOD2 の発現量増加のメカニズムと、これらの上昇の STZ 誘発性糖尿病発症の抑制への寄与について検討していく予定である。
[1] J.Agric. Food Chem. 2010;58:5597　J.Nutr Sci Vitaminol. 2012;58:408.

pancreatic ß cell, coffee, diabetes

講演番号：3B05p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ B 校舎 05 会場

ラット体内リグナン分布の検討及び愛媛県東温市住民の血中リグナン濃度調査

Lignan distribution in rats fed various lignan and research of serum lignan concentration in toon city, Ehime.

○岸田 太郎[1]、斉藤 功[2]、江口 依里[2]、丸山 広達[2]、梶原 秀平[1]、松木 翠[1]、西脇 寿[1]、山内 聡[1]、谷川 武[2] ([1]愛媛大農、[2]愛媛大院医)
○Taro Kishida[1], Isao Saito[2], Eri Eguchi[2], Kotatsu Maruyama[2], Shuhei Kajiwara[1], Midori Matsuki[1], HIsashi Nishiwaki[1], Satoshi Yamauchi[1], Takeshi Tanigawa[2] ([1]Faculty of Agriculture, Ehime Univ, [2]Graduate school of Medicine, Ehime Univ)

【目的】リグナンは広範な食品に存在しており、大豆イソフラボンと並び食品成分中の植物エストロゲンとして注目されている。多くのリグナンは腸内細菌により代謝され主に Enterodiol (END)、Enterolacton (ENL)として体内に分布することが知られているが、どのリグナンが、どれだけ END、ENL 濃度に寄与するかは詳細に比較されていない。本研究では食事中の主なリグナンである Matairesinol(MAT)、Secoisolarisiresinol (SECO)、Larisiresinol (LARI)、Pinolesinol (PINO)、を与えたラットのリグナン分布を調べた。また愛媛県東温市の住民について、血清リグナンプロファイルを調べ、ラット試験の結果と比較し、ヒトの日常的なリグナン源について考察した。また、生活習慣や臨床データと血中リグナン濃度との関係も検討した。
【方法】ラット実験：OVX または sham(偽手術)を行った 6 週齢メス SD 系ラットにコントロール(C)飼料、 (-)-および(+)-の各リグナン添加飼料 (0.005%～0.1%添加) を与えた。 3 週間飼育後、血漿、肝臓、胆汁、尿、糞を採取し、リグナン濃度を測定した。
観察研究：研究の趣旨についてインフォームドコンセントした約 1500 人の健診者を対象とした。すべての健診者について、身長、BMI、ウエスト周囲径、皮脂厚、内臓脂肪評価 (エコー)、検尿 (糖、タンパク質) および一般血液パラメーター等の測定を行い、FFQ を中心とした生活習慣に関わる詳細なアンケートを実施した。リグナン測定は UPLC-Tof-MS 法で行い、HPLC 部：ACQUITY UPLC(waters)、カラム：ACQUITY UPLC BEH C18(waters)、質量分析部：Q-Tof Micro(waters) を使用した。
【結果】飼料中 0.02%添加までは、SECO 摂取時ラット体内に存在するリグナンは ENL と END だが ENL の方が多く、MAT 摂取時には ENL のみであった。SECO、MAT も微量に存在した。飼料中添加 0.1%を超えると、SECO、MAT ともそのままで存在した。いずれのリグナン摂取時も胆汁中の濃度が高かった。LARI、PINO については現在検討中である。東温市住民の観察研究では ENL が高濃度で存在し、平均値は北欧の報告の数値を超えるものであった。END も ENL の 10 分の 1 程度検出された。食事中のリグナンの中では SECO が最も高度濃度で検出され、ENL の 10 分の 1 程度の濃度であった。MAT も SECO の 10 分の 1 程度検出されたが LARI は検出されなかった。PINO 濃度は現在検討中である。本調査における SECO と ENL の割合は以前の検討でラットに SECO を投与した際のものとほぼ同等であったことから、本調査の健診者の食事中の主要なリグナン源は SECO である可能性が高い。血中リグナン濃度の高い被験者は野菜類、果実類、豆類の摂取量が多かった。その他の観察研究については現在検討中である。

lignan, rat, human

講演番号：3B05p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ B 校舎 05 会場

ルテオリン（パプリカ葉フラボノイド）の体内吸収動態評価

Internal absorption change evaluation of luteolin (paprika leaf flavonoid)

○近藤 桃子[1]、庄子 真樹[2]、仲川 清隆[1]、津志田 藤二郎[3]、宮澤 陽夫[1,4] ([1]東北大院農　機能分子解析学分野、[2]宮城県産業技術総合センター、[3]宮城大学　食産業学部、[4]東北大未来科学技術共同センター)

○ Momoko KONDOU[1], Naoki SYOJI[2], Kiyotaka NAKAGAWA[1], Tojiro TSUSHIDA[3], Teruo MIYAZAWA[1,4] ([1]Tohoku Univ., [2]ITIM, [3]Miyagi Univ., [4]NICHe.Tohoku Univ.)

【目的】宮城県はパプリカの生産が盛んである。パプリカの葉には、フラボン類のルテオリンとその配糖体が多く含まれており、パプリカ葉ルテオリンの潜在的な生理作用の発見と活用に関心が寄せられている。そのために、食品成分として摂取したパプリカ葉ルテオリンがヒトの体内で、どのように消化吸収され代謝を受けて、血液や末梢の組織細胞にまで運ばれ、生理作用を示すのかについて理解が必要である。過去に、ルテオリン（アグリコン）とその配糖体が体内で吸収されると、グルクロン酸抱合体に代謝されることが報告されている[1)]。しかし、パプリカ葉に含まれるルテオリンの体内動態に関してはほとんど報告されていない。そこで本研究では、はじめにルテオリン（アグリコン）、ルテオリン配糖体、ヒト体内で生成が想定される代謝物の LC-MS/MS 分析法を検討し、次にラットにルテオリン（アグリコン）およびパプリカ葉エキスを与え血漿および各臓器の LC-MS/MS 分析により、パプリカ葉ルテオリンの体内動態を明らかにしようとした。

【方法と結果】トリフルオロ酢酸(0.05%)とギ酸(0.1%)を共に LC 移動相へ加えると、ルテオリン（アグリコン）、ルテオリン配糖体、ルテオリン代謝物（抱合体）は良好に分離し、MS/MS のマルチプルリアクションモニタリング（MRM）で高感度分析が可能であった。そこで、SD 雄性ラットにルテオリン（アグリコン）を 20mg/kg 単回投与し、2 時間後に採血し、血漿と肝臓を採取した。血漿と肝臓からアセトニトリルとメタノールを用いてルテオリンを抽出し[2)]、LC-MS/MS に供し分析した。結果、血漿および肝臓から共にルテオリングルクロン酸抱合体が検出された。したがって、ルテオリンを摂取すると、その一部が速やかに消化管から吸収され体内でグルクロン酸へ抱合化されることが明らかとなった。また、配糖体の多いパプリカ葉エキスでも同様に単回投与試験を行ったところ、血漿中では、ルテオリン代謝物であるグルクロン酸抱合体が検出された。肝臓では、糖が結合したグルクロン酸抱合体が検出されたことから、パプリカ葉ルテオリンは、アグリコンに加水分解されずにそのまま吸収されることが示唆された。

【参考文献】

1) K. Shimoi et al., FEBS Let. **438**, 220-224 (1998)　2)W. Mullen et al., *Bri. J. Nutr.*, **96** ,107-116 (2006)

luteolin, biokinetics, Paprika leaf

講演番号：3B05p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ B 校舎 05 会場

半永久胸管リンパカニュレーションを施したラットにおける食事ステロイドのリンパ吸収及びリンパ液中サイトカイン濃度に対するエゼチミブの影響

Effects of ezetimibe on lymphatic dietary steroid absorption and cytokine levels in thoracic lymph duct-cannulated rats

○城内 文吾、古川 裕美子、河内 明日香、中村 有理、佐藤 匡央（九大院農）
○Bungo SHIROUCHI, Yumiko FURUKAWA, Asuka KAWAUCHI, Yuri NAKAMURA, Masao SATO (Kyushu Univ.)

【目的】酸化コレステロール (Oxycholesterols : OC) とはコレステロール酸化物の総称であり、脂肪肝、動脈硬化症などの疾患発症との関連が報告されている。OC はコレステロールを含む食品の調理・保蔵により生成される。OC、コレステロール、植物ステロールを含む食事ステロイドの一部は、小腸上部刷子縁膜上に存在する Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) を介して吸収され、コレステロール吸収阻害剤エゼチミブ (Ezetimibe) はこの NPC1L1 をターゲットとしている。本研究では半永久胸管リンパカニュレーションを施したラットを用い、Ezetimibe が OC を含んだ食事脂質の吸収に及ぼす影響を評価した。さらに、NPC1L1 阻害による小腸での食事ステロイド吸収変動がリンパ液中のサイトカイン濃度に及ぼす影響を検討した。
【方法】7 週齢雄 Sprague-Dawley ラットを AIN-76 組成に準じ Lard を 10%添加した食餌 (Basal diet) で 5 日間 meal-feeding を行った。その後、カニュレーション手術を施し、術後 2 日間の回復期間を設けた。術後 3 日目にリンパ液を 20 分間回収した後、30 分間 OC diet (Basal diet に OC を 0.075% 添加) あるいは OC + Ezetimibe diet (Ezetimibe 摂取量 : 5 mg/kg BW･day) を与え、摂取開始から 7 時間後までリンパ液を回収した。リンパ液中の脂質濃度は酵素法により測定した。リンパ液中の OC 濃度は GC-MS により測定した。また、リンパ液中の 27 種類のサイトカイン濃度は磁気ビーズ抗体を用いたマルチプレックスアッセイにより測定した。
【結果・考察】摂食量およびリンパ流量に群間で差は認められなかった。OC 群と比較して、OC + Ezetimibe 群の総コレステロール輸送量、β-epoxycholesterol の見かけの吸収率が有意に低下した。リンパ液において、27 種類のサイトカインのうち 16 種類の定量に成功し、OC + Ezetimibe 群では炎症性サイトカインである Tumor necrosis factor (TNF)−α、Fractalkine、Interleukin (IL)-12p70 および IL-17 濃度が有意に低下した。これら 4 種類のサイトカイン濃度と総コレステロール濃度との間に正の相関が確認され、総コレステロール濃度の影響を除いた偏相関により Fractalkine 濃度とβ-epoxycholesterol 濃度との間に正の相関が確認された。以上より、Ezetimibe が食事 OC の吸収に与える影響は分子種によって異なり、β-epoxycholesterol の吸収を抑制することが示された。また小腸より吸収されるステロイドの量がリンパ液中の炎症性サイトカイン濃度に影響を与えることが示された。

Ezetimibe, dietary steroid absorption, lymphatic cytokine levels

講演番号：3B05p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ B 校舎 05 会場

フラボノイドが胆汁酸およびコレステロール腸管吸収トランスポーター発現に与える影響

Effect of flavonoids on the expression of intestinal bile acid and cholesterol transporters

○小川 真奈[1]、高田 龍平[2]、阿部 啓子[1]、小林 彰子[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]東大病院薬)
○Mana Ogawa[1], Tappei Takada[2], Keiko Abe[1], shoko Kobayashi[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Dept. of Pharm., Univ. of Tokyo Hosp.)

【目的】過剰な食事性コレステロールの腸管吸収を抑制することは、高コレステロール血症の予防・治療のターゲットとなる。一方、肝臓では胆汁酸がコレステロールから合成され、腸肝循環する。従って、腸管における胆汁酸の再吸収を抑制できれば、肝臓におけるコレステロールの胆汁酸への変換が促進され、高コレステロール血症の予防・治療に繋がる。これまでに我々は、Caco-2 細胞を用いて、腸管からのコレステロールおよび胆汁酸吸収抑制成分を食品ポリフェノールの中からスクリーニングし、ルテオリンおよびケルセチンがコレステロール吸収を抑制し、その作用がコレステロールトランスポーター（Niemann-pick C1 Like 1 Protein, NPC1L1）阻害であること、またラットを用いた *in vivo* 試験においてもコレステロール負荷による血中コレステロール値の上昇を抑制することを見出した。また、ケルセチンは Caco-2 細胞において胆汁酸の吸収をも抑制した。本研究では、ルテオリンとケルセチンによる血中コレステロール低下作用のメカニズムを解明するために、これらのフラボノイドが NPC1L1 および胆汁酸トランスポーター（Apical Sodium-dependent Bile acid Transporter, ASBT）の発現に与える影響を検証したので報告する。
【方法】小腸上皮のモデルとしてヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を用いた。Caco-2 細胞にルテオリンとケルセチンをそれぞれ添加し、2, 6, 24 時間インキュベートした後、mRNA およびタンパク質を抽出し、定量 PCR により mRNA 量を、Western blotting によりタンパク量を時間依存的に測定した。
【結果・考察】NPC1L1 の mRNA 発現について、ルテオリン・ケルセチンともに 6 時間までのインキュベートでは変化はなかったが、24 時間インキュベートでは、ケルセチンで有意に減少し（$P<0.05$）、ルテオリンで減少傾向を示した（$P=0.08$）。NPC1L1 のタンパク質の発現量はいずれも変化がなかった。ASBT については、mRNA の発現変化は見られなかった。これまでの我々の検討において、Caco-2 細胞での取込み試験では、フラボノイド 2 時間インキュベーションでコレステロールおよび胆汁酸ともに吸収抑制作用がみられたことから、短時間のインキュベートでみられた取込み抑制は、トランスポータータンパク質の発現抑制ではないことが明らかとなった。また、24 時間インキュベートで NPC1L1 の mRNA の発現が減少したことから、*in vivo* での長期摂食においては、トランスポーターの発現レベルでの調節が起こる可能性が示唆された。現在、ルテオリンおよびケルセチンにおける NPC1L1 の転写制御への影響についてルシフェラーゼアッセイにより検討中である。

cholesterol, bile acid, flavonoid

講演番号：3B05p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ B 校舎 05 会場

小腸刷子細胞の分化制御と機能の解明
Mechanisms of differentiation and physiological role of intestinal brush cells
○吉岡 美紗子[1]、石丸 喜朗[1]、朝倉 富子[1]、阿部 啓子[1,2] ([1]東大農生科・応生化、[2]KAST)
○Misako YOSHIOKA[1], Yoshiro ISHIMARU[1], Tomiko ASAKURA[1], Keiko ABE[1,2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]KAST)

【目的】味覚の受容・伝達に重要な働きをする遺伝子群（Trpm5、Gα-gust、PLC-β2 など）は、小腸においてそれぞれ多様な発現パターンを示す。転写調節因子 Skn-1a は甘味・うま味・苦味受容細胞（Ⅱ型細胞）の細胞運命を決定し、*Skn-1* (-/-)マウスではⅡ型細胞が消失してⅢ型細胞（酸味受容細胞）に置換されている。本研究では、小腸において Skn-1a によって分化が制御される細胞とその機能を解明することを目的とする。
【方法・目的】まず、野生型と *Skn-1* (-/-)マウス小腸（十二指腸、空腸、回腸）の凍結切片を作製し、*in situ* ハイブリダイゼーション法と免疫染色法を用いて、味覚関連遺伝子群の mRNA およびタンパク質の発現パターンを比較した。その結果、Trpm5、Gα-gust、PLC-β2 がいずれも発現する野生型マウスとは異なり、*Skn-1* (-/-)マウスでは Gα-gust と PLC-β2 は発現していたが、Trpm5 は発現していなかった。Trpm5 は、小腸において主に刷子細胞に発現しているため、それぞれ刷子細胞、内分泌細胞、L 細胞のマーカー分子である DCLK1、ChgA、GLP-1 について、免疫染色法を用いてタンパク質の発現を調べた。その結果、DCLK1 のみ *Skn-1* (-/-)マウスにおいて発現が消失していた。以上より、Skn-1a がマウス小腸において刷子細胞の分化を制御していることが示された。
次に、機能未知である刷子細胞の糖代謝に与える影響を調べるために、OGTT、IPGTT、ITT、HOMA 解析を行い、野生型と *Skn-1* (-/-)マウス間で比較した。その結果、OGTT 解析において、血糖値変化には両群間で差がなかったが、グルコース投与 15 分後における血漿インスリン濃度が、*Skn-1* (-/-)マウスにおいて有意に低かった。また、IPGTT、HOMA、ITT 解析からは、膵臓インスリン分泌能とインスリン感受性には差がないことが分かった。以上の実験結果から、刷子細胞がグルコースセンサーとして働き、インスリン分泌を促進している可能性が示唆された。

brush cell, small intestine, insulin

講演番号：3B05p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ B 校舎 05 会場

腸管上皮グルコーストランスポーターSGLT1 を制御する食品因子の探索及び解析

Search and Analysis of Food Factors that Modulate Glucose Transporter SGLT1 in Intestinal Epithelia

○柴田 諒祐[1]、山本 憲朗[2]、戸塚 護[1]、清水 誠[1]、薩 秀夫[1]([1]東大院農生科、[2]ハウスウェルネスフーズ)

○Ryosuke SHIBATA[1], Norio YAMAMOTO[2], Mamoru TOTSUKA[1], Makoto SHIMIZU[1], Hideo SATSU[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]House Wellness Foods Corp.)

【目的】Na+/グルコース共輸送担体 1（SGLT1）は、腸管上皮においてグルコースの吸収を担っている主要なグルコーストランスポーターであり、生活習慣病予防の観点から近年食品因子による SGLT1 の穏やかな阻害が期待されている。一方、従来用いられている腸管上皮モデル細胞株は SGLT1 活性が極めて低いものが多く、解析に用いることができないのが現状である。これまでの研究で、我々は SGLT1 安定高発現細胞株を樹立し、SGLT1 活性を調べるための in vitro 評価系を構築すると共に、緑茶に含まれるエピカテキンガレートが SGLT1 を顕著に抑制することを報告してきた。そこで本研究では、引き続き構築した評価系を用いて、SGLT1 阻害活性を有する食品因子の探索及び解析を行うこととした。
【方法・結果】SGLT1 安定高発現 CHO 細胞株を用いて、約 60 種類のフィトケミカル類がグルコース取込み活性に与える影響を検討したところ、柑橘類に含まれるタンジェレチン及びショウガ科の植物に含まれるカルダモニンが高い取込み阻害活性を有することが示された。そこでタンジェレチンの構造類似体(ノビレチン・シネンセチン・ヘスペレチン)について検討したところ、ノビレチンにおいても顕著な取込み阻害活性が見出された一方で、シネンセチンやヘスペレチンでは阻害活性が見られなかった。またカルダモニンの構造類似体(アルピネチン・フラボカワイン B)について検討したところ、カルダモニンと同様にカルコン構造を有するフラボカワイン B においても顕著な取込み阻害活性が見出された一方で、アルピネチンでは阻害活性が見られなかった。さらにタンジェレチンがグルコースの腸管吸収に与える影響を動物レベルで検討することとし、ICR マウスを用いて経口糖負荷試験(OGTT)を行ったところ、体重 1 kg あたり 250mg 及び 400mg の投与で、有意な血糖値上昇の抑制及び血糖上昇面積(AUC)の減少が認められた。
【結論】以上より、SGLT1 活性の in vitro 評価系を用いてスクリーニングをおこなった結果、タンジェレチン及びカルダモニンが SGLT1 活性を顕著に抑制することを新たに見出した。また、タンジェレチンは腸管における SGLT1 活性を阻害することで血糖値の上昇を抑制していることが示唆された。今後、タンジェレチン及びカルダモニンによる SGLT1 阻害活性のメカニズムを解析すると共に、カルダモニンがグルコースの腸管吸収に与える影響を動物レベルでも検討する予定である。

Glucose, SGLT1, Tangeretin

講演番号：3B05p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ B 校舎 05 会場

ゲニステインによる腸管上皮における解毒代謝酵素の制御解析
The regulation of detoxification enzymes by genistein in intestinal epithelium
○大前 佑介、戸塚 護、清水 誠、薩 秀夫（東大院農生科）
○Yusuke Omae, Mamoru Totsuka, Makoto Shimizu, Hideo Satsu (Univ. of Tokyo)

【目的】腸管は体内にありながら食品中に混入する外来異物に最もさらされやすい器官であるため、異物に対して様々な防御機構を発達させている。その 1 つに第一相～第三相からなる解毒代謝系があり、外来異物を酸化・抱合化して体外に排出することが知られている。またある種のフィトケミカルでは、核内受容体である Pregnane X Receptor(PXR)を介して解毒代謝酵素の発現を制御することが報告されている。本研究では主要な大豆イソフラボンの 1 つであるゲニステインが腸管上皮細胞における解毒代謝酵素発現に及ぼす影響、およびその作用メカニズムについて検討することとした。
【方法】ゲニステインが解毒代謝酵素の mRNA 発現に与える影響を検討するため、腸管上皮モデル細胞である LS180 細胞にゲニステインを添加して 24 時間後に RNA を回収し、解毒代謝酵素である CYP1A1、CYP3A4、UGT1A1、MDR1 の mRNA 発現量を real-time PCR 法を用いてそれぞれ測定した。次に解毒代謝酵素のタンパク質発現に与える影響を検討することとし、ゲニステインを添加して 96 時間後に細胞の膜画分を回収し、MDR1 のタンパク質発現量を Western blotting 法を用いて測定した。またゲニステインが核内受容体である PXR 及び Aryl hydrocarbon receptor(AhR)依存的な転写活性に与える影響を検討することとした。ルシフェラーゼ遺伝子を含むレポーターベクターに PXR あるいは AhR 応答配列を挿入したベクターとそれぞれの核内受容体の発現ベクターを、HepG2 細胞に安定に遺伝子導入した PXR あるいは AhR 応答安定株を用いて、ルシフェラーゼアッセイをおこなった。
【結果】ゲニステインは第一相解毒代謝酵素である CYP1A1 及び CYP3A4、第二相である UGT1A1、第三相である MDR1 の mRNA 発現量をいずれも濃度依存的に増加させた。また第三相異物排出トランスポーターである MDR1 に関してはそのタンパク質発現量がゲニステインにより亢進されることが明らかとなった。そこで次に PXR 及び AhR 応答安定株を用いてルシフェラーゼアッセイをおこなった結果、ゲニステインは PXR 及び AhR 依存的な転写活性を有意に亢進することが見出された。
【結論】ゲニステインは腸管上皮モデル LS180 細胞において解毒代謝酵素の発現を亢進することが明らかとなり、その発現制御には核内受容体である PXR や AhR の活性化が関与していることが示唆された。今後、ゲニステインが解毒代謝酵素の酵素活性にゲニステインが及ぼす影響を検討するとともに、ゲニステインと PXR など核内受容体との直接的な相互作用について検討を進める予定である。

genistein, intestinal epithelium, MDR1

講演番号：3B05p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ B 校舎 05 会場

リゾホスファチジルイノシトールが腸管上皮における炎症メディエーター発現に及ぼす影響

The effect of lysophosphatidylinositol on the expression of inflammatory mediaters in intestinal epithelial cells

○宮崎 悠、戸塚 護、清水 誠、薩 秀夫（東大院農生科）
○Chikashi MIYAZAKI, Mamoru Totsuka, Makoto Shimizu, Hideo Satsu (Univ. of Tokyo)

【目的】リゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルイノシトール（LPI）は生理活性脂質として多様な生理作用が知られている。例として神経における痛みや骨の再吸収、血管新生、がん細胞の増殖や転移などに関わっていることが明らかとなっており、LPI によるこれらの生理作用は主として G タンパク共役型受容体の一種である GPR55 を介していることが報告されている。一方で消化管において GPR55 の発現が高いことが報告されているにもかかわらず、消化管特に腸管上皮細胞における LPI の生理機能については未だ明らかとはなっていない。そこで本研究では腸管上皮モデル細胞株を用いて、GPR55 の腸管上皮細胞における発現を検討すると共に、LPI が炎症性サイトカインを始めとする炎症メディエーターに及ぼす影響について遺伝子発現レベルを中心に解析することとした。
【方法】腸管上皮モデル細胞として、マウス由来 Mos13 細胞を用いることとした。Mos13 細胞より RNA を抽出し、GPR55 の mRNA 発現について RT-PCR 法により解析した。また Mos13 細胞に LPI を一定時間添加して培養した後 RNA を抽出し、さらに cDNA 合成をおこない real time RT-PCR 法によって炎症関連遺伝子の mRNA 発現量の変化を解析した。またサイトカインについては、その産生量を ELISA 法によって解析した。
【結果】RT-PCR の結果、GPR55 はマウス腸管上皮モデル Mos13 細胞に mRNA レベルで発現していることが見出された。次に Mos13 細胞に LPI を一定時間添加したところ、炎症性サイトカインの一種である IL-6 の mRNA 発現量が、添加した LPI の濃度依存的に増加することが示された。次にその他の炎症関連遺伝子である MIP-2 および COX-2 についても検討したところ、LPI による mRNA 発現量の増加はみられなかった。また LPI 添加によって IL-6 産生量も増加傾向にあることが示され、これより LPI は IL-6 をある程度選択的に制御していることが示唆された。現在さらに LPI による IL-6 の発現亢進機構について、詳細に解析を進めている。

lysophosphatidylinositol, intestine, interleukine-6

講演番号：3B05p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ B 校舎 05 会場

炭素安定同位体比を用いた食餌性グルコシルセラミドの皮膚セラミド生合成へ寄与の推定

Estimation of the influence of glcosylceramide on the biosynthesis of ceramide in a skin by carbon stable isotope ratio

○原口 浩幸[1,2]、山田 桂大[2]、宮下 留美子[1]、間 和彦[1]、大西 正男[3]、木下 幹朗[4]、菅原 達也[5]、吉田 尚弘[2]([1]日本製粉中央研究所、[2]東工大院総理工、[3]藤女子大人間生活学部、[4]帯広畜大食品科学研究部門、[5]京大院農学研究科)

○Hiroyuki HARAGUCHI[1,2], Keita YAMADA[2], Rumiko MIYASHITA[1], Kazuhiko AIDA[1], Masao OHNISHI[3], Mikio KINOSHITA[4], Tatsuya SUGAWARA[5], Naohiro YOSHIDA[2] ([1]Nippon Flour Mills Co., Ltd., [2]Tokyo Institute of Technology, [3]Fuji Women's University, [4]Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, [5]Kyoto University)

【目的】スフィンゴ脂質の一種であるグルコシルセラミド(GlcCer)は機能性食品として皮膚の保湿やバリア機能を向上させる効果があることが報告されている[(1),(2)]。しかしながら、経口摂取した GlcCer はリンパ管などでの吸収は少なく[(3)]、皮膚の遊離セラミド(Cer)に直接大きく寄与していないと考えられている。そこで、経口摂取された GlcCer の体内動態を調べるために、GlcCer の炭素安定同位体比（$\delta^{13}C$）に着目し、マウスに経口摂取させた GlcCer の $\delta^{13}C$ と皮膚の Cer の $\delta^{13}C$ を比較することで、皮膚の Cer 生合成への食餌性 GlcCer の直接的な寄与を推定した。

【方法】ヘアレスマウス（Hos HR-1　4 週齢　オス）を HR-AD 飼料にて 7 日間予備飼育した後、コメ由来またはトウモロコシ由来の GlcCer を、それぞれ 0.5、5.0、50.0mg/日の割合で配合した HR-AD 飼料（5.0g／日／匹）を与えるコメ由来 GlcCer 摂取群（コメ群）またはトウモロコシ由来 GlcCer 摂取群（トウモロコシ群）と、GlcCer を配合しない HR-AD 飼料のみを与えるコントロール群に分け、28 日間飼育した後、それらの皮膚を採取した。これをディスパーゼ®処理を行い、表皮を剥離した後、Sep-Pak®と薄層クロマトグラフィー（TLC）を組み合わせて、表皮から Cer を精製した。経口摂取させた GlcCer の $\delta^{13}C$ は波長スキャンキャビティリングダウン分光法を用いて、表皮から精製した Cer の $\delta^{13}C$ はガスクロマトグラフ-燃焼-安定同位体質量分析計(GC-C-RIMS)を用いてそれぞれ測定した。

【結果と考察】マウスが経口摂取した飼料中のコメ由来及びトウモロコシ由来の各 GlcCer の $\delta^{13}C$ はそれぞれ約-31‰と約-13‰となり、由来植物の $\delta^{13}C$ 全体値を反映した値となった。一方、Sep-Pak®と TLC を組み合わせて表皮から精製した Cer は Cer 以外の脂質が除去されていたため、GC-C-IRMS で化合物別に測定することができた。コメ群及びトウモロコシ群のそれぞれの表皮から抽出された d17:1-16h:0 と d18:1-16h:0 の Cer の $\delta^{13}C$ は、いずれの群においても飼料中に配合した GlcCer の由来、並びに摂取量にかかわらず、コントロール群と比べて有意な差はなかった。これらの結果から、経口摂取された食餌性 GlcCer は生体内で消化、吸収された後、その構成成分が極わずかではあるが Cer 生合成に利用さている可能性もあるが、大きく寄与していない事が示唆された。

1) S. Asai, et al., *Rinsho Byori* **2007**, *55*, 209.
2) J. Ishikawa, et al., *Journal of Dermatological Science* **2009**, *56*, 205.
3) T. Sugawara, et al., *Journal of Lipid Research* **2010**, *51*, 1761.

Glucosylceramide, Carbon stable isotope

講演番号：3B05p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ B 校舎 05 会場

ユリネのエタノール抽出物および抽出残渣物が高脂肪食摂取ラットの腸内環境に及ぼす影響
Effects of ethanol extract of lily bulb and the extract residue on colonic luminal environment in rats fed a high-fat diet

○岡崎 由佳子[1]、山口 さより[2]、平 敏夫[2]、福田 絵里[1]、知地 英征[1]、加藤 範久[3] ([1]藤女子大人間生活、[2]コスモ・バイオ（株）、[3]広島大院・生物圏科学)
○Yukako OKAZAKI[1], Sayori YAMAGUCHI[2], Toshio TAIRA[2], Eri FUKUDA[1], Hideyuki CHIJI[1], Norihisa KATO[3] ([1]Fuji Women's Univ., [2]Cosmo Bio Co., Ltd., [3]Hiroshima Univ.)

【目的】ユリネは，古くから東アジアで食用や薬用として利用されている伝統的な食材である。主成分は糖質であり，食物繊維，フラボノイド及びサポニンなども含まれている。我々はこれまでに，ユリネの摂取がラットの腸内発酵や Mucin（腸管バリア機能の指標）を顕著に増加させ，腸内環境を改善させる可能性を示してきた。本研究では，ユリネのエタノール抽出物およびその残渣物が高脂肪食摂取ラットの腸内環境に及ぼす影響を調べ，腸内環境改善に関与する画分について検討した。

【方法】実験試料として，ユリネ（北海道産）の凍結乾燥粉末， 乾燥粉末の 70%エタノール抽出物及び 70%エタノール抽出残渣物を用いた。70%エタノール抽出物は，抽出液を減圧下で濃縮乾固し，粉末化したものを試料とした。4 週齢の SD 系雄ラットを 1 週間予備飼育後，高脂肪食（30%牛脂）を基本食とし，7%ユリネ粉末，0.9%エタノール抽出物及び 6.1%エタノール抽出残渣物を添加した飼料を与え，3 週間飼育した。なお，ユリネのタンパク質や食物繊維等の量はカゼインやセルロース等で補正した。糞及び盲腸内容物中のムチンについては蛍光光度分析法を用いて測定した。盲腸内容物中の pH はコンパクト pH メーターを用いて測定し，有機酸は HPLC により分析した。盲腸内容物中の細菌叢は qPCR 法で測定した。

【結果】食餌摂取量と体重増加量は本食餌組成による影響を受けなかった。糞と盲腸内容物中の Mucin 含量はユリネ粉末食群とユリネ残渣物食群で顕著に増加し，エタノール抽出物食群においても糞中 Mucin 含量が有意に増加することが認められた。盲腸内容物重量はユリネ残渣物食群で有意に増加し，ユリネ粉末食群も同様の傾向を示した。盲腸内容物中の pH は，ユリネ粉末食及びユリネ残渣物食群において有意に低下し，エタノール抽出物食群で低下する傾向を示した。盲腸内容物中の乳酸，プロピオン酸，酢酸および酪酸は，ユリネ粉末食及びユリネ残渣物食群において有意に増加した。一方，エタノール抽出物食群の盲腸有機酸含量に対する顕著な影響は認められなかった。盲腸内容物中の *Bifidobacterium* spp.は，ユリネ残渣物食群において有意に増加することが認められた。以上の結果より，ユリネ摂取による Mucin 産生と腸内発酵促進作用は，主にユリネ残渣画分の作用が関与していると推察された。また，エタノール抽出物画分も Mucin 産生に対して部分的に関与している可能性が示唆された。

Ethanol extract of lily bulb, Ethanol extract residue of lily bulb, Rats

講演番号：3B05p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ B 校舎 05 会場

便通状態が尿中・血中栄養素並びに尿中酸化ストレスマーカーに与える影響

The effect of bowel movement on urinary/serumal nutrition concentration and urinary oxidative-stress markers.

○小林 晃[1]、信田 幸大[1]、菅沼 大行[1]、青江 誠一郎[2] ([1]カゴメ株式会社、[2]大妻女子大学)
○Akira KOBAYASHI[1], Yukihiro NOBUTA[1], Hiroyuki SUGANUMA[1], Seiichiro AOE[2] ([1]KAGOME CO.,LTD., [2]Otsuma Women's University)

便通と腸内菌叢の状態とは密接に関連しており、便秘傾向者や便秘患者の腸内菌叢は健常者とは異なると言われている。また、腸内菌叢の状態が宿主の栄養吸収に影響を与えるとの報告が近年なされていることから、便秘になると宿主の栄養状態に影響があると考えられる。しかしこれまでに便通と宿主の栄養状態との関連性を検証した研究は少ない。そこで我々は、便通状態の悪化が栄養状態に与える影響を明らかにすべく検討を進めてきた。　そしてこれまでに、健常者と便秘傾向者との間で尿中栄養素および酸化ストレスマーカーの濃度を比較し、食事からの摂取栄養素量に両者で差が見られなかったにも関わらず、便秘傾向者ではビタミン B2、B6、葉酸の利用効率（摂取栄養素量と尿中栄養素濃度から算出）が低下していること、また、尿中酸化ストレスマーカー（8-OHdG、イソプラスタン）の濃度が高いことを示す結果を得てきた。しかし、酸化ストレスマーカーと関連が深いと考えられる、抗酸化作用を有する脂溶性栄養素の状態については未検討であった。

そこで今回、便通状態が脂溶性栄養素の栄養状態に及ぼす影響について調べるために、健常者と便秘傾向者から採血を行い、それらの血中濃度を比較した。具体的には、まず、被験者の排便回数並びに便性状を 7 日間調査し、それに基づき被験者を便秘傾向者と非便秘傾向者とに分類した。次に、調査 7 日目に採取した尿・血液を用い、尿中酸化ストレスマーカー濃度及び血中ビタミン、カロテノイド濃度を測定した。また、採尿・採血を実施する 3 日前から被験者の食事調査を行った。

その結果、便秘傾向者では血中ビタミン A 及び E の濃度が有意に低く、上記の尿中酸化ストレスマーカー濃度が有意に高かった。便秘傾向者では摂取したレチノール当量及びαトコフェロール量が有意に少なかったことから、血中濃度の差にはこれら栄養素の食事からの摂取量の差が影響したと考えられた。また、カロテノイドの供給源である緑黄色野菜の摂取量や血中カロテノイド濃度には有意な差がみられなかったことから、便秘傾向者で酸化ストレスマーカー濃度が高かった原因の一つとして、ビタミン E の食事からの摂取量が少なく、それにより血中濃度が低かったことが推測された。一方で、DNA 損傷の指標である 8-OHdG の尿中濃度と血中ビタミン E 濃度との間に相関関係は無いとする報告もあることから、体内のビタミン E 濃度だけで今回のストレスマーカーの結果を全て説明することは難しく、例えば便通状態の悪化が影響している可能性が考えられた。今後は便秘傾向者の便通状態を改善することで酸化ストレスマーカーの数値が改善されるかどうかを検証する。

bowel movement, nutritional status, oxidative stress

講演番号：3B05p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ B 校舎 05 会場

プロトン共役型オリゴペプチド輸送体を介した食品ペプチド素材の生体吸収性解析

Analyzing the substrate multispecificity of proton-coupled oligopeptide transporter using food peptides

○伊藤 圭祐[1]、VU THI TUYET LAN[1]、木村 美香[1]、本山 貴康[2]、河合 駿[3]、加藤 竜司[3]、河原崎 泰昌[1] ([1]静県大院・薬食、[2]不二製油・基盤研、[3]名大院・創薬)
○Keisuke ITO[1], LAN VUTHITUYET[1], Mika KIMURA[1], Takayasu MOTOYAMA[2], Shun KAWAI[3], Ryuji KATO[3], Yasuaki KAWARASAKI[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Fujioil Co., Ltd., [3]Nagoya Univ.)

【背景と目的】　食品たん白質は消化管中でプロテアーゼにより加水分解された後、アミノ酸もしくはペプチド形態として吸収される。ペプチド形態での吸収はアミノ酸形態よりも優れているため、ペプチド素材は経腸栄養剤やスポーツ用途食品等に活用されている。生体へのペプチド吸収を担うプロトン共役型オリゴペプチド輸送体は“基質多選択性”を有し、8,400 種類のジ・トリペプチドそれぞれの輸送体親和性は数千倍異なる※。そのため、原材料や製造方法の最適化によりペプチド素材の生体吸収性の向上が可能と考えられる。そこで本研究では、我々が開発した新規ペプチド輸送体解析システムを用い、各種ペプチド素材の生体吸収性、および輸送体による認識メカニズムを解析した。

【方法と結果】　出芽酵母と蛍光性トレーサー基質をツールとするペプチド輸送体解析システム“Fluorescence-based Competitive Uptake (F-CUp) assay system”を用い、各種大豆ペプチド素材についてヒトペプチド輸送体（hPEPT2）への親和性を測定した結果、親和性はジ・トリペプチド含量と高い相関を示した（R^2=0.62）。続いて全 400 種類ジペプチドの親和性を網羅的に解析した結果、高親和性ペプチドは芳香族・分岐鎖アミノ酸を高頻度で含有していたことから、**hPEPT2 はヒト必要アミノ酸含有ペプチドを高効率に吸収する**ことが明らかとなった。これは大豆ペプチドのように、アミノ酸スコアの高い食品たん白質を原料とするペプチド素材が生体吸収性に優れることを意味する。

次に、酵母ペプチド輸送体（Ptr2p）をモデルとして、基質結合ポケットを構成する 12 個のアミノ酸残基について、Alanine-scanning mutagenesis により大豆・卵白・乳清ペプチド素材認識への寄与度を解析した。各変異体の細胞内局在を解析した結果、Y97A 以外全ての変異体は酵母細胞表面への発現が確認され、基質輸送能を有していた。作出した 11 種の変異体について解析した結果、各食品ペプチド素材は同様な分子メカニズムで認識され、特に輸送体アミノ酸残基 R93、K205、I251、W362、E480 が共通して認識に重要であることが明らかとなった。

※ K. Ito *et al.* Analysing the substrate multispecificity of a proton-coupled oligopeptide transporter using a dipeptide library. ***Nature Commun.*** 2013;4:2502.

Food peptides, Transporter, High-throughput analysis system

講演番号：3B05p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ B 校舎 05 会場

プロトン共役型オリゴペプチド輸送体によるジ・トリペプチドおよび医薬品認識メカニズムの解明
Multisubstrate recognition mechanism of proton-coupled oligopeptide transporter
○VU THI TUYET LAN[1]、伊藤 圭祐[1]、石黒 正路[2]、本山 貴康[3]、河合 駿[4]、加藤 竜司[4]、河原崎 泰昌[1] ([1]静県大院・薬食、[2]新潟薬大・応生科、[3]不二製油・基盤研、[4]名大院・創薬)
○LAN VUTHITUYET[1], Keisuke ITO[1], Masaji ISHIGURO[2], Takayasu MOTOYAMA[3], Shun KAWAI[4], Ryuji KATO[4], Yasuaki KAWARASAKI[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [3]Fujioil Co., Ltd., [4]Nagoya Univ.)

【背景と目的】 生体吸収性に優れたペプチド素材や医薬品の開発には、吸収経路の分子基盤の整備が重要である。ペプチドの生体吸収を担うプロトン共役型オリゴペプチド輸送体は、8,400 種類のジ・トリペプチドや類似構造の医薬品を認識・輸送する“基質多選択性”を有している。我々はこれまでにヒト PEPT2・酵母 Ptr2p の基質多選択性の全貌を解明した※。一方で、ペプチド輸送体の多基質認識メカニズムは明らかとされていない。そこで本研究では、基質結合ポケットを構成するアミノ酸残基について、各種基質認識における寄与度を Alanine-scanning mutagenesis により定量的に解析した。

【方法と結果】 原核生物由来ペプチド輸送体 PepTso の結晶構造をテンプレートとして Ptr2p の立体構造モデルを構築し、基質結合ポケットを構成する 12 個のアミノ酸残基をピックアップした。これらのアミノ酸残基をそれぞれアラニンへ置換した変異体を作出し、我々の開発した Fluorescence-based Competitive Uptake assay system により、ジペプチド認識における各アミノ酸残基の寄与度を定量解析した。その結果、Y365 はジペプチドの N 末端アミノ酸側鎖 R1 の、Y248、I251 は C 末端アミノ酸側鎖 R2 の認識に重要であることが明らかとなった。同様にトリペプチド認識への寄与度を解析した結果、Y365 と F507 は N 末端アミノ酸側鎖 R1 の、Y248 は C 末端アミノ酸側鎖 R3 の認識に重要であることが明らかとなった。側鎖 R2 の認識に大きく寄与するアミノ酸残基は特定されなかった。得られた情報を統合することで、**ペプチド輸送体の基質結合ポケットにおけるジ・トリペプチドの結合配向を解明することに成功**した。続いて各種医薬品（アンピシリン、アラフォスファリン、バラシクロビル、アラフェメニン B、カルノシン）についても解析した結果、それぞれ異なる認識メカニズムではあるものの、認識への寄与が大きいアミノ酸残基（K205, W362, E480）はジ・トリペプチドの場合と共通していた。以上のように、ジ・トリペプチドや医薬品の認識における各アミノ酸残基の奇与度の定量比較解析により、ペプチド輸送体の多基質認識メカニズムを解明した。

※ K. Ito *et al.* Analysing the substrate multispecificity of a proton-coupled oligopeptide transporter using a dipeptide library. ***Nature Commun.*** 2013;4:2502.

Peptide and drug, Transporter, High-throughput analysis system

講演番号：3B05p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ B 校舎 05 会場

食用地衣のレニン及びキマーゼ阻害活性
Renin and chymase inhibitory activities of edible lichens
○韮澤 悟[1]、程 永強[2]、山本 好和[3]、高橋 砂織[4] ([1]国際農研、[2]中国農大食品科学、[3]秋田県大生物資源、[4]秋田県総食研)
○Satoru NIRASAWA[1], Yongqiang Cheng[2], Yoshikazu Yamamoto[3], Saori Takahashi[4] ([1]JIRCAS, [2]China Agric. Univ., [3]Akita Pref. Univ., [4]ARIF)

【目的】レニンは、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系における血圧調節上、律速酵素として重要な役割を担っている。これまで、活性測定が容易なアンジオテンシンⅠ変換酵素（ACE）を標的として各種食材よりその阻害物質の探索が多数行われてきた。しかしながら、レニンを標的酵素とした食物由来阻害物質の探索は殆ど行われていなかった。高橋らは、ヒト型組換えレニンと消光性蛍光基質を組み合わせたレニン阻害活性の測定方法を確立し[1]、これまでに大豆からソヤサポニンI[2]をまた米から遊離脂肪酸であるオレイン酸とリノール酸を同定した[3]。今回、各種食材よりレニン阻害物質を探索することを目的とした。また、ACEと同様にアンジオテンシンⅠに作用し、アンジオテンシンⅡを生成する酵素キマーゼについても同様に検索した。
【方法】レニン[1, 2]、キマーゼ[4]及び ACE[5]活性測定は高橋らの方法で行った。活性の測定には消光性蛍光基質(レニン及びキマーゼ: Nma-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Thr-Lys(Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH2、ACE: Nma-Phe-His-Lys(Dnp)を用いた。各種食材のメタノール抽出液、熱水抽出液を調製し、阻害活性検定用に用いた。また、*in vivo* における作用の検証は、各種抽出液を生後 12 週齢の雄性の高血圧自然発症ラット(SHR)に単回経口投与し、経時的に血圧を測定した。
【結果】各種食材抽出液のレニン阻害活性を測定したところ、食用地衣（*Sulcaria sulcata*, *Lobaria kurokawae*）に強い活性があることが明らかになった。*Sulcaria sulcata* は日本でバンダイキノリ、中国で樹花菜として、*Lobaria kurokawae* は中国で樹胡蝶として食されている。一方、これらの ACE 阻害活性を測定したところ、比較的低かった。また、キマーゼについて、これらの抽出液の阻害活性を測定したところ、高い阻害活性を示した。つぎに、これらの抽出液の SHR における作用を検討したところ、抽出液投与後、4～6 時間において、コントロール群に比べ有意な血圧上昇抑制効果が確認された。
【参考文献】
[1]Takahashi *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.,* **71**, 2610-2613 (2007)
[2]Takahashi *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.,***72**, 3232-3236 (2008)
[3] Takahashi S. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1713-1715 (2010)
[4] 高橋他　中央味噌研究所報告 35, 印刷中 (2014)
[5] Takahashi S.*et al., Biomed. Res.,* **32**, 407-411 (2011)

renin, chymase, lichen

講演番号：3B05p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ B 校舎 05 会場

納豆菌を用いた発酵マコンブの血圧上昇抑制作用

Inhibitory Effects of Fermented *Laminaria japonica* by *Bacillus subtilis natto* on Increse of Blood Pressure

○橋口 慧理[1]、三沢 宏[2]、矢澤 一良[3]、濱田（佐藤） 奈保子[1]([1]東京海洋大院・食品流通、[2]日本・バイオ株式会社、[3]東京海洋大・ヘルスフード科学プロジェクト)
○Satori HASHIGUCHI[1], Hiroshi SANSAWA[2], Kazunaga YAZAWA[3], Naoko HAMADA(SATO)[1] ([1]Tokyo University of Marine Science and Technology, Graduate School, [2]Nihon Bio Corporation, [3]Tokyo University of Marine Science and Technology)

【目的】高血圧症は動脈硬化や梗塞など多くの循環器系障害を引き起こす疾患である。2011 年の厚生労働省の調査によると、成人（20～70 歳）の罹患率は 27.5%であり、4 人に 1 人以上が高血圧症に脅かされていることが分かっている。その予防には血圧上昇抑制作用が明らかにされたヘルスフードを取り入れた食生活も重要である。本研究で扱う納豆菌は糸引き納豆の製造に利用されている他、生成するビタミン K の骨粗鬆症予防効果等が報告されている。これまでに、納豆菌およびマコンブの機能性についてはそれぞれ単独では多くの研究報告があるが、両者を組み合わせた海藻発酵物の機能性についての学術的な報告例はない。そこで本研究は、納豆菌によりマコンブを発酵することで、高血圧の予防効果が期待できる機能性食品素材を開発することを目的とした。
【方法】乾燥マコンブ（北海道道南産）をミキサーで粉砕し、粉末状にした。マコンブ粉末のみを含む培地に納豆菌を接種し、振とう培養した。発酵マコンブとして凍結乾燥後、抽出および減圧濃縮したものを試料として用いた。*in vitro* において ACE-Kit WST（同仁化学研究所）を用いてアンジオテンシン I 変換酵素（以下、ACE）阻害活性を測定した。また、*in vivo* において単回血圧上昇抑制試験を行った。雄性 ddY マウス（6 週齢）を Control 群（蒸留水投与)、マコンブ投与群（マコンブ抽出物投与、1000 mg/kg 体重)、発酵マコンブ投与群（発酵マコンブ抽出物投与、1000 mg/kg 体重）に分け（n =8)、それぞれ経口投与した。測定ケージ内で 30 分間安静にさせた後、アンジオテンシン I 、アンジオテンシンⅡ、ブラジキニン（80 μg/kg 体重）をそれぞれ腹腔内投与し、腹腔内投与前後での収縮期血圧を Tail-cuff 法で測定し、比較した。
【結果】納豆菌でマコンブを発酵したところ、培養 5 日目で 1.5×10^9 CFU/ml の生菌数が得られ、十分な発酵が確認された。ACE 阻害活性は発酵により阻害活性が約 3 倍上昇した。単回血圧上昇抑制試験では、アンジオテンシン I 負荷試験において、発酵マコンブ投与群が Control 群、マコンブ投与群に対し血圧上昇を有意に抑制したが、アンジオテンシンⅡ負荷試験においては、各群に有意な差は見られなかった。一方、ブラジキニン負荷試験において、発酵マコンブ投与群では Control 群およびマコンブ群に対し有意に降下した。これらの結果から、マコンブを納豆菌で発酵することにより血圧上昇抑制作用が上昇することが明らかとなった。また、この作用は ACE 阻害によるものと考えられた。ACE は昇圧系、降圧系の双方に関与するペプチド分解酵素であり、両系で血圧上昇を抑制することが確認され、発酵マコンブは高血圧予防食品素材として期待できる。

Bacillus subtilis natto, Makombu (*Laminaria japonica*), blood pressure

講演番号：3B05p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ B 校舎 05 会場

自然発症高血圧ラットにおける米糀の血圧上昇抑制効果と抗肥満効果

Antihypertensive and antiobesity effect of rice koji on spontaneously hypertensive rats

○佐藤 優太郎、櫻井 美仁、佐藤 眞治（新潟薬大）
○Yutaro SATO, Misato SAKURAI, Shinji SATO (Niigata Univ. Pharm. Appl. Sci.)

【目的】糖尿病、高血圧症、高脂血症などのメタボリック症候群の罹患者数は一向に減る様子はなく、大きな社会問題となっている。その要因の一つとして内臓脂肪蓄積型の肥満症が考えられる。メタボリック症候群の発症を予防するためには、肥満症を改善することや血圧上昇を抑制することやインスリン抵抗性を改善することが重要であると考えられる。清酒、甘酒、米味噌などの製造に用いられる米糀にはアミラーゼやプロテアーゼなどの酵素類や機能性糖質や機能性ペプチドなどの有用成分が多数含有している可能性がある。そこで本研究では、米麹を混餌させた飼料を自然発症高血圧ラットに長期間摂取させ、抗肥満効果、血圧上昇抑制効果について検討を行った。
【方法】実験動物として、4 週齢の高血圧自然発症ラット（SHR）ラットを用いた。AIN-93 飼料摂取(コントロール)群、10%米糀混餌飼料摂取(米糀)群に分けた。米糀群のタンパク質、糖質、食物繊維、脂質などの飼料組成は AIN-93 標準飼料と同じになるように調製した。調製した飼料を用いて 150 日間の飼育を行った。飼育期間中に摂餌量、体重、血圧の変動を測定した。血圧は飼育 3 週間後より非観血式血圧測定装置を用いて測定した。長期飼育後、頚静脈にカニューレを施してグルコース負荷試験（0.833g/kg）及びインスリン負荷試験(0.5IU/kg)を行い、血糖値、血漿中インスリン、遊離脂肪酸濃度の変動を測定した。更に、血液生化学試験を行った。
【結果】米糀群とコントロール群の摂餌量はほぼ同量であった。米糀群の体重がコントロール群に比べ有意に低いこと、米糀群の血圧はコントロール群の血圧よりも有意に低いことが明らかとなった。また、米糀群の LAP 値がコントロール群に比べ有意に低いことが明らかとなった。グルコース負荷及びインスリン負荷後の血糖値には大きな差は認められなかった。これらの結果は、米糀には抗肥満効果、血圧上昇抑制効果、肝機能改善効果を発揮する機能性成分が含有していることを示している。

blood pressure, rice koji, metabolic syndrome

講演番号：3B05p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ B 校舎 05 会場

低分子量化酸性多糖類の食後血糖上昇抑制作用

Suppressive effect of acidic polysaccharides lowered molecule for the elevation of postprandial blood glucose

○本 三保子[1]、内田 菜穂子[1]、鬘谷 要[1]、田中 克幸[2]、岩崎 一泰[2]、室田 明彦[3]([1]和洋女子大生活、[2]奥野製薬工業、[3]明治大理工)
○Mihoko MOTO[1], Naoko UCHIDA[1], Kaname KATSURAYA[1], Katsuyuki TANAKA[2], Kazuyasu IWASAKI[2], Akihiko MUROTA[3] ([1]Wayo Women's Univ., [2]Okuno Chemical Industries, [3]Meiji Univ.)

【目的】
酸性多糖類は、食品中に広く存在し、様々な生理作用が報告されている。酸性多糖類の生理作用は構造だけでなく、分子量に依存するとの報告があり、酸性多糖類の生理作用を構造と分子量の両面から評価する必要がある。そこで本研究は、加水分解により低分子量化した酸性多糖類の糖質消化酵素活性阻害作用および食後血糖上昇抑制作用を検討した。
【方法】
実験 1）加水分解により、任意の分子量に調整した酸性多糖（アルギン酸、コンドロイチン硫酸、フコイダン）のα-グルコシダーゼ活性阻害試験を行った。実験 2）ICR 系雄ラット（8 週齢）を対照群と低分子量化糖群に分け（n=7～8)、対照群には糖質溶液を、低分子量化糖群には糖質溶液と同時に低分子量化糖（アルギン酸またはコンドロイチン硫酸）溶液をそれぞれ経口投与した。投与前および投与後 120 分まで経時的に尾静脈より採血し、血糖値を測定した。
【結果および考察】
実験 1）アルギン酸、コンドロイチン硫酸は分子量を低下させることにより、α-グルコシダーゼ活性阻害作用が高くなった。一方、フコイダンは分子量を低下させることにより、α-グルコシダーゼ活性阻害作用が低くなった。実験 2）正常マウスにアルギン酸、コンドロイチン硫酸を投与することにより、糖質負荷後の血糖上昇が抑制された。以上の結果より、アルギン酸、コンドロイチン硫酸は *in vitro* でのα-グルコシダーゼ活性阻害作用の分子量活性相関が確認された。さらに、低分子量化したアルギン酸、コンドロイチン硫酸は糖質の消化を抑制し、抗糖尿病作用が期待できる新規生理活性素材となりうる可能性が示唆された。

acidic polysaccharides, lowered molecule, postprandial blood glucose

講演番号：3B05p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ B 校舎 05 会場

絶食条件下におけるシイタケ抽出物の血中エタノール濃度上昇抑制作用

Suppressive effect of shiitake-mushroom extract on elevation of blood ethanol level under fasting condition

○吉岡 沙織[1]、廣中 聡[1]、鵜飼 愛梨[1]、増田 秀樹[2]、松井 謡子[2]、西村 修[2]、作田 圭亮[2]、赤尾 真[1]、熊谷 日登美[1]（[1]日大・生資・生化、[2]小川香料（株））
○Saori Yoshioka[1], So Hironaka[1], Airi Ukai[1], Hideki Masuda[2], Yoko Matsui[2], Osamu Nishimura[2], Keisuke Sakuda[2], Makoto Akao[1], Hitomi Kumagai[1] ([1]Nihon Univ., [2]Ogawa & Company, Ltd.)

【目的】

アルコール飲料の摂取により体内へ入ったエタノールは，酵素によってアセトアルデヒドに酸化され，酢酸へと代謝されるが，エタノールやアセトアルデヒドは悪心，頭痛，嘔吐など神経系へ影響を与える．そのため，アルコール飲料を摂取する際には，血中エタノール濃度が上昇せず，かつ，エタノールやアセトアルデヒドが速やかに代謝されることが望ましい．

我々はこれまでに，ラットの非絶食条件下において，シイタケ抽出物が血中エタノール濃度の上昇を有意に抑制することを明らかにした．しかし，アルコール飲料は，摂取するタイミングによって酔いに差があることが日常的に知られている．これは，胃の内容物が多い場合にはエタノールが胃内に残留し，血中への移行が緩慢になるためとされている．そこで本研究では，消化管内に食物が存在しない絶食条件下においても，シイタケ抽出物が同様の効果を示すか否か検討を行った．

【方法】

シイタケ抽出物の調製

シイタケ抽出物は，粉砕した干しシイタケを 37℃の水に 1 時間浸漬し，固液分離後，凍結乾燥することにより調製した．干しシイタケとして 2 g および 0.2 g/kg 体重となるよう，得られたシイタケ抽出物をエタノール溶液に溶解させ，動物実験に用いた．

動物実験デザイン

ラットを 20 時間絶食させた後，調製したシイタケ抽出物溶液を経口胃内投与した．なお，Control 群にはエタノール溶液のみを投与した．投与後，経時的に尾静脈より血液を採取し，タンパク質を除去後，血中のエタノール，アセトアルデヒド，酢酸の濃度を測定した．

【結果と考察】

0.2 g/kg 体重シイタケ抽出物を投与した群の血中エタノール，アセトアルデヒド濃度は，Control 群とほぼ同等の値であったが，2 g/kg 体重シイタケ抽出物を投与した群では，血中エタノール，アセトアルデヒド濃度の上昇が有意に抑制された．また，2 g および 0.2 g/kg 体重シイタケ抽出物を投与した群の血中酢酸濃度は，180 分まで Control 群より高い値を示し，投与後 270 分で Control 群の値を下回った．これらの結果より，シイタケ抽出物は絶食条件下においても，血中エタノール濃度の上昇を抑制することが明らかとなった．

blood ethanol level, shiitake mushroom, fasting condition

講演番号：3B05p23
講演日時、会場：3 月 29 日 17:59～ B 校舎 05 会場

ケルセチン硫酸抱合体の合成と抗炎症作用の解析

Synthesis of quercetin sulfates and analysis of their anti-inflammatory activity

○黒川 健治[1]、生城 真一[2]、榊 利之[2]、寺尾 純二[3]、大西 康太[1]、河合 慶親[1] ([1]名大院生命農、[2]富山県大・工、[3]徳島大院・HBS 研)
○ Kenji KUROKAWA[1], Shin-ichi IKUSHIRO[2], Toshiyuki SAKAKI[2], Junji TERAO[3], Kohta OHNISHI[1], Yoshichika KAWAI[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Toyama Pref. Univ., [3]Univ. Tokushima)

【背景と目的】フラボノイドは日常の食事中に多く含まれており、抗酸化性や抗炎症作用など多彩な生理活性を有することが明らかになっている。経口摂取されたフラボノイドは腸管から吸収された後、グルクロン酸抱合や硫酸抱合によって速やかに代謝されるため、血中ではほとんど全てが抱合体として存在している。したがって、抱合体の体内動態を明らかにすることはフラボノイドの活性発現機構を理解するうえで重要である。演者らのグループでは、食事中に含まれる代表的なフラボノイドであるケルセチンに注目し、抱合体の体内動態について検討を進めてきた。その結果、グルクロン酸抱合体がマクロファージから分泌されるβ-グルクロニダーゼによって脱抱合され、ケルセチンアグリコンになることで抗炎症作用を発揮することが明らかとなった[1,2]。一方で、ケルセチンを投与したマウスにリポ多糖（LPS）を腹腔内投与することで炎症反応を誘導したところ、血漿中の硫酸抱合体が有意に増加することも明らかになった[2]。しかしながら、硫酸抱合体の炎症部位における作用機構は未だ解明されていない。そこで本研究では、ケルセチン硫酸抱合体を化学合成し、マクロファージとの相互作用や抗炎症作用について解析することを目的とした。
【方法と結果】ケルセチンとスルファミン酸をピリジン中で混合し、80℃で 4 時間加熱した。反応液を逆相 HPLC 分析に供したところ、ケルセチン以外に 2 本の主要なピークが検出された。これらのピークを分取し ESI-MS 分析を行った結果、ケルセチンに硫酸基が一つ結合したと考えられる分子イオンピーク（m/z 381）が陰イオンモードで検出された。さらに、これらのピークは硫酸転移酵素である sulfotransferase (SULT)1A1 や SULT1E1 を発現させた酵母を用いて調製した quercetin-3’-sulfate（Q3’S）および quercetin-4’-sulfate（Q4’S）と溶出時間が一致した。これまでに、Q3’S はケルセチン摂取後のヒト血漿中に含まれる主要な硫酸抱合体であることが明らかになっていることから、本合成法は Q3’S の大量調製に有効であると考えられた。現在、マウスマクロファージ細胞株（J774.1）を用いて LPS 刺激によって誘導される一酸化窒素産生や、シクロオキシゲナーゼ-2 発現に対する硫酸抱合体の作用について、ケルセチンアグリコンやグルクロン酸抱合体である quercetin-3-glucuronide と比較検討しながら解析を行っている。

[1] Kawai et al., J. Biol. Chem., 283, 9424 (2008)
[2] Ishisaka et al., PLoS ONE, 8, e80843 (2013)

Flavonoid, Sulfate, Inflammation

講演番号：3B06a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ B 校舎 06 会場

Immune enhancement and Antiviral activity of herbal medicines, Phellodendron amurense Ruprecht & Angelica tenuissima Nakai

○Myun Soo KIM[1,2], Prasanna Weeratunga[2], Ki Jong YU[1], Hongik KIM[1], Jong-Soo LEE[2] ([1]R&D Division, Vitabio., [2]College of veterinary medicine, Chungnam National University)

Herbal medicine have long been used as a remedy for diverse diseases in Asia owing to their various pharmacological effect. The oriental traditional medicine*, Phellodendron amurense Ruprecht(PA)* ***&*** *Angelica tenuissima Nakai(AT)* has been widely used for its various medicinal effects (e.g. anti-inflammatory, anti-diarretict, disinfectant and stomachic agent). In this study, the immuno-enhancing activity and antiviral activity of these two herbal medicines were investigated using macrophage cell line and epithelial cell lines. The water soluble extracts from boiled barks of *PA* & roots of *AT* were found to exhibit a potential antiviral effect. The water soluble extracts of *PA & AT* significantly inhibited a various RNA virus (influenza A virus, vesicular stomatitis virus and Newcastle disease virus) replication and a DNA virus (Herpes simplex virus, Coxsackie virus, Enterovirus-71) in vitro and also protected mice against challenge with lethal doses of the highly pathogenic influenza A which containing H1N1, H5N2, H7N3, H9N2 virus in vivo. Mechanically, we found that PA&AT induced the type I interferon and pro-inflammatory cytokines (such as tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and interleukin-12) on murine macrophage cells and epithelial cells. Overall, Our results suggest that the two herbal medicine extracts has the components which can induce the type I interferon stimulation and can be a potential antiviral reagent against wide range of viruses by inducing possible cellular antiviral state.

herbal medicine, immune-enhancement, antiviral activity

講演番号：3B06a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ B 校舎 06 会場

ウーロン茶ポリフェノール Chafuroside B の皮膚表皮細胞における紫外線防御作用 （UVB による DNA 損傷および皮膚免疫抑制因子生成に対する改善作用について）

Chafuroside B, an Oolong Tea Polyphenol, Ameliorates UVB-Induced DNA Damage and Generation of Photo-immunosuppression Related Mediators in Human Keratinocytes

○長谷川 達也[1]、島田 正一郎[1]、石田 均司[2]、中島 優哉[1] ([1]資生堂リサーチセンター、[2]静岡県立大学)
○ Tatsuya HASEGAWA[1], Shoichiro SHIMADA[1], Hitoshi ISHIDA[2], Masaya NAKASHIMA[1] ([1]Shiseido Research Center, [2]University of Shizuoka)

【背景】Chafuroside B は最近、烏龍茶葉から新たに単離同定された抗炎症作用を有するフラボノイドである。しかしながら、皮膚での作用については不明である。そこで、我々は、皮膚ケラチノサイトにおける紫外線に対する防御作用（UVB 誘導性 DNA damage 修復作用および免疫抑制関連因子の生成抑制作用）について評価を検討した。

【方法】ヒト正常皮膚ケラチノサイト（NHEK）細胞を用いて、UVB 照射（20 mJ/cm^2）によって誘導される DNA damage、Apoptosis および UVB 誘導性免疫抑制関連因子（IL-10, IL-12, TNF-α, PGE_2, Receptor activator of nuclear factor κB ligand (RANKL)）の生成抑制または促進に対する Chafuroside B の作用を細胞免疫蛍光染色、RT-PCR、ELISA 等の手法により評価した。

【結果】NHEK 細胞において、UVB 照射によって DNA damage の指標である Cyclobutane pyrimidine dimers（CPD）の生成増加、Apoptosis の指標である Caspase-3/7 活性の上昇、UVB 誘導性免疫抑制関連因子である IL-10, TNF-α, PGE_2 の産生亢進ならびに RANKL の mRNA 発現亢進が認められた。これに対して、Chafuroside B（0.3 or 1 μM）を UVB 照射直後に処置すると、CPD の生成、Caspase-3/7 活性の上昇、UVB 誘導性免疫抑制関連因子（IL-10, TNF-α, PGE_2, RANKL）の発現もしくは産生亢進がそれぞれ抑制された。
一方、Chafuroside B（1 μM）は、UVB による DNA damage の修復作用および UVB 誘導性免疫抑制の改善作用を有することが知られている IL-12 の mRNA 発現および産生促進作用が示された。

【考察】Chafuroside B は UVB 誘導性 DNA damage の修復促進作用ならびに、UVB 誘導性免疫抑制関連因子（IL-10, TNF-α, PGE_2, RANKL）の生成抑制作用を有することが示唆された。またこれらの改善作用は、Chafuroside B のケラチノサイトにおける IL-12 の誘導を介して引き起こされる可能性が示唆された。以上のことから、Chafuroside B は紫外線防御作用を有する新たな有用性フラボノイドとしてその今後を期待している。

Chafuroside B, Photoprotection, Keratinocyte

講演番号：3B06a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ B 校舎 06 会場

緑茶カテキンにより誘導される食作用活性の増強は Transient Receptor Potential Melastatin 2（TRPM2）阻害剤によって抑制される

Enhancement of green tea catechin induced phagocytosis can be blocked by an inhibitor of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2)

○物部 真奈美[1]、江間 かおり[1]、徳田 佳子[1]、山本（前田） 万里[2]、堀江 秀樹[1] ([1]（独）農研機構野菜茶業研究所、[2]（独）農研機構食品総合研究所)
○Manami MONOBE[1], Kaori EMA[1], Yoshiko TOKUDA[1], Mari MAEDA-YAMAMOTO[2], Hideki HORIE[1] ([1]NARO Institute of Vegetable and Tes Science, [2]NARO National Food Research Institute)

【目的】緑茶（*Camellia sinensis* L.）は様々な健康効果を有する機能性食品であるが，その機能の１つとして免疫調節能が報告されており、その代表的な有効成分としてカテキン類が知られる。抗炎症作用等の免疫抑制的な働きを有するカテキンとしてはエピガロカテキンガレート（EGCG）がよく知られており、EGCG は 67kDa ラミニンレセプター（67LR）を介して炎症性メディエーターの発現を阻害することが報告されている。一方、我々は最近、免疫系を活性化するカテキンとしてエピガロカテキン（EGC）を見いだした。EGC はマクロファージの食作用活性の増強など、自然免疫系を活性化することを確認している。しかしながら、EGC が作用する受容体は発見されておらず、作用機序は不明であった。そこで、本研究では、EGC によるマクロファージの食作用増強活性に関わる受容体を調べることを目的とした。

【方法】EGC によるマクロファージの食作用増強活性を調べるため、HL60 細胞を活性型ビタミン D 刺激によりマクロファージ様細胞へ分化誘導した。マクロファージ様細胞の食作用活性変化は、蛍光ビーズの取り込み活性指標にフローサイトメーターを用いて測定した。

【結果】EGC によるマクロファージ様細胞の食作用活性はカタラーゼの添加により有意に阻害され、さらに低濃度の過酸化水素を培養液中に添加した場合でも食作用活性が増強されることが確認された。また、EGC による食作用活性の増強は、2-aminoethoxydiphenyl borate（2-APB）および *N*-(*p*-amylcinnamoyl)anthranilic acid（ACA）によって有意に阻害された。2-APB および ACA は Transient receptor potential melastatin 2（TRPM2）の活性阻害剤であり、TRPM2 は過酸化水素に反応してマクロファージを活性化する受容体として知られる。これらの結果から、EGC により産生された低濃度レベルの過酸化水素が TRPM2 を活性化することによりマクロファージの活性を増強する可能性が示唆された。

Green tea catechin, Phagocytosis, TRPM2

講演番号：3B06a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ B 校舎 06 会場

自然免疫応答を用いた新規食品機能性評価法で判明した茶類の機能性

Monitoring of health pormoting power in tea varieties by using dual-mode observation of innate immune responses in neutrophiles

○數村 公子[1]、山本（前田） 万里[2]、里園 浩[1]、呉 暁紅[3]、土屋 広司[1]、小池 隆[4]、岡崎 茂俊[5]、大澤 俊彦[6]（[1]浜松ホトニクス・中研、[2]農研機構・食総研、[3]ヘルスケアシステムズ、[4]浜松ホトニクス・電子管、[5]浜松医大・MPRC、[6]愛知学院大・心身）

○Kimiko KAZUMURA[1], Mari MAEDA-YAMAMOTO[2], Hiroshi SATOZONO[1], Xiaohong Wu[3], Hiroshi TSUCHIYA[1], Takashi KOIKE[4], Shigetoshi OKAZAKI[5], Toshihiko OSAWA[6] ([1]Hamamatsu Photonics CRL, [2]NFRI, NARO, [3]Healthcare Systems, [4]Hamamatsu Photonics Electron, [5]Hamamatsu Univ. Sch. Med., [6]Aichi Gakuin Univ.)

【目的】免疫細胞である好中球の自然免疫応答を、光情報に変換して検出する技術を構築し、食品や成分の抗酸化（活性酸素消去作用）、抗炎症（活性酸素産生を抑え過剰な炎症反応を抑制する作用）、自然免疫賦活作用の 3 つの生理活性を同時に評価出来る手法を開発した。昨年度のアントシアン類の報告に続いて、今回は複合物質である茶抽出液について評価した結果を報告する。茶類は、緑茶（不発酵茶）、ウーロン茶（半発酵茶）、紅茶（発酵茶）、麦茶（茶外茶）、プーアル茶（好気的微生物発酵茶）、阿波晩茶（嫌気的微生物発酵茶）、碁石茶（2 段階微生物発酵茶）の 7 種を選択し、茶葉の発酵過程に生じる機能性の変化に着目して評価した。

【方法】ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 より得た好中球様細胞懸濁液 1.5mL（1×10^5 cells/ml）に、それぞれ飲用に適した推奨法で抽出した茶抽出液を添加し（0.66μL～66μL）、好中球刺激誘引物質 fMLP で刺激した際に現れる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇と O_2^-（スーパーオキシド）産生を、Ca^{2+} 濃度測定用蛍光指示薬（Fluo-3）の蛍光ならびに $O_2^{-\bullet}$ 検出用化学発光試薬（MCLA）の化学発光として、同時に検出した。茶抽出液の添加による蛍光と化学発光の発光量変化より、茶類が自然免疫反応に及ぼす影響を評価した。その際、茶抽出液が持つ着色性による光計測への影響を、昨年報告したように試料の吸収スペクトルと発光試薬の発光スペクトルを用いて補正した。さらに、本評価法の結果を、従来から用いられている抗酸化能測定法であるヒポキサンチンーキサンチンオキシダーゼ反応を用いた化学発光法で評価した結果と比較した。また、評価した濃度範囲における茶抽出液の細胞毒性について、MTT アッセイ法にて確認した。

【結果】それぞれのお茶で、違った特徴を持った結果が得られた。特に、緑茶で高い抗酸化作用が見られ、紅茶では抗酸化作用に加えて強い抗炎症作用も見られたが、同時に高濃度域において、細胞毒性も確認された。麦茶は、今回の濃度範囲においては、活性はほとんど見られなかった。茶葉は、抗酸化活性をもともと有しており、ウーロン茶、紅茶と酸化発酵が進むにつれて、抗炎症活性を持つ物質が増えてくることが推測された。それに伴い細胞毒性も強くなったため、毒性を持つ物質が酸化発酵によって産生されることも示唆された。微生物発酵茶においては、好気的発酵の後、嫌気的発酵を行って製造された碁石茶が強い抗酸化活性を示したが、緑茶、ウーロン茶、紅茶の抗酸化活性より弱かった。

以上より、3 つの生理活性を同時に評価できる本手法は、複合物質の評価にも有効であることが示唆された。

health pormoting power, innate immune response, tea

講演番号：3B06a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ B 校舎 06 会場

ナチュラルキラー細胞を活性化する食品成分の探索

Search for compounds that can activate natural killer cells

○齋藤 武、阿部 大吾、野方 洋一（農研機構・近中四農研）
○Takeshi SAITO, Daigo ABE, Yoichi NOGATA (NARO/WARC)

【目的】

ナチュラルキラー(NK)細胞は、がん細胞やウイルス感染細胞を認識し、排除する役割を持つ免疫細胞の一種である。NK 細胞の活性は加齢やストレス等により低下することから、NK 細胞の活性を強める成分を食品として摂取できれば、健康の維持または回復が期待できる。そこで本研究では、NK 細胞のがん細胞に対する細胞傷害活性を指標として、NK 細胞の機能を強めることができる食品成分のスクリーニングを行った。

【方法】

食品成分を含む化合物約 250 種類を試験成分とした。NK 細胞の活性化を評価するため、試験成分を含む培地で培養したヒト由来 NK 細胞株 KHYG-1 と、試験成分を含まない培地で培養したヒト白血病細胞株 K562 を混合し、一定時間培養したのち培養上清を回収した。培養上清中に含まれる K562 細胞由来の乳酸脱水素酵素の活性を細胞傷害性マーカーとして、市販のキットを用いて測定した。また、NK 細胞に試験成分を添加することによる細胞傷害性関連因子の遺伝子およびタンパク質の発現レベルの変化を、リアルタイム PCR 法およびウエスタンブロット法により解析した。

【結果】

スクリーニングの結果、kahweol および cafestol といった、コーヒーに含まれるジテルペンが NK 活性を著明に増加させることが分かった。リアルタイム PCR あるいはウエスタンブロット解析の結果から、これら化合物の添加により NK 細胞内におけるグランザイム B の発現が特に増加していること、さらに、グランザイム B の遺伝子発現に関与しうる転写因子のリン酸化レベルも増加していることを明らかにした。

natural killer cell, kahweol, granzyme b

講演番号：3B06a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ B 校舎 06 会場

マウス自己免疫病発症に対するアスタキサンチンの効果

Effect of Astaxanthin on the Development of Autoimmune Disease in Mice

○茶山 和敏[1]、中岡 千種[1]、山下 栄次[2] ([1]静岡大院農、[2]アスタリール)
○Kazutoshi SAYAMA[1], Chigusa NAKAOKA[1], Eiji YAMASHITA[2] ([1]Shizuoka Univ., [2]AstaReal Co.)

＜緒論＞

自己免疫病は、自分自身の異常な免疫反応によって全身性あるいは臓器特異的に重篤な障害がもたらされる疾患で、その治療は非常に困難である。これまでの研究で、強い抗酸化作用や抗炎症作用を有するアスタキサンチンがマウス自己免疫病の発症を抑制することが報告されている。しかし、投与量などを含めたその発症抑制の詳細や抑制メカニズムについては詳細な検討がなされていない。そこで、本研究では、その発症がより重篤な自己免疫病モデルマウスにアスタキサンチンを投与して、その投与量による発症抑制を比較した。また、より正確な発症抑制作用の強さを生存率の検討によって確認するとともに、死亡に直接つながる自己免疫性腎炎の発症やその他の自己免疫病発症指標について詳細に検討を行った。

＜材料および方法＞

自己免疫病のモデルマウスで、全身性の重篤な症状を呈する MRL/*lpr*^{cg} マウスを実験に用いた。4 週齢のメス MRL/*lpr*^{cg}マウスに、0.015%および 0.06%のアスタキサンチンを混合した飼料を 12 週間投与した。投与期間中、体重増加、摂食量および尿中たんぱく量を測定し、投与終了後、リンパ節および各種臓器の重量を調べた。また、血清を採取して、抗 DNA 抗体、免疫複合体、尿中尿素窒素量などの自己免疫病発症指標を測定・比較した。さらに、生後 7 カ月齢までの投与群を別に作成して生存率を調べた。

＜結果及び考察＞

12 週間のアスタキサンチン投与の結果、体重および摂食量には変化が見られなかった。自己反応性免疫細胞の集積に伴う皮下リンパ節の腫脹はアスタキサンチンによって有意に抑制され、腹腔内リンパ節重量も投与量に相関して抑制される傾向を示した。自己免疫病の発症および悪性進展に伴って炎症・肥大する腎臓と副腎の重量はアスタキサンチン投与によって有意に減少していた。また、6 ヶ月間のアスタキサンチン投与群によって、その生存率は対照群と比較して顕著に改善した。

以上の結果から、アスタキサンチンは自己免疫病の発症を抑制し、その生存率を大幅に改善することが明らかとなった。そして、生存率の改善要因として、腎炎の発症抑制が関与している可能性が示唆された。現在、血中の発症指標を測定しており、その結果は発表の際に詳細に報告する。

Astaxanthin, Autoimmune Disease, Mice

講演番号：3B06a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ B 校舎 06 会場

Oral administration of kaempferol induces IL-10-producing regulatory B cell population and inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis

○Chenhao YEH, Junya HORIUCHI, Hideo SATSU, Makoto SHIMIZU, Mamoru TOTSUKA
(Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

【Aim】 The regulatory B cell (Breg) has been functionally defined in human and mice by their ability to regulate or suppress excessive immune responses. Our previous results demonstrated kaempferol as a potent dietary regulator to induce interleukin-10 (IL-10) producing Bregs *in vitro,* and *ex vivo* transfer of these kaempferol-induced Bregs are more competent to suppress the experimental autoimmune encephalomyelitis in comparison with lipopolysaccharide (LPS)-only-induced Bregs. In the present study, we made an investigation to elucidate the effects of oral administration of kaempferol on the *in vivo* induction of Bregs in mouse intestine and the inhibition of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis.

【Methods】 C57BL/6 mice were orally administered kaempferol at 10 mg $kg^{-1}day^{-1}$ for 14 days. $B220^{+}$ B cells isolated from spleens and mesenteric lymph nodes were cultured with LPS in the presence of brefeldin A for 5 hours and then subjected to flow cytometry analysis for evaluating the percentage of IL-10-producing Bregs. Another group of C57BL/6 mice were orally administered kaempferol at 10 mg $kg^{-1}day^{-1}$ for 21 days, but from day 14, mice were induced colitis by incorporation of 3% DSS in the drinking water. The disease activity index including body weight loss, stool consistency and rectal bleeding were scored daily, and the quantification of inflammatory markers and pathological symptom was evaluated at day 21 after dissection.

【Results and Discussion】 Oral administration of kaempferol was found to effectively enhance the frequency of IL-10-producing Bregs in spleen and mesenteric lymph node. Moreover, the treatment also ameliorated DSS-induced colitis severity, colonic MPO activity and pro-inflammatory cytokine levels in the colonic tissue. Our results suggest that kaempferol may be a potent dietary factor in maintaining the immune tolerance by inducing Bregs *in vivo* and thus have beneficial potentials for the prevention or therapeutic approaches against ulcerative colitis.

Regulatory B cell, Kaempferol, Colitis

講演番号：3B06a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ B 校舎 06 会場

植物由来食品因子エリオジクチオールおよびモリンのマウス制御性 T 細胞分化誘導機能
Induction of mouse regulatory T-cell differentiation by eriodictyol and morin.
○松本 優樹、薩 秀夫、清水 誠、戸塚 護（東大院農）
○Yuki MATSUMOTO, Hideo SATSU, Makoto SHIMIZU, Mamoru TOTSUKA (Tokyo Univ.)

【目的】制御性 T 細胞は T 細胞応答を抑制し、過剰な免疫応答を調節する役割を果たしている。末梢でも抗原未感作 $CD4^+$T 細胞から分化することが知られているが、その分化制御の分子メカニズムは未だ不明である。これまでに柑橘類に含まれるフラボノイドであるナリンゲニンが Foxp3 の発現および制御性 T 細胞の分化を誘導することを明らかにした。一方で、多くの植物由来食品因子についてはその制御性 T 細胞分化に対する効果が明らかとなっていない。本研究ではさまざまな食品由来因子による Foxp3 発現誘導を解析することで、制御性 T 細胞分化誘導能を有する食品因子を探索した。

【方法】In vitro における制御性 T 細胞の誘導においては BALB/c マウス脾臓由来 $CD4^+$T 細胞を、プレートコーティングした抗 CD3 抗体、溶液中の抗 CD28 抗体および IL-2 と共に、TGF-β の存在下あるいは非存在下で培養した。培養後の T 細胞における Foxp3 の発現をフローサイトメトリーによって解析した。

【結果】植物由来食品因子のうち 2 種類のフラボノイド、エリオジクチオールとモリンが、T 細胞における Foxp3 の発現誘導を促進することが明らかとなった。エリオジクチオールは TGF-β 非存在下では Foxp3 発現を増強しなかったが、モリンは TGF-β 非存在下においても Foxp3 発現を促進した。エリオジクチオールやナリンゲニン添加群においては、培養後の細胞における生細胞の割合が溶媒のみ添加の場合と比較して低下するのに対し、モリン添加群においては生細胞の割合は維持された。エリオジクチオール、モリンは制御性 T 細胞分化誘導能を有し、既知のナリンゲニンと異なる性質を有することが示唆された。

regulatory t cell, eriodictyol, morin

講演番号：3B06a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ B 校舎 06 会場

Lactococcus lactis C59 株とナリンゲニンの同時経口投与による経口免疫寛容誘導の強化
Enhancement of oral tolerance induction by oral administration of *Lactococcus lactis* C59 and naringenin

○西田 実紗[1]、青木一吉田 綾子[2]、鈴木 チセ[2]、薩 秀夫[1]、清水 誠[1]、戸塚 護[1] ([1]東大院農生・応生化、[2](独)農研機構・畜草研)
○MISA NISHIDA[1], Ayako Aoki-Yoshida[2], Chise SuZuki[2], Hideo Satsu[1], Makoto Shimizu[1], Mamoru Totsuka[1] ([1]Dept.Appl.Biol.Chem., The Univ. Tokyo, [2]NILGS)

【目的】*Lactococcus lactis* C59(C59) は抗アレルギー効果を持つことが知られているプロバイオティック乳酸菌である。これまでに C59 経口投与が経口免疫寛容誘導を強化することを報告している。一方、柑橘類に多く含まれるフラボノイドであるナリンゲニンがマウス脾臓 $CD4^+$T 細胞の制御性 T 細胞への分化を促進することも報告している。本研究では、卵白アルブミン(OVA)特異的 T 細胞レセプター遺伝子を導入したトランスジェニックマウスである DO11.10 マウスへの OVA 含有水の投与で誘導される経口免疫寛容に対して、C59 およびナリンゲニンの同時経口投与が及ぼす効果を解析した。

【方法】DO11.10 マウスに C59 生菌を毎日 1 mg、ナリンゲニンを毎日 300mg/kg、12 日間胃内強制投与した。その最初の 7 日間は水道水を、最後の 5 日間には 20%OVA 含有水を自由摂取させて、経口免疫寛容を誘導した。DO11.10 マウスの脾臓 $CD4^+$ T 細胞を、抗原提示細胞、OVA ペプチドとともに培養し、増殖応答、サイトカイン産生量、他の T 細胞に対する抑制活性を測定した。また、脾臓の制御性 T 細胞のマーカー発現についてフローサイトメトリーで調べた。

【結果】経口免疫寛容誘導時、C59 経口投与により、経口免疫寛容誘導の指標である、脾臓 $CD4^+$ T 細胞の増殖応答および IL-2 産生量が低下、他の T 細胞に対する抑制活性が観察された。これに対し C59 とナリンゲニンを同時に投与することで C59 単独投与と比較して、増殖応答、IL-2 産生量がより顕著に低下し、また他の T 細胞に対してより強い抑制活性が認められた。さらに、経口免疫寛容誘導時の脾臓 $CD4^+$T 細胞の IL-10 産生と脾臓細胞中の制御性 T 細胞の割合が C59 とナリンゲニンの同時投与により増加した。これらのことから、C59 単独投与と比較して C59 とナリンゲニンの同時投与は、より顕著に経口免疫寛容誘導を強化する効果があることが示唆された。

oral tolerance, lactic acid bacteria, naringenin

講演番号：3B06a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ B 校舎 06 会場

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* FC により産生された菌体外多糖のアレルギーモデルマウスに対する効果

Effect of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC against allergy model mouse

○後藤 弥生[1]、鈴木 志保[2]、戸田 登志也[1]、山田 勝重[1]、北村 進一[3] ([1]フジッコ株式会社、[2]有限会社 IPE、[3]大阪府大院・生命環境)

○ Yayoi GOTOH[1], Shiho SUZUKI[2], Toshiya TODA[1], Katsushige YAMADA[1], Shinichi KITAMURA[3] ([1]Fujicco Co., Ltd., [2]IPE Inc., [3]Osaka Prefecture Univ.)

【目的】カスピ海ヨーグルトの生産に用いられる *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC は、その発酵物中に菌体外多糖（EPS）を産生することが知られている。本研究では、EPS の経口投与がアレルギーモデルマウスに与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】BALB/c マウス（6 週齢、♂）を馴化飼育後、耳介に 2,4,6-トリニトロクロロベンゼン（TNCB）を塗布することで感作し、4 日目以降 1 日おきに TNCB を塗布してアレルギー様の皮膚炎を誘発した。感作 4 日前より感作日までは 1 日 1 回、感作日以降は 1 日おきに、EPS を 0.05mg、0.5mg/kg/日となるように経口投与し、対照群には PBS を、陽性対照群にはプレドニゾロンを 3mg/kg/日となるように投与した。感作日および感作 4 日後からは 1 日おきに 18 日後まで TNCB 塗布前の耳介厚測定および血漿中 IgE の測定を行い、19 日後に糞便中 IgA 量を測定した。IgE、IgA の測定は ELISA 法にて実施した。次に、同様の実験系にて感作 10 日後までマウスを飼育し、11 日目に耳介の摘出と採血を行った。耳介切片をトルイジンブルーにより染色し、耳介組織中の肥満細胞数を計測した。また、血漿中のバイオマーカー含量を網羅的に調べた。

【結果】EPS 0.05mg、0.5mg/kg の投与により、対照群に比べて耳介肥厚化が有意に抑制された。血漿中 IgE 量は全ての試験区において感作 12 日目をピークとして経日的に上昇し、その後は緩やかに低下した。また、EPS 0.05mg/kg 群の血漿中 IgE 量は、感作 10 日目以降は対照群に比べて高い傾向にあり、感作 16 日目以降は有意に高かった。また、EPS 0.5mg/kg 群でも感作 12 日目以降は対照群に比べて高い傾向にあった。糞便中 IgA 量は EPS 0.05mg/kg および 0.5mg/kg 投与群では対照群に比べて高い傾向にあった。さらに、EPS 0.5mg/kg 投与群では耳介組織内での肥満細胞数が有意に減少していた。また、血漿中のバイオマーカーを調べた結果、EPS 投与群では対照群に比べて IL-1α 含量が低く、IFN-γ 含量が高かった。さらに macrophage-derived chemokine、macrophage inflammatory protein-1β、macrophage inflammatory protein-2 の含量も EPS 投与群で高かった。

lactic acid bacteria, exopolysaccharide, allergy

講演番号：3B06a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ B 校舎 06 会場

乳酸菌由来 GAPDH による IgE 産生の抑制

The IgE suppressive effect of GAPDH derived from lactic acid bacteria

○岩元 彬[1]、井上 愛子[2]、井上 祐一[3]、山田 耕路[1]、立花 宏文[1]、川原 浩治[3]([1]九大院農院・生機科、[2]キューリン・検査部、[3]北九州高専・物化工)
○Akira IWAMOTO[1], Aiko INOUE[2], Yuichi INOUE[3], Koji YAMADA[1], Hirofumi TACHIBANA[1], Hiroharu KAWAHARA[3] ([1]Kyushu Univ, [2]KYURIN, [3]KCT)

【目的】これまでに我々は、ヒト末梢血単核球を用いた *in vitro* アレルギーモデルにおいて特定品種のイチゴ抽出物が IgE 産生を抑制することを見出し、さらにその抽出物の経口投与はアトピー性皮膚炎モデルマウス NC/NgaTndCrlj の皮膚炎症症状を改善することを明らかにした。また、イチゴ成分の精製により本実験系における IgE 産生抑制成分の一つは Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) であることを突き止めた(1)。そこで本研究では、乳酸菌由来 GAPDH も同様に IgE 産生抑制作用を有するか検討した。
【方法】乳酸菌 GAPDH は、洗浄した *L. rhamnosus* NBRC3831 の細胞表面から PBS で抽出した後に、Hiload 26/10 Phenyl Sepharose High Performance を用いて精製し、SDS-PAGE により 95%以上の純度であることを確認したものを使用した。IgE 産生への影響を評価するためにヒト末梢血単核球を IL-4, -6、MDP、Cry j 1 を添加した 10%ヒト血漿、5%FBS を含む ERDF 培地中で培養した（*in vitro* アレルギーモデル)。この系に対し、乳酸菌由来 GAPDH を添加したものも同様に培養した。一定期間培養後、ELISA を用いて IgE 産生への影響を検討した。また、Th2 分化のマスター遺伝子である GATA3 と SOCS3 の mRNA 発現の変化についても調べた。
【結果】*L. rhamnosus* の細胞表面から精製した GAPDH の IgE 産生への影響を検討したところ、濃度依存的に IgE 産生を抑制した。また、この活性は GAPDH のアポトーシス誘導によるものではなかった。従って、*in vitro* アレルギーモデルにおいて乳酸菌 GAPDH はイチゴ GAPDH と同様に IgE 産生を抑制することが明らかになった。また、RT-PCR の結果から、GAPDH は GATA3 と SOCS3 発現を抑制することが分かった。そのため、GAPDH は B 細胞の IgE 産生だけでなく、Th2 分化にも影響を及ぼすことが示唆された。これらの知見から、乳酸菌の細胞表面 GAPDH は、乳酸菌の抗アレルギー効果に関与している可能性が考えられた。

(1) A. Iwamoto, K. Mitsuda, A. Inoue, T. Kato, Y. Inoue, H. Kawahara, *Cytotechnology*. 64(2012)309-314

GAPDH, IgE, in vitro immunization

講演番号：3B06a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ B 校舎 06 会場

ロタウイルス感染マウスモデルにおける *Lactococcus lactis* JCM5805 株摂取の効果
Effect of oral administration of *Lactococcus lactis* JCM5805 in a mouse model of rotavirus infection

○城内 健太[1,2]、杉村 哲[2]、大塩 木乃実[2]、藤原 大介[2]（[1]小岩井乳業（株）技術開発センター、[2]キリン（株）基盤技術研究所）
○ Kenta Jounai[1,2], Tetsu Sugimura[2], Konomi Ohshio[2], Daisuke Fujiwara[2] ([1]Technical Development Center, Koiwai Dairy Products Company,Ltd., [2]Central Laboratories for Key Technologies, Kirin Company, Ltd.)

【目的と意義】ロタウイルス感染は、主として乳幼児が感染し発症することが知られており、世界各国でワクチンの開発も進められている。我々はこれまでウイルス感染防御機構を司るプラズマサイトイド樹状細胞（pDC）を直接活性化する乳酸菌として、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 株を見出し、本大会で報告してきている。今回は、*L. lactis* JCM5805 株を経口投与した際の抗ウイルス効果についてロタウイルス感染モデルを用いて検証した。

【材料と方法】サルロタウイルス SA11 株(Simianrotavirus SA11 strain)を、生後 7 日齢の乳仔 BALB/c マウスに経口感染させた。*L. lactis* JCM5805 株はウイルス接種 2 日前から飼育終了時まで 1mg/日/匹となるように強制経口投与した。感染後は体重および糞便性状スコア観察を毎日行った。感染 2 日後の糞便について、MA104 細胞を用いたプラーク法でウイルス量を測定した。また、感染 3 日後に 5 匹を安楽死させ、ロタウイルスの感染・増殖局所となる小腸上皮細胞（IECs）の抗ウイルス因子 ISG15 転写量および脾臓（SPN）中 pDC 活性を評価した。

【結果】*L. lactis* JCM5805 株投与群でウイルス感染によって引き起こされる体重増加の抑制が、感染 4 日目で生理食塩水投与群と比較し有意に緩和された。糞便性状スコアに関しても、*L. lactis* JCM5805 株投与群で、ウイルス感染 2 日目から改善傾向が確認され、3 日目で有意な改善が確認された。また、*L. lactis* JCM5805 株投与群において、感染 2 日後の糞便中ウイルス量の有意な低下が確認された。さらに、感染 3 日目における IECs の ISG15 転写量の上昇傾向、SPN 中 pDC の有意な活性化が認められた。

【まとめ】本試験において *L. lactis* JCM5805 株の経口投与によるロタウイルス感染防御効果を検討し、当該乳酸菌株予防摂取により、症状の緩和効果が認められ、pDC を起点とする抗ウイルス自然免疫系活性が病態改善に関与している可能性が示唆された。ロタウイルスの感染・増殖は小腸上皮細胞（IECs）で起こり、腸管局所で活性化を誘導可能な乳酸菌はデリバリー手法の観点からも特に有用と考えられる。

Plasmacytoid dendritic cells, Lactic acid bacteria, Viral infection

講演番号：3B06a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ B 校舎 06 会場

乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* MCC1849 による IgA 産生促進作用と感染防御作用

Effects of *Lactobacillus paracasei* MCC1849 on IgA production and their protective effects against infection.

○新井 聡[1]、岩淵 紀介[1]、田中 智弘[1]、小田巻 俊孝[1]、清水（肖） 金忠[1]、八村 敏志[2]、阿部 文明[1]([1]森永乳業・食基研、[2]東大院農生科・食の安全研セ)
○Satoshi Arai[1], Noriyuki Iwabuchi[1], Tomohiro Tanaka[1], Toshitaka Odamaki[1], Jin-zhong Xiao[1], Satoshi Hachimura[2], Fumiaki Abe[1] ([1]Morinaga Milk Industry Co., Ltd.,, [2]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo)

【目的】

一部の乳酸菌はインターロイキン-12（IL-12)を介してNK細胞を活性化し、感染防御効果を示すことが示唆されている。乳酸菌Lactobacillus paracasei MCC1849（MoLac）株は高いIL-12誘導活性を有し、インフルエンザなどの感染に対して防御作用を有することが期待される。また、感染防御には粘膜でのIgA分泌による防御機構も重要であることが示されている。本研究ではMCC1849株によるIgA産生促進作用およびインフルエンザウイルス感染防御作用を、マウスを用いて検討した。

【方法】

MCC1849菌体含有飼料または通常飼料を2週間投与したマウスに、オボアルブミン（OVA）とコレラトキシンを1週間毎に3回経口投与することで抗原感作を行った。最終感作から1週間後に、腸管組織や腸管内容物、血液、肺組織を採取し、総IgA量およびOVA特異的IgA量を測定した。また、小腸パイエル板を採取し、細胞のポピュレーションをフローサイトメトリーを用いて解析した。

マウスにMCC1849菌体または生理食塩水を2週間投与したマウスにインフルエンザウイルスを鼻腔より感染させ、感染による症状や肺ウイルス濃度、肺組織の病理学的評価を行った。

【結果】

MCC1849菌体含有飼料を摂取したマウスでは、小腸組織、小腸内容物、血中や肺組織において、総IgA量の有意な増加が認められ、血中のOVA特異的IgA量の増加が見られた。MCC1849菌体を摂取したマウスの小腸パイエル板細胞ではIgA陽性B細胞の割合が有意に増加していた。

インフルエンザ感染試験では、MCC1849菌体の投与は感染による症状を軽減し肺ウイルス濃度を減少させた。またMCC1849投与群でウイルス感染による肺組織での病変の程度が軽減される傾向が見られた。

これらの結果から MCC1849 菌体の摂取は小腸での IgA 産生を促進し、またインフルエンザウイルスによる感染を軽減することが示唆された。

Lactobacillus, IgA, influenza

講演番号：3B06a17
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ B 校舎 06 会場

エンドウマメより単離された乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 株の免疫賦活能の解析
Immunomodulating activity of exopolysaccharide-producing *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048 from green peas

○松崎 千秋[1]、山元 優花[1]、松本 健司[2]、古賀 博則[2]、片山 高嶺[1]、加藤 紀彦[1]、山本 憲二[1]、久 景子[3]([1]石川県大・資源研、[2]石川県大・生資環、[3]日東薬品工業（株））
○Chiaki Matsuzaki[1], Yuka Yamamoto[1], Kenji Matsumoto[2], Hironori Koga[2], Takane Katayama[1], Toshihiko Katoh[1], Kenji Yamamoto[1], Keiko Hisa[3] ([1]Ishikawa Pref. Univ. Res. Inst., [2]Ishikawa Pref. Univ., [3]Nitto Pharm. Inds., Ltd.)

[目的]我々はエンドウマメより単離した乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NTM048 株が、粘膜免疫に重要な免疫グロブリン A（IgA）の産生を促進することを、BALBc/A マウスを用いた菌体投与実験によって明らかにしている（J. Appl. Microbiol., *in press* ）。そこで本菌株の食品または医薬への応用の可能性を検証するため、マウスへの低投与量における IgA 産生誘導効果を検討した。さらに、本菌株の IgA 産生誘導物質についても解析した。
[方法・結果]*L. mesenteroides* NTM048 株および基準株 *L. mesenteroides* JCM6124 株について生菌粉末を調製し、0.0038% 添加した食餌を BALBc/A マウスに 14 日間摂取させ、乳酸菌無添加の食餌マウス群と比較した。給餌開始 0、7、14 日後に、一日当たりの糞中 IgA 量を比較したところ、7 日および 14 日後の *L. mesenteroides* NTM048 株投与マウスにおいて有意な上昇が認められた。14 日後にマウスよりパイエル板および脾臓を摘出し、免疫誘導に関与する遺伝子の mRNA 発現量を比較したところ、*L. mesenteroides* NTM048 株投与マウスの脾臓において、CD4 遺伝子 mRNA 発現量の上昇傾向($P = 0.07$)が認められた。基準株 *L. mesenteroides* JCM6124 株投与マウスにおいては、乳酸菌無添加マウスと比較して有意な差は認められなかった。これらの結果、*L. mesenteroides* NTM048 株は、低投与量でも免疫賦活効果が期待できることが明らかとなった。さらに、本菌株の IgA 産生誘導物質の解析を行った。電界放出形走査電子顕微鏡による観察によって、*L. mesenteroides* NTM048 株は菌体外に多糖（EPS）を産生していることが示されたので、15%スクロース培地によって培養した培養液の上清からエタノール沈殿によって EPS を分離し、その IgA 産生誘導能を調べた。EPS とマウス小腸パイエル板細胞を 5 日間共培養後、産生した総 IgA 量を測定したところ、EPS の濃度依存的に IgA 産生量の増加が認められた。また、本 EPS を 1.75 M 過塩素酸で 80ºC、16 時間加水分解し、遊離した単糖を HPLC で解析したところ、グルコースおよびフルクトースのピークが認められた。この結果、*L. mesenteroides* NTM048 株はグルコースおよびフルクトースを構成糖として含む EPS を産生し、その IgA 産生誘導活性が確認され、プレバイオティクスとしての可能性が期待される。

Leuconostoc mesenteroides, exopolysaccharide, IgA

講演番号：3B06p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ B 校舎 06 会場

食品因子の抗アレルギー効果を評価する新規評価法の有効性

Validation of a novel in vitro method in evaluating anti-allergy food factors

○横山 友紀、橋本 堂史、水野 雅史 (神戸大院農)
○Yuki YOKOYAMA, Takashi HASHIMOTO, Masashi MIZUNO (Kobe Univ.)

【目的】 近年、アレルギー疾患の患者数は増加の一途をたどっており、その治療法および予防法の発展が望まれている。花粉症、食物アレルギーなどに代表されるⅠ型アレルギーの一つの要因として、肥満細胞からの過剰な脱顆粒が挙げられる。これまで、この現象をターゲットとして、食品の抗アレルギー効果を評価する *in vitro* 実験が行われている。しかし、従来の評価法は、小腸での応答が想定されていない。食品因子は必ず、小腸上皮での吸収・代謝を受けるため、それらを無視して食品因子の抗アレルギー作用を議論することは出来ない。そこで本研究では、Ⅰ型アレルギーを抑制する食品因子探索のために、経口摂取を想定することが可能でより簡便な *in vitro* 測定法の構築を試みた。

【方法】 トランズウェルを用いて、管腔側に小腸上皮様 Caco-2 細胞、基底膜側に肥満細胞（RBL-2H3）を配置した共培養モデルを作成した。脱顆粒の評価法には、β-hexosaminidase assay を採用した。RBL-2H3 細胞を抗 DNP-IgE 抗体で感作させ洗浄後、管腔側に種々の食品因子を添加した。6 時間反応後、基底膜側に抗原として DNP-albumin を添加することで脱顆粒を誘引し、RBL-2H3 細胞から基底膜側の上清に放出された β-hexosaminidase 活性を測定し脱顆粒の指標とした。また、L929 細胞を用いた killing assay によって、脱顆粒誘引から 4 時間後に基底膜側に放出された TNF-α 量も測定した。なお、ポジティブコントロールには、脱顆粒抑制剤 Go6976 を使用した。

【結果】 RBL-2H3 細胞は、Caco-2 細胞との共培養によって β-hexosaminidase 活性に影響を及ぼされることはなく、脱顆粒抑制剤である Go6976 は脱顆粒を約 90％抑制した。供試したポリフェノール類（最終濃度 100μM）の内、ルテオリンおよびケンフェロールに有意な活性が認められた。また、これらは肥満細胞からの TNF-α 産生も抑制したため、Ⅰ型アレルギー症状の軽減に大きく寄与することが示唆された。一方で、Schmelz らによって小腸を透過しないことがすでに報告されている米由来セラミド（最終濃度 50μg/ml）にも脱顆粒抑制効果が確認できた。このことは、小腸から吸収されない食品因子でも、小腸上皮細胞に何らかの作用を与える、あるいは吸収代謝物が脱顆粒抑制効果に影響していることを示唆しており、今回の評価法は今まで検知できなかった食品因子も探索できる可能性を含んでいる。今後は、脱顆粒の抑制効果が見られたサンプルに関して動物実験を行い、今回の新規評価系での結果がどの程度反映されるかを検討していく予定である。

mast cell, anti-allergy, co-culture

講演番号：3B06p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ B 校舎 06 会場

授乳期の抗原摂取が仔の免疫応答に及ぼす影響の解析

Effects of maternal allergen exposure during lactation period on the immune responses of the offspring

○阿部 麻里奈[1]、渡辺 純[1]、後藤 真生[2]、石川（高野） 祐子[2] ([1]筑波大院生環、[2]農研機構 食総研)
○Marina ABE[1], Jun WATANABE[1], Masao GOTO[2], Yuko ISHIKAWA(TAKANO)[2] ([1]Tsukuba Univ., [2]NARO NFRI)

【目的】

近年、小児食物アレルギー患者が増加しており、その対策が急がれている。乳児にとって母乳は唯一の栄養源であるが、母乳には母親が摂取した食物に由来する抗原が含まれ、母乳中の抗原が子を感作し、これが小児の食物アレルギーの一因となる可能性が考えられている。本研究では、授乳中に摂取した食物抗原が母乳を介して子に移行し子の免疫応答を変化させ、ひいては食物アレルギーの発症リスクを高めるのかアレルギー動物モデルを用いて、解析することにした。

【方法】

DO11.10 マウスに、OVA を断続的に経口投与すると抗原感作が成立するが、DO11.10 の元系統である Balb/c では感作は成立しない。本研究では、母を Balb/c、父を DO11.10（+/+）として交配させ、仔 DO11.10（+/−）を得た。出産直後から母マウスに 2%OVA 水を投与し、仔は 3 週齢で離乳させた。OVA 水の投与は、3 日間の投与を 4 日間の休止期間を設けて 2 回行う断続的投与と、休止期間を設けず 6 日間投与する連続的投与の 2 パターンとした。仔は、2 週齢で採血および胃内容物の回収を行い、5 週齢、10 週齢で脾臓および血清を採取した。さらに 10 週齢の仔に 2%OVA 水を断続的に投与して感作した後､背部皮内に OVA を投与してアレルギー性皮膚反応の重症度を定量した。一部の仔マウスは OVA 水による感作なしに皮膚反応を誘導した。脾細胞は OVA 刺激下で培養し、培養上清を得た。血清、培養上清中の抗体価およびサイトカインの測定は、ELISA 法を用いて行った。また、western blotting 法により胃内容物中の OVA 含量を測定した。

【結果】

OVA 水の投与パターンに関わらず、OVA を投与した母の母乳を摂取した仔の胃内容物中にインタクトな OVA が検出された。仔の血清中 OVA 特異的抗体価の経時変化を調べた結果、2 週齢では、授乳期に OVA を投与した群で OVA 特異的 IgG1 が検出されたが、非投与の群では検出限界以下であった。5 週齢、10 週齢では、授乳期に OVA を投与した群で OVA 特異的 IgG1、IgE レベルが OVA 非投与群と比べて高い傾向であったが、10 週齢で OVA 水の断続投与により感作しない場合には、皮膚反応は誘導されなかった。OVA 水の断続投与により感作した仔マウスでは、授乳期の OVA 投与の有無は皮膚反応の重症度に影響しなかった。脾細胞からのサイトカイン産生は、仔の週齢に関わらず群間に有意な差は認められなかった。以上のことから、本動物モデルにおいては授乳中に母親が摂取した抗原は母乳に移行し、仔の免疫応答に一過性の変化を誘導するが、成長後の仔のアレルギー発症に対して促進的にも抑制的にも影響を与えないことが明らかになった。

Allergy, DO11.10 mouse, Breast milk

講演番号：3B06p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ B 校舎 06 会場

エビアレルギー発症リスクと調理または鮮度との関係
Relationship between a shrimp allergy risk and cooking or freshness
○臼井 将勝[1]、西大 杏里[1]、五十嵐 真璃亜[1]、高場 穂那実[1]、安本 信哉[2]、近藤 昌和[2]、宮崎 泰幸[1]、花岡 研一[1]([1]水大校食品科学、[2]水大校生物生産)
○ Masakatsu USUI[1], Anri NISHIDAI[1], Maria IKARASHI[1], Honami TAKABA[1], Shinya YASUMOTO[2], Masakazu KONDO[2], Taiko MIYASAKI[1], Ken'ichi HANAOKA[1] ([1]Fisheries Univ. food science, [2]Fisheries Univ. Aquabiology)

【目的】食品衛生法にてアレルギー表示が義務づけられているエビの主要アレルゲンはトロポミオシンであり，分子レベルでは諸性質が明らかにされている。他方で食品レベルでの研究，すなわち調理・加工や鮮度とアレルギーリスクとの関連についての報告例は少ない。そこで本研究では，抗原性を有するトロポミオシン量が，調理方法または鮮度によって増減するか否かを明らかにすることを目的とし，クルマエビをモデルとして数種の条件下で抽出・定量を行った。さらに，口腔や食道・胃などの未消化抗原への暴露リスクと食品全体での抗原量を想定した異なる 2 種類の抽出方法によるエビアレルギー発症リスクについて検討した。
【方法】食品モデルとしてクルマエビの可食部を使用して実験を行った。調理による摂取抗原量変化については，生，茹で，焼き，蒸しの 4 条件で検討した。各エビは活エビを－80℃で保存したものを解凍して用いた。茹でエビは，1 尾ごとに 50 ml のイオン交換水中にて 100℃で 5 分間茹でたものを使用した。焼きエビは，180℃で 5 分間加熱したものを使用した。蒸しエビは，沸騰浴上で 5 分間蒸したものを使用した。鮮度低下による抗原量変化は活クルマエビを断頭処理直後（殻付き）のもの，4℃で 24 時間保存，4℃で 72 時間保存，－80℃で冷凍後解凍，25℃で 24 時間保存の 5 条件で検討した。未消化抗原への暴露リスクの評価は，Phosphate buffered saline を使用し（生理的抽出法），食品全体での抗原量の測定は，FA テスト 抽出用試薬「ニッスイ」を使用した（総タンパク質抽出法）。各サンプルは破砕後，エビ重量の 20 倍量の抽出溶液を加えて，生理的抽出法では 37℃で 1 時間，総タンパク質抽出法では 25℃で 20 時間振とうした後，遠心分離した上清を回収した。各抽出液中のタンパク質抽出状態は SDS-PAGE および吸光度測定で確認した。トロポミオシンの定量は ELISA キット（FA テスト EIA - 甲殻類「ニッスイ」）を使用して行った。得られた測定値に対し，T 検定を行い各条件間の有意差を求めた。
【結果】トロポミオシンの定量の結果，加熱調理エビの生理的抽出では，生エビに対し茹エビ，焼きエビ，蒸しエビのトロポミオシン抽出量が有意に上回った。しかし，総タンパク質抽出では同様の差は確認できなかった。これらの結果より，食品レベルでは加熱調理による筋肉繊維形成タンパク質の変性等によってトロポミオシンの遊離が容易になることが予想された。しかし，いずれの摂食条件においても表示義務をはるかに上回る濃度のエビトロポミオシンが検出された。また，活エビと腐敗したエビの間にもおいてもトロポミオシン抽出量に有意な差は見られなかった。

shrimp allergy, cooking, freshness

講演番号：3B06p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ B 校舎 06 会場

赤シソからの新規 I 型アレルギー抑制因子の単離・同定

Identification of a novel type1 allergy inhibitory factor from *Perilla frutescens*

○亀井 力哉[1]、河本 正次[1]、荒川 賢治[1]、平川 規子[2]、馬場 堅治[2]、小埜 和久[1,3]([1]広島大院先端、[2]三島食品株式会社研究所、[3]広島工大生命)
○Rikiya Kamei[1], Seiji Kawamoto[1], Kenji Arakawa[1], Noriko Hirakawa[2], Kenji Baba[2], Kazuhisa Ono[1,3] ([1]Hiroshima Univ., [2]Mishima Foods Co.,Ltd., [3]Hiroshima Institute of Technology)

【目的】我々は漢方にて抗炎症薬としても用いられるシソ（*Perilla frutescens*）に着目し、そのアトピー疾患に対する予防効果を報告してきた。本研究では、赤シソの I 型アレルギー抑制作用を担う新規の活性本体を単離・同定することを目的とした。

【方法】赤シソ熱水抽出物を逆相 HPLC により分画し、ラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 からの IgE 依存的なヒスタミン遊離を抑制する因子を単離・精製した。本因子の分子量と組成式を ESI-MS 分析により求めると共に、その構造を ^{1}H-および ^{13}C-NMR 解析により決定した。また、本因子の *in vivo* におけるアレルギー予防効果をスギ花粉の腹腔内投与と経鼻感作を基調とした花粉症モデルマウスに対する経口投与試験により評価した。

【結果】まず、赤シソ熱水抽出物が RBL-2H3 細胞からの IgE 依存性脱顆粒反応を顕著に抑制することを確認した。この I 型アレルギー反応抑制因子の逆相 HPLC 上での挙動はシソ由来の既知抗アレルギー因子（ロズマリン酸、ルテオリン、アピゲニン、カフェ酸）のそれらとは異なっており、本活性本体が未同定の抗アレルギー物質であることが示唆された。本因子を単離・精製して構造解析に供したところ、8-hydroxy-5,7-dimethoxyflavanone（分子量 300.09、組成式 $C_{17}H_{16}O_5$）であることが判明した。本分子は上述のシソ由来既知抗アレルギー因子よりも強力なヒスタミン遊離抑制活性を示した。更に本分子をスギ花粉症モデルマウスに経口投与したところ、その病態進展が著明に緩和されることも明らかとなった。

Perilla frutescens, flavanone

講演番号：3B06p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ B 校舎 06 会場

ホウレンソウ由来フラボノイドの抗アレルギー作用の評価

Study on anti-allergic effects of flavonoids isolated from spinach

○森下 雄太[1]、小川 晃太朗[1]、熊石 朱純[1]、澤谷 一樹[2]、武藤 徳男[1] ([1]県広大院生命、[2]県広大生環)
○ Yuta MORISHITA[1], Kotaro OGAWA[1], Kasumi KUMAISHI[1], Kazuki SAWATANI[2], Norio MUTO[1] ([1]Pref. Univ. Hiroshima Grad. school, [2]Pref. Univ. Hiroshima)

【目的】花粉症に代表されるⅠ型アレルギーの罹患者数は増加しており、食による予防や改善の可能性が追究されている。これまでに我々は、ホウレンソウ（*Spinacia oleracea*）から強い脱顆粒抑制活性を示すフラボノイド（SO-1）を単離し、マウスの受動皮膚アナフィラキシー反応（PCA 反応）を抑制することを報告した。本研究では、SO-1 の抗アレルギー作用機序を明らかにするために、活性酸素によるカルシウムイオン流入の観点からのフラボノイドの抗酸化活性の関与について、および *in vivo* における炎症性メディエーターによる血管透過性亢進に対する影響について解析した、

【方法】脱顆粒抑制活性はラット好塩基球性白血病細胞 RBL-2H3 を用い、抗原抗体反応とカルシウムイオノフォア刺激による脱顆粒に対する抑制活性として評価した。抗酸化活性は DPPH ラジカル消去活性とスーパーオキシドアニオン消去活性を評価した。ヒスタミンまたはセロトニンによる血管透過性亢進に対する作用は、ICR マウスを用いて背部皮下での色素の血管外漏出量を評価した。すなわち、SO-1 とそのアグリコンを経口投与後、背部皮下にヒスタミンまたはセロトニンを投与し、エバンスブルーを尾静脈注射して色素漏出が生じた皮膚から抽出した色素量を評価した。

【結果】SO-1 は強い脱顆粒抑制活性を示したが、抗酸化活性は示さなかった。一方、そのアグリコンには脱顆粒抑制活性と抗酸化活性が共に認められた。アグリコンの脱顆粒抑制活性の IC_{50} 値は 1.5 μM であり、DPPH ラジカルおよびスーパーオキシドアニオン消去活性の IC_{50} 値はそれぞれ 29.2 μM および 44.9 μM であった。他のホウレンソウ由来フラボノイド（SO-2, SO-3）については、脱顆粒抑制活性と抗酸化活性共に弱かった。ホウレンソウ由来フラボノイドとルテオリン等の既知フラボノイドを比較すると、SO-1 は脱顆粒抑制活性を特に強く発揮する点が特徴であった。ヒスタミンまたはセロトニンによる血管透過性亢進に対しては、SO-1 およびそのアグリコンは共に顕著な色素漏出抑制活性を示した。SO-1 は 52 mg/kg で約 70%抑制し、アグリコンは 34 mg/kg で約 70%抑制した。以上の結果から、ホウレンソウ由来フラボノイドである SO-1 は、他のフラボノイドと比較して脱顆粒抑制作用が強く、その作用が抗酸化作用に因るものではないことが明らかになった。SO-1 とそのアグリコンは、炎症性メディエーターによる血管透過性亢進を顕著に抑制したことから、抗アレルギー効果と抗炎症効果も合わせて有する有用な物質であることが示唆された。

Spinacia oleracea, flavonoid, allergy

講演番号：3B06p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ B 校舎 06 会場

ノビレチンの抗アレルギー作用に関する研究

Studies on the suppressive effect of nobiletin on degranulation.

○安永 翔[1]、大西 紗与[1]、西 甲介[1]、門田 歩[2]、菅原 卓也[1] ([1]愛媛大・農、[2]伊方サービス(株))
○Sho YASUNAGA[1], Sayo ONISHI[1], Kosuke NISHI[1], Ayumu KADOTA[2], Takuya SUGAHARA[1] ([1]Ehime Univ., [2]Ikata Service Co.)

［目的］柑橘類に含まれるポリメトキシフラボノイドの一種であるノビレチンは、抗炎症作用や抗がん作用などの生理機能を持つことが明らかにされている。好塩基球に対する脱顆粒抑制による抗アレルギー作用についても報告はあるものの、詳細な作用機序は解明されていない。本研究では、ノビレチンによる脱顆粒抑制効果とその作用機構の解明を行い、抗アレルギー効果を有する機能性食品素材としての可能性を評価することを目的とした。
［方法］ラット好塩基球性白血病細胞株(RBL-2H3 細胞)、およびマウス骨髄由来初代マスト細胞(BMMC)を用いて、抗原抗体反応により細胞外に放出されたβ-ヘキソサミニダーゼの活性を指標に脱顆粒抑制作用を評価した。細胞内カルシウムイオン濃度は Fluo 3-AM を用いて測定した。脱顆粒シグナル伝達系への影響はウェスタンブロット法により解析した。PI3 キナーゼ活性は、リコンビナント PI3 キナーゼと基質（PIP_2）をインキュベートし、反応生成物（PIP_3）を ELISA で定量することで測定した。生体内における作用の解析として、受動皮膚アナフィラキシー（PCA）モデルマウスに対するノビレチン経口投与の影響を評価した。また、スギ花粉アレルゲン(Cry j1)を鼻腔内投与することで花粉症を誘導した BALB/c マウスに対する温州みかん果皮の経口投与による症状緩和効果を評価した。
［結果］ノビレチンを RBL-2H3 細胞、および BMMC に作用させたところ、いずれの細胞に対しても抗原誘導性の脱顆粒を抑制した。また、細胞内カルシウムイオン濃度を測定したところ、ノビレチンによる細胞質内へのカルシウムイオン流入の阻害が認められた。脱顆粒シグナル伝達系へのノビレチンの影響を検討した結果、PI3 キナーゼとその下流に位置する Akt のリン酸化がノビレチンの作用によって抑制されることが確認された。また、PI3 キナーゼ酵素活性に対するノビレチンの影響を検討したところ、ノビレチンは PI3 キナーゼ酵素活性には影響しないことが明らかになった。これらのことから、ノビレチンは脱顆粒シグナル伝達系において、リン酸化による PI3 キナーゼの活性化を阻害することで抗原刺激による細胞内へのカルシウムイオン流入を下方制御し、脱顆粒を抑制することが示唆された。PCA モデルマウスにおける血管透過性亢進がノビレチンの投与によって有意に抑制されたことから、生体内における脱顆粒抑制効果が確認された。また、ノビレチンを含有する食品素材の有用性を評価するため、スギ花粉症モデルマウスに温州みかん果皮を経口投与することで症状緩和効果を検証した。その結果、Cry j1 感作後のくしゃみの回数が温州みかん果皮投与群で減少し、アレルギー症状の軽減が確認された。

Nobiletin, anti-allergic activity, degranulation

講演番号：3B06p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ B 校舎 06 会場

褐藻類アカモク由来クロロフィル c2 の脱顆粒抑制作用に関する研究

Inhibitory effect of *Sargassum horneri* extract containing chlorophyll c2 on degranulation of RBL-2H3 cells

○石田 萌子[1]、吉岡 久史[2]、鎌田 彰[2]、小西 達也[2]、高橋 潤[3]、織田 浩司[2]、玉井 忠和[2]、豊原 治彦[3]、菅原 卓也[1] ([1]愛媛大学・農、[2]（株）マルハニチロ、[3]京都大院・農)
○ Momoko ISHIDA[1], Hisashi YOSHIOKA[2], Akira KAMATA[2], Tatsuya KONISHI[2], Jun TAKAHASHI[3], Hiroshi ODA[2], Tadakazu TAMAI[2], Haruhiko TOYOHARA[3], Takuya SUGAHARA[1] ([1]Ehime Univ., [2]Maruha Nichiro Holdings, [3]Kyoto Univ.)

[目的]食経験を有する海藻類の中から、アレルギー抑制作用を有する新規な機能性食品素材を開発する。
[方法] 我々が構築してきた海産物エキスライブラリーを対象に、食経験を有する海藻類を選択し、ラット好塩基球由来 RBL-2H3 細胞株に対する脱顆粒抑制活性を評価した。活性が認められた褐藻類アカモクの 80%エタノール抽出エキス(以降、アカモク抽出エキス)について、1-ブタノール/水、90%メタノール水溶液/ヘキサンを用いた液/液分配及びシリカゲルカラム、HPLC 分取により活性成分を精製し、質量分析等によって活性物質を同定した。作用メカニズム解明のため、Fluo3 カルシウム測定キット(Dojindo 社製)を用いて細胞内 Ca^{2+}濃度を測定すると共に、ウエスタンブロット法を用いて、脱顆粒反応のシグナル伝達経路内の酵素のリン酸化レベルを評価した。更に、アカモク抽出エキスを約 4 週間自由摂取させたオス C57BL/6 マウスをジニトロフェニル(DNP)特異的 IgE で感作させた後、DNP-ヒト血清アルブミン(DNP-HSA)を点鼻投与して炎症を惹起させ、一時間当たりの鼻掻き回数を計測することで生体内における症状緩和効果を評価した。
[結果]脱顆粒抑制活性によるスクリーニングから、褐藻類アカモクに強い活性が認められた。そこで、本活性を指標に分画精製した後、構造解析を行ったところ、活性物質として褐藻類に特徴的に含まれる色素成分であるクロロフィル c2 が同定された。アカモク抽出エキスの抑制メカニズムを解明するため、まず、脱顆粒反応のシグナル伝達経路の中で重要な役割を示す細胞内 Ca^{2+}濃度に及ぼす影響を検討した。その結果、抗原抗体反応により誘導される細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇が抑制された。また、脱顆粒シグナルの上流に位置する Syk や PI3K のリン酸化レベルの低下が確認され、アカモク抽出エキスは Syk や PI3K のリン酸化を下方制御することで細胞内への Ca^{2+}流入を阻害して脱顆粒反応を抑制することが示唆された。更に、アレルギー性鼻炎モデルマウスにおいても、アカモク抽出エキスは鼻掻き回数を有意に抑制し、生体内においてもアレルギー抑制作用を示すことが明らかになった。本研究により、クロロフィル類の中でも褐藻類に特徴的に含まれるクロロフィル c2 はアレルギー抑制作用を有する機能性食品素材として有用である可能性が考えられた。

chlorophyll c2, *Sargassum horneri*, degranulation

講演番号：3B06p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ B 校舎 06 会場

スフィンゴミエリンの蓄積を介したシフォナキサンチンの脱顆粒抑制作用
Suppressive effect of siphonaxanthin on antigen-induced mast cell degranulation via a stimulation of sphingomyelin synthesis
○真鍋 祐樹[1]、平田 孝[1,2]、菅原 達也[1] ([1]京大院農、[2]四条畷学園大)
○Yuki MANABE[1], Takashi HIRATA[1,2], Tatsuya SUGAWARA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Shijonawate Gakuen Univ.)

【目的】マスト細胞の脱顆粒反応はⅠ型アレルギーの主要な炎症反応であり、これを抑制することによって効果的にアレルギー症状を軽減できると考えられている。これまでに演者らは脱顆粒抑制作用を有する海洋生物由来カロテノイドの探索を行い、緑藻由来のシフォナキサンチンが強い抑制活性を有することを見出した。またいくつかのカロテノイドが高親和性 IgE 受容体の脂質ラフトへの移行を抑制することも見出しており(1)、シフォナキサンチンが脂質ラフトの機能に何らかの影響を与えることが推測された。そこで本研究では細胞内のスフィンゴ脂質量の変動に注目し、シフォナキサンチンの脱顆粒抑制作用メカニズムの解明を試みた。
【方法】緑藻の一種であるミルから有機溶媒を用いて脂溶性成分を抽出し、HPLC を用いてシフォナキサンチンを精製した。ラット好塩基球性白血病細胞株 RBL-2H3 をマスト細胞のモデルとして用い、抗原刺激後の培地のβ-ヘキソサミニダーゼ活性を測定することによって脱顆粒反応を評価した。また蛍光免疫染色法を用いて高親和性 IgE 受容体と脂質ラフトの局在を可視化した。シフォナキサンチン処理後の細胞から Bligh-Dyer 法を用いて脂質を抽出し、HPTLC を用いてグリセロリン脂質量とコレステロール量を評価した。さらに LC-MS を用いて細胞内のスフィンゴ脂質組成を解析した。RBL-2H3 細胞によるスフィンゴミエリンの代謝は、蛍光標識したセラミドあるいはスフィンゴミエリンを細胞に取り込ませ、一定時間後の代謝産物量を測定することによって評価した。
【結果】シフォナキサンチンは抗原刺激によって誘導される高親和性 IgE 受容体の脂質ラフトへの移行と脱顆粒反応を抑制した。またシフォナキサンチン処理は細胞内のスフィンゴミエリン量を有意に増加させたが、グリセロリン脂質やコレステロール、セラミド、セラミドモノヘキソシド量には影響を与えなかった。RBL-2H3 細胞のスフィンゴミエリン代謝を調べたところ、シフォナキサンチンはスフィンゴミエリンの分解を抑制し、合成を促進することが見出された。さらにスフィンゴミエリン合成酵素阻害剤の存在下では、シフォナキサンチンの脱顆粒抑制作用が減弱されることがわかった。以上の結果より、シフォナキサンチンは細胞内のスフィンゴミエリン量を増加させ、高親和性 IgE 受容体の脂質ラフトへの移行を抑制することによって、抗原刺激に伴う脱顆粒反応を抑制すると考えられた。

(1) *J. Biol. Chem.*, 281, 28172-28179 (2009)

Carotenoid, Mast cell, Sphingomyelin

講演番号：3B06p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ B 校舎 06 会場

茶葉成分ストリクチニンは IL-4 受容体 a に結合するとともに IgE 産生経路を阻害する
IL-4 receptor a is a cell surface target molecule of strictinin to inhibit IL-4-induced signal transduction

○金 允喜[1]、藤村 由紀[2]、二宮 悠[1]、中山 和子[1]、山田 耕路[1]、立花 宏文[1,2,3,4] ([1]九州大院農、[2]九大レドックスナビ、[3]九大バイオアーク、[4]九大食品機能デザイン)
○ Yoonhee Kim[1], Yoshinori Fujimura[2], Yu Ninomiya[1], Kazuko Nakayama[1], Koji Yamada[1], Hirofumi Tachibana[1,2,3,4] ([1]Kyushu Univ., [2]ICMRN, Kyushu Univ., [3]Bio-Architecture Center, Kyushu Univ., [4]Food Functional Design Research Center, Kyushu Univ.)

【背景・目的】食物アレルギーやスギ花粉症などの I 型アレルギーの発症には過剰な免疫グロブリン E (IgE) 産生を伴うことから IgE の産生を抑制する食品成分には抗アレルギー作用が期待できる。我々はこれまでに、ポリフェノールの一種である茶葉成分ストリクチニンを経口投与することにより、抗原感作したマウスの抗原特異的な IgE 産生が抑制されること、また、B 細胞における IgE 産生の指標となる IL-4 誘導性 STAT6 の活性化とε germline transcript (εGT)の 発現を抑制することを見出した[1)]。しかしながら、その抑制機序の詳細は不明であった。そこで本研究では、ストリクチニンの IL-4 誘導性 IgE 産生抑制機構について検討した。
【方法・結果】ヒト成熟 B 細胞株 DND39 細胞をストリクチニンもしくは緑茶カテキンの一種である epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) で前処理した後、IL-4 誘導性εGT の発現誘導転写因子である STAT6 のリン酸化を検討した。その結果、ストリクチニンは IL-4 誘導性の STAT6 の活性化を阻害したのに対し、EGCG には阻害活性が見られなかった。また、ストリクチニンは IL-4 シグナル伝達に担う IL-4 受容体α鎖 (IL-4Rα)ならび janus kinase (JAK) 3 の活性化を阻害した。一方、これらポリフェノールは細胞表面に結合することが surface plasmon resonance (SPR) 法を用いた検討から明らかになった。そこで、ショ糖密度勾配遠心により細胞膜のラフトおよび非ラフト画分を調製し、各画分中のストリクチニンならびに EGCG を ECD-HPLC 法により検討した。その結果、EGCG は主にラフト領域に局在するのに対してストリクチニンは非ラフト領域に局在することを見出した。さらに、IL-4Rαおよび JAK3 もストリクチニンと同様に非ラフト領域に局在していた。ストリクチニンの IL-4Rαへの結合性を SPR 法により検討した結果、ストリクチニンは IL-4Rαに対し結合 (K_D = 4.53 μM) することが示された。
【結論】ストリクチニンは細胞膜の非ラフト領域に局在する IL-4Rα鎖へ結合することとともに IL-4 シグナルを阻害することが示された。

1) Tachibana H. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 208, 53 (2001)

Strictinin, IL-4Ra, non-raft domain

講演番号：3B06p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ B 校舎 06 会場

マンゴーエタノール抽出物の IgE 産生抑制活性に関する研究

Studies on IgE production suppressive effect of mango ethanol extracts.

○佐々木 智子[1]、近藤 倫世[1]、西 甲介[1]、玉元 武司[2]、菅原 卓也[1] ([1]愛媛大・農、[2]オキナワ宮古市場)
○ Tomoko SASAKI[1], Michiyo KONDO[1], Kosuke NISHI[1], Takeshi TAMAMOTO[2], Takuya SUGAHARA[1] ([1]Ehime Univ., [2]OKINAWA ICHIBA)

［目的］現代において、花粉症等のⅠ型アレルギー疾患の患者数の増加は社会問題化している。Ⅰ型アレルギーの発症には IgE が関与している。我々はマンゴーの保健機能に着目して検討を重ねた結果、マンゴーのエタノール抽出物に IgE 産生抑制効果があることを見出した。そこで本研究では、マンゴーのエタノール抽出物の IgE 産生抑制効果とその作用メカニズムの解明を目的とした。
[方法]完熟しても果皮が緑色のままであるキーツ種マンゴーの果肉に蒸留水を加え、ペースト化したのち、26,000x*g* で 20 分間遠心し沈殿を回収した。沈殿に 100% エタノールを加え、4℃で 12 時間攪拌した後、26,000x*g*、20 分間の遠心で上澄みを回収し、試験サンプルとした。サンプル添加した培地でヒト骨髄腫細胞株 U266 細胞を培養し、培地中に産生された IgE 量を酵素抗体法(ELISA)により定量することで IgE 産生抑制効果を評価した。BALB/c マウス由来の初代脾臓リンパ球にサンプルを作用させた後、培地中に産生された抗体、及びサイトカイン量を定量した。
［結果］U266 細胞に対する IgE 産生抑制活性を検討したところ、マンゴー果肉のエタノール抽出物は細胞の生存率に影響することなく IgE 産生を濃度依存的に抑制することが確認された。リアルタイム RT-PCR の結果から、マンゴー果肉エタノール抽出物は、IgE をコードする mRNA の転写レベルを低下させることにより、IgE 産生を抑制していることが確認された。次に、BALB/c マウスから単離した脾臓由来のリンパ球の各種免疫グロブリン産生量に及ぼす影響を検討したところ、IgE 産生が抑制されることが明らかになった。サイトカイン産生に及ぼす影響を検討したところ、マンゴー果肉エタノール抽出物は脾臓リンパ球のインターロイキン 4（IL-4）産生を抑制し、インターフェロンγ（IFN-γ）産生を促進することが明らかとなった。これらのことから、マンゴー果肉エタノール抽出物は、Th2 免疫応答を抑制し、Th1 免疫応答を活性化することが推察された。活性物質の推定を目的として、マンゴーに特徴的なポリフェノールであり、脂肪蓄積抑制効果などが知られているマンギフェリンの IgE 産生抑制活性を評価したところ、マンギフェリンは U266 細胞の IgE 産生を抑制することが明らかとなった。また、マンギフェリンを多く含むマンゴー果皮のエタノール抽出物にも IgE 産生抑制活性が認められたことから、マンゴーの果肉や果皮に含まれる抗アレルギー物質はマンギフェリンである可能性が推察された。しかし、マンゴー果肉エタノール抽出物を UPLC で解析した結果、抽出物にはマンギフェリンは殆ど含まれていないことが確認され、マンギフェリン以外の活性物質の存在が示唆された。

immunoglobulin E, mango, anti-allergic activity

講演番号：3B06p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ B 校舎 06 会場

じゃがいも皮抽出物の経口投与によるマウスパイエル板細胞のサイトカイン産生への影響

Oral administration of potato peel extracts affects cytokine production in murine Peyer's patch cells

○須藤 麻里[1]、加藤 卓[2]、入澤 恵[2]、市澤 恵[1]、石原 克之[1]、平林 真一[1]、古賀 秀徳[1]、佐久間 塁[1]、伏谷 眞二[2]、高野 文英[2] ([1]カルビー（株)、[2]日薬大薬学)

○ Mari SUTO[1], Suguru KATO[2], Megumi IRISAWA[2], Megumi ICHISAWA[1], Katsuyuki ISHIHARA[1], Shinichi HIRABAYASHI[1], Hidenori KOGA[1], Rui SAKUMA[1], Shinji FUSHIYA[2], Fumihide TAKANO[2] ([1]CALBEE, Inc., [2]Nihon Pharmaceutical Univ.)

【目的】

じゃがいもは世界の五大食用作物のひとつに数えられており、その塊茎にはビタミン C、ビタミン B 群、カリウム、クロロゲン酸など様々な栄養成分や機能性成分が含まれている。しかし、収穫後に畑に残される植物体や加工工場から大量に排出される塊茎の皮などの残渣はこれまで利用されていなかった。そこで、これらの残渣についても「未利用資源」として新規機能性成分の探索を進めている。今回は塊茎の皮に着目し、皮エタノール抽出物をマウスへ経口投与して、小腸パイエル板細胞の各種サイトカイン産生への影響について検討した。

【方法】

凍結乾燥後、粉砕した塊茎の皮より、70%エタノールまたは 100%エタノールで抽出し、濃縮・乾固したものを、それぞれ皮 70%EtOH 抽出物、皮 100%EtOH 抽出物とした。動物飼育室に搬入後、2 週間馴化飼育した C3H/HeN マウス（♂、7 週齢）に皮抽出物を 100mg/kg/day、3 日間胃ゾンデ投与した。コントロールのマウスには同量の蒸留水を投与した。4 日目にマウスから小腸を摘出し、パイエル板を採取した。これらを 1.3mg/mL のコラゲナーゼを含む RPMI-1640 培地（5% FCS）で 37℃、1 時間処理し、メッシュろ過後、培地で 2 回洗浄することによりパイエル板細胞懸濁液を調製した。この懸濁液の細胞濃度を 2×10^6 cells/mL に調整し、1 ml ずつ 24 穴平底プレートに播種した。これに終濃度 50 μg/mL になるように Concanavalin A（ConA）を添加して 96 時間培養した。48、72、および 96 時間後に回収した培養液上清中の各種サイトカイン濃度を ELISA 法により定量した。

【結果】

まず、IL-2 産生と IL-17 産生への影響について検討した。ConA 刺激によりパイエル板細胞からの IL-2 や IL-17 の産生量は無刺激に比べ大幅に増加した。ConA 刺激下での IL-2 産生量は皮 70%EtOH 抽出物や皮 100%EtOH 抽出物の投与によりコントロールに比べて有意に増加した。一方、IL-17 産生量はどちらも抑制された。よって、じゃがいも塊茎の皮には小腸パイエル板を介して腸管免疫系に作用する成分が含まれている可能性が示唆された。現在、他のサイトカイン産生への影響についても検討を進めている。

potato peel, cytokine, Peyer's patch

講演番号：3B06p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ B 校舎 06 会場

褐藻サガラメ由来フロロタンニンの免疫調節作用

The immunomodulating effects of phlorotannins from *Eisenia arborea*, a brown alga

○杉浦 義正、田中 竜介、松下 映夫、宮田 昌明（水大校 食品科学）
○Yoshimasa SUGIURA, Ryusuke TANAKA, Teruo MATSUSHITA, Masaaki MIYATA (Natl. Fish. Univ.)

【目的】褐藻サガラメは「刻みアラメ」等の原料として三重県伊勢・志摩地区で古来より食品利用されている。これまでに、アレルギーモデルラットを用いた抗アレルギー性評価により、サガラメ乾燥粉末は免疫調節作用（抗アレルギー）を有することが分かっている [1)]。また、in vitro 試験で海藻ポリフェノール（フロロタンニン）が有効成分であることも突き止めている [2, 3)]。しかし、フロロタンニンが in vivo 実験でも抗アレルギー性を示すかどうか明らかにしていないので、本研究では、フロロタンニンが実験動物において、免疫調節による抗アレルギー作用を示すかどうか検討した。
【方法】BALB/c マウス（メス、4 週齢）を陰性対照群、陽性対照群および試験群に区分けした（各群 n = 6）。試験群には、サガラメからクロロフォルム／メタノール抽出して調製したフロロタンニン濃縮物を 21 日間経口投与（4.5 mg/day/body）し、各群とも 22 日目に全採血して血清を得た。アレルギー応答を誘発するため、経口投与試験開始 7 日目と 14 日目に、陽性対照群および試験群に卵白アルブミン（OVA）を腹腔内投与して免疫負荷した。免疫調節の指標として、各群の血清中の抗体レベル（IgG1, IgE, IgG2a）を ELISA 法により測定し、抗アレルギー性を評価した。
【結果】①OVA 特異的抗体量：BALB/c マウス血清中の Th2 型細胞活性化に起因する OVA 特異的 IgG1, IgE 量は試験群では陽性対照群に比べて、有意に低下していた。一方、Th1 型細胞活性化に起因する IgG2a 量は、陽性対照群と試験群で有意な変化はみられなかった。②総抗体量：測定した 3 種の抗体量（IgG1、IgE および IgG2a）全てが、陽性対照群に対して試験群で有意に低下していた。
【考察】今回のフロロタンニン濃縮物の投与量では、OVA 特異的および総抗体量いずれも、総じて低下する応答を示したので、この投与量のフロロタンニンは一様な Th1/Th2 バランス改善による作用ではなく、免疫抑制によるアレルギー応答抑制を示す可能性が示唆された。現在、低投与量（0.9 mg/day/body）での応答を検討し、合わせて、関連するサイトカイン（インターロイキン-4 やインターフェロン-γ 等）量等の指標についても確認中である。

1) Sugiura Y, et al., *Fish. Sci.*, **74**, 180-186 (2008). 2) Sugiura Y, et al., *Food Sci. Technol. Res.*, **13**, 54-60 (2007). 3) Sugiura Y, et al., *J. Funct. Foods*, **1**, 387-393 (2009).

Eisenia arborea , phlorotannin, anti-allergy

講演番号：3B06p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ B 校舎 06 会場

マウス好塩基球の IgG 依存性活性化マーカーの同定

Identification of a marker that indicates IgG-mediated basophil activation

○松原 毅、岩本 洋、中里 友紀、難波 和美、武田 安弘（森永乳業栄養科学研究所）
○Takeshi MATSUBARA, Hiroshi IWAMOTO, Yuki NAKAZATO, Kazuyoshi NAMBA, Yasuhiro TAKEDA (Nutritional Science Laboratory, Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

【背景と目的】　アレルゲンに対する感作状態を in vitro で評価した血中特異抗体価は、必ずしも個体のアレルギー症状と一致しない。一方、血中の感作好塩基球をアレルゲンで刺激した際の活性化マーカーの変化をフローサイトメトリー解析で評価する好塩基球活性化試験（BAT）は、生体反応に近い形で感作状態を評価できる検査法として、アレルギーの診療分野でも注目されている。マウスの場合、好塩基球は IgE あるいは IgG を介したアレルゲン刺激によって活性化されるが、これまでに IgG 依存性の活性化マーカーは知られていない。今回我々は IgG を介した好塩基球の活性化マーカーを新規に見出したので報告する。

【方法と結果】　β-LG を免疫感作した BALB/c マウスの末梢血をβ-LG と 2 時間培養後、CD49b と IgE、もしくは CD49b と CD200R3 を好塩基球マーカーに、CD200R1 を IgE 依存性活性化マーカーにそれぞれ用い、好塩基球の活性化を評価した。その結果、β-LG の添加により、好塩基球表面における CD200R1 の発現上昇と CD200R3 の発現低下が見られたが、両者の変動は必ずしも相関しなかった。

未感作 BALB/c マウスの末梢血を抗 IgE 抗体で刺激すると好塩基球上 CD200R1 の発現上昇が、抗 FcγRIII/II 抗体で刺激すると CD200R3 の発現低下が、それぞれ認められた。別途調製したマウス抗β-LG 血清で未感作マウス末梢血を受動感作し、β-LG で刺激すると CD200R1 の発現上昇と CD200R3 の発現低下が認められた。この際、受動感作に用いる抗血清中の IgE を不活化すると CD200R1 の発現上昇は抑制され、抗血清から IgG1 を除去すると CD200R3 の発現減少が消失した。

次に、牛乳アレルゲンを免疫感作したマウスを用いて BAT とアナフィラキシー惹起性の相関を検討した。マウスより末梢血を採取し、アレルゲン性の異なる育児用ミルク（通常の育児用ミルクまたは加水分解乳）で刺激して BAT を評価したうえで、マウスにこれらミルクを経静脈投与し、直腸温度の低下によりアナフィラキシーを評価した。その結果、ミルクのアレルゲン性に依存して好塩基球上の CD200R1 と CD200R3 の発現が変化し、アナフィラキシーが惹起された。アナフィラキシー惹起性は BAT の結果と同傾向を示し、特に CD200R3 の発現変化とよく相関した。

【結論】　好塩基球表面 CD200R3 の発現変化は、新規の IgG 依存性好塩基球活性化マーカーであることを見出した。CD200R3 の発現変化を CD200R1 と共に評価することで、アレルギー反応における IgE と IgG の役割を解析できると考えられる。

basophil activation test, IgG-mediated anaphylaxis, CD200R3

講演番号：3B06p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ B 校舎 06 会場

アトピー性皮膚炎の増悪化予防に寄与する北海道産果実由来脂肪酸の微生物選択的な抗菌活性
Selective antibacterial activity of fatty acids prepared from a fruit in Hokkaido that is useful for the prevention against atopic dermatitis aggravation

○永尾 寿浩[1]、川上 誠治[2]、遠藤 正弘[3]、板野 勝[2]、田中 重光[1]、倉田 淳志[4]、田中 小百合[4]、岸本 憲明[4]、中野 博文[1] ([1]阪市工研、[2]ジェミニ、[3]遠藤組、[4]近畿大院農)
○Toshihiro Nagao[1], Seiji Kawakami[2], Masahiro Endo[3], Masaru Itano[2], Shigemitsu Tanaka[1], Atsushi Kurata[4], Sayuri Tanaka[4], Noriaki Kishimoto[4], Hirofumi Nakano[1] ([1]OMTRI, [2]Gemini Corp., [3]Endo-gumi Corp., [4]Univ. of Kinki)

【目的】近年、アトピー性皮膚炎（AD と略する）の患者数は増加傾向にあり、20 歳以下の 10 人に 1 人が AD であると言われている。この AD は様々な要因で発症・増悪化するが、その増悪化の要因の 1 つとして、ヒトの皮膚に常在する *Staphylococcus aureus* と *Staphylococcus epidermidis* の微生物数の不均衡が知られている。健常者の皮膚では、全微生物数に占める *S. aureus* の平均比率が 1.1%、*S. epidermidis* の比率が 9.1%で、優勢となっている後者の分泌物および皮脂中の脂肪酸（6-*cis*-C16:1, パルミトオレイン酸）が *S. aureus* の増加を抑えている。一方、AD 患者の病理部では、*S. aureus* の比率が顕著に増加し（平均 65%）、この微生物の細胞表層タンパクが炎症悪化に関与し、更にこの微生物が各種感染症などの合併症を引き起こす。そこで、*S. aureus* を抑制し *S. epidermidis* を抑制しない微生物選択的な抗菌活性により、両微生物のバランスを正常な状態に保たせ、AD の増悪化および合併症を予防する手法の開発が期待されている。
【方法と結果】皮脂中の 6-*cis*-C16:1 は *S. aureus* に対する抗菌活性を持つが、天然油脂中に存在しない。そこで、これの代替素材として、限定的な天然油脂中に存在する 9-*cis*-C16:1（純度 99%）の、*S. aureus* NBRC13276 および *S. epidermidis* NBRC100911 に対する抗菌活性を評価した。その結果、pH7.0 では、*S. aureus* に対する最小発育阻止濃度（MIC）は 7.8 μg/mL、*S. epidermidis* に対する MIC は 15.6 μg/mL で、いずれの菌株に対しても抗菌活性が強く、微生物選択的な活性を示さなかった。しかし、弱酸性の pH6.0 では、9-*cis*-C16:1 の *S. aureus* に対する抗菌活性が 2 倍強くなり、*S. epidermidis* に対する抗菌活性が 16 倍弱くなり、微生物に対する選択性が大きく向上した。次に、天然素材の利用を目的として、9-*cis*-C16:1 の数少ない供給源であるマカデミアナッツ油（含量 22 wt%）を遊離脂肪酸に変換後、活性を測定したが、いずれの菌株に対しても抗菌活性が非常に弱かった（MIC, 1000 μg/mL）。原因を調べたところ、夾雑するオレイン酸（9-*cis*-C18:1, 含量 50 wt%）が、9-*cis*-C16:1 の抗菌活性を有意に阻害することが分かった。これに対して、北海道の少数の農園で栽培されているシーベリー（英名：Sea Buckthorn、学名：*Hippophae rhamnoides*）の果実に含まれる油脂（9-*cis*-C16:1, 40 wt%; 9-*cis*-C18:1, 10 wt%）から調製した遊離脂肪酸は、9-*cis*-C18:1 による抗菌活性の阻害が認められず、*S. aureus* に対して抗菌活性が強く、*S. epidermidis* に対して抗菌活性が非常に弱く、微生物選択的な抗菌活性を示すことが分かった。この果実由来の遊離脂肪酸素材は、AD の増悪化および合併症の予防に寄与する医薬・化粧品の原料として、今後の更なる研究が期待された。

antibacterial activity, atopic dermatitis, *Staphylococcus aureus*

講演番号：3B06p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ B 校舎 06 会場

TCR トランスジェニックマウスを用いた食物アレルギーモデルにおける Th2 型皮膚炎の解析
Analysis of Th2-dependent skin inflammation in a food allergic model using TCR transgenic mice.
○平出 恵利華[1,2]、足立（中嶋） はるよ[2]、北村 紀子[3]、上滝 隆太郎[1,2]、武山 純[1,2]、佐伯 真弓[3]、西村 友枝[3]、神沼 修[3]、廣井 隆親[3]、八村 敏志[1,2]（[1]東大院農生科・応生化、[2]東大院農生科・食の安全研セ、[3]東京都医学総合研・花粉症プロ）
○Erika HIRAIDE[1,2], Haruyo NAKAJIMA-ADACHI[2], Noriko KITAMURA[3], Ryutaro KOTAKI[1,2], Jun TAKEYAMA[1,2], Mayumi SAEKI[3], Tomoe NISHIMURA[3], Osamu KAMINUMA[3], Takachika HIROI[3], Satoshi HACHIMURA[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [2]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [3]Pollen Allergy Proj., Tokyo Metropol. Inst. Med. Sci.)

[目的] OVA23-3 マウスは卵白アルブミン(OVA)の 323-339 残基に特異的な T 細胞抗原レセプター(TCR)を発現するトランスジェニックマウスである。この OVA23-3 マウスは卵白含有飼料（EW）の自由摂取のみで、Th2 サイトカインの産生、体重減少、IgE 抗体価の上昇、および腸炎症が誘導される食物アレルギーモデルである。我々は、これまでに OVA23-3 マウスが卵白食の投与に伴い皮膚炎を発症するモデルであるかも検討してきた。食物アレルギーの臨床症状では、皮膚炎症が最も多いとされているため、食物抗原の摂取に伴い皮膚炎が誘導されるモデルマウスの開発は、食物アレルギー性皮膚炎のメカニズム解析に役立つと考えられる。今回は皮膚炎誘導時の腸間膜リンパ節（MLN）および皮膚所属リンパ節（DLN）における $CD4^+$T 細胞の増殖応答やサイトカイン産生量について報告する。

[方法] 皮膚炎を誘導するためにOVA23-3マウスにEWまたは標準食であるCE-2を1週間与えた後、OVAまたはPBSを浸み込ませた脱脂綿をマウスの背中の皮膚に48時間接触させた。その後、接触部位を摘出し、サイトカインmRNAの測定、HE染色等の組織解析を行った。また、MLNおよびDLN中の$CD4^+$T細胞の増殖応答、サイトカイン産生量を解析した。

[結果] EWを摂取させOVAを皮膚接触させたEW/OVA群では、皮膚組織中のTh2サイトカインmRNA発現が他群に比べ高かった。一方、標準食で飼育し、OVAを皮膚接触させたCE-2/OVA群ではIFN-γの発現が高かった。皮膚組織解析では、OVAを皮膚接触させたEW/OVAおよびCE-2/OVAで細胞の浸潤が認められた。EW/OVA群ではCE-2/OVA群より細胞浸潤が促進されており、特に好酸球の浸潤が顕著であった。さらに、EW/OVA群のMLNおよびDLNの$CD4^+$T細胞の解析を行ったが、他群と比較して増殖応答の上昇や、IL-4産生量の増加は認められなかった。以上の結果から、卵白食摂取がEW/OVA群において好酸球の浸潤を伴うTh2型の皮膚炎を促進したが、MLNやDLNといった所属リンパ節では必ずしもTh2優位な応答が誘導されていないことが示唆された。

food allergy, skin inflammation

講演番号：3B06p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ B 校舎 06 会場

高圧下酵素処理した低アレルゲン化β-ラクトグロブリンで誘導されるアナフィラキシーの評価

Anaphylaxis induced by hypoallergenic ß-lactoglobulin digested under high hydrostatic pressure

○藤原 麻美、楯岡 潤、勝俣 雅之、東 徳洋、山田 潔 (宇都宮大農)
○Asami FUJIWARA, Jun TATEOKA, Masayuki KATSUMATA, Norihiro AZUMA, Kiyoshi YAMADA (Utsunomiya Univ.)

【目的】β-ラクトグロブリン（β-LG）は主要な牛乳アレルゲンである。これまでに、高圧下でタンパク質分解酵素の処理を行うことによる様々なアレルゲンタンパク質の低アレルゲン化が報告されているが、β-LG における手法は確立されていない。昨年度の大会で、高圧下ペプシン処理することによりβ-LG で誘導される皮膚アナフィラキシーが低下することを報告した。本研究では、異なる条件下で高圧下ペプシン処理したβ-LG で誘導される皮膚および全身性アナフィラキシーを評価した。
【方法】β-LG 水溶液（10 mg/ml）にペプシン（酵素：基質＝1：100）を添加し、400 MPa または 600 MPa の高圧下で 10 分間処理した。それぞれの条件で処理したβ-LG を C8 カラム（Xbridge）を用いて逆相 HPLC で解析した。これらのβ-LG のアレルゲン性試験は次のように行った。BALB/c マウス（6 週齢、メス）を用い、2 週間ごとに 1 回 50 μg のβ-LG を Alum アジュバントと共に腹腔内に 2 回注射した。最初の Alum 免疫から 1 ヶ月後に、β-LG を腹腔内投与することにより全身性アナフィラキシーの誘導を行った。また、同様に免疫したマウスを用いて、最初の Alum 免疫から 2 ヶ月後に皮膚アナフィラキシーの誘導を行った。皮膚アナフィラキシーは、Alum 免疫を行ったマウスの背部皮内にβ-LG を注射することで誘導し、尾静脈からエバンスブルーを投与することで確認した。30 分後に皮膚を切除し、*N,N*-ジメチルホルムアミドを使用して皮内漏出した色素を抽出し、定量した。
【結果】逆相 HPLC 解析の結果、10 分間の高圧下ペプシン処理では 400 MPa と 600 MPa との間で未分解のβ-LG の残存量に違いは認められなかった。一方、クロマトグラムパターンの違いから、これらの処理で生成したペプチド断片は異なることが示唆された。Alum アジュバントで免疫したマウスの腹腔内へβ-LG を投与したときに誘導される全身性アナフィラキシーを直腸温の低下を指標に評価した結果、400 MPa 及び 600 MPa で処理したいずれのβ-LG によっても直腸温の低下は認められなかった。一方、未処理のβ-LG の投与では顕著に直腸温が低下した。また、これらのβ-LG で誘導した皮膚アナフィラキシーの強度を比較した結果、未処理のβ-LG では強いエバンスブルーの皮内漏出が認められたのに対し、400 MPa 及び 600 MPa で処理したいずれのβ-LG によっても漏出が減少し、アレルゲン性の低下が認められた。これらの結果から、400 MPa 及び 600 MPa で 10 分間の高圧下ペプシン処理することにより、本研究で用いたいずれのアナフィラキシー誘導モデルにおいても、β-LG が低アレルゲン化されていることが示唆された。

food allergy, anaphylaxis, hypoallergenic food

講演番号：3B06p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ B 校舎 06 会場

接触過敏症モデル動物実験系における大豆の効果

Soybeans reduce dinitorofluorobenzene-induced contact hypersensitivity in mice

○長野 隆男[1]、烏 烏日娜[1]、米元 博子[2]、津村 和伸[2] ([1]川崎医福大臨床栄養、[2]不二製油)
○Takao Nagano[1], Wurina Wu[1], Hiroko Yano-Yonemoto[2], Kazunobu Tsumura[2] ([1]Kawasaki Univ. Med. Welfare, [2]Fuji Oil Co.)

【目的】マウスを用いた接触過敏症モデル動物実験系は，ヒトでの接触性皮膚炎のよいモデル動物実験系と考えられている．昨年度に我々は，このモデル動物実験系を用いてザクロジュース由来ポリフェノール濃縮物に効果があることを見出した．さらに，その実験で使用した MF 飼料には，大豆が原材料として使用されていることから，飼料中の大豆に接触過敏症抑制効果があることが考えられる．そこで本研究では，大豆を原材料に使用していない F2PLD1 飼料を使用して，MF 飼料の接触過敏症抑制効果について検討をおこなった．

【方法】6 週齢雄 BALB/c マウスを用い，非感作コントロール（C）群，F2PLD1 飼料(F2)群，MF 飼料(MF)群の 3 群（各群 n=5）で実験をおこなった．まず，実験 0 日目と 1 日目に，マウスの腹部に 0.5% dinitrofluorobenzene（DNFB）で感作をおこなった．実験 5 日目，12 日目，19 日目に 0.15%DNFB を耳介にチャレンジした．チャレンジした 24 時間後に，耳介の厚みをマイクロメーターで測定することによって，接触過敏症の程度を評価した．マウス耳介組織の観察は，まず，実験 21 日目に耳介を採取した後，4%パラホルムアルデヒドで一晩固定した．固定した組織をパラフィン包埋してから切片を作製し，HE 染色，PAS 染色と免疫組織化学（IHC）染色をおこなった．IHC 染色には，抗 Gr-1 抗体と MHC classⅡ抗体を用いた．

【結果】F2PLD1 飼料と MF 飼料に含まれる大豆イソフラボンの量を測定したところ，大豆イソフラボンは，F2PLD1 飼料では検出されず，MF 飼料では 51.2mg/100ｇ検出された．合計 3 回のチャレンジをおこない，24 時間後に耳介の腫れを測定した.その結果，3 回すべてのチャレンジにおいて，C 群と比較して，F2 群と MF 群で耳介の腫れの増悪が観察された.2 回目と 3 回目のチャレンジで，MF 群では，F2 群と比較して耳介の腫れが優位に抑制された．次に，マウス耳介の組織観察をおこなった．HE 染色をおこなって組織を顕微鏡観察した結果，MF 群では F2 群と比べて耳介組織の腫れが抑制されていた．PAS 染色をおこなって染色された細胞を観察したところ，MF 群では F2 群と比べて耳介組織に浸潤した細胞が減少していた．抗 Gr-1 抗体を用いて好中球を染色した結果，MF 群では F2 群と比べて耳介組織に浸潤した細胞が減少していた．抗 MHC classⅡ抗体を用いて抗原提示細胞を染色した結果，C 群，F2 群，MF 群で耳介組織に浸潤した細胞に大きな違いはなかった．以上の結果から，MF 飼料中の大豆には接触過敏症を抑制する効果があること，耳介で好中球の浸潤を伴う炎症を抑制することが示された．

contact hypersensitivity, soybeans, isoflavones

講演番号：3B07a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ B 校舎 07 会場

Nostoc 属の示す抗変異原性に対する消化液処理による影響

The effect of simulated digestive juice treatments on antimutagenicity of *Nostoc spp.*

○小原 章裕[1]、川村 磨史[1]、山口 裕司[2]、竹中 裕行[2]、湊 健一郎[1] ([1]名城大農、[2]マイクロアルジェ―コーポレーション)
○ Akihiro OHARA[1], MAFUMI KAWAMURA[1], Yuji YAMAGUCHI[2], Hiroyuki TAKENAKA[2], Ken-ichiro MINATO[1] ([1]Meijo Univ., [2]MicroAlgae Corporation Co. Ltd.)

【目的】本研究では微細藻類の一種で念珠藻と呼ばれる *Nostoc* 属 3 種類の発ガン性と関連の深い抗変異原性について調べ，更に活性画分を消化酵素処理した際の抗変異原性の変化を調べた。また抗変異原性は，変異原物質が DNA に作用する際に生成するラジカル(活性酸素種)の生成も関係性があるため，ラジカルの捕捉能についても調べた。
【方法】試料は髪菜 (*N. flagelliforme*)，イシクラゲ(*N. commune*)，葛仙米(*N. sphaericum*)をヘキサン，酢酸エチル及びメタノールで順次超音波抽出した画分(各々0.1mg/plate)を用いた。抗変異原活性は Ames 試験の変法である pre-incubation 法により評価した。変異原物質に直接変異原である 1-ニトロピレン（1-NP，0.15μg/plate）及び間接変異原である Trp-P-1(0.07μg/plate)，IQ(2ng/plate)を用い，試料を消化酵素処理した際の活性の変化を調べた。ラジカル捕捉能は DPPH ラジカル捕捉試験により評価した。試料と DPPH 溶液を 37℃で 20 分間反応させ，520nm の吸光度を測定した。
【結果】1-NP に対する抗変異原活性は，髪菜の酢酸エチル抽出画分が 17.0%，イシクラゲのヘキサン抽出画分が 26.4%，葛仙米のヘキサン抽出画分が 30.5%であった。しかし Trp-P-1 に対しては 3 種類とも活性を示さなかった。これらの活性を示した画分について，ペプシン処理による活性の変化を調べた。pH4.0 で処理した時にイシクラゲ及び葛仙米はそれぞれ 28.3%，27.0%と変化は見られず，髪菜は pH4.0 及び 5.0 でそれぞれ 28.4%，31.6%と処理前よりも上昇した($p<0.05$)。また，pH2.0 では，髪菜のみ活性が消失した。パンクレアチン処理による活性は 3 種類とも処理前と後で有意な差は見られなかった。よってこれら試料中の抗変異原成分は，消化酵素の作用によって活性は減少しないと推察した。また DPPH ラジカル捕捉活性は，髪菜のメタノール抽出画分が 24.4%，イシクラゲの酢酸エチル抽出画分が 30.5%，葛仙米のメタノール抽出画分が 37.0%であった。しかし葛仙米についてはヘキサン抽出画分が 34.7%，酢酸エチル抽出画分が 28.9%と 3 画分とも高い活性を示した。よって葛仙米のヘキサン抽出画分は，抗変異原活性と抗酸化活性ともに高い活性を示すと推察した。以上の結果から，髪菜，イシクラゲ，葛仙米は抗変異原活性と抗酸化活性を有する機能性素材として期待できると推察した。

antimutagenicity, *Nostoc*, digestive juice

講演番号：3B07a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ B 校舎 07 会場

ラクトフェリン+ラクトパーオキシダーゼ含有粉末組成物の抗菌作用および口臭抑制作用

Antibacterial action and oral malodor suppression by lactoferrin and lactoperoxidase containing powder composition

○新 光一郎、中野 学、若林 裕之、山内 恒治、阿部 文明（森永乳業食基研）
○Kouichirou Shin, Manabu Nakano, Hiroyuki Wakabayashi, Koji Yamauchi, Fumiaki Abe (Food Science & Technology Institute, Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

【目的】ラクトフェリン（LF）とラクトパーオキシダーゼ（LPO）は、乳や唾液中の感染防御因子として知られている。ヒト臨床試験によって、LF+LPO 配合錠菓の口臭抑制効果および歯周病患者でのプラーク（歯垢）指数や歯肉縁下細菌叢の改善が報告されている。本研究では、LF+LPO の保存安定性に優れた粉末状組成物について、口腔内細菌に対するバイオフィルム形成抑制作用と殺菌作用を確認し、口臭抑制効果と細菌の含硫アミノ酸リアーゼ阻害を介した口臭抑制作用機構を検討した。
【方法】①バイオフィルム試験：歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis*（PG）を TS 培地中で嫌気性チャンバー（Coy 社製）内で前培養した。唾液と同等の濃度（0.5 mM）の NaSCN 含有 TS 培地に LF+LPO 含有粉末組成物（森永乳業製・オーラバリア®）を種々の濃度で溶解添加して、96 穴プレートで 24 時間培養し、染色後、ウェル底面への菌の付着量を測定した。②殺菌活性試験：精製水に 0.66 mM NaSCN および 8 mg/ml オーラバリア®を添加し、PG を約 7.0 $\log_{10}$ cfu/ml となるように懸濁後、37℃で 10～30 分間インキュベートした。この懸濁液の生菌数を、希釈後、寒天培地で測定した。③口臭抑制試験：担当者 4 名が 80 mg／錠オーラバリア®配合錠菓 2 錠を 1 時間間隔で口腔内で溶解させて摂取し、摂取前、一錠目摂取直後、1 時間後（二錠目摂取前）、2 時間後の口臭レベルを口臭測定器（アビリット社製、オーラルクロマ）で測定した。④口臭抑制作用機構検討：②のインキュベート後の懸濁液を 3,000 rpm、15 分間遠心分離して得た菌体をリン酸緩衝液 pH7.7 に再懸濁後、システインまたはメチオニンを添加して 37℃、90 分間インキュベートし、生成されたピルビン酸またはα-ケト酪酸を MBTH 法で測定し、リアーゼ活性を調べた。
【結果】①バイオフィルム試験では、LF+LPO 含有粉末組成物 0.05 mg/ml 以上で顕著にバイオフィルム形成が抑制され、0.5 mg/ml ではほぼ完全に無くなった。②殺菌活性試験では、10 分後において生菌数は 3 log オーダー低下し、30 分後において検出限界（2.7 $\log_{10}$ cfu/ml）以下となった。③口臭抑制試験では、メチルメルカプタンの平均値が摂取前において嗅覚閾値（0.5 ng/10ml）を上回ったが、一錠目摂取直後および 2 時間後において嗅覚閾値を下回った。④口臭抑制作用機構検討では、LF+LPO の作用開始 10 分後においてシステインおよびメチオニンに対するリアーゼ活性の低下がみられた。以上の結果から、LF+LPO 含有粉末組成物の口腔衛生への応用性について、口腔内細菌に対するバイオフィルム形成抑制活性と殺菌活性が確認され、口臭抑制効果が観察された。また、口臭抑制効果の作用機構として、口臭産生に関与する代謝酵素活性の阻害が示唆された。

lactoferrin, lactoperoxidase, Porphyromonas gingivalis

講演番号：3B07a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ B 校舎 07 会場

ラクトパーオキシダーゼ（LPO）システムによる揮発性硫黄化合物産生抑制作用機構

Mechanisms of suppression of volatile sulfur compounds production by the lactoperoxidase system

○中野 学[1]、新 光一郎[1]、若林 裕之[1]、山内 恒治[1]、阿部 文明[1]、朝岡 あかね[2]、川津 正俊[2]、弘中 祥司[3]（[1]森永乳業食基研、[2]クリニコ、[3]昭和大・歯）
○Manabu Nakano[1], Kouichirou Shin[1], Hiroyuki Wakabayashi[1], Koji Yamauchi[1], Fumiaki Abe[1], Akane Asaoka[2], Masatoshi Kawazu[2], Shouji Hironaka[3] ([1]Food Science & Technology Institute, Morinaga Milk Industry Co., Ltd.,, [2]Clinico Co., Ltd.,, [3]Showa University School of Dentistry)

【目的】ラクトパーオキシダーゼ（LPO）は、乳や唾液などに含有され、過酸化水素とチオシアン酸イオンの共存下において殺菌活性の強い次亜チオシアン酸の生成を触媒する(LPO システム)。我々は、LPO 含有食品の摂取試験において、人体に有害な硫化水素やメチルメルカプタンといった揮発性硫黄化合物（VSC）の口腔内での抑制を報告している。VSC は口腔内細菌の代謝酵素である含硫アミノ酸リアーゼによって、システインやメチオニンから生成される。本研究では、VSC 産生抑制作用機構を検討するため、含硫アミノ酸リアーゼに対する LPO システムの影響を調べた。
【方法】LPO、グルコースオキシダーゼ（GO)、グルコースおよび NaSCN をクエン酸緩衝液 pH 5.0 に添加し、*Porphyromonas gingivalis* ATCC 53978（PG）を約 10^7 cfu/ml となるように懸濁後、37℃、10～30 分間インキュベートした。次に、この LPO システム処理後の懸濁液を遠心分離して菌体を回収し、リン酸緩衝液 pH 7.7 に再懸濁し、①処理後菌懸濁液とした。さらに、未処理の PG を破砕した上清を LPO システムに添加して、37℃、10～30 分間インキュベートし、②菌破砕上清処理液とした。①または②に、システインまたはメチオニンを添加して 37℃、90 分間インキュベートし、生成されたピルビン酸または α-ケト酪酸を MBTH 法で測定し、硫化水素産生酵素とメチオニン γ-リアーゼの活性を調べた。
【結果と考察】LPO システムは、作用 30 分後に PG の生菌数を検出限界（2.7 $\log_{10}$ cfu/ml）以下まで減少させた。①処理後菌懸濁液では、作用 10 分後、硫化水素産生酵素とメチオニン γ-リアーゼの活性が処理前の約 30%に低下した。②菌破砕上清処理液では、処理前に比べて作用 30 分後で、硫化水素産生酵素活性が 13%、メチオニン γ-リアーゼ活性が 17%に低下した。LPO、GO、グルコースまたは NaSCN のいずれかでは、両リアーゼ活性ともに低下しなかった。したがって、LPO システムが含硫アミノ酸リアーゼを不活性化させたと考えられる。なお、*Fusobacterium nucleatum* JCM 6328 の菌破砕上清に対しても、作用前に比べて作用 30 分後に硫化水素産生酵素活性が 50%、メチオニン γ-リアーゼ活性が 1%に低下した。以上の結果から、LPO システムは VSC 産生菌に対して抗菌作用を示すだけではなく、含硫アミノ酸リアーゼを不活性化することで、有害成分である VSC の発生を抑制することが示された。

lactoperoxidase, volatile sulfur compounds, hypothiocyanite

講演番号：3B07a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ B 校舎 07 会場

乳酸菌と酵母で発酵した発酵乳の香りが自律神経と行動に与える影響

Effect of odor of milk fermented with lactic acid bacteria and yeast on autonomic nerve and behavior

○川口 恭輔[1]、小谷 恵[1]、水野 征一[1]、永井 克也[2]([1]カルピス株式会社　発酵応用研究所、[2]株式会社 ANBAS)
○Kyosuke Kawaguchi[1], Megumi Kotani[1], Seiichi Mizuno[1], Katsuya Nagai[2] ([1]Calpis Co., Ltd. Microbiology and Fermentation Laboratory, [2]ANBAS Corp.)

【目的】
近年、香り刺激が自律神経系に影響を与え、自律神経活動変化が引き起こす生理機能変化に関する研究成果が多数報告されている。これまでわれわれはラットを用いた発酵乳の研究において、乳酸菌と酵母で発酵した発酵乳の嗜好性が高く、その要因として香りが重要であることを明らかにしてきた[1]。今回、乳酸菌と酵母で発酵した発酵乳の香りの機能性探索を目的とし、自律神経活動と行動に与える影響を評価した。

【方法】
ウレタン麻酔下のラットに、乳酸菌と酵母で発酵した発酵乳の香り刺激を行い、自律神経活動変化を電気生理学的に測定した。また、乳酸菌と酵母で発酵した発酵乳の香りが行動に与える影響について、動物を用いた自発活動量測定および高架式十字迷路試験にて評価した。

【結果】
乳酸菌と酵母で発酵した発酵乳の香り刺激により、胃副交感神経活動の有意な上昇および副腎交感神経活動の有意な低下が認められた。乳酸菌と酵母で発酵した発酵乳の香りの曝露による自発活動量への影響を評価した結果、プラセボと比較して全活動量に有意な差は認められなかったが、明期活動率を有意に低下させた。更に、高架式十字迷路試験の結果、乳酸菌と酵母で発酵した発酵乳の香りの曝露により、オープンアームへの進入回数の有意な増加が認められた。
以上の結果より、乳酸菌と酵母で発酵した発酵乳の香りは自律神経調節作用を介し、日周リズム改善作用や抗不安作用などの「癒し」効果を持つことが示唆された。

[1]日本農芸化学会 2012 年度大会講演要旨集

odor, autonomic nerve, behavior

講演番号：3B07a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ B 校舎 07 会場

高脂肪高ショ糖給餌ラットにおける米穀由来バイオエタノール発酵残渣の抗肥満効果

Antiobesity effect of fermented rice residue for bio-ethanol on rat fed a high-fat and high-sucrose diet

○櫻井 美仁[1]、内海 竜也[2]、佐藤 眞治[1]（[1]新潟薬大応生・食品分析、[2]JA 全農・資源開発）
○Misato SAKURAI[1], Tatsuya UTSUMI[2], Shinji SATO[1]（[1]NUPALS, [2]Zen-Noh）

【目的】現在化石エネルギーの枯渇や二酸化炭素発生量の増加が問題視され、様々なバイオマスを用いたバイオ燃料が注目されている。新潟県においては農水省「バイオ燃料生産拠点確立事業」の一環として、米穀を原料としたバイオエタノールの製造と販売の実証事業が行われており、我々はこの製造時に生じるバイオエタノール醗酵残渣に注目した。本製造所で排出される醗酵残渣は米穀が原料であることから、酒粕同様に米穀由来のタンパク質やビタミン、植物繊維を豊富に含んでおり、更に糖化や醗酵に用いられる酵素・酵母などに由来する有用成分が含まれていることが示唆される。これら米穀由来成分にはエネルギー代謝などを改善し、肥満症やメタボリック症候群の発症予防に効果を発揮することが期待されていることから、本研究では高脂肪高ショ糖餌に米穀由来バイオエタノール醗酵残渣（米醗酵残渣）を含有させた飼料をラットに長期間摂取させ、抗肥満効果とインスリン抵抗性改善効果についての検討を行った。
【方法】普通飼料摂取（コントロール）群、高脂肪高ショ糖飼料摂取（HFHS）群、米醗酵残渣 16.1%（米醗酵残渣食物繊維 2.5%相当）含有高脂肪高ショ糖飼料摂取（HFHS+米醗酵残渣）群に分け、100 日間長期飼育を行った。飼育終了後、頚静脈にカニューレを施してグルコース負荷試験（0.833g/kg）及びインスリン負荷試験（0.05IU/kg）を行い、血糖値、血漿中中性脂肪、遊離脂肪酸の変動を測定した。更に血液生化学検査及び解剖による内臓脂肪重量を測定した。
【結果】HFHS 群と HFHS+米醗酵残渣群では摂餌量に差異は見られなかったが、体重の推移を見ると摂餌試験開始後 8 週以降で HFHS 群より HFHS＋米醗酵残渣群で体重の上昇が抑制され、100 日目における体重では HFHS 群より HFHS＋米醗酵残渣群で有意に体重が減少していた。また体重脂肪重量も HFHS 群より HFHS+米醗酵残渣群で減少傾向が見られたことから、米醗酵残渣には抗肥満効果があることが示唆される。また、空腹時血糖値では HFHS 群と比較して HFHS+米醗酵残渣群で有意に低く、インスリン負荷後の血糖値の推移についても HFHS 群より低く推移していることから、米醗酵残渣はインスリン抵抗性に対する改善効果を有していると示唆される。更に血液生化学検査において AST 及び ALT が HFHS 群より有意に低く、肝臓重量についても有意に減少していたことから、高脂肪高ショ糖飼料による肝機能障害を改善する効果を有していることが示唆された。

antiobesity, residue of rice fermentation, bio-ethanol

講演番号：3B07a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ B 校舎 07 会場

麹菌エキス末のヒトにおける抗血栓効果

Antithrombotic effect of Koji Extract Powder in humans.

○菅 美奈子[1]、山下 裕輔[1]、武島 一仁[1]、丸 勇史[1]、脇本 真之介[2]、脇本 吉清[2]、金 武祚[1]([1]株式会社ファーマフーズ、[2]ワキ製薬株式会社)
○MINAKO SUGA[1], YUSUKE YAMASHITA[1], KAZUHITO TAKESHIMA[1], ISAHUMI MARU[1], SINNOSUKE WAKIMOTO[2], YOSHIKIYO WAKIMOTO[2], MUJO KIM[1] ([1]Pharma Foods International Co.,Ltd, [2]Waki Pharmaceutical Co.,Ltd)

【目的】

日本人の死因別割合のうち、上位を占める心疾患及び脳血管疾患には、血栓症が関連することが知られている。我々は、これまでに血栓症を予防する機能性食品素材の開発を目的とし、麹菌エキス末に高い抗血栓効果を有することを見出した。In vitro 試験及び in vivo 試験にてその効果を確認し、昨年度の本大会にて報告を行った。今回は、麹菌エキス末のヒトにおける抗血栓効果について報告する。

【方法】

被験者は､年齢が 50 歳以上の方で LDL コレステロールが 100 mg/dL 以上もしくは中性脂肪が 150 mg/dL 以上の方を対象とした。検体は、麹菌エキス末「フィブレキシン®」(300 mg/日）及びデキストリン（コントロール、300 mg/日）をカプセルに充填し、各群 7 人に 21 日間経口投与した。検体投与開始 7 日後、及び 21 日後に採血を行い、各種凝固・線溶マーカー（APTT、PT、FDP、D ダイマー、PIC）の測定、血小板凝集能検査、さらに安全性を評価するために血液一般検査及び血液生化学検査を実施した。

【結果】

フィブリノーゲン・フィブリンの分解産物である FDP において、コントロール群では検体摂取における変動が認められなかったのに対し、麹菌エキス末群では摂取前と比べ摂取 21 日間後に FDP の上昇が確認された。その他の凝固・線溶マーカー及び血小板凝集能検査では、麹菌エキス末群は摂取前と比べ顕著な変動は認められなかった。また、血液一般検査及び血液生化学検査においては、いずれの検体においても値の変動が摂取前と摂取後では基準値範囲程度であり、生物学的意義は認められなかった。また、麹菌エキス末摂取によって副作用を含む有害事象は認められなかった。

以上の結果から、麹菌エキス末は、血液凝固には影響を及ぼさず、血栓溶解作用を有する抗血栓素材であることが示唆された。また､麹菌エキス末は本試験条件における安全性が認められた。今後は、麹菌エキス末中の活性成分の同定と作用機序の解明を行なう予定である。

Aspergillus oryzae, Antithrombotic, Clinical study

講演番号：3B07a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ B 校舎 07 会場

Lactobacillus gasseri CP2305 株の経口投与が自律神経活動および HPA 軸での遺伝子発現に及ぼす影響

Impact of *Lactobacillus gasseri* strain CP2305 on activity of autonomic nervous system and gene expression in organs of HPA axis of rats under psychological stress

澤田 大輔[1]、○藤原 茂[2]、永井 克也[3]、桑野 由紀[4]、六反 一仁[4] ([1]カルピス(株) 商開セ、[2]アルピス(株) 発酵研、[3]（株）ANBAS、[4]徳島大ストレス制御医学)
Daisuke Sawada[1], ○Shigeru Fujiwara[2], Katsuya Nagai[3], Yuki Kuwano[4], Kazuhito Rokutan[4] ([1]Products Dev. Center, Calpis Co., Ltd., [2]Fermentation & Microb. Lab., Calpis Co., Ltd., [3]ANBAS Corporation, [4]Dept. of Stress Science, The Univ. of Tokushima)

[目的]
L. gasseri CP2305 株（CP2305 株）投与によるストレスリリーフ効果および関連疾患に対する有効性について報告してきた。この作用機序を明らかにするため、ラットを用いて自律神経活動ならびに HPA 軸の機能に及ぼす影響について検討を加えた。

[方法]
CP2305株を単回経口投与したWistarラットを用いて、ウレタン麻酔下に迷走神経活動を測定した。電位変化データは、分散分析を用い、時間因子との交互作用をもって統計的な有意性を判断した。
CP2305 株を 3 週間経口投与した SD ラットを用いて、CRF 投与後の骨盤神経活動を測定するとともに、HPA 軸関連部位ならびに遠位結腸部位から RNA を抽出し、DNA アレイ解析によって遺伝子発現を比較した。データをクラスタリングし、パスウェイ解析を行った。

[結果と考察]
CP2305 株の摂取により、ラットの腸の迷走神経求心枝の活動は有意に昂進した。一方、副腎交感神経活動は有意に抑制された。CP2305 株は消化管から中枢神経系へのシグナル伝達に影響し、副腎髄質の急性期ストレス応答に影響を与え、その後、HPA 軸を通じた副腎皮質によるストレス応答を抑制することが推測された。さらに、CRF を静注した後の骨盤神経活動の低下が有意に緩和されることが明かとなり、ストレス負荷時の消化管機能の改善が示唆された。ラットに CRF を投与した際の副腎ならびに遠位結腸の遺伝子発現は CP2305 株の摂取によって大きく変化し、同時に誘発される下痢症状の有意な緩和が確認された。また、副腎および遠位結腸における炎症関連遺伝子の発現の抑制も明らかとなり、ストレス応答における炎症の抑制が示唆された。

Lactobacillus gasseri strain CP2005, Autonomic nerve activity, HPA axis

講演番号：3B07a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ B 校舎 07 会場

ヒト常在ビフィズス菌と非常在ビフィズス菌の母乳に対する親和性の違いについて

Difference of affinity for the breast milk between Human Residential Bifidobacteria and non-Human Residential Bifidobacteria.

○南 淳一、小田巻 俊孝、橋倉 那波、清水(肖) 金忠、阿部 文明（森永乳業株式会社）
○Jun-ichi MINAMI, Toshitaka ODAMAKI, Nanami HASHIKURA, Jin-zhong XIAO, Fumiaki ABE (MORINAGA MILK INDUSTRY)

＜目的＞
Bifidobacterium 属細菌（ビフィズス菌）には、ヒト常在ビフィズス菌種（Human residential Bifidobacteria; HRB）と、通常ヒトには生息していないヒト非常在ビフィズス菌種（non-Human residential Bifidobacteria; nHRB）が存在し、それぞれ異なる環境に適応して進化したと推察される。我々は HRB と nHRB の比較ゲノム解析の結果、ヒトミルクオリゴ糖の主要骨格である Lacto-N-Tetraos（LNT）や Lacto-N-Biose（LNB）、および各構成糖の代謝に関連する遺伝子の保有に差があることを見出した。そこで本研究では、母乳における各ビフィズス菌種の増殖性を調べ、母乳との親和性について評価した。
＜方法＞
母乳サンプルから遠心分離により粗脂肪分を除き、HRB 及び nHRB のビフィズス菌 3 菌種 2 亜種 22 株を接種し、母乳中での生育能を評価した。また、糖を含まない MRS 培地に LNT、または LNB を添加し、ヒトミルクオリゴ糖主要骨格に対する資化能を検証した。更に、母乳中でのビフィズス菌の生育能に影響を与える要因として、抗菌性物質であるリゾチームに着目し、ELISA を用いて母乳中のリゾチーム濃度の測定を行うとともに、各ビフィズス菌株のリゾチーム耐性を評価した。
＜結果＞
主に乳児から検出される HRB の *Bifidobacterium*（*B*）*breve* および *B. longum subsp. infantis* は、どの株も LNT と LNB の資化能を有し、母乳中で高い生育能を示したのに対し、nHRB である *B. animalis subsp. animalis* および *B. animalis subsp. lactis* はいずれの株も LNT、LNB の資化能を有せず、母乳中で培養後の菌数が初発菌数よりも低下した。更に、母乳の主要抗菌成分の 1 つであるリゾチームに対する耐性を比較した結果、HRB と nHRB では Minimum Inhibitory Concentration（MIC）が異なっており、*B. animalis subsp. animalis* と *B. animalis subsp. lactis* の全ての株が、母乳中の平均的なリゾチーム濃度である 50 μg/mL において増殖しなかった。一方、HRB の *B. longum subsp. longum* は、株によって MIC が 50～1000 μg/mL の範囲で大きく異なり、母乳での生育が阻害される株もあった。従って、ヒトミルクオリゴ糖の資化能の違いは、各ビフィズス菌株の母乳での生育能に関連し、それに加えて母乳に含まれるリゾチームに対する耐性能が、HRB と nHRB の棲み分けを決める重要な要因の 1 つであることが示唆された。

bifidobacterium, breast milk, human residential

講演番号：3B07a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ B 校舎 07 会場

ヒト常在ビフィズス菌または非常在ビフィズス菌による無菌マウスに対する影響

Effect of Human Residential Bifidobacteria or non-Human Residential Bifidobacteria on germ-free mice

○菅原 宏祐、小田巻 俊孝、橋倉 那波、田中 智弘、南 淳一、清水(肖) 金忠、阿部 文明（森永乳業株式会社　食品基盤研究所）

○Hirosuke SUGAHARA, Toshitaka ODAMAKI, Nanami HASHIKURA, Tomohiro TANAKA, Jun-ichi MINAMI, Jin-zhong XIAO, Fumiaki ABE (Food Science and Technology Institute, Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

＜目的＞ビフィズス菌はヒト腸内細菌の中で優勢菌群の一つであり、ヒトの健康に寄与すると考えられている。ビフィズス菌はヒトのみではなく動物、昆虫、環境中からも分離されているが、ヒト常在ビフィズス菌[Human Residential Bifidobacteria (**HRB**)]とそれ以外の環境に存在するビフィズス菌(**nHRB**)の菌種が異なっており、明らかな棲み分けが知られている。我々はこれまでに **HRB** と **nHRB** の比較ゲノム解析を通じて、**HRB** のみが葉酸の代謝経路に関与する遺伝子群をセットで有していることを明らかにしている。本研究では、無菌マウスに **HRB** と **nHRB** をそれぞれ単独定着させたマウスモデルを用いて、宿主に与える影響について解析した。

＜方法＞**HRB** として *Bifidobacterium longum* spp. *longum* BB536 と *Bifidobacterium breve* M-16V、**nHRB** として *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* DSM10140 をそれぞれ無菌環境下で飼育した BALB/c マウスに飲水投与し、それぞれの単独定着マウスを作製した。この単独定着マウスと無菌マウス計４群の糞便及び血液を経時的に採取し、糞便中の菌数と糞便および血液中の葉酸量を測定した。菌の定着後 4 週後に解剖を行い、血中各種パラメータを評価した。

＜結果＞糞便中葉酸量の経時的変動を評価した結果、無菌マウスや *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* DSM10140 単独定着マウスに比べて、*Bifidobacterium longum* spp. *longum* BB536 や *Bifidobacterium breve* M-16V 単独定着マウスでは葉酸量が有意に高値であった。本結果は比較ゲノム解析による各菌株の違いの結果を支持した。

血液中の葉酸量については群間に有意な差は認められなかったが、血液中の葉酸量と糞便中の葉酸量には有意な正の相関が認められ($r=0.54$, $p<0.001$)、消化管内で産生された葉酸が血中の葉酸量に影響している可能性が示された。さらに、血中パラメータ測定の結果、*Bifidobacterium longum* spp. *longum* BB536 単独定着マウスにおける血中ヘモグロビン量やヘマトクリット値が *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* DSM10140 単独定着マウスに比べて有意に高い値を示した。葉酸の不足により貧血症状が引き起こされることから、*Bifidobacterium longum* spp. *longum* BB536 は葉酸産生を介してまたはそれ以外の影響により貧血抑制に関与する可能性が考えられた。

Bifidobacterium, Folic acid, Germ-free mice

講演番号：3B07a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ B 校舎 07 会場

発酵青バナナ末の開発

Development of Fermented unripe banana powder

○井上 侑紀[1]、堀江 健二[1]、渡部 和哉[1]、青笹 正義[1]、丸 勇史[1]、加藤 敬[2]、山田 敬[2]、金 武祚[1]
([1]（株）ファーマフーズ、[2]（株）ドール)
○Yuki Inoue[1], Kenji Horie[1], Kazuya Watabe[1], Masayoshi Aosasa[1], Isahumi Maru[1], Takashi Kato[2], Takashi Yamada[2], Mujo Kim[1] ([1]Pharma Foods International Co.,LTD., [2]Dole Janpan,Inc)

【目的】

バナナ（CAVENDISH 種）は日本で最も多く消費されている果物である。フィリピン等の亜熱帯地域で 1 年を通じて栽培される。収穫された青バナナは、消費国へ輸出され、国内で熟成し出荷される。生産現地では、収穫されたバナナの一部は選果基準に達しないため、高い栄養価を有するにも関わらず、未利用のまま廃棄されてきた。本研究では、未利用資源である青バナナの高度利用を目的として、免疫賦活能を有する機能性食品素材の製法を検討した。

【方法】

発酵青バナナ末の調製

収穫した青い未成熟なバナナの果実部を粉末化し、青バナナ末を調製した。青バナナ末は独特の渋味を呈する不溶性の粉末であり、このままでは食品素材として利用出来ない。そこで、青バナナ末を各種酵素・微生物等を用いて分解・発酵し、生理機能としてサイトカイン産生促進能を指標とし、可溶性粉末の製法を検討した。

マクロファージ試験

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を用いて TNF-α産生試験を行った。各種製法で調製した発酵青バナナ末を添加し、培養後に回収した培養上清中の TNF-α濃度を、Quantikine ELISA Mouse TNF-α(R&D Systems)を用いて測定した。

マウスマクロファージ様細胞株 J774.1 細胞を用いて貪食活性試験を行った。各種製法で調製した発酵青バナナ末を添加後、ポリエチレンビーズを添加して培養し、ビーズを貪食した細胞の割合を測定した。

【結果】

不溶性の青バナナ末を原料として、ほのかな甘みを呈する可溶性粉末「発酵青バナナ末」を開発した。
「発酵青バナナ末」を添加した RAW264.7 細胞で、濃度依存的な TNF-α産生量増加が認められた。また、同粉末を添加した J774.1 細胞で貪食率の増加が認められた。これらの結果から、「発酵青バナナ末」は免疫賦活能を有することが示唆された。
「発酵青バナナ末」の栄養成分は、成熟バナナと同等であり、味覚的にみても幅広く食品に配合可能である。

Banana, Fermentation, Immunity

講演番号：3B07a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ B 校舎 07 会場

発酵青バナナ末が培養筋細胞ミトコンドリアに与える影響

Effects of Fermented unripe banana powder on Mitochondria in Cultured muscle cell

○堀江 健二[1]、井上 侑紀[1]、坂下 真耶[1]、薩 日娜[1]、渡部 和哉[1]、青笹 正義[1]、山下 裕輔[1]、丸 勇史[1]、加藤 敬[2]、山田 敬[2]、金 武祚[1] ([1]（株）ファーマフーズ、[2]（株）ドール)
○Kenji Horie[1], Yuki Inoue[1], Maya Sakashita[1], rina Sa[1], Kazuya Watabe[1], Masayoshi Aosasa[1], Yusuke Yamashita[1], Isahumi Maru[1], Takashi Kato[2], Takashi Yamada[2], Mujo Kim[1] ([1]Pharma Foods International Co.,LTD., [2]Dole Janpan,Inc)

【目的】

バナナは、日々の活力源として広く食されている、最も栄養バランスに優れた食品の一つである。活力ある生活を送るために重要な骨格筋のエネルギーは、筋細胞内のミトコンドリアが産生している。ミトコンドリアはエネルギー代謝に直接関わる細胞内器官であり、骨格筋におけるミトコンドリア活性は筋持久力を左右する重要な要因である。そこで本研究では、我々が新たに開発した「発酵青バナナ末」が培養筋細胞ミトコンドリアに与える影響について検討を行った。

【方法】

ATP 産生試験

マウス横紋筋由来細胞株 C2C12 細胞を用いて、ATP 産生試験を行った。C2C12 細胞に発酵青バナナ末を添加、培養後、ルシフェラーゼアッセイにより ATP 産生量を測定した。同時にタンパク質定量を行い、タンパク量あたりの ATP 産生量を評価した。

ミトコンドリア関連遺伝子測定試験

C2C12 細胞に発酵青バナナ末を添加、培養後、total RNA を回収し cDNA を合成した。cDNA を鋳型として、real-time PCR によりミトコンドリア関連遺伝子の発現量を測定した。

【結果】

発酵青バナナ末を添加した C2C12 細胞で、ATP 産生量の有意な増加が認められた。本結果から、発酵青バナナ末がミトコンドリア活性化能を有することが示唆された。 また、同粉末を添加した C2C12 細胞で、ミトコンドリア脱共益タンパク質３（UCP3）の発現量が有意に増加した。UCP3 は骨格筋細胞で高濃度に存在し、エネルギー消費の増加に関与すると報告されている。その他、ミトコンドリア関連遺伝子の発現に与える影響について、検討中である。

これらの結果から、「発酵青バナナ末」は、免疫賦活能に加え、筋細胞のミトコンドリア活性化能を有することが示唆された。

Banana, Fermentation, Mitochondria

講演番号：3B07a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ B 校舎 07 会場

紅麹抽出物による骨石灰化の効果
Effect of mineralization by beni-koji extracts
○安里 雪乃、池尻 真美、宮里 梨恵、比嘉 由美子、橘 信二郎（琉大農・亜熱生資）
○Yukino Asato, Mami Ikejiri, Rie Miyazato, Yumiko Higa, Shinjirou Tachibana (Univ. Ryukyus)

【研究背景・目的】紅麹菌（*Monascus* 属菌）は、子のう菌に属する食品微生物である。沖縄県では、琉球王朝時代より大豆発酵食品の豆腐よう製造に用いられてきた。また、紅麹菌は、血中コレステロール低下作用をはじめとする様々な生理活性を示す多様な二次代謝産物を産生することが知られている。骨粗鬆症は骨強度の低下により骨折リスクを増大させ、罹患者の生活の質（QOL）を著しく低下させるとともに社会保障費の増大を引き起こすことから問題となっている。よって、骨強度を高め骨粗鬆症の発症を予防する効果をもつ生理活性物質の探索が求められている。近年、紅麹の産生するモナコリンによる骨量増加作用が報告され、骨粗鬆症の新しい治療モデルとして注目されている。しかし、脂溶性のスタチンは、肝臓への移行性が高い強力なコレステロール生合成阻害剤であるため、末梢の骨組織への移行性に課題があることが指摘されている。当研究室では、紅麹の機能性食品素材開発の一環として、マウス骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞を用いた紅麹抽出物による骨石灰化促進活性のスクリーニングを行ってきた。本研究では、骨石灰化促進活性を示す紅麹抽出物による骨芽細胞の骨形成関連遺伝子の発現について調べたので報告する。
【方法・結果】寄託菌株と研究室の保存菌株の紅麹菌を用い、米および麦で調製した紅麹の水抽出物を凍結乾燥後、滅菌水に再溶解してろ過滅菌し、紅麹抽出物試料（1% (w/v) 乾燥重量として）とした。マウス前駆骨芽細胞 MC3T3-E1 株は、10%牛胎児血清を含むαMEM を基本培地として培養した。基本培地でコンフルエントになるまで培養し、アスコルビン酸およびβ - グリセロリン酸を培地に添加して分化誘導刺激を与えて骨芽細胞へ分化させるとともに骨石灰化形成を行った。試料添加群（終濃度：0.1%および 0.01%）と対照群（10% (v/v) 滅菌水）を本実験に用いた。紅麹抽出物の同細胞に対する細胞毒性は、MTT ホルマザン比色法により評価した。骨石灰化をアリザリン染色および von Kossa 染色により評価した。骨形成代謝マーカー酵素のアルカリホスファターゼ（ALP）活性を定法に従って測定した。細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR により骨形成関連遺伝子の発現量を調べた。アリザリン染色で骨石灰化促進を示した細胞では、主要骨基質タンパク質のコラーゲン 1a1 や ALP の遺伝子の発現量が対照群に比べて有意に高い値を示す傾向が認められた。また、これらの細胞では、骨形成代謝マーカー酵素の ALP 活性も対照群に比べて高い傾向が認められた。

beni-koji, MC3T3-E1, mineralization

講演番号：3B07a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ B 校舎 07 会場

マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 の石灰化に及ぼす PQQ 長期曝露の影響
Effect of long-term exposure of PQQ on mineralization in murine MC3T3-E1 cells
○比嘉 由美子、橘 信二郎（琉大農・亜熱生資）
○Yumiko Higa, Shinjiro Tachibana (Univ. Ryukyus)

【背景・目的】ピロロキノリンキノン（PQQ）は、NAD(P)、FAD に次ぐ 3 番目の酸化還元酵素の補酵素として微生物で発見された。近年、抗酸化作用や神経保護作用などの様々な PQQ の生理作用が報告されている。我々は、PQQ 欠乏食給餌マウスにおける骨格異常出現の報告をもとに、PQQ が骨代謝に何らかの影響を及ぼすと仮定した。本研究では、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 株を用いて石灰化に及ぼす PQQ の影響を明らかにすることを目的とした。これまでに、14 日間分化誘導培養した細胞において培地中 PQQ の用量依存的な石灰化の抑制を確認している（農芸化学会 2013 年度大会)。今回、さらに長期的な PQQ 曝露による同細胞の石灰化に及ぼす影響について検討したので報告する。
【方法】MC3T3-E1 細胞は、10%牛胎児血清を含むαMEM を基本培地として 37℃、5% CO_2 下で培養した。同細胞の未分化細胞および分化細胞に対する PQQ（10^{-12}～10^{-4} M）の細胞毒性は、WST-1 比色法により評価した。1×10^6 個の細胞を 24 穴プレートに播種し、基本培地で 3 日間培養してコンフルエントにした後、L-アスコルビン酸とβ - グリセロリン酸および各濃度（10^{-10}、10^{-6}、10^{-4} M）の PQQ を添加した分化誘導培地で 35 日間培養し、アリザリンレッド S 染色および von Kossa 染色により石灰化を評価した。対照として超純水を分化誘導培地に添加して同様に 35 日間培養した。同条件で 35 日間培養した細胞の無細胞抽出液を用いて骨形成代謝マーカーのアルカリホスファターゼ（ALP）活性を測定した。同条件で培養した各培養期間の細胞から TRIzol を用いて total RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により骨形成関連遺伝子群の経時的な発現変動を調べた。
【結果】未分化の同細胞は、10^{-4} M PQQ 存在下において顕著な細胞生存率の低下が確認された。細胞増殖速度に及ぼす PQQ の影響についても調べた結果、10^{-4} M PQQ の存在下において経時的かつ顕著な細胞増殖速度の抑制を示した。一方、分化誘導刺激を開始した後の細胞では、10^{-4} M PQQ 添加培地においてのみ有意な細胞生存率の低下が認められたものの、未分化の細胞に比べて生存率の改善が認められた。PQQ の長期曝露においても、用量依存的な石灰化および ALP 活性の減少が確認された。

PQQ, osteoblast, mineralization

講演番号：3B07p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ B 校舎 07 会場

朴葉熱水抽出物中に存在するロタウイルス感染抑制成分の解析

Characterization of anti-rotavirus agents in a hot-water extract from leaves of Magnolia obovata

○河原 岳志[1]、友野 拓真[1]、濱渦 康範[1]、田中 勝巳[2]、保井 久子[2]([1]信州大院農、[2]木曽町地域資源研)
○Takeshi Kawahara[1], Takuma Tomono[1], Yasunori Hamauzu[1], Katsumi Tanaka[2], Hisako Yasui[2] ([1]Shinshu Univ., [2]Kiso Town Research Institute)

【目的】ホオノキ（*Magnolia obovata*）はモクレン科の落葉高木であり、その葉である朴葉は、長野県木曽地方から岐阜県飛騨地方にかけての地域を中心に、朴葉巻きなどの郷土料理の食品包装材として用いられてきた。このような背景から、朴葉には食の安全性を高める効果が期待されるが、機能性に関する知見は少ない。演者らはこれまで、朴葉熱水抽出物が冬期下痢症の原因ウイルスであるロタウイルスの感染およびそれによって引き起こされる下痢症の誘発に対して抑制効果を持つことを明らかにし、その成果を報告してきた。今回、熱水抽出物中に含まれる活性成分の解明に向けた特性付けを行った。
【方法】冷凍下で粉末化した朴葉から 100℃で 60 分間の熱水抽出を行った。得られた抽出物を試料とし、Sep-Pak C18 カラムを用いた水-メタノール系で 0、30、100%メタノール濃度によるステップワイズ溶出により 3 つの画分を得るとともに、複数の有機溶媒と水による分配抽出を行った。得られた分画物は、アンスロン硫酸法による糖検出、フォーリンチオカルト法によるフェノール性化合物検出、リーベルマン-ブルハルト反応によるステロール検出による特性付けを行うとともに、サル胎児由来腎細胞株 MA104 に対するサルロタウイルス SA-11 株（グループ A, タイプⅢ）の感染実験系に供した。ロタウイルスに対する作用の検討は、ニュートラルレッド法による細胞傷害の判定と定量 PCR 法によるウイルス内層構成タンパク質 VP6 ならびに非構成タンパク NSP4 の経時的検出により行った。
【結果】MA104 細胞を用いた細胞傷害評価を指標に活性成分の特性付けを試みたところ、Sep-Pak 溶出後の画分において 100%メタノール溶出画分に抑制活性が認められ、親水性ながらも疎水性の特性を合わせもつ活性成分の存在が示唆された。そこでヘキサンおよびアルコール系溶媒と水を用いた分配抽出に供したところ、最終的に 1-ブタノール抽出画分に強い抑制活性を見出した。この画分にはフェノール性物質、ステロール系物質が多く検出され、ウイルス感染後に添加培養を行った細胞を用いた定量 PCR 解析の結果、感染 8 時間後において VP6 や NSP4 発現に対する抑制が観察された。以上のことから、朴葉熱水抽出物から得られた本画分に宿主細胞内でのウイルス増殖抑制や NSP4 産生抑制を通じて細胞傷害抑制効果を示す活性成分の存在が示唆された。

Magnolia obovata, rotavirus, diarrhea

講演番号：3B07p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ B 校舎 07 会場

マクロファージ分化に対する多糖およびその他食品成分の影響

Influence of a functional polysaccharide and other food factors on a differentiation of macrophage

○湊 健一郎、安藤 恵、小原 章裕（名城大院農）
○Kenichiro Minato, Megumi Andoh, Akihiro Ohara (Meijo Univ.)

【目的】自然免疫における異物排除に重要な役割を示すマクロファージは，分化の違いにより M1 型と M2 型とに大別される。マクロファージの大きな役割である微生物や腫瘍の排除にはM1 型のマクロファージが関わっている。一方 M2 型マクロファージは老廃組織の除去，血管新生，免疫制御において，重要な役割を果たしていることが示唆されている。演者らははこれまで食用キノコ中の多糖が生体内のマクロファージを活性化することを報告してきたが, 本報告ではそれら多糖がマクロファージの分化においては, どのような影響を及ぼしているのか, また M1/M2 どちらのタイプのマクロファージへの分化に関与しているのか検証した。さらに食用キノコという食品全体としての作用を念頭に置き，多糖とその他キノコ成分との相互作用の有無についても検討した。

【方法】 単球 THP-1(RIKEN 細胞株 RCB1189 株)を適当期間培養して, マクロファージへの分化を促すため PMA により 48 時間刺激した。洗浄後，血清を含まない RPMI1640 培地中で 24 時間培養した後，各試料を添加した。24 時間後に接着細胞に分化したことを確認して，M1/M2 分化マーカーとして細胞内に蓄積されているサイトカイン IL-12（M1 マーカー）もしくは IL-10（M2 マーカー）の蛍光検出をおこない，マクロファージ分化への影響を調べた。また，分化後のマクロファージは上記以外のサイトカイン類を両タイプ特異的に産生・分泌することが示唆されているため，分化後さらに 6 時間培養して産生サイトカインを qRT-PCR により調べた。

【結果および考察】

多糖試料として食用キノコ“タモギタケ”から抽出精製したものを使用した。本多糖の作用については生体内マクロファージを活性化して，TNF-α，IP-10 および NO などの炎症性サイトカイン・バイオマーカーを分泌させることが示唆されている。本実験においてマクロファージ分化への影響を調べたところ，分化細胞内に IL-12 の蓄積が認められたため，M1 型への分化に有利に働くことが示唆された。さらに，分化後のマクロファージからは特に炎症性サイトカインである TNF-αおよび IL-1βの遺伝子発現が誘導された。一方で，同じく炎症性サイトカインである IL-6 および IL-12 の発現はわずかながら認められた。しかしながら免疫制御型（M2 型）サイトカインである IL-10 の遺伝子発現の顕著な誘導は認められなかった。

キノコ類のその他成分としてビタミン D_2 及びグアニル酸と，多糖との相互作用について検討したが，ビタミン D_2 についてはマクロファージ分化後の炎症性サイトカイン遺伝子産生を抑制する効果が，一方グアニル酸については増強させる効果が示唆されたが，分化に対する影響については不明であった。

以上のことから，機能性多糖単独の作用としては炎症性マクロファージ（M1 型）の活性化という単一的な作用が示されるが，食用キノコとしてはその作用が過剰にならないように，調節している可能性が示唆された。

polysaccharide, macrophage, vitamin D

講演番号：3B07p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ B 校舎 07 会場

GLP-1 の分泌を促す食品因子の解明とその機序

Enhancement of glucagon-like peptide-1 secretion by food factors

○加藤 正樹、谷 翼、津田 孝範 (中部大・応生)
○Masaki Kato, Tsubasa Tani, Takanori Tsuda (Chubu Univ.)

【目的】
Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) は、消化管下部の内分泌細胞である L 細胞で産生・分泌され、血中グルコース濃度に依存した膵臓でのインスリン分泌刺激作用や膵外組織での多様な作用が知られている。当研究室においては、これまでに GLP-1 分泌促進作用を示す食品因子としてクルクミンを見出し、その機序を明らかにしている 1)。本研究では、クルクミン以外の GLP-1 の分泌促進に関与する食品因子を明らかにし、その機序を解明することを目的とした。
【方法】
マウス大腸由来の GLP-1 産生細胞株を定法に従い培養した後、各種食品因子を投与し、培地中へ分泌される Total GLP-1 の濃度を ELISA により測定した。分泌を促進した成分については、構造活性相関や分泌促進機構に関与する分子の挙動を検討した。
【結果】
種々の食品因子の投与による GLP-1 の分泌促進作用を検討した結果、クルクミン以外にも分泌促進作用を有する食品因子を明らかにした。分泌促進成分については、その構造と分泌促進作用には、ある程度の相関が認められた。現在、分泌促進作用の機序について検討を行うとともに、動物個体における作用の検証を進めている。

1) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435: 165-70, (2013).

Glucagon-like peptide-1, Diabetes

講演番号：3B07p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ B 校舎 07 会場

血管弛緩性ペプチド Trp-His（WH）の AMP キナーゼ活性化作用とそのメカニズム

Mechanism of AMPK activation by Trp-His（WH）in L6 myotubes.

○曽我 実[1]、大橋 彩加[1]、谷口 恵実[1]、滝川 雅仁[1]、松井 利郎[2]、津田 孝範[1] ([1]中部大・応生、[2]九大院・農)
○Minoru Soga[1], Ayaka Ohashi[1], Megumi Taniguchi[1], Mashahito Takikawa[1], Toshirou Matsui[2], Takanori Tsuda[1] ([1]Chubu Univ., [2]Kyushu Univ.)

【目的】Trp-His（WH）は、血管弛緩作用の他、抗動脈硬化作用が報告されている多機能性のジペプチドである。一方演者らは、アントシアニンやローヤルゼリーをはじめとする食品因子の細胞内エネルギー代謝を制御する AMP-activated protein kinase (AMPK)を介した糖尿病予防・抑制作用を明らかにしている (1, 2)。本研究では、WH の新たな機能性開発の点から AMPK の活性化とその作用機序の解明を目的とした。

【方法】ラット由来の筋芽細胞株 L6 を定法に従い培養・分化誘導し、筋管細胞を得た。これを骨格筋のモデルとして WH の投与による AMPK の活性化作用、細胞内への糖取り込みを測定した。さらに AMPK の活性化作用機序、WH の細胞内移行に関わるペプチドトランスポーターの関与を検討した。

【結果】WH の投与は AMPK を活性化させ、インスリン非依存的に細胞内への糖取り込みを有意に上昇させるが、これらの変化は AMPK 阻害剤処理により消失した。WH による AMPK 活性化機序を検討したところ、WH の投与は AMP/ATP 比を上昇させ、上流キナーゼである LKB1 のノックダウンにより AMPK 活性化作用は消失した。一方 WH は、細胞内カルシウム濃度や CaMKII のリン酸化に影響を与えなかった。従って WH による AMPK の活性化にカルシウムシグナルは関与していないと考えられた。さらに WH の細胞内移行について検討するため、L6 筋管細胞のペプチドトランスポーターの発現を調べた結果、PHT1（SLC15a4）の発現を確認した。現在、WH による AMPK 活性化における PHT1 の関与を検討している。

1) *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61, 5558−64.
2) *Mol. Nutr. Food Res.* 2013, 57, 1794–802.

AMP-activated protein kinase, dipeptide

講演番号：3B07p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ B 校舎 07 会場

骨格筋の分化を促進する活性物質探索法の確立

Establishment of method to identify natural products which promote muscle differentiation

○木村 駿介、木村 太郎、加藤 英介、川端 潤（北大院農）
○Shunsuke KIMURA, Taro KIMURA, Eisuke KATO, Jun KAWABATA (Hokkaido Univ.)

〈研究背景〉

近年、高齢化社会の進行に伴い後期高齢者の著しい増加が認められている。老化に伴い、骨格筋量ならびに筋力は低下する。この低下が顕著な状態をサルコペニア（筋肉減少症）という。このサルコペニアに肥満が併発すると、肥満よりも糖尿病などの生活習慣病のリスクを高めることが知られている。サルコペニア肥満を効果的に予防するためには、筋肉そのものの量を増やして基礎代謝を高めることが有効であると考えられる。そこで本研究では、骨格筋量の増加に寄与する化合物を探索する方法を確立し、天然から活性物質を単離および同定することを目的とする。

〈方法・結果〉

骨格筋量の増加に寄与する化合物を探索するにあたり、試験法を確立する必要がある。骨格筋への分化に関わる因子の一つに IGF-1(insulin-like growth factor-1)がある。IGF-1 は筋細胞の増殖と分化に作用することが知られ、*in vivo*の系においても筋細胞の分化を誘導することが知られている。そこで IGF-1 をポジティブコントロールとした筋分化促進試験法の開発を検討した。筋の分化マーカー遺伝子としては myogenin を用いた。ラット骨格筋由来の細胞である L6 を、IGF-1 を含む低血清培地で培養後、RNA を抽出して半定量 PCR を行い myogenin の mRNA 発現量を調べた。その結果、IGF-1 で刺激していないものに比べて myogenin の mRNA 発現量の増加が見られた。現在、この評価系を用いて植物サンプルからのスクリーニングを行っている。

myocyte, myogenin, insulin-like growth factor-1

講演番号：3B07p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ B 校舎 07 会場

肝臓水解物の肉体疲労改善効果

Liver Hydrolysate Assists in the Recovery From Physical Fatigue

○山田 耕太郎[1]、中川西 修[2]、根本 亙[2]、櫻井 英知[1]、只野 武[2,3]、丹野 孝一[2] ([1]ゼリア新薬工業株式会社　コンシューマーヘルスケア製品開発部、[2]東北薬科大学　薬理学教室、[3]金沢大学医薬保健学総合研究科環境健康科学)
○ Kotaro YAMADA[1], Osamu NAKAGAWASAI[2], Wataru NEMOTO[2], Hidetomo SAKURAI[1], Takeshi TADANO[2,3], Koichi TAN-NO[2] ([1]Consumer Healthcare Products Development, Zeria Pharmaceutical Co., Ltd., [2]Department of Pharmacology, Tohoku Pharmaceutical University, [3]Laboratory of Environmental and Health Sciences, College of Medical Pharmaceutical and Health Sciences)

【目的】肝臓水解物は、哺乳類の肝臓を酵素によって加水分解した医薬品有効成分であり、ペプチドを主成分として各種アミノ酸、ヌクレオチド、ビタミン、ミネラル等を含んでいる。肝臓水解物は、肝臓機能障害を起こした患者への含有成分の補充を目的として投与されており、古くより肝臓疾患の治療薬として用いられている。また、肝臓水解物は、肝再生促進作用、抗肝線維化作用、アルコール代謝促進作用、インスリン抵抗性改善作用等を有することが報告されている。本研究では、肝臓水解物の肉体疲労に及ぼす影響を検討することを目的とした。

【方法】実験動物は、ｄｄＹ系雄性マウスを用いた。肉体疲労として電動式回転カゴでマウスに３時間強制的に歩行を負荷した。肝臓水解物は、３時間の強制歩行の前後（肝臓水解物の単回投与群）又は数日間の経口投与（肝臓水解物の数日間投与群）を行った。肝臓水解物の肉体疲労に対する作用メカニズムを検討するために、強制歩行後の肝臓及び筋肉のＡＭＰ活性化プロテインキナーゼ（ＡＭＰＫ）の活性を測定した。さらに、肝臓及び筋肉のグリコーゲン量、血中の乳酸濃度を測定した。

【結果】３時間の強制歩行後、コントロール群（強制歩行無し）と比較して、自発運動量の減少、肝臓及び筋肉のグリコーゲン量の減少、血中の乳酸濃度の増加が認められた。肝臓水解物の単回投与群は、肝臓及び筋肉のＡＭＰＫの活性化が認められた。また、肝臓水解物の単回投与群は、自発運動量及び筋肉グリコーゲン量は顕著に増加し、血中の乳酸濃度は減少した。肝臓水解物の数日間投与群は、肝臓水解物の単回投与群の投与量よりも低用量で自発運動量が増加した。

【結論】肝臓水解物の投与により肝臓及び筋肉のＡＭＰＫが活性化し、グリコーゲンを有効利用することでＡＴＰ産生が促進し、肉体疲労改善効果を示す可能性が示唆された。

liver hydrolysate, physical fatigue, 5'-AMP-activated protein kinase

講演番号：3B07p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ B 校舎 07 会場

ココア摂取による体表温の上昇に寄与する成分の検討

Components of cocoa contributing to changes in body surface temperature

○森 紀之[1]、岡村 実咲[1]、中山 由子[1]、亀井 優徳[2]、灘本 知憲[1]([1]滋賀県大人間文化、[2]森永製菓株式会社)
○Noriyuki MORI[1], Misaki OKAMURA[1], Yuko NAKAYAMA[1], Masanori KAMEI[2], Tomonori NADAMOTO[1] ([1]Univ. of Shiga Pref., [2]Morinaga Co., Ltd.)

【目的】　冷え性は通常の人が苦痛を感じない程度の冷涼環境下において、身体の一部、特に四肢末端や腰部が他の部位に比べ冷たく感じる症状とされている。冷え性にははっきりとした診断基準がなく、末梢血流量の改善による体表面温低下の改善などが症状の軽減に有効であるとされている。これまでに演者らは、純ココアの摂取により身体の末梢部位の体表温が上昇するということを明らかにしている。しかしながら、純ココアに含まれるどのような成分が末梢部位の体表温の上昇に寄与しているのかは不明であった。純ココアにはテオブロミンが多く含まれている。テオブロミンは古くは動脈硬化症、末梢血管疾患、狭心症、高血圧症などの治療薬として用いられた歴史があり、純ココア摂取による身体の末梢部位の体表温の上昇にはテオブロミンによる血管拡張作用などの影響が考えられた。そこで本研究はテオブロミンの純ココア摂取による末梢体表温の上昇作用への関与について検討することを目的とした。

【方法】　冷え性の自覚のある女子学生 9 名を被験者とし、試料摂取前後の体表温および末梢血流量の測定を恒温室にて行った。体表温の測定部位は額、腹、背中、手首、手指先、足指先とし、末梢血流量の測定部位は左手薬指とした。摂取試料として純ココア、テオブロミンレスココア、テオブロミンレスココアにテオブロミンを純ココアと同量になるように添加したテオブロミン添加ココアを用いた。試験試料は60℃にて摂取した。体表温および末梢血流量の測定は試料摂取5 分前から摂取45 分後まで行い、摂取後の体表温の変化を比較した。

【結果】　手首および手指先ではテオブロミンレスココア摂取時と比較してテオブロミン添加ココアおよび純ココア摂取時に体表温の上昇が増大し、さらにテオブロミン添加ココア摂取時と比較して純ココア摂取時の方が体温上昇の変化が大きい傾向が確認された。末梢血流量の変化では各群間に手首、手指先と同様の傾向が確認された。足指先ではテオブロミン添加ココア群で他の２群より試料摂取後の体表温が高値を示す傾向が確認された。以上の結果より、純ココア摂取によるヒトの末梢部位の体表温の上昇にはテオブロミンが寄与していることが考えられた。

cocoa, theobromine, feeing of Cold

講演番号：3B07p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ B 校舎 07 会場

ココア飲用による計算能力向上効果について：カカオ類の日常摂取頻度の影響

Effect of cocoa drink on arithmetic performance :relation to intake frequency of chocolate and cocoa drink

○西村 雅明[1]、佐藤 広康[2]、亀井 優徳[1] ([1]森永製菓株式会社、[2]四天王寺大学)
○Masaaki NISHIMURA[1], Hiroyasu SATOH[2], Masanori KAMEI[1] ([1]Morinaga & CO.,LTD., [2]Shitennoji Univ.)

【目的】ココアは、嗜好飲料としてのみならず機能性飲料としてもよく知られるようになってきた。ココアに含有されるカカオポリフェノールには血管拡張による脳血流改善効果が報告され、認知能力の向上効果が期待されている。また、テオブロミンの類緑体であるカフェインを含むコーヒーの計算能力向上効果がすでに報告されている。しかしながら、日常の生活の中でコーヒーを常飲している人ではその効果が減弱されることも報告されている。そこで我々は、カカオポリフェノールやテオブロミンを含有するココアによる計算能力向上効果を検証した。また併せて、日常のココアおよびチョコレートの摂取頻度についてアンケート調査を実施し、ココアによる計算能力向上効果が日常のココアおよびチョコレートの摂取頻度により影響を受けるかどうか検証した。
【方法】中学 2 年生、3 年生の男女 207 人を男女比がほぼ同じになるように無作為に 2 群に分け、試験飲料として、ココアまたはココアと等カロリーの対照飲料（キャラメル風味）を摂取させた。被験者にはクレペリン検査様の加算計算問題を課し、各試験飲料の摂取前・後（15－75 分）の解答数、正答数、および誤答率を統計処理し比較検討した。また、これら被験者に対して日常のココア及びチョコレートの摂取頻度を調べる為にアンケート調査を実施し、同様に解析した。
【結果】各試験飲料の摂取 45 分後に、ココア摂取群は、対照飲料摂取群に比較して、解答数、および正答数ともに有意に増加した。しかし、誤答率に有意差は認められなかった。次に、誤答率の高い被験者だけを除いて統計処理をすると、ココア摂取群と対照飲料摂取群の差はより顕著になった。さらに、被験者の日常的なココア及びチョコレートの摂取頻度を調べ、摂取頻度の高い（週 1 回以上の頻度でココアまたはチョコレートを摂取する）被験者と摂取頻度が低い（摂取しないを含む）被験者の 2 つに層別した。その結果、摂取頻度が低い層よりも摂取頻度が高い層の方が、ココア摂取群と対照飲料摂取群の計算能力向上効果の差が顕著だった。これらの結果から、一杯のココア摂取により計算能力の向上効果が認められ、また、日常的にココアまたはチョコレートを摂取する頻度の高い層でその効果が大きいことが示唆された。

cocoa, chocolate, arithmetic performance

講演番号：3B07p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ B 校舎 07 会場

mRNA-Seq 法を用いた味蕾特異的発現遺伝子の網羅的解析

Comprehensive mRNA expression analysis by mRNA-Seq method to reveal the genes specifically expressed in the taste buds

○角田 俊介[1]、石丸 喜朗[1]、吉澤 真人[1]、吉岡 美紗子[1]、朝倉 富子[1]、阿部 啓子[1,2]（[1]東大院農生科・応生化、[2]KAST）
○Shunsuke KADOTA[1], Yoshiro ISHIMARU[1], Masato YOSHIZAWA[1], Misako YOSHIOKA[1], Tomiko ASAKURA[1], Keiko ABE[1,2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]KAST)

【目的】既存の遺伝子発現解析手法と比べて、mRNA-Seq 法は全組織中の発現量が低い遺伝子に対しても高い定量性をもって解析できること、新規遺伝子も解析対象となること、さらに mRNA 配列（スプライシングバリアント）情報も入手可能なことで優れている。本研究では、mRNA-Seq 法を用いて、味蕾特異的に発現する遺伝子を網羅的に解析することで、新規味覚関連遺伝子の探索を行うことを目的とした。
【方法と結果】野生型マウスの有郭乳頭上皮と周辺上皮からそれぞれ抽出した全 RNA を用いて、mRNA-Seq 法による遺伝子の発現解析を行い、各遺伝子の有郭乳頭上皮（CV）と周辺上皮（Epi）における発現量を調べた。また、転写調節因子 Skn-1 遺伝子欠損マウス味蕾では、Ⅱ型細胞が消失し、Ⅲ型細胞に置き換わっている。そこで、各遺伝子がどの細胞種に発現するかを予測するために、Skn-1 遺伝子欠損（S KO）マウスと野生型（WT）マウスの CV 値を比較した。その結果、既知の味蕾特異的発現遺伝子の大部分は、CV>3 かつ CV/Epi>3 を満たしていた。また、Tas1rs、Gαgust などⅡ型細胞特異的に発現する遺伝子は、CV 値の S KO/WT 比が 0.25 以下であるのに対して、Pkd1l3 や Car4 などⅢ型細胞特異的に発現する遺伝子は 1.5 以上であった。次に、CV>3 かつ CV/Epi>3 を満たす 1123 遺伝子から味蕾における発現が報告されていない 76 遺伝子を選択し、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、有郭乳頭味蕾における組織学的な発現解析を行った。現在までに、Msln や Inhbb など 17 個の新規味蕾特異的発現遺伝子を同定することができた。

mRNA-Seq, taste, Skn-1

講演番号：3B07p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ B 校舎 07 会場

レポーターアッセイを用いた客観的味評価系の開発

Development of a taste evaluation system using a reporter assay.

○鈴川 縁、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Yukari SUZUKAWA, Takumi MISAKA (Dept. Appl. Biol. Chem. , the Univ. Tokyo)

【目的】近年、甘味・旨味・苦味といった基本味の受容に関わる味覚受容体が同定された。これらの味覚受容体を培養細胞に発現させ、味物質に対する細胞応答を測定することで、味覚の強度を客観的に評価することが可能となってきた。G タンパク質共役型受容体である甘味・旨味・苦味受容体では、Gq ファミリーのキメラ G タンパク質と受容体を培養細胞に共発現させ、受容体の活性化によって上昇する細胞内 Ca^{2+}濃度をカルシウム感受性蛍光指示薬やカルシウム依存的発光タンパク質によって感知する手法が汎用されている。この実験法はリガンドによる刺激直後にリガンドの存在下で蛍光強度変化または発光を検出するため、自家蛍光や色素を持つ物質の評価は困難であり、現在探索・評価できる呈味物質は限られている。
しかし食品成分中には多くの物質及び呈味物質が共存しており、測定可能なリガンドの範囲を広げるような測定手法の開発が必要だと考えられる。そこで新たにレポーターアッセイ法を試行することを考えた。レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを利用する手法では、刺激に用いる成分を洗浄した後に活性測定を行うため、旧来の方法では測定できないような食品サンプルの評価が可能になると考えられる。
【方法】レポーター遺伝子として G タンパク質の活性化を検出できる市販の各種コンストラクトを用いた。培養細胞に味覚受容体、キメラ G タンパク質、レポーター遺伝子を一過的に発現させ、6-24 時間のリガンド処理を行った。細胞外液を洗浄後、細胞溶解液を用いて細胞を溶解し、細胞内に蓄積されたルシフェラーゼ量をルミノメーターを用いて測定した。
【結果】自家蛍光物質や色素などを含んだリガンドをレポーターアッセイで評価できるか検討するために、培養細胞に内在する G タンパク質共役型受容体を用いた評価を行った。多種類の色素・蛍光物質を混合したリガンドで刺激した場合においても受容体刺激に特異的な応答が検出できたため、本実験法が多様な食品成分の味覚評価に応用可能であると推測できる。現在味覚受容体を遺伝子導入した細胞においても、レポーターアッセイを行い最適化を実施している。

taste receptor, reporter assay, colorant

講演番号：3B07p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ B 校舎 07 会場

メダカにおける味覚関連遺伝子群の発現様式
Expression patterns of the taste signal transduction molecules in medaka fish
○家木 誉史、池永 直弥、吉田 晃子、岡田 晋治、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Takashi IEKI, Naoya IKENAGA, Akiko YOSHIDA, Shinji OKADA, Takumi MISAKA (Tokyo Univ.)

【目的】食品中の呈味物質は口腔内などに存在する味蕾という器官で受容される。味蕾は、複数の細胞種から構成されるヘテロな細胞集団であり、それぞれの細胞種は異なる組み合わせで、5 基本味の受容体や細胞内シグナル分子などの味覚関連分子を発現している。ヒト、マカク、マウス、ラット、ゼブラフィッシュなどについて、味覚関連分子の発現様式が解析されており、その発現様式が各生物種において異なることが明らかになってきた。このことから各生物の食性、摂食行動に適応した味覚感覚を獲得するように、味覚関連分子の発現様式は進化してきたと考えられる。しかし、味覚関連分子の発現様式が解析された生物種は限られており、その詳細は不明である。本研究において我々は、モデル生物の 1 つであるメダカの味蕾における味覚関連分子の発現様式の解明を目的とした。メダカはゼブラフィッシュと同じく硬骨魚類であるが、進化系統的に離れており、硬骨魚類の共通性や魚種による特異性について考察が可能であると考えた。また、メダカをモデルとして味覚システム研究を行う上での基盤的知見となる。【方法と結果】ゼブラフィッシュでの解析と同様に、2 つの GPCR 型味覚受容体ファミリーT1Rs (T1R1、T1R2a、T1R2b、T1R2c、T1R3 の混合) および T2R1、G タンパク質 Gαia、Gα14、エフェクター分子 PLC-β2、酸味受容細胞マーカーPKD2L1 の各プローブを用いて、メダカ成魚の薄切切片に対する二重標識 *in situ* ハイブリダイゼーションによってこれらの遺伝子の発現相関を解析した。体軸前後方向での発現様式の違いを調べるため、鰓周辺部と咽頭歯部の味蕾においてそれぞれ陽性細胞数を計数した。メダカ味蕾において、PLC-β2 と PKD2L1 とは排他的に発現していた。PLC-β2 発現細胞は、Gαia を共発現する細胞と Gα14 を共発現する細胞とに二分されていた。T1Rs および T2R1 は Gαia 発現細胞特異的に発現しており、互いの発現は排他的であった。両者で Gαia 発現細胞の大部分を占めたが、一部いずれの味覚受容体も発現していない細胞が存在した。体軸前後で比較すると、鰓周辺部の味蕾では Gα14 発現細胞と Gαia 発現細胞の割合が 7:3 であったのに対し、より後方に存在する咽頭歯部の味蕾ではその割合が逆転していた。これらの結果をゼブラフィッシュと比較すると、PLC-β2 発現細胞が Gαia 発現細胞と Gα14 発現細胞とで二分される点、T1Rs、T2Rs の 2 つの味覚受容体が Gαia 発現細胞特異的に発現している点が共通であり、硬骨魚類共通の特徴であることが示唆された。一方メダカでは、ゼブラフィッシュに比べて Gαia 発現細胞中の味覚受容体発現細胞の割合が高く、ゼブラフィッシュでは一部発現が重なる T1Rs と T2Rs が互いに排他的に発現している点が異なっており、生物種特異的な特徴であることが示された。

medaka fish, taste bud, double-label *in situ* hybridization

講演番号：3B07p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ B 校舎 07 会場

メダカ味覚受容体 T1R1 の転写制御配列の取得

Identification of the transcriptional regulator of T1R1 taste receptor in medaka fish

池永 直弥、○吉田 晃子、家木 誉史、岡田 晋治、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
Naoya Ikenaga, ○Akiko Yoshida, Takashi Ieki, Shinji Okada, Takumi Misaka (Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

[目的]食品中に含まれる味物質は、口腔内などに存在する味蕾という器官で受容される。受容された味覚情報は中枢神経系へと伝達され、味として認識される。味蕾は、5 基本味、甘、旨、苦、酸、塩のそれぞれの味受容細胞など複数の細胞種から構成される。このような味の受容・伝達・認識システムを研究する上で、特定の味蕾細胞種において外来遺伝子の発現を誘導できる転写制御配列は解析ツールとして有用である。

われわれの研究グループでは、小型魚類の一種であるメダカを脊椎動物の味覚研究のモデルとして解析を行ってきた。これまでに、味蕾に発現するエフェクター分子、メダカホスホリパーゼ Cβ2(mfplcb2)遺伝子の上流 1.6kbp の配列が転写制御配列として機能することを示した。mfplcb2 発現細胞の一部には 2 つの味覚受容体ファミリーT1Rs、T2Rs が共発現しており、この転写制御配列を用いて外来遺伝子導入を行うことで、味受容細胞内シグナリングの阻害や味受容細胞を起点とした味覚情報伝達神経回路の可視化を実現した。しかし、メダカ味蕾細胞で利用可能な転写制御配列は他に報告がなかった。本研究においてわれわれは、新たな味蕾細胞種特異的に機能する転写制御配列として、味覚受容体 T1R ファミリーの 1 つであり、旨味(アミノ酸)受容体サブユニットの構成分子であるメダカ T1R1(mfT1R1)の転写制御配列の取得を目的とした。

[方法・結果]ゲノムデータベース検索によって、mfT1R1 遺伝子の上流-3.0kb の位置に他の遺伝子が存在することが明らかになった。そこで mfT1R1 遺伝子上流-3.0kb から-1 までの配列を転写制御配列候補とし、メダカゲノム DNA を鋳型とした PCR によって取得した。転写制御活性をしらべるため、取得した配列の下流に EGFP を接続したコンストラクトを作製し、メダカ受精卵に微量注入することで、トランスジェニック(Tg)メダカを作出した。得られた Tg メダカ稚魚の EGFP 蛍光を観察したところ、口唇や鰓耙の味蕾存在部位において陽性細胞が観察された。その他の部位においては EGFP 蛍光は観察されなかった。そこで、蛍光が観察された Tg メダカを野生型メダカとの交配によって系統化した。系統化によって得られた F2 世代の Tg メダカにおいて、内在 T1R1 と発現誘導された EGFP との発現相関を詳細に解析するため、薄切切片に対する二重 *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、内在 T1R1 mRNA を発現するほとんど全ての細胞で EGFP mRNA が共存していることが明らかになった。以上の結果から、取得した mfT1R1 遺伝子上流領域 3.0kbp の配列が転写制御配列として機能することを示した。

medaka fish, transcriptional regulator, taste receptor

講演番号：3B07p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ B 校舎 07 会場

マウス有郭乳頭における味蕾マーカーとしての *Ulex europaeus* agglutinin-1 の有用性

Ulex europaeus agglutinin-1 is a useful taste bud marker at circumvallate papilla of the mice

○吉本 靖東[1,2]、岡田 晋治[1]、山上 圭吾[2]、三坂 巧[1]([1]東大院農生科・応生化、[2]ミツカン・中研)
○Joto Yoshimoto[1,2], Shinji Okada[1], Keigo Yamagami[2], Takumi Misaka[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo, [2]Central Research Institute, Mizkan Group Corporation)

【目的】脊椎動物の味覚受容器である味蕾は複数種の細胞集団から構成され、それぞれが異なる味質の受容を担っている。味物質の受容およびその細胞内シグナル伝達には依然として不明な点が多く、各味細胞種にて発現する遺伝子やタンパク質を同定することにより、その解明が試みられてきた。同時に、各味細胞種を識別するためのマーカーも味覚研究において重要な役割を担っていた。

いくつかのレクチンは味蕾の一部の細胞と特異的に結合することが報告されており、味細胞マーカーとして利用できることが示されてきた。*Ulex europaeus* agglutinin-1(UEA-1)はα(1,2)フコースと特異的に結合するレクチンであり、マウスを含む数種の哺乳類において味細胞を特異的に染色することが報告されている。しかしながら UEA-1 がどの種類の味細胞を染色するか、あるいは味細胞のどの領域を染色しているかについての詳細な解析はなされていない。また、免疫組織染色(IHC)と比べて組織に対して多くの処理を必要とする *in situ* hybridization(ISH)による mRNA 発現解析においても UEA-1 が味蕾マーカーとして使用できるかについての報告はない。本研究は、脊椎動物の味覚受容システムの研究に組織学的観点から貢献することを目的に、UEA-1 の味蕾マーカーとしての有用性について詳細な検討を行った。

【方法】マウスの有郭乳頭(CvP)を含む新鮮凍結切片を作製し、パラホルムアルデヒドで固定した。続いて、ビオチン標識した UEA-1 と既知の味蕾マーカーの抗体を用いて多重染色を行い、UEA-1 が染色する細胞種を同定した。また、味細胞にて発現既知な遺伝子の cRNA アンチセンスプローブを用いて蛍光二重 ISH を施し、続いてビオチン標識した UEA-1 で染色を行うことで ISH における UEA-1 の有効性を検討した。

【結果】既知の味蕾マーカーである KCNQ1 は、Ⅰ型、Ⅱ型、Ⅲ型およびⅣ型細胞を全て染色することが明らかとなっている。抗 KCNQ1 抗体と UEA-1 の多重染色を行った結果、両者によって染色された細胞は完全に一致していた。このことは UEA-1 が味蕾の全細胞を染色することを免疫組織化学的に示せたといえる。さらに、抗 ZO-1 抗体と UEA-1 の多重染色により、抗 KCNQ1 抗体では染色されないタイトジャンクションより上部の味孔部組織でも UEA-1 染色が認められることを明らかにした。また、固定、酵素消化、アセチル化を実施した蛍光二重 ISH 後の組織でも、mRNA の染色像とともに UEA-1 の味蕾特異的な染色像を得ることができた。これらのことから、マウスの CvP において IHC および ISH と共染色可能な UEA-1 は、味蕾の全細胞を標識できる有用なマーカーであることを示すことができた。

taste bud, lectin histochemistry, *in situ* hybridization

講演番号：3B07p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ B 校舎 07 会場

ヒト甘味受容体に作用する新規天然化合物の探索と機能評価

A novel natural compound acts on human sweet taste receptor

○寺田 育生、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Ikuo TERADA, Takumi MISAKA (Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

【目的】関東から九州の沿岸に生息するホンドオニヤドカリ *Aniculus miyakei* は、その中腸腺を食した後に何を味わっても甘味を誘起させるという性質を持つことが経験的に知られている。この現象のメカニズムについては全く知見が得られていないため、活性物質の探索と機能解析を行った。

【方法及び結果】ホンドオニヤドカリの中腸腺を 1－ブタノールによって抽出後、イオン交換樹脂 HP20、順相シリカゲル及び逆相 ODS 固相抽出などのクロマトグラフィによって分離・精製した。得られた精製物を NMR、元素分析、質量分析にて解析した結果、Sodium 3-(*E*)-octenyl sulfate（SOS）であることが判明した。

精製した SOS の甘味活性を官能評価した結果、SOS を口に含んだ時点では甘味を示さず、その後に水を味わうと甘味が誘起されることが判明した。またヒト甘味受容体を発現させた培養細胞を用いて甘味強度を客観的に評価した結果、SOS を添加した際には細胞応答は認められず、その後に緩衝液で潅流洗浄すると細胞応答を示すという非常にユニークな特性を有していることが明らかになった。

以上の結果から、ホンドオニヤドカリの甘味を誘起する現象は SOS がヒト甘味受容体に結合し、その後に解離する際に受容体を活性化させることで生じることが示唆された。

natural product, sweet, taste receptor

講演番号：3B07p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ B 校舎 07 会場

ヒト甘味受容体を活性調節するフレーバー化合物の探索

Characterization of flavor compounds that modulate human sweet taste receptor

○野尻 健介[1,2]、藤原 聡[1]、山本 直人[1]、中北 智哉[2]、三坂 巧[2]([1]長谷川香料（株）、[2]東大院農生科・応生化)
○Kensuke Nojiri[1,2], Satoshi Fujiwara[1], Naoto Yamamoto[1], Tomoya Nakagita[2], Takumi Misaka[2]
([1]R&D Center, T. Hasegawa Co., Ltd., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

【目的】
フレーバー化合物の中には匂いを呈するのみならず、味に影響するものが知られている。例えば、シンナムアルデヒドはそれ自身が甘味を呈し、ダマスコンはスクロースの甘味を抑えることが報告されている。我々はヒト甘味受容体発現細胞を用いることにより、シンナムアルデヒドがヒト甘味受容体を活性化することを確認し、フレーバー化合物が味覚受容体にも作用しうることを明らかにした。本研究では、ダマスコンの甘味抑制作用がヒト甘味受容体の活性抑制を介した作用であるかを検証した。さらに他のフレーバー化合物がヒト甘味受容体に作用する可能性も考えられたため、汎用的なフレーバー化合物が有するヒト甘味受容体の活性調節作用を評価した。
【方法】
ヒト甘味受容体（hT1R2/hT1R3）およびキメラGタンパク質(hG16gust44)を安定発現させた細胞へフレーバー化合物を各種甘味料とともに投与した。リガンド投与により生じるヒト甘味受容体発現細胞内のCa^{2+}濃度変化を受容体活性の指標とし、甘味料のみの場合をコントロールとして甘味調節活性を評価した。
【結果】
ダマスコンのヒト甘味受容体への作用を検証ところ、ヒト甘味受容体のスクラロースに対する応答はダマスコン存在下で有意に抑制された。この抑制効果は0.04～1 mMの範囲において濃度依存的に観察された。またダマスコンによる甘味受容体の応答抑制効果はスクロース、ペリラルチン、シクラメート等、様々な甘味料を用いても観察された。したがってダマスコンはヒト甘味受容体に直接作用することで甘味を抑制していることが強く示唆された。現在、汎用的なフレーバー化合物（約400種）を選定し甘味受容体への作用を評価している。

flavor, sweet, taste receptor

講演番号：3B07p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ B 校舎 07 会場

旨味受容体 T1R1/T1R3 の L-Glu 活性を決定する因子の同定

Identification of the Determinants of the L-Glu Activity in T1R1/T1R3

○戸田 安香、中北 智哉、岡田 晋治、成川 真隆、石丸 喜朗、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○ YASUKA TODA, TOMOYA NAKAGITA, SHINJI OKADA, MASATAKA NARUKAWA, YOSHIRO ISHIMARU, TAKUMI MISAKA (Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

【背景と目的】

近年、甘味、旨味、苦味といった基本味の受容に関わる味覚受容体や、辛味や冷感などの味感覚に関わる受容体など、様々な味物質の受容に関わる分子が同定されてきた。旨味受容体としては T1R1/T1R3、mGluR1、mGluR4 など複数の候補分子が報告されている。これらの中で T1R1/T1R3 は旨味感覚に特有な「核酸とアミノ酸による旨味の相乗効果」を媒介する重要な受容体である。T1R1/T1R3 は L-アミノ酸の味を受容する分子として 2002 年に同定され、その受容するアミノ酸の種類には動物種差があることも明らかとなった。ヒト T1R1/T1R3 は官能評価において強い旨味を感じる L-Glu により強く活性化されるが、マウス T1R1/T1R3 は酸性アミノ酸に対する感度が悪く、一方で L-Ala や L-Ser などの他の幅広い L-アミノ酸により強く活性化される。しかし、この動物種ごとに異なるアミノ酸受容の分子メカニズムは未解明のままであった。

これまでに、我々は T1R1/T1R3 の味物質に対する応答を高感度かつハイスループットに検出可能な新規細胞評価系の構築に成功している（2013 年度本大会にて発表）。そこで、本細胞評価系を用い、T1R1/T1R3 における L-Glu 活性に影響を与える因子の探索を行った。

【方法】

T1R1 の全領域を網羅するようなヒト-マウスキメラ T1R1 および点変異体発現プラスミドを作製した。これらの受容体を T1R3 サブユニットと共に培養細胞に発現させ、L-Glu 活性を野生型と比較することで、L-Glu 受容に重要な残基の絞込みを行った。変異体実験により L-Glu 受容に重要な残基として同定された残基を T1R1 の分子モデル上にマッピングし、マウスとヒトの T1R1/T1R3 間で L-Glu 活性にどのような差異が生じるのか考察した。

【結果】

L-Glu 活性に決定的な影響を与える残基を 2 残基同定した。これら 2 残基は T1R1 サブユニットの L-Glu 結合領域内に上下対になって存在していた。この 2 残基はマウス T1R1 では酸性アミノ酸残基であるのに対し、ヒト T1R1 ではアラニン残基であった。よって、マウス T1R1 では、L-Glu 結合時にこれらの酸性アミノ酸残基と L-Glu の側鎖のカルボキシル基との間で静電的な反発が生じるため、L-Glu 活性が低くなると推察された。一方で、ヒト T1R1 はこれらの残基の負電荷が消失したために、高い L-Glu 活性を獲得したと考えられた。

taste receptor, umami, G protein-coupled receptor

講演番号：3B07p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ B 校舎 07 会場

レタス苦味成分のヒト苦味受容体発現細胞を用いた評価

Evaluation of bitter compounds in lettuce by human bitter taste receptor-expressing cells

○柳澤 琢也[1,2]、木村 義治[1]、久能 昌朗[1]、高宮 満[1]、三坂 巧[2]([1]キユーピー（株）、[2]東大院農生科・応生化)
○Takuya YANAGISAWA[1,2], Yoshiharu KIMURA[1], Masaaki KUNOU[1], Mitsuru TAKAMIYA[1], Takumi MISAKA[2] ([1]Kewpie Co., [2]Tokyo Univ.)

【背景】

近年、野菜は消費者の嗜好に合わせて食べやすさ（特有の香りや苦味の抑制、食感の向上など）を目指した品種改良が進み、サラダなど生食で食べられる野菜が増えている。さらに健康志向の高まりから、野菜に含有される機能性成分に着目した品種改良や栽培技術の開発が実施され、機能性成分を多く含む野菜も市場で販売されるようになった。このように、野菜をおいしく食べて健康になりたいという要望は高いものの、野菜の苦味に対する許容範囲は一般に広くはない。野菜をおいしくたくさん食べられるようにするため、野菜の苦味の受容機構を解析し、それを適切に制御する技術が求められている。

【目的】

野菜の苦味を客観的に評価できれば、品種改良・栽培・加工技術による苦味低減効果を適切に判断することができる。またその受容機構が解明できれば、苦味を制御する調理技術・素材探索・調味料によるおいしい食べ方の提案などに繋げることも可能となる。多くの苦味成分に応答するヒト苦味受容体が明らかになっているものの、受容体の特定や苦味強度評価が実施されていない苦味成分も多く残されている。本研究では、国内消費量が多いレタスの苦味に注目し、代表的な 3 種の苦味成分について、対応する苦味受容体の探索と苦味強度の評価を行った。

【方法と結果】

HEK293T 細胞にヒト苦味受容体（hTAS2Rs）、キメラ G タンパク質の各遺伝子を導入し、一過的に発現させたヒト苦味受容体発現培養細胞を用いて解析を実施した。蛍光カルシウム指示薬（Fura-2）により細胞を標識し、リガンド添加前後における蛍光画像を蛍光顕微鏡により取得した。2 波長励起による蛍光比（F340/F380）を擬似カラーで表示し、細胞応答を観察した。

レタスに含有される苦味成分（3 種）を 1～300μM の濃度で hTAS2R46 発現細胞に投与したところ、リガンド投与により細胞応答を示すことが確認された。また、苦味成分の 1 種については EC_{50} 値が約 30～100μM の範囲であることも明らかとなった。これらの結果は、既に報告されている各成分の苦味閾値の結果と良い相関を示した。以上のことから、レタスの苦味を味覚受容体発現細胞を用いて評価できる可能性が示された。

lettuce, bitter compounds, human bitter taste receptor-expressing cells

講演番号：3B07p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ B 校舎 07 会場

ポリフェノールに応答する苦味受容体の同定
Identification of human bitter taste receptor which responds to polyphenol
○成川 真隆、三坂 巧（東京大院農生科）
○Masataka NARUKAWA, Misaka TAKUMI (Univ. Tokyo)

［背景・目的］ポリフェノールは代表的なフィトケミカルであり、果実や穀物をはじめとして様々な植物に含まれている。近年、大豆ポリフェノールを中心にその抗酸化能に関する研究が進展し、抗菌作用、抗腫瘍作用など多くの機能性が報告されている。しかし、ポリフェノールは苦味を呈することから、食品の嗜好性を低下させる原因となる。そのため、ポリフェノールの苦味をコントロールすることは食品の品質を向上させる上で重要である。

苦味は口腔内に存在する苦味受容体によって受容される。苦味のマスキングに関して、古くから研究が行われている。しかし、苦味受容メカニズムが明らかになっていないため、食品の苦味は対処療法的に管理されてきた。特に、数百以上も存在するポリフェノールの受容に関する研究の進展は鈍い。そこで、ポリフェノールが呈する苦味の定量化及び苦味抑制法の開発を目指し、本研究ではポリフェノールに応答を示す苦味受容体の同定を試みた。

［方法］ヒト胎児腎由来 HEK293T 細胞に苦味受容体およびキメラ G タンパク質を一過的に発現させ、カルシウム蛍光指示薬 Fluo-4AM を負荷し、ポリフェノール投与時における細胞内カルシウム濃度の変化を測定した。代表的なポリフェノール化合物をサンプルとして用い、マルチウェルプレートリーダーを用いたハイスループット測定を行った。

［結果］ヒト苦味受容体は 25 種類存在する。それぞれの苦味受容体を発現させた細胞を用いて、一次スクリーニングを行った。テストしたポリフェノールのうち、アピゲニン、バイカレイン、レスベラトロールに応答する苦味受容体の存在を確認した。現在、詳細な濃度応答関係を検討している。

本研究はタカノ農芸化学研究助成財団からの助成により行われた。

Bitter taste receptor, Polyphenol

講演番号：3C01a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ C 校舎 01 会場

Influenza virus sensing system via PL enhancement monitoring using AuCNT and CdTe quantum dot

○Jaewook LEE[1], Rahin Ahmed Syed[2], Sangjin Oh[3], Enoch Y. Park[1,2] ([1]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [2]Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [3]Department of Cogno-Mechatronics Engineering, Pusan National University)

Recently, many carbon based nanomaterials have been interested because of their potential property. Among of them, gold nanoparticles (AuNPs) decorated carbon nanotube (AuCNT) has been spotlighted due to its great functions such as optical, plasmonic, electrical, and catalytic properties and so on.[1-3] Here, we successfully synthesized AuCNT at the room temperature with mild conditions for influenza virus detection. The synthesis reaction occurred in two steps: the first step was the adhesion of Au ions on the CNT under the sonication process. The second step was the reduction of Au ions by phytochemicals, and conversion of Au NPs on the CNT surface. In particular, this AuCNT possesses great plasmonic property, which is based on the plasmon of AuNPs and pi electrons of CNT. And if some quantum dot nanoparticles (CdTe NPs) which have photo luminescence (PL) property are located near AuCNT nanostructure, their PL intensity could be enhanced by plasmonic resonance energy transfer (PRET). Therefore we demonstrated the influenza virus detection using this phenomenon. In our system, two different antibodies were decorated on the surface of AuCNT and CdTe NPs, respectively. Subsequently, different amounts of influenza virus were added into nanomaterials environment. In this case, two different nanostructures were bound by antigen-antibody reaction. As increased the virus concentration, PL intensity was also increased. It established that the binding ratio between AuCNT and CdTe NPs was changed according to the virus concentration. Moreover, it means that influenza virus was detected by PL enhancement monitoring. Therefore, this technique is extraordinarily valuable to detect the influenza virus.

1. Hao Kong, Yuexiang Lu, He Wang, Fang Wen, Sichun Zhang, and Xinrong Zhang, Protein Discrimination Using Fluorescent Gold Nanoparticles on Plasmonic Substrates, *Anal. Chem*. **2012**, *84*, 4258−4261.

2. Haitao Wang, Zhuxin Dong, and Chongzheng Na, Hierarchical Carbon Nanotube Membrane-Supported Gold Nanoparticles for Rapid Catalytic Reduction of p‑Nitrophenol, *ACS Sustainable Chem. Eng*. **2013**, *1*, 746−752

3. Calum F McAndrew and Mark Baxendale, High electrical conductance enhancement in Au-nanoparticle decorated sparse single-wall carbon nanotube networks, *Nanotechnology* **2013**, *24*, 305202/1-305202/10

Virus detection, AuCNT, Quantum dot

講演番号：3C01a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ C 校舎 01 会場

卵白アルブミン、β-ラクトグロブリン、およびトロポミオシンのアレルゲン高感度測定

A Simple and Sensitive Immunoassay for Allergen Determination of Egg-ovalbumin, ß-lactoglobulin and Tropomyosin

○大岡 尚貴、斎木 博、鈴木 義規（東京工科大学院）
○Naoki Ooka, Hiroshi Saiki, Yoshinori Suzuki (Tokyo University of Technology)

［背景・目的］
食物アレルギーは先進国で特に問題視されており、成人人口の約２％、小児人口の約８％に影響している。そして、食物アレルギーの原因食物の一つである鶏卵は子供の食物アレルギーの最も頻繁な原因となっている。この他にも多くの食品でアレルギー症状がみられ、卵、牛乳、小麦、えび、かに、そばが日本の法令により特定原材料に指定されている。本研究では卵アレルゲンである卵白アルブミン、乳アレルゲンであるβ-ラクトグロブリン、えび、かにのアレルゲンであるトロポミオシンの新規測定法開発を目的としている。
［測定方法］
PMMA ビーズ（ガンツ化成）と抗原との結合は抗原タンパクの疎水性部分と PMMA との疎水結合により吸着された。KinExA のフローセル中にビーズを充填し、サンプルを流して抗原と結合していない遊離抗体のみがビーズ上の抗原と結合する。そこに、Cy5 二次抗体を流すことで遊離抗体に結合し蛍光強度を得ることが出来き、蛍光強度によりサンプル中の遊離抗体濃度から抗原濃度を求めることが可能である。使用試薬は以下の通りである。卵白アルブミン(Sigma、A5503)、β-ラクトグロブリン(L3908、Sigma)、トロポミオシン（Sigma、T2400)、マウス由来のモノクローナル抗卵白アルブミン（Sigma、A6075)、ラビット由来のβ-ラクトグロブリン抗体（ニッポンハム)、マウス由来のトロポミオシン（Sigma、T2780)、ヤギから精製したマウス IgG(H+L)に結合する Cy5（Jackson Immuno Research、115-176-003）
［結果・考察］
卵白アルブミン抗体を 10nM の濃度でビーズ上に 130 秒間流して、Cy5 二次抗体を流した結果 1V の充分なシグナル強度を得ることが出来た。一次抗体濃度 10 nM 中で段階希釈した卵白アルブミンを測定し、検量線を作成した。KinExA を用いて得られた卵白アルブミン検量線からこの測定法の検出限界は 5nM、測定範囲は 400 nM~5 nM であった。また、この抗体の Kd は 34.32nM であった。同様にβ-ラクトグロブリン検量線から検出限界は 20 pM、測定範囲は 200 pM~20 pM であった。トロポミオシン検量線から検出限界は 200 pM、測定範囲は 200 nM~200 pM であった。KinExA を用いることにより高感度、簡易的、迅速、再現性のある食物アレルゲン測定法の開発をすることができた。

KinExA, Food Allergy, Egg-ovalbumin

講演番号：3C01a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ C 校舎 01 会場

抗原抗体反応を用いた抗生物質の新規測定法の開発

Development of new Bioassay on antibiotics

○福田 裕之、齋木 博、鈴木 義規（東京工科大学大学院）
○Hiroyuki FUKUDA, hiroshi SAIKI, yoshinori SUZUKI (tokyo university of Technology)

[背景・目的]

環境中に放出されている抗生物質は多剤耐性菌を生み出す原因となるため、環境中の抗生物質の存在量は正確に評価される必要がある。抗生物質の測定に使われている機器は HPLC や GC/MS があり、これらの機器は前処理に時間がかかり、また極微量で測定することができないといった問題点が生じる。KinExA 3000（Sapidyne 社, USA）を利用した免疫測定法は上記した機器よりも高感度かつ簡易的な分析が可能である。そこで本研究ではこの KinExA を用いて抗生物質の新規検出法の開発を目指す。

[測定方法]

KinExA の測定原理は固相にビーズを使用するフロー式の測定法である。セファロースビーズ（Epoxy-activated Sepharose 6B）上にカナマイシン（KM）を結合させる。KinExA の測定部にビーズを充填する。一次抗体（Anti-kanamycin,sheep-poly）が入ったサンプルを流すことでサンプル中の遊離の抗体がビーズ上の抗原に結合する。次に蛍光標識化された二次抗体（anti-IgG（H+L）, sheep , rabbit-poly , F(ab')2,Cy5）を測定部に流し二次抗体と結合させ励起光をあてることで、二次抗体からの蛍光強度が求められ、その蛍光強度から抗原濃度を示すことができる。

[結果・考察]

FT-IR によりセファロースビーズとカナマイシンとが結合しているのが確認できた。各種抗体濃度で測定した結果、5 nM で 1.73 V のシグナル強度の結果が得られた。次に抗原濃度を 1 ｆM ～ 100 nM の範囲で測定可能範囲を決める測定を行い 50 nM ～ 1 pM の範囲が測定可能ということがわかった。さらに測定可能範囲内で抗原溶液を希釈し測定を行った結果 KM の測定可能範囲は 100 pM ～ 2 nM（シグナル強度 10 %～90%）であることがわかった。KinExA での測定限界は Kd 値（解離定数）の約 10^{-1} 倍である。測定したカナマイシンの Kd 値は 240 pM で Kd 値から測定限界は約 24 pM という結果が出た。論理的には抗体濃度を薄めることにより測定限界値に近づけることができる。テトラサイクリンも同様の測定方法を用いて測定を行ったのでこれについても発表する。

Bioassay, antibiotics, antibody

講演番号：3C01a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ C 校舎 01 会場

酸処理を用いた SDS-PAGE によるプロテアーゼ含有試料の簡便な純度分析方法

A simple method of purity analysis for protease-containing samples by acid treatment SDS-PAGE.

○藤田 智大[1]、小川 俊[2]、吉川 潤[2]、塩田 一磨[1]([1]合同酒精（株）酵素医薬品工場、[2]合同酒精（株）酵素医薬品研究所)
○TOMOHIRO FUJITA[1], SHUN OGAWA[2], JUN YOSHIKAWA[2], KAZUMA SHIOTA[1] ([1]Godo Shusei Co.,Ltd.Enzyme and Pharmaceuticals Plant, [2]Godo Shusei Co.,Ltd.Enzyme and Pharmaceuticals Laboratory)

【目的】タンパク質の純度分析法として SDS-PAGE は一般的に用いられている。しかしながら、試料の前処理として煮沸処理の手間が必要となる上、試料中にプロテアーゼを含んでいる場合には前処理中に自己分解が起こり、分析結果に影響を及ぼすことがある。合同酒精(株)が製造しているプロテアーゼ製剤であるディスパーゼ®に関しても、再生医療領域を含む様々な分野で利用されているが、一般的な煮沸処理による SDS-PAGE では正確な純度分析が困難であった。医療分野での利用を考慮すると、正確に純度を分析する方法が必要であるため、SDS-PAGE の前処理法を検討し、プロテアーゼ製剤の正確で簡便な純度分析方法を開発した。
【方法】ディスパーゼ® I 溶液 50μl に 0.05 M 硫酸 50μl を混和し、サンプル処理液（25% グリセリン、5.0% SDS、ブロムフェノールブルーを含む）を 100μl 加え良く混和した後に、10μl を SDS-PAGE（15%ゲル）に供した。従来法 SDS-PAGE として、ディスパーゼ I 溶液に等量のサンプル処理液を加え良く混和し、3 分間煮沸した後に、10μl を SDS - PAGE に供した。
【結果】ディスパーゼ® I 及び高度精製品を従来法 SDS-PAGE に供すると、いずれにおいても、ディスパーゼタンパクのメインバンド以外に自己分解に因ると思われる低分子側のバンドが無数に認められた。ディスパーゼタンパクは中性金属プロテアーゼであることから、試料溶液に硫酸を添加し酸性下（pH 0.7～1.9）で即座に失活させることを試み、サンプル処理液を添加後、煮沸をせずに SDS-PAGE に供した結果、不純物バンドが殆ど認められなくなった。強酸性下にすることで自己分解が抑制され、変性したタンパク質は煮沸処理なしに SDS 化されることが示された。本法を用いディスパーゼ®製剤の純度を分析した結果、ディスパーゼ® I は 92%以上、高度精製品は 98%以上であることが明らかとなった。また本法は、他のプロテアーゼを含むタンパク質試料を分析する際にも有効であることが示された。

なお、本発表内容について国際特許出願中である（WO2011/062174、特願 2011-541932 特許査定）。

electrophoresis, protease, Dispase

講演番号：3C01a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ C 校舎 01 会場

中性子捕捉反応を利用した植物組織におけるホウ素の *in situ* 可視化法

in situ visualization of boron in plant tissues using neutron capture radiography

○木野内 忠稔[1]、小林 優[2] ([1]京大・原子炉、[2]京大院・農)
○Tadatoshi KINOUCHI[1], Masaru KOBAYASHI[2] ([1]Research Reactor Inst., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景】ホウ素は植物の微量必須元素であり、欠乏は新葉の展開阻害、肥大組織の壊死や不稔等の多様な生理障害をもたらす。ホウ素は細胞壁多糖ペクチンをホウ酸ジエステル結合で架橋し、細胞壁構造を安定化する役割を果している。植物体内には、この細胞壁ペクチン結合態ホウ素に加え、余剰のホウ素に相当する遊離の無機ホウ酸も存在する。ホウ素には放射性同位体が存在せず高感度微量分析が困難なため、これらの形態のホウ素が組織内あるいは細胞内でどのように分布しているかは明らかにされていない。そこで我々はホウ素中性子捕捉反応（BNC）を応用して植物組織中のホウ素を可視化・定量する方法の確立に取り組んでいる。ここではハツカダイコンおよびタバコ培養細胞 BY-2 を用いた条件検討の結果について報告する。
【方法・結果】本法では、試料中の ^{10}B の原子核が中性子を吸収し核崩壊する際に放出されるα線を、試料に密着させたプラスチック板（CR-39）に残る損傷痕（エッチピット）として検出することでホウ素の空間分布を解析する。まずタバコ培養細胞を試料として細胞レベルでのホウ素分布の解析を試みたところ実際にエッチピットを観察することができた。ホウ素の機能形態であるペクチン結合態ホウ素は細胞壁に局在するが、エッチピットは細胞壁に局在しているとの結果は得られず、むしろ固定に伴って凝集した細胞質部分により多く検出された。このことから、現在の方法では細胞壁ペクチン結合態ホウ素ではなく遊離の無機ホウ酸を検出しているものと考えられる。
【結論】水耕栽培したハツカダイコンの根から作成した凍結超薄切片を試料とした場合、ホウ素十分条件で栽培した根では、ホウ素欠乏条件で栽培した根に比べより多くのエッチピットが観察された。したがって本法を用いることで植物組織中の遊離無機ホウ酸を定量できると考えられ、将来的には作物のホウ素栄養診断等に応用できる可能性が示唆された。

Boron, neutron capture radiography, *in situ* visualization

講演番号：3C01a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ C 校舎 01 会場

化学発光を利用した HPLC ポストカラム法による Fe(III)キレーターの分析

Chemiluminescence detection of Fe(III) chelators using HPLC post-column method

○有賀 智子、井村 祐己、吉村 悦郎（東大院農生科・応生化）
○Tomoko ARIGA, Yuki IMURA, Esturo YOSHIMURA (Univ. of Tokyo)

【背景・目的】Fe は光合成や呼吸における電子伝達系で重要な働きをするなど、高等植物に必須の元素である。イネ科植物は水に難溶な Fe(III)の効率的な吸収のため、ムギネ酸、デオキシムギネ酸などを根から分泌し、Fe(III)を可溶化して吸収する。また、植物体内における Fe の輸送は導管、及び篩管を通じて行われる。フリーの Fe(II)イオンは酸素分子を還元し活性酸素種を生成することから、Fe は植物体内では何らかのキレーターと結合し電気的に中性な状態で輸送されていると予想される。これまでにニコチアナミンや有機酸などが Fe(III)の輸送に関わっていることが示されている。このように Fe(III)キレーターは植物における Fe の吸収・輸送に大きく関与しており、その化学的分析システムを構築することは Fe が関わる多くの生理学的機構の解明に必須だと考えられる。本研究では Fe(III)キレーターの分離・検出のため、化学発光物質を検出試薬として用いた HPLC ポストカラム法の開発、及び植物サンプル中の Fe(III)キレーター分析への応用を目的とした。
【実験・結果】ルミノール(5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione)は pH 9～11 のアルカリ溶液中において Fe(II)や $K_3Fe(CN)_6$ などの酸化補助剤存在下で H_2O_2 により酸化され、強い化学発光を生じる。本研究では、Fe(III)-Fe(III)キレーター複合体をルミノールの酸化補助剤として用い、ルミノールの化学発光強度をモニタリングすることで Fe(III)キレーターの高感度な分析法の開発を行った。分析サンプルにはあらかじめ Fe(III)を加えてインキュベートし、サンプル中の Fe(III)キレーターを Fe(III)と結合させた。この Fe(III)-Fe(III)キレーター複合体を HPLC カラムで分離したのち、ポストカラム溶液と反応コイル内で反応させた。ポストカラム溶液にはルミノールと H_2O_2 が含まれており、Fe(III)-Fe(III)キレーター複合体の存在下で生じる化学発光を化学発光検出器で検出した。本分析法を用いることで高感度での Fe(III)-Fe(III)キレーター複合体の検出が可能であった。また、本分析法を応用して植物から採取したサンプル中の Fe(III)キレーターの分析を行った。

Fe(III) chelators, chemiluminescence, high performance liquid chromatography

講演番号：3C01a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ C 校舎 01 会場

C4D 検出器を利用した植物水耕液の簡易分析

Application of a capacitively coupled contactless conductivity detector for a simple analysis of hydroponic solution

○東 良太[1]、林 俊弘[1]、吉野 将紀[2]、岡部 勝美[2]、安保 充[1]([1]明治大農・農化、[2]明治大・黒川農場)
○Ryota AZUMA[1], Toshihiro HAYASHI[1], Masaki YOSHINO[2], Katsuyoshi OKABE[2], Mitsuru ABO[1] ([1]Meiji Univ., School of Agriclutre, [2]Meiji Univ., Kurokawa Farm)

【目的】近年注目されている植物工場では、従来その栽培管理に室内温度や湿度、CO_2 濃度、光条件、水耕液の温度、pH、電気伝導率(EC)がモニタリングされている。より生産性を高めるためには、植物の生育ステージによって必要なミネラルをバランスよく供給する必要がある。しかしながら、植物体の成長が著しい局面や栽培が長期にわたる場合には、循環している水耕液のミネラルバランスが崩れる可能性がある。そこで、今回、主要栄養素の簡易計測手法の開発を行った。
【方法および結果】水耕液中に多量に含まれる栄養素として、K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^+, NO_3^-, PO_4^{3-}を分析対象とした。分析にはキャピラリー電気泳動装置(Quanta 4000E, Waters)、検出には C^{4}D (Capacitively coupled contactless conductivity detector: 非接触型電気伝導度検出器, ET120, eDAQ)を用いた。キャピラリーは内径 50 μm, 外径 375 μm で、有効長 45 cm (全長 60 cm)の位置に C^{4}D を取り付けた。泳動液は Kuban らの報告[1)]を参考に、10.5 mM ヒスチジン- 50 mM 酢酸(pH 4.10)、あるいは 10 mM ヒスチジン- 7 mM グルタミン酸 (pH 5.75)を中心に、18-クラウン-6 の添加の有無など、水耕液試料に対する最適条件を検討した。上記、各イオン 100 μM の標準液を分析した結果、各ピークは相互に分離し、再現性よく分析することができた。このシステムの検出限界とともに、植物工場の循環水耕液を分析した結果を示し、本法のモニタリング手法としての可能性についても述べる。

1) Kuban *et al.*, Electroanalysis 18, 13-14, 1289-1296 (2006)

Capacitively coupled contactless conductivity detector, C4D, Plant Factory

講演番号：3C01a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ C 校舎 01 会場

ヒト同一個体異種試料および摂食情報の統合解析技術構築

Integrated approach using non-invasive human sampling with dietary variations for evaluation of human homeostasis

○三澤 拓真[1]、伊達 康博[1,2]、菊地 淳[1,2,3,4] ([1]横市院生命医、[2]理研 CSRS、[3]理研 BMRP、[4]名大院生命農)
○ TAKUMA MISAWA[1], YASUHIRO DATE[1,2], JUN KIKUCHI[1,2,3,4] ([1]Yokohama City Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]RIKEN BMEP, [4]Nagoya Univ.)

【序論】

和食が無形文化登録されたように、農芸化学分野等で如何に特定の健康・薬効成分の研究が発展しても、自然界由来の多様な幸を楽しむ食文化は継続されるであろう。個人の多様な食習慣が 3 種の腸型形成に深く関与することは知られているが、代謝表現型への応答理解は次の喫緊課題となっている。健常人であれば毎日 kg 単位もの飲食物を体内で代謝反応させ続けているが、その反応産物である尿や糞便などは、被験者への負担が少ないことから非侵襲的試料と呼ばれる。こういった非侵襲的試料は、食事や運動等の生活習慣を反映した多様な代謝プロファイルを示し、ヒトの恒常性維持と密接に関わって変動することから、入力栄養源—代謝反応場—出力摂動の応答理解を目指した非侵襲的試料のプロファイリング技術を構築することが重要であると著者らは考えた。本研究では、単体でも豊富な情報量を持つ非侵襲的ヒト試料（尿、唾液、糞便）の代謝プロファイルおよび統合解析技術の構築を目指し、年会にてその初歩的な試みを紹介したい。

【実験】

複数名の健常人ボランティアから唾液、尿、糞便を時系列で採取し、唾液についてはサンプリング・前処理・計測手法の最適化を行い、それぞれのサンプルを最適な条件で調製し NMR 計測を行った。得られたスペクトルはビン化処理により数値化し、多変量解析（PCA, PLS-DA, STOCSY 等）やネットワーク解析などを用いて解析した。

【結果と考察】

本研究では初めに、唾液サンプリング方法の検討および前処理方法の検討を行い、NMR メタボノミクスによる唾液代謝プロファイリング法の最適化を行った。最適化されたプロトコルを用いて各ボランティアの唾液代謝プロファイルを評価したところ、各ボランティア内の日差変動は個体差や年齢差と比べ比較的小さく、ボランティアごとに特徴的な代謝プロファイルを示す傾向が得られた。尿や糞便についても同様に個体差が代謝プロファイルに大きく影響を与えていたことから、個体内における時系列で採取した唾液・尿・糞便の代謝プロファイルを相関解析やネットワーク解析を用いて評価することにより、それぞれの関係性を見出すことが出来た。つまり同一個体を時系列で評価することで、健常人の日々の代謝摂動を追跡できる可能性を示唆しており、年会では日常的に摂取している栄養情報のスコア化と唾液・尿・糞便の代謝変動との統合解析についても議論したい。

NMR metabonomics, nutrition, network analysis

講演番号：3C01a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ C 校舎 01 会場

オートクレーブを用いた PCR 鋳型活性の除去

Removing PCR template activity of DNA with autoclaving

○陶山 哲志、川原崎 守（産総研）
○Tetsushi SUYAMA, Mamoru KAWAHARASAKI (AIST)

【背景】コンタミネーションを起こした DNA の PCR 鋳型活性を除去することは非常に困難であり、疑陽性検出の原因になってきた。一方、実験室においてオートクレーブは廃棄物や研究試料間で PCR 鋳型活性のクロスコンタミネーションを発生させる場である可能性が疑われてきた。また一般的な滅菌条件として 121℃の飽和水蒸気によりオートクレーブ内を置換する必要があり、この過程でオートクレーブから大量の水蒸気が放出されるが、この水蒸気も実験室の汚染源であることが疑われてきた。今回高コピー数の PCR 産物をモデル DNA 廃棄物として、これらの疑念に関する定量的な検討を行った結果、オートクレーブは確かにひとつの汚染源であるという結論が得られたので報告する。また、オートクレーブを利用して PCR 鋳型活性を安全かつ確実に分解除去する試みについても報告する。
【結果】pUC19 プラスミドを直鎖化した約 2.7kb の PCR 産物をモデル DNA 廃棄物として処理し、ボイラー水および水蒸気のサンプル中から定量 PCR にて 84bp の部分配列を検出・定量する実験を行った。10^{14} コピーのオーダーの PCR 産物を気相にのみ暴露する条件で 20 分間処理したところ、ボイラー水から 10^{6} コピー相当の鋳型活性が検出された。蒸気のサンプルに関しては定量下限値を下回ったため数量的な議論はできないが、排気ボトルを通過して出て来た蒸気にもなお PCR 鋳型の存在が確認された。以上のことからオートクレーブで高コピー数の DNA を含む試料を処理する場合には汚染の発生について注意を払う必要がある。一方で運転条件によってはオートクレーブは有効かつ安全に PCR 鋳型活性を除去する手段になり得ることがわかった。例えば PCR 産物を含む溶液をスクリューキャップ付きのチューブに封入して 80 分ほどオートクレーブにかければ、検討したすべての条件で PCR 鋳型活性が検出できない程度に分解処理できることが確認できた。従来オートクレーブでは気相を飽和水蒸気で置換することが望ましく、空気が残留していると滅菌に支障があると考えられてきたが、DNA の分解に関しては空気が混ざっていることは問題にならず、むしろ促進効果が観察された。酸素を除去した系では効果が少なかったことから、空気の効果は酸素による DNA へのアタックであることが推定される。
【結論】DNA を含む廃棄物をオートクレーブ処理することはお勧めできないが、避けられない事情がある場合には容器に密封して 121℃・80 分以上の条件で処理することをお勧めする。
【参考文献】[1] T. Suyama and M. Kawaharasaki. Decomposition of waste DNA with extended autoclaving under unsaturated steam. *BioTechniques* in press. [2] 特願 2013-090178

PCR, contamination, false-positive

講演番号：3C01a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ C 校舎 01 会場

RNA 干渉酵素を用いた RNA 切断技術の開発

Development of an RNA cleavage technique using mRNA interferases

○宮本 龍樹[1]、関口 勇地[2]、常田 聡[1]、野田 尚宏[2] ([1]早大院先進理工、[2]産総研バイオメディカル)
○Tatsuki MIYAMOTO[1], Yuji SEKIGUCHI[2], Satoshi TSUNEDA[1], Naohiro NODA[2] ([1]Waseda Univ., [2]AIST)

【背景】制限酵素を用いた二本鎖 DNA の配列特異的な切断技術は遺伝子工学技術に大きな革新をもたらした。一方、酵素反応を用いた RNA の切断技術は DNA のものに比べ開発・利用が遅れている。RNA 干渉酵素は原核生物に広く保存されている核酸酵素であり、一本鎖 RNA の配列特異的な切断反応を触媒する。近年、RNA を配列特異的に切断するという本酵素の性質は様々な分野で応用されつつあるが、現状、その認識配列が判明しているものは少なく、従って生物工学的に利用される RNA 干渉酵素の数は少ない。そこで本研究では、種々の微生物を遺伝子源とし RNA 干渉酵素を取得、認識配列を特定することで RNA 干渉酵素の生物工学的応用を試みる。生物工学的応用が行われている RNA 干渉酵素が少ない理由として、RNA 干渉酵素の認識配列を特定する手法が十分に発達していないことが考えられたため、本研究ではまず蛍光消光現象を利用した RNA 干渉酵素の認識配列特定系の構築を行った。また、*Pseudomonas putida* 由来の RNA 干渉酵素である MazF-pp を新たに取得し、構築した認識配列特定系を用いることで、認識配列の特定を試みている。
【方法、結果】既往研究により、認識配列が既知である RNA 干渉酵素 MazF をモデル RNA 干渉酵素とし、蛍光消光現象を利用した酵素活性測定系の構築を試みた。蛍光共鳴エネルギー移動が起こるよう両末端に蛍光修飾を施した短鎖 RNA/DNA のキメラオリゴヌクレオチドの設計を行った。設計したこれらオリゴヌクレオチドと MazF と混合したところ、オリゴヌクレオチド内部に MazF の認識配列が含まれる際、蛍光強度の増加が観測され、本構築系が RNA 干渉酵素の認識配列特定系として有効であることが示された。そこで次に、*Pseudomonas putida* のゲノムを遺伝子源として新たに RNA 干渉酵素 (MazF-pp) を取得し、本 MazF-pp を数十種類の短鎖オリゴヌクレオチドと混合したところ、数種類の短鎖 RNA オリゴヌクレオチドの切断が確認され、MazF-pp が配列特異的な RNA 切断活性を持つことが判明した。現在、これら切断されたオリゴヌクレオチドの内部配列を参考に、両末端に蛍光修飾を施したオリゴヌクレオチドの内部配列を設計し、構築した系を用いて MazF-pp の切断配列の確定を進めている。

mRNA interferase, Sequence-specific cleavage, MazF

講演番号：3C01a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ C 校舎 01 会場

STH クロマト PAS を利用した色素生産用サツマイモ品種判別法の開発

Simple and rapid testing of dye-producing sweet potatoes using DNA based array-strips

○高崎 一人[1]、田中 勝[2]、峯岸 恭孝[3]、川瀬 三雄[4]、門田 有希[5]、田原 誠[5]、布藤 聡[1]([1]株式会社ファスマック、[2]農研機構九州沖縄セ、[3]株式会社ニッポンジーン、[4]東北大学院医工学、[5]岡山大院環境生命科学)

○Kazuto TAKASAKI[1], Masaru TANAKA[2], Yasutaka MINEGISHI[3], Mitsuo KAWASE[4], Yuki MONDEN[5], Makoto TAHARA[5], Satoshi FUTO[1] ([1]FASMAC CO., LTD., [2]AFFRC, [3]Nippon Gene CO., LTD., [4]Tohoku Univ., [5]Okayama Univ.)

現在の農作物 DNA 品種判定法は高価な機器や高度な分析技術が必要であり、安価で簡便な検出方法の開発が望まれている。これまでに、品種ごとに異なるレトロトランスポゾン挿入部位を利用することにより、青果のみならず加工食品においても品種判別可能な新しい DNA マーカーの開発が行われてきた。一方、従来のアガロースゲル電気泳動による検出方法では、多検体を取り扱う際に作業が煩雑になることや、同じ長さのマーカー配列を同時に検出することが難しい、といった問題点が挙げられる。そこで我々は、あらかじめマーカー配列と特異的に結合するオリゴ DNA をメンブレンにスポットしておき、PCR 産物をクロマト展開することで判定を行う極めて簡便な方法（STH クロマト PAS 法）を利用して、新たな色素原料用サツマイモ品種判別法の開発を行った。

アントシアニン色素生産用サツマイモ主要 3 品種（アヤムラサキ、ムラサキマサリ及びアケムラサキ）とその親や近縁系統にあたる計 8 品種を利用して品種判別法の開発を行った。はじめに、選抜された 4 種類のレトロトランスポゾン由来品種判別マーカー配列（Pattern1094、Pattern2761、Pattern494 及び Pattern478）と内在性ポジティブコントロール配列（SSII）に対し、プライマーの設計及びマルチプレックス PCR の条件検討を行った。さらに、マルチプレックス PCR 産物をクロマト PAS に供してクロマト展開を行い、検出されるバンドの組合せによりムラサキイモの品種判別を行った。

今回使用した 4 種類のレトロトランスポゾン品種識別マーカー配列は、組合せパターンの違いにより色素生産用サツマイモを正確に判別することが可能であった。STH クロマト PAS は PCR 産物に展開液と色素を添加した後にクロマト展開するだけで検出することができるため、PCR 反応終了後、15 分程度で結果を確認することが可能である。以上より、STH クロマト PAS を利用した品種判別法は、 1）非常に操作が簡便で短時間で検出することが可能、2）複数のマーカー配列を同時に検出することが可能、3）マーカー配列長に依存しない、という点で優れている。今後は、加工品からの検出を検討するとともに本品種判別法のキット化を試みる予定である。

略称： STH (Single Tag Hybridization)、 PAS (Printed Array Strip)

retrotransposon, sweet potato, printed array strip

講演番号：3C01a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ C 校舎 01 会場

応用生命科学分野における「産学協同 PBL 講座」初年次教育実施の試み

Trials of the "industry-university cooperation PBL course" enforced for Freshmen of applied life sciences majors

○高橋 勇二[1]、井上 英史[1]、平山 恭子[2] ([1]東京薬科大生命科学部、[2](株）ベネッセコーポレーション 大学事業部　FSP 研究会事務局)
○Yuji Takahashi[1], Hideshi Inoue[1], Kyoko Hirayama[2] ([1]Tokyo Univ. Pharm. Life Sci, [2]Benesse Co. Future Skills Project)

【背景】理系大学で、学ぶことへの意欲が入学後に徐々に低下する学生が散見される。また、卒論研究や大学院での研究が開始された後に、実験研究に強い興味を持っていながら、実験上のつまずきで、研究をやり遂げることのできない学生および院生がおり、教育的な観点から問題となっている。一方、バイオ関連企業においても、少しの失敗でも意欲を消失する社員の増加、そして、就職 3 年以内離職率の増加など、大学卒業あるいは大学院修了者の質的な変化が企業の人材育成に困難をもたらす一因となっている。大学と企業が共有しているこのような問題背景から、主体性を備えた学生を育成することが産学双方の緊急な課題として浮上してきている。そこで我々は、Future Skills Project（FSP）研究会が開発した「産学協同 PBL（Project Based Learning）講座」を東京薬科大学生命科学部の応用生命科学科初年次生に導入し、本講座の応用生命科学分野での有用性を評価することを試みた。
【方法】2013 年 4 月に東京薬科大学生命科学部応用生命科学科に入学した初年次生 69 人に前期必修科目として、FSP 研究会が開発した「産学協同 PBL 講座」を基本設計に沿って実施した。また、受講前後に勉学意欲に関するアンケートを実施した。FSP 研究会は 5 大学（青山学院大学、上智大学、東京理科大学、明治大学、立教大学）と 6 企業が参加して、主体性と応用力を 1 年次から育てるコースカリキュラムを立案し実践している（http://www.benesse.co.jp/univ/event2013_fsp/about/index.html)。「産学協同 PBL 講座」は、初年次生を受講対象者として開発されており、90 分 14 回のコース構成で、前半と後半のそれぞれに、異なる企業が正解のない課題を学生に与え、学生はグループワークを通して課題への対応策を立案して発表する。企業からの講師は、課題の提示、中間発表、そして、最終発表回の 3 回、前半および後半の計 6 回講座に参加する。学生は仮の社員という位置づけで、先輩社員から出される課題に取り組む。学生の中間発表に対しては、社員講師が厳しい批評や指摘を学生に与えて受講生の成長を促す。この講座では、提示された課題に対する解決策の内容ではなく、課題解決に取り組む過程と姿勢を評価の対象としている。
【結果と考察】講座終了後の学生には、仲間意識、コミュニケーション力、および、積極性の向上が認められた。さらに、座学的な基礎科学科目に積極的に取り組むなど、勉学意欲の高まりも認められた。以上の結果は、本講座が応用生命科学分野を含む理系大学初年次生の主体性を育成する上で有効である可能性を示している。

Project Based Learning, Freshman Education, Motivation

講演番号：3C02a01
講演日時、会場：3 月 29 日 09:00～ C 校舎 02 会場

ネコの尿臭識別能力と尿臭の個体差を作り出す揮発性化合物の探索

Profiling of volatile compounds for identification of scent signals that are involved in the individual recognition in the domestic cat

○中野 晴日、加藤 恭子、山下 哲郎、宮崎 雅雄 (岩手大学)
○Haruhi NAKANO, KYOKO KATO, TETSURO YAMASHITA, MASAO MIYAZAKI (Iwate Univ.)

多くの哺乳動物は、種や性、年齢、個体に特有なにおいやフェロモンなど化学物質を嗅覚コミュニケーションの重要な媒体として利用している。例えば、我々に身近な動物であるネコは、尿のにおいを塀や砂場にマーキングして縄張りを確保することが知られている。しかし、ネコの尿臭に種や性、年齢、個体の違いがあるか、あった場合ネコがその違いを識別できるかよく分かっていない。そこで本研究では、まず行動学的試験によりネコが他個体の尿臭を嗅ぎ分けることができるか調べた。次にネコの尿から放出される揮発性化合物の分子種を同定し、個体差のある揮発性物質の探索を行った。まず、ネコに複数の他個体の尿を嗅がせ、各尿に対するにおい嗅ぎ時間を計測した結果、ネコは尿臭の個体差を識別できることが分かった。次に、ネコの尿のヘッドスペースガスをモノリス捕集剤に濃縮し、加熱脱却−二次元 GC-MS で分析した。その結果、各ネコの尿から 2000 以上の多数の化合物が検出されたので、分析結果を主成分分析したところ、Fisher ratio 200 以上の化合物が約 70 種に絞り込めた。今後は、この 70 種の中から個体差の識別に関与する揮発性化合物を探索する。

chemical communication, scent signal, GC-MS

講演番号：3C02a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ C 校舎 02 会場

ネコの嗅覚コミュニケーションに重要なマーキング臭と体臭の有意な違い

Significant differences of scent signals emitted from marking materials and body in the domestic cat

○宮崎 雅雄、北條 渉、西村 貴志、山下 哲郎（岩手大農）
○MASAO MIYAZAKI, WATARU HOJO, TAKASHI NISHIMURA, TETSURO YAMASHITA (Iwate Univ.)

哺乳動物の糞や尿などの排泄物や皮脂腺、生殖腺などの分泌物には、様々な揮発性化合物が含まれており、その組成の違いが、種や性、年齢、個体に特有なにおいを作り出している。多くの動物は、個体ごとに異なるにおいの違いを嗅ぎ分ける能力を有しており、敵と味方、同胞と親族、親と子供の識別などが行われ、動物社会の恒常性が維持されていると考えられている。このような嗅覚コミュニケーションについて、その分子機構はモデル生物であるマウスで盛んに研究されている。一方、我々に身近な動物であるイヌやネコでは嗅覚受容機構のみならず、排泄物や分泌物に含まれるにおい物質の成分もよく分かっていない。そこで本研究では、ネコの尿、糞、肛門周囲から放出される揮発成分の分子種を網羅的に解析して、マーキング臭と体臭の成分の違いについて考察した。まず未去勢オスネコの糞と尿のヘッドスペースガス、肛門周囲の体臭を捕集剤に濃縮し、加熱脱却 GC-MS で揮発性化合物の組成を分析し、各試料から様々な揮発性化合物を同定した。その結果をもとに尿と糞の共通成分から 3-メルカプト-3-メチルブタノール（MMB）に着目した。MMB は、ネコ特有なアミノ酸である 2-アミノ-7-ヒドロキシ-5,5-ジメチルヘプタン酸（フェリニン）の分解物であり、ネコ特有な尿臭の原因物質として同定されていた。本研究で MMB はネコの糞にも含まれていること、体臭には検出されないことが分かった。体臭の分析では、様々な短鎖脂肪酸が検出され、各化合物の構成比が性や個体ごとに変化することが分かった。そこで次に馴化-脱馴化試験でネコが MMB の有無を識別できるか行動試験を行った。その結果、ネコは MMB を含有する糞と含有しない糞のにおいを識別できることが分かった。以上の結果、糞や尿などのマーキング物質から放出されるにおいには、におい主の動物種の情報を反映する種特有な化合物が含まれていること、体臭の場合、性差や個体差を反映する揮発性化合物で構成され、種に特有な化合物が含まれないことが分かった。この違いは、動物がにおいを嗅ぐ以前に視覚情報などでにおい主の種の情報を入手できるか（体臭）、できないか（糞・尿）が関係する可能性が強く示唆された。

chemical communication, scent signals, GC-MS

講演番号：3C02a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ C 校舎 02 会場

オオカミ尿中の恐怖誘発性物質の同定と副嗅球への影響

Novel kairomones identified from wolf urine induce avoidance and freezing behaviours in mice

○長田 和実[1]、柏柳 誠[2] ([1]北海道医療大学、[2]旭川医科大学)
○Kazumi Osada[1], Makoto Kashiwayanagi[2] ([1]Health Sciences Univ of Hokkaido, [2]Asahikawa Medical Colledge)

野生動物は天敵の匂いを本能的に忌避することがある。キツネの糞中より見出された trimethyl-thiazoline(TMT)は低濃度でも恐怖行動を誘発する因子である。オオカミはキツネよりも大型の肉食動物であり、尿マーキングの習性が強いことから尿中により強力な恐怖誘発物質を含んでいる可能性が期待できるが、詳細は不明である。本研究は、オオカミ尿中に含まれる恐怖誘発性忌避物質の確認と同定、および副嗅球に対する作用の有無を明らかにすることを目的としておこなった。採取時期の異なった３種類のオオカミ尿を C57BL/6 雌マウスに提示すると、いずれのサンプルも忌避行動や恐怖誘発行動が見られたが、特にサンプル C（３月に採取）に強い活性が見られた。さらにオオカミ尿サンプルをマウスに提示すると、サンプル C を提示した群では副嗅球での c-fos 陽性細胞数が有意に増加したが、サンプル A,B では副嗅球刺激作用は弱かった。またガスクロマトグラム-マススペクトロメトリー(GC-MS)を用いた化学分析の結果、サンプル C に有意に高く含まれる３種類の化合物が見出されたので、構造決定を行った。これらの化合物をマウスに提示すると忌避行動や恐怖誘発行動が観察され、その程度は TMT と同等以上であった。さらに、これら３種類の化合物を混合してマウスに提示すると、オオカミ尿と同様に副嗅球での c-fos 陽性細胞数が有意に増加した。本結果はオオカミの尿中に強力な恐怖誘発成分が含まれており、本成分の恐怖行動の誘発には副嗅球への刺激が関与する可能性を示唆している。

kairomones, accessory olfactory bulb, wolf urine

講演番号：3C02a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ C 校舎 02 会場

マウス鋤鼻細胞の増殖とアポトーシスに関与する転写因子 ATF5

The role of ATF5 on proliferation and apoptosis in mouse vomeronasal neurons

○鈴木 誠人、飯田 吉剛、青木 満里恵、笹川 洋、中野 春男、梅村 真理子、高橋 滋、高橋 勇二（東薬大生命・環境応用動物）
○MAKOTO SUZUKI, YOSHITAKA IIDA, MARIE AOKI, HIROSHI SASAGAWA, HARUO NAKANO, MARIKO UMEMURA, SHIGERU TAKAHASHI, YUJI TAKAHASHI (Tokyo Univ. Pham. Life Sci.)

鋤鼻器は同種の個体間での性行動、攻撃行動や社会行動を制御するフェロモンを受容する働きを持つ器官である。鋤鼻器に存在しフェロモン受容体を発現する鋤鼻細胞は生涯を通じて更新を続ける特殊な神経細胞であるが、その細胞増殖･アポトーシスの制御は不明な点が多い。Activating transcription factor 5 (ATF5)は CREB/ATF ファミリーに属する転写因子であり、肝細胞やグリア細胞における細胞増殖、アポトーシス、及び癌化に機能を有することが知られている。マウス鋤鼻細胞において ATF5 mRNA が高発現していることから、鋤鼻細胞の増殖･アポトーシスにおける ATF5 の機能に着目した。本研究において我々は、ATF5 遺伝子欠損マウス（ATF5 KO 型マウス）の鋤鼻細胞において活性型 caspase-3 染色によって示されるアポトーシスが亢進していることを見出した。出生直後の ATF5 KO 型マウスの鋤鼻器における活性型 caspase-3 陽性細胞数は、野生型に比べて約 3 倍に増加しており、成体マウスの鋤鼻器においては約 7 倍にも増加していた。一方、細胞増殖マーカーである Ki-67 陽性細胞数は、出生直後の野生型鋤鼻器と ATF5 KO 型との間に差異は見られなかったが、成体の ATF5 KO 型の鋤鼻器においては、野生型に比べて約２０倍にも増加していた。さらにフェロモン受容体 V1R, V2R 遺伝子プローブを用いた In situ hybridization を行ったところ、ATF5 KO 型の鋤鼻器における V1R, V2R 発現細胞数が野生型に比べて減少していた。これらの結果から、ATF5 は鋤鼻細胞において抗アポトーシス作用を持つこと、鋤鼻細胞の細胞増殖を抑えて分化の促進に働くことが示唆された。

vomeronasal neurons, proliferation, apoptosis

講演番号：3C02a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ C 校舎 02 会場

マウスペプチド性フェロモン ESP1 と ESP22 が活性化する鋤鼻神経回路の解析

Identification of vomeronasal neural circuits activated by mouse ESP peptides

○小坂田 拓哉[1]、フェレーロ デイヴィット[2]、堀尾 奈央[1]、リバーレス ステファン[2]、東原 和成[1]([1]東大院農、[2]ハーバード大院医)
○Takuya OSAKADA[1], David FERRERO[2], Nao HORIO[1], Stephen LIBERLES[2], Kazushige TOUHARA[1] ([1]The university of Tokyo, [2]Harvard medical school)

哺乳類のモデル生物であるマウスは、主に匂いを認識する主嗅覚系と、フェロモンを認識する鋤鼻系というふたつの嗅覚系を有している。鋤鼻系の受容器である鋤鼻器官は鼻腔下部に存在するが、そのリガンド物質はほとんどが明らかにされていなかった。当研究室において、性成熟した雄マウスの涙液中に含まれる約 7 kDa の新規ペプチド ESP1(Exocrine gland-Secreting Peptide 1)が鋤鼻活性物質として単離された(Kimoto et al. 2005)。その後、ESP1 が鋤鼻器官に発現する G タンパク質共役型受容体 V2Rp5 で特異的に受容されること、また、ESP1 が雌マウスにおいて、性的受け入れ行動であるロードシス反射を促進するフェロモンとして機能していることが明らかになった(Haga et al. 2010)。ESP ペプチドは多重遺伝子ファミリーを形成しており、ESP1 に似た遺伝子配列がマウスゲノム上には 38 個存在している。また、ESP ファミリーはラットゲノム上に 10 個の相同遺伝子が存在するが、ヒトのゲノム上には存在しない(Kimoto et al. 2007)。

近年、我々はマウスにおいて、新たにフェロモン候補物質の探索を行った。すると、約 10 k Da のペプチド ESP22 が、幼少期のマウスの眼窩外涙腺で幼少期特異的に発現し、涙液中に含まれていることが明らかになった。また、ESP22 が鋤鼻器官に発現する鋤鼻神経細胞で受容されることがわかり、ESP22 がフェロモンとして機能している可能性が示唆された。そこで行動実験によって生理機能の解析を行ったところ、ESP22 は雄マウスに対して、幼少期のマウスへのマウント行動を抑制していることが明らかにされた。すなわち、ESP22 が親と子の間でのコミュニケーションに関わるフェロモンであるということが示された(Ferrero et al. 2013)。

次に、ESP22 が鋤鼻神経細胞で受容された後、どのような脳領域を活性化しているのかを明らかにすることを目指した。初期応答遺伝子の一つである c-Fos の発現を神経細胞の活性化のマーカーとし、c-Fos の抗体を用いた免疫組織染色を行った。その結果、扁桃体の尾腹部において領域特異的な c-Fos 発現細胞数の上昇が観察された。扁桃体の尾腹部は、防御行動や性行動の抑制に関わっていることがこれまでに知られており、この結果は ESP22 が雄マウスの性行動を抑制するという結果と整合性があるものと考えられる。さらに、ESP1 ならびに ESP22 のふたつのペプチドフェロモンが機能する際に、それぞれが活性化する脳領域には違いが存在するかどうかを明らかにするため解析を行った。

pheromone, neural circuit, vomeronasal

講演番号：3C02a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ C 校舎 02 会場

Intracranial Self-Stimulation（ICSS）を用いた新規中枢性疲労測定法の確立

Development of A New Measurement Method for Central Fatigue with Intracranial Self-Stimulation

○井樋 聡美、上野 聡子、永吉 宏充、井上 和生、伏木 亨（京大院農）
○Satomi IHI, Satoko UENO, Hiromitsu NAGAYOSHI, Kazuo INOUE, tohru FUSHIKI (Kyoto Univ.)

【背景と目的】疲労を負荷したとき、筋肉痛等の肉体的な疲労と共に脳で疲労感、すなわち中枢性疲労が発生する。疲労は様々な要素が複合して発生するため、中枢性疲労のみの疲労度を定量的に測定することは困難とされていた。中枢性疲労発生時の主な症状として「行動する意欲の低下」が挙げられる。本研究ではこの意欲の低下に着目し、Intracranial self-stimulation(ICSS, 脳内自己刺激)を用いて定量的な中枢性疲労の疲労度測定系構築を試みた。ICSS はオペラント行動の一種であり、ラットがレバーを叩くと脳報酬系に設置した電極を通して電流が流れる。これにより脳報酬系が活性化、ラットはこの電気刺激を快感として捉え刺激を求め自発的にレバーを叩くようになる。このレバー叩き行動を快感を得ようとする意欲の表れとみなし、疲労負荷前後での意欲の変化を測定する。レバー叩き行動における変化は、与えた電気刺激とレバー叩き数から算出される脳報酬閾値により定量化することができる。脳報酬閾値とはレバー叩き行動を起こすのに必要な刺激電気強度の最小値を指しており、周波数として算出される。脳報酬閾値が上昇したということは、快感を得るために最低限必要な刺激強度が上昇したということであり、快感を得ようとする意欲が低下したと解釈することが出来る。疲労の種類として運動を負荷した場合と精神的ストレスを負荷した場合を想定し、脳報酬閾値の変化が中枢性疲労の指標として応用できるか検討した。
【方法】雄性 Wistar ラットの中脳内側前脳束に電極設置手術を行い、ICSS 試験に供した。15m/min、10m/min の 2 種類の強度で 30 分間トレッドミル走行を課すことにより肉体的疲労を、コミュニケーションボックスに 60 分間かけることにより精神的ストレスを負荷し、負荷前後での脳報酬閾値を算出、比較した。
【結果と考察】トレッドミル走行により肉体的疲労を負荷したとき、各強度において負荷前に比して負荷後で有意に脳報酬閾値が上昇した。また、各運動強度における脳報酬閾値の上昇率（負荷後の脳報酬閾値を負荷前の脳報酬閾値で割ることで割合換算したもの）を比較したところ、安静時に比して運動負荷時で上昇率が増加し、運動強度依存的に脳報酬閾値の上昇率が増加することも示唆された。コミュニケーションボックス用いて精神的ストレス負荷したとき、負荷前に比して負荷後に有意に脳報酬閾値が上昇した。脳報酬閾値の上昇率を比較したところ、安静群に比して有意ではないものの上昇率が増加する傾向が見られた。以上の結果より、肉体的疲労と精神的ストレスの両方に対して ICSS を中枢性疲労の疲労度の指標として応用できることが示唆された。

Central fatigue, Intracranial Self-Stimulation, Rewarding

講演番号：3C02a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ C 校舎 02 会場

持久運動時の中枢性エネルギー代謝調節における脳内 Thrombospondin-1 の関与

Thrombospondin-1 is involved in enhancing fatty acid metabolism during exercise in the brain.

○藤谷 美菜、山田 裕之、井上 和生、伏木 亨（京都大院農）
○mina fujitani, hiroyuki yamada, kazuo inoue, tohru fushiki (Kyoto Univ.)

【背景・目的】これまでに運動によってラットの脳脊髄液中のTGF-β活性が増大すること（Inoue et al. 1999)、大槽へのTGF-βの投与が脂肪酸酸化を亢進させること（Yamazaki et al. 2002)、脳内TGF-βの阻害により、持久運動時の脂質利用が減少すること（Ishikawa et al. 2006）を報告している。成熟型のTGF-βはペプチドダイマーであるlatency associated peptide（LAP）と非共有的に結合し、活性を示さない潜在型として細胞外に放出される。これが活性化されることによってTGF-βの作用が発現する。多機能性タンパク質TSP-1（Thrombospondin-1）は様々な細胞から分泌される細胞外糖タンパク質である。中枢神経系でも発現していることが報告されている（Risher et al. 2012)。TSP-1はKRFKという配列を持ち、これがLAPのLSKLという配列と相互作用することによって、潜在型TGF-βを活性化する。我々は以前、末梢血液中の乳酸レベルの上昇に伴い、TSP-1によって脳内TGF-βが活性化されることを示した。本実験では、合成ペプチドLSKLを投与したラットにトレッドミル走行を課し、TSP-1によるTGF-β活性化を阻害したときの全身エネルギー代謝の変化について検討した。
【方法】7週齢の雄性ラットの大槽にカニューレを設置した（from lambda, 60° [from horizontal plane], -2.5 mm[AP], 0.0 mm[ML], 10 mm[DV])。回復させた後、走行トレーニングを課し、傾斜角10°、21 m/minで20分間走行できた個体を実験に用いた。100分間絶食させたラットに、テトラペプチドLSKLまたはそのスクランブル配列のペプチドSLLK(20 μg/20μL 生理食塩水)を大槽カニューレより投与した。投与後ただちに呼気ガス分析を開始し、20分後から30分間ラットを走行(10°、21 m/min)させた。
【結果】SLLK群に比してLSKL群で、走行時の呼吸交換比が有意に高かった。酸素消費量は両群間に有意な差は認められなかった。LSKLの投与によって、エネルギー消費量は影響を受けないが、脂質酸化が減弱し、糖質酸化が高まることが示された。
【考察】抗 TGF-β抗体の投与と同様に、LSKL の大槽投与は持久運動時において脂質酸化を減弱させた。これまでに乳酸を麻酔下のラットに腹腔内投与することによって脳内 TGF-βの活性化が引き起こされること、この乳酸投与に伴う TGF-β活性化は大槽内に LSKL を投与しておくことによって阻害されることが示されている（山田裕之,2007 年農芸化学会大会)。乳酸閾値を超える運動において、乳酸レベルの上昇→TSP-1 による TGF-βの活性化→TGF-βを介した脂質酸化の促進という経路が、少なくとも部分的にエネルギー基質の利用割合の調節に関与すると考えられる。

thrombospondin-1, lactate, TGF-beta

講演番号：3C02a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ C 校舎 02 会場

Capsaicin 受容体 (TRPV1)活性に作用する物質の検討

Examination of compounds modulated the capsaicin receptor (TRPV1) activity

○佐藤 崇弘[1]、青島 均[2]、伊豆 英恵[3]、山田 康江[1] ([1]近畿大院工、[2]山口大院、[3]酒類総合研究所)
○TAKAHIRO SATO[1], HITOSHI AOSHIMA[2], HANAE IZU[3], YASUE YAMADA[1] ([1]Kinki Univ., [2]Yamaguchi Univ., [3]NRIB)

【目的】Capsaicin 受容体（transient receptor potential cation channel subfamily V member 1, TRPV1）は皮膚，脳，神経等に多く発現し，43℃以上の刺激や辛味成分である capsaicin（Cap）などで活性化する Ca イオンチャネルであり，痛みにも深く関与している．TRPV1 の活性化は抗肥満，抗炎症作用があり，活性抑制は頭痛を抑制する作用がある．新たに TRPV1 に作用する物質を見つけるためにアフリカツメガエル卵母細胞にウシの TRPV1 を発現させ，受容体活性に作用する物質を探索しその活性を測定した．

【方法】アフリカツメガエル卵母細胞に TRPV1 の mRNA を卵母細胞に注入し受容体を発現させた．二電極膜電位固定法により膜電位を-70mV に固定し，Cap を受容体に潅流し得られる Ca イオンの流入による電流を測定した． TRPV1 の特異的阻害剤である capsazepine，偏頭痛薬に用いられている sumatriptan， TRPV1 への効果が示唆されている raspberryketone，TRPV 1 の partial agonist（部分作動薬）である ethanol（EtOH）の効果を検討した．また，日本酒を 3 種類のイオン交換樹脂を用い，塩基性アミノ酸やペプチドなど含まれる C 画分，中性・酸性アミノ酸などが含まれる R 画分．有機酸などが含まれる A 画分，糖などが含まれる N 画分を得た． 4 画分全ての受容体への効果を検討し，さらに日本酒成分に含まれる amine の効果を検討した．

【結果・考察】Cap で活性を示した卵母細胞に capsazepine 共存下で測定した結果，受容体活性を阻害したことから発現したものが TRPV1 であることを確認し，Cap の EC_{50} は 3.70 μMであった．sumatriptan は高い阻害効果を示し，raspberryketone では受容体への効果は見られなかった．また分画した日本酒の A 画分，N 画分は受容体活性を阻害し，C 画分，R 画分は活性化を示した．日本酒に含まれる amine のうち spermine，agmatine は単独で活性を示し，その EC_{50} はそれぞれ 259 μM，250 μM であった． 日本酒中のどの成分が効果を与えているのかメタボローム解析を行い同定していく予定である．今後，細胞内情報伝達系への効果の検討や動物による行動実験（痛みへの効果，肥満への効果）を行い，TRPV1 への効果のある物質の作用機序を検討する予定である．また食品中から TRPV1 に作用する物質を見つけ，機能性食品の開発や，痛みを軽減する薬品への応用の可能性を検討する．

Capsaicin, TRPV1, Amine

講演番号：3C02a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ C 校舎 02 会場

ラット小腸に発現する CRBPII の MS/MS 解析

MS/MS analysis of CRBPII expressed in the rat small intestine

○伊藤 景子、川端 博秋 (明治大農)
○Ito Keiko, Hiroaki Kawabata (Meiji Univ.)

【目的】

ラットの小腸に発現する CRBPⅡ(Cellular Retinol Binding Protein Ⅱ)は、2 つのタイプ(アイソフォーム)の存在することが知られている。我々はこれまでにラット小腸の二次元電気泳動(2DE)により、CRBPⅡが等電点の異なる 2 つの大きなスポットとして存在することを確認している[1)]。しかしながら、これらの分子構造の違いについてはこれまでに十分な理解がされていない。そこで今回、これら 2 つの CRBPⅡの翻訳後修飾について、MS/MS 解析および de novo シーケンスを行い、これらの違いを明らかにする目的で実験を行った。

【方法】

Wistar 系雄ラット(8-10wk)ラットから十二指腸を採取し、タンパク質を抽出した後、2DE によりタンパク質を分離した。得られた CRBPⅡの 2 つのスポット(酸性側、塩基性側として区別)を、それぞれトリプシンによりゲル内消化した。その 2 サンプルを、MALDI-TOF/TOF 質量分析計(AXIMA Performance, 島津製作所)によって、Full MS と MS/MS の 2 つの方法で MS 分析を行った。Mascot 検索(Mascot Server 2.4)によって、検索可能な約 30 種類の修飾について検討した。また、各ペプチドの de novo シーケンスを MS^{++}ソフトウェアを用いて行った。

【結果】

2 種の CRBPⅡについて、それぞれゲル内消化後の Full MS 分析を行った。その結果、酸性側は 10 個、塩基性側では 7 個のペプチドのピークが確認され、両 CRBPⅡ間でトリプシンによる消化の特徴に違いのあることが認められた。また、酸性側と塩基性側の両方において、シーケンスの coverrage は約 90%であった。さらに、酸性側では m/z2029 や 2581、塩基性側では 2353 や 2539 などの特徴的なピークが観察された。このうち、酸性側の m/z2581、塩基性側の m/z2539 のペプチドは同一のアミノ酸配列 (2-22,TKDQNGTWEMESNENFEGYMK)を示し、さらに酸性側は Acetyl(N-term)と Deamidated(NQ)の修飾、塩基性側では Deamidated(NQ)の修飾の違いが示された。

1) Iizumi G, Sadoya Y, Kawabata H
Biochim Biophys Acta 1774 1289-98 (2007)

CRBPII, MS/MS analysis, small intestine

講演番号：3C02a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ C 校舎 02 会場

トランスポーターの網羅的比較定量プロテオミクス技術の確立とショ糖摂取による小腸上皮トランスポーター発現変動解析への適用

Establishment of comprehensive proteomics for quantitative comparison of transporters and its application to the sucrose-induced changes in small intestine

西山 俊、○奥田 傑、高藤 和輝、ウォンタイ プリンティップ、五十棲 規嘉、永森 收志、金井 好克（大阪大院医）
Takashi NISHIYAMA, ○Suguru OKUDA, Kazuaki TAKAFUJI, Printip WONGTHAI, Noriyoshi ISOZUMI, Shushi NAGAMORI, Yoshikatsu KANAI (Osaka Univ.)

経口摂取した栄養素の吸収は、主に小腸上皮細胞に発現する種々のトランスポーターによって行われる。そのため、個々のトランスポーターの機能特性を解明し、同時に小腸上皮のトランスポーターの全体像を定量的に把握することは、消化吸収の生理機能やその病態変動を理解するために重要な課題である。しかし、ウエスタンブロットや DNA マイクロアレイなどを用いた従来の定量的研究手法では、栄養吸収に関与するトランスポータータンパク質の量的変動を網羅的に解析することは難しく、全体像の評価は困難であった。プロテオミクスはタンパク質の網羅的解析に最適な方法であるが、トランスポーターのように複数膜貫通領域を持つ膜タンパク質に関しては、発現量の低さや取り扱いの難しさにより、他のタンパク質に比べてプロテオミクスによる網羅的解析が確立されていない。そこで今回我々は、トランスポーターの網羅的変動解析技術を確立するため、膜タンパク質に特化した比較定量プロテオミクスを適用した。本研究では、確立した解析技術を用い、ショ糖摂取によるマウス小腸上皮トランスポーターの発現変動を網羅的に捉えるため、ショ糖水摂取群（ショ糖群）と水摂取群（対照群）の比較定量解析を行った。

マウスを 2 群に分け、低炭水化物食の自由摂食下において、脱イオン水、もしくはショ糖溶液の自由摂取条件下で 2 週間飼育した。2 群間で摂取エネルギー量および体重には有意な差は見られなかった。これらのマウスの小腸（十二指腸、空腸）上皮粘膜より精製した刷子縁膜小胞から、膜タンパク質に特化した相間移動溶解法によりタンパク質を抽出した。その後トリプシン処理を行い、得られたペプチドを二次元逆相クロマトグラフィーによって分画し、定量型質量分析計を用いて比較定量解析を行った。その結果、膜タンパク質を網羅的に比較定量することができた。ショ糖群において、従来手法を用いた研究により報告されている糖トランスポーターや膜型代謝酵素の発現変動に加え、コレステロールの代謝吸収に関与するトランスポーターや酵素の発現増加が観察された。さらにアミノ酸、ペプチドの代謝吸収に関するトランスポーターや酵素の発現低下が見られた。本研究手法は、網羅的に栄養吸収分子の変動を解析可能にするのみではなく、今後、様々な膜タンパク質が関与する生体機能の網羅的変動解析に応用可能である。

proteomics, transporter, nutrient absorption

講演番号：3C02a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ C 校舎 02 会場

血清のプロテオーム解析による黒毛和種牛の脂肪交雑度を診断するバイオマーカーの探索

Biomarker discovery for predicting beef marbling of Japanese Black by serum proteomic analysis

○赤尾 大樹[1]、池上 春香[1]、松橋 珠子[2]、武本 淳史[3]、永井 宏平[1]、樋口 智香[3]、守田 昂太郎[3]、小林 直彦[4]、松本 和也[1] ([1]近畿大学生物理工学部、[2]岐阜県畜産研究所、[3]近畿大学大学院生物理工学専攻、[4]岐阜県家畜保健衛生所)
○HIROKI AKAO[1], HARUKA IKEGAMI[1], TAMAKO MATSUHASHI[2], ATSUSHI TAKEMOTO[3], KOUHEI NAGAI[1], CHIKA HIGUCHI[3], KOUTAROU MORITA[3], NAOHIKO KOBAYASHI[4], KAZUYA MATSUMOTO[1] ([1]School of biology oriented science and technology, Kinki Univ., [2]Gifu prefectural livestock research institute, [3]Graduate school of biology oriented science and technology, Kinki Univ., [4]Gifu prefectural hida livestock hygiene service center)

【背景と目的】黒毛和種などの肉用牛では、肉質と枝肉価格に強い関連性があることが知られており、特に肉の霜降りである脂肪交雑度合が高い程、枝肉価格が高い傾向がある。牛肉の霜降り度合は、第6～第 7 肋骨間切断面を用いて 1 から 12 の脂肪交雑基準ナンバー(BMS ナンバー)によって判定され、BMS ナンバーが高いほど脂肪交雑が多い。肉牛の肥育には長期（概ね 15～20 ヶ月）を必要とするが、牛肉の霜降り度合はそのウシを屠殺（と畜）することで初めて確認が可能となる形質であり、これまでに超音波生体診断や代謝プロファイルテスト等を応用した研究がなされているものの、科学的根拠に基づいて肥育中に牛肉の霜降り度合を推定する方法は確立されていない。そこで我々は、肥育期間中に非侵襲的に採材する必要性から、血清を用いたプロテオーム解析によりバイオマーカー候補タンパク質を探索した。
【方法】平成 21 年 12 月に黒毛和種肥育牛の BMS ナンバーの高い群 16 頭（平均 10.4）と低い群 18 頭（平均 4.8）からと畜時に血清を採材した。また、平成 21 年 7 月～平成 22 年 1 月に肥育導入した黒毛和種牛の BMS ナンバーの高い群 4 頭（平均 11.0）と低い群 4 頭（平均 6.5）から、肥育導入後 1 ヶ月以降、6 ヶ月毎に血清を採材した（導入後 1，7，13，19 ヶ月後)。採材した血清から、ProteoMiner Protein Enrichment kit(Bio-Rad)を用いて血清中のタンパク質を回収した。回収したタンパク質を二次元電気泳動で分離して検出し、画像解析によって各スポットのタンパク質を定量した。と畜時に採材したサンプルについて、BMS ナンバーの高い群と低い群の各タンパク質量を t 検定を用いて比較し、有意差のあるタンパク質スポットを抽出し、質量分析を用いて同定した。さらに、と畜時サンプルの解析で同定したバイオマーカー候補タンパク質について、肥育中に経時的に採材したサンプル中の含有量を調べた。
【結果】と畜時のプロテオーム解析において、BMS ナンバーの高い群と低い群間で 4 スポットのタンパク質に有意差があった。その内、脂質輸送に関わるタンパク質 Apolipoprotein E (Apo-E) について肥育期間中 6 ヶ月毎の Apo-E 量を調べたところ、肥育中期において、BMS ナンバーの高い個体では 3 倍以上の高値を示した。以上の結果より、Apo-E は肥育過程において BMS ナンバーを予測するバイオマーカーとして有効である可能性が示された。
※本研究の一部は、JRA 日本中央競馬会・畜産振興事業で実施した。

bovine, beef marbling, proteome

講演番号：3C02a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ C 校舎 02 会場

バイオ医薬品製造向け細胞株育種研究開発の統合管理: CHO ゲノム精査と解析

Integrated Management of Cell Line Development R&D for Bio-Manufacturing: CHO genome refinement and analysis

Thomas Hartsch[2]、Ludwig Macko[2]、Sebastien Ribrioux[2]、Julia Retey[2]、下広 英樹[1]、森脇 香織[1]、○新城 雅子[1] ([1]ジーンデータ株式会社、[2]Genedata AG)
Thomas Hartsch[2], Ludwig Macko[2], Sebastien Ribrioux[2], Julia Retey[2], Hideki Shimohiro[1], Kaori Moriwaki[1], ○Masako Shinjoh[1] ([1]Genedata KK, [2]Genedata AG)

（目的）バイオ医薬品の工業生産では、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞が重要な役割を果たしている。プロセスサイエンスにおいて効率的な細胞株エンジニアリングを行うためには、次のアプローチが要求される：

- 生産性改良：遺伝子機能、分子機構、実験データの統合的視覚化
- 培養プロセスの最適化：培地と培養条件
- 細胞株育種支援：伝統的変異育種と合理的遺伝子操作による育種
- 遺伝子型と表現型の関係解析：マウス、ハムスター、系列細胞株の比較ゲノム応用
- セルファクトリー育種全行程での支援：ゲノムから最終プロダクトさらに特許まで
- プロセス開発と培養最適化の支援：培養中の汚染ファージ・微生物の検出

（結果）マウス、ハムスター、複数の CHO 細胞株、酵母、細菌のゲノムを一つの統合システム内で比較し、ゲノム参照一覧（genome reference compendia）を提供する目的で Genedata Selector™ を用いた。公共にある CHO K1 株のゲノム配列および RNAseq データをアノテーションに使用した。
その結果、各遺伝子のアノテーションおよび遺伝子、転写物からタンパク質、代謝物までの全バイオプロセスにおいて、転写因子結合部位および代謝・制御パスウェイを含む機能同定が顕著に改善された。Selector を用いて、膨大な量の自社所有データと公共データ（次世代シーケンシング、メタボロミクス、プロテオミクスなどの先端技術による）は、分析研究室や培養プロセス（スケールアップから実生産）から排出される実験データと共に統合解析できる。これにより、研究者が組換えタンパク質生産プロセスを顕著に改善することを支援する。培養生産プロセスにおける制御とデータ収集の支援も含み、培養中の汚染の検出もメタゲノミクス解析で可能となる。
このアプローチが、自社株配列とその表現系の解釈を可能にし、優良クローン選択プロセスを質的、量的に改善し、培養プロセスが介在するアポトーシスの軽減にも繋がることが期待されている。
今後は、バイオ医薬品開発を研究室レベルの分子から医薬に作り上げる全行程のコンピューターシステムによる一元管理・支援システムを研究開発の現場と共同で更に改善、発展させる。

参考： Thomas Hartsch et al. 5th Annual Next Generation Sequencing Congress 2013, London
Masako Shinjoh et al. 2013 年度 生物工学会大会、仙台

bio-pharmaceuticals and biologics, CHO cell line development, next generation sequencing

講演番号：3C02a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ C 校舎 02 会場

ROCK 阻害剤による ES 細胞および iPS 細胞の分化促進効果

Promotion of ES and iPS cell differentiation by ROCK inhibitor

○上芝原 佑[1]、川口 英夫[1]、清水 範夫[2] ([1]東洋大院生命科学、[2]東洋大バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター)
○Yu KAMISHIBAHARA[1], Hideo KAWAGUCHI[1], Norio SHIMIZU[2] ([1]Toyo Univ., [2]Bio-Nano Electronics Research Center)

【目的】胚性幹（ES）細胞や人工多能性幹（iPS）細胞は、*in vitro* において様々な細胞に分化する多分化能を有し、半永久的に増殖することが可能なため、再生医療分野への応用が期待されている。しかし、これらの幹細胞の分化をコントロールすることが困難なことや、単一細胞で培養すると細胞死（アポトーシス）を起こすなど、技術上の問題がある。これらの問題を解決するための基礎研究が行われている。最近の研究で、分散により生じるアポトーシスは Rho キナーゼ（ROCK）経路が関わっており、ROCK の働きを阻害することでアポトーシスを効率的に抑制することや、ROCK が幹細胞や神経細胞の増殖や分化などに関わっていることが明らかにされてきた。そこで本研究では、ROCK 阻害剤を ES 細胞と iPS 細胞の分化培養液に添加して、これらの細胞の神経細胞及び筋肉細胞への分化効率を向上させることを目的とした。
【方法】マウス ES 細胞やマウス iPS 細胞の分化を誘導させるために、浮遊培養により直径 200 μm の細胞コロニーを形成させた。この細胞コロニーに ROCK 阻害剤または ROCK 阻害剤と同時に神経成長因子（nerve growth factor ： NGF）を添加して分化培養した。培養 12 日目にβIII-tubulin などの神経細胞系マーカー及びα-actinin などの筋肉細胞系マーカーを用いて免疫蛍光染色を行い、フルオロ・イメージアナライザーを用いて蛍光強度を測定し、神経細胞及び筋肉細胞への分化割合を検討した。
【結果】ROCK 阻害剤を細胞コロニーに添加して分化培養した結果、ES 細胞および iPS 細胞とも無添加の場合に比較して、神経細胞に分化した割合が高くなった。さらに、ROCK 阻害剤と同時に NGF を添加した場合、ROCK 阻害剤のみに比較して、神経細胞に分化した割合が高くなった。一方、筋肉細胞への分化においても、ROCK 阻害剤を添加することで無添加の場合に比較して、分化した割合が高くなった。しかし、ROCK 阻害剤と NGF を同時に添加した場合、ROCK 阻害剤のみ添加した場合より筋肉細胞への分化割合が低下した。また、神経細胞と筋肉細胞の分化割合を比較すると神経細胞に分化した割合が高い結果が得られた。
以上の結果から、ROCK 阻害剤を添加して幹細胞を分化誘導させることで、神経細胞及び筋肉細胞に効率よく分化誘導できることを明らかにした。

ES cell, iPS cell, differentiation

講演番号：3C02a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ C 校舎 02 会場

絹由来タンパク質セリシン加水分解物の高純度化と細胞培養への応用
Ultra-purification of sericin hydrolysate and its application to mammalian cell culture
○寺田 聡[1]、福本 健[1]、山内 莉奈佳[1]、奥本 光軌[1]、佐々木 真宏[2]、高橋 潤[2]、山田 英幸[2] ([1]福井大院工、[2]セーレン株式会社)
○Satoshi Terada[1], Ken Fukumoto[1], Rinaka Yamauchi[1], Mitsuki Okumoto[1], Masahiro Sasaki[2], Jun Takahashi[2], Hideyuki Yamada[2] ([1]Univ. of Fukui, [2]SEIREN)

【緒言】　絹糸は外科手術において永年利用された素材である。絹の主要構成タンパク質は、フィブロインとセリシンであり、このセリシンの加水分解物には、ある程度、血清の作用を代替えし、株化細胞の無血清培養を改善する効果のあることを報告して来た。そして、このセリシン加水分解物は、和光純薬より市販されている。今回はこのセリシン加水分解物をさらに高純度に精製し、より効果の高い高純度ピュアセリシンの開発を試みた。つづいて、この高純度ピュアセリシンを用いて、再生医療用の幹細胞、特に間葉系幹細胞の培養を改善できるか評価した。
【着眼点】　これまでの検討から、ゲル濾過クロマトグラフィにより、分子量に応じてセリシンを分画した場合、低分子側が活性が弱く、高分子側が強いことがわかっている。さらに、溶液中では、セリシン加水分解物の個々のポリペプチドは互いに強く相互作用しているのではないかという知見が得られている。そして、生糸から絹を精製する際に生じる精練廃液から、セリシン加水分解物は分離精製されているのだが、この廃液に含まれる低分子の不純物のいくらかが、ポリペプチドと相互作用して会合し、残留しているのではないかと想定された。
　そこで、現在市販されているセリシン加水分解物を対象に、有効成分の含有率を高めた高純度ピュアセリシンの取得法として、次のような方策を考えた。セリシンペプチドの持つ他の分子に対する相互作用を弱めてやれば、低分子が遊離して、限外濾過膜を用いることで容易に分離できるのではないかと考えた。相互作用を弱めるために、尿素などのタンパク質の変性材を利用することとした。
【実験方法】　セリシン加水分解物を、タンパク質変性材存在下で限外濾過膜を用いて低分子を除去した。用いた変性材は、尿素、グアニジン塩酸、SDS、2ME である。また、pH の影響もあわせて検討した。つづいて、得られた残留画分を添加して細胞を培養し、高純度ピュアセリシンを評価した。株化細胞は、ハイブリドーマ、肝細胞株 HepG2、CHO、HeLa を、またラット間葉系幹細胞も検討した。
【結果】　尿素やグアニジン塩酸存在下で、酸性にて限外沪過処理を行って得られたセリシン分画品は、未処理のものよりも培地添加剤としての能力が高まっており、牛血清アルブミンよりも高い効果を示した。一方、変性材を含まない緩衝液に溶解して限外沪過した場合には、セリシンの活性は高まらなかったことから、変性が有効であったと考えられる。続いて、この高純度ピュアセリシンを、ラット骨髄由来の間葉系幹細胞の培養系に添加したところ、細胞増殖が有意に促進された。再生医療で利用される間葉系幹細胞の増幅培養にピュアセリシンが有用なことが期待される。

Sericin, Serum-free culture, Culture supplement

講演番号：3C02a17
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ C 校舎 02 会場

ラット神経細胞に発現させたアミロイドβタンパク質凝集体の免疫染色

Expression and immunostaining of amyloid-ß aggregates in rat neurons

○板倉 暁[1]、落石 知世[2]、清水 武則[1]、小森谷 友絵[1]、神野 英毅[1]、吉宗 一晃[1] ([1]日本大学生産工学部、[2]独立行政法人産業技術総合研究所)
○Akira ITAKURA[1], Tomoyo OCHIISHI[2], Takenori SHIMIZU[1], Tomoe KOMORIYA[1], Hideki KOUNO[1], Kazuaki YOSHIMUNE[1] ([1]Nihon Univ., [2]AIST)

アルツハイマー病(AD)の主要な病理変化に脳における老人斑形成と神経原線維変化がある。老人斑は疎水性アミノ酸残基を多く含むアミロイドβタンパク（Aβ）からなる不溶性の凝集体である。これまでに様々な大きさのAβ凝集体が報告され、直径 50nm 程度の非晶質のAβ凝集体は水への溶解度が相対的に高く、直径１μm 程度のAβ凝集体は不溶性である。可溶性のAβ凝集体は神経細胞に対する毒性が特に高いことから研究が進められているものの、これら可溶性の凝集体だけでは AD を説明することは困難である。これまでに我々は 50nm より大きなAβ凝集体に注目し、それらに対するモノクローナル抗体を複数作製してきた。これらの抗体は Aβモノマーや線維状 Aβとは反応せず、一定の大きさの Aβ凝集体とだけ反応することから凝集体上に形成される Aβの立体構造を認識していることが予想されている。本研究では直径 0.22μm 以上の大きな$A\beta_{1-42}$凝集体を特異的に認識する抗体(CloneNumber:31-2)の細胞内での反応性を解析するために、ラット海馬初代培養細胞で強制発現させたAβによって形成される凝集体を免疫組織化学的手法により染色した。

培養神経細胞に導入する$A\beta_{1-42}$遺伝子にはその発現を確認するためにN末にmycタグをつなげた。また凝集体を形成しにくくした既知の変異型$A\beta_{1-42}$も用いて両者に対する 31-2 抗体の染色性を解析した。Aβを発現するプラスミド DNA を培養 4 日目の海馬初代培養細胞に遺伝子導入し、31-2 抗体と myc 抗体および、市販の抗Aβ抗体(6E10)を用いて遺伝子導入から 6、12、18、24 時間後の細胞を免疫染色した。

Aβ遺伝子を発現させた細胞を 6E10 および myc 抗体を用いて二重染色した結果、遺伝子導入から 6 時間経過後よりAβの神経細胞内での発現が両抗体で確認された。一方、31-2 抗体と myc 抗体による二重染色では、遺伝子導入から 6 時間後では 31-2 抗体による免疫陽性反応は認められず、12 時間経過以降にAβの陽性反応が認められるようになった。また変異型Aβを発現させた細胞では 31-2 抗体による免疫反応はどの時間でもほとんど認められなかった。

以上の結果から31-2抗体は神経細胞内での特定の大きさのAβ凝集体を特異的に認識できると考えられる。このことから 31-2 抗体はAβの細胞内での凝集過程の観察に利用できると考えられる。

Alzheimer's disease, amyloid-ß, immunocytochemistry

講演番号：3C02p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ C 校舎 02 会場

遺伝子欠損細胞を用いたヒストンバリアント H2A.Z の機能解析

Analysis of function of the histone variant H2A.Z by using gene knockout cells

○奥 裕之[1]、日下部 将之[2]、松田 涼[2]、北村 大志[2]、堀 哲也[3]、深川 竜郎[3]、原田 昌彦[1,2] ([1]東北大学・農、[2]東北大学院・農、[3]国立遺伝研)
○hiroyuki oku[1], masayuki kusakabe[2], ryo matsuda[2], hiroshi kitamura[2], tetsuya hori[3], tatsuro fukagawa[3], masahiko harata[1,2] ([1]Tohoku Univ., [2]Grad.sch..Tohoku Univ., [3]Natl.Inst.Genet.)

【背景】真核生物において DNA はヒストンと結合することでクロマチン構造を形成して核内に収納されており、このクロマチン構造の変換によって転写制御など様々なエピゲノム制御が行われる。近年、クロマチン構造変換に関与する因子として、コアヒストンに替わってヌクレオソームに導入されるヒストンバリアントが注目されている。H2A.Z はコアヒストン H2A のバリアントの 1 つであり、出芽酵母からヒトにまで進化的に高く保存され、転写や DNA 損傷修復など様々なエピゲノム制御に関わる。特に、アセチル化修飾を受けた H2A.Z が転写活性化された遺伝子に多く存在するという報告などから、H2A.Z が転写活性化に寄与することが考えられている。しかし、H2A.Z による転写制御の分子機構については多くの点が不明である。そこで我々は、脊椎動物 H2A.Z の機能解析のため、ニワトリ DT 40 細胞を用いて H2A.Z 欠損 (H2A.Z KO)の細胞樹立を行った (1)。この H2A.Z KO 細胞を用いた解析によって、H2A.Z が細胞増殖に必要であること、H2A.Z が初期応答遺伝子 *JUN*, *FOS* の転写誘導に必要なことなどを観察している。
【方法】細胞増殖や転写制御における H2A.Z の機能ドメイン解析のため、外来性 H2A.Z 遺伝子を H2A.Z KO 細胞へ導入する相補 （レスキュー）実験を行った。具体的には、ニワトリ H2A.Z、ヒト H2A.Z、アセチル化修飾を受けない H2A.Z、アセチル化修飾を模倣 (mimic)した H2A.Z、出芽酵母 H2A.Z など発現するベクターを作製し、H2A.Z DKO 細胞へ遺伝子導入をした。そして、これらの外来性 H2A.Z により、細胞増殖や *JUN*, *FOS* 遺伝子転写誘導を相補できるかを BrdU の複製 DNA への取り込みや、定量 PCR 解析により解析した。
【結果】ニワトリ H2A.Z およびヒト H2A.Z の導入により、H2A.Z DKO 細胞の増殖および *JUN*, *FOS* 遺伝子の転写誘導の相補が観察されたことから、この実験系により、H2A.Z の機能評価が行えることが示された。出芽酵母 H2A.Z の導入ではこのような機能相補は観察されず、このことは脊椎動物の H2A.Z が新たな機能ドメインを進化的に獲得したことを示唆している。この機能ドメインの同定のため、脊椎動物と出芽酵母のキメラ H2A.Z を用いた解析を行っている。また、アセチル化変異 H2A.Z の導入によって、*JUN, FOS* 遺伝子の発現に変化が観察されたことから、これらの遺伝子発現に H2A.Z アセチル化が関与することが示された。現在さらに、ヒストンのコア領域に変異を導入した H2A.Z を H2A.Z DKO 細胞に導入することによって、新たな H2A.Z の機能ドメイン解析を行っている。
Reference: 1　Ohfuchi Maruyama et al., J.Cell Sci. 125, 3739-3743 (2012)

epigenetics, histone, transcription

講演番号：3C02p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ C 校舎 02 会場

高分子非コード RNA,*ANRIL* の作用機序と細胞機能の解明

Elucidation of the cellular function and action mechanism of long non-coding RNA,*ANRIL*

○苗村 円佳、神武 洋二郎（近大院産理工）
○Madoka NAEMURA, Yojiro KOTAKE (Kinki Univ.Grad)

高分子非コード RNA(long non-coding RNA: lncRNA)は、数百～数十万塩基の長さで、キャップ構造とポリ（A）鎖を持つ非コード RNA である。近年の研究から、いくつかの lncRNA が、クロマチン制御、転写制御、核内構造体形成やタンパク質輸送などに関与することが明らかとされた。ほとんどの lncRNA の作用機序は不明であるが、一つの共通作用機序として、lncRNA はヒストン修飾因子と相互作用して、標的遺伝子の転写制御に関与することが分かっている。

ANRIL(antisence non-coding RNA in the INK4 locus)は、細胞周期を負に制御する CDK インヒビター*p15*、*p16* 及び *ARF* をコードしている *INK4* 遺伝子座から転写される lncRNA である。この *ANRIL* の機能解析を行うため、ヒト胎児肺正常線維芽細胞を用いて *ANRIL* をノックダウンすると、*p15* 及び *p16* の転写が活性化し、細胞増殖が抑制され、最終的に早期細胞老化の表現型を示すことが分かった。*ANRIL* の作用機序を解明するため、RNA 免疫沈降(RIP)実験を行った結果、*ANRIL* はクロマチン制御因子であるポリコームタンパク質 SUZ12 と結合していることが判明した。さらに、クロマチン免疫沈降(ChIP)実験の結果、*ANRIL* をノックダウンすると、*INK4* 遺伝子座上に結合しているポリコームタンパク質の結合量が減少することが分かった。これらの結果から、*ANRIL* は、ポリコームタンパク質と結合して、*INK4* 遺伝子座にリクルートすることにより、*p15*/*p16* の転写を抑制することが考えられた。次に *ANRIL* の発現解析を行った結果、癌化シグナル（活性型 H-Ras 変異体の過剰発現）によって、*ANRIL* の発現量が顕著に減少することが分かった。また、様々なヒト細胞を用いて *ANRIL* の発現解析を行った結果、*ANRIL* は正常細胞と比較して癌細胞において高発現していることが判明した。そこで、癌細胞における *ANRIL* の機能解析を行うため、肺癌細胞 H1299 及び子宮頸癌細胞 HeLa を用いて *ANRIL* をノックダウンすると、*p15* の転写が活性化し、細胞増殖が抑制された。これらの結果から、*ANRIL* は癌細胞においても *p15* の転写抑制を介して細胞増殖を正に制御していることが示唆された。本発表では、*ANRIL* による作用機序を中心に、正常及び癌細胞における *ANRIL* の機能についても発表する。

long non-coding RNA, *p15*, *p16*

講演番号：3C02p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ C 校舎 02 会場

細胞分化における核内アクチンの機能解析
Analysis of function of nuclear actin in cell differentiation.
○山本 浩志[1]、山崎 祥他[4]、十川 久美子[2,3]、徳永 万喜洋[2,3]、原田 昌彦[1,4]([1]東北大農、[2]東工大院生命理工、[3]理研免疫センター、[4]東北大院農)
○Koji YAMAMOTO[1], Shota YAMAZAKI[4], Kumiko SOGAWA[2,3], Makio TOKUNAGA[2,3], Masahiko HARATA[1,4] ([1]Tohoku Univ., [2]Tokyo Tech., Grad., [3]RIKEN, [4]Tohoku Univ., Grad.)

アクチンは細胞骨格の主要構成タンパク質であり、細胞の運動、分裂、形態変化など多様な機能を制御している。その一方で近年では核内においてもアクチンとそのファミリータンパク質 (actin-related protein : Arp)の存在が見いだされ、アクチンの核内での機能が注目されている [1]。核内では、アクチンは Arp と共に、クロマチンリモデリング複合体の構成因子としてエピジェネティクス制御に関与することが報告されている。また最近の研究により、血清応答因子 (Serum Response Factor : SRF)などの転写因子に核アクチンが直接結合することで遺伝子発現制御に関わることも明らかにされている。さらに遺伝子の初期化に核内アクチンの重合が必要であること、発生の初期段階にも一時的な核内アクチン線維が形成されることも報告されている [2]。そこで我々は、細胞分化における核内アクチンの役割を、ヒトケラチノサイトである HaCaT 細胞を用いて解析した。HaCaT 細胞はカルシウム濃度依存的な分化誘導が可能であり、分化マーカーであるケラチン 10 の発現、また細胞コロニーの重層化によって分化の進行度を検出できる。この分化モデル系を用い、アクチン重合を促進する化合物 Phalloidin 処理による細胞内のアクチンダイナミクスの変化が細胞分化に与える影響を観察した。その結果、Phalloidin 処理によって、分化の指標である細胞の重層化の促進が観察されると共に、核内アクチン局在量の増加が観察された。この結果は、アクチンのダイナミクスが細胞分化に関与していることを示唆している。細胞分化過程での細胞内アクチン局在変化を詳細に解析するため、EYFP タグを付加した actin を HaCaT 細胞に導入・発現させた。カルシウムによる分化誘導により、未分化時と比較して核内のアクチンが増加することが観察された。また、重合したアクチン (F-actin)に特異的に結合するペプチドを蛍光で可視化したプローブを用いた観察により、分化過程で核に集積したアクチンが重合していることも示された。これらの結果から、細胞分化にはアクチンの核への移行に加えて、核内でのアクチン重合状態の変化も関与していることが示唆された。

References
[1] Oma Y and Harata M., Actin-related proteins localized in the nucleus; From discovery to novel roles in nuclear organization. Nucleus, 2: 38-46, 2011.
[2] Miyamoto K, et al., Nuclear actin polymerization is required for transcriptional reprogramming of Oct4 by oocytes. Genes Dev., 25: 946-958, 2011.

nuclear actin, cell differentiation, epigenetics

講演番号：3C02p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ C 校舎 02 会場

転写およびアクチンダイナミクス制御におけるアクチンファミリーArp5, Arp8 の機能解析

Involvement of the actin family proteins Arp5 and Arp8 in transcription and actin dynamics

○村上 寛和[1]、高橋 裕一朗[2]、山崎 祥也[2]、西嶋 仁[3]、柴原 慶一[3]、原田 昌彦[1,2] ([1]東北大・農・分子生物、[2]東北大院・農・分子生物、[3]国立遺伝研)
○Hirokazu MURAKAMI[1], Yuichiro TAKAHASHI[2], Shota YAMAZAKI[2], Hitoshi NISHIJIMA[3], Kei-ichi SHIBAHARA[3], Masahiko HARATA[1,2] ([1]Tohoku Univ., [2]Tohoku Univ., Grad. Sch. Agri., [3]Nat. Inst.Genet.)

真核生物のゲノム DNA は、ヒストン八量体に巻付いたヌクレオソーム構造を基本単位とし、高度に凝集したクロマチン構造を形成する。このようなクロマチン構造をとることで DNA は効率よく核に収納されているが、転写や複製の際にはクロマチンリモデリング複合体により、凝集したヘテロクロマチンからユークロマチンへの構造変換がおこる。核内には多様なクロマチンリモデリング複合体が存在し、その多くでアクチンとアクチン関連タンパク質 (actin-related protein; Arp)が構成タンパク質として同定されている。しかし、これらの複合体におけるアクチンファミリーの役割に関する知見は少ない。本研究室ではこれまで INO80 複合体に特異的な構成因子である Arp5, Arp8 について、これらの遺伝子ノックアウト（KO）細胞を作成・解析することにより、その機能解析を行ってきた。マイクロアレイ解析により Arp5, Arp8 が複数のストレス応答遺伝子の発現制御に関与することを明らかとし、その中で酸化ストレス応答遺伝子である Heme oxygenase-1（HO-1）に注目した。Arp5 KO および Arp8 KO 細胞では、酸化ストレス時の HO-1 の発現量の著しい減少が観察された。また、クロマチン免疫沈降法により、Ino80, Arp5, Arp8 の HO-1 遺伝子エンハンサー領域への結合が検出された。このことから、Arp5, Arp8 が INO80 複合体によるクロマチン構造変換を介して、HO-1 遺伝子発現制御に関与していることが示唆された。そこで、本研究では、クロマチンのヌクレアーゼ感受性を利用し、クロマチン構造変化を観察することで INO80 複合体における Arp の機能解析を試みた。その結果、酸化ストレス時に、Arp5 KO 細胞では WT より HO-1 遺伝子領域のクロマチン構造が閉じた傾向にあることが示された。一方でこの KO 細胞においても、Ino80 の HO-1 遺伝子エンハンサーへの結合に変化はなかった。この結果から、Arp5 が、INO80 複合体のクロマチンへの結合ではなく、複合体の活性を制御することによって HO-1 遺伝子活性化に関与する可能性が示された。今後、Arp5, Arp8 の ATP 結合ドメインに変異を入れ、KO 細胞に導入することで Arp5, Arp8 の詳細な機能解析を行うことを計画している。また近年の in vitro 解析により、Arp が直接アクチンに結合してアクチンの重合を制御することが観察されている。核内アクチンは、クロマチンリモデリング複合体の構成タンパク質としての機能に加え、そのダイナミクスや構造がエピジェネティクスの制御に関与することも報告されている。そこで、我々は Arp5, Arp8 が核内アクチンのダイナミクス制御によってもエピジェネティクス制御に関与している可能性を考え、Arp5 KO, Arp8 KO 細胞における核内アクチンの局在や重合状態の解析を行っている。

actin-related proteins, chromatin remodeling complex

講演番号：3C02p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ C 校舎 02 会場

がん細胞における p27 機能抑圧因子の探索

Search of functional depressor of p27 in cancer cell

○荒井 拓也、浅野 祐一、吉川 博文、千葉櫻 拓（東京農大・応生科・バイオ）
○ Takuya ARAI, Yuuichi ASANO, Hirohumi YOSHIKAWA, Taku CHIBAZAKURA（Tokyo Univ.Agric.）

p27 は cyclin/CDK 複合体に結合することで細胞周期を負に制御する因子として広く知られ、接触阻止や栄養飢餓などで発現が誘導される。その量的制御は転写後調節とプロテアソーム系による分解が主である。また p27 はがん抑制因子であり、p27 の発現量とがんの悪性度に負の相関性があることが臨床的に知られている。しかし当研究室において、ある種のがん細胞では p27 の発現が十分量あるにも関わらず、細胞周期が停滞しないという現象が観察されており、p27 の機能制御には量的なものだけではなく、質的な制御も存在することが示唆されている。

そこで本研究では、がん細胞において p27 の機能を質的に抑圧する因子を探索する端緒として、種々のがん細胞株における p27 と cyclin/CDK 複合体との相互作用を解析するとともに、相互作用に関与する因子を探索することを目的とした。

Cyclin/CDK と p27 との相互作用を多種の細胞株において簡便に検出するために、split-YFP 法を用いた相互作用評価系を確立した。これは p27 の N 末端側に YFP の C 末端（YFP_C）を、cyclin A の C 末端側に YFP の N 末端（YFP_N）をそれぞれ融合したものを発現させ、p27 と cyclin A が相互作用すると YFP の立体構造が復元され蛍光を発することを利用して、蛍光の有無により相互作用を定性的に検出する系である。この split-YFP の利点として　①検出が簡便であること②生細胞で観察が可能なこと③バックグラウンドが低いことの３つが上げられる。各種がん細胞株（HEK293, HT1080, U2-OS, HepG2, MDAH041, HeLa など）に YFP_C-p27 および cyclin A-YFP_N を共トランスフェクションすることで、がん細胞における p27 と cyclin A との相互作用の有無を検証した。その結果、HT1080 と HepG2 において YFP の蛍光が検出されなかった。細胞内での p27、cyclin A の発現量は十分量であるため、この２つのがん細胞では p27 と cyclin A の相互作用が抑制されていることが示唆された。

そこで、これらのがん細胞においては、p27 に相互作用して（1）cyclin A との相互作用を抑圧する因子が存在する可能性と（2）cyclin A との相互作用に必要な因子が欠損している可能性が考えられた。そのような因子を探索するために、抗 p27 抗体を用いた免疫沈降により細胞抽出液から p27 を含む複合体を分離し、MS 解析により p27 と相互作用する因子を現在解析中である。

cell cycle, cancer, CKI

講演番号：3C02p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ C 校舎 02 会場

酵母 split-ubiquitin システムを用いたヒトドリコールキナーゼ hDOLK の物理的相互作用の解析
Analyses of the human dolichol kinase, hDOLK, with the yeast split-ubiquitin system

○高橋 哲夫、樋口 洋子、山田 直人、傳能 康成（東海大工生命化学）
○Tetsuo Takahashi, Yoko Higuchi, Naoto Yamada, Yasunari Dennou (Tokai Univ.)

【目的】

ヒト粗面小胞体(rER)膜に局在するドリコールキナーゼ(hDOLK)は、rER膜の細胞質側でのドリコール(Dol)のCTP依存性リン酸化反応を触媒する。本酵素により生合成されたドリコールリン酸(Dol-P)は、同じくヒトrER膜に局在するGlcNAc-1-P転移酵素(hGPT)、Dol-P-Man合成酵素(hDPMS)及びDol-P-Glc合成酵素(hDPGS)の単糖受容体基質となり、N-グリカン前駆体であるドリコール中間体(DLO)、GPIアンカー及びO-マンノース型糖鎖などの糖鎖生合成に利用される。我々はこれまでに酵母split-ubiquitinシステムを利用して、ポリトピック型酵素であるhDOLKの膜配向性を解析し、本酵素が少なくとも10の膜貫通ドメインを有することを明らかにしてきた。本研究では、rER膜上でのhDOLKの挙動を解明すべく、酵母split-ubiquitinシステムを用いた解析をさらに進め、hDOLKの物理的相互作用について詳細に検討することにした。

【方法、結果及び考察】

N末端及びC末端にCub-LexA/VP16を付加したhDOLKを発現するための2種類のベイトコンストラクト(pBT-N-hDK及びpBT-C-hDK)を、上述のhGPT、hDPMSサブユニット及びhDPGSに加えて、hDOLK自身、ヒトドリコールピロリン酸ホスファターゼ(hDPP)及びヒトMPDU1(hMPDU1)の末端にNubGを付加した融合蛋白質を発現するプレイコンストラクト(pPR-N-xまたはpPR-C-x; xはいずれかの酵素遺伝子)と組み合わせて酵母NMY51株を二重形質転換し、得られたベイト/プレイ共発現株について相互作用に関するレポーター検出用選択培地(SD-LWH及びSD-LWHA)上で増殖性試験を行った。その結果、pBT-C-hDK/pPR-N-hDK共発現株及びpBT-N-hDK/pPR-N-hDK共発現株について選択培地上での増殖性が観察され、hDOLKは自身と物理的に相互作用して膜上でホモオリゴマーを形成することが示唆された。さらに、pBT-C-hDK/pPR-N-hDPP1共発現株やpBT-C-hDK/pPR-N-hGPT共発現株などについても選択培地上での増殖性が確認され、hDOLKが他のDLO生合成関連酵素と物理的に相互作用することが明らかになった。現在、各相互作用に必要な領域を限定するために、hDOLKまたは他の酵素の各疎水性領域(HR)の直前まで欠失した変異ベイトコンストラクトまたは変異プレイコンストラクトを作製して解析を進めている。

dolichol kinase, split-ubiquitin system, physical interaction

講演番号：3C02p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ C 校舎 02 会場

HDL 産生における ABCA1 のダイマー化の生理的意義の解析

Analysis of physiological significance of ABCA1 dimerization during HDL generation

○石神 正登[1]、永田 紅[2]、笠井 倫志[3]、永岩 耕太[1]、提坂 友梨奈[1]、楠見 明弘[2,3]、植田 和光[1,2]（[1]京大院農、[2]京大 iCeMS、[3]京大再生研）
○Masato ISHIGAMI[1], Koh NAGATA[2], Rinshi KASAI[3], Kouta NAGAIWA[1], Yurina SAGESAKA[1], Akihiro KUSUMI[2,3], Kazumitsu UEDA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoro Univ., [3]Ins. for Front. Med. Sci., Kyoto Univ.)

＜背景・目的＞

ABCA1 は、善玉コレステロールと呼ばれる高密度リポタンパク質（HDL）の形成の鍵を握るトランスポーターであり、末梢細胞の過剰なコレステロールを肝臓に逆輸送し、動脈硬化を防ぐ重要な役割を担っている。HDL 形成時には、血漿中のアポリポタンパク質 apoA-I が、まず ABCA1 の細胞外ドメインに結合し、ABCA1 からコレステロールとリン脂質を直接受け取って、HDL 複合体を形成すると我々は提唱している。これまでに我々は、機能的な ABCA1 は細胞膜上で一時的にダイマーを形成して静止し、HDL 産生後に再度モノマーとなって自由拡散することを、全反射照明蛍光顕微鏡（TIRFM）を用いた解析によって明らかにした。しかし、ABCA1 のダイマー化のメカニズム、および ABCA1 のダイマー化の生理的意義は未だわかっていない。一方、ABCA1 と最も高いアミノ酸配列相同性をもつ ABCA7 は、ABCA1 と同様に apoA-I に脂質を排出するが、ABCA1 とは大きさの異なる HDL を産生することが知られている。本研究では、ABCA7 と ABCA1 の変異体を用いて、ABCA1 のダイマー化のメカニズムと生理的意義を明らかにすることを目的とした。

＜結果＞

ABCA7 の一分子の挙動を TIRFM によって解析したところ、ABCA1 とは異なり細胞膜上での一時的な静止が見られなかった。ABCA7 と ABCA1 のアミノ酸配列を比較したところ、ABCA1 の C 末端領域には 7 アミノ酸残基おきにロイシンが現れるロイシンジッパー様モチーフが存在することがわかった。我々はこのモチーフが ABCA1 のダイマー化に関与していると予測し、このモチーフに含まれる 3 つのロイシン残基をアラニンに置換した変異体（ABCA1-3LA）を作製した。TIRFM によって一分子解析したところ、ABCA1-3LA は細胞膜上での静止がほとんどみられず、我々の予想どおりダイマー化できないことが示唆された。次いで、ABCA1, ABCA1-3LA, ABCA7 発現 BHK 細胞を Bodipy-cholesterol でラベルしたのち、培養培地に Alexa 蛍光色素でラベルした apoA-I を添加し、培地中に HDL 粒子を産生させた。この HDL 粒子を蛍光ゲルろ過法で解析したところ、ABCA1 発現細胞からは Bodipy-cholesterol が含まれた大きさの異なる 2 種類の HDL（Large, Small）ピークが得られたのに対し、ABCA1-3LA, ABCA7 発現細胞からは Small HDL のピークしか得られなかった。以上の結果から、ABCA1 のダイマー化には C 末端領域のロイシンジッパー様モチーフが必要であることと、ABCA1 のダイマー化は Large HDL の産生に必要であることが示唆された。

HDL generation, ABC transporter, dimerization

講演番号：3C02p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ C 校舎 02 会場

ヒト Intelectin(Lactoferrin receptor)の哺乳動物細胞における発現検討

Human Intelectin is expressed as both a GPI-anchored and a secreted protein in mammalian cells.

○関 航平、中 侑希、大島 裕太、渋谷 昌孝、横山 竜也、佐藤 淳（東京工科大院バイオニクス専攻）
○Kouhei SEKI, Yuuki NAKA, Yuuta OOSHIMA, Masataka SHIBUYA, Tatsuya YOKOYAMA, Atsushi SATO (Tokyo University of Technology)

【目的】

インテレクチン(Intelectin)は小腸上皮細胞において、Lactoferrin(LF)の受容体として機能することが報告されている。その発現様式は組織により異なり、分泌タンパク質として血中に存在するとともに、GPI アンカー型としても発現すると報告されている。本研究では、ヒトインテレクチン(hIntelectin)の発現様式を調べる目的で、哺乳動物細胞による発現検討を行なった。

【方法】

hIntelectin の遺伝子全長を COS-1 細胞で一過性発現させ、分泌型、および膜タンパク質型としての発現を Western Blot 法で解析した。更に、発現細胞を phosphatidylinositol-specific phospholipase C(PI-PLC)で処理し、遊離する hIntelectin を指標にして、GPI アンカー型としての可能性を検討した。遺伝子全長を発現する CHO(DG44)安定発現細胞株を樹立し、培地中に分泌する hIntelectin を、Protein G カラムで精製した。

【結果】

hIntelectin は COS-1 細胞において、分泌型、および GPI アンカー型の両方の発現様式を示した。C 末端側に存在する疎水性領域を欠損させた場合には、分泌型、および膜タンパク質型ともに発現量が激減した。CHO(DG44)安定発現細胞株では、COS-1 と同様に分泌型、および GPI アンカー型として発現した。培地中に分泌した hIntelectin は Protein G に結合した。しかし、酸性下での溶出により、Protein G への再結合能が完全に消失したことから失活したと考えられる。

【結論】

hIntelectin は COS-1、CHO(DG44)細胞において、分泌型、および GPI アンカー型として発現した。その C 末端側疎水性配列は、発現において重要な領域であると示唆される。既に報告があるヤツメウナギの Intelectin ホモログと同様に、hIntelectin は Protein G に結合した。しかし、酸性下で速やかに失活した。活性を保持した溶出方法については現在検討中である。

Intelectin, GPI-anchored protein, secreted protein

講演番号：3C02p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ C 校舎 02 会場

ウシ乳に含まれるリポカリンタンパク質のリガンド特性解析
Ligand specificity analysis of bovine milk lipocalin
○福田 健二[1]、古川 奈那[2]、土井山 爽太[2]、浦島 匡[1] ([1]帯畜大院畜産衛生、[2]帯畜大食品)
○Kenji FUKUDA[1], Nana FURUKAWA[2], Souta DOIYAMA[2], Tadasu URASHIMA[1] ([1]Obihiro Univ., [2]Obihiro Univ. Food Sci.)

【目的】ウシ乳にはβ-ラクトグロブリンをはじめ数種類のリポカリンタンパク質が含まれている。リポカリンタンパク質は分子量 20 kDa 程度の球状タンパク質であり、分子内キャビティに疎水性低分子化合物をリガンドとして結合し運搬する。乳中リポカリンタンパク質のうち、bovine colostral odorant-binding protein (bcOBP) は 200 μg/L と極微量であるが恒常的に分泌されている。本研究は、bcOBP の生理的役割を推定するため、組換え体 bcOBP のリガンド結合特性の解明を目的とした。
【方法】Stockell の式$[A_0]/[E_0]Y=K_d/[E_0](1-Y)$, ($[A_0]$, 蛍光基質の全濃度、$[E_0]$, タンパク質の全濃度、リガンドが飽和濃度を与えるとき Y=1) を用いて蛍光基質 1-aminoanthracene (1-AMA)および 4,4’-dianilino-1,1’-binaphthyl-5,5’-disulfonic acid (bis-ANS)に対する 解離定数を求めた。対照として、組換え体 bovine nasal odorant-binding protein (bOBP) を用いた。蛍光強度は Ex, Em スリット 5 nm、ホトマル電圧 400 V、レスポンス 0.4 sec、スキャンスピード 1500 nm/min、励起波長 250 nm (1-AMA), 270 nm (bis-ANS), 280 nm (bOBP, bcOBP)、蛍光波長 400-600 nm (1-AMA, bis-ANS), 300-400 nm (bOBP, bcOBP)の条件で測定した。なお、散乱光は WG320 フィルターにより除去し、ローダミンを用いて装置関数を補正した。リガンド候補物質の IC_{50} 値および K_i 値は以下のように求めた。100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した 1 μM の bOBP (モル吸光係数 $36\times10^3\ M^{-1}cm^{-1}$) または bcOBP (モル吸光係数 $23\times10^3\ M^{-1}cm^{-1}$) にメタノールに溶解した 1-AMA または bis-ANS を終濃度 1 μM となるよう混合し、4℃で一晩保持した。その後、各濃度 (0 – 33 μM) のリガンド候補物質を添加し、競合的結合阻害による 1-AMA および bis-ANS の遊離に伴う蛍光強度低下を測定した。IC_{50} 値は得られたグラフから見積もり、K_i 値は式 $K_i = [IC_{50}]/(1 + [L]/K_d)$, ($[L]$, 蛍光基質濃度、$K_d$, タンパク質の蛍光基質に対する解離定数) を用いて算出した。
【結果】bOBP では 1-AMA 及び bis-ANS、bcOBP では bis-ANS を使用した場合、タンパク質への取り込みに伴い蛍光基質の最大蛍光波長がブルーシフトし、また蛍光強度の増加が観察された。解離定数は、bOBP が 0.12 ± 0.04 μM (1-AMA, n = 3)、bcOBP が 0.49 ± 0.07 μM (bis-ANS, n = 3)と見積もられた。bOBP は脂肪酸、テルペン類、シクロペンタン誘導体、アルデヒド類、芳香族化合物、複素環式化合物など幅広く結合し、trans-2-ノネナール (IC_{50} = 2.18 μM, K_d = 0.232) を最も強く結合した。これに対し、bcOBP は一部の不飽和脂肪酸及びレチノイドを結合したが、all-trans-レチナール (IC_{50} = 0.73 ± 0.007 μM, K_d = 0.24 ± 0.002, n = 2) を特に強く結合することが明らかとなった。

milk, lipocalin, retinoid

講演番号：3C02p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ C 校舎 02 会場

ニワトリ中期～後期胚の中脳視蓋における TGF β スーパーファミリーの発現解析

Analysis of the expression pattern of the members of TGFßsuperfamily in the tectum development of chick mid-stage and late embryos

○太田 知希[1]、小野寺 望[2]、荒木 功人[1,2] ([1]岩手大院工、[2]岩手大院連合農)
○tomoki ota[1], nozomi onodera[2], isato araki[1,2] ([1]Iwate Univ., [2]Iwate University)

ニワトリ胚は、胚が大きく体外で生育するので胚操作が行いやすい、エレクトロポレーション法により遺伝子導入を簡単に行うことが出来る、有精卵を安価で入手可能である、有精卵を 16℃で保存しておけば、１～２週間は何時でも 38℃で培養を開始できる、羊膜類に属し遺伝子ネットワークや体の構造が哺乳類に近い、といった研究上の利点を持つので、様々な組織・器官の発生研究におけるモデルシステムとして用いられている。中脳視蓋は哺乳類を除く脊椎動物の視覚情報処理の中枢であり、ニワトリの場合、孵化前には 16 層から成る層構造をとるようになる。中脳視蓋に対し、網膜神経節細胞の軸索はトポグラフィックに投射する。この特徴的な投射パターンの基にある分子機構は詳細な解析がなされて いるが、中脳視蓋そのものがどのような分子機構により最終的に 16 層から成る複雑な層構造をとるようになるか、どのような種類の神経細胞が視蓋に存在し、それらがどのような発生様式で生ずるか、といったことに関する研究は遅れている。本研究では、TGFβ スーパーファミリーに着目し、そのメンバーのニワトリ中期～後期胚の中脳視蓋における発現パターンを報告する。

neural development, BMP, GDF

講演番号：3C02p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ C 校舎 02 会場

組換えタンパク質を利用したニワトリ卵膜マトリックス形成機構の解析

Analyses of the molecular mechanisms of chicken egg-coat matrix formation using recombinant egg-coat proteins.

○佐藤 喬洋、福島 英晃、氏田 稔、奥村 裕紀（名城大院農）
○Takahiro SATO, Hideaki FUKUSHIMA, Minoru UJITA, Hiroki OKUMURA (Meijo Univ.)

受精とは、多くの二倍体生物において、配偶子である卵子と精子が融合して新たな個体が生み出される極めて重要な生命現象の一つである。脊椎動物の卵母細胞は、一般に卵膜、卵外被や卵被膜、哺乳類では特に透明帯（zona pellucida）と呼ばれる特殊な細胞外マトリックスに覆われている。卵膜は種特異的に配偶子融合が行われるために必要な卵・精子間認識や、精子が卵膜に孔を形成して通過するために必要な酵素を分泌する精子先体反応の誘導、また精子が通過した後に卵膜の分子構造が変化することによって、2 つ以上の精子が卵子に侵入する多精受精を防止することなどの役割をもつ。卵膜は zona pellucida (ZP) domain という進化上よく保存された分子内領域を有する 3~5 種類の ZP 糖タンパク質によって構成されている。ZP domain は 8~10 個の Cys 残基を有する約 260 アミノ酸残基から構成されており、N 末端側の ZP-N domain と C 末端側の ZP-C domain が疎水性残基に富む短いペプチド（internal hydrophobic patch; IHP）を含むリンカー領域によって連結された構造をしている。

当研究室では、脊椎動物の卵膜マトリックス形成機構の解明を目指し、生化学的解析に必要な量の試料を調製することが容易なニワトリ卵膜を研究対象としている。ニワトリの卵膜は ZP1･ZP3･ZPD の 3 種類の ZP 糖タンパク質から構成されており、ZP1 と ZP3 から成る繊維状のマトリックスに ZPD が緩やかに結合した分子構造をもつと考えられている。本研究では、これらニワトリ ZP1・ZP3･ZPD について構造ドメインごとに組換えタンパク質を作製し、それらをプローブとして ligand blotting や pull-down assay などのタンパク質間相互作用解析を行った。また、作製した組換えタンパク質を抗原としてニワトリ ZP1･ZP3･ZPD に対するドメイン特異的なマウス抗血清を作製し、タンパク質間相互作用解析に用いた。本研究で得られた結果により、ニワトリ卵膜マトリックス内で各 ZP 糖タンパク質がどの分子内領域の間で結合してネットワークを形成しているのかを推測することが可能となった。

脊椎動物卵膜の形成機構を解明することによって、卵膜マトリックスの形成阻害や構造の改変などを行う道が開かれると考えられ、それらを応用して有害鳥獣の個体数管理や不妊症の治療、また非ホルモン性避妊薬の開発などを行うことができると考えられる。

egg-coat matrix, zona pellucida(ZP) glycoproteins, intermolecular interactions

講演番号：3C02p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ C 校舎 02 会場

ニワトリ IFITM がもつ抗ウイルス活性の機能解析

Functional analysis of chicken IFITM antiviral activity

○木溪 俊介、奥嵜 雄也、金岡 英徳、西島 謙一、飯島 信司 (名大院・工)
○Shunsuke KIDANI, Yuya OKUZAKI, Hidenori KANEOKA, Ken-ichi NISHIJIMA, Shinji IIJIMA (Nagoya Univ.)

・目的

生物はウイルスに対する自己防御機構として免疫システムを持っており、その中でも感染直後から働く機構として自然免疫系が知られている。自然免疫系では、インターフェロン(IFN)が抗ウイルス活性タンパク質の発現を誘導する事で、感染細胞及びその周囲の細胞に抗ウイルス活性を付与する。この抗ウイルスタンパク質で近年注目されているものに interferon-inducible transmembrane protein(IFITM)があり、IFN により誘導されるタンパク質の一種である。IFITM はウイルスエンベロープとエンドソームのヘミフュージョンを阻害することが知られており、ヒトやマウスといった哺乳類では IFITM に関する研究が進んでいるが、ニワトリではあまり進んでいない。そこで、ニワトリの IFITM に着目してその機能を明らかにするために研究を行った。

・ 方法と結果

ニワトリには数種の IFITM ホモログが存在することが知られている。それぞれの遺伝子について、各臓器から取得した cDNA をリアルタイム PCR で解析した。また、これらの遺伝子のクローニングを行ない、細胞に強制発現させて免疫染色することでその細胞内の局在を観察したところ、これら IFITM1/3/5/10 の細胞膜及び細胞質への局在が観察された。また、IFITM の構造は膜を完全に貫通するモデルと膜に埋没するモデルの二種類が示唆されている。IFITM 発現細胞を FACS にて解析を行なったところ膜表面での発現が見られず、膜に埋没したモデルである事が示唆された。

さらに、IFITM はウイルス-細胞の膜融合を阻害する事が知られている。ニワトリの IFITM についてもこの阻害活性を持つか明らかにするため、ニワトリ IFITM を一過的に発現させた細胞に対して VSV-G タンパク質を発現させて細胞の融合を観察した。顕微鏡観察から、ニワトリの IFITM1/5/10 でも細胞の融合が抑制される結果を得た。また、現在様々なウイルスに対するニワトリ IFITM の抗ウイルス活性の解析を行っている。

以上の結果から、ニワトリ IFITM についても抗ウイルス活性を持つ事が示唆された。

interferon-inducible transmembrane protein, antivirus, innate immunity

講演番号：3C02p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ C 校舎 02 会場

クロマグロのグルコース代謝におけるアイソザイムの進化的関係の探索
Evolutionary relationship of isozymes in glycolysis of　Pacific bluefin tuna
○岩塚 美由紀[1]、森 一樹[1]、田代 康介[1]、中村 洋路[2]、藤原 篤志[2]、小林 敬典[2]、乙竹 充[2]、久原 哲[1] ([1]九州大学、[2]中央水研)
○ Miyuki IWATSUKA[1], Kazuki Mori[1], Kousuke TASHIRO[1], Yoji NAKAMURA[2], Atsushi FUJIWARA[2], Takanori KOBAYASHI[2], Mitsuru OTOTAKE[2], Satoru KUHARA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Research Center for Aquatic Genomics)

１、目的　クロマグロは瞬発力と持久力を兼ね備えた高い遊泳能力を持つことが知られている。我々は ATP 産生を担うグルコース代謝経路に着目して、アイソザイムごとに同種間、異種間でアミノ酸配列の相同性を比較し、酵素間の進化的関係について検討した。
２、方法　マグロのアミノ酸配列は以前当研究室で解析したものを用いた。ゼブラフィッシュのアミノ酸配列は KEGG(http://www.genome.jp/kegg/),NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/)から取得した。ゼブラフィッシュのグルコース代謝経路と関連する酵素の対応付けには KEGG を用いた。酵素間の進化的関係の検討は、blast 検索を用いた双方向ベストヒット法により行った。
３、結果　phosphoglucomutase(EC5.4.2.2)では、ゼブラフィッシュが２つの遺伝子を持つのに対しクロマグロは３つの遺伝子を持つことから、ゼブラフィッシュとクロマグロの種の分岐後にクロマグロにおいて遺伝子重複が生じた可能性が示唆された。glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(EC:1.2.1.12)ではゼブラフィッシュが２つの遺伝子を持つのに対しクロマグロは３つの遺伝子を持つことから、種の分岐後にクロマグロにおいて遺伝子重複が生じた可能性が示唆された。この酵素 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase において重複が生じたと考えられる遺伝子は、元となったと考えられる遺伝子と重複により生じたと考えられる遺伝子で、部位別の発現パターンが異なることが明らかになった。元となったと考えられる遺伝子は、白筋での発現量が最も多く、発現量に差はあるものの赤筋、肝臓、心臓、腎臓でも多く発現している。それに対し、重複により生じたと考えられる遺伝子は、赤筋で最も多く発現しており、心臓での発現量も多い。一方で、肝臓、白筋でも微量の発現が確認されたものの、腎臓における発現量は０であった。従ってグルコース代謝経路において生じた遺伝子の重複がクロマグロの遊泳能力に関わっている可能性が示唆された。

tuna, isozyme, energy

講演番号：3C02p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ C 校舎 02 会場

大腸菌ペリプラズム空間に発現したマウス酸性哺乳類キチナーゼの性質

Characterization of Protein A-mouse acidic mammalian chitinase-V5-His expressed in periplasmic space of *Escherichia coli*

○大川 一明、樫村 明徳、石川 晃太朗、貴田 雄太、岩渕 志、松嶋 裕大、坂口 政吉、菅原 康里、小山 文隆（工学院大学工学部応用化学科）
○ Kazuaki OKAWA, Akinori KASHIMURA, Kotarou KOTAROU, YUTA KIDA, Kokoro IWABUCHI, Yudai MATSUSHIMA, MASAYOSHI SAKAGUCHI, YASUSATO SUGAHARA, FUMITAKA OYAMA (Kogakuin Univ.Department of Applied Chemistry)

Acidic mammalian chitinase（AMCase，酸性哺乳類キチナーゼ）は哺乳類で二番目に発見されたキチンを加水分解する酵素である。AMCase は酸性領域に至適 pH を持ちモデルマウスの胃と肺で多く発現する。この酵素は喘息マウスモデルの肺で発現レベルが増加することからアレルギー炎症に関わっていることが示され，また，マウスの胃で過剰に発現されることから食物消化に関わっていることが示唆されている。しかし， AMCase の生理的な役割はあまり解明されていない。AMCase の生化学的特性解析のためには精製酵素を大量に得る必要がある。現在，その目的のためには，動物培養細胞，昆虫培養細胞発現系が主に用いられている。我々はマウス AMCase を大腸菌で発現するため，その cDNA を大腸菌発現ベクター pEZZ18 に組み込み，N 末に Protein A を，C 末に V5 epitope と His タグを有する Protein A-AMCase-V5-His として細胞外で発現することを試みた。発現した組換え酵素はペリプラズム画分に最も多く検出され，IgG Sepharose，その後 Ni Sepharose を用いることで精製することができた。次に 4-nitrophenyl *N, N'* -diacetyl-β-D-chitobioside を基質として，発現した大腸菌組換え酵素の基本的性質を明らかにした。この酵素の至適 pH は pH 2.0 で，その条件での至適温度は 54℃ だった。この酵素は pH 1.0 から pH 11.0 に氷上で 1 時間放置しても酵素活性は全く影響を受けず，さらに pH 2.0 あるいは pH 7.0 で 54℃までの熱安定性を示した。また，大腸菌組換え AMCase はキチンビーズに結合することがわかった。次に，この大腸菌組換え酵素と CHO 細胞で発現した AMCase との酵素機能を比較した。大腸菌で発現した AMCase は CHO 細胞で発現した AMCase に匹敵する酵素活性を示した。大腸菌で合成した AMCase は CHO 細胞で発現した AMCase と同様に結合した。また，この組換え体酵素はコロイダルキチンを基質とした場合，CHO 細胞で発現した AMCase と同様に，主に，*N,N'* -diacetylchitobiose を生成した。これらの結果から，大腸菌で発現した組換え AMCase は，CHO 細胞で発現した酵素に匹敵する機能を有していることが分かった。この組換えタンパク質は，マウス AMCase の詳細な生物・医学的機能を解明するために使用することができると考えられる。

Acidic mammalian chitinase, periplasmic production, characterization

講演番号：3C02p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ C 校舎 02 会場

プロリン異性化酵素 Pin1 による神経細胞内 CaMKII の活性と安定性制御
Regulation of CamKII activity and stability in neural cells by peptidyl prolyl cis/trans isomerase Pin1
○金井 研太、内田 隆史（東北大院農）
○kenta kanai, takafumi uchida (Touhoku Univ.)

［目的］
プロリン異性化酵素 Pin1 は、特定のリン酸化 Ser/Thr-Pro 部位の cis/trans 異性化を触媒し、タンパク質の分解や活性を制御する酵素である。多様な生物機能を持つが、我々はタウオパチー防御機能に注目した。タウオパチーはリン酸化タウが脳内で凝集し認知症症状を呈する疾患でアルツハイマー病とも重なる疾患である。Pin1 は、リン酸化タウに結合し phosphatase PP2A による脱リン酸化を受けやすくする。またタウキナーゼの一種として、CaMKⅡ（Ca2+/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼⅡ）が知られている。我々は Pin1 がマウス脳の CaMKⅡに結合することを報告している（1）。この結果より、Pin1 が CaMKⅡに作用しその活性化や安定性を制御し、タウのリン酸化を制御することで、タウの安定性を変化させるのではないかと推測した。このように Pin1、CaMKⅡ、タウの関係性に焦点を当てることにより、神経変性疾患のメカニズムを解明することが本研究の目的である。
［方法と結果］
始めに、CaMKⅡの Pin1 結合サイトを詳細に検討した。CaMKⅡ中の Pin1 が結合する可能性のある部位に変異をいれた Pin1 変異体を、マウス神経芽細胞腫 Neuro2a で過剰発現させ、Pull down assay を行った。その結果より、CaMKⅡの T176 部位が Pin1 との結合に重要であることが示唆された。次に Pin1 がその結合部位を介して CaMKⅡの安定性やキナーゼ活性に与える影響を解析した。安定性についての実験では、CaMKⅡと Pin1 を過剰発現させ、Westrn blot によりタンパク質の量を確認した。すると CaMKⅡは著しくタンパク質の量が減少していた。この結果は、Pin1 が CaMKⅡの安定性の制御に関わっていることを示唆した。さらに MG132 を加え、ユビキチン・プロテアソーム経路を阻害した所、CaMKⅡのタンパク質の量が増加した。ゆえに Pin1 はユビキチン・プロテアソーム系を介して CaMKⅡを分解している事が示唆された。現在、CamKII がユビキチン化されていることを確認している。次にキナーゼ活性について調べた。Neuro2a で Pin1 を過剰発現させ、CaMKⅡのキナーゼ活性を測定した。その結果より、Pin1 は CaMKⅡのキナーゼ活性を低下させた。

1) Tatara Y, Terakawa T and Uchida T (2010) Identification of Pin1-binding phosphorylated proteins in mouse brain. Biosci Biotechnol Biochem 74, 2480-2483

CaMKII, Pin1, tau kinase

講演番号：3C02p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ C 校舎 02 会場

Growth arrest specific protein b(Gas7b)によるリン酸化 Tau 量の調節機構
Regulation of phospho-Tau accumulation by Growth arrest specific protein b(Gas7b)
○乗田 理恵[1]、清水 泰希[1]、秋山 弘匡[2]、広瀬 恵子[3]、後藤 愛那[1]、日高 將文[1]、内田 隆史[1]([1]東北大学農、[2]東京理科大学、[3]産業技術総合研究所)
○ Rie NORITA[1], Taiki SHIMIZU[1], Hirotada AKIYAMA[2], Keiko HIROSE[3], Aina GOTO[1], Masafumi HIDAKA[1], Takafumi UCHIDA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Tokyo.Univ.sci., [3]AIST)

背景

Gas7b は、プロリン異性化酵素である Pin１の WW domein と類似した構造を持ったタンパク質である。この WW ドメインと Tau の結合を介してニューロン形成に必要な微小管重合を促進することを我々は見出した(1)。マウス Gas7b にはヒト hGas7a,hGas7b のホモログである mGas7cb と mGas7b などが存在しているが、このうち微小管重合促進能をもつのが Gas7b である。アルツハイマー病患者脳では Gas7b が激減しているため(2)、Gas7b と神経疾患との関連について研究を行った。また、最近、本研究室の後藤らは、Gas7b は F-Bar ドメインで微小管やアクチン線維と直接結合し神経細胞の形態形成を変化させるのに重要な役割を果たしていることを報告した（３)。Gas7b の WW ドメインとリン酸化 Tau との相互作用による Gas7b の安定化は Gas7 による細胞の形態形成の変化を促進することにも影響を与えていると予測される。

方法と結果

tau-KO mouse では野生型マウスに比べて Gas7b の発現が低下していることから tau が Gas7b を安定化させていることが示唆された。HEK293T 細胞に *tau* および *gas7b* を導入した実験でも Tau による Gas7b の安定化が観察された。

今回、我々は、逆に Gas7b が Tau の発現量を変化させるかどうか検討した。HEK293T 細胞に *tau* および *gas7b* を導入しリン酸化 Tau の発現をコントロールと比較した。AT8, AT180, PHF の 3 種類の抗体で western blot 法を行い解析したところ、*gas7b* と *tau* を導入した細胞では、Tau の pSer202/pThr205 を認識する抗体である AT8 のシグナルの有意な減少のみが見られた(n=3)。 我々は、この結果から Gas7b が tau の pSer202,pThr205 を認識し、分解を促進するのではないかと考えている。Gas7b が Tau のどの部分に結合するかを解明するために tau のいろいろな変異体を作成し pull down 法で検討しているがまだ明確に結合部位を同定できていない。また、Tau の分解はユビキチン化とそれに続くプロテアソームでの分解だと予測しているが、tau および Gas7 のユビキチン化を明確に示す実験も行っている。

Gas7b, Tau, Alzheimer's Disease

講演番号：3C03a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ C 校舎 03 会場

Ras 活性化因子 RasGRP1 はリサイクリングエンドソームで Ras と共局在する

Ras-activation factor, RasGRP1, colocalizes with Ras on recycling endosomes.

糸川 和貴、○三崎 亮、藤山 和仁（大阪大・生物工学国際交流センター）
Kazuki ITOKAWA, ○Ryo MISAKI, Kazuhito FUJIYAMA (Osaka Univ. ICBiotech)

【背景および目的】

リサイクリングエンドソーム（RE）は物質の再回収を制御することで見出されてきた細胞小器官である。これまで再回収以外の役割については不明であったが、昨今の研究成果から RE に関わる分子も発見され徐々にその重要性が明らかになりつつある。　これまでに、我々はシグナル伝達の中核を担い癌原としても知られる Ras タンパク質（H-および N-Ras）について、主な細胞内局在がこれまでの報告にある「ゴルジ体/細胞膜」ではなく「RE/細胞膜」であること、RE への局在には C 末端領域脂質修飾が必要であること、さらに RE に局在する Ras が細胞膜同様に活性状態にあることを明らかにした。この結果、「RE からのシグナル伝達機構」という RE の新たな機能が存在する可能性が示された。

本研究では、RE で Ras の活性化がどのように行われているかを証明するために、（１）RE に安定的に局在できない変異型 Ras を作成し、（２）Ras 活性化因子の細胞内局在が Ras の局在によってどのような影響を受けるのかについて検証した。

【方法および結果】

RE への局在に必要な脂質修飾部位を含む C 末端アミノ酸を改変した変異型 H-Ras を、緑色蛍光タンパク質（GFP）との融合タンパク質として生産した。また、Ras 活性化因子であるグアニンヌクレオチド交換因子 RasGRP1 を赤色蛍光タンパク質（RFP）との融合タンパク質として生産した。各種変異型 GFP-H-Ras と RFP-RasGRP1 をアフリカミドリザル腎臓由来 COS-1 細胞にて共発現し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて各局在を解析した。細胞内での Ras 活性化は、シグナル伝達下流に位置する Raf タンパク質の Ras 結合ドメインを共発現し、免疫蛍光染色法で可視化した。血清飢餓状態に置きシグナル伝達をオフにすることで Ras を不活性化した細胞を準備し、次にシグナルを入力することで GFP-H-Ras および RFP-RasGRP1 の局在を追跡した。

C 末端アミノ酸の変異により、RE に安定的に局在できない GFP-H-Ras（細胞膜もしくはゴルジ体に局在）を取得した。これら変異型および野生型 Ras と RasGRP1 は、シグナル伝達経路のオンオフにかかわらず共局在することが分かった。一方で、細胞膜に局在する変異型 Ras は野生型同様に活性状態にあったが、ゴルジ体に限局し RE および細胞膜に輸送されない Ras は活性状態にないことが分かった。

recycling endosome, Ras, RasGRP

講演番号：3C03a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ C 校舎 03 会場

哺乳動物細胞小胞体に局在する ERdj5(JPDI)の生理的基質候補タンパク質の網羅的解析

Identification of the disulfide-linked partners of ERdj5/JPDI, a PDI family member, from a mammalian tissue

○門倉 広[1,2]、斉藤 美知子[2]、都留 秋雄[2]、稲葉 謙次[1]、河野 憲二[2] ([1]東北大多元研、[2]奈良先端大バイオ)
○Hiroshi KADOKURA[1,2], Michiko SAITO[2], Akio TSURU[2], Kenji INABA[1], Kenji KOHNO[2] ([1]Tohoku Univ., [2]NAIST)

【目的】ジスルフィド結合の形成は、多くの分泌タンパク質にとって立体構造形成上、重要な反応ステップである。哺乳動物細胞の小胞体にはチオレドキシン様のドメインをもつ PDI ファミリータンパク質が約 20 種類知られている。これらの酵素は分泌タンパク質にジスルフィド結合を導入する過程やジスルフィド結合を切断する過程に関わると予想される。しかし、個々の酵素の生理的な役割についてはあまり分かっていない。その最も大きな要因としては各酵素の生体内における基質が不明であることが挙げられる。本研究ではこれらの酵素の生体内における働きを理解するための第一歩として、PDI ファミリータンパク質の一つである ERdj5(JPDI)のマウス個体組織中における基質を同定することにした。

【方法と結果】PDI ファミリーに属する酵素が、ジスルフィド結合の形成、還元、異性化を行う際には、酵素と基質が分子間のジスルフィド結合で連結した中間体が形成する。ERdj5 の基質を同定するためにはこの性質を利用した。ただし、このような酵素・基質複合体は一過的にのみ形成する。よって、このような複合体を精製し基質を同定するためには、いかにこの複合体を安定化させるかが鍵になる。今回、我々はトリクロロ酢酸と N-エチルマレイミドを利用することによってマウス個体の組織中で生成するこのような複合体を安定化することに成功した。ERdj5 に対する抗体を利用して調べたところ、ERdj5 はマウスの精巣上体で強く発現しており、この組織中で、上述の中間体と予想される複合体が多数検出された。そこで、これらの複合体を、ERdj5 に対する抗体を利用して精製後、質量分析法によって解析した。その結果、ERdj5 の基質の候補となるタンパク質を多数同定することに成功した。更に、これらのタンパク質の幾つかは分子間のジスルフィド結合を介して ERdj5 と相互作用をしていることも突き止めた。同定されたタンパク質から予想される本酵素の役割や本手法の特長について議論したい。

disulfide bond, substrate, oxidative folding

講演番号：3C03a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ C 校舎 03 会場

小胞体関連分解を担うジスルフィド還元酵素がグルタチオンにより還元される機構

Reduction mechanism of an ER disulfide reductase required for ERAD by glutathione

○寶関 淳[1,2]、山本 章嗣[3]、阪井 康能[1,2]、永田 和宏[4]（[1]京大・生理化学、[2]京大院農、[3]長浜バイオ大バイオサイエンス、[4]京産大総合生命）
○Jun HOSEKI[1,2], Akitsugu Yamamoto[3], Yasuyoshi Sakai[1,2], Kazuhiro Nagata[4] ([1]Res. Unit for Physiol. Chem., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Agri.,Kyoto Univ., [3]Bio-Sci., Nagahama Inst. Bio. Sci. & Technol., [4]Fac. Of Life Sci., Kyoto Sangyo Univ.)

【背景】小胞体は分泌タンパク質や膜タンパク質の成熟の場である。小胞体は細胞内で合成される 3 分の 1 を占める多量なタンパク質の成熟を扱うため、厳格なタンパク質品質管理機構を持つ。その破綻は、異常タンパク質が小胞体内に蓄積した状態である小胞体ストレスを引き起こし、神経変性疾患等の病因となる。

小胞体で成熟されるタンパク質は正しくフォールディングされたもののみが、ゴルジ体へと送られる。一方、正しくフォールディングされなかったものは小胞体内に留められ、分子シャペロンの介助により、再びフォールディングされる。最終的にフォールディングできなかったものは識別され、小胞体からサイトゾルへ逆行輸送され、ユビキチン・プロテアソーム系で分解される。この一連の機構は小胞体関連分解（ERAD）と呼ばれる。

小胞体はジスルフィド結合形成に適した酸化的な環境にある一方、ERAD においては逆行輸送における立体障害を避けるため、ミスフォールドタンパク質のジスルフィド結合は還元される必要があるが、その機構は不明であった。我々はこれまでに小胞体ジスルフィド還元酵素 ERdj5 がミスフォールドタンパク質のジスルフィド結合を還元することで ERAD を促進する詳細な機構を明らかにしてきた（Ushioda *et al. Science* (2008), *Hagiwara et al. Mol. Cell* (2011), Ushioda et al. (2013) Mol. Bio. Cell)。しかしながら、ERdj5 のレドックスポテンシャルは小胞体の酸化的なレドックス環境と比べて、ずっと還元的であり、この矛盾をどのように解消し、ERdj5 が小胞体において還元力を受け取ることで機能しているのかは不明なままであった。

【結果】今回、我々は ERdj5 の還元にグルタチオン(GSH)が必要であること、また、ERdj5 が小胞体膜付近の小胞体内で還元的な環境に局在することを明らかにした。つまり、ERdj5 は小胞体膜付近に局在することでサイトゾル由来の GSH 由来の還元力を効率良く受け取り、ミスフォールドタンパク質のジスルフィド結合を還元し、ERAD を促進していることがわかった。

protein quality control, redox, endoplasmic reticulum

講演番号：3C03a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ C 校舎 03 会場

炎症応答における細胞膜コレステロールの関与

Participation of cell membrane cholesterol in the inflammatory response

○中島 史恵、柴田 貴広、内田 浩二（名大院生命農・応用分子生命科）
○Fumie NAKASHIMA, Takahiro SHIBATA, Koji UCHIDA (Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ.)

【背景・目的】サイトカインなどの刺激により発現が誘導されるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) は細胞膜から切り出されたアラキドン酸からプロスタグランジン類を合成する経路に関与する酵素であり、炎症関連分子として知られている。これまでに当研究室において COX-2 誘導に血清成分が重要であることを見出してきた。実際にマクロファージ細胞において、血清アルブミンの投与により COX-2 の発現が誘導されることや、ヒトアテローム動脈硬化病巣における血清アルブミンの蓄積が確認されている。そこで本研究では血清アルブミンによる COX-2 発現誘導機構について解析を行うこととした。

【方法・結果】RAW264.7 細胞にヒト血清アルブミン(HSA)を 4 時間投与した後、細胞を回収しウエスタンブロットを行った結果、HSA の濃度依存的に COX-2 の発現が誘導された。これまでに血清アルブミンがコレステロール結合能を有すると報告されていることから、COX-2 発現におけるコレステロールの関与を予想した。そこで、コレステロール除去剤として知られている FilipinⅢおよびメチル-β-シクロデキストリン(MβCD)を RAW264.7 細胞に 4 時間投与し、COX-2 の発現を確認した結果、COX-2 の発現が誘導されることが明らかとなった。さらに、MβCD とともにコレステロールを RAW264.7 細胞に 4 時間共投与し、COX-2 の発現を確認した結果、コレステロールの濃度依存的に COX-2 の発現が抑制されることを確認した。また、蛍光標識コレステロールである NBD-コレステロールを RAW264.7 細胞に 24 時間処理し HSA を 1 時間投与した後、細胞を回収し蛍光測定を行った結果、血清アルブミンの濃度依存的に細胞中の NBD-コレステロールが減少することを確認した。さらに、HSA 画分のコレステロール量についても検討を行った。RAW264.7 細胞に HSA を 1 時間処理後、上清の HSA 画分からコレステロールを抽出し、誘導体化した後に LC/MS/MS を用いて誘導体化コレステロールを定量した。その結果、細胞投与によって HSA 画分のコレステロールが増加することを確認した。

現在血清アルブミンとコレステロールの相互作用および COX-2 誘導メカニズムについて解析中である。

albumin, inflammation, cholesterol

講演番号：3C03a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ C 校舎 03 会場

GDE5 の遮断による脂肪細胞分化の抑制は、clonal expansion の阻害による

Decreasing GDE5 abundance suppresses clonal expansion and adipocyte differentiation of 3T3-L1 adipocytes.

中村 啓司[2]、○武田 崇登[1]、吉澤 郁美[2]、加藤 範久[2]、JEFF M. SANDS[3]、矢中 規之[2]([1]広島大生物生産、[2]広島大院生物圏科学、[3]Emory Univsity School of Medicine)
KEISHI NAKAMURA[2], ○SHUTO TAKEDA[1], IKUMI YOSHIZAWA[2], NORIHISA KATOU[2], SANDS JEFF M.[3], NORIYUKI YANAKA[2] ([1]Faculty of biological science of Hiroshima Univ., [2]Graduate School of Integrated Arts and Sci.,Hiroshima Univ., [3]Emory Univsity School of Medicine)

【緒言】肥満時の白色脂肪細胞では，中性脂肪を蓄積する脂肪滴の表層のリン脂質や，細胞容積の増加を伴って形質膜のリン脂質の主成分である phosphatidylcholine(PC)の合成量が増加するために，材料である choline の需要が高まると考えられており，choline の供給は脂肪細胞分化において重要な調節ポイントであることが予想される．最近見出したリン脂質代謝酵素 glycerophosphodiester phosphodiesterase 5（GDE5）は， 細胞内の glycerophosphocholine（GPC）を分解し，choline を供給する細胞質酵素であり，choline は kennedy pathway を介して PC の合成に利用されると考えらえる．また最近，マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞の分化誘導に伴って GDE5 の発現量の増加を見出したことから，新規 choline 供給経路としての GDE5 の脂肪細胞分化における意義を明らかにすることを目的として本研究に着手した．【方法・結果】3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化過程における細胞内 GPC 量を LC/MS 法を用いて測定したところ，脂肪細胞分化での GDE5 の発現誘導に伴って GPC 量の減少が確認され，GDE5 の choline 供給経路としての役割が示唆された．さらに，3T3-L1 細胞において siRNA を用いて GDE5 の発現を抑制したところ，脂肪細胞分化の抑制が認められた．マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞は分化開始に伴い clonal expansion と呼ばれる一過性の細胞増殖を起こすが，GDE5 の遮断により分化誘導した際の BrdU 陽性細胞数が有意に減少したことから，GDE5 の遮断による脂肪細胞分化抑制は，clonal expansion の阻害に基づく可能性が示された．細胞増殖においては細胞膜合成に伴った PC 合成の増加が大きく関わるため，GDE5 遮断時の choline 供給の低下による PC 合成への影響を想定し、脂質画分を抽出し，TLC 法，および LC/MSMS 法によって PC 量を解析したところ，意外にも対照群との差は認められなかった．一方， GDE5 遮断時の細胞内の GPC 量を測定したところ，対照群に対して 10 倍以上の著しい蓄積が認められた．GPC は細胞内有機浸透圧性物質としての役割が報告されており，また GDE5 の遮断をした際に培養液中の LDH 活性の増加が認められたため，GDE5 遮断による脂肪細胞の増殖抑制効果には，浸透圧バランスの破綻が関わる可能性が示唆された．そこで，3T3-L1 細胞における GDE5 の遮断による影響について詳細に解明するために，DNA microarray 法によって遺伝子発現解析を行ったところ，proteoglycan 類の遺伝子発現が誘導されるとともに浸透圧性物質である urea の transporter (UT-B)の発現上昇を見出した．GDE5 の遮断により 3T3-L1 細胞内 urea 濃度の増加が確認されたことからも，GDE5 の遮断による脂肪細胞分化抑制効果は，基質である GPC の著しい蓄積に伴う浸透圧ストレスが深く関与する可能性が示唆された．

adipocyte differentiation, glycerophosphocholine, 3T3-L1

講演番号：3C03a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ C 校舎 03 会場

マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞分化における PLSCR3 の役割

Role of PLSCR3 in differentiation of mouse 3T3-L1 preadipocytes

○猪川 亮、犬塚 達俊、高原 照直、柴田 秀樹、牧 正敏（名大院生命農）
○Akira INOKAWA, Tatsutoshi INUZUKA, Terunao TAKAHARA, Hideki SHIBATA, Masatoshi MAKI (Grad.Sch.Bioagric.Sci.,Nagoya Univ.)

Phospholipid scramblase(PLSCR, 以下 Scr)は Tubby-like protein スーパーファミリーに属す。Scr ファミリーには 5 種類のアイソフォーム(Scr1-5)が存在する。Scr3 はカルジオリピンの合成やアポトーシスに関与することなどが報告されている。また、Scr3 ノックアウトマウスでは腹部脂肪の蓄積、血中の脂質濃度の上昇、インシュリン抵抗性の生活習慣病症状を示すことが知られている。しかし、未だ Scr3 の機能についての詳細は不明である。そこで我々は Scr3 ノックアウトマウスで脂肪の蓄積に影響が出ることから Scr3 と脂質代謝の関係を明らかにするために、これまでにマウスの脂肪前駆細胞である 3T3-L1 細胞を用いて分化誘導後 8 日目における Scr3 発現解析を行った。その結果、3T3-L1 細胞内の Scr3 タンパク質の存在量と mRNA 存在量は分化に伴い減少するが、細胞外にエクソソームとして放出される Scr3 タンパク質の量は変わらないことを見出した。しかし、Scr3 と 3T3-L1 分化の関係は依然として定かではなく、本研究ではその関係性の理解を深める目的で行った。

3T3-L1 細胞分化に伴う Scr3 存在量の経時的変化を調べるため、Scr3 特異的抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ分化誘導後 2 日目で Scr3 タンパク質が著しく減少した。しかし、3T3-L1 細胞分化により分化の早い段階で Scr3 発現量は減少したが、その意義は不明である。そこで分化誘導をかける前に Scr3 を 3T3-L1 細胞に一過性発現させて、分化誘導を行った。その結果、トリグリセリド蓄積を測定することにより 3T3-L1 細胞分化をモニターしたところベクターを一過性発現させた 3T3-L1 細胞と比較してタンパク質濃度に対するトリグリセリドの蓄積量は減少した。一方、RNAi 干渉法で Scr3 発現抑制を行った 3T3-L1 細胞を分化誘導させたところコントロールと比較してトリグリセリド蓄積量にはほとんど差が見られなかった。このことから Scr3 はトリグリセリド蓄積を抑えるもしくは遅らせる因子であると示唆された。また、分化の早い段階で Scr3 発現量が減少していることからも 3T3-L1 の主要な分化制御転写因子である C/EBP ファミリータンパク質や PPARγの発現量もしくはこれらの転写因子阻害剤として機能する可能性が考えられる。現在、3T3-L1 細胞における Scr3 一過性発現が分化制御転写因子 mRNA 発現に及ぼす影響についてリアルタイム PCR 法を用いて解析中である。

PLSCR3, 3T3-L1, exosome

講演番号：3C03a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ C 校舎 03 会場

Apolipoprotein A-I 周囲環境変化に着目した新規 HDL 形成測定法の開発

Detection of HDL formation by sensing the environmental change around apolipoprotein A-I

○長尾 耕治郎、大村 理紗、斎藤 博幸（徳島大院 HBS）
○Kohjiro NAGAO, Risa OMURA, Hiroyuki SAITO (Univ. of Tokushima)

ATP-binding cassette（ABC）トランスポーターである ABCA1 は、コレステロールとリン脂質を血液中の apolipoprotein A-I（apoA-I）に受け渡すことで善玉コレステロールとして知られる高密度リポタンパク質（HDL）を形成する。近年、血清 HDL コレステロール量だけでなく、マクロファージによる HDL 形成量が動脈硬化症の発症リスクと強く逆相関することが報告され、HDL 形成過程の重要性が再認識された。しかし、現在使用されている HDL 形成の各測定法には感度が低い、多検体解析に不向きである等の問題がそれぞれ存在する。そこで、apoA-I の周辺環境が HDL 粒子へ組み込まれることで親水性から疎水性へと変化することに着目し、この apoA-I の環境変化を環境感受性プローブ POLARIC で検出するという新規の HDL 形成測定法を開発することを本研究の目的とした。

ApoA-I の 53 番目に導入したシステイン残基を POLARIC-maleimide（五稜化学）により標識することで apoA-I-POLARIC を作成した。ApoA-I-POLARIC をコール酸透析法により人工 HDL に組み込むと、蛍光強度が約 4 倍増加したことから、試験管内での HDL 形成を POLARIC 蛍光強度変化により検出できることが示された。次に、ヒト ABCA1 を過剰発現させたハムスター由来 BHK 細胞による HDL 形成の測定に apoA-I-POLARIC を適用した。ABCA1 発現細胞の培養液へ apoA-I-POLARIC を添加すると、apoA-I-POLARIC 濃度に依存して培養液の蛍光強度が増加し、K_m 値付近の 2.5 μg/ml apoA-I-POLARIC では 6 時間で約 70%増加した。一方、ABCA1 を発現していない細胞では蛍光強度は増加しなかった。また、ABCA1 発現細胞の培養上清からゲル濾過クロマトグラフィーにより分離した HDL 画分が高い蛍光強度を示したことから、apoA-I-POLARIC の蛍光強度の増加が HDL 形成に起因していることが明らかになった。さらに、ヒトマクロファージ様細胞 THP-1 による HDL 形成を本方法により測定することができた。上記のように、ABCA1 に依存した HDL 形成を apoA-I の周辺環境の変化により検出するという新規の方法を開発することに成功した。

HDL, cholesterol, ABC transporter

講演番号：3C03a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ C 校舎 03 会場

アミノ酸置換導入による ABCA1 の基質認識部位の解析

Analysis of substrate recognition sites of ABCA1 by amino acid substitution

○伊藤 晋平[1]、長尾 耕治郎[3]、木村 泰久[1]、植田 和光[1,2]（[1]京大院農、[2]京大 iCeMS、[3]徳島大ヘルスバイオサイエンス研究部）
○Shimpei Ito[1], Kohjiro Nagao[3], Yasuhisa Kimura[1], Kazumitsu Ueda[1,2]（[1]Kyoto Univ. Agric., [2]Kyoto Univ. iCeMS, [3]Institute of Health Biosciences The Univ. of Tokushima）

＜背景・目的＞

ABCA1 は、細胞中の過剰なコレステロールとホスファチジルコリンを血漿中の脂質アクセプターである apoA-I に受け渡すことによって高密度リポタンパク質(HDL)を新生する。これらの輸送基質は、ABCA1 の 12 本の膜貫通ヘリックスから構成される膜貫通領域において認識されると考えられるが、ABCA1 の基質認識・輸送機構の詳細は未だ明らかではない。一方、ABCB1(MDR1)では、12 本の膜貫通ヘリックスのうち、6 番目のヘリックス（TM6）が基質認識において重要であることが X 線結晶構造及び生化学的実験により示されている。ABC タンパク質は共通した機構で機能すると考えられることから、ABCA1 の基質認識においても TM6 が重要であると考えた。本研究では、まずアルギニン残基への置換を TM6 に系統的に導入することによって、ABCA1 の TM6 の基質通過部位に面する領域をまず予測した。次に、機能に重要と予測されたアミノ酸残基を他の 19 種類のアミノ酸に置換することによって、ABCA1 の基質認識に関わるアミノ酸残基を特定することを試みた。

〈結果＞

結晶構造解析によって、ABC タンパク質は膜貫通領域内部に基質結合に関わる大きな空洞をもつと予想される。その空洞を向いたヘリックス面に大きな親水性の側鎖を持つアルギニン残基を導入しても、蛋白質の立体構造はあまり影響を受けないと、我々は予想した。一方、アルギニンが脂質二重層や他の TM と相互作用するヘリックス面に挿入された場合、蛋白質の立体構造が大きく崩れるため、小胞体に留められることが予想される。その結果、細胞膜への局在は大幅に減少することになる。ABCA1 の TM6 を構成するアミノ酸残基を順番に 1 つずつアルギニンに置換した変異体 23 種を作成し、それらの細胞膜への局在の有無を検討した。その結果に基づいて TM6 のヘリックスモデルを作成し、基質通過部位に面する領域と脂質二重膜や他のヘリックスと相互作用する領域を予測した。変異体の脂質輸送活性を解析したところ、L834R 変異体が細胞膜への局在は正常であるにもかかわらず、コレステロールおよびホスファチジルコリン両方の輸送活性を示さないことが明らかになった。これらの結果は、L834 が ABCA1 の脂質輸送に重要な働きをしていることを示唆している。次に、L834 を他のアミノ酸残基 18 種類にそれぞれ置換した変異体を作製した。その結果、L834 のアスパラギン酸またはグルタミン酸置換が細胞膜への局在に大きな影響を与えることが明らかになった。現在、脂質輸送活性を検討するため、安定発現株の樹立を行っている。

ABCA1, Cholesterol, HDL

講演番号：3C03a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ C 校舎 03 会場

ABCG1 と ABCG4 による脂質ラフトを介した細胞機能の制御

Regulation of cellular functions by ABCG1 and ABCG4 via lipid raft

○伊藤 志帆[1]、佐野 修[1]、松尾 道憲[1]、植田 和光[1,2]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大 iCeMs）
○Shiho Ito[1], Osamu Sano[1], Michinori Matsuo[1], Kazumitsu Ueda[1,2] ([1]Kyoto Univ, Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agric., [2]Kyoto Univ, iCeMS.)

【背景・目的】ABCG1 と ABCG4 は ABC トランスポーターファミリーに属し、ABCG1 は細胞膜のコレステロールとスフィンゴミエリンを、ABCG4 はコレステロールを輸送する。これらは免疫応答や細胞増殖の制御に関わることが知られているが、このメカニズムは未だ不明である。脂質ラフト領域は ABCG1 と ABCG4 の基質であるコレステロールとスフィンゴミエリンを多く含む細胞膜上のマイクロドメインであり、シグナル伝達やエンドサイトーシスの場として細胞機能の制御に重要な役割を果たす。そこで、ABCG1 と ABCG4 が機能することによって脂質ラフト構造を変化させ、その結果シグナル伝達やエンドサイトーシスの抑制を介して、免疫応答や細胞増殖を制御しているのではないかと考え、これらを検証することを目的とした。
【方法・結果】まず、脂質ラフトの構成タンパク質である caveolin-1 の局在を調べた。ABCG1, ABCG4 と脂質輸送活性を持たない ABCG1KM 変異体, ABCG4KM 変異体を安定発現させた HEK293 細胞を界面活性剤で可溶化し、スクロース密度勾配超遠心法によって脂質ラフト画分に含まれる caveolin-1 の量を調べた。その結果、ABCG1, ABCG4 安定発現株では親株細胞に比べて脂質ラフトに含まれる caveolin-1 の量が減少していたのに対し、ABCG1KM, ABCG4KM の安定発現株では変化がなかった。また脂質ラフトに集積するガングリオシド GM1 の局在を調べるため、ABCG1, ABCG4, ABCG1KM, ABCG4KM をそれぞれ一過的に発現させた HEK293 細胞を GM1 に特異的に結合するコレラトキシンで染色した。その結果、ABCG1 と ABCG4 を発現している細胞では、発現していない細胞と比べてコレラトキシンの蛍光強度が弱くなっていた。一方で、ABCG1KM, ABCG4KM を発現している細胞では変化はなかった。これらの結果から ABCG1 と ABCG4 の発現によって脂質ラフト構造が壊れていることが示唆された。脂質ラフトで起こるエンドサイトーシスに対する影響を調べるため、ABCG1, ABCG4 をそれぞれ一過的に発現させた HEK293 細胞に蛍光標識したコレラトキシンを取り込ませてエンドサイトーシスを観察した。その結果、ABCG1 発現細胞ではエンドサイトーシスが抑制された。
以上の結果から、ABCG1 と ABCG4 はコレステロールやスフィンゴミエリンを動かすことによって脂質ラフトを壊し、その結果エンドサイトーシスなど脂質ラフトで起こる現象が変化していることが示唆された。この結果は、ABCG1 と ABCG4 が細胞機能を制御するメカニズムの解明につながると考えている。

ABC transporter, lipid raft, cellular function

講演番号：3C03a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ C 校舎 03 会場

ABCB4 によるホスファチジルコリン排出はスフィンゴミエリンに依存する
Phosphatidylcholine efflux by ABCB4 is dependent on sphingomyelin

○趙 禹[1,2]、石神 正登[1]、長尾 耕次郎[3]、花田 健太郎[4]、松尾 道憲[1]、木岡 道憲[1]、植田 和光[1,2] ([1]京大院農、[2]京大 iCeMS、[3]徳島大薬、[4]感染研)
○Yu Zhao[1,2], Masato Ishigami[1], Kohjiro Nagao[3], Kentaro Hanada[4], Michinori Matsuo[1], Michinori Kioka[1], Kazumitsu Ueda[1,2] ([1]Kyoto Univ. Gra. Sch. of Agri, [2]Kyoto Univ. iCeMS, [3]Univ. of Tokushima Inst. of Health Biosc. & Grad. Sch. Of Pharm. Sci., [4]NIID)

＜背景・目的＞

ATP-Binding Cassette protein B4(ABCB4, MDR2)は、肝臓細胞の毛細胆管膜に特異的に発現し、ホスファチジルコリン(PC)を細胞から胆汁中へ排出し、強い界面活性剤である胆汁酸をミセル化することによって毛細胆管を保護している。ABCB4 は大量に PC を排出することから、ABCB4 は細胞膜中の PC が豊富な環境中で機能していると、我々は予想した。その予想を確かめるため、細胞膜中のスフィンゴミエリン(SM)量を減少させ、細胞膜環境の変化が ABCB4 の活性に与える影響を検討した。

＜方法＞

ABCB4 と同様に PC とコレステロールを輸送基質とする ABCA1 を、比較のために同時に解析した。SM 量を減少させるため、作用の異なる 2 種類の SM 合成阻害剤：SM 合成の第 1 段階の serine palmitoyltransferase の阻害剤 myriocin と、セラミドの小胞体からゴルジ体への輸送に関わる CERT の阻害剤 HPA-12 を用いた。細胞株は、ABCB4 あるいは ABCA1 を一過的に発現させた HEK293 細胞と Gene Switch 系を組み込み ABCB4 と ABCA1 を誘導発現できる BHK 細胞を用いた。また PC 排出は、ABCB4 を ABCA1 の両方で脂質アクセプターとして機能するタウロコール酸の存在下測定した。

＜結果＞

HEK 細胞を 20μM myriocin 存在下 24 時間培養すると、SM 量は 25%減少した。この条件において、ABCA1 による PC 排出は 18%上昇した。しかし、ABCB4 による PC 排出は、予想に反して 31%低下した。BHK 細胞を 40μM myriocin 存在下 24 時間培養すると、SM 量は 25%減少した。この条件で、ABCA1 による PC 排出は 11%上昇したのに対して、ABCB4 による PC 排出は 28%減少した。さらに、10μM HPA-12 処理によって細胞の SM を 25%減少させた条件においても、ABCA1 による PC 排出は 42%上昇したが、ABCB4 による PC 排出は 27%減少した。以上の結果から、ABCB4 と ABCA1 はいずれも PC を基質として排出するが、細胞膜中の SM 量の変化は異なった影響を及ぼすことが明らかになった。つぎに、細胞を 3 種の界面活性剤 TritonX-100、Lubrol WX、CHAPS で可溶化し、ABCA1 と ABCB4 の分布を調べた。ABCA1 と ABCB4 はいずれも TritonX-100 可溶画分、Lubrol WX 不溶画分に分布した。一方、ABCA1 は CHAPS 可溶画分に回収されるのに対して、ABCB4 は CHAPS 不可溶分画に回収された。さらに、CHAPS 不溶画分は SM 含量が高いことが明らかになった。ABCB4 の PC 排出活性には細胞膜中の SM が必要であることが明らかになった。

ABC transporter, membrane environment, lipid transport

講演番号：3C03a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ C 校舎 03 会場

結合能と接着斑増強効果を指標としたビネキシンファミリー（Srobs)タンパク質の機能の比較解析
Comparison of the affinity to common binding proteins and the effect on focal adhesions among vinexin family (Sorbs) proteins.
○喜多 真弘、市川 尚文、瀬崎 拓人、松尾 道憲、植田 和光、木岡 紀幸（京都大学院農学研究科）
○Masahiro Kita, Takafumi Ichikawa, Takuhito Sezaki, Michinori Matsuo, Kazumitsu Ueda, Noriyuki Kioka (Kyoto univ.)

ビネキシンファミリー(Sorbs)タンパク質は多細胞動物において保存されているアダプタータンパク質ファミリーであり、接着斑や筋細胞のコスタメアに局在しているタンパク質である。ヒトにおいてはビネキシン、ArgBP2、CAP の 3 種類のタンパク質があり、これらはいずれも接着斑裏打ちタンパク質の一つであるビンキュリンと結合することが報告されている。一方でこれらのタンパク質は生体内ではそれぞれ創傷治癒の促進、ガン抑制遺伝子としての機能、インスリンシグナルの構成因子といったように異なる役割を持っている。したがって、Sorbs タンパク質には共通の機能と独自の機能があることが予想される。しかし、同一の細胞系や精製タンパク質を用いて 3 つのタンパク質を同時に比較した研究はこれまでなされてこなかった。本研究では 3 つのタンパク質がいずれも発現していない三重発現抑制繊維芽細胞を作製し、そこに Sorbs タンパク質を一つずつ再発現させた細胞を作製することで 3 つのタンパク質の機能を同一の細胞を用いて比較した。免疫細胞染色により細胞内局在を解析した結果、ビネキシンと CAP は接着斑でビンキュリンと共局在していたのに対して、ArgBP2 はストレスファイバー上でその構成タンパク質であるα-アクチニンと共局在していた。また、ビネキシンと CAP はアクチン細胞骨格と強く結合したビンキュリンを増加させ、接着斑を増大させる一方、ArgBP2 にはそのような効果がないことが分かった。さらに、これらの機能の違いのメカニズムを明らかにするため、GST タグを付加した Sorbs タンパク質を低温誘導系を用いて大腸菌に発現させて、グルタチオンセファロースを用いて精製した。精製標品を用いて pull-down 実験を行い、共沈してくるビンキュリン、α-アクチニンの量をウェスタンブロットにより比較した。その結果、ビネキシンと CAP はビンキュリンと強く結合し、α-アクチニンとはほとんど結合しなかった。一方、ArgBP2 はα-アクチニンと強く結合し、ビンキュリンとはほとんど結合しなかった。本研究により、Sorbs タンパク質再発現細胞と精製標品を用いて 3 つのタンパク質の機能を詳細に比較することが初めて可能となった。その結果、繊維芽細胞においてビネキシンと CAP はビンキュリンと結合して接着斑に局在し、ビンキュリンのアクチン親和性を増大させ、接着斑を増大するという共通の機能を持つ一方、ArgBP2 はα-アクチニンと結合してストレスファイバー上に局在し、ビンキュリンのアクチン親和性には影響を与えない、という異なる役割を持つことが示唆された。

focal adhesion, extracellular matrix, actin

講演番号：3C03a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ C 校舎 03 会場

ビネキシンαの N 末端側領域は細胞外マトリクスの硬さの感知に必要である

N-terminal region of vinexin α is required for sensing extracellular matrix stiffness

○市川 尚文[1]、山下 寛[1]、木村 泰久[1]、植田 和光[1,2]、木岡 紀幸[1]([1]京大院農、[2]京大 iCeMS)
○Takafumi ICHIKAWA[1], Hiroshi YAMASHITA[1], Yasuhisa KIMURA[1], Kazumitsu UEDA[1,2], Noriyuki KIOKA[1] ([1]Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ.)

【背景・目的】動物細胞はコラーゲンなどの細胞外マトリクス(ECM)が持つ物理的な硬さを感知し、それに基づいて自身の分化や運動、増殖などの運命を決定していることがわかってきた。これまでのところ、細胞は ECM との接着部位である接着斑タンパク質複合体にアクチン繊維を繋ぎ留め、接着斑を介して ECM を引っ張ることで ECM の硬さを感知していると考えられている。昨年度までの本大会で、アクチン繊維と直接結合する接着斑タンパク質「ビンキュリン」は、ECM の硬さに依存して、自身と別の接着斑タンパク質「パキシリン」の挙動を変化させることと、それにはビンキュリンと「ビネキシンα」との結合が必要であることを報告してきた。このことから我々はビンキュリン-ビネキシンα相互作用が ECM の硬さを感知するメカノセンサーであると提唱している。ところで、多くの動物細胞はビネキシンαとビネキシンβの 2 種類のスプライシングバリアントを発現している。ビネキシンαとビネキシンβは共に C 末端側に 3 つの SH3 ドメインを持つ一方、ビネキシンαのみ N 末端側に SoHo ドメインを有している。最近、ビネキシンαのショウジョウバエオーソログである dCAP は張力の強くかかる体節-筋接合部や弦音器官などの器官形成に必要であり、ビネキシンβに相当する dCAP-E はドミナントネガティブとして働いて、これらの器官形成を阻害することが報告された。そこで ECM の硬さの感知においてビネキシンβがビネキシンαと異なる機能を持つ可能性について検討することにした。
【方法・結果】ビネキシン遺伝子欠損マウス繊維芽細胞にビネキシンαとビネキシンβを別々に再発現させた細胞を作製し、硬さの異なる培養基板上でのビンキュリンのアクチン繊維との結合性を調べた。既報通り、ビネキシンα再発現により、ビンキュリンは ECM の硬さに応じてアクチン繊維との結合性の増加を示したが、ビネキシンβの再発現による変化は見られなかった。また、ビンキュリンの接着斑上でのターンオーバーについて FRAP(光褪色後蛍光回復)法で調べたところ、ビネキシンαの再発現によってビンキュリンは安定化したが、ビネキシンβの再発現による効果は見られなかった。次に、ビネキシンαとビネキシンβそれぞれの接着斑上でのターンオーバーを調べたところ、ビネキシンαは接着斑上で非常に安定であるのに対し、ビネキシンβは非常に速いターンオーバーを示した。さらに、精製タンパク質を用いたプルダウン実験から、ビネキシンαはビネキシンβに比べてビンキュリンとの結合能が高いことがわかった。以上の結果から、ビネキシンαの N 末端側の SoHo ドメインを含む領域が、接着斑上での安定化やビンキュリンとの強い結合に関与しており、ECM の硬さ依存的なビンキュリンの挙動の調節に必要であることが示唆された。

mechanosensing, focal adhesion, vinculin

講演番号：3C03a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ C 校舎 03 会場

脂肪細胞分化の「細胞外マトリクスの硬さ」依存性に接着斑タンパク質ビンキュリンが必要である

Focal adhesion protein vinculin is required for ECM-rigidity dependency of adipocyte differentiation

○黒田 美都[1]、和田 洋樹[1]、植田 和光[1,2]、木岡 紀幸[1] ([1]京大院・農・応用生命、[2]京大・iCeMS)
○Mito KURODA[1], Hiroki WADA[1], Kazumitsu UEDA[1,2], Noriyuki KIOKA[1] ([1]Div. of Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ.)

【目的】
多分化能を持つ間葉系幹細胞は「細胞外マトリクス(ECM)の硬さ」に応じて、脂肪細胞や骨芽細胞などへの分化方向性を決定している。細胞は ECM との接着構造(接着斑)を介して ECM の硬さを感知していると考えられているが、どのような仕組みで接着斑を通じて硬さを感知し、分化を制御しているのかは解明されていない。接着斑では ECM がインテグリンと結合し、インテグリンは細胞内の接着斑タンパク質を集積し、細胞骨格を接着斑に係留している。我々は接着斑タンパク質のうち、アクチン繊維と結合し、アクチン繊維からの張力に応じて構造が変化すると考えられているビンキュリンに着目している。これまでに我々は ECM が硬くなるにつれて、接着斑におけるアクチン高親和型ビンキュリンの量が増え、ビンキュリンが接着斑に安定的に留まっていることを示してきた。これらの結果はビンキュリンが ECM の硬さを感知する装置(メカノセンサー)の一部として機能している可能性を示している。しかし間葉系幹細胞の分化の「硬さ依存性」にビンキュリンが必要かについては分かっていない。そこで本研究ではビンキュリンの発現抑制が、ECM の硬さに依存的した間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化に与える影響について検証した。

【方法・結果】
間葉系幹細胞としてマウスの骨髄由来の ST2 細胞を使用し、レンチウイルスを用いてビンキュリン発現抑制株を作製した。ビンキュリン発現抑制株のビンキュリンの発現レベルは、コントロール株の 2 割程度に抑制された。培養基板には、ビスアクリルアミドの混合率を変えることで硬さを可変なポリアクリルアミド(PAA)ゲルを用いた。1.5 ~8.7 kPa 硬さの PAA ゲル上で細胞を培養し、インスリン、IBMX、デキサメタゾンで処理し、脂肪細胞への分化を誘導した。6 日後に細胞より RNA を抽出し、脂肪細胞マーカー(PPARγ2, aP2, LPL)の mRNA 発現量をリアルタイム PCR により定量化した。コントロール株は軟らかいゲル(1.5 kPa)上に比べ、硬いゲル(8.7 kPa)上では脂肪細胞マーカーの mRNA 発現量が低く、野生型の ST2 細胞同様 ECM の硬さに依存した脂肪細胞分化が確認できた。一方、ビンキュリン発現抑制株では、軟らかい ECM 上で培養した場合と硬い ECM 上で培養した場合での脂肪細胞マーカーの発現量に有意な差はなく、ECM の硬さ依存的な脂肪細胞分化は見られなかった。ECM の硬さに応じて細胞内におけるビンキュリンの挙動が変化することを合わせて考えると、ビンキュリンは間葉系幹細胞においてもメカノセンサーとして働き、脂肪細胞への分化の「細胞外マトリクスの硬さ」依存性に必要であることが示唆された。

focal adhesion, vinculin, ECM-rigidity

講演番号：3C03a17
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ C 校舎 03 会場

接着斑タンパク質ビンキュリンによる細胞外基質の硬さ感知には、ビンキュリンの脂質ラフト局在化が必要である

Distribution of vinculin to lipid rafts is required for vinculin to sense ECM stiffness

○長里 彩花[1]、山下 寛[1]、市川 尚文[1]、松尾 道憲[1]、植田 和光[1,2]、木岡 紀幸[1] ([1]京大院農・応用生命、[2]京大・iCeMS)
○Ayaka NAGASATO[1], Hiroshi YAMASHITA[1], Takafumi ICHIKAWA[1], Michinori MATSUO[1], Kazumitsu UEDA[1,2], Noriyuki KIOKA[1] ([1]Kyoto Univ. Div. of Appl. Life Sci, Grad. Sch. of Agri., [2]Kyoto Univ. iCeMS)

[背景・目的]
脂質ラフトは、シグナル伝達のプラットホームとして機能し、細胞の増殖、生存、分化等に重要な役割を果たしている細胞膜ドメインである。細胞と細胞外基質との接着部位である接着斑は、動物細胞の生存や増殖にとって必須の役割を担っており、最近脂質ラフトとの関連が示唆されている。これまでに我々は、接着斑タンパク質ビンキュリンが、脂質ラフトに局在すること、それには別の接着斑タンパク質ビネキシンとの結合が必要なこと、また、この脂質ラフト局在化は細胞接着により調節されていることを示してきた。しかし、これまでビンキュリンが脂質ラフトに局在化する意義については不明であった。一方、細胞を取り囲む細胞外基質の硬さの違いが、脂肪細胞の分化の効率や間葉系幹細胞の分化の方向性に影響を与える等、細胞の運命決定に関与していることが明らかとなっている。また、我々は、ビンキュリンがビネキシンと結合することで、細胞外基質の硬さを感知するセンサーとして機能することを明らかにしている。本研究では、ビンキュリンの脂質ラフト局在化が細胞外基質の硬さを感知する際に果たしている役割について検討した。
[方法・結果]
これまでに光褪色後蛍光回復法を用い、ビンキュリンの接着斑での不動画分(ターンオーバーの極端に遅い画分)は細胞外基質の硬さが硬い時ほど増加し、それが細胞外基質の硬さの感知に寄与していることを我々は示している。この現象に与える脂質ラフトの効果を調べるために、マウス胎児繊維芽細胞(MEF)を Methyl-β-cyclodextrin 処理し、脂質ラフトを破壊したところ、硬い培養基板上でもビンキュリンの接着斑での不動画分は軟らかい培養基板上と同程度に減少した。この結果より、脂質ラフトは細胞外基質の硬さに依存したビンキュリンの接着斑の安定性調節に必要である可能性が示唆された。次に、細胞外基質の硬さがビンキュリンの脂質ラフト局在化に与える効果について検討した。培養基板にはアクリルアミドゲルを利用して、細胞外基質の硬さを変えたものを用いた。脂質ラフトと非ラフト画分の分画は、細胞膜を単離後、4℃の TritonX-100 に対する不溶性画分と可溶性画分にそれぞれ分離することで行った。その結果、異なる硬さの培養基板上で MEF を培養後、ビンキュリンの TritonX-100 不溶性を調べたところ、TritonX-100 不溶性画分におけるビンキュリンは、軟らかい培養基板上に比べて、硬い培養基板上で多かった。これらの結果から、ビンキュリンによる細胞外基質の硬さ感知には、ビンキュリンの脂質ラフト局在化が必要であることが示唆された。

vinculin, lipid rafts, focal adhesion

講演番号：3C03p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ C 校舎 03 会場

glabridin は PP2C を活性化し、破骨細胞分化を阻害する
glabridin suppresses osteoclastogenesis through activation of protein phosphatase 2C
○秋山 智美[1]、寶地 美妃[1]、青山 友果[1]、車 炳允[2]、禹 済泰[1,2]、大西 素子[1] ([1]中部大応生、[2]生物機能開発研究所)
○Satomi AKIYAMA[1], MISAKI HOCHI[1], YUKA AOYAMA[1], BYUNG-YOON CHA[2], JE-TAE WOO[1,2], MOTOKO OHNISHI[1] ([1]Graduate school of Bioscience and Biotech., Chubu Univ., [2]Research Institute for Biological Function, Chubu Univ.)

【目的】glabridin は生薬などに用いられるマメ科の甘草に含まれるイソフラボノイドの一種であり、抗菌作用や抗酸化作用、抗炎症作用などが知られている。また最近の研究で、glabridin には骨芽細胞の機能向上や高脂肪食による肥満の抑制、がん細胞の増殖抑制などの効果があることが報告されている。我々はこれまでに、glabridin が PP2C を活性化することを明らかにしてきた。ところで、PP2Cβは破骨細胞分化因子の RANKL によって活性化する TAK1 の活性を抑制し、破骨細胞分化を負に制御することがわかっている。そのため破骨細胞分化に対する glabridin の作用を検討した結果、glabridin が破骨細胞分化を阻害すること、RANKL によって活性化される p38 を阻害し、その下流の転写因子 NFATc1 の発現を抑制すること、さらに同様に RANKL によって活性化されるⅠκB キナーゼ(IKK)を抑制することを見出した。しかしながら、RANKL によって活性化されるシグナル伝達経路における glabridin の作用点は明らかではない。そこでこの度、PP2Cβを介して glabridin が RANKL/RANK シグナル伝達経路を抑制し、破骨細胞分化を阻害するのか検討した。
【方法】RANKL/RANK シグナル伝達系に対する glabridin の影響は、マウスマクロファージ・単球由来 RAW264 細胞を glabridin 存在下で 4 時間培養し sRANKL で刺激後、抗リン酸化 TAK1 抗体および抗 TAK1 抗体を用いてウェスタンブロットにより検討した。PP2CβsiRNA および non-targeting siRNA はリポフェクション法で RAW264 細胞に導入した。siRNA 導入 48 時間後に細胞を回収し、再度播種を行い、さらに 20 時間培養した。その後 glabridin を加えて 4 時間培養後、sRANKL を添加し 72 時間培養を行い、酒石酸耐性ホスファターゼ陽性の多核細胞数を計測した。評価は、それぞれの細胞において glabridin 未添加時を 100%とし、glabridin 添加時の分化レベルを算出することにより比較した。
【結果】IKK の下流で、NF-κB の活性化に関与するⅠκB への glabridin の影響を調べた。その結果、glabridin はⅠκB のリン酸化を抑制した。PP2Cβは、MAPK シグナル伝達経路と NF-κB シグナル伝達経路の両方に共通する因子である TAK1 を、直接脱リン酸化して不活性化することが報告されている。そこで、TAK1 のリン酸化への labridin の作用を検討した結果、glabridin は TAK1 のリン酸化を抑制した。次に、siRNA によって PP2Cβの発現を抑制し、glabridin の破骨細胞分化抑制効果に対する影響を調べたところ、スクランブル siRNA 処理細胞と比較して、有意に glabridin の破骨細胞分化抑制効果が減少した。以上の結果から、glabridin は PP2Cβを活性化することにより TAK1 のリン酸化を抑制し、RANKL/RANK シグナル伝達経路を抑制することで破骨細胞分化を阻害すると考えられる。

protein phosphatase 2C, RANKL, osteoclastogenesis

講演番号：3C03p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ C 校舎 03 会場

カルシウム依存性リン脂質結合タンパク質アネキシン A11 と EF-hand タンパク質の相互作用解析

Interactions between the Ca^{2+}-dependent phospholipid-binding protein annexin A11 and EF-hand proteins

○佐藤 あかね、京 卓志、加村 悟史、高原 照直、牧 正敏、柴田 秀樹（名大院・生命農・応用分子生命科）
○Akane Sato, Takashi Kanadome, Satoshi Kamura, Terunao Takahara, Masatoshi Maki, Hideki Shibata (Dept. Appl. Mol. Biosci., Grad. Sch. Bioagric. Sci. Nagoya Univ.)

【背景と目的】アネキシン A11 は、ヒトに 12 種存在するアネキシンファミリータンパク質のひとつで、N 末端側に約 150 アミノ酸の調節領域を有する。これまでに、5 つの EF-hand 構造を持つ 2 種の penta-EF-hand タンパク質、ALG-2 と sorcin、2 つの EF-hand 構造を持つ S100A6 が、アネキシン A11 の N 末端領域に結合することが報告されている。ALG-2 は、小胞体からの順行輸送を担う COPII 小胞の被覆構成タンパク質 Sec31A やエンドソームの内部小胞形成に関与する ALIX などと相互作用し、細胞内小胞輸送を制御する可能性が示されている。一方、sorcin は、小胞体のリアノジン受容体に結合し Ca^{2+}動態を制御している。また S100A6 は、細胞増殖や細胞骨格の再構成など多岐の細胞機能との関連が示唆されている。本研究では、アネキシン A11 の Ca^{2+}シグナル伝達における役割の解明を目的として、細胞内におけるアネキシン A11 と上記 3 種の EF-hand タンパク質との結合割合を比較した。また、Ca^{2+}濃度上昇に伴うアネキシン A11 の局在変化を、緑色蛍光タンパク質を融合させたアネキシン A11（AnxA11-GFP）を用いて観察した。
【方法と結果】AnxA11-GFP を発現させたヒト胎児腎細胞 HEK293 から AnxA11-GFP を免疫沈降したところ、内在性 ALG-2 の約 10%が Ca^{2+}依存的に AnxA11-GFP と共沈降された。一方、AnxA11-GFP と FLAG タグを付加した sorcin あるいは S100A6 を共発現させた HEK293 から AnxA11-GFP を免疫沈降したが、沈降産物中に FLAG-sorcin、FLAG-S100A6 は検出されなかった。しかし、抗 FLAG 抗体による FLAG-S100A6 の沈降産物中には、Ca^{2+}依存的に、１％以下ではあるが AnxA11-GFP が検出された。ALG-2 が、アネキシン A11 と S100A6、sorcin との結合を阻害している可能性を考え、ALG-2 を発現抑制した HEK293 を用いて解析を行ったが、同様の結果であった。次に、蛍光 Ca^{2+}指示薬 R-GECO を発現させたヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y を用いて、AnxA11-GFP の局在を観察した。AnxA11-GFP は細胞全体に散在していたが、細胞外液に高濃度の KCl を加えて脱分極させたところ、Ca^{2+}濃度の上昇とともに、AnxA11-GFP は斑点状の局在様式に変化した。細胞質の斑点において Sec31A との共局在が観察されたことから、アネキシン A11 が神経細胞の小胞体からの物質輸送に関与していることが考えられた。

calcium-binding protein, annexin, EF-hand

講演番号：3C03p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ C 校舎 03 会場

アネキシン A11 のリン脂質結合特性の解析

Characterization of the phospholipid-binding properties of annexin A11

○加村 悟史、京 卓志、佐藤 あかね、高原 照直、牧 正敏、柴田 秀樹（名大院・生命農）
○Satoshi Kamura, Takashi Kanadome, Akane Sato, Terunao Takahara, Masatoshi Maki, Hideki Shibata (Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ)

【背景と目的】我々は、5 つの EF-hand 構造を繰り返して持つ Ca^{2+}結合タンパク質 ALG-2 の生理機能に関する研究の過程で、リン脂質依存性 Ca^{2+}結合タンパク質アネキシン A11 が、小胞体からゴルジ体への順行輸送を担う COPII 小胞の被覆構成タンパク質 Sec31A と ALG-2 を介して間接的に相互作用し、COPII 小胞が出芽する小胞体の特別な膜領域 ER exit site（ERES）に動員されることを見出している。アネキシン A11 は、他のアネキシンと同様に、高濃度の Ca^{2+}存在下でホスファチジルセリン（PS）をはじめとする酸性リン脂質から成るリポソームに結合することが報告されている。一方、ERES はホスファチジン酸（PA）に富むこと、また ERES においてホスファチジルイノシトール-4-リン酸（PI-4-P）が産生され、PI-4-P が COPII 被覆タンパク質の会合に必要であることが示されている。本研究では、アネキシン A11 が ERES に動員されることの生理的役割を解明することを目的とし、ERES に存在するリン脂質との結合特性を詳細に解析した。
【方法と結果】大腸菌 Rosetta(DE3)に組換体アネキシン A11 を発現させた。精製には、アネキシンが Ca^{2+}依存的に生体膜と相互作用することを利用した。すなわち、Ca^{2+}存在下でまずアネキシン A11 を発現させた大腸菌の膜画分を回収し、次に Ca^{2+}キレート剤処理を行い可溶化した。さらに、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。リポソームは、ホスファチジルコリン（PC）をベース成分として、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、PS、PA、PI-4-P を 10%含むリポソームを調製した。Ca^{2+}（10 μM）あるいは Ca^{2+}キレート剤 EGTA（5 mM）存在下でアネキシン A11 と混合し、超遠心することでリポソームを沈降させ、リポソームと共に沈降されるアネキシン A11 を定量した。その結果、PC のみのリポソームでは Ca^{2+}の有無に関わらず沈殿画分に約 10%アネキシン A11 が回収されたが、PS、PA、PI-4-P を含むリポソームでは Ca^{2+}存在下において、ほぼ 100%が沈殿画分に回収された。しかし、アネキシン A11 は、Ca^{2+}とリポソームの有無に依らず、一定の割合で沈殿画分に回収される傾向があることから、現在、ビオチン標識化脂質とストレプトアビジン固定化ビーズを用いた実験系の導入をすすめている。また、リポソームに結合したアネキシン A11 に ALG-2 が結合するかの検討を行っており、その結果もあわせて報告したい。

annexin, calcium-binding protein, Liposome

講演番号：3C03p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ C 校舎 03 会場

カルシウム動態に応じた機能未知タンパク質 MISSL の ALG-2 結合と細胞内局在解析

Analyses of MISSL, an uncharacterized protein on the interaction with ALG-2 and its subcellular localization

○井上 国子、高原 照直、佐々木 桂奈江、柴田 秀樹、牧 正敏 (名大院・生命農)
○Kuniko INOUE, Terunao TAKAHARA, Kanae SASAKI, Hideki SHIBATA, Masatoshi MAKI (Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

【背景・目的】カルシウム結合タンパク質 ALG-2 (Apoptosis-linked gene 2) はカルシウム結合モチーフである EF-hand を 5 つ持っており penta-EF-hand ファミリーに属する。ALG-2 はカルシウムを介して様々なタンパク質と相互作用することが知られており、それら相互作用タンパク質に共通するアミノ酸配列から 2 種類の結合モチーフ (ABM:ALG-2 binding motif) が考えられている。ABM-1 は PPYP(x)$_{3-5}$YP という配列で、ABM-2 は P(x)PGF という配列と考えられている。我々はヒトタンパク質配列データベース上での検索によって、ABM-1 を持つタンパク質として MISSL (MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein-like) を見出した。MISSL は機能未知のタンパク質であり、本研究は MISSL が ALG-2 の真の相互作用因子であるか、またその結合意義について解析を進めることで MISSL の機能、ひいては ALG-2 の機能の解明を目指している。
【方法・結果】ALG-2 と MISSL との結合を調べるために、GFP 融合 MISSL を発現させた HEK293T 細胞の細胞抽出液から GFP 融合 MISSL を精製し、ビオチン化 ALG-2 をプローブとしてファーウェスタンブロットを行った結果、両者の直接の結合が見られた。またカルシウムキレート剤 EGTA 存在下もしくは塩化カルシウム存在下において GST-ALG-2 プルダウン法、ウサギ GFP 抗血清による共免疫沈降実験を行ったところ、カルシウム依存的な結合が確認された。さらに GFP 融合 MISSL と mCherry 融合 ALG-2 を共発現させた HeLa 細胞での共焦点レーザー顕微鏡による生細胞観察において、カルシウム依存的にドットを形成し、両者が共局在する様子が観察された。このことから、カルシウム濃度上昇に応じて MISSL と ALG-2 とが協調して機能していると考えられる。また、MISSL には ABM-1 様配列が 2 か所存在するため、これらの配列の欠失変異体 (GFP 融合) を作製して ALG-2 との結合への影響を調べた。ファーウェスタンブロットや共免疫沈降実験を行った結果、ALG-2 との結合には 2 か所とも重要であるとわかった。さらに、欠失変異体においても生細胞観察でカルシウム依存的なドット形成が起こるかを検討したところ、全長に比べてドットの形成が低下していた。このことは ALG-2 との結合がドット形成に重要であることを示唆する。今後、ALG-2 と結合できない MISSL の変異体を導入した時や RNA 干渉法によるノックダウンした時の細胞への影響等を調べる予定である。

ALG-2, calcium, subcellular localization

講演番号：3C03p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ C 校舎 03 会場

ALG-2 結合モチーフ２型の精査と新規 ALG-2 相互作用因子の探索

Refinement of ALG-2-binding motif type 2 and search for novel ALG-2-interacting proteins

○小島 亨介、高橋 健、伊藤 優、佐々木 桂奈江、川崎 真依、張 維、高原 照直、柴田 秀樹、牧 正敏（名古屋大院農・応用分子生命科）
○Kyosuke KOJIMA, Takeshi TAKAHASHI, Masaru ITO, Kanae SASAKI, Mai KAWASAKI, Wei ZHANG, Terunao TAKAHARA, Hideki SHIBATA, Masatoshi MAKI (Dept Appl Mol Biosci, Grad Sch Bioagric Sci, Nagoya Univ.)

【目的】 Ca^{2+}結合タンパク質 ALG-2（遺伝子記号 *PDCD6*）は，細胞内小胞輸送に関与している ALIX や小胞体-ゴルジ体間輸送の被覆小胞（COPⅡ小胞）構成因子である Sec31A をはじめとする様々な因子とカルシウム依存的に相互作用する。ALG-2 はホモ２量体およびヘテロ２量体を形成するため、相互作用因子を探索する際、酵母 Two-Hybrid 法では ALG-2 および peflin が優先的に、そして共免疫沈降産物やプルダウン産物の質量分析による同定法においても、量的に多く存在する既知の因子が優先して探し出される。したがって、さらに未知の新規相互作用因子を探索する場合、これらの方法による成功率の低さが問題となっていた。しかし、存在量が少なくても ALG-2 と相互作用して重要な生理機能を果たしている因子が多数存在している可能性があり、そのような因子の探索は重要である。我々は、ALG-2 が一般に Pro に富む領域を認識し、結合配列として特定のモチーフをもつことを利用して、データベースより候補配列を抽出し、発現産物の Far Western 解析による小規模な半網羅的探索を行い、複数の新規相互作用因子を同定した（Osugi et al. JB 2012; Sasaki-Osugi, JBC 2013）。しかし、結合が検出されなかったり弱かったものが多数存在し、満足な結果とは言えなかった。原因として、スクリーニングに用いた結合モチーフの配列情報が不十分であったことが考えられる。そこで本研究はこの点を改善するため、２種類存在する結合モチーフのうち、２型モチーフに焦点を当て、アミノ酸残基置換が結合に及ぼす影響を調べてモチーフを精査することを目的とした。
【方法と結果】 Sec31A における ALG-2 結合の必要十分領域である 837-NPPPPGFI-844 の８残基および各種アミノ酸置換配列の GST 融合変異体を大腸菌で発現させ、組換えタンパク質を精製した。ビオチン標識 ALG-2 をプローブとして用いた Far Western を行い、結合の強弱を定量的に解析した。また、２型モチーフをもつ他の既知タンパク質由来アミノ酸配列の結合解析結果も考慮すると、好ましい配列は、７残基中にΦPXΦGF/WΩ（Φ,疎水性；X,任意；Ω,長側鎖）で表記されるアミノ酸残基をもつと推定された。既知の２型モチーフタンパク質間で８残基の結合の強さを比較したところ、Sec31A＞PatL1＞＞PLSCR3,CHERP,RBM22 であった。Sec31A では８残基よりＣ末側に配列を追加しても結合の強さに大きな影響はなかったが、PLSCR3 では結合の増強が観察され、結合の弱い８残基領域を補う効果があると推測される。現在、上記モチーフをもつタンパク質をデータベースより抽出し、新規相互作用因子の同定を試みている。また、Sec31A の結合様式に関して、Sec31A ペプチドと ALG-2 との複合体のＸ線結晶構造解析の結果（高橋ら未発表）と併せて考察する予定である。

ALG-2, calcium, interaction

講演番号：3C03p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ C 校舎 03 会場

糖化タンパク質 AGEs は腸管上皮細胞における抗ウイルス因子の発現を抑制する

Advanced glycation end products down-regulates anti-viral factors in intestinal epithelial cells

○布野 絢子、早瀬 文孝、渡辺 寛人 (明治大院農)
○Ayako Funo, Fumitaka Hayase, Hirohito Watanabe (Meiji Univ.)

【目的】糖尿病患者の体内ではメイラード反応と呼ばれる糖とタンパク質との非酵素的化学反応が亢進しており、その反応後期段階生成物である糖化タンパク質（advanced glycation end products; AGE)が蓄積する。また体内に蓄積した AGE とその受容体との相互作用によってひきおこされる種々の細胞応答は、糖尿病合併症をはじめとした疾患の発症と進行に寄与することが示されている。

われわれは細胞障害作用のとくに強いグリセルアルデヒド（GLA）由来 AGE の作用について解析を行い、これまでに GLA 由来 AGE がマウスマクロファージ様細胞に作用し、I 型インターフェロン(IFN)および I 型 IFN に誘導される抗ウイルス遺伝子群の発現を低下させることを見出している。本研究ではウイルス感染初期の自然免疫応答に対する AGE の作用をさらに明確なものとすることを目的とし、上皮細胞における抗ウイルス応答に対する AGE の作用を解析した。

【方法】BSA と GLA を 37℃、7 日間反応させることにより、GLA 修飾 BSA（GLA-BSA）を調製した。これを GLA 由来 AGE のモデルとして用い、ヒト腸管上皮細胞株 HT-29 に作用させたときの抗ウイルス応答関連遺伝子の発現変化を RT-PCR 法により解析した。

【結果】HT-29 細胞にウイルス二本鎖 RNA 類似分子 poly（I:C）を作用させたところ、poly（I:C）の濃度依存的にⅢ型 IFN（IFN-λ1, λ2/3）の mRNA 発現が増大した。一方、GLA-BSA の添加により、HT-29 細胞におけるⅢ型 IFN mRNA 発現は有意に低下した。さらに GLA-BSA の作用により抗ウイルス因子である Mx1 および OAS3 の発現が有意に低下することが明らかとなった。これらの結果から、糖尿病患者において生成・蓄積する AGE が上皮細胞の抗ウイルス応答を抑制しうることが示唆された。

Glycation, Interferon, Intestinal epithelial cells

講演番号：3C03p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ C 校舎 03 会場

糖化タンパク質受容体ＲＡＧＥの細胞接着分子としての機能解析

Function as a cell adhesion molecule of RAGE, a receptor for agvanced glycation end products

○石川 かれん、早瀬 文孝、渡辺 寛人（明治大院農）
○Karen Ishikawa, Fumitaka Hayase, Hirohito Watanabe (Meiji Univ)

【目的】糖尿病患者の体内は慢性的な高血糖状態にあり、糖とタンパク質との間でメイラード反応が亢進して糖化タンパク質（Advanced Glycation End products; AGE）が生成・蓄積する。AGEは、その受容体であるRAGE（Receptor of AGE）を介して細胞に作用し、糖尿病合併症の発症・進展に関与することが知られている。一方RAGEはAGEのほか、HMGB1やS100/calgranulin群などの炎症性メディエーターをも認識することが明らかとなっており、多様なリガンドとの相互作用を介してさまざまな細胞機能を調節することが知られている。

一方、RAGEは白血球の細胞膜に発現するインテグリンMac-1（CD11b/CD18）と直接相互作用することも報告されている。このことからRAGEは、受容体として細胞内へのシグナル伝達に関与するだけでなく、細胞接着分子としても機能し、白血球のリクルートを介して動脈硬化症の発症メカニズムに関与しうることが示唆されている。しかしながらRAGEの接着分子としての機能の詳細は明らかになっていない。本研究では、糖尿病合併症の発症・進展におけるRAGEの新たな役割を明らかにすることを目的とし、RAGEの細胞接着分子としての機能について解析を行った。

【方法】HEK293細胞にヒトRAGE発現ベクターを導入し、これを安定的に過剰発現する細胞株を樹立した。これを96 well プレートに培養したものと、蛍光標識したヒト単球細胞株THP-1をインキュベートし、THP-1の接着能を蛍光強度により評価した。さらにタグを付加したヒトRAGE組換えタンパク質を大腸菌にて発現させ、これを用いたGST pull-down assayにより、相互作用の有無を解析した。

【結果】THP-1の接着能は、RAGEをHEK293細胞に過剰発現させることにより高まることが明らかとなった。また、可溶性RAGEタンパク質を共存させることにより、THP-1の接着は抑制された。一方、GST pull-down assayにより、RAGEがホモフィリックな相互作用を示すことが明らかとなった。またこの相互作用はS100A12などのRAGEリガンドを共存させることによって増強された。これらのことから、RAGEが細胞接着分子として機能することが示唆された。

Maillard reaction, glycation, RAGE

講演番号：3C03p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ C 校舎 03 会場

膵β細胞におけるグルココルチコイド誘導性アポトーシスに対するアンドロゲンの抑制メカニズム
The mechanism by which androgen suppresses glucocorticoid-induced apoptosis in pancreatic β-cells

○原田 直樹[1]、中野 長久[2]、乾 博[3]、山地 亮一[1]([1]大阪府大・生命環境・応用生命、[2]大阪女子短大、[3]大阪府大・栄養)
○Naoki HARADA[1], Yoshihisa NAKANO[2], Hiroshi INUI[3], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Osaka Pref. Univ. Div. Life Envirom. Sci., [2]Osaka Woman's college, [3]Osaka Pref. Univ. Dept. Nutr.)

【目的・背景】アジア人ではグルコース摂取に伴うインスリン分泌量が欧米人の半分程度と低いために、インスリンを分泌する膵β細胞の減少やグルコース応答不全の影響による糖尿病を発症しやすい。近年、2 型糖尿病患者では男性ホルモンであるテストステロンレベルが低いことや、前立腺がん患者に抗アンドロゲン療法を行うと 2 型糖尿病のリスクが上昇することが疫学研究で明らかになり、糖代謝における男性ホルモンの重要性が認識され始めている。ステロイドホルモンであるテストステロンは、直接またはジヒドロテストステロン（DHT）に変換された後にアンドロゲン受容体（AR）に結合して生理作用を発揮する。一方で、同じくステロイドホルモンであるグルココルチコイドは、血糖上昇ホルモンとしての機能を持ち、膵β細胞に対しては胎児期の発達抑制作用や、成人期ではインスリン分泌の抑制作用を持つ。さらにグルココルチコイドは、膵β細胞株である INS-1 細胞ではグルココルチコイド受容体（GR）に作用してアポトーシスを誘導する。転写因子として機能する AR と GR の DNA 結合領域は相同性を有し、一部で共通の標的遺伝子プロモーターのシスエレメントに結合する。そこで、本研究では、膵β細胞におけるテストステロンシグナルとグルココルチコイドシグナルのクロストークについて検討を行った。
【方法・結果】INS-1 細胞から単離した AR を高発現する INS-1 #6 細胞で、合成グルココルチコイドであるデキサメサゾン（DEX）によって誘導された細胞死は、テストステロンや DHT によって低減された。アポトーシスの指標となる DNA 断片化、カスパーゼ-3 の活性化と PARP の断片化は DEX によって誘導され、テストステロンによって抑制された。DEX によるアポトーシス誘導に必須である thioredoxin-interacting protein（TxNIP）の発現は、テストステロン存在下ではタンパク質レベル、mRNA レベルともに DEX による増加が抑制された。これらのテストステロンによる抗アポトーシス作用は、抗アンドロゲン剤であるフルタミドの存在下では減少した。TxNIP プロモーター（-1081）には推測されるアンドロゲン応答配列/グルココルチコイド応答配列（ARE/GRE）が 3 つ存在し、上流から ARE/GRE サイト 1–3 と名称した。ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、DEX が TxNIP プロモーター活性を上昇させ、テストステロンが抑制することを見出した。さらにこの DEX とテストステロンによるプロモーター活性の変動は、ARE/GRE サイト 1 のみを含むレポーターでも観察されることを明らかにした。クロマチン免疫沈降により、AR と GR はそれぞれのリガンド依存的に ARE/GRE サイト 1 に直接結合すること、テストステロンの存在下では、DEX 刺激による GR の ARE/GRE サイト 1 への結合が減少することが判明した。これらの結果から、TxNIP プロモーター上で AR と GR が拮抗することで、テストステロンはグルココルチコイドによるβ細胞のアポトーシスを抑制することが明らかになった。

androgen, glucocorticoid, pancreatic β-cells

講演番号：3C03p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ C 校舎 03 会場

PC12 細胞におけるグルコース枯渇依存的な Sortilin 発現制御

Glucose-deprivation attenuates Sortilin expression in PC12 cells

○川島 健一、藤野 耕太郎、小倉 友里奈、宮西 伸光、根建 拓（東洋大院生命）
○KENICHI KAWASHIMA, KOTARO FUJINO, YURINA OGURA, NOBUMITSU MIYANISHI, TAKU NEDACHI (Toyo Univ.)

成長因子プログラニュリン（PGRN）の遺伝子変異による脳内 PGRN 活性の不足は、前頭側頭葉変性症や筋萎縮性側索硬化症などの神経変性症の発症・進行と関連することが多く報告されている。PGRN は分泌タンパク質であり、細胞保護や細胞増殖などの生理作用を持つことが分かっているが、その生理作用発現機構については不明な点が多い。特に PGRN 受容体については長く不明な状態が続いていたが、近年、膜タンパク質 Sortilin が PGRN の受容体候補分子として同定された。一方、Sortilin の発現制御機構については明らかになっていないことが多い。本研究では、ラット褐色細胞種である PC12 細胞を用いて神経細胞における Sortilin 発現制御機構の一端を明らかにすることを目的とした。

まず、細胞外栄養条件に応答した Sortilin 発現量の変化を詳細に調べた。4.5 g/l（High glucose; HG）あるいは 1.0 g/l（Low Glucose; LG）のグルコース存在下で PC12 細胞を種々の時間培養し、Sortilin 発現量を調べたところ、LG 条件下で 48 時間培養することで Sortilin の発現が有意に抑制されることがわかった。本実験条件下における培地中グルコース濃度を測定したところ、LG 条件下で 48 時間培養を継続すると培地中のグルコースがほぼ消費されており、Sortilin はグルコース枯渇依存的に発現が抑制されることが示唆された。次に、Sortilin 発現がどのような細胞内シグナルで制御されているかを調べた。特にグルコース枯渇条件下で活性化される細胞内因子に注目して解析を行った結果、AMP キナーゼ（AMPK）の関与を見出した。すなわち、AMPK の阻害剤である Compound C は、グルコース枯渇依存的な Sortilin 発現量低下を抑制するとともに、細胞外グルコースが豊富に存在する通常培養条件下であっても AMPK の活性化剤である AICAR の添加によって Sortilin の発現低下が観察された。一連の結果から、神経細胞におけるグルコース枯渇に応答した Sortilin の発現抑制は、グルコース枯渇依存的な AMPK によって制御されていることが明らかとなった。

以上の結果をまとめると、脳神経系細胞がグルコース枯渇によるストレスを受けると Sortilin の発現量が著しく減少し、PGRN の生理活性が減弱する可能性が初めて示された。この Sortilin 発現抑制の過程で AMPK が中心的な役割を担っていたことから、AMPK の活性抑制が PGRN の生理活性増加に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

Sortilin, Glucose, PGRN

講演番号：3C03p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ C 校舎 03 会場

犬の骨格筋培養細胞におけるインスリンによる糖取り込みと細胞内代謝産物の変動

Insulin-mediated glucose uptake and change of cellular metabolites in primary cultured canine skeletal muscle cell.

○野澤 聡司、佐藤 稲子、関根 舞、片山 欣哉、田崎 弘之（日獣大・獣医）
○Satoshi NOZAWA, Touko SATO, Mai SEKINE, Kinya KATAYAMA, Hiroyuki TAZAKI (Nippon Veterinary and Life Science Univ. Veterinary Science.)

【緒言】犬では先天的異常がない場合、糖尿病の発症には何らかの因子がインスリン抵抗性を増大させると考えられており、その要因は肥満とグルココルチコイド（GC）の分泌が増加するクッシング症候群（CS)、および妊娠期に過剰に分泌された黄体ホルモンとされている。本研究ではインスリン抵抗性を惹起する 3 つの要因のうち、犬においても糖尿病の発症報告がある CS との関連に着目し、GC がインスリン作用に及ぼす影響の検討を行った。
【材料および方法】犬の初代骨格筋培養細胞を用いて 4 日間の増殖培養の後、さらに 96 時間の分化培養により得た犬の筋管様細胞を材料とした。GC 添加の影響を検討するために分化誘導開始 72 時間後に GC 製剤であるデキサメサゾン（Dexa）を最終濃度 1 μM で添加、24 時間作用させた後、培地を無血清培地に交換し、6 時間平衡化させた。ついで、試験用緩衝液に交換しインスリン（Ins）および細胞内で代謝を受けない 2-デオキシグルコース（2-DG）を最終濃度 1 mM で添加してインキュベートした後、細胞を回収した。2-DG 取り込み量測定では培養条件の違いから Control、Ins、Dexa、Dexa＋Ins の 4 群とした。次に、LC-MS 分析用サンプルの調製を行った。分化誘導開始 96 時間後に培地を無血清培地に交換し、6 時間平衡化させた。ついで、試験用緩衝液に交換し Ins を最終濃度 1 μM で添加して 30 分間インキュベートし、さらにグルコースを最終濃度 10 mM で添加して 30 分間インキュベートした後、細胞を回収、LC-MS 分析を行った。検出された代謝産物の *m/z*_RT を変数とし、*t*-test を行いコントロールと Ins 添加群で有意水準 $p<0.05$ で変化する代謝産物を抽出した。さらに、多変量解析ソフト SIMCA による OPLS 判別分析を行い、群の分離に $|p1|>0.1$ で寄与する代謝産物を絞り込んだ。
【結果および考察】2-DG 取り込み量は Control と比べて Dexa ではほとんど変化はなかった。また、Ins では増加傾向が見られたが、Dexa+Ins では Control よりも低値を示すも有意な差は認められなかった。デキサメサゾンは齧歯動物の培養細胞においてインスリンによる糖取り込み作用を抑制することが知られており、本研究で用いた犬の培養細胞でも同様の傾向があることが示唆された。今後は条件の更なる検討を行うとともにインスリン作用の抑制に関与する犬特異的な機構の探索をしていく。
LC-MS 分析では上記のデータ抽出方法によりインスリン添加により変化する代謝産物を 46 個絞り込んだ。現在、MS/MS 測定を行い代謝産物の同定作業中であり、絞り込んだ代謝産物とインスリン作用の関連についても併せて報告する。

dog, glucose uptake, LC-MS

講演番号：3C03p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ C 校舎 03 会場

低酸素により惹起されるアンドロゲン受容体の選択的分解亢進について

hypoxia-enhanced selective degradation of androgen receptor

○三谷 塁一[1,2]、南 真人[2]、原田 直樹[2]、中野 長久[3]、乾 博[4]、芦田 均[5]、山地 亮一[2] ([1]神大・自然科学、[2]大阪府大院・生命環境、[3]大阪女子短大、[4]大阪府大・栄養、[5]神大院・農)

○Takakazu MITANI[1,2], Masato MINAMI[2], Naoki HARADA[2], Yoshihisa NAKANO[3], Hiroshi INUI[4], Hitoshi Ashida[5], Ryoichi YAMAJI[2] ([1]Org. of Adv. Sci. and Technol., Kobe Univ., [2]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life Environ., Osaka Pref. Univ., [3]Osaka Woman's Junior College, [4]Nutr., Osaka Pref., [5]Agr. Sci., Grad. Sch. Kobe Univ.)

【目的】男性ホルモン（アンドロゲン）依存性の初期前立腺がんは、転写因子であるアンドロゲン受容体（AR）の機能亢進によって増殖・進行する。一方、発達した前立腺がんはアンドロゲン非依存的な増殖を示し、転移性前立腺がんでは AR の発現量が減少する。しかしながら、悪性化に伴って AR の発現量が減少する分子機構は未だ不明である。前立腺がんを含む全ての固形がんは、血管からの酸素供給の不足により生育環境が低酸素状態である。低酸素は、多種類のシグナル経路を介してがんの悪性化を惹起する。そこで本研究では、低酸素が AR の発現量に及ぼす影響について解析した。

【方法・結果】BALB/c 雄性ヌードマウスに AR を発現するヒト前立腺がん細胞（LNCaP 細胞）を移植し、増殖初期の腫瘍（移植 2 週間後）または発達した腫瘍（移植 9 週間後）を摘出し、低酸素マーカー（ピモニダゾール）で染色した。その結果、初期の腫瘍と比較し、発達した腫瘍では、ピモニダゾールによる強い染色が認められた。また腫瘍中の AR の発現量を比較したところ、発達した腫瘍で、AR の発現量はタンパク質レベルで減少した。低酸素下での AR タンパク質の減少機序を解析するために、LNCaP 細胞をプロテアソーム阻害剤もしくはオートファジー阻害剤の存在下で低酸素（1% O_2）に暴露した。その結果、低酸素による AR タンパク質の減少は、オートファジー阻害剤によって抑制された。一方、プロテアソーム阻害剤は低酸素下の AR タンパク質レベルに影響を及ぼさなかった。さらに、選択的オートファジー関連因子である p62 を siRNA でノックダウンした LNCaP 細胞では、低酸素による AR タンパク質の分解亢進が阻害された。低酸素下で p62 の役割を検討するため、p62 をノックダウンしたところアポトーシスのマーカーである PARP の開裂が増加、つまりアポトーシスが亢進した。さらに低酸素下での AR の分解亢進の細胞死における役割を検討するために p62 と AR の両方をノックダウンすると PARP の開裂は抑制、つまりアポトーシスが抑制された。

【結論】腫瘍の発達によって低酸素領域は拡大し、それに伴って AR のタンパク質の分解が亢進することが示された。また低酸素下の AR は、p62 を介した選択的オートファジー経路によって分解が亢進され、p62 は AR の分解を亢進することで低酸素下での細胞死を抑制することが明らかとなった。

androgen receptor, hypoxia, autophagy

講演番号：3C03p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ C 校舎 03 会場

cGMP ホスホジエステラーゼ 6 の発現におけるシャペロンタンパク質の影響
Effect of chaperon proteins on functional expression of cGMP phosphodiesterase 6
○尾谷 優磨、田端 勇人、嶺岸 卓徳、奥田 祐介、岡崎 修治、赤沼 元気、石塚 盛雄（中央大院理工応化）
○yuma otani, hayato tabata, Takunori Minegisi, Yusuke Okuda, Shuji Okazaki, Genki Akanuma, Morio Ishizuka (Dept. of Appl. Chem., Fac. of Sci. and Engn., Chuo Univ.)

脊椎動物の眼網膜視細胞に局在する cGMP Phosphodiesterase 6 (PDE6) は、錐体細胞内でα'$_2$ γ'$_2$ のヘテロ 4 量体サブユニット構造をとっている。その内のα'$_2$ 触媒サブユニットがリン酸ジエステル結合を加水分解し、細胞内 cGMP 濃度を下げることで、細胞内外の情報伝達に重要な役割を担っている。脊椎動物において、この PDE6 の遺伝子変異が先天性定常夜盲、網膜色素変性症などの原因の一つであるとの報告があり、これまでに、大腸菌や昆虫細胞などで遺伝子組換え技術を用いた PDE6 の発現が試みられてきたが、機能的な発現は確認されていなかった。近年、翻訳後修飾タンパク質である Aryl-hydrocarbon-interacting protein-like 1 (AIPL1)により PDE6 触媒サブユニットが最適化されること、AIPL1 が分子シャペロンタンパク質の Heat-shock protein 70 (Hsp70)と相互作用することが報告された。これらのことから、複数のシャペロンが PDE6 の機能的発現に寄与することが考えられた。

そこで本研究では、取扱いの容易な大腸菌による発現・解析システムを用いた触媒サブユニット PDE6α'の機能的発現を目的とし、*in vitro* と *in vivo* の両方で PDE6α'発現におけるシャペロンの影響を調べた。ウサギ網状赤血球ライセートを用いた無細胞発現系おいて、シャペロン Hsp40, 70, 90, AIPL1 が PDE6α'の機能的発現に与える影響を観察すると共に、PDE6α'と Hsp40, 70, 90, AIPL1 の大腸菌同一系内、温度制限下での機能的発現を試みた。その結果、桿体細胞 PDE6 と同じく、錐体細胞の活性サブユニット PDE6α'が Hsp40, 70, 90, AIPL1 とそれぞれ相互作用することが確認され、AIPL1 が最も PDE6α'の立体構造構築に影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、Hsp70, 90 によって AIPL1 の機能が補助されることで PDE6α'との相互作用効率が高まり、PDE6α'の発現量が増加することがわかった。加えて、阻害サブユニット PDE6γ'が PDE6 の四次構造の安定化に寄与しているという報告があることから、さらなる PDE6α'の機能的発現を目指し、精製 Hsp40, 70, 90, AIPL1 及び、PDE6γ'発現プラスミドを用いた無細胞発現系による PDE6α'の発現量増加条件の検討を試みると共に、PDE-Glo™ Phosphodiesterase Assay Kit による cGMP 加水分解活性の測定を行った。その結果、阻害サブユニットである PDE6γ'により PDE6α'の活性が低下した。そこで、無細胞発現系において、転写・翻訳させた PDE6α'の発現量を Western Blotting でモニターし、比活性を求めることで PDEγ'の PDE6α'活性と構造安定化への寄与を調べると共に、PDE6α'と PDE6γ'の大腸菌同一系内、温度制限下での機能的発現を行うことで、より活性を維持した PDE6α'の発現・精製を試みている。

PDE6, phaperone protein, cGMP

講演番号：3C03p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ C 校舎 03 会場

cGMP-dependent protein kinase II と小胞輸送制御因子 Rab11B との相互作用の解析

Trafficking of cGMP-dependent protein kinase II via interaction with Rab11B

○伊藤 千尋[1]、小出（吉田） 静代[2]、Reger Albert[3]、辻 明彦[2]、Kim Choel[3]、湯浅 恵造[2]([1]徳島大工、[2]徳島大院 STS、[3]Baylor College of Medicine)
○Chihiro Ito[1], Shizuyo Koide(Yoshida)[2], Albert Reger[3], Akihiko Tsuji[2], Choel Kim[3], Keizo Yuasa[2]([1]Univ. of Tokushima, [2]Dept. of Biol. Sci. & Tech., Univ. of Tokushima, Grad. Sch., [3]Baylor College of Medicine)

cGMP-dependent protein kinase (PKG)は、ナトリウム利尿ペプチドやNOの刺激に対して細胞内セカンドメッセンジャーとして機能するcGMPの主な標的因子であり、I型（Iα、Iβ）、II型の計3種類が同定されている。主に平滑筋や脳に発現するPKG Iは細胞質に局在するのに対して、腎臓や骨に発現しているPKG IIは2番目のGly残基がミリストイル化されることにより細胞膜に局在している。PKG IIは、ノックアウトマウスの解析結果より、軟骨細胞の増殖・分化に関与することが明らかとなっているが、細胞内における詳細なシグナル伝達経路に関して十分な解析がなされていない。これまでに我々は、PKG IIと相互作用するタンパク質として小胞輸送に関わるRab11Bを同定した。Rabファミリーは低分子量GTP結合タンパク質であり、GTPを結合した活性化型とGDPを結合した不活性化型の二つのコンフォメーションをサイクルすることで小胞輸送を制御しており、その中でRab11はエンドサイトーシスにより取り込まれた分子のリサイクリングに関与している。免疫蛍光細胞染色により、PKG IIは単独発現においては主に細胞膜に局在したのに対して、Rab11Bとの共発現により細胞質に移行したことから、PKG IIはRab11により局在制御を受けるとともに、Rab11との相互作用を介してリサイクリングの制御を行っている可能性が考えられた。また、PKG IIとRab11Bの複合体の立体構造解析により、PKG IIの62番目のThr残基と66番目のAla残基がRab11Bとの結合において重要な部位であることが示された。そこで、PKG IがRab11Bと結合しないことに着目して、PKG IIのThr^{62}とAla^{66}をPKG Iのそれぞれに相当するGluとGln残基に置換したPKG II T62E/A66Q変異体を作製し、PKG II及びRab11Bの細胞内局在を調べた。その結果、野生型PKG IIはRab11Bとの共局在が確認できたのに対し、PKG II T62E/A66Q変異体はRab11Bとの共局在が認められなかったため、PKG IIがRab11Bと共局在するためにはThr^{62}とAla^{66}を要求することが明らかとなった。さらに、2番目Gly残基をAlaに置換し、ミリストイル化を阻害したPKG II G2A変異体とRab11Bの細胞内局在について調べた結果、PKG II G2Aは細胞膜へ移行せず、Rab11Bと細胞質で共局在が認められたため、PKG IIとRab11Bは細胞質で結合しリサイクルされることが示唆された。現在、PKG IIの候補基質として考えられているCFTR Cl^-チャネルがRab11B依存的リサイクリングエンドソーム輸送によって細胞膜へとリサイクルすることが報告されていることから、PKG II-Rab11B複合体によりどのような制御を受けるのか解析しており、合わせて報告したい。

PKG II, Rab11, interaction

講演番号：3C03p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ C 校舎 03 会場

脱ユビキチン化酵素 USP19 の骨格筋量における性差への関与

Gender-specific regulation of skeletal muscle mass by ubiquitin-specific peptidase 19

○小川 真弘[1]、原田 直樹[1]、中野 長久[2]、乾 博[3]、山地 亮一[1]([1]大阪府大院生命環境、[2]大阪女子短大、[3]大阪府大総リハ栄養)
○Masahiro OGAWA[1], Naoki HARADA[1], Yoshihisa NAKANO[2], Hiroshi INUI[3], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Osaka Women's Junior College, [3]Dept. Clin. Nutr., Osaka Pref. Univ.)

【背景・目的】女性は骨格筋量が男性よりも少ないが、この男女間の性差を引き起こす要因として性ホルモンが挙げられる。エストロゲン（E2）は子宮の発育や子宮内膜の増殖、乳腺の発達を促進し、女性にとって重要な性ホルモンである。E2 が結合した ER エストロゲン受容体（ERαと ERβ）は標的遺伝子に存在するエストロゲン応答配列（ERE）と結合し、標的遺伝子の発現を転写レベルで調節する。骨格筋のタンパク質レベルはユビキチン-プロテアソーム系によって制御されているが、筋萎縮時にユビキチン化タンパク質からユビキチンを切り離す脱ユビキチン化酵素 USP19 の発現が上昇する。これまでに我々はマウス筋芽細胞株（C2C12 細胞）において E2 が ERαを介して USP19 の発現量を増加させることと USP19 が筋形成の抑制に関与することを見いだした。しかしながら、USP19 が筋量の性差に関与するのかは不明である。そこで本研究では、オスとメスマウスの骨格筋で USP19 の発現をノックダウンすることが筋量にどのような影響を及ぼすかについて検討するとともに、ERαによる USP19 の発現調節機構に性差があるのかについても評価した。
【方法・結果】USP19 の発現は E2 により上昇するため、オスとメスマウスの骨格筋組織（ヒラメ筋）における USP19 の発現量を RT-PCR 法により検討した。その結果、メスマウスの骨格筋における USP19 の発現量はオスマウスの発現量よりも高かった。そこで、USP19 の筋量に及ぼす影響を検討するため、マウス後肢の骨格筋の USP19 をノックダウンしたところ、メスマウスのヒラメ筋重量が増加した。一方、USP19 のノックダウンはオスマウスの筋量に影響を与えなかった。組織切片を解析したところ、USP19 をノックダウンすることでメスマウスの筋繊維の面積が増加した。次に E2 による USP19 の発現調節機構を解明するため、USP19 遺伝子配列を解析したところ USP19 遺伝子のイントロン 1 に ERE の候補配列が存在したので、その領域のゲノム DNA をクローニングし、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより C2C12 細胞で評価した。その結果、E2 はレポーター活性を増加させ、候補となる ERE に変異をいれると E2 によるレポーター活性の上昇は消失した。また E2 によるレポーター活性の上昇は ERαのノックダウンすることで消失した。さらに ERαと ERE の相互作用をクロマチン免疫沈降法で検討したところ、卵巣を摘出したマウスに E2 を投与するとヒラメ筋で ERαの ERE への結合量が増加した。そこで骨格筋の ERαをノックダウンさせたところ、メスマウスのヒラメ筋で USP19 の発現量が減少し、筋量が増加したが、オスマウスでは USP19 の発現量にも筋量にも影響はなかった。以上のことから、メスマウスでのみ ERαによって発現の上昇する USP19 は骨格筋量の性差を調節する因子であることが明らかとなった。

estrogen receptor, ubiquitin-specific peptidase 19, skeletal muscle

講演番号：3C03p23
講演日時、会場：3 月 29 日 17:59～ C 校舎 03 会場

紫外線 DNA 損傷の修復機構における SUMO E3 結合酵素の機能解析

The roles of SUMO E3 ligase in nucleotide excision repair

○金岡 英徳[1]、柘植 麻亜沙[1]、増田 裕介[1]、伊藤 弘樹[1]、三宅 克英[2]、飯島 信司[1] ([1]名大院工、[2]石川県大資源研)
○Hidenori KANEOKA[1], Maasa Tsuge[1], Yusuke Masuda[1], Hiroki Ito[1], Katsuhide Miyake[2], Shinji Iijima[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

【背景と目的】

オゾンホールが拡大傾向にある現在、太陽光に含まれる紫外線(UV)は皮膚にとって最大の環境要因であり、UV による DNA 損傷の蓄積はシミ・シワなど皮膚老化や皮膚ガンの原因になると考えられている。生体には UV により生じた損傷を修復する機構（ヌクレオチド除去修復: NER）が備わっており、30種類以上のタンパク質が連動し働いている。この機能連携にはタンパク質の翻訳後修飾が重要な役割を持つと考えられており、本研究では SUMO 化を中心とした翻訳後修飾によるタンパク質-タンパク質相互作用の制御が NER に及ぼす影響を解析する。

【方法・結果】

SUMO 化は翻訳後修飾の一つであり、ユビキチン様の小型タンパク質 SUMO が基質タンパク質に結合することにより、その活性や局在、他のタンパク質との相互作用を制御する。これらの機能から、SUMO 化は DNA 複製や DNA 修復など様々な生命現象の制御因子であると考えられている。そこで我々は、SUMO の基質への結合を触媒する E3 ligase を RNAi によりノックダウンすることにより、NER への影響を測定した。代表的な紫外線 DNA 損傷であるシクロブタンピリミジンダイマー（CPD）と 6-4 光産物(6-4PP)の修復効率を ELISA 法により測定したところ、同じ SUMO E3 ligase に属する酵素であるにも関わらず、CPD 修復にのみ影響する酵素と、CPD と 6-4PP 両方の修復に影響する酵素が観察された。これらの異なるパターンを示した SUMO E3 ligase について、ターゲットタンパク質の同定をはじめとする詳細な検討を行った。

UV damage, nucleotide excision repair, SUMOylation

講演番号：3C04a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ C 校舎 04 会場

シロイヌナズナの光応答におけるストリゴラクトン誘導性転写因子の機能解析

Functional analysis of STH7 induced by strigolactone

○永井 優子[1]、中村 英光[1]、長江 未有[1]、増口 潔[2]、山上 あゆみ[3]、光田 展隆[4]、高木 優[5]、中野 雄司[3]、浅見 忠男[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]理研 PSC、[3]理研・抗生物質研究室、[4]産総研・生物プロセス、[5]埼玉大・環境)

○Yuko NAGAI[1], Hidemitsu NAKAMURA[1], Miyu NAGAE[1], Kiyoshi MASHIGUCHI[2], Ayumi YAMAGAMI[3], Nobutaka MITSUDA[4], Masaru TAKAGI[5], Takeshi NAKANO[3], Tadao ASAMI[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]RIKEN, Plant Science Center, [3]Antibiotic lab., RIKEN, [4]Bioproduction Research Institute, AIST, [5]IEST, Saitama Univ.)

【背景と目的】ストリゴラクトン（SL）は、植物体内で枝分かれを抑制する植物ホルモンである。ストリゴラクトンは枝分かれ制御のほか、側根・根毛の発達制御や芽生えの光応答などにも関与している。ストリゴラクトンの情報伝達は、ストリゴラクトン受容体であるα/β加水分解酵素 D14 と F-box タンパク質である MAX2 が関わることが報告されているが、その下流の情報伝達機構については多くが未解明のままである。我々は SL 情報伝達の下流の因子について追究することを目的とし、ストリゴラクトン処理したシロイヌナズナを対象にマイクロアレイ解析を行い、発現が上昇する 31 の遺伝子を見出した。それらのうち MAX2 の下流で働くことを確認できた遺伝子について解析を進めており、特にその中で芽生えの光応答に関与する 1 つの転写因子に着目し、詳細な解析を行っている。

【方法及び結果】現在、ストリゴラクトン誘導性の転写因子（STH7）を過剰発現、あるいは機能抑制するシロイヌナズナを作製、もしくは入手し、その表現系の解析を行っている。STH7 の属するサブファミリーの他の因子は、光形態形成に関与して働くことが報告されており、STH7 の変異体における芽生えの胚軸長などの違いからも、STH7 は光シグナルを正に制御する転写因子であると考えられた。シロイヌナズナではストリゴラクトンが芽生えの時期の光形態形成に関与することが知られているため、STH7 がストリゴラクトンの下流で光応答を制御するという推測のもと、過剰発現体・機能抑制体の形態や光関連遺伝子の応答について解析している。特に、*STH7* の過剰発現体では野生型株と比較してクロロフィルやアントシアニンの量が増加しており、光応答性遺伝子の発現量が上昇していた。また、SRDX 配列を付加した *STH7* のキメラリプレッサー過剰発現変異体は明所での胚軸の徒長が見られた。これらの結果から、STH7 がストリゴラクトンの下流で光応答シグナル伝達に関与する因子であることが示唆された。また、STH7 がブラシノステロイドの負の制御因子として報告されたことから、ブラシノステロイドとストリゴラクトンとのクロストークについても解析を進めているので、その結果についても報告する。

strigolactone, transcription factor, light response

講演番号：3C04a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ C 校舎 04 会場

ストリゴラクトンシグナル因子 D14 と DELLA タンパク質の相互作用の解析

Analysis of interaction between D14 and DELLA protein

○吉澤 真人[1]、中村 英光[1]、PARK Seung-Hyun[1]、伊藤 晋作[1]、福井 康祐[1]、伊藤 瑛海[2]、上田 貴志[2]、宮川 拓也[1]、田之倉 優[1]、浅見 忠男[1] ([1]東大院・農生化、[2]東大院・理)
○Masato YOSHIZAWA[1], Hidemitsu NAKAMURA[1], Seung-Hyun PARK[1], Shinsaku ITO[1], Kosuke FUKUI[1], Emi ITO[2], Takashi UEDA[2], Takuya MIYAKAWA[1], Masaru TANOKURA[1], Tadao ASAMI[1] ([1]Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]Grad. Sch. Sci., Univ. of Tokyo)

【背景・目的】
ストリゴラクトン（SL）は、枝分かれの抑制などの働きを持つ植物ホルモンであり、また根寄生植物の発芽誘導物質や、アーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導物質としても知られている。植物の枝分かれの制御には SL 以外にもジベレリン（GA）も関与することが知られているが、二者の相互作用に関しては不明な点が多い。そこで私たちは SL と GA のそれぞれの枝分かれ抑制機能におけるシグナルのクロストークについて研究を進めている。SL の受容には α / β 加水分解酵素である D14 が重要な働きをすることが明らかにされている。また、GA 受容体 GID1 と相互作用し GA シグナル伝達において中心的な働きをする DELLA タンパク質はブラシノステロイドやジャスモン酸など、他のホルモンシグナル伝達とのクロストークに関与することが知られている。そこで本研究では SL シグナル伝達因子と GA シグナル伝達因子の間のタンパク質相互作用に着目し、D14 と DELLA タンパク質が相互作用することを見出し、その解析を進めた。

【方法・結果】
イネ D14 とイネにおける唯一の DELLA タンパク質である SLR1 とが相互作用するかどうかを酵母 2 ハイブリッド(Y2H)系により検討したところ、SL 依存的に D14 と SLR1 が相互作用することが判明した。また蛍光タンパク質再構成法（BiFC 法）によりこの相互作用は植物細胞の核内で起こっていることが観察され、さらに、酵母 3 ハイブリッド系による解析から、GA 受容体 GID1-GA-SLR1 複合体の形成と D14-SL-SLR1 複合体の形成は競合することが示唆された。以上の結果から、SL シグナルと GA シグナルが D14 と DELLA タンパク質の相互作用を介してクロストークしていることが示唆された。SLR1 は 8 ドメインから構成されており、ドメインごとのデリーション解析を Y2H 系で行い、D14-SL-SLR1 複合体を形成するか否かを調べた。その結果より、D14-SL-SLR1 複合体形成に必要なドメインを「S/T/V」「LHR1」「VHIID」の 3 つに絞り込むことが出来た。これは DELLA タンパク質と相互作用する GID1 や PIF4 などの作用部位と一部異なっている。これらの情報をもとに、現在 D14-SL-SLR1 複合体の形成機構について詳細な検討を行っている。

strigolactone, gibberellin, DELLA

講演番号：3C04a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ C 校舎 04 会場

ブラシノステロイド生合成阻害剤 Brz 耐性を示す低緑化変異体 *bpg4* の FOX ラインからの単離と機能解析

Screening of Brz-insensitive pale-green mutant *bpg4* from FOX line

○阿部 晋[1,2,7]、山上 あゆみ[1,7]、市川 尚斉[4]、松井 南[4]、久城 哲夫[2]、長田 裕之[1,3]、浅見 忠男[6,7]、中野 雄司[1,5,7]([1]理研・抗生物質、[2]明治大院・農芸化学、[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[4]理研 CSRS・合成ゲノミクス、[5]理研 CSRS・機能開発、[6]東大院・農化生、[7]JST CREST)
○Susumu ABE[1,2,7], Ayumi YAMAGAMI[1,7], Takanari ICHIKAWA[4], Minami MATSUI[4], Tetsuo KUSHIRO[2], Hiroyuki OSADA[1,3], Tadao ASAMI[6,7], Takeshi NAKANO[1,5,7] ([1]RIKEN, Antibiotics Lab., [2]Dep. Agric. Chem., Meiji Univ., [3]RIKEN CSRS, Chemical Biology, [4]RIKEN CSRS, Synthetic Genomics, [5]RIKEN CSRS, Gene Discovery, [6]Dept. Biol. Sci., Univ. of Tokyo, [7]JST CREST)

【背景と目的】

ブラシノステロイド(BR)は植物の生長促進や葉緑体分化を制御している植物ホルモンである。我々は、BR 情報伝達経路の下流に位置し、葉緑体の活性を制御する新規な葉緑体局在型 GTP 結合タンパク質遺伝子である *BPG2* を同定したが、葉緑体と BR の関連性については未解明な部分が多い。そこで本研究では、BR による葉緑体制御機構の解明を目的として、理化学研究所 CSRS が開発した FOX（Full-length cDNA over-expressor gene）ラインを対象とした BR 生合成阻害剤 Brz に対して緑化の異常を示す変異体の選抜を試みた。

【方法・結果・考察】

野生型アラビドプシスを、Brz による BR 欠損状態・明所下で生育させると、子葉が Brz 無処理に比べて濃緑色化することが明らかとなっている。この Brz 存在下においても緑化促進を示さない変異体を単離し、その変異原因遺伝子を解析することが出来れば、BR による葉緑体制御因子を同定し得ると考え、Brz 耐性低緑化変異体 *bpg*（*Brz-insensitive pale-green*）の選抜を試みた。機能獲得型変異体群である FOX ライン約 25000 ラインから選抜を行った結果、顕著な *bpg* 形質を示す Y622 変異体が選抜された。

Y622 変異体は通常の明所発芽で子葉やロゼット葉が薄緑色を示し、野生型の明所 Brz 条件での緑化促進形態が認められないことから、BR から葉緑体制御への情報伝達に異常が生じた変異体であると考えられた。候補変異原因遺伝子を、ゲノム PCR により単離した結果、機能未知の新規な遺伝子が同定された。候補変異原因遺伝子の相同遺伝子は、植物界には広く存在するが、動物界や藻類、シアノバクテリアには存在しないことが明らかとなり、高等植物において特異的に機能する遺伝子であることが示唆された。候補変異原因遺伝子の高発現株を作出した結果、T2 世代において、明所 Brz 条件での薄緑色形態が再現したことから、この遺伝子が変異原因遺伝子として同定されたと考え、*BPG4* と呼称することとした。*BPG4* 高発現変異体 *bpg4* における薄緑色形態は目視に留まらず、クロロフィル含量分析においても、野生型で内生量が増加する Brz 条件下で、*bpg4* では内生量が低下したままで増加しないことが認められた。さらに、核コードの光合成遺伝子 *rbcS* や *CAB* の発現が、野生型に比べて *bpg4* および *BPG4* 高発現株で低下していることが確認された。*BPG4* promoter：GUS 解析では、緑葉で発現が認められ、BPG4-GFP 解析により、BPG4 は細胞核内に局在が観察された。これらの結果は、BPG4 が核内において、転写因子などに作用して、光合成関連遺伝子発現制御に関与する機能を持つことを示唆すると考えられる。現在、BPG4 の核内相互作用因子の探索や、BPG4-RNAi 株で予備的に観察された緑化促進形態の解析などによって、BPG4 の細胞核内における機能について詳細な解析を進めている。

Plant hormone, Brassinosteroid, Chlorophyll

講演番号：3C04a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ C 校舎 04 会場

ブラシノステロイド不活性化に関わるシトクロム P450 酵素 CYP72C1 の機能解明
Functional characterization of CYP72C1 involved in brassinosteroid catabolism

○佐原 瑞穂[1]、渡辺 文太[2]、横田 孝雄[3]、渡辺 修治[4,5]、水谷 正治[6]、大西 利幸[1,7]（[1]静大院農、[2]京大化研、[3]帝京大バイオ、[4]静大院工、[5]静大院創造、[6]神戸大院農、[7]静大グリーン研）
○mizuho sahara[1], Bunta Watanabe[2], Takao Yokota[3], Naoharu Watanabe[4,5], Masaharu Mizutani[6], Toshiyuki Ohnishi[1,7] ([1]Grad. School Agric., Shizuoka Univ., [2]Institute for Chemical Research, Kyoto Univ., [3]Department of Bioscience, Teikyo Univ., [4]Grad. School Eng., Shizuoka Univ., [5]School of Science and Technology., Shizuoka Univ., [6]Graduate School of Agri., Kobe Univ., [7]RIGST, Shizuoka Univ.)

【研究背景】ブラシノステロイド（BR）は植物ホルモンの一つであり、細胞伸長、細胞分化、種子発芽の促進などの生理作用を持つ。その生理作用は BR 生合成・代謝バランスを精密に調節することによって制御されている。現在まで BR 生合成経路が重点的に研究されてきたが、一方で BR 代謝は未解明な部分が多い。そこで本研究では、BR の不活性化に関わる酵素と推定されたシトクロム P450 酵素の一つである CYP72C1 の機能解明に取り組んでいる。

Activation T-DNA tagging 法により単離されたシロイヌナズナの変異体 *chibi2/sob7/shk1* は著しい矮性を示す。*chibi2/sob7/shk1* の BR 内生量分析の結果、6-デオキソカスタステロン（6-deoxoCS）、カスタステロンやブラシノライドが野生株に比べて減少した（Nakamura *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2005; Turk *et al.*, 2005）。これより、原因遺伝子である CYP72C1 の過剰発現により BR 欠乏したことが矮化した原因と予想され、CYP72C1 が BR 代謝酵素であることが示唆された。しかし、CYP72C1 の酵素機能および酵素代謝物の化学構造は未解明のままである。前年度の大会では、6-deoxoCS を基質としたときに CYP72C1 酵素の代謝物が生成されることを報告した。本大会では CYP72C1 酵素代謝物の構造解析実験について報告する。

【方法・結果】CYP72C1 酵素代謝物の化学構造を明らかにするために以下の二つの実験を行った。ⅰ）酵母発現系を用いて CYP72C1 と NADPH-P450 還元酵素を共発現した遺伝子組換え酵母に 6-deoxoCS を添加して培養した。培養液から酵素反応生成物を抽出し、蛍光ラベル化剤で誘導体化した後、高速液体クロマトグラフィー-蛍光検出器で分析した。その結果、代謝物と推定される二つのピークを確認した。これら二つの化合物を分取して質量分析に供した結果、二つの代謝物は 6-dexoCS の分子イオンより、質量数が 14、30 増加した化合物であることが明らかになり、6-deoxoCS のアルデヒド体とカルボン酸体であることが示唆された。ⅱ）6-deoxoCS を添加した培地で育成した *chibi2/sob7/shk1* から BR をメタノール抽出し、有機溶媒で分配した後、HPLC 精製を行った。精製した抽出物を蛍光ラベル化剤で誘導体化し、高速液体クロマトグラフィー-蛍光検出器を用いて分析した。その結果、ⅰ）の実験と同保持時間に CYP72C1 酵素代謝物と推定される二つのピークを検出した。現在、上記 2 つの実験で得られた CYP72C1 酵素代謝物の構造解析を行っている。

参考文献）Nakamura *et al. J. Exp. Bot.*（2005） Takahashi *et al., Plant J.*（2005） Turk *et al., Plant J.* 42, 23-34（2005）

brassinosteroid, cytochrome P450, CYP72C1

講演番号：3C04a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ C 校舎 04 会場

発芽大豆根における DDMP グループサポニンの活性酸素種代謝制御による根伸長メカニズム
Mechanism of root elongation through control of reactive oxygen species metabolism by group DDMP saponin in root of germinated soybean

○永井 華澄、八木 絵美、小牧 香里、石川 佳奈子、伊藤 慧、佐々木 由香里、白岩 雅和 (茨城大農)
○Kasumi NAGAI, Emi YAGI, Kaori KOMAKI, Kanako ISHIKAWA, Kei ITO, Yukari SASAKI, Masakazu SHIRAIWA (Ibaraki Univ)

［目的］大豆サポニンは、非糖部であるアグリコンの違いによって 4 つのグループ（A,DDMP,B,E）に分類され、それらの動物やヒトに対する生理機能については数多く報告がある。しかし、大豆植物体におけるサポニンの生理機能については未知な部分が多い。当研究室では発芽大豆において、DDMP グループサポニンが活性酸素種（ROS）代謝を制御して根の伸長を促進している可能性を示唆した。今回は､様々な発芽大豆根中の ROS およびサポニンの分布と根の伸長度との関係を調査することにより、DDMP グループサポニンの根伸長メカニズムを考察したので報告する。
［方法］以下に示す条件下で発芽大豆根を調製し、それら大豆根の伸長度、サポニン量および ROS 量（スーパーオキシドアニオン:$O_2^{\cdot -}$、過酸化水素:H_2O_2、ヒドロキシルラジカル:・OH）を測定した。
（1）大豆種子をバーミキュライトで発芽させた後、水耕栽培を 96 時間行い、24 時間ごとの大豆根を採取した。（2）発芽後の大豆根が 3 等分になるように 3 ヶ所に印をつけ、水耕栽培 48 時間後の大豆根を印ごとに 4 部位に分けた。（3）発芽後、ROS 代謝阻害剤（シアン化カリウム:KCN）および DDMP グループサポニンを加えた水耕液で 48 時間栽培し、大豆根を採取した。
［結果および考察］（1）発芽大豆における経時的な根の伸長度とサポニン量を調べたところ、根の伸長に伴い DDMP グループサポニンが B グループサポニンへ変換されていることが明らかとなった。DDMP グループサポニンは ROS 消去作用を示した後、B グループサポニンに変換されることがわかっていることから、DDMP グループサポニンが植物体内で ROS 消去作用を発揮し、根伸長に関与していることが推測された。（2）発芽 48 時間後の大豆根を伸長度合の異なる 4 部位に分けて各部位の ROS とサポニンを定量した結果、伸長の著しい根端と子葉付近に $O_2^{\cdot -}$が多く存在した。一方、・OH は根端に多く、子葉付近には少なかった。さらに、子葉付近には DDMP グループサポニンが多く存在していた。・OH は細胞壁弛緩に関与することが報告されており、細胞壁硬化が進む子葉付近では、DDMP グループサポニンが・OH を消去することで細胞壁硬化を促していることが推測された。（3）大豆根を KCN で処理すると、伸長が抑制されたが、これに DDMP グループサポニン添加すると、根の伸長抑制が改善された。また、KCN 処理をすると根の中の $O_2^{\cdot -}$は増加し、・OH は減少したが、これに DDMP グループサポニンを加えると、KCN 処理と比較して $O_2^{\cdot -}$の減少、・OH の増加がみられた。これらのことから、外因的な DDMP グループサポニンは $O_2^{\cdot -}$を消去し、・OH へと変換することで根伸長に適切な ROS バランスを調節していると推測された。

DDMP saponin, Reactive oxygen species, Soybean root

講演番号：3C04a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ C 校舎 04 会場

A グループサポニンの大豆種子発芽における生理機能の解明

Elucidation of the physiological function of group A saponin in soybean seed germination.

○松本 剣、白岩 雅和 (茨城大農)
○ken MATSUMOTO, masakazu Shiraiwa (Ibaraki Univ.)

【目的】大豆には真正サポニンとして A グループサポニンと DDMP グループサポニンが存在する。DDMP グループサポニンの植物体における機能に関しては、鶴見らによるアラビドプラス根における細胞数の増加と細胞伸長の促進作用や当研究室による発芽大豆根の伸長促進作用の報告があるが、A グループサポニンの大豆植物体における生理機能の報告はない。当研究室において登熟期に A グループサポニンが DDMP グループサポニンよりも優先的に生合成されることが明らかにされたのに加えて、登熟期での貯蔵物質が発芽時期に関与するという知見から A グループサポニンは休眠・発芽時期に生理機能を有する可能性が推測された。そこで今回は、様々な条件下での発芽試験により休眠・発芽時期における A グループサポニンの生理機能について調査したので報告する。
【方法】発芽試験は、9 ㎝シャーレを用いた 0.7%寒天 20ml の発芽床に大豆種子 20 粒を播種し、5ml の各溶液を添加後、アルミホイルで包み、温度 25℃・湿度 65%の培養室で培養した。根を出した種子を発芽と判断し、発芽率（%）を（発芽種子数）÷（播種種子数）×100 で算出した。A グループサポニンとして主要 A グループサポニンとして知られるサポニン Ab を用いた。植物ホルモンとしては発芽に重要であるアブシジン酸（ABA：休眠に関与）とジベレリン酸（GA：発芽に関与）を用いた。
【結果及び考察】まず、A グループサポニンの大豆種子中における生理機能を調査するためサポニン Ab 溶液の添加試験を行った結果、吸水開始後 36 時間時に 250μM、48 時間時に 50μM・100μM で有意的な発芽促進作用が確認された。続いて休眠期間および発芽期間の各時期における A グループサポニンの生理機能をより追求するため発芽に関与する各植物ホルモンを用いた発芽試験を行った。休眠期間における A グループサポニンの生理作用を調査するため ABA とサポニン Ab の混合溶液の添加試験を行った結果、発芽までの時間を約 24 時間遅らせる 100μM ABA との混合溶液処理では、100μM ABA 溶液単独処理に対して吸水開始後 48 時間時に 100μM・250μM で有意的な発芽促進作用が確認された。休眠を長時間持続させる 400μM ABA との混合溶液処理では変化は確認されなかった。発芽期間における A グループサポニンの生理機能を調査するため 50μM GA とサポニン Ab の混合溶液の添加試験を行った結果、50μM GA 溶液単独処理に対し、吸水開始後 24 時間時に 10μM・25μM、36 時間時に 250μM で有意的な発芽促進作用が確認された。以上のように A グループサポニンが 100μM ABA による休眠を打破し、かつ 50μM GA 溶液単独処理よりもサポニン Ab との混合溶液処理で発芽率が高かったことから、A グループサポニンは大豆種子において発芽を促進する物質として生合成されている可能性が推測された。

group A saponin, germination, soybean seed

講演番号：3C04a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ C 校舎 04 会場

殺菌剤イソプロチオランの植物成長調節活性の解析

Plant growth regulation activity of isoprothiolane

○草島 美幸、宮嵜 樹、宮下 範大、前原 恭兵、與多垣内 雄也、仲下 英雄（東農大生応）
○ Miyuki KUSAJIMA, Itsuki Miyazaki, Norihiro Miyashita, Kyouhei Maehara, Yuya Yotagakiuchi, Hideo Nakashita (TUA)

イソプロチオラン（diisopropyl 1,3-dithiolan-2-ylidenemalonate; IPT）は日本農薬（株）から販売されている殺菌剤フジワンの有効成分であるが、フジワンは植物成長調節剤としても利用されている。殺菌剤としてはイネいもち病防除に利用されているが、植物成長調節剤としてはイネのムレ苗防止に利用されている。以前の報告では、IPT はイネの根の伸長を促進する効果が認められ、そこではエチレンの生成量の増加及びオーキシンとの協調的な作用が関与していることが示されていたが、詳細な作用メカニズムは不明のままであった。本研究では、IPT の植物成長調節作用の作用債を明らかにすることを目的として、シロイヌナズナを用いて植物ホルモンの関与についての解析を行った。

野生株（Col-0）および各植物ホルモン関連変異株を用い、IPT 添加 1/2MS 培地に播種して根の伸長を測定した結果、野生株では IPT 12.5μg/ml 付近では伸長が促進され、37.5μg/ml 以上の濃度では根の伸長が抑制された。エチレンシグナル欠損株 ein2 では、野生株で伸長が促進された濃度において伸長抑制効果が認められ、より低濃度においても伸長が抑制された。また、IPT 添加培地におけるジャスモン酸シグナル欠損株 jar1 の根の伸長促進効果が抑制されていた。さらに、ein2 jar1 二重変異体を用いて解析するとともに、各植物ホルモンシグナルの生合成阻害剤を用いた解析を行い、ジャスモン酸およびエチレンの関与について確認した。

以上の結果から、IPT による根の伸長促進効果にはエチレンおよびジャスモン酸シグナルの関与が示唆された。現在は、更に詳細はメカニズムの解明を目指し、IPT の植物成長調節に関わる植物ホルモンシグナルに関して、遺伝子レベルでの解析が進行中である。

rice, root, phytohormone

講演番号：3C04a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ C 校舎 04 会場

ヒメツリガネゴケにおける 12-オキソファイトジエン酸還元酵素の機能解析
Functional analysis of OPDA reductases in *physcomitrella patens*

○高橋 知寛、松浦 英幸、高橋 公咲（北大院農）
○Tomohiro TAKAHASHI, Hideyuki MATSUURA, Kosaku TAKAHASHI (Hokkaido Univ.)

【研究背景】
オクタデカノイド経路はジャスモン酸の生合成経路であり、12-オキソファイトジエン酸（OPDA）などのオキシリピンの生産に関与している。高等植物において、オクタデカノイド経路に関わる主要な酵素であるアレンオキシドシンターゼ（AOS）、アレンオキシドシクラーゼ（AOC）および 12-オキソファイトジエン酸還元酵素（OPR）がすでに明らかにされている。また、OPR は、非天然型の OPDA を還元するグループ I と天然型の OPDA も還元できるグループ II に分類される。一方、蘚類のモデル植物であるヒメツリガネゴケ（*Physcomitrella patens*）においては、すでに *AOS* と *AOC* をコードする遺伝子がクローニングされ、それらの組換えタンパク質の酵素活性は高等植物と同様であることが示されている。しかし、OPR に関する研究報告はこれまでなされていない。そこで、我々はヒメツリガネゴケの *OPR* 遺伝子をクローニングし、その機能を解析することを目的として研究を行った。

【方法・結果】
ヒメツリガネゴケのゲノムデータベースから、7 種類の *OPR* 遺伝子（*PpOPR1*～*PpOPR7*）の存在が示唆された。系統解析の結果、*PpOPR3*、*PpOPR6* および *PpOPR7* がグループ II に、その他の *PpOPR* はグループ I に分類されることが推測された。そこで、*PpOPR3* および *PpOPR6* をクローニングし、組換えタンパク質をそれぞれ作製した。それらを用いて OPR 活性を確認した結果、PpOPR3 および PpOPR6 は共にグループ II の OPR 活性を持つことが確認された。これらのタンパク質が植物体内でも実際に機能しているか確認するため、*PpOPR3* および *PpOPR6* の過剰発現変異株をそれぞれ作製し、OPDA 内生量を測定した。その結果、両過剰発現株の OPDA 内生量が野生株よりも減少していたため、植物体内においても PpOPR3 および PpOPR6 がグループ II の OPR として機能していることが示唆された。また、OPDA 添加培地で両過剰発現株を生育させると、その生育が野生株に比べて抑制されていた。現在、*PpOPR3* および *PpOPR6* の欠損変異株を作製し、その表現型の変化を解析中である。

physcomitrella patens, 12-oxo-phytodienoic acid, octadecanoid pathway

講演番号：3C04a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ C 校舎 04 会場

Cloning and Characterization of Allene Oxide Cyclase, SmAOC, in the Model Lycophyte *Selaginella moellendorffii*

○Putri Pratiwi, Tomohiro Takahashi, Matsuura Hideyuki, Kosaku Takahashi (Hokkaido Univ.)

[Background]

In flowering plants, jasmonic acid is important signals for stress responses and development. Jasmonic acid is biosynthesized through the octadecanoid pathway. Allene oxide cylcase (AOC) is a bottleneck enzyme to catalyze the cyclization of an unstable allene oxide to produce 12-oxo-phytodienoic acid, a biosynthetic precursor of jasmonic acid. Recently the genome of *Selaginella moellendorffii*, a non-seed vascular plant, has been successfully sequenced. A database search identified an ortholog of known plant AOC genes, which was designated *SmAOC*. In this study, we investigated the role of SmAOC in *S. moellendorffii* as the model lycophyte.

[Results]

SmAOC was predicted to consist of 245 amino acids with a molecular mass of 26.3 kDa and to be localized in chloroplast. In phylogenetic analysis, the position of SmAOC was different from that of all existing AOC clusters. SmAOC has shown an AOC activity similar to that in flowering plants. Expression pattern of *SmAOC* reached its maximum level at 2 hours after wounding stresses. UPLC-MS/MS analysis detected the presence of 12-oxo-phytodienoic acid and jasmonic acid which was also highly accumulated after wounding for 2 hours. These results suggest the role of JA as a plant hormone regulating adaptation to wounding in a model lycophyte *S. moellendorffii*.

allene oxide cyclase, *Selaginella moellendorffii*, jasmonic acid

講演番号：3C04a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ C 校舎 04 会場

ヒメツリガネゴケ原糸体の分化誘導に関わるジベレリン様新奇成長制御物質の探索

Gibberellin-like substances required for protonema differentiation in *Physcomitrella patens*

○PARK Seung-Hyun[1]、大谷 征史[1]、川出 洋[2]、林 謙一郎[3]、浅見 忠男[1]、中嶋 正敏[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]東京農工大・農、[3]岡山理大・生物化学)
○Seung-Hyun PARK[1], Masato Otani[1], Hiroshi Kawaide[2], Ken-ichiro Hayashi[3], Tadao Asami[1], Masatoshi Nakajima[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]Dept. Appl. Biol. Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol., [3]Dept. Biochem., Okayama Univ. Sci.)

【背景・目的】
ヒメツリガネゴケ（*Physcomitrella patens*）原糸体の分化誘導に、*ent*-カウレンを生合成中間体とする物質が関与しているが、その構造は明らかでない。シダ植物や高等植物において、*ent*-カウレンは植物ホルモン・ジベレリン（GA）の生合成中間体として知られる。しかし、ヒメツリガネゴケからは既知の GA が全く検出されていない。このことは、ヒメツリガネゴケにおける *ent*-カウレン以降の代謝過程が一般的に知られる GA の生合成過程と異なり、GA とは別の未同定物質が合成されて、その物質が原糸体の分化誘導を引き起こしていると考えられる。我々はこのヒメツリガネゴケに特有の生理活性物質を GA 様新奇成長制御物質と称して、その分子構造と生産制御機構の解明を目的として研究を展開している。本発表においては、その進捗状況について報告する。
【方法・結果】
ent-カウレン合成酵素の機能欠失型変異株 A74 は、赤色光下における原糸体の分化頻度が野生型株と比較して有意に低いが、*ent*-カウレン酸の投与により野生型株と同程度まで回復が認められる。この応答系を基本に据え、赤色光の照射時間や照射開始時期、*ent*-カウレン酸投与量、他の添加物質の影響など応答を増幅させる要素について精査した。また、^{14}C 標識 *ent*-カウレン酸と TLC を用いて変異株 A74 の原糸体分化誘導過程における代謝状況を調べた結果、*ent*-カウレン酸の R_f 値とは異なるより高極性物質への変換を確認した。現在、非標識 *ent*-カウレン酸を投与して赤色光照射下で一定時間経過した変異株 A74 の原糸体を採取し、常法に従って溶媒中で破砕･抽出した画分の溶媒分画と HPLC を用いた精製を行い各画分中の分化誘導活性を調べており、GA 様新奇成長制御物質の前駆体に関する分画状況について報告する予定である。

gibberellin, *Physcomitrella patens*, protonema differentiation

講演番号：3C04a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ C 校舎 04 会場

ヒメツリガネゴケ原糸体の青色光への忌避反応にジベレリン様新奇成長制御物質が関与する

Gibberellin-like substances affect to blue-light avoidance response of *Physcomitrella patens* protonema

○宮崎 翔[1,2]、豊島 輝[1]、夏目 雅裕[1]、中嶋 正敏[3]、川出 洋[1]([1]東京農工大院・農、[2]日本学術振興会特別研究員 PD、[3]東大院・農生科・応生化)

○Sho MIYAZAKI[1,2], Hikaru TOYOSHIMA[1], Masahiro NATSUME[1], Masatoshi NAKAJIMA[3], Hiroshi KAWAIDE[1] ([1]Grad. school of Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]JSPS Research Fellow, [3]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo)

【背景・目的】

植物は赤色光と青色光に対する受容体をそれぞれ持ち、光シグナルに応答して様々な生理現象を示す。光シグナルの下流においてはジベレリン(GA)等の多くの植物ホルモンを介してこれらの現象が制御されている。コケは原始陸上植物に近縁な位置づけにあり、コケも顕花植物と同様に赤色光・青色光受容体をもつが、植物ホルモンによる成長制御機構については未解明な部分も多い。我々はコケのモデル生物であるヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*)から多機能型 *ent*-カウレン合成酵素(PpCPS/KS)と、*ent*-カウレン酸化酵素(PpKO)のクローニングと機能解析を行い、*ent*-カウレン酸までは顕花植物と同様の GA 生合成経路を持つことを明らかにしている。*P. patens* からは既知の GA 類が検出されないことから、*ent*-カウレン酸以降の生合成経路が GA とは異なる新奇成長制御物質の存在を想定し、その制御物質の生合成経路・構造解明を目指している。顕花植物では青色光により活性型 GA の生合成が抑制され不活性型への代謝が促進されるのに対して、*P. patens* では青色光照射により *PpCPS/KS* 遺伝子の急激な発現誘導と共に、青色光に対して忌避する極めてユニークな応答と、この応答に原始 GA 型成長制御物質の関与が示唆されたので報告する。

【方法・結果】

白色光下で培養した *P. patens* の原糸体を線状に揃え、赤色光または青色光をそれぞれ水平方向から照射して培養し、1 週間後の表現型を観察した。その結果、WT では赤色光を照射した場合、光源に向かって原糸体が成長したのに対して、青色光を照射した場合は光を避ける成長を示した。一方、*PpCPS/KS* 欠損変異株 A74 では赤色光を照射した場合、WT と同様に光源に向かって成長したのに対して、青色光照射の場合は光を避ける応答が観察されなかった。しかし、*ent*-カウレン酸を投与した場合、変異株 A71 の忌避応答が WT 同様に回復した。さらに、qRT-PCR を用いて WT における *PpCPS/KS*、*PpKO* の発現解析を行ったところ、*PpCPS/KS* の発現量が青色光処理に伴い顕著に増加した。これらの結果は、*P. patens* において GA 様新奇成長制御物質が *ent*-カウレン合成の段階で光による制御を受け、特に青色光下での忌避反応に関与する事を示唆している。一方、*PpKO* は発現量が低く定量が困難であった。青色光忌避応答機構への *ent*-カウレン酸の関与や、*ent*-カウレン酸以降の生合成経路を明らかにするため、変異株 A74 作出時と同様な手法により *PpKO* 欠損変異株の取得を計画した。複数の形質転換株を得ており、赤色光・青色光に対する応答結果など併せて報告したい。

Physcomitrella patens, Gibberellin, blue-light

講演番号：3C04a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ C 校舎 04 会場

ジャスモン酸-アミノ酸結合体に対する CYP94B3 の活性
CYP94B3 activity against jasmonic acid amino acid conjugates
○天野 就基[1]、北岡 直樹[1]、川出 洋[2]、松原 卓也[1]、鍋田 憲助[1]、高橋 公咲[1]、松浦 英幸[1] ([1]北大院農、[2]東農工大)
○Naruki AMANO[1], Naoki KITAOKA[1], Hiroshi KAWAIDE[2], Takuya MATSUBARA[1], Kensuke NABETA[1], Kousaku TAKAHASHI[1], Hideyuki MATSUURA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Tokyo Univ. of Agriculture and Tech.)

【目的】ジャスモン酸（JA）は、防御応答を始め様々な生理活性を有する植物ホルモンとして知られている化合物であり、多様な JA 誘導体が報告されている。その中で、イソロイシンと結合したジャスモン酸イソロイシン（JA-Ile）は JA 応答における活性本体であり、JA-アミノ酸結合体の主要な化合物である。さらに、植物体内ではアラニンやバリン、フェニルアラニンなど、様々なアミノ酸との結合体の存在も報告されており、JA-Val においては JA-Ile と同様な活性を持っていることが示されている。過去の研究において、シトクローム P450 に属する酵素である CYP94B3 が JA-Ile の 12 位の炭素を水酸化する酵素であり、JA 応答の不活性化機構の 1 つが報告されている。しかし、この酵素の他のアミノ酸結合体に対する活性については報告がない。本研究は、CYP94B3 の基質特異性の検討と、その特異性に基づいた植物体内での JA-アミノ酸結合体の内生量分析を目的として行った。
【方法・結果】CYP94B3 の基質特異性を検証するために、JA-Ile、JA-Leu、JA-Val、JA-Phe、JA-Gly、JA-Ala、JA-Trp、JA-ACC をそれぞれ含んだ培地で、CYP94B3 を導入した *pichia pastoris* を培養し、その代謝産物を UPLC MS/MS によって分析した。その結果、JA-Ile、JA-Val、JA-Phe に対して 12 位の水酸化活性を持つこと、またその他の化合物には活性がないことが明らかとなった。よって、植物体内において 12-OH-JA-Ile、12-OH-JA-Phe、12-OH-JA-Val の存在が予想された。この予想を証明すべく、*Arabidopsis thaliana* の WT と *cyp94b3* 欠損変異体に傷害を与え、これらの化合物の内生量を UPLC MS/MS を用いて定量した。その結果、WT において、傷害 6 時間後に 12-OH-JA-Ile、12-OH-JA-Phe、12-OH-JA-Val の蓄積が観察されたとともに、*cyp94b3* 欠損変異体において、これらの化合物の蓄積量が WT よりも低いことが明らかとなった。また、傷害処理した *Nicotiana tabacum*、*Glycine max* においても 12-OH-JA-Ile、12-OH-JA-Phe、12-OH-JA-Val の蓄積が観察された。したがって、植物体内において、CYP94B3 が JA-Ile だけでなく JA-Phe、JA-Val も代謝していることが示され、基質特異性による予想が植物体内の 12-OH-JA-Phe、12-OH-JA-Val の初の発見につながった。さらに、これらの化合物について *A. thaliana* の根の伸長阻害活性試験を行ったところ、JA-Ile、JA-Phe、JA-Val で根の伸長阻害活性が確認され、そして 12-OH-JA-Ile、12-OH-JA-Phe、12-OH-JA-Val ではその活性が弱くなることが確認された。これらの結果から、CYP94B3 は JA-Ile だけでなく、JA-Phe、JA-Val も代謝しており、その活性を不活性化している可能性が示された。

jasmonic acid, cytochrome P450, *Arabidopsis thaliana*

講演番号：3C04a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ C 校舎 04 会場

ジャスモン酸生合成遺伝子 *DAD1* 及びそのホモログの傷害誘導性発現制御機構

Regulation of *DAD1* and *DAD1-LIKE LIPASE* expression upon wounding in Arabidopsis

RUDUS Izabela[1,2]、寺井 はる霞[1]、○石黒 澄衛[1] ([1]名大院生命農、[2]Szczecin Univ.)
Izabela RUDUS[1,2], Haruka TERAI[1], ○Sumie ISHIGURO[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Szczecin Univ.)

ジャスモン酸(JA)は傷害を受けた植物組織で直ちに合成され、食害や感染に対する防御反応を誘導する植物ホルモンである。しかし、JA の生合成が傷害によってどのようなしくみで制御されているのかは必ずしもよく分かっていない。我々は JA 生合成の初発段階で働くシロイヌナズナのリパーゼ *DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE1*（*DAD1*)とそのパラログである *DAD1-LIKE LIPASE1*（*DALL1*)-*DALL4* および *DONGLE*（*DGL*）の 6 遺伝子に注目し、その傷害応答性発現制御機構の解明を目的として研究を行った。

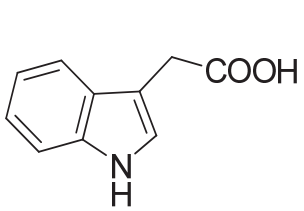
傷害を加えていないシロイヌナズナのロゼット葉では *DALL2*, *DALL3*, *DALL4* の 3 遺伝子のみが発現していたが、傷害 80 分後の葉では *DAD1*, *DALL1*, *DGL* を含む全ての遺伝子の発現が検出できるようになり、特に *DALL3* と *DAD1* の発現レベルが高かった。JA を合成できない *aos* 突然変異体や JA-Ile を合成できない *jar1* 突然変異体で調べてみたところ、傷害誘導レベルは（*DALL4* の場合を除き）野生型と変わらないかやや低下している程度であり、これらの遺伝子の傷害誘導には傷害で生成した JA によるポジティブフィードバックはあまり重要ではないことがわかった。しかし、*DAD1* と *DGL* の傷害誘導発現は JA-Ile の受容体として知られる *coi1* 突然変異体では顕著に低下していた。このことは、JA でも JA-Ile でもない分子が傷害を受けた植物体内で作られ、COI1 のリガンドとして働いている可能性を示唆している。同様の JA-Ile 非依存性と COI1 依存性は JA 生合成遺伝子としてよく知られている *AOS* や *LOX2* でも認められることから、JA 生合成遺伝子に共通の傷害応答性遺伝子発現制御機構が存在するのかもしれない。さらに、*DALL1*, *DALL2*, *DALL3* については COI1 も傷害誘導に必要ではなく、また別の発現制御機構の存在が示唆された。JA 生合成の出発点となるリパーゼが多数の遺伝子でコードされ、異なるしくみで発現制御されていることは、傷害直後から数時間に渡って JA を合成し続けるのに必要なことなのかもしれない。

Arabidopsis thaliana, jasmonic acid, wounding

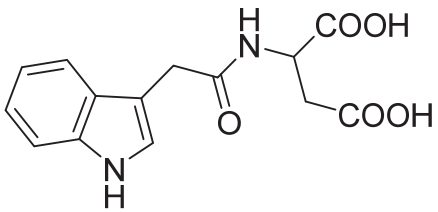
講演番号：3C04a17
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ C 校舎 04 会場

ジャスモン酸処理によるイネにおける IAA およびその類縁体の変化
Analysis of IAA and its metabolites in rice after jasmonic acid treatment
○藤岡 敬大、宮下 正弘、宮川 恒（京都大院農）
○Takahiro FUJIOKA, Masahiro Miyashita, Hisashi Miyagawa (Kyoto Univ.)

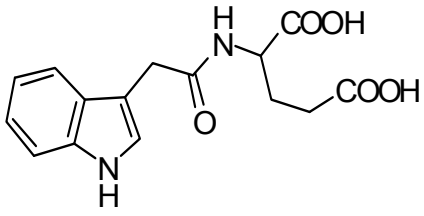
【目的】オーキシンは植物の伸長成長を促進する等の働きを持つ植物ホルモンとして知られるが、防御応答の調節にも関与することが示されている。オーキシンとして主要な働きをしているのはインドール-3-酢酸（IAA）である。IAA には酸化体やアミノ酸抱合体などの代謝物が確認されており、我々はこれまでの研究で、イネに病原菌を感染させた場合、何らかの理由で IAA 及びその代謝物の変動が起こることを明らかにしている。本研究では病傷害応答時における IAA とその代謝の役割を更に解析するため、シグナル分子として知られるジャスモン酸をイネに投与した時の変化を定量的に分析し、病原体を感染させた場合との比較を行った。
【方法】イネ（日本晴）を水耕栽培により発芽後 5 日間生育させた。JA を培地に加える場合と加えない場合に分けて 2 日間さらに生育させた。それぞれの個体から 80%アセトン水溶液を用いて抽出操作を行い、この抽出液を C18 固相カートリッジで部分精製した後、LC-ESI-MS/MS 分析に供した。MRM 検出法を用いて、同位体置換した内部標準物質との比較により IAA およびその代謝物を定量した。
【結果】JA 投与は IAA の濃度に影響を与えなかった。しかし、主要代謝物であるアミノ酸抱合体濃度には大きな変化が見られ、JA 投与後に IAA-Asp およびその酸化体が著しく減少した。培地に含まれる代謝物を分析したところ IAA-Asp の酸化体が多く検出されたことから、排出が促進されていることが分かった。一方、IAA-Glu の濃度にはほとんど変動がなく、JA に対する応答における IAA アミノ酸抱合体の役割が異なっていることが示唆された。



IAA



IAA-Asp



IAA-Glu

Auxin, Rice, Jasmonic acid

講演番号：3C04p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ C 校舎 04 会場

米のとぎ汁発酵液中のトマトかいよう病菌増殖抑制化合物について

A compound inhibiting growth of *Clavibacter michiganensis*,found in the fermented rice-rinsing solution

○中田 達矢[1]、プリエト ラファエル[2]、高瀬 尚文[2]、川口 章[3]、關谷 次郎[2] ([1]京都学園大院バイオ環境、[2]京都学園大バイオ環境、[3]岡山農林水産総合センター)
○Tatsuya NAKATA[1], Rafael PRIETO[2], Hisabumi TAKASE[2], Akira KAWAGUCHI[3], Jiro SEKIYA[2] ([1]Grad.School, Kyoto Gakuen Univ., [2]Kyoto Gakuen Univ., [3]Okayama Pref. Technol. Center Agric. Forest. Fish.)

【目的】さまざまな民間農業資材が植物病害の防除に用いられているが、米のとぎ汁発酵液も病害防除に効果があると報告されている。演者らはこの米のとぎ汁発酵液がトマトかいよう病菌（*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*）の増殖を抑制する活性を有することを見出し、これまでに報告してきた。また米のとぎ汁発酵液には乳酸菌が関与するといわれていたが、とぎ汁発酵液から乳酸菌を単離・同定した。今回はトマトかいよう病菌に対する抗菌物質の探索などを中心に報告する。
【方法】米のとぎ汁発酵液は、密閉容器に米のとぎ汁と市販の牛乳を 4：1 の割合で混合し、25℃暗所で 2 週間以上静置培養して調製した。トマトかいよう病菌はポテト・ショ糖培地（PS 培地）で培養した。増殖に与える影響は、PS 液体培地にトマトかいよう病菌を一定量移植し、これにとぎ汁培養液などの被検液を加えて 30℃で 24 時間振とう培養した後、660 nm の濁度から評価した。とぎ汁発酵液を TYG 培地プレートにて嫌気培養して得られたコロニーを用いて菌の同定を行った。
【結果】①米のとぎ汁発酵液がトマトかいよう病菌の *in vitro* 増殖を抑制することを初めて見出したが、500 日間培養したとぎ汁培養液でも活性を有し、また D-乳酸の生成も認められた。②米のとぎ汁発酵液は、沸騰水中で 10 分間熱処理した場合でもトマトかいよう病菌を抑制した。従って活性化合物は熱に安定である。またとぎ汁発酵液の pH は約 3.5 であるが、pH を上げると白色の沈殿が生じた。この沈殿を遠心分離で回収したところ、沈殿画分にトマトかいよう病菌増殖抑制活性が存在した。③とぎ汁発酵液から乳酸菌を単離し、16SrDMA の配列 、グラム染色、D－乳酸の生成などからすでに *Lactobacillus. fermentum* を同定した。単離した *L. fermentum* のを MRS 培地で嫌気培養したところ、培養ろ液はトマトかいよう病菌の増殖を抑制した。またこの活性は熱処理でも失われることがなかった。④これらの結果から、米のとぎ汁発酵液中のトマトかいよう病菌の増殖抑制物質は乳酸菌に起因するものと考えている。現在この活性物質の単離を米のとぎ汁発酵液から試みている。

fermented rice-rinsing solution, *Clavibacter michiganensis*, Lactobcillus

講演番号：3C04p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ C 校舎 04 会場

活性酸素種生成を指標とした植物免疫制御剤の選抜

screening of novel plant defense activator

○北畑 信隆[1]、八木 智華子[1]、吉川 岳史[1]、助川 夏雄[1]、来須 孝光[2]、浅見 忠男[3]、朽津 和幸[1] ([1]東京理科大、[2]東京工科大、[3]東大院)

○Nobutaka KITAHATA[1], Chikako Yagi[1], Takefumi Yoshikawa[1], Natsuo Sukegawa[1], Takamitsu Kurusu[2], Tadao Asami[3], Kazuyuki Kuchitsu[1] ([1]Tokyo Univ. of Sci., [2]Tokyo Univ. of Tech., [3]Tokyo Univ.)

病原菌感染時に植物の免疫応答を亢進することで、植物に耐病性を付与する植物免疫活性化剤は、殺菌・殺虫を目的とした既存の農薬と異なり、耐性菌の出現の回避や圃場の微生物相の保全等の面からも有効である。また、これらの化合物は、感染防御応答機構の解明のためのプローブとして利用できる。しかし、このような活性を持つ化合物は、サリチル酸(SA)経路を亢進する数種類の植物免疫活性化剤が報告されているのみで、適用範囲も限定的である。

卵菌由来のタンパク質性エリシターcryptogein により誘導されるタバコ培養細胞 BY-2 の感染防御応答の研究の過程で、活性酸素種(ROS)生成のパターンと防御関連遺伝子の発現やプログラム細胞死の誘導との間に相関関係を見出した。それに基づき ROS 生成を指標とした、簡便な植物免疫活性化剤の選抜方法を考案し(PCT 出願済)、約 11,000 化合物からなるケミカルライブラリーを対象としたケミカルスクリーニングを行った。さらに cryptogein 誘導性のプログラム細胞死を指標として、化合物を絞り込んだ結果、58 種の化合物を植物免疫活性化剤の候補として選抜した。

培養細胞を用いた選抜から得られた 58 化合物について、シロイヌナズナ植物体に対する効果を調べるために、病害応答の主要経路である SA シグナル経路及びジャスモン酸(JA)シグナル経路のマーカー遺伝子の発現を調べた。その結果、既知の植物免疫活性化剤と同様に SA 経路の活性化する化合物だけでなく、JA 経路の活性化する化合物や、SA と JA の両方の経路の活性化する化合物が含まれていた。これらの化合物は、新しい機構の植物免疫活性化剤の候補と考えられ、その作用機構の解析を進めている。

一方、病原菌感染や様々な環境ストレスに誘導される過度な ROS により、植物の生育が阻害される。よって、ROS の生成を抑制する化合物はストレス緩和剤となる可能性がある。そこで、構築した植物免疫活性化剤の選抜系を改変して、ROS 生成を強く抑制する化合物のスクリーニングを行い、238 化合物を選抜した。それぞれの化合物で前処理したシロイヌナズナ植物体について、病原体/微生物関連分子パターン(PAMP/MAMP)の一種であるペプチドエリシターflg22 誘導性の ROS 生成を解析したところ、26 化合物で植物体での ROS 生成が 85%以上抑制された。感染シグナルにより活性化され、積極的に ROS を生成する酵素 NADPH oxidase (Nox)の本体 Rboh タンパク質の異種発現系(Ogasawara *et al. JBC* 2008)を用いた解析の結果、一部の化合物は新規の Nox/Rboh 阻害剤候補である可能性が考えられた。

plant activator, defense, pathogen

講演番号：3C04p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ C 校舎 04 会場

円石藻 *Pleurochrysis carterae* に対する Ca、P の生育と石灰化への影響

Effects of Ca and P on growth and calcification of the coccolithophorid *Pleurochrysis carterae*

○田村 綾子[1]、村松 英直[2]、坂田 昂也[2]、高野 あゆみ[2]、長坂 征治[1]([1]東洋大院生命、[2]東洋大生命)
○ Ryoko TAMURA[1], Hidenao MURAMATSU[2], Kouya SAKATA[2], Ayumi TAKANO[2], Seiji NAGASAKA[1] ([1]Grad.Sch.Toyo Univ., [2]Toyo Univ.)

【目的】生物が生体の内外に無機物からなる硬組織を形成する作用はバイオミネラリゼーション（生体鉱物形成機構）と呼ばれる。海洋性単細胞藻類である円石藻は、バイオミネラリゼーションによって細胞表面にココリスと呼ばれる炭酸カルシウムの殻をつくる。円石藻がブルームと呼ばれる人工衛星から観察できるほどの大規模増殖を引き起こすことから、円石藻がココリス形成によって固定する二酸化炭素量は海洋において最大量であり、地球規模の炭素循環において重要な役割を果たしているとされている。また、ココリスは非常に精巧で種特異的な微細構造を持つ。このような形態が無機化学的に作られることは困難であることから、ココリス形成の制御には遺伝情報を基に作られる有機物が関与していると考えられている。これらのことから、円石藻のココリス形成制御機構は将来的により効果的な二酸化炭素固定技術の開発、バイオミメティック技術を応用した材料創製分野への貢献につながる可能性を秘めており、バイオミネラリゼーション研究の主要な研究対象となっている。そこで本研究は円石藻のココリス形成機構の解明を目的として行った。
【方法および結果】*Emiliania huxleyi* では P 欠乏条件における石灰化促進と生育の抑制が報告されている。また、Ca はココリスの材料である。このことから、本実験では *Pleurochrysis carterae* を用いて P の欠乏・過剰、Ca の欠乏・過剰条件で生育を測定し、ココリス生成を観察した。その結果、Ca 欠乏条件では生育速度の低下と細胞の凝集が見られた。これは細胞外にココリスを形成していないためだと考えられる。P 欠乏・過剰条件においては生育速度の変化と細胞の凝集は見られなかった。培養した円石藻の遺伝子発現の変化を調べるため、リアルタイム PCR による発現解析を行った。遺伝子発現解析は、先行研究で得られている石灰化関連候補遺伝子群から石灰化に関与すると考えられている 6 遺伝子を選抜して行った。P、Ca 欠乏・過剰条件では、1 遺伝子を除いたすべての遺伝子で発現上昇が見られた。しかし、濃度に依存した発現量の変化は見られなかった。このため、さらなる解析を進めている。加えて、培養した円石藻の細胞の元素含有量の変化についても調べた。誘導結合プラズマ質量分析計（ICP-MS）による微量元素分析の結果、Mn、Zn においては Ca 濃度に依存した細胞内濃度の変化が見られた。一方で、Cu、Mo については培地中の Ca 濃度に依存した細胞内濃度の変化は見られなかった。P については現在解析中である。
今回の結果は、P 欠乏条件で生育が抑制される他種の円石藻とは生態が異なる可能性を示した。
今後は、さらに詳細な形態、遺伝子発現量、細胞内元素含量の解析を進めていく。

Biomineralization, *Pleurochrysis carterae*

講演番号：3C04p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ C 校舎 04 会場

バラ科果樹果実のメタボローム解析
Metabolic profiling of developing Rosaceae fruits
○及川 彰[1,2]、大塚 貴生[2]、中林 亮[2]、竹林 裕美子[2]、五十鈴川 寛司[3]、村山 秀樹[1]、斉藤 和季[2,4]、白武 勝裕[5]（[1]山形大農、[2]理研 CSRS、[3]山形県農総研セ、[4]千葉大院薬、[5]名古屋大院生命農）
○Akira OIKAWA[1,2], Takao OTSUKA[2], Ryo NAKABAYASHI[2], Yumiko TAKEBAYASHI[2], Kanji ISUZUGAWA[3], Hideki MURAYAMA[1], Kazuki SAITO[2,4], Katsuhiro SHIRATAKE[5] ([1]Yamagata Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Yamagata Integrated Agricultural Research Center, [4]Chiba Univ., [5]Nagoya Univ.)

【目的】
果実には風味に関わる糖類や有機酸の他，色素や栄養素が豊富に含まれている．これまでの研究では，主に食品科学の観点から，完熟した果実に含まれる代謝物についてのみ調べられてきた．一方，果実の生長（細胞分裂や細胞肥大を含む）や追熟における代謝物の変動については余り調べられていなかった．本研究では，バラ科果樹果実のセイヨウナシ，オウトウ，リンゴの開花後から成熟（セイヨウナシについては追熟）までの果実に含まれる代謝物を，メタボローム解析によって網羅的に調べることにより，果実成長および追熟による果実内代謝動態を明らかにすることを目的とした．
【材料・手法】
セイヨウナシ，オウトウおよびリンゴの果実は山形県内の圃場から，開花期前後から経時的にサンプリングを行い，凍結粉砕した．それぞれのサンプルは各内部標準物質を含むメタノールを用いて抽出し，以下のメタボローム解析に供した．アミノ酸や有機酸などのイオン性一次代謝物はキャピラリー電気泳動質量分析装置によって，フラボノイドなど中性化合物は液体クロマトグラフィー質量分析装置によって分離・検出された．また植物ホルモン類は固相抽出などの前処理後に液体クロマトグラフィー質量分析装置によって定量分析された．さらに糖類およびデンプンについても液体クロマトグラフィーによって定量した．得られた全てのメタボローム情報は統合され，各種統計解析に用いられた．
【結果・考察】
セイヨウナシからは約 260 種類の代謝物が検出された．それぞれは果実の生長・追熟に応じて様々な挙動を示し，階層的クラスター解析の結果，６つのグループに分類された．その中には経時的な蓄積を示した糖類のように想定された結果も含まれていたが，細胞肥大期に特異的に蓄積された含硫アミノ酸や，追熟期に蓄積が認められたブラシノステロイド類などこれまで知られていなかった代謝動態も明らかになった．年次変動を考慮するために，セイヨウナシは２年間の分析を行った．一方，オウトウからは約 160 種の代謝物が検出され，セイヨウナシと同様または全く異なる挙動を示す代謝物が検出された．リンゴについては現在解析中であり，今後セイヨウナシやオウトウとの比較を行う予定である．また本研究の結果はデータベース（Fruits Omics Database）にて公開予定である．
＊なお本研究は，生研センターイノベーション創出基礎的研究推進事業により行われた．

metabolomics, Rosaceae, fruits

講演番号：3C04p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ C 校舎 04 会場

巨大胚変異系統米における遺伝子発現プロファイル解析
Gene Expression Profiling of Giant Embryo Mutants in Rice
○坂見 綾佳、田代 康介、榎本 亜紀子、阪田 光和、吉村 淳、佐藤 匡央、熊丸 敏博、佐藤 光、久原 哲（九州大院農）
○ Ayaka SAKAMI, Kosuke TASHIRO, Akiko ENOMOTO, Mitsukazu SAKATA, Atsushi YOSHIMURA, Masao SATO, Toshihiro KUMAMARU, Hikaru SATO, Satoru KUHARA (Kyushu Univ.)

米油とはその名の通り米の胚及び糊粉層（糠層）から抽出される植物油である。原料をほぼ国産で賄える点や栄養価の高さ、加熱による酸化のしにくさなどから多くの菓子メーカーや学校給食において用いられている。一方で、米の消費量の減少による原料不足、精製に必要な独自の技術や手間といった面で他の植物油と比べると価格が高いといった問題点を抱えており、米油の生産効率向上が求められている。米生産の観点から米油の増産を図る手法として、原料を増大させるための米品種の育種が挙げられる。巨大胚変異系統は、米油の原料のひとつである胚が肥大化した高含油米であり、米油生産用の米品種候補である。本研究では、米油生産用の米品種を選抜するための分子基盤を解明することを目的として、巨大胚変異系統の遺伝子発現解析を行ってきた。
米試料として、巨大胚変異系統 EM39 及び EM40 とこれらの親株である金南風と、巨大胚変異系統 EM734 とこの親株である台中 65 号を用いた。受精後 1 週間までの米種子を採取し、液体窒素で凍結した。種子は-80℃で保存し、使用前に液体窒素下でもみ殻を取り除き TRIzol（Invitrogen）を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA から Low Input Quick Amp Labeling Kit（Agilent Technologies）を使用して cRNA を作製し、Rice Gene Expression Microarray（Agilent Technologies）を用いて遺伝子プロファイルを収集した。
巨大胚変異系統とその親株である通常米から得られたプロファイルを比較した結果、巨大胚変異系統全てにおいて共通して発現が上昇する遺伝子群が得られた。この中には巨大胚遺伝子 *ge1* も含まれており、これは通常米と比べて巨大胚変異系統で 2 倍以上の発現量を示していた。巨大胚変異系統において共通して発現量が変化した遺伝子群には、脂質の移動に関わる遺伝子やストレス関連遺伝子などが含まれており、それらの遺伝子によってイネの胚の巨大化や脂質の蓄積が起こっているのではないかと推測している。

rice, giant embryo

講演番号：3C04p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ C 校舎 04 会場

イネ胚乳における澱粉生合成関連酵素の相互作用の解析
Protein-protein interactions among starch biosynthetic enzymes in rice endosperm

○阿部 奈津子[1]、クロフツ 尚子[1]、中村 保典[1]、Ian J. TETLOW[2]、Michael J. EMES[2]、藤田 直子[1]（[1]秋田県大・生物資源、[2]Univ. of Guelph）
○Natsuko ABE[1], Naoko CROFTS[1], Yasunori NAKAMURA[1], Ian J. TETLOW[2], Michael J. EMES[2], Naoko FUJITA[1] ([1]Akita Pref. Univ., [2]Univ. of Guelph)

植物の光合成産物である澱粉は、1) α-1,4 鎖を伸長する Starch synthase（SS）2) SS の基質を供給する ADP-Glucose pyrophosphorylase 3) α-1,6 結合を形成する Branching enzyme（BE）4) 不要な α-1,6 結合をトリミングする Debranching enzyme（DBE）5) 澱粉生合成の初期過程に関与すると考えられている Phosphorylase（PHO）の少なくとも 5 クラスの酵素により合成され、これらの酵素は多数のアイソザイムを有する。澱粉の主要な構成単位であるアミロペクチンは分子量が $10^{8\sim9}$ と非常に巨大であり、クラスター構造が規則正しく繰り返された分子構造をしている。アミロペクチンがこのような分子となったのは、澱粉生合成関連酵素が複合体を形成し、効率の良い澱粉生合成メカニズムが存在するためと考えられている。最近では、トウモロコシやコムギにおいて、SSI や SSIIa、BEI、BEIIb などが複合体を形成し、リン酸化が複合体形成を調節していることが分かっている（Tetlow et al., 2004; 2008）。イネにおいても、登熟胚乳から抽出した可溶性画分をゲルろ過法により分離したフラクションをウエスタンブロットした結果、複合体を形成することが明らかとなった（2012 年大会）。しかし、複合体の構成要素や活性の有無については不明である。そこで、免疫沈降法により複合体の構成要素を調べ、ゲルろ過法と Native-PAGE を組み合わせ、複合体の活性の検出を試みた。

免疫沈降法で単離した複合体をウエスタンブロットした結果、SSI、SSIIa、SSIIIa、BEI、BEIIb、Pullulanase（PUL）は澱粉生合成に関与する他のアイソザイムと複合体を形成していることが分かった。トウモロコシと比較すると、SSI、SSIIa、BEI、BEIIb が他の澱粉生合成関連酵素と複合体を形成している点、Isoamylase1（ISA1）と PHO1 は他の澱粉生合成関連酵素と複合体を形成していない点が共通の特徴であった。一方、BEI が PUL と複合体を形成している現象はイネ特異的であった。

次に、ゲルろ過カラムにより登熟胚乳から抽出した可溶性画分を分離し、そのフラクションを Native-PAGE に用いて SSI、SSIIIa、BEI、BEIIb、ISA1、PUL、PHO1 活性の検出を行った。その結果、複合体が溶出するフラクションにおいて、上記のアイソザイムの活性が検出され、複合体においてもこれらのアイソザイムが活性を有することが分かった。特に、SSIIIa と BEI は 700kDa 以上の超高分子量の複合体においても活性が見られ、SSIIIa は超高分子量の複合体の活性がモノマーより高いという結果が得られた。また、PHO1 は複合体の大きさに関わらず活性がほぼ同程度であった。

今後はイネにおける複合体形成の調節機構は何か、また、様々な変異体を用いて解析することで澱粉生合成メカニズムの解明に貢献していきたい。

rice, starch biosynthesis, protein-protein interaction

講演番号：3C04p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ C 校舎 04 会場

高アミロース二重変異体米の解析

Analyses of high amylose double mutant of rice

○藤田 直子、淺井 裕貴、阿部 奈津子、追留 那緒子、クロフツ 尚子、中村 保典 (秋田県大生物資源科学)
○Naoko FUJITA, Hiroki Asai, Natsuko Abe, Naoko Oitome F, Naoko Crofts, Yasunori Nakamura (Akita Pref. Univ.)

【背景・目的】アミロース含量は、澱粉の性質を大きく左右する要因の一つであり、その制御法は、作物澱粉育種において非常に重要である。トウモロコシの枝作り酵素(BE)IIb 欠損変異体(*amylose extender(ae)*変異体) は、アミロース含量が通常の澱粉が 25%程度であるのに対し、50-70%と非常に高アミロースであり、難消化性澱粉素材等として産業利用されている。一方、イネ品種では、これまで最も高い (見かけの)アミロース含量のもので 33%程度と、トウモロコシ *ae* 変異体に比べるとアミロース含量が低い。我々は、澱粉生合成関連酵素のイネ変異体を多数単離し、それらをいろいろな組み合わせで交配した二重変異体を作出した。これらのうち、スターチシンターゼ(SS)IIIa 欠損変異体(*ss3a*)と BEIIb 欠損変異体(*be2b*)を交配して作出した二重変異体 *ss3a/be2b* で見かけのアミロース含量が 45%であることを見出した。この変異体の性質および高アミロースになる理由について調べた。
【結果】野生型の種子は半透明であるのに対し、*ss3a/be2b* の種子は *be2b* と同様、白濁であり、*be2b* より種子重量および澱粉含量が高かった。見かけのアミロース含量は 45%であり、*be2b* と同様、アミロペクチンの短鎖が激減していた。一方、アミロペクチンのクラスターを連結する長い鎖の量は、野生型と比べると増加していたが、*be2b* と比べると減少していた。高アミロースになる理由を探るため、SS の基質である ADP グルコースを供給する ADP グルコースピロフォスフォリラーゼ(AGPase)とアミロース合成酵素である結合型スターチシンターゼ I (GBSSI)の活性を測定した。*ss3a* および *be2b* の AGPase 活性は野生型の約 1.5 倍であり、*ss3a/be2b* は 2 倍であった。また、*ss3a* および *ss3a/be2b* の GBSSI 活性は野生型の約 2 倍に増加していた。さらに、登熟過程における種子重、アミロペクチン量、アミロース量の経時変化を調べた。*be2b* および *ss3a/be2b* では、野生型や *ss3a* が開花後 30 日以降に脱水が生じているのに対し、20 日以降で生じており、脱水が開始した後はアミロペクチン量の増加は見られなかった。一方、アミロース含量は *ss3a* および *ss3a/be2b* で開花後 10 日目には他系統より既に高く、*be2b* および *ss3a/be2b* では脱水後の開花後 30 日目以降でも著しく増加していた。以上の結果から、*ss3a/be2b* では、SSIIIa および BEIIb が欠損することで GBSSI の発現が強くなり、AGPase 活性の上昇により他の SS より ADPG に対する Km 値が高い GBSSI が働きやすくなったと考えられる。また、開花後 20 日目までの早い時期と開花後 30 日目以降完熟するまでの 2 段階でアミロースを積極的に合成しているため、高アミロースになったと考えられた。

high amylose rice, starch synthase, branching enzyme

講演番号：3C04p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ C 校舎 04 会場

イネ植物体における新規ビタミン E 合成酵素の探索

Search of new vitaminE biosynthesis gene in rice plants

○阿部 伎[1]、木村 映一[2]、木村 俊之[3]、村田 和優[4]、吉田 泰二[2]、仲川 清隆[1]、宮澤 陽夫[1]([1]東北大院農・機能分子解析学分野、[2]東北農研セ、[3]中央農研セ、[4]富山農総技セ)
○Takumi ABE[1], Eiichi KIMURA[2], Toshiyuki KIMURA[3], Kazumasa MURATA[4], Taiji YOSHIDA[2], Kiyotaka NAKAGAWA[1], Teruo MIYAZAWA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Tohoku Agri Res Center, [3]Central Agri Res Center, [4]Toyama Pref Agri Forestry&Fish Res Center)

【目的】米（特に糠部）には不飽和ビタミン E であるトコトリエノール（T3）が特徴的に含まれ、T3 による抗血管新生や抗腫瘍、抗肥満、脂質代謝改善、皮膚保湿、抗アレルギー、テロメア抑制などの新たな機能性をわれわれは明らかにしてきている 1)。そこで T3 高含有米の作出に取り組み、血管新生病予防や新機能活用に向けた新食品の開発研究を進めてきた。本研究では、GGR を欠損させたイネカルスを作製し新規ビタミン E 合成酵素の性質を明らかにし、T3 高純度・高生産システムの実現を目指した。
【方法】GGR1 遺伝子内に内在性レトロトランスポゾンが転移したイネ品種日本晴の GGR1 変異カルスと、対照として野生型カルスを作出し、ビタミン E を 4000QTRAP LC-MS/MS で定量した。次に、GGR1（既知 GGR）変異カルスについて、さらに GGR2（新規 GGR）を RNAi 処理（遺伝子発現抑制）した変異カルスを作出し、同様にビタミン E を LC-MS/MS で定量した。さらに、GGR1 変異株と野生型の苗のクロロフィル（Chl）組成を UV-HPLC, QTOF-MS で調べた。
【結果・考察】GGR1 の欠損に関わらず、T3 と Toc はともに合成されていた。このことは GGR が複数存在し相補的に機能することを示唆した。また、GGR1 と GGR2 をともに欠損するカルスでは、Toc 量は顕著に減少した。これは GGR1 と GGR2 が共に Toc 生合成に必須であることを示した。さらに、野生型と GGR1 変異株の Chl 組成を比較すると、本来 GGR が欠損するとゲラニルゲラニル側鎖を持つ Chl（gg-Chl）のみが生成するはず（野生型では gg-Chl が GGR により還元されたフィトール側鎖の Chl しか検出されない）だが、GGR1 変異株では Chl（フィトール側鎖）と gg-Chl の両方の存在を確認した。。現在は GGR1 と GGR2 を両方欠損させた株のクロロフィル組成も調べている。
以上から、2 種の GGR が存在することが示唆され、今後は T3 を高純度・高生産させることを目指したいと考える。

1) E. Eitsuka et al, BBRC (2006); K. Nakagawa et al, JN (2007); A. Shibata et al, Biochem Pharmacol (2008), JN (2008); T. Miyazawa et al, JNB (2009); T. Tsuduki et al, BBA (2013)

tocotrienol, rice, geranylgeranyl reductase

講演番号：3C04p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ C 校舎 04 会場

ウメ（*Prunus mume* Sieb. Et Zucc）のアミグダリン生合成に関わる P450 の同定と性状解析
Identification and characterization of P450s from *Prunus mume* Sieb. Et Zucc in the biosynthesis of amygdalin

○山口 拓也[1,2]、浅野 泰久[1,2]（[1]富山県大・生工科・生工研セ、[2]JST, ERATO）
○Takuya YAMAGUCHI[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2]（[1]Toyama Pref. Univ., Biotech. Res. Center & Dept. Biotech, [2]JST, ERATO）

青酸配糖体は 2500 種以上の植物において報告がある防御物質である。ウメ（*Prunus mume* Sieb. Et Zucc）は青酸配糖体であるアミグダリンを L-フェニルアラニンから生合成し、その生合成経路上には医薬品やファインケミカルにおいて重要な中間体であるマンデロニトリルがある。マンデロニトリルは 2 種の P450 により L-フェニルアラニンがフェニルアセトアルドキシムへ、続いてマンデロニトリルへと変換されることで生合成されると考えられているが、その P450 については報告がない。マンデロニトリルの生合成に関与する P450 を用いたマンデロニトリルおよびその誘導体の合成方法作出を目的とし、本研究では L-フェニルアラニンからマンデロニトリルを生合成する P450 の同定を行った。

ウメの RNA シークエンスデータを Sequence Read Archive から取得し、SOAPdenovo-Trans を用いてアッセンブルした。アッセンブル後の配列から in house BLAST を用いて P450 相同性配列を検索し、計 6 種の *P450* をクローニングした。各 P450 を発現させた出芽酵母からミクロソーム画分を調製し、L-フェニルアラニンまたはフェニルアセトアルドキシムを基質とした酵素反応を行い、生成物を LC-MS または GC-MS により検出した。その結果、L-フェニルアラニンをフェニルアセトアルドキシムへ変換する P450 およびフェニルアセトアルドキシムをマンデロニトリルへと変換する P450 がそれぞれ得られた。また、両 P450 の RT-PCR による発現組織解析や、基質特異性についても報告する。

P450, *Prunus mume*, mandelonitrile

講演番号：3C04p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ C 校舎 04 会場

フェニルアセトアルドキシム変換に関与するシロイヌナズナ由来シトクロム P450 の探索
Screening of phenylacetaldoxime-converting cytochrome P450s in *Arabidopsis thaliana*

○三木 佑太[1,2]、岡崎 誠司[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Yuta Miki[1,2], Seiji Okazaki[1,2], Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO)

【目的】一部の植物は、アミノ酸二次代謝経路であるアルドキシム-ニトリル経路にて L-Phe から防御物質である phenylacetonitrile (PAN) や mandelonitrile (MAN) を生合成する。種々のアミノ酸を出発物質とした類似経路についての知見から、L-Phe から N-水酸化反応（これに伴う自動的な脱炭酸）により phenylacetaldoxime (PAOx) へと変換後、アルドキシム基の脱水反応にて PAN へと変換した後、ベンジル位水酸化反応によって MAN へと変換する一連の反応経路が推測されている。従来研究にて、初発の PAOx 生成を担う酵素としてシロイヌナズナ由来シトクロム P450 (CYP) 79A2 が既に見出されている。一方、PAOx から PAN や MAN を生成するシロイヌナズナ由来酵素は未だ同定されていない。しかしながら、MAN と構造的に類似した 4-hydroxy MAN の生合成に関与する *Sorghum bicolor* 由来 CYP71E1 が既に見出されているため[1)]、シロイヌナズナにおける PAOx 変換においても CYP71 類の関与が推測される。そこで本研究では、シロイヌナズナ由来 PAOx 変換酵素の探索を開始した。

【方法および結果】 CYP は相同性に関わらず全体のフォールディングが類似しているため、基質認識部位の一次配列における位置が保存されている。よって先ず、CYP71E1 のホモロジーモデルと PAOx とのドッキングシミュレーションから CYP71E1 の基質認識部位を推測した。次に、*A. thaliana* 由来 CYP71 のアライメント解析より、CYP71E1 基質認識部位と類似した部分配列を有する 7 分子種を PAOx 変換酵素の候補として選抜した。また、CYP71E1 と配列全体で高い相同性を有する 6 種の *A. thaliana* 由来 CYP71 も候補に加えた。これらの CYP71 と *A. thaliana* 由来 CYP レダクターゼ (ATR) の大腸菌共発現系を構築し、形質転換体による PAOx 代謝能について検討した。その結果、CYP71A12 および A13 の発現菌体から PAOx から PAN への顕著な変換活性が得られた。また、これら 2 種の CYP 発現菌体は indole-3-acetaldoxime や 4-hydroxyphenylacetaldoxime からニトリルへの脱水反応を行うことも確認された。本発表では、これらの CYP の諸性質についても併せて報告する。

1) Kahn, R.A. et al. *Arch. Biochem. Biophys.* **363**, 9-18.

aldoxime-nitrile pathway, cytochrome P450, Arabidopsis thaliana

講演番号：3C04p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ C 校舎 04 会場

プロテインジスルフィドイソメラーゼファミリーGmPDIM のダイズ Ero1 による活性化と構造との関係

Activation of protein disulfide isomerase family GmPDIM by soybean Ero1

○小石原 克典、松崎 元紀、三田 竜太、奥田 綾、成尾 由理香、増田 太郎、裏出 令子（京大院農・農学）
○Katsunori KOISHIHARA, Motonori MATSUSAKI, Ryuta MITA, Aya OKUDA, Yurika NARUO, Taro MASUDA, Reiko URADE (Kyoto Univ., Division of Agronomy and Horticultural Science)

【背景と目的】真核細胞の小胞体では、新生タンパク質の多くが分子内ジスルフィド結合形成を伴ってフォールディング（酸化的フォールディング）される。酵母及び哺乳動物では、酸化的フォールディングに複数の Protein Disulfide Isomerase (PDI)ファミリーが作用している。これらのうち、PDI は基質タンパク質にジスルフィド結合を導入することで還元状態となると、その活性中心が Endoplasmic reticulum oxidoreductin-1 (Ero1)によって再酸化（活性化）される。この PDI/Ero1 系が新生タンパク質の酸化的フォールディングに中心的な役割を果たすと考えられている。植物細胞にも多種類の PDI ファミリーと Ero1 オーソログが存在するが、それらの協同的作用の分子機構は不明である。我々は６グループのダイズ PDI ファミリーとダイズ Ero1 オーソログ(GmEro1)の遺伝子を同定し、リコンビナントタンパク質を用いて *in vitro* での変性タンパク質の酸化的リフォールディングを検討してきた。本研究では、GmEro1 による PDI ファミリーの活性化の作用機構を明らかにすることを目的に研究を行った。**【方法】**ダイズ PDI ファミリー(GmPDIL-1, GmPDIL-2, GmPDIM, GmPDIS-1, GmPDIS-2)、GmPDIM の変異タンパク質及び GmEro1 のリコンビナントタンパク質は大腸菌発現系を用いて大量発現し純化した。GmEro1 の細胞内局在性は抗血清を用いて蛍光免疫染色した子葉細胞の共焦点蛍光顕微鏡観察により検討した。ダイズ組織中の GmEro1 はウエスタンブロット法により検出した。リコンビナント GmEro1(rGmEro1)の FAD 結合量は分光光度計を用いて計測した。GmEro1 による PDI ファミリーの酸化は、PDI を還元するグルタチオン存在下で酸素電極を用いて定量した。**【結果】**ダイズ細胞内での GmEro1 は小胞体に局在化する一回膜貫通タンパク質である。膜結合領域を除いて発現させた可溶性の rGmEro1 は、オリジナル GmEro1 と同様分子内ジスルフィド結合によりコンパクトな構造が形成されており FAD が 1 分子結合していることを確認した。rGmEro1 は主要ダイズ PDI ファミリーのうち GmPDIL-2 を除く GmPDIL-1, GmPDIM, GmPDIS-1, GmPDIS-2 を酸化した。このうち *in vivo* で他の複数の PDI ファミリーと会合しそれらと協同的に作用する可能性が考えられる GmPDIM に着目し、rGmEro1 による酸化と構造との関係を解析した。GmPDIM は 3 つのドメイン（a, a’, b）から構成され、a と a’に活性中心 CGHC が一個ずつ存在し、ともに基質を酸化する活性を有する。しかし、rGmEro1 によって a は酸化されず a’のみが直接酸化されることが明らかとなった。さらに、a が基質を酸化して得られた電子は a’を介して rGmEro1 に移動することを示唆する結果が得られた。また、活性中心を持たない b は酸化をうけないが、GmEro1 との相互作用の足場となっていることを明らかにした。

soybean, endoplasmic reticulum oxidoreductin-1, protein disulfide isomerase

講演番号：3C04p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ C 校舎 04 会場

二種類のダイズ PDI ファミリーと Ero1 の連携による効率的なタンパク質フォールディング

Cooperative oxidative folding by two soybean protein disulfide isomerase family proteins and Ero1

○松崎 元紀、小石原 克典、奥田 綾、三田 竜太、増田 太郎、裏出 令子（京大院農・農学）
○Motonori MATSUSAKI, Katsunori KOISHIHARA, Aya OKUDA, Ryuta MITA, Taro MASUDA, Reiko URADE (Kyoto Univ., Division of Agronomy and Horticultural Science)

【背景と目的】真核細胞の小胞体内腔では新生タンパク質の大部分が分子内ジスルフィド結合形成を伴ってフォールディング(酸化的フォールディング)される。酵母や哺乳動物では、酸化的フォールディングの主要経路は酸化酵素 Ero1 が Protein Disulfide Isomerase (PDI)の活性中心にジスルフィド結合を転移し（活性中心の酸化)、酸化型となった PDI が基質タンパク質にジスルフィド結合を導入する経路であり、その分子メカニズムが研究されている。われわれは、主要な種子作物の中で最もタンパク質含量の高いダイズにおける酸化的フォールディング機構の解明を目指して研究を行い、複数のダイズ PDI ファミリーがダイズ Ero1 オーソログ(GmEro1)とのカップリングにより酸化的フォールディング活性を示すこと、PDI ファミリーのうち GmPDIM と GmPDIL-2 は小胞体内で会合していることを見いだした。そこで、GmEro1 と GmPDIM 及び GmPDIL-2 との連携による酸化的フォールディングの有無や、その作用機構を分子レベルで明らかにすることを目的に本研究を行った。
【方法】GmEro1、GmPDIM、GmPDIL-2 及び変異タンパク質は大腸菌発現系を用いて大量発現し、純化した。酸化的フォールディング活性は、還元変性した RNaseA を基質としてフォールディングによる酵素活性の回復速度を指標に測定した。ジスルフィド結合の形成量は Ellman 法により定量した。RNaseA のフォールディング中間体は遊離システイン残基を AMS により修飾し、非還元 SDS-PAGE で解析した。
【結果】GmPDIM には GmEro1 存在下で、還元変性 RNaseA にジスルフィド結合を形成しフォールディングさせる活性がある。一方、GmPDIL-2 は GmEro1 により活性中心が酸化されないため、これらの活性がみられない。しかし、GmEro1 存在下で GmPDIM に GmPDIL-2 を共存させると GmPDIM と GmPDIL-2 が協同的に作用して酸化的フォールディング速度が GmPDIM 単独の約 4.5 倍に上昇することを発見した。この GmPDIL-2 の作用には、ドメイン a および a' に存在する 2 個の酸化還元活性中心が必須であった。さらに、基質のジスルフィド結合形成速度は GmPDIM 単独系に比して GmPDIL-2 共存系で顕著に上昇し、ジスルフィド結合をより多く含んだ中間体がより速く形成されていた。以上の結果から、Ero1 により酸化された GmPDIM は GmPDIL-2 と連携して、GmPDIL-2 の酸化還元活性とフォールディング活性に依存した反応機構で基質タンパク質の酸化的フォールディングを効率的に行うことが示唆された。本研究で示された複数の PDI ファミリーの連携による酸化的フォールディングは他の真核生物も含めた初めての例であり、小胞体に多種類の PDI ファミリーが存在する理由について重要な示唆を与えるものである。

protein disulfide isomerase, Ero1, folding

講演番号：3C04p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ C 校舎 04 会場

ダイズジスルフィド結合形成酵素 QSOX と PDI ファミリーを用いた *in vitro* 酸化的フォールディング系

In vitro oxidative folding system using soybean QSOX and PDI family

○奥田 綾、松崎 元紀、三田 竜太、東野 ゆうき、増田 太郎、裏出 令子（京大院農・農学）
○Aya OKUDA, Motonori MATSUSAKI, Ryuta MITA, Yuki HIGASHINO, Taro MASUDA, Reiko URADE (Kyoto Univ., Division of Agronomy and Horticultural Science)

【目的】真核細胞の粗面小胞体で生合成されるタンパク質の多くは分子内あるいは分子間ジスルフィド結合を有しており、これらは立体構造の安定化に重要な役割を果たしている。真核細胞小胞体には複数の PDI ファミリーが存在し、それらの多くがジスルフィド結合形成を伴うフォールディング活性を有するが、反応には他の酵素あるいは酸化剤からのジスルフィド結合の供給が必須である。一方、クイエシンスルフヒドリルオキシダーゼ(QSOX)は単独で変性タンパク質にジスルフィド結合を形成する強力な活性を有するがフォールディング活性を有さない。本研究では、強力な *in vitro* タンパク質酸化フォールディング系の構築を目的として、植物で初めて同定したダイズ(Gm)QSOX と GmPDI ファミリーとの協同的な酸化的フォールディングを検討した。

【方法】GmPDI ファミリー及びそれらの変異タンパク質、GmQSOX、グリシニン A1aB1b の前駆体(proA1aB1b)のリコンビナントタンパク質を大腸菌発現系で大量発現させ、GST 融合タンパク質の場合はグルタチオン(GSH)セファロース、His タグ付加タンパク質の場合は Ni 樹脂を用いてアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製した。ジスルフィド結合の形成量は Ellman 法により定量した。還元変性させた RNaseA のフォールディングは、活性回復を指標に測定した。還元変性させた proA1aB1b のフォールディング反応生成物は Blue Native-PAGE により解析した。

【結果】GmQSOX と活性中心を還元した GmPDI ファミリー(GmPDIL-1, GmPDIL-2, GmPDIM, GmPDIS-1, GmPDIS-2)を還元変性させた RNaseA とインキュベーションすると、RNaseA がリフォールディングされ活性が回復した。特に GmQSOX と GmPDIL-2 の共存下で最も速やかにリフォールディングが進行し、酸化型グルタチオンでジスルフィド結合を供給した GmPDIL-2 単独系に比しても約 3 倍の速度であった。このリフォールディング反応には、GmPDIL-2 に存在する酸化還元反応を触媒する 2 つの活性中心が機能していることを、活性中心変異により明らかにした。また、GmPDIL-2 の活性中心を持たない b 及び b’ ドメインもリフォールディングに重要な役割を果たしていることを、ドメインフラグメントを用いて明らかにした。さらに、RNaseA よりも高分子で複雑な構造を有するダイズ種子貯蔵タンパク質 proA1aB1b を基質として検討したところ、GmQSOX と GmPDIL-2 の共存下で還元変性させた proA1aB1b にジスルフィド結合が形成されるとともに、3 量体と推定される複合体の形成がみられた。proA1aB1b は立体構造が形成されると 3 量体となるため、この系において proA1aB1b が酸化的フォールディングされたと考えられる。

QSOX, protein disulfide isomerase, oxidative folding

講演番号：3C04p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ C 校舎 04 会場

紅藻スサビノリにおけるフィコエリスリン結合タンパク質の探索
Screening of proteins interact with phycoerythrin in *P. yezoensis*.
○吉村 航、井村 祐己、吉村 悦郎（東大院農生科・応生化）
○Ko YOSHIMURA, Yuki IMURA, Etsuro YOSHIMURA (Univ. of Tokyo)

[背景と目的]
紅藻類に属するスサビノリ(*Porphyra yezoensis*)は、光合成色素タンパク質であるフィコビリン類を持つ。数種類のフィコビリンはフィコビリソームとよばれる巨大な複合体を形成し、光化学系Ⅱ上で集光アンテナとして機能する。藍藻において、フィコビリソームは光条件や栄養条件などにより複合体の大きさやその組成が大きく変化する。スサビノリにおいても栄養条件により、フィコビリソームの量が大きく変動することが知られているが、その生化学的な過程について多くは明らかになっていない。本研究では、スサビノリにおけるフィコビリンの生合成、維持、分解などに関わるタンパク質について調べることを目的として、フィコビリンの一種であり最も多量に含まれるフィコエリスリンと相互作用するタンパク質を探索した。
[方法と結果]
タンパク質間の相互作用を検出する方法として Far-Western Blotting(West-Western)を用いた。prey タンパク質としてスサビノリから抽出した全タンパク質を用い、IEF と SDS-PAGE の二次元電気泳動によって分離した。これを PVDF 膜に転写し、段階的に希釈した塩酸グアニジンバッファー中で変性・リフォールディング処理を行った。bait タンパク質として、スサビノリからショ糖密度勾配遠心により調製した無傷フィコビリソームを用いた。タンパク質転写後の PVDF 膜を、フィコビリソームを含むバッファー中でインキュベーションした。架橋化剤を用いて prey タンパク質と bait タンパク質の間に共有結合を形成させた。これに順次、1 次抗体であるマウス抗フィコエリスリン抗体、それに対する 2 次抗体を反応させ、化学発光により複合体のスポットを検出した。また、同様の条件で二次元電気泳動した後、銀染色したゲルから対応するスポットを切り出し、MALDI TOF/TOF によりタンパク質の同定を行った。結果、フィコエリスリンに対して結合性を有すると考えられるタンパク質のスポットが複数検出された。また、そのうちのいくつかについてタンパク質を同定した。

red algae, phycobilin, far-western blotting

講演番号：3C04p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ C 校舎 04 会場

ガジュマル由来 *cis*-prenyltransferase のクローニング及び機能解析
Cloning and functional characterization of *cis*-prenyltransferase from *Ficus microcarpa*
○増田 有紗[1]、中村 武志[2]、大谷 典正[2] ([1]山形大院理工、[2]山形大学)
○Arisa MASUDA[1], Takeshi NAKAMURA[2], Norimasa OHYA[2] ([1]Graduate school, Yamagata Univ., [2]Yamagata Univ.)

【目的】
パラゴムノキ（*Hevea brasiliensis*）由来の天然ゴムは合成ゴムと比較して総合的に優れた物性を示すこと、また植物由来の資源であるため石油資源の枯渇にも対応できることから需要が増加している。しかし、パラゴムノキの生育地域は一部の熱帯地域に集中しているため、供給不足が懸念される。パラゴムノキに並ぶ高分子量体ゴムを生産するガジュマル（*Ficus microcarpa*）は亜熱帯地域に広く分布し、代替資源として有用であるといえる。天然ゴムの主成分は *cis*-1,4-ポリイソプレンであり、その重合反応には *cis*-prenyltransferase (CPT) が関与すると推定されるが、天然ゴムの末端構造は未だに明らかにされておらず、生合成機構についても不明な点が多い。そこで本研究では代替植物としてガジュマルに着目し、新たな天然ゴム資源の獲得と生合成機構を解明することを目的として、ガジュマル由来 CPT (FmCPT) の機能解析を行った。
【方法】
ガジュマルの葉から total RNA を抽出し、cDNA を合成した。Degenerate PCR、RACE PCR を行い、既知の CPT と相同性の高い 2 種類の全長 cDNA (FmCPT1、2) を獲得した。各 FmCPT を pCold ProS2 (Takara) へ挿入し、大腸菌 BL21 を宿主として発現させて単離精製した。酵素活性測定は液体シンチレーションカウンターを用いて、[1-^{14}C] IPP モノマーの取り込み量を測定した。また CPT 欠損酵母変異株（SNH23-7D）を用いて、各 FmCPT を発現させて生育状態を観察した。
【結果】
決定した 2 種類の FmCPT アミノ酸配列を解析した結果、どちらも天然ゴムの開始基質と推測される FPP 結合部位を持ち、既知の CPT との相同性が高い配列であることを確認した。FmCPT1、2 の ORF はそれぞれ 885 bp、948 bp からなり、アミノ酸配列は互いに 20%の相同性を示した。また各 FmCPT を YEp352（ATCC）へ挿入して、CPT 欠損酵母変異株に形質転換させた後、23℃または 35℃で培養したときの生育差を観察した。CPT 欠損酵母は 35℃の培養温度下で明らかな生育遅延を示すが、各 FmCPT を欠損酵母へ導入し発現した結果、どちらも野生型酵母と同様の生育状態を示した。このことから FmCPT は *in vivo* において CPT としての機能を有していることが示唆される。

cis-prenyltransferase, Natural rubber, *Ficus microcarpa*

講演番号：3C04p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ C 校舎 04 会場

Partial purification and characterization of novel monoterpene dehydogenase from plant

○NIK ABDUL GHANI NIK RASHIDA, MAIZOM HASSAN (Inst.of Systems Biology, National Univ. of Malaysia)

Geranic acid is a monoterpene compound found in essential oil of *Polygonum minus* which is promising as potential tyrosinase inhibitor and anticancer. NAD-dependent geranial dehydrogenase is an enzyme that catalyzes the oxidation of geranial to geranic acid. The biochemical pathway of geraniol catabolism has not been well elucidated in plants. Therefore, the study on geranial dehydrogenase purification and characterization is necessary for the purpose of the use of geranic acid in pharmaceutical industry. Stable, highly active cell-free extract was obtained and the enzyme preparation was separated into two activity peaks by GigaCap Q Toyopearl 650M column chromatography at pH 7.5. Both isoenzymes were partially purified in three chromatographic steps. The enzymes showed high specificity towards citral and other allylic aldehydes.

monoterpene, isoenzymes, substrate specificity

講演番号：3C04p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ C 校舎 04 会場

Purification and characterization of farnesal dehydogenase from plant

○ KAMARULZAMAN AHMAD FARIS, MAIZOM HASSAN (INSTITUTE OF SYSTEMS BIOLOGY, UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA)

NAD^+-dependent farnesal dehydrogenase is an enzyme that catalyzes the oxidation of farnesal to farnesoic acid. The enzyme involve in biosynthetic pathway of juvenile hormone (JH). JH has attracts attention as safe and selective targets for the design and development of environmentally friendly and biorational insecticides**.** Farnesal dehydrogenase was identified and purified to homogeneity in 4 chromatographic steps from *Polygonum minus*. The purification procedures included Gigacap S-Toyopearl 650M, Gigacap Q-Toyopearl 650M, and AF Blue-Toyopearl 650M, followed by TSK Gel 3000SW Toyopearl chromatographies. The enzyme was check for substrate specificity and inhibited by higher concentration of farnesal and NAD^+.

farnesal dehydrogenase, juvenile hormone, substrate specificity

講演番号：3C04p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ C 校舎 04 会場

Substrate specificity of farnesol dehydrogenase from plant

○NOR AIN SHAHAJAR AHMAD SOHDI, MAIZOM HASSAN (INSTITUTE OF SYSTEMS BIOLOGY, UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA)

Farnesol and farnesal possess a wide range of medicinal properties such as antimicrobial, antioxidant, anticancer and chemopreventative activities. Farnesol dehydrogenase is an enzyme that catalyzes the oxidation of farnesol to farnesal. Farnesol dehydrogenase from *P. minus* leaves was extracted and purified to homogeneity by ion exchange and gel filtration chromatographies. Both NAD^+ and $NADP^+$ function as coenzymes in *P. minus* farnesol dehydrogenase reaction. The enzyme was shown to oxidize *trans, trans*-farnesol. Geometrical isomers of *trans, trans*-farnesol, *cis, trans*-farnesol and *cis, cis*-farnesol are oxidized at lower rates. Other terpene alcohols such as geraniol, nerolidol, (*S*)-perillyl alcohol cinnamyl alcohol and carveol were also dehydrogenated. Proteomic analysis using MALDI TOF TOF MS/MS revealed the appearance of oxidoreductase variant.

farnesol dehydrogenase, farnesol farnesal, substrate specificity

講演番号：3C04p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ C 校舎 04 会場

NAD kinase overexpression promotes the biosynthesis of nitrogen-rich amino acids under elevated CO_2

○ Yayoi ONDA[1], Atsuko MIYAGI[2], Kentaro TAKAHARA[3], Hirofumi UCHIMIYA[2], Maki KAWAI-YAMADA[2] ([1]Yamagata Univ., [2]Saitama Univ., [3]Tokyo Univ.)

The concentration of carbon dioxide (CO_2) in the atmosphere is projected to double by the end of the 21st century. In C_3 plants, elevated CO_2 concentrations increase photosynthesis but inhibit the assimilation of nitrate into organic nitrogen (N) compounds. Several steps of nitrate assimilation depend on the availability of ATP and sources of reducing power, such as nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH). Plastid-localized NAD kinase 2 (NADK2) plays key roles in increasing the ATP/ADP and NADP(H)/NAD(H) ratios. Here we examined the effects of *NADK2* overexpression on primary metabolism in rice (*Oryza sativa*) leaves in response to elevated CO_2, by using transgenic rice plants that continuously produced NADK2 at markedly enhanced levels. Capillary electrophoresis mass spectrometry showed that the primary metabolite profile of *NADK2*-overexpressing plants clearly differed from that of wild-type plants under ambient and elevated CO_2. In *NADK2*-overexpressing leaves, the expression of N-assimilatory genes was upregulated, and the levels of N-rich amino acids increased in response to elevated CO_2. These results suggest that overexpression of *NADK2* promotes the biosynthesis of N-rich amino acids under elevated CO_2. The genetic manipulation of *NADK2* would provide a strategy to avoid the bottleneck of N assimilation under elevated CO_2 conditions.

NAD kinase, Nitrogen assimilation, Primary metabolite

講演番号：3C04p23
講演日時、会場：3 月 29 日 17:59～ C 校舎 04 会場

ウリ科植物の根における脂溶性物質結合タンパク質の局在性

Localization analysis of binding proteins to hydrophobic compounds in root tissues of *Cucurbita pepo*

○吉原 亮平[1]、後藤 純弥[2]、岩渕 彩[3]、池田 健一[2]、井上 加奈子[2]、乾 秀之[1,2] ([1]神戸大遺伝子、[2]神戸大院農、[3]神戸大農)
○Ryouhei YOSHIHARA[1], Junya GOTO[2], Aya IWABUCHI[3], Kenichi IKEDA[2], Kanako INOUE[2], Hideyuki INUI[1,2] ([1]Res. Ctr. Environ. Genomics Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Sci. Kobe Univ., [3]Fac. Agric. Kobe Univ.)

【目的】

脂溶性汚染物質であるダイオキシン類は、難分解性で環境中に蓄積し、食物連鎖により生物濃縮されやすいことが知られている。特に広範囲にわたるダイオキシン類による土壌汚染は問題視されており、効率的かつ低コストで除染可能な技術が求められている。近年、植物による環境浄化法であるファイトレメディエーションが注目されている。中でもウリ科植物は、高い脂溶性汚染物質蓄積能を有しており、ファイトレメディエーションに有効な植物として有望視されている。これまでの研究で、ウリ科植物である *Cucurbita pepo*（ペポカボチャ）は、他の植物種と比べて特に高い脂溶性物質蓄積能を持ち、Major latex-like protein (MLP)の GR3 タイプが脂溶性物質の蓄積に重要であることが示された。そこで、MLP による脂溶性物質蓄積メカニズムをさらに詳細に明らかにするために、MLP の機能解析を行った。

【方法】

脂溶性汚染物質の高蓄積 *C. pepo* 品種（Magda：MG）と低蓄積品種（Peter Pan：PP）の根および導管液 MLP-GR3 の蓄積量をウエスタンブロット分析により比較し、高蓄積および低蓄積品種間での違いを評価した。さらに、根における MLP-GR3 の組織局在を免疫組織化学的手法により検出し、高蓄積および低蓄積品種間で比較を行った。

【結果】

脂溶性物質高蓄積品種 MG と低蓄積品種 PP における、根および導管液タンパク質のウエスタンブロット分析から、MLP-GR3 は、根において MG と PP ともに検出されたが、導管液では MG のみで検出された。このことから、MG では MLP-GR3 が導管液中に分泌されていることが示された。さらに MLP-GR3 の根組織における局在解析から、PP において MLP-GR3 は、特定の組織に局在するのに対して、MG では明確な局在は見られなかった。これらのことから、高蓄積品種 MG の MLP-GR3 は、移動性があり脂溶性物質と結合し、導管に分泌され地上部へ移行するが、低蓄積品種 PP の MLP-GR3 は、特定の組織からほとんど移動しないため、脂溶性物質の地上部での蓄積量が低いと考えられた。

C. pepo, MLP, phytoremediation

講演番号：3C05a01
講演日時、会場：3 月 29 日 09:00～ C 校舎 05 会場

ダイジョ（*Dioscorea alata L.*）の葉における色素変異
Somaclonal variation of anthocyanin biosynthesis in leafs of *Dioscorea alata* L.
○飯島 健[1]、上村 昴大[1]、バビル パチャキル[2]、川原 玲香[4]、野口 治子[1]、内野 昌孝[1]、児玉 浩明[3]、高野 克己[1]（[1]東京農大応生・化学、[2]独立行政法人 国際農林水産業研究センター、[3]千葉大学、[4]東京農業大学生物資源ゲノム解析センター）
○Ken IIJIMA[1], Takahiro UEMURA[1], P.K. Babil[2], Ryouka KAWAHARA[4], Haruko NOGUCHI[1], Masataka UCHINO[1], Hiroaki KODAMA[3], Katsumi TAKANO[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Biosci. Tokyo Univ. Agric., [2]JIRCAS, [3]Chiba Univ., [4]NGRC, Tokyo Univ. Agr.)

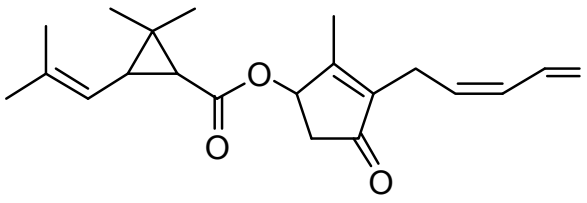
［目的］
ダイジョ（*Dioscorea alata* L.）は雌雄異株植物で開花結実がまれであるため、塊茎分割により栄養繁殖される。しかし、クローン増殖が行われているにもかかわらず、種内には多様な遺伝的変異が観察され、アントシアニンによるとみられる色素発現が高まる変異が繰り返し出現した。これまでに、次世代シーケンサーを用いてアントシアニン色素合成にかかわる酵素群の mRNA 発現量を比較し、ANS の発現が抑制されていることを見出した。本研究では、色素発現と、mRNA の発現量を評価するため、各試験に用いるサンプルを同時に採取し、mRNA 発現量および ANS の構造解析、クロロフィルおよびアントシアニンの発現量を調査した。
［材料および方法］
温室で栽培された緑色、赤紫色植物体それぞれ 5 個体から、色素発現の差が著しい幼葉を採取し各試験に用いた。DMF 溶液に浸漬しクロロフィルを抽出した。分光光度計を用いて、クロロフィル a（663.8nm）、クロロフィル b（646.8nm）を測定し、その合計値からクロロフィル量を算出した。アントシアニンは、１％塩酸-メタノール溶液に浸漬し抽出した。その後、分光光度計（530.4nm）にて測定しアントシアニン量を算出した。リアルタイム PCR は色素抽出と同時に葉を採取し、RNA を抽出し、各酵素群および Actin のプライマーを設計し発現量の解析を行った。
［結果および考察］
アントシアニンは赤色の葉で著しく発現していたが、クロロフィルの量は、赤、緑の葉を比較すると有意な差はみられなかった。これまでの結果からも、HPLC による分析では緑色の葉におけるアントシアニンは検出限界以下であり、赤色の葉では（蓄積量：159μg/g FW）であり本結果と符合した。リアルタイム PCR の結果は、次世代シーケンサーの結果と相対的に概ね同様の結果となった。これらの結果と、これまでのフラボノールの分析結果から、ケンフェロールおよびケルセチンが赤、緑ともに合成されていることから、CHS から DFR までのアントシアニン合成経路の構造遺伝子の発現には大きな変化が無く、ロイコアントシアニジンまでは合成されていると考えられ、色素発現の変異は ANS の発現が抑制されていることに起因し、トランスポゾン、あるいは ANS の発現を制御する転写因子に変異があると示唆された。

vegetative propagation, anthocyanin biosynthesis, somaclonal variation

講演番号：3C05a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ C 校舎 05 会場

除虫菊の分化状態とピレスリン生合成
Differentiation state of *Tanacetum cinerariifolium* and pyrethrin biosynthesis
○阪森 宏治[1]、安達 元希[2]、古谷 章悟[1]、畑中 顯和[3]、松田 一彦[1] ([1]近畿大院・農・応生化、[2]近畿大・農・応生化、[3]山口大学)
○Koji Sakamori[1], Motoki Adachi[2], Shogo Furutani[1], Akikazu Hatanaka[3], Kazuhiko Matsuda[1] ([1]Graduate school,Kinki Univ., [2]Kinki Univ., [3]Yamaguchi Univ.)

［目的］シロバナムシヨケギク(*Tanacetum cinerariifolium*；以下除虫菊と記す)は殺虫活性を示すピレスリンを生合成し、花部に蓄積する。ピレスリン類は、蚊に対して優れた即効性を示すが、温血動物に対する毒性や環境中での残留性は低い。しかし、除虫菊の生産は気温、日照、降雨などの気象の影響を受けやく、播種から花を収穫するまで、2 年の歳月を要する。このような問題を克服するためには、除虫菊でのピレスリン生合成のしくみを理解し、論理的にピレスリンの生産性を向上させることが必要である。このことを念頭に置いて、今回われわれは除虫菊の組織培養技術を確立するとともに、組織の分化状態とピレスリン生合成との関係について検討したので報告する。



Pyrethrin I

[方法] 除虫菊から採取された種子を滅菌し、無菌条件で除虫菊の幼苗を栽培した。本幼苗の葉から調製した切片を特定の濃度の植物ホルモンを添加した MS 培地で培養し、カルス化を誘導した。さらに、カルス化した組織の一部については、適宜植物ホルモン量を変化させることで再分化も試みた。分化および脱分化状態にある除虫菊組織のピレスリン含量は HPLC で測定した。また、当該組織におけるピレスリン生合成関連遺伝子の発現は、realtime PCR により定量した。

［結果と考察］MS 培地のオーキシンとサイトカイニンの濃度を適宜調節することで、無菌栽培した除虫菊幼苗の葉から安定してカルスを得た。さらに、培地中のホルモン濃度を特定の濃度まで下げることで、一端カルス化した組織から除虫菊を再分化させることも可能となった。ピレスリン生産能の有無を HPLC で調べた結果、分化した除虫菊葉部では 6 種の天然ピレスリン類がすべて検出された。しかし、脱分化状態のカルスではピレスリンの生合成が顕著に抑制されていた。その原因を明らかにするため、ピレスリン生合成に寄与する遺伝子群の発現を調べた。ピレスリン生合成の最終ステップは GDSL リパーゼの一種である TcGLIP が触媒する。本遺伝子については、カルス化することで変動するものの、有意に発現が認められた。しかし、ピレスリンの酸部である菊酸の生合成に寄与する遺伝子群については、カルス化することでその発現量が有意に低下した。このことから、カルス化した除虫菊の組織においてピレスリン生合成量が顕著に低下する原因の一つは、ピレスリンの酸部の生合成能の低下にあることが示唆された。

Pyrethrin, *Tanacetum cinerariifolium*, biosynthesis

講演番号：3C05a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ C 校舎 05 会場

遺伝子組換えアスタキサンチン高産生レタスのメタボローム解析

Metabolome analysis of transplastomic lettuce (*Lactuca sativa*) dominantly producing astaxanthin

○佐々木 貴子[1]、小川 拓水[1]、岡澤 敦司[1]、三沢 典彦[2]、太田 大策[1] ([1]阪府大院　生命環境、[2]石川県大　生資研)
○takako sasaki[1], takumi ogawa[1], athushi okazawa[1], norihiko misawa[2], daisaku ohta[1] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ. Res. Inst. Biores. Biotech.)

【背景と目的】

外来遺伝子の導入により代謝経路を改変した遺伝子組換え作物が普及しつつあるが，それらの遺伝子改変が既存の代謝経路に及ぼす影響に関する知見は限定されている．今回我々は，海洋微生物由来の 3 遺伝子 (*crtW*; β-carotene ketolase, *crtZ*; β-carotene hydroxylase, *idi*; isopentenyl pyrophosphate-isomerase) を導入することでアスタキサンチン生合成経路が付与されたレタスにおいて，この遺伝子改変が既存の中心代謝経路に及ぼす影響を調べることを目的として，LC-MS を用いたメタボローム解析を行った．

【材料と方法】

供試植物として，2012 年と 2013 年に栽培した遺伝子組換え (GM) および非組換え (non-GM) レタスを用いた．GM および non-GM レタスそれぞれの可食部の凍結乾燥粉末から 80% メタノール抽出液を調整し，LC-iontrapTOF/MS による質量分析（標準品分析データをもとにして 94 種類の代謝物の同定・定量が可能）に供した．

【結果と考察】

同定した 52 種類の化合物の分析データに基づく主成分分析の結果，第一主成分（寄与率 53 %）は栽培時期の違いを反映し，第二主成分（寄与率 25.9 %）は遺伝子型の違いを反映した．つまり栽培時期の違いの方が，遺伝子導入の有無よりも代謝物の蓄積プロファイルに与える影響が大きいことが分かった．次に，GM および non-GM レタスの蓄積代謝物の比較解析を実施した．2012 年産の試料では同定できた 48 種類の代謝物のうち 17 種類，2013 年産の試料では 45 種類の代謝物のうち 19 種類の蓄積量に GM と non-GM レタスの間で有意な差が認められた．異なる栽培時期で共通して差が見られたのは 8 種類の代謝物であり，そのうち 5 種類は核酸代謝物であった．

この結果から，GM レタスの核酸代謝が何らかの影響を受けた可能性が示唆された．GM レタスにおける核酸の蓄積量が他の異なる品種を含む non-GM レタスの蓄積量と比べどの程度の蓄積量なのか把握することを目的として，複数の市販レタスを上記の分析系に供試し，non-GM レタスにおける核酸代謝物蓄積量の変動レベルを把握した．

講演番号：3C05a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ C 校舎 05 会場

培養地衣菌の二次代謝に対するガンマ線照射の影響

Influences of gamma ray irradiation on secondary metabolisms in cultured mycobionts of lichens

○小林 優維[1]、古田 雅一[2]、原 光二郎[1]、小峰 正史[1]、山本 好和[1] ([1]秋田県立大学大学院、[2]大阪府立大学)
○Yui KOBAYASHI[1], Masakazu FURUTA[2], Koujirou HARA[1], Masashi KOMINE[1], Yoshikazu YAMAMOTO[1] ([1]Akita Prfectural Univ., [2]Osaka Prefecture Univ.)

【背景と目的】

地衣類は菌類と藻類の共生生物で、特有の二次代謝産物を産生する。この成分は、多様な生物活性を持っており、古くから医薬品や化粧品などに利用されてきた。ガンマ線は放射線の一種であり、放射性物質から放出される電磁波である。強い透過力を持ち、DNA に損傷を与える。

本研究では分離培養した地衣菌に、ガンマ線を照射することで二次代謝を変化させ、新規成分の生合成や成分の増産する菌株を獲得することを目的とし、地衣菌の二次代謝に及ぼす放射線の影響について検討した。

【方法】

実験には、研究室で継代培養している培養地衣菌の中からランダムに選抜した 40 種を用いた。照射実験の一週間前に 0～8 kGy の 4 段階の照射条件を設定し、各条件に対し 3 個のサンプルを用意した。サンプルは、麦芽酵母エキス（MY）培地を分注した 60 mm シャーレに約 50 mg 秤量した地衣菌を移し、4 分割後、これらが等間隔になるように植え付けた。サンプルを照射施設でコバルト-60 ガンマ線を照射した後、20℃の環境下で培養した。4 週間後、地衣菌のおよそ半量を一昼夜凍結乾燥し、乾物をアセトンで一晩抽出した。抽出後、フォトダイオードアレイ付き高速液体クロマトグラフィー（PDA-HPLC） 島津製作所製 HPLC 10A-DP、カラム YMC-Pack ODS-A、流出溶媒 MeOH：H_2O：H_3PO_4=80：20：1、流量 1 ml/min、カラム温度 40℃、フォトダイオードアレイ検出器（180～700 nm）で分析した。解析は、標品ライブラリとの UV スペクトル、保持時間の比較により行った。

【結果と考察】

各成分について、照射したものと未照射のものの含有量を比較し、照射量に伴う変化を増加・減少・変化なしの 3 つに分類したところ、それぞれ 41.3 %、42.8 %、16.8 %であった。減少したものは、細胞の死滅や DNA の損傷によって成分が産生されなくなったものだと考えられる。増加したものは、放射線によって DNA が変異し二次代謝に影響した可能性が考えられる。また、同じ菌体でも減少したものと変化のなかったものがあり、成分によって含有量の変化が異なることがわかった。

lichen, gamma ray, secondary metabolism

講演番号：3C05a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ C 校舎 05 会場

Arabidopsis Response regulator 14 の転写活性化機構の解析

Transcriptional regulation mechanism of Arabidopsis Response Regulator 14

○高林 佑輔[1]、萬年 一斗[1]、橋川 博一[1]、高橋 征司[1]、本橋 令子[2]、古山 種俊[3]、中山 亨[1]([1]東北大院工、[2]静岡大院農、[3]東北大多元研)
○ Yusuke Takabayashi[1], Kazuto Mannen[1], Hirokazu Hashikawa[1], Seiji Takahashi[1], Reiko Motohashi[2], Tanetoshi Koyama[3], Toru Nakayama[1] ([1]Grad. Sch. of Eng., Univ. of Tohoku, [2]Grad. Sch. of Agri., Univ. of Shizuoka, [3]IMRAM., Univ. of Tohoku)

【目的・背景】イソプレノイドは，炭素数 5 のイソペンテニルニリン酸（IPP）およびその重合体を基本骨格として生合成される．植物由来のイソプレノイドには有用な化合物が多く，その生産性の向上が求められてきた．私たちは植物におけるイソプレノイド代謝制御機構の解明とそれを応用した代謝工学を目的として，IPP 生合成を包括的に制御する転写因子の探索を行い，色素体内 IPP 生合成経路である 2-*C*-メチル-D-エリスリトール 4-リン酸（MEP）経路の酵素遺伝子群の発現を包括的に制御しうる転写因子として，Type-B の Arabidopsis Response Regulator（ARR）ファミリーの転写因子 ARR14 を選抜した．Type-B の ARR はレシーバードメイン，Myb 様転写活性化ドメインから構成されており，レシーバードメインの保存された Asp 残基が二成分制御系を介したリン酸基転移を受けることで活性化されることが知られているが，その詳細な機構は不明な点が多い．特に ARR14 はホモ変異体が単離されていないため，その生理機能も明らかになっていない．
【方法・結果】MEP 経路の酵素遺伝子が二成分制御系を介した制御を受けているかを調べるために，ARR14 のレシーバードメインの部分欠損変異体シリーズ，およびリン酸基受容アミノ酸を置換した部位特異的変異体（D63A）を作製し T87 培養細胞で過剰発現させた．その結果，D63A 変異体の過剰発現体で MEP 酵素遺伝子群に対する転写活性化効果がさらに顕著になり，ARR14 のリン酸化非依存的な制御機構の存在が示唆された．それぞれの過剰発現体におけるマイクロアレイ解析，定量 RT-PCR における発現パターン解析の結果，花器官の発生に関与する遺伝子群も Asp リン酸化非依存的に制御されていると考えられた．これらの結果と，MEP 酵素や色素体内イソプレノイド代謝経路の酵素遺伝子群の発現が光に応答するという知見から，ARR14 は光応答のシグナル伝達経路を介して活性化され，イソプレノイド代謝や花器官形成を調節していることが想定された．そこで，Interactome 解析により示されていた ARR14 に相互作用するタンパク質群のなかでも，特に ARR14 機能制御への寄与が想定されるタンパク質と ARR14 の相互作用解析を酵母ツーハイブリッド法によって行い，ARR14 が避陰反応に関与する AtHB2 と相互作用することを明らかにした．*AtHB2* は PIF5 によって転写制御を受けることが知られているが，当研究室の過去の研究で，PIF5 も MEP 酵素遺伝子群の発現を正に制御することが示されているため，ARR14 は AtHB2 との相互作用で活性化し，下流の遺伝子の転写を調節すると考えている．現在 ARR14 のターゲット配列の解析，ターゲット候補遺伝子のプロモーター解析，ARR14 変異体を過剰発現させた植物の表現型解析を行っており，その結果についても報告する．

Arabidopsis Response Regulator, Isoprenoid, MEP pathway

講演番号：3C05a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ C 校舎 05 会場

微生物を用いた sanguinarine 生合成経路の再構築

Reconstruction of the sanguinarine biosynthetic pathway in microorganisms

○堀 健太郎、岡野 峻祐、佐藤 文彦（京大院・生命）
○Kentaro Hori, Syunsuke Okano, Fumihiko Sato (Kyoto Univ.)

高等植物は様々な二次代謝産物を産生し、中でもアルカロイドと呼ばれる含窒素塩基性化合物の一群は、強力な活性を示すことから医薬品の原料として広く利用されてきた。そして近年では、一部の植物体が持つアルカロイド生合成経路を微生物体内に再構築し、有用アルカロイドを大量生産する手法の開発が進んでいる。実際に、イソキノリンアルカロイドの共通中間体であるレチクリンなど、複数のアルカロイドに関して、大腸菌あるいは酵母菌を用いた生産が報告されている。

ケシ科のハナビシソウが産生するサンギナリンは、レチクリンを前駆体とするベンゾフェナンスリジンアルカロイドの一種であり、現在までに全ての生合成酵素遺伝子が単離・同定されている。本研究では、レチクリン以降のサンギナリン生合成酵素である 4 種の P450 (CYP719A5, CYP719A2/A3, MSH, P6H)、2 種の小胞体局在酵素 (BBE, DBOX)、1 種の N-メチル化酵素および P450 還元酵素を酵母菌体で同時発現することにより、多様なアルカロイド生産システムおよび膜酵素多重発現系の確立を目指している。

これまでに、発現宿主としてメタノール資化性酵母のゲノムへの挿入系を用い、BBE/CYP719A5/CYP719A2/*Ec*CPR の 4 遺伝子同時形質転換が可能であることを確認した。同菌体を用いた酵素アッセイの結果、現時点では導入コピー数の多い CYP719A5 活性のみの検出にとどまっているが、さらにコピー数の多い形質転換菌株の作出を行い、多重酵素活性の検出を試みている。一方、SNMT/MSH/P6H の同時形質転換酵母の作出にも成功しており、tetrahydtoberberine を基質とした in vivo での酵素アッセイの結果、dihydrochelerythrine と推定される化合物を検出し、同一菌体における 3 反応の進行が示唆された。また、形質転換酵母を用いた反応系において、P450 活性に還元酵素の同時発現が不要であることを示唆する結果も得られており、P450 還元酵素の有無による活性の変化についても解析を進めている。さらに、複数の形質転換酵母を組み合わせた酵素アッセイや、より多種類の酵素遺伝子の同時形質転換も検討しており、上記の結果と合わせて報告する。

Cytochrome P450, plant isoquinoline alkaloids, microbial production

講演番号：3C05a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ C 校舎 05 会場

ハナビシソウ形質転換培養細胞を用いた CjbHLH1 ホモログ、EcbHLH1 の機能解析

Functional analysis of CjbHLH1 homolog, EcbHLH1, in transgenic California poppy cells.

○山田 泰之、本村 幸也、佐藤 文彦（京大院生命科学）
○Yasuyuki YAMADA, Yukiya MOTOMURA, Fumihiko SATO (Kyoto Univ.)

高等植物が生産する多様な二次代謝産物の中でも強い生理活性を有するアルカロイドは、生産する植物種が限定されているために、発現制御に関する知見がより普遍的に存在するフェニルプロパノイド生合成系と比べると少ない。

当研究室では、キンポウゲ科のオウレン（*Coptis japonica*）が産生するイソキノリンアルカロイド（IQA)、ベルベリンの生合成系をモデルに研究が進められ、ほぼ全ての生合成酵素遺伝子、ならびにその発現制御に関わる 2 種類の転写制御因子、*CjWRKY1*, *CjbHLH1* が単離・同定されている。

特に、CjbHLH1 には、IQA 産生植物種の EST 中に相同性の高いホモログが見出される一方、シロイヌナズナ等の IQA 非産生植物種にはホモログが存在せず、IQA 産生植物種に特徴的な bHLH 型転写因子であると考えられた。しかし、オウレン以外の植物種に存在する CjbHLH1 ホモログが、CjbHLH1 と同様に IQA 生合成系の発現制御に関わるかどうかは未だ確かめられていない。

本研究では、オウレンと一部共通の生合成経路を有し、安定形質転換体の作出が比較的容易なハナビシソウ（*Eschscholzia californica*）を用い、ハナビシソウ CjbHLH1 ホモログによる IQA 生合成系の発現制御を解析した。

まず、ハナビシソウから 2 種類の *CjbHLH1* ホモログ（*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2*）遺伝子を単離し、核局在性や、メチルジャスモン酸(MeJA)応答性等の解析から両者が冗長的に機能していると推察した。一方、植物体における両遺伝子の組織別発現解析から、両遺伝子の発現プロファイルが異なり、両転写因子が異なる組織で機能していることが示唆された。さらに、37 bp の短い配列を標的とした RNAi 法により両遺伝子を単独、あるいは同時に発現抑制した培養細胞株を作出したところ、これらの発現抑制株において、ハナビシソウ IQA の主成分であるサンギナリンの複数の生合成酵素遺伝子の発現抑制と、サンギナリン蓄積量の減少を確認した。以上の結果から、CjbHLH1 のホモログである EcbHLH1 が、ハナビシソウのサンギナリン生合成系においても発現制御に関わると結論付けた。

isoquinoline alkaloid, basic helix-loop-helix protein, *Eschscholzia californica* (California poppy)

講演番号：3C05a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ C 校舎 05 会場

ソバ由来の *C*配糖化酵素遺伝子を発現させた大腸菌によるフラボノイド *C*配糖体の生産

Production of flavonoid-*C*-glucosides by *Escherichia coli* expressing *C*-glucosyltransferases from *Fagopyrum esculentum*

○伊藤 崇充、臼井 栞理、古謝 詠喜、藤本 俊介、水藤 史明、長友 仁寿、田口 悟朗（信州大・繊維）
○Takamitsu ITO, Shiori USUI, Eiki KOJA, Shunsuke FUJIMOTO, Fumiaki SUITO, Yoshihisa NAGATOMO, Goro TAGUCHI (Shinshu Univ.)

【研究背景】

植物において、その生産するフラボノイドは、通常、配糖化を受けて蓄積される。フラボノイド配糖体は、主に糖が酸素原子を介して結合した *O*-配糖体であるが、糖のアノメリック炭素がフラボノイドの芳香環に直接共有結合した *C*配糖体も広く存在する。*C*配糖体は、その特徴的な結合様式のため、グルコシダーゼや酸による加水分解を受けないといった特徴を持つ。さらに、フラボノイド *C* 配糖体には、抗酸化作用や抗腫瘍作用など、生理活性を示すものも多いため、それら配糖体の合成を目指したさまざまな取り組みが行われている。

これまでに我々は、ソバ（*Fagopyrum esculentum*）子葉よりフラボノイド *C* 配糖体であるビテキシンの生合成に関わる *C*配糖化酵素遺伝子(FeCGTa)を単離した。異種宿主発現させた FeCGTa の組換えタンパク質は、様々な基質に対する *C* グルコシル化活性を示した。そこで本研究では、FeCGTa の基質特異性を活かして、大腸菌の異種宿主発現系を用いた簡便な *C*配糖体生産法を確立することを目的とした。

【方法】

FeCGTa を pET28a(+)に導入したプラスミドで大腸菌 Rosetta2(DE3)を形質転換した。得られた組換え大腸菌を LB 培地で培養し、IPTG を添加して 22℃でタンパク質発現誘導を行った。この大腸菌を集菌し、M9 培地に再懸濁した。組換え FeCGTa 酵素が *C* グルコシル化活性を示した 2-ヒドロキシフラバノン類やその類縁化合物を基質としてそれぞれ加え、30℃で培養し、その後、培地上清を分析した。

【結果・考察】

FeCGTa を発現させた大腸菌に 2-ヒドロキシピノセンブリンを投与して培養したところ、培地上清中にその *C* グルコシドが蓄積した。この系に FeCGTa 酵素が反応する基質を投与した場合、そのいずれでも、*C* グルコシドが培地上清中に検出された。現在、培地の組成による *C*配糖体の生産効率の改善や、基質の繰り返し投与などを試みており、その結果と合わせて報告したい。

C-glucosylation, flavonoid-*C*-glucosides, *Fagopyrum esculentum*

講演番号：3C05a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ C 校舎 05 会場

トウガラシ果実由来のバニリルアルコール、バニリン酸産生菌の単離
Isolation of bacteria that produce vanillyl alcohol and vanillic acid from *Capsicum* fruits
○久原 崇史、丸山 将明、土佐 菜摘、古旗 賢二、中谷 祥恵、和田 政裕（城西大院薬）
○ Takafumi KUHARA, Masaaki MARUYAMA, Natsumi TOSA, Kenji KOBATA, Sachie NAKATANI, Masahiro WADA (Josai Univ.)

【目的】
バニリルアルコールはフェニルプロパノイド経路に由来する芳香族化合物で、抗菌作用、血管新生抑制効果などが報告されている。今回我々は、トウガラシの果実からバニリルアルコールとバニリン酸を産生する菌を見出したので報告する。
【方法】
新鮮なトウガラシの果実表面を次亜塩素酸塩とメタノールで殺菌した。無菌条件下で果実内の胎座を摘出し、標準寒天培地またはサブロー寒天培地の表面に接触させた。培地を 25℃でインキュベートして、発現したコロニーをさらに分離・培養した。単離した菌にバニリン溶液を添加し、25℃でインキュベートした。経時的にバニリルアルコールとバニリン酸生成量を HPLC-蛍光で測定した。
【結果】
標準培地において複数種のコロニーの発現を確認し、コロニーの色と形状から主に 4 種の菌を分離した。単離した菌はいずれもバニリンをバニリルアルコールとバニリン酸に代謝したが、バニリルアルコールへ優位に代謝する菌は 1 種のみで 3 種はバニリン酸へ優位に代謝する菌であった。
【考察】
トウガラシの果実内に含まれる芳香族化合物の代謝にはある種の菌が関与している可能性が示唆された。

vanillyl alcohol, *Capsicum* fruits, bacteria

講演番号：3C05a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ C 校舎 05 会場

シロイヌナズナにおけるフェノール性異物の配糖化およびその排出現象の解析
Analysis of the glucosylation and export system of phenolics in *Arabidopsis thaliana*
○渡邉 貴史、丸山 佳紀、田口 悟朗（信州大・繊維）
○Takashi WATANABE, Yoshinori MARUYAMA, Goro TAGUCHI (Shinshu Univ.)

【背景・目的】植物は外来性の異物に対して防御機構を備えており、配糖化はその代表的な一つである。モデル植物として知られるシロイヌナズナに、低分子フェノール性化合物である 2-ナフトールを投与すると体内で配糖化修飾を受け解毒代謝される。これまでの研究で、これらの配糖体はマロニル化酵素 PMaT1 によってさらなるマロニル化を受け液胞へ輸送されるが、生成した配糖体の一部が細胞外に排出されるという現象が確認された。配糖体の排出に関わる輸送体として ABC トランスポーターや MATE トランスポーターが候補として考えられるが、その詳細は明らかになっていない。本研究では、外来異物である 2-ナフトールの配糖化に関わる酵素ならびに細胞外への排出に関わるトランスポーターの解明を目的とした。
【方法】ジクロロフェノールなどのフェノール性異物への配糖化が報告されているシロイヌナズナの配糖化酵素遺伝子 *UGT72B1* の破壊株、およびシロイヌナズナの根で高発現している種々のトランスポーター遺伝子破壊株を入手し、発芽後 3 週間ほど栽培した遺伝子破壊株の幼植物に対して 2-ナフトールの投与を行い、24 時間後に培地を回収し成分中に含まれる配糖体の割合を HPLC で解析した。また植物体をメタノールで抽出し 2-ナフトールグルコシドならびに 2-ナフトールマロニルグルコシドの蓄積量を調査した。
【結果】*UGT72B1* 遺伝子破壊株に、2-ナフトールを投与したところ、野生株で観察された培地中への配糖体の放出が確認されなかった。大腸菌で発現させた UGT72B1 は、2-ナフトールに対する配糖化活性を示したことから UGT72B1 がシロイヌナズナにおけるナフトールの代謝に関与することが示唆された。一方、MATE トランスポーターの遺伝子破壊株への 2-ナフトール投与実験において ROOT HAIR SPECIFIC 2(RHS2)として知られる *At1g12950* 遺伝子破壊株で野生株と比べて配糖体の排出量の減少を確認した。現在、マロニル化酵素 PMAT1 遺伝子の破壊株において *UGT72B1* ならびに RHS2 の発現を抑制した株の作出を行っている。

Arabidopsis thaliana, metabolism of xenobiotics, export of phenolic-glucosides

講演番号：3C05a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ C 校舎 05 会場

シロイヌナズナ GDP-D-Mannose 加水分解酵素（AtNUDX9）の機能解析
Functional analysis of Arabidopsis GDP-D-Mannose pyrophosphohydrolase (AtNUDX9)

○田中 裕之[1]、吉村 和也[2]、小川 貴久[3]、田部 記章[3]、丸田 隆典[4]、田茂井 政宏[1,3]、重岡 成[1,3]（[1]近畿大院・農・バイオ、[2]中部大・応生・食栄、[3]近畿大・農・バイオ、[4]島根大・生資科・生命工）
○Hiroyuki Tanaka[1], Kazuya Yoshimura[2], Takahisa Ogawa[3], Noriaki Tanabe[3], Takanori Maruta[4], masahiro tamoi[1,3], shigeru shigeoka[1,3] ([1]Dept. Adv. Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [3]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [4]Dept. Life Sci. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.)

高等植物において、GDP-D-mannose（GDP-D-Man）はアスコルビン酸（AsA：ビタミン C）生合成の主要な代謝中間体であるほか、タンパク質の N-結合型糖鎖や細胞壁多糖のドナーとして必須の糖ヌクレオチドである。このことから、細胞内 GDP-D-Man レベルの制御はそれらの経路への炭素分配を決定する上で重要であると考えられる。これまでに我々は、シロイヌナズナのヌクレオシド-2 リン酸類縁体加水分解酵素（Nudix hydrolase : AtNUDX）ファミリーには多様な糖ヌクレオチドや酸化ヌクレオチド、NADH、FAD などに対して特異的な加水分解活性を有するものが存在し、それらのレベル制御を介して様々な代謝や細胞応答に関与することを明らかにしてきた。興味深いことに、AtNUDX の中で、細胞質局在型 AtNUDX9 は GDP-D-Man 特異的活性（GDP-D-Man + H_2O → GMP + mannose- 1 リン酸）を有していた。そこで本研究では、AtNUDX9 の GDP-D-Man 代謝への関与について酵素学的および分子遺伝学的な解析を試みた。

シロイヌナズナから *AtNUDX9* cDNA を単離し、pCold Ⅱベクターおよび大腸菌 BL21 STAR 株を用いて His-Tag 融合リコンビナントタンパク質を精製した。HPLC を用いて AtNUDX9 リコンビナント酵素の GDP-D-Man 加水分解活性を測定した結果、V_{max}: 1.6 ±0.15 μmol/min/mg protein、K_m: 376± 24 μM であった。Western blot 解析により、通常条件で生育したシロイヌナズナ野生株において AtNUDX9 タンパク質の発現を確認した。DIONEX IC-3000 system （HPLC-ECD）を用いて植物粗抽出液中の GDP-D-Man 特異的 mannnose-1 生成活性を測定した結果、AtNUDX9 遺伝子破壊株の同活性は野生株の約 25%であった。以上の結果から、AtNUDX9 はシロイヌナズナ生体内で発現し、GDP-D-Man の加水分解に機能することが示唆された。

ところで、GDP-D-Man 関連代謝系は日周変動や環境ストレスなどの外部環境の変化に応答性を示すことが知られている。そこで、種々の条件下における *AtNUDX9* の発現をリアルタイム RT-PCR により解析した。その結果、*AtNUDX9* の発現は強光や高温処理などにより誘導された。現在、AtNUDX9 遺伝子破壊株および過剰発現株を用いて、種々の条件下における GDP-D-Man 代謝への影響について解析している。

Nudix hydrolase, GDP-D-Mannose, arabidopsis

講演番号：3C05a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ C 校舎 05 会場

ジャガイモの有毒ソラニン生合成に関わる新規ジオキシゲナーゼの機能解析
Characterization of a novel dioxygenase involved in solanine biosynthesis in potato

○中安 大[1]、梅基 直行[2]、大山 清[3,4]、渡辺 文太[5]、村中 俊哉[4,6]、斉藤 和季[4,7]、杉本 幸裕[1]、水谷 正治[1] ([1]神戸大院・農、[2]キリン・基盤研、[3]東工大院・理工、[4]理研 CSRS、[5]京大・化研、[6]大阪大院・工、[7]千葉大院・薬)
○ Masaru NAKAYASU[1], Naoyuki UMEMOTO[2], Kiyoshi OHYAMA[3,4], Bunta WATANABE[5], Toshiya MURANAKA[4,6], Kazuki SAITO[4,7], Yukihiro SUGIMOTO[1], Masaharu MIZUTANI[1] ([1]Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, [2]Central Laboratories for Key Technology, Kirin Co., Ltd., [3]Department of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology, [4]RIKEN Center for Sustainable Resource Science, [5]Institute for Chemical Research, Kyoto University, [6]Graduate School of Engineering, Osaka University, [7]Graduate School of Pharmaceutical Science, Chiba University)

【背景および目的】
ナス科植物であるジャガイモやトマトにはそれぞれα-ソラニンやα-トマチンといった分子内に窒素原子を持つステロイドグリコアルカロイド (SGA) が多く含まれている。SGA はコレステロールを前駆物質とし、C-16, 22, 26 位の酸化、C-26 位のアミノ化、E, F 環形成、C-3 位の配糖化を経て生合成されると推定されている。しかし、生合成遺伝子および反応経路はいくつかの糖転移酵素を除いてほとんど明らかとなっていない。本研究では、SGA 生合成を分子レベルで明らかにすることを目的とした。
【結果および考察】
トマトおよびジャガイモの EST データベース上で SGA 内生量が高い組織で発現していることを指標にして、コレステロールを酸化する候補遺伝子として 2 種の P450 遺伝子と 1 種の 2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ遺伝子を選抜し、それぞれ *SGA1*, *SGA2, 2OGD1* と名付けた。我々は先行研究において、SGA1, SGA2 の In vivo および In vitro での活性を評価した結果、SGA1 はコレステロール C-26 水酸化を、SGA2 は C-22 水酸化を触媒することを明らかとした。次に、トマトおよびジャガイモのゲノムに着目したところ、*SGA2* の近傍に *2OGD1* が位置しており、*2OGD1* は SGA 内生量が高い組織で *SGA1* および *SGA2* と共発現していた。そこで、*2OGD1* を RNAi によりノックダウンさせた形質転換体を作製し分析した結果、SGA 内生量が顕著に減少し、22, 26-ジヒドロキシコレステロールが蓄積していることを見出した。次に、大腸菌発現系を用いて 2OGD1 組換えタンパク質を作製し活性を評価した結果、(22*S*)22-ヒドロキシコレステロールを基質として 16 位の水酸化を触媒する活性を確認した。以上より、2OGD1 はソラニンおよびトマチン生合成に関わるステロール 16 位水酸化酵素であることが明らかとなった。

potato, solanine, dioxygenase

講演番号：3C05a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ C 校舎 05 会場

ソバ(Fagopyrum esculentum)のルチン合成に関わるラムノシル化酵素の機能解析とその応用
Functional analysis and application of rhamnosyltransferase responsible for rutin biosynthesis in buckwheat

○丸山 佳紀、古謝 詠喜、田口 悟朗（信州大繊維）
○Yoshinori MARUYAMA, Eiki KOJA, Goro TAGUCHI (shinshu Univ.)

【研究背景・目的】

ソバはその植物体に種々のフラボノイドを蓄積しており、特に子葉において、ルチンやビテキシン、イソビテキシンなどユニークな構造をもつ配糖体を多く蓄積していることが知られている。ルチンは、柑橘類やアスパラガスなどにも含まれており、フラボノイドの一種であるケルセチンの３位にグルコースおよびラムノースが結合した構造である。ルチンは、抗酸化作用、抗アレルギー作用、血圧降下作用などの生理活性を示す健康増進物質として注目されている。本研究室では昨年度の本大会において、ルチン合成に関与するラムノシル化酵素遺伝子の全長配列を獲得し、組換えタンパク質を用いて機能解析を行ったことを報告した。[1]

本研究ではルチンの生合成に関わるラムノシル化酵素の反応速度論解析を行ってその酵素機能の解析を進めるとともに、遺伝子工学的手法を用いたルチン生産系を確立することを目的とした。

【結果・考察】

大腸菌での異種宿主発現により得られた精製組換えタンパク質 Fe3RhaT について、その反応性を確認したところ、ケルセチンおよびケンフェロールの 3-*O*-グルコシド、3-*O*-ガラクトシドに対してラムノシル化活性を示す一方、7-*O*-グルコシドに対する活性は認められなかったことから、高い位置特異性を有することが示唆された。そこで、ケルセチン-3-*O*-グルコシドと糖供与体である UDP-ラムノースに対する反応速度論的解析を行い、より詳細な酵素の性質について検討した。

現在、タバコ BY-2 細胞に *Fe3RhaT* を導入して、組換えタバコ細胞によるルチンの合成が可能かを検討しており、本大会ではこれら２つの研究成果について報告する。

[1] 古謝ら　２０１３年度日本農芸化学会大会講演要旨集

rhamnosyltransferase, rutin, tobacco cultured cell

講演番号：3C05a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ C 校舎 05 会場

フラノクマリン生合成初発反応を担うクマリン特異的プレニル基転移酵素の解析

PcPT, a parsley prenyltransferase, catalyzes the key reaction in furanocoumarin biosynthesis

○棟方 涼介[1]、KARAMAT Fazeelat[2]、OLRY Alexandre[2]、肥塚 崇男[3]、杉山 暁史[1]、PARIS Cedric[2]、HEHN Alain[2]、BOURGAUD Frederic[2]、矢崎 一史[1]([1]京大・生存研、[2]ナンシー大学、[3]山口大・農)
○Ryosuke MUNAKATA[1], Fazeelat KARAMAT[2], Alexandre OLRY[2], Takao KOEDUKA[3], Akifumi SUGIYAMA[1], Cedric PARIS[2], Alain HEHN[2], Frederic BOURGAUD[2], Kazufumi YAZAKI[1] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]Nancy Univ., [3]Agr., Yamaguchi Univ.)

フラノクマリン類（FCs）はクマリン類の 1 サブグループを形成する三環性のフェノール系二次代謝産物であり、フラン環の置換様式からリニア型とアンギュラー型にさらに分類される。植物界においてはセリ科、クワ科、マメ科、ミカン科に多く分布している。FCs の特徴として、抗病原菌活性や抗捕食活性、アレロケミカルとしての機能など植物の化学防御に関わる多様な生理活性を有することも報告されている。FCs の生合成経路においてはクマリンのプレニル基転移酵素（PT）が決定的に重要な役割を果たしており、umbelliferone（7-hydroxycoumarin）のジメチルアリル基転移酵素（umbelliferone dimethylallyltransferase: UDT）がその初発反応を担っている。さらに、この反応段階は最終産物がリニア型、又はアンギュラー型になるのかを決定する分岐点となり、U6DT 活性によりジメチルアリル側鎖が umbelliferone の 6 位に結合するとリニア型に、一方 U8DT 活性により 8 位に結合するとアンギュラー型となる。このように、UDT は FCs を生み出すことでクマリン類の化学構造の多様化・生理活性向上に大きく寄与している。そのため、UDT に関する生化学的研究が活発になされてきたものの、本酵素をコードする遺伝子は 40 年以上不明であった。

本研究ではこの *UDT* のクローニングと機能解析に着手した。まず、FCs を高蓄積するセリ科草本パセリ（*Petroselinum crispum*）を材料として、既知の植物由来芳香族基質 PT のアミノ酸配列上の保存配列を基にしたホモロジーベース PCR、及び RACE を行った。その結果、パセリ由来 total RNA 逆転写産物から候補遺伝子 *PcPT* の全長 cDNA を得た。分子系統樹解析の結果、PcPT は homogentisate PT ファミリーに属し、umbelliferone 8-geranyltransferase（U8GT、論文未発表）であるレモン由来の Cl-PT1a と比較的相同性の高い位置となった。Agroinfiltration 法を用いた *N. benthamiana* 一過的発現系によって酵素機能解析を行った結果、組換え PcPT は強い U6DT 活性を示すこと、また若干ではあるが U8DT 活性を有することも明らかとなった。基質特異性試験では、他のクマリン誘導体、プレニルジリン酸を基質として認識しなかったことから、PcPT は非常に基質特異性、並びに生成物特異性が狭く、U6DT 活性を主活性とすることが示された。さらにタマネギ表皮細胞一過的発現系を用いて細胞内局在の解析を行った結果では、PcPT の N 末端領域がプラスチド移行シグナルとして機能することが示された。

パセリの器官別の発現量解析においては、FCs の分布と同様に植物体全体で *PcPT* の発現が確認された。現在は代謝工学的アプローチとして、他の FCs 生合成関連酵素との共発現による FCs 非生産植物での FCs 生合成経路の構築を試みている。

Prenyltransferase, Furanocoumarin, *P. crispum*

講演番号：3C05a17
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ C 校舎 05 会場

マメ科植物が生産するダイズシストセンチュウ孵化促進物質の探索

Analysis of hatching factor concerning soybean cyst nematode

○野中 詩織[1]、町田 教暢[1]、近藤 竜彦[2]、佐々木 康幸[1]、浅見 忠男[3]、矢嶋 俊介[1]、伊藤 晋作[1]（[1]東農大・応生科・バイオ、[2]名大院・生命農学、[3]東大院・農生科・応生化）

○ Shiori NONAKA[1], Yukinobu MATIDA[1], Tatsuhiko KONDO[2], Yasuyuki SASAKI[1], Tadao ASAMI[3], Syunsuke YAZIMA[1], Shinsaku ITO[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Bioagricultural Sciences,Nagoya Univ., [3]Dept. Appl. Chem., Univ. of Tokyo)

【背景・目的】ダイズシストセンチュウは、ダイズやアズキなどマメ科植物に寄生する根寄生性線虫である。本線虫が寄生することにより、作物の生長が阻害され、作物収量の甚大な減少が引き起こされる。本線虫は土壌にシストという状態で存在し、付近のマメ科植物の根から分泌される孵化促進物質を認識することにより孵化し、根に寄生する。これまでに孵化物質の１つとして、インゲン根よりグリシノエクレピンが単離されているものの、インゲン豆以外からの孵化促進物質の単離、同定の報告はない。そのため我々は今回、グリシノエクレピン類以外の孵化促進物質を得るためにマメ科植物を用いて孵化活性の有無を調査した。

【方法及び結果】室温条件下で発芽したアズキを植物チャンバー内で水耕栽培した後、水耕液を回収した。回収した水耕液は酢酸エチルにより抽出を行い、抽出液中における孵化促進物質量をダイズシストセンチュウの孵化率を元に計測した。その結果、今回用いたアズキ水耕液のうち中・塩基性画分において孵化活性が見られた。ササゲの水耕液においても分画を行い、各画分における孵化活性を測定したところ、中性画分に最も強い孵化活性が見られた。また、既知のグリシノエクレピン（A から C）はカルボン酸を含む酸性物質であるが、その検証として標品のグリシノエクレピン A を酸塩基分画し MS スペクトルで解析したところ、酸性画分に移動していることが確認できた。このことから、少なくともアズキ、ササゲにおける主要な孵化促進物質は、グリシノエクレピン A とは別の孵化促進物質である可能性が示唆された。

soybean cyst nematode, legumes, Glycinoeclepin

講演番号：3C05p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ C 校舎 05 会場

植物の耐塩性に関与する機能未知タンパク質 GmTDF-5 のユビキチン - プロテアソームによる制御
Regulation of a function-unknown protein GmTDF-5 involved in plant salt tolerance through the ubiquitin-proteasome

○木村 愛、佐藤 光朗、高原 英成、小島 俊雄（茨城大・農・生化）
○Ai KIMURA, Mitsuaki SATO, Hidenari TAKAHARA, Toshio KOJIMA (Lab. Biochem. Mol. Biol., Agri., Ibaraki Univ.)

アルマジロリピート（Arm）は、タンパク質間相互作用に関与する機能ドメインとして真核生物に広く存在しており、このドメインを有する多くのタンパク質が細胞骨格や核-細胞質間輸送、転写制御などの重要な細胞内プロセスに関与している。植物では、ホルモンを介したシグナル伝達や自家不和合性など、植物特有の生命現象にも Arm タンパク質が関与していることが知られている。当研究室では、塩ストレス処理したダイズより単離された機能未知な Arm タンパク質 GmTDF-5 の機能解明に取り組んでいる。これまでの研究で、GmTDF-5 が核に局在すること、同遺伝子を過剰発現させるとシロイヌナズナに高い耐塩性を付与できることを明らかにしている。また、100 mM NaCl で処理したダイズ組織（上葉、下葉、茎、根）では 24 時間以内に転写量が著しく増加し、とくに葉で強い応答性を示すことも明らかとなっている。ところが、翻訳レベルでの応答性を調べると、塩ストレス処理・未処理にかかわらず、いずれの組織からも GmTDF-5 タンパク質が検出されていない。このため、GmTDF-5 は翻訳後に何らかの選択的な分解制御を受けている可能性が示された。本研究では、環境ストレス応答を含め、主要な細胞内プロセスを制御しているタンパク質分解機構のひとつ、ユビキチン-プロテアソームに着目し、同機構による GmTDF-5 分解制御への関与を調査した。

100 mM NaCl で 24 時間処理したダイズ幼個体全組織から調製した細胞抽出液に、GST 融合 GmTDF-5 および GST を添加した反応液を用いて、プロテアソーム阻害剤 MG-132 の添加の有無が GmTDF-5 の存在量（分解性）にどのような影響を及ぼすかを解析した。なお、GST 融合 GmTDF-5 として全長（367 アミノ酸残基）と、ホモログ間で高度に保存された C 末端領域（CCD 領域：57 アミノ酸残基）を用いた。反応液を 0、1.5、3 時間／30℃でインキュベートした結果、ダイズ細胞抽出液中の GmTDF-5 量が全長、CCD 領域ともに時間の経過にともなって減少し、MG-132 を添加するとその減少は著しく抑えられた。この間、同じように添加した GST 量には変化が見られなかった。同様の傾向が塩ストレス未処理のダイズから調製した細胞抽出液を用いた解析でも見られた。以上の結果から、GmTDF-5 は転写レベルの制御に加え、ユビキチン - プロテアソームによる翻訳レベルの制御も受けていることが明らかとなった。現在、同様の実験系を用いて、ダイズ組織の違いによる分解性の変化やユビキチン化領域の特定を進めている。

Soybean, Salt stress, Armadillo repeat protein

講演番号：3C05p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ C 校舎 05 会場

塩ストレス条件下で栽培したトマト果実で発現する遺伝子の網羅的解析
Global gene expression analysis in tomato fruit under the salt stress conditions
○緑川 景子[1]、牧野 孝宏[1]、田村 倫子[2]、星 雅子[1]、石丸 喜朗[1]、阿部 啓子[1,3]、朝倉 富子[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]東農大応生科・栄養、[3]神奈川科学技術アカデミー)
○ keiko MIDORIKAWA[1], takahiro Makino[1], tomoko TAMURA[2], masako HOSHI[1], yoshiro ISHIMARU[1], keiko ABE[1,3], tomiko ASAKURA[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Tokyo Agri. Univ., [3]KAST)

[目的]トマトを乾燥などのストレス条件下で栽培すると通常、一般のトマトよりも糖度の高く、旨味が増加した果実が作出されることが知られており、塩トマトやフルーツトマトなどとして親しまれている。これらのトマトは土壌の塩分濃度を上げることで水分吸収量を下げ、乾燥ストレスを与える栽培方法がとられている。しかし、この乾燥ストレスにより引き起こされる果実の構成成分の変化がどのように糖度や旨味の増加に影響を及ぼしているのか、その分子生物学的アプローチは少ない。近年、トマトの全ゲノム配列が解読され、糖度や旨味増加のマーカー遺伝子を探索することが可能となった。本研究では DNA マイクロアレイを用いた遺伝子の網羅的解析により、果実中の成分変化を遺伝子レベルで解明することを試みた。
[方法・結果]高塩濃度下でストレスを与えて栽培したトマト（処理区）と、通常条件下で栽培したトマト（無処理区）をサンプルとして用いた。品種はマイクロトムを使用し、栽培には固形培地耕（ヤシ殻）を利用した養液栽培を用いて肥料濃度を管理した。液肥（N：P：K：Mg：Ca＝2：1：3.7：0.7：1.6）は EC（電気伝導度）1.2 ds/m になるように与え、ストレス処理区では定植 20 日目以降より飽和食塩水を EC 4.0 ds/m となるように添加した。その後生育状況を見ながら 1 日当たり EC 0.5 ds/m ずつ上昇させ、50 日後には EC 8.0 ds/m に設定した。定植後 70 日目に処理区と無処理区それぞれの非着色果実から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイに供した。得られたデータから、DFW、RMA、MAS5 の 3 種の正規化法によりクラスタリング解析を行ったところ、両群は別々のクラスターを形成する傾向が見られた。そこで、2 群間の発現遺伝子を比較する Rank Products（RP）法に最も適しているとされる DFW による正規化法を採用した。RP 法により得られた偽陽性率（FDR）0.05 未満の変動遺伝子は、塩ストレスによって発現が上昇したものが 225 個、及び発現が低下したものが 169 個であった。これらの遺伝子群を NetAffx および MiBASE Micro-Tom Database によりアノテーション解析を行ったところ、キチンや細胞壁を含む多糖類分解関連分子、病害応答関連分子、酸化還元反応に関わる酵素群が発現変動したものとして抽出された。塩ストレスにより、糖代謝を中心としたこれらの遺伝子発現変化が果実の成分組成に関与している可能性が示唆された。

Micro-Tom, DNA microarray, salt stress

講演番号：3C05p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ C 校舎 05 会場

タバコから単離した TRI1 は、ナミハダニ、アザミウマ、ハスモンヨトウに対する抵抗性を誘導し、植物の防御遺伝子の発現を高める
TRI-1, a substance isolated from tobacco, induces resistance to Tetranychus urticae, Frankliniella occidentalis, and Spodoptera litura and enhances expression of defense-related genes
○田島 直人[1]、村田 未果[1]、望月 淳[2]、光原 一朗[1]、瀬尾 茂美[1] ([1]生物研・植物科学研究領域、[2]農環研・生物多様性研究領域)
○Naoto Tajima[1], Mika Murata[1], Atsushi Mochizuki[2], Ichiro Mitsuhara[1], Shigemi Seo[1] ([1]NIAS, Div.Plant Sci., [2]NIAES, Biodiversity Div.)

近年、環境低負荷型の病害虫防除手法として、病害や害虫に対する植物の抵抗性を誘導する手法に注目が集まっている。病害に対する抵抗性を誘導する物質（いわゆるプラントアクティベーター）は多く見つかっているが、害虫に対する抵抗性を誘導する物質はあまり知られていない。害虫に対するプラントアクティベーターを見つけるべく、病害防御遺伝子のみならず虫害防御遺伝子の発現誘導が起きる過敏感反応（HR）に着目した。タバコモザイクウイルス感染により HR が誘起されたタバコ葉から、ナミハダニの生存率低下を指標として害虫抵抗性物質の探索を行い、活性物質(便宜上、TRI1 と呼ぶ) の単離に成功した（前回の本学会にて報告）。今回、他の害虫に対する効果を検証するとともに、その作用機作解明に向けた研究を行ったので、報告する。TRI1 を処理したトマト葉を用いて生物検定を行ったところ、アザミウマ孵化幼虫とハスモンヨトウ幼虫の生存率を低下させる活性が検出できた。また、TRI1 を処理したトマト葉では、ジャスモン酸経路の防御遺伝子の発現量が有意に増加した。TRI1 自体はこれらの害虫に対して直接殺虫作用を示さなかったことから、見られた殺虫効果は植物の抵抗性反応の誘導の結果によるものであると考えられた。

induced resistance, plant activator, *Frankliniella occidentalis*

講演番号：3C05p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ C 校舎 05 会場

シロイヌナズナエコタイプに見られたヒ酸反応性の差異と新規ヒ酸反応性決定遺伝子の座乗領域の同定

Differential arsenate response of various Arabidopsis ecotypes and identification of the chromosomal region determining arsenate response

○木幡 光[1]、井上 雅貴[1]、國廣 俊太[1]、松田 大樹[1]、藤井 伸治[1]、高橋 秀幸[1]、ユセフィアン ショハブ[2]、草野 友延[1] ([1]東北大院生命、[2]秋田県立大)
○Hikaru KOWATA[1], Masataka INOUE[1], Shuta KUNIHIRO[1], Taiki MATSUDA[1], Nobuharu FUJII[1], Hideyuki TAKAHASHI[1], Shohab YOUSSEFIAN[2], Tomonobu KUSANO[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Akita Pref univ.)

【目的】我々の研究室では、植物の重金属耐性機構の解明を目指している。本研究では、シロイヌナズナの約 100 種類のエコタイプにおいてカドミウム（Cd）および５価のヒ素［As(V)］に対する反応性を明らかにすることを目的とした。さらに、As(V)反応性においてエコタイプ間で反応性に大きな違いが見られたことからエコタイプ Col-0 の耐性形質に着目し、この形質に関与する遺伝子の座乗する染色体領域の特定を目的とした。
【方法】Cd または As(V)を含む培地およびコントロール培地に各エコタイプの種子を播種し、それぞれのエコタイプにおける根の相対伸長を重金属反応性の指標とした。また、異なる As(V)反応性を示したエコタイプとして Col-0（As(V)耐性）および Pro-0（As(V)感受性)、これら両者間の後代種子を用いて Col-0 の As(V)耐性遺伝子の遺伝特性を明らかにすると共に、DNA マーカーを用いて多型解析を行い、Cd 耐性遺伝子の座乗領域を限定することを行った。
【結果・考察】(1) Cd および As(V)に対する反応性はエコタイプにより異なっており、エコタイプ間で直線的な変化であったことから、Cd および As(V)に対する応答には多数の遺伝子が関与していることが示唆された。また、各エコタイプの Cd 反応性および As(V)反応性をプロットし、相関関係の有無を調べたところ、Cd と As(V)との間で反応性の相関は見られなかった。
(2) As(V)に耐性を示した Col-0 と感受性を示した Pro-0 を交配させて得られた F_1 を As(V)含有培地に播種したところ、F_1 個体はいずれも As(V)耐性の形質を示した。さらに、F_1 を自家受精させて得られた F_2 種子を As(V)含有培地に播種し、As(V)に対する表現型を調べたところ、As(V)耐性と感受性を示した個体数の比はほぼ 3:1 となった。このことから、Col-0 のもつ As(V)耐性形質は優性の単一遺伝子により支配されていると考えられた。
(3) As(V)耐性の F_2 個体を選抜し、SSLP マーカーおよび CAPS マーカーを用いて DNA 多型解析を行ったところ、１、２、５番染色体に目的遺伝子が存在すると考えられた。さらに、１、２、５番染色体の領域について As(V)感受性の F_2 個体を用いて多型解析を行ったところ、２番染色体の Col-0 との組換え率が１、５番染色体の組換え率に比べて低かったことから、As(V)耐性遺伝子は２番染色体に座乗している可能性が高いと考えられた。

Arabidopsis thaliana, arsenate response, gene mapping

講演番号：3C05p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ C 校舎 05 会場

ヘム存在下におけるデハイドリンの酵素活性発現に関する研究

Study on the expression of enzyme activity of dehydrin in the presence of heme

○天野 翔乃[1]、原 正和[2] ([1]静岡大農、[2]静岡大グリーン科技研)
○Shono AMANO[1], Masakazu HARA[2] ([1]Shizuoka Univ. Fuc. Agric., [2]Shiuzoka Univ. RIGST)

【はじめに】デハイドリンは、植物種子の発達において、後期の乾燥段階で発現する LEA（late embryogenesis abundant）タンパク質の一種である。また、デハイドリンは、成長中の植物が非生物的ストレスを受けた時にも発現するため、植物のストレス耐性向上に関与すると考えられている。現に、デハイドリンを高発現させた植物のストレス耐性向上を報告した例は多く、デハイドリンの発現を抑制した種子の生存率が低下したという結果もある。デハイドリンは、特定の二次構造を取らない天然変性タンパク質であるため、機能予測が困難であり、どのように植物のストレス耐性に関与しているかは目下のところ研究途上である。無機分子（水、カルシウム、重金属）や高分子（タンパク質、核酸）との結合が見出され、ミネラル保持、活性酸素発生抑制、タンパク質の変性抑制、シグナル制御など、ストレスを受けた細胞を保護する活性が想定されてきた。しかし、リン脂質リポソームを除けば、有機低分子との結合に関する報告例はない。本研究では、デハイドリンの重金属親和性にヒントを得て、デハイドリンとヘムとの結合を調査した。その結果、デハイドリンはヘムと結合し、ヘムが有するペルオキシダーゼ様活性を変化させることが判明したので報告する。
【方法】シロイヌナズナの KS 型デハイドリン AtHIRD11（At1g54410）は大腸菌発現系で調製した。AtHIRD11 の配列に His 含有率を変化させた変異タンパク質も用意した。デハイドリンとの結合反応にはヘミンを用いた。ヘミン結合は吸光度の変化を利用したストイキオメトリから推定した。ヘミンのペルオキシダーゼ活性は、グアイアコールを基質とした比色法で調べた。
【結果と考察】AtHIRD11 はヘミンと結合した。弱い結合を含めれば、1 分子の AtHIRD11 あたり、最大 13 分子のヘミンが結合すると予想された。ヘミンは、単独で弱いペルオキシダーゼ様の活性を示したが、AtHIRD11 を加えると、ペルオキシダーゼ様活性は高まった。この活性化は、13 個の His 残基を全て Ala に置換した変異タンパク質では消失した。以上の結果、AtHIRD11 はヘミンと結合し、His 残基の関わりの下でペルオキシダーゼ様活性を発揮することが示された。デハイドリンには、ヘムと結合し、ストレス下での植物細胞のラジカル消去機構に関与するものがあると示唆される。

dehydrin, heme, peroxidase activity

講演番号：3C05p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ C 校舎 05 会場

光酸化的ストレス条件下におけるデヒドロアスコルビン酸還元酵素アイソザイムによる細胞内レドックス状態の制御機構

Regulation of cellular redox states by dehydroascorbate reductases under photooxidative stress

○畑中 理佐[1]、野志 昌弘[2]、田茂井 政宏[1,2]、丸田 隆典[3]、石川 孝博[3]、重岡 成[1,2]([1]近畿大院農バイオ、[2]近畿大農バイオ、[3]島根大生資科生命工)
○Risa HATANAKA[1], Masahiro NOSHI[2], Masahiro TAMOI[1,2], Takanori MARUTA[3], Takahiro ISHIKAWA[3], Shigeru SHIGEOKA[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]Dept. Life Sci. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.)

【目的】アスコルビン酸（AsA）は、植物細胞内に最も豊富に存在する水溶性抗酸化剤であり、活性酸素種（ROS）の消去を介してレドックス制御に重要であるだけでなく、生長/発達および遺伝子発現にも関与する。AsA の持つ生理作用の多くは自身の還元力に依存することから、その機能維持には酸化型 AsA（デヒドロ AsA: DHA、モノデヒドロ AsA: MDA）の再生系が鍵であると考えられる。シロイヌナズナには、それぞれ局在の異なる 5 つの MDA 還元酵素（MDAR1~5）および 3 つの DHA 還元酵素（DHAR1、3 および 5）が存在している。これまでに、DHAR1 は葉緑体、DHAR3 は細胞質、そして DHAR5 は葉緑体やペルオキシソームに局在することが示唆されており、それらの協調がオルガネラから細胞全体での AsA レドックス状態の調節に機能すると考えられている。しかしながら、個々のアイソザイムの特性および生理機能には不明な点が多く残されている。そこで今回は、光酸化的ストレス条件下における DHAR アイソザイムの機能解析を試みた。
【方法・結果】各 DHAR アイソザイムの欠損株を単離し、2 週齢の植物体における総 DHAR 活性を野生株と比較したところ、全ての欠損株で総 DHAR 活性の低下が認められた。しかしながら、その度合いは DHAR5 株で最も大きく、次に DHAR1 欠損株で顕著に見られた。次に、野生株および各 DHAR アイソザイムの欠損株にパラコート処理または強光照射に起因する光酸化的ストレスを付与した。その結果、DHAR3 欠損株の表現型に野生株との明確な違いは認められなかった。一方、DHAR1 および DHAR5 欠損株は顕著な感受性を示した。DHAR1 および DHAR5 欠損株に強光を照射したところ、光化学の最大量子収率が野生株よりも著しく低下し、タンパク質および脂質の酸化レベルも増大していた。また、DHAR1 および 5 の欠損は強光下での AsA レベルやレドックス状態にも影響した。興味深いことに、両アイソザイムの欠損株ではグルタチオンレベルおよびレドックス状態の顕著な変化が見られ、特に DHAR5 欠損株では強光下での酸化型グルタチオンの増加が抑制された。これらの結果から、DHAR1 および DHAR5 は AsA およびグルタチオンの量およびレドックス状態の制御に関与しており、光酸化的ストレス防御・応答に重要であることが明らかになった。

Ascorbate recycling enzymes, ascorbate, oxidative stress

講演番号：3C05p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ C 校舎 05 会場

シロイヌナズナにおけるペルオキシソーム型モノデヒドロアスコルビン酸還元酵素アイソザイムの生理機能

Physiological function of peroxisomal monodehydroascorbate reductases in Arabidopsis

○高橋 隆樹[1]、畑中 理佐[2]、野志 昌弘[3]、田茂井 政宏[2,3]、丸田 隆典[1]、澤 嘉弘[1]、石川 孝博[1]、重岡 成[2,3] ([1]島根大・生資科・生命工、[2]近畿大院・農・バイオ、[3]近畿大・農・バイオ)
○Ryuki Takahashi[1], Risa Hatanaka[2], Masahiro Noshi[3], Masahiro Tamoi[2,3], Takanori Maruta[1], Yoshihiro Sawa[1], Takahiro Ishikawa[1], Shigeru Shigeoka[2,3] ([1]Dept. Life Sci. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [3]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ.)

ペルオキシソームは脂肪酸のβ酸化や光呼吸によるグリコール酸酸化の場であるため、植物細胞内における主要な活性酸素種（ROS）の発生源である。そのため、植物ペルオキシソームはカタラーゼを高蓄積しており、効果的に ROS を消去していると考えられてきた。一方、モノデヒドロアスコルビン酸還元酵素（MDAR）を含む AsA 代謝系酵素もまたペルオキシソームに存在する。シロイヌナズナにおいて MDAR3 および 4 がペルオキシソームの膜およびマトリックスにそれぞれ局在している。また、MDAR3 欠損株は独立栄養条件で致死性を示し、本酵素は発芽直後の脂肪酸β酸化由来の ROS の消去に必須であることが報告された。そこで、ペルオキシソームにおける AsA 代謝の生理学的意義の解明を目的として、MDAR3 および 4 の機能重複性や分化について検討した。

シードリング発達段階（3~14 日齢）における *MDAR3* および *4* の転写レベルについて解析した。*MDAR4* mRNA は発達とともに促進されたが、*MDAR3* mRNA は常に一定のレベルで発現していた。次に、両遺伝子の欠損株（*mdar3* および *mdar4*）を単離した。シードリング発達段階における野生株および欠損株の総 MDAR 活性の比較により、3 日齢では総 MDAR 活性に対して MDAR3 と MDAR4 が同程度に寄与し、それ以降では MDAR4 が主要な MDAR であることが分かった。独立栄養条件において、*mdar3* はシードリング致死を示したが、*mdar4* の生育に野生株との違いは見られなかった。*mdar3* の表現型は、MDAR3 だけではなく、MDAR4 の過剰発現によっても相補されることが明らかになった。一方、光呼吸を促進する強光を照射したところ、*mdar4* のみが高感受性を示した。また、強光下の *mdar4* では酸化型 AsA レベルが増大する傾向が見られた。これらの結果から、MDAR3 および MDAR4 は機能重複性を持つが、発達段階における発現制御により、それぞれ脂肪酸のβ酸化および光呼吸由来の ROS 代謝に特化して寄与することが示唆された。現在、この仮説を裏付けるために、ペルオキシソーム局在性を欠失または変化させた両酵素を *mdar3* または *mdar4* で発現させた変異株を作出している。

ascorbate, monodehydroascorbate reductase, redox

講演番号：3C05p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ C 校舎 05 会場

VTC2 によるアスコルビン酸生合成制御の組織特異性

Tissue-specificity of the regulation of ascorbate biosynthesis by VTC2

近藤 真美[1]、大北 由佳[1]、丸田 隆典[2]、石川 孝博[2]、重岡 成[3]、○吉村 和也[1]([1]中部大・応生・食栄、[2]島根大・生資科・生命工、[3]近畿大・農・バイオ)
Mami KONDO[1], Yuka OHKITA[1], Takanori MARUTA[2], Takahiro ISHIKAWA[2], Shigeru SHIGEOKA[3], ○Kazuya YOSHIMURA[1] ([1]Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [2]Dept. Life Sci. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ., [3]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ.)

アスコルビン酸(AsA)は植物に最も豊富に存在する水溶性抗酸化物質であり、酸化ストレスに対する防御系や様々な代謝系における補酵素として機能している。そのため、その細胞内レベルやレドックスバランスの制御は、光合成、ストレス応答および形態形成を含めた様々な細胞機能の発現に必須である。これまでに我々は、エストロゲン(ES)誘導による一過的発現系を用いて、植物の AsA 生合成の主経路である D-マンノース/L-ガラクトース(D-Man/L-Gal)経路の構成酵素群の中で、GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼをコードする *VTC2* の転写レベルでの制御が、シロイヌナズナの葉の明/暗条件に応答した細胞内 AsA 量の調節に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた (Yoshimura et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* In press)。そこで本研究では、一過的発現系を用いて、VTC2 による AsA 生合成制御の組織特性を検討した。

通常条件(明/暗: 12 h / 12 h)で播種後 5 週間栽培したシロイヌナズナコントロール株および ES 誘導性 VTC2 一過的発現系導入(IE-VTC2)株から、ロゼッタ葉、カーリン葉、茎、根、および花を切断し、MS 培地上で 100 μM ES をスプレーにより噴霧し、さらに 3 日間通常条件下で静置した。リアルタイム RT-PCR 解析および AsA 定量の結果、Mock 処理と比較して ES 処理したコントロール株の各組織における VTC2 mRNA 量および AsA 量に変化は認められなかった。一方、IE-VTC2 株のすべての組織において、ES 処理による VTC2 mRNA の発現誘導が認められた。また、IE-VTC2 株のロゼッタ葉、カーリン葉、茎、および花における AsA 量は ES 処理により有意に増加していたが、根では変化が認められなかった。

以上より、シロイヌナズナの根以外の組織での AsA 量の調節には、*VTC2* の転写段階での制御が重要であると考えられた。一方、根では VTC2 が律速段階でない、もしくは D-Man/L-Gal 経路以外の経路が AsA 生合成に優勢に機能している可能性が考えられた。

Ascorbate, VTC2, Arabidopsis

講演番号：3C05p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ C 校舎 05 会場

細胞内 NADH レベルの変化を介したストレス応答制御

Regulation of stress response via changes in the intracellular NADH levels

○村本 亘平[1]、高田 梨沙[2]、小川 貴央[2]、重岡 成[2]、吉村 和也[1] ([1]中部大院・応生、[2]近畿大・農・バイオ)

○Kohei MURAMOTO[1], Risa TAKADA[2], Takahisa OGAWA[2], Shigeru SHIGEOKA[2], Kazuya YOSHIMURA[1] ([1]Biosci. Biotech. Grad. Sch. Chubu Univ, [2]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ.Dept.)

近年、種および部位特異的なレドックスシグナルの存在が明らかになってきている。生物にとって必須の還元力である NADH のレベルやレドックス状態(NADH/NAD^+)の変化は、多様な代謝反応に影響するだけでなく、シグナルとして重要な役割を果たしていると予想される。実際に、シロイヌナズナにおいて、NADH に対して加水分解活性を有する Nudix hydrolase（AtNUDX6 および 7）は、それぞれ生物的および非生物的ストレス応答の制御に機能していた（*Plant Physiol.* 2009; 2010)。しかし、細胞内 NADH レベルの変化がどの様にしてそれら全く異なる 2 つの細胞応答の制御に関与しているかは不明なままである。そこで本研究では、細胞内 NADH レベルの変化が遺伝子発現制御に及ぼす影響を解析した。

細胞内 NADH レベル変化の影響を解析するためのモデルケースとして、NADH レベルが野生株と比較して約 1.56、1.62 および 2.85 倍へと段階的に増加しているシロイヌナズナ AtNUDX6 破壊株（KO-*nudx6*)、AtNUDX7 破壊株(KO-*nudx7*)および二重遺伝子破壊株(WKO-*nudx6/7*)を用いた。GeneChip 解析および定量的 RT-PCR 解析の結果、野生株および各遺伝子破壊株における発現量が NADH レベルと高い正および負の相関（R ≧ 0.90 / R ≦ -0.90）を示す遺伝子が、現在までにそれぞれ 23 個および 19 個同定された。また、外部からの NADH 処理により、それらの中で 13 個および 11 個の発現はそれぞれ誘導および抑制された。それらの遺伝子（NADH-responsive gene: NRG）には、14 個の生物的および非生物的ストレスに対して応答性を示す遺伝子が含まれ、転写因子およびシグナル伝達因子がそれぞれ 9 および 3 個存在した。また、既報の細胞内 ROS や抗酸化物質レベルにより発現制御されている遺伝子群とは一部しか重複が認められなかった。以上より、細胞内 NADH 量もしくはそのレドックスバランスの変化が遺伝子発現の制御に関与していることが明らかになった。そこで次に、種々のストレス条件下での本制御の生理的意義の解明を試みた。正常条件と比較して、パラコートによる酸化ストレス下における細胞内 NADH レベルは 2.46 倍に蓄積していた。同条件下において、NRG の中で発現抑制された遺伝子はわずか 3 個であったが、発現誘導されたものは 13 個存在した。このことから、酸化ストレス下における NADH レベル変化の重要性が示唆された。

NADH metabolism, stress response, gene expression

講演番号：3C05p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ C 校舎 05 会場

葉緑体由来の酸化的シグナリングに関与する転写因子ネットワークの解明

Transcription factor network involved in chloroplast-derived oxidative signaling

○丸田 隆典[1]、野志 昌弘[2]、問田 英里[3]、岡本 泰[3]、大和 開[1]、田茂井 政宏[2,3]、高木 優[4,5]、澤 嘉弘[1]、石川 孝博[1]、重岡 成[2,3] ([1]島根大・生資科・生命工、[2]近畿大・農・バイオ、[3]近畿大院・農・バイオ、[4]産総研・生物プロセス、[5]埼玉大・環境科学)

○Takanori MARUTA[1], Masahiro NOSHI[2], Eri TOIDA[3], Yutaka OKAMOTO[3], Kai YAMATO[1], Masahiro TAMOI[2,3], Masaru TAKAGI[4,5], Yoshihiro SAWA[1], Takahiro ISHIKAWA[1], Shigeru SHIGEOKA[2,3] ([1]Dept. Life Sci. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [4]AIST, [5]IEST, Saitama Univ.)

活性酸素種（ROS）はストレス応答を誘発するシグナルとして重要であり、ROS の生成部位や種類に依存した複数のシグナル伝達経路の存在も示唆されてきている。最近、我々は誘導型 RNAi 法によるチラコイド膜結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（tAPX）の誘導抑制系を構築し、マイクロアレイ解析により葉緑体由来の H_2O_2 に特異的に応答する候補遺伝子群（Responsive to tAPX silencing; RTS）を 774 個同定した（*J. Biol. Chem.* 287, 11717-29, 2012）。さらに、RTS 遺伝子群の機能分類および生理学的解析により、葉緑体由来の H_2O_2 はストレスおよびホルモン応答に関与することが強く示唆されたが、その分子機構は不明であった。そこで本研究では、葉緑体由来の H_2O_2 シグナリングの経路およびその生理学的意義を明らかにするため、RTS 遺伝子群、特に転写因子の包括的な逆遺伝学的解析を試みた。

RTS 遺伝子群の欠損株および転写因子の優性抑制株のパラコートやエリシター（flg22）処理に対する感受性を評価し、複数の光酸化的ストレス感受性（*pss*）、非感受性（*psi*）およびエリシター感受性（*fs*）変異株が得られた。それらの原因遺伝子のうち、*PSS8* および *PSI2* はそれぞれフェニルプロパノイドやγ-アミノ酪酸代謝に関与する酵素をコードしており、両代謝が酸化的ストレス応答機構において重要な機能を持つことが示唆された。一方、11 の *PSS/PSI/FS* 遺伝子群が転写因子をコードしており、酸化的シグナリングへの関与が示された。PSS7 は転写抑制因子として機能し、その欠損株はパラコートに高感受性を示し、優性抑制株は非感受性を示した。変異体を用いたマイクロアレイの結果、PSS7 は複数のストレス応答性遺伝子の発現を制御する可能性が示唆された。また、PSS9 の優性抑制株は著しい光酸化的ストレス感受性を示し、その下流遺伝子群と RTS 遺伝子群に明確なオーバーラップが見られた。それらの多くは、病原菌応答性を持つことも分かり、PSS9 は生物的および非生物的ストレス応答に関与すると考えられた。さらに、FS1 はエリシター応答性も有し、サリチル酸非依存的な病原菌応答に関与する可能性が考えられた。現在、これらの転写因子の更なる機能解析を進めている。

reactive oxygen species, chloroplast, redox

講演番号：3C05p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ C 校舎 05 会場

シロイヌナズナ HsfA1d の酸化還元が熱ショックエレメントの結合に及ぼす影響 の解析
Effect of Redox of Arabidopsis HsfA1d on the Heat Shock Element binding activity

○小林 宏太[1]、野坂 亮太[1]、中村 朋美[1]、田部 記章[2]、藪田 行哲[3]、田茂井 政宏[1,2]、重岡 成[1,2] ([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]鳥取大・農・生資環)
○Kota KOBAYASHI[1], Ryota NOSAKA[1], Tomomi NAKAMURA[1], Noriaki TANABE[2], Yukinori YABUTA[3], Masahiro TAMOI[1,2], Shigeru SHIGEOKA[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]Fac. Agr., Tottori Univ.)

【目的】

我々はこれまでに、シロイヌナズナにおいて熱ショック転写因子HsfA2が光酸化的ストレスに迅速に応答すること、熱ショックタンパク質（HSPs）などの防御遺伝子の発現を誘導によるストレス耐性能獲得に寄与する重要な転写因子である事を明らかにしている（*Plant J.* 2006）。また、HsfA2の発現はプロモーター領域に存在する熱ショックエレメント（HSE）を介してHsfA1dおよびHsfA1eが制御していること（*Plant Cell Physiol.* 2011）、さらに酸化的ストレスにより生じた活性酸素種に起因する26Sプロテアソームの不活性化は、細胞質に存在するHsfA1d-Hsp90複合体の解離を引き起こし、フリーとなったHsfA1dが核移行し、HsfA2の発現を誘導する経路を提唱してきた（*Plant Cell Physiol.* 2010）ところで最近、HsfA1dによる標的遺伝子の誘導にはHsfA1dに存在する2つのCys残基（C153・C357）の酸化還元状態が関与することが報告され、HsfA1dの翻訳後調節がHsfA2を含めた標的遺伝子の発現制御に重要であることが強く示唆された。 そこで本研究では、HsfA1dのHSE認識機構をin vitroで解析した。

【方法と結果】

N 末端に His x 6 配列を付加した HsfA1d、変異型 $HsfA1d^{C153S,C357S}$、および HSP90.2 cDNA を pColdII ベクターにサブクローニングした。大腸菌 BL21(DE3)株内でそれぞれのタンパク質を過剰発現させ、His-Trap カラムおよびゲル濾過カラムを用いて Äkta system によりリコンビナントタンパク質を精製した。次に、HsfA1d が HSE を認識するかをゲルシフトアッセイにより検討した結果、HsfA1d の HSE への結合を示すシグナルが検出された。この結合に対する HSP90.2 の関係を明らかにするために、HSP90.2 と競合的な条件下で HsfA1d の HSE との結合を解析した。その結果、HSP90.2 は濃度依存的に HsfA1d の HSE への結合を抑制したことから、HSP90.2 は HsfA1d の HSE 認識のネガティブレギュレーターとして機能していることが明らかとなった。

一方、変異型 $HsfA1d^{C153S,C357S}$ も HsfA1d と同様 HSE に in vitro で結合し、その結合は HSP90.2 濃度依存的に阻害された。この結果は、HsfA1d の HSE への結合が Cys 残基の酸化還元状態に依存していないことを示すものであり、HsfA1d による標的遺伝子の転写活性化機構には別の因子が必須であるかもしれないことを示唆する。

heat shock transcription factor, oxidative stress, heat shock protein

講演番号：3C05p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ C 校舎 05 会場

シロイヌナズナキチン受容体の細胞内動態の解析

Study on the Cellular Behavior of Chitin Receptor in Arabidopsis Cells

○安川 大喜[1]、松波 絵里香[1]、地阪 光生[1]、長屋 敦[1]、横田 一成[1]、中川 強[2]、西村 浩二[2]([1]島根大・生資、[2]島根大・総科セ・遺伝子)
○Daiki Yasukawa[1], Erika Matsunami[1], Mitsuo Jisaka[1], Tsutomu Nagaya[1], Kazushige Yokota[1], Tsuyoshi Nakagawa[2], Kohji Nishimura[2] ([1]Fac.of Life and Env. Sci.,Shimane Univ., [2]Inter. Cent. Sci. Res., Shimane Univ.)

シロイヌナズナキチン受容体（CERK1）は、細胞膜において病原菌の細胞壁に由来するエリシター分子としてキチンを認識し、植物病原菌に対する防御応答の信号伝達因子として機能していることが近年の研究から明らかになってきた。CERK1 は細胞膜受容体であり、キチンを認識する細胞外ドメインと細胞内信号伝達経路の活性化に関わる細胞質ドメインからなる。本研究では sGFP と融合した CERK1 タンパク質（CERK1-sGFP）を発現する形質転換シロイヌナズナの根を用いて、CERK1 分子の細胞内動態を共焦点レーザー蛍光顕微鏡により解析した。CERK1-sGFP は主に細胞膜に局在するが、細胞内の動的なドットとしても局在していた。リサイクリングエンドサイトーシスの阻害剤として知られる Brefeldin A 処理を施した結果、CERK1-sGFP の細胞内のドットは BFA body となり、エンドサイトーシス追跡試薬である FM4-64 でも染色された。したがって、CERK1 もエンドサイトーシスすることが示唆された。各種小胞輸送阻害剤を用いて CERK1 の細胞内輸送経路を解析したので、本大会ではその結果も併せて報告する。

chitin, chitin receptor, vesicle trafficking

講演番号：3C05p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ C 校舎 05 会場

植物の耐熱性を向上させるアルカロイドに関する研究

Study on alkaloid which enhances thermotolerance in plant

○原 正和[1]、栗田 郁也[2] ([1]静岡大　グリーン科技研、[2]静岡大　農学部)
○Masakazu Hara[1], Ikuya Kurita[2] ([1]Shizuoka Univ RIGST, [2]Shizuoka Univ. Fac. Agr.)

【はじめに】近年、気象変動に伴い、農作物の生産は困難を来している。特に、夏季の高温による作物のダメージは大きく、植物の耐熱性の向上は喫緊の課題である。温調施設の建設や、耐熱性品種の作出といった、従前の対策の推進が求められる一方、安価で安全かつ手軽に植物の耐熱性を向上させる新技術の開発も期待されている。われわれは、一昨年の本大会において、植物の含硫揮発成分イソチオシアネートが、植物の耐熱性を向上させることを報告した。本発表では、植物アルカロイドに、同様の植物耐熱性向上効果を見出したので報告する。
【方法】主として薬用植物等に含まれる有効成分を中心に、13 種類のアルカロイドを選出した。ポジティブコントロールとして、ゲルダナマイシンを用いた。われわれが設定した方法で、無菌培養したシロイヌナズナに各物質を様々な濃度で作用させ、47℃、1 時間、熱ショックを与えた。その後、3 日間、元の条件で栽培し、植物体の新鮮重量を測定し、併せて、クロロフィル含量を測定した。遺伝子の発現は、半定量 RT-PCR で評価した。
【結果と考察】我々が設定したシロイヌナズナ耐熱性評価法が、適切に機能するかを調べるために、ゲルダナマイシンを用いて試験したところ、確かに、ある濃度で作用させた区の新鮮重量は、対照（無処理）区の重量と比べ、有意に高かった。そこで、本法を用い、13 種類のアルカロイドを試験して、新鮮重量を指標とした耐熱性向上活性の評価を行った。すると、イソキノリンアルカロイドの中に耐熱性向上を示すものがあった。さらに、シロイヌナズナにおける 2 種類の熱ショックタンパク質の発現を調査したところ、耐熱性向上を示したアルカロイドにおいて、誘導効果が見られた。当該の有効アルカロイドと使用法に関し、実用化に向けた開発が進められている。

alkaloids, heat stress, thermotolerance

講演番号：3C05p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ C 校舎 05 会場

テルペン類の植物耐熱性向上に関する研究
Study on thermotolerance enhancement of plant by terpenoids
○角田 佳紀[1]、原 正和[2]([1]静岡大院農、[2]静岡大グリーン科技研)
○Yoshiki Sumita[1], Masakazu Hara[2] ([1]Shizuoka Univ. Agr., [2]Shizuoka Univ. RIGST)

【はじめに】異常気象による夏場の高温は、植物生産を量的質的に悪化させている。植物の耐熱性を向上させる技術は、高温下での植物生産性の低下を緩和する点で有益である。われわれは、揮発性のテルペン類が、植物の耐熱性の向上に関与する可能性があるとの先行情報から、食品や医薬品に用いられる種々のテルペン類に関し、植物の耐熱性を向上させるか否かについて調査した。われわれが設定した試験方法で耐熱性の有無を判定したところ、ある特定のテルペン類に植物耐熱性向上作用が見られたので報告する。
【方法】アルファルファの種子を、ピートバンを入れたプラスチックポット（150 ml 容積、口径 7cm、高さ 8.5cm）に播種し、22 度の下、明所と暗所をそれぞれ 16 時間と 8 時間に設定したインキュベーターにて栽培した。播種後 12 日目で、各種テルペン類を、0.05 mM から 5 mM の濃度範囲で水に分散させたものを、ハンディスプレーボトルを使って葉面噴霧した。その 2 日後、ヒートショック区域に対し 55℃・1 時間のヒートショックを与えた。その後、同じ条件に戻して 7 日間栽培を継続し、写真を撮影した後、地上部の新鮮重量を測定した。なお、これらの日数は、栽培状況によって僅かに変化させることがあった。耐熱性の有無の判断は、ある処理区の新鮮重量が、対照区の新鮮重量よりも有意に大きい場合を、耐熱性ありとした。
【結果と考察】今回の試験系では、あるモノテルペンに、アルファルファの耐熱性を向上させる活性が認められた。しかし、その他のテルペン類には、耐熱性向上活性は見いだせなかった。本発表では、効果を有するテルペン類の構造上の特徴について考察したい。

alfalfa, terpenoids, thermotolerance

講演番号：3C05p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ C 校舎 05 会場

シロイヌナズナにおけるポリアミン酸化酵素 5 の生理的役割

Physiological roles of polyasmine oxidase 5 in *Arabidopsis thaliana*

○Kim Dong Wook[1]、新津 勝[2]、ベルベリッヒ トーマス[3]、草野 友延[1] ([1]東北大院生命、[2]城西大薬、[3]BiK-F)
○Dong Wook Kim[1], Masaru NIITSU[2], Thomas BERBERICH[3], Tomonobu KUSANO[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Josai Univ., [3]BiK-F)

【背景】ポリアミンは、植物の生長や環境変化に対する応答において重要な役割を果たすことが知られている。このポリアミンの恒常性は、生合成量と分解量との動的な均衡によって保たれていると考えることができる。シロイヌナズナのゲノムには、ポリアミン分解に関与する 5 種のポリアミン酸化酵素遺伝子が存在し、*AtPA01*～*AtPA05* と呼称されている。国内外の複数のグループにより、AtPA01～AtPA04 までの 4 種の組換え酵素の特徴づけがなされ、基質特異性は異なるものの、4 種全てが逆変換反応を触媒することが示された。我々は、残された *AtPA05* につき解析を行い、昨年の本大会において、大腸菌で調製した組換え AtPA05 酵素が、テトラアミンであるスペルミンやサーモスペルミンをトリアミンであるスペルミジンへ逆変換する活性を持つことを報告した。
【目的】シロイヌナズナにおける AtPA05 の生理的役割を明らかにすることを目的とした。
【方法】T-DNA 挿入によりポリアミン酸化酵素 5 (*AtPA05*)遺伝子の機能が欠損した loss-of-function 変異体を用いて、シロイヌナズナの生育への影響を種々検討した。
【結果】
（1） *Atpao5-1*、*Atpao5-2* の 2 つの loss-of-function 変異体のポリアミン含量を野生株のものと比較検討したところ、プトレシン、スペルミジン、スペルミンの含量は野生株とほぼ同濃度であったが、サーモスペルミン含量が野生株の約 2 倍となっていた。上述の組換え AtPA05 酵素の基質特異性の結果を加味すると、AtPA05 はシロイヌナズナ植物体においてサーモスペルミン酸化酵素として機能することが強く示唆された。
（2） 幼植物の生育において、野生株と *Atpao5-1*、*Atpao5-2* との間には差が見られなかったが、培地に低濃度のサーモスペルミンを加えると変異体の地上部の生育が著しく阻害された。一方、根部の生育には大きな差異が見られなかった。サーモスペルミンの 20 倍濃度のスペルミン、あるいは 200 倍濃度のスペルミジンやプトレシンでは両者の生育に差異は見られなかった。さらに、*Atpao5-2* 植物に野生株由来の *AtPA05* 遺伝子を導入した形質転換植物では、サーモスペルミン含有培地での生育阻害が回復することを確認した。
上記の結果をもとに、ポリアミン酸化酵素 5 のシロイヌナズナでの役割を考察する。

polyamine, polyamine oxidase, *Arabidopsis thaliana*

講演番号：3C05p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ C 校舎 05 会場

苔類ゼニゴケを用いた祖先的な赤色光シグナル伝達機構の解析

Analysis of the ancestral red light signaling in the liverwort, *Marchantia polymorpha* L.

○井上 佳祐[1]、西浜 竜一[1]、石崎 公庸[2]、河内 孝之[1]([1]京大院生命、[2]神戸大院理)
○Keisuke INOUE[1], Ryuichi NISHIHAMA[1], Kimitsune ISHIZAKI[2], Takayuki KOHCHI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kobe Univ.)

固着生活を営む植物にとって、「光」は光合成のエネルギー源であると同時に、周囲の環境を認識するための重要な環境情報の 1 つである。植物は光をその波長ごとに異なる光受容体で受容しており、フィトクロムは赤色光/遠赤色光を特異的に受容する光受容体である。これまでに、基部陸上植物である苔類ゼニゴケはフィトクロム遺伝子（*MpPHY*）を 1 分子種のみもち、被子植物のフィトクロムと同様の生化学的性質をもつことを報告した。フィトクロムのシグナル伝達機構として被子植物では bHLH 型転写因子である PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR（PIF）を介したシグナル伝達機構がよく知られている。今回、フィトクロムシグナル伝達機構の原形と進化を明らかにすることを目的に、ゼニゴケ PIF 相同遺伝子の探索を行い、ゼニゴケが PIF ファミリーのオルソログ遺伝子（*Mp*PIF）を 1 分子種のみもつことを見出した。*Mp*PIF の過剰発現株およびノックアウト株を作出し、表現型解析を行ったところ、*Mp*PIF 過剰発現株は赤色光下において野生株と比較して葉状体が伸長生長した。一方、*Mp*PIF ノックアウト株は青色光下でも赤色光依存的な光形態形成を示した。さらに、*Mp*PIF ノックアウト株は恒常活性型フィトクロム発現株と同様に遠赤色光下においても無性芽の成長が開始した。つまり、光形態形成を負に制御する転写因子 PIF を介した赤色光シグナル伝達機構は基部陸上植物において既に成立していたことを明らかにした。ゼニゴケはその冗長性の低さからフィトクロム-PIF を介したシグナル伝達機構を解析する上で有効なモデル植物であることが期待される。

phytochrome, light signaling, liverwort

講演番号：3C05p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ C 校舎 05 会場

UV-C で誘導されるオオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子の機能解析

Function of Nudix hydrolase genes in barley induced by UV-C irradiation

○田中 小百合[1]、木原 誠[2]、杉本 学[1]([1]岡山大学・植物研、[2]サッポロビール・バイオ研究開発部)
○Sayuri TANAKA[1], Makoto KIHARA[2], Manabu SUGIMOTO[1] ([1]IPSR, [2]BRDD, Sapporo Brew. Ltd.)

【背景・目的】植物は、紫外線、高濃度塩類、乾燥等の環境ストレス下で、TCA サイクルやアミノ酸代謝の阻害、DNA らせん構造の崩壊といった傷害を生じる。DNA を構成する 4 種類の塩基の中でもグアニンは最も酸化損傷を受けやすく、8-oxoG を生成する。8-oxoG はシトシンだけでなくアデニンとも塩基対を形成してしまうため､DNA のトランスバージョンの変異を引き起こす要因となる。Nudix hydrolase は植物の代謝制御や 8-oxoG を含む酸化ヌクレオチド修復能を有する酵素の１つであり、環境ストレス下における植物の適応力に重要な役割を担う。これまでに我々は、オオムギに 14 種類の Nudix hydrolase 遺伝子が存在し、UV-C、塩、乾燥、ABA、SA 処理により応答性が異なることを明らかにした。さらに､今後は環境悪化によって引き起こされるオゾン層の破壊による、短波長紫外線ストレスも懸念されることから、UV-A(340nm)、UV-B(312nm)、UV-C(260nm)の紫外線応答について解析した結果、オオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子は紫外線の波長により応答性が異なること、UV-C に対し HvNUDX6、7、12、14 遺伝子の発現が有意に増加することが明らかとなった。本研究では、UV-C で発現誘導するオオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子の機能を明らかにする目的で、これらの遺伝子がコードするタンパク質の酵素科学的性質を検討した。

【方法・結果】HvNUDX6、7、12、14 遺伝子を大腸菌で発現させ、得られた可溶性タンパク質を Ni-NTA カラムで精製した。ADP-Sugar を特異的に加水分解する AtNUDX14 と 63%の相同性を示す HvNUDX7 は、ADP-ribose だけでなく、8-oxo-dGTP、8-oxo-dGDP に対しそれぞれ、0.39、0.53、0.35 pmol/min/mg の加水分解活性を示した。AP_5A に対し最も高い加水分解活性を有する AtNUDX26 と 56%の相同性を示す HvNUDX12 は AP_5A だけでなく、8-oxo-dGTP、8-oxo-dGDP、ADP-ribose に対し、17.8、18.3、17.3、2.0 pmol/min/mg の加水分解活性を示した。HvNUDX6 と HvNUDX14 は酸化ヌクレオチド、糖ヌクレオチド AP_nA、NADH、CoA、FAD に対する加水分解活性を示さなかった。

Nudix, UV, Barley

講演番号：3C05p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ C 校舎 05 会場

被覆栽培したチャの被覆解除時に引き起こされるストレスに対する応答

Stress responses of shade-grown tea leaves after removal of shading for direct sunlight

○佐野 智[1]、竹本 哲行[2]、荻原 彬[1]、鈴木 健吾[1]、増村 威宏[1,3]、佐藤 茂[1,3]、高野 和文[1]、三村 裕[2]、森田 重人[1,3] ([1]京都府大院生命環境、[2]京都農技セ　農林セ茶研、[3]京都農技セ　生資セ)
○Satoshi Sano[1], Tetsuyuki Takemoto[2], Akira Ogihara[1], Kengo Suzuki[1], Takehiro Masumura[1,3], Shigeru Sato[1,3], Kazufumi Takano[1], Yutaka Mimura[2], Shigeto Morita[1,3] ([1]Grad. Sch. Life Env. Sci., Kyoto Pref. Univ., [2]Tea Indus. Res. Div., Agr. Forest. Technol. Dept., Kyoto Pref. Agr. Forest. Fish. Technol. Center, [3]Biotech. Res. Dept., Kyoto Pref. Agr. Forest. Fish. Technol. Center)

玉露や抹茶などの高級茶は被覆栽培をした茶葉から生産される。被覆栽培とは、新芽の生育中に茶樹を遮光資材で覆って 20 日間程度栽培した後、摘採・収穫する方法である。これにより茶葉の色が濃くなり、香りやうまみの成分が増加する。近年の茶価の低下や加工用抹茶の需要拡大に伴い、被覆茶をより多く収穫するために、従来は一番茶（4 月～5 月に栽培、収穫される茶）でのみ行われていた被覆栽培を、二番茶（一番茶の収穫後、6 月～8 月に栽培、収穫される茶）にも適用する例が多くなっている。しかし、このような長期間の被覆栽培を複数年にわたって行うと、チャがストレスを受け、樹勢が低下するという報告がある。本研究では、被覆栽培したチャが受けるストレスは、被覆解除時の強光ストレスであるという仮定のもと、圃場においてチャのストレス応答を調査した。

被覆方法としては、茶樹の上に枠組みを作りそこに黒色化繊を展開する棚掛けと、茶樹の上に直接黒色化繊をかぶせる直掛けの 2 つの方法を用いた。20 日または 30 日間被覆を行い、展開直後の第 1 葉または第 2 葉を用いて、クロロフィル蛍光の測定を行った。また直掛け被覆で栽培したチャについては、カルボニル化タンパク質の量と、活性酸素（ROS）消去系酵素の活性を測定した。

その結果、光化学系 II 活性の指標である Fv/Fm 値は被覆解除後に低下したが、その程度は直掛けより棚掛けの方が大きかった。これは、直掛けに比べて棚掛けでは遮光が厳密であり、弱光にチャがより適応したためであると思われる。Fv/Fm 値は直掛けでは 3 日後に、棚掛けでも 1 週間後には、被覆せずに露天栽培したものと同程度にまで上昇したことから、被覆解除によるストレスのダメージは速やかに回復することが分かった。酸化傷害のマーカーであるカルボニル化タンパク質の量を測定したところ、被覆栽培によって露天栽培したものより減少する傾向が見られたが、被覆解除後急速に増加し、1 日後には露天栽培の 1.5～2 倍になった。このことから被覆解除によってチャが強い酸化的ストレスを受けていることが明らかになった。しかし、その後カルボニル化タンパク質の量は、露天栽培したものと同程度にまで減少した。これらのことから、年を越しての樹勢の低下は、光化学系の損傷を含めた、タンパク質の酸化による機能障害だけでは説明できないことが分かった。また、ROS 消去系の酵素の内、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）とグルタチオンレダクターゼの活性が、被覆栽培によって低下し、被覆解除に伴って上昇することがわかった。特に SOD は 1 日後には露天栽培したものと同程度にまでに回復した。被覆解除後のストレス障害とその速やかな回復に、このような酵素の活性の増減が影響している可能性が示唆された。

tea, shade culture, oxidative stress

講演番号：3C05p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ C 校舎 05 会場

Response of antioxidative enzymes and lipid peroxidation of *Kandelia obovata* seedlings to long-term salinity

○MD. DAUD HOSSAIN, Naoyuki Taira, hironori Iwasaki, Masashi Inafuku, Hirosuke Oku (Ryukyu Univ)

Salinity affects normal growth and development of plants depending on their capacity to overcome the induced stress. In this study, 2-month-old *Kandelia obovata* seedlings were subjected to 0, 0.5, 1.5 and 3% salt solutions, and the activities of some antioxidative enzymes and lipid peroxidation were determined after 1- and 2-month of salt stress exposure. Different trends of enzymatic activities were revealed between the leaves and roots of salt treated seedlings. Increasing salt concentrations caused a significant decrease in leaf superoxide dismutase (SOD) activity while root SOD activity increased upto 1.5% salinity and then declined at 3% salinity. The ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (GPX) activities in leaves and roots of both 1- and 2-month treated seedlings increased with increasing salinity, but root APX activity declined at high salinity. Although, the leaf catalase (CAT) activity decreased with increasing salinity, the root CAT activity increased markedly in 1-month treated seedlings but remained unchanged in 2-month treated groups. In case of lipid peroxidation, increasing concentrations of salinity caused a decrease in malondialdehyde (MDA) level in leaves and roots of 1- and 2-month treated seedlings. These results suggest that long-term salinity tolerance of *Kandelia obovata* plants might be closely related with the increased capacity of antioxidative system to scavenge reactive oxygen species and thus suppressed level of lipid peroxidation under salinity conditions. Moreover, decrease in leaf SOD activity under salt stress suggests that the enzymes involved in H_2O_2 scavenging (APX, GPX and CAT) can be more important to defend against salinity-induced oxidative stress than SOD and that non-enzymatic ways might have been involved in the scavenging of superoxide radicals.

Salinity, Antioxidative enzymes, *Kandelia obovata*

講演番号：3C05p23
講演日時、会場：3 月 29 日 17:59～ C 校舎 05 会場

孔辺細胞アブシジン酸シグナル伝達におけるグルタチオンの役割

Roles of glutathione in abscisic acid signaling in guard cells

○宗正 晋太郎[1]、室山 大地[1]、長橋 大樹[2]、中村 宜督[1]、森 泉[3]、村田 芳行[1]（[1]岡山大院環境生命、[2]岡山大農、[3]岡山大 IPSR）
○ Shintaro MUNEMASA[1], Daichi MUROYAMA[1], Hiroki NAGAHASHI[2], Yoshimasa NAKAMURA[1], Izumi MORI[3], Yoshiyuki MURATA[1] ([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., [2]Faculty of Agriculture, Okayama Univ., [3]IPSR, Okayama Univ.)

気孔は、一対の孔辺細胞から形成された小孔であり、蒸散やガス交換の調節を行う重要な場所である。植物は様々な刺激に応答して、気孔の開度を厳密に調節することで環境変化に適応している。乾燥ストレス下で合成される植物ホルモンであるアブシジン酸は、気孔閉口を誘導し、蒸散による水分損失を抑制する働きを持つ。グルタチオンは、細胞の酸化還元状態の調節に機能し、成長などの重要な生理学的プロセスに関与している。これまで我々の研究から、グルタチオンは孔辺細胞内に比較的多く存在しており、アブシジン酸の誘導する気孔閉口シグナルの負の調節因子として機能することが明らかとなった。本研究では、グルタチオンによるアブシジン酸シグナル伝達経路の調節メカニズムの詳細を明らかにするため、シロイヌナズナの *cad2-1* 変異体を用いて、気孔閉口に関わる S-type 陰イオンチャネルやカルシウムイオンチャネルの活性測定を行った。

Stomata, Abscisic acid, Gluathione

講演番号：3D01a01
講演日時、会場：3 月 29 日 09:00～ D 校舎 01 会場

Pseudomonas aeruginosa PAO1 株由来γ-glutamyltranspeptidase の機能解析
Characterization of γ-glutamyltranspeptidase from Pseudomonas aeruginosa PAO1
○若山 守[1]、野々村 祐輝[1]、高木 一好[1]、矢野 成和[2]、梅川 碧里[1] ([1]立命館大学生命科学、[2]山形大学院理工)
○ Mamoru Wakayama[1], Yuki Nonomura[1], Kazuyoshi Takagi[1], Shigekazu Yano[2], Midori Umekawa[1] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Yamagata Univ.)

【目的】*Helicobacter pylori* のγ-glutamyltranspeptidase が感染宿主に対し、病態形成を及ぼす要素であることが示唆されつつある今、病原微生物由来の GGT の生理的意義を明らかにすることは大変興味深いものがあると思われる。本研究では、日和見感染症の原因菌の１つである *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株のγ-glutamyltranspeptidase（GGT）に着目し、生理的意義、及び酵素の特性評価を行うことを目的とした。

【方法】BlueNative-PAGE（GGT 活性染色法）,および RT-PCR 法を用いて *Ps. aeruginosa* PAO1 株における GGT の発現を確認した。また、*Ps. aeruginosa*PAO1 株の染色体 DNA を抽出し、PCR 法により GGT 構造遺伝子領域を増幅し、pET-22b(+)に組み込んだ。作製したプラスミドを用い *E. coli* Rosetta-gami B(DE3)を形質転換し、組換え体 GGT を発現させた。組換え体 GGT は弱陰イオン、ゲル濾過などのクロマトグラフィーを用いて分離精製を行った。また、高速液体クロマトグラフィー、比色定量によって酵素の特性評価を行った。

【結果および考察】*Ps. aeruginosa* PAO1 株には３つの GGT 遺伝子が存在することが明らかになった。RT-PCR を行った結果、３つの GGT 全ての発現が認められた。さらに *Ps. aeruginosa* PAO1 を培養、集菌破砕し得られた無細胞抽出液を Blue Native-PAGE に供し活性染色を行った結果、１本のバンドの呈色が見られた。その結果を踏まえ、３つの GGT 遺伝子の生理的意義が不明確であるため、３つの GGT（paggtⅠ、paggtⅡ、paggtⅢ）の組換え体を作製し、個々の酵素の特性評価を行った。paGGTⅠは、微弱ながら活性を有するものの数時間で失活した。シグナル予測からもシグナルペプチドが存在せず、ペリプラズムへ輸送がうまくいかないためプロセシング、もしくはフォールドがうまく進行していない可能性があり、遺伝子は保持されてはいるものの、生成物は生体内ではうまく機能していないことが考えられた。また paGGTⅡもほとんど発現が確認できなかった。しかし、C 末端に適当な長さペプチド付加させることで 245 倍の活性上昇が見られた。C 末端にペプチドが付加した paGGTⅡと paGGTⅢは各種クロマトグラフィーを用い単一状態にまで精製した。得られた酵素の特性評価を行った結果、双方の酵素ともγ-グルタミル基受容体に対する *K*m 値は非常に高く、生体内においては、アミノ酸等の転移反応は関与していないと推測された。また、paGGTⅡとⅢの間には、基質特異性を始め、互いの特性を補い合うような傾向が見られた。

γ-glutamyltranspeptidase, Pseudomonas aeruginosa PAO1, γ-glutamyl compounds

講演番号：3D01a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ D 校舎 01 会場

Actinomadura sp. RD001933 株由来新規プロテアーゼの発現と自己分解抑制
Expression and autolysis repression of a novel protease from *Actinomadura* sp. RD001933
○後藤 あずさ、杉森 大助（福島大理工）
○Azusa GOTO, Daisuke SUGIMORI (Fukushima Univ.)

【緒言】

プロテアーゼは古くから研究開発され、様々な分野で利用されている。医療機器洗浄液にもプロテアーゼ（サチライシン）が使用されているが、手術器具に強固に付着した血液汚れを完全に洗浄することができないため、強力なプロテアーゼの開発が望まれている。本研究では、固着血液に対して高い洗浄力を有する新規プロテアーゼの開発を目指し、放線菌を対象に目的酵素のスクリーニングを行った。その結果、*Actinomadura* sp. RD001933 株が強力なプロテアーゼを分泌生産することを見出した。これまでに当研究室では、本酵素の精製、キャラクタリゼーション、遺伝子クローニングを行った。一方、RD001933 株による本酵素の生産量は満足するものではなく、さらに既知プロテアーゼと同様に自己分解も確認された。そこで本研究では、これらの問題点の解決を目指した。本発表では、*Streptomyces lividans* を用いた新規プロテアーゼの組換え発現と、本酵素の自己分解抑制等について報告する。

【結果】

Streptoverticillium cinnamoneum 由来 phospholipase D のプロモーター、シグナル、ターミネーター間に本プロテアーゼ遺伝子のプロ配列と成熟配列を連結した発現ベクター pUC702/actpro を構築した。これを用いて宿主 *S. lividans* を形質転換し、組換え大量発現株を得た。発現株によるプロテアーゼの生産は、培養 4 日目の培養上清中に約 16 U/ml（約 30 U/mg）の活性を示し、親株の生産量約 2 U/ml（約 3 U/mg）の 8 倍となった。さらに、 EDTA や界面活性剤（SDS 等）を添加することにより最大約 3 倍活性を向上させることができた。

多くのプロテアーゼは自己分解を起こすことが知られており、本酵素についても自己分解が確認された。そこで酵素液にEDTA、グリセリン、DTT、スキムミルクを添加することで自己分解の抑制を試みた。その結果、スキムミルクを添加することで40℃においても自己分解が大幅に抑制されることがわかった。

今後、X線結晶化構造解析を進めて自己分解点を予測し、部位特異的変異を導入することで自己分解の抑制を試みる予定である。

Actinomadura sp., protease, expression

講演番号：3D01a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ D 校舎 01 会場

親水性イオン液体[BMIM][Cl]耐性 *Bacillus* sp. CMW1 由来のプロテアーゼ

Extracellular protease from hydrophilic ionic liquid [BMIM][Cl]-tolerant *Bacillus* sp. CMW1

○古中 康平[1]、池田 泰之[1]、貝田 英彰[1]、倉田 淳志[1]、広瀬 侑[2]、岸本 憲明[1] ([1]近畿大農、[2]豊橋技科大・EIIRIS)
○Kohei FURUNAKA[1], Yasuyuki IKEDA[1], Hideaki KAIDA[1], Atsushi KURATA[1], Yuu HIROSE[2], Noriaki KISHIMOTO[1] ([1]Kinki Univ, [2]Toyohashi Tech. EIIRIS)

【目的】イオン液体はアニオンとカチオンから構成され、常温常圧で液体の塩である。不揮発性や難燃性を示すため安全性が高い。アニオンとカチオンの組み合わせを変化させることで、親水性や疎水性を示すイオン液体を調製可能である。親水性イオン液体は、セルロースやケラチンなどの難水溶性バイオマスを溶解できるため、バイオマス利用技術に応用されつつある。イオン液体は溶媒として有用性が高いが、高濃度の親水性イオン液体中では酵素が変性して失活する。親水性イオン液体や疎水性イオン液体存在下で *Escherichia coli* や *Bacillus subtilis* の生育は阻害された。そのため高濃度の親水性イオン液体中で利用できる酵素や微生物の開発が期待されている。昨年度、我々は親水性イオン液体存在下で生育する *Bacillus* sp. CMW1 を見いだし、本菌株が生産するプロテアーゼの諸性質について報告した[1)]。本年度は、本酵素についてさらに諸性質を解明した。さらに本菌株のゲノム配列を決定して、酵素遺伝子の取得を試みた。

【方法・結果】親水性イオン液体[BMIM][Cl]存在下で生育する微生物を探索したところ、京都味噌から *Bacillus sp.* CMW1 株を見いだした。CMW1 株は、10% [BMIM][Cl]存在下で良好に生育し、培養液上清中においてプロテアーゼ活性を検出できた。硫酸アンモニウム沈殿と各種カラムクロマトグラフィーを用いて、培養液上清から本酵素を電気泳動的に均一になるまで精製した。精製酵素を用いて、諸性質の検討を行った。PMSF によって酵素は失活したことから、本酵素はセリンプロテアーゼに分類された。本酵素反応の最適 pH は 8.0~9.0 であった。最適反応温度は 55℃であり、$CaCl_2$ の添加により 65℃となった。本酵素は、pH 4.0~12.5 で安定であった。10% [BMIM][Cl] 存在下では本酵素反応は 45%の活性を示した。[BMIM][Cl]を用いて酵素安定性を検討したところ、80% [BMIM][Cl]存在下まで安定であった。有機溶媒耐性を検討したところ、50%（v/v）各種有機溶媒中で活性を示した。さらに本菌株のゲノム配列の解読を試みたところ、スキャフォールド 19 本を得られ、ゲノムサイズは 3.9 Mbp であった。本酵素の N 末端アミノ酸配列を利用してゲノム配列を検索したところ、本酵素遺伝子を見いだした。

1) 妹尾ら、2013 年度日本農芸化学会大会講演要旨集 2B23p06

ionic liquid, protease, Bacillus

講演番号：3D01a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ D 校舎 01 会場

既存プロリダーゼとは異なる Gly-Pro 分解性システインペプチダーゼの生化学的解析と結晶化

Biochemical analysis and crystallization of Gly-Pro-hydrolyzing cysteine peptidase that is different from conventional prolidases

○河野 良輔[1]、坂本 琢馬[1]、中野 博明[2]、渡部 邦彦[1]([1]京府大院・生命環境・応用生命、[2]兵庫医療大学・薬)

○Ryosuke Kono[1], Takuma Sakamoto[1], Hiroaki Nakano[2], Kunihiko Watanabe[1] ([1]Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University, [2]Department of Pharmacy, Hyogo University of Health Sciences)

【背景･目的】コラーゲン中に存在する繰り返し配列 Gly-Pro-X に含まれる、最も難分解性ジペプチド Gly-Pro を分解する酵素は、アーキアや真正細菌などで金属ペプチダーゼであるプロリダーゼとして報告があるが、その例は極めて少ない。そこで細菌由来新規 Gly-Pro 分解酵素の発見を目指し、Gly-Pro の分解活性を指標にスクリーニングを行った結果、乳酸菌 *Lactobacillus farciminis* JCM1097 株が選択された。JCM1097 株から Gly-Pro 分解酵素を精製単離し N 末端アミノ酸配列をゲノム情報と照合したところ、既存のプロリダーゼとは全く異なる C69 ファミリーに属するシステインペプチダーゼであることが判った*。このファミリーは翻訳後開裂による成熟化の後 N 末端に活性部位 Cys を持つことが判っているが、結晶構造や詳細な機能については未だ不明な点が多い。そこで本酵素遺伝子を大腸菌で発現させたリコンビナント酵素を用いて、基質特異性の調査及び活性部位 Cys9 の変異、X 線結晶構造解析のためのタンパク質結晶化条件の検討を行った。

【方法・結果】基質特異性は、種々のジペプチド基質とリコンビナント酵素を 37℃10 min 反応させた後、アミノ酸組成分析機で検出･解析した。その結果、本酵素はジペプチドに対し広い基質特異性を有するが、X-Pro に対しては Gly-Pro に高い選択性と強い活性を示すことが判った (*Pyrococcus furiosus* 由来プロリダーゼの 18.5 倍)。加えて本酵素は Gly-Hyp に対しても Gly-Pro の 17.5%の活性があることが判明し、既存のプロリダーゼとは全く異なる基質特異性を示すことが判明した。

活性部位 Cys9 を部位特異的変異により Ala に変異させ (変異体酵素 C9A) 大腸菌で発現、精製した。変異体酵素 C9A の N 末端アミノ酸配列解析により、成熟化に伴う N 末端 8 残基の開裂が起こらないことが判り、Cys9 残基が自己触媒的に成熟化の機能を担うことが示唆された。

結晶化条件のスクリーニングは､大阪大学蛋白研で自動結晶化ロボット Mosquito (96 穴 sitting drop plate, 200 nl-drop) を使用し、異なる glycerol 濃度 (10 or 30%) のタンパク質溶液とリザーバーキット (Wizard Ⅰ,Ⅱ、Crystal Screen Ⅰ,Ⅱ) の各 48 条件、計 192 条件で行った。20°C1 週間静置の結果、33 条件で結晶及び沈殿が観察された。このうち 4 条件について、2 μl-drop で結晶生成の再現性を確認した。さらに pH や沈殿剤濃度､そしてタンパク質濃度を変えて結晶化条件の最適化を試みた結果、2-propanol 及び 1,6-hexandiol を沈殿材とする 2 条件で 0.15 mm×0.05 mm×0.05 mm 程度の良質の結晶が得られた。

＊*J. Biochem*. 154: 419-427 (2013)

dipeptidase, Gly-Pro, prolidase

講演番号：3D01a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ D 校舎 01 会場

超好熱菌由来 D 型アミノ酸特異的ペプチダーゼの機能解析
Enzymatic analysis of D-amino acid specific archaeal peptidase
○張 榮維、濱口 昌宏、小川 哲弘、日高 真誠、正木 春彦（東大院・農生科・応生工）
○Jung Wei Chang, Masahiro Hamaguchi, Tetsuhiro Ogawa, Makoto Hidaka, Haruhiko Masaki (Univ. of Tokyo)

【目的】　タンパク質は Gly 以外 L-アミノ酸だけからなるが、加齢により一部の残基が非酵素的にエピメリ化して D-アミノ酸となる例が知られており、タンパク質中の D-アミノ酸は疾病との関連で研究が進んでいる。またタンパク質は、加熱や長時間の保温によりアミノ酸のエピメリ化が進むことが知られている。生物は、このようなエピメリ化に対する品質管理機構を持っている可能性を考え、我々は、D-アミノ酸を持つペプチドに特異的に働くペプチダーゼに注目した。ペプチダーゼデータベース MEROPS の S12 family は、ペプチドグリカン合成に働く D-Ala-D-Ala カルボキシペプチダーゼ B を代表とする分類群であるが、バクテリアだけでなく、ペプチドグリカンと無関係のアーキア、菌類、動物、植物にも広く分布している。もし非酵素的に進行するエピメリ化に対抗する機構があるとすれば、エピメリ化の速度は温度に依存するため、我々は、超好熱性アーキアの細胞内 S12 family ペプチダーゼに注目し、酵素的性質を再検討した。
【方法･結果】　S12 family の中で、超好熱性アーキア由来で、膜結合性／分泌性でない細胞質性と推定される *Aeropyrum pernix*、 *Pyrobaculum aerophilum*、 *Pyrococcus abysii* のペプチダーゼ APE、PAE、Pab87 に着目した。このうち Pab87 はその 8 量体の立体構造が解かれている。
N 末端に His タグを付加した形で各ペプチダーゼ遺伝子を大腸菌内で高発現させ、酵素を部分精製した。これらは Ala-D-Glu-Lys-D-Ala-D-Ala などの基質に対してカルボキシペプチダーゼ活性を示した。一方、N アセチル化した L-あるいは D-アミノ酸の 4-methylcoumaryl-7-amide 体（Ac-Xaa-MCA）を基質として、各種アミノ酸に対するアミダーゼ活性を測定したところ、3 種のカルボキシペプチダーゼとも、D-アミノ酸基質だけに作用し、L-アミノ酸の MCA アミドを切断しなかった。すなわち、C 末端側の D-Ala を認識するカルボキシペプチダーゼ活性のほか、N 末端隣接部位に D-アミノ酸を要求するアミダーゼ活性を示した。さらに、アミダーゼの至適温度、熱安定性、pH 依存性、基質選択性などを検討した。また、活性セリン残基を含む推定触媒残基の変異体はいずれもアミダーゼ活性を失った。これらが、細胞内タンパク質の品質管理に関与する証拠はないが、D-アミノ酸に対する高い特異性が何を意味するのか興味が持たれる。

Archaea, D-amino acid, amidase

講演番号：3D01a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ D 校舎 01 会場

ナンキョクオキアミ由来新規フィブリン分解酵素の精製及び諸性質

Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from Antarctic krill

○湯原 駿介（東京農大院醸造）
○Shunsuke Yuhara (Tokyo Univ.Agriculture)

【目的】フィブリンは血管損傷の修復において重要な役割を果たす物質であるが、近年の生活習慣病に列挙される心筋梗塞や脳梗塞に代表される循環器系疾患の原因ともなっているタンパク質である。これらの疾患の治療薬は、使用に際しての年齢制限、副作用のリスク、遅効性、高額な治療費等が問題点とされている。一方、ナンキョクオキアミ（*Euphausia superba*、以下オキアミ）は甲殻類の一種であり、飼料や塩辛、釣り餌として利用されているが、生物資源量の 99%以上が未利用であり、有効活用されているとは言い難いのが現状である。我々はナンキョクオキアミの活用法の模索中にフィブリン分解酵素を見出した。これにより未利用資源の有効活用の拡大に繋がるだけでなく、安価で安全な血栓溶解剤の開発に寄与することが出来ると考えた。本研究ではオキアミからフィブリン分解酵素を精製し、この酵素の酵素化学的諸性質を明らかにすることを目的とした。
【方法】オキアミを 3 倍量の buffer とともにホモジナイズし抽出液を得た後、硫安沈澱分画、DEAE-Sepharose イオン交換クロマトグラフィー、Sephadex G-75 ゲル濾過クロマトグラフィー、HiTrap Benzamidine アフィニティークロマトグラフィー、Sephacryl S-200HR ゲル濾過クロマトグラフィーによって酵素の精製を行なった。酵素精製の際にはフィブリンプレートアッセイによる活性を指標にした。酵素化学的諸性質の検討のためにプラスミン基質又は各種合成ペプチド MCA 誘導体を基質として用いて活性測定を行なった。
【結果】精製されたフィブリン分解酵素は SDS-PAGE にて 29.5kDa の単一バンドを示した。本酵素はアルカリ域の広い範囲で高いプラスミン様の分解活性を示したが、40 ℃以上では不安定であった。阻害剤の影響からセリンプロテアーゼと推定され、基質特異性の検討からは顕著な X-Prolyl dipeptidylaminopeptidase 活性を併せ持つことが明らかとなった。

Antarctic krill, Fibrinolytic enzyme, X-prolyl

講演番号：3D01a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ D 校舎 01 会場

味噌中のレニン・アンギオテンシン関連酵素類の阻害活性について
Renin-angiotensin related enzyme inhibitory activity in miso
○高橋 砂織、佐々木 康子、佐藤 愛、小笠原 博信、渡辺 隆幸（秋田県総食研）
○Saori Takahashi, Koko Sasaki, Ai Sato, Hironobu Ogasawara, Takayuki Watanabe (Akita Res. Inst. Food & Brew.)

【目的】
レニン･アンギオテンシン系(RAS)は､哺乳類で最も解析が進んでいる昇圧系である。これまで RAS 制御を目的として様々な食材よりアンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害物質の探索が行われてきた。その結果、多くの阻害ペプチドが同定されている。我々は、RAS に関連する酵素群としてレニン、ACE 及びキマーゼに注目して味噌由来これら酵素群の阻害活性を検討したので報告する。
【方法】
①RAS 酵素活性測定用基質の開発：レニンおよびキマーゼ活性測定用蛍光消光基質としては Nma-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Thr-Lys(Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH_2 を[1, 2]、また、ACE 活性測定用蛍光消光基質としては Nma-Phe-His-Lys(Dnp)を用いた[3]。
②阻害活性測定用酵素の調製：組換え型ヒトレニンは、バキュロウイルス・昆虫細胞発現系を用いて発現し、ペプスタチンアフィニティークロマトグラフィー等で精製した標品を用いた[1]。組換え型ヒト ACE 及びキマーゼは、Sigma-Aldrich 社製及び R&D Systems 社製を用いた。
③味噌抽出液の調製：市販味噌及び試験醸造味噌の抽出液は、既報により調製した[4]。
【結果】
平成 22 年度全国市販味噌及び秋田県産味噌の各種酵素阻害活性を検討した結果、調べた全ての味噌抽出液にレニン、ACE 及びキマーゼ阻害活性が認められ、味噌には普遍的に RAS 酵素群阻害活性の存在することが示された。一方、大豆や麹菌の違う味噌を試験醸造した結果、大豆の種類や用いる麹菌の種類によりレニン、ACE やキマーゼ阻害活性に相違が見られた。

【参考論文】
1. Takahashi S., *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2610-2613 (2007).
2. Takahashi S., *et al.*, *ibid.*, **72**, 3232-3236 (2008).
3. Takahashi S., *et al.*, *Biomed. Res.*, **32**, 407-411 (2011).
4. 高橋砂織他、*中央味噌研究所報告* **33**, 165-170 (2012).

謝辞：本研究は、平成 24 年度一般社団法人中央味噌研究所研究助成により行われた。

Renin, ACE, Chymase

講演番号：3D01a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ D 校舎 01 会場

Function of C-terminal domain of Pholiota nameko pro-tyrosinase
○Lai Lai Moe, Saya Maekawa, Yasuko Konishi (Grad. Sch. Bioresources and Environmental Sci., Ishikawa Pref. Univ.)

INTRODUCTION: Tyrosinase (EC 1.14.18.1) belongs to a class of metalloproteins named type-3 copper proteins, and is distributed in a wide range of organisms. Fungal tyrosinase is biosynthesized as a pro-enzyme, and is cleaved enzymatically with releasing C-terminal domain. The removal of the C-terminal domain is essential for activation of tyrosinase because the C-terminal domain shields the active site of tyrosinase. In order to investigate the function of the C-terminal domain, site-directed mutagenesis of the amino acid residues in the C-terminal domain was performed on *Pholiota nameko* pro-tyrosinase.

MATERIALS AND METHODS: The recombinant pro-tyrosinase was expressed as a thioredoxin fusion protein in *Escherichia coli* cells[(1)]. Recombinant mutants, in which Phe515 is replaced with Gly (F515G), His539 with Asn (H539N), Leu540 with Gly (L540G) and Tyr543 with Ala (Y543A), were purified from corresponding cell lysate by column chromatography. The purity of the mutants was assayed by SDS-PAGE and Western Blotting using anti-tyrosinase and anti-C-terminal peptide of pro-tyrosinase antibodies. Tyrosinase activity of the mutants was examined on SDS-PAGE gel using tyramine as a substrate with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone. Copper content of the mutants (Cu/mol) was calculated from the results of the atomic absorption and the Bio-Rad Protein Assay. To be activated, the purified mutants were digested with bovine pancreatic alpha-chymotrypsin.

RESULTS: Respective mutant was confirmed as a protein band at a molecular mass of 84 kDa on SDS-PAGE gels, which was in agreement with the calculated molecular weight of the fusion protein. H539N and Y543A were observed as positive activity-staining bands on of SDS-PAGE gels while the other mutants, F515G and L540G, were not. Cu contents of F515G, H539N and Y543A were 0.8, 0.9 and 1.6, respectively. L540G had only 0.1 Cu/mol. Purification of the digested mutants and evaluation of their activity are now in progress.

(1) Y. K-Konishi, *et al. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90** (2011) 227-234.

tyrosinase

講演番号：3D01a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ D 校舎 01 会場

新規芳香族ポリマー4CDP 分解機構の解析

Analysis of bio-degradation mechanism of 4CDP, a newly developed aromatic polymer

○老沼 研一、佐々木 太洋、高谷 直樹（筑波大院生命環境）
○Ken-Ichi OINUMA, Taiyo SASAKI, Naoki TAKAYA (Univ. of Tsukuba)

【目的】微生物は、様々な加水分解酵素を用いて、自然界に存在する天然または人工的な高分子ポリエステルやポリアミドを分解する。これらの加水分解酵素は、主鎖がアルキル鎖からなるポリマーを基質とするものがほとんどであり、主鎖に芳香環を含むポリマーの加水分解酵素はほとんど知られていない。poly(4HCA-*co*-DHCA) (4CDP)は、4-hydroxycinnamic acid (4HCA)と 3,4-dihydroxycinnamic acid (DHCA)を構成単位として持つ新規な芳香族主鎖型ポリエステルである。本ポリマーは土壌中で生分解されることが示されているものの、その分子機構は不明である。そこで、我々は 4CDP 分解菌の分離およびその 4CDP 分解メカニズムの解析に取り組んだ。
【方法と結果】4CDP エマルションの濁度の低下を指標としたスクリーニングにより、4CDP 分解菌の候補株を 1 株単離した。更に、26S rDNA D1/D2 領域を用いた系統解析等の結果から、この菌を *Myrothecium* sp. T09 と命名した。本菌を 4CDP 存在下で培養したところ、培養液中にポリマーの構成成分である 4HCA と DHCA の蓄積が認められた。また、培養液中に 4CDP 分解活性が認められたことから、本菌は分泌型の 4CDP 分解酵素を発現することが示された。一方、市販の加水分解酵素による 4CDP 分解を検討した結果、*Engyodontium album* 由来の Proteinase K が 4CDP 分解活性を有することを発見した。この活性はセリンプロテアーゼ阻害剤である PMSF によって完全に消失した。更に、*Aspergillus niger* 由来の polygalacturonase 試薬中にも活性が認められたが、現在までに活性因子の特定には至っていない。*Myrothecium* sp. T09 の培養上清と polygalacturonase 試薬による 4CDP の加水分解反応は PMSF によって強く阻害されなかったことから、これらの活性はセリンプロテアーゼによるものではないことが示唆された。現在、これら活性因子の精製と同定を試みている。

bio-degradation, aromatic polyester, hydrolase

講演番号：3D01a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ D 校舎 01 会場

Aspergillus oryzae のタイプ D に属するフェルラ酸エステラーゼ様遺伝子の機能解析
Characterization of a type-D feruloylesterase-like gene from *Aspergillus oryzae*
○大塚 基広、渡邊 裕也、小関 卓也、塩野 義人 (山形大農)
○Motohiro OTSUKA, Yuya WATANABE, Takuya KOSEKI, Yosihito SHIONO (Yamagata Univ.)

【目的】フェルラ酸エステラーゼは植物細胞壁ヘミセルロースに存在するフェルラ酸と糖のエステル結合を加水分解する酵素で、効率的なバイオマス分解、特徴ある醸造物の製造、生理活性物質として有用なフェルラ酸の抽出などに寄与している。フェルラ酸エステラーゼは合成基質のフェルラ酸メチル(MFA)、*p*-クマール酸メチル(MpCA)、カフェ酸メチル(MCA)およびシナピン酸メチル(MSA)に対する特異性とアミノ酸配列の相同性に基づいてタイプ A-D の４つに分類されている。今回、*Aspergillus oryzae* 由来でタイプ D に相同なフェルラ酸エステラーゼ様遺伝子の機能解析について発表する。
【方法】*A. oryzae* の遺伝子情報から、*A. clavatus* および *Coprinopsis cinerea* 等のタイプ D フェルラ酸エステラーゼに特徴づけされた遺伝子に相同性のある遺伝子(AO090701000884)をクローン化し、*Pichia pastoris* GS115 を用いて発現させた。リコンビナント酵素は各種クロマトグラフィーにより精製し、精製酵素を用いて特徴づけを行った。
【結果】分子量は SDS-PAGE で約 27kDa で、計算値とほぼ一致した。最適 pH および温度はそれぞれ、pH8 および 50℃で、pH8-10 の領域および 40℃まで安定であった。α-ナスチルエステルに対する活性では、酪酸エステルに対して最も活性が高く、短鎖の脂肪酸エステルに対しては活性を示したものの、長鎖の脂肪酸エステルに対しては活性を示さなかった。フェルラ酸エステラーゼの指標に用いられる MFA、MpCA、MCA、MSA に対する活性は全く示さず、タンナーゼ基質の没食子酸メチル、パラベンエステラーゼ基質の 4-ヒドロキシ安息香酸メチルに対する活性も示さなかった。一方、アセチル化したグルコースおよびキシロースに対しては酢酸を遊離し、アセチル化グルコースよりも、アセチル化キシロースからの遊離酢酸量が多かった。また、小麦フスマからも酢酸を遊離し、キシラナーゼを同時に働かせることにより、エステラーゼ単一よりも酢酸の遊離量が増加し、キシラナーゼの相乗効果が示された。よって、本酵素はタイプ D に属するフェルラ酸エステラーゼとアミノ酸配列は類似しているものの基質特異性は異なり、アセチルキシランエステラーゼと特徴付けられた。

Aspergillus oryzae, acetylxylan esterse

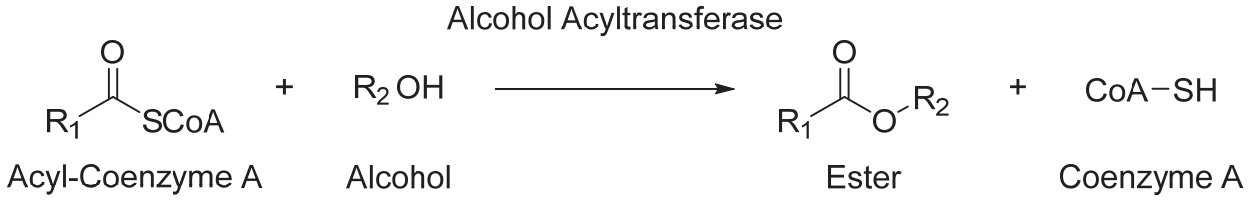
講演番号：3D01a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ D 校舎 01 会場

植物の香気成分の評価とアルコールアシルトランスフェラーゼの解析

Identification of aromatic compounds in plants and characterization of alcohol acyltransferase

○吉川 千晶[1]、亀谷 将史[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Chiaki YOSHIKAWA[1], Masafumi Kameya[1,2], Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO)

【目的】香気成分は果物や花などの品質に影響を与える重要な要素である。そのため、芳香化合物やそれらの生合成経路の解明に関する研究が進められている。また、芳香化合物の生合成に関与する個々の酵素についての研究も近年になって増加している。
植物の芳香成分は、通常多くの化合物の複雑な混合物で構成されている。例えば、苺の香りにはアルコール、アルデヒド、エステル、硫黄化合物、フラノン誘導体など 300 種類もの化合物が含まれている。中でも揮発性エステルは芳香の特徴づけている場合が多い。揮発性エステルの生合成の最終段階を触媒しているのが Alcohol acyltrancferase (AAT)である。この酵素は、アシル CoA のアシル基をアルコールへ転移する反応を触媒する。植物で多種類のエステルが生合成されているのは、様々なアルコールとアシル CoA の組み合わせが AAT の基質として用いられている結果である。本研究では、各種植物体より香気成分を採取し同定すること、また、揮発性エステルの合成に関与する AAT の酵素化学的諸性質を明らかにすることを目的とした。



【方法・結果】熱帯の果物、ハーブなど約 40 種類の植物を採取し測定に用いた。吸着剤(MonoTrap、SPME)を用いて香気成分を固相抽出し、GC-MS によって各成分を同定した。AAT 活性は 2 つの手法を併用して測定した。1 つ目は、生成物である揮発性エステルを GC により定量する手法である。もう一方は、遊離 CoA を HPLC または比色定量法を用いて測定した。各種植物由来組織で AAT の活性測定にも成功し、また AAT 反応によりエステルが生成することも上記手法の併用により裏づけられた。AAT の解析によって明らかになった諸性質についても報告する。

Aromatic compounds, Alcohol acyltransferase, Gas chromatography

講演番号：3D01a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ D 校舎 01 会場

ゼブラフィッシュグルタチオン転移酵素の同定とその諸性質検討
Identification and characterization of zebrafish glutathione S-transferase
○黒木 勝久[1]、榊原 陽一[1]、Liu Ming-Cheh[2]、水光 正仁[1] ([1]宮崎大・農・応生、[2]トレド大・薬)
○ Katsuhisa KUROGI[1], Yoichi SAKAKIBARA[1], Ming-Cheh Liu[2], Masahito Suiko[1] ([1]Univ Miyazaki, [2]Univ toledo)

【目的】ゼブラフィッシュは、マウスやラットに次ぐ第 3 の脊椎モデル生物であり、そのスループットの高さと豊富な遺伝子操作実験から、様々な研究分野に用いられている。それ故、新薬開発や毒性試験など薬学分野でも広く使用されはじめているが、薬物代謝に関する研究ではあまり使われていない。薬物代謝酵素の一つ、グルタチオン転移酵素(Glutathione S-transferases, GSTs)は、体内に取り込まれた有害物質や薬物のほか、ステロイドホルモンやプロスタグランジンなどの生理活性分子の代謝に関わる酵素である。また本酵素群は、がん細胞に強く発現していることも知られており、抗がん剤の代謝亢進によるがん細胞の抗がん剤抵抗性の要因の一つとしても知られており、本酵素の発現や機能解明は、薬剤によるがん治療においても重要になってきている。そこで、ゼブラフィッシュを薬物代謝研究のモデル生物としての基盤を固めるべく、ゼブラフィッシュにおける本酵素の研究を行った。

【方法】NCBI のデータベース上から、ゼブラフィッシュ *GSTs* 遺伝子を探索し、アミノ酸配列のアライメント解析および系統樹解析を用いて分類・命名を行った。その中から、*GST*pi ファミリーに属する zebrafish*GSTP1* をクローニングし、大腸菌を用いたリコンビナント酵素の精製を行った。精製したリコンビナント酵素を用いて、酵素の諸性質解析を行った。さらに、胚発生を含めた個体発生過程における遺伝子発現を RT-PCR により解析した。

【結果・考察】ゼブラフィッシュでは、ヒトなどの哺乳動物同様に、細胞質型、ミトコンドリア型、そして、ミクロソーム型と、全ての型の GST 遺伝子が保存されていた。特に、遺伝子スーパーファミリーを形成している細胞質型においても、alpha, mu, pi, omega, theta, sigma などの数多くのファミリーが保存されていた。その中の一つ、zebrafish*GSTP1* に着目し、リコンビナント酵素を用いた酵素解析の結果、哺乳動物の GSTP1 と同様に 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB)に対し高い活性(44.83 μmol/min/mg)を示した。さらなる酵素諸性質解析の結果、humanGSTP1 と比較的近い反応速度定数が得られた一方、高い熱安定性も有していた。発現解析では、受精直後(0-h pf)から発現しており、胚発生の初期段階から機能していることが想定された。以上のことから、*GSTP1* は、ゼブラフィッシュにおいてもグルタチオン転移酵素として機能していることが想定された。さらなる発現制御解析および全てのアイソフォームに関する研究を行うことで、グルタチオン転移酵素研究のモデル生物としての基盤が確立すると期待される。

zebrafish, GST

講演番号：3D01a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ D 校舎 01 会場

好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 の酸化ストレス防御酵素 Bacterioferritin comigratory protein の反応機構解析

Study on the mechanism of an oxidative-stress defense enzyme, bacterioferritin comigratory protein, of *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6

○加藤 真美[1]、佐藤 由也[2]、新井 博之[1]、石井 正治[1] ([1]東大院・農生科、[2]産総研・環境管理)
○Mami KATO[1], Yuya SATO[2], Hiroyuki ARAI[1], Masaharu ISHII[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]AIST EMTech)

好熱性絶対独立栄養性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 は還元的 TCA 回路という特徴的な回路で二酸化炭素を固定している。この回路は酸化方向に反応する TCA 回路を逆回しにした回路であり、還元的 TCA 回路を構成する諸酵素は酸化ストレスに弱いことが知られている。そのため、還元的 TCA 回路を持つ生物のほとんどが嫌気性あるいは微好気性であるが、本菌は 30%以上という極めて高い酸素濃度条件下でも生育することが可能である。本研究室ではこの事実に着目し、本菌の酸化ストレス防御機構について研究を進め、これまでに、好気生育に必須な新規酵素 Fpx (Ferriperoxin) を発見している。

本菌ゲノムからは Fpx の他に数種類の酸化ストレス防御酵素遺伝子が見出されているが、本研究ではそれらのうち過酸化物解毒酵素 (peroxidase)の一種である Bacterioferritin comigratory protein (BCP)に着目した。BCP では Cys が活性中心として働き、チオール残基が基質の還元に伴いジスルフィド結合を形成する。BCP の反応機構は活性に関わる Cys の数によって大きく二つに分類されており、それぞれ 1-Cys pathway と 2-Cys pathway と呼ばれる。2-Cys pathway は 2 つの Cys が反応に関与する経路であり、さらに 2 種類に分類される。1 つ目は Typical 2-Cys pathway と呼ばれる分子間ジスルフィド結合を形成する経路、2 つ目は Atypical 2-Cys pathway と呼ばれる分子内ジスルフィド結合を形成する経路である。一方、1-Cys pathway は 1 つの Cys のみが反応に関与し、他分子のチオールと反応してジスルフィド結合を形成する。BCP のアミノ酸配列中には 2 つあるいは 3 つの Cys が保存されていることが一般的だが、本菌由来 BCP は 4 つの Cys を有しており、新たな反応機構を持つことが期待された。

2013 年度の農芸化学会の大会では、本菌 BCP において Cys-48 が活性に必須でありその他の Cys 残基は活性に必須ではないこと、活性中心ではない Cys-12 と Cys-26 がジスルフィド結合を形成することが明らかにされた。

本研究では、本菌 BCP の反応機構を解明することを目的とした。本菌 BCP を過酸化水素処理してジスルフィド結合を形成させた後、N-ethylmaleimide によって Cys のチオール基をアルキル化した。続いてこれをトリプシン処理し、MALDI-TOF/MS により質量変化を解析することでジスルフィド結合を形成する Cys を探索した。その結果、Cys-48 と Cys-53 を含む断片が計算値より 2 Da 減少しており、Cys-48 と Cys-53 によりジスルフィド結合が形成されたことが示された。次に 4 つの Cys それぞれのアミノ酸置換体を異なる過酸化水素濃度下で処理し、非還元 SDS-PAGE に供した。すると、穏やかな酸化条件下では Cys-53 の変異体が二量体を形成することが明らかとなり、Cys-53 を失っても分子間ジスルフィド結合を形成することで過酸化物を処理していることが示唆された。従って、本菌の BCP は通常 Atypical 2-Cys pathway を取っており、Cys-53 を欠損させることで、Typical-Cys pathway に変化することが示された。

oxidative stress, peroxidase, bacterioferritin comigratory protein

講演番号：3D01a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ D 校舎 01 会場

微生物による第 4 級アンモニウム化合物の分解(第 13 報): γ-ブチロベタイニル CoA 合成酵素の精製と諸性質の検討

Microbial degradation of quaternary ammonium compounds (No.13) : Purification and characterization of γ-butyrobetainyl CoA synthetase

○藤光 洋志[1]、松本 彬[2]、有馬 二朗[2]、森 信寛[2] ([1]鳥取大院連農、[2]鳥取大農)
○Hiroshi Fujimitsu[1], Akira Matsumoto[2], Jiro Arima[2], Nobuhiro Mori[2] ([1]United Grad. School of Agric. Sci. Tottori Univ., [2]Tottori Univ.)

【背景・目的】本研究グループでは，コリンや L-カルニチンなどの第 4 級アンモニウム化合物の微生物での分解経路・分解酵素の研究を行っている．第 4 級アンモニウム化合物のうち，L-カルニチンは真核生物において，脂質代謝に必須の物質である．近年は，サプリメントに利用されるなど，その需要は拡大している．L-カルニチンの主な製造法は，*Agrobacterium* 属細菌による γ-ブチロベタインの水酸化反応である．L-カルニチン製造に関する特許によると，γ-ブチロベタインは脂肪酸の β 酸化類似の酵素反応を経て L-カルニチンに代謝されると言われているが，これらの酵素の活性検出や精製に関する報告はない．本研究では，*Agrobacterium* sp. 525a 株を用い，初発の酵素と考えられる γ-ブチロベタイニル CoA 合成酵素を精製し，その諸性質の検討を行った．

【方法】*Agrobacterium* sp. 525a 株を D-カルニチンを C, N 源とした培地で培養し，次に γ-ブチロベタイン培地に移し本酵素を誘導した．酵素活性の測定はヒドロキサム酸法(図 1)によって行った．

ヒドロキサム酸法 反応液組成

Tris-HCl buffer (pH 7.5)	180 mM
γ-ブチロベタイン	4.8 mM
CoA-Li_3	0.96 mM
ATP-Na_2	3.6 mM
$MgCl_2$	3.6 mM
DTT	3.0 mM
ヒドロキシアミン塩酸塩 (pH 7)*	500 mM
無細胞抽出液	25.0 % (v / v)

* pHは6 M NaOHで調整した.

酵素反応は30℃で行った. 反応開始120分後に鉄試薬
(30 % $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 10% トリクロロ酢酸 / 2M HCl (v / v))
を反応液と同液量添加. 遠心 (12,100 × g, 室温, 15分)の後,
上清の 540 nmの吸光度を測定した.

図1. ヒドロキサム酸法によるγ-ブチロベタイニルCoA合成酵素活性検出の手順

【結果】Poros HQ-50, Butyl-Toyopearl, Mono-Q のカラムクロマトグラフィーを用い，本酵素を精製した．Native-PAGE で純度検定を行ったが，完全には精製できていなかった．部分精製酵素を用い，諸性質を検討した．ゲルろ過法により分子質量を測定した結果，本酵素は約 70kDa であった．基質特異性を検討したところ，γ-ブチロベタインと 4-ジメチルアミノ酪酸が基質となった．反応に ATP が必須であったが，GTP では代替できなかった．また本酵素反応は Mn^{2+} あるいは Mg^{2+} を要求した．

L-Carnitine, ß-oxidation, quaternary ammonium compounds

講演番号：3D01a17
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ D 校舎 01 会場

第一原理計算および MD シミュレーションを用いた植物由来ヒドロキシニトリルリアーゼのマルチスケールシミュレーション

Multiscale Simulations of Plant Hydroxynitrile Lyase using the First-Principles Calculations & MD Simulations

岡崎 誠司[1,2]、中野 祥吾[1,2]、○常盤 広明[1,3,4]、浅野 泰久[1,2]（[1]JST,ERATO、[2]富山県大工・生工研セ、[3]立教大理、[4]立教大未来分子研究セ）
SEIJI OKAZAKI[1,2], SHOGO NAKANO[1,2], ○HIROAKI TOKIWA[1,3,4], YASUHISA ASANO[1,2]
([1]JST,ERATO, [2]Toyama Pref. Univ., [3]Rikkyo Univ., [4]Res. Cent. for Smart Mol., Rikkyo Univ.)

【目的】

最近の計算化学手法のパラダイムシフトにより、従来までの計算手法とは一線を画し、パラメータを一切用いない第一原理計算に基づく全電子分子軌道法が、酵素や生体触媒系などにも適用可能となった。実際に、タンパク質などが関与する複雑系の解析に対する計算化学的手法の開発者3人に2013度のノーベル化学賞が与えられたのは記憶に新しい。一方、大腸菌発現系における異種タンパク質の可溶性画分への低発現は、酵素の産業利用における主要な問題点の一つである。例えば、植物の *Manihot esculenta* 由来のヒドロキシニトリルリアーゼ(*Me*HNL)は、37℃培養における大腸菌発現系において可溶性画分への発現量が少ないことが知られている。それに対して、我々は本酵素の大腸菌発現系における可溶性画分への発現量が多い変異体(K176P、 K176P&K199P&K224P、H103L 等)を得ることに成功した。[1] そこで本研究では、この変異導入による酵素可溶性変化の起源解明に向けて、第一原理計算および分子力学(MD)シミュレーションを用いた理論解析からアプローチした。

【方法・結果】

*Me*HNL の構造は、Wild Type(WT)の X 線結晶構造(PDB ID:1DWP)を Refmac5 にて精密化し、統合化プログラム MOE 中の Protnate3D により水素付加したものを用いた。高発現する変異体(K176P、K176P&K199P&K224P、H103L など)については、点変異導入による構造緩和を考慮した人工変異構造を理論的に作成した。これらの構造を初期構造として、MD シミュレーションを用いて、立体構造の経時変化をトレースした。MD トラジェクトリからサンプルアップした構造に対して、静電的相互作用だけでなく疎水性アミノ酸残基側鎖の分散相互作用をも適切に評価できる RI-MP2/cc-pVDZ レベルのフラグメント分子軌道 (FMO) 計算を実行し、*Me*HNL を構成する全アミノ酸間の相互作用エネルギー (IFIE) を算出した。IFIE を効率よく 3 次元表示して解析するため、PyMOL のプラグイン PyPaics を開発し、WT と変異体とで相互作用変化について比較検討した。実際の FMO 計算はすべて並列化プログラム PAICS を用いて実行した。点変異導入による相互作用変化は、変異の導入点周辺だけにとどまらず、酵素全体に伝搬していることが分かった。さらに、アミノ酸間相互作用エネルギーの伝搬経路と構造緩和との関係について理論的に解析し、酵素の可溶性が変化する鍵相互作用の特定を試みた。

【参考】

[1] Asano Y., *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.* **24**, 607-616 (2011)

first-principles calculations, fragment molecular orbital, hydroxynitrile lyase

講演番号：3D01p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ D 校舎 01 会場

芳香族アミノ酸誘導体による可溶性エポキシドハイドロラーゼ阻害

Inhibition of the phosphatase activity of soluble epoxide hydrolase by aromatic amino acid derivatives

○片岡 将樹（東農工大院農）
○Masaki KATAOKA (Tokyo Univ. of Agri. & Tech.)

【背景・目的】可溶性エポキシドハイドロラーゼ（sEH）は、C 末端に脂質エポキシド加水分解活性、N 末端に脂質ホスファターゼ活性（Nterm-phos）を持つハイブリッド型の酵素であり、ヒトを含む哺乳類では動脈、心臓、肝臓、腸、腎臓、肺、脳などの組織に広範に発現している。sEH のエポキシドハイドロラーゼ活性は、血管弛緩や抗炎症などの活性を有するエポキシエイコサトリエン酸を加水分解するため、慢性炎症性疾患、心血管疾患、高血圧などの治療標的として注目されている。一方で sEH Nterm-phos については、リゾホスファチジン酸やコレステロール生合成に関わる脂質リン酸エステルを基質としており、脂質代謝制御への関与が示唆されているが生理的機能は未解明な点が多い。また、これまでに sEH ホスファターゼの特異的阻害剤は報告されていない。sEH Nterm-phos 特異的阻害剤が発見されれば、その生理的意義の解明だけでなく、新たな医薬開発に繋がることが期待される。sEH Nterm-phos 阻害剤を微生物培養液から探索した結果、チロシンを含むペプチド類縁体が阻害活性をもつことが判明した。本研究は、アミノ酸誘導体から有用な sEH Nterm-phos 阻害剤を同定することを目的とした。

【方法・結果】マウス肝臓より精製した sEH を用い、合成蛍光基質 AttoPhos の加水分解を指標として Nterm-phos 活性を評価した。L および D アミノ酸 35 種の阻害活性を測定した結果、D チロシンに弱い活性を認めた（IC_{50} 530 μM）。次に、Fmoc アミノ酸、Boc アミノ酸の誘導体を評価した結果、Boc-Tyr(Cl_2-Bzl) (IC_{50} 3.0 μM)、Fmoc-D-Arg(Pmc) (IC_{50} 2.6 μM) 、Fmoc-D-Asn(Trt) (IC_{50} 3.7 μM)などが比較的強い阻害活性をもつことが明らかとなった。特に、Fmoc-Trp (IC_{50} 2.0 μM)や Fmoc-Tyr (IC_{50} 1.8 μM)、Fmoc-Tyr(Cl_2-Bzl) (IC_{50} 1. 9 μM)、Fmoc-Tyr(Clt) (IC_{50} 2.4 μM)など、比較的疎水性の高い修飾アミノ酸が強い阻害活性を示した。Fmoc-Tyr-OH による sEH Nterm-phos の阻害は基質に対して非競合的（K_i 1.8 μM）であったが、同様に非競合阻害を与える脂肪酸とは別の部位に結合することが示唆された。以上の結果から、sEH には Nterm-phos 活性を制御するアロステリック部位が、少なくとも 2 つ以上存在すると考えられる。これらのアロステリック部位を介した sEH Nterm-phos 活性の生理学的制御機構の解析に、これらの阻害剤の利用が期待できる。

soluble epoxide hydrolase (sEH), phosphatase

講演番号：3D01p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ D 校舎 01 会場

脂肪酸による可溶性エポキシドハイドロラーゼ阻害

Inhibition of the phosphatase activity of soluble epoxide hydrolase by fatty acids

○多田 祥太郎（東農工大農）
○Shotaro TADA (Tokyo Univ. of Agri. & Tech.)

〈背景〉

可溶性エポキシドハイドロラーゼ（soluble epoxide hydrolase：sEH）は C 末端側に脂質エポキシド加水分解活性（Cterm-EH）、N 末端側に脂質ホスファターゼ活性(Nterm-phos)を有し、肝臓・脳を始め種々の臓器や組織に広範に発現する酵素である。EH 活性の阻害は、抗炎症的生理活性を有するエポキシエイコサトリエン酸(EET)の生体内濃度の上昇を導き、抗炎症作用、抗血小板凝集作用などに繋がる。そこで、土壌微生物の培養液サンプルから、合成蛍光基質とマウス肝臓由来精製 sEH を用いた *in vitro* 生化学的解析により sEH の EH 活性の阻害物質の探索を行った。結果、リノール酸に強い阻害活性が認められたが、その Nterm-phos 阻害活性は Cterm-EH 阻害活性と比較しはるかに強いものであった。Cterm-EH 活性については生理的機能や特異的阻害剤に関する情報が存在する一方で、Nterm-phos については、生体内基質や生理的機能が未解明である。そこでリノール酸を始めとする各種脂肪酸による Nterm-phos 阻害の詳細な機序を解析することで、未解明な Nterm-phos の機能解明や、EH 活性との互助関係の解明に繋がると考え、本研究において検証を行うこととした。

〈結果〉

マウス肝臓より精製した sEH および合成蛍光基質 Attophos を用い、*in vitro* で sEH ホスファターゼ阻害における各種脂肪酸の阻害活性を評価した。結果、炭素鎖が 12~18 の脂肪酸(ラウリン酸、パルミチン酸など)に強い活性が見られた。また脂肪酸の不飽和度に比例して活性が強くなることが分かった。また、炭素鎖が 8 以下の脂肪酸では阻害活性は全く見らなかった。さらに、カルボキシル基のメチル化、アルコールへの還元、および鎖中へのヒドロキシ基の導入により阻害活性が大きく減少した。以上のことから、Nterm-phos の阻害には脂肪酸の炭素数が 10 以上であること、またカルボキシル基と疎水性部分が必須であることが示唆された。また、一連の酵素反応速度論的解析の結果から、脂肪酸による Nterm-phos 阻害は基質に対して非競合的である(Ki = 2.2 μM)ことが示され、長鎖脂肪酸は活性中心とは別の結合部位を介して、その作用を示すものと考えられた。

本研究において、長鎖脂肪酸が sEH Nterm-phos を阻害することが明らかとなり、脂質代謝と sEH 活性調節との関連が示唆された。今後細胞レベルでの解析を行うことにより、生理的な sEH 活性制御機構の解明に繋がることが期待される。

soluble epoxide hydrolase, long-chain fatty acids

講演番号：3D01p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ D 校舎 01 会場

リゾプラズマローゲンを特異的に加水分解する新規ホスホリパーゼ D

A novel lysoplasmalogen-specific phospholipase D

○松本 優作[1]、杉森 大助[1]、酒瀬川 信一[2]、松本 英之[2] ([1]福島大院理工、[2]旭化成ファーマ)
○Yusaku Matsumoto[1], Daisuke Sugimori[1], Shin-ichi Sakasegawa[2], Hideyuki Matsumoto[2] ([1]Grad. Sch. Symbio. Sys. Sci. Tech., Fukushima Univ., [2]Asahi Kasei Pharma Corp.)

【緒言】プラズマローゲンは*sn*-1位にアルケニルエーテル結合を有するグリセロリン脂質で認知症や癌のバイオマーカーとして注目されている。現在、血液試料中のプラズマローゲンは^{125}Iを用いたHPLC法により分析されている。しかし、この方法は煩雑な処理を必要とするため、大規模なスクリーニング検査には不向きである。そこで、酵素を用いた新しいプラズマローゲン測定法の開発を目指し、プラズマローゲンの誘導体であるリゾプラズマローゲンを特異的に加水分解する酵素の探索を行った。本発表では、スクリーニングにより見出されたリゾプラズマローゲンホスホリパーゼD (LPLS-PLD)の精製、遺伝子クローニングおよび発現LPLS-PLDの諸性質について報告する。
【方法・結果】LPLS-PLDを生産する放線菌の培養上清より、各種カラムクロマトグラフィーを用いて目的酵素を部分精製した。SDS-PAGE分析の結果とLPLS-PLD活性の相関から、本酵素が33.5 kDaのポリペプチド鎖から構成されていることがわかった。しかし、本酵素の精製は困難で少量の部分精製酵素サンプルしか得られなかったため、LPLS-PLD遺伝子の特定には次世代シーケンサーとLC/MS-MSを使用した。まず、次世代シーケンサーを用いてLPLS-PLD生産菌のゲノム解析を行った。取得した塩基配列から推定コード領域を抽出し、アミノ酸配列に変換したプロテインデータベースを構築した。次に、部分精製酵素のLC/MS-MS分析を行い、目的酵素を構成するペプチド配列を取得した。得られた複数のペプチド配列を有するタンパク質を上述のプロテインデータベースから検索し、LPLS-PLD遺伝子を特定した。LPLS-PLD遺伝子は334 aaから成るタンパク質をコードしており、そのうちN末端の27 aaがシグナルペプチドであることが予想された。また、BLASTサーチの結果、本酵素はグリセロホスホジエステルホスホジエステラーゼと66%の相同性を示した。LPLS-PLD遺伝子を放線菌（*Streptomyces lividans*)の発現系を用いて分泌発現させた結果、培養上清中に目的とする酵素活性が確認でき、高純度精製も可能となった。発現酵素を精製後、諸特性解析を行った結果、本酵素はpH 8、45°Cで最大活性を示した。また、EDTA存在下では活性を示さず、Ca^{2+}イオンによって活性化した。基質特異性試験の結果、本酵素はリゾプラズマローゲンを特異的に加水分解し、リゾホスファチジルコリンをわずかに加水分解した。一方で、プラズマローゲン、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンおよびグリセロ-3-ホスホコリンを全く加水分解しなかったことから、本酵素が新規な基質特異性を有するホスホリパーゼDであることが明らかとなった。

lysoplasmalogen, phospholipase D, gene cloning

講演番号：3D01p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ D 校舎 01 会場

カテキン類によるジアシルグリセロールキナーゼα活性化機構の解明

Molecular mechanism of catechin induced diacylglycerol kinase α-activation

○林 大輝[1]、芦田 均[2]、上田 修司[1]、山之上 稔[1]、白井 康仁[1] ([1]神戸大院・農・生命機能・動物資源、[2]神戸大院・農・生命機能・開発)
○Daiki HAYASHI[1], Hitoshi ASHIDA[2], Shuji UEDA[1], Minoru YAMANOUE[1], Yasuhito SHIRAI[1] ([1]Department of Applied Chemistry in Bioscience, Graduate School of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Kobe University, [2]Department of Biochemistry Frontiers, Graduate School of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Kobe University)

【目的】ジアシルグリセロールキナーゼ（DGK）は、脂質であるジアシルグリセロール（DG）をリン酸化し、ホスファチジン酸（PA）を産生する脂質キナーゼであり、これまでに 10 種のサブタイプが報告されている。換言すると、DGK は DG によって活性化されるプロテインキナーゼ C（PKC）の活性を間接的に抑制できる酵素である。一方、糖尿病性腎症は、糖尿病の三大合併症の一つであり、血中高グルコースによる DG の de novo 産生が引き起こす PKC 活性の亢進によって発症することが既に知られている。これまでに我々は、ビタミン E が DGK の活性化を介し、糸球体における DG 産生及び PKC 活性の亢進を正常化することで糖尿病性腎症が改善すること、この腎症改善効果にはクロマン環構造を介した DGKα の特異的活性化が重要であることなどを明らかにしてきている。そこで本研究では、DGKα をターゲットとする糖尿病性腎症を改善する分子標的機能食品の開発を目指して、ビタミン E と同様、クロマン環構造を有するフラバン-3-オール類（カテキン類）の DGKα に対する活性化能を評価した。
【方法】GFP-DGKα を発現させた DDT1-MF2 細胞に、エピカテキン（EC)、エピガロカテキン（EGC)、エピカテキンガレート（ECg)、エピガロカテキンガレート（EGCg)、ガレート（g）を添加し、共焦点レーザー顕微鏡で活性化の指標である細胞質膜移行を観察した。また、GFP-DGKα とその基質である DG を γ-^{32}P ATP 及び種々の濃度の EGCg 存在下で反応させた時に生成される PA の放射活性を測定することで、EGCg の DGKα の活性化能を測定した。
【結果】ガレート基をもつ ECg、EGCg では、濃度依存的に GFP-DGKα の細胞質から細胞質膜への移行が確認出来たのに対し、EC、EGC、g では、膜移行は認められなかった。このことから、カテキン類による DGKα の活性化には、クロマン環構造だけでなく、ガレート基の存在が重要であることが明らかとなった。また、EGCg は DGKα を直接活性化しなかったことから、EGCg による DGKα の活性化は受容体を介していることが示唆された。そこで、既にガレート型カテキンと結合することが知られている 67kDa ラミニンレセプター(67LR)をハムスターの細胞からクローニングし、FLAG-67LR コンストラクトを作成した。GFP-DGKα と FLAG-67LR の共発現下において EGCg による GFP-DGKα の細胞質膜移行は増強され、その効果は 67LR 抗体を用いた結合阻害実験によって減衰した。このことから EGCg は 67LR を介して GFP-DGKα を活性化していることが示唆された。

diacylglycerol kinase α, catechin, 67kDa laminin receptor

講演番号：3D01p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ D 校舎 01 会場

核内受容体コファクターによる骨格筋アミノ酸代謝制御

Regulation of muscle amino acid metabolism by nuclear receptor cofactors

○畑澤 幸乃[1,2]、只石 幹[3]、長池 祐太[4]、守田 昭仁[4]、小川 佳宏[1]、江崎 治[5]、北浦 靖之[6]、下村 吉治[6]、亀井 康富[2]、三浦 進司[4] ([1]東京医科歯科大学、[2]京都府立大学、[3]国立健康栄養研究所、[4]静岡県立大学、[5]昭和女子大学、[6]名古屋大学)

○Yukino HATAZAWA[1,2], Miki Tadaishi[3], Yuta Nagaike[4], Akihito Morita[4], Yoshihiro Ogawa[1], Osamu Ezaki[5], Yasuyuki Kitaura[6], Yoshiharu Shimomura[6], Yasutomi Kamei[2], Shinji Miura[4] ([1]Tokyo Medical and Dental University, [2]Kyoto Prefectural University, [3]National Institute of Health and Nutrition, [4]University of Shizuoka, [5]Showa Women's University, [6]Nagoya University)

転写共役因子 PGC-1α は、骨格筋等において運動により発現増加し、ミトコンドリアの生合成・筋線維タイプの変化・脂肪酸酸化促進など、エネルギー代謝や運動に関連する遺伝子発現を活性化することが知られている。我々はこれまでに、骨格筋特異的 PGC-1α 過剰発現マウス(PGC-1α Tg マウス)を作製し、PGC-1α の過剰発現により骨格筋の顕著な赤筋化が生じ、持久運動能力が向上したことを報告した（Tadaishi et al. Plos one, 6: e28290, 2011)。このマウスの表現型を説明する遺伝子発現変化を調べるためにマイクロアレイ法を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、PGC-1α Tg マウスで発現増加した遺伝子についてバイオインフォマティクス解析を行った。その結果、PGC-1α によって活性化することが知られている脂肪酸代謝などのほか、これまでに PGC-1α との関連が知られていなかった分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 代謝関連経路が検出された。すなわち、BCAA 代謝酵素である BCAT（branched-chain aminotransferase）や BCKDH（branched-chain α-keto acid dehydrogenase）の発現増加が認められた。つづいて、PGC-1α Tg マウスの骨格筋において BCAA 代謝酵素の発現が増加していることを Real time PCR 法及びウエスタンブロット法を用いて確認した。さらに in vitro においても PGC-1α が BCAA 代謝を活性化するか否かを検討するために、PGC-1α をレトロウイルスで過剰発現させた C2C12 筋芽細胞を用いて、BCAA 代謝酵素の遺伝子発現増加を確認した。また、これらの結果と一致して PGC-1α Tg マウスの骨格筋及び PGC-1α 過剰発現 C2C12 筋芽細胞において BCAA 含有量が減少していた。これらの結果から、骨格筋における PGC-1α は BCAA 代謝に貢献し、運動により生じる PGC-1α の発現増加は BCAA 代謝に関与している可能性が示唆された。

amino acids, skeletal muscle, BCAA

講演番号：3D01p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ D 校舎 01 会場

Syncephalastrum racemosum 由来新規アミンオキシダーゼのキャラクタリゼーションと異種組換え発現

Characterization and heterologous expression of a novel amine oxidase from *Syncephalastrum racemosum*

○杉森 大助[1]、長南 圭介[1]、酒瀬川 信一[2]、松本 英之[2]([1]福島大理工、[2]旭化成ファーマ)
○ Daisuke Sugimori[1], Keisuke Chonan[1], Shin-ichi Sakasegawa[2], Hideyuki Matsumoto[2] ([1]Fukushima Univ., [2]Asahi Kasei Pharma Corp.)

【緒言】

アミンオキシダーゼ（以下 AOX）は、体外臨床診断薬用酵素として産業利用されている。しかしながら、既存の AOX はチラミン等の芳香族アミンに対する特異性は高いものの、エタノールアミン等の脂肪族アミンに対する特異性が低いという課題がある。そのため、エタノールアミンに対して高い触媒効率を持つ AOX の開発が強く望まれている。そこで発表者らは、エタノールアミンに対して K_m が低い新規 AOX をスクリーニングした。その結果、糸状菌 *Syncephalastrum racemosum* が菌体内に目的酵素を生産することを見出した。本発表では、新規 AOX の諸特性と大腸菌による異種組換え発現等について報告する。

【結果と考察】

S. racemosum の細胞質画分から目的酵素を精製し、キャラクタリゼーションを行った。SDS-PAGE 分析の結果、本酵素は約 70 kDa のポリペプチド鎖からなるタンパク質であることがわかった。本酵素の基質特異性を調べた結果、エタノールアミンのほかアリルアミン、ヘキシルアミンなどの 1 級アミンに対して高い活性を示す primary-amine oxidase [EC 1.4.3.21]であることがわかった。既知 *Arthrobacter* sp. 由来 AOX はフェニルエチルアミンやチラミンなどの芳香族アミンに対する活性が高いことから、本酵素の基質特異性は既知酵素と大きく異なっていた。エタノールアミンを基質とした場合、本酵素は pH 7.2、45°C において最大活性を示した。エタノールアミンに対する K_m 値は 0.26 mM、V_{max} は 26 μmol/min/mg-protein であり、既知酵素に比べて K_m 値は約 1/50 と極めて特異性が高いことが明らかとなった。

本酵素遺伝子を取得するため cDNA クローニングを行った結果、本酵素遺伝子の orf は 2,052 bp で 683 アミノ酸をコードすることが明らかになった。BLAST 検索の結果、本酵素のアミノ酸配列は *Rhizopus delemar* AOX (Uniprot accession no. 1BW81)と 56%の相同性を示した。さらに、本酵素には銅 AOX に共通する２つのモチーフ配列（銅結合サイト HHQH、補酵素トパキノンに変換されるチロシン残基を含む活性部位 NYD/EY）が存在することがわかった。

S. racemosum 由来 AOX の cDNA を pET24a(+)に組み込み、*E. coli* BL21(DE3)株を用いて大腸菌の細胞質内に活性型酵素として過剰発現させることに成功した。現在、X 線結晶構造解析とキャラクタリゼーションを進めている。

amine oxidase, characterization, heterologous expression

講演番号：3D01p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ D 校舎 01 会場

ポリフェノールによるプロリン異性化酵素(Pin1, Cyp, FKBP)の活性制御

Regulation of Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase by Polyphenols

○小坂 啓太、生地 紘子、日高 將文、内田 隆史 (東北大院農)
○KEITA KOSAKA, HIROKO IKUJI, MASAFUMI HIDAKA, TAKAFUMI UCHIDA (Tohoku Univ.)

ポリフェノールは、健康志向が高まっている近年特に注目されている食品成分である。特に肥満や癌といった加齢疾患に有効であるとされており、その効果は Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase)の一種である Pin1 の持つ生理機能と共通点が多い。

Pin1 は、リン酸化した Ser/Thr--Pro のペプチド結合の cis-trans 異性化を触媒し、リン酸化タンパク質の立体構造を制御している。Pin1 遺伝子ノックアウトマウスの解析から、癌、アルツハイマー病、糖尿病等の様々な加齢疾患の発症に関わることが判明しており、Pin1 活性の制御は疾患の治療において有効であると考えられている。これらの結果を考え合わせると、ある種のポリフェノールは Pin1 の酵素活性を調節し、健康増進作用を発現していると推察できる。

現在、ポリフェノールの効能は、それらが共通して持っている抗酸化活性のみにより説明されていることが多い。我々は、ポリフェノールが持つPin1の活性制御という新たな機能に注目し、作用機序を分子レベルで解明することで、ポリフェノールの効果に更なる価値を付加するだけでなく、PPIase をターゲットとする薬剤開発にも寄与することを目的として研究を行っている。

最近、我々は、天然物よりPin1の活性を制御する化合物をスクリーニングし、海藻よりPin1阻害活性を持つポリフェノールを見出した。さらに、主要な茶カテキンであるエピガロカテキンガレートがPin1の阻害活性を持つことも報告されている。

多彩な構造を持つポリフェノールである茶カテキンを用い、Pin1阻害における構造活性相関の解析を行った。構造の異なる十数種のカテキン類を添加した反応系においてPin1酵素活性を測定し、それぞれについてPin1活性50%阻害濃度を算出し比較した。その結果、Pin1阻害にはカテキンの基本骨格構造に付加されるガレート基が必須であること、さらに置換基の有無による阻害活性の変化が観察された。さらにPin1以外の代表的なPPIaseであるcyclophilin、FKBPへのカテキンの作用も検討した。

次に、Pin1阻害ポリフェノールの細胞への影響を調査した。Pin1ノックアウトMEFは脂肪細胞へ分化しにくいという特徴があることから、脂肪細胞分化をPin1制御の一つの指標とすることを考えた。脂肪前駆細胞やPin1ノックアウトMEFに対する脂肪分化誘導とオイルレッド0染色、遺伝子発現解析により、前述の海藻ポリフェノールやカテキン類が脂肪細胞分化抑制効果を有することを確認した。

polyphenol, pin1, cyclophilin

講演番号：3D01p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ D 校舎 01 会場

高基質特異性 L-グルタミン酸オキシダーゼより作製した L-アルギニンオキシダーゼの特異な性質

Characterization of L-arginine oxidase made from L-glutamate oxidase

○中井 隆一郎[1]、田村 隆[1]、今田 勝巳[2]、日下部 均[3]、稲垣 賢二[1] ([1]岡山大院環境生命、[2]大阪大院理、[3]（株）エンザイムセンサ)
○ Ryuichiro NAKAI[1], Takashi TAMURA[1], Katsumi IMADA[2], Hitoshi KUSAKABE[3], Kenji INAGAKI[1] ([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okyama Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., [3]Enzyme Sensor Co. Ltd.)

【目的】L-グルタミン酸オキシダーゼ（LGOX）は，L-グルタミン酸の酸化的脱アミノ化反応を触媒する L-アミノ酸オキシダーゼの一種である．LGOX は基質特異性が極めて厳格であるため，L-グルタミン酸の微量定量が可能であり，L-グルタミン酸バイオセンサーに活用されている．我々は LGOX の X 線結晶構造解析[1)]及びドッキングスタディーの結果から 305 番目のアルギニンが LGOX の基質認識に最も重要であることを明らかにした[2)]．この 305 番目のアルギニンに部位特異的変異を導入し，新規 L-アルギニンオキシダーゼ（R305D 変異 LGOX），L-ヒスチジンオキシダーゼ（R305L 変異 LGOX）の創出に成功した．R305D 変異 LGOX は作成した変異 LGOX の中でも特に高い基質特異性を有しており，LGOX や他の変異 LGOX は有していない独特な性質を示した．その原因を解明するために今回は L-アルギニンオキシダーゼ（R305D 変異 LGOX）の性質検討を行った．

【方法】R305D 変異 LGOX は，発現ベクターpGOx-mal1 を有する *E. coli* JM109 を用いて発現させ，Amylose Resin カラムクロマトグラフィー，Sephacryl S-300 HR カラムクロマトグラフィーを用いて精製を行った．酵素活性の測定には，酵素が触媒する反応によって生成されるα-ケト酸を定量する MBTH 法を用いた．

【結果】R305D 変異 LGOX は活性測定に 70 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液（pH 8.0）を用いた場合では L-アルギニンに対して 0.9 mM の K_m 値，8.4 s^{-1} の k_{cat} 値を示した．一方，70 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 8.0）を用いた場合では L-アルギニンに対して 2.4 mM の K_m 値, 6.2 s^{-1} の k_{cat} 値を示した．このような，緩衝液による K_m 値や k_{cat} 値への影響は LGOX や R305L 変異 LGOX では確認されなかった．Tris-HCl 緩衝液やホウ酸カリウム緩衝液，リン酸ナトリウム緩衝液を用いた活性測定の結果，R305D 変異 LGOX の活性の低下の原因はリン酸であり，リン酸が L-アルギニンと競合阻害を引き起こしている可能性が示唆された．更に，リン酸による活性の阻害は L-アルギニン，L-ヒスチジン，L-リシンといった塩基性アミノ酸を基質として用いた場合に限定され，基質として L-チロシン，L-フェニルアラニン，L-ロイシンといった電荷を持たないアミノ酸を用いた場合では，リン酸による阻害を受けないことが明らかになった．現在，この独特な性質のメカニズムについて解析を試みている．

1) Arima, J., *et al., FEBS Journal*. **276**, 3894-3903 (2009)
2) Utsumi, T., *et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **417**, 951-955(2012)

L-arginine oxidase, L-glutamate oxidase, substrate specificity

講演番号：3D01p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ D 校舎 01 会場

アミノアシル-tRNA 合成酵素の ATP トリリン酸部位とピロリン酸認識におけるクラス間差異に関する洞察
Aminoacyl-tRNA synthetases: insights into the class-specific differences in the recognition of ATP triphosphate moiety and pyrophosphate
○滝田 禎亮、大山 創平、和田 工、平井 伸博、井上 國世（京大院農）
○Teisuke Takita, Sohei Ohyama, Takumi Wada, Nobuhiro Hirai, Kuniyo Inouye (Kyoto Univ)

（目的）アミノアシル−tRNA 合成酵素（aaRS）は、対応するアミノ酸（aa）と tRNA を結合させるアミノアシル化反応を触媒する。本反応は、多くの場合、aa と ATP からアミノアシルアデニレート中間体（aa-AMP）を形成しピロリン酸（PPi）を放出する aa 活性化と、aa の tRNA への転移の 2 段階からなると考えられている。我々は、*Bacillus stearothermophilus* 由来リジル-tRNA 合成酵素（*Bs*LysRS）の L-リジン（Lys）活性化反応を研究してきた。興味深いことに、aaRSs は、触媒ドメイン構造により、Class I と II に分かれる。どちらも、ATP 結合は induced-fit 機構により、Class I では KMSKS ループ、II では motif 2 ループが重要な役割を果たす。しかし、ATP のトリリン酸部分（PPP）は、Class I では、１個の Mg^{2+}イオンと結合し直線的配置で塩基性アミノ酸残基により認識されるのに対し、II では２あるいは３個の Mg^{2+}イオンと結合し曲線的配置で Mg^{2+}イオンを介し酸性アミノ酸残基により認識される。これらは、Class I と II では、酵素に結合した PPP や PPi は異なる電子状態をとることを示唆する。今回の目的は、この違いを、ATP 及び PPi アナログを用い明らかにし、PPP や PPi 認識に関する洞察を得ることである。（方法）Class I として大腸菌由来トリプトフィルとチロシル-tRNA 合成酵素（*Ec*TrpRS と *Ec*TyrRS）、II として *Bs*LysRS とそのヒト由来酵素（*hu*LysRS）を用いた。*Bs*LysRS 以外は新たにクローニングし pET-22b を用い、*hu*LysRS と *Ec*TrpRS は C 末端に His-tag 配列ありで、*Ec*TyrRS は、*Bs*LysRS と同様、付加配列なしで発現精製した。pH 8.0、37 ˚C で、10 mM $MgCl_2$ と各基質 1 mM 存在下（Tyr は 200 μM）に、aa 活性化を ATP-PPi 交換反応で測定し速度論的パラメーターを決定した。次に、β, γ-methylene ATP（AMPPCP）、methylene PPi（PCP）、imidediphosphate（PNP）、phosphonoacetic acid、及び Foscarnet による阻害を調べた。さらに、ATP の代わりに AMPPCP を用い aa 活性化を調べた。（結果と考察）AMPPCP は、*Ec*TyrRS を阻害せず、*Bs*LysRS と *hu*LysRS を、*Ec*TrpRS に比べ、低濃度で阻害した。どの PPi アナログも *Ec*TrpRS と *Ec*TyrRS を阻害しなかったが、PCP と PNP は *Bs*LysRS と *hu*LysRS を阻害した。*Bs*LysRS と *hu*LysRS は、*Ec*TrpRS と *Ec*TyrRS と異なり、AMPPCP で aa を活性化した。pH 6.5-9.0 でも同様の結果が得られた。これらは、Class I は、II に比べ、PPP や PPi を厳密に認識することを示唆した。AMPPCP 依存的 Lys 活性化で、*hu*LysRS は、*Bs*LysRS に比べ、同程度の AMPPCP に対する K_m と、約 10 倍低い k_{cat} を示した。この様な傾向は、ATP 依存的 Lys 活性化でも見られた。*Bs*LysRS による ATP 依存的 Lys 活性化では、PCP 存在下、AMPPCP が生成した。AMPPCP 依存的 Lys 活性化では、pH 上昇に伴い、AMPPCP に対する K_m は減少したが、k_{cat} は変化しなかった。

aminoacyl-tRNA synthetase, amino acid activation, ATP recognition

講演番号：3D01p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ D 校舎 01 会場

細胞性粘菌における D-セリン代謝酵素欠損の影響
Effect of mutation of D-serine metabolizing enzymes in *Dictyostelium discoideum*
○伊藤 智和[1]、濱内 菜月[1]、邊見 久[1]、齊藤 玉緒[2]、吉村 徹[1] ([1]名大院生命農、[2]上智大理工)
○ Tomokazu ITO[1], Natsuki HAMAUCHI[1], Hisashi HEMMI[1], Tamao SAITO[2], Tohru YOSHIMURA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Sophia Univ.)

[背景・目的]
哺乳類脳内で D-セリンは *N*-メチル-D-アスパラギン酸レセプターのコアゴニストとして働き、記憶や学習など、脳の高次機能発現に重要な役割を担っている。脳内 D-セリンの生合成酵素として知られるセリンラセマーゼや、その分解を司る D-アミノ酸オキシダーゼは、哺乳類以外の種々の真核生物にも存在するが、現在、D-セリンの生理機能は哺乳類以外でほとんど知られていない。我々は、セリンラセマーゼ、D-アミノ酸オキシダーゼ、さらには D-セリン特異的な分解酵素である D-セリンデヒドラターゼを有する細胞性粘菌を用いて D-セリンの生理機能の解明を目指している。

[結果]
細胞性粘菌における主要な D-セリン合成酵素と推測されるセリンラセマーゼ、同じく D-セリン分解酵素として予想される D-セリンデヒドラターゼの遺伝子欠損株（ΔSR, ΔDSD）をそれぞれ作製し、各遺伝子欠損が生育や発達へ与える影響を検証した。ΔDSD は野生株と比較し、生育や発達の顕著な遅延が観察された。また、ΔDSD は、無細胞抽出液中の D-セリン分解活性がほぼ完全に消失し、野生株ではみられない D-セリンの蓄積が観察された。発達過程ではΔDSD においてのみ細胞外への D-セリン排出が確認されることから、同菌では D-セリンの分解に代えて、細胞外排出系が菌体内 D-セリン調節に寄与している可能性が示唆された。
本大会では、これらの結果に加え、発達過程における D-セリンの動態解析や、D-セリン代謝酵素（セリンラセマーゼ、D-アミノ酸オキシダーゼ、D-セリンデヒドラターゼ）の発現解析の結果について報告する。

D-serine, D-amino acid, Dictyostelium disoideum

講演番号：3D01p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ D 校舎 01 会場

好熱性細菌 *Rhodothermus marinus* 由来色素依存性 D-フェニルアラニン脱水素酵素の性質の解明と基質特異性の解析

Characterization and substrate specificity analysis of Dye-linked D-phenylalanine dehydrogenase from *Rodothermus marinus*

○廣田 湧也[1]、石倉 優[1]、里村 武範[1,2]、櫻庭 春彦[3]、大島 敏久[4]、末 信一朗[1,2]（[1]福井大院・工・生物応化、[2]福井大・生命セ、[3]香川大・農・応生、[4]大阪工大・工・生命工）

○ YUYA HIROTA[1], MASARU ISHIKURA[1], TAKENORI SATOMURA[1,2], HARUHIKO SAKURABA[3], TOSHIHISA OHSHIMA[4], SHIN-ICHIRO SUYE[1,2] ([1]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui, [3]Dept. Appl. Biol. Sci., Fac. Agric., Kagawa Univ, [4]Dept. Bio. Eng, Osaka. Inst. Technol)

[目的]

D-アミノ酸はヒトなどの高等生物生体内に存在し、様々な生理機能を果たしていることが明らかになっている。また、近年、発酵食品などの食品中にも D-アミノ酸の存在が報告されており、食品の呈味に関与していることが示唆されている。我々の研究グループでは、これら D-アミノ酸を簡便に検出可能なバイオセンサ用素子の探索を目的として研究を進め、好熱性細菌 *Rhodothermus marinus* に D-フェニルアラニンを最も良好な基質とする色素依存性脱水素酵素を見出し、大腸菌によるタンパク質発現系の構築にも成功した。組換えタンパク質について部分精製を行い酵素化学的性質の解析を行ったところ、70℃、10 min で熱処理を行っても失活せず高い安定性を有し、D-アミノ酸定量用バイオセンサ用素子として有用性が高いことを明らかにした。しかし、本酵素は D-フェニルアラニン以外にも D-プロリン、D-ロイシンなどの多くの D-アミノ酸の酸化反応を触媒することが判明した。本研究では本組換え酵素の精製方法を確立し、詳細な酵素化学的性質の解明、基質認識に関与するアミノ酸残基の解析を行うことを目的として研究を行った。

[方法・結果]

本酵素の発現用ベクターである RmDPheDH-pEt11a を大腸菌に導入後、タンパク質の発現誘導を行った。発現タンパク質を 70°C、10 分間の熱処理後、Q-セファロースカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーによって電気泳動的に単一に精製することに成功した。精製酵素について酵素の詳細な性質を調べたところ、50℃、30 分間の処理では pH 4 から 11 の間で安定であり、70° C、10 min で熱処理を行っても失活せず、80℃、10 分間の処理でも 60%の残存活性を示し高い安定性を有していることが判明した。また、基質特異性に関与するアミノ酸残基を特定するため、RmDPheDH-pEt11a を鋳型として、エラープローン PCR 法によって変異酵素作成を行った。その結果、400 個の変異酵素を得ることに成功した。現在 400 個の変異酵素について、野生型酵素と比較して基質特異性に変化が認められる酵素のスクリーニングを行っている。

D-amino acid, thermostable nzyme, thermophile

講演番号：3D01p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ D 校舎 01 会場

酵母 D-アスパラギン酸オキシダーゼにおける His56 の機能解析

Functional analysis of His56 in a yeast D-aspartate oxidase

○島田 梢[1]、野沢 駿友[1]、後藤 勝[2]、阿部 勝正[1]、高橋 祥司[1]、解良 芳夫[1] ([1]長岡技科大工、[2]東邦大学)

○ Kozue SHIMADA[1], Shunske NOZAWA[1], Masaru GOTO[2], Katsumasa ABE[1], Shouji TAKAHASHI[1], Yoshio KERA[1] ([1]Nagaoka Univ.Tec, [2]Toho Univ.)

【背景・目的】D-アスパラギン酸オキシダーゼ（DDO）と D-アミノ酸オキシダーゼ（DAO）は D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒する FAD 酵素である。前者は酸性 D-アミノ酸を，後者は中性および塩基性 D-アミノ酸を基質とする。両酵素は D 体に特異的であり，一次構造の相同性が高いことや反応機構が同じであることから同一祖先から進化したと考えられている。現在までに，様々な生物由来の両酵素の酵素学的諸特性が解析されている。DAO に関しては，酵母，ブタやヒト DAO の結晶構造が決定され，基質結合部位などの機能部位が明らかにされている。その一方で，DDO の基質認識に関する知見は DAO に比べて著しく少ない。我々は，酵母 *Cryptococcus humicola* が生産する DDO（ChDDO）の酵素学的諸特性や結晶構造の解析を行ってきた。その解析において，His56 が酸性 D-アミノ酸の基質特異性に重要な役割を担っていると示唆された。そこで本研究では，His56 を Ala（H56A）および Asn（H56N）へ置換した変異体を作成し，その酵素学的諸特性を解析した。

【方法】ChDDO の野生型と変異体は，*E. coli* BL21（DE3）を用いて His タグ融合タンパク質として発現させ，TALON 樹脂を用いて精製した。酵素活性は *o*-ジアニシジン/ペルオキシダーゼ法と 2,4-ジニトロヒドラジン発色法を用いて測定した。阻害剤の影響は，DDO 阻害剤（マロン酸，メソ酒石酸，D-リンゴ酸）と DAO 阻害剤（安息香酸，アントラニル酸，クロトン酸）を用いて 10 mM の濃度で解析した。

【結果・考察】野生型 ChDDO，H56A 変異体および H56N 変異体の FAD 含有量はほぼ同等だった。しかし、野生型 ChDDO は D-Asp に対して 280 U/mg の活性を示したのに対し，H56A および H56N 変異体は D-Asp に対してそれぞれ 0.01 U/mg と 0.04 U/mg の活性しか示さなかった。一方，H56A 変異体は D-Met に対して最も高い活性（10.2 U/mg）を示した。また，H56N 変異体は D-Gln に対して最も高い活性（2.62 U/mg）を示した。野生型の ChDDO は DDO 阻害であるマロン酸により反応が阻害されるが，H56A 変異体および H56N 変異体は阻害されなかった。その一方で，H56A は DAO 阻害剤である安息香酸，アントラニル酸およびクロトン酸により阻害された。また，H56N は安息香酸，アントラニル酸により阻害された。したがって，His56 変異により ChDDO が DAO に変化したことが示された。以上の結果より，ChDDO の酸性 D-アミノ酸に対する基質特異性において His56 が主要な役割を担っていることが明らかとなった。また，単一アミノ酸残基の変異により DDO が DAO に変換できることが示された。

D-aspartate oxidase, substrate specificity, site-directed mutagenesis

講演番号：3D01p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ D 校舎 01 会場

好熱菌 *Rubrobacter xylanophilus* D-アミノ酸オキシダーゼの諸特性解析
Characterization of D-amino acid oxidase of the thermophilic bacterium *Rubrobacter xylanophilus*
○古川原 諒、高橋 祥司、田所 南海帆、斎藤 弥生、小林 見江子、大前 圭史、阿部 勝正、解良 芳夫（長岡技大工）
○Makoto FURUKAWARA, SHOUJI TAKAHASHI, Namiho TADOKORO, Yayoi SAITOU, Mieko KOBAYASHI, Keishi OME, Katsumasa ABE, Yoshio KERA (Nagaoka Univ.Tec)

【背景】D-アミノ酸オキシダーゼ（DAO）は，中性および塩基性 D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒するフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）を補酵素とするフラビン酵素である。DAO は真菌からヒトに至る様々な真核生物に見いだされ，フラビン酸化酵素のモデル酵素として反応メカニズムや結晶構造が詳細に解析されている。一方，原核生物における DAO の酵素学的諸特性や構造に関する知見は少ない。DAO は，D-アミノ酸の定量・検出，アミノ酸ラセミ体混合物の光学分割，医薬品原料となるα-ケト酸や 7-アミノセファロスポラン酸の生産やガン治療など広範囲な生物工学的応用が可能である。そのため，高い安定性を有する DAO が求められている。我々は，好熱菌 *Rubrobacter xylanophilus* に既知の DAO に相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子を見出した。さらに，*Escherichia coli* における発現解析から，当遺伝子が DAO をコードしていることを明らかにした。本研究では，*E. coli* で発現させた *R. xylanophilus* DAO（RxDAO）を精製し，熱安定性を含む酵素学的諸特性を解析した。
【方法・結果】RxDAO を *E. coli* BL21（DE3)において His タグ融合タンパク質として発現させ，金属キレートカラムを用いて電気泳動的に単一にまで精製した。RxDAO は，既知の DAO と同様に，非共有結合的に結合した補酵素 FAD を含有しており，反応に伴う FAD の還元が観察された。RxDAO は D-Val に対し最も高い活性を示し，次いで D-Leu，D-Ile の順に高い活性を示した。反応温度 65℃における D-Val に対する比活性は 15-21 U/mg であり，他生物由来の DAO における最も良い基質に対する比活性と比べて低い（細菌，酵母）か同程度（動物）であった．反応速度論解析から，RxDAO は D-Tyr や D-Val に対して高い k_{cat} 値を示すものの，D-Leu と D-Ile に対して低い K_m 値を示したことから，結果として D-Leu と D-Ile に対して高い k_{cat}/K_m 値を示した。なお，D-Tyr による基質阻害が観察された。RxDAO の至適温度と酵素の半分が失活する温度（T_{50}）はそれぞれ 65℃と 64℃であり，既知の DAO の中で最も高い熱安定性を有していた。また，30℃における長期熱安定性解析では，7 日後でも活性の減少はほとんど観察されず，28 日後も約 40%の残存活性が観察された。更に，RxDAO は過酸化水素に対する高い酸化耐性も有することが示された。RxDAO は DAO 阻害剤（安息香酸，アントラニル酸）や PMSF により阻害されたが，D-アスパラギン酸オキシダーゼ阻害剤（マロン酸，メソ酒石酸），DTNB やヨード酢酸では阻害されなかった。以上の結果より，RxDAO が高い安定性を有する DAO であることが明らかとなった。

D-amino acid oxidase, thermophilic bacterium, characterization

講演番号：3D01p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ D 校舎 01 会場

紫外線照射によりアポ化した D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを用いた高感度 PLP 測定

High-sensitive assay for pyridoxal 5'-phosphate by apo-D-amino acid aminotransferase

○太田 寛毅[1]、吉村 徹[2]、吉宗 一晃[1] ([1]日大生産工、[2]名大院農)
○Hiroki Ota[1], Tohru Yoshimura[2], Kazuaki Yoshimune[1] ([1]Nihon Univ., [2]Nagoya Univ.)

【背景】ビタミン B_6(VB6)はアミノ酸代謝の中心的な役割を果たす酵素の補酵素であるピリドキサール 5'-リン酸（PLP）を含む。VB6 の欠乏症として脂漏性皮膚炎，小赤血球性貧血等が報告されている．これら欠乏症は血漿中 PLP 濃度が 30 nM を超えると観察されなくなるため臨床的にその測定が必要である．現在，血漿中 VB6 濃度の測定は，HPLC での逆相カラムを用いた蛍光検出による方法が一般的であるが，多検体の分析には適していない．そこでアポ化した PLP 酵素に PLP を添加して生成するホロ酵素の活性を測定する PLP の簡易測定法の開発を試みた．D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ(D-AAT, EC 2.6.1.21)は D-アミノ酸とαケト酸との間のアミノ基転移反応を触媒する PLP 酵素であり，人体にほとんど含まれない D-アミノ酸を代謝する．

【目的】本研究では YM-1 株由来 D-AAT をアポ化し，試料中の PLP でホロ化した酵素の活性を測定することで PLP を簡便に，安価且つ迅速に測定する方法を確立することを目的とした．

【方法】YM-1 株由来 D-AAT 遺伝子発現プラスミドで BL21 を形質転換させ，得られた菌体を LB 培地で培養し，0.1 M イソプロピル-β-チオガラクトピラノシドを添加し 3 時間培養することで遺伝子を誘導した．超音波破砕後，TALON(Cobalt)レジンを用いたアフィニティクロマトグラフィーにより D-AAT を精製した．SDS-PAGE により純度は 95%以上であることを確認した．活性測定は 0.1 M D-アラニンと 10 mMα-ケトグルタル酸を基質として生成するピルビン酸を強アルカリ下でサリシルアルデヒドと反応させて得られる生成物を OD_{480} で測定することで行った．さらにこの逆反応の測定は D-グルタミン酸とピルビン酸から生成する D-アラニンを D-アミノ酸オキシダーゼで酸化し生成する過酸化水素を 4-アミノアンチピリン法で測定することで行った．D-AAT のアポ化は紫外線ランプ(15W)から 7ｃｍ離した位置に酵素を氷上で約 8h 静置することにより行った．

【結果・考察】D-AAT は塩酸グアニジンや尿素などの変性剤でほとんど失活しないものの，8h の紫外線照射により失活した．この失活した酵素に 1mM PLP を添加したところ，失われた活性は回復した．このことから紫外線照射による失活は D-AAT がアポ化したためであると考えられた．このアポ化 D-AAT に PLP を添加して活性測定したところ，その比活性と 10 から 100 nM までの PLP 濃度が直線関係にある検量線を作成することができた．この方法において PLP の検出限界値が健常人の血漿中 PLP 濃度よりも低いため，PLP 血漿中濃度の迅速診断に応用できる可能性が考えられた．

pyridoxal 5'-phosphate, D-amino acid aminotransferase, vitamin B6

講演番号：3D01p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ D 校舎 01 会場

Characterization of glycine oxidase involved in the biosynthesis of the thiazole moiety of thiamine in *Pseudomonas putida* KT2440

○Yohannes Equar Messelle[1], Yasushi Tani[1,2], Hisaaki Mihara[1] ([1]Dept. Biotechnol., Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]R-GIRO, Ritsumeikan Univ.)

A gene encoding a putative FAD-dependent oxidoreductase (PP_0612) consisting of 365 amino acid residues was found in the genome of *Pseudomonas putida* KT2440. The gene is clustered with genes involved in pili assembly and biogenesis. The PP_0612 gene was inserted in to the multiple cloning site of pCold I vector and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). His-tagged PP_0612 was purified by nickel-chelate chromatography to a specific activity of 0.073 U/mg (as glycine dehydrogenase) with a yield of 88%. Analysis of the purified enzyme showed that PP_0612 is a monomer of 42.7 kDa with spectral properties typical of a flavoprotein. The enzyme contained non-covalently bound FAD and effectively catalyzed the oxidation of glycine, sarcosine, and some D-amino acids to yield the corresponding keto acid, amine/ammonia, and H_2O_2. The enzyme also used artificial dyes including 2,6-dichloroindophenol (DCIP) and PMS/INT as electron acceptors. The specific activities of the enzyme towards glycine with O_2, DCIP, and PMS/INT as an electron acceptor were 0.31, 0.07, and 0.02 U/mg, respectively. The enzyme exhibited moderate thermostability with a T_m of 40°C after 1 h incubation, and its stability was maximum in a pH range of 8.0-8.5. PP_0612 shares highest sequence identity with *thiO*-encoded glycine oxidase (26.8%) essential for the de novo biosynthesis of the thiazole moiety of thiamine in *Bacillus subtilis*, followed by monomeric sarcosine oxidase (19%) and D-amino acid oxidase (21.6%). Kinetic analysis of PP_0612 revealed the highest k_{cat}/K_m value for glycine, suggesting that this enzyme is also involved in thiamine biosynthesis in *P. putida* KT2440.

FAD-dependent enzyme, glycine, thiamine

講演番号：3D01p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ D 校舎 01 会場

4-メチル-5-(β-ヒドロキシエチル)チアゾールキナーゼ ThiM の酵素学的特性の解析

Characterization of 4-methyl-5-(β-hydroxyethyl)-thiazole kinase from *Escherichia coli*

○谷 泰史[1,2]、木村 圭佑[1]、斎藤 茂樹[1,2]、三原 久明[1] ([1]立命館大・生命科学・生物工、[2]立命館大・R-GIRO)
○Yasushi TANI[1,2], Keisuke KIMURA[1], Shigeki SAITO[1,2], Hisaaki MIHARA[1] ([1]Dept. Biotechnol., Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]R-GIRO, Ritsumeikan Univ.)

【目的】

ビタミン B_1 は、ピリミジン部とチアゾール部が縮合して生合成される。4-メチル-5-(β-ヒドロキシエチル)チアゾール (Thz) キナーゼは、Mg^{2+} 依存的に Thz をリン酸化する酵素である。*Escherichia coli* の Thz キナーゼは ThiM と呼ばれており、より研究が進んでいる他微生物種の同酵素である *Bacillus subtilis* ThiK 及び *Saccharomyces cerevisiae* Thi6 とのアミノ酸配列相同性は 25-34% 程度しかない。我々はこれまでに、ThiM の酵素学的性質 (至適 pH 11, 至適温度 70ºC、比活性 7.3 U/mg) は、ThiK 及び Thi6 のそれと異なることを見出している (ThiK: pH 7.5、25ºC、0.5 U/mg、Thi6: pH 7.5、37ºC、2.6 U/mg)。本研究では、*E. coli* ThiM のサブユニット構造、基質特異性、金属特異性について解析を行った。

【方法・結果・考察】

ThiM 高発現大腸菌株を構築し、Ni-NTA カラム操作により精製酵素を得た。ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量測定から、本酵素は、27.3 kDa の同一サブユニット 2 つから成る二量体 (55.7 kDa) を形成することが分かり、ThiK (三量体) や Thi6 (四量体) とは異なることが明らかになった。生成物である Thz-P の HPLC 定量により本酵素の活性を測定し、基質特異性および金属特異性を調べた。Mg^{2+} 存在下で ADP および AMP に対する活性は示さなかったが、GTP、TTP、dATP、dUTP および dCTP に対する活性は ATP に対する活性のそれぞれ 2.1、5.5、5.8、2.5 および 2.5 倍高い値を示し、dGTP に対する活性は 8.3 倍と最も高い値を示した。また、UTP に対する活性は ATP に対する活性と同等であった。続いて、5 mM の二価金属イオン (Mg^{2+}、Ca^{2+}、Mn^{2+}、Fe^{2+}、Co^{2+}、Ni^{2+}、Cu^{2+}、Zn^{2+}、Mo^{2+}) 存在下の酵素活性を比較した結果、Ca^{2+}、Mn^{2+}、Fe^{2+}、Cu^{2+}、Zn^{2+}、Mo^{2+} 存在下の ATP に対する活性は Mg^{2+} 存在下での活性と同程度かそれ以下であったが、本酵素反応は Co^{2+} 及び Ni^{2+} によって顕著に促進されるという、既知の Thz キナーゼでは例のない新たな特性を見出した。以上より、*E. coli* ThiM は、サブユニット構造および酵素学的特性において、従来知られている Mg^{2+} 依存的 Thz キナーゼとは異なることが明らかとなった。

ThiM, Thiamin, *Escherichia coli*

講演番号：3D01p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ D 校舎 01 会場

酵母における *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 依存的な新規アルギニン合成系の分子機構の解析

Molecular mechanism of a novel arginine synthetic pathway mediated by *N*-acetyltransferase Mpr1 in yeast

○関口 春菜、那須野 亮、西村 明、高木 博史 (奈良先端科学技術大学院大学)
○Haruna Sekiguchi, Ryo Nasuno, Akira Nishimura, Hiroshi Takagi (Nara Institute of Science and Technology Univ.)

【目的】当研究室で酵母 *Saccharomyces cerevisiae* より見出した新規 *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 は、酵母に酸化ストレス耐性を付与することが明らかとなっている。これまでに、遺伝学的な解析から Mpr1 がプロリン（Pro）とアルギニン（Arg）の代謝を連結し、酸化ストレス条件下における Mpr1 依存的な Arg 合成が酸化ストレス耐性に寄与することを報告している。現在我々は、酵母が酸化ストレスに曝されると、Mpr1 によって Pro からの Arg 合成が亢進し、Arg 依存的に一酸化窒素が生成されることで下流のシグナル伝達系を活性化し、酸化ストレス耐性を獲得するというモデルを考えている。しかし、Mpr1 が酵母細胞内の Arg 合成に関与する際、どのような反応を触媒しているかについては証明されていない。本研究では、Mpr1 依存的なストレス耐性機構の鍵段階である Mpr1 依存的な Arg 合成に関わる反応とその制御機構を明らかにすることを目的とした。今回は、Arg 合成系遺伝子の変異株を用いて Mpr1 の活性と Arg 代謝との関連を調べた結果について報告する。
【方法・結果】酵母では、グルタミン酸を出発物質として Arg2,6,5 により、*N*-アセチルグルタミン酸、*N*-アセチルグルタミルリン酸、*N*-アセチルグルタミル-γ-セミアルデヒドへとそれぞれ変換され、その後数段階の反応を経て Arg が合成される。Mpr1 が Pro と Arg の代謝にどのように関与しているか詳細に検討するため、Arg 合成系遺伝子の破壊株を用いて Arg 要求性の検討を行った。その結果、Arg2 遺伝子破壊株は Arg 要求性にならなかったが、Arg2 の下流である Arg5/6（同一遺伝子上にコードされる）の遺伝子破壊株は Arg 要求性を示すことが確認できた。このことより、Mpr1 は *N*-アセチルグルタミン酸、もしくは *N*-アセチルグルタミルリン酸を生成していることが示唆された。また、Arg 合成に Mpr1 の酵素活性が重要であるかを検証するために、Arg2 遺伝子破壊株で野生型 Mpr1 および活性残基に変異を導入した変異型 Mpr1（N178D）を過剰発現させ、Arg 無添加の培地での生育を評価した。その結果、野生型 Mpr1 の過剰発現により Arg2 遺伝子破壊株は良好に生育するようになったが、変異型 Mpr1 の過剰発現では生育は改善されなかったことから、Mpr1 の酵素活性が Pro と Arg の代謝経路のバイパスに必要であることが示された。現在、Arg5 遺伝子または Arg6 遺伝子の単独破壊株を用いて Arg 要求性を評価し、Mpr1 の細胞内基質を明らかにすることを試みている。また、*in vitro* での酵素アッセイ系により Mpr1 の細胞内基質を同定することで、活性発現に必要な制御機構を解析する予定である。

N-acetyltransferase Mpr1, proline-arginine metabolism, auxotrophy

講演番号：3D01p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ D 校舎 01 会場

立体構造に基づく酵母の抗酸化酵素 Mpr1 の機能向上を目指した分子設計

Structure-based molecular design of the yeast anti-oxidative enzyme Mpr1 with its enhanced function

平瀬 冴華、○那須野 亮、高木 博史（奈良先端大バイオ）
Saeka HIRASE, ○Ryo NASUNO, Hiroshi TAKAGI (Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】　当研究室で見出した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 は、細胞を酸化ストレスから保護していることが明らかになっている。Mpr1 は、遺伝学的解析からプロリン・アルギニン代謝を連結することが示唆され、またアルギニン合成とその後の一酸化窒素生成を介して、酵母の酸化ストレス耐性に寄与すること、さらに酵母を高温ストレスに暴露した時に生じるプロリン代謝中間体 Δ^1-ピロリン-5-カルボン酸（P5C）の細胞毒性を低下させることにより、ストレス耐性の向上に寄与していることが分かっている。アミノ酸代謝を介した酸化ストレス耐性の制御機構はこれまで報告がなく、この系を強化することは酵母の酸化ストレス耐性を向上させ、発酵生産力の高い産業酵母の育種に直結する。これまでに Mpr1 遺伝子へのランダム変異導入により、熱安定性などが向上した変異型 Mpr1（Lys63Arg, Phe65euL など）を取得し、それらを発現させた酵母の酸化ストレス耐性が向上することを報告している。最近我々は、Mpr1 の立体構造と触媒反応機構を明らかにすることに成功した。そこで本研究では、立体構造に基づいて Mpr1 の理論的な分子設計を行い、活性や安定性の向上した変異型 Mpr1 を効率的に創製することを目的とした。
【方法・結果】　すでに結晶構造解析と速度論的解析から、Asn178 残基が生成物である CoA チオレートアニオンの安定化により反応を触媒することが示唆されている。そこで、Asn178 によるチオレートアニオン安定化能を向上させる目的で、Asn178Lys、Asn178Arg の各変異型 Mpr1 を大腸菌から組換え酵素として精製し、*in vitro* でモデル基質の L-アゼチジン-2-カルボン酸（AZC）を用いて酵素活性を測定した。その結果、どちらの変異型 Mpr1 もほとんど活性を示さなかった。Mpr1 の Asn178 はホモログ間で完全に保存されており、活性の発現には基質との厳密な相互作用が必要であると考えられるため、今回試みたアミノ酸置換は側鎖サイズの変化が大き過ぎた可能性がある。Mpr1 が属する Gcn5-related *N*-acetyltransferase（GNAT）スーパーファミリーの酵素の多くは、CoA チオレートを保存性 Tyr 残基（Mpr1 では Trp185 に相当）がプロトン化して反応を触媒するため、現在、Asn178Cys や Trp185Tyr などプロトン化能を向上させた変異型 Mpr1 の活性や酵素特性を解析中である。一方、Mpr1 の Asn135 は基質のカルボキシレートを認識・結合している。Asn135 のカルボキシレート結合能を向上させるため、塩基性アミノ酸残基をこの部位に導入したところ、比活性が著しく低下した。上記の結果と同様に、側鎖サイズの変化が大き過ぎたことに起因すると考えられる。現在、側鎖サイズの変化が小さいアミノ酸置換を導入し、カルボキシレート結合能が向上する変異体を精製・解析している。

N-acetyltransferase Mpr1, 3D structure, rational design

講演番号：3D02a02
講演日時、会場：3 月 29 日 09:11～ D 校舎 02 会場

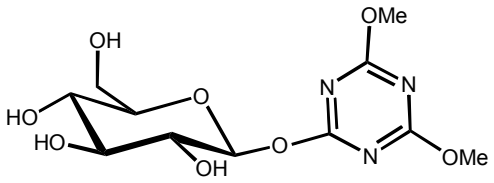
実験室で容易に調製可能な新規糖ドナー：ＤＭＴグリコシド

DMT-glycoside: Easily preparable glycosyl donors for enzymatic glycosylation

○正田 晋一郎、小林 厚志、野口 真人（東北大院工）
○Shinichiro Shoda, Atsushi Kobayashi, Masato Noguchi (Tohoku Univ.)

【背景】実験室レベルで，比較的簡単な構造のオリゴ糖を，グラムスケールで調達したい時，糖加水分解酵素によるグリコシル化は有効な手段の一つである。天然由来の少糖類をドナーとして使用できる碓氷反応のようなグリコシル化は例外として，一般に糖ドナーを得るためには，適切な脱離基の導入による還元末端の活性化が必須である。しかし，従来より汎用されている *p*-ニトロフェニル(*p*NP)誘導体は，大変高価であり，また，有機合成ができない研究者にとって，市販されていない *p*NP 体を自ら調達する際の，ハードルは極めて高い。転移活性が高い糖ドナーとして知られているフッ化糖の調製に関しても同様のことが言える。

【結果】我々は，無保護糖から 4,6-ジメトキシトリアジン（DMT）誘導体を，水中において一段階で合成する反応を開発した。また，得られた DMT 体が，対応する糖加水分解酵素により，よく認識され有効な糖ドナーとして働くことを明らかにした。DMT 体は，塩基存在下，DMT 塩化物と無保護糖の水溶液を混ぜるだけで，実験室で簡単に調製することができる。興味深いことに，これまで報告されてきた *p*NP 体と糖加水分解酵素によるグリコシル化に比べ，DMT 体の糖転移能が高いことも判明した。このことは，DMT 体が，糖加水分解酵素によるグリコシル化における一般性の高い新しい糖ドナーとして利用できることを示すものである。以下，DMT 体の構造とその特色を記す。



DMT-glycosides

1） 無保護糖から一段階で合成できる（保護基を用いない）。
2） 水溶液中で合成でき，実験操作が簡単である。
3） β 体が優先的に得られる。α 体は 1,2-二置換体へと変換されるため，クロマトグラフィーによる両者の分離が容易である。
4） 糖加水分解酵素により完全に分解される。脱離したトリアジン誘導体による阻害がない。
5） 出発原料が安価である。

DMT-glycoside, Glycosidase, Transglycosylation

講演番号：3D02a03
講演日時、会場：3 月 29 日 09:22～ D 校舎 02 会場

起源の異なるβ-グルコシダーゼの加水分解活性と糖転移活性の比較研究

A comparative study of hydrolysis and transglucosylation activities of ß-glucosidases from different sources

○寺坂 美紀、早川 有美、仁戸田 照彦、神崎 浩（岡山大院環境生命）
○Miki Terasaka, Yumi Hayakawa, Teruhiko Nitoda, Hiroshi Kanzaki (Okayama Univ.)

【目的】我々はアスコルビン酸 (AA)配糖体を合成する酵素の探索を行う中で糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー3 に属する *Aspergillus niger* 由来β-グルコシダーゼが AA の 6 位水酸基への位置特異的な糖転移反応を触媒し，アスコルビン酸 6βグルコシド (AA6βGlc)を合成することを見出した。一方，*Trichoderma* 属由来β-グルコシダーゼはアスコルビン酸 2βグルコシド (AA2βGlc)と AA6βGlc を同時に生成し，配糖化の位置選択性が低いことが分かっている。このように，同じβ-グルコシダーゼでも由来が違うと位置選択性をはじめとする糖転移活性が異なることが明らかとなったため，起源の異なる複数のβ-グルコシダーゼについて粗酵素レベルで糖転移活性を比較したところ違いがみられた。これまでに起源の異なるβ-グルコシダーゼの糖転移反応の位置選択性や基質認識の違いに注目した研究は少なく，このような違いは興味深い。そこで，本研究では粗酵素レベルで糖転移活性が異なる 4 種類の酵素を精製し，市販精製品を含めた 8 種類の酵素の加水分解活性と糖転移活性を比較した。
【方法・結果】*A. niger* 由来酵素は固体培養より得た抽出液を，*Aspergillus oryzae*, *Trichoderma viride*, *Penicillium multicolor* 由来酵素は市販酵素剤を各種クロマトグラフィーに供して電気泳動的に均一に精製した。N 末端アミノ酸配列の解析と相同性検索より *A. oryzae*, *T. viride* 由来酵素は GH3 に属することが分かった。加えて，市販精製品である Almond 由来酵素及びファミリー既知の精製酵素である *Bacteroides fragilis* (GH3), *Rhizobium etli* (GH1), *Clostridium thermocellum* (GH1)由来酵素を用いた。糖転移活性測定は糖受容体基質に AA を用い，生成した AA 配糖体量を HPLC により定量した。*p*-nitrophenyl β-D-glucopyranoside (*p*NPG)分解活性を揃えた酵素量でセロビオースまたは *p*NPG を糖供与体基質として 4 時間糖転移反応を行った結果, *Aspergillus* 属由来酵素は AA6βGlc を特異的に合成し，高い糖転移活性を示した。一方で，その他の酵素は糖転移活性が低く，Almond 由来酵素は AA6βGlc のみを, *T. viride, P. multicolor* 由来酵素は AA2βGlc と AA6βGlc を両方生成し，*B. fragilis*, *R. etli*, *C. thermocellum* 由来酵素は AA 配糖体を生成しなかった。本結果より，酵素間で糖転移活性に明確な違いがあること，さらには同じ GH3 に属する酵素間でも糖転移活性が全く異なることが明らかとなった。糖供与体基質の優先性を比較すると *Aspergillus* 属由来酵素はセロビオースが優位であったのに対して他の起源の酵素では *p*NPG が優位であった。また，両基質に対する加水分解活性を評価したところ，前者の酵素はセロビオース加水分解能の方が高いのに対して後者の酵素は *p*NPG 加水分解能の方が高く，糖転移反応と加水分解反応の基質優先性は同じ傾向にあった。

β-glucosidase, transglucosylation, regioselectivity

講演番号：3D02a04
講演日時、会場：3 月 29 日 09:33～ D 校舎 02 会場

Listeria innocua 由来β-グルコシダーゼの機能と構造解析
Structural and functional analysis of ß-glucosidase from *Listeria innocua*
○吉田 龍太[1]、中島 将博[1]、宮永 顕正[2]、阿部 紘一[1]、豊泉 大幸[1]、北岡 本光[3]、田口 速男[1]([1]東理大院理工、[2]東工大、[3]農研機構・食総研)
○Ryuta YOSHIDA[1], Masahiro NAKAJIMA[1], Akimasa MIYANAGA[2], Koichi ABE[1], Hiroyuki TOYOIZUMI[1], Motomitsu KITAOKA[3], Hayao TAGUCHI[1] ([1]Tokyo Univ Sci., [2]Tokyo Tech., [3]NARO)

【目的】*Listeria innocua* 由来の Lin1840 タンパク質は糖加水分解酵素ファミリー3(GH3)に属する遺伝子と同一クラスター内に存在する遺伝子が新規ホスホリラーゼ、1,2-β-オリゴグルカンホスホリラーゼ(OGP)をコードすることが近年明らかになった。そのため、Lin1840 タンパク質は β-1,2-グルカンの代謝に関与するβ-グルコシダーゼ（BGL）と推測されるが、その機能と構造は未解明である。そこで、Lin1840 タンパク質の機能解析と構造解析を行った。
【方法・結果】大腸菌を用い組み換え Lin1840 タンパク質(Lin1840r)を調製した。本酵素の pNP 糖に対する特異性を検討したところ、pNP-β-グルコースのみ活性を示したことから Lin1840 は BGL であることが示された。β結合を持つグルコ 2 糖に対する本酵素の活性を調べたところ、ソホロースとラミナリビオースに対して高い活性を示し、セロビオースとゲンチオビオースに対しては全く活性を示さなかった。また、重合度 3 以上のβ-1,2-グルコオリゴ糖に対する活性はソホロースに対する活性に比べ顕著に低かったことから、本酵素は 3 糖以上に特異的な OGP と協同的にβ-1, 2 グルカン代謝を行うと推測された。次に、構造機能の相関を明らかにするために、Lin1840r の X 線結晶構造解析を行った。分解能 2.0Åにて構造決定した結果、Lin1840r は TIM barrel、α/β sandwich、fibronectin type III の 3 つのドメインをもつホモ二量体の酵素であり、GH3 の既知構造との比較から D270 と E473 がそれぞれ求核触媒残基と酸塩基触媒残基であることが示唆された。Lin1840r は他の GH3 酵素には見られない特徴的なループ(L568-F598)を有しており、これが隣のサブユニットの基質結合サイト形成に関与していた。Lin1840r の基質認識に関与する知見を得るため、GH3 酵素 *Hordeum vulgare* 由来 Exo Ⅰの構造と比較したところ、ExoI のサブサイト+1 を形成する Trp 側鎖芳香環の位置に Lin1840r では Y583 が存在しており、この残基がサブサイト+1 を形成していると考えられた。更に、このループ上の R572 は、Exo Ⅰ-チオセロビオース複合体構造のサブサイト+1 のグルコース部分の 6 位 OH 基の立体障害となる位置に存在していたことから、Lin1840r の 2 糖に対する基質特異性の決定に重要な働きをしていることが示唆された。このように、このループの存在が Lin1840 に特徴的な基質特異性を生み出していると考えられる。また、Lin1840r と阻害剤イソファゴミンとの複合体構造を決定したところ、驚くべき事に TIM barrel ドメイン内のヘリックスがほどけて、サブサイト+1 に入り込んでいた。この結果からは、このヘリックスの動きが基質認識に関与する可能性が考えられた。

β-glucosidase, sophorose, GlycosideHydrolases3

講演番号：3D02a05
講演日時、会場：3 月 29 日 09:44～ D 校舎 02 会場

特徴的な基質特異性を持つ麹菌由来新規β-グルコシダーゼ(BglH)の酵素学的諸性質
Characterization of a novel ß-glucosidase(BglH) from Aspergillus oryzae with characteristic substrate specificity
○渡部 昭、鈴木 萌、氏家 成隆、五味 勝也（東北大院農）
○Akira WATANABE, Moe SUZUKI, Seiryu UJIIE, Katsuya GOMI (Tohoku Univ.)

【目的】我々は、麹菌(*Aspergillus oryzae*)ゲノム情報を元に未解析の新規β-グルコシダーゼの機能解明をこれまで行ってきており、作製したβ-グルコシダーゼ遺伝子の網羅的高発現株から新規なβ-グルコシダーゼを精製しその酵素学的諸性質を報告してきた（１、２、３）。今回、新たに特徴的な基質特異性を持つβ-グルコシダーゼを見出したので報告する。
【方法】麹菌ゲノムデータベース(DOGAN: http://www.bio.nite.go.jp/dogan/top、AspGD:http://www.aspgd.org/)を用いて推定β-グルコシダーゼ遺伝子を探索し、麹菌野生株 RIB40 のゲノム DNA を鋳型としたPCR反応で得られた目的DNA断片を麹菌高発現用ベクターであるpNGA142に組み込み、*A. oryzae* AOK11 株に導入して推定新規β-グルコシダーゼ遺伝子の高発現株を作製した。このうち、液体培養で pNPG を基質とした際活性が検出された BglH について、硫安塩析、疎水クロマトグラフィーを用いて本酵素を精製した。
【結果】BglH の至適温度、至適 pH はそれぞれ 50℃、pH4.5 であった。また、本酵素は 60℃まで安定であり、麹菌由来のβ-グルコシダーゼの中では最も温度安定性の高い酵素の部類に入るものであった。次に、基質特異性を検討したところ本酵素は合成基質の pNPG、天然オリゴ糖のゲンチオビオースに非常に高い特異性を示し、他の基質はほとんど分解しない酵素であることが判明した。BglH は、既に報告した同じ麹菌由来の BglA とアミノ酸レベルで 62%と麹菌ゲノムに存在する GH3 ファミリー酵素の中では最も高い相同性を有していたが、BglA が大豆イソフラボンのような配糖体分解活性を有する酵素である（２）のに対して、BglH はこうした配糖体分解活性を示さず、両者の基質特異性には大きな違いが見られた。この他、BglH の他の諸性質を合わせて報告する。

なお、本研究は「復興促進プログラム（A-STEP）探索タイプ」の一貫として JST の委託を受けて実施された。
（１） 工藤ほか、2010 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、ｐ２５６
（２） 工藤ほか、2011 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、ｐ４４
（３） 工藤ほか、2012 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、ｐ７９

β-glucosidase, *Aspergillus oryzae*, GH3

講演番号：3D02a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ D 校舎 02 会場

Trichoderma reesei 由来のβ-グルコシダーゼの基質特異性

Substrate specificity of *Trichoderma reesei* ß-glucosidases.

○平沢 巽[1]、鈴木 尊久[2]、岡田 宏文[2]、尾形 慎[3]、村田 健臣[4]、戸谷 一英[1]([1]一関高専・物化工、[2]長岡技科大・生物、[3]福島高専・物工、[4]静岡大農・応生化)

○Tatsumi HIRASAWA[1], Takahisa SUZUKI[2], Hirofumi OKADA[2], Makoto OGATA[3], Takeomi MURATA[4], Kazuhide TOTANI[1] ([1]Chem. Eng., Ichinoseki Natl. Coll. Tech., [2]BioEng., Nagaoka Univ. Tech., [3]Chem. Materi. Eng., Fukushima Natl. Coll. Tech., [4]Appl. Biol. Chem., Agric., Shizuoka Univ.)

【目的】これまで我々は、糸状菌 *Trichoderma reesei* 由来の EG I は高濃度セロビオースの存在下では BGL I (β-グルコシダーゼの一種)に匹敵するグルコース生成速度を示すこと、菌体外に存在するが役割が不明な BGL I は 2 糖に対する基質特異性が広いこと(β1→4 結合に加えて β1→2、β1→3、β1→6 結合も分解する)、などを明らかにしてきた(農芸化学会 2012 年大会報告)。本研究では異種発現した BGL I の広範な基質特異性を調べ BGL I の役割を考察することを目的とした。

【方法】*T. reesei* 由来の BGL I 遺伝子を pET22b(+)プラスミドに組み込み、それぞれ大腸菌 Rosetta-gami に形質転換をした。形質転換体を培養後、超音波で溶菌したのち、酢酸緩衝液(pH4.0)を添加、遠心後、上澄みを限外濾過により濃縮した。酵素の均一性は SDS-PAGE で確認した。精製 BGL I について各種 *p*-nitrophenyl (*p*NP)配糖体、オリゴ糖、多糖に対する基質特異性を調べた。基質は、セロオリゴ糖(β1→4)、ラミナリオリゴ糖(β1→3)、ゲンチオオリゴ糖(β1→6)、Pachyman (β1→3 グルカン、不溶性)、Short-chain pachyman(可溶性 β1→3 グルカン。Pachyman をギ酸分解して調製)、Pustulan (β1→6 グルカン)、Laminaran (β1→3、1→6 グルカン、可溶性)、Curdlan (β1→3 グルカン、ゲル状)、Avicel (β1→4)、CMC (β1→4、可溶性セルロース)を使用。加水分解生成物は Somogyl-Nelson 法や LC-MS による定量分析を行った。

【結果および考察】精製 BGL I は SDS-PAGE で単一バンドであり、推定分子量 72kDa とほぼ一致した。BGL I の基質特異性は、*p*NP 配糖体に対しては、*p*NP β-D-glucoside、*p*NP β-D-cellobioside の順に分解活性を示したが、他は分解しなかった。オリゴ糖に対しては、ラミナリオリゴ糖をよく分解した。特に重合度の高い 6 糖や 7 糖で分解速度が速く、セロオリゴ糖やゲンチオオリゴ糖に対する挙動とは異なった。多糖に対しては、Short-chain pachyman、Pachyman、Laminaran、Pustulan、CMC の順にグルコースを生成し、β1→3 >> β1→6 > β1→4 結合の順に高い分解活性を示すと推測された。LC-MS から BGL I は多糖をグルコース単位で分解していた。当初 BGL I は *p*NP 配糖体に対する挙動から典型的な β-glucosidase と考えられたが、オリゴ糖や多糖に対する挙動から「多糖やオリゴ糖をエキソ型で加水分解しグルコースを生成する β-glucanase であり、その基質特異性は極めて広い」と考えられた。糖転移活性も存在するが単糖レベルの伸長に限定された。BGL I のヘミセルロースを含む β-glycan 分解性への関与については現在検討中である。また、EG I CD (触媒ドメイン)や BGL II などについても同様に大腸菌で発現させ、基質特異性を検討している。

Trichoderma reesei, ß-glucosidase, ß-glucanase

講演番号：3D02a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ D 校舎 02 会場

β-グルコシダーゼを含有する *Clostridium thermocellum* セルロソームの試験管内再構成

In vitro reconstitution of *Clostridium thermocellum* cellulosome containing *β*-glucosidase

○平野 勝紹[1]、古内 正紀[1]、鈴木 優也[1]、二瓶 哲[1]、春木 満[1]、平野 展孝[1,2]（[1]日大・工・生命応化、[2]JST・PRESTO）
○Katsuaki HIRANO[1], Takaki FURUNAI[1], Yuya SUZUKI[1], Satoshi NIHEI[1], Mitsuru HARUKI[1], Nobutaka HIRANO[1,2] ([1]Nihon Univ., College of Eng., Dept. of Chem. Bio. & Appl. Chem., [2]JST, PRESTO)

好熱嫌気性細菌 *Clostridium thermocellum* は、多様なセルラーゼおよびヘミセルラーゼから成る複合体酵素(セルロソーム)を産生する。*C. thermocellum* 由来のセルロソームは、CipA と呼ばれる一次骨格に 9 つの糖質加水分解酵素が結合して分子量 200 万を超える複合体を形成し、さらに、二次骨格である Cthe0736 や OlpB に一次骨格が 7 つ結合することで、巨大なセルラーゼ・ヘミセルラーゼ超分子複合体を形成する。セルロソームは、多種多様な糖質加水分解酵素が分子的に近傍で働くことにより基質分解において相乗効果を発揮し、強力な結晶性セルロース(Avicel)分解活性を示す。しかしながら、酵素反応系においては、その加水分解産物であるオリゴ糖やセロビオースの生成物阻害によってセルロソーム活性が抑制される。そのため、効率の良い分解を行うために、分解生成物の*β*-グルコシダーゼによるグルコースへの分解が必要となる。

本研究では、*C. thermocellum* 由来セルロソームの分解活性を改善することが知られている好熱嫌気性細菌 *Thermoanaerobacter brockii* 由来*β*-グルコシダーゼ(CglT)の C 末端に、*C. thermocellum* 由来セルロソーム構成セルラーゼ CelS のセルロソーム結合ドメイン(dockerin)を融合した CglT-dockerin を作製し、セルロソーム複合体への導入を試みた。無細胞蛋白質合成系を用いて *C. thermocellum* 由来セルロソームの主要構成因子である 3 種のセルラーゼ (CelA、CelK、CelS)および全長一次骨格 CipA の調製を行い、試験管内再構成した人工セルロソームの Avicel 分解活性について検討した。この際、ドックリンを付加していない CglT を添加した場合と、CglT-dockerin をセルロソーム複合体へ導入した場合の Avicel 分解活性について検討したので報告する。

Cell-free protein synthesis, Cellulosome, *Clostridium thermocellum*

講演番号：3D02a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ D 校舎 02 会場

1,2-β-オリゴグルカンホスホリラーゼを用いた新規の直鎖状β-1,2-グルカンの大量合成

Practical preparation of a novel linear ß-1,2-glucan using 1,2-ß-oligoglucan phosphorylase

○阿部 紘一[1]、中島 将博[1]、北岡 本光[2]、田口 速男[1] ([1]東理大院理工、[2]食総研)
○Koichi ABE[1], Masahiro NAKAJIMA[1], Motomitsu KITAOKA[2], Hayao TAGUCHI[1] ([1]Tokyo Univ. Sci., [2]NARO)

【目的】β-1,2-グルカンは一部のグラム陰性菌の分泌する環状糖としての存在が知られており、宿主との共生や宿主免疫系からの回避などに重要である。一方、自然界における直鎖状のβ-1,2-グルカンの存在はこれまでに報告例がなく、その役割や機能性は未知である。近年、1,2-β-オリゴグルカンホスホリラーゼ(OGP)が発見され、この酵素を用いた直鎖状β-1,2-グルカンの合成が可能となった。しかし、糖リン酸を出発原料とした合成法では十分な収率が得られなかったため、本研究では安価なスクロースとグルコースを出発材料とした、スクロースホスホリラーゼ(SP)と OGP による新規の直鎖状β-1,2-グルカンの大量調製を試みた。
【方法、結果】SP、OGP は大腸菌を用いた組換え酵素として調製した。ミニスケールの反応系を用い、反応初期におけるβ-1,2-グルカン合成量を薄層クロマトグラフィー(TLC)により調べることで合成条件の最適化を行った。まず、グルコース濃度を最適化するためにスクロース濃度を 1 M、無機リン酸(pH 7.0)濃度を 0.1 M に、SP と OGP 濃度を 0.2 mg/ml に固定し、0.1 M から 1 M までのグルコース濃度で反応を行った。グルコース濃度 0.5 M でβ-1,2-グルカン合成量が最大に達したことから最適グルコース濃度を 0.5 M と決定した。次に SP と OGP 濃度比率の最適化を行った。上記の濃度のスクロースと無機リン酸、0.5 M グルコース存在下で様々な濃度比率の SP と OGP を用いて反応を行った。SP 濃度を OGP の 4 分の 1 に減らしてもβ-1,2-グルカン合成量の減少が見られなかったことから SP と OGP の最適濃度比率を 1:4 と決定した。以上の結果をもとに、2 L のワンポット酵素反応を 12 日間行った。反応液中の基質、反応産物の濃度の経時変化を定量的に調べたところ、スクロースの減少に付随してβ-1,2-グルカンが増加し、その濃度は 0.9 M(グルコース濃度換算)に達していた。DEAE-セルロース(DE52)の添加による反応液からの除タンパク質を行った後、反応液中のβ-1,2-グルカン以外の糖を酵母処理により除去した。酵母処理液上清の約半分を濃縮後、等量のエタノールを加えてβ-1,2-グルカンを沈殿させ、沈殿物の凍結乾燥により 167 g の精製β-1,2-グルカンを得た。精製β-1,2-グルカンの平均重合度を NMR により調べたところ 25 であった。

linear ß-1,2-glucan, 1,2-ß-oligoglucan phosphorylase, one-pot enzymatic synthesis

講演番号：3D02a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ D 校舎 02 会場

Talaromyces funiculosus 由来β-1,2-グルカン分解酵素の精製と機能解析
Purification and characterization of a β-1,2-glucan degrading enzyme from *Talaromyces funiculosus*

○田中 信清[1]、阿部 鉱一[1]、中島 将博[1]、北岡 本光[2]、田口 速男[1]([1]東理大、[2]食総研)
○Nobukiyo Tanaka[1], Kouichi Abe[1], Masahiro Nakajima[1], Motomitu Kitaoka[2], Hayao Taguchi[1]
([1]Tokyo Univ of Sci, [2]NARO)

【目的】β-1,2-グルカンは微生物の分泌する環状糖としての存在が知られており、宿主との共生や宿主免疫系からの回避などに重要とされる。一方、β-1,2-グルカン分解酵素については基質の入手が容易でないことから、いくつかの菌で分解活性の報告があるのみである。そこで、演者らが大量調製に成功した直鎖状β-1,2-グルカン(本大会で発表予定)を用い、活性既知の微生物からβ-1,2-グルカン分解酵素の精製単離と機能解析を行った。

【方法、結果】活性既知の 3 つの糸状菌(*Eupenicillium parvum*、*Talaromyces funiculosus*、*Penicillium melinii*)をβ-1,2-グルカンを唯一の炭素源として培養し、培養上清中の糖を薄層クロマトグラフィー(TLC)により検出したところ、*T. funiculosus* が最も速くβ-1,2-グルカンを分解しオリゴ糖を蓄積した。そこで、β-グルコシダーゼ(BGL)の阻害剤であるグルコン酸存在下におけるβ-1,2-グルカンからのオリゴ糖の遊離活性を指標として、*T. funiculosus* の培養上清から疎水、陰イオン交換、ゲルろ過カラムによりβ-1,2-グルカン分解酵素の精製を行った。各精製段階の酵素溶液中のβ-1,2-グルカン分解活性を還元糖定量法により、BGL 活性は pNP-β-Glc を基質として調べたところ、ゲルろ過カラムによりβ-1,2-グルカン分解酵素と BGL は完全に分離された。この精製酵素の分子量を SDS-PAGE 及びゲルろ過クロマトグラフィーにより調べた結果、いずれにおいても約 59kDa の分子量が得られた。この結果は本酵素が単量体である事を示している。また、本酵素への糖鎖修飾の有無を PAS 染色により調べた結果、本酵素は PAS 染色により検出されたが、ペプチド:N-グリカナーゼ処理を行うと本酵素は分子量が 50kDa に減少し PAS 染色により検出されなかった。これらから本酵素が N 結合型糖鎖のみに修飾されている事が明らかとなった。また、本酵素の pH、温度依存性を調べたところ、本酵素の至適 pH は 4～5 で、pH 4～8 で安定であり、至適温度は 50℃で、50 分間の処理では 20℃まで安定であった。更に、多糖に対する基質特異性を調べた結果、本酵素は β-1,2-グルカンに特異的であった。さらに β-1,2-グルカンに対する分解様式を TLC により調べたところ、反応初期から主生成物としてソホロースが検出され、後期にはソホロテトラオースも検出された。また、β-1,2-グルコオリゴ糖（重合度 2-5）に対する特異性を調べたところ、本酵素は 5 糖のみを分解し、ソホロースを遊離した。以上から、本酵素は 5 糖以上の β-1,2-グルカンに作用するソホロヒドロラーゼと考えられる。

Sophorohydrolase, β-1,2-glucan, *Talaromyces funiculosus*

講演番号：3D02a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ D 校舎 02 会場

Fervidobacterium pennivorans 由来の耐熱性 β-1,3-グルカンホスホリラーゼの機能解析

Characterization of thermostable beta-1,3-glucan phosphorylase from *Fervidobacterium pennivorans*

○磯野 直人、伊藤 翔子（三重大院生資）
○Naoto ISONO, Shoko ITO (Mie Univ.)

【目的】β-1,3-グルカンホスホリラーゼ [BGP; β-1,3-$(Glc)_n$ + α-G1P ⇄ β-1,3-$(Glc)_{n+1}$ + Pi] は β-1,3-グルカンの加リン酸分解とその逆反応（合成反応）を触媒する酵素である. 我々は黄金色藻 *Ochromonas danica* 由来 BGP（OdBGP）の構造と機能の解析や OdBGP を用いた β-1,3-グルカンの合成法の開発を行なってきた. 工業的に物質を生産する場合, 使用する酵素にはできるだけ耐熱性があることが望ましい. しかし, OdBGP の至適温度は 25–30°C であり, 高温で不安定である. そこで, 本研究では耐熱性 BGP を見出し, 高温下で β-1,3-グルカンを酵素合成することを目的とした.

【方法・結果】好熱性細菌 *Fervidobacterium pennivorans* のゲノム中に OdBGP と約 50%のアミノ酸配列類似性を示す 125 kDa のタンパク質 FpBGP がコードされていることを見出した. 大腸菌でヒスチジンタグが付加された FpBGP を発現させ, ニッケルカラムで精製した. FpBGP は BGP 活性を有し, 三糖以上のラミナリオリゴ糖やラミナリンを加リン酸分解した. 一方, ラミナリビオースに対しては分解活性を示さなかった. α-G1P を基質とした合成反応ではラミナリオリゴ糖やラミナリンのほか, グルコース, セロビオース, ソホロースなどをアクセプターとした反応を触媒した. FpBGP の至適温度は 80°C, 至適 pH は 7.5 であった. また, 85°C で 30 min 加熱処理した後も加熱前の 90%の酵素活性を維持していた. さらに, FpBGP は界面活性剤（5% Triton X-100, 5% Tween 20, 5% Tween 80, 1% CHAPS）や 30% DMSO 中でも酵素活性を示した. FpBGP, α-G1P, ラミナリビオース（またはグルコース）を混合して, 80°C で一晩, 反応を行ったところ, β-1,3-グルカンが合成された. また, 反応産物をサイズ排除 HPLC で解析したところ, 基質濃度や温度などの合成条件によって β-1,3-グルカンの重合度分布が変化することが明らかとなった. そこで, FpBGP を用いて重合度分布のピークが DP 30, 45, 55, 65 の β-1,3-グルカンを調製した. これらの β-1,3-グルカンをラット肺胞マクロファージ細胞株 NR8383 培養液中に添加し, NO 産生能を測定した. その結果, DP 55 以上の酵素合成 β-1,3-グルカンに高いマクロファージ活性化能があることが明らかとなった.

β-1,3-glucan phosphorylase, thermophile, macrophage activation

講演番号：3D02a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ D 校舎 02 会場

きのこ類β-グルカナーゼによる昆布ラミナリン分解物の免疫賦活機能

Laminarin degradation products by a mushroom ß-glucanase indicate immunostimulation

○金野 尚武[1,2]、渡辺 千尋[1]、山田 秀俊[2]、高橋 秀行[2]、坂本 裕一[2]、羽生 直人[1] ([1]宇都宮大農、[2]岩手生物工学研究センター)
○Naotake KONNO[1,2], Tihiro WATANABE[1], Hidetoshi YAMADA[2], Hideyuki TAKAHASHI[2], Yuichi SAKAMOTO[2], Naoto HABU[1] ([1]Utsunomiya Univ., [2]Iwate biotechnology research center)

真菌類の細胞壁は主にキチンとβ-1,3/1,6 グルカンから構成され、自身で生産する酵素により細胞壁を分解・合成しながら形態を変化させている。担子菌類が形成する子実体（きのこ）中にも、キチナーゼ、β-1,3 グルカナーゼ、β-1,6 グルカナーゼといった糖質加水分解酵素（GH）が豊富に含まれており、いくつかの酵素については単離することに成功している。真菌類のβ-1,3/1,6 グルカンの一部は、シイタケ由来のレンチナンのように、免疫賦活やアレルギー抑制機能が報告され、健康食品や医薬品として市販されている。きのこ類の中にはこれら機能性β-グルカンに作用する酵素も含まれている。このような背景から、我々はきのこ類の糖質関連酵素を利用して機能性材料を開発できないかという着想のもと研究を進めている。

担子菌ウシグソヒトヨタケ（*Coprinopsis cinerea*）の子実体から cDNA を調製し、ゲノム情報を用いながら GH ファミリー16 のβ-1,3-1,4 グルカナーゼをクローニングした。麹菌（*Aspergillus oryzae*）に形質転換し、酵素を異種発現させたところ、20kDa のリコンビナント酵素が得られた。（CcLam16A)。酵素反応における最適条件は pH4, 30℃であった。本酵素は大麦グルカン（β-1,3/1,4 グルカン)、椎茸レンチナン、昆布ラミナリン（β-1,3/1,6 グルカン）等の様々なβ-1,3 グルカン構造を有する多糖に対してエンド型の分解活性を有し、結合様式が混在するユニークな構造のβ-グルカンオリゴ糖が生成した。

そこで、昆布ラミナリンを CcLam16A で酵素分解し、生成したオリゴ糖をゲル濾過クロマトグラフーで分離し、各フラクションに含まれるオリゴ糖の免疫賦活機能を分析した。免疫賦活機能はマクロファージ様細胞（RAW246.3 細胞）における TNFα発現により評価した。本検討において、元の昆布ラミナリンは免疫賦活機能を示さなかった。一方で、酵素分解物の一部に免疫賦活機能が検出された。生理機能をもつオリゴ糖はβ-1,3 結合とβ-1,6 結合が混在したグルカンオリゴ糖であることが示唆された。また LC/MS で分析したところ、５糖以上であると推定された。現在詳細な構造解析を進めている。

β-glucanase, ß-glucan, mushroom

講演番号：3D02a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ D 校舎 02 会場

担子菌 *Coprinopsis cinerea* の子実体形成過程において発現する糖質関連酵素遺伝子の網羅的解析
Transcriptmics of CAZyme genes from the basidiomecete *Coprinopsis cinerea* in the process of fruiting body formation

○梅澤 究[1]、村口 元[2]、古崎 利紀[1]、石井 一夫[1]、吉田 誠[1] ([1]東京農工大農、[2]秋田県立大生資科)
○Kiwamu UMEZAWA[1], Hazime MURAGUCHI[2], Toshinori KOZAKI[1], Kazuo ISHII[1], Makoto YOSHIDA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric. and Technol., [2]Akita Pref. Univ.)

担子菌の子実体、いわゆる「きのこ」は食品として世界中の多くの地域で利用されている。日本のきのこ生産額は年額 2,000 億円にも達し、これは林業産出額の約 50%を占めるほど大きい。さらに近年、消費者の健康意識の高まりを受け、低カロリー・高栄養価のきのこが注目されている。きのこは古くから人工栽培されてきたことから多くの研究がなされてきたものの、子実体形成の分子メカニズムについては未だ不明な点が多く、その詳細は明らかになっていない。

担子菌はキチンや ß-グルカンなど各種多糖類で構成される厚い細胞壁を有しており、その細胞壁はキチン層やグルカン層といった層構造を呈している。菌糸から子実体へと分化する過程では、これらの細胞壁多糖類が分解・再構成されると考えられている。これまでに、子実体形成時の細胞壁多糖類分解に関わる酵素として、キチナーゼや ß-1,3-グルカナーゼ、ß-1,6-グルカナーゼなどの糖質加水分解酵素が報告されているが、菌糸から子実体への劇的な形態変化を考慮すると、より多くの糖質関連酵素が関与していることが予想される。

本研究では，きのこにおける子実体形成のモデル菌の一つであるウシグソヒトヨタケ（*Coprinopsis cinerea*）の菌糸体から成熟子実体の形成に至るまでの 9 つの生長ステージと子実体における傘と柄の 2 つの部位の計 13 サンプルを対象として、次世代シークエンサーを用いた RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。これにより、子実体形成過程の各段階において特徴的な発現挙動を示す遺伝子を特定し、子実体形成に関与する糖質関連酵素に関する新たな知見を得ることを試みた。

本研究は、平成２３年度新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「突然変異育種法を利用した栽培きのこの有用形質創出とその DNA マーカーの開発」(23053)および DOE Joint Genome Institute. JGI's Community Sequencing Program "Functional genomics in the model mushroom *Coprinopsis cinerea*" Primary Investigator (PI): Patricia J. Pukkila, Univ. of North Carolina の一環として実施された。

CAZyme, fruiting body, RNA-Seq

講演番号：3D02a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ D 校舎 02 会場

糖質加水分解酵素ファミリー6 セルラーゼのプロセッシビティを中心とした機能解析

Functional analysis of Glycoside Hydrolase family 6 cellulases processivity

○内山 拓[1]、金子 哲[2]、内橋 貴之[3]、中村 彰彦[1]、五十嵐 圭日子[1]、安藤 敏夫[3]、鮫島 正浩[1]([1]東大院農生科、[2]食総研、[3]金沢大理工)
○Taku UCHIYAMA[1], Satoshi KANEKO[2], Takayuki UCHIHASHI[3], Akihiko NAKAMURA[1], Kiyohiko IGARASHI[1], Toshio ANDO[3], Masahiro SAMEJIMA[1] ([1]University of Tokyo, [2]National Food Research Institute, [3]Kanazawa University)

［目的］強固な結晶構造を持つ固体であるセルロースを効率よく加水分解することができるセルラーゼには、大きく 2 つの機能が備わっている。すなわち固体基質表面に吸着し集合するための機能と、酵素が固体基質に吸着した後、基質表面上にとどまりながらセルロース鎖を連続的（プロセッシブ）に分解する機能（プロセッシビティと呼ばれる）がある。我々は今までに *Trichoderma reesei* 由来のセルラーゼ、CBH I（*Tr*Cel7A)が実際に結晶性セルロース表面上において連続的にセルロース鎖を加水分解している様子を高速原子間力顕微鏡（HS-AFM)を用いることで可視化することに成功している(1)。一方で、*T. reesei* 由来のセルラーゼ CBH II（*Tr*Cel6A)については、プロセッシブな動きは観察されなかった。そこで我々は、*Tr*Cel6A と同様 Glycoside Hydrolase（GH）ファミリー6 に属する触媒ドメインを持つセルラーゼ（Cel6）を新たに 3 種用意し、それぞれ単独での結晶性セルロースに対する分解活性、Cel6 同士を 2 種混合した際の分解活性、*Tr*Cel7A と混合した際の分解活性の比較と、それぞれの結晶性セルロース加水分解時の HS-AFM 観察をおこなうことで、GH ファミリー6 に属するセルラーゼのプロセッシビティを比較することにした。
［結果と考察］GH ファミリー6 に属するセルラーゼとして、*Tr*Cel6A および放線菌 *Cellulomonas fimi* 由来の CenA（*Cf*Cel6A)と CbhA（*Cf*Cel6B)、*Streptomyces avermitilis* 由来の SAV1853（*Sa*Cel6A)をそれぞれ異宿主発現させ精製した。これらを単独、Cel6 同士の 2 種混合、*Tr*Cel7A と混合した時の分解活性を比較した。*Tr*Cel6A、*Cf*Cel6B および *Sa*Cel6A は単独で結晶性セルロース分解活性を示し、また *Tr*Cel7A と混合すると単独で作用させた時の合計よりも高い活性を示す、いわゆる相乗効果が確認された。一方 GH ファミリー6 に属するセルラーゼ同士の 2 種混合では、それぞれ単独で作用させた際の合計よりも活性が低下した。HS-AFM では、*Cf*Cel6B および *Sa*Cel6A がセルロース結晶表面上を *Tr*Cel7A とは逆方向に動く様子が観察された。以上の結果から、プロセッシブな加水分解を行うセルラーゼが GH ファミリー6 にも存在し、それらは *Tr*Cel7A と相乗効果を示すことが明らかとなった。一方 *Tr*Cel6A はセルロース結晶表面上にとどまるが加水分解の方向性は確認できず、*Cf*Cel6A の場合は基質表面への吸着自体が観察されなかった。プロセッシビティは低いが *Tr*Cel7A と同程度の結晶性セルロース分解活性をもつ *Tr*Cel6A の存在から、GH ファミリーが異なる場合はプロセッシビティの高さと分解活性の強さが必ずしも相関しないことが明らかとなった。

(1) K. Igarashi, T. Uchihashi, *et al. Science* 333, 1279 (2011)

Cellulase, Processivity, Synergy

講演番号：3D02a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ D 校舎 02 会場

セロビオン酸ホスホリラーゼの発見
Discovery of cellobionic acid phosphorylase in cellulolytic bacteria and fungi
○仁平 高則[1]、斉藤 由華[1]、西本 完[2]、北岡 本光[2]、五十嵐 圭日子[3]、伏信 進矢[4]、中井 博之[1]、大坪 研一[1]([1]新潟大院・自然科、[2]農研機構・食総研、[3]東大院・農生科・生材科、[4]東大院・農生科・応生工)
○Takanori NIHIRA[1], Yuka Saito[1], Mamoru Nishimoto[2], Motomitsu Kitaoka[2], Kiyohiko Igarashi[3], Shinya Fushinobu[4], Hiroyuki Nakai[1], Ken'ichi Ohtsubo[1] ([1]Niigata Univ., [2]NFRI-NARO, [3]Univ. Tokyo, [4]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

【目的】セルロースは地球上で最も大量に存在する有機物であり，その分解・代謝は自然界における炭素循環の重要なプロセスの一つである。セルロースの分解には，多種多様なセルラーゼやβ-グルコシダーゼによる加水分解反応およびセロビオースホスホリラーゼ，セロデキストリンホスホリラーゼによる加リン酸分解反応の関与が古くから知られていたが，近年セロビオースデヒドロゲナーゼ（CDH）や溶解性多糖モノオキシゲナーゼ（LPMO）による酸化的低分子化反応の関与が注目されている。しかし，その主たる最終生成物であるセロビオン酸（β-1,4-D-グルコシル-D-グルコン酸）の代謝経路に関しては全く不明であり，次段階の代謝経路へ移行するための鍵酵素の存在が推測される。セロビオン酸の加水分解物の D-グルコン酸がβ-グルコシダーゼの強力な阻害剤になることから，本研究では加水分解酵素ではなく加リン酸分解酵素ホスホリラーゼに注目し，β-グルコビオースを加リン酸分解する酵素が所属する糖加水分解酵素ファミリー（GH）94 において，セロビオン酸代謝に関与するホスホリラーゼの探索および同定を行なった。
【方法と結果】分子系統解析により，既知 GH94 ホスホリラーゼと相同性の低いホモログ遺伝子に着目し，PCR にて構造遺伝子を増幅後 pET ベクターに連結し，大腸菌 BL21(DE3)を宿主とした His-Tag 付加の組換えタンパク質を調製した。得られた組換え酵素について，α-グルコース 1 リン酸(αGlc1*P*)をドナー基質，D-グルコン酸をアクセプター基質として逆反応による合成活性を確認した。その結果，植物病原菌 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC33913 由来のホスホリラーゼホモログ XCC4077 が高い反応性を示した。反応生成糖を NMR 構造解析した結果β-1,4 結合を有するセロビオン酸と同定されたことから，XCC4077 はセロビオン酸をリン酸存在下で加リン酸分解しαGlc1*P* と D-グルコン酸を遊離する新規酵素セロビオン酸ホスホリラーゼであることが判明した。XCC4077 のアミノ酸配列を基に改めてシークエンス解析を行なった結果，多糖分解海洋性細菌 *Saccharophagus degradans* 2-40 や糸状菌 *Neurospora crassa* OR74A においても当該ホスホリラーゼホモログ遺伝子が見出だされ，それらの組換えタンパク質 Sde0906 および NCU09425 に関してもそれぞれ高いセロビオン酸の加リン酸分解活性を確認できた。各種セルラーゼ，LPMO および CDH などの相乗作用によって効率的に進行するセロビオン酸を経由するセルロース代謝経路は，本研究で発見された鍵酵素セロビオン酸ホスホリラーゼを介して解糖系およびペントースリン酸経路へ移行することが初めて判明した。
1. T.Nihira, et al, *FEBS Lett.*, **587**, 3556-3561 (2013).

cellobionic acid phosphorylase, cellulose metabolism, glycoside hydrolase family 94

講演番号：3D02a17
講演日時、会場：3 月 29 日 11:54～ D 校舎 02 会場

Saccharophagus degradans 由来セロビオン酸ホスホリラ-ゼのＸ線結晶構造解析
Crystal structure of cellobionic acid phosphorylase from Saccharophagus degradans
○南 ヨンウ[1]、仁平 高則[2]、北岡 本光[3]、中井 博之[2]、荒川 孝俊[1]、伏信 進失[1]([1]東大・農生科、[2]新潟大・農、[3]農研機構・食総研)
○ Young Woo Nam[1], Takanori Nihira[2], Motomitsu Kitaoka[3], Hiroyuki Nakai[2], Takatoshi Arakawa[1], Shinya Fushinobu[1] ([1]Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, [2]Faculty of Agriculture, Niigata Univ., [3]NFRI-NARO)

【目的】近年、セルロースの加水分解に加えて酸化分解が注目されているが、その主な最終産物であるセロビオン酸の代謝経路については全く不明であった。我々はごく最近、アカパンカビと*Xanthomonas*属細菌よりGH94に分類される新規酵素セロビオン酸ホスホリラーゼ(CBAP)を発見し、この酵素がセロビオン酸を加リン酸分解した産物のグルコース1-リン酸とグルコン酸が下流の代謝経路に繋がることを明らかにした(Nihira et al., *FEBS Lett.*, 587, 3556, 2013)。今回我々は多糖分解性海洋細菌*Saccharophagus degradans* 2-40からもCBAPを発見した。GH94ではこれまでキトビオースホスホリラーゼとセロビオースホスホリラーゼ(CBP)の結晶構造が報告されているが、CBAPの結晶構造は未解明である。本研究では*S. degradans*由来CBAPのＸ線結晶構造解析を行い、その基質認識と反応機構を解明することを目的とした。
【方法】大腸菌で発現させたCBAPを３段階のクロマトグラフィーで精製し、シッティングドロップ蒸気拡散法により作成した結晶化を用いてKEK-PFでＸ線回折を測定した。CBAPは構造既知のGH94酵素とのアミノ酸配列同一性が24%以下であるため分子置換法は適用できず、Se-Met置換体を用いて位相決定を行った。さらにセロビオン酸とグルコン酸を結晶にソーキングし、複合体の立体構造を決定した。
【結果】CBAPの立体構造の決定に成功し、セロビオン酸複合体とグルコン酸複合体の構造をそれぞれ分解能1.6 Åと1.75 Åで決定した。CBAPは溶液中では二量体で存在するが、結晶格子中の非対称単位には単量体が存在しており結晶学的な２回軸により二量体が形成されていた。全体構造はN末端側のβ-サンドイッチドメインとC末端側の$(\alpha/\alpha)_6$バレル触媒ドメインからなる。CBAP二量体においてはβ-サンドイッチドメインの一部が隣のサブユニットの基質結合部位の近くに存在し、ここに存在するGln190が基質認識に関与することが示唆された。CBAPとCBPの基質結合部位を重ね合わせて相互作用しているアミノ酸残基を比べたところ、サブサイト-1(Glucose結合部位)では保存性が高いのに対し、サブサイト+1(グルコン酸結合部位)は保存性が低いことが分かり、CBAPは他のGH94と異なる特別な基質認識部位を持つことが明らかになった。

crystal structure, gycoside hydrolase family 94, cellobionic acid phosphorylase

講演番号：3D02p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ D 校舎 02 会場

アルカリ性嫌気下で生産される *Amphibacillus xylanus* の xylan 分解酵素（第 3 報）

Xylanolytic enzymes produced by *Amphibacillus xylanus* cultured under alkaline anaerobic conditions. (Part. 3)

西田 俊介[1]、○川村 友亮[1]、浅石 真由[1]、望月 大地[1]、藤田 信之[2]、佐藤 純一[1]、川崎 信治[1]、新村 洋一[1] ([1]東農大応生科・バイオ、[2]NITE)
Syunsuke NISHIDA[1], ○ Yusuke KAWAMURA[1], Mayu ASAISHI[1], Daichi MOCHIZUKI[1], Nobuyuki FUJITA[2], Junichi SATO[1], Shinji KAWASAKI[1], Youichi NIIMURA[1] ([1]Tokyo Univ. Agri., [2]NITE)

【背景・目的】

ヘミセルロースは植物細胞壁のアルカリ抽出画分であり、xylan はヘミセルロースの主要構成成分であるため好アルカリ性菌による xylan 分解に研究興味が持たれてきた。*Amphibacillus xylanus* (以下 *A. xylanus*) [1)] は幅広い植物由来の xylan を資化可能であり、アルカリ性下の無酸素・有酸素条件で良好に生育し、菌体自身で強力に酸素を吸収することにより生育ニッチ (アルカリ性下での嫌気状態) の確立が可能である [2)]。そのため、簡便で効率的な xylan 培養が期待される。

我々は本菌の xylan 分解機構の解明を目的として、Beechwood xylan アルカリ嫌気培地で培養し 2 種の xylanase を精製した。さらに、その遺伝子を用いて大腸菌での発現系を構築し精製を試みた。本大会では *A. xylanus* が持つ xylanase の諸性質に関する解析結果について発表する。

【方法・結果】

Beechwood xylan を糖源とした嫌気条件において培養した *A. xylanus* の培養上清を限外濾過濃縮し、各種カラムに供し、主要な 2 種の xylanase を精製した [3)]。独立行政法人 NITE との共同研究 (*A. xylanus* のゲノム解析) により、本菌は 5 種の xylanase 遺伝子を有しており、 5 種の中の 2 種と N 末端アミノ酸配列が一致した。 XYN-38 は分子量 38 kDa であり至適温度 50 ℃、XYN-150 は分子量 150 kDa であり至適温度 40 ℃であった。両酵素とも pH 6 から pH 9 で活性を示した。それぞれを大腸菌の発現系 (pET101/TOPO) にて発現後、精製を試みた。XYN-38 は大腸菌で良好に発現したが、XYN-150 では発現が少ないため現在検討中である。発現した rXYN-38 は *A. xylanus* より精製した酵素と同じ分子量と至適 pH を示した。また rXYN-38 に Beechwood xylan 、Birchwood xylan 、Larchwood xylan 、Oat spelts を反応させたところ、すべての基質を分解したが Beechwood xylan において最大の活性を示した。薄層クロマトグラフィーを用いて上述の xylan の分解差異を観察した結果、Beechwood xylan、Birchwood xylan を 2 、4 糖に分解し、Larchwood xylan、Oat spelts を 2 糖に分解した。

【引用】

[1)] Niimura Y. et al. (1990) *IJSB*, vol. 40 p. 297-301
[2)] Niimura Y. et al. (1987) *A. B. C.* 51 p. 2271-2275
[3)] 西田俊介ら 2013 年 農芸化学会年次大会

Amphibacillus xylanus, xylan, xylanase

講演番号：3D02p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ D 校舎 02 会場

放線菌 *Streptomyces turgidiscabies* 由来グルクロノキシラン特異的 GH30 キシラナーゼの特性解析
Characterization of a GH30 glucuronoxylan specific xylanase from *Streptomyces turgidiscabies* C56

○前原 智子[1]、紙野 圭[2]、金子 哲[1] ([1]（独）食品総合研究所、[2]（独）製品評価技術基盤機構)
○Tomoko MAEHARA[1], Kei KAMINO[2], Satoshi KANEKO[1] ([1]NFRI, [2]NBRC)

【背景】近年、食料と競合しないリグノセルロースがバイオマスエネルギーの原料として注目されている。リグノセルロース中には約 20%のヘミセルロースが含まれ、ヘミセルロースの利用がバイオマス利用の鍵となる。主要なヘミセルロースであるキシランの分解酵素系において GH10 及び GH11 キシラナーゼに関しては多くの詳細な研究報告があるが、その他の酵素については不明な点が多い。本研究では、キシラン分解酵素の一つである GH30 キシラナーゼについて、より詳細な知見を得るため、立体構造モデルや変異体酵素を用いて酵素の特性解析を行った。

【方法・結果】放線菌 *Streptomyces turgidiscabies* C56 株のゲノム配列を解析した結果、*Erwinia chrysanthemi* や *Bacillus subtilis* 由来の GH30 キシラナーゼと高い相同性を持つ配列を見出したため、本遺伝子をクローニングした。組換え酵素は大腸菌 Tuner (DE3)株を用いて発現させ、Ni-NTA agarose カラムによって精製を行った。本酵素の反応の至適は pH 6.0, 55℃にあり、birchwood, beechwood, oat spelts キシラン等の 4-O-Me-グルクロン酸を含むキシランには作用したが、wheat arabinoxylan には作用しなかったことからグルクロノキシラン特異的なキシラナーゼであることが示された。また、本酵素の反応はグルクロン酸側鎖を認識することが重要であると考えられたため、アミノ酸置換による変異体酵素を構築し、グルクロン酸側鎖と酵素の相互作用が酵素の基質特異性に及ぼす影響を検討した。

GH30, xylanase, glucronoxylan

講演番号：3D02p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ D 校舎 02 会場

キシログルカナーゼ XEG74 のエンド-プロセッシブ活性に重要なアミノ酸の特定

Identification of key amino acids for the endo-processive activity of xyloglucanase XEG74

○松沢 智彦、矢追 克郎（産総研 生物プロセス）
○Tomohiko MATSUZAWA, Katsuro YAOI (AIST)

キシログルカンは植物細胞壁中に存在する多糖類であり、グルコースがβ-1,4 結合で連なったβ-1,4 グルカンを主鎖とし、α-1,6 結合のキシロース側鎖が高頻度に枝分かれした構造をとっている。これまでにキシログルカンの分解に関与する酵素は多数報告されており、主鎖のβ-1,4 グルカンのグルコシド結合を分解するキシログルカナーゼや側鎖のキシロースを遊離させるα-キシロシダーゼなどが知られている。キシログルカナーゼにはキシログルカンの末端から分解するエキソ型、キシロース側鎖のないグルコース残基を認識して分解するエンド型が存在しており、エンド型キシログルカナーゼにはエンド型の分解を繰り返す典型的なエンド型と、エンド型で分解した後にエキソ型様の分解にシフトするエンド-プロセッシブ型の２種類が存在している。当研究室では *Paenibacillus* sp. 由来エンド-プロセッシブ型キシログルカナーゼ(XEG74)を取得しており、本研究ではホモロジーモデリングを駆使することによって XEG74 のエンド-プロセッシブ活性に重要な構造･アミノ酸の特定を試みた。

エンド-プロセッシブ型キシログルカナーゼである XEG74 のホモロジーモデリングを作製し、エンド型キシログルカナーゼである *Geotrichum* sp. 由来 XEG(Xyloglucan-specific endo-β-1,4-glucanase)と構造を比較すると、XEG74 は活性中心近傍に特徴的な４つのトリプトファン残基（W61, W64, W318, W319）を有していた。これらのトリプトファン残基が XEG74 のエンド-プロセッシブ活性に重要であると予想し、各トリプトファン残基のアラニン置換体を作製し、その解析を行った。HPLC によるキシログルカン分解産物の解析やキシログルカンに特徴的な粘度の測定を行った結果、XEG74 W61A 変異体及び XEG74 W64A 変異体ではキシログルカンの分解様式に変化は見られないのに対し、XEG74 W318A 変異体及び XEG74 W319A 変異体では分解様式がエンド-プロセッシブ型から典型的なエンド型に変化することが明らかになった。

以上の結果より、XEG74 の活性中心近傍の２つのトリプトファン残基（W318, W319）は本酵素のエンド-プロセッシブ型キシログルカナーゼ活性に重要であり、XEG74 はこれらのトリプトファン残基を用いて基質であるキシログルカンにスタッキングすることによってエンド-プロセッシブ型キシログルカナーゼとして機能していることが示唆された。

Xyloglucanase, Xyloglucan, Hemicellulose

講演番号：3D02p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ D 校舎 02 会場

メタゲノム由来 GH43 酵素について

GH43 enzyme from metagenomic library

○矢追 克郎、松沢 智彦（産総研生物プロセス）
○Katsuro Yaoi, Tomohiko Matsuzawa (AIST)

【目的】環境中に存在する微生物のうち、人為的に培養できるのはごくわずかで、99%以上は培養できないといわれている。すなわち、従来の培養を介した方法では、環境中の微生物資源全体の 1%に満たない部分にしかアクセスできていないことになる。これを解消する一つの手法がメタゲノムである。環境中の微生物から遺伝子を直接抽出し利用する方法で、培養を介さないため難培養微生物の遺伝子資源を利用する事が出来るのである。我々はこれまでに、メタゲノムの手法を用いて様々な酵素の探索を行ってきた。2008 年から始まった NEDO のバイオマス PJ [(1)] においては、セルロース系バイオマスの糖化に資する酵素の探索を行い、多くのセルラーゼやヘミセルラーゼを獲得し、非常にユニークなβグルコシダーゼの単離にも成功した [(2)]。 本発表では、セルロース系バイオマスのトリコデルマセルラーゼ製剤による酵素糖化への増強効果を指標とした探索の結果、糖質加水分解酵素ファイミリー43（GH43）に属する酵素を単離したので報告する。
【方法と結果】まず、食品、コンポスト、温泉、土壌など様々な環境より DNA を抽出し、pUC 系のプラスミドベクターに挿入し、大腸菌を宿主としたメタゲノムライブラリーを作成した。それを寒天プレートにまき、単コロニーをそれぞれ 96 well のプレートの各 well で培養した。それぞれのクローンについて、一次スクリーニングとして pNP キシロピラノシドや pNP アラビノフラノシドなどの pNP 基質を用いて、糖質加水分解活性を指標にした選抜を行った。活性のあったクローンについて、アルカリ処理稲ワラをトリコデルマセルラーゼで酵素糖化する際の添加効果を指標とした 2 次スクリーニングを行った結果、GH43 の酵素が単離された。本酵素遺伝子を pET ベクターに組み込んで高発現系を構築し、組換え酵素について性状解析を行った。その結果、分子量 37 kDa、至適 pH 7.5、至適温度が 55℃で、キシロシダーゼ活性とアラビノフラノシダーゼ活性を有していた。本酵素は、アラビノキシランをトリコデルマセルラーゼ製剤で分解する際に添加効果を示すことも明らかになった。

(1) 新エネルギー技術研究開発／バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発（先導技術開発）
酵素糖化・効率的発酵に資する基盤研究（2008 年～2013 年）
(2) Taku Uchiyama, Kentaro Miyazaki, and Katsuro Yaoi
Characterization of a Novel β-Glucosidase from a Compost Microbial Metagenome with Strong Transglycosylation Activity. J. Biol. Chem. (2013) 288:18325-18334

Metagenome, Glycoside hydrolase, hemicellulase

講演番号：3D02p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ D 校舎 02 会場

放線菌由来フェルラ酸エステラーゼの探索

Identification of *Streptomyces* Ferulic acid esterases

裏地 美杉[1]、原園 幸一[2]、川上 賀代子[1]、○畑中 唯史[1] ([1]岡山生物研、[2]ナガセケムテックス)
Misugi Uraji[1], Koichi Harazono[2], Kayoko Kawakami[1], ○Tadashi Hatanaka[1] ([1]RIBS, Okayama, [2]NagaseChemteX)

【背景】フェルラ酸は、主に米、小麦、とうもろこしや種子の細胞壁にフェルラ酸エステルや配糖体として存在している。現在フェルラ酸は、米油の精製工程から製造され、すでに一部利用が始まっているが、強塩基を使用するため、着色不純物の生成や、反応液の中和により生じる多量の塩が問題になると予想される。また、ヨーロッパでは、バニラの原料としての化学合成フェルラ酸の使用が禁じられたため、フェルラ酸の需要はひっ迫している状況である。

【目的】酵素により、イネ科植物細胞壁に豊富に含まれるフェルラ酸を抽出するため、放線菌ゲノム情報を利用し、鍵酵素であるフェルラ酸エステラーゼ（FAE）遺伝子の同定を試みる。
【方法】我々が開発した放線菌用発現ベクター（pTONA5a）*に、エステラーゼモチーフをもつ放線菌 *Streptomyces* 属由来遺伝子を挿入し、*Streptomyces lividans* を宿主として、分泌発現させた。エステラーゼ活性を含む培養液濃縮物を酵素源として、フェルラ酸エチルエステルの加水分解活性を指標に、FAE の探索を試みた。

【結果】エステラーゼ活性を示した 43 種のうち、2 種について、フェルラ酸エチルエステルの加水分解活性を見出した。これらは、既知の *Aspergillus* 由来 FAE とは、相同性が低く、新規な FAE であった。これら 2 種は、ケイ皮酸エステル類に対する基質特異性から、いずれも　タイプ D に分類された。放線菌由来キシラナーゼ、アラビノフラノシダーゼ**と組み合わせ、イネ科植物バイオマスからのフェルラ酸の遊離を検討した結果、脱脂米糠を用いた場合、FAE 添加により、著しく遊離フェルラ酸が上昇した。

【参考文献】
*T. Hatanaka, H. Onaka, J. Arima, M. Uraji, Y. Uesugi, H. Usuki, Y. Nishimoto and M. Iwabuchi　*Protein Expr. Purif.* **62**:244-248 (2008)
** M. Uraji, M. Kimura, Y. Inoue, K. Kawakami, Y. Kumagai, K. Harazono and T. Hatanaka
Appl. Biochem. Biotechnol. **171**(5): 1085-1093 (2013)

Ferulic acid, *Streptomyces*

講演番号：3D02p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ D 校舎 02 会場

Clostridium cellulovorans が生産するセルロソーム形成マンナナーゼの酵素学的諸性質と新規骨格タンパク質 CbpB との相互作用解析
Cloning, expression and characterization of cellulosomal mannanase from *Clostridium cellulovorans* and the its interaction with novel scaffolding protein CbpB
○石川 岳[1]、中島 大地[1]、原 浩美[1]、柴田 敏行[1]、田中 礼士[1]、黒田 浩一[2]、植田 充美[2]、田丸 浩[1,3]、三宅 英雄[1,3] ([1]三重大院・生資・生物圏生命、[2]京大院・農・応用生命、[3]三重大・生命支セ)
○GAKU ISHIKAWA[1], Daichi Nakajima[1], Hiromi Hara[1], Toshiyuki Shibata[1], Reiji Tanaka[1], Kouichi Kuroda[2], Mitsuyoshi Ueda[2], Yutaka Tamaru[1,3], Hideo Miyake[1,3] ([1]Dept. Life Sci., Grad. Sch. Bioresour, [2]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Life Sci. Res. Center, Mie Univ.)

【目的】*Clostridium cellulovorans* は、セルロソームと呼ばれる超高分子複合体を生産し、セルロースだけでなくヘミセルロースも分解することができる。セルロソームとは、触媒活性を持たない骨格タンパク質と、セルロソーム形成酵素から構成される酵素複合体である。骨格タンパク質およびセルロソーム形成酵素はコヘシンドメインおよびドックリンドメインをそれぞれ有しており、セルロソームは各ドメインを介して形成される。当研究グループによる全ゲノム解析の結果、セルロソーム形成可能なマンナナーゼ遺伝子は GH5 ファミリーに 2 種、GH26 ファミリーに 4 種の計 6 種あることが確認された。GH5 ファミリーに属す *manA* は、通常 C 末端側に存在するドックリンドメインが N 末端側に存在している。また、GH26 ファミリーに属し新規マンナナーゼ遺伝子である *manGH26A* は、糖質結合モジュール（CBM）を 4 つ保持している。このように、ManA および ManGH26A は、他のマンナナーゼと比べ特徴的なドメイン構造を有している。また、トランスクリプトーム、プロテオーム解析により、これら 2 種のマンナナーゼは高い発現量を示した。一方、*C. cellulovorans* は 4 種の骨格タンパク質を生産する。中でも CbpB は一つの CBM とコヘシンドメインから構成される最小の新規骨格タンパク質であり、ガラクトマンナンで培養したときに発現することが確認された。そこで本研究では、ManA および ManGH26A の酵素学的諸性質を明らかにし、CbpB との相互作用解析を行った。
【方法・結果】大腸菌株 BL21(DE3)を宿主として ManA、ManGH26A および CbpB の組み換え体を作製した。得られた ManA および ManGH26A を用いて、ガラクトマンナンを基質としたときの速度パラメータを算出した。その結果、k_{cat}、K_m はそれぞれ 19.9 s^{-1}、2.69 mg mL^{-1} および 148 s^{-1}、4.20 mg mL^{-1} であり、ManGH26A はこれまでに報告されているマンナナーゼの中でも高い酵素活性を示した。ManA および ManGH26A と CbpB との結合力を等温滴定型熱量計によりそれぞれ評価した。その結果、ManA および ManGH26A と CbpB との解離定数 K_d はそれぞれ 4.79×10^{-10} M および 1.56×10^{-7} M であり、その相互作用は両者ともエントロピー駆動であることが示された。ドックリンドメインの構成アミノ酸はセルロソーム生産性 *Clostridium* 属の種間で異なるが、同じ種内では高く保存された領域が存在する。ManA のドックリンドメインは同種由来のセルロソーム形成酵素のアミノ酸配列と異なり、一部の保存領域を保持していない。等温滴定熱量計による結合力の測定結果から、ManA および ManGH26A と CbpB とのそれぞれの結合力の違いが、ドックリン内の一部のアミノ酸の違いによりもたらされたことが示唆された。

cellulosome, *Clostridium cellulovorans*, mannanase

講演番号：3D02p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ D 校舎 02 会場

Characterization of a thermophilic 4-*O*-β-D-mannosyl-D-glucose phospholylase from *Rhodothermus marinus*

○ Nongluck Jaito[1], Wataru Saburi[1], Rei Odaka[1], Yusuke Kido[1], Ken Hamura[1], Mamoru Nishimoto[2], Motomitsu Kitaoka[2], Hirokazu Matsui[1], Haruhide Mori[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]NARO)

4-*O*-β-D-mannosyl-D-glucose phosphorylase (MGP) catalyzes phosphorolysis of 4-*O*-β-D-mannosyl-D-glucose (Man-Glc) to α-D-mannosyl phosphate (Man1*P*) and D-glucose. MGP is involved in mannan metabolism with cellobiose 2-epimerase (CE), which converts the mannan degradation product mannobiose to Man-Glc by epimerization of the D-mannose residue at the reducing end. This mannan metabolic pathway was found in intestinal and ruminal anaerobic bacteria, *Bacteroides fragilis* NCTC9343[1)] and *Ruminococcus albus* NE1[2)], but the homologous genes can be found also in aerobic bacteria.

Rhodothermus marinus, an obligatory aerobic, moderately halophilic, thermophilic Gram-negative bacterium, possesses the tenderly-arranged genes encoding CE[3)] and a MGP homologue (Rmar_2440), which suggested the presence of the mannan metabolic pathway in *R. marinus*. In the present study, first, activities of β-mannanase, CE, and MGP during the growth of *R. marinus* were monitored. In the presence of konjac glucomannan, the activities of MGP and CE in the cells and extracellular β-mannanase were enhanced. Second, recombinant MGP (RmMGP) was produced in *E. coli* and characterized. RmMGP catalyzed the phosphorolysis of Man-Glc through a sequencial bi-bi mechanism involving ternary-complex formation. The activity was maximal at temperature 75°C, whereas *R. albus* NE1 and *B. fragilis* NCTC9343 MGP showed highest activity at 50°C[1,2)]. In the reverse phosphorolysis reaction, RmMGP had high acceptor preferences for D-glucose, 6-deoxy-D-glucose, and D-xylose. Methyl β-D-glucoside and 1,5-anhydro-D-glucitol were also used as acceptors, but D-mannose and β-1,4-mannnobiose were not.

This is the first enzymatic characterization of an MGP of the aerobic bacterium. The presence of MGP suggests that the degradation of mannan mediated by CE and MGP is not limited to anaerobe.

1) Senoura et al., Biochem.Biophys. Res.Commun., 2011. 2) Kawahara et al., J. Biol. Chem., 2012. 3) Ojima et al., Biosci. Biotechnol.Biochem., 2011.

4-*O*-β-D-mannosyl-D-glucose phospholylase, *Rhodothermus marinus*, mannan

講演番号：3D02p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ D 校舎 02 会場

アクセプタ結合部位を改変した *Ruminococcus albus* 由来マンノシドホスホリラーゼの基質特異性と反応特性の解析

Analysis of substrate specificities and reaction characteristics of mutated mannoside phosphorylases in acceptor-binding site from *Ruminococcus albus*

○尾高 伶[1]、佐分利 亘[1]、福士 江里[1]、西本 完[2]、北岡 本光[2]、松井 博和[1]、森 春英[1]（[1]北大農、[2]食総研）
○ Rei ODAKA[1], Wataru SABURI[1], Eri FUKUSHI[1], Minoru NISHIMOTO[2], Motomitsu KITAOKA[2], Hirokazu MATSUI[1], Haruhide MORI[1]（[1]Hokkaido Univ., [2]NARO）

【背景と目的】

Ruminococcus albus には，glycoside hydrolase family 130 に属するβ1→4 マンノシド結合に作用するホスホリラーゼ 2 種 RaMP1 および RaMP2 が存在する．RaMP1 は 4-*O*-β-D-マンノシルグルコース（Man-Glc）に作用するホスホリラーゼ（MGP）であり，サブサイト+1 では Man 残基とは結合しないが Glc の 6 位 OH 基の認識はゆるい．RaMP2 はマンノオリゴ糖に作用するマンノオリゴ糖ホスホリラーゼ（MP）である．サブサイト+1 では Man の他各種糖残基を受け入れるが，6-OH を必須とする．本研究では，既知構造に基づき，6-OH 認識に関与するアミノ酸残基を Ile212（RaMP1）および His186（RaMP2）と推定し，変異酵素を作成し解析を行った．

【結果と考察】

変異酵素 RaMP1-I212H および RaMP2-H186I を大腸菌を宿主として生産した．変異酵素の活性 (Man-Glc) に対する加リン酸分解活性) は，それぞれ親酵素 RaMP1 および RaMP2 の 40%，1.8%であり，RaMP2 の His186 改変による低下が顕著であった．Glc，6-デオキシグルコース (6DG) および 6-デオキシ 6-フルオログルコース (6FG) をアクセプターとした逆反応の速度を測定してサブサイト+1 における 6-OH 認識を評価した．10 mM Man1*P* 存在下で求めた 6DG および 6DF に対する k_{cat}/K_m は，RaMP1 では Glc の 31%および 6%であったが，RaMP1-I121H では 12%と 2%であり，RaMP1 への His の導入により 6-OH 特異性は上昇した．一方 RaMP2 では，His186→Ile により，Glc をアクセプターとした Man-Glc 合成速度は 2.4 s^{-1} から 0.16 s^{-1} へと大きく低下し，他方，野生型では全く作用しない 6DG および 6FG に対しては濃度依存的に Man1*P* からのリン酸遊離速度が増加した．すなわち His186 改変により 6-OH 特異性は低下した．ここで，RaMP2 および RaMP2-H186I はアクセプター非存在下でも Man1*P* からのリン酸遊離 (それぞれ 0.059 s^{-1} および 0.046 s^{-1}) を示した．生成物の反応経時的解析により，野生型では反応初期には Man，反応の進行に伴いマンノオリゴ糖の生成が見られたのに対し，RaMP2-H186I では Man の蓄積のみ観察された．^{1}H-NMR によりβ-D-Man であることが確認された．すなわち，RaMP2 は Man1*P* をアノマー反転様式で加水分解でき，野生型では生成 Man をアクセプターとしてオリゴ糖を生成するのに対し，変異酵素では 6-OH 認識 (親和力) 低下のため，Man をアクセプターとせずに蓄積したと考えられた．

substrate specificity, reaction characteristic, mannoside phosphorylase

講演番号：3D02p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ D 校舎 02 会場

新規エンド型ペクチン分解酵素の探索

Screening of endo polygalacturonases for detergent

○長見 篤、小川 晃範、奥田 光美、小澤 忠弘、佐伯 勝久、尾崎 克也（花王・生科研）
○Atsushi NAGAMI, Akinori OGAWA, Mitsuyoshi OKUDA, Tadahiro OZAWA, Katsuhisa SAEKI, Katsuya OZAKI (Kao Biol. Sci. Res.)

【諸言】
衣類の泥汚れに対して高い洗浄性能を有するペクチン分解酵素の取得を目的にエンド型ペクチン分解酵素の探索を行っている。しかしながら現在、エンド型ペクチン分解酵素は酸性至適のものしか発見されておらず、洗浄条件下（中性～アルカリ性）で十分な効果を発揮することができていない。そこで我々はアルカリ至適のエンド型ペクチン分解酵素の探索を行った。
【方法と結果】
エンド型ペクチン分解酵素の探索にはハイスループットに分解様式（エンド型、エキソ型）の判別を行う必要がある。分解様式を判別する方法としては分解産物を検出する方法や反応溶液の粘度変化を測定する方法が知られているが、今回はハイスループットな評価が可能なエンド型酵素選択的に反応する基質を用いる方法を検討した。種々検討した結果、ペクチン分解酵素の基質であるポリガラクツロン酸に色素を付加し、エキソ型のペクチン分解酵素で前処理することでエンド型酵素選択的に反応する基質となることを見出し、ハイスループットなエンド型ペクチン分解酵素の検出方法を確立した。本手法を用いてエンド型ペクチン分解活性を有する微生物のスクリーニングを行った結果、アルカリ領域においても活性を有するペクチン分解酵素を分泌する菌株（*Epilithonimonas* sp.）の取得に成功した。本菌株より活性成分の精製を行い、諸特性解析を行った結果、本精製画分は pH5.5～8.0 の範囲で活性を有する中性至適のエンド型ペクチン分解酵素であることが判明した。

polygalacturonase, detergent, screening

講演番号：3D02p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ D 校舎 02 会場

新奇 ulvan 分解酵素の探索

Screening of a novel ulvan degrading enzyme

○高橋 亮[1]、大西 浩平[2] ([1]高知大院農、[2]高知大総研セ)
○Ryo TAKAHASHI[1], Kohei OHNISHI[2] ([1]Kochi Univ., [2]Science Research Center, Kochi Univ.)

【背景】近年，日本を含む世界各地の沿岸部において，アオサ属（*Ulva*）に属する緑藻類が異常増殖して堆積・腐敗する「緑潮（グリーンタイド)」が多発しており，新たな環境問題となっている。各沿岸地域の自治体は毎年数千万円の費用を投じてアオサの除去を行っているが，それら膨大なバイオマスを有効利用することは，除去費用や環境負荷の低減につながる可能性がある。ulvan はアオサ属の細胞壁間に見出される硫酸化多糖の総称であり，アオサ乾燥重量の 8～29%を占める。それらの主鎖は，主に 3 位が硫酸化された L-ラムノースにグルクロン酸，イズロン酸，キシロースのいずれかが結合した二糖単位の繰り返しによって構成される。ulvan を分解し，これら単糖を得ることができれば，酵母等によるバイオ燃料生産の糖源として用いることができると考えられる。これまでに報告されている ulvan 分解酵素の中で遺伝子のクローニングまで行われているものは ulvan リアーゼ 1 つのみであり，環境中には更なる ulvan 分解細菌・分解酵素が存在していると推測される。本研究では新奇 ulvan 分解細菌のスクリーニングと ulvan 分解酵素の探索を行った。【方法・結果】高知県土佐市浦の内湾に生息するミナミアオサ（*Ulva ohnoi*）を採集し，それらを餌として藻体表面に付着していたブドウガイ（*Haloa japonica*）を水槽内で飼育した。その後，水層底部に堆積したブドウガイの排泄物を採取し，人工海水で懸濁後，0.2 % (w/v) ulvan を含む人口海水寒天培地に塗布した。シャーレを 25℃で 3～7 日間インキュベート後，5 %塩化セチルピリジニウム溶液を用いて培地を数時間浸漬し，この処理によって周囲にハロが形成されたコロニーを ulvan 分解細菌候補として選抜した。得られた複数の ulvan 分解細菌候補を 0.1 % ulvan 含有 Marine Broth 培地 2 mL で 3 日間培養し，濃縮した各培養上清 ulvan 溶液を反応させた結果，2 株の細菌 KUL1 と KUL10 の培養上清中に ulvan 分解活性が確認できた。これら 2 株について 16S rDNA 解析と BLAST 検索を行ったところ，KUL1 は *Hyunsoonleella* 属に，KUL10 は *Glaciecola* 属に分類された。また，KUL1，KUL10 の 16S rDNA 配列は，それぞれ種名まで決定されている種の 16S rDNA 配列と最大でも 95 %の類似性しか有しておらず，2 株共に新種である可能性が示唆された。次に KUL1 と KUL10 をそれぞれ 0.05 % ulvan 含有 Marine Broth 培地 500 mL で 3 日間培養し, 培養上清に 80 %飽和濃度硫酸アンモニウムを加えて菌体外粗酵素を回収した。得られた粗酵素溶液を陰イオン交換クロマトグラフィーと疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し，ulvan 分解酵素の精製と SDS-PAGE による確認を行った結果，ulvan 分解酵素と思われるタンパク質を特定した。現在 ulvan 分解酵素のアミノ酸配列の決定と遺伝子のクローニングを行っている。

ulvan degrading enzyme, polysaccharide, green algae

講演番号：3D02p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ D 校舎 02 会場

Thalassomonas agarivorans 由来αアガラーゼの結晶化及び機能解析
Crystallization and functional analysis of alpha agarse from *Thalassomonas agarivorans*

○高木 瑛実子[1,2]、大田 ゆかり[2]、嶋根 康弘[2]、湯川 清孝[1,2]、増田 美希[1,2]、柳田 早智[1,2]、弓田 涼[1,2]、殿塚 隆史[3]、秦田 勇二[1,2] ([1]横浜市大院生命ナノ、[2]海洋研究開発機構、[3]東京農工大院農)
○ Emiko TAKAGI[1,2], Yukari OHTA[2], Yasuhiro SHIMANE[2], Kiyotaka YUKAWA[1,2], Miki MASUDA[1,2], SACHI YANAGIDA[1,2], Ryo YUMITA[1,2], Takashi TONOZUKA[3], Yuji HATADA[1,2] ([1]Yokohama City Univ., [2]JAMSTEC, [3]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】　日本人が古くから食材として利用している寒天は紅藻類に属する海藻（テングサ、オゴノリなど）から抽出される。その主成分はアガロースと呼ばれる多糖であり、D-ガラクトースと 3,6-アンヒドロ-L-ガラクトースが α-1,3、β-1,4 結合で交互に繋がった構造をしている。*Thalassomonas agarivorans* 由来のアガラーゼは、2006 年に発見された酵素でアガロースの α-1,3 結合を加水分解するαアガラーゼである。これまでαアガラーゼの報告例は希少であり、*Thalassomonas agarivorans* 以外では、*Alteromonas agarilytica* 由来の酵素が報告されているだけである。発見されてからの歴史が浅いこともあり、αアガラーゼの立体構造に関与する報告は皆無である。

αアガラーゼは他酵素種とのアミノ酸配列相同性も認められないことから、如何なる立体構造を呈しているのか、さらにはβ-1,4 結合を分解するβ-アガラーゼとはどのように異なっているのか(反対に共通する部分はあるのか)、など強く興味が持たれる。

今回、本酵素がどのような構造・性質を有するかを解明することを目的とし、本酵素の結晶化条件検討及び触媒残基の探索を行ったので、これらの結果について報告する。

【方法と結果】　初めにαアガラーゼの活性必須領域の限定を行った。タンパク質の二次構造予測結果を基に、様々な長さの派生体酵素を調製し、活性の有無を確認した。この結果より、活性必須領域は 764 アミノ酸残基で構成されることが明らかになった(全長 1463 アミノ酸より 699 アミノ酸の不要な領域を除去した)。

この組換えαアガラーゼの粗酵素液の調製は大腸菌による宿主・ベクター発現系を用いて行った。陰イオン交換クロマトグラフィー、固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーによって粗酵素液から組換えαアガラーゼを精製し、3 %の酵素溶液になるまで濃縮した。本精製により比活性は 191 倍向上した。SDS-PAGE 解析より、精製された酵素は約 80 kDa のタンパク質であることが示された。この試料を用いて結晶化条件のスクリーニングを行った。

また、本酵素の触媒残基の限定にあたり、αアガラーゼのアミノ酸アライメントを基に、候補残基を酸性アミノ酸の中の 37 残基に絞った。この候補残基に部位特異的変異を導入し(Asp→Asn、Glu→Gln に置換)、活性が無くなったものを触媒残基候補とした。

現在、本結晶を用いＸ線の回折が得られるか検討を行うとともに、残りの触媒残基の限定を進めている。

Alpha-agarase, Crystallization, Deep-sea

講演番号：3D02p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ D 校舎 02 会場

植物細胞壁多糖ラムノガラクツロナン I の主鎖の生合成に関与するラムノース転移酵素の生化学的解析
Biochemical characterization of rhamnosyltransferase involved in biosynthesis of rhamnogalacturonan I polysaccharide in plant cell wall
○上原 洋平[1]、田村 峻佑[1]、加藤 大詞[1]、牧 祐介[2]、湯浅 大史[1]、石水 毅[1] ([1]立命館大生命、[2]阪大院理)
○Yohei UEHARA[1], Syunsuke TAMURA[1], Hirotsugu KATO[1], Yusuke MAKI[2], Taishi YUASA[1], Takeshi ISHIMIZU[1] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Osaka Univ.)

【背景】 植物細胞壁成分のペクチンは構造が非常に複雑であり、その生合成には約 50 種類の糖転移酵素が関与していると考えられている。ペクチン生合成に変異がある植物体の単離例が少なく、これらの酵素の遺伝子はほとんど同定されていない。そのため、ペクチン生合成に関わる糖転移酵素の活性測定法を構築する必要がある。ペクチン構成成分の一つ、ラムノガラクツロナン I の主鎖は、ガラクツロン酸とラムノースの二糖繰り返し構造の多糖である。本研究室ではラムノガラクツロナン I 主鎖のオリゴ糖を調製し、このオリゴ糖を伸長させるラムノース転移酵素の活性測定法を構築している。本発表では、構築された活性測定法を用いてラムノース転移酵素の生化学的解析を行ったことを報告する。
【方法・結果】ドナー基質の UDP-ラムノースは、既報の合成法に従い調製した。アクセプター基質のラムノガラクツロナンオリゴ糖は、市販のラムノガラクツロナン I にドリセラーゼを作用させ、生成した各オリゴ糖を 2-アミノピリジンにより蛍光標識し、陰イオン交換クロマトグラフィーにより分離することで調製した。これらを基質として、ペクチン合成が盛んなアズキ上胚軸のミクロソーム膜画分を酵素源に用いて、ラムノガラクツロナンオリゴ糖を伸長させるラムノース転移酵素の活性を検出する。この活性測定法を用いて、ラムノース転移酵素の生化学的解析を行った。この糖転移反応は、反応時間に依存して、酵素量に依存して、定量的に進行した。至適反応温度は 30℃、至適 pH は 7.0 であった。本酵素は、ドナー基質として UDP-β-ラムノースのみを基質とした。アクセプター基質としては三糖オリゴ糖より五糖オリゴ糖がより良い基質であった。また、ドナー基質、アクセプター基質に対する酵素動力学的定数（K_m、V_{max}）を求めた。本酵素は膜タンパク質であるが、試した界面活性剤のうち、0.5 % TritonX-100 が本酵素を最も可溶化した。スクロース密度勾配遠心によるオルガネラ分画実験から、本酵素はゴルジ体に局在し、活性部位はゴルジ体の内腔に向いていることが分かった。これらの結果は、本ラムノース転移酵素は、典型的なゴルジ体局在糖転移酵素の性質を有していることを示している。これらラムノース転移酵素の生化学的特徴は、その遺伝子の同定の際の指標となる。

cell wall, glycosyltransferase, pectin

講演番号：3D02p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ D 校舎 02 会場

Teratosphaeria acidotherma AIU BGA-1 が産生する酸性β-ガラクトシダーゼ
Acid β-galactosidase from *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1

○千葉 瀬里奈[1]、磯部 公安[1]、山下 美穂[1]、高橋 直己[1]、小山 貴史[2]([1]岩手大農、[2]天野エンザイム)
○Serina CHIBA[1], Kimiyasu ISOBE[1], Miho YAMASHITA[1], Naomi TAKAHASHI[1], Takahumi KOYAMA[2] ([1]Iwate Univ., [2]Amano enzyme)

【目的】高温酸性温泉地から分離した *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1 は菌体内に 3 種類の酸性 β-ガラクトシダーゼと1種類のアルカリ性 β-ガラクトシダーゼを産生する[1]。本研究では、pH 1.0 付近で高い活性を示す酵素を精製し、諸性質を明らかにした。
【方法】本菌は 2%ラクトース含有培地(pH 4.0)で 30ºC, 4 日間培養し、粗酵素液は 120 g の湿菌体をマルチビーズショッカーで破砕して調製した。酵素は、0.5 mM phenylmethanesulfonyl fluoride 含有リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) を用いて、硫安塩析と、イオン交換や疎水クロマトグラフィーなど4種類のカラムクロマトグラフィーで精製した。酵素活性は、2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (2-NPG) を基質にして、pH 1.5 で 37ºC、15 分間反応した後、Na_2CO_3 を添加して反応を停止し、420 nm の吸光度値から遊離の 2-nitrophenol 量を求めて算出した。
【結果】本酵素は硫安塩析と 4 種類のカラムクロマトグラフィーを用いて、Native PAGE で単一のタンパク質バンドまで精製した。本酵素は、2-NPG (K_m=0.48 mM)、4-NPG (K_m=0.43 mM) および 4-nitrophenyl-β-D-fuctopyranoside (K_m=27 mM) によく作用した。酵素反応の最適 pH は 1.0 で、pH 4.5 と pH 7.0 の活性は、pH 1.0 の約 60%と 20%であり、強酸性領域で高い活性を示した。本酵素の最適温度は pH 1.5 で 70ºC、pH 4.5 で 80ºC であった。酵素を pH 1.5, 4.5, 7.0 で 37ºC, 3 時間加温した場合 90%以上の活性が残存し、50ºC で 1 時間加温しても 80%以上の活性が残存した。以上の結果より、本酵素は、従来報告されている β-ガラクトシダーゼよりも高い温度で活性を示し、pH 2.0 以下の強酸性領域でも安定な新規な耐熱性酸性 β-ガラクトシダーゼであると考えられた。本酵素は、分子質量 126 kDa と 56 kDa のサブユニットで構成されるヘテロ 2 量体で、126 kDa 画分の N 末端アミノ酸は SPNLQDIVTYDGESY と推定された。酵素の等電点は 4.6 で、酵素活性は金属、カルボニル試薬、SH 阻害剤などで影響されなかった。また、市販の牛乳やヨーグルト中のラクトースも pH 1.5 で加水分解されたので、本酵素は、食後および空腹時の胃内でもラクトースを分解できる可能性があると考えられた。

[1]Isobe, K., et al.: Acidophilic fungus, *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1, produces multiple forms of intracellular β-galactosidase, J. Biosci. Bioeng., 116, 171-174 (2013)

β-galactosidase, Lactase, *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1

講演番号：3D02p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ D 校舎 02 会場

Bifidobacterium longum における β-アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群の転写解析
Transcriptional analysis of the degradation enzymes for β-arabinooligosaccharides in *Bifidobacterium longum*

○藤田 清貴、吉嶺 良平、下川 倫子、北原 兼文 (鹿児島大農)
○Kiyotaka Fujita, Ryohei Yoshimine, Michiko Shimokawa, Kanefumi Kitahara (Kagoshima Univ.)

【目的】β-アラビノオリゴ糖鎖はエクステンシン等の糖タンパク質糖鎖として、植物に普遍的に存在する糖鎖である。我々は、α-L-arabinofuranosidase (HypAA:BLLJ_0213)、β-L-arabinobiosidase (HypBA2:BLLJ_0212)、 β-L-arabinofuranosidase(HypBA1: BLLJ_0211)で構成されたβ-アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群を*Bifidobacterium longum* JCM1217から見いだすとともに、*B. longum* がHypBA2の遊離糖である Ara*f*β1,2Ara*f* (β-Ara_2)を炭素源として生育することを報告した。そこで本研究では、β-Ara_2の分解・取り込み・代謝に関わるβ-アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群・輸送体・L-Ara代謝遺伝子の転写誘導機構の解析を目的とした。
【方法】β-Ara_2を炭素源とした PYF 培地で *B. longum* JCM1217 を嫌気培養した。転写の比較検討のために L-Ara、グルコース(Glc)、ガラクトース(Gal)、Galβ1,6Gal(Gal_2)、Galβ1,6Galβ1,6Gal (Gal_3)、カラマツ由来Ⅱ型アラビノガラクタン(LWAG)を炭素源として用いて同様の条件で嫌気培養した。菌体培養は対数増殖後期まで行い、集菌した菌体から mRNA を抽出後、逆転写により調製した cDNA を用いて、β-Ara_2輸送体(BLLJ_0208)・β-アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群(BLLJ_0211,0213)・L-Ara 代謝を担う L-ribulokinase(BLLJ_0340)の転写量をリアルタイム PCR により測定した。転写レベルでの遺伝子発現量の測定は検量線法を用い、リファレンスとして RNA polymerase β subunit (rpoB:BLLJ_0405)を用いた。
【結果】BLLJ_0340 は、Glc を炭素源としたときの転写量をキャリブレーターとして用いた場合、β-Ara_2と L-Ara での培養において 10 倍及び 9 倍に転写量が増加した。このため、AraBAD オペロンの一員として L-Ara 代謝を担っていることが予想された。また、L-Ara を炭素源としたときの転写量をキャリブレーターとして用いた場合、BLLJ_0208 と BLLJ_0211 ではβ-Ara_2での培養において 34 倍と 27 倍に転写量を増加させたが、他の炭素源においては転写量の増加は確認されなかった。このため、BLLJ_0208 と BLLJ_0211 は同一のオペロン下で転写制御されていると予想された。一方、BLLJ_0213 はβ-Ara_2での培養において転写量の増加量は 4 倍であった。現在、β-アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群をコードするオペロンの転写単位を明らかにするため、隣接する遺伝子間のプライマーセットを用いた RT-PCR を行っている。

Transcriptional analysis, arabinofuranosidase, *Bifidobacterium longum*

講演番号：3D02p17
講演日時、会場：3 月 29 日 16:54～ D 校舎 02 会場

ビフィズス菌由来 GH127 β-L-アラビノフラノシダーゼの新規な活性中心
The active center of GH127 ß-L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum* JCM1217

○伊藤 佑[1]、齋川 匡[1]、Seonah Kim[5]、藤田 清貴[2]、石渡 明弘[3]、Sophon Kaeothip[4]、荒川 孝俊[1]、若木 高善[1]、Gregg T. Beckham[5]、伊藤 幸成[3,4]、伏信 進矢[1]([1]東大院農、[2]鹿児島大農、[3]理研、[4]ERATO, JST、[5]National Renewal Energy Laboratory)
○Tasuku ITO[1], Kyo Saikawa[1], Kim Seonah[5], Kiyotaka Fujita[2], Akihiro Ishiwata[3], Kaeothip Sophon[4], Takatoshi Arakawa[1], Takayoshi Wakagi[1], Beckham Gregg T.[5], Yukishige Ito[3,4], Shinya Fushinobu[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Kagoshima Univ., [3]RIKEN, [4]ERATO, JST, [5]NREL)

植物は、植物細胞壁に含まれるエクステンシンに代表されるようなヒドロキシプロリン(Hyp)に富む糖タンパク質(hydroxyproline-rich glycoproteins: HRGP)を様々な生物学的プロセスに利用している。これらは Hyp を含む繰り返し構造（Ser-Hyp_4 モチーフ）を有しており、その Hyp 残基には、最大 4 単位のアラビノフラノース（Ara*f*）からなるβ-アラビノオリゴ糖鎖（Ara*f*-α1,3-Ara*f*-β1,2-Ara*f*-β1,2-Ara*f*-β-Hyp: Ara_4-Hyp）が *O* 型結合している。最近、ビフィズス菌から Ara_4-Hyp などを分解し取り込む経路の関連遺伝子群が発見された。さらに、ここに含まれる酵素群の中から、β結合したアラビノフラノースからなるオリゴ糖に対して分解活性を示す酵素が初めて同定され機能解析された[1, 2]。これらは、植物の糖タンパク質のアラビノオリゴ糖鎖を加水分解する酵素としても初めてのものである。

本研究では、これらの酵素のうち、GH127 および DUF1680 に属する、*Bifidobacterium longum* JCM1217 由来β-L-アラビノフラノシダーゼ (HypBA1)の X 線結晶構造解析を行い、アポ状態とβ-L-Ara*f* 複合体の結晶構造を、それぞれ 2.2 Å と 2.0 Å で決定した。複合体構造の活性中心では、1 つの Glu と 3 つの Cys が亜鉛イオンに配位結合しており、そのうちの 1 つの Cys は基質のアノマー炭素を求核攻撃するのに適した向きと位置にあった。このことから、HypBA1 では、この Cys が亜鉛イオンに配位することで求核性を帯び、触媒反応に関わるのではないかと考えられた。本発表では、この仮説を支持するために生化学的実験を行った。pNP-β-Ara*f*[3]によって活性測定を行い、変異体解析によって、活性中心を構成するアミノ酸の役割を明らかにした。また、金属定量によって活性中心の金属が亜鉛に他ならないことを改めて確認した。共同研究者による QM/MM 計算でも、この仮説がエネルギー的に妥当であることが示されている。

この Cys 残基は GH127 と DUF1680 で保存性が極めて高く、植物や真菌、細菌などに広く分布している。この反応機構はこれらの酵素に共通のものである可能性がある。

1. Fujita, K., et al., *J Biol Chem*, 2011. **286**(7): p. 5143-50.
2. Fujita, K., et al., *J Biol Chem*, 2011. **286**(44): p. 38079-85.
3. Kaeothip, S., et al., *Carbohydr Res*, 2013. **382**: p. 95-100.

Crystal structure, Glycoside hydrolase, Hydroxyproline-rich glycoproteins

講演番号：3D02p19
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ D 校舎 02 会場

Purification and Characterization of plant ß-Galactosidase that hydrolyzes ß1-3 Gal residue in complex type N-glycans

○Md. Ziaur RAHMAN, Megumi Maeda, Yoshinobu Kimura (Okayama University)

Many secreted-type plant glycoproteins often carry complex type N-glycans containing the Lewis a epitope, but the physiological significance of the plant specific N-glycans remains to be elucidated. As a par of study to elucidated the physiological function of Lewis a epitope in plants, in this study, we purified and characterize β-galactosidase (β-Gal’ase) involved in the release of β-Gal residue(s) from the plant complex type N-glycans.

In this report, we purified and characterized a β-galactosidase to homogeneity from *Ginkgo biloba* seeds, giving a final specific activity of about 402 units /mg protein with approximately 538 fold purification. Purified β-galactosidase (β-Gal Gb-1) gave a single band with molecular masses of 24 kDa on SDS-PAGE under the both reducing and non-reducing condition. On the other hand, the molecular weight was estimated to be 48 kDa by gel filtration, indicating that β-GalGb-1 might function in dimeric structure in plant cells. β-Gal Gb-1 can hydrolyze *p*NP-β-galactopyranoside with a Km and Vmax value of 2.7 mM and 13.2 μM/min, respectively. The *N*-terminal sequence of β-GalGb-1 was identified as Ala-Gln-Asn-Val-Ala-Pro-Arg-Phe-Asn-Gln-. The *N*-terminal sequence alignment of β-Gal Gb-1 with other known plant β-galactosidase showed no highly homology. When three complex type *N*-glycans (animal, insect, and plant type) were used as substrates, the β-GalGb-1 showed substantial activity towards, Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6(Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3)Manβ1-4GlcNAcGlcNAc-PA (animal complex type), and modest activity towards β1-3 Gal linkage in Galβ1-3GalNAcβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6 (Galβ1-3GalNAcβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-PA (insect type) and Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-6(Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-3)(Xylβ1-2)Manβ1-4GlcNAcβ1-4(Fucα1-3) GlcNAc-PA (plant type) with optimum pH of 5.0 at 37ºC, indicating that β-Gal Gb-1 is involved in the degradation of plant *N*-glycoproteins or complex type free *N*-glycans.

β-galactosidase, plant N-glycan, glycoprotein metabolism

講演番号：3D02p20
講演日時、会場：3 月 29 日 17:26～ D 校舎 02 会場

深海底泥由来 *Bacillus* sp. F8 の chondroitin sulfate 分解酵素

Chondroitin sulfate-degrading enzyme from the deep-sea bacterium *Bacillus* sp. F8

○倉田 淳志[1]、西村 みどり[1]、小林 徹[2]、岸本 憲明[1] ([1]近畿大農、[2]独立行政法人海洋研究開発機構)
○Atsushi KURATA[1], Midori NISHIMURA[1], Tohru KOBAYASHI[2], Noriaki KISHIMOTO[1] ([1]Kinki Univ., [2]JAMSTEC)

【目的】　chondroitin sulfateは、硫酸化アセチルガラクトサミンとグルクロン酸から成る硫酸化多糖の総称である。ヒトでは細胞外マトリックスを構成し、細胞接着、分化、形態形成などに関与している。現在、角膜表層の保護や関節炎、神経痛の治療を目的とした薬用成分や、健康食品や化粧品に利用されており、低粘性である硫酸化オリゴ糖への変換技術の開発が期待されている。

伊豆小笠原海溝（深度2759 m）の深海底泥から、chondroitin sulfate C分解活性を示す単離株F8を見いだした。本研究は、本菌株の生産するchondroitin sulfate C分解酵素の特性の解明を目的とした。

【方法・結果】

chondroitin sulfate C分解酵素活性は、生成物である不飽和二糖の増加を235 nmにおける吸光度で測定した。本菌株は、chondroitin sulfate Cを培地に添加した場合のみ、培養液上清中に酵素活性を検出できたことから、本酵素はchondroitin sulfate C によって誘導的に合成されることが明らかとなった。F8株は16S rRNAの解析から*Bacillus* 属に属し、chondroitin sulfate C分解酵素を生産する初めての*Bacillus*属細菌であった。

各種クロマトグラフィーを用いて、本酵素を電気泳動的に均一になるまで精製した結果、精製度は1166倍、活性収率は6%であった。SDS-PAGEでの分析の結果、本酵素の大きさは120 kDaであった。基質特異性を検討したところ、hyaluronateを良好に分解した。hyaluronateに対する分解活性を100%とした場合、他の基質に対する相対活性は以下のとおりであった：chondroitin sulfate A（44%）、chondroitin sulfate C（30%）、chondroitin（23%）、chondroitin sulfate B（1.7%）。heparinには作用しなかった。

chondroitin sulfate Cを基質とし、ESI-MSにより酵素反応生成物の同定を試みた。酵素反応生成物は、不飽和二糖2-acetamido-2-deoxy-3-*O*-(*β*- D-gluco-4-enepyranosyluronic acid)-6-*O*-sulfo-D-galactoseと同様の分子イオンピーク（*m*/*z* 458.1）とフラグメントイオンピークを示した。したがって、本酵素はchondroitin sulfate AおよびCに作用する広い特異性を持つhyaluronate lyaseであることが示された。

chondroitin sulfate, Bacillus, deep-sea

講演番号：3D02p21
講演日時、会場：3 月 29 日 17:37～ D 校舎 02 会場

グース型リゾチームの触媒部位周辺に存在する Asp 残基の機能について
Functions of Asp residues at the catalytic site on goose-type lysozyme
○川口 裕也[1]、米田 一成[2]、荒木 朋洋[2] ([1]東海大院農、[2]東海大農)
○Yuya Kawaguchi[1], Kazunari Yoneda[2], Tomohiro Araki[2] ([1]Grad. sch. of Agric. Tokai Univ., [2]Sch. of Agric. Tokai Univ.)

リゾチームは，ニワトリ型，T4 ファージ型，グース型および無脊椎型の 4 つに大きく分類され，N-アセチルムラミン酸と N-アセチルグルコサミンの共重合体やキチンを構成する N-アセチルグルコサミンの重合体のβ-1，4 グリコシド結合を加水分解する糖加水分解酵素である．さらに，ニワトリ型リゾチームは，糖加水分解反応だけではなく，糖転移反応を触媒する．ニワトリ型リゾチームには，二つの触媒基(Glu35，Asp52)が存在しており，Glu35 がプロトンドナーとして働き，Asp52 が基質を安定化することにより，糖転移反応に関与すると考えられる．一方，グース型リゾチームでは，ニワトリ型リゾチームと似た触媒部位を持ち, 触媒基 Glu73 が存在するが, ニワトリ型リゾチームの Asp52 の位置に触媒作用を示さない Gly90 が存在し，その近傍に別の二つの Asp 残基(Asp86 および Asp97)が存在している．そこで本研究では，ダチョウ由来のグース型リゾチームの Asp86，Asp97 を Ala に置換した変異体(D86A，D97A，D86A/D97A)，Gly90 を Asp に置換した変異体(G90D)，さらに，三つのアミノ酸残基を置換した変異体(D86A/G90D/D97A)について，機能解析を行った．N-アセチルグルコサミンの 6 量体の対する活性測定を行った結果，ダチョウリゾチームと比較して，すべての変異体において活性が低下した．触媒反応に関与すると考えられる Asp 残基を置換した変異体の活性の強さは，D97A，D86A，D86A/D97A の順となり，D86A/D97A ではほぼ活性が見られないことから，この 2 つの Asp 残基が触媒反応に重要であることが明らかとなった．さらに，Gly90 に Asp 残基を導入した変異体(G90D)も活性が低下した．一方，活性が消失した D86A/D97A に G90D を導入した三重変異体(D86A/G90D/D97A)は，触媒活性が回復した．このことから，導入した Asp 残基が触媒基として作用したと考えられた. さらに, N-アセチルグルコサミンの 6 量体の対する活性測定の反応産物を HPLC で解析した結果，これらの変異体(D97A，G90D，D86A/G90D/D97A)において，ダチョウリゾチームが触媒しない糖転移反応が観察された．さらに，D86A/G90D/D97A について，質量分析機で反応産物の解析を行った結果，N-アセチルグルコサミンの 7 量体が確認された．以上の結果により，プロトンドナーの Glu 残基の近傍に存在する 2 つの Asp 残基は，ダチョウリゾチームにおいて，触媒反応に重要であることが明らかになった．さらに，Asp 残基の環境が糖転移反応に関与している可能性が考えられた．

lysozyme, catalytic site, transglycosylation

講演番号：3D02p22
講演日時、会場：3 月 29 日 17:48～ D 校舎 02 会場

糖タンパク質品質管理機構関連酵素に対する 5-チオグルコース置換型基質の効果

Effect of 5-thioglucose on activity of relevant enzyme to ER glycoprotein quality control.

○迫野 昌文[1]、瀬古 玲[1]、武田 陽一[1]、八須 匡和[1]、小泉 晶彦[1]、藤川 紘樹[1]、瀬戸 秀春[2]、伊藤 幸成[1,2] ([1]JST, ERATO、[2]理研)

○Masafumi SAKONO[1], AKIRA SEKO[1], YOICHI TAKEDA[1], MASAKAZU HACHISU[1], AKIHIKO KOIZUMI[1], KOHKI FUJIKAWA[1], HIDEHARU SETO[2], YUKISHIGE ITO[1,2] ([1]JST, ERATO, [2]RIKEN)

【目的】小胞体における糖タンパク質の生合成において、レクチンシャペロンや糖転移酵素、糖加水分解酵素等の様々なタンパク質からなる品質管理機構が重要な役割を果たしている。糖タンパク質上の糖鎖は、グルコース、マンノース、N-アセチルグルコサミンから形成される高マンノース型であり、糖タンパク質のフォールディング状況に合わせて糖鎖へのグルコースの転移、切断やマンノースのトリミングなどが行われる。グルコースの類縁化合物である 5-チオグルコースは、グルコースの加水分解酵素ならびに転移酵素に影響を与えることが知られている。本研究では、5-チオグルコースを用いて、品質管理機構に関わる様々な酵素反応に与える影響について検討を行った。

【方法】蛍光性置換基で修飾したハイマンノースを作製し、小胞体関連酵素の基質として用いた。ヒト由来各種小胞体関連酵素は、大腸菌を用いた大量発現により取得した。シャペロンと基質の相互作用の割合は、複合体と未反応の基質を限外ろ過により分離し、未反応基質濃度の測定を行うことで求めた。糖転移活性および糖加水分解活性は HPLC 測定から導出した。

【結果および考察】Man9GlcNAc2 型糖鎖を持つ未成熟タンパク質にグルコースを転移する UDP-glucose glycoprotein:glucosyltransferase (UGGT) の糖転移活性への影響を調べた。UDP-5S-Glc をグルコースドナーとして用いたところ、UDP-Glc に比べて反応効率は低下するものの、5S-Glc を転移したハイマンノース型糖鎖を与えた。一方、得られた 5S-Glc 転移糖鎖はグルコシダーゼ II による切断を受けないことが分かった。更に分子シャペロンカルネキシン/カルレティキュリンとの相互作用を検討したところ、特にカルネキシンとの相互作用が大きく低下することが示された。これらの結果は、カルネキシン/カルレティキュリンとハイマンノース型糖鎖の相互作用様式は、グルコースの分子認識において明確な違いがあることを示唆した。したがって、5S-Glc はカルネキシンおよびカルレティキュリンの間における基質認識の違いを明らかにする有効なツールになると期待される。

thiosugar, molecular chaperone, high mannose glycan

講演番号：3D02p23
講演日時、会場：3 月 29 日 17:59～ D 校舎 02 会場

超好熱性微生物由来の無機ピロリン酸依存性ホスホフルクトキナーゼの結晶構造解析とリン酸供与体の認識機構
Crystallography of inorganic pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from hyperthermophilic microorganisms and their recognition mechanisms of phosphate donors
○宋 賢珍、日高 将文、荒川 隆俊、伏信 進矢、若木 高善（東京大学）
○Hyunjin Song, Masafumi Hidaka, Takatoshi Arakawa, Shinya Fushinobu, Takayoshi Wakagi (Tokyo Univ.)

【目的】
ホスホフルクトキナーゼ（PFK）は解糖系を調節する重要な酵素であるが、超好熱性古細菌 *Thermoproteus tenax* においては ATP ではなく無機ピロリン酸（PPi）をリン酸供与体とする PFK（TPFPと略す）が働いている。PPi をリン酸供与体とする PFK（PPi-PFK）を有する *Borrelia burgdorferi*、*Giardia lamblia*、*Toxoplasma gondii*、*Entamoeba histolytica* などは、ヒトに対して病原性を持つものも多数含まれている。ヒトは PPi-PFK を持たないため、 PPi-PFK が創薬の有望なターゲットとして注目されており、そのために立体構造解析の情報が不可欠である。PFK は3つのグループに分類され、今まで11種の PFK 構造が解析されてるが、TPFP はグループIII に属しており、このグループの酵素に関しては立体構造解析の報告がないため、その解明が望まれている。リン酸供与体の識別機構を明らかにするために TPFP の立体構造解析を行った。
【方法】
組換え菌体抽出液を熱処理後に二段階のカラムクロマトグラフィーによって精製し TPFP を得た。スクリーニングにより最適化された条件から得られた結晶を用いてX線回折データを得た。
【結果】
アミノ酸の同一性が36％であるグループI に属する大腸菌由来の ATP 依存性 PFK （EcPFK）をモデルとして、分子置換法を用いて、分解能2.35Åでリガンドフリーの構造を得た。その後、FBP 複合体（分解能1.8Å）、F6P・Pi 複合体（分解能1.9Å）を決定し、さらに、PPi-PFK では初めのPPi・Mg^{2+} 複合体（分解能1.6Å）の構造解析に成功した。TPFP は EcPFK と同様に四量体で類似のフォールド（RMSD = 1.2Å）を示すが、EcPFK には無い独特なヘアピンループが活性部位を覆っており、D102 とヘアピンループの先端に位置する Y232 の側鎖が ATP の結合に対して両側から立体障害を起こすことが分かった。さらに、超好熱性バクテリアである *Thermotoga maritima* 由来の無機ピロリン酸依存性 PFK （MPFP）を用いて変異体を作成し、リン酸供与体の認識機構について調べた。

glycolysis, hyperthermophilic enzyme, Archaea

講演番号：3D03a07
講演日時、会場：3 月 29 日 10:05～ D 校舎 03 会場

各種 aminoacyl-tRNA synthetase のアミノ酸定量への応用

Application of aminoacyl-tRNA synthetases to amino acid determination.

○亀谷 将史[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Masafumi KAMEYA[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO)

食品の品質管理をはじめとする多くの産業においてアミノ酸定量は重要な技術として用いられ、また近年は血中アミノ酸濃度をバイオマーカーとした各種疾病診断法が開発されるなど、医療分野においても注目を集めている。研究室レベルでのアミノ酸定量には HPLC などの機器分析が用いられているが、高価な分析機器や技術を要し、その実用の範囲は限られている。機器分析法と比較して酵素法では迅速・簡便な測定が可能であり、我々はこれまでに各種アミノ酸定量用酵素の開発に成功している。しかし、各アミノ酸に特異性の高い酵素の取得は必ずしも容易ではなく、まだ定量法の確立されていないアミノ酸も多かった。

Aminoacyl-tRNA synthetase (AARS)は生物のタンパク質翻訳に寄与する酵素であり、アミノ酸へ対し高い特異性を有することが知られている。本研究ではこの AARS に着目し、ピロリン酸検出系[1]とカップリングさせることにより新規定量法を開発した。まず *Thermotoga* 由来の Tyr-specific な AARS (TyrRS)を取得し、求核剤存在下で反応させることにより Tyr 濃度依存的なピロリン酸生成が見られることを明らかにした[2]。さらに本定量法の有用性を示すため、Tyr 以外のアミノ酸についても本手法が適用可能か、また異なる生物由来の AARS でも定量系構築が可能かを検討し、本発表ではその結果も報告する。本定量法は、下記の国内・国際特許出願を済ませている[3, 4]。

1. Kameya, M., Himi, M. & Asano, Y. Rapid and selective enzymatic assay for L-methionine based on a pyrophosphate detection system. *Anal Biochem*. in press.
2. 亀谷・浅野. 第 65 回日本生物工学会大会. (2013)
3. 特許 5305208 アミノアシル tRNA 合成酵素を用いたアミノ酸の定量方法.
4. PCT/JP2013/053146 Method for quantifying target substance.

amino acid, aminoacyl-tRNA synthetase

講演番号：3D03a08
講演日時、会場：3 月 29 日 10:16～ D 校舎 03 会場

A new hydroxynitrile lyase: purification, characterization and recombinant expression

○M. Dadashipour-Lakmehsari[1,2], Yuko Ishida[1,2], Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO)

White biotechnology and biocatalysis need to explore new sources for more efficient tools rather than microorganisms and plants especially among the animal world. The current research represents characteristics of a hydroxynitrile lyase enzyme catalyzing the last step of Aldoxime-Nitrile Pathway (cyanogenesis) in the millipede *Chamberlinius hualienensis*. The enzyme is responsible for production of the toxic gas HCN to the environment. Various column chromatography methods were used to purify the enzyme to homogeneity. The enzyme shows activity toward ranges of carbonyl compounds as substrate. It is a homodimer and exhibits remarkable kinetics parameters as well as the high stability to both pH and temperature (native and recombinant forms). A high k_{cat}/K_m ratio was achieved in synthesis of cyanohydrins by the enzyme.

hydroxynitrile lyase, characterization, cDNA cloning and expression

講演番号：3D03a09
講演日時、会場：3 月 29 日 10:27～ D 校舎 03 会場

異種宿主による活性型酵素の発現
Functional expression of dehydrogenase from *Schizosaccharomyces pombe* in *Escherichia coli*

○伊奈 隆年[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Atsutoshi INA[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ, [2]JST, ERATO)

【目的】
大腸菌を宿主とした異種生物の酵素を活性型で発現させることは、組換え酵素を産業利用する際の課題の一つに挙げられる。異種生物のタンパク質を可溶性に発現させるために、シャペロンの共発現や異種ホストの生育温度を低下させる等の検討がなされている。一方、遺伝子改変による異種生物のタンパク質発現では、正しいフォールデングを取り、可溶化の向上を期待されるが、この方法による可溶化に関する報告は少なく、一点変異体による可溶化発現の報告は本研究室の Dadashipour ら[1]によって始めて報告された。本研究では、*Schizosaccharomyces pombe* 由来のオキサロ酢酸脱水素酵素に着目し、ランダムミューテーション法を用いた可溶化発現変異体の取得を目的に検討を行った。

【方法】
S. pombe 由来オキサロ酢酸脱水素酵素は、理研バイオリソースセンターから購入した。pDEST-17 発現ベクターを用い、大腸菌発現プラスミドの構築を行った。ランダムミューテーションは、エラープローン PCR 法を行った後、さらに改変を行うため、遺伝子修復酵素遺伝子欠損株である XL1-Red 株（endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac mutD5 mutS mutT Tn10 (Tetr)）に形質転換い、ミューテーションライブラリーの作成を行った。その後、*E.coli* BL21-AL 株で発現をさせた。可溶化の確認は、SDS-PAGE、活性測定を行い評価した。

【結果】
S. pombe 由来のオキサロ酢酸脱水素酵素を *E.coli* BL21-AL 株で発現させたところ、不溶性画分に過剰発現していた。そのプラスミドを基に、ランダムミューテーションを繰り返し行い、遺伝子改変を行ったところ、段階的に可溶化した変異体を取得することができた。

1; Mohammad Dadashipour *et al.* (2011)*Protein Expr. Purif.*, **77 (1)**, 92-97

Functional expression, *Escherichia coli*, dehydrogenase

講演番号：3D03a10
講演日時、会場：3 月 29 日 10:38～ D 校舎 03 会場

酵母細胞表層工学によるセルラーゼの集積と共役・相乗効果の解析

Analysis of integration and synergistic reaction of three types of cellulases by yeast cell surface engineering

○BAE Jungu、黒田 浩一、植田 充美（京大院農）
○Jungu BAE, Kouichi KURODA, Mitsuyoshi UEDA (Kyoto Univ.)

【背景・目的】自然界のセルロースは、3 種類のセルラーゼ、エンドグルカナーゼ（EG）、セロビオハイドロラーゼ（CBH）、β-グルコシダーゼ（BG）により、単糖であるグルコースまで完全分解できる。しかし、セルロースは堅い結晶構造を取っているため、その分解効率が低く、エタノールなどを生産するにはコストが高くなる。そこで、我々は、セルロースの分解効率を上げるために、セルラーゼの共役・相乗的働きに注目した。本研究では、当研究室で開発した酵母の細胞表層工学を用いることで、用いた 3 種類のセルラーゼを提示した酵母をそれぞれの目的に応じて作製し、セルラーゼの共役・相乗的働きを検討した。

【方法・結果】初めに、何も提示していない酵母（Cont 酵母）、1 種類のセルラーゼのみを提示した酵母（EG 酵母、CBH 酵母、BG 酵母）、3 種類のセルラーゼを同時に提示した酵母（All 酵母）の 5 種類のセルラーゼ提示酵母を構築した。蛍光抗体染色により、セルラーゼの提示を確認し、リン酸膨潤セルロース（PASC）や 4-ニトロフェニル β-D-グルコピラノシドを基質に全ての酵母株のセルラーゼ活性が確認できた。各酵母株のセルラーゼ提示量を定量・比較し、EG 酵母、CBH 酵母、BG 酵母を、それぞれの提示量が All 酵母におけるそれぞれのセルラーゼの提示量と同じになるように混ぜたものを Mix 酵母として使用した。それらを用いて、PASC 分解活性を比較することで、セルラーゼ間の距離に依存した共役・相乗効果を明らかにした。また、All 酵母のセルラーゼ提示量を上げることで、セルロース分解の更なる高効率化が期待できることも判明したので、まとめて報告する[1]。

[1] Bae *et al*., submitted

synergistic reaction, yeast cell surface engineering, cellulase

講演番号：3D03a11
講演日時、会場：3 月 29 日 10:49～ D 校舎 03 会場

Clostridium cellulovorans を基にしたセルロソームの酵母細胞表層工学による構築の試み
Construction of artificial cellulosome based on *Clostridium cellulovorans* with yeast cell surface engineering

○石高 彰人[1]、BAE Jungu[1]、三宅 英雄[2]、田丸 浩[2]、黒田 浩一[1]、植田 充美[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]三重大院・生資）
○Akihito ISHITAKA[1], Jungu BAE[1], Hideo MIYAKE[2], Yutaka TAMARU[2], Kouichi KURODA[1], Mitsuyoshi UEDA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Dept. Life Sci., Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ.)

【背景・目的】近年、食糧と競合しない非可食バイオマスからのバイオリファイナリーが注目を集めている。非可食バイオマスの主成分はセルロース・ヘミセルロースであり、自然界にはこれらの分解酵素を生産する多くの微生物が存在するが、中でも *Clostridium cellulovorans* は菌体外にセルロソームと呼ばれる酵素超複合体を形成し、セルロース・ヘミセルロースを効率的に分解することができる。セルロソームは足場タンパク質上に多数の酵素（セルロソーマル酵素）を集積する構造をとり、酵素間の相乗効果を促進するとともに、基質に応じて構成酵素の組み合わせを最適化する。そこで、本研究では、効率的糖化が可能な *C. cellulovorans* のセルロソームに着目し、エタノール発酵が可能な酵母の細胞表層にその酵素超複合体を構築させることを試みた。
【手法・結果】各種基本的多糖類に対して生産される *C. cellulovorans* の菌体外タンパク質についての定量的プロテオーム解析の結果[1]を基に、恒常的に生産されている足場タンパク質とセルロソーマル酵素に着目した。まず基盤となる 1825 アミノ酸残基からなるセルロソーマル足場タンパク質 CbpA 全長を酵母で細胞表層提示するため、我々の開発してきた手法により CbpA を分泌シグナル、α-アグルチニンの細胞壁アンカリングドメインと融合した形で発現させた。CbpA に対する抗体を用いて蛍光抗体染色を行った結果、細胞表層提示を確認することができた。さらに、各種セルロソーマル酵素については分泌シグナルを付加することで酵母での分泌発現を試みた。本報告では、その第一報として、足場タンパク質とこれら分泌させた酵素の組み合わせを用いて酵母細胞表層におけるセルロソームの構築を試みているので、現況についてまとめて報告する。

[1]K. Matsui *et al., Appl. Environ. Microbiol.,* 79, 6576-6584(2013)

Cellulosome, Cell surface engineering, Yeast

講演番号：3D03a13
講演日時、会場：3 月 29 日 11:10～ D 校舎 03 会場

機能物質探索ツールとしての D-アミノペプチダーゼ：反応の効率化と生成物の網羅的解析

Application of D-aminopeptidase as a screening tool for biological active substance: Reaction efficiency and exhaustive analysis of products

○恒原 由佳[1]、磯田 佳孝[2]、田村 丹[3]、森 信寛[1]、有馬 二朗[1] ([1]鳥取大農、[2]鳥取大院連農、[3]鳥取大院)
○Yuka TSUNEHARA[1], Yoshitaka ISODA[2], Akira TAMURA[3], Nobuhiro MORI[1], Jiro ARIMA[1] ([1]Fac. of Agric. Tottori Univ., [2]United Grad. School of Agric. Sci. Tottori Univ., [3]Grad. School of Agric. Tottori Univ.)

【目的】D-アミノ酸やその誘導体、そして D-アミノ酸を含有するペプチドは、L-アミノ酸にはない機能をもつことがあり、実際に有用な機能が発見されつつある。しかし、それらが持つ機能の網羅的な解析が行われておらず、今後、新たな有用物質が見つかる可能性が大いに見込まれる。我々が保有する *Streptomyces* sp. 82F2 由来の D-アミノペプチターゼは、本来の機能である加水分解と拮抗し、副反応として、アミノリシスを触媒する。本酵素を利用することで、D-アミノ酸誘導体やジペプチド類の合成を 1 ポット 1 ステップで行うことが可能であり、加水分解とは比較にならないほどの生成物の多様性をもたらす。そのため、現在は新たな機能物質探索ツールへの応用に期待し、酵素反応液を様々なアッセイ系に供することで、反応生成物を対象とした網羅的な機能物質探索を行っている。しかし、本酵素の反応液中に存在する生成物は網羅されておらず、反応効率も不明な点が多い。そこで本研究では、本酵素の機能探索への応用に向け、酵素反応の効率化と生成物の網羅解析を行った。
【方法・結果】アシル供与体として D-Phe-OR(-OMe,-OBzl)、アシル受容体として L-Leu-OR(-OMe,-OBzl)を使用し、基質濃度、pH、温度、時間と反応効率の関係について検討した。その結果、アシル供与体を 20 mM,アシル受容体を 200 mM、pH 8.5、4℃、4 時間でアミノリシス反応の生成物が最大となった。続いてアシル供与体を D-Phe-OBzl に固定し、アシル受容体の候補となる 111 種類の化合物に対する生成効率を検討した結果、99 種類でアミノリシス活性が認められ(変換率 10%以上)、変換率が 50%以上の化合物は 39 種類であった。次に、アシル受容体を L-Leu-OEt に固定し、12 種類の D-アミノ酸誘導体をアシル供与体として用いたときの生成効率を求めた結果、側鎖に芳香族を持つ D-アミノ酸誘導体で効率の良いアミノリシス反応が確認された。しかし酸性及び塩基性の D-アミノ酸誘導体では生成物が確認できず、D-Val-、D-Leu-、D-Pro-、D-His-OMe、及び D-Ser-OBzl を用いた場合、反応が十分に進まない結果となった。そこで反応時間を延ばし、酵素濃度を上げると、上記 D-アミノ酸誘導体でアミノリシス反応の効率が上昇した。また、一部の反応液からは、生成物としてジケトピペラジンやトリペプチドが確認され、アシル受容体として L-アミノ酸誘導体を使用した際には、L-アミノ酸同士のペプチドが観察された。現在、792 種類の基質の組合せによる反応液を調整し、ライブラリーとしての利用を見込み、網羅的な生成物の同定を行っている。

peptidase, D-amino acid, chemical library

講演番号：3D03a14
講演日時、会場：3 月 29 日 11:21～ D 校舎 03 会場

グラム陽性細菌に対して抗菌活性を有する酵素合成 D-ホモジペプチド：D-Trp-D-Trp

D-Trp-D-Trp: an antimicrobial D-homodipeptide constructed by enzymatic synthesis

○磯田 佳孝[1]、霜村 典宏[2]、森 信寛[2]、有馬 二朗[2]([1]鳥取大連農、[2]鳥取大農)
○Yoshitaka ISODA[1], Norihiro SHIMOMURA[2], Nobuhiro MORI[2], Jiro ARIMA[2] ([1]United Grad. School of Agric. Sci. Tottori Univ., [2]Fac. of Agric.Tottori Univ.)

【目的】近年、D-アミノ酸関連の研究の進展によって、優れた機能が発見されつつある。しかしD-アミノ酸を含有するペプチド類はその数が膨大であり、L-アミノ酸からなるペプチド類と比較すると機能が未同定のペプチドが多数存在していると考えられる。我々はこれまでに、放線菌由来のD-アミノペプチダーゼから高いアミノリシス触媒活性を見出し、そのD-,L-配列を有するペプチド類を高収率に合成するという特徴を利用して、様々なD-アミノ酸含有ペプチド類を合成してきた。更には、様々な基質の組合せからなる酵素反応液から、抗腫瘍や抗菌活性能を有する物質の探索を行い、抗腫瘍活性を有する化合物としてD-Phe-Gly-OBzl、黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性能を有する化合物としてD-Trp-L-Phe-OBzl及びD-Phe-L-Trp-OBzlを見出した。しかしながら、これらの化合物は全てベンジルエステルを有するため、細胞や生物に対する毒性の強さも懸念される。本研究では、上記化合物と比較して単純な構造であるD-Trp-D-Trpから抗菌活性が認められたため、当該ジペプチドに焦点を当て、諸性質を検討した。
【方法】D-Trp-D-Trp 及び D-Trp-L-Trp の合成は、D-アミノペプチダーゼを、L-Trp-D-Trp の合成は当研究室で保有するエリンギ由来のセリンペプチダーゼを利用して合成した。L-Trp-L-Trp は市販品を使用した。それぞれのペプチドの濃度は L-Trp-L-Trp を標品として LC/MS で求めた。抗菌活性試験には、緑濃菌、枯草菌および黄色ブドウ球菌を用い、96 穴培養プレート中で、100μL の培養液に対し 1～10μL の酵素反応液を添加し、一晩培養後の濁度測定により生育阻害活性を評価した。
【結果】20 mM の D-Trp-OMe のみを基質とした D-アミノペプチダーゼの反応液から、黄色ブドウ球菌及び枯草菌に対する抗菌活性が確認され、LC/MS 解析から D-Trp－D-Trp が生成物として確認された。また、酵素未反応区では抗菌活性が見られなかったため、反応液中に存在する生成物が、抗菌活性を示す化合物であることが確証づけられた。反応液中の生成物濃度は約 1 mM（変換率：10%）であり、黄色ブドウ球菌に対する MIC 値は約 10 μg/mL であった。また、D-Trp-D-Trp で処理した菌体を走査型電子顕微鏡で観察したところ、各所に潰れた菌体が確認された。一方で、L-Trp-L-Trp からは 200 μg/mL 以上でも抗菌活性がみられなかったことから、D 体であることが抗菌活性に重要であることが示唆された。現在は、菌体に対する作用機序や、D-Trp-L-Trp、L-Trp-D-Trp といった構造類縁体を用いた活性の比較を行っている。

antimicrobial activity, D-amino acid, peptidase

講演番号：3D03a15
講演日時、会場：3 月 29 日 11:32～ D 校舎 03 会場

カイコ幼虫後部絹糸腺由来無細胞タンパク質合成系における翻訳促進配列の機能解析

Analysis of translational enhancer sequence on cell-free protein synthesis system derived from posterior silk gland of silkworm, Bombyx mori

○佐事 武[1]、尾山 廣[2]、伊東 昌章[3] ([1]沖縄高専　専攻科、[2]摂南大学　理工　生命科学、[3]沖縄高専　生資工)
○Takeshi SAJI[1], Hiroshi OYAMA[2], Masaaki ITO[3] ([1]ONCT AC, [2]Setsunan Univ, [3]ONCT)

＜目的＞カイコ幼虫後部絹糸腺抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系（カイコ無細胞系）は、真核生物由来の系において、高いタンパク質合成能(約 30μg/mL)を有しており、タンパク質研究のツールとして有用である。しかし、迅速かつ簡便に合成タンパク質の解析を行っていくためには、さらなる合成量の向上が必須である。そのような状況の下、本研究では、合成量を向上させることを目的として、昆虫培養細胞無細胞系において翻訳促進効果が認められている配列を用いて、カイコ無細胞系に適する翻訳促進配列のスクリーニングを行った。また、選定した配列のどの部分が翻訳促進能を有するのかを明らかにすることを目的として、タンパク質合成量における翻訳促進配列の短縮による影響を調べた。
＜方法＞実験には、翻訳促進配列として *Malacosoma neustria* 核多角体病ウイルス(MnNPV)由来ポリヘドリン遺伝子の 5’非翻訳領域（5’UTR）が導入されている昆虫培養細胞無細胞系用発現ベクター pTD1(AB194742)に β-galactosidase 遺伝子を挿入したプラスミドを用いた。スクリーニングには、それに加えて、翻訳促進配列を、β-globin 遺伝子由来の 5’UTR、*Spodoptera frugiperda, Autographa californica, Ectropis oblique, Choristoneura rosaceana* 核多角体病ウイルス(SfNPV, AcNPV, EoNPV, CrNPV)由来ポリヘドリン遺伝子の 5’UTR にそれぞれ置換したプラスミド、合計 6 種類を用いた。これらのプラスミドをもとに PCR により直鎖化 DNA を調製した後、*in vitro* mRNA 合成キットを用いて mRNA を合成し鋳型として用いた。抽出液は、5 齢 4 日目のカイコ幼虫から採取した後部絹糸腺を用いて調製した。この抽出液を用いて、EDTA を添加することで転写と翻訳を連続的に行う Link 法と、mRNA を精製して行う方法にて、無細胞タンパク質合成を行った。反応液中のβ-galactosidase の合成量は、市販のキットを用いて、発光強度と比活性の値より算出した。
＜結果＞6 種類の翻訳促進配列によるβ-galactosidase の合成量の変化を調べた結果、42 塩基からなる SfNPV 由来ポリヘドリン遺伝子の 5’UTR を有するプラスミドにおいて最も高い合成量が得られ、MnNPV の 5’UTR の場合と比べて 1.7 倍の合成能を有することがわかった。さらに、翻訳促進に重要な配列を見出すために、①5’末端から 2 塩基ずつ短縮した 19 種類、②3’末端から 2 塩基ずつ短縮した 19 種類、③コザック配列に相当する 4 塩基を残し 3’末端から短縮した 17 種類、合計 55 種類の翻訳促進配列を短縮したプラスミドを構築した。現在、それらのプラスミドを用いて合成量の変化を調べており、その結果もあわせて報告する。

Cell-free Translation, Translational enhancer sequence, 5'UTR

講演番号：3D03a16
講演日時、会場：3 月 29 日 11:43～ D 校舎 03 会場

パパインによるオリゴチロシンペプチドの合成
Papain-catalyzed synthesis of oligotyrosine peptides

○三橋 純、奈良井 朝子、中山 勉（日獣大応生）
○Jun MITSUHASHI, Asako NARAI, Tsutomu NAKAYAMA (Nippon Veterinary and Life Science Univ.)

【目的】
L-チロシンエチルエステル(Tyr－OEt)を基質として pH 7.5 のリン酸緩衝液中でパパインと反応させると、チロシンジペプチドならびにトリペプチドを合成できることをこれまでに報告してきた[1)]。これらはアンジオテンシン変換酵素阻害活性を示し、抗高血圧作用が期待される。しかしながら、パパインによる合成では重合度(DP)が 5 以上の不溶性生成物が蓄積する。基質濃度を下げて高重合化を抑制しても DP 2, 3 のペプチドの収量は限られていた。オリゴチロシンペプチドの機能性を in vitro と in vivo で評価し応用を検討するにあたっては、高収率かつ高収量で合成できる酵素反応条件の設定が必要となる。そこで演者らは今回、pH が生成物の DP に及ぼす影響について調べるとともにペプチドの伸長機構の解析を試みた。
【方法と結果】
100 mM Tyr－OEt と 30 μM パパインを pH 6.0～7.5 のリン酸緩衝液中、30℃で反応させ、生成物を RP-HPLC にて分析した。pH 7.5 から pH 6.5 までは pH の低下に伴って DP 2～4 のペプチドの収率は増加し（32%→40%）、不溶性の高 DP 生成物は減少した（44%→40%）。pH 6.0 では基質の減少速度が低下した。次に、pH 6.5 において Tyr－OEt の初濃度を 25 mM まで段階的に下げるとさらに高 DP 化が抑制された。50 mM では低 DP ペプチドの収率が最も増加したが、収量は微増にとどまった。Tyr－OEt の初濃度と減少速度の関係を調べた結果、Tyr－OEt によるアシル化酵素中間体形成は本反応の律速段階であることがわかった。そして、Tyr－OEt は脱アシル化過程の求核剤として使われることで反応初期産物の伸長に寄与する可能性が高いことが示唆された。経時的な生成物濃度の変化を調べたところ、DP 3, 4 のペプチドは反応初期に増加した後で徐々に減少する傾向が認められた。減少に転じる濃度の値から、DP 3, 4 のペプチドは Tyr－OEt よりもパパインとの親和性が高いアシル基供与基質として利用されることが示唆された。それにより形成されたアシル化酵素中間体が加水分解されると低 DP のペプチドを生成し、Tyr－OEt や共存ペプチドのアミノ基へアシル基を転移すると高 DP ペプチドを生成すると予想された。

1) *Journal of Biotechnology* 150 (2010) 343-347

papain, tyrosine, peptide synthesis

講演番号：3D03p01
講演日時、会場：3 月 29 日 14:00～ D 校舎 03 会場

FRET を用いた硝酸センサータンパク質の開発
Development of Nitrate sensor protein based on FRET signal changes
○後藤 愛那[1]、日高 將文[1]、岡部 恵美子[1]、金井 研太[1]、小坂 啓太[1]、板倉 学[2]、クリスチーナ サンチェス[2]、南澤 究[2]、内田 隆史[1] ([1]東北大院農、[2]東北大院生命)
○Aina GOTOH[1], Masafumi HIDAKA[1], Emiko OKABE[1], Kenta KANAI[1], Keita KOSAKA[1], Manabu ITAKURA[2], Sanchez Cristina[2], Kiwamu MINAMISWA[2], Takafumi UCHIDA[1] ([1]Tohoku Univ. Agri. Science, [2]Tohoku Univ. Life Science)

《背景・目的》FRET（Fluorescence resonance energy transfer）の原理に基づくバイオセンサーは、リガンドの結合によるタンパク質の構造変化やタンパク質間相互作用を蛍光タンパク質のシグナル強度の変化として測定することを可能としたツールである。近年、細胞内のカルシウムや ATP 濃度の変化を可視化するセンサータンパク質が実用化されている。本研究では、新たなバイオセンサーとして硝酸イオン（NO_3^-・NO_2^-）濃度変化を測定するセンサータンパク質の開発を目指した。
《方法》*Paracoccus denitrificans* の NasS および NasT タンパク質は複合体を形成しており、NO_3^-・NO_2^-存在下では解離することが明らかとなっている[1]。本研究では、根粒菌 *Bradyhizobium japonicum* の NasS/NasT を「硝酸センサー」として応用するため、蛍光タンパク質を付加した CFP-NasT、NasS-YFP を作成し、NO_3^-・NO_2^-の有無による蛍光強度の変化を測定した。
《結果・考察》蛍光強度測定の結果、CFP と NasS-YFP を混合した場合では FRET は起こらなかったが、CFP-NasT と NasS-YFP を混合した場合は FRET が起こったことから、NasS-NasT の相互作用を二分子間 FRET として評価できることが示された。この系に各種オキソ酸を添加したところ、NO_3^-および NO_2^-特異的に FRET が解消された。以上の結果より、FRET センサータンパク質を用いた NO_3^-・NO_2^-による NasS・NasT の解離を可視化することに成功したと考えている。また、NasS の変異体を作成し NO_3^-・NO_2^-感受性の変化の検討と、センサータンパク質の改良を目指し蛍光タンパク質の組み合わせの検討を進めている。
《今後の展望》現在の臨床において、血中の NO_3^-・NO_2^-濃度は、一酸化窒素（NO）を測定する指標とされている。一酸化窒素は血管拡張、血小板凝集抑制作用を持つことが知られており狭心症、脳血栓、心筋梗塞を予防する因子のひとつであると考えられている。硝酸センサータンパク質を新たな硝酸測定系あるいは細胞における硝酸の挙動観察へと応用することで、これら関連疾患の診断や細胞内の硝酸関連シグナルの解明に繋がる。
[1]Luque-Almagro V. M. *et al.* (2013) *J. Biol. Chem.,* 288, 29692-29702

FRET, nitrate, sensor protein

講演番号：3D03p02
講演日時、会場：3 月 29 日 14:11～ D 校舎 03 会場

FRET 法を用いた Pin1 構造変化の可視化

Direct observation of conformation change of Pin1 using FRET based method

○岡部 恵美子、日高 將文、内田 隆史（東北大院農）
○Emiko OKABE, Masafumi HIDAKA, Takafumi UCHIDA (Tohoku Univ.)

【背景・目的】

タンパク質のリン酸化は、多くの酵素・受容体に構造変化をもたらし、それらを活性化・非活性化させることで細胞機能を調節している。プロリン異性化酵素 Pin1 は、タンパク質のリン酸化セリン-プロリン部位を認識し、そのペプチド結合の異性化を触媒することでリン酸化タンパク質の速やかな構造変化を促している。Pin1 は転写因子（p53, c-Myc など）、微小管重合因子（タウ）、酵素（キナーゼ）など様々なタンパク質に結合し、リン酸化タンパク質の機能や安定性を制御することで癌やアルツハイマー病などの発症メカニズムに深く関連している。

Pin1 は WW ドメインと触媒ドメインを有する。水溶液中では、これら二つのドメインは弱い相互作用しか示さないが、Pin1 の基質と成り得るリン酸化ペプチドやタンパク質存在下では強い相互作用を形成する。すなわち、Pin1 は標的分子との結合によって大きく構造変化する事が示唆される。我々は、この構造変化を利用する事で Pin1 の生体内の働きや関連する疾患のメカニズム解明、Pin1 阻害剤（ポリフェノールなど）の効果の評価に役立つのではないかと考えた。本研究では FRET（Fluorescence Resonance Energy Transfer）に基づくセンサータンパク質を開発し、Pin1 の構造変化の可視化を試みた。

【方法・結果】

昨年度の農芸化学会年会において Pin1 の N 末端および C 末端に、CFP と YFP を融合させたセンサータンパク質を作成し、リン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチド存在下における蛍光強度の測定や Pin1 野生型と変異体との FRET 比の比較から、本 FRET 法を利用する事で Pin1 の構造変化を可視化できる事を示した。Pin1 の構造変化の可視化により、Pin1 を標的とした薬剤候補化合物のスクリーニングや細胞内イメージングへの応用が期待されるが、実用化には感度や特異性の改善が必要とされる。そこで本研究では、さらに高感度なセンサータンパク質開発のため、蛍光タンパク質と Pin1 間のリンカー配列や蛍光タンパク質の種類の検討を行った。その結果、リンカーの挿入や蛍光タンパク質の組み合わせにより FRET 効率が変化することがわかった。さらに蛍光タンパク質への円順列変異の導入や、蛍光タンパク質の単量体化、Buffer の検討においても FRET 効率が変化した。本学会においてそれぞれの要因が FRET 効率に与える影響について議論する。また本改良型タンパク質を用いて、Pin1 と阻害剤（ポリフェノールなど）の相互作用を解析した結果も報告する。

FRET, Pin1, phosphorelated protein

講演番号：3D03p03
講演日時、会場：3 月 29 日 14:22～ D 校舎 03 会場

ナノ粒子局在表面プラズモン共鳴によるインフルエンザウイルスの検出

Detection of influenza virus using LSPR of Gold nano perticle and Quantum dot

○高橋 直人[1]、アハメッド ラヒン[1,2]、加藤 竜也[1,3]、朴 龍洙[1,2,3] ([1]静岡大院農、[2]静大　創科技院、[3]静大　グリーン科学技術研)
○Naoto TAKAHASHI[1], Rahin Ahmed[1,2], Tatuya KATO[1,3], Yong-soo Park[1,2,3] ([1]Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Technol. shizuoka Univ.)

【目的】　近い将来強毒性インフルエンザが突然変異により発生し、世界規模で多大な被害を出すことが予想される。早急な原因ウイルスの同定は感染拡大の防止、早期治療に繋がり、延いては社会・経済活動に対する影響を最小限にする為、高感度かつ迅速な検出が必要不可欠である。従来の簡易検出ではイムノクロマト法を用いたものが主流であるが、感度が低く感染初期では偽陰性、偽陽性が出てしまうという問題がある。そこで本研究では、抗体や糖鎖などの生体分子と結合可能なカルボキシル基、もしくはアミノ基提示型蛍光性半導体ナノ粒子(quantum dot, QD)と金ナノ粒子(AuNP)を用いて H1N1 型インフルエンザに対する新規検出技術の開発を試みた。
【方法】　QD(CdTe)と AuNP をそれぞれ水溶液中のボトムアップ法と HEPES バッファーによる液相還元法により作製し、各粒子を遠心分離で精製した。それぞれの粒子液に抗 A 型 H1N1 インフルエンザウイルスの Anti hemagglutinin (HA) antibody 及び Anti Neuraminidase (NA) antibody を 6.1 μg/ml となるように加えて、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt (NHS)を用いた EDC/NHS カップリングによって修飾した。抗体修飾粒子を限外濾過で精製し、抗 HA-QD と抗 NA-AuNP を得た。その後、各粒子の抗体修飾評価を ELISA によって確認した。抗 HA-QD と抗 NA-AuNP を混合した検出液にインフルエンザウイルスを 1 pg/ml～1 μg/ml(終濃度)となるように加え、反応させた後に蛍光マイクロプレートリーダーを用いて励起光 280 nm で 522 nm の蛍光強度を測定した。
【結果】　抗 HA-QD と抗 NA-AuNP を含む検出液にウイルスを加え、蛍光を検出したところ、1 pg/ml ～ 1 μg/ml の範囲でウイルス濃度に依存して蛍光の増加が確認でき、検出感度は 100 pg/ml であった。また、抗 HA-QD と抗 HA-AuNP を用いた場合に比べ約 10 倍の感度上昇が確認できた。この結果より、QD と AuNP がウイルス表面上に結合し隣接し合うことで局在表面プラズモン共鳴による蛍光増強が起き、それによってウイルスを定量的に検出できる事が確認できた。さらに、複数の抗体を用いることでウイルス上での粒子同士の競合を防ぎ、検出感度上昇に成功した。今後、グラフェンによる消光効果を用いて更なる感度上昇を検証する予定である。

influenza, nanoparticle, quantum dot

講演番号：3D03p04
講演日時、会場：3 月 29 日 14:33～ D 校舎 03 会場

がん細胞特異的一本鎖抗体を提示したがん細胞追跡用ウイルス様粒子によるがん細胞のイメージング

Cancer cell imaging by virus-like particles displaying cancer cell-specific scFv

○油井 恵[1]、デオ ピピンクマール[2]、加藤 竜也[1]、上田 宏[3]、朴 龍洙[2]([1]静岡大院農、[2]静岡大グリーン科技研、[3]東工大資化研)
○Megumi YUI[1], Vipin Kumar DEO[2], Tatsuya KATO[1], Hiroshi UEDA[3], Enock Y. PARK[2] ([1]Grad. Sch. of Agric., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. of Green Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [3]Chem. Resour. Lab., Tokyo Tech.)

【目的】日本では三人に一人ががんで亡くなっている。近年、がん治療の副作用が大きな問題となっており、がんの効果的かつ特異的な治療方法の確立は喫緊の課題である。ヒト化抗体hCC49は多くのガン細胞表面に存在するガン関連糖タンパク質72(TAG-72)上のシアリルTn糖鎖を特異的に認識する[1)]。本研究ではカイコ-バクミド発現システムを用いてカイコ体内でhCC49の一本鎖抗体とレトロウイルス構造タンパク質(Gag)を共発現させることによって、ウイルス様粒子上に一本鎖抗体を提示させ、ガン細胞を特異的に認識するナノ粒子を構築し、がん細胞のイメージングを行った。
【方法及び結果】ヒト化CC49一本鎖抗体遺伝子にカイコ由来bombyxinシグナル配列、FLAGタグもしくはStrepタグを融合し、さらにウイルス様粒子表面に提示させるためにインフルエンザウイルス由来ヘマグルチニン膜貫通領域をC末端に融合した。この融合遺伝子を挿入した組換えBmNPVバクミドを作製した。Gag遺伝子が挿入されたバクミドは以前本研究室で構築されたラウス肉腫ウイルス由来のgag遺伝子を挿入したものを使用した。一本鎖抗体組換えバクミドとgag遺伝子組換えバクミドの2種類を混合しカイコ幼虫に接種することで、カイコ体内で目的タンパク質を共発現させた。接種後一週間飼育し、体液と脂肪体を採取した。得られた体液、脂肪体をWestern blottingに供し、抗FLAGタグ抗体、抗Gagタンパク質抗体を用いてhCC49とGagタンパク質の発現を確認した。一本鎖抗体が提示されたウイルス様粒子をショ糖密度勾配遠心法によって精製し、形状を透過型電子顕微鏡で確認した。hCC49のTAG-72およびがん細胞への結合活性については、ELISAと免疫染色により測定した。ELISAには抗FLAG抗体を用い、3,3’,5,5’-Tetramethylbenzidineで発色させ波長450nm/655nmのOD値を測定したところ、有意な活性があることを確認した。蛍光色素Alexa594標識抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡の検鏡によってがん細胞表面への結合を確認した。さらに、Electroporation法によりウイルス様粒子中にFITCを内包し、ヒト結腸がん細胞であるLS174T細胞に加え、がん細胞のイメージングを行った。ウイルス様粒子を加えたがん細胞へのFITCのデリバリーは、共焦点レーザー顕微鏡により特異的に観察された。これらの結果より、抗体提示Gagウイルス様粒子はがん細胞特異的イメージングに利用可能であることが示された。

1) Yoon et al., JBC 281, 6985 (2006)

virus-like particles, cancer, DDS

講演番号：3D03p05
講演日時、会場：3 月 29 日 14:44～ D 校舎 03 会場

タンパク質を提示したマグネタイト粒子の作製と細菌回収への応用
Novel method for the production of protein displaying magnetic beads and application to cell collection
○梅田 憲義、池田 丈、椎原 史裕、廣田 隆一、黒田 章夫（広島大学先端研）
○NORIYOSHI UMEDA, TAKESHI IKEDA, FUMIHIRO SHIIHARA, RYUUITI HIROTA, AKIO KURODA (Hiroshima Univ.)

[目的]
磁性粒子は、液中において凝集・分散の制御ができ、磁場勾配を利用することで回収・輸送できるため、特定の生体分子の単離や、薬物を輸送するドラッグデリバリーシステム、ガンの温熱治療など様々な応用が期待される。
当研究室で開発された L2（Si-tag）はシリカ（SiO_2）表面に結合するタンパク質である。L2 と目的タンパク質の融合タンパク質を作製すれば、L2 を介して任意のタンパク質をシリカ表面上に固定化できる。L2 はシリカの他にも、磁性を有するマグネタイト（Fe_3O_4）にも結合することが最近の研究で示されたため、L2 融合タンパク質を固定化することで、タンパク質を提示したマグネタイト粒子を簡便に作製できる。本研究では、低コストの細菌回収法の開発を目的とし、細菌結合タンパク質を提示したマグネタイト粒子の作製を行い、その有用性を評価した。

[方法・結果]
本研究で用いた細菌結合タンパク質 CWB（cell wall binding）は、グラム陽性菌の細胞壁に特異的に結合するタンパク質である。CWB と L2 の融合タンパク質（L2 融合 CWB）を作製し、マグネタイト粒子と混合することで、粒子表面にタンパク質を固定化した。得られた粒子を、グラム陽性菌である *Bacillus subtilis* の培養液と混合後、磁石で粒子を回収した。粒子を LB 寒天培地にプレーティングし、37℃で一晩培養したところ、多数のコロニー形成が確認された。一方、CWB を固定化していない粒子を用いた場合にはコロニーが得られなかった。これらの結果から、L2 を介してマグネタイト粒子上に固定化された CWB が機能的に働き、目的の細菌を回収できたことが示された。
続いてグラム陰性菌との混合培養液中からの目的細菌回収を検討した。*B. subtilis* と *Escherichia coli* の混合培養液に、L2 融合 CWB を固定化したマグネタイト粒子を混合し、上と同様の実験を行った。その結果、*E. coli* のコロニーは確認できず、*B. subtilis* のコロニーのみが確認できたため、混合培養液中でも選択的に目的の細菌が回収できることが示された。現在、マグネタイト粒子に提示する L2 融合タンパク質を変えることで、グラム陽性菌以外にも様々な用途に応じた細菌回収を目指している。

magnetic beads, cell collection, Si-tag

講演番号：3D03p07
講演日時、会場：3 月 29 日 15:05～ D 校舎 03 会場

新規細胞膜透過ペプチド「ポリヒスチジン」の発見

Discovery of novel cell-penetrating peptide "Poly-histidine"

○岩崎 崇、綿谷 佳久、小竹 彩香、河野 強（鳥取大農）
○Takashi IWASAKI, Yoshihisa WATATANI, Ayaka KOTAKE, Tsuyoshi KAWANO (Tottori Univ.)

【背景・目的】細胞膜透過ペプチドは、タンパク質や核酸の細胞内への導入ツールとして、現在広く使用されている。その代表例としてオクタアルギニン(R8：RRRRRRRR-NH2)が挙げられる。アルギニン(R)(側鎖 pKa=12.5)は生理的条件下で正電荷を帯びるため、R8 は正電荷に富むことが分かっており、この高い正電荷密度が効率的な細胞内取込みに重要であることが知られている。この知見を基に、本研究では低 pH(pH6.0 付近)限定的に正電荷を帯びるヒスチジン(H)(側鎖 pKa=6.0)に着目した。前述の R8 の R 残基を H 残基に置換した『RH ハイブリッドペプチド』は、生理的 pH 条件から低 pH 条件の間で急激な正電荷の上昇を示した。この現象を利用して、低 pH 選択的に正電荷を帯び、細胞膜を透過する『低 pH 選択的な細胞膜透過ペプチド』の開発が可能であると考えられた。生体内においては、低 pH 環境(pH6.0～6.9)が腫瘍組織内部に特異的に形成されていることから、上記の『RH ハイブリッドペプチド』の開発を通じて、腫瘍組織に特異的な細胞膜透過ペプチドの開発を試みた。
【方法・結果】前述の背景に基づいて、全 14 種類の RH ハイブリッドペプチドと、ネガティブコントロールとしてヒスチジンのみで構成された H16(HHHHHHHHHHHHHHHHH-NH2)を合成した。これらのペプチドは、pH6.0 において等しい正電荷を帯びるように設計された。次いで、ヒト肝癌細胞株 HepG2 を用いて、pH6.0 と pH7.4 の両条件における細胞膜透過の評価を行った。しかしながら、全 RH ハイブリッドペプチドに関して、低 pH 選択的な細胞膜透過は認められなかった。ところが驚くべきことに、ヒスチジンのみで構成された H16 が極めて高い細胞膜透過を示すことが明らかとなった。R8 に対する H16 の相対的な細胞膜透過率は、pH6.0 条件下で 5.45 倍、pH7.4 条件下で 5.36 倍であった。

上記の実験において、ヒスチジンのみで構成された H16 が極めて高い細胞膜透過効率を示したことから、様々な鎖長(6～24 残基)のポリヒスチジン(ヒスチジンのみが連続したペプチド)を化学合成し、ヒスチジン残基数と細胞膜透過率の関連性を HepG2 細胞により解析した。その結果、H12(ヒスチジン 12 残基)において、R8 と同等の顕著な細胞膜透過率が観察され、H16(ヒスチジン 16 残基)において細胞膜透過率はピークに達した。また、この細胞膜透過は pH 条件に非依存的であることが確認された。
【結論】ヒスチジンのみで構成されたポリヒスチジンが、代表的な細胞膜透過ペプチド：R8 よりも高い細胞膜透過を示すという新知見が確認された。ポリヒスチジンは pH 条件に非依存的な細胞膜透過を示したことから、正電荷に非依存的な細胞膜透過ペプチドであることが示唆された。
●本研究はアステラス病態代謝研究会の助成を受け実施した。

cell-penetrating peptide, histidine, arginine

講演番号：3D03p08
講演日時、会場：3 月 29 日 15:16～ D 校舎 03 会場

新規細胞膜透過ペプチド「ポリヒスチジン」の分子機構の解析

Analysis of molecular mechanism of novel cell-penetrating peptide "Poly-histidine"

○綿谷 佳久、小竹 彩香、河野 強、岩崎 崇（鳥取大農）
○Yoshisisa WATATANI, Ayaka KOTAKE, Tsuyoshi KAWANO, Takashi IWASAKI (Tottori Univ.)

【背景・目的】

これまでに演者らの研究室では、ポリヒスチジン(H16)が既存の細胞膜透過ペプチドよりも高い細胞膜透過を示すことを明らかにした。しかし、ポリヒスチジンの細胞膜透過機構は解明されていない。そこで本研究ではポリヒスチジンの細胞膜透過メカニズムの解明を目的とした。

【方法】

L 体または D 体のヒスチジン残基のみで構成されるポリヒスチジン(H16)を化学合成し、C 末端をアミド化修飾、N 末端を Tetramethyl rhodamine(赤色蛍光色素)で標識した。次いで、ヒト扁平上皮癌由来細胞株 RERF 及びヒト繊維肉腫癌由来細胞株 HT1080 におけるポリヒスチジン(H16)の細胞内取り込み量を共焦点レーザー顕微鏡とフローサイトメーターにより解析した。この際、血清の存在、温度条件、エンドサイトーシス阻害剤処理がポリヒスチジン(H16)の細胞膜透過へ与える影響を解析した。

次いで、細胞表面の糖鎖の存在がポリヒスチジン(H16)の細胞膜透過に与える影響を解析するために、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株 CHO 及び糖鎖欠失細胞株 A745 を用いて、ポリヒスチジン(H16)の細胞内取り込み量を共焦点レーザー顕微鏡とフローサイトメーターにより測定した。

また、細胞内に取り込まれた後のポリヒスチジン(H16)の細胞内局在を解析するために、ミトコンドリア、小胞体、リソソーム、ゴルジ体を染色し、ポリヒスチジン(H16)との共局在を観察した。

【結果・考察】

D 体のヒスチジン残基のみで構成されたポリヒスチジン(H16)と比較して、L 体のヒスチジン残基のみで構成されたポリヒスチジン(H16)は 2.6 倍高い細胞膜透過率を示した。より詳細な解析の結果、ポリヒスチジン(H16)の細胞膜透過は低温条件下及びマクロピノサイトーシス阻害剤によって顕著に抑制された。また、細胞内においてポリヒスチジン(H16)はリソソーム及びゴルジ体との共局在が観察された。

以上のことから、ポリヒスチジン(H16)の細胞膜透過は、L 体/D 体の構造依存的かつマクロピノサイトーシス経路を主とするエンドサイトーシス経路であることが明らかとなった。また、細胞内移行後はリソソーム及びゴルジ体に局在することが示唆された。

●本研究は JSPS 科研費 13277619 の助成を受け実施した。

cell-penetrating peptide, histidine, endocytosis

講演番号：3D03p09
講演日時、会場：3 月 29 日 15:27～ D 校舎 03 会場

非天然アミノ酸 D-Nle を含有するジペプチド誘導体の腫瘍細胞に対する細胞毒性

Mechanism for toxicity of non-natural dipeptide derivative containing D-Nle to tumor cells

○田村 丹[1]、岩崎 崇[2]、森 信寛[2]、有馬 二朗[2] ([1]鳥取大院農、[2]鳥取大農)
○Akira TAMURA[1], Takashi Iwasaki[2], Nobuhiro Mori[2], Jiro Arima[2] ([1]Grad. School of Agric. Tottori Univ., [2]Fac. of Agric. Tottori Univ.)

【目的】非天然アミノ酸の構造は無限大であり、現在までに多くが合成され、数々の生理機能が報告されている。同様に、非天然アミノ酸を含有するペプチドにも、特異な生理活性を示す例があることから、多様な機能や生理活性が期待できる素材であると考えられる。我々はこれまでに D-アミノ酸誘導体をアシル供与体として、L-アミノ酸誘導体をアシル受容体として優先的に利用してアミノリシス反応を触媒する酵素、放線菌由来 D-アミノペプチダーゼの酵素反応液から、腫瘍細胞に対して毒性を示す反応液を見出した。本研究では、毒性が見出された反応液の中から DL-Nle-OMe と L-Leu-OBzl を基質とした酵素反応液を取り上げ、腫瘍細胞に対する毒性機序について解析した。
【方法・結果】440 種類の基質の組み合わせによる酵素反応液から、ヒト由来 T-リンパ性白血病細胞 Jurkat に対し毒性を示し、正常細胞のマウス由来繊維芽細胞 NIH/3T3 に対して毒性を示さない反応液を選抜した結果、DL-Nle-OMe と L-Leu-OBzl との組み合わせが選抜された。なお、この組み合わせの未反応区からは、Jurkat に対する細胞毒性は確認されなかった。D-アミノペプチダーゼのアミノリシス活性の特徴から、主な酵素反応生成物は D-Nle-L-Nle-OMe と D-Nle-L-Leu-OBzl の 2 通りが考えられた。DL-Nle-OMe のみを基質として使用した酵素反応液では、Nle-Nle-OMe の合成が確認されたが、 Jurkat に対して高い毒性が見られず、L-Leu-OBzl を基質として加えた酵素反応液に高い毒性が見られた。酵素反応液からは D-Nle-L-Leu-OBzl の合成が確認されたことから、本研究では D-Nle-L-Leu-OBzl に着目した。D-Nle-L-Leu-OBzl の精製標品を使用し、様々な腫瘍細胞を用いて細胞毒性評価を行った結果、Jurkat に加え、ヒト由来肺ガン細胞 RERF-LC-AI、マウス由来マクロファージ様細胞 RAW264 に対し細胞毒性(IC100:125μM)を示した。D-Nle-L-Leu-OBzl に曝された Jurkat や RERF-LC-AI の培養液からは、カスパーゼ 3/7 及び乳酸脱水素酵素活性が確認されたことから D-Nle-L-Leu-OBzl による細胞死はアポトーシス及び細胞膜破壊の可能性が示唆された。そこで、D-Nle-L-Leu-OBzl 暴露時間による細胞死、膜破壊及びアポトーシス誘導の経緯を解析した結果、約 4 時間で細胞死が 50%に到達し、カスパーゼ 3/7 の活性は約 6 時間で最大値に達した。一方で培養液中の乳酸脱水素酵素活性は 8 時間 D-Nle-L-Leu-OBzl を曝露しても最大値に達しなかった。本実験結果から D-Nle-L-Leu-OBzl に曝された細胞は、膜以外の損傷等によりアポトーシスが誘導され、細胞死が引き起こされるのではないかと推測された。現在、各種カスパーゼ阻害剤を使用したカスパーゼシグナル経路を解析中である。

dipeptide, non-natural amino acid, tumor cells

講演番号：3D03p10
講演日時、会場：3 月 29 日 15:38～ D 校舎 03 会場

エリンギ由来セリンペプチダーゼ：特定の残基の酸化と変異が基質特異性を変える
Serine peptidase from *Pleurotus eringii*: Oxidation or mutation of specific residue promotes change in substrate specificity
○東海 彰太[1]、森 信寛[2]、有馬 二朗[2]([1]鳥取大院農、[2]鳥取大農)
○Shota TOKAI[1], Nobuhiro MORI[2], Jiro ARIMA[2] ([1]Grad. School of Agric. Tottori Univ., [2]Fac. of Agric. Tottori Univ.)

【目的】エリンギ（*Pleurotus eryngii*）から見出された 80 kDa の高分子アミノペプチダーゼは、MEROPS データベース上ファミリーS9 に属するセリンペプチダーゼであり、加水分解と拮抗してアミノリシス反応を触媒するため、ペプチド類合成への応用が期待される。本酵素は N 末端 β-プロペラドメイン及び C 末端触媒ドメインから構成され、β-プロペラドメインの存在が、触媒ドメインへの基質の取り込みを制限していると考えられる。これまで、本酵素のペプチド類合成への利用拡大に向け、基質認識の改変を試みてきた。その過程で、本酵素を過酸化水素で処理すると、基質特異性の変化（L-Phe-pNA 分解活性は保持され、L-Leu-pNA 分解活性が激減）が確認され、酸化された領域を探索した結果、β-プロペラドメインの一部（Leu193-Arg211）を構成する領域が特定された。本研究では、変異解析を通し、当領域に存在する残基と基質認識との関係に迫った。
【方法及び結果】推定酸化領域である Leu193-Arg211 の中で、酸化されやすい Met 及び Trp を Ala に置換し、性質を検討した結果、全ての変異で基質特異性の変化や活性の低下が確認された。特に Met203 の Ala への置換（M203A）で、酸化処理による特異性変化と似た効果が観察され、Trp198 の Ala への置換（W198A）では逆に L-Phe-pNA 分解活性のみの低下が見られた。一方で、酸化時間と特異性の推移を検討した結果、野生型酵素や W198A では、短時間の酸化で L-Phe-pNA に対する活性が一時的に上昇したが、M203A では観察されなかった。従って、Met203 が最初に酸化されてメチオニンスルホキシドとなり、周囲との相互作用ネットワークが崩れ、基質の取り込みに影響をきたすと考えられた。続いて、198 番目と 203 番目の残基の構造変化が及ぼす基質取り込みへの影響を調べるため、各残基を様々なアミノ酸に置換した。その結果、Trp198 を極性の高いアミノ酸残基（Asp、Lys）に置換すると活性が大きく低下し、側鎖が小さなアミノ酸（Ala、Ser）に置換すると L-Leu-pNA に対する活性が維持された。一方で Met203 の変異では、全ての変異で L-Leu-pNA に対する活性が低下し、水酸基を持つ Ser に置換すると、野生型酵素の短時間の酸化で見られる現象と同様、L-Phe-pNA に対する活性が野生型酵素より高くなった。本実験結果から、硫黄原子よりも電気陰性度の高い酸素原子の存在が、L-Phe-pNA 活性の上昇に大きく関与していることが考えられた。現在、基質特異性に関わる Met203 と Trp198 近傍残基の変異解析を行い、近傍部位の相互作用ネットワークと基質取り込みとの関係について、検討中である。

substrate specificity, oxidation, mutation

講演番号：3D03p11
講演日時、会場：3 月 29 日 15:49～ D 校舎 03 会場

米タンパク質由来ペプチドの抗菌・抗炎症・創傷治癒作用の解析とその機構の解明

Investigation on antimicrobial, anti-inflammatory, and wound healing actions of a peptide from rice protein and clarification of their mechanisms.

○谷口 正之、田嶋 幸司、松嶋 健太、高橋 清志、中道 俊一、落合 秋人、田中 孝明 (新潟大自然研)
○ Masayuki Taniguchi, Koji Tajima, Kenta Matsushima, Kiyoshi Takahashi, Shunichi Nakamichi, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka (Niigata Univ.)

【目的】これまでに米タンパク質由来のペプチドが，ヒト病原菌に対する抗菌活性だけでなく,エンドトキシンに直接結合して抗炎症活性などを発揮することを報告してきた。本研究では，新たに見出した米タンパク質由来のペプチド AmyI-1-18 の抗菌作用・抗炎症作用・創傷治癒作用などの生体防御に関する多機能性を明らかにすることを目的とした。すなわち，AmyI-1-18 の 10 種類のヒト病原菌に対する抗菌作用，グラム陰性菌が有するリポ多糖(LPS)またはその構成成分である Lipid A によって誘導される一酸化窒素(NO)産生に対する抑制作用，およびヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)の管腔形成促進作用を，それぞれ検討した。また，それらの作用機構に関して検討した。
【実験方法】生体防御ペプチドとして，米のα-Amylase（AmyI-1）の部分配列である 18 残基のアミノ酸からなる AmyI-1-18 を用いた。抗菌活性は，生菌に由来する ATP 量に基づく発光強度を測定することによって評価した。本研究では，エンドトキシンとして *Escherichia coli* の LPS と Lipid A を使用した。抗炎症活性は，マウスマクロファージ RAW264 を培養した後，AmyI-1-18 を LPS あるいは Lipid A と同時に添加し,一定時間培養した後に産生する NO を定量することによって評価した。創傷治癒活性は，HUVEC の管腔形成促進作用によって評価した。抗菌作用機構は，細胞膜への作用を主にフローサイトメーター用いて検討した。LPS あるいは Lipid A と AmyI-1-18 の親和性は，AmyI-1-18 をセンサーチップに固定化し，Biacore システムを用いて測定した。
【結果】AmyI-1-18 は，RAW264 細胞 に対して 1.2 mM の濃度においても細胞毒性を示さなかった。AmyI-1-18 は，歯周病菌，ニキビ菌，日和見感染真菌などに対して抗菌活性を示した。AmyI-1-18 の細胞膜への作用は，これまで報告してきたペプチドに比べて弱かった。RAW264 細胞を 100 ng/mL の LPS または Lipid A で刺激した場合に NO の産生は著しく増加したが,AmyI-1-18 を添加することによって，NO の産生を抑制できた。Biacore システムを用いて LPS と AmyI-1-18 の親和性を測定した結果、解離定数は 10^{-10} オーダーであり，両者は強く結合することがわかった。したがって，AmyI-1-18 は LPS に直接結合することによって,抗炎症作用を発揮していると考えられる。現在,AmyI-1-18 による HUVEC の管腔形成促進作用について検討している。

host defense peptide, antimicrobial peptide, wound healing

講演番号：3D03p13
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ D 校舎 03 会場

こんにゃく飛粉を用いた機能性ペプチドの開発

Development of functional peptides from Tobiko (Fly Powder of Konjac).

○田中 雅幸、高屋 朋彰（小山高専物質）
○Masayuki TANAKA, Tomoaki KOUYA (Oyama NCT.)

【背景・目的】こんにゃく製造時に副産物として生じるこんにゃく飛粉（飛粉）は，年間 4000 トン程度排出される農産廃棄物である．飛粉は多くのタンパク質や糖質を含んでいる一方，えぐみや刺激臭があることなどから有効な利用法が確立されておらず，焼却による CO_2 の増加，焼却コスト増による農家への負担，悪臭などが問題となっている．本研究では，飛粉を用いた機能性ペプチドの開発を目的として，飛粉の酵素加水分解条件の検討，限外ろ過膜およびゲルろ過クロマトグラフィーを用いた飛粉ペプチドの分離・分画，および得られた飛粉ペプチドの機能性評価について検討を行った．

【方法】プロテアーゼは，市販の酵素製剤 9 種類を用いた．50 mM Glycine-HCl buffer (pH 2.5)，または 50mM Phosphate buffer (pH 7.0, pH 8.0)の各緩衝液と飛粉を混合し, 飛粉タンパク質あたり 1%（w/w）の酵素を添加した．24 時間の酵素反応後，遠心分離（20，000×g， 10 min）により培養上清を回収した．培養上清中のタンパク質濃度は Lowry 法，分子量分布はポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）による評価を行った．次に，加熱処理（121℃，20 分間）によって飛粉中に含まれるプロテアーゼインヒビターを失活処理した後，飛粉タンパク質の加水分解における酵素反応時間の最適化を検討した. 最適化した酵素反応条件によって調製した飛粉ペプチド溶液は, 限外ろ過膜（MWCO 10,000）を用いて高分子成分の除去を行った後, ゲルろ過クロマトグラフィー（HiLoad 16/600 Superdex 30 pg，GE ヘルスケア）を用いた分子量分画を行った．

【結果】プロテアーゼとしてパパインを用いた場合, 飛粉タンパク質の低分子化が確認された. また，パパインとペプチダーゼを組み合わせて用いた結果，飛粉タンパク質の低分子化が促進された．加熱処理した飛粉に対して，パパインとペプチダーゼを用いた酵素反応を行うことにより，40℃，3 時間の反応条件で飛粉ペプチドを調製することが可能となった．調製した飛粉ペプチドを限外ろ過（Mw<10,000）した後にゲルろ過クロマトグラフィーを行った結果， 4 つの画分が得られた．現在，これらの画分について機能性評価を行っている．

Tobiko, peptide, *Amorphophallus konjac*

講演番号：3D03p14
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ D 校舎 03 会場

主鎖骨格にアゾール環を含むペプチド合成法の開発

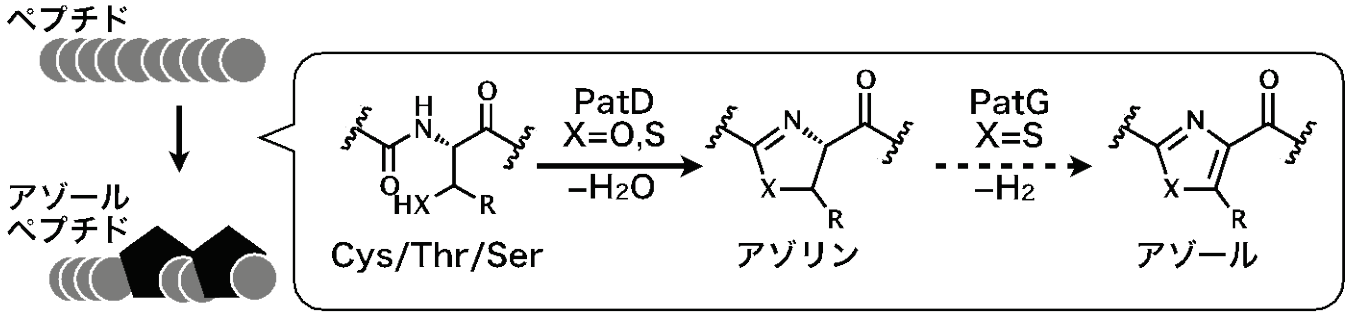
Synthesis of peptides containing azole moieties

○加藤 保治、後藤 佑樹、菅 裕明（東大院理）
○Yasuharu KATO, Yuki GOTO, Hiroaki SUGA (Univ. of Tokyo)

天然に存在する生理活性ペプチドには主鎖骨格に複素環構造を持つものが存在し、この複素環構造がペプチドの生理活性に寄与していると考えられる。中でもアゾール環構造をもつもの（以下、アゾールペプチド）は、アゾール環のπ電子や剛直性といった通常のペプチドにはない特徴をもつため、アゾールペプチドライブラリーの構築が、新しい生理活性ペプチドの開発に有用であると考えられる。

このようなアゾールペプチドライブラリーの構築法として、天然物の生合成系の利用が一つの方法としてあげられる。例えば、シアノバクチンの生合成に関わる翻訳後修飾酵素 PatD、PatG は、基質ペプチド配列中のシステインを修飾し、チアゾールを合成する。この反応においては脱水複素環化酵素 PatD がシステインからチアゾリンを合成し、続いて脱水素酵素 PatG がチアゾリンからチアゾールを合成する。この翻訳後修飾反応は酵素反応としては基質許容性が高く、様々な修飾配列を許容するが、依然として合成可能なアゾールペプチドの配列がチアゾール合成酵素の基質許容性に制限されるという問題が存在する。

本発表では、チアゾール合成酵素の基質許容性に制限されない、アゾールペプチドの新しい合成法について報告する。



azole containing peptide, peptidic natural product, post-translational modification

講演番号：3D03p15
講演日時、会場：3 月 29 日 16:32～ D 校舎 03 会場

赤血球中に含まれる Aβ凝集体の検出

Detection of amyloid-ß aggregates in erythrocytes

○細見 恵里、小森谷 友絵、神野 英毅、吉宗 一晃（日大生産工）
○Eri HOSOMI, Tomoe KOMORIYA, Hideki KOUNO, Kazuaki YOSHIMUNE (Nihon Univ.)

【緒言】近年、社会の高齢化に伴いアルツハイマー病(AD)の患者数は増加傾向にある。AD の発症機構は完全には解明されていないが、その主要な病理変化の一つである老人斑の主成分であるアミロイドβタンパク(Aβ)凝集体が深く関与していると考えられている。AD の治療法は未だ確立されていないが、薬物等で症状の進行を遅らせることは可能であり、早期発見による予防が重要視されている。しかしながら AD の客観的な判断基準は無く、PET や MRI 等の脳画像による診断、髄液中の Aβ濃度やタウ蛋白質等の生物学的マーカーによる早期診断が検討されている。しかし、髄液検査は負担が大きく感染リスクを伴うため、健康診断でも利用できる簡便な診断方法ではない。このため血液を用いた AD 診断の可能性も検討され、抗 Aβ抗体を用いた ELISA により赤血球中に Aβが存在することが報告されている。我々は直径 20 から 400nm 程度の非晶質の Aβ凝集体と特異的に反応し、Aβモノマーや線維状 Aβと反応しないモノクローナル抗体を 9 種類作製した。本実験では、これらの抗体を用いてヒト赤血球(Lee BioSolutions, Inc)中に含まれる Aβ凝集体濃度を、サンドイッチ ELISA 法により測定したので報告する。

【実験操作】Aβ凝集体のみを認識する 9 つのモノクローナル抗体の中から、異なる 2 種類の抗体を捕獲抗体および検出抗体として用い、サンドイッチ ELISA において高感度に Aβ凝集体を検出できる抗体の組み合わせを選択した。検出抗体は HRP を直接標識した HRP 標識、HRP をアビジンに標識し、ビオチンを結合させた抗体と反応させるアビジン・ビオチン標識の 2 種類を作製し、それらの感度を比較した。基質には o-Phenylenediamine dihydrochloride(OPD)を使用し、生成物の 492nm での吸光度を測定した。さらにこの系を用いてヒト赤血球中に含まれる Aβ凝集体濃度を測定した。赤血球は等量の蒸留水を添加して溶血し、赤血球中に含まれるタンパク質 1mg あたりの濃度として計算した。

【結果と考察】Aβ凝集体と特異的に反応する 9 種類の抗体のうち、抗体 77-3 および 37-11 をそれぞれ捕獲抗体および検出抗体とした場合が最も検出感度が高くなった。またアビジン・ビオチン標識ではなく直接 HRP を標識した方が、約 10 倍感度が向上した。この最も検出感度が高くなる条件において 0.3nmol/ml 程度の Aβ凝集体を再現性良く検出することができた。この反応系でヒト赤血球中に含まれる Aβ濃度を調べたところ、赤血球中のタンパク質 1mg あたり 50pmol(226ng)の Aβ凝集体が検出された。

Alzheimer's disease, amyloid-ß aggregates, ELISA

講演番号：3D03p16
講演日時、会場：3 月 29 日 16:43～ D 校舎 03 会場

硫酸イオン塩架橋による Bacillus sp.TB-90 ウリカーゼの耐熱化
Thermal stabilization of *Bacillus* sp.TB-90 Uricase by salt bridges with sulfate
○林 祐太[1]、伊藤 貴文[1]、西矢 芳昭[2]、深田 はるみ[3]、日ビ 隆雄[1] ([1]福井県立大生物資源、[2]摂南大理、[3]大阪府立生命環境)
○Yuta Hayashi[1], Takahumi Itoh[1], Yoshiaki Nishiya[2], Harumi Fukada[3], Takao Hibi[1] ([1]Fukui Prefectural Univ, [2]Setsunan Univ, [3]Osaka Prefectural Univ)

Bacillus sp.由来のウリカーゼは、分子量 38,000 のサブユニットから構成されるホモ４量体の酵素であり、極めて特異的に尿酸の酸化反応を触媒することから尿酸の酵素定量に広く用いられている。また臨床分析への応用の他に、高尿酸血症の治療薬、美白用化粧品、毛髪染色の反応開始剤などの用途にも利用されている。本酵素の熱安定性について調べたところ、塩濃度の増加に伴って変性温度が上昇する現象を見出した。そこで、今回はその特性について検討した。

【方法】

Thermal shift assay 法は、Life technology 社の Thermal shift assay kit を用い、StepOne PCR 装置を使用して測定し、変性温度の解析は二状態変性を仮定して行った。示差走査型熱量測定(DSC)は nanoDSC 示差走査型熱量計を用い、昇温速度 1 ℃/min で行った。結晶化は、N 末端および C 末端領域の欠損変異体として Δn6Δc13 変異体を作製し、ハンギングドロップ蒸気拡散法で単結晶を得た。つくばフォトンファクトリーAR のビームライン NW-12A で X 線回折測定を行い、1.75Å分解能のデータを収集し、結晶構造解析を行った。

【結果及び考察】

添加する塩のアニオン種およびその濃度が熱安定性に与える影響を、蛍光色素を利用する Thermal shift assay 法により調べた結果、硫酸イオンで最も大きな安定化効果が認められた。1 M Na_2SO_4 添加時で変性温度は約 10° C 上昇した。Na_2SO_4 添加時の熱安定性を DSC により分析した結果、低イオン強度条件下では明瞭な２つの変性ピークが認められ、塩濃度が高まるにつれて低温側ピークが高温側に大きくシフトすることが見いだされた。低温側ピークは酵素濃度やリガンド濃度の増加によっても高温側にシフトしたが、高温側ピークではこのような現象は認められなかった。ゲルろ過クロマトグラフィーにより、硫酸ナトリウム濃度上昇に伴いサブユニットの解離が抑えられ、同時に熱変性が抑制されることが示された。X 線結晶構造解析の結果、2 回対称で関係付けられる異なるサブユニットの Arg298 が硫酸イオンを介して塩結合していることが判明した。そこで Arg298 を Glu に変えた変異体 R298E を作製し DSC 解析を行った結果、高温側変性ピークが大きく低温側にシフトし、Arg298-硫酸イオンの塩架橋が４量体構造の安定化に関わることが示唆された。

enzyme, thermal shift assay, crystallization

講演番号：4A01a02
講演日時、会場：3 月 30 日 09:11～ A 校舎 01 会場

Clostridium thermocellum によるリグノセルロースからの直接グルコース生産法
Direct Glucose Production from Lignocellulose Using *Clostridium thermocellum* Cultures
○小杉 昭彦[1,2,3]、Prawitwong Panida[1]、Waeonukul Rattiya[4]、Ratanakhanokchai Khanok[4]、Deng Lan[1]、森 隆[1]([1]国際農研センター、[2]筑波大院　生命環境、[3]鳥取大院　生物資源、[4]King Mongkut's University)
○akihiko KOSUGI[1,2,3], Panida Prawitwong[1], Rattiya Waeonukul[4], Khanok Ratanakhanokchai[4], Lan Deng[1], Yutaka Mori[1] ([1]JIRCAS, [2]Tsukuba Univ, [3]Tottori Univ, [4]KMUTT)

【目的】 好熱嫌気性細菌 *Clostridium thermocellum* はセルロース高分解活性を有するセルロソームを生産する。セルロソームのセルロース分解能を最大限引き出すためには、その生成物であるセロビオースによる活性阻害を回避する必要があり、β-glucosidase の利用により大きく改善される。私たちは、セルロースを炭素源とし、*C. thermocellum*の培養時にβ-glucosidaseを共存させることで、セルロース高分解が起こるだけでなく、培養液にグルコースを生産し蓄積できることを見いだした。
【結果】 結晶性セルロース(シグマセル)10 % (w/v)を含む培地に *C. thermocellum* を植菌し、6 時間後、*Thermoanaerobacter brockii*のβ-glucosidase (CglT)を 30 U/g セルロースとなるように添加した。その結果、セルロースは完全糖化され、培養液には 7.0 %のグルコースを生産、蓄積していた。対照として CglT を添加しない *C. thermocellum* の培養では、大部分のセルロースが糖化できずに残存し培養液中へのグルコースの蓄積も認められなかった。また耐熱性の低いβ-glucosidase の使用は同じく低糖化率となる。これらの結果から、*C. thermocellum*の培養時、耐熱性を有するβ-glucosidaseを共存させると、セルラーゼを加えずともセルロースからグルコースを生産し、培養液に蓄積される。一方、アルカリ前処理を行った稲わら 10 % (w/v)を用い *C. thermocellum* を利用した生物学的糖化法を行った結果、同様にグルコース 7.2 % (w/v)が培養液に生産、蓄積できた。このグルコースを蓄積した培養液を直接用いて酵母 *S. cerevisiae* によるエタノール発酵を行ったところ、発酵阻害なく 3.2% (w/v)のエタノールを生産することができた。
【結論】 この *C. thermocellum*を利用した生物学的糖化法は、従来 SHF 法で行われていたセルラーゼ生産と糖化反応を統合させる新しいセルロース糖化プロセスの提案である。私たちはこの糖化法に BSES(Biological Simultaneous Enzyme-production and Saccharification)法と名付けた(1)。BSES 法は従来、糖化の際に必要なセルラーゼ糖化酵素を全く使用しない。*C. thermocellum*の増殖過程で生産されるセルロソームとCglTの高糖化能と、*C. thermocellum* の単糖低資化能を利用し、グルコース等糖質を培地中に直接生産、蓄積させるセルロースからのグルコース生産方法である。これまでの酵素糖化技術の中で、最も安価な糖化プロセスとなり得ると考える。

本研究の一部は農林水産省「農山漁村におけるバイオ燃料等生産基地創造のための技術開発」の支援のもとで行われた。

(1) Prawitwong P, et al: *Biotechnology for Biofuels*, in press.

Clostridium thermocellum, Lignocellulose, ß-Glucosidase

講演番号：4A01a03
講演日時、会場：3 月 30 日 09:22～ A 校舎 01 会場

ソフトバイオマス分解を目指した *Clostridium cellulovorans* のエキソプロテオーム解析
Exoproteome analysis of *Clostridium cellulovorans* for soft-biomass degradation

○江坂 康平[1]、松井 一真[1]、森坂 裕信[1,2]、黒田 浩一[1]、三宅 英雄[3]、田丸 浩[3]、植田 充美[1,2]([1]京大院・農・応用生命、[2]京都バイオ計測センター、[3]三重大院・生資)
○ Kohei ESAKA[1], Kazuma MATSUI[1], Hironobu MORISAKA[1,2], Kouichi KURODA[1], Hideo MIYAKE[3], Yutaka TAMARU[3], Mitsuiyoshi UEDA[1,2] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Kyoto Integrated Science & Technology Bio-Analysis Center, [3]Dept. Life Sci. Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ.)

【背景・目的】バイオリファイナリーにおいて、ソフトバイオマスを分解できる中温性絶対嫌気性細菌 *Clostridium cellulovorans* が注目を集めている。これを可能にするのが、菌体外に生産されるセルロソームと呼ばれるタンパク質超複合体と、分泌型の糖質分解関連酵素であるノンセルロソーマルタンパク質群の共役である。我々は、セルロソームにフォーカスしたプロテオーム解析により、*C. cellulovorans* は基質に応じてセルロソーム構成タンパク質の生産プロファイルを変化させ、最適な組み合わせにすることにより、効率的なバイオマスの分解を実現していることを報告してきた[1]。さらに、ペクチン、キシランなどの標品多糖を基質とした培養液中に含まれる全タンパク質（エキソプロテオーム）のプロファイルを定量的に解析した結果、ノンセルロソーマルタンパク質もバイオマス分解に大いに寄与していることが分かった[2]。そこで、本研究では、これらの基礎的な知見を応用して、稲わらなどの実バイオマス分解系の最適化を目指し、実バイオマスを基質とした培養液中のエキソプロテオーム解析を行った。
【方法・結果】ソフトバイオマスであるバガス、ジャームカス、稲わらと、対照としてセロビオースを炭素源として *C. cellulovorans* を嫌気条件下で 2 週間培養し、菌体内タンパク質を指標に、生育を確認した。その後、培養上清の濃縮、トリプシン消化を行い、抽出したタンパク質由来のペプチドに、比較定量分析のための安定同位体ラベルを導入した。その後、独自に開発したロングモノリスカラム (470 cm) を用いた nanoLC-MS/MS システム[1] により、発現タンパク質のプロファイル定量解析を行った。そのデータ解析の結果、分解基質によるエキソプロテオームの量的変化を網羅的に明らかにすることに成功した。さらに、ゲノム情報を組み合わせた解析結果をまとめて報告する。

[1] H. Morisaka *et al*., *AMB Express*, 2, 37 (2012)
[2] K. Matsui *et al*., *Appl. Environ. Microbiol.,* 79, 6576-6584 (2013)

Clostridium cellulovorans, Quantitative proteome analysis, Cellulosome

講演番号：4A01a04
講演日時、会場：3 月 30 日 09:33～ A 校舎 01 会場

Clostridium cellulovorans の基質認識の解析
Analysis of substrate recognition mechanism of *Clostridium cellulovorans*
○油屋 駿介[1]、江坂 康平[1]、森坂 裕信[1,2]、黒田 浩一[1]、植田 充美[1,2]（[1]京大院・農・応用生命、[2]京都バイオ計測センター）
○Shunsuke Aburaya[1], Kohei Esaka[1], Hironobu Morisaka[1,2], Kouichi Kuroda[1], Mitsuyoshi Ueda[1,2]
([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Kyoto Integrated Science and Technology Bio-Analysis Center)

【背景・目的】中温絶対嫌気性菌 *Clostridium cellulovorans* は、菌体外にセルロソームを形成して、非常に効率良くソフトバイオマスを分解できる[1]。セルロソームは、足場タンパクの上に多数の糖質分解関連酵素を集積した巨大な酵素複合体である。*C. cellulovorans* はセルロソーム上の酵素群と分泌酵素群の組み合わせを基質に応じて最適化してこれらを巧みに共役させていることが知られているが[1]、どのようにして基質を認識し、それぞれの基質に応じた最適な酵素群を発現しているのかはまだ明らかになっていない。そこで、我々が世界に先駆けて明らかにした *C. cellulovorans* の全ゲノム配列解析の結果[2]と、開発した nanoLC-MS/MS[3]を用いて実際の培養液からのタンパク質プロファイルを併せて解析することにより、認識機構の解析を試みた。
【方法・結果】これまで生産タンパク質プロファイルの変動が大きいと報告されている基質を用いて[1], *C. cellulovorans* を嫌気条件下で培養し、菌体から抽出したタンパク質と、濃縮した培養上清のタンパク質を、それぞれトリプシン消化により断片化を行った。調製したペプチド断片を安定同位体でラベル化した後、独自に開発したロングモノリスカラム[3]を用いた nanoLC-MS/MS システムによるプロテオーム解析を行い、基質の成分のタンパク質プロファイルに与える影響を報告する。
[1] K. Matsui *et al*., *Appl. Environ. Microbiol.*, 79, 6576-6584 (2013)
[2] Y. Tamaru *et al*., *J. Bacteriol.*, 192, 901-902 (2010)
[3] H. Morisaka *et al*., *AMB Express*, 2, 37 (2012)

Clostridium cellulovorans, substrate recognition, quantitative proteome analysis

講演番号：4A01a05
講演日時、会場：3 月 30 日 09:44～ A 校舎 01 会場

Clostridium paraputrificum による水素ガス生産向上のための培養条件の検討と代謝関連遺伝子の発現解析

Control of hydrogen gas production by *Clostridium paraputrificum*

中西 有斗[1]、大石 琢馬[1]、黒岩 千智[1]、大島 健志朗[2]、服部 正平[2]、粟冠 真紀子[1]、○木村 哲哉[1]、粟冠 和郎[1] ([1]三重大院生資、[2]東大院新領域)

Yuto Nakanishi[1], Takuma Oishi[1], Chisato Kuroiwa[1], Kenshiro Oshima[2], Masahira Hattori[2], Makiko Sakka[1], ○Tetsuya Kimura[1], Kazuo Sakka[1] ([1]Mie Univ., [2]Univ. Tokyo)

【目的】*Clostridium paraputrificum* M21 株はキャンパス土壌から単離された嫌気性菌であり、難分解性バイオマスであるキチンを分解することができ、短時間で増殖して水素を生産する。この性質を利用し、*C. parputrificum*M21 による水素ガス生産の効率化を検討している。すでに、本菌のヒドロゲナーゼ A 遺伝子(*hyd*A)をクローニングし、高発現させて水素ガス生産量を 29%向上させることができたが期待したほどではなかった。そこで、培養条件の改良による水素ガス生産の効率化を検討した。さらに、糖代謝経路のなかでピルビン酸から乳酸と酢酸、酪酸への代謝経路は水素ガス生産と密接に関連していることから、本菌の水素ガス生産を解明するため全ゲノム配列の決定を行い、ピルビン酸代謝酵素遺伝子を検索してそれらの発現について解析を行った。

【方法】培養は 0.5L の GS 改変培地を用い 1L のジャーで嫌気的に行った。発生した気体は水上置換法で回収し、水素ガスはガスクロマトグラフィーで分析した。また、培養上清中の有機酸を HPLC 法で分析した。サンプリングした培養液から遠心分離によって菌体を回収し、RNA を抽出して cDNA を合成し、遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法で解析した。

【結果】従来培養に使ってきた GS 改変培地には緩衝液として高価な MOPS を用いていたが、MOPS 無添加でも水素生産に差はなかった。ヒドロゲナーゼを始めとする水素生産に関わる酵素の多くはその構造内に鉄を必要とするため、培地に添加する鉄イオン($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)の濃度検討を行った。その結果、鉄イオンの濃度には依存せず微量（5mg/L）の添加でも水素ガス生産性が 70%向上した。添加する鉄イオンは 2 価でも 3 価でも効果は同じであった。水素ガスの増加に伴い、乳酸の生産が抑制され、酢酸と酪酸の生産が増加した。これは *hydA* 遺伝子の高発現でも見られた現象であり、解糖によって生じたピルビン酸からアセチル CoA を経て酢酸や酪酸への流れが促進された結果と考えられた。ゲノム解析の結果から、本菌は 3,489,469bp の配列を持っていた。配列を解析したところ、*Clostridium* で報告されているピルビン酸代謝系遺伝子は良く保存されていた。リアルタイム PCR でこれらの遺伝子の発現を調べたところ、鉄の添加はこれらの発現を促進していなかった。培養初期に乳酸を添加したところわずかに水素ガス生産が増加した。また、酢酸や酪酸を添加した場合は増殖が阻害され水素ガスの生産が抑制された。

Clostridium, hydrogen, hydrogenase

講演番号：4A01a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ A 校舎 01 会場

バイオ電池構築のための超好熱性古細菌 *Pyrobaculum aerophilum* 由来 multicopper oxidase を用いたバイオカソード

Biocathode for biofuel cell using multicopper oxidase from hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum aerophilum*

○末 信一朗[1]、内井 俊貴[1]、坂元 博昭[1]、里村 武範[1]、櫻庭 春彦[2]、大島 敏久[3] ([1]福井大院工、[2]香川大農、[3]大阪工大)
○Shin-ichiro SUYE[1], Toshiki UCHII[1], Hiroaki SAKAMOTO[1], Takenori SATOMURA[1], Akihiko SAKURABA[2], Toshihisa OHSHIMA[3] ([1]Univ. Fukui, [2]Kagawa Univ., [3]Osaka Inst. Tech.)

［緒言］
東日本大震災以降、エネルギー供給の在り方が根本から見直されている。持続可能な社会の構築のためにもバイオマスをエネルギー源とすることは極めて重要である。なかでもバイオ電池は電極の触媒が酵素であることから温和な条件で作動が可能であり、燃料はセルロースやデンプンの糖化液等のバイオマス資源が利用可能であることから環境への負荷などの点で優れている。
バイオ電池構築では電極の構成が鍵となり、カソード電極用の生体触媒としてマルチ銅オキシダーゼ(MCO)が一般に用いられている。一方で MCO は安定性が極めて低いという問題があった。そこで我々は超好熱性アーキア由来の *Pyrobaculum aerophilum*(MCOP)のバイオ電池のカソード触媒としての可能性について電極のカーボンナノチューブ(CNT)による修飾と併せて検討した。
［実験］
MCOP は組換え体大腸菌より精製した。ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) と CNT を混合し 3 日間撹拌することで分散させ、上清を除去した後に MCOP を添加した。MCOP, ABTS, CNT 混合液をカーボン電極上に滴下し風乾した後にナフィオン溶液を添加し固めることで MCOP, ABTS, CNT 電極を調製した。電気化学測定は 3 電極方式を用いた。
［結果と考察］
精製した MCOP は常温条件下で 30 日間経過した後も当初の約 80%の活性を維持していた。
飽和酸素存在条件下で MCOP, ABTS, CNT 電極の特性を評価したところ、本電極の電流密度は 90.7 $\mu A/cm^2$ であった。これは、MCOP と MABTS を吸着固定させた電極と比較すると約 9 倍の値を示した。

biofuel cell, biocathode, carbon nano tube

講演番号：4A01a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ A 校舎 01 会場

バイオ燃料電池のための *Pyrobaculum aerophilum* 由来 PQQ 依存型グルコース脱水素酵素配向固定化によるバイオアノードの構築

Construction of bioanode using oriented immobilization of PQQ-dependent glucose dehydrogenase from *Pyrobaculum aerophilum*

○向當 綾子[1]、坂元 博昭[1]、里村 武範[2,3]、末 信一朗[1,2,3]([1]福井大学院・工・繊維、[2]福井大学院・工・生物応用化、[3]福井大学・生命セ)
○Ayako KOUTOU[1], Hiroaki SAKAMOTO[1], Takenori SATOMURA[2,3], Shin-ichiro SUYE[1,2,3] ([1]Dept. Front. Fib., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [3]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui)

[緒言]

酵素を触媒とするバイオ燃料電池は、安全性が高い、軽量化・小型化が容易であるといった利点から次世代エネルギーとして期待されているものの、電子移動効率や酵素の安定性などの問題から、実用化への道のりは遠いものとされてきた。そこで本研究ではバイオ電池用の生体触媒として超好熱性古細菌由来酵素に注目した。超好熱菌由来酵素は安定性が高く、電池の長期駆動が期待される。*Pyrobaculum aerophilum* 由来 PQQ 依存型 グルコース脱水素酵素(PQQ-GDH)に His-tag を導入し(PQQ-GDH(His-tag))、金電極上に電析した銅原子を介して酵素分子を一定方向に配向させたアノードを構築し、電極表面での酵素分子の配向性を検討した。また、同時に高出力を目指して、高い電気伝導性、高い比表面積をもつ多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を用いた電極の構築を行った。

[実験]

・電極表面への酵素直接配向固定　洗浄した電極を硫酸銅溶液(100 mM $CuSO_4$, 100 mM NaCl)中で定電位印加(-0.3 V vs. Ag/AgCl, 5 min)することにより電極表面に銅を電析させた。その後 sp 水で電極表面を洗浄し、PQQ-GDH(His-tag)溶液(0.98 mg/ml)に浸漬(5 min, 室温)し酵素を固定化させた。作製した電極上での酵素と基質との反応をサイクリックボルタンメトリー(CV)によって電気化学的に評価した。

・MWCNT-酵素配向固定化複合体の調製　50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)buffer に MWCNT(φ＝10-20 nm, L＝5-15 μm))1 mg とピレン酪酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(Pyrene(NHS)) 0.4 mg を加え、超音波処理を 3 時間行い、MWCNT の分散液を調製した。さらに、N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid(AB-NTA)を 1.3 mg 加え 2 時間、その後終濃度 50 mM となるように $NiCl_2$ を加えて 30 分間それぞれインキュベートし、MWCNT 表面に酵素固定化アンカーを修飾した。洗浄後、MWCNT 分散溶液に 1 mg/ml となるように酵素を加え 5 分間インキュベートし PQQ-GDH を His-tag を介して固定化することで MWCNT-酵素配向固定化複合体とした。

[結果と考察]

・直接的配向固定化による酵素電極反応への影響　酵素を電極表面に配向固定化させたところ、ランダムに固定化させた電極よりも 90 倍大きな電流密度を得た。電極上に固定化された酵素量は、両電極とも顕著な差は見られず、酵素の配向性が基質との接触性や電極との電子授受に寄与しているために電極反応効率が良いと考えられる。

・MWCNT-酵素複合体の酵素活性の確認　調製した MWCNT-酵素配向固定化複合体は基質であるグルコースを酸化することが確認され、酵素活性を有していることがわかった。今後は MWCNT-酵素配向固定化複合体を電極に修飾し、バイオアノードとしての評価を行う。

Bio-fuel cell, Oriented immobilization, Carbon nanotube

講演番号：4A01a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ A 校舎 01 会場

微生物燃料電池による霞ヶ浦湖底堆積物のバイオマスエネルギーとしての利用

Utilization of Lake Sediment by Microbial Fuel Cells in Kasumigaura

○返町 洋祐[1]、丹羽 晋太郎[1,2]、星野 貴行[1] ([1]筑波大生命環境、[2]茨城水試)
○Yosuke SORIMACHI[1], Shintaro NIWA[1,2], Takayuki HOSHINO[1] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]Ibaraki Fisheries Institute)

［目的］ 霞ケ浦は国内第 2 位の面積を有する平均水深 4 m の淡水湖である。近年は改善されつつあるが、長年の富栄養化の影響により湖底には多量の有機堆積物が存在している。本研究では、この湖底堆積物を利用して、フィールドでの微生物燃料電池による発電を試みることにより、霞ヶ浦における水産現場での小型電子機器の電源への応用を目指すこととした。従来の微生物燃料電池は下水処理場での利用が多く、電池内部に廃液などを取り込む構造のものが多い。これに対して、我々は湖底に電極を設置するという完全な開放系での発電を目指した。また、現場での実用化を考慮して、白金触媒などの高価な材料を用いない安価な電極の開発も課題とした。

［方法］ 発電実験は茨城県水産試験場内水面支場に設置される桟橋の、湖岸距離約 100 m、水深 4.5 m の地点で実施した。漁業用の筒状プラスチック網を利用し、先端部にアノード（燃料極）を、そこから様々な距離をおいてカソード（空気極）を、それぞれ炭素繊維を材料として設けた。アノードが湖底堆積物に埋没するように電池を設置し、外部抵抗を介して接続された両極間の電位差を、データロガーで記録することで出力を測定した。電極として用いた炭素繊維については、アノード側は空気中での加熱による酸化での電極表面へのキノン等の含酸素官能基の賦与、カソード側では混酸を用いたニトロ基の賦与、といった化学修飾の効果をサイクリックボルタンメトリー等の電気化学的手法によって評価した。

［結果］ それぞれの電極の修飾処理は、電流密度の向上や過電圧の低減に有効であった。また、桟橋に設置した微生物燃料電池のアノードーカソード間の距離は、0.5 m が最適であることが明らかとなった。これらの結果に基づいて、アノード・カソードともに修飾された炭素繊維電極で製作した電池では、霞ヶ浦への設置後 1 ヶ月間の積算発電量が、無修飾電極を用いた場合と比較し、6.5 倍に増大した。夏季～秋季にかけては最大で 0.4 mW の出力が得られ、発光ダイオードを点灯させることができた。今後、スケールアップや装置の改良を行うことにより、養殖桟橋や定置網等の夜間における危険回避のための目印などとして利用できる可能性が強く示唆された。

biomass energy, microbial fuel cell, hydrosphere

講演番号：4A01a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ A 校舎 01 会場

非白金水素エネルギー変換系につなげるヒドロゲナーゼの電気化学的アプローチ

Bioelectrochemistry of Hydrogenase as a Non-platinum Electrocatalyst

○宋 慶盛[1]、河井 翔太[1]、北隅 優希[1]、白井 理[1,2]、西原 宏史[3]、加納 健司[1,2] ([1]京大院農、[2]Crest、[3]茨城大農)
○Keisei SO[1], Shota KAWAI[1], Yuki KITAZUMI[1], Osamu SHIRAI[1,2], Hirofumi NISHIHARA[3], Kenji KANO[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]Crest, [3]Ibaraki Univ.)

【目的】
次世代型水素エネルギー社会構築のため，世界を挙げてプロジェクトが進行している．その中でも，非白金水素酸化触媒の開拓が急務である. 生体触媒のヒドロゲナーゼは Ni や Fe で構成される活性中心を持つタンパク質であり，本要求を満たす新規触媒に該当する．本酵素は白金に匹敵した触媒能を有する上に，最小過電圧での水素酸化が可能であり，革新的な生物電気化学的エネルギー変換デバイス（バイオ電池）を創成できる．本研究は国内外を問わず，盛んに推進されているが，酸素による失活が急所となり実用化には至っていない．そこで我々は，酸素耐性を兼ね備えた *H. marinus* 由来膜結合型[NiFe]ヒドロゲナーゼに着目した．しかしながら，ヒドロゲナーゼ固有の現象である“酸化的不活性化反応”ももうひとつに大きな障壁となる．本反応は過剰な酸化的ストレスで，活性部位の Ni が一電子酸化を受け，水が Ni に配位し不活性化する，つまり“拮抗阻害”機構で進行すると考えられる．本反応は，大過剰水素濃度の反応場により抑止可能と考えられるが，飽和溶存水素濃度は約 0.7 mM のため溶存系からの脱却が必須である．そこで，酵素反応のための親水性と，気相側から水素供給のための撥水性を制御したガス拡散型電極の構築・利用を図った．ガス拡散系では，溶存系に対して 50 倍以上の水素濃度，45 mM（水素分圧 100%，理想気体で換算）を実現できる．本発表では，K_m 値を定量し，両実験系での電気化学的挙動を考察し，本不活性化反応の抑止を目的とした．
【方法】
溶存系：多孔性炭素材料で電極を作製後，電極上に酵素を修飾し，電気化学測定を行った．
ガス拡散系 : 炭素材料とフッ素樹脂を混合し，ガス拡散型電極を作製後，同様の修飾・測定を行った．
【結果と考察】
溶存系で水素濃度を規定した触媒電流値の水素濃度依存性の新規解析法を提示した．それに基づいて解析すると，電極上酵素の K_m 値は約 0.6 mM となった．本 K_m 値と飽和溶存水素濃度（約 0.7 mM）の関係から，酵素の約半数のみが酵素基質複合体であり，溶存系では“拮抗阻害”機構である本不活性化が進行しやすいと考察した．一方，ガス拡散型電極で水素供給量が大幅に増加したところ，本不活性化が観測されず，反応抑止に成功した．ガス拡散系では，前述の K_m より大過剰な水素濃度により，酵素基質複合体数が支配的となることが要因と結論した．本結果は，“酸化的不活性化反応”を初めて抑止した例であり，バイオ電池実用化に繋がる大きなブレークスルーである．

hydrogenase, biofuel cell, non-platinum

講演番号：4A01a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ A 校舎 01 会場

アルカリ性条件下における微生物燃料電池の構築

Construction of microbial fuel cell using alkaliphilic bacteria

○江邉 正平[1]、大池 達矢[1]、岡南 政宏[1,2]、阿野 貴司[1,2] ([1]近大院生物理工、[2]近大生物理工)
○Shohei EBE[1], Tatsuya OIKE[1], Masahiho OKANAMI[1,2], Takashi ANO[1,2] ([1]Grad. Sch. BOST, Kinki Univ., [2]Dept. Biotechnol. Sci., Kinki Univ.)

【目的】

微生物燃料電池（Microbial fuel cells：MFC）は、微生物が有機物を分解した際に生じる還元力を電子という形で取り出し、発電に用いる装置である。大部分の廃水処理場では活性汚泥法が行われている。その廃水中の有機物を微生物が分解するプロセスを MFC に置換えることで、廃水の浄化と電力生産が可能になるため、この技術は廃水処理における応用が期待されている。

活性汚泥中の微生物群の制御は難しいため、一般的な細菌が生育できない高 pH という極限条件下で生育することが出来る好アルカリ性菌に着目した。本研究の目的は環境中から発電能力を有する好アルカリ性菌群を分離し MFC を構築することである。

【方法】

土壌や河川水を含む環境中サンプルから好アルカリ性菌スクリーニング培地である Horikoshi - I 液体培地（glucose 1%, polypeptone 0.5%, yeast extract 0.5%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, Na_2CO_3 1%）を用いて、増殖による 1 次スクリーニングを行った。次に、容積が 8 mL の各槽を陽イオン交換膜（NeoSepta CMS）で分離し、電極として各槽に炭素棒電極を挿し込んだ二槽式 MFC を用い、アノード槽に 1 次スクリーニングで増殖した菌液と Horikoshi - I 液体培地、カソード槽には 50 mM のフェリシアン化カリウムを添加、外部抵抗を両槽の電極に接続し、発電能力を比較することにより 2 次スクリーニングを行った。

【結果】

1 次スクリーニングにおいて、初期 pH 10.5 のアルカリ条件下で増殖を行う微生物菌群が得られた。増殖が見られた菌群を MFC に組み込んだところ発電を行う微生物群 Al5 が得られた。また培養 3 日目の MFC のアノード槽を菌液と電極に分け、新しい MFC に組み込んだところ、菌液を用いたものよりも電極を用いたものの方が高い電圧を示した。このことから電極に付着した微生物が主に発電を行っていると考えられる。またアノード槽の菌群から 2 種の微生物が単離された。この 2 種の菌を用いて同様の実験を行ったところ、各菌を単独で用いた場合は複合培養時の約半分の電圧が得られたのに対し、共培養したものでは菌群の時と同程度の電圧が生じた。

microbial fuel cell, alkaliphilic bacteria, power generation

講演番号：4A01a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ A 校舎 01 会場

電流生成条件下における *Shewanella oneidensis* 変異株の糖代謝産物の同定

Identification of sugar metabolites in *Shewanella oneidensis* mutants under current-generating conditions

○中川 元、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大院生命）
○Gen NAKAGAWA, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. of Pharmacy and Life Sciences)

【背景と目的】微生物電気化学システム (bioelectrochemical system，以下 BES) は電気化学的手法によって微生物細胞と電極との間で電子の授受を発生させるシステムであり，有機物分解に伴って生じる電子を電極によって回収する微生物燃料電池や，電極から細胞内に電子を供給することによって有機物合成を促進させる microbial electrosynthesis として応用可能である。BES では電極電位を制御することによって細胞・電極間の電子の流れをコントロールすることが可能であるが，電極電位の違いが細胞内の代謝活性に与える影響についてはほとんど明らかにされていない．そこで本研究では *Shewanella oneidensis* MR-1 株をモデル微生物として用い，電極電位の変化が解糖系などの主要炭素代謝系の活性に与える影響を明らかにすることを目的とした．MR-1 株は微生物燃料電池におけるモデル発電細菌として非常によく研究されており，導電性外膜シトクロムから構成される細胞外電子伝達経路を介して細胞内の基質代謝によって生じた電子を細胞外の電子受容体（電極）に伝達することが知られている．しかし本株は，解糖系遺伝子の一部欠損によりグルコースを資化することができないため，本研究では解糖系遺伝子を導入することによってグルコース資化能を付与した MR-1 変異株を作製し（図），電極電位が糖代謝産物に与える影響について解析した．

【方法と結果】MR-1 変異株を BES に添加後，0 V 及び+0.4 V (vs. Ag/AgCl) に電極電位を設定してグルコースを基質とした電気化学的培養を行い，培養上清に含まれる代謝産物を HPLC 及び酵素法によって分析した．その結果，いずれの電位においても最終生成物として酢酸が蓄積し，代謝中間体として乳酸が生じることが明らかとなった。しかし 0 V の電位設定では L-乳酸が検出されたのに対し，+0.4 V では D-乳酸のみが検出され，電極電位によって糖代謝経路が異なることが示された．現在，電極電位が解糖系遺伝子および乳酸合成酵素遺伝子の発現に与える影響について解析を行っている．

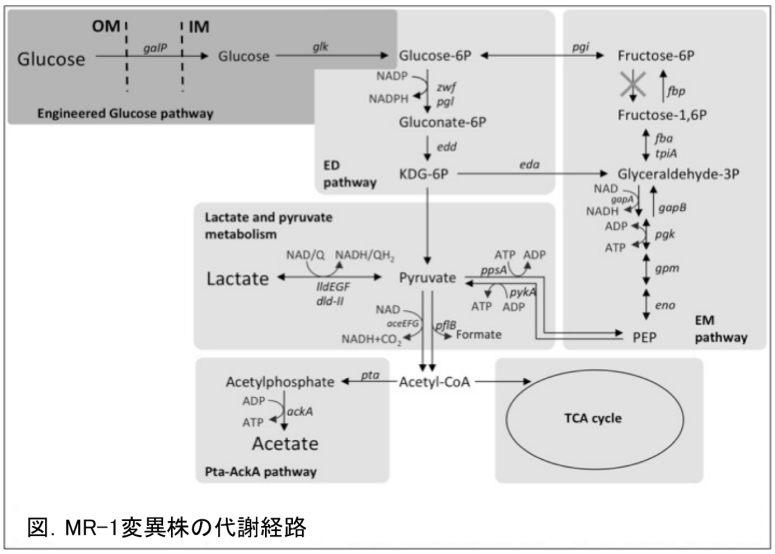


図. MR−1変異株の代謝経路

Shewanella oneidensis, Extracellular electron transfer, Bioelectrochemical system

講演番号：4A01a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ A 校舎 01 会場

通電型固定床式メタン発酵の植物工場由来農業廃棄物への適用

Energy recovery from agricultural wastes of plant factory by methane fermentation with electrolysis

○平野 伸一、松本 伯夫、大村 直也（電中研）
○Shin-ichi HIRANO, Norio MATSUMOTO, Naoya Ohmura (CRIEPI)

【背景および目的】農業で発生する植物残渣は再生可能な未利用エネルギー資源の１つとして注目されている。近年、種々の利点から普及・大規模化が進むトマト栽培などの植物工場において植物残渣は大量かつ継続的に発生し、有効な処理/活用法が求められている。これに対してメタン発酵は有機系廃棄物の処理とエネルギー回収、回収されるバイオガスを利用したコジェネレーションなど分散型電源としてその活用が期待されている[1)]。メタン発酵はこれまで下水汚泥など様々な有機系廃棄物の処理に導入されており、植物工場由来の植物残渣についても適用できる可能性があるが、それに関する知見は少ない。一方、当所ではメタン発酵槽に炭素繊維と炭素電極からなる担体を固定床として設置し、固定床に定電位を印加することにより有機物高負荷時においても安定した処理が可能となることをこれまでに報告している。そこで、本研究ではメタン発酵の植物工場への適用を想定し、トマト栽培時に発生した植物残渣のメタン発酵による処理を試みると共に、通電型固定床式メタン発酵の効果について評価することを目的とした。
【方法及び結果】トマト栽培で発生した植物残渣を基質として用い、発酵温度 55℃、３つの方式のメタン発酵槽（完全混合型、固定床式（固定床：炭素繊維＋炭素板)、通電型固定床式（-0.8V vs Ag/AgCl)）の 140 日間連続運転を行った。連続運転期間中は水理学的滞留時間（HRT）を調節することで徐々に有機物負荷量を上げ、物理化学的性状と微生物群集構造の解析を行った。完全混合型では HRT8.5 日で有機酸の顕著な蓄積が生じ、ガス発生量が低下、メタン発酵は停止した。固定床式、通電型固定床式メタン発酵槽では HRT8.5 においても COD 除去率 50%程度、安定したガス発生（メタンガス比率 77%程度）が確認され、固定床利用による植物残渣に対するメタン発酵適用の可能性が示された。しかし、固定床式メタン発酵槽（非通電）では通電型では検出されなかった酢酸が経時的に増加・培養液中に蓄積していく傾向が見られた。基質添加後のメタンおよび酢酸の挙動について短時間（80h)、詳細に解析したところ、通電型では非通電時に比べメタン生成速度が約 1.4 倍向上、酢酸は 20h まで増加した後、減少に転じていることが明らかとなった。この違いを微生物群集の構成および量から評価したが、通電の有無による大きな違いは検出されなかったため、RNA ベースでの微生物群集構造解析を行ったところ通電時にはメタン菌の量が多く、特に水素資化性メタン菌の群集に占める比率が増加していることが明らかとなった。通電型固定床式メタン発酵では水素資化性メタン菌の活性化による植物残渣の安定処理が期待される。

1). 渡邉 淳ら　電力中央研究所報告（V12011）

Electrochemical cultivation, Methane fermentation, Agricultural organic wastes

講演番号：4A01a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ A 校舎 01 会場

電気培養によるグリセロール廃液からのエタノール生産の促進

Efficient ethanol production from glycerol in BDF waste by electrochemical cultivation

○椎葉 千慧[1]、平野 伸一[3]、松本 伯夫[3]、大村 直也[3]、安藤 昭一[2] ([1]千葉大院・園芸、[2]千葉大、[3]電中研)
○Chisato SHIIBA[1], Shin-ichi HIRANO[3], Norio MATSUMOTO[3], Naoya OHMURA[3], Akikazu ANDO[2] ([1]Chiba Univ, Horticulture, [2]Chiba Univ, [3]CRIEPI)

【背景および目的】近年、油糧作物などから合成されるバイオディーゼル燃料（BDF）が軽油代替燃料として注目されている。BDF 合成プロセスではアルカリ触媒法による油脂の変換反応に伴ってグリセロールを含有するアルカリ性廃液が大量に発生する。この廃液中のグリセロールを炭素資源として捉え、微生物機能により有用物質へ変換することが期待されているが、アルカリ環境での処理が大きなハードルとなっている。これまでに、我々のグループでは湖沼底泥から嫌気条件下、効率的にグリセロールをエタノールへ変換する能力を有する *Paenibacillus macerans* NS-1 株の単離に成功している。また、特性解析の結果、NS-1 株はアルカリ条件下でも中性条件下と同程度のグリセロール変換能を示し、また BDF 廃液の直接処理が可能であることが明らかとなっている [1)]。一方、これまで我々のグループでは電気化学的な手法を組み合わせた新規培養法「電気培養法」を開発し、種々の微生物代謝の活性化について実績を有している。この電気培養法の適用によって NS-1 株の増殖、代謝をさらに促進できる可能性がある。そこで、本研究では BDF 廃液の直接処理を指向し、NS-1 株の増殖および代謝に与える電気培養の効果を評価することを目的とした。
【方法および結果】基質としてグリセロールを 54mM、電極-微生物間の電子の授受をサポートする電子メディエーターとしてアントラキノン 2,6-ジスルホン酸を 2mM 含む培地（pH7.0）に酸化電位（+0.6V vs Ag/AgCl）もしくは還元電位（-0.6V）を印加しながら電気培養を行った。一般的な培養法（非通電）と増殖および代謝産物の比較を行った結果、酸化電位を印加した場合では非通電時と比べ、増殖および代謝が抑制されたのに対して、還元電位を印加した場合では増殖（最終到達菌体密度）、エタノール生産量が約 2 倍に向上した。そこで、アルカリ環境下での電気培養の効果を評価するために pH9.0 に調整した培地で同様の試験を行ったところ、pH7.0 の場合よりも還元電位印加の効果が顕著に表れ、非通電時に比べ増殖開始時期が早まると共に、グリセロール消費、エタノール生産が約 2.5 倍向上した。次に BDF 変換の過程で発生した実際の廃液（pH9.9, グリセロール含有率 45%）を基質として添加し（グリセロール終濃度として 30mM 程度）、pH7.0 調整および pH 未調整（約 pH9）培地において NS-1 株の電気培養を試みた。pH を 7.0 に調整した場合では還元電位の印加によるグリセロール代謝促進効果が得られた。現在、pH 未調整の実験系についても解析を進めており、本発表ではそれらを含め電気培養による BDF 廃液の有効活用について議論する。

1). 松本ら、電力中央研究所報告（V12006）

Electrochemical cultivation, Glycerol, Ethanol

講演番号：4A01a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ A 校舎 01 会場

電気培養を用いた水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株への還元力の供給とその影響
Electrochemical activation of nitrate respiration of *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6
○松本 伯夫[1]、平野 伸一[1]、石井 正治[2] ([1]電中研、[2]東大院農生科・応生工)
○Norio MATSUMOTO[1], Shin-ichi HIRANO[1], Masaharu ISHII[2] ([1]CRIEPI, [2]Tokyo Univ)

【背景および目的】微生物の代謝は多くの電子授受反応に基づく電子の流れと密接に関与している。我々のグループでは細胞外の電極反応によって細胞内の電子の流れ、ひいては代謝を制御する「電気培養法」の開発を進めている。水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株は二酸化炭素固定生物の中で最高レベルの固定速度を有することから TK-6 株の代謝を高度に利用することで CO_2 からの効率的な有用物質生産が期待される。CO_2 を高次化合物に変換するためにはエネルギー物質を介した還元力（電子）が必須である。そこで、TK-6 株が生育に必要とする本来の電子供与体である水素に加えて、外部から還元力（電子）を電気化学的に供給することにより有用物質生産を促進できる可能性がある。本研究では TK-6 株を用いた CO_2 からの有用物質生産系構築のための基盤として電気化学的培養系を構築し、電気化学的な電子供給が TK-6 株に与える影響を解析すると共に、その影響が誘因されるメカニズムをゲノム情報を基盤とした網羅的解析手法により推定することを目的とした。
【方法および結果】水素/二酸化炭素/窒素混合ガス（75:15:10）雰囲気、硝酸呼吸条件下、電子メディエーターとして anthraquinone 2,6-disulfonate (AQDS)を使用することで還元電位（-0.6V vs Ag/AgCl）に設定した電極から TK-6 株細胞へ電子を供給しながら培養できる系を構築した。この培養系を用いて通電時と非通電時（一般的培養法）での増殖、硝酸呼吸速度について比較を行った。その結果、通電時には TK-6 株の増殖に伴った電流値の増加が見られ、非通電時と比較して硝酸呼吸の速度が約 1.9 倍向上した。その一方で、増殖については通電時においても非通電時と顕著な差は見られず、電気化学的に供給された還元力や促進された呼吸によって得られたエネルギーは細胞合成に利用されていないことが推定された。異化代謝反応における電子の流れの変化およびそれに伴った代謝変動が推測される。そこで、対数増殖期中期の細胞について CE-MS によるメタボローム解析を行った結果、電極からの電子の供給に起因して細胞内の 42 種の化合物について大きな増減が見られ、本菌の中心代謝系である還元的 TCA サイクルにおいて乳酸、リンゴ酸といった合成に還元力が必要とされる化合物の増加が検出された。また、還元力供給による硝酸呼吸速度の促進メカニズムを明らかにするために、TK-6 株のゲノム情報を基にカスタムアレイを作製し、マイクロアレイによる通電/非通電時の網羅的転写解析を行った。これらの結果をもとに、TK-6 株の電気化学的な代謝制御メカニズムおよび有用物質生産への適用可能性を議論したい。本研究は科研費基盤Ａ「絶対独立栄養性・好熱性水素細菌のゲノム情報を基盤とした生理生化学的研究」の一部として実施された。

Electrochemical cultivation, Hydrogenobacter thermophilus, nitrate respiration

講演番号：4A01a17
講演日時、会場：3 月 30 日 11:54～ A 校舎 01 会場

Corynebacterium glutamicum 増殖時の電気培養下での乳酸生成
Lactate production by growing *Corynebacterium glutamicum* in a bioelectrochemical reactor
○佐々木 建吾[1]、柘植 陽太[1]、佐々木 大介[2]、近藤 昭彦[2] ([1]神戸大・自科、[2]神戸大院・工)
○Kengo SASAKI[1], Yota TSUGE[1], Daisuke SASAKI[2], Akihiko KONDO[2] ([1]Kobe Univ., [2]Kobe Univ. Eng.)

【背景・目的】電気培養法は、電子の流れを制御して還元力もしくは酸化力を与える事により微生物の代謝を制御できる技術として注目されている。一方、*Corynebacterium glutamicum* はアミノ酸の工業生産株として知られており、グルコースから高効率に有機酸生産が可能である。しかし、電気培養法が *C. glutamicum* の化合物生産に与える影響についての知見は乏しい。そこで本研究において、電気培養法により還元力を与える事が *C. glutamicum* の生育や有機酸生産に与える影響について検討した。
【方法・結果】電気培養には 3 電極方式を使用した。作用極と対極をプロトン交換膜で仕切り、作用極上の電位を定電位設定装置により-0.6V(vs. Ag/AgCl)に設定して還元力を与えた。対極としてエアアノードを用い、作用極槽に 110mM グルコースおよび電子メディエーターとしてアントラキノン-2,6-ジスルホン酸二ナトリウム(AQDS)を添加した。*C. glutamicum* を 600nm における初期濁度が約 0.1 になるように作用極槽に添加して、次の 4 通りの培養条件下での生育および有機酸生産を比較した。１）-0.6V の電位を掛け AQDS を添加した、２）-0.6V の電位を掛けた、３）AQDS を添加した、４）電位を掛けず AQDS も添加していない。24 時間、30℃で pH＞6.8 に制御して培養した結果、１）の条件において *C. glutamicum* の比増殖速度は最も低く、乳酸の収率も最も高かった。以上より還元力は、生育条件下にある *C. glutamicum* の乳酸の収率を増加させる効果がある事が明らかとなった。本研究の一部は日本学術振興会の科学研究費補助金（若手研究(B)）の支援により実施された。

Corynebacterium glutamicum, lactate, electrochemical cultivation

講演番号：4A02a02
講演日時、会場：3 月 30 日 09:11～ A 校舎 02 会場

タンパク質と各種還元糖のアミノカルボニル反応に対するホウ酸塩の影響

Effect of borates on the amino-carbonyl reaction of protein and redusing sugars

○小林 厚志、酒井 謙介、吉田 尚生、正田 晋一郎（東北大院工）
○Atsushi KOBAYASHI, Kensuke SAKAI, Naoki YOSHIDA, Shin-ichiro SHODA (Tohoku Univ.)

【緒言】糖加水分解酵素の糖転移反応を用いてタンパク質表面に糖鎖を導入するためには、タンパク質表面に糖受容体となり得る少糖類の付加が必須である。我々は少糖類をタンパク質表面に導入する手段として、温和な条件下で進行するタンパク質の化学修飾反応であるアミノカルボニル反応(糖化反応)の活用を検討してきた。これまでに、糖化したタンパク質が糖加水分解酵素による糖転移反応の糖受容体になることは明らかになったものの、糖化反応によるタンパク質への少糖類の導入が低効率であることから、本プロセスを実践的な糖タンパク質合成法にするためには糖化反応の効率化を達成する必要がある。糖化反応は pH や塩等の影響を受けることが知られており、我々はこれまでにリン酸塩による弱塩基性条件下においてその反応速度が最大になるということを明らかにしてきた。今回、酵素タンパク質である鶏卵リゾチーム（HEL）への糖化反応による糖導入に対する糖、塩、pH、温度の効果について検討したので報告する。

【実験】糖として D-fructose, cellobiose 等の単糖及び二糖を用いた。塩としてリン酸塩またはホウ酸塩を用いた。糖化反応の解析は 1.0 mM の HEL に対し、250 mM の糖、200 mM の塩濃度下、所定温度で反応させ、一定時間毎に分取したサンプルを HPLC(YMC BioPro SP-F column)を用いて分析し、HEL の減少量を転化率とした。HPLC により分離した分画は、MALDI-TOF MS によって解析した。

【結果】Figure 1 に D-fructose または cellobiose を用いたときの HEL の転化率の経時変化を示した。cellobiose による HEL の糖化反応をリン酸塩存在下、pH 8.0 で行ったところ、8 日経過後の転化率は約 30%であった。同様の実験をホウ酸で行ったところ、8 日経過後の転化率は 40%を超えた。一方、D-fructose による HEL の糖化反応をリン酸で行ったところ、8 日経過後の転化率は 80%であった。しかし、ホウ酸存在下ではほとんど糖化反応は起こらなかった。糖と塩の種類による HEL の糖化度の変化は、ホウ酸と糖の間で形成するホウ酸エステルの影響による開環体の存在比が変化した結果であると考えられる。

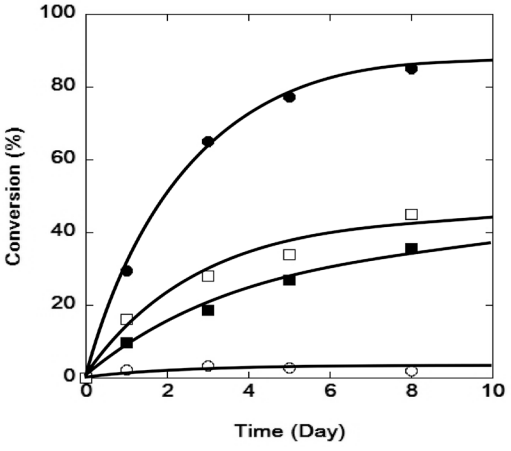


Figure 1 Time course of glycation reaction of HEL. Solid circle; fructose in phosphate, Open circle; fructose in borate, Solid square; cellobiose in phosphate, Open square; cellobiose in borate.

amino-carbonyl reaction, glycoprotein, borates

講演番号：4A02a03
講演日時、会場：3 月 30 日 09:22～ A 校舎 02 会場

糖-タンパク質間相互作用を基盤とする Organic framework の創成研究

Synthetic study toward creating organic framework based on carbohydrate-protein interaction

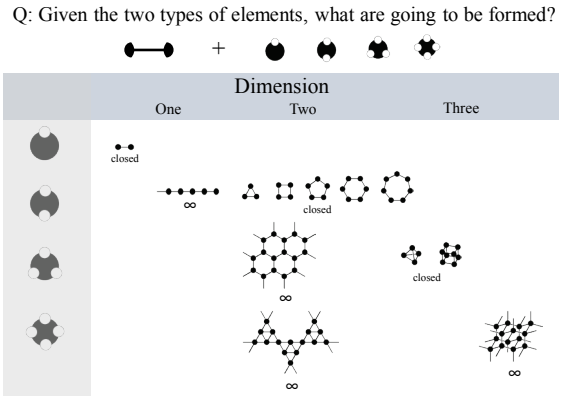
○中川 篤、蟹江 治（東海大糖鎖研）
○Atsushi NAKAGAWA, Osamu KANIE (Tokai Univ.)

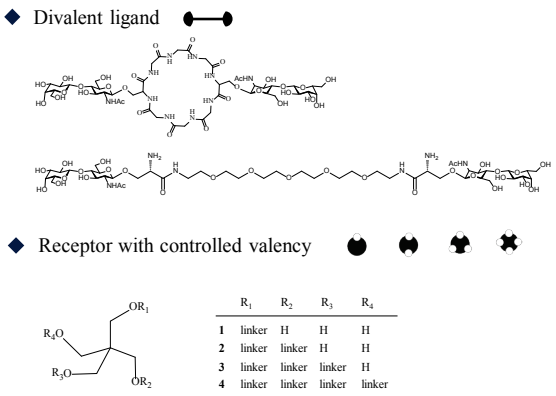
【研究目的】

近年、金属イオンと有機リガンドが配位結合により自己集合し構築された均一で周期性のあるナノ細孔を有する金属-有機骨格体 (Metal-Organic Framework; MOF) の合成研究が盛んに行われている。MOF はゼオライトなどの従来の多孔性材料では実現が困難である細孔のサイズ、形状、性質をナノレベルで設計、構築できるという利点を有する。MOF は細孔サイズがメソスケール (2~50 nm) 以下のものが多く報告されており、分子やイオンの選択貯蔵、徐放、分離、さらには触媒など多岐に渡る応用が検討されている。本研究では、糖鎖リガンドとタンパク質の分子認識を基盤とした分子ネットワーク構造の構築を目的とする。糖鎖、タンパク質、linker の選択により従来の多孔性材料や MOF とは異なる細孔骨格、細孔サイズ、機能を有する化合物群を探求することで新たな機能性物質の創成や空間制御技術の開拓につながることを期待している。

【方法と結果】

価数を制御した糖鎖リガンドとレセプタータンパク質の組み合わせにより形成される構造、さらにその構造の幾何学的情報と機能の相関関係について検討することとした。リガンドは 2 価に固定し、レセプターを 1 ~ 4 価とした。2 価リガンドは *N*-acetyllactosamine (LacNAc) を有する環状ペプチドと hexaethyleneglycol 誘導体、またレセプターは β-ガラクトシドを特異的に認識する Galectin-3 と Halo-Tag の融合タンパク質を選択した。これまでに 2 価リガンドの鍵中間体である *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-β-D-galactopyran-syl-(1→4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl]-L-serine と LacNAc 含有 hexaethyleneglycol 誘導体を合成した。現在、Halo-Tag Galectin-3 のリガンドとなる pentaerythritol 誘導体をコア部分とする linker の





合成を行っている。発表では、これらの合成の詳細やその後の進捗状況を報告する。

organic framework, *N*-acetyllactosamine, Galectin-3

講演番号：4A02a04
講演日時、会場：3 月 30 日 09:33～ A 校舎 02 会場

生物多様性損失因子に由来する海藻多糖ソフトマテリアルの開発

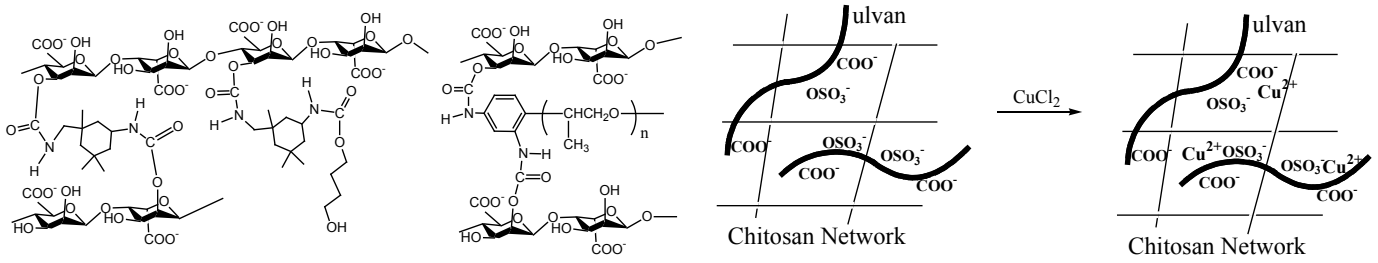
Investigation of softmaterial derived from algae threatening biodiversity

○菅野 憲一[1]、藤田 雄大[2] ([1]近大産理工、[2]近大院産理工)
○KENICHI KANNO[1], YOSHIHIRO FUJITA[2] ([1]Kinki Univ., [2]Kinki Univ. Grad. Sch.)

【研究背景】生物多様性条約愛知目標の戦略目標Ｂ（生物多様性への直接的な圧力を減少させ、持続可能な利用を促進）には、「目標７：2020年までに、農業、養殖業、林業が行われる地域が、生物多様性の保全を確保するよう持続的に管理される。目標８:2020年までに、過剰栄養などによる汚染が、生態系機能と生物多様性に有害とならない水準まで抑えられる。」とある。処分にコストがかかる海藻由来廃棄物の付加価値化や、栄養塩を吸収した海藻の回収・有効利用はこれらの目標達成のために重要である。そこで、本研究では、世界中の湾で大繁殖しているアオサや米国西海岸における侵略的外来種であるワカメを炭素資源ととらえ、循環型ソフトマテリアルの開発を目指している。
【研究内容】アルギン酸（ワカメなどが含有する多糖）は、キトサンと混合することでハイドロゲルを与えることが知られているので、和白干潟において採取したアオサから熱水抽出によって得た硫酸化多糖ウルバンをキトサンとのポリイオンコンプレックス形成によってハイドロゲル化したところ、ｐＨ２～１１の範囲で安定なハイドロゲルを形勢した。このハイドロゲルは、水溶液中の銅イオンなどの重金属イオンを吸着除去することが可能であった。一方、ワカメからとれるアルギン酸に関しても種々のハイドロゲルを調整し、これらのゲルは重金属イオンの除去効果を示した。

キトサンとのポリイオンコンプレックスは、多糖の溶出が確認されたことから、ポリイオンコンプレックスを共有結合によって架橋することで、多糖の溶出をなくした。

生体適合性材料への応用を視野に、血液成分との相互作用を調べたところ、海藻から得られた多糖類のハイドロゲルはアルブミンの吸着は弱いものの尿素を吸着することが示された。



Scheme 種々のハイドロゲルの構造およびアオサ多糖ハイドロゲルによる重金属イオン除去

[1]本研究は JSPS 科研費 24651094 の助成を受けたものです。

alginate, ulvan, soft material

講演番号：4A02a05
講演日時、会場：3 月 30 日 09:44～ A 校舎 02 会場

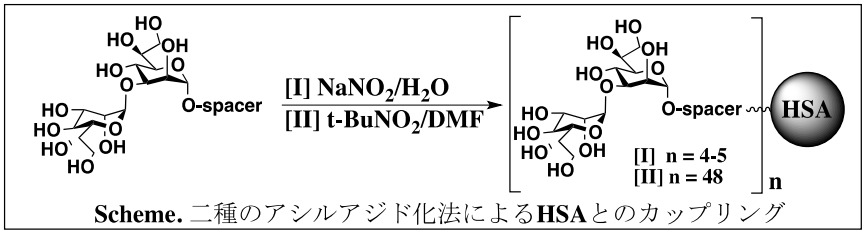
ナイセリア属細菌の産生する部分糖鎖コンジュゲートの合成

Conjugation of partial oligosaccharide of neisserial lipooligosaccharide with human serum albumin

○岸本 勝也、石井 一之、山崎 良平（鳥取大学・農）
○Katsuya KISHIMOTO, Kazuyuki ISHII, Ryohei YAMASAKI (Tottori Univ.)

我々は、これまでに、ヒト血清中に存在する IgG が、リポオリゴ糖 (LOS) 内のオリゴ糖鎖部の部分構造を認識することを免疫化学分析により明らかにしている [1)]。このようなヒト抗体が認識する部分糖鎖構造の解明を、部分糖鎖とタンパクとのコンジュゲートの免疫化学分析により明らかにすることを目指している。本研究では、アシルアジド化法による、糖鎖とタンパクとのコンジュゲート化、特に、マイクロスケールでのカップリング条件を検索した。

モノメチルスベリン酸と Heptosyl α1-3heptose (Hep α1-3Hep) をモノメチルスベリン酸で炭素鎖伸張した誘導体をモデル化合物として用いた。これらの化合物をヒドラジド化後、無機ニトリル/水溶媒系と有機ニトリル/有機溶媒系の二種の異なる系でアシルアジドに変換し、HSA とのカップリングを行った。



Scheme. 二種のアシルアジド化法による**HSA**とのカップリング

50-200 当量のヒドラジニルスベリン酸を無機ニトリル/水溶媒系 (HCl/H_2O, NaOH/H_2O) でアジド化後、HSA (1.4-2.8 mg) とのカップリングを行い、平均 8-20 残基結合した HSA を得た。C8 のスペーサーと同様に、Hep α1-3Hep ヒドラジド (50-200 当量) をアシルアジドに変換後、HSA (0.7-1.4 mg) と反応させたが、糖鎖の結合数は 4-5 残基であった。

一方、有機ニトリル/有機溶媒系 (HCl/dioxane, t-$BuNO_2$/DMF) で、C8 ヒドラジド (100 当量) をアジド化体に変換後、 HSA (0.7 mg) と反応させた場合、30 残基結合した。また、同様の条件下で二糖を処理し、～48 残基の糖鎖が HSA に結合した。

これらの結果から、有機ニトリル/有機溶媒系でアシルアジド化することにより、より多くの糖残基が結合することを見いだし、1 mg 以下の HSA を用いたマイクロスケールでのカップリング条件を確立した。今回、他の分岐糖の糖鎖コンジュゲートの合成結果も合わせて報告する。

1. Yamasaki. R, Yabe.U, Kataoka. C, Takeda. U, Asuka. S, Infect. Immun, **78** (2010) *3247-3257*

石井 一之: 現所属 株式会社 糖鎖工学研究所（京都）

lipooligosaccharide, oligosaccharide, conjugate

講演番号：4A02a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ A 校舎 02 会場

DDS を指向したシアリルルイス X 修飾リポソームの合成と機能評価

Synthesis and Evaluation of Novel Sialyl Lewis X-coated Liposomes as Drug Carrier for DDS

○植木 章晴[1,2]、ウンガ ヨハン[3]、樋口 ゆり子[3]、川上 茂[3]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、山下 富義[3]、橋田 充[2,3]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS、[3]京都大・薬)
○ Akiharu UEKI[1,2], Johan UNGA[3], Yuriko HIGUCHI[3], Shigeru KAWAKAMI[3], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Fumiyoshi YAMASHITA[3], Mitsuru HASHIDA[2,3], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS, [3]Kyoto Univ.)

【目的】薬物輸送システム（DDS）は標的とする臓器および細胞へ特異的に薬物を送達することが可能であり、その中でもがん及び肝炎などの難治性の疾病に対する治療法として非常に有用な手法の一つである。近年、我々のグループでは糖鎖修飾リポソームを利用するDDS法の開発を行なっており、肝細胞表面上の各種糖受容体を標的とする選択的な取り込み作用及び薬物送達の機能評価を行なってきた。[1)] また、マイクロバブルへの超音波照射により引き起こされるバブル崩壊（キャビテーション）を利用した、目的組織にのみ低侵襲的な薬剤送達を可能にする超音波応答性ナノバブルリポソーム[2)]への応用にも取り組んでいる。今回我々は、炎症性サイトカインにより血管内皮細胞上に発現誘導されるE-セレクチンを標的分子とした、新たなDDS法の開発に着手した。E-セレクチン（CD62E）は炎症部位やがん組織周辺の血管内皮細胞に発現し、白血球のローリング作用と呼ばれる血管細胞上への接着と脱離に関与することが知られている。その特異的リガンドはシアリルルイスX（sLe^X）糖鎖エピトープであることが明らかとなっている。そこでシアリルルイスX糖鎖を表面に有する糖鎖修飾リポソームの開発により、がん組織及び炎症部位への薬剤送達が可能となり、新たな治療法を確立できると考えた。本研究では細胞内への効率的な薬剤送達が期待できるナノバブルリポソームを指向した、標的認識部位として機能しうる新規シアリルルイスX修飾リン脂質の合成、糖鎖修飾リポソームの調製、及び炎症モデルにおける糖鎖修飾リポソームのE-セレクチンに対する特異的結合能の評価を行った。

【方法】シアリルガラクトース、グルコサミン、及びフコースを順次結合し、シアリルルイス X エピトープ 4 糖を合成した。続くリンカー導入、カップリング反応により sLe^X-PEG-DSPE の合成を達成した。さらに、これを用いて蛍光標識を導入したリポソームを調製しその結合能を評価した。未処理の HUVEC 細胞に sLe^X-修飾リポソームを投与したところ特異的な結合は殆ど見られなかったのに対し、TNF-α及び IL-1β で処理した細胞では糖脂質の含有量に依存して結合量が増加することが明らかとなった。この結果から sLe^X-修飾リポソームは炎症性サイトカインにより発現した E-セレクチンに対し特異的結合能を有していることが示唆された。

1) Un, K.; Hashida, M.; Kawakami, S.; Kiso, M.; Ueki, A.; Ando, H.; *PCT Int. Appl*. **2013**, WO2013035757.
2) Maruyama, K. *et al*. *YAKUGAKU ZASSHI*, **2007**, *127*, 781-787.; Negishi, Y. *et al*. *YAKUGAKU ZASSHI*, **2010**, *130*, 1489-1496.

glycolipid, glyco-coated liposomes, sialyl Lewis X epitope

講演番号：4A02a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ A 校舎 02 会場

ITC 滴定実験による LacNAc 含有糖鎖クラスターとデイゴマメレクチンとの相互作用解析
Interaction analysis between carbohydrate cluster bearing LacNAc and *Erythrina cristagalli agglutinin* by using ITC

○安本 佳成[1]、尾形 慎[2]、田見 祐一[1]、中馬 康志[1]、碓氷 泰市[1,3]、朴 龍洙[1,3]([1]静岡大農・応生化、[2]福島高専・物質工、[3]静大院・創科技)
○Yoshinori YASUMOTO[1], Makoto OGATA[2], Yuichi TAMI[1], Yasushi CHUMA[1], Taichi USUI[1,3], Park Enoch Y.[1,3] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Department of Chemistry and Biochemistry, Fukushima National College of Technology, [3]Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【背景・目的】糖鎖タンパク質間相互作用は一般的に弱いが、糖鎖を高密度に集合させることで結合親和性が飛躍的に上昇することが知られている（糖鎖クラスター効果）。本研究室ではこれまでに、この糖鎖クラスター効果に基づいて、*N*-アセチルラクトサミン（LacNAc；Galß1,4GlcNAc）結合性タンパク質であるデイゴマメレクチン（ECA）に対して高結合親和性および架橋複合体形成能を有する新規糖鎖クラスター材料｛$(LacNAc)_4$-DBG-C_{18}｝の化学酵素合成に成功している。$(LacNAc)_4$-DBG-C_{18} は、骨格部であるオクタデカン二酸に LacNAc 残基を四つ配位した糖鎖クラスターで、同等の価数で骨格部のアルキル鎖長が短い$(LacNAc)_4$-DBG-C_{12} や$(LacNAc)_4$-DBG-C_6 と比較して、結合親和性が高いという結果が赤血球凝集阻害試験によって得られている。本研究では、$(LacNAc)_4$-DBG-C_{18} の ECA に対する高結合親和性獲得の解明を等温滴定カロリメトリー（ITC）および動的光散乱法（DLS）を用いた相互作用解析により試みた。
【方法・結果】ECA との相互作用解析には、$(LacNAc)_4$-DBGs をはじめ、対象化合物として多価性骨格部であるグリコールエーテルジアミン四酢酸（EGTA）に LacNAc 残基を四つ有した $(LacNAc)_4$-EGTAs および LacNAc 残基を二つ有した二価性糖鎖クラスターを使用した。これら糖鎖リガンドの ECA に対する結合親和性は ITC により評価した。今回用いた化合物と ECA との結合はすべて、エンタルピー駆動型であることが示された。$(LacNAc)_4$-DBG-C_{18} と ECA との結合に対する ΔH の値は、-34.6 kcal/mol と他の四価糖鎖リガンドと比較して低いものの、エントロピー損失が最も低く、その結果今回用いた化合物の中で最も強い結合親和性（K_d = 2.4 μM）を示した。これにより、$(LacNAc)_4$-DBG-C_{18} の結合親和性は一価の LacNAc と比較しても 15 倍強いということが示されると共に、$(LacNAc)_4$-DBGs 骨格部のアルキル鎖長の伸長に伴い結合親和性が上昇するという赤血球凝集阻害試験結果とも相関性が得られた。また、ITC 分析で得られる化学量論比（*n*）より、糖鎖リガンドと ECA との結合比を算出することができる。その結果、$(LacNAc)_4$-DBG-C_{18}：ECA が 1：2 の結合であったのに対して、今回使用した化合物の中で最も高いΔH（-51.1 kcal/mol）を示した $(LacNAcsp)_4$-EGTA は ECA と 1：3 の結合を示した。現在、これら形態変化に伴う架橋複合体形成メカニズムの詳細な解明は DLS を用いて行っている最中である。以上の結果より、$(LacNAc)_4$-DBG-C_{18} の ECA に対する高親和性の獲得には糖鎖クラスター効果とエントロピー損失の減少が影響していることが示された。

lectin, multivalent glycoside, cluster effect

講演番号：4A02a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ A 校舎 02 会場

癌や精神疾患に関わるポリシアル酸構造に特異的な一本鎖抗体の作製と特異性評価

Development and characterization of a single-chain antibody specific for polysialic acid

○羽根 正弥[1,2,3]、長江 雅倫[4]、池田 明美[4]、山口 芳樹[4]、北島 健[1,2,3]、佐藤 ちひろ[1,2,3] ([1]名大・生物機能セ、[2]名大院・生命農学、[3]リーディング大学院プログラム・IGER、[4]理研・糖鎖構造)
○ Masaya HANE[1,2,3], Masamichi NAGAE[4], Akemi IKEDA[4], Yoshiki YAMAGUCHI[4], Ken KITAJIMA[1,2,3], Chihiro Sato[1,2,3] ([1]Biosci. Biotech. Center, Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [3]Program forLeading Graduate Schools IGER, Nagoya Univ., [4]RIKEN)

α2,8-結合ポリシアル酸（polySia）はシアル酸が 8-400 残基縮重合した構造体の総称である。胎児脳に一過的に発現する一方、いくつかの種類の癌細胞に特異的に発現することから癌胎児性抗原として注目されている。近年では、成体脳における海馬や嗅球など可塑的な領域に発現が維持されて、記憶、学習、社会性行動に深く関わることが明らかにされている。さらに、polySia は癌の進行度や精神疾患に依存して、その質と量が変動することが示唆されている。しかし、このような polySia の疾患に伴う変動の詳細なメカニズムや、その病態との関係については不明な点が多い。そのため、polySia 構造に特異的であり、診断や治療への応用を可能にする高機能化プローブの作製は重要な課題である。本研究は、その課題解決を目的として、polySia 特異的プローブとして頻用されているマウスモノクローナル抗体 735（mAb735）の抗原結合部位に着目し、その遺伝子配列から一本鎖抗体（scFv735）を作製し、その特異性を検証した。大腸菌由来の組換え体 scFv735(WT)および抗原結合部位における 1 アミノ酸変異体 scFv735(Mu)を調製した。ブタ胎児および成体脳ホモジェネート、polySia-NCAM-Fc および脂質化 oligo/polySia(oligo/polySia-PE)を抗原として用いて、ウエスタンブロッティングおよび ELISA によって scFv735 と mAb735 の特異性を詳細に比較解析した。その結果、scFv735(WT)と mAb735 は、ともにブタ胎児脳ホモジェネートおよび polySia-NCAM-Fc、polySia-PE に対して特異的な反応性を示したが、scFv735(Mu)ではこれら全ての反応性が消失した。また、scFv735(WT)と mAb735 の polySia 鎖に対する競合実験を行った結果、両者はともに polySia 鎖上のまったく同じ領域を認識しており、scFv735(WT)が mAb735 と同等の特異性をもつプローブであることが示唆された。以上のことから、scFv735(WT)は polySia の検出、構造と機能解析に有用なプローブであるとともに、高機能化による医療応用の可能性もあることが示された。

single chain variable fragment, polysialic acid, cancer

講演番号：4A02a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ A 校舎 02 会場

Characterization of medaka fish CMP-Sia synthetase (CSS) mutants detected in the TILLING library

○di wu[1,2,3], Akiko Fujita[1], Yuko Yasukawa[1,3], Yoshihito Taniguchi[4], Yasuhiro Kamei[5] ([1]Biosci. Biotech. Center, [2]Program for Leading Graduate Schools IGER, [3]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [4]Sch. Med., Keio Univ., [5]Dept Appl. Life Sci., Nat. Inst. Basic Biol.)

Sialic acids (Sia) are situated at the terminal ends of glycan chains of *N*- and *O*-glycoproteins, and glycolipids. Sia residues exhibit different linkages and a variety of natural modifications in a development- and organ-specific manner. However, the significance of the structural diversity and the spatiotemporally regulated expression of Sia have remained largely unknown at animal level. The CMP-Sia synthetase (CSS) catalyzes the synthesis of CMP-Sia, which is the only donor substrate of all sialyltransferases, and is prerequisite for the expression of Sia-glycoconjugates on the cell surface. To reveal how significant Sia-glycoconjugates are at animal level, we began to generate CSS-mutant medaka fish using the Targeting Induced Local Lesions In Genomes (TILLING) method. First, we screened the TILLING library for selecting gametes with mutations in the exons of CSS gene by high-resolution melting (HRM) curve analysis of focused CSS region of the genome. We obtained 6 genomes containing mutations in CSS exons. Second, based on the detected mutations, a series of plasmids encoding those CSS mutants were prepared by site-directed mutagenesis using a pET32 plasmid encoding wild-type medaka CSS. Each recombinant CSS mutant was bacterially expressed for measuring the enzyme activity. Optimal pH and temperature for the activity of recombinant wild-type medaka CSS were pH 9 and 25ºC, respectively. Of Sia species, *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) and *N*-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) were better substrates than deaminoneuraminic acid (Kdn) for medaka CSS. Of six TILLING mutants, two mutants M1 and M2 in N- and C-terminal domains of CSS, respectively, had very low *in vitro* activity. These mutated amino acid residues are important for the enzyme activity. Interestingly, the *in vitro* activity of M1 was greatly decreased to Neu5Ac, while unchanged to Neu5Gc, indicating that this particular mutation is important for Neu5Ac recognition. We are now making medaka strains of M1 and M2 mutations to analyze their phenotypes at animal level.

Sialic acids, CMP-Sia synthetase, TILLING

講演番号：4A02a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ A 校舎 02 会場

シアル酸を過剰発現した細胞株の樹立とその応用

Establishment of cell lines overexpressing sialic acid and its application

○柿沼 俊光[1]、上宮 悠[1]、鈴木 佑典[2]、峯 利喜[2]、山本 岳[2]、櫛 泰典[1] ([1]日本大・院・理工、[2]日本たばこ・植物イノベーション)
○Toshihiro KAKINUMA[1], Hisashi KAMIMIYA[1], Yusuke SUZUKI[2], Toshiki MINE[2], Takeshi YAMAMOTO[2], Yasunori KUSHI[1] ([1]Nihon Univ., [2]Japan Tabacco Inc.)

【目的】複合糖質の中でも，シアル酸を有する糖鎖(シアロ糖鎖)を有は，細胞間の認識機構や細胞の分化，細菌やウイルスの感染機構といった重要な生命現象に関与している．細胞内において，糖鎖へのシアル酸の付加は，シアル酸転移酵素(ST)によって行われる．近年，細菌から数多くのSTが単離され，これらの性質と機能が徐々に明らかになってきている．その一つとして，海洋性細菌由来のSTは動物由来STよりも高い触媒能，幅広い基質特異性を持ち，多様な構造の糖鎖にシアル酸を付加できることが示された．これまでの研究で我々は，これらの組み換え酵素がスフィンゴ糖脂質を受容体基質とした際に，高効率のガングリオシド合成を明らかにした．その結果，インフルエンザウイルスに親和性を有するネオラクト系の合成に効率が良いことが分かった．本研究では，海洋性細菌の1つである*Photobacterium damselae* JT0160株由来のα2,6-STを動物細胞において安定的に発現できる系を構築する．動物細胞における細菌由来STの発現及びシアリル糖鎖の生合成は，シアル酸の関与する生命現象において，新たな知見を得られると期待できる．

【方法】*P. damselae* JT0160株由来のα2,6-ST遺伝子を動物細胞で発現させるため，ヒト由来のST6 β-ガラクトサミド α-2,6-ST(ST6Gal Ⅰ)の膜結合領域遺伝子をOver-lap extension PCR によって組み合わせた．また，作製した酵素遺伝子はシーケンサー(ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer)により塩基配列を解析した．作製した遺伝子をAcGFP1-N3 expression vectorへ挿入し発現ベクターとして構築した．構築した発現ベクターを動物細胞へ遺伝子導入し，シアル酸の発現を観察した．

【結果・考察】ヒトST6Gal Ⅰの膜結合領域遺伝子と*P. damselae* JT0160株由来のα2,6-ST遺伝子を連結させ，発現ベクターへ挿入することで，動物細胞内で発現させるための遺伝子構築ができた．構築した遺伝子を動物細胞へ遺伝子導入することで，本酵素を発現した細胞株を樹立した．今後，これらの細胞株のシアロ糖鎖の解析，及びシアロ糖鎖の増減が引き起こす細胞への影響を確認する予定である．本研究で作製した遺伝子は，生命現象を解明する新たなツールとして期待できる．

sialic acid, bacterial sialyltransferase

講演番号：4A02a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ A 校舎 02 会場

耐熱グルコシダーゼ HT1 酵素反応におけるマイクロ波効果の研究

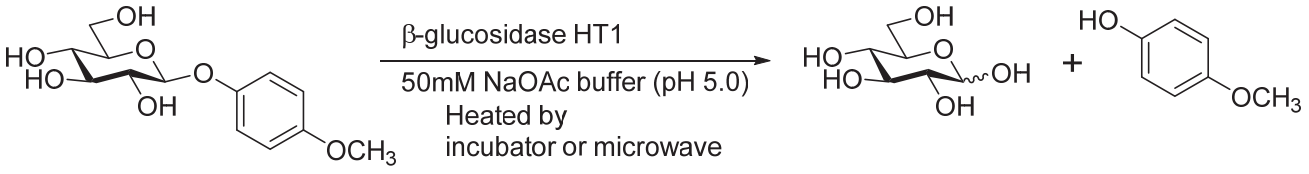
Study of microwave effect for a hydrolysis by thermostable ß-Glucosidase HT1

○長島 生[1]、作田 智美[1]、杉山 順一[2]、佐々木 正秀[1]、清水 弘樹[1] ([1]産総研生物プロセス、[2]産総研ナノシステム)
○Izuru NAGASHIMA[1], Tomomi SAKUTA[1], Jun-ichi SUGIYAMA[2], Masahide SASAKI[1], Hiroki SHIMIZU[1] ([1]AIST BPRI, [2]AIST NRI)

2.45GHz マイクロ波は物質を効率よく加熱することができ、家電の電子レンジなどに利用されている。近年、化学反応においても効率加熱手段として多用され、反応時間の短縮、副反応の抑制、高収率化などの効果をもたらす報告が多く見られる。我々は、マイクロ波は単に効率加熱作用だけではない化学反応における特有の効果を有していると考え、これまでに低温下マイクロ波照射によるユニークなオリゴ糖合成法の開発やマイクロ波特有グリコシル化反応などの報告をおこなった。

本発表では、酵素反応におけるマイクロ波効果について発表する。市販のβ-グルコシダーゼ HT1（株式会社耐熱性酵素研究所）は至適温度が 60℃と比較的高いエキソ型β-グルコース加水分解酵素である。4-メトキシフェニルグルコシドを基質として、まず通常加熱法と 2.45GHz マイクロ波照射で加熱した場合のこの酵素の反応性を比較検討した。その結果、同条件で反応を遂行したのにもかかわらず、2.45GHz マイクロ波で加熱した場合は、同温度における反応効率が向上し至適温度が 50℃に低下した。続いて、他の周波数帯のマイクロ波効果について検討した。直径 10㎜ のガラス管に 5.80GHz マイクロ波を照射する装置を作製し、同径の NMR 管を利用し本反応を検討したところ、通常加熱の場合と反応率はほぼ同じとなった。

これらの結果を基にマイクロ波効果について考察するため、反応溶媒である酢酸ナトリウムバッファーの複素比誘電率を 200MHz～14GHz のマイクロ波帯で測定した。その結果、2.45GHz マイクロ波は誘電損失と導電損失両方で作用しているが、5.80GHz マイクロ波は誘電損失作用のみであることが明らかとなった。誘電損失は双極子である水分子に作用するが、導電損失は単極子であるバッファーイオンに作用する。つまり、2.45GHz マイクロ波はバッファーイオンに直接作用したことから酵素反応が促進されたのではないかと考えている。現在、化学反応におけるマイクロ波の効果をより明らかにするため、さらに低周波数帯（400MHz）の照射実験を計画中である。



microwave, enzyme, glycosidase

講演番号：4A02a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ A 校舎 02 会場

ゴルジマンノシダーゼの糖蛋白質に対する作用の解析

Analysis of actions of golgi mannosidases on glycoproteins

○相川 順一[1]、武田 陽一[2]、松尾 一郎[3]、伊藤 幸成[1,2] ([1]理研、[2]JST ERATO、[3]群馬大院工)
○Junichi Aikawa[1], Yoichi Takeda[2], Ichiro Matsuo[3], Yukishige Ito[1,2] ([1]RIKEN, [2]JST ERATO, [3]Grad. Sch. Eng., Gunma Univ.)

「目的」

Golgi α-1,2 mannosidase(GolgiMan)はアスパラギン結合型糖鎖 $Man_9GlcNAc_2$ から、主に A 及び C 鎖のα-1,2 結合したマンノースを遊離させる酵素である。構造的には、GolgiMan は Glycosidase family 47 に属し、ヒトには３種類のアイソザイム 1A1,1A2,1C1 が存在する。昨年までの大会において、我々は主に B 鎖に作用する ER α-1,2 mannosidase I (ERManI) が変性条件にさらされた $Man_9GlcNAc_2$ 及び $GlcMan_9GlcNAc_2$ を有する糖蛋白質から、より多くのマンノースを刈り込むことを示すことにより、ER-associated degradation(ERAD)に寄与していることを明らかにしてきた[1、2)]。一方で、GolgiMan に関しても ERAD への寄与が示唆されていること[3)]から、GolgiMan が ERManI と同様にタンパク質の高次構造の状態に応じて活性を発揮するかを明らかにすることを目指した。

「方法」

組換え型ヒト GolgiMan-1A1 及び 1A2 を調製し、尿素処理もしくは加熱処理した糖蛋白質を基質とした反応を行った。反応後、糖蛋白質から糖鎖を切り出し、蛍光標識を行い、構造解析に供した。

「結果」

まず、GolgiMan-1A1 及び 1A2 は糖鎖 $Man_9GlcNAc_2$ を有する Soybean agglutinin からは糖蛋白質の未変性・変性の条件にかかわらず、マンノースをほとんど切り出すことができなかった。次に、糖鎖 $GlcMan_9GlcNAc_2$ を有する Immunoglobulin Y を基質とした反応においては未変性状態の糖蛋白質からはマンノースを切り出すことができなかったものの、熱処理により変性状態を達成した糖蛋白質からは、マンノースを切り出すことができた。以上の結果から、GolgiMan-1A1 及び 1A2 は、基質となる糖蛋白質の種類に依存して、変性状態の糖蛋白質から糖を切り出すことが示された。糖鎖を基質とした反応についても報告する予定である。

[1)] J. Aikawa, I. Matsuo & Y. Ito *Glycoconj. J.* **29**, 35-45 (2012)
[2)] 相川、武田、松尾、伊藤　２０１２年農芸化学会大会要旨（京都）
[3)] N. Hosokawa, Z. You, L. O Tremblay, K. Nagata & A. Herscovics *Biochem Biophys Res Commun.* **148**, 5842-5850 (2007)

mannosidase, ERAD, glycoprotein

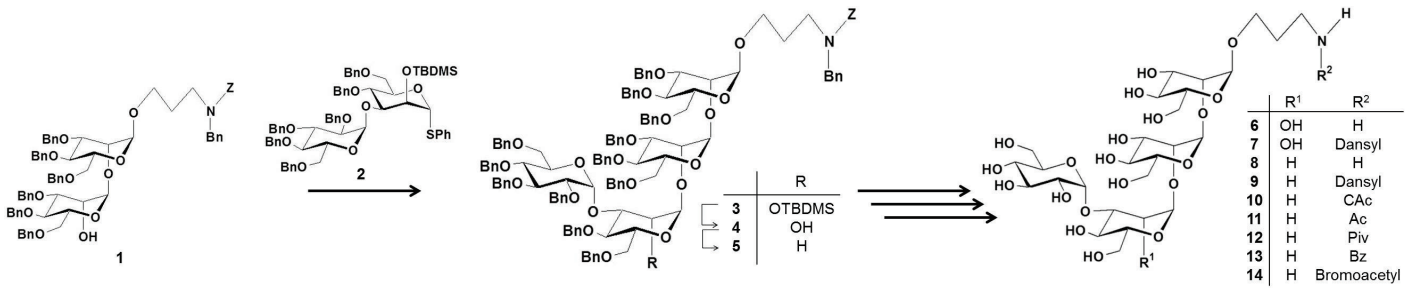
講演番号：4A02a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ A 校舎 02 会場

新規 endo-α-mannosidase 探索に向けたアフィニティーゲルの作成

Development of affinity gel for isolation of endo-α-mannosidase

○笠原 佑太[1]、岩本 将吾[1]、亀井 健一[1]、武田 陽一[2]、瀬古 玲[2]、伊藤 幸成[2,3]、松尾 一郎[1] ([1]群馬大院理工、[2]ERATO-JST、[3]理研・細胞制御化学)
○Yuta KASAHARA[1], Shogo IWAMOTO[1], Kenichi KAMEI[1], Yoichi TAKEDA[2], Akira SEKO[2], Yukishige ITO[2,3], Ichiro MATSUO[1] ([1]Gunma Univ., [2]ERATO-JST, [3]RIKEN)

【背景・目的】endo-α-mannosidase は *cis*-ゴルジに局在するエンド型の糖加水分解酵素で、グルコシル化された高マンノース型糖鎖から Glc α 1-3Man 残基を切断する活性を有することから、小胞体から誤って *cis*-ゴルジに輸送されたグルコシル化糖鎖をトリミングすることで正しい糖鎖プロセッシング経路に戻す役割を持つと考えられている。近年、ER に局在する新たな endo-α-mannosidase の存在が示唆され、糖鎖を介した糖タンパク質品質管理機構との関連からも注目を集めている。この様な背景のもと、我々は endo-α-mannosidase を分子レベルで解析するために蛍光標識糖鎖の合成研究を行なってきた。本発表では、新規 endo-α-mannosidase の取得を目的として、アフィニティーゲルを作成し、endo-α-mannosidase の精製を試みた結果について報告する。
【方法・結果】アフィニティー担体作成のためには、対象となる酵素に認識され且つ切断されないリガンドが必要である。そこで、endo-α-mannosidase の基質となるグルコシル化された高マンノース型糖鎖の構造を基に、加水分解に関与する糖残基上の水酸基をデオキシ化したプローブをデザインした。2 糖マンオビオース受容体 **1** に対し、2 糖供与体 **2** を結合、4 糖骨格を構築した。得られた 4 糖誘導体の TBDMS 基を除去後、ラジカル的にデオキシ化することでデオキシ誘導体 **5** を得た。脱保護後、得られたアミノ体 **8** に対して種々のアシル基を導入、酵素阻害実験を行なった。その結果、いずれの化合物も濃度依存的に酵素活性を阻害し、その阻害活性はほぼ同等であったことにより、還元末端部分の置換基が酵素の認識に影響を与えないことを確認した。アフィニティー担体は、アミノ体 **8** をブロモアセチル基で修飾した 4 糖 **9** を、TCEP で処理した Thiopropyl Sepharose 6B と反応させることで調製した。調製したアフィニティー担体を用いて endo-α-mannosidase の精製が可能であることを確認した。



endo-α-mannosidase, affinity gel, sugar

講演番号：4A02a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ A 校舎 02 会場

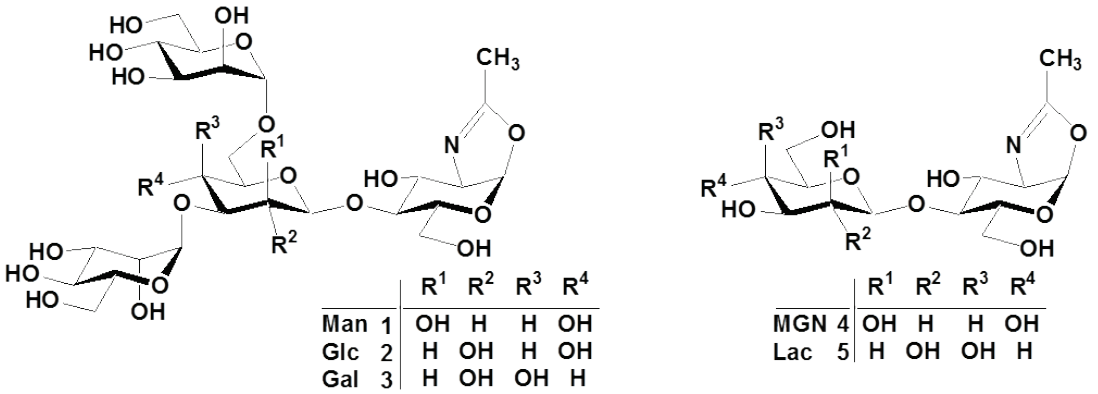
Endo-M の N-型糖鎖コア構造認識に関する研究

Analysis of substrate specificity for endo-M using synthetic glycan probes

○石井 希実[1]、岩本 将吾[1]、熊田 純一[2]、松崎 祐二[2]、松尾 一郎[1] ([1]群馬大院理工、[2]東京化成)
○Nozomi ISHII[1], Syogo IWAMOTO[1], Jyunichi KUMADA[2], Yuji MATSUZAKI[2], Ichiro MATSUO[1] ([1]Gunma Univ., [2]TCI)

糸状菌 *Mucor hiemalis* 由来のエンド-*β*-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ（endo-M）の変異体グライコシンターゼ：endo-M-N175Q は高い糖転移活性を示す一方で糖加水分解活性が抑えられており、糖タンパク質・糖ペプチド合成への応用が期待されている。本研究では endo-M を用いたタンパク質への非天然型糖鎖導入を目的として endo-M-N175Q の糖鎖認識に関する知見を得ることとした。

N-結合型糖鎖の共通コア構造に着目して図に示す 3 種類の 4 糖オキサゾリン誘導体 **1**～**3** および 2 糖誘導体 **4~6** を合成し、endo-M（WT）と endo-M-N175Q を用いて糖転移反応を行った。4 糖ガラクトース誘導体は、ガラクトース残基の 2,3,4,6 位に遊離の水酸基を有するラクトサミン誘導体に対してマンノース供与体を 3,6 位に位置選択的に導入することで合成した。得られたガラクト型 4 糖のガラクトース残基の 2,4 位の水酸基の立体を反転させることにより 4 糖マンノ型誘導体を、4 位水酸基のみを反転させることにより 4 糖グルコ型誘導体を合成した。一方 2 糖誘導体は、ラクトサミン誘導体の 3,6 位水酸基を Piv 基にて選択的に保護した後に 2,4 位の水酸基の立体を反転することでマンノ型 2 糖を合成した。4 糖および 2 糖誘導体の保護基を除去した後に還元末端部分をオキサゾリン化することで糖供与体へと導いた。得られたオキサゾリン誘導体を用いて endo-M-N175Q および endo-M による *p*NP-GlcNAc への糖転移反応をおこなった。その結果、endo-M-N175Q は 4 糖マンノ体 **3** のみを転移したのに対し、endo-M はマンノ体 4 糖 **3** と 2 糖 **6** に加え、グルコ体 4 糖 **2** および 2 糖 **5** も転移した。また、両酵素ともガラクト型は基質としなかった。これらの結果より、endo-M は基質特異性が広く、一方 endo-M-N175Q は天然型構造を厳密に認識することが明らかとなった。



endo-M, transglycosylation, oligosaccharides synthesis

講演番号：4A02a17
講演日時、会場：3 月 30 日 11:54～ A 校舎 02 会場

変異酵素 Endo-M N175H の酵素学的解析と効率的な糖転移反応の検討

Studies on enzymological analysis of Endo-M N175H mutant and its efficient condition for transglycosylation reaction

○坂口 広大、加藤 紀彦、山本 憲二（石川県大・生資工研）
○KOUTA SAKAGUCHI, TOSHIHIKO KATOH, KENJI YAMAMOTO (Ishikawa Pref. Univ., Res. Inst. Bioresour. Biotechnol.)

糸状菌 *Mucor hiemalis* 由来の Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase（Endo-M）は糖タンパク質や糖ペプチドのアスパラギン結合型糖鎖の結合部に作用してタンパク質やペプチドに 1 残基の *N*-Acetylglucosamine を残して糖鎖を遊離する加水分解活性のみならず、さまざまな化合物の水酸基に遊離した糖鎖を転移付加する糖転移活性をも有するユニークなエンド型酵素である。本酵素は化合物に糖鎖を付加するツールとして用いられているが、加水分解酵素であるため、糖転移反応によって生成した糖転移生成物は本酵素により加水分解されて失われる。そこで、Endo-M の酵素反応中間体であるオキサゾリン構造を有する N-型糖鎖を供与体とすることによって、糖転移反応を触媒するが糖転移生成物を加水分解しない glycosynthase-like に機能する変異酵素 N175Q を取得し、本変異酵素とオキサゾリン糖鎖誘導体を用いた効率的な糖鎖付加法を確立した。

本研究では、glycosynthase-like の変異酵素 N175Q がオキサゾリン糖鎖誘導体のみならず、シアロ糖ペプチドを糖鎖供与体とした場合においても効率的に糖転移生成物が得られることを見出し、さらに N175Q よりも N175H によって高い収率で糖転移生成物が得られることを見出した。すなわち、N175H の糖転移活性は N175Q よりも高く、その加水分解活性は N175Q よりも低いことが示された。そこで、より効率的な糖転移反応の条件を検討するために、N175H の反応の至適温度、至適 pH および速度論的パラメーターを調べた。その結果、至適温度（30℃）と至適 pH（pH6.0）については N175Q と大きな差異はみられなかった。しかし、糖転移反応の糖鎖受容体に対する kcat は N175Q が N175H よりも大きいことがわかったが、長時間の糖転移反応においては、N175H による生成物量が N175Q による生成物量よりも多くなることが示された。これは、N175Q の加水分解活性が N175H に比べて高いため、糖転移反応によって生成した糖転移生成物が加水分解されることによると考えられる。

本変異酵素は糖転移反応においてオキサゾリン糖鎖誘導体を糖鎖供与体として用いる必要がなく効率的に糖鎖付加を行うことができるために糖鎖工学において実用的な酵素になり得る可能性がある。

endo-β-*N*-acetylglucosaminidase, transglycosylation, Endo-M

講演番号：4A03a01
講演日時、会場：3 月 30 日 09:00～ A 校舎 03 会場

卵殻膜の機能を活用した燃料電池の開発

Development of fuel cell utilizing egg shell membranes

○谷藤 尚貴、西尾 幸祐、井田 健太郎、大江 ひかる、小西 那奈、小林 周平、田原 早央莉、可知 佳晃（米子高専）
○NAOKI TANIFUJI, Kosuke Nishio, kentarou ida, hikaru oe, nana konishi, shuuhei kobayashi, saori tabara, yoshiaki kachi (Yonago National College of Technology)

次世代の発電装置として期待されている燃料電池において，発電部位の要である電解質膜に関する新たな材料の提案として卵殻膜の応用を考案し，膜の主成分であるタンパク質によるプロトン伝導性を用いた発電が生じる現象を見出したので報告する．近年注目されているエネルギー資源にはメタンハイドレートやシェールガスなどがある．これらの資源は採取する技術が開発されていないために、近年まではエネルギーとして利用できる段階には至っていなかったが，近年は資源採掘技術の開発に伴いシェールガス革命という言葉で知られる様に採掘が実用化レベルで行われるようになったことから，我々の生活で消費される資源の寿命は数年前に比べると格段に伸びている．それによって，現在は新しいエネルギー開発だけではなく，今あるエネルギー資源をいかに効率良く使うかを重要視した研究が必要となっている．そこで本研究では，エネルギーロスの少ない発電装置として開発が進められている燃料電池内の高分子型電解質膜に注目し，我々が研究対象としてきた卵殻膜をその発電の要となる材料に置き換えた燃料電池の試作を行い，性能評価を行った．

実験で用いる卵殻膜は，酢酸で外側の卵殻を溶解除去して得た膜について，上下の曲面の大きな部位を切除して赤道面を切り出すことで 3×3 ㎝ 角程度の平面性の膜が得られた. 触媒となる白金は切り出した卵殻膜に対してスパッタコーティングを行うことで，既成品における触媒量に比べると少量ではあるものの，膜の両面に対して一定量の白金を付着させた．これを高分子型電解質膜の代替品として，燃料電池セルの中に導入して，メタノール水溶液を加えた際の発電特性について I-V 特性で評価した．

予備試験として，白金コートされた部位にテスターを当てて，片面へメタノールを滴下すると発電が生じた．これは白金により生じた化学反応で生じたプロトンが卵殻膜を介して反対側の白金面へ伝導したことを示唆する現象である．次に，燃料電池セルの電極版に挟み込んだセルで発電性能を評価した際に，当初は装置に物理的に生じる隙間に由来するクロスオーバーが出力の安定化の障害となったが，両面導電テープによる燃料の横漏れと導電性を確保した結果，開放電圧 700 mV で性能が安定化した．卵殻膜には水溶性の化合物に対する吸着能が有り，これを化学物質の添加手段として活用した結果，有機色素分子や金属塩化物などの吸着後の卵殻膜では未処理の膜と比べると電流値の増加が見られた．これは，添加物が卵殻膜のタンパク質へ吸着された部位がプロトン伝導部位として作用して，本来卵殻膜で示していたプロトン伝導性を高める寄与を示したと予想され，その結果として燃料電池の発電性能の向上が繋がったと考えている．

egg shell membrane, fuel cell

講演番号：4A03a02
講演日時、会場：3 月 30 日 09:11～ A 校舎 03 会場

生乳からのグリセロール資化性菌の分離と解析

Isolation and characterization of glycerol utilizing organisms from raw milk.

○布川 玲奈[1]、松井 徹[2]、上田 誠[1]、高屋 朋彰[1] ([1]小山高専物質、[2]琉大熱生研)
○Reina NUNOKAWA[1], Toru MATSUI[2], Makoto UEDA[1], Tomoaki KOUYA[1] ([1]Oyama NCT. , [2]TBRC, Univ. Ryukyus.)

【背景・目的】バイオディーゼル燃料（BDF）は軽油に近い特性を持つことから，従来の化石燃料に替わる燃料として注目されている．しかし，BDF 製造のプロセスで副生するグリセロールは，精製にコストがかかるためその多くが廃棄されている．本研究では，産業廃棄物であるグリセロールの微生物変換を目的として，生乳由来の微生物（プロピオン酸菌，乳酸菌）を単離し，グリセロールを資化する候補株の分離と解析を行った．

【方法】微生物の分離源としてウシ生乳およびヤギ生乳を用いた．プロピオン酸菌および乳酸菌の単離用培地として， YEL 培地および MRS 培地をそれぞれ使用した．生乳を単離用寒天培地に塗布し，30℃で 3～7 日間の嫌気培養を行った．得られたコロニーの形状等を目視で確認し，候補株を釣菌して液体培地で静置培養した．得られた候補株は，-80℃で保管した．

次に，単離した候補株の炭素源の資化性試験を行った．炭素源として，グルコース，乳酸ナトリウム, およびグリセロールを用いた. 初期炭素源濃度を 5g/L に調整した各培地に候補株を初期濁度（O. D. $_{660}$）≒0．1 となるように接種し，静置培養を行った．72 時間培養して吸光度（O．D．$_{660}$）を測定した後，遠心分離（20，000×*g*， 20 min）により培養上清を回収した．得られた培養上清中の有機酸濃度は Shim-Pack SCR-102H カラム（島津製作所）と電気伝導度検出器（島津製作所）を備えた HPLC により測定した．また，単離菌の推定はカタラーゼ試験および 16S rRNA 系統解析により行った．

【結果】ウシ生乳およびヤギ生乳から，29 菌株（YEL 培地：15 菌株，MRS 培地：14 菌株）の候補株を単離した．単離した候補株のうち，グルコースを炭素源としてプロピオン酸と酢酸を生産するカタラーゼ陽性菌（プロピオン酸菌候補株）は 9 菌株, グルコースを炭素源として乳酸を生産するカタラーゼ陰性菌（乳酸菌候補株）は 12 菌株であった．次に，これらの候補株に対して炭素源の資化性試験を行った．その結果，7 菌株（プロピオン酸菌候補株 6 菌株および乳酸菌候補株 1 菌株）がグリセロールを炭素源として有意に増殖した．現在，見出したこれらの候補株の 16S rRNA 系統解析を行っている．

Propionibacteria, Lactic acid bacteria, glycerol

講演番号：4A03a03
講演日時、会場：3 月 30 日 09:22～ A 校舎 03 会場

幌延深部地下環境における腐植物質分解能を示す嫌気性微生物の探索

Isolation of anaerobic bacteria capable of degrading humic substances from the terrestrial deep subsurface environment in Horonobe, Hokkaido, Japan.

○上野 晃生[1]、清水 了[1]、玉村 修司[1]、奥山 英登志[2]、長沼 毅[3]、金子 勝比古[1,4] ([1]幌延地圏環境研究所、[2]北大院・地球環境、[3]広島大院・生物圏科学、[4]北大院・工)
○ Akio UENO[1], Satoru SHIMIZU[1], Shuji TAMAMURA[1], Hidetoshi OKUYAMA[2], Takeshi NAGANUMA[3], Katsuhiko KANEKO[1,4] ([1]H-RISE, [2]Grad.School Env.Earth.Sci.Hokkaido University, [3]Hiroshima University, [4]Grad.School Eng. Hokkaido University)

【研究背景】
地圏環境有機物の主要分画を成す腐植物質は、環境中では非常に分解されにくい安定な物質のため、微生物の炭素源としての利用性はほとんど無いと考えられている。しかしながら、腐植物質分解能を有する微生物の報告があることから [1-3]、腐植物質は微生物分解を経て地圏環境中の炭素循環に重要な役割を果たしていると考えられる。現在まで報告のある微生物による腐植物質分解は好気条件で行われており、嫌気条件で調べられた例は非常に僅かである [4]。嫌気環境である深部地下環境おいても腐植物質分解に関わる微生物が存在するのかどうか、また、そのような微生物が存在するならば、腐植物質に対しどのような影響を与えるのかは不明である。本研究では、腐植物質の一画分であるフミン酸(humic acid; HA)分解能を有すると考えられる嫌気性細菌の探索と、それらの微生物が HA 分子構造に与える影響を調べた。

【方法】
日本原子力研究開発機構・幌延深地層研究施設より採取した地下水を接種源とし、市販のフミン酸 Aldrich HA を添加した培養液を用い、嫌気条件下での集積培養を行った。その結果、*Clostridium* 属に分類される単離株(HSAI-1 株)を得た。Aldrich HA もしくは珪藻質泥岩(声問層)より調製した声問層 HA を添加した培養液にて HSAI-1 株の培養を行い、高速サイズ排除クロマトグラフィー(HPSEC)とフーリエ変換赤外分光スペクトル(FT-IR)解析による HA 分析を既知の方法で行った [5]。

【結果及び考察】
HPSEC の結果、HA 主ピークの分子量分布が低分子側にシフトした一方、高分子量の HA ピークが観察された。FT-IR 解析では、Aldrich HA と声問層 HA では 3420 と 1710 cm^{-1} 付近の、声問層 HA ではさらに 1035 cm^{-1} 付近の吸収の消失が観察され、双方の HA において 3290、3070、1540、1450 cm^{-1} 付近の吸収の出現が観察された。これらの結果から、HSAI-1 株は HA の一部分の構造を分解する一方、HSAI-1 株由来の細胞成分が HA に吸着することにより分子構造が変化し、高分子量の HA が生成している可能性が考えられた。現在、腐植物質を嫌気条件下で分解する可能性のある微生物探索を引き続き行っている。

【参考文献】
[1)]Dari *et al.*(1995) FEMS Microbiol. Ecol. 16:115-122.; [2)]Grinhut *et al.*(2011) Environ. Sci. Technol. 45:2748-2754.; [3)]Yanagi *et al.*(2008) Microbes Environ. 23:44-48.; [4)]Liang *et al.* (2009) Chemosphere 74:1315-1320.; [5)]Ueno *et al.*(2013) Geomicrobiol. J. in press.

humic acids, deep subsurface environment, *Clostridium*

講演番号：4A03a04
講演日時、会場：3 月 30 日 09:33～ A 校舎 03 会場

クロム・銅・ヒ素(CCA)系保存剤で処理された木材に結合するペプチドの探索

Selection of peptide showing binding ability to CCA-treated wood

○太田原 統[1]、中澤 光[2]、梅津 光央[2]、吉田 誠[1] ([1]東京農工大農、[2]東北大院工)
○Osamu OTAHARA[1], Hikaru NAKAZAWA[2], Mitsuo UMETSU[2], Makoto YOSHIDA[1] ([1]Tokyo univ. of Agric. and Technol., [2]Tohoku Univ.)

クロム・銅・ヒ素化合物系木材保存剤（CCA）は，防蟻・防腐に優れた木材保存剤である。低コストで高い効果が得られることから，1980 年頃から日本の木材保存剤市場を独占した。当初，CCA はヒ素などの有害物質を含むものの，木材中で難溶体を形成するため環境中へ流出する心配はないとされていた。しかしその後，徐々に CCA の危険性への懸念が高まり，法規制も相まって 1996 年を境に生産・使用量が急激に減少し，現在我が国ではほとんど使用されていない。このような中で，2000 年代初頭に建築リサイクル法が施行された。これにより，建築廃材は再資源化を行うことが義務付けられたが，ヒ素などの有害物質を含む CCA 処理木材は，現時点では再資源化が困難であるため廃棄する必要がある。これまでに大量の CCA 処理材が使用されてきたことから，今後数十年にわたり膨大な量の CCA 処理材が廃棄物として発生すると試算されており，この大量の CCA 処理廃材をその他の再利用可能な廃材と区別して処理するためには，CCA 処理廃材とその他の廃材とを効率的に判別する手法が不可欠である。これまでに，CCA に含まれる重金属を呈色反応で検出する手法や分光学的手法により検出する手法が数多く開発されているが，前者は特異性の低さや検出試薬の安定性などの問題を，また，後者はレーザなど大きな機器類を要するため現場での使用に不向きであるなどの問題を抱えている。そこで，演者らは，無機材料結合性ペプチドに着目した。無機材料結合性ペプチドは化合物表面の構造を認識して結合するため特異性が高く，また，抗原抗体反応を用いた検出が可能であるため，現場での使用に適していると考えられる。そこで，本研究では，ファージディスプレイペプチドライブラリーを用いて CCA 処理材に結合するペプチドの探索を試みた。

ファージディスプレイペプチドライブラリーとして，Ph.D.™-12 Phage Display Peptide Library (NEB 社)を用いた。非特異的に木材に吸着するペプチドを排除するため，ペプチドを提示したファージを，粉砕したスギ木紛に結合させた。この操作で木紛に吸着しなかったファージライブラリーを用いて，CCA 処理したスギ木紛を担体としたパニング操作を行った。これを 4 回繰り返した後，CCA 処理材吸着性ファージを選抜した。得られたファージのペプチド配列をコードする DNA 配列を決定し，その配列がコードするアミノ酸配列情報をもとにしてペプチドを合成した。このペプチドを用いて，CCA 処理材への吸着試験を試みた。

本研究は，科研費若手研究 B (課題番号：23780180)の助成を受けて実施された。

CCA, wood preservation, phage display

講演番号：4A03a05
講演日時、会場：3 月 30 日 09:44～ A 校舎 03 会場

アーミング酵母によるレアアース回収のためのテーラーメードスクリーニング法の開発

Development of tailor-made screening methods towards a recovery of rare earth elements using arming yeast

○橋本 遥、戎谷 一輝、黒田 浩一、植田 充美（京大院農・応用生命）
○Haruka HASHIMOTO, Kazuki EBISUTANI, Kouichi KURODA, Mitsuyoshi UEDA (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景・目的】ハイテク技術に必須の鉱物資源の供給を他国からの輸入に依存している日本では、特にレアアースをはじめとするレアメタルを国内の莫大な都市鉱山からリサイクルする技術の効率化および新規開発が急がれている。我々はこれまでに酵母細胞表層工学を用いた生物学的手法によるリサイクル技術の開発を進めているが[1,2]、さらなる発展のために目的のレアアースに対して特異的吸着能を示すペプチドをいかに取得して細胞表層提示するかが重要である。ところがレアアースイオンを配する天然のペプチド/タンパクは発見されていない。したがって、本研究では酵母表層でのレアアース回収に利用可能なレアアースイオン吸着能のある新規ペプチドの探索を目的として、ランダムペプチドを提示した酵母をレアアースイオン吸着能の有無によりスクリーニングする手法の開発を行った。
【方法・結果】低分子の蛍光標識化合物を用いたランダム酵母ライブラリーのスクリーニング法を開発している。我々は蛍光化合物と金属イオンキレート化合物とを化学合成し、金属イオンに結合し、かつ蛍光により検出可能な新たな蛍光標識化合物を作製した。この化合物は細胞表層上のペプチドに吸着した目的金属に作用することで、目的金属吸着能のあるアーミング酵母の蛍光による識別・選択を可能にする。また別法として磁性ビーズによるスクリーニング法の機能性も確認し、レアアースイオンを目的金属としたランダムペプチド提示酵母のスクリーニングを試みた。なおスクリーニング対象には、NNK コドンによりランダム化したアミノ酸配列をもつペプチドを提示した酵母ライブラリーを作製し用いた。上記 2 つのスクリーニング法の機能性について検討したのでまとめて報告する。

[1]K. Kuroda, M. Ueda, *Current Opinion in Biotechnology*, **22**, 427-433 (2011)
[2]植田　充美, 黒田　浩一, 環境資源工学会誌, **60**, 78-83 (2013)

cell surface engineering, rare earth elements, recovery technology

講演番号：4A03a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ A 校舎 03 会場

水生植物オオカナダモ(*Egeria densa*)の Mn 蓄積性

Mn accumulation of an aquatic plant *Egeria densa*

○浅山 拓馬、白木 望美、井上 翔太、奥田 絵里奈、長谷川 博、原田 英美子 (滋賀県大環境)
○TAKUMA ASAYAMA, Nozomi Shiraki, Shota Inoue, Erina Okuda, Hiroshi Hasegawa, Emiko Harada (Univ. of Shiga Pref.)

【緒言】水生植物のなかには重金属集積性が高い種があり、水圏の環境浄化（ファイトレメディエーション）や有用金属の回収（ファイトマイニング）に利用できる可能性がある。本研究では多年生単子葉沈水植物オオカナダモ（*Egeria densa*）に着目し、野外での重金属の集積を調査した。さらに、生育環境の調査と実験室内栽培系を用いて、本種における金属蓄積能の季節変動および環境要因の関連を調べた。

【材料及び方法】琵琶湖東岸の集落の環濠(北緯 35 度 14 分、東経 136 度 10 分)に生育しているオオカナダモを主な調査対象とした。環濠内に 5 ヶ所の採取地点を設け、2011 年 10 月に予備調査を行い、2012 年－2013 年の 4 月から 10 月にかけて月に 1 度採取地点のオオカナダモと水、底泥を採取した。重金属集積性に影響を与える可能性がある環境要因として、各採集地の水深、水温、pH、流速、濁度、溶存酸素量、硝酸イオン濃度を測定した。分析前処理として、植物体と土は乾燥後湿式分解、水はろ過を行い、ICP-AES（誘導結合プラズマ発光分光分析装置）を用いた金属の定量分析を行った。また実験室内で Gaudet’s medium を用いてオオカナダモを栽培し、Mn 集積と培地 pH の影響について調べた。節から形成された小植物体(シュート長約 5 cm)を切り離し、酸性、中性、アルカリ性処理区を設け栽培し、植物体の生育を画像処理により経時的に非破壊的に評価した。さらに、2 週間処理後の植物体の金属含有量を調べた。

【結果】2011 年 10 月に環濠で数種の水生植物を採取し、金属含有量を測定したところ、オオカナダモが種々の重金属を集積していることが分かった。特に、マンガン(Mn)含有量は陸生の重金属集積植物に匹敵する濃度であった。2012 年―2013 年の野外サンプルの分析結果では、単位重量当たりの Mn 集積量は季節変動しており、春先で高く、夏から秋に向けて減少していた。多量必須元素であるカリウムよりも Mn の蓄積量が多い月が確認された。Mn 蓄積の個体別最大蓄積量は 56,000 mg/kg であった。以上の結果から野外でオオカナダモが水中の Mn を効率的に回収していると考えられた。室内実験の結果、オオカナダモの Mn 蓄積量は野外で採集した植物体と比較して著しく低く、Mn の濃縮係数（植物体の Mn 濃度を環境水中の濃度で割った値）も野外での測定値とは異なっていた。また、酸性、中性、アルカリ性処理区間の比較では Mn 集積量に有意な差はなかった。これらの結果から、Mn の蓄積要因に水の pH は関係しないことと、野外では何らかの環境要因がオオカナダモの Mn 集積性に寄与していることが示唆された。

Egeria densa, manganese, metal hyperaccumulator

講演番号：4A03a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ A 校舎 03 会場

Pseudomonas stutzeri NT-I 株のジメチルジセレニド合成能の特徴
Characterization of dimethyldiselenide production by *Pseudomonas stutzeri* NT-I
○大塚 治[1]、成田 尚宣[1]、黒田 真史[2]、池 道彦[2]、山下 光雄[1] ([1]芝浦工大 SIT 総研 レアメタルバイオリサーチセンター、[2]大阪大院・工・環エネ)
○Osamu OOTSUKA[1], Takanobu Narita[1], Masashi Kuroda[2], Michihiko Ike[2], Mitsuo Yamashita[1] ([1]RMBC, Res. Org. Adv. Eng. SIT, Shibaura Inst. Tec., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

[目的]　廃水からセレンの浄化・回収技術の確立を目指して、我々は以前高濃度のセレン酸を好気的に還元するセレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を単離した。NT-I 株はセレノオキソアニオン（セレン酸・亜セレン酸）を還元して赤色元素態セレン（バイオセレンと称す）を合成する。さらに元素態セレンを還元し、ジメチルジセレニド（Dimethyl diselenide: DMDSe）を合成する。DMDSe は揮発し、気体セレンとして培養液中から除かれる。そこで NT-I 株を用いてセレノオキソアニオン含有廃水からセレンを気体として回収することで、純度の高いセレンを得られると考えた。本発表では NT-I 株が元素態セレンから DMDSe を合成する特徴を調べることを目的とした。

[実験方法]　バイオセレン、市販の元素態セレン粉末（結晶セレン）、亜セレン酸を還元剤で還元した赤色元素態セレン（非晶質セレン）を基質として、NT-I 株が DMDSe を合成できるかを調べた。実験には 5L 容量のバイオリアクターを用いた。TSB 培地（30g/L）を用いてバイオリアクターで NT-I 株を増殖させた後に、基質を投入して温度 38℃、pH9.0、撹拌速度 250rpm、通気量 1L/min の条件で反応を行った。揮発した DMDSe の捕集液には硝酸を用いた。捕集液と培養液を経時的にサンプリングした。培養液は培養液上清と沈殿に分画し、それぞれを分析サンプルとした。誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICP-AES）を用いてセレン量を測定した。捕集液に含まれるセレン量を NT-I 株が合成（揮発）した DMDSe 量とし、DMDSe 合成速度を計算した。

[結果]　結晶セレン、非晶質セレンを NT-I 株培養液に投入したところ、捕集液中や培養液上清にセレンを検出できなかった。培養液沈殿中に含まれる結晶セレン、非晶質セレン量は減少しなかった。以上のことから、NT-I 株は結晶セレン、非晶質セレンを基質として DMDSe を合成できないと示唆された。次にバイオセレンを NT-I 株培養液に投入したところ、沈殿中のセレン量は初期投入量の 80%程度が減少し、捕集液中のセレン量が増加した。なお TSB 培地にバイオセレンを投入しても変化はなかった。以上のことから、NT-I 株はバイオセレンを基質として DMDSe を合成でき、DMDSe 合成最高速度は 9.6 μ mol^{-1}・L^{-1}・h^{-1} と計算できた。調べた限りにおいては NT-I 株の DMDSe 合成最高速度は既存の報告値よりも速いことがわかった。

Pseudomonas stutzeri NT-I, selenium, dimethyl diselenide

講演番号：4A03a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ A 校舎 03 会場

好酸性鉄酸化菌を利用した廃電子基板からの有用金属回収

Metal recovery from waste printed circuit boards using acidophilic iron-oxidizing microorganisms

○東條 ふゆみ[1]、渡邊 陽祐[1]、宮田 直幸[1]、梁 瑞録[1]、谷 幸則[2]、福島 淳[1] ([1]秋田県大、[2]静岡県大)
○Fuyumi TOJO[1], Yosuke WATANABE[1], Naoyuki MIYATA[1], Ruilu Liang[1], Yukinori TANI[2], Jun FUKUSHIMA[1] ([1]Akita Pref. Univ., [2]Univ. of Shizuoka)

IT関連産業や自動車産業等の先端産業の発展に伴い、近年、レアメタル等有用金属の消費が世界的に急伸しているが、その供給構造は脆弱であり、特に資源の乏しい我が国ではその安定供給が重要課題となっている。一方で、国内で 廃棄される電気電子機器には多量の有用金属が残存しており、その再資源化が期待されている。

本研究では、好酸性鉄酸化菌を用いた効率的な有用金属回収技術(バイオリーチング)の確立を目的とし、有用菌株の選抜とそれを用いた廃電子基板からの金属回収を試みた。好酸性鉄酸化菌を用いたバイオリーチングは、微生物による鉄（II）酸化で生じた鉄（III）イオンが酸化剤となり、固相中の金属を溶出させるプロセスである。

初めに、研究室で保有する環境水由来の好酸性鉄酸化菌の集積培養系の中から、7 mM 鉄（II）イオンと希硫酸を含む培地（pH1.9、培養温度 25、37、45 ℃）で生育可能なものを選抜した。次に、廃電子基板中の含有量が多い、銅、アルミニウム、亜鉛、ニッケル、マンガンの各イオンに対する耐性を調べた。その結果、高濃度（～10 mM）の重金属イオンに対して耐性をもつ 1 つの集積培養系を取得することができた。この集積培養系を用いて、バイオリーチング試験を行った。

バイオリーチング試験には、培養温度と pH を制御可能な 2 L 容ジャーファーメンター装置を用いた。廃電子基板試料（パソコン由来）は、20 mm 以下の破砕物をさらにカッティングミル等で粉砕したものを用いた。選抜した集積培養系を用いて、45 ℃、pH1.8-1.9 で 4 日間リーチングを行った結果、銅、マンガン、ニッケル、アルミニウム、亜鉛はそれぞれ 80%以上の溶出が確認された。

既往研究と比較して、本研究では短時間での金属の溶出が認められた。今後は、本研究で用いた集積培養系の培養特性および微生物群集構造を解析するとともに、バイオリーチングの最適条件を詳細に検討する予定である。

なお、本研究は平成 25 年度環境研究総合推進費補助金（3K133012）の助成を受けて行った。

bioleaching, acidophilic iron-oxidizing microorganisms, metal recovery

講演番号：4A03a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ A 校舎 03 会場

核酸によるレアアース回収

Recovery and separation of rare earth elements using nucleic acid

○近藤 和博[1]、高橋 嘉夫[2] ([1]（株）アイシン・コスモス研究所、[2]広島大院理)
○Kazuhiro KONDO[1], Yoshio TAKAHASHI[2] ([1]Aisin Cosmos R&D, [2]Hiroshima Univ.)

レアアースは、産業のビタミンとも呼ばれ、磁石などの製品に幅広く使われている。現在レアアース資源の供給は、偏在性が高く、コストの安さから、中国がほぼ独占している。こうした独占状態を克服する上で、安価で効率的なレアアースの回収・分離技術を開発することは有意義である。本研究ではバクテリアへのレアアース吸着現象をヒントにリン酸含有量の多い核酸に着目し、核酸を用いたレアアースの分離回収を試みた。

DNA はアミノ基を多く含む塩基と呼ばれる部位があるため、分子内に 2 個アミノ基と反応する官能基を保有する二価性架橋剤スベリン酸ジスクシンイミジルにより DNA をろ紙に固定化し、細かく粉砕してカラムに充填し、レアアースを含む溶液をカラムに導入した後に、希塩酸でレアアースを溶離した。詳細な溶出条件を検討することで、レアアース各元素の DNA への親和性が異なることを示すことができた。一方、主要なレアアースのリサイクルの例として、自動車エンジン等に使われるネオジム（Nd）-鉄（Fe）-ホウ素（B）系の磁石の成分であるネオジムイオン（Nd3+）と鉄イオン（Fe3+）の分離を検討した。DNA 固定化カラムを用いて条件の最適化などを行ったところ、Nd3+と Fe3+を容易に分離できることが分かった。

様々な条件を検討している中で､高濃度レアースと DNA を混合すると沈殿を生じることが判明した。固定化したカラムでは処理量に難点があるため、新たな手法として沈殿法の開発を行なった。核酸ポリマーである DNA では溶解度が低く、レアアースの回収効率が数%と低いため、高濃度が可能な核酸モノマーであるイノシン酸（IMP）を用いた沈殿回収を検討した。塩化ネオジム溶液に IMP を添加することで 95%以上のネオジムを回収可能とした。更には IMP とレアアースの沈殿に炭酸ナトリウムを添加することで、レアアース炭酸塩に変換することができた。沈殿回収法は一度に多量の溶液を処理することも可能であり、沈殿物とすることで濃縮が容易となる利点がある。

以上から、DNA や IMP などの核酸はレアアース回収に使用することができるバイオ材料であり、レアアース元素濃縮回収や各元素分離能を示すことができた。

nucleic acids, rare earth elements

講演番号：4A03a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ A 校舎 03 会場

非鉄金属にキレート作用を示すシデロフォアのスクリーニングと希少金属回収への利用

Screening for novel siderophores that chelate non-iron metals and its availability for rare metal recovery

○篠崎 由紀子[1,2]、平舘 俊太郎[1]、牧野 知之[1]、中島(神戸) 敏明[3]、北本 宏子[1] ([1]農環研、[2]JSPS-RPD、[3]筑波大院・生命環境)
○Yukiko Shinozaki[1,2], Syuntaro Hiradate[1], Tomoyuki Makino[1], Toshiaki Nakajima-Kambe[3], Hiroko Kitamoto[1] ([1]NIAES, [2]JSPS-RPD, [3]Tsukuba Univ.)

【背景と目的】多くの微生物は生育に必要な鉄を細胞内に取り込むために、様々な構造の鉄キレート物質（シデロフォア）を生産することが知られている。一般にシデロフォアは３価鉄のみに対して強いキレート作用を示すと考えられてきたが、近年、非鉄金属に対しても強いキレート作用を示すシデロフォアがいくつか報告されている。本研究では、このようなシデロフォアを利用した排水等からの希少金属回収法の開発を最終目的として、有用なシデロフォアの探索を行っている。今回はその一例として、コバルト(Co)に対してキレート作用を示すシデロフォア生産菌のスクリーニングと、その生産物を利用した水溶液からの Co 回収の検討結果について報告する。
【方法と結果】Co キレート作用を示すシデロフォアの生産菌は、比較的高濃度の Co 存在下でも生育可能と予測される。そこで、1 mM $CoCl_2$ を含む細菌用天然培地(NB)10mL に土壌約 0.1g を添加して集積培養を行い、Co 耐性菌を取得した。スクリーニング源としては、一般的な畑土壌および、シデロフォア生産菌取得の報告例が少なく新規な株の取得が見込まれる小笠原諸島内で採取した土壌を用いた。取得した Co 耐性菌から、シデロフォア活性の判定として一般的な CAS アッセイにより、シデロフォア生産性を示す菌株を選抜した。その結果、20 種類の土壌から合計 12 株の Co 耐性を示すシデロフォア生産菌が得られた。各菌株が生産するシデロフォアの特性は、Co を保持させたキレート担体および疎水性担体を用いた抽出効率から簡易的に評価した。その結果、Co キレート作用を示唆し、かつ疎水性担体で抽出可能なシデロフォアの生産菌が 6 株得られたことが分かった。これらの 16S rDNA の部分配列を解析したところ、畑土壌由来の株は *Delftia* 属、小笠原土壌由来の株は *Cupriavidus* 属または *Pandoraea* 属の細菌であった。

シデロフォアを用いて水溶液から微量金属の回収が可能かを検討するため、Co を含む水溶液にシデロフォア粗抽出物を添加し、一定時間静置した後に疎水カラムに通し、カラム非吸着（素通り）画分および吸着画分（メタノールで溶出）の Co 濃度を ICP-OES にて測定した。その結果、カラム非吸着画分の Co 濃度はコントロール（シデロフォア非添加）に比べて低下し、シデロフォアの Co キレート作用が示唆された。また、Co の一部はカラムからメタノール溶出によって回収されることを確認した。最も高い Co 回収率を示したシデロフォア粗抽出物（*Pandoraea* 属細菌由来）から、分取 HPLC にてシデロフォアを精製し LC/MS に供したところ、この近縁種が生産する既知のシデロフォアの分子量と一致しなかったため、新規のシデロフォアが取得された可能性が高いと考えられる。

siderophore, cobalt, rare metal recovery

講演番号：4A03a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ A 校舎 03 会場

土壌化技術を利用した無機肥料の製造と有機質肥料活用型養液栽培

Inorganic nutrients production and organic hydroponics by Soilization

○篠原 信[1]、岩井 喬[2]、藤原 和樹[1]、河邑 ちひろ[1]、小川 順[3]、安藤 晃規[3]、加藤 康夫[4]、宮本 憲二[5]、高野 雅夫[2]、浅川 晋[6]([1]農研機構、[2]名古屋大、[3]京都大農、[4]富山県大、[5]慶應大理、[6]名大院・生命農)

○Makoto SHINOHARA[1], Takashi Iwai[2], Kazuki Fujiwara[1], Chihiro Kawamura[1], Jun Ogawa[3], Akinori Ando[3], Yasuo Kato[4], Kenji Miyamoto[5], Masao Takano[2], Susumu Asakawa[6] ([1]NARO, [2]Nagoya Univ., [3]Kyoto Univ., [4]Toyama Pref. Univ., [5]Keio Univ, [6]Grad Sch Bioagric Sci, Nagoya Univ)

【背景・目的】月の土は土壌ではない。土壌は「有機物を分解し植物に養分を供給する機能を有するもの」と定義することができ、そのような機能を有する媒体は地球においても土壌だけである。人工樹脂や人工培土など非土壌に土壌機能を付与する技術はこれまでになく、有機物を肥料として陥る場合は土壌で栽培せざるを得なかった。この課題を克服するため、土壌微生物の培養法を検討した結果、アンモニア化成、硝酸化成という土壌の基本機能を水中でも再現できる微生物培養法（並行複式無機化法）を開発した。培養した微生物を多孔質担体に固定化することにより、ウレタンなどの人工樹脂に土壌機能を付与する土壌化(Solization)が可能になった。土壌化した担体を利用することで有機質資源から無機肥料を製造することができるほか、培土として利用することで有機質肥料活用型養液栽培が可能である。そこで本研究では、種々の多孔質担体に微生物を固定化して土壌化し、その諸性質を検討することとした。

【方法・結果】並行複式無機化反応を触媒する微生物群を培養し、各種多孔質担体に微生物群を固定化した。担体をカラム状に整形し、鰹煮汁（鰹節工場の副産物）を添加、一晩静置後、蒸留水で洗浄し、流出液を回収した。その結果、鰹煮汁に含まれる有機態窒素はアンモニウムイオン、亜硝酸イオン、硝酸イオンなどの無機態窒素イオンに変換することを確認した。無機態窒素イオンの回収率が高い多孔質担体として、ロックウール、ウレタン、籾殻燻炭、蛎殻、ヤシ殻などを選抜することができた。ロックウール、ウレタン、籾殻燻炭を培地とし、トマトの固形培地耕（養液栽培の一手法）を行ったところ、いずれも健全にトマトが生育した。特に籾殻燻炭は軽量で入手しやすく、人工土壌として有望であることが明らかとなった。

1) 篠原信(2008)「化学と生物」, **46**, 230-232.

2) Shinohara M, Aoyama C, Fujiwara K, Watanabe A, Ohmori H, Uehara Y, Takano M (2011) *Soil Sci. Plant Nutr.*, **57**, 190-203.

organic hydroponics, soilization, multiple parallel mineralization

講演番号：4A03a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ A 校舎 03 会場

有機質肥料活用型養液栽培における根圏微生物群が Fusarium oxysporum f. sp. lactucae に及ぼす影響

Influence of the rhizosphere microbes on Fusarium oxysporum f. sp. lactucae in the multiple parallel mineralization system

○藤原 和樹[1]、染谷 信孝[1]、飯田 祐一郎[1]、安藤 晃規[2]、大西 純[1]、小川 順[2]、加藤 康夫[3]、宮本 憲二[4]、高野 雅夫[5]、寺見 文宏[1]、篠原 信[1] ([1]農研機構、[2]京大・生理化学・京大院農・応用生命、[3]富山県大工・生工研セ、[4]慶大・理工、[5]名大院・環境)
○kazuki FUJIWARA[1], Nobutaka Someya[1], Yuichiro Iida[1], Akinori Ando[2], Jun Ohnishi[1], Jun Ogawa[2], Yasuo Kato[3], Kenji Miyamoto[4], Masao Takano[5], Fumihiro Terami[1], Makoto Shinohara[1] ([1]NARO, [2]Kyoto Univ., [3]Toyama Pref. Univ., [4]Keio Univ., [5]Naogya Univ.)

【目的】有機質肥料活用型養液栽培は微生物生態系を水中に構築することで有機質肥料を分解し、養分を供給する栽培方法である[1)]。この微生物生態系は有機質肥料を無機化するだけではなく、根部病害を抑止する効果も保持している[2)]。従来の無機養液栽培では培養液中に競合する微生物がいないため、病原菌の侵入を許すと容易に蔓延し深刻な被害を受けるが、有機質肥料活用型養液栽培は病原菌を潅注接種しても根部病害が発生しない。本研究では本栽培技術での培養液中から病原菌に影響を与える微生物群の単離を試みた。
【方法】並行複式無機化法（有機成分のアンモニアへの分解と更なる硝化が効率的に進行する培養条件）により土壌微生物を培養し、この培養液からR2A寒天培地を用いて細菌群の単離培養を行った。これら単離菌株を1/10 Nutrient Broth(NB)液体培地で培養し、この培養液に根部病原菌（レタス根腐病菌*Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*）を接種し、その消長を調べた。また、単離細菌群が根部病原菌の形態に及ぼす影響を観察した。
【結果】R2A寒天培地から得た単離菌株を1/10NB液体培地で2日間培養した結果、13菌株の細菌群を選抜した。この13菌株混合培養液中の根部病原菌の消長について、13菌株を含まない1/10NB液体培地中では病原菌の菌密度の上昇が認められたのに対し、13菌株混合培養液中で病原菌が検出されるものの菌密度の上昇は認められなかった。13菌株のうち2菌株の組み合わせを検証したところ、７菌株間における5組で病原性*F. oxysporum*の菌密度の上昇が認められなかった。一方、7菌株をそれぞれ単独で病原性*F. oxysporum*と培養したところ、病原菌の菌密度の上昇が認められた。これらの結果から、有機培養液中の微生物生態系から単離培養した細菌群でも根部病原菌の菌密度の上昇が抑制されることが明らかとなった。

1) M. Shinohara, C. Aoyama, K. Fujiwara, A. Watanabe, H. Ohmori, Y. Uehara, and M. Takano, *Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 57. No. 2, p. 190-203 (2011)
2) K. Fujiwara, C. Aoyama, M. Takano, and M. Shinohara, *Journal of General Plant Pathology*, vol. 78. No. 3, p. 217-220 (2012)

organic hydroponics, disease suppression, biofilm

講演番号：4A03a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ A 校舎 03 会場

有機質肥料活用型養液栽培における硝化関連微生物群集の動態解析

Transition of the microbial community related to nitrification process in the organic hydroponics

○宇佐美 晶子[1]、安藤 晃規[1,2]、犬飼 龍矢[1]、溝渕 久恭[1]、池本 成美[1]、島 純[3]、篠原 亘[5]、吉田 昭介[5]、宮本 憲二[5]、加藤 康夫[6]、藤原 和樹[7]、浅川 晋[4]、篠原 信[7]、小川 順[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大・生理化学、[3]京大・微生物科学、[4]名大院・生命農、[5]慶大・理工、[6]富山県立大工・生工研セ、[7]農研機構）

○Shoko USAMI[1], Akinori Ando[1,2], Ryuya Inukai[1], Hisanori Mizobuchi[1], Narumi Ikemoto[1], Jun Shima[3], Wataru Shinohara[5], Syosuke Yoshida[5], Kenji Miyamoto[5], Yasuo Kato[6], Kazuki Fujiwara[7], Susumu Asakawa[4], Makoto Shinohara[7], Jun Ogawa[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [3]Res. Div. Microb. Sci., Kyoto Univ., [4]Grad Sch Bioagric Sci, Nagoya Univ., [5]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [6]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [7]NARO)

【目的】

有機溶液栽培は環境負荷を低減し、効率的な栽培を実現する水耕栽培として期待を集めている。本技術は、通気下で有機態窒素の硝化微生物群を馴養する耕水工程と、植物定植後に有機物の硝化と栽培を同時に行う栽培工程で構成される。これまでに微生物源として硝化能が優れた土壌を選抜し、数回硝化を行わせることで安定した硝化能を示す微生物群集を獲得することができ、有機養液栽培用の微生物剤として活用できることを報告した。本研究では、硝化工程における菌相の推移を PCR-DGGE 法によって解析し、ゲノムシークエンスによる菌の同定を行ったので報告する。

【方法】

有機廃棄物としてのポリペプトン NF（0.5 g/L)、炭酸カルシウム（1 g/L)、微生物源としてのバーク堆肥（5 g/L）を含む溶液（20 ml）を試験管に分注し、28°C、300 rpm で培養し、硝化を行わせた。随時、窒素動態を測定し、微生物群の回収、ゲノム抽出を行った。抽出したゲノムを対象に 16S rRNA V6-V8 領域、ならびに、アンモニア酸化菌群、アンモニア酸化アーケア群、亜硝酸酸化菌群に特異的なプライマーを利用して PCR-DGGE 解析を行い、各バンドに対応する遺伝子配列を解析して個々の菌の簡易的な同定を行った。

【結果】

硝化工程中の細菌相は、土壌の細菌相にくらべ単純化されており、一定の菌相に収斂していることが明らかになった。その中でも硝化に関わる菌相は再現性良く、窒素動態と連動して推移していた。また、我々が開発した微生物剤の中においても、硝化活性が報告されている菌群が同定された。菌群の推移を簡便にモニターするための real time PCR を用いた解析系の確立を試み、DGGE により観察された窒素動態と連動する菌群集の推移との相関関係を解析している。

the organic hydroponics, nitrification, PCR-DGGE

講演番号：4A03a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ A 校舎 03 会場

次世代シーケンサーによる有機養液栽培における根圏微生物叢の経時変化解析
Comprehensive and transitional analysis of microbial community in the organic hydroponics
○篠原 亘[1]、吉田 昭介[1]、安藤 晃規[2,3]、小川 順[2,3]、加藤 康夫[4]、浅川 晋[5]、篠原 信[6]、宮本 憲二[1] ([1]慶大・理工、[2]京大院農・応用生命、[3]京大・生理化学、[4]富山県立大工・生工研セ、[5]名大院・生命農、[6]農研機構)
○Wataru SHINOHARA[1], Shosuke YOSHIDA[1], Akinori ANDO[2,3], Jun OGAWA[2,3], Yasuo KATO[4], Susumu ASAKAWA[5], Makoto SHINOHARA[6], Kenji MIYAMOTO[1] ([1]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [2]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [4]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [5]Grad Sch Bioagric Sci., Nagoya Univ., [6]NARO)

[背景・目的] 有機肥料活用型養液栽培（有機養液栽培）は、有機物を肥料として使用できる栽培方法である。植物を養液中に定植すると、根に微生物の群集構造（バイオフィルム）が形成される。これら微生物群は有機物からアンモニア化成、硝酸化成を経て、植物への栄養供給を行う。またそれに加え、根部の病害抑止を担う可能性も示唆されている。そこで、本研究ではバイオフィルム微生物叢の菌種組成および経時的な変化に着目し、次世代シーケンサーを用いた菌叢解析を行った。
[方法]マイクロトム（トマト）を鰹煮汁を肥料とした養液中で栽培した。栽培槽および根圏に形成されるバイオフィルムを経時的に計 6 点（植物定植前 1 点、定植直後 2 点、それ以降 3 点）採取し、メタゲノム抽出後、次世代シーケンサーによる網羅的配列解析を行った。得られたリード配列はメタゲノム専用の解析サーバーを用いて由来菌種を推定した。そして、菌種組成の経時的な推移を追跡した。特に硝酸化成を担う菌種に着目し、その推移を解析した。また、本研究で得られた菌種組成のデータセットを用いて、様々な環境メタゲノムのデータセットとの比較を行った。
[結果]各栽培フェイズにおける菌叢、およびその推移を解析したところ、定植前・定植直後・それ以降の 3 期間で大きく異なることが分かった。アンモニアから硝酸を産生する菌種として知られる、*Nitrobacter* 属、*Nitrococcus* 属、*Nitrospira* 属、*Nitrosospira* 属、*Nitrosococcus* 属、*Nitrosomonas* 属が 0.01%以上の存在比で確認できた。そのうち、亜硝酸酸化菌である *Nitrobacter* 属は、いずれのフェイズでも 0.4～0.9%程度の高い割合で存在することが確認された。環境メタゲノムデータセットとの比較では、有機養液栽培の菌叢はどの環境メタゲノムとも親近性は低く、独特な菌叢を形成していることが示唆された。

Rhizosphere microbiome, Organic hydroponics, Next generation sequencing

講演番号：4A03a17
講演日時、会場：3 月 30 日 11:54～ A 校舎 03 会場

有機質肥料活用型養液栽培法を用いた水稲根圏微生物群集解析の試み

Analysis of microbial community in rice rhizosphere by organic hydroponics of rice plants

赤木 美咲[2]、米田 恒明[2]、服部 亜紀[2]、篠原 信[3]、木村 眞人[4]、○浅川 晋[1]([1]名古屋大院生命農、[2]名古屋大農、[3]農研機構・野茶研、[4]農林水産消費安全技術センター)
Misaki AKAGI[2], Komei YONEDA[2], Aki HATTORI[2], Makoto SHINOHARA[3], Makoto KIMURA[4], ○SUSUMU ASAKAWA[1] ([1]Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [2]Sch. Agric., Nagoya Univ., [3]NARO Inst. Veg. Tea Sci., [4]FAMIC)

［目的］水稲根圏微生物はイネの生育に重要な役割を果たしていると考えられるが、それら微生物群集の活動と水稲根との相互作用はほとんど明らかにされていない。本研究では、有機物を分解する微生物生態系を養液中に構築する有機質肥料活用型養液栽培法（篠原、2006）により水稲を栽培し、水稲根圏微生物群集の解析を試みる。本方法では養液中の植物根にバイオフィルムが付着し、そこで微生物群が有機物を分解していると考えられているため、イネの根に付着する微生物バイオフィルムを水稲根圏微生物群集のモデルとして捉えることができる。本方法により水稲苗を栽培し、養液および根圏に生じた微生物バイオフィルムの細菌群集を解析することにより、その種類と動態を明らかにすることを目的とした。
［方法］バーク堆肥あるいは水田土壌を微生物接種源、鰹煮汁を有機質肥料として用い、ジャーファーメンターで保温通気培養することにより調製した有機養液（耕水）を 1L ポットに入れ、発芽後約 1 週間のコシヒカリの苗を植えて温室内で 4 週間栽培した。耕水および根より採取したバイオフィルムから DNA を抽出し、DGGE 法とクローンライブラリ解析により細菌群集の遷移と種類構成を調査した。
［結果］ジャーファーメンターでの培養では耕水中にアンモニア、亜硝酸、硝酸が逐次的に生成し、耕水内の細菌群集が培養初期から後期にかけて変化した。また、微生物接種源の違いにより DGGE パターンが異なったため、耕水中のアンモニア酸化細菌群集は微生物接種源に影響を受けることが示唆された。有機養液栽培下の水稲根に付着したバイオフィルムの細菌群集は水稲栽培初期から中期にかけて大きく変化したが、その後の変化は小さく、有機質肥料添加後には添加前よりも濃く現れる少数のバンドが認められた。また、水田圃場で生育した水稲の根圏土壌の細菌群集の DGGE パターンと比較すると、養液栽培下の根のバイオフィルムの細菌群集の DGGE パターンではバンドの本数が 2/3 程度に減少し、単純化され解析の容易な群集構成となっていると考えられた。クローンの配列解析の結果、耕水では Firmicutes や Proteobacteria 門の細菌が、根圏バイオフィルムでは Firmicutes、Sphingobacteriia、Proteobacteria 門の細菌が群集の主要構成菌群であることが示された。今後、水稲根圏のバイオフィルムを構成する細菌群集の機能・動態やイネとの間の相互作用を明らかにしていきたい。
文献　篠原　信（2006）農業および園芸，81，753-764.

microbial community, organic hydroponics, rice rhizosphere

講演番号：4A04a03
講演日時、会場：3 月 30 日 09:22～ A 校舎 04 会場

エピロドデンドリン酸化体の化学合成と生理活性評価

Chemical synthesis and biological evaluation of the oxidation product of epirhododendrin

○岩舘 丈央[1]、二瓶 賢一[1,2] ([1]東農工大院連農、[2]宇都宮大農)
○Takehiro IWADATE[1], Ken-ichi NIHEI[1,2] ([1]Tokyo Univ. Agric. and Technol., [2]Utsunomiya Univ.)

【目的】

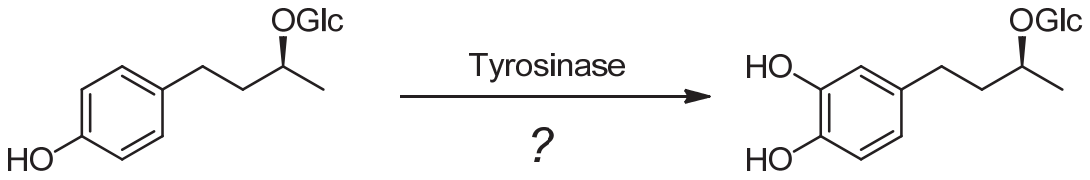
日本固有のカエデ科植物であるメグスリノキ(*Acer nikoense*)には，特徴的な二次代謝産物として(+)-epirhododendrin(**1**)が含まれる．この配糖体 **1** はモノフェノール構造を有していることから，酸化還元酵素であるチロシナーゼの基質になることが予想される．ビタミン C や NADH などの還元剤の共存下，チロシナーゼによりモノフェノールの酸化を行うと，*o*-ジフェノールが蓄積することが知られている．チロシナーゼは多くの生物に見出される酵素であり，*A. nikoense* にも含まれている可能性も高い．我々はチロシナーゼによる **1** の酸化が *A. nikoense* およびそれを用いた食品中でも起き，ジフェノール **2** が生成されているのではないかと考えた．そこで，新規天然有機化合物と予想される **2** を化学合成し，*A. nikoense* 中の存在確認および生理活性評価を行うこととした．

【方法および結果】

ラセミ体で合成したアグリコン部分を配糖体化することでエピマー混合物を得た後，望みの立体を有する **2** の単離を試みた．しかしながら，逆相 HPLC において，各エピマーの保持時間の差が非常に小さく，効率的な **2** の大量供給は不可能であった．

そこでアグリコン部分の前駆体である末端オレフィンに対して，シャープレス不斉ジヒドロキシ化によって不斉点を構築する **2** の合成計画を立案した．市販のカフェ酸から変換したオレフィンに対する不斉ジヒドロキシ化の後，一級水酸基を還元し，エナンチオマー過剰率 74%で *S* の絶対立体配置を持つ **2** のアグリコン部分を得た．

現在，アグリコン部分の効率的合成，**2** の生理活性評価および *A. nikoense* における **2** の存在確認を行っている．



(+)-Epirhododendrin (**1**) **2**

Tyrosinase, *o*-diphenol, *Acer nikoense*

講演番号：4A04a04
講演日時、会場：3 月 30 日 09:33～ A 校舎 04 会場

ツバキ科ビベンジル配糖体の化学合成と生理活性評価

Chemical Synthesis and Biological Evaluation of Bibenzyl Glycoside from Theaceous Plant

○大出 知里[1]、小太刀 悠佳[1]、島田 亙[2]、井筒 ゆき子[2]、二瓶 賢一[1] ([1]宇都宮大農、[2]コスモステクニカルセンター)
○Chisato ODE[1], Yuka KODACHI[1], Wataru SHIMADA[2], Yukiko IDUTSU[2], Ken-ichi NIHEI[1] ([1]Utsunomiya Univ., [2]Cosmos technical center)

【目的】

ツバキ科植物，*Camellia oleifera* に含まれるビベンジル配糖体は，抗酸化作用や抗老化作用を示すレスベラトロールの類似化合物である．しかしながら，この配糖体の生理活性の詳細については，明らかではない．当研究分野では，様々なビベンジル配糖体を化学合成し，それらに強力なチロシナーゼ阻害活性があることを見い出した．レゾルシノール骨格を持つこのツバキ科ビベンジル配糖体も，同様に，チロシナーゼ阻害活性などの酸化酵素の阻害やラジカル捕捉活性などの抗酸化性を示す可能性が高い．また，この配糖体の全合成は現在まで達成されていない．そこで本研究では，Wittig 反応とトリクロロアセトイミデート法を鍵反応に用いて，ツバキ科ビベンジル配糖体の全合成を行い，その生理活性の評価した．

【結果および考察】

出発物質であるジヒドロキシベンズアルデヒドの水酸基を TBS 基で保護した．一方，ヒドロキシベンズアルデヒドの水酸基をベンジル基で保護し，そのアルデヒドを還元してアルコールに導いた．得られたアルコールを塩素化し，トリフェニルホスフィンを用いてホスホニウム塩を調製した．このホスホニウム塩と先に合成したジヒドロキシベンズアルデヒドとの Wittig 反応により，スチルベンを得た．

得られたスチルベンの二重結合の還元およびベンジル基の脱保護を，水素添加反応により同時に行い，アグリコン部分を合成した．このアグリコン部分と市販の糖から誘導した糖ドナーを，トリクロロアセトイミデート法を用いて連結し，配糖体を得た．最後にすべての保護基を除去して，目的とするツバキ科ビベンジル配糖体の全合成を達成した(6 段階，総収率 10%)．

現在，この配糖体の生理活性の評価および類似誘導体の化学合成を行っている．



bibenzyl, Wittig reaction, glycosylation

講演番号：4A04a05
講演日時、会場：3 月 30 日 09:44～ A 校舎 04 会場

オオヨモギ精油の鎮静作用に関する研究

Studies on sedative effect of essential oil produced from *Artemisia montana*

○國廣 建斗[1]、後藤 広太郎[1]、田島 範明[2]、妙田 貴夫[1]、藤森 嶺[1]、戸枝 一喜[1]、西澤 信[1] ([1]東農大・生物・食香、[2]株式会社アルビオン)
○Kento KUNIHIRO[1], Kotaro GOTO[1], Noriaki TAJIMA[2], Takao MYODA[1], Takane FUJIMORI[1], Kazuki TOEDA[1], Makoto NISHIZAWA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]ALBION CO., LTD.)

ヨモギ属 (*Artemisia*) はキク科の多年草である。世界中で約 250 種類が分布しており、日本では約 30 種類が存在している。中でもオオヨモギ (*Artemisia montana*) は北海道などの寒冷な地方に多くみられる種である。茎や葉裏には白色の綿毛が密生し、その綿毛を集めたものが艾 (もぐさ) と呼ばれ、灸に用いられている。草餅など食用になるほか、艾葉として薬用に利用されてきた。その精油は若草のような芳香を有しており、近年アロマテラピーにおいて注目されている。しかし、ヨモギのアロマ効果に関する科学的な解明は全くなされていない。そこで本研究では、オオヨモギの香気成分を詳細に分析し、その鎮静作用を酸素化ヘモグロビン相対濃度変化量 (Δ[oxy-Hb]) を指標として解析した。

【実験方法】

2012 年 6~8 月に東京農業大学オホーツクキャンパスで採取した乾燥オオヨモギを直接蒸留に供し、精油 (yomogi Oil) を得た。これを GC/MS-O で分析し、さらに AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis) 法によりオオヨモギの重要香気成分を探索した。鎮静作用は被験者に携帯型近赤外線組織酸素モニタ装置 (NIRS) を装着し、腹外側前頭前野 (ventrolateral prefrontal cortex:VLPFC) における酸素化ヘモグロビン相対濃度変化量 (Δ[oxy-Hb]) を測定することで評価した。

【結果および考察】

オオヨモギ乾燥葉 50 g を直接蒸留し、yomogi Oil を 503.1 mg (収率 1.0 %) 得た。これを GC/MS で分析した結果、1, 8-cineol、borneol および camphor が主要香気成分であることが明らかとなり、その他に α-piperitone、caryophyllene oxide、camphene、α-bisabolol、α-pinene、β-pinene、γ- terpinolen などが含有されていた。AEDA 法では 1, 8-cineol、borneol、*O*-cymene、β-thujone および bornyl acetate の順で FD (Flavor Dilution) 値が高かった。香調はそれぞれ若葉様、薬草様、芝生様、マスカット様および柑橘様であり、これらの化合物がオオヨモギの重要香気成分であると示唆された。オオヨモギの機能性として鎮静作用を評価した。その結果、オオヨモギの精油を嗅ぐことで酸素化ヘモグロビン相対濃度変化量 (Δ[oxy-Hb]) は減少傾向にあり、脳活動の鎮静化が認められた。これらの結果から、オオヨモギ香気はリラックス効果があることが示唆された。

Artemisia montana, essential oil, sedative effect

講演番号：4A04a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ A 校舎 04 会場

アオノリ香気特性および香気成分の品種間・産地間差異の解析
Analysis of volatile compounds and the aroma character in Aonori
○山本 正芳[1,2]、Baldermann Susanne[3]、渡辺 修治[1]([1]静大・創造科技院、[2]焼津水産化学工業（株）、[3]ライプニッツ研究所・植物・食品化学)
○Masayoshi Yamamoto[1,2], Susanne Baldermann[3], Naoharu Watanabe[1] ([1]SU・GSST, [2]YSK, [3]IGZev)

【目的】アオノリの香りは品種にかかわらず酷似しており、品種間差異に資する分析データ、報告は全く見られない。本研究では、簡便で実用的な産地判別の分析・解析手法の開発促進に貢献するため、アオノリの香気特性および香気成分の品種間・産地間差異の解析を実施した。
【方法】産地や種類の異なる 4 種類の市販の乾燥アオノリ（岡山県産（*Ulva prolifera*）、徳島県産（*Ulva prolifera*）、愛媛県産（*Ulva linza*）、静岡県産（*Monostroma nitidum*）を用いた。液体窒素を用いて粉砕し、各 200 mg を密閉容器内封入し、香気成分の発散を促す目的で 60℃、1 時間維持した後、ポリジメチルシロキサンファイバー（100 μm）を装着した SPME（Solid Phase Micro Extraction）を用いて、60℃、1 時間、密閉容器内のヘッドスペースの揮発性成分を吸着し、捕集した。揮発性成分は、GC-MS にて分析した。各揮発性成分は NIST データベース、Flavornet、標準化合物の保持時間、MS を基に同定した。
【結果及び考察】GC-MS による分析の結果、4 種類のアオノリに共通する 41 化合物を同定した。加えて、Food and Agriculture Organization of the United Nations や Flavornet のデータベースを用いて、同定した化合物の香気特性を調査した。内部標準とのピークエリア比を算出した各揮発性成分含量データを基に、統計ソフト（XL-STAT（Version2013, Addinsoft, New York, USA））により多変量解析した結果、岡山・徳島県産、愛媛県産と静岡県産アオノリの 3 群で、香気成分の構成比が異なることを確認した。岡山・徳島・愛媛県産はアルケン類の相対含量が多く、アルデヒド類が少ない。特に岡山・徳島県産はα-、β−イオノンやβ−イオノンエポキシド等の閾値の低い揮発性アポカロテノイドが多い。静岡県産はアルケン類が少なく、アルデヒド類が多く、ベンズアルデヒドが特に多い。本含量や組成比は、*U. prolifera, U. linza, M. nitidum* を識別する上で、最も重要な指標の一つと考えられる。また、相関円からそれぞれの原料由来の香りに寄与率の高い化合物を容易に確認できた。
異なるアオノリサンプル（岡山県産、徳島県産、愛媛県産、静岡県産）の香気成分の主成分分析は、本報告が初めてである。また、本研究の成果は、植物学的、地理的起源が異なるアオノリの香気成分解析結果に基づいた識別の可能性を示すものである。

volatile compounds, green algae, SPME-GC-MS

講演番号：4A04a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ A 校舎 04 会場

和種ハッカ「ほくと」精油の香気成分分析

Characterization of aroma components in the essential oil of Japanese mint "Hokuto"

○松村 卓磨、妙田 貴生、戸枝 一喜、西澤 信、久保田 紀久枝、藤森 嶺（東農大・生物・食香）
○Takuma MATSUMURA, Takao MYOUDA, Kazuki TOEDA, Makoto NISHIZAWA, Kikue KUBOTA, Takane FUJIMORI (Tokyo Univ. of Agric.)

ミントはシソ科ハッカ属の多年草で洋種ハッカと和種ハッカに大別される。洋種ハッカはスペアミントやペパーミントが知られている。和種ハッカは日本原産のハッカで、学名を *Mentha arvensis* var. *piperascens* という。 洋種ハッカに比べ menthol 含量が高く、65%以上のものが和種ハッカの取卸油と定められていた。1900 年以降北海道オホーツク地方では高い収益性から和種ハッカ栽培が急速に拡大していった。ハッカから精製された menthol は、主に医療用に使用するアメリカへ輸出され、高値で取引された。そのシェアは世界の生産量の約 7 割を占めるほどであった。しかし、戦争での減反、合成 menthol の登場、インドや中国などの安価なハッカの台頭を理由に生産は減少し、現在では商業的大規模生産は行われていない。北海道農業試験場では海外産ハッカに対抗するため品種改良が進められてきた。北海道で品種改良されたハッカは 11 種類存在するが、これら栽培品種の香気成分に関する研究は報告されていない。そこで本研究では、和種ハッカ「ほくと」の香気成分について分析する事を目的とした。

［試料および方法］

北見ハッカ記念館から提供を受けた和種ハッカ「ほくと」の精油を供試試料とした。まず、精油を GC-MS により分析した。さらに、精油 4g をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画した。溶出溶媒はヘキサンとジエチルエーテルを用い、100:0、98:2、90:10、80:20、50:50、0:100 の割合で調製し各画分を得た。得られたフラクションは順に Fr.1、2、3、4、5 および 6 とし、それぞれを GC-MS で分析した。

［結果］

GC-MS 分析を行った結果、和種ハッカの主要香気成分である menthol、menthone、isomenthone、piperitone、α-pinene などのピークが検出された。中国産ハッカの文献値と比較したところ menthone の含有割合が低いことがわかった。また、ペパーミントと比較したところクロマトグラムのパターンが非常に似ており、32 成分が同一の成分であった。シリカゲルカラムにより分画した各画分の香りを嗅いだところ、最もハッカ様の香りが感じられたフラクションは Fr.4、次いで Fr.3 であった。最もハッカ様の香りのした Fr.4 ではピーク面積値の最も高い成分は menthol、ついで menthone、piperitone であった。Fr.3 では menthone が最も大きくなり、次いで menthyl acetate、isomenthone であった。

mint, aroma, Hokuto

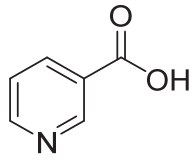
講演番号：4A04a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ A 校舎 04 会場

MS/MS 分析によるペプチド中の Leu/Ile の判別における N 末端修飾の効果

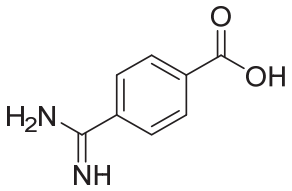
Effect of N-terminal derivatization on discrimination between leucine and isoleucine in peptides by MS/MS analysis

○北中 淳史、宮下 正弘、宮川 恒（京都大院農）
○Atsushi KITANAKA, Masahiro MIYASHITA, Hisashi MIYAGAWA (Kyoto Univ.)

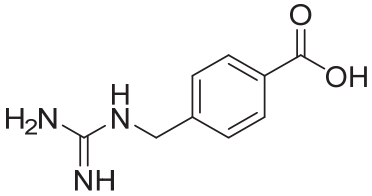
【目的】*De novo* シーケンシング法は、ペプチドの MS/MS スペクトルの結果から配列を決定する手法であり、データベースに存在しない未知ペプチドの配列解析に有用である。この手法においては、スペクトルの複雑さゆえに解析が難しい場合が多いが、我々はこれまでにペプチド N 末端を 4-アミジノ安息香酸によって修飾することで、低エネルギー衝突誘起解離（LE-CID）条件下において、解釈の容易なスペクトルを得ることに成功している。LE-CID 条件下では、主鎖部分で開裂したフラグメントが主に得られるが、この場合ロイシンとイソロイシンの判別はできない。一方、N あるいは C 末端配列中に塩基性残基をもつペプチドの高エネルギー衝突誘起解離（HE-CID）条件下における MS/MS スペクトルでは、ロイシンとイソロイシンの側鎖部分の開裂の違いを観測できるという報告がある。そこで本研究では、ロイシンとイソロイシンを含むペプチドの N 末端に、3 種の塩基性の異なる修飾基を導入した後、MALDI-TOF/TOF MS による HE-CID 条件下で分析し、ロイシンとイソロイシンの判別における修飾基の効果を比較した。
【方法】ペプチド（配列：AAGLQIA）の N 末端アミノ基に下記の Nic、Aba および Gmb をサクシンイミドエステル法あるいは縮合試薬（DMT-MM）を用いて導入し、HPLC で精製を行った。未修飾のペプチドおよび得られた N 末端誘導体化ペプチドを MALDI-TOF/TOF MS（Bruker autoflexⅢ）によって分析した。
【結果】Nic 修飾体は未修飾のものとほぼ同様のスペクトルを示し、ロイシンとイソロイシンの判別はできなかった。また、Aba 修飾体では 4 残基目のロイシンの判別のみ可能であった。一方、Gmb 修飾体では 4 残基目のロイシンと 6 残基目のイソロイシンの両方を判別することができた。塩基性は Nic、Aba、Gmb の順に高くなることから、修飾基の塩基性が高くなるにしたがって、ロイシンとイソロイシンの判別に必要なピークの強度が増し、これらを完全に判別するには Gmb のもつ高い塩基性が必要であることが明らかとなった。



Nic



Aba



Gmb

MS/MS, peptide, derivatization

講演番号：4A04a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ A 校舎 04 会場

熱帯牧草 *Brachiaria humidicola* の根から分泌される硝化抑制物質ブラキアラクトンの GC-MS-SIM による定量

Quantification of an effective nitrification inhibitor of tropical grass *Brachiaria humidicola*, brachialactone

○吉橋 忠、中原 和彦、スバラオ グントゥール (国際農研)
○Tadashi YOSHIHASHI, Kazuhiko NAKAHARA, Guntur V. SUBBARAO (JIRCAS)

作物生産には、化石燃料によるエネルギーで窒素固定された化学肥料が広く用いられている。しかし、一般的には施肥された窒素の３０～４０％のみが作物に利用される。窒素肥料として施肥されたアンモニウム塩は、土壌中で硝化細菌により硝化される過程において、二酸化炭素の３１０倍の地球温暖化係数をもつ一酸化二窒素として大気中へ放出されることで地球温暖化を促進し、さらに土壌に留まりにくい硝酸態窒素として作土から流亡し水質汚染を引き起こすなど、農業による地球環境への負荷の要因の一つとなっている。特に、畑地からの環境負荷において硝化は大きな役割があり、ニトラピリンやジシアンジアミド被覆肥料などの硝化抑制剤の施用が解決策とされることもある。
我々は窒素利用効率が高く環境負荷が低い栽培体系を確立するため、土壌中で硝化細菌によって行われる硝化作用を作物自身が生物的に抑制する働き(生物学的硝化抑制作用；BNI)に着目し、この機能をもつ熱帯牧草 *Brachiaria humidicola*(BH)の圃場における BNI を確認し、そのメカニズムを明らかにすると共に、BNI 活性をもつ化合物として、5-8-5 環とγ-ラクトン環をもつジテルペンであるブラキアラクトン(1)を単離同定した。[1)]
BH 根から分泌される 1 は極めて微量であると共に、従来 1 を単離精製するための手順は極めて煩雑であり、BH 遺伝資源を利用した BNI の活用、或いは、根が分泌した後の土壌での 1 の動態など、圃場での BNI への 1 の寄与等を検討するためには、微量の 1 を精度よく定量する必要がある。本報告では、植物体からの GC-MS-SIM による 1 の定量法を検討した。
BH 根滲出液から精製した 1 は、HPLC 上で２つのピークを示すが、GC-MS においても分子イオンピークが m/z334 で、類似したマススペクトルを示す２つのピークが観測された。HPLC における各ピークの分析の結果から、これらは互変異性体であると考えられた。さらに、プロゲステロンを内部標準とした 1 の GC-MS-SIM による定量法を確立すると共に、単離精製のプロトコルを精査した結果、試料の前処理を大幅に簡素化することが可能であり、凍結乾燥植物体試料からエタノール抽出することで、1 の回収が良好となった。現在、土壌などの BH 根以外の試料も検討中であり、併せて発表する。

1) Subarao G.V. *et al. PNAS* 106, 17302-7 (2009)

brachialactone, biological nitrification inhibition (BNI), *Brachiaria humidicola*

講演番号：4A04a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ A 校舎 04 会場

酵素タンパク質の鏡像体選択性に関する大規模量子化学計算

Large-scale quantum chemical computations on the enantioselectivity of enzyme lipases

○矢城 陽一朗[1,2]、木村 崇知[3]、亀澤 誠[3]、直島 好伸[1,2]([1]岡山理大自然科学研、[2]岡山理大院総合情報、[3]甲南化工)
○Yoichiro Yagi[1,2], Takatomo Kimura[3], Makoto Kamezawa[3], Yoshinobu Naoshima[1,2] ([1]Research Institute of Natural Sciences, Okayama Univ. of Sci., [2]Graduate School of Informatics, Okayama Univ. of Sci., [3]Konan Chemical Industry Co., Ltd)

【目的】我々はこれまで、有機合成で多用されている酵素リパーゼの一つである*Burkholderia cepacia* Lipase（BCL）と、8種の第1級および12種の第2級アルコール系エステルの複合体に対する分子動力学計算によって、BCLの鏡像体選択性とその程度（*E*値の大小）が正確に予測し得ることを見いだしてきた。本研究は、分子動力学計算から得られたBCL－基質複合体に対してフラグメント分子軌道（Fragment Molecular Orbital, FMO）法による大規模量子化学計算を行い、酵素リパーゼの鏡像体認識に関わるアミノ酸残基の特定とその機構の解明を目指したものである。
【方法と結果】まず、Protein Data BankからダウンロードしたBCLのX線結晶解析構造（PDB code：1HQD）を、生体分子計算ソフトウェアAMBERによるエネルギー極小化計算で調整した。つぎに、量子化学計算プログラムGaussian 03で構築、構造を最適化した基質エステルを、AMBERによりBCLの活性中心であるSER87付近に配置して複合体を構築した後、その周り8Åに水分子を置きエネルギー極小化計算を行った。ついで、AMBER－GPGPU計算システムで2000psの分子動力学計算を行い、得られた2000psの時点における複合体構造から周囲の水分子を除去し、大規模量子化学計算ソフトウェアABINIT-MP/BioStationによる、2体のフラグメント展開を考慮したFMO2-MP2/6-31GレベルでのFMO計算を実行した。

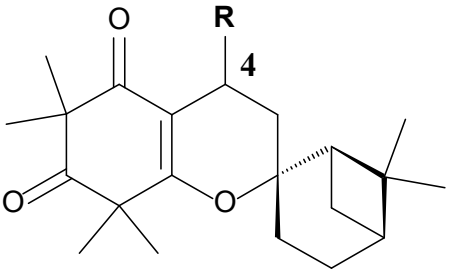
FMO2 計算で算出した第 1 級および第 2 級基質エステルの両鏡像体と BCL のアミノ酸残基の相互作用エネルギーを解析した結果、選択性が高い基質では、優先的に変換される鏡像体の全てが BCL のアミノ酸残基 HIS286 と強く相互作用していることが認められた。さらに、HIS286 以外に、THR18、GLY19、LEU248、ASP264、および LEU287 など、基質に応じてそれぞれ特定のアミノ酸残基と比較的強く相互作用していることが判明した。それに対して変換されにくい鏡像体においては、HIS286 を含めアミノ酸残基との相互作用はほとんど認められなかった。一方、選択性が低い基質では、その両鏡像体ともに HIS286 を含む同じようなアミノ酸と相互作用していることが判明した。これらのことから、BCL にあっては HIS286 が基質の鏡像体認識における重要なアミノ酸残基であると推定できる。目下、BCL のアミノ酸残基を主鎖と側鎖にフラグメント分割して、計算精度を 2 体から 4 体のフラグメント展開まで取り入れた FMO4-MP2/6-31G レベルに高めた FMO 計算を実施し、基質が BCL のどのアミノ酸残基のどの部分とどのように相互作用しているのかを明らかにする考えである。また、BCL 以外のリパーゼについて同様な FMO 計算を検討している。

Computational chemistry, Lipase, Enantioselectivity

講演番号：4A04a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ A 校舎 04 会場

フィシフォリジオンとその類縁体の培養細胞に対する毒性評価ならびに作用機序の解明
Evaluation of cytotocity against the cultured cells of ficifolidione and its derivatives
○藤原 敏美、西脇 寿、岩本 洋幸、西 甲介、菅原 卓也、山内 聡、首藤 義博（愛媛大農）
○Satomi Fujiwara, Hisashi Nishiwaki, Hiroyuki Iwamoto, Kosuke Nishi, Takuya Sugahara, Satoshi Yamauchi, Yoshihiro Shuto (Ehime Univ.)

【目的】
Ficifolidione はフトモモ科植物の *Eucalyptus ficifolia* や *Kunzea ericifolia* から単離された．蚊やモンシロチョウなどに対して弱い殺虫活性を示すことが報告されている．この化合物は，細胞毒性を示す多環状多プレニルアシルフロログルシノール類縁体と類似の構造を有することが知られていることから，細胞毒性を示すことが期待された．そこで，本研究では細胞毒性を評価するために ficifolidione 類縁化合物を合成し，化合物の構造が細胞毒性におよぼす影響を明らかにするとともに，そのメカニズムを解明することを目的とした．



R=isobutyl : ficifolidione
R=*n*-propyl : 4-propyl 類縁体

【方法】
Phloroglucinol を出発原料とし，aluminium chloride と acetyl chloride を用いた Friedel-Crafts 反応でアシル化した後に，iodomethane と sodium methoxide によってメチル化した．次に，6 M HCl aq.中で加熱還流することにより脱アセチル化して syncarpic acid を合成した. 得られた syncarpic acid を(-)-β-pinene と isovaleraldehyde と縮合させ，ficifolidione とその 4-epimer 体を得た．さらに，butylaldehyde を用いて，4-propyl 類縁体とその 4-epimer 体を合成した．

合成した化合物を用いて，各種培養細胞（*Spodoptera frugiperda* 卵巣由来の Sf-9 細胞，マウスの大腸ガン細胞 Colon26，白血病細胞 HL-60）に対する細胞毒性を WST-8 試験により求めた．さらに，この細胞毒性が引き起こされるメカニズムについて検討した．

【結果】
昆虫由来 Sf-9 細胞に対する IC_{50} 値は，置換基の違いで差は認められなかったが，立体異性体間で違いが認められ，4 位の *R* 体では約 30 μM，*S* 体では約 100 μM であった．一方，Colon26 細胞ならびに HL-60 細胞に対する IC_{50} 値は，4 位の立体配置・置換基の違いに関係になくそれぞれ約 10 μM と 3 μM であり，細胞種の違いにより活性に差があることが明らかとなった．また，western-blot によって化合物を処理した細胞に caspase の活性化が認められたため，アポトーシスにより細胞死が引き起こされている可能性が強く示唆された．このことは，DNA ladder の形成が観察されたことによっても支持された．

ficifolidione, cytotoxicy, apoptosis

講演番号：4A04a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ A 校舎 04 会場

アミノ酸由来イソニトリル化合物の合成と付着阻害活性に関する構造－活性相関の考察
Structure-activity relationship studies of synthesized isonitriles drived from amino acids toward antifouling activity

○福田 拓也[1]、小南 喜郁[1]、野方 靖行[2]、吉村 えり奈[3]、千葉 一裕[1]、北野 克和[1] ([1]東農工大農、[2]電中研、[3]セレス)
○ Takuya FUKUDA[1], Yoshifumi KOMINAMI[1], Yasuyuki NOGATA[2], Erina YOSHIMURA[3], Kazuhiro CHIBA[1], Yoshikazu KITANO[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric. and Technol., [2]CRIEPI, [3]CERES inc.)

【目的】

フジツボ、イガイ、ヒドロ虫などの海洋付着生物は、船底、漁網、および発電所の取水路に付着し、生物汚損として多大な被害を与えている。これら汚損生物の被害を防ぐために、有機スズ化合物や銅化合物などの重金属を含む塗料が利用されてきた。しかしながら、有機スズ化合物は海水や海底の土砂へ長期間残留し、海洋生物の生体内に蓄積されてしまうことが問題視され、現在使用が禁止されている。また、銅化合物に関しても海水、海底への蓄積や海洋生物への影響が懸念されており、これらに代わる新しい付着阻害剤の開発が必要とされている。これまでに我々は、ウミウシおよびカイメンより単離される付着阻害活性を有する天然物に着目し、構造－活性相関関係の考察を行った結果、イソシアノ基が付着阻害活性発現に重要であることを明らかにした。そして、天然物よりも付着阻害活性が高く、合成の容易なイソニトリル化合物を多く創製してきた。一方、これまでに創製した付着阻害物質は、生分解性や分解物の毒性の点ではまだ改善の余地があると考えられた。そこで本研究では、高い生分解性と、分解物の無毒性を期待して、アミノ酸由来のイソニトリル化合物を合成し、付着阻害活性に関する構造－活性相関を考察することとした。

【方法と結果】

タンパク質構成(–アミノ酸を原料として、アミノ基をイソシアノ基に、カルボキシ基をエステルに変換したアミノ酸由来イソニトリル化合物を合成した。そして、合成した化合物に対してタテジマフジツボのキプリス幼生を用いた付着試験を行い、付着率と死亡率を観察した。生物試験の結果、合成したすべてのアミノ酸由来イソニトリル化合物に高い付着阻害活性が見られるとともに、多くの化合物で高濃度においても低い死亡率が確認された。特にフェニルアラニン、チロシン由来のイソニトリル化合物は強い付着阻害活性を示すとともに高い安全域（LC_{50}/EC_{50}）を示した。以上より、アミノ酸誘導体イソニトリルは、“環境にやさしい” 新たな付着阻害物質として有望であることが示唆された。

antifouling activity, isonitrile, barnacle

講演番号：4A04a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ A 校舎 04 会場

黒ゴマ抗酸化成分 anthrasesamone F の種子成熟度別含量変化

Anthrasesamone F content in seeds at different seed developmental stages of black sesame

○古本 敏夫、西本 潔司（香川大農）
○Toshio Furumoto, Kiyoshi Nishimoto (Kagawa Univ.)

【目的】

ゴマは、健康に良い食品として世界中で重宝されてきた作物です。また、昔から「黒ゴマの方が白ゴマより健康に良い」とも言われています。最近、黒ゴマ種子から新規成分としてジヒドロキシアントラキノンである anthrasesamone F が単離・構造決定され、白ゴマ種子には含まれないことが報告された。さらに、anthrasesamone F が黒ゴマ種子の種皮部分に局在していること、およびトロロックスよりも強い DPPH ラジカル消去活性を持つことが明らかとなり、黒ゴマ種子の特徴的な機能性成分である可能性が示唆された。一方、ゴマは植物体の下部から上部に向かって開花・蒴果形成が進行するため、蒴果の着生位置によりその内部に含まれるゴマ種子の発達・成熟度が異なる。本研究では、黒ゴマ種子に含まれる anthrasesamone F の生成機構解明のため、種子の発達・成熟度と収穫後処理の違いによる anthrasesamone F 含量変化を調査した。

【方法・結果】

まず、種子の形成～種皮着色・生理的成熟段階（ゴマ栽培での収穫前の状態）における anthrasesamone F の含量変化を調べるために、黒ゴマを１１週間栽培した後、蒴果をその着生位置と数（６蒴果／ステージ）に従って、いくつかの異なる種子成熟ステージに分割した。成熟ステージごとに蒴果を収穫した後、すぐに種子の取り出しと種子成分の抽出を行った。各成熟ステージから得られた種子抽出物を、逆相 HPLC を用いて定量分析した。その結果、anthrasesamone F は、成熟が進んだ種子により多く含まれることが判明した。また、黒色に着色していない未熟種子において検出されなかったことから、種皮の着色後に蓄積が始まることも判明した。しかしながら、その平均含量は通常のゴマ栽培・収穫後処理（風乾）を経て得られた黒ゴマ種子中の含量と比べて低かった。

次に、種子成熟の最終段階である乾燥段階（ゴマ栽培での収穫後の状態）における含量変化について検討するため、上記と同様に分割した各ステージの蒴果（着色した種子を含むステージのみ）をさらに２つに分割した。二分割した蒴果の一方は風乾処理を行わずに、もう一方は１週間風乾処理（室温、暗所）を行った後に、それぞれ定量分析を行った。その結果、全ての成熟ステージにおいて、風乾処理を行うことにより anthrasesamone F の含量が増加することが判明した。また、各ステージ間の含量差も小さくなった。

sesame seed, antioxidant, anthrasesamone F

講演番号：4A04a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ A 校舎 04 会場

染色用紅花加工品“紅餅”における加工処理条件と品質の関係
Relationship of Quality and Processing Conditions in the Processed Products of Safflower for Dyeing "Benimochi"
○勝見 直行、遠藤 昌幸（山形県農業総合研究センター）
○ NAOYUKI KATSUMI, MASAYUKI ENDO (Yamagata Integrated Agricultural Research Center)

【目的】山形県で伝統的に製造されている染色用紅花加工品“紅餅”は、その加工処理条件によって品質が大きく左右される加工品である。紅餅の加工は、収穫から完成するまで様々な工程を経るが、それぞれの工程が品質にどういった影響を与えるかは不明な点が多い。紅餅の品質は、外観の赤みの強さや、含有される赤色素“カルタミン”の量で示すことができる。カルタミンは、紅花中の水溶性の黄色素“サフラワーイエロー”の一種から生合成されることがわかっている。そこで本研究では、紅餅加工において黄色素洗い出しの工程といわれている“中振り”の処理条件が、品質に与える影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】中振りは、原料花弁を 10 倍量の水道水に浸漬することとした。中振りの程度の違いをみるため、水浸漬の時間（0、6、12、18、24hr）を変え試験区とし、それ以外の加工工程は同一にし紅餅加工を行った。調査は、水浸漬時に花弁から流出したサフラワーイエロー量として浸漬液の吸光度（405nm）を分光光度計で、加工中の花弁および紅餅の色調を測色色差計を用いて、水分含量を常圧乾燥法にて測定した。また、紅餅中の各色素量は、60%アセトン抽出液の吸光度（カルタミン 520nm）を分光光度計で測定した。
【結果】水浸漬時に花弁から流出するサフラワーイエローは、浸漬時間が長いほど流出量が多くなる傾向がみられ、時間当たりの流出量はほぼ一定であった。中振り後の花弁の色調は、水浸漬 12hr 区で最も a*値（赤色度）が高く、赤みの強い色調となった。紅餅の色調は、0hr 区のみ明らかに異なっており、黒みがかった色調であった。その他の区では、中振りの水浸漬時間が長くなるなるほど a*値が高くなる結果となったが、処理区間の外観色調の差は大きくなかった。紅餅中の色素を抽出した結果、サフラワーイエローは 6hr 区で最も高く、中振りの水浸漬時間が長いほど低くなった。カルタミンは、6hr 区と 12hr 区が同程度で高く、それ以降は水浸漬時間が長いほど低くなり、最も低い値となったのは 0hr 区であった。

Safflower, Benimochi, Carthamin

講演番号：4A04a17
講演日時、会場：3 月 30 日 11:54～ A 校舎 04 会場

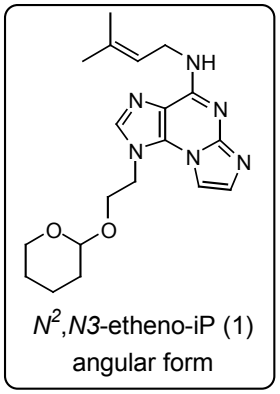
Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase の蛍光基質としての N^6-isopentenyl-ethenoadenine 類の合成及び基質特異性の解析

Design and synthesis of N^6-isopentenyl-ethenoadenine for Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase

○竹井 昭登、設楽 研司、大久保 駿、飯野 誠之、杉山 民二 (明治大院農)
○Akito TAKEI, Kenji SHITARA, Shun OKUBO, Masayuki IINO, Tamizi SUGIYAMA (Meiji Univ.)

【目的】

Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase (CKX)はイソペンテニルアデニン(iP)をアデニンと 3-メチル-2-ブテナールに不可逆的に分解する酵素である．アデニン骨格をエテノアデニン骨格(ε-Ade)に変換した化合物(1)はサツマイモ由来の CKX によって分解されることを確認された．そして化合物(1)は CKX の蛍光基質として利用できることを報告した．本研究では新たにシクロヘキシルメチル基を導入した N^6-isopentenyl-ε-Ade を合成し, CKX との基質特異性を調べることを目的とした．

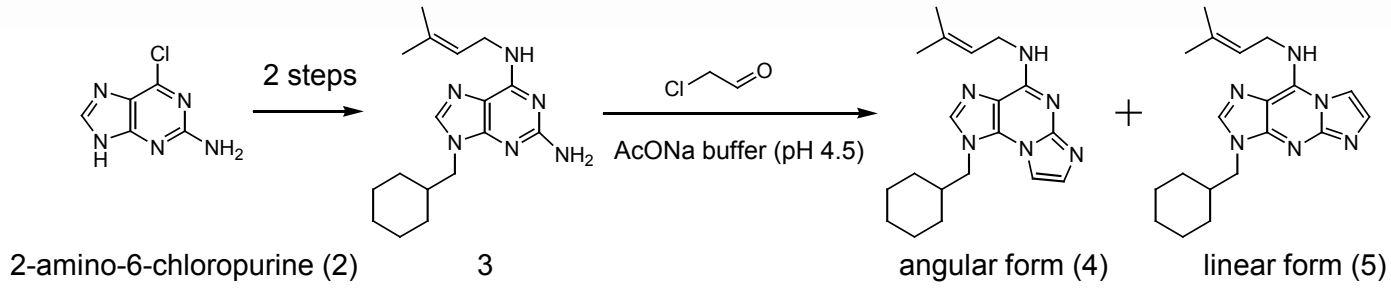


N^2,*N3*-etheno-iP (1)
angular form

【方法・結果】

2-アミノ-6-クロロプリン(2)を出発原料として9位をアルキル化した後, 6位にイソペンテニルアミノ基を導入した．化合物(3)を酢酸緩衝液(pH=4.5)中でクロロアセトアルデヒドと反応させてエテノ環を形成した．この反応ではスキームに示すように angular 型(4)と linear 型(5)の 2 種類の構造異性体が生成した．シクロヘキシルメチル基に改変したことによる疎水性の向上により収率は改善できた．

サツマイモ形質転換細胞から硫安分画により調製した CKX の粗酵素標品を化合物(4)及び(5)に作用させた．CKX による両化合物の分解作用は HPLC により測定した．化合物(1)と比較して疎水性が向上したことにより分解産物と粗酵素標品中の共雑成分との分離ができ, 分解産物の蛍光ピーク面積から CKX の活性を測定できるようになった．サツマイモ由来の CKX 以外に, AtCKX2 による化合物(4)及び(5)の分解作用も検討している．



2-amino-6-chloropurine (2)　3　angular form (4)　linear form (5)

cytokinin oxidase/dehydrogenase, fluorescent substrate, enzyme assay

講演番号：4A06a03
講演日時、会場：3 月 30 日 09:22～ A 校舎 06 会場

ヤマノイモ属トゲトコロに蓄積するステロイドサポニンの単離精製および定量解析

Identification and quantification of steroidal saponins in *Dioscorea esculenta* (Togedokoro)

○李 ヒョン宰[1]、渡辺 文太[2]、中安 大[1]、山村 理恵[1]、岡田 実佳[1]、杉本 幸裕[1]、水谷 正治[1]([1]神戸大院・農・生命機能科学、[2]京都大学・化学研究所)
○Hyoung Jae Lee[1], Bunta Watanabe[2], Masaru Nakayasu[1], Rie Yamamura[1], Mika Okada[1], Yukihiro Sugimoto[1], Masaharu Mizutani[1] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Kobe Univ., [2]Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

ステロイドサポニンは様々な生理活性を示す天然の界面活性剤であり、特にヤマノイモ属（*Dioscorea* spp.）の塊茎には医薬用ステロイド薬剤の合成原料として利用されているジオスゲニンをアグリコンとするサポニンが多量に含まれている。トゲトコロ(*D. esculenta*)は沖縄特産のヤマノイモとして知られており、機能性化合物として塊茎に多量のステロイドサポニンを蓄積している。しかし、トゲドコロのステロイドサポニンの構造および含量はまだ十分に解明されていない。そこで、本研究では、トゲドコロの塊茎からステロイドサポニンを精製単離し、それらの構造を決定することを目的とした。さらに、構造解析した化合物について様々な組織での定量分析を行った。まず、トゲドコロからステロイドサポニンを精製単離するため、凍結乾燥した塊茎乾燥粉末を 70%(v/ v)エタノールで抽出し、抽出物を順に溶媒分画、C18 固相抽出及び ODS-HPLC によって精製した。その結果、14 種のサポニンを単離し、NMR と LC-MS によって 3 種のフロスタン型サポニンと 11 種のスピロスタン型サポニンを構造決定した。これらの 14 種の サポニンはトゲドコロから初めて精製されたサポニンであり、3 種のスピロスタン型サポニンは新規化合物であった。構造決定した化合物についてトゲドコロの様々な組織(塊茎、塊茎皮質、葉、葉柄、茎、根)で定量分析を行った結果を報告する。

Dioscorea esculenta, steroidal saponin, identification

講演番号：4A06a04
講演日時、会場：3 月 30 日 09:33～ A 校舎 06 会場

赤米の種皮および芒の成分

Constituents of skins and beards of red-kerneled rice

○我如古 菜月、伊東 秀之（岡山県大保福）
○Natsuki GANEKO, Hideyuki ITO (Okayama Pref. Univ.)

【目的】紫黒米や赤米などの有色米は，それらに含まれる色素成分の機能性が期待され，注目されている。赤米の色素成分は特に種皮に局在し，高分子ポリフェノール成分のタンニンであるプロアントシアニジン系の化合物の存在が知られているが，その構成モノマーの構造やモノマー間の結合位置および立体構造などの化学構造の詳細については未だ不明な点が多く残されている。我々は岡山県総社市と鹿児島県種子島で栽培されている赤米の種皮および芒について成分探索を行った。
【方法】試料として赤米（岡山県総社市産、鹿児島県種子島産）および芒（岡山県総社市産）を用いた。赤米は家庭用精米機で種皮を削り取り、70%含水アセトンで抽出し、ろ過・濃縮後、赤米種皮エキスを得た。この種皮エキスを水に溶解後、Diaion HP-20 カラムクロマトに付し、メタノール溶出部を濃縮乾固し、分析用サンプルとした。そのサンプルについて、ブタノール-塩酸反応によるプロアントシアニジンの定性反応および Gel Permeation Chromatography（GPC）分析によって分子量分布を算出した。また、芒については、赤米と同様に 70%含水アセトンでホモジナイズし、ろ過後濃縮して芒エキスを得た。これらのエキスについては順相系および逆相系 HPLC 分析を行った。
【結果および考察】種皮エキスのブタノール-塩酸反応の結果、総社産および種子島産の両方とも赤色を呈した。その UV スペクトルから、ともに 547nm に吸収極大波長を示し、シアニジンの生成が確認され、赤米種皮の成分は主にプロシアニジンから成ることが示唆された。また GPC 分析の結果、総社産、種子島産ともに同じ保持時間にピークを示し、その保持時間から、主要成分は 8～9 量体のプロシアニジンオリゴマーであると考えられた。さらに、^{13}C－NMR スペクトルおよびフロログルシノール分解反応によって、オリゴマーの構成モノマーの構造について検討中である。一方、芒エキスは、その溶液の色調が種皮のブタノール-塩酸反応後の色調と同様に赤色を呈し、その UV スペクトルを測定した結果、547nm 付近に吸収極大波長を示したことから、シアニジン系化合物の存在が示唆された。芒エキスの HPLC 分析において、主要な２つのピークが観察されたので、シアニジン配糖体の標準品と比較した結果、２つのピークは cyanidin 3-*O*-glucoside および cyanidin 3-*O*-rutinoside と一致した。
以上の結果、赤米の種皮はプロシアニジンオリゴマー、芒は cyanidin 3-*O*-glucoside および 3-*O*-rutinoside を主成分とすることが分かり、赤米の種皮と芒の色素成分が異なることが明らかとなった。

Red-kerneled rice, Proanthocyanidin, Anthocyanin

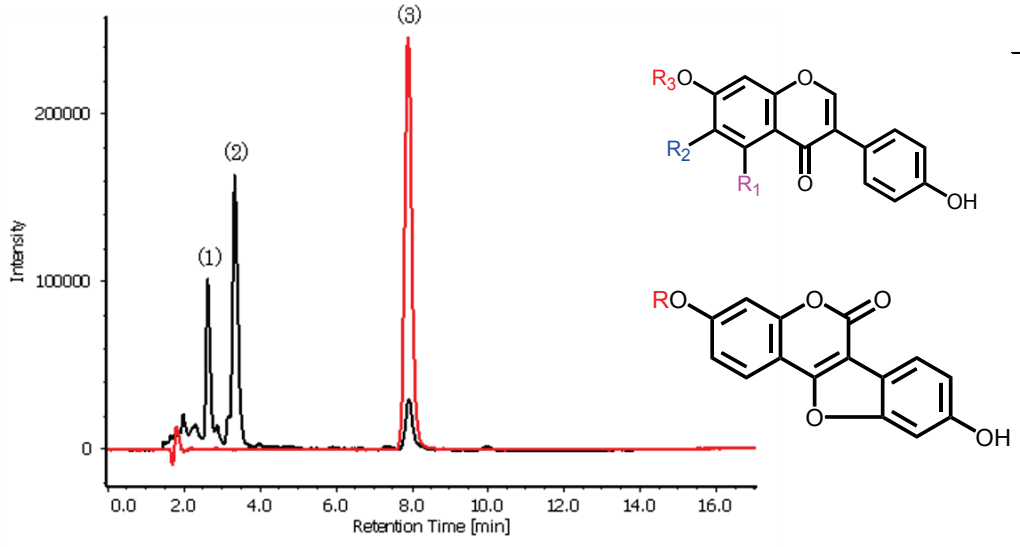
講演番号：4A06a05
講演日時、会場：3 月 30 日 09:44～ A 校舎 06 会場

大豆もやし種皮中のイソフラボン類縁体の分析

Identification of isoflavone analogs from soy bean sprout seed coat

○大島 綾華[1]、中田 光彦[2]、柳瀬 笑子[1] ([1]岐阜大院応生、[2]（株）サラダコスモ)
○Ayaka OSHIMA[1], Mitsuhiko NAKATA[2], Emiko YANASE[1] ([1]Gifu Univ., [2]Salad Cosmo Co., Ltd.)

【目的】イソフラボンは、マメ科などの植物に存在するフラボノイド類であり、エストロゲン様活性や抗酸化活性等を示すことから機能性成分として注目されている。食品中では特に大豆に多く含まれており、さらにこれらイソフラボン含有量は大豆の成長に伴い変化することが知られている。大豆もやしの製造過程では、食感の悪さなどから種皮が取り除かれ、廃棄されている。しかし、一般的にフラボノイドなどの機能性成分は種皮に多く含まれている。そこで、本研究では大豆もやしの皮部の有用性を知るために、皮部に含まれるイソフラボノイドについて調べることにした。
【方法・結果】凍結乾燥した子大豆もやし及び種皮を粉砕し、抽出を行った。得られた抽出液を用いて HPLC 分析及び定量を行った結果、子大豆もやしの主要イソフラボンは配糖体の Daidzin 及び Genistin とそのマロニル配糖体であった。また、アグリコンはほとんど含まれなかった。一方で、子大豆もやし皮部を同様に HPLC 分析したところ、イソフラボン類のピークはほとんど検出されず、新たに 3 つのピークが検出された。この 3 つのピークについて各種分析を行った結果、Coumestrol とその配糖体、及びマロニル配糖体であることが分かった。Coumestrol は大豆もやしの成長に伴い増加していく Daidzein の代謝物として知られているイソフラボン類縁体である。



	R_1	R_2	R_3
Daidzin	H	H	Glc
Glycitin	H	OCH_3	Glc
Genistin	OH	H	Glc
Daidzein	H	H	H
Glycitein	H	OCH_3	H
Genistein	OH	H	H

	R
1 配糖体	Glc
2 マロニル配糖体	Glc−malonyl
3 アグリコン	H

isoflavone, coumestrol

講演番号：4A06a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ A 校舎 06 会場

パッションフルーツ種子中における新規スチルベン型化合物の単離

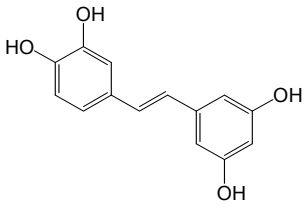
Isoration of novel stilbenoid from Passiflora edulis seeds

山本 諭志、○中塚 宏志、松本 恵実、中塚 進一 (長良サイエンス)
Satoshi YAMAMOTO, ○Hiroshi NAKATSUKA, Emi MATSUMOTO, Shin-ichi NAKATSUKA (Nagara science)

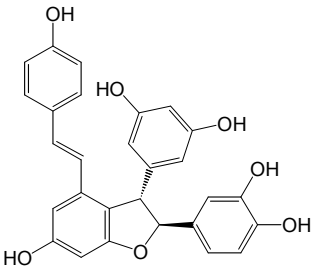
【目的】南米を原産とするパッションフルーツ(クダモノトケイソウ　*Passiflora edulis*)は、国内でも各地で栽培が盛んになっている。加工品としての利用が多いが、果肉を種子ごと食べることもできる。このパッションフルーツ種子には、レスベラトロール、ピセアタンノールに代表されるスチルベン型化合物群が含まれており、近年、強い抗酸化活性およびサーチュイン遺伝子の活性化に影響があるとして注目されている。また、ピセアタンノール二量体も存在することがわかっており、活性研究においても興味深い。本研究は、パッションフルーツ種子中のスチルベン型化合物群の同定および、含有する単量体より予測される、新規二量体スチルベン型化合物の探索を行うことを目的とする。

【結果】

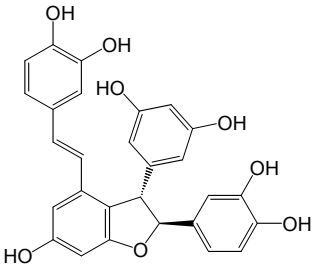
パッションフルーツ種子を乾燥、破砕後、抽出し、分液による脱脂、オープンカラムによる精製過程を経て、単量体スチルベン型化合物レスベラトロール、ピセアタンノールおよび、二量体スチルベン型化合物スキルプシン A、B、グネアフリカニン C を同定した。これまでに、レスベラトロール、ピセアタンノール、スキルプシン B は、パッションフルーツ種子中に存在することが知られていたが、スキルプシン A、グネアフリカニン C のパッションフルーツ種子中よりの同定は、本研究にて初となる。同時に、独自の HPLC 分離技術を用いることで、スキルプシン B と同様の基本構造を持ち、性質のわずかに異なる化合物の単離に成功した。各種機器分析の結果より構造決定をしたところ、スキルプシン B 立体異性体であった。



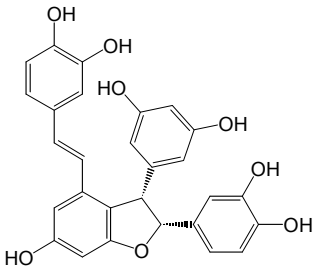
Piceatannol



Scirpusin A



Scirpusin B



Scirpusin B Isomer

Passiflora edulis, Scirpusin, stilbenoid

講演番号：4A06a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ A 校舎 06 会場

パッションフルーツ種子中スチルベノイドを利用した天然微量成分の合成

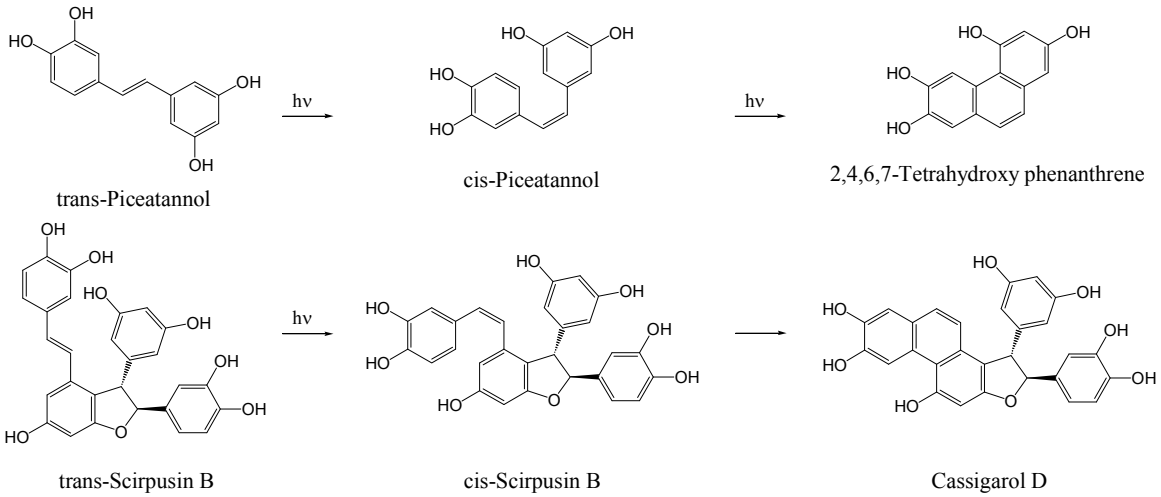
Synthrsis of natural minor constituents from Passiflora edulis seeds Stilbenoid

○山本 諭志、松本 恵実、中塚 進一 (長良サイエンス)
○Satoshi YAMAMOTO, Emi MATSUMOTO, Shin-ichi NAKATSUKA (Nagara science)

【目的】植物中に含まれているスチルベンヒドロキシ誘導体のスチルベノイドは、その強い抗酸化活性やサーチュイン遺伝子活性化、血管拡張作用などが注目されている。スチルベノイドは、多くの植物中に存在し、ヒドロキシ基の配置、重合数も様々で、これまでに数多くの種類が各植物より単離されている。しかし、スチルベノイドの基本骨格はトランス体であり、これまでに報告されているシス体、フェナントレン体は微量にしか植物中に存在していない。微量成分の供給を考慮し、トランス体スチルベノイドより、シス体、フェナントレン体の効率的合成法の確立を目指した。

【結果】

今回、パッションフルーツ種子由来スチルベノイドに着目し、スチルベン特有の光異性化、および電子環状反応を利用し、基本骨格トランス体より、微量成分シス体、フェナントレン体を合成できると予想した。まず、パッションフルーツ種子より、抽出、精製過程を経て、レスベラトロール、ピセアタンノール、スキルプシン A、B の 4 種スチルベノイドを同定した。これらパッションフルーツ種子に含まれるスチルベノイドはトランス体であるが、光照射による異性化反応で、異なる植物種に含有するシス体への変換を行うことができた。さらには、合成したシス体から、電子環状反応によってフェナントレン型化合物を得ることができた。この結果から、植物中豊富に存在するスチルベノイドより、天然微量スチルベノイドを効率的に合成できたので、今後の活性研究に役立つものと考えている。



Passiflora edulis, Stilbenoid, Scirpusin

講演番号：4A06a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ A 校舎 06 会場

ワサビ葉の成分分析および機能性評価

Components and their biological activity of wasabi (*Wasabia japonica* Matsumura) leaves

○吉田 周平[1]、細谷 孝博[1]、増田 英樹[2]、熊澤 茂則[1] ([1]静岡県大院食品栄養、[2](株) 田丸屋本店)
○ Shuhei Yoshida[1], Takahiro Hosoya[1], Hideki Masuda[2], Shigenori Kumazawa[1] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Tamaruya Honten)

【目的】

ワサビ (*Wasabia japonica* Matsumura) はアブラナ科ワサビ属に属しており、根茎は古くから香辛料としてだけでなく、消臭剤や抗菌剤として用いられてきた。一方、葉は一部おひたしや天ぷら、スナック菓子や練りワサビの風味づけに利用されているが、そのほとんどが廃棄されてしまっている。ワサビの研究は根茎に関するものが多く、葉の研究に関しては抗酸化作用、抗菌作用、抗炎症作用、抗肥満作用などの報告があるが、その活性成分においては未だ不明な点が多い。そこで本研究では、ワサビ葉成分の精製、構造解析および同定を行い、また機能性として抗炎症活性および抗肥満活性を評価することでワサビ葉の利用価値を高めることを目的とした。

【方法および結果】

成分分析において、静岡県産ワサビの生葉 6 kg を凍結乾燥後メタノールで抽出し、得られた抽出物をヘキサンと水、および酢酸エチルで順次分配した後、各種クロマトグラフィーにより分画し、14 種の成分を単離した。それらを MS、NMR 等の各種分析機器を用いて構造解析し、9 種のフェニルプロパノイド、2 種のフラボノイド、2 種のテルペノイド、および 1 種のカロテノイドを同定した。

機能性評価において、抗炎症活性試験としてマウスマクロファージ細胞 (J744.1) を用いた NO 産生阻害試験を単離した各化合物について行ったところ、5-hydroxy-ferulic acid methyl ester、sinapic acid methyl ester、all-*trans*-lutein に活性が見られた。特に 5-hydroxy-ferulic acid methyl ester および all-*trans*-lutein は IC_{50} がそれぞれ 22 μM および 25 μM と比較的強い活性が見られた。

抗肥満活性試験においては、マウス前駆脂肪細胞 (3T3-L1) を用いた分化抑制試験を行い、ワサビ葉中の抗肥満活性成分の探索を行った。抗肥満活性を指標としてワサビ葉抽出物の分画を進めたところ、5-hydroxy-ferulic acid methyl ester、sinapic acid methyl ester、ferulic acid methyl ester、および all-*trans*-lutein に活性が認められ、それぞれ 100 μM の濃度で 81%、49%、31%、および 73%の脂肪細胞分化抑制率を示した。特に all-*trans*-lutein は 12.5 μM で脂肪細胞分化抑制率が 68%を示し、低濃度であっても活性を示した。ワサビ葉の抗肥満活性は、これらフェニルプロパノイドの非配糖体および all-*trans*-lutein が寄与していることが明らかとなった。

以上より、ワサビ葉に含まれる種々の機能性成分が明らかとなり、有用資源としての価値が見出された。

Wasabia japonica Matsumura, anti-inflammatory, anti-obesity

講演番号：4A06a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ A 校舎 06 会場

Camu-camu 種子に含まれる縮合型タンニンとその機能性
Condensed tannins in camu-camu seed and its biological activities.
○金嶋 泰、妙田 貴生、戸枝 一喜、藤森 嶺、西澤 信（東農大・生物・食香）
○Tai KANESHIMA, Takao MYODA, Kazuki TOEDA, Takane FUJIMORI, Makoto NISHIZAWA (Tokyo Univ. of Agric.)

ペルー原産の植物であるカムカム (*Mirciaria dubia*) は、果実にビタミン C を多量に含むことで知られている。日本をはじめとするいくつかの国では、このビタミン C を利用したジュースや酢などの製品が販売されている。一方現地では、果汁製造の際に果実の約 40 %を占める果皮や種子といった残渣が廃棄されている。そこで本研究では、カムカム果汁残渣の種子および果皮に含まれる機能性成分の探索を行い、機能性素材としての可能性を検討することを目的とした。我々はこれまでに、種子および果皮粉末の 50 %アセトン抽出物に多量のポリフェノールが含有され、これが抗酸化活性を示す主要な成分であることを明らかにした。また、*C*-配糖体エラジタンニンである castalagin および vescalagin の存在およびこれらの類縁化合物の存在を明らかにした。本報告では、種子に含有される縮合型タンニンの機能性および構造解析について報告する。

【試料および方法】乾燥したカムカム種子粉末を試料とした。この 50 %アセトン抽出物を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに供し、50-100 %メタノールおよび 50, 100 %アセトンで溶出させて各溶出画分を得た。各画分の縮合型タンニン含量はバニリン塩酸法で測定した。機能性の評価は、糖質および脂質分解酵素に対する阻害活性および消臭を指標として検討した。構造解析は、2-sulfanylethanol と塩酸により縮合型タンニンを分解し、各種クロマトグラフィーと機器分析により行った。

【結果および考察】50 %アセトン抽出物に含有されるポリフェノールのうち、約 20 %を縮合型タンニンが占めた。これらは、Sephadex LH-20 による分画では 100 %メタノールおよび 50, 100 %アセトン画分に溶出した。縮合型タンニンの機能性を評価したところ、100 %アセトン画分がヒト唾液由来 α-amylase に対して阻害活性 (9.6 μg/ml, 56.3 %) を示した。ブタ膵リパーゼに対する阻害活性 (IC_{50} 値 = 107.8 μg/ml) は、ポジティブコントロールである (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) より強い阻害活性を示した。さらに、*n*-吉草酸に対する消臭効果は柿渋と同等であった。カムカム種子に含有される縮合型タンニンは、EGCG および (-)-epicatechin gallate (ECG) により構成され、2-sulfanylethanol が 4 位に置換したことから、縮合する際の C-C 結合の片方は 4 位であることが明らかとなった。また、EGCG が検出されたことから、末端に EGCG を有する縮合型タンニンの存在が明らかとなった。以上の結果から、カムカム種子には加水分解型タンニンだけでなく縮合型タンニンも含有され、これらは様々な機能性を示す主要な成分であることが明らかとなった。

Condensed tannin, Camu-camu, Biological activities

講演番号：4A06a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ A 校舎 06 会場

静岡県産温室メロン葉の成分研究

Chemical constituents of leaves of *Cucumis melo* in Shizuoka

○増田 友香[1]、細谷 孝博[1]、大場 聖司[2]、熊澤 茂則[1] ([1]静岡県大院薬食・食栄、[2]静岡県農林技術研)
○ Yuka MASUDA[1], Takahiro HOSOYA[1], Seiji OHBA[2], Shigenori KUMAZAWA[1] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Shizuoka Res. Inst. of Agrc. and For.)

【目的】静岡県は温室メロン‘アールス・フェボリット’（*Cucumis melo* L.）の栽培が盛んであり、収穫量、作付面積ともに日本一を誇る重要な特産物となっている。しかし、果実の収穫後に残る大量の葉や茎には使用用途がなく、廃棄されているのが現状である。本研究ではそのような未利用部位に新たな利用価値を見出すべく、メロンの葉に着目した化学的成分分析および機能性評価を行うこととした。

【方法】果実収穫後のメロン生葉 5 kg を採集し、試料とした。葉は乾燥後にメタノールで抽出し、メタノール抽出物 192 g を得た。メタノール抽出物は、ヘキサン、酢酸エチルおよびブタノールと水でそれぞれ液液分配した。分配後の画分について、各種カラムクロマトグラフィーおよび分取 HPLC を用いた成分の単離・精製を行い、酢酸エチル画分から化合物 **1**（10.5 mg）、化合物 **2**（2.9 mg）、化合物 **7**（1.3 mg）、化合物 **8**（2.9 mg）を、ブタノール画分から化合物 **3**（1.0 mg）、化合物 **4**（4.2 mg）、化合物 **5**（3.8 mg）、化合物 **6**（4.7 mg）を得た。得られた化合物について NMR や MS 等の測定を行い、構造を決定した。

【結果】単離した化合物について構造解析を行った結果、化合物 **1**－**3** は、メガスティグマン型化合物 cucumegastigmane I（**1**）、 cucumegastigmane II（**2**）、staphylionoside D（**3**）、化合物 **4** は、フラボノイド配糖体 isoorientin-2″-*O*-β-D-glucoside であることが明らかとなった（図 1）。化合物 **5** および **6** は、化合物 **4** の誘導体であると考えられたが、詳細な化学構造については現在検討中である。その他の成分として indole-3-aldehyde（**7**）、nicotinic acid（**8**）を同定した。今回得られた化合物の構造および機能性評価について報告する。

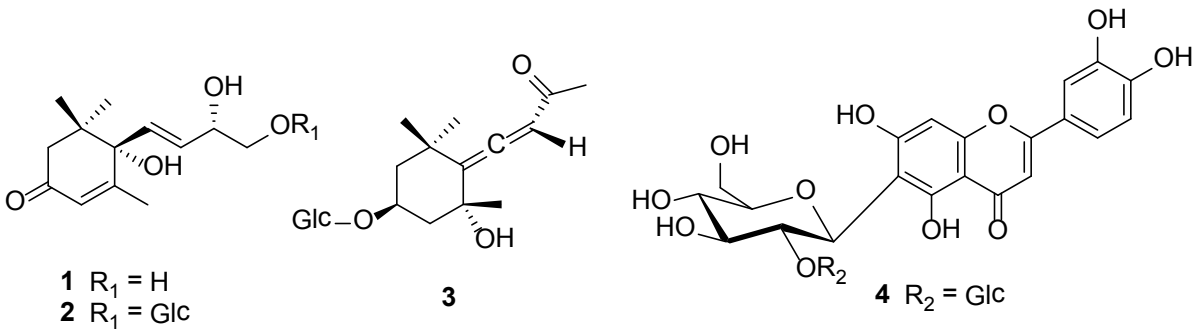


図 1. メロン葉から得られた化合物

Cucumis melo, megastigmane, flavonoid

講演番号：4A06a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ A 校舎 06 会場

ぶどう山椒に含まれるアポトーシス誘導活性物質の探索とその作用機構

Apoptosis-inducing active components from *Zanthoxylum piperitum* and there possible mechanisms

○古川 和樹[1]、原田 悠希[1]、奥野 祥治[1]、河野 良平[2]、野村 幸子[2]、宇都宮 洋才[2]([1]和歌山高専、[2]和歌山県医大)
○ Kazuki FURUKAWA[1], Yuki HARADA[1], Yoshiharu OKUNO[1], Ryohei KONO[2], Sachiko NOMURA[2], Hirotoshi UTSUNOMIYA[2] ([1]Wakayama NCT., [2]Wakayama Med. Univ.)

【目的】がんは 3 大死因の一つであり、各種のがん疾患に対して新たな抗がん剤の開発が行われている。がん治療において、より副作用の少ない治療法が課題とされており、その有効な手段としてがん細胞に対するアポトーシス誘導がある。我々の研究室では、植物および食資源中に含まれる機能性成分に関する研究を行っており、その一環として、アポトーシス誘導物質の探索及び作用機構に関する研究を行っている。

山椒（*Zanthoxylum piperitum*）はミカン科山椒属の植物で、古くから香辛料や薬用として用いられてきた。和歌山県は山椒の生産日本一であり特に大粒のぶどう山椒とよばれる品種を栽培しており、抗酸化活性や抗菌作用をもつことが報告されている。しかし山椒に含まれるアポトーシス誘導物質に関する報告はされていない。山椒のメタノール抽出物の胃癌細胞 MKN-45 に対する増殖抑制試験を行ったところ、強い効果が見られた。そこで本研究ではぶどう山椒に含まれる胃癌細胞に対するアポトーシス誘導物質の探索と構造決定およびその作用機構の解明を目的とした。

【実験】乾燥したぶどう山椒の実 1kg をメタノールに浸して常温で 24 時間抽出した後、減圧濃縮しメタノール抽出物(141.8g)を得た。このメタノール抽出物が MKN-45 に対して増殖抑制効果を示したため、水で懸濁後ヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチルで順次抽出し、各抽出物を得た。これらの各抽出物を試験した結果、ジクロロメタン抽出物に強い効果がみられたため、抽出物を細胞増殖抑制試験を指標として、SiO_2 カラムクロマトグラフィーにより分画を繰り返した。

【結果】山椒に含まれるアポトーシス誘導物質の探索は、MKN-45 に対する増殖抑制効果を指標とした。ぶどう山椒の実から得たメタノール抽出物が、MKN-45 に対し、100μg/mL で 80% 以上の細胞増殖抑制効果を示した。そこで、メタノール抽出物をヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチル、水に分画したところ、ジクロロメタン抽出物が最も強い抑制効果を示したため、SiO_2 カラムクロマトグラフィーにより、Fr. 1~Fr. 13 に分画した。細胞増殖試験の結果 Fr. 2、4、6、7 が強い効果を示し、Fr. 2 が最も強い抑制効果を示した。現在、これらの活性成分の単離、構造決定を行っている。

Zanthoxylum piperitum, apoptosis, MKN-45

講演番号：4A06a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ A 校舎 06 会場

梅種子由来新規リグナン 2’,9-epoxylyoniresinol の絶対立体構造の決定と全合成

Determination of absolute configuration and total synthesis of 2’,9-epoxylyoniresinol from seed of *Prunus mume*

○須戸 雅弘[1]、奥野 祥治[1]、河野 良平[2]、野村 幸子[2]、宮澤 三雄[3]、宇都宮 洋才[2]([1]和歌山高専、[2]和歌山県医大、[3]近畿大理工)

○ Masahiro SUDO[1], Yoshiharu OKUNO[1], Ryohei KONO[2], Sachiko NOMURA[2], Mitsuo MIYAZAWA[3], Hirotoshi UTSUNOMIYA[2] ([1]Wakayama NCT., [2]Wakayama Med. Univ., [3]Kinki Univ.)

【目的】

梅はバラ科サクラ属の落葉樹であり、中国中南部が原産地である。日本への渡来は古く、我が国において伝統的に健康食品として食されてきたが、科学的な研究はほとんどなされていなかった。我々はこれまでに、梅の糖尿病予防効果および抗動脈硬化活性について報告している。さらに、ヘリコバクターピロリ菌に対する抑制物質としてリグナン類の 1 種であるシリンガレシノールを見出した。リグナン類は多彩な生理活性を有していることから、梅に含まれるリグナン類の探索研究を行ったところ、4 種の既知リグナンおよび、1 種の新規リグナン 2’,9-epoxilyoniresinol を単離し、構造決定した。しかし、2’,9-epoxilyoniresinol の立体構造の決定には至っていない。そこで本研究では、立体構造の決定および、全合成を目的とした。

【方法】

梅種子からのリグナン類の精製

梅種子の 60%エタノール抽出濃縮物 10 L を蒸留水で 2 倍希釈した後、ヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチルで順次抽出した。そのジクロロメタン抽出物を SiO_2 カラムクロマトグラフィーおよび分取 HPLC により分画し、pinoresinol、(-)-syringaresinol、(-)-episyringaresinol、lyoniresinol および (-)-2’,9-epoxilyoniresinol を単離した。

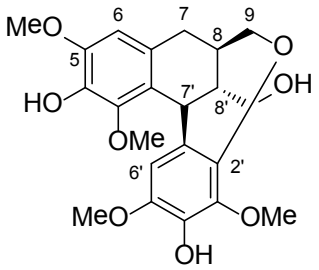
2’,9-epoxilyoniresinol の合成

Sinapinic acid を出発原料とした 2’,9-epoxilyoniresinol の全合成を検討した。

【結果】

梅種子から単離した(-)-2’,9-epoxilyoniresinol の絶対立体を決定するために、まず相対立体構造について検討した。^{1}H NMR において、7′位のプロトンのシグナルがシングレットであったことから、7′位と 8′位のプロトンがつくる二面角は Karplus 則より約 90 度であることが分かった。さらに、H-H COSY から、8 位と 8′位のプロトンの相関がみられなかった。このことから、8′位のプロトンと 7′位、8 位のプロトンはそれぞれ *trans* form であると決定した。また、比旋光度は負の値とっていたことから (-)-2′,9-epoxilyoniresinol と決定した。現在絶対立体の決定を行っている。

2′,9-Epoxilyoniresinol の合成については、sinapinic acid の酸化カップリング反応を経由した合成を検討している。



(-)-2′,9-epoxilyoniresinol

Prunus mume, Lignan, 2',9-Epoxylyoniresinol

講演番号：4A06a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ A 校舎 06 会場

シラカンバ外樹皮からの AGEs 形成阻害物質の探索

Isolation of AGEs inhibitors from outer bark of *Betula platyphylla*

○岡田 直己、重冨 顕吾、三橋 進也、生方 信 (北海道大学院農)
○Naoki OKADA, Kengo SHIGETOMI, Shinya MITSUHASHI, Makoto UBUKATA (Hokkaido Univ.)

【背景】

現在、糖尿病患者数は年々増加しており、大きな社会問題となっている。糖尿病合併症の原因の一つであるメイラード反応由来の終末糖化産物(AGEs)の形成を阻害する化合物を発見することは、糖尿病合併症に対する新たな予防・治療へと繋がると考えられる。当研究室では、樹皮に含まれる成分の多様性に着目し、北海道に自生する 8 種類(トドマツ・カラマツ・シラカンバ・キハダ・ハルニレ・アズキナシ・ミズナラ・イタヤカエデ)の樹木の外樹皮・内樹皮の抽出成分の組成と AGEs 形成阻害活性との相関性に関する調査を行った。その結果、フェノール性化合物含有量と AGEs 形成阻害活性とは正に相関することが示めされた。フラボノイド等のフェノール化合物は抗酸化作用を示し、AGEs 形成阻害活性能を持つことが知られている。しかし、シラカンバ外樹皮抽出物のみ、相対的にフェノール含有量は低いにもかかわらず高い AGEs 形成阻害活性を示した。そこで、シラカンバ外樹皮からの AGEs 形成阻害物質の単離・構造決定を目的として本研究を行った。

【方法】

7月の苫小牧研究林において採取されたシラカンバ外樹皮を凍結乾燥・粉末化した後、暗所下・4℃・24時間で酢酸エチルによる抽出操作を行った。得られた粗抽出物を出発材料として、グルコースとBSAを用いたAGEs阻害活性試験による蛍光度(励起波長 360 nm・蛍光波長 465 nm)と、フェノール性化合物の検出を行うフォーリン・チオカルト法による吸光度(765 nm)を指標として、シリカゲルカラムクロマトグラフィーやHPLC(ODS)、Sephadex LH-20カラムクロマトグラフィー等により分離・精製操作を行った。

【結果と考察】

カラムクロマトグラフィーを用いて、AGEs形成阻害物質の単離を行った結果、シラカンバ外樹皮の主成分であるベチュリンの誘導体である3β-O-(*trans*-caffeoyl)betulin (TCB)が得られた。TCBは粗抽出物に対して約10倍の比活性を示した(IC_{50}=0.54 μM)。さらに、粗抽出物中のTCBは、質量比で約10%であることがHPLC分析によって示された。これらのことから、TCBはシラカンバ外樹皮粗抽出物におけるAGEs阻害活性の主要成分の一つであることが考えられる。また、TCBが他樹種のフェノール性化合物に比べて、フォーリン・チオカルト法によって検出されにくいため、シラカンバ外樹皮粗抽出物におけるAGEs形成阻害活性とフェノール性化合物含有量の相関性が低いと示唆された。現在、シラカンバ外樹皮中からTCB以外のAGEs形成阻害剤の探索と、TCBによるメイラード反応の阻害メカニズムの解明を検討している。

Betula platyphylla, AGEs

講演番号：4A06a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ A 校舎 06 会場

ヤナギ科カワヤナギ由来の生薬抽出物の HL-60 増殖抑制活性

Antiproliferative activity of the extracts from *Salix gilgiana*

○小山 愛美[1]、常盤野 哲生[2]、川井 悟[3]、吉澤 結子[2]（[1]秋田県立大院生資科、[2]秋田県立大生資科、[3]東京電機大理工）
○Manami OYAMA[1], Tetsuo TOKIWANO[2], Satoru KAWAII[3], Yuko YOSHIZAWA[2] ([1]Akita Pref. Univ. Grad. Sc., [2]Akita Prefectural Univ., [3]Tokyo Denki Univ.)

【緒言】

本研究室では、木本植物由来の生薬に含まれる生理活性物質の探究を行っている。その一環として、ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制活性を指標に、木本植物生薬 11 種類のメタノール抽出物について、活性スクリーニングを行った。その結果、*Salix gilgiana*（和名カワヤナギ）抽出物に、IC_{50} が 15.9 ppm と強い活性を見いだした。カワヤナギはヤナギ科木本植物で、その枝の乾燥品が生薬カワヤナギとして用いられており、消炎・鎮痛などに効果があるとされている。*S. gilgiana* からは、Apigenin や Luteolin などのフラボンおよびフラボン配糖体の単離が報告されている。本研究では、この生薬を材料とし、HL-60 増殖抑制活性を指標に *S. gilgiana* に含まれる HL-60 増殖抑制成分の解明を目的とした。

【実験方法】

S. gilgiana 由来の生薬（枝の乾燥品）をメタノールに浸漬し、不溶物をろ過した後、メタノールを減圧留去して粗抽出物を得た。これを HL-60 に対する増殖抑制活性を指標にカラムクロマトグラフィーにて分画・精製を行った。単離した化合物は NMR 等の機器分析によって構造解析を行った。HL-60 に対する活性試験は、10%牛胎児血清（FBS）を含む RPMI-1640 培地を用い 37 ºC、5% CO_2 条件下で維持した HL-60 に、最終濃度が 50.0 ppm から始まる公比 4 倍の希釈系列で抽出物試料を添加し 72 時間培養した。その後、alamar Blue® 色素を添加し、さらに 24 時間培養した。培養終了後に吸光度を測定し、IC_{50} 値を求めた。

【結果】

メタノール抽出物について、セルロースを用いてクロロホルム、酢酸エチル、アセトン、メタノール、水で固相抽出を行い、活性を示したクロロホルム、酢酸エチル、アセトン画分について、さらにクロマトグラフィーを繰り返して精製を進めた。その結果、活性の強い分画 2 種が得られた。一方は、リグニン様物質の混合物と考えられ、現在精製を進めており、もう一方の分画からは化合物 1 種を単離した。これらの化合物の構造解析および生理活性の詳細について報告する。

HL-60, *Salix gilgiana*

講演番号：4A06a17
講演日時、会場：3 月 30 日 11:54～ A 校舎 06 会場

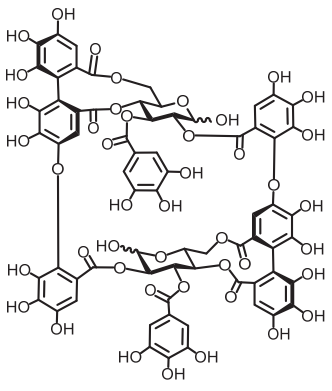
ザクロの新規ネオリグナンの構造

A new neolignan derivative from pomegranate arils

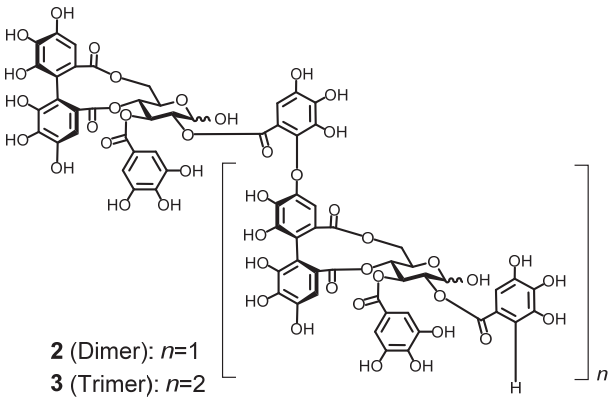
○金田 麻央[1]、李 鵬[2]、我如古 菜月[1]、長友 暁史[3]、西田 典永[3]、伊東 秀之[1,2]（[1]岡山県大院保福、[2]岡山大院医歯薬、[3]森下仁丹株式会社）
○Mao KANADA[1], Peug LI[2], Natsuki GANEKO[1], Akifumi NAGATOMO[3], Norihisa NISHIDA[3], Hideyuki ITO[1,2] ([1]Okayama Pref. Univ., [2]Okayama Univ., [3]Morishita Jintan)

【目的】ザクロ（*Punica granatum* L.）の果皮は中国で駆虫作用や整腸作用に使用され，欧米ではザクロの搾汁は飲料として広く親しまれている。最近になってザクロには抗酸化作用をはじめ抗炎症作用や抗腫瘍作用など様々な機能性が報告されてきているが，それらは，特に果皮部分に多く含まれるエラジタンニンの punicalagin, punicalin や ellagic acid の作用に帰さられているのが現状である。我々は，さらなるザクロの機能性成分の探索を目的として，成分の精査を行った結果，可食部であるアリルから，ザクロには初めての存在となるエラジタンニン２量体の oenothein B (**1**), eucalbanin B (**2**)，および３量体の eucarpanin T_1 (**3**) を同定すると共に，新規エラジタンニン４量体 [pomegraniin A (**4**)] および５量体 [pomegraniin B (**5**)] を単離，構造解明し，[1] さらにそれら新規成分は強い抗糖化作用を有することも明らかにした。[2] 今回，引き続きアリル部分の成分探索を行った。

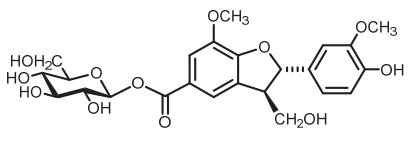
【方法・結果】チリ産のザクロからアリルを採取し，搾汁後，Diaion HP-20 カラムクロマトに付し，さらに Toyopearl HW-40 カラムクロマトによる分離，精製を行い，新規化合物を単離した。新規化合物は，2D-NMR，MS などの各種スペクトル解析および化学反応の結果に基づき，ネオリグナンにグルコースがエステル結合した (**6**) 式で表わされるような構造を有することが明らかとなり，pomegralignan と命名した。



1



2 (Dimer): *n*=1
3 (Trimer): *n*=2
4 (Tetramer): *n*=3
5 (Pentamer): *n*=4



6

1) 伊東秀之ら, 日本農芸化学会 2013 年度大会（2013, 仙台）, 2) 長友暁史ら, 第 13 回日本抗加齢医学会総会（2013, 横浜）

Pomegranate, Ellagitannin, Pomegralignan

講演番号：4A07a03
講演日時、会場：3 月 30 日 09:22～ A 校舎 07 会場

ジュンサイ成分による HIV-1 逆転写酵素活性の阻害

Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase activity by Brasenia schreberi components

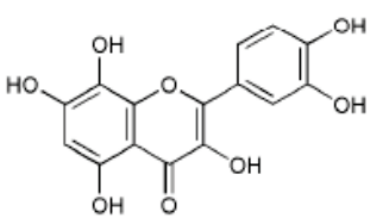
○久好 哲郎[1]、篠村 まゆ[2]、小西 篤[2]、田中 潤司[3]、下田 博司[3]、畠 恵司[4]、高橋 砂織[4]、保川 清[2] ([1]京大・農、[2]京大院・農、[3]オリザ油化（株）、[4]秋田県総食研)

○Tetsuro Hisayoshi[1], Mayu Shinomura[2], Atsushi Konishi[2], Junji Tanaka[3], Hiroshi Shimoda[3], Keishi Hata[4], Saori Takahashi[4], Kiyoshi Yasukawa[2] ([1]Faculty Agric., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Oryza Oil & Fat Chem., [4]Akita Res. Inst. Food & Brew)

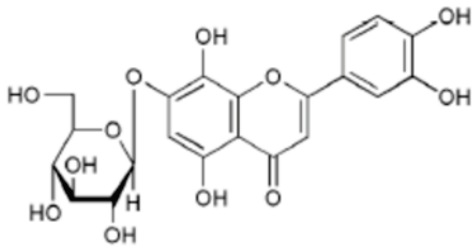
【目的】1 型ヒト免疫不全ウイルス逆転写酵素（HIV-1 RT）は HIV-1 の増殖に不可欠であり、後天性免疫不全症候群（AIDS）治療薬の標的となっている。また、阻害剤耐性 RT を持つ変異型 HIV-1 株の出現を抑えるため、新たな阻害機構を有する阻害剤の開発が求められている。そこで本研究では、様々な食品に含まれる HIV-1 RT 阻害物質を探索することを目的とした。

【方法】1. 組換え HIV-1 RT の調製：HIV-1 RT は分子量 51,000 の p51 と分子量 66,000 の p66 からなるヘテロダイマーである。p51 を発現させた大腸菌 BL21(DE3)の菌体と p66 を発現させた菌体を混合し、超音波破砕の後、可溶性画分から HIV-1 RT を精製した。2. poly(rA)-p(dT)$_{15}$（T/P）への dTTP の取り込み反応：食品抽出液と HIV-1 RT 溶液を混合し、常温で 3 分間インキュベートした。その後、25 μM T/P（濃度は p(dT)$_{15}$ のモル換算）、0.2 mM [^{3}H]dTTP 存在下、37℃で反応を行い、継時的に反応液を採取して酸不溶性画分への放射能の取り込みから初速度を求めた。

【結果】25 種類の食品抽出液のうち、ジュンサイのエタノール抽出液と水抽出液が HIV-1 RT の逆転写活性を阻害した。さらに 15 種類のジュンサイ成分を調べたところ、Gossypetin と Hypolaetin 7-*O*-glucoside が HIV-1 RT を阻害した。



Gossypetin



Hypolaetin 7-*O*-glucoside

Brasenia schreberi, HIV-1, reverse transcriptase

講演番号：4A07a04
講演日時、会場：3 月 30 日 09:33～ A 校舎 07 会場

新規アシルプルンバギンの合成と抗がん・抗炎症・抗アレルギー活性

Anti-cancer, anti-inflammatory and anti-allergic activities of the synthesized novel acyl-plumbagins

○栗山 磯子[1]、河村 萌[2]、椿 一典[2]、倉持 幸司[2]、吉田 弘美[1]、水品 善之[1,3]([1]神戸学院大・栄養、[2]京府大院・生命環境、[3]神戸学院大・LSC)
○Isoko KURIYAMA[1], Moe KAWAMURA[2], Kazunori TSUBAKI[2], Koji KURAMOCHI[2], Hiromi YOSHIDA[1], Yoshiyuki MIZUSHINA[1,3] ([1]Faculty of Nutrition, Kobe Gakuin Univ., [2]Kyoto Pref. Univ., [3]LSC, Kobe Gakuin Univ.)

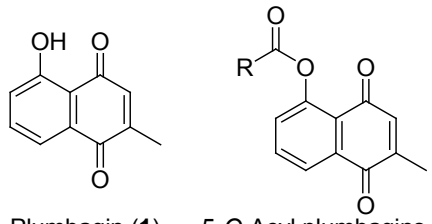
【目的】我々はこれまでに、ビタミン K_3 の誘導体であるジュグロンの 5 位に脂肪酸を結合させたアシルジュグロン 10 物質を合成して、DNA 合成酵素(DNA ポリメラーゼ, Pol)阻害活性を見いだした[1,2]。本研究では、ジュグロンにメチル基 1 つが結合したプルンバギン(**1**)に脂肪酸を結合させた新規物質であるアシルプルンバギン 10 物質(**2**)を合成した【図１】。そして、アシルジュグロンとアシルプルンバギンの安定性、Pol 阻害活性とがん細胞増殖抑制活性、抗腫瘍活性を比較調査した。

【方法】哺乳類の Pol は精製酵素を準備して、*in vitro* の活性測定を実施した。ヒト由来がん細胞株に対する増殖抑制活性は MTT 法で測定した。抗腫瘍活性は、ヌードマウスへヒト大腸がん細胞（HT-29 cells）を移植してから腫瘍体積の経時的変化を測定した。抗炎症活性は、マウス・マクロファージ（RAW264.7 cells）へリポ多糖（LPS）刺激による TNF-α の産生抑制活性およびマウス耳へ起炎剤 TPA の塗布による浮腫重量差から測定した。

【結果】合成した 10 種類のアシルプルンバギンのうち、8 種類が新規物質であった[3]。アシルプルンバギンは、アシルジュグロンよりも溶液中での安定性が見られた。アシルプルンバギンは、哺乳類 Pol 阻害活性、ヒト大腸がん細胞増殖抑制活性を示し、これらの生理活性の強さはアシルジュグロンとほぼ同じであった。アシルプルンバギン 10 物質のうち、C18:1-プルンバギンは最も強い Pol α 阻害活性とヒトがん細胞増殖抑制活性を示した。ヌードマウス抗腫瘍活性では、C18:1-プルンバギンは C18:1-ジュグロンよりも強い作用があった。一方、C22:6-プルンバギンは最大の TNF-α 産生抑制活性、マウス耳介抗炎症活性を示し、C22:6-ジュグロンよりも強かった。また、C22:6-プルンバギンは抗アレルギー活性も有していた。

【考察】アシルプルンバギンによる生理活性の上昇は、生体内での安定性の向上に起因すると考えられる。C18:1-プルンバギンは Pol α 阻害活性に基づいた抗がん作用、C22:6-プルンバギンは抗炎症・抗アレルギー作用が期待できる。

[1]特願 2011-065045（特開 2012-201600）　[2]Maruo, Kuriyama *et al.* (2011) ***Bioorg. Med. Chem.*** 19, 5803-5812. [3]特願 2013-189451



Plumbagin (**1**)　5-*O*-Acyl plumbagins (**2**)

a: R = CH_3,　**b**: R = *n*-C_2H_5,　**c**: R = *n*-C_5H_{11}
d: R = *n*-$C_{11}H_{23}$,　**e**: R = *n*-$C_{17}H_{35}$
f: R = *cis*-$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7$
g: R = *cis*,*cis*-$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7$
h: R = all *cis*-$CH_3CH_2(CH{=}CHCH_2)_3(CH_2)_6$
i: R = all *cis*-$CH_3CH_2(CH{=}CHCH_2)_5(CH_2)_2$
j: R = all *cis*-$CH_3CH_2(CH{=}CHCH_2)_6CH_2$

【図１】アシルプルンバギン 10 物質(**2a-j**)

acyl-plumbagin, DNA polymerase, enzyme inhibitor

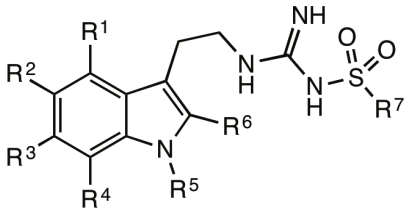
講演番号：4A07a05
講演日時、会場：3 月 30 日 09:44～ A 校舎 07 会場

インドール誘導体の小胞体グルコシダーゼ阻害剤活性に関する研究

Research of inhibitory activity of indole derivatives against ER glucosidase

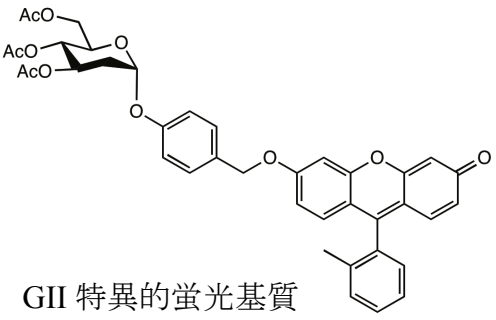
○荒井 詩織[1]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[1]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大生資科・生命化、[2]日大院 生資科)
○ SHIORI ARAI[1], WATARU HAKAMATA[1,2], TAKAKO HIRANO[1], TOSHIYUKI NISHIO[1,2] ([1]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ., [2]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

【目的】現在、新型インフルエンザなどのウイルス感染症が大きな社会問題となっている。しかし、細菌感染症に対する抗生物質に比べ、抗ウイルス薬の開発は大きく遅れている。そこでウイルス感染症の原因ウイルスの感染・増殖に *N*-結合型糖鎖が必須であることに着目した。これら糖鎖の修飾酵素の中でも、小胞体グルコシダーゼ II（以下 GII）の阻害は、ウイルス表面糖鎖を未成熟としウイルスの感染力を大幅に低下させる。そのため、GII 阻害剤は抗ウイルス剤と成り得ることが多く報告されている。これまでに我々は GII を標的とした阻害剤のバーチャルスクリーニングを行い (W. Hakamata, *Bioorg. Med Chem. Lett.*, **22**, 62, 2012)、右図インドール誘導体が、α-グルコシダーゼ阻害活性を有し、抗ウイルス活性を示すことを明らかにした（袴田　航ら、特開 2012-206959)。そこで、これらの誘導体が細胞内で GII 阻害剤であるか確認するために、培養細胞において GII 特異的基質（下図参照）となる蛍光プローブを開発し (S. Tamura, International Chemical Biology Society 2013)、それを用いて、これらインドール誘導体の培養細胞中での GII 阻害活性を明らかにすることを本研究の目的とした。



阻害剤の骨格

【方法および結果】はじめに 6 穴プレートに HeLa 細胞を培養し、蛍光基質および 19 種類のインドール誘導体を加えインキュベート後に、細胞を固定化した。その後、蛍光顕微鏡を用いて細胞を観察し、細胞の有する蛍光面積と輝度を測定した。化合物を投与していない細胞と比較して、インドール誘導体を加えたときに、蛍光染色面積および蛍光輝度の総和を比較することにより阻害活性を算出した。その結果、4 種類のインドール誘導体に高い阻害活性がみられた。そこでこれら 4 種類の化合物について、化合物濃度依存的な蛍光量の減少を測定し、EC_{50} 値を算出した。更に、これら 4 種類のインドール誘導体について、MTT 法による細胞毒性の評価を行い、細胞毒性を示す CC_{50} 値を算出した。これらの値より、細胞毒性が低く阻害活性が高い化合物を見出した。今後は、用いた 19 種類とは異なる構造を有したインドール誘導体について、GII 阻害活性の有無を確認し、詳細な構造活性相関について検討を行う予定である。



GII 特異的蛍光基質

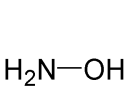
glucosidase, glucosidase inhibitor, antivirus activity

講演番号：4A07a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ A 校舎 07 会場

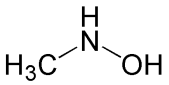
ヒドロキシアミンの骨格筋細胞に対する糖取り込み促進作用とその作用機構解析
Analysis on signal transduction pathway responsible for the enhancement of glucose uptake by hydroxylamine against skeletal muscle cells
○木村 太郎、加藤 英介、町川 司、木村 駿介、片山 紳司、川端 潤 (北大院農)
○ Taro KIMURA, Eisuke KATO, Tsukasa MACHIKAWA, Shunsuke KIMURA, Shinji KATAYAMA, Jun KAWABATA (Hokkaido Univ.)

【背景・目的】糖尿病は世界的に患者数が増加傾向にあり、今後も同様の傾向が続くことが懸念されている。骨格筋細胞は人体の 50%を占める主要な細胞であり、食後の糖代謝において重要な役目を担うことが知られている。さらに、Ⅱ型糖尿病患者では骨格筋細胞の代謝が大きく低下することが報告されている。[1] これまでに様々な糖尿病治療薬が開発されてきたが、筋細胞の糖代謝を直接改善するような薬剤は少ないのが現状である。骨格筋細胞に対して糖取り込み促進作用を示す化合物を調べる過程で、我々はヒドロキシアミンが活性を示すことを見つけた。そこで、本研究ではヒドロキシアミンに関連する化合物の糖取り込み試験を行い、作用機構解析を行った。

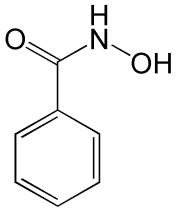
【方法・結果】各種試験は分化したマウス骨格筋由来の C2C12 細胞を用いて行った。ヒドロキシアミン関連化合物の糖取り込み促進作用を測定したところ、ベンゾヒドロキサム酸(BzA)、*N*-メチルヒドロキシアミン(*N*-MA)、*N*-ベンジルヒドロキシアミン(*N*-BA)、*O*-ベンジルヒドロキシアミン(*O*-BA)に顕著な活性は見られず、ヒドロキシアミン(HA)のみに強い活性が見られた。PI3K 阻害剤を用いた糖取り込み試験により、ヒドロキシアミンは PI3K シグナル経路に関わることがわかった。また、ウエスタンブロッティング解析の結果、PI3K の上流の因子である IRS1 と下流の因子である Akt のどちらもヒドロキシアミンにより活性化されたことから、ヒドロキシアミンはインスリンシグナル経路を活性化することが明らかになった。



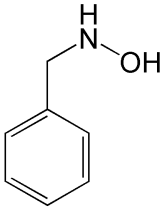
HA



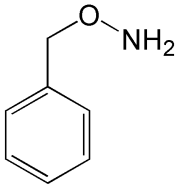
***N*-MA**



BzA



***N*-BA**



***O*-BA**

1) D.M. Casirola, R.P. Ferraris, *J. Clin. Invest. 81,* 1563-1571 (**1988**).

diabetes mellitus, glucose uptake, hydroxylamine

講演番号：4A07a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ A 校舎 07 会場

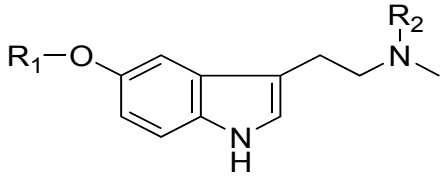
山椒種子中のセロトニン関連配糖体および類縁体のチロシナーゼ阻害活性評価

Tyrosinase inhibitory activity of serotonin glycosides analogs in the seed of Japanese pepper

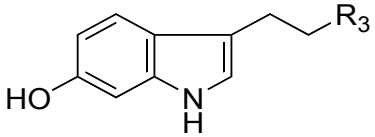
吉田 拓弥、○小川 和樹、柳瀬 笑子 (岐阜大学)
Takuya YOSIDA, ○Kazuki OGAWA, Emiko YANASE (Gifu Univ.)

【目的】チロシナーゼは動植物に存在する酸化還元酵素であり、L-チロシンを酸化して神経伝達物質ドーパミンの前駆体である L-ドーパを合成する。しかし、チロシナーゼは L-ドーパも酸化し、メラニン色素生成の原因となるドーパキノンを生成することが知られている。近年、N-フェニルアシルセロトニンに高いチロシナーゼ阻害活性があり、特にケイ皮酸とヒドロキシトリプタミンの結合体がチロシナーゼ阻害剤として有用である可能性が報告されている[1)]。我々は、山椒種子中より、2 種類のセロトニン誘導体配糖体及びそのアグリコンの単離に成功している[2)]。これらについて、チロシナーゼ阻害活性試験を行ったところ配糖体には活性がなく、アグリコン 2 種に弱いチロシナーゼ阻害活性が見られた。そこで、本研究では構造活性相関を明らかにする目的で各種誘導体を合成し、そのチロシナーゼ阻害活性を比較することにした。

【方法・結果】各種 3 位置換インドールを出発原料として、1 位及び 3 位の適切な保護、位置選択的 Friedel-Crafts アシル化反応、Baeyer-Villiger 酸化反応等を用い、各種誘導体を合成した[3)]。得られた各種誘導体についてチロシナーゼ阻害活性試験を行ったところ、ベンゼン環部の水酸基の位置は天然型の 5 位よりも 6 位に導入することで著しく向上することが分かった。さらに 3 位側鎖の構造の違いによる活性への影響について検討したところ、特に 3 位側鎖のカルボニル基の存在が阻害活性の増強に効果的であり、アミンあるいはアミド基は必須でないことが分かった。3 位側鎖のアミノ基の存在はインドール類の誘導化反応をより複雑にするため、アミノ基が不要であるという知見はチロシナーゼ阻害剤の開発にとって非常に有益である。



R_1=H or Glu
R_2=H or CH_3



R_3=COOMe, $NHCOOCH_3$, $NHCOCH_3$, *etc*

1) Y. Yamazaki *et. al, Bioorg. Mod. Chem Lett.*, **19**, 4178 (2009).
2) E. Yanase *et. al, Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1951 (2010).
3) 吉田他　日本農芸化学会 2012 年度大会　2A07a05

tyrosinase, inhibitor

講演番号：4A07a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ A 校舎 07 会場

構造生物学的アプローチによるヒドロキシルアミン酸化還元酵素を標的とした硝化抑制剤の開発

Structure based approach for nitrification inhibitor design targeting for hydroxylamine oxidoreductase

○西ヶ谷 有輝[1,2]、熊谷 美穂[3]、土屋 渉[2]、藤本 瑞[2]、鮫島 玲子[4]、藤原 健智[3]、山崎 俊正[2]（[1]東大院新領域、[2]生物研、[3]静岡大理、[4]静岡大農）
○ Yuki Nishigaya[1,2], Miho Kumagai[3], Wataru Tsuchiya[2], Zui Fujimoto[2], Reiko Samejima[4], Taketomo Fujiwara[3], Toshimasa Yamazaki[2] ([1]Grad. Sch. Front. Sci., University of Tokyo, [2]Natl. Inst. Agrobio. Sci., [3]Fac. Sci., Shizuoka Univ., [4]Fac. Agri., Shizuoka Univ.)

【背景】農耕地では、土壌に生息するアンモニア酸化細菌が原因となって、施肥コスト増や環境負荷が起こる。農耕地に窒素肥料として大量投入されたアンモニア態窒素（NH_4^+）は、アンモニア酸化細菌などの過剰な増殖と硝化を促し、急速に硝酸態窒素（NO_3^-）に変化する。NO_3^-は土壌に留まりにくいため、大半が河川などへ流出し、施肥効率低下や環境汚染を引き起こす。また、硝化反応の副産物として亜酸化窒素ガス（N_2O）が生成され、地球温暖化やオゾン層破壊をもたらす。

過剰な硝化に伴う負荷の軽減には、アンモニア酸化細菌の代謝・増殖を抑える薬剤（硝化抑制剤）が有効である。既存の硝化抑制剤は、窒素肥料や N_2O ガスの削減に一定の効果をあげているが、薬効向上や使用方法の改良が望まれている。しかし、既存の薬剤はどれも作用機構がはっきりしておらず、理論的な薬剤デザインは難しい。そこで新規な硝化抑制剤開発として、ヒドロキシアミン酸化還元酵素（HAO）を薬剤標的に定め、その構造情報を利用した創農薬の基盤構築を行った。標的の HAO は、アンモニア酸化細菌の生存エネルギーのほぼすべてを作り出しており、さらに N_2O ガスの直接の発生源であるとされている。そのため、HAO の基質ポケットをブロックする薬剤を開発できれば、有効な硝化抑制剤となり得ることが期待された。本発表では、新規 HAO 阻害剤（硝化抑制剤シード）の発見とその結合構造の解析および、硝化抑制剤標的としての HAO の有用性について議論する。

【結果】HAO をアンモニア酸化細菌 *Nitrosococcus oceani* strain NS58 から精製し、アポ酵素の結晶構造解析と N_2O ガスの生成観測に成功した。さらにリガンドが結合した HAO 構造を明らかにするため、基質のヒドロキシルアミンに構造が類似している数種の化合物を HAO 結晶に添加し、結晶構造解析を行った。その中からアセトアルドキシムが HAO の活性中心に結合した構造が 2.0 Å の分解能で得られた。

アセトアルドキシムは、*in vitro* 実験において非常に弱いながらも HAO の活性阻害効果を示した。さらにアセトアルドキシムの増殖阻害効果を、アンモニア酸化細菌と HAO を持たない菌（大腸菌、緑膿菌など）を対象に測定したところ、アンモニア酸化細菌のみが特異的に増殖阻害された。

これらにより、硝化抑制剤開発における分子標的としての HAO の有用性と、硝化抑制剤シードとしてのアセトアルドキシムの有用性が実証された。今後はリード化合物導出や農地での実地試験への展開を推進し、高性能な硝化抑制剤の実用化を目指す。

Nitrification inhibitor, Ammonia-oxidizing bacteria, Structure based agrochemical design

講演番号：4A07a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ A 校舎 07 会場

Gallic acid 誘導体の植物病原菌に対する構造活性相関
Structure activity relationship of gallic acid derivative against plant pathogenic fungi.
○谷澤 悟、中川 泰伯、矢嶋 俊介、佐々木 康幸、伊藤 晋作 (東農大・応生科・バイオ)
○Satoru YAZAWA, Yasutaka NAKAGAWA, Shunsuke YAJIMA, Yasuyuki SASAKI, Shinsaku ITO (Tokyo univ. of agric.)

【目的】　Gallic acid 及びそのエステル化合物は多くの植物に存在する加水分解型タンニンの一つである。抗酸化作用、抗炎症作用、チロシナーゼ阻害、バチルス属や緑濃菌、大腸菌に対する抗菌活性など、様々な生理活性を有することが知られ、現在、propyl gallate、octyl gallate、dodecyl gallate は酸化防止剤として利用されている。我々は植物病原菌に対する gallic acid 誘導体の抗真菌活性の検証を行い、4 種の植物病原菌（*Fusarium solani*、*Alternaria brassicicola*、*Colletotricum dematium*、*Colletotricum acutatum*）に対して、gallic acid 誘導体が抗真菌活性を有することを明らかにしてきた。さらに、直鎖アルキル誘導体では直鎖が長いほど活性が強くなる傾向が見られ、分岐鎖アルキル誘導体は炭素数の等しい直鎖アルキル誘導体よりも強く生育を阻害する傾向が見られている。
今回、gallic acid の親水性部位に着目し、新たに誘導体を合成した。
また、gallic acid 誘導体が *Pseudomonas aeruginosa* の酸素消費を抑制したという知見から、ミトコンドリア呼吸鎖を阻害する可能性が考えられた。そのため、植物病原菌からミトコンドリア画分を精製し、呼吸鎖複合体に対する阻害活性を検証した。

【結果】　今回、水酸基の位置、及び数が異なる誘導体を合成した結果、3-hydroxybenzoic acid 及び、4-hydroxybenzoic acid を用いた場合に、*A. brassicicola* に対して gallic acid 誘導体よりも強い抗真菌活性を示す誘導体が得られた。
呼吸鎖複合体に対する阻害活性を測定した結果、複合体Ⅱに対して阻害活性が見られた。また、その活性は植物病原菌に対する抗真菌活性と同様、アルキル鎖の炭素数が多いほど強い阻害を示したことから、gallic acid 誘導体による抗真菌活性は呼吸鎖複合体Ⅱを阻害することで引き起こされている可能性が示唆された。

gallic acid, structure activity relationship, plant pathogenic fungi

講演番号：4A07a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ A 校舎 07 会場

ニコチン性アセチルコリン受容体の多型によって生じるネオニコチノイド感受性変化の分子機構
Molecular mechanism for the effect of the polymorphism of nicotinic acetylcholine receptor on the agonist action of neonicotinoids

○伊原 誠[1]、島津 直弥[1]、宇都宮 麻衣[1]、赤松 美紀[2]、David B. SATTELLE[3]、松田 一彦[1]([1]近畿大農、[2]京都大院農、[3]Univ. College London)
○Makoto IHARA[1], Naoya SHIMAZU[1], Mai UTSUNOMIYA[1], Miki AKAMATSU[2], David B. SATTELLE[3], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Kinki Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Univ. College London)

[目的]ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)は、脊椎・無脊椎動物を問わず動物に普遍的に見られる神経受容体である。ネオニコチノイドは昆虫の nAChR に対する選択的な相互作用が、ネオニコチノイドの高い殺虫活性と人畜に対する高い安全性が可能な分子機構の一端を担っている。nAChR のサブユニットのいくつかは、選択的スプライシングや RNA 編集に加えて、ゲノム配列に由来する多型が見つかっているが、この多型がネオニコチノイド感受性に及ぼす影響については報告されていない。本研究では、ショウジョウバエ nAChR サブユニットのうち、Dα1 サブユニットの多型とネオニコチノイド感受性との関連を評価し、観察された現象を説明する分子機構を解明することを目的とした。
[方法]ショウジョウバエ Dα1 サブユニットとヒヨコの β2 サブユニットからなる、Dα1β2 nAChR をアフリカツメガエル卵母細胞に機能発現させ、本受容体に対するアセチルコリンおよびネオニコチノイドのアゴニスト活性を二電極膜電位固定法を用いて評価した。Dα1β2 nAChR におけるネオニコチノイド結合モデルは、ホモロジーモデリング法を用いて構築した。
［結果と考察］まず初めに、2 種の Dα1β2 nAChR に対するアセチルコリンのアゴニスト活性を比較したところ、Dα1 サブユニットのアゴニスト結合部位近傍の多型はアセチルコリンのアゴニスト活性における親和性ならびに活性化効率のいずれにおいても有意な影響を及ぼさないことが明らかになった。次に、ネオニコチノイドの活性を調べたところ、2 種の Dα1β2 nAChR に対するネオニコチノイドの親和性に有意な差は認められなかったものの活性化効率に有意な差を見いだした。多型が認められた領域は、これまでに知られているアゴニスト結合に直接関与する領域ではないことから、nAChR のアゴニスト結合ドメインのサロゲートタンパク質であるアセチルコリン結合タンパク質の X 線結晶構造をもとに Dα1β2 nAChR－ネオニコチノイド複合体のホモロジーモデルを作成し、当該領域の構造変化とネオニコチノイド感受性との関係について検討した。その結果、当該のアミノ酸は、ネオニコチノイドと直接相互作用することはないものの、nAChR に対するネオニコチノイドの結合に関与する loop B 領域のトリプトファンの動きを間接的に制御するのみならず、イオンチャネルの開口に繋がる nAChR の outer sheet から inner sheet への位置変化の伝達にも関与するため、ネオニコチノイドの nAChR 活性化効率に影響したものと推察された。このようなリガンド選択的なアゴニスト作用に影響をおよぼす昆虫 nAChR の多型は、抵抗性の発達に関与する可能性もあり、野外調査も含めた総合的な研究が期待される。

neonicotinoid, nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), polymorphism

講演番号：4A07a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ A 校舎 07 会場

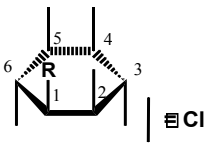
(1245/36)1-Hydroxy-2,3,4,5,6-pentachlorocyclohexane： γ-BHC 1-OH 類縁体のラセミ体光学分割とその鏡像異性体の活性

Optical resolution of (1245/36)1-Hydroxy-2,3,4,5,6-pentachlorocyclohexane racemate and the activities of its enantiomers on GABA receptor

○田中 啓司[1]、永崎 果鈴[2]、松田 一彦[2]、森本 正則[2]、尾添 嘉久[3]、栗原 紀夫[4] ([1]近畿大農・名古屋大エコトピア科研、[2]近畿大農、[3]島根大生物資源科学、[4]京都大)
○Keiji Tanaka[1], Karin Nagasaki[2], Kazuhiko Matsuda[2], Masanori Morimoto[2], Yoshihisa Ozoe[3], Norio Kurihara[4] ([1]Kinki Univ. Faculty of Agriculture・Nagoya Univ. Ecotopia Science Institute, [2]Kinki Univ. Faculty of Agriculture, [3]Shimane Univ. Faculty of life and environmental science, [4]Kyouto Univ.)

目的：γ-BHC が昆虫神経系の GABA 作動性の抑制性 Cl イオンチャンネル（GABA 受容体）に作用して高い殺虫活性を引き起すこと、一見 γ-BHC と構造的に異なる dieldrin 等の cyclodiene 系殺虫剤やピクロトキシニン、環状リン酸エステル・オルトエステル等ともこの部位にγ-BHC と競合的に作用こと[1)]等、よく知られている。 しかし γ-BHC 以外の BHC 異性体に関しては、γ-BHC と塩素原子（Cl）の配位が一か所しか違わない α-BHC に弱い殺虫活性が存在する以外、殺虫活性は認められず、γ-BHC の作用する部位がリガンド認識において、“なぜ厳格なのか”不思議である。先に、γ-BHC の立体配位を維持したまま、Cl を他の原子(H、F、Br、I、CH_3、OCH_3 等) に置換したγ-BHC 類縁体を合成し、構造活性相関研究を行った[2)]が、これらの基はいずれも疎水性であった。 最近、1 つの Cl を親水性の OH で置換しても GABA 受容体に対し高い活性を維持していることを見出している。1 位の Cl を OH に置換した 1-OH 類導体（1-OH 体）はラセミ体で、それぞれの鏡像異性体間に、*in vivo* 活性や、GABA 受容体に対する *in vitro* 活性にどのような違いが見られるか調べることにより、γ-BHC の作用する部位の構造に関する情報を得る。

方法：1-OH 体を (-)カンファン酸のエステルに導きジアステレオマーとして、カラムクロマトで分離後、加水分解して光学活性な(+)1-OH 体と(-)1-OH 体を得た。これらの GABA 受容体に対する *in vitro* での活性評価法として、イエバエ頭部の膜画分を用いた[^{3}H]-EBOB 結合阻害活性、アフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた GABA 受容体 Cl イオンチャンネルの GABA 誘起電流阻害活性を測定した。



R: Cl　γ-BHC
R:OH　1-OH 体

結果：γ-BHC の 1 個の Cl を OH や OCH_3 等で置換した類縁体の、[^{3}H]-EBOB 結合阻害活性や Cl イオンチャンネルの GABA 誘起電流の阻害活性は、γ-BHC に匹敵する活性であり、Cl、OCH_3、そして OH 間で大きな差は認められなかった。 (+)1-OH 体と(-)1-OH 体とで、[^{3}H]-EBOB 結合阻害活性やアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた GABA 受容体 Cl イオンチャンネルの GABA 誘起電流阻害活性にも差は認められなかったが、昆虫の培養細胞に発現させたショウジョウバエ由来 GABA 受容体での膜電位感受性蛍光プローブでの活性評価系では、10 倍程度の差が確認された。

1)Pestic. Biochem. Physiol. 22 124 (1984)　2) Pestic. Biochem. Physiol. 8 33 (1978)

γ-BHC, GABA receptor, EBOB binding

講演番号：4A07a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ A 校舎 07 会場

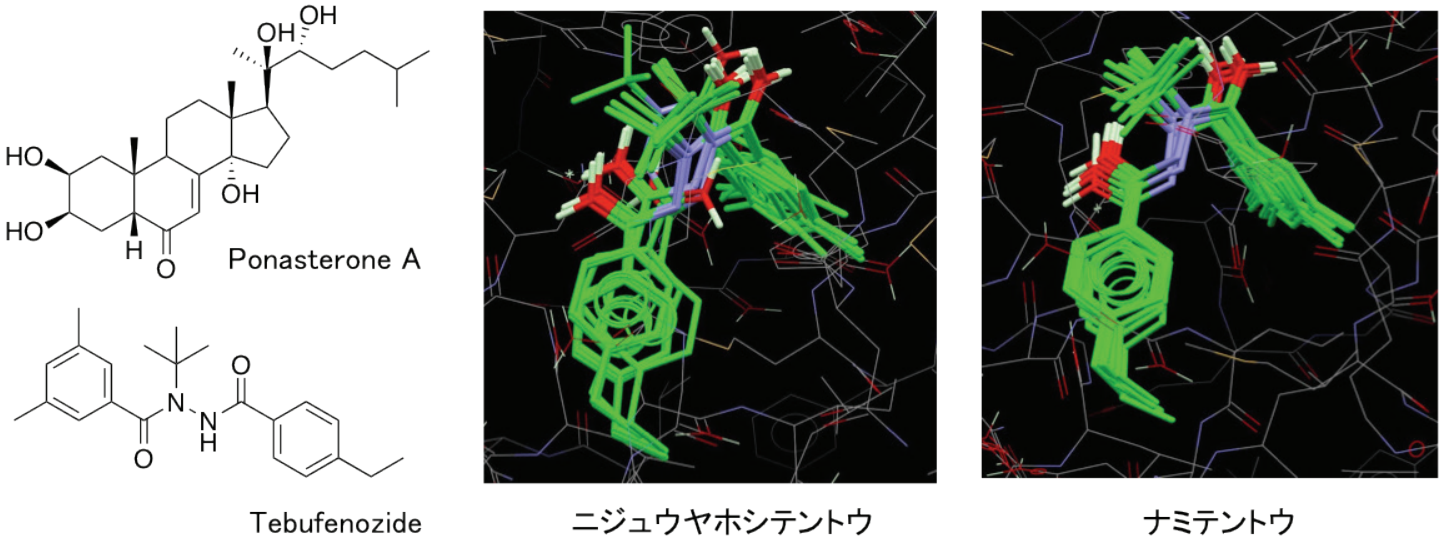
ナミテントウとニジュウヤホシテントウの脱皮ホルモン受容体（EcR/USP）に対する脱皮ホルモン類の結合親和性評価と受容体に対する結合様式の予測

Binding affinity of ecdysone agonists to the in vitro translated ecdysone receptor and ultraspiracle of *Harmonia axyridis* and *Epilachna vigintioctopunctata* and the prediction of the ligand-receptor binding

○中川 好秋[1]、森下 知奈[2]、水口 智江可[3]、横井 大洋[1]、瀧本 征佑[1]、細田 晃文[2]、赤松 美紀[1]、田村 廣人[2]（[1]京大院農、[2]名城大院農、[3]名古屋大院農）

○Yoshiaki NAKAGAWA[1], China MORISHITA[2], Chieka MINAKUCHI[3], Taiyo YOKOI[1], Seisuke TAKIMOTO[1], Akifumi HOSODA[2], Miki AKAMATSU[1], Hiroto TAMURA[2] ([1]Kyoto Univ., [2]Meijyo Univ., [3]Nagoya Univ.)

ナミテントウ *Harmonia axyridis*, ニジュウヤホシテントウ *Epilachna vigintioctopunctata* から脱皮ホルモン受容体 EcR, USP の cDNA クローニングを行い，それぞれの受容体タンパク質を in vitro タンパク質発現系を用いて合成した．さらに，これらの EcR, USP,トリチウムで標識した Ponasterone A ([^{3}H]PonA)を用いて受容体−リガンド結合実験を行い，脱皮ホルモン類の受容体に対する結合親和性 ([^{3}H]PonA の結合を 50%阻害する濃度 IC_{50}) を求めた．ナミテントウとニジュウヤホシテントウの脱皮ホルモン受容体(EcR/USP)に対するステロイド型脱皮ホルモン類 PonA の IC_{50} 値はそれぞれ 5.6 nM，4.0 nM で，これまでに測定されている他の昆虫脱皮ホルモン受容体に対する IC_{50} 値と同程度であった．一方，非ステロイド型の脱皮ホルモン類である RH-5849 と tebufenozide のナミテントウの脱皮ホルモン受容体に対する IC_{50} 値は，それぞれ 10.5 µM，11.0 µM であったが，ニジュウヤホシテントウに対する活性は認められなかった．また，立体構造が既知のタバコガの EcR リガンド結合部位をもとに，Isolated FAMS (In SIlico Science) というホモロジーモデリングの手法を用いて，ナミテントウとニジュウヤホシテントウの脱皮ホルモン受容体の立体構造を構築した．続いて，FRED (Open Eye)と GOLD (CCDC)という 2 つのソフトウエアを用いてドッキングシミレーションを行って，リガンド結合様式の予測をおこなった．



脱皮ホルモンアゴニストの構造と，GOLDを用いたドッキングシミレーション

ecdysone agonists, molting inhibitor, ecdysone receptor

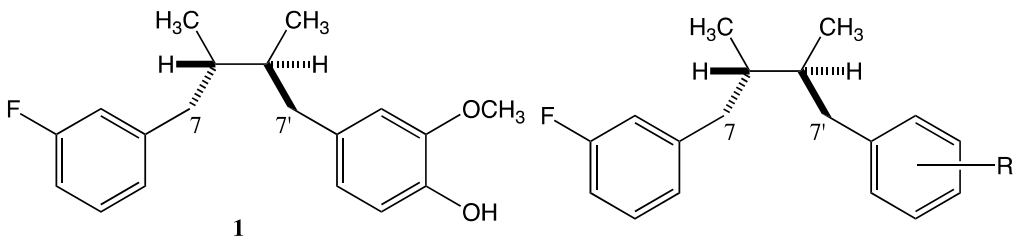
講演番号：4A07a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ A 校舎 07 会場

ブタン型リグナンの２つのベンゼン環上の置換基が抗かび活性に与える影響

Effect of substituents at benzene ring of butane type lignan on antifungal activity

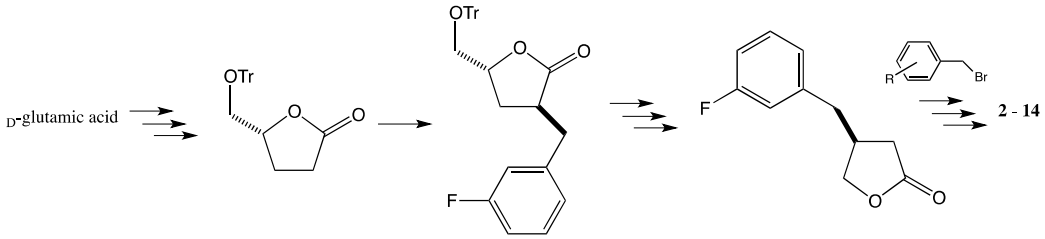
○中崎 翔子[1]、西脇 寿[1]、秋山 浩一[2]、山内 聡[1] ([1]愛媛大農、[2]愛媛大総科支セ)
○ Shouko NAKAZAKI[1], Hisashi NISHIWAKI[1], KOICHI AKIYAMA[2], Satoshi YAMAUCHI[1] ([1]Ehime University, Faculty of Agriculture, [2]Ehime University, Integrated Center for Sciences)

目的）(+)-dihydroguaiaretic acid の 7 位の構造と抗かび活性との関係を調べた結果、7 位のベンゼン環上の *m* 位に小さい電子吸引基を有する誘導体が高い活性を有する事を見出し、化合物 **1** の EC_{50} 値が *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype に対して 20 μM、*Alternaria citri* に対して 47 μM だった (J. Agr. Food Chem., 2013, 61, 8548)。そこで本研究では、7 位を 3-fluorophenyl 基に固定し、7 '位のフェニル基上の置換基を変換した誘導体を合成して、さらに高い活性、広い抗菌スペクトルを有する化合物の検索を目指した。



2: R = H
3: R = 2-F
4: R = 3-F
5: R = 4-F
6: R = 2-CH_3
7: R = 3-CH_3
8: R = 4-CH_3
9: R = 2-OCH_3
10: R = 3-OCH_3
11: R = 4-OCH_3
12: R = 2-OH
13: R = 3-OH
14: R = 4-OH

方法）D-グルタミン酸から得られるブチロラクトンのα位の立体選択的ベンジル化を鍵反応として各誘導体の合成を行った後、抗かび活性を調べた。



結果）疎水性の誘導体 **2-11** には活性は観察されなかったが、フェノール性水酸基を有する **12-14** は、*Alternaria alternata* Japanese pear pathotype 及び *Alternaria citri* に対して活性を示し、特に 3-OH 体 **13** がそれぞれのかびに対して EC_{50} 値が約 20 μM の活性を示した。現在さらに誘導体の合成を行っているが、7'位のベンゼン環上はフェノール性水酸基の存在が高い活性のために必要であることが分かった。また、3-OH 体 **13** は、*Alternaria citri* に対してリード化合物 **1** よりも２倍高い活性を示した。

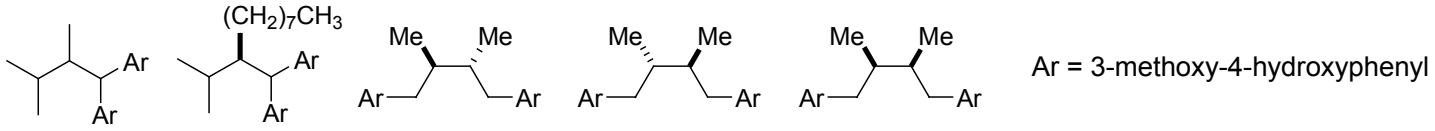
lignan, antifungal activity, structure-activity relationship

講演番号：4A07a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ A 校舎 07 会場

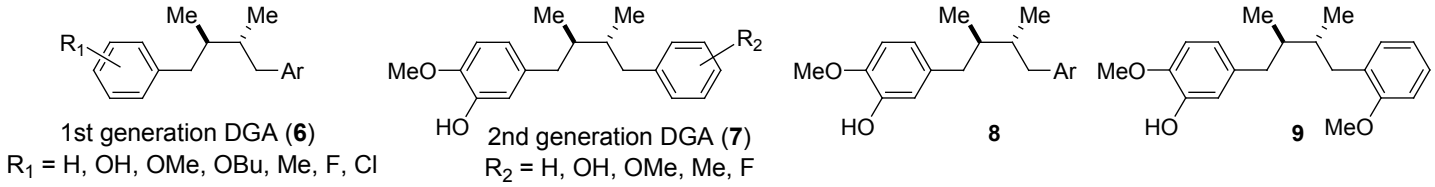
Induction of apoptosis by 1,7-seco-2,7'-cyclolignane and structure-cytotoxic activity relationship of (-)-dihydroguaiaretic acid

○Tuti Wukirsari, Hisashi Nishiwaki, Kosuke Nishi, Takuya Sugahara, Satoshi Yamauchi (Ehime Univrsity, Faculty of Agriculture)

Introduction) 1,7-Seco-2,7'-cyclolignane (SCL) **1** and dihydroguaiaretic acid (DGA) (**3**-**5**) are natural butane-type lignans. All stereoisomers and many derivatives of both SCL and DGA have been synthesized. Derivative **2** of SCL had cytotoxic activity against HeLa and HL-60 cells (IC_{50}: 3 μM). The effect of **2** on cell death mechanism is examined.



Derivatives of SCL on aromatic ring are not prepared due to difficulties on diphenylmethyl moiety construction. Therefore, optimization of aromatic ring substituent is conducted on DGA. Two generations derivative of (-)-DGA (**6** and **7**) were synthesized.



Method) Synthetic methods for preparing some compounds have been previously reported. Cytotoxic activity of all compounds was determined by using WST-8 kit. Molecular mechanism of cell death was examined by flow cytometry and western blot protocol.

Result) Derivative **2** induced apoptosis by activation of caspase-9 and 3. (-)-DGA **3** had higher activity than **4** and **5** (IC_{50}: 22 and 26 μM for HeLa and HL-60, respectively). A promising result was obtained on first generation derivatives **6**. Compound **8** and other derivatives had IC_{50} between 5 and 10 μM. Due to stability reason, 3-hydroxy-4-methoxyphenyl was chosen as part of basic structure of **7**. Compound **9** from second generation derivative showed a 16-fold stronger activity than (-)-DGA **3** (IC_{50}: 1.6 μM for HL-60).

Lignan, Cytotoxic activity, Apoptosis

講演番号：4A07a17
講演日時、会場：3 月 30 日 11:54～ A 校舎 07 会場

抗がん活性を有する新規ナフトキノンの単離と構造決定

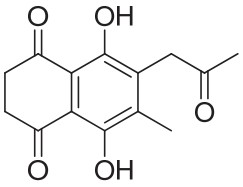
Isolation and determination of new naphthoquinone that inhibit cancer cell proliferation

○竹本 健二[1]、紙透 伸治[1]、水品 善之[2]、菅原 二三男[1] ([1]東理大理工・応生、[2]神戸学院大・栄養)
○kenji Takemoto[1], Shinji Kamisuki[1], Yoshiyuki Mizushina[2], Fumio Sugawara[1] ([1]Tokyo Univ of Sci., [2]Kobe Gakuin Univ., Faculty of Nutrition)

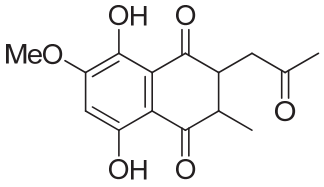
微生物の代謝産物は様々な生理活性を有しており、医薬品や農薬などの開発を目的に研究されており、特に真菌の二次代謝産物からは、有用な生理活性を有する物質が数多く報告されている。そこで我々は真菌に着目し、その二次代謝産物による天然有機化合物ライブラリーを作製し、様々な生理活性試験を行うことで生理活性物質を探索した。*Fusarium solani* の培養液中から、細胞増殖抑制活性を有する新規ナフトキノンを単離・構造決定したので報告する。

日本各地の海洋・土壌から動植物を採取し、付着している真菌を液体培地で約 3 週間静置培養した。培養液を有機溶媒で抽出し、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製し、化合物を単離した。単離した化合物を MS や NMR を用いて解析し、構造を決定した。化合物に対して、がん細胞増殖抑制活性試験などを行った。

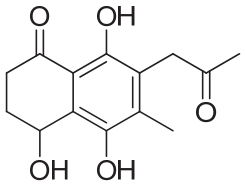
長野県で採取した土壌より分離した真菌 *Fusarium solani* を PDB 培地 (4 L)、21 日間、静置培養し、培養ろ液を塩化メチレンで抽出した。得られた粗抽出物をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製し、6 つの化合物を単離した。それらの化合物の構造を MS や NMR を用いて解析し、構造を決定した。これらの内で 3 つの化合物はナフトキノン骨格を有する新規化合物であり、karuquinone A, B, C と名付けた。また得られた化合物について、細胞増殖抑制活性を測定したところ、各種がん細胞の増殖を阻害することが明らかとなった。中でも強い活性を示した karuquinone A で HeLa 細胞を処理し、CM-H_2DCFDA を用いて細胞内 ROS 定量試験を行った。その結果、細胞内 ROS 量が上昇していることが示唆された。



karuquinone A



karuquinone B



karuquinone C

naphthoquinone, cytotoxicity, natural product

講演番号：4A08a01
講演日時、会場：3 月 30 日 09:00～ A 校舎 08 会場

Acetobacter 属酢酸菌に至適化した新規シャトルベクターの開発

Construction of novel shuttle vector optimized to the genus *Acetobacter*

貝沼(岡本) 章子、○山我 幹太、石川 森夫、永山 広輝、海野 祥子、小泉 幸道（東農大応生科・醸造)
Akiko Okamoto-Kainuma, ○kanta yamaga, Morio Ishikawa, Hiroki Nagayama, Shoko Umino, Yukimichi Koizumi (Tokyo Univ.Agric.)

【目的】酢酸菌の生理の発現メカニズムを解明することは、発酵生産技術の開発や改良の上で重要であり、その検討にはベクターDNA の使用が不可欠である。しかし、酢酸菌において使用可能なベクターDNA は限定され、これが酢酸菌研究の 1 つの障害になっている。本研究では、*Acetobacter* 属酢酸菌における形質転換効率の向上を図るため、本属酢酸菌の ori をもつ新規シャトルベクターを構築した。
【方法および結果】16 株の *Acetobacter* 属酢酸菌のプラスミドを抽出し、*Acetobacter* 属酢酸菌中の至適プラスミドの探索を行い、プラスミドサイズ、コピー数から *A.aceti* NRIC0470 株保有のプラスミド(2.9 kbp)を選定し、これを pAA0470 と命名した。pAA0470 の塩基配列は *Gluconacetobacter europaeus* 保有プラスミド pJK21 と 99.5%の相同性を示し、異属間で同一のプラスミドが保持されていることが示唆された。pJK21 の推定 ori 配列を含む数種の pAA0470 断片について、A. *pasteurianus* NBRC3283 株への形質転換能の可否を検討した結果、配列中の 1.4 kbp の領域が *Acetobacter* 属 ori 領域と推定された。この推定 ori 領域と pUC119 の *E. coli* ori 領域・MCS を含む断片(2.3 kbp)を ligation したプラスミドを *E. coli* DH5α, *A. pasteurianus* NBRC3283 の両株に導入したところ、いずれも形質転換体を生じたため、本プラスミドを新規シャトルベクター pUS1 とした。pUS1 について機能評価を行った結果、本ベクターは *Acetobacter* 属各種に形質転換が可能であった。特に、*A. pasteurianus* NBRC3283 への形質転換効率は高く、10^7/μgDNA の効率を示し、市販シャトルベクターpBBR122 に比べ 2-3 オーダー高い値を示した。また、本ベクターの *A. pasteurianus* NBRC3283 における保持率は、5 代の継代培養後、抗生物質の有無にかかわらず 95%以上の値を示した。挿入 DNA 断片長の形質転換効率への影響明らかにするため、1-7 kbp の遺伝子断片を pUS1 に挿入し、*A. pasteurianus* NBRC3283 に導入した結果、pUS1 は挿入断片長 4kbp まで 10^4-10^7/μgDNA、5-7 kbp の挿入においても 10^3/μgDNA と良い効率を示した。以上の結果より、本プラスミド pUS1 は、*Acetobacter* 属に至適化した良好な形質転換効率と安定性を示すベクターとして機能することが示唆された。

Acetobacter, shuttle vector, acetic acid bacteria

講演番号：4A08a02
講演日時、会場：3 月 30 日 09:11～ A 校舎 08 会場

伝統的壺造り純米黒酢醸造における酢酸菌の生態生理学的研究

The ecophysiology of acetic acid bacteria in traditional rice vinegar fermentation

○菅原 圭悟[1]、橋口 和典[2]、菱田 直人[2]、長野 正信[2]、新井 博之[1]、五十嵐 泰夫[1]、石井 正治[1] ([1]東大院農生科・応生工、[2]坂元醸造株式会社)
○ KEIGO SUGAWARA[1], KAZUNORI HASHIGUCHI[2], NAOTO HISHIDA[2], MASANOBU NAGANO[2], HIROYUKI ARAI[1], YASUO IGARASHI[1], MASAHARU ISHII[1] ([1]Univ. Tokyo Grad. Sch. Agri. Life. Sci, [2]Sakamoto brewery)

【背景と目的】

鹿児島県霧島市福山町で 200 年余り続けられている伝統的な壺造り純米黒酢醸造では、原料に蒸し米・米麹・地下水だけを用いており麹菌以外の微生物の添加を行っていないが、壺畑に並べられた約 5 万 2 千個の壺で再現的に酢が生産されている。壺は洗浄乾燥した後に繰り返し用いられており、酢酸発酵の担い手である酢酸菌は洗浄乾燥後も壺の内壁に留まり次の発酵に関与していると考えられている。過去の壺内壁の拭き取り調査では、食酢醸造の代表株である *Acetobacter pasteurianus* や *A. aceti* の他にも、*A. tropicalis, Gluconacetobacter xylinus*, *Ga. europaeus* など醸造と関わりの深い酢酸菌が多く単離された。一方、時期や壺を違えた発酵液からの単離調査では、単離した 100 株超の酢酸菌のほぼ大多数が *A. pasteurianus* であり他の酢酸菌は淘汰されている様であった。

そこで本研究では、醸造開始時にタイプストレインである *A. aceti* IFO14818 株を添加し、経時的に *A. aceti* と *A. pasteurianus* の量比を定量 PCR 法により調べ、実際に *A. aceti* が淘汰されるかどうかを検証した。

【方法】

醸造開始日を day0 とする。day0 に *A. aceti* の壺内菌体濃度が 10^9cell/ml (壺 A)および 10^8cell/ml(壺 B)になるように添加した。サンプルは壺 A, B ともに、菌添加前 day0(before), 菌添加後 day0, 1, 2, 3, 6, 8, 10, 15, 21, 30, 41, 52, 70, 91 に採取した。仕込み液表面から 15cm の深さの発酵液を約 250ml 採取後遠心して集菌し、その後 DNA を抽出した。

A. aceti と *A. pasteurianus* 各々の 16S rRNA 遺伝子を対象に設計された primer と TaqMan-MGB probe セットを用いて[1]、抽出した DNA を RT-qPCR に供し二者の存在比を決定した。

【結果】

発酵液の酸度、およびエタノール濃度は未添加壺の平均的な値と大差なかった。

壺 A, B 両方で *A. aceti* IFO14818 は淘汰された。*A. pasteurianus* は徐々にその割合を増やしていき 40 日目にはほぼ 100%となった。

[1] Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan–MGB probe, M.J. Torija *et al*, Food Microbiology 27 (2010) 257–265

traditional rice vinegar fermentation, acetic acid bacteria, selection

講演番号：4A08a03
講演日時、会場：3 月 30 日 09:22～ A 校舎 08 会場

混合または従属培養条件下でトリグリセリド類を高蓄積する緑藻株の探索

Screening of green algae strains highly accumulating triglycerides under mixotrophic or heterotrophic cultivation conditions

○加藤 康夫[1,2]、藤城 迪子[2]、伊藤 純平[2]、野村 泰治[1,2]、荻田 信二郎[1,2]（[1]富山県立大工・生工研セ、[2]富山県立大工・生物工）
○Yasuo KATO[1,2], Michiko FUJIKI[2], Jumpei ITO[2], Taiji NOMURA[1,2], Shinjiro OGITA[1,2] ([1]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [2]Dep. Biotech., Toyama Pref. Univ.)

【目的】

近年、食糧との競合、限られた農地の利用や、水の転用等の問題がなく、大量培養が可能な微細藻類が蓄積する脂質を利用した次世代バイオ燃料生産に関する研究が活発となっている。脂質生産能を有する微細藻類は以前から知られており、既存の植物バイオマスと比較してそれらの単位面積あたりの脂質生産量は数百から数千倍高く、そのバイオ燃料原料としてのポテンシャルは非常に高いとされているが、目的に合った脂質の種類の制御や培養・培地コスト等、実用化に向けて解決すべき点が依然として数多く残されている。今回演者らは、本プロセスの実用化を目指し、バイオディーゼル原料として利用可能なトリグリセリド（TG）類を、混合または従属栄養条件下で高蓄積する藻類、特に緑藻株に着目して自然界からスクリーニングを行った。

【方法及び結果】

富山県内外数十ヵ所からサンプリングした湖沼水を固体無機塩培地上に塗布後、明条件（独立栄養）下で培養し、緑藻株を千株強単離した。この際、培地中に抗細菌物質としてナリジクス酸、セフォタキシム、アンピシリン、クロラムフェニコールを混合添加することで、混在する細菌や藍藻類を排除でき、効率的な緑藻の選抜が可能となった。単離した緑藻株を、炭素源として Glucose または Glycerol を含む固体培地上で明・暗条件下にて培養して生育特性を調べ、各炭素源に対して混合または従属栄養下で良好に生育するものを百株強、二次選抜した。各株が菌体内に蓄積した脂質を有機溶媒にて抽出後、詳細に TLC 分析を行い、高い TG 蓄積能を有する 5 株を選出した。18S + ITS1 + 5.8S + ITS2 + 28S(部分) rDNA 領域の塩基配列シークエンスと顕微鏡観察を行うことでそれらを *Chlorella luteoviridis*、*Chlorella sorokiniana*、*Chlorococcum ellipsoideum*、*Micractinium pusillum*、*Podohedriella falcata* と同定した。様々な培養条件下にて液体培養後、経時的に菌体重量と脂質量を測定して脂質蓄積能の評価を行ったところ、いずれの株も最大で菌体乾燥重量の 60～70%前後の脂質を高蓄積することが分かった。脂質を塩酸-メタノールにてメチルエステルへと誘導後、キャピラリーガスクロマトグラフィー分析により、TG を構成する脂肪酸の組成を明らかにした。各株ともパルミチン酸(16:0)、オレイン酸(18:1n9c)、リノール酸(18:2n6c)を TG の主たる脂肪酸としていたが、菌種によってその組成は異なっていた。脂質の蓄積量および TG の脂肪酸組成は培養条件（培地組成、温度、光照射の有無、栄養饑餓、塩ストレス等）によって影響を受けた。

Screening, Green algae, Oil-accumulating

講演番号：4A08a04
講演日時、会場：3 月 30 日 09:33～ A 校舎 08 会場

大腸菌におけるプトレッシン生産法の開発

Development of putrescine production process in *Escherichia coli*

○古道 紗斗里、鈴木 秀之（京都工繊大院応生）
○Satori FURUMICHI, hideyuki SUZUKI (Kyoto Institute of Technology Univ.)

【背景・目的】

炭素 4 つの直鎖ジアミンであるプトレッシン（1,4-ジアミノブタン）は、化学工業において広範囲の用途を有する重要なプラットフォームの化学物質である。再生可能バイオマスからのプトレッシンの生物工学的生産は、再生不可能な石油からのプトレッシン化学合成に代わる手段として有望である。プトレッシンは、微生物から動植物まで広範囲の生物に存在する生理活性物質ポリアミンの一種である。グラム陰性菌である大腸菌において、プトレッシンは細胞増殖や正常な細胞生育に重要な役割を担っており、細胞内では 30 mM という高濃度で存在していることが知られている。本研究では、プトレッシンの大量合成能を持つ大腸菌の育種を目的としている。

【結果】

大腸菌において、プトレッシンは、オルニチン脱炭酸酵素（ODC ； 遺伝子 *speC, speF*）により、アミノ酸の一種であるオルニチンから合成される。オルニチンは高価であるため、本研究では、大腸菌自身にオルニチン大量生産能をもたせ、さらに IPTG 誘導性の多コピープラスミドを用いて SpeC を過剰発現させることで、プトレッシン合成能を上昇させることを目指した。また、オルニチン大量生産能をもたせるために、オルニチン合成経路において、グルタミン酸を N-アセチルグルタミン酸に変換する N-アセチルグルタミン酸合成酵素（NAGS ； 遺伝子 *argA*）のアルギニンによるフィードバック阻害の解除を試みた。フィードバック阻害を脱感作するアミノ酸置換を導入した変異 ArgA を IPTG 誘導性の多コピープラスミドを用いてクローニングし、大腸菌を形質転換した。さらに、ArgA と SpeC により合成されたプトレッシンがコハク酸やスペルミジンへ代謝されないように、各代謝経路の遺伝子を欠損させた。

育種した大腸菌株を培養し、プトレッシン合成量を比較したところ、SpeC と変異 ArgA を導入した株がコントロール株に比べ、プトレッシン合成量が顕著に上昇したことから、ODC の活性上昇と、NAGS のアルギニンによるフィードバック阻害を解除できたと考えられた。

さらに、オルニチン合成経路を抑制するリプレッサーArgR を欠損させ、プトレッシン合成量をより上昇させることを検討した。

Escherichia coli, polyamine, putrescine

講演番号：4A08a05
講演日時、会場：3 月 30 日 09:44～ A 校舎 08 会場

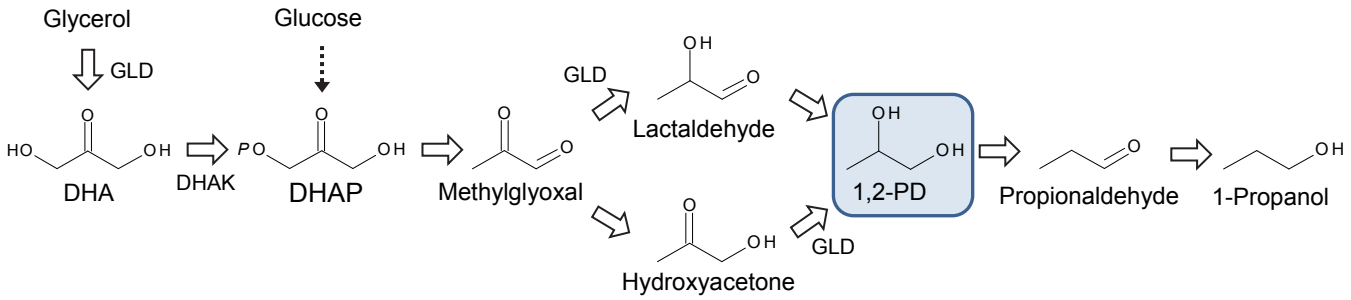
組換え大腸菌を用いたグリセロールを出発基質とする 1-プロパノール発酵生産に関する研究

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for fermentative production of 1-propanol from glycerol

○松原 充、浦野 信行、藤居 実咲、會野 宏志、片岡 道彦（阪府大院生環科・応生科）
○ Mitsuru MATSUBARA, Nobuyuki URANO, Misaki FUJII, Hiroshi KAINO, Michihiko KATAOKA (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【目的】1-プロパノールは代表的な汎用ポリマーであるポリプロピレンの原料として，近年注目を集めている化合物である。一方グリセロールはバイオディーゼル製造において副産物として生成される化合物であるが，その多くは産業廃棄物となっている。こうした観点から本研究ではグリセロールを出発基質とする 1-プロパノールの発酵生産について検討をおこなった。これが達成できれば，資源の有効利用や汎用ポリマー原料としてのバイオマス利用による長期的な CO_2 固定といった点において大きな効果が期待される。

【方法と結果】これまでの先行研究により，解糖系中のジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) から 1-プロパノールへ至る人工生合成経路を導入した組換え *Escherichia coli* を用いることにより，グルコースから 1-プロパノールの発酵生産が可能となった。そこで本生合成経路をもとにグリセロールを利用できるように修飾した経路の設計をおこなった (下図) 。すなわちグリセロールを DHAP に変換する 2 段階の反応として，グリセロール脱水素酵素 (GLD) によるグリセロールから DHA への変換反応と，続くジヒドロキシアセトンキナーゼ (DHAK) によるリン酸化反応を組み込んだ。なお GLD については，DHAP から 1,2-プロパンジオール (1,2-PD) を合成する経路中に既に組み込まれており，それを利用することとした。まず，*Escherichia blattae* 由来 DHAK の発現プラスミドを作成し，*E. coli* に導入したところ，DHAK の発現と活性が確認できた。さらにこの株に対して，1-プロパノール生合成経路の中間物質である 1,2-PD の合成へ至る酵素遺伝子群を含むプラスミドを導入し，嫌気的条件で培養をおこなった。その結果，培養上清中に 1,2-PD の蓄積が見られ，グリセロールが 1-プロパノール生合成経路に流入していることが確認できた。さらにこの株に対し 1,2-PD を 1-プロパノールへ変換する酵素遺伝子群を組み込むことで，グリセロールからの 1-プロパノール発酵生産について検討中である。



metabolic engineering, 1-propanol, *Escherichia coli*

講演番号：4A08a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ A 校舎 08 会場

代謝工学に基づいた大腸菌によるイタコン酸生産

Production of itaconic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*

○麻生 祐司、岡本 脩佑、陳 泰駿、平塚 賢、田中 康智、小原 仁実（京都工繊大院・工芸科学）
○Yuji ASO, Syusuke OKAMOTO, Taejun CHIN, Ken HIRATSUKA, Yasutomo TANAKA, Hitomi OHARA (Kyoto Inst. Tech.)

[緒言] 糸状菌 *Aspergillus terreus* によって発酵生産されるイタコン酸はラジカル重合性を有するバイオビニルモノマーとして注目されている。現在、更なるイタコン酸生産性向上を目指し、イタコン酸高生産株の開発が盛んである。本研究では、大腸菌の代謝経路を改変し、グルコースから効率的にイタコン酸を生産する大腸菌株の開発を行った。

[方法] *A. terreus* 由来の *cis*-アコニット酸脱炭酸酵素遺伝子 *cad* を pET system 用発現ベクターにクローニングし pETHis-cad を作製した。これと pLysS を大腸菌 *Escherichia coli* BW25113 (DE3)に導入しイタコン酸生産大腸菌株（遺伝子非破壊株）を作製した後、LB 培地にて 20˚C、78h 培養した。このとき、0.1mM IPTG を添加し *cad* を発現誘導した。培養後、SDS-PAGE および HPLC 分析により、Cad タンパク質発現、細胞内 Cad 比活性値、培養液中／細胞内イタコン酸濃度をそれぞれ解析した。また、イタコン酸生産大腸菌株のイソクエン酸脱水素酵素遺伝子 *icd* とイソクエン酸リアーゼ遺伝子 *aceA* をそれぞれ破壊した株（*icd* 破壊株および *aceA* 破壊株）を作製し、同様の実験を行った。さらに、*icd* 破壊株および *icd* 破壊株においてアコニターゼ遺伝子 *acnB* を大量発現した株（*icd* 破壊 *acnB* 大量発現株）を作製し、3%グルコース添加 LB 培地にて 28℃で pH-stat 回分培養しイタコン酸発酵生産を行った。

[結果と考察] LB 培地にて 20℃、78h 培養した結果、*icd* 破壊株は 0.35g/L のイタコン酸を生産した。一方、*aceA* 破壊株は遺伝子非破壊株と同等の生産（0.07g/L）を示した。このとき、*icd* 破壊株の細胞内イタコン酸濃度（8.6 mg/g-cell）は他の株のそれら（1.7～2.3mg/g-cell）と比べて高く、イタコン酸の菌体外分泌が律束段階の一つである可能性が示唆された。次に、3%グルコース添加 LB 培地にて pH-stat 回分培養した結果、培養開始約 100h 後に添加したグルコースが枯渇し、このとき *icd* 破壊株および *icd* 破壊 *acnB* 大量発現株はそれぞれ 2.10g/L、4.90g/L のイタコン酸を生産した。また、培養液中のクエン酸濃度はそれぞれ 1.67g/L、0.83g/L であった。従って、*icd* を破壊することでイソクエン酸下流のフラックスが抑制され、さらに *acnB* を大量発現することでクエン酸から *cis*-アコニット酸のフラックスが促進された結果、大腸菌におけるイタコン酸生産性が向上したと考えられた。

Itaconic acid, Metabolic engineering, *Escherichia coli*

講演番号：4A08a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ A 校舎 08 会場

シアノバクテリアを用いた二酸化炭素からのイタコン酸生産

Itaconic acid production from carbon dioxide using Cyanobacteria

○陳 泰駿、岡本 脩佑、麻生 祐司、小原 仁実（京都工繊大院・工芸科学）
○Taejun CHIN, Shusuke OKAMOTO, Yuji ASO, Hitomi OHARA (Kyoto Inst. Tech.)

[緒言] 糸状菌 *Aspergillus terreus* によって工業的に発酵生産されるイタコン酸は、ラジカル重合性を有する環境調和型ビニルモノマーとして注目されている。一方、世界人口の爆発的な増加に伴った化石資源の枯渇や二酸化炭素排出量の増加による資源問題および環境問題がクローズアップされている。そこで本研究では、光合成微生物であるシアノバクテリアを用いて二酸化炭素からイタコン酸を直接生産するためのバイオプロセス法の開発を目的とし、シアノバクテリア培養装置の開発および遺伝子発現システムの構築を行うとともに、二酸化炭素からのイタコン酸生産を試みた。
[方法] シアノバクテリア培養装置として、シアノバクテリアの生育に適した光量子量に調節可能な LED ライトを配し二酸化炭素を通気可能な LED フォトバイオリアクターを開発した。次に、遺伝子発現システムに用いる発現ベクターとして pJAK12 を選択した。発現ベクターとしての機能を評価するにあたり、緑色蛍光タンパク質遺伝子 *gfp*（S65T 改変型）をレポーター遺伝子として pJAK12 にクローニングし pJAK12-gfp を構築した。pJAK12-gfp を接合伝達法により大腸菌からシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 に導入し形質転換体 *Synechocystis* sp. PCC6803 (pJAK12-gfp)を得た。プラスミドの導入は PCR により確認した。得られた形質転換体を 50mM $NaHCO_3$ を添加した BG11 培地にて OD_{730}=0.3~0.5 まで培養後、0, 0.1, 0.5, 1, 5 mM IPTG を添加することで、GFP 蛍光強度および至適 IPTG 濃度を調べた。GFP 蛍光強度は蛍光光度計（励起波長 490nm、蛍光波長 510nm）にて解析した。次に、イタコン酸生合成キー酵素である *A. terreus* 由来 *cis*-アコニット酸脱炭酸酵素遺伝子 *cad* を PCR により増幅後、pJAK12 にクローニングし pJAK12-cad を構築した。これを接合伝達法により PCC6803 株に導入し形質転換体 *Synechocystis* sp. PCC6803 (pJAK12-cad)を得た。
[結果と考察] 開発した LED フォトバイオリアクターを用いて PCC6803 株を培養したところ、至適光量子量は 30μmol/m^2s であった。また、IPTG を添加後 1 週間培養した *Synechocystis* sp. PCC6803 (pJAK12-gfp)の GFP 蛍光強度を測定したところ、0, 0.1, 0.5, 1, 5 mM IPTG 添加した場合でそれぞれ 6.11, 17.9, 29.6, 32.3, 36.4 であった。この結果から、pJAK12 は PCC6803 株において発現ベクターとして機能し、至適 IPTG 濃度は 5 mM 以上であることが確認できた。現在、*Synechocystis* sp. PCC6803 (pJAK12-cad)による二酸化炭素からのイタコン酸生産を試みるにあたり、本菌の細胞内 Cad 活性の測定と Cad タンパク質発現の解析を行っている。

itaconic acid, Cyanobacteria, carbon dioxide

講演番号：4A08a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ A 校舎 08 会場

Corynebacterium glutamicum の脂肪酸生産に関わる変異の解析
Analysis of specific mutations relevant to fatty acid production in *Corynebacterium glutamicum*
○村松 哲広[1]、見村 晃紀[1]、大下 政一[1]、三橋 敏[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1]([1]信州大農・応生科、[2]協和発酵バイオ)
○Tetsuhiro MURAMATSU[1], Akinori MIMURA[1], Masakazu OHSHITA[1], Satoshi MITSUHASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

Corynebacterium glutamicum はアミノ酸のみならず、種々のコモディティケミカルや異種タンパク質の生産宿主としても有用である。しかし、本菌種に脂質の生産能があるかどうかは不明で、脂肪酸合成経路への代謝を高める方法すら知られていなかった。我々は、前大会で、脂肪酸分解代謝系を持たない同菌種に脂肪酸生産宿主としてのポテンシャルがあることを示すとともに、脂肪酸生産に関わる 3 変異（*fasR* 変異、*fasA* 上流変異、*fasA* 内部変異）を明らかにした。今回は、その 3 変異の解析を行った。変異の再構成実験により、野生株に脂肪酸の分泌生産能を付与できるのは *fasR* 変異のみであり、残り 2 変異は脂肪酸生産量を高める増産変異であることがわかった。転写解析で、*fasR* 変異は脂肪酸合成遺伝子の *accD1* と *fasA* の高発現化を、一方、*fasA* 上流変異は *fasA* 自身の高発現化をもたらしていることがわかった。*accD1* はアシル CoA カルボキシラーゼの β サブユニットを、*fasA* は脂肪酸シンターゼ IA を担うことから、両遺伝子産物の量的変化が本菌種における脂肪酸過剰合成の必要条件と推察された。

Corynebacterium glutamicum, fatty acid production, mutation

講演番号：4A08a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ A 校舎 08 会場

Corynebacterium glutamicum のオレイン酸非依存性ビオチン要求株の育種

Development of an oleic acid-independent biotin-auxotrophic strain of *Corynebacterium glutamicum*

○白野 裕隆[1]、宮本 綾[1]、北野 由子[1]、三橋 敏[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1]([1]信州大農・応生科、[2]協和発酵バイオ)

○ Hirotaka SHIRONO[1], Aya MIYAMOTO[1], Yuko KITANO[1], Satoshi MITSUHASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

我々は、前大会で、ビオチン要求性の *Corynebacterium glutamicum* でビオチンの取り込み系遺伝子 *bioY* を破壊すると、ビオチンの要求量が約千倍に高まることを見出して報告した。さらに、この *bioY* 破壊株をビオチンのバイオアッセイ用指示菌として用いると測定域を 3 桁高められることができ、野生株と併用することで、0.1 μg/L から 1 g/L に及ぶ 7 桁の範囲で定量が可能なバイオアッセイ系を構築できることも報告した。しかし、本菌種のビオチン要求性は、膜の主要な構成脂肪酸であるオレイン酸により代替されるため、両指示菌とも生育がオレイン酸にも反応するという欠点があった。もし、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを遮断して、ビオチン酵素であるピルビン酸カルボキシラーゼのみにすれば、脂肪酸合成だけでなくアナプレロティック経路もビオチン依存性になるので、生育がオレイン酸に依存しないビオチンのみの要求性になる可能性がある。その検証を試みたので報告する。

Corynebacterium glutamicum, biotin-bioassay system, anaplerotic pathway

講演番号：4A08a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ A 校舎 08 会場

Corynebacterium glutamicum のビオチン要求性解除
Development of a biotin-prototrophic *Corynebacterium glutamicum* strain
○宮本 綾[1]、武藤 葦[1]、田島 明[1]、白倉 大輔[1]、三橋 敏[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1] ([1]信州大農・応生科、[2]協和発酵バイオ)
○ Aya MIYAMOTO[1], Sumire MUTOH[1], Mei TAJIMA[1], Daisuke SHIRAKURA[1], Satoshi MITSUHASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

Corynebacterium glutamicum のビオチン要求性はグルタミン酸発酵の根幹をなす形質であると同時に、ビオチン酵素であるピルビン酸カルボキシラーゼを経由して合成されるリジン等アミノ酸の発酵収率を左右する重要な形質でもある。ビオチンはピメリン酸チオエステルから 4 段階（BioFADB）で合成されるが、本菌種のゲノムにはその内の *bioF* 遺伝子がない。これまでに、異種の *bioF* 導入によるビオチン要求性の解除が試みられた経緯があるが、成功していなかった。今回、本菌種に、大腸菌由来の *bioF* 遺伝子と枯草菌由来の *bioI* 遺伝子を導入したところ、その導入株の中からビオチン非要求株が得られることを見出した。この結果は、本菌種が *bioF* のみならず、ピメリン酸チオエステルの供給に関わる *bioI* の機能も欠損しており、その両機能を外来遺伝子で補えば、糖からビオチンに至る全経路がつながることを示すものである。

Corynebacterium glutamicum, biotin prototrophy, pimeloyl-thioester

講演番号：4A08a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ A 校舎 08 会場

コリネ型細菌を用いた糖を原料とする GABA の生産

Robust production of GABA by *Corynebacterium glutamicum* expressing glutamate decarboxylase

○岡井 直子[1]、高橋 千尋[2]、畑田 一樹[2]、荻野 千秋[2]、近藤 昭彦[2]([1]神戸大自、[2]神戸大院工・応化)
○Naoko OKAI[1], Chihiro TAKAHASHI[2], Kazuki HATADA[2], Chiaki OGINO[2], Akihiko KONDO[2]
([1]Org.Adv.Sci.Tech.,Kobe Univ., [2]Dept.Chem.Sci.Eng.,Kobe Univ.)

【目的】化石資源は有限であり、繊維・プラスチック原料のバイオマスを原料とする生産が望まれる。本研究ではポリアミド 4 の原料となるγ-アミノ酪酸（GABA）に着目し、コリネ型細菌を用いて糖からの直接生産系の開発を行った。GABA は 2-ピロリドンを経て重合させることによりポリアミド 4 を合成できるため、糖から GABA を発酵生産すると 100%バイオマスプラスチックの生産が可能となる。GABA は大腸菌や乳酸菌の菌体内で L-グルタミン酸からグルタミン酸脱炭酸酵素（GAD)の反応により生合成される。そこで大腸菌由来の GAD を *Corynebacterium glutamicum* に導入し、増殖を伴う GABA 発酵の条件最適化を行った。さらに前駆体の生合成能を上昇させ GABA を効率的に生産するため、TCA 回路の 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ (ODH)活性の調節に関与するプロテインキナーゼについて遺伝子破壊を施し、GAD を導入して GABA 発酵を試みた。
【方法】大腸菌由来の *gadB* をコリネバクテリウム-大腸菌シャトルベクターpCH に組み込み、*C.glutamicum*ATCC13032 に導入し GAD 株とした。GABA 発酵は 50g/L グルコース、ソイペプトン、ビオチンおよびピリドキサル 5'-リン酸（PLP）を含む GP2 培地を構成して行い、フラスコを用いて振とう速度 120rpm、30℃の条件にて 96 時間培養した。培養上清は経時的に採取し、グルコース、GABA およびグルタミン酸濃度を測定した。次に、*C. glutamicum* の Ser/Thr プロテインキナーゼ遺伝子について破壊株を構築し、GAD を導入しグルコースを原料として GABA 発酵を行った。
【結果および考察】*C. glutamicum* GAD 株を用いて 50g/L グルコースおよび 0.1mM PLP を含む GP2 培地で発酵を行ったところ、72 時間で 12.37±0.88 g/L の GABA を上清中に生産した。このときの GAD 株の GABA 生産速度は 0.172 g/L/h、グルコースからの収率は 0.523 mol/mol であった。さらにプロテインキナーゼ破壊株に GAD を導入し最適条件にて発酵を行ったところ、72 時間において GAD 株と比較して上清に 1.43 倍の GABA 生産が認められた。また両株ともに上清へのグルタミン酸の生成は認められなかった。本 GABA 発酵法は、従来乳酸菌で行われていた前駆体アミノ酸の途中添加が不要であり副生物も少ないことから、化学品原料としての生産に適するものである。
（謝辞）本研究は JST 科学技術振興調整費「バイオプロダクション次世代農工連携拠点の形成」プログラムの一環で行われたものである。

Corynebacterium glutamicum, GABA, protein kinase

講演番号：4A08a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ A 校舎 08 会場

Corynebacterium glutamicum における短鎖アシル化修飾の網羅的解析
Label-free quantitative proteomic analysis of protein acylation in *Corynebacterium glutamicum*
○水野 裕太[1,2]、久保 翔世[1,3]、吉田 稔[4]、古園 さおり[1]（[1]東大・生物工学セ、[2]協和発酵バイオ、[3]東電大院・工、[4]理研 CSRS）
○Yuta MIZUNO[1,2], Shosei KUBO[1,3], Minoru YOSHIDA[4], Saori KOSONO[1]（[1]UTokyo, [2]Kyowa Hakko Bio, [3]Tokyo Denki Univ., [4]RIKEN）

アセチル化に代表されるタンパク質の短鎖アシル化修飾は、その反応にアセチル CoA、スクシニル CoA などのアシル CoA や NAD+といった代謝産物を利用することから、代謝や栄養シグナルに応答したタンパク質の機能調節に関わると考えられており、これを標的とした代謝制御への応用が期待される。*C.glutamicum* は、ビオチン制限、Tween 40 添加、およびペニシリン添加によりグルタミン酸を過剰生産することが知られている。上記の刺激は細胞膜張力に変化を与え、グルタミン酸排出を担うメカノセンシティブチャネルを開口させると同時に、2-oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC)などの代謝酵素反応のフラックスをグルタミン酸合成方向に変化させる。OdhI による ODHC 活性の負の制御は知られているが、ODHC 以外での代謝フラックス変化が上記の刺激により誘発されるメカニズムについては明らかになっていない。本研究では、グルタミン酸生産時の代謝フラックス変化への短鎖アシル化修飾の関与を検証するため、短鎖アシル化修飾の網羅的解析を行った。

Tween 40 添加によるグルタミン酸生産誘導条件と非誘導条件における短鎖アシル化修飾を Western blotting で調べたところ、生産誘導条件ではアセチル化が抑制される一方で、スクシニル化は促進されており、グルタミン酸生産誘導時に短鎖アシル化修飾の変化が起きていることが判明した。LC-MS/MS を利用したアシル化修飾部位の網羅的解析から、生産非誘導条件および生産誘導条件ともに、炭素源であるグルコースからグルタミン酸までの代謝酵素の多くでアセチル化が起きていることが明らかとなった。生産誘導条件では、生産非誘導条件に比べてアセチル化部位数が減少する一方で、スクシニル化部位は増加していた。また、内部標準ペプチドを利用した定量解析から、両条件で検出されたアセチル化部位のうち、生産誘導条件でアセチル化レベルが変動する部位を同定した。各条件で特異的にアシル化される部位やアシル化レベルが大きく変動する部位は、グルタミン酸生産時の代謝フラックス変化に関与することが期待される。グルタミン酸生産に重要な glutamate dehydrogenase、ODHC および補充経路のタンパク質にもアセチル化およびスクシニル化を見いだしており、現在それらの修飾部位の変異体を作成してグルタミン酸生産に与える影響を検討している。

protein acylation, *Corynebacterium glutamicum*, glutamate production

講演番号：4A08a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ A 校舎 08 会場

Corynebacterium glutamicum の 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体における短鎖アシル化修飾の役割

The role of protein acylation of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in *Corynebacterium glutamicum*

○久保 翔世[1,2]、水野 裕太[1,3]、川崎 寿[2]、古園 さおり[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]東電大院・工、[3]協和発酵バイオ)
○Shosei Kubo[1,2], Yuta Mizuno[1,3], Hisashi Kawasaki[2], Saori Kosono[1] ([1]UTokyo, [2]Tokyo Denki Univ., [3]Kyowa Hakko Bio)

【目的】*Corynebacterium glutamicum* は、ビオチン制限や Tween 40 添加、ペニシリン添加によりグルタミン酸を過剰生産する。グルタミン酸過剰生産時には糖代謝のフラックスがグルタミン酸合成へ向かうように変化することが知られているが、そのメカニズムは明らかではない。我々は、グルタミン酸生産時の代謝フラックス変化に関わる短鎖アシル化修飾を同定する目的で、アシル化修飾を受けるタンパク質の網羅的解析を行っている（前演者の発表)。その結果、グルタミン酸生産と関連が深い ODHC (2-oxoglutarate dehydrogenase complex)に複数のアシル化部位を見いだした。ODHC は 2-オキソグルタル酸からスクシニル CoA への反応を触媒する TCA 回路上の酵素で、グルタミン酸過剰生産には ODHC の活性抑制が重要だと考えられている。ODHC 活性の負の制御因子として OdhI が良く知られているが、我々はアシル化修飾による ODHC の活性制御メカニズムがあるのではないかと考え、本研究では ODHC のコアを形成する E2 サブユニットに注目してアシル化部位の機能解析を行った。
【結果】ODHC は、PDHC (pyruvate dehydrogenase complex)と同様に、E1、E2、E3 の 3 種類のサブユニットで構成される巨大な複合体である。他の細菌とは異なり、*C.glutamicum* のゲノムには E2 に相当する遺伝子が 1 つしかない事から、ODHC と PDHC で共通の E2 遺伝子（NCgl2126）を利用し、E2 を介した超複合体を形成することが示唆されている。E2 サブユニットは N 末側から順にリポイル基結合、E1/E3 サブユニット結合、アセチルトランスフェラーゼ活性のドメイン構造を持つ。我々は、E1/E3 サブユニット結合部位に 2 カ所、アセチルトランスフェラーゼ活性ドメインに 3 カ所のアセチル化部位を見いだした。興味深い事に、Tween 40 添加によるグルタミン酸過剰生産時に ODHC の E1o サブユニットが複合体コアより解離することを示唆する結果が得られている。E2 サブユニットのアセチル化が、E1o サブユニットの結合を制御している可能性を考え、E1/E3 サブユニット結合ドメインに見つかったアセチル化部位について変異体を作成し解析を進めている。

protein acylation, *Corynebacterium glutamicum*, 2-oxoglutarate dehydrogenase complex

講演番号：4A08a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ A 校舎 08 会場

汎用型物質排出担体としての *Corynebacterium glutamicum* 由来圧力依存性チャネルの有用性

The usability of mechanosensitive channels in *Corynebacterium glutamicum* as a versatile exporter

○橋本 賢一[1]、小西 智之[2]、李 双春[2]、三井 岳志[2]、矢部 勇[1]、中松 亘[2]、川崎 寿[2]([1]東電大工・環境化、[2]東電大院工・物質工)
○Kenichi HASHIMOTO[1], Tomoyuki KONISHI[2], Shuangchun LI[2], Takeshi MITSUI[2], Isamu YABE[1], Tsuyoshi NAKAMATSU[2], Hisashi KAWASAKI[2] ([1]Dep. Green Sust. Chem. TDU, [2]Materials Sci. Eng.TDU)

【背景及び目的】

Corynebacterium glutamicum はある特定の条件下にて細胞外に著量のグルタミン酸を排出することが知られている。近年、この微生物が有する *NCgl1221* 遺伝子産物が細胞内で合成されたグルタミン酸を細胞外へ排出する担体であることが示唆された。このタンパク質は圧力依存性チャネルと相同性があり、我々はパッチクランプ法を用いた電気生理学的解析によってこのチャネルが圧力依存的に開孔し、グルタミン酸の濃度勾配に従った排出を行うことを明らかにした(Hashimoto et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* 2012)。またこのチャネルは、グルタミン酸以外にアスパラギン酸も通過させるため、基質特異性が低いことが予想される。我々はこのチャネルを対象物質を限定しない汎用性の高い物質排出担体として活用することで、グルタミン酸以外の物質生産効率を高めることができるのではないかと考えた。大腸菌ベースのフェニルアラニン生産菌へこのチャネルを導入したところ、生育の向上とフェニルアラニン生産量の向上が見られた。このことより我々は従来の代謝経路の最適化と合わせて最適化された排出担体を新たに導入することで物質生産性の向上や、これまで発酵によって生産できなかった物質の生産を可能にする新たな技術を創成できる考え、この技術を Exporter Engineering(ExE)として提唱している。

本研究は ExE へ向けた、汎用的物質排出担体として *NCgl1221* 遺伝子産物を利用する。このチャネルの特徴をより詳細に解析し、実際の有用物質生産菌の物質生産性にどのような影響を与えるか検討することを目的とした。

【方法及び結果】

C. glutamicum を対象としたパッチクランプ法は未だ確立していないため、既にパッチクランプ法の適用実績のある枯草菌を宿主として選択した。圧力依存性チャネルをコードする遺伝子全てを破壊した枯草菌に対し、*C. glutamicum* 由来 *NCgl1221* 遺伝子を導入した株を作成した。この株を用いてパッチクランプ法を用いた解析を行ったところ、このチャネルはグルタミン酸、アスパラギン酸以外にもリジン、フェニルプロピオン酸も基質の濃度勾配に従って排出させることが分かった。そこで大腸菌をベースとしたリジン生産菌にこのチャネルを導入した株を作成し、どのような影響があるか調べた。

Glu, Mechanosensitive channel, Corynebacterium

講演番号：4A08a17
講演日時、会場：3 月 30 日 11:54～ A 校舎 08 会場

Pantoea ananatis における新規 L-グルタミン酸排出輸送体の同定
Identification of novel L-Glu exporter in Pantoea ananatis
○原 吉彦[1]、泉井 裕[1]、伊藤 久生[1]、中松 亘[2] ([1]味の素、[2]東京電機大学)
○Yoshihiko Hara[1], Hiroshi Izui[1], Hisao Ito[1], Tsuyoshi Nakamatsu[2] ([1]Ajinomoto, [2]Tokyo Denki Univ.)

我々はグルタミン酸の溶解度が低い酸性条件下でグルタミン酸結晶を析出させながら発酵を行うことにより、発酵工程の中和に必要となるアンモニア、更に単離精製工程で使用する酸類を削減できる「グルタミン酸晶析発酵法」の実現を目指している。これまでに、自然界より単離した耐酸性菌 *Pantoea ananatis* AJ13355 株から生合成経路の改変等により pH4.5 の酸性条件下において溶解度を上回るグルタミン酸を蓄積する菌株を育種し、培地中にグルタミン酸結晶が析出することを確認している。この取り組みの中で、酸性条件下では菌体生育・糖消費活性がグルタミン酸濃度依存的に低下していることを明らかにしていた。従ってグルタミン酸の菌体外への排出活性を向上させ、菌体内のグルタミン酸濃度を低く維持することによって、このグルタミン酸による阻害は回避でき、発酵成績を向上させられると考えられた。

グルタミン酸の排出担体については *Corynebacterium glutamicum* においてメカノセンシティブチャネル(YggB)が輸送体として機能していることが報告されているが、その他の微生物において、いずれの排出担体が機能しているかは特定されていなかった。そこで我々は *P,ananatis* AJ13355 株の α-KGDH 欠損株が、酸性条件下においてグルタミン酸に対して感受性を示すことを利用し、グルタミン酸耐性を付与する因子のスクリーニングを行った。その結果、多くのクローンにおいて *crp*(cAMP receptor protein)遺伝子の周辺を含む断片が確認された。これらクローンに含まれる遺伝子の中で *yhfK* 遺伝子のみを過剰発現させることによって、スクリーニングに用いた宿主株はグルタミン酸に耐性を示すようになることが確認でき、本因子がグルタミン酸耐性を付与する遺伝子であることが明らかとなった。YhfK は Putative efflux transporter (PET) family のタンパク質で、5～6 回膜貫通領域に続く約 170 アミノ酸残基の親水領域というユニットが重複した特徴的な構造を有する。このファミリーには p-hydroxybenzoate の排出担体も含まれることから、本因子がグルタミン酸を排出する輸送担体であると予想された。実際にグルタミン酸生産菌において *yhfK* 遺伝子を過剰発現させることにより、菌体内のグルタミン酸濃度は顕著に低下し、グルタミン酸生産能・糖消費活性を飛躍的に向上させることに成功した。

glutamic acid, exporter, Pantoea

講演番号：4A09a03
講演日時、会場：3 月 30 日 09:22～ A 校舎 09 会場

Aspergillus nidulans が有する adenosine deaminase-related growth factor 様遺伝子の解析

Characterization of genes coding for putative adenosine deaminase-related growth factor in *Aspergillus nidulans*

○西川 良平[1]、伊藤 靖夫[2]、稲冨 聡[3]、田口 悟朗[1]、下坂 誠[1] ([1]信州大・繊維・応生系、[2]信州大・全学教育機構、[3]ホクトきのこ総合研)
○ Ryohei NISHIKAWA[1], Yasuo ITOU[2], Satoshi INATOMI[3], Goro TAGUCHI[1], Makoto SHIMOSAKA[1] ([1]Shinsyu Univ., [2]Sch. Gen, Edu., [3]Mushroom Lab. Hokuto Co.)

【研究背景】

昆虫などで報告されている adenosine deaminase-related growth factor (ADGF) は、adenosine deaminase (ADA) 活性中心配列を保持し、ADA 活性を介して細胞増殖や分化を制御する新規の growth factor である。これまでに *Sarcophaga peregrina*（センチニクバエ）や *Drosophila melanogaster*（ショウジョウバエ）、*Homo sapiens*（ヒト）などで細胞増殖や形態分化に ADGF が関与することが示されている。ADGF 様遺伝子は菌類にも広く存在するが、それらの生理的意義は未だ明らかになっていない。

これまでに我々は、担子菌 *Flammulina velutipes*（エノキタケ）より単離した ADGF 様遺伝子（*Fv-ada*）を大腸菌宿主で発現させた組換えタンパク質に ADA 活性が存在すること、および RNA interference による *Fv-ada* 発現抑制がエノキタケ菌糸の伸長速度を低下させることを報告した(1)。菌類 ADGF は細胞増殖を制御するという仮説をさらに検証するため、今回は糸状菌 *Aspergillus nidulans* が有する ADGF 様遺伝子の解析を試みた。

【方法】

A. nidulans 由来 cDNA より単離した 2 個の ADGF 様遺伝子（*An_ADGF-1*、*An_ADGF-2*）を大腸菌を宿主に用いて発現させた。*An_ADGF-1* を *Aspergillus* 属真菌用の染色体組込型シャトルベクターpPTRI に導入し、プロトプラスト法を用いて染色体との相同組換えを行った。

【結果・考察】

大腸菌発現により得られた各組換えタンパク質を調査した結果、An_ADGF-1 には ADA 活性が検出されたが、An_ADGF-2 は活性を示さなかった。そこで、*An_ADGF-1* のプロモーター領域を *A. nidulans* 由来アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子（*alcA*）のプロモーターに置換したコンストラクトを作成し、*A. nidulans* ゲノムの *An_ADGF-1* と相同組換えさせた形質転換体を獲得した。現在、*alcA* の発現抑制条件である炭素源（グルコース）を用いた場合、および誘導条件であるグリセロール、スレオニンを用いた場合の培養条件下で菌糸の伸長速度を比較調査中である。

(1) Sekiya *et al*., J. Biosci. Bioeng., 115, 360-365, (2013)

adenosine deaminase, growth factor, *Aspergillus nidulans*

講演番号：4A09a04
講演日時、会場：3 月 30 日 09:33～ A 校舎 09 会場

表面の分子修飾による真菌の接着制御
Surface properties that suppress fungal attachment
○西村 麻里江[1]、中野 美紀[2]、三宅 晃司[2] ([1](独）生物研、[2]（独）産総研)
○Marie NISHIMURA[1], Miki NAKANO[2], Kouji MIYAKE[2] ([1]NIAS, [2]AIST)

糸状菌は住環境の至る所に見られる微生物であり、産業的に有用である一方で食品、居住環境、医療器具や工業機器などの汚染や動植物への感染といった社会的に深刻な問題を引き起こしている。糸状菌は、水分・糖・無機塩などを認識すると胞子発芽と菌糸伸長を開始し、基板に接触すれば接着してバイオフィルムを形成する。これまでの研究から *Magnaporthe oryzae*(イネいもち病菌)を始めとする一部の糸状菌では基板表面の物理的特性や化学的特性を認識して形態分化を誘導することが明らかになっている。そこで本研究では、基板表面の化学的特性が菌のバイオフィルム形成に及ぼす影響について解析を行った。
化学的特性が付加された基板として、金コーティングしたシリコン基板上に自己組織化法で各種有機分子の自己組織化単分子膜(SAM)を生成したものを実験に用いた。この修飾基板上で代表的な環境汚染真菌（糸状菌；*Cladosporium* 属菌、*Alternaria* 属、*Penicillium* 属菌、*Aspergillus* 属菌、及び酵母；*Rhodotrula* 属菌）の胞子もしくは菌体の懸濁液（1×10^{5}/培地 1 ml）を室温で 24 時間培養した後に、菌の基板への接着性を解析した。実験に用いた全ての修飾基板上で菌が正常に増殖したが、水酸基及びメトキシ基修飾では菌の基板表面への接着が特異的に阻害され、バイオフィルム化しにくいことが明らかになった。結果として、基板表面を水酸基やメトキシ基で修飾することにより環境汚染真菌の水洗による除去が可能であった。本結果は、人体に安全な有機分子を用いた表面修飾による防カビ技術への可能性を示すものである。

fungi, biofilm, surface attachment

講演番号：4A09a05
講演日時、会場：3 月 30 日 09:44～ A 校舎 09 会場

eIF5A による発現制御を受けるタンパク質の網羅的探索

Hypusine-dependent regulation of protein levels in fission yeast.

○近藤 直子[1,2]、白井 温子[1,6]、松山 晃久[1,3]、夏目 徹[4]、浜本 牧子[5]、吉田 稔[1,2,3]（[1]理研 化学遺伝、[2]東京大院農、[3]理研 CSRS、[4]産総研 創薬分子、[5]明治大院農、[6]理研 細胞記憶）
○Naoko KONDO[1,2], Atsuko SHIRAI[1,6], Akihisa MATSUYAMA[1,3], Tohru NATSUME[4], Makiko HAMAMOTO[5], Minoru YOSHIDA[1,2,3] ([1]RIKEN Chemical Genetics Lab., [2]UTokyo, [3]RIKEN CSRS, [4]AIST molprof, [5]Meiji Univ., [6]RIKEN Cellular Memory Lab.)

eIF5A（eukaryotic translation initiation factor 5A）は真核生物で広く保存されている翻訳因子であり、生育に必須のタンパク質である。しかしながら、翻訳そのものには必須でないことが明らかにされており、その分子機能はベールに包まれている。非常にユニークな特徴として、ハイプシン化という翻訳後修飾を受ける唯一のタンパク質であることが知られている。ハイプシン化は eIF5A の活性に必須の修飾であり、DHS（deoxyhypusine synthase）と DOHH（deoxyhypusine hydroxylase）による二段階反応によって触媒される。

分裂酵母において、DHS の遺伝子破壊株は致死となる一方、DOHH の遺伝子破壊株は生育可能ながら顕著なミトコンドリアの局在異常を示す。このことから、eIF5A はミトコンドリア関連タンパク質の翻訳に関わっているのではないかと予想される。そこで、eIF5A の役割を明らかにするために、分裂酵母の全遺伝子発現ライブラリーを利用したリバースプロテオミクスにより、ハイプシン化に依存した発現制御を受けるタンパク質のスクリーニングを試みた。

我々の研究室では、分裂酵母の全遺伝子（約 5,000）のクローニングが完了し、タグを付加した各 ORF を同一のプロモーターの制御下で発現できるようにした株のコレクションが作製されている。まず、このコレクションを元に、かけ合わせによって同様に全 ORF を発現可能な DOHH 遺伝子破壊株のコレクションを作製した。次に、これらの２つの株のセットを同じ条件で培養した後、各株から全細胞抽出液を調製し、ニトロセルロースメンブレンにスポットしてプロテインアレイを作製した。このアレイに対し、各タンパク質に融合させたタグに対する抗体を用いて検出を行い、野生株と DOHH 遺伝子破壊株の間で同一のタンパク質について発現レベルの比較を行った。

スクリーニングの結果、DOHH 依存的にタンパク質レベルが変化する遺伝子を複数同定した。同定したタンパク質の中には、ミトコンドリアのリボソームのサブユニットや呼吸鎖関連タンパク質も含まれていたことから、eIF5A はこれらのタンパク質の翻訳を介してミトコンドリアの機能制御を行っている可能性がある。今後、これらの標的遺伝子と eIF5A の関連性について調べていく予定である。

fission yeast, hypusine, translation

講演番号：4A09a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ A 校舎 09 会場

大腸菌のシステイン代謝に関わる新規 CysB レギュロン yciW 遺伝子の機能解析

Functional analysis of a novel CysB regulon, the *yciW* gene, that is involved in cysteine metabolism in *Escherichia coli*.

○玉越 愛、河野 祐介、大津 厳生、高木 博史（奈良先端大バイオ）
○Ai TAMAKOSHI, Yusuke KAWANO, Iwao OTSU, Hiroshi TAKAGI (Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】当研究室では微生物によるグルコースからのシステインの直接発酵法を検討し、過剰生産にも成功している。しかし、コスト面で安価な人・動物毛からの抽出法を凌駕するには至っていない。そこで発酵法のコスト削減のため、硫黄源の価格がシステインの生産コストに直結することに着目した。現在、システイン発酵の硫黄源には高価なチオ硫酸塩（140円/kg）が主に用いられている。これを安価な硫酸塩（20円/kg）に代替できれば、発酵プロセスの変更なしに原材料の工夫のみで大幅なコスト削減が可能となる。本研究では、安価な硫酸塩を高効率で利用できる大腸菌の育種を目指した。
【方法・結果】まず、大腸菌のシステイン生合成に必要な遺伝子群の転写を制御している転写調節因子CysBに注目した。CysBの制御下にある新規な遺伝子（CysBレギュロン）を発見できれば、その遺伝子の欠損や過剰発現によってシステインの発酵生産性の向上が期待できる。そこで、配列検索ソフト「MEME」を用いて新規なCysBレギュロンをゲノムワイドに探索したところ、機能未知の*yciW*遺伝子を見出した。*yciW*はグラム陰性の腸内細菌群にのみ広く存在し、オキシドレダクターゼをコードすると推定されているが、分子機能や生理的役割については不明である。そこで*yciW*の破壊株および過剰発現株を作製し、各種無機および有機硫黄化合物をそれぞれ単一硫黄源とした培地での生育を評価した。その結果、*yciW*の過剰発現株では硫酸・チオ硫酸添加時に誘導期の延長が観察された（有機硫黄源よりも硫酸塩で約10時間後、チオ硫酸塩で約5時間後にそれぞれ対数増殖期へ移行した）。また、過剰量のシステインは大腸菌の生育を阻害することが知られているため、高濃度システイン（1 mM）を培地に添加したところ、*yciW*過剰発現株は野生株に比べて明確なシステイン耐性を示した。したがって、YciWはシステインを毒性の低い化合物へと変換している可能性が示唆された。実際に、システインを過剰生産する大腸菌の*yciW*を破壊したところ、野生株よりもシステイン生産量が約1.4倍増加した。以上の結果から、*yciW*産物の基質がシステインであること、*yciW*の破壊はシステインの発酵生産に有効であることが示された。一方、細胞内のシステイン濃度は、セリンアセチルトランスフェラーゼのシステインによるフィードバック阻害や、システイン分解酵素の発現によって厳密に調節されている。また、システイン分解の際には硫化水素が生成するが、*yciW*過剰発現株では硫化水素臭は全く感じられない。以上の結果から、*yciW*産物はシステインを分解するのではなく、別の化合物に変換することで解毒していると推測される。現在、LC-MS/MS解析によって*yciW*産物が生成する化合物の同定を試みている（本研究は生研センターイノベーション創出事業の支援を受けて行った）。

Sulfur metabolism, cysteine fermentation, YciW

講演番号：4A09a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ A 校舎 09 会場

アミノ酸を単一炭素源として利用する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の解析
Analysis of amino acid utilization as the sole carbon source in yeast *Saccharomyces cerevisiae*
○西田 郁久、大津 厳生、渡辺 大輔、高木 博史（奈良先端大バイオ）
○Ikuhisa NISHIDA, Iwao Ohtsu, Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi (Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech)

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、外界のアミノ酸を効率良く利用するために、代謝や取り込みに関わる酵素群を遺伝子の転写レベルで厳密に制御している。*S. cerevisiae* においてグルコースとアミノ酸が共存する環境では、アミノ酸センサーの Ssy1、窒素カタボライト抑制に関わる転写因子などがアミノ酸の濃度や種類依存的に複雑な制御を行い、アミノ酸を窒素源や炭素源として利用することを可能にしている。*Scheffersomyces stipitis* などの酵母はアミノ酸を単一の炭素源として良好に生育するが、*S. cerevisiae* はグルコースなど利用しやすい炭素源が枯渇した際に、アミノ酸を炭素源として生育することがほとんどできず、そのメカニズムも明らかになってない。本研究では、アミノ酸が単一炭素源の場合とアミノ酸とグルコースが炭素源の場合で、アミノ酸の代謝や取り込みの制御機構の違いを解明することを第一の目的とする。また最近、ミトコンドリア輸送体などいくつかの遺伝子の破壊株が野生株と比較してアミノ酸を単一炭素源とする培地でも良好に生育することを見出した。この結果は、*S. cerevisiae* において通常は抑制されている単一炭素源としてのアミノ酸の利用系が解除される機構の存在を示唆していることから、本研究ではその機構の解明を第二の目的とする。
【方法・結果】*S. cerevisiae* におけるプロリンの分解系はミトコンドリアに存在し、ミトコンドリア内膜を介したプロリンの取り込み系の存在が示唆されている。これまでに、プロリンのミトコンドリアトランスポーターを探索する目的で、プロリンを単一の窒素源や炭素源とする培地で生育が低下する遺伝子破壊株を複数取得した。一方で、それとは対照的に *ANT1*, *FMP12*, *OAC1*, *YPR011C* といったミトコンドリアの輸送体関連遺伝子や機能未知遺伝子の単独破壊株において、プロリンを単一炭素源とした培地での生育が野生株よりも向上する興味深い表現型を見出した。さらに、これらの菌株ではプロリン以外のアミノ酸を単一炭素源とする培地や、少量（0.0025%）のグルコースを添加したプロリン炭素源培地でも野生株に比べて良好な生育を示すことを明らかにした。現在、グルコース濃度が減少したアミノ酸含有培地における各菌株の増殖や発酵力に与える影響を調べている。また、炭素源としてのアミノ酸の利用に必要な glutamate dehydrogenase 遺伝子（*GDH2*）を破壊・過剰発現した際の各菌株の表現型を解析中である。さらに、アミノ酸を単一炭素源とする際のアミノ酸の代謝や取り込みの制御機構を解明するために、トランスクリプトームやプロテオーム解析を用いて発現変動する因子の同定を行う予定である。

Amino acid metabolism, Carbon source, Yeast metabolic engineering

講演番号：4A09a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ A 校舎 09 会場

メチロトローフ酵母 *Pichia methanolica* の様々な炭素源による生育特性と AOD アイソザイムの発現誘導

Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase isozymes in *Pichia methanolica*

○若山 敬嗣、早川 享志、中川 智行（岐阜大応生）
○Keishi WAKAYAMA, Takashi HAYAKAWA, Tomoyuki NAKAGAWA (Gifu Univ.)

【目的】

メチロトローフ酵母 *Pichia methanolica* は，強力な発現力を持つメタノール誘導性の *MOD1* プロモータを有することから，その能力を利用した異種遺伝子発現系が開発され，広く利用されている。しかし，*P. methanolica* は他のメチロトローフ酵母とは異なり，アルコールオキシダーゼ（AOD）を 9 種のアイソザイムとして持つ。これら AOD アイソザイムは，2 種の AOD 遺伝子 *MOD1* と *MOD2* にコードされており，両遺伝子は異なる発現応答を示すことが知られている [1)]。つまり，両 AOD 遺伝子の発現特性を詳細に解析し，その能力を有効活用することで，より有益な新規異種遺伝子発現系への応用が期待できる。一方, メチロトローフ酵母は, メタノール生育では高い菌体収量が見込めず, 生育の良いグルコース培養では AOD 遺伝子発現が抑制されることから，生育が良好であり，かつ AOD 遺伝子発現を抑制しない新たな炭素源の選抜が必要不可欠である。このような背景から，本研究では *P. methanolica* AOD アイソザイムの発現特性の詳細を解析し，さらには両 AOD 遺伝子プロモータを用いた遺伝子発現系に最適な培養炭素源の選抜を目的とした。

【結果・考察】

まず，様々な炭素源による *P. methanolica* の生育特性を観察した。*P. methanolica* は，マンニトール（Man）とセロビオース（Cel）ではグルコースと同等の生育を示し，アラビノース（Ara）とソルビトール（Sor）にも良好な生育を示したが，ガラクトース（Gal），キシロース（Xyl），トレハロース（Tre）への生育はメタノールよりも低いものであった。また，これら炭素源にメタノールを加えた場合，炭素源とメタノールの相加効果で細胞収率が上昇し，Man および Cel にメタノールを添加した培地では，メタノールのみでの培養時と比べ，約 3 倍に菌体収率が上昇した。さらに，これら培養細胞における AOD アイソザイムの発現パターンを観察したところ, これら炭素源だけでは Mod1p のみの発現が観察されたが，メタノールを添加した場合では 9 本のアイソザイムが観察された。

これらのことから，*P. methanolica* を用いて異種タンパク質を発現させる場合，Man および Cel を炭素源として用いることで，菌体収量および *MOD1* プロモータの発現が見込め，そこにメタノールを添加することで *MOD2* プロモータの発現が期待でき，これら炭素源を *P. methanolica* の 2 つの AOD プロモータを活用した異種遺伝子発現系に応用が可能であると推察した。

1) Nakagawa *et al.*, 2006. *Yeast* 23: 15–22.

alcohol oxidase, isozyme, *Pichia methanolica*

講演番号：4A09a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ A 校舎 09 会場

ジペプチドによる細胞増殖阻害
Inhibition of yeast cell growth by dipeptides
○北村 憲司（広島大・自然科学研セ）
○Kenji KITAMURA (Hiroshima Univ.)

【目的】 細胞外のアミノ酸やオリゴペプチドは、蛋白質合成の素材としてのみならず、窒素源や炭素源としても利用される。細胞内へアミノ酸単量体を取込む輸送体が多岐に渡るのに対し、オリゴペプチド輸送体の種類は少なく基質特異性も厳密ではないため、一種類の輸送体が多種多様なオリゴペプチドを輸送する。ペプチド利用の制御が詳しく調べられている出芽酵母 *S. cerevisiae* と分裂酵母 *S. pombe* のいずれでも、オリゴペプチド輸送体遺伝子の発現にはヒト Johanson Blizzard 病の原因遺伝子 Ubr1 ユビキチンリガーゼのオルソログの機能が必要であり、当該遺伝子が機能しない酵母細胞はオリゴペプチドが取込めない。出芽酵母では Tup1-Ssn6-Cup9 複合体がペプチド輸送体の転写を抑制しており、Ubr1 は Cup9 をポリユビキチン化して分解を促し抑制を解除する。一方で、分裂酵母では Tup1 ホモログがペプチド利用に必要な上、ゲノムには Cup9 類似遺伝子が無く Ubr11(Ubr1 ホモログ)の基質が不明であるなど、実際の制御は両酵母間でかなり異なっている。本研究では、分裂酵母のペプチド利用制御機構の解明を目的に、Ubr11 関連因子の変異株単離と解析を行った。また、いくつかのジペプチドについて、栄養源以外の生理作用、特に細胞増殖に対する影響を調べた。

【方法・結果】 出芽酵母では、Ubr 蛋白質は細胞内ジペプチドの N 端が直接結合する事で活性化し、細胞外ジペプチドの取込みを促進するとされている。分裂酵母の Ubr11 についてペプチド認識能と細胞外からの取込みの関係を調べると、N端が疎水性アミノ酸のペプチド認識がジペプチド取込み促進には必須なのに対し、塩基性N端アミノ酸認識能は無関係だった。ペプチド利用制御に関わる因子を探すため、Ubr11 の機能をバイパスし、*ubr11* 変異株のオリゴペプチド輸送体遺伝子の発現不全とペプチド利用不能形質を完全に回復させる変異株(*upa1* と仮称)を単離した。*upa1* 遺伝子はまだ未同定でありクローニングを試みている。また、分裂酵母の増殖を阻害する複数のジペプチドを見出したが、特に glycylglycine（構造が最も単純なジペプチド）と carnosine（抗酸化・抗老化・抗腫瘍作用を持つ動物由来ジペプチド）は、*upa1* 変異株の生育のみを特異的に阻害する興味深い性質を示したため、作用機作について調べている。更に *ubr11* と *upa1* の変異株では, 一部のアミノ酸の利用能も変化していた。Ubr11 と Upa1 は細胞内外の状況と輸送体遺伝子発現を媒介するハブとして、細胞外オリゴペプチドとアミノ酸の取込みと利用を制御する重要な役割を担っていると考えられる。

S. pombe, oligopeptide transporter, dipeptide

講演番号：4A09a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ A 校舎 09 会場

出芽酵母において染色体からのセントロメア DNA の切り出し誘導時に出現する生存細胞の解析
Analysis for surviving cells appeared with induction of excision of centromeric DNA from a chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*

○宮本 昭弘、柳本 敏彰、秦野 琢之、松崎 浩明（福山大生命工）
○ Akihiro MIYAMOTO, Toshiaki YANAMOTO, Takushi HATANO, Hiroaki MATSUZAKI (Fukuyama Univ.)

遺伝子組換え生物が野外で拡散した場合、環境へ及ぼす影響が危惧される。我々は、条件致死性質や不稔性質の付与によって遺伝子組換え生物の野外環境での拡散を防止することを目指している。それらの性質の付与には、部位特異的組換えを利用して特定の条件下や時期に染色体からセントロメア DNA を切り出し、細胞死を誘導することが有効であると考えた。そこで、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデル生物として pSR1 プラスミドの R-RS 部位特異的組換え系を利用して染色体からセントロメア DNA を切り出して細胞死を誘導するシステムを開発した。このシステムは、まず、*S. cerevisiae* 染色体のセントロメア DNA の両側に組換え標的部位(RS)を同じ向きで挿入し、さらに、R レコンビナーゼ発現プラスミドを導入した細胞を作製した後に、ガラクトースによりレコンビナーゼの発現を誘導して行う。一倍体では第 IV 番染色体 1 本から切り出すことで、また、二倍体では第 IV 番相同染色体の両方から切り出すことで、生存率が大きく低下し、細胞死を誘導することができた。しかし、切り出しを誘導しても僅かな数の生存細胞が出現した。そこで、今回は、生存細胞が出現する原因を解明し、生存細胞の出現を抑制することで、さらに生存率を低下させることを目指した。一倍体のプレート培養で出現した生存細胞クローンのセントロメア近傍の構造の PCR 解析や、RS 領域の DNA シークエンス解析から、生存細胞が出現した主な原因は、染色体から片方 1 個の RS が欠失して組換えが起こらなかったためであった。また、この欠失は全て、RS DNA の両端に存在する TCGA 配列の間で起きており、同時に 2 個の RS が欠失したものは認められなかった。このことから、構造的に RS は欠失する可能性が示唆された。そこで、TCGA 配列を改変することで欠失が抑制され、生存率をさらに低下させることができると考えている。

cell death, surviving cell, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：4A09a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ A 校舎 09 会場

グリコーゲン欠乏が出芽酵母の増殖と経時寿命に及ぼす影響

Effects of glycogen deficiency on the prolifecation and chronological life span in yeast.

○山内 雪菜、井澤 真吾（京都工繊大工芸科学）
○Yukina YAMAUCHI, Shingo IZAWA (Kyoto Inst. Technol.)

グルコースの重合体であるグリコーゲンは、リピッドボディ中の中性脂質とともにエネルギー源の細胞内リザーバーだと考えられているが、微生物細胞における重要性や実際の役割などはよくわかっていないのが現状である。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はグリコーゲン合成酵素をコードする遺伝子として *GSY1* と *GSY2* を持つ。定常期やストレス条件下では両遺伝子の発現が誘導され、グリコーゲンの合成が活発になることが知られている。今回、酵母細胞におけるグリコーゲンの生理的機能を検討するために、グリコーゲン合成能を欠失した *GSY1*/*GSY2* 遺伝子の二重破壊株(*gsy1*Δ*gsy2*Δ)を構築して解析をおこなった。

野生株と *gsy1*Δ*gsy2*Δ株について 50mL の最少培地で生育を比較したところ、log phase 初期の細胞増殖速度に大きな違いは認められなかった。一方、*gsy1*Δ*gsy2*Δ株は野生株の約 1.5 倍の培地内細胞密度まで生育することが可能であった。また、培地内グルコース濃度の減少についても、log phase 後期から両株で違いが観察された。加えて、定常期移行後 15 時間以上培養を継続すると *gsy1*Δ*gsy2*Δ株は急速に死滅することが、メチレンブルー染色やコロニーカウント法などによって確認された。これらの現象は、*gsy1*Δ*gsy2*Δ株への *GSY1* 遺伝子または *GSY2* 遺伝子の導入によって抑圧された。

また、グルコースを含まない新たな最少培地に定常期細胞を植菌した際の細胞数の変化を検討したところ、野生株では緩やかながら増殖が確認され、30 時間培養後には細胞数が約 6 倍に増加した。しかし、*gsy1*Δ*gsy2*Δ株では細胞数の増加は全く認められなかった。定常期の *gsy1*Δ*gsy2*Δ細胞は野生株と同様にリピッドボディを保持していたことから、C 源のみが枯渇した条件下では、グリコーゲンを利用して増殖を再開することは可能だが、リピッドボディ中の中性脂質をエネルギー源として利用することは困難だと考えられた。

以上の結果から、グリコーゲンは C 源飢餓ストレス条件下における酵母の経時寿命や増殖再開などにおいて重要な働きをすると考えられる。また、グリコーゲンを合成しないことにより、培地中のグルコースがより多く細胞増殖に利用できると推測された。

glycogen, lipid body, chronological life span

講演番号：4A09a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ A 校舎 09 会場

出芽酵母の *SSG1-1* 長寿変異株における遺伝子発現の解析
Analysis of the Transcriptional Profile of Long-Lived Mutants in Budding Yeast
○小川 貴史[1]、椿山 諒平[1]、金井 宗良[2]、藤井 力[2]、平田 大[1]、水沼 正樹[1] ([1]広島大院・先端研・分子生命、[2]酒総研)
○Takafumi OGAWA[1], Ryouhei TSUBAKIYAMA[1], Muneyoshi KANAI[2], Tsutomu FUJII[2], Dai HIRATA[1], Masaki MIZUNUMA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]NRIB)

研究目的・背景

これまでに酵母や線虫、ショウジョウバエ、マウスなどのモデル生物を用いて寿命制御機構について多くの研究がなされてきた。モデル生物から得られた知見は保存性が高いことから、これらを用いた寿命研究の有用性が示唆されている。

S-アデノシルメチオニン(SAM)は、タンパク質をはじめ各種生体分子におけるメチル化反応のメチル基供与体として働く。我々は、出芽酵母の Ca^{2+}シグナルの生理機能を解析する過程で、*S*-アデノシルホモシステイン水解酵素遺伝子 *SAH1* に変異を持つ *sah1-1* 変異株を取得した。*sah1-1* 変異株は著しい増殖遅延が観察され、細胞内に SAM および *S*-アデノシルホモシステイン(SAH)が高蓄積している。SAH は SAM を基質とするメチルトランスフェラーゼの内在性拮抗阻害物質で、細胞に有害なため、Sah1 によって速やかに分解される必要がある。*sah1-1* 変異株はテロメアが短縮し、経時的寿命において短命を示すことが分かった。

新規寿命制御因子の取得を目的として、*sah1-1* 変異株の増殖遅延の抑圧を指標にスクリーニングを実施した。取得した変異は一つの遺伝子座に集約され、*ERC1* (過剰発現によってメチオニンの構造アナログであるエチオニン耐性となる遺伝子)が原因遺伝子である優性変異であったことから、*SSG1-1* (*Spontaneous Suppressor of Growth-delay of the sah1-1*) 変異株と命名した。*sah1-1SSG1-1* 二重変異株では、*sah1-1* 変異株の短命が抑圧され、テロメアの短縮も野生株程度まで抑圧されることが明らかとなった。また EGFP-Ssg1 の観察により、Ssg1 タンパクは液胞膜に強く局在することが明らかとなった。そこで *SSG1-1* 変異株の代謝に与える影響を明らかにするために、マイクロアレイ法を用いて遺伝子発現について解析を行い、*SSG1-1* 変異株の寿命機構を解明することを目的とした。

研究結果

キャピラリー電気泳動法により、*SSG1-1* 変異株は対数増殖期で SAM/SAH を蓄積した。またマイクロアレイ法による *SSG1-1* 変異株の遺伝子発現の解析では、高発現した遺伝子にアミノ酸の生合成やグルコース代謝に関与する遺伝子が多数見つかった。興味深いことに、グルコース代謝に関与する遺伝子は、多くが細胞内グルコース欠乏時に発現する遺伝子であった。これにより *SSG1-1* 変異株は細胞内グルコース濃度が低下し、カロリー制限を模倣する変異株であることが予想された。そこで現在、*SSG1-1* 変異株のグルコースの取り込みについて測定を行っている。

yeast, lifespan, S-adenosylmethionine

講演番号：4A09a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ A 校舎 09 会場

高温・高圧ストレス下における酵母トリプトファン輸送体 Tat1 の安定性に関する解析

Stability of the yeast tryptophan permease Tat1 under high temperature and high pressure

○望月 貴博[1]、持田 和範[1]、上村 聡志[1]、阿部 文快[1,2] ([1]青山学院大理工、[2]海洋研究開発機構)
○ Takahiro MOCHIZUKI[1], Kazunori MOCHIDA[1], Satoshi UEMURA[1], Fumiyoshi ABE[1,2] ([1]AoyamaGakuin Univ., [2]JAMSTEC)

【目的】 出芽酵母におけるトリプトファンの取り込みは、トリプトファンに対する特異性の異なる 2 つの輸送体 Tat1 (低親和性) と Tat2 (高親和性) により担われ、いずれも様々なストレスに高い感受性を示す。Tat1 と Tat2 は Rsp5 ユビキチンリガーゼ依存的に分解されるが、Tat1 は非常に安定なタンパク質であり、定常状態の半減期は 6 時間程度である。ところが、高圧 (25 MPa) に酵母細胞をさらすと急速に Tat1 の分解が進む。この分解が圧力による細胞膜の流動性低下に起因するのか、Tat1 自身の構造変化によるものなのかは不明である。そこで本研究では、まず細胞膜の流動性に影響を与える高温 (42 ℃) 条件下での Tat1 の分解について調べた。また、エラープローン PCR で *TAT1* にランダム変異を導入し、高温ストレス下で分解されない変異型 Tat1 を取得することで、Tat1 の分解に重要なアミノ酸残基の同定を試みた。

【方法】 高温条件下での野生型 Tat1 の分解を調べるために、Tat1 発現プラスミドを野生株 YPH499 に導入し、42 ℃で 2 時間培養した。その後、HA を標識とするウエスタンブロッティングを行なうことで発現量を調べた。また、変異を誘発するため、異なる濃度のヌクレオチド存在下で *TAT1* を PCR で増幅し、その産物とベクターを Gap Repair 法により酵母細胞内で連結した。このようにして得られた酵母を、高圧 (25 MPa, 3 時間) もしくは高温 (42 ℃, 2 時間) 条件下で培養し、ウエスタンブロッティングを行なった。野生型 Tat1 よりも安定発現しているものについて、プラスミドを抽出し Tat1 の変異部位を決定した。

【結果】 25 MPa で細胞を培養したところ Tat1 の分解は著しく促進され、その発現量は 3 時間で約 30 %になった。また、細胞を 42 ℃にさらすと Tat1 は 2 時間で約 15 %にまで低下した。一方、同じく Rsp5 の基質であるエンドソームタンパク質 Sna3 では、高圧・高温ストレスによる分解の促進は見られなかった。よって、高圧・高温ストレスは Tat1 に何らかの構造変化をもたらし、分解を促進したと考えられた。エラープローン PCR により高圧や高温条件下でも分解されない変異型 Tat1 の取得をしたところ、変異型には 6 ヵ所のアミノ酸置換が確認された。現在、当該部位を個々に置換し、高圧や高温ストレス条件下での Tat1 分解に必要なアミノ酸残基の同定を試みるとともに、安定化の要因についても検討を行っている。

Tryptophan permease Tat1, Rsp5 ubiquitin ligase, Saccharomyces cerevisiae

講演番号：4A09a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ A 校舎 09 会場

出芽酵母のペプチド輸送体 Ptr2 の発現と機能解析
Expression and functional analysis of the yeast peptide transporter Ptr2
○河合 建[1]、上村 聡志[1]、阿部 文快[1,2] ([1]青山学院大院理工、[2]海洋研究開発機構)
○ KEN KAWAI[1], SATOSHI UEMURA[1], FUMIYOSHI ABE[1,2] ([1]Aoyama Gakuin Univ., [2]JAMSTEC)

【目的】Ptr2 は出芽酵母の細胞膜に局在するペプチド特異的な輸送体である。しかしながら、ペプチドの認識や透過メカニズムについての詳細については不明な点が多い。本研究では、Ptr2 の機能に重要な部位を同定するため、アミノ酸置換を導入した変異型 Ptr2 の発現プラスミドを作製し解析を行った。

【方法】X 線結晶構造が明らかとなっているレンサ球菌 *Streptococcus thermophilus* の PepTst の知見、ならびにヒトペプチド輸送体との相同領域からの類推で、置換部位を TMD1–5, 7, 10, 11 に合計 19 カ所選定した。そして PrimeStar Max DNA ポリメラーゼを用い、酵母 *PTR2* に 19 カ所の変異をそれぞれ導入した。変異型プラスミドを *ptr2*Δ *trp1* 株に導入し、Ala-Trp 培地での増殖能を指標にアミノ酸置換の影響を評価した。Ptr2 タンパク質の発現量については HA タグによるウエスタンブロッティングで、細胞内局在については GFP 標識による蛍光観察により行った。Ptr2 のペプチド取り込み活性については、[^{3}H-]Ala-Ala を用いた実験により評価した。

【結果】導入した 19 変異のうち、13 カ所のアミノ酸残基が置換の影響を受け、Ptr2 機能を様々な程度で低下させた。それらのうち、5 カ所のアミノ酸置換については Ptr2 機能を完全に消失させることがわかった。ウエスタンブロッティングによる解析の結果、変異型 Ptr2 の発現量は SD 培地では野生型と同等であるのに対し、Ala-Trp 培地では前述した 5 個の変異型で有意に低下していた。GFP 融合変異型 Ptr2 を *ptr2*Δ株で発現させ細胞内局在を観察したところ、SD 培地においてそれら 5 つの変異型 Ptr2 は細胞膜に正常に局在していたが、Ala-Trp 培地では細胞膜から消失していた。以上のことから、これらの変異型 Ptr2 は、基質輸送能を完全に失っており、結果として液胞分解に至るという可能性が示唆された。このことは、[^{3}H]Ala-Ala を用いたペプチド取り込み実験からも支持された。すなわち、変異型 Ptr2 が正常に発現する SD 培地で細胞を培養し、経時的に取り込み活性を調べたところ、5 つの変異株は *ptr2*Δ株と同様、[^{3}H]Ala-Ala を全く取り込まないことがわかった。したがって、これら 5 つのアミノ酸残基は Ptr2 のペプチド取り込み能に不可欠であるものと結論づけた。

peptide, *Saccharomyces cerevisiae*, peptide transporter Ptr2

講演番号：4A09a17
講演日時、会場：3 月 30 日 11:54～ A 校舎 09 会場

出芽酵母のロイシン輸送体 Bap2 における機能部位の同定
Determination of the essential amino acid residues in the yeast leucine permease Bap2
宇佐美 佑紀、望月 貴博、上村 聡志、○阿部 文快（青山学院大・理工）
Yuki USAMI, Takahiro MOCHIZUKI, Satoshi UEMURA, ○Fumiyoshi ABE (Aoyama Gakuin Univ)

【目的】出芽酵母においてロイシンはタンパク質合成の材料であるのみならず、酢酸イソアミルなど香気性成分の前駆体として重要なアミノ酸である。Bap2 は分岐鎖アミノ酸の高親和性輸送を担う 12 回膜貫通型（TMD）タンパク質だが、基質特異性や取り込み機能の詳細は不明である。最近我々は、高親和性トリプトファン輸送体 Tat2 において、機能に不可欠な 15 個のアミノ酸残基を同定しこれを報告した。Bap2 と Tat2 は互いに相同性の高い膜タンパク質である。そこで、本研究では Tat2 で明らかとなった 15 カ所のアミノ酸残基について、Bap2 に同様の変異を導入し機能を検証した。

【方法】Bap2 によるロイシン輸送活性の評価系を構築するため、ロイシン要求性の野生型 BY4741 株と *bap2*Δ株のロイシン濃度依存的な細胞増殖を比較した。PrimeStar Max DNA ポリメラーゼを用いた部位特異的変異導入法により、Bap2 の TMD1, 3, 6-8, 10 における 17 個のアミノ酸残基をそれぞれ置換した。また、^{3}H-ロイシンを用いて Bap2 に依存したロイシン取り込み活性を定量した。野生型と変異型 Bap2 の存在量については、HA タグを用いたウエスタンブロッティングにより、細胞内局在については GFP 標識によって調べた。

【結果】100 μg/mL のロイシンを含む完全合成（SC）培地では、野生株と *bap2*Δ株の増殖に差が見られないのに対し、40 μg/mL のロイシン存在下では *bap2*Δ株の増殖能が大きく低下した。そこで、以後の Bap2 変異の評価は 40 μg/mL ロイシンを含む SC 培地で行った。導入した 17 カ所のアミノ酸置換のうち、変異による増殖失陥が認められたのは 7 アミノ酸残基に限られ、^{3}H-ロイシンを用いた取り込み実験の結果もこれを支持した。ウエスタンブロッティングによる発現量の比較、ならびに GFP 標識による細胞内局在の比較を行ったところ、いずれも野生型 Bap2 と変異型の間で大きな違いは見られなかった。よって、今回得られた変異は Bap2 分子のロイシン取り込み能を失陥させるものと考えられた。また、Tat2 に比べ Bap2 では全体としてアミノ酸置換を許容する傾向にあることは興味深い。大腸菌のアルギニン輸送体 AdiC の結晶構造を鋳型とした構造モデリングを行ったところ、Bap2 の 7 カ所のアミノ酸残基は AdiC において基質認識に重要な部位に位置していた。本発表では、Bap2 によるロイシンの認識と透過のメカニズムに関する私たちの作業仮説を提唱する。

Saccharomyces cerevisiae, leucine permease Bap2, homology modeling

講演番号：4A10a03
講演日時、会場：3 月 30 日 09:22～ A 校舎 10 会場

Corynebacterium glutamicum の細胞表層形成に関与する遺伝子の解析
Genetic analysis of cell surface structure in *Corynebacterium glutamicum*
○北原 裕己[1]、松田 吉彦[2]、和地 正明[1] ([1]東工大院生命理工、[2]味の素(株)イノベーション研究所)
○Yuki KITAHARA[1], Yoshihiko MATSUDA[2], Masaaki WACHI[1] ([1]Tokyo Tech, [2]Ajinomoto)

【背景】
産業微生物である *Corynebacterium glutamicum* はグラム陽性菌に分類されるが、その細胞表層は他のグラム陽性菌と異なり、ペプチドグリカン層の外側にミコール酸層という脂質膜が存在する。さらに外側には S-layer と呼ばれるタンパク質の層が存在する。これら特殊な細胞表層について理解することは、物質の分泌生産などにおいて非常に重要であると思われる。そこで本研究では *C. glutamicum* ATCC13869 を用い、細胞表層の構成に関わる遺伝子に関する解析を行った。

【結果と考察】
本研究では S-layer を構成する細胞表層タンパク質 CspB（PS2 とも呼ばれている）をコードする *cspB*、*cspB* の転写因子 RamA をコードする *ramA* という 2 つの遺伝子に着目し、各遺伝子の欠損株を用いて細胞表層への影響を調べた。まず、細胞透過性を比較するためにリゾチーム感受性試験を行ったところ、*ΔcspB* 株、*ΔramA* 株共に野生株よりも高い感受性を示した。CspB は S-layer の構成タンパク質であることから、欠損させることによりリゾチームが細胞内に侵入しやすくなり感受性が高まったと予想される。また、*cspB* の発現は RamA によって制御されていることから、*ΔramA* 株は *ΔcspB* 株と同程度のリゾチーム感受性を示すことが予想されたが、*ΔcspB* 株よりも遥かに高い感受性を示した。このことから、RamA は *cspB* 以外にも細胞表層形成に関与する遺伝子の転写制御に関わっていることが示唆された。また、*ΔramA* 株の菌体外分泌タンパク質を SDS-PAGE によって調べたところ、野生株や *ΔcspB* 株と比べ、非常に多くのタンパク質の分泌が見られた。このことから RamA は細胞表層の物質透過性に大きく影響していると考えられる。

【結論】
本研究により、*cspB*、*ramA* の細胞表層における物質透過性への影響が明らかとなった。RamA は酢酸代謝系の転写因子として知られており、細胞表層については *cspB* の転写制御のみが知られていた。しかし、本研究により RamA が *cspB* の以外にも細胞表層形成に関わる因子の発現制御に大きく影響していることが示唆された。今後、RamA の細胞表層に関する転写制御についてさらに詳しく調べていく必要がある。

Corynebacterium glutamicum, cell surface, lysozyme sensitivity

講演番号：4A10a04
講演日時、会場：3 月 30 日 09:33～ A 校舎 10 会場

Lactobacillus plantarum の免疫調節作用に関わる因子の探索
Study of immune modulatory molecules in *Lactobacillus plantarum*
○長井 遼太[1]、浜村 南実[1]、福井 雄一郎[2]、菅沼 大行[2]、梶川 揚申[1]、田中 尚人[3]、佐藤 英一[1]、岡田 早苗[1] ([1]東農大応生科・化学、[2]カゴメ (株)、[3]東農大・菌株)
○Ryota NAGAI[1], Nami HAMAMURA[1], Yuichiro FUKUI[2], Hiroyuki SUGANUMA[2], Akinobu KAJIKAWA[1], Naoto TANAKA[3], Eiichi SATOH[1], Sanae OKADA[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Tokyo Univ. Agr., [2]KAGOME CO. LTD., [3]NRIC, Tokyo Univ. Agr.)

【目的】近年、乳酸菌はプロバイオティクスとして多様な保健効果が期待され、中でも免疫学的機能について関心が集まっている。乳酸菌による免疫調節作用については様々な研究がなされ、因子として細胞壁成分や多糖体などの報告があるものの、未だ分子レベルでの詳細なメカニズムは充分に明らかにされていない。2007 年、冨田は発酵食品「すんき」から分離された *Lactobacillus plantarum* の株間での免疫賦活活性差と、細胞壁テイコ酸の構造多様性に着目した。しかし、すんき分離株の免疫賦活活性と細胞壁テイコ酸の多様性との間に関連性を見出すことは出来なかった[1)]。また、2012 年杉浦は、免疫賦活作用の高い株と低い株の細胞壁画分とプロトプラストを調整し、それらの活性差を比較した。そしてそれらの活性差がプロトプラストに起因している可能性があることを報告した[2)]。そこで本研究ではプロトプラスト表層に存在するリポテイコ酸(LTA)に着目し、IL-12 産生誘導能に差がある菌株のリポテイコ酸の構成と保有量について比較することにより、IL-12 誘導能に差を生じさせる要因を検討することとした。
【方法と結果】抗 LTA モノクローナル抗体 clone55 を用いて乳酸菌表層の LTA を標識し、フローサイトメーターにより定量を行った。その結果、免疫賦活作用の高い株の表層 LTA は、低い株に比べ多く存在していることが明らかとなった。現在、精製した LTA を用いて LTA に付加されている D-Alanine 量、各供試菌の全 LTA 量の比較も行っており、その結果も併せて報告する。
[1)]冨田ら 2007 年度日本農芸化学大会 3A08p11
[2)]杉浦ら 2012 年度日本農芸化学大会 3J15a11

Lactobacillus plantarum, Immuno modulatory factor, Lipoteichoic acid

講演番号：4A10a05
講演日時、会場：3 月 30 日 09:44～ A 校舎 10 会場

乳酸菌における細胞壁テイコ酸の分布
Distribution of wall teichoic acid in lactic acid bacteria
○佐々木 織江[1]、梶川 揚申[1]、田中 尚人[2]、佐藤 英一[1]、岡田 早苗[1]([1]東農大応生科・化学、[2]東農大・菌株)
○Orie SASAKI[1], Akinobu KAJIKAWA[1], Naoto TANAKA[2], Eiichi SATOH[1], Sanae OKADA[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem. Tokyo Univ. Agr., [2]NRIC, Tokyo Univ. Agr.)

【背景・目的】我々は同一環境（すんき漬）から分離した乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* 19 株を用い、細胞壁テイコ酸（WTA）の構造を調べ、グリセロール型 3 タイプ、リビトール型 3 タイプ〔それぞれの糖アルコールに結合するグルコースのモル数やグルコースからなる二糖類の種類（nigerose や kojibiose）により〕、合計 6 タイプが存在することを明らかにした(1)。これは同一菌種内で WTA の構造多様性を明らかにした初めての報告である。WTA は糖アルコールとリン酸から構成される酸性多糖であり、菌体の生育に重要な成分であると考えられている。これまでの研究で、WTA は細胞形態維持や陽イオン吸着などの役割を果たすと言われている。更に WTA の構成成分がそれらの機能に影響を与えることが示唆されているが、その詳細は明らかとなっていない。

また、現在報告されている *Lactobacillus* 属 200 種弱の中だけで見ても、WTA の存在が明確に記されているものは 20 種程度で、存在しないと記載された菌種も複数有り、また存否そのものが記載されていないものが多い。そこで WTA の役割を明らかにするために、乳酸菌種ごとにおける WTA の存否の再確認、あるいはその構造多様性などについて調査し、WTA の機能性解明の基礎データの構築を目指している。

【実験方法・結果】WTA の有無について乳酸菌全般に亘り広く知るために、岡田らによる乳酸菌実験マニュアル記載の手法を用い細胞壁の分画を行った。供試株は各種基準株（Type strain）を用いた。調製した細胞壁に含まれるリン酸を Allen 法にて定量し WTA の存否を調べた。また、リン酸が定量された細胞壁について WTA 画分を分取し、そのリン酸量と細胞壁画分のリン酸量を比較し、WTA 含有率の算出を行った。*Lactobacillus* 属複数種を調査した結果、WTA を確認できた株と検出されない株が存在した。今後、乳酸菌全般の WTA の分布を明らかにすると共に、WTA の存在が認められた乳酸菌株についてその構造解析を試みる。

(1) S. Tomita, *et al.*, *Microbiology*, 158(11), 2712-2723 (2012).

wall teichoic acid, lactic acid bacteria

講演番号：4A10a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ A 校舎 10 会場

New Insight Into the Surface of Living *Rhodobacter sphaeroides* Using the High-Speed Atomic Force Microscope

○Zachery Oestreicher[1], Taoka Azuma[1,2], Yoshihiro Fukumori[1,2] ([1]Kanazawa Univ. Sch. of Sci. and Tech., Fac. of Nat. Sys., [2]Kanazawa Univ. Sch. of Sci. and Tech. Bio-AFM FSC)

In this study we took advantage of the high-speed atomic force microscope (HS-AFM) to investigate the surface of *Rhodobacter sphaeroides*. This technique has the advantage of nanoscale spatial resolution as well as millisecond temporal resolution because it can take several high-resolution images per second. These features allow the dynamics of molecules on the cell surface to be witnessed while imaging the cells in liquid growth media.

The organism we examined was *R. sphaeroides*, which is a photosynthetic, gram-negative bacterium belonging to the *Alphaproteobacteria* class and has a single flagellum located midway along the long axis of the cell. We first grew the cells on a swarming plate to confirm they were motile. Next, these motile cells were grown in liquid media until they reached the early stationary phase, after which they were incubated for one hour on a mica substrate prior to imaging. To firmly attach the cells, the surface of the mica was first coated with 0.1% poly-L-lysine and then treated with 0.1% glutaraldehyde. The viability of the cells on the mica was estimated by using the LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit. Many living cells were observed in liquid media using the HS-AFM and then movies were collected using different frame rates (approximately 2-3 frames/second) and different scan sizes (between 50-1500 nm^2).

The series of images from the HS-AFM revealed 3 significant features on the surface of the cells. The first feature of the surface of the cells is that it is covered in a lattice-like framework where the width of each lattice is approximately 3 nm and the space between each lattice is approximately 7 nm. The second feature is that small molecules, approximately 3 nm long and 1nm high, move over the lattice-like framework over the timespan of milliseconds. The third feature is that the base of the flagella is visible medially on the body of the cell and appears as a hook-like structure. Interestingly, this structure is occasionally removed while imaging creating a pore approximately 17 nm wide remaining in its place.

This work gives new insight about the morphology and dynamics of the outer surface of *R. sphaeroides* as well as confirms the feature of a lattice-like organization on the surface of gram-negative cells is a conserved feature.

High-Speed Atomic Force Microscopy, Rhodobacter sphaeroides, Cell surface

講演番号：4A10a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ A 校舎 10 会場

生細胞タイムラプスイメージングによる原核細胞オルガネラ「マグネトソーム」の細胞内動態観察

Subcellular dynamics of bacterial organelle ‘magnetosomes’ visualized by live-cell time-lapse imaging

○上杉 知佳[1]、田岡 東[2,3]、森井 香[1]、福森 義宏[2,3]([1]金沢大院自然科学、[2]金沢大理工自然システム、[3]金沢大理工バイオ AFM)
○Chika UESUGI[1], Azuma TAOKA[2,3], Kaori MORII[1], Yoshihiro FUKUMORI[2,3] ([1]Dep. of Life Sci., Grad. Sch. of Nat. Sci. and Tech., Kanazawa Univ., [2]Sch. of Nat. Sys., Coll. of Sci. and Eng., Kanazawa Univ., [3]Bio-AFM FRC, Kanazawa Univ.)

【目的】磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 はリン脂質二重膜に覆われた単結晶性のマグネタイトを生合成し、「マグネトソーム」と呼ばれるナノサイズの磁気オルガネラを形成する。磁性細菌はマグネトソームを直鎖状に配列することで、地磁気を感知し、生育に適した環境へ効率的に移動すると考えられている。マグネトソームは直径が約 50 nm であり、光学顕微鏡では直接観察することができない。そのため、マグネトソームの観察は主として電子顕微鏡技術を用いて行われている。しかし、生きた細胞内において、マグネトソームの局在や動態を観察することは、マグネトソームや、マグネトソームを構成するタンパク質の働きを理解するために必須である。そこで本研究では、マグネトソーム小胞に局在するタンパク質 MamC と蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現させ、マグネトソームを蛍光標識することで生きた磁性細菌内でのマグネトソームという磁気オルガネラの動態の観察を試みた。
【方法】広宿主域プラスミドを用いて、*M. magneticum* AMB-1 において MamC-GFP の融合タンパク質の発現系を構築した。MamC-GFP を発現させた細胞を、ポリ-L-リジンでコートしたカバーグラスに付着させ、長時間観察による細胞の遊離を防ぐためジェランガムゲルにより細胞を固定した。液体培地で満たしたチャンバー内で、微好気的に磁性細菌の培養を行いつつ 24～48 時間に渡って長時間蛍光タイムラプス観察を行った。観察には、斜光照明(HILO 照明)法を用いた。
【結果・考察】蛍光顕微鏡観察の結果、MamC-GFP は、細胞の長軸方向に沿ってスポット状に観察され、マグネトソームの局在部位と一致していた。細胞はタイムラプス観察中に複数回分裂し、細胞周期を通してマグネトソームの動態を観察することができた。細胞の伸長とともに、細胞内の蛍光スポット間の距離が増加したが、細胞長軸における相対的な位置は変化せず、その後に起った細胞分裂により、蛍光スポットが娘細胞へ安定して分配される様子が観察された。また、娘細胞では細胞の成長とともに、新規にマグネトソームが形成される様子を観察することができた。さらに、同様の実験を *mamK* 欠損株を用いて行った。MamK はアクチン様細胞骨格タンパク質であり、マグネトソームの鎖状構造形成や安定伝搬に寄与することが示唆されている。*mamK* 欠損株において、MamC-GFP の蛍光スポットは、野生株のように細胞の長軸方向に沿って分布せず、野生株と比べて細胞内をランダムに移動し、結果として娘細胞に不均等に受け渡されていた。本研究の結果、マグネトソームの生細胞イメージング技術を確立し、細胞周期を通じたマグネトソームの動態観察に初めて成功した。

live cell imaging, bacterial organelle, magnetosome

講演番号：4A10a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ A 校舎 10 会場

Rhodococcus erythropolis N9T-4 株が低栄養生育時に形成するオリゴボディーの機能解析
Functional analysis of the oligo body formed in *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 grown under oligotrophic conditions

○藤好 拓也[1]、永井 里奈[4]、岩野 恵[1]、西田 倫希[2]、田口 英次[2]、吉田 信行[3]、高木 博史[1]([1]奈良先端大・バイオ、[2]阪大・超高圧電顕セ、[3]静大・工、[4]理研・生命システム・細胞場構造)
○Takuya FUJIYOSHI[1], Rina NAGAI[4], Megumi IWANO[1], Tomoki NISHIDA[2], Eiji TAGUCHI[2], Nobuyuki YOSHIDA[3], Hiroshi TAKAGI[1] ([1]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, [2]UHVEM, Osaka Univ, [3]Fac. Eng, Shizuoka Univ, [4]Cell Field Struc., QBiC, Riken)

【目的】 当研究室で備蓄原油より単離した *Rhodococcus erythropolis* N9T- 4 株は、炭素源・窒素源無添加の条件で完全無機塩からなる固体培地に良好に生育するという超低栄養性を示す。また、生育には CO_2 を要求するが、光などのエネルギーの添加を必要としないため、低エネルギー型の CO_2 固定経路を有していると予想し、研究を進めている。本菌を低栄養条件下で生育させると、細胞内に比較的大きな球形の構造体が形成されることが分かった。我々はこの構造体を「オリゴボディー」と名付け、低栄養生育との関連を解析している。今回はこのオリゴボディーの構成成分を解析したので報告する。
【方法・結果】 これまで、オリゴボディーの形態の観察、形成条件の検討などは主に透過型電子顕微鏡を用いて行ってきたが、オリゴボディーの観察をより容易に行うため、また構成成分の予想を立てることを目的として、様々な染色法を用いて蛍光あるいは光学顕微鏡による可視化を試みた。染色は低栄養条件（BM 培地)と富栄養条件（LB 培地)のそれぞれで生育した細胞に対して行った。その結果、トルイジンブルー（TB）で染色した場合、細胞内で特異的に濃く染まる構造体が観察された。TB は塩基性色素で、微生物では無機ポリリン酸（polyP）からなる顆粒を染色する際に用いられている。polyP を主成分とする細胞内顆粒は環境中のリンを除去できる微生物で報告があるが、その場合 4,6-ジアミジノフェニルインドール（DAPI)で顆粒が染色されることが報告されている。しかしながら、N9T-4 株のオリゴボディーは DAPI では染色できなかった。また、オリゴボディーはかなり大きな顆粒であり、細胞当たり 1 個形成されていること、細胞分裂と共に形成される可能性があること、細胞の局部分に存在していること、などが上記微生物の polyP 顆粒と異なる点である。実際に、N9T-4 株から polyP を抽出し、加水分解を行った後にモリブデン-マラカイトグリーン法を用いて、無機リン酸の定量を行った。その結果、BM 培地で生育させた細胞において顕著な無機リン酸量の増加が確認された。さらに、透過型エネルギー分散型 X 線分光法（TEM-EDX)による元素分析では、オリゴボディー内に細胞質よりも高いリンとカリウムのピークが見られた。以上の結果より、N9T-4 株は低栄養生育時にオリゴボディー内に polyP を蓄積していることが示唆された。N9T-4 株のゲノム上に polyP の生合成に関与する遺伝子（*ppk1* 及び *ppk2*）の存在が確認されたので、これらの単独破壊株と二重破壊株を作製し、低栄養時の生育やオリゴボディーの形成の有無の確認を試みた。その結果、*ppk1* 破壊株は LB 培地、BM 培地での生育は親株と変わらないものの、窒素源を除いた BM 培地での生育能は若干低下していた。現在、*ppk2* 破壊株についても構築中である。

Rhodococcus erythropolis, inorganic polyphosphate, oligo body

講演番号：4A10a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ A 校舎 10 会場

Sphingomonas 属細菌 A1 株の側べん毛関連および非関連遺伝子群による極単べん毛の形成

A single polar flagellum formation by lateral and non-lateral flagellar gene sets in *Sphingomonas* sp. strain A1

○丸山 如江[1]、小林 将大[1]、村田 幸作[2]、橋本 渉[1]([1]京大院・農、[2]摂南大・理工)
○Yukie MARUYAMA[1], Masahiro KOBAYASHI[1], Kousaku MURATA[2], Wataru HASHIMOTO[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Fac. Sci. Eng., Setsunan Univ.)

【背景と目的】グラム陰性の *Sphingomonas* 属細菌 A1 株は、土壌より分離されたアルギン酸分解細菌である。これまで、本菌はべん毛を作らず、運動性を示さないと考えられてきたが、最近、富栄養軟寒天培地上でスクリーニングすることにより、細胞極に単一のべん毛を形成し、活発に運動する株（A1-M5）を分離した。A1 株のゲノム上には、べん毛（基部体、フック、繊維）形成に必須な 30 以上のべん毛関連遺伝子からなる一つのクラスター（べん毛遺伝子セット I）と、ゲノムの複数箇所に散在したべん毛関連遺伝子群（べん毛遺伝子セット II）が存在する。本研究では、2 セットのべん毛遺伝子群が単一の極単べん毛を形成する機構を明らかにすることを目的として、A1-M5 のべん毛遺伝子の構造解析および発現解析を行った。

【方法と結果】KEGG ゲノムデータベースを対象に、遺伝子クラスターの構造を比較した。べん毛遺伝子セット I は、*Aeromonas* 属細菌や *Vibrio* 属細菌の側べん毛遺伝子クラスターと類似の構造をとっていた。側べん毛形成細菌では、通常は細胞の極にべん毛を形成し、特定の条件下においてのみ細胞全体からも繊維を伸長するのが一般的である。本クラスターの末端には、側べん毛フラジェリン遺伝子（lafA）と相同性を示す algp6 遺伝子が存在した。一方、セット II 遺伝子には、側べん毛遺伝子クラスターとの類似性は見られなかったことから、セット I を側べん毛型、セット II を非側べん毛型とした。次に、プログラム MEME を用いて共通モチーフ配列を抽出したところ、ゲノム中に散在するにもかかわらず、セット II のべん毛関連遺伝子[フラジェリン algp5(sph223)、motA(sph242)、flaG(sph539)、flgM(sph1057)]の上流に、べん毛に特異的なσ因子（fliA）の認識モチーフ TAAAGTTT(N)$_{11}$GCCGATAA が見出された。本モチーフは、algp6 をはじめとするセット I の遺伝子の上流には存在しない。セット I とセット II の遺伝子群は、異なるσ因子による発現制御を受けていることが示唆される。野生株と A1-M5 の遺伝子発現を DNA マイクロアレイで解析した結果、A1-M5 では 2 セットの全べん毛関連遺伝子の転写レベルが、野生型に比べて大きく上昇していた。また、A1-M5 から単離したべん毛繊維の構成タンパク質を調べたところ、Algp5 及び Algp6 が主要構成因子であることがわかった。

【結論】A1-M5 では、異なるσ因子による制御を受ける 2 セットのべん毛遺伝子群が共に高発現しているにもかかわらず、単一の極べん毛が形成されることが明らかになった。

lateral flagellin, polar flagellum, *Sphingomonas*

講演番号：4A10a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ A 校舎 10 会場

エノキタケ子実体由来接着タンパク質の抽出とその機能

Extraction and its function of adhesive protein from Flammulina veltipes

○楮畑 智代[1]、泉 沙織[1]、吉見 慎太郎[1]、小出 芳栄[2]、片倉 啓雄[1]、河原 秀久[1]([1]関西大化生工、[2]有限会社　一栄)
○ Tomoyo KAKIHATA[1], Saori IZUMI[1], Shintaro YOSHIMI[1], Yoshihide KOIKE[2], Yoshio KATAKURA[1], Hidehisa KAWAHARA[1] ([1]Kansai Univ., [2]Ichiei Co.)

【目的】カビなどの真菌類は、細胞壁表層に成長段階で両親媒性膜を形成するハイドロフォビンとよばれる低分子量のタンパク質を生産している。このタンパク質は SDS に不溶性であるクラスⅠと可溶性であるクラスⅡに分類されている。これまでの研究において、真菌類である担子菌（キノコ）は、クラスⅡの存在は報告されていない。現在、糸状菌の 1 種である *Trichoderma ressei* 由来のクラスⅡ遺伝子組み換え産物のみが試薬レベルで利用されているだけである。そこで本研究では、低温馴化させたエノキタケにおいて、食品用途で使用できるハイドロフォビンと同様の接着活性を持ったタンパク質の抽出法の確立、およびその機能性の評価を目的としている。
【方法】低温馴化させた乾燥エノキタケ子実体は、ミキサーで粉砕し、水およびヘキサンで浸漬処理を行った。その残渣は、常温下の 10%酢酸中で撹拌処理し、その残渣から、熱水抽出し、粗抽出エキスとした。それぞれの収量を比較し、その後ゲルろ過クロマトグラフィー、SDS-PAGE で分析した。機能性において、乳化活性の能力は、ケロシンや植物油に対する乳化指標(E_{24})を用いた測定方法で評価した。さらに、接着活性は、数種のタンパク質や無機物に対する接着率で比較を行った。
【結果】従来抽出に使用している TCA 処理から酢酸処理に変更することで、タンパク質の収量が SDS 抽出では 2.1 倍、熱水抽出では 2.8 倍に増加した。最終的に、従来法（TCA 処理・SDS 抽出）と比較して、改良法（酢酸処理・熱水抽出）の収量は 60%ほどであった。また、この両サンプルを SDS-PAGE 分析したところ、どちらも 14.4 k Da にメインバンドを確認できた。次に、ゲルろ過クロマトグラフィー分析では、改良法のサンプルのみで、高分子量タンパク質のピークが確認でき、低分子のタンパク質のピークは両サンプルでも確認できた。この高分子量タンパク質の存在は、改良法サンプルの接着タンパク質が凝集したものであると予測している。次に、機能性の評価を行ったところ、乳化活性の評価では、改良法サンプルは、従来の市販の乳化剤で乳化されにくいとされているオリーブ油を含む 7 種類の植物油やケロシン等を乳化することが確認された。接着活性の評価では、低濃度の改良法エキスは、同量のタンパク質において、コラーゲンへの接着率が 60%以下であるが、試薬ケラチンおよび人の髪の毛には 100%接着することが確認できた。これらの結果から、エノキタケはハイドロフォビンクラスⅡタンパク質の存在はないが、改良法エキスには、糸状菌のハイドロフォビンクラスⅡの機能性活性と類似した活性を持つタンパク質を含んでいることが確認された。このタンパク質がハイドロフォビンクラスⅡ様のタンパク質であると考え、現在、同定を進めている。

Flammulina veltipes, Hydrophobin, Keratin

講演番号：4A10a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ A 校舎 10 会場

麹菌 *A. oryzae* における Ime2p 相同タンパク質の高発現による菌核内部での有性生殖器官形成の促進
Promotion of sexual reproduction in sclerotia by overexpressing Ime2p homologue in *Aspergillus oryzae*

○田中 勇気、金 鋒杰、丸山 潤一、北本 勝ひこ（東大院農生科・応生工）
○Yuuki TANAKA, Feng Jie JIN, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】

麹菌 *Aspergillus oryzae* において有性世代は発見されていないが、株によって異なる接合型遺伝子 *MAT1-1* あるいは *MAT1-2* をもつことから、ヘテロタリックな有性生殖を行う可能性が示唆されている。*A. oryzae* で有性生殖が可能になれば、優良な形質をもつ菌株の育種に役立つと期待される。菌核は菌糸が分岐、融合、接着を繰り返して形成する耐久構造であり、近縁の糸状菌では、菌核内に有性生殖器官である子嚢果が存在し、その内部で子嚢および子嚢胞子が形成されることが報告されている。我々の最近の研究において、菌核形成を正に促進する転写因子 SclR の高発現、負に制御する転写因子 EcdR の欠損により、2 つの株が菌糸融合して形成する菌核の数が増加することを見出した [1,2)]。しかし、*A. oryzae* の菌核の内部構造に関する知見はなく、有性生殖器官が形成されるか不明である。今回は、*A. oryzae* が菌核内部に有性生殖器官を形成するかどうか、顕微鏡観察による検討を行った。また、有性生殖に関連する遺伝子を高発現し、有性生殖器官形成の促進効果を解析した。

【方法と結果】

はじめに、*A. oryzae* の EcdR 欠損株を、接合型ごとに異なる色の蛍光タンパク質と栄養要求性によって標識した。作製した株を用いて対峙培養を行ったところ、2 つの株が菌糸融合して菌核を形成する効率が上昇することを確認した。この菌核の内部を観察したところ、子嚢果と推定される構造の形成がほとんど見られなかった。Ime2p は酵母における有性生殖の主要制御因子である。糸状菌 *Aspergillus nidulans* では、Ime2p ホモログである ImeB を高発現させることで、有性生殖器官の形成が促進されることが報告されている。そこで、*A. oryzae* のゲノムデータベースより、*IME2* と相同性をもつ AO090026000271 を見いだし、*Aoime2* と命名した。EcdR 欠損株において AoIme2 を高発現した結果、菌核の形成能に変化は見られなかったが、菌核内部において子嚢果に類似した構造の形成効率が上昇していた。この菌核の内部構造を、走査型電子顕微鏡を用いて観察したところ、近縁の糸状菌で報告されている子嚢や子嚢胞子に類似した構造が観察された。現在、子嚢胞子様構造において標識した蛍光色と栄養要求性の組み合わせを調査することにより、有性生殖が行われているかどうか解析を行っている。

1) Wada *et al.* (2013) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* in press
2) 田中勇気ら、2013 年日本農芸化学会大会講演要旨 4B13a04

Aspergillus oryzae, sexual cycle, sclerotium

講演番号：4A10a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ A 校舎 10 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* の菌糸融合に培地成分が与える影響の解析
Effect of media composition on hyphal fusion in *Aspergillus oryzae*
○塚崎 和佳子、丸山 潤一、北本 勝ひこ（東大院農生科・応生工）
○Wakako TSUKASAKI, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本の伝統的な醸造産業に使用されてきたほか、酵素生産や異種タンパク質生産の宿主としても利用されている。*A. oryzae* が菌糸融合を行う能力をもつことは、およそ 60 年前に坂口謹一郎東京大学名誉教授らにより報告されているが [1)]、それ以降ほとんど研究が行われてこなかった。また、菌糸融合は有性生殖での重要なステップの一つであり、これを解析することにより、まだ見つかっていない *A. oryzae* の有性生殖の発見につながる可能性がある。我々は最近、*A. oryzae* の菌糸融合能力を定量的に解析する方法を確立した [2)]。今回はその方法を用いて、蛍光観察による菌糸融合の確認と、培地成分による菌糸融合能力への影響の検討を行った。

A. oryzae において、核に赤い蛍光(mDsRed)をもち、ウリジン・ウラシル要求性(Δ*pyrG*)の株と、核に緑の蛍光(EGFP)をもち、アデニン要求性(Δ*adeB*)の株の 2 種類を使用した。我々の確立した方法では、これら 2 株の混合培養ののち形成された分生子をウリジン・ウラシル、アデニンを含まない培地に塗布し、栄養要求性が相補され生育するコロニーを数えることによって菌糸融合の効率を判定することができる。また、混合培養を行っている間、一部の菌糸や分生子に赤と緑両方の蛍光が観察されたことから、菌糸融合が行われたことが直接確認できた。以上のことから、本法は、菌糸融合を評価するうえで有効であることが支持された。

この実験系を利用して *A. oryzae* の菌糸融合能力の定量的な解析を行い、混合培養での培地成分の影響を CD 培地(pH 5.5)をベースに窒素源や炭素源、pH を変えて検討した。窒素源については、資化しやすいアンモニウム、グルタミンを含む培地で菌糸融合の効率が低下し、資化しにくい硝酸、ロイシンを含む培地で効率が上昇した。また、窒素源が欠乏した条件でさらに菌糸融合が起こりやすくなることが分かった。炭素源の種類の変更ではほとんど変化は見られなかった。一方、グルコースを 20%含む培地では菌糸融合効率の上昇が見られた。pH については、酸性条件の培地では菌糸融合の効率が低下し、中性とアルカリ性の条件では上昇した。これらの結果を踏まえ、窒素源、炭素源、pH のいずれも最適な条件の培地で実験を行ったところ、菌糸融合効率が CD 培地と比較して 3.2 倍にまで上昇した。以上の結果から、*A. oryzae* の菌糸融合の効率は培地成分と pH により影響を受けることが明らかになり、その条件を最適化することにより菌糸融合効率を上昇させることに成功した。

1) Ishitani and Sakaguchi (1956) *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2, 345-400.
2) 塚崎和佳子ら、2013 年度日本農芸化学会大会講演要旨 4B13a05

Aspergillus oryzae, hyphal fusion, sexual cycle

講演番号：4A10a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ A 校舎 10 会場

BiFC 法による麹菌 *Aspergillus oryzae* の菌糸融合の解析
Analysis of hyphal fusion in *Aspergillus oryzae* by bimolecular fluorescence complementation
○岡部 知弥[1]、塚崎 和佳子[1]、金 鋒杰[1]、藤井 郁雄[2]、丸山 潤一[1]、北本 勝ひこ[1] ([1]東大院農生科・応生工、[2]阪府大院・理)
○Tomoya OKABE[1], Wakako TSUKASAKI[1], Feng Jie JIN[1], Ikuo FUJII[2], Jun-ichi MARUYAMA[1], Katsuhiko KITAMOTO[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Osaka Pref. Univ.)

【目的】 麹菌 *Aspergillus oryzae* は産業上有用な微生物であるが、有性世代が発見されていないため、複数の優良な形質を併せもつ株を育種することが困難である。このような育種のためには、まず異なる株どうしで菌糸融合を行う必要であるが、我々は以前、2 つの栄養要求性株を利用して、*A. oryzae* の菌糸融合能力を解析することに成功した[1,2]。しかし、この手法では菌糸融合による栄養要求性の相補の確認までに日数を要することが問題であった。そこで本研究では、*A. oryzae* の菌糸融合を BiFC (bimolecular fluorescent complementation)法で解析することを目的とした。BiFC 法とは、2 つのタンパク質それぞれに、分割した蛍光タンパク質を融合させることで、細胞内での相互作用を可視化する手法である。この BiFC 法を応用し、それぞれの融合タンパク質を発現する株どうしを菌糸融合させたのち、蛍光タンパク質の再構成によって菌糸融合体を可視化することを試みた。
【方法と結果】 BiFC 法による解析には、結合することが報告されているタンパク質 LZA と LZB[3]、および蛍光タンパク質 EGFP を使用した。EGFP の N 末側部分と LZA を融合させたタンパク質 NEGFP-LZA、EGFP の C 末側部分と LZB を融合させたタンパク質 CEGFP-LZB をコードする遺伝子を、同時に発現するためのプラスミドを作製した。*A. oryzae* の株にこのプラスミドを導入した結果、NEGFP-LZA と CEGFP-LZB が細胞質で結合して蛍光を発することを確認した。次に、ウリジン・ウラシル要求性株に NEGFP-LZA、アデニン要求性株に CEGFP-LZB をコードする遺伝子を導入した。両株の混合培養で形成した分生子を回収し、ウリジン・ウラシル、アデニンを含まない培地に塗布して生育した菌糸融合体において蛍光が観察された。また、両株を混合培養した後に回収した分生子を直接観察した結果、菌糸融合体に由来し、蛍光を発する分生子が一部存在することを確認した。このことから、混合培養の後の蛍光観察により菌糸融合の有無を確認できたことで、栄養要求性の相補の確認に必要な期間を短縮することに成功した。今後は、栄養要求性を導入していない株で同様の実験を行い、BiFC 法による菌糸融合の解析が有効であるかどうかを検討する予定である。

1) Wada et al. (2013) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* in press.
2) 塚崎和佳子ら、2013 年度日本農芸化学会大会講演要旨 4B13a05
3) Kojima *et al.* (2011) *J. Biosci. Bioeng.* 111:397-401.

Aspergillus oryzae, hyphal fusion, bimolecular fluorescence complementation

講演番号：4A10a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ A 校舎 10 会場

Adjusting the cargo receptor composition of ER-Golgi secretoty pathway for enhancing heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*

○Huy Dung HOANG, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

[Purpose] Owing to its excellent secretory machinery, *Aspergillus oryzae* is a good candidate for recombinant protein production host. However, studies in *A. oryzae* and other *Aspergilli* have found several abnormalities in synthesis and traffic, which discriminate heterologous protein with native protein, generating bottlenecks that cripple the production of heterologous proteins. Previously, we found that disruption of the ER-Golgi cargo receptor AoVip36 and AoEmp47 (AO090026000428 and AO090102000145, respectively) improved the secretion of heterologously expressed α-amylase fused chymosin (AmyB-CHY) and EGFP (AmyB-EGFP) in *A. oryzae* (Ref. 1, 2). Extending this finding, we have investigated the mechanism of cargo receptor inhibition on secretory heterologous proteins and exploited this knowledge to turn the ER-Golgi cargo receptor bottleneck into an accelerator for heterologous protein traffic.
[Results] Analyzing of ER-enriched fraction revealed that disruption of each cargo receptor alleviated the retention of AmyB-CHY and AmyB-EGFP in the ER. Fluorescence microscopy observation revealed that overexpression of mDsRed-AoEmp47, but not mDsRed-AoVip36, together with AmyB-EGFP cause ER accumulation of both proteins. In the light of this new finding, we tried to solve ER exit bottleneck by deleting AoEmp47 and overexpressing AoVip36. Surprisingly, such genetic modification significantly increased the secretion of AmyB-EGFP, suggesting that AoEmp47 plays a key role in retention of heterologous proteins in the ER, but AoVip36 might promote anterograde transport. Together, our data revealed a new bottleneck in heterologous protein production brought forth by a novel role of two cargo receptors, which were previously believed to function in anterograde transport of secretory proteins. Moreover, releasing such bottleneck by altering the two cargo receptor's expression favored significantly the secretion of heterologous proteins, suggesting a novel strategy for improving heterologous proteins.

1) *Hoang HD et al.* (2013) *The Annual Meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry* 4B13a02.
2) *Hoang HD et al.* (2013) *The Annual Meeting of the Society for Biotechnology* 1P-033.

Aspergillus oryzae, secretory pathway, heterologous protein production

講演番号：4A10a17
講演日時、会場：3 月 30 日 11:54～ A 校舎 10 会場

麹菌の *PHO36* ホモログ破壊株を用いた植物由来オスモチンの生産
Production of the plant osmotin by *PHO36* homologue disruptants in *Aspergillus oryzae*
○伊藤 大修[1]、丸山 潤一[1]、永田 宏次[2]、田之倉 優[2]、北本 勝ひこ[1] ([1]東大院農生科・応生工、[2]東大院農生科・応生化)
○Hiromasa ITO[1], Jun-ichi MARUYAMA[1], Koji NAGATA[2], Masaru TANOKURA[2], Katsuhiko KITAMOTO[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Appl. Biol. Chem., The Univ. of Tokyo)

【目的】オスモチンは、植物の防御ペプチドファミリーの PR-5 (Pathogenesis-related proteins of family 5) に属する抗菌活性を持つタンパク質であり、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に対しては、細胞膜上に存在する Pho36p に結合してアポトーシスを誘導する[1)]。また、哺乳類細胞において、糖取込みや脂肪酸代謝を促進するアディポネクチンと類似の活性を示すことが報告されている[1)]。このことから、オスモチンは糖尿病や動脈硬化など生活習慣病を改善する物質として期待されている。

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、長年食品製造に用いられてきたことから安全性が保証されており、大量のタンパク質を培地中に分泌する能力を持つため、異種タンパク質の生産宿主として利用されている。これまでに我々は、トマトおよびイチゴ由来のオスモチンについて *A. oryzae* を用いて生産し、His タグを利用した精製を行った[2)]。しかし、*A. oryzae* の形質転換株の生産能が植え継ぎ中に消失する現象が見られ、オスモチンが糸状菌に対して抗菌活性を示すという報告と関連する可能性が考えられた。本研究では、*A. oryzae* のオスモチン感受性を低下させることにより、安定した生産株の取得を試みた。

【方法と結果】酵母 *S. cerevisiae* Pho36p のアミノ酸配列をもとに *A. oryzae* ゲノムデータベースに対して BLAST 検索を行った結果、相同性の高い順に AO090003000602、AO090026000756 が見出され、*Aopho36A*、*Aopho36B* と命名した。これらがコードするタンパク質はそれぞれ Pho36p と 40%、31%のアミノ酸相同性をもつ。

A. oryzae プロテアーゼ遺伝子 10 重破壊株 NSPlD-ΔP10 [3)] に対して、*pyrG* マーカーを用いてそれぞれの遺伝子の単独破壊株を作製した。さらに、*Aopho36A* 破壊株について 5-FOA 培地を用いたマーカーリサイクリングを行い、再度 *pyrG* マーカーを用いて *Aopho36A*, *Aopho36B* 二重破壊株を作製した。各遺伝子の単独および二重破壊による生育への影響はほとんど見られず、タンパク質生産に利用可能だと考えられた。現在それぞれの破壊株にオスモチン発現プラスミドを導入し、生産を試みている。

1) Narasimhan *et al.* (2005) *Mol. Cell* 17, 171-180.
2) 伊藤ら、2013 年度日本農芸化学会大会講演要旨 2B23a05
3) Yoon *et al.* (2011) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 747-759.

Aspergillus oryzae, heterologous protein production, osmotin

講演番号：4A11a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ A 校舎 11 会場

アルコール依存症患者の糞便から分離した腸内細菌のアセトアルデヒド代謝

Acetaldehyde metabolism by intestinal bacteria isolated from feces of alcoholism

○下山 武文[1]、桑原 明香[1]、山口 晴彦[1]、大島 健志朗[2]、服部 正平[2]、横山 顕[3]、水上 健[3]、堤 絵梨[4]、諏訪 芳秀[4]、戸塚 ゆ加里[5]、中山 亨[1] ([1]東北大院工、[2]東大院新領域、[3]久里浜医療セ、[4]サントリー研究セ、[5]国立がん研究セ)

○ Takefumi SHIMOYAMA[1], Akika Kuwahara[1], Haruhiko Yamaguchi[1], Kenshiro Oshima[2], Masahira Hattori[2], Akira Yokoyama[3], Takeshi Mizukami[3], Eri Tsutsumi[4], Yoshihide Suwa[4], Yukari Totsuka[5], Toru Nakayama[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Tokyo Univ., [3]Kurihama Medical and Addiction Center, [4]Suntory Research Center, [5]National Cancer Center)

【目的】疫学的研究により，習慣的多量飲酒と大腸発がんのリスク増大には明確な相関があることが示されている．この関係が最も顕著に観察される例はアルコール依存症患者であり，同患者における大腸鏡検査による大腸腺腫発見率（54%）と上皮内がんを主とする大腸がん発見率（5.9%）は，アルコール依存症でない健常な被験者（非患者）のものと比較すると格段に高い．習慣的多量飲酒により惹起される上部消化管の発がんについては， ALDH2 ヘテロ不活性型のヒトでとりわけリスクが高く，エタノールの酸化で生じるアセトアルデヒド（AcH）がそのリスク因子となっていることが確実視されている．こうしたことから，習慣的多量飲酒がもたらす大腸発がんのリスク増大についても，大腸内で生成する AcH が関わる可能性が推察され，AcH の生成における腸内細菌の関与も指摘されてきた（1）．しかしながら，腸内細菌のなかでどのような微生物種が AcH を著量生成するのかについて，系統的かつ網羅的に調べた例はない．そこでわれわれは，アルコール依存症患者の糞便から腸内細菌の分離し，個々の分離株について 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析を実施するとともに，それらの AcH 代謝能を調べた．

【実験と結果】馬血清含有 BL 寒天培地を用いた嫌気的培養によって，治療のために来院した断酒後まもないアルコール依存症患者 10 名の糞便からコロニーの性状の違いに基づいて約 800 の腸内細菌を分離した．これらの分離株の 16S rRNA 遺伝子の部分配列を決定し，微生物種を推定した．分離株の AcH 代謝活性を測定するため，細胞濃度をそろえた 0.01 M リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）にエタノールまたは AcH を終濃度でそれぞれ 23 mM，0.05 mM となるように添加し，AcH の生成と分解を in vitro で経時的に追跡した．このようにして得られた各分離株の AcH 生成能と分解能に基づいて，分離株を A～E の 5 群に分類した．このうち D 群（AcH 生成能が高く分解能力が低い）と E 群（AcH 生成能があり，分解能力が認められない）を，大腸内で AcH を蓄積する可能性が高い微生物群（potential acetaldehyde accumulators, PAA）と位置づけた．PAA の細胞密度が 10^9 cfu/ml を超える環境にエタノールが存在すると，その環境の AcH の濃度は変異誘発最小濃度を超える可能性がある．PAA 群の中でも *Collinsella* 属と *Prevotella* 属の AcH 生産能は特に高く，AcH をリスク因子とする大腸発がんモデルではハイリスクグループとして位置づけられた．

【参考文献】

[1] Seitz, H. and Stickel, F.: *Nature Rev. Cancer* **7**, 599-612 (2007)

acetaldehyde, intestinal bacteria, alcoholics

講演番号：4A11a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ A 校舎 11 会場

アルコール依存症患者の糞便中のアセトアルデヒド代謝と網羅的な腸内細菌叢解析

Acetaldehyde metabolism and intestinal microbiota analyses of alcoholics feces

○中山 亨[1]、桑原 明香[1]、斉藤 祐太[1]、下山 武文[1]、須田 亙[2]、大島 健志朗[2]、服部 正平[2]、森田 英利[3]、横山 顕[4]、水上 健[4]、堤 絵梨[5]、諏訪 芳秀[5] ([1]東北大院工、[2]東大院新領域、[3]麻布大、[4]久里浜医療セ、[5]サントリー研究セ)

○Toru Nakayama[1], Akika Kuwahara[1], Yuta Saito[1], Takefumi Shimoyama[1], Wataru Suda[2], Kenshiro Oshima[2], Masahira Hattori[2], Hidetoshi Morita[3], Akira Yokoyama[4], Takeshi Mizukami[4], Eri Tsutsumi[5], Yoshihide Suwa[5] ([1]Tohoku Univ., [2]Tokyo Univ., [3]Azabu Univ., [4]Kurihama Medical and Addiction Center, [5]Suntory Research Center)

【目的】疫学的研究により，習慣的多量飲酒と大腸発がんのリスク増大には明確な相関があることが示されている．以前の研究で，ヒト（健常者）の糞便にエタノールを添加すると変異誘発最小濃度（50 μM）を超えるアセトアルデヒド（AcH）が生成することが示され，糞便中の AcH が大腸発がんのリスク因子であると考えられてきた (1)．またエタノールを投与されたラットの糞便のエタノール消費速度が，抗生物質投与で有意に減少することから，AcH 生成における糞便微生物の重要性も示唆されてきた (2)．しかしながら，習慣的多量飲酒者で大腸発がんのリスクが著しく高いアルコール依存症患者において，糞便中の AcH 濃度やその動態を調べた例はなく，また同患者と非患者の腸内細菌叢を比較した例もない．本報告では，アルコール依存症患者の糞便中の AcH 濃度やその代謝能を調べるとともに，同患者と非患者の腸内細菌叢を次世代シーケンサーで網羅的に比較した．

【実験と結果】アルコール依存症患者（治療のために来院した断酒後まもない患者 10 名）とアルコール依存症でない健常な被験者（非患者，8 名）の糞便中の AcH およびエタノールの濃度を測定した．またこれらの被験者の糞便にエタノールまたは AcH を添加し，それらの濃度変化も追跡した．分析の結果，患者の糞便中の AcH 濃度は，非患者の同濃度よりも有意に低く，AcH の変異誘発最小濃度を大きく下回った．また，エタノールからの AcH の生成速度も，患者の糞便の方が非患者の値より有意に小さいことがわかった．次に患者および非患者の糞便中の腸内細菌叢を次世代シーケンス解析で網羅的に比較した．その結果，アルコール依存症患者の菌叢構造は非患者のものとは有意に異なることがわかった．前の講演で同定された PAA 群の総数はアルコール依存症患者において有意に少なかった．これらの結果は，患者における大腸発がんのリスク増大の原因について別の因子を模索する必要性を示唆している．また大腸がんが上皮性の悪性腫瘍であることから，大腸粘膜上での微視的・局所的・持続的な AcH 生成が発がんの引き金をもたらす可能性についても考慮すべきであると考えられた．

【参考文献】

[1] Jokelainen, K. et al. *Gut* **35**, 1271-1274 (1994)
[2] Nosova T. et al. *Alcohol Alcohol* **34**, 48-54 (1999).

intestinal microbiota, acetaldehyde, alcoholics

講演番号：4A11a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ A 校舎 11 会場

アセトアルデヒド蓄積微生物によるバイオフィルム形成と酸化ストレス応答

Biofilm formation and the effects of an oxidative stress on acetaldehyde production by intestinal bacteria

○鶴谷 篤生[1]、菅 将吾[1]、斎藤 祐太[1]、坪 嵩久[1]、天間 ナツキ[1]、稲井 真[1]、高橋 征司[1]、下山 武文[1]、横山 顕[2]、水上 健[2]、中山 亨[1] ([1]東北大院工、[2]久里浜医療センター)
○Atsuki Tsuruya[1], Shogo Suga[1], yuta Saitou[1], Takahisa Tsubo[1], Natsuki Tenma[1], Makoto Inai[1], Seiji Takahashi[1], Takefumi Shimoyama[1], Akira Yokoyama[2], Takeshi Mizukami[2], Toru Nakayama[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Kurihama Medical and Addiction Center)

【目的】大腸がんを高頻度に発症するアルコール依存症患者の糞便のアセトアルデヒド（AcH）の濃度は著しく低く，その変異誘発最小濃度を大きく下回る．また，エタノールからの AcH の生成速度も，同患者の糞便の方が非患者の値より有意に小さい．このことは，糞便そのものに含まれる AcH は直接的なリスク因子とはならない可能性を示唆している．一方，同患者の糞便から分離した微生物株の生化学解析によって，大腸内で AcH を蓄積する可能性のある微生物（PAA）が見いだされた．大腸がんが上皮性の悪性腫瘍であることから，これらの微生物による大腸粘膜上での微視的・局所的・持続的な AcH の蓄積が大腸発がんの引き金となる可能性が考えられた．大腸管内壁近傍は微好気性であるとされ（1），大腸粘膜へのエタノール投与により活性酸素種（ROS）が生成することも示されている（2）．そこでわれわれは，大腸粘膜上にバイオフィルムを形成した PAA が酸化ストレス受け，そのストレス応答の一環として，恒常的に存在するエタノールから AcH を生成するモデルを考え，このモデルの妥当性を検証するための実験を行った．

【方法と結果】アルコール依存症患者の大腸腺腫や腫瘍上に，PAA のバイオフィルムが存在するか否かをいくつかの方法で観察した．次世代シーケンサーを用いて，患者の大腸腺腫定着微生物と非定着（糞便）微生物の菌叢解析を行ったところ，定着微生物のなかに PAA のひとつ *Ruminococcus* 属細菌が多く存在することがわかった．大腸腺腫表面の SEM および FISH 解析によって，大腸粘膜表層への PAA の定着が確認され，これらはバイオフィルムを形成していると考えられた．また ROS のひとつとして過酸化酸素を取り上げ， PAA 微生物細胞による嫌気的条件下での AcH 生成に対する ROS の添加効果を調べた．その結果，ROS 存在下では，非存在下の場合と比較して AcH 生成量が 900 倍ほど増加する PAA の存在が明らかになった．これらの PAA の酸化ストレス応答における AcH 代謝の役割と上述のモデルにおける意義について考察した．

【参考文献】
[1] Wilson, M.: The gastrointestinal tract and its indigenous microbiota. pp. 251-317 (2004)
[2] Bagchi, D. *et al.*: *J. Appl. Toxicol.***18**, 3-13 (1998)

acetaldehyde, intestinal bacteria, oxidative stress

講演番号：4A11a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ A 校舎 11 会場

水平伝播を利用したクローニングシステム(CMM)の汎用性

A versatile designed horizontal gene-transfer system by natural transformation, named as Culture Mix Method (CMM) for genomic syntheses.

○金子 真也[1]、板谷 光泰[2] ([1]東工大・生命理工、[2]慶応大・先端生命研)
○Shinya KANAKO[1], Mitsuhiro ITAYA[2] ([1]Dept. of Life Science, Tokyo Tech., [2]Inst. Adv. Biosci. Keio Univ.))

微生物間で行われるDNAの水平伝播において細胞外核酸を介して行われる自然形質転換は供与菌の生死を問わず、放出されたDNAの安定性に依存して幅広い遺伝情報(DNA)の移動が可能となる現象である。我々はこれまでに大腸菌ラムダ溶原株を供与菌として用いて溶菌を誘導し、溶菌液中に自然形質転換能を持つことで知られる枯草菌を共存させて混合培養を行うことで、供与菌(大腸菌)から放出されたプラスミドDNAを効率よく受容菌(枯草菌)に移動させるシステムを構築した(1-3)。

Culture Mix Method(CMM)と称するこのシステムの汎用性を拡大させるため、λgt10を用いたビルレントファージ(virulent phage)による溶菌システムの構築を試みた。感染させるファージの量と大腸菌の培養条件を調整することで、効率よく供与菌を溶菌させ、プラスミドDNAを受容菌である枯草菌へ移行させることに成功した。これにより培養温度を一定(37℃)として供与菌(大腸菌)から受容菌(枯草菌)へ簡便にDNAを水平伝播させることが可能となった。様々な大腸菌株で枯草菌への水平伝播実験を行った結果、ヌクレアーゼ(endA1) 欠損株を用いることで、溶菌後17～18時間経過してもプラスミドDNAが分解されず、安定に枯草菌を形質転換できることを見出した。通常使用されている大腸菌株はendA欠損株であることが多く、一般の大腸菌DNAライブラリーにおいて非常に安定的にまた簡便に運用できるものと期待される。

(1) Kaneko S. and Itaya M. (2010) *J. Biochem.* **147**: 819-822.
(2) Itaya M. and Kaneko S. (2010) *Nucleic Acids Research* **38**: 2551-2557.
(3) Kaneko S. and Itaya M. (2010) *Nucleic Asids and Molecular Biology* **25**:39-53 (Springer).

horizontal gene transfer, natural transformation, Culture mixed method

講演番号：4A11a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ A 校舎 11 会場

Bacillus cereus 細菌芽胞を標的とした DNA アプタマーの構築

Selection and characterization of DNA aptamer against Bacillus cereus spore

○海谷 慎一[1,2]、梅影 創[1]、菊池 洋[1] ([1]豊橋技科大、[2]（公財）科技財団)
○Shinichi KAIYA[1,2], Sou UMEKAGE[1], You KIKUCHI[1] ([1]Toyohashi Univ. of Tech., [2]ASTF)

【目的】アプタマーは、金属イオンや低分子有機化合物、ペプチド、タンパク質、ウイルス、バクテリアなどといった幅広い物質に対して特異的に結合する核酸分子やペプチドを指し、酵素機能の制御や、特定物質の捕集や標識などに使用される。我々は、近年食品衛生問題が大きく取りざたされている背景を受け、アプタマーを用いた食中毒原因菌検出に注目している。本研究では食中毒原因菌の一つである *Bacillus cereus* 細菌芽胞に特異的に結合する DNA アプタマーの取得を目的とした。
【方法】アプタマーの構築は、SELEX（Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment）法により行った。内部に 48 塩基のランダム DNA 配列を持つ全長 88 塩基の DNA プールから、*Bacillus cereus* NBRC15305^{T} の芽胞体をアプタマーの標的として、SELEX を 18 ラウンド行った。9 ラウンド目と 18 ラウンド目の集積 DNA プールを精製し、クローニング解析に供試した。得られた DNA 配列をアプタマー候補配列とした。
【結果・考察】SELEX 法では、セレクションラウンドを繰り返すことで芽胞表層に結合する DNA アプタマーが集積していくと考えられたが、ラウンドを進めるにつれ DNA プールの塩基長にばらつきが見られた。目的長のバンドが集積していた 9 ラウンド目と、目的長を含む複数の鎖長の DNA に集積していた 18 ラウンド目から、アプタマー候補配列をクローニングした結果、ラウンドを進めすぎることで、内部配列にプライマー結合配列を持つ DNA プールや、DNA 同士が交差し、長塩基に変異していると思われる DNA 配列が蓄積する可能性が示された。しかし、目的長の PCR バンドからは、9 ラウンド目と 18 ラウンド目に置いて、それぞれ 4 種類のアプタマー候補配列が得られた。アプタマー配列は 1 種類が重複しており、合計 7 種類だった。RNA structure v5.4（Mathews Lab）を用いて、得られた 7 種類のアプタマー候補配列の二次構造予測を行った結果、これらの配列は大きく 3 種類の形状に分けることができた。これらのタイプを Apt11 タイプ、Apt20 タイプ、Apt25 タイプとして分類した。結合予測部位の確率分布解析の結果、Apt11 タイプは構造が強固であり形状がほぼ一律化していると示されるのに対し、Apt20 タイプと Apt25 タイプは結合予測部位の確率分布が幅広く広がっており、多様な構造を取りやすいことが示された。蛍光標識したアプタマー候補配列を用いて、結合率試験を行ったところ、Apt20 の結合率が最も高く、またこの候補配列を用いて、蛍光顕微鏡観察を行ったところ、実際に *Bacillus cereus* 細菌芽胞に特異的に結合することが分かった。以上から、Apt20 は *Bacillus cereus* 細菌芽胞に特異的に結合能を有する DNA アプタマーであることが確かめられた。

DNA aptamer, Bacillus cereus, Bacteria cell-SELEX

講演番号：4A11a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ A 校舎 11 会場

黄色ブドウ球菌の 2 成分性膜孔形成血球崩壊毒素 S 型成分の細胞特異性に関与する領域の解析(2)

Analysis of regions involving hemolysis in S-components of Staphylococcal bi-component toxins (2)

○竹下 珠由[1]、長崎 由依[1]、神尾 好是[2]、田中 良和[3]、金子 淳[1]([1]東北大院農、[2]尚絅学院大健康栄養学、[3]北大院先端生命科学)
○MIYU TAKESHITA[1], YUI NAGASAKI[1], YOSHIYUKI KAMIO[2], YOSHIKAZU TANAKA[3], JUN KANEKO[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Shokei Gakuin Univ., [3]Hokkaido Univ.)

【背景・目的】黄色ブドウ球菌の二成分性膜孔形成毒素群は、F 型成分および S 型成分という二成分の存在下でのみ血球崩壊活性を示す。F 型成分である LukF はγ-ヘモリジン(Hlg)とロイコシジン(Luk)の共通成分であり、その赤血球結合にはホスファチジルコリン(PC)結合ドメインと血球に接する rim ドメインのループ上に存在する Y72 が重要である。一方、血球特異性を規定している S 型成分は PC 結合ドメインを欠き、血球認識・結合に関わる領域は不明であった。我々は各種 S 型成分の 1 次構造が大きく異なる領域が標的細胞に接する rim ドメインのループ領域に該当することに注目し、ヒト赤血球に対して強い溶血活性を示す Hlg の S 型成分 Hlg2 と３つの rim ドメインループ(loop1: Lys_{64}-Tyr_{67}, Loop2: Asn_{167}-Gly_{168}, Loop4: Val_{240}-Arg_{244})を、ヒト白血球特異的な Panton-Valentine leukocidin (PVL)の S 型成分 LukS-PV の相当する領域に部分的に入れ替えた変異毒素、HSL1, HSL2, HSL4 を作成した。その結果 HSL4 は標準反応条件でヒト赤血球崩壊活性を失い、Hlg２のループ 4 が赤血球経の結合に重要であることを見いだし、昨年度の大会で報告した。今回はさらに進めて、標的細胞認識と活性発現に必要な毒素成分上の最小領域の同定を試みた。

【方法・結果】

Hlg2 は赤血球崩壊能力に加え、白血球上でも膜孔を形成する。ヒト末梢血から調製した多形核白血球に対して LukF とともに Hlg2 およびその変異体を作用させ、顕微鏡下で膜孔形成に伴う細胞の膨潤を観察した。その結果 HSL4 は Hlg2 と同様の白血球崩壊活性を示し、ループの置換は白血球方形活性に影響しないことが明らかになった。次にループ４を構成する５つの残基 V, T, R, H, R について、それぞれを LukS-PV の対応する Y, G, N, S, Y へと 1 残基ずつ置換した変異体を作成し、赤血球崩壊活性に与える影響を調べた。その結果、HSV240Y, HST241G は活性の低下が見られなかったのに対し、HSR241N、HSH242S、HSR243Y ではそれぞれ活性がほぼ半減し、Hlg2 の $R_{242}HR_{244}$ が赤血球崩壊活性に重要であること示唆された。現在、これら３残基を LukS-PV 型に変換した変異体を作成中である。

一方、逆に LukS-PV のそれぞれのループ領域を Hlg2 型に全て入れ換えた SPVL124 では明らかな赤血球崩壊能を示す。しかし Hlg２に比べて高い毒素量と、長い時間を要する。我々は Hlg２の赤血球崩壊に関わる領域として既に同定している $K_{52}RLAI_{56}$ (D 領域)に注目した。この領域は rim ドメインではなく、膜孔形成時に側面に露出する。現在、SPVL124 に D 領域を導入した変異体 (SPVL124+D) および Hlg2 から D 領域を除いた変異体を構築し、赤血球崩壊能を解析している。

staphylococcal bi-component toxin, gamma-hemolysin, Panton Valentine Leukocidin

講演番号：4A11a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ A 校舎 11 会場

アカマツ菌根圏土壌の抗菌活性物質

An antimicrobial compound from mycorrhizal zone soils of *Pinus densiflora*

○西野 勝俊[1]、城 美沙緒[1]、大泉 一也[1]、藤田 徹[2]、山田 明義[3]、田中 千尋[1]、笹森 貴裕[4]、時任 宣博[4]、平井 伸博[1]([1]京大院農、[2]京都府農水技セ、[3]信州大農、[4]京大化研)
○Katsutoshi NISHINO[1], Misao SHIRO[1], Kazuya OIZUMI[1], Toru FUJITA[2], Akiyoshi YAMADA[3], Chihiro TANAKA[1], Takahiro SASAMORI[4], Norihiro TOKITOH[4], Nobuhiro HIRAI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Technology Center, [3]Shinshu Univ, [4]Institute for Chemical Research, Kyoto Univ.)

【目的】アカマツ（*Pinus densiflora*）の生育に適した土壌は、水はけがよく、貧栄養の、いわゆるやせ土である。このような土壌で生育出来る理由として、水の消費量が少ないこと、および根系が広く、細根に外生菌根を付けているため、広範囲の土壌から栄養分を吸収できることが挙げられる。マツタケ（*Tricholoma matsutake*）はアカマツ菌根菌の一つとして知られており、その子実体はアカマツを中心に環状に形成される。この輪のことはフェアリーリングと呼ばれており、このフェアリーリングとその内部の土壌には菌根や菌糸を含むマツタケ菌のコロニーが形成されている。この土壌のことをシロという。シロは、毎年約 10–15 cm ずつ外側へと菌糸の伸長とともに拡大していき、先端は最も生育の活発な菌根量が多く、活性菌根帯と呼ばれる。活性菌根帯から採取したシロは、グラム陰性菌や枯草菌に対して抗菌活性を示す一方、培養菌糸や子実体、シロ外部土壌の根には抗菌活性が認められていない。これまで、シロに含まれる抗菌活性物質本体はα-pinene やβ-pinene などのモノテルペンと推測されていた。しかし、我々による追試の結果、これらのモノテルペンは活性物質本体ではないことが明らかとなった。本研究では、シロに含まれる抗菌活性物質を単離、同定することを目的とした。

【方法と結果】抗菌活性は、枯草菌を用いてペーパーディスク法で行った。シロの EtOAc、MeOH および 20% MeOH 抽出物の抗菌活性を調べたところ、20% MeOH 抽出物が一番強い活性を示した。このことから、本抗菌活性物質は水溶性であると考えられた。20% MeOH 抽出物を ODS カラム（H_2O-MeOH）を用いて精製すると、0% MeOH 区に抗菌活性成分が溶出した。0% MeOH 溶出物をアニオン交換樹脂の TOYOPEARL DEAE ゲルにより精製（0–300 mM HCl）した結果、抗菌活性は 100 mM HCl 溶出物に認められた。この活性画分は酸性を示したこと、ならびに ^{1}H NMR スペクトルで有意なシグナルが検出されないこと、^{13}C NMR スペクトルでカルボニル炭素に由来するシグナルが認められたことから、主成分は四級炭素のみから成る有機酸と推定した。この主成分を結晶化後、X 線構造解析によりシュウ酸と同定した。シュウ酸は抗菌活性を有することから、抗菌活性本体もシュウ酸であると考えられた。しかし、抗菌活性画分の活性の強さは、そこに含まれるシュウ酸よりも明らかに強かった。主な抗菌活性物質はシュウ酸以外の物質であると推定される。

Pinus densiflora, mycorrhiza, oxalic acid

講演番号：4A11a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ A 校舎 11 会場

麹菌が産生する hydrophobin RolA と固体表面間の相互作用に関する研究
Analysis of the interaction between Aspergillus oryzae hydrophobin RolA and solid surfaces.
○田中 拓未[1]、田邊 弘毅[1]、高橋 徹[2]、冨樫 貴成[3]、有田 稔彦[4]、阿部 敬悦[1,2] ([1]東北大院農、[2]東北大・未来研、[3]山形大理、[4]東北大・多元研)
○Takumi Tanaka[1], Hiroki Tanabe[1], Toru Takahashi[2], Takanari Togashi[3], Toshihiko Arita[4], Keietsu Abe[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ, [2]NICHe., Tohoku Univ., [3]Dept. Sci., Yamagata Univ., [4]IMRAM., Tohoku Univ.)

【背景・目的】　麹菌 *Aspergillus oryzae* は，生分解性ポリエステル PBSA(Polybutylene succinate-co-adipate)を唯一の炭素源として培養すると，PBSA 分解酵素の cutinase CutL1 と共に，界面活性蛋白質である hydrophobin RolA を発現する。RolA は PBSA に吸着した後，CutL1 を PBSA 表面にリクルートすることで，PBSA 分解効率を上昇させている(1)。さらに，hydrophobin は，固体表面の湿潤性を逆転させることや，免疫学的に不活性であることが示されており，機能性ナノ粒子などの材料表面加工への応用が期待されている。一方で，様々な特性を有する固体表面と hydrophobin との相互作用機構や，その 吸着 kinetics の詳細は不明である。現在までに我々は，①RolA の Leu137, Leu142 が PBSA への結合に重要，②pH4-10 での PBSA への RolA の親和性は pH4 で最大，③PBSA 微粒子の pH4-10 でのゼータ電位は中性で負，酸性で 0 に近づく，という結果を得た。また，RolA の予測等電点が pH4.8 であることから，PBSA への RolA 吸着において“疎水的相互作用”が正に，“負電荷の静電反発”が負に働く可能性が推察された。本報告では，PBSA をはじめとした種々の固体表面に対する RolA の相互作用機構を解析し，RolA と固体表面の相互作用機構について考察する。
【方法】　分子間相互作用解析装置 QCM のセンサーである金表面を，様々な化学性質を持つ物質で被覆し，その表面に対する RolA の吸着を，pH4，7，10 で評価した。また，pH3-10 の条件下において，野生型 RolA のゼータ電位を測定した。
【結果・考察】　正電荷表面に対する親和性は pH4，7 で無荷電性表面より上昇し，pH10 で低下した。負電荷表面に対しては他の表面よりも RolA 低濃度条件での吸着量が少なかったが，吸着が始まると急激に吸着量が増加した。また，RolA 吸着 kinetics は pH と固体表面の荷電性の両方に依存して変化したが，高 pH 条件よりも低 pH 条件の方が RolA の親和性が高かった。さらに，RolA のゼータ電位は pH 低下に伴って上昇し，約 pH4.8 で等電点に至った。以上から，固体表面への RolA の親和性において，固体表面の疎水性及び正電荷が吸着に，固体表面と RolA の負電荷が反発に働く可能性が示唆された。また，RolA は両親媒性であり，荷電性アミノ酸に富む領域と疎水性アミノ酸に富む領域を持つことから，固体表面の荷電性に依存して RolA の接地配向性が異なり，吸着 kinetics が影響を受けている可能性が推察された。現在，固体表面の疎水度を変えた場合の RolA 吸着 kinetics や，固体表面の荷電性による RolA の接地配向性を検証している。

(1) Takahashi *et al.*, *Mol Microbiol.* 57: 1780-1798 (2005)

Aspergillus oryzae, Hydrophobin, QCM

講演番号：4A11a17
講演日時、会場：3 月 30 日 11:54～ A 校舎 11 会場

世界のパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の多様性(2)
Diversity of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the bread of the world(2)
○長野 宏子[1]、村山 美穂[2]、井上 英治[2]、鈴木 徹[1] ([1]岐阜大連農、[2]京都大理学)
○Hiroko NAGANO[1], Miho MURAYAMA[2], Eiji INOUE[2], Tohru SUZUKI[1] ([1]Gifu Univ., [2]kyoto Univ.)

【目的】パンは昔から世界中で食され、饅頭、包子、ナン、チャパティなど多種類の伝統的なパンが、製造されている。現代では、パンの発酵には、パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が一般的に使われている。しかし、世界各地で伝統的に作られているパン中の微生物は多種である。今回は、世界各地から採集した「パン欠片」に存在するパン酵母と保存株 *Saccharomyces cerevisiae* との遺伝学的解析の可能性を探ることを目的とした。 パン欠片の *S. cerevisia* の系統樹から、調理加熱法（焼く、揚げる、蒸す）により異なるか？地理的な要因によるのか？パンの材料によるのか？ または、人々の移住によるのか？探ることも行うこととした。

【方法】1）研究対象パン酵母 *Saccharomyces cerevisia* は、NBRC から、パンの欠片は 1990 年代から現在まで世界各地から入手した 200～300 欠片である。2）パン中の微生物は、パンをライト染色液で染色し、光学顕微鏡(接眼レンズ 10 倍、対物レンズ 100 倍)で観察した。3）*S. cerevisiae* 保存菌株、パン欠片からの DNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN)を用い、微生物の DNA 抽出を行った。4）*S .cerevisiae* のマイクロサテライト6領域を PCR 後、その産物の長さを DNA シークエンサーで測定した。5）マイクロサテライト6領域のアリル頻度のデータから近隣接合法により、系統樹を作成した。

【結果】1）採集したパン欠片の微生物は、顕微鏡観察の結果、多くの試料で卵型の酵母や桿菌等が確認でき、数種類の微生物が発酵に関与していた。2）*S. cerevisiae* 保存菌株、市販・天然酵母、特に焼成したパンやパン欠片からの DNA 抽出は可能であった。3）マイクロサテライト解析後、系統樹を作成した結果、日本の市販天然酵母とそれを用いたパンは近い位置を示し、妥当性のある解析法であることが明らかになった。4）世界中のパン欠片のアリル頻度に基づく系統樹はアジアグループ、ヨーロッパグループ、多型の少ないグループの 3 クラスターを形成した。5）ヨーロッパグループに、ラオスやベトナムやガーナのパンが入っており、人々の動きも反映された。さらに、試料を増やし、調理法、地理的要因、歴史の面からの検討を行っている。

bread, *Saccharomyces cerevisiae*, Genetic analysis

講演番号：4A14a01
講演日時、会場：3 月 30 日 09:00～ A 校舎 14 会場

ヒト腸内細菌 *Prevotella copri* のキシラナーゼ 10B の特性解析
Characterization of xylanase 10B from *Prevotella copri*
○田中 芳貴[1]、今井 裕也[2]、小林 海渡[2]、林 秀謙[1,2] ([1]前工大院工、[2]前工大工)
○ Yoshiki TANAKA[1], Yuya IMAI[2], Kaito KOBAYASHI[2], Hidenori HAYASHI[1,2] ([1]Maebashi Inst.Technol., [2]Maebashi Inst. Technol.)

【背景・目的】 食物繊維は消化、吸収を受けることなく大腸に達し、大腸内細菌の糖質加水分解酵素により分解され、短鎖脂肪酸に変換される。短鎖脂肪酸の一つである酪酸は発ガン、炎症性疾患の抑制、腸管上皮細胞の代謝などの役割を果たしている。ヒトの糞便より単離した *Prevotella copri* は、ヒト腸内に高頻度に存在していると報告されており、ゲノム DNA 配列の決定がなされ、食物繊維分解に関与する糖質加水分解酵素遺伝子を多数保有している。今回は糖質加水分解酵素のキシラナーゼ 10B(Xyn10B)の性質について報告する。Xyn10B はファミリー10 に属する触媒ドメインが、約 300 アミノ酸からなる機能未知の配列により分断されている。この配列を除いた、触媒ドメインのみの改変キシラナーゼ(Xyn10B-1)においても、酵素の性質について報告する。
【方法】 *P. copri* よりゲノム DNA の抽出を行い、*xyn10B* を PCR により増幅した。*xyn10B* 遺伝子を大腸菌で発現させ、Xyn10B の至適 pH、至適温度、熱安定性および pH 安定性、基質特異性などの解析を行った。さらに、TLC によるキシロオリゴ糖の分解産物の解析を行った。また、Overlap Extension PCR を用いて、触媒ドメインのみをつなげた改変キシラナーゼ(*xyn10B-1*)を構築した。Xyn10B-1 を大腸菌で発現させて精製し、解析を行った。Xyn10B および Xyn10B-1 の基質に対する吸着を比較するため、Native-affinity PAGE および吸着実験を行った。
【結果および考察】 精製した Xyn10B を SDS-PAGE により確認したところ、単一バンドまで精製され、分子量は約 80,000Da であった。これは推定される分子量と一致した。また、Xyn10B-1 では約 48,000Da であり、推定される分子量と一致していた。Xyn10B の性質は、至適 pH6.0、至適温度 50℃、熱安定性は 55℃まで、pH 安定性は pH3～pH11.5 まで 80%以上の活性を示し、キシランに対する比活性は 18.82±0.38U/mg であった。Xyn10B-1 では、至適 pH6.0、至適温度 60℃、熱安定性は 60℃まで、pH 安定性は pH2.5～pH11.5 まで 80%以上の活性を示し、キシランに対する比活性は 13.54±0.17U/mg であった。Xyn10B と比較すると、pH に対する性質は変わらなかったが、温度に関しては、至適温度が 10℃、安定性が 5℃上昇する結果となった。キシロオリゴ糖[X2～X6]の分解産物は Xyn10B、Xyn10B-1 共に同様の結果となり、X3 以上の鎖長での主な分解産物は X2、X1 であり、X2 においては、ほぼ分解されていなかった。Native-affinity PAGE と吸着実験の結果、Xyn10B とキシランの吸着は確認できたが、Xyn10B-1 では吸着が見られなかった。このことから、Xyn10B の触媒ドメイン間の配列は基質との結合に関与する、carbohydrate binding module(CBM)だと考えられる。

Prevotella copri, xylanase

講演番号：4A14a02
講演日時、会場：3 月 30 日 09:11～ A 校舎 14 会場

ヒト腸内細菌 *Prevotella copri* のキシラナーゼ 10B 由来の新規 CBM の機能解析

Characterization of Novel CBM from Xyn10B of *Prevotella copri* which is Human Gut Bacteria.

○小林 海渡[1]、今井 裕也[1]、田中 芳貴[2]、松尾 一郎[3]、林 秀謙[1] ([1]前工大工、[2]前工大院工、[3]群馬大理工)
○Kaito KOBAYASHI[1], Yuya IMAI[1], Yoshiki TANAKA[2], Ichiro MATSUO[3], Hidenori HAYASHI[1] ([1]Maebashi Inst. Technol., [2]Maebashi Inst. Technol., [3]Gumma Univ.)

【背景・目的】ヒトの腸内細菌である *Privotella copri* はゲノム DNA 上に複数のキシラナーゼをコードしている．そのうちの 1 つ Xyn10B は，ファミリー10 に属する触媒ドメインが機能未知の約 300 アミノ酸からなる挿入配列で分断されているという珍しい構造を有しており，これまでの研究でこの挿入配列は Carbohydrate binding module(CBM)であることが示唆された.本研究では,*P. copri* の Xyn10B に含まれる CBM であると推測される挿入配列の特性解析を目的とする.
【方法】*P. copri* の Xyn10B の機能未知挿入配列のみを大腸菌内で発現させ，精製したタンパク質を用いて定性結合実験及び Native-affinity PAGE を行った．また，*Bacteroides* グループに属する細菌が生産するキシラナーゼの中には触媒ドメインが挿入配列で分断されているものがあり，その挿入配列は繰り返し配列から構成されている.そのため,*P. copri* の Xyn10B の機能未知挿入配列を 2 つに分け，前半部分を CBM1(約 150 アミノ酸)，後半部分を CBM2(約 150 アミノ酸)とし，CBM1 及び CBM2 遺伝子を大腸菌で発現させ精製したタンパク質を用いて特性解析を行った．分子量を MLDI-TOFMS で測定し，各種キシラン及びセルロースへの吸着特異性を調べるために，定性結合実験及び Native-affinity PAGE を行った．また，結合定数 K_a を求めるために，キシロオリゴ糖(Xylohexaose, Xylopentaose, Xylotetraose)を用いて CBM2 の isothermal titration calorimetry(ITC)を行った.
【結果及び考察】*P. copri* の Xyn10B の機能未知挿入配列のみを発現させたタンパク質は，定性結合実験及び Native-affinity PAGE の結果より CBM であることが示唆された．精製した CBM1 と CBM2 の分子量を MALDI-TOFMS で測定した結果，推定分子量と一致した．定性結合実験では CBM1 と CBM2 のいずれもキシラン(beechwood xylan, birchwood xylan, oat-spelt xylan)に対して吸着したが，セルロース(Avicel，リン酸膨潤セルロース)には吸着するものとしないものがあった．Native-affinity PAGE では,CBM1 は oat-spelt xylan のみに弱い吸着を示し,CBM2 では用いたキシラン全て(beechwood xylan, birchwood xylan, oat-spelt xylan)に強い吸着を示した．基質による吸着性の違いは，キシランの側鎖の違いから生じる影響である可能性がある．また，この結果より，CBM1 と CBM2 のぞれぞれが CBM であることが示唆され，*P. copri* の Xyn10BXyn の機能未知挿入配列は 2 つの CBM から構成されていることが判明した.CBM2 の ITC では,キシロオリゴ糖に対して吸着性を示した.このことからも,*P. copri* 由来 Xyn10B の挿入配列は CBM であると考えられ，特に CBM2 はキシランに対して強い吸着性を持っている.

xylanase, CBM, *Prevotella copri*

講演番号：4A14a03
講演日時、会場：3 月 30 日 09:22～ A 校舎 14 会場

Variovorax sp.由来、及び *Burkholderia* sp.由来組換えβ-Phe アミノアシラーゼの性質解析

Characterization of the recombinant beta-phenylalanine aminoacylases derived from *Variovorax* sp. and *Burkholderia* sp.

○山崎 穣、竹澤 俊大、加藤 雄己、橋本 賢一、川崎 寿、夏目 亮、中松 亘（東電大院工）
○Yutaka YAMASAKI, Toshihiro TAKEZAWA, Yuki KATO, Kenichi HASHIMOTO, Hisashi KAWASAKI, Ryo NATSUME, Tsuyoshi NAKAMATSU (Tokyo Denki Univ.)

【背景】*R* 体の β-フェニルアラニン(*R*-β-Phe)は、抗がん剤の一種 TAXOL の原料となる有用な物質である。β-Phe は化学合成法で合成できるがラセミ体として得られるため、光学異性体の一方だけの β-Phe を得るには、ラセミ体の β-Phe（あるいはその誘導体）を光学分割する必要がある。環境に対して低負荷な方法で β-Phe を光学分割するプロセスの開発を念頭に、我々は、アミノ基をアセチル化した β-Phe((*R,S*)-*N*-Ac-β-Phe)の *R* 体のみをキラル特異的に加水分解できる酵素 *R*-β-Phe アミノアシラーゼ (*R*-β-PheAA)に着目した研究を行っている。本酵素活性を利用して *R*-β-Phe を光学分割する本法の利点は、(i)反応で生じる副産物が酢酸のみであること、(ii)別の部位を化学修飾した β-Phe を基質に用いて光学分割するよりも高いキラル特異性が見込めること、である。*R*-β-PheAA の生産菌として *Variovorax* sp. 及び *Burkholderia* sp. が得られ、両微生物由来 *R*-β-PheAA 遺伝子がクローニングされた。Cold ショックプロモーターを利用し、それぞれの酵素を His-Tag 付加及び Tagfree で高発現させる発現系を構築した。

【目的】本研究では *Variovorax* sp. 由来、及び *Burkholderia* sp. 由来 *R*-β-PheAA を組換え発現させて精製し、酵素反応の至適温度、至適 pH、至適 Buffer の種類を検討したうえで、比活性と熱処理後の残存活性を分析する。His-Tag 付加による酵素活性への影響について評価し今後の解析で His-Tag 付加酵素と Tagfree 酵素のどちらを用いるべきかを判断する。

【方法・結果】*Variovorax* sp. 由来、及び *Burkholderia* sp. 由来の His-tag 付加の酵素については Ni アフィニティー、強陰イオン交換、ゲルろ過の 3 段階のカラムクロマトグラフィーで精製した。また Tagfree の両酵素については、弱陰イオン交換、強陰イオン交換、ゲルろ過の 3 段階のカラムクロマトグラフィーで精製した。酵素の至適反応条件については *Variovorax* sp. 由来の His-Tag 付加 *R*-β-PheAA では 50℃、pH 7.07、HEPES-OH Buffer の条件で比活性が最大になった。また *Variovorax* sp. 由来の Tagfree 酵素について同条件で比活性を算出したところ、His-Tag 付加酵素の倍以上の比活性を有することが分かった。より詳細な分析が必要であるが *Variovorax* sp. 由来酵素については Tagfree 酵素を用いて今後の研究を行うべきかもしれない。*Burkholderia* sp. 由来の His-Tag 付加 *R*-β-PheAA では 65℃、pH 7.79、HEPES-OH Buffer の条件で比活性が最大になった。

beta-phenylalanine, aminoacylase, enantioselective resolution

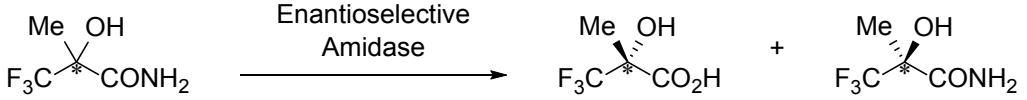
講演番号：4A14a04
講演日時、会場：3 月 30 日 09:33～ A 校舎 14 会場

立体選択的にα-トリフルオロメチル乳酸アミドを加水分解する微生物酵素の精製と遺伝子クローニング、大腸菌による大量発現

Purification, gene cloning and expression of enantioselective amidase acting on α-(trifluoromethyl)lactamide

○渡部 俊介[1]、冨宿 賢一[1]、西井 哲郎[3]、石井 章央[3]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO、[3]セントラル硝子)
○Shunsuke WATANABE[1], Ken-ichi Fuhshuku[1], Tetsuro Nishii[3], Akihiro Ishii[3], Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO, [3]Central Glass Co., Ltd.)

【目的】構造内にフッ素原子を含む化合物は、フッ素原子の大きな電気陰性度に起因する顕著な特性を示すことが多く、近年フッ素原子を有する合成原料の需要は増している。このような状況下、光学活性なα-トリフルオロメチル乳酸は、医薬品や農薬などの合成原料として非常に有用であり、両鏡像体の簡便な合成法の開発が望まれている。我々はこれまでにα-トリフルオロメチル乳酸アミドに作用する立体選択的なアミダーゼを微生物から探索し、(*R*)-体あるいは(*S*)-体のα-トリフルオロメチル乳酸アミドをそれぞれ高立体選択的に加水分解する微生物を 1 菌株ずつ見出している [1)]。これら 2 種の菌株が有するアミダーゼのうち、*Arthrobacter* sp. S-2 株が構成的に産生する *S*-立体選択的に作用するアミダーゼの精製と遺伝子クローニング、大腸菌による大量発現を目的として研究を行った。



【方法と結果】*Arthrobacter* sp. S-2株が産生する*S*-立体選択的なアミダーゼを精製するために、まず大量かつ純度良くアミダーゼを発現する培地の検討を行った。最適化した培養条件下、50 Lの培養液から集菌し、超音波破砕により無細胞抽出液を調製した。無細胞抽出液から各種カラムクロマトグラフィーを用いて酵素の精製を行い、目的の酵素を単一に精製することができた。しかし得られた酵素量が微量であったため、酵素化学的諸性質を明らかにすることはできず、N-末端アミノ酸配列の解析のみを行った。得られたN-末端アミノ酸配列から縮重プライマーを設計し、*Arthrobacter* sp. S-2株のゲノムDNAから遺伝子クローニングを行った。得られた遺伝子を含む組換え大腸菌を作製し、タンパク質の発現とアミダーゼ活性の測定を行った結果、目的のアミダーゼの発現を確認することができた。この組換え大腸菌を大量培養し、アミダーゼの大量精製し酵素化学的諸性質を解明した結果について報告する。

1) Watanabe S, Fuhshuku K, Nishii T, Ishii A, Asano Y. JSBBA, 3B24a01 (2013).

amidase, enationselective hydrolysis, α-(trifuloromethyl)lactic acid

講演番号：4A14a05
講演日時、会場：3 月 30 日 09:44～ A 校舎 14 会場

麹菌の凝乳酵素の機能解析

Characterization of milk clotting enzymes in Aspergilli

○田久 陽子、岡本 綾子、前田 浩、山形 洋平、竹内 道雄（東京農工大院・応生化）
○Yoko TAKYU, Ayako OKAMOTO, Hiroshi MAEDA, Youhei YAMAGATA, Michio TAKEUCHI (Division of Applied Biological Chemistry, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】

凝乳酵素はチーズの製造過程でカード生成に使用される酵素で、古くから仔牛の第 4 胃から抽出した chymosin が使用されてきた。chymosin は乳中に含まれるκ- casein の Phe105 – Met106 を特異的に分解することで、カゼインミセルが崩壊し、カードを生成する。*Aspergillus oryzae* のある菌株では生産されるアスパルティックプロテアーゼ (APase) が凝乳活性を有することが報告されている。しかし、その酵素が菌株特異的な酵素であるかは明らかになっていない。ゲノム解析の結果、*A. oryzae* RIB40 は 11 種類の APase 遺伝子を保有していることが明らかとなっている。本研究では、これらのプロテアーゼ遺伝子産物について凝乳活性のスクリーニングを行い、RIB40 にも凝乳活性を有する APase が存在することを明らかにし、その酵素化学的性質を同定することを目的とした。

【方法および結果】

各 APase 遺伝子を発現し、スクリーニングを行った結果、1 つの遺伝子産物で高い凝乳活性が確認され、それを AOchymosin 1 と命名した。*A. nidulans* A89 をホストに AOchymosin 1 の高発現株を作製し、培養液中に分泌されたプロテアーゼを硫安沈殿法による濃縮の後に、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーにより電気泳動的に均一となるまで精製し、各温度、pH における凝乳活性、タンパク質分解活性試験を行った。その結果、 30℃、pH 5.5 の条件で良質なカードを生成することを確認した。この酵素の pH 安定性は pH 3.0 ~ 7.0 で 80% 以上の活性を保持していることが明らかとなった。熱安定性については pH 5.5 で 50℃まで活性を保持したが、60℃で失活し、カード生成後の酵素の失活が容易である性質が明らかとなった。また、pH 5.5 におけるκ - casein の分解プロファイルを SDS-PAGE で確認したところ、この酵素はκ - casein に対して複数の切断点をもつことが示唆された。

また、*A. luchuensis* におけるオルソログ ALchymosin 1 についても同様に高発現株を作製し、凝乳活性を確認した。この酵素は AOchymosin 1 とよく類似した性質を示しており、*Aspergillus* 属は凝乳酵素を普遍的に有していることが示唆された。

なお、本研究の一部は、生研センター基盤研究推進事業の一環として行われたものである。

Aspergilli, aspartic protease, milk clotting enzyme

講演番号：4A14a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ A 校舎 14 会場

麹菌ペプスタチン非感受性プロテアーゼの機能解析

Functional analysis of pepstatin insensitive protease in Aspergillus oryzae

○竹内 真理衣、岡本 綾子、阿保 春花、前田 浩、山形 洋平、竹内 道雄（東京農工大院・応生化）
○Marii TAKEUCHI, Ayako Okamoto, Haruka Abo, Hiroshi Maeda, Youhei Yamagata, Michio Takeuchi (Division of Applied Biological Chemistry, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本の醸造産業において酵素の供給源として広く用いられ、安全な微生物として認められている。 ゲノム解析の結果から、*A.oryzae* RIB40 株は 3 つの pepstatin insensitive protease (PIP) をコードすると推定される遺伝子（*pipA*、*pipB*、*pipC*）を持つことが明らかになった。PIP は酸性領域で作用するエンド型プロテアーゼであり、DGDT W(F/Y)EW(F/Y/L)PED(F/Y)の活性中心モチーフを有する酵素である。PIP は aspartic protease とは違い、pepstatinA によって活性阻害を受けず、グルタミン酸残基が触媒残基であることから glutamic protease という新しいカテゴリーに分類されている。この protease の遺伝子は、糸状菌や一部のバクテリアで見つかっているが、詳しい生理機能などについてはまだ明らかになっていない。本研究では、*A.oryzae* の 3 つの PIP の機能解析を目的とした。
【方法・結果】*A.oryzae* RIB40 株の PIP 遺伝子の発現について培養条件を変え調べたところ、3 つの *pip* 遺伝子は mRNA として発現していることがわかった。*pipC* は調べたどの培養条件でも発現していたが、*pipA*、*pipB* は窒素源をタンパク質とした培地でのみ発現し、$NaNO_3$ を含む培地では発現が抑制された。また、PIP の酵素学的性質を解析するために、*pipA*、*pipB* は *Pichia pastoris*、*pipC* は *Aspergillus nidulans* を宿主とした発現系を用いて、発現した。発現した PipA、PipC は可溶性画分に存在し、活性を指標としてゲル濾過クロマトグラフィー、イオンクロマトグラフィーによって精製を行った。一方、PipB は His tag 融合タンパク質として不溶性画分に発現したため、8M urea による可溶化と段階透析法によるリフォールディングを行い、His tag アフィニティークロマトグラフィーによって精製を行った。3 つの PIP は酸性領域においてタンパク質基質に対して pepstatinA に阻害されない活性を示した。PipA、PipC については至適 pH、pH 安定性、熱安定性を調べ、oxidized insulin chain B の切断点の解析を HPLC で行った。その結果、PipA も PipC も oxidized insulin chain B の alanine と leucine の間のみを切断し、基質特異性の高い protease であることがわかった。PipB は、pH 3.0 において塩基性タンパク質である salmine に対して高い活性を持つことがわかった。現在、PipB の最適なリフォールディング条件と詳細な酵素学的性質の検討を行っている。さらに、生物学的なアプローチからも PIP の機能を解析するために *pyrG* 遺伝子をマーカーとし、*pipA*、*pipB*、*pipC* 各遺伝子の単独破壊株を作製した。各遺伝子の破壊は、PCR とサザンハイブリダイゼーションによって確認した。3 つの破壊株は $NaNO_3$ を窒素源として含む Czapeck-dox 培地ではホスト株と変わらない生育を示した。現在コントロール株と比較して、様々な培地における *Δpip* 株の表現型の観察を行っている。
なお、本研究の一部は、生研センター基盤研究推進事業の一環として行われたものである。

Aspergillus oryzae, protease, PIP

講演番号：4A14a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ A 校舎 14 会場

Listeria 属由来キチナーゼの発現と性質の解析
Expression in *Escherichia coli* and characterization of two chitinases from *Listeria innocua*
○本田 翔太郎、菅原 康里、小山 文隆、坂口 政吉（工学院大学　工学部　応用化学科）
○ Shotaro HONDA, Yasusato SUGAHARA, Fumitaka OYAMA, Masayoshi SAKAGUCHI (Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kogakuin University)

キチンは *N*-acetyl-D-glucosamine が β-1,4 グリコシド結合した多糖で,カニ,エビの外骨格や真菌などの構成成分であり,セルロースに次ぐバイオマスである。キチナーゼ(EC 3.2.1.14)はキチンの β-1,4 グリコシド結合を加水分解する酵素である。酵素を用いてキチンを分解した場合,主に二量体のキチンオリゴマーが生産される事が知られているが，近年 *Bacillus thuringiensis* 由来のキチナーゼ ChiA74 がコロイダルキチンを基質としたときに六量体のキチンオリゴマーを生成することが報告された。本研究では ChiA74 とアミノ酸配列相同性を 50%持ち，非病原性のグラム陽性菌である *Listeria innocua* 由来のキチナーゼ様遺伝子に注目した。*L. innocua* は二つのキチナーゼ遺伝子（lin0153 および lin1996）を持ち，lin0153 遺伝子の推定アミノ酸配列が ChiA74 と 50%のアミノ酸配列相同性を示す。このことから lin0153 遺伝子産物も ChiA74 と同様に有用な六量体のキチンオリゴマーを生成する可能性がある。本研究ではこの *L. innocua* 由来のキチナーゼ（lin0153 および lin1996 遺伝子産物)の発現,精製,およびその特性解析を行った。

発現ベクターには pET21d を用い,発現タンパク質の C 末端側にヒスチジンタグ(His-Tag)が付加されるように設計した。SDS 電気泳動の結果，細胞抽出液中に lin0153 遺伝子産物および lin1996 遺伝子産物の発現が検出できた。また，アフィニティクロマトグラフィーの精製画分にも，両遺伝子産物と推定される均一なタンパク質バンドが認められた。精製された両酵素は,合成基質（4-Nitrophenyl *N*,*N*-diacetyl-β-D-chitobioside）を加水分解することがわかった。合成基質を用いた至適 pH および至適温度の測定の結果,lin0153 遺伝子産物は至適 pH 6.0，至適温度が 50℃であり,一方， lin1996 遺伝子産物は至適 pH 5.0，至適温度 50℃であった。

Listeria innocua, chitinase, characterization

講演番号：4A14a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ A 校舎 14 会場

変異導入による超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 由来の PH0459 のデハロゲナーゼ活性またホスファターゼ活性強化

Improvement of dehalogenase or phosphatase activity of PH0459 from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3 by site-directed mutagenesis

○殷 梓蘭、中村 卓 (長浜バイオ大)
○Zilan Yin, Takasi Nakamura (Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

【背景と目的】

PH0459は超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3株由来、推定のハロ酸デハロゲナーゼである。アミノ酸全体の配列の一致度は低いものの（16%）、活性部位のアミノ酸残基は、既知の*Pseudomonas* sp. YL 由来のL-2-ハロ酸デハロゲナーゼ（L-DEX YL）と類似し、ハロ酸デハロゲナーゼ（HAD）スーパーファミリーに属する。L-DEX YLと同様のデハロゲナーゼ活性を持つことが期待されたが、その活性はL-DEX YLの1/100程度であった。したがってPH0459の機能についてはまだ明らかになっていない。PH0459と他のHADの配列アラインメントにより、デハロゲナーゼ活性に関わると思われる残基が複数存在する。これらの配列の違いに基づいて変異酵素を作製し、そのデハロゲナーゼ活性を強化することを目指した。一方、HADスーパーファミリーに属する脱リン酸化酵素（フォスファターゼ）は特徴的な配列motif（Ⅰ: DX(D/T/Y)X(T/V)(L/V)、Ⅱ: S/T、Ⅲ: K(G/S)、Ⅳ: (D/S)XXX(D/N)）を持っている。PH0459においては、motifⅡ、Ⅲ、Ⅳが保存されているが、motifⅠはDXVXTLになっているため、そのVをDに置換することによりホスファターゼ活性を持つことが期待された。PH0459のホスファターゼ活性が上昇するか、実際に変異導入し、活性測定を行うことにした。

【方法】

アラインメント上活性に関わると思われる残基について、部位特異的変異導入実験キットを用いて PH0459 の D8A、D8E、D43R、D8ED43R、G179SD180S を作製した。それらをタンパク質発現用大腸菌 BL21（DE3）*plysS* に形質転換して、目的の PH0459 変異酵素を発現させ、精製した。その後、塩化物イオンのチオシアン酸水銀による比色定量法（Iwasaki 法）により L-2-クロロプロピオン酸に対するデハロゲナーゼ活性を、マラカイトグリーン法によりホスファターゼ活性を確認した。

【結果】

作製した 5 種類の PH0459 変異酵素 D8A、D8E、D43R、D8ED43R、G179SD180S のうち、G179SD180S のデハロゲナーゼ活性は野生型と比較して、変化がなかった。ホスファターゼ、デハロゲナーゼ共に基質に求核攻撃を行う残基として保存されている Asp に変異導入したもの（D8A）については、ホスファターゼ活性を確認したところ野生型より活性を低下したため、この Asp8 が基質へ求核攻撃を行う役割を果たしていると考えられた。他の 3 種類の変異酵素の活性については現在測定中である。これらの結果とホスファターゼ活性の上昇に関わる V10D 変異酵素の結果については本学会で発表する。

Dehalogenase, Phosphatase, HAD superfamily

講演番号：4A14a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ A 校舎 14 会場

Aspergillus oryzae KB 株によるフルクトース転移酵素の生産条件
Profuction of fructosyl-transferase from *Aspergillus oryzae*
○倉掛 昌裕、兼国 将一、古賀 雅紀、芝田 美幸、廣津 紗弥 (福山大 生命工学)
○ Masahiro Kurakake, Shoichi Kanekuni, Masaki Koga, Miyuki Shibata, Saya Hirotsu (Fukuyama Univ.)

【目的】*Aspergillus oryzae* KB株は、２種のβ-フルクトフラノシダーゼ、F1及びF2を生産した。F1は糖転移性の高い酵素でフルクトオリゴ糖合成に有効であるのに対し、F2は加水分解性を有した。非イオン性界面活性剤（Tween等）を培地に添加し液体培養することで、KB株の菌体ペレットの大きさや、個数は大きく変化し、F1酵素生産性が改善された。今回は、界面活性剤添加等の培地条件により異なるペレット径を調製し、各酵素生産性との関係について調べた。また、F1酵素の選択的生産性のための培地条件についての検討も行った。
【方法】KB株の液体培養は、1%シュクロース、0.5%酵母エキス、0.2%リン酸水素2ナトリウム12水和物の培地に、Tween等の非イオン性界面活性剤を0.5～1.0%添加し、100ml容三角フラスコにて液量30mlとして、30℃、150rpmで2～3日間行った。培養後、菌体ペレットをホモジナイズした懸濁液を1%シュクロースに、pH5、40℃で10分間反応させ、生成したグルコース量をグルコースオキシダーゼ法によって定量することで、β-フルクトフラノシダーゼ活性を求めた。この活性値を0.2U/mlにそろえ、20%シュクロース にpH5、40℃にて1～2時間反応させ、HPLC（NH2-P50カラム；旭化成(株)）にて生成糖を分析した。フルクトースおよびグルコースの生成量を測定することで糖転移活性（F1相当）及び加水分解活性（F2相当）を求めた。それぞれ1分間に1μmolのフルクトースを転移および遊離させる酵素量を１Uと定義した。
【結果】KB 株の液体培養において、シュクロース培地に HBL（hydrophile lipophile balance）値の異なる非イオン性界面活性剤の Tween 20、40、および 80、または各種ポリオキシエチレンオレイル（POE 2～50）を添加することで菌体のペレット粒径は変化し、酵素生産性も異なることが認められた。また培地のシュクロース濃度を増加させることでペレット径は大きくなり、炭素源にシュクロースの代わりグリセリンを添加することでペレット粒径は小さくなった。また培地の pH をクエン酸-リン酸緩衝液で調整し培養を行ったところ、酸性側で粒径は大きくなった。これら各粒径のペレットを調製し、F１酵素生産性および F1 酵素の生産選択性（F1/F2）について評価した。これら各培地条件の結果より F1 酵素のみを効率的に生産するための最適条件について検討を行った。

fructooligosaccharide, fructofuranosidase, transglycosylation

講演番号：4A14a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ A 校舎 14 会場

大腸菌でのプラスミド改変よるセルラーゼ発現への効果

Effects of modification in expression plasmids for cellulase expression in *E. coli*

○岸川 昭太郎[1,2]、渡部 暁[3]、木川 隆則[3,4,5]、大熊 盛也[1,2]、村田 武英[1]、小幡 裕一[1,2] ([1]理研バイオリソースセンター、[2]理研バイオマス工学研究プログラム、[3]理研生命システム研究センター、[4]理研イノベーション推進センター、[5]東京工業大学)
○Shotaro KISHIKAWA[1,2], Satoru WATANABE[3], Takanori KIGAWA[3,4,5], Moriya OHKUMA[1,2], Takehide MURATA[1], Yuichi OBATA[1,2] ([1]RIKEN BioResource Center, [2]RIKEN BMEP, [3]RIKEN QBiC, [4]RIKEN RINC, [5]Tokyo Inst. of Tech.)

世界的な環境・エネルギー問題の解決策としてバイオマスの有効利用は喫緊の課題であり、食料と競合しない木質系バイオマスの利用の取り組みが進められている。理研バイオリソースセンター(BRC)では、ライフサイエンス研究の発展と社会的課題解決に資する遺伝子材料の開発と整備を進めており、その一環として木質系バイオマスの糖化に必要なセルラーゼ関連遺伝子の収集と提供を行っている。さらに研究者に有効に活用してもらうため、それらセルラーゼ関連遺伝子を異種発現させ、至適pHや至適温度などの酵素の特性を明らかにし、付加情報として公開している。

これまで、*Trichoderma reesei*由来のセルラーゼを含む20種類の糖化酵素遺伝子を収集し、うち14遺伝子を大腸菌での菌体内発現用および菌体外分泌用発現ベクターに組み込み提供を行っている。菌体内発現用プラスミドは、酵素のN末端にT7タグ、C末端にHisタグが付加された融合タンパク質を発現する。これまでの検討で、菌体内発現用プラスミドに組み込んだエンドグルカナーゼ7種類中2種類(egl2とegl3)とキシラナーゼ3種類中2種類（xyn2とxyn3）に酵素活性を認めている。しかし、発現させた酵素のほとんどは活性を持たず不溶性画分に存在することが示された。そこで、活性を持つ酵素の可溶性画分への増加と活性を持つ酵素の種類を増やすことを目的とし、菌体内発現用プラスミドを、酵素のN末にインクルージョンボディ形成を抑えるHATタグとそのタグを切り離すためのTEVプロテアーゼ認識配列を持つ融合タンパク質を発現するプラスミドに変更した。前検討と同じエンドグルカナーゼ7種類を変更後の発現用プラスミドを用い大腸菌で発現させ、CMCase活性の測定を行った。その結果、酵素活性を認めたものは前検討と同じくegl2とegl3の2種類だけであったが、以前の発現用プラスミドと比べて粗酵素溶液中の酵素活性は、egl2で最大で1.4倍、egl3では最大で6.1倍を示した。このことは可溶性画分に活性を持つ酵素量が増加したことを示しており、特にHATタグへの変更が効果的であったと考えられた。

今回の報告したセルラーゼ関連遺伝子の発現プラスミドは、理研バイオリソースセンター 遺伝子材料開発室から近々提供する予定である。

- 理研バイオリソースセンター (BRC): http://brc.riken.jp/
- 理研 BRC 遺伝子材料開発室: http://dna.brc.riken.jp/ja/

cellulase, Trichoderma, biomass

講演番号：4A14a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ A 校舎 14 会場

γグルタミル基転移反応によるペプチドの呈味性の改善

Improvement in the taste of peptide by γ-glutamyl group transfer reaction

○田村 友規、鈴木 秀之（京都工芸繊維大学工芸科学部）
○Tomoki TAMURA, Hideyuki SUZUKI (Kyoto Institute of Technology)

【目的】タンパク加水分解物は、うま味が強く、調味料として利用されている。塩酸加水分解によって製造したものは、ほとんどアミノ酸にまで分解されているため、うま味が強く、調味料として優れている。一方、タンパク加水分解物をよりマイルドなプロテアーゼ処理によって製造することも試みられている。この場合の問題点は、完全にアミノ酸にまで分解することが難しく、ペプチドが多く混在し、うま味が弱いだけでなく、しばしば苦味を伴うことである。当研究室では苦味アミノ酸をγ-グルタミル化すると苦味が激減することを報告しており[1)]、また最近γ-グルタミルアミノ酸やγ-グルタミルペプチドの中にごく微量でコク味を生じるものが報告された[2)]。γ-グルタミルトランスペプチダーゼ（GGT）は多くの生物が持つ酵素であり、アルカリ性条件下でグルタミンのγ-グルタミル基を他のアミノ酸やペプチドに転移する反応と、酸性条件下でγ-グルタミル化合物を加水分解してグルタミン酸を遊離する反応を触媒する。そこで、GGT を用いてタンパク加水分解物に含まれる苦味ペプチドをγ-グルタミル化し、呈味性を改善することを検討した。

【方法と結果】食品添加物として市販されている *Bacillus amyloliquefaciens* 由来のグルタミナーゼの転移反応が加水分解反応に比して非常に高いことから、ウェスタンブロッティングを行ったところ、抗大腸菌 GGT 抗体とクロスリアクトするバンドを確認したので、この酵素剤を GGT として用いた。

大豆タンパク質を食品添加物として市販されている *B. licheniformis* 由来のペプチターゼを用いて pH 8.5 で分解し、タンパク加水分解物を得た。次に、このタンパク加水分解物溶液にγ-グルタミル基供与体であるグルタミンと *B. amyloliquefaciens* 由来のグルタミナーゼを添加し、pH 10.0、37℃で反応させた。グルタミナーゼを反応させる前後の溶液を HPLC で分析したところ、転移反応によりγ-グルタミルペプチドが生成したと考えられるピークのシフトが見られた。次に、大腸菌 GGT を事実上加水分解反応のみが起こる pH 5.5 で反応させ、シフトしていたピークがもとに戻り、グルタミン酸が生成したことを確認した。

グルタミナーゼで処理する前後のサンプルについて味覚試験を行った結果、グルタミンを添加しただけのサンプルとは異なり、酵素反応させた後のサンプルでは、顕著な苦味の低減と呈味性の改善がみられた。

Ref. 1) Suzuki *et al.* **J. Agric. Food Chem.** *50*:313-318 (2002); 2) Ohsu *et al.* **J. Biol. Chem.** *285*:1016 (2010).

γ-glutamyl transpeptidase, γ-glutamyl peptide, taste

講演番号：4A14a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ A 校舎 14 会場

スチレンモノオキシゲナーゼ発現 *Kocuria rhizophila* DC2201 を用いた立体選択的エポキシド生産システム
Bioprocess for producing chiral (*S*)-epoxyalkanes by styrene monooxygenase expressed in *Kocuria rhizophila* DC2201
○大内 卓也[1]、今江 龍太[1]、戸田 弘[1,2]、伊藤 伸哉[1,2] ([1]富山県大・生物工、[2]富山県大・生工研セ)
○Takuya OHUCHI[1], Ryouta IMAE[1], Hiroshi TODA[1,2], Nobuya ITOH[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ. Dept. Biotechnol., [2]Toyama Pref. Univ.Biotechnol.Res)

我々が土壌より単離した *Rhodococcus* sp. ST-10 由来スチレンモノオキシゲナーゼ(RhSMO)は、様々な芳香族アルケン類および直鎖アルケン類を立体選択的に(*S*)-体エポキシドへと変換する。SMO による連続的なエポキシド生産では NADH の供給が必要であることから、2-プロパノールを水素供与体として NADH を再生する *Leifsonia* sp. S749 由来アルコール脱水素酵素 (LSADH) との共発現菌体を作成し、*Rhsmo-lsadh* 発現菌体を利用した水-有機溶媒二相系反応プロセスによる各種光学活性エポキシドの生産を検討してきた。[1)] しかしこの生産プロセスは、反応系中に高濃度の 2-プロパノールを添加する必要があるため、SMO の失活を引き起こす要因となり長時間の反応には適切ではなかった。また、芳香族アルケンの変換に比べ直鎖アルケン類の変換効率は概して十分ではなかった。そこで本研究では、直鎖アルケン類の効率的なエポキシド変換系の構築を目的とし、新たな宿主の検討と反応条件の最適化を行った。

Rhsmo 発現用宿主として、*E. coli* BL21(DE3)に加え有機溶媒に耐性な *Pseudomonas flurescens* IAM12026、*Kocuria rhizophila* DC2201、*Rhodococcus* sp. ST-10、*R. rhodochrous* NBRC160969、*R. rhodochrous* ATCC12674 の計 6 株を使用し、それぞれ *Rhsmo* 組換え発現株を作成した。二相系反応に適した有機溶媒を検討する目的で、有機溶媒存在下における各菌株の生育試験を行った。6 株すべてにおいて菌の生育が確認されたヘキサデカンおよびフタル酸ビスエチルヘキシル（BEHP）を有機溶媒として用い、1-ヘプテンを基質とし菌体反応による変換試験を行った。その結果、*K. rhizophila* DC2201/pCK-PSD StyAB で 1,2-エポキシヘプタンの生産が確認された。特に、有機溶媒として BEHP を用いた際に高い 1,2-エポキシヘプタン生産性を示した。そこで同溶媒を用いた反応系を基本とし、エポキシド生産プロセスにおける最適条件を検討した。使用炭素源、基質濃度、pH 調整など各種条件を検討した結果、初発濃度 400 mM の 1-ヘプテンより約 100 mM の(*S*)-1,2-エポキシヘプタンの生産が確認できた。現在更なる反応条件の最適化および各種基質への応用を展開している。

1) H. Toda, R. Imae, N. Itoh, Tetrahedron: Asymmetry, 23 (2012) 1542-1549.

styrene monooxygenase, chiral (*S*)-epoxyalkanes, *Kocuria rhizophila* DC2201

講演番号：4A14a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ A 校舎 14 会場

シークワァーサー由来フラボノイド O-メチルトランスフェラーゼのクローニングおよび機能解析

Cloning and characterization of flavonoid *O*-methyltransferase coding genes from *Citrus depressa*

伊藤 伸哉[1,2]、○戸田 弘[1,2]、岩田 知沙[2] ([1]富山県大・生工研セ、[2]富県大工・生物工)
Nobuya ITOH[1,2], ○Hiroshi TODA[1,2], Chisa IWATA[2] ([1]Toyama Pref. Univ. Biotech. Res. Center, [2]Toyama Pref. Univ. Dept. Biotechnol.)

【目的】　近年、ベニフウキやシークワァーサーに含まれる“メチル化フラボノイド”が、抗アレルギー作用、抗腫瘍作用、肥満抑制、抗アルツハイマーなど多岐にわたる生理活性を有することが明らかとなり、研究がなされている。メチル化フラボノイドは、植物体内においてフラボノイド O-メチルトランスフェラーゼ(FOMT)の作用により S-アデノシルメチオニン(SAM)をメチルドナーとして合成される。シークワァーサーなどの柑橘植物類は、その果皮中にノビレチンのような高度にメチル化を受けたポリメトキシフラボノイド(PMF)を蓄積することから、複数の FOMT を有することが示唆されている。そこで本研究ではシークワァーサーより各種 FOMT を単離取得し、その機能解析とメチル化フラボノイド生産への応用を試みた。

【実験方法・結果】　沖縄県産シークワァーサーの果皮および本葉より調製したゲノム DNA を鋳型とし、既知の植物由来 FOMT アミノ酸配列をもとに設計した縮重プライマーを用いて PCR を行った。得られた増幅断片の配列解析を行った結果､いくつかの断片において既知 FOMT との相同性が見られた。これらの配列情報をもとにシークワァーサーゲノム DNA に対して TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced PCR) を行い、合計 5 つの FOMT 様遺伝子の全長配列(CdFOMTs)を取得した。また、果皮より調製した mRNA を鋳型とした RT-PCR を行い、それぞれ対応する cDNA を取得した。

得られた cDNA を大腸菌用発現ベクターpET-21b(+)および pMAL-c5x へクローニングし、大腸菌による異宿主発現を試みた結果、CdFOMT5 および CdFOMT6 において有意な組換えタンパクを得ることができた。精製した組換え CdFOMT5、6 を用いてメチル化活性を検討したところ、両酵素ともケルセチンに対してメチル化活性を示した。ケルセチンを基質としてメチル化部位選択性を検討したところ、CdFOMT6 はフラボノイド 3’-O-メチルトランスフェラーゼであることが明らかとなった。また CdFOMT6 はミリセチン、ルテオリン、エピカテキン、エピガロカテキンガレートなど各種フラボノイドに対してメチル化活性を有することが明らかとなった。

一方、CdFOMT5 では複数のメチル化産物と思われるピークが HPLC により確認された。LC-MS による分析の結果、m/z がそれぞれ 14,28,42 増えたメチル化産物が得られたことから、CdFOMT5 は複数ヶ所の水酸基をメチル化する酵素であることが示唆された。そこでモノヒドロキシフラボンを基質とした分析を行った結果、CdFOMT5 はフラボノールの 3,5,6,7 位水酸基に対してメチル化活性を有することが明らかとなった。

flavonoid, *O*-methyltransferase, *Citrus depressa*

講演番号：4A14a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ A 校舎 14 会場

PCR 法により取得したメタゲノム由来新規短鎖アルコール脱水素酵素遺伝子とその翻訳産物の諸性質

Characterization of novel short-chain dehydrogenase/reductase genes directly amplified from metagenome by PCR.

○黒川 純司、狩谷 理美、礒谷 健太郎、伊藤 伸哉（富山県大・工・生物工）
○Junji Kurokawa, Satomi Kariya, Kentaro Isotani, Nobuya Itoh (Toyama Pref. Univ.)

Leifsonia sp. S749 由来アルコール脱水素酵素(LSADH)は short-chain dehydrogenase/reductase(SDR)ファミリーに属する酵素であり、目的のケトンの不斉還元を進めると同時に 2-プロパノールを水素供与体に用いて補酵素 NADH を再生できることからキラルアルコールの生産に適している。本酵素はギ酸脱水素酵素やグルコース脱水素酵素等の一般的な補酵素再生用の酵素が不要であり生産系を簡素化できるという利点がある。今回 LSADH に比べて、より広い又は異なる基質特異性や高い安定性を有するアルコール脱水素酵素(ADH)の取得を目的に、メタゲノムから直接 PCR を用いてホモログ遺伝子の増幅及びその翻訳産物の解析を行った。

lsadh 遺伝子の塩基配列を基に縮重プライマーを設計し、主にバーク(樹皮)堆肥由来のメタゲノムを鋳型に PCR を行った。増幅した遺伝子を In-Fusion 反応によりベクターと融合させ、*E. coli* JM109 株を用いて LSADH のキメラ酵素として発現させた。1,1 - ジクロロアセトンの還元活性の有無により選別した後、これらの遺伝子解析を行った。その結果、LSADH とアミノ酸の同一性が 30-99%の多様な ADH が多数取得できた。また大部分の ADH はデータベースに登録された既知酵素配列とも同一性は低かった。

発現した酵素を基質特異性や有機溶媒耐性等により選別したところ、同一性が 55%のアルコール脱水素酵素 ADH21 は LSADH では活性を示さない 3-キヌクリジノンやベンゾイルギ酸エチルに対する還元活性を示した。そこで ADH21 を SDS-PAGE で単一バンドまで酵素精製を行い、その諸性質について調べた。2,2,2-トリフルオロアセトフェノン(PTK)に対する K_m 及び V_{max} はそれぞれ 0.75mM、77.2/mg であり LSADH(12.6mM、76.6U/mg)よりも親和性が高かった。2-プロパノール対する K_m 及び V_{max} はそれぞれ 100mM、23.8U/mg であり、LSADH(57.5mM、25.7U/mg)と大きな差はなく、2-プロパノールを水素供与体に利用することが可能であった。実際に 3-キヌクリジノンから鏡像体過剰率 99%e.e.で医薬中間体である(*R*)-キヌクリジノールを生産することを確認した。

また、バーク堆肥由来のメタゲノムからは、有機溶媒存在下 PTK に対して高い還元を示す酵素や 60℃、30 分間の熱処理後も高い活性を保持する高機能な ADH が取得できた。

metagenome, SDR, PCR

講演番号：4A14a17
講演日時、会場：3 月 30 日 11:54～ A 校舎 14 会場

好熱性 enoate reductase の探索と特性解析および疎水性細菌を発現宿主とした脂溶性キラル化合物生産への応用

Characterization of a thermophilic enoate reductase and its application to biocatalytic production of water-immiscible chiral compounds

○本田 孝祐、辻 直人、岡野 憲司、大竹 久夫 (阪大院工)
○Kohsuke Honda, Naoto Tsuji, Kenji Okano, Hisao Ohtake (Dept Biotechnol, Osaka Univ)

【目的】

Rhodococcus opacus は、湿潤状態で有機溶媒中に分散するユニークな性質を有した疎水性細菌として特徴づけられる。この特性のため本菌は、有機溶媒中に溶解した脂溶性化合物に効率的に接触することができる。われわれのグループでは脂溶性化合物を対象とした微生物変換反応のための新規プラットフォームとして､本菌を whole-cell catalyst として用いた有機溶媒単相反応システムを開発している。本システムは、目的酵素遺伝子を *R. opacus* 内で発現させ、得られた組換え菌体を、基質を溶解した有機溶媒中で触媒として使用するだけの極めてシンプルなシステムであるが、発現させる酵素には有機溶媒に十分な耐性を有することが求められる。本研究では、好熱菌等に由来する耐熱性酵素の多くが、熱だけでなく種々のケミカルストレスに対しても比較的優れた耐性を有する点に着目し、好熱菌由来 enoate-reductase の探索と同定、ならびに同酵素の *R. opacus* への導入と、これを用いた有機溶媒単相反応システムでのキラル化合物生産実験を行ったので報告する。

【方法と結果】

大阪大学構内から採取した土壌サンプルから 70℃での生育が可能な微生物群を単離し､クロトンアルデヒドの飽和化活性を指標としたスクリーニングを実施した。選抜された微生物は、16S rDNA 配列解析により、*Geobacillus* 属細菌であると同定された。目的酵素の部分精製と質量分析を用いたアミノ酸配列解析、ならびに同菌のゲノム解析結果より、目的酵素をコードする遺伝子を同定した。本酵素遺伝子を大腸菌内で過剰発現させ、得られた組換え酵素を用いて基質特異性、有機溶媒耐性等の特性評価を行った。この結果、本酵素は、2-methyl 2-cyclohexenone や ketoisophorone の立体選択的な飽和化反応を触媒することが明らかとなった。次いで、同酵素遺伝子を *R. opacus* 内で過剰発現させ、ketoisophorone からの(6R)-levodione 生産実験を行った。反応に必要な NADH の再生のため、*Thermus thermophilus* HB-8 由来 alcohol dehydrogenase を共発現させ､補酵素再生反応の基質として cyclohexanol を用いた。Ketoisophorone (500 mM)を溶解させた cyclohexanol に組換え *R. opacus* の湿菌体を分散させた反応液を調製し、50℃にて 24 時間反応させたところ 250 mM の生産物を得ることができた。

thermophile, enoate reductase, *Rhodococcus opacus*

講演番号：4A15a01
講演日時、会場：3 月 30 日 09:00～ A 校舎 15 会場

システイン合成に利用できる新規硫黄同化経路の同定と機能解析

Identification and functional analysis of novel sulfur assimiration for cysteine synthesis

○高橋 砂予、大津 巌生、高木 博史（奈良先端大）
○Sayo TAKAHASHI, Iwao OHTSU, HIROSHI TAKAGI (Nara Inst. Sci. Tech)

【目的】L-システイン（Cys）は生理的に重要なアミノ酸の一つであり、医薬品や化粧品など工業的にも広く利用されている。現在、Cysは主に毛髪や羽毛の酸加水分解物からの抽出法により製造されているが、その方法は環境に大きな負荷がかかる。その改善策として、当研究室では微生物によるグルコースからのシステインの直接発酵法を検討し、過剰生産にも成功している。大腸菌には*O*-アセチルセリン（OAS）をCysに変換する酵素として、2種類のOASスルフヒドラーゼ（CysK, CysM）が存在する。前者は硫酸経路によって、硫酸イオンから2分子のATPを消費して生成する硫化物イオンを硫黄源としてCysを合成する。一方、後者はチオ硫酸経路で作用し、チオ硫酸イオンを硫黄源として*S*-スルホシステイン（SSC）を合成し、その後Cysへと還元される。当研究室では最近、Δ*cysK*株は硫酸イオンを単一硫黄源とする培地で生育せず、Δ*cysM*株はチオ硫酸イオンを単一硫黄源とする培地において僅かに生育することを明らかにした。このことから、大腸菌には細胞内に取り込んだチオ硫酸イオンがSSCを経由することなく、Cysへと変換するバイパスが存在することを想像させる。そこで本研究では、チオ硫酸を還元し得る硫黄転移酵素の同定およびその機能解析を行った。
【方法・結果】大腸菌ゲノム上でチオ硫酸硫黄転移酵素を検索したところ、14 種類の候補遺伝子を見出した。これらの遺伝子をΔ*cysM* 株に、それぞれ導入したところ、チオ硫酸イオン単一硫黄源で野生株並みに生育が回復する *glpE*,*pspE*,*yeeD* を同定した。これらの結果から、これらチオ硫酸硫黄転移酵素の Cys 残基がチオ硫酸イオンを求核攻撃し、亜硫酸イオンと硫化物イオンが転移する反応が考えられた。また、この反応によりチオ硫酸イオンから生じた亜硫酸イオンまたは硫化物イオンが硫酸経路を介して Cys へと変換される新規のバイパス経路が存在することが示唆された。しかし、*glpE* を過剰発現したΔ*cysM* 株では、グルコースを炭素源とした場合システインをほとんど合成しなかった。*glpE* は、グリセロール代謝制御に関連する *glpEGR* オペロンの一員であるため、単一炭素源をグリセロールにして同様の実験を行った。その結果、グリセロールではグルコースの場合よりも約 10 倍の Cys を合成した。これは、大腸菌に Cys を合成するための硫黄代謝経路と中央代謝経路の共役を司る因子が存在することを意味する。現在、新規硫黄同化経路におけるチオ硫酸硫黄転移酵素の生理的意義の解析と硫黄代謝経路と中央代謝経路の共役を司る因子の探索を試みている（本研究は生研センターイノベーション創出事業の支援を受けて行った）。

cysteine biosynthesis, thiosulfate sulfurtransferase, sulfur metabolome

講演番号：4A15a02
講演日時、会場：3 月 30 日 09:11～ A 校舎 15 会場

硫黄中間代謝産物の動態解析による大腸菌のチオ硫酸硫黄転移酵素 GlpE の機能解析

Functional analysis of thiosulfate sulfurtransferase GlpE by sulfur metabolome analysis in *Escherichia coli*

○河野 祐介、大津 巌生、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Yusuke Kawano, Iwao Ohtsu, Hiroshi Takagi (Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

【背景・目的】大腸菌の硫黄同化には、硫酸イオン（SO_4^{2-}）もしくはチオ硫酸イオン（$S_2O_3^{2-}$）を利用する２つの経路が存在し、生育に必須の L-システイン（Cys）が生合成される。チオ硫酸経路では、$S_2O_3^{2-}$と *O*-アセチルセリンから CysM によりスルホシステインが生成し、さらに還元を経て Cys が生成する。したがって、Δ*cysM* 株はチオ硫酸塩を単一硫黄源とする培地で生育できないと予想され、実際に野生株と比較して生育は著しく制限されたが、僅かな生育が再現性よく確認できた。我々はこの CysM 非依存的な生育に着目し、*cysM* 欠損による生育不良がチオ硫酸硫黄転移酵素ファミリーの GlpE の過剰発現で相補されることを明らかにした。以上の結果から、GlpE による新規な $S_2O_3^{2-}$の同化経路の存在が示唆されたが、この硫黄同化の経路やフラックスの実体は全く不明である。そこで、本研究では硫黄同化における GlpE の役割を明らかにする目的で、各硫黄中間代謝産物の蓄積量（サルファーインデックス）を網羅的に解析した。
【方法・結果】Δ*cysM* 株と野生株をチオ硫酸塩が単一硫黄源の培地で培養し、120 分後における両株のサルファーインデックスを比較した。その結果、ほとんど生育できないΔ*cysM* 株でも野生株と同程度の Cys が検出された。また、硫酸経路中間体である亜硫酸イオンや硫化物イオンが野生株と同等に存在していた。これらの結果は、チオ硫酸イオンから不均化反応を経て亜硫酸イオンや硫化物イオンが生じ、硫酸経路を介して Cys が生成していることを示唆している。さらに、Δ*cysM* 株では、Cys の下流の代謝産物であるグルタチオンの蓄積量が激減していた。この結果から、野生株は $S_2O_3^{2-}$から十分量の Cys を合成し、Cys の蓄積に起因する細胞毒性を回避するために余剰分をグルタチオンとしてプールしているが、Δ*cysM* 株はグルタチオンのプールやホモシステインへの変換を行うほどの Cys は合成できないことが推察される。つまり、CysM 依存的なチオ硫酸経路では Cys を効率的に合成できるが、CysM に非依存的な GlpE によるバイパス経路は Cys の合成効率が低く、生育に影響を及ぼすことが判明した。一方、Δ*cysM* の GlpE 過剰発現株では、*cysM* 欠損で生じたサルファーインデックスの変化が、生育と同様に野生株並みに回復する傾向を示した。特に、グルタチオンが再び野生株と同レベルにまで蓄積しており、Cys の合成効率が改善されたことが示唆される。以上の結果から、GlpE は新規のチオ硫酸同化経路を担うと結論づけた。現在、Δ*cysM* 株の生育を回復させる他のチオ硫酸硫黄転移酵素（PspE, YeeD）についても解析を進め、硫黄代謝との関連や個々の硫黄転移酵素の機能の解明を試みている（本研究は生研センターイノベーション創出事業の支援を受けて行った）。

cysteine biosynthesis, thiosulfate sulfurtransferase, sulfur metabolome

講演番号：4A15a03
講演日時、会場：3 月 30 日 09:22～ A 校舎 15 会場

超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株における TCA バイパス経路の解析
Biochemical analysis of bypass pathway of the TCA cycle in an extremely oligotrophic bacterium, *Rhodococcus erythropolis* N9T-4

○矢野 嵩典[1]、吉田 信行[2]、高木 博史[1] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]静大・工)
○Takanori YANO[1], Nobuyuki YOSHIDA[2], Hiroshi TAKAGI[1] ([1]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, [2]Fac. Eng, Shizuoka Univ)

【目的】当研究室で備蓄原油中より単離した *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は、炭素源無添加の完全無機塩からなる固体培地で良好に生育し、その生育に CO_2 を要求するという超低栄養性を示す。しかしながら、既知の独立栄養性細菌における CO_2 固定系の鍵酵素遺伝子は本菌のゲノム上には存在しない。また、それらの独立栄養性細菌が CO_2 を固定する際に必要な光、水素、金属などのエネルギーの添加を全く必要としない。従って、本菌は新奇な「低エネルギー型 CO_2 固定系」を有していると予想し、研究を進めている。これまでに、本菌の炭素代謝に関して、ホルムアルデヒド代謝関連酵素が炭素源無添加の条件（低栄養条件）で特異的に発現することを明らかにしたが、中央代謝についてはほとんど検討されていない。今回は、N9T-4 株の TCA 回路について新たな知見を得たので報告する。
【方法・結果】炭素源無添加の最少培地（BM 培地）で生育させた細胞から調製した粗酵素液を用いて TCA 回路の各酵素活性を調べたところ、α-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ（KGDH）のみ活性が検出できなかった。KGDH の E1 コンポーネントは、α-ケトグルタル酸（KG）からコハク酸セミアルデヒド（SSA）への脱炭酸反応、すなわち KG デカルボキシラーゼ（Kgd）反応を触媒することが知られている。本菌の類縁菌である *Mycobacterium* 属やシアノバクテリアなど一部の微生物においては、Kgd 活性に基づく TCA バイパス回路の存在が示唆されている。そこで、N9T-4 株の粗酵素液を用いて検討を行ったところ、予想通り Kgd 活性が検出された。本反応はチアミンピロリン酸（TPP）および Mg^{2+} に依存的であることが知られているが、本菌の粗酵素液においても同様の傾向が見られた。N9T-4 株のゲノム配列には KGDH の E1 コンポーネントをコードすると思われる遺伝子（*kgd*）が 1 つ存在し、そのアミノ酸配列は *R. erythropolis* PR4 株、*M. smegmatis* mc^2 155 株、*M. tuberculosis* H37Rv 株のものと高い相同性を示した。そこで、本菌の Kgd を大腸菌で発現させ、組換え酵素（rKgd）として精製し、その反応を解析した。その結果、rKgd が KG の脱炭酸反応を触媒し、SSA を生成することを確認した。さらに、本菌のゲノムには SSA をコハク酸に変換する SSA デヒドロゲナーゼ（SSADH）をコードする遺伝子も存在し、実際に本菌の粗酵素液に SSADH 活性が確認できた。以上の結果より、本菌の TCA 回路においては、*Mycobacterium* 属と同様に KG から SSA を経てコハク酸に至るバイパス経路を含んでいる可能性が示された。

α-ketoglutarate decarboxylase, oligotroph, *Rhodococcus erythropolis*

講演番号：4A15a04
講演日時、会場：3 月 30 日 09:33～ A 校舎 15 会場

Methylobacterium extorquens のメタノール生育におけるレアアース要求性とその役割
Function of rare-earth elements on methanol growth of *Methylobacterium extorquens*
○日比野 歩美[1]、三井 亮司[2]、谷 明生[3]、田代 晋也[1]、早川 享志[1]、中川 智行[1] ([1]岐阜大院応生、[2]岡山理大理、[3]岡山大資植研)
○Ayumi HIBINO[1], Ryoji MITSUI[2], Akio TANI[3], Shin-ya TASHIRO[1], Takashi HAYAKAWA[1], Tomoyuki NAKAGAWA[1] ([1]Gifu Univ., [2]Okayama Univ. Sci., [3]Okayama Univ.)

【目的】
主要な植物葉上の共生微生物として知られる *Methylobacterium* 属細菌は，メタノールを唯一の炭素源として利用できるメチロトローフ細菌である。*Methylobacterium* 属細菌のメタノール代謝の鍵酵素はメタノール酸化を触媒するメタノールデヒドロゲナーゼ（MDH）であり，多くの *Methylobacterium* 属細菌は MDH をコードする遺伝子を数コピー持つと報告されている。*M. extorquens* AM1 株も同様に，ゲノム上に *mxaF*，*xoxF1*，*xoxF2* の 3 コピーの MDH 遺伝子を持つことが知られており，私たちのグループでは，これまで MxaF が Ca 依存型 MDH，XoxF1 は La 依存型 MDH であることを証明してきた [1)]。一方，Delmotte らは植物の葉部表層に存在する微生物由来主要タンパク質が XoxF1 であることを報告している [2)]。このことは XoxF1 とレアアースが *Methylobacterium* 属細菌の植物共生系において鍵因子であることが推測され，*Methylobacterium* 属細菌の生態系における役割を知る上で，本細菌および XoxF1 のレアアース依存性を知ることは非常に重要である。そこで，本研究では *M. extorquens* AM1 株のレアアース要求性と XoxF1 の機能発現におけるレアアースの役割について解析を行った。

【方法・結果】
AM1 株のメタノール生育における金属依存性を観察したところ，AM1 株は Ca のみならず，Ca の代わりにレアアースである La，Ce，Pr，Nd を用いた場合，十分なメタノール生育を示した。一方，これら 4 種以外のレアアースや Al, Fe などの 3 価の金属イオンではメタノール生育を全く示さなかった。また，MDH 遺伝子破壊株のメタノール生育特性を観察したところ，Δ*mxaF* 株は Ca ではメタノール生育を示さなかったが，レアアースでは野生株と同等の生育を示した。一方，Δ*xoxF1* 株はレアアースではほとんど生育できず，Ca でも生育遅延が観察された。また，Δ*xoxF2* 株は生育阻害が観察されなかった。さらには，野生株を用いてホルムアルデヒドに対する生育を観察したところ，金属による生育の相違はみられなかった。一方，AM1 株の MDH 活性は La，Ce，Pr，Nd 生育細胞でのみ観察され，その活性レベルとメタノール生育は関連性を示した。

以上のことより，*M. extorquens* AM1 株では，レアアースが MDH の活性発現に大きく影響を与えていることが推測され，AM1 株のメタノール生育はレアアースによる MDH の活性発現に依存することが明らかとなった。

[1)] Nakagawa T *et al*., 2012. *PLoS ONE* 7: e50480.　[2)] Delmotte *et al.*, 2009. *PNAS* 106: 16428.

Methylobacterium extorquens, rare-earth elements, methanol dehydrogenase

講演番号：4A15a05
講演日時、会場：3 月 30 日 09:44～ A 校舎 15 会場

Pichia pastoris フルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼアイソザイムの機能とメタノール代謝における役割

Molecular function of fructose-1,6-bisphosphate aldolase isozymes on methanol metabolism in *Pichia pastoris*

○福岳 寛隆、早川 享志、中川 智行（岐阜大院応生）
○Hirotaka FUKUOKA, Takashi HAYAKAWA, Tomoyuki NAKAGAWA (Gifu Univ.)

【目的】

メチロトローフ酵母はメタノール代謝の際，ペルオキシソーム内でメタノールを酸化し，代謝中間体のホルムアルデヒドをキシルロース 5-リン酸（Xul5P）に固定することで，メタノール由来炭素を細胞構成成分に導いている。つまり，メタノール代謝ではホルムアルデヒドを固定する Xul5P の供給が必要不可欠であり，メタノール代謝中間体をペントースリン酸経路へ導くフルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼ（FBA）が重要な役割を担っていることが推測される。これまで FBA は解糖系酵素として十分な研究がなされてきたが，メチロトローフ酵母のメタノール代謝における FBA の重要性や機能に関する詳細な報告はほとんどないのが現状である。

そこで本研究では *P. pastoris* のメタノール代謝に関与する FBA の解析を行った。

【方法・結果】

P. pastoris において FBA 活性を観察したところ、メタノール培養細胞において強い誘導が見られた。そこで *P. pastoris* ゲノムデータベースを用いて FBA と相同性が高い遺伝子を探索したところ，酵母由来 Class-II FBA と高い相同性を示す 2 つの遺伝子（PAS_chr1-1_0072 および PAS_chr1-1_0319）を見いだし，それぞれ *PpFBA1* および *PpFBA2* と命名した。これらのうち，PpFba2p は C 末端にペルオキシソーム移行シグナルを保持していたが，FBA 活性の細胞内局在を観察したところ，その局在は全て細胞質であった。また，*PpFBA1* および *PpFBA2* の遺伝子発現応答を観察したところ，*PpFBA1* は構成的な発現，*PpFBA2* はメタノールにおいて高い発現レベルを示した。さらに *PpFBA1* および *PpFBA2* を欠損させた株 *fba1*Δ 株と *fba2*Δ 株を作製し，異なる炭素源での生育特性を観察した。その結果，*Ppfba1*Δ 株は，グルコース，グリセロールを炭素源にした場合，ほとんど生育が見られず，メタノールにおいても明らかな生育の遅延が観察された。一方，*Ppfba2*Δ 株は炭素源にメタノールを用いた場合のみ，野生株に対して若干の生育の遅延が観察された。

これらのことから，*P. pastoris* はゲノム上に FBA を 2 コピーもっており，グルコースを代謝する場合，PpFba1p が主要な FBA として機能しているが，メタノール代謝では PpFba1p のみではフルクトース 1,6-ビスリン酸の供給が不十分であり，メタノール特異的に誘導される PpFba2p がその機能を補うことで，十分なメタノール生育を可能にしていることが示唆された。

fructose-1,6-bisphosphate aldolase, methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*

講演番号：4A15a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ A 校舎 15 会場

Streptomyces coelicolor A3(2) M145 における窒素酸化物によって制御される遺伝子群の解析
Analysis of the nitrogen oxide regulated genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145
○小川 翔大、草間 慎一朗、杉浦 遼、田瀬 有紀、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、祥雲 弘文、佐々木 康幸(東農大・応生・バイオ)
○Shota OGAWA, Shinichiro KUSAMA, Ryo SUGIURA, Yuki TASE, Shinsaku ITO, Shunsuke YAJIMA, Hirohumi SHOUN, Yasuyuki SASAKI (Tokyo Univ.Aglic.)

放線菌 *Streptomyces* 属細菌はグラム陽性の土壌細菌で広く分布している。本菌の大きな特徴として、糸状菌のような複雑なライフサイクルを持ち、かつ結核菌の治療薬として用いられるストレプトマイシンをはじめ、二次代謝産物として様々な天然生理活性物質を生産する有用な菌であることの 2 つが挙げられる。この 2 つの特徴により基礎研究、応用研究の両面において、非常に興味深い菌である。

我々の研究グループでは、過去の研究において放線菌 *Streptomyces antibioticus* で成育時に有機体窒素を亜硝酸にする酵素、また一酸化窒素を硝酸に酸化する酵素を発見した。この 2 つの酵素の発現は既知の微生物の知見と異なっており、これらの酵素から本菌で「有機体窒素→NO→NO_3^-→NO_2^-」新規の窒素代謝経路が考えられた。この経路は既知のエネルギー代謝と異なる役割を持つ可能性があると考えられたため、遺伝学的解析が容易なモデル放線菌 *Streptomyces coelicolor* を用いて、新規窒素代謝経路の機能解析を行った。その結果、本菌で「有機体窒素→NO_3^-→NO_2^-→NO→NO_3^-→」の順に代謝される新規窒素代謝経路の存在を明らかとした。

そこで、本代謝系が産生する窒素酸化物の生理的意義を知るために、窒素酸化物が関与すると考えられるタンパク質の探索を行った結果、窒素酸化物をシグナルとする他菌の二成分制御系（TCS）に配列上の相同性がみられ、関連が示唆される TCS を見出した。他菌の TCS では、外来の窒素酸化物をシグナルとして受容し自身の生育を制御していることが知られており、この受容は細菌の主要な外的環境応答制御機構である。しかし自身の生育において生産される窒素酸化物を利用する知見は無く、本菌がどのように利用しているのかは不明である。

また、他菌の TCS では複数の遺伝子発現を調節していることが知られているため、*S. coelicolor* の TCS においても、下流に制御下遺伝子が存在すると示唆された。

以上のことから本菌において、自身で生産した窒素酸化物を主体として、二成分制御系と、その下流の制御下遺伝子の関連性を調べた。

Streptomyces, nitrogen oxide, two-component system

講演番号：4A15a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ A 校舎 15 会場

放線菌の新規窒素代謝系における生産物調節因子の解明
regulation of intracellular concentration involved in novel nitrogen metabolism
○信田 啓介、小口 悠、棚橋 月子、矢嶋 俊介、伊藤 晋作、祥雲 弘文、佐々木 康幸（東農大・応生・バイオ）
○Keisuke Sida, Haruka Oguchi, Tsukiko Tanahashi, Shunsuke Yajima, Shinsaku Ito, Hirohumi Shoun, Yasuyuki Sasaki (tokyo Univ. of agric.)

放線菌 *Streptomyces* 属は、土壌中やその他自然界に広く分布している原核微生物であり、二次代謝産物として多種多様な有用物質を生産することから、古くから工業面・医薬面で大いに利用されてきた。結核の特効薬として莫大な数の人命を救ったストレプトマイシンをはじめ、現在利用されている抗生物質のうち放線菌由来のものが約 60%を占める。本菌が生産する抗生物質等の天然生理活性物質は微生物資源として極めて魅力的であり、本菌は我々人類にとって非常に有用な微生物であるといえる。

近年、我々の研究チームにより、*Streptomyces* 属のモデル生物であり、全ゲノム解析済みの株 *Streptomyces coelicolor* A3(2)M145 において新規の窒素代謝系を確認した。*S. coelicolor* A3(2) M145 は本代謝系において有機体窒素から窒素酸化物を生産し、亜硝酸を菌体外に蓄積する。その後、蓄積された亜硝酸は速やかに減少する。また、本代謝系によって生産される窒素酸化物は二次代謝の制御や形態分化に関与することが示唆された。

新規窒素代謝系に関与するタンパク質をコードする遺伝子の破壊株と親株の生育を亜硝酸添加培地で比較したところ、親株と比較して破壊株では亜硝酸が著しく消費されることを確認した。この結果から、本菌には生体内の亜硝酸量を調節する機構が存在することが示唆された。そこで、本菌のゲノム情報を検索したところ、亜硝酸に関連すると考えられるタンパク質を見出した。本タンパク質の生理的意義を検証するために、見出したタンパク質をコードする遺伝子の破壊株を作成し、親株と破壊株の生育と生産された亜硝酸量を比較した。

Streptomyces, nitrogen oxide, nitrous acid

講演番号：4A15a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ A 校舎 15 会場

放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 における内在的 NO の生理的意義の解明

Elucidation of the physiological roles of endogenous NO in *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145.

○平田 卓也、田瀬 有紀、小林 卓矢、小口 悠、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、祥雲 弘文、佐々木 康幸（東農大・応生・バイオ）
○Takuya Hirata, Yuki Tase, Takuya Kobayashi, Haruka Oguchi, Shisaku Ito, Shunsuke Yajima, Hirohumi Shoun, Yasuyuki Sasaki (Tokyo Univ. agric.)

放線菌 *Streptomyces* 属は、胞子の発芽後、基底菌糸を培地表面に張り巡らせる。続いて自身により基底菌糸を分解し、これを栄養源としながら空中に向かって気中菌糸をのばすという非常に複雑な形態分化を行う菌である。また、二次代謝産物として抗生物質等の有用な物質を生産することから我々人類にとって非常に有用な菌である。

近年、我々の研究グループで土壌細菌 *Streptomyces antibioticus* において新規窒素代謝系が確認された。この新規窒素代謝系は硝酸(NO_3^-)から始まり、亜硝酸(NO_2^-)、一酸化窒素(NO)へとかわり、再び硝酸に帰するものである。このような代謝は今までに報告例がなく、この代謝系を解明することは学術的新規知見を与えうるものとして非常に興味深い。そこで、全ゲノム配列解読済みである *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 を用い、この代謝系の解明を行うことを目的とした。

NO はフリーラジカルとして知られ、哺乳類では白血球やマクロファージといった貪食細胞が生産することが知られており、血液循環、神経系、免疫システムにおいて重要な要素であることが知られている。近年では微生物でも NO を生産することが明らかとなり、その重要性が認知されている。本代謝系で生産される NO は *S. coelicolor* において赤色抗生物質 Undecylprodigiosin を生産するシグナル分子として働くことがわかった。このことから内在性 NO が代謝調節分子としての役割を持つことが強く示唆されたため、本菌における NO の更なる生理的意義を探求することとした。

本研究では転写抑制タンパク質に注目した。このタンパク質は *E. coli* において NO を感知することが知られており、[Fe-S]クラスターを保持していることが確認されている。[Fe-S]クラスターが NO により破壊されると、本タンパク質が DNA から外れ転写が可能となる。一方、*S. coelicolor* も本タンパク質のホモログが確認された。そこで *S. coelicolor* において本タンパク質をコードする遺伝子の破壊株を作成し、内在性 NO と本タンパク質の関連性および、本タンパク質が制御している遺伝子群を探求した。

Streptomyces coelicolor A3(2) M145, endogenus NO

講演番号：4A15a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ A 校舎 15 会場

Streptomyces coelicolor A3(2) M145 における SoxR の機能解析
Analysis of transcription factor SoxR involved in endogenously generated nitric oxide in *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145
○田瀬 有紀、小林 卓矢、杉浦 遼、草間 慎一朗、矢嶋 俊介、伊藤 晋作、祥雲 弘文、佐々木 康幸 (東農大・応生・バイオ)
○Yuki TASE, Takuya KOBAYASHI, Ryo SUGIURA, Shinichiro KUSAMA, Shunsuke YAJIMA, Shinsaku ITO, Hirohumi SHOUN, Yasuyuki SASAKI (Tokyo Univ. of agric.)

好気性土壌細菌である放線菌 *Streptomyces* 属は複雑な形態分化を行い、多くの天然生理活性物質を生産することが知られている。

近年、我々は *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 において、好気・NO_3^-非添加条件下で有機体窒素から窒素酸化物(NO, NO_3^-, NO_2^-)を生産する新規窒素代謝系の存在を明らかにした。その代謝経路中で、有機態窒素から生成される内在性 NO が確認された。内在性 NO は、赤色抗生物質 Undecylprodigiosin(RED)生合成遺伝子群を制御する *redD* の転写レベルを上昇させるシグナル物質として作用することが示唆され、本代謝系により自身で生成した NO を一種の微生物ホルモンとして用いていることが考えられた。

既知の細菌では、外来の窒素酸化物をシグナルとして受容し自身の生育を制御していることが知られている。この受容は細菌の主要な外的環境応答制御機構である、二成分制御系や、NO により活性に変化が起こる[Fe-S]クラスターを持つ転写制御因子により行われている。

そこで NO により活性に変化が起こる「Fe-S」クラスターを持つレギュレーターSoxR について検証した。SoxR は古くから知られている転写制御因子で、*Escherichia coli* や多くのバクテリアに保存されており、NO などの活性酸素種が活性中心の鉄硫黄クラスターに作用することで、活性化され酸化ストレス応答を行うことが知られている。

しかし、*S. coelicolor* における *soxR* 遺伝子破壊は酸化ストレス耐性に影響がないことが報告されており、かつ、SoxR が青色抗生物質 Actinorhodin(ACT)によって活性化され、抗生物質生産や形態分化に関与することが明らかとされている。

これらの報告から、*S. coelicolor* の SoxR は活性酸素種で活性化されるといった知見はなかったが、[Fe-S]クラスターと密接な関係のある NO が内在性で存在する他に、自身で NO を作り出すことから、これら二つに関連性はないかと考え、検証を行った。さらに、*S. coelicolor* における SoxR は、酸化ストレス応答以外の生理的意義を持つのではないかと考えられた。

以上のことから SoxR と NO 関連性を検証するため SoxR 欠損株を作成し、トランスクリプトーム解析と表現型の検証を行った。

Streptomyces, nitrogen oxide, transcription factor

講演番号：4A15a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ A 校舎 15 会場

Streptomyces coelicolor A 3 (2) M145 における窒素酸化物受容タンパクの機能解析
Analysis of recepter protein for endogenously produced nitrogen oxide in *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145
○草間 慎一朗、杉浦 遼、田瀬 有紀、小川 翔大、矢嶋 俊介、伊藤 晋作、祥雲 弘文、佐々木 康幸 (東農大・応生・バイオ)
○ Shinichiro KUSAMA, Ryo SUGIURA, Yuki TASE, Shota OGAWA, Shunsuke YAJIMA, Shinsaku ITO, Hirohumi SHOUN, Yasuyuki SASAKI (Tokyo Univ. of agric.)

＜背景＞

放線菌 *Streptomyces* 属は、複雑な形態分化を行い生育する好気性のグラム陽性細菌である。本菌の大きな特徴として、抗生物質をはじめとする様々な天然生理活性物質を二次代謝産物として生産する事が知られている。それらの天然生理活性物質は工業面、医薬面など様々な場で利用されており、本菌は我々人類にとって非常に有用な微生物といえる。

近年、我々は *Streptomyces* 属のモデル生物であり、全ゲノム解読済みの株 *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 において新規の窒素代謝系を確認した。*S. coelicolor* A3(2) M145 は本代謝系において有機体窒素から窒素酸化物を生産し、菌体外に蓄積する。また、本代謝系によって生産された窒素酸化物が赤色抗生物質ウンデシルプロジギオシン（RED）の生産に関与していることが明らかとなった。

本代謝系が産生する窒素酸化物の生理的意義を知るために、ゲノム上から窒素酸化物が関与すると考えられるタンパク質の探索を行った。その結果、二成分制御系を見出した。本制御系は構造上に窒素酸化物と結合しうるヘムドメインを有し、同時に窒素酸化物をシグナルとする他菌の二成分制御系に配列上の相同性がみられた。以上の事実から本ホモログは窒素酸化物をシグナルとして受容しうると考え、本二成分制御系と *S. coelicolor* A3(2) M145 が産生する窒素酸化物との関連を調べ、その結果を報告する。

＜方法・結果＞

本制御系におけるセンサータンパクとレスポンスレギュレータータンパクをコードする遺伝子の破壊株を構築し、親株と生育を比較したところ、生育速度には差が見られず、窒素酸化物の生産量と RED および青色抗生物質アクチノロージン(ACT)の生産量が減少した。以上の結果から本制御系は *S. coelicolor* A3(2) M145 において新規窒素代謝系に関与し、二次代謝を制御する事が示唆された。

Streptomyces, Two component system, nitrogen oxide

講演番号：4A15a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ A 校舎 15 会場

n-アルカン資化性酵母 *Yarrowia lipolytica* における 12 種のシトクロム P450ALK の機能解析
Functional analysis of twelve cytochromes P450ALK in *n*-alkane assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*

○岩間 亮[1]、小林 哲[1]、堀内 裕之[1]、太田 明徳[2]、福田 良一[1]([1]東大院・農生科・応生工、[2]中部大・応生・応化)
○ Ryo IWAMA[1], Satoshi KOBAYASHI[1], Hiroyuki HORIUCHI[1], Akinori OHTA[2], Ryouichi FUKUDA[1] ([1]Dept. Biotech., Univ. Tokyo., [2]Dept. Biol. Chem., Chubu Univ.)

シトクロム P450 の多くは分子状酸素を利用して基質に酸素原子 1 つを付加するモノオキシゲナーゼ活性を有する酵素であり、細菌から植物、動物に至るまで自然界に広く分布し、多様な生理機能を示す。*n*-アルカン資化性酵母 *Yarrowia lipolytica* は、シトクロム P450 の一種である P450ALK によって *n*-アルカンの末端を水酸化して、長鎖アルコールに変換した後、長鎖アルデヒド、脂肪酸へと順次酸化し、脂肪酸を細胞内で利用することが知られている。*Y. lipolytica* は P450ALK をコードすると推定される遺伝子として 12 種の *ALK* 遺伝子（*ALK1* - *ALK12*)を持つ。これまでにこれらの P450ALK のうち、Alk1p が *n*-アルカンの水酸化において主要な働きを担うこと、Alk2p が炭素鎖長 16 の長鎖 *n*-アルカンに対し強い活性を持つことが知られていた[1)]。また、植物 *Nicotiana benthamiana* の葉で *Y. lipolytica* の *ALK1* - *ALK8* を異種発現させた解析から、Alk3p、Alk5p、Alk7p がラウリン酸の ω 末端を水酸化することが報告されている[2)]。しかしながら、12 種の *ALK* 遺伝子が *Y. lipolytica* 内でどのような機能を持つのかについての体系的な知見は得られていなかった。そこで今回、12 種の *ALK* 遺伝子すべてを破壊した *ALK* 遺伝子 12 重破壊株（Δ*alk1-12* 株）[3)]において、各 *ALK* 遺伝子を 1 種類だけ発現する株を 12 種作製し、それらの株の表現型を解析した。その結果、*Y. lipolytica* における 12 種の P450ALK には、これまでに報告されている P450ALK 以外にも、*n*-アルカンを基質とするもの、脂肪酸を基質とするもの、この両者を基質とするものが存在することが明らかとなった。

1) Iida T, Sumita T, Ohta A, Takagi M (2000) *Yeast*, **16**, 1077-1087
2) Hanley K, Nguyen LV, Khan F, Pogue GP, Vojdani F, Panda S, Pinot F, Oriedo VB, Rasochova L, Subramanian M, Miller B, White EL (2003) *Assay Drug Dev. Technol.* **1**, 147-160
3) Takai H, Iwama R, Kobayashi S, Horiuchi H, Fukuda R, Ohta A (2012) *Fungal Genet. Biol.*, **49**, 58-64.

n-alkane, Cytochrome P450ALK, *Yarrowia lipolytica*

講演番号：4A15a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ A 校舎 15 会場

ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ活性型変異体を発現させた脂質蓄積性出芽酵母の解析

Analysis of oleaginous Saccharomyces cerevisiae expressing the active diacylglycerol acyltransferase variant

○神坂 泰、木村 和義、植村 浩、山岡 正和（産総研生物プロセス）
○Yasushi KAMISAKA, Kazuyoshi KIMURA, Hiroshi UEMURA, Masakazu YAMAOKA (AIST, Bioproduction Res Inst.)

【目的】我々は、貯蔵脂質合成酵素ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼを出芽酵母 *S.cerevisiae* に過剰発現させて、脂質生産系の構築をめざしている。これまでに、本酵素のコードする出芽酵母の遺伝子 *DGA1* を、転写因子 *SNF2* の破壊株や *DGA1* の破壊株に過剰発現させると、野生株に比べて、脂質蓄積への効果が顕著に増加して、脂質含量の高い形質転換株が得られることを見出している。*DGA1* の破壊株では、隣接する遺伝子でヒストンアセチルトランスフェラーゼをコードする *ESA1* の発現が低下が、脂質蓄積に重要であることが見出され、この株に、N 末端欠失で活性の高い Dga1p（Dga1dNp）を *dga1* 破壊株に過剰発現させると、脂質含量が 45%程度に達することを見出した。今回は、この脂質蓄積性の形質転換株について更に解析を行った。
【方法及び結果】この出芽酵母 BY4741 の脂質蓄積性形質転換株を 10%グルコース培地で培養して得た脂質のクラスを分離して、脂肪酸組成を調べたところ、トリアシルグリセロールが全脂質中の 90%程度を占め、そのパルミトオレイン酸含量が 36%であるのに対し、リン脂質等の極性脂質画分やジアシルグリセロールではパルミトオレイン酸含量がそれぞれ 30%、27%と低いことが見出された。すなわち、過剰発現された Dga1dNp は、パルミトオレイン酸をトリアシルグリセロールに取り込みやすいことが示唆された。また、この株を非発酵性のグリセロール/乳酸培地で培養したところ、野生株に Dga1dNp を発現した株に比べて、増殖が低下していることが見出された。さらに、この株に糖新生の律速酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ *PCK1* を発現させると、グリセロール/乳酸培地での増殖が回復した。非発酵性のグリセロール/乳酸培地では糖新生が増殖に必要であり、また Pck1p は Esa1p によって活性化されることが知られている。これらの知見と得られた結果を勘案して、*dga1* 形質転換株では Esa1p の機能低下により、糖新生が抑えられていることが示唆された。

lipid production, diacylglycerol acyltransferase, Saccharomyces cerevisiae

講演番号：4A15a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ A 校舎 15 会場

Aspergillus terreus のイタコン酸生産におけるシス・アコニット酸デカルボキシラーゼの重要性

Importance of *cis*-aconitic acid decarboxylase of *Aspergillus terreus* for the production of itaconic acid

○篠田 優[1]、山田 智士[2]、朴 龍洙[3]、荒井 基夫[1]、金政 真[1] ([1]中部大・環境生科、[2]中部大院・応生、[3]静岡大・グリーン科技研)

○Suguru SHINODA[1], Satoshi YAMADA[2], Enoch Y. PARK[3], Motoo ARAI[1], Shin KANAMASA[1] ([1]Dept. Envi. Biol., Chubu Univ., [2]Grad. Sch. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. & Technol., Shizuoka Univ.)

イタコン酸は不飽和基を有する二価の水溶性有機酸であり、その構造から重合や共重合によって線状高分子を形成できる特性を有していることから、合成樹脂や合成繊維、接着剤、印刷インキ等の原料や添加剤として幅広く利用されている。イタコン酸は *Aspergillus terreus* や *Aspergillus itaconicus*、*Ustilago maydis* などの糸状菌や酵母において生産されることが報告されており、工業生産においては生育速度の観点から *A. terreus* が使用されている。*A. terreus* のイタコン酸生合成経路について、クエン酸回路において生成するシス・アコニット酸からシス・アコニット酸デカルボキシラーゼ（CAD）によりイタコン酸が生成される説が支持されてきた。我々はこれまでに *A. terreus* 由来の CAD をコードする *CAD1* 遺伝子を単離・同定し、本酵素がシス・アコニット酸を基質としてイタコン酸を直接生成することを明らかにし、本酵素のイタコン酸生合成における重要性を示した。しかし、アイソザイムを含め CAD によらないイタコン酸生成機構の有無は知られていない。そこで本研究では *A. terreus* の *CAD1* 遺伝子を破壊し、イタコン酸生産への影響を調べることにより、それらの解明を目指した。

先ず *A. terreus* のゲノムより *CAD1* 遺伝子を含む DNA 断片をクローニングし、*CAD1* 遺伝子内部に *Aspergillus oryzae* 由来ピリチアミン耐性遺伝子を挿入することで *CAD1* 破壊カセットを作製した。次に破壊カセットを *A. terreus* に導入し、得られた形質転換体について破壊カセットの挿入確認と CAD 活性の測定を行い、*CAD1* 破壊株を選別した。得られた破壊株についてグルコースを炭素源とした無機塩培地にて培養し、培養上清中のイタコン酸量を経時的に測定した。その結果、野生株と破壊株のイタコン酸生産量はそれぞれ最大で 0.84 g/L と 0.013 g/L であり、破壊株の生産量は野生株の生産量の 1.5% に低下していた。さらにイタコン酸の前駆体であるシス・アコニット酸についても測定を行ったところ、野生株と破壊株の生産量はそれぞれ最大で 8.7 mg/L と 97 mg/L であり、破壊株の生産量は野生株と比較して 11 倍に増加していた。これらの結果より *A. terreus* が生産するイタコン酸の大部分は CAD を介してシス・アコニット酸より生成されていることが明らかとなった。また破壊株でもイタコン酸が検出されたことから、CAD を介さないイタコン酸生成機構の存在が示唆された。現在、イタコン酸の生成に関わる他の有機酸の挙動について検討を行っている。

Aspergillus terreus, *cis*-Aconitic acid decarboxylase, Itaconic acid

講演番号：4A15a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ A 校舎 15 会場

クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* におけるシアン非感受性呼吸系酵素遺伝子(*aox1*)の高発現によるクエン酸生産量の向上

Increase of Citric Acid Production by Enhancement of Cyanide-insensitive Respiration through Overexpression of Alternative Oxidase Gene (*aox1*) in *Aspergillus niger*

○田中 珠、服部 貴澄、小林 慶一、桐村 光太郎 (早大理工・応化)
○Megumi TANAKA, Takasumi HATTORI, Keiichi KOBAYASHI, Kohtaro KIRIMURA (Dept. Appl. Chem., Fac. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* にはシトクロム鎖とは別に alternative oxidase (EC 1.10.3.11; AOX)によって構成されるシアン非感受性呼吸系が存在する[1]。当該呼吸系は ATP の生産を伴わずに NADH を再酸化することから、糖の代謝やクエン酸生産に関与している。本研究では、AOX 活性の消失や増大がクエン酸生産に与える影響を明らかにするため、クエン酸高生産株である *A. niger* WU-2223L[1, 2]を供試菌として、AOX 遺伝子である *aox1* を破壊した株と高発現した株を作製し、呼吸の特徴とクエン酸生産量の増減について検討した。

【方法および結果】*aox1* 破壊株(DAOX-1)の作製には、*A. niger* WU-2223L よりクローニングした *aox1* の一部を欠失させ、ピリチアミン耐性遺伝子 *ptrA* に置換した構造を有する *aox1* 破壊用プラスミド pDAOX-PTR を用いた。*aox1* 高発現株(EAOX-1)の作製には *Aspergillus* 属用高発現プロモーター(P-*glaA142*)下流に *aox1* cDNA を連結した *aox1* 高発現用プラスミド pNGA-AOX を用いた。pDAOX または pNGA-AOX を使用して、WU-2223L を宿主としたプロトプラスト-PEG 法による形質転換を行い、DAOX-1 と EAOX-1 を作製した。それぞれの株について、シトクロム c オキシダーゼ活性または AOX 活性を阻害した条件下における呼吸活性を酸素電極によって測定した。呼吸の特徴や mRNA の転写量の測定から DAOX-1 では AOX 活性が消失していること、EAOX-1 では *aox1* が高発現し AOX 活性が WU-2223L と比較して増大していることを確認した。グルコース 120 g/L を炭素源とする 9 日間のクエン酸生産条件下では、DAOX-1 と EAOX-1 のクエン酸生産量はそれぞれ 55.7 g/L と 59.8 g/L で、WU-2223L と比較してそれぞれ 1.59%減少および 5.65%増加した。また、DAOX-1 と比較して *aox1* を高発現している EAOX-1 は 1.07 倍のクエン酸生産量となった。さらに、グルコース 200 g/L を炭素源とする高糖濃度条件下での 30 日間の培養では、EAOX-1 のグルコース消費量は 185 g/L、クエン酸生産量は 106 g/L となり、WU-2223L に比較してそれぞれ 20.9%、11.6%増加した。以上より、AOX はクエン酸生産に必須な因子ではないが、とくに高糖濃度条件下において、クエン酸の高生産に寄与する因子の一つであることを明らかにした。

[1] Y. Honda, et al., J. Biosci. Bioeng., **113**, 338-342 (2012).
[2] Y. Honda, et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. **75**, 1594-1596 (2011).

alternative oxidase, *Aspergillus niger*, citric acid production

講演番号：4A15a17
講演日時、会場：3 月 30 日 11:54～ A 校舎 15 会場

発酵熱の生成機構に関する研究
Mechanism of Fermentation Heat Production
○西村 佳祐[1]、伊藤 智和[1]、高橋 克忠[2]、羽田 亜紀[2]、邊見 久[1]、吉村 徹[1] ([1]名大院生命農、[2]けいはんな文化学術協会微生物計測システム研究所)
○ Keisuke NISHIMURA[1], Tomokazu ITO[1], Katsutada TAKAHASHI[2], Aki HADA[2], Hisashi HEMMI[1], Tohru YOSHIMURA[1] ([1]Grad. Sch. Bioagr. Sci. Nagoya Univ., [2]Keihanna Academy of Science and Cultures)

【背景と目的】堆肥の作製時に発酵熱が産生されることは古くからよく知られている現象である。稲わらや震災瓦礫などにおいては、時に自然発火が引き起こされる程の高い発酵熱が生成する。発酵熱は有機物の酸化分解に伴って生成すると考えられるが、あまりに自明の現象のためか発酵熱生成の詳細な機構についての研究はほとんど知られていない。本研究では、熱生成を制御する生化学的手法の開発を目的に、発酵熱産生の機構の解明を試みた。
【方法】藍染めに際して行う藍葉からの「すくも」作製時の発熱を発酵熱産生のモデル系として、発熱測定や発酵過程における菌叢解析と微生物の単離・同定を行った。発熱測定は藍葉の温度上昇の計測とともに、けいはんな文化学術協会製の非破壊微生物活性計測システム Antares 0204FP（19 試料同時計測）を用いて行った。菌叢解析には DGGE 法を、微生物の増殖評価にはリアルタイム PCR 法を用いた。
【結果と考察】発酵中の藍葉では *Rhizopus* 属（真菌）、*Aspergillus* 属（真菌）、*Pantoea* 属（細菌）の近縁種が主に検出されたが、抗生物質存在下における発酵熱生成から、この系では真菌類が発酵熱生成に寄与していることが明らかとなった。一方、*E. coli* の ATP 合成酵素複合体の ε サブユニット欠損株では野生株に比べ発熱が抑制され、α サブユニット欠損株においては発熱が認められなかった。これらの結果より、*E. coli* では酸化的リン酸化による ATP 合成が発熱に必要である可能性が示唆された。

fermentation heat, FoF1 ATPase, biophysical chemistry

講演番号：4B04a02
講演日時、会場：3 月 30 日 09:11～ B 校舎 04 会場

プロテアーゼ処理をした 100%米粉パンの香気成分

Odor compounds from gluten-free rice bread treated by protease

○小西 康子[1]、本多 千咲[1]、笹木 哲也[2] ([1]石川県大食品、[2]石川工試)
○Yasuko Konishi[1], Chisaki Honda[1], Tetsuya Sasaki[2] ([1]Ishikawa Prefectural Univ., [2]Industrial Research Institute of Ishikawa)

【目的】小麦グルテンは、パンの生地に粘弾性やイーストの発酵過程で産生したガスを保持する能力を与えることから、パン製造に不可欠な成分である。一方、米粉はグルテンを形成するタンパク質を含有していないため、米粉 100%でパンを製造すると十分な膨脹が得られず、体積が小さくキメが粗い硬いパンとなる。我々は、プロテアーゼ処理により米粉 100%パンのこのような品質を改善できることを明らかにした [1)]。プロテアーゼ処理をしたパンは独特の香ばしい匂いを有している。そこで、本研究では焼成パンの香り成分とバッターのアミノ酸を分析し、パンの品質に与えるプロテアーゼ処理の効果について検討した。
【方法】基本製パン材料（米粉・水・砂糖・塩・オリーブオイル・ドライイースト）にプロテアーゼ（サモアーゼ PC10F、天野エンザイム㈱製）を添加し、ホームベーカリーで焼成したものをプロテアーゼ処理パンとした。同様の工程で、プロテアーゼを添加していない無処理パン、失活させたプロテアーゼを添加したパンを作成した。これら米粉パンの香気成分を固層マイクロ抽出法により捕集し、GC/MS を用いて分析した。また、匂い嗅ぎ評価により、香りが感じられる香気成分を特定した。あわせて、発酵前後のバッターのアミノ酸分析を行った。
【結果・考察】GC/MS で分析した結果、100%米粉パンにはいくつかの特徴的な香気成分が含まれていることが判明した。特に、メチオノールは、プロテアーゼ処理パンにのみ検出され、匂い嗅ぎ評価においても発酵臭として確認された。アミノ酸分析の結果から、プロテアーゼ処理バッターは、無処理パンやプロテアーゼ失活パンと比較して、アミノ酸が多く含まれていた。続いて、プロテアーゼ処理バッターの発酵によるアミノ酸量変化を評価した結果、ほとんどのアミノ酸が発酵により増加したのに対し、Met と Leu のみ減少したことが確認された。GC/MS 分析により、メチオノールとイソペンチルアルコールが検出されたことから、Met と Leu の減少は、酵母によってそれぞれがメチオノールとイソペンチルアルコールへと代謝されたためと考えられる。以上の結果から、プロテアーゼ処理によってバッターのアミノ酸量が増加し、それらが酵母によって代謝されて生成した揮発性成分が、プロテアーゼ処理米粉パンが有する特徴的な香りの一因であることが示唆された。

1） Y. K-Konishi,,*et al. J.Cereal Sci.* **58** (2013) 45-50

Rice bread, Order compound

講演番号：4B04a03
講演日時、会場：3 月 30 日 09:22～ B 校舎 04 会場

にがり成分が食塩の呈味性に及ぼす影響

Influence of bittern components on the taste of salts

○遠藤 由香、石川 匡子（秋田県立大学院生物資源）
○Yuka ENDO, Kyoko ISHIKAWA (Akita Pref. Univ.)

【目的】塩専売法が廃止されて以降、にがり成分を含む塩が多数販売されるようになった。これらの塩は、塩化ナトリウムのみからなる単純塩(食塩)とは味質が異なると言われている。我々はこれまで市販塩を用い、にがり含有量によって塩味や苦味に与える影響が異なることを明らかにしてきた。しかし、にがりを構成するどの成分が塩の味に影響するか、どの程度含まれていると味の違いとして認識できるかは分かっていない。そこで、本研究では、にがりの構成成分と塩味の味質の関係について、官能検査および味覚センサを用いて検討を行った。
【方法】にがり構成成分の中から、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、硫酸ナトリウム、塩化カリウムを用いた。基準となる食塩水の塩化ナトリウム濃度は 0.8%に設定し、そこに各にがり成分を 3～4 段階の濃度で添加したにがり添加食塩水を調製した。官能検査は、順位法、3 点識別法を用い、塩味、苦味の強さを評価した。官能検査に用いたにがり添加食塩水について味覚センサ（味認識装置 SA-402、株式会社インテリジェントセンサテクノロジー)測定を実施した。
【結果】官能検査により、にがり添加での塩味への影響を検討した結果、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウムの 2 種類は、にがり無添加食塩水に比べ、塩味が弱く感じられ、添加量の増加に比例して塩味も軽減されるということが明らかになった。これはいずれのにがり成分も独特の苦味やえぐみなどを持っており、食塩水に添加することで味全体は濃くなるものの、塩味とは評価できなかったと考えられる。硫酸ナトリウムは他のにがり成分とは異なり、味の変化が認識しづらく、添加量による味への影響もほとんど見られなかった。これは硫酸ナトリウム自体が無味であるため、食塩水の味に与える影響も少なかったと考えられる。また、塩化カリウムについても、市販塩に含まれる程度では識別困難なパネルもいた。これらの溶液について味覚センサ測定を実施した結果、塩味の強さおよび味質に変化が認められなかった硫酸ナトリウム添加食塩水は、無添加食塩水と同じ応答パターンを示した。苦味が感じられ、塩味を弱く感じた塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム添加食塩水については、苦味の応答パターンが無添加食塩水と異なっており、塩の味質が苦味やえぐみの影響で変化し、塩味と評価できなかったという官能検査の結果を支持するものであった。

bittern component, saltiness, taste sensor

講演番号：4B04a04
講演日時、会場：3 月 30 日 09:33～ B 校舎 04 会場

マウスを利用した香辛料抽出物による塩味増強評価

Evaluation of saltiness enhanced by spice extract based on mice behavior

○安室 憲一[1]、河合 崇行[2]、日下部 裕子[2]、足立 謙次[1]、安部 忍[1]、濱口 隆[1] ([1]小川香料（株)、[2]農研機構　食品総合研究所)
○Kenichi YASUMURO[1], Takayuki KAWAI[2], Yuko KUSAKABE[2], Kenji ADACHI[1], Shinobu ABE[1], Takashi HAMAGUCHI[1] ([1]Ogawa & Co., Ltd., [2]National Food Research Institute)

【目的】　塩化ナトリウムは飲食物へ塩味を付与し、おいしさを表現するうえで欠かすことのできない素材であるが、ナトリウムの過剰摂取は高血圧症など多くの疾患の原因と考えられている。そのためナトリウム摂取量低減を目的に様々な減塩素材の開発が試みられている。演者らは塩味増強効果があるオランダセンニチ抽出物に含まれるスピラントールを使用し、スピラントールの塩味増強効果を嗜好性という観点から動物行動学に基づき定量評価するとともに作用メカニズムを考察した。
【方法】　実験 1：C57BL/6 マウスをリック測定装置内でショ糖溶液を用いてトレーニングした後、ナトリウム制限食と利尿薬スピロノラクトンを加えた餌を与えて約 3 週間飼育した。その後 0～60mM 塩化ナトリウム水および塩化ナトリウム水にスピラントールを加えた溶液を提示し、10 秒間のリック回数を測定した。
実験 2：上記トレーニングを実施した後、通常食を与えて飼育したマウスを 20 時間絶水ののち 0～1M 塩化ナトリウム水および塩化ナトリウム水にスピラントールまたは塩化カリウムを加えた溶液を提示し、10 秒間のリック回数を測定した。
【結果】　ナトリウム制限食と利尿剤を常時摂取させた脱塩状態のマウスでは塩化ナトリウムの濃度にかかわらず 30ppm のスピラントールを加えるとリック数が増加した。一方、通常食を摂取し、0～1M と高濃度の塩化ナトリウムを試験したマウスでは 10ppm のスピラントールまたは塩化カリウムを加えるとより低濃度の塩化ナトリウム水からリック数の低下がみられた。
塩味には塩化ナトリウム特異的な塩味と塩化カリウムなどによっても引き起こされる非特異的な塩味があると考えられている。脱塩状態のマウスは食塩濃度に応じてリック数が増加するが塩化カリウムを加えてもリック数は変化しない（Kawai ら 2011 年)。そのためリック数の増加はナトリウム特異的な塩味による嗜好性の向上を反映しているものと考えられる。一方、高濃度の塩化ナトリウムに対しては塩化ナトリウムも塩化カリウムも同様の忌避行動を引き起こしたことから、高濃度の塩化ナトリウムでの評価は非特異的な塩味強度を反映していることが示唆される。
この結果から、高濃度のスピラントールの塩味増強効果はナトリウム特異的塩味経路と非特異的塩味経路の両方に作用することが示唆され、低濃度のスピラントールは主に非特異的な塩味経路に作用することが示唆された。

salt taste, lick, spilanthol

講演番号：4B04a05
講演日時、会場：3 月 30 日 09:44～ B 校舎 04 会場

半脱脂米糠麹による酵素生産と糖化液の特徴

Properties of enzyme production and saccharification by semi-defatted rice bran-*koji*

○鬼島 直子[1,2]、勝見 直行[1]、遠藤 修二郎[3]、川瀬 蓮[4]、小関 卓也[5]([1]山形県農業総合研究センター、[2]宮城大学大学院食産業、[3]三和油脂株式会社、[4]サンブラン株式会社、[5]山形大学農)
○Naoko KIJIMA[1,2], Naoyuki KATUMI[1], Syujiro ENDO[3], Ren KAWASE[4], Takuya KOSEKI[5] ([1]Yamagata Integrated Agricultural Research Center, [2]Miyagi Univ, [3]Sanwa-yushi Co.,Ltd, [4]SUNBRAN CO., ltd, [5]Yamagata Univ.)

【目的】米糠は、米全体の約１割を占めており、栄養的には優れた成分を含むが、酸化安定性・細菌繁殖・食味等の問題があるために、食品利用は少ない。我々の研究チームでは米糠を食品として利用することを目的に研究を行っている。具体的には、物理的な圧搾で脂質を除き半脱脂とした米糠を原料として、食味が良い米糠発酵素材を作ることを目標としている。食品開発の第一段階として、半脱脂米糠について麹菌を用いて麹にする方法を検討し、米糠麹とその糖化物の基本的な性質を明らかにする。
【方法】物理的な圧搾と加熱処理を行って安定した品質の半脱脂米糠を原料として用いた。原料の比較対象としては、米粉（粳米を粉砕した粉や酒米の吟上糠＝白糠）を用いた。製麹試験は、半脱脂米糠粉末を、小型の製麺機を用いて成形し、麹菌の繁殖しやすい米粒状に近い固形状にして行った。米粉及び米粉と米糠の混合についても、同様に成形して製麹の材料とした。はじめに、米粉、米糠米粉混合、米粉の３試験区について、焼酎用の麹で製麹する試験を行い、できた麹の品質を評価した。次に、米糠と米粉の麹について、麹菌の比較試験を行った。種麹は、市販の４種（甘酒用、甘酒・味噌用、焼酎用、みりん用、いずれも秋田今野もやし㈱製）を用いて行い、できた麹の品質を評価した。製麹は、成形したそれぞれの原料を加熱殺菌及び水分調整し、麹菌を接種、35℃、湿度 90%以上の条件で培養をスタートして行った。麹の品質は、麹を糖化した成分及び酵素活性を測定して評価した。

【結果】米糠を成形したものは、米粉の成形物に比較して、水分の少ない渇き気味の麹に仕上がった。米糠の割合を変えて行った製麹試験では、米糠の麹が、米粉麹、米粉米糠混合麹よりも液化量が多く、α-アミラーゼ活性が米粉麹、米粉米糠混合麹のいずれとも２倍以上と高く、グルコアミラーゼ活性は米粉麹よりも米糠麹、米粉米糠混合麹で高かった。また、キシラナーゼ及びフェルラ酸エステラーゼ活性は、米糠麹で顕著に高かった。4 種の麹菌を比較した製麹試験では、焼酎用麹菌の麹がその他の麹菌に比べて、液化量が最も多く、糖化した液の pH が低く、有機酸分析を行ったところクエン酸が多く含まれていた。4 種の種麹を用いた麹のグルコアミラーゼ、キシラナーゼおよびフェルラ酸エステラーゼ活性は、焼酎用麹菌の米糠麹で高い活性が見られた。以上、原料に米糠を用いることで、糖化力やフェルラ酸抽出力の強い麹が得られることが示唆された。

rice bran, *koji*, enzyme production

講演番号：4B04a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ B 校舎 04 会場

梅酢由来ポリフェノール調製物（UP)の構成化合物の解明

Chemical component elucidation of Umezu Phenolic preparation (UP)

○堀西 朝子[1]、葛巻 里紗[1]、部屋 雄一[1]、多中 良栄[2]、三宅 靖仁[2]、高垣 昌史[2]、森 一[2]、岸田 邦博[1]、尾崎 嘉彦[1]([1]近畿大・生物理工、[2]和歌山県工技セ)
○Asako HORINISHI[1], Risa KUZUMAKI[1], Yuichi HEYA[1], Yoshie TANAKA[2], Yasuhito MIYAKE[2], Masashi TAKAGAKI[2], Hajime MORI[2], Kunihiro KISHIDA[1], Yoshihiko OZAKI[1] ([1]Kinki Univ., [2]Ind. Tech. Ctr. of Wakayama Pref.)

【目的】

梅酢より合成吸着樹脂を用いて回収した梅酢ポリフェノール調製物（UP）の構成成分の解析を進めている。これまでに、UP に含まれるフェノール性化合物は、*p*-クマル酸、カフェ酸、フェルラ酸等のヒドロキシ桂皮酸類とキナ酸、アセチル化ショ糖あるいは細胞壁由来の糖等が結合した誘導体から構成されることを報告してきた。しかし、これらの構成比については、明らかにされていなかった。本研究では、UP をゲル濾過クロマトグラフィーにより分画し、得られた画分についての分析を行い、UP の構成化合物の定量的解析を試みた。

【方法】

Superdex75 カラム(HiLoad16/600)を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより、フェノール性化合物含量（フォーリン・チオカルト法）と糖含量（フェノール硫酸法）を指標に UP を分画し、Fr.1-6 の 6 つの画分を得た。次に各画分をアルカリ加水分解し、HPLC 分析により基本骨格となるヒドロキシ桂皮酸の分布を調べた。また、HPLC、LC-MS、NMR などで各画分の化学的特性を調べた。

【結果】

蒸留水に溶解した UP30mg をカラムにロードし、0.5%ギ酸水溶液で展開したところ、まず糖のピーク（Fr.1）が出現し、その後フェノール性化合物のピーク（Fr.2-6）が出現した。Fr.1-5 をアルカリ加水分解すると、Fr.1-3 からは *cis* および *trans*-*p*-クマル酸とフェルラ酸、Fr.4 と 5 からは、カフェ酸のみが検出された。Fr.6 には遊離のヒドロキシ桂皮酸類が検出された。Fr.1 は酸加水分解により、アラビノース、ガラクトース、グルコースとキシロースを遊離したことから、細胞壁多糖由来の成分と考えられる。Fr.2 には LC-MS 分析で *p*-クマル酸のポリアセチル化ショ糖配糖体（プルノース類）が多く含まれることが確認された。Fr.4 はネオクロロゲン酸、Fr.5 はクロロゲン酸であることが NMR で確認された。現在、さらに詳細な量的解析を進めている。

Prunus mume, Umezu phenolics, polyphenol

講演番号：4B04a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ B 校舎 04 会場

Rosa gallica の花弁に含まれるヒスチジン脱炭酸酵素阻害成分の探索
Identification of recombinant human histidine decarboxylase inhibitors from petals of *Rosa gallica*
○秋本 梢[1]、渡邉 裕香[2]、新田 陽子[2]、植野 洋志[1]、小林 慧子[1]、菊崎 泰枝[1] ([1]奈良女子大院、[2]岡山県立大保健福祉)
○Kozue AKIMOTO[1], Yuka WATANABE[2], Yoko NITTA[2], Hiroshi UENO[1], Keiko KOBAYASHI[1], Hiroe KIKUZAKI[1] ([1]Nara Woman's Univ., [2]Okayama Prefectural Univ.)

【目的】
ヒスチジン脱炭酸酵素（HDC）はヒスタミンの生成を触媒する酵素である。ヒスタミンには、胃酸分泌や血管透過性亢進、平滑筋収縮などのほか、アレルギー反応に関与するという面も持っている。そのため、HDC 活性を制御する成分はヒスタミンが介在して生じるアレルギー症状や胃潰瘍の治療に有用であると考えられる。しかし、HDC 活性を阻害する成分についての研究は限られている。先行研究として 9 種のバラ科植物の HDC 阻害活性を詳細に調べたところ、*Rosa gallica* の花弁の HDC 阻害活性が高いことが分かった。そこで、本研究はハーブティーなどに利用される *Rosa gallica* の花弁に含まれる HDC 阻害成分の解明を目的とした。
【方法・結果】
ヒスタミンはピリドキサール 5'-リン酸の存在下で基質ヒスチジンと HDC 粗酵素液を反応させたのち、生成したヒスタミンを *o*-フタルアルデヒド法で定量した。HDC 阻害活性は、試料添加によるヒスタミン生成抑制の割合から算出した。
Rosa gallica の花弁をヘキサン、塩化メチレン、酢酸エチル、水で順次抽出及び分配し、それぞれ HDC 阻害活性試験を行った。結果、酢酸エチル可溶部と水可溶部に HDC 阻害活性が認められ、最も活性の高い酢酸エチル可溶部を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーを用いて 14 画分に分画した。各画分について HDC 阻害活性試験を行ったところ、Fr.3 及び 6-14 に HDC 阻害活性が認められ、特に Fr.9-14 が強い阻害活性を示した。Fr.9-14 をそれぞれ ODS カラムクロマトグラフィーで精製し、5 種の化合物を単離し、NMR にて構造解析を行った。その結果、単離化合物は、加水分解性タンニンの 1,2,3-tri-*O*-galloyl-β-D-glucose、1,2,3,6-及び 1,2,4,6-tetra-*O*-galloyl-β-D-glucose、tellimagrandinⅡ、rugosinA であることが判明した。これら 5 種の化合物、および比較として penta-*O*-galloyl-β-D-glucose の HDC 阻害活性試験を行った。基質が十分存在する条件では、galloyl 基の数の増加に伴い阻害率が大きくなり、galloyl 基の結合位置によっても阻害率が異なることが分かった。また、penta-*O*-galloyl-β-D-glucose よりも tellimagrandinⅡの方が高い阻害率を示したことから、2 つの galloyl 基よりも HHDP 基が阻害に影響すると考えられる。また、化合物によって異なる阻害様式であることが分かった。グルコースに結合している galloyl 基の数や位置、架橋構造の形成の有無などの構造の差異が阻害率や阻害様式に影響を与えていることが示唆された。

hydrolyzable tannin, *Rosa gallica*, histidine decarboxylase

講演番号：4B04a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ B 校舎 04 会場

マヌカ蜂蜜に特有な Leptosin の質量分析による検出定量と認証評価

Quantification of leptosin by mass spectrometry -Plausible authentication of manuka honey-

○加藤 陽二[1]、藤中 里衣[1]、石坂 朱里[1]、北元 憲利[1]、瀧本 陽介[2]([1]兵庫県大環境人間、[2]（株）ヘルスケアシステムズ)
○Yoji Kato[1], Rie Fujinaka[1], Akari Ishisaka[1], Noritoshi Kitamoto[1], Yosuke Takimoto[2] ([1]Univ. Hyogo, [2]Healthcare Systems)

【目的】ニュージーランドで得られるマヌカ蜂蜜は抗炎症作用や高い抗菌活性を有することが知られており、抗菌活性を指標とした Unique Manuka Factor®(UMF®)によりランク付けされている。抗菌活性を担う主な物質は Methylglyoxal(MGO)とされており、MGO 量によりランク付けを行う会社もある。MGO は蜂蜜中の Dihydroxyacetone に由来し、蜂蜜の保温・貯蔵中に MGO に変化するため、検査時に合わせ MGO 含量を調節できる。また、MGO は安価に入手可能で、人為的に添加されるおそれがあり、高い UMF や MGO 値の蜂蜜へ偽装される可能性もある。世界でのマヌカ蜂蜜の年間販売量がニュージーランドでの年間総生産量をはるかに上回るという報告もある。本研究では、演者らが発見した新規配糖体 Leptosin(Methyl syringate 4-*O*- β -D-gentiobiose)及びそのアグリコンである Methyl syringate(MSYR)の検出定量がマヌカ蜂蜜認証に有用であるかどうかを検証する。
【方法】抗菌活性が証明されたマヌカ蜂蜜 20 種を UMF 協会から入手し、HPLC-PDA(多波長検出器)及び四重極型タンデム質量分析器(LC/MS/MS)を用いて成分分析を行った。さらに、マヌカ蜂蜜の添加された飴などのサンプルから LC/MS/MS を用いた Leptosin 及び MSYR の微量検出定量を行った。
【結果】20 種類のマヌカ蜂蜜サンプルを HPLC-PDA 分析したところ、Leptosin と抗菌活性との間に高い相関関係が見られたが(r=0.732**, p<0.01)、MSYR では相関は認められなかった。次に LC/MS/MS(multiple-reaction monitoring, MRM 法)による 1 検体 15 分間の迅速高感度な手法を検討した。ESI 法では、MSYR を検出できず、APCI 法により 2 成分の同時検出定量が可能となった。その際、Leptosin 及び MSYR の内部標準物質として、*p*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside と 3,4,5-Trimethoxybenzoic acid をそれぞれ用いた。測定の結果、HPLC 法との高い相関が認められ(Leptosin: r=0.839**, p<0.01, MSYR: r=0.949**, p<0.01)、Leptosin については同様に抗菌活性とも高い相関性を示した(r=0.830**, p<0.01)。これにより、LC/MS/MS による測定法の信頼性が証明された。UMF 表示のあるマヌカ蜂蜜入り飴や化粧品を LC/MS/MS により分析したところ、微量に含まれる Leptosin と MSYR を検出できたことから、実際に製品へのマヌカ蜂蜜の添加を確認できた。
【結論】
HPLC 及び LC/MS/MS による Leptosin 及び MSYR の検出定量結果から、Leptosin はマヌカ蜂蜜及びマヌカ蜂蜜添加製品の認証評価に有用なケミカルマーカーになり得ることが明らかとなった。

manuka honey, authentication, leptosin

講演番号：4B04a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ B 校舎 04 会場

ワインに含まれるレスベラトロール誘導体の検出

Analysis of resveratrol derivatives in wine

吉田 知夏[1]、來住 明宣[2]、松川 泰治[2,3]、茶山 和敏[3]、○細谷 孝博[1]、熊澤 茂則[1] ([1]静岡県大食栄、[2]ユーハ味覚糖、[3]静岡大自然科学)
Chinatsu Yohida[1], Akinobu Kishi[2], Taiji Matsukawa[2,3], Kazutoshi Sayama[3], ○Takahiro Hosoya[1], Shigenori Kumazawa[1] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Mikakuto Co., Ltd., [3]Shizuoka Univ.)

【目的】調理をすることは、食材を加熱したり高圧化にさらしたりすることであるが、そうした条件下において、含有する成分が調理中の熱や圧力により変化をする可能性がある。我々はこれまでに、ワイン中に含まれるポリフェノールの一種であり、抗酸化活性や Sirtuin 1 遺伝子を活性化することで知られるレスベラトロールが、数種のポリフェノール成分と高温、高圧化にさらすことで、レスベラトロールの重合体や、他成分と重合体を形成することを見いだしている。その得られた重合体成分の構造は既に決定しており、新規レスベラトロール誘導体として報告している。また、得られた新規レスベラトロール誘導体は、単量体であるレスベラトロールよりも優れた生理活性を示すことも報告している。我々は、このような重合体成分が、加工調理した食品にも含まれているかどうかを検証するため、種々食品サンプルにおけるレスベラトロール誘導体を系統的に分析することを試みた。
【方法】本研究において対象としたレスベラトロール誘導体は 6 種類であり、レスベラトロールの重合体やレスベラトロールとフェニルプロパノイドの重合体等が含まれる。これらレスベラトロール誘導体の標品は、化学合成にて調製した。分析の対象とした食材は、市販のワイン（赤および白）を用いた。また、ワイン煮などの調理を考慮し、ワインを加熱したサンプルも測定対象とした。測定サンプルは、固相抽出により前処理を行い、100 ppm に調製したものを分析用サンプルとした。測定に用いた装置は、Orbitrap 検出器付き UHPLC/MS（サーモフィッシャーサイエンティフィック社：Q-Exactive）を用いた。それぞれの誘導体の保持時間および精密質量分析（HRESIMS）により、成分の同定を行った。
【結果】今回分析を行った赤ワインからは、6 種類すべてのレスベラトロール誘導体の成分の存在が確認された。また、白ワインからは、3 種類の成分の存在が確認できた。加熱したワインでは、各成分の有無に変動が見られた。ワイン中のレスベラトロールにおいては、*trans*-レスベラトロールではなく、*cis* 体が検出された。現在、対象とした 6 種類の成分の含有量を明らかにするため、定量分析を行っている。
本研究により、食材を調理することで、食材に含まれる成分が変化することが明らかとなり、特に、ワインに含まれるレスベラトロールにおいては、調理や加工等により、より優れた成分が調理後食材に含まれる可能性があることが明らかとなった。

resveratrol derivatives, wine, analysis

講演番号：4B04a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ B 校舎 04 会場

セネガル産プロポリスに含まれる成分と生理活性に関する研究

Constituents in Senegalese propolis and their biological activities

乾 沙王里[1]、細谷 孝博[1]、吉積 一真[2]、佐藤 一[3]、○熊澤 茂則[1] ([1]静県大院食栄、[2]（株）ファンケル、[3]ブルカー・バイオスピン（株））
Saori INUI[1], Takahiro HOSOYA[1], Kazuma YOSHIZUMI[2], Hajime SATO[3], ○ Shigenori KUMAZAWA[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Fancl, [3]Bruker BioSpin)

【目的】プロポリスとは、ミツバチが周辺の植物から採取した樹脂状物質を巣に蓄えたもので、その採取場所によって原料となる植物（起源植物）はさまざまである。これまでの研究では、ポプラ由来やキク科バッカリス由来のプロポリスがよく知られているが、近年では、起源植物の不明なプロポリスも多く見つかっている。今回我々は、今までに構成成分や生理活性などの研究が行われていなかったセネガル産プロポリスを入手した。そのため、本研究では、セネガル産プロポリスの成分分析と生理活性評価を行うことを目的とした。
【方法】セネガルのファティック州で採取されたプロポリスの原塊 41 g をエタノールで抽出し、29 g の抽出物を得た。エタノール抽出物を、ヘキサン層、酢酸エチル層、水層に分画し、そのうち酢酸エチル層からシリカゲルカラムクロマトグラフィーと分取 HPLC を用いて、10 個のフェノール性化合物を単離した。それらの化合物を MS、NMR 等の各種分析機器を用いて構造解析を行った。また、プロポリスのエタノール抽出物を用いて、抗菌及び抗酸化活性等の生理活性評価を行った。
【結果】セネガル産プロポリスエタノール抽出物を HPLC 分析したところ、これまでに知られているプロポリスとは、異なったピークパターンを示した。単離した 10 個の化合物のうち、7 個は phenanthrene 骨格の既知化合物であり、3 個は stilbene 骨格の既知化合物であった（図 1）。これらの化合物のほとんどは *Combretum* 属の植物より単離されていたため、セネガル産プロポリスの起源植物は *Combretum* 属の植物である可能性が考えられた。セネガル産プロポリスエタノール抽出物は、弱い抗菌及び抗酸化活性を示した。現在、その他の生理活性評価を進めており、合わせて報告する。

なお、今回の研究試料の入手にあたっては、国際協力機構（JICA）の実施する「セネガル国一村一品運動を通じた地場産業振興プロジェクト」に協力いただいた。

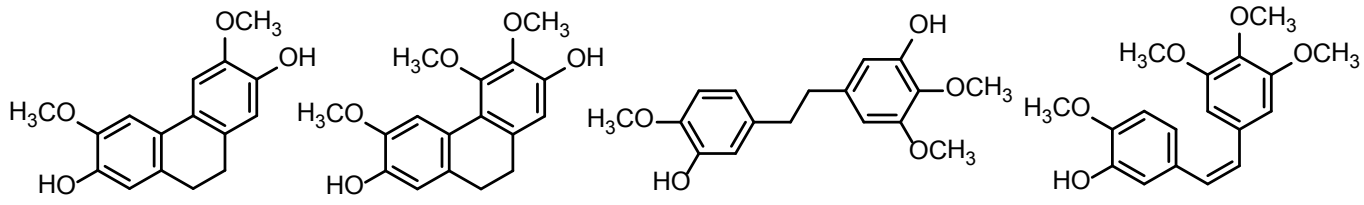


図 1. セネガル産プロポリスより単離、構造決定した主なフェノール成分

propolis, Senegal, phenanthrene

講演番号：4B04a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ B 校舎 04 会場

枯草菌における EGCg と相互作用する菌体表層タンパク質の解析

Identification of envelope proteins interact with in *Bacillus subtilis*

○島谷 佳奈果[1]、中山 素一[1]、小澤 忠弘[1]、富山 大輔[1]、湯井 幸治[1]、野中 愛[2]、香月 真央[2]、宮本 敬久[3] ([1]花王(株)・安全性科学研、[2]九大・生資環、[3]九大院・農)

○Kanami SHIMATANI[1], Motokazu NAKAYAMA[1], Tadahiro OZAWA[1], Daisuke TOMIYAMA[1], Koji YUI[1], Ai NONAKA[2], Mao KATSUKI[2], Takahisa MIYAMOTO[3] ([1]Kao Corp., [2]Kyushu Univ., [3]Kyushu Univ.)

【目的】カテキン類が各種微生物に対し高い抗菌性を示すことは良く知られているが、菌体への吸着部位等、カテキンの抗菌メカニズムについては未知な部分が多い。我々はこれまでに、細胞表層におけるカテキンの存在部位をセリウムを用いた可視化技術により解析し、EGCg が菌体の細胞表層に吸着していることを明らかにした。さらに、グラム陰性菌の *Escherichia coli* において、EGCg は外膜タンパク質であるポリンの孔内部の塩基性アミノ酸と結合して塞ぎ、物質の取り込みを阻害することが抗菌メカニズムの一つであることを明らかとした。今回、抗菌性が強く発現するグラム陽性菌の *Bacillus subtilis* において、EGCg と結合するタンパク質の分離・同定を行い、その機能に対する EGCg の影響を検討した。

【方法および結果】EGCg で 1 時間処理を行った *B. subtilis* の菌体破砕上清を二次元電気泳動に供した結果、EGCg 未処理菌体(コントロール)と EGCg 処理菌体では、二次元電気泳動のパターンが異なった。EGCg 処理することで、スポット強度が減少、またはスポットが消失したタンパク質は、カテキンと相互作用し、不溶化したものと考えられた。変化が認められたスポットのタンパク質を抽出して同定した結果、EGCg と相互作用する細胞表層の候補タンパク質として、ABC transporter、PTS system transporter、 penicillin - binding protein (PBP) が見出された。

Oligo peptide ABC transporter との EGCg との相互作用を、ドッキングシュミレーションにて解析した結果、EGCg は Oligo peptide ABC transporter の Open 構造における内側の塩基性アミノ酸側鎖と水素結合していることが示唆された。EGCg が Open 構造に取り込まれた後、Close 構造への構造変換を阻害することで、基質である Oligo peptide の輸送を阻害していると考えられた。枯草菌のグルコース取り込みの主たる経路は、ホスホトランスフェラーゼシステム (PTS) である。この PTS system transporter と EGCg の相互作用について調べるため、グルコース取り込みに伴う酸素消費速度を DOX(ダイキン社製)を用いて測定した。その結果、EGCg 処理菌体ではグルコース取り込み速度の低下が認められた。

以上の結果から、*B.subtilis* において、EGCg は速やかに細胞表層の種々の膜タンパク質に吸着し、膜タンパク質の機能を阻害することで、抗菌性を発現しているものと考えられた。

catechin, Bacillus subtilis, proteome analysis

講演番号：4B04a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ B 校舎 04 会場

水気耕栽培の食品学的利用に関する研究

Utilization of the Hydroponic culture in Food Science

○後藤 英子（実践女子大学)
○Eiko Goto (Jissen Women's Univ.)

目的

本研究では水気耕栽培に注目し、植物性食物の栽培を通して栽培管理技術を習得するとともに、栽培環境の計測情報をオンラインでコンピュータに取り込み時系列データを集積して、水気耕栽培適用による種と養分履歴を明確にする食物のトレイサビリティ管理の可能性を研究した。

方法

- 栽培には研究室に置ける規模の水気耕栽培装置と温度と照明を制御できる人工気象器を用いた。
- 試料として屋内の研究室でトマトとパセリを栽培した。
- トマトは水気耕栽培装置を用い 4 月から 12 月まで栽培し､開花した後は人工照明で照度を補った。
- パセリは人工気象器（室温 20℃と人工照明）による水耕栽培記録である。栽培条件の違いとして水源の異なる湧き水と雨水と水道水による栽培を行い比較した。
- 栽培管理記録とした測定項目は温度、湿度、光度、水素イオン濃度、導電率、溶存酸素である。測定値はオンラインでコンピュータに取り込んだ。
- 収穫作物は成分分析を行い品質評価表を作成し、併せてデジタルマイクロスコープによる種子、根、茎、葉、花の画像データベースを作成した。

結果

- トレイサビリティデータとして種子と栽培履歴が明確なトマトとパセリを収穫し、品質評価表と植物の構造を示す画像（種子、茎、葉、花等）のデータベースを作成できた。
- 栽培期間に水温と光度を経時的に測定し、栽培管理にフィードバックする管理方法を蓄積した。
- 人工気象器を使用した水耕栽培パセリでは、水源の異なる水道水、雨水、湧き水による試料の間で一般成分（水分、灰分、タンパク質、炭水化物など）に明確な差は認められなかった。
- 安心・安全なトマト栽培法として水気耕栽培を行うことにより殺虫剤、除草剤などの農薬を使用すること無く、トマトの収穫に至った。また、本栽培法により、環境要因は気温 25±2℃、水温 26±3℃（至適範囲 25～30℃)、水素イオン濃度 6.3（至適範囲 5.5～6.5）を栽培期間維持できた。
- 光度は天気との関連が高く、目視の天気観測による晴天、曇天、雨天等と光度（Lux）の計測値の関係は晴天 2480±1406Lux、曇天 2278±1040Lux、雨天 1473±728Lux と計測された。トマト栽培において光度不足時には人工照明を用いる目安が得られた。

hydroponic culture, traceability, food science

講演番号：4B04a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ B 校舎 04 会場

各種清酒の水素・酸素安定同位体比

Hydrogen and oxygen stable isotope ratios of various sake

○橋口 知一、伊豆 英恵、橋本 知子、藤田 晃子、藤井 力 (酒類研)
○Tomokazu HASHIGUCHI, Hanae IZU, Tomoko HASHIMOTO, Akiko FUJITA, Tsutomu FUJII (NRIB)

【背景】演者らは清酒中の水の酸素安定同位体比（$\delta^{18}O$）とその原料水（又は湧水）のそれの間には相関があり、清酒の $\delta^{18}O$ は原料水起源解析の科学的根拠となる可能性があることを報告した。$\delta^{18}O$ と同様に原料水起源解析に用いられる水素安定同位体比（δD）について、広島県西条地区の各種清酒を分析したところ、アルコール添加量の多い清酒ほどδD が小さくなる傾向が見られた。清酒に使用される醸造アルコールは、一般に C4 植物由来であるため、アルコール添加酒は炭素安定同位体比（$\delta^{13}C$）で判別することができる。しかし、米を原料としたアルコールを清酒に使用した場合は、$\delta^{13}C$ での判別は困難であると考えられる。そこで、δD によるアルコール添加酒及び純米酒の判別について検討することとした。
【方法】(1)アルコール添加量を変えた仕込試験：総米 100g の仕込を定法に従って２連で製造し、アルコール添加量を 116 L/t（本醸造規格)、280 L/t（いわゆる普通酒程度）とした。アルコールは、米由来のものと C4 植物由来のものをそれぞれ用いた。上槽後、仕込水と同一の水を用いてアルコール分を 15%に調整した。(2)市販酒分析：米アルコール添加酒及び純米酒を製造しているＡ社、Ｂ社、Ｃ社及びＤ社の市販酒計 28 点を小売店から購入した。(3)米アルコール添加酒の仕込試験：当研究所で製造した米アルコール添加酒及び純米酒は、総米 100kg の仕込を定法に従って２連で製造し、上槽直前にもろみを２分割し、片方をそのまま上槽、他方に四段仕込、112 L/t の米アルコール添加を行って上槽した。(4) δD 及び $\delta^{18}O$ 分析：熱分解型元素分析計（TC/EA, Thermo Fisher Scientific）を接続した質量分析計(DELTA V, Thermo Fisher Scientific)で行った。
【結果及び考察】アルコール添加量を変えた仕込試験については、アルコール添加量が増加するほど、δD が小さくなる傾向が見られた。これは、添加アルコールのδD は、米由来-126‰、C4 植物由来-116‰と仕込水の-48.2‰より小さい値であるためと考えられる。当所製造清酒を含む同一メーカーの米アルコール添加酒と純米酒のδD を比較すると、全社とも米アルコール添加酒のδD は純米酒のそれより小さかった。同一メーカーの純米酒及び米アルコール添加酒のδD により、米アルコール添加酒を判別できる可能性が示された。

sake, hydrogen stable isotope ratio, alcohol fortification

講演番号：4B05a02
講演日時、会場：3 月 30 日 09:11～ B 校舎 05 会場

ローズマリー(*Rosmarinus officinalis*) 精油成分の神経分化促進作用による抗ストレス作用
Anti-stress effect of compounds of *Rosmarinus offcinalis* essential oil
○池谷 亜有美[1]、HAN Junkyu[1,3]、NEFFATI Mohamed[2]、礒田 博子[1,3] ([1]筑波大院生命環境、[2]チュニジア国立乾燥地研究所、[3]北アフリカ研究センター)
○ Ayumi IKEYA[1], Junkyu HAN[1,3], Mohamed NEFFATI[2], Hiroko ISODA[1,3] ([1]University of Tsukuba, [2]IRA, [3]ARENA)

【目的】ストレスの蓄積は神経細胞死、海馬萎縮などの機能障害を招き、うつ病、記憶障害などの重篤な疾患の一因となることが知られている。ストレスに対して、数種の植物由来精油は鼻からの成分吸入により抗ストレス作用を示すことが報告されている。本研究では、伝承薬効としてリラックス効果が知られ、含有ポリフェノールにおいて神経保護作用が報告されている地中海産ローズマリー(*Rosmarinus officinalis*)精油に関して、ICR マウスを用いた吸入経路による短期間ストレスに対する抗ストレス作用および、神経分化モデル細胞である PC12 細胞を用いた神経分化促進作用について調査した。
【方法】ICR マウスにて 50μl、100μl の *R. officinalis* 精油の 30 分間吸入を毎日、6 分間の尾部懸垂試験を隔日で 7 回、１４日間の行動試験を行った。その後、血清サンプル及び脳サンプルを摘出し、血清中コルチコステロン濃度、脳中神経伝達物質濃度測定を行った。神経分化モデル細胞である PC12 細胞にて *R.officinalis* 精油処理による神経分化促進作用を調査した。*R. officinalis* 精油処理濃度は細胞毒性評価において毒性の見られなかった 10μg/ml に統一し、以下の実験を行った。神経分化の指標として、神経分化後に分泌活性上昇が見られる酵素アセチルコリンエステラーゼ(AChE)の活性を測定した。次に遺伝子レベルにおける神経分化促進作用に関して、神経分化、神経突起伸長関連遺伝子である Growth associated protein 43 (*Gap43*)の発現量を測定した。また、神経伝達物質分泌能に関して、神経伝達物質アセチルコリンとその基質コリンの分泌量を測定した。
【結果】尾部懸垂試験において、*R.officinalis* 精油吸入によりストレス状態の指標である無動時間の減少が見られた。コルチコステロン濃度測定では、精油吸入群にて減少が見られた。神経伝達物質濃度測定では、精油吸入群にてドーパミン濃度の上昇が見られた。PC12 細胞において、*R. officinalis* 精油処理による AChE の活性上昇、*Gap43* 発現上昇、アセチルコリン及びコリン分泌量増加が見られた。
【まとめ】以上から、*R. officinalis* 精油は吸入により ICR マウスにてホルモン、神経伝達物質量調節により抗ストレス作用を示し、PC12 細胞にて酵素活性上昇、遺伝子発現上昇、神経伝達物質分泌促進により神経分化促進作用を示した。ここから *R.officinalis* 精油の神経分化促進作用と抗ストレス作用の関連性があることが示唆された。

Rosmarinus officinalis, anti-stress, neuronal differentiation

講演番号：4B05a03
講演日時、会場：3 月 30 日 09:22～ B 校舎 05 会場

大豆由来の新規ペプチドは経口投与により迷走神経を介して抗不安作用を示す

A novel bioactive peptide derived from soy b-conglycinin exhibits anxiolytic-like activity via vagus nerve after oral administration

○太田 愛美[1]、水重 貴文[1]、金本 龍平[1]、鈴木 秀幸[2]、柴田 大輔[2]、大日向 耕作[1]（[1]京都大院農、[2]公益財団法人かずさ DNA 研究所）
○Ami OTA[1], Takafumi MIZUSHIGE[1], Ryuhei KANAMOTO[1], Hideyuki SUZUKI[2], Daisuke SHIBATA[2], Kousaku OHINATA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kazusa DNA Res. Inst.)

【目的】本研究では、主要な大豆種子貯蔵タンパク質β-コングリシニンを消化管酵素で消化した際に生成する抗不安ペプチドをマウス行動試験により探索し、経口投与で強力な抗不安作用を示す新規ペプチドを見出した。さらに、その作用機構を検討した。
【方法】大豆β-コングリシニンを各種消化管酵素で消化し、得られた消化物の抗不安作用を高架式十字迷路試験で評価した。LC/MS を用いた消化物中ペプチドの網羅的解析および、これまでに見出した抗不安ペプチドの構造－活性相関に基づき［1-2］、候補ペプチドを絞り込んだ。さらに、候補ペプチドを化学合成し、高架式十字迷路およびオープンフィールド試験により抗不安作用を検討した。
【結果および考察】大豆β-コングリシニンの各種消化物をマウスに投与し高架式十字迷路試験を行ったところ、キモトリプシン消化物が抗不安作用を示すことがわかった。キモトリプシン消化物の分析により大豆β-コングリシニンαサブユニット（β-Cα）の一次構造中に存在する FLSSTEAQQSY、すなわちβ-Cα(261-271)が候補ペプチドとして得られた。本ペプチドを化学合成し腹腔内投与（0.3-1.0 mg/kg）および脳室内投与（0.03 nmol/mouse）したところ、抗不安作用を示すことがわかった。また、β-Cα(261-271)は 11 残基にも関わらず経口投与で抗不安作用を示し、その最少有効用量は 0.3 mg/kg と医薬品に匹敵した。なお、β-Cα(261-271)の抗不安作用はオープンフィールド試験でも確認された。さらに、その抗不安機構を検討したところ、β-Cα(261-271)の経口投与による抗不安作用は迷走神経切除（vagotomy）により消失することがわかった。おそらく本ペプチドは消化管にまず作用し、迷走神経を介して抗不安作用を示すと考えられる。また、β-Cα(261-271)の抗不安作用は、セロトニン 5-HT_{1A}、ドーパミン D_1 および $GABA_A$ 受容体アンタゴニストにより阻害されたことから、これらの受容体の活性化を介することが明らかとなった。
【結論】大豆β-コングリシニンのキモトリプシン消化により生成するβ-Cα(261-271)は、経口投与により消化管に作用し迷走神経を介して抗不安作用を示すと考えられる。

[1] Kanegawa, N., Suzuki, C. and Ohinata, K. (2010) *FEBS Letter*, 584(3), 599-604.
[2] Mizushige, T., Kanegawa, N., Yamada, A., Ota, A., Kanamoto, R. and Ohinata, K. (2013) *Neuroscience Letter*, 543, 126-129.

soy β-conglycinin, anxiolytic-like activity, vagus nerve

講演番号：4B05a04
講演日時、会場：3 月 30 日 09:33～ B 校舎 05 会場

牛乳由来ペプチド Tyr-Leu-Gly の海馬神経新生作用および抗うつ作用

Antidepressant-like activity of milk-derived peptide, Tyr-Leu-Gly, inducing hippocampal neurogenesis

○内田 朋希[1]、水重 貴文[1,2]、金本 龍平[1]、大日向 耕作[1] ([1]京大院農、[2]京大学際融合生理化学)
○Tomoki Uchida[1], Takafumi Mizushige[1,2], Ryuhei Kanamoto[1], Kousaku Ohinata[1] ([1]Kyoto Univ., [2]C-PIER)

最近、我々は主要な牛乳タンパク質のαs-カゼインを、消化管を想定した酵素条件で処理した際に、トリペプチド Tyr-Leu-Gly（YLG）が生成するとともに、YLG が医薬品に匹敵する強力な抗不安作用を示すことを見出した[1]。また、これまで我々は抗不安作用を示す低分子ペプチドが抗うつ活性を併せ持つ場合があることを明らかにしている。そこで本研究では、YLG が、抗うつ活性を示すか否かを行動実験により評価した。また近年、抗うつ薬が効果を示す際に、成体脳の海馬神経新生が起こることが報告され注目されている。そこで YLG の海馬神経新生に及ぼす影響ついて検討した。

【方法】実験動物は ddY 雄性マウスを用いた。抗うつ活性は、強制水泳試験および尾懸垂試験により評価した。強制水泳試験では、ペプチドをマウスに投与し、その 30 分後に円筒形の水槽でマウスを 6 分間遊泳させ無動時間を測定した。尾懸垂試験では、マウスの尾を固定して吊り下げ、6 分間の無動時間を測定した。どちらの試験も、無動時間が減少した場合に抗うつ活性ありと判定した。また、神経新生に及ぼす影響を検討するため、マウスに YLG および臭化デオキシウリジン（BrdU）を投与し、24 時間後に組織固定し脳を摘出した。さらに、新生細胞に取り込まれた BrdU を抗 BrdU 抗体を用いて染色し、海馬における BrdU 陽性細胞数を計測した。

【結果および考察】強制水泳試験において YLG の腹腔内投与および脳室内投与により、無動時間の減少が認められ、抗うつ活性を示すことが明らかとなった。また、YLG の経口投与により無動時間の低下が認められ、経口投与でも効果を示すことが分かった。YLG の尾懸垂試験においても、無動時間の減少が認められ、抗うつ活性を示すことが明らかとなった。以上、二つの評価系で抗うつ作用を確認した。また、YLG 投与によりマウスの海馬歯状回における BrdU 陽性細胞が増加し、海馬神経新生が促進しているものと考えられた。

【結論】牛乳タンパク質由来ペプチドの YLG は、海馬歯状回における神経新生を促進するとともに、抗うつ作用を示すことを新たに見出した。

[1] Mizushige T, Sawashi Y, Yamada A, Kanamoto R, Ohinata K. FASEB J. 27(7):2911-7, 2013

Tyr-Leu-Gly, antidepressant, neurogenesis

講演番号：4B05a05
講演日時、会場：3 月 30 日 09:44～ B 校舎 05 会場

海馬神経新生を誘導する抗うつジペプチド Tyr-Leu の標的受容体同定

Identification of target receptor on antidepressant dipeptides, Tyr-Leu inducing hippocampal neurogenesis

○水重 貴文[1,2]、石田 祐己[2]、金本 龍平[2]、大日向 耕作[2]（[1]京大学際融合、[2]京大院農食品生物）
○Takafumi MIZUSHIGE[1,2], Yuki ISHIDA[2], Ryuhei KANAMOTO[2], Kousaku OHINATA[2] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ. Agr.)

【目的】最近、我々はジペプチド Tyr-Leu（YL）が医薬品に匹敵する強力な抗うつ作用を示すことを見出した。本研究では、YL の標的受容体を脳膜画分のプルダウンアッセイにより探索し、候補受容体として骨形成タンパク質受容体タイプ 1A（$BMPR_{1A}$）を見出した。さらに YL の抗うつ作用が $BMPR_{1A}$ を介しているかを明らかにするとともに、$BMPR_{1A}$ のシグナル伝達に及ぼす YL の影響を検討した。また、うつとの関連が指摘されている海馬神経新生についても検討した。

【方法】マウス脳膜画分を YL 結合担体とインキュベートし、プルダウンして得られた YL 結合タンパク質候補を peptide mass fingerprinting 法により同定した。抗うつ活性は、雄性 ddY マウスに試料を投与し、30 分後に強制水泳試験を実施し評価した。6 分間の行動を観察し、無動時間が減少した際に抗うつ活性がありと判定した。siRNA を脳室内投与し作成した $BMPR_{1A}$ 発現抑制マウスを用いて、YL の抗うつ作用が $BMPR_{1A}$ を介しているか否か検討した。また、神経芽細胞腫 Neuro2a を用いてシグナル伝達に及ぼす影響を検討した。神経新生は、海馬初代培養細胞を用いて、新生細胞に取り込まれるブロモデオキシウリジン（BrdU）の陽性細胞数をカウントすることにより評価した。

【結果および考察】マウス脳膜タンパク質画分を YL 結合担体でプルダウンしたところ、YL の標的受容体候補として $BMPR_{1A}$ が検出された。強制水泳試験において、YL 投与により無動時間が減少し抗うつ作用が認められる一方、*in vivo* RNAi により海馬 $BMPR_{1A}$ 発現を抑制したマウスでは YL の抗うつ作用が消失した。したがって、YL が $BMPR_{1A}$ 受容体を介して抗うつ作用を示すことが明らかとなった。$BMPR_{1A}$ はセリン/スレオニンキナーゼ活性を示す受容体で、本受容体の活性化により細胞内 Smad 1/5/8 がリン酸化されることが知られている。そこで、Smad 1/5/8 リン酸化を指標に BMP シグナルに及ぼす影響を検討したところ、YL は $BMPR_{1A}$ の内因性アゴニストである BMP2 による Smad 1/5/8 リン酸化を抑制し BMP シグナルを阻害することがわかった。さらに、YL は BMP2 による海馬初代培養細胞の神経新生抑制を用量依存的に阻害したことから、YL は神経新生を促進すると考えられる。

【結論】YLの標的受容体として$BMPR_{1A}$を同定した。YLは$BMPR_{1A}$に結合しBMPシグナルを抑制することにより、海馬神経新生を促進し、抗うつ作用を示す可能性が示された。

antidepressant, peptide, neurogenesis

講演番号：4B05a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ B 校舎 05 会場

柑橘系香気成分を含む飲料が自律神経活動や気分状態におよぼす影響

The effects of grapefruits and yuzu flavors on mood states and autonomic nervous system

○山崎 英恵[1]、高田 浩平[2]、豊嶋 麻里[2]、伏木 亨[2] ([1]龍谷大、[2]京都大院農)
○Hanae YAMAZAKI[1], Kohei Takada[2], Mari Toshima[2], Tohru Fushiki[2] ([1]Ryukoku Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】気分転換を目的として摂取される飲料や食品には、リラックス効果や高揚感などの心理学的効果があることが経験的に知られている。また、様々な食品の摂取や、香りの吸引により自律神経活動に影響を与える事が明らかとなっている。我々はこれまで、気分の切り替え（スウィッチング）効果をもつ飲料・食品の評価方法を確立した。本研究では、柑橘系香気成分を含む飲料による気分のスウィッチング効果を主観的及び客観的な両側面から検討した。
【方法】21-28 歳の健康な日本人女性 18 名が実験に参加した。気分を表す 30 ワードで構成された評価尺度「気分シート」を主観的指標として、各ワードに対する評価を気分の変化量としてスコア化した。自律神経活動変化は、心拍変動パワースペクトル解析法により評価した。心拍変動測定と気分シート記入を 1 セットとし、その後サンプル飲料（150 mL）摂取を組み込み、4 回測定を行った。飲料サンプルには水（コントロール）、グレープフルーツ精油を 0.005% (w/w) 添加した水（GW）、及びユズ精油を 0.005% (w/w) 添加した水（YW）を用い、全てのサンプルに乳化剤 0.045% (w/w) を添加した。各飲料摂取後には、摂取したサンプルに対する嗜好強度を Visual Analogue Scale (VAS) を用いて測定した。
【結果と考察】 各飲料摂取前後の気分スコア変化量は、コントロール群に比して、GW 群で喜びのスコアが有意に増加し、総合的な気分がポジティブな状態へと移行した。YW 群では、統計上有意な差はなかったものの、コントロール群に比して喜びのスコアは高い値を示した。また、各飲料摂取前後の自律神経活動の変化に関して、GW 群及び YW 群で、コントロールに比して自律神経活動バランスの値（LF/HF 値）が有意に増加し、自律神経活動のバランスが交感神経活動優位となったことが認められた。これらのことから、グレープフルーツ及びユズ精油を添加した水の摂取によって、気分状態はポジティブに、また自律神経活動は交感神経活動優位に、それぞれ誘導されることが示唆された。

Mood States, Autonomic nervous system, flavor

講演番号：4B05a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ B 校舎 05 会場

脂質と糖質の嗜好性における opioid の寄与の違い
Difference in contribution of opioid system to palatability of fat and carbohydrate
○坂本 和洋、岡橋 達也、岡藤 洋子、松村 成暢、都築 巧、井上 和生、伏木 亨（京都大院農）
○Kazuhiro SAKAMOTO, Tatsuya OKAHASHI, Yoko OKAFUJI, Shigenobu MATSUMURA, Satoshi TSUZUKI, Kazuo INOUE, Tohru FUSHIKI (Kyoto Univ.)

【目的】脂質と糖質はどちらもおいしく、そのおいしさには opioid の寄与が報告されている。しかしながら、glucose や sucrose には甘味がある一方で、脂質にははっきりとした味はなく、そのおいしさは大きく異なっているように感じる。本研究では、脂質と糖質の嗜好性に対する opioid の寄与の違いを調べるために、マウスにおける脂質と糖質の摂取行動に対する opioid receptor antagonist (naltrexone) の影響を調べた。
【方法】8 週齢の雄性 BALB/c マウスを用い、摂取トレーニングを行った後に、一瓶試験または二瓶試験（10 分間）を行った。一瓶試験は、実験 30 分前に naltrexone（0.5, 2mg/kg）または saline を皮下投与し、10% Intralipid (乳化油脂)、20% sucrose、20% dextrin、0.5% sucralose の 10 分間の摂取量を測定した。マウスにはあらかじめ各溶液の摂取を 3 回以上経験させた。二瓶試験は、実験 30 分前に naltrexone（2mg/kg）または saline を皮下投与し、10% Intralipid と 20% sucrose の二瓶試験（10 分間）を行った。マウスの摂取トレーニングは水と生理食塩水で行った。
【結果・考察】一瓶試験において、naltrexone 投与群では 10% Intralipid、20% sucrose、20% dextrin、0.5% sucralose の摂取量はいずれも少なくなった。そのため opioid は本実験で用いたいずれの溶液の摂取行動にも関与していることが示唆された。一方で、10% Intralipid と 20% sucrose の二瓶試験において、saline 投与群では 10% Intralipid と 20% sucrose の摂取量に差がなかったのに対して、naltrexone 投与群では 10% Intralipid よりも 20% sucrose を多く摂取した。そのため、opioid は 20% sucrose よりも 10% Intralipid の嗜好性に大きく関与していることが示唆された。これらの実験結果から、opioid は脂質や糖質のいずれの嗜好性にも関与しているが、溶液の種類によって opioid の寄与が異なっている事が示唆された。

palatability, opioid, fat

講演番号：4B05a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ B 校舎 05 会場

認知症モデルマウスを用いた脳老化に対するカルノシンの予防・改善作用の解明

Elucidation of the prevention/improvement effect against brain aging by carnosine in the case of Alzheimer's disease model mice

○金子 順、芝原 恵、久恒 辰博（東大院新領域）
○Jun KANEKO, Megumi SHIBARA, Tatsuhiro HISATSUNE (Tokyo Univ)

【序論】高機能食品成分による脳の機能老化ひいては認知症の予防に期待が寄せられている。我々はこれまでに、アルツハイマー病モデルマウスを用いた研究から、鶏肉に多く含まれる高機能ジペプチドであるカルノシンに脳の機能老化による記憶機能の低下を改善する作用があることを見出してきた。本研究においては、このカルノシンの脳老化予防作用のメカニズムを明らかにするために、アルツハイマー病原因遺伝子を組み込んだマウスに高脂肪食を２ヶ月間投与する糖尿病併発型認知症モデルマウスを用いて分子レベルにおける解析を行い、新しい知見が得られたので発表を行う。

【方法】実験にはアルツハイマー病モデルマウス(Tg, APPswe/PS1⊿E9)を使用した。糖尿病併発型認知症モデルマウスとしてこの Tg マウスに生後４カ月令より２ヶ月間高脂肪食を投与した。また、加齢性の認知症モデルマウスとして生後１年半の Tg マウスも reference として実験に用いた。Tg マウスの記憶機能の低下に、記憶に関わる海馬回路における GABA 神経系の変調が関与していることが報告されている。そこで、我々はこの GABA 回路の変調に関わる脳内調節因子 DBI に着目し、この分子の発現動態解析を介した研究を行った。

【結果】下記の６群のマウスにおける海馬における DBI の発現状態を定量的免疫染色画像評価法により解析した。１）6 ヵ月齢の野生型(WT)マウス、２）6 ヵ月齢の Tg マウス、３）HFD を給餌した 6 ヵ月齢の Tg マウス、４）HFD を給餌し、かつ Car を投与した 6 ヵ月齢の Tg マウス、５）17-19 月齢の WT マウス、６）17-19 月齢の Tg マウス。
その結果、認知記憶障害を示す HFD を与えた 6 か月齢の Tg マウス、ならびに 17-19 月齢の Tg マウスで、海馬領域における有意な DBI の発現の上昇が見られた。しかし認知記憶障害が改善される Car を投与した群では DBI 発現が抑制されていた。

【考察】認知記憶障害を示すマウスでは海馬領域において炎症反応が起こっており、この炎症反応によって DBI の発現が誘導され GABA 回路の変調を経て記憶機能が低下したものと考えられた。カルノシン投与マウスではこの脳内炎症反応が抑制されたため、DBI の発現誘導が抑えられ、結果的に認知機能の低下が回避されたと思われる。

Carnosine, Diazepam Binding Inhibitor, Alzheimer's disease

講演番号：4B05a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ B 校舎 05 会場

中高齢者の脳老化予防に対する高機能食品成分の作用を検証する心理機能検査法の確立

Establishment of cognitive/psychological function tests to verify the prevention effect of functional food component against brain aging in elder people

○貴田 潤平、樋口 陽太、芝原 恵、藤永 梨沙、金子 順、久恒 辰博（東京大学）
○Junpei Kida, Yota Higuchi, Megumi Shibahara, Risa Fujinaga, Jun Kaneko, Tatsuhiro Hisatsune (Tokyo Univ.)

【序論】当研究室ではアルツハイマーモデルマウスを用いて、食品中の栄養成分が海馬依存的な記憶に与える影響を研究してきた。これまでに、抗炎症作用をもつ栄養成分(イミダゾールペプチドであるカルノシン)の投与が記憶力の低下抑制に有効であることを示してきた。認知機能の低下は、加齢により誰にも起こることであるが、有効な改善・回復法は依然として確立できていない。それゆえに、食品摂取による認知機能低下予防が大きく期待されている。そこで、今回の研究では、認知・心理機能検査を用いて食品成分の効果を確かめる認知機能評価法を確立することを目的とした。

<方法>　認知機能検査として、数ある検査方法の中から、感度が高く精度が高いと定評のある、以下の３つの検査方法を採用した。１）英国ケンブリッジ大学が開発し、医薬品開発臨床試験で使用実績があるコンピューターを用いた認知機能テストである CANTAB。その検査バッテリーの中から、脳の機能老化の評価法に適した DMS(Delayed Matching to Sample)、RVP(Rapid Visual Information Processing)、PAL(Paired Associates Learning)の３種類。２）我が国において、認知症の初期診断に利用されている MMSE(Mini-Mental State Examination)、ADAS-cog(Alzheimer`s Disease Assessment Scale-cognitive behaviour)、と WMS-R ロジカルメモリー(Wechsler Memory Scale Revised)。３）一般的な心理機能検査法である BDI(Beck Depression Index)、SF-36()、と VAS(Visual Analogue Scale)。健康な中高齢者を募集し、各検査を行った。

<結果、考察>　中高年ボランティア(40~78 歳)で、解析を行ったところ、DMS, RVP, PAL, ADAS-cog, WMS-R ロジカルメモリーで加齢による正答率の低下がそれぞれ統計学的に有意に認められた。これらのことから、各検査を行うことにより、認知機能を正確に評価することができると考えられた。現在この評価法を用いて、中高年ボランティア(約６０名)を試験食摂取群とプラセボ群にランダムに割り付け、抗炎症成分（イミダゾールジペプチド）を含む有効成分を一日朝晩二回、500mg ずつ計 1g を三カ月摂取してもらい、一ヵ月半後、三ヵ月半後の認知機能の検査を現在行っている。

Cognitive Function, Carnosine

講演番号：4B05a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ B 校舎 05 会場

Accumulation of flavonoids quercetin and luteolin in SH-SY5Y cells and their effects on Monoamine oxidase-A

○Yauhen Bandaruk, Rie Mukai, Junji Terao (University of Tokushima)

Objective: Monoamine oxidase-A (MAO-A), which is located in the outer mitochondrial membranes of serotonin neurons and glial cells, is the main enzyme for serotonin metabolism in the central nervous system (CNS). Elevation of MAO-A activity in CNS is suggested to be essential in the pathogenesis of depression. Rodent animal studies have demonstrated that dietary flavonoids possess antidepressant-like effect and *in vitro* studies have implied that the attenuation of MAO-A activity participates in their effect. In the preceding work, we found that quercetin and luteolin inhibited MAO-A activity of mouse brain mitochondria and that the efficacy of quercetin was inferior to that of luteolin (1). Here, we tried to clarify the relationship among cellular uptake, transfer into the cellular target site and the inhibition of MAO-A activity in both quercetin and luteolin by using human neuroblastoma SH-SY5Y cells.

Methods: Quercetin or luteolin was added into the SH-SY5Y cells and mitochondrial fraction was separated from the cell lysate after the incubation. Flavonoids were determined by RP-HPLC analysis. Cell viability was measured by WST-1 which indicates cell proliferation. MAO-A activity was determined by Amplex Red reagent. MAO-A protein level and gene expression level were measured by Western blot analysis and real time PCR analysis, respectively.

Results: Both flavonoids were incorporated into the cell immediately and excluded gradually. Efflux of luteolin was significantly slower than that of quercetin, indicating that luteolin accumulates in the cell more efficiently. Both flavonoids were distributed in the mitochondrial particles accompanied by the cellular uptake. Luteolin and its cellular metabolite, diosmetin, lowered SH-SY5Y cell viability at concentrations at >10 μM after incubation for 24 hr, while quercetin and its cellular metabolite, isorhamnetin, did not. Both flavonoids attenuated MAO-A activity slightly at 10 μM after the incubation for 24 hr. At this concentration, luteolin, but not quercetin, lowered MAO-A protein level, although any effect was not observed in MAO-A gene expression level. These results indicate that both flavonoids can be distributed in the target site and inhibit mitochondrial MAO-A activity without attenuation of gene expression in the neuronal cells.

(1) Bandaruk et al. *J. Agric. Food Chem.* 60:10270:2012

MAO-A, Flavonoid, Accumulation

講演番号：4B05a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ B 校舎 05 会場

フィタン酸によるヒストン脱アセチル化酵素活性化を介した Neuro2a 細胞に対する毒性作用
Toxicity of phytanic acid in Neuro2a cells via histone deacetylase activation
○長井 薫（山梨大院医工総合）
○Kaoru NAGAI (Univ. Yamanashi)

【目的】分枝脂肪酸であるフィタン酸は、クロロフィルの代謝中間体として知られている。フィタン酸の蓄積が病因とされている遺伝性疾患であるレフサム病は、小脳性運動失調や多発性神経炎等の神経系の異常を示す事が知られている。一方、近年、ヒストンの翻訳後修飾や DNA のメチル化等に依存し、遺伝子配列に依存しない遺伝子発現調節機構であるエピジェネティクスの神経系における重要性に注目が集まっている。ヒストン脱アセチル化酵素(Hdac)はエピジェネティクス転写調節に関与する酵素であり、この阻害剤が神経変性疾患の予防効果を有することが報告され注目を集めている。また、不飽和脂肪酸や低級脂肪酸類が Hdac 阻害剤として作用することが報告されており、これらの神経系の細胞への作用についても研究が進められている。

本研究の目的は、フィタン酸の Hdac 活性制御作用についての検討を行い、その作用を介した神経系の細胞に対する作用についてについて明らかにすることである。

【方法】フィタン酸の Hdac 活性への作用については、*in vitro* 酵素活性測定および処理細胞のヒストンアセチル化を ELISA 法により定量を行った。神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞を神経細胞のモデル細胞として用い、フィタン酸の神経系の細胞への作用について、細胞生存率の解析、ミトコンドリアの解析を中心として行った。

【結果】フィタン酸は、不飽和脂肪酸や低級脂肪酸で見られる Hdac 阻害効果とは反対に、Hdac 活性化作用および、細胞内ヒストンアセチル化量を有意に低下させる作用が見られた。さらに、Neuro2a 細胞に対し細胞死、およびミトコンドリア障害を誘導した。これらの作用は Hdac 阻害剤である酪酸により抑制された。本結果は、レフサム病における神経細胞障害がフィタン酸による Hdac 活性化作用を介していることを示唆している。

phytanic acid, histone deacetylase, neuronal cell death

講演番号：4B05a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ B 校舎 05 会場

ポリフェノール類によるヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）活性制御と神経機能調節
Neurite outgrowth and neuroprotective effect by polyphenols is regulated by histone deacetylase (HDAC) families.

○名取 貴光[1,2]、長井 薫[2] ([1]山梨学院大・健・管理栄養、[2]山梨大院・医・環境遺伝医学)
○Takamitsu Natori[1,2], Kaoru Nagai[2] ([1]Dept. Health and nutrition, Univ. of Yamanashi Gakuin, [2]Dept. Epigenetic medicine, Univ. of Yamanashi)

【目的】
ヒストン脱アセチル化酵素（Histone deacethylase：HDAC）は、アセチル化されたヒストンのアセチル基を除去することで遺伝子発現を調節する酵素である。HDAC が関与するエピジェネティクス機構は神経変性疾患やガンなどの発症・進行に深く関係しており、HDAC の阻害剤は新規な治療薬の候補として注目を浴びている。HDAC 活性の阻害分子として、酪酸ナトリウム（SB）やバルプロ酸（VPA）、トリコスタチン A（TSA）などが知られているが、近年、植物由来のポリフェノール類に阻害作用のあることが報告されている。また、ポリフェノール類には、抗酸化作用をはじめ、抗炎症作用や神経保護作用のあることが報告されている。今回我々は、ポリフェノール類のもつ神経保護作用や神経突起伸長作用などの生理活性が HDAC 活性制御によるエピジェネティック機構によるものか否か検討を行った。
【方法】
蛍光基質ペプチドを用いた活性測定法により各種ポリフェノール類のHDAC阻害活性の解析を行った。また、マウス脳およびヒト脳由来の神経芽細胞種（Neuro2aおよびSH-SY5Y細胞株）を用いて神経保護作用および神経突起伸長作用の検討を行った。細胞保護作用は、ストレスによる細胞死に対する抑制効果を細胞生存率の定量解析を行うことにより評価し、神経突起伸長作用は、レチノイン酸（RA）により神経分化した際の神経突起を解析することにより評価した。また、各種遺伝子の発現解析は、Western blot（WB）及び免疫染色法、Real time-PCR、細胞内ヒストンのアセチル化は、市販の測定キットを用いて解析した。
【結果】
供試した数種のポリフェノール類の中から HDAC 阻害活性を有する分子としてアントシアニジン類、フラボン類、イソフラボン類の数種を見出した。また、これら分子の神経系培養細胞に対する保護効果および神経突起伸長作用を解析したところ、有意な効果が確認された。本結果は、ポリフェノール類による神経保護作用や神経突起伸長作用が HDAC 活性制御を介したエピジェネティック調節を受けている可能性を示唆している。

polyphenols, histone deasetylase, neurite outgrowth

講演番号：4B05a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ B 校舎 05 会場

離乳期マウスの大脳皮質味覚野・体性感覚野におけるカプサイシン応答領域の解析

Analysis of mouse gustatory and somatosensory cortices in response to capsaicin during weaning period

○匂坂 美輝、成川 真隆、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Miki SAGISAKA, Masataka NARUKAWA, Takumi MISAKA (The Univ. Tokyo)

【目的】　食事を摂取した際に生ずる甘い・苦いといった味覚情報や、硬い・やわらかいといった食感に関する情報は口腔内において受容された後に、大脳皮質味覚野・体性感覚野に伝えられ、味や食感が認識される。このような食関連情報が処理される脳領域について、ある程度明らかにされているものの、食関連情報が脳にどのような変化をもたらすかについて、ほとんど解析されていない。視覚や聴覚といった味覚以外の感覚では、幼少期の特定の時期で刺激が遮断されると脳の関連領域の発達が阻害され、正常な能力を獲得できないことが示唆されている。一方で、味覚に関連する現象について、幼少期における食刺激が脳にどのような影響を与え、またそれが脳の発達にどう影響するのか、その詳細は不明である。そこで本研究では幼少期における食刺激が大脳皮質味覚野・体性感覚野の発達に与える影響について検証することを目的とした。

我々はこれまでマウスをモデル動物として、母乳から母乳以外へと食環境が劇的に変化する離乳期に着目し、離乳期の食刺激によって発現変動する分子の同定を試みた。その結果、大脳皮質味覚野・体性感覚野においてシナプス関連タンパク質 SNAP25 の発現量が増加することを見出している。[1] そこで本研究では、SNAP25 タンパク質の発現を指標とし、大脳皮質味覚野・体性感覚野においてこれまで経験したことのない新規な食刺激によって生じる活性化された領域の同定を試みた。

【方法】　実験に用いた C57BL/6J マウスは、試験当日まで母親と同じケージで飼育した。生後 21 日目に母親と別々のケージに移し、カプサイシン溶液の提示を開始した。甘味や苦味物質などの食品成分では飼育飼料に含まれてしまうことから、食刺激としてカプサイシンを用いた。カプサイシン溶液の提示は 3 日間行った。刺激終了後、マウスを還流固定し、脳を摘出した。大脳皮質の味覚野・体性感覚野を含む領域で連続切片を作製し、抗 SNAP25 抗体に対する免疫反応を観察した。

【結果】　3 日間のカプサイシン刺激により SNAP25 タンパク質の発現範囲の拡大が見られた。味覚野は前後軸方向に 3 mm 程度厚みを持つことが知られているが、特にその中央部において SNAP25 タンパク質に対する免疫反応性の増加が見られた。現在、カプサイシン刺激によって最も活性化する領域を明らかにすべく、より詳細な解析を行っている。

[1] Kawakami *et al.*, *Neuroscience*, **218**, 326-34 (2012)

taste, gustatory cortex, SNAP25

講演番号：4B05a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ B 校舎 05 会場

trans,trans-2,4-デカジエナールの経口投与によるラット胃排出遅延作用

trans,trans-2,4-decadienal reduces gastric emptying in rats

○矢萩 明日香[1]、比良 徹[2]、西山 千草[3]、山下 貴稔[3]、今義 潤[3]、原 博[2] ([1]北海道大・農・生機化、[2]北海道大・院農・応生科、[3](株)J-オイルミルズ　油脂開発研究所)
○Asuka YAHAGI[1], Tohru HIRA[2], Chigusa NISHIYAMA[3], Takatoshi YAMASHITA[3], Jun IMAGI[3], Hiroshi HARA[2] ([1]Hokkaido Univ. Agr., [2]Hokkaido Univ., [3]J-OIL MILLS, INC.)

【背景】我々はこれまでに、不飽和アルデヒドの一種 trans, trans-2, 4-デカジエナール（2, 4-デカジエナール）が、マウス小腸由来消化管内分泌細胞株 STC-1 において Cholecystokinin（CCK）分泌を強く刺激することを見いだした。CCK は、上部小腸に散在する消化管内分泌細胞 I cell から分泌される消化管ホルモンであり、胃排出抑制・膵酵素分泌促進・食欲抑制などの生理作用をもつ。本研究では、ラットに 2, 4-デカジエナールを経口投与し、CCK の生理作用の一つである胃排出抑制作用が見られるかを検討した。
【方法】胃排出能は、吸収性マーカーであるアセトアミノフェンと、非吸収性マーカーであるフェノールレッドを用いた二通りの方法で検討した。実験には、8～10 週齢の SD 系雄性ラットを用いた。AIN-93G 準拠飼料にて飼育し、試験前日は一晩絶食させた。
◇アセトアミノフェン法による胃排出速度の検討：試料（2, 4-デカジエナール）とアセトアミノフェンの混合液を経口投与し、経時的に 120 分まで尾静脈より採血を行い、血漿中アセトアミノフェン濃度を測定した。
◇フェノールレッド法による胃排出率の検討：試料（2, 4-デカジエナール）とフェノールレッド、アセトアミノフェンの混合液を経口投与し、15 分後に麻酔下で放血致死させた。胃および小腸（上部、下部）の内容物を回収し、残存するフェノールレッド量から胃排出率を算出した。また、門脈血も同時に採取し、血漿中アセトアミノフェン濃度を測定した。
【結果と考察】2, 4-デカジエナール（50, 100 mg/kg）投与群の尾静脈血中アセトアミノフェン濃度は、投与後 15 分ではコントロール群よりも有意に低い値を示し、投与後 30 分でもその傾向が維持され、濃度推移が全体的に緩やかになった。2, 4-デカジエナール投与後 15 分の門脈血中アセトアミノフェン濃度も、コントロール群の 1/3 程度であった。さらに、2, 4-デカジエナール投与群では、投与量の約 80%のフェノールレッドが胃内に残存するという結果が得られた。これはコントロール群の残存量の約 2 倍であった。これらの値から算出した胃排出率は、2, 4-デカジエナール投与群でコントロール群よりも有意に低い値となった。一方で、小腸上部・下部に到達するフェノールレッド量は、コントロール群では投与量の 10～30%程度であるのに対し、2, 4-デカジエナール群では 3%にも満たなかった。これらの結果から、2, 4-デカジエナールは、ラットへの経口投与により胃排出を抑制することが明らかになった。

aldehyde, gastric emptying

講演番号：4B05a17
講演日時、会場：3 月 30 日 11:54～ B 校舎 05 会場

米糠・胚乳ペプチドはラットにおいて GLP-1 分泌を促進し、血中 GLP-1 の Active／Total 比を高める

Peptide derived from rice protein promotes GLP-1 secretion, and increases the ratio of active GLP-1 to Total GLP-1.

○石川 結貴[1]、比良 徹[1]、原田 幸和[2]、橋本 博之[2]、藤井 幹夫[3]、門脇 基二[4]、原 博[1]([1]北大院農応生科、[2]築野食品工業株式会社 基礎研究部、[3]亀田製菓株式会社 お米研究所、[4]新潟大院・自然研)
○Yuki ISHIKAWA[1], Tohru HIRA[1], Yukikazu HARADA[2], Hiroyuki HASHIMOTO[2], Mikio FUJI[3], Motoni KADOWAKI[4], Hiroshi HARA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]TSUNO CO., LTD., [3]KAMEDA SEIKA CO., LTD., [4]Niigata Univ.)

【目的】Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)は食事刺激により L cell(下部小腸に多く存在)から分泌される消化管ホルモンで、血糖依存的にインスリン分泌を促進することで血糖上昇を抑制するほか、胃排出抑制作用や食欲抑制作用などを有している。これまでの研究にて、米胚乳由来ペプチドをラットに経口投与することで血中 GLP-1 濃度の上昇と血糖上昇抑制が観察された。本研究では米糠由来ペプチドにも同様の作用が見られるかを検討し、さらに、分泌された GLP-1 を不活化する血中 Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4)の活性に米由来ペプチドが影響するか麻酔下ラットにて検討した。
【方法】米糠タンパク質および米胚乳タンパク質をペプシンにより 37℃で 30 分間加水分解後、中和し、凍結乾燥により粉末化したものをそれぞれ米糠ペプチド、米胚乳ペプチドとした。
＜ラットでの血糖上昇抑制効果の検討＞ SD 系雄性ラット(6 週齢)を一晩絶食させ、米糠ペプチドまたは米胚乳ペプチドの経口投与下で腹腔内糖負荷試験(IPGTT)を行った。また、これらペプチド試料投与後の継時的な血漿中 GLP-1 濃度、インスリン濃度を測定した。
＜麻酔下ラットでの回腸静脈血中 DPP-4 活性への影響＞ SD 系雄性ラット(7 週齢)を一晩絶食させ、回腸内を生理食塩水にて洗浄後結紮ループを作成し、回腸静脈にカニューレを留置した。ループ内に米糠ペプチドまたは米胚乳ペプチドを投与し、カニューレより継時的に採血し、回収した血漿中の DPP-4 活性を測定した。また、試料投与 60 分後の血漿中 Active および Total GLP-1 濃度を測定した。
【結果】覚醒ラットにおいて、米糠ペプチドおよび米胚乳ペプチドを 2 g/kg 体重で経口投与することにより、腹腔内糖負荷後 30 分での血糖上昇がコントロール群と比較して有意に低下した。また、このときの血中 GLP-1、インスリン濃度はコントロール群と比較して有意に上昇した。
麻酔下ラットにおいて、回腸ループ内に米糠ペプチド、米胚乳ペプチドを投与したところ、コントロール群と比較して持続的に DPP-4 活性を低下させる傾向が見られた。また、試料投与 60 分後の血中 Active GLP-1 濃度は両米ペプチド投与で高値を示し、さらに Total GLP-1 に占める Active GLP-1 の割合も上昇した。
以上の結果から、米糠・胚乳ペプチドの経口投与は GLP-1 分泌を促進し、血糖上昇を抑制することが示された。また、これらペプチドの回腸への直接投与は分泌された GLP-1 (Total GLP-1) における活性型 (Active GLP-1) の割合を高めることが明らかとなり、これには米ペプチドによる血中 DPP-4 活性の抑制が関与することが示唆された。

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1), Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4), Rice protein

講演番号：4B06a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ B 校舎 06 会場

食品中機能性分子の組合せによる相乗的抗腫瘍活性の可能性

The synergistic antitumor activity of combination of bioactive substances.

○岩崎 公典、屋 宏典 (琉大熱生研)
○Hironori Iwasaki, Hirosuke Oku (Univ. of the Ryukyus)

【目的】

大規模な疫学研究によって、食事習慣と抗腫瘍効果には関連があることが示唆されており、要因の一つとして食品成分の相乗効果による抗腫瘍活性の可能性が考えられる。しかしながら、食品成分同士の相乗効果に言及した報告例は少なく、主に化学療法剤の増強や副作用の緩和に関わるものが多い。

当研究室ではこれまでに選択的細胞毒性を指標としたスクリーニングにより複数の食品成分由来の選択的細胞毒性を検出してきた。さらに近年、これらの食品成分を同時に作用させることで、高い相乗効果が得られることを明らかにしている。現在これらの活性成分のうち、生薬の一種であるゴボウシ(*Arctium lappa L.*)とキコク(*Poncirus trifoliata*)に注目し、ゴボウシからはリグナン誘導体であるアルクチゲニン（ARC)、キコクからはポリメトキシフラボノイドのシネンセチン（SIN）を単離している。両分子は、それぞれ単独でもヒト肺腺がん細胞に対して選択的に作用するが、併用することで相乗効果による新たな抗腫瘍活性が期待された。そこで本研究では、ARC と SIN の相乗効果の作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

相乗効果の評価は、Lehar らの dose matrix を利用した実験法に従い、相乗効果が認められる ARC/SIN 組成における各種代謝パラメータの解析を行い、ARC、SIN の単独処理の結果と比較した。

細胞内代謝活性の測定結果からは、ARC と SIN の併用により、細胞内代謝活性が相乗的に抑制されていることが明らかになった。特に SIN に関しては、単独処理の場合と比較して極めて低濃度領域（1/40 濃度）において、ARC と相乗的に作用することが明らかになった。同濃度域においては、培地の pH が著しく下がることも確認されており、代謝産物の蓄積が示唆された。さらに、同一条件下において DNA 定量による細胞生存率を調べた結果、ほぼすべての濃度域において細胞増殖には変化が認められず、今回の相乗効果は細胞増殖には関与していないことが示された。

【考察】

アルクチゲニン、シネンセチンにはそれぞれ抗腫瘍効果が報告されているが、本研究では細胞毒性を伴わない、相乗的な代謝抑制効果の存在を初めて明らかにした。今後さらに代謝抑制と相乗的に作用する化合物を明らかにしていくことで、複数の代謝経路を標的とすることではじめて効果を発揮する「抗腫瘍活性分子群」が明らかになっていくと考えている。

antitumor, combination, bioactive substances

講演番号：4B06a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ B 校舎 06 会場

キクイモ塊茎に含まれる前立腺ガン細胞増殖抑制成分の探索

Search of the compounds which inhibit the proliferation of prostate cancer cells from a Jerusalem artichoke tuber

○柴田 祥平、竹花 駿平、白岩 雅和（茨城大院農・食品生化）
○Shohei SHIBATA, Shunpei TAKEHANA, Masakazu SHIRAIWA (Ibaraki Univ.)

【目的】キクイモ(*Helianthus tuberosus*)はキク科ヒマワリ族の多年草であり、地中に形成する塊茎が可食部とされている。キクイモ塊茎は血糖値上昇抑制作用を示すイヌリンを豊富に含み、糖尿病を緩和させる食材として知られている。近年、キクイモ塊茎を摂取した前立腺ガン患者の症状改善が報告され、キクイモ塊茎に前立腺ガンに有効な抗ガン成分の存在が示唆された。一昨年度の本大会において当研究グループはキクイモ塊茎由来の疎水性画分がマウス白血病細胞 P388 に対して細胞増殖抑制作用・アポトーシス誘導作用を示すことを報告した。今回はキクイモ塊茎に含まれる前立腺ガン細胞の増殖を抑制する抗ガン成分の探索を行ったので報告する。
【方法】キクイモ塊茎粉末から 70%エタノールを用いて成分抽出を行い、得られた抽出液を濃縮乾固後、水とブタノールで分配し、得られたブタノール層を画分 A、水層を画分 B とした。次に、画分 A はクロロホルム：メタノール：水＝75 ： 25 ： 10 の下層に少量の酢酸を添加した溶媒を用いたシリカゲルクロマトグラフィーに供して溶出順に 4 画分に分け、それぞれ画分 A2、AB、AC、AD とした。続いて、画分 A2 はヘキサン：酢酸エチル＝5：95 の溶媒を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供して溶出順に 4 画分に分け、それぞれ画分 A3、A2B、A2C、A2D とした。全ての画分を DMSO に溶解し、アンドロゲン依存性ヒト前立腺ガン細胞 LNCaP とアンドロゲン非依存性ヒト前立腺ガン細胞 PC-3 に対する細胞増殖抑制作用を WST-8 アッセイにより評価した。また、正常ヒト前立腺上皮細胞 HPEC に対する細胞毒性についても同様の方法で評価した。さらに、アクリジンオレンジ/エチジウムブロマイド二重染色試験および DNA ラダー試験によりアポトーシス誘導作用を評価した。
【結果】70%エタノール抽出液、画分 A、B について細胞増殖抑制試験を行った結果、コントロールの細胞生存率を 100%としたとき画分 A のみが濃度依存的な細胞増殖抑制作用を示し、400μg/mL,24 時間暴露条件において LNCaP を 78.2%、PC-3 を 75.2%まで抑制した。続いて、画分 A を分画し得られた画分 A2、AB、AC、AD および画分 A3、A2B、A2C、A2D について試験した結果、同上条件において画分 A2B が LNCaP を 12.6%、PC-3 を 38.4%まで抑制し、最も強い増殖抑制作用を示した。また、同上条件においてガン細胞の生存率を 50%以下まで抑制した画分について細胞毒性試験を行った結果、画分 A2B が最も低い毒性を示した。さらに、アクリジンオレンジ/エチジウムブロマイド二重染色試験の結果、画分 A2B で暴露した細胞にアポトーシスの形態的特徴であるクロマチン凝縮が観察された。現在、画分 A2B のアポトーシス誘導作用を DNA 断片化の観点から証明するために DNA ラダー試験を行っている。

Jerusalem artichoke, anticancer, prostate cancer

講演番号：4B06a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ B 校舎 06 会場

ヒト乳腺細胞および乳がん細胞におけるカテコールアミンによるβ-シグナリングにおよぼす quercetine-3-O-glucuronide の影響

Effects of quercetine-3-O-glucuronide on catecholamines-induced ß-signaling in human mammary epithelial cells and breast cancer cells

○山崎 隼輔[1]、三好 規之[2]、保田 倫子[2]、下位 香代子[1,2]（[1]静岡県立大院生活健康、[2]静岡県立大院薬食生命）
○SHUNSUKE YAMAZAKI[1], NORIYUKI MIYOSHI[2], MICHIKO YASUDA[2], KAYOKO SHIMOI[1,2]（[1]Grad. Sch. Nutr. Environ. Sci. Uni. Shizuoka, [2]Grad. Sch. of Integra. Pharma. and Nutr. Sci. Univ. of Shizuoka）

【目的】現代はストレス社会と言われているが、ストレスに過度にあるいは慢性的に曝露され続けると、生体機能に異常をきたし、がんをはじめ様々な疾病のリスクが増加する。生体における主要なストレス応答の一つが視床下部-交感神経-副腎髄質系の活性化による副腎髄質および神経末端からのカテコールアミン（ノルアドレナリン、アドレナリン）の分泌増加である。これらのカテコールアミンは、アドレナリン受容体に結合することでシグナルが伝達され、様々なストレス反応が起きる。昨年度の大会で我々は、乳腺細胞MCF-10Aと乳がん細胞MDA-MB-231では、β_2-アドレナリン受容体が共に発現しており、フラボノイド類のアドレナリン受容体への結合作用が異なることを報告した。そこで、本研究では、カテコールアミンのMCF-10AとMDA-MB-231細胞におけるβ-シグナリングに及ぼす影響を評価すると共に、たまねぎに多く含まれているケルセチン配糖体の代謝物である quercetine-3-*O*-glucuronideのβ-シグナリングに対する抑制効果について検討した。

【方法】MCF-10AおよびMDA-MB-231細胞にノルアドレナリン（0.1、1、10 μM）およびケルセチンの代謝物（0.1、1、10 μM）を作用させ、活性酸素の生成をフローサイトメトリーにて評価した。さらに、β_2-アドレナリン受容体の重要なシグナル伝達とされているcyclic AMP（cAMP）の生成をenzyme immunoassay kitを用いて測定した。

【結果・考察】MCF-10AおよびMDA-MB-231細胞にノルアドレナリンを作用させると、MDA-MB-231細胞では、濃度依存的に活性酸素の生成が増加し、cAMPの生成も増加したが、MCF-10A細胞ではいずれも増加は見られなかった。本結果は、MCF-10A乳腺細胞にβ_2-アドレナリン受容体が発現していても感受性が低いことを示唆している。一方、MDA-MB-231乳がん細胞では、quercetine-3-*O*-glucuronide（0.1 μM）によって活性酸素もcAMPも増加が有意に抑制され、quercetine-3-*O*-glucuronideが生理的な濃度でβ-シグナリングに対して抑制効果を示すことがわかった。

Catecholamines, ß2-adrenergic receptor, MDA-MB-231

講演番号：4B06a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ B 校舎 06 会場

中枢神経系癌細胞の細胞周期タンパク質に対するグリチルレチン酸の影響

The effects of glycyrrhetinic acid on cyclins in a CNS tumor cell line

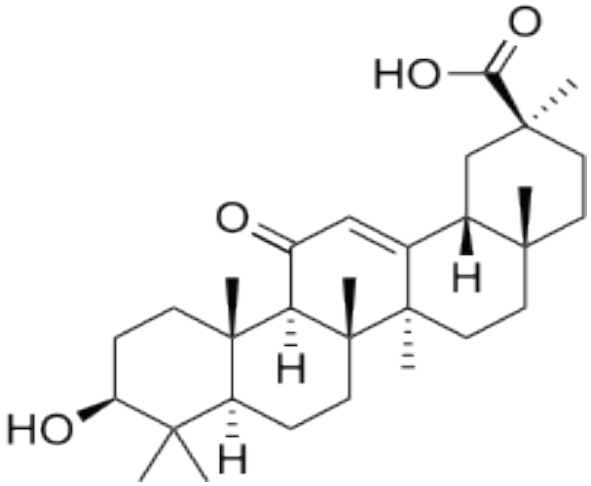
伊藤 大輔[1]、川瀬 裕太[1]、清水 涼平[1]、田中 大樹[1]、上家 勝芳[2]、木立 由美[2]、野下 俊朗[3]、梅津 博紀[4]、猟山 一雄[2]、○山口 秀明[1] ([1]名城大薬、[2]青森大薬、[3]県立広島大生命環境、[4]岐阜聖徳学園短大生活)

Daisuke ITO[1], Yuta KAWASE[1], Ryohei SHIMIZU[1], Daiki TANAKA[1], Katsuyoshi KAMIIE[2], Yumi KIDACHI[2], Toshiro NOSHITA[3], Hironori UMETSU[4], Kazuo RYOYAMA[2], ○ Hideaki YAMAGUCHI[1] ([1]Meijo Univ., [2]Aomori Univ., [3]Pref. Univ. Hiroshima, [4]Gifu Shotoku Gakuen Univ.)

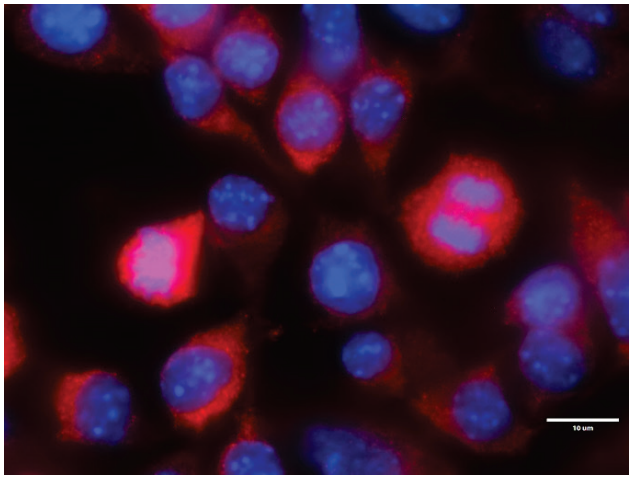
【目的】我々は、これまで甘草の成分であるグリチルレチン酸（GA）が、中枢神経系の癌細胞の１つである r/m HM-SFME-1 細胞の増殖を選択的に抑制することを解明してきたが、その抗癌メカニズムについては不明なところが多い。本研究においては、グリチルレチン酸の選択的抗癌作用における細胞周期関連タンパク質に対する影響を明らかにする。

【方法】細胞増殖は MTT 法、タンパク質発現はウェスタンブロット法、タンパク質の細胞局在性は免疫蛍光染色法を使用した。

【結果】細胞周期関連タンパク質のうち、サイクリン B1 およびサイクリン D1 に対し、GA がそれらの発現量および細胞局在性に影響を及ぼすことで、癌細胞の増殖能力の低下およびアポトーシス誘導を促進し、癌細胞に対する選択的毒性に関わっている可能性が示唆された。



グリチルレチン酸（GA）



r/m HM-SFME-1 細胞における
サイクリン D1 の細胞局在性

glycyrrhetinic acid, cancer, cyclin

講演番号：4B06a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ B 校舎 06 会場

サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツの抽出物による HL-60 細胞のアポトーシス誘導
Apoptosis induction of HL-60 cells by the extract of cordyceps militaris in sweetpotato shochu
○章 超[1,3]、坂尾 こず枝[2]、小野 友愛[2]、高瀬 良和[3]、岩井 謙一[3]、侯 徳興[1,2] ([1]鹿大・連合農、[2]鹿大、[3]霧島酒造)
○Cho SHO[1,3], Kozue SAKAO[2], Tomomi ONO[2], Yoshikazu TAKASE[3], Kenichi IWAI[3], De-Xing HOU[1,2] ([1]Ka Univ. Unit. Agr., [2]Ka Univ., [3]kirishimashuzo Co.)

[研究目的]

冬虫夏草（*Cordyceps militaris*）は真菌類の伝統的な漢方薬であり、コルディセピン，コルディセフィクポリサカライド，コルディセフィク酸，タンパク質，アミノ酸，ビタミンB_{12}含有していると知られている。本研究はこれらの生理活性成分を有する冬虫夏草をサツマイモ焼酎に浸漬した冬虫夏草スピリッツについて、その機能性解析の一環としてヒト白血病癌細胞に対する細胞増殖抑制機能及び作用機序を解明することを目的としている。

[方法と結果]

冬虫夏草と冬虫夏草スピリッツ試料を合成吸収樹脂HP20，Sephdex G25，HPLC（ODS C-18）により4分画し，凍結乾燥したものを供試試料とした。ヒト前骨髄性白血病細胞HL-60（Human promyelocytic leukemia cells）を用いて，各画分の癌細胞増殖抑制効果及びアポトーシス誘導作用について検討した結果、冬虫夏草スピリッツから分画された画分1A，1B，1DがHL-60細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。つぎに、抑制能の最も強かった画分1Dについてアポトーシスの誘導作用を解析した。画分1Dがカスパーゼ3及びPARPの活性化を誘導し、DNAの断片化などを引き起こした。画分1Dをさらに精製すると、4つの成分(1D－Ⅰ，1D－Ⅱ，1D－Ⅲ，D－Ⅳ)得られた。その中でも、1D－Ⅲが強い癌細胞増殖抑制効果及びアポトーシス誘導作用能を有することが明らかになった。現在、1D－Ⅲ成分の構造決定をNMR，IR，MSスペクトル解析により行っている。

militaris cordyceps, HL-60, apoptosis

講演番号：4B06a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ B 校舎 06 会場

トコトリエノールによる癌細胞増殖抑制とフェルラ酸の相乗効果

The synergistic inhibitory action of tocotrienol with ferulic acid in human cancer cells

○永塚 貴弘[1]、舘脇 直人[1]、西田 浩志[1]、仲川 清隆[2]、宮澤 陽夫[2]([1]新潟薬大応生化、[2]東北大院農機能分子解析)
○Takahiro EITSUKA[1], Naoto TATEWAKI[1], Hiroshi NISHIDA[1], Kiyotaka NAKAGAWA[2], Teruo MIYAZAWA[2] ([1]Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences, [2]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

【目的】米ぬかにはトコトリエノール (T3)、フェルラ酸 (FA)、セラミドなどの食品成分が多含され、近年これらの機能性が数多く見出されている。T3 は多様な生理作用を有しており、中でも抗腫瘍作用についての研究報告が多く存在する[1,2]。T3 は 4 種の異性体の間で生理活性の強さが異なり、δ-T3 が最も高い抗腫瘍効果を発揮することが知られている。一方、FA にも抗酸化、認知症予防、発癌抑制などの様々な効果が認められ、近年注目を集めている。以上のことから、米ぬか成分の積極的活用は健康維持に繋がると考えられるが、これら機能性成分を組み合わせてその影響を検証した研究例は過去にない。そこで本研究ではδ-T3 と FA に着目し、δ-T3 による癌細胞の増殖抑制と FA の相乗効果を検討した。
【方法・結果】δ-T3 (10～12.5μM)、FA (5～20μM)、δ-T3＋FA を添加した培地で、PANC-1 (膵臓癌) MCF-7 (乳癌)、DU-145 (前立腺癌) を 72 時間培養後、各細胞の生存率を MTT 法で測定した。δ-T3 を単独で処理した結果、各種癌細胞の増殖を濃度依存的に阻害した。一方、FA 単独では 20μM の濃度でも細胞の増殖に何ら影響がなかった。しかし、δ-T3 と FA を同時に添加することで、いずれの癌細胞においてもδ-T3 による増殖阻害活性が FA の濃度に依存して飛躍的に高まることが明らかになった。例えば、PANC-1 に 12.5μM のδ-T3 を添加すると生存率は 60%であったが 20μM FA の同時添加で 35%にまで低減した。また、その相乗作用は細胞によって異なり、DU-145 よりも PANC-1 と MCF-7 の方がδ-T3＋FA に対して高い感受性を示した。フローサイトメトリー解析の結果、細胞周期に対する FA の効果は認められなかったが、δ-T3 処理によって G1 期停止を誘導し、FA の同時添加でその作用がさらに高まった。ウエスタンブロット法によって細胞周期を G1 期で停止させる p53 と p21 の発現を調べたところ、δ-T3 及びδ-T3＋FA 処理で両タンパク質の発現レベルが増加していた。FA による相乗効果の作用機序を明らかにするために、細胞からδ-T3 を抽出して HPLC で分析した。FA を同時処理することで顕著に細胞内のδ-T3 量が増大しており、FA による相乗作用はδ-T3 の細胞内濃度に起因すると考えられた。以上のことから、δ-T3 による細胞増殖抑制に FA が相乗効果を発揮することが明らかになった。

[1] T. Eitsuka et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 348, 170-175 (2006)
[2] T. Miyazawa et al., J. Nutr. Biochem., 20, 79-86 (2009)

tocotrienol, ferulic acid, synergistic effect

講演番号：4B06a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ B 校舎 06 会場

ホウレン草糖脂質 MGDG と抗がん剤ゲムシタビンのヒト膵臓がん細胞増殖抑制活性と抗腫瘍活性の相乗効果

The glycolipid (monogalactosyl diacylglycerol) from spinach enhances the anti-cell proliferation and anti-tumor effects of gemcitabine in human pancreatic cancer cells

○水品 善之[1,2]、赤坂 浩亮[3]、吉田 賢史[3]、高山 いずみ[3]、吉田 弘美[1]、佐々木 良平[3] ([1]神戸学院大・栄養、[2]神戸学院大・LSC、[3]神戸大院・医)
○ Yoshiyuki MIZUSHINA[1,2], Hiroaki Akasaka[3], Kenji Yoshida[3], Izumi Takayama[3], Hiromi Yoshida[1], Ryohei Sasaki[3] ([1]Faculty of Nutrition, Kobe Gakuin Univ., [2]LSC, Kobe Gakuin Univ., [3]Kobe Univ. Grad. Sch. of Med.)

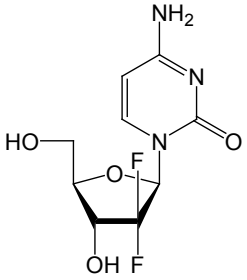
【目的】我々は、食品成分や栄養素から哺乳類の DNA 合成酵素（DNA ポリメラーゼ, Pol）阻害物質を探索している。これまでに、ホウレン草の糖脂質 MGDG（monogalactosyl diacylglycerol）【図２】が DNA 複製型の Pol 分子種を選択的に阻害して、がん細胞増殖抑制活性を示すことを見出した[1]。ホウレン草の MGDG をがん対策の補助食品として開発することを目的として、既知の抗がん剤であるゲムシタビン（GEM）【図１】との併用効果を調査した。

【方法】GEM のリン酸化体は、常法により化学合成した。Pol 阻害活性測定は精製酵素と合成 DNA を用いて *in vitro* の活性測定を実施した。ヒトがん細胞の増殖抑制活性（生存率）は、MTT 法で定量測定した。抗腫瘍活性は、ヌードマウスへヒト膵臓がん細胞（MIAPaCa2 cells）を移植して腫瘍体積の経時的変化を測定した。

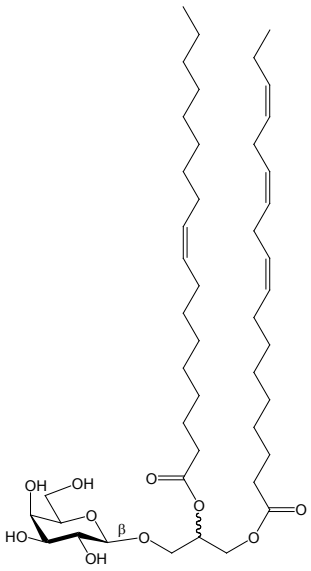
【結果】10μM の GEM は、哺乳類 Pol 分子種を阻害しなかったが、リン酸化体は阻害を示した[2,3]。特に三リン酸化体（GEM-TP）が最も強く Pol を阻害した。GEM-TP とホウレン草 MGDG の Pol 阻害活性の併用効果を調べた結果、Polαおよび Polγにおいては、GEM-TP 単独、MGDG 単独よりも両者を混合すると Pol 阻害活性の相乗効果を示した[2,3]。ホウレン草 MGDG と GEM は、ヒト由来の膵臓がん細胞の増殖を抑制した。そこで両者を併用した結果、MGDG→GEM 添加の場合は、MGDG 単独および GEM 単独を添加して得られた細胞増殖抑制活性値を足した数値よりも強い活性があったことから相乗効果を示した[2,3]。抗腫瘍活性は、両者の単独よりも MGDG→GEM 投与で腫瘍体積が縮小して相乗効果が見られた。

【考察】GEM は膵臓がんなどの抗がん剤として使用されているが、劇的な効果を発揮していない。また GEM の使用は副作用の懸念がある。膵臓がんの GEM による化学療法にホウレン草 MGDG を併用することで、GEM の投与量を減らしながら効果的な膵臓がんの治療が期待できる。

[1] C. Murakami, Y. Mizushina *et al.* (2003) ***Biochem. Pharmacol.***, 65, 259-267.
[2] H. Akasaka, Y. Mizushina *et al.* (2013) ***Biochim. Biophys. Acta***, 1830, 2517-2525.
[3] 国際特許出願：PCT/JP2013/69220



【図１】GEM



【図２】ホウレン草 MGDG

spinach, anti-cancer, DNA polymerase

講演番号：4B06a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ B 校舎 06 会場

67-k Da Laminin Receptor は 慢性リンパ性白血病患者における EGCG の感受性を規定する因子である

Correlation between EGCG susceptibility and 67LR expression

○熊添 基文[1]、塚本 俊太郎[1]、Shanafelt Tait[2]、Kay Neil[2]、山田 耕路[1]、立花 宏文[1,3] ([1]九大院農院・生機科、[2]メイヨークリニック、[3]九大食品機能デザイン)
○Motofumi KUMAZONE[1], Shuntaro TSUKAMOTO[1], Tait SHANAFELT[2], Neil KAY[2], Koji YAMADA[1], Hirofumi TACHIBANA[1,3] ([1]Department of Bioscience and Biotechnology, Kyushu University, [2]Mayo Clinic, [3]Food Functional Design Research Center, Kyushu University)

【目的】緑茶カテキンの一種である Epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG)はヒト第 II 相臨床試験において慢性リンパ性白血病患者に対して抗がん作用を発揮することが報告されている。しかしながらどのような因子が EGCG に対する感受性を規定しているのかは明らかとなっていない。我々はこれまでに、EGCG が腫瘍細胞表面に高発現する 67-kDa Laminin Receptor (67LR)に結合することで、cyclic GMP (cGMP)産生を誘導し、細胞致死を引き起こすことを報告した[1]。そこで、67LR の発現と *ex vivo* における慢性リンパ性白血病細胞の EGCG に対する感受性の相関について検討した。また、cGMP 分解酵素の一種である Phosphodiesterase 5 (PDE5)を阻害することで、EGCG の作用を増強できるのではないかと考え、PDE5 阻害剤及び EGCG の併用について検討を実施した。

【方法】慢性リンパ性白血病患者より採取した慢性リンパ性白血病細胞に対して EGCG を添加し、アポトーシス細胞を Annexin-V/PI 重染色により評価した。さらに、EGCG の感知分子である 67LR の発現及び cGMP 分解酵素である PDE5 をウエスタンブロット法により評価した。また、慢性リンパ性白血病細胞に EGCG 及び PDE5 阻害剤を添加し、その相乗性を検討した。

【結果】EGCG の患者由来初代慢性リンパ性白血病細胞に対する抗がん作用において、EGCG の感知分子である 67LR の発現が高い患者由来の細胞ほど、EGCG に対して高い感受性を示した。さらに、PDE5 が慢性リンパ性白血病細胞において高発現すること、勃起不全症治療薬として臨床的に使用されている PDE5 阻害剤により、EGCG の作用が相乗的に増強されることが明らかとなった。

【結論】慢性リンパ性白血病患者において 67LR が EGCG の感受性マーカーとなりえること、また、勃起不全症治療薬として臨床的に使用されている PDE5 阻害剤は、EGCG の作用を相乗的に高めることが示唆された。

1) J. Clin. Invest. 123, 787-799 (2013)

EGCG, 67LR, PDE5

講演番号：4B06a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ B 校舎 06 会場

ルテオリンによる AhR-Nrf2 経路を介した薬物代謝系調節能の解明
Luteolin modulates expression of drug-metabolizing enzymes through cross-talk between AhR and Nrf2 pathways in hepatocytes
○木村 有希、姜 嵩岩、芦田 均 (神戸大院農)
○Yuki KIMURA, Songyan JIANG, Hitoshi ASHIDA (Kobe Univ.)

【目的】環境汚染物質であるダイオキシン類は、アリール炭化水素受容体 (AhR) を活性化し、CYP1A1 などの薬物代謝第 I 相酵素を誘導することが知られている。また、AhR の活性化により、nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) によって制御される第Ⅱ相酵素も誘導されることが報告されている。これまでに、植物に含まれるフラボノイドなどの食品因子が AhR のアンタゴニストとなることを見出してきたが、これらの食品因子が AhR を介して誘導された薬物代謝酵素、特に第 II 相酵素の発現に及ぼす影響については充分に明らかにされていない。ルテオリンはフラボノイドの一種であり、シソをはじめとする様々な植物に含まれている。本研究では、ダイオキシンの一種である 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) によって誘導された薬物代謝第 I 相酵素および第 II 相酵素に対するルテオリンの効果を検討した。【方法】ヒト肝がん由来 HepG2 細胞にルテオリンを 3, 10, 30 μM の濃度で前処理し、10 分後に TCDD を 1 nM 負荷した。負荷 24 時間後にタンパク質を回収し、薬物代謝第 I 相酵素である CYP1A1 および第 II 相酵素である GST と NQO1 の発現量をウエスタンブロット法により解析した。同様の実験をマウス肝がん由来 Hepa1c1c7 細胞およびラット肝上皮由来 RL-34 細胞で行い、生物種による効果の違いを検討した。続いて、AhR 阻害剤である CH-223191 を 1 時間前処理した HepG2 細胞にルテオリンおよび TCDD を作用させ、薬物代謝酵素および Nrf2 のタンパク質発現量を解析した。さらに、Nrf2 の siRNA を導入した HepG2 細胞における薬物代謝酵素の発現誘導を検討した。また、ルテオリンを前処理した HepG2 細胞に第 II 相酵素の誘導剤である tBHQ を 30 μM の濃度で作用させ、24 時間後にタンパク質を回収し各薬物代謝酵素の発現量を解析した。【結果】TCDD によって誘導された第 I 相酵素および第 II 相酵素は、ルテオリンによって濃度依存的に抑制されることが確認された。このルテオリンの効果は、ヒト、マウス、ラットの肝臓由来細胞のいずれでも確認され、生物種による効果の相違はなかった。また、AhR の阻害あるいは Nrf2 のノックダウンにより、TCDD による第 II 相酵素の発現誘導は抑制された。また、ルテオリンは tBHQ によって誘導された第 II 相酵素に対しても抑制効果を示すことが確認された。以上の結果より、肝細胞では AhR が Nrf2 シグナル経路の上流に位置することが明らかとなり、ルテオリンは AhR の活性化を阻害することにより AhR-Nrf2 経路を制御し、薬物代謝第 I 相だけでなく第 II 相酵素の発現を抑制することが判った。一方で、ルテオリンは AhR を介さなくとも Nrf2 を介した第 II 相酵素の発現も抑制することも判った。

luteolin, aryl hydrocarbon receptor (AhR), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)

講演番号：4B06a17
講演日時、会場：3 月 30 日 11:54～ B 校舎 06 会場

白金ナノ粒子及び分子状水素の併用処理によるガン細胞のアポトーシス誘導機構

Apoptosis-inducing mechanism in cancer cells by the combined treatment of platinum nanoparticles and hydrogen

○中西 恵[1]、村田 みさと[1]、福永 有紗[1]、濱崎 武記[3]、樺山 繁[4]、照屋 輝一郎[2]、白畑 實隆[2]([1]九大院シス生、[2]九大院生資環、[3]九大院農院生機科、[4]日本トリム)

○ Megumi Nakanishi[1], Misato Murata[1], Arisa Fukunaga[1], Takeki Hamasaki[3], Shigeru Kabayama[4], Kiichiro Teruya[2], Sanetaka Shirahata[2] ([1]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ, [2]Grad. Sch. Agr. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ, [3]Dept. Biosci. Biotech., Fac Agr., Kyushu Univ, [4]Nihon Trim Co.,Ltd)

[目的]

水の電気分解により得られる電解還元水は多量の分子状水素及び微量の電極由来の白金ナノ粒子を含むことが知られている。分子状水素は近年様々な酸化ストレス関連疾患モデル動物において酸化ストレス抑制効果を示す新しい抗酸化物質として注目されている。また、白金ナノ粒子はスーパーオキシドラジカル、過酸化水素、ヒドロキシラジカルを消去する多機能の抗酸化剤として作用することも報告されている。一方、分子状水素と白金ナノ粒子が共存した場合には、白金ナノ粒子表面で原子状水素が生成し、より強い抗酸化性を示すことが期待される。原子状水素の生理機能についてはまだ十分明らかにされていない。そこで、本研究では白金ナノ粒子及び水素の併用処理によるガン細胞死誘導機構について解析を行った。

[方法]

白金ナノ粒子で 2 時間処理後、水素ガスインキュベーター(75%H_2, 20%O_2, 5%CO_2)中で培養した HL60 細胞(ヒト骨髄性白血病株)に対して flow cytometry を用いた Annexin V-FITC 染色及び caspase Inhibitor を用いた Sub-G1 解析を行った。また、さらに詳細なアポトーシス経路を探索するため、Western blotting によるアポトーシス関連タンパクの解析を行った。

[結果・考察]

白金ナノ粒子または水素の単独処理では細胞増殖への顕著な影響は見られなかったが、白金ナノ粒子及び水素を併用的に処理した条件での HL60 細胞の増殖抑制が確認された。Flow cytometry による解析からは、白金ナノ粒子及び水素の併用処理により HL60 細胞に caspase 経路の活性化を伴うアポトーシスが誘導されることが確認された。特に Caspase 12 の活性化が見られたため、小胞体ストレスとの関連が示唆された。また、Western blotting による解析から、Caspase 8 及びその関連タンパクの活性化も確認されたことからミトコンドリア経路との関連も示唆されたため、さらに詳細なアポトーシス誘導経路についての検討を行っている。

platinum nanoparticle, hydrogen, apoptosis

講演番号：4B07a03
講演日時、会場：3 月 30 日 09:22～ B 校舎 07 会場

ビタミン B_{12} 欠乏による酸化ストレスが線虫(*Caenorhabditis elegans*)の記憶・学習能に及ぼす影響

Effect of oxidative stress caused by vitamin B_{12} deficiency on memory and learning ability in *Caenorhabditis elegans*

○美藤 友博、藪田 行哲、河野 強、渡辺 文雄 (鳥取大院連合農学)
○Tomohiro BITO, Yukinori YABUTA, Tsuyoshi KAWANO, Fumio WATANABE (Tottori Univ)

【目的】線虫(*Caenorhaditis elegans*)はヒトのモデル生物として広く様々な研究に用いられており，その中でも寿命や老化、記憶・学習機能などの分野での活用が注目されている．我々はこれまでに食餌性ビタミン B_{12}(B_{12})欠乏線虫において著しいメチオニンシンターゼ活性の低下によるビタミン C やグルタチオンの減少，また，それに伴い活性酸素種や活性窒素種の顕著な蓄積を示し，B_{12} 欠乏線虫は非常に強い酸化ストレス障害を受けていることを明らかにした．しかし，B_{12} 欠乏症として認知機能障害が知られているが，その発症メカニズムの解明には至っていない．そこで本研究では B_{12} 欠乏線虫を用いて，B_{12} 欠乏と記憶・学習障害の関連性について検討すると共に酸化ストレスと記憶・学習障害の関与について検討した．

【方法】M9 最小培地で培養した大腸菌(OP50 株)を B_{12} 制限食餌として、線虫を 5 世代継代的に生育させ B_{12} 欠乏線虫を調製した．NaCl と餌の関連付けを利用した連合学習アッセイ法で Chemotaxis Index を算出し B_{12} 欠乏線虫の記憶・学習障害を評価した．また，ビタミン E(VE)とグルタチオン(GSH)を添加した培地で B_{12} 欠乏線虫を調製し，同様の連合学習アッセイ法で酸化ストレスと記憶・学習障害の関与を検討した．線虫の酸化ストレス状態は TBARS 法で過酸化脂質を測定することで評価した．

【結果・考察】B_{12} 欠乏線虫は連合学習能に障害を有する *ins-1* 線虫ほどではないが、コントロール線虫と比較した時，顕著な記憶・学習能の低下が観察された．また B_{12} 欠乏線虫に B_{12} を供給した時，記憶・学習能の回復は 1 世代の B_{12} の曝露では顕著な回復は見られなかったが，2 世代以降は顕著な回復を示し，5 世代の B_{12} の曝露ではコントロール線虫のレベルにまで記憶・学習能が回復した．以上のことより B_{12} 欠乏が線虫の記憶・学習能の低下を引き起こしていることが明らかとなった．

また，酸化ストレスが線虫の連合学習能にどの程度影響を及ぼしているのかを検討するために，B_{12} 欠乏線虫に VE と GSH を供給した．その結果，両抗酸化物質添加において B_{12} 欠乏線虫の過酸化脂質が顕著に減少した．さらに両抗酸化物質供給線虫において記憶・学習能低下の緩和が観察された．GSH は 1 世代の継代で顕著な緩和が観察されたが，VE では数世代の継代が必要であった．これは VE に比べ GSH が様々な抗酸化反応に寄与していることによると推察された．以上の結果より，B_{12} 欠乏線虫における酸化ストレス障害の発生が記憶・学習障害へ寄与していることが示唆された．

Vitamin B_{12}, *Caenorhabditis elegans*, Memory and learning

講演番号：4B07a04
講演日時、会場：3 月 30 日 09:33～ B 校舎 07 会場

α-トコフェロールがα-トコフェロール輸送タンパク質（α-TTP）の細胞内局在に与える影響

Effect of alpha-tocopherol on intracellular localization of alpha-tocopherol transfer protein

○依包 智行、佐藤 道夫、竹中 麻子 (明治大院農)
○Tomoyuki YORIKANE, Michio SATO, Asako TAKENAKA (Meiji Univ.)

【目的】

α-TTP は、主に肝臓に発現し、肝臓に取り込まれた食餌由来ビタミン E 同族体の中から α-トコフェロールと選択的に結合して血中に輸送するタンパク質である。α-TTP は肝細胞の細胞質に存在するが、リソソームに移動して膜中の α-トコフェロールを抜き取り、細胞膜に輸送する可能性も報告されている。一方われわれは、α-TTP が細胞内で滑面小胞体 (sER) に局在する可能性を、α-TTP 高発現培養細胞やラット肝臓を用いた透過型電子顕微鏡（TEM）観察で検討、報告してきた。α-トコフェロールを輸送するという機能を考えると、細胞内 α-トコフェロールの濃度の上昇は α-TTP の細胞膜移行などの局在変化を引き起こす可能性が高い。そこで本研究では、ラットに α-トコフェロール含量の異なる飼料を与え、肝臓中のα-TTP を TEM で観察することにより、α-トコフェロール濃度の違いが in vivo での α-TTP の細胞内局在におよぼす影響を解析した。

【方法】

生後 3 週齢の Wistar 系オスラットに AIN93 組成に準じた通常食（CON）、CON から α-トコフェロールを除いたビタミン E 欠乏食（E－）、CON に α-トコフェロールを 500mg / kg 添加したビタミン E 添加食（E＋）を 1 週間与えた。心臓から固定液（4%PFA＋0.1%GA）を灌流して肝臓を固定し、凍結ミクロトームにより凍結切片を作製した。この切片を抗 α-TTP 抗体とコロイド金標識された 2 次抗体と反応後、nano probes HQ kit による銀増感を行い、脱水後 Quetol651 樹脂で包埋した。包埋したサンプルから、ウルトラミクロトームを用いて超薄切片を作成し、電子染色後、TEM により観察した。

【結果】

α-TTP は E＋では細胞内で密な局在を示し、E－では広範囲に散在した局在パターンを示した。しかし、いずれの α-トコフェロール濃度群でも α-TTP は sER に局在し、α-トコフェロール添加群で α-TTP が細胞膜に移動する現象は観察されなかった。さらに詳細に観察すると、E＋では sER の領域が増大しており、α-トコフェロール過剰摂取により sER が発達したと考えられた。一方で、E－では sER 構造が不明瞭で空隙が観察され、α-トコフェロール欠乏による膜の脆弱化が進行していると考えられた。本研究の結果から、α-TTP は細胞内の α-トコフェロール濃度によらず、常にその多くが sER に局在することを示した。

alpha-tocopherol, alpha-tocopherol transfer protein, transmission electron microscopy

講演番号：4B07a05
講演日時、会場：3 月 30 日 09:44～ B 校舎 07 会場

細胞外マトリクスがα-トコフェロール輸送タンパク質遺伝子発現に及ぼす影響

Effect of extracellular matrix on alpha-tocopherol transfer protein gene expression.

○江口 岳[1]、尾崎 依[1]、小田 裕昭[2]、竹中 麻子[1] ([1]明治大院農、[2]名古屋大院・生命農学研究科)
○Gaku EGUCHI[1], Yori OZAKI[1], Hiroaki ODA[2], Asako TAKENAKA[1] ([1]Meiji Univ., [2]Nagoya Univ.)

【目的】食餌中のα-トコフェロールは、小腸で吸収されて一度肝臓に取り込まれた後、再び血中に放出される。この肝臓から血中へのα-トコフェロール輸送は、肝臓に存在するα-トコフェロール輸送タンパク質（α-TTP）によって行われている。α-TTP mRNA は肝臓で多く発現し、発現量が肝細胞の分化状態に応じて変化するが、この肝臓特異的な発現の制御機構は明らかではない。そこで本研究では、肝細胞の分化状態を維持できる EHS マトリゲル（マウス肉腫細胞由来の細胞外基底膜）を用いて、細胞外マトリクスがα-TTP 遺伝子の肝臓特異的発現におよぼす影響を解析した。
【方法】ラット初代培養肝細胞、ラット肝がん細胞 H4IIE を通常の組織培養ディッシュ上、EHS マトリゲルをコートしたディッシュ上、EHS マトリゲルを重層した三次元でそれぞれ培養した。24 時間または 48 時間培養した細胞から total RNA を抽出し、肝臓特異的転写因子（HNF-1α、HNF-3γ、HNF-4α）とその標的遺伝子（ albumin、apoA1、apoC3、PEPCK、TAT ）、およびα-TTP の mRNA 量を解析した。これにより、分化状態の異なる肝臓細胞において、α-TTP と他の肝臓特異的遺伝子の発現に細胞外マトリクスがおよぼす影響を比較検討した。
【結果】ラット初代培養肝細胞、H4IIE 細胞を EHS マトリゲル上あるいはマトリゲル三次元で培養すると、いずれの細胞も形状が通常培養時の平面単層状から球状へと変化した。ラット初代培養肝細胞では EHS マトリゲル培養で肝臓特異的転写因子 HNF-4α の遺伝子発現量が通常培養時より増加した。また、α-TTP 遺伝子と肝臓特異的遺伝子の一部（ apoA1、PEPCK、TAT ）は、EHS マトリゲル培養時に発現量の増加が見られた。また、PEPCK や TAT は三次元培養で発現量が大きく増加し、細胞外マトリクスの影響を強く受けると考えられた。一方で、H4IIE 細胞を EHS マトリゲルで培養した場合には、通常培養と比較して肝臓特異的転写因子およびα-TTP を含む肝臓特異的遺伝子の発現量に変化が生じなかった。本研究の結果から、初代培養肝細胞では細胞外マトリクスにより肝細胞の分化が維持されてα-TTP 遺伝子や肝臓特異的遺伝子の発現が高くなるが、肝がん細胞では影響を受けないことが示された。

alpha-tocopherol transfer protein, vitamin E, extracellular matrix

講演番号：4B07a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ B 校舎 07 会場

トコトリエノールがビタミン E 欠乏による不安行動におよぼす影響

Effect of tocotrienols on anxiety-like behavior in vitamin E deprived rats.

○内山 智、中間 未祈子、原田 健史、竹中 麻子 (明治大農)
○Sato UCHIYAMA, Mikiko NAKAMA, Takeshi HARADA, Asako TAKENAKA (Meiji Univ.)

【目的】α-トコフェロールはビタミン E 同族体の中で体内濃度が最も高く、食事由来のビタミン E の活性本体であると考えられている。一方トコトリエノールは、α-トコフェロールよりも体内濃度は低いが、強い神経保護作用が報告されている。われわれはこれまでに、ビタミン E 欠乏食の摂取がラットの不安行動を増加させることを見出しており、この不安の増加は酸化ストレスの増大による脳神経系の細胞機能低下によるのではないかと考えている。そこで本研究では、ビタミン E 欠乏による不安行動増加モデルラットにトコトリエノールを摂取させ、不安行動抑制作用をα-トコフェロールと比較して検討した。またトコトリエノールの体内濃度を測定し、トコトリエノールの臓器ごとの蓄積量、およびα、β、γ、δ-トコトリエノールそれぞれの蓄積量を比較検討した。
【方法】3 週齢 Wistar 系雄ラットを 3 群に分け、(1)ビタミン E 欠乏食、(2) α-トコフェロール（α-T）添加食（100mg/kg diet)、(3) トコトリエノール（T3）ミックス（α, β, γ, δ-トコトリエノールをそれぞれ 31.5%,4.2%,45.7%,17.2%含む）添加食（100mg/kg diet）を 1 週間または 4 週間摂取させた後、高架型十字迷路（EPM）試験により不安行動の解析を行った。EPM 試験の翌日、10 時間の絶食後解剖し、採取した血漿、肝臓、大脳、小脳の TBARS 濃度、およびα-トコフェロール濃度、α、β、γ、δ-トコトリエノール濃度を HPLC 法により測定した。
【結果】ビタミン E 欠乏による不安行動は、飼育 1 週間、飼育 4 週間ともに指標動作の一つである head dipping においてα-T 添加群で抑制された。また、飼育 4 週間では T3 添加群でも不安行動の抑制が確認された。この結果から、ビタミン E 欠乏時の不安行動は T3 の 4 週間摂取によって抑制されるが、T3 の不安抑制効果はα-T よりも弱いことが示唆された。一方、T3 添加群の T3 体内濃度は肝臓で最も高かった。また、血漿、肝臓、大脳、小脳ともにα、β、γ、δの中でα-T3 が最も高く検出された。δ-T3 は、血漿でのみ添加群で濃度が上昇し、肝臓、大脳、小脳では上昇がみられなかった。β-T3 はいずれの臓器でも添加群での濃度上昇がみられなかった。また、大脳よりも小脳の T3 濃度が高く、T3 は大脳よりも小脳に取り込まれやすいことが示唆された。

tocotrienol, anxiety, tocopherol

講演番号：4B07a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ B 校舎 07 会場

ビタミン K 欠乏食による KK-A^yマウスのインスリン分泌能・感受性の変化

Vitamin K deficient diet induces the alternation of insulin secretion and insulin sensitivity of KK-A^y diabetic mice

○白川 仁、平原 啓甫、後藤 知子、駒井 三千夫（東北大院農）
○Hitoshi SHIRAKAWA, KEISUKE HIRAHARA, TOMOKO GOTO, MICHIO KOMAI (Tohoku Univ.)

【目的】ビタミンK（VK）は、血液凝固因子や骨基質タンパク質などのVK依存性タンパク質のGlu残基のγ位カルボキシル化（Gla化）を行う酵素γ-glutamylcarboxylaseの補因子として作用し、血液凝固や骨代謝に関与する。ラットやマウスにおけるVKの分布を見ると、肝臓や骨の他にも、脳、膵臓、精巣、脂肪組織などに多量に存在し、その大部分は、VK2の一種であるメナキノン-4（MK-4）である。MK-4は、VKのもつGla化活性の他に、腫瘍細胞の細胞死誘導、転写因子PXRのリガンド活性、PKAの活性化、NFκBの活性化抑制などのユニークな作用を有していることが報告されている。本研究では膵臓に多量に存在するMK-4に焦点を当て、VKが糖代謝に与える影響について、遺伝的糖尿病モデル動物であるKK-A^yを用いて解析を行った。
【方法】KK-A^yマウス（4週齢、雄）に、AIN-93G組成の標準飼料（VK1を0.75 mg/kg添加：cont群）、またはVK無添加飼料（K free群）を与え、20日間および60日間飼育した。飼育期間中は体重、摂食量、摂食時血糖値の測定を行った。60日間の飼育試験では、33日目に経口糖負荷試験を実施した。飼育期間終了後、無麻酔下・断頭により解剖に供し、血清、各臓器を採取した。得られた血清の血糖値、インスリン値、各種脂質パラメーター値を測定した。また、臓器中のVK量は、定法に従い蛍光HPLC法で定量した。また、膵臓、肝臓、筋肉、脂肪組織からトータルRNAを調製し、定量RT-PCR法によって糖代謝関連遺伝子のmRNA量を測定した。また、ウエスタンブロット法によりタンパク質発現量の測定を行った。さらに、マウス膵臓からランゲルハンス島を分離、培養し、グルコース刺激により分泌されるインスリン量を測定した。
【結果】摂食時の血糖値は、飼育日数に従い両群で上昇したが、K free 群において cont 群に比べ有意な増加が観察された。経口糖負荷試験の結果、cont 群と比較して K free 群で耐糖能が悪化する傾向が見られた。また、肝臓の解糖系関連遺伝子、IRS-2 遺伝子の mRNA 量が低下していた。肝臓および膵臓中の総 VK 量、MK-4 量は、K-free 群で有意に減少していた。分離ランゲルハンス島からのインスリン分泌量は、MK-4 の存在下で有意に増加した。以上のことから、VK 欠乏食は臓器中の VK 量を低下させ、膵臓において糖負荷時のインスリン分泌量を低下させること、また、肝臓のインスリン抵抗性を招く可能性が示唆された。

vitamin K, diabetic mice

講演番号：4B07a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ B 校舎 07 会場

海藻アカモクの食用加工によるミネラル含量への影響

Effect of parboiling on the mineral content in the marine brown alga *Surgassum horneri*

○村上 香、岡 聡子、江島 潤、小田 涼太（広島工業大学）
○Kaori Murakami, Satoko Oka, Jun Ejima, Ryouta Oda (Hiroshima institute of technology)

【目的】

我々はこれまでに、アカモク*Sargassum horneri* (Turner) C. Agardhの食糧資源としての有効活用のために、経口摂取によるラットの糞便増加や腸内細菌叢への影響を確認し、機能性食品としての可能性を示した*。また、アカモクの成長・成熟に伴う食品一般成分、食物繊維および有用ミネラル含量の変化を調べ、水溶性および不溶性食物繊維やミネラルの供給源として有用であることを示した**。本研究では、アカモクの調理・加工による有用ミネラル含量への影響を調べた。

【方法】

アカモク原藻雌雄株それぞれ可食部（上部2/3）を、超純水で1分間3回洗浄（原藻；洗浄水）、洗浄後に5倍量の2.2% NaCl（超純水で調製）で1分間湯煮後（ゆで汁）、5倍量の超純水で1分間冷却した（加工品；冷却水）。アカモク原藻および加工品を凍結乾燥後に粉砕・混合して、酸分解法で湿式灰化し測定試料を調製した。湿式灰化したアカモク試料および洗浄水、ゆで汁、冷却水は原子吸光分析器を用いてカリウム、カルシウム、マグネシウム、マンガン、ナトリウム等の含有量を測定した。

【結果】

アカモク可食部のミネラル含量は、塩ゆで加工により、ナトリウム濃度が増加したのに対して、カリウム、カルシウム、マグネシウム、銅、マンガンは減少していた。特にカリウムの減少率は高く（65－78%）、カルシムの減少率は低かった（16－27%）。雄株、雌株それぞれの塩ゆで加工品のミネラル含量（湿重量）は、ナトリウムは 458±2、398±6 mg/100 g、カルシウムは 145±2、162±1 mg/100 g、カリウムは 129±2、208±8 mg/100 g、マグネシウムは 68.9±0.7、64.7±1.7 mg/100 g、マンガンは 14.3±0.2、11.4±0.5 mg/100 g であった。

* 5th International Dietary Fibre Conference (2012) p.159, International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods 2012 (2012) p.155
** *J Food Compost Anal*, 24 (2011) 231–236, 2013 年度日本農芸化学会大会要旨集 (2013) 3A20p01

seaweed, mineral, brown alga

講演番号：4B07a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ B 校舎 07 会場

共役アッセイ法を用いたヒト肺由来セレノリン酸合成酵素の機能解析

Functional analysis of Selenophosphate synthetases from human lung cell

○鎌田 早帆、奥河内 貴大、稲垣 賢二、田村 隆（岡山大院・環境生命）
○Saho Kamada, Takahiro Okugouchi, Kenji Inagaki, Takashi Tamura (Grad. Sch. of Nat. Sci. Tech., Okayama Univ)

【目的】原子番号 34 のセレン（Se）は，ヒト，ほ乳類，鳥類，魚類，ある種の細菌において微量必須元素である。セレンは，抗酸化作用，ホルモン調節作用，免疫賦活化作用など様々な生理作用を有している。その生理機能はセレノシステイン（Sec）残基を持つセレンタンパク質の触媒能に基づいて発揮される。セレノリン酸はセレンタンパク質合成の代謝中間体であり，セレノリン酸合成酵素(SPS)によって供給される。哺乳類には相同性の高い 2 つのアイソザイム SPS1，SPS2 が存在する。SPS2 はそれ自身が活性中心に Sec を持つセレン酵素であり，セレノリン酸合成活性がある。対照的に活性中心に Thr を持つ SPS1 は in vitro における SPS 活性を示さず，その生理的意義が不明である。本研究では，これらアイソザイムの生理的意義を酵素化学的に解明することを目的とした。
【方法】大腸菌を宿主としたヒト肺由来 SPS の異種発現系の最適条件を検討した。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来ホスホエノールピルビン酸ジキナーゼ(PPDK)との共役アッセイ法により，AMP 生産を指標とする SPS 活性測定法を検討した。さらにセレンのリサイクル機構に関与すると考えられている L-セレノシステインβリアーゼ（SCL）と SPS1 の相互作用を AlaDH（アラニンデヒドロゲナーゼ）共役アッセイ法および GFP-融合タンパク質のプルダウンアッセイ法により検討した。これらの方法を用いて SPS1 共存下と SPS2 共存下での SCL 活性を比較した。
【結果】ヒト肺由来 SPS1，SPS2 の大量発現系は pET28a ベクターを用いて His タグ融合型タンパク質として低温で誘導することで可溶性画分に発現できた。さらに，Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーを用いる簡易で効率的な精製法も確立した。PPDK/ピルビン酸脱水素酵素系を用いて組換え型 SPS2 の触媒能を測定する PPDK 共役法を確立した。GFP 融合型タンパク質を用いた実験では，GFP 融合型 SPS1 は SCL に結合することが示唆された。SCL/AlaDH の共役反応系に組換え型 SPS1 を共存させると SCL 活性が促進された。これらの実験結果より，SPS1 は SCL に結合し，SCL が切り出す 2 価セレンを SPS1 が受け取ることで SCL 活性を促進することが考えられる。以上の結果より SPS1 はセレン代謝において有機態セレン Sec からセレンをリサイクルする機構に寄与していること示された。一方で，SPS2 共存による SCL 触媒反応の加速効果はみられず，SPS2 は有機態セレンのリサイクルには関与しないことが示唆された。

Selenium, Selenophosphate synthetases, Selenocysteine lyase

講演番号：4B07a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ B 校舎 07 会場

四物湯（漢方薬）による造血促進効果

Activating effects of Shimotsu-to (herbal medicine) on hematopoiesis in iron deficient rats

○陳 風霞、大塚 紗恵、芋岡 佑里奈、パズリジャン イスカンダル、篠田 粧子（首都大院人）
○FENGXIA CHEN, SAE OTSUKA, YURINA IMOOKA, ISKANDAR PAZIL, SHOKO SHINODA (Tokyo Metropolitan Univ.)

【目的】鉄欠乏の予防・改善は積極的に進める必要があるが、一方で、貯蔵鉄の低減によるがん罹患率の低下（Zacharski, et al., 2008）や、鉄サプリメントの長期摂取による死亡リスクの増加など（Mursu, et al., 2011)、鉄過剰による弊害も注目されている。そこで鉄以外の食品成分で貧血予防・改善効果を有するものを探索し、漢方薬や薬膳として用いられる四物湯に鉄摂取量が低い条件下で鉄欠乏ラットの赤血球を速やかに増加させる効果があることを確認した。本研究では、四物湯の投与が鉄欠乏ラットの造血活性に及ぼす影響について、エリスポエチン（EPO）及び造血に関連するサイトカイン産生を中心に検討した。

【方法】4 週齢の Wistar 系雄ラット標準飼料に（AIN-93G：鉄 35ppm 含有）または鉄無添加飼料を投与し、通常ラット（n=7)、貧血ラット（n=63）とした。3 週間後に通常ラット及び貧血ラット各 7 匹を解剖し、残りの貧血ラット（n=56）を 4 群に分け、①標準飼料-脱イオン水群(S-C)、②標準飼料-四物湯群（S-SH)、③低鉄飼料(Fe17ppm 含有)-脱イオン水群（L-C)、④低鉄飼料-四物湯群（L-SH）とした。1 週間及び 3 週間後に各群 7 匹を解剖し、赤血球数（RBC)、ヘマトクリット（Ht)、ヘモグロビン（Hb)、EPO、ferritin、血清鉄（SI)、総鉄結合能（TIBC)、トランスフェリン飽和度（Tf%）を測定した。右大腿骨は切断して骨髄を採取し、RPMI1640 培地で洗浄し骨髄細胞数をカウントした。血清を試料とし、造血幹細胞から赤血球形成に関わるサイトカイン（IFN-γ、G-CSF、GM-CSF、IL-4、IL-6）を Bio-Plex ラットサイトカインアッセイ、Bio-Plex100 システムで測定した。

【結果】ラット血液中の鉄栄養状態では、Ht、Hb、SI、Tf（%）は何れの飼料においても 1 週間より 3 週間で増加し、S-C、S-SH 群は L-C、L-SH 群より高くなった。一方、TIBC は 1 週間より 3 週間で減少し、S-C、S-SH 群は L-C、L-SH 群より低くなった。貧血は改善傾向にあったが、これらの指標に対する四物湯投与の影響は認められなかった。四物湯は、標準飼料を投与した S-SH 群の造血に影響をしなかったが、鉄摂取量が低い L-SH 群では投与から 1 週間及び 3 週間で L-C 群に比べて赤血球を有意に増加させた。血清中の EPO やサイトカインの IFN-γ、GM-CSF、IL-4、IL-6 濃度には影響が見られなかったが、G-CSF は有意に高くなり、四物湯による造血促進効果は G-CSF の関与により活性化する可能性が示唆された。

iron deficiency, Shimotsu-to, red blood cell

講演番号：4B07a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ B 校舎 07 会場

亜鉛欠乏予防に向けた食品由来の亜鉛吸収促進因子の探索

Searching for food factors enhancing zinc absorption

○橋本 彩子[1]、木津 久美子[2]、宮前 友策[1]、増田 誠司[1]、永尾 雅哉[1]、成田 宏史[3]、神戸 大朋[1]([1]京大院生命・統合生命、[2]大阪成蹊短大・総合生活、[3]京女大・家政・食物栄養)
○Ayako HASHIMOTO[1], Kumiko KIZU[2], Yusaku MIYAMAE[1], Seiji MASUDA[1], Masaya NAGAO[1], Hiroshi NARITA[3], Taiho KAMBE[1] ([1]Grad Sch. Biostudies, Kyoto Univ., [2]Dept. of Life and Living, Osaka Seikei Col., [3]Dept. of Food and Nutr., Kyoto Women's Univ.)

【目的】超高齢社会を迎えた我が国において、高齢者の QOL 向上は重要課題である。そのなかで、近年、亜鉛欠乏が高齢者に多いことが疫学調査から明らかとなっており、さらに亜鉛サプリメントの利用による免疫機能の向上など、亜鉛と高齢者の健康に関する研究が数多く報告されている。亜鉛欠乏予防のためには亜鉛吸収量の増大が肝心となるが、消化管での亜鉛吸収率は 30%と低い。亜鉛の吸収には、小腸上皮細胞の腸端膜上に発現する亜鉛トランスポーターZIP4 が機能しており、亜鉛欠乏時には細胞膜に増加して亜鉛取り込みに働いている。我々は、ZIP4 を過剰発現させることにより、細胞内亜鉛レベルが増加することを複数の培養細胞において確認しており、ZIP4 発現量を指標に亜鉛吸収促進因子を探索することの有効性を見出している。そこで、日々の食生活を通して亜鉛欠乏の予防を実現させるため、ZIP4 の発現量を増加させる食品因子を探索した。
【方法】食品因子のスクリーニングには、内在性 ZIP4 を発現し、小腸上皮細胞と同様に亜鉛レベルに応答して ZIP4 の発現が制御される Hepa 細胞を用いた。食品サンプル添加時における ZIP4 の発現量の変化は、Immunoblotting により評価した。ZIP4 の増加が確認されたサンプルについては、細胞内亜鉛レベルの変化を、細胞内亜鉛のマーカー遺伝子であるメタロチオネイン(MT)の mRNA 量の定量と MT プロモーター制御下で分泌型アルカリフォスファターゼを発現させるレポーターアッセイにより評価した。
【結果・考察】400 を超える食品サンプルをスクリーニングした結果、複数の大豆抽出物に ZIP4 の発現量ならびに細胞内亜鉛レベルを増加させる効果が認められた。これらの大豆抽出物による ZIP4 の発現変化について詳細に解析した結果、ZIP4 は細胞表面で増加しており、さらに mRNA レベルでは発現に影響を受けず、ZIP4 タンパク質が分解抑制されていることを明らかにした。また、見出した大豆抽出物は、クラスリンや脂質ラフトを介してエンドサイトーシスされる代表的な因子の細胞内への取り込みにはほとんど影響しないことから、ZIP4 特異的にエンドサイトーシスを阻害すると考えられた。以上の結果から、見出した大豆抽出物には、細胞膜上の ZIP4 発現量を増加させることにより細胞内への亜鉛取り込みを増加させる成分が含まれると考えられた。このような ZIP4 を標的とした亜鉛吸収率の向上が期待される食品因子は初めての報告である。現在、本探索系を活用し、さらなる因子を見出している。高齢者が急増している現代社会において、食品中に存在する亜鉛吸収促進因子を見出すことは、日常の食事を通した亜鉛欠乏予防の実現につながると期待される。

zinc, transporter, ZIP4

講演番号：4B07a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ B 校舎 07 会場

亜鉛トランスポーターZIP4 発現促進活性を示す大豆サポニン分子の機能評価

Functional evaluation of soyasaponin molecules with the zinc transporter ZIP4 protein-increasing activity

○岡本 亘弘[1]、桑室 慶考[1]、大倉 克摩[1]、橋本 彩子[2]、永尾 雅哉[2]、神戸 大朋[2]、入江 一浩[3]、高橋 正和[1]（[1]福井県大院生物資源、[2]京大院生命・統合生命、[3]京大院農・食生科）
○Nobuhiro OKAMOTO[1], Yoshitaka KUWAMURO[1], Katsuma OHKURA[1], Ayako HASHIMOTO[2], Masaya NAGAO[2], Taiho KAMBE[2], Kazuhiro IRIE[3], Masakazu TAKAHASHI[1] ([1]Dept. of Biosci., Fukui Pref. Univ., [2]Div. of Int. Life Sci., Kyoto Univ., [3]Dept. of Food Sci. Biotechnol., Kyoto Univ.)

【目的】亜鉛はタンパク質の構造因子や酵素の補因子、シグナル因子などとして重要な役割を有する必須重金属元素であり、亜鉛欠乏症は味覚障害や皮膚疾患、免疫機能の低下などを引き起こす。一方、食事による亜鉛の腸内吸収効率は約 30%と低い。亜鉛トランスポーターZIP4 は小腸上皮細胞に発現し、亜鉛吸収に必須な役割を果たしている。そこで、亜鉛吸収効率の改善に役立つ食品成分を得るため、ZIP4 発現促進活性を示す食品因子を探索した。本研究では、もっとも顕著な活性を示した大豆抽出物より、大豆サポニンを単離・同定し、各分子種について ZIP4 発現促進活性などの機能評価を行った。
【方法】マウス Hepa 細胞は小腸上皮細胞と同様亜鉛欠乏下で ZIP4 発現量が増加する。そこで Hepa 細胞をサンプル含有培地で培養後、細胞破砕物を Western 解析して ZIP4 発現促進活性を評価した。またメタロチオネイン mRNA 発現量は RT-qPCR 法で検討した。活性因子は大豆抽出物から逆相液体クロマトグラフィー等によって精製・単離し、NMR などの機器分析により同定した。
【結果・考察】大豆抽出物から強い活性成分として大豆サポニン Bb を単離・同定した。大豆サポニン Bb は濃度依存的に明瞭な ZIP4 発現促進活性を示し、さらに、メタロチオネイン遺伝子の発現誘導活性も確認されたことから、細胞内への亜鉛取込みも増大させていることが示唆された。一方、大豆サポニン Bb と同時に単離・同定された大豆サポニン Aa や Ab は、Bb よりも弱い活性を示した。A グループと B グループでは大豆サポニンの糖鎖構造が大きく異なることから、糖鎖構造の違いが活性の強さに関与していると考えられた。

soybean, zinc transporter, ZIP4

講演番号：4B07a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ B 校舎 07 会場

新規ナノ化食品の吸収性向上に関する研究

Sturdies on improvement for absorption of novel nano-sized foods

○丸 勇史[1]、樽井 一也[1]、山下 裕輔[1]、木村 信之[2]、加賀美 和宏[2]、金 武祚[1] ([1]ファーマフーズ、[2]アクティバスファーマ)
○Isafumi MARU[1], Kazuya Tarui[1], Yusuke Yamashita[1], Nobuyuki Kimura[2], Kazuhiro Kagami[2], Mujo Kim[1] ([1]Pharma Foods, [2]Activus Pharma)

【目的】
機能性食品素材として有用性が注目されている難水溶性のクルクミンやルテインは、ナノ粒子に粉砕することにより水分散性が向上するため、飲料等様々な食品への応用が期待されている。また、ナノ化食品素材は、非ナノ化素材に比べて生体への吸収率が向上すると言われている。今回、新たに開発された技術によりナノ化されたウコン抽出物（クルクミン）およびマリーゴールド抽出物（ルテイン）について、水への分散性を検討し、さらに生体に対する吸収性を検討するためヒトでの経口投与試験を実施した。

【方法および結果】
クルクミンをアクティバスファーマ社独自の粉砕技術（Hirokawa 法）で粉砕することで、平均粒子径 371 nm、粒度分布 D(10%) 187 nm～D (90%) 670 nm の粉末が得られた。このナノ化クルクミンは良好な水分散性を示し、室温で 1 か月以上静置をしても沈殿は生じなかった。更にクルクミン 30 mg 当量をヒトに経口投与し、継時的に血中クルクミン量を測定したところ、投与 30 分後にピークに達し、非ナノ化のクルクミンに対して 13 倍の血中濃度の増加がみられた。一方、ルテインについても同様の粉砕方法で、平均粒子径 220 nm、粒度分布 D(10%) 137 nm～D(90%) 310 nm の粉末が得られた。このナノ化ルテインも水に対して良好な分散性を示し、ルテイン 10 mg 当量のヒト経口投与試験では、非ナノ化のルテインと比較し 5 倍以上の吸収量の増加が認められた。これらの結果から、難水溶性のクルクミンやルテインは、ナノ粒子に粉砕することにより、水分散性が向上するとともに、生体への吸収率が向上することが確認された。今回、新たに開発されたナノ化食品は、難水溶性素材の飲料への応用や摂取量の少量化などに寄与できるものと考えている。

nano, curcumin, lutein

講演番号：4C02a02
講演日時、会場：3 月 30 日 09:11～ C 校舎 02 会場

線虫 *Caenorhabiditis elegans* の休眠打破物質の単離と受容体の探索

Isolation of a substrate promoting recovery from larval diapause of *C. elegans* and a search for its receptor candidate

○河野 強、大道 由香里、竹歳 悠希、岩崎 崇、一柳 剛 (鳥取大農)
○Tsuyoshi KAWANO, Yukari Omichi, Yuki Taketoshi, Takashi Iwasaki, Tsuyoshi Ichiyanagi (Tottori Univ.)

【背景と目的】

「休眠」は生育環境に適応した優れた生存戦略の 1 つであり、幅広い生物種が有する。モデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* も生育環境の悪化（エサとなる大腸菌の枯渇・生育密度の上昇・高温）に応答して幼虫休眠し、生育環境が改善すると生育を再開する。*C. elegans* の休眠誘導機構は詳細に解析されており、①休眠誘導物質の単離・構造解析ならびにその受容体の同定、②内分泌制御下のペプチドホルモンによる情報伝達機構の解析、③最終的に休眠を決定づけるステロイドホルモンの同定、などが行われた。一方、生育環境が改善した際の休眠打破機構に関する知見は極めて少ない。約 30 年前にエサとなる大腸菌の培養液中に休眠打破物質が存在することが示唆されたが、単離・構造決定には至っていない。また、休眠打破に重要な役割を果たす神経細胞が同定されたが、その休眠打破制御機構は不明のままである。そこで本研究では、休眠打破物質の単離・構造決定ならびに受容体の同定を行うことにより、*C. elegans* の休眠制御機構の全容解明に迫ることを目的とする。本大会では、休眠打破物質の単離・構造決定ならびにその受容体候補について報告する。

【方法と結果】

（休眠打破物質の単離・構造解析）休眠誘導物質粗抽出物を用いて調製した休眠幼虫の休眠打破率を指標として、エサとして用いる大腸菌 OP50 株の培養濾液 1 リットルより精製を進めた。活性炭，ダイアイオン HP20，セルロース，Sephadex G-10 カラムクロマトグラフィー，HILIC ならびにゲル濾過 HPLC により活性物質約 5mg を得た。現在、構造解析を行っている。

（受容体候補の探索）休眠打破に重要な役割を果たす ASJ 神経細胞に発現する遺伝子を探索し(C. elegans neuronal network: http://www.wormweb.org/neuralnet/)、GPCR をコードする *srh-11* 遺伝子に着目した。現在、入手した遺伝子破壊線虫の休眠打破率の測定を行っている。

参考文献

（1）James W (1984) J Chem Ecol 10:1265
（2）Bargmann CI (1991) Science 251:1243
（3）Kawano T (2005) BBB 67:2479

C. elegans, diapause, isolation

講演番号：4C02a03
講演日時、会場：3 月 30 日 09:22～ C 校舎 02 会場

ブドウ抽出物 ANOX-R5 が線虫 *C.elegans* に与える影響の検討

Effects of grape extract (ANOX-R5) on *C.elegans*

○高橋 航大[1]、真野 貴[2]、笹川 昇[1] ([1]東海大工、[2]日本薬品株式会社)
○Kodai Takahashi[1], Takashi Mano[2], Noboru Sasagawa[1] ([1]Tokai Univ, [2]Nihon Pharmaceutical Co.,Ltd.)

【目的】食品中に含まれるポリフェノールには抗酸化物質として作用するものがある。モデル生物を用いた実験では、寿命延長作用や抗癌作用など様々な生理活性が知られており、線虫 *C.elegans* ではレスベラトロール標品やカテキン標品を培地に添加することで、 寿命延長の効果が見られると報告されている。日本薬品(株)が販売している ANOX-R5 は赤ワイン由来のブドウ抽出物である。ANOX-R5 には t-レスベラトロールが 6.2%含まれていることをはじめ、レスベラトロール、プロアントシアニジン、カテキンなどのポリフェノールを含有していることが判明している。前回の 2013 年度農芸化学会年会において、我々は t-レスベラトロールの終濃度換算 100μM になるよう ANOX-R5 を添加した培地を作製し、その培地で線虫 *C.elegans* を生育させたところ、これら線虫の寿命延長効果が見られたことを報告した。その一方で、高濃度の ANOX-R5 を添加した培地では寿命延長効果が見られず、むしろ寿命が短縮する現象が見られることも明らかにした。これらを踏まえ、今回は、ANOX-R5 を t-レスベラトロール終濃度換算 100μM で添加した培地において線虫を飼育し、その結果見られる遺伝子発現変化を解析していくことを目的とした。
【方法】線虫 *C.elegans* は N2 野生株を用い、20℃恒温器で飼育した。使用した全ての NGM プレートには、大腸菌 OP50 株を餌として塗布した。線虫をアルカリ・ブリーチ法で同調培養したのち、2-デオキシ-5-フルオロウリジン(FudR)で不妊処理を施した。ANOX-R5 はエタノールに溶解し、オートクレーブ後の NGM 寒天培地が約 65℃になった時を見計らって、t-レスベラトロールの終濃度が 100μM になるよう添加した。ANOXR5 を添加したプレートに不妊処理を施した線虫を移し、飼育した。飼育後、そのプレートに Lysis buffer (10mM Tris-HCl pH 7.6、10mM EDTA、0.5% SDS、5% 2-mercaptoethanol、0.5mg/ml Proteinase K) を加え、チューブに回収し、55℃で 1 時間インキュベートした。イソプロパノール沈殿後、酸性フェノール法で total RNA を抽出した。
【結果・考察】まず、通常の酸性フェノール法で RNA 回収を行ったところ、ブドウ抽出物 ANOX-R5 添加下で飼育した線虫をサンプルとした場合、不思議なことに正常対照に比べ total RNA の回収量が低いという現象が繰り返し見られた。そこで、Proteinase K を添加した Lysis buffer で線虫を構成するタンパク質を消化し、その溶液をイソプロパノール沈殿させてから、その沈殿物に対して酸性フェノール法を行うことで正常対照と同等の total RNA を抽出することに成功した。このように抽出した RNA を用い、ANOX－R5 添加下における遺伝子発現変化について報告したい。

C.elegans, grape extract, life span

講演番号：4C02a04
講演日時、会場：3 月 30 日 09:33～ C 校舎 02 会場

ケナガコナダニからのΔ12-desaturase 遺伝子同定
Identification of delta12-desaturase genes from *Tyrophagus putrescentiae*
○網干 貴子、櫻谷 英治、田中 晃一、島 純、小川 順、西田 律夫、天野 洋、桑原 保正、森 直樹（京大院農）
○Takako Aboshi, Eiji Sakuradani, Koichi Tanaka, Jun Shima, Jun Ogawa, Ritsuo Nishida, Hiroshi Amano, Yasumasa Kuwahara, Naoki Mori (Kyoto Univ.)

【目的】
ケナガコナダニ *Tyrophagus putrescentiae* を d_{31}-palmitic acid (C16:0) 添加乾燥酵母中で 3 日間飼育すると、ダニ体内から d_{29}-oleic acid (C18:2Δ9) や d_{27}-linoleic acid (C18:2Δ9、12) が検出される。したがって、ケナガコナダニは餌由来の palmitic acid を伸長後、Δ9、Δ12 位を不飽和化し、oleic acid や linoleic acid を生合成していると考えられる。一般に動物は、脂肪酸の Δ12 位に二重結合を導入する不飽和化酵素（Δ12-desaturase）を持たないが、近年コオロギの一種とコクヌストモドキから Δ12-desaturase 遺伝子が同定されている。そこで本研究では、ケナガコナダニから Δ12-desaturase 遺伝子の同定を試みた。
【方法と結果】
コオロギとコクヌストモドキのアミノ酸配列情報を基に PCR クローニングを行い、ケナガコナダニの Δ12-desaturase 遺伝子配列を探索した。その結果、約 1300 bp の desaturase ホモログ遺伝子の全長を取得した。本遺伝子をシャトルベクター pYES2 にサブクローニングした後、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (INVSc1 株) で発現させた。得られた形質転換体の脂肪酸組成を GC にて分析した結果、linoleic acid (C18:2) を検出した。また、同じ遺伝子を Δ9-desaturase 遺伝子（*OLE1*）の破壊株で発現させ、その形質転換体の脂肪酸組成を分析すると、oleic acid (C18:1Δ9) が検出された。本遺伝子は Δ9 および Δ12-desaturase の両方の活性を示すことが示唆された。

Δ12-desaturase, Δ9-desaturase, Tyrophagus

講演番号：4C02a05
講演日時、会場：3 月 30 日 09:44～ C 校舎 02 会場

フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* の脂肪酸不飽和化酵素 delta 9-および delta 12-desaturase のクローニングと酵素活性測定

Molecular cloning and characterization of delta 9- and delta 12-desaturases in the two-spotted cricket, Gryllus bimaculatus.

○小沼 貴裕[1]、網干 貴子[2]、吉永 直子[2]、森 直樹[2]、長澤 寛道[1]、永田 晋治[3] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]京大院農・応生科、[3]東大院・新領域・先端生命科学)

○Takahiro KONUMA[1], Takako Aboshi[2], Naoko Yoshinaga[2], Naoki Mori[2], Hiromichi Nagasawa[1], Shinji Nagata[3] ([1]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, the University of Tokyo, [2]Kyoto University, [3]Graduate School of Frontier Sciences, the University of Tokyo)

【背景・目的】前年度の本大会までに、フタホシコオロギの栄養要求性摂食行動は、体液中の脂質レベルで調節されており、脂質代謝が摂食行動モチベーションを制御していることを報告した。そこで、本研究では、脂質レベルの質的な変動に関しても、フタホシコオロギにおいて、栄養要求性摂食行動に影響を与えているかを検討することを目指し、脂質代謝経路で脂質を質的に制御する重要な酵素である、脂肪酸を不飽和化する酵素であるΔ9-desaturase (Δ9)およびΔ12-desaturase (Δ12)をコードする cDNA をクローニングし、その酵素活性を検討することを目的とした。

【方法・結果】先ず、常法に従い、他の昆虫種との塩基配列上の相同性をもとに、縮重プライマーを用いた PCR 法および RACE 法により、フタホシコオロギのΔ9 およびΔ12 をコードする cDNA をクローニングした。得られたΔ9 およびΔ12 の塩基配列は、既に明らかにされている他の昆虫種の塩基配列と高い相同性を有していた。また、演繹アミノ酸配列をもとに作成した系統樹では、フタホシコオロギをはじめとする昆虫種のΔ12 の属するクレードは、微生物や細菌のΔ12 が構成しているクレード内に見出された。このことは、フタホシコオロギのΔ12 は進化上、細菌などから水平伝播されたことを示唆する。

次に、フタホシコオロギのΔ9 およびΔ12 の cDNA を酵母での発現用ベクターに挿入し、酵母で発現させたそれぞれの酵素に対する脂肪酸の不飽和化の活性を測定した。その結果、Δ9 には、パルミチン酸(16:0)、およびステアリン酸(18:0)の不飽和化能が認められた。一方、Δ12 に関しても、強いΔ9 の触媒能が認められ、昆虫以外の生物種で認められるΔ12 の本来の酵素活性であるオレイン酸(18:1)からリノール酸(18:2)への触媒能は微弱であった。これらの結果から、フタホシコオロギのΔ12 は進化の過程で細菌類より得た後、Δ12 の本来の酵素活性が弱まり、それと引き換え、Δ9 の触媒活性を得たことが考えられた。

Gryllus bimaculatus, desaturase, lipid metabolism

講演番号：4C02a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ C 校舎 02 会場

フタホシコオロギにおける摂食行動を制御する神経ペプチドの網羅的変動解析
Comprehensive analyses of neuropeptides regulating feeding behavior in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*
○塚本 悠介、永田 晋治（東大院・新領域・先端生命）
○Yusuke TSUKAMOTO, Shinji NAGATA (the Univ. of Tokyo)

【目的】昆虫の摂食行動は、脳神経系のペプチド性因子により制御されていることが知られている。これまで、個々の脳神経ペプチドが、摂食行動に影響を与えることに関する報告はいくつかある。しかし、これら複数の脳神経ペプチドが、それぞれ単独で摂食行動を制御し調節するような例はない。そのため、複数種の脳神経ペプチドが、ネットワークを形成して摂食行動を調節することは示唆されているものの、これまで、統合的に脳神経ペプチドによる摂食行動の調節機構を解析されていない。そこで本研究では、フタホシコオロギ（*Gryllus bimaculatus*）を用いて、脳(Br)と食道下神経節(SOG)の神経ペプチドを網羅的かつ半定量的に解析することを目的とし、最終的には、摂食行動に関わる神経ペプチドのネットワークを明らかにすることを目指す。
【方法・結果】通常の摂食条件で飼育しているフタホシコオロギのメスの成虫から、Br と SOG を摘出後、60%アセトニトリル/0.1%TFA により粗抽出物を得た。粗抽出物を逆相カートリッジにて粗精製後、MALDI-TOF MS にて測定したところ、生理活性などが既に報告されている既知ペプチドに由来するイオンピークを含め、顕著なイオンピークが、Br からは 28 個、SOG からは 25 個確認できた。次に、上記で認められたイオンピークの強度がそれぞれ食餌条件下で変化するかを検討するため、食餌制限で摂食モチベーションを上昇させた個体(Unfed)と、自由摂食条件で飼育した個体(Fed)の Br と SOG 由来の各神経ペプチドの量的な変動を比較した。具体的な方法として、Fed および Unfed 条件下で飼育した成虫メス個体から Br および SOG を摘出し、60%アセトニトリル/0.1%TFA による粗抽出物を、逆相カートリッジにて粗精製した。その後、それぞれの粗精製物をホルムアルデヒドおよび重水素標識ホルムアルデヒドと反応させ、反応後の分子質量がお互い 4 ずつずれるように化学修飾した。さらに、Fed と Unfed の反応産物を混合し MALDI-TOF MS で測定後、得られたイオンピークの強度比を比較することにより、各脳神経ペプチドの増減を半定量的に分析した。その結果、Unfed から摘出した Br 由来のほとんどのペプチドは、Fed から摘出した Br 由来のものより顕著に減少した。それに対し、SOG 由来のペプチドは、食餌条件でのイオンピークの強度に変化は認められたものの、その変動パターンは多様であり、増減するいくつかのパターンが認められた。今後、摂食行動に直接的に働く脳神経ペプチドホルモンネットワークを解析するには、さらなる検討が必要だが、本発表により、ペプチド性因子をホルムアルデヒドで化学修飾し MALDI-TOF MS を測定することにより、フタホシコオロギの脳神経ペプチドホルモンを網羅的にかつ半定量的に解析できるようになった。

feeding behavior, MALDI-TOF MS, neuropeptide

講演番号：4C02a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ C 校舎 02 会場

フタホシコオロギの選好性摂食行動の自動計測システム作成
Automated monitoring system for evaluation of self-selective feeding behavior in the two-spotted cricket.
○永田 晋治（東大院新領域）
○Shinji NAGATA (Univ. of Tokyo)

【目的】生物が栄養分を摂取するメカニズムのうち、Ritcher らにより 1938 年に提唱された Self-selection は、体内に必要な栄養分を体外から選択的に取り込むために必要なメカニズムであり、ほとんどの生物で保存されていることが知られている。すなわち、生物には、体に不足している栄養分や必要な栄養分は、積極的に要求している栄養分の含まれているエサを探し摂取することで、それぞれの生物種にとって基準となる栄養分レベル(基準値)まで補償する。これまで、要求する栄養分を選択的に摂取する仕組みは、生理学的かつ行動学的に明らかにされているものの、この Self-selection に関して分子レベルでのメカニズムは明らかにされていない。そこで、我々のグループは、Self-selection をはじめとする本能的な摂食行動の分子メカニズムを明らかにするため、昆虫を用いた選好性摂食行動の研究を行ってきた。昨年度の本大会の発表までに、フタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)の摂食行動や共食い行動に関しては、エサ中の脂溶性成分が鍵分子であることを明らかにした。そこで、本年度は、脂質成分のうち脂肪酸に着目をしてフタホシコオロギがどのような選好性を有しているかを検討するため、選好性摂食行動を見出すための評価方法を確立することを目的とした。なお、大量に観察し、その結果を自動的に解析する方法を目指した。
【方法・結果】フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* の行動の自動的な評価法を作成するため、まず 3 齢幼虫の動きをビデオモニタリングした画像データを用いた。実際には、画像内のコオロギの 1 個体が 1 つのドットとなるよう解像度を変更し、コオロギを点追跡できるようにコントラストの調節をした。次に、計測する動画を 10 秒毎の連続静止画にし、その画像内の点を自動計測する Interface を作成した。この Interface を、NIH から配信されている Image J のプラグインソフトとして起動させ、コオロギの個体数自動計測ソフト Cricket counter #3 を完成させた。また、コオロギに提示するエサは、各種脂肪酸を 1%含むセルロース粉末をタブレット状に調製したものを使った。
　上記の Cricket counter #3 を用いて、コオロギ 3 齢幼虫 30 匹に対し、含有脂肪酸組成の異なるタブレット餌 2 つの選好性を解析した。現在データを蓄積中であるが、これまでの結果から、エサ中に含まれる各種脂肪酸には選好性が認められ、特にオレイン酸やリノール酸を含むエサを選好した。今後は、エサに含まれる脂肪酸に対する選好性のヒエラルキーを確認し、選好性摂食行動に寄与する生体内鍵分子をスクリーニングし、選好性摂食行動の分子メカニズムを明らかにしたい。

Gryllus bimaculatus, feeding behavior, self-selection

講演番号：4C02a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ C 校舎 02 会場

ボンビコール産生メカニズムに関与するリパーゼの解析

Characterization of lipases participating in the bombykol biosynthetic mechanism

○大西 敦[1,2]、松本 正吾[2] ([1]帝京平成大薬、[2]理研分子昆虫)
○Atsushi OHNISHI[1,2], Shogo MATSUMOTO[2] ([1]Teikyo Heisei Univ., [2]RIKEN)

【目的】カイコガ性フェロモン(ボンビコール)は、その合成・分泌に特化した器官であるフェロモン腺(PG)で*de novo*に生合成される。その産生は、頭部内分泌器官である食道下神経節で合成される神経ホルモンPBAN(pheromone biosynthesis activating neuropeptide)により調節されている。PBANがPG細胞膜上のPBAN受容体と結合することにより、下流のシグナルカスケードが活性化し、ボンビコールの産生が開始する。加えてボンビコール産生過程において、PG細胞内には数多くの脂肪滴が確認でき、その中にはボンビコール前駆体である脂肪酸がトリアシルグリセロール(TAG)の形で蓄積している。PBANの作用は脂肪滴のダイナミックな縮減を誘導し、脂肪滴内のTAG量も著しく減少する。PBANの刺激はPG細胞内の脂肪滴TAGリポリシスを引き起こし、これがボンビコールの産生・放出につながることから、ボンビコール産生メカニズムにおいてリパーゼが関与していることが予想される。
カイコガ純系系統p50のPG細胞由来のESTクローンライブラリを調べた結果、4種類のリパーゼ候補遺伝子（*Bmpglipase*-1～4）が見つかった。そこでどのリパーゼ候補遺伝子がボンビコール産生メカニズムにおいて重要な役割を果たしているのか解析を行った。
【方法】(1)RT-PCRにより、カイコガ成虫器官における*Bmpglipases*の発現レベルを調べた。(2)*各Bmpglipase*の塩基配列を基に二本鎖RNA(dsRNA)を作製し、蛹化１日目の蛹にdsRNAを注射することにより発現抑制を行った。Bmpglipaseを発現抑制した個体を用いて、HPLCを用いたボンビコールの定量により、各Bmpglipaseのボンビコール産生への影響を調べた。(3)(2)の方法と同様にBmpglipaseを発現抑制した個体を用いて、HPLCを用いた脂肪滴TAGの定量、およびTAGのマーカーであるNile Red染色により脂肪滴の動態を蛍光顕微鏡により観察した。(4)抗Bmpglipase-4抗体を作製し、これを用いてPG細胞の免疫染色を行い、共焦点顕微鏡でBmpglipase-4のPG細胞内における局在を調べた。
【結果】(1)Bmpglipaseは他の成虫器官と比較してPGで特に強い発現がみられた。(2) Bmpglipase-4の発現抑制は、他のBmpglipaseと比較して最も顕著にボンビコール産生量を減少させた。(3) PG細胞内脂肪滴の動態観察、および脂肪滴TAGの定量解析から、Bmpglipase-4の発現抑制は、PBANの作用が引き起こす脂肪滴TAGリポリシスを阻害することが示された。(4)抗Bmpglipase-4抗体、およびNile Redを用いてPG細胞を染色した結果、Bmpglipase-4は脂肪滴に局在することが確認できた。
以上の結果から、Bmpglipase-4 は PG 細胞内の脂肪滴に局在し、PBAN シグナルを受けると脂肪滴 TAG リポリシスを活性化することによりボンビコールの産生を促進させることが示唆された。

pheromone, lipase, Bombyx mori

講演番号：4C02a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ C 校舎 02 会場

カイコガ性フェロモン生合成活性化神経ペプチド受容体のホモロジーモデリングおよびリガンドとのドッキングシミュレーション

Homology modeling and and ligand docking simulation of the silkmoth pheromone biosynthesis-activating neuropeptide receptor

○永田 宏次[1]、河合 岳志[1]、郭 琳君[1]、劉 徳生[1]、鈴木 達也[1]、片山 幸江[1]、早川 江[1]、李 載みん[2]、永峰 俊弘[2]、Hull J. Joe[3]、松本 正吾[2]、長澤 寛道[1]、田之倉 優[1] ([1]東大院農生科、[2]理研、[3]米農務省)
○ Koji NAGATA[1], Takeshi Kawai[1], Linjun Guo[1], Desheng Liu[1], Tatsuya Suzuki[1], Yukie Katayama[1], Kou Hayakawa[1], Jae Min Lee[2], Toshihiro Nagamine[2], J. Joe Hull[3], Shogo Matsumoto[2], Hiromichi Nagasawa[1], Masaru Tanokura[1] ([1]UTokyo, [2]RIKEN, [3]USDA)

【背景・目的】　多くの蛾類昆虫において性フェロモンの生合成は、フェロモン生合成活性化神経ペプチド（PBAN）によって制御されている。PBAN は 33 または 34 アミノ酸残基のペプチドであり、C 末端の FXPRLamide モチーフが活性部位であると特定されている。一方、カイコガ PBAN 受容体（PBANR）は G タンパク共役型受容体（GPCR）である。本研究では害虫防除の観点から、PBAN アンタゴニストの設計に有用な知見を得ることを目的としている。我々は昨年度 PBANR の点変異体解析からリガンド認識に重要な残基を特定したことを報告した。今回、PBANR のホモロジーモデリングおよび PBANR と PBAN 活性部位とのドッキングシミュレーションを行った。
【方法】　PBANR のホモロジーモデルは既報の GPCR 結晶構造を鋳型として MOE（Chemical Computing Group）を使用し構築した。この PBANR ホモロジーモデルと PBAN 活性部位の溶液構造とを用いて AutoDock Vina（Trott and Olson, 2010）を使用しドッキングシミュレーションを行った。
【結果】　A2a アデノシン受容体（A2aAR）や β2 アドレナリン受容体（β2AR）等の既報の GPCR 結晶構造を鋳型として PBANR のホモロジーモデリングを複数構築した。ドッキングシミュレーションには、この PBANR ホモロジーモデルと PBAN C 末端 10 残基ペプチドの NMR 溶液構造に含まれる PBAN 活性に必須な C 末端 5 残基の構造とを用いた。AutoDock Vina によるドッキングシミュレーションから PBAN C 末端の活性部位は β ターンを形成した状態で A2aAR 等の低分子リガンド結合部位に相当する部位に結合しているドッキングモデルが得られ、このモデルは PBAN および PBANR の点変異体解析の結果をよく説明するものであった。PBAN-PBANR のオルソログであるヒトニューロメジン U（NMU）-NMU 受容体（NMUR）についても同様のドッキングモデルが得られた。

GPCR, PBAN receptor, peptide hormone

講演番号：4C02a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ C 校舎 02 会場

リフォールディングによるヨトウガ PTTH の作製とその活性

Verification of refolded PTTH activity in *Mamestra brassicae*.

○星川 珠莉、伊賀 正年、齋藤 一樹、片岡 宏誌（東大・新領域・先端生命）
○Tamari HOSHIKAWA, Masatoshi IGA, Kazuki SAITO, Hiroshi KATAOKA (Tokyo Univ.)

農業害虫であるヨトウガ（*Mamestra brassicae*）は低温・短日条件において蛹休眠が誘導される。休眠予定の蛹に幼虫の脳抽出物を注射すると休眠への導入が阻まれるが、脳ペプチドホルモンである前胸腺刺激ホルモン（PTTH）を除いた脳抽出物では阻害作用は見られない。したがって、PTTH は休眠誘導の阻害に必須である。しかし、この休眠誘導の阻害が PTTH 単独の作用によるものか、それとも他の因子との複合的な作用なのかは不明である。そこで、純粋な PTTH を調製し検討を行うことにした。天然物の精製には数百万頭のヨトウガが必要であるため、本研究では大量調製が可能な大腸菌発現系を用いてヨトウガの PTTH（*Mb*PTTH）を作製した。

精製を簡便にするため、C 末端に His-Tag を付加した *Mb*PTTH の配列を pET ベクターに挿入したプラスミドを作製した。大腸菌株 BL21 に形質転換して発現させたところ、集菌・破砕後に大部分の *Mb*PTTH が不溶画分に存在することがわかった。そこで、不溶画分を塩酸グアニジンと DTT を含む緩衝液で可溶化し、Ni Sepharose カラムを用いて *Mb*PTTH を精製した。変性・還元状態の *Mb*PTTH が含まれた溶液からゲルろ過により DTT を除いた後、様々な比の酸化型・還元型グルタチオンを含む緩衝液で 10 倍に希釈して変性剤の濃度を下げることにより、リフォールディングを行った。リフォールディング後のサンプルは遠心式の限外ろ過によって塩を除き濃縮した。天然の *Mb*PTTH のジスルフィド結合の構造は明らかにされていないが、カイコガ PTTH の構造からの類推により、*Mb*PTTH は、分子内で 3 つ、分子間で 1 つのジスルフィド結合をもつ、二量体構造をとっていると予想される。非還元 SDS-PAGE で分子量を確認した結果、還元条件であるほど、二量体の形成量が少ないにもかかわらず、多量体の形成が多くみられた。また、ヨトウガから摘出した培養前胸腺からのエクジソン分泌量を指標にして、どのような酸化還元条件下でリフォールディングさせた *Mb*PTTH が最も高い活性を示すのか検定している。

PTTH, refolding, *Mamestra brassicae*

講演番号：4C02a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ C 校舎 02 会場

クマムシの乾眠誘導機構の解析

Analysis of regulatory mechanism of anhydrobiosis in tardigrades.

○近藤 小雪、久保 健雄、國枝 武和（東京大学）
○Koyuki KONDO, Takeo KUBO, Takekazu KUNIEDA (Tokyo Univ.)

クマムシは体長 1mm 以下の微小動物であり、分類上、独自の緩歩動物門を構成する。これまでに 1000 種余りが記載され、海、淡水、陸など広範な環境に生息している。陸生のクマムシは土壌の間隙水やコケの上の薄い水膜の中で生息しているが、周辺環境が乾燥すると、体内の水分をほぼ完全に失って乾眠と呼ばれる無代謝状態に移行する。この状態のクマムシは、高温、高圧、高線量の放射線など極限的な環境ストレスに耐性を持ち、曝露後に給水することで生命活動を再開できる。こうしたクマムシの乾眠メカニズムの解明は動物細胞の乾燥保存法の開発にもつながることが期待されるが、不明な点が多く、特に乾燥の感知から乾眠誘導に至るメカニズムについてはまったく分かっていない。クマムシは種によって耐えられる乾燥速度が異なり、急速乾燥にも耐えられる種のほか、あらかじめ数日間の高湿度曝露（プレコンディショニング）を行うことで初めて乾眠に移行できる種も存在する。耐性獲得までの時間が異なる種間では乾燥によって誘導されるメカニズムも異なると考えられ、本研究ではこの違いを解明することで耐性の差を生み出すメカニズムを明らかにすることを目的とした。

これまで、乾燥耐性獲得までに時間がかかるクマムシで安定的に乾眠を誘導する系は確立されていなかったことから、まず乾燥耐性が低いクマムシの中で、遺伝子情報が最も充実しているドゥジャルダンヤマクマムシ *Hypsibius dujardini*（以下、ヤマクマムシ）を用いて、高湿度曝露（プレコンディショニング）の条件を検討し、安定的に乾眠を誘導する条件を確立した。急速乾燥に耐える種として私達がゲノム解読を進めているヨコヅナクマムシと耐性比較を行った結果、ヨコヅナクマムシは低湿度環境に直接曝露しても多くの個体が乾眠に移行できるのに対し、ヤマクマムシでは低湿度環境に直接曝露するとほぼ全ての個体が生存できず、低湿度曝露に耐性を持つためには少なくとも２日間のプレコンディショニングが必要なことが明らかになった。さらに、ヨコヅナクマムシとヤマクマムシの乾燥時における遺伝子発現の必要性を検討するためにクマムシを乾燥前に転写阻害剤溶液に浸漬し、その影響を比較した。その結果、ヤマクマムシでは阻害剤処理により乾眠が顕著に阻害されることが示された。一方、ヨコヅナクマムシでは阻害剤で処理しても乾眠後の生存率には影響は見られなかった。ヤマクマムシは乾眠に移行するために２日間のプレコンディショニング期間と新たな遺伝子発現を必要とすることから、乾燥感知後、高湿度環境でゆっくり乾燥する間に乾燥耐性に必要な因子の発現をしていると考えられた。一方、ヨコヅナクマムシは低湿度環境への直接曝露に耐性を持ち、転写阻害剤の影響も受けないことから、乾燥耐性のための機能性因子を常時体内に備えていると考えられた。

今後は本実験で用いた薬剤浸漬系を用いて、乾燥感知から乾眠誘導に至るメカニズムの解析を進めていく予定である。

tardigrades, anhydrobiosis, regulatory mechanism

講演番号：4C02a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ C 校舎 02 会場

軟体動物におけるレチノイン酸シグナルおよび幹細胞関連遺伝子の組織再生への関与
Expression of retinoic acid-signal- and stemness-related genes in during tissue regeneration of gastropods
○中間 翼、渡邊 弘明、中野 春男、梅村 真理子、高橋 滋、高橋 勇二（東京薬科大学　生命科学部 環境応用動物学研究室）
○Tsubasa Nakama, Hiroaki Watanabe, Haruo Nakano, Mariko Umemura, Shigeru Takahashi, Yuji Takahashi (Tokyo　Univ.　Pharm. Life Sci.　Sch. Life Sci.　Lab. Environ. Molec. Physiol.)

【背景】無脊椎動物におけるレチノイドの機能に関しては未解明な点が多く残されている。軟体動物のイボニシ（Thais clavigera）は、環境汚染物質の有機スズ化合物である Tributyltin（TBT）と Triphenyltin（TPT）の影響により、雌に雄性生殖器官が形成するインポセックスを発症することが報告されている。有機スズ化合物は核内受容体の retinoid X receptor（RXR）と強い結合性を持つ事が知られ、インポセックスの誘導における RXR の関与が示唆されている。近年、RXR の内因性のリガンドである 9-cis-retinoic acid（9CRA）を投与したイボニシの雌個体においても、インポセックスを発症した事が報告された。しかし、インポセックス発症の分子メカニズムには未解明な点が多い。また、軟体動物は高い再生能力を示すことが知られており、イボニシにおいても組織の部分切除後に再生することが確認された。レチノイン酸合成阻害剤をイボニシに投与した結果、再生の遅延が観察され、再生過程においてレチノイン酸の関与が示唆された。しかし、イボニシの組織再生における詳しい分子メカニズムについては不明である。当研究室では、インポセックスと組織再生において、両方とも個体成熟後に組織を形成する点で共通性を予想し、それぞれの過程を解析し比較を行ってきた。今回、イボニシのペニス再生に関わる因子としてレチノイン酸カスケードおよび幹細胞関連遺伝子に着目し、組織再生過程での発現状態について real-time PCR 法を用いて検討を行った。

【方法】イボニシ雄個体のペニスを部分切除し、部分切除したペニスと、切除３、７日後の再生ペニスから mRNA を抽出した。mRNA から合成した cDNA を用いて、RXR、レチノイン酸合成酵素の Aldh1, Aldh2、レチノイン酸分解酵素の Cyp26、幹細胞関連遺伝子の Vasa, Piwi-like1, Piwi-like2 について real-time PCR 法を用いて定量を行った。

【結果】再生過程において、tcAldh1, tcAldh2、tcRXR、および tcVasa の mRNA 量の上昇を確認した。また、tcCyp26mRNA 量に有意な減少を確認した。これらのことから、イボニシの再生過程では、レチノイン酸の合成が促進し、また分解が抑制されることにより、組織中のレチノイン酸濃度が変化すると考えられた。イボニシのインポセックス発症および組織再生において、チノイン酸シグナルの関与が示唆された。

retinoic acid, regeneration, blastema

講演番号：4C02a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ C 校舎 02 会場

小笠原海溝に生息する超深海性ヨコエビの消化酵素

Digestive enzymes of the deep-sea amphipods living in Ogasawara trench

○小林 英城、荒井 渉、高見 英人 (海洋機構)
○Hideki KOBAYASHI, WATARU ARAI, HIDETO TAKAMI (JAMSTEC)

緒言）海洋環境は地球の表面積の約２／３を占め、多種多様な生物が存在している。特に深度 7,000m を超える超深海環境では、生物の存在が確認されているが、その生態は全くわかっていない。我々はこれまで、深度約 10,900m の世界最深部マリアナ海溝チャレンジャー海淵からヨコエビの一種、カイコウオオソコエビの生態を研究し、消化酵素としてセルラーゼを見出した。本セルラーゼは天然セルロースから、グルコースとセロビオースを生産する新規セルラーゼだった。カイコウオオソコエビは、流木などの植物片を食べている事が明らかとなった(1)。この植物食性は、カイコウオオソコエビ特有の性質なのか、それとも超深海海域の生物は植物食性を持つという一般的な性質なのか、分かっていない。そこで、本研究では他の超深海海域について生物の採取を試み、どのような消化酵素を持っているのか検討を行った。
方法）小笠原海溝にサバを寄せ餌としたベイトトラップを複数機装着した係留計を投入した。係留計の深度は約 9,400ｍに達し、約６時間の海底滞在後、浮上・回収を行った。採取した超深海性生物は、船上にて液体窒素または−８０℃にて凍結保存を行った。採取した生物をすり潰し、各種基質との反応性を調べ、酵素活性の有無を検討した。
結果と考察）今回、小笠原海溝より採取できた超深海性生物は、全てヨコエビ類だった。ヨコエビ類の大きさは、約２−５cm と幅があるものの、チャレンジャー海淵に生息するカイコウオオソコエビとほぼ同等の大きさだった。また、形状もカイコウオオソコエビと似ていたが、色については赤から白色と多様だった。10cm 以上の大きな生物を捕獲できるベイトトラップも同時に使用したが、何も捕獲されていなかった。ヨコエビ類の酵素活性を検討したところ、βグルコシダーゼの活性が認められた。カイコウオオソコエビの場合、βグルコシダーゼは検出されなかった。また、小笠原海溝とマリアナ海溝の接点は深度が浅くなるため、お互いの行き来は困難であると推察される。したがって、それぞれ固有の進化をした別種と考えられる。
引用文献）
(1) Kobayashi H, Hatada Y, Tsubouchi T, Nagahama T, Takami H (2012) The Hadal Amphipod *Hirondellea gigas* Possessing a Unique Cellulase for Digesting Wooden Debris Buried in the Deepest Seafloor. PLoS ONE 7(8): e42727.

amphipods, deep-sea, polysaccharide hydrolase

講演番号：4C02a17
講演日時、会場：3 月 30 日 11:54～ C 校舎 02 会場

重イオンビーム照射によるキイロショウジョウバエ変異系統の樹立系構築

Construction of the system for establishing the mutant lines of Drosophila by heavy ion beam irradiation.

○常泉 和秀、阿部 知子（理化学研究所　仁科加速器研究センター　生物照射チーム）
○Kazuhide TSUNEIZUMI, Tomoko ABE (RIKEN Nishina Center,　Radiation Biology Team)

変異系統の樹立方法としてエックス線やガンマ線の照射による変異誘発方法や、エチルメタンスルフォン酸(EMS)などの化学変異原を用いる方法などが広く利用されている。その中で、近年我々の研究室で新たな有用系統の樹立方法として重イオンビーム照射技術が開発された。本技術は既に植物の育種に応用され、既に 40 を越える新品種の育種に成功している。しかしこの技術はまだ動物へ応用できていないため、キイロショウジョウバエを用いて照射量による致死率や稔性率、変異率などの基礎的なデータの蓄積と共に、キイロショウジョウバエで安定して変異系統を樹立できる系の構築を行ってきた。

本研究では野生型である CantonS 系統の雄および雌の成虫に、それぞれ炭素 12 重イオンビームを 80keV/μm のエネルギーで照射し、次世代へ与える影響の評価を行った。更に 3 番染色体に焦点をあて致死変異率の計測を行った。照射の際には市販のディスポーザブルプラスティックバイアルにキイロショウジョウバエを封入し、簡便に且つ再現性のある照射方法を確立できた。

モデル植物を用いたこれまでの知見として、エックス線やガンマ線と比べて重イオンビームでは突然変異率が高くなることが知られ、この知見は重イオンビームの利点のひとつとして理解されている。本研究でもキイロショウジョウバエの致死変異系統の樹立において致死変異率を計測したところ、エックス線やガンマ線ではおよそ 5%の致死変異率であるのに対し、高い変異率を観察した。　育種にはホモ接合体で生存可能な変異系統の樹立も重要であると予想され、本実験でもホモ接合体で生存可能な複眼の色や剛毛に変異が導入された系統も数系統樹立されており、動物においても育種に重イオンビームを応用可能であることを強く支持する結果が得られた。今後染色体に固定された変異の詳細な解析を行っていく予定である。

Drosophila, heavy ion beam, mutagenesis

講演番号：4C03a02
講演日時、会場：3 月 30 日 09:11～ C 校舎 03 会場

PCTK3 は cyclin A 及び PKA によって活性調節を受け、アクチン動態を制御する

PCTK3 activated by cyclin A and PKA regulates actin dynamics

○松田 真弥、小湊 恭平、小出 静代、宮本 賢治、辻 明彦、湯浅 恵造（徳島大・STS）
○ SHINYA MATSUDA, KYOHEI KOMINATO, SHIZUYO KOIDE, KENJI MIYAMOTO, AKIHIKO TSUJI, KEIZO YUASA (Dept. of Biol. Sci. & Tech., Univ. of Tokushima, Grad. Sch.)

Cyclin dependent kinase（CDK）ファミリーは、細胞周期制御をはじめとする様々な細胞機能の調節に関わる Ser/Thr キナーゼであり、その活性は調節サブユニットである cyclin との結合や CDK-activating kinase といったプロテインキナーゼによるリン酸化などの複数の調節機構により制御されている。CDK ファミリーの一つである PCTAIRE kinase 3（PCTK3）/CDK18 は特異的な活性調節因子が存在することが予想されているが、その活性調節因子に関する報告は無く、生理機能解明への糸口は未だ見出されていない。ごく最近、我々は PCTK3 の結合因子として cyclin A2 を同定し、retinoblastoma（Rb）を基質とした in vitro キナーゼアッセイにより PCTK3 は cyclin A2 によって特異的に活性化されることを明らかとした。また、PCTK3 のアミノ酸配列を調べた結果、cAMP-dependent protein kinase A（PKA）によるリン酸化推定部位（RRXS/T）が 4 ヶ所存在することが判明した。そこで本研究では、PKA による PCTK3 のリン酸化およびその生理的意義について検証した。まず初めに、HEK293T 細胞にアデニル酸シクラーゼ活性化剤である forskolin を添加し、抗 PCTK3 抗体を用いて免疫沈降した後、PKA のリン酸化モチーフ抗体（抗 phospho-RRXS/T 抗体）を用いてウエスタンブロットを行った。その結果、forskolin を添加した細胞において PCTK3 のリン酸化が確認された。さらに、forskolin を添加することによって内在性 PCTK3 活性が上昇することを明らかにした。これらの結果より、PCTK3 は PKA によるリン酸化によって活性化されることが明らかとなった。4 箇所のリン酸化推定部位の中で、3 箇所（Ser^{12}、Ser^{66}、Ser^{109}）が PKA によってリン酸化され、これら 3 箇所のリン酸化部位をアスパラギン酸に置換した擬似リン酸化変異体の活性を調べた結果、PCTK3 S12D 変異体は cyclin A2 非存在下においても Rb リン酸化活性を示した。また、cyclin A2 存在下においては、PCTK3 S12D 変異体は CDK2 に匹敵するほどの活性を有することが明らかとなった。さらに、siRNA によるノックダウン解析を行った結果、PCTK3 をノックダウンすることによって HEK293T 細胞の形態が変化することを見出した。蛍光標識した phalloidin を用いて F-アクチンを染色した結果、コントロール細胞と比較して PCTK3 ノックダウン細胞では細胞膜辺縁でのアクチンの凝集が観察された。アクチンの重合・脱重合には、コフィリンが関与していることから、コフィリンのリン酸化状態について調べた結果、PCTK3 ノックダウン細胞ではそのリン酸化が増加していることが確認された。以上の結果から、PCTK3 は cyclin A2 と PKA の双方による活性調節を受け、アクチン動態の調節に関わることが明らかとなった。

CDK, PKA, Actin

講演番号：4C03a03
講演日時、会場：3 月 30 日 09:22～ C 校舎 03 会場

高温ストレス下における細胞周期制御機構の解析

Analysis of the cell cycle regulation under the thermal stress.

○遠藤 里佳子、針谷 香澄、吉川 博文、千葉櫻 拓（東農大・応生科・バイオ）
○Rikako Endo, Kasumi Hariya, Hirofumi Yoshikawa, Taku Chibazakura (Tokyo Univ. Agric)

がん細胞は高温ストレスに感受性を示すことが知られているが、そのメカニズムは不明な点が多い。当研究室におけるこれまでの研究から、がん細胞株 U2-OS では高温ストレス下において、G2/M 期停滞、サイクリン依存性キナーゼ CDK1 の活性亢進、スピンドルチェックポイントの長期活性化という細胞周期異常と、その後 M 期後期に進まずアポトーシス様の細胞死である M 期崩壊が起こることが分かっている。さらに、高温ストレス下におけるがん細胞の G2/M 期停滞が、Mps1(紡錘体チェックポイントキナーゼ)の特異的阻害剤 Reversine の添加によって解除されることが示された。これらのことから高温ストレス下でのがん細胞の G2/M 期停滞には Mps1 が関与することが示唆されている。

本研究ではがん細胞における高温ストレス下での G2/M 期停滞および M 期崩壊の分子機構解明を目指し、それらの異常を引き起こすキープレイヤーである Mps1 と CDK1 の制御経路に着目して研究を行った。

高温ストレス下（42℃）で G2/M 期停滞を引き起こしている U2-OS 細胞において Mps1 と CDK1 のキナーゼ活性測定を行ったところ、両者ともに異常な活性上昇が見られた。また、それらの活性亢進は Reversine 添加により抑圧された。そこで、時期特異的に Reversine を添加したところ、42℃での M 期において Mps1 を阻害することで CDK1 活性が抑圧された。同時に蛍光免疫染色法で 42℃における cyclin B1 の局在とヒストン H3 のリン酸化を確認したところ、cyclin B1 の核内局在と M 期前中期の細胞が増加していた。M 期に Reversine を添加したものは cyclin B1 の核内局在と M 期前中期細胞が減少していることも分かった。さらに、ATM/ATR(DNA 傷害センサーキナーゼ)の阻害剤 caffeine の添加により、42℃での G2/M 期停滞および CDK1 の活性亢進が抑圧されたことより、DNA 傷害チェックポイントの下流に Mps1, CDK1 が位置することが示唆された。

加えて、正常細胞でも時期特異的に高温ストレスを与えた結果、S 期以降にストレスを与えた場合は、G2/M 期停滞を引き起こし、U2-OS 細胞同様に CDK1 活性が上昇した。

以上の結果から、高温ストレス下で M 期特異的な細胞死を引き起こすメカニズムには、DNA 傷害チェックポイント経路を通して、その下流で Mps1 が異常に活性化し、CDK 1 活性を促進していることが考えられる。

cell cycle, cancer, thermal stress

講演番号：4C03a04
講演日時、会場：3 月 30 日 09:33～ C 校舎 03 会場

歯胚発生における Lgr4 の機能解析
The role of Lgr4 in the tooth development
○山上 友希子、大山 一徳、毛利 泰彰、西森 克彦（東北大院農）
○Yukiko YAMAKAMI, Kazunori OYAMA, Yasuaki MOHRI, Katsuhiko NISHIMORI (Tohoku Univ.)

食物を摂る入口の臓器である歯は、食物から栄養を効率よく摂取するための「噛む」機能を担っている。このように歯は、食を支える最初の重要な器官の一つである。ヒトを含む哺乳類の歯の形成は、胎児期から始まり、歯胚と呼ばれる組織において、上皮細胞・間葉細胞間の複雑なシグナル伝達によって細胞分化が制御されている。歯の中でも特に重要であると考えられるのは、食物をすりつぶす役割を果たす臼歯である。マウスには臼歯は 3 本存在し、それらはもともと 1 つの歯胚が成長とともに分岐することで形成されるが、その連続的な発生のメカニズムには不明な点が多くある。本研究では上皮組織の細胞分化を制御する新規受容体遺伝子 LGR4(Leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptor4)の、歯胚形成における機能解析を行った。

本研究では始めに LGR4 の遺伝子領域に蛍光タンパク質 EGFP を組み込んだレポーターマウスを用い、歯胚の発生時期における LGR4 の発現パターンを解析した。その結果胎児期 14.5 日(E14.5)には歯胚上皮細胞の Bud 構造で LGR4 が発現していた。しかし、出生後 0 日（P0）には、第一臼歯歯胚では LGR4 の発現はほとんど見られず、第二臼歯歯胚の後方部分の歯上皮において発現していることを確認した。以上の結果と、第三臼歯は第二臼歯の後方から連続的に形成されるという知見から、LGR4 は第三臼歯の形成に関わっている可能性が示唆された。$Lgr4^{-/-}$マウスは出生後に致死を引き起こすため、成獣齢(11 週齢)における第三臼歯の形態観察には、上皮組織特異的に Lgr4 を欠損させて致死を回避した $Lgr4^{K5\,KO}$マウスを用いた。その結果、25%のマウスで第三臼歯の完全な欠損が認められ、残りの 75%のマウスについては第三臼歯の矮小化、歯根の形成不全といった形態異常が認められた。また $Lgr4^{K5\,KO}$ マウスでは、第一臼歯および第二臼歯の全長も $Lgr4^{K5\,Ctrl}$ マウスと比較して優位に減少していた。

次に $Lgr4^{-/-}$マウスを用いて E14.5、P0 における歯胚組織の形態観察を行ったところ、第二臼歯歯胚から形成される第三臼歯原基の形成不全が観察された。また、新生児期の $Lgr4^{K5\,KO}$ マウスにおいては、第三臼歯原基は形成されていたものの、細胞の配列に異常が見られた。以上の結果より、上皮における Lgr4 が連続的な臼歯発生を特異的に制御する事で、第三臼歯の発生に必須の機能を有する事が示唆された。Lgr4 は Frizzled や LRP と協調して Wnt シグナル伝達を制御している GPCR であることから、現在は歯胚発生と Wnt シグナルとの詳細な関係について解析を行っている。

tooth development, Wnt signaling, Knockout mice

講演番号：4C03a05
講演日時、会場：3 月 30 日 09:44～ C 校舎 03 会場

アーユルヴェーダハーブのヒト毛乳頭細胞における遺伝子発現への効果

Effects of ayurvedic herbs on gene expression in human dermal papilla cells

○米倉 佑香[1]、Mohammad N Hossain[1]、三木 健輔[1]、山下 律郎[2]、藤井 道彦[1]、鮎沢 大[1] ([1]横浜市大院生命ナノ、[2](株)SLH BCL カンパニー)
○YUKA YONEKURA[1], Hossain Mohammad N[1], KENSUKE MIKI[1], RITSURO YAMASHITA[2], MICHIHIKO FUJI[1], DAI AYUSAWA[1] ([1]Yokohama City Univ., [2]SLH BCL Company)

毛髪は毛根・毛球・毛包などいくつかの組織から成り立っている。成長期の毛根の下部には球状をした毛球が存在し、その中は毛母細胞で満たされている。毛母細胞が分裂し角化することで毛髪となる。毛球の先端部には毛乳頭細胞が存在している。毛乳頭細胞は毛髪の成長に非常に重要な役割を持つ。例えば、毛細血管から養分を受け取り毛母細胞に受け渡したり、様々な細胞増殖因子を産生したりする。毛乳頭細胞が産生した細胞増殖因子が毛母細胞の細胞分裂を促進させ、毛髪を形成させる。私たちは育毛に大きな役割を果たしている毛乳頭細胞に着目して研究を行ってきた。

現在、薄毛などの毛髪に関する悩みを持つ人は多い。私たちはインドの伝統医学であるアーユルヴェーダで育毛効果があるとされているハーブを用いてその改善を試みている。毛髪形成のメカニズムには不明な点が多いが、いくつかの遺伝子が脱毛・育毛に関連すると報告されている。例えば、休眠状態にある毛乳頭細胞を増殖期に導くとされる IGF1、血管新生を促進する作用をもつ VEGF-A、休止期にある毛包を成長期に導く HGF、毛包幹細胞の休眠状態を解除する TGF-β2 などである。本研究では、in vitro で培養した毛乳頭細胞にアーユルヴェーダで育毛効果があるとされているハーブ十数種類の抽出液を混合したハーブ混合液を、濃度を変えて添加した。培養後、毛乳頭細胞の RNA を抽出し、脱毛・育毛に関連する遺伝子の発現量を比較した。しかし、毛乳頭細胞は in vitro で数回で分裂が停止するため、解析が難しい。そこで、SV40 ウイルス Large T 抗原遺伝子を導入して分裂寿命の延長を試みた毛乳頭細胞についても解析を行っている。

Dermal papilla cell, Herb, Hair growth

講演番号：4C03a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ C 校舎 03 会場

粘膜型マスト細胞分化における Notch シグナルと IL-3 シグナルの協調作用

Coordinate action of Notch signaling and IL-3 signaling on differentiation of mucosal mast cells

○中野 信浩[1]、西山 千春[1,2]、奥村 康[1]、小川 秀興[1] ([1]順天堂大・医、[2]東京理科大・基礎工)
○Nobuhiro NAKANO[1], Chiharu NISHIYAMA[1,2], Ko OKUMURA[1], Hideoki OGAWA[1] ([1]Juntendo Univ. School of Medicine, [2]Tokyo Univ. of Science)

【目的】マスト細胞には結合組織型と粘膜型の 2 つのサブタイプがあり、両者は形態や刺激に対する反応性、及び顆粒内に含まれるプロテアーゼの種類などが異なっている。消化管や鼻粘膜などに局在する粘膜型マスト細胞は、寄生虫の排除や粘膜組織で起こるアレルギー反応において主要な役割を果たしている。しかしながら、粘膜型マスト細胞の分化過程や粘膜組織に局在するメカニズムはほとんどわかっていない。以前にマスト細胞に発現する Notch レセプターを介したシグナルが粘膜型マスト細胞の形質発現を誘導することを見いだしたことから、本研究ではその分子的なメカニズムの解明を行った。
【方法】BALB/c マウスの骨髄細胞から linage マーカー陰性細胞を分離し、IL-3 と stem cell factor (SCF) 存在下で 7 日間培養した後、IL-3, SCF またはその両者を含む培地に移し、Notch リガンドを強制発現させた CHO 細胞株と共培養した。
【結果】マスト細胞マーカーFc ε RI/c-Kit 陽性細胞の割合は、IL-3 存在下で Notch リガンドと 6 日間共培養させたとき対照群と比べ顕著に増加したが、SCF のみ存在下ではこの増加は見られなかった。また、粘膜型マスト細胞マーカーmouse mast cell protease-1, CD103 も IL-3 存在下で Notch リガンドと共培養させたとき発現が誘導され、SCF のみ存在下では発現誘導はほとんど見られなかった。IL-3 レセプターの下流には PI3 kinase/Akt 経路と JAK2/STAT5 経路が存在しており、マスト細胞分化には Akt の活性化が重要であることが報告されている。ウエスタンブロットによる解析から、Notch シグナルが Akt のリン酸化を増強することでマスト細胞分化に寄与していることが推定された。また、STAT5 に対する特異的阻害剤添加により、IL-3 存在下において見られた Notch シグナルによる粘膜型マスト細胞マーカー分子の発現が消失したことから、これらマーカー分子の発現誘導に STAT5 の活性化が重要であることが示された。
【結論】Notch シグナルは IL-3 シグナルと協調して粘膜型マスト細胞の分化を誘導することが示唆された。

mast cell, Notch signaling, IL-3 signaling

講演番号：4C03a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ C 校舎 03 会場

ニワトリ胚中脳視蓋発生の間の層および細胞特異的マーカーの発現解析

Analysis of the expression of cell type/layer-specific markers in the tectum development of chick embryos

○中田 洸[1]、小野寺 望[2]、荒木 功人[1,2] ([1]岩手大院工、[2]岩手大院連合農)
○Hiroshi NAKATA[1], Nozomi ONODERA[2], Isato ARAKI[1,2] ([1]Iwate University, [2]Iwate Univ.)

ニワトリ胚は、胚操作・遺伝子導入の行いやすさや入手・培養のしやすさといった利点を持つため、中枢神経系を含む様々な器官発生における研究、例えば網膜視蓋投射パターンや脳の領域化の分子機構の解析において頻用されている。中脳視蓋は哺乳類を除く脊椎動物の視覚情報処理の中枢であり、ニワトリの場合、成熟すると 16 層から成る層構造をとる。

網膜神経節細胞(RGC)は中脳視蓋にトポグラフィックな軸索の投射を行う。神経回路形成のモデルシステムとして網膜視蓋投射において多くの研究がこれまでに行われ、RGC で発現する Eph 受容体の網膜平面上の濃度勾配と、視蓋の外側の幾つかの層で発現する ephrin 分子の視蓋平面上の濃度勾配が上記のトポグラフィックな軸索投射の形成に関わることが示されている。一方、これ以外の中脳視蓋の発生の側面、例えば中脳の領域化の後どのように層構造が構築され、どのような種類の神経細胞が視蓋に存在し、それらがどのような発生様式で生ずるか、といったことに関する研究は遅れている。そこで、中脳視蓋で既に層特異的な発現の報告がある分子マーカー（Neuropilin-1、ChAT など）に加え、他のモデル生物や脳の他の領域で用いられている分子マーカー群（神経伝達物質産生関連マーカー、グリアマーカーなど）の経時的発現解析を、in situ ハイブリダイゼーション法を用いて、特に中期胚から後期胚の中脳視蓋において行った。本結果は、神経回路構築の分子機構のより良い理解のための基礎的データとして役立つであろう。

neural development, neuron, glia

講演番号：4C03a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ C 校舎 03 会場

ニワトリ網膜内 peptidylarginine deiminase type I ならびに type III の機能解析
Functional analysis of peptidylarginine deiminase type I and type III in chicken retina
○清水 明[1]、井尻 怜果[3]、本田 智則[3]、小島 俊雄[1,3]、高坂 哲也[2]、高原 英成[1,3] ([1]東京農工大院連合農学、[2]静岡大農、[3]茨城大農)
○Akira SHIMIZU[1], Raika IJIRI[3], Tomonori HONDA[3], Toshio KOJIMA[1,3], Tetsuya KOHSAKA[2], Hidenari TAKAHARA[1,3] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, [2]Shizuoka Univ., [3]Ibaraki Univ.)

【目的】Peptidylarginine deiminase (PAD) は脊椎動物に広く存在する翻訳後修飾酵素であり、Ca^{2+}存在下でタンパク質中のArg残基をCit残基に変換することにより、多様な機能を発揮している。鳥類 (ニワトリ) では3つのPAD遺伝子が存在し、これらはそれぞれ哺乳類が有する5つのPAD遺伝子のうちのtype I、II、IIIに相同する。先に我々はウエスタンブロットレベルでこれら3種のPADアイソザイムのうち2つのPAD (cPAD1とcPAD3) が脳ならびに眼球網膜で発現していることを報告した。そこで本研究ではニワトリPADの機能解明を目的にし、詳細な発現分布ならびにニワトリ生体内への遺伝子導入による変化を調査した。
【方法および結果】まず cPAD1 と cPAD3 タンパク質が発現している脳ならびに網膜について脱イミノ化タンパク質の局在をウェスタンブロットを用いて調査した結果、脱イミノ化タンパク質は網膜でのみ検出された。そこでニワトリ網膜に焦点を絞り、免疫組織化学染色により cPAD1、cPAD3、脱イミノ化タンパク質の組織内局在を調査した。その結果、cPAD1 は網膜の内顆粒層上部で検出し、cPAD3 は視細胞で検出した。特に cPAD3 の免疫電顕組織化学を行うと、外節のラメラ構造体に局在していることが判った。脱イミノ化タンパク質は網膜の内顆粒層上部と視細胞外節で検出された。それらのことから cPAD1 は内顆粒層上部、cPAD3 は視細胞外節で機能していることが示唆され、光シグナル伝達に関与していると思われる。そこで網膜における cPAD の機能解明を目的に、孵化後のニワトリ網膜内 cPAD 遺伝子の過剰発現および各 cPAD 特異的 siRNA による発現抑制を行う。外来遺伝子導入法はいくつか存在するが、神経細胞への導入が可能、遺伝子発現が安定的、安全性が高いなどの理由から鳥類アデノ随伴ウイルスを用いた網膜内神経細胞への遺伝子導入法を試みる。具体的な方法は shRNA 発現プロモーターとしてニワトリ由来の U6 プロモーター、その下流に合成 shRNA 配列をもつ siRNA 発現ベクターを構築した。さらに GFP 融合 cPAD1、cPAD2、cPAD3 ベクターを構築し、siRNA 発現ベクターとニワトリ胚線維芽由来不死化細胞 (DF-1) に共形質導入することで siRNA の抑制効果を調査した。その結果、デザインした siRNA は各 cPAD 特異的に発現抑制することが判った。ついで A3V の ITR をクローニングしたベクターへ U6 プロモーターと shRNA 配列を ITR 間に挿入した shRNA 発現 A3V ベクターと、各 cPAD の ORF を ITR の間に挿入した cPAD 過剰発現 A3V ベクターを構築した。現在、shRNA 発現ならびに cPAD 過剰発現 A3V を HEK293T 細胞内で産生しており、ウイルスを精製後、ニワトリ網膜組織への感染及び遺伝子導入を行い、cPAD の網膜での役割を報告する予定である。

peptidylarginine deiminase, chicken retina, Avian adeno-associated virus

講演番号：4C03a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ C 校舎 03 会場

分泌型ホスホリパーゼ A2 は神経栄養因子からのシグナルを増強する
Secretory phospholipase A2 enhances neurotrophin-induced signals
○畢 純、オハン チメグ、北本 勝ひこ、有岡 学（東大院農生科・応生工）
○Chun BI, WUHAN QIMUGE, Katsuhiko KITAMOTO, Manabu ARIOKA (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】ホスホリパーゼ A_2 (PLA_2) はグリセロリン脂質の 2 位のエステル結合を加水分解し、脂肪酸とリゾリン脂質を生成する酵素である。PLA_2 の代謝産物であるアラキドン酸とリゾリン脂質は多くの生理プロセスに関与し、特にリゾホスファチジルコリン (LPC) は哺乳類において炎症反応やアポトーシス、分化などに関わることが明らかになりつつある。当研究室におけるこれまでの研究により、分泌型 PLA_2 である secretory PLA_2 ($sPLA_2$) の一種であるグループ X $sPLA_2$ が PC12 細胞の突起伸長を誘導し、またマウス小脳顆粒細胞をアポトーシスから保護するなどの神経栄養因子作用を示すこと、またその作用が LPC の産生を介したものであることが明らかにされている。一方、最近我々は LPC が神経成長因子 (NGF) による PC12 細胞の MAPK リン酸化を増強すること、NGF 受容体である TrkA を発現する CHO-K1 においても PC12 細胞と同様の現象が観察されることを報告した (1)。これらの結果から、LPC が TrkA-MAPK シグナル経路を増強し、細胞の分化と生存に働くことが示唆された。LPC は $sPLA_2$ による加水分解産物であることから、本研究では主にマウス由来 $sPLA_2$ が LPC と同様に NGF シグナルを増強するかどうか検討し、$sPLA_2$ による生存と分化シグナルの伝達機構を分子レベルで解析することを目的とした。
【結果】まず COS1 細胞を用い、マウス由来の代表的な 4 つの $sPLA_2$ (グループ IB、IIA、V、X) の生産を試みた。各々を、その C 末端に HA および His_6 配列を付加して COS1 細胞で発現させ、その培養上清について抗 HA 抗体を用いた Western blotting を行ったところ、各 $sPLA_2$ のバンドが確認された。次いで Ni^{2+}-NTA カラムを用いて精製を行い、各 $sPLA_2$ について $sPLA_2$ Assay Kit により酵素活性を確認した。その結果、$sPLA_2$-X の活性が最も高いことが分かった。次に精製した $sPLA_2$ で PC12 細胞を前処理し、NGF による MAPK リン酸化への影響を検討した。その結果、NGF は単独でも PC12 細胞の MAPK のリン酸化を誘導したが、$sPLA_2$-X で前処理した PC12 細胞ではより高いレベルの MAPK リン酸化が観察された。この結果から、$sPLA_2$-X が生体膜にあるリン脂質から LPC を遊離し、それが NGF-TrkA-MAPK シグナル経路を増強する可能性が示唆された。一方、TrkA をその共受容体である p75 と伴に CHO-K1 に発現させると、LPC による TrkA-MAPK シグナル経路の増強がさらに亢進することが分かった。現在、同様の現象が $sPLA_2$-X による前処理によっても見られるかどうかを検討している。
(1) Wuhanqimuge et al., FEBS Open Bio 3, 243 (2013)

secretory phospholipase A2, nerve growth factor, mitogen-activated protein kinase

講演番号：4C03a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ C 校舎 03 会場

シアル酸認識レクチン Siglec によるマクロファージの活性制御

Siglecs regulate macrophage activity

○樋口 廣士、庄司 徹、西島 謙一、飯島 信司 (名大院工)
○Hiroshi Higuchi, Toru Shoji, Ken-ichi Nishijima, Shinji Iijima (Nagoya Univ.)

○背景

高等生物の糖鎖の末端に付加し、様々な生理活性を示すことが知られているシアル酸を認識するレクチンとして Siglec が知られている。Siglec は細胞外にシアル酸と結合するレクチンドメインを持つ膜タンパク質として見出され、その中でも CD33 型に分類されるものは、細胞質内に抑制性のチロシンモチーフ ITIM(Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif)を持つことが特徴として挙げられる。さらに Siglec のほとんどは、免疫細胞に特異的な発現パターンを持つことが知られ、様々な免疫機能を負に調節すると想定されている。

これまでにマウスマクロファージ細胞株 RAW264 にヒト Siglec-9 および 5 を安定発現させ、マクロファージの活性に与える影響について解析を行ってきた。その結果、Siglec-9 および 5 発現 RAW264 では、各 TLR リガンドに対する TNFα産生などの炎症応答が抑制される反面、抗炎症性サイトカインである IL-10 の産生を著しく促進するということを報告した。

○方法・結果

マクロファージは炎症応答を担う M1 マクロファージと、抗炎症、創傷治癒、組織の恒常性維持などを担う M2 マクロファージの二つのサブタイプに分類される。Siglec がマクロファージの M1/M2 応答に与える影響について解析を行った結果、Siglec 発現 RAW264 では IL-4 刺激により M2 マクロファージマーカーの発現量が著しく増加することを見出した。

次にヒト Siglec-9 の機能的ホモログと考えられている、内在のマウス Siglec-E のノックダウンを行ったところ、IFN-γ及び LPS 刺激による M1 応答が促進される反面、IL-4 刺激による M2 応答は抑制されるという結果が得られた。

以上のことから、Siglec はヒト、マウスともに免疫制御を担う重要な因子であることが示唆される。

さらに IL-4 により誘導される M2 応答が、Siglec によってどのように増強されるのかを解明するため、IL-4 受容体の代表的な下流因子である STAT6 及び Akt のリン酸化レベルを解析した。その結果、驚くべきことに Siglec-9 発現 RAW264 では IL-4 刺激による STAT6 のリン酸化が減少していたのに対し、Akt のリン酸化は増加していた。

STAT6 は M2 応答に必須の因子として広く認識されているが、本研究により STAT6 のみならず Akt の活性化がマクロファージの M2 応答に重要であることが示唆された。

Siglecs, M2 macrophage, Innate immunity

講演番号：4C03a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ C 校舎 03 会場

TSLP による KU812F 細胞の好塩基球機能亢進

Enhanced basophil function in KU812F cells upon treatment with TSLP

○原 崇、伊藤 達城、城 斗志夫（新潟大農）
○Takashi HARA, Tatsuki ITO, Toshio JOH (Fac. Agric., Niigata Univ.)

【目的】TSLP は上皮組織に高発現するサイトカインであり，アトピー性皮膚炎や喘息のアレルギー性炎症の発症に重要な役割を担う。TSLP は，Th2 細胞を誘導することから，アレルギー性炎症の発症機序の中心に潜在するサイトカインとして注視されている。また，最近，TSLP は好塩基球の分化誘導因子として働くことも明らかとなってきた。本研究では、ヒト好塩基球のモデル細胞である KU812F 細胞に対し，TSLP がヒスタミン産生やヒスチジン脱炭酸酵素（HDC）活性，高親和性 IgE 受容体 FcεRI 発現など特徴的な細胞機能を亢進させるか否か検討した。
【方法】TSLP を添加（100 pg/ml～100 ng/ml）して KU812F 細胞を培養し，細胞内ヒスタミン蓄積量，HDC 活性ならびにその発現レベル，FcεRI 発現レベルなど，好塩基球に特徴的な機能分子および細胞機能の変化について調べた。ヒスタミンは, o-フタルアルデヒドを用いた蛍光法により定量した。HDC 発現量はイムノブロット法により, HDC 活性は単位時間当たりに生じるヒスタミン量を測定することにより評価した。細胞表面上の FcεRI は，FACS 解析により評価した。HDC と FcεRI の発現レベルについて，RT-PCR 法による評価も実施した。
【結果】TSLP を添加して 3～7 日間培養すると，KU812F 細胞内のヒスタミン蓄積量が増え，それに伴い HDC 活性ならびに HDC 発現量の増大が確認された。同時に，FcεRI 発現レベルの増大も確認された。TSLP 添加培養により好塩基球様機能の亢進した KU812F 細胞では，IgE を介したヒスタミン遊離（遊離率）も増大することが確認された。現在, TSLP 処理による細胞表面上の CD117 (c-kit), CD49b の発現レベルの推移，好塩基球の活性化マーカーとなる CD63 および CD203c の発現レベルについて検討中であり，これらの点についても併せて報告する。

TSLP, KU812F, histidine decarboxylase

講演番号：4C03a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ C 校舎 03 会場

食道扁平上皮がん細胞に対する UCN-01 の放射線感受性増強活性

Radiation-sensitizing activity of UCN-01 against esophageal squamous cell carcinoma

○小泉 幸央、岳 発貴、小代田 宗一、杉山 俊博（秋田大院医）
○Yukio KOIZUMI, Fa Gui YUE, Souichi KOYOTA, Toshihiro SUGIYAMA (Akita Univ.)

【目的】食道がんに対する治療は手術と放射線が中心的役割を担っており、抗がん剤と組み合わせた化学放射線療法も行なわれている。しかしながら放射線治療は副作用も生じることから、がん特異的に放射線感受性を増強させる試みや治療に先立ち放射線感受性を予測する試みが近年行なわれている。今回、食道がんの放射線感受性を増強させる薬剤の開発を目的に、G2期チェックポイント阻害剤の影響を調べた。
【方法】食道がん細胞には扁平上皮由来のTE-5細胞株を用いた。X線誘発G2期チェックポイント機構の発現と阻害活性はフローサイトメーターを用いた細胞周期解析により行なった。細胞増殖抑制活性はトリパンブルー染色により測定した。細胞周期調節因子の解析はウエスタンブロットにより行なった。
【結果】TE-5細胞株に対する種々のG2期チェックポイント阻害剤の影響を調べた結果、カフェイン、ペントキシフィリン、UCN-01、SB-218078、Gö6976、ヒメニアルジシンが20 GyのX線照射によって誘発されたG2期停止を阻害することがわかった。次に、X線照射によるTE-5細胞株の増殖抑制に対するG2期チェックポイント阻害剤の影響を調べた結果、UCN-01がX線感受性を増強することがわかった。このUCN-01によるX線増強効果は、X線吸収線量依存性（1-20 Gy）かつUCN-01濃度依存性（10-500 nM）を示した。続いて、UCN-01によるTE-5細胞株に対するX線感受性増強活性の作用機序の解析を行なった。X線照射によってG2期に停止したTE-5細胞株内で増加したG2期サイクリンのcyclin B1はUCN-01との併用により減少し、また細胞内で減少したG1期サイクリンであるcyclin D1及びcyclin EはUCN-01との併用によって増加することがわかった。UCN-01はChk1キナーゼの阻害剤として知られるが、TE-5細胞株に対するX線との併用処理によってChk1のタンパク質レベルの減少を導くことが新たにわかった。今回の結果から、食道がんに対する放射線感受性増強剤としてのUCN-01の可能性が示された。

Esophageal cancer, Radiation, UCN-01

講演番号：4C03a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ C 校舎 03 会場

旋回振とうによる流体刺激が MG-63 骨肉腫細胞株に引き起こす力学応答の特性について
Characterization of the mechanical response in MG-63 osteosarcoma cells to the fluid shear stress caused by orbital shaking
○深田 尚、杉本 憲治（大阪府大院生命環境）
○Takashi FUKADA, Kenji SUGIMOTO (Osaka Prefecture Univ.)

骨組織が重力負荷や運動刺激などの力学刺激を受容し、応答することはよく知られているが、硬組織である骨がどのようにして力学刺激を受容するのかは明らかではない。これについての有力な説の一つは、骨のわずかな変形が骨細管内に圧力差を生じ、細管内の細胞外液の素早い流動として増幅され、細胞に知覚されるというものである。培養細胞系でこの流体刺激を再現する方法としては平行板法が一般的である。これは細胞を培養したスライドグラスを二枚のプラスチック板で挟み、その隙間に薄い流路を形成して培地を灌流するもので、細胞を交換するためにはその都度装置を分解しなければならないため非常に手間のかかる実験法である。これに代わるより簡便な方法として、我々は通常の培養皿を旋回振とうして培地を流動させる方法を試み、ヒト骨肉腫細胞株 MG-63 で振とう開始の 5 分後に 5 倍程度の鋭いピークを持つ MAP キナーゼ ERK の活性化を見出している。このため、将来的には旋回振とうによる流体刺激の測定法を、薬剤スクリーニングなどにも利用可能な簡便で処理能力の高い方法として確立できるのではないかと期待して検討を進めている。

しかし、過去に平行板法で MG-63 を刺激した報告と旋回振とう法での我々の結果には異なる部分があり、例えば平行板法では一定（2 倍程度）の ERK 活性化が数時間以上持続する例が多く、5 分後の鋭い活性化ピークは報告されていない。この応答の違いについて詳しく検討したところ、細胞から培地中に放出された何らかの物質が ERK の力学応答を変化させている可能性を示唆する結果を得た。現在この物質を特定するため検討を続けている。その他、各種情報伝達経路の阻害剤に対する応答など、旋回振とう法で検出される力学応答の特性について報告したい。

mechanotransduction, fluid shear stress, osteoblast

講演番号：4C03a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ C 校舎 03 会場

Regulatory effect of terpene compounds on melanogenesis signal transduction pathways in B16 murine melanoma cells

○Myra VILLAREAL, Junkyu HAN, Hideyuki SHIGEMORI, Hiroko ISODA (University of Tsukuba)

Terpenes are naturally occurring compounds produced by many plant species. The importance of terpenes in human health is evident in its wide biological activities which include cancer chemopreventive effects, antimicrobial, antiviral, antihyperglycemic, and anti-inflammatory activities. Terpenes are also effective as regulators of melanogenesis which may be useful in addressing skin pigmentation disorders such as melasma and hypomelanosis. Daphnane diterpenes from *Thymelaea hirsuta,* for example, are effective inhibitors of the microphthalmia-associated transcription factor (*Mitf*) gene expression, the gene considered the "master regulator" of melanin biosynthesis. Also, lupenone, a triterpene, increase melanogenesis by inhibiting the MAPK pathway. Results of our studies have shown that terpene compounds may be used to regulate melanogenesis. Here, we discuss the regulatory effect of terpene compounds on melanin biosynthesis signaling pathways in B16 murine melanoma cells.

Melanin biosynthesis, Terpene compounds, B16 murine melanoma cells

講演番号：4C03a17
講演日時、会場：3 月 30 日 11:54～ C 校舎 03 会場

メラノサイトの機能に影響を及ぼすアーユルヴェーダハーブの探索
Screening of ayurvedic plants that affect melanocyte function
○十文字 浩美[1]、三木 健輔[1]、モハマドナジール ホサイン[1]、山下 律朗[2]、藤井 道彦[1]、鮎沢 大[1]([1]横浜市大・生命ナノ、[2]（株）SLH BCL カンパニー)
○Hiromi Jumonji[1], Kensuke Miki[1], Hossain Mohammad Nazir[1], Ritsuo Yamashita[2], Michihiko Fujii[1], Dai Ayusawa[1] ([1]Yokohama City Univ., [2]SLH BCL Company)

メラノサイト（色素細胞）は表皮最下層の基底層に存在し、紫外線など外的刺激を受けると、表皮細胞の損傷を防ぐ働きをもつメラニンを産生する。しかし、一方でメラニンはしみの原因となる。また、メラノサイトの機能は髪の色にも深い関係があり、加齢などによって機能が弱まると、メラニンは生成されなくなり、白髪になると考えられている。そのため、メラノサイトの機能制御は色素沈着や白髪予防に重要である。そこで我々は、世界最大の植物利用学であるアーユルヴェーダに着目し、約 200 種類のハーブ抽出液について、培養メラノサイトの増殖やメラニン合成能に影響を与えるハーブの探索を行った。マウスメラノーマ細胞（B16）を用い、専用培地を含むシャーレに細胞を植え込み、ハーブエキスを適当量添加して 1-2 週間培養した。その後、メラニンの産生量に影響を及ぼしたいくつかのハーブについて、正常ヒト表皮メラノサイト（NHEM）を用いて、再現性の確認を行った。その結果、細胞の増殖促進作用と増殖抑制効果を示すハーブをいくつか見出した。また、増殖抑制効果を示すハーブは正常線維芽細胞の増殖には影響を及ぼさなかった。しかし、ハーブの効果は必ずしも十分であるとは言えなかった。そこで、実験条件の再検討を行った。以上の研究は、色素沈着や白髪予防への応用が期待される。

ayurvedic plants, melanocyte

講演番号：4C04a01
講演日時、会場：3 月 30 日 09:00～ C 校舎 04 会場

抗菌性蛋白質 AFP1 のイネ植物体表面処理によるイネいもち病菌の感染抑制効果の検証

The availability of antimicrobial protein AFP1 as an antifungal agent for *Magnaporthe orizae*

○提箸 祥幸[1]、芦澤 武人[2]、高久 洋暁[3]、矢頭 治[2]（[1]農研機構・北農研、[2]農研機構・中央農研、[3]新潟薬大・応生科）
○Yoshiyuki SAGEHASHI[1], Taketo ASHIZAWA[2], Hiroaki TAKAKU[3], Osamu YATOU[2] ([1]NARCH, [2]NARC, [3]NUPALS)

イネいもち病菌は日本の稲作における最大にして最重要な病害である。その防除には化学農薬を使用することが一般的になっており、発生予察などによる適切な農薬散布が心がけられているが、栽培圃場での化学農薬の使用は環境負荷の増大につながるとの懸念もある。そのため環境負荷の低い新規抗菌剤の開発が期待されている。

これまで多種多様な生物から多くの抗菌性蛋白質が単離され解析されてきたが、植物ディフェンシンはそれらのうちの一種であり、世界中の多くの植物を材料に解析が進められている。本研究ではアブラナ科植物から単離されたディフェンシン AFP1 に着目している。AFP1 は分子内に S-S 結合を 4 つ有する分子量 5,670 の蛋白質で、イネいもち病菌をはじめとする多くのイネ病原糸状菌に対し強い抗菌活性を示し、イネいもち病菌に対する抗菌活性強度（IC_{50}）はイネいもち病菌防除剤の主成分であるカスガマイシンと同程度である。さらに熱や広い pH 条件でも抗菌活性を維持することができることから栽培圃場での実用的な抗菌剤としての幅広い利用が期待できる。

しかしながらこれまで植物体上への散布を想定した AFP1 の抗菌効果の検証は行われてきていなかったため、本研究では大腸菌を宿主として生産したディフェンシン AFP1 とアミノ酸置換を行った変異型 AFP1 の 2 種類のディフェンシン蛋白質を用い、栽培圃場での散布を想定してイネ植物体に処理することでイネいもち病菌の感染を防ぐことができるのか検証を行い、作物栽培の現場での抗菌成分としての実用可能性を考察した。

はじめにイネ葉身に AFP1 を塗布後イネいもち病菌の噴霧接種を行ったところ、AFP1 塗布部位でのみイネいもち病菌の病斑形成が抑えられていた。そこで AFP1 をイネ葉鞘に処理しイネいもち病菌を接種した結果、AFP1 接種により無処理区と比較してイネいもち病菌の付着器の形成が葉鞘裏面細胞においてほとんど観察されなかった。次に AFP1 の濃度を変えてイネ葉鞘に処理を行ったところ、イネいもち病菌接種後 24 時間の付着器の形成率、48 時間後のイネ細胞内への侵入率が AFP1 濃度に依存して抑えられていた。同様の結果は変異型 AFP1 の処理実験からも得られた。

以上のことから、ディフェンシン AFP1 は生育中のイネ植物体上でも抗菌成分としてイネいもち病菌のイネへの感染を防ぐことができることを実証した。またその機構は、AFP1 の強い抗菌作用によりイネいもち病菌の正常な付着器形成を阻害することで、イネいもち病菌のイネ細胞への侵入を抑えていることが考えられた。

defensin, antifungal activity, *Magnaporthe oryzae*

講演番号：4C04a02
講演日時、会場：3 月 30 日 09:11～ C 校舎 04 会場

ダイズにおけるイソフラボン主骨格生合成酵素群のタンパク質相互作用解析
Protein-protein interactions of enzymes involved in isoflavone biosynthesis in *Glycine max* (L.) Merr.

○和氣 駿之[1]、本橋 令子[2]、高橋 征司[1]、中山 亨[1] ([1]東北大院工、[2]静岡大農)
○ Toshiyuki Waki[1], Reiko Motohashi[2], Seiji Takahashi[1], Toru Nakayama[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Shizuoka Univ.)

【目的】イソフラボンはダイズなどのマメ科植物に多く含まれるフラボノイド化合物であり，これを摂取したヒトに対して様々な有益な生理活性を示すばかりでなく，植物 - 微生物間相互作用においても生理的に重要な役割を果たしている．したがって，実用作物であるダイズにおいて，イソフラボンの代謝制御機構を明らかにし，それに基づく高度な代謝工学系をデザインすることは産業的に非常に重要である．

イソフラボン，特にダイズの根に多く含まれるダイゼインは，3 分子のマロニル CoA と 1 分子の 4-クマロイル CoA を出発物質としてカルコン合成酵素（CHS），カルコン還元酵素（CHR），カルコン異性化酵素（CHI），2-ヒドロキシイソフラバノン合成酵素（IFS），2-ヒドロキシイソフラバノン脱水素酵素（HID）が作用することにより生成する．ダイズにおいては，これら（イソ）フラボノイド代謝酵素の多くが多重遺伝子族を形成しており，いくつかの研究によりこれらアイソザイムには機能分担が存在することが示唆されているが，その詳細については不明な点が多い．

近年，フラボノイド生合成において，代謝経路を構成する酵素間で動的な解離会合（メタボロン形成）によりタンパク質レベルで代謝が制御されていることが示唆されている．しかしながら，フラボノイド生合成におけるメタボロン形成は，シロイヌナズナにおいて実験的に示されているものの，その存在の普遍性に関しては全く明らかになっていない．本研究では，ダイズのイソフラボン生合成におけるメタボロンの存在を立証し，メタボロン形成によるイソフラボンの代謝制御機構の実態に迫るため，イソフラボン代謝酵素間のタンパク質間相互作用解析を行った．

【方法および結果】フラボノイド生合成におけるメタボロンは，膜タンパク質であるシトクロム P450 を足場として ER 膜上に形成されることが提唱されている．そこでまず，シトクロム P450 である IFS1（CYP93C）と相互作用する可溶性代謝酵素を，Split ubiquitin システムを用いる酵母ツーハイブリッドシステム（Y2H）により検索した．その結果，IFS1 と相互作用するタンパク質として，二つの CHS アイソザイム（CHS1，CHS7）および二つの CHR アイソザイム（CHR2，CHR4）が同定された．またこれらの相互作用の有無を，植物細胞を宿主として用いた BiFC（Bimolecular fluorescence complementation）法によりさらに確認した．これらの結果から，これらアイソザイムがイソフラボン生合成におけるメタボロン形成に寄与していることが示唆された．また Y2H の結果から，IFS1 との相互作用の強さが同じ酵素のアイソザイム間で異なる可能性が示唆された．

isoflavone, metabolon, protein-protein interaction

講演番号：4C04a03
講演日時、会場：3 月 30 日 09:22～ C 校舎 04 会場

ダイズにおけるイソフラボン 7-O-グルコシルトランスフェラーゼ相同遺伝子の包括的機能解析

Comprehensive and functional analyses of genes coding for isoflavone 7-*O*-glucosyltransferase homologs from *Glycine max* (L.) Merr.

○船木 亜由太、和氣 駿之、高橋 征司、中山 亨（東北大院工）
○Ayuta FUNAKI, Toshiyuki WAKI, Seiji TAKAHASHI, Toru NAKAYAMA (Tohoku Univ.)

【目的】イソフラボンはヒトに対して様々な有益な生理活性を示すフラボノイドである．ダイズ植物体においては, 紫外線防御物質, ファイトアレキシンの前駆体, 共生微生物に対する誘引物質として, 植物－微生物間相互作用に不可欠な役割を果たす．ダイズ細胞内に含まれるイソフラボンの多くは, 貯蔵型である配糖体化・アシル化された修飾体として存在している．しかしながら，上述のようなイソフラボンの生理機能はアグリコン型で最も強く発現するため，イソフラボンの修飾・脱修飾のステップは，イソフラボンが関与するダイズの生理応答を理解する上で非常に重要である．

これまでの研究により，当研究室においてダイズのイソフラボン配糖体化酵素 (*IF7GT1*) の単離・同定に成功しているが [1]，この *IF7GT1* の転写解析の結果，イソフラボンが高蓄積される根での転写量が非常に低いことが明らかになった．また，近年 *IF7GT* 相同遺伝子 (*IF7GT1~6*) の詳細な組織別転写解析の結果が報告され，根において *IF7GT4* の転写量が特に高い (*IF7GT1* の 11 倍) ことから，根におけるイソフラボンの配糖体化には *IF7GT4* が主に寄与している可能性が示された[2]．そこで本研究では，IF7GT アイソザイムの機能分担を明らかにし，ダイズ各組織のイソフラボン代謝における配糖体化のステップの理解を深めることを目的として，*IF7GT* 相同遺伝子の網羅的な酵素機能解析および転写解析を行った．

【方法および結果】公開されているダイズのゲノム配列情報（Phytozome）から *IF7GT1* 相同遺伝子を検索した．報告された *IF7GT* 相同遺伝子の転写量解析データと系統解析にもとづいて代表的な *IF7GT* 相同遺伝子を選抜し，大腸菌発現用ベクターpCold I に組み込んだ．大腸菌の菌体内に His_6-tag 融合タンパク質として発現させ，各 IF7GT アイソザイムを均一状態に精製した．精製酵素を用いてフラボノイドと UDP-グルコースを反応させ，HPLC により生成物を定量し，各アイソザイムの基質特異性ならびに反応速度論的性質を解析した．その結果，IF7GT1 は高い比活性をもつものの各種のフラボノイドに対して比較的広い特異性を示す一方，IF7GT3 および IF7GT 4 はイソフラボンに高度に特異的であることがわかった．本発表では，*IF7GT* 相同遺伝子群の組織別，ステージ別の詳細な転写量解析の結果も合わせて報告する．

【参考文献】[1] Noguchi A et al.: J. Biol. Chem. **282,** 23581-23590 (2007)；[2] Livingstone, JM et al.: Plant Physiol. Biochem. **49**, 1071-1075 (2011)

isoflavone, *Glycine max*, glucosyltransferase

講演番号：4C04a04
講演日時、会場：3 月 30 日 09:33～ C 校舎 04 会場

短鎖シス型プレニルトランスフェラーゼの基質認識機構

Regulation mechanism for allylic substrate recognition by short-chain *cis*-prenyltransferase

○沓川 諒、末永 美樹、高橋 征司、中山 亨（東北大院工）
○Ryo Kutsukawa, Mki Suenaga, Seiji Takahashi, Toru Nakayama (Tohoku Univ.)

【緒言】自然界に存在するポリイソプレノイドは，二重結合の立体配置をもとに all-*E*型と *Z,E*-混合型に大別される．原核生物や酵母，哺乳動物における all-*E*型と *Z,E*-混合型ポリイソプレノイドの炭素鎖長分布はそれほど広くないが，高等植物では同一個体内で多様な炭素鎖長の *Z,E*-混合型ポリイソプレノイドを生合成している．一般的に，*Z,E*-混合型ポリイソプレノイドの基本骨格生合成経路では，トランス型プレニルトランスフェラーゼによって炭素数 5（C_5）のイソペンテニル二リン酸（IPP）およびジメチルアリル二リン酸（DMAPP）から生合成された GPP（C_{10}）・FPP（C_{15}）・GGPP（C_{20}）といった短鎖の all-*E* 型プレニル二リン酸をプライマー基質として，シス型プレニルトランスフェラーゼ（cPT）が連続的に *Z*-型に IPP を縮合させるが，cPT によるプライマー基質特異性決定機構や鎖長決定機構には不明な点が多い．近年，DMAPP をプライマー基質とする新奇な酵素機能を有した cPT であるネリル二リン酸（C_{10}）合成酵素（NDPS1）がトマトからクローニングされた．そこで本研究では，cPT の反応制御機構について知見を得るために，FPP を含む結晶構造解析がなされている細菌由来の cPT と NDPS1 とをモデリングにより構造比較し，部位特異的変異導入によりプライマー基質の認識に関わるアミノ酸残基を特定した．

【実験】構造比較から NDPS1 の基質認識部位において特徴的な Ile106 を見出し，そのアミノ酸残基を，FPP をプライマー基質とする他種 cPT で広く見られた Gly に置き換えた NDPS1 Ile106Gly を作製した．NDPS1 I106G は His-tag 融合タンパク質として大腸菌で発現させ，可溶性粗酵素抽出液を Ni^{2+}-アフィニティーカラムに供することで部分精製酵素標品を取得した．得られた部分精製酵素標品に対し DMAPP，GPP，FPP のいずれかをプライマー基質として加え，^{14}C-IPP と反応させた．生成物はブタノール抽出した後，酸性ホスファターゼで処理し，逆相薄層クロマトグラフィーにより鎖長解析を行った．

【結果】WT の NDPS1 では，DMAPP および GPP を基質として反応させた場合にそれぞれ $C_{10,15}$ と $C_{15,20}$ の生成物が検出されたが，FPP を利用することはできなかった．しかし，NDPS1 Ile106Gly では DMAPP をほとんど基質として利用できなくなり，代わりに FPP を基質認識できるようになった．また，NDPS1 Ile106Gly では GPP を基質としたときには $C_{15\text{-}25}$，FPP を基質としたときには $C_{20\text{-}35}$ まで生成物鎖長が伸長した．以上の結果から，NDPS1 において Ile106 は，DMAPP の基質認識だけでなく，生成物鎖長制御にも重要な残基であることが明らかとなった．

cis-prenyltransferase, isoprenoid biosynthesis, polyprenol

講演番号：4C04a05
講演日時、会場：3 月 30 日 09:44～ C 校舎 04 会場

ヤセウツボ発芽種子で発現する糖加水分解酵素の機能解析
Functional analysis of glycosyl hydrolase specifically expressed in *O. minor* germinating seeds
○東久保 諒[1]、ギリモ グレゴリー[1]、若林 孝俊[1]、水谷 正治[2]、杉本 幸裕[2,3]、關 光[1]、村中 俊哉[1]、岡澤 敦司[3,4] ([1]阪大院・工・生命先端、[2]神大院・農・生命機能科、[3]JST/JICA・SATREPS、[4]阪府大院・生命環境・応生科)
○ Ryo HIGASHIKUBO[1], Gregory Guirimand[1], Takatoshi WAKABAASHI[1], Masaharu MIZUTANI[2], Yukihiro SUGIMOTO[2,3], Hikaru SEKI[1], Toshiya MURANAKA[1], Atsushi OKAZAWA[3,4] ([1]Osaka Univ., [2]Kobe Univ., [3]JST/JICA・SATREPS, [4]Osaka Prefecture Univ.)

【背景】ハマウツボ科のヤセウツボは，マメ科植物など広範囲の双子葉植物の根に寄生する全寄生植物である．これらの根寄生植物は特有の生活環を持っており，一定の吸水期間を経た後にストリゴラクトンなどの発芽刺激物質を感受して初めて発芽する．ハマウツボ科の根寄生植物によって，アフリカなどの乾燥地での農業は甚大な被害を受けており，その防除技術の確立が望まれている．これまでハマウツボ科の根寄生植物の制御のために様々な研究が行われてきたが，未だ完全な防除技術は確立されていない．我々はハマウツボ科の根寄生植物に特異的な発芽過程における代謝に注目した防除標的の探索を行っており，これまでにヤセウツボ種子中の糖質加水分解活性が発芽の進行とともに上昇することを明らかにした．一方，トマトなどにおいて糖質加水分解酵素 (GH) が発芽に関与することが知られている．これらのことから，ヤセウツボにおいても発芽に GH が関与することが予想された．ヤセウツボの EST データベースを検索した結果，ヤセウツボ発芽種子で特異的に発現する GH 相同遺伝子断片の配列が得られた．その配列はトマト種子の発芽において細胞壁中のガラクトマンナンの分解に関与すると考えられている β-マンノシダーゼと高い配列相同性を示したことから，この遺伝子がヤセウツボの種子発芽にも関与していると予想した．そこで本研究では，ヤセウツボ発芽種子で特異的に発現する GH 相同遺伝子のクローニングとその機能解析を行った．
【結果】ヤセウツボの種子から total RNA を抽出し，EST データベースから得られたヤセウツボ発芽種子由来の GH 相同遺伝子断片の配列を用いて GH 相同遺伝子のクローニングを行い，さらにクローニングした GH 相同遺伝子を大腸菌と BY2 細胞において GST, GFP 融合タンパク質として発現させ，酵素活性解析，細胞内局在解析をそれぞれ行った．その結果，ヤセウツボ発芽種子由来の GH 相同遺伝子は GH1 ファミリーに属し，細胞壁に局在する β-マンノシダーゼをコードしていることが明らかになった．そこで，ヤセウツボの種子とその宿主植物であるアカクローバーの根から細胞壁画分の多糖を抽出し，組み換え酵素によるそれら多糖の加水分解産物を UPLC-ELSD，LC-MS を用いて解析したところ，ヤセウツボ種子細胞壁画分の加水分解産物からマンノースが検出された．一方，アカクローバーの根の細胞壁画分を基質として用いた場合，反応物として単糖は検出されなかった．以上の事から，この β-マンノシダーゼが宿主植物の根への侵入には関与せず，寄生植物種子の細胞壁の分解に関わることが示唆された．我々の知る限り，植物の β-マンノシダーゼによる細胞壁画分の多糖分解活性を示した例は今回が初めてである．

β-mannosidase, *Orobanche minor*, Glycosyl hydrolase family 1

講演番号：4C04a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ C 校舎 04 会場

トマトにおけるアスコルビン酸生合成酵素ガラクツロン酸レダクターゼの生理機能と発現調節
Physiological function and gene expression regulation of galacturonic acid reductase for ascorbic acid biosynthesis in tomato
○末川 麻里奈、藤川 愉吉、江坂 宗春（広島大院生物圏）
○Marina SUEKAWA, Yukichi FUJIKAWA, Muneharu ESAKA (Hiroshima Univ.)

【目的】
アスコルビン酸は、ストレスによって植物体内に生じた活性酸素種を除去する抗酸化物質として機能するだけでなく、酵素の補因子や細胞分裂、シグナル伝達にも関与するなど、植物にとって非常に重要な物質である。これまでのところ、植物では、複数のアスコルビン酸生合成経路の存在が示されているが、主経路であるマンノース経路に対し、副経路に関する知見は乏しい。副経路の一つと示唆されるガラクツロン酸経路は、細胞壁成分の分解産物であるペクチンを初発物質としてアスコルビン酸を生合成する経路であるが、その詳細は不明である。当研究室では、D-ガラクツロン酸から L-ガラクトン酸への反応を触媒するガラクツロン酸レダクターゼ（GalUAR）に着目し、トマトのアスコルビン酸生合成における GalUAR の生理機能に関する研究を行っている。これまでにトマト葉の老化やストレスに伴って GalUAR の mRNA 発現が増加することを明らかにしているが、その遺伝子発現調節機構の詳細は明らかでない。そこで、本研究では GalUAR のプロモーター領域について詳細な解析を行った。
【方法・結果】
最初に、トマト GalUAR がアスコルビン酸生合成に関与しているかを評価するために、トマト GalUAR 遺伝子を、トマト葉から単離したプロトプラストに導入して一過的にトマト GalUAR を発現させた。遺伝子導入したプロトプラストのアスコルビン酸含量を測定した結果、GalUAR を遺伝子導入していないプロトプラストに対して、導入したプロトプラストではアスコルビン酸含量が有意に増加した。このことから、トマト GalUAR はアスコルビン酸生合成に関与していることが示唆された。また、トマト GalUAR の細胞内局在性を明らかにするために、トマト GalUAR と GFP 融合蛋白質をプロトプラスト内で一過的に発現させ、蛍光顕微鏡観察した結果、核と細胞質に GFP シグナルが確認された。次に、トマト GalUAR の転写調節機構を解析するために、トマト GalUAR 遺伝子の開始コドンから上流域 1400bp に着目し、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子としたプロモーターアッセイを行った。トマト GalUAR 遺伝子の上流域 1400bp についてデリーション解析した結果、トマト GalUAR 遺伝子の上流域には 3 つの転写調節シス因子が存在する可能性が明らかになった。現在、これらの転写調節シス因子についてより詳細な解析を行っている。

Ascorbic acid, Tomato, gene expression

講演番号：4C04a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ C 校舎 04 会場

シロイヌナズナのペルオキシソーム輸送におけるカタラーゼのヘム結合領域の機能解析
A functional analysis of heme-binding region of catalase in translocation into peroxisomes in *Arabidopsis thaliana*

○遠藤 聡至[1]、藤川 愉吉[1]、真野 昌二[2]、林 誠[3]、西村 幹夫[2]、江坂 宗春[1] ([1]広大院生物圏、[2]基生研高次細胞機構、[3]長浜バイオ大バイオサイエンス)
○ Satoshi Endo[1], Yukichi Fujikawa[1], Shoji Mano[2], Makoto Hayashi[3], Mikio Nishimura[2], Muneharu Esaka[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]NIBB, [3]NIB)

【目的】ペルオキシソーム蛋白質は、ペルオキシソーム局在化シグナル(Peroxisomal Targeting Signal : PTS)を持つ。カルボキシル末端(C 末端)に特徴的なトリペプチド PTS1 を持つペルオキシソーム蛋白質は、PTS1 レセプターPEX5 に認識され、ペルオキシソームへ輸送される。当研究室のこれまでの研究により、ペルオキシソーム蛋白質である植物カタラーゼでは、PTS1 が C 末端ではなく、C 末端から 11 アミノ酸残基上流に存在している可能性が明らかになった。さらに最近になってカタラーゼのヘム結合領域がペルオキシソーム輸送に関与することも明らかになった。そこで本研究では、植物カタラーゼのヘム結合領域において、ペルオキシソーム輸送に関わるアミノ酸残基の同定を試みた。
【方法・結果】最初に、シロイヌナズナのカタラーゼ 2(*Arabidopsis thaliana* Catalase 2：*At*Cat2)において、ヘム結合に重要な 62 番目、102 番目、348 番目と 355 番目のアミノ酸残基に着目した。それらのアミノ酸残基をそれぞれ Gly に置換した変異体と GFP の融合蛋白質を発現するベクターを、シロイヌナズナ葉から調製したプロトプラストに遺伝子導入し、蛍光顕微鏡観察した。その結果、野生株 *At*Cat2 と GFP の融合蛋白質はペルオキシソームで GFP シグナルが観察されたのに対し、いずれの変異体も細胞質で GFP シグナルが観察された。このことから、ヘム結合領域がペルオキシソーム輸送に関与することが示唆された。次に、アミノ末端(N 末端)側を欠失させた *At*Cat2 変異体の局在性について、同様の方法で検討した。N 末端からヘム結合領域に重要な 348 番目の Tyr の上流までを欠失させた変異体は、ペルオキシソームで GFP シグナルが観察された。しかし、その変異体において、348 番目の Tyr を Gly に置換すると、細胞質で GFP シグナルが観察された。一方、興味深いことに、ヘム結合領域を完全に欠失させた C 末端から 50 アミノ酸残基からなる変異体でもペルオキシソームで GFP シグナルが観察された。このことから、カタラーゼのペルオキシソーム輸送にヘムの結合が重要ではあるが、ヘムが結合していない C 末端部分だけでもペルオキシソームへ輸送されることが分かった。現在、*At*Cat2 と PEX5 の相互作用に着目し、ヘム結合領域の機能解析を試みている。

Catalase, Peroxisome, Heme

講演番号：4C04a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ C 校舎 04 会場

アセロラのアスコルビン酸生合成酵素 GDP-D-マンノースピロホスホリラーゼ遺伝子のプロモーター解析

Promoter analysis of gene for GDP-D-mannose pyrophosphorylase, ascorbic acid biosynthesis enzyme in Acerola.

○近藤 隆之、藤川 愉吉、江坂 宗春（広島大院生物圏）
○Takayuki KONDO, Yukichi FUJIKAWA, Muneharu ESAKA (Hiroshima Univ.)

【目的】ビタミン C として知られているアスコルビン酸(AsA)は、その強い還元力により活性酸素種を無毒化する抗酸化剤として機能するなど、植物にとって必要不可欠な物質である。植物において AsA は D-glucose を初発物質としたマンノース経路により主に生合成されると考えられている。熱帯植物であるアセロラは、その果実に AsA を非常に豊富に含んでいる。これまで当研究室では、アセロラ果実における AsA 大量集積についてマンノース経路の AsA 生合成酵素の遺伝子発現に着目し研究を行ってきた。その結果、シロイヌナズナに比べアセロラにおいて AsA 生合成酵素の高い mRNA 発現が確認されたことから、転写レベルで AsA 集積が制御されている可能性を明らかにした。また、マンノース-1-P から GDP-D-マンノースへの反応を触媒する酵素である GDP-D-マンノースピロホスホリラーゼ(GDP-D-mannose pyrophosphorylase,GMP)の転写開始点から上流 1200 bp までの塩基配列を明らかにしている。そこで本研究では、アセロラにおけるアスコルビン酸生合成酵素の高発現機構を転写レベルで明らかにすることを目的として、アセロラ GMP 遺伝子のプロモーター解析を行った。

【方法・結果】本研究では、アセロラ GMP 遺伝子の転写開始点から上流 1200 bp に着目して、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子としたプロモーターアッセイを行った。まず、アセロラ GMP 遺伝子の上流域 1200 bp にルシフェラーゼ遺伝子を結合したベクターを作製した。そして、作製したベクターをシロイヌナズナ葉より単離したプロトプラストにポリエチレングリコール・カルシウム法により導入し、プロトプラスト内のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、アセロラ GMP 遺伝子では、シロイヌナズナに比べ高いルシフェラーゼ活性が検出された。次に、アセロラ GMP 遺伝子の転写活性化シス因子の存在を検討するため、上流域 1200 bp についてデリーション解析を行った。その結果、アセロラ GMP 遺伝子の転写開始点から上流 1100 bp から 1080 bp にアセロラ GMP 遺伝子の高発現に必要なシス因子が存在していることが示唆された。現在、この領域に着目し、さらに詳細な解析を行っている。

ascorbic acid, Acerola, gene expression

講演番号：4C04a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ C 校舎 04 会場

NPP1 は高温・高 CO_2 環境下における成長およびデンプン蓄積を負に制御する
Function analysis of NPP1 in rice seedlings.Starch accumulation and growth under High-temperature and High-CO_2 condition.
○金古 堅太郎[1]、猪俣 拓也[2]、増井 貴広[2]、伊藤 紀美子[2]、ハビア ポズエタ-ロメロ[3]、三ツ井 敏明[1,2]（[1]新潟大農・応生化、[2]新潟大院・自然科学、[3]バイオ研・CSIC&UPNA）
○Kentaro Kaneko[1], Takuya Inomata[2], Takahiro Masui[2], Kimiko Itoh[2], Pozueta-Romero Javier[3], Toshiaki Mitsui[1,2] ([1]Dep. Applied Biol. Chem. Niigata Univ., [2]Grad. Sch. Sci. & Tech. Niigata Univ., [3]Inst.Agrobiotech. CSIC&UPNA)

Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (NPP)は動植物に普遍的に存在する酵素である。動物 NPP については解析が進んでいるが、一方、植物 NPP の生理機能は殆ど明らかにされていない。イネ NPP は 6 種の遺伝子が同定されている。その中で NPP1 はデンプン合成の基質となる ADP-グルコースに対する加水分解活性を有していた。我々は NPP1 の生理機能を明らかにするために、*npp1* 遺伝子欠損体の形質を調査した。*npp1* シュートにおける ADP-グルコース加水分解活性は野生型（WT）と比較して減少していたことから、イネにおける ADP-グルコース加水分解活性の大部分は NPP1 に由来するものと考えられた。*npp1* 芽生えを 160 Pa CO_2、28℃/23℃ で育てたところ、WT に比べて成長およびデンプン促進されることが見出された。さらに、高温条件（33℃/28℃）下においても *npp1* 芽生えの成長およびデンプン蓄積は高まることが分かった。これらの結果から、NPP1 は高温・高 CO2 環境下における植物成長およびデンプン蓄積の負の制御因子であることが示唆された。

Starch, high temperature and high CO_2

講演番号：4C04a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ C 校舎 04 会場

シロイヌナズナシグナルペプチドペプチダーゼ（AtSPP）の基質探索の為のリポーターアッセイ系の構築

Construction of reporter assay system for detecting substrates of Arabidopsis signal peptide peptidase

○星 雅子[1]、前田 達哉[2]、石丸 喜朗[1]、阿部 啓子[1,3]、朝倉 富子[1]（[1]東大院農生科・応生化、[2]東京大学 分子細胞生物学研究所、[3]神奈川科学技術アカデミー）
○masako HOSHI[1], Tatsuya MAEDA[2], yoshiro ISHIMARU[1], keiko ABE[1,3], tomiko ASAKURA[1]
([1]Tokyo Univ., [2]Tokyo Univ., Institute of Molecular and Cellular Bioscience, [3]KAST)

[目的] シグナルペプチドペプチダーゼ（SPP）は ER 膜内に存在する複数回膜貫通型のアスパラギンプロテアーゼであり、主にシグナルペプチダーゼで切られた後のシグナルペプチドを切断する。今までに報告されている SPP の基質としては MHCclass I 分子、hepatitis C virus polyprotein などがあり、SPP に切断され切り出されたペプチドが生物活性を有することが報告されている。我々は植物内に初めて SPP を見出し、昨年本大会において、膜内プロテアーゼとして活性を有することをプレプロラクチンの合成ペプチドを基質として *in vitro assay* により示した。しかし、AtSPP の生理機能は不明であり、機能解析を行う為には、基質の探索を行うことが最重要課題だと考える。そこで今回基質の探索を行う為のツールとして酵母内リポーターアッセイ系の構築を試みた。
[方法]出芽酵母 AH109 株の SPP ノックアウト株を作製し、発現ベクターとして p414ADH、p414GPD、p415ADH、p415GPD、p424GPD を用い、基質、酵素の遺伝子を導入プラスミドとして同時に発現させた。酵素が発現すると酵母内で同時に導入した基質の切断が行われ、基質の N 末端に連結された転写因子 GAL4 が放出されて核に移行し、レポーター遺伝子が発現するスキームを構築した。まず、p415GPD(LEU2)ベクターに GAL4 とその C 末端に humanSPP の基質である human CMV glycoproteinUL40(gpUL40)のシグナル配列あるいはプレプロラクチンシグナル配列を挿入したプラスミドを、もう一方は p414GPD(TRP1) にシロイヌナズナの SPP（AtSPP）あるいは humanSPP を挿入したプラスミドを構築し２つのプラスミドを同時形質転換を行った。選択培地には SD－LW と X-α-Gal を含む SD-LWH を用いて栄養要求性選択と青白コロニー選択によりレポーター遺伝子（ヒスチジン合成、α―Gal 活性）の発現のアッセイを行った。
[結果] ベクターのプロモーターの強さやコピー数の組合わせを gpUL40 のシグナル配列を基質にしていくつか試したところ、基質の発現量が多いと膜にアンカーされきれず、酵素を導入していないコントロールの株でも X-α-Gal を含む培地で青いコロニーが生じた。基質側を比較的弱い Alcohol dehydrogenase(ADH)プロモーターを用いることで基質部分が適度にアンカーされることがわかった。次に gpUL40 のシグナル配列とプレプロラクチンシグナル配列それぞれと同時に AtSPP あるいは humanSPP を導入したところ、p414GPD を組み合わせることで酵素側のベクターには強いプロモーターを用いた場合に最もよくリポーター遺伝子のアッセイを行うことができることがわかった。

signal peptide peptidase, Arabidopsis, reporter assay

講演番号：4C04a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ C 校舎 04 会場

シロイヌナズナのセリン生合成を担うリン酸化経路とその制御

Molecular basis of regulatory mechanism of phosphorylation pathway for L-serine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*

○岡村 英治、平井 優美（理研 CSRS）
○Eiji OKAMURA, Masami Yokota Hirai (RIKEN CSRS)

セリンは植物において、タンパク質の構成アミノ酸として重要であるほか、リン脂質の一種であるホスファチジルセリンや核酸の生合成において重要である。また、システインやメチオニンなどの硫黄代謝にかかわるアミノ酸、さらには植物ホルモンオーキシンやインドールアルカロイドの前駆アミノ酸であるトリプトファンの生合成に関与する重要なアミノ酸である。従って、従ってセリン生合成とその制御は細胞プロセスにおいて極めて重要であると言える。

植物では、セリン生合成経路として、光呼吸に由来する 2 分子のグリシンを前駆体とするグリコール酸経路と、カルビン回路や解糖系に由来する 3-ホスホグリセリン酸を前駆体とするリン酸化経路が知られている。このうち、リン酸化経路は植物のみならずバクテリアや動物にも広く存在しており、その制御は、鍵酵素である 3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ（PGDH）の活性制御を介した負のフィードバック制御である。バクテリアでは PGDH の C 末端上に見出される ACT （Aspartate kinase-Chorismate mutase-TyrA）ドメインと呼ばれる領域に L-セリンが結合して酵素の立体構造が変化して、PGDH の酵素活性がアロステリックな活性制御を受ける。一方、ヒトやラットなどの動物では *PGDH* 遺伝子が L-セリンによって転写制御される。一方、植物では PGDH の制御機構、さらにはリン酸化経路の制御機構も不明であった。そこで本研究では、シロイヌナズナにおけるリン酸化経路の制御機構解明を目指している。

前大会において我々はシロイヌナズナに複数見出される PGDH アイソザイムの酵素活性がメチオニンやホモシステインなどの含硫アミノ酸によって上昇することを発表した。本大会では、シロイヌナズナ由来 PGDH アイソザイムのアミノ酸結合部位と推定される領域を、点変異導入によってアラニンに置換した変異酵素を作出して、それら変異酵素の含硫アミノ酸に対する感受性を解析した結果について発表する。また、これまでに報告されている PGDH ホモログの酵素学的性質をもとに、シロイヌナズナ由来 PGDH の塩による酵素活性への影響を検討した結果について発表する。さらに、動物型の PGDH 転写制御機構が存在するか否かを明らかにするため、Columbia-0 株に L-セリンを投与した生育条件化での各 PGDH アイソザイムの転写産物量をリアルタイム定量 PCR により解析した結果についても発表を行う。

Amino acid, *Arabidopsis thaliana*, Serine

講演番号：4C04a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ C 校舎 04 会場

CP12-GAPDH-PRK 複合体形成によるカルビン回路調節機構の解明

Regulation mechanism of the Calvin-cycle via the CP12-GAPDH-PRK complex formation

○松村 浩由[1]、清水 伸隆[2]、木津 奈都子[1]、吉田 将康[1]、荒武 将弘[1]、溝端 栄一[1]、田茂井 政宏[3]、和田野 晃[4]、重岡 成[3]、井上 豪[1] ([1]阪大院工、[2]高エネ機構物構研、[3]近畿大農、[4]阪府大院生環科)
○Hiroyoshi MATSUMURA[1], Nobutaka SHIMIZU[2], Natsuko KIZU[1], Masayasu YOSHIDA[1], Masahiro ARATAKE[1], Eiichi MIZOHATA[1], Masahiro TAMOI[3], Akira WADANO[4], Shigeru SHIGEOKA[3], Tsuyoshi INOUE[1] ([1]Osaka Univ., [2]KEK, [3]Kinki Univ., [4]Osaka Pref. Univ.)

【背景・目的】日中、太陽光は雲などの障害物に遮られるため、葉面に達する光量は大きく変動する。その光量変化に迅速に対応するため、固着生物である植物は幾つかの調節機構を有している。その機構の一つに、カルビン回路では、分子同士の集合／解離による調節が知られている。この機構では、暗期の葉緑体内で酸化力の上昇と NAD(H)の濃度上昇のシグナルを受け、天然変性蛋白質 CP12 がカルビン回路の酵素である glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）と phosphoribulokinase（PRK）に順次結合して CP12-GAPDH-PRK 複合体（約 500kDa）を形成し、それらの酵素を同時に不活性化させる。そして、還元力と NADP(H)の濃度上昇を伴う明期にはその複合体は解離し、それぞれの酵素は再び活性化する。このように本機構は、還元力の源である NADPH を消費する GAPDH と、高エネルギー化合物 ATP を消費する PRK を同時に調節することによってカルビン回路全体を調節していると考えられている。一昨年、我々は、この機構の初段階にあたる CP12-GAPDH 複合体の立体構造を世界に先駆けて報告し（Matsumura, et al, 2011）、それによって GAPDH の阻害機構が分子レベルで解明できた。しかし、PRK の阻害機構、さらにはその先の協調的調節機構は未だに不明である。そこで、本研究では、PRK 単体、ならびに CP12-GAPDH-PRK 複合体の構造研究に取り組んだ。
【結果・考察】ラン藻 *Synechococcus elongatus* 由来 PRK の結晶化、X線構造解析に取り組み、2.8Å分解能でのX線回折強度データを収集し、位相決定に成功した。しかし、結晶中の分子パッキングから二量体 PRK の候補が複数存在したため、二量体構造を決定することができなかった。そこでX線溶液散乱実験を行ったところ、この問題を解決でき、酸素発生型光合成生物の PRK で初めて全体構造を決定できた。PRK は全体的に広がった特徴的な構造を呈しており、これはアミノ酸の保存性などから、高等植物からラン藻に至る酸素発生型光合成生物で共通の構造であることが示唆された。つづいて、X線溶液散乱による CP12-GAPDH-PRK 複合体の構造解析を行った。サイズ排除クロマトグラフィーで精製した CP12-GAPDH-PRK 複合体を試料としてX線溶液散乱実験を行ったところ、単分散性を示す良好なX線散乱データが得られ、最終的に CP12-GAPDH-PRK 複合体の分子外形を決定することができた。そして、得られた分子外形に構造解析済みの CP12-GAPDH 複合体および PRK をフィッティングし、分子界面に存在するアミノ酸の変異体の挙動を精査することによって、CP12-GAPDH-PRK 複合体の全体モデルを構築した。本発表では、これらの結果を踏まえ、複合体形成によって如何にして GAPDH と PRK が協調的に調節されるかについて考察する。

Calvin cycle, regulation, CP12-GAPDH-PRK complex

講演番号：4C04a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ C 校舎 04 会場

低温ストレスに応答するイネ由来熱ショックタンパク質 Hsp70 のX線結晶構造解析

X-ray crystallographic analysis of rice Hsp70 induced by cold shock stress

○落合 秋人、菅井 寛、原田 計、田中 孝明、谷口 正之 (新潟大院自然研)
○Akihito Ochiai, Hiroshi Sugai, Kazuki Harada, Takaaki Tanaka, Masayuki Taniguchi (Grad. Sch. of Sci. Technol., Niigata Univ.)

【目的】熱ショックタンパク質(Heat Shock Protein, Hsp)は、種々のストレス条件下で細胞を保護する役割を担い、分子シャペロンとして機能する。その立体構造は、N 末端側の ATPase ドメインと C 末端側の基質結合ドメインから主に構成される。植物におけるストレス応答の研究は、ストレスに強い作物を育種するために広く行われている。イネ(*Oryza sativa*)においても寒冷条件下におけるストレス応答遺伝子の発現パターンなどが過去に報告されているが、イネをはじめとする植物由来 Hsp の分子レベルでの詳細な応答機構は不明である。これまでに我々は、イネ種子から分子サイズ約 72 kDa の Hsp70(OsHsp70)を見出した。OsHsp70 は、ヒトやウシなどの Hsp70 と高い相同性を示し、ウエスタンブロット解析により米糠部において最も高発現することを明らかにしている。本研究では、OsHsp70 の低温ストレス条件下における発現変動を解析するとともに、X線結晶構造解析によりその立体構造を明らかにした。
【方法と結果】催芽処理したイネ種子(日本晴)を蒸留水を浸したシャーレに置床し、暗黒条件下で 30℃、16 時間静置した。さらに、暗黒条件下で 5℃、0～5 日間低温処理を施し、OsHsp70 の発現変動をウエスタンブロット解析により検証した。その結果、 OsHsp70 は低温処理により発現誘導を受け、その蓄積量は 24 時間で最大になることがわかった。また、OsHsp70 の全長および N 末端側 ATPase ドメイン(OsHsp70N)の大腸菌を用いた大量発現系を構築した。発現ベクターおよび宿主には、それぞれ pET15b と *Escherichia coli* BL21(DE3)株を使用した。精製した組換えタンパク質を用いて結晶化を行ったところ、沈殿剤として PEG4000 を含む条件においてX線結晶構造解析に適した OsHsp70N の結晶を得ることができた。1.9 Å 分解能において決定した OsHsp70 の全体構造は、18 本のβ-ストランドと 15 本のα-ヘリックスから構成される馬蹄形であり、ADP 認識に関わるアミノ酸残基を含めて、立体構造既知のヒト、ウシ、酵母、および大腸菌由来の Hsp70 と高い類似性を有していた。また、これらの Hsp70 において保存性の低い領域はほぼ分子表面に位置しており、植物細胞に固有の特徴であることが示唆された。現在、OsHsp70 の C 末端基質結合ドメインを含む全体の立体構造解析を進めている。

heat shock protein, Oryza sativa, crystal structure

講演番号：4C04a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ C 校舎 04 会場

ジベレリン生合成・代謝酵素の X 線結晶構造解析
Crystal structure of gibberellin biosynthesis and metabolism enzyme
○竹原 清日[1]、三上 文三[2]、樫尾 徹[1]、松岡 信[1]、上口（田中） 美弥子[1] ([1]名大・生物機能開発利用研究センター、[2]京大院農・応用生命)
○ Sayaka TAKEHARA[1], Bunzo MIKAMI[2], Toru KASHIO[1], Makoto MATSUOKA[1], Miyako UEGUCHI-TANAKA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Kyoto Univ.)

【背景】植物ホルモンのひとつであるジベレリン（GA）は、草丈の伸長促進や発芽促進、花芽形成促進などさまざまな生理作用をもつ。 ジベレリン生合成経路の後半段階においては GA20-oxidase (GA20ox)および GA3-oxidase (GA3ox)が働き、GA3ox は 3 位炭素に水酸基をつけて活性型 GA を合成する。 一方、代謝経路では GA2-oxidase (GA2ox)が働いており、2 位炭素に水酸基をつけて不活性化させる。 これらは全く反対の働きをする酵素であるが、いずれも 2-オキソグルタル酸要求性酸化酵素（2ODDs）に属する。 そこで我々は、生合成および代謝酵素がどのように GA を認識しているのかを明らかにするため、構造が明らかとなっていないイネ 2ODDs の結晶化を試みた。 また、これら酵素の機能解析も合わせて行った。
【方法】GA2ox 及び GA3ox は大腸菌系で発現させ、反応(生成)物質である GA_4 と 2-オキソグルタル酸を加え、20℃で蒸気拡散法により結晶化を行なった。 また、Trp 蛍光、CD などにより性質を検討した。 酵素活性は、安定同位体の基質を用い GC-MS により測定を行った。
【結果】両酵素は GST タグを付加して発現させ、GA_4 を加えて精製する事で結晶化に成功した。GA2ox の結晶構造は分子置換法によって決定し、2.4 Å分解能までのデータを用いて精密化した。 全体構造はダイマー2 つが相互作用したテトラマーを形成しており、活性中心に GA_4 及び 2-オキソグルタル酸が結合し、さらにダイマー同士の間にも GA_4 が結合していた。 また、活性中心にある GA_4 の 3 位炭素の水酸基や 6 位炭素のカルボキシル基、ガンマラクトン環は酵素タンパク質と 5 つの水素結合を形成して GA_4 の位置を固定し、反応場所を明確にしている事が明らかとなった。 実際これらのアミノ酸を Ala に変えると活性は低下した。 一方、GA3ox は凝集しやすく安定性に欠けるため、リガンド等の添加などの検討を行い、結晶化の初期条件を探索中である。
本研究は、最先端・次世代研究開発支援プログラムにより助成された。

gibberellin biosynthesis, plant hormone, 2-oxoglutarate dependent dioxygenases

講演番号：4C04a17
講演日時、会場：3 月 30 日 11:54～ C 校舎 04 会場

ストリゴラクトン受容体 D14 の DELLA 相互作用に関わる構造基盤の解析
Structural basis of a strigolactone receptor D14 in the interaction with DELLA protein

○宮川 拓也[1]、薛 友林[1]、中村 英光[1]、侯 峰[1]、秦 慧民[1]、福井 康祐[1]、石 玄[1]、伊藤 瑛海[2]、伊藤 晋作[1]、PARK Seung-Hyun[1]、宮内 裕美子[1]、浅野 敦子[1]、戸塚 直哉[1]、上田 貴志[2]、浅見 忠男[1,3]、田之倉 優[1] ([1]東大院農生科、[2]東大院理、[3]JST・CREST)
○Takuya MIYAKAWA[1], You-Lin XUE[1], Hidemitsu NAKAMURA[1], Feng HOU[1], Hui-Min QIN[1], Kosuke FUKUI[1], Xuan SHI[1], Emi ITO[2], Shinsaku ITO[1], Seung-Hyun PARK[1], Yumiko MIYAUCHI[1], Atsuko ASANO[1], Naoya TOTSUKA[1], Takashi UEDA[2], Tadao ASAMI[1,3], Masaru TANOKURA[1] ([1]Grad. School Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Grad. School Sci., Univ. Tokyo, [3]JST, CREST)

ストリゴラクトン（SL）は、ラクトン構造を有するカロテノイド誘導体で、農業上重要な形質である枝分かれを抑制する植物ホルモンとして機能する。植物体における SL の受容とシグナル伝達に関して、α/β 加水分解酵素である DWARF14（D14）の重要性が指摘されていたが、D14 が SL の加水分解活性に依存して SL シグナル伝達に関わる F-box タンパク質と相互作用することが報告され、SL の受容体タンパク質として D14 が注目されている。一方、我々のグループでは、イネ由来の D14 がジベレリン（GA）シグナル伝達の抑制因子である DELLA タンパク質 SLR1 と SL 依存的に相互作用することを見出し、その相互作用に D14 の SL 加水分解活性が必須であることを明らかにした[1)]。このことは、SL による植物の枝分かれの制御が SLR1 を介した GA シグナル伝達とのクロストークにより行われている可能性を強く示唆しているが、D14 による SL 加水分解とそれに依存した SLR1 との相互作用の分子メカニズムはまだ十分に理解されていない。

種々の SL 合成アナログを用いた D14 の結晶構造解析の過程で、我々は D14 による SL 加水分解産物と考えられる 5-hydroxy-3-methylbutenolide（D-OH）との複合体構造を分解能 2.1 Å で決定した[1)]。この構造において、D-OH は D14 の触媒残基である His297 から離れた位置に結合し、主に Phe186, Trp205, Tyr209, Phe245 の芳香環に囲まれていた。また、Trp205 の側鎖インドールアミンが D-OH の加水分解により生じた 2 位の水酸基と水素結合を形成していた。D-OH の結合に伴う大きな構造変化は観察されなかったが、Phe245 の側鎖は D-OH に向かって約 1.3 Å 移動しており、Phe245 が位置するαヘリックスを中心として Cα 原子の位置に僅かなずれが生じていた。また、D-OH が D14 の活性ポケットの入口に栓をするように配置することで、D14 に新たな分子表面が形成された。この結晶構造に基づいて、D-OH の結合に関わる残基が D14 と SLR1 の SL 依存的な相互作用に寄与することを調べるために、各残基を Ala に置換した変異体を調製し、各変異体の SL 加水分解活性と SL 依存的な SLR1 との相互作用を評価した。その結果、SL の加水分解活性を保持した F245A 変異体は、SL 存在下においても SLR1 と相互作用できないことが示され、D14 による SL の加水分解に続く D-OH の結合が SLR1 との相互作用において重要である可能性が示唆された。

1）Nakaramura H., Xue Y.-L., Miyakawa T. et al. Nat. Commun. 4, 2613 (2013)

Strigolactone, X-ray crystallography, α/ß-hydrolase

講演番号：4C05a01
講演日時、会場：3 月 30 日 09:00～ C 校舎 05 会場

イネの免疫反応を誘導するエフェクタータンパク質 IPPT の同定と機能解析

Identification of IPPT as effector protein that causes the rice immune response

○柳生 暁輝[1]、近藤 真千子[2]、宮田 千加[1]、蔡 晃植[1,2]（[1]長浜バイオ大院バイオサイエンス、[2]長浜バイオ大バイオサイエンス）
○Katsuki Yagyu[1], Machiko Kondo[2], Chika Miyata[1], Fang-Sik Che[1,2]（[1]Grad. School of Biosci., Nagahama Inst. of Bio-Sci. and Tech., [2]Div. of Bio-Sci., Nagahama Inst. of Bio-Sci. and Tech.）

植物病原細菌 *Acidovorax avenae* N1141 菌株を非宿主であるイネに接種すると植物免疫反応である過敏感細胞死が誘導される。この様な過敏感細胞死誘導には、*A. avenae* N1141 菌株に存在する TypeIII 分泌装置（T3SS）によって植物細胞内に分泌されるエフェクタータンパク質が関与することが示唆されている。*A. avenae* N1141 菌株に存在するエフェクタータンパク質を同定するために、N1141 菌株のトランスポゾン挿入変異体を作製し、イネの過敏感細胞死誘導能を欠損した変異体を選抜した。約 6,200 株の変異体をスクリーニングしたところ、*IPPT* 遺伝子にトランスポゾンが挿入された変異体がイネの過敏感細胞死誘導能を失っていることが示された。そこで、相同組換え法を用いて *IPPT* 遺伝子欠損株（*NΔIPPT*）を作製し、イネ培養細胞に接種したところ、イネの過敏感細胞死が誘導されないことが明らかになった。さらに、イネプロトプラストで一過的に IPPT を発現させたところ、この遺伝子が発現した細胞において特異的な細胞死が誘導されることが示された。また、イネの過敏感細胞死誘導時に発現が増加し、過敏感細胞死を正に制御する *OsNAC4* 遺伝子の発現について調べたところ、IPPT を発現させたイネ細胞において *OsNAC4* の発現が誘導されていることが明らかになった。次に、IPPT はイネの特異的なエフェクターとして機能するかどうかを調べるために、非宿主であるタバコ（*Nicotiana benthamiana*）に *NΔIPPT* を接種し、過敏感細胞死の誘導について調べた。その結果、*NΔIPPT* は N1141 野性株と同様にタバコの過敏感細胞死を誘導したことから、IPPT はイネにおいてのみエフェクターとして機能することが明らかとなった。これまでの研究で、植物病原細菌のエフェクターは宿主に対して病徴因子として機能する場合があることが示されている。そこで、*NΔIPPT* を宿主であるシコクビエに接種したところ、*NΔIPPT* 株は宿主であるシコクビエに対しての病徴発現能力も失っていることが明らかになった。以上のことから、IPPT はイネの細胞内で認識されイネの免疫反応を誘導する特異的なエフェクター分子であることが明らかになった。

Cell death, Effector, Plant

講演番号：4C05a02
講演日時、会場：3 月 30 日 09:11～ C 校舎 05 会場

イネの PAS ドメインを有する MAP3K の機能について

Functions of the rice MAP3K having PAS domain.

○高岡 翔平[1]、深山 浩[1]、松岡 大介[1]、南森 隆司[1,2]([1]神戸大院・農、[2]神戸大・遺伝子実験センター)
○Shohei TAKAOKA[1], Hiroshi FUKAYAMA[1], Daisuke MATSUOKA[1], Takashi NANMORI[1,2]
([1]Grad. Sch. Agr. Sci., Kobe Univ, [2]Research Center for Environmental Genomics, Kobe Univ)

AtMAP3Kδ4 は、N 末端側にタンパク質の相互作用の場として働くと考えられている PAS ドメインを持つ MAPKKK の一つである。本研究室の成果より AtMAP3Kδ4 の全長遺伝子(*AtMAP3Kδ4 FL*)を過剰発現させたシロイヌナズナでは成長が促進され、植物体が大型化し種子重量も増加することや、キナーゼドメイン不活性型の遺伝子(*AtMAP3Kδ4 KN*)を過剰発現したシロイヌナズナでは枝分かれの増加し、種子数も増加することがわかっている。以上の結果より、AtMAP3Kδ4 は成長制御に関連した遺伝子であるといえる(Sasayama *et al.*, 2011 Plant Biotechnol. 28:463-470)。

本研究では単子葉植物のモデル生物であるイネを材料とし、*AtMAP3Kδ4* の過剰発現体を作製して当遺伝子が単子葉植物においても有用な形質をもたらすのかを明らかにすることを目的とした。*AtMAP3Kδ4* の FL と KN をそれぞれアグロバクテリウム法によりイネに導入した。再分化当代のイネから RNA を抽出し cDNA を作製した後、RT-PCR により導入した遺伝子が過剰発現されていることを確認した。得られた過剰発現系統を各 2 系統ずつ播種し、日本晴と成長を比較した。その結果、KN では 1 個体当たりの総種子数が増加することがわかった。

イネゲノムから *AtMAP3Kδ4* 遺伝子のホモログを探索し、そのノックアウトラインを用いてさらなる解析を行った。キナーゼドメインの配列を元に近隣結合法で作成された系統樹より、*Os11g45280* と *Os12g37570* の 2 種類がイネゲノムに存在することがわかった。*Os11g45280* のノックアウトラインを農業生物資源研究所イネゲノムリソースセンターより分譲を受け、その表現型を日本晴と比較した。分譲を受けた *Tos17* の挿入による *Os11g45280* 遺伝子破壊系統の種子を播種し、各個体からゲノム DNA を抽出した。ゲノム PCR を行って破壊された遺伝子に関してホモ接合であるイネを選抜した。同イネを播種し、3 週齢まで育てたホモ接合イネから RNA を抽出し、cDNA を作製して RT-PCR を行った。RT-PCR の結果、*Os11g45280* 遺伝子が発現していないノックアウト系統を選抜した。選抜されたノックアウトラインを 3 系統用いて日本晴と比較した。その結果、ノックアウトラインは日本晴と比較し草丈が低く、分げつ数も減少していることがわかった。さらに、3 系統中 2 系統で種子数が減少していることがわかった。

以上の結果より、*AtMAP3Kδ4* 遺伝子は単子葉植物においても成長制御に関わる遺伝子であること、ならびに *Os11g45280* 遺伝子も成長制御に関連した遺伝子であることが示唆された。

MAPK signaling pathway, transgenic rice, plant growth control

講演番号：4C05a03
講演日時、会場：3 月 30 日 09:22～ C 校舎 05 会場

高等植物細胞周期停止因子の分解にオートファジーは関与するのか？
Does autophagy contribute degradation of inhibitors of CDK in higher plant?
○関 史恵、大熊 康仁、高橋 伸明、豊増 知伸、三橋 渉 (山形大学農学部)
○FUMIE SEKI, YASUHITO OKUMA, NOBUAKI TAKAHASHI, TOMONOBU TOYOMASU, WATARU MITSUHASHI (Yamagata Univ.)

【目的】高等生物の細胞周期は細胞周期エンジンである Cyclin-dependent kinase (CDK)-Cyclin 複合体によって制御されており、その活性は様々な因子によって調節されている。そうした因子の一つに、CDK-Cyclin 複合体と結合し CDK 活性を阻害する CDK 阻害タンパク質群(Inhibitors of CDK, ICKs)がある。高等植物では２つの ICK ファミリーの存在が知られており、これらのうち Kip-related proteins (KRPs)ファミリーが主要に働いていると考えられている。 モデル植物シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*, At)では同ファミリーに 7 分子種(AtKRP1~7)が含まれている。ICK が分解されることによって細胞周期を進行させることができることから、その分解機構には興味が持たれる。ヒト由来 KRP ホモログである p21 や p27 はプロテアソーム経路で分解されることがよく知られており、シロイヌナズナにおいても AtKRP1,2,6,7 の少なくとも 4 分子種がプロテアソームで分解される。このように KRP や KRP ホモログは界を超えてプロテアソーム経路で分解されるものと考えられている。しかし、生体内にはファゴソームを介した分解系も存在しており、演者らは KRP ホモログがプロテアソーム経路のみで分解されているのか、オートファジーの関与はないのか、という疑問を持ち、それぞれの経路に対する阻害剤を用いて検討することにした。
【方法・結果】対象にはニンジン植物(*Daucus carota* L.cv.US-Harumaki- gosun)由来の KRP ホモログ、DcICK1、を用いた。細胞分裂が活発に行なわれている継代培養 10 日目の培養細胞にオートファゴソーム形成阻害剤 3-methy-adenine(3-MA)又はプロテアソーム阻害剤 N-(benzyloxycarbonyl) leucinylleucinylleucinal(MG-132)を添加して培養を行った。その後、ウエスタンブロット法により DcICK1 のタンパク質レベルを検討した。その結果、培養後 12 時間目では対照区と比べ、3-MA および MG-132 添加区のいずれの区においても若干ではあるが存在量が減少する傾向が見られた。また、72 時間培養区では、3-MA 添加区では存在量がさらに減少したのに対し、MG-132 添加区では大きな変化は見られなかった。このことから、DcICK1 の分解にはファゴソーム経路は直接的ではないものの、何らかの関与を示していることが示唆された。次に、この可能性を更に明らかにするため、まず、DcICK1 とファゴソーム関連因子とが直接的に相互作用しうるのかを調べることとし、酵母 Two hybrid 法を用いて DcICK1 と相互作用を示すファゴソーム関連因子の探索を行った。その結果、因子が一つ釣り上げられた。発表ではこの因子と DcICK1 の結合部位等についても言及し、DcICK1 分解におけるファゴソーム経路の関与について考察する。

Inhibitor of CDK, Cell cycle, Autophagy

講演番号：4C05a04
講演日時、会場：3 月 30 日 09:33～ C 校舎 05 会場

シロイヌナズナ T87 培養細胞の葉緑体分化に際した転写制御の解析
Transcriptional regulation during chloroplast differentiation in *A. thaliana* T87 cultured cells
○木山 貴史、江波 和彦、上原 浩一、華岡 光正（千葉大院園芸）
○Takashi KIYAMA, Kazuhiko ENAMI, Koichi UEHARA, Mitsumasa HANAOKA (Chiba Univ.)

【背景と目的】高等植物の色素体は、光合成組織では葉緑体、貯蔵組織ではアミロプラストやクロモプラストなど、構造的・機能的に多様に分化することが知られており、それぞれの色素体に特徴的な代謝経路を分化に応じて ON/OFF するための遺伝子発現調節が特に重要な役割を果たす。成長初期の植物では、光に依存した葉の発達に伴って、細胞中の色素体は未分化な原色素体から葉緑体へと分化するが、この過程においては、核ゲノムと葉緑体ゲノムに分かれてコードされる光合成などに関わる遺伝子群の協調的な発現が必須であることが知られている。これまでの生化学的・遺伝学的な解析により、葉緑体分化における遺伝子発現調節に関与する様々な因子が報告されているが、それらによる調節メカニズムの全体像の理解には至っていない。本研究では、シロイヌナズナの葉緑体 RNA ポリメラーゼの調節サブユニットとして転写制御に関与する 6 種のシグマ因子のうち、特に葉緑体分化に深く関わる SIG2 と SIG6 に着目し、これらの役割分担や各々の特異的な機能の解明を目指した。
【方法と結果】葉緑体分化の過程を詳細に調べるため、均一なサンプルを得やすく、経時的な回収が容易なシロイヌナズナの葉組織に由来する T87 培養細胞を研究材料として用いた。本研究ではまず、T87 細胞を用いた葉緑体分化誘導系の構築を行った。通常は連続光条件で培養する T87 細胞を 4 週間暗条件下で培養したところ、クロロフィル含量が段階的に減少し、原色素体への脱分化が起こったと考えられた。さらに 4 週間の暗順応により白化した細胞に白色光を再照射した結果、クロロフィルの再蓄積が観察された。同時に、この光を再照射した細胞を経時的に回収し、ノザン解析により様々な遺伝子の発現量の変化を調べた結果、核遺伝子である *SIG2* と *SIG6* に加えて、葉緑体ゲノムコードの光合成遺伝子である *psbD* や *rbcL* の発現が活性化することを見いだした。以上の結果は、T87 細胞を用いた分化誘導系の有効性を示していると考えられた。また、*in vivo* における DNA-タンパク質間の結合レベルを調べることのできるクロマチン免疫沈降（ChIP）法を用いて、葉緑体分化の後期で機能することが予想されるシグマ因子 SIG1 の、T87 細胞における標的プロモーターへの結合パターンを調べたところ、緑葉組織を用いて行った従来の結果と相関しており、T87 細胞を用いた ChIP 解析が有効であることが示唆された。これらを踏まえ、C 末端に FLAG 配列を付加した SIG2 と SIG6 を発現する形質転換株を作出して同様に ChIP 解析を進めており、SIG2・SIG6 の発現パターンとそれぞれのターゲット遺伝子への結合パターン変化の結果から、両シグマ因子の葉緑体分化における機能分担について議論する。

Chloroplast differentiation, Transcriptional regulation, Sigma factor

講演番号：4C05a05
講演日時、会場：3 月 30 日 09:44～ C 校舎 05 会場

気孔閉口シグナル伝達因子としてのカルボニル化合物

Involvement of reactive carbonyl species in abscisic acid signaling in guard cells

○村田 芳行[1]、Islam Md. Moshiul[1]、松島 大貴[1]、叶 文秀[1]、宗正 晋太郎[1]、中村 宜督[1]、真野 純一[2]([1]岡大院環境生命、[2]山口大院農)
○Yoshiyuki Murata[1], Md. Moshiul Islam[1], Daiki Matsushima[1], Wenxiu Ye[1], Shintaro Munemasa[1], Yoshimasa Nakamura[1], Jun'ichi Mano[2] ([1]Okayama Univ., [2]Yamaguchi Univ.)

一対の孔辺細胞が形成する気孔は、二酸化炭素の取り込みと蒸散、及び病原菌侵入に対する防御応答を厳密に制御している。乾燥ストレス下の植物において、植物ホルモンの一つであるアブシジン酸（ABA）は気孔閉口を誘導し、蒸散による水損失を抑制する。この ABA 誘導気孔閉口には、活性酸素種（ROS）がセカンドメッセンジャーとして関与していることが明らかとなっている。ABA 誘導気孔閉口における ROS の重要性は広く認識されているにも関わらず、ROS の蓄積を下流のシグナルへ変換するメカニズムは不明である。最近、活性カルボニル（RCS）が ROS 産生の下流で生成し、シグナル分子として機能していることが報告された。本発表では、孔辺細胞における ROS による ABA 信号伝達の制御と RCS の ABA 信号伝達への関与について報告する。

abscisic acid, reactive carbonyl species, stomatal closure

講演番号：4C05a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ C 校舎 05 会場

AM 菌共生シグナルによる共生関連遺伝子発現誘導における植物ホルモンの関与

The involvement of phytohormones in the induction of symbiosis-related genes by AM fungal symbiotic signals

○秋山 康紀、河原 千春（阪府大院・生命環境）
○Kohki Akiyama, Chiharu Kawahara (Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【目的】アーバスキュラー菌根菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, AM 菌) と植物との共生は 80%以上もの陸上植物に見られ，農業や自然生態系での植物の生育に大きな役割を果たしている。AM 菌と植物はそれぞれが生産するシグナル物質により互いの存在を認識する。植物の根から分泌されるストリゴラクトン (strigolactone, SL) は AM 菌の宿主認識反応である菌糸分岐を誘導する。一方，AM 菌が生産するリポキトオリゴ糖 (mycorrhizal lipochitooligosaccharide, Myc-LCO) は，根粒菌の共生シグナルである Nod factor（NF）とよく似た構造を持ち，common sym pathway (CSP) 依存的に菌根共生誘導性遺伝子の発現や菌根形成促進などの共生応答を誘導する。最近，AM 菌の細胞壁成分の一つであるキチンオリゴ糖も，CSP 依存的に共生応答を誘導することや，合成 SL である GR24 処理により菌体からの分泌が顕著に増加することが報告されている。本研究では，AM 菌由来の共生シグナルが植物の SL 生合成に及ぼす影響を精査するために，Myc-LCO およびキチンオリゴ糖についてミヤコグサ根における菌根共生誘導性遺伝子と SL 関連遺伝子の発現誘導活性を調べた。また，これらの発現誘導におけるオーキシンやサイトカイニンなど他の植物ホルモンの影響についても検討した。
【方法・結果】Myc-LCO [LCO-IV(C16:0), LCO-IV (C18:1Δ9*Z*)] およびキチンオリゴ糖 (4,7,8 糖)で処理したミヤコグサの根における菌根共生誘導性遺伝子 (*SbtS, SbtM1*, *NSP2*) と SL 関連遺伝子ホモログ (*D27*, *CCD7, CCD8, MAX1, D3, D14*) の発現を qRT-PCR により調べた。その結果，Myc-LCO とキチンオリゴ糖は菌根共生誘導性遺伝子だけでなく SL 生合成遺伝子 *D27*, *CCD8*, *MAX1* も有意に発現誘導することが分かった。Myc-LCO による菌根共生誘導性遺伝子と SL 生合成遺伝子の発現誘導は NFR 変異体 (*nfr1*, *nfr5*, *nfr1/nfr5*) では全て大きく低下したが，キチンオリゴ糖では野生型と同様の応答が見られた。次に，IAA, ゼアチンリボシド（ZR），ジャスモン酸メチル（MeJA），5-デオキシストリゴール（5DS）を処理したミヤコグサ根における菌根共生誘導性遺伝子と SL 生合成遺伝子の発現について調べた。IAA および 5DS 処理ではすべての遺伝子で発現量にほとんど違いはなく，また，これら植物ホルモンの存在下で Myc-LCO 処理した際にも発現応答は維持された。MeJA 処理ではすべての遺伝子の発現量が低下した。また，MeJA 存在下では Myc-LCO による *SbtM1* の誘導が見られなくなった。ZR 処理では SL 生合成遺伝子発現の顕著な低下が見られ，さらに，ZR 存在下ではすべての遺伝子において Myc-LCO 処理による発現誘導が全く見られなくなった。

arbuscular mycorrhizal fungi, lipochitooligosaccharide, strigolactone

講演番号：4C05a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ C 校舎 05 会場

イネは EF-Tu タンパク質の N 末端ペプチドである elf18 とは異なる領域を認識して免疫反応を誘導する。

Two distinct EF-Tu epitopes induce immune responses in rice and *Arabidopsis*

○稲垣 宏明、古川 岳人、高井 亮太、平井 洋行、蔡 晃植（長浜バイオ大院バイオ）
○Hiroaki Inagaki, Takehito Furukawa, Ryota Takai, Hiroyuki Hirai, Fang-Sik Che (Nagahama Inst. of Bio-Sci. and Tech.)

植物は、病原菌の持つ Pathogen-associated molecular pattern（PAMP）を認識して PAMP-triggered immunity（PTI）という免疫反応を誘導する。我々は、これまでにイネに対して非病原性の *Acidovorax avenae* N1141 株の鞭毛構成タンパク質フラジェリンがイネの PTI を特異的に誘導し、イネに対して PAMP として機能することを報告した。一方、フラジェリン欠損 N1141 株においても一部の PTI 誘導能が保持されることから、この菌株にはフラジェリン以外の PAMP も存在すると考えられた。そこで、フラジェリン欠損 *A. avenae* N1141 菌株からイネに対して PTI 誘導能を有する新たな PAMP の精製と同定を試みた。フラジェリン欠損 N1141 菌株の菌体破砕物から PAMP 活性物質を陰イオン交換クロマトグラフィーと二次元電気泳動で精製し、質量分析計を用いた構造解析を行ったところ、Elongation factor-Tu（EF-Tu）が PTI 誘導活性画分に存在することが示された。そこで、イネが *A. avenae* N1141 菌株由来の EF-Tu（EF-Tu-a）を PAMP として認識するかどうかを大腸菌で発現させた EF-Tu-a を用いて調べたところ、イネの PTI を誘導することが明らかとなり、EF-Tu がイネに対して PAMP として機能することが示された。そこで、シロイヌナズナにおける EF-Tu の認識領域である N 末端ペプチド elf18 を EF-Tu-a のアミノ酸配列をもとに作製し、シロイヌナズナおよびイネ培養細胞にそれぞれ処理したところ、シロイヌナズナ培養細胞では PTI が誘導されたが、イネでは誘導されなかった。そこで、イネにおける EF-Tu-a の認識領域を明らかにするために、EF-Tu-a の N 末端、中央、C 末端領域の 200 アミノ酸に相当する発現ペプチドを作製し、イネ培養細胞における PTI 誘導能を調べた。その結果、イネ培養細胞においては中央領域の 200 アミノ酸配列に相当するペプチドが PTI を誘導することが示された。さらに、イネによる EF-Tu-a の認識に必要な最小単位を明らかにするために、中央領域の様々な部分で構成されるペプチドを作製し、イネ培養細胞における PTI 誘導能を調べたところ、イネは EFa50 と名付けた Lys176 から Gly225 で構成される中央領域 50 アミノ酸からなるペプチドを認識することが示された。以上のことから、イネはシロイヌナズナとは異なり、EF-Tu の中央領域 EFa50 を認識し PTI を誘導することが明らかになった。

Plant, Immunity, PAMP

講演番号：4C05a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ C 校舎 05 会場

高等植物・エンドファイト共培養液中の生理活性因子に関する研究

Studies on plant growth promoting factors produced during co-culture of higher plants and endophytic microorganisms

○西垣 舞穂、小川 拓水、岡澤 敦司、太田 大策（大阪府大院・生命環境）
○Maiho NISHIGAKI, Takumi OGAWA, Atsushi OKAZAWA, Daisaku OHTA (Osaka Pref. Univ.)

【目的】植物は病原微生物の侵入に対して多様な抵抗性反応を示す．共生微生物であるエンドファイト感染初期においても防御応答が惹起されると考えられるが，宿主植物の防御応答制御についての明確な説明はない．植物の化学防御物質であるファイトアレキシンの生合成誘導を指標として，宿主植物とエンドファイトの共生関係成立過程における抵抗性反応制御の解明を目的とした．
【方法】シロイヌナズナは病原体感染に応答してファイトアレキシンであるカマレキシン生合成を誘導する．これまでに，カマレキシン生合成を正に制御する転写調節因子 *ANAC042* 遺伝子を同定し，*ANAC042* プロモーター制御下で *GUS* レポーター遺伝子を発現するシロイヌナズナ系統（*ANAC042pro::GUS*）を樹立した．*Sebacina* 科エンドファイト接種は，*ANAC042* 発現を強く誘導するので，*ANAC042* 発現誘導を指標としてエンドファイト感染によるシロイヌナズナの抵抗性反応を解析する．
【結果】*Sebacina* 科エンドファイトと *ANAC042pro::GUS* 植物を液体培地で共培養したところ，根端のカマレキシン生合成部位での GUS 発現誘導とともに根系発達促進が認められた．共培養後の液体培地をフィルター濾過後，*ANAC042pro::GUS* 植物に添加したところ，GUS 発現誘導と根系発達が促進されたことから，共培養液中にはファイトアレキシン生合成誘導，及び根系発達促進に関わる生理活性因子が存在することが明らかとなった．根系発達促進にエンドファイト由来オーキシンが関与する可能性を検証するため LC-iontrap TOF/MS による共培養液分析を行ったところ，共培養液中に IAA は検出されなかった．一方，共培養液処理によりオーキシン生合成遺伝子である *CYP79B2* 発現誘導が認められたことから，植物体内でのオーキシン生合成が誘導されていることが示唆された．現在，GUS 発現を指標として共培養液中の根系発達促進物質の単離を進めている．

endophyte, phytoalexin, plant microbe interactions

講演番号：4C05a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ C 校舎 05 会場

植物免疫活性化ペプチド PIP-1 の分解と防御応答誘導の関係
Relationship between enzymatic degradation and plant defense activation of PIP-1
○金 容賢、宮下 正弘、宮川 恒（京都大院農）
○Yonghyun Kim, Masahiro Miyashita, Hisashi Miyagawa (Kyoto Univ.)

【目的】 PIP-1（YGIHTH-NH_2）はランダムライブラリより見出された植物免疫を活性化するペプチドである。このペプチドはタバコ細胞に対して過酸化水素の発生、防御関連遺伝子の発現、ファイトアレキシンの生成などの様々な防御応答を誘導する。しかしながら、PIP-1 によるファイトアレキシン生成や過敏感細胞死などの後期防御応答の誘導には、過酸化水素発生などの初期応答に比べて高濃度の PIP-1 処理を必要とする。この違いには、植物細胞による PIP-1 の分解が大きく影響していることが示唆されている。そこで、本研究においては、PIP-1 の分解と防御応答の関係について明らかにするため、分解耐性をもつ PIP-1 類縁体を合成し、その防御応答について PIP-1 と比較した。

【方法】 PIP-1 およびその分解耐性類縁体である MePIP-1（YGIHTmeA-NH_2）を Fmoc 固相法により合成した。防御応答の測定にはタバコ懸濁細胞を用い、ファイトアレキシン（カプシジオール）の生成は GC/MS により測定した。MAP キナーゼ（SIPK および WIPK）の活性化については、それらの遺伝子の発現を RT-PCR 法により、またキナーゼ活性は[^{32}P]-ATP を用いたゲル内キナーゼアッセイ法により評価した。

【結果】 PIP-1 および MePIP-1 によるファイトアレキシン生成を調べたところ、10 μM の PIP-1 処理によってはカプシジオールの生成はほとんど誘導されなかったのに対して、同じ 10 μM の MePIP-1 処理では顕著な生成が見られた。次に、MePIP-1 を処理してから 3 時間後に細胞を洗浄して MePIP-1 を除去したところ、カプシジオールの生成は認められなかった。一方、6 時間後に洗浄した場合は生成が見られたことから、PIP-1 によるカプシジオールの生成には 3-6 時間程度の持続的な刺激が必要であることが明らかとなった。さらに、防御応答のシグナル伝達に関与していることが知られている MAP キナーゼ（SIPK および WIPK）の活性化に対する影響を調べた。その結果、PIP-1 と MePIP-1 のいずれの処理によっても WIPK の遺伝子発現が誘導され、両者の間で変化は見られなかった。一方、キナーゼ活性を指標とした場合、いずれも SIPK の活性化を誘導したが、PIP-1を処理した場合はその活性が 1 時間後には低下するのに対して、MePIP-1 を処理した場合は SIPK の活性が 9 時間後まで持続して高いことが確認された。このことから、PIP-1 によるファイトアレキシンの生成には、持続的な刺激による長時間の SIPK の活性化が必要であることが示唆された。

Degradation, MAP kinase, Phytoalexin

講演番号：4C05a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ C 校舎 05 会場

植物免疫活性化ペプチド PIP-1 の環状化による分解耐性の向上

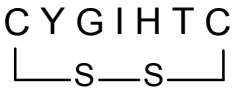
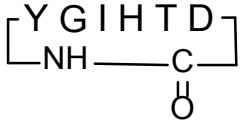
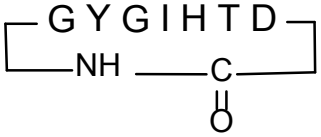
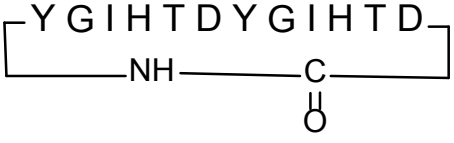
Improvement of enzymatic degradation-resistance of plant immunity activating peptide(PIP-1) by cyclization

○眞重 るり、安西 友里恵、宮下 正弘、宮川 恒（京都大院農）
○Ruri Mashige, Yurie Anzai, Masahiro Miyashita, Hisashi Miyagawa (Kyoto Univ.)

【目的】植物は病原菌の感染を認識し、過酸化水素の生成、PR タンパク質やファイトアレキシンの合成など様々な防御応答を示す。このような防御応答は、病原菌由来の様々な物質(エリシター)により引き起こされる。我々はこれまでに、合成ランダムライブラリより植物に防御応答を引き起こすペプチド PIP-1(YGIHTH-NH_2)を発見している。しかしながら PIP-1 は直鎖ペプチドであるため植物による分解反応を受けやすく、このことが活性発現に大きな影響を与えている。そこで本研究では、PIP-1 の植物細胞による分解耐性の向上を目的として、種々の環状類縁体を合成し、エリシター活性および植物による分解性を評価した。

【方法】PIP-1 の環状類縁体は、Fmoc 固相合成法により調製した。合成した類縁体を表に示した。1，2 については空気酸化によってジスルフィド結合を生成することで、3 については N 末端のクロロアセチル基と C 末端の Cys 側鎖との間でチオエーテル結合を生成させることで環状化した。また、4～6 については固相担体上で N 末端アミノ基と C 末端カルボキシル基との間でアミノ結合を生成させた。得られたペプチドは HPLC によって精製した。エリシター活性測定にはタバコ懸濁細胞を使用し、過酸化水素の発生を活性の指標とした。分解性に関しては、それぞれの化合物を細胞に加え、一定時間後に残存する量を LC/MS で定量することで評価した。

【結果】活性測定の結果、PIP-1 に比べて低下するものの、アミド結合により環状化された 4 と 6 が活性を示した。これらの類縁体の分解性を評価したところ、PIP-1 は 3 時間でほぼ完全に分解されてしまうのに対し、4 および 6 は 24 時間後でもそれぞれ約 80%および 40%残存しており、分解耐性が大きく向上していることが分かった。これらの環状類縁体は、持続的な刺激を必要とする PIP-1 の後期防御応答誘導機構の解明に有用であると考えられる。

No	Analog
1	
2	
3	
4	
5	
6	

plant immunity, cyclic peptide, degradation

講演番号：4C05a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ C 校舎 05 会場

イネ *OsREX1-S* 遺伝子は植物細胞の DNA 修復能を高め、カドミウム及び紫外線耐性を向上させる
Rice *OsREX1-S* confers cadmium and UVB tolerance via enhancing DNA repair activity

○國廣 俊太[1]、木幡 光[1]、近藤 陽一[2]、高橋 真哉[2]、松井 南[2]、ベルベリッヒ トーマス[3]、ユセフィアン ショハブ[4]、日出間 純[1]、草野 友延[1] ([1]東北大院生命、[2]理研、[3]BiK-F、[4]秋田県立大)
○Shuta KUNIHIRO[1], Hikaru KOWATA[1], Youichi KONDOU[2], Shinya TAKAHASHI[2], Minami MATSUI[2], Thomas BERBERICH[3], Shohab YOUSSEFIAN[4], Jun HIDEMA[1], Tomonobu KUSANO[1] ([1]Tohoku Univ., [2]RIKEN, [3]BiK-F, [4]Akita Pref Univ.)

【目的】重金属汚染は、生態系の破壊を引き起こすばかりでなく我々の健康被害を引き起こすことから、早急に解決すべき課題である。我々は、特にカドミウム（Cd）に着目し、Cd 汚染土壌のファイトレメディエーション技術の確立を最終目標とし､植物由来の新規 Cd 耐性遺伝子の探索を行ってきた。今回は、イネ全長 cDNA をランダムに高発現させたシロイヌナズナの種子プール（FOX-hunting line）を探索源に用いて、新規 Cd 耐性遺伝子の同定と特徴付けを目的とした。
【方法】イネ全長 cDNA が導入されたシロイヌナズナの種子プールを Cd 含有ゲランガム培地に蒔き、野生型よりも根の伸長が顕著に良い系統を選抜し、土壌に移植して後代種子を採取した。これらを用いて 2 次スクリーニングを行った。
【結果】約 40,000 粒を対象に 2 次スクリーニングまで実施した結果、7 つの Cd 耐性候補系統を選抜することができた。このうちの一つである FOX26 系統は *OsREX1-S* を発現していることを確認した。*OsREX1-S* の遺伝子産物である OsREX1-S は、131 アミノ酸からなるタンパク質であり、クラミドモナスの CrREX1-S や分裂酵母やヒトの TFIIH 転写複合体の 10 番目のサブユニットである TFB5(=p8)と高い相同性を示した。このことから OsREX1-は、植物細胞の核に局在することが予測されたが、OsREX1-S-GFP 融合タンパク質を用いた実験により核局在を実証した。FOX26 で見られた Cd 耐性の形質が、*OsREX1-S* 遺伝子に依ることを確認するためにアグロバクテリウム法により *OsREX1-S* 遺伝子を発現しているシロイヌナズナ形質転換体を再度得た。独立した 2 系統はいずれも、Cd 耐性を示した。従って、FOX26 が示した Cd 耐性は *OsREX1-S* 遺伝子に依ると結論した。これらの植物体は紫外線耐性も示した。そこでこれら植物体に UVB 照射後､DNA 光回復酵素が機能しない赤色光条件下で生育させ、各植物体からゲノム DNA を調製し、シクロブタンピリミジン 2 量体（CPD）の量を、抗 CPD 抗体を用いた ELISA 法で検定した。その結果 *OsREX1-S* 発現系統は野生株よりも CPD の量が有意に低下していた。従って､*OsREX1-S* 過剰発現株では DNA 除去修復活性が高まっていることが強く示唆された。次に、DNA 鎖の切断や 2 本鎖架橋構造の誘導を引き起こす薬剤であるブレオマイシンやマイトマイシン C を野生株と *OsREX1-S* 発現株に処理し、これらの薬剤に対する反応を調べた。その結果、*OsREX1-S* 過剰発現株は野生株に比べ、より耐性となることを確認した。以上の結果から、*OsREX1-S* を高発現した植物は、宿主の TFIIH 複合体を安定させ、DNA 損傷修復能を高めると考察した。

Oryza sativa, DNA repair, cadmium tolerance

講演番号：4C05a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ C 校舎 05 会場

イネにおけるジテルペン型ファイトアレキシン生産を負に制御する bZIP 型転写因子の機能解析
Functional analysis of a bZIP transcription factor that negatively regulates the diterpenoid phytoalexin production in rice

○宮本 皓司[1,3]、西澤 洋子[2]、南 栄一[2]、野尻 秀昭[3]、山根 久和[1,3]、岡田 憲典[3]（[1]帝京大バイオ、[2]農生資研、[3]東大生物工学セ）
○Koji MIYAMOTO[1,3], Yoko Nishizawa[2], Eiichi Minami[2], Hideaki Nojiri[3], Hisakazu Yamane[1,3], Kazunori Okada[3] ([1]Teikyo Univ., [2]The National Institute of Agrobiological Sciences, [3]The University of Tokyo)

植物は病原菌の感染を認識すると、ファイトアレキシンの生産を含む様々な抵抗性反応を示す。イネにおいては、ジテルペン型とフラボノイド型のファイトアレキシンが同定されており、ジテルペン型ではモミラクトン類およびファイトカサン類が主要成分として知られている。ジテルペン型ファイトアレキシンは、メチルエリスリトールリン酸 (MEP)経路由来のゲラニルゲラニル２リン酸を共通の前駆体として、ジテルペン環化酵素による環化反応およびP450などによる酸化反応を経て生合成される。我々はこれまでにモミラクトン生合成酵素遺伝子が４番染色体上において、ファイトカサン生合成酵素遺伝子が２番染色体上において、それぞれ遺伝子クラスターを形成していることを見出している。さらに、キチンエリシター応答性bZIP型転写因子OsTGAP1がMEP経路遺伝子・モミラクトン生合成酵素遺伝子・ファイトカサン生合成酵素遺伝子の発現誘導に関与することを報告した。また、我々はこれらの遺伝子のOsTGAP1による発現誘導機構の解明を目指し、yeast two-hybrid法によるOsTGAP1の相互作用因子のスクリーニングを行い、10個の候補遺伝子を得たことを2012年度本大会において報告した。本研究においては、候補遺伝子のうち、OsTGAP1とアミノ酸レベルで約35%のidentityを示すbZIP型転写因子をコードする遺伝子(*OsbZIP*)に注目し、機能解析を行った。

我々は以前に *OsbZIP* の mRNA 量がキチンエリシター処理により上昇すること、OsbZIP が核局在性を示すことを報告している[1]。まず、OsbZIP の転写調節能を解析するため、GAL4 DNA 結合ドメインと OsbZIP の融合タンパク質をエフェクターとし、GAL4 シス配列下流にホタルルシフェラーゼをつないだレポーターを用いた trans-activation assay を行ったところ、OsTGAP1 と同様に OsbZIP が転写活性化能を有することが示された。次に、OsbZIP をトウモロコシユビキチンプロモーターの下流で構成的に発現する OsbZIP 過剰発現イネを作出し、ジテルペン型ファイトアレキシン生産の制御に OsbZIP が関与しているかを検討した。野生型株および OsbZIP 過剰発現培養細胞にキチンエリシターを処理し、処理 72 時間後におけるファイトアレキシンの蓄積量を定量したところ、OsbZIP 過剰発現培養細胞において顕著にモミラクトン類およびファイトカサン類の蓄積量が低下していた。これは、ジテルペン型ファイトアレキシン生産の制御において OsbZIP が OsTGAP1 と逆の機能を持つことを示唆するものである。現在、OsbZIP 過剰発現培養細胞におけるファイトアレキシン生合成遺伝子などの発現解析を行っている。

[1] Okada A et al., ***J Biol Chem*** 284: 26510-26518 (2009)

Rice, Phytoalexin, bZIP transcription factor

講演番号：4C05a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ C 校舎 05 会場

イネの転写因子 DPF によるジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の転写活性化に関わるシス因子の解析

Analyses of cis-elements Involved in Transcriptional Activation of Diterpenoid Phytoalexin Biosynthetic Genes via Rice Transcription Factor DPF

○山村 千紘[1,2]、水谷 恵美[1,2]、福島 説子[1]、前田 哲[1]、松下 茜[1]、鎌倉 高志[2]、岡田 憲典[3]、山根 久和[3,4]、高辻 博志[1]、森 昌樹[1] ([1]農業生物資源研、[2]東理大・理工、[3]東大・生物生産工学研究センター、[4]帝京大・バイオサイエンス)

○Chihiro YAMAMURA[1,2], Emi MIZUTANI[1,2], Setsuko FUKUSHIMA[1], Satoru MAEDA[1], Akane MATSUSHITA[1], Takashi KAMAKURA[2], Kazunori OKADA[3], Hisakazu YAMANE[3,4], Hiroshi TAKATSUJI[1], Masaki MORI[1] ([1]NIAS, [2]Fac. Science and Tech., Tokyo Univ. of Science, [3]Biotechnology Research Center, The Univ. of Tokyo, [4]Department of Biosciences, Teikyo Univ.)

【目的】イネのジテルペン型ファイトアレキシン（DP）としてモミラクトン、ファイトカサンが知られており、DP 生合成を制御する転写因子として、これまでに bZIP 型の OsTGAP1 が報告されている。前々回の大会で我々は、OsTGAP1 とは別の転写因子 DPF(Diterpenoid Phytoalexin Factor;旧名 BU2)について、その遺伝子の発現が、いもち病感染により増大すること、また *DPF* の過剰発現イネでは DP 生合成酵素遺伝子の転写レベルが上昇するとともに、モミラクトン及びファイトカサンの蓄積、疑似病斑の出現が認められることを報告している。また、DPF の発現を抑制したイネでは、DP 生合成遺伝子の発現が対照の野生型イネに比べ減少していたため、DPF は DP 生合成遺伝子の発現を正に制御する転写因子であることを報告している。本年度は DPF による DP 生合成酵素遺伝子の活性化に関わるシス配列を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】イネ葉鞘での一過的発現系を用いた転写活性化実験において、DPF はモミラクトン生合成への関与が示唆されている *CYP99A2*、およびファイトカサン生合成に関わる *CPS2* の上流 2kb 領域を接続したルシフェラーゼ・レポーター遺伝子をそれぞれ活性化した。DPF は bHLH 型転写因子であるが、これら 2kb 領域には植物の bHLH 型転写因子の典型的な結合配列 G-box が存在していた。そこでまず *CPS2* の上流 2kb 領域の G-box に変異を導入したが、転写活性に変化はなかった。次に、この 2kb 領域を欠失解析したところ、転写活性化に必要なシス領域は-259～-206 の約 50bp 領域に絞り込まれた。この中には動物の bHLH 型転写因子の結合配列として知られている N-box が存在したので、この配列に変異を導入したところ、転写活性化が失われた。よって DPF は N-box を介して *CPS2* 等の転写を正に制御している可能性が示唆された。さらに *CYP99A2* の上流 2kb 領域にも同様の N-box が存在したので、変異を導入し転写活性化実験を行ったところ、変異無しの場合に比べ活性化レベルが減少したものの、40%程度の減少にとどまった。よって N-box と冗長的なシス因子の存在が考えられたので、*CYP99A2* の上流 2kb 領域を段階的に欠失したプラスミドを作製し、現在転写活性化実験を行っている。

phytoalexin, rice, transcription factor

講演番号：4C05a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ C 校舎 05 会場

イネのジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の発現を制御する転写因子 DPF の機能解析
Recombinant protein expression of the rice bHLH factor DPF, a transcriptional regulator of diterpenoid phytoalexin synthesis

○堤 涼[1]、宮本 皓司[1,2]、山根 久和[1,2]、野尻 秀昭[1]、森 昌樹[3]、岡田 憲典[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]帝京大・バイオ、[3]農生資研)
○Ryo Tsutsumi[1], Kouji Miyamoto[1,2], Hisakazu Yamane[1,2], Hideaki Nojiri[1], Masaki Mori[3], Kazunori Okada[1] ([1]the Univ. of Tokyo, [2]Teikyo Univ., [3]NIAS)

【背景目的】

イネの培養細胞におけるキチンエリシター誘導的なジテルペン型ファイトアレキシン生合成の制御因子として、我々はこれまでに bZIP 型転写因子の OsTGAP1 を単離し、OsTGAP1 過剰発現培養細胞におけるジテルペン型ファイトアレキシンの生産誘導の増強について報告した(1)。しかし、OsTGAP1 過剰発現植物体ではその現象が見られず、また、OsTGAP1 はイネいもち病菌感染によるイネ植物体での発現誘導も認められないことから、イネいもち病菌感染時のファイトアレキシン生産誘導には、別の転写因子の存在が考えられた。最近、我々は新規 bHLH 型転写因子 DPF (Diterpene Phytoalexin Factor) がイネの葉身におけるいもち病感染時のファイトアレキシン生産に関与していることをつきとめた。前演者の発表にあるように、イネ葉鞘での一過的発現系を用いた転写活性化実験において、DPF はファイトアレキシン生合成遺伝子（OsCPS2, CYP99A2）のプロモーターを活性化すること、また、その活性化には bHLH 型転写因子の結合配列として知られる N-box が関与することが示唆された。そこで、本研究では、DPF の標的遺伝子プロモーター内のシス配列への結合をより詳細に解析するため、*in vitro* での結合実験に必要な大腸菌組換え DPF タンパク質の精製を進め、また、クロマチン免疫沈降法を用いた *in vivo* での染色体上の DPF 結合領域の同定を目指すことにした。

【方法と結果】

GATEWAY システムを用いて DPF cDNA を保持したエントリークローンを LR 反応によって各種 pDEST ベクターに移し替え、ヒスチジンタグあるいは GST タグ融合型の DPF として発現するプラスミドベクターを得た。これらを用いて大腸菌 rosetta2 (DE3) を形質転換し、定法に従って組換えタンパク質の発現条件を検討した。N 末端側 GST タグを付加させた DPF 組換えタンパク質は、抗 GST 抗体を用いたウエスタンブロット法によって一部可溶化タンパク質として発現することを確認した。現在、GST-DPF 組換えタンパク質の可溶化条件の検討、精製タンパク質の調整を行っており、ゲルシフトアッセイを進める予定である。一方、*in vivo* における DPF の結合領域の同定のため、DPF 過剰発現培養細胞と DPF ペプチド抗体を用いたクロマチン免疫沈降実験の準備を進めている。これまでに DPF の発現が野生型株と比較して約 50 倍に増加した過剰発現培養細胞を確立した。今後、DPF 抗体を用いて DPF 過剰発現培養細胞におけるタンパクレベルでの DPF の発現状態と免疫沈降の条件検討を進めていく。

[1] Okada A et al., *J Biol Chem* 284: 26510-26518 (2009)

DPF, phytoalexin, rice

講演番号：4C05a17
講演日時、会場：3 月 30 日 11:54～ C 校舎 05 会場

蘚類ハイゴケにおけるモミラクトン A 合成酵素遺伝子の単離と機能解析
Structural gene for the synthesis of momilactone A, a specialized diterpene compound in the moss *Hypunm plumaeforme*

○藤原 薫[1,3]、宮崎 翔[2]、宮本 皓司[1,4]、竹村 哲雄[3]、山根 久和[1,4]、野尻 秀昭[1]、野崎 浩[5]、林 謙一郎[5]、川出 洋[2]、岡田 憲典[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]東京農工大院・農、[3]東京理科大・理、[4]帝京大・バイオ、[5]岡山理科大・理)
○Kaoru FUJIWARA[1,3], Sho MIYAZAKI[2], Koji MIYAMOTO[1,4], Tetsuo TAKEMURA[3], Hisakazu YAMANE[1,4], Hideaki NOJIRI[1], Hiroshi NOZAKI[5], Ken-ichiro HAYASHI[5], Hiroshi KAWAIDE[2], Kazunori OKADA[1] ([1]the Univ. of Tokyo, [2]Grad. School of Agric.,Tokyo Univ. Agric. Technol., [3]Tokyo Univ. of Sci., [4]Teikyo Univ., [5]Okayama Univ. of Sci.)

抗菌性化合物であるファイトアレキシンの生産は、植物の持つストレス応答のひとつとして知られている。イネにおいては、14 種類のジテルペン型ファイトアレキシンが病原菌感染により誘導的に生産されるが、中でもモミラクトンはイネの主要な抗菌性化合物として、その生合成酵素遺伝子、発現誘導機構、生理活性などが詳細に研究されてきた。イネにおけるモミラクトンの生理作用としては、病原菌に対する効果以外にも、周囲の植物の生育阻害を引き起こすアレロパシー物質としての生理機能が報告されている。興味深いことに、2007 年に蘚類ハイゴケ（*Hypunm plumaeforme*）もアレロパシー物質としてモミラクトン類を生産していることが報告された。このことは、進化的にかけ離れたこれら２つの植物種が同一の物質を生理活性物質として生存戦略に活用していることを示している。本研究では、未解明のハイゴケにおけるモミラクトン生合成経路とその制御機構を明らかにすることを目的として、まずは、ハイゴケのモミラクトン生合成酵素遺伝子の探索を進めることにした。モミラクトン生合成の中間生成物であるジテルペン炭化水素ピマラジエンの合成酵素遺伝子 *HpDTC2* については、昨年度の本大会で報告した。今年度は、モミラクトン A 合成酵素様遺伝子 *HpMASL* について解析を進めたので報告する。

先行研究において、ハイゴケのモミラクトン生産が重金属ストレス処理によって強く誘導されることが報告されていた。そこで終濃度 0.5 mM の塩化銅処理後に発現誘導を受ける遺伝子を RNA-seq を用いて探索した。まず、塩化銅処理後の *HpDTC2* 遺伝子の発現プロファイルを指標に、その他の生合成酵素遺伝子の発現も協調的に誘導を受けると考えられた処理後 8 時間のハイゴケサンプルから RNA を調製し、RNA-seq に供した。得られたデータを用いてイネのモミラクトン A 合成酵素 OsMAS をクエリーに Local BLAST サーチを行い、また、KEGG Pathway データベースによる pathway 解析の結果、identity 46%以上を示す OsMAS に相同性の高い遺伝子配列が 2 つ存在した。その内、塩化銅処理後のハイゴケにおいて明らかに転写誘導を受けていた一種について、全長 cDNA をカバーする可能性の高い領域を PCR により取得した。*H. plumaeforme* Momilactone A synthase-like (HpMASL) と名付けた本タンパク質は、イネの OsMAS と 53%の相同性を示した。MAS は中間生成物 3β-Hydroxy-9β-pimara-7,15-dien-19,6β-olide から Momilactone A への酸化反応を触媒する脱水素酵素である。現在この反応について、ヒスチジンタグ融合型 HpMASL 組換えタンパク質を大腸菌を用いて精製し機能解析を進めている。

moss, phytoalexin, momilactone

講演番号：4D01a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ D 校舎 01 会場

超好熱アーキア *Pyrobaculum calidifontis* 由来 NAD(P)依存性 L-セリン 3-脱水素酵素の機能・構造解析

Function-structure analysis of NAD(P)-dependent L-serine 3-dehydrogenase from a hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum calidifontis*

○米田 一成[1]、櫻庭 春彦[2]、荒木 朋洋[1]、大島 敏久[3]([1]東海大・農・バイオ、[2]香川大・農・応用生物科学、[3]大阪工大・工・生命)
○ Kazunari YONEDA[1], Haruhiko SAKURABA[2], Tomohiro ARAKI[1], Toshihisa OHSHIMA[3] ([1]Tokai Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Osaka Institute of Technology)

【目的】L-セリン 3-脱水素酵素(SerDH, EC: 1.1.1.276)はNAD(P)を補酵素としてL-セリンから 2-アミノマロン酸セミアルデヒドへの脱水素反応を触媒する酵素である。安定性の高いSerDHはL-セリンの定量などへの有効利用が期待できる。我々は相同性検索により超好熱アーキア*Pyrobaculum calidifontis*にすでに明らかにされている*Pseudomonas aeruginosa*由来のSerDHとアミノ酸配列上36%の同一性を示すホモログ遺伝子を見出した。本研究ではこの高度耐熱性を有すると予測されるSerDHの機能及および構造解析を行った。
【方法・結果】*P. calidifontis*のゲノムからPcal_0699を増幅後、pET15bベクターに挿入し、大腸菌BL21-CodonPlus(DE3)-RIL株を用いてIPTGによる遺伝子の発現を行った。その結果、SDS-PAGEで予測される分子量にバンドが検出され、His-tagカラムによる精製にも成功した。酵素の機能解析の結果、本酵素は分子量 29 KDaのモノマーであり、L-セリン以外にD-セリン、DL-グリセリン酸、DL-3 ヒドロキシイソ酪酸、3-ヒドロキシプロピオン酸にも反応性があることがあることを明らかにしており、既知の*Ps. aeruginosa*由来のSerDHとは基質特異性が異なることを明らかにした。本酵素の結晶化を試みたところ、PEG2000と硫安を沈殿剤としてNADPとの複合体結晶を得ることに成功しており、本結晶を用いて高エネルギー加速器研究機構においてX線回折実験を行った[1)]。セレンを用いたMAD法により酵素-NADPの 2者複合体を分解能 2.0 Åで、触媒残基の変異体であるK170M-NADPの2者複合体を分解能 1.4 Åで構造決定することに成功し、*Ps. aeruginosa*由来のSerDHとの構造比較により基質の結合に関与するループ構造に大きな違いを見出している。現在、基質や阻害剤との複合体結晶の作成を行っており、今後、酵素-NADP-基質/阻害剤の 3者複合体結晶構造の解析を行う予定である。

[1)]Yoneda, K., *et al. Acta Crystallographica Section F* 69 (2013), 134-136.

L-serine 3-dehydrogenase, NAD(P), Pyrobaculum calidifontis

講演番号：4D01a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ D 校舎 01 会場

進化分子工学による L-リジンε-酸化酵素の異種発現；抗生物質耐性マーカーとの融合による発現型変異酵素のスクリーニング

Heterologous expression of L-lysine ε-oxidase by directed evolution; Selection of the expressible variant by fusion with an antibiotic marker

○松井 大亮[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Daisuke MATSUI[1,2], Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO)

【目的】海洋細菌 *Marinomonas mediterranea* NBRC 103028^T 由来 L-リジンε-酸化酵素(LodA, EC 1.4.3.20)は L-リジンに基質特異性が高く、*K*m が 0.0018 mM と低いことから血中アミノ酸定量用酵素として利用が可能である[1,2]。また、我々は本酵素の補酵素がシステイントリプトフィルキノン(CTQ)であることを明らかにし、基礎と応用の両面から注目される酵素である[3]。

しかし、野生型 L-リジンε-酸化酵素の遺伝子(*lodA*)を一般的な大腸菌に導入しても遺伝子は発現せず、組換え酵素を得ることはできなかった。本研究では、異種発現可能な L-リジンε-酸化酵素を調製することを目的として、変異型ライブラリーからのスクリーニングを行った。

【方法】フレオマイシン耐性遺伝子を 3'末端に融合した L-リジンε-酸化酵素遺伝子で、ランダム突然変異用コンピテントセル *Escherichia coli* XL1-Red を形質転換し、ランダム変異導入を誘発した。得られた変異型酵素ライブラリーで、*lodB* を導入した *E. coli* BL21(DE3)を形質転換し、フレオマイシン添加培地でスクリーニングした。

【結果と考察】

変異型酵素ライブラリーからのスクリーニング：L-リジンε-酸化酵素の変異型遺伝子が発現することで、フレオマイシン耐性遺伝子も変異型 L-リジンε-酸化酵素に融合した形で共発現し、そのプラスミドベクターを有する株がフレオマイシン耐性能を示すようになる。このことから、フレオマイシンを含む培地で選別することで、変異型 L-リジンε-酸化酵素の取得に成功した。得られた発現型変異酵素のシーケンス解析により、6 点のサイレント変異と 1 点のミスセンス変異が明らかとなった。本手法を用いることで、発現困難な L-リジンε-酸化酵素の変異導入による可溶性発現型酵素を取得することに成功した[4]。

lodB との共発現による L-リジンε-酸化酵素活性への影響：*lodA* とクラスターを形成している *lodB* を共発現した時においてのみ変異型 L-リジンε-酸化酵素は酵素活性を示したことから、LodB が L-リジンε-酸化酵素の発現に重要であることが明らかとなった。

1. 浅野、松田、特開 2011-433969
2. M. Matsuda and Y. Asano, *Anal. Biochem.*, **406**, 19-23 (2010)
3. S. Okazaki *et al.*, *J. Biochem.* **154**, 233-236 (2013)
4. 浅野、松井、特願 2013-209828

L-Amino acid oxidase, Directed evolution, Heterologous expression

講演番号：4D01a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ D 校舎 01 会場

Marinomonas mediterranea 由来 L-リシンε-酸化酵素におけるシステイントリプトフィルキノン補酵素の存在の結晶学的証明

Crystallographical evidence for the presence of the cysteine tryptophylquinone cofactor in L-Lysine ε-oxidase from *Marinomonas mediterranea*

○岡崎 誠司[1,2]、中野 祥吾[1,2]、松井 大亮[1,2]、赤地 周作[3]、稲垣 賢二[2,3]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO、[3]岡山大院環境生命)

○ Seiji OKAZAKI[1,2], Shogo NAKANO[1,2], Daisuke MATSUI[1,2], Shusaku AKAJI[3], Kenji INAGAKI[2,3], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO, [3]Okayama Univ.)

【目的】海洋細菌 *Marinomonas mediterranea* 由来の L-リシンε-酸化酵素(LodA, EC 1.4.3.20)は、L-リシンのε位の酸化的脱アミノ反応を触媒し、2-アミノアジピン酸-6-セミアルデヒドと過酸化水素とアンモニアへ変換する L-アミノ酸酸化酵素である[1)]。LodA は、FAD を補酵素として使用しない稀な L-アミノ酸酸化酵素であり、キノプロテインであることがレドックスサイクリング染色法から示唆されているが、類縁酵素の構造がまだ報告されていない構造学的に新規な酵素であり、詳細は不明であった。また LodA はその基質特異性の高さより、様々なアミノ酸を含む溶液中における L-リシンの定量に利用できる産業上有用な酵素でもあり、基礎と応用の両面から注目される酵素である。本研究では、LodA の X 線結晶構造解析による構造機能相関の解明を目的とした。

【方法・結果】*Marinomonas mediterranea* を培養後、培養液上清を脱塩水で 3 倍希釈した酵素液を 1st DEAE-Toyopearl、Sephacryl S-300HR、2ndDEAE-Toyopearl に供して精製を行い、電気泳動的に単一のバンドを得た。まずヨウ素を含んだ結晶化条件で共結晶を得、新たに富山県立大に導入された実験室系のタンパク質結晶 X 線立体構造解析システム(CuKα線, λ=1.54Å)を用いて 2.3Å分解能の回折強度データを 720° 分収集し、ヨウ素の異常散乱シグナルを利用した単波長異常分散法により位相の決定及び構造解析に成功した[2)]。1.94Å分解能の native 構造のデータ収集は KEK-PF のビームライン BL-1A で行った。Native 構造では、Trp581 と Cys516 がシステイントリプトフィルキノン(CTQ)というビルトイン型キノン補酵素を形成していることが電子密度より示唆された。本酵素は、キノヘムプロテイン・アミンデヒドロゲナーゼ[3,4)]に次いで 2 例目の CTQ 含有酵素であることが示唆された。また、75mM の L-リシンを含んだリザーバー溶液に 3 分間結晶をソーキングすることにより L-リシン複合体の結晶を得ることに成功し、その L-リシン複合体構造の 1.99Å分解能のデータ収集は KEK-PF のビームライン BL-17A で行った。L-リシン複合体構造では、L-リシンのε位のアミノ基が、CTQ の C6 位カルボニル基と生成物シッフ塩基中間体を形成していることが電子密度から示唆された。本研究により、CTQ を補酵素として用いるアミノ酸酸化酵素の存在が初めて明らかとなった。

1) Gómez D., *et al.*, *Biochmica et Biophysica Acta* **1764**, 1577-1585 (2006)
2) Okazaki S., *et al.*, *J. Biochem.* **154**, 233-236 (2013)
3) Datta S., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14268-14273 (2001)
4) Satoh A., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **277**, 2830-2834 (2002)

Cysteine tryptophylquinone, Iodide SAD, Oxidative deamination

講演番号：4D01a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ D 校舎 01 会場

Burkholderia sp. AIU 395 由来のデカルボキシラーゼ活性とオキシダーゼ活性を有する酵素の性質
Characterization of an enzyme with decarboxylase and oxidase activities from *Burkholderia* sp. AIU 395

○菅原 麻美[1]、松井 大亮[2,3]、山田 美和[1]、浅野 泰久[2,3]、礒部 公安[1]([1]岩手大・農、[2]富山県大工・生工研セ、[3]JST ERATO)
○Asami SUGAWARA[1], Daisuke MATSUI[2,3], Miwa YAMADA[1], Yasuhisa ASANO[2,3], Kimiyasu ISOBE[1] ([1]Iwate Univ., [2]Toyama Pref. Univ., [3]JST, ERATO)

【目的】L-リジンを精度よく測定するために、L-リジンに特異的なオキシダーゼを産生する微生物をスクリーニングし、*Burkholderia* sp. AIU 395 を見出した。本研究では、分離菌が産生する L-リジンに特異的な酵素を精製し、諸性質を明らかにした。
【方法】*Burkholderia* sp. AIU 395 は 6-アミノヘキサン酸を単一窒素源とする培地で 36 時間培養した。酵素は、菌体破砕して調製した粗酵素液から DEAE-Toyopearl、Q Sepharose、Hydroxyapatite のカラムクロマトグラフィーで精製した。L-リジンオキシダーゼ活性は、オキシダーゼ反応で生成される H_2O_2 を 555 nm で比色測定して算出した。L-リジンデカルボキシラーゼ活性は、デカルボキシラーゼ反応で生成するカダベリンを *Micrococcus rubens* 由来のプトレシンオキシダーゼ[1]で酸化し、生成する H_2O_2 を 555 nm で比色測定して算出した。
【結果】本酵素は、上記の方法で精製すると、比活性が約 560 倍上昇し、電気泳動分析で単一のタンパク質バンドになった(活性回収率は約 28%) 。本酵素の分子質量は約 150 kDa で、76.5 kDa の同一サブユニットの二量体と推定された。本酵素の補欠分子族はピリドキサール-5’-リン酸で、N 末端アミノ酸配列は、TASLTQPAFRRLGMK であり、*Burkholderia* 属由来の塩基性アミノ酸デカルボキシラーゼと高い相同性を示した。本酵素は、L-リジンに対して高いオキシダーゼ活性を有し、5-ヒドロキシリジンとカダベリンにもわずかに作用したが、他の L-アミノ酸や L-リジン誘導体および D-アミノ酸には作用しなかった。本酵素は L-リジンデカルボキシラーゼ活性を有し、オキシダーゼ反応の L-リジンに対する K_m 値は 0.44 mM、V_{max} 値は 0.787 μmol/min/mg protein であり、デカルボキシラーゼ反応の K_m 値は 0.84 mM、V_{max} 値は 122 μmol/min/mg protein であった。本酵素の最適反応 pH は pH 6.0 で、pH 5.0～7.0 で安定であった。
以上の結果より、本研究で見出した酵素は、L-リジンの脱炭酸反応と酸化反応を触媒する新規な酵素であると推定された。そして、本酵素で L-リジンを定量した結果、1.0 mM L-リジンまで 30 分以内に測定が可能で、プトレシンオキシダーゼを共役させると、低濃度の L-リジン(0～60 μM)も測定することができた。

1. Adachi et al., Agric. Biol. Chem., **30**: 1202-1210 (1966).

L-lysine oxidase, L-lysine decarboxylase, *Burkholderia*

講演番号：4D01a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ D 校舎 01 会場

Aeropyrum pernix K1 由来 *O*-Phosphoserine sulfhydrylase における F225 の役割
Role of F225 located at the active site in *O*-Phosphoserine sulfhydrylase from *Aeropyrum pernix* K1

○武田 瑛美[1]、中村 卓[1]、石川 一彦[2] ([1]長浜バイオ、[2]産総研)
○Emi Takeda[1], Takashi Nakamura[1], Kazuhiko Ishikawa[2] ([1]Nagahama bio Univ., [2]AIST)

【目的】*O*-Phosphoserine sulfhydrylase (OPSS)は、ピリドキサール-5'-リン酸（PLP）を補酵素とする耐熱性システイン合成酵素である。システインは、ping-pong bibi 機構に伴い 1 次基質（*O*-ホスホセリン(OPS)）と 2 次基質(スルフィド)によって合成される。OPSS は基質特異性が広いため多様な 2 次基質を用いることができ、その反応生成物（非天然アミノ酸）の医薬品やビルディングブロック、サプリメントへの応用が期待されている。至適温度の高さ（80－90℃）と多種多様な生成物を生産できるというメリットをもつ OPSS の効率的な反応機構を知り、それを非天然アミノ酸の生産へ応用することが本研究の最終目的である。現在、活性部位の中で役割が明確な残基は、K127、T152、S153、Q224、R297 である。OPSS free、OPSS_中間体複合体、OPSS_システイン(Cys)複合体の構造比較で、側鎖の Root Mean Square Deviation (RMSD)が 0.4 Å以上動きのある活性部位残基が 8 つあることがわかった。これらの残基は、基質が入ることでポケットを閉じ、生成物ができると開く。このうち一番顕著に変化が見られ、活性部位に近い残基が F225 であった。そこで、F225A、F225Y、K127A F225Y 変異体を作製し、F225 の役割を推定した。
【方法】我々は OPSS の F225A と F225Y 変異体に対して、酸ニンヒドリン法により活性を測定した。各変異体の中間体の分解度を乳酸脱水素酵素を用いて測定した。F225Y における OPS または *O*-アセチルセリン(OAS)との相互作用を確認するため、K127A F225Y 変異体を作製し大型放射光施設 SPring-8 にて X 線結晶構造解析を行った。
【結果・考察】F225A の酸ニンヒドリン法による活性は野生型の半分以下であることを前回の学会で報告した。アラインメントの結果、結核菌由来の *O*-acetylserine sulfhydrylase-B では F225 に相当する残基がチロシン(Tyr)であり、それは OPS の認識に関わると推定されている。F225Y 変異体では野生型の約 1.5 倍のシステイン合成活性の上昇が見られた。それぞれの変異体の中間体分解度は、F225A の分解速度が最も高かった。これらの結果より、F225 は反応機構上で中間体を保護する役割を持つと推定した。OPSS の K127A F225Y_OPS 複合体構造は、野生型_OPS 複合体より 225 番目の側鎖に OPS のリン酸基が接近していた。F225Y において活性上昇が見られたのは Tyr の水酸基により OPS の認識部位が増加したためだと推測される。この仮説を検証するため、現在、K127A F225Y_OAS の構造解析中であり、今後 F225Y 変異体の OAS に対するシステイン合成活性の測定を予定している。

Cysteine synthase, Pyridoxal-5'-phosphate (PLP) dependent enzyme, F225 mutant

講演番号：4D01a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ D 校舎 01 会場

放線菌由来 L-メチオニン脱炭酸酵素の大腸菌発現系の構築と精製

Recombinant Expression and Purification of L-Methionine Decarboxylase from Streptomyces sp.

○岡田 茜[1]、広瀬 侑[2]、田村 隆[1]、稲垣 賢二[1] ([1]岡山大院環境生命、[2]豊技大 EIIRIS)
○Akane OKADA[1], Yuu HIROSE[2], Takashi TAMURA[1], Kenji INAGAKI[1] ([1]Okayama Univ., [2]Toyohashi Tech.)

【目的】放線菌 *Streptomyces* sp. 590 由来 L-メチオニン脱炭酸酵素(MetDC)は, L-メチオニンの脱炭酸反応を触媒し，補酵素としてピリドキサール 5'-リン酸を持つビタミン B_6 酵素である。MetDC を保有する生物として報告されているのは放線菌以外でシダと鞭毛藻の二種のみと非常に少なく，その構造や生理的意義に興味が持たれる。しかし発現が微量であり, 精製及び解析が非常に困難であることから，遺伝子レベルでの解析例は今まで一例もない。最近我々は，次世代シークエンサーを用いて放線菌 *Streptomyces* sp.590 株のゲノム DNA 解析を行い, MetDC をコードしていると考えられる遺伝子配列(1671 bp , 557 アミノ酸)を見いだす事に成功した。放線菌由来 MetDC の構造と機能の更なる解析を目的として，大腸菌における発現系を構築し，MetDC の精製を行った。
【方法及び結果】 MetDC の酵素活性は，我々が確立した簡便な測定法，即ち反応産物である 3-メチルチオプロピルアミンをアミンオキシダーゼによって酸化し，発生する過酸化水素を 4-アミノアンチピリン法により定量する方法で測定した。*Streptomyces* sp. 590 株のゲノム DNA の解析は，ゲノムシーケンサーRoche 454 GS FLX+を用いて行った。その結果 MDC の N 末端アミノ酸配列 15 残基と完全に一致する遺伝子(1671 bp, 557 アミノ酸)が見い出された。この遺伝子の相同性検索を行ったところ，*Streptomyces viridifaciens* 由来の L-バリン脱炭酸酵素と 45%と高い相同性を示したことから，この遺伝子が MetDC をコードしていることが強く示唆された。この推定 MetDC 遺伝子を pET28a に繋ぎ込み，His-Tag 融合タンパク質となるよう発現プラスミドを構築した。このプラスミドを *E. coli* BL21(DE3)に形質転換し，培養，菌体破砕後，Ni-NTA カラムによる簡易精製を行った。その結果，SDS-PAGE により発現確認ができ，更に MetDC 活性も確認できた。培養条件を詳細に検討した結果，modified TB 培地にて培養(37℃，3 時間)後に IPTG 誘導(37℃，6 時間)を行うことで発現が上昇した。酵素精製は，菌体破砕後の無細胞抽出液を，硫安分画と Ni-NTA Agarose 等のカラムクロマトグラフィーを用いて行った。分子量の測定には HPLC (TSK-GEL G3000SW カラム)を使用し，280 nm の吸光度により定量した。SDS-PAGE と TSK-GEL G3000SW のゲル濾過の結果より，MetDC は約 60 kDa のサブユニットから成るホモダイマー構造を形成することが示唆された。また，大腸菌で発現させた組換え MetDC の最適温度は 40℃であり，最適 pH は 6.0 だった。現在その他の性質を検討中である。

L-methionine decarboxylase, recombinant expression, purification

講演番号：4D01a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ D 校舎 01 会場

超好熱アーキア Thermococcus litoralis DSM 5473 のアスパラギナーゼホモログ遺伝子のクローニングとその遺伝子産物の酵素科学的性質の解明

Asparaginase homolog gene of hyperthermophilic archeaon, *Thermococcus litoralis* DSM 5473: cloning and enzymatic characterization of its gene product

○山崎 遼[1]、老川 典夫[2] ([1]関西大学理工学研究科、[2]化学生命工学部)
○Ryo YAMASAKI[1], Tadao OIKAWA[2] ([1]Graduate school of Science and Engineering, Kansai University, [2]Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University)

【目的】超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM 5473 は 80℃以上の高温環境下で生育が可能な偏性嫌気性菌である。これまでにいくつかの超好熱アーキアにアスパラギナーゼ(ANSase: EC 3.5.1.1)が存在することが報告されているが、その生体内での機能や詳細な酵素科学的な性質については不分明なままである。本研究では *T. litoralis* DSM 5473 のアスパラギナーゼホモログ遺伝子(*tla*)を大腸菌で発現し、得られた遺伝子産物の精製方法を確立するとともにその酵素科学的性質を解明することを目的とする。
【方法】*T. litoralis* DSM 5473 のゲノムに対して本菌と近縁の超好熱アーキアの ASNase の保存領域に基づき設計したプライマーでポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行った。得られた DNA 断片からゲノムウォーキング PCR で *tla* を取得した。*tla* を pET14b に挿入後得られた pET14b-*tla* を *Escherichia coli* BL21(DE3)に形質転換した。得られた形質転換体を、アンピシリンを含む LB 培地で 37℃、9 時間振とう培養した。得られた菌体を超音波破砕後その無細胞抽出液から Tla を熱処理、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーで精製した。酵素活性は L-Asn を基質として用い 85℃で反応を行い、生成した NH_3 を、ネスラー試薬を用いて定量し測定した。酵素活性 1 U は 1 分間に 1 μmol の NH_3 を生成する反応を触媒する酵素量とした。
【結果及び考察】Tla は 996 bp の DNA でコードされており総アミノ酸残基数は 331 であった。Tla は可溶性画分に発現し電気泳動的に単一に精製された。精製酵素標品を用いて酵素科学的性質を検討したところ、本酵素の最適反応温度、最適 pH はそれぞれ 95℃、8.0 であった。また本酵素の 90℃での活性の半減期は 35 min であり、pH 4.0～10.0 で安定であった。本酵素は L-Asn および D-Asn に高い特異性を示し、他のアミノ酸には作用しなかった。L-Asn および D-Asn に対する精製酵素の比活性はそれぞれ 647.1、454.6 U/mg であり、D-Asn にも高い比活性を示した。また反応速度論的解析の結果、L-Asn、D-Asn に対する K_m 値はそれぞれ 38.3 mM、9.48 mM であった。本酵素の分子質量はゲルろ過で 68 kDa、サブユニットの分子質量は SDS-PAGE で 39 kDa であったことから本酵素はホモダイマーであることが明らかとなった。Tla の一次構造は *Thermococcus sibiricus* MM 739、*Pyrococcus yayanosii* CH1、*Thermococcus kodakarensis* KOD1 の ANSase とそれぞれ約 77.3 、63.3 、62.3%の相同性を示した。また *Thermococcus* 属と *Pyrococcus* 属のアスパラギナーゼに高い相同性を持つことから、D-Asn に高い活性を有する新規な I 型の L-asparaginase であることが示唆された。

asparaginase, *Thermococcus*, D-asparagine

講演番号：4D01a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ D 校舎 01 会場

Brevibacillus brevis の機能未知 MocR ファミリータンパク質に関する研究
Research of an unknown MocR family protein of *Brevibacillus brevis*
○竹中 崇[1]、伊藤 智和[2]、邊見 久[2]、吉村 徹[2] ([1]名大農、[2]名大院生命農)
○Takashi TAKENAKA[1], Tomokazu ITO[2], Hisashi HENMI[2], Toru YOSHIMURA[2] ([1]Nagoya Univ., [2]Grad.Sch.Bioagr.Sci.Nagoya Univ.)

[背景] MocR ファミリーに属する細菌の転写調節因子は N 末端にヘリックス-ターン-ヘリックス DNA 結合ドメイン、C 末端にピリドキサール-5’リン酸(PLP)を結合するアミノトランスフェラーゼ様ドメインを有するキメラタンパク質である。このタイプの転写調節因子は多くの細菌に見出され、現在までに 2000 以上の存在が確認されているが、その詳細な生理機能や制御機構は殆ど知られていない。本研究では *Brevibacillus brevis* の機能未知 MocR ファミリータンパク質の機能解析を行なった。

[結果] *Brevibacillus brevis* NBRC100599 のゲノムより当該遺伝子を単離し、大腸菌体内における大量発現系を構築した。精製タンパク質のスペクトル解析から、本タンパク質が PLP との結合能を有する可能性が示唆された。アミノトランスフェラーゼ活性の有無を検証したところ、検討した条件下では活性を確認できなかった。本タンパク質が制御する遺伝子や結合領域を同定するため、周辺領域の配列を用いて DNA-タンパク質ゲルシフトアッセイを行った。その結果、本タンパク質が自身の推定プロモーター領域に存在する 7 塩基からなるダイレクトリピート（1 塩基のミスマッチを含む）を特異的に認識することや、PLP 存在下では DNA への結合能が増大することを見出した。以上の結果から、本タンパク質は自身とともに直下に存在する D-Ala-D-Ala リガーゼ（Ddl）の発現を調節している可能性が示唆された。

Aminotransferase, Transcription, Pyridoxal-5' phosphate

講演番号：4D02a03
講演日時、会場：3 月 30 日 09:22～ D 校舎 02 会場

Retrosynthesis of 2’-deoxyribonucleosides in live Escherichia coli compensates the ribonucleotide reductase inactivation

○Dayong SI[1], Nobuyuki Horinouchi[1], Makoto Hibi[2], Anthony M. Poole[3], Jun Ogawa[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Canterbury Univ.)

In all of the known cellular systems, synthesis of deoxyribonucleotides occurs exclusively through the process of ribonucleotide reduction, which is catalyzed by ribonucleotide reductase (RNR). *Escherichia coli* contains three kinds of ribonucleotide reductase (RNR) genes: class Ia (*nrdAB*), class Ib (*nrdHIEF*), and class III (*nrdDG*). Among the three kinds of RNR, NrdAB is essential for *E. coli* growth. On the other hand, an enzymatic process in which 2’-deoxyribonucleoside (2’-dNS) was synthesized efficiently from glucose, acetaldehyde and a nucleobase, through the 2’-dNS retrosynthesis pathway, has been established. If dNSs can be synthesized in growing cells through the 2’-dNS retrosynthesis pathway, it opens the prospect of an alternative evolutionary pathway to DNA synthesis. To confirm this hypothesis, the growth capacity of *E. coli* in which the RNR activity was eliminated by hydroxyurea and gene disruption was investigated. As a result, the growth of *E. coli* with reduced RNR activity was observed in MOPS minimal medium with 2-deoxyribose or 2’-dNS mixture, but not without 2-deoxyribose or 2’-dNS mixture. The *E. coli* also grew in the medium replaced 2-deoxyribose or 2’-dNS mixture with acetaldehyde. To synthesis 2’-dNS from de novo synthesized acetaldehyde from glucose, the pyruvate decarboxylase gene from *Zymomonas mobilis* was transformed into *E. coli*. The transformant *E. coli* grew successfully in MOPS minimal medium with glucose and pyruvate. This result indicated that the retrosynthesis of 2’-dNS from intermediates of central metabolism in growing cells is possible, and the synthesized 2’-dNSs could meet the growing needs of the *E. coli*. This is the first use of synthetic biology to test an evolutionary hypothesis.

2'-deoxyribonucleosides, retrosynthesis, ribonucleotide reductase

講演番号：4D02a04
講演日時、会場：3 月 30 日 09:33～ D 校舎 02 会場

リボヌクレアーゼ P タンパク質 Pop5 の RRM 非標準構造の機能解析

Functional analysis of extra-structural elements in the RNA recognition motif of in the ribonuclease P protein Pop5

○杤山 紘輔、濱崎 真人、中島 崇、角田 佳充、木村 誠（九大院生資環）
○Kohsuke Hazeyama, Masato Hamasaki, Takashi Nakashima, Yoshimitsu Kakuta, Makoto Kimura (Kyushu Univ.)

リボヌクレアーゼ P (RNase P) は前駆体 tRNA の 5’ 末端余剰配列を切断するリボザイムである。超好熱性アーキア（*Pyrococcus horikoshii*）の RNase P は RNA (*Pho*pRNA) と 5 種のタンパク質から構成され、*Pho*pRNA 自身では触媒活性を示さず、タンパク質によりその触媒活性が活性化される。構成タンパク質の一つである *Pho*Pop5 は、RNA の解離会合を促進することにより *Pho*pRNA を活性化する RNA シャペロンで、RNA 結合蛋白質に多く見られる RNA recognition motif: RRM（β1-α1-β2-β3-α2-β4）を形成している。しかし、標準的な RRM とは異なり、α1 とβ2 の間にヘリックス構造（α3）を、C 末端に正電荷に富んだヘリックス構造（α4 と α5）を有し、α1-α2 間のループが *Pho*Pop5 の二量体化に関与していることが明らかになっている。本研究では、*Pho*Pop5 の RRM 非標準構造の *Pho*pRNA 活性化への関与について検討した。

まず、*Pho*Pop5 のα1-α2 間のループを欠失した変異体（ΔL）、α5 を形成する 6 残基欠損体(Δ6C)、およびα4 とα5 を形成する 14 残基欠損体(Δ14C)を調製し、*Pho*pRNA とその他のタンパク質と混合後、前駆体 tRNA 切断活性を測定した。その結果、Δ6C を含む再構成酵素は野生型 *Pho*Pop5 を含む再構成酵素と同程度の触媒活性を保持していたが、ΔL あるいはΔ14C を含む再構成酵素の活性は著しく低下していた。続いて、ΔL、Δ6C、Δ14C の RNA 解離会合促進活性を FRET 法により測定したところ、ΔL とΔ6C の RNA 解離会合促進活性（RNA シャペロン活性）は野生型とほぼ同程度維持していたが、Δ14C は両活性を失っていた。

次に、α4 領域の重要な残基を特定するために、α4 を形成している各アミノ酸残基をそれぞれ Ala に置換した 8 種の変異体 (Ala 置換体) を作製し、同様に前駆体 tRNA 切断活性を検討したところ、Lys107、Lys112、Phe113、Leu114 を Ala に置換した変異体を含む再構成酵素の pre-tRNA 切断活性が僅かに低下していた。この 4 種のアミノ酸残基の構造を見てみると、Lys107 と Lys112 は分子表面に位置しているのに対して、Phe113 と Leu114 はβシート状の疎水性アミノ酸と相互作用していた。以上の結果より、α1-α2 間のループを介して二量体化した *Pho*Pop5 のC末端に位置するα4 が *Pho*pRNA の活性化に重要であること事が解った。また、α4 の疎水性アミノ酸 Phe113 と Leu114 が α4 の構造安定化に関与し、塩基性アミノ酸である Lys107 と Lys112 が *Pho*pRNA を活性化する RNA シャペロン活性に関与していることが示唆された。

Ribonuclease P, RNA recognition motif, RNA chaperone

講演番号：4D02a05
講演日時、会場：3 月 30 日 09:44～ D 校舎 02 会場

シロイヌナズナ由来 RNase P 様タンパク質(PRORP1)PPR ドメインの基質認識機構の解析

Study on the substrate recognition mechanism of the pre-tRNA processing enzyme PRORP1 in *Arabidopsis thaliana*

○今井 崇喜[1]、中村 崇裕[2]、中山 郁[1]、前田 卓[1]、中島 崇[2]、角田 佳充[2]、木村 誠[2]([1]九大院・生資環、[2]九大院・農)
○Takayoshi IMAI[1], Takahiro NAKAMURA[2], Kaoru NAKAYAMA[1], Taku MAEDA[1], Takashi NAKASHIMA[2], Yoshimitsu KAKUTA[2], Makoto KIMURA[2] ([1]Dept. of Biores., Kyushu Univ., [2]Dept. of Agr., Kyushu Univ.)

【目的】シロイヌナズナの葉緑体とミトコンドリアに局在するタンパク質（PRORP1）は、前駆体 tRNA（pre-tRNA）の 5'末端をプロセシングする酵素で、リボザイムである RNase P 様の触媒活性を持つことが知られている。PRORP1 は 572 アミノ酸から構成され、N 末端に 38 アミノ酸からなるシグナル配列と RNA 結合ドメインである Pentatricopeptide repeat (PPR)、C 末端に新規ヌクレアーゼドメイン・Nedd4-BP1, YacP nuclesase (NYN)を有している。本研究では、PRORP の PPR ドメインの基質認識機構を明らかにするために、PRORP1 の N 末端欠損体を作製し、それらの pre-tRNA 切断活性を検討した。

【方法と結果】まず、シグナル配列 (pos.1-38) を除いた des38 を大腸菌内発現系により大量発現し、トリプシン限定分解を行ったところ、pos. 90-527 と pos. 222-572 のタンパク質断片が得られた。そこで、PPR ドメインを保持した des91 と、PPR 1 ～PPR 3 を欠いた des222 を調製し、pre-tRNA^{Phe} 切断活性を検討した。その結果、des91 の活性は des38 の酵素活性に比べて僅かに低下していたが、des222 の活性は著しく低下していた。この結果より、PRORP1 の N 末端領域（pos. 91-221）に位置する PPR 1 ～PPR 3 が酵素活性に必須であることが分かった。さらに、PPR ドメインの基質認識への関与を詳細に明らかにするために、PPR 1 と PPR1-PPR2 を欠いた des130 と des150 を調製し、その pre-tRNA^{Phe} 切断活性を検討したところ、両タンパク質の切断活性は著しく低下していた。この結果より、PRORP1 の触媒活性には、各 PPR の pre-tRNA^{Phe} との相互作用が重要であることが分かった。続いて、PPR ドメインの RNA 認識コードに基づいて、各 PPR ドメインの認識塩基を予測したところ、PPR2～PPR5 が C、A、A/U、U/A を認識していることが予測された。この配列を tRNA^{Phe} の配列と比較したところ、T ループの C56-A57-A58-U59 とよく一致した。そこで、tRNA^{Phe} の T ループの各塩基（U54、U55、C56、A57、A58、U59、C60）と D ループの保存されている塩基（G18 と G19）をそれぞれ他の塩基に置換した pre-tRNA^{Phe} 変異体を作製し、des38 の酵素活性を検討した。その結果、des38 は D アームの変異体に対しては、野生型 pre-tRNA と同等の活性を示したが、T アームの U54、U55、C56、A57、A58 の pre-tRNA^{Phe} 変異体に対しては、その切断活性が低下していた。この結果から PRORP1 は pre-tRNA の T ループの U54～A58 を優先的に認識していることが示唆された。以上の結果より、PRORP1 は D ループと T ループの塩基を認識することが知られているリボザイムである RNase P とは異なった様式により基質を認識していることが示唆された。

PRORP, pre-tRNA, RNase P

講演番号：4D02a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ D 校舎 02 会場

最小ドメイン型 ppGpp 加水分解酵素 SAH の同定およびその機能構造解析

Functional and crystallographic analysis of the minimum (p)ppGpp hydrolases

○泉 厚志[1]、野村 勇太[2]、福永 芳規[2]、野澤 彰[3]、戸澤 譲[3] ([1]愛媛大・VBL、[2]愛媛大・理工、[3]愛媛大・PROS)
○ Atsushi IZUMI[1], Yuhta NOMURA[2], Yoshinori FUKUNAGA[2], Akira NOZAWA[3], Yuzuru TOZAWA[3] ([1]VBL, Ehime Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Eng., Ehime Univ., [3]PROS, Ehime Univ.)

[目的]
バクテリアのグローバルレギュレーターとして知られる ppGpp は alarmone とも呼ばれ、アミノ酸や炭素源などの栄養飢餓状態で一過的に合成され、細胞機能を制御する。この ppGpp による転写・翻訳・複製・代謝の多面的な細胞制御機構を緊縮応答と呼ぶ。一連の細胞応答は ppGpp の合成と分解を担う酵素により制御され、バクテリアでは、主に合成酵素と加水分解酵素が融合した RelA-SpoT 型酵素 RSH が主たる酵素として機能すると考えられてきた。我々はこれまでに枯草菌などから、合成酵素ドメインのみで構成される最小ドメイン型酵素（small alarmone synthetase, SAS）の発見および機能解析を進め、多様な緊縮制御因子の存在を明らかにしてきた。他方、一部の真核生物から、ppGpp の加水分解ドメインのみで構成される最小ドメイン型酵素 Mesh1 が見出されている。その後もアミノ酸配列検索に基づき、一部のバクテリアゲノムに最小ドメイン型 ppGpp 加水分解酵素（small alarmone hydrolase, SAH）が存在することが示唆されてきた。しかし、SAH の存在は予想のみで、具体的な機能解析は現在のところ行われていない。そこで本研究は、SAH が実際に細胞内でどのような酵素機能を示すかを明らかにすることを目的とする。
[方法]
本研究では、バクテリア界で進化的距離が比較的離れている好熱性細菌とシアノバクテリアに由来する SAH タンパク質を対象とした。SAH の調製には、大腸菌を使った組換えタンパク質発現系を利用した。また、セレノメチオニン標識した SAH の調製にはコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を利用した。金属アフィニティー、イオン交換そして、ゲルろ過精製した SAH タンパク質を結晶化、または ppGpp 加水分解反応測定に使用した。SAH タンパク質結晶の回折データ収集は PFAR NW12A で行った。ppGpp の加水分解反応測定には HPLC または酵素共役法を利用した。
[結果]
本研究で対象にした SAH はどれも ppGpp の加水分解反応を触媒する酵素であることを我々は明らかにした。また、1.6 Å分解能で決定した好熱性細菌由来の SAH 構造の触媒ポケットには、これまでに報告のない近接する２つの金属イオン結合部位があることを発見した。本発表では変異体解析の結果をもとに、予想される触媒機構についても紹介する。

ppGpp, cell free, metalloprotein

講演番号：4D02a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ D 校舎 02 会場

DNA 認識ドメインへの変異導入による制限酵素 EcoT38I の機能改変
Alteration of the specificity of EcoT38I restriction enzyme
○日置 貴大、中村 啓悟、喜多 恵子 (京大院農)
○TAKAHIRO HIOKI, Keigo Nakamura, Keiko Kita (Kyoto Univ.)

【目的】*Escherichia coli* TH38 株由来の制限酵素 EcoT38I は、GRGCYC(R=A or G、Y=C or T)という回文配列を認識し Y-C 間を切断する。酵素-DNA 複合体の結晶構造解析より、C 末端側の切断ドメインと N 末端側の認識ドメインがリンカーでつながれた構造をとり、切断ドメインを介してホモダイマーを形成していることが明らかにされている。また、二本鎖 DNA を一本ずつ順番に切断するということも確認されている。このように EcoT38I は FokI と同様にドメイン構造を有する珍しい制限酵素だが、その反応機構は異なるため、新たな機構のカスタム制限酵素創製の可能性が示唆される。本研究では各ドメインの機能の解析及び変異体作製による機能の改変を目的とした。
【方法】EcoT38I の各ドメインを単独で発現させ、His タグを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。λ-DNA を用いた切断実験により、各ドメインのみ、もしくは両ドメインが同時に存在したときの二本鎖 DNA 切断活性を調べた。また、オリゴヌクレオチドを用いたゲルシフトアッセイにより DNA 結合活性を調べた。WT において、認識部位の DNA の近傍に位置するアミノ酸残基を他アミノ酸に置換した変異体を作製し、認識配列や活性の変化を調べた。
【結果】切断ドメイン、認識ドメインともに単独での発現・精製に成功した。DNA 切断活性測定の結果、各ドメインはそれぞれ単独では活性を示さないが、両者を混合すると WT と同じパターンの活性を示した。しかしその活性の強さは WT の 1/100 以下であった。WT において DNA の近傍に位置するアミノ酸を置換した変異体を 11 種作製し、それらの無細胞抽出液の活性を測定した。その結果、WT と異なる切断パターンを示す変異体が 2 種、WT と同じ切断パターンを示す変異体が 3 種得られた。WT と異なる切断パターンを示す変異体 2 種を精製し、現在改めて活性を確認している段階であるが、認識配列の改変を示唆するデータを得ている。今後さらに詳細な解析を行い、その結果を報告する予定である。

restriction enzyme, site-directed mutagenesis, DNA recognition

講演番号：4D02a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ D 校舎 02 会場

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* におけるヌクレオシド代謝の解明

Studies on nucleoside metabolism in *Thermococcus kodakarensis*.

○青野 陸[1]、佐藤 喬章[1,3]、今中 忠行[2,3]、跡見 晴幸[1,3]（[1]京大院工、[2]立命館大、[3]JST CREST）
○Riku AONO[1], Takaaki SATO[1,3], Tadayuki IMANAKA[2,3], Haruyuki ATOMI[1,3]（[1]Kyoto Univ., [2]Ritsumeikan Univ., [3]JST CREST）

AMP phosphorylase (AMPpase) と ribose-1,5-bisphosphate isomerase (R15Pi) は超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* において同定された酵素であり、Type III ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) とともにアーキア特有の nucleoside monophosphate (NMP) を代謝する経路において機能する。本代謝経路は AMP により活性化され、AMP、CMP、UMP を分解することが明らかになっている。

また *T. kodakarensis* を nucleoside 添加条件で培養した場合、R15Pi および Rubisco の細胞内タンパク質量が増加することが明らかとなった。このことから本代謝経路が nucleoside の代謝に関与し、nucleoside から NMP を生成する nucleoside kinase が存在する可能性が考えられた。しかし *T. kodakarensis* のゲノム上には nucleoside kinase と推定される遺伝子が存在しない。一方、本菌の無細胞抽出液において adenosine, guanosine, uridine から NMP 代謝経路の中間生成物である ribose 1,5-bisphosphate (R15P) の生成が観察された。そこで一次構造上新規な nucleoside kinase が存在する可能性を考え、その探索を行うことにした。

これまでにアーキアにおいて nucleoside kinase 活性を示す 3 種の遺伝子（MJ0406、APE0012、Ta0880）が報告されている。そこで *T. kodakarensis* のゲノム上からこれらと相同性を示す遺伝子を探索した結果、TK1843 および TK2029 が最も高い相同性を示した (Identity: 18-28%)。そこでこれらの遺伝子について組換え型タンパク質を調製し、基質特異性の検討を行った。その結果、TK1843 が ATP をリン酸基供与体として cytidine をリン酸化することを明らかにした。一方、TK2029 はいずれの nucleoside に対しても活性を示さず、nucleoside の加リン酸分解反応産物である ribose 1-phosphate (R1P) に対し活性を示し、R15P を生成することを明らかにできた。さらに TK2029 は ATP ではなく ADP をリン酸基供与体とすることが分かった。

以上の結果から、*T. kodakarensis* において nucleoside 代謝と NMP 代謝経路が R15P を介して繋がっていることが示唆された。

archaea, nucleoside, ADP-dependent kinase

講演番号：4D02a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ D 校舎 02 会場

有機リン系神経剤を分解する Organophosphorus hydrolase の固定化

Immobilization of Organophosphorus hydrolase that degrades nerve agents

○中山 公介[1]、大森 毅[2]、瀬戸 康雄[2]、有路 沙織[1]、石川 暁志[1]、川原 一芳[1] ([1]関東学院大・工・物質生命、[2]科警研)
○Kousuke NAKAYAMA[1], Takeshi OMORI[2], Yasuo SETO[2], Saori ARIJI[1], Satoshi ISHIKAWA[1], Kazuyoshi KAWAHARA[1] ([1]Kanto Gakuin University, [2]National Institute of Police Science)

【目的】*Sphingobium fuliginis* 等の好気性グラム陰性細菌が産生する Organophosphorus hydrolase（OPH）は有機リン系化合物を分解する酵素として知られている。本酵素はパラオキソンを始めとする有機リン系農薬を分解する酵素として発見されたが、その後、様々な有機リン結合にも作用し、構造が類似するサリン等の神経剤も分解することがわかった。従って、化学テロに使用される可能性が高い神経剤の除染という観点から研究が行われている。我々はこれまでに OPH の活性中心のアミノ酸を置換し、より分解活性の強い変異酵素を作製してきた。また、N 末端に His-tag を付加することで部分精製することができたが、実際の除染に使用するためには酵素の大量産生と固定化が必要となると考えられる。そこで、本研究では発現用プラスミドを用いて OPH の大量発現の可能性を検討した。また、いくつかの方法を用いて固定化を試みたので報告する。
【方法】OPH の大量発現には Novagen 社の大腸菌菌株と発現用プラスミド pET15b と pET32b を用いた。菌体を超音波で破砕した後、約 40,000 x g の上清（可溶画分）と沈渣（不溶画分）に分画し、上清画分を粗酵素液とした。酵素を Zn イオンあるいは Co イオン共存下で一晩放置して活性化した後、活性測定を行った。パラオキソン分解活性は p-ニトロフェノールの遊離を色調変化により測定し、神経剤分解活性は各種の有機リン系神経剤との反応の後、反応液中の神経剤残存量を GC-MS で測定することにより定量した。CNBr 活性化 Sepharose 4B を用いた固定化反応は試薬のプロコールに従って行った。
【結果】発現用プラスミドを用いることにより、IPTG による誘導で大量の OPH が産生されたが、生育温度や時間に関係なく、大部分の OPH は不溶画分に得られた。不溶物を 8 M 尿素あるいは 0.3%Lauroyl sarcosine で可溶化したが、可溶化酵素には活性が検出されなかった。一方、通常の pUC 系プラスミドによる発現では、酵素量は少ないものの、活性を有する可溶性酵素が得られたので、これを用いて固定化の検討を行った。この酵素を直接 Ni カラムに吸着させたものを固定化酵素(I)とした。次に、Ni カラムから溶出した部分精製酵素を CNBr 活性化 Sepharose 4B と反応させて固定化酵素(II)を作製した。これらの固定化酵素についてパラオキソンと神経剤の分解活性を測定した。その結果、固定化酵素(I)では遊離酵素と同程度の活性が保持されていたのに対して、固定化酵素(II)では活性が大きく減弱することがわかった。これにより、化学的方法は OPH の固定化には適さないことが示唆されたので、今後は多孔質シリカ等を用いた物理的固定化法を検討する予定である。

Sphingobium fuliginis, Organophosphorus hydrolase, nerve agents

講演番号：4D02a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ D 校舎 02 会場

Burkholderia sp. a13 株が生産する新規フィチン酸分解酵素の解析

Enzymatic and primary structure study of a novel phytase produced by *Burkholderia* sp. a13 strain.

○グラミニオ エドワード、高谷 直樹、中村 顕、星野 貴行 (筑波大生命環境)
○Eduardo Graminho, Naoki Takaya, Akira Nakamura, Takayuki Hoshino (Univ. Tsukuba,Grad. Sch. Life Env. Sci.)

[目的] 植物組織における主要なリンの貯蔵源であるフィチン酸（*myo*-イノシトール-1,2,3,4,5,6 六リン酸）は穀物や豆類などの種子に多く含まれている。穀類・豆類は家畜・家禽用飼料に広く用いられている。これらに含まれるフィチン酸は、反芻動物ではルーメン中のフィチン酸分解酵素（フィターゼ）産生微生物により分解されるが、非反芻動物ではそのまま排泄され、環境負荷を増大させる原因の一つとなっている。さらに、フィチン酸は鉄、亜鉛など重要なミネラルに対して強いキレート作用を示すため、消化管内でミネラルの吸収を阻害する抗栄養因子としても知られている。
我々は霞ヶ浦をフィールドとして、魚類（コイ）用プロバイオティクスの開発を目指した研究を行っている [1,2]。淡水魚用の飼料の主成分は穀物であるが、それに含まれるフィチン酸の挙動についてはこれまでほとんど考慮されてこなかった。そこで、水圏および水圏生物の消化管内を対象として、フィターゼ産生微生物の検索を行い、フィターゼの淡水魚養殖への利用を目指すこととした。

【方法及び結果】霞ヶ浦の底泥や魚類消化管内から、フィチン酸を単一リン源とする集積培養によって、フィターゼ生産能を持つ微生物のスクリーニングを行った。得られた微生物の中から、フィターゼ生産量が高く、これまでフィターゼ産生の報告がなかった *Burkholderia* sp. a13 株よりフィターゼを精製した [3]。その結果、a13 株のフィターゼは分子量約 44 kDa であり N-末端のアミノ酸配列から新規性が高い酵素であると考えられた。今回は、本酵素の N-末端アミノ酸配列に基づく縮重プライマーを用いた PCR、と Inverse PCR により、a13 株フィターゼをコードする遺伝子をクローニングした結果について報告する。a13 株フィターゼは 428 アミノ酸残基から構成されており、ヒスチジン酸フォスファターゼ（HAP）モチーフ（RHGXRXP や HD）が配列上に確認されたことから、HAP-フィターゼに属する可能性が示唆されたが、既知のフィターゼに対するアミノ酸配列の相同性は最大でも 48%であったことから、新規性の高いフィターゼであると考えられた。

1) Hagi and Hoshino, Biosci. Biotechnol. Biochem., 73(7), 1479-1483 (2009)
2) Sugimura et at., Biosci. Biotechnol. Biochem., 75(3), 511-515 (2011)
3) Graminho et al., 日本農芸化学会大会講演要旨集(Web), 2C09P18 , (2012)

Burkholderia, phytase, aquatic environment

講演番号：4D02a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ D 校舎 02 会場

部位特異的変異導入による HIV-1 逆転写酵素の熱安定性の向上

Increase in thermal stability of HIV-1 reverse transcriptase activity by site-directed mutagenesis

○西村 耕作[1]、篠村 まゆ[1]、小西 篤[1]、横川 貫太[2]、久好 哲郎[2]、保川 清[1]([1]京大院・農、[2]京大・農)

○ Kosaku NISHIMURA[1], Mayu SHINOMURA[1], Atsushi KONISHI[1], Kanta YOKOKAWA[2], Tetsuro HISAYOSHI[2], Kiyoshi YASUKAWA[1] ([1]Faculty Agric., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】1 型ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）逆転写酵素（RT）は分子量 66,000 の p66 と 51,000 の p51 から成るヘテロダイマー（p66/p51）である。我々は HIV-1 グループ M（HIV-1 M）p66/p51 と HIV-1 グループ O（HIV-1 O）p66/p51 が、cDNA 合成に用いられているモロニーマウス白血病ウイルス（MMLV）RT よりも dTTP および鋳型プライマーに対して高い親和性をもつことを示した [1)]。本研究では、p51 のホモダイマー $(p51)_2$、p66 のホモダイマー $(p66)_2$、p66/p51 の逆転写活性を比較した。さらに、部位特異的変異導入により熱安定化を試みた。

【方法】HIV-1 M と HIV-1 O について N 末端に$(His)_6$が結合した$(p51)_2$、$(p66)_2$、p66/p51 を大腸菌で作製した。さらに、RNase H 活性を消失させる変異 D443→A を p66 に導入し、$p66_{D443A}$/p51 を作製した。

【結果】HIV-1 M と HIV-1 O のいずれにおいても、poly(rA)-p(dT)$_{15}$（T/P）へ dTTP を取込む反応の $K_{m,dTTP}$ と $K_{m,T/P}$ は $(p66)_2$ と p66/p51 が $(p51)_2$ よりも低く、k_{cat} は p66/p51 が $(p51)_2$ と$(p66)_2$ よりも高かった（表 1）。10 分間の熱処理により上記活性を 50%に低下させる温度は、HIV-1 M $p66_{D443A}$/p51 が 44℃、HIV-1 O $p66_{D443A}$/p51 が 52℃であり、野生型 p66/p51（それぞれ 42、48°C）よりも高かった。モデル RNA を用いた RT-PCR における cDNA 合成の反応温度の上限は、HIV-1 M $p66_{D443A}$/p51、HIV-1 O $p66_{D443A}$/p51 ともに 68℃であり、野生型 p66/p51（それぞれ 62、66°C）よりも高かった [2)]。

【考察】これらのことから、今回作製した変異型酵素の cDNA 合成酵素としての有用性が示唆された。

【文献】1. Konishi, A. *et al.* (2013) *Appl. Biochem. Biotechnol.* **169**, 77–87

2. Nishimura, K. *et al.* (2013) *Biotechnol. Lett.* **35**, 2165–2175

表 1. HIV-1 RT の速度論的パラメータ（37℃）

RT	$K_{m,dTTP}$ (μM)	$K_{m,T/P}$ (μM)	k_{cat} (s^{-1})
HIV-1 M $(p51)_2$	34 ± 9	2.1 ± 0.8	0.19 ± 0.02
HIV-1 M $(p66)_2$	16 ± 3	1.6 ± 0.5	0.19 ± 0.01
HIV-1 M RT p66/p51	18 ± 5	0.75 ± 0.30	0.60 ± 0.03
HIV-1 O $(p51)_2$	130 ± 50	3.5 ± 1.0	0.73 ± 0.14
HIV-1 O $(p66)_2$	44 ± 5	1.3 ± 0.2	2.1 ± 0.1
HIV-1 O RT p66/p51	23 ± 3	1.7 ± 0.2	3.3 ± 0.1

cDNA synthesis, human immunodeficiency virus, reverse transcriptase

講演番号：4D02a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ D 校舎 02 会場

Val433 への変異導入による MMLV 逆転写酵素の耐熱化

Stabilization of MMLV reverse transcriptase by site-directed mutagenesis of surface residue Val433

○小西 篤[1]、馬 暁晨[1]、横山 高広[2]、保川 清[1] ([1]京大院・農、[2]京大・農)
○Atsushi Konishi[1], Xiaochen Ma[1], Takahiro Yokoyama[2], Kiyoshi Yasukawa[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Faculty Agric., Kyoto Univ.)

【目的】モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素（MMLV RT）は分子量 75,000 のモノマーであり、cDNA 合成酵素として分子生物学的研究や臨床診断で広く用いられている。RNA は高温では二次構造をとらないため、逆転写反応は高温で行うことが望まれるが、RT の熱失活が問題となる。本研究では、MMLV RT の分子表面に存在する疎水性残基（F303、L304、L432、V433、I434）をそれぞれ荷電性残基（K、R）に置換することで、耐熱化を試みた。

【方法】①組換えMMLV RTの調製：C末端に$(His)_6$が結合したMMLV RTを大腸菌で発現させ、菌体の可溶性画分より精製した。②poly(rA)-$p(dT)_{15}$ (T/P) へのdTTPの取込みの測定：25 μM T/P (濃度は$p(dT)_{15}$のモル換算)、0.2 mM [^{3}H]dTTP存在下、37℃で反応を行った。経時的に反応液を採取し、酸不溶性画分への放射能の取込みから初速度を求めた。③熱失活の測定：MMLV RTを48、50℃で10分間熱処理した後、37℃でT/PへのdTTP取込み活性を測定した。

【結果】①一重変異体の評価：L304R と L304K は活性をもたなかった。F303R、F303K、L432R、L432K、V433R、V433K、I434R、I434K は野生型酵素（WT）の 40-100%の活性を有した。V433R と V433K は 48℃10 分間の熱処理後の残存活性が 55%であり、WT (17%) より高い耐熱性を有した。②多重変異体の評価：V433→R とこれまでに見出された耐熱化変異（D108→R、E286→R、E302→K、L435→R、x D524→A[1)]）を組み合わせることで、さらなる耐熱化を試みた。その結果、D108R/E286R/V433R と D108R/E286R/V433R/D524A は 50℃10 分間の熱処理後の残存活性が 70%であり、V433R (18%) より高い耐熱性を有した。

【考察】MMLV RTは安定性の低い酵素であり、容易に凝集体を形成する。凝集体の形成には、分子間のジスルフィド結合と、分子表面に存在する疎水性残基による分子間相互作用が重要であると言われている。変異V433→RとV433→Kは、疎水性残基による相互作用を減少させ、耐熱性を向上させたものと考えられる[2)]。

【文献】1. Yasukawa, K., Mizuno, M., Konishi, A., Inouye, K. (2010) *J. Biotechnol*. **150**, 299-306
2. Konishi, A., Xiaochen, M., Yasukawa, K. (2014) *Biosci. Biotechnol. Biochem*., in press

cDNA synthesis, Moloney murine leukemia virus, reverse transcriptase

講演番号：4D02a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ D 校舎 02 会場

ピペロナール代謝酵素の大量発現と諸性質の解析
Overexpression and characterization of the enzyme involved in aldehyde metabolism
○土居 志織、富田 千晶、橋本 義輝、小林 達彦（筑波大院生命環境）
○Shiori DOI, Chiaki TOMITA, Yoshiteru HASHIMOTO, Michihiko KOBAYASHI (Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. of Tsukuba)

ピペロナール（3-ベンゾジオキソール-5-カルボアルデヒド）は独特の甘い芳香を有する芳香族アルデヒドであり、香水や一般化粧品、食品香料の調合基剤、医薬品や麻薬の合成原料として使用され、今後も多分野での応用が期待される化合物である。ピペロナールはイソサフロールの酸化などによって化学的に合成されるが、コショウやバニラなどの植物から抽出される精油にも含まれ、自然界にも存在する天然化合物である。しかし、微生物によるピペロナール分解・代謝についてはこれまで全く報告がなく、生物における分解経路および代謝に関わる酵素は未解明である。

我々は既に土壌からピペロナール代謝活性を持つ微生物の単離に成功している。ピペロナール代謝活性が最大となるような最適条件を決定し、大量培養した。得られた菌体を破砕し、硫安分画および４種のクロマトグラフィーにより本酵素の精製標品を得た。しかし、酵素量は少なく諸性質の解析には十分でないため、精製した本酵素の部分アミノ酸配列を決定し、その情報を基にピペロナール代謝酵素遺伝子のクローニングに成功した。さらに、His タグを付与した本酵素の大量発現系を構築し、アフィニティークロマトグラフィーによる簡便な精製法を確立した。現在、精製標品を用いて本酵素の諸性質の検討を行っている。

purification, enzyme, metabolism

講演番号：4D02a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ D 校舎 02 会場

好冷細菌 *Pseudoalteromonas sp.* AS-131 及び大腸菌由来グルコキナーゼの酵素反応における構造変化のトリプトファン蛍光分析

Tryptophan fluorescence analysis of structural changes during enzymatic reaction of glucokinase from psychrophilic *Pseudoalteromonas sp.* AS-131 and mesophilic *Escherichia coli*

○湧川 盛洋、佐藤 奈々、本島 浩之、渡邉 啓一（佐賀大農）
○Morihiro WAKUGAWA, Nana SATOU, Hiroyuki MOTOSHIMA, Keiichi WATANABE (Saga Univ.)

【目的】自然界には様々な温度環境下において進化、適応している細菌が存在している。なかでも南極海などに生息する好冷細菌は、低温環境で生息するために代謝効率をよくする必要がある。一般的に低温適応酵素は相同な中温生物由来の酵素と比較して、反応の至適温度が低く、低温域で活性が高く、熱安定性は低い。現在、低温域での高い活性には酵素の柔軟な構造が必要であると考えられているが、低温適応と構造の関係は十分に解明されていない。最近、我々は、好冷細菌 *Pseudoalteromonas* sp.AS-131 由来グルコキナーゼ（PsGK）と大腸菌由来グルコキナーゼ（EcGK）の機能及び構造の比較解析により、PsGK は低温域で活性が高い酵素でありながら、高い熱安定性を有していることを明らかにした。さらに、結晶構造解析により PsGK の構造を決定した結果、PsGK は EcGK よりも小ドメインとヒンジ領域の揺らぎが大きく大ドメインの揺らぎが小さいことが明らかとなった。これらの構造の特徴は、PsGK の高い触媒効率と高い熱安定性の要因の一つと考えられた。また、EcGK は単量体あたり 3 つの Trp を有しており、PsGK では 2 つ有している。そこで本研究では、両酵素の酵素反応時の構造変化を比較するために、基質、基質アナログ、遷移状態アナログおよび反応生成物によって誘導される両酵素の構造変化をトリプトファンの蛍光を利用して分析した。

【方法・結果】フリー酵素に基質、基質アナログ、遷移状態アナログおよび反応生成物を加えて蛍光スペクトルの変化を測定した結果、グルコース（Glc）または ATP アナログである AMPPNP 結合により、両酵素とも蛍光スペクトルに変化はなかった。Glc と共に AMPPNP を加えると、EcGK では大きな蛍光強度の低下が認められたが、PsGK ではほとんど変化がなかった。遷移状態アナログ（Glc+NO^{3-}+ADP）を加えると、両酵素とも蛍光強度の大きな低下が認められた。一方、反応生成物（G6P+ADP）とフリー酵素の間で、両酵素とも蛍光強度に変化はなかった。以上の結果より、PsGK は基質（Glc+AMPPNP）と結合した時の構造変化が小さく遷移状態の時にはじめて大きな構造変化を起こし、EcGK では基質結合時と遷移状態移行時に構造変化をすることが示唆された。さらに、両酵素は酵素反応生成物複合体の形成時にフリー酵素と同じ構造に戻ることが示唆された。この構造変化の違いが、両酵素の温度適応の違いに関係しているものと推察される。

Pseudoalteromonas sp. AS-131, Glucokinase, Psychrophilic

講演番号：4D03a02
講演日時、会場：3 月 30 日 09:11～ D 校舎 03 会場

エレクトロポレーション法による様々な生物種への遺伝子導入

Gene transfer to various types of cell by electroporation with NEPA21 or ELEPO21

○山上 義巳[1]、早川 清[2]、早川 靖彦[2]、三木 健輔[1]、藤井 道彦[1]、鮎沢 大[1]([1]横浜市大・生命ナノシステム、[2]ネッパジーン（株））
○ YOSHIMI YAMAKAMI[1], KIYOSHI HAYAKAWA[2], YASUHIKO HAYAKAWA[2], KENSUKE MIKI[1], MICHIHIKO FUJII[1], DAI AYUSAWA[1] ([1]Yokohama City Univ., [2]NEPA GENE CO., LTD.)

遺伝子導入は、遺伝子工学、分子生物学、細胞生物学において重要な技術の一つである。現在、培養細胞へ遺伝子を導入する方法として、レトロウイルス法、リポソーム法、電気パルス法などが用いられている。電気パルスによる遺伝子導入法は、最も簡便で普遍的方法であるが、従来の方法では生存率と導入効率において満足する結果が得られていなかった。

そこで、我々は高電圧と低電圧を組み合わせた独自のパルス印加モデルを提唱し、生存率と導入効率を著しく改善する条件を確立してきた。本研究では、1 台で複数のパルスの組み合わせを設定できネッパジーン社製のスーパーエレクトロポレーター NEPA21 及び ELEPO21 を用い、種々の生物種（動物細胞、大腸菌、藻類細胞など）に遺伝子（GFP）の導入を試みた。種々の条件において生存率および導入率を算出したので、これらの結果について報告する。

electroporation, gene transfer, algae

講演番号：4D03a03
講演日時、会場：3 月 30 日 09:22～ D 校舎 03 会場

大腸菌を用いた組換えタンパク質の細胞外発現
Extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*.
○柳原 芳充[1]、草野 美紀[1]、松尾 健太郎[1]、上垣 真理[1]、古我 怜恵[1]、鈴木 涼介[1]、森 浩禎[2]、進藤 康裕[1] ([1]三洋化成工業株式会社、[2]奈良先端科学技術大学院大学)
○Fusamitsu Yanagihara[1], Miki Kusano[1], Kentaro Matsuo[1], Masamiti Uegaki[1], Satoe Koga[1], Ryousuke Suzuki[1], Hirotada Mori[2], Yasuhiro Shindo[1] ([1]Sanyo Chemical Industries, [2]Nara Institute of Science and Technology)

我々は大腸菌を用い、組み換えタンパク質を細胞外に分泌発現させる系の構築を行っている。組換えタンパク質を細胞外に分泌発現する事により、発現量向上、精製の容易性などの利点がある。従来から行われているアプローチとしては、野生株でも細胞外にタンパク質を発現する能力を有するグラム陽性菌を用いた発現系の開発が行われてきた。しかし、枯草菌をはじめとするグラム陽性菌は分泌性のプロテアーゼ活性が強く、分解されやすいタンパク質の発現には適さない等の短所が存在する。我々は、プロテアーゼ分泌活性が低く、遺伝子工学が進んでおり迅速な開発が見込め、幅も広い工業的な応用例が存在する大腸菌に着目して、組換えタンパク質を細胞外に発現する系の構築を行った。

大腸菌をはじめとするグラム陰性菌は細胞質膜の外側に外膜が存在し、グラム陽性菌は存在しない。この違いが、分泌発現能の有無に影響していると考えられている。どちらの細菌も細胞質膜にはタンパク質を透過させるための分泌機構が存在するが、外膜には汎用的な分泌機構は存在しない。このため一般的には、グラム陰性菌は組換えタンパク質を細胞外に発現する事ができない。一方、外膜を有しないグラム陽性菌は細胞外発現が可能である。そこで我々は膜透過性を変化させる添加剤を培地中に加えて、大腸菌の細胞外発現系構築を試みた。つまり、外膜の透過性は向上させるが、菌の生存には悪影響を与えない添加剤を培養時に用いることにより、ペリプラズムに発現している組み換えタンパク質を外膜の外にまで分泌発現させることができると考えた。この様な性質を有する添加剤として界面活性剤が適切であろうと考え、種々の界面活性剤から探索を行った。探索アプローチとして、細胞質に局在しているタンパク質は細胞外に漏れ出させず（生存に影響を与えにくいと推定）に、ペリプラズム（内膜と外膜の間隙空間）局在タンパク質は細胞外に漏出させることを指標に探索を行った。

見出した界面活性剤を用いる事により、大腸菌を生存させたまま組み換えタンパク質を細胞外に分泌発現させることに成功した。この様に、外膜の透過性を向上させる界面活性剤を添加しても大腸菌が死なずに分泌発現を行う理由を調べるために、大腸菌の全遺伝子の単一欠損株ライブラリー（ＫＥＩＯライブラリー）を用い、欠損することにより感受性となる遺伝子群を同定した。その結果、リポ多糖合成や薬剤排出、ＡＴＰ合成経路が、我々の発現系で用いる界面活性剤存在下での菌の生存に重要であることを見出した。

secretory expression, surfactant

講演番号：4D03a04
講演日時、会場：3 月 30 日 09:33～ D 校舎 03 会場

オカラと廃食用油を用いた好気高温固体発酵システムへの油脂分解能を有する微生物群の添加効果

Effect of supplementation of microorganisms having ability to decompose oil on a high-temperature aerobic solid-state fermentation system with okara and waste cooking oil

○岩瀬 徳康[1]、山田 千早[1]、西田 茂雄[2]、松岡 真生[1]、須田 亙[3]、服部 正平[3]、祥雲 弘文[1]、若木 高善[1]、伏信 進矢[1] ([1]東大院農生科、[2]環清技研エンジニアリング、[3]東大院新領域)

○Noriyasu IWASE[1], Chihaya YAMADA[1], Shigeo NISHIDA[2], Masaki MATSUOKA[1], Wataru SUDA[3], Masahira HATTORI[3], Hirofumi SHOUN[1], Takayoshi WAKAGI[1], Shinya FUSHINOBU[1] ([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Kanseigiken Engineering, [3]Grad. Sch. Frontier Sci., Univ. Tokyo)

【背景と目的】日本国内における廃食用油の年間発生量は約 45 万ｔと推定され、このうち、事業系から排出されるものはほぼ回収されているものの、数万ｔが再生利用困難として廃棄されている。また、一般家庭からの回収率は低く、約 10 万ｔがゴミや下水として廃棄されている。一方、豆腐製造における副産物であるオカラは、中・小規模の製造所においては産業廃棄物として処分されている。しかも、オカラは含水率が 80%を超える高含水率食品加工残渣であり、保管や運送における腐敗やコストの問題が、リサイクルの大きな妨げとなっている。そこで我々は、廃食用油の資化による微生物の発酵熱を利用しつつオカラを乾燥させることで、飼料や燃料へと再利用する新規な好気高温固体発酵システムの構築を目指している。

【方法と結果】コンポストや、大豆油を用いて集積した微生物群の大量培養物を、好気高温固体発酵システムに添加した。発酵槽中の脂質量や含水率、排気中の二酸化炭素濃度、使用電力を経時的に測定し、廃食用油の微生物による分解と、油脂分解能を有する微生物群の添加効果を評価した。今後、発酵槽内の微生物群集の解析と、脂質分解菌の探索を行う予定である。

okara, waste cooking oil, solid-state fermentation

講演番号：4D03a05
講演日時、会場：3 月 30 日 09:44～ D 校舎 03 会場

白色腐朽菌 Phanerochaete sordida YK-624 株による木質バイオマス減容化プロセスの開発
Operating conditions for the biodegradation of woody biomass by phanerochaete sordida YK-624 in a solid-state reactor

菖蒲 貴弘[1]、富成 宏典[2]、平井 浩文[3]、新谷 政己[1]、○金原 和秀[1]（[1]静岡大院工、[2]静岡大工、[3]静岡大院農）
Takahiro Shobu[1], Hironori Tominari[2], Hirohumi Hirai[3], Masaki Shintani[1], ○Kazuhide Kimbara[1]
([1]Grad. School of Eng. Shizuoka Uni., [2]Shizuoka Univ., [3]Grad. School of Agr. Shizuoka Univ.)

【研究背景】木質バイオマスから、酵素糖化・発酵により有用な化学物質を生産するには、植物細胞壁を固める難分解性芳香族化合物リグニンによる被覆を破壊しなければならない。白色腐朽菌*Phanerochaete sordida* YK-624株は、リグニンを高度に分解できる唯一の微生物として知られている。しかし、白色腐朽菌によるリグニン分解には、処理時間が長いという欠点がある。本研究では、白色腐朽菌によるリグニン分解の高速化・効率化を目指し、固体培養装置を設計・製作し、本装置を用いたリグニン分解における最適な運転条件の確立を目的として実験を行った。
【実験方法】固体培養装置にて行うリグニン分解試験の条件検討のため、滅菌した風乾ブナ木粉1.0 g、及び蒸留水2.5 mLを培地とする200 mL容の培養瓶を用いた分解試験を行った（小型試験）。小型試験では、PDAプレート上で3日間前培養を行ったYK-624株が形成する菌糸コロニーに対し、外縁付近より10 mm四方のディスクを打ち抜いたものを菌体ディスクとして培地に接種し、1~4週間30℃で培養した。その際、栄養源、菌体接種方法の違いよるリグニン分解率の比較を行った。さらに、大スケールでのブナ木粉中のリグニン分解能調査を目的として、固体培養装置を設計・製作した。風乾ブナ木粉100 g、蒸留水203.5 mLを固体培養装置に加え、滅菌した。その後PDAプレート1/2枚に滅菌水を加え、ホモジナイザーで破砕したものを菌液とし、この菌液を木粉に均一に塗布した。培養は5 L・min^{-1} で連続的に湿潤空気の通気を行いながら30℃で行った。培養後、リグニン分解率、リグニン分解酵素活性、及びリグニン分解選択性を算出した。
【結果と考察】小型試験、固体培養装置で YK-624 株を 4 週間培養した場合、それぞれ 31.2%および 37.5%のリグニン分解率が得られ、リグニン分解の選択性は 1.7 および 2.9 を示した（セルロース分解率を 1.0 とした際のリグニンの分解率）。リグニン分解酵素である、LiP・MnP 活性においても、固体培養装置では、それぞれ 0.48 U/g および 0.36 U/g と、小型試験より、それぞれ 0.17 U/g および 0.05 U/g 高い値を示した。これらの結果より、固体培養装置において連続的に通気を行うことで、リグニン分解酵素活性が上昇し、リグニン分解が促進されることが示唆された。また、固体培養装置を用いることで、本菌株は、よりリグニンを高選択的に分解したと考えられた。さらに、培地の栄養源として、スギ木粉をセルラーゼによって糖化後、固液分離した液分（スギ糖化液）を培地に添加した場合、小型試験における7 日間の培養で、リグニン分解率は21.7%に達し、無添加での培養と比較すると、8.0%の増加が見られた。このことからスギ糖化液に含まれる炭素源、及びエネルギー源により、YK-624 株の生育が促進され、リグニン分解が加速化されたと示唆された。現在、菌体の接種方法の検討を小型試験で行い、得られた知見を基に、固体培養装置による試験を行っている。

White-rot fungi, Solid-state reactor, biomass

講演番号：4D03a07
講演日時、会場：3 月 30 日 10:05～ D 校舎 03 会場

アスタキサンチン培養スケールアップのための培養基本特性解析

Analysis of Astaxanthin Fermentation Characteristics for Scale-up

○永井 秀忠[1]、高橋 季之[1]、森弘 敏夫[1]、矢田 哲久[1]、東 光利[1]、佐藤 博[1]、武部 英日[2] ([1]JX 日鉱日石エネルギー（株）、[2]株式会社エーアイソリューションズ)
○Hidetada NAGAI[1], Toshiyuki TAKAHASHI[1], Toshio MORIHIRO[1], Tetsuhisa YATA[1], Mitsutoshi AZUMA[1], Hiroshi SATOU[1], Hidehi TAKEBE[2] ([1]JX Nippon Oil &Energy Corporation, [2]AI SOLUTIONS Co., LTD.)

【背景】*Paracoccus carotinifaciens* はアスタキサンチンを生成し、当社はこれを利用してサケ・マス養殖のための色素添加剤を製造・販売している。商業規模の製造に初期には、培養が非常に不安定かつ生産性が安定しなかったものの、種々条件検討により、培養時の撹拌・通気条件と培養結果に相関がみられることが判明した。このため、5L スケールのラボ培養槽にスケールダウンを行い、撹拌通気条件についてデータを整理して解析を行うこととした。
【目的】スケールアップに有用な培養基本特性の把握
【実験方法】培養条件は、撹拌および通気を培養中に変化させず一定の条件とした。各培養条件において Gassing-Out 法によって酸素移動容量係数（kLa）を測定し、培養結果と kLa の関連を考察した。
【結果及び考察】水 2L の液量で 5L ジャーの kLa を測定した結果を図 1 に示した。撹拌回転数を増加させると kLa は上昇するが 500rpm 以上では停滞する傾向を見せた。各々の条件で培養を行って kLa による培養成績の変化を調べたところ、kLa よりも撹拌回転数によって培養成績が影響を受けることを確認した。kLa=210[1/h]に固定した条件での撹拌回転数の菌体 delta OD max の相対値を図 2 に示した。低撹拌回転数領域で培養成績の低下は、おそらく懸濁物質の多い培地が撹拌不十分により不均一化されているために起こると考察された。また、剪断力を表す周速度を求めると、実生産培養では 5L ジャーの 900rpm の回転数とほぼ同レベルとなるため、実生産においても本菌株は各範囲による剪断力に対しても問題ないことが確認できた。

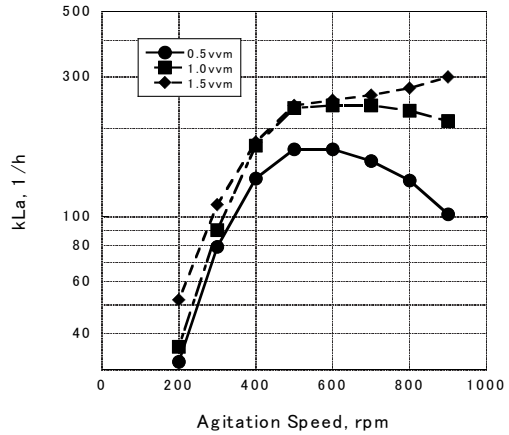


図１．水 2L での 5L ジャーの kLa 測定結果

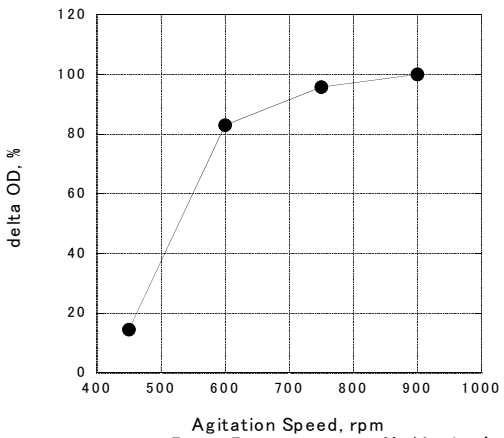


図２．kLa=210[1/h]における菌体生育比較

Astaxanthin, Fermentation, Scale-up

講演番号：4D03a08
講演日時、会場：3 月 30 日 10:16～ D 校舎 03 会場

ゼアキサンチン培養におけるスケールアップのための条件検討

Examination of condition for the scale-up in Zeaxanthin cultivation

○高橋 季之[1]、永井 秀忠[1]、東 光利[1]、矢田 哲久[1]、佐藤 博[1]、武部 英日[2]([1]JX 日鉱日石エネルギー（株） 中央技術研究所、[2](株)エーアイ・ソリューション)
○Toshiyuki TAKAHASHI[1], Hidetada NAGAI[1], Mitsutoshi Azuma[1], Tetsuhisa YATA[1], Hiroshi SATO[1], Hidehi TAKEBE[2] ([1]JX Nippon Oil & Energy Corporation, [2]AI Solution Co.,Ltd.)

【背景】*Paracoccus carotinifaciens* はアスタキサンチン、カンタキサンチンやゼアキサンチンを生成する微生物である。当社はこの中でゼアキサンチンを利用して鶏飼料に添加することにより、鶏卵の卵黄に移行して黄色を強化出来ると考えている。一方、ゼアキサンチンチンはヒト網膜の黄斑部にも存在し、眼病との因果関係が精力的に研究されている。*Paracoccus* 菌のアスタキサンチン生産株は、スケールアップした大型培養槽においても生育するが、ゼアキサンチン生産株は、5L ジャーレベルでは旺盛に生育するが、大型培養槽では生育しないという問題点を抱えていた。
【目的】本研究では、ゼアキサンチン培養のスケールアップにおいて問題となっていた大型培養槽での培養を可能にさせることを目的とした。
【方法】*Paracoccus carotinifaciens* ゼアキサンチン生産株 ZXA-23 株を用い、5L ジャー培養（溶存酸素濃度一定、撹拌回転数一定、圧力 0.05MPa 固定条件）において、各種条件を変更し培養を試みた。
【結果及び考察】5L ジャーでの培養において溶存酸素濃度、回転数一定条件で培養すると図 1 に示すとおり、圧力 0.02MPa から 0.06MPa の間で菌体の生育が著しく阻害された。しかしながらクエン酸を 3～8g/L 培地に添加する事により、図 2 に示すとおり 6～8 倍の菌体生育となり、常圧条件とほぼ同程度まで菌体生育が回復することが確認出来た。この方法を用いることにより、100L 培養、5kL 培養でもゼアキサンチン培養が可能であることを確認した。

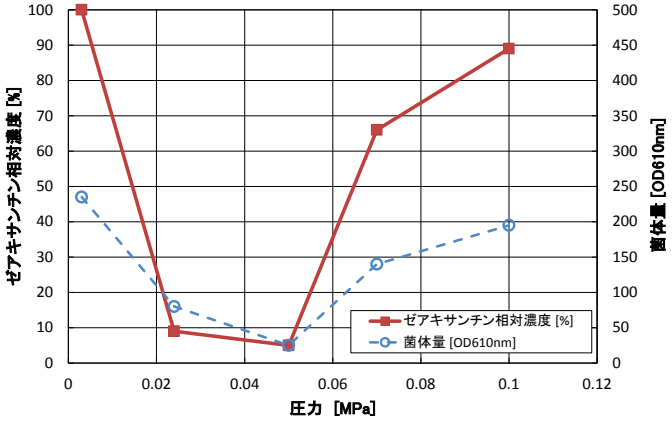


図 1. 溶存酸素濃度・回転数一定条件培養での培養成績

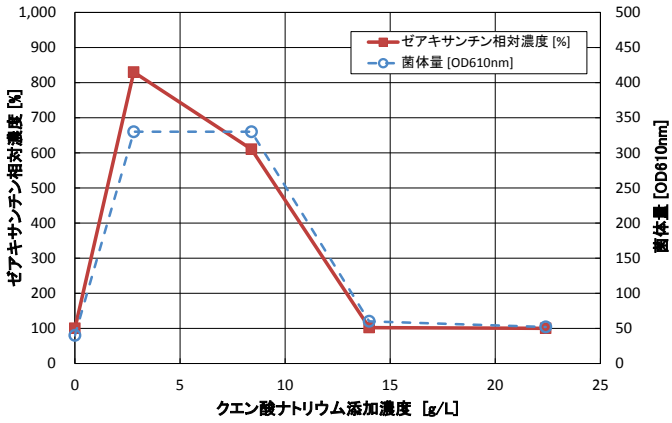


図 2. 0.05MPa 内圧下でのクエン酸ナトリウム添加量とゼアキサンチン培養成績の関係

Zeaxanthin, Culture, Scaleup

講演番号：4D03a09
講演日時、会場：3 月 30 日 10:27～ D 校舎 03 会場

酸化物半導体ナノ素材合成のための新規なタンパク質の構築
A novel protein supramolecule for metal-oxide semiconductor nanomaterials synthesis

○井之上 一平[1]、石河 泰明[2]、山下 一郎[2]、浦岡 行治[2,3]、安枝 寿[1] ([1]味の素(株)イノベーション研、[2]奈良先端大・物質創成、[3]科学技術振興機構, CREST)
○IPPEI INOUE[1], YASUAKI ISHIKAWA[2], ICHIRO YAMASHITA[2], YUKIHARU URAOKA[2,3], HISASHI YASUEDA[1] ([1]Ajinomoto Co., Inc., [2]NAIST, [3]JST, CREST)

【目的】DNA やタンパク質などの生体超分子は自己組織化能力によりナノサイズの均一な高次構造を形成できる。さらに、無機材料認識能力を持つ分子も存在し、骨や貝殻などにみられるように無機材料を用いて均一な微細構造を構築することができる。我々はこのような生体分子の持つ特に二つの能力を無機ナノ素材合成や半導体加工技術に応用することを目指している。本発表では、次世代のエレクトロニクス材料として注目され、太陽電池やトランジスタ等への応用が検討されているカーボンナノチューブ（CNT）に着目し、その周囲へタンパク質を用いて酸化物半導体の代表的な素材である酸化チタン膜の被膜を試みた。すなわち、CNT 表面を認識し、その表面に酸化チタンを特異的に析出させる触媒能を持つタンパク質を人工的にデザインし、CNT-酸化チタンのナノ複合体の合成を試みた。
【方法】12 量体を形成し内部に直径 4 nm の空洞を持つ *Listeria innocua* 由来のカゴ状蛋白質 Dps の遺伝子を改変することで、CNT 結合性ペプチドとチタン析出能力を持つペプチドを同時に表面提示した新規なカゴ状タンパク質 CDT1 を設計し、これを *Escherihia coli* で量産化した(1)。そしてその CNT 結合能やチタン化合物析出能力を、水晶発振子マイクロバランス法(QCM)や透過型電子顕微鏡(TEM)などにより解析した。
【結果】QCM によりタンパク質と CNT の結合力を計測したところ、CNT 結合性ペプチドを持つ CDT1 は、Dps と比較して CNT への結合速度が約 30 倍高かった。そして、CDT1 と CNT を混合し超音波処理することで、CNT の周囲に多数の CDT1 が吸着し CNT-CDT1 複合体を得ることができた。さらに、その複合体とチタン化合物前駆体を混合し室温で放置することで CNT の周囲にチタン化合物膜を特異的に形成させることに成功した。続いて、その複合体を加熱処理することで、CNT の周囲にタンパク質由来の空孔酸化チタン膜を持つ、新規な CNT-酸化チタン複合体を合成することができた。この素材は、従来の CNT-酸化チタン複合体よりも、3 倍大きな表面積を持っていた。このような複合素材は、例えば、色素増感太陽電池の電極特性を向上させるのに利用することができる(2)。すなわち、人工的にデザインされた無機物結合能力と無機物析出能力を持つタンパク質を利用することで、CNT などの繊維状のナノ構造体の周囲に、比較的マイルドな反応条件で、特異的なナノ構造を持つ酸化物半導体膜を形成できることが分かった。

(1) I. Inoue, et al. *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 12649.
(2) I. Inoue, et al. 245th ACS National Meeting & Exposition, New Orleans, USA, 2013.

Biological supramolecule, Single-walled carbon nanotube, TiO_2

講演番号：4D03a10
講演日時、会場：3 月 30 日 10:38～ D 校舎 03 会場

チオレドキシン高含有酵母抽出物によるメラニン合成抑制効果

Suppressive effect on melanin synthesis by thioredoxin-enriched yeast extract

○伊井野 貴史、山下 裕輔、丸 勇史、金 武祚（（株）ファーマフーズ)
○Takashi IINO, Yusuke YAMASHITA, Isafumi MARU, Mujo KIM (Pharma Foods International Co., Ltd)

【目的】

チオレドキシンは生体が酸化ストレスや炎症に曝されたときに誘導される抗酸化・抗炎症活性を有するタンパクである。我々はこれまでチオレドキシン高含有酵母抽出物（以後 TRX と表記）摂取時の口腔内炎症予防効果や、喫煙時の唾液タンパクの酸化予防効果等、機能性食品素材としての効果を報告してきたが、今回メラニン合成抑制効果およびその作用機序について検討したので報告する。

【方法】

メラニン合成抑制試験

マウスメラノーマ B16-4A5 細胞（以後 B16 細胞と表記）を培養し、100 nMα-MSH(Melanocyte stimulating hormone)存在下で TRX を培地に添加して 3 日間培養後、自動細胞計数計(ADAM)により細胞数を計数、同時にメラニンを抽出・定量し、一定細胞数あたりのメラニン量を算出した。

チロシナーゼ活性阻害試験

メラニンはチロシナーゼという酵素により L-チロシン → L-DOPA → DOPAquinone を経由して生合成される。マッシュルーム由来のチロシナーゼを用い L-DOPA を基質としてメラニンが合成される反応系に、TRX を添加して 37℃でインキュベーション後、OD492 を測定することによりチロシナーゼ酵素に対する阻害活性を調べた。

チロシナーゼ遺伝子発現抑制試験

B16 細胞を培養、100 nMα-MSH 存在下で TRX を培地に添加して 24 時間培養後、Total RNA を抽出、cDNA 合成、リアルタイム PCR を行い、GAPDH mRNA の発現量に対するチロシナーゼ mRNA の発現量の割合を算出した。

【結果】

TRX は濃度依存的に単位細胞数あたりのメラニン合成を抑制した。一方、チロシナーゼに対する酵素阻害活性は認められず、チロシナーゼ遺伝子に対する発現抑制効果が認められた。これらの結果より、TRX はチロシナーゼに対する酵素阻害ではなく、チロシナーゼ遺伝子を特異的に発現抑制することによりメラニン合成抑制効果を示すものと考えられる。

以上の結果より、チオレドキシン高含有酵母抽出物（TRX）は機能性食品素材として有望であるばかりではなく、美白を目的とする化粧品素材としても有望であることが示された。

thioredoxin, melanin, tyrosinase

講演番号：4D03a11
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ D 校舎 03 会場

抗スギ、ヒノキ花粉鶏卵抗体（IgY）を用いたヒトにおける花粉症症状緩和効果

The hen egg antibody against the Cedar and Hinoki cypress pollen was effective for palliation of pollinosis symptoms in human

○山下 裕輔、山津 敦史、丸 勇史、金 武祚（株式会社ファーマフーズ）
○ Yusuke YAMASHITA, Atsushi YAMATSU, Isafumi MARU, Mujo KIM (Pharma Foods International Co., Ltd.)

【目的】
花粉症は、花粉によって引き起こされるアレルギー疾患で、日本では特にスギ、ヒノキの花粉症が多い。花粉に含まれるアレルゲンが鼻粘膜上皮に接することでアレルギー反応が惹起される。我々は、アレルゲンが粘膜上皮に接する前に中和できればアレルギー反応が緩和されると考え、スギ、ヒノキ花粉アレルゲンに対する鶏卵抗体（抗花粉 IgY）を作製した。本発表では、抗花粉 IgY の効果検証として、花粉飛散時期に抗花粉 IgY を貼着したマスクを花粉症患者に使用してもらい、アレルギー症状軽減効果として評価した。
【材料および方法】
スギ、ヒノキの各花粉を等量混合し抗原として産卵鶏へ免疫した。抗体力価が上昇した卵黄から抗花粉 IgY を精製した。抗花粉 IgY はエアロゾルスプレーに配合してマスク用スプレーとした。ヒト試験はダブルブラインドクロスオーバーで、花粉の飛散量、天候がほぼ等しい日に（2013 年 4 月 19 日、22 日）行った。スギ、ヒノキ花粉 IgE の血中濃度が高く、花粉症自覚症状がある被験者 5 名に対し、抗花粉 IgY スプレーで 2 秒間噴霧したマスク、あるいはコントロール IgY スプレーマスクいずれかを 1 日使用してもらった。マスク着用日の朝、夜に、日本アレルギー性鼻炎標準 QOL 調査票に基づき、鼻や目の症状をスコア化し、抗花粉 IgY の効果を検証した。
【結果】
抗花粉 IgY は各花粉由来タンパク質を特異的に認識した。さらに、エアロゾルスプレー中においても抗体力価の減損は認められなかった。ヒト試験では、鼻の症状で、鼻水、鼻詰まり、鼻のかゆみは抗花粉 IgY スプレーマスク着用時においてスコアの低下（改善）が認められた。特に、鼻の症状全項目の総合スコアにおいては、プラセボマスク着用時よりも、有意なスコア低下が認められた（$p<0.01$）。
【結論】
抗花粉 IgY は、マスク表面上で各花粉アレルゲンと結合することによりアレルゲンを中和し、その結果、マスク着用者のアレルギー症状を緩和していることが推察された。抗花粉 IgY は花粉症のセルフメディケーションにおける機能性素材として有用であると思われる。

hen egg antibody, pollinosis, mask spray

講演番号：4D03a13
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ D 校舎 03 会場

Human papillomavirus L1 タンパク質の発現と磁気微粒子を用いたタンパク質精製
Expression of *Human papillomavirus* L1 protein and protein purification by using magnetic nanoparticle

○吉松 勝彦[1]、油井 恵[2]、アメド ラヒン[3]、加藤 竜也[1]、朴 龍洙[1]([1]静岡大グリーン科技研、[2]静岡大院農、[3]静岡大院創造科技研)
○Katsuhiko YOSHIMATSU[1], Megumi YUI[2], Syed Rahin AHMED[3], Tatsuya KATO[1], Enoch Y. PARK[1] ([1]Res. Inst. of Green Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Agric., Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ.)

Human papillomavirus(以下 HPV)は日本語では，ヒト乳頭腫ウイルスと呼ばれ，いぼの原因となるウイルスを含むグループである．近年話題となっている子宮頚癌の原因となるウイルスもこのグループに含まれる． HPV のキャプシドは主に，L1 タンパク質の 5 量体(キャプソミアー)72 個からなっており，キャプソミアーは，自己集合して virus like particle(以下 VLP)と呼ばれる空のキャプシドを形成する．VLP はワクチンとしての利用や融合タンパク質発現の核としての利用が考えられるが，その精製は大変困難であった．

今回の実験では尖圭コンジローマの原因ウイルスである HPV タイプ 6 b を材料として用い，Flag タグを付加した L1 タンパク質の発現をカイコ - バキュロウイルス発現系を用いて行い,アフィニティーカラムを用いて精製を行った． また，このタンパク質の精製を試みるにあたって，Magnetic Nano Particle（磁気微粒子，以下 MNP)が特異的にタンパク質に結合することを見出したので，MNP のタンパク質精製への応用も合わせて報告する．

＜実験＞　HPV L1 遺伝子を Flag tag をデザインしたプライマーを用いて PCR 増幅した後，pFastBacI に Infusion で導入した．得られた pFastBacI 改変プラスミドを，大腸菌 Bm10Bac に形質転換し，細胞内組み換えによって組み換えバクミドを得た．得られたバクミドを DMREI-C を用いて 5 齢 1 日目のカイコ幼虫に導入し，飼育したのち 5 齢 7 日目に脂肪体を回収した．得られた脂肪体サンプルを超音波破砕し，Flag アフィニティーカラムを用いて Flag tag 結合 L1 タンパク質を精製した．

精製した L1 タンパク質，および脂肪体サンプルを MNP とインキュベートし MNP と L1 タンパク質の結合を調べた．

＜結果＞　組み換えバクミドを感染させたカイコでは，体液中には L1 タンパク質の発現は見られず，脂肪体に発現が確認された．アフィニティーカラムを用いることによって，1g の脂肪体から 0.4mg の L1 タンパク質を精製することができた．

L1 タンパク質を発現させた脂肪体サンプルを MNP とインキュベートすると，カイコ由来のタンパク質はほとんど結合せずに，L1 タンパク質が特異的に吸着し，タンパク精製に利用できるできることが分かった．また，1 μg の MNP に，精製した L1 タンパク質は，0.18μg 結合することが分かった．

protein purification, magnetic nanoparticle

講演番号：4D03a14
講演日時、会場：3 月 30 日 11:21～ D 校舎 03 会場

Chimeric virus like particles (VLPs) made using capsid (gag-577 and M1) proteins from Rous Sarcoma Virus and Influenza virus.
○Vipin Kumar Deo[1], Tatsuya Kato[1,2], Mizuho Harada[2], Enoch Y Park[1,2] ([1]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [2]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University)

New bio-materials like enveloped virus like particles (VLPs) have shown ingenuity in fusion with cells and play important role in rapidly evolving vaccine development and drug delivery systems (DDS) platforms. We propose chimera VLPs can be made using one or more capsid proteins (chimera) in silkworm expression system provided they re-assemble in near vicinity of each other and thus serve as a dual platform. Three types of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) bacmids, encoding RSV-gag, M1 and rscFvs cDNA, were co-injected into silkworm larvae to produce chimera VLPs (VLP-M1-rscFv). At 7 days post-injection, hemolymphs (30 silkworms) were collected and proteins purified using DDDDK affinity column. One milligrams of chimera VLPs was purified and there composition was confirmed by standard western blotting by probing the membrane with specific antibodies against capsid protein group antigen protein (gag) from Rous sarcoma virus and M1 from influenza virus. These chimera VLPs also displayed glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored tumor targeting short chain fragment region (scFVs) which target tumor associated glycoprotein-72 (TAG-72) a marker protein. The antigenicity and GPI anchor of rscFvs on chimera VLPs was confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using TAG-72 as antigen and Phospho inositol lipase C (PI-PLC) respectively. The morphology and diameter of the chimera VLPs were confirmed by transmission electron microscope and dynamic light scattering, respectively showing smooth particle size of approximately 30 nm. These chimera VLPs can specifically bind to colon carcinoma cells and the presence of M1 and gag proteins was confirmed using confocal microscope. Based on similar principle chimera VLPs specifically target colon carcinoma spheroids in vitro as a model for DDS and test the potential for immunotherapy against colon carcinoma tumors. One hundred micrograms of chimera VLPs were also injected into balb/c mice by 3 dose-regimen in interval of 2 weeks to confirm the potential for vaccination platform. M1 protein is a conservered protein in known influenza virus and has potential to be used as a universal flu vaccine saving yearly recurring costs and fatalities. The serum collected from the mice show potential for vaccination. Our study has shown that chimera VLPs produced using silkworm expression system serves dual purpose of DDS and vaccination, a new and efficient system which can be easily scaled up.
Keywords: display technology; macromolecular nano-structures; Universal Flu vaccine; virus-like particle; silkworm expression system

Macromolecular nano-structures; Universal Flu vaccine; Drug delivery system, Virus-like particle, Silkworm expression system

講演番号：4D03a15
講演日時、会場：3 月 30 日 11:32～ D 校舎 03 会場

Metal enhanced fluorescence based Influenza A (H1N1) virus detection on nanoporous gold leaf

○SYED Rahin AHMED[1,2], Md Ashraf Hossain[2], Dongyun Lee[3], Tetsuro Suzuki[4], Jaebeom Lee[3], Enoch Y. Park[1,5] ([1]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [2]Department of Nano Fusion Technology, Pusan National University, [3]Department of Cogno-Mechatronics Engineering, Pusan National University, [4]Department of Infectious Diseases, Hamamatsu University School of Medicine, [5]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University)

Influenza viruses have intimidated human society recently.. In the present study, a rapid, sensitive and quantitative detection of influenza A (H1N1) virus targeting Hemagglutinin (HA) was developed using hybrid structure of quantum dots (QDs) and nanoporous gold leaf (NPGL). NPGL was prepared by the dealloying method and brought near QDs by means of ultrasonic-assisted layer-by-layer self assembly. A maximal four-fold increase in fluorescence intensity and drastic reduction of the time-resolved fluorescence lifetime were observed for the rougher nanoporous films. Hemagglutinin antibody (HA ab 66189) was bound with NPGL and amino ($–NH_2$) terminated QDs by an amide bond, which was confirmed by ELISA. These biofunctionalized NPGL and QDs formed a complex with the influenza A (H1N1) virus and the photoluminescence (PL) intensities of QDs were linearly correlated with the concentrations of the virus up to 1 ng/ml. In the absence of the virus and in bovine serum albumin (BSA, 1 μg/ml) alone, no PL was observed. In addition, in clinical sample monitoring, it was demonstrated that this assay successfully measured influenza virus at a concentration of approximately 50 plaque forming units (PFU)/ml which is 200 times more sensitive than commercial rapid influenza diagnostic test. From the results, the proposed assay potentially offers rapid and sensitive influenza virus detection and may assist public health laboratories in the upcoming influenza season.

Metal enhanced fluorescence　(MEF), Influenza A (H1N1) virus, Nanoporous gold leaf (NPGL)

講演番号：4D03a16
講演日時、会場：3 月 30 日 11:43～ D 校舎 03 会場

Silver Nanoparticle assisted Macromolecule drug for internalization into mycobacterial smegmatis

○FANGFANG SUN, Enoch Y. Park (Shizuoka University)

Nanotechnology has been widely demonstrated and applied for the treatment, diagnosis, monitoring and control of biological systems [1], which include the development of nanoparticles for the diagnostic and screening purposes, manufacture of drug delivery and single-virus detection. Among all the promising nanomaterials with antibacterial properties are metallic nanoparticles, silver (Ag) nanoparticle has long been known as a considerable antibiotics [2]. In this work, silver nanoparticle (Ag NP) and Ag NP bioconjugated with vancomycin (Ag@VAM) via amide bond formation between activated carboxyl groups and amine groups have been prepared, subsequently they were treated with *Mycobacterial smegmatis*. The effect of Ag NP and Ag@VAM after treated with *M. smegmatis* have been investigated by UV-vis spectroscopy, confocal microscopy and transmission electron microscopy (TEM). Moreover, the viability of the *M. smegmatis* after treated with Ag and Ag@VAM have been evaluated. Results showed that comparing with Ag NP non-conjugated with VAM, significant decrease around 27% in UV absorption of Ag@VAM was monitored, which means the Ag NPs after conjugated with VAM exhibit more strong internalization ability into the *M. smegmatis*. Meanwhile, TEM and confocal images showed the consistent results with UV data. The results pave a new way in drug delivery system for the macromolecule drug with the assistant of nanotechnology.

Reference:

[1] Mritunjai Singh, et al. Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures 3,3 (2008) 115 – 122.

[2] Jose Ruben Morones, et.al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology, 16 (2005) 2346-2353

silver nanoparticle, vancomycin, internalization

講演番号：4D03a17
講演日時、会場：3 月 30 日 11:54～ D 校舎 03 会場

C 型肝炎ウイルスコアタンパク質と細胞内抗体の発現と機能解析

Expression and functional analysis of hepatitis C virus core protein and its intrabody

山本 英[1]、デオ ビピン クマール[2]、○加藤 竜也[1,2]、鈴木 哲朗[3]、朴 龍洙[1,2,4] ([1]静大農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]浜医大・感染症学、[4]静大・創科技院)
Takeshi Yamamoto[1], Vipin Kumar Deo[2], ○Tatsuya Kato[1,2], Tetsuro Suzuki[3], Enoch Y. park[1,2,4] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Research Institute of Green Science and Technology , Shizuoka University, [3]Department of Infectious Diseases, Hamamatsu University School of Medicine, [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】C型肝炎は世界中で約 1 億 7 千万人の患者が確認されている一方で、その有効なワクチンは知られていない。C型肝炎はC型肝炎ウイルス（Hepatitis C virus ： HCV）に感染することで発症する病であるが、C型肝炎ウイルスは未だ明らかになっていない部分が多い。またその感染はヒトとチンパンジーに限定されており、小動物モデルがいないことも有効な治療薬の開発の妨げとなっている。一方で、抗 HCV コア細胞内抗体はC型肝炎ウイルスの感染と増殖に重要な役割を果たす、C型肝炎ウイルスのコアタンパク質の機能を阻害することが明らかになった。本研究は、HCV 産生を阻害する抗 HCV コア細胞内抗体について、精製抗体及びコアー抗体複合体の立体構造を解析し、その知見を基に新たな抗 HCV 剤の開発へ展開を目指すものである。そこで、抗 HCV コア細胞内抗体をカイコで発現し、精製を行い、精製した抗 HCV コア細胞内抗体を用いてC型肝炎ウイルスコアタンパク質との相互作用を検討したので、ここで報告する。
【方法と結果】抗原相補性決定領域（CDR）から成る抗 HCV コア細胞内抗体(1Y4L）の遺伝子を含んだプラスミド（pCAG/1Y4L）から、PCR により抗 HCV コア細胞内抗体の配列を増幅した。更に 1Y4L 遺伝子にウェスタンブロットでの検出や精製のためのタグ配列、及びカイコでの分泌シグナルの配列を連結した遺伝子を TOPO Cloning、Gate way technology、Bac-to-Bac を用いて *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus （BmNPV） -Bacmid へ組込み、Bacmid/1Y4L を得、これをカイコに注射した。また、タンパク質のフォールディングを補助するシャペロンタンパク質の HSP70 遺伝子を組込んだ Bacmid/HSP70 も同時に注射し、1Y4L と HSP70 を共発現させた。組換えバクミドによる十分な感染を確認した後、カイコの体液と脂肪体を回収して、anti-FLAG M2 antibody agarose クロマトグラフィーで目的タンパク質を精製した。HEK293T 細胞または大腸菌 BL21（DE3）に、コアタンパク質と HA タグまたは His タグ配列を組込んだ発現ベクター（pCAG/38HA、pCold/C152）を導入することにより発現させたコアタンパク質と得られた精製 1Y4L との相互作用を ELISA、免疫沈降や Biacore で確認したところ、組換え抗 HCV コア細胞内抗体とコアタンパク質との相互作用が確認された。更に HSP70 との共発現により、抗 HCV コア細胞内抗体のコアタンパク質への結合能は向上した。これらの結果より、組換え抗 HCV コア細胞内抗体はコアタンパク質に結合でき、今後コアタンパク質の解析ツールとして利用可能であることが示唆された。

hepatitis C virus, intrabody, protein expression

シンポジウムプログラム

3 月 30 日（日）13 : 30〜16 : 30

4SY01　天然物創薬「いつやるの？　今でしょ」

3 月 30 日（日）13 : 30〜16 : 30　A05 会場（中央校舎 4F）
世話人：長田裕之（理研 CSRS），井本正哉（慶應大理工）
座　長：長田裕之（理研 CSRS），井本正哉（慶應大理工），加藤直樹（理研 CSRS）

13 : 30　はじめに……○長田裕之（理研 CSRS）
13 : 35　4SY01–1　世界における天然物創薬の現状……○長田裕之（理研 CSRS）
14 : 00　4SY01–2　韓国における天然物創薬の現状……○張　宰赫，安　宗石（韓国生命工学研究院）
14 : 25　4SY01–3　**Current situation of natural product drug discovery in China**
……○Jianhua Qi（Zhejiang Univ.）
14 : 50　4SY01–4　日本における天然物創薬の現状……○井本正哉（慶應大理工）
15 : 15　4SY01–5　アカデミアにおける天然物創薬研究―微化研の今―……○川田　学（微化研・沼津）
15 : 40　4SY01–6　企業における天然物創薬・シード探索の方向性
……○高瀬保孝（エーザイ　オンコロジー創薬ユニット）
16 : 05　総合討論，おわりに……○井本正哉（慶應大理工）

4SY02　あえて言(い)おう！自然の摂理を読み解くサルファーワールド

3 月 30 日（日）13 : 30〜16 : 30　A02 会場（中央校舎 4F）
世話人：大津厳生（奈良先端大バイオ），大津直子（農工大生物生産科），高木博史（奈良先端大バイオ）
座　長：大津厳生（奈良先端大バイオ），大津直子（農工大生物生産科），高木博史（奈良先端大バイオ），
河野祐介（奈良先端大バイオ）

13 : 30　4SY02–1　大腸菌における硫黄源の選択的利用によるシステイン合成機構：サルファーリプレッション
……○大津厳生，河野祐介，仲谷　豪（奈良先端大・バイオ）
14 : 00　4SY02–2　バクテリアの硫黄代謝とシステイン発酵……○野中　源（味の素(株)）
14 : 30　4SY02–3　植物における有機態硫黄の貯蔵形態であるグルタチオンの代謝機構
……○大津直子，北岩泰祐（東京農工大農）
15 : 00　4SY02–4　硫黄栄養の変化に応じた植物の硫黄同化と代謝の調節機構……○丸山明子（九州大院農）
15 : 30　4SY02–5　酸化ストレス応答とポリチオールバイオロジー……○赤池孝明（東北大院医）
16 : 00　4SY02–6　**CO 感受性受容体：Cystathionine *β*-synthase の生物学的意義**
……○末松　誠[1,2]（[1]慶應義塾大学医学部医化学教室，
[2](独)科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業 末松ガスバイオロジープロジェクト研究総括）

4SY03　モノづくり農芸化学における「生命システム工学」を利用した次世代プラットホーム

3 月 30 日（日）13 : 30〜16 : 30　A03 会場（中央校舎 4F）
世話人：前田理久（明治大農），松本謙一郎（北海道大工院）
座　長：前田理久（明治大農），高木博史（奈良先端大バイオ），花井泰三（九州大院農），木賀大介（東工大院総合），
梅野太輔（千葉大工），南　博道（石川県大生物研）

13 : 30　はじめに……○前田理久（明治大農）
13 : 35　4SY03–1　酵母に見出したプロリン・アルギニン代謝を介した抗酸化機構とその応用
……○高木博史（奈良先端大バイオ）
14 : 00　4SY03–2　合成生物学の物質生産への利用……○花井泰三（九大院農）
14 : 25　4SY03–3　システム工学を応用した合成生物学による人工遺伝子回路のプログラミング
……○木賀大介[1,2]（[1]東工大院総理工，[2]東工大地球生命研）
14 : 50　4SY03–4　代謝ネットワーク機能の進化デザイン……○梅野太輔[1,2]（[1]千葉大学院工，[2]JST さきがけ）
15 : 15　4SY03–5　植物アルカロイド発酵生産のための微生物プラットフォームの構築
……○南　博道（石川県大資源研）
15 : 40　4SY03–6　バイオマスから高効率で乳酸プラスチックを生産する微生物工場の開発とポリマー物性評価
……○松本謙一郎[1]，前田理久[2]，田口精一[1,3]（[1]北大院工，[2]明治大院農，[3]CREST・JST）
16 : 05　おわりに……○松本謙一郎（北海道大工院）

4SY04　生命現象の鍵として働く化合物とその標的タンパク質の化学と生物

3 月 30 日（日）13:30〜16:30　A04 会場（中央校舎 4F）
世話人：河岸洋和（静岡大グリーン研），東原和成（東大院農），西川俊夫（名大院農）
座　長：河岸洋和（静岡大グリーン研），東原和成（東大院農），西川俊夫（名大院農）

13:30　4SY04–1　海洋産抗腫瘍性物質アプリロニン A の生物有機化学……○木越英夫（筑波大数理物質）
14:05　4SY04–2　シロアリ社会における繁殖制御と女王フェロモンの多面的機能……○松浦健二（京大院農・昆虫生態）
14:40　4SY04–3　スギヒラタケ急性脳症事件の化学的解明の試み……○河岸洋和（静大グリーン研）
15:15　4SY04–4　ホタルの発光メカニズムの進化：ルシフェリンはどこから来て，どのようにしてルシフェラーゼの基質となったのか？……○大場裕一（名古屋大院生命農）
15:50　4SY04–5　動物の性行動を制御するフェロモンと受容体の同定……○東原和成（東大院農/JST ERATO）

4SY05　生命情報を活用した遺伝子やタンパク質の構造・機能解析

後　援　文部科学省創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業
3 月 30 日（日）13:30〜16:00　A01 会場（中央校舎 4F）
世話人：永田宏次（東大院農生科），五條堀　孝（国立遺伝研），清水謙多郎（東大院農生科）
座　長：永田宏次（東大院農生科），菅原秀明（国立遺伝研），清水謙多郎（東大院農生科）

13:30　4SY05–1　構造生命科学データクラウドはゲノムからタンパク質に至る課題を解決する……○菅原秀明（国立遺伝学研究所）
13:55　4SY05–2　タンパク質の構造予測，相互作用予測と創薬等 **PF** における支援……○清水謙多郎（東大農）
14:20　4SY05–3　**HOMCOS**：複合体立体構造の検索・モデリングサーバ……○川端　猛，中村春木，金城　玲（大阪大蛋白研）
14:40　4SY05–4　タンパク質機能解析に向けた立体構造情報の活用基盤の構築……○木下賢吾[1,2,3]，村上洋一[1]，城田松之[1,2]（[1]東北大院情報，[2]東北メディカルメガバンク，[3]加齢医学研究所）
15:00　4SY05–5　ゲノム塩基配列の変異と表現型の変化をつなぐタンパク質立体構造の変化……○由良　敬[1,2]（[1]お茶の水女子大学，[2]国立遺伝学研究所）
15:20　4SY05–6　構造生物学とバイオインフォマティクスの境界領域における研究支援と高度化……○永田宏次（東大院農生科）
15:40　4SY05–7　生命系の分子シミュレーション……○池口満徳（横浜市大院生命医）

4SY06　糖鎖工学における酵素・レクチンの開発と産業応用

3 月 30 日（日）13:30〜16:30　A06 会場（中央校舎 4F）
世話人：千葉靖典（産総研生物プロセス），北岡本光（農研機構食総研），北島　健（名大・生物機能セ）
座　長：北岡本光（農研機構食総研），千葉靖典（産総研生物プロセス），北島　健（名大・生物機能セ）

13:30　4SY06–1　酵母由来 **ENGase** の糖ペプチド合成への利用……○千葉靖典，村上智史，高橋佳江，小松崎亜紀子（産総研・生物プロセス）
14:00　4SY06–2　エンド-**α**-マンノシダーゼの応用……○松尾一郎（群馬大院理工）
14:30　4SY06–3　ヒトミルクオリゴ糖に作用するビフィズス菌の酵素　〜機能解析と応用〜……○片山高嶺（石川県立大学）
15:00　4SY06–4　ホスホリラーゼによる糖鎖合成……○中井博之（新潟大院自）
15:30　4SY06–5　ヒト **iPS/ES** 細胞特異的レクチンプローブの開発と産業応用……○舘野浩章（産総研）
16:00　4SY06–6　異種細胞での糖タンパク質生産に向けたプラットフォーム構築……○藤山和仁（大阪大生物国際交流セ）

4SY07　生物種を超えた脂質代謝制御のパラダイム

3 月 30 日（日）13:30〜16:30　A07 会場（中央校舎 4F）
世話人：植田和光（京大院農），佐藤隆一郎（東大院農生科）
座　長：植田和光（京大院農），佐藤隆一郎（東大院農生科）

13:30　はじめに……○佐藤隆一郎（東大院農生科）
13:32　4SY07–1　ラビリンチュラ類のグローバルな脂質代謝……○伊東　信（九大院農）
14:07　4SY07–2　ショウジョウバエのユニークな膜構築と脂質代謝機構……○梅田真郷（京大院工）
14:42　4SY07–3　骨・脂質代謝を制御する植物化学成分……○上原万里子（東農大応生）
15:17　4SY07–4　コレステロール恒常性維持の鍵をにぎるヒト **ABCA1** の分子メカニズム
……○植田和光[1,2]，永田　紅[2]，冨岡麻衣子[2]，石神正登[1]，川野邊峻哲[1]，伊藤晋平[1]，提坂友梨奈[1]，橋本秀彦[1]
（[1]京大院農，[2]京大 iCeMS）
15:52　4SY07–5　脂肪細胞分化過程における脂肪滴形成の分子基盤……○佐藤隆一郎（東大院農生科）
16:27　おわりに……○植田和光（京大院農）

4SY08　アルデヒドのバイオサイエンス－生物の多様なアルデヒド代謝系とその戦略的活用－

3 月 30 日（日）13:30〜16:30　C02 会場（第二校舎 5 号館 2F）
世話人：中川智行（岐阜大応生科），井上善晴（京大院農），由里本博也（京大院農）
座　長：中川智行（岐阜大応生科），井上善晴（京大院農），由里本博也（京大院農）

13:30　4SY08–1　微生物ホルムアルデヒド代謝の戦略的活用……○由里本博也，阪井康能（京大院農・応用生命）
14:00　4SY08–2　出芽酵母へのアルデヒド耐性の付与とリグノセルロース系エタノール生産への応用
……○蓮沼誠久（神戸大自）
14:30　4SY08–3　生物の持つアセトアルデヒド耐性能の分子メカニズムの解明と戦略的活用
……○中川智行（岐阜大応生）
15:00　4SY08–4　香料原料としてのアルデヒドの活用 …○江本英司，桜井和俊（高砂香料工業株式会社 研究開発本部）
15:30　4SY08–5　植物による揮発性アルデヒドの吸収と代謝－地球大気組成改善への貢献－
……○松井健二（山口大院医）
16:00　4SY08–6　メチルグリオキサールによる新しいインスリン抵抗性モデル……○井上善晴（京大院・農・応生科）

4SY09　次世代に向けた創農薬ターゲットの提案－最近の昆虫研究から

3 月 30 日（日）13:30〜16:30　C01 会場（第二校舎 5 号館 2F）
世話人：永田晋治（東大院新領域），吉永直子（京大院農），森　直樹（京大院農）
座　長：吉永直子（京大院農），永田晋治（東大院新領域）

13:30　はじめに……○永田晋治（東大院新領域）
13:36　4SY09–1　昆虫の嗅覚受容体を利用した細胞利用型匂いセンサ素子の性能評価
……○光野秀文[1]，櫻井健志[1]，岩松琢磨[2]，田中亜紀子[3]，並木重宏[4]，神崎亮平[1,2,3]
（[1]東大先端研，[2]東大院工，[3]東大院情報理工，[4]ハワードヒューズ医学研究所ジャネリアファーム）
14:04　4SY09–2　ヤエヤマサソリ毒液に含まれる殺虫性ペプチドの構造と活性
……○宮下正弘，中川好秋，宮川　恒（京都大院農）
14:32　4SY09–3　カイコにおけるイオン輸送ペプチド受容体の同定
……○永井千晶，長澤寛道，永田晋治（東大院・農生科・応生化）
15:00　4SY09–4　脱皮ホルモン生合成酵素阻害剤の探索
……○引場樹里[1]，藤本善徳[2]，片岡宏誌[1]（[1]東大院・新領域，[2]東工大院・理工）
15:28　4SY09–5　深化する性フェロモンの進化……○藤井　毅[1]，櫻井健志[2]（[1]東大院農，[2]東大先端研）
15:56　4SY09–6　昆虫に見られる **FACs** 生合成メカニズムの種間比較
……○吉永直子，森田沙代，吉田哲也，阿部弘明，森　直樹（京大院農）
16:24　おわりに……○森　直樹（京大院農）

4SY10　スフィンゴ脂質研究の新展開　―食品から医薬まで―

3 月 30 日（日）13:30～16:30　C03 会場（第二校舎 5 号館 2F）
世話人　菅原達也（京大院農），薩　秀夫（東大院農生科），財満信宏（近畿大院農）
座　長　菅原達也（京大院農），薩　秀夫（東大院農生科），財満信宏（近畿大院農）

13:30　はじめに……○菅原達也（京大院農）
13:35　4SY10–1　食品成分としてのスフィンゴ脂質の評価……○菅原達也（京大院農）
14:10　4SY10–2　スフィンゴ脂質研究の医薬品応用を目指して……○光武　進（佐賀大農）
14:45　4SY10–3　イメージングマススペクトロメトリーによるスフィンゴ脂質の可視化……○財満信宏（近畿大院農）
15:20　4SY10–4　生体蛍光イメージングによるスフィンゴシン 1 リン酸の細胞動態制御機構の解析
……○石井　優（大阪大院医免疫細胞生物学）
15:55　4SY10–5　スフィンゴシン–1–リン酸 2 型受容体のケミカルバイオロジー……○薩　秀夫（東大院農生科）

4SY11　農芸化学を横断するオートファジー研究の新展開

3 月 30 日（日）13:30～16:30　C05 会場（第二校舎 5 号館 3F）
世話人：阪井康能（京大院農・応用生命），門脇基二（新潟大院自然(農)），桐谷隆嘉（キリン(株)基盤技術研究所）
座　長：阪井康能（京大院農・応用生命），門脇基二（新潟大院自然(農)），桐谷隆嘉（キリン(株)基盤技術研究所）

13:30　4SY11–1　はじめに：オートファジーと栄養学……○門脇基二（新潟大院自然(農)）
13:55　4SY11–2　亜鉛飢餓によって誘導されるオートファジー
……○川俣朋子，堀江哲郎，松浪文珠，大隅良典（東工大　フロンティア）
14:20　4SY11–3　麹菌オートファジーのユニークな生理機能とその応用
……○菊間隆志，北本勝ひこ（東大院農生科・応生工）
14:45　4SY11–4　環境変動に対応するための Atg タンパク質によるオルガネラ動態制御機構
……○奥　公秀[1]，阪井康能[1,2]（[1]京大院農，[2]京大学際融合）
15:10　4SY11–5　植物の栄養リサイクルと葉緑体のオートファジー……○石田宏幸（東北大院農）
15:35　4SY11–6　哺乳動物におけるオートファジーの生理機能
……○久万亜紀子[1,2]，吉井紗織[1,3]，板倉英祐[4]，原　太一[5]，設楽浩志[6]，江石義信[7]，水島　昇[1]
（[1]東大・医・分子生物，[2]JST さきがけ，[3]東京医科歯科大・細胞生理，[4]MRC 分子生物学研究所，
[5]群馬大・細胞構造，[6]都医学研・基盤技術研究センター，[7]東京医科歯科大・人体病理）
16:00　4SY11–7　創薬におけるオートファジー研究の動向……○竹鼻健司（味の素製薬株式会社）
16:25　総括とまとめ……○阪井康能（京大院農・応用生命）

4SY12　トランスポーターを通して見る生命現象

3 月 30 日（日）13:30～16:30　C04 会場（第二校舎 5 号館 3F）
世話人：永森収志（阪大院医），木村泰久（京大院農）
座　長：永森収志（阪大院医），木村泰久（京大院農）

13:30　4SY12–1　精製タンパク質を用いたヒト ABC タンパク質の機能解析
……○木村泰久[1]，平山裕士[1]，井上修一[1]，津山智美[1]，
木岡紀幸[1]，松尾道憲[1]，加藤博章[2]，植田和光[1,3]
（[1]京大院・農・応用生命，[2]京大院・薬，[3]京大 iCeMS）
14:00　4SY12–2　病原真菌における ABC タンパク質を介したステロール取り込み……○田辺公一（国立感染研・真菌）
14:30　4SY12–3　リン代謝調節機序における NaPi トランスポーターの役割
……○瀬川博子，宮本賢一（徳島大院ヘルスバイオサイエンス研究部分子栄養学分野）
15:00　4SY12–4　コレステロールおよび脂溶性ビタミンの腸管吸収……○高田龍平，鈴木洋史（東大病院薬）
15:30　4SY12–5　亜鉛トランスポーターの機能：亜鉛欠乏症の観点から……○神戸大朋（京大院生命）
16:00　4SY12–6　網羅的定量オミクスによるトランスポーター研究の新しい展開
……○永森収志，金井好克（阪大院医）

4SY13　γ–グルタミル化合物の魅力～そのユニークな生物学的意義と秘められた応用的価値～

3 月 30 日（日）13:30～16:30　B03 会場（第一校舎 1 号館 2F）
世話人：鈴木秀之（京都工繊大），平竹　潤（京大化研）
座　長：平竹　潤（京大化研），鈴木秀之（京工繊大）

13:30　4SY13–1　γ–グルタミル化合物の特徴と γ–グルタミル結合を生成できる様々な微生物酵素について
……◦鈴木秀之（京都工繊大）

13:55　4SY13–2　ポリ–γ–グルタミン酸の合成と改質，並びに応用例について
……◦芦内　誠（高知大院農）

14:20　4SY13–3　γ–Glu–Val–Gly の呈味特性 ……◦宮村直宏（味の素(株)）

14:45　4SY13–4　世界で通じるアミノ酸「テアニン」の製造技術とその多様な機能
……◦ジュネジャ・レカ・ラジュ（太陽化学(株)）

15:10　4SY13–5　トランスグルタミナーゼによる食品のテクスチャー改良……◦熊澤義之（味の素(株)）

15:35　4SY13–6　γ–グルタミルトランスペプチダーゼの構造と機能相関
……◦和田　啓[1]，鈴木秀之[2]，平竹　潤[3]，福山恵一[4]
([1]宮崎大テニュアトラック推進機構，[2]京都工繊大院工芸，[3]京大化研，[4]阪大院工)

16:00　4SY13–7　γ–グルタミルトランスペプチダーゼ阻害剤とグルタチオン制御　―アンチエイジング効果と創薬標的としての価値―
……◦平竹　潤[1]，小島(湯浅)明子[2]，李　春杰[1]，渡辺文太[1]，鈴木秀之[3]，和田　啓[4]，福山恵一[5]
([1]京大化研，[2]大阪市大院生活科学，[3]京都工繊大応生，[4]宮崎大テニュアトラック，[5]阪大院工)

4SY14　農芸化学における精神疾患のマイクロエンドフェノタイプ

共　催　科研費新学術領域（領域提案型）「マイクロエンドフェノタイプによる精神病態学の創出（マイクロ精神病態）」
3 月 30 日（日）13:30～16:30　B02 会場（第一校舎 1 号館 2F）
世話人：喜田　聡（東農大・応生科・バイオ），竹中麻子（明大・農・農化）
座　長：喜田　聡（東農大・応生科・バイオ），竹中麻子（明大・農・農化）

13:30　はじめに……◦喜田　聡（東農大・応生科・バイオ）

13:35　4SY14–1　心的外傷性ストレス障害のメカニズム解明に向けた臨床研究と基礎研究の融合
……◦富田博秋，兪　志前，笠原好之，小野千晶（東北大災害研）

14:10　4SY14–2　多価不飽和脂肪酸と統合失調症……◦吉川武男，前川素子（理研 BSI）

14:45　4SY14–3　多価不飽和脂肪酸・コレステロールと心的外傷後ストレス障害のリスク：食事療法による一次予防に向けて……◦松岡　豊（国立精神・神経医療研究センター）

15:20　4SY14–4　抗酸化ビタミンの欠乏と不安行動……◦竹中麻子（明治大農）

15:55　4SY14–5　脳栄養学的観点からの精神疾患のマイクロエンドフェノタイプ
……◦喜田　聡[1,2]（[1]東農大応生科，[2]CREST, JST）

4SY15　アプライド RNA サイエンス ―産業利用を目指した微生物・植物・動物の RNA 研究―

3 月 30 日（日）13:30～16:30　B04 会場（第一校舎 1 号館 2F）
世話人：増田誠司（京大院・生命），井沢真吾（京都工繊大）
座　長：増田誠司（京大院・生命），井沢真吾（京都工繊大）

13:30　4SY15–1　mRNA flux からの見た酵母のストレス耐性と発酵能の改良 ……◦井沢真吾（京都工繊大）

13:55　4SY15–2　核酸アプタマーによる低分子カビ毒パツリンの新規検出系の開発
……◦森田悠治[1]，冨田康之[1]，菅　裕明[2]，藤原大介[1]
([1]キリン(株)基盤技術研究所，[2]東京大学理学系研究科)

14:20　4SY15–3　接ぎ木と siRNA 篩管輸送による品種改良 ……◦原田竹雄，北條初音，葛西厚史（弘前大農生科）

14:45　4SY15–4　RNA を用いた新奇害虫防除法の開発……◦佐藤　豊，新美輝幸，吉岡博史（名大院生農）

15:10　4SY15–5　mRNA のエンジニアリングに基づく動物細胞の遺伝子発現制御系
……◦遠藤　慧[1]，齊藤博英[1,2]（[1]京大 iPS 研，[2]京都大白眉）

15:35　4SY15–6　動物細胞の核外輸送過程を利用したタンパク質生産 ……◦増田誠司（京大院・生命）

16:00　総括と今後の展望 ……◦増田誠司[1]，井沢真吾[2]（[1]京大院・生命，[2]京都工繊大）

4SY16　オメガ 3 脂肪酸－より良い脂質バランスを実現するための機能解析と製品・生産法開発

3 月 30 日（日）13:30～16:30　B05 会場（第一校舎 1 号館 2F）
世話人：小川　順（京大院農），林　雅弘（宮崎大農），永尾晃治（佐賀大農）
座　長：小川　順（京大院農），林　雅弘（宮崎大農），永尾晃治（佐賀大農）

13:30　はじめに……○小川　順（京大院農）
13:35　4SY16–1　脂質バランス栄養食品を創出する新規オメガ 3 脂肪酸素材の開発
……○櫻谷英治[1]，安藤晃規[1,2]，岸野重信[1]，日比　慎[3]，小川　順[1,2]
（[1]京大院農・応用生命，[2]京大・生理化学ユニット，[3]京大院農・産業微生物）
14:00　4SY16–2　海洋性微生物資源を活用するオメガ 3 脂肪酸素材の生産……○林　雅弘（宮崎大農）
14:25　4SY16–3　オメガ 3 脂肪酸の栄養化学……○永尾晃治（佐賀大農）
14:50　4SY16–4　オメガ 3 脂肪酸の抗炎症作用とメタボロミクス
……○磯部洋輔[1]，有田　誠[1,2]，新井洋由[1]（[1] 東大院薬，[2]JST さきがけ）
15:15　4SY16–5　オメガ 3 脂肪酸によるリポタンパク質の質的制御を介した生理作用
……○松尾道憲[1]，斉藤貴将[1]，中塔充宏[1]，木岡紀幸[1]，小川　順[1]，植田和光[1,2]
（[1]京大院農，[2]京大 iCeMS）
15:40　4SY16–6　オメガ 3 脂肪酸の機能を生かした食品の開発……○河島　洋（サントリーウエルネス・健康科学研）
16:05　4SY16–7　EPA の健康機能の新たな応用をめざして……○辻　智子（日本水産株式会社）

4SY17　食肉由来成分の健康寿命延伸効果と機能性発現の分子メカニズム

3 月 30 日（日）13:30～16:30　B06 会場（第一校舎 1 号館 3F）
世話人：片倉喜範（九大院農），久恒辰博（東大院新領域）
座　長：片倉喜範（九大院農），久恒辰博（東大院新領域）

13:30　4SY17–1　鶏肉由来高機能ジペプチドの脳老化予防への可能性……○久恒辰博（東京大院新領域）
14:10　4SY17–2　脳老化予防を評価する MRI 撮像および解析手法の標準化
……○松田博史（国立精神・神経医療研究センター）
14:50　4SY17–3　鶏肉由来高機能ジペプチドの免疫調節作用……○戸塚　護，薩　秀夫，清水　誠（東大院農生科）
15:30　4SY17–4　マイクロアレイ解析による鶏肉由来高機能ジペプチドの機能性検証……○片倉喜範（九大院農院）
16:00　4SY17–5　鶏肉由来高機能ジペプチドの応用可能性……○佐藤三佳子，松本貴之，森松文毅（日本ハム中研）

4SY18　食と健康のインターフェースを考える腸内細菌研究の最前線

協　賛　日本乳酸菌学会
3 月 30 日（日）13:30～16:30　D01 会場（第二校舎 A 館 2F）
世話人：中山二郎（九大院農），横田　篤（北大院農），山本憲二（石川県大）
座　長：山本憲二（石川県大），横田　篤（北大院農），中山二郎（九大院農）

13:30　はじめに……○中山二郎（九大院農）
13:35　4SY18–1　Asian Microbiome Project：アジア人の食と腸内フローラと健康に関する調査研究
……○中山二郎[1]，渡辺幸一[2]，Lee Yuan Kun[3]
（[1]九大院・農，[2]ヤクルト中研，[3]シンガポール国立大）
14:05　4SY18–2　統合オミクスによる宿主－腸内細菌間相互作用の理解
……○福田真嗣[1,2]（[1]慶大先端生命研，[2]理研 IMS）
14:35　4SY18–3　腸内細菌によるオリゴ糖分解の解析……○山本憲二（石川県大生物資源研）
14:55　4SY18–4　比較ゲノム解析から推測されるヒト常在ビフィズス菌（HRB, Human-Residential Bifidobacteria）の生存戦略……○小田巻俊孝，小田巻俊孝，堀米綾子，菅原宏祐，橋倉那波，南　淳一，清水（肖）金忠，阿部文明
（森永乳業食基研）
15:25　4SY18–5　腸内細菌が作り出すシンビオジェニック因子ポリアミン～その機能と生産最適化
……○栗原　新[1]，松本光晴[2]，鈴木秀之[3]，辨野義己[4]
（[1]石川県大・腸内細菌共生機構学，[2]協同乳業・研究所・技術開発，[3]京工繊大院・応用生物，[4]理化学研究所・辨野研）
15:55　4SY18–6　胆汁酸と腸内フローラ：メタボリックシンドローム発症との関連性
……○横田　篤[1]，吹谷　智[1]，イスラムケービーエムサイフル[1]，大岡唯祐[2]，小椋義俊[2,3]，林　哲也[2,3]，萩尾真人[1]，石塚　敏[1]
（[1]北大院農，[2]宮崎大医，[3]宮崎大フロンティア）
16:25　おわりに……○横田　篤（北大院農）

4SY19　骨格筋細胞機能と代謝制御

3 月 30 日（日）13:30〜16:30　B07 会場（第一校舎 1 号館 3F）
世話人：眞鍋康子（首都大　人間健康），亀井康富（京府大　生命環境）
座　長：眞鍋康子（首都大　人間健康），亀井康富（京府大　生命環境）

13:30　4SY19–1　**マイオカイン研究のアプローチとその解析法**……◦眞鍋康子（首都大学東京　人間健康）
14:15　4SY19–2　**骨格筋糖代謝と Notch シグナリング**……◦小野悠介（長崎大学大学院医歯薬学）
15:00　4SY19–3　**骨格筋インスリン抵抗性に対する食事療法の効果**
……◦寺田　新（東京大学　大学院総合文化研究科　生命環境科学系）
15:45　4SY19–4　**骨格筋アミノ酸代謝における遺伝子発現制御**……◦亀井康富（京都府立大学生命環境科学研究科）

4SY20　食品の免疫機能研究の新たな潮流

3 月 30 日（日）13:30 〜 16:30　D02 会場（第二校舎 A 館 2F）
世話人：八村敏志（東大院農生科），細野　朗（日大生資科）
座　長：八村敏志（東大院農生科），三浦　豊（農工大院・応用生命化学），細野　朗（日大生資科）

13:30　**はじめに**……◦八村敏志（東大院農生科）
13:35　4SY20–1　**酵素合成グリコーゲンの生体防御機能活性化作用**……◦角谷　亮[1]，安達禎之[2]，梶浦英樹[3]，古屋敷隆[1]，高田洋樹[1]，栗木　隆[1]，大野尚仁[2]
([1]江崎グリコ(株)健康研，[2]東京薬科大・薬・免疫，[3]グリコ栄食(株)開発部)
14:05　4SY20–2　**ミルク由来スフィンゴ脂質の抗炎症作用**……◦三浦　豊[1]，竹島一憲[1]，副島理人[1]，森　悠美[1]，春田裕子[2]，酒井史彦[2]，門岡幸男[2]，矢ヶ崎一三[1]
([1]東京農工大学・院・応用生命化学，[2]雪印メグミルク(株))
14:35　4SY20–3　**ビタミン A による腸管免疫応答制御**……◦中妻(横田)彩[1,2]，岩田　誠[1,2]
([1]徳島文理大香川薬，[2]JST, CREST)
15:05　4SY20–4　**腸内共生菌と食品成分の相互作用による腸管免疫応答調節**……◦細野　朗（日本大生資科）
15:30　4SY20–5　**生体分子イメージングでみる生活習慣病における免疫細胞賦活化機構の解明**……◦西村　智
(東京大学 医学系研究科循環器内科 東京大学　システム疾患生命科学による先端医療技術開発拠点 自治医科大学分子病態治療研究センター　分子病態研究部)
16:00　4SY20–6　**加齢による免疫機能変化と食品による調節**……◦八村敏志[1]，田之倉優[2]
([1]東大院・農生科・食の安全研セ，[2]東大院・農生科・応生化)
16:25　**おわりに**……◦細野　朗（日大生資科）

4SY21　微生物・代謝・触媒研究の最前線：機能解析と応用への展望

共　催　応用微生物学研究協議会
3 月 30 日（日）13:30〜16:30　A09 会場（中央校舎 3F）
世話人：小林達彦（筑波大生命環境），西山　真（東大生物工学セ）
座　長：小林達彦（筑波大生命環境），西山　真（東大生物工学セ），田中　寛（東工大・資源化学），上田賢志（日大・生物資源科学），高谷直樹（筑波大生命環境）

13:30　**はじめに**……◦小林達彦（筑波大生命環境）
13:35　4SY21–1　**無機リン酸化合物のバイオサイエンスとテクノロジー**……◦黒田章夫（広島大院先端）
13:59　4SY21–2　**ペプチド合成：酵素のユニークな機能と新規反応機構**……◦小林達彦（筑波大・生命環境）
14:23　4SY21–3　**アミノ基修飾型キャリアタンパク質を介した二次代謝産物の生合成**……◦西山　真（東大生物工学セ）
14:47　4SY21–4　**共培養によって誘発されるシンビオバクテリウムのアミノ酸代謝**……◦上田賢志（日大生物資源）
15:11　4SY21–5　**大腸菌代謝フローにおけるカスケード制御**……◦田中　寛，島田友裕（東工大資源研）
15:35　4SY21–6　**超好熱菌を対象とした代謝工学**……◦跡見晴幸[1,2]，佐藤喬章[1,2]，今中忠行[2,3]，金井　保[1,2]
([1]京大院工，[2]JST, CREST，[3]立命館大・生命科学)
15:59　4SY21–7　**カビから学ぶ一酸化窒素解毒の新たなメカニズム**……◦高谷直樹，周　勝敏（筑波大生命環境）
16:23　**おわりに**……◦西山　真（東大生物工学セ）

4SY22　社会に役立つ様々な酵母の可能性（新産業酵母研究会後援）

後　援　新産業酵母研究会
3 月 30 日（日）13:30〜16:15　A10 会場（中央校舎 3F）
世話人：北本宏子（農環研），正木和夫（酒類研）
座　長：北本宏子（農環研），正木和夫（酒類研）

13:30　4SY22–1　**「新産業酵母研究会（MINCY）」の活動**……○飯村　穣（新産業酵母研究会）
13:45　4SY22–2　**発酵原料としての大豆ペプチド**……○杉山将宏，北川さゆり（不二製油）
14:15　4SY22–3　**Pseudozyma 属酵母のゲノム解析と産業利用**……○森田友岳（産総研）
14:45　4SY22–4　**生分解性プラスチック（PHBH）の工業化を目指して一宿主選択と生産株の育種**
……○松本圭司（株式会社カネカ　GP 事業開発部）
15:15　4SY22–5　***Lipomyces* 属酵母を利用した低価値な再生可能資源からの油脂生産**
……○長沼孝文[1]，黒川博史[2]（[1]山梨大院医工総合生命，[2]ライオン（株））
15:45　4SY22–6　**Candida 属酵母由来の産業用酵素**……○高木　忍，トムニールセン（ノボザイムズ　ジャパン（株））

4SY23　微生物ゲノム設計の時代に塩基組成の機能と進化を再考する

3 月 30 日（日）13:30〜16:30　A11 会場（中央校舎 3F）
世話人：吉川博文（東農大応生科），西田洋巳（富山県大工）
座　長：西田洋巳（富山県大工），吉川博文（東農大応生科），鈴木治夫（山口大理工），大島　拓（奈良先端大バイオサイエンス）

13:30　**はじめに**……○西田洋巳（富山県大工）
13:50　4SY23–1　**生物種が固有の GC 含量を持つのは何故か？**……○吉川博文[1]，明石基洋[1]，志波　優[2]
（[1]東農大応生科，[2]東京農大ゲノム解析セ）
14:30　4SY23–2　**ゲノムの塩基組成に基づいたプラスミドの宿主の予測**……○鈴木治夫（山口大理工）
15:10　4SY23–3　**細菌における外来遺伝子発現抑性機構**……○大島　拓（奈良先端大バイオサイエンス）
15:50　4SY23–4　**菌類におけるエキソン，イントロン，塩基組成とヌクレオソーム形成**……○西田洋巳（富山県大工）

4SY24　ゲノム改変による潜在能力覚醒を基にした細菌研究の新展開

3 月 30 日（日）13:30〜16:30　A12 会場（中央校舎 3F）
世話人：板谷光泰（慶應大先端生命研），朝井　計（埼玉大院理工），末次正幸（立教大理生命理）
座　長：朝井　計（埼玉大院理工），末次正幸（立教大理生命理）

13:30　**はじめに**……○朝井　計（埼玉大院理工）
13:35　4SY24–1　**ゲノム改造によるバクテリアの RNA ポリメラーゼの多様性と互換性の解析**
……○朝井　計[1]，古園さおり[2]，吉川博文[3]
（[1]埼玉大院理工，[2]東大生物生産セ，[3]東農大応生科）
14:00　4SY24–2　**再構成アプローチによる大腸菌染色体複製周期の解析**
……○末次正幸[1,2,3]，小林寛子[1]，松本健佑[1]，片山　勉[2]
（[1]立教生命，[2]九大院，[3]JST さきがけ）
14:30　4SY24–3　**Ribosomal RNA の人工水平伝播による大腸菌宿主デザイン**……○宮崎健太郎[1,2]
（[1]産総研生物プロセス，[2]東大院新領域）
15:00　4SY24–4　**細胞壁を失ったバクテリアの増殖とその利用**
……○川合良和，Mercier Romain，Errington Jeff（ニューキャッスル大学）
15:30　4SY24–5　**大腸菌をプラットフォームとしたアーキア特異的イソプレノイド脂質の生合成研究**
……○邊見　久（名大院生命農）
16:00　4SY24–6　**ゲノム可塑性に基づくバクテリアゲノムの大規模な改変と設計**……○板谷光泰（慶應大先端生命研）
16:25　**おわりに**……○板谷光泰（慶應大先端生命研）

4SY25　電子の流れを基に，紐解く・利用する微生物代謝

共　催　バイオインダストリー協会・新資源生物変換研究会
3 月 30 日（日）13:30〜16:30　A13 会場（中央校舎 3F）
世話人：石井正治（東大院農），加納健司（京大院農），松本伯夫（電中研），小川　順（京大院農）
座　長：石井正治（東大院農），松本伯夫（電中研），新井博之（東大院農）

13:30　はじめに……◦石井正治（東大院農）
13:35　4SY25–1　電子の流れを基に，微生物代謝を紐解く……◦石井正治[1]，佐藤由也[1,2]（[1]東大院農，[2]産総研）
14:10　4SY25–2　電気培養法による微生物の代謝制御……◦松本伯夫，平野伸一（電中研）
14:45　4SY25–3　電子フロー制御による微生物の環境適応とストレス防御……◦新井博之（東大院農）
15:20　4SY25–4　代謝共役型酵素合成プロセスの有用物質生産への展開
……◦日比　慎，堀之内伸行，木村隆利，小川　順（京大院農）
15:55　4SY25–5　微細藻類－ユーグレナーによる有用物質生産の可能性……◦林　雅弘（宮崎大農）

4SY26　ゲノムからアプローチした微生物代謝工学

3 月 30 日（日）13:30〜16:30　A14 会場（中央校舎 3F）
世話人：川向　誠（島根大生資），内海龍太郎（近畿大院農）
座　長：戒能智宏（島根大生資），五十嵐雅之（微化研），三沢典彦（石川県立大・生工）

13:30　はじめに……◦川向　誠（島根大・生資）
13:32　4SY26–1　細菌分子標的剤開発に向けた微生物代謝工学
……◦内海龍太郎[1]，五十嵐雅之[2]，三沢典彦[3]（[1]近畿大院農，[1]微化研，[2]石川県立大・生工）
13:57　4SY26–2　アルツハイマー病への適応が期待されるシローイノシトールを生産する枯草菌細胞工場
……◦吉田健一[1]，田中耕生[2]，竹中慎治[1]（[1]神戸大院農，[2]神戸大院自）
14:22　4SY26–3　コリネ菌における脂肪酸合成経路の代謝工学……◦池田正人（信州大農）
14:47　4SY26–4　機能性・希少カロテノイド生産のための大腸菌代謝工学
……◦竹村美保[1]，眞岡孝至[1,2]，徳田春邦[3]，鈴木信孝[3]，三沢典彦[1]
（[1]石川県大資源研，[2]生産開発研，[3]金沢大医）
15:12　4SY26–5　ゲノムを利用したアミノ酸誘導体の発酵生産プロセス開発
……◦纐纈健人，三橋　敏，田畑和彦（(株)協和発酵バイオ）
15:37　4SY26–6　眠っている代謝系を呼び起こす統合オミックス解析……◦緒方法親[1,2]
（[1](株)日本バイオデータ，[2](株)ネオ・モルガン研究所）
16:02　4SY26–7　ゲノムを活用した **CoQ10** 代謝工学……◦川向　誠（島根大生資）
16:27　おわりに……◦内海龍太郎（近畿大院農）

4SY27　生体超分子の視覚化による新しい世界の発見

共　催　新学術領域研究「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」
3 月 30 日（日）13:30〜16:30　A15 会場（中央校舎 3F）
世話人：伊藤政博（東洋大生命科），福森義宏（金沢大理工）
座　長：伊藤政博（東洋大生命科），福森義宏（金沢大理工）

13:30　はじめに……◦伊藤政博（東洋大生命科）
13:35　4SY27–1　細菌べん毛の電子顕微鏡観察……◦相沢慎一（県立広島大学）
14:10　4SY27–2　電子線トモグラフィーによる生体試料の立体構造解析
……◦加藤貴之[1]，Ruan Juanfang[1]，川本晃大[1]，宮田知子[1]，難波啓一[1,2]
（[1]阪大生命，[2]理研生命システム）
14:45　4SY27–3　高速原子間力顕微鏡（**High-speed AFM**）を用いた微生物細胞表層の可視化
……◦田岡　東[1,2]，山下隼人[3]，Oestreicher Zachery[1]，福森義宏[1,2]
（[1]金沢大・理工・自然システム，[2]金沢大・理工・バイオ AFM 先端研究センター，
[3]慶應義塾大・医学部）
15:15　4SY27–4　**3D** プリンターによる生体超分子の視覚化，可触化……◦川上　勝（北陸先端大マテ）
15:50　4SY27–5　戦車のような仕組みで動くバクテリア……◦中根大介[1]，小高祥子[1]，佐藤啓子[2]，和田浩史[3]，
McBride Mark[4]，中山浩次[4]，西坂崇之[1]
（[1]学習院大，[2]長崎大，[3]立命館大，[4]UW-Milwaukee）
16:20　おわりに……◦福森義宏（金沢大理工）

4SY28　先端技術が未解明環境微生物の「生き様」を解き明かす

共　催　環境バイオテクノロジー学会
3 月 30 日（日）13:30〜16:10　A16 会場（中央校舎 6F）
世話人：金原和秀（静大院工），野尻秀昭（東大生物工学セ）
座　長：金原和秀（静大院工），野尻秀昭（東大生物工学セ），永田裕二（東北大院生命）

13:30　はじめに……◦金原和秀（静大院工）
13:35　4SY28–1　環境微生物の一細胞レベルの単離と解析……◦新谷政己（静大院工）
14:00　4SY28–2　**Like a complete unknown**：一細胞解析で見える新しい生命現象……◦宮崎　亮（産総研）
14:25　4SY28–3　環境中で活発に機能している新規 $\mathbf{N_2O}$ 除去細菌のシングルセル分離……◦石井　聡（北海道大院工）
14:50　4SY28–4　培養法で切り拓く未知微生物の新機能……◦玉木秀幸（産総研 生物プロセス）
15:15　4SY28–5　マイクロコロニーに着目した新規単離培養手法の開発
……◦常田　聡[1]，藤谷拓嗣[1]，牛木章友[1]，籾内研吾[1]，青井議輝[2]
（[1]早稲田大先進理工，[2]広島大 ISSD）
15:40　4SY28–6　シングルセル・ゲノミクスによるシロアリ腸内共生系解明に向けて
……◦本郷裕一（東工大院生命理工）
16:05　おわりに……◦遠藤銀朗（東北学院大工）

4SY29　バイオマス研究から新産業への展開

3 月 30 日（日）13:30〜16:30　A08 会場（中央校舎 3F）
世話人：関亦克彦（理研 CLST），軸丸裕介（アジレント・テクノロジーライフサイエンス化学分析本部）
座　長：神谷勇治（理研），関亦克彦（理研 CLST），軸丸裕介（アジレント・テクノロジーライフサイエンス化学分析本部）

13:30　はじめに……◦神谷勇治（理研環境資源科学研究センター）
13:40　4SY29–1　新素材と呼ばれたコケ植物原糸体の研究と開発〜アカデミアからのメッセージ〜
……◦井藤賀操[1]，川上　智[2]
（[1]理研環境資源科学研究センター，[2]DOWA エコシステム株式会社環境技術研究所）
14:00　4SY29–2　新素材と呼ばれたコケ植物原糸体の研究と開発〜企業からのメッセージ〜
……◦川上　智[1]，井藤賀操[2]
（[1]DOWA エコシステム株式会社環境技術研究所，[2]理研環境資源科学研究センター）
14:20　質疑応答及び休憩
14:30　4SY29–3　バイオポリエステルの基盤研究・実用化研究……◦阿部英喜（理研環境資源科学研究センター）
14:50　4SY29–4　カネカバイオポリマー　アオニレックスの実用化研究……◦鈴木紀之（株式会社カネカ）
15:10　質疑応答及び休憩
15:20　4SY29–5　微細藻類の産業利用における可能性について……◦鈴木健吾（株式会社ユーグレナ）
15:50　4SY29–6　バイオマス研究から新産業への展開……◦神谷勇治（理研環境資源科学研究センター）

講演番号：4SY01-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:35～ A 校舎 05 会場

世界における天然物創薬の現状
Current situation of natural product drug discovery in the world

○長田 裕之(理研 CSRS)
○HIROYUKI OSADA(RIKEN CSRS)

人類は、古来から、天然物に医薬を求めていたが、目的の作用を示す薬剤を系統的にスクリーニングするようになったのは、1950 年代に抗生物質探索が盛んになってからである。しかし、1990 年代半ば以降、ハイスループットスクリーニング（HTS）の流行に伴って、製薬企業では、コンビナトリアルケミストリーで合成したライブラリーを医薬源として重視するようになった。しかし、そのような状況でも、ホヤ類から単離されたトラベクテジン（化合物名 Ecteinascidin、DNA binder)、放線菌由来のテムシロリムス（Rapamycin のジヒドロエステル誘導体、mTOR inhibitor)、グラム陰性細菌由来のイストダックス（化合物名 FK-228 または Romidepsin、HDAC inhibitor）などが FDA の新薬承認を得ており、天然物およびその誘導体の有用性は未だに衰えていない。特に、微生物二次代謝産物に関しては、その生合成遺伝子（PKS, NRPS）の単離と改変技術が進んだために、天然物の化学構造の多様性を拡大することや大量発現が可能になっており期待が大きい。

そのような背景のもと、本シンポジウムでは、韓国、中国の研究者を交えて、国内外における天然物創薬の動向を俯瞰する。アカデミアならびに企業における研究開発の具体例を学んで、天然物創薬のメリット、デメリットを考察し、今、何ができるか、何をすべきかを議論したい。

drug screening, biosynthesis, chemical biology

講演番号：4SY01-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:00～ A 校舎 05 会場

韓国における天然物創薬の現状

Current situation of natural product drug discovery in Korea

○張 宰赫、安 宗石(韓国生命工学研究院)
○Jae-Hyuk Jang, Jong Seog Ahn(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology)

近年、韓国を含め世界的に急速に進む高齢化および生活習慣の急変に伴い、成人病および慢性疾患などが急速に増加し、人類の健康、長寿社会、暮らしの質の向上に貢献するために医薬品開発のパラダイムは急激に変化している。天然物創薬は昔から東洋、西洋の創薬開発の歴史の中で多様な構造および生理活性を持つ天然物が数多くの医薬品開発のシードとなっており、天然物または天然物を母体にした化学合成誘導体が医薬品として実際に使われている。しかしながら、２１世紀に入り天然物化学、合成化学、スクリーニングなどの組み合わせにより創薬候補物質を選定していく従来の手法が通用しなくなり、莫大な研究開発費の投入およびリスクがある天然物を中心とした医薬品開発を行う巨大製薬企業が急減しているのが現実である。このような中で、医薬品開発に関して先進国に比べ遅れた韓国は、効率的な創薬技術を確立することと共に、政府の支援政策等により一層の国際競争力を高めていくことが求められている。

韓国では天然物創薬のための政府の支援策として“天然物新薬研究開発の促進法”が 2000 年に法制化された。この法律は天然物科学の育成など天然物新薬研究開発の基盤を育成して、天然物を用いた新薬研究開発とその開発技術の産業化を促進することを目指している。この法律の下で我が国における天然物創薬は様々な生物資源が用いられているが、植物(自生植物、生薬、韓薬製剤など)が特に重要な研究資源として利用されている。これは昔から汎用された伝統生薬剤を現代の科学技術で再解析し、天然物創薬に結びつくことを目指している。そのために、政府の天然物創薬に関する強い意志が反映された様々な研究費の投資(未来創造科学部、保健福祉部、海洋水産部など)、先端医療複合団地の構築、大規模研究開発団などの基盤として、天然物創薬に全力を注いでいる。

今回の発表には韓国での天然物創薬のための韓国政府の政策、各研究機関、製薬会社でのあらゆる研究開発の状況に関してご紹介する。また、我々のグループで行われている微生物由来の生理活性物質探索に関する最近の研究結果もご紹介する。

natural product, drug discovery, Korea

講演番号：4SY01-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:25～ A 校舎 05 会場

Current situation of natural product drug discovery in China

○Jianhua Qi(Zhejiang Univ.)

In China, natural products can be used as drugs in three ways: herbal extracts, herbal active fractions and active compounds isolated from natural products.

Herbal extracts have been used in China for thousands of years. They are convenient to prepare but they are short of mechanism study and quality standard.

For the herbal active fractions, they have grown into the big market in China, especially the Chinese medicine injections. Currently, the sales of Chinese medicine injection “Zhusheyong Xueshuantong” has reached billions of yuan. Other several injections such as “Monosialotetrahexosylganglioside Sodium Injection” and “Danhong Zhusheye” have also sold very well. Although these injections are popular in China, their unclear mechanism and safety issues remain a big concern, preventing them from selling abroad.

The third way of Chinese medicine development is to isolate active compounds from natural products. Artemisinin was no doubt the famous example of natural product drug discovery in China. Another Chinese initiated new drug is Huperzine-A isolated from *Huperzia serrate* in 1985. Clinical trials have shown it to be effective for Alzheimer's disease treatment. In the recent decade, Chinese government has put great emphasis on new drug development. In the 12th Five Year Plan period, the government plans to spend heavily on support drug discovery and development. Thus many breakthroughs have been made in new drug discovery. Several natural products drugs had got CFDA drug clinical trial approvals.

Although some progress has been made, Chinese natural products resources are far from being fully tapped in. In China there are hundreds of groups both in universities and institutions devoted to natural products research and drug development.

With ever more investment, ever more advanced science and technology and ever more talents coming back China from studying abroad, China has made great progress in drug R&D. From me-too drug to research imitation drug, from research imitation drug to innovative drug, China is stepping into the leading group of world of new drug discovery and development.

natural product drug discovery, China, situation

講演番号：4SY01-4
講演日時、会場：3 月 30 日 14:50～ A 校舎 05 会場

日本における天然物創薬の現状

Current situation of natural product drug discovery in Japan

○井本 正哉(慶應大理工)
○Masaya Imoto(Keio Univ.)

わが国は伝統的に天然物由来の化学的および生物学的研究に強く，天然物創薬では世界をリードしてきた歴史がある．実際に多くの抗菌抗生物質や抗がん抗生物質，さらには免疫抑制剤 FK506，高脂血症治療薬メバロチン，また抗寄生虫抗生物質イベルメクチンなどの天然物創薬では輝かしい実績を誇っている．天然化合物は人知を越えたユニークな構造，とくにタンパク質との相互作用に重要と思える sp^3 リッチな構造を有しているおり，また多様で多彩な生物活性を示す点で治療薬開発における有用なスクリーニングソースと考えられている．しかし，近年は化学合成化合物ライブラリーを用いた大規模スクリーニングが実施され，またそれに対応する創薬シード探索の効率化重視体制への移行により，わが国の製薬企業では天然物創薬研究からの撤退が相次いでいる．また，それと時を同じくしてこれまで微生物資源からの探索研究を行ってきた大学の研究室も，その規模の縮小，方向性の転換，さらには研究室自体が消滅したりする事態も起こっている．これらは一つのブームのように全て天然物質が有する創薬シードとして優位性を理解しながらも，効率性の悪さや煩雑性に起因した現象であると思える．ではしかし，化学合成化合物ライブラリーを用いた大規模スクリーニングは本当に創薬の効率性がアップしたのかという疑問が生じる．この疑問が確信に変わった時，再び天然物創薬への回帰が起こる可能性はあるのか？もしそのようなことが起こった時，かつてわが国が誇ってきた天然物創薬研究を推進する技術やノウハウは伝承されており，またそれを担う人材は存在するのであろうか？本シンポジウムではわが国における天然物創薬の現状と問題点を示し，解決を模索したい．

Drug discovery, Natural Products

講演番号：4SY01-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:15～ A 校舎 05 会場

アカデミアにおける天然物創薬研究―微化研の今―

Natural product drug discovery in non-profit organization (academia); current situation of BIKAKEN

○川田 学(微化研・沼津)
○Manabu Kawada(Inst. Microbial Chemistry, Numazu)

微生物が産生する天然物は構造がユニークであり、創薬の対象として魅力があるものの、その開発には莫大な時間と費用を要するため長期的な研究体制が必要である。一方、メガファーマが台頭する今日、多くの製薬企業は基礎レベルからの創薬研究、特に天然物を題材とした創薬研究を継続するのが困難な状況となっている。このような背景の中、大学や研究機関などアカデミアからの創薬研究が期待されているとともに要求されるレベルは年々高くなっていると言える。微生物化学研究所は、抗生物質 kanamycin の特許収入を基に 1962 年に設立され、天然物を用いた医薬品の開発を主に行ってきた。1994 年までに arbekacin (ABK)などの抗菌剤、bleomycin や bestatin などの抗がん剤を含めて 13 の化合物（8 個が天然物、5 個が天然物の合成誘導体）を上市し、leupeptin や pepstatin といった 13 の研究用試薬を送り出してきた。それからしばらくの間、医薬品の開発という点では困難な時期を迎えたが、2011 年に牛呼吸器病の予防・治療薬 tildipirosin を上市した。この化合物は天然物 tylosin の合成誘導体であるが、その成功には少なくとも 2 つのポイントがあげられる。一つは、製薬企業からの具体的なメルクマールがあった事。もう一つは、抗生物質合成研究の独自のノウハウである。一方で、製薬企業からのメルクマールをほぼ満たしたにも関わらず、前臨床試験で予期せぬ毒性が認められたり、方針の変更によって開発がストップしてしまったりした化合物群もあり、創薬研究の難しさを表している。現在微化研では、アンメットメディカルニーズに創薬研究の活路を見出すべく、感染症およびがんを主な対象として研究を行っている。例えば、多剤耐性結核菌に有効な抗菌剤として caprazamycin の合成誘導体 CPZEN-45 を米国および国内企業と共同開発している。他にも MRSA や VRE などの院内感染症の耐性菌に有効な抗菌剤として tripropeptin や amycolamicin などの天然物の研究を行っている。また、腎毒性を軽減した新しいアミノ配糖体抗生物質として 2-OH-ABK を創製している。一方、がんに対してはがん抑制遺伝子 p53 の制御を標的とした geraniin やがん組織中の間質細胞を標的とした intervenolin など、新たな機構で抗がん活性を示す天然物の研究を行っている。本シンポジウムでは、天然物を生業としている研究機関の活気あるアクティビティについて紹介したい。

Antibiotic, Antitumor drug, Natural compound

講演番号：4SY01-6
講演日時、会場：3 月 30 日 15:40～ A 校舎 05 会場

企業における天然物創薬・シード探索の方向性

Industrial direction of natural product-based lead/drug discovery

○高瀬 保孝(エーザイ　オンコロジー創薬ユニット)
○Yasutaka Takase(Eisai Oncology Product Creation Unit)

古来の伝承薬に始まり、天然物は薬の発見と適用に多大なる貢献を果たしてきた。人類の叡智を超えた生理活性天然物の発見は、新規創薬研究の端緒として普遍的に魅力あるアプローチと映る。一方で、ハイスループットスクリーニング（ＨＴＳ）／コンビナトリアルケミストリー（ＣＣ）の普及、ヒューマンゲノムの解読と解析の進展を転機とし、創薬分子標的の設定と活性化合物の発見に対しては、より高い効率性と確実性とが求められるようになった。こと製薬産業においては、偶然的発見（セレンディピティ）に依拠する創薬アプローチに対して一定の距離を置かれるようになってきているのが現状で、天然物研究もその例外ではない。単離精製と構造決定の迅速化・ＨＴＳへの対応によって、転機当初に指摘された天然物創薬の欠点は、探索研究の実施面については克服されたように見受けられるものの、難易度・リスク・費用対効果に由来する敬遠の風潮は、依然として払拭されたとは言い難い。
そのような中、化合物ライブラリーにおけるケミカルスペースの観点から、ＣＣ合成小分子の限界も指摘され始め、天然物化学構造の再評価と合成的活用も提唱・検討されるようになってきている。さらに、ＡＤＣ（抗体－薬物複合体）の臨床有用性の証明によって、天然物に代表される極めて強力な殺細胞性増殖阻害剤の創薬への再活用も図られている実情がある。天然物に依拠した創薬研究は、今後どのような方向に向かっていくことになるのか。
演者の所属するケミカルバイオロジー室は、これまでにない新しい薬理作用を有するシード化合物の創出をめざし、①独自性の高い化合物ライブラリーの構築（シード源の創出）、②薬理作用の特徴・ユニークさを獲得するためのスクリーニング・プロファイリング（シード化合物の発見）、③特徴的作用を有するシード化合物の標的同定（ターゲットＩＤ：創薬研究移行への戦略保証）、の三機能を保有している。社としての Eribulin（出発天然物 Halichondrin B）や E7107（出発天然物 Pladienolide D）における経験に後押しされ、天然物化学専門組織との連携により、天然物を出発点とした創薬も主眼の一つとして据えている。限られた研究人員・リスク管理から我々は、「フォーカスしたライブラリーをフォーカスしたスクリーニングに流す」戦略をとっているが、これは、社内外の創薬研究における多様性・網羅性の発想とは一見矛盾したもののようにも見える。
我々はさらに、フォーカスすることによるリスク回避のため、①我々自身の経験に基づいて、強みのある構造あるいは強みの出せる構造に先鋭化する、②独自の経験を活かせる領域――がん領域と関連する一部免疫等の領域――に絞る、③本領域の将来を見据え、スクリーニング系に工夫を凝らす、④ターゲットＩＤの経験を蓄積することで標的・作用メカニズム確定のスピード化と研究プロジェクトの確度向上をめざす、などの方針を立てている。本発表では、このような選択と集中によるリスクをいかにして克服するか、オープンイノベーションの活用も含めた戦略の一端についてご紹介したい。

drug discovery, natural product, pharmaceutical industry

講演番号：4SY02-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:30～ A 校舎 02 会場

大腸菌における硫黄源の選択的利用によるシステイン合成機構：サルファーリプレッション

Selective utilization of sulfur sources for L-cysteine biosynthesis in Escherichia coli: sulfur repression

○大津 厳生、河野 祐介、仲谷 豪(奈良先端大・バイオ)
○Iwao Ohtsu, Yusuke Kawano, Takeshi Nakatani(NAIST)

生物地球化学サイクルのうちで、生命活動に必須な『硫黄』の循環に着目する。微生物、高等植物は土壌中の無機硫黄を取り込み有機性硫黄化合物に固定する硫黄同化系が存在する。一方、ヒトを含めた哺乳類には、この硫黄同化経路は存在しない。そのため哺乳類は生命活動の維持に必要な硫黄源を微生物・植物に依存している。地球上での硫黄循環は、微生物・植物による有機性硫黄への固定と哺乳類による無機性硫黄への異化という一方向に循環している。最近、硫黄源や窒素源といった無機物は微生物・植物栄養の生体物質の生合成に用いられるだけでなく、これら無機化合物から生合成されたアミノ酸（システインやグルタチオン）や、その中間代謝物である低分子硫黄化合物（硫化水素）が、遺伝子発現制御や、代謝調節に関わる栄養シグナル分子として機能し、微生物・植物の生長や物質生産の調節に関与することが分かってきた。微生物・高等植物における栄養シグナルに基づいた物質生産の仕組みを明らかにし、システイン代謝バランスを改変した微生物によるシステイン発酵生産性の向上について紹介する。さらに、これら育種した微生物の新規な硫黄メタボローム解析により炭素と硫黄の同化経路間の相互制御、栄養シグナル伝達および応答機構の構成因子についても現状を紹介する。生物は、栄養を外界から取り込み、代謝して細胞構成成分を合成し、エネルギーを生産する。カタボライトリプレッションやアンモニアリプレッションなど、炭素源・窒素源における選択的な利用機構が微生物には存在する一方、これまで硫黄源に関する選択的な利用機構は知られていない。最近、私達は*ΔcysM*株が硫酸塩を含む最少培地で良好に生育するのに対し、チオ硫酸塩を添加した条件では感受性を示すことから、チオ硫酸塩が硫酸塩の利用を抑制することで、チオ硫酸経路優先的にシステインを合成する硫黄源の選択的利用機構「チオ硫酸リプレッション（TSR）」を見出した。このTSRの普遍性について、大腸菌と同様のシステイン代謝経路を有する分裂酵母・シアノバクテリアや、一方、大腸菌とは全く異なるシステイン代謝経路を有する出芽酵母のいずれでも、チオ硫酸塩単一硫黄源で生育するだけでなく、硫酸塩と比べて生育速度も増加した。以上のことから、チオ硫酸塩の生育促進効果や優先的な利用機構は、原核・真核微生物から高等植物まで普遍的に存在すると考えられた。本シンポジウムでは、大腸菌のTSRの分子機構として、①タンパク質レベルの制御、②転写レベルの制御、③翻訳後レベルの制御について紹介する。尚、本研究は生研センターイノベーション創出事業の支援を受けて行った。

cysteine biosynthesis, thiosulfate, sulfate

講演番号：4SY02-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:00～ A 校舎 02 会場

バクテリアの硫黄代謝とシステイン発酵

Sulfur metabolism and fermentative cysteine production in bacteria

○野中 源(味の素（株）)
○Gen Nonaka(Ajinomoto Co., Inc.)

システイン（Cys）はタンパク質の構成成分としてのジスルフィド結合を介した立体構造の維持、SH 基の酸化還元反応による生体成分の代謝など生理的に重要なアミノ酸である。また、食品・飼料添加物、香粧品素材、医薬品などの工業原料に広く用いられており、工業的にも重要なアミノ酸の一つである。その製法としては人毛など動物由来タンパク質からの抽出法のほかに、酵素法、発酵法などのバイオを用いた方法が知られている。現在コスト面では抽出法が有利であると考えられているが、製品の安全性や製造過程での環境への影響などに配慮する消費者の意識は高まってきており、非動物原料由来の Cys のニーズは高まっている。多くのアミノ酸には微生物による発酵法が有効であるが、Cys に関しては細胞への毒性や複雑な代謝制御などのために効率的な発酵生産が非常に困難であり、商業ベースでの発酵法の成立を阻んできた。

我々は効率的な Cys の発酵生産の実現を目指し研究開発を進めてきた。その結果、Cys 発酵成立のための重要な技術要素が明らかとなってきた。まず第一に、アミノ酸発酵菌育種の定石ともいえる、生合成経路の鍵酵素の改変である。Cys 生合成経路上には Cys で阻害される serine acetyltransferase と Ser で阻害される 3-phosphoglycerate dehydrogenase の二つの鍵酵素が存在する。これらの酵素をフィードバック阻害を受けない改変型酵素としておく必要がある。第二に、毒性の高い Cys を速やかに細胞外に排出するポンプを強化することである。我々はスクリーニングにより多数の Cys 排出ポンプを取得し、Cys 発酵菌に搭載させた。第三に、Cys の分解系を欠損しておくことである。バクテリアは、毒性の高い Cys に対処するため複数の分解系を備えている。我々は、バクテリアの Cys 耐性において極めて重要な生理機能を有す新規 Cys 分解遺伝子を発見し、同遺伝子の欠損が Cys 発酵菌に必須であることを示した。そして最後に、硫黄代謝のマスターレギュレーターである転写因子 CysB とそのレギュロンの発現を最適に調節することが挙げられる。我々は硫黄代謝に関与する複数の新規 CysB レギュロンのメンバーを発見し、機能を解明、Cys 発酵菌への応用を試みた。見いだされた新規因子の中には硫黄源や Cys 関連物質の取り込みに関与する新規のトランスポーターが含まれた。

こうした研究開発が実を結び、我々は近年ついに商業ベースでの Cys 発酵生産に成功した。本発表では、成功に至った Cys 発酵菌と Cys 発酵技術を紹介するとともに、その過程で明らかとなったバクテリアの硫黄代謝及び Cys 代謝の制御機構について議論する。

sulfur, cysteine, fermentation

講演番号：4SY02-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:30～ A 校舎 02 会場

植物における有機態硫黄の貯蔵形態であるグルタチオンの代謝機構
Metabolism of glutathione, a storage form of organic sulfur in plants
○大津 直子、北岩 泰祐(東京農工大農)
○Naoko Ohkama-Ohtsu, Taisuke Kitaiwa(Tokyo Univ. Agr. Tech.)

植物は無機態硫黄を吸収して有機態硫黄に同化するが、有機態硫黄の主要な貯蔵形態の一つがグルタチオンである。グルタチオンはγ-Glu-Cys-Gly から成るトリペプチドであり、全ての生物に普遍的に存在する。植物における栄養を輸送する管である篩管中の液にはグルタチオンが高濃度で含まれ、有機態となった硫黄がグルタチオンとして輸送されていることが示唆されている。輸送された先の器官等でグルタチオンは分解代謝され、様々な有機硫黄化合物に硫黄を供給している。

グルタチオン分解経路として古くから哺乳類においてγグルタミルサイクルが提唱されてきた。このサイクルにおいてグルタチオンはまず細胞外に排出され、γグルタミルトランスペプチダーゼ(GGT)により分解される。植物において GGT は、細胞外空間であるアポプラスト及び液胞において機能している。アポプラストに局在する GGT1 の変異株は葉の黄化を示し、アポプラスト空間の酸化型グルタチオンを蓄積することから、GGT1 が酸化ストレス除去に役割を担っていることが分かった(Ohkama-Ohtsu et al., 2007a)。また液胞に局在する GGT4 は、グルタチオン抱合体を分解している(Ohkama-Ohtsu et al., 2007b)。植物において、一部の農薬がグルタチオン抱合体として液胞に隔離されることが知られているが、内在性グルタチオン抱合体についての報告は少ない。*ggt4* 変異株を利用したメタボローム解析から内在性グルタチオン抱合体の探索が行い、植物ホルモンであるジャスモン酸の前駆体がグルタチオン抱合体として液胞に輸送されることが示された(Ohkama-Ohtsu et al., 2011)。

しかしながら GGT は細胞外の酵素であり、ほとんどが細胞内に存在するグルタチオンの主要な分解酵素ではないと考えられる。実際 GGT 活性を欠損した植物では、グルタチオン分解速度は野生株と同様である。植物の細胞内におけるグルタチオン分解経路として、γグルタミルサイクロトランスフェラーゼ(GGC)による経路が示唆されている(Ohkama-Ohtsu et al., 2008)。グルタチオンは一日に約 80%が分解、合成を繰り返しており、合成にエネルギーを使用するにも関わらず代謝回転が速い理由は不明である。グルタチオン代謝の意義を解明するために、現在細胞内グルタチオン分解酵素の同定とその機能解析を目指している。

グルタチオンは、有機態硫黄の貯蔵形態として以外にも、活性酸素除去能力を持ち、環境ストレスや病原菌ストレス応答において重要な役割を果たしている。タンパク質の酸化還元状態を調節することにより、光合成を始めとした重要な代謝酵素の活性を制御していることも示唆されている。また、根の伸長、開花など、植物における様々な生理過程にグルタチオンが関与している。

glutathione, plant, sulfur

講演番号：4SY02-4
講演日時、会場：3 月 30 日 15:00～ A 校舎 02 会場

硫黄栄養の変化に応じた植物の硫黄同化と代謝の調節機構
Regulatory mechanism of sulfur assimilation and metabolism in response to sulfur limitation

○丸山 明子(九州大院農)
○Akiko Maruyama(Kyushu Univ.)

植物は生命活動に必要なアミノ酸であるメチオニンやシステインを環境中の硫酸イオンを使って生合成しており、自然界の硫黄循環に大きな役割を果たしている。硫黄は植物の必須多量元素の一つであり、硫黄栄養条件および硫黄同化効率は作物の生産性・質に大きく影響する。また、植物由来の含硫化合物には酸化還元物質や補酵素類、病害虫への忌避物質や医薬として有用なものが多く存在する。このような背景から、演者らは、作物の生産性向上、食を通した人間の健康増進、硫黄が原因となる環境問題の解決、を目的として、植物の硫黄同化・代謝とその調節機構について研究している。

植物の硫黄同化は、環境中からの硫酸イオンの吸収に始まる。吸収された硫酸イオンは、その後、数段階の反応により硫化物イオンへと還元され、システインへと同化される。低硫黄条件(-S)下におかれた植物では、硫酸イオンの吸収および同化に働くいくつかの酵素遺伝子の発現が上昇する。シロイヌナズナにおいては、2 種の高親和型硫酸イオントランスポーター*SULTR1;1*、*SULTR1;2* が根からの硫酸イオン吸収を担っており、これらの転写産物量は-S 下において著しく上昇する。シロイヌナズナが-S にさらされると、硫黄同化系が促進されるとともに、アブラナ科植物に蓄積する含硫二次代謝物質グルコシノレートの生合成が抑制され、分解が促進される。

この-S への応答に関わる情報伝達系を解明するために、*SULTR1;2* promoter-*GFP* 植物($P_{SULTR1;2}$-*GFP*)を親株とした硫黄栄養応答欠損変異株の探索を行った。得られた変異株の一つ *sulfur limitation1* (*slim1*) では、-S 下での GFP および *SULTR1;2* の蓄積が認められず、-S 条件に応じた遺伝子発現変化の大部分が認められなかった。*slim1* では、-S 下におけるシステインやグルタチオンの濃度が野生型株よりも低く、また、野生型株で認められる-S によるグルコシノレート量の減少が起きず、グルコシノレート量は硫黄十分条件下と同じレベルに維持されていた。さらに *slim1* では、-S 下における成長が抑制された。*SLIM1* は、EIL ファミリーに属する機能未知の転写因子 *EIL3*(*ethylene insensitive3 like3*)と一致した。以上の結果は、SLIM1 が-S に応じて硫黄同化・代謝の調節に中心的な役割を担い、SLIM1 を必要とする代謝変換が-S 下での植物の生存に重要な役割を果たすことを示している。

このように、植物は環境中の硫黄濃度に応じて、積極的に硫黄の同化と代謝を調節している。今後、SLIM1 の機能発現機構や他の変異株の解析を通じて、硫黄栄養の感知から硫黄同化・代謝の調節にいたる分子機構を解明するとともに、これらの知見を活かした応用研究に着手していきたいと考えている。

sulfur, plant

講演番号：4SY02-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:30～ A 校舎 02 会場

酸化ストレス応答とポリチオールバイオロジー

Polysulfur biology in oxidative stress response

○赤池 孝章(東北大院医)
○Takaaki Akaike(Tohoku Univ.)

近年、活性酸素シグナル研究が急速に進展した。その成果により、酸化ストレス病態が単なる生体分子の酸化的損傷によるものではなく、活性酸素によるシグナル制御の破綻という機能的変化として理解されるようになってきた。一方我々は、活性酸素シグナルのセカンドメッセンジャーである 8-ニトロ-cGMP の代謝制御に、システインイオウ付加体であるシステインパースルフィド（過イオウ化システイン）などの新規イオウ代謝物が深く関わることを見出した（Nature Chem. Biol. 2012）。すなわち、その代謝経路で真に産生されるのは硫化水素ではなく、システインパースルフィドに代表される一連の活性イオウ分子種であり、この反応分子種が、8-ニトロ-cGMP と求核的脱ニトロ化・チオール化により新規環状ヌクレオチドである 8-SH-cGMP を生成することが分かった。さらに、活性イオウ分子は、親分子であるシステインよりレドックス活性（求核性）が高く、強力な抗酸化能を有することが分かってきた。また、活性イオウ分子が、H-Ras などの 8-ニトロ-cGMP のエフェクターを負に制御することも明らかとなった。さらに興味深いことに、主要な活性イオウ分子であるシステインパースルフィドが、タンパク質翻訳後修飾を介してレドックスシグナルの主要な制御系を構築していることも示されている。例えば、過イオウ化されたチオール側鎖は求核性が高まりレドックスセンサーとしての感度が上昇し、活性酸素のみならず、親電子性の低い分子状酸素に対してもセンサー機能を発揮しているかもしれない。この様な活性イオウ分子種は、化学物質による環境ストレス、活性酸素による酸化ストレスや酸素センシングと生体応答における主要なシグナル伝達機能を担っていると考えられる。我々は、この様なユニークなポリサルファーバイオロジーに基づくメタボローム手法を確立し、生体の環境応答と新規イオウ代謝経路の解明を試みている。本シンポジウムでは、活性酸素シグナル研究とポリチオールバイオロジーの新たな切り口から酸化ストレス応答のパラダイムシフトを議論したい。

Reactive sulfur species, Cysteine persulfide, Oxidative stress response

講演番号：4SY02-6
講演日時、会場：3 月 30 日 16:00～ A 校舎 02 会場

CO 感受性受容体: Cystathionine β-synthase の生物学的意義
CBS as a CO-responsive regulator of sulfur metabolism
○末松 誠[1,2]([1]慶應義塾大学医学部医化学教室、[2] (独) 科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 末松ガスバイオロジープロジェクト研究総括)
○Makoto Suematsu[1,2]([1]Department of Biochemistry, School of Medicine, Keio University, [2]Leader, JST ERATO Suematsu Gas Biology Project)

NO, CO, H_2S などは細胞機能を調節するガスメディエータとして知られているが、これらのガス分子の生体高分子による受容機構の全貌は明らかにされていない。細胞内の代謝経路に散在する酵素群の中には金属中心を含む低分子有機複合体が補欠分子族として結合し、酵素活性中心を作るだけでなくアロステリック調節部位を構成する場合もある。したがってガス分子が金属中心に配位結合して蛋白質機能を制御することを勘案すると、ガス分子の急性作用はメタボローム情報上にフットプリントとして検出できるはずである。このような考え方の下に、ストレスによる heme oxygenase (HO)-1 の誘導で増加するガスメディエータである CO の受容体探索を CE-TOFMS により探索した結果、transsulfuration 経路の律速酵素であり、H_2S の主要生成酵素である cystathionine β-synthase (CBS)が候補分子として探索された(Shintani, et al. Hepatology 2009)。一方脳は恒常的に大量の CO を構成型酵素である HO-2 から生成しているが、その脳における生理作用は不明であった。HO は分子状酸素から CO を生成するため、脳が低酸素に晒された際に CO が低下することにより局所血流制御が起こる可能性を考え、マウス小脳の生スライス標本を用いて低酸素血管拡張をモニターする実験系を構築し解析を進めた結果、神経細胞への酸素供給の低下が起こると、同細胞での CO 生成の低下として変換され、paracrine に astrocyte の CBS 抑制を解除し血管拡張作用を有する H_2S が増加することによって、局所の細動脈の拡張が起こることが示唆された(Morikawa et al. PNAS 2012)。さらに CO による CBS への阻害効果は、Methionine cycle の代謝物にも影響を及ぼし、がん細胞において糖代謝酵素である PFKFB3 の脱メチル化を起こすことにより、糖代謝を解糖系から pentose phosphate pathway にシフトさせることも明らかになった。発表では CO-CBS system による H2S や含硫アミノ酸代謝制御の生物学的インパクトについて新知見を報告する。

CBS, methylation, metabolism

講演番号：4SY03-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:35～ A 校舎 03 会場

酵母に見出したプロリン・アルギニン代謝を介した抗酸化機構とその応用

Proline/arginine metabolism-mediated antioxidative mechanism found in yeast and its application

○高木 博史(奈良先端大バイオ)
○Hiroshi Takagi(Nara Inst. Sci. Tech.)

好気的生物は酸素呼吸により効率良くエネルギーを獲得するが、その一方で細胞内は活性酸素種（ROS）が発生しやすい状態にある。ROS レベルの制御は細胞の生命維持に重要であり、通常は抗酸化酵素や抗酸化物質により ROS を消去しているが、ROS が十分処理されずに蓄積し、生育阻害や細胞死を引き起こす状態を酸化ストレスと呼ぶ。パン類、酒類、バイオエタノールなどの製造に使用される酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、発酵生産過程において高温、冷凍、乾燥、高濃度エタノール、高浸透圧などの環境に曝されている。酵母はこれらの環境に長時間または複合的に曝されると、抗酸化酵素の変性やミトコンドリア膜の損傷などに伴い ROS が蓄積した酸化ストレス状態に陥り、有用機能（エタノール、炭酸ガス、味・風味物質などの生成）が制限される。本発表では、酵母に見出した「生命システム」として、プロリン（Pro）・アルギニン（Arg）代謝を介した新規な酸化ストレス耐性機構について、および「生命システム工学」を利用した次世代のモノづくりとして、高機能化型「パン酵母」の育種と製パン技術への応用についてそれぞれ紹介する。

我々は実験室酵母において、Pro オキシダーゼ Put1 と *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 の両遺伝子の転写が高温処理などの酸化ストレスにより誘導され、Pro から *N*-アセチルグルタミン酸-γ-セミアルデヒドを介して Arg の合成を亢進すること、および増加した Arg が酵母の高温ストレス耐性に寄与することを明らかにした。さらに、Arg は哺乳類のシグナル分子である一酸化窒素（NO）の前駆体であることに着目し、酵母においても NO が Arg から Tah18 タンパク質依存的に生成し、細胞に酸化ストレス耐性を付与することを見出した。NO は銅代謝に関与する転写因子 Mac1 を活性化し、銅依存性スーパーオキシドジスムターゼ Sod1 の活性上昇を介して、抗酸化に関与すると考えている。以上の知見に基づき、酵素機能が向上した変異型のγ-グルタミルキナーゼ Pro1 と Mpr1 を同時に発現させることで、過剰合成された Pro から Arg を経て NO を効率的に生成するパン酵母を作製した。その結果、高機能型 Pro1・Mpr1 発現株は酸化ストレス耐性が親株に比べ、約 10 倍向上した。また、高温乾燥、冷凍などの製パンストレス条件下においてもその効果が実証できた。特に、高温乾燥処理条件において、高機能型 Pro1・Mpr1 発現株では親株に比べ、細胞内の NO レベルが増加し、ROS レベルが減少した。NO が細胞に酸化ストレス耐性を付与し、高温乾燥・冷凍耐性を獲得したと考えられる。さらに、高機能型 Pro1・Mpr1 発現株は親株に比べて、高温乾燥後、冷凍後の発酵力がそれぞれ約 20%向上した。以上の結果から、NO が複数の製パンストレスに対する耐性を向上させることが示された。

yeast, oxidative stress tolerance, proline/arginine metabolism

講演番号：4SY03-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:00～ A 校舎 03 会場

合成生物学の物質生産への利用
Application of synthetic biology to bioproduction

○花井 泰三(九大院農)
○Taizo Hanai(Kyushu Univ.)

細胞を、多数の相互作用する生体分子ネットワークからなるシステムとして捉える「システム生物学」と呼ばれる研究が行われている。しかし、すべての生体分子ネットワークが十分には理解されてはいないため、真の意味での「システム生物学」は完成しておらず、現状では、遺伝子、mRNA、代謝物などの大量のデータを「眺めて解析する生物学」にとどまっている。一方、このような生体分子ネットワークを「眺めて解析する生物学」から、「創って解析する・利用する生物学」を目指し、2000 年頃から米国で合成生物学(synthetic biology)という研究が行われている。「創って」と言っても「無から生物を創る」ことを指しているのではない。サイエンスの面では、同定済みの相互作用する生体分子を組み合わせた人工遺伝子回路(Genetic circuit)を設計して、発振回路などの特定の生体内現象を再現させようとする試みがなされている。また、エンジニアリングの面では、別の生物由来の酵素遺伝子を複数組み合わせた合成代謝経路(Synthetic pathway)を設計し、その生物が本来生産できない物質を大量生産させる試みが行われている。ここでは、我々のグループの研究結果を例に、人工遺伝子回路および合成代謝経路の研究を紹介したい。

まず、人工遺伝子回路についての研究であるが、我々は遺伝子トグルスイッチの開発を行っている。遺伝子トグルスイッチとは二つの遺伝子（例えば遺伝子①と②）のうち、初期状態では①の発現が ON で②の発現が OFF、誘導添加などでスイッチを切り替えるように、逆に①が OFF で②が ON というように二つの遺伝子の発現を同時に制御できるものを指している。PLtet0-1 および PLlac0-1 プロモーター、tetR および lacI リプレッサーを利用したトグルスイッチを作成したが、望み通りの遺伝子発現を行わせるためには、lacI リプレッサーの供給量とその他の要素のバランスが重要であることが明らかとなった。

次に、合成代謝経路についての研究であるが、我々はイソプロパノール、イソブタノール、ブタノールを生産する合成代謝経路の開発を行っている。ここでは、イソプロパノール生産大腸菌について紹介したい。グルコースからイソプロパノールを生産するために必要な 4 種類の酵素の遺伝子を、アルコールデヒドロゲナーゼは C. beijerinckii NRRL B593 から、それ以外は C. acetobutylicum ATCC824 から 大腸菌に導入した。大腸菌は、アセチル CoA からアセトアセテートを生み出すための atoB、atoAD を持っているため、上記の遺伝子とこれらの遺伝子のいくつかの組み合わせを大量発現させた。その結果、thlA、atoAD、adc、cbadh の組み合わせで、81.6mM のイソプロパノールが生産された。

Synthetic biology, Synthetic pathway, bioproduction

講演番号：4SY03-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:25～ A 校舎 03 会場

システム工学を応用した合成生物学による人工遺伝子回路のプログラミング

Programming of artificial genetic circuit by synthetic biology dependent on system engineering

○木賀 大介[1,2]([1] 東工大院総理工、[2] 東工大地球生命研)
○Daisuke Kiga[1,2]([1]Tokyo Tech, [2]ELSI)

近年のゲノム情報の蓄積と長鎖 DNA 合成手法の発達により、種々の生物から機能モジュールとしての所望の遺伝子をピックアップして組み合わせることで有用な遺伝子ネットワークである「人工遺伝子回路」を構築することを研究手段とする、合成生物学が発展しつつある。ただし、遺伝子を組み合わせる場合に、単にゲノム配列上の遺伝子や cDNA を使用するだけでは不十分である。なぜならば、遺伝子は、何を造る、というタンパク質の配列情報だけでなく、いつどれだけ造る、という制御情報も併せ持つためである。それぞれの生物ごとにこの制御情報ネットワークが完結しているものの、有用な人工遺伝子回路を創るためには、制御情報を一からデザインしてモジュールのフローをブラッシュアップする必要が生じてくる。実際、2000 年以降の合成生物学の主要な研究では、人工遺伝子回路のデザイン上での挙動と、この回路を導入された細胞の挙動との比較に焦点が当てられたものが多い。このデザイン過程においては、数理モデルの活用などの、Dry アプローチも重要になっている。

本発表では、このような人工遺伝子回路をデザインして生きた細胞に導入する際に、システム工学一般で行われているような数理モデル化を遺伝子ネットワークに適用する Dry アプローチを、Wet 実験に対して順次組み合わせていくことが有用であることを、構築の 2 例と共に紹介する。

本研究では、まず、相互抑制関係にある遺伝子の大量発現によって、細胞に多分化能を与え、さらに分化後の細胞の比率を自由にコントロールできるメカニズムと大腸菌での実装を紹介する。相互抑制回路を持つ細胞は、二つの安定状態(遺伝子発現プロファイルにより記述される状態)のうちのどちらかをとる、双安定を示す。双安定状態にある細胞内で遺伝子の大量発現を行うと、双安定状態から単安定に変化させることができる。その後大量発現を解除することで、大量発現のレベルに依存して、細胞の比率を簡単にコントロールすることができるようになった。

続いて、同一遺伝子セットを持つ細胞集団が遺伝子発現状態の多様性を細胞間通信の活用によって自律的に回復するという、プログラムのデザインと大腸菌での実装を紹介する。同じ遺伝子セットを持ちつつも、H 状態と L 状態の 2 つの状態に多様化できる大腸菌が、2 状態の共存ではどちらも安定となる一方、L 状態の細胞のみとなると、L 状態の不安定化の後に一部の細胞が H 状態に変化し、残りが L 状態に戻ることで 2 状態の共存が再出現する。この遺伝子ネットワークは、相互抑制回路と、H 状態で強く発現し L 細胞状態で少しだけ発現する細胞間シグナル生産回路を組み合わせることで構築できた。

synthetic biology, modularity, mathematical modeling

講演番号：4SY03-4
講演日時、会場：3 月 30 日 14:50～ A 校舎 03 会場

代謝ネットワーク機能の進化デザイン
Evolutionary Engineering of Metabolic Networks

○梅野 太輔[1,2]([1]千葉大学院工、[2]JST さきがけ)
○Daisuke Umeno[1,2]([1]Chiba Univ., [2]PRESTO, JST)

酵素遺伝子を組み合わせることによって，多種多様な化合物への代謝経路が構築できる。また，これら人工の生合成経路は、個々の酵素遺伝子の発現調節や機能改良によって、その生産効率を高めることができる。本講演では，代謝ネットワークのデザインと構築において，進化分子工学がどのように適用され得るか，幾つかの例をご紹介したい。

1. 近年は、天然分子にこだわらず、望む化学構造への新規な代謝経路を自由に構築する試みが増えつつある。我々は，非天然のカロテノイドやテルペンの多段階からなる代謝経路の建設に取り組んできた。１０年にわたる苦労の中から，新規な酵素機能（あたらしい反応特異性）を生み出すことがかなり容易であること，一方で，それを実際に組み合わせて代謝経路を創るときに，様々な問題が起こり得ること，などを我々は学ぶ羽目になった。
2. 遺伝子転写ネットワークをRewiringすることによって，さまざまな人口制御回路が試作されつつあるが，多くの分子の協働によって生じるこれらのシステム機能の合理的設計は，思いのほか困難である。これら制御回路の建設を確実化，高速化するうえで，進化分子工学は強力な武器となる…はずであった。しかし，実際にやってみると，遺伝子回路の進化デザインには，思いのほか苦労が多いことが分かってきた。我々の研究室が体験した多くの失敗をもとに，多成分機能の進化デザインはどうなされるべきかを改めて議論したい。

pathway engineering, directed evolution, regulatory network

講演番号：4SY03-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:15～ A 校舎 03 会場

植物アルカロイド発酵生産のための微生物プラットフォームの構築

A bacterial platform for fermentative production of plant alkaloids

○南 博道(石川県大資源研)
○Hiromichi Minami(Res. Inst. Biores. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ.)

【目的】植物の産生する多様な二次代謝産物のなかでも、アルカロイドは少量で顕著な生理活性を示すため、市販されている医薬品原料として非常に高い需要がある。植物の産生するアルカロイドの中で、イソキノリンアルカロイド（IQA）と呼ばれるグループは、モルヒネやコデインをはじめ、多くの薬理学的に有用な化合物を含む。一般にアルカロイドは化学構造が複雑なために、化学合成による大量生産は困難であり、植物体からの抽出が主な生産法である。しかし、植物体に乾燥重量の数パーセント程度しか含まれていないものも多く、植物体の生育には数ヶ月～数年を要するため、大量に供給する方法が検討されている。そこで、実用生産システムの構築を目的として、微生物発酵法による IQA 生産を行った。

【方法・結果】多くの IQA はチロシンを出発物質として、norcoclaurine synthase（NCS）によるドーパミンと 4-hydroxyphenylacetaldehyde（4-HPAA）との縮合反応の後、IQA の重要な中間体である(*S*)-レチクリンを経由して生産される。そこで我々は、微生物由来の酵素、チロシナーゼ（TYR）、ドーパ脱炭酸酵素（DODC）、モノアミン酸化酵素（MAO）をレチクリン生合成酵素（NCS、6OMT、CNMT、4'OMT）と組み合わせ、改変型のレチクリン生合成経路を構築し、チロシン生産大腸菌に導入することで、発酵生産システムを確立した（図１）。80 時間の培養で、培地中のグルコースから 2.2 mg/L の（*S*)-レチクリンが生産された。炭素源としてグリセロールを用いた場合には、収量は 6.2 mg/L に増大した。さらに、この生産システムに酸化活性の低い TYR を用いることで、グリセロールからのレチクリン合成活性が大幅に向上（46 mg/L）した[1)]。

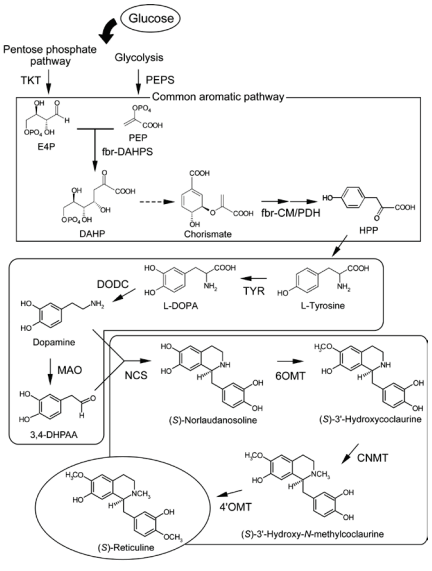


図 1 大腸菌におけるグルコースからのレチクリン生合成経路

微生物発酵法によるアルカロイド生産システムは、植物培養細胞の培養または遺伝子組換え植物による生産（通常、数ヶ月から数年程度の期間を要する）よりも速く（２～３日）生産することが可能である。化学合成ではその不斉合成が生産の難点となるが、我々のシステムでは医薬的に極めて重要な光学活性体を短時間に効率よく生産することが可能であった。炭素源として用いるグルコースやグリセロールは安価で、入手が容易である。そのため、従来の生産方法と比較して、生産コストは非常に低いものとなる。医薬的に重要なアルカロイドの微生物発酵法の確立は、需要の高まる医薬品への安定した供給方法になるだけでなく、創薬研究における新たな展開に貢献できるものと期待される。

1) A. Nakagawa et al., *Nat. Commun.* 2011, 2, 326.

reticuline, benzylisoquinoline alkaloid, microbial production

講演番号：4SY03-6
講演日時、会場：3 月 30 日 15:40～ A 校舎 03 会場

バイオマスから高効率で乳酸プラスチックを生産する微生物工場の開発とポリマー物性評価
The production of biomass-derived lactate-based polymers using microbes and their material properties
○松本 謙一郎[1]、前田 理久[2]、田口 精一[1,3]([1]北大院工、[2]明治大院農、[3]CREST・JST)
○Ken'ichiro MATSUMOTO[1], Michihisa MAEDA[2], Seiichi TAGUCHI[1,3]([1]Hokkaido Univ., [2]Meiji Univ., [3]CREST-JST)

近年、バイオマスを原料とした化製品の合成法の開発が盛んに研究されている。その中でも、ある種の微生物が産生するポリエステルは、バイオマスから一段階で合成可能であり、抽出後はプラスチックとして利用可能なことから注目される。微生物産生ポリエステルとしては、3-ヒドロキシ酪酸(3HB)のポリマーである P(3HB)が良く知られているが、P(3HB)は加工が困難なため、二次モノマー成分を導入することにより、物性を改良することが試みられてきた。当研究グループでは、ポリマー合成系を人工的に改変する事により、非天然のモノマーユニットが導入された新規ポリエステルの生合成に取り組んでいる。中でも、乳酸ユニット（LA）が取り込まれた乳酸ポリマーP(LA-co-3HB)は、バイオベースプラスチックの代表格であるポリ乳酸と P(3HB)が融合した興味深い構造を有する。本共重合体は、柔軟で伸張性を有する素材になることから、硬質なポリ乳酸や P(3HB)とは異なる用途が期待される。P(LA-co-3HB)は、大腸菌を宿主として糖質バイオマスから合成可能であり、その合成には乳酸発酵と類似した代謝経路を使用するが、好気条件で合成が促進されるなど、乳酸発酵とは異なる性質を多く有する。さらに、乳酸は対糖の炭素収率が高いため、P(3HB)よりも生産性が高くなるのが特徴である。この効果をさらに高めるため、乳酸の合成と競合する代謝経路を遮断する代謝工学を行い、乳酸ポリマーの合成量およびポリマー中の乳酸分率を向上させることに成功した。加えて、炭素源としてリグノセルロースの主要構成成分であるキシロースを用いることにより乳酸ポリマーの合成が促進されることを見出し、現時点での最高値として、既存の P(3HB)合成系と比較して３倍近い生産性が達成できた。これらの組換え大腸菌を電子顕微鏡観察したところ、細胞内にポリエステルの粒子が高蓄積されていることが分かった。この非天然ポリマー合成系は、他のモノマーユニットにも応用可能である。一例として、乳酸と類似の構造を有する 2-ヒドロキシ酪酸（2HB）のポリマーの合成を試みた。P(2HB)は不斉炭素を有し、そのキラルポリマーは、鏡像関係にあるポリ乳酸とヘテロステレオコンプレックスを形成するなど、興味深い性質が示されていたが、キラル原料のコストが高いために、詳細な物性は知られていなかった。我々は、上記の重合系にラセミ 2HB を加えて培養することにより、P(2HB)を合成できる手法を見出した。得られたポリマーは、ほぼ完全に R 体の 2HB のみを含み、ラセミ原料からキラルポリマーの合成が可能であることが分かった。ポリマーをフィルム化して解析することにより、P(2HB)が透明で柔軟性を示す材料であることが明らかとなった。
Nduko et al., Appl. Microbiol. Biotech., in press.

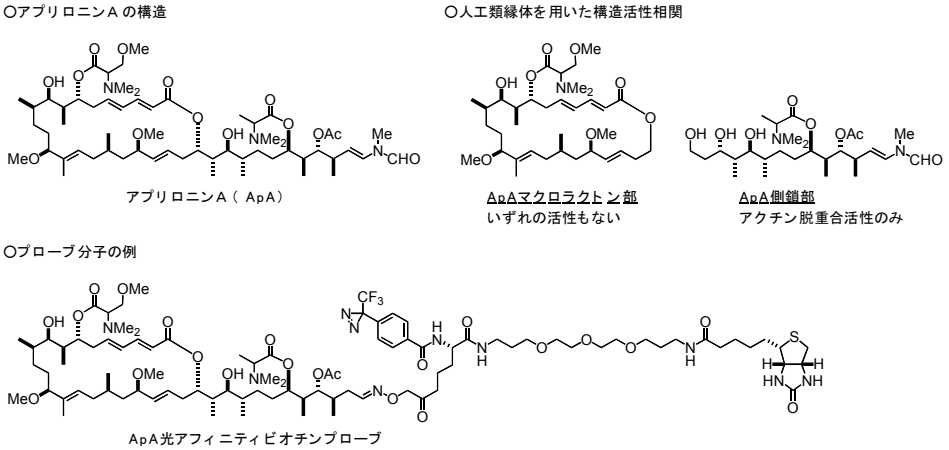
biobased plastic, poly(lactic acid), microbial production

講演番号：4SY04-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:30～ A 校舎 04 会場

海洋産抗腫瘍性物質アプリロニンＡの生物有機化学
Bioorganic chemistry of an antitumor marine macrolide, aplyronine A

○木越 英夫(筑波大数理物質)
○Hideo Kigoshi(Univ. of Tsukuba)

海洋軟体動物アメフラシ（*Aplysia kurodai*）は、貝殻を持たない貝の一種であり、日本では本州以南に生息している。我々は、その成分検索を行った結果、極めて強い腫瘍細胞増殖阻害活性と市販の抗がん剤を上回る抗腫瘍性（白血病モデルマウスの延命率 545%など）を示す化合物、アプリロニンＡ（ApA）を極微量成分として単離し、その構造を決定した。ApA は、末端に *N*-メチルエナミド構造を有する 24 員環マクロリドであり、二つの *N,N*-ジメチルアミノ酸エステル構造を特徴とする。我々は、その化学合成を行うことにより、立体構造を確定するとともに量的供給法の道を拓いた。



ついで、生体標的分子を探索した結果、ApA は細胞骨格タンパク質のアクチンと相互作用することを見いだした。ApA は線維状重合体 F-アクチンを切断して脱重合するとともに、単量体 G-アクチンの重合を阻害する。アクチンは、細胞の増殖、運動、形態維持などに極めて重要なタンパク質である。そこで、上記の化学合成で得られた人工類縁体を用いて、腫瘍細胞増殖阻害活性とアクチン脱重合活性についての構造活性相関研究を行ったところ、以下のことがわかった。

（１）強力な腫瘍細胞増殖阻害活性には、ApA 分子全体が必要である。
（２）アクチン脱重合活性には、ApA の側鎖部だけで十分である。

これらの構造活性相関や細胞内のアクチンの濃度が極めて高いこと（100 μM）を考慮すると、ApA の強力な腫瘍細胞増殖阻害活性や抗腫瘍性は、アクチン脱重合活性のみでは説明できない。よって、まず ApA は細胞内でアクチンと結合した後（K_d 約 100 nM)、その複合体が第二の標的タンパク質と相互作用することにより、腫瘍細胞増殖阻害活性や抗腫瘍性が発現しているという仮説を立てた。

そこで、ApA をリガンドとするプローブ分子を設計・合成し、第二の標的タンパク質を探索した。その結果、ApA とアクチンの複合体が、チューブリンに結合し、腫瘍細胞の増殖を阻害することがわかった。これらの詳細について述べる。

aplyronine A, actin, tubulin

講演番号：4SY04-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:05～ A 校舎 04 会場

シロアリ社会における繁殖制御と女王フェロモンの多面的機能

Multifunctional queen pheromone and regulation of reproduction in termites

○松浦 健二(京大院農・昆虫生態)
○Kenji MATSUURA(Kyoto Univ.)

アリやハチ、シロアリなど高度な社会生活を営む昆虫では、繁殖は専ら生殖階級の女王（シロアリには王も）が行い、労働や防衛はワーカーと兵隊が行うという、繁殖分業が発達している。繁殖個体が死亡すると新たな繁殖個体が出現する。例えば、シロアリの女王が死亡すれば、新たな女王が分化して巣内の繁殖を継承する。これは、十分な繁殖能力をもつ女王が、他の雌の繁殖分化を何らかの方法で抑制していることを意味している。古くから、その繁殖分化制御が女王から発せられる何らかの化学成分「女王フェロモン」によるものであることが示唆されていたが、長年その物質は特定されておらず、いわば幻のフェロモンであった。近年、講演者らは、ヤマトシロアリの女王フェロモンの成分がアルコールの 2-methyl-1-buranol とエステルの n-butyl-n-butyrate の２つの揮発性化学物質であることを特定した（Matsuura et al. 2010, PNAS）。女王フェロモンが特定できたことにより、その機能に関する様々な操作実験が可能となり、繁殖分業やフェロモンの進化プロセスを理解する上でも重要な知見が得られるようになった。まず、女王フェロモンと全く同じ揮発性物質が卵からも放出されており、この卵揮発物質はワーカーが卵を育室に運搬・保護する際の定位フェロモンとしても機能していることが分かった。また、女王が複数存在するコロニー内では、女王フェロモンが女王間の産卵シグナルとして働き、コロニーレベルの卵生産量の調節に重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、ワーカーの唾液腺で作られるリゾチームには、卵の抗菌機能と卵認識フェロモンの機能があるが、女王フェロモンに暴露したワーカーでは有意に唾液腺リゾチーム量が増加することが分かった。このように、シロアリのコロニーにおいて女王フェロモンは女王の卵生産を示すシグナルとして働き、巣内のメンバーの繁殖に関連した様々な行動や生理に作用することが明らかになっている。そもそも、なぜ 2-methyl-1-buranol と n-butyl-n-butyrate が女王フェロモンとして利用されるようになったのか。フェロモン進化の最節約性（pheromone parsimony）の観点から、さらなる機能探索を行った結果、これらの成分にはシロアリの寄生性糸状菌である卵擬態菌核菌ターマイトボールやその他の昆虫病原菌に対して抗菌活性があることが分かった。これらの知見に基づいてシロアリの女王フェロモンの多面的機能の進化プロセスについても議論する。

queen pheromone, social insect, termite

講演番号：4SY04-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:40～ A 校舎 04 会場

スギヒラタケ急性脳症事件の化学的解明の試み

Chemical elucidation of acute encephalopathy caused by the mushroom *Pleurocybella porrigens*

○河岸 洋和(静大グリーン研)
○Hiorkazu Kawagishi(Shizuoka Univ.)

スギヒラタケ（*Pleurocybella porrigens*）は，秋に針葉樹，特にスギの古い切株や倒木に重なり合うように群生する。東北，北陸，中部地方を中心に広く食用とされていた。ところが，2004 年秋に，このキノコの摂取により急性脳症が発生した。患者数は 59 名に達し，腎機能障害をもっていた 17 名が亡くなった。この事件は戦後最悪の食中毒事件とされているが，原因の解明は困難を極め，厚生労働省研究班は「原因不明」と結論した。しかし，我々はその化学的解明の努力を現在も続けている。

現時点において，我々は「高分子 2 成分（B３と PPL）によって血液脳関門（blood brain barrier, BBB：無秩序に物質が脳に移行しないための関門）が破壊され，低分子毒（pleuocybeaziridine）によって急性脳症が惹起された」（図）という仮説に従って研究を行っている。[1-4)]

本シンポジウムでは，これまでの経緯と最新の結果を紹介する。

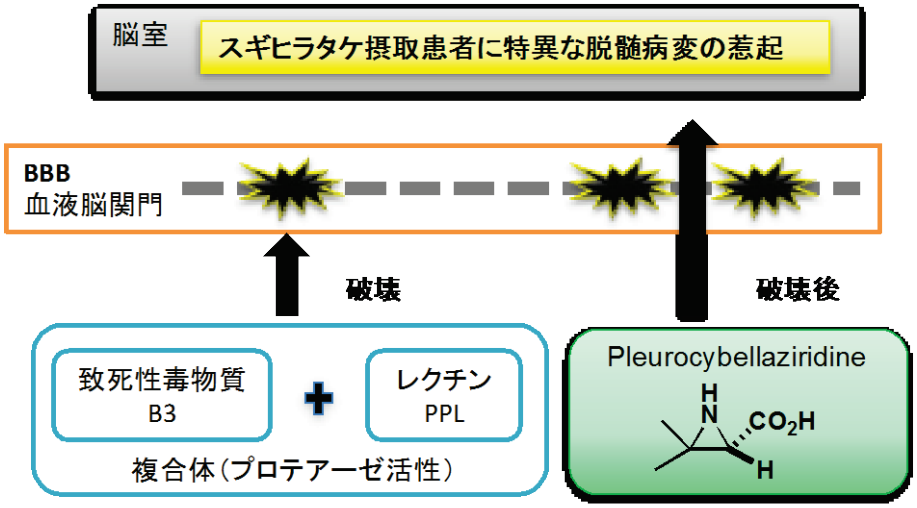


図 スギヒラタケ急性脳症発症機構の仮説

参考文献
1) 鈴木智大ら，スギヒラタケ食中毒事件の化学的解明，第 52 回天然有機化合物討論会講演要旨集，p.655-660 (2010)
2) Suzuki, T. et al., Purification, characterization and cDNA cloning of a lectin from the mushroom *Pleurocybella porrigens*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 73, 702-709 (2009).
3) Kawaguchi, T. et al., Unusual amino acid derivatives from the mushroom *Pleurocybella porrigens*, Tetrahedron, 66, 504–507 (2010).
4) Wakimoto, T. et al., Proof of the existence of an unstable amino acid, pleurocybellaziridine, in *Pleurocybella porrigens* (angel's wing mushroom), Angew. Chem., Int. Ed., 50, 1168-1170 (2011).

Mushroom, Pleurocybella porrigens, acute encephalopathy

講演番号：4SY04-4
講演日時、会場：3 月 30 日 15:15～ A 校舎 04 会場

ホタルの発光メカニズムの進化：ルシフェリンはどこから来て、どのようにしてルシフェラーゼの基質となったのか？

Evolution of bioluminescence system in firefly

○大場 裕一(名古屋大院生命農)
○Yuichi Oba(Nagoya Univ.)

ホタルの発光メカニズム（ルシフェリン―ルシフェラーゼ反応）は、古くから生物有機化学者や生化学者の興味を惹き付け、その詳細が解明されてきた。すなわち、ルシフェリンはベンゾチアゾール環とチアゾリン環からなる低分子化合物で、ホタルを含む発光性甲虫にしか見つかっていない。また、ルシフェラーゼは約 60kDa の単量体タンパク質で、発光性甲虫以外のルシフェラーゼとは全く類似性を持たない独自の酵素である。

我々は、このような「光の放出を触媒する」という特殊な酵素–基質反応系がいかにしてホタルで進化し得たのかについて、ケミカルバイオロジーの視点から研究を続けてきた。

その結果、「ホタルルシフェラーゼ」は、脂肪酸代謝経路（β酸化）に関与する脂肪酸 CoA 合成酵素という酵素から進化したことを明らかにした。実際、光らない生物が持つ脂肪酸 CoA 合成酵素にわずか 1－3 アミノ酸の変異を加えるだけで、ルシフェリンを認識して発光反応を触媒する活性を付与させることができた。つまり、特殊な触媒活性を持つルシフェラーゼは、ありふれた酵素のひとつから僅かなアミノ酸変異によって進化しうることが確かめられた。

では、認識される側の「ホタルルシフェリン」はどこから来たのだろうか？ホタルルシフェリンに似た構造をもつ天然有機化合物は見つかっていない。しかし、たとえルシフェラーゼが容易に進化しうるのだとしても、ルシフェリンがなければ発光反応は成立しない。これについて、我々はごく最近、ホタルルシフェリンが、多くの生き物が持っている 2 種類の物質から生合成されることを明らかにした。

今回の講演では、このような新しい酵素―基質反応系はいかにして進化しうるのかについて、私が行なってきたホタルの発光を例に紹介したい。

Bioluminescence, Luciferin, Luciferase

講演番号：4SY04-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:50～ A 校舎 04 会場

動物の性行動を制御するフェロモンと受容体の同定

Pheromones and receptors that regulate sexual behaviors

○東原 和成(東大院農/JST ERATO)
○Kazushige Touhara(The University of Tokyo/ JST ERATO)

生態系は、多様かつ複雑な化学物質で充満しているが、生物は、そのなかから、仲間、敵、異性などのシグナルを、化学感覚神経系で正確に識別する[1]。化学シグナルである匂いやフェロモンは、マウスにおいては鼻腔の主嗅覚系と鋤鼻系で感知される。我々はオスマウスの涙液から涙に分泌され、メスの鋤鼻器官で感知され、交尾受入れ行動を促進させるペプチド性フェロモン(ESP1)を見つけた [2]。また、最近、性成熟する前の幼少マウスの涙に特異的に分泌されるタンパク質(ESP22)を発見した。ESP22 は、性成熟する前のメスマウスに交尾をしかけるような余計なことをしないように、大人のオスマウスの性行動を抑制する幼少フェロモンであることがわかった[3]。また、オスマウス包皮腺から尿に分泌され、メスマウスの主嗅覚系を刺激し、誘引行動をひきおこす物質として、炭素鎖 14 の新規の不飽和脂肪族アルコール Z5-14:OH を発見した[4]。一方、ムスコンは、発情期のジャコウジカのオスが臭腺から発し、自分のテリトリーを示し、メスを呼び寄せるフェロモンである。ムスコンは、大環状ケトン構造という特徴的な構造を持つだけでなく、動物種を越えてフェロモン様の生理作用をもつという興味深い性質がある。また、魅惑的な匂いを呈するので、トイレタリー製品や香粧品に頻繁に使われる。我々は、マウスとヒトでムスコンを特異的に認識する嗅覚受容体を同定した[5]。産業的に有用なムスク系香料の新規開発につながると期待される。このように、日本のお家芸でもある「ものとり」研究によって、動物の性行動を制御するフェロモンには、Z5-14:OH やムスコンのように揮発性で主嗅覚系の特異的な嗅覚受容体によって感知されるものと、ESP のようにペプチド性で直接接触によって鋤鼻神経系で感知されるものが存在することがわかってきた。

[1] Touhara, K. & Vosshall, L.B.: Annu. Rev. Physiol. 71, 307−332 (2009)
[2] Haga, S. et al.: Nature 466, 118-122 (2010)
[3] Ferrero, D. et al.: Nature 502, 368-371 (2013)
[4] Yoshikawa, K. et al.: Nature Chem. Biol. 9, 160-162 (2013)
[5] Shirasu, M. et al.: Neuron in press (2013)

pheromone, olfactory, muscone

講演番号：4SY05-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:30～ A 校舎 01 会場

構造生命科学データクラウドはゲノムからタンパク質に至る課題を解決する
Data cloud for structural life sciences will solve your problems from genomes to proteins

○菅原 秀明(国立遺伝学研究所)
○HIDEAKI SUGAWARA(National Institute of Genetics)

構造生命科学とは

2012 年 1 月に開催された日本学術会議公開シンポジウムにおいて、「構造生物学と先端的ライフサイエンス領域との融合から生まれる新しい『構造生命科学』は、“原子レベルで生命を見る、知る、そして使う”というところまで進展し、ライフサイエンスの革新に繋がるものでなければならない」と謳われました。その具現化に向けて、創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業（以下、創薬等 PF）では、タンパク 3000 とそれに続くターゲットタンパク研究プログラムの成果を活かして、複数の機関で構成される解析拠点・制御拠点・情報拠点の三拠点体制を整えて、研究課題の「いま」を支援し、「さき」の研究課題を見据えた高度化を進めています。

データクラウドとは

計算機機能をネットワーク経由で提供するサービスは 1960 年代から存在していましたが、2006 年以後、計算機の所在や仕様を意識せずにサービスを利用できるクラウドコンピューティングの概念と用語が定着しました。データクラウドは、それに触発された著者等による造語です。情報拠点は、利用者がネットワーク上の膨大なデータベースとデータ解析ツールの所在や仕様を意識することなく最適な検索結果や解析結果を引き出すことができるデータクラウドの実現を目指しています。

情報拠点が「いま」提供できるサービス

情報拠点を構成する国立遺伝学研究所、大阪大学、東北大学、お茶の水女子大学ならびに東京大学は、分野を問わず研究開発における問題解決のコンサルティングおよび支援を行っています。情報拠点へのご依頼は、創薬等 PF のサイト（http://pford.jp/_onestop2/）からオンラインまたは同サイトからダウンロードした文書ファイルを創薬 PF 事務局へのメール添付にてお申込みいただけます。お申し込みは、公平性・透明性の観点から、第三者で構成される課題選定協議会による審査結果に基づいて実施に移されます。一方で、情報拠点の Web サイト（http://p4d-info.nig.ac.jp/）では手軽に、研究開発に必要な機能を提供するデータベースやツールに出会え、アミノ酸配列からタンパク質の立体構造・機能を予測しさらにタンパク質複合体の検索と構造も予測でき、あるいは構造生物学に関わる詳細な実験プトロコルを学び、オートファジーなど専門分野に特化したデータベースを検索することができます。また、構造生命科学の普及を念頭に日々更新しているニュースウオッチ欄もご覧いただけます。

Structural Biology, Life Sciences, Problem Solving Environment

講演番号：4SY05-2
講演日時、会場：3 月 30 日 13:55～ A 校舎 01 会場

タンパク質の構造予測、相互作用予測と創薬等 PF における支援
Protein structure and interaction prediction
○清水 謙多郎(東大農)
○Kentaro SHIMIZU(Univ. Tokyo)

創薬等支援技術基盤プラットフォームは、解析拠点、制御拠点、情報拠点の 3 つの拠点から構成されている。そのうち、解析拠点は、タンパク質の調整、構造解析を担当し、「構造解析をライフサイエンス研究者がより身近なものとして利用できるようにし、その研究を最先端の技術で強力に支援すること」を目的とする。本発表では、まず、解析領域の中のバイオインフォマティクス領域における活動について、支援の内容、体制、現状について述べる。次に、発表者のグループが創薬等支援技術基盤プラットフォームで行っている研究について述べる。

発表者のグループでは、タンパク質の複合体構造・相互作用に関する総合的な予測・解析の研究を行っている。タンパク質の構造予測では、球面調和関数の級数展開を用いた独自の高速化手法によるタンパク質-タンパク質の複合体構造予測、分子動力学計算を用いたタンパク質の精密なモデリング、特定の鋳型によらない de novo 構造予測について述べる。相互作用予測については、タンパク質のアミノ酸情報のみから機械学習を用いて、タンパク質とタンパク質、糖鎖、脂質との相互作用予測（相互作用するかどうかの予測）および相互作用部位予測（相互作用する残基を予測）の手法、さらに、相互作用部位予測については、与えられたリガンドから相互作用部位を予測するツールを自動生成するシステムについて述べる。また、発表者らは、タンパク質の構造が得られているとき、リガンドが結合する空間的位置を予測する手法を開発した。本手法は、リガンドとタンパク質の相互作用エネルギーが低い位置をクラスタリングによって求めるとともに、類縁タンパク質の残基保存性の情報を使って、より高い精度でリガンドが結合する位置を求めようというものである。リガンドが既知の場合は、相互作用の条件をより詳細に設定して、予測精度を向上させることが可能である。さらに、粗視化分子動力学シミュレーションでは、リガンドが結合する部位の予測、リガンドがタンパク質に結合する過程の解析を可能にするもので、その実例を示す。そのほか、タンパク質-リガンド複合体、タンパク質-糖鎖結合タンパク質などのデータベースと、セマンティック Web を用いたそれらの連携について述べる。

protein structure prediction, protein interaction prediction, protein-protein docking

講演番号：4SY05-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:20～ A 校舎 01 会場

HOMCOS：複合体立体構造の検索・モデリングサーバ

HOMCOS：a server for searching and modeling protein complexes

○川端 猛、中村 春木、金城 玲(大阪大蛋白研)
○Takeshi Kawabata, Haruki Nakamura, Akira Kinjo(IPR, Osaka Univ.)

一つの蛋白質の立体構造からでも、その性質について多くのことがわかるが、さらに、別の分子がその蛋白質に結合した複合体の立体構造データがあれば、分子機能を理解する重要な手がかりが得られる。どのアミノ酸が他の分子とどのように接触しているかが明確にわかるため、分子間結合や酵素反応のメカニズムを考えることができるからだ。また、結合だけを阻害する点変異体の設計にも役立つだろう。こうした複合体立体構造データは、立体構造データベース PDB に既に多数登録されているが、その数は実際に相互作用する分子ペアに比べ遥かに少ない。そこで、タンパク質の相同性や化合物の類似性を利用することで、類似した相互作用を検索し、鋳型ベースで複合体構造を予測が試みられてきた。だが、単体の立体構造を配列から検索・モデリングするサーバが数多く公開されている一方、複合体の立体構造を検索できるサーバは少ない。我々は、蛋白質二量体構造を検索できるサーバ HOMCOS(HOmology Modeling of Complex Structure)を以前に開発していたが、その設計を一新し、対象分子を蛋白質だけでなく低分子化合物や核酸にまで拡張したサーバの新規開発を行っている。本サーバには、蛋白質、低分子、核酸など PDB データベースに収納されている全ての分子の立体構造が別々に収納され、それらの結合関係が別途 RDB に収納されている。サーバには BLAST や化学構造比較プログラム KCOMBU が組み込まれ、入力した分子のアミノ酸配列や化学構造から、結合する分子の検索を行うことができる。「ホモ多量体検索」サービスではアミノ酸配列１本、「ヘテロ多量体検索」ではアミノ酸配列２本、「低分子―蛋白質複合体検索」では、アミノ酸配列１本と化学構造をクエリとして入力することで、入力分子と相同・類似な複合体構造を検索することができる。いずれのサービスでも、検索した複合体構造の表示だけでなく、それを鋳型とした簡易ホモロジーモデリングまで行えるようになっている。また、「タンパク質に対する結合分子検索」では、アミノ酸配列１本を入力とし、その相同なタンパク質が結合している分子の一覧を作成、それらの予測結合サイトまで表示することができる。このサービスは、多くの分子に結合する蛋白質について、変異による結合への影響を見積もる場合に有用であろう。また、「化合物に対する結合分子検索」では、化学構造を入力とし、その類似分子と結合するタンパク質の一覧を求めることができる。このサービスは、薬剤の副作用を起こす原因タンパク質の同定に示唆を与えるかもしれない。完成した WEB サービスは順次公開し、生命科学や創薬プロセスに活用可能な技術基盤の一つとしていきたい。

complex 3D structure, homology modeling, chemical compound

講演番号：4SY05-4
講演日時、会場：3 月 30 日 14:40～ A 校舎 01 会場

タンパク質機能解析に向けた立体構造情報の活用基盤の構築
Development of a platform for the structure-based function annotation of proteins.
○木下 賢吾[1,2,3]、村上 洋一[1]、城田 松之[1,2]([1]東北大院情報、[2]東北メディカルメガバンク、[3]加齢医学研究所)
○Kengo Kinoshita[1,2,3], Yoichi Murakami[1], Matsuyuki Shirota[1,2]([1]Tohoku Univ., [2]ToMMO, [3]IDAC)

多くの生物でゲノム解析が進んだが、未だ機能が解明されていない遺伝子は多い。生物の分子レベルでの理解のためには、これら機能未知遺伝子の機能を決める必要がある。実験的に全ての機能をチェックするのは困難であり、計算科学的な手法により可能性を絞ることが有用なアプローチとなることがある。既に多くの手法やデータベースが利用可能となってきているが、実験系研究者がこれらの手法を駆使するにはまだハードルが高い点がいくつもある。例えば、ある特定の低分子を認識するタンパク質の立体構造を網羅的にリストアップして、共通の特徴を抽出するだけでも、パスウェイデータベース、タンパク質の立体構造データベースを併用しないといけない。また、これらを併用する段階で、低分子の名前の不一致や、アナログ低分子での構造解析データしか利用できない場合には、低分子の類似性検索を利用する必要が出てくるなどの問題が発生する。その結果として、タンパク 3000 やターゲットタンパク質で蓄積されたタンパク質立体構造情報は十分に活用されているとは言いがたい状況となっている。これに対して我々は、創薬等基盤プラットフォーム事業として、立体構造情報の活用促進のために、以下の２つの開発を行っている。
天然リガンドデータベース構築:PDB 中には多くのタンパク質と低分子の複合体構造の情報が登録されているが、多くの場合は反応が起こらないように、基質のアナログ分子を利用して構造解析がなされている。一方で、代謝パスウェイデータベースである KEGG を利用することで、各タンパク質天然状体で認識することが分かっている低分子の情報は取得することができる。そこで、これら２つの情報を利用しつつ、我々がこれまで開発を行ってきた低分子複合体予測法を利用して、天然のリガンドを結合した状態のタンパク質複合体構造のモデルを構築する。モデルはあくまでもモデルであり、天然リガンドとの複合体構造をデータベース化することにより、特定低分子を認識するタンパク質とそのおおよその結合部位を網羅的に観察することができる基盤を提供する。
ヒト多型情報の立体構造へのマッピング：現在はヒトに限って開発を行っているが、ゲノム上の位置とタンパク質立体構造情報を統合することで、変異の影響を立体構造の観点から考察できるツールの開発を行っている。従来は構造の内外やアミノ酸の保存度等で評価していた変異の影響を、より構造情報を活用した形で評価するための基盤となるものである。
本講演では、これら２つのアプローチについての開発状況と応用例を紹介したい。

Bioinformatics, Protein ligand complex, 3D rare variant

講演番号：4SY05-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:00～ A 校舎 01 会場

ゲノム塩基配列の変異と表現型の変化をつなぐタンパク質立体構造の変化

Trial for the mechanistic understanding of the effect of SNP to phenotype through protein structures

○由良 敬[1,2]([1]お茶の水女子大学、[2]国立遺伝学研究所)
○Kei Yura[1,2]([1]Ochanomizu Univ., [2]National Institute of Genetics)

前世紀末に真核生物のゲノム塩基配列が決定できるようになり、現在では同一種別個体のゲノム塩基配列を大量に決定できるようになった。この技術革新によって、集団のゲノム進化を解析することが可能となった。集団として生物種をみたときに、ゲノムの相同部位塩基が個体によってどの程度変異しており、その変異が個体の表現型にどのような影響をおよぼしているのかを測定する研究が始まっている。ヒトのゲノム塩基配列の場合にも、遺伝的に受けつがれている変異と個人のなかで新たに発生した変異があり、これらの変異には時として病気を引き起こすものがあるため、遺伝子の変異と疾患の関係を探る研究が数多くなされている。変異と疾患の相関関係を明らかにすることで、発症前であっても将来の発症リスクを知ることができ、疾病に対する予防措置を施すことも現実的になってきている。しかし、疾患に対するゲノムからの解析の多くは、その相関関係の解析にとどまっていることが多く、分子機構に基づく因果関係までとらえた例はまれである。しかし創薬などを目標とする場合には、ゲノム、特にタンパク質のコード領域に存在する変異が、タンパク質にどのような影響をもたらすことで疾患にいたるのかを明らかにすることが必要である。この情報を得ることで、ターゲットとなるタンパク質に対して、例えば、適切な摂動を加える低分子を効率的に設計することができるようになる。あるいは、新規の変異が見つかった場合に、その変異によって疾患が発生する可能性を推定することができるようになる。そこで我々の研究グループでは、ゲノムの変異がタンパク質の構造や機能にどのような影響をおよぼすのかを、計算機を用いて明らかにすることを目指している。

このひとつの例としてヒトのリンチ症候群の発症機構解明の試みを紹介する。リンチ症候群は、ヒト２番染色体にコードされている MSH6 遺伝子やその他の関連遺伝子に変異が生ずることで大腸ガンが発症する遺伝病である。遺伝子変異と大腸ガンの発症との間に関連があることは知られているが、その分子的機構は明らかにされていない。そこで、MSH6 における遺伝子の変異とガン発症の有無を集積し、タンパク質の進化と立体構造情報を通してこれらのデータを見ることで、タンパク質のどのような変異が疾患に関与するのか明らかにすることを試みた。

ゲノム塩基配列とタンパク質の階層で研究解析を行うこのような研究において、同一の技法がことなる生物種に適用することが可能である。我々の研究グループでは、植物のゲノムとタンパク質の情報にも、上記方法の適用を試みている。

Protein Structure, Genome sequence, Computational Biology

講演番号：4SY05-6
講演日時、会場：3 月 30 日 15:20～ A 校舎 01 会場

構造生物学とバイオインフォマティクスの境界領域における研究支援と高度化

Research support and technical development activities in the interdisciplinary field of structural biology and bioinformatics

○永田 宏次(東大院農生科)
○Koji Nagata(UTokyo)

文部科学省「創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業」は、創薬プロセス等に活用可能な技術基盤の整備、積極的な外部開放（共用）等を行うことで、創薬・医療技術シーズ等を着実かつ迅速に医薬品等に結び付ける革新的プロセスを実現することを目的とし、平成 24 年度から開始されたプロジェクトです。

演者は、上記プロジェクトの「情報拠点」の一員として、構造生物学とバイオインフォマティクスとの境界領域における「研究支援」および「技術高度化」を進めています。「研究支援」では、広く生物学に携わっている研究者の皆様に構造生物学とバイオインフォマティクスにおける技術支援を行い（自分で支援できない場合は専門家を紹介し）、構造生物学やバイオインフォマティクスの有用性をより多くの生物学研究者に理解していただくことを目的としています。

お手持ちのアミノ酸配列から、標的タンパク質の立体構造についてどれくらいのことが予測できるか、アミノ酸配列相同性があるタンパク質の立体構造についてどれくらいのことが分かっているのか、立体構造が類似しているタンパク質の情報をどのようにして収集したらよいのかなど、タンパク質の配列情報と立体構造や機能部位とを実験的にまたは計算科学により結び付けたい場合にお役に立てると思います。

本発表では、演者がこれまでに行ってきた「研究支援」および「技術高度化」の実例を２つずつ挙げ、農芸化学会会員の皆様の研究にどのように貢献できるかを紹介します。前者は、１．情報伝達物質阻害剤の分子モデリング支援、２．酵素の結晶構造解析・機能解析支援、後者は、３．高圧処理による膜タンパク質の脂質二重膜からの可溶化技術開発、４．ペプチドをリガンドとする GPCR のホモロジーモデリングとリガンドとのドッキングシミュレーションです。

なお、「研究支援」を希望される方は本プロジェクトのホームページ（http://pford.jp/）から申し込むことができますが、本シンポジウムの各演者に直接連絡していただくことも可能です。aknagata@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp に「コンサルティング希望」のメールをお送りいただければ対応いたします。

structural biology, bioinformatics, protein structure

講演番号：4SY05-7
講演日時、会場：3 月 30 日 15:40～ A 校舎 01 会場

生命系の分子シミュレーション
Molecular simulations for biomolecules

○池口 満徳(横浜市大院生命医)
○Mitsunori Ikeguchi(Yokohama City Univ.)

スーパーコンピュータ「京」を始めとして、コンピュータの飛躍的進歩は、様々な科学分野に大きな影響を与えている。生体分子シミュレーションもその一つで、タンパク質や核酸などの生体分子の立体構造をコンピュータの中に仮想的に置いて、その周囲に水やイオンなどの溶媒分子を配置し、物理化学的法則に基づいて、その動きをコンピュータの中で再現することでその動作原理を理解しようとする研究手法である。生体分子シミュレーションの歴史は意外と古く、１９７０年代から研究が行われているが、２１世紀に入って超並列スーパーコンピュータの発展と共に、生体分子シミュレーションの対象がより巨大化し、生物学的に興味がもたれる多くの生体超分子システムに対する分子シミュレーションも可能になってきた。

現在、実施されている創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業においても、生体分子シミュレーションは主要な「支援」の一つに位置づけられている。X 線結晶構造解析などで決定される立体構造は、働いている最中の動的な構造の一つ（スナップショット）であり、それを基にして、どのように動いて機能しているかを探るのが、分子シミュレーションの役割である。

本講演では、そのような生体超分子システムに対する分子シミュレーションの実例を示し、どのように、生体分子シミュレーションが行われているか、紹介したい。

simulation, molecular dynamics, high performance computer

講演番号：4SY06-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:30～ A 校舎 06 会場

酵母由来 ENGase の糖ペプチド合成への利用

Application of yeast ENGase for synthesis of glycopeptides

○千葉 靖典、村上 智史、高橋 佳江、小松崎 亜紀子(産総研・生物プロセス)
○Yasunori Chiba, Satoshi Murakami, Yoshie Takahashi, Akiko Komatsuzaki(AIST)

【目的】Endo-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ（ENGase)は *N*-型糖鎖のキトビオース部分を加水分解する酵素であり、またその糖転移反応を活用した糖タンパク質合成への活用が期待されている。我々は昨年の大会で酵母由来の ENGase の遺伝子クローニングと一部の酵素特性について報告したが、メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* 由来の ENGase（Endo-Om）についてより詳細な解析を行なったので報告する。

【方法と結果】クローニングした Endo-Om 遺伝子（*OmENG1*）を酵母で発現させ、金属アフィニティーカラムで精製を行った。カイネティックパラメーターを測定したところ、*K*m、Vmax ともに大幅に高いことが確認された。また PA 化されたアガラクト 2 分岐複合型糖鎖に対する比活性は約 100 倍程度低下しており、還元末端の GlcNAc の開環の有無が酵素活性に影響すると考えられた。各種 PA 化糖鎖に対する基質特異性を解析した結果、本酵素はα-1,6-Man にβ-1,6 結合で GlcNAc が付加した 3 分岐複合型糖鎖を切断する一方、α-1,3-Man 側が分岐した 3 分岐複合型糖鎖は切断できないことが示された。また比較的糖の数が少ない構造を好んで切断するが、還元末端にコアフコースが付加していると糖鎖を切断できなかった。Endo-Om は低塩濃度では凝集を起こしてしまうため、安定性を保つには 0.5M NaCl の添加が必要となるが、類縁の *Candida parapolymorpha* 由来の ENGase（Endo-Cp）では NaCl の添加が必要ないことから、比較的相同性の低い C 末端側の領域が酵素の安定性に影響していると考えられた。そこで、Endo-Om の N 末端側と Endo-Cp の C 末端側の領域を融合したキメラ酵素を作製し、*O. minuta* Δeng1 株で発現を行なった。精製した酵素は低塩濃度でも不溶性にならず、比活性も Endo-Om と同程度であったことから、従来の Endo-Om に比べ安定性の高い酵素を作出できた。

さらに Endo-Om を利用した糖タンパク質合成を目的として、Endo-Om のグライコシンターゼ化を検討した。すでに *Mucor hiemalis* 由来の ENGase（Endo-M）の N175Q 変異体が高いトランスグリコシレーション活性を有することが報告されている。そこでアミノ酸の相同性を基に Endo-Om N194Q 変異体の作製を行なった。pNP-グルコースを受容体、オキサゾリン化した二分岐複合型糖鎖を糖供与体とした際に、Endo-Om N194Q 変異体は糖鎖を転移し、系時的に反応産物を生産することが確認できた。また短時間でオキサゾリン化糖鎖を調製する方法を検討した。これらの反応条件を組み合わせて、いくつかの糖ペプチドの合成を行なったので、その詳細を報告する。

yeast, endo-ß-N-acetylglucosaminidase, glycopeptide

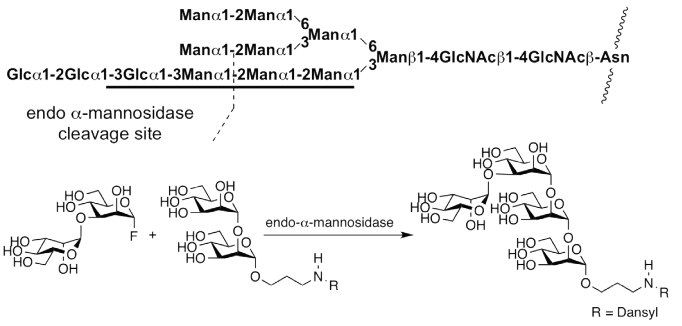
講演番号：4SY06-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:00～ A 校舎 06 会場

エンド-α-マンノシダーゼの応用

Synthesis of glucosylated N-glycan using endo-α-mannsidase

○松尾 一郎(群馬大院理工)
○Ichiro Matsuo(Gunma Univ.)

ゴルジに局在するエンド−α−マンノシダーゼは，アスパラギン結合型糖鎖上のグルコシル化されたマンノース残基（$Glc_{3\sim1}Man$）を切断する糖加水分解酵素である。糖鎖を介した糖タンパク質品質管理機構において，アスパラギン結合型糖鎖上のグルコース残基はカルネキシンやカルレティキュリンに認識され，タンパク質高次構造形成に関与することから，既存の糖鎖生合成経路とは異なる糖鎖プロセッシングを触媒するエンド−α−マンノシダーゼが，これら糖タンパク質の品質管理機構においてどのような役割を果たしているのか興味がもたれる。



我々は，エンド−α−マンノシダーゼの機能解明を目指し，基質となる蛍光標識糖鎖の系統的合成と新規エンド−α−マンノシダーゼの探索研究を展開している。蛍光標識糖鎖は，本酵素が認識するグルコース残基を有する 4 糖（$GlcMan_3$）からグルコース残基数の異なる 5 糖（Glc_2Man_3）および 6 糖（Glc_3Man_3）を合成後，糖鎖の還元末端部分にアミノプロピル基を介して蛍光性置換基を導入することで合成した。これらの合成糖鎖プローブによりエンド−α−マンノシダーゼの酵素活性検出を行い，基質特異性を明らかにした。一方，新規エンド−α−マンノシダーゼの取得を目的としたアフィニティーゲルの作成には“酵素に認識されるが切断されない基質”すなわち，糖鎖型阻害剤の合成が必要となる。そこで酵素の切断部位に相当するマンノース残基の２位水酸基をデオキシ化した糖鎖をデザイン，合成した。得られたプローブが酵素阻害活性を有し，さらに酵素による切断も受けないことを確認した後に，チオプロピルセファロースに固定化することでアフィニティーゲルを調製した。

エンド−α−マンノシダーゼの機能解析研究を進める中で，本酵素が糖転移活性を有しているという興味深い知見を得た。すなわち，フッ素誘導体（Glcα1-3Man-F）を糖供与体として，マンノビオース誘導体（Manα1-2Man-Dansyl）に対して糖転移反応を行ったところ，対応する 4 糖誘導体の生成を確認した。しかし 4 糖誘導体は時間経過とともに加水分解された。そこで，エンド−α−マンノシダーゼの触媒部位近傍にタンパク工学的にアミノ酸変異を導入することでグライコシンターゼ化を試みた。その結果，得られた酵素は糖加水分解活性を示さずグライコシンターゼとして機能することを確認した。本酵素は，複雑な糖鎖に対しても糖転移が可能なことから糖鎖合成への応用が期待される。

endo-α-mannosidase, glycosynthase, oligosaccharide synthesis

講演番号：4SY06-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:30～ A 校舎 06 会場

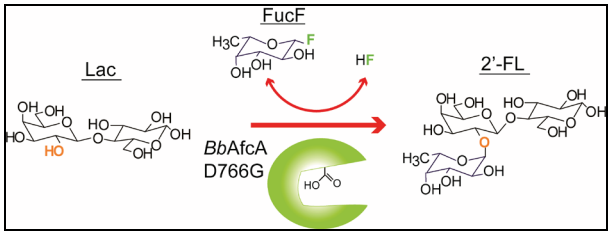
ヒトミルクオリゴ糖に作用するビフィズス菌の酵素　～機能解析と応用～

Regio- and acceptor specific oligosaccharide synthesis using HMO-degrading enzymes from bifidobacteria

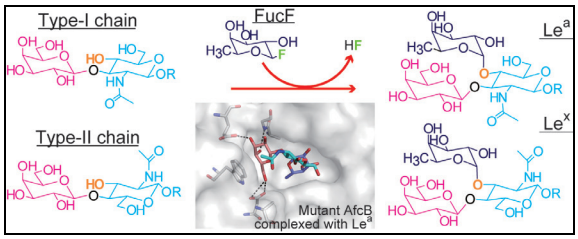
○片山 高嶺(石川県立大学)
○Takane Katayama(Ishikawa Pref. Univ.)

母乳栄養児の腸管では、授乳開始後速やかにビフィズス菌優勢な腸内フローラ（ビフィズスフローラ）が形成される。これには母乳中に含まれるオリゴ糖（ヒトミルクオリゴ糖）が関与することが示唆されていたが、その詳細は明らかでなかった。最近、我々は、ビフィズス菌にはヒトミルクオリゴ糖に作用する極めてユニークな酵素（グリコシダーゼやトランスポーターなど）が存在していることを見出し、それら酵素の機能解析を進めてきた。これらの酵素のホモログは、乳児腸管に生息するビフィズス菌種にのみ存在し、他のビフィズス菌や腸内細菌には全くと言って良いくらい存在しない。これらのことは、ビフィズスフローラ形成の謎を解く重要な手がかりとなると考えている。

さて、ヒトミルクオリゴ糖に作用するグリコシダーゼの解析を進める過程で、これらの酵素が極めてユニークで高い基質特異性を示すことが分かってきた。ビフィズス菌は進化の過程で、宿主であるヒト由来の糖鎖構造を分解するのに特化した酵素を発達させてきたとも言える。このことは逆に、これらの酵素を利用すれば、ヒト由来の糖鎖構造（生理活性の期待できる）を特異的に合成可能であることをうかがわせる。本シンポジウムでは 1,2-α-L-フコシダーゼ(AfcA)および 1,3-1,4-α-L-フコシダーゼ(AfcB)の構造と機能の相関について、これまでの成果を詳しく解説するとともに、変異型酵素を用いた立体・位置特異的なフコシルオリゴ糖（血液型抗原決定基）合成法の開発について紹介する。また、つい最近になって見出した新規なラクト-*N*-ビオシダーゼ(LnbXY)の性状解析とそのツールとしての可能性についても言及したい。



1,2-α-L-フコシンターゼ



1,3-1,4-α-L-フコシンターゼ

histo-blood group antigens, fucosidases, lacto-N-biosidase

講演番号：4SY06-4
講演日時、会場：3 月 30 日 15:00～ A 校舎 06 会場

ホスホリラーゼによる糖鎖合成

Utilizaiton of phosphorylase for enzymatic synthesis of β-mannoside

○中井 博之(新潟大院自)
○Hiroyuki Nakai(Niigata Univ.)

糖タンパク質，糖脂質，プロテオグリカンなどの複合糖質は，構造多様性に富んだ糖鎖を有しており，生体内において細胞内輸送，細胞間接着およびシグナル伝達など生命活動に不可欠な役割を果たしている。これら生体機能を厳密に分析しそのメカニズムを解明するためには，糖鎖を単一な分子として獲得することが重要であり，現在糖鎖合成の中心的役割を化学合成が担っている。その中で，1,2-シスエカトリアルに配向したグリコシド結合をもつ β-マンノシドは，1,2-トランスの隣接炭素をもたないため，合成化学的手法において立体電子的効果も隣接基関与も利用することができないことから，その選択的合成は最も困難な課題の 1 つとなっている。β-マンノシド構造は，アスパラギン結合型糖鎖のコア構造をはじめ，肺炎球菌や腸内細菌などの嫌気性グラム陰性細菌のリポ多糖 *O* 抗原糖鎖など病原性微生物由来の表層糖鎖に見出されており，糖鎖研究を行なう上で生物学的意義から極めて重要であるため，その簡便な合成法の開発が期待されている。

そこで我々は，簡便な糖鎖合成の手法としてホスホリラーゼを活用した One-pot 酵素合成法を提案する。ホスホリラーゼは，オリゴ糖などの糖鎖を無機リン酸存在下において加リン酸分解し，糖 1 リン酸を遊離する酵素であるが，その反応の可逆性，厳密な位置選択性から糖鎖合成に適した有用な触媒となり得る。近年我々は，腸内細菌 *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 からアスパラギン結合型糖鎖のコア構造 β-1,4-マンノシル *N*-アセチルグルコサミンを加リン酸分解するホスホリラーゼを発見した[1]。本酵素は，逆反応によって α-マンノース 1 リン酸と *N*-アセチルグルコサミンから β-1,4-マンノシル *N*-アセチルグルコサミンを合成可能であり，加えて *N*-アセチルグルコサミンを *N,N'*-ジアセチルキトビオースに置換することでコア三糖も合成可能である。さらに，本酵素の糖鎖合成反応と，安価なショ糖から高価な α-マンノース 1 リン酸を生産する手法を組み合わせた One-pot 酵素合成法により，ショ糖と *N*-アセチルグルコサミンから β-1,4-マンノシル *N*-アセチルグルコサミンを簡便に合成することに成功した。また，好熱性細菌 *Thermoanaerobacter* sp. X514 から β-1,2-マンノオリゴ糖に対して異なる鎖長認識性を示す 2 種の β-1,2-マンノオリゴ糖ホスホリラーゼを見出だしている。そこで今回、これら β-マンノシドに作用する新規ホスホリラーゼの発見およびその利活用による β-マンノシドの簡便な合成法の開発例を紹介する。

[1] Nihira T., Suzuki E., Kitaoka M., Nishimoto M., Ohtsubo K., Nakai H. J. Biol. Chem (2013) 288, 27366-2737

phosphorylase, β-mannoside

講演番号：4SY06-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:30～ A 校舎 06 会場

ヒト iPS/ES 細胞特異的レクチンプローブの開発と産業応用

Development and industrial application of a human iPS/ES cell-specific probe

○舘野 浩章(産総研)
○Hiroaki Tateno(AIST)

全ての細胞は高密度で複雑な糖鎖で覆われている。糖鎖は細胞の性質や系譜を反映し、それ故、ある特定の細胞型を同定するための細胞マーカーとしてよく用いられる。事実、ヒト胚性幹細胞（ES 細胞）や人工多能性幹細胞(iPS 細胞)などの多能性幹細胞を同定するために用いられるステージ特異的胚性抗原(SSEA-3、SSEA-4)や腫瘍拒絶抗原(Tra-1-60、Tra-1-81)は糖鎖である。しかしこれまで、ヒト iPS 細胞表面糖鎖の全体像、グライコーム、についてはほとんどわかっていなかった。我々は高密度レクチンマイクロアレイを用いて多数のヒト iPS/ES 細胞の網羅的糖鎖解析を行った結果、ヒト ES/iPS 細胞表面糖鎖の３つの特徴（α2-6Sia、α1-2Fuc、1 型 LacNAc）を明らかにした。これらの特徴は、DNA マイクロアレイとグリコシダーゼ支援・質量分析/液体クロマトグラフィー法を用いた解析からも検証することができた。更に、ヒト iPS/ES 細胞に特異的に反応する新規レクチンプローブ・rBC2LCN の発見に至り、和光純薬工業から上市された。市販されているレクチンは全て天然物から調製されたものであり、安定供給や品質の面で大きな課題があった。また一般的に特異性が甘いなどの理由から、細胞解析用のプローブ試薬としても定着しなかった。本レクチン分子は大腸菌で大量、安価に調製でき、ヒト iPS/ES 細胞に大変高い特異性を示す。また分子量も抗体と比べて 1/10 程度（16 kDa）と小さく、タンパク質工学的な機能付与も容易であるなどの利点を有する。本講演では、ヒト iPS/ES 細胞表面糖鎖の構造解析から、ヒト iPS/ES 細胞特異的プローブ・rBC2LCN の再生医療分野への産業応用まで、我々がこれまで得てきた研究成果について紹介したい。

Lectin, Stem cells, Regenerative medicine

講演番号：4SY06-6
講演日時、会場：3 月 30 日 16:00～ A 校舎 06 会場

異種細胞での糖タンパク質生産に向けたプラットフォーム構築

Development of platform toward production of glycoproteins in heterologous host cells

○藤山 和仁(大阪大生物国際交流セ)
○Kazuhito Fujiyama(Osaka Univ.)

医療用タンパク質は、これまで主としてＣＨＯ細胞に代表される動物細胞で行われることが多かった。しかし、この数年の間に、子宮頸ガンワクチンが昆虫細胞で生産され、使用されているなど、多様な宿主での生産が実用化されている。また、植物を用いた生産した医療用タンパク質は、２０１２年ニンジン培養細胞由来ヒト・グルコセレブロシダーゼが、植物生産タンパク質で初めてＦＤＡの認可を受けた。グルコセレブロシダーゼは、ゴーシェ病の酵素補充法に用いられ、これまでＣＨＯ細胞で生産されていた。

医療用タンパク質の生物学的機能発現には、糖鎖修飾を含む翻訳後修飾が重要であることが多い。糖鎖修飾は用いる宿主の修飾機能に依存するため、酵母、昆虫細胞、植物細胞で組換え医療用タンパク質を生産させるとヒトとは異なる糖鎖が付加することになる。実用化を視野に入れると、よりヒトに適応した糖鎖構造であることが望ましい。このため、酵母、昆虫細胞、植物細胞の糖鎖修飾機能をヒト型化へ改変する技術が開発されている。

植物糖鎖は、植物特有な糖残基（α1，3-Fuc，β1，2-Xyl）が存在しアレルギー性が懸念されている。このため、植物糖鎖修飾機能をヒト型に改変する研究がヨーロッパを中心に活発化している。昆虫細胞、特にＳｆ９細胞では、特有な糖残基としてα1，3-Fuc が存在する。植物・昆虫細胞は、シアル酸付加能力を付与する必要があり、シアル酸合成酵素群とともに転移酵素が異種細胞の遺伝子を導入することで実現している。

以上のように、高品質化医療用タンパク質生産を目指して、糖鎖修飾機能をヒト型化へ改変する技術開発が加速化している。本発表では、このような最近の技術状況を紹介したい。

glycosylation, engineering, plant

講演番号：4SY07-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:32～ A 校舎 07 会場

ラビリンチュラ類のグローバルな脂質代謝

Global lipid metabolism of thraustochytrids

○伊東 信(九大院農)
○Makoto Ito(Kyushu Univ.)

ラビリンチュラ類は、ストラメノパイルと呼ばれる生物群に属する真核単細胞生物で、光合成は行なわず、汽水域を含む海洋に広く生息する。増殖速度の速さ、バイオマス収量の高さに加えて、近年、ドラフトゲノム解析、形質転換法の開発が急速に進み、高度不飽和脂肪酸（PUFA）をはじめとする脂質生合成経路が解明されてきたことで産業微生物として活用する気運が高まっている。また、飽和脂肪酸、スクアレン等を高度に蓄積する株も見いだされ、バイオ燃料としての期待も大きい。

ラビリンチュラ類は、ドコサヘキサエン酸（DHA）をはじめとする PUFA を多量に細胞内油滴（油球）に蓄積する。DHA の生合成経路は、属によって大きく異なっていた。*Aurantiochytrium* 属では PUFA 合成酵素という酵素複合体によってマロニル CoA から DHA が一挙に合成されるが（PUFA 合成酵素経路）、*Thraustochytrium* 属では PUFA 合成経路以外にもデサチュラーゼ/エロンゲース（スタンダード）経路で DHA が合成されることが分かった。DHA を合成しない *Thraustochytrium* 属変異株は、低温条件下での増殖遅滞が観察された。合成された DHA は CoA 体化された後、グリセロール骨格を持つ中性脂質やリン脂質に組み込まれる。その分子機構もほ乳類や酵母と大きく異なっており、ラビリンチュラ類では新生合成経路で作られた DHA 含有ホスファチジン酸がその後のグリセロ中性脂質及びリン脂質合成の起点となることが明らかになった。

グリセロ中性脂質は油滴に蓄積される。私達は、油滴の形成や維持に不可欠な遺伝子を同定した。一つは、ジアシルグリセロールをトリアシルグリセロール（TG）に変換する DGAT2 遺伝子、もう一つは油滴に特異的に発現する LDRP1 遺伝子である。これらの遺伝子欠損株においては、油滴の消失や油滴形態の異常が観察された。

油滴に蓄積された TG はリパーゼによって分解され、遊離脂肪酸は再び CoA 体化された後に、脂肪酸 β-酸化経路でアセチル CoA へと変換される。この過程を営むいくつかの酵素遺伝子を単離し、それらの欠損株を作製した。その結果、TG の分解に関与するリパーゼおよび DHA の β-酸化に関与すると示唆されるアシル CoA-デヒロゲナーゼ（ACAD）が同定された。

さらに、ラビリンチュラ類のスフィンゴ脂質としてエタノールアミンホスホセラミド（EPC）、糖脂質としてステリル β−グルコシドを単離し精密構造を決定した。その結果、両者とも脂質部位が新奇構造であることが分かった。EPC の長鎖塩基の 9 位をメチル化する酵素の欠損株は油滴形成に異常が見られ、スフィンゴ脂質が油滴形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

lipid metabolism, thraustochytrid, DHA

講演番号：4SY07-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:07～ A 校舎 07 会場

ショウジョウバエのユニークな膜構築と脂質代謝機構
Unique membrane organization and lipid metabolism in *Drosophila melanogaster*
○梅田 真郷(京大院工)
○Masato UMEDA(Kyoto Univ.)

昆虫は、地球上で最も繁栄している動物種であり、優れた生理システムと環境適応能力を有している。例えば、ヒトはわずか数℃ の温度域（核心体温）でのみ生命活動が維持できるのに対し、昆虫は数十℃ の温度域で活動できることから広温動物とも呼ばれる。また、昆虫の飛翔時には大量のエネルギーが産生されることが知られており、キイロショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*、以下ショウジョウバエ）飛翔時の体重当たりのエネルギー消費量はマウス活動時の 8 倍以上であることが示されている。一方、ショウジョウバエは古くからモデル生物として広く使われて来ているにもかかわらず、その代謝経路、生理機能や細胞機能の調節メカニズムなどに関する生化学的知見は未だ僅かである。

我々は、ショウジョウバエの行動性体温調節機構を解析する過程で（Science 323:1740, 2009）、ショウジョウバエの温度選択行動が膜脂質に強く影響を受けることを見出した。この観察を契機に、ショウジョウバエの膜脂質組成、脂質二重層内外でのリン脂質分子の配向性、脂質代謝経路等について解析を進めた結果、ショウジョウバエは他の脊椎動物や線虫などのモデル生物とは著しく異なったユニークな膜構築・脂質代謝機構を有することが明らかになりつつある。本シンポジウムでは、ショウジョウバエのユニークな膜構築と脂質代謝について最近の知見を紹介したい。

insect, membrane, lipid

講演番号：4SY07-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:42～ A 校舎 07 会場

骨・脂質代謝を制御する植物化学成分

Phytochemicals regulate bone and lipid metabolism.

○上原 万里子(東農大応生)
○Mariko Uehara(Tokyo Univ. of Agric.)

我々が、普段、文献検索を行う website の PubMed 上で、「bone」または「osteoporosis」と、幾つかの関連 key word である「phytochemicals」「polyphenols」「flavonoids」との組み合わせで検索してみると、一番多くヒットしたのは「flavonoids and bone」で、1717 報(2013 年 11 月現在)であった。その第一報目は 1952 年に遡るが、2000 年以降で発表された報文数は 1403 であり、全体の 82%を占めている。1999 年の Nature 誌上でタマネギの成分による骨代謝調節作用が明らかにされて以来、野菜や果物中のフラボノイドをはじめとする機能性素材が注目され始め、研究が進んでいる。大豆イソフラボンおよびフラクトオリゴ糖は既に特定保健用食品の関与成分として許可されているが、他の植物由来の機能性素材についても、科学的根拠を積み重ね、骨の健康を考える上で、広く活用されることが期待されている。一方、それら機能性成分は骨代謝のみならず、脂質代謝異常にも効果を発揮する可能性が示唆されている。骨形成に関わる骨芽細胞と脂肪細胞の前駆細胞は同じ間葉系幹細胞であるが、異なる転写因子により、それぞれの細胞に分化することが知られている。また、骨芽細胞から産生されるオステオカルシンが血糖値や脂肪蓄積を調節しているという知見により、メタボリックシンドロームとの関係も明らかになっている。本シンポジウムでは、骨・脂質代謝の相互連関を踏まえ、骨および脂質代謝を同時に制御する可能性のある植物化学成分を採り上げる。

大豆イソフラボンは estrogen と類似した構造をとり、estrogen 受容体(ER)に親和性をもつことより、古くから骨代謝を制御することが明らかとなっているが、近年、主要イソフラボンである daidzein 代謝産物の equol について、細胞、実験動物のみならず、ヒト介入試験においても骨・脂質代謝調節作用を有することが報告されている。また、イソフラボンの estrogenic な作用とはメカニズムの異なる柑橘系フラボノイドは、スタチン系薬剤のようにコレステロール合成阻害を介して骨・脂質代謝を制御する。オリーブポリフェノール、含硫化合物などは抗炎症作用により骨吸収をコントロールする破骨細胞分化を抑制する。また、興味深いことに、これらの効果は幾つかの生体内代謝産物について親物質よりも強いことが確認されている。

生活習慣病、特にメタボリックシンドロームからロコモティブシンドローム(続発性骨粗鬆症)が引き起こされるように、現在、我々は複数の疾病に罹患するリスクが高い。従って、骨・脂質代謝(あるいは糖代謝)を同時に制御し、これら複数の疾病対し予防効果を示す可能性のある植物化学成分の検討は、健康科学・予防医学分野等への寄与度も高いものと思われる。

phytochemicals, osteoporosis, metabolic syndrome

講演番号：4SY07-4
講演日時、会場：3 月 30 日 15:17～ A 校舎 07 会場

コレステロール恒常性維持の鍵をにぎるヒト ABCA1 の分子メカニズム
Molecular mechanism of human ABCA1 in cholesterol homeostasis

○植田 和光[1,2]、永田 紅[2]、冨岡 麻衣子[2]、石神 正登[1]、川野邊 峻哲[1]、伊藤 晋平[1]、提坂 友梨奈[1]、橋本 秀彦[1]([1]京大院農、[2]京大 iCeMS)
○Kazumitsu Ueda[1,2], Koh Nagata[2], Maiko Tomioka[2], Masato Ishigami[1], Takaaki Kawanobe[1], Shimpei Ito[1], Yurina Sagesaka[1], Hidehiko Hashimoto[1]([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ. iCeMS)

哺乳類にとって、コレステロールは細胞膜の構成成分として必須であり、またホルモンやビタミン合成の材料として重要である。しかし、コレステロール恒常性の破たんは動脈硬化の原因となり、日本人の死因の３０％を占める血管系の疾病を引き起こす。高密度リポ蛋白質（HDL、いわゆる善玉コレステロール）の形成は、末梢細胞の余剰コレステロールを除去する唯一の経路であり、その過程に ABC 蛋白質のひとつ ABCA1 が重要な役割を果たしている。

ヒトでは、48 種類の ABC 蛋白質が生体異物、代謝産物、膜脂質などの輸送に関わり、我々の健康維持に重要な役割を果たしている。ABC 蛋白質の機能異常は、痛風、のう胞性繊維症、糖尿病、神経変性疾患、黄斑部変性症、呼吸窮迫症、皮膚疾患、弾性繊維失調症、免疫異常、胆汁うっ滞、アルツハイマー病などさまざまな疾病と関係する。ABCA1 の異常は高脂血症を引き起こし、動脈硬化の原因となる。

これまで、ABCA1 の機能はリン脂質（特にホスファチジルコリン）をフロップ（脂質二重層の内層から外層への移動）し細胞膜上に特殊なドメインを形成することであり、血中の脂質アクセプターであるアポリポ蛋白質 apoA-I がその特殊な膜ドメインに結合し、リン脂質とコレステロールを引き抜くことによって、HDL 粒子を形成すると考えられてきた。しかし我々は、ABCA1 の細胞生物学的解析や生化学的解析や他の ABC 蛋白質との比較によって、apoA-I が ABCA1 に直接結合し、リン脂質とコレステロールを ABCA1 から直接受けとり HDL 粒子を形成するというメカニズムを示唆してきた(BBA, 1831, 398, 2013)(JLR 53, 126, 2012)(BBA 1821, 530, 2012)。

我々は、さらに全反射蛍光顕微鏡を用いて、HDL 形成初期段階における ABCA1 の細胞膜上での挙動を 1 分子レベルで可視化することによって HDL 形成機構を解明することを試みた。その結果、ABCA1 が HDL 形成時に一時的に細胞膜上で二量体を形成することを明らかにした(PNAS, 110, 5034, 2013)。本講演では、動脈硬化の予防に重要なコレステロール排出ポンプである ABCA1 の作用メカニズムを議論したい。

cholesterol, ABC protein, ABCA1

講演番号：4SY07-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:52～ A 校舎 07 会場

脂肪細胞分化過程における脂肪滴形成の分子基盤

Molecular basis of lipid droplet formation during adipocyte differentiation

○佐藤 隆一郎(東大院農生科)
○Ryuichiro Sato(The Univ of Tokyo)

肥満は生活習慣病、メタボリックシンドローム発症のリスクファクターの上位に位置する。抗肥満を目指す際に、脂肪組織を構成する脂肪細胞の分化制御機構、脂肪滴蓄積機構の詳細を明らかにすることは不可欠である。我々は脂肪細胞脂肪滴表面に局在するタンパク質 Perilipin1 に着目し、脂肪細胞での特異的発現、脂肪滴形成機構について解析を進めてきた。

脂肪細胞分化過程において、マスターレギュレーターである PPARγ の発現上昇に伴い Perilipin1 発現も上昇し、そのプロモーター領域に存在する PPAR 応答領域が重要な役割を担っていた(1)。さらに入念な解析の結果、この領域のメチル化が分化に伴い減少して行くことを認め、その機構を追跡した(2)。PPAR 応答領域に結合した PPARγ を含む転写因子複合体はポリ ADP リボシル化修飾され、それに伴いメチル化シトシンに水酸基を導入し脱メチル化を促進する因子 Tet がリクルートされ脱メチル反応の進行する機構が明らかになった。この機構は他の PPARγ 応答遺伝子の分化に伴う発現上昇にも寄与した。こうして Perilipin1 発現が上昇すると脂肪滴形成が活発になるが、一方 Perilipin1 KO マウスでは脂肪組織が萎縮し、小型の脂肪滴が見られる。脂肪細胞分化過程で膜結合型 SREBP-1 タンパク質は核内型への活性化プロセシングを受け、脂質合成系遺伝子発現を増加させる。野生型マウスの脂肪組織と異なり、KO マウス組織では SREBP-1 活性化が著しく低下していた(3)。その結果、脂質合成系応答遺伝子群は顕著な発現低下を示した。この現象は、各マウスより MEF を分離し、脂肪細胞へと分化させた *in vitro* 系でも再現された。KO MEF に Perilipin1 を遺伝子導入し、脂肪細胞へと分化させると、脂肪滴形成、脂質蓄積、SREBP-1 活性化、応答遺伝子発現はすべて回復した。脂肪滴は脂質一重層で囲まれ、小胞体膜から出芽するように派生する。成熟脂肪細胞内では、大量の小胞体膜が脂肪滴へと動員され、結果的に小胞体膜コレステロール量が有意に低下していた。KO マウス脂肪組織ではこのような小胞体膜コレステロールの顕著な低下は認められなかった。以上の知見は、脂肪滴形成は小胞体膜環境を劇的に変化させ、この変化が SREBP-1 活性化の引き金となることを示唆している。Perilipin1 発現に伴う脂肪滴形成増加は、SREBP-1 活性化を介して脂肪蓄積を促進し、さらに脂肪滴数、サイズの増大を招く。脂肪細胞分化過程において、脂肪滴形成→SREBP-1 活性化→脂質合成・蓄積増→脂肪滴形成のフィードフォワード機構が明らかになった。

(1) Arimura et al. *J.B.C.* (2004) (2) Fujiki et al. *Nat.Commun.* (2013)
(3) Takahashi et al. *PLoS ONE* (2013)

Perilipin, Adipocyte, SREBP-1

講演番号：4SY08-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:30～ C 校舎 02 会場

微生物ホルムアルデヒド代謝の戦略的活用

Strategic applications of microbial formaldehyde metabolism

○由里本 博也、阪井 康能(京大院農・応用生命)
○Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai(Kyoto Univ.)

ホルムアルデヒドは極めて毒性が高く、低濃度でも人体に悪影響を及ぼすことから、シックハウス症候群の原因物質の一つとされている。一方、ホルムアルデヒドは植物細胞壁構成成分のリグニン分解過程や、植物から放出されるメタノールの酸化により生じ、メタンやメタノールを含めたこれらの還元型 C1 化合物は、自然界に広く存在している。C1 化合物を炭素源として利用できる微生物（C1 微生物）もまた自然界に普遍的に存在するが、C1 微生物における C1 化合物代謝の最大の特徴は、その強力な毒性にもかかわらず、ホルムアルデヒドが同化経路と異化経路の分岐点に位置する重要な代謝中間体となっている点であり、このために C1 微生物は極めて巧妙なホルムアルデヒド耐性機構を持っている。さらに、C1 微生物の代謝経路では、CO_2 よりもエネルギー準位の高いホルムアルデヒドを固定して細胞構成成分を合成しており、CO_2 固定よりも少ない消費エネルギーで炭素固定が可能である。本発表では、我々がこれまでに明らかにしてきた、微生物ホルムアルデヒド代謝の生理機能・制御機構を戦略的に活用し、ホルムアルデヒドの検出・除去、温室効果ガス排出削減や低炭素社会の構築など環境問題の解決に役立つ基盤技術を開発した事例を紹介する。

C1 微生物のホルムアルデヒド資化経路の一つであるリブロースモノリン酸（RuMP）経路は、2 種の鍵酵素である 3-ヘキスロース-6-リン酸シンターゼ(HPS)および 6-ホスホ-3-ヘキスロイソメラーゼ(PHI)によって触媒される。この反応は、補酵素類やその他の低分子化合物を必要とせず、遊離のホルムアルデヒドを直接基質とする。さらに、HPS によるホルムアルデヒド固定反応は発エルゴン反応であることから、エネルギーを消費しない炭素固定反応である。また、HPS/PHI 反応の基質であるリブロース 5-リン酸および生成物であるフルクトース 6-リン酸は、ペントースリン酸経路やカルビン回路の代謝中間体としてあらゆる生物に普遍的に存在することから、RuMP 経路を持たない生物に HPS, PHI を導入するだけで、RuMP 経路が構成され、ホルムアルデヒド耐性および資化能を異種生物に附与することができる。我々は、これまでに植物や大腸菌で HPS, PHI を発現させ、ホルムアルデヒド耐性能、資化能の附与に成功してきた。一方、メタノールは、穀物を原料とするバイオエタノールとは異なり、食糧と競合しない等の利点から、環境負荷の低い循環型物質生産体系の基幹物質として有望視されている。メタノールを培養原料とする有用物質・タンパク質生産宿主であるメタノール資化性細菌および酵母における、ホルムアルデヒド代謝機能強化に関する研究も併せて紹介する。

formaldehyde, methanol, methylotroph

講演番号：4SY08-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:00～ C 校舎 02 会場

出芽酵母へのアルデヒド耐性の付与とリグノセルロース系エタノール生産への応用

Improvement of yeast tolerance to furan aldehyde for production of lignocellulosic ethanol

○蓮沼 誠久(神戸大自)
○Tomohisa Hasunuma(Kobe Univ.)

20 世紀の急速な石油化学産業の発展は一方で大量消費・廃棄型の社会構造と地球規模の気候変動を生み出した。この問題を解決し，持続可能な低炭素・自然共生型の未来社会を実現するために，再生可能なバイオマスから生産するバイオ燃料やバイオベース化学品の供給を可能にする技術の開発が求められている。特に賦存量が多く，食糧と競合しないリグノセルロース系バイオマスの利用は重要である。演者らは稲わら等の草本系バイオマスを原料として，水熱処理等の前処理後に得られたセルロース・ヘミセルロース系画分を効率的にエタノールに変換できる遺伝子組換え酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の構築に取り組んできた。一般にリグノセルロースは，高等植物の地上部を支える繊維として強靭な高分子構造を形成しており，酵母による発酵で利用するためには物理化学的な前処理が必要になるが，前処理反応の条件は高温高圧になるため構造の弱い植物組織は過分解してフルフラールやヒドロキシメチルフルフラール等のフラン系アルデヒドや，酢酸やギ酸などの弱酸類を生じ，これらが酵母発酵を阻害することが課題である。特に，キシロース資化性を付与した酵母への影響が大きいことが明らかとなってきた。演者らの研究グループでは，細胞内の代謝状態を俯瞰することが可能な代謝プロファイリング（メタボロミクス）技術やトランスクリプトミクス技術を利用して，発酵阻害物質が細胞内代謝に与える影響を解析するとともに，解析に基づいて推測したボトルネックを克服することにより，発酵阻害物存在下でのエタノール生産量が高い遺伝子組換え酵母の開発に成功してきた。本研究では，NADH 依存的なフラン変換酵素である変異型 ADH1 を過剰発現させることでフラン類の解毒とキシロースからの発酵効率の向上に成功した。キシロースは一般に，キシロースレダクターゼ（XR）およびキシリトールデヒドロゲナーゼ（XDH）の酸化還元反応によりキシリトールを経てキシルロースに変換されるが，XR と XDH の利用補酵素（NADPH および NAD^+）の違いから細胞内のレドックスバランスの不均衡が生じ，キシリトールの蓄積とエタノール収率の低下を引き起こすことが課題であった。変異型 ADH1 の発現はフラン化合物の還元と同時に NAD^+の再生を実現し，キシリトール蓄積量の抑制とエタノール収率の向上をもたらした。

Yeast, Aldehyde, Ethanol production

講演番号：4SY08-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:30～ C 校舎 02 会場

生物の持つアセトアルデヒド耐性能の分子メカニズムの解明と戦略的活用

Molecular mechanism of acetaldehyde tolerance in the yeast

○中川 智行(岐阜大応生)
○Tomoyuki Nakagawa(Gifu Univ.)

アセトアルデヒドは，細胞内で DNA やタンパク質などの生体構成成分とランダムに付加体を形成し，それらの分子機能を阻害することで毒性を示すと考えられている。つまり，アセトアルデヒドは全ての生物に対して強い毒性を示すことが予想され，ヒトにおいては「二日酔い」や「シックハウス症候群」の原因物質として，近年では発ガン性をも示すことが明らかとなった毒性化学物質のひとつである。一方，アセトアルデヒドは生体内で様々な代謝過程において常に生産される代謝中間体でもあり，出芽酵母のアルコール発酵や酢酸菌の酢酸発酵では重要な鍵代謝中間体であるのは周知の通りである。つまり，これら産業用微生物をはじめ，全ての生物は細胞内で自ら生産するアセトアルデヒドに対して，その毒性を回避しなければいけないことが容易に推測される。

私たちは，生物の持つアセトアルデヒドの毒性回避の分子メカニズムを詳細に知り，その知見をヒトの「二日酔い対策」や「シックハウス対策」などの創薬に，さらには産業用微生物の細胞機能を最大限に引出す分子育種に応用できると考えている。本講演では，これまで私たちのグループが示してきた出芽酵母のアセトアルデヒドに対する細胞応答と毒性回避の分子メカニズムの一端を紹介する。

1）アセトアルデヒド耐性機構における細胞内 NADPH 生産系の重要性

出芽酵母はアセトアルデヒドに曝されると，転写因子 Stb5p がペントースリン酸経路（PPP）の遺伝子発現を上昇させ，解糖系 *GPI1* の発現を低下させることで PPP を統括的に活性化させていた。また, NADPH 依存型アルデヒド脱水素酵素（Ald6p）もアセトアルデヒド毒性回避に必須因子であった。これらは出芽酵母がアセトアルデヒドストレスに対して細胞内 NADPH レベルを亢進させることを意味する。これらアセトアルデヒド耐性機構における NADPH 強化の分子機構と役割について述べる。

2）アセトアルデヒド耐性機構における硫黄代謝制御とグルタチオンの役割

私たちはアセトアルデヒド誘導型遺伝子プロモータにおける共通配列として Met31/32 結合配列を見いだした。Met31/32 は硫黄代謝の制御因子として知られ，グルタチオン（GSH）合成系の遺伝子発現も制御する。一方，GSH 合成系の欠損も重篤なアセトアルデヒド感受性を示し，GSH およびその分解産物がアセトアルデヒド耐性機構において重要な役割を持つことを示してきた。これら硫黄代謝の制御と GSH によるアセトアルデヒド耐性機構の分子機構の詳細について解説する。

acetaldehyde, *Saccharomyces cerevisiae*, stress tolerance

講演番号：4SY08-4
講演日時、会場：3 月 30 日 15:00～ C 校舎 02 会場

香料原料としてのアルデヒドの活用

The use of aldehydes as raw materials of flavor and fragrance

桜井 和俊、〇江本 英司(高砂香料工業株式会社 研究開発本部)
Kazutoshi Sakurai, 〇Eiji Emoto(Takasago International Co., Ltd.)

香料は、用途によってフレーバー[食品用香料]とフレグランス[香粧品用香料]に分けられる。アルデヒド類は、化学物質としては活性が高く反応性に富んでいるものも多いが、香料分野においては、匂いの強度が強く少量でも全体の香調に及ぼす効果が大きいものが多くフレーバーやフレグランスの調合において重要な化合物群である。

フレーバー分野では、基本的には天然に存在するアルデヒド類(Nature Identical)が用いられ、炭素数 2～10 程度の飽和アルデヒド、炭素数 10 のテルペン系アルデヒドとしては、citral, citronellal, perilla aldehyde などが使用される。また、芳香族アルデヒド類としては、vanillin, anisaldehyde, cinnamaldehyde, α-amylcinnamaldehyde などが使用される頻度が高い。

一方、フレグランス分野では、天然での存在の有無に関わらずアルデヒド類が使用され、フレーバーとは若干異なり、炭素数８～１２程度のものが多く用いられる。例えば、炭素数９の 2,4-dimethyl-3-cyclohexene-1-carboxaldehyde (triplal：IFF 社商品名)、10-undecen-1-al(aldehyde C11undecylenic)や methyl nonyl acetaldehyde (aldehyde C12 MNA) などがアルコール製品用(メンズ)や石鹸用香料としてよく使用される。また、フレーバーと同様、テルペン系の citronellal, citral, hydroxy citronellal などの使用量も多い。芳香族アルデヒド類としては、benzaldehyde, phenylacetaldehyde, α-hexylcinnamaldehyde, 3,4-methylenedioxybenzaldehyde, 2-methyl-3-(4-tert-butylphenyl) propanal [lilial:Givaudan 社商品名]などが香水やファブリックケア製品用香料として多くの製品に使用されている。

日本では、アルデヒド類をはじめとした各種香料物質を使用する際には、フレーバーでは食品衛生法が適用され、フラグランスでは、化審法や薬事法などが適用されており、それらに準拠して各種化学物質である原料を用いて調合香料が作成されている。

aldehyde, flavor, fragrance

講演番号：4SY08-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:30～ C 校舎 02 会場

植物による揮発性アルデヒドの吸収と代謝－地球大気組成改善への貢献－

Absorption and metabolism of volatile aldehydes by plants

○松井 健二(山口大院医)
○Kenji Matsui(Yamaguchi Univ.)

地球大気は様々な揮発性活性アルデヒドに満ちている。これらは人為起源だけでなく、植物起源の寄与度も高い。例えば典型的な「みどりの香り」である(*Z*)-3-ヘキセナールは典型的な植物起源アルデヒドである。一方、イソプレンをはじめとする揮発性テルペノイドの多くは二重結合を有し、大気中でオゾンや紫外線などによる酸化的開裂反応を受けてメタクロレインなどのアルデヒドへと変換される。つまり、植物の放散する揮発性化合物の多くはアルデヒドそのものか、潜在的アルデヒドである。植物表層は比較的疎水性が高く、こうしたアルデヒドが沈着浸潤しやすいと同時に比較的高い反応性（毒性）を有する。そのため植物は人為起源のみならず自らが起源となる揮発性アルデヒドを吸収し、代謝（解毒）する必要がある。私たちは密閉容器での実験系で植物がこうした揮発性活性アルデヒドを効率よく吸収、代謝していることを明らかにした。

(*Z*)-3-ヘキセナールは植物組織が傷つくと一過的に生成され、傷口の消毒に寄与している。密閉容器内で無傷植物を (*Z*)-3-ヘキセナール蒸気に曝すと、(*Z*)-3-ヘキセナールは速やかに容器内から失われ、同時に(*Z*)-3-ヘキセノールやそのアセテート体が再放散されてくる。つまり、植物は(*Z*)-3-ヘキセナールを吸収し、還元、あるいは更にアセチル化することによって無毒化し、体外に再放散することで破棄している。我々は、キャベツからヘキセナールに特異性の高い還元酵素を精製し、NADPH 依存デヒドロゲナーゼであることを確認し、組換え植物によりこの還元の重要性を確認中である。一方、トマト実生をメタクロレインに曝すと、10 分程度で容器内から失われた。この時、一部はメタリルアルコールへと変換されたため、(*Z*)-3-ヘキセナールと同様のデヒドロゲナーゼ反応による無毒化が進んだと考えられる。また、一部はイソブチルアルデヒドとなって再放散されたが、イソブチルアルデヒドもその後再吸収されて大気中からは失われた。そのためトマト実生にはアルデヒド還元活性以外にメタクロレインの C-C 二重結合を還元する能力と、これらアルデヒドの揮発性を失わせる未知の代謝活性があることが示された。

植物は自らが揮発性化合物を生成放散し始めた太古から揮発性活性アルデヒドに曝され、その解毒系を獲得する必要があったと考えられる。私たちはこうした「吸収」「代謝」を検出する実験系を確立し、その分子基盤を明らかにしようとしている。まだ端緒についたばかりであるがこの分子基盤を明らかにすることで現在、そして将来に予測される地球大気環境の悪化を抑制する新しい戦略を提案できると期待している。

volatile aldehyde, reduction, recruiting plant

講演番号：4SY08-6
講演日時、会場：3 月 30 日 16:00～ C 校舎 02 会場

メチルグリオキサールによる新しいインスリン抵抗性モデル
A new model of insulin resistance induced by methylglyoxal

○井上 善晴(京大院・農・応生科)
○Yoshiharu Inoue(Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ.)

メチルグリオキサール（MG）は、解糖系酵素の一つであるトリオースリン酸イソメラーゼ反応の中間体から生成する 2-オキソアルデヒドである。MG（CH_3COCHO）はその構造からも容易に想像されるように極めて反応性が高く、タンパク質と反応して終末糖化産物（AGE）を形成する能力は、グルコースの 20,000 倍にも達する。糖尿病患者の血中や組織中では MG レベルが上昇しており、MG 由来 AGE は糖尿病網膜症などの糖尿病合併症との関連が指摘されている。しかしながら、MG と糖尿病の発症との関係は、MG が引き起こす細胞応答の全容が不明なため、まだよく分かっていない。

われわれは、MG の生理機能について、酵母をモデル生物として解析を進めて来た。今回、MG が TORC2 を活性化することを発見した。TOR（Target of Rapamycin）は、真核生物において保存された Ser/Thr キナーゼである。TOR は異なる 2 つの TOR 複合体（TORC1、TORC2）を形成する。TORC1 はアミノ酸などの栄養源の存在下で活性化され、タンパク質合成や細胞の増殖など、栄養源に担保された細胞の活動を制御する。一方、TORC2 の活性化因子として、哺乳類においてはインスリンやインスリン様成長因子が知られているが、生物種を超えた TORC2 活性化因子の存在は明らかにされていない。これに対しわれわれは、酵母だけに限らず、高等真核生物においても MG が TORC2 の活性化因子として機能することを、マウスの培養細胞を用いて明らかにした。

哺乳類の TORC2（mTORC2）は、インスリンシグナル伝達系における主要なプロテインキナーゼである Akt の Ser473 を、インスリン刺激に応答してリン酸化し活性化する。われわれは、MG 刺激によっても Akt Ser473 のリン酸化が起こることを明らかにした。しかしながら、MG はインスリン受容体基質である IRS-1 のチロシンリン酸化は誘導せず、MG はインスリンのアゴニストとして機能しているわけではないと考えられた。一方、インスリンシグナル伝達系は、ネガティブフィードバック調節を受ける。すなわち、インスリン刺激を受容すると、Akt 下流でもう一つの TOR 複合体である mTORC1 が活性化され、IRS-1 のセリン残基がリン酸化される。その結果、インスリン受容体に対する IRS-1 のアフィニティーが低下し、シグナル伝達が遮断される。興味深いことに、MG は IRS-1 のセリン残基のリン酸化を誘導した。さらに、脂肪細胞を MG で前処理すると、その後のインスリン刺激による Akt Ser473 のリン酸化レベルが、MG で処理しなかった場合よりも減弱した。このことは、MG がインスリンシグナル伝達系に対して阻害的に機能する可能性を示唆している。本講演では、2 型糖尿病の主要な病態であるインスリン抵抗性の獲得における MG の関与の可能性について議論したい。

methylglyoxal, insulin resistance, TOR

講演番号：4SY09-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:36～ C 校舎 01 会場

昆虫の嗅覚受容体を利用した細胞利用型匂いセンサ素子の性能評価

Performance evaluation of cell-based odorant sensor elements based on insect odorant receptors

○光野 秀文[1]、櫻井 健志[1]、岩松 琢磨[2]、田中 亜紀子[3]、並木 重宏[4]、神崎 亮平[1,2,3]([1]東大先端研、[2]東大院工、[3]東大院情報理工、[4]ハワードヒューズ医学研究所ジャネリアファーム)
○Hidefumi Mitsuno[1], Takeshi Sakurai[1], Takuma Iwamatsu[2], Akiko Tanaka[3], Shigehiro Namiki[4], Ryohei Kanzaki[1,2,3]([1]RCAST, Univ. Tokyo, [2]Graduate School of Engineering, Univ. Tokyo, [3]Graduate School of Information Science and Technology,Univ. Tokyo, [4]Janelia Farm Research Campus, HHMI)

食品の品質管理、水質管理、農作物の生産環境のモニタリングだけでなく、危機安全管理や環境汚染モニタリング、匂いによる病気診断など、我々の生活の安全・安心、質の向上のため、ごく微量の化学物質をリアルタイムに検出する技術に対するニーズが高まってきている。これまで、金属酸化物半導体、水晶振動子、弾性表面波などの工学的技術に基づいた匂いセンサの開発が進められており、一部は実用化されている。しかしながら、これらのセンサは、センサ素子の被覆材料の制約により検出できる匂い物質が限定される、匂い選択性や検出感度が十分でない、検出に要する時間が長い、大掛かりな装置を必要とするといった問題点がある。これら問題点を克服するために、検出可能な匂い物質の種類に制限がなく、高い検出感度、高い選択性を兼ね備えリアルタイムに匂いを検出できる、革新的な検出原理に基づく匂いセンサの開発が望まれている。

昆虫は、繁殖、採餌、外敵感知など多くの生命活動に匂い情報を利用しているため、環境中に存在する多様な匂い物質を高感度かつリアルタイムに検出する機構を備えている。最近になり、この匂いの検出が触角に存在する嗅覚受容細胞の膜上で機能する嗅覚受容体によって成し遂げられていることが明らかにされてきた。そこで、我々はこれら昆虫の嗅覚受容体に着目して、高感度かつ多様な匂い物質をリアルタイムで検出できる匂いセンサ素子の構築を目指して研究を進めている。

今回は、我々が研究開発を進めている昆虫の嗅覚受容体を発現させた Sf21 細胞を利用した匂いセンサ素子について紹介する。これまでに我々は、昆虫の嗅覚受容体としてカイコガの性フェロモン受容体を対象にして、カルシウム感受性蛍光タンパク質と共に Sf21 細胞に遺伝子導入することで、性フェロモン成分に対して蛍光強度変化を示す細胞系統を樹立してきた。これら細胞系統について、選択性、検出感度、応答時間に関して匂いセンサ素子としての性能を評価したところ、導入した性フェロモン受容体の選択性に従い蛍光強度変化を示し、数 10ppb の感度、10 数秒の応答時間で性フェロモン成分を検出できることが分かった。また、一般に生体分子を利用したバイオセンサはセンサ素子の寿命に課題があると指摘されているが、樹立した細胞系統は 2 ケ月間にわたる長期培養後も感度及び選択性に変化なく性フェロモン成分を検出できることが分かった。さらに、これら細胞系統を微小流路チップに導入することにより、携帯性のある小型の匂いセンサチップを構築することが可能であることも分かってきた。本講演では、我々が提案する匂いセンサ素子の性能評価についての研究成果を紹介するとともに、現在開発を進めているキイロショウジョウバエの一般臭嗅覚受容体を対象とした様々な匂い物質を検出できる匂いセンサ素子開発の最近の研究成果を含めて紹介したい。これにより、昆虫の嗅覚受容体を発現させた Sf21 細胞が、多様な匂い物質を高感度かつリアルタイムに検出できるセンサ素子として有用であることを示したい。

biosensor, insect odorant receptor, calcium imaging

講演番号：4SY09-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:04～ C 校舎 01 会場

ヤエヤマサソリ毒液に含まれる殺虫性ペプチドの構造と活性

Structure-activity relationship of insecticidal peptides isolated from the venom of the scorpion *Liocheles australasiae*

○宮下 正弘、中川 好秋、宮川 恒(京都大院農)
○Masahiro Miyashita, Yoshiaki Nakagawa, Hisashi Miyagawa(Kyoto Univ.)

サソリは、星座の一つとしても知られるほど、古くから人類に恐れられた生物である。その理由は言うまでもなく、サソリが強力な毒をもっていることによる。しかしながら、2000 種近いサソリのうち哺乳動物に危険を及ぼすものはごく一部に過ぎず、大多数のサソリは餌となる昆虫などの捕獲のために毒を使っていると考えられている。つまり、殺虫活性がサソリ毒の主要な活性であり、サソリが種特有の毒素を持っていると考えると、その構造は極めて多様なものであることが予想される。

日本には、八重山諸島などに 2 種のサソリ（ヤエヤマサソリとマダラサソリ）が生息している、特にヤエヤマサソリは、毒素の研究例のほとんどない Hemiscorpiidae 科に属しており、精力的に研究が行われている Buthidae 科に属するサソリの毒素とは異なる特徴をもつことが期待された。そこで、ヤエヤマサソリの毒液に含まれる殺虫性毒素の探索を進めた結果、2 種（LaIT1、LaIT2）の毒素ペプチドの単離・同定に成功した。いずれの毒素も殺虫性ペプチドとしての報告例のない構造を有しており、特に LaIT1 については発見当時には類似した配列が存在せず、全くの新規構造であった。本講演においては、これらの毒素ペプチドの構造と活性の関係について述べたい。

LaIT1 は昆虫に対して致死活性を示すものの、マウスに対しては毒性を示さない。その作用機構は不明ではあるが、殺虫性サソリ毒素の主要な作用ターゲットであるナトリウムチャネルには作用しないことが分かっている。LaIT1 は 36 残基からなるペプチドであり、2 つのジスルフィド結合を含んでいる。これは、他のほとんどの殺虫性サソリ毒素の構造的特徴（60-70 残基程度、4 つのジスルフィド結合）とは大きく異なっており、その立体構造に興味が持たれた。そこで、NMR 解析によりその立体構造を明らかにした結果、LaIT1 は inhibitor cystine knot モチーフと呼ばれる構造を持つことが分かった。さらに各種 Ala 置換体の構造と活性の関係から、15 番目のアルギニン残基とそれを取り囲む複数の残基からなる分子表面が活性発現に重要であることが示唆された。

LaIT2 は 59 残基からなるペプチドであり、殺虫活性だけでなく抗菌活性も示す。LaIT2 の N 末端側はα-helix 構造を形成している一方で、C 末端側は 3 つのジスルフィド結合によってコンパクトに折りたたまれており、その構造は特徴的である。そこで、LaIT2 の活性発現に重要な構造要因を明らかにするため、LaIT2 の N 末端あるいは C 末端部分のみからなる類縁体を合成し、その殺虫活性ならびに抗菌活性を評価した。その結果、N 末端部分だけでもいずれの活性も示すことが分かり、N 末端部分のα-helix 構造による細胞膜破壊が LaIT2 の活性発現にとって重要であることが示唆された。

scorpion toxin, peptide, insect toxicity

講演番号：4SY09-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:32～ C 校舎 01 会場

カイコにおけるイオン輸送ペプチド受容体の同定

Identification of G protein-coupled receptors for ion transport peptides in the silkworm, *Bombyx mori*

○永井 千晶、長澤 寛道、永田 晋治(東大院・農生科・応生化)
○Chiaki Nagai, Hiromichi Nagasawa, Shinji Nagata(The Univ. of Tokyo)

イオン輸送ペプチド（ITP）および ITP-like（ITPL）は、甲殻類血糖上昇ホルモン（CHH）族ペプチドと呼ばれるペプチドホルモンファミリーに属する昆虫の神経ペプチドである。CHH 族ペプチドは脱皮動物（節足動物や線虫）に普遍的に存在し、糖代謝、脂質代謝、脱皮、生殖、ストレス応答など、多様な生体制御を担う。その作用機構には不明な点が多く、特に受容体分子は未同定であった。

CHH 族ペプチドの研究は、その生物活性が良く知られている甲殻類において盛んに行われてきた。クルマエビ *Marsupenaeus japonicus* などの甲殻類での生化学的解析による CHH 族ペプチド受容体の推定分子質量を考慮すると、G タンパク質共役型受容体（GPCR）が CHH 族ペプチド受容体として機能する可能性が考えられた。そこで、我々は、カイコにて神経ペプチドの受容体として機能するクラス A および B の GPCRs（BNGRs）の中に、カイコの ITP および ITPL に対する受容体が存在するかどうかを検討した。異種発現させたオーファン BNGRs の応答解析から、BNGR-A2 および-A34 を ITP 受容体、BNGR-A24 を ITPL 受容体の候補として見出した。そして、①異種発現系での ITP および ITPL に対する候補 BNGRs の応答の用量反応解析、②ITP および ITPL の標的組織における候補 BNGRs の発現解析、③カイコ卵巣由来 BmN 細胞の ITP・ITPL 応答性の変動解析、④異種発現系での候補 BNGRs と ITP・ITPL との結合実験、の 4 つの実験により、これらの受容体候補 BNGRs が生体内で ITP や ITPL 受容体として機能することを実証した。興味深いことに、BNGR-A24 は CHH 族ペプチドとは構造的相同性のない神経ペプチドである tachykinin（TK）の受容体と高い相同性を示し、カイコの 5 種の TKs にも応答した。また、BNGR-A24 に対する ITPL と TKs の結合は競争的であることが判明し、これらの神経ペプチドの機能的連関が示唆された。

昆虫特異的ホルモンやその作用機序に関与する分子は、安全性の高い殺虫剤の開発の標的として優れている。本研究の成果は、CHH 族ペプチドによる生体制御の理解に大きく貢献するだけでなく、種特異的な殺虫剤の開発に対する新たな作用点を提供することが期待される。

Bombyx mori, G protein-coupled receptor, ion transport peptide

講演番号：4SY09-4
講演日時、会場：3 月 30 日 15:00～ C 校舎 01 会場

脱皮ホルモン生合成酵素阻害剤の探索

Research for inhibitors of cytochrome P450 enzymes mediating ecdysteroid biosynthesis

○引場 樹里[1]、藤本 善徳[2]、片岡 宏誌[1]([1]東大院・新領域、[2]東工大院・理工)
○Juri Hikiba[1], Yoshinori Fujimoto[2], Hiroshi Kataoka[1]([1]Tokyo Univ., [2]Titech)

近年、食の安全や環境汚染への関心が高まっており、殺虫剤の残留による人体の健康や環境への影響が懸念されている。一方で、世界中の約 500 種類の害虫について殺虫剤抵抗性が報告され、農業や公衆衛生の面で問題となっている。

従来の殺虫剤の多くは神経系に作用する化合物である。それらの化合物は、哺乳類と昆虫との解毒・分解・不活性化能力の違いを利用しヒトへの毒性を軽減するように設計されてはいるものの、いまだに選択性が十分であるとはいえない。昆虫の神経系に作用して効果を現す薬剤以外には、キチン質合成酵阻害薬や幼若ホルモン薬などの昆虫の脱皮・変態を妨げる薬剤、消化管に作用する薬剤や、筋肉の収縮に作用し摂食行動を阻害させる薬剤などが開発されている。しなしながら、薬剤抵抗性の問題や難分解性化合物の残留による環境負荷の問題があり、低残留性かつ防除したい生物にのみに的確に毒性を発揮する選択性の高い農薬の開発が常に望まれている。

本研究では昆虫の脱皮という生理現象に着目し、脱皮ホルモン生合成酵素の阻害剤の探索を行った。脱皮ホルモン、エクジソンは、コレステロールを原料に前胸腺で合成され、血中で 20-ヒドロキシエクジソンに水酸化されて生理活性を示す。このエクジソン生合成反応は、Phantom (Phm)、Disembodied (Dib)、Shadow (Sad)、Shade (Shd) シトクローム P450 (CYP) 酵素が担っている。ショウジョウバエ S2 細胞を用いて、これら酵素によるステロイドのヒドロキシル化反応を in vitro で再現できる系と LC-MS/MS による多種のステロイドを高感度かつ一斉に定量できる分析系を確立した。これらの手法を用いて、エクジソン生合成酵素の基質認識について解析を行った。また、化合物ライブラリーから Phantom のステロイド変換活性を抑制する化合物のスクリーニングを行ったので紹介したい。(本研究は、NARO 生物系特定産業技術研究支援センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」の助成を受けたものである。)

cytochrome P450 enzymes, ecdysteroid biosynthesis, inhibitor

講演番号：4SY09-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:28～ C 校舎 01 会場

深化する性フェロモンの進化
Evolution of moth sex pheromone deepened

○藤井 毅[1]、櫻井 健志[2]([1]東大院農、[2]東大先端研)
○Takeshi FUJII[1], Takeshi SAKURAI[2]([1]Tokyo Univ., [2]Tokyo Univ. RCAST)

ガ類のメスが分泌する性フェロモンは揮発性低分子の生理活性物質であり、微量にも関わらず同種オスを選択的に興奮させ誘引することができる。ガ類性フェロモン交信系のこの性質は、その環境負荷の低さゆえに、圃場において種選択的な大量捕殺という形で総合的害虫管理の一翼を担っている。現在同定されているガ類性フェロモン分子には（１）炭素鎖骨格の長さ（２）官能基の種類（３）二重結合やエポキシ環の位置と向き、等の情報が含まれており、これら成分が特定の比率で複数混ざり合うことで膨大な数のガ類種の種間交雑を防ぎ、種のメンテナンスを担っている。フェロモン分子とそれら複雑な成分の混合比は、ガ類の腹部末端に位置するフェロモン腺で高発現する生合成酵素群の協奏的な反応によりコントロールされている。このシステムのおかげで、メスが生産する性フェロモン組成とオスの反応する性フェロモン組成は同調し、変異が減る方向に進化してきたとしばしば考えられてきた（Butlin and Trickett, 1997）。しかし、実際はフェロモン成分の同定が進むにつれ、メスが生産する性フェロモンとオスの反応性には種内変異が存在するなど、予想外の結果が多く報告されるようになってきている。

本講演では、このガ類性フェロモン交信系の「曖昧さ」に注目し最近の知見を整理しながら議論したい。重要害虫を多く含むアワノメイガ属では、性フェロモン生合成に関与する重要酵素の一つである不飽和化酵素の遺伝子が、同属近縁種内のゲノム上で保存されていることが実験的に明らかとされた（Fujii et al., 2011）。この結果は転写レベルで性フェロモン生合成酵素が調節されており、転写調節の変更がそのまま、フェロモン成分の変更につながる可能性を示唆している。また最近、カイコガを用いて、オスの性フェロモン選好性が触角で発現する性フェロモン受容体の僅か 1 遺伝子によって規定されている事が明らかとなった(Sakurai et al., 2011)。この結果は、オスの性フェロモンに対して性的に興奮し、誘引される行動を発現するために重要な匂いの選別が１遺伝子の変異により、変更することを示唆している。これら最近の結果から見えてくるガ類フェロモン交信系は、種のメンテナンスの役割を担っているにも関わらず、当初のイメージとは異なり、変更が容易な柔軟なものだった。

Sex pheromone communication system of moth, Enzymes for sex pheromone production, Receptor for sex pheromone

講演番号：4SY09-6
講演日時、会場：3 月 30 日 15:56～ C 校舎 01 会場

昆虫に見られる FACs 生合成メカニズムの種間比較

FACs in insects: a convergent evolution or phylogenetic inheritance?

○吉永 直子、森田 沙代、吉田 哲也、阿部 弘明、森 直樹(京大院農)
○Naoko Yoshinaga, Sayo Morita, Tetsuya Yoshida, Hiroaki Abe, Naoki Mori(Kyoto Univ.)

鱗翅目幼虫の吐き出し液中から発見された FACs（脂肪酸-アミノ酸縮合物）は、幼虫が食害した植物にテルペン類等の揮発成分を誘導する。この揮発成分ブレンドが幼虫の天敵である寄生蜂にとって寄主発見の手がかりとなることから、これは植物における間接的防御であると考えられ、FACs はそのエリシターとして研究されてきた。これまでの研究で、FACs がハスモンヨトウ幼虫において窒素代謝の効率化に寄与していると予想され、しかも FACs の分布は一部の種に限らず、調べた種の３分の２に及ぶ９科１９種の鱗翅目幼虫が FACs を持っていた。さらに、ショウジョウバエや数種のコオロギも腸内に FACs を持つことが明らかになった。これらの昆虫で、FACs が中腸内でのみ見られることに加えて、類縁体がグルタミン型・グルタミン酸型・水酸化脂肪酸型の３パターンに限られることが共通している。しかしながら、コオロギやショウジョウバエは植食性の鱗翅目幼虫と食性・栄養条件が全く異なることから、これらの種に見られる FACs が同じ役割を担っているのかどうかは明らかでない。また、数種のハバチ幼虫、カメムシ成虫、バッタなどで FACs が見つからなかったことから、FACs の由来に系統関係があるのかどうかも興味深い。

そこで、ハスモンヨトウ、アワヨトウ、カイコ、オオスカシバ、タバコスズメ等の鱗翅目幼虫及びショウジョウバエ・コオロギにおいて、これら FACs の生合成メカニズムを検討した。安定同位体でラベルしたアミノ酸及び脂肪酸を用いて FACs の in vitro 生合成を行ったところ、いずれの種でもグルタミン型 FACs が明瞭に確認された。通常、鱗翅目のタバコスズメ、ショウジョウバエ、コオロギ生体からはグルタミン酸型 FACs が主成分として検出され、それ以外の鱗翅目幼虫４種はグルタミン酸型を持たないが、in vitro ではグルタミン酸型 FACs がショウジョウバエと鱗翅目５種全てから微量ながら検出された。また、in vivo でカイコ幼虫中腸から FACs は検出されないが、in vitro で他の４種と同様の生合成が見られたことから、生合成能はあるものの、何らかの理由で FACs 生成が生体では制限されていると考えられる。一方、コオロギではグルタミン型 FACs から脱アミノ化により直接的にグルタミン酸型 FACs が生成することが確認された。この反応は鱗翅目幼虫やショウジョウバエでは見られないことから、少なくともコオロギでは他の昆虫とは異なる FACs 生合成機構を持つと結論づけられる。

以上の結果から、グルタミン酸型 FACs については、昆虫内で収斂進化的に発生した可能性が示唆された。FACs 生合成酵素の同定により、この仮説の検証を試みる。

Fatty acid amino acid conjugates, insects, biosynthesis

講演番号：4SY10-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:35～ C 校舎 03 会場

食品成分としてのスフィンゴ脂質の評価

Evaluation of sphingolipids as food components

○菅原 達也(京大院農)
○Tatsuya Sugawara(Koyto Univ.)

近年、スフィンゴ脂質の食品機能が注目され始めており、これまでに大腸ガン抑制作用、抗糖尿病作用、血中脂質低下作用などが報告されている。なかでも注目されているのが、皮膚バリア機能向上作用である。皮膚最外層の角層における細胞間脂質のほぼ 50%をセラミドが占め、保水性やバリア機能に重要であることから、スフィンゴ脂質の経口摂取による皮膚バリア機能向上作用が期待されている。しかしながら、経口摂取されたスフィンゴ脂質が皮膚に到達し、機能を発揮することは証明されておらず、作用メカニズムについては不明な点が多い。また、現在市販されているスフィンゴ脂質素材の多くは、植物由来グルコシルセラミドであるが、これらはヒトを含めたほ乳動物のものとは厳密には異なる化学構造であり、その消化管吸収機構や機能性の作用メカニズムについては評価されていなかった。そこで演者らは、機能性食品素材としてのスフィンゴ脂質に着目し、高機能食品に応用するための科学的な基盤を構築することを目的とした研究を推進している。

消化管吸収についてのこれまでの検討結果から、植物由来グルコシルセラミドは小腸内で消化され、精製した主要な構成成分である 4,8-スフィンガジエニンはリンパを介して吸収されることが証明されている (1,2)。しかしながら、その吸収率はほ乳動物に多い構造であるスフィンゴシンに比べて低い。その吸収の選択性には薬物排出トランスポーターである MDR1 が、スフィンゴイド塩基の選択的吸収に関わることが示唆されている (3)。これらの結果から、これまでの脂質成分の吸収とは異なる吸収機構の存在が予想される。また、グルコシルセラミドを経口摂取することで、皮膚バリア機能が改善することも確認されている。しかしながら、吸収率が極めて低いことから、経口摂取されたスフィンゴ脂質が直接皮膚で利用されている可能性は低い。作用メカニズムとして、内因性スフィンゴ脂質代謝の亢進により、皮膚バリア機能の増強作用を発揮する可能性が示されてきている (4)。

超高齢化社会を迎えている我が国において、スフィンゴ脂質の食品機能性は QOL 向上に貢献するものと期待される。しかしながら、作用機序を含めた科学的な根拠を解明することが不可欠であることから、スフィンゴ脂質を機能性食品素材として効率的に活用するためには、今後の持続的な研究が必須といえる。

1) J. Nutr. 133, 2777, 2003. 2) J. Lipid Res. 51, 1761, 2010. 3) Biosci. Biotechnol. Biochem. 68, 2541, 2004. 4)Exp. Dermatol. 21, 448, 2012.

sphingolipids, food function, intestinal absorption

講演番号：4SY10-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:10～ C 校舎 03 会場

スフィンゴ脂質研究の医薬品応用を目指して

Sphingolipid biology as a therapeutic target, and its future prospect.

○光武 進(佐賀大農)
○Susumu Mitsutake(Saga Univ.)

スフィンゴ脂質はコレステロールやグリセロ型のリン脂質と共に細胞膜を構成する脂質の一群である。近年、その代謝物である ceramide(Cer)や sphingosine 1-phosphate に生理活性が見いだされ注目を集めた。また、細胞膜に最も多量に存在する sphingomyelin(SM)は、cholesterol と共に細胞膜上に脂質マイクロドメインや脂質ラフトと呼ばれる領域を形成すると考えられている。現在、これらスフィンゴ脂質の生理機能として、①細胞膜脂質マイクロドメイン構成脂質としての働き、②細胞内脂質セカンドメッセンジャーとしての働き、③細胞間シグナル伝達物質としての働き、が挙げられる。

我々は、近年スフィンゴ脂質合成代謝に関わる２つの酵素に関して、遺伝子欠損マウスの解析を行い、スフィンゴ脂質の生理機能の中でも①の働きが、脂肪肝、肥満症、糖尿病などを含むメタボリックシンドロームの発症と深く関与する事を見いだした(1,2)。今回のシンポジウムでは、我々が行った、スフィンゴミエリン合成酵素２（SMS2）とセラミドキナーゼ（CERK）の遺伝子欠損マウスを用いた研究を紹介したい。どちらのマウスも食事誘導性の肥満に強い抵抗性を示す。興味深い事に、SMS2 は細胞膜の外側で Cer から SM を合成する酵素で、CERK は細胞膜の細胞質側で Cer から Ceramide 1-phosphate を合成する酵素である。我々は以前に、細胞膜上で生じた Cer が速やかに細胞膜の内側に移動する事を示した。つまり細胞膜上で増えた Cer は、細胞膜を不安定化する事が予想され、CERK や SMS2 の働きはその細胞膜を再び安定化し、脂質マイクロドメインの構造機能に変化を与えていると考えられる。我々が得た知見は、これら細胞膜マイクロドメインが、スフィンゴ脂質代謝／合成酵素によって構造／機能制御され、疾患発症とも関係している事を示している。実際、SMS2 欠損マウスでは、脂質マイクロドメイン上に存在する脂肪酸受容体の一つ CD36 の働きに変化が見られた(1)。

現在、様々な受容体等が細胞膜脂質マイクロドメインを足場として機能している事が確認されている。この脂質マイクロドメインの機能制御は、これまでと異なる新しい創薬概念になる事が期待される(3)。

(1) Mitsutake S.*, *et al.* (2011) *J. Biol. Chem.* **286,** 28544
(2) Mitsutake S.*, *et al.* (2012) *FEBS letters* **586,** 1300
(3) Yuyama K., Mitsutake S.*, *et al.* (2013) *Biochim. Biophys. Acta. in press*

sphingolipids, ceramide, metabolic syndrome

講演番号：4SY10-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:45～ C 校舎 03 会場

イメージングマススペクトロメトリーによるスフィンゴ脂質の可視化

Visualization of sphingolipid by imaging mass spectrometry

○財満 信宏(近畿大院農)
○nobuhiro zaima(Kinki Univ.)

生体分子の局在は、それらの生体内機能を推測するための重要な情報である。生体分子を分子レベルで同定し観察する分子イメージング手法においては、タンパク質であれば抗体を用いた免疫染色や GFP などを用いた可視化手法が一般的であり、mRNA であれば、in situ hybridization などが一般的な顕微鏡観察手法として用いられてきた。しかしながら、分子種レベルで脂質の観察が可能な汎用的な手法は存在せず、局在の解析が進んでいないものが多い。

我々は、脂質の局在を分子レベルで可視化するための課題に取り組むための新たなアプローチとして、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法-イメージングマススペクトロメトリー（MALDI-IMS）を用いてきた。MALDI-IMS は組織切片上で二次元の質量分析を行うことにより、目的分子の位置情報を明らかにする手法である。具体的には、薄切片とした生体試料にマトリックスを噴霧して均一な微細結晶を作り、目的部位に微小径のレーザーを照射して切片上に存在する分子をイオン化する。さらにレーザーを切片上で数十マイクロメートルオーダーの間隔で二次元に順次照射することによって、一切片あたり数百～数万のマススペクトルを取得する。その後、専用のイメージングソフトウェアを使用することにより、任意のピークの組織切片における分布を、測定点ごとのシグナル強度に応じたイメージとして画像化する。理論的には、イオン化する物質であれば、どのような物質の可視化も可能な手法であり、実際に、従来の手法では可視化が不可能であった多くの脂質分子の可視化を可能にしている。我々はこれまでに様々な脂質種の局在を、ヒトをはじめとした様々な生体組織上で解析してきた。

脂質は生命活動と深い関わりがあり、脂質分子種レベルでのイメージングによる脂質の局在解析の意義は大きいと考えられる。特に、心筋梗塞、脳卒中、癌などの日本人の死因の上位を占める疾患をはじめとした多くの疾患が脂質代謝異常と関連すると指摘されており、これらの疾患解析から得られる知見が、疾患発症機構の解明、治療法、予防法、および診断法などの開発につながることが期待される。

組織切片中の脂質を「見る」ことが可能な MALDI-IMS は、脂質研究における重要な解析手法として認識されつつある。スフィンゴ脂質可視化への応用例は少なく、理想と現実の間にはまだ大きな開きもあるが、本発表では、MALDI-IMS による可視化の実例を紹介し、MALDI-IMS の可能性を議論したい。

sphingolipid, imaging mass spectrometry, lipid imaging

講演番号：4SY10-4
講演日時、会場：3 月 30 日 15:20～ C 校舎 03 会場

生体蛍光イメージングによるスフィンゴシン 1 リン酸の細胞動態制御機構の解析

Intravital optical imaging dissecting S1P-mediated cellular migration in vivo

○石井 優(大阪大院医免疫細胞生物学)
○Masaru Ishii(Osaka Univ. Grad. Sch. Med.)

２光子励起顕微鏡などを用いた近年の生体イメージング技術は、生きたままの細胞の動きのある世界を捉えることを可能にしてきた。本演者はこれまで、この技術を活用して、骨髄内の細胞動態を観察する中で、骨組織内で骨を破壊するマクロファージである破骨細胞の遊走が、生理活性リゾリン脂質の 1 種であるスフィンゴシン 1 リン酸（S1P）によって巧妙に制御されていることを明らかにしてきた。破骨細胞は血中に存在する S1P に引き戻されたり（1 型受容体 S1PR1 の作用)、逆に 2 型受容体（S1PR2）の作用により S1P から遠ざかることによって骨に引き寄せ得られるメカニズムが存在することが分かった。さらに最近では、これまでどのようにして骨破壊を抑制しているか不明であった活性型ビタミン D が、この S1P による破骨細胞遊走を制御することで治療効果を発揮することも分かったきた。本講演では演者の研究室が備える、生体イメージング技術による種々の臓器・組織での細胞動態解析について紹介し、本技術が今後のスフィンゴ脂質研究における発展性について紹介する。

imaging, sphingosine-1-phosphate, bone and immune system

講演番号：4SY10-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:55～ C 校舎 03 会場

スフィンゴシン-１-リン酸２型受容体のケミカルバイオロジー

Chemical biology of sphingosine 1-phosphate receptor 2

○薩 秀夫(東大院農生科)
○Hideo Satsu(The University of Tokyo)

スフィンゴシン-1-リン酸（S1P）は生理活性脂質の一つであり、スフィンゴ脂質の代謝産物である。S1P は細胞増殖の亢進、免疫細胞の遊走制御など多彩な生理作用を有することが報告されており、その作用発現はセカンドメッセンジャーとして機能する細胞内作用と G タンパク質共役型受容体に属する 5 種類の S1P 受容体（$S1P_1$ - $S1P_5$）を介した細胞外作用が知られている。中でも $S1P_1$ は、近年承認された多発性硬化症の治療薬であるフィンゴリモド（FTY720）の標的分子であり非常に注目を集めている。また 5 種類の S1P 受容体のそれぞれの生理作用は、近年受容体欠損マウスや選択的アゴニスト・アンタゴニストを用いた解析で明らかにされつつある。しかしながら $S1P_2$ については、これまで有用なアゴニストが報告されていなかった。そこで本研究では、$S1P_2$ に対する選択的アゴニスト探索評価系の構築及び実際にハイスループットスクリーニング（HTS）を用いた新規アゴニストの探索・評価をおこなうこととした。

$S1P_2$ 選択的アゴニスト探索評価系としてレポーターアッセイ系を用いることとし、$S1P_2$ の下流で活性化される転写因子を解析した。その結果、$S1P_2$ は cyclic AMP response element binding protein（CREB）を活性化し CRE 依存的な転写活性を亢進することが示された。そこで CRE を上流につないだレポーター遺伝子を安定に発現する CHO 細胞に $S1P_2$ 発現ベクターを遺伝子導入し、限界希釈法などを用いて S1P に対して最も高感度に応答する $S1P_2$ 高発現応答クローンを獲得した。アッセイ条件の最適化をおこなった後、約 16,000 及び約 100,000 の 2 種類の化合物ライブラリーを用いて HTS を進めた。その結果 2 種類の $S1P_2$ アゴニスト候補化合物が見出され、さらにその一つをリードとして構造活性相関をおこない、最終的に EC50 が 500 nM の新規 $S1P_2$ アゴニスト（CYM5520）を見出した。CYM5520 は他の S1P 受容体（$S1P_{1,3,4,5}$）を活性化せず、またその活性化は $S1P_2$ アンタゴニストである JTE013 によって完全に抑制されたことから、$S1P_2$ に対する高い選択性を有することが示された。また CYM5520 は S1P の $S1P_2$ に対する結合を競合的に阻害せず、また CYM5520 による $S1P_2$ 活性化は、S1P が $S1P_2$ に認識されるのに重要なアミノ酸残基を必要としないことが明らかとなった。以上より CYM5520 は、S1P と結合領域を競合しないアロステリックアゴニストであることが示された[1]。本講演ではさらに、CYM5520 を用いて腸管上皮における S1P 及び $S1P_2$ の生理作用を解析した結果についても紹介したい。

1）Satsu, H., et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 21(17), 5373-538 (2013).

sphingosine-1-phosphate, chemical biology, high throughput screening

講演番号：4SY11-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:30～ C 校舎 05 会場

はじめに：オートファジーと栄養学
Introduction： Autophagy and Nutritional Science

○門脇 基二(新潟大院自然（農）)
○Motoni Kadowaki(Niigata Univ.)

現在、高齢社会における老化や健康に立ち向かう分野として、食と栄養は大きな注目を浴びている。ここでは、オートファジーの広がる世界を議論するに当たり、シンポジウムの始めにその歴史を辿ることにより、特に栄養学との関連を考察してみたい。古典的な栄養学、特に不足の栄養学においては、まず生体の窒素バランスが健康の指標であり、数多くの必須アミノ酸の決定やタンパク質要求量決定の際の基準になってきた。それは体内で体タンパク質の動的状態、すなわち合成と分解のバランスによって規定されるものであり（Rudolf Schoenheimer, 1940)、そのため、タンパク質合成とタンパク質分解の仕組みの解明が大きな課題となってきた。特に後者の仕組みは多様であり、長らくその主要機構の詳細は全く不明であった。そうした中で、Christian de Duve により発見されたリソソームとオートファジーという現象が登場したが（1962)、主に病理学的な観点からとらえられ、正常な細胞活動の現象とはみなされなかった。その後、栄養学と細胞学とは長らく乖離したままであり、オートファジーという細胞現象が、正常な範囲でも体タンパク質分解の多くを説明する機構であることが判明したのは、1980 年代になってである（Glenn E. Mortimore, Per O. Seglen)。その後、細胞内での主要タンパク質分解系としてプロテアソームとオートファジーの経路が並立してきた。そして、このオートファジーの分子レベルでの機構解明は、まさに大隅良典らによる酵母のオートファジー欠損変異株の発見をスタートとする（1993)。その後の大発展の詳細は後の講演者に譲るが、オートファジーは今やタンパク質分解だけではなく、細胞内のミトコンドリアを始めとするオルガネラの品質管理や神経変性疾患や免疫など様々な局面で役立っていることが解明され始めた。さらにはエイジングにも密接に関わることも強く示唆されるにおよび、栄養学とは再び親密な関わりを持ち始めている。近年の高齢社会という時代のニーズに対し、オートファジーは大きなインパクトを与えうるものとして注目を浴びつつある。

Autophagy, Nutrition

講演番号：4SY11-2
講演日時、会場：3 月 30 日 13:55～ C 校舎 05 会場

亜鉛飢餓によって誘導されるオートファジー

Zinc starvation triggers autophagy

○川俣 朋子、堀江 哲郎、松浪 文珠、大隅 良典(東工大　フロンティア)
○Tomoko Kawamata, Tetsuro Horie, Miou Matsunami, Yoshinori Ohsumi(Frontier Research Center, TITECH)

オートファジーは細胞内の分解系であり、タンパク質、超分子構造体やオルガネラ等がオートファゴソームによって取り囲まれ、リソソーム・液胞内で分解される。オートファジーは栄養飢餓状態で強く誘導され、飢餓条件における生存に不可欠である。オートファジーによって異化された小分子は様々な形でリサイクルされることから、オートファジーは細胞内の代謝と密接な関係があると考えられる。現在、様々な栄養環境におけるオートファジーの誘導とオートファジーによる代謝変動について、酵母を用いて系統的に解析を進めている。本シンポジウムでは、亜鉛飢餓とオートファジーの関係について報告する。亜鉛は細胞内の微量必須元素で、細胞内の 5-10%のタンパク質が亜鉛結合タンパク質であると予想されている。RNA polymerase や DNA 結合タンパク質、多数の代謝酵素などについても、亜鉛がその機能・活性や構造維持に必須である。我々は、亜鉛が欠乏した合成培地では、オートファジー欠損株では増殖が阻害されることを見いだした。これは、亜鉛飢餓によりオートファジーが誘導され、その結果亜鉛結合タンパク質が分解され、遊離した亜鉛が増殖に必須なタンパク質に再供給されるのではないかと予想した。現在、亜鉛飢餓によって起こる代謝変化とオートファジー誘導のタイミング、関与するシグナル系についての解析を行っており、それらの結果について報告し、金属イオンのホメオスタシスにおけるオートファジーの新たな機能について議論したい。

Autophagy, Metabolism, Zinc

講演番号：4SY11-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:20～ C 校舎 05 会場

麹菌オートファジーのユニークな生理機能とその応用

The unique physiological function in *Aspergillus oryzae* and its application

○菊間 隆志、北本 勝ひこ(東大院農生科・応生工)
○Takashi KIKUMA, Katsuhiko KITAMOTO(Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、我が国で古来より日本酒、味噌、醤油の醸造に用いられてきた産業上極めて重要な微生物である。近年では、その優れたタンパク質分泌能力により、酵素生産や異種タンパク質生産などに利用されている。本講演では、麹菌のオートファジーに関して発見されたユニークな生理機能及びその応用について紹介する。

麹菌の形態形成におけるオートファジー[(1), (2)]　糸状菌である麹菌は、分生子から細長い細胞（菌糸）を伸長させることにより生長する。寒天培地上では、培地表面に沿って伸長する菌糸に加え、空中に向けて伸長する気中菌糸、その先端から分生子を形成する。我々は、気中菌糸、また発芽中の分生子においてオートファジーが誘導されていることを見出した。さらに麹菌のオートファジー関連遺伝子 *Aoatg8* 破壊株では、気中菌糸および分生子形成の低下、分生子発芽の遅延が観察された。これらの結果は、オートファジーが寒天培地表面上から離れた気中菌糸および分生子内の栄養源を供給すると共に、形態の変化に伴う細胞の再構築に関与することを示唆した。

麹菌オートファジーによる核の分解[(3)]　近年、オートファジーがバルクな非選択的分解だけでなく、基質特異的な分解にも機能することが明らかとなってきた。我々は麹菌において様々なオルガネラのオートファジーによる分解を検討した。その結果、麹菌は核を丸ごとオートファゴソームで囲い込み、液胞へ輸送して分解することを発見した。これは、多核細胞から成る麹菌の核をも栄養源として利用する“したたかさ”を示すとともに、麹菌をはじめとする多核細胞生物がなぜ細胞に複数個の核をもつかという疑問に対する一つの答えではないかと考えられる。

オートファジー欠損株による異種タンパク質生産[(4)]　我々は、麹菌の分泌タンパク質である α-アミラーゼの S-S 結合欠損型を発現させると、このタンパク質が小胞体で蓄積し、オートファジー依存的に液胞に取り込まれることを見出した。これはオートファジーが異種タンパク質生産におけるボトルネックのひとつであることを示唆している。そこで、オートファジー欠損株において異種タンパク質のモデルとしてウシキモシンを生産させたところ、生産量が有意に上昇した。これはオートファジーを異種タンパク質生産に応用した初めての例である。

(1)Kikuma *et al*., *Eukaryot. Cell* **5**:1328-36, 2006　(2) Kikuma et al., *FEMS Microbiol. Lett.* **316**: 61-9, 2010
(3)Shoji et al., *PLoS One*, **5**:e15650, 2010　(4) Yoon et al., *PLoS One*. 8: e62512 ,2013

Koji mold, *Aspergillus oryzae*, autophagy

講演番号：4SY11-4
講演日時、会場：3 月 30 日 14:45～ C 校舎 05 会場

環境変動に対応するための Atg タンパク質によるオルガネラ動態制御機構

Regulation mechanism of organelle dynamics by Atg proteins in response to environmental fluctuations

○奥 公秀[1]、阪井 康能[1,2]([1]京大院農、[2]京大学際融合)
○Masahide Oku[1], Yasuyoshi Sakai[1,2]([1]Grad. Sch. Agriculture, Kyoto Univ., [2]C-PIER, Kyoto Univ.)

自然界に生きる微生物はたえず環境変動にさらされている。たとえば一日の日周期に沿った変動を考えると、温度・日照光量の変化に加え、植物の光合成や蒸散作用の変化によりその近傍にある炭素・窒素源などの栄養源量や浸透圧が変化すると予想される。実際私たちは、植物葉上のメタノール濃度が日周期に応じて変動することを見いだしている[1]。

酵母をはじめとする真核微生物がこのような環境変動に対応する術として、オルガネラ動態の制御があることがこれまでの研究から明らかとなりつつある。特に特定の炭素源の資化に機能するペルオキシソーム、そして細胞構成成分の分解やアミノ酸、リン酸等の栄養成分の蓄積の場である液胞は、環境変動が大きな動態変化を引き起こすオルガネラである。

私たちはこれまでに、オートファジーに機能する Atg タンパク質群が、さまざまな環境変動に対応するための生理機能を担うことを示してきた。特にメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* の Atg8 および Atg18 が、オートファジーに機能するだけでなく浸透圧変化や酸化ストレスに対応した液胞の形態変化にも機能すること、また Atg18 の機能がそのリン酸化・脱リン酸化サイクルにより制御されることを明らかにした[2]。さらにメタノール資化性酵母 *Candida boidinii* では、植物葉上生育のため、葉上のメタノール濃度変動に対応して、ペルオキシソーム特異的オートファジー（ペキソファジー）を誘導することで本オルガネラの量制御を行うことを見いだした[1]。このペキソファジーに機能する因子として私たちが同定した Atg26 は、リン酸化イノシトールリン脂質 phosphatidylinositol 4-phosphate（PI4P）のシグナル伝達経路の下流で機能することを見いだしていたが[3]、植物病原菌 *Colletotrichum orbiculare* の感染過程にも同様の Atg26 を介したペキソファジーが重要であることが分かった[4]。本発表では、これらの事例を中心に、微生物の環境変動対応のための Atg タンパク質の多様な機能やその分子メカニズを紹介する予定である。

1. Kawaguchi *et al.*, *PLoS One*, **6**, e25257 (2011)
2. Tamura *et al.*, *J. Cell Biol.*, **202**, 685-698 (2013)
3. Yamashita *et al.*, *J. Cell Biol.*, **173**, 709-717 (2006)
4. Asakura *et al., Plant Cell*, **21**, 1291-1304 (2009)

autophagy, peroxisome, vacuole

講演番号：4SY11-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:10～ C 校舎 05 会場

植物の栄養リサイクルと葉緑体のオートファジー
Nutrient recycling and chloroplast autophagy in plants
○石田 宏幸(東北大院農)
○Hiroyuki Ishida(Tohoku Univ.)

独立栄養生物である植物にとって、栄養素やエネルギーの体内での効率利用は、過酷な環境下での生存戦略の一つとして重要である。C_3 植物では葉の全窒素の約 80%が葉緑体に分配され主にタンパク質として光合成機能を担っている。中でも CO_2 固定酵素 Rubisco は光合成の律速因子の一つであり、単一タンパク質として可溶性タンパク質の約 50%を占めている。葉の老化の進行とともに葉緑体タンパク質は速やかに分解され、それらを構成していた窒素は成長部位や種子に転流される。老化後期には葉緑体自身も分解され、細胞当たりの葉緑体数は減少する。また光合成が十分に行えない炭素制限下では、タンパク質を構成するアミノ酸が糖に代わる呼吸基質として利用される。

近年の酵母とシロイヌナズナにおけるゲノムワイドな解析、さらにオートファジー関連遺伝子 *ATG* の欠損変異体を用いた逆遺伝学的な解析から、植物においても酵母オートファジーと同様な分子システムが存在することが明らかにされた。そしてオートファジーは植物においてもタンパク質のバルク分解・栄養素リサイクルを担う主要なシステムと位置付けられたが、その葉緑体分解における役割については不明であった。私たちは老化葉における Rubisco を含む小胞、RCB(Rubisco-containing body)、の発見をきっかけに、葉緑体タンパク質の分解とオートファジーの関係について調べ、以下のことを明らかにした。

(1) RCB は、*ATG* 遺伝子に依存したマクロオートファジーの機構により、液胞に輸送、分解される(Ishida et al., 2008, *Plant Physiol.* 148:142)。(2) 葉緑体のオートファジーには Rubisco などのストロマタンパク質を含む RCB による部分分解と、チラコイド膜をも含む葉緑体本体の分解の 2 つの様式がある(Wada et al., 2009, *Plant Physiol.* 149:885)。(3) RCB 形成は主に葉の炭水化物含量によって制御されており、その制御は葉緑体以外の成分のオートファジーとは異なっている(Izumi et al., 2010, *Plant Physiol.* 154:1196)。(4) 葉の暗処理老化において Rubisco の少なくとも 40%はオートファジーによって分解されている (Ono et al., 2013, *Plant Cell Environ.* 36:1147)。(5) オートファジーは RCB を主とするタンパク質分解から糖に代わる呼吸基質としてアミノ酸を供給することで、夜間のエネルギー利用に寄与している (Izumi et al., 2013, *Plant Physiol.* 161:1682)。

本発表ではこれらの知見を紹介するとともに、植物の栄養リサイクルにおけるオートファジーの寄与について最新の実験結果を加えて議論したい。

autophagy, chloroplast, Rubisco

講演番号：4SY11-6
講演日時、会場：3 月 30 日 15:35～ C 校舎 05 会場

哺乳動物におけるオートファジーの生理機能

The physiological role of autophagy in mammal

○久万 亜紀子[1,2]、吉井 紗織[1,3]、板倉 英祐[4]、原 太一[5]、設楽 浩志[6]、江石 義信[7]、水島 昇[1]([1]東大・医・分子生物、[2]JST さきがけ、[3]東京医科歯科大・細胞生理、[4]MRC 分子生物学研究所、[5]群馬大・細胞構造、[6]都医学研・基盤技術研究センター、[7]東京医科歯科大・人体病理)
○Akiko Kuma[1,2], Saori Yoshii[1,3], Eisuke Itakura[4], Taichi Hara[5], Hiroshi Shitara[6], Yoshinobu Eishi[7], Noboru Mizushima[1]([1]Univ. of Tokyo, [2]PRESTO, Japan Science and Technology Agency, [3]Tokyo Med. & Dent. Univ, [4]MRC・Laboratory of Molecular Biology, [5]Gunma Univ., [6]Tokyo Metro Inst. of Med. Sci., [7]Tokyo Med. & Dent. Univ.)

オートファジーは真核生物に保存された細胞内分解システムである。これまで私たちは、オートファジー遺伝子 *Atg5* ノックアウトマウスを用いてその生理機能解析を行ってきた。しかし、*Atg5* ノックアウトマウスは、外見は正常に生まれてくるが生後 1 日以内に致死となるため、アダルトマウスにおける役割を全身で解析することができなかった。死因の一つとして、神経変性による吸綴障害が疑われた。そこで全身性 *Atg5*$^{-/-}$マウスの神経系のみに Atg5 を発現させたマウス（神経特異的 *Atg5* レスキューマウス）を作製した。この新しいモデルマウスは新生仔死亡を回避し、少なくとも生後 16 週齢まで生存した。これにより、アダルトマウスにおけるオートファジー欠損の影響を全身網羅的に解析することが可能となった。

神経特異的 *Atg5* レスキューマウスは、成長不全、肝臓・脾臓の腫大、重篤な貧血、生殖器の委縮など様々な異常を呈した。特に顕著であった貧血と生殖器の異常について解析を進めた。精巣はコントロールマウスに比べて小さく、成熟精子が極めて少なかった。組織観察および電子顕微鏡観察により精細胞分化過程を詳細に観察したところ、精細胞分化の後期過程で形態異常が観察された。また、このマウスは重篤な貧血を呈し、赤血球は鉄欠乏性貧血と類似した形態異常を示した。血清鉄を測定したところ神経特異的 *Atg5* レスキューマウスでは血清鉄濃度が有意に低下しており、鉄投与によって貧血が改善した。各臓器における鉄貯蔵量も著しく低下していた。哺乳動物は生理的な鉄排泄機構を持たず、出血や異所性の鉄蓄積は認められなかったため、小腸からの鉄吸収不全が鉄欠乏の原因として疑われた。これらの異常を解析することによって、オートファジーの新しい生理機能が明らかになると考えられる。

Autophagy, Knockout mice, Iron

講演番号：4SY11-7
講演日時、会場：3 月 30 日 16:00～ C 校舎 05 会場

創薬におけるオートファジー研究の動向

Trends of Autophagy Research in Drug Discovery and Development.

○竹鼻 健司(味の素製薬株式会社)
○Kenji Takehana(Ajinomoto Pharmaceuticals Co., Ltd.)

オートファジー研究は、現在の生命科学における最もホットな領域であり、そして、これまでに我が国から発信された研究によってリードされているという紛れもない事実がある。国内製薬産業に身を置く研究者の端くれの身としては、この好環境を活かして、世界に先駆けた医薬品開発を成し遂げたいという思いからオートファジーとその周辺研究に携わってきた。しかし、敵は相当に手強いのである。連日のように、オートファジー研究とさまざまな疾患との関連性を報告する論文が最新ジャーナルを賑わせてはいるが、未だ創薬における具体的な成功例は知られていない。課題も多いのである。この機会に、オートファジーと創薬をめぐる現状と動向を概観し、さらには、今後のオートファジー研究に対して創薬研究者の立場から期待することについて論じたい。なお、内容は発表者が所属する組織の見解ではなく、あくまでも発表者の個人的な意見であることをご勘弁いただきたい。

autophagy, drug discovery, drug edvelopment

講演番号：4SY12-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:30～ C 校舎 04 会場

精製タンパク質を用いたヒト ABC タンパク質の機能解析

Functional analysis of human ABC transporter with purified protein.

○木村 泰久[1]、平山 裕士[1]、井上 修一[1]、津山 智美[1]、木岡 紀幸[1]、松尾 道憲[1]、加藤 博章[2]、植田 和光[1,3]([1]京大院・農・応用生命、[2]京大院・薬、[3]京大 iCeMS)
○Yasuhisa Kimura[1], Hiroshi Hirayama[1], Shuichi Inoue[1], Tomomi Tsuyama[1], Noriyuki Kioka[1], Michinori Matsuo[1], Hiroaki Kato[2], Kazumitsu Ueda[1,3]([1]Div.Appl.Life Sci., Grad.Sch.of Agri., Kyoto Univ., [2]Grad.Sch.of Pharm., Kyoto Univ., [3]iCeMS., Kyoto Univ.)

ABC タンパク質はその多くが ATP に依存した能動的な膜輸送を行うトランスポーターとして機能する。ヒトには 48 種類の ABC タンパク質が存在し、脂質恒常性の維持や有毒な化合物からの保護等の重要な役割を担う。ABC タンパク質は 12 回以上の膜貫通ヘリックスと 2 つの ATP 結合ドメインからなる巨大な膜タンパク質であり、発現、精製が困難であることから生化学的研究が大きく立ち遅れていた。我々はヒト培養細胞を用いた発現系により、ヒト由来の ABC タンパク質を機能的に発現、精製する実験系の構築を行った。本発表では、脂質トランスポーター(ABCG1)と薬物トランスポーター(MDR1、p-glycoprotein)の機能解析を報告する。

高密度リポタンパク質(HDL)によるコレステロール逆転送系は末梢組織の余剰コレステロールを肝臓へと送り返す唯一の経路である。HDL は動脈硬化症とも密接に関連することから善玉コレステロールと呼ばれ、治療ターゲットとしても着目されている。HDL は ABCA1 と ABCG1 の 2 種類の脂質輸送型 ABC タンパク質によって形成されるが、ABCG1 については基質特異性など不明な点が多く、機能解明には精製標品を用いた生化学的解析が必須であった。本研究では精製したヒト ABCG1 を様々な脂質組成のリポソームに再構成して検討を行った。その結果、ヒト ABCG1 はコレステロールとスフィンゴミエリンを輸送基質として認識することが明らかとなった。さらに濃度依存性の詳細な検討から、コレステロールとスフィンゴミエリンの結合サイトは独立しており、協調的に機能することが示唆された。

MDR1 は様々な脂溶性化合物を細胞外へと輸送し、生体を有毒な化合物から保護している。また、癌の多剤耐性に関与し、投与薬物の体内動態に影響することから適切な医療という側面からも輸送機構解明は重要である。最近、我々が取得したヒト MDR1 のホモログ遺伝子の立体構造において、膜貫通ヘリックスの一部がほどけており、基質の取り込み経路として機能している可能性が示唆された。本研究ではヒト MDR1 について同様のメカニズムが存在するかを検討した。その結果、ヒト MDR1 では 4 番目と 10 番目のヘリックスが基質の取り込み経路となっている事が示唆された。また 4 番目と 10 番目のヘリックスを個別に固定した変異体では輸送基質に対する特異性が変化したことから、それぞれ異なる化合物を通過させる可能性が示唆された。更に予想される基質結合部位に存在するアミノ酸に変異を導入し、基質認識に重要なアミノ酸を同定した。

ABC transporter, membrane transport, purification

講演番号：4SY12-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:00～ C 校舎 04 会場

病原真菌における ABC タンパク質を介したステロール取り込み

Sterol uptake in pathogenic fungus Candida glabrata

○田辺 公一(国立感染研・真菌)
○Koichi Tanabe(NIID)

[背景]

ヒトに感染する病原酵母 *Candida glabrata* は、他の酵母と同様にステロール合成能を有するが、臨床ではステロールを合成できない変異株（ステロール要求性株）がしばしば分離される。このことは、「*C. glabrata*は感染時に宿主由来のコレステロールを利用して生育できる」ことを示唆している。

細胞外ステロール取り込みにかかわると考えられる ATP-binding cassette (ABC) protein である Aus1p に着目し、*C. glabrata* におけるステロール取り込み活性調節機構と生理的役割を明らかにすることを目的に研究を進めてきた。

[方法と結果]

C. glabrata と遺伝学的に近縁種である *Saccharomyces cerevisiae* は、嫌気条件でのみ細胞外のフリーステロールを取り込む。脂質分析の結果、*C. glabrata* においても、嫌気条件で細胞外のフリーステロールが菌体内に取り込まれ、*AUS1* 遺伝子破壊株（*aus1*Δ）ではステロール取り込みが消失することを明らかにした。嫌気条件以外のステロール取り込み活性化条件を検討した結果、鉄欠乏培地において *AUS1* の発現量が著明に増加し、ステロール取り込みが活性化されることを明らかにした。また、*C. glabrata* 野生株と *aus1*Δを用いてマウス感染実験を行い、*aus1*Δ感染マウスでは、腎臓における生菌数が野生型株感染マウスよりも顕著に低下していた。

[考察]

*aus1*Δ株を用いた実験より、Aus1p がステロール取り込みのために必須であることを明らかにした。鉄はステロール合成反応に必須の元素であるが、血液中では遊離鉄はトランスフェリンと強固に結合し、血中遊離鉄濃度は極めて低く保たれている。血流感染時の *C. glabrata* はステロール合成能が低下するために、鉄欠乏条件をシグナルとしてステロール取り込みを活性化させるのかもしれない。マウス感染実験の結果は、この仮説をさらに支持するものであり、宿主臓器内におけるステロール取り込みが *C. glabrata* の生存に重要な役割を果たしていることが示唆された。

yeast, sterol, ABC protein

講演番号：4SY12-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:30～ C 校舎 04 会場

リン代謝調節機序における NaPi トランスポーターの役割

The role of NaPi transporters in the phosphate homeostasis.

○瀬川 博子、宮本 賢一(徳島大院ヘルスバイオサイエンス研究部分子栄養学分野)
○Hiroko Segawa, Ken-chi Miyamoto(Institution of Health Bioscience, University of Tokushima Graduate School)

リンは骨の重要な構成要素であるだけでなく、細胞内で ATP などの高エネルギーリン酸化合物の構成成分としてエネルギー代謝の維持に必須の役割を演じている。また細胞膜のリン脂質を構成し、細胞膜機能の維持のうえでも重要な役割を果たしている。多くの生理機能を担うリンの生体内バランスは厳密にコントロールされており、この恒常性の破綻は生命の危険をも招く。とくに、慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease：CKD）における高リン血症は、骨病変が起こるのみならず，血管を含んだ全身の石灰化を介して生命予後に影響することが明らかとなり，近年，全身性疾患としての CKD に伴う骨ミネラル代謝異常が提唱されている。一方、遺伝性低リン血症性くる病など、成長期において、生体内のリンが不足する状態では、骨障害をはじめとする成長障害が見られる。血中リン濃度は腸管からの吸収、骨形成、骨吸収および、腎からの排泄と再吸収が様々な因子に応答し、そのバランスが保たれている。食事に含まれるリン含量、活性型ビタミン D、またリン利尿因子である副甲状腺ホルモン(Parathyroid hormone; PTH)や Fibroblast growth factor (FGF) 23 が中心的なリン吸収/再吸収調節因子である。長い間、リン代謝調節は PTH、ビタミン D、カルシトニンなどカルシウム調節ホルモンの付随的な作用として行われていると考えられてきた。しかしながら近年、新規リン代謝調節因子(FGF23, PHEX, Klotho, FRP4)などの関与が明らかとなりリン代謝調節機構の複雑さ、カルシウムとは独立した調節系の存在やリン感受機構の存在が考えられている。上記の調節因子と生体内リン濃度の調節に重要な役割を果たしているのが腸及び腎リントランスポーター分子(NaPi2a-2c/SLC34A1-3)である。我々は、リン代謝とトランスポーターの役割について、モデル動物等を用いて検討し、様々な報告を行ってきた。特に、SLC34A３はヒトにおいてその遺伝子変異により遺伝性低リン血症を引き起こすリントランスポーターである。本講演にて、ナトリウム依存性リン酸トランスポーターがかかわる生体内リン調節機構について概説する

transporter, phosphate homeostasis, (re)absorption

講演番号：4SY12-4
講演日時、会場：3 月 30 日 15:00～ C 校舎 04 会場

コレステロールおよび脂溶性ビタミンの腸管吸収
Intestinal absorption of cholesterol and fat-soluble vitamins

○高田 龍平、鈴木 洋史(東大病院薬)
○Tappei Takada, Hiroshi Suzuki(Univ. of Tokyo Hosp.)

生体内の脂質恒常性維持における腸管吸収の重要性は高く、脂質異常症などの生活習慣病の発症・治療との関連が注目されている。近年の研究から、腸管からのコレステロール吸収には Niemann-Pick C1-like 1（NPC1L1）というトランスポーターが重要な役割を担うこと、新規脂質異常症治療薬エゼチミブ（ゼチーア）は NPC1L1 を阻害することにより血清コレステロール値の低下をもたらすことなどが次々と明らかになった。しかしながら、コレステロール選択的なトランスポーターであると考えられていた NPC1L1 は、実はビタミン E をはじめとする複数の脂溶性ビタミンも輸送し、脂溶性ビタミンの体内動態制御において重要な役割を果たすことが、種々の *in vitro* 実験・*in vivo* 実験により示されている。本講演においては、基礎・臨床の両面から注目されているこれら一連の研究について、最新の知見も交えて紹介したい。

【参考文献】

1) Narushima K, Takada T, *et al*., *Mol Pharmacol*. 74(1):42-9 (2008).

2) Yamanashi Y, Takada T, *et al*., *Pharmacogenet Genomics*. 19(11):884-92 (2009).

3) Takada T, Suzuki H. *Mol Nutr Food Res*. 54(5):616-22 (2010).

4) 高田龍平, 鈴木洋史. *ビタミン*. 84(8):376-83 (2010).

5) 高田龍平. *栄養・食品機能とトランスポーター*. 167-82 (2011).

6) 高田龍平. *ビタミン*. 87(7):396-8 (2013).

transporter, cholesterol, vitamin

講演番号：4SY12-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:30～ C 校舎 04 会場

亜鉛トランスポーターの機能：亜鉛欠乏症の観点から

Physiological functions of zinc transporters: From the standpoint of zinc deficiency

○神戸 大朋(京大院生命)
○Taiho Kambe(Kyoto Univ.)

亜鉛は、タンパク質の構造や酵素の補因子、シグナル調節因子として重要な役割を果たす必須微量栄養素である。そのため、日々の食事より亜鉛を十分に摂取することは、健康の保持に重要となる。しかしながら、近年、栄養素が充足しているはずの先進国においても女性や高齢者を中心に亜鉛欠乏者の数が増加している。亜鉛欠乏に陥ると、味覚の変調や免疫機能の低下など一見すると亜鉛欠乏とは結びつかない多様な症状が現れ、重篤な場合には、下痢、脱毛、皮膚炎が著明な症例として現れる。本発表では、先天性亜鉛欠乏症の原因として同定された亜鉛トランスポーターの紹介を通じて、亜鉛の多岐に渡る生理機能や亜鉛トランスポーターの生体内での役割について概説したい。

生体内では、約 2g という極微量に存在する亜鉛を正常に代謝するために、20 種類を超える亜鉛トランスポーターが機能している。哺乳動物において亜鉛輸送に関与するトランスポーターは、全て Solute Carrier (SLC)に属しており、Zrt, Irt-related Protein (ZIP)と Zn transporter (ZnT) の二種類のグループに大別される。ZIP は細胞質の亜鉛量を増加させる向きに、一方の ZnT は、その逆の向きに亜鉛を輸送する。ZIP と ZnT の発現は、体内亜鉛レベルによって厳密に維持されているが、炎症などの様々な刺激に応じて、また、ガンや糖尿病などの疾患時において変動することも知られている。食事由来の亜鉛は、主として小腸より吸収されるが、その吸収過程には、小腸特異的に発現し、亜鉛状態（欠乏）に応じて頂端膜に蓄積する亜鉛トランスポーターZIP4 が機能する。*ZIP4* 遺伝子の変異は、先天性亜鉛欠乏症として知られる腸性肢端皮膚炎（Acrodermatitis enteropathica; AE）を引き起こす。これまでに、15 種類以上の変異が見出されており、これら変異によって、ZIP4 タンパク質に亜鉛輸送活性の喪失や頂端膜における発現量の低下、安定性低下などが引き起こされることが報告されている。我々は、ZIP4 のプロセシング（細胞外領域の除去）が AE を引き起こす遺伝子変異によって起こらなくなることを見出し、このプロセシングも ZIP4 の亜鉛輸送活性制御に重要であることを報告している。現在、プロセシングは、ZIP トランスポーターの重要な活性制御機構として注目を集めているが、その詳細な分子機構については明らかになっていない。また、先天性亜鉛欠乏症は、消化管からの亜鉛吸収能に異常のない乳児にも見出される。この場合に原因となるのは母親の母乳中の亜鉛量であり、亜鉛量の減少した母乳（低亜鉛母乳）を授乳された乳児は重篤な皮膚炎を発症する（Transient neonatal zinc deficiency)。最近、我々は、重篤な皮膚炎を発症した乳児の母親が低亜鉛母乳を分泌すること、さらに、その母親が亜鉛トランスポーターZnT2 の複合ヘテロ接合体であることを見出した。症例報告数から、日本人は他国に比べて低亜鉛母乳を分泌する母親が多いと予想される。また、乳幼児期の亜鉛不足が将来の健康を損なう危険性が懸念されているため、ZnT2 の機能と母乳中亜鉛との 関連については、さらに詳細な解析が必要である。亜鉛を活用した健康の維持・増進のためにも、個々の亜鉛トランスポーターの機能を分子レベルで明らかにすることが重要となっている。

zinc, transporter, zinc deficiency

講演番号：4SY12-6
講演日時、会場：3 月 30 日 16:00～ C 校舎 04 会場

網羅的定量オミクスによるトランスポーター研究の新しい展開

Comprehensive and quantitative "omics" bring up new world of transporter research.

○永森 收志、金井 好克(阪大院医)
○Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai(Osaka Univ. Grad. Schl. Med.)

トランスポーターの機能は、生体膜を介する物質輸送であり、培養細胞やアフリカツメガエル卵母細胞などの発現系や、膜小胞、再構成系などを用いた *in vitro* の輸送活性測定によって解析されてきた。しかし従来行われてきた研究は、輸送される基質を予想しそれを検証するといったものであり、恣意的な要素を排除できておらず、仮に輸送される基質を見いだせたとしてもそれが生体内における本来の基質であるとは限らず、またそのトランスポーターが生体内でどのような役割を担っているのかを明らかにすることは困難であった。近年、遺伝子操作技術の進歩により、細胞や個体レベルで特定のトランスポーターの発現を制御できるようになり、各々のトランスポーターの生体内での機能、生体における役割を研究することが可能になった。しかしながら、トランスポーターは一般に基質選択性が広く、また同種の基質を輸送するトランスポーターが複数存在するため、その生体内での機能を適格に捉えるためには、生体反応全体を対象とする測定、すなわち網羅的定量解析手法が必要となる。そこで、演者らは、近年著しく進歩した網羅的比較定量オミクス技術のなかでも、比較定量プロテオミクスおよび比較定量メタボロミクスをトランスポーター解析に最適化し、トランスポーターの生体での機能を捉える研究に取り組んでいる。すでに、比較定量発現プロテオミクスおよび比較定量リン酸化プロテオミクスを適用することで、細胞におけるアミノ酸シグナル機構を網羅的に解析し、アミノ酸トランスポーターLAT1 を介して取り込まれたアミノ酸が発動するシグナル系とそれによって制御される代謝系を明らかにしている。また、機能未知のオーファントランスポーターOAT-N1 のノックアウトマウスに対して比較定量メタボロミクスおよび比較定量発現プロテオミクスを用いることで、その生体内での真の基質を同定し、エネルギー代謝における役割を明らかにした。これらの実例を通して、トランスポーター研究の新たな方向性と、それを可能にする網羅的解析手法の実際について紹介したい。

transporter, proteomics, metabolomics

講演番号：4SY13-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:30～ B 校舎 03 会場

γ-グルタミル化合物の特徴とγ-グルタミル結合を生成できる様々な微生物酵素について

Characteristics of γ-glutamyl compounds and microbial enzymes that can synthesize γ-glutamyl linkage

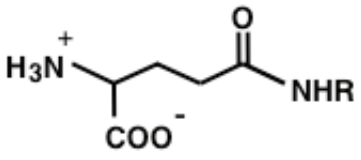
○鈴木 秀之(京都工繊大)
○Hideyuki Suzuki(Kyoto Inst. Technol.)

多くのタンパク質やペプチドは、アミノ酸がα−ペプチド結合により連なった構造をしていることから、α−ペプチド結合やα−ペプチド結合を持つ化合物（いわゆるペプチド）については、古くから研究が進んでいた。それに対して、グルタミン酸のγ位のカルボキシル基が他のアミノ酸のアミノ基との間でアミド結合した“γ−グルタミル結合”やγ−グルタミル結合を持つ化合物はあまり知られていなかったため、長い間注目されずにいた。しかし、実際には細菌のペプチドグリカンの一部を構成するペプチド鎖にはγ−グルタミル結合が存在しているほか、納豆のネバネバや炭疽菌の夾膜はポリγ−グルタミン酸が主成分であり、さらに生物細胞に普遍的に存在するグルタチオン（γ−グルタミルシステイニルグリシン）は、生物がつくりだす天然の還元剤として活性酸素の除去や生体異物の解毒など生体防御に深く関わっている。一方、γ−グルタミル化により、（１）水に難溶性物質の溶解度が劇的に改善できること、（２）血液中のペプチダーゼによって分解されることなく長時間血液中にとどまれるようになること、（３）優れた呈味性を持つようになることが明らかとなっている。このように、γ−グルタミル結合をもった化合物は、いわゆるイソペプチドの代表格として生物界において重要な位置を占め、ユニークな物性や生物活性をもつ非常に興味深い化合物群であることがわかってきた。γ−グルタミル化合物は、有用な機能を持ったバイオオリエンティッドな素材であり、まだまだ未知の生物活性が潜んでいる可能性が高い。

γ−グルタミル結合を生成できる酵素としては、γ−グルタミルトランスペプチダーゼ、トランスグルタミナーゼ、グルタミナーゼのほか、リガーゼであるグルタミン合成酵素、γ−グルタミルシステイン合成酵素、ポリ−γ−グルタミン酸合成酵素、γ−グルタミルプトレッシン合成酵素、γ−グルタミルメチルアミド合成酵素、テアニン合成酵素などが知られている。

本講演では、γ−グルタミル化合物の特徴とγ−グルタミル結合を生成できる酵素の性質について概括する。

Ref. H. Suzuki. Microbial production of amino acids and their derivatives for use in foods, nutraceuticals, and medications. *In* **Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals,** ed. by B. McNeil *et al.*, pp. 385-412, Woodhead Publishing, Cambridge, UK (2013).



γ-グルタミル化合物の構造

γ-glutamyl compound, γ-glutamyl linkage, microbial enzyme

講演番号：4SY13-2
講演日時、会場：3 月 30 日 13:55～ B 校舎 03 会場

ポリ-γ-グルタミン酸の合成と改質、並びに応用例について

Microbial Synthesis, Chemical Transformation, and Potential Applications of Poly-γ-Glutamate

○芦内 誠(高知大院農)
○Makoto Ashiuchi(Kochi Univ.)

ポリ−γ−グルタミン酸（ＰＧＡ）は、ナイロン様の主鎖骨格とポリアクリル酸に類似の構造特性をあわせ持ったポリアミド新素材である。加えて、生分解性やヒトへの安全性にも優れていることから、ＰＧＡの新たな用途展開や産業材料化に大きな期待が寄せられている。

ＰＧＡは「納豆の糸」の主成分として有名だが、その立体化学性を精査すると DL 混成型のポリマーであることが分かる。炭疽菌からは D ホモ型ＰＧＡ、また、極限環境微生物の一部が L ホモ型ＰＧＡを生産するとの報告もある。従って、生合成されるＰＧＡは大きく三つの異なるタイプ（D−ＰＧＡ；L−ＰＧＡ；DL−ＰＧＡ）に分けて考える必要がある。本講演では、主に納豆菌と炭疽菌のＰＧＡ合成を取り上げ、ＰＧＡ合成酵素複合体の構造と機能の比較、推定反応機構、並びに両者のＰＧＡ局在性の違い（分泌ポリマーか，莢膜結合ポリマーか）を演出する周辺酵素群を紹介するとともに、ＰＧＡの生理機能と合目的的な該合成システムとの関係性についても理解を深めていく。一方、L−ＰＧＡ関連の合成酵素及び反応機構については未だ推定の域を出ないものの、D 体を含むＰＧＡを合成する酵素種とは明らかに異なる構造的特徴を有している可能性が示唆されている。最新の知見を交えながら、L−ＰＧＡ生合成についても詳解していく予定である。

さて、ＰＧＡに期待される今日的な産業用途は多岐にわたっている。実際、公衆衛生・医療健康・環境農業等、様々な産業分野で実践的な応用研究が進んでいる。今回、その一端に触れるとともに、ありふれたバイオポリマーが先端機能材料へと昇華する過程を見据えながら、今後のバイオ新素材の開発に求められる視点、論点を浮き彫りにしていきたい。最後に、講演者らの研究グループが中心となって開発した画期的な「ＰＧＡの化学改質（Chemical Transformation）技術」について紹介する。元々は歯磨き粉の薬効成分“ﾍｷｻﾃﾞｼﾙﾋﾟﾘｼﾞﾆｳﾑｶﾁｵﾝ（ＨＤＰ$^{+}$）”とＰＧＡを混ぜるという単純な試みに端を発している。ＰＧＡのカルボキシル基とＨＤＰ$^{+}$で化学量論的な複合体が形成されることから、本（超分子）新素材のことをＰＧＡＩＣと呼んでいる。ＰＧＡＩＣには、純正ＰＧＡでは実現困難とされてきた有用材料機能がいくつも備わっていることが示された。実際、近代材料としての加工性・利便性を保証する「プラスチック性」、多様な材料（金属，セラミックス他）表面の被膜化に役立つ「高度接着性」、重大かつ魅力的な性能としては「抗真菌活性／ウイルス不活化能」まで示された。また、ＰＧＡＩＣは超分子材料であるため、該薬効成分（ＨＤＰ$^{+}$）の「徐放機能」にも期待できる。以上より、ＰＧＡＩＣの先端機能プラスチック素材としての応用性や用途展開について考察する。

Poly-γ-Glutamate, Microbial Synthesis, Chemical Transformation

講演番号：4SY13-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:20～ B 校舎 03 会場

gamma-Glu-Val-Gly の呈味特性
Taste Characteristics of gamma-Glu-Val-Gly

○宮村 直宏(味の素株式会社)
○NAOHIRO MIYAMURA(Ajinomoto Co., Inc.)

1990 年に上田らはグルタチオン（GSH ; γ-Glu-Cys-Gly）の味覚関連物質としての特性を初めて報告した（Ueda et al., 1990）。この報告で、それ自身呈味を発現しない濃度の GSH による、うま味塩味溶液やスープの「持続性」「厚み」「広がり」増強が示された。海外においても Hofmann らは同手法を用い、同様の効果を有する γ-Glutamyl ペプチド類を発見した（Dunkel et al., 2007; Toelstede et al., 2009; Toelstede & Hofmann,2009）。これらペプチドは、基本味物質とは別に「コク味」（“*kokumi*”）物質と呼ばれた。この研究成果を受けて、食品業界においては GSH を含む酵母エキスが調味料原料として使用されている。しかしながら、「コク味」物質の理解を進展させる受容機構が不明であった。

一方、我々はアミノ酸受容機構に関する研究の過程で、舌部にも存在するカルシウム感知受容体 (Calcium-Sensing Receptor ; CaSR）が、カルシウムのみならず、L-アミノ酸や GSH を含む数種のペプチドを受容することを見出し、CaSR が「コク味」物質を受容するという仮説を立て検証した。その結果、種々の CaSR 活性化物 ; CaSR アゴニスト（ヒスチジン、各種低分子ペプチド、プロタミン、ポリリジン、シナカルセット、カルシウム）に GSH と同様の効果が認められ、CaSR の「コク味」物質受容への関与が示唆された（Ohsu et al., 2010）。

また、γ-Glutamyl ペプチド類では、CaSR アゴニスト活性と官能上の「コク味」増強に有意な正相関が認められた。GSH の約 30 倍のアゴニスト活性を示す γ-Glu-Val-Gly は、GSH の 1/10 の濃度で GSH と同様のうま味・塩味・甘味増強を示した（Ohsu et al., 2010）。

現在、我々は食文化の異なる地域における「コク味」物質の効果を表現する用語の抽出を目的として、上記に示した γ-Glu-Val-Gly をチキンスープなどの各種食品に添加した際の効果について、記述分析型官能評価（Descriptive Analysis）を、日本のみならず、米国、東南アジアで進めている。これら官能評価の内容は、Kim らの GSH に関する評価結果（Jung, Hong &Kim,2010）と近い。その内容についても紹介する。

近年、味覚受容機構に関する分子生物学的解明が進展する中、基本味以外の「コク味」物質など味覚修飾物質に関しても、科学的エビデンスが加えられる状況が整いつつあると考えられる。多様な味風味に関して理解する感覚を有し、科学的な蓄積が深い日本が正確に本知見を探求し、普及させることによって、世界の味覚研究や人々の食生活向上に貢献できるのでは、と考える。

gamma-Glutamyl peptide, CaSR, kokumi

講演番号：4SY13-4
講演日時、会場：3 月 30 日 14:45～ B 校舎 03 会場

世界で通じるアミノ酸「テアニン」の製造技術とその多様な機能
Innovative Production and Functions of L-Theanine: Global market

○ジュネジャ レカ　ラジュ(太陽化学株式会社)
○Lekh R. Juneja(Taiyo Kagaku Co., Ltd.)

L-テアニン（テアニン）は、茶に多く含まれるアミノ酸の一種で、他の植物にあまりみられないユニークな成分である。

テアニンの製法に関しては、茶葉からの分離法、化学的合成法、茶細胞の組織培養法などが検討されてきたが、それらの製法はいずれも低収量、煩雑な工程、また高純度のテアニンが得られないなどの問題があり、製造コストは高くならざるを得なかった。我々は、微生物(*Pseudomonas nitroreducens*)由来グルタミナーゼのアミノ基転移反応を利用し、グルタミンとエチルアミンを基質として高純度のテアニンを安価に高効率で生産する方法を確立することに成功した。工業的生産技術が確立したことにより研究の素材として幅広く用いられ、機能性食品として様々な食品への応用が広がった。

テアニンはさまざまな健康効果が確認されている。テアニンの水溶液を摂取し脳波を測定したところ、30 分以降に気分がゆったりとした時に現れるα波が増加しリラックス効果が確認された。また、就寝 1 時間前にテアニンを摂取すると、中途覚醒割合の減少、起床時の疲労感の低減やリフレッシュ感の向上などが見られ、睡眠の質が改善する。さらに、集中力向上効果も確認されている。注意力および反応時間を確認する試験を行い、ともに経時的な変化率を見たところ、テアニン摂取群では、摂取後 30 分および 60 分で有意に変化率が改善した。その他、月経前症候群（PMS）や更年期障害など女性特有の症状に対する改善効果、学習能力向上など様々な生理作用について実証されている。テアニンの脳内での動きや自律神経系への作用などメカニズム解明とあわせて、最近の研究では、注意欠陥多動性症候群、社会的ストレス、統合失調症などへの効果が確認されてきている。

テアニンの安全性については、茶の飲用の歴史が長いことから経験的に認識されているが、変異原性試験、動物による単回投与急性毒性や90日間反復投与亜急性毒性試験およびヒト摂取試験を実施することで消費者が安心して口にできる素材として提供できるように努めてきた。

米国では FDA が認定する GRAS（Generally Recognized As Safe）審査において承認が得られ、韓国や台湾においても食品添加物として認可され、一般食品への広範な利用が可能となっている。現在、清涼飲料、サプリメント、菓子、乳製品など数多くの商品に採用されている。国内だけでなく、アメリカなど近年ますますストレスを抱えやすい社会となっている先進国での需要は飛躍的に伸びている。今後は、経済的に成長が見込まれる新興国における需要も増えると考えられる。

以上のように我々は工業スケールでの生産技術を確立し、世界ナンバーワン企業として「サンテアニン®(Suntheanine)」を商品化することに成功した。社会が求める“癒し”に対応できる食品素材の生産技術と研究開発を通し、国内外の食品業界に新しいコンセプト訴求できる製品としてテアニンを開発してきた。これからも新たな機能性の探求に挑戦していく姿勢で研究開発を行うよう努めていきたい。

enzymatic production, stress relief, FDA-GRAS approved

講演番号：4SY13-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:10～ B 校舎 03 会場

トランスグルタミナーゼによる食品のテクスチャー改良

Food texture modification by transglutaminase.

○熊澤 義之(味の素)
○Yoshiyuki Kumazawa(Ajinomoto)

食品のおいしさにおいて「食感」（テクスチャー）は重要な要素の一つである。テクスチャーの改良技術としては、加熱、加圧、撹拌等の物理的処理や増粘剤、ゲル化剤等の食品添加物によるものなどが挙げられるが、酵素的にも改良が可能である。本講演では、食品のテクスチャーを変化させることが可能であるトランスグルタミナーゼ（TGase；EC 2.3.13.2）について述べる。

TGase は、ポリペプチド鎖中のグルタミン残基のγ-カルボキシアミド基とリジン残基のε-アミノ基間の架橋結合を触媒し、ε-(γ-グルタミル)リジン結合（以下 GL 結合）を形成する酵素である。GL 結合を介してタンパク質中にネットワーク構造が生ずることにより、タンパク質溶液の粘性の増加やゲル化を起こすことが可能である。尚、GL 結合は酵素的に生成する以外にも、タンパク質の高温の乾熱処理により生成することも知られており、一般食品中にも広く分布している。GL 結合は、タンパク質の立体構造に重要な役割を果たしているジスルフィド結合と同様に共有結合であるため安定であり、タンパク質の物理的特性に大きく影響していると考えられる。

我々は天野エンザイム社との共同研究により、世界で初めて本酵素を産生する微生物を見出し、食品産業での実用化に成功した。微生物 TGase は、比較的広い温度帯やｐH に対して活性を発現し、食品を始め様々な応用分野が期待される酵素である。食品産業において既に商業化されているが、その製品形態は酵素原末に用途に応じた副原料を配合した粉末の酵素製剤である。主な食品と期待される効果としては、蒲鉾やカニカマ等の水産練り製品の弾力、しなやかさの付与、ハムやソーセージ等の畜肉加工品の硬さや歯ごたえ、肉粒感の付与、中華麺やうどん等麺類のコシや中芯感（アルデンテ様食感）強化や茹で伸び抑制、ヨーグルト等乳製品の濃厚感や滑らかさの付与などを挙げることができる。これらの食感改良の効果は、TGase によってタンパク質分子内、分子間に形成される GL 結合によるものである。実際の利用においては、一般的には酵素製剤を原料と水や各種調味料との混合工程で同時に投入することが可能であり、特殊な設備を追加する必要はない。ただし、酵素が反応し得るような温度帯で一定の保持時間は必要である。

タンパク質の物理特性は、ジスルフィド結合はじめ疎水性相互作用、イオン結合や水素結合など様々な相互作用、結合により影響を受けるが、特に食品の「食感」という観点から見たとき、TGase によるγ-グルタミル結合の形成は、反応制御によるコントロールが可能であり、極めて有用である。今後の更なる研究と用途拡大が望まれる。

texture, transglutaminase, ε-(γ-glutamyl)lysine

講演番号：4SY13-6
講演日時、会場：3 月 30 日 15:35～ B 校舎 03 会場

γ-グルタミルトランスペプチダーゼの構造と機能相関

Structural and functional analyses of γ-glutamyltranspeptidase

○和田 啓[1]、鈴木 秀之[2]、平竹 潤[3]、福山 恵一[4]([1]宮崎大テニュアトラック推進機構、[2]京都工繊大院工芸、[3]京大化研、[4]阪大院工)
○Kei Wada[1], Hideyuki Suzuki[2], Jun Hiratake[3], Keiichi Fukuyama[4]([1]Univ. of Miyazaki, [2]Kyoto Institute of Tech., [3]Kyoto Univ., [4]Osaka Univ.)

生体にとって必須の抗酸化物質であるグルタチオン（GSH; γ-Glu-Cys-Gly）は、グルタミン酸側鎖を介した特殊なペプチド結合（γ-グルタミル結合）を有し、一般的なプロテアーゼによる分解を受けない。γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) は、GSH のγ-グルタミル結合を切断する唯一とも言える酵素であり、GSH 代謝と生体異物解毒の初期反応を担う鍵酵素として抗酸化ストレスに決定的な役割を果たし、動脈硬化症や腎障害、パーキンソン病、ガン細胞の多剤耐性など広範囲の疾患に深く関与している。GGT は、いわゆる Ntn-ヒドロラーゼファミリーに属し、不活性な前駆体は自己触媒的プロセッシングにより活性型ヘテロダイマーに成熟する。また、GGT はグルタチオンなどのγ-グルタミル化合物からγ-グルタミル基を切断し、他のアミノ酸やペプチドに受け渡す転移反応とγ-グルタミル化合物を加水分解してグルタミン酸を生成する加水分解反応を触媒する。これらの反応はγ-グルタミル化合物から切り出されたγ-グルタミル基が GGT に結合した「γ-グルタミル酵素中間体」を経て進行すると言われてきた。本研究では、GGT の成熟過程から反応機構までを構造学的に追跡し、GGT の分子機構に迫った。

【酵素反応機構】
我々は基質の結合様式や反応機構の詳細を明らかにするために大腸菌 GGT の X 線結晶構造解析を行い立体構造を 1.9 Å 分解能で決定した。さらに GSH を含む溶液に短時間 (10 秒) 浸けた結晶を急速凍結させることにより「γ-グルタミル酵素中間体」をトラップし、その構造を実験的に明らかにした。

【成熟化機構】
変異導入により自己触媒的プロセッシングを起こらなくした前駆体GGTを調製し、その構造を決定した。前駆体GGTの構造から成熟化過程に伴う構造変化によって触媒ポケットが形成されることを明らかにした 。

【阻害剤結合様式】
古典的な GGT 阻害剤であるアシビシンの結合様式を、大腸菌 GGT を用いて決定し、阻害剤の構造変換を伴う新規な結合機序を提唱した。さらに、バクテリア GGT は一見すると同じ基質結合ポケットを持つように見えるが、枯草菌 GGT-アシビシンの構造からバクテリア GGT がもつ阻害剤結合様式の多様性が見えてきた。

本発表では、以上を踏まえて、本酵素の分子機構の全容を議論します。

glutathione, Ntn-hydrolase, X-ray crystallography

講演番号：4SY13-7
講演日時、会場：3 月 30 日 16:00～ B 校舎 03 会場

γ-グルタミルトランスペプチダーゼ阻害剤とグルタチオン制御　―アンチエイジング効果と創薬標的としての価値―
γ-glutamyl transpeptidase inhibitors and regulation of glutathione －anti-aging effect and drug target-

○平竹 潤[1]、小島（湯浅） 明子[2]、李 春杰[1]、渡辺 文太[1]、鈴木 秀之[3]、和田 啓[4]、福山 惠一[5]([1]京大化研、[2]大阪市大院生活科学、[3]京都工繊大応生、[4]宮崎大テニュアトラック、[5]阪大院工)
○Jun Hiratake[1], Akiko Kojima-Yuasa[2], Chunjie Li[1], Bunta Watanabe[1], Hideyuki Suzuki[3], Kei Wada[4], Keiichi Fukuyama[5]([1]Institute for Chemical Research, Kyoto Univ., [2]Osaka City Univ., [3]Kyoto Institute of Technology, [4]Miyazaki Univ., [5]Osaka Univ.)

γ-グルタミルトランスペプチダーゼ（GGT）は生体防御物質としてきわめて重要なグルタチオン（GSH）の代謝分解をつかさどる鍵酵素で、GSH および GSH 複合体のγ-グルタミル結合を加水分解する。生理学的には、生体異物の解毒代謝に加え、細胞の GSH 生合成に必要な Cys を供給する役割を果たしており、細胞内の GSH レベルは、その律速基質である Cys の供給によって大きな影響を受ける。したがって、ある種のガン細胞は GGT を高発現し、細胞の GSH レベルを上昇させることによって多剤耐性を獲得している。また、GSH は細胞の酸素呼吸や紫外線照射で発生する活性酸素種の除去にきわめて重要な役割を果たしているため、細胞内 GSH の減少は、酸化ストレスを引き起こす。

我々は、GGT の反応機構にもとづき、活性中心の Thr 残基と反応機構依存的に共有結合を形成し GGT を失活させる強力なホスホン酸型 GGT 阻害剤 GGsTop™を開発した。本化合物は、従来から GGT の非特異的な阻害剤として使われていた天然物 acivicin に比べ、ヒト GGT を 120 倍以上の速さで失活させる強い阻害活性があることに加え、GGT 特異的で他の酵素（glutamine amidotransferase 等）を阻害しないため、acivicin とは異なり、全く毒性がなく安全で使いやすい阻害剤である。

興味深いことに、GGsTop™をヒト皮膚線維芽細胞に与えると、20 μM まで濃度依存的に成熟 I 型コラーゲンの産生量を最大で 3 倍に亢進させる生物活性があることが判明した。それ以上の濃度の GGsTop™を与えてもコラーゲンの増大には変化がなかった。また、コラーゲンのみならず、弾性線維のエラスチン、コラーゲン特異的シャペロンである HSP47 の産生も 1.5 倍程度増やす働きがあること、紫外線照射による活性酸素種の消去に効果があること、ヒト皮膚角化細胞の遊走・増殖を促進する効果をもつことがわかった。さらに、ヒトモニター試験の結果、顔肌の肌弾力と角質水分含量を有意に増大させる *in vivo* 効果が確認された。そこで、徹底的な安全性試験を経て、アンチエイジング化粧品の新成分として実用化するに至った。GGT 阻害剤の一連の生理作用は、GGT の阻害により細胞への Cys 供給が一時的に滞ることで細胞内 GSH の一過性低下を引き起こし、これが引き金となって、細胞自身のもつ抗酸化ストレス応答（おそらく Nrf2 系）が誘導されたことによるものと考えられる。

最近、ヒト GGT の活性中心のうち、GSH の C 末端カルボキシ基を認識する残基に注目し、その残基と特異的に相互作用する官能基を組み込んだカーバメート系の第二世代の GGT 阻害剤を開発したところ、GGsTop™に比べ、約 700 倍の非常に強い阻害活性を示す新しい化合物を開発することに成功した。GGT 阻害による抗酸化ストレス応答の誘導と、薬物標的としての GGT の可能性について議論したい。

γ-glutamyl transpeptidase, mechanism-based inhibitor, glutathione metabolism

講演番号：4SY14-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:35～ B 校舎 02 会場

心的外傷性ストレス障害のメカニズム解明に向けた臨床研究と基礎研究の融合

Integration of basic and clinical researches to elucidate the mechanism of posttraumatic stress disorder

○富田 博秋、俞 志前、笠原 好之、小野 千晶(東北大災害研)
○Hiroaki Tomita, Zhiqian Yu, Yoshiyuki Kasahara, Chiaki Ono(Tohoku Univ. IRIDeS)

人は予期せぬ形で突然、危うく死ぬ、または、重症を負うような出来事に巻き込まれると、その体験の際に心に加えられた衝撃が心的外傷として残り、様々なストレス反応を引き起こす。その反応は心的外傷後ストレス反応(PTSR)と総称され、臨床上、(1) 意思に反してその体験の記憶が意識に侵入する、追体験をする、悪夢をみる、(2) 体験に関連する物事を回避する、(3) 記憶や感情が変容する、(4) 不眠、精神的不安定などの過覚醒状態を来すの 4 つのクラスターに分けて考えられる。PTSR が顕著に頻発して生活に支障を来す状態が 1 ヶ月以上持続する場合、心的外傷後ストレス障害(PTSD)と呼ばれる。東日本大震災のような大規模自然災害が生じると、一度に多くの人が心的外傷性の体験をし、その後、長期に渡って心的外傷後ストレス反応を呈する。心的外傷後ストレス反応や災害関連のストレスを的確に捉え、適切なサポートに結び付けていくことは重要な課題である半面、これらのストレスの影響を捉えることは容易ではない。一方、心的外傷後ストレス反応や各種ストレスは脳画像や交感神経系、視床下部・下垂体・皮質副腎皮質系、免疫系の変化などの身体的な所見に影響が及ぶことが知られている。これらの客観的な指標として、心的外傷後ストレス反応や災害関連のストレスが現時点でどのような影響を心身に呈しているかを評価したり、今後どのように転じやすいかを予測する手法を確立することは有用と思われる。また、恐怖記憶の過度な再固定化(reconsolidation)や恐怖記憶の消去(extinction)不全が PTSD の病態を説明するモデルと考えられ、マウス等による動物研究によりそのメカニズムの解明が進んでいる。マウスモデルは電気刺激への暴露後に恐怖記憶の想起時間が短い場合は恐怖記憶の再固定化が促進され、長い場合は恐怖記憶の消去が誘導される。これらのモデル動物を用いた基礎研究は、臨床的にみられる PTSD の全てを説明することはできないまでも、そのメカニズムを解明していく上で重要なアプローチであり、基礎研究と臨床研究を如何に統合していくかが疾患の本態の理解や有効な治療法、支援法の確立に必須となる。本演題では災害による心的外傷後ストレス反応の生物学的研究の現況と今後の展望につき演者の取り組みも交えて概説を行う。

posttraumatic stress disorder, microendophenotype, fear conditioning

講演番号：4SY14-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:10～ B 校舎 02 会場

多価不飽和脂肪酸と統合失調症

Polyunsaturated fatty acids and schizophrenia

○吉川 武男、前川 素子(理研 BSI)
○Takeo YOSHIKAWA, Motoko MAEKAWA(RIKEN BSI)

統合失調症は、思春期以降好発する精神疾患の中でも最も重篤であり、発症頻度も約１％と決して少なくない。発症病理の詳細は未だ不明であるが、遺伝学的にも環境的にも脳発達期の微細な侵襲が将来の顕在発症の脆弱性を形成すると考えられている。前者は、リスク遺伝子の多くが脳の発達期に発現開始・増加を示し、後者については、母体や胎児が受けるさまざまなストレスイベントがリスク要因となっているという疫学データの蓄積がある。

リスク環境要因の１つとして、母体が曝された飢饉の大規模事例が２つ報告されている。１つは、第二次世界大戦末期にアムステルダムで起こった”Dutch Hunger Winter”であり、もう１つは、1959 年から 1961 年にかけて中国全土を襲った大飢饉で、安徽省蕪湖での疫学データが解析された。両事例とも、飢饉のさなかに母胎にいた子供がその後統合失調症を発症した割合は約２倍と報告されている。

近年、統合失調症のミエリン仮説に関連して、栄養素として必須脂肪酸の役割が注目されている。我々は、妊娠の２週間前から離乳期までの間、母マウスにアラキドン酸（arachidonic acid: AA)、ドコサヘキサエン酸（docosahexaenoic acid: DHA）欠乏食を与え、生まれてきた仔マウスには通常食を与えた「脳発達期必須脂肪酸欠乏マウス」を作成した。対照群は、母マウスにも通常食を与えたものである。

「脳発達期必須脂肪酸欠乏マウス」は、成体になったときの行動はヒトの軽度精神病状態、あるいは精神病前駆状態に対応すると考えられる表現型を示し、遺伝子発現では複数のミエリン関係の遺伝子発現レベルが低下していた。前者はモデルとしての「表面妥当性」、後者は「構成妥当性」と考えることも可能であると思われる。

ミエリン関連の遺伝子発現レベル低下の「上流メカニズム」を探るため、発現制御に関わると思われる転写因子群の発現量を調べたところ、対照群に比較して低下していた。この低下の原因を探るべく、発現量の低下していた転写因子遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化状態を調べたところ、メチル化が亢進している所見を得た。脳発達期の栄養状態と DNA メチル化状態の因果関係はなお不明ながらも、エピジェネティックスマークを刻印していることが示唆された。

polyunsaturated fatty acid, schizophrenia, mouse

講演番号：4SY14-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:45～ B 校舎 02 会場

多価不飽和脂肪酸・コレステロールと心的外傷後ストレス障害のリスク：食事療法による一次予防に向けて

Polyunsaturated fatty acids, cholesterol and the risk of posttraumatic stress disorder: Taking a nutritional approach toward universal prevention

○松岡 豊(国立精神・神経医療研究センター)
○Yutaka Matsuoka(National Center of Neurology and Psychiatry)

命の安全を脅かされたり、大怪我をしたりする等の心的トラウマに曝された後に生じる精神的後遺症に心的外傷後ストレス障害（ＰＴＳＤ）がある。わが国では阪神淡路大震災と地下鉄サリン事件という二つの出来事を契機として広く注目され、先の東日本大震災・福島原子力発電所事故の経験を通じてもＰＴＳＤの重要性はあらためて認識されている。心的トラウマは突然予告なく発生するのでそれを防止することは困難である。ＰＴＳＤの発症に影響を与えるものとして、様々な人口動態学的、心理社会的そして神経生物学的因子が検討されているが、食事・栄養の役割については明らかになっていない。

脂質は、糖質やたんぱく質と並ぶ三大栄養素の一つであり、細胞膜をはじめとする生体膜の主要構成成分、エネルギー産出の主要基質となる。ω３系及びω６系多価不飽和脂肪酸は体内で合成できないため経口摂取な必須脂肪酸である。コレステロールはステロイドホルモンや胆汁酸の合成に必須の材料である。そしてトリグリセリドはエネルギー貯蔵と供給という役割がある。すなわち脂質は生命活動において極めて重要な栄養成分である。近年、精神疾患の病態解明において、栄養成分との関連に注目が集まっている。

我われは先に、交通外傷患者の長期的な精神健康を追跡する前向きコホート研究（Matsuoka et al, 2009）を実施した。今回、その既収集データを活用し、ベースライン時点の血清と６カ月時点に構造化診断面接で評価したＰＴＳＤ診断との関連を検討する解析を行った。その結果、事故直後ベースライン調査時に採取した血清中のエイコサペンタエン酸及びアラキドン酸値が高いほど、事故６か月時点のＰＴＳＤ発症リスクが低くなること（Matsuoka et al, 2013）そしてＨＤＬコレステロール値が高いほど事故６か月時点のＰＴＳＤ発症リスクが低くなること、トリグリセライド値が高いほどＰＴＳＤ発症リスクが高くなること（Hamazaki et al, 投稿中）を見出した。これらの所見は、食事療法という新しいアプローチを適用することによる、ＰＴＳＤの一次予防の可能性を示唆する。

Posttraumatic stress disorder, Polyunsaturated fatty acids, Cholesterol

講演番号：4SY14-4
講演日時、会場：3 月 30 日 15:20～ B 校舎 02 会場

抗酸化ビタミンの欠乏と不安行動

Anxiety-related behavior under antioxidant vitamin deficiency

○竹中 麻子(明治大農)
○Asako Takenaka(Meiji Univ.)

ビタミンは食事からの摂取が必要な栄養素であり、摂取量の不足によって欠乏症を発症する。したがって、それぞれのビタミンの必要量は欠乏症のような身体への影響を基準として決められている。一方で、ビタミン摂取の不足は身体だけでなく精神活動にも影響をおよぼす可能性が指摘されている。本講演では、抗酸化ビタミンの欠乏がラットの行動と脳機能におよぼす影響について、われわれが得てきた知見を中心に概説したい。

［抗酸化ビタミンの欠乏と不安行動］

脂溶性ビタミンの 1 つであるビタミン E を含まない飼料でラットを飼育すると、1～2 週間で高架型十字迷路試験における不安行動が増加した。ビタミン E 欠乏 1 ヶ月による不安行動は抗不安薬で抑制することができ、ビタミン E の 1 週間程度の再給餌によって回復した。ビタミン E 欠乏症として運動失調が知られているが、不安行動が増加したラットでもロータロッド試験や迷路試験の運動量における運動機能の低下はみられなかった。さらに、ビタミン C 合成能が欠如した ODS ラットにビタミン C の欠乏食を摂取させると、3～7 日間でラットの不安行動が増加した。また、ビタミン E 欠乏時のビタミン C 摂取やビタミン C 欠乏時のビタミン E 摂取は、不安行動の抑制効果があった。したがって、抗酸化ビタミンの不足は、欠乏症のような身体症状が現れる前にラットの不安行動を増加させると考えられた。

［不安行動増加と脳機能］

ビタミン E 欠乏時には行動解析直後の血中グルココルチコイド濃度の増加がみられたことから、不安行動の増加とグルココルチコイドの関連性が予想された。そこでグルココルチコイドの分泌臓器である副腎を除去したラットで行動解析を行った結果、ビタミン E 欠乏による不安行動の増加がみられなくなった。一方、副腎除去したラットにコルチコステロンを投与すると不安行動が増加したが、この増加はビタミン E 欠乏の影響を受けなかった。この結果から、ビタミン E 欠乏による不安行動増加は血中グルココルチコイド濃度の上昇を介していると考えられた。副腎からのグルココルチコイド分泌は、視床からの CRF 分泌、下垂体からの ACTH 分泌による HPA 軸によって制御されている。ビタミン E 欠乏ラットではストレスに応答したコルチコステロン分泌が高いが、ACTH 投与や CRF 投与によるグルココルチコイド分泌は高くなかった。一連の結果から、抗酸化ビタミンの欠乏は HPA 軸を制御する脳機能に影響を与える可能性が考えられた。

vitamin E, vitamin C, anxiety

講演番号：4SY14-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:55～ B 校舎 02 会場

脳栄養学的観点からの精神疾患のマイクロエンドフェノタイプ
Nutrient factors and microendophenotypes of psychiatric disorders
○喜田 聡[1,2]([1]東農大応生科、[2]CREST, JST)
○Satoshi Kida[1,2]([1]Tokyo Univ. Agriculture, [2]CREST, JST)

精神疾患は遺伝要因のみならず、環境要因との複合要因により発症する。しかし、精神疾患の発症メカニズムは未解明であり、しかも、精神疾患では脳内に異常が生じていることは明らかであるものの、その病態すら明確にされていないのが現状である。精神疾患には、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患における老人班や細胞死のような容易に目で観察される病態は発見されておらず、一方、環境要因が関与するため、ゲノム解析のみで精神疾患の原因を明らかにすることも困難である。以上の点から、精神疾患の病態は神経回路、シナプス、ニューロン、ニューロン内微細領域における分子動態に潜んでいることは明らかである。そのため、精神病態の分子動態・細胞・回路レベルの表現型、すなわち、「精神病態のマイクロエンドフェノタイプ」を同定することが、今後の精神疾患研究に重要であるものと考えられる。

精神疾患発症の原因となる環境要因として、社会的ストレスや恐怖体験などが知られているが、我々の食生活（栄養状態）もその一つである。しかし、精神疾患発症に対する栄養状態の影響に関しても、生物学的な研究がほとんど進展していない状況であり、今後の重要な課題となっている。一方、現在の神経科学分野の進展は目覚ましく、遺伝学、電気生理学、分子生物学、行動学、イメージングなど多彩な手法を組み合わせて脳機能を統合的に理解することは世界的主流である。このような手法を活用して、様々な栄養条件で飼育したマウスやラットを解析することも可能である。以上の背景の中で、我々は、マウス遺伝学的手法と栄養学的手法を用いて、脳機能に対する必須栄養素の役割とその作用メカニズムを解明し、研究を進めてきた。本発表では、脳機能制御に対するビタミン A やビタミン B1 の役割を紹介し、これら必須栄養素と脳機能との関連性を議論する。

microendophenotype, psychiatric disorders, Nutrient factor

講演番号：4SY15-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:30～ B 校舎 04 会場

mRNA flux からの見た酵母のストレス耐性と発酵能の改良

Improvement of yeast stress tolerance and fermentation activity by mRNA-flux modification

○井沢 真吾(京都工繊大)
○SHINGO IZAWA(Kyoto Inst. Technol.)

出芽酵母をはじめとする真核生物の場合、ある種のストレス条件下では選択的な mRNA の核外輸送と翻訳制御が行われ、ストレスへの対処に急ぎ必要とされる遺伝子を優先的に発現することが知られている。たとえば、熱ショック条件下の酵母では大部分の mRNA の輸送が抑制されて核内に蓄積する一方で、ヒートショックプロテインをコードする *HSP* mRNA は優先的に細胞質側へと運ばれ効率的に翻訳される(Saavedra *et al*., *Genes Dev.*, 1996; Izawa *et al*., *J. Biol. Chem.*, 2004)。また、細胞質側でも、それまで翻訳されていた大部分の mRNA が RNA 結合タンパク質とともに P-body や stress granule を形成してリボソームから隔離される。P-body や stress granule の形成により、ストレスへの対処に必要とされる mRNA に翻訳装置が優先され、効率的・選択的な翻訳を可能にしている(Buchan *et al*., *J. Cell Biol.*, 2008)。このように、酵母細胞がストレスへの対処に必要とされる遺伝子の発現に注力することから、翻訳が抑制されるストレス条件下でも優先的に翻訳される mRNA はストレスへの適応や耐性獲得において真に必要な遺伝子だと考えられている。

しかしながら、熱ショック以外のストレス種では、どのような mRNA が優先的に翻訳されるのかよくわかっていないのが現状である。興味深いことに、熱ショック、エタノールストレスともに *HSP* 遺伝子の転写は活性化するが、熱ショック下で *HSP* mRNA の輸送と翻訳が優先的に行われるのに対し、エタノールストレス下では *HSP* mRNA は核内に蓄積してしまいほとんど翻訳されないことが明らかにされている(Izawa *et al*., *Biochem. J*., 2008)。そのため、ストレスによって転写活性化される遺伝子が必ずしも優先的に翻訳されている訳ではなく、転写から翻訳に至る一連の流れ(mRNA flux)でストレス応答をとらえることが酵母のストレス応答の解析では重要である。

一方、廃材や稲藁などをはじめとする木質・草本系バイオマス（リグノセルロース系バイオマス）から生産される第二世代バイオエタノールは、食糧資源と競合しないことや未利用資源の有効活用という点で、今後の規模拡大が期待されている再生可能な石油代替エネルギーである。しかし、バイオマスの前処理過程でバニリンやフラン化合物などの発酵阻害物質が副産物として生じてしまい、酵母の生育や発酵能を著しく抑制・阻害することが大きな問題となっている。 近年、発酵阻害物質による翻訳活性の抑制が生育阻害の一因となっていることが明らかになってきた(Iwaki *et al*., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2013; Iwaki *et al*., *PLoS One*, 2013)。また、エタノールや酸などの発酵関連ストレスも翻訳抑制を誘導することが報告されている(Iwaki and Izawa, *Biochem. J*., 2012)。これらの発酵関連ストレス下では大部分の mRNA の翻訳が抑制される一方で、ストレスへの適応や耐性獲得の上で重要な mRNA が選択的に翻訳されている。このような背景を踏まえて演者らは、mRNA flux の改変を通じて酵母アルコール発酵能の改善に取り組んでいる。バニリンなどの発酵阻害物質やエタノールストレス存在下でも優先的に翻訳される mRNA の同定とその活用などについて、最新の知見を紹介する予定である。

mRNA flux, vanillin, furfural

講演番号：4SY15-2
講演日時、会場：3 月 30 日 13:55～ B 校舎 04 会場

核酸アプタマーによる低分子カビ毒パツリンの新規検出系の開発

Development of a novel method for the detection of food borne mycotoxin using nucleic acid aptamer

○森田 悠治[1]、冨田 康之[1]、菅 裕明[2]、藤原 大介[1]([1]キリン（株） 基盤技術研究所、[2]東京大学 理学系研究科)
○Yuji Morita[1], Yasuyuki Tomita[1], Hiroaki Suga[2], Daisuke Fujiwara[1]([1]Kirin Company, Ltd., Central Laboratories for Key Technologies, [2]The University of Tokyo)

【背景】近年、核酸には遺伝子としての機能に加えて様々な新たな機能が次々と見つかり始めている。タンパク質同様に高次構造を形成することで抗体的機能（aptamer）や酵素的機能（ribozyme、DNAzyme）を持った核酸の発見もその１つである。核酸アプタマーは安価な製造が可能である、乾燥状態での保存安定性が高い等、抗体にはない利点を持っている。また、抗体が比較的苦手とする低分子化合物に対する結合も可能なことから、先行して開発がスタートしている核酸医薬に加えてアプタマーを用いた低分子化合物に対するナノセンサーの開発にも注目が集まり始めている。
【研究目的】上記のような背景のもと、簡易検出系が望まれているが有用な抗体が取得されていない低分子化合物の代表としてカビ毒パツリンを取り上げた。パツリンは、*Penicillium expansum* 等のカビによって産生され、健康被害を有する危険性のあるカビ毒である。パツリンの検出方法としては HPLC や LC/MS 等の機器分析が用いられているが、on site/リアルタイムに検出できる簡易分析系の開発が切望されている。そこで、我々はパツリンアプタマー及びそれを用いた検出系の開発を行った。
【方法及び結果】①自己切断リボザイムの利用：通常、アプタマーセレクションにはターゲット化合物の固定化が必要である。しかし、低分子化合物の場合、固定化に必要な誘導体化によって構造が大きく変化してしまうことがしばしば特異的アプタマー取得を困難にする要因となる。そこで、我々は自己切断リボザイムとランダム配列を組み合わせることで、誘導体化することなくセレクションを可能にした。その結果選抜された配列は、ターゲット分子であるパツリンがアプタマー部位に結合することで全体の構造変化が起こり、アロステリックな自己切断活性を示した。②アプタマーアレイ：さらに我々は低分子に対するアプタマーを効率的に探索する方法として、上記方法に加えて、酸化還元 DNAzyme とコンピューター上で設計した配列を連結させたアプタマーアレイについても独自に開発した。本手法はターゲット結合に伴う酸化還元反応をアレイ上で検出することによってアプタマー選抜を行う手法であり、この方法によってもパツリンアプタマーの取得に成功した。さらにシミュレーションとしてパツリンを人為的に混入させたりんごジュースからの検出についても検討を行っている。

以上のように、我々はパツリンをモデル化合物としてアプタマーの取得を試み、低分子に対する簡易検出系構築の可能性を検証した。今後の産業応用の可能性についても合わせて議論したい。

aptamer, ribozyme, mycotoxin

講演番号：4SY15-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:20～ B 校舎 04 会場

接ぎ木と siRNA 篩管輸送による品種改良

Crop improvement by grafting and siRNA phloem transport

○原田 竹雄、北條 初音、葛西 厚史(弘前大学農学生命科学部)
○Takeo Harada, Hatune Houjyo, Atsushi Kasai(Hirosaki University)

植物において siRNA は原形質連絡糸を通る Cell-to-Cell の移動および篩管を介した長距離輸送の両者によって Non-Autonomous に機能できる。後者の場合はシンク - ソースの流れに依存して輸送され、その輸送先で RNAi を発動する。そこで、我々は siRNA の産生と RdDM（RNA directed DNA Methylation）の発動場所を別個とすることで外来遺伝子（DNA）を残さずにエピジェネティック変異を発動させるシステムを構築した。

先ず、35S：GFP 導入タバコを使用して 35S プロモーター配列の siRNA 産生コンストラクトを一過的発現系であるアグロインフィルトレーション法、または、これを導入した形質転換体を接ぎ木することで、新展葉（シンク）における RdDM ならびに TGS（Transcriptional Gene Silencing）を発動させることが可能であることを証明した。この場合、siRNA の篩管輸送の起点である伴細胞特異的プロモーターの使用により TGS 発動を高めることに成功した。一方、穂木からの siRNA 輸送により、台木の根に TGS を発動できるが、主根に比べて側根においては TGS 発動は根端分裂組織を含め全細胞に認められた。この理由を形態学的に検討したところ、主根においては篩管隣接細胞に TGS が発動するが、側根は篩管細胞に隣接する内鞘細胞より de novo に形成されることで、その全域が TGS となることが判明した。そこで、siRNA 産生の個体を穂木として台木の側根から再分化個体を得ることでエピ変異体を獲得できる技術を開発した（国際特許出願）。獲得された 35S:GFP の TGS エピ変異体は 6 世代を通して GFP 蛍光消失が安定して持続されている。また、ターゲット遺伝子をトマトのある内生遺伝子プロモーターとする同様の実験を行ったところ、側根の内生遺伝子にも TGS が発動できたことを確認した。

以上のように、特定遺伝子のプロモーター配列の siRNA を産生する個体を穂木とすることで、そのターゲット領域のメチル化を介して、TGS を誘導することができる。一方、生殖細胞においては DNA メチル化の状態が初期化されて脱メチル化される場合とメチル化がリセットされる場合があり、siRNA 産生コンストラクトを有しない次世代には、TGS が安定して継承されない例も知られている。そこで。生殖細胞を経ない栄養繁殖性植物ではエピジェネティック状態が安定して継承される可能性が高い。栄養繁殖性植物においてエピ変異を人為的に作出することが、品種改良技術として活用できると考察される。

ジャガイモにおいては特定遺伝子の PTGS (Post Transcriptional Gene Silencing)による品種改良体が作出されているが、これらは組換え体（GM: Gene Modified）作物である。これに対して、著者らの方法である「接ぎ木と篩管輸送 siRNA により作出されるエピ変異体」には使用した siRNA 産生コンストラクトは含まれないことから、従来の GM には相当しなく、新たな品種改良法となる。

epi-mutant, grafting, siRNA

講演番号：4SY15-4
講演日時、会場：3 月 30 日 14:45～ B 校舎 04 会場

RNA を用いた新奇害虫防除法の開発

Development of a novel pesticide using RNA

○佐藤 豊、新美 輝幸、吉岡 博史(名大院生命農)
○Yutaka Sato, Teruyuki Niimi, Hirofumi Yoshioka(Nagoya Univ.)

爆発的な人口増加に伴い世界規模での食糧不足が緊迫するなか、驚くべきことに農作物の約３分の１が病害虫等により消失していることが国連食糧農業機関によって報告されている。言い換えれば、適切な害虫管理によって、害虫による食害を減少させることが可能になれば、それだけで膨大な食糧増産が見込まれる。従って、世界規模での食糧増産を果たす上で、いかに害虫を管理するかは非常に重要な問題である。しかしながら、その対策として既存の害虫防除法では化学農薬が主に使用され、農薬市場は世界中で年間約 3 兆円の市場規模に膨らんでいる。毒劇物である化学農薬は害虫に対する特異性が低く、人間や家畜に対する安全上の問題および環境に対する負荷が大きい。これに対し、現在では資源の循環に基づいた持続的な社会の形成が求められており、環境に配慮した害虫防除法の確立、特に生物農薬の利用は今後ますます重要な位置を占めると考えられている。また、化学農薬に依存する従来の害虫防除法では、昆虫生理機構の新たな作用点に有効な新奇薬剤を開発しても、昆虫はその薬剤に対する抵抗性を短期間のうちに発達させてしまうことが大きな問題となっている。持続的な農業生産を目指す上で、既存の害虫防除法の限界を打破する必要があり、これまでとは全く異なる原理に基づく新たな害虫防除法の開発を行う必要がある。演者らは、二本鎖 RNA を害虫に摂食させることにより害虫に RNAi を誘導する画期的な方法を発明し、RNAi に基づき生存に必須の遺伝子の機能阻害をもたらす RNA を“RNA 農薬”と命名した。そこで、害虫制御の RNAi のターゲットとして、プログラム細胞死を抑制し生存に必須のアポトーシス阻害因子（inhibitor of apoptosis; IAP）に着目し、*iap* 遺伝子をジャガイモ害虫であるニジュウヤホシテントウからクローニングした。その配列に基づいて合成した二本鎖 RNA（dsRNA）を塗布したジャガイモ葉を摂食した幼虫は、摂食が迅速に停止し、早期に致死に至ることが明らかとなった。RNA 農薬は、RNAi に基づく配列の特異性が厳密であるため、これまで不可能であった種特異的な殺虫剤の開発も可能となる。また、共通した配列の選択、あるいは dsRNA の混合により、ターゲットとする害虫種の適応範囲を任意に設定することも可能である。現在、この現象の分子メカニズムの解析および各種害虫に対する RNA 農薬の有効性について検討を行っている。本シンポジウムでは、害虫防除に向けた昆虫における RNAi 法およびプログラム細胞死に関する最近の解析結果および RNA 農薬の今後の展望について紹介したい。

RNA, pesticide, IAP

講演番号：4SY15-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:10～ B 校舎 04 会場

mRNA のエンジニアリングに基づく動物細胞の遺伝子発現制御系

mRNA engineering for controlling gene expression in mammalian cells

○遠藤 慧[1]、齊藤 博英[1,2]([1]京都大 iPS 研、[2]京都大白眉)
○Kei Endo[1], Hirohide Saito[1,2]([1]CiRA, Kyoto Univ., [2]Hakubi center, Kyoto Univ.)

動物培養細胞に対して任意の遺伝子を導入し、発現制御する技術は、再生医療や細胞療法など対象細胞の運命を人為的に操作し、産業利用しようとする試みにとって非常に強力な技術といえる。しかし従来の DNA 分子を中心とした遺伝子工学技術は、細胞に導入した DNA 分子がホスト細胞のゲノム DNA を意図せず損傷する危険があり、特に、細胞をクローニングできない状況で利用する場合に問題となっている。一方 mRNA 分子は、任意の遺伝子のアミノ酸配列を保持するだけでなく、原核生物の代謝制御などにみられるリボスイッチのように、細胞内の様々な標的因子に結合する配列を保持することができる。その結果、単一の mRNA 分子を用いることで、細胞内因子に応答した遺伝子発現制御を実現できる。さらに、タンパク質因子に応答してタンパク質因子を出力する mRNA を設計し、それらを組み合わせることによって、生物のゲノムにプログラムされているような複雑な遺伝子回路を構築できると期待される。我々はこのような mRNA の可能性に着目し、特に医療分野への応用を目指して DNA 分子に依存しない遺伝子工学技術の開発に取り組んでいる[1–3]。

人工 mRNA の細胞内因子への応答性能は、mRNA と細胞内因子の結合親和性に大きく依存し[2]、この応答性能を調節するためには、標的因子に対して様々な親和性を持つ RNA 配列が多数必要になる。また、同じ因子に対する応答であっても、出力遺伝子の抑制と活性化を実現するには、異なる RNA 配列や異なる分子機構を利用する必要があった。そこで我々は、mRNA の構成を改変することによって、標的因子と mRNA の親和性を改変することなく、応答性能を調節する技術や、出力の抑制から活性化へと逆転させる技術を開発した[3]。mRNA の性能を *cis* 因子のみで調整する本技術は、1 つの制御因子が多数の遺伝子を同時に、かつ個別に制御することを可能にし、mRNA 応用の汎用性を高めるだけでなく、多数の構成因子からなる遺伝子回路の構築を容易にすると期待される。

さらに我々は、試験管内で合成した mRNA を細胞に導入した場合にも、外来遺伝子の発現を同様に制御することに成功している。導入された mRNA による細胞内部状態の検知技術や、導入された mRNA で構成される遺伝子回路について、ごく最近の研究成果をあわせて報告したい。

1. Saito, H., *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, **6**: 71–78 (2010), Saito, H., *et al.*, *Nat. Commun.*, **2**: 160 (2011)
2. Stapleton, J.A., *et al.*, *ACS Synth. Biol.*, **1**: 83–88 (2012)
3. Endo, K., *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **41**: e135 (2013), Endo, K., *et al.*, *Nat. Commun.*, **4**: 2393 (2013)

mRNA engineering, genetic engineering, synthetic biology

講演番号：4SY15-6
講演日時、会場：3 月 30 日 15:35～ B 校舎 04 会場

動物細胞の核外輸送過程を利用したタンパク質生産

Protein production system using mRNA export process in mammalian cells

○増田 誠司(京都大学生命科学研究科)
○Seiji Masuda(Biostudies, Kyoto University)

医薬品などに使用されるタンパク質の多くは、糖鎖やジスルフィド結合が活性の発現に必要である。このため大腸菌などではうまく活性のあるタンパク質を効果的に生産できないことが多い。したがってタンパク質生産の多くは動物細胞で行われている。動物細胞によるタンパク質生産技術は、強力なプロモータの発見（転写の促進）、翻訳の最適化と遺伝子導入技術の実用化により達成され、1990 年代に新しいバイオ産業の育成へと結実した。しかし、その後 20 年間根本的な技術革新は行われておらず、動物細胞における生産性を飛躍的に向上させる抜本的な技術革新が期待されている。

動物細胞における遺伝子発現を規定する段階は、遺伝子の転写、mRNA のプロセシング過程、細胞核から細胞質への輸送過程、タンパク質翻訳過程となる。従来研究から、非常に強いプロモーターの使用や翻訳促進配列などの発現ベクターへの導入により、転写や翻訳過程の研究は終了し、これらの改良での上積みは多くを期待しにくい。

発表者は、mRNA を効率よく核内から細胞質に輸送する仕組みを研究している中で、現在のイントロンを含まない発現ベクターを用いる際、mRNA スプライシング過程は問題でないが、細胞質への輸送過程は十分促進できないことを見いだした。すなわち、現在の動物細胞におけるタンパク質生産の律速段階は、転写や翻訳段階にあるのではなく mRNA の核から細胞質への核外輸送過程にある可能性を見いだした。このことは、mRNA を効率的に細胞質へと輸送する系を開発すれば、動物細胞におけるタンパク質の生産量を改善できることを意味する。そこで細胞やウイルスの mRNA 輸送システムを模倣した標的 mRNA 専用輸送システム創成を行った。

本発表では、mRNA の核外輸送過程の促進することで動物細胞におけるタンパク質生産性の改善につなげる方法論とその結果について議論する。

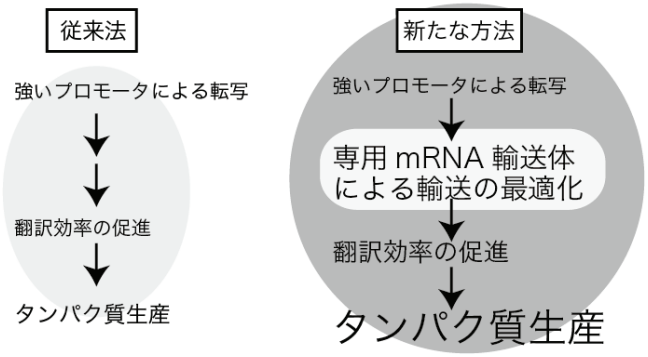


図 専用 mRNA 輸送体の創成による効率的タンパク質生産法

Protein production, mRNA export, mammalian cell

講演番号：4SY16-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:35～ B 校舎 05 会場

脂質バランス栄養食品を創出する新規オメガ 3 脂肪酸素材の開発

Creation of novel omega-3 fatty acid materials for protective foods with the balance of lipids

○櫻谷 英治[1]、安藤 晃規[1,2]、岸野 重信[1]、日比 慎[3]、小川 順[1,2]([1]京大院農・応用生命、[2]京大・生理化学ユニット、[3]京大院農・産業微生物)
○Eiji Sakuradani[1], Akinori Ando[1,2], Shigenobu Kishino[1], Makoto Hibi[3], Jun Ogawa[1,2]([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3]Indust. Microbiol., Kyoto Univ.)

高度不飽和脂肪酸（PUFA）のような機能性脂質の応用研究は、「健康」や「栄養」に関わる様々な分野で行われており、近年、PUFA の中でもより積極的なオメガ 3 脂肪酸の摂取に関心が集まっている。ここでは、アラキドン酸（ARA）生産性糸状菌 *Mortierella alpina* の育種による様々なオメガ 3 脂肪酸の発酵生産、ならびに、オメガ 3 脂肪酸の微生物変換の可能性について紹介したい。

これまでの *M. alpina* 変異株育種研究と PUFA 生合成に関わる酵素遺伝子の機能解析から多岐にわたる PUFA 生合成経路を構築し、様々な脂肪酸を選択的につくる技術を開発した。*M. alpina* においてオメガ 3 脂肪酸を生産するためには、オメガ 6 脂肪酸をオメガ 3 脂肪酸へ変換するω3 脂肪酸不飽和化（ω3DS）酵素の活性を高くすることが最も重要となる。これまでにいくつかの脂肪酸不飽和化酵素や鎖長延長酵素遺伝子の活性を付与することで、希少なオメガ 3 脂肪酸の生産に取り組んできた。

*M. alpina*を20℃以下の温度で培養するとω3DSが活性化されエイコサペンタエン酸（EPA）が総脂肪酸当たり10%程度蓄積する。そこで、*M. alpina*において*ω3ds*遺伝子を過剰発現させるとオメガ 6 脂肪酸からオメガ 3 脂肪酸への変換が活性化され、EPAが著量に蓄積する。12℃で8日間培養すると、形質転換体のEPA含量は35 mol%に達する。一方で、糸状菌*Saprolegnia declina*のω3DS（Δ17DS)は*M. alpina*の通常培養温度28℃でも酵素活性を示すことから、本酵素遺伝子を*M. alpina*で発現させることで通常培養温度でのEPA生産を実現することが可能になった。また、オメガ 3 脂肪酸に属するエイコサテトラエン酸やドコサペンタエン酸含有油脂生産についても検討を行っている。一方、オメガ 3 脂肪酸の微生物変換を検討し、EPAのエポキシ化、異性化、飽和化を可能とした。

このように、*M. alpina*の育種により発酵油脂の生産法が確立され、ARAだけでなく様々なオメガ 3 脂肪酸を供給できること、ならびに、さらなる誘導体化の可能性を示すことができた。

fatty acid, microbial production, eicosapentaenoic acid

講演番号：4SY16-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:00～ B 校舎 05 会場

海洋性微生物資源を活用するオメガ 3 脂肪酸素材の生産

Production of omega-3 fatty acids by marine microorganisms

○林 雅弘(宮崎大農)
○Masahiro Hayashi(Univ. Miyazaki)

海洋性の微生物・微細藻類の中には、ドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)などのオメガ 3 脂肪酸を生産するものがいくつも知られているが、高い増殖性や脂質蓄積性からラビリンチュラ類の産業利用が各方面で検討されている。ラビリンチュラ類は、ストラメノパイルと呼ばれる生物群に属する海洋性真核単細胞生物である。ストラメノパイルは、遊泳のための鞭毛に特殊な鞭毛小毛を持つという性質に基づいてまとめられている生物群で、ラビリンチュラ類以外にも卵菌類や、コンブやワカメなどの褐藻類、珪藻などの微細藻類が含まれる。ラビリンチュラ類は従属栄養性の生物で、光合成は行なわず、汽水域を含む広い範囲の海洋に数多く生息する。科のレベルで 2 つの分類群が認識され、ラビリンチュラ科に属するラビリンチュリッド(Labyrinthulids)と、ヤブレツボカビ科に属するスラウストキトリッド(Thraustochytrids)に大別される。このうち、スラウストキトリッドの方が増殖性や脂質蓄積性の点から産業利用には適していると考えられる。スラウストキトリッドには、これまで応用面での検討例が多いオーランチオキトリウム(*Aurantiochytrium*)、シゾキトリウム(*Schizochytrium*)、スラウストキトリウム(*Thraustochytrium*)、ウルケニア(*Ulkenia*)、パリエティキトリウム(*Parietichytrium*)などの 11 属が含まれることが形態的特徴や最近の 18SrRNA 遺伝子の分子系統解析によって示されており、いずれの属のスラウストキトリッドも DHA や EPA、ドコサペンタエン酸 (DPA)、アラキドン酸 (ARA) などの多価不飽和脂肪酸(PUFA)を細胞内の油滴に主としてトリアシルグリセロールとして大量に蓄積する。

近年、ラビリンチュラ類のドラフトゲノム解析や形質転換法の開発が急速に進歩しており、ラビリンチュラ類の産業利用が大きく期待されている。本講演ではスラウストキトリッドによる脂質素材生産について、特にオメガ 3 脂肪酸を中心に 1)有用株の探索、2)培養特性・脂質特性、3)形質転換系の開発について紹介する。また、最近ではスラウストキトリッドによるオメガ 3 脂肪酸以外の脂質生産も注目されるようになり、オメガ 3 脂肪酸以外の微生物生産が期待される脂質素材についても紹介する。

omega-3 fatty acids, thraustochytrids, marine microorganisms

講演番号：4SY16-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:25～ B 校舎 05 会場

オメガ 3 脂肪酸の栄養化学

Omega3 PUFAs in metabolic syndrome

○永尾 晃治(佐賀大農)
○Koji Nagao(Saga University)

“栄養”とは、生物による外界からの化合物摂取を、生体との関わりにおいて定義付けした概念である。いわゆる“栄養素”も受け取る生体側の要求（応答）がなければ、主に炭素・酸素・水素・窒素に分解される単なる化学物質に過ぎない。食事脂質は、生命維持のためのエネルギーや必須成分の供給源として（食品の１次機能）、食事を楽しむための嗜好面への働きかけ（食品の２次機能）および生体防御系や体調を調節する機能（食品の３次機能）など、適切な量を摂取する限りにおいて、ヒトが楽しく健康に過ごすのに欠かせない機能を内包した優れた食品・栄養素である事は周知の通りである。オメガ３脂肪酸の栄養機能を考えたとき、エネルギー供給源としては他の脂肪酸とほぼ変わるところはないが、構成成分として細胞膜の動態や機能に影響を与え、エイコサノイドへの変換を介して体調調節機能を発揮するなど、“必須脂肪酸”としての役割が最も知られているところであろう。また近年着実に増え続けている健康志向の高い消費者にとっては、オメガ３脂肪酸の“身体に良さそう”という予備知識が、感覚的に嗜好性を高めるのに役立っているかも知れない。

“分子栄養学”や“ニュートリゲノミクス”は、従来の“栄養学”への分子生物学的手法の導入により、生体内における栄養素と遺伝的因子の相互作用を研究する学問領域である。個々人における表現型の違い（個体差）には、遺伝的素因と環境因子の複雑な相互作用が関係することが知られているが、食事・栄養素の摂取は代表的な外的刺激として、遺伝子発現・細胞機能・栄養素代謝を変動させて疾病の発症・進展に大きな影響を及ぼす事が明らかになっている。しかしながら、生体内に取り込まれた“機能性食事成分”と呼ばれるものが、どのように細胞内の代謝恒常性制御、ひいては生体の健康維持に関わっているかの詳細は未だ不明な点が多い。

本講演では、オメガ３脂肪酸の栄養・健康機能、とくに生活習慣病・メタボリックシンドロームに対する予防･改善作用に関して、動物実験の結果からヒトでの臨床試験の成果にわたって紹介しつつ、その作用機序について現時点で分子栄養学的に明らかにされていることを解説したい。またオメガ３脂肪酸の機能性を、今後より有効に活用するための可能性についても考察したい。

K. Nagao, T. Yanagita: Bioactive lipids in metabolic syndrome. *Prog. Lipid Res.*, **47**, 127-146, 2008.
永尾晃治, オメガ 3 脂肪酸の栄養化学. *BIO INDUSTRY* **30**, 5-10,2013.

Omega3 PUFAs, Molecular Nutrition, Metabolic syndrome

講演番号：4SY16-4
講演日時、会場：3 月 30 日 14:50～ B 校舎 05 会場

ω３脂肪酸の抗炎症作用とメタボロミクス

Lipidomic analysis of omega-3 PUFA derived anti-inflammatory mediators

○磯部 洋輔[1]、有田 誠[1,2]、新井 洋由[1]([1]東大院薬、[2]JST さきがけ)
○Yosuke Isobe[1], Makoto Arita[1,2], Hiroyuki Arai[1]([1]Univ. of Tokyo, [2]PRESTO, JST)

エイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸（DHA）に代表されるω３脂肪酸には、古くから抗炎症作用が知られている。近年、ω３脂肪酸から生成する抗炎症性代謝物としてレゾルビン等が同定され、ω3 脂肪酸が積極的にメディエーターに変換されて抗炎症作用を発揮する可能性が考えられている。レゾルビンは EPA のω3 位の二重結合に水酸基が付加した 18-hydroxy-EPA（18-HEPE）を前駆体としているが、この代謝経路はω3 脂肪酸に特徴的なものであり、抗炎症作用など、ω3 脂肪酸に固有の機能に重要である可能性が考えられる。我々は、特にこうしたω3 脂肪酸に特徴的な代謝経路に着目した脂肪酸メタボロミクス解析を展開しており、18-HEPE から生成する抗炎症性代謝物レゾルビン E3（RvE3）を同定した。また、最近 18-HEPE とは異なるω3 脂肪酸に特徴的な代謝経路として、EPA のω3 位の二重結合がエポキシ化された 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid （17,18-EpETE）を起点に複数の代謝物が生成することを明らかにし、その中に抗炎症活性を有する代謝物 12-OH-17,18-EpETE を見出した。

12-OH-17,18-EpETE は、典型的な急性炎症反応を示すザイモサン誘導マウス腹膜炎モデルにおいて、わずか 10 ng の投与量で炎症初期の好中球の浸潤を約 40%抑制する作用を示した。そこで、in vitro における好中球遊走に対する代謝物の効果を検討したところ、1-100nM の 12-OH-17,18-EpETE を処理することで好中球が走化性因子（LTB_4）のグラジエント方向へ直進せず、かつ遊走速度も低下することが明らかになった。こうした好中球の遊走抑制作用は RvE3 にも認められるが、RvE3 については好中球の遊走速度は抑制するものの細胞遊走の方向性には影響を与えず、それぞれの代謝物が異なる作用機構で好中球の抑制作用を発揮しているものと考えられた。さらに、代謝物の作用を詳細に解析した結果、12-OH-17,18-EpETE の処理によって LTB_4 の刺激依存的な好中球の細胞極性形成に異常を生じることが明らかになった。

以上、EPA 由来の抗炎症性代謝物として RvE3 に加え、12-OH-17,18-EpETE を新たに見出した。これらの代謝物はいずれも、ω３脂肪酸に特徴的な代謝経路から生成するものであり、抗炎症作用などω３脂肪酸に固有の機能の発揮に重要である可能性が考えられた。

omega-3 polyunsaturated fatty acid, anti-inflammatory mediator, lipidomics

講演番号：4SY16-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:15～ B 校舎 05 会場

オメガ 3 脂肪酸によるリポタンパク質の質的制御を介した生理作用

Physiological effects of omega-3 fatty acids via regulation of lipoprotein quality

○松尾 道憲[1]、斉藤 貴将[1]、中塔 充宏[1]、木岡 紀幸[1]、小川 順[1]、植田 和光[1,2]([1]京大院農、[2]京大 iCeMS)
○ Michinori Matsuo[1], Takahiro Saito[1], Mitsuhiro Nakato[1], Noriyuki Kioka[1], Jun Ogawa[1], Kazumitsu Ueda[1,2]([1]Kyoto Univ. Grad. Sch. of Agricult., [2]iCeMS, Kyoto Univ.)

リポタンパク質は、アポリポタンパク質とコレステロール、トリグリセリド、リン脂質などの脂質からなる複合体である。末梢では低密度リポタンパク質(LDL)と高密度リポタンパク質(HDL)が血中における脂質の運搬に大きな役割を果たす。このうち HDL はアポリポタンパク質(apo)A-I を主なアポリポタンパク質として含み、末梢細胞から肝臓へのコレステロール逆転送に働くことで、動脈硬化を抑制する作用がある。また中枢神経系では apoE 含有リポタンパク質(LpE, apoE-HDL)がグリア細胞から神経細胞への脂質の供給や神経細胞の修復に働く。HDL と LpE の生成には、ATP-binding cassette(ABC)トランスポータースーパーファミリーに属する ABCA1 と ABCG1 が関与し、ABCA1 と ABCG1 が協調しながら細胞膜のコレステロールとリン脂質をアポリポタンパク質に受け渡すことで、HDL や LpE が形成される。

オメガ 3 脂肪酸は細胞に取り込まれてリン脂質の脂肪酸鎖となることから、ABCA1 と ABCG1 によって輸送され、リポタンパク質の構成成分となることが予想される。本講演では、リポタンパク質を介したオメガ 3 脂肪酸の新たな生理機能について紹介したい。

HDL にはリポ多糖(LPS)刺激で誘導される炎症に対する抑制効果があることから、オメガ 3 脂肪酸含有 HDL がさらに強い炎症抑制効果を持つか調べた。マクロファージ様細胞に分化させた THP-1 細胞にオメガ 3 脂肪酸(DHA)を添加し、培地中に分泌されたオメガ 3 脂肪酸含有 HDL を精製した。精製した HDL を THP-1 細胞に添加し、LPS 刺激で誘導される炎症性サイトカインの mRNA 量を定量的 PCR で調べた。その結果、オメガ 3 脂肪酸含有 HDL が、炎症性サイトカインの産生をコントロールの HDL に比べて抑制することが明らかとなった。

グリア細胞から分泌される LpE は神経細胞の軸索伸長を促進することから、オメガ 3 脂肪酸含有 LpE が、神経突起伸長促進作用を持つか調べた。オメガ 3 脂肪酸を取り込ませたラット大脳皮質由来グリア初代培養細胞の条件培地をラット海馬由来神経初代培養細胞に添加し、神経突起成長を調べた。その結果、オメガ 3 脂肪酸含有 LpE を含む条件培地は、コントロールの条件培地に比べて神経突起伸長促進作用を持つことが分かった。

以上の結果から、オメガ 3 脂肪酸はリポタンパク質の質的制御を介して、炎症の抑制や神経細胞突起伸長促進などの生理作用を持つことが示唆された。

lipoprotein, omega-3 fatty acids, ABC transporter

講演番号：4SY16-6
講演日時、会場：3 月 30 日 15:40～ B 校舎 05 会場

オメガ 3 脂肪酸の機能を生かした食品の開発

Development of healthy foods utilizing functions of omega-3 fatty acids

○河島 洋(サントリーウエルネス・健康科学研)
○Hiroshi Kawashima(Suntory Wellness Ltd.)

オメガ 3 脂肪酸がさまざまな機能を持つことは広く知られており、それらを生かした多くの応用がなされている。ここでは、魚油あるいはその主成分であるドコサヘキサエン酸（DHA）やエイコサペンタエン酸（EPA）の食品への応用を中心に紹介する。

食品への応用を考える場合には、オメガ 3 脂肪酸の栄養素としての位置付けが重要である。「日本人の食事摂取基準」（2010 年版）において、血中中性脂肪値の低下、不整脈の発生予防、血管内皮細胞の機能改善、血栓生成予防作用等を介して生活習慣病の予防効果を示すとされ、1 g/日以上が目標量（下限）とされている。日本人の食事からの DHA、EPA の摂取量は多い（性別、年齢などによるが、成人の 50 パーセンタイル値は 0.2～0.8 g/日程度[1]）ので、日常の摂取量に対する考慮も重要である。ヒトの豊富なエビデンスを背景に、主要な海外の機関からも様々な推奨がなされている。

実際に食品に応用する場合には、「短所の最小化」「長所の最大化」がポイントとなる。そのために多くの方策が工夫されているが、ここでは機能性成分との組合せについて述べる。

魚油の短所は、不適切に扱った場合の過酸化である。DHA や EPA には二重結合が多いので過酸化されやすいが、良い原料魚油を使って、ゼラチンカプセルや容器などを工夫することにより、年単位で安定な製品にすることができる。その際、トコフェロール類との組合せは抗酸化の観点で非常に重要である。摂取後の体内における過酸化については、ゴマ由来のリグナンであるセサミン類との組合せ効果が知られている。セサミンは体内で代謝されて強い抗酸化力を発揮する[2]。低トコフェロール食で過酸化亢進状態にしたラットに魚油を摂取させる際に、セサミンを同時に摂取させることにより赤血球溶血率や肝臓 TBARS 値が有意に改善した[3]。

一方、長所については、ラットの脂質代謝に対する魚油の効果が、同じくセサミンとの組合せで向上することが知られている[4,5]。血清トリグリセリド値の低下だけでなく、肝臓の脂肪酸β酸化系および脂肪酸合成系の酵素活性、遺伝子発現に対する魚油の効果がセサミン摂取でさらに高まることが示された。魚油の有効性を増強する他の機能性成分の研究についても紹介したい。

(1)平成 17 年及び 18 年国民健康・栄養調査 (2) Nakai M *et al.*, *J Agric Food Chem*, **51**, 1666 (2003) (3) Yamashita K *et al.*, *BioFactor*, **11**, 11 (2000) (4) Ide T *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, **1682**, 80 (2004) (5) Arachchige PG *et al.*, *Metabolism*, **55**, 381 (2006)

docosahexaenoic, DHA, sesamin

講演番号：4SY16-7
講演日時、会場：3 月 30 日 16:05～ B 校舎 05 会場

EPA の健康機能の新たな応用をめざして

Novel application of EPA for human health benefits

○辻 智子(日本水産株式会社)
○Tomoko Tsuji(Nippon Suisan Kaisha, Ltd)

「グリーンランドのイヌイットは同じ年齢範囲でデンマーク人やアメリカ人と比較した場合、急性心筋梗塞が極めて少ない」という 1960 年代に行われた疫学調査結果と、イヌイットの食生活に由来する血中 EPA 濃度の高さとの関係が注目され、それがきっかけとなって EPA の急性心筋梗塞に対する効果を解明する研究が開始された。現在までに EPA の生理機能の研究は多岐にわたって成果を上げ、その用途は医薬品のみならず機能性食品やサプリメントとしても世界中に拡大している。

EPA の機能としては、その物理化学的性質に起因して細胞膜、特に赤血球膜の柔軟性を高める効果と、PPARsや SREBP-1 を介して脂質代謝調節をすること、アラキドン酸カスケードの炎症性生理活性物質群の生合成と拮抗することにより抗炎症作用を示すことが主として知られている。また、最近は脂肪細胞への直接的な作用により、アディポサイトカインの産生調節や内臓脂肪蓄積抑制に関与する事、消化管のＬ細胞の脂肪酸受容体を介して GLP-1 などのホルモン分泌へ関与している可能性がある事が報告されている。これらの最近の研究は、EPA が心血管系疾患の一次及び二次予防に有効であるだけでなく、糖尿病や内臓脂肪型の肥満などの、メタボリックシンドロームの発症に対して有効である可能性を示唆している。

また、我々は最近、EPA による血液流動性向上に伴い、運動時の心臓や血管への負担が軽減する可能性を予想し、一定運動負荷下における酸素摂取量の測定を試みた。

この実験では、EPA を摂取すると赤血球の膜の EPA 組成は高まり、同じレベルの運動負荷をこなすのに必要な酸素摂取量が減少するという結果が得られた。この酸素摂取量の減少は、赤血球膜の EPA の増加量に相関した事から、EPA 摂取により赤血球の膜組成中の EPA を高めることにより、効率よく酸素を体内に運搬・利用して、運動負荷をこなすことができるようになると推定される。この現象は、エクササイズエコノミーが改善すると表現され、運動持久力の向上の一因とされる。また、同じ負荷に対する体感も EPA 摂取により軽くなることも明らかとなった。

古くから北欧では、スポーツ選手による EPA 摂取の習慣があったが、最近では国内外でアスリートの競技成績向上のために EPA 摂取を推奨する動きが出ており、EPA の新たな用途として注目される。

EPA, exercise economy, physical endurance

講演番号：4SY17-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:30～ B 校舎 06 会場

鶏肉由来高機能ジペプチドの脳老化予防への可能性

Prevention of Brain Aging by imidazole dipeptides, carnosine and anserine

○久恒 辰博(東京大院新領域)
○Tatsuhiro HISATSUNE(GSFS, Univ. Tokyo)

高齢化が進むわが国において、食事や運動を介した健康寿命の延伸に期待が寄せられている。脳の老化ひいては認知症の発症を予防する方法を見出していくことは、健康寿命の延伸に大きく貢献する。私たちはこれまでにマウスのアルツハイマー病モデルを用いて、栄養成分による脳老化の予防に関する研究を行ってきた。近年の研究から、糖代謝異常がアルツハイマー病の主要なリスク因子であることがわかったため、私たちはアルツハイマー病の原因遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスに、高脂肪食を摂取させる糖尿病併発型アルツハイマー病モデルマウスを用いて研究を行っている。このマウスでは、生後６ヶ月の時点で海馬機能に依存した空間記憶機能が低下する。記憶機能の低下を防止できる食品栄養成分の探索を行ったところ、鶏肉にも含まれる高機能ジペプチド（イミダゾールジペプチド）のひとつであるカルノシンに、記憶機能の低下を阻止するはたらきがあることを発見した。このマウスの脳切片を調べたところ、老人斑の蓄積と糖代謝異常の相乗作用によって起こる脳内の炎症反応が、イミダゾールジペプチドの投与により軽減していることもわかってきた。そのため、イミダゾールジペプチドは、記憶低下に関わる脳の炎症反応を抑えることにより、脳老化を防ぐはたらきを有していることが推定された。そこで、ヒトの脳老化に対する、イミダゾールジペプチドの予防効果を確かめていくために中高齢者健康ボランティアの参加によるヒト研究に着手した。まずはこの第一段階として、有効成分を摂取する小規模なヒト試験を実施してきた。試験食として、鶏肉を出発材料としたパウダー状の食品（日本ハム（株）中央研究所製造：カルノシンとアンセリンを合わせて０．５ｇ含有）を健康な中高齢者が一ヶ月間摂取し、この摂取前後の記憶機能をコンピューター式の記憶検査（ＣＡＮＴＡＢ）にて評価した。また、摂取前後の脳の変化を調べる各種のＭＲＩ画像検査を実施した。その結果、僅か１ヶ月間鶏肉由来の高機能ジペプチドを摂取しただけで、記憶に関する脳機能が有意に向上していることが見出された。そして脳機能ＭＲＩ画像検査の結果、記憶に関わる脳領域である海馬と前頭葉の機能的な結びつきが強化されていることが認められた。おそらく、加齢に伴い脳内で緩慢に進行する炎症反応が、イミダゾールジペプチドの摂取により改善され、その結果、脳回路の活動が改善し、記憶機能が改善したものと考えられる。現在、この高機能ジペプチドの作用を立証していくために、４０－８４歳の健康ボランティア約６０名を２群に分け、試験食またはプラセボ食を３ヶ月間摂取する２重盲検下無作為比較試験（ＲＣＴ）を実施している。本研究を通じ鶏肉由来高機能ジペプチドの脳老化予防に対する新機能が明確になることが期待される。

Alzheimer's Disease, Memory function, Chicken

講演番号：4SY17-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:10～ B 校舎 06 会場

脳老化予防を評価する MRI 撮像および解析手法の標準化

Standardization of MRI acquisition and analysis for the evaluation of prevention of brain aging

○松田 博史(国立精神・神経医療研究センター)
○Hiroshi Matsuda(National Center of Neurology and Psychiatry)

正常加齢においては、1 年間に脳全体で 0.3%程度、海馬で 0.8%程度、萎縮するとされている。この脳老化による萎縮を評価する手段として、Magnetic Resonance Imaging (MRI)は放射線被ばくもなく、繰り返し安全に 1mm 前後のスライス厚で全脳を撮像することが可能であり、現時点で最適の画像診断法と考えられる。しかし、MRI 装置には機種間差がみられ、さらに固有の幾何学的歪みと信号値不均一性を有することに留意しなければならない。これらの歪みと信号値不均一性は高磁場装置でより顕著となるため、適切な画像補正が必要となる。歪み補正に関しては、傾斜磁場を形成するコイルの空間的配置から、傾斜磁場の非線形性を理論的に算出し、それを元に補正する Grad unwarp と呼ばれる方法がある。しかし、この手法は対応している装置が限られており、またコイルの空間的配置情報のみを元にしているため、MRI 装置の違いや装置の時間的な撮像条件の変化に対応していないという欠点がある。われわれは被験者の撮像の前後にファントムを撮像し、その結果を元に装置の歪みを取り除く手法を開発した。ファントムの内部には、硫酸銅の溶液が封入された 1 cm 径の小球が多数配置されており、その空間的な相対位置が 1mm 以下の精度で既知となっている。得られたファントムの画像から小球の画像上の位置を自動的に検出し、それを本来の位置へ変形させる非線形な画像変換を施すことによって、装置の幾何学歪みを取り除く。信号値不均一性補正には Non-parametric Non-uniform intensity Normalisation 補正という数学的なモデルを立てることにより信号値不均一場の推定を行う。各組織の信号分布に関するパラメトリックなモデルを立てずに、不均一場が比較的低周波成分に含まれるという制約のもと、逐次的に推定する手法である。この方法はどのパルスシーケンスにも対応し、得られた MRI 画像に対してこの処理を適応するだけで信号の不均一を取り除くことができるため広く用いられている。脳体積の解析手法としては、Voxel-based morphometry などの統計学的手法と、FreeSurfer のような直接測定法がある。Voxel-based morphometry で全脳の局所変化を探索し、FreeSurfer で変化の強くみられる部位の体積を求めるなど、組み合わせて評価されることも多い。MRI は脳構造の評価ばかりでなく、脳機能も評価することが可能である。Blood Oxygen Level Dependent 原理に基づく安静時 fMRI を用いた脳機能連結の評価、拡散テンソルイメージングによる神経線維連絡機能の評価、さらには、自家動脈血を磁気パルスで標識し脳血流画像を得る Arterial Spin Labeling と呼ばれる方法が開発されている。これらの機能的イメージングの解析手法にも標準化が進んでおり、脳老化およびその予防法の効果判定に MRI は生物学的マーカーとして有用である。

MRI, Brain, Aging

講演番号：4SY17-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:50～ B 校舎 06 会場

鶏肉由来高機能ジペプチドの免疫調節作用

Immunomodulatory effects of imidazole dipeptides

○戸塚 護、薩 秀夫、清水 誠(東大院農生科)
○Mamoru Totsuka, Hideo Satsu, Makoto Shimizu(Univ. Tokyo)

鶏胸肉などに多く含まれるイミダゾールジペプチド（カルノシン、アンセリン）は、抗酸化、抗糖化、抗疲労など様々な機能が報告されている高機能ペプチドである。我々は、カルノシンの免疫系に対する影響に着目し、解析を行ってきた。本講演では、ヒトおよびマウス腸管上皮細胞株を用いた *in vitro* 実験系、マウスを用いた *in vivo* 実験系で見出されたカルノシンの免疫調節効果（抗炎症効果、粘膜免疫賦活効果）に加えて、健常中高齢ボランティアによる鶏肉由来高機能ジペプチド摂取試験における血中サイトカイン量変化の解析結果について報告する。

ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 は酸化ストレスや炎症性サイトカインの刺激に対して、インターロイキン 8（IL-8）を産生する。IL-8 は炎症性ケモカインの一つであり、腸管での炎症時において IL-8 産生の増加は炎症を悪化させる方向に働く。Caco-2 の IL-8 産生を抑制する食品成分は腸管の炎症を抑制する機能性食品として有効であることが期待される。過酸化水素および TNF-α による刺激で誘導される IL-8 産生に対して、カルノシンは抑制効果を示した。カルノシンは IL-8 mRNA 発現量は低下させないことから、翻訳段階で抑制しているものと考えられた。

一方、Caco-2 細胞をビフィズス菌体で刺激した際に誘導される IL-8 産生はカルノシン添加によって増強されることが見出された。微生物成分を認識する Toll 様受容体(TLR)の各種リガンドで刺激した場合に誘導される IL-8 産生に対しても同様に増強効果を示した。このことから腸管上皮において病原体や腸内共生細菌からの刺激を受けて誘導される免疫応答に対して、カルノシンが増強効果をもつことが示唆された。このカルノシンによるサイトカイン産生増強効果は、マウス小腸上皮細胞株 MoS13 細胞においても TLR リガンド刺激した際の IL-6 産生に対する増強効果として観察された。カルノシン存在下、TLR リガンド刺激した MoS13 細胞の培養上清を、マウス腸管粘膜固有層由来 IgA 抗体産生細胞に添加すると IgA 抗体産生が増強された。また、0.5%カルノシン含有水を２週間自由摂取させたマウスの小腸粘膜において、IgA 抗体量が増加していることが観察された。このことより、カルノシンは腸管粘膜免疫応答を増強することが示された。

現在、中高齢健常者 60 名を対象とした鶏肉由来高機能ジペプチドの効果に関する二重盲検ランダム化比較試験が進行中である。摂取前後の末梢血中の各種サイトカイン量を、Luminex 社のマルチプレックス法を用いて測定している。この結果について、脳機能改善効果との関係に関する考察も含めて報告したい。

carnosine, cytokine, IgA

講演番号：4SY17-4
講演日時、会場：3 月 30 日 15:30～ B 校舎 06 会場

マイクロアレイ解析による鶏肉由来高機能ジペプチドの機能性検証

Molecular basis for the functionalities of imidazole dipeptides revealed by microarray analysis

○片倉 喜範(九大院農院)
○Yoshinori Katakura(Kyushu Univ.)

これまでの、高脂肪食を摂取させる糖尿病併発型アルツハイマー病モデルマウスを用いた研究から、鶏肉に含まれる高機能ジペプチドの一つであるカルノシンに、記憶機能の低下を抑制し、さらに脳内炎症を抑制する働きがあることが明らかとなっている。そこで本研究では、中高齢者ボランティアの参加によるヒト試験を実施し、ヒトの脳老化に対するイミダゾールジペプチドの予防効果の分子基盤を、ヒト末梢血リンパ球における遺伝子発現プロファイルから推測することを目的として研究を行った。まずそのための第一段階として、カルノシンとアンセリンを含む鶏肉由来のパウダー状の食品を、健康な中高齢者が 1 ヶ月間摂取することにより引き起こされる末梢血リンパ球における遺伝子発現プロファイルの変化を、マイクロアレイ解析により追跡した。摂取前後の末梢血から、RNA を調製後、ラベル化した cRNA を合成し、ヒトマイクロアレイ（Agilent Technologies）にハイブリダイズを行った。34,127 の遺伝子について、摂取前後の発現変動を paired t-test により評価を行い、発現変動遺伝子の探索・同定を行った。p-value が 0.05 以下、ratio が 1.5 以上あるいは 1/1.5 以下の発現変動を示す遺伝子の同定を行った結果、高機能ジペプチドの摂取により末梢血リンパ球における、ケモカイン／炎症系サイトカイン遺伝子等において、有意な発現変動が認められた。この 1 ヶ月間にわたる高機能ジペプチドの摂取により、記憶に関わる脳機能の有意な向上が認められることが、MRI 画像検査の結果から明らかになっていることから、リンパ球において発現変動が認められた上記遺伝子群が、これら脳機能向上に何らかの寄与を果たしているものと考えることができた。またさらに現在、健康ボランティア約 60 名を 2 群に分け、試験食またはプラセボ食を 3 ヶ月間にわたり摂取する二重盲検下無作為比較試験を実施している。本研究を通じて、鶏肉由来高機能ジペプチドによる脳老化予防に関わる分子基盤が明らかになるものと考えられる。

Microarray, Carnosine

講演番号：4SY17-5
講演日時、会場：3 月 30 日 16:00～ B 校舎 06 会場

鶏肉由来高機能ジペプチドの応用可能性

Application of the imidazole dipeptide to functional foods

○佐藤 三佳子、松本 貴之、森松 文毅(日本ハム中研)
○Mikako Sato, Takashi Matsumoto, Fumiki Morimatsu(R&D center, Nippon Meat Packers, Inc.)

我々は、食肉由来の有用成分として、イミダゾールジペプチド（カルノシン、アンセリン）に着目し、その研究と実用化を進めてきた。イミダゾールジペプチドは、骨格筋および脳を中心として動物の各組織に分布し、緩衝作用や抗酸化作用を有していることが知られている。その含有量や比率は動物種や器官により異なるが、ヒトの骨格筋中ではほぼ全量がカルノシンとして存在する。

食肉中には、イミダゾールジペプチドが非常に高濃度に存在し、牛・豚は主にカルノシンを、鶏はカルノシンとアンセリン両方を含有している。我々は、鶏肉からイミダゾールジペプチドを抽出し、特に“食とスポーツ”の観点から、そのサプリメントとしての実用化研究を進めてきた。これまでにヒトを対象として長期間の経口摂取による筋肉中カルノシン濃度の上昇や、運動パフォーマンスの向上、疲労感や筋肉痛の低減を見出している。また、運動中の筋 pH 変化を非侵襲的にモニタリングできる ^{31}P-MRS（Magnetic Resonance Spectroscopy）を用いることにより、運動による筋 pH 低下がイミダゾールジペプチド摂取により抑制されることを確認した。すなわち、摂取による筋中カルノシン濃度の増加が筋緩衝能の向上をもたらし、運動パフォーマンス向上につながると示唆された。すでに、我々は鶏肉由来イミダゾールジペプチド抽出物を機能性食品（素材）として販売しており、トップアスリートにご愛用いただくなど、スポーツ分野での実用化に成功している。

一方、これまでの臨床研究において、イミダゾールジペプチド摂取による有効性には、他の食品成分で多く報告されているように、個人差があることが認められている。血清カルノシナーゼは、血中に存在するカルノシン分解酵素であるが、いくつかの遺伝子多型が報告されており、イミダゾールジペプチドの有効性に関して影響を与え個人差をもたらす可能性が考えられる。今後、血清カルノシナーゼ活性をはじめ、有効性に影響を与え得る要因について検証し、体質に合わせた摂取方法など、イミダゾールジペプチドの有効性を高めた食品開発に生かしたいと考えている。

chicken, imidazole dipeptide, functional foods

講演番号：4SY18-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:35～ D 校舎 01 会場

Asian Microbiome Project: アジア人の食と腸内フローラと健康に関する調査研究

Asian Microbiome Project: Investigation on gut microbiota, diet, and health of Asian population

○中山 二郎[1]、渡辺 幸一[2]、Lee Yuan Kun[3]([1]九大院・農、[2]ヤクルト中研、[3]シンガポール国立大)
○Jiro Nakayama[1], Koichi Watanabe[2], Yuan Kun Lee[3]([1]Kyushu Univ., [2]Yakult Central Institute for Microbiological Research, [3]National Univ. of Singapore)

食と健康のインターフェースであるヒトの複雑な腸内細菌叢をプロファイル化し、腸内フローラの構造と機能を理解するための基盤研究が、国際規模で展開されている。アジア乳酸菌学会連合でも、アジア人の腸内細菌叢の基盤データ整備に向けて、研究コンソーシアムを設立し、アジア人の腸内細菌叢と食の調査を行っている。第一期調査として、地域の食文化を反映した食習慣を保持していると期待される小児（７歳から１１歳）を対象に、５カ国（中国、日本、台湾、タイ、インドネシア）で調査を行った。各国、都市部と地方の 2 箇所にて、それぞれ 25 名以上の児童、計 303 人より糞便を採取し、同時に食習慣と健康状態に関するアンケート調査を行った。糞便細菌叢は、糞便中の細菌 16S rRNA 遺伝子の次世代シーケンサーによる大量配列解析および定量 PCR によりプロファイリングした。

303 名の腸内細菌叢プロファイルデータは、科あるいは属レベルにおける主成分分析により、明確に２つのタイプに分けられた。一つは、日本、中国、台湾の児童に多い、ビフィドバクテリウム属とバクテロイデス属をコアとするタイプ（BB エンテロタイプ）、もう一つは、インドネシアとタイのコンケンの児童に多い、プレボテラ属をコアとするタイプ（P エンテロタイプ）である。P エンテロタイプは、プレボテラ属細菌に付随して、硫酸還元菌やエリシペロソリックス科を有し、 BB エンテロタイプより多くの細菌種で構成される傾向を示した。一方、BB エンテロタイプの細菌組成は被験者間でばらつきが多いのに対し、P エンテロタイプの細菌叢は多くの被験者間でより多くの細菌種を共有し高く保存されていることが示された。食事調査から、インドネシアやタイの児童は、一日あたりのコメ摂取回数が有意に多く、2.5 回から 3 回を示した。一方、日本の児童は平均約 2 回、中国の児童は 1.5 回であった。食餌中の炭水化物源の質・量とエンテロタイプとの関係が疑われる。一方、ランダムフォレスト解析、クラスタリング解析、多様度解析により、上記の２つの大きなクラス分けに加えて、各国特有の特徴が菌組成データに見出された。特に、日本の児童の菌叢は特徴的で、他国に比べて多様性に乏しく、特に大腸菌群やウェルシュ菌などの悪玉菌が少ない傾向にあった。我国特有の食事様式に加えて、生活環境が腸内フローラの構成に影響を及ぼしている可能性が示唆される。

以上、腸内フローラは地域特異性を有することが示された。現在、調査国を 5 カ国から 10 カ国に拡大し、また、乳幼児、成人、高齢者と他の年齢層の調査も行っている。この調査結果から、食がどのように腸内細菌叢に影響を及ぼし、さらにはその腸内フローラが宿主の健康にどのような影響を及ぼしているか、多くの知見を得ることができると期待される。

Gut microbiota, Asia, 16S rRNA

講演番号：4SY18-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:05～ D 校舎 01 会場

統合オミクスによる宿主－腸内細菌間相互作用の理解

Understanding host-microbial crosstalk via integrated omics approach

○福田 真嗣[1,2]([1]慶大先端生命研、[2]理研 IMS)
○Shinji Fukuda[1,2]([1]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [2]RIKEN IMS)

生体の生命維持・存続のために外界から栄養素を吸収するという生命現象の根幹となる組織である腸は、生体と外界とのインターフェースであり、多くの外来抗原に絶えず暴露されている。そのため、体にとって必要な栄養素だけを吸収しつつ、病原微生物を排除し、さらには食物抗原などに対しては免疫寛容が成立するなど、非自己である異種抗原の排除と免疫寛容を巧妙に操る腸管粘膜免疫系が発達している。また腸管は、第三の自律神経系とも称される腸管壁内神経系を有し、知覚神経や介在神経、運動神経などから構成される内在性の反射回路も形成されており、興奮性神経と抑制性神経とが調和を保ちながら統合的に機能している。さらに腸管には、その粘膜上皮に腸管内の情報を感知し、対応する臓器にホルモンを介して信号を伝達する腸管内分泌細胞が散在している。これら腸管における免疫系・神経系・内分泌系はそれぞれが独立して機能しているのではなく、緊密なクロストークを保ちながら統合的な腸管イントラネットを構成し、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

一方、腸管の管腔内には、1,000 種類以上、総数にして 100 兆個もの細菌が生息しており、それら腸内共生細菌群が腸管イントラネットとさらにクロストークすることで、腸管内における複雑な生態系、すなわち「腸エコシステム」を形成している。腸エコシステムは通常はこれら異種細胞間の絶妙なバランスの元に恒常性を維持しており、外界からの軽微な刺激やストレス、老化などによりそのバランスが多少崩れても元に戻すロバスト性を有するが、過度の遺伝的要因あるいは外環境由来の要因によりその恒常性が破綻してしまうと、最終的には粘膜免疫系や神経系、内分泌系の過剰変動に起因すると考えられる炎症性腸疾患や大腸癌などの腸そのものの疾患に加えて、自己免疫疾患や生活習慣病といった全身性の疾患につながることが知られている。従って、腸エコシステムの破綻に起因するこれらの疾患を正しく理解し制御するためには、その構成要素のひとつである腸内共生細菌群と腸管イントラネットとのクロストークについて統合的な観点から理解する必要がある。

本講演では、生体恒常性維持における腸内共生細菌の役割や、宿主－腸内共生細菌間相互作用がもたらす種々の疾患に関する近年の研究について紹介するとともに、メタボロミクスを基盤とする統合オミクスを用いたわれわれのこれまでの研究成果から、腸内共生細菌が産生する代謝産物が宿主－腸内共生細菌叢間相互作用において重要な役割を担うことも明らかにしたので、これらも合わせて紹介したい。

gut microbiota, metabolite, omics

講演番号：4SY18-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:35～ D 校舎 01 会場

腸内細菌によるオリゴ糖分解の解析

Analysis of degradation of oligosaccharides by intestinal bacteria

○山本 憲二(石川県大生物資源研)
○Kenji Yamamoto(Ishikawa Prefec. Univ.)

腸内細菌が棲息する腸管の表面には粘性の糖タンパク質であるムチンが存在し、病原体や消化酵素、あるいは酸性環境からのバリアーとなって腸管を保護している。ムチン糖タンパク質はセリンまたはスレオニン残基にムチン型糖鎖と呼ばれる多様な *O*-結合型糖鎖が結合し、α-*N*-アセチルガラクトサミン残基を還元末端として、ガラクトース（Gal）やフコース、*N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc)、*N*-アセチルガラクトサミン（GalNAc)、シアル酸などの糖残基で構成されている。宿主が摂取する糖質は宿主自身あるいは腸管上部に棲息する腸内細菌によって消化・吸収され、ビフィズス菌などが棲息する小腸下部から大腸にはほとんど届かないと推察される。それ故にビフィズス菌などは多様な糖質分解酵素を有し、難消化性の糖を分解資化するとともに宿主腸管に分泌されるムチン糖タンパク質の糖鎖を分解資化すると考えられる。

我々は多くのビフィズス菌株がムチン型糖鎖のコア構造である Galβ1,3GalNAc２糖をタンパク質から遊離する特異な酵素エンド-α-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼを生産することを見出した。本酵素は腸内細菌である *Clostridium* 属細菌から最初に見出された酵素であるが、ムチン型糖鎖のコア１型と呼ばれる Galβ1,3GalNAcα-に対して高い基質特異性を有する。本酵素を有する *Bifidobacterium longum* には Galβ1,3GalNAc に対するトランスポーターが存在することを見出しており、この２糖が菌体内で資化されることが示唆される。しかし、本酵素は小腸や大腸のムチン糖タンパク質に多く見られるコア３型の GlcNAcβ1,3GalNAcα-に対してはほとんど作用しない。一方、我々は *Bifidobacterium bifidum* の菌体内にコア３型糖鎖に対する作用に関わると示唆される酵素を見出した。本酵素はエキソ型のα-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼであるが、コア３型糖鎖やコア１型糖鎖にもわずかに作用するエンド型活性をも有するユニークな酵素である。すなわち、小腸や大腸で分泌されるムチン糖タンパク質のコア３型の *O*-結合型糖鎖は、我々が既にビフィズス菌の菌体外酵素として見出しているシアリダーゼやラクト-*N*-ビオシダーゼ、あるいはβ-ガラクトシダーゼ、β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼなどによって逐次分解を受け、GalNAcα-Ser/Thr に分解された後、トランスポーターによって菌体内に運ばれ、α-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼの作用によりα-GalNAc を遊離するというムチン型糖鎖の代謝経路がビフィズス菌に存在することが推察される。また、我々はムチン型糖鎖の非還元末端に存在するＢ型血液型の抗原決定基であるα1,3 結合した Gal に作用する特異なα-ガラクトシダーゼをも *B.bifidum* に見出した。

Oligosaccharides, Intestinal bacteria, Glycosidases

講演番号：4SY18-4
講演日時、会場：3 月 30 日 14:55～ D 校舎 01 会場

比較ゲノム解析から推測されるヒト常在ビフィズス菌(HRB, Human-Residential Bifidobacteria)の生存戦略

Survival strategy of Human-Residential Bifidobacteria(HRB) speculated by comparative genomics

○小田巻 俊孝、堀米 綾子、菅原 宏祐、橋倉 那波、南 淳一、清水（肖） 金忠、阿部 文明(森永乳業食基研)
○ Toshitaka Odamaki, Ayako Horigome, Hirosuke Sugahara, Nanami Hashikura, Junichi Minami, Jin-zhong Xiao, Fumiaki Abe(Morinaga Milk Industry CO., LTD.)

Bifidobacterium 属の細菌は現在約 40 菌種に分類されているが、ヒト腸管に生息する菌種は *B. longum* や *B. breve* をはじめ基本的には 9 種類に限定される。各菌種はそれぞれの生息環境に適応することで独自の進化を遂げてきた結果、ヒトにはヒト特有の、動物には動物特有の菌種が生息するようになったのではないかと推測されるが、その理由は明らかになっていない。本研究では、ヒトに生息するビフィズス菌種 Human-Residential Bifidobacteria (HRB)とそれ以外の種 non-Human-Residential Bifidobacteria (nHRB)の本質的な差異を見出すことを目的に、プロバイオティクスとしても幅広く利用されている HRB である *B. longum* (15 株)と *B. breve* (14 株)、および nHRB である *B. animalis* (20 株) の 3 菌種計 49 株について比較ゲノム解析を実施した。その結果、COG カテゴリーとしてはいずれの菌種も炭水化物やアミノ酸の代謝・輸送に関する遺伝子群の割合が多いことや、*B. animalis* 菌株間における共通遺伝子の割合が他 2 菌種よりも非常に高く、菌株特異性が低いことが示された。オーソログ遺伝子を確認したところ、3 菌種共通の遺伝子クラスターは 584 個であったのに対し、HRB 菌種間で共通した遺伝子クラスターは 166 個、HRB と nHRB との共通クラスターはいずれの菌種間でも 10 個以下であった。そこで菌種特有の遺伝子を詳細に確認したところ、HRB と nHRB との間には炭水化物の代謝能力に大きな違いがあることが示された。特に乳幼児に生息する HRB はヒトミルクオリゴ糖やムチンの構成糖に対する資化関連遺伝子を多く保有しており、成人にも多く生息する *B. longum* は加えて植物由来の難消化性糖質に関連する遺伝子が多く認められた。また、シグナルペプチドを有するタンパク質の割合は HRB で有意に高く、エラスターゼ活性阻害を有する Serin-protease inhibitor(SERPIN)等、HRB のみが保有する機能遺伝子も認められた。他にも、既に報告されている定着関連因子など膜貫通型タンパク質をコードする遺伝子にも違いが認められたことや、葉酸をはじめとするビタミン群の代謝能力、環境変化への応答能力に関与する遺伝子にも違いが認められた。本研究から得られた遺伝子情報は、各菌種が独自の生育環境に適応したメカニズムを解明する上で重要な手がかりになると考えられる。

シンポジウムではこれら遺伝子情報に基づいて実施した phenotype 確認試験についてもいくつか紹介し、遺伝子解析結果と合わせてヒト腸管に適した HRB の生存戦略について考察したい。

bifidobacteria, genome

講演番号：4SY18-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:25～ D 校舎 01 会場

腸内細菌が作り出すシンビオジェニック因子ポリアミン～その機能と生産最適化

Function and the optimized production of polyamine, a symbiogenic factor synthesized by intestinal bacteria.

○栗原 新[1]、松本 光晴[2]、鈴木 秀之[3]、辨野 義己[4]([1]石川県大・腸内細菌共生機構学、[2]協同乳業・研究所・技術開発、[3]京工繊大院・応用生物、[4]理化学研究所・辨野研)
○ Shin Kurihara[1], Mitsuharu Matsumoto[2], Hideyuki Suzuki[3], Yoshimi Benno[4]([1]Ishikawa Prefectural Univ., [2]Kyodo Milk Industry, [3]KIT, [4]Benno Lab, Riken)

ポリアミンは原核生物から高等動植物に至るまでほとんど全ての生物の細胞内に存在する生理活性アミンであり、代表的なものにはプトレッシン、スペルミジン、スペルミンがある。ポリアミンは生理的 pH 下では正電荷を帯びるため、細胞内で核酸やリン脂質など負電荷を持った細胞内成分と弱く結合することで様々な生理的役割を担い、細胞増殖因子として知られている。ポリアミンの細胞内濃度は数 mM～数 10 mM のオーダーであり、ガン細胞や対数増殖期の細胞では特に高い。

多くの細菌は自らポリアミンを生合成するが、環境中にポリアミンが存在する場合はこれを取り込む。取り込まれたポリアミンは細胞内で様々な用途に利用されている。この一方で、細菌は生育条件によっては環境中にポリアミンを放出する。放出されたポリアミンは他の微生物によって取り込まれて利用されるほか、細菌細胞間のシグナル物質としても利用される。このポリアミンによるシグナル伝達はバイオフィルム形成に重要であることが報告されており、我々も培地表面における運動性の誘導および病原性に重要であることを報告した。

ヒト大腸腸管内腔のポリアミン濃度は個人差が大きいがおよそ数 100 μM のオーダーであり、このポリアミンは腸内細菌由来である。我々は腸管内ポリアミン濃度を上昇させることが、慢性炎症と腸管上皮細胞の老化を抑制し、宿主の寿命伸長に繋がることをこれまでに報告した。大腸腸管内腔のポリアミンの濃度は、複雑な腸内細菌叢によるポリアミンの放出と吸収の平衡を反映している。ポリアミンは生理的な pH 下では親水性物質であり、疎水性の細胞膜を透過することは出来ないため、ポリアミンの輸送にはトランスポーターが必須である。従ってこれらのトランスポーターを適切に調節することが、腸管内腔のポリアミン濃度を上昇させるのに有効であると考えられるが、腸内細菌のトランスポーターの全貌は明らかとなっていない。

大腸菌のポリアミントランスポーターは 1990 年代に 3 種類が報告されていたが、我々はこれに加え、2 種類の新規プトレッシンインポーターを報告した。このうち、PuuP は細胞外プトレッシンを栄養源として利用する際に重要であり、PlaP は細胞外プトレッシンをシグナルとして認識する際に重要である。腸内細菌叢内部では、これらのトランスポーターに加え、これまで全ての細菌で未同定であるポリアミンエクスポーターを始めとした未知のトランスポーターが働いている。腸内細菌はこれらのトランスポーターを駆使してポリアミンを介したシグナル伝達や共生を行っていると考えられる。従って、腸管内においてポリアミン生産を最適化するには、未知トランスポーターの同定およびトランスポーターの調節機構の解明が必要であると考えられる。

Polyamine, Intestinal bacteria, Transporter

講演番号：4SY18-6
講演日時、会場：3 月 30 日 15:55～ D 校舎 01 会場

胆汁酸と腸内フローラ：メタボリックシンドローム発症との関連性

Bile acid and the gut microbiota: Implications to understand the development of metabolic syndrome

○横田 篤[1]、吹谷 智[1]、イスラム ケービーエム サイフル[1]、大岡 唯祐[2]、小椋 義俊[2,3]、林 哲也[2,3]、萩尾 真人[1]、石塚 敏[1]([1]北大院農、[2]宮崎大医、[3]宮崎大フロンティア)
○Atsushi YOKOTA[1], Satoru FUKIYA[1], K.B.M. Saiful ISLAM[1], Tadasuke OOKA[2], Yoshitoshi OGURA[2,3], Tetsuya HAYASHI[2,3], Masahito HAGIO[1], Satoshi ISHIZUKA[1]([1]Hokkaido Univ., [2]Miyazaki Univ., [3]Miyazaki Univ. Frontier)

近年、高脂肪食摂取による腸内細菌叢変化と肥満やメタボリックシンドローム発症との関連性、炎症性腸疾患等における腸内細菌叢変化について多くの報告がみられ、腸内細菌叢と健康の関係が注目されている。このような中、演者らは胆汁酸が腸内細菌叢の制御に関わっていることを見出した[1)]。

胆汁酸は両親媒性のステロール化合物で、胆汁の主成分として十二指腸に分泌され、小腸で食事中の脂質の消化吸収を補助している。胆汁酸は腸内細菌により二次胆汁酸に変換される。ヒトの主要胆汁酸はコール酸（CA）であり、CA から *Clostridium* 属細菌により生成されるデオキシコール酸（DCA）が主要二次胆汁酸となる。高脂肪食摂取は胆汁分泌を促進するため、ヒト糞便中の DCA 濃度も増大する。一方、胆汁酸はその両親媒性により細菌の細胞膜を損傷するため殺菌活性を示し、疎水性の強い DCA の殺菌作用は特に強力である[2)]。以上のことから、演者らは胆汁酸が大腸内で菌叢に対する強い選択圧となり、特に高脂肪食摂取に伴う菌叢変化を引き起こす要因となる可能性を考えた。

そこで胆汁酸の選択圧を検証するために、ラットに普通食および普通食に CA を添加した食餌を投与して 10 日間飼育後、糞中胆汁酸濃度、ならびに盲腸内細菌叢を解析した。その結果、CA 摂取は糞中 DCA 濃度の上昇と菌叢の劇的な変化をもたらした。普通食群の菌叢構成は、門レベルではマウス等で報告されている構成に近い Firmicutes 54%、Bacteroidetes 31%、その他、となったが、CA 添加食群では菌叢の殆どが Firmicutes となった。Operational taxonomic unit (OTU) 解析の結果、これらの変化は一部の OTU の異常増殖によるものであり、菌叢の多様性も低下することが示された。盲腸内容物分離株の DCA 感受性を調べたところ、Bacteroidetes 分離株は Firmicutes 分離株よりも有意に高い DCA 感受性を示した。このことは CA 摂取により Firumicutes の濃縮が起こったことと矛盾しなかった。

興味深いことに、このような腸内細菌叢の変化は、高脂肪食摂取による菌叢変化と酷似していた。そこで演者らは現在、胆汁酸が高脂肪食における菌叢変化の選択圧である可能性を提唱している（胆汁酸仮説）。この仮説を適用すると、食事と腸内細菌叢バランスの変動を理解しやすくなる[3)]。一方、胆汁酸はシグナル分子として、核内受容体 FXR を介して宿主の脂質代謝や糖代謝に深く関与していることも分かってきた。従って胆汁酸に着目して様々な解析を進めることは、高脂肪食の過剰摂取によるメタボリックシンドローム発症等の機構を解明する上での突破口となることが期待される。

1) *Gastroenterology* **141**:1773-1781(2011). 2) *J Bacteriol* **188**:1979-1986 (2006). 3) *Gut Microbes* **3**:455-459 (2012).

bile acid, gut microbiota, metabolic syndrome

講演番号：4SY19-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:30～ B 校舎 07 会場

マイオカイン研究のアプローチとその解析法
Approaches and analysis for finding myokines

○眞鍋 康子(首都大学東京　人間健康)
○Yasuko Manabe(Tokyo Metropolitan Univ.)

近年、これまで分泌器官とは考えられていなかった骨格筋から様々な生理活性物質が分泌され、全身性に多様な効果を発揮しているとの報告がある。骨格筋から分泌される生理活性物質は総称して「マイオカイン」と呼ばれている。しかし、これまでに発見されたマイオカインのほとんどは、動物や筋組織全体を用いる検証方法に頼っており、実際に報告されているマイオカインが骨格筋細胞由来なのか、その周辺細胞由来であるの検証がなされていないものが多い。また、「マイオカイン」の分泌機序やその生理作用に関しては、ほとんど明らかにされていない。

我々は、運動（筋収縮）をトリガーとして、筋細胞から分泌されるマイオカインを探索すべく、新たな骨格筋細胞の収縮系を構築した。培養骨格筋細胞株（C2C12 細胞）を十分に分化させ、白金電極を備えた専用の刺激電極を装着し、電気刺激を与えることで筋細胞の収縮が可能になった。この系で用いるパルスジェネレーターは、電気刺激による筋細胞の障害を引き起こすことなく最大限の刺激を与えることのできるような詳細な設定と培地中に流れる電流の測定が可能であり、細胞障害による細胞からの漏れとは区別して分泌タンパク質を発見できるという利点を有している。

マイオカインの探索は、この収縮モデルを用いて実施した。収縮した細胞の培養上清と収縮していない細胞の培養上清を定量プロテオーム解析に供し、収縮によって分泌の変化のあるもの同定した。さらに、収縮させた後の細胞を回収し、収縮により遺伝子発現変化があったものをマイクロアレイ法により同定した。以上の方法で得られた結果は、バイオインフォマティクスを用いた構造解析に供し、分泌されるタンパク質のみを選定し、マイオカインの候補とした。これらの候補となったものは、実際に分泌されるかを、細胞の培養上清をウェスタンブロッティングすることで検証した。

さらに選定されたものの中から、生理的に重要なマイオカインを絞り込むためのアプローチとしてショウジョウバエによる機能スクリーニングを行った。ショウジョウバエの骨格筋特異的に標的マイオカインを欠損させた遺伝子改変ショウジョウバエを作製し、その表現系として寿命を計測した。その結果、欠損ショウジョウバエでは寿命が減少するものがあった。骨格筋に欠損するだけで寿命に変化が現れるという事実は、そのマイオカインが全身性に重要な意味を有していると推測されるため、今後、遺伝子改変マウスを用いて、その生理作用を明らかにしていく。

マイオカインの研究は、まだ、歴史が浅く、多くは明らかにされていないが、運動による様々な健康効果を考慮すると、マイオカインが全身性の健康維持に深くかかわっている可能性が期待できる。

skeletal muscle, myokines, C2C12

講演番号：4SY19-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:15～ B 校舎 07 会場

骨格筋糖代謝と Notch シグナリング

Glucose metabolism and Notch signaling in skeletal muscle

○小野 悠介(長崎大学大学院医歯薬学)
○Yusuke ONO(Nagasaki University)

骨格筋は極めて可塑性に富んだ組織であり，負荷をかければ肥大し逆に使わなければ急速に萎縮する。加齢にともなう急激な筋力・筋量の低下は加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）とよばれ，日常生活動作（ADL）の低下や転倒骨折のリスク増加につながるロコモティブシンドローム発症に直結する。人類史上類を見ない超高齢社会を迎えた我が国では，要介護リスクの第一位であるロコモティブシンドロームが急増傾向にあり，社会的に深刻な問題になっている。また，骨格筋は運動器としてのみならず，生体内最大のエネルギー代謝臓器であることから，筋量減少は，糖尿病などのメタボリックシンドロームを発症しやすい素地をつくる。そのため，自立した健康な生活を営むことのできる健康寿命の延長や高騰する医療費の削減のためにも，筋量や筋代謝能を維持向上させることは重要である。

細胞膜貫通タンパク質である Notch は，さまざまな組織幹細胞の増殖や分化などの運命決定を制御する。哺乳類では Notch1～4 の 4 種類が存在し，近年のゲノム疫学研究から，Notch2 遺伝子座の変異は 2 型糖尿病発症リスクに関連することが指摘されている。しかし，Notch による幹細胞制御に関する研究は枚挙に暇がないが，増殖や分化能を失った成熟細胞に関する報告はほとんどない。我々は，マウス骨格筋における Notch2 の発現を調べたところ，骨格筋組織幹細胞に加え，最終分化を遂げた筋線維においても Notch2 が発現することを確認した。マウス骨格筋から単離培養した初代培養筋管細胞にインスリン刺激を行うと一過性にインスリンシグナルが活性化するが，インスリン刺激後期には Notch シグナルの誘導が観察された。培養筋管細胞の Notch2 発現を siRNA でノックダウンすると，インスリン受容体を不活性化するリン酸化 p70S6K の低下がみられ，インスリン感受性が亢進した。*in vivo* 糖負荷試験を行ったところ，骨格筋特異的 Notch2 欠損マウスは野生型と比較し糖取り込みが促進し，逆に，筋特異的活性型 Notch2 過剰発現マウスでは高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性の憎悪がみられた。以上の結果から，Notch2 はインスリンシグナルのネガティブフィードバック機構として働き，筋糖取り込みを負に制御していることが示唆された。

本シンポジウムでは，我々が最近見出した骨格筋エネルギー代謝における Notch の新規役割についてご紹介させていただく。

Glucose Metabolism, Skeletal Muscle, Notch

講演番号：4SY19-3
講演日時、会場：3 月 30 日 15:00～ B 校舎 07 会場

骨格筋インスリン抵抗性に対する食事療法の効果

Effects of dietary interventions on muscle insulin resistance

○寺田 新(東京大学　大学院総合文化研究科　生命環境科学系)
○Shin Terada(The University of Tokyo)

骨格筋は体重の約 4 割を占め、インスリン刺激による糖取り込みの 80%以上を担う重要な組織である。したがって骨格筋の血糖取り込み機能の低下、すなわち骨格筋のインスリン抵抗性が 2 型糖尿病の主な原因になると考えられている。本シンポジウムでは、骨格筋のインスリン抵抗性のメカニズムさらには、インスリン抵抗性に及ぼす食事療法の効果に関して最近得られた知見を紹介する。

骨格筋インスリン抵抗性の主な原因の一つとして内臓脂肪の過剰蓄積がよく知られている。また最近では、肥満者や糖尿病患者の骨格筋ではミトコンドリア量の減少や酵素活性の低下が認められることから、ミトコンドリア機能不全とそれに伴う細胞内への脂肪蓄積が骨格筋インスリン抵抗性の原因であるという説が提唱されている。しかしながら、ミトコンドリアが半減したとしても、通常の生活活動時における糖・脂質代謝が滞ることはなく、ミトコンドリアの機能不全がインスリン抵抗性の原因になるとは考えにくい。そこで我々は、高脂肪食を摂取したラットの骨格筋における糖取り込み機能とミトコンドリアとの関係を再評価した。その結果、長期間の高脂肪食の摂取により骨格筋ではインスリン抵抗性が惹起されるものの、ミトコンドリアを構成する酵素群の発現量はむしろ増加し、脂肪酸酸化能力も向上していた。したがって、骨格筋のインスリン抵抗性の原因にはミトコンドリアの機能不全は関与しないものと考えられる（Hancock et al. 2008)。

インスリン抵抗性を改善する代表的な方法として、摂取エネルギー制限が挙げられる。ラットに高脂肪食を摂取させた場合でも、自由摂取した場合の 7～8 割程度に食餌の摂取量を制限することで、内臓脂肪の蓄積および骨格筋インスリン抵抗性の発症を予防できることが報告されている（Kim et al. 2000)。また、最近では、新たな食事療法として 1 日毎に摂食と絶食を繰り返す間欠的絶食や糖質制限食が提唱されている。しかしながら、これらの食事療法が全身および骨格筋の糖代謝能に及ぼす影響は必ずしも明らかとなっていない。最近、我々はこれらの食事療法が糖代謝能に及ぼす影響についての検討を進めている。その結果、高脂肪食を摂取したラットに対し間欠的絶食を行うことで、内臓脂肪量が普通食摂取群と同程度にまで減少するものの、骨格筋の糖輸送体 GLUT-4 の減少が生じ、インスリン抵抗性が改善しないことが明らかとなった（Higashida et al. 2013)。また、糖質制限食を長期的に摂取した場合には、骨格筋に対する影響は認められないものの、脂肪組織及び消化管における糖輸送体の発現量が変化し、インスリン抵抗性が改善する可能性が示唆されている。

mitochondria, alternate-day fasting, carbohydrate-free diet

講演番号：4SY19-4
講演日時、会場：3 月 30 日 15:45～ B 校舎 07 会場

骨格筋アミノ酸代謝における遺伝子発現制御

Amino acid metabolism gene regulation in the skeletal muscle

○亀井 康富(京都府立大学生命環境科学研究科)
○Yasutomi Kamei(Kyoto Prefectural University)

骨格筋はヒトの体重の約 40%を占め、人体で最も大きい組織でありタンパク質（アミノ酸）の形でエネルギー貯蔵を行なっている。飢餓時においては、骨格筋はアクチンやミオシンといった構成タンパク質を分解し、生成したアミノ酸は他臓器にてエネルギー源として利用される。骨格筋は環境の変化に順応する可塑性があり、例えば、適切な運動トレーニングと十分な栄養により肥大する。骨格筋の肥大化は、同化ホルモンであるインスリンや IGF-1 などの作用が知られるとともに、分岐鎖アミノ酸(BCAA)が骨格筋を肥大化させるという知見がある。一方、寝たきりやギプス固定、飢餓や加齢などによって、骨格筋の萎縮が生じる。その結果、エネルギー消費減少（肥満）や、糖取り込み能の低下・血糖値上昇（糖尿病）へと向かう。高齢化社会を迎えている我が国において、生活習慣病の予防や生活の質の維持に大きな役割を果たす骨格筋の代謝能および肥大・萎縮の分子機序を理解する事は、国民の健康の維持・増進を目指した筋萎縮・筋機能不全の予防法の開発のために重要である。

Forkhead protein-01（FOXO1）はフォークヘッド型の転写因子であり、生体代謝の同化ホルモンであるインスリンシグナルに拮抗する。我々は、数年来、個体レベルで FOXO1 の骨格筋代謝調節機構を検討してきた。すなわち、エネルギー欠乏により骨格筋における FOXO1 の遺伝子発現が増加することを踏まえ、FOXO1 を骨格筋特異的に過剰発現する遺伝子改変マウスを作製し、FOXO1 が骨格筋萎縮を引き起こすことを示した。また、脂質合成および糖取り込み増加が FOXO1 によって抑制されることを見出した。さらに、タンパク質分解酵素遺伝子が FOXO1 によって転写活性化されることを示した。この結果は、FOXO1 が骨格筋でのエネルギー欠乏への適応（糖利用の抑制、タンパク質分解促進）に役割を果たす事を示唆する。

FOXO1 のみならず、転写共役因子 PPARγ co-activator 1α（PGC1α）は、骨格筋代謝および骨格筋量の維持に重要であることが示唆される。我々は、PGC1α が骨格筋のミトコンドリア増加とエネルギー代謝（脂肪酸β酸化）亢進を引き起こすことを見出した。さらに、PGC1α の過剰発現により、筋萎縮が抑制される事が報告されている。一方、我々は、骨格筋において FOXO1 がグルタミン合成酵素の遺伝子発現を、PGC1α が BCAA 分解酵素の遺伝子発現を増加させるデータを得ており、FOXO1 と PGC1α はそれぞれ、骨格筋のアミノ酸代謝に重要な役割を果たすことが示唆される。本研究では FOXO1 および PGC1α を骨格筋アミノ酸代謝の主要制御因子と想定し、その分子機序を明らかにするとともに FOXO1 と PGC1α が骨格筋量を調節する作用機序について検討を行なっている。

skeletal muscle, transcription factor, metabolic syndrome

講演番号：4SY20-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:35～ D 校舎 02 会場

酵素合成グリコーゲンの生体防御機能活性化作用

Immunomodulating effect of Enzymatically Synthesized Glycogen

○角谷 亮[1]、安達 禎之[2]、梶浦 英樹[3]、古屋敷 隆[1]、高田 洋樹[1]、栗木 隆[1]、大野 尚仁[2]([1]江崎グリコ(株)健康研、[2]東京薬科大・薬・免疫、[3]グリコ栄食(株)開発部)
○Ryo Kakutani[1], Yoshiyuki Adachi[2], Hideki Kajiura[3], Takashi Furuyashiki[1], Hiroki Takata[1], Takashi Kuriki[1], Naohito Ohno[2]([1]Ezaki Glico Co., Ltd., [2]Tokyo Univ. of Pharm. & Life Sci., [3]Glico Nutrition Co., Ltd.)

グリコーゲンは天然に存在するα-1,4/1,6 グルカンであり、多くの分岐をもつ球形の高分子である。グリコーゲンの分子量は 10^6～10^8 にも達するが、その分子サイズは直径 20～60 nm と小さいことから、構成糖であるグルコースが高度にパッキングされた構造をとっていると考えられる。グリコーゲンは動物の肝臓や筋肉に多く含まれており、血中グルコース濃度の調節や筋肉活動へのエネルギー供給など、主に貯蔵多糖としての役割を担っている。その他にも、脳、胸腺、心臓、皮膚、胎盤、膣、軟骨、白血球など、様々な組織及び細胞に存在することが知られている。

貯蔵多糖として知られるグリコーゲンであるが、1998 年にホタテ及びカキ由来グリコーゲンの免疫賦活効果が報告された。グリコーゲンの微細構造の違いが免疫賦活効果に影響することが推察されたが、グリコーゲンの詳細な効果発現メカニズムはわかっていなかった。我々は、大きさや構造の異なる様々なグリコーゲンを酵素で合成する方法を確立し、得られた酵素合成グリコーゲン（Enzymatically synthesized glycogen；ESG）を用いて、グリコーゲンを経口摂取した際の効果を中心に、グリコーゲンの構造と生理機能発現の関係について検討した。

腫瘍細胞を移植したマウスに ESG を経口投与したところ、経時的な腫瘍の成長が抑制され、マウスの生存日数が延長された。また、ESG 経口投与により、マウス脾臓の Natural killer（NK）細胞の活性が上昇することを見出した。さらに *in vitro* の検討において、ESG は小腸の免疫組織であるパイエル板の細胞を活性化した。ESG の各種消化酵素に対する分解性を調べたところ、ESG はデンプンなどの他のα-グルカンと比べて明らかに低分子化しにくかった。この分解耐性により、経口投与した ESG は小腸まで届き、パイエル板細胞を活性化することで生体防御機能を亢進していると推察された。次に、免疫細胞への ESG の作用メカニズムを検討した。各種受容体発現レポーター細胞およびノックアウトマウスを用いて ESG を認識する受容体の探索を試みたところ、自然免疫受容体の一つである Toll-like receptor 2（TLR2）が ESG の細胞刺激活性に重要な役割を果たしていることを見出した。ELISA 法による結合試験においても、ESG と TLR2 が直接結合することが示された。ESG が細胞表面上にある TLR2 に作用することにより、MAPK および NF-κB などのシグナル伝達系が活性化され、種々のサイトカインの産生が誘導されることが推察された。

本研究により、グリコーゲンの免疫細胞活性化メカニズムの一端が示されたとともに、免疫強化に有効な食品素材としての可能性が示された。

Glycogen, Immunomodulating activity, Peyer's patch

講演番号：4SY20-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:05～ D 校舎 02 会場

ミルク由来スフィンゴ脂質の抗炎症作用
Anti-inflammatory effect of milk-derived sphingolipids
竹島 一憲[1]、副島 理人[1]、森 悠美[1]、春田 裕子[2]、酒井 史彦[2]、門岡 幸男[2]、矢ヶ崎 一三[1]、○三浦 豊[1]([1]東京農工大学・院・応用生命化学、[2]雪印メグミルク（株））
Kazunori Takeshima[1], Rihito Soejima[1], Yumi Mori[1], Yuko Haruta[2], Fumihiko Sakai[2], Yukio Kadooka[2], Kazumi Yagasaki[1], ○Yutaka Miura[1]([1]Tokyo Univ. of Agric. & Tech., [2]Megmilk Snow Brand Co.)

スフィンゴ脂質はセラミドにリン酸コリンや糖鎖が結合した両親媒性の脂質であり、主として細胞膜に存在している。スフィンゴ脂質は動物性食品ではミルクや卵に、植物ではトウモロコシ、コメなどに多く含まれており、植物セラミドはすでに機能性食品素材としてその利用に関する研究が進められている。一方動物性スフィンゴ脂質は、その機能性や栄養学的な作用などについては不明な点が多く残されている。我々はミルク由来のスフィンゴ脂質に注目し、その機能性を明らかにすることで、新たな機能性食品素材としての利用の可能性を検討している。本シンポジウムではミルク由来スフィンゴ脂質濃縮物の免疫系および炎症に対する作用を検討した結果を中心に紹介する。

これまでにミルク由来スフィンゴ脂質濃縮物 MC-5 をヘアレスマウスに経口摂取させると皮膚の水分蒸散量が減少することが報告されている。アトピー性皮膚炎等では皮膚バリア機能が低下し、症状が悪化することが知られている。そこで、まず塩化ピクリル誘導性皮膚炎への MC-5 の作用を検討した。NC/Nga 雄性マウスに対照食である 20%カゼイン食（20C）および 20C の脂質分の一部を 12%の MC-5 で置換した MC-5 含有食を 2 週間摂取させた後、塩化ピクリルによりかぶれに類似した皮膚炎症状を惹起させた。その結果、MC-5 含有食の摂取により、皮膚炎の臨床スコアが有意に低下し、引っ掻き行動の持続時間、頻度も MC-5 群で低下する傾向を示した。また MC-5 食の摂取は脾臓および腸管膜リンパ節由来リンパ球のサイトカイン産生能を抑制する傾向を示し、特に炎症性サイトカインである IL-6 の産生を有意に低下させていた。また皮膚炎症部位において真皮内に浸潤したマスト細胞数および浸潤後に脱顆粒したマスト細胞数の両者が有意に低下しており、食事性の MC-5 は全身および皮膚局所において炎症を抑制していることが示唆された。MC-5 の抗炎症作用をさらに確認するため、カラゲニン誘導性急性炎症モデルについても検討したところ、MC-5 の摂取が急性炎症を抑制することも明らかになった。また MC-5 食摂取マウスにオボアルブミンを抗原として免疫を行ったところ、抗原特異的 IgE 産生が抑制される傾向があることも見出している。

これらの結果より、経口摂取したミルク由来スフィンゴ脂質は免疫抑制的に作用し、その結果として抗炎症作用が示された可能性が考えられる。免疫系を調節し、炎症を抑制しうる新たな機能性食品因子として、動物性のスフィンゴ脂質を利用できる可能性が示されたと考えている。しかしスフィンゴ脂質の消化吸収過程には不明な点も多く残されており、さらに今回用いたものはスフィンゴ脂質混合物であるため、その作用本体の同定を含め、詳細な作用の解明には更なる検討が必要である。

Sphingolipid, Inflammation, immune system

講演番号：4SY20-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:35～ D 校舎 02 会場

ビタミン A による腸管免疫応答制御

Role of vitamin A in intestinal immune regulation

○中妻（横田） 彩[1,2]、岩田 誠[1,2]([1]徳島文理大香川薬、[2]JST, CREST)
○Aya YOKOTA-NAKATSUMA[1,2], Makoto IWATA[1,2]([1]Tokushima Bunri Univ., [2]JST, CREST)

腸管粘膜は、食物とともに多くの病原微生物が侵入してくる危険に絶えず曝されているため、生体防御の最前線として多数のリンパ球を配備し、最大の免疫防御システムを発達させている。当グループは、ビタミン A の代謝産物であるレチノイン酸が、小腸組織に T 細胞を配備するための必須因子であることを発見した。一般に、二次リンパ系組織には、その担当組織から抗原情報を持った樹状細胞が移入してきている。そこで、血管から移住してきたナイーブ T 細胞が樹状細胞と出会って抗原刺激を受けると、エフェクター／メモリーT 細胞へと分化するとともに、その担当組織への帰巣（ホーミング）特異性を刷り込まれる。これにより、抗原特異的 T 細胞が抗原の侵入してきた組織に的確に配備され、効率良くその機能を発揮することになる。小腸パイエル板や腸間膜リンパ節などの腸管関連二次リンパ系組織には、レチノイン酸産生酵素の一つである retinal dehydrogenase 2（RALDH2）を発現する樹状細胞が存在し、T 細胞に抗原提示する際にレチノイン酸を与えることによって、小腸ホーミング特異性を刷り込む。粘膜免疫に重要な IgA 抗体産生細胞の小腸ホーミングも、同様のメカニズムでレチノイン酸は決定的な役割を担う。そのため、ビタミン A 欠乏飼料摂取によって生体内のレチノイン酸レベルが低下したマウスでは、小腸組織から T 細胞や IgA^+ B 細胞がほどんど消失する。

一方、腸管粘膜は、生体にとって無害な異物である食物や腸内共生細菌などに対しては免疫応答を起こさないよう、全身性の免疫寛容状態（経口免疫寛容）を確立している。レチノイン酸は、腸に存在する誘導型制御性 T 細胞や炎症誘導性 Th17 細胞の分化にも影響することが複数のグループにより報告され、経口免疫寛容の誘導にもレチノイン酸が関与することが示唆された。最近、当グループは、ビタミン A 欠乏マウスでは腸間膜リンパ節樹状細胞がその性質を著しく変化させ、Th17 細胞だけではなく、IL-13 を高産生する新規炎症性 T 細胞を誘導することを見出した。これらのマウスでは経口免疫寛容は破綻し、IL-13 依存的に経口抗原に対する強い抗体産生が誘導された。レチノイン酸シグナルの欠如が食物抗原に対するアレルギー炎症反応の一因となることを見出した。

以上のように、腸管関連二次リンパ系組織の $RALDH2^+$樹状細胞が産生するレチノイン酸は、直接的および樹状細胞自身の機能制御を介して間接的に、リンパ球のホーミング組織特異性と機能分化の方向性を制御し、腸管免疫系の恒常性を維持するために必須な key player となっている。現在、当グループは $RALDH2^+$樹状細胞の誘導メカニズムの全貌を明らかにし、アレルギーや炎症性疾患などの発症予防や治療を目的とした医療技術の開発を目指して研究を進めている。

retinoic acid, lymphocyte trafficing, oral tolerance

講演番号：4SY20-4
講演日時、会場：3 月 30 日 15:05～ D 校舎 02 会場

腸内共生菌と食品成分の相互作用による腸管免疫応答調節

Intestinal immunomodulation by the interaction of gut commensal bacteria and food components

○細野 朗(日本大生資科)
○Akira Hosono(Nihon Univ.)

生体で最大の免疫系組織である腸管には膨大な数と種類の腸内細菌が共生し，この腸内共生菌が宿主の消化吸収はもちろんのこと，免疫系に対しても大きな影響を及ぼしている．なかでも，*Bacteroides* や *Lactobacillus* はヒトやマウスの腸内細菌叢を構成する細菌の優勢菌のひとつであるが，その菌種としての特性や宿主に及ぼす機能性については，近年注目が集まっている．腸内共生菌は摂取した食品由来成分や腸内共生菌の代謝産物などの腸内環境によって強く影響を受けており，グラム陰性菌である *Bacteroides* はオリゴ糖をはじめとする難消化性糖類を資化することができることが明らかになっている．特に，*Bacteroides* がフラクトオリゴ糖やその構成糖であるケストース（GF2）およびニストース（GF3）をいずれも資化することで腸内での *Bacteroides* の増殖が活性化される．さらに，*Bacteroides* は腸管免疫系に対して免疫修飾作用を有し，腸管関連リンパ組織の細胞応答における IgA 産生誘導能は *Lactobacillus* よりも強い特徴をもっている．例えば，腸内細菌をもたない無菌マウスにおいては，腸管関連リンパ組織の形成が未熟であるとともに，IgA 産生応答も低応答性であるが，無菌マウスに *Bacteroides* を定着させたノトバイオートマウスにおいては，小腸および盲腸のリンパ節における胚中心の形成を誘導するとともに，腸管粘膜固有層での総 IgA 産生の活性化がみられる．特に，無菌マウスでは大腸部位において IgA 産生はほとんどみられないのに対し，*Bacteroides* ノトバイオートマウスにおいては盲腸や結腸部位における胚中心形成がみられることや，腸管組織中の粘膜固有層のおける IgA 産生が顕著に誘導されており，IgA クラススイッチの活性化を介した免疫調節作用がその特徴として観察される．このとき，無菌マウスにおける結腸リンパ節細胞の IgA 産生応答は同マウス由来のパイエル板細胞に比べて低応答であったが，*Bacteroides* ノトバイオートマウスの結腸リンパ節細胞は同マウス由来の小腸パイエル板細胞と同程度の IgA 産生がみられ，腸管内に定着した *Bacteroides* が結腸部位の免疫応答に対して顕著な影響を与えている可能性が示唆されている．一方，グラム陽性菌である *Lactobacillus* の特徴は，*Bacteroides* の菌体成分に比べて抗原提示細胞を介した T 細胞応答や抗体産生を制御する機構が考えられ，よる免疫修飾作用は抗原提示細胞を介した T 細胞応答の活性化や炎症反応の制御などを通して，生体の生理機能にも大きな影響を与えていると考えられる．

Bacteroides, IgA, colon

講演番号：4SY20-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:30～ D 校舎 02 会場

生体分子イメージングでみる生活習慣病における免疫細胞賦活化機構の解明

Inflammatory responses in adult common diseases visualized by in vivo imaging

○西村 智(東京大学 医学系研究科循環器内科 東京大学　システム疾患生命科学による先端医療技術開発拠点 自治医科大学分子病態治療研究センター　分子病態研究部)
○Satoshi Nishimura(Jichi Medical Univ, The Univ of Tokyo)

従来、免疫学は、胸腺・骨髄・リンパ節・脾臓といった、”免疫系臓器”のみが着目され、研究がすすめられてきた。しかし、近年の研究により、代謝性疾患においては、末梢、特に、代謝臓器における免疫系の細胞の重要性が明らかになってきている。たとえば、脂肪組織の間質には多数の免疫系細胞が存在し、肥満においてはＣＤ８陽性Ｔ細胞およびマクロファージが、慢性炎症を引き起こし、メタボリック症候群発症の契機となることがわかっている。

我々は、独自に開発した生体イメージング手法を、各種、病態モデル動物（肥満、動脈硬化、免疫不全、炎症モデル）・遺伝子改変動物に適応して、局所の臓器における炎症性・免疫細胞の動態と、その賦活化・活性化・遊走といった病態を可視化したきた。また、これらの結果をふまえて、複雑脂質や脂質メディエーターなどが、いかに生体内において局所免疫を賦活化し、脂肪組織炎症などの病態を引き起こしているかを明らかにしている。本シンポジウムでは現在まで我々が得ている、脂肪組織免疫賦活化機構と脂質の関わりについて明らかにしていく。

我々は、イメージング手法を用いて、肥満脂肪組織においてCD8陽性T細胞が浸潤し、炎症性マクロファージの浸潤を引き起こし、脂肪組織炎症と糖尿病病態を悪化させていることを示している。さらに、脂肪組織、特に皮下脂肪にはB細胞が多数存在しており、IL-10を発現し、脂肪組織の炎症に関わっていた。以上より、脂肪組織の中では、間質に多数存在する免疫細胞・炎症性細胞が相互作用し、病態を形成していると考えられた。

さらにメタボリックシンドロームのバイオマーカーの探索から、複雑脂質生合成酵素であるオートタキシン（Ｅｎｐｐ２）が肥満における脂肪細胞分化を規定していることも明らかにした。血清リン脂質とその生合成酵素は新規のMSに対する有用なバイオマーカーとなるだけでなく、新しい抗肥満・抗糖尿病治療の標的ともなり得ると考えられた。

我々の開発した生体イメージングは、従来の手法ではアプローチできなかった細胞間相互作用を生体内で直接可視化するもので、今後、多くの研究領域において重要な役割を果たすと考えられる。

inflammation, metabolic syndrome, obesity

講演番号：4SY20-6
講演日時、会場：3 月 30 日 16:00～ D 校舎 02 会場

加齢による免疫機能変化と食品による調節

Alteration of immune functions by aging and its modulation by foods

○八村 敏志[1]、田之倉 優[2]([1]東大院・農生科・食の安全研セ、[2]東大院・農生科・応生化)
○SATOSHI HACHIMURA[1], MASARU TANOKURA[2]([1]Research Center for Food Safety, Univ. Tokyo, [2]Dept. Applied Biological Chemistry, Univ. Tokyo)

加齢により免疫機能が変化することが知られている。この中で、一般的に抗原特異的な免疫応答は低下するが、その一方で、炎症反応は増強することが近年指摘されている。これら加齢による免疫機能の変化は、高齢者における感染症や炎症性疾患発症の要因となっている可能性が考えられる。

我々は加齢マウスにおいて、脾臓細胞の IL-6 産生が亢進することを観察していた。この IL-6 を産生する細胞について検討したところ、免疫組織の支持構造を構成する非血球系の $CD45^-$ストローマ細胞の IL-6 産生が、若齢マウスと比較して加齢マウスにおいて高いことが示された。ストローマ細胞は、リンパ組織の構造を形成する役割に加え、免疫応答を調節する機能が最近注目されている。ストローマ細胞による炎症性サイトカイン産生が加齢による炎症亢進に関わる可能性が示された。

一方で、加齢により低下する機能として、リンパ球のマイグレーション能がある。腸管における細胞のマイグレーションは、適切な腸管免疫応答のために重要であり、腸管において産生されるレチノイン酸が、腸管指向性のホーミングレセプターを誘導する。我々は、加齢マウスにおいて $CD4^+$T 細胞をレチノイン酸存在下で抗原刺激した際に誘導されるケモカインレセプターCCR9 の発現が低いことを見出した。CCR9 のリガンドは腸管で多く産生される CCL25 であるが、このような条件で刺激した若齢マウスの細胞では認められる CCL25 に対する遊走能が、加齢マウスの細胞では観察されなかった。これらを含めた結果により、加齢により腸管免疫系における $CD4^+$T 細胞のマイグレーション能が低下しており、その一因がレチノイン酸に対する応答性の低下であることが示唆された。

このような加齢による免疫機能の変化を、食品成分の摂取によって、より好ましい状態に調節することができれば、高齢者の健康増進に有用である。本シンポジウムではさらに、こうした食品由来因子による免疫調節について紹介したい。

aging, immune function, food

講演番号：4SY21-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:35～ A 校舎 09 会場

無機リン酸化合物のバイオサイエンスとテクノロジー

Bioscience and biotechnology of inorganic phosphate compounds

○黒田 章夫(広島大院先端)
○Akio Kuroda(Hiroshima Univ.)

一言で無機リン酸と言っても、その化学形態は多様である。リン酸が重合すれば「ポリリン酸」になり、また還元されれば「亜リン酸」になる。これらの重合型リン酸、還元型リン酸（演者らの造語）がリン酸に戻るとき、それぞれ生命のエネルギーである ATP と還元力である NADH が生み出される。リン酸を回収して化学的に重合（加熱縮合）や水素還元することができれば、持続型の生命エネルギー再生系ができ上がる。また、リンは生命にとって必須な元素であることから、生育に制限を加えることが出来る。本講演では、これら無機リン酸化合物のバイオサイエンスとテクノロジーについて最近の研究を幾つか述べたい。

【無機リン酸化合物による ATP、NADH 再生系】亜リン酸（H_3PO_3）はリンの酸化数が＋3 価のリン酸（還元型リン酸）である。生物界のリン酸は通常＋5 価のリン酸（H_3PO_4）として循環しているが、まれに価数の少ないリン酸が存在し、一部の微生物が利用している。亜リン酸デヒドロゲナーゼ（PtxD）は亜リン酸をリン酸へ酸化し、その際に NAD^+を還元する酵素である。還元型リン酸の酸化の研究の歴史は古く、1966 年には NAD^+依存性亜リン酸デヒドロゲナーゼが発見されていた。2001 年 Costas らが *Pseudomonas stutuzeri* の NAD^+依存性亜リン酸デヒドロゲナーゼの一次構造を明らかにした。我々は、強力な亜リン酸酸化菌 *Ralstonia sp.* の単離に成功し、亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 *ptxD* を取得した。亜リン酸と共役した NAD^+の還元は、ほぼ不可逆的に NADH の合成にかたよっている。我々の PtxD は、これまでになく安定で比活性の高い酵素であり、優れた NAD(P)H 再生系になることが分かった。

一方、ポリリン酸は数十から数百のリン酸が高エネルギーリン酸結合で直鎖状につながった無機ポリマーである。ポリリン酸キナーゼはポリリン酸を使って ADP から ATP を合成（Class I）、あるいは AMP から ADP を合成する酵素（Class II）である。我々は最近 AMP から ATP を合成する一群の PPK（Class III）が存在することを明らかにした。安価なリン酸化合物を基質にした PPK-ATP 再生系と PtxD-NADH 再生系は、廃棄物がすべてリン酸であり、多くのバイオものつくりに利用可能であると考えている。

【無機リン酸化合物によるによる選択培養】多くの生物は還元型のリン酸である亜リン酸を直接利用できない。*ptxD* を異種生物（微生物、植物）に導入したところ、亜リン酸をリン源とする選択培地で生育が確認できた。抗生物質による選択培養は、実用規模では難しいとされている。本技術では、亜リン酸をリン源とし、亜リン酸酸化酵素を選択マーカーとして用いることで、この問題を解決したいと考えている。

polyphosphate, phosphite, coenzyme regeneration

講演番号：4SY21-2
講演日時、会場：3 月 30 日 13:59～ A 校舎 09 会場

ペプチド合成: 酵素のユニークな機能と新規反応機構
Peptide synthesis: Unique function of enzymes

○小林 達彦(筑波大・生命環境)
○Michihiko Kobayashi(Univ. Tsukuba)

我々はこれまで微生物におけるニトリル代謝研究で、関連酵素の著量誘導生成、新規の翻訳後修飾や触媒反応機構、ユニークな発現制御機構などを発見、解明するとともに、その一部の機能を利用した有用物質生産の応用研究を行ってきた[1-4]。本シンポジウムでは、一連の研究の過程で発見した酵素と、その酵素が属するスーパーファミリー内の酵素が触媒する新規反応について紹介したい。

我々は、ニトリル代謝によって生成する酸の代謝に アシル CoA 合成酵素が関与することを実証した[5,6]。一般的に脂肪酸代謝の第 1 段階に関与し、広くはベータ酸化系の初発酵素として知られるアシル CoA 合成酵素は、脂肪酸と CoA を基質しアシル CoA の合成を触媒するが、我々は本酵素の基質特異性を詳細に解析している過程で、本酵素がユニークな触媒機能を有することを発見した。即ち、CoA の代わりに L-システインやチオール含有アミノ酸誘導体等を基質として用いた場合、本酵素の本来の反応であるチオエステル結合(-CO-S-)形成ではなく、アミド結合（-CO-NH-）形成を触媒することを明らかにした。また、サッカロマイセス属のアセチル CoA 合成酵素を酢酸と L-システインに作用させた場合にも同様にアミド結合反応を触媒した[7]。

アシル CoA 合成酵素とアセチル CoA 合成酵素が触媒する本来のチオエステル結合形成反応は、(1) 酸と ATP が反応し、酸のアデニル化によるアシル AMP の形成と、(2) アシル AMP が CoA と反応して、AMP と CoA の置換によるアシル CoA の合成の２つの連続した反応から成る。反応の最初の段階でアシル AMP を形成する特徴をもつ酵素はアデニレート合成酵素スーパーファミリーを形成している。そこで、本スーパーファミリーに属する他の酵素についても本新規反応を触媒するかを検討した結果、いずれの酵素もアミド結合形成を触媒する機能を有することが判明した。例えば、甲虫ルシフェラーゼはルシフェリンをオキシルシフェリンに変換（同時に発光）する反応を触媒するが、本酵素の基質として L-システインとルシフェリンを用いた場合、*N*-ルシフェリル L-システインが生成された。また、非リボソームペプチド合成酵素のアデニレーションドメインも対象とし、ジペプチドやトリペプチド、オリゴペプチドの生成検討も行った。

アデニレート合成酵素スーパーファミリーに属する酵素が何故、チオエステル結合形成以外のアミド結合およびペプチド結合形成反応を触媒するのか興味深い。反応機構についても考察したい。

1) *Nature Biotechnol.*,16, 733 [1998]; 2) *PNAS*, 103, 564 [2006]; 3) *PNAS*, 105, 14849 [2008]; 4) *PNAS*, 110, 2810 [2013]; 5) *JBC*, 280, 8660 [2005]; 6) *J. Bacteriol.*, 190, 4210 [2008]; 7) *JBC*, 283, 11312 [2008]

amide bond, peptide bond, thioester bond

講演番号：4SY21-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:23～ A 校舎 09 会場

アミノ基修飾型キャリアタンパク質を介した二次代謝産物の生合成

Biosynthesis of secondary metabolites using amino group-modifying carrier protein

○西山 真(東大生物工学セ)
○Makoto Nishiyama(BRC, The Univ. of Tokyo)

リジンは全ての細菌でジアミノピメリン酸経路を経て生合成されると考えられていたが、我々は高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* において、リジンがカビのリジン生合成と同様にαアミノアジピン酸（AAA）を経由して生合成されることを発見した。前半部分である AAA まではカビのリジン生合成と同様であるが、後半部分はアルギニン生合成に類似した反応で進行する[1)]。同リジン生合成では、50 アミノ酸残基あまりからなる LysW と名付けた低分子タンパク質が、生合成中間体である AAA のアミノ基の保護修飾をすると同時に、より効率の良い生合成を行うための各生合成酵素へのキャリアとして機能する。最近、我々は超好熱性アーキアがリジン生合成だけでなくアルギニン生合成においても、グルタミン酸のアミノ基の保護修飾に LysW ホモログを使うことを見いだし、LysW ホモログを用いる物質変換系が生物の一次代謝に重要な働きを持つことを見いだした[2)]。次いで、同様なキャリアタンパク質を用いる物質変換系を他の生物で探索したところ、放線菌において同様なシステムが存在することを見いだした。放線菌はジアミノピメリン酸経路でリジンを生合成することから、それらのホモログがどのような物質変換系に関わるかについて興味が持たれた。現在、我々は同ホモログを有する *Streptomyces* sp. SANK 60404 株（以下、SANK 60404 株）を対象として LysW ホモログが関わる物質変換系の解明を試みている。SANK 60404 株では、LysW ホモログをコードする遺伝子の近傍に NRPS をコードすると予想される遺伝子がクラスターとなって存在しており、これらが二次代謝産物の生合成を担っていることが予想された。*T. thermophilus* のリジン生合成の最終段階では、LysW に付加した AAA の側鎖がリジン側鎖へと変換され、最後に LysW 部分が切り離されることでリジンが生成する。そこで SANK 60404 株において LysW ホモログを切り離す段階を触媒すると考えられる酵素の遺伝子破壊株を作製し、そこから精製した LysW ホモログに付加している化合物の分子量を MS/MS により決定した。クラスターを構成する各遺伝子の推定機能から、当該分子量の化合物を生産するために必要な遺伝子を推定し、組換え大腸菌を用いて同化合物の大量調製を行い、化学構造を決定した。現在、最終産物の構造決定を試みている。これに加えて、約 900 株の放線菌のゲノムをスクリーニングし、LysW ホモログが多くの二次代謝産物の生合成に利用されることが明らかになりつつある。本シンポジウムでは LysW ホモログを利用した二次代謝生合成研究の現状を紹介する。

1) Horie, A., et al., (2009) *Nat. Chem. Biol.*, 5:673-679. 2) Ouchi, T., et al., (2013) *Nat. Chem. Biol.*, 9:277-283.

Secondary metabolite, *Streptomyces*, Carrier protein

講演番号：4SY21-4
講演日時、会場：3 月 30 日 14:47～ A 校舎 09 会場

共培養によって誘発されるシンビオバクテリウムのアミノ酸代謝
Coculture-dependent amino acid metabolism in *Symbiobacteirum*

○上田 賢志(日大生物資源)
○Kenji Ueda(Nihon Univ.)

共生細菌 *Symbiobacterium thermophilum*（ST）は、耐熱性トリプトファナーゼ（TNase）を生産する好熱菌の探索において広島県の堆肥から分離された細菌である。自由生活性の本菌が共生細菌として捉えられる理由は、寒天平板上で単独のコロニーを形成する能力がない一方で、共に分離された *Geobacillus stearothermophilus*（GS）と液体静置 60℃の条件で共培養すると、10^8cells/ml を越える細胞数にまで対数的な増殖を示すためである。これまでに発表者らは、本菌の特性を様々な角度から検証してきた。

ST の増殖を支持する主要因は炭酸ガスである。ST は、10%の CO_2 を含む嫌気雰囲気下で 10^7cells/ml 程度にまで単独増殖させることができる。本菌が CO_2 を要求するメカニズムの詳細は不明であるが、他のモデル生物における遺伝子破壊試験やゲノム情報に基づいた観察などから、炭酸脱水酵素の欠損がその遺伝的基礎のひとつになっていることが推測されている。

今回の発表では、増殖を支持する濃度よりさらに高い濃度の CO_2 が ST のアミノ酸代謝を誘発している可能性について述べる。発見当初から、ST は GS との共培養で顕著な TNase 活性を示したが、上記の単独培養の条件ではその活性が認められない。一方、単独培養時に培地に 10 mM 重炭酸アンモニウムを添加すると本酵素の顕著な活性が認められた。等濃度の他のアンモニウム塩には活性が認められないことなどから、高濃度の重炭酸が TNase 活性誘発の引き金になっていることが推測された。

ST の *tna* オペロンは、2 つの TNase パラログをコードする遺伝子 *tna1*/*tna2* とトリプトファン輸送体遺伝子 *tnaT* が並んだ構造をとり、*tna2* の前に位置するプロモーター（P*tna2*）が 3 遺伝子の主要な転写を司っていると考えられる。転写解析の結果から、P*tna2* の活性が重炭酸添加の条件で顕著に上昇していること、また P*tna2* はおそらく σ^{54} 依存的に転写されることが示された。ST の *tna* オペロンの転写は、大腸菌などで知られるトリプトファン依存的なリーダーペプチドの機能を介した制御とは全く異なる調節を受けていることが強く示唆される。

tna2 の上流側には隣接して PAS ドメインを有する σ^{54} 依存的転写活性化蛋白質（EBP）がコードされている。類型の EBP 遺伝子がロイシン脱水素酵素を含む他のアミノ酸代謝関連遺伝子の近傍にも分布していることから、高い濃度の重炭酸がこのタイプの EBP による調節を介して一連のアミノ酸代謝遺伝子の転写を誘起する「重炭酸レギュロン」が存在し、ST ならびに類縁の嫌気性細菌群における共生依存的な増殖の一支持基盤を形成していることが推測される。

microbial interaction, tryptophanase, CO2

講演番号：4SY21-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:11～ A 校舎 09 会場

大腸菌代謝フローにおけるカスケード制御
Cascade Regulation in Metabolic Flux States in *E.coli*

○田中 寛、島田 友裕(東工大資源研)
○KAN TANAKA, TOMOHIRO SHIMADA(Tokyo Institute of Technology)

代謝系は全ての生物に普遍性が高く、自在にその流れを変えながら、様々な局面で重要な生命現象を引き起こしている。しかし、代謝制御に関わる知見が蓄積した今日でも、代謝フローの方向性を細胞が操る機構は明確でなく、任意の人為操作が可能となる目処も立っていない。私達は研究の背景となる情報に富んだ大腸菌を材料とし、代謝フローの転換を引き起こす分子機構の「枠組み」を明らかにすることを目的として研究を進めている。

これまでの研究で、グルコースを主要な炭素源とした最小培地でのバッチ培養系を用い、培養開始時のグルコースを低濃度（0.002%）とすることで、主要な代謝フローが解糖系によるグルコース酸化（State I)、アセチル CoA から酢酸へ（State II)、酢酸から TCA 回路へ（State III)、非主要炭素源のサルベージと再変換（State IV）の代謝ステート（Metabolic States）を順次遷移していく実験系を確立した。この遷移の状況は、細胞内のレドックス状態に鋭敏に反応する *Vibrio* 由来ルシフェラーゼ活性によりモニターすることが可能であり、関連する代謝酵素や制御因子の変異株で調べることで、特定の酵素（因子）がどの代謝ステートに、あるいは代謝ステート間の遷移に働くかを解析することができる。本発表では、これまで不明確であったアイソザイム間の役割分担、アセチル化やリン酸化などの酵素修飾の意義や動態、調節因子のアセチル化制御などの新しい知見について紹介したい。

carbon metabolism, regulatory cascade, Escherichia coli

講演番号：4SY21-6
講演日時、会場：3 月 30 日 15:35～ A 校舎 09 会場

超好熱菌を対象とした代謝工学
Metabolic engineering in hyperthermophilic archaea
○跡見 晴幸[1,2]、佐藤 喬章[1,2]、今中 忠行[2,3]、金井 保[1,2]([1]京大院工、[2]JST, CREST、[3]立命館大・生命科学)
○Haruyuki Atomi[1,2], Takaaki Sato[1,2], Tadayuki Imanaka[2,3], Tamotsu Kanai[1,2]([1]Grad. School Eng., Kyoto Univ., [2]JST, CREST, [3]College of Life Sciences, Ritsumeikan Univ.)

Thermococcus kodakarensis は至適生育温度 85℃の超好熱性アーキアで、ペプチド・アミノ酸・多糖類など多様な有機物を資化できる絶対従属栄養生物である。本菌はゲノム解析が完了し、さらに遺伝子操作系が構築されている数少ない超好熱菌でもある。我々は本菌の特異な代謝機構に興味をもち、その解糖・糖新生、ペントース・核酸代謝、アミノ酸異化代謝・生合成などに関与する酵素の同定を進めてきた。ここでは *T. kodakarensis* の chitin 分解活性や水素発生能力、イソプレノイド合成能に注目した代謝工学的試みについて報告する。

Chitin は *N*-acetyl-glucosamine (GlcNAc) が β-1,4 結合で直鎖状に繋がった天然多糖である。地球上における chitin の年間生産量は約１千億トンと、多糖類の中では cellulose に次いで豊富に存在するが、そのバイオマスとしての活用は限られている。*T. kodakarensis* は特異な chitin 代謝経路をもつが、まず分泌型 chitinase (ChiA) によって chitin は二糖である chitobiose$(GlcNAc)_2$にまで分解される。$(GlcNAc)_2$ は細胞内へと取り込まれた後、二種の酵素によって２分子の glucosamine (GlcN) に変換される。その後 GlcN は未同定の kinase により glucosamine 6-phosphate (GlcN6P) に変換され、さらに GlcN6P deaminase によって fructose 6-phosphate (Fru6P) へと変換され、解糖系に合流する。本菌の chitin 分解能を高めるために、まず chitinase 高発現株の育種を試みた。続いて、本菌の chitin 資化能の向上を目指し、chitin 代謝経路上で未同定であった GlcN kinase (GlcNK) を同定するとともに chitin 分解経路下流の遺伝子の発現強化も試みた。

イソプレノイドの一種である squalene は石油の代替燃料となり得る炭化水素の１つとして注目されている。アーキアの細胞膜脂質はイソプレノイド型の疎水性部位を有していることから、これらの合成経路を利用して、*T. kodakarensis* 内に squalene もしくは phytoene が合成できるかどうかを検討した。本菌は膜脂質合成の中間生成物として炭素数 15 の farnesyl pyrophosphate (FPP)や炭素数 20 の geranyl geranyl pyrophosphate (GGPP)を生合成する。Squalene synthase (SS)、phytoene synthase (PS)の酵素反応によって 2 分子の FPP または GGPP の縮合により squalene または phytoene が合成されると考えられる。しかし *T. kodakaranesis* のゲノム上には SS および PS をコードする遺伝子が存在しないため通常はこれらの炭化水素は生合成していない。そこで他生物由来 phytoene/squalene synthase ホモログを本菌に導入することで、squalene または phytoene を合成する株の創製を目指した。

Archaea, Thermophile, Metabolic Engineering

講演番号：4SY21-7
講演日時、会場：3 月 30 日 15:59～ A 校舎 09 会場

カビから学ぶ一酸化窒素解毒の新たなメカニズム

Novel nitric oxide detoxifying mecanism of the fungus Aspergillus nidulans

○高谷 直樹、周 勝敏(筑波大生命環境)
○Naoki Takaya, Shengmin Zhou(Univ. Tsukuba)

一酸化窒素（NO）は、ヒトなどのシグナル伝達物質であるとともに、自然免疫において重要な役割を持つ。即ち、体内に侵入した病原菌は、マクロファージが放出する活性酸素種や NO などによって殺菌・除去される。これに対して、病原細菌は NO の殺菌作用を回避して生き延びることが知られ、既に複数の NO 耐性化因子が報告されている。これに対して、真菌の NO 耐性化については不明点が多い。我々は、モデル真菌である *Aspergillus nidulans* の NO 耐性化に関わる因子の解明を目指しており、これまでに、ポルホビリノーゲンデアミナーゼの活性化によるヘムの生合成の促進やフラボヘモグロビンによる NO の酸素化が本菌の NO 解毒と耐性化に関わることを見出してきた。

A. nidulans の多コピー型ベクターを用いた遺伝子ライブラリーの導入によって、生育の NO 耐性を付与する新たな遺伝子 ANIA_05696 を見出した。本遺伝子の発現は NO によって誘導され、遺伝子破壊により生育の NO 感受性が増加した。本遺伝子は 6 つのシステインを含む 23 アミノ酸からなるペプチドからなるチオネインファミリーに属するペプチドをコードしており、動植物の重金属耐性化に関わるメタロチオネインの N 末端側の半分にあたるβドメインのアミノ酸配列と類似していた。本ペプチドのシステイン残基は NO と定量的に反応しニトロソチオールを生成させたことから、我々は、ANIA_05696 がコードするペプチドを、NO 誘導性のニトロソチオネイン（ニトロソ化されて機能を発現するチオネインを意味する）“NO-inducible nitrosothionein (iNT)”と命名した。

ニトロソ化された iNT（iNT-SNO）が *in vitro* でチオレドキシンによって還元され、ニトロソ化される前の iNT が再生されることが明らかとなった。また、iNT の高発現株の生育の NO 耐性にはチオレドキシンが必須であったことから、iNT が Trx システムに依存して NO 耐性化を引き起こすことが示された。以上のことから、iNT は自身のニトロソ化反応を利用した単なる NO のトラップではなく、チオレドキシン系と協調して NO を触媒的に除去する新たな NO 耐性化機構を構成することが明らかとなった（Zhou et al., Nat. Chem. Biol. 9, 657-663 (2013)）。

iNT はメタロチオネインと同様に銅イオンと結合するが、これまでに細胞の重金属耐性化に関わるという証拠は得られていない。一方、重金属誘導性のメタロチオネインも iNT と同様にニトロソチオールを形成することは疑いなく、両者の生理作用の違いは発現誘導の違いによるものと考えている。重金属耐性化に関与しない機能未知のメタロチオネインはニトロソチオネインなのかもしれない。一方、病原性真菌に見出される iNT は NO 耐性化と病徴の発現に関わっている可能性も考えられる。

filamentous fungi, nitric oxide, nitrosothionein

講演番号：4SY22-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:30～ A 校舎 10 会場

「新産業酵母研究会(MINCY)」の活動
The Introduction to MINCY
○飯村 穣(新産業酵母研究会)
○Yuzuru Iimura(The Meeting for Industrial Non-Conventional Yeasts)

新産業酵母研究会（The Meeting for Industrial Non-Conventional Yeasts (MINCY)）の背景

Saccharomyces 属の酵母は酒類醸造など食品産業の主要な微生物として広く用いられてきた。また周知のように *S. cerevisiae* および *Schizosaccharomyces pombe* は真核生物のモデル細胞としても遺伝学、分子生物学などの研究対象として生物学の発展にも大きく貢献してきた。

一方、これら以外のいわゆる non-conventional yeasts については現在までに約 100 属余が報告されており、それらの中には産業利用の可能性が高い有用形質を有するものが多く見られ、さらに今後も新種とそれに伴う新規有用形質の発見と利用が期待されている。

一般に酵母は世代の大部分を単細胞ですごすため他の真核微生物に比べゲノム解析、遺伝子操作が容易であることから逆遺伝学的研究が可能であり、そのため改良育種がしやすいなどの大きな利点を有している。さらにタンパク質輸送系のオルガネラが発達し、遺伝子組換えの宿主としても異種タンパク質の分泌生産に適するなどの原核微生物には見られない優れた特徴を備えている。また培養に際してもウィルス汚染が少ない、細胞が比較的堅牢である、菌体を回収しやすいなどの長所がある。このような多くの特長をもつ酵母を駆使した有用物質生産によって環境、エネルギー、医療等が抱えている課題を解決するための基礎から応用までの幅広い研究が求められている。

これらを背景に「新産業酵母研究会（MINCY）」は産業利用に大きな可能性をもつ酵母について、多方面からの会員相互の情報交換と産業利用への展開を主な目的として 2011 年に設立された。

MINCY の活動：講演会および MINCY サロン

具体的には年間２回の講演会と MINCY サロンを同時開催している。これまでの６回の講演会では酵母の分類、命名についての最新情報、天然からの新規酵母の分離、油脂生産酵母、界面活性剤生産酵母、生分解性プラスチック分解酵母さらに分裂酵母や *Candida*、*Pichia* 属を宿主とする異種タンパク質生産に関するテーマを取り上げてきた。また、MINCY サロンは酵母に関する国際学会参加報告や最新トピックをもとに、広く酵母研究の将来展望を自由討論する有意義な場となっている。今後はこれらの課題にくわえゲノム解析およびプロテオーム解析を機軸にして、有用形質の探索とその発現機構の解明と高度利用の成果を取り上げ、将来は単に情報交換にとどまらず、企業、大学、研究機関などとの連携によるプロジェクト発信の中核を目指していきたい。

新産業酵母研究会（MINCY）の HP： https://sites.google.com/site/mincyjapan/

Non-Conventional Yeasts, Industrial Yeasts

講演番号：4SY22-2
講演日時、会場：3 月 30 日 13:45～ A 校舎 10 会場

発酵原料としての大豆ペプチド

The benefits of soy peptide in fermentaion

○杉山 将宏、北川 さゆり(不二製油)
○Masahiro Sugiyama, Sayuri Kitagawa(Fuji Oil Co., Ltd.)

発酵分野において、大豆ペプチドは主に微生物の窒素源として利用され、酵母や乳酸菌等に対して高い発酵促進効果を示す。私達は、発酵における大豆ペプチド添加効果のメカニズム解明について取り組んできた。酵母を用いた検討で、大豆ペプチド添加により、酵母細胞はアミノ酸輸送体とペプチド輸送体の両方を利用することが可能となり、効率的に窒素源を取り込めることが示唆された。ペプチド輸送体はバクテリアからヒトまで高度に保存されている。最近の研究で、ペプチドを構成するアミノ酸種によって取り込み効率が異なること、また酵母はアミノ酸輸送体から取り込みにくいアミノ酸種をペプチド輸送体を介して効率的に取り込めること等が明らかとなった(1)。本講演では酵母の発酵における大豆ペプチドの添加効果について、これまでの検討内容と最近の知見を報告したい。

【代謝産物(香気成分)の増産効果】

窒素源として大豆ペプチドまたは遊離アミノ酸混合物(大豆ペプチドと同等となるよう遊離アミノ酸を混合)を用いて、ビール酵母の発酵試験を行った。大豆ペプチド添加区では、ビール酵母では取り込まれにくい Phe・Tyr・Ala 等のアミノ酸種の取り込み量が多い傾向が見られた。さらに Phe の代謝産物で、酒類に含まれる香気成分の一種であるβ-フェネチルアルコール(β-PheOH)の生産量が大豆ペプチド添加区で多いことも確認された(2)。大豆ペプチドを添加することで、遊離アミノ酸としては取り込まれにくいアミノ酸種を酵母に効率よく取り込ませることができると考えられる。

【増殖(発酵)促進効果、低温ストレス耐性】

ビールの発酵試験ではβ-PheOH の生産量増加の他に、発酵の立ち上がりが早い傾向も観察された。ビール下面発酵は低温で行われる。*Saccharomyces cerevisiae* を用いた研究で、低温では Trp 高親和性輸送体である Tat2p が分解を受けることが報告されており、今回の発酵試験でも Trp の取り込まれ方が大豆ペプチド添加区と遊離アミノ酸混合物添加区で異なっているのではないかと考えられた。検討の結果、実際に大豆ペプチド添加区では Trp が多く取り込まれていることが示唆された(3)。

1. Ito K, Hikida A, Kawai S, Lan VT, Motoyama T, Kitagawa S, Yoshikawa Y, Kato R, Kawarasaki Y., *Nature commun.*, 4, 2502(2013)
2. Kitagawa S, Mukai N, Furukawa Y, Adachi K, Mizuno A, Iefuji H., *J. Biosci. Bioeng.*, 105, 360(2008)
3. Kitagawa S, Sugiyama M, Motoyama T, Abe F., *Biotechnol Lett.*, 35, 375(2013)

soy peptide, fermentation, peptide transporter

講演番号：4SY22-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:15～ A 校舎 10 会場

Pseudozyma 属酵母のゲノム解析と産業利用
Genome analysis of the industrial yeast, Pseudozyma antarctica
○森田 友岳(産総研)
○Tomotake Morita(AIST)

Pseudozyma antarctica（＝*Candida antarctica*）は、黒穂菌科の担子菌系酵母であり、種々のバイオマスから機能性脂質を菌体外に大量生産することができる。この機能性脂質は糖型バイオサーファクタント（BS）と呼ばれ、低濃度で優れた界面活性を発揮するだけでなく、特異な自己組織化能や多様な生理活性を示す「機能性バイオ素材」として注目されてきた。最近、この糖型 BS は、皮膚保湿効果や毛髪修復効果などの新たな実用特性が見出され、化粧品素材として実用化されている。また、*P. antarctica* は工業用リパーゼ生産酵母としても知られており、さらにアミラーゼやプラスチック分解酵素等の産業上有用な酵素を分泌生産することが分かってきている。このように、*P. antarctica* は、機能性バイオ素材や酵素などを量産する産業酵母として高いポテンシャルを有している。本公演では、ゲノム解析の結果を中心に、*P. antarctica* の優れた糖型 BS 生産性や、関連する担子菌系酵母の産業利用への可能性について概説したい。

P. antarctica のゲノムサイズは約 18Mb（遺伝子数＝6,543）であり、糖型 BS 生合成のための遺伝子クラスター（5 遺伝子）が保存されている［1]。また、脂質代謝に関連する遺伝子が有意に多く保存されており、*P. antarctica* は油脂生産酵母としての遺伝的性質を有する。さらに、近縁種であるトウモロコシ黒穂病菌 *Ustilago maydis* と染色体レベルで類似しており、両菌種のゲノム配列間で非常に高いシンテニーが見られるが、非植物病原菌である *P. antarctica* には、*U. maydis* の植物病原性に重要な遺伝子のオルソログは保存されていない。さらに、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の結果、植物油を炭素源とする糖型 BS 量産条件下で、*P. antarctica* の脂質代謝に関連する遺伝子が有意に発現誘導されており、また糖型 BS の生合成遺伝子は、炭素源に依存せず高頻度で発現していた。これらの結果は、*P. antarctica* が、植物油を原料とした糖型 BS の量産に適した遺伝子発現機構を備えていることを示している。

糖型 BS を量産するためには生合成だけでなく輸送系にも精巧なメカニズムが必要と考えられ、これらの制御技術は、脂質だけでなくタンパク質等の生産にも適用可能と期待される。また、*P. antarctica* 以外の *Pseudozyma* 属酵母や *Ustilago* 属の菌類も同様の物質生産能を持っており、産業酵母として高い可能性を秘めている。今後、これら担子菌系酵母のスクリーニングや育種・改良技術の向上によって、より広範な産業分野への貢献が期待される。

[1] Morita et al., *Genome Announc.*, **1**, e0006413 (2013)

Pseudozyma antarctica, Genome, Industrial yeast

講演番号：4SY22-4
講演日時、会場：3 月 30 日 14:45～ A 校舎 10 会場

生分解性プラスチック（PHBH)の工業化を目指して一宿主選択と生産株の育種

Challenge for the industrial production of biodegradable plastic (PHBH) -Selection of host microorganism and their molecular breeding

○松本 圭司(株式会社カネカ　GP 事業開発部)
○Keiji Matsumoto(KANEKA Corp. GP Business Development Division)

循環型社会の構築を目指し、石油由来プラスチックに代わる環境調和型素材としてバイオプラスチックの開発が加速している。バイオプラスチックには微生物によって分解可能な生分解性プラスチック、及び再生可能な植物原料から生産されるバイオマスプラスチックがあり、廃棄物処理等に関わる環境問題の解決手段として前者の開発が求められている。我々は、植物由来生分解性プラスチックが環境問題に加えて温室効果ガスの削減といった課題解決につながると考え、微生物産生ポリエステルの実用化に向けた取組みを行っている。

我々は、1991 年に *Aeromonas caviae* が(R)-3-ヒドロキシ酪酸(3HB)と(R)-3-ヒドロキシヘキサン酸(3HH)の共重合ポリエステル（PHBH）を生産することを見出した。PHBH は 3HH 共重合比率によって硬質～軟質の性質を示し、また優れた生分解性を有していることから、特に柔軟性が要求される使い捨てプラスチックバッグやコンポスト袋、農業資材などの生分解用途への適用が期待された。

A.caviae の PHBH 生産性は著しく低く、工業生産に適した株ではなかったが、Fukui 等によって同菌株より PHBH 合成酵素遺伝子がクローニングされたことから PHBH 高生産株育種の可能性が得られた。

我々は PHBH 高生産株の育種には宿主の選択が重要と考え、種々の微生物（*E.coli*、*S.cerevisiae*、*Ralstonia eutropha*（*Cupriavidus necator*)、*Candida maltose*、*Yarrowia lipolitica*）について複数の視点より検討を行った。その結果、*C.maltosa*、*R.eutopha* が宿主として好適と判断し、両菌株について分子育種を試みた。

本発表では、宿主の選択とそれぞれの菌株を用いた PHBH 高生産株の育種について紹介する。

polyhydroxyalkanoate, Ralstonia eutropha, Candida maltosa

講演番号：4SY22-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:15～ A 校舎 10 会場

Lipomyces 属酵母を利用した低価値な再生可能資源からの油脂生産

Lipid production by yeast *Lipomyces* from sustainable resources.

○長沼 孝文[1]、黒川 博史[2]([1]山梨大院医工総合生命、[2]ライオン（株））
○Takafumi Naganuma[1], Hiroshi Kurokawa[2]([1]Yamanashi Univ., [2]Lion Co.)

Lipomyces 属酵母は適当な条件下で培養すると油脂を生成し、菌体内脂肪球として貯える性質がある。蓄積油脂はトリアシルグリセロールが殆どで、主構成脂肪酸はオレイン酸とパルミチン酸であり植物油脂と近似している。

用途が広い植物油脂の我が国おける自給率は 2%(カロリーベース)と極めて低く、今後世界人口の増加よって更に輸入がひっ迫する可能性は大きい。このような背景のもと、微生物による植物性油脂の生産を行う必要性は高いと考え、再生可能資源を炭素源として *Lipomyces* に油脂を生産させる研究を行っている。既に、酒総研（家藤・正木）と山梨大共同の NEDO 受託研究において、木質系バイオマスのセルロース系・ヘミセルロース系の糖に関する検討を行った。その結果、これらの糖の 20%が油脂に変換される培地や培養条件が開発できた。

この結果を元に新たな炭素源として、山梨県南アルプス市で発生する廃棄果実（単糖・二糖）や遊休農地を利用して生産した余剰じゃがいも・米（でんぷん）など、および植物油脂のエステル化で生じる廃グリセロールを設定し、これら低価値な再生可能資源からの油脂生産をライオン(株)・ 山梨大共同で JST 受託研究として、現在検討を行っている。

生産コスト低減を図るために、じゃがいもや米は糖化処理を行わずにでんぷんを直接 *Lipomyces* に資化させ油脂を生産させるための条件を検討しているが、でんぷんを加熱滅菌処理すると糊化が起こり、液体培地としての使用が難しい。これを防ぐために無機塩を添加したところ、想定していた程度の液体化は可能になったが、でんぷん資化が抑制され油脂生産量が想定を下回った。このような結果が得られてしまう要因を探し出し、高い油脂生産量が得られる条件の検討を行っている。また、でんぷん糊化培地をそのまま利用することについても基礎的検討をしていて、比較的良好な結果が得られている。

果汁、じゃがいも・米、グリセロールなどの炭素源 13 種類を対象にして、分譲菌株と野外分離菌株 400 以上の *Lipomyces* 属酵母の油脂生産能力を 3 段階の培養温度で調べている。各炭素源や培養温度に対応して高い油脂生産性を示す菌株が存在していて、低価値な再生可能資源からの効率良い油脂生産にこの属の酵母を利用する価値は大きいことが示唆される。

油脂生産量が高くなる培地や培養条件についての検討も行っている。炭素源が高濃度のグリセロール溶液では連続培養することで高い油脂生産量が得られる。一方、農産廃棄物のような炭素源濃度が低く不溶性物質を含むものではバッチ培養法を採らざるを得ないが、この場合には短期間の培養で高い油脂生産量に達する培養条件が開発できれば油脂生産コストの低減が図れる。

yeast*Lipomyces*, lipid production, sustainable resources

講演番号：4SY22-6
講演日時、会場：3 月 30 日 15:45～ A 校舎 10 会場

Candida 属酵母由来の産業用酵素
Industrial enzymes from yeast *Candida antarctica*
○高木 忍、トム ニールセン(ノボザイムズ ジャパン(株))
○Shinobu Takagi, Tom Nielsen(Novozymes Japan)

現在 200 を超える微生物酵素が産業用酵素として市場にあるが、酵母由来の酵素は、実は数多くない。その中で複数存在する酵母由来のリパーゼは、むしろ例外的といえる。今回は当社で発見した *Candida* 由来の産業用リパーゼについて紹介する。
1980 年代に土壌・植物などの自然界由来のサンプルから大掛かりな微生物リパーゼの探索を行った際、非常に耐熱性に優れたリパーゼを生産する酵母 LF058 株の単離に成功した。本菌株は後にオランダの CBS により *Candida antarctica* と同定された。本菌は複数のリパーゼ活性を有するが、なかでも耐熱性に優れた酵素 2 種を精製し、各々lipase A (CLA), lipase B (CLB)と命名した。CLA は分子量４３ｋDa、至適ｐH を中性付近に持つリパーゼで、熱変性温度（Td）が９５度と当時知られていた中で最も耐熱性に優れた微生物リパーゼであった。一方 CLB は分子量３５ｋDa の中性リパーゼで、CLA には劣るが比較的耐熱性の良いリパーゼであった。それまでに知られていた糸状菌由来リパーゼの多くがトリグリセリドに対して１，3 位特異的に反応するのに対し、CLA、CLB は 2 位にも作用する非位置特異的なリパーゼであった。CLA, CLB 両酵素遺伝子をクローニングし、麹菌 *Asp. oryzae* において発現することにより量産が可能となった。
その後、CLB はさらに複数の点で特徴的であることが判明する。まず、ヘキサン、アセトン、アセトニトリルなど様々な極性の有機溶媒中で安定に活性を示すこと。これにより、疎水性・親水性の様々なエステル化合物に対して作用することができる。次に、光学活性に対する反応選択性が高いこと。本酵素により純度の高い光学活性物質の合成、または混合物から一方を選択的に分解する光学分割が可能となる。医薬中間体など高付加価値化合物の製造への利用が期待されている。また、例えば糖エステル化反応などにおける位置特異性が高いこと。目的の化合物の選択的な製造に役立つ。CLB は固定化することによりさらに安定性が高まるため、現在は主に固定化製品として販売されている。
CLB の高い基質特異性や反応選択性について、立体構造から解明することを試みたので紹介したい。このほか、これらのリパーゼの新たな応用分野について、簡単に紹介したいと考えている。

参考文献：T.B.Nielsen, M.Ishii and O.Kirk, Lipase A and B from the yeast Candida Antarctica , *from* Biotechnological Applications of Cold-Adapted Organisms, by R.Margesin, F.Schinner (Eds.), pp49-61,1999, Springer.

Candida, lipase

講演番号：4SY23-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:50～ A 校舎 11 会場

生物種が固有の GC 含量を持つのは何故か？

Exploration of the evolutionary aspect of species-specific GC content.

○吉川 博文[1]、明石 基洋[1]、志波 優[2]([1]東京農大応生科バイオ、[2]東京農大ゲノム解析セ)
○Hirofumi Yoshikawa[1], Motohiro Akashi[1], Yuh Shiwa[2]([1]Tokyo Univ. Agric. Dept. Bioscience, [2]Tokyo Univ. Agric. Genome Res. Center)

［目的］ 昨年の本大会シンポジウムにおいて、バクテリアにおける「種」とは何なのか、というテーマで討論を行ったが、基本的に「種」はゲノム配列の相同性によって分けられており、概念的には、遺伝子発現とその産物の機能発現というレベルにおけるバリアーとして捉えられる。その表現型は基本的遺伝子発現機構や複製機構、代謝制御機構におけるバリアーであるが、このバリアーの要因となっているもの、「種」を特徴づけるシグナチャーは、根本的には塩基配列の中に秘められているはずである。さまざまなミニ配列のパターン解析からも進化の痕跡を辿ることができるが、GC 含量もシグナチャーの一つであろう。我々は、生物種が固有の GC 含量を持つことの進化的背景を探るため、突然変異の方向性に焦点を当て、GC 含量を変動させる要因について解析してきた。変異の要因としては複製・校正装置と修復装置が考えられ、この両者に関する我々の考察を紹介する。

［方法・結果］ DNAポリメラーゼの合成反応を司るαサブユニットを用いて系統分類を行い、種を多く含む６つのグループについてGC含量の比較を行った。その結果、各クレードにはどれもGC70%近い種が存在するのに対し、低GCの種を含む割合に応じて、各クレードの平均GC含量が決まっていることがわかった。一方、枯草菌の修復系*mutS* 欠損株を用いて変異株を取得し、その塩基置換の方向性を野生型が蓄積する変異と比較解析した結果、野生型ではATを増加する方向の変異が優位であったのに対し、*⊿mutS* 株ではGCを増加する方向への変異が顕著であった[1)]。Actinobacteria はMutL/Sの修復系が欠損しており、このことが放線菌群が高GCであることの要因である可能性が考えられた。枯草菌においてはリーディング鎖の複製はPolCが行い、ラギング鎖の複製はDnaEが行う。生物種のGC含量と複製装置の分布を比較すると、DnaEがGC含量を高める方向に、またPolCはGC含量を低める方向に進化させる傾向が見える。しかし一方、市販の変異キットデータを注視すると、AT/GCバイアスの挙動は、無機塩濃度や塩基のインバランスによって異なることも分かる。したがって、GC含量がある一定の値に収束するのは、その生物種が持つ複製・校正装置と修復装置の性質、および細胞内環境の総合的な要因があると考えられる。

[1)] Akashi, M. and Yoshikawa, H. Relevance of GC content to the conservation of DNA polymerase III/mismatch repair system in Gram-positive bacteria. *Frontiers Microbiol.,* Sep 17;4:266. (2013)

GC content, DNA polymerase, Mismatch repair

講演番号：4SY23-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:30～ A 校舎 11 会場

ゲノムの塩基組成に基づいたプラスミドの宿主の予測

Predicting plasmid hosts based on genome base composition

○鈴木 治夫(山口大院理工)
○Haruo Suzuki(Yamaguchi Univ.)

細菌間を移動する伝達性プラスミドは、細菌の薬剤耐性や病原性の獲得に関与していると考えられる。細菌間の遺伝子水平伝播ネットワークにおけるプラスミドの重要性を理解するためには、プラスミドの宿主域を知る必要がある。様々な細菌において、プラスミドの塩基組成（2 連続塩基や 3 連続塩基の出現頻度）は、染色体の塩基組成と類似している。この類似性は、宿主の DNA 複製・修復系に特異的な変異バイアスや、プラスミドと染色体の DNA 断片の交換に起因すると考えられる。プラスミドは複製装置の種類に基づき複数の不和合性グループに分類されている。本研究では、不和合性グループ間で「プラスミドが滞在した宿主細菌の多様性」に違いが認められるかどうかを検証するため、染色体とプラスミドの塩基組成の類似度に基づいて、各プラスミドの宿主域を予測した[1]。コンプリートゲノム配列が解読された細菌の染色体とプラスミドの塩基組成の非類似度をマハラノビス距離[2]により定量化し、距離の小さい細菌をプラスミドの宿主候補とした。塩基組成に関して、狭宿主域不和合性グループのプラスミドは一部の細菌の染色体にのみ類似しているのに対し、広宿主域不和合性グループのプラスミドには、多様な細菌の染色体に類似しているものや、何れの細菌の染色体にも類似していないものが認められた。この結果は、ゲノム塩基組成の解析がプラスミドの宿主域の予測に有効であることを示唆する。

References

1. Suzuki H, Yano H, Brown CJ, Top EM: **Predicting plasmid promiscuity based on genomic signature**. *Journal of bacteriology* 2010, **192**(22):6045-6055.
2. Suzuki H, Sota M, Brown CJ, Top EM: **Using Mahalanobis distance to compare genomic signatures between bacterial plasmids and chromosomes**. *Nucleic acids research* 2008, **36**(22):e147.

Plasmid hosts, Genome base composition, Bioinformatics

講演番号：4SY23-3
講演日時、会場：3 月 30 日 15:10～ A 校舎 11 会場

細菌における外来遺伝子発現抑性機構

Silencing of horizontally transferred genes in bacterial cells

○大島 拓(奈良先端科学技術大学院大学)
○Taku Oshima(Nara Institute of Science and Technology)

細菌は、多様な環境に適応し生育することができる。遺伝子の水平伝搬は、この高い適応能力を支える重要な要素である。例えば、大腸菌は、そのゲノム DNA の 1 割程度が、水平伝搬により獲得した、他のバクテリアやファージ由来の外来 DNA と考えられており、外来 DNA にコードされた遺伝子は、酸耐性や、高浸透圧耐性、金属の代謝能等を大腸菌にもたらしている。興味深いことに、近年、大腸菌や結核菌を始めとする多様な細菌で、外来 DNA の取り込みを助ける機能を持つ DNA 結合タンパク質が存在することが明らかになった。これらのタンパク質は、1)ゲノム DNA 全体の平均 GC 含量に対して、GC 含量の低い領域に選択的敵に結合する。2)結合領域に存在する一群の遺伝子の転写を、遺伝子の機能にかかわらず抑制する。3)ゲノム DNA と結合し、凝集した構造を取る等、共通した性質を持つ。このような活性の一部は、真核生物における遺伝子サイレンシング活性とよく似ており、細菌におけるサイレンシングとして認識されている。

H-NS タンパク質は、大腸菌の染色体（核様体）の主要な構成成分である。そのため、ヒストン様タンパク質とも呼ばれている。我々は、H-NS と大腸菌のゲノム DNA との結合様式が、大腸菌のゲノム DNA の構造と、どのような関係があるかを調べるために、8 年ほど前からタイリングアレイとクロマチン免疫沈降法を組み合わせた、ChIP-chip 解析を開始した。その結果、H-NS は、大腸菌ゲノム DNA の GC 含量が低い領域に結合し、結合領域に存在する遺伝子の転写を抑制する因子であることが明らかになった。さらに、結合領域の多くが、外来 DNA であることから、H-NS が、外来遺伝子の転写を抑制し、その発現による悪影響から宿主大腸菌を守る役割を持つサイレンサータンパク質であることを提唱した。加えて、大腸菌に存在する複数の H-NS ホモログが、H-NS と複合体を形成し、H-NS の機能をサポートすることで、サイレンシングの頑強性に貢献することも明らかになった。大腸菌以外にも、H-NS と同様の活性を持つタンパク質が広範な細菌種に存在することを考慮すると、サイレンシングは、細菌のゲノム多様性を維持する基盤メカニズムの一つである可能性がある。細菌のサイレンシングから、細菌ゲノムの構成原理について議論したい。

silencing, bacteria, nucleoid

講演番号：4SY23-4
講演日時、会場：3 月 30 日 15:50～ A 校舎 11 会場

菌類におけるエキソン、イントロン、塩基組成とヌクレオソーム形成

Exon, intron, DNA base composition, and nucleosome formation in fungi

○西田 洋巳(富山県大工)
○Hiromi Nishida(Toyama Prefectural Univ.)

糸状子嚢菌類 *Aspergillus fumigatus, A. nidulans, A. oryzae* のエキソン、イントロン領域における DNA 塩基組成（GC 含量)、2 塩基配列の出現頻度、ヌクレオソーム形成頻度を比較した。いずれの菌類においてもエキソン領域はイントロン領域よりも GC 含量およびヌクレオソーム形成頻度が高い傾向にあることがわかり、動物や植物における報告と一致した。しかし、ヌクレオソーム形成頻度に最適な GC 含量には若干の違いが見られ、*A. fumigatus* では GC 含量 55%を超える領域、*A. nidulans* および *A. oryzae* では 55%未満の領域においてヌクレオソーム形成頻度が最も高く、その数値から離れるほどヌクレオソーム形成の頻度が低下する傾向にあった。2 塩基配列の出現頻度においては、3 種の *Aspergillus* に共通の傾向として、5'-AG-3', GG, GC, CT, CG, CC がイントロン領域よりもエキソン領域において高い頻度で使用され、AA, AT, TA, TT, TG, CA がエキソン領域よりもイントロン領域において高い頻度で使用されていた。エキソン領域におけるヌクレオソーム形成頻度が高い領域においては GG, GC, CG, CC が、低い領域においては AA, AT, TA, TT が頻繁に使用されていることがわかった。

A. nidulans と *A. oryaze* における 9616 のオルソログ遺伝子間における GC 含量とヌクレオソーム形成頻度を比較したところ、GC 含量の相関レベル（スピアマンの順位相関係数 0.51）がヌクレオソーム形成の相関レベル（0.31）よりも高いことを示した。この結果、*Aspergillus* においては種間の違いがヌクレオソーム形成の違いにより反映されていることを示し、*Aspergillus* における種分化にヌクレオソーム形成の違いが影響していることを示唆している。

以上の結果より、*Aspergillus* において、ゲノム塩基配列とヌクレオソーム形成は関連し、エキソンとイントロン構造に影響していることが明らかとなり、塩基配列の違いは種のアイデンティティの維持に極めて重要であると考えられる。よって、塩基置換がランダムに生じているように見える領域においても我々がまだ気が付いていない規則の下に塩基置換が生じていると考えざるを得ない。

参考文献: Nishida H, Katayama T, Suzuki Y, Kondo S, Horiuchi H (2013) Base composition and nucleosome density in exonic and intronic regions in genes of the filamentous ascomycetes *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus oryzae*. Gene 525, 5-10. Nishida H (2012) Nucleosome positioning. ISRN Molecular Biology 2012, 245706. Nishida H (2012) Conservation of nucleosome positions in duplicated and orthologous gene pairs. Scientific World Journal 2012, 298174.

fungi, GC content, nucleosome

講演番号：4SY24-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:35～ A 校舎 12 会場

ゲノム改造によるバクテリアの RNA ポリメラーゼの多様性と互換性の解析

Analysis of diversity and compatibility of bacterial RNA polymerase by genome remodeling

○朝井 計[1]、古園 さおり[2]、吉川 博文[3]([1]埼玉大院理工、[2]東大生物生産セ、[3]東農大応生科)
○Kei ASAI[1], Saori KOSONO[2], Hirofumi YOSHIKAWA[3]([1]Saitama Univ., [2]Tokyo Univ., [3]Tokyo Univ. of Agriculture)

近年のゲノム高出力解読と大規模解析技術の発達は、ライフサイエンス研究に大きな変革をもたらした。バクテリアのゲノム解析においても例外ではなく、その多様性を再確認させられるとともに、ゲノムの全容解明の難しさを思い知らされることとなった。一方、ゲノム解読・解析技術の発達と対照的に、ゲノムの改変や構築を大規模に行う技術はあまり進展していない。枯草菌や大腸菌はゲノム解析のモデル生物としても重用されたが、これらのバクテリアは、宿主ベクター系等の DNA 導入法や、ゲノム改変技術が確立していて、ゲノムを大規模に作り替えることが容易である。従ってこれらのモデルバクテリアでは、異種ゲノム導入やゲノムの大規模改変・変異誘発による、いわゆる合成生物学的手法でゲノムを改造することで、異種代謝経路全体を導入したり、それまでは観察不能であったバクテリアのもつ潜在能力を顕在化させたり、逆に進化を逆行させること等が自在に行える。枯草菌や大腸菌に限らないバクテリアの生命活動の一般原理・法則の解明に、この方法論が有益であることを、RNA ポリメラーゼに関する解析をもとに検証する。

バクテリアはゲノム情報の増加に応じて、転写因子の数と種類を増やし、転写制御を複雑化することで適応・生存してきた。RNA ポリメラーゼの転写の特異性を決定する主要な転写因子群である、シグマ因子ファミリーもその一つである。枯草菌の有する 18 のシグマ因子を可能な限りゲノムから削除したところ、必須な主要シグマ因子のみで増殖が可能であるが、増殖停止後の生存能に欠損が見られた。対数増殖後の細胞の維持・保存機構の解明につながる観察結果と考えている。また主要シグマ因子はバクテリア間で保存性が高いが、枯草菌シグマ削除株において、他種の主要シグマ因子が機能を代替可能かどうか調べている。

RNA ポリメラーゼのコア酵素の基本活性は、シグマ因子と共に RNA を合成することであり、ほぼ全てのバクテリアで、有する RNA ポリメラーゼのコア酵素は 1 種類である。現在我々はこのコア酵素が細菌間で互換性があるのかについて、枯草菌のコア酵素遺伝子群を大腸菌やシアノバクテリア由来のものと置換するという実験により、検討している。

アセチル化等のタンパク質の短鎖アシル化修飾は、真核生物ではヒストンによる転写調節など、幅広く研究されているが、近年バクテリアについても、網羅的な解析が行われている。枯草菌の RNA ポリメラーゼコア酵素も種々の培養条件で短鎖アシル化修飾がおきていることが示唆されたので、その意義解明とともに、コア酵素修飾部位が枯草菌において特異的なものか否か検討している。

Synthetic biology, RNA polymerase, Sigma factor

講演番号：4SY24-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:00～ A 校舎 12 会場

再構成アプローチによる大腸菌染色体複製周期の解析
Synthetic approach of *Escherichia coli* replication cycle
○末次 正幸[1,2,3]、小林 寛子[1]、松本 健佑[1]、片山 勉[2]([1]立教生命、[2]九大院、[3]JST さきがけ)
○ Masayuki Suetsugu[1,2,3], Hiroko Kobayashi[1], Kensuke Matsumoto[1], tsutomu Katayama[2]([1]Rikkyo Univ., [2]Kyushu Univ., [3]JST, PRESTO)

大腸菌の細胞周期進行における主要な制御ポイントは染色体 DNA 複製の開始段階である。複製開始蛋白質 DnaA は細胞周期を通じて一定量（約 1000 分子／細胞）存在し、その活性型の割合があたかも真核生物におけるサイクリンのように細胞周期を通じてオシレーションする。DnaA 活性制御機構の基本的な分子メカニズムは分かってきた。そこで我々は、染色体複製周期を規則正しく繰り返すための仕組みを理解するべく、再構成アプローチにより DnaA 活性のオシレーションを人工的に再現できないかと考え研究を進めている。

DnaA は ATP 結合型で複製開始活性をもち、ADP 結合型は不活性である。ATP 結合型 DnaA による複製開始反応後、DNA 複製の進行とともに DNA 上には多数のクランプ分子が装着される。クランプは複製装置の構成因子として継続的な DNA 複製反応に機能するだけでなく、DNA 装着型の構造をとる事に依存して、DnaA に結合した ATP の加水分解を促し、DnaA の不活性化を導く。よってフィードバック的に、続くラウンドの複製開始が抑制されることとなる。複製終結後、クランプは DNA から解離するので、DnaA 不活性化反応が解除される。そして ATP 結合型 DnaA が再蓄積し、次のラウンドの複製が導かれる。このように DnaA 活性オシレーションにおいては、クランプの DNA 装着・解離の動態が主要な作動原理となっている。そこで我々は、枯草菌という異種細胞を用いて、大腸菌クランプの DNA 装着・解離の動態を再現できるか検討した。枯草菌内で発現した大腸菌クランプの蛍光顕微鏡解析を行ったところ、クランプが枯草菌染色体 DNA 上に装着されていることを示唆する結果が得られた。この大腸菌クランプの装着は枯草菌の複製周期に依存しており、複製開始とともに DNA へと装着され、複製終結後には DNA から解離するという動態を捉えることができた。大腸菌クランプの発現は内在する枯草菌クランプの機能を相補することはできず、また枯草菌細胞増殖に対して影響することもなかった。さらに、大腸菌 DnaA の枯草菌内への導入についても検討した。過剰な DnaA 発現は枯草菌細胞の増殖阻害を導くものであったものの、発現量を抑える事で枯草菌に大腸菌 DnaA を保持させる事が可能であった。

枯草菌を用いた検討に加え、我々は精製蛋白質とミニ染色体 DNA とを用いて、試験管内で複製周期を再構成し、DnaA 活性オシレーションを再現する系の構築を進めている。また、生細胞内における DnaA 活性オシレーションをリアルタイムに観測するための系の開発も行っており、これらについてもあわせて報告する。

Replication, DnaA, Clamp

講演番号：4SY24-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:30～ A 校舎 12 会場

Ribosomal RNA の人工水平伝播による大腸菌宿主デザイン

Escherichia coli host engineering through horizontal gene transfer in ribosomal RNA

○宮崎 健太郎 [1,2]([1] 産総研生物プロセス、[2] 東大院新領域)
○Kentaro Miyazaki[1,2]([1]AIST, [2]Univ. Tokyo)

【研究の背景】　大腸菌は、工業的な物質生産（各種有用化合物、蛋白質、酵素等）で頻用される宿主微生物である。大腸菌を用いた異種遺伝子発現の効率化には、転写•翻訳•蛋白質フォールディングなど、様々な過程での最適化が要求される。転写については、強力プロモーターや厳密な制御系の開発が確立している一方、翻訳については未解決な問題が山積している。我々は大腸菌における翻訳レベルの諸問題を解決するため、リボソームに着目した。リボソーム改変に伴う翻訳効率の変化は単なる異種遺伝子発現にとどまらず、ゲノムにコードされる遺伝子全体の発現変動や代謝フラックスも変化させると考えられ、細胞機能工学としての発展も期待される。

バクテリアのリボソームは、3 つの RNA(16S, 23S, 5S)と 57 種の蛋白質からなる超分子複合体である。16S rRNA は mRNA 上の SD 領域と相互作用するアンチ SD 領域（ASD）領域を 3’末端に含み、翻訳の開始段階で重要な役割を担う。我々は 16S rRNA 遺伝子に着目し、その人工的な「水平伝播」を行い、大腸菌 16S rRNA との配列相同性が 80%程度の相同性しか示さない 16S rRNA であっても、大腸菌の生育を相補可能であることを明らかにしてきた（Kitahara & Miyazaki, *Nat. Commun.*, 2011; Kitahara et al., *PNAS*, 2012）。

【実験内容】　バクテリアの 16S rRNA 遺伝子は系統分類の指標として利用されていることからも明らかなように、生物種を超えて遺伝子全体にわたり高い相同性が見られる。両末端配列においても生物種を超えて高く保存されているため、遺伝子の両端にアニールするユニバーサルプライマーによって、全長遺伝子を PCR 法により容易に増幅可能である。本研究では、土壌や水系等の様々な環境サンプルより環境 DNA（メタゲノム）を抽出した。これを鋳型に、PCR 法により幅広い系統群由来の 16S rRNA を取得することができた。これらの外来 16S rRNA 遺伝子の機能を、大腸菌 MG1655 株の rrn オペロン完全欠損株（Δ7 株）の生育可否に基づいてスクリーニングし、相補株をライブラリー化した。数千規模の相補株を得る一方、特徴的な表現型を示す株を二次スクリーニングした。それらの中には野生型（大腸菌）16S rRNA よりも速い増殖を示すもの、高温環境で増殖が良好なもの、レポーター遺伝子の発現効率高いものなども存在することが分かった。

今後は、これらの方法で得た有用宿主の更なる改良、工学としての確立を目指したい。また、表現型に変化を与える仕組みの理解も深めていきたい。

Escherichia coli, 16S rRNA, Horizontal Gene Transfer

講演番号：4SY24-4
講演日時、会場：3 月 30 日 15:00～ A 校舎 12 会場

細胞壁を失ったバクテリアの増殖とその利用
Life without walls and its use for investigating de novo cell wall synthesis and cell morphogenesis

○川合 良和、Mercier Romain、Errington Jeff(ニューキャッスル大学)
○Yoshikazu Kawai, Romain Mercier, Jeff Errington(Newcastle Univ.)

現存するほぼ全てのバクテリアは、細胞膜の外側にペプチドグリカンを主成分とする細胞壁を持っている。したがって、３０億年前に存在していたであろうバクテリアの共通祖先にも細胞壁はあったと思われる。この細胞壁は、細胞形態の維持そして分裂・増殖に不可欠な役割を担っている。ところが驚くべきことに、バクテリアは細胞壁を失ってもＬ型（L-form）へと変化することで増殖可能となる。

L 型株は 1935 年に発見されて以来、大腸菌や枯草菌などの代表的なモデル生物でも分離されてきたが、扱いの難しさから分子生物学的な研究は最近までほとんど行われておらず、その増殖メカニズムに関してもこれまで不明であった。最近、私たちは枯草菌できわめて効率的なＬ型株の分離と培養の方法を確立することに成功し、これまで困難であったＬ型株での遺伝学および細胞生物学的な手法を用いた解析を可能とした。L 型株の分裂は通常バクテリアの分裂に必須な FtsZ に依存せず、細胞膜の形態変化に伴う不規則な様式で起こる。L 型株の分裂は 1 あるいは 2 箇所での点突然変異に起因した、細胞膜の過剰生産により誘導されていることがゲノム塩基配列の解析から判明した。

さらに私たちは、枯草菌のＬ型株の研究から得られた知見を基に、大腸菌や黄色ブドウ球菌など他のモデルバクテリアでの効率的なＬ型株の分離方法も確立した。これらのＬ型株でも FtsZ に依存しない分裂様式が確認された。高度な分子装置を必要としない単純なＬ型株の分裂様式は、細胞壁を獲得する以前の細胞、すなわち３０億年以上前の原始的な生命体の分裂を想起させる。

L 型株はその増殖に細胞壁を必要としないため、細胞壁合成系を含め、細胞形態の維持と形成に必須な遺伝子を破壊することができる。私たちは現在、こうしたＬ型株の性質を利用することで、細胞壁の新規合成から始まる、細胞形態の構築原理の理解を目指した研究を進めている。

L-form bacteria, cell division, cell wall

講演番号：4SY24-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:30～ A 校舎 12 会場

大腸菌をプラットフォームとしたアーキア特異的イソプレノイド脂質の生合成研究

Study on the biosynthesis of archaea-specific isoprenoid lipids using *Escherichia coli* as a platform

○邊見 久(名大院生命農)
○Hisashi Hemmi(Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

アーキアは真核生物とバクテリアに並ぶ第 3 の生物分類群（ドメイン）である。この分類はもともと核酸の配列相同性に基づくものであるが、それ以外の生体分子においてもその構造や代謝経路にアーキアと他生物を分ける様々な特徴が存在する。その最たるものが、他生物における脂肪酸の代わりにイソプレノイドアルコールを疎水性炭化水素鎖として有するアーキア特有の膜脂質である。我々はアーキア独特のイソプレノイド代謝経路の解明を目指して研究を進めており、その一環として、アーキア膜脂質生合成経路の大腸菌における再構成を行った。これは複数個のアーキア遺伝子を大腸菌に導入することにより達成されたものであり、この大腸菌はアーキア膜脂質およびその生合成前駆体を生産できる。我々は現在、この系をプラットフォームとしてアーキア膜脂質生合成に関わる新奇酵素の探索を進めている。つまり、この大腸菌に対してアーキア由来の機能未知遺伝子を追加導入し、生産される膜脂質の構造変化から同遺伝子の機能を推定しようというのである。アーキアへの遺伝子導入は現在限られた種においてのみ可能で、かつ難易度が高い技術である。大腸菌を利用することでこの遺伝子操作に関する困難は解消される。さらに、大腸菌自体の膜脂質生合成は基本的にアーキア酵素の発現の影響を受けないため、アーキア膜脂質の構造変化が宿主に及ぼす影響が小さいというメリットもある。この系を利用して、我々は最近、アーキア膜脂質の二重結合の部分的な還元を触媒する新奇酵素を、メタン生成アーキアである *Methanosarcina acetivorans* より単離した。同酵素は炭素数 20 のプレニル基であるゲラニルゲラニル基を有する化合物に高い特異性を示し、大腸菌に生産させたアーキア膜脂質の前駆体だけでなく、ゲラニルゲラニル二リン酸やゲラニルゲラニオールを還元する。生成物の構造解析の結果、同酵素による還元はゲラニルゲラニル基の 14 位の二重結合に特異的であった。一方で、炭素数の異なるプレニル二リン酸に対し、同酵素はほとんど反応性を示さなかった。この基質特異性は同酵素のアーキア膜脂質生合成への関与を想像させるが、その機能は膜脂質のイソプレノイド鎖の完全飽和を触媒する既知のゲラニルゲラニル基還元酵素のものと重複している。そこで、膜脂質以外のイソプレノイドの代謝への関与を疑い、*M. acetivorans* が生産するイソプレノイド脂質の分析を行ったところ、一部の二重結合が還元された糖キャリア脂質の存在を見出した。これらの結果は、同酵素が *M. acetivorans* 特異的な糖キャリア脂質の生合成に関与していることを示唆している。すなわち、同菌においては 14,15-ジヒドロゲラニルゲラニル二リン酸を前駆体として糖キャリア脂質が生合成されていると考えられる。

archaea, isoprenoid, lipid

講演番号：4SY24-6
講演日時、会場：3 月 30 日 16:00～ A 校舎 12 会場

ゲノム可塑性に基づくバクテリアゲノムの大規模な改変と設計

Large-scale rearrangements and de novo design of bacterial genomes based on their structural plasticity

○板谷 光泰(慶応大学先端生命研)
○Mitsuhiro Itaya(Keio Univ.)

微生物ゲノムの全塩基配列決定により「このゲノムにはこういう遺伝子がある、または無い」ことが明確に記述できるようなった。産業応用の基盤となる微生物の育種に向けて、遺伝子と遺伝子産物を解析、改変、設計する方法は現在多用されている。対象遺伝子の数は当面は少数にとどまるが、将来は代謝経路等の大規模な設計技術の進展に伴い、同時に多数の遺伝子改変を必要とする展開になるだろう。その段階では、現存のゲノムを改変して活用するのに飽き足らず、役に立つゲノムを一から設計し、それらを合成、選択する究極のゲノム合成生物学の目標と一致する。
しかしながら「遺伝子のデザイン」に比べて、「ゲノムのデザイン」は格段に複雑になる。「ゲノム」は多数の「遺伝子」が単純に連結しただけではなく、それらの遺伝子のゲノム中での場所、向き、遺伝子間の配列等の膨大な因子を考慮しなければならないからである。さらにゲノム構造は大規模な構造変化に適応できる可塑性を有する。ゲノム構造の可塑性は、同じ遺伝子構成でも異なる生育環境で適応選択されるべく多様性を創出していると考えるが、ゲノムをデザインするレベルに対応するには未知の要素が多い。ゲノム可塑性はゲノムの再編成に関する研究と表裏一体で重要ではあるが、現存ゲノムの多様性と可塑性を体系的に調べる作業が必要であり、一部の微生物に限定されている。我々は枯草菌 168 株を材料に用いて、ゲノム構造の改変、再構築の研究に長年取り組んできた。
本講演では、細胞当りのゲノム数、ゲノムサイズ、ゲノム分断、ゲノム逆位、プラスミドと副ゲノム、等の再編成項目に関して我々の結果を紹介し、ゲノムのデザインに向けた考察、議論を行いたい。

genome rearrangements, genome synthesis, Bacillus subtilis

講演番号：4SY25-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:35～ A 校舎 13 会場

電子の流れを基に、微生物代謝を紐解く

Clarifying the microbial metabolism through the electron flow analyses

○石井 正治[1]、佐藤 由也[1,2]([1]東大院、[2]産総研)
○Masaharu Ishii[1], Yuya Satoh[1,2]([1]The University of Tokyo, [2]AIST)

エネルギー伝達体としての ATP や、還元力としての NAD(P)H は、生命活動を支える物質として知られている。しかしながら、これらの物質は、外来エネルギー物質が有するエネルギーを、生物が使い得る形に変換した（だけの）ものと捉えることも出来る。生命を支えているのは、自由電子の規定された動きであり、それを可能にしているのは、生命が組み上げた精緻なエネルギー代謝システムである。つまり、エネルギー代謝システム中に適切に入っていくことで初めて、自由電子はエネルギーを保ったまま、その自由性だけを失い、生命の役に立つ物質へと変貌して行くこととなる。

こうした事柄を踏まえ、演者らは「e-バイオ」なる研究概念を立ち上げつつある。「e-バイオ」とは、生物のエネルギー代謝の中枢ともいえる電子の流れに着目し、電子の生物(群)への注入、生物(群)中の流れの制御、生物(群)からの引き抜きなどにより、炭素循環をベースとした有用物質生産に資する全く新たな反応場の創生を目指すこと、を目的としている。

より具体的には、

（1）生命が司る代謝を、特に電子の流れを意識し、明らかにする研究
（2）生命が司る代謝を、特に電子の流れを意識し、細胞の内側・外側から制御する研究
（3）電子の流れを意識したライフサイエンス・バイオテクノロジー研究

を推進することを通して、目的達成の道筋を明らかにしようと模索している。

本発表においては、上記概念を簡単に説明した後、演者らの研究成果を述べていく。

具体的には、70℃に生育至適温度を有する好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* の活性酸素種に対する代謝的応答を最近の知見に絡めて論じたい。酸素は最終電子受容体として用いられると、多くのエネルギーを産みだすこととなる物質である一方、活性酸素種を生成する元凶でもある。本菌においては、還元的 TCA サイクルなる還元的な代謝系が機能しているため、酸素を電子受容体として用いる場合には、活性酸素種だけでなく、細胞内の酸素濃度そのものもコントロールしなければならない。つまり、本菌が、酸素呼吸の恩恵を受けるためには、何重もの安全策を講じておく必要が生じてくる。本発表では、本菌が、どのように安全策を講じているか（≒酸素の毒性を軽減するようにしているか）を、新規 Peroxidase やヒドロゲナーゼの機能性を論じることを通して明らかにしていきたい。

electron flow, Hydrogenobacter thermophilus, ROS

講演番号：4SY25-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:10～ A 校舎 13 会場

電気培養法による微生物の代謝制御

Metabolic control of microbes by electrochemical cultivation

○松本 伯夫、平野 伸一(電中研)
○Norio Matsumoto, Shin-ichi Hirano(CRIEPI)

【はじめに】

発酵や浄化といった産業活動に貢献する微生物の代謝には、少なからず、体内で生じる酸化還元反応が関与している。この酸化還元反応を人為的にコントロールすることで、微生物の代謝活性をさらに向上させることができるのではないか。そのような発想から、我々は、微生物の培養の際に、培養液に電極を挿入し、酸化還元反応を施すことによって微生物の代謝を改変する試みを実施している。今回は我々が実施した事例を基に、電子の流れに着目した微生物代謝制御の可能性について紹介したい。

【ブタノール生産菌の電気化学的代謝制御】

Clostridium acetobutylicum は、糖類からブタノールを生産する作用を持つが、ブタノール以外にも酢酸や酪酸などの副残物を生産する。ブタノール収率の向上を考えた場合、代謝後段への電子の供給を行うことが効果的と思われる。そこで本菌を培養する際に培養液に酸化還元剤であるメチルビオロゲンを 2mM 共存させ、培養液中に浸した電極によって-0.7V(vs Ag/AgCl)の還元電位を与えた。通電条件などの試行錯誤の結果、ブタノール生産期初期に短時間電子を細胞に供給することによって、ブタノールの生産量を非通電条件と比較して約 3 倍向上させることに成功した。

【セルラーゼ生産糸状菌の電気化学的胞子形成誘導】

糸状菌の一種である *Trichoderma reesei* は、胞子中にセルラーゼを作ることからセルロースの糖化プロセスへの応用が期待される。我々は、寒天上に生育させた糸状菌に対し、寒天に埋め込んだ電極を介して電位を与えることで、糸状菌の胞子形成作用を促進させることを試みた。寒天中に酸化還元剤であるチオニンを 0.2mM 共存させ、電極間に+1.0V の電位差を与えたところ、陽極側での胞子形成が加速された。糸状菌は特定のストレスを受けることで胞子を形成するとされており、電極で生じた酸化反応が胞子形成を誘引するストレスとなったものと考えている。

【まとめ】

電気化学的な制御によって微生物の代謝を改変できる事例が少しずつ増えてきている。今後、代謝と電気化学的作用の直接的な因果関係を明確にすると共に、産業利用のための装置構成についても検討を重ねていきたい。

metabolic control, electrochemical cultivation, redox reaction

講演番号：4SY25-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:45～ A 校舎 13 会場

電子フロー制御による微生物の環境適応とストレス防御

Bacterial adaptation to environmental changes and stress resistance by electron flow control in the respiratory chain

○新井 博之(東大院農生科)
○Hiroyuki Arai(Univ. of Tokyo)

一般的に呼吸とは酸素を水に還元する反応と捉えられているが、実際には酸素還元と、それに共役するエネルギー基質の還元が別々の場所で起こることが呼吸の特徴と言える。還元反応で生じた電子は、電子伝達系（呼吸鎖）を介して酸素に受け渡され、その過程で細胞やミトコンドリアの膜外にプロトンが排出され、生じたプロトン濃度勾配を利用してエネルギー(ATP)が生産される。高等動植物のミトコンドリアでは、末端電子受容体として酸素を用いる好気呼吸しか行われないが、微生物の中には酸素以外の硝酸や鉄などを電子受容体として嫌気呼吸を行うものや、様々な物質をエネルギー源として利用できるものが存在する。また、酸素を還元する末端酸化酵素を複数持つ微生物も多く存在する。これらの微生物では、呼吸鎖は複数の経路に分岐しており、生育環境に応じて、「どの経路を通って電子を流すか」が決定される。我々は、個々の微生物が持つ呼吸鎖の構成と電子フロー制御機構を、その微生物の能力や個性を規定する主要因の一つとして捉え、各種微生物のエネルギー代謝制御機構の解析を行ってきた。本発表では、特に複雑な呼吸鎖を持つ緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* の研究成果について紹介する。

緑膿菌は環境遍在性の日和見感染菌であり、ヒトを含めた多くの動植物に対して病原性を示す。本菌は複数の好気呼吸鎖末端酸化酵素と、嫌気硝酸呼吸（脱窒）酵素からなる高度に分岐した呼吸鎖電子伝達系を有しており、好気・嫌気両条件下で生育が可能である。さらに、アルギニンやピルビン酸の発酵的代謝により嫌気条件下で長期間生残する能力がある。このような多様なエネルギー代謝機能を持つことが、本菌が感染病巣を含めたさまざまな環境に生息できる要因となっている。

緑膿菌は cbb_3 型、aa_3 型、bo_3 型、および、シアン耐性型の末端酸化酵素を持つ。これらは酸素親和性、プロトン排出効率、阻害剤に対する耐性などの性質に違いがあり、緑膿菌は酸素濃度、栄養条件、ストレス条件などに応じてこれらを使い分けることで環境適応している。また、酸素非存在下では硝酸呼吸の末端酸化酵素である 4 種の脱窒酵素が誘導発現し嫌気呼吸が行われる。これらの好気・嫌気呼吸酵素の発現には、酸素、一酸化窒素、鉄、酸化還元状態などを感知する複数の転写調節因子からなる制御ネットワークが関与することが明らかになった。また、酸素高親和性酵素である cbb_3 型 cytochrome *c* oxidase には複数のイソ型サブユニットが存在し、ストレス条件下でこれらの発現量が変化することを明らかにした。緑膿菌は生育条件によって cbb_3 型酵素のサブユニット構成を変えることで、性質の異なるハイブリッド酵素を生産し、ストレス耐性を獲得していると考えられた。

respiration, cytochrome c oxidase, Pseudomonas aeruginosa

講演番号：4SY25-4
講演日時、会場：3 月 30 日 15:20～ A 校舎 13 会場

代謝共役型酵素合成プロセスの有用物質生産への展開

Bioprocesses using enzyme reactions coupled with energy metabolisms

○日比 慎、堀之内 伸行、木村 隆利、小川 順(京大院農)
○Makoto Hibi, Nobuyuki Horinouchi, Takatoshi Kimura, Jun Ogawa(Kyoto Univ.)

化学産業において実用的な酵素の利用を推し進めるためには、複合酵素系の開発による反応様式の多様化が重要な鍵となる。複合酵素系の構築には酵素反応の機能的な組み合わせと、エネルギーや還元力を供給するための複雑な生体システムが必要である。本講演では実際の複合酵素系の例として、微生物生体システムに倣った新規な有用物質生産法の開発を取り上げる。

(1)Fe(II)/α−ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ（Fe/αKGDO）反応系：Fe/αKGDO はアミノ酸などの基質に対して位置・立体選択的な水酸化反応を触媒する酵素である。Fe/αKGDO を産業的な水酸化反応触媒として利用するためには、補基質である αKG を効率的に供給する複合酵素系の構築が必要となる。我々は Fe/αKGDO の一種である L-isoleucine hydroxylase（IDO）を持つ *Bacillus thuringiensis* が、TCA サイクルにおいて αKG を succinate に変換する酵素活性が欠落している一方で、IDO 反応がそのバイパス経路として機能していることを見出している。そこで、この代謝経路に倣って作製した TCA 代謝改変大腸菌を遺伝子組み換えホスト株として用いることで、大腸菌の TCA サイクルを借用する形での αKG の効率的な供給が可能となり、この結果、光学活性水酸化アミノ酸を高収率にて発酵生産する手法を開発することができた。

(2)シトクロム P450（CYP）反応系：CYP は NAD(P)H の還元力を複雑な電子伝達リレーを介して受け取り、幅広い基質の水酸化反応を触媒する酵素である。我々は *Bacillus megaterium* 由来の CYP である BM-3 が、細胞内においては superoxide dismutase（SOD）の作用を受けて高活性を維持していることを見出している。そこでこの生体システムに倣い、SOD/CYP 共発現大腸菌を作製することで、より効果的な共役システムを構築した。本システムの利用により、BM-3 の NAD(P)H 消費速度やカップリング効率を向上させることに成功し、結果的に長時間安定な水酸化反応を実施できるようになった。

(3)アルドラーゼ反応系：炭素間結合生成反応を触媒するアルドラーゼの中には、基質として代謝中間体であるリン酸化化合物を要求する場合が多い。我々はパン酵母の持つ glucose から ethanol へと代謝する高活性な解糖経路が、効率的なリン酸化中間体の供給システムとして有効であることを見出している。本供給システムを様々なアルドラーゼ反応と組み合わせて利用することで、glucose から誘導されるリン酸化化合物とアルデヒド類を縮合し、効率的に希少糖類を生産するプロセスを開発している。

multi-component enzyme system, energy metabolism, cofactor regeneration

講演番号：4SY25-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:55～ A 校舎 13 会場

微細藻類－ユーグレナーによる有用物質生産の可能性

Potential of *Euglena* for the production of paramylon and wax esters

○林 雅弘(宮崎大農)
○Masahiro Hayashi(Univ. Miyazaki)

ユーグレナ *Euglena gracilis* はユーグレナ植物門に属する微細藻類であるが、光合成による独立栄養培養に加え、暗黒下ではグルコースや廃糖蜜などを炭素源とする従属栄養培養、さらに有機炭素源を利用しつつ光合成も行う光従属栄養培養も可能で、すでに工業レベルの大量培養も行われて水産飼料や食品として実用化されている。 ユーグレナによる物質生産についてはこれまでに実用化の例がないが、培養方法や培養条件によって細胞内の炭素の流れをコントロールして、β-1,3-グルカン、ワックスエステル、タンパク質など生産物を作り分けることが可能である。

パラミロン（β-1,3-グルカン）

ユーグレナは光合成産物としてパラミロンと呼ばれる多糖類（β-1,3-グルカン）を細胞内に蓄積する。また、培地中の有機炭素源も貪欲に細胞内に取り込み、パラミロンとして蓄積する。パラミロンはグルコースのみを構成単糖とするホモ多糖で、水には不溶であるがアルカリや DMSO、ギ酸に可溶である。培養条件によっては乾燥細胞重量の 60%以上、数 10g/L オーダーでの生産性を示す。演者らは最近、このパラミロンを主骨格とするバイオプラスチックを開発し、そのプラスチックとしての特性も紹介する。

ワックスエステル

ユーグレナは嫌気状態では細胞内のパラミロンをワックスエステルへと変換して ATP を獲得する。したがって、好気的に培養したユーグレナを嫌気状態にシフトすることで、細胞内に蓄積したパラミロンをほぼ全量ワックスエステルへと変換することが可能である。この際に生じるワックスエステルは C28 を中心とする飽和ワックスエステルであるが、培地に任意の脂肪酸を添加して細胞に取り込ませることで、ワックスエステルの構成脂肪酸や構成脂肪アルコールに反映させることができる。

このようにユーグレナはエネルギー貯蔵物質としてパラミロンを細胞内に蓄積し、さらにそれを脂質へ、あるいはタンパク質へと人為的に変換することができる。その上、光合成によって CO2 固定を行いながら、かつ培地中の有機炭素源を利用して高密度に培養することができる。そのためこれまで微細藻類によるものづくりのネックとされてきた「培養密度が薄い、増殖速度が遅い」という点を大きくクリアできる。すなわち、光合成により光エネルギーを電子の流れに変えるという e-Bio 的な微細藻類の武器を生かしつつも、大気中の CO2 や植物バイオマス由来の有機炭素源を多糖類、脂質、タンパク質といった任意の物質に変換する、いわゆる炭素の流れを自在にコントロールすることができる物質生産ツールとしての大きな可能性がユーグレナというユニークな微細藻類に見いだされることを期待する。

Euglena, paramylon, wax esters

講演番号：4SY26-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:32～ A 校舎 14 会場

細菌分子標的剤開発に向けた微生物代謝工学
Metabolic engineering for development of the drugs targeting bacterial signal transduction
○内海 龍太郎[1]、五十嵐 雅之[2]、三沢 典彦[3]([1]近畿大院農、[2]微化研、[3]石川県大生資研)
○Ryutaro Utsumi[1], Masayuki Igarashi[2], Norihiko Misawa[3]([1]Kinki Univ., [2]Institute of Microbial Chem., [3]Ishikawa Prefectural Univ.)

従来の方法で、微生物が生産する、新規な抗生物質を見出すことが困難な状況である。一方、ゲノム・代謝工学、合成生物学の進展により、微生物細胞に新たに、多重の遺伝子を導入して、代謝系を改変することにより、医薬品の合成も可能になってきた。例えば、抗マラリア薬である、アルテミシンの生合成中間体であるセスキテルペンとその誘導体の合成が大腸菌や酵母細胞を用いて、可能になっている。合成困難な希少医薬品の生産に微生物代謝工学や合成生物学の手法の寄与することが示された(1)。演者らは、グラム陽性細菌である枯草菌や MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）の 2 成分情報伝達システム(TCS)、WalK(HK, ヒスチジンキナーゼ)/WalR(RR, レスポンスレギュレーター)を特異的に作用する薬剤が MRSA の細胞増殖、分裂を阻害して、致死的効果を示すことを報告してきた(2)。本シンポジュームでは、(I) 最初に放線菌代謝産物を用いて、WalK 特異的な阻害剤を探索する手法の開発事例を示す。その後、（II）ショウガ由来セスキテルペンとその誘導体の大腸菌生産システムの開発と細菌分子標的剤開発に向けた微生物代謝工学の可能性を探る。
(I) 放線菌代謝産物を用いた WalK 阻害剤の探索: WalR 温度感受性変異株が、HK 阻害剤に対して、野生株に比較して、高感受性になる性質を利用して（Ts 法)、選択的な WalK 阻害剤の探索を行った。その結果、３種の新規な抗生物質（Walkmycin, Signermycin, Waldiomycin）を開発することができた。本研究においては、これら３剤の WalK 特異的阻害作用を示すとともに、MRSA 剤の開発の可能性についても言及したい。
(II) ショウガ由来セスキテルペンとその誘導体の大腸菌生産システムの開発: 大腸菌にけるセスキテルペン合成用プラスミドとしては、三沢等によって、作成された pAC-Mev を用いた。pAC-Mev を含む大腸菌にハナショウガ（*Zingiber zerumbet*）由来セスキテルペン合成遺伝子を導入した結果、α-humulene、β-eudesmol の生産が可能になった。さらに、条件検討した結果、α-humulene 合成は 1mg/ml(培養液)までの生産性を示した。さらにハナショウガ由来 P450 遺伝子を導入すると、8-hydroxy-α-humulene も合成が確認された。

1) Kiesling J. D. *Metabolic Engineering* 14:189 (2013).
2) 江口陽子、内海龍太郎.*化学療法の領域* 29:100-105 (2013).
本研究は生研センター、異分野融合研究支援事業（2008-2012 年）として、実施された

histidine kinase inhibitors, antibiotics, sesquiterpene

講演番号：4SY26-2
講演日時、会場：3 月 30 日 13:57～ A 校舎 14 会場

アルツハイマー病への適応が期待されるシローイノシトールを生産する枯草菌細胞工場
Bacillus subtilis cell factory to produce *scyllo*-inositol, a promising therapeutic agent for Alzheimer's disease
○吉田 健一[1]、田中 耕生[2]、竹中 慎治[1]([1]神戸大院農、[2]神戸大院自)
○Ken-ichi Yoshida[1], Kosei Tanaka[2], Shinji Takenaka[1]([1]Kobe Univ., Dept. Agrobiosci., [2]Kobe Univ., OAST)

イノシトール（1,2,3,4,5,6-シクロヘキサンヘキサオール）には、6 つの水酸基の立体配座の組み合わせによって 9 種類の異性体がある。天然に最も多く見られる異性体はミヨーイノシトール(MI)で、米ぬかなどから比較的安価に供給される。一方、他の異性体はいずれも希少で高価であるが、そのひとつであるシローイノシトール(SI)はアルツハイマー病への適応が示されており、アメリカ食品医薬品局による早期開発ターゲットの指定を受けて有効性を評価する臨床試験が進行中である。
我々は、枯草菌の MI 代謝経路を解明する過程で、本菌には MI のみならず SI を含む他の異性体をも代謝する別経路があり、それらが MI の代謝経路と連絡していることを見出した。そして、これらの代謝経路の連絡反応を触媒する複数の酵素とその遺伝子を選択的に活用・削減して代謝経路を人為的改変（パスウエイデザイン）し、安価な MI を有用希少な SI へと変換するアイデアを想起した。このアイデアに基づいて枯草菌にパスウエイデザインを施した結果、MI を一旦細胞内に取り込んでから SI へと変換して細胞外へ放出するバイオコンバージョンが可能であることがわかり、SI を生産する枯草菌細胞工場のプロトタイプを提案することができた。
しかし、このプロトタイプ細胞工場には解決せねばならない 2 つの問題があった。第 1 の問題は原料となる MI の大半が分解浪費されることだった。そこで、バイオコンバージョンに不必要な遺伝子を全て削除した株を作製した。この第 2 世代細胞工場においては、変換後の MI と SI の量を合算すると培養開始時に添加した MI 量と一致し、MI 浪費の問題は解決された、しかし、第 2 の問題が残された。すなわち、不要遺伝子の削除では MI から SI への変換率は依然として 40%程度のまま改善されなかったのである。そこで、次に変換効率を引き上げるための付加的遺伝子改変を行った。まず、MI から SI への変換の第 1 段階に必要な酵素 IolG (NAD-dependent MI dehydrogenase)ならびに第 2 段階 IolW (NADP-dependent SI dehydrogenase)を恒常的に強力なプロモーターを用いて過剰発現させた結果、変換効率はそれぞれ 50%と 85%であった。次に、IolG と IolW の共過剰発現株を作製したところ、変換効率は遂に 100%に達した。すなわち、MI から SI へのコンバージョンの効率化には、特に第 2 段階の IolW の増強が有効であり、IolW の量が十分な場合は IolG のさらなる供給がこれを後押しすることがわかった。100%変換を達成した第 3 世代細胞工場は、ダイズタンパク分解物をより多く添加した条件でパフォーマンスを発揮することが分かっている。現在は、その原因について調査しており、窒素源の強化が及ぼす細胞内のグローバルな代謝変動の意義について考察を進めている。

Bacillus subtilis, inositol, cell factory

講演番号：4SY26-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:22～ A 校舎 14 会場

コリネ菌における脂肪酸合成経路の代謝工学

Development of fatty acid-producing *Corynebacterium glutamicum* strains

○池田 正人(信州大農)
○Masato IKEDA(Shinshu Univ.)

多様な機能を有する脂質の発酵生産はカビや酵母、藻類が中心で、アミノ酸や核酸等、水溶性物質生産の主役である細菌はなぜかマイナーである。我々は、脂肪酸の分解代謝系を持たないコリネバクテリウム・グルタミカム（以下、コリネ菌と称す）を題材に、細菌による脂質発酵の課題を明らかにして、基盤となる技術の開発を目指している。しかし、同菌に脂質の生産能があるかどうかは不明で、脂肪酸合成経路の炭素流束を高める方法すら知られていなかった。我々はまず、脂肪酸分泌生産菌を誘導してから原因変異に遡る方針を立てた。変異剤に依存しない自然変異によって目的生産菌を得て原因変異の特定は全ゲノム解析に委ねようという狙いである。我々のアプローチを紹介し、高速シーケンス時代の育種研究の一つの方向を示してみたい。

１．オレイン酸分泌株の誘導　適切な選択条件により、野生株から一段の自然変異によってオレイン酸分泌株が得られることがわかった。これは、1 変異により脂肪酸の過剰合成と分泌が起こることを意味する。この自然変異育種を 3 段階繰り返すことによってオレイン酸分泌量が段階的に向上した変異株を得た。同株はオレイン酸の分泌生産に関わる有効変異を三つ有していると推察される。

２．全ゲノム解析と転写解析　予想通り、同株のゲノムには次の 3 変異が見出された。①調節遺伝子 *fasR* の内部変異、②脂肪酸合成の鍵酵素遺伝子 *fasA* の上流変異、③同 *fasA* の内部変異。これら 3 変異は上記の順に導入されていた。転写解析で、*fasR* 変異は脂肪酸合成遺伝子の *accD1* と *fasA* の脱抑制を、一方、*fasA* 上流変異は *fasA* 自身の高発現をもたらしていることがわかった。

３．変異の再構成　3 変異のうち、野生株に脂肪酸分泌を惹起するのは *fasR* 変異のみであり、他 2 変異は脂肪酸合成経路の代謝を高める増産変異であった。転写解析の結果と併せ、*accD1*、*fasA* 両遺伝子産物の量的変化が本菌種における脂肪酸過剰合成の必要条件と判断された。

４．脂質分析　グルコース 1%培地で培養したときの同株の脂肪酸分泌量は 280mg/L であった（内 74%がオレイン酸、17%がパルミチン酸）。コリネ菌による脂肪酸生産は本研究が最初である[1)]。

脂肪酸合成経路の下流には有用な物質が多く存在する。その一つがビオチンである。その要求性微生物であるコリネ菌でビオチンを生産できるか、その可能性についても触れてみたい[2)]。

1）*Appl Environ Microbiol* **79**:6776（2013）　2）*Appl Environ Microbiol* **79**:4586（2013）

Corynebacterium glutamicum, fatty acid producion, metabolic engineering

講演番号：4SY26-4
講演日時、会場：3 月 30 日 14:47～ A 校舎 14 会場

機能性・希少カロテノイド生産のための大腸菌代謝工学
Metabolic engineering for the production of functional and rare carotenoids in *E. coli*
○竹村 美保[1]、眞岡 孝至[1,2]、徳田 春邦[3]、鈴木 信孝[3]、三沢 典彦[1]([1]石川県大資源研、[2]生産開発研、[3]金沢大医)
○ Miho Takemura[1], Takashi Maoka[1,2], Harukuni Tokuda[3], Nobutaka Suzuki[3], Norihiko Misawa[1]([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Res. Inst. Prod. Dev., [3]Kanazawa Univ.)

カロテノイドは炭素数 40 の基本骨格を持つイソプレノイドであり、ラン藻、光合成細菌、植物などによって生合成されている。β-カロテンに代表されるように、カロテノイドはヒトの栄養上重要な化合物であり、最近ではサプリメントとして人気が高まっている。とりわけ、ルテインやアスタキサンチンといったキサントフィルには眼や皮膚の老化を予防するなどの機能性があり、医療や美容分野で注目されている。現代人の食生活を含めた生活習慣を考えると、これら機能性カロテノイドの重要性はますます高まり、さらに機能性の高いカロテノイドが必要とされるであろう。そのため、これまでに自然界には見出されていない、あるいは未検証の希少なカロテノイドの機能性の検証が不可欠である。そこで本研究では、新規あるいは希少カロテノイドを大腸菌代謝工学により生産することを目的としている。

大腸菌を用いたカロテノイド生産の利点は、培養の容易さと生産性の高さである。ただし、大腸菌にはもともとカロテノイド生産能はないので、カロテノイド生合成経路を付加する必要がある。これまでに、植物や細菌のカロテノイド生合成系遺伝子が多数単離されており、我々は主に細菌由来の遺伝子を大腸菌に共導入することにより、リコペンやアスタキサンチンなどの生産に成功している。さらに、最近のゲノム研究の進展により、多種多様な生物のカロテノイド生合成系遺伝子の利用が可能となっている。そこで、ゲノム情報を利用して、自然界には存在しないあるいは希少で、かつ高い機能性を有するカロテノイドを生産するための研究を行っている。

これまでに、細菌とゼニゴケ由来の遺伝子を組み合わせることにより、新規あるいは希少カロテノイドの生産に成功した。具体例を挙げると、土壌細菌 *Pantoea ananatis* 由来の *crtE*, *crtB*, *crtI* 遺伝子とゼニゴケの *MpLCYe* 遺伝子を組み合わせると希少カロテノイドである δ-カロテンと ε-カロテンを生産することができた。これらの遺伝子に加えて、ゼニゴケの *MpLCYb* と *MpBHY*、ならびに海洋細菌 *Paracoccus* sp. N81106 由来の *crtW* 遺伝子を共導入すると、新規カロテノイドである 4-ケトゼイノキサンチン、希少カロテノイドであるゼイノキサンチンとα-エキネノンを生産することができた。そして、これらのカロテノイドが実際に高い機能性を持つことを、動物実験により確認した。

本シンポジウムでは、大腸菌代謝工学による機能性・希少カロテノイド生産の現状と展望について、これまでに行ってきた種々の実施例を挙げて紹介する。

metabolic engineering, carotenoid, *E. coli*

講演番号：4SY26-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:12～ A 校舎 14 会場

ゲノムを利用したアミノ酸誘導体の発酵生産プロセス開発
Development of the fermentation process for the production of amino acid derivatives
○纐纈 健人、三橋 敏、田畑 和彦(協和発酵バイオ（株）)
○Kento Koketsu, Satoshi Mitsuhashi, Kazuhiko Tabata(Kyowa Hakko Bio Co., Ltd.)

近年の次世代シーケンサーの登場により、ゲノムを短時間かつ安価に解析することが可能になり、データベース上には、様々な生物の膨大な遺伝子情報が登録されている。企業におけるポストゲノム研究では、これら膨大な遺伝子情報の中から、目的に沿う有用な遺伝子を効率的に見つけ出し、産業に結びつけることが重要である。

一般的にアミノ酸発酵では、ゲノム情報を活用し、アミノ酸生産菌の代謝改変などにより、生産性が向上する菌株が育種されてきた。一方、一次代謝産物ではない物質、ジペプチドやヒドロキシプロリンを発酵生産させるためには、特定の生物にのみ存在する遺伝子を見つけることが必要である。実際に当社では、バチリシン生合成における鍵酵素としてジペプチド合成酵素を、また、ペプチド系二次代謝産物生合成に含まれるプロリン水酸化酵素を発見し、それぞれ実用的な発酵生産プロセスの開発に成功している。今回、新たに非天然型アミノ酸であるホモフェニルアラニン（Hph）の生産プロセス開発に取り組んだので発表する。

Hph は、ACE 阻害薬の共通骨格であり、また、最近上市された多発性骨髄腫治療薬である Carfilzomib（Kyprolis®）の構成アミノ酸であり、有用な非天然型アミノ酸の 1 つである。そのため、これまでにいくつか化学ー酵素プロセスが開発されてきた。一方で、微生物による Hph 生産は報告例がなかった。そこで、当社が得意とするアミノ酸発酵と同じように、発酵法による Hph 生産プロセスの開発に取り組んだ。具体的には、まず、Hph 残基を含むペプチド系二次代謝産物を生産するシアノバクテリアに着目し､すでにゲノムが解析されている *Nostoc punctiforme* PCC73102 について、目的遺伝子を探索した。結果、ロイシン生合成遺伝子と相同性を示す 3 つの遺伝子を候補として見出した。これらを大腸菌にて発現し、Phe 添加条件にて Hph 生産を確認した結果、3 つの遺伝子全てを導入した株でのみ Hph 生産を認めた(1)。さらに、フェニルアラニン生産性を付与した大腸菌を宿主とすることで、安価な糖からの Hph 直接発酵生産も可能であることを確認した。また、基質特異性を調査した結果、フッ素化ホモフェニルアラニンやホモチロシンの生産も可能であることが明らかとなった。

(1) Koketsu K, Mitsuhashi S, Tabata K. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013 ;79(7):2201-8.

Fermentation, Homophenylalanine, Cyanobacteria

講演番号：4SY26-6
講演日時、会場：3 月 30 日 15:37～ A 校舎 14 会場

眠っている代謝系を呼び起こす統合オミックス解析
Integrated omics approaches and adaptive evolution

○緒方 法親[1,2]([1]株式会社日本バイオデータ、[2]株式会社ネオ・モルガン研究所)
○Norichika Ogata[1,2]([1]Nihon BioData Corporation, [2]Neo-morgan Laboratory Incorporated)

人類はこれまで、食料やエネルギーを得るために周囲の資源を利用して来た。特に生物資源に対しては、より多くの資源を得るために他種の生物を改変してきた。生物を改良する営みを育種と言い、人類の文明の発達は育種と共に歩んできたと言える。物理学が純粋に理論的な研究から原子力エネルギーを開発した様に、生物学においても理論的な研究から新たなリソースを得る活動が行われており、生物の進化に関する理論研究を育種技術に応用した最初の例が不均衡変異導入法である。不均衡変異導入法は、DNA 複製機構における対称性の破れの発見に基づいて開発されたゲノム変異導入方法である。DNA 複製時の複製エラー確率を増加させることによって育種対象生物のゲノムの多様性を増大させる方法であるため、UV や EMS などの化学的･物理的な手法と比べて自然な変異を導入することが可能である。自然な変異とは変異スペクトルの偏りの小さな変異導入パターンをいう。

株式会社ネオ・モルガン研究所では不均衡変異導入法を用いることであらゆる種類の微生物、微細藻類、動物培養細胞を育種してきた。近年、DNA シーケンスの技術革新により微生物ゲノムの解析が容易になったことで、育種株ゲノムに含まれる有用変異点を特定したいという要望が増えている。これまで、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析、トランスクリプトーム解析を行ってきたが、メタボローム解析については絶対定量データでないこと、遺伝子との関連解析手法の欠如から行ってこなかった。今回、不均衡変異導入法を用いて代謝を改善した育種株ゲノム中に存在すると想定される有用変異点を、ゲノム解析より見つかった多数の候補変異から絞り込む目的で、新規のメタボローム解析手法を開発した。ネットワークをエッジ毎に切り出してパラレルな比較を行うことにより、代謝パスウェイ中の酵素反応を、反応速度の変化量についてランク付けすることに成功した。これにより、メタボロームの変化と、ゲノム・トランスクリプトームの変化を網羅的に比較することをはじめて可能にした。統合オミックス解析によって、ゲノム解析から見つかった多数の有用変異候補の中から有用な変異を絞り込むことができるため、有用変異点特定の期間が短縮された。また、今回開発したオミックス解析方法は、有用変異の特定だけでなく、代謝の弱点を解明することにも応用可能であった。メタボローム解析を通じて見出された代謝経路の弱点を、ゲノムデータ、トランスクリプトームデータの知見と組み合わせることにより、セルフクローニングによる補強や育種の際の選択圧設定に役立てることができる。

bioinformatics, adaptive evolution, next generation sequencing

講演番号：4SY26-7
講演日時、会場：3 月 30 日 16:02～ A 校舎 14 会場

ゲノムを活用した CoQ10 代謝工学

Metabolic engineering of CoQ10 production

○川向 誠(島根大生資)
○MAKOTO KAWAMUKAI(Shimane Univ.)

コエンザイムＱ（CoQ）はユビキノンとも称される脂溶性成分であり、電子伝達系の必須成分として ATP 合成に重要な機能を果たしていると同時に抗酸化物質としての役割も重要である。CoQ の側鎖部分が 10 個のイソプレン単位からなるものを CoQ10 と言い、サプリメントとして絶大な人気を受けている。CoQ10 はヒトも合成できるが、加齢とともに合成能が減少してくることから、サプリメントとしての供給が効果を発揮する。その一方で、CoQ 生合成の基礎的な研究は立ち後れており、CoQ 生合成の全容はまだ明らかになっていないのが現状である。

微生物でCoQ10生産を考える上では、生合成の知見が必須である。これまでに出芽酵母の変異体や生化学的研究からその生合成には最低８種類の酵素の必要性が知られている。そのうち６種類の酵素は判明しているが２種類の酵素は未同定である。我々は、分裂酵母で推定される８種類の酵素に対応する遺伝子のCoQの生合成との関与を調べた[1)]。さらに、ヒトのゲノムから、酵母で見いだされているCoQ合成酵素と相同性の高い遺伝子を見いだし、酵母内で発現させた。基本的にはCoQの生合成に関わるとヒトの遺伝子を酵母内で発現させると相補的に働くことがわかった。さらにCoQに結合するタンパク質も見いだし、教科書で書かれているようにCoQは膜に浮遊している状態ではなく、実際にはタンパク質に結合している状態なのかもしれないと考えている[2)]。またCoQを生合成できない分裂酵母は酸化ストレスに感受性を示し、硫化水素を発生し、ウラシル合成が低下し、寿命が低下するという、興味深い多面的な表現型を示し、CoQが単に呼吸鎖に関わるだけではないことを明らかにしている[3)]。

コエンザイムＱは生物種によってそのイソプレノイド鎖長が違い、出芽酵母ではCoQ６、大腸菌ではCoQ８、ラットやイネではCoQ９、分裂酵母やヒトではCoQ10である。CoQ10生産においては、本来CoQ10を生産する微生物の育種を行なうか、もともとCoQ10を生産しない微生物に生産能力を付与するかの選択がある。これまでに大腸菌や出芽酵母でCoQ10を生産させることに成功しており、さらに、お米でCoQ10を生産させることに成功している[4)]。分裂酵母は元来CoQ10を合成するので、分裂酵母の遺伝子機能を解析すると同時にそれらを用いたCoQ10生産を考えることが有効であると考えた。残念ながらCoQ合成系の遺伝子を増強するだけでは生産性の向上は見られなかったが、分裂酵母の破壊株ライブラリーより、ある種の変異体でCoQ10の生産が上昇していることを見いだした。

1) Kawamukai *Biotechnol. Appl. Biochem*. 53:217 (2009), 2) Cui et al. *FEBS J.* 276:748 (2008)
3) Matsuo et al. *PLoS ONE* :e59887 (2013), 4) 川向誠　生物工学会誌 89:323 (2011)

fission yeast, coenzyme Q, ubiquinone

講演番号：4SY27-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:35～ A 校舎 15 会場

細菌べん毛の電子顕微鏡観察

Bacterial flagella observed by electron microscopy

○相沢 慎一(県立広島大学)
○Shin-Ichi Aizawa(Prefectural University of Hiroshima)

細菌（バクテリア）の運動器官であるべん毛は構造的に基部体、フックおよびフィラメントの 3 つの部位に分けられる。各部位はそれぞれ異なる目的をもって研究されているが、いずれも電子顕微鏡観察が欠かせない。

基部体はべん毛モータのロータ本体として、その回転対称性やサブユニット数の確定が必要である。結晶構造と電子顕微鏡像との合致をめざした手法が取られている。

フックは基部体で発生したトルクを効率よくフィラメントに伝達するユニバーサル・ジョイントとして働くと考えられているが、その作動の実態はよくわかっていない。電子顕微鏡像から多種類の変異フックの長さが計測され、サルモネラ菌などの野生株では平均長が約 55nm に制御されていることが明らかにされている。しかし、長さ 55nm の生理学的な意味は推測の域を出ないし、長さ制御のメカニズムに関しても、いくつかのモデルが提案されているもののどれも一長一短である。

フィラメントはべん毛研究の初期からもっとも精力的に研究されてきた。フィラメントの形態観察には暗視野顕微鏡と電子顕微鏡が用いられる。多くのバクテリア種のべん毛の形態が記録され分類されているが、なぜ 1 種類（あるいは数種類）のべん毛タンパク質・フラジェリンから一定の大きさを持つらせん形が作られるのか満足な回答は得られていない。さらに菌種によって特異的ならせん形態をもちひとつの Family を形成しているが、複数の family が存在することに関して、統一的に説明することがまだできていない。

講演では、これらべん毛研究に伴う技術的な問題点と歴史的背景を話すつもりである。

Bacteria, Flagella, Electron Microscopy

講演番号：4SY27-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:10～ A 校舎 15 会場

電子線トモグラフィーによる生体試料の立体構造解析
Structural analysis of biological molecules by electron cryomicroscopy

○加藤 貴之[1]、Ruan Juanfang[1]、川本 晃大[1]、宮田 知子[1]、難波 啓一[1,2]([1]阪大生命、[2]理研生命システム)
○ Takayuki Kato[1], Juanfang Ruan[1], Akihiro Kawamoto[1], Tomoko Miyata[1], Keiichi Namba[1,2]([1]Osaka univ, [2]Riken)

生体試料の構造解析の手法には X 線結晶構造解析法、NMR 法、低温電子顕微鏡法がある。X 線結晶構造解析法は高分解能で解析が可能だが、結晶を作成する必要があり、複雑で柔軟な構造変化をする超分子複合体の構造解析よりも、それを構成するタンパク質の構造解析に向いている。また、NMR 法は分子量に上限があり、分子量 50,000 Da を超えるような分子の構造は解析できないが、溶液中での分子構造と併せて、分子の運動を解析することができる。一方、低温電子顕微鏡法の中でも単粒子像解析法、電子線トモグラフィー法は、試料を液体エタンなどで急速に凍結し、ガラス状の氷に閉じ込めて、低温に保ったまま電子顕微鏡で分子像を撮影し、その画像を基に構造解析を行う。そのため、X 線結晶構造解析法のような結晶を必要とせず、また分子量の上限が極めて緩いため、複数の分子からなる超分子複合体の構造解析に適している。中でも、電子線トモグラフィー法は、試料を傾斜させ様々な角度から電子顕微鏡像を撮影し、その画像と角度情報から元の三次元構造を解析する手法であり、一つの試料から立体構造を解析することができる。そのため、電子線トモグラフィー法では分解能が低いものの、試料を精製することなく細胞丸ごとを観察することが可能で、数ある構造解析の手法のうち完全に機能状態の分子の立体構造を解析できる唯一の方法である。

我々は、この低温電子顕微鏡による電子線トモグラフィー法を用いてサルモネラ菌、磁性細菌 MO-1 のべん毛モーターの構造解析を行った。

べん毛モーターは約 30 種類のタンパク質からなる超分子複合体で、プロペラとして働く長いフィラメント、ユニバーサルジョイントであるフック、モーターに相当するべん毛基部体で構成される。べん毛基部体は直径約 45 nm 程度の小さなモーターであり、固定子、回転子、回転軸、軸受けなど、我々の身近にあるモーターと同じ構造を持っている。これまでに低温電子顕微鏡による単粒子像解析法によってべん毛基部体の構造解析がなされたが、試料を界面活性剤で処理することで精製しているため、膜タンパク質のほとんどが欠落しており、機能を完全に理解するに至らなかった。そのため、試料を精製することなく細胞のまま電子線トモグラフィーによって解析した結果、これまで解析することができなかった膜タンパク質を含んだ構造で解析することに成功した。本シンポジウムでは、サルモネラ菌と磁性細菌 MO-1 のべん毛基部体の構造について報告する。

Electron cryomicroscopy, Electron cryotomography, Molecular motor

講演番号：4SY27-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:45～ A 校舎 15 会場

高速原子間力顕微鏡（High-speed AFM）を用いた微生物細胞表層の可視化

Visualization of the bacterial cell surface structures using high-speed atomic force microscopy (high-speed AFM)

○田岡 東[1,2]、山下 隼人[3]、Oestreicher Zachery[1]、福森 義宏[1,2]([1]金沢大・理工・自然システム、[2]金沢大・理工・バイオ AFM 先端研究センター、[3]慶應義塾大・医学部)
○Azuma Taoka[1,2], Hayato Yamashita[3], Zachery Oestreicher[1], Yoshihiro Fukumori[1,2]([1]Sch. of Nat. Syst., Col. of Sci. and Eng., Kanazawa Univ., [2]Bio-AFM FRC, Col. of Sci. and Eng., Kanazawa Univ., [3]Sch. of Med., Keio Univ.)

生細胞内において、生体分子の構造や動態を、分子レベルの解像度で観察することは、その分子の機能を理解するために重要である。金沢大学の安藤教授らの研究グループが開発した高速原子間力顕微鏡（High-Speed AFM）は、生体分子の構造とダイナミクスを高い空間時間分解能で同時に記録できる。しかも、AFM 観察は緩衝液や液体培地などの生理的溶液中で行うことが可能であり、生理的条件で機能中の分子を観察することができる。本研究では、High-Speed AFM を用いて、生きた細菌の表層構造を液体培地中で観察し、これまで電子顕微鏡などにより静止画像でのみ観察されてきた細菌の細胞表層構造とそのダイナミクスをナノオーダーの解像度でとらえることに成功した。

AFM 観察には、液体培地中で培養した対数増殖期の磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 及び光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* を用いた。これらの細菌細胞をポリ-L-リジンとグルタルアルデヒドで化学修飾したマイカ基板上に生きたまま固定した。固定した細胞の生存は、生/死二重蛍光染色キット（LIVE/DEAD® *BacLight* Bacterial Viability Kit）を用いて確認した。基板に固定した細菌の細胞表層を、AFM を用いて液体培地中でイメージングしたところ、どちらの細菌においても、細胞の表層が網目状（または蜂の巣状）の構造体により完全に被われていることが明らかになった。網目状構造は *M. magneticum* AMB-1 のもので直径が約 7.3 nm、深さは約 0.85 nm、一方、*R. sphaeroides* のものでは、直径が約 8.0 nm、深さは約 0.87 nm であり、ほぼ同じ大きさであった。このことから、この構造は少なくともαプロテオバクテリアに保存されていることが示された。また、精製した外膜の AFM 観察でも同様の構造が観察された。さらに、精製した外膜において、AFM 探針を用いた微解剖実験を行ったところ、網目状構造は、ポーリン３量体により構成されていることが明らかになった。また、High-Speed AFM により、生細胞上において網目状構造の動態を観察した結果、網目状構造はゆっくりとランダムに移動していた。最後に、AFM 観察の結果、細胞表層において観察された網目状構造の以外の構造についても紹介する。

live cell imaging, bacterial cell surface, atomic force microscopy

講演番号：4SY27-4
講演日時、会場：3 月 30 日 15:15～ A 校舎 15 会場

3D プリンターによる生体超分子の視覚化、可触化

3D Printing Technology Brings Visualization and Tactilization of Biomolecules

○川上 勝(北陸先端大マテ)
○MASARU KAWAKAMI(JAIST)

構造生命科学の進展にコンピュータグラフィックスと印刷技術の進歩が多大な貢献をしたことは誰もが認める事であろう。現在では我々は、ＰＣのビューワソフトを用いて、画面上に美しく描画されたタンパク質のＣＧ画像を眺め、マウス操作で分子を回転させながら分子の立体構造を理解することができる。またタンパク質の構造が美しく描画され、構造に関する高度な議論がなされている論文を電子版で入手し、これをカラープリンタで手軽に印刷して読むことができる。

しかし、いくらＣＧや印刷技術が進歩したとはいえ、それらの方法はせっかく手にした豊富な 3 次元の構造情報を、ＰＣ画面や紙面という２次元の情報に質を落とし、観察者の「視覚情報から空間を認識する能力」に頼って再び脳内に 3 次元情報を構築しているということに他ならない。その過程において、重要な立体情報の見落としや、思わぬ見間違いがあるかもしれない。また、タンパク質サブユニットが集まって複合体を形成し、巧妙で高度な機能を獲得するような生体超分子の構造を理解するうえでは、タンパク質間の相互作用を深く、正しく理解する必要があるが、複雑に入り組んだ分子表面の凸と凹が組み合わさる様子を、上述の手法で果たしてどれだけ理解できているであろうか甚だ疑問である。

３次元の情報を、そのまま３次元として観察者に伝える手法があれば、そういった問題は大きく改善するはずであり、そのひとつの答えが「視覚」と「触覚」を使ってその形状を「直感的に」深く理解することができる模型の利用である。従来タンパク質の分子模型と言えば、組み立てが難解、高価でサイズが大きく、とても議論に使えるものでは無かったが、「３次元印刷技術」（３Ｄプリンター）の出現で、近年その様子が変わりつつある。タンパク質のみならず、細胞や組織、臓器など、あらゆる模型を詳細に造型できる 3Dプリンターは、構造生命科学におけるこれまでの議論の手法を変える大きな転換点をもたらす可能性を秘めている。

本講演では、構造生命科学の黎明期から近年に至るまでの模型やバーチャルリアリティ技術の役割とその変遷を紹介し、特に近年の３Ｄプリンターの進歩によって実現した「触れる」「組み合わせる」ことが可能な新しいタンパク質分子模型を紹介し、生体分子の「見える化」「触れる化」が構造生命科学の進展に今後どのようにインパクトを与えるかについて論じたい。

molecular model, protein, tangibility

講演番号：4SY27-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:50～ A 校舎 15 会場

戦車のような仕組みで動くバクテリア
Bacterium moves like a tank
○中根 大介[1]、小高 祥子[1]、佐藤 啓子[2]、和田 浩史[3]、McBride Mark[4]、中山 浩次[4]、西坂 崇之[1]([1]学習院大、[2]長崎大、[3]立命館大、[4]UW-Milwaukee)
○Daisuke Nakane[1], Showko Odaka[1], Keiko Sato[2], Hirofumi Wada[3], Mark McBride[4], Koji Nakayama[4], Takayuki Nishizaka[1]([1]Gakushuin Univ., [2]Nagasaki Univ., [3]Ritsumeikan Univ., [4]UW-Milwaukee)

バクテロイデテスに属する土壌細菌 *Flavobacterium johnsoniae* は，ガラスや寒天などの固形物表面上で，前進・後進・反転・回転する，複雑な運動をおこないます．この動きは何十年も前に見つかっていましたが，詳細な運動メカニズムは全く分かっていませんでした．最近，私たちは，一見，複雑に見える上記の運動様式が，実は，簡単な２つの要素によって生じることを示しました．１．表面タンパク質が，左巻きらせんのループに沿って外膜上を動き回ること，２．表面タンパク質が，固形物表面との接着力を変えること，です．これは，戦車の走行装置である『無限軌道』とよく似ています．興味深いことに，この仕組みは，歯周病原細菌やアユ冷水病原細菌などの病原因子の分泌システムとも深く結びついており，バクテロイデテス属細菌によって引き起こされる感染症の予防や治療につながる可能性を秘めています．本講演では，このバクテリアの運動装置に関する，私たちの最新の研究成果について紹介させていただきます．

Gliding motility, Left handed helical loop, Colony pattern

講演番号：4SY28-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:35～ A 校舎 16 会場

環境微生物の一細胞レベルの単離と解析

Single-cell analyses of environmental bacteria

○新谷 政己(静大院工)
○Masaki Shintani(Shizuoka Univ.)

自然環境には，多種多様な微生物が生息しているが，それらの大半は未培養あるいは難培養性であるとされている．それらの役割や生態は不明であり，まだ多くの有用な機能をもつ未知微生物が存在する可能性がある．こうした未知微生物を研究するには，微生物集団から一種類ずつ微生物を分離する必要がある．

接合伝達性プラスミドは，様々な細菌間を接合伝達によって移動可能な遺伝子の「運び手」であり，細菌の進化・適応能の原動力ともなっている．プラスミドがどのような細菌に移動し，複製されるのか，という宿主域の情報は，プラスミドの重要な性質の一つであるが，細菌の種類によっては，プラスミドが接合伝達しても複製されない場合や，その逆があり得る．すなわち，プラスミドの接合伝達機構と，複製機構とが規定する宿主域は必ずしも一致しない．しかし，従来，プラスミドの宿主域は培養を介した接合実験によって決定され，接合伝達によってプラスミドを受け取り，そのプラスミドを複製可能な細菌のみが宿主として得られた．プラスミドが細胞内で複製されない場合，その細胞の分裂後，プラスミドを維持できないが，分裂速度が極端に遅い細胞など，一細胞レベルではプラスミドを保持する状態があり得る．つまり，これまで宿主とされた細菌以外にも，自然環境には，プラスミドを保持した状態の，分裂速度が遅い細菌や，未培養・難培養性の細菌が存在する可能性が高い．こうした，いわば「一過的な」宿主も，プラスミドが介する遺伝子の伝播には重要と考えられる．こうした接合伝達機構のみが規定する宿主を取得するには，培養を介さずに接合完了体を得るが必要となる．そこで本研究は，培養法に依らずに，環境微生物集団からプラスミドの新たな宿主を得ることを目的とした．

プラスミドには，*Proteobacteria* 門に属する大半の細菌に伝達可能とされてきた不和合性（Inc）P-1 群プラスミド pBP136 と，主として *Pseudomonas* 属細菌間を移動可能とされた IncP-7 群プラスミド pCAR1，IncP-9 群プラスミド NAH7 を用いた．また，土壌より抽出した細菌集団を受容菌候補とし，宿主細胞の検出・分離には，プラスミドの接合伝達後に GFP が発現するシステムを導入し，その蛍光を指標としたフローサイトメトリーのソーティング機能を用いた．ソーティング後，分離した細胞のゲノム DNA を，φ29 ファージ由来の DNA ポリメラーゼによって等温増幅し，宿主細胞がプラスミド DNA をもつことを PCR で確認すると同時に，その 16S rRNA 遺伝子配列を決定し，どのような種類の細菌がプラスミドを受け取ったかを調べた．その結果，pBP136 は，*Proteobacteria* 門以外の *Actinobacteria* 門，*Bacteriodetes* 門，*Firmicutes* 門に属する細菌を，pCAR1，NAH7 については *Pseudomonas* 属細菌とは細菌綱レベルで異なる，*Delftia* 属細菌を宿主として取得した．これらは，従来の培養法に依存する手法では宿主として得られなかった細菌であった．本手法は，他の環境微生物を細胞レベルで分離し，解析する方法として有用であると期待される．

single cell, bacteria, plasmid

講演番号：4SY28-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:00～ A 校舎 16 会場

Like a complete unknown：一細胞解析で見える新しい生命現象

Like a complete unknown: Learn details of life from single cell analysis

○宮崎 亮(産総研)
○Ryo Miyazaki(AIST)

生物が地球上で“種の保存”という使命を果たすためには、全ての生理反応が秩序を保って機能し、獲得した遺伝情報を正確に子孫に継承するという「恒常性」「正確性」といった要素が不可欠である。一方、これらと対義の「不均一性」「不確実性」という要素は一見して生命活動において負の因子として働くように思われるが、生物は生きる過程でこれらと巧みに付き合い、むしろ進化・生存戦略的アドバンテージを得るための一要素として利用していると我々は考える。

近年の分子生物学・ゲノム解析技術の進展によって、あらゆる生命現象に関わる遺伝子発現を網羅的に解析することが微生物学分野においても可能となった。一方で、本来、生命の最小単位である細胞のサイズは非常に小さく、一個一個の細胞をダイレクトにハンドリングするのはスケール的にも定量的にも非常に難しい。そこで従来の微生物学的手法では、外的要因を制御した実験室環境下において細胞を純粋培養し、得られたクローン細胞集団を実験材料として扱うことで様々な生命現象とそのメカニズムを解明してきた。しかし、このような培養集団から得られたデータはあくまで集団の“平均値”を表しており、実際は同一のゲノムを有するクローン細胞集団を同じ環境下で培養したとしても、厳密には個々の細胞レベルの mRNA やタンパク質の分子数にばらつきが存在する。さらに、この確率論的な遺伝子発現のばらつき (ノイズ) が、それぞれの細胞の個性的な挙動や表現型を生み出していると考えられる。

近年、我々は細菌細胞をモデルとして、分子遺伝学的手法ならびに単一細胞レベルでの遺伝子発現解析を駆使し、細胞のストレス・飢餓応答を制御する因子の発現ノイズが、原核生物特有の遺伝能力(遺伝子水平伝播) を誘起していることを明らかにした。これにより、細胞内における当該因子の量的変動に依存して一部の細胞が水平伝播に関わる遺伝子群の発現をオンにし、隣接する他細胞に DNA を伝達することが判明した。また、一細胞ライブイメージング解析により、この遺伝子水平伝播のイベントと同時に宿主細胞が必ず死滅するという新しい現象を発見し、その細胞死の原因となる新規遺伝子を同定した。遺伝子の水平伝播という進化的に重要な現象と引き換えに、プログラム細胞死がなぜ起こるのか、様々な視点からその生物学的意義を検討する。

phenotypic heterogeneity, stochastic noise, single cell analysis

講演番号：4SY28-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:25～ A 校舎 16 会場

環境中で活発に機能している新規 N_2O 除去細菌のシングルセル分離
Single-cell isolation of active N_2O-reducing bacteria from environmental samples

○石井 聡(北海道大院工)
○Satoshi Ishii(Hokkaido Univ.)

土壌を含む環境試料中にはさまざまな機能を持った多種多様な微生物が存在している。我々は、特定の機能を持った微生物を識別し、一細胞ずつ分離する技術（Functional single-cell[FSC]分離法）を開発し、応用してきた。この技術は、特定の条件下で増殖しようとしている微生物を細胞分裂阻害剤によって伸張させ、顕微鏡下で観察したのち、マイクロマニピュレーターで分離する手法である。これにより、環境下で活発に機能している微生物を、選択培養のようなバイアスを経ることなく分離することができる。本発表では、FSC 分離法を新規 N_2O 還元細菌の分離に応用した事例を紹介する。

水田土壌は脱窒活性が高い一方で、N_2O 発生が少ないことが知られている。この一因として、N_2O 還元能力の高い脱窒菌が水田に存在していることが考えられる。我々は、水田土壌で機能する N_2O 還元菌を、非培養法(Stable Isotope Probing [SIP]法)を用いて特定し、FSC 分離法により単離・解析した。水田から採取した土壌に脱窒の電子受容体として N_2O を、電子供与体として ^{13}C-コハク酸を添加して嫌気条件にし、N_2O 還元菌が活発に増殖する室内モデル系を設定した。24 時間の培養後、^{13}C でラベルされた重たい DNA 画分を超遠心分離し、群集構造を 16S rRNA 遺伝子および N_2O 還元酵素遺伝子（*nosZ*）のクローンライブラリ解析から推定した（SIP 法）。その結果、主要な N_2O 還元脱窒菌は *Herbaspirillum* sp. および *Azospirillum* sp. に近縁であることが特定された。

同じ室内モデル系の水田土壌から、FSC 分離法を用いて N_2O 還元脱窒菌を一細胞ずつ分離・培養した。単離株について、N_2O 還元能の検定を行ったのち、16S rRNA 遺伝子および *nosZ* の塩基配列を解読した。SIP 法による解析と同様に *Herbaspirillum* sp. および *Azospirillum* sp. に近縁な株が多く得られた。単離株の詳細な解析を行ったところ、*Herbaspirillum* sp. 近縁株は *Azospirillum* sp. と比較して N_2O 還元能が高く、N_2O 還元除去への応用が期待できることがわかった。また、*Herbaspirillum* sp. に近縁だと思われた細菌は新規の分類群に属することが明らかになった。これらの株について現在ゲノム解析を行っている。

近年はメタゲノム解析が盛んに行われているが、特に土壌のような多様な環境試料を対象とした場合はメタゲノム情報からだけでは遺伝子の持ち主までは特定できないことが多い。シングルセル解析とメタゲノム解析を融合し、また可能であれば分離培養によって微生物の生理生態を解明することによって、未解明環境微生物の「生き様」が明らかになっていくであろう。

single-cell isolation, N_2O reduction, stable isotope probing

講演番号：4SY28-4
講演日時、会場：3 月 30 日 14:50～ A 校舎 16 会場

培養法で切り拓く未知微生物の新機能

Cultivation-driven discovery of novel microbes and their functions

○玉木 秀幸(産総研 生物プロセス)
○Hideyuki Tamaki(AIST BPRI)

地球上には膨大かつ多様な微生物が棲息しており、実にその 99%以上が未だ分離培養されたことのない機能の未知な微生物であると言われている。そんな未知微生物の多様性や機能を、培養することなく明らかにする分子生態解析技術の誕生により、1990 年代、環境微生物学は大きな転換期を迎え、今世紀に入りさらなる飛躍的な発展を遂げてきている。特に、次世代シークエンス技術の登場により、「遺伝子を読む」から「ゲノムを読む」時代へと変革し、今や、環境中の DNA、RNA を網羅的に解読し、系統と機能の両面から微生物生態系を丸ごと解明しようとする環境オミックス情報解析研究が欧米を中心に隆盛を極めている。さらに最近になって、シングルセルゲノミクスの技術がほぼ確立され、1 細胞の未知微生物からゲノム断片情報を取得し、その基本的な代謝様式や機能をより精緻に解き明かそうとする試みが始まっている。このような環境オミックス情報解析の時代にあって、コッホ・パスツールの時代から 140 年以上も続いてきた培養を介したアプローチは、ややもすると時代遅れと見なされ、敬遠されがちであり、環境微生物学研究にはもはや培養は必要ないのではないか、という声すら聞かれる。しかし、20 年以上も前にゲノムが決定された大腸菌でさえ、未だ機能の不明な遺伝子が 10%程度あり、門レベルで新しい微生物のゲノムに至っては 45%もの遺伝子が機能不明のまま、という事実を鑑みると、シークエンス情報のみからでは決して見えてこない、未知微生物の重要な新機能は少なくなく、培養を介したアプローチはやはり微生物学の根幹技術であり、環境オミックス解析技術を相互補完するためにも重要な基盤技術であり続けるだろう。いや、そもそも、培養できないと言われる未知微生物を培養できた時、「環境中のほとんどの微生物が培養できないのは何故か」という環境微生物学・微生物生態学の最大の謎に答えを見出すことができ、我々は未知微生物の深淵な生き様を知ることになるのではないだろうか。このような背景から、私たちの研究チームでは、環境ゲノム解析技術を活用しながらも、やはり未知微生物の新生物機能を明らかにし、複合微生物生態系を解き明かしてゆくには、「分離培養を介したアプローチ」が必要であるという信念のもと、研究を進めている。本講演では、2001 年以降、その歩みは遅いものの着実に進展してきている未知微生物探索研究について、我々の研究成果を踏まえつつ、その現状、課題、展望について論じるとともに、環境ゲノム情報を活用した未知微生物の可培養化の試みについてご紹介したい。

cultivation, uncultured microorganisms, environmental genomics

講演番号：4SY28-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:15～ A 校舎 16 会場

マイクロコロニーに着目した新規単離培養手法の開発

New Cultivation and Isolation Strategy Based on Bacterial Micro-Colony Formation

○常田 聡[1]、藤谷 拓嗣[1]、牛木 章友[1]、籾内 研吾[1]、青井 議輝[2]([1]早稲田大先進理工、[2]広島大 ISSD)
○ Satoshi TSUNEDA[1], Hirotsugu FUJITANI[1], Norisuke USHIKI[1], Kengo MOMIUCHI[1], Yoshiteru AOI[2]([1]Waseda Univ., [2]Hiroshima Univ.)

環境中に生息する微生物の生理学的特性を解明するためには，微生物の分離培養が必須である。従来，純菌株を獲得するために，Robert Koch によって開発された平板プレート（固体培地）でコロニーを獲得する方法が用いられてきた。しかし，多くの微生物は固体培地上でコロニー形成をしないため，獲得できる純菌株は限られてしまう。一方，Louis Pasteur によって開発された限界希釈法（液体培地）で純化する方法も知られているが，標的にできるのは環境中のメジャーな存在の微生物に限られ，マイナーな存在である難培養微生物の純菌株を得ることは難しい。したがって，環境中の 99%以上の微生物が今もなお培養困難であり，新規な微生物を獲得することは依然としてハードルが高い。これに対して我々は，環境中のマイクロコロニー（単一細胞から増殖し，密着した 100 細胞程度の集合体）に着目し，これらを選択的に分取することで，純菌株を獲得することを目指した。

本研究では，まず活性汚泥中の難培養性亜硝酸酸化細菌 *Nitrospira* をターゲットにして，セルソーターによって目的のマイクロコロニーを選択的に分取する手法を開発した。*Nitrospira* は，構造が単純な（球形に近い）マイクコロニー（直径 3-20μm）を形成する。そこで，セルソーターのパラメーターとして“粒子の大きさ”を反映する前方散乱光（FSC）および“構造の複雑さ”を反映する側方散乱光（SSC）を用い，高い FSC と低い SSC を示す粒子のみをソートすることで，蛍光標識を用いることなく，*Nitrospira* のマイクロコロニーを選択的に分取することに成功した（集積率 99%以上）。セルソーターによって分取したマイクロコロニーを，亜硝酸培地を含有した 96 ウェルプレートに分注して 1 ヶ月培養したところ，細胞の増殖を確認することができた。さらに，16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行ったところ，2 種類の *Nitrospira* 純菌株の獲得が確認できた。一つは Sublineage I に属する ND1 株であり，もう一つは Sublineage II に属する NR1 株（*Nitrospira japonica* と命名）であった。この二つの株は，活性汚泥から獲得された世界初の *Nitrospira* 純菌株であり，現在これらの株の生理学的性質の解明を急いでいる。また，河川水サンプルを対象に本手法を適用したところ，Sublineage II に属する NA1 株（*Nitrospira aquarum* と命名）の獲得にも成功した。さらに，本手法をアンモニア酸化細菌の分離培養に適用したところ，難培養性として名高い *Nitrosomonas mobilis* や *Nitrosomonas oligotropha* の純菌株を次々と獲得することができた。『固体培地上のコロニーを人間の目で見て取得する』という従来型の分離培養手法に対し，本手法は『液体培地中のマイクロコロニーを機械の目で見て取得する』という新しいコンセプトに基づいた分離培養手法である。

Bacteria Isolation, Micro-Colony, Cell Sorting

講演番号：4SY28-6
講演日時、会場：3 月 30 日 15:40～ A 校舎 16 会場

シングルセル・ゲノミクスによるシロアリ腸内共生系解明に向けて

Deciphering the symbiotic mechanism in the gut of termites by single cell genomics

○本郷 裕一(東工大院生命理工)
○Yuichi Hongoh(Tokyo Tech)

未培養種を多数含む環境微生物群集の研究は、分子生態学的手法により飛躍的に進歩した。特に、環境中の DNA を断片化して網羅的に配列解析するメタゲノミクスの確立は、培養を介さずに群集全体の機能を予測し、また群集間で遺伝子組成を比較することを可能とした。しかしながら、メタゲノム解析では断片の由来生物種の特定が困難であり、個々の微生物種の機能は未知のままである。最新の情報解析手法により、メタゲノム中の細菌種の（近似的）ゲノム完全長配列やドラフト配列の再構築成功例も見られるようになったものの、常に可能なわけではない。

そこで現在、広く用いられはじめているのが、シングルセル・ゲノミクスである。これは、環境中から微生物細胞を蛍光セルソーター (FACS) やマイクロマニピュレーションで物理的に単離し、全ゲノム増幅を経て、次世代シーケンサーでドラフト・ゲノム配列を取得する研究手法である（*1*）。ほぼ単一系統の細菌細胞を 100 個以上回収できる場合は、完全長ゲノム配列の取得も可能である（*2–4*）。この手法によって、培養不能微生物種の機能をある程度推定するとともに、遺伝子資源として利用することも可能となる。我々の研究グループでは、同手法を核とした分子生態学的解析によって、シロアリ腸内共生系の全容の解明を目指している。

シロアリは枯死植物体のみを摂食する社会性昆虫で、人間にとっては大害虫である一方、自然界では最重要分解者の一つであり、また木質バイオ燃料開発への応用も期待されている。シロアリは腸内微生物群集との絶対共生によって、高効率な木質分解能力や空中窒素固定能力などを獲得したが、原生生物・真正細菌・古細菌からなる腸内共生微生物の大多数はシロアリ特異的かつ培養不能であり、それらの実態は未だ不明な点が多い（*5*）。我々は、これらの腸内微生物の中で、セルロース分解の主体と考えられている原生生物と、その細胞に特異的に共生する細菌に注目し、シングルセル・ゲノミクスを含む分子生態学的解析を行ってきた。本講演では、シロアリ腸内共生系に関する最新のデータを紹介するとともに、シングルセル・ゲノミクスの有用性と課題なども論じたい。

参考文献：

(1) 本郷裕一 (2013) *Jpn. J. Lactic Acid Bact.* (日本乳酸菌学会誌) 24（印刷中）
(2) Hongoh Y. et al. (2008) *PNAS* 105: 5555-60
(3) Hongoh Y. et al. (2008) *Science* 322: 1108-9
(4) Hongoh Y. (2010) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 1145-51
(5) Hongoh Y. (2011) *Cell. Mol. Life. Sci.* 68: 1311-25

single cell genomics, termite, biomass

講演番号：4SY29-1
講演日時、会場：3 月 30 日 13:40～ A 校舎 08 会場

新素材と呼ばれたコケ植物原糸体の研究と開発～アカデミアからのメッセージ～
Research and development of moss protonemata as a new metal adsorbent material
○井藤賀 操[1]、川上 智[2]([1]理研環境資源科学研究センター、[2]DOWA エコシステム株式会社環境技術研究所)
○Misao Itouga[1], Satoshi Kawakami[2]([1]RIKEN Center for Sustainable Resource Science, [2]DOWA Eco-System Co.,LTD. Environmental Protection Laboratory)

私たちは、コケ植物原糸体を用いて水中から有害重金属を除去したり有用金属を回収したりする技術を研究開発している。世界的にも類をみない本技術の研究開発の起源は、文部科学省の経済活性化のための研究開発プロジェクト「一般・産業廃棄物・バイオマスの複合処理・再資源化プロジェクト」の中で実施された研究課題「焼却灰からの有害物質溶出のリスクを軽減する技術の研究」にある。ヒョウタンゴケの原糸体を浮遊培養し、得た培養細胞をカラムに充填し、そこへ焼却灰溶出液を通液した前後の溶液中の重金属類濃度を誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP－MS）でモニターしていたデータを解析する過程で、鉛が選択的に除去されていることに気づいたことが発端となっている。

2008 年 4 月に独立行政法人理化学研究所と DOWA ホールディングス株式会社は共同研究 2 課題「コケ植物原糸体を用いた重金属排水処理装置開発」及び「重金属・レアメタルを高蓄積するコケ植物体の取得」を開始した（研究開発第一ステージ）。これら 2 課題は 2011 年 4 月に共同研究課題 1 課題「重金属・レアメタルを高蓄積するコケ植物体の取得」に統合し、現在に至る（研究開発第二ステージ）。

研究開発第一ステージでは、原糸体の培養装置のスケールアップに取り組み、開発開始当初 0.5L 規模であった装置を 800 倍となる 400L 規模にすることに成功した。また鉛以外の金属類を除去・回収できる新たな株を取得するために重イオンビーム照射実験と選抜試験を実施し、基本株の性質を予め調べる過程で鉛以外に金を高蓄積する性質を見出した。研究開発第二ステージでは、原糸体の金属吸着素材としての物理化学的な性質や特性を調べたり、新たな原糸体の培養系を確立したりすることで、他の金属吸着素材との比較やスペック化のポテンシャルを引き出す取り組みへと研究内容をシフトさせた。

本講演では、企業との共同研究開発取り組みの中でアカデミア側の研究者として経験した貴重な体験談を交えながら、「死の谷」を超える方法について話題提供したい。研究の着想や計画についてもコケ植物研究の歴史を眺めながら議論することにしたい。

Green innovation, Suspension culture, Slurry

講演番号：4SY29-2
講演日時、会場：3 月 30 日 14:00～ A 校舎 08 会場

新素材と呼ばれたコケ植物原糸体の研究と開発～企業からのメッセージ～

Research and development of moss protonemata as a new metal adsorbent material

○川上 智[1]、井藤賀 操[2]([1]DOWA エコシステム株式会社環境技術研究所、[2]理研環境資源科学研究センター)
○Satoshi Kawakami[1], Misao Itouga[2]([1]DOWA Eco-System Co., LTD. Environmental Protection Laboratory, [2]RIKEN Center for Sustainable Resource Science)

本講演は、アカデミアからのメッセージに続く企業視点からの内容・解釈となる。

私たちは、コケ植物原糸体を用いて水中から有害重金属を除去したり有用金属を回収したりする技術を研究開発している。世界的にも類をみない本技術の研究開発の起源は、文部科学省の経済活性化のための研究開発プロジェクト「一般・産業廃棄物・バイオマスの複合処理・再資源化プロジェクト」の中で実施された研究課題「焼却灰からの有害物質溶出のリスクを軽減する技術の研究」にある。ヒョウタンゴケの原糸体を浮遊培養し、得た培養細胞をカラムに充填し、そこへ焼却灰溶出液を通液した前後の溶液中の重金属類濃度を誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP－MS）でモニターしていたデータを解析する過程で、鉛が選択的に除去されていることに気づいたことが発端となっている。

2008 年 4 月に独立行政法人理化学研究所と DOWA ホールディングス株式会社は共同研究 2 課題「コケ植物原糸体を用いた重金属排水処理装置開発」及び「重金属・レアメタルを高蓄積するコケ植物体の取得」を開始した（研究開発第一ステージ）。これら 2 課題は 2011 年 4 月に共同研究課題 1 課題「重金属・レアメタルを高蓄積するコケ植物体の取得」に統合し、現在に至る（研究開発第二ステージ）。

2011 年 3 月に日本鉱業協会から、コケ植物の原糸体は「新素材である」と評され、「金属吸着素材」として仲間入りを果たした。この時点で「生物学的な研究材料」ではなくなった訳である。

本講演では共同研究の企業側の研究者として共同研究の経緯と成果について企業の視点でどう捉えているかを述べたい。研究成果を具体的な社会貢献につなげる役目が企業側にあるものと自覚しているが、現時点で具体的なユーザーが見いだされていない状況にある。企業活動の目的と整合した植物機能活用のメリットと実用化への課題について、技術面に限らず討論できれば幸いである。

Green innovation, Suspension culture, Slurry

講演番号：4SY29-3
講演日時、会場：3 月 30 日 14:30～ A 校舎 08 会場

バイオポリエステルの基盤研究・実用化研究
Progress of fundamental and practical researches in biopolyesters
○阿部 英喜(理研環境資源科学研究センター)
○Hideki ABE(RIKEN CSRS)

ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、微生物によって合成されるバイオポリエステルであり、自然環境中の微生物により分解・資化される生分解性という機能を併せ持つ環境適合性高分子素材の一つである。本講演では、共同研究先である(株)カネカと共に進めてきたバイオポリエステルの基盤研究・実用化研究の開発経緯を、諸先輩方の業績と併せて紹介したい。

最も典型的な PHA は、R 体の 3-ヒドロキシブタン酸の高重合物であるポリ(3-ヒドロキシブタン酸)（P(3HB)）であり、1925 年にフランスのパスツール研究所で枯草菌から初めて発見された。微生物の種類、用いる炭素源を変えることにより、さまざまな分子構造をもつ共重合ポリエステルが見出され、合成高分子における共重合化と同様に、バイオポリエステルにおいても、共重合化により多様な物性の発現が可能となった。1992 年に、（株）カネカが、土壌より単離した微生物 *Aeromonas caviae* に植物油を単一炭素源として与えることにより、3-ヒドロキシブタン酸(3HB)と 3-ヒドロキシヘキサン酸(3HH)から成る、新しい共重合ポリエステルを見いだした。この共重合ポリエステルは、比較的少量の 3HH ユニットの導入によって物性の改質が確認され、例えば、3HH ユニットを 6 モル%導入したポリエステルは、融点が 135℃、フィルムの破壊強度が 31MPa、破壊伸びが 220%と優れた物性を示した。その後、遺伝子組換え微生物の分子育種の成功により、3HH 分率 6 モル%の P(3HB-*co*-3HH)が乾燥菌体重量あたり 80～90%という大量も体内に蓄積する技術が確立された。

上述の開発技術をもとに、（株）カネカは、2009 年１月に（独）科学技術振興機構「独創的シーズ展開事業」を受託して、2010 年に年産 1,000 トンの生分解性ポリエステルを微生物生産する能力をもつプラントを完成し、100％植物由来で軟質性、耐熱性を有する共重合ポリエステル（カネカ　バイオポリマーアオニレックス）として、幅広い分野への実用化をめざして、用途開発を進めている。

バイオポリエステル素材の生産が着実に進展する中、この素材を高分子材料として実用化するためには、バイオポリエステルがもつ本来の特性を引き出すことのできるさらなる成型加工技術の開発が要求されている。実用化に向け克服すべき問題点として、熱成型時の熱分解による性能劣化、固化速度が遅いという加工性の悪さが挙げられる。熱分解抑制技術においては、バイオポリエステルの熱分解反応を促進する不純物の特定とその除去技術を見出している。また、加工性向上に向け、結晶化核剤として作用する化合物の探索にも成功してきた。これら実用化に向けた開発の現状についても紹介する予定である。

Biopolyesters, Polyhydroxyalkanoates, Collaborative research

講演番号：4SY29-4
講演日時、会場：3 月 30 日 14:50～ A 校舎 08 会場

カネカバイオポリマー　アオニレックスの実用化研究

Development of processing technology for the application of KANEKA biopolymer AONILEX

○鈴木 紀之(株式会社カネカ)
○Noriyuki SUZUKI(KANEKA CORPORATION)

カネカバイオポリマーアオニレックス（以下、アオニレックス）は３－ヒドロキシブタン酸（３ＨＢ）と３－ヒドロキシヘキサン酸（３ＨＨ）から成る共重合ポリエステルである。バイオマスを主原料として微生物の体内に蓄積・産生され、精製単離してポリマーとして使用でき、石油由来プラスチックの代替として将来の循環型社会の実現に貢献が期待される材料である。温暖化ガス削減とゴミ処理などの環境問題に対して、欧州ではＥＵ指令として生ゴミの埋立て量の削減目標を掲げている。このため、生分解性を有するバイオマス由来のプラスチックの利活用については、使い捨てプラスチックバッグ、生ゴミコンポスト用袋及び農業用資材等へのインセンティブにより普及を図ろうとしている。アオニレックスは優れた生分解性を有するので上記用途へ展開されることが期待されるが、そのためには、成形加工性と物性の観点から克服すべき技術課題がある。

・成形加工性：アオニレックスは溶融状態から結晶化し難いので固化が非常に遅い、すなわち加工性が悪いという課題を抱えている。そのため実用に足る有効な結晶化技術の開発が必須である。これまで種々の観点から結晶化技術を検討してきたが、今回は、アオニレックス自身を結晶核として活用する方法につき検討を重ねた結果を紹介する。当該法では、成形時に溶融樹脂温を適切な範囲に制御する事によってアオニレックスの結晶メモリーを残し、核剤として利用する方法である。ビーズ発泡や溶融紡糸等、他の成形加工においても結晶の制御が重要な要素であるので、更なる加工性向上を目指し、配合技術の観点からも結晶化を促進する技術を開発していく。

・物性：アオニレックスの優れた生分解性を活かす袋製品などのフィルム分野では、耐引裂強度と延性が要求される。用途により求められるレベルは異なるが、実用に足る物性を付与するために、同じ生分解樹脂の中で最も靭性が高いとされるポリブチレンアジペートーテレフタレート（ＰＢＡＴ）とのブレンドが有効であった。また有効な可塑剤配合も見出すことが出来た。幅広い分野へ応えていくために、例えば射出成形用の配合についても検討に着手した。高植物由来度という市場ニーズに応え得るために、バイオベースポリエステルであるアオニレックスの配合比を可能な限り高めかつ実用に足る物性を有する配合技術の確立を目指す。

KANEKA biopolymer AONILEX, polyhydroxyalkanoate, processing technology

講演番号：4SY29-5
講演日時、会場：3 月 30 日 15:20～ A 校舎 08 会場

微細藻類の産業利用における可能性について

Application of microalgae biomass to various industries

○鈴木 健吾(株式会社ユーグレナ)
○Kengo Suzuki(euglena Co.,Ltd.)

現在、微細藻類を用いたバイオインダストリーの可能性について市場からの注目を集めている。それは、人にとって有用な物質を環境負荷が低い形で生産することができる新しい方法として期待されてのことである。

微細藻類により生産されたバイオマスについては、一般的なバイオマス利用の考え方と変わらず、食品（Food)、繊維（Fiber)、飼料（Feed)、肥料（Fertilizer)、燃料（Fuel）という順で基本的に付加価値が高く、上位からの利用を試みることで、環境負荷の軽減と高い事業性を同時に実現することが可能である。微細藻類の中でも最近注目を集めているユーグレナを例として、このバイオマスの 5F の考え方にあてはめてみると、付加価値の高い Food は機能性食品としての利用など多様な展開が可能で、現在はサプリメントやクッキーの形で実際に市場への供給が行われ流通している。Fiber は化粧品素材などが一部実用化されているほか、生分解性プラスチックなどへの応用が期待されている。Feed においては、高機能性飼料としてたんぱく飼料などの代替物として市場を満たしていくことが考えられ、海洋資源の減少に伴う良質な飼料である魚粉価格の値上がりを抑えることができる可能性がある。Fertilizer としては、ユーグレナをそのまま肥料として施肥することで、窒素やリンを補うと同時に、土壌中の微生物活性を高めることができる可能性がある。Fuel に関してはユーグレナが生成するワックスエステルを取り出して利用することが考えられる。事業性を考慮すると、このような高付加価値の需要から満たしていくカスケード方式での展開に鑑みて、培養スケールを決定することが重要となる。

微細藻類の大量培養は古くから研究が行われており、将来性に関しても期待される点が多いものの、コスト面や生産方法などを中心にいまだ議論・検証の余地があり、環境技術として社会に大きく寄与する形での実用化には至っていないが、産業としての可能性については多方面からの考察が進みつつある。ユーグレナという藻類において、経済合理性を中心とした事業性を考慮しながら開発を進めてきた経緯と将来性を中心に紹介をする。

euglena, bioengineering, microalgae

講演番号：4SY29-6
講演日時、会場：3 月 30 日 15:50～ A 校舎 08 会場

バイオマス研究から新産業への展開
Translational research from basic biotechnology to new industry
○神谷 勇治(理研環境資源科学研究センター)
○Yuji Kamiya(RIKEN CSRS)

最近は税金を使った公的な研究機関や大学の基礎研究の実用化,[translational research]が重要だといわれて久しいですが、実際に基礎研究、基盤研究をすすめているアカデミアにとって産業化は、以前として大きな壁です。今回は産業化を視野に入れた基礎科学研究の実際について、アカデミアと企業双方の立場からご講演をしていただき、いわゆる「死の谷」を超える方法を模索してみたいと思います。私個人は「死の谷」という言葉は好きではありません。私はこの谷は困難でありますが、卓越した発想と乗り越える情熱、チームワークがあれば、必ず乗り越えられると確信しています。不可能な死の谷でないことは、すでに多くの開発秘話や成功事例などが証明しています。ただ、自分の身近な問題として考えにくい点に問題があります。そこで、本シンポジウムが一般のアカデミア、若い学生にとっても勇気づけになることを期待しています。

大学や国立系研究機関での農芸化学を基盤とする研究から新産業を創出し、社会に普及させるためには、具体的にどのような研究戦略が必要なのでしょうか？今回は基礎科学研究の成果から新産業へ繋がる知的財産権を選択した、優れた着想をもつ先生方に、その実践方法をご講演していただきます。ご講演していただくアカデミアの先生方からは、研究の着想や計画、資金調達についてご教示いただき、企業の先生方からは、プロセス研究と市場評価、情報発信の方法についてご教示いただきます。はじめに「瓢箪から駒がでた」ヒョウタンゴケの研究から重金属を蓄積するコケの単離と培養方法を理研の井藤賀操先生、その工業化の現状と将来を DOWA エコシステムの川上智先生にお願いします。つぎに微生物を用いたバイオプラスチックの基盤研究を理研の阿部英喜先生とパイロットプラントによる工業化を株式会社カネカの鈴木紀之先生にお願いします。最後に現在バイオ燃料として脚光を浴びている微細藻類の産業利用の可能性について株式会社ユーグレナの鈴木健吾先生にお話しいただきます。そのあとはこれらの先生を迎えてパネルディスカッションを行い、みんなでわたれば怖くない「死の谷」の渡り方について考えようと思います。

Translational research, Biotechnology, Academia and industrial company

ランチョンシンポジウムプログラム

本大会でのランチョンシンポジウムのチケットは，明治大学生田キャンパス中央校舎 1 階ホールで当日の朝 8:30 より配布します．チケットを受け取り，開始 5 分前までに会場にお越しください．空席がある場合は，チケットがなくても入場できます．

4LS01　**JABEE** ランチョンシンポジウム

3 月 30 日（日）12:30〜13:20　B01 会場（第一校舎 1 号館 2F）
世話人：江坂宗春（広島大院生），三浦　豊（東京農工大院農）
座　長：三浦　豊（東京農工大院農），浅野行蔵（北大院農）

12:30　4LS01–1　**JABEE と人材養成**……◦江坂宗春（広島大院生）
12:40　4LS01–2　**イノベーションリーダーの育成を目指す大学の役割**……◦千葉一裕（東京農工大院農）
13:00　4LS01–3　**人材　博士のキャリアパスや農芸化学という実践科学**……◦宮田　満（日経 BP 社 特命編集委員）

4LS02　男女共同参画ランチョンシンポジウム

3 月 30 日（日）12:30〜13:20　B08 会場（第一校舎 1 号館 3F）
世話人：合谷祥一（香川大農）
座　長：合谷祥一（香川大農）

12:30　4LS02–1　**科学技術分野における女性研究者の能力発揮のために**……◦都河明子（元東大男女共同参画室）
13:00　**パネルディスカッション「農芸化学分野において男女共同参画を推進するには」**
……都河明子（元東大男女共同参画室），植田和光（京大院農），裏出令子（京大院農），
越阪部奈緒美（芝浦工大システム理工），川向　誠（島根大生資），
合谷祥一（香川大農），鈴木義人（茨城大農）

講演番号：4LS01-1
講演日時、会場：3 月 30 日 12:30～ B 校舎 01 会場

ＪＡＢＥＥと人材養成

JABEE and human resource development

○江坂 宗春(広島大院生物圏)
○Muneharu Esaka(Hiroshima Univ.)

JABEE（日本技術者教育認定機構 Japan Accreditation Board for Engineering Education）は、技術者教育プログラムの審査・認定を行う非政府団体で、1999年に設立された（JABEEの詳細は、http://www.jabee.org/を参照）。

JABEEは、2005年に、ワシントンアコードへの加盟が認められ、国際的にも認知された技術者教育認定機関になった。2012 年度、国際的整合性や審査方法の改善の観点から、JABEEの認定基準が大幅に改定された（http://www.jabee.org/OpenHomePage/kijun/kaitei2012_110609.pdf）。JABEE修了生は，ワシントンアコード加盟国のプログラム修了生と同じ技術者教育を受けた者として認められるとともに、技術士の第一次試験が免除され、登録を行えば、すぐに技術士補となれる。実務経験（通常４年間）を経た後、第二次試験に合格すれば、正式に技術士になることができる。

現在、169教育機関の 466プログラムがJABEE認定を受け、認定プログラムからの修了生の累計は約18万人になる。認定・審査分野は16分野あるが、農芸化学会が所属する「農学一般関連分野」は、農学系17学会が加盟する農学会技術者教育推進委員会のもとに、「生物工学および生物工学関連分野」とも連携しながら、JABEEの審査、普及、指導等の活動を行っている。農芸化学領域が含まれるJABEE認定プログラムは６プログラムある。しかし、生物工学および生物工学関連分野でも６プログラムが認定されており、広い意味では、１２プログラムが農芸化学系のJABEEプログラムと考えられる。

日本農芸化学会では、JABEE対応委員会を組織し、JABEE対応の活動を行うとともに、これまでに、以下のようなJABEE・教育シンポジウムを全国大会時に開催している。

- 2007年度　「日本農芸化学会とJABEE」
- 2008年度　「農芸化学における魅力ある大学教育とJABEE」
- 2009年度　「農芸化学分野の大学院における技術者、研究者養成教育の改革」
- 2010年度　「農芸化学における教育改革と分野別質保証」
- 2011年度　「JABEEとキャリア教育」（東日本大震災で中止）
- 2012年度　「農芸化学における人材育成」
- 2013年度　「大学・大学院での教育改革と人材養成」

今回は、「農学系人材養成に関する最近の取り組み」と題したシンポジウムを開催し、農学系の人材養成への最近の取り組みを紹介しながら、農学系における人材養成のあり方について議論したい。

JABEE, educational reform, human resource development

講演番号：4LS01-2
講演日時、会場：3 月 30 日 12:40～ B 校舎 01 会場

イノベーションリーダーの育成を目指す大学の役割
Mission of Universities Producing Innovation Leaders
○千葉 一裕(東農工大院農)
○Kazuhiro Chiba(Tokyo Univ. Agric. Technol.)

【イノベーションリーダーとは何か】

「イノベーション」の定義は立場や組織等によって様々であるが，この意味するものを広くとらえれば，「新しい価値を提案し，人々の心を動かし，社会をよりよい方向へ変えていくこと」である．短い表現ではあるが，その内容には非常に大きな意味が込められている．例えば新しい価値を提案することがいかに難しいことであるかは，多くの人が理解するところであろう．また，人を惹きつけること，自分が提案した新たな価値が他人から理解され共感を得ることはさらに難しい．しかし，社会に対して新しい科学技術や社会システムなど未来の価値を提案し，社会がそれを受入れ，その結果社会がよい方向に変わっていくためには，その一つ一つのプロセスがとても重要である．そして自らの洞察力で見出した課題について，熱意と展望をもって実際にイノベーションを牽引する人物こそがイノベーションリーダーであると考えている．

【イノベーションリーダー育成のための具体的な方法とは】

イノベーションリーダーに求められることは，強い自己制御の力，知性，そして説得力である．説得力の基盤は日本語の力，人の気持ちを理解できる豊かな情緒，すなわち人間としての幅の広さそのものである．もちろん学術研究者を目指す博士課程の学生にもイノベーションリーダーとしての力が必要である．例えば優れた学術論文を継続的に発表するということ一つをとっても，専門領域の深い知識や技術，経験を持つだけに止まらない力が必要である．

【イノベーションリーダー育成に向けた大学の役割は】

イノベーションを推進する人材育成が，大学の大きな役割の一つとして位置づけられているが，その実践の場は例えば日常的な研究室活動の中にも沢山存在している．学術論文は単に実験や調査の結果を記述すれば済むものではない．そこには，自分自身の研究課題に対する理念に基づく明快なストーリー性，具体性，信頼性，意外性，そして何と言っても人の心を動かす説得力が必要である．また，研究室の運営一つをとっても，そこで必要になることはイノベーション推進のための基本的な考え方やスキルとよく一致している．

本講演では演者がこれまでに経験した，イノベーションリーダー育成に関わる様々な問題点とその対応策を含め，現在推進している国際的な連携や多彩なネットワーク構築を基軸とした「社会が求めるイノベーションを推進するリーダー像」について議論の場を提供したいと考えている．

innovation, leader, education

講演番号：4LS01-3
講演日時、会場：3 月 30 日 13:00～ B 校舎 01 会場

人材　博士のキャリアパスや農芸化学という実践科学
Carrier Path in Agricultural Chemistry in Japan
○宮田 満(日経 BP 社)
○Mitsuru Miyata(Nikkei Business Publications,Inc)

世の中の人々を幸福にするイノベーションの担い手は、ほとんど例外なく若者である。

わが国は 21 世紀に入り、ポスドク 1 万人計画の呼び声の下、大量のポスドクを養成した。また、それに先んじて、大学院重点化を遂行、修士と博士教育の外形的な強化にも着手した。先進国を高度人材の養成強化によって急迫し、イノベーションによる経済成長を夢見たのだ。

だが、残念ながら一人当たり 6000 万円から 1 億円も投入したと言われるポスドクをわが国は有効に活用することができなかった。ただ、失業者もしくは非常に低賃金で働く研究者層が出現した結果に終わり、人材養成によるイノベーションの進展⇒雇用の増大⇒国税の増収⇒研究費の増大⇒高度人材の増加、、、という好循環が何故生まれなかったのか？その結果、わが国は 90 年代から続いた失われた 20 年によって、先進国で例外的に 20 年ものデフレにあえぐことになったのか？

第一の理由は言うまでもなく、大学の教育内容の劣化である。急速に変化する社会のニーズに対応できず、しかも、専門的な教育手法を習ったことのない素人教官が、前任者の教官のやり方を科学的に批判せず、ただ狭小なアカデミズムの継承と自己の実績のために人材を酷使するというモラルハザードが起こっていた。また、学生やその家族、教官の単純なアカデミズム志向、言葉を換えれば学士農工商というまったく時代遅れのプライドも、高度人材の社会進出の足を引っ張る精神風土を大学に形成していた。こうした複合的要因が、大学と社会の中に壁を作り、小さな平和による時代錯誤を助長してしまったのだ。

第二の原因は、いうまでもなく企業の博士などの高度人材に対する喰わず嫌いと、イノベーターを社内で遇するマネージメントスキル不足である。人口が増大する高度成長時代には、大学の人材に知識や判断力を求めず、命令一下、均質な労働を勤勉に提供する能力を求めていた。しかし、人口が低下する時代になり、同じ事の繰り返しでは自然に市場が縮小することに気付いた企業は、新規事業の核となるイノベーションを重視するように大きく変化した。中でも 2008 年のリーマンショックによる新興国の台頭により、イノベーションを求める企業の声は悲壮感すら帯びていた。

そして、今、注目されるのが、2006 年から大学のミッションに社会貢献が加わった国立大学法人が生み出すイノベーション人材なのである。その現状と課題を皆さんと議論することを期待している。

Carrer Path

講演番号：4LS02-1
講演日時、会場：3 月 30 日 12:30～ B 校舎 08 会場

科学技術分野における女性研究者の能力発揮のために
Promotion and Support for the Careers of Female Researchers in S&T

○都河 明子(東京大男女共同参画室)
○Akiko Tsugawa(Univ. of Tokyo)

少子高齢化による生産人口の減少が進み、科学技術の進展著しいアジア諸国に対し競争力を失いつつある日本の現況を鑑みると、我が国が今までのような科学技術創造立国を維持するための国家戦略の一つとして、性別・年齢・国籍を問わない多様な人材を積極的に登用する努力が求められる。なかでも、知の一翼を担う女性研究者の能力発揮に向けた取り組みが重要であると考えている。

本講演では主に、日本の科学技術分野における女性研究者の現状、次世代の女子中高校生に対する理系進学を奨励する活動・支援、及び東京大学における男女共同参画推進のための取り組みを紹介する。

科学技術分野における女性研究者のキャリア育成のためには、就学前女子児童に対する理科への感性涵養、女子小・中・高校生に対する理系大学・大学院への進学奨励、そして、女性研究者のキャリア継続への支援と道のりは長く、各ステップでのきめ細かな対応が必要である。また、男女ともに働きやすい環境を国や地方が整備すれば少子化問題も好転すると思われる。

戦後の日本の科学技術の発展は目覚ましく、日本を経済大国・科学技術創造立国の地位に押し上げたが、これからの 21 世紀社会では「人間の活動と自然の調和」が最大の課題となる。そのためには科学技術分野の新しい人材育成が重要で、科学的リテラシーと斬新な“知”を持った女性研究者を始めとする多様な人材を活用する必要がある。

promotion of gender equality, nurturing of the careers of female researchers, utilization of deiverse human resources

ランチョンセミナー　プログラム

本大会でのランチョンシンポジウムのチケットは，明治大学生田キャンパス中央校舎1階ホールで当日の朝配布します（28日は8:15，29日と30日は8:30）．チケットを受け取り，開始5分前までに会場にお越しください．空席がある場合は，チケットがなくても入場できます．

3月28日（金）12:30〜13:20

LS28–E1　日東薬品工業株式会社　　E01会場（第二校舎2号館2001）

司会　　漆原 正人（日東薬品工業株式会社 研究開発本部）

「腸内細菌」の物質代謝と美味しい健康生活
－乳酸菌機能の食品，プロバイオティクス，医薬への応用－
小川 順（京都大学大学院農学研究科 教授）

LS28–E2　協和発酵バイオ株式会社　　E02会場（第二校舎2号館2002）

ジペプチドの発酵生産，並びにアラニルグルタミンの機能

三宅 浩一郎（協和発酵バイオ株式会社 開発営業部）
池田 武史（協和発酵バイオ株式会社 ヘルスケア商品開発センター）

LS28–E3　味の素株式会社　　E03会場（第二校舎2号館2003）

司会　　鬼頭 守和（味の素株式会社　研究開発企画部）

私たちの脳は知る，世界に誇る和食（だしとうま味）の価値
－和食のユネスコ無形文化遺産登録記念－
山本 茂（十文字学園女子大学 アジアの栄養・食文化研究所 教授）

LS28–E4　バイオ・ラッド ラボラトリーズ　　E04会場（第二校舎2号館2004）

Stain-Free 電気泳動テクノロジーによるタンパク質解析ワークフローの新潮流

山本 謙治（バイオ・ラッド ラボラトリーズ プロダクトサポート）
中田 宣之（バイオ・ラッド ラボラトリーズ マーケティング）

LS28–E5　株式会社 島津製作所　　E05会場（第二校舎2号館2005）

司会　　渡邉 淳（株式会社 島津製作所 分析計測事業部））

イメージング質量顕微鏡 **iMScope** による高解像度イメージング

緒方 是嗣（株式会社 島津製作所 分析計測事業部）

MALDI-MS による微生物同定の最前線
－さらなる高識別能への展開－
島 圭介（株式会社 島津製作所 分析計測事業部）

LS28–B8　ブルカー・ダルトニクス株式会社　　B08会場（第一校舎1号館138）

司会　　志村 信之（ブルカー・ダルトニクス株式会社）

超高分解能 **MS** を用いたメタボロミクス研究
質量分析を用いた迅速微生物同定とその応用－**MALDI Biotyper**－

森下 宜彦（ブルカー・ダルトニクス株式会社 アプリケーションエンジニア）
松山 由美子（ブルカー・ダルトニクス株式会社 アプリケーションエンジニア）

3月29日(土) 12:30〜13:20

LS29–E1　キッコーマン株式会社　E01会場（第二校舎2号館2001）

座長　小幡 明雄（キッコーマン株式会社 研究開発本部）

高血圧と上手につきあうには
－生活習慣の改善を目指して－　木村 健二郎（聖マリアンナ医科大学 教授）

ペプチド高含有しょうゆの血圧降下作用　内田 理一郎（キッコーマン株式会社 研究開発本部）

LS29–E2　アジレント・テクノロジー株式会社　E02会場（第二校舎2号館2002）

司会　芹野 武（アジレント・テクノロジー株式会社）

メタボロミクス研究をサポートするアジレントGC/MSソリューション
～1000万円台から始められるシステムからGC/QTOFによる構造解析まで～

小笠原 亮（アジレント・テクノロジー株式会社）
中村 貞男（アジレント・テクノロジー株式会社）

LS29–E3　株式会社 明治　E03会場（第二校舎2号館2003）

座長　清水 誠（東京大学 名誉教授）

世界をリードする日本の機能性ヨーグルト研究　齋藤 忠夫（東北大学大学院農学研究科 教授）

LS29–E4　タカラバイオ株式会社　E04会場（第二校舎2号館2004）

次世代シーケンス解析での微量RNAからのライブラリー調製とPCR酵素　大場 利治（タカラバイオ株式会社）

LS29–E5　日清ファルマ株式会社　E05会場（第二校舎2号館2005）

司会　福富 竜太（日清ファルマ株式会社 健康科学研究所 所長代理）

ネギ属含硫アミノ酸摂取でテストステロン（男性ホルモン）増！　西村 弘行（北翔大学 学長・東海大学 名誉教授）

LS29–B1　キリン株式会社　B01会場（第一校舎1号館120）

司会　三浦 裕（キリン株式会社 健康技術研究所）

樹状細胞による感染制御　佐藤 克明（宮崎大学医学部医学科 感染症学講座免疫学分野 教授）

乳酸菌JCM5805株によるウイルス感染防御　金山 雅也（キリン株式会社 健康技術研究所）

3 月 30 日(日) 12:30〜13:20

LS30–E1　サントリー食品インターナショナル株式会社／サントリーウエルネス株式会社

E01 会場（第二校舎 2 号館 2001）

座長　　柴田 浩志（サントリーウエルネス株式会社 健康科学研究所長）

ケルセチン配糖体の体脂肪低減効果に関する研究
中村 淳一（サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社 研究部 主幹研究員）

LS30–E3　コスモ石油株式会社／コスモＡＬＡ株式会社　　E03 会場（第二校舎 2 号館 2003）

司会　　渡辺 圭太郎（コスモＡＬＡ株式会社　医薬・食品事業部）

生命の根源物質 『5 －アミノレブリン酸』（ALA）

ALA の多様性とその製造　　西川 誠司（コスモ石油株式会社）

ALA 含有肥料で広がる農業の可能性　　陣内 秀史（コスモ ALA 株式会社）

ヘルスケア　そして医療へ　　田中 徹（SBI ファーマ株式会社）

日本農芸化学会2014年度大会

日東薬品工業株式会社ランチョンセミナー

「腸内細菌」の物質代謝と美味しい健康生活

―乳酸菌機能の食品、プロバイオティクス、医薬への応用―

2014年3月28日(金) 12:30～13:20

E01会場（明治大学生田キャンパス）

司会：漆原正人（日東薬品工業株式会社 研究開発本部）



講演者：小川　順　先生

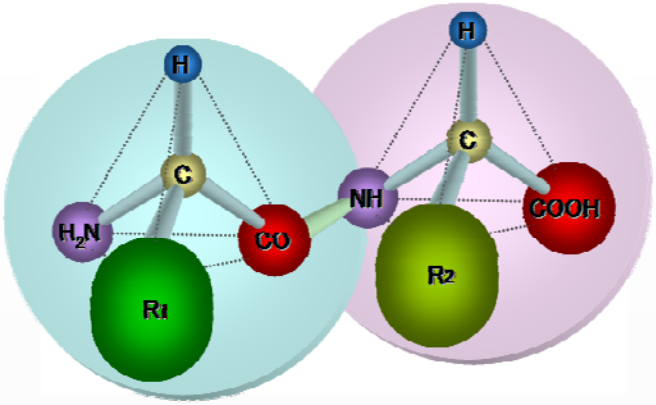
（京都大学大学院農学研究科 教授）

1995 年　京都大学農学研究科博士課程修了
1995 年　同大学農学研究科助手
2006 ～ 2007 年　フランス国立農業研究所客員研究員
2008 年　京都大学微生物科学寄附研究部門特定教授
2009 年～京都大学大学院 農学研究科 応用生命科学専攻
発酵生理及び醸造学研究室教授

食品・医薬品に含まれる成分は、私たちの体内で様々な化合物へと変換を受けたのち吸収され、生理活性を発揮します。この過程には、私たち自身の代謝のみならず、もう一つの臓器とも称される「腸内細菌群」による代謝が少なからず関わっていると考えられています。腸内細菌の数は、ヒトの体細胞数60 兆に対し100 兆を超えるとされ、その種も500種から1000種と言われています。
このことからも、腸内細菌による食品・医薬品成分の代謝を把握し、代謝産物が与える影響を評価することは、健康生活の維持にとって大切なことであると思われます。我々は、このような発想から、腸内細菌の一種である乳酸菌を対象に、食品・医薬品成分の代謝解析、ならびに代謝産物の機能解析に取り組んでいます。本セミナーでは、新たに見いだされた代謝と代謝中間体の生理機能解析に端を発する研究を紹介し、乳酸菌の新たな産業利用への展開を議論してみたいと思います。

NITTO PHARMA
日東薬品工業株式会社

日本農芸化学会2014年度大会
ランチョンセミナー LS28-E2



ジペプチドの発酵生産、並びにアラニルグルタミンの機能

日時：3月28日(金)12:30-13:20
場所：E02会場(第二校舎 2号館 2002)
発表者：協和発酵バイオ株式会社
三宅浩一郎(開発営業部)
池田武史(ヘルスケア商品開発センター)

ジペプチドは2つのアミノ酸がペプチド結合した化合物で様々な用途が期待されているが、経済的な工業製法が確立されていないことから製品開発の大きな妨げとなっていた。弊社はアミノ酸発酵をベースとした微生物による新規なジペプチド直接発酵法を開発した。その製法について概説するとともに、ジペプチドの発酵生産の一例として、アラニルグルタミン(AlaGln)とその用途(輸液、培地、健康食品)について紹介する。

協和発酵バイオ株式会社
〒100-8185 東京都千代田区大手町1-6-1
TEL:03-3282-0974
http://www.kyowahakko-bio.co.jp/
E-mail: health@kyowa-kirin.co.jp

日本農芸化学会2014年度大会
LS28-E3　味の素株式会社　ランチョンセミナー
2014年3月28日（金）12:30-13:20
E03会場（第二校舎2号館2003）



私たちの脳は知る、世界に誇る和食（だしとうま味）の価値
－和食のユネスコ無形文化遺産登録記念－

山本　茂（十文字学園女子大学　アジアの栄養・食文化研究所　教授）

昨年（平成25年）12月、和食がユネスコ無形文化遺産に登録されました。これは、フランス美食術、地中海料理、メキシコ、トルコの伝統料理の登録に続くものです。日本には多様で豊富な旬の食材・食品、栄養バランスの取れた食事構成、食事と年中行事・人生儀礼との密接な結びつきなどといった特徴を持つ世界に誇れる食文化が存在しています。日本の食文化は『だし・うま味』を共通の要素とし高度に発展してきた特徴を持つ食文化と考えます。

うま味は、昆布や鰹節の出汁（だし：グルタミン酸やイノシン酸）であることはよく知られています。トマトは世界中で調味料として使われているグルタミン酸の多い食品です。ではどうして私たちは、それらを美味しいと感じるのでしょう。実は、これらのうま味成分は食事の美味しさに貢献しているだけでなく、私たちが健康な食生活を営んでいくために必要な多くの生理機能を持っていることが最近分かってきました。おそらく私たちの脳は、うま味を含んだ食事は、私たちの“生命（いのち）”にとって大切な意味のあることを知っていたのでしょう。

本セミナーでは、うま味の発見の歴史から、その生理機能そして病院の栄養管理現場での新しいうま味の活用法について、最近の研究事例を紹介したいと思います。

おいしさ、そして、いのちへ。
Eat Well, Live Well.
AJINOMOTO®

日本農芸化学会2014年度大会
ランチョンセミナー　LS28-E4

バイオ・ラッド ラボラトリーズ

日時：3月28日（金）12:30～13:20

場所：E04会場（第二校舎2号館3階）

Stain-Free電気泳動テクノロジーによる タンパク質解析ワークフローの新潮流



山本 謙治
バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社　プロダクトサポート



中田 宣之
バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社　マーケティング

Stain-Free電気泳動テクノロジーは、電気泳動後、染色操作をすることなくタンパク質を可視化でき、また様々なタンパク質解析ワークフローに活用できる新しい技術です。

本セミナーでは、Stain-Freeテクノロジーの基本原理、と既存染色法との検出比較のご紹介、また、この技術を用いたタンパク質解析ワークフローへの応用として、クロマトグラフィー分画チェックやウェスタンブロッティングのデータ補正をご紹介いたします。Stain-Freeテクノロジーはプレキャストゲルの他、新しく発売された自作ゲル用フォーマットの発売も開始し、タンパク質電気泳動・ウェスタンブロッティングを行うすべての研究者にご利用いただけます。



BIO-RAD

バイオ・ラッド　ラボラトリーズ株式会社
www.bio-rad.com

SHIMADZU
Excellence in Science

日本農芸化学会2014年度大会

ランチョンセミナーのご案内

LS28-E5

日時　2014年3月28日（金）12:30～13:20

会場　明治大学 生田キャンパス 第二校舎2号館4階 E05会場

演者　緒方是嗣　（株式会社 島津製作所　分析計測事業部）
　　島　圭介　（株式会社 島津製作所　分析計測事業部）

生体切片上の分布情報を可視化する新しいイメージング質量分析の現状を、最新テクノロジーを組み合わせたiMScopeによる高解像度イメージングにより紹介します。
また菌種同定目的で急速に普及しつつあるMALDIによる微生物同定のさらなる高識別能を目指した最新技術を紹介します。

司会　渡邉　淳　（株式会社 島津製作所　分析計測事業部）

お問合せ
（株）島津製作所　分析計測事業部　グローバルマーケティング部
〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原1　TEL：075-823-1352

Bruker Daltonics

ブルカー・ダルトニクス㈱ ランチョンセミナー　LS28-B8

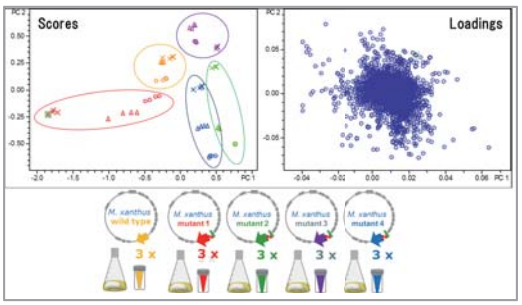
3 月 28 日（金）12：30－13：20　第一校舎 1 号館 3 階　B08 会場



solariX XR

●超高分解能 MS を用いたメタボロミクス研究

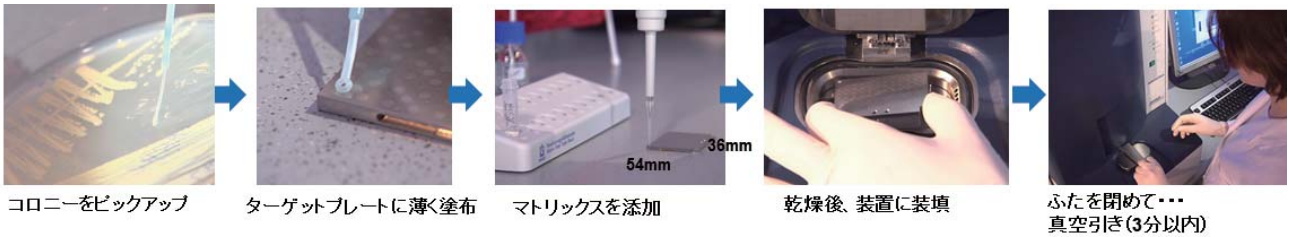
新型 FT-ICR solarix XR では最大 1000 万という超高分解能を実現しました。同位体ピークを全て分離することにより各元素の含有率を解析することが可能になりメタボロミクス研究の大きな課題であった未知成分の同定能力が飛躍的に向上します。



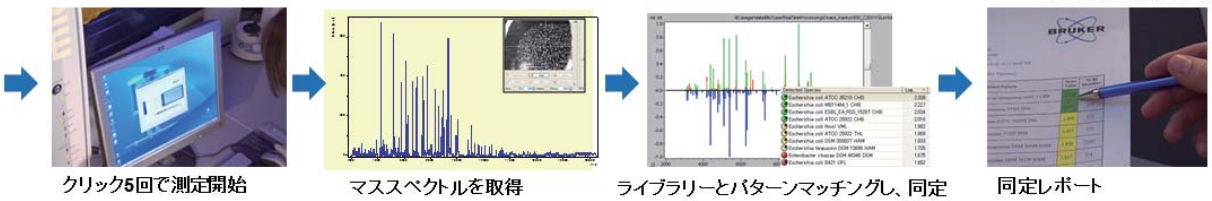
主成分分析による
微生物群の差異の検出

●質量分析を用いた迅速微生物同定法とその応用 - MALDI Biotyper -

● 迅速簡単ワークフロー （スメア法）



コロニーをピックアップ　ターゲットプレートに薄く塗布　マトリックスを添加　乾燥後、装置に装填　ふたを閉めて･･･ 真空引き(3分以内)



クリック5回で測定開始　マススペクトルを取得　ライブラリーとパターンマッチングし、同定　同定レポート

MALDI Biotyper は、 微生物に直接レーザーを照射し得られる、 主にリボゾームタンパク質のプロファイルパターンをライブラリと照合することで、 属・種を決定します。 スメア法では微生物コロニーを直接ターゲットプレートに塗布してからマトリクスを添加するだけで、 10 分以内に結果が得られます。

Mass Spectrometry

Innovation with Integrity

詳しくは www.bruker.jp をご訪問ください。

ブルカー・ダルトニクス株式会社
●営業本部・テクニカルサポートセンター
〒221-0022横浜市神奈川区守屋町3-9
TEL: 045-440-0471　FAX: 045-453-1827
●大阪営業所
〒532-0004 大阪市淀川区西宮原1-8-29 テラサキ第2ビル2F
TEL: 06-6396-8211　FAX: 06-6396-1118

LS29-E1　日本農芸化学会2014年度大会
キッコーマン株式会社　ランチョンセミナー

血圧と食生活

3月29日（土）　12:30-13:20
明治大学生田キャンパス第二校舎2号館2階　E01会場

演題1

「高血圧と上手につきあうには」
ー生活習慣の改善を目指してー

聖マリアンナ医科大学教授　木村　健二郎　先生

本邦における高血圧患者は4300万人で、年間約10万人が高血圧が原因の疾患で死亡していると推定されています。高血圧は自覚症状がなく徐々に血管を傷つけるため、命を脅かす病気が突然発症するのです。本セミナーでは高血圧と上手につきあうための生活習慣の改善について分かりやすく解説します。

演題2

「ペプチド高含有しょうゆの血圧降下作用」

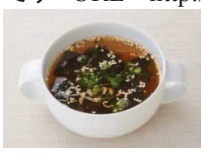
キッコーマン（株）研究開発本部　内田　理一郎

血圧上昇を抑制する食品成分として、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害ペプチドが知られており、しょうゆ中にもACE阻害ペプチドが存在します。我々は、醸造条件を工夫することにより通常のしょうゆよりもACE阻害ペプチドの含有量を増加させたしょうゆを開発することに成功しました。本セミナーではペプチド高含有しょうゆの研究と血圧が高めの方が摂取したときの影響について紹介します。

kikkoman
おいしい記憶をつくりたい。

無理なくおいしく続けられる節塩レシピ公開中です　URL　http://www.kikkoman.co.jp/






日本農芸化学会 2014 年度大会

アジレント・テクノロジー ランチョンセミナー

ランチョンセミナー LS29-E2

日時： 2014 年 3 月 29 日（土） 12：30 ～ 13：20

会場： 明治大学生田キャンパス
第二校舎 2 号館 2 階 E02 会場

メタボロミクス研究をサポートする アジレント GC/MS ソリューション

～1000 万円台から始められるシステムから GC/QTOF による構造解析まで～

アジレント･テクノロジー株式会社 小笠原 亮、 中村 貞男

代謝物の変動を網羅的・統合的に理解することが求められるメタボロミクス研究では、 サンプルに含まれる代謝物の探索（定性分析）と検証（定量分析）で高い分析精度が求められます。 GC/MS は簡便性とデータの安定性などからメタボロミクス研究の手法として広く用いられています。
本ランチョンセミナーでは、アジレントの GC/MS の幅広いラインアップの中から、 メタボロミクス研究でお役に立つ GC/MS 分析のソリューションをご紹介いたします。

- GC/MS の使い分け：シングル四重極型、 飛行時間型、トリプル四重極型
- 揮発性成分の高感度分析
- 誘導体化などのサンプル前処理の自動化
- Fiehn メタボロミクス MS ライブラリ
- GC/QTOF による代謝物同定

明日をもっとおいしく

meiji

LS29-E3　日本農芸化学会2014年度大会

株式会社 明治　ランチョンセミナー

世界をリードする日本の機能性ヨーグルト研究



2014年3月29日（土）　12:30-13:20

明治大学生田キャンパス　第二校舎2号館3階　E03会場

座長

清水 誠先生

（東京大学名誉教授）



講演者

齋藤 忠夫先生

（東北大学大学院農学研究科　教授）



東北大学大学院農学研究科博士課程修了、農学博士

1982年から東北福祉大学助手、講師。1989年から東北大学大学院農学研究科助教授、准教授を経て、2001年より教授、現在に至る。

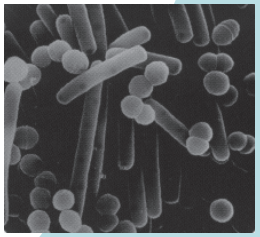
専門分野は、畜産物利用学、応用微生物学、食品機能学、糖鎖生物工学。

現在、日本酪農科学会会長（2011年～）およびアジア乳酸菌学会連合（AFSLAB）会長（2012年～）、総長特別補佐（企画担当）などを務める。

これまで、日本酪農科学会賞（1998年）、日本畜産学会賞（2002年）、日本学術振興会第1回科学研究費優秀審査員賞（2008年）、国際酪農連盟日本委員会（JIDF）第3回光岡賞を受賞。

ヒトの腸内細菌は、善玉菌、悪玉菌、日和見菌に三分されますが、これらの菌の存在が、その後の腸管および全身免疫系の確立に重要と考えられます。腸内で有害な酵素やガスや代謝物を作らない善玉菌は、最近では「プロバイオティクス」と呼ばれ、これには乳酸菌やビフィズス菌が該当します。

日本のヨーグルトの歴史は、世界の数千年の歴史と比較すると後発ですが、各種生理活性試験で選抜された優れた菌による機能性ヨーグルト作りは、非常に高いレベルにあります。ヨーグルトの消費量は、世界一のトルコと比較すると約5分の1と低いですが、機能性ヨーグルト研究は世界を牽引していると言っても過言ではありません。1996年からは、特定保健用食品（トクホ）としてのヨーグルトも新登場しています。日本では患者数の多いピロリ菌感染症、アレルギー（花粉症やアトピー皮膚炎）、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎）などに対する機能性ヨーグルト、さらにインフルエンザ罹患率を下げたり、内臓型脂肪を減少させたり、美肌効果を示したりするなどの各種機能性ヨーグルトの内容紹介と、その背景にある学問的エビデンスについてお話したいと思います。



日本農芸化学会 2014年度大会
ランチョンセミナー LS29-E4

次世代シーケンス解析での微量RNAからのライブラリー調製とPCR酵素

日時：　3月29日（土）　12:30 - 13:20

会場：　E04会場（第二校舎2号館3階）

演者：　大場　利治（タカラバイオ株式会社）

タカラバイオでは、次世代シーケンサー（NGS）ライブラリーの調製、増幅、定量など、NGSアプリケーションに適した製品の開発を行っています。
開発した技術は、微量RNAからDNAストランド特異性を維持したcDNA調製が可能なSMARTer® Stranded RNA-Seq Kit をはじめ、NGS関連製品群に活かされています。

本セミナーでは、RNA-Seqにおいて、微量RNAからのライブラリー調製が可能なSMARTer®シリーズ等のキットの選択と使用方法を中心に説明いたします。
また、NGSライブラリーの調製に用いられるPCR酵素の特徴を、具体的なデータを示して説明いたします。

タカラバイオウェブサイト　http://www.takara-bio.co.jp/

TaKaRa Clontech

東京支店　TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282
関西支店　TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995

日清ファルマ

LS29-E5　日本農芸化学会2014年度大会
日清ファルマ株式会社 ランチョンセミナー

ネギ属含硫アミノ酸摂取でテストステロン（男性ホルモン）増！



［講演者］西村 弘行 先生
北翔大学 学長・東海大学 名誉教授

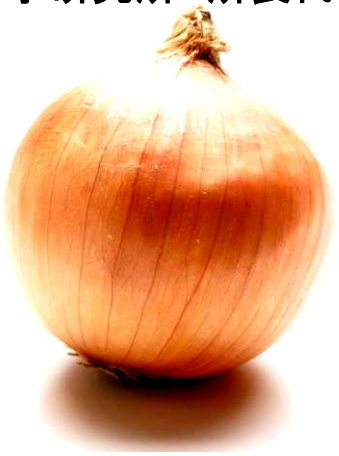
近年、ストレス社会の中で、中・高年男性の男性ホルモンが減少し、「いらいら」「意欲の減退」「性的機能低下」さらには「メタボリック症候群系の疾病」を発症させている。これは、LOH症候群（加齢男性性腺機能低下症候群）と呼ばれ、加齢に伴う臨床的・生化学的症候群で、血中テストステロン低下に特徴づけられている。LOH症候群の疾病および潜在患者数を合わせた人数が約600万人と推定されている。

食材の中で、タマネギ、ニンニク、ニラ、ギョウジャニンニクなどのネギ属野菜は、古くから強精作用が知られていた。しかし、男性ホルモンとネギ属食品との関係について、科学的研究が行われていなかった。そこで、老化促進モデルマウス（SAM）を用いた実験で、タマネギエキスを摂取させた場合に、血清中のテストステロン値が上昇することを明らかにし、その誘導物質を解明した。さらに、有効な加工技術を確立し、特許化した（「テストステロン増加剤、およびネギ属植物処理物の製造方法」特許第4172488号）。

タマネギを用いて、テストステロン誘導物質を種々検討した結果、含硫アミノ酸*S*-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxideであることが判明した。そこで、男性ホルモン誘導機能性を高める有効な調理・加工技術を検討した。一般に、ネギ属野菜は、カット調理時に内在性の酵素（C-S lyase）の作用で、ネギ属含硫アミノ酸が減少する。そこで、含硫アミノ酸を最も高い濃度で保持するには、最初に丸ごと加熱し、予め酵素を失活させてから調理・加工すればよいことを明らかにした。

［司会］福富 竜太（日清ファルマ株式会社　健康科学研究所　所長代理）

［日時］2014年3月29日（土）12:30～13:20
［会場］第二校舎 2号館 4階 E05会場



日本農芸化学会2014年度大会

キリン株式会社ランチョンセミナーLS29-B1

ウイルス感染防御と乳酸菌

日時：3月29日(土)12：30～13：20

会場：第一校舎1号館2階 B01会場



樹状細胞による感染防御

演者：佐藤　克明　先生

宮崎大学医学部医学科感染症学講座免疫学分野　教授

樹状細胞は自然免疫と獲得免疫を繋ぐ最も強力な抗原提示細胞として免疫系を活性化します。特にウイルス感染では樹状細胞の一種であるプラズマサイトイド樹状細胞(pDC)が炎症反応の惹起に関与するだけでなく、I型インターフェロン(IFN)産生と細胞傷害性T細胞生成を介した宿主からのウイルス排除に必須であることが近年判明しています。本講演ではpDCを中心に感染防御について述べていただきます。

乳酸菌JCM5805株によるウイルス感染防御

演者：金山　雅也

キリン（株）健康技術研究所

我々の研究では乳酸菌JCM5805株がpDCを刺激し、IFNα産生能を向上させることを明らかとしました。これまでの研究で判明した乳酸菌JCM5805株の機能性・効果について紹介させていただきます。

座長：三浦　裕　キリン（株）健康技術研究所

「飲みもの」を進化させることで、
「みんなの日常」をあたらしくしていく。
KIRIN

お問い合わせ
〒236-0004
横浜市金沢区福浦1-13-5
TEL:045-330-9005　Fax:045-788-4042

日本農芸化学会2014年度大会

ランチョンセミナー LS30-E1

サントリー食品インターナショナル株式会社
サントリーウエルネス株式会社　共催

【日時】 3月30日(日) 12:30－13:20

【会場】 第二校舎2号館2階　E01会場

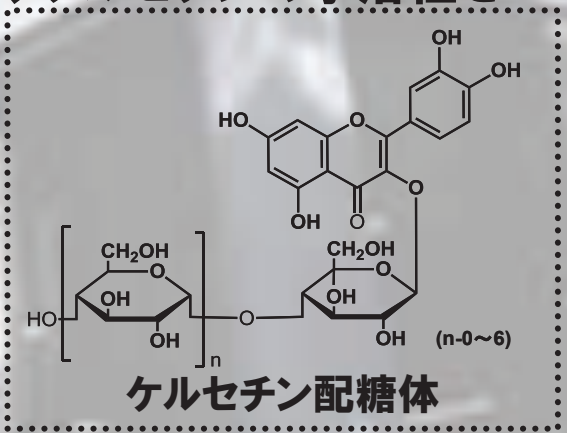
【演　題】

「ケルセチン配糖体の体脂肪低減効果に関する研究」

中村　淳一　（サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社）

ケルセチンは野菜や果物に豊富に含まれるポリフェノール成分であり、抗酸化作用、抗炎症作用、降圧作用など多くの生理作用が研究・報告されています。一方、抗肥満に関する研究は脂肪分解促進作用やコレステロール低下作用などがあるものの、体脂肪への効果を検討した報告はありませんでした。そこで我々は、ケルセチンの水溶性を向上させたケルセチン配糖体を配合した飲料を用いて検討を行った結果、体脂肪低減効果を確認することが出来ました。

本セミナーでは、ケルセチン配糖体による体脂肪低減効果について、作用メカニズムを含めてご紹介いたします。



ケルセチン配糖体

【座　長】

柴田　浩志　（サントリーウエルネス株式会社）

日本農芸化学会2014年度大会
ランチョンセミナー：LS30-E3

生命の根源物質『5－アミノレブリン酸』（ALA）

ヘム・クロロフィルの前駆体、ALAの用途が、肥料、飼料、化粧品、サプリ、医薬品へと様々な分野に広がっています。
ALAの素晴らしい効果・利用方法をご紹介！！

日時：2014年3月30日（日）12:30～13:20
場所：第二校舎2号館3階
会場：E03会場

演者1　西川　誠司（コスモ石油株式会社）
【ALAの多様性とその製造】

演者2　陣内　秀史（コスモALA株式会社）
【ALA含有肥料で広がる農業の可能性】

演者3　田中　徹　（SBIファーマ株式会社）
【ヘルスケア　そして医療へ】

司会　渡辺　圭太郎（コスモALA株式会社）

ランチョンセミナーへの参加には整理券（無料）が必要です
当日の8：30より　但し整理券がなくなり次第終了となります（定員：300名）

コスモ石油株式会社　ALA事業部　　TEL　03-3798-3215
http://www.cosmo-oil.co.jp/ala/index.html
コスモALA株式会社　　TEL　03-3798-1225
http://www.cosmo-ala.com/

コスモ石油　コスモALA

本書の内容の一部または全部を無断で複写複製（コピー）及び転載することは、法律で認められた場合を除き、権利の侵害となりますので、あらかじめ本会あて許諾を求めてください。
Copyright © 2014 by Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

日 本 農 芸 化 学 会　2014 年 度 大 会 講 演 要 旨 集　（オンライン）
Proceedings (online) of the Annual Meeting 2014 Tokyo of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry
2014 年 3 月 5 日公開　　Published online 5 March 2014　　ISSN 2186-7976

発行者　　公益社団法人日本農芸化学会　　JSBBA　　http://www.jsbba.or.jp/
PUBLISHER　113-0032 東京都文京区弥生 2-4-16 学会センタービル 2 階　　Phone 03-3811-8789

データ作成者 株式会社ダイナコム　　DYNACOM　　http://www.dynacom.co.jp/
ASSISTS　　261-7125 千葉県千葉市美浜区中瀬 2-6-1WBG マリブイースト 25 階　　Phone 043-213-8131
小宮山印刷工業株式会社　　COMOIYAMA PRINTING　　http://www.kopas.co.jp/
162-0808 東京都新宿区天神町 78　　Phone 03-3368-3023